

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

HİYALURONİDAZ ENZİM İNHİBİTÖRÜ HETEROSİKLİK BİLEŞİKLER ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Ecz. Yağmur APÇİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Öztekin ALGÜL

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE MB (YA) 2006-3 YL numaralı ve TÜBİTAK(SBAG-JULICH-4 104S453) numaralı proje ile desteklenmektedir.

Tez No:.....

MERSİN-2008

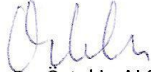
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Hyaluronidaz Enzim İnhibitörü Heterosiklik Bileşikler Üzerine Çalışmalar” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 17/06/2008



Prof. Dr. Şahan SAYGI
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

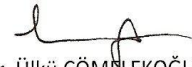


Yrd. Doç. Dr. Öztekin ALGÜL
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Semra UTKU
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 27/06/2008 tarih ve 200 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

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

Yüksek lisans tez çalışmam sırasında her zaman, her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Semra UTKU'ya teşekkür ederim.

Her zaman bilgi ve deneyimleriyle yardımcı olan Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyelerine ve çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen araştırma görevlisi ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma,

Aktivite çalışmalarını 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 hiç bir zaman eksik etmeyen biricik anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Teşekkürler	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Benzimidazol Halkasının Genel Özellikleri	3
2.2. Benzimidazollerin Genel Sentez Yöntemleri	8
2.2.1. 2-Alkilsüstitüe Benzimidazollerin Genel Sentez Yöntemleri	8
2.2.2. 2-Arilsüstitüe Benzimidazollerin Genel Sentez Yöntemleri	15
2.3. Hiyaluronidaz Enziminin Doğal Ve Sentetik İnhibitör Etkili Bileşikler Üzerinde Yapılan Çalışmalar	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1 Kimyasal Çalışmalar	36
3.1.1. Materyal	36
3.1.2. Yöntem	36
3.1.2.1. 2-Alkilsüstitüe Benzimidazollerin Genel Sentez Yöntemi	36
3.1.2.1.1 Phillips Yöntemi Uygulanarak Elde Edilen 2-Süstitüe Benzimidazollerin Genel Sentez Yöntemi	36
3.1.2.2 2-Arilsüstitüe Benzimidazollerin Genel Sentez Yöntemi	37
3.1.2.2.1 Polifosforik asit kullanılarak elde edilen 2-Arilsüstitüe Benzimidazollerin Genel Sentez Yöntemi	37
3.2. Analitik Çalışmalar	37
3.2.1 Erime Noktası Tayini	37
3.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi ve Kolon Kromatografisi ile Yapılan Kontroller	38
3.2.2.1. Materyal	38

3.2.3. Spektroskopik Kontroller	38
3.2.3.1. IR Spektrumları	38
3.2.3.2. ¹ H NMR Spektrumları	38
3.3. Mikrobiyolojik Çalışmaları	39
3.3.1. Metod	39
3.3.1.1. Morgan-Elson Testi	39
3.3.1.2. Stain-all Testi	40
4. BULGULAR	41
4.1. Kimyasal Bulgular	41
4.1.1. Benzimidazol	41
4.1.2. 2-Metilbenzimidazol	42
4.1.3. 2-Etilbenzimidazol	43
4.1.4. 2-Hidroksimetilbenzimidazol	44
4.1.5. 2-Merkaptometilbenzimidazol	45
4.1.6. 2-Aminometilbenzimidazol	46
4.1.7. 2-Fenilbenzimidazol	47
4.1.8. 2-(3-Aminofenil)benzimidazol	48
4.1.9. 2-(4-Fluorofenil)benzimidazol	49
4.1.10. 2-(4-Metoksifenil)benzimidazol	50
4.1.11. 5(6)-Metil-2-hidroksimetilbenzimidazol	51
4.1.12. 5(6)-Kloro-2-hidroksimetilbenzimidazol	52
4.2. Biyolojik Bulgular	53
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	57
7. KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	71

ŒEKİLLER DİZİNİ

Reaksiyon Denklem 1-5 : Benzimidazollerin kimyasal özellikleri

Reaksiyon Denklem 6-37 : Benzimidazollerin genel sentez yöntemleri

Tablo 1: Hiyaluronidaz enzimin bazı doğal ve sentetik inhibitörleri

Table 2: Sentezlenen Bileşiklerin Hiyaluronidaz İnhibitör Etkileri

Tablo 3: Sentezlenen Bileşiklerin Formülleri

Şema 1: Hiyaluronidaz enzim inhibitörü etkileri belirlenen N-süstitüe indol-2- ve indol-3-karboksamit türevleri

Şema 2: Sentezlenen Bileşiklerin Sentez Şeması

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Hyaluronik asit	(HA)
Dimetil sülfoksit	(DMSO)
Polifosforik asit	(PPA)
Polifosforik asit etil esteri	(PPE)
Dimetil formamit	(DMF)
Transforme büyüme faktörü	(TGF- β)
Tümör nekroz edici faktör	(TNF)
Bovine aortik endotelyal hücre	(BAEC)
Cis-hinokiresinol	(CHR)
Bovine serum albumin	(BSA)
Dimetilamino benzaldehit	(DMAB)
Bütillenmiş hidroksi toluen	(BHT)

ÖZET

Hyaluronidaz Enzim İnhibitörü Heterosiklik Bileşikler Üzerinde Çalışmalar

Tümör hücrelerinde endotel tabakası çok hızlı değişmektedir. Hiyaluronik asit endotel hücrelerinin yapısında yer aldığı ve bu hücrelerde önemli rolünün olduğu bilinmektedir. Hiyaluronik asitin vücutta sentezini kontrolü hyaluronidaz enzimi tarafından yapılmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda, tümör metastazının sadece hyaluronidaz bulunan hücrelerde meydana geldiği ancak hyaluronidaz bulunmayan hücrelerinde ise gerçekleşemediğinin tespit edilmesi, bu enzimin inhibisyonunun yeni bir kanser tedavi yaklaşımı olabileceği fikrini güçlendirmektedir.

Tümör metastazı üzerinde yapılan çalışmalarında araştırmacıların dikkatini çeken heterosiklik halkalardan biri de benzimidazol halkasıdır. Benzimidazol halkasının yaşam için gerekli olan bazı biyolojik moleküllerin yapısında yer almaktadır.

Henüz günümüzde antimetastazik etkili yeni bir benzimidazol türevi bileşik tedaviye girmemişse de son yıllarda benzimidazolün antitümör aktiviteleri üzerine birçok araştırma yapılmaktadır.

Bu çalışmada benzimidazol halkasının 2 numaralı konumunda alkil veya aromatik gruplar taşıyan 12 adet benzimidazol türevi bileşik hyaluronidaz enzim inhibitör etkileri karşılaştırılmak amacıyla sentezlenmiştir. Sentezlenen benzimidazol türevi bileşikler ve standart madde olarak kullanılan askorbik asit 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 2-5, 8, 11,12 pH 7'de %25-40 arasında olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada sentezlenen 2-(3-aminofenil)benzimidazol (Bileşik No: 8) bileşiğinin en yüksek antihiyaluronidaz etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bileşik 1,9 ve 10 hiçbir aktivite göstermemektedirler. Ancak antihiyaluronidaz aktiviteye sahip bileşiklerin in vitro antihiyaluronidaz etkilerinin varlığı daha ileri çalışmalar ile desteklenmesi ve kanıtlanması gerekmektedir.

ABSTRACT

Investigations on Hyaluronidase Enzyme Inhibitor Heterocyclic Compounds

The endothelium layer in tumor cells changes very rapidly. It is well known fact that hyaluronic acid exists and plays an important role in the endothelium cells. Control of the synthesis of hyaluronic acid in the organism is performed by hyaluronidase enzyme. Furthermore, a strong assumption can be made that the inhibition of this enzyme may be a new approach for cancer treatment as it was determined in the related scientific 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 benzimidazole ring. This ring exists in the structure of some essential biological molecules.

Although a new benzimidazole 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 benzimidazoles.

In this study, twelve benzimidazole derived compounds which have alkyl or aromatic groups at the second position of the benzimidazole ring were synthesized in order to compare their hyaluronidase enzyme inhibitory effects. The anti-hyaluronidase effects of the synthesized benzimidazole 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.

Upon investigating the per cent inhibition values for the synthesized compounds at a concentration of 100 mM, those values for the compounds 2-5, 8, 11 and 12 were found to be in the range of % 25-40 at pH 7.

In this study, it was determined that the newly synthesized compound of 2-(3-aminophenyl)benzimidazole) (Compound # 8) exhibited the highest anti-hyaluronidase activity. No such activity was found with the compounds 1, 9 and 10. However, it can be suggested that in vitro anti-hyaluronidase effect of the compounds should be investigated and proved by further studies.

1. GİRİŞ

Tümör metastazı tam olarak aydınlatılmamış kompleks bir olaydır. Tümör hücrelerinin büyüüp gelişmesi, temelde kan desteği, oksijen ve tümörün beslenmesine bağlıdır. Tüm bunların sağlanabilmesi ise yeni damarların oluşması ile mümkündür. Ancak bu şekilde tümör diğer doku ve organlara yayılabilmektedir. Ekstraselüler matriks uzun zincirli polimerlerden mukopolisakaritler, glikosakaritler ve proteoglikanlardan oluşmaktadır. Dokularda bulunan glikozaminoglikanlardan en önemlileri; hiyaluronik asit (HA), kondroitin ve kondroitin sülfattır. Bunlardan özellikle HA türevlerinin endotel hücrelerinin yapısında yer aldığı ve anahtar rol oynadığı çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (1,2). HA'nın vücutta sentezini kontrol eden hiyaluronidaz enzimleridir (3). Bu enzimler üzerinde yapılan çalışmalar 1928 yıllarına kadar dayanmaktadır (4). Ancak matriks metalloproteinazları üzerinde çok sayıda çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, proteoglikanların yapısını bozacak enzimler üzerinde oldukça az çalışma yapıldığı literatür çalışmalarında görülmektedir (1,2). Ayrıca yapılan çalışmalarda, metastazın sadece hiyaluronidaz bulunan hücrelerde meydana geldiği ancak hiyaluronidaz bulunmayan tümör hücrelerinde ise gerçekleşemediğinin tespit edilmesi, bu enzimin inhibisyonunun yeni bir kanser tedavi yaklaşımı olabileceği fikrini güçlendirmektedir (5).

Tümör metastazının tedavisinde yararlanmak üzere araştırmacıların dikkatini çeken heterosiklik halkalardan biri de benzimidazol halkasıdır. Benzimidazol halkasının yaşam için gerekli olan bazı biyolojik moleküllerin yapısında yer almaktadır. Bu halka sistemi purin çekirdeğini taşıyan adenin ve guanin izosteri olup, purin antimetaboliti olabilir. Bu nedenle, canlı sistemlerde benzimidazol halkasının biyopolimerlerle kolayca etkileşim gösterebileceği düşünülmektedir.

Vitamin B₁₂ (siyanokobalamin)'in yapısında doğal olarak da yer alan benzimidazol çekirdeği, günümüzde bazı farklı ilaç gruplarının etken maddesi olarak karşımıza çıkmaktadır.

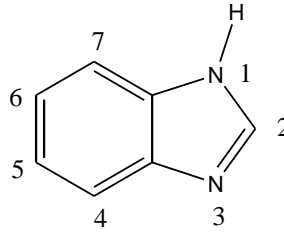
Henüz günümüzde antimetastazik etkili yeni bir benzimidazol türevi bileşik tedaviye girmemişse de son yıllarda benzimidazol türevlerinin antitümör aktiviteleri üzerine birçok araştırma yapılmaktadır.

Bu çalışmada, hiyaluronidaz enzim inhibisyon aktivitesi olduğu literatürde kayıtlı olan, apigenin, biryoantratiyofen, 1,8-dihidroantrakinon, SU5416, *cis*-hinokiresol gibi moleküllerinin kimyasal yapılarından esinlenilerek bir seri benzimidazol türevlerinin sentezlenmesi ve hiyaluronidaz enzim inhibisyonu etkilerinin test edilmesi amaçlanmıştır (6,7).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Benzimidazol Halkasının Genel Özellikleri

Benzimidazol halkası, benzen ve imidazol halkalarının kaynaşmasından oluşmuş bir halka sistemidir.

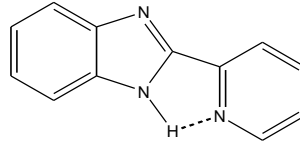


Formül 1

Yukarıdaki formülde de görüldüğü üzere, benzimidazol halka sistemi iki farklı yapıda azot atomuna sahiptir. Bu halka sisteminde numaralandırmaya üzerinde hidrojen atomu taşıyan ve “imino azotu” veya “pirol azotu” olarak adlandırılan azot atomuna bir numara verilerek başlanır (Formül 1). İmino azotunun taşıdığı hidrojen atomu ise, “imino hidrojeni” olarak adlandırılır. Numaralandırmaya tersiyer yapıdaki “piridin azotu” ya da “tersiyer azot” olarak tanımlanan azot atomuna 3 numara verilerek devam edilmektedir (8).

Benzimidazol türevi bileşikler genellikle yüksek erime ve kaynama noktasına sahip katı bileşiklerdir. Örneğin, benzimidazol molekülü 170°C’de erir. Bu bileşikler polar çözücülerde oldukça iyi, polar olmayan çözücülerde ise az çözünürler ve polar çözücülerde serbest imino hidrojeni asosiyel halde bulunur. İmino hidrojeninin sübstitüsyonu kaynama ve erime noktalarını önemli ölçüde düşürür (8).

Benzimidazol halka sisteminin 2. konumuna bazı sübstitüentler (hidrojen, metil, 2-piridil, 4-piridil, 2-kinolin ve 4-kinolin vb.) getirilip pKa değerleri incelendiğinde, 2-piridil türevinin en yüksek pKa değerine sahip olduğu ve bunun nedeninin piridin azotu ile benzimidazolün imino hidrojeninin, hidrojen bağı yapması olduğu ileri sürülmüştür (Formül 2) (9).



Formül 2

¹H-NMR spektroskopisi ile 2. konumunda, heteroatom üzerindeki hidrojen ile intramoleküler hidrojen bağı yapabilen bir sübstitüentin bulunması halinde, proton değişme hızının yavaşladığı Elquero ve ark. (10) tarafından kanıtlanmıştır. Aynı çalışmada, ortama konsantre H₂SO₄ ilavesi ile benzimidazolium iyonu oluşturularak da bu sürecin büyük ölçüde yavaşlatılabildiği gösterilmiştir. H-2 protonu azot atomları üzerindeki her bir hidrojen ile etkileşerek triplet vermeside bu görüşün kanıtı olarak sunulmuştur ($J_{1,2}=J_{2,3}=2.5$ Hz).

Benzimidazoller, bazik özelliği asit özelliğinden daha baskın amfoterik karaktere sahip bileşikler olup, metallere tuz oluştururlar. Bazik özelliklerini, üzerindeki ortaklanmamış elektron çiftini, reaksiyona girdikleri atom veya gruba verebilme özelliğinde olan tersiyer azot atomundan kaynaklanmaktadır (11). Benzimidazoller, asitlerle tuz oluşturma kabiliyetine sahip bazik bileşiklerdir.

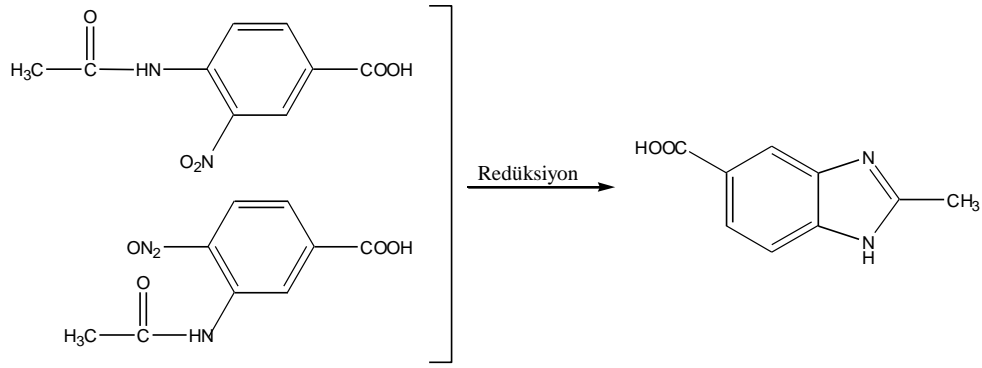
Rogers ve Clayton (12) yaptıkları bir çalışmada, benzimidazol halkasının asitlerle protonlandığında, floresans dalga boylarında kaymaların olduğunu göstermişlerdir.

Benzimidazol (pKa 5.5), imidazol'den (pKa 7.0) daha zayıf bir bazdır. Bu farklılık imidazol ve benzen halkaları arasındaki konjugasyondan kaynaklanmaktadır. Konjugasyondan dolayı rezonans nedeniyle halka dayanıklılığı artmakta ve böylece piridin azotunun bazik karakteri azalmaktadır. Benzimidazoller, asitler ve bazlara karşı oldukça dayanıklıdırlar ve oksitleyici bileşiklerden kolay etkilenmezler. Metilbenzimidazollerin permanganat ile oksidasyonu, benzimidazolkarboksilik asitleri verir. Ancak permanganat ile yapılan kuvvetli oksidasyon, benzimidazolün 4,5-imidazoldikarboksilik aside dönmesine neden olur (12).

Benzimidazoller asit özelliklerini ise, taşıdıkları imino hidrojeni ortama proton halinde vererek gösterir ve elektron çekici gruplar ile sübstitüe edilirse asit özellikleri artar (11). Kaynar sudaki benzimidazol çözeltisine AgNO₃ ilavesi ile suda az çözünen gümüş tuzu oluşur. Bu tuz seyreltik mineral asitlerde ve asetik asitte çözünür.

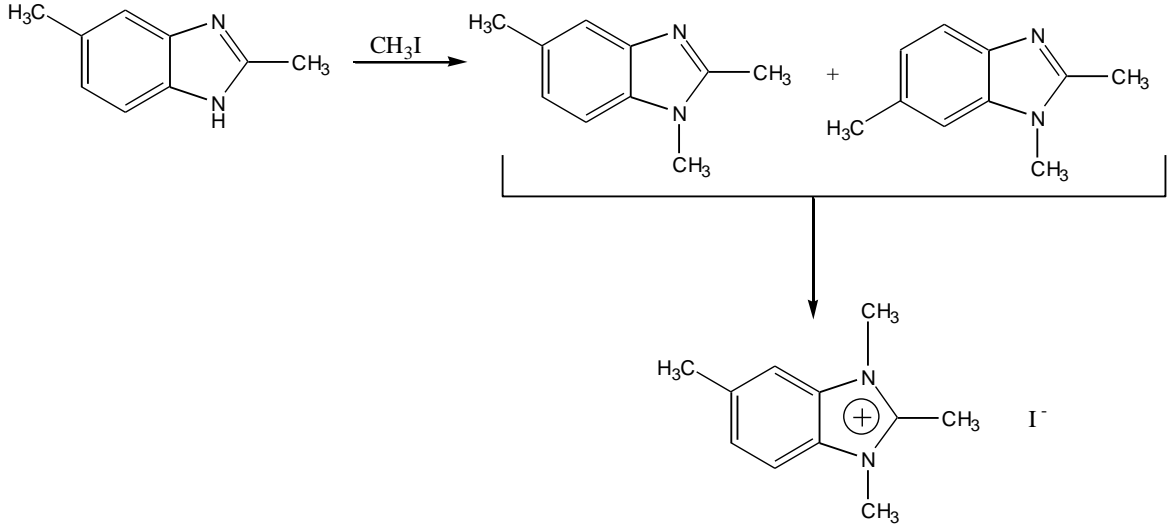
Benzimidazollerin asidik karakterlerinin bir diğer göstergesi ise grignard bileşikleri ile reaksiyona girerek N-magnezyum halojenürleri vermesidir. Benzimidazollerin imino hidrojeninin süstitüsüyonu pseudo-asidik karakterini ortadan kaldırır. Örneğin, nitrobenzimidazoller, Na_2CO_3 veya sulu amonyak çözeltileri ile tuz oluşturacak kadar asidiktir.

Serbest imino hidrojeni içeren benzimidazoller, tautomerik sistemlerdir. Benzimidazollerin tautomerik karakterini göstermek amacıyla, Green ve Day (13) 1942 yılında yaptıkları çalışmada, 3-nitro-4-asetamidobenzoik asit ve 4-nitro-3-asetamidobenzoik asitin redüksiyonu ile tek ve aynı benzimidazol elde etmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 1).

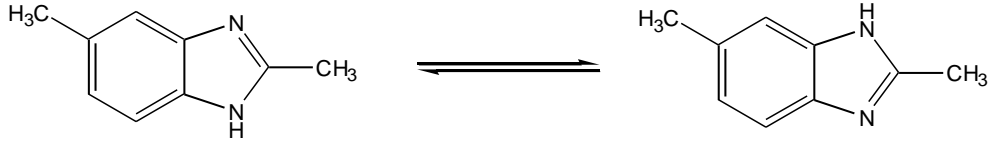


Reaksiyon Denklemi 1

Benzimidazollerin tautomerizmi, nötral şartlarda da oluşmaktadır. Yine Green ve Day'ın (13) yaptıkları çalışmada, 2,5-dimetilbenzimidazol, metiliyodür ile reaksiyona sokulduğunda 1,2,5-trimetilbenzimidazol ve 1,2,6-trimetilbenzimidazolü, ayrı ayrı elde ettiklerini ve her iki izomer tekrar metil iyodür ile kuaternize edildiğinde tek bir türeve ulaştıklarını bildirmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 2).



5(6)-Metilbenzimidazol gibi simetri düzlemi içermeyen türevlerin iki farklı izomer formuna sahip olması imino azotundan kaynaklanmaktadır. Bu tip bileşiklerde kesin yapıyı tanımlamak mümkün olmayabilir. Reaksiyon Denklemi 3’de görüldüğü gibi 5-metilbenzimidazol, 6-metilbenzimidazolün tautomerik formudur. Aynı durum, 4(7)-süstitüe benzimidazoller ile de örneklenebilir (14).



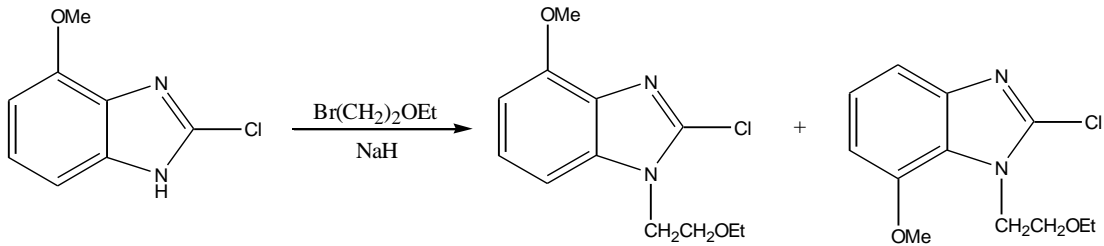
Benzimidazol ve simetri düzlemi içeren türevlerin tautomerik formları ise birbirinin aynıdır ve kesin bir yapı belirlemek mümkündür. Örneğin; 2-metil, 5,6-dimetil ve 4,7-dimetil benzimidazol simetri düzlemine sahiptir. Benzimidazolün, benzen halkası üzerinde simetri düzlemini bozacak şekilde süstitüent taşınması halinde, imino hidrojeni süstitüe edilecek olursa, iki farklı izomer karışımı elde edilmektedir (8).

Benzen üzerindeki süstitüentın karakteri azot üzerindeki süstitüsyonu etkilemekte ve genellikle farklı verimlerde izomerler elde edilmesine neden olmaktadır. Benzimidazol halkasının 4. konum süstitüentleri, önemli ölçüde elektrostatik, termodinamik ve sterik etkilere sahip fakat 5. konumdaki süstitüentlerde bu etkilerin yeterince baskın olmaması nedeniyle, izomer oluşum oranının değiştiği bildirilmiştir

(15). Arnau ve ark. (16) tarafından benzimidazolün 5 (6). konum süstituentlerinin tautomerik denge üzerinde az bir etkisi olması nedeni ile bu tip süstitüentler varlığında, hemen hemen eşdeğer miktarda regioizomerlerin oluştuğu bildirilmiştir.

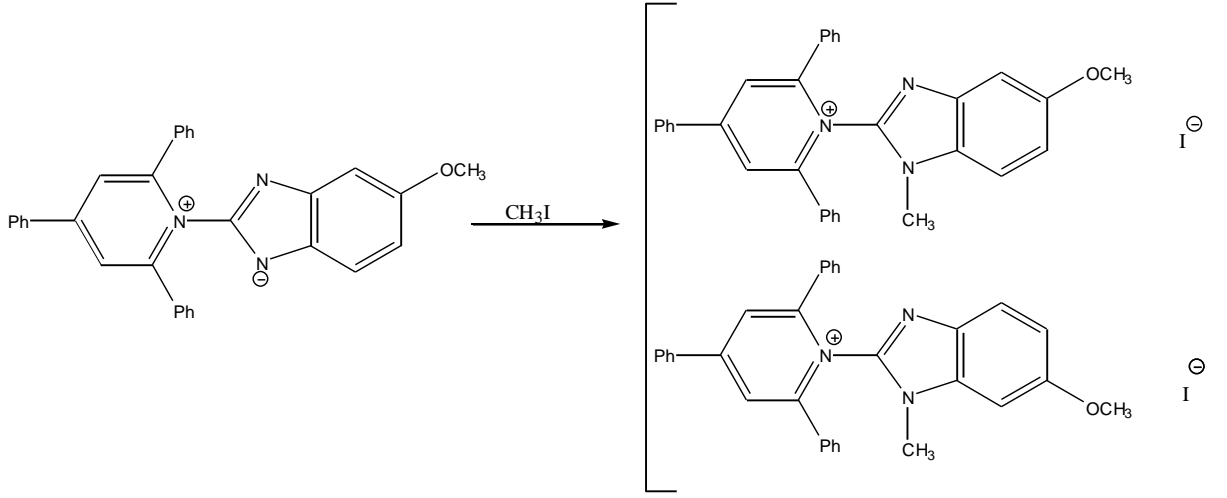
2-Furil ya da tiyeniil süstitüe benzimidazol türevlerinin DMSO içinde tautomerizm gözlenirken, 2-fenil benzimidazolde gözlenememesinin, molekülde heteroaril grupların varlığında –NH asiditesinin artmasına bağlı olabileceği bildirilmiştir (17).

Iemura ve ark. (18) tarafından yapılan bir çalışmada, 2-kloro-4-metoksibenzimidazolün imino hidrojeninin süstitüsüyonu ile 2-kloro-1-(2-etoksietil)-4-metoksi-1*H*-benzimidazol ve 2-kloro-1-(2-etoksietil)-7-metoksi-1*H*-benzimidazol yapıları elde edilmiş ve bu izomerler kolon kromotografisi ile ayrılmıştır (Reaksiyon Denklemi 4).



Reaksiyon Denklemi 4

2,4,6-Trifenilpiridinyum benzimidazol (iç tuz) ile metil iyodürden hareketle elde edilen izomer karışımı kristalizasyonla ayrılmaya çalışıldığında, 6-metoksi izomer saf olarak elde edilebilmiş, ancak 5-metoksi izomeri için bunun mümkün olmadığını Alcalde ve ark. (19) tarafından yapılan çalışmada bildirilmiştir (Reaksiyon Denklemi 5). Aynı araştırmacı grubu, bu çalışmaya benzer şekilde elde ettikleri izomer karışımını kristalizasyon tekniği ile ayrı ayrı saf olarak elde ettiklerini bildirmişlerdir (20). Arnau ve ark. (16) ise, sentez sonucunda elde edilen izomer karışımının, ancak preparatif ince tabaka kromotografisi ile ayrılabilirdiği bildirilmiştir.



Reaksiyon Denklemi 5

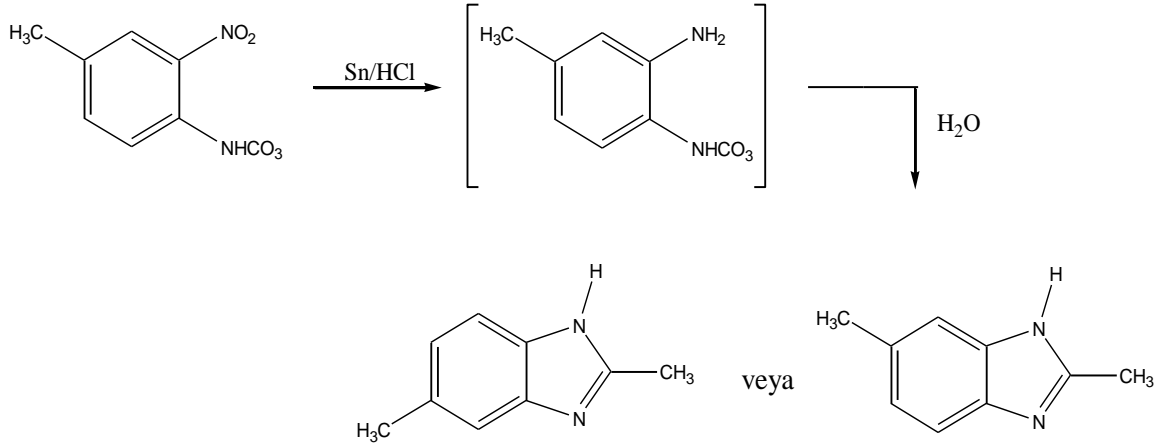
Katritzky ve Rachwal (21), alışılmadık alkilasyon şartlarında karşılaşılan izomer sorununu çözmek için, 5-nitrobenzimidazol üzerinden selektif alkilasyon ile 1-metil-5-nitrobenzimidazol ve 1-metil-6-nitrobenzimidazol regioizomerlerinin ayrı ayrı elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

2.2-Benzimidazollerin Genel Sentez Yöntemleri

Benzimidazol sentez yöntemlerinde başlangıç maddesi olarak çoğunlukla *o*-fenilendiamin ya da bunu verecek sübtitüe türevlerin kullanıldığı görülmektedir.

2.2.1 2-Alkilsübtitüe Benzimidazol Türevlerinin Genel Sentez Yöntemleri

İlk benzimidazol türevi bileşik, 1872 yılında Hoebrecker (11) tarafından sentezlenen, 2,5(6)-dimetilbenzimidazol olduğu Alright (11) tarafından bildirilmiştir. Bu bileşik 2-nitro-4-metilasetanilidin kalay klorür ile hidroklorik asit varlığında indirgenme reaksiyonu ile elde edilmiştir (Reaksiyon Denklemi 6).



Reaksiyon Denklemi 6

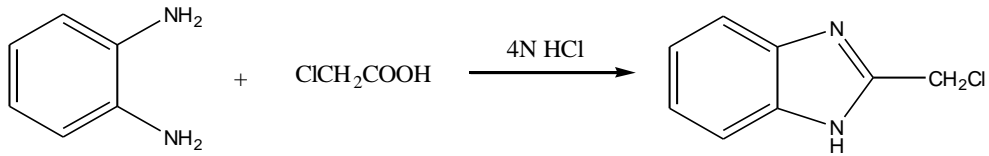
Daha sonra aynı bileşik 3,4-dimainotoluenin glasiyal asetik asit içinde ısıtılması ile 2,5- (ya da 2,6) dimetil benzimidazol sentezlenmiştir (11).

Günümüze kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde 2-alkilsüstitübenzimidazol türevlerinin sentezi için en çok uygulanan yöntemin, uygun *o*-fenilendiamin türevinin uygun bir karboksilik asit türevi ile seyreltik mineral asit çözeltisi (22-25), polifosforik asit (PPA) (26-32) veya polifosforik asit etil esteri (PPE) (26,31,33-36) içinde yürütülen kondensasyon reaksiyonları olduğu görülmektedir.

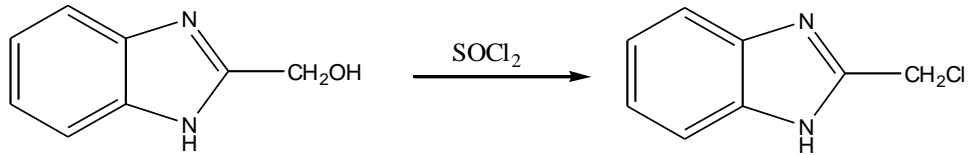
1928 yılında yayınlanan bir çalışmada Phillips (22), bazı 2-süstitübenzimidazollerin sentezlendiğini bildirmiştir. Kendi adını verdiği sentez yöntemini kullanarak, 2 numaralı konumda metil, etil, hidroksimetil, α -hidroksibenzil ve fenil gruplarını taşıyan benzimidazol türevlerini; *o*-fenilendiamin ve uygun karboksilik asitin (sırası ile asetik asit, propiyonik asit, glikolik asit, mandelik asit ve benzoik asit) 4 N hidroklorik asit çözeltisi içerisinde 30-40 dakika geri çeviren soğutucu altında ısıtılması ile elde etmiştir. Daha sonraki yıllarda bu yöntem aynı şekilde ya da modifiye edilerek bir çok araştırmacı tarafından uygulanmış (11,13,37-39) ve alifatik karboksilik asitler kullanılarak yürütülen reaksiyonlarda yüksek verimde 2-alkilsüstitübenzimidazol türevlerinin elde edilmesine karşılık aromatik karboksilik asitler sonucu elde edilen ürünlerin eser miktarda olduğu bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (11,27).

Yine *o*-fenilendiamin ile karboksilli asitlerin reaksiyonu sonucu Pool ve ark. (37) tarafından 2-alkilbenzimidazoller elde edilmiştir.

1938 yılında Hughes ve Lions (40), Phillips yöntemi kullanılarak 2-klorometilbenzimidazol sentezlendiğinde verimin çok düşük, izolasyonun da çok zor olduğunu bildirmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 7). Bunun üzerine çalışmacılar, 2-klorometilbenzimidazolü, Phillips yöntemi ile sentezledikleri 2-hidroksimetilbenzimidazol'ün tiyonil klorür ile olan reaksiyonu sonucu elde etmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 8).



Reaksiyon Denklemi 7



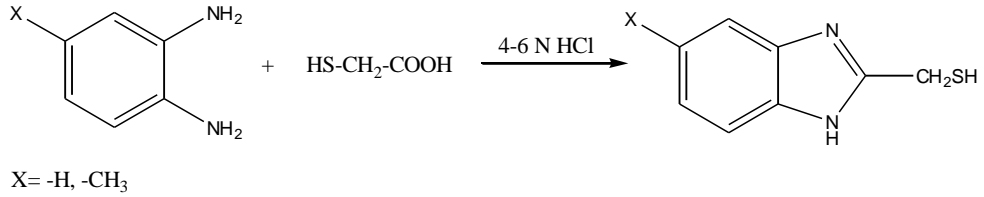
Reaksiyon Denklemi 8

1939 yılında yayınlanan bir çalışmada, Bloom ve Day (41) 2-klorometilbenzimidazol sentezi için Phillips yöntemini kullandıklarını, sonuç ürünü, bu konuda daha önce çalışma yapmış olan Hughes ve Lions'a göre daha yüksek verimle elde ettiklerini bildirmişlerdir. Verimin artması, 1,2-fenilendiamin ile kloroasetik asitin 4 N hidroklorik asit içindeki çözeltisinin 45 dakika geri çeviren soğutucu altında ısıtılma süresinden sonra 1 gece bekletilip, su ile seyreltikten sonra, 6N amonyak çözeltisi ile nötrale edilmesine bağlanmıştır. Aynı yöntem 1943 yılında Skolnik ve ark. (42) tarafından da kullanılmıştır.

1940'lı yıllarda *o*-fenilendiaminin organik asitlerle vermiş olduğu reaksiyonun mekanizması üzerinde bazı çalışmalar yapılmıştır (13,38,39). Phillips (43), bu reaksiyon sırasında önce monoaçil yapısı taşıyan bir ara ürünün oluştuğunu ve daha sonra halkanın kapanarak benzimidazol yapısının elde edildiğini bildirmektedir.

Yapılan bir çalışmada *o*-fenilendiaminin monoaçil türevinin susuz ortamda halka kapanma reaksiyonu vermediği, benzimidazol yapısının oluşması için ortamda suyun bulunması gerekli olduğu bildirilmiştir (39).

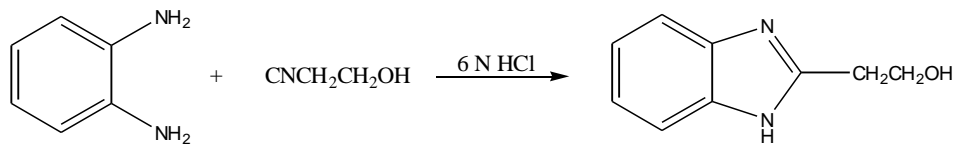
Çeşitli araştırmacılar 2-merkaptometilbenzimidazol ve 5-süstitüe türevlerini ilk defa Phillips (23) tarafından uygulanan yöntemle sentezlediklerini bildirmişlerdir. Bu yöntem uygun *o*-fenilendiamin ve tiyoglikolik asitin 4-6 N hidroklorik asit içerisinde geri çeviren soğutucu altında bir kaç saat ısıtılması esasına dayanır (Reaksiyon Denklemi 9) (44-49).



Reaksiyon Denklemi 9

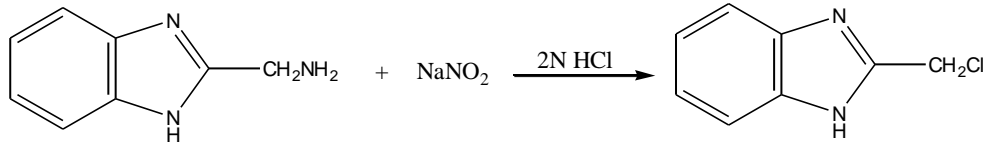
1964 yılında yayınlanan bir çalışmada Milner ve ark. (47) Phillips yöntemini uygulayarak elde ettikleri 2-merkaptometilbenzimidazolün hidroklorik asit tuzu halinde daha dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir.

1949 yılında Bachman ve Heisey (50), 2-(2'-hidroksietil)benzimidazolü Phillips yöntemi kullanarak sentezlediklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, 1,2-fenilendiamin ve karboksilik asit türevi olarak kullanılan 3-hidroksipropiyonitril, 6 N hidroklorik asit çözeltisi içinde 5 saat süreyle geri çeviren soğutucu altında ısıtılmış, daha sonra reaksiyon karışımı amonyum hidroksit çözeltisi ile nötralize edilerek 2-(2'-hidroksietil)benzimidazol elde edilmiştir (Reaksiyon Denklemi 10).



Reaksiyon Denklemi 10

1970 yılında Chub ve ark. (51), yayınladıkları bir çalışmada 2-klorometilbenzimidazol sentezi için farklı bir yöntem bildirmişlerdir. Bu yönteme göre, 2-aminometilbenzimidazol dihidroklorür ile sodyum nitritin sulu çözeltisinin 2 N hidroklorik asit varlığında -10 °C' de reaksiyonu sonucu 2-klorometilbenzimidazolün elde edildiği bildirilmiştir (Reaksiyon Denklemi 11).



Reaksiyon Denklemi 11

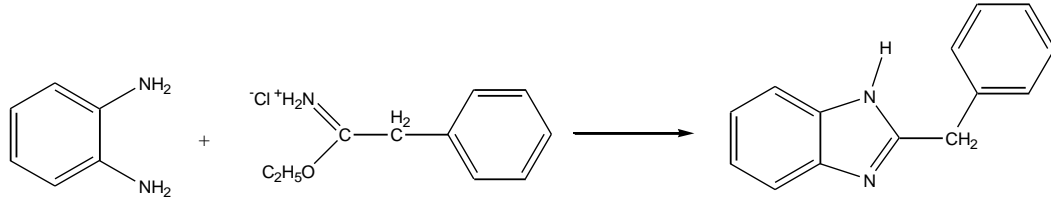
Yukarıda verilen sentez yöntemlerinin dışında, günümüze kadar çalışmaların çoğunda 2-klorometilbenzimidazol, Phillips yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir.

Noyanalpan ve Işıkdag (52) tarafından 1984 yılında yayınlanan bir çalışmalarında, o-fenilendiamin ile bazı karboksilik asit türevlerini değişik kondensasyon ajanlarının (mineral asitler, polifosforik asit, polifosfat esterleri) katalizörlüğünde reaksiyona soktuklarını ve 2 numaralı konumlarında bazı alkil ve aril sübstitüentleri taşıyan benzimidazol türevlerini, bu ajanların tümü ile, değişik süre ve verimlerde elde ettiklerini bildirmişlerdir. Uzun zincirli alkil grupları ile, aromatik, siklik ve heterosiklik grupları içeren türevlerin sentezlerinde ise, PPA ve PPE yöntemleri ile daha yüksek verimde ürünler elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu türevlerin 4 N hidroklorik asit çözeltisi ile kondenzasyonları, çözünme güçlükleri, halka açılması veya karbonizasyon gibi nedenlerden dolayı sentezlerin gerçekleştirilemediğini veya çok düşük bir verimde ürünler elde edildiğini bildirmişlerdir.

Aynı çalışmacıların 1985 yılında yayınladıkları bir diğer çalışmada, 2 numaralı konumlarında çeşitli alkil grupları (metil, monoklorometil, hidroksimetil, merkaptometil, difloromonoklorometil, triflorometil, benzil) bulunan, 17 adet benzimidazol türevlerini sentezlemişlerdir (44). Bileşiklerin sentezlerinde, çoğunlukla kondensasyon reaksiyonları denenmiş, bu tip reaksiyonlarda, serbest bir amin (o-fenilendiamin) ve bununla kondensasyona giren bir aldehit, nitril veya karboksilik asit türevlerinden birini kullandıklarını ve gerek laboratuvar koşullarına uygunluğu ve gerekse daha yüksek verim elde edilmesi nedeni ile, karboksilik asit türevleri üzerinden yaptıklarını bildirmişlerdir. Sentezlerde reaksiyon ajanı ve çözücü olarak, 4 N hidroklorik asit çözeltisi Phillips yöntemi, PPA ve PPE kullanmışlardır.

Hunger ve ark. (53,54) 2-benzilbenzimidazolü, benzil siyanürden oluşturulan iminoeter hidroklorür yapısından hareketle sentezlemişlerdir. Benzil siyanürün kloroform ve mutlak alkol içerisindeki çözeltisinden hidroklorik asit gazı geçirerek

oluşan iminoeter hidroklorür yapısını *o*-fenilendiamin ile reaksiyona sokarak 2-benzilbenzimidazol bileşiğini elde etmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 12) .



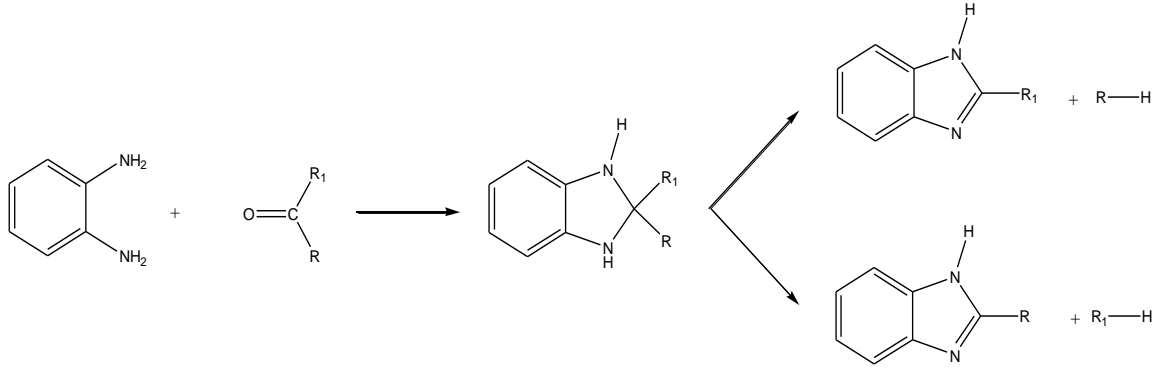
Reaksiyon Denklemi 12

Işıkdağ (55) tarafından 1982 yılında tamamlanan doktora tez çalışmasında, 2-benzilbenzimidazolün sentezi için kullanılan bir diğer yöntemin de *o*-fenilendiaminin, PPE varlığında fenil asetik asit ile oluşturduğu kondensasyonu sonucu gerçekleştirildiği bildirilmiştir.

2-Süstitüe benzimidazol türevlerinin sentezinde, *o*-fenilendiamin ve uygun aldehit türevleri ile yapılan kondensasyon çalışmalarında kullanılan ajanlar (nitrobenzen, bakır(II)asetat, kurşun asetat ve sodyum bisülfid) ve solvanlar, kuvvetli asidik ortamda dayanıksız yapılar için, uygun birer reaksiyon ortamı yaratırlar (56-61). Ancak bunun yanında, oluşan ürünün izolasyonunda çıkan güçlüklerle ilgili olarak, verimin düşük olması nedeni ile 2-alkilsüstitüebenzimidazol türevlerinin sentezinin daha çok karboksilik asitlerden hareketle yapıldığı görülmektedir (55).

Weidenhagen (61) aldehitler ile yürütülen reaksiyonlarda katalizör olarak bakır(II)asetat kullanılması halinde verimin daha yüksek olduğunu bildirmiştir.

Elderfield ve ark. (62,63) tarafından 1948 ve 1951 yılında yayınlanan iki ayrı çalışmada, *o*-fenilendiamin, ketonlarla muamele edildiğinde 2,2-dialkilsüstitüe benzimidazolinleri verdiği ve bu oluşan ürün ısıtıldığı zaman 2-süstitüebenzimidazol ve hidrokarbon yapılarını verdiği bildirilmiştir (Reaksiyon Denklemi 13).



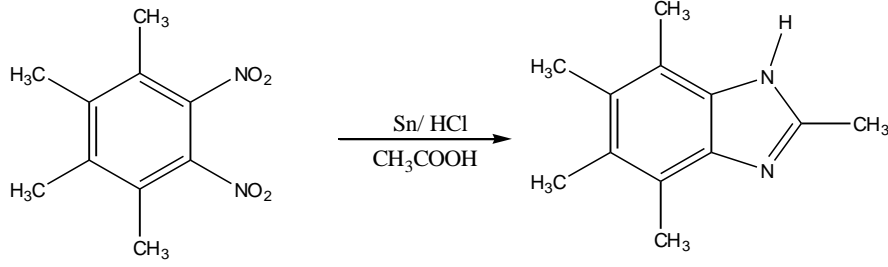
Reaksiyon Denklemi 13

Kondensasyon ajanlarından PPA, çoğu kez mineral asit çözeltilerinin etkili olmadığı yerlerde kullanılır (27,28,64). Kuvvetli bir çözücü özelliği vardır. Reaksiyon ortamında oluşan su ile birleşen anhidrit grupları taşır. Reaksiyon sırasında, önce monoasit türevi oluşmakta ve bunu bir molekül su çıkışı ile halkanın kapanması takip etmektedir. PPA'nın viskoz bir sıvı olması nedeni ile 90⁰C'nin altında zor karışır olması, sakıncalı yönüdür. Ayrıca reaksiyon sonunda hidrolizinde güçlük gösterir.

Diğerlerine göre daha yumuşak bir kondensasyon ajanı olan PPE, alifatik, aromatik ve heterosiklik karboksilik asitlerin, *o*-fenilendiamin ile kondensasyonunda ve ayrıca, benzoksazol, benzotiyazol bileşiklerinin sentezlerinde kullanılmıştır (31,34-36,65). Halkalı trimetafosfat yapısında olan PPE, ilk defa 1910 yılında Langheld (34) tarafından fosforpentaoksit ve dietiler karışımının ısıtılması ile elde edilmiştir. Aside duyarlı olan heterosiklik türevler bu yöntem ile yüksek bir verimle elde edilebilirler (55).

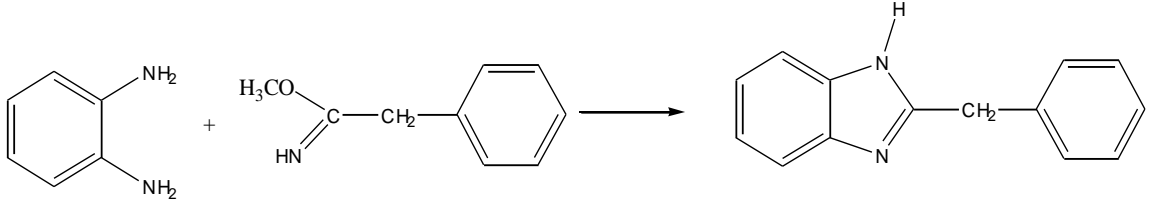
Ancak reaksiyon koşulları yeterince kuvvetli değil ise, halka kapanması reaksiyonu olmaz, ürün olarak mono veya diaçilamin türevleri elde edilir. Reaksiyon ısısı 160 ⁰C nin üzerine çıktığında ise, PPE'nin yapısında bozunma meydana gelmesi nedeni ile reaksiyonların yürümediği bildirilmektedir (27).

Smith ve ark. (66,67) 1,2-dinitro-3,4,5,6-tetrametilbenzen'in asetik asit içinde kalay klorür ve hidroklorik asit varlığında redüksiyonu ile 2,4,5,6,7-pentametilbenzimidazolü elde ettiklerini bildirmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 14).



Reaksiyon denklemleri 14

King ve Achenson (68) tarafından 1949 yılında yayınlanan bir çalışmada, *o*-fenilendiamin ve fenasetiminometil esterinin, metanoldeki çözeltisinin ısıtılması sonucu 2-benzilbenzimidazolün sentezlendiği bildirilmiştir (Reaksiyon Denklemi 15).



Reaksiyon denklemleri 15

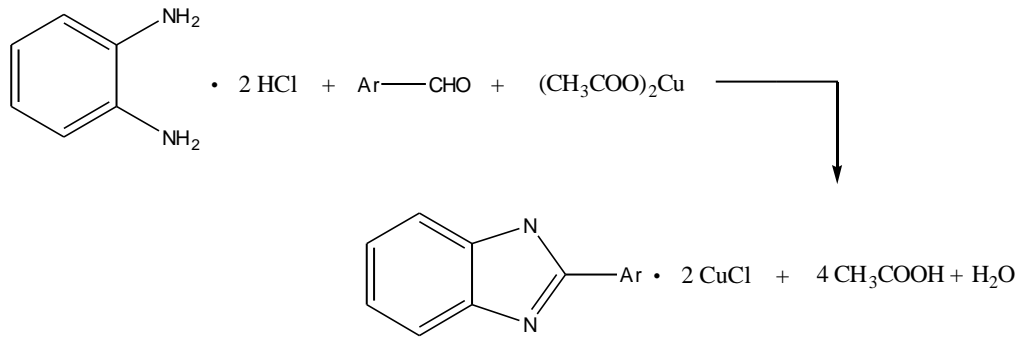
1964 yılında Porai-Koshits ve ark. (69) yayınladıkları bir çalışmada, bazı 2-hidroksimetilbenzimidazol türevlerinin asetik asit ve asetik asit anhidriti ile olan reaksiyonları sonucunda, bu türevlerin asetik asit esterlerinin elde edildiğini bildirmişlerdir.

2.2.2 2-Arilbenzimidazol Türevlerinin Genel Sentez Yöntemleri

1928 yılında yayınlanan bir çalışmada Phillips (22), bazı 2-süstitüe-benzimidazolleri *o*-fenilendiamin ve uygun karboksilik asiti 4 N hidroklorik asit çözeltisi içerisinde 30-40 dakika geri çeviren soğutucu altında ısıtılması sonucu başarı ile elde etmiştir. Ancak bu çalışmada uygulanan bu yöntem ile 2-fenilbenzimidazolün eser miktarda elde edilebildiği bildirilmiştir. 2-fenilbenzimidazol sentezinde, benzoik asit yerine benzoik asit anhidriti veya benzoil klorür kullanılması durumunda da

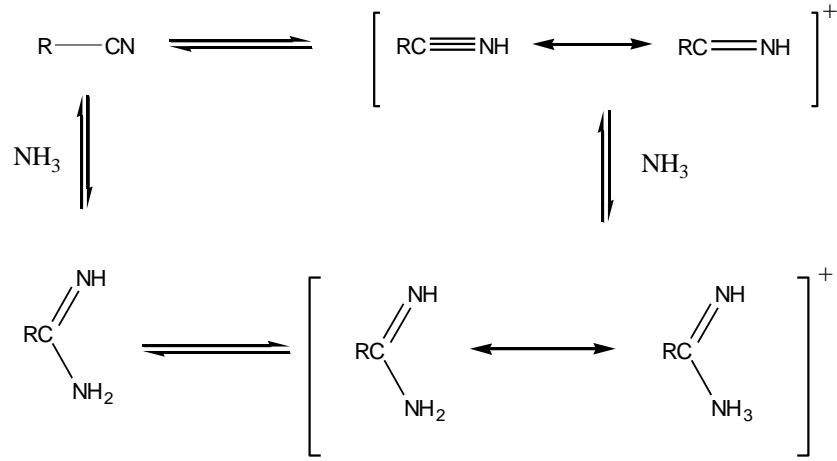
reaksiyonun başarılı olmadığı bu çalışmada ve diğer bazı çalışmalarda kayıtlıdır (27,28).

Rudolf Weidenhagen (61) 1936 yılında, ilk kez kendisi tarafından uygulanan ve adını taşıyan bu yöntemle, bazı 2-sübstitüebenzimidazol türevi bileşikleri sentezlemiştir. Weidenhagen ve Train (59), uygun bir aldehitin *o*-fenilendiaminin bir amino grubu ile reaksiyonu sonucu elde ettiği Schiff bazını, bakır(II) asetat veya kurşun tetra asetat gibi bir oksidanla reaksiyona sokarak 2-sübstitüebenzimidazollerini elde etmişlerdir. Aşağıda genel reaksiyon denklemi (Reaksiyon Denklemi 16) verilen bu yöntem ile 2-fenil, 2-(*o*-/*m*-/*p*-nitrofenil), 2-(4-oksi-3-metoksifenil), 2-(3,4-metoksifenil)benzimidazoller sentezlenmiştir. Ancak bu yöntem sonucu elde edilen ürünün saflaştırılmasının güç olduğu diğer literatürlerde de kayıtlıdır (70).

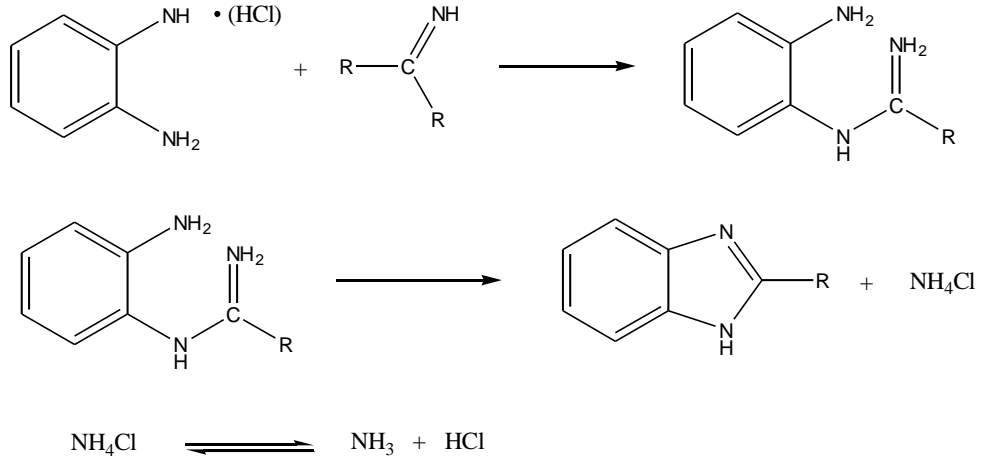


1940 ve 1944 yılında yayınlanan çalışmalarında Hölljes ve Wagner (71,72) *o*-fenilendiamin ile aromatik ve alifatik nitrillerden hareketle 2-sübstitüebenzimidazol ve benzoksazol türevi bileşikleri elde etmişlerdir. Bu yöntemle çalışmacılar reaksiyonun asit ortamda ve susuz şartlarda yürütülmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmacılar *o*-fenilendiaminin hidroklorik asit tuzu kullanıldığında 2-fenilbenzimidazolün yüksek bir verimle elde edildiğini bildirmişlerdir. Yüksek verimle 2-fenilbenzimidazol eldesi için ortamda, en azından kullanılan nitrile eşdeğer miktarda asitin bulunması gerektiğini, daha az asitin kullanılması durumunda da reaksiyonun yürüdüğünü ancak hızının daha az olduğunu bildirmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 17).

Çalışmacılar reaksiyon mekanizmasının aşağıdaki şekilde olduğunu ifade etmişlerdir.



Reaksiyon denkleminde görülen $\text{RC}^{\oplus}=\text{NH}$ iyonu reaktif bir ara üründür ve bu iyon, proton varlığında hem amidin, hem de nitril varlığında oluşabilir.

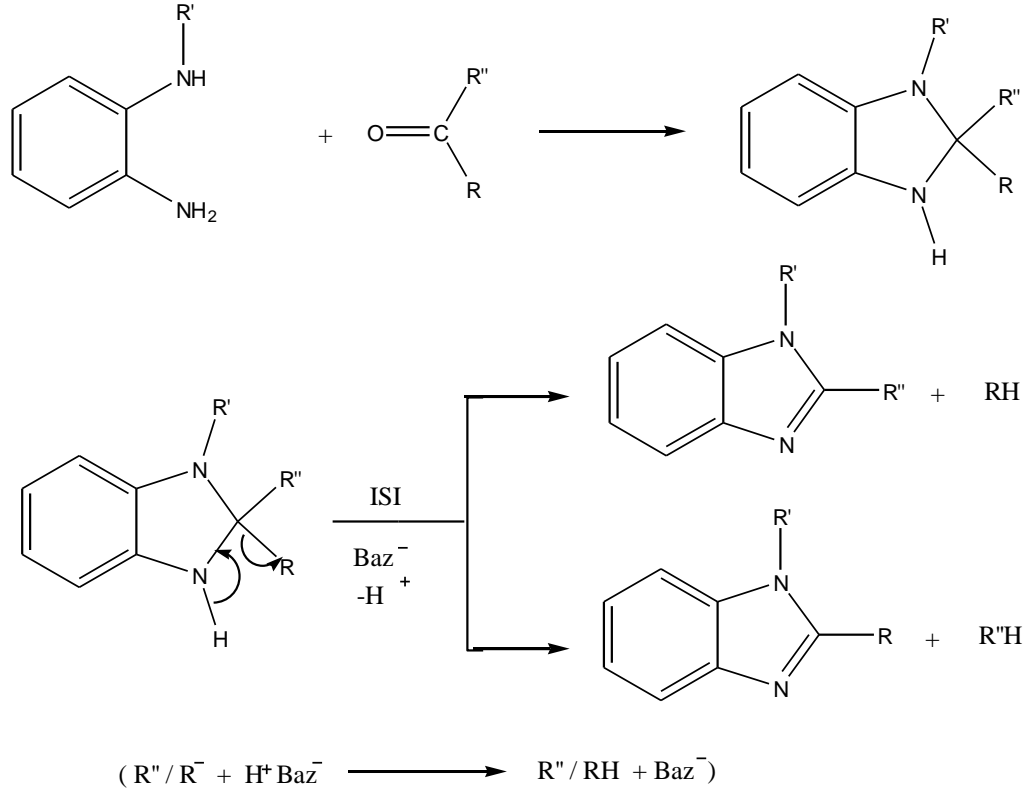


(R= -fenil, -metil, -etil, -n-propil, -n-butil, -n-amil, -p-tolil)

Reaksiyon Denklemi 17

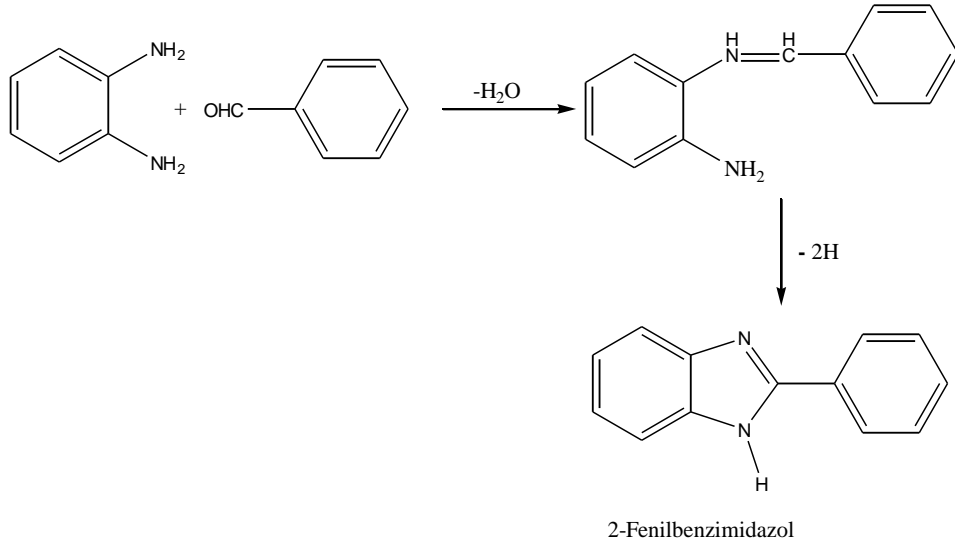
1951 yılında Charlton ve ark. (73) 2-fenilbenzimidazollerin N-süstitüe türevlerinin sentezlemiştir. Bileşikleri bakır(II)asetat varlığında arilaldehit ve uygun o-fenilendiamin karışımının oksidasyonu ile hazırlamışlardır.

1951 Yılında Elderfield ve McCarthy (63) yaptıkları bir çalışmada ketonlar ve onların monosüstitüe türevlerinin o-fenilendiaminler ile reaksiyonu sonucu 2-süstitüe-benzimidazollerini sentezlediklerini bildirmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 18).



Reaksiyon Denklemi 18

1952 yılında yayınlanan bir çalışmada Jerchel ve ark. (74) 2-fenilbenzimidazol'ü iki farklı yöntemle sentezlemişlerdir. Birinci yöntemde *o*-fenilendiamin ile benzaldehitin bisülfid katım ürününü alkol içerisinde 3 dakika geri çeviren soğutucu altında ısıtıttıktan sonra nitrobenzen ilave edip, soğutarak bileşiği % 72 verimle elde etmişlerdir. İkinci yöntemde ise *o*-fenilendiamini alkol içerisine alıp 0°C'ye kadar soğuttuktan sonra benzaldehit ilave edip diaminin mono benzal bileşiğini oluşturmuşlardır. Sonra üzerine nitrobenzen ilave ederek kaynama noktasına gelinceye kadar ısıtmışlardır. Soğutuluncada 2-fenilbenzimidazol'ü elde etmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 19).



Reaksiyon Denklemi 19

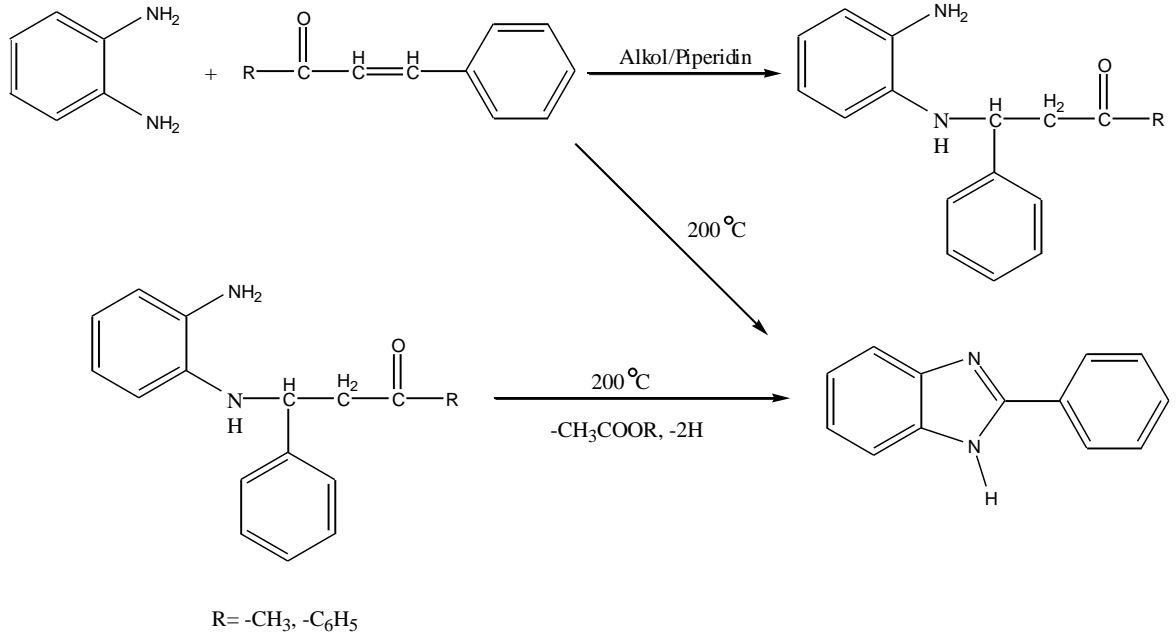
Verimi arttırmak için reaksiyon çözeltisinden hidroklorik asit gazı geçirerek bileşiğin tuzunu oluşturmuşlardır. Oluşan tuzun eter ile çöktürüp, elde ettikleri çökeleğe Na_2CO_3 ilave ederek 2-fenilbenzimidazolü % 85 verimle elde etmişlerdir.

Araştırmacılar 2. yöntemde nitrobenzen ilave ettikten sonra 4 saat 90°C 'de ısıttıklarında 2-fenilbenzimidazol'ü izole edemediklerini, nitrobenzen yerine m-dinitrobenzen kullandıklarında 150°C 'de kısa bir süre ısıttıktan sonra %70 verimle 2-fenilbenzimidazolü elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Lane (75), 1953 yılında yayınlanan bir çalışmasında, amonyum benzoat ve *o*-fenilendiaminin gliserol içerisinde reaksiyona girmesiyle, 2-fenilbenzimidazol'ü sentezlediğini bildirmiştir.

1954 yılında Jerchel ve ark. (56) 2-fenilbenzimidazol'ü, *o*-fenilendiamin ile benzaldehiti benzen içerisinde %10'luk Pd-silikajel katalizörlüğünde 4 saat geri çeviren soğutucu altında ısıttıktan sonra, reaksiyon içeriğini vakum altında yoğunlaştırarak elde etmişlerdir.

1957 yılında Ried ve Stahlhofen (76) *o*-fenilendiamin ve α,β doymamış karbonil bileşiklerinin kondenzasyonu ile 2-sübstitüefenilbenzimidazol türevlerini sentezlediklerini bildirmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 20).

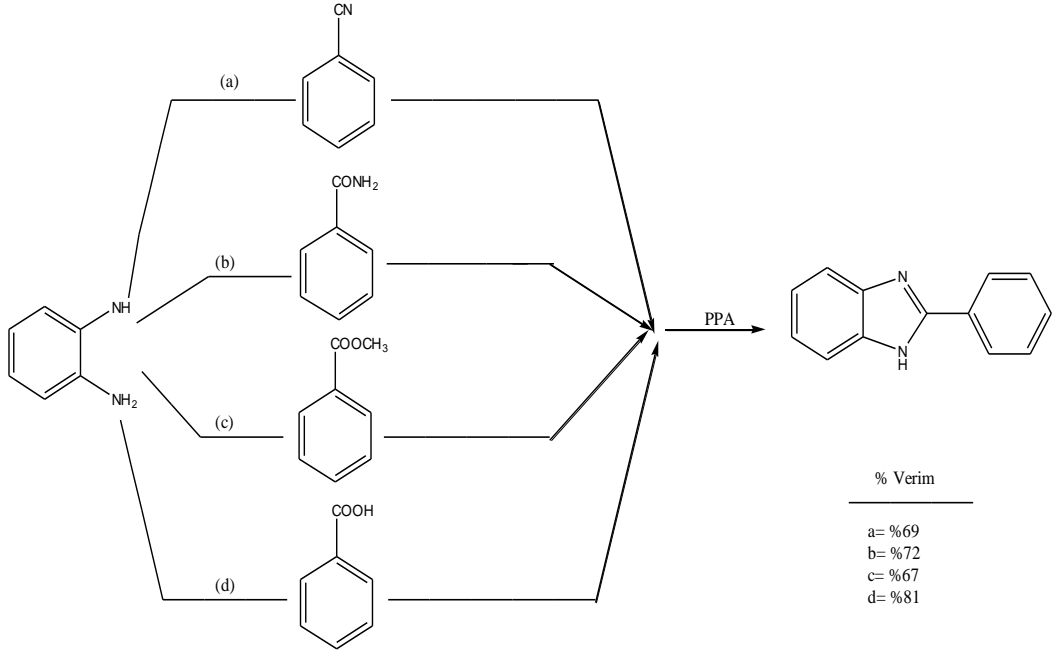


Reaksiyon Denklemi 20

Yine aynı yılda Thomas ve Tyler (70) tarafından yapılan bir çalışmada 2-arilbenzimidazollerin, aromatik diaminler ile imidat hidroklorürlerin metanol içinde ısıtılması ile elde edildiği bildirilmiştir. Ayrıca bu yöntemin 2-alkilbenzimidazoller için, özellikle *o*-fenilendiaminin 4 nolu konumunda elektrofilik süstitüent taşıması durumunda kullanışlı bir yöntem olmadığını açıklamışlardır. Yine, bu yöntemle Weidenhagen'nin metoduna göre daha temiz ve yüksek verimde ürünler elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Hein ve ark. (27) 1957 yılında yayınladıkları bir çalışmalarında, benzimidazol halkası oluşturmak için Phillips yöntemini kullanmanın, 2-alkil süstitüe türevleri için uygun olduğunu fakat 2-aril benzimidazollerin sentezi için uygun olmadığını, çok düşük verim elde edildiğini bildirmişlerdir. Aynı makalede Phillips yöntemi ile 2-fenilbenzimidazol sentezi çalışmalarında sadece eser miktarda ürün elde edilebileceği, ancak reaksiyon derişik hidroklorik asitli ortamda 180°C'de kapalı bir tüp içinde (basınç altında) yapıldığında 2-fenilbenzimidazol'un daha yüksek verimle edilebileceğini bildirmişlerdir.

Araştırmacılar 2-arilsüstitüe benzimidazollerin sentezleri için PPA kullanımının uygun olduğunu ve basınç uygulamaya gerek kalmadan yüksek verimle ürün elde edildiğini bildirmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 21) .

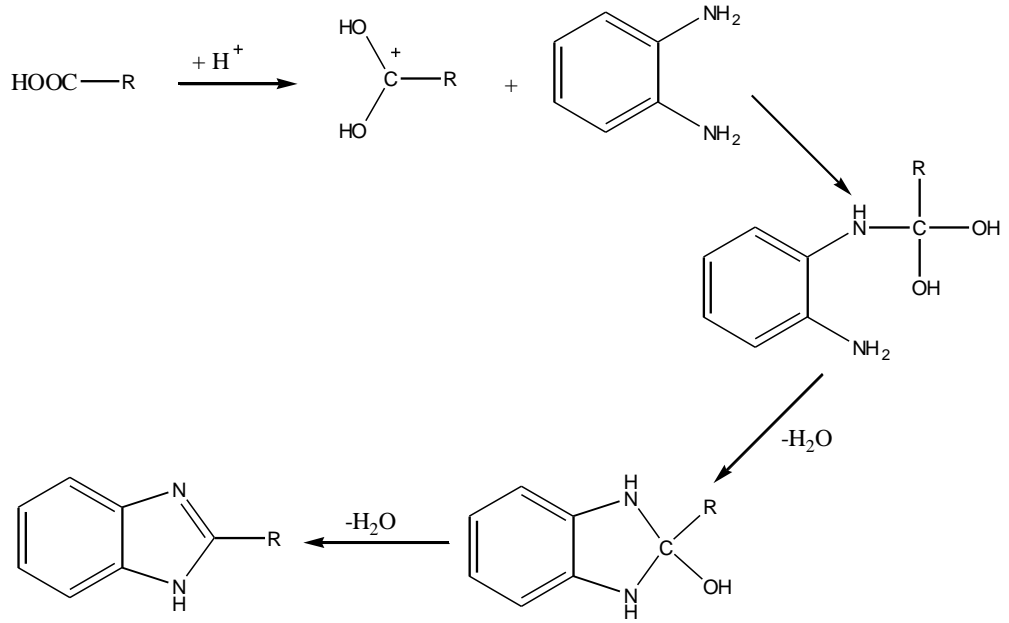


Çalışmacılar *o*-fenilendiamin ile yukardaki 4 farklı bileşiği PPA içerisinde reaksiyona soktuklarında en yüksek verimi benzoik asit ile elde ettiklerini bildirmişlerdir.

o-Fenilendiamin ve benzoik asitten hareketle 2-fenilbenzimidazol'un sentezinde kondensasyon ajanı olarak PPA kullanımı, 1986 yılında Kumar (77) tarafından da uygulanmıştır.

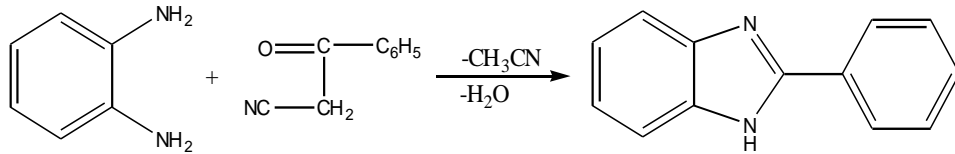
1964 yılında Kanaoka ve ark. (28) yaptıkları bir çalışmada 2-süstitübenzimidazollerini *o*-fenilendiamin ile çeşitli karboksilik asitlerin kondensasyon reaksiyonuyla elde etmişlerdir. İlk defa bu çalışmada halka kapama ajanı olarak PPE kullanılmıştır.

Araştırmacılar *o*-fenilendiamin ve alifatik asitten hareketle Phillips metodu ile sentezlenen 2-alkilbenzimidazollerin veriminin yüksek olduğunu, ancak aromatik asit kullanıldığında oldukça düşük verimde ürün elde edildiğini bildirmişlerdir. Phillips yöntemi ile yüksek verimde 2-arilbenzimidazol eldesi için bu reaksiyonun kapalı bir tüp içerisinde ve 180°C'de yürütülmesi gerektirdiğini, ancak mineral asitler yerine, PPE'nin kullanımı sonucu daha iyi sonuçlar alındığını bildirmişlerdir. PPE kullanımı ile benzoik asitten hareketle 2-fenilbenzimidazol sentezi 120 °C'de 20-40 dakika ısıtılmakla oldukça iyi verimde yapılabilmektedir (Reaksiyon Denklemi 22) (34).



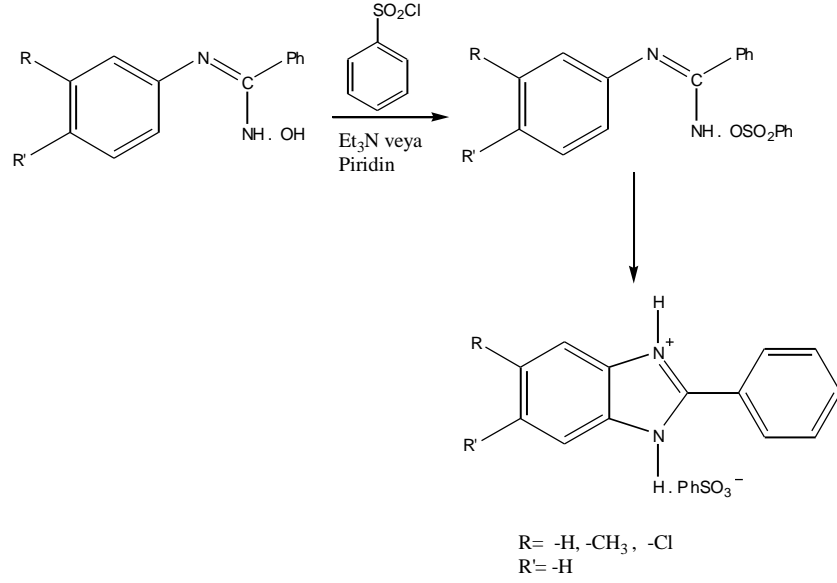
Reaksiyon Denklemi 22

Kröhnke ve Leister (78) 1958 yılında yaptıkları bir çalışmada 2-fenilbenzimidazol'ü benzoilasetonitril ve *o*-fenilendiaminden hareketle formik asit içerisinde yarım saat ısıtılarak elde ettiklerini bildirmişleridir (Reaksiyon Denklemi 23).



Reaksiyon Denklemi 23

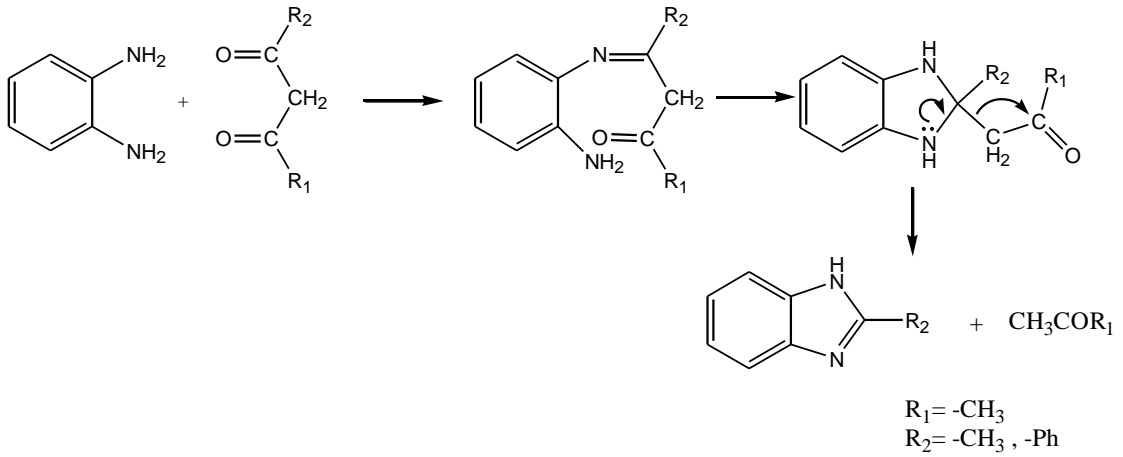
1958 yılında Partridge ve Turner (79) tarafından yapılan bir çalışmada, 5-süstitüe-2-fenilbenzimidazollerin, N'-aril-N-hidroksiamidin ile benzen sülfonil klorürün tersiyer bir baz varlığında (piridin veya trietilamin) susuz ortamda, reaksiyonu ile elde edildiği bildirilmiştir (Reaksiyon Denklemi 24).



Reaksiyon Denklemi 24

Bileşiklerin benzensülfonat tuzları da elde edilmiştir.

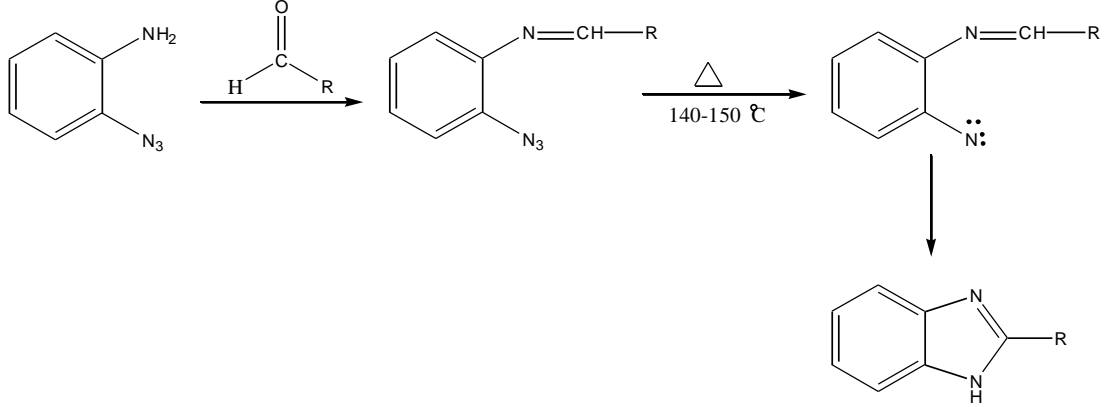
1959 yılında Barltrok ve ark. (80) 1,5-benzodiazepinler ve 3,6-diaza-4,5-benzotropon türevleri üzerinde çalışırken yan ürün olarak 2-fenilbenzimidazol'ü sentezlediklerini bildirmişlerdir. 2-Fenilbenzimidazol'ü benzilidenasetilasetat ile benzen içindeki o-fenilendiaminin piperidin ile 4 saat ısıtılması ile elde etmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 25).



Reaksiyon Denklemi 25

1964 yılında Krbecek ve Takimoto (81) yaptıkları bir çalışmada, 2-azidoanilinlerin uygun aldehitlerle kondensasyonu sonucu oluşan benziliden-2-azido

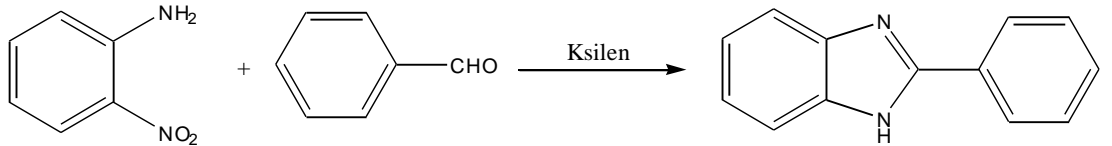
anilinlerin 1,2-diklorobenzen içerisinde 140°C'deki termal dekompozisyonu sonucu 2-sübstitüefenilbenzimidazoller yüksek verimle sentezlenmiştir (Reaksiyon Denklemi 26).



Reaksiyon Denklemi 26

Bu termal dekompozisyonun, azidin'in N₂ kaybetmesi ve azometin bağının karbon atomuna atak ederek molekül içi halka kapanmasına uğraması sonucu oluştuğu bildirilmiştir.

Stacy ve ark. (82) 1964 yılında yayınlanan bir çalışmalarında, 2-fenilbenzimidazol'ü *o*-nitroanilin ve benzaldehitin ksilen içerisinde 7 gün ısıtılması ile elde ettiklerini bildirmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 27).



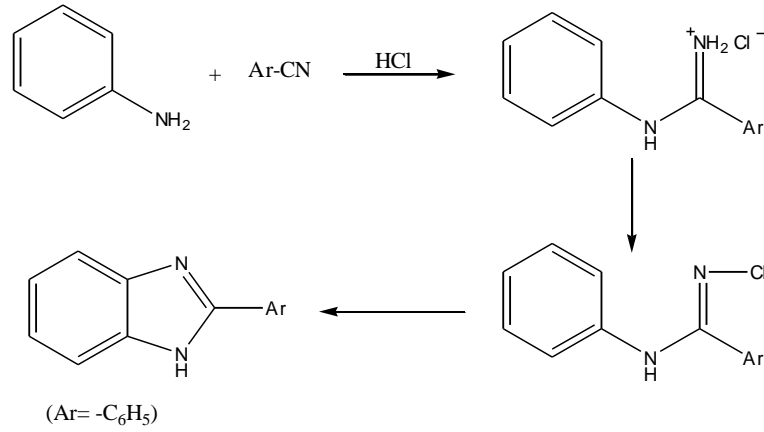
Reaksiyon Denklemi 27

Ridley ve ark. (83) 1965 yılında yaptıkları bir çalışmada, *o*-fenilendiamin ile 4-siyanobenzaldehitin sodyumbisülfid tuzu DMF içerisinde reaksiyona sokularak 4-(1*H*-benzimidazol-2-il)benzonitril elde etmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 28).



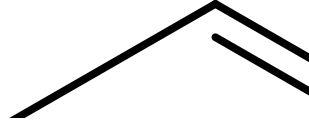
Reaksiyon Denklemi 28

Grenda ve ark. (84) 1965 yılında yayınlanan bir çalışmalarında anilin ve benzonitril'den hidroklorik asitli ortamda elde ettikleri N-arilamidin'i bazik ortamda sodyum hipoklorit ile reaksiyona sokarak 2-arilbenzimidazollerini sentezlemişlerdir. N-fenil benzamidin %34 verimle 2-fenilbenzimidazol'e dönüştüğünü bildirmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 29).

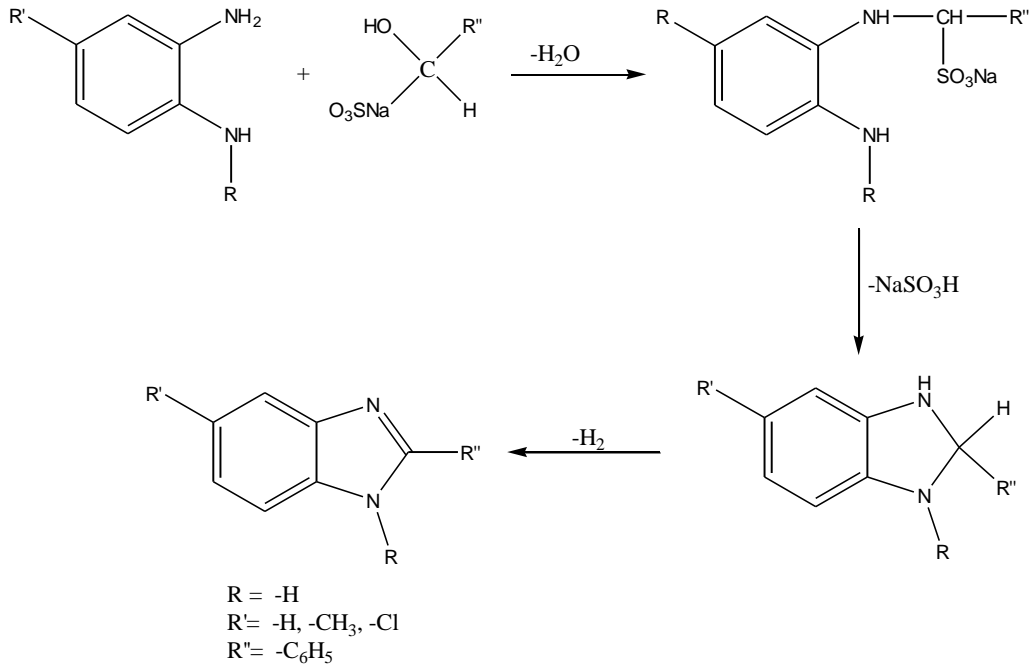


Reaksiyon Denklemi 29

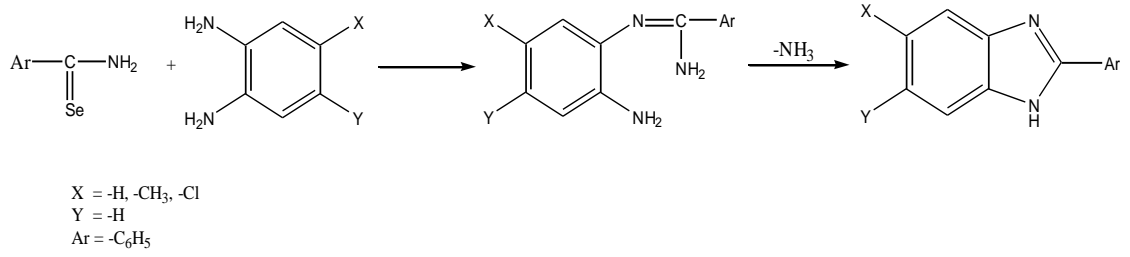
Mekanizması;



1965 yılında Ridley ve ark. (83) yaptıkları bir çalışma ile 2-aril benzimidazollerin aldehytlerin sodyum bisülfid katım ürününün o-fenilendiamin ile sıcak etanol içinde reaksiyonu ile hazırladıklarını bildirmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 30).

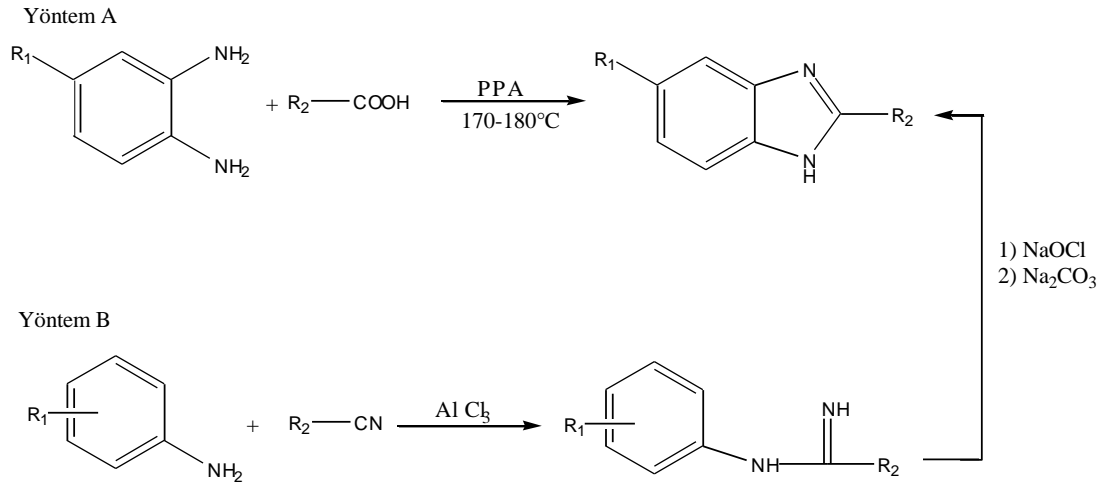


Reaksiyon Denklemi 30



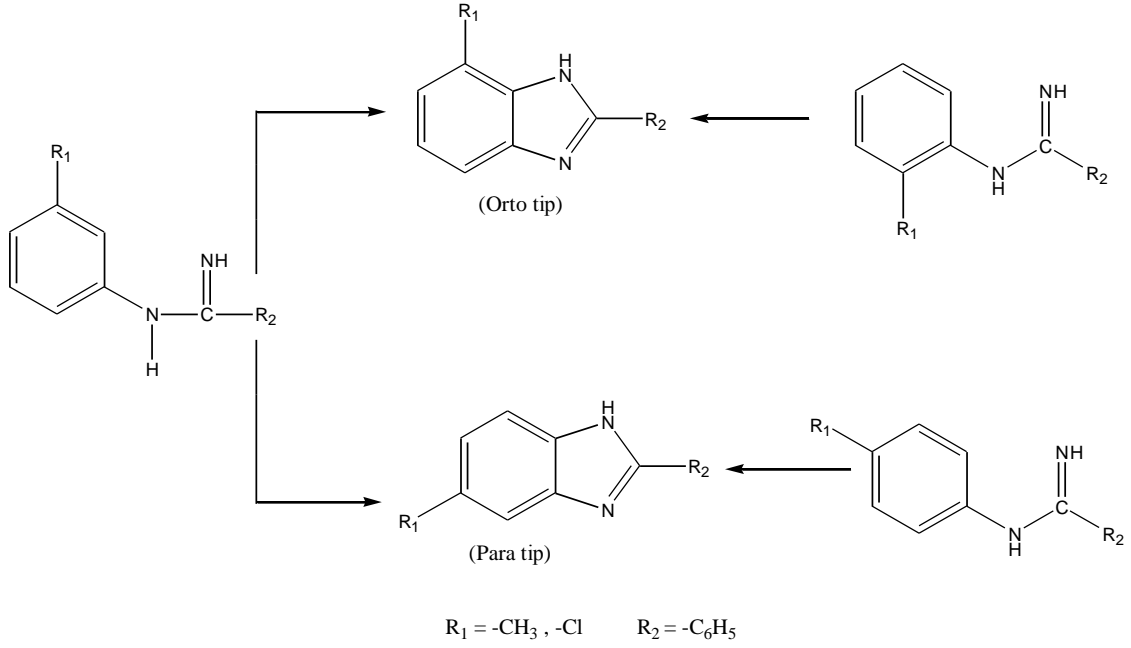
Reaksiyon Denklemi 33

Ichikawa ve ark. (91) 1979 yılında yayınladıkları bir çalışmada, bazı 2-arilbenzimidazol ve onların 5-sübstitüe türevlerini aşağıdaki şemada görülen iki farklı yöntemle sentezlemiştir (Reaksiyon Denklemi 34).



Reaksiyon Denklemi 34

Araştırmacılar N⁷-(m-sübstitüefenil)arilamidlerin halka kapama reaksiyonu ile elde ettikleri benzimidazollerin aşağıdaki denklemlerde görüldüğü gibi, orto ve para tipi izomerlerin bir karışımı olduğunu ve bu izomerlerin fraksiyonlu rekristalizasyon ile ayırdıklarını bildirmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 35).



Reaksiyon Denklemi 35

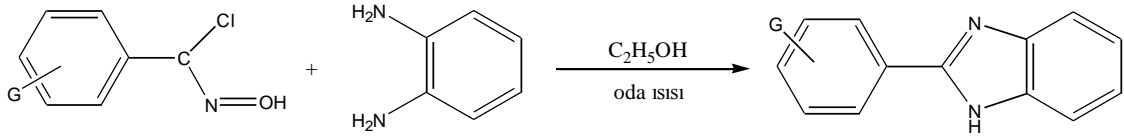
Ancak 2 numaralı konumda fenil halkası taşıyan ve 5/7-metil-sübstitübenzimidazollerin fraksiyonlu rekristalizasyon yöntemi ile ayrılmasının güç olduğu, bu nedenle bu izomerlerin kolon kromatografisi ile ayrıldığı bildirilmiştir.

PPA kullanımının reaksiyon ve reaksiyon sonucu elde edilen ürünlerin temizlenmesi için gerekli olan süreyi azalttığı ve verimi %20 civarında arttırdığı kaydedilmiştir.

1984 yılında Noyanalpan ve Işıkdag (52), 2-sübstitüe benzimidazol türevlerinin sentezlerinde değişik reaksiyon ajanları kullanarak birbirleri ile karşılaştırmışlardır. 2-Fenilbenzimidazol'ün sentezinde *o*-fenilendiamin ve benzoik asitin PPA, PPE, 4 N hidroklorik asit içerisinde reaksiyonları ayrı ayrı denenmiş, PPA içerisinde 170-180°C'de 3 saat içinde %90 verimle madde elde edilirken, PPE içerisinde 120°C'de 40 dakikada %58 verimle madde elde edilmiştir. 4 N hidroklorik asit çözeltisi ile kondensasyonlarının, çözünme güçlükleri, halka açılması veya karbonizasyon gibi nedenlerden dolayı mümkün olmadığı bildirilmiştir.

1986 yılında Gümüş ve ark. (64) bazı 2',4',5-trisübstitüe-2-fenilbenzimidazol türevlerinin 4-sübstitüe *o*-fenilendiamin ve uygun sübstitüe-benzoik asitin PPA varlığında kondenzasyonu ile elde etmişlerdir.

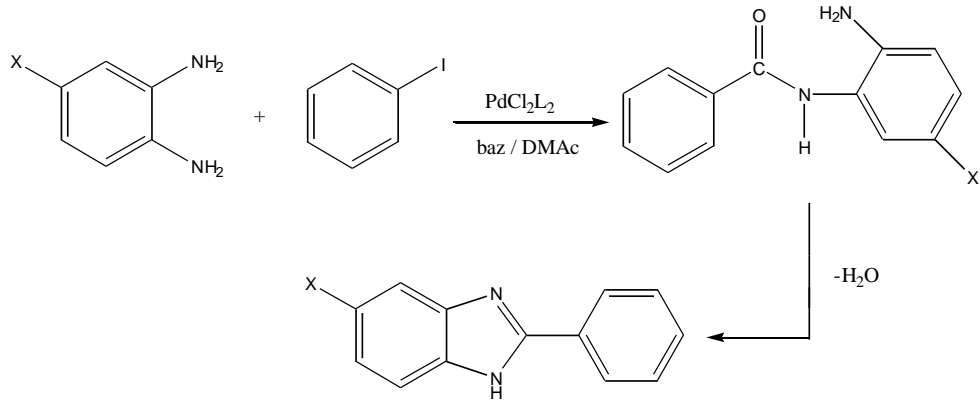
1988 yılında Abdelhamid ve ark. (92) tarafından yayınlanan bir çalışmada süstitüe hidroksimoil klorürler ile bazı o-süstitüe aromatik aminlerden hareketle 2 numaralı konumdan aril grupları ile süstitüe edilmiş benzimidazol, benzoksazol ve benzotiyazol yapısındaki bileşiklerin sentez edildiği bildirilmiştir (Reaksiyon Denklemi 36).



Reaksiyon Denklemi 36

Bu metodun uygulanması ile o-süstitüe aromatik aminlerin asit klorürleriyle kondenzasyonu ile yürütülen reaksiyonlardan daha yumuşak şartlarda ve daha yüksek verimle ürün elde edildiği bildirilmiştir.

1993 yılında Perry ve Wilson (93), 2-fenilbenzimidazol türevlerini 4-süstitüe-o-fenilendiamin ile iyoda benzeni $PdCl_2L_2$ (L=trifenilfosfin) katalizörlüğünde kuvvetli bir baz ve DMAc (N,N-dimetilasetamid) içerisinde elde etmişlerdir (Reaksiyon Denklemi 37).



Reaksiyon Denklemi 37

Pamuk'a (94) ait 1997 yılında tamamlanan yüksek lisans tez çalışmasında, 2-fenil ve 5(6)-metil-2-fenilbenzimidazol türevlerinin, o-fenilendiamin ile benzoik asitin polifosforik asit içinde, yağ banyosu üzerinde, geri çeviren soğutucu altında ısıtılması ile %83 ve %72 verimle elde edildiği bildirilmiştir.

2.2.6 Hiyaluronidaz Enzimi Doğal Ve Sentetik İnhibitörleri Etkili Bileşikler Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Anjiyojenez’de HA türevlerinin endotel hücrelerinin yapısında ve taşınmalarında anahtar rol oynadığı çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu durum anjiyojenez inhibitörleri üzerindeki çalışmaların yakın gelecekte yoğunlaşacağını göstermektedir.

Sağlıklı hücrelerde ekstraselüler matriks son derece yavaş yapısal değişikliğe uğrarken, tümör hücrelerinde ekstraselüler matriks çok hızlı değişmektedir. Ekstraselüler matriksin yapısı uzun zincirli polimerlerden, mukopolisakkaritlerden, glikozaminoglikanlardan ve proteoglikanlardan oluştuğu üç boyutlu çalışmalarda belirlenmiştir. Hücrelerde yer alan en yaygın glikozaminoglikanlar, HA, kontroitin ve kontroitin sülfatır. Tümör hücrelerinde ekstraselüler matriks proteinlerini parçalayan bazı enzimlerin bulunduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Özellikle matriks metalloproteinlerinin üzerinde çok yoğun çalışmalar yapılmakla birlikte, matriksi parçalayan enzimler ve proteoglikanlar üzerinde ise çok az çalışmaya rastlanmaktadır (1,2).

Hiyaluronan ve HA ekstraselüler matrikste yer alan N-asetil-D-glukozamin ve D-glükronik asit disakaritlerinden oluşan uzun zincirli polimer yapısındadır (95). HA’in yeni kan damarlarını oluşmasını modüle ettiği kesin olarak kanıtlanmıştır. Örneğin, hayvan deneylerinde yapılan çalışmalarda, hücrelerde yer alan HA ve türevlerinin inhibisyonu sonucu yara iyileşmelerinin azaldığı gösterilmiştir (96). Ayrıca, HA’nın endotel hücre çoğalması ve göçünde yani anjiyojeneziste önemli rol oynadığı bildirilmektedir (96,97). Bu nedenle HA’in normal hücrelerin yapısının korunmasında çok önemli rolü olduğu görülmektedir.

Hiyaluronidaz enzimleri β -1-4-endoglukozamidaz enzim ailesinden olan ekstraselüler matriks degradasyon enzimlerindedir. Hiyaluronidaz enzimi HA küçük moleküllü ağırlıklı sakkaritlere özel reaksiyon mekanizmaları ile parçalamaktadır (3). Hiyaluronidaz enzimi, ilk kez 1928 yılında insan ve hayvan testiküler ekstraktlarında viral ajanların yayılmasını arttırıcı ajan olarak tespit edilmiştir (4). Daha sonraki yıllarda hiyaluronan enzimi olarak tanımlanmış ve hiyaluronidaz enzimi olarak isimlendirilmiştir (98). 1947 yılında Fishman ve ark. (99) testislerde bulunan bu enzim ile tümör hücrelerinde aynı enzimin bulunduğunu göstermişlerdir. Daha sonra nekrotik

tümörlerde hiyaluronidaz aktivitesinin normal hücrelere göre çok daha yüksek oldukları bulunmuştur (100,101). Ek olarak, metastatik meme ve prostat kanseri hücrelerinde hiyaluronidaz enzimi ve *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) protein miktarlarının yüksek olduğu görülmüştür (102-106). TGF-β proteinleri, embriyojenezis, ekstraselüler matriks protein sentezi, hücre çoğalması ve ölümü, immün hücrelerinin fonksiyonlarının yenilenmesi gibi çok sayıdaki biyolojik olaylarla ilişkilidir (107-109). TGF-β1, *tumor necrosis factor* (TNF) aracılıklı hücre ölümlerinde, prostat LNCaP ve L929 fibroblastlarda ölümlere karşı koruyucu olduğu bilinmektedir. Testicular hiyaluronidaz enzimi bu hücrelerdeki TNF hassasiyetini artırırken, TNF karşı TGF-β1 fonksiyonunu azaltmaktadır (110). Hiyaluronidaz enzimi akciğer epitel Mv1Lu hücrelerinde TGF-β1 aracılıklı büyüme fonksiyonunu bloke ettiği belirlenmiştir (111). Sonuç olarak, hiyaluronidaz enzimi TGF-β1 fizyolojik olarak inhibitörü olduğu söylenebilir.

Normal fibroblastlarda ve kanser hücrelerinin çoğunda HA, hiyaluronidaz enzimi gibi salınmaktadır (112-117). Hiyaluronidaz enzimi, HA'nın hücre yüzeyine bağlanması için gerekli olan ve kanserli hücrelerinin metastazında da yer alan CD44 proteinini modüle etmektedir (118-119). Hiyaluronidaz enzimi, endometriyum, ovaryum, meme kanserlerinin metastazını artırırken, prostat kanserinin ilerlemesini sağlar ve tümör hücrelerinde *in vivo* anjiyojenezi desteklediği bildirilmektedir (5,103,120-123).

Liu ve ark. (5) yaptıkları çalışmada, hiyaluronidaz⁺ tumor hücrelerinde anjiyojenez meydana gelirken, hiyaluronidaz⁻ olan hücrelerde ise anjiyojenez gerçekleşmediğini bildirmektedirler. Hiyaluronidaz⁺ tümör hücrelerinde anjiyojenez hiyaluronidaz inhibitörleri ile engellenmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında, kanser tedavisinde ve teşhisinde hiyaluronidaz enziminin varlığının göz önünde tutulması gerektiğini fikri ileri sürülebilir.

Sonuç olarak, anjiyojenezis ile hiyaluronidaz inhibitörleri kanser tedavisi için yeni terapötik ajanlar olarak kullanılması mümkün görünmektedir.

TNP-470, Marimastat, SU5416 gibi doğal ve sentetik bileşikler antihyaluronidaz veya anjiyojenez inhibitör aktiviteye sahip oldukları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (124-126) (Tablo 1).

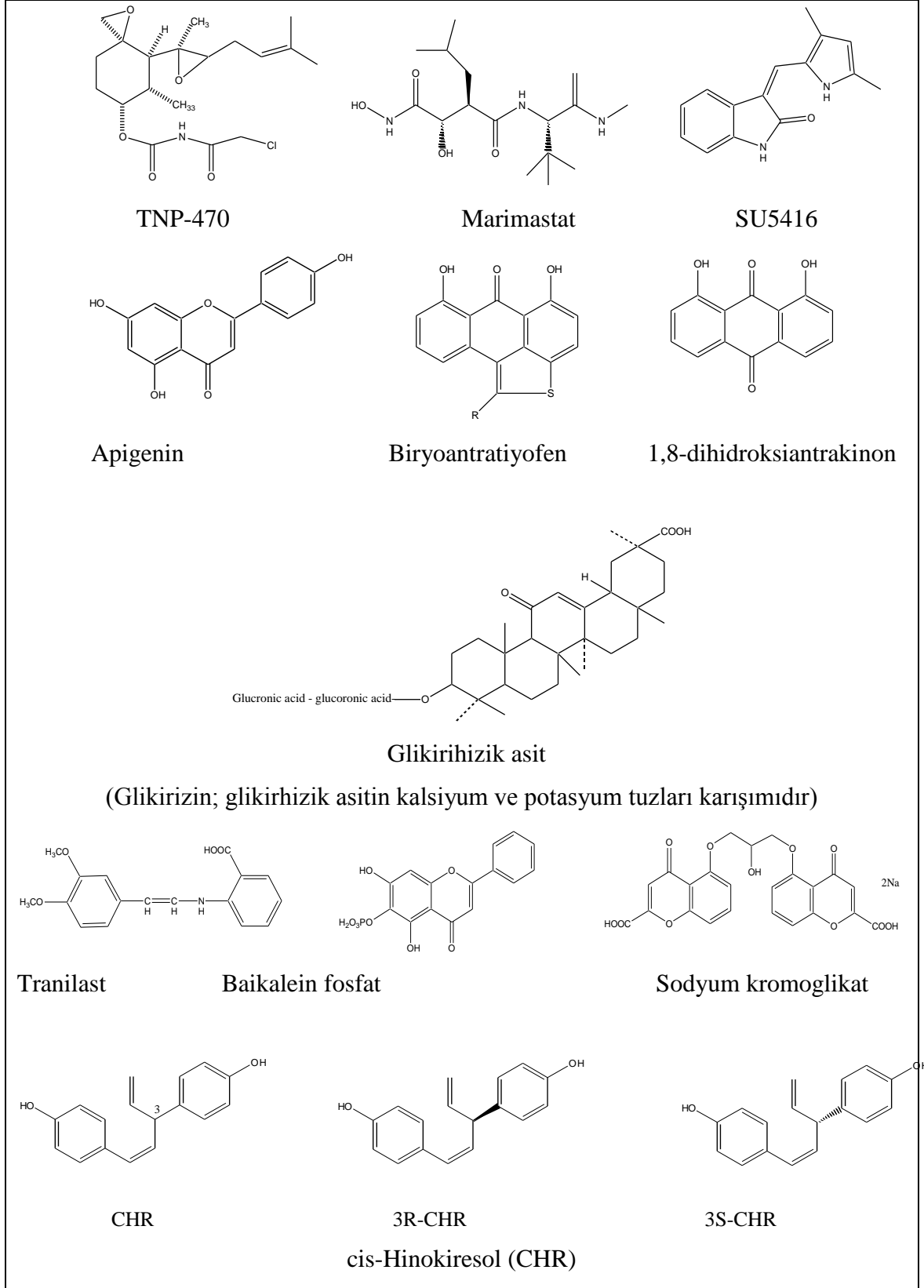
Apigenin, hiyaluronidaz inhibitörü doğal kaynaklı ve anjiyojenez inhibitörü olduğu literatürde bildirilmiştir (127,128). Ayrıca polisakkaritler; aljinik asit (129),

pektin (130), glukozaminoglikanlar (131), flavonoidler (132), glikirhizin (133), saponinler (134), hiyaluronidaz enzimini inhibe ettiği bildirilmektedir.

Ayrıca, antialerjik bileşik olan tranilast (135), traxonox (133), baikalein fosfat (133) ve sodyum kromoglikat, kortizon ve dezoksikortikosteron asetat (136), kortikotropin (137), kikorik asit (138), dekstran sülfat (139) gibi bileşiklerin de antihiyaluronidaz aktivite sahip olduğu literatürde kayıtlıdır.

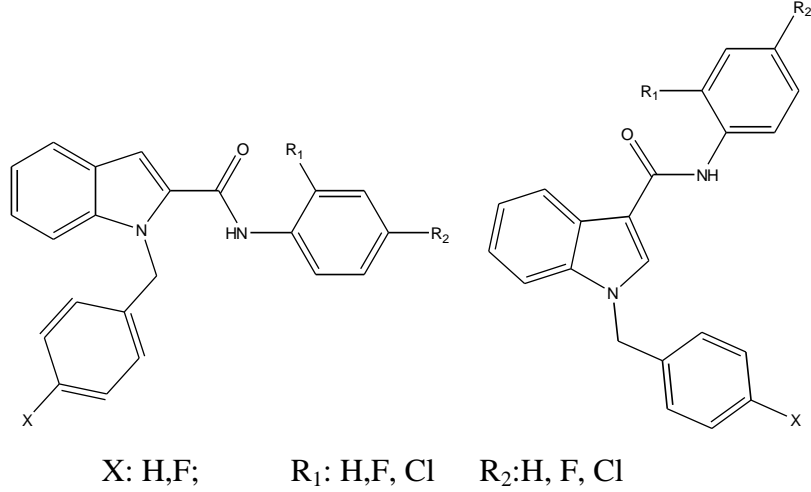
Diczfalusy ve ark. (140) polidietilstilbesterol fosfat ve polimerik fosfatlardan olan dinesterol, hegzasterol ve benzasterolün de etkili hiyaluronidaz inhibitörü olduklarını bildirmişlerdir.

Jeong ve ark. (6) biryoantratiyofen, 5,7-dihidroksi-1-metoksikarbonil-6-okso-6*H*-antra[1,9-bc]tiyofen ve 1,8-dihidroksiantrakinon doğal bileşiklerin anjiyenez inhibitörü aktiviteye sahip olduklarını ve bu bileşiklerden biryoantratiyofen bileşiğinin *Bovin aortic Endothelial Cell* (BAEC) kanser hücrelerinde en önemli antianjiyogenik etkinliğe sahip olduğu bildirilmektedir. Aynı araştırmacı grubunun yaptığı diğer bir çalışmada CHR (cis-Hinokiresinol)'ün hiyaluronidaz inhibitörü aktiviteye sahip olduğu belirlemişlerdir (127).



Tablo 1: Hiyalüronidaz enzimin bazı doğal ve sentetik inhibitörleri

Ölgen ve ark. (141) tarafından yayınlanan bir çalışmada, indol-2- ve indol-3-karboksamit türevlerinin antihyaluronidaz aktiviteleri araştırılmış ve indol azotuna bağlı p-fluoro veya klorobenzil grubu taşıyan bileşiklerin en aktif bileşikler olduğu bildirilmiştir.



Şema 1: Hyaluronidaz enzim inhibitörü etkileri belirlenen N-sübstitüe indol-2- ve indol-3-karboksamit türevleri

2007 yılında grubumuz tarafından, 2-sübstitüe benzimidazol türevi bir grup bileşiğin in vitro antihyaluronidaz aktivitesi araştırılmıştır. Yine grubumuz tarafından yapılan bir diğer çalışmada 2008 yılında yayınlamış olup, benzimidazol, benzotiyazol ve indol türevi bileşiklerin antihyaluronidaz aktiviteleri belirlenmiştir. Tüm bu bileşikler arasında di(1H-benzo[d]imidazol-2-il)metan yapısındaki benzimidazol türevi bileşiğin iki ayrı pH'da % 63 ve 67 inhibisyonla en aktif bileşik olduğu tespit edilmiştir (7,142).

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 1,2-fenilendiamin (Merck), 4-metilbenzen-1,2-diamin hidroklorür (Aldrich), 4-klorobenzen-1,2-diamin (Merck), formik asit (Merck), asetik asit (Merck), asetik asit anhidriti (Merck), propiyonik asit (Merck), glikolik asit (Merck), tiyoglikolik asit (Aldrich), glisin (Merck), benzoik asit (Merck), p-anisik asit (Aldrich), 4-fluorobenzoik asit (Aldrich), 3-aminobenzoik asit (Aldrich), polifosforik asit (Merck), HCl (Merck) kullanıldı.

Bileşiklerin ¹H NMR spektrumlarının alınmasında dimetilsulfoksit-d₆ (Merck), ince tabaka kromatografisi (İTK) çalışmalarında Kieselgel 60F₂₅₄ 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 Phillips Yöntemi Uygulanarak Elde Edilen 2-Alkilsüstitüe Benzimidazollerin Genel Sentez Yöntemi:

Her bileşik, 0.1 mol 1,2-fenilendiamin veya 4-metilbenzen-1,2-diamin hidroklorür tuzu ve 0.15 mol uygun karboksilik asitin 100 mL 4-5 N hidroklorik asit içinde su banyosu üzerinde, geri çeviren soğutucu altında 2-20 saat arasında değişen sürelerde magnetik karıştırıcılı ısıtıcı ile ısıtılmasıyla elde edildi. Reaksiyonun tamamlanması ince tabaka kromatografisi (İTK) ile izlendi. Hazır plaklar kullanılarak yapılan İTK çalışmalarında, lekelerin belirlenmesinde ultraviyole ışığı, metalik iyot ve

Dragendorff belirtecinden yararlanıldı. Reaksiyonun karışımı bir gece oda ısısında bekletildi. Bu sürenin sonunda çöken bileşik 4-(2-aminometilbenzimidazol) hidroklorik asit tuzu halinde elde edilirken, bu bileşiğin dışındaki bileşikler, reaksiyon karışımları buz banyosu içine alınarak potasyum bikarbonat ilavesi ile bazı halinde elde edildi. Oluşan çökelek süzüldü. Turnusol kağıdı nötr reaksiyon verinceye kadar her defasında az miktarda kullanılan buzlu su ile yıkandı ve açık havada kurutuldu. Daha sonra elde edilmek istenen bileşiğe göre seçilen uygun bir solvandan kristallendirildi. Oluşan kristal halindeki bileşik süzülerek alındı ve kalsiyum klorür üzerinde vakum desikatöründe kurutuldu.

3.1.2.2 Polifosforik Asit Kullanılarak Elde Edilen 2-Arilsüstitüe Benzimidazollerin Genel Sentez Yöntemi

Her bileşik, elde edilmek istenen bileşiğe göre seçilen 50 mmol 4-süstitüe-1,2-fenilendiamin ile 75 mmol benzoik asit veya türevleri, polifosforik asit içinde, yağ banyosu üzerinde, geri çeviren soğutucu altında ısıtılması ile elde edildi. Uygulanan ısı ve süresi her bileşiğe göre değiştirildi ve ısıtma süresince magnet ile karıştırıldı. Reaksiyonun tamamlanışı İTK ile izlendi. Hazır plaklar kullanılarak yapılan İTK çalışmalarında, lekelerin belirlenmesinde ultraviyole ışığı ve Dragendorff belirtecinde yararlanıldı. Reaksiyon karışımı buz banyosu içine alınarak, turnusol kâğıdına karşı alkali reaksiyon verinceye kadar katı potasyum bikarbonat ilave edildi. Oluşan çökelek süzüldü. Turnusol kağıdına karşı nötr reaksiyon verinceye kadar buzlu su ile yıkandı ve açık havada kurutuldu. Elde edilen bu çökelek etanol içinde çözüldü ve aktif kömür ile rengi giderildi. Vakumda kuruluğa kadar uçurulduktan sonra, her bileşiğe göre değişen bir çözücü de çözümlü soğukta kristallendirildi. Oluşan kristal halindeki bileşik süzülerek alındı ve kalsiyum klorür altında vakum desikatöründe kurutuldu.

3.2. Analitik Çalışmalar

3.2.1 Ergime Noktası Tayini

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

3.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi 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.

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 (cm^{-1}) cinsinden değerlendirildi.

3.2.4.2. ^1H NMR Spektrumları

Bileşiklerin ^1H NMR Spektrumları, dimetilsülfoksit- d_6 (Merck) içindeki çözeltileri ile Varian Mercury 400 FT-NMR spektrofotometrisinde alınıp kimyasal kayma değerleri δ skalasında değerlendirildi. Eşleşme sabitleri Hz olarak verildi.

3.3. BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

3.3.1. Metod

3.3.1.1. Morgan-Elson Testi

0.1 M sodyum format içeren bir tampon çözelti ve 0.1 M NaCl inkübasyon tamponu hazırlanarak ve pH'sı formik asit ile 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 hidroklorik asit içindeki 5 g dimetilamino benzaldehit (DMAB) 50 mL ye glasiyel asetik asit ile seyreltildi.

Stok çözelti olarak kullanılan 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 çözülüp seyreltilerek hazırlandı.

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

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

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

300 µL stain çözelti, stain yöntemine başlamak için her hücreye ilave edilerek ve 37°C de 20 dakika microplate 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 µL glasiyel asetik asit ve 1.3 mg bütillenmiş hidroksi toluen (BHT); 100 ml dioksan ve 100 ml su karışımı içinde çözülerek hazırlanan stok çözeltisi karanlıkta saklandı.

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

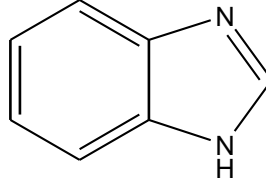
Absorpsiyon 650 nm de microplate reader (Mithras LB940, Berthold, Germany) ile izlendi.

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 hesaplanmadı.

4. BULGULAR

4.1. KİMYASAL BULGULAR

4.1.1. Benzimidazol (Bileşik No: 1)



10.80 g (0.1 mol) 1,2-fenilendiamin ve 6.90 g (0.15 mol) formik asitin 100 mL 4.5 N hidroklorik asit içinde 2 saat ısıtılarak, genel sentez yöntemine göre yürütülen reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, sudan kristallendirilerek 8.26 g saf bileşik elde edildi.

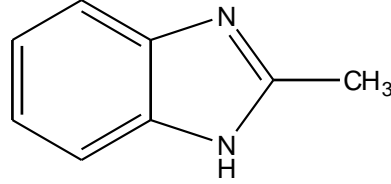
Verim : % 70

Erime Noktası: 170 °C (Lit: 170°C^{23,143})

IR spektrumu (cm⁻¹), 3300-2300 (N-H, aromatik = C-H gerilimleri), 1600 (C=N gerilim), 1600-1400 (aromatik C=C gerilimLeri, N-H eğilim plan dışı), 745 cm⁻¹ (benzen =C-H plan-dışı eğilim)

¹H NMR spektrumu (DMSO- d₆) δ ppm, 7.15-7.20 (2H, dd, J= 9.5 ve 3.2 Hz, H⁵, H⁶), 7.55-7.60 (2H, dd, J= 8.5 ve 3.2 Hz, H⁴, H⁷), 8.20 (1H,s, H²), 12.40 (1H, yayvan s, -NH)

4.1.2. 2-Metilbenzimidazol (Bileşik No: 2)



10.80 g (0.1 mol) 1.2 –fenilendiamin ve 15.30 g (0.15 mol) asetik asit anhidriti ve 2 mL asetik asit 50 mL 4.5 N hidroklorik asit içinde 3 saat ısıtılarak, genel sentez yöntemine göre yürütülen reaksiyon ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, etanolden kristallendirilerek 8.58 g saf bileşik elde edildi.

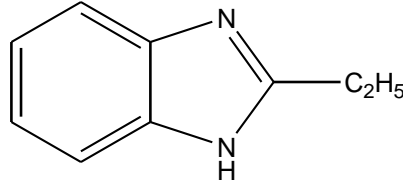
Verim : % 65

Erime Noktası: 175°C (Lit: 174-175 °C^{28,61})

IR spektrumu (cm⁻¹), 3300-2300 (N-H, aromatik = C-H, alifatik –C-H gerilimleri), 1610 (C=N gerilim) 1600-1300 (aromatik C=C gerilimLeri, N-H eğilim, alifatik –C-H eğilim), 740 cm⁻¹ (benzen =C-H plan-dışı eğilim)

¹H NMR spektrumu (DMSO- d₆) δ ppm, 2.45 (3H, s, CH₃), 7.10-7.14 (2H, dd, J= 9.2 ve 3.2 Hz, H⁵, H⁶), 7.40-7.45 (2H, dd, J= 9,0 ve 3,2 Hz, H⁴, H⁷), 12.20 (1H, yayvan s, -NH)

4.1.3 2-Etilbenzimidazol (Bileşik No: 3)



10.80 g (0.1 mol) 1,2-fenilendiamin ve 11.10g (0.15 mol) propiyonik asitin 80 mL 4 N hidroklorik asit içinde 3 saat ısıtılarak, genel sentez yöntemine göre yürütülen reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, etanol-sudan kristallendirilerek 11.30 g saf bileşik elde edildi.

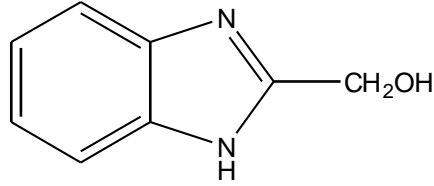
Verim : % 78

Erime Noktası: 168 °C (Lit: 172-173 °C^{28,144})

IR spektrumu (cm⁻¹), 3200-2300 (N-H, aromatik = C-H, alifatik -C-H gerilim), 1618 (C=N gerilim), 1600-1400 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim), 740 cm⁻¹ (benzen =C-H plan-dışı eğilim).

¹H NMR spektrumu (DMSO- d₆) δ ppm, 1.20-1.25 (3H, t, J= 7.61 Hz, CH₃), 2.70-2.75 (2H, q, J= 7.60 Hz, CH₂), 7.00-7.02 (2H, dd, J=9.4 ve 3.2 Hz, H⁵, H⁶), 7.38 (2H,m, H⁴,H⁷), 12.40 (1H, s, -NH).

4.1.4 2-Hidroksimetilbenzimidazol (Bileşik No: 4)



10.80 g (0.1 mol) 1,2-fenilendiamin ve 7.60 g (0.1 mol) glikolik asitin 80 mL 5N hidroklorik asit çözeltisi içinde, 2 saat ısıtılarak, genel sentez yöntemine göre yürütülen reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, etanol kristallendirilerek 5.92 g saf bileşik elde edildi.

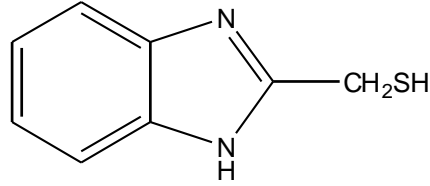
Verim : % 40

Erime Noktası: 169-171 °C (Lit: 171-172 °C^{145,146}, 170-171 °C¹⁴⁷)

IR spektrumu (cm⁻¹), 3600-2300 (N-H, O-H gerilimleri), 3050-3020 (=C-H gerilim, aromatik =C-H gerilim), 2910 (alifatik -C-H gerilim), 1615 (C=N gerilim), 1600-1500 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim), 742 cm⁻¹ (benzen =C-H plan-dışı eğilim).

¹H NMR spektrumu (DMSO- d₆) δ ppm, 4.68 (2H, s, -CH₂OH), 5.53 (1H, yayvan s, -OH), 7.07-7.16 (2H, m, H⁵, H⁶), 7.45-7.47 (2H, d, H⁴, H⁷), 12.10 (1H, s, -NH).

4.1.5 2-Merkaptometilbenzimidazol (Bileşik No: 5)



6.54 g (0.06 mol) 1,2-fenilendiamin ve 5.89 g (0.064 mol) tiyoglikolik asitin 80 mL 5N hidroklorik asit içinde 3 saat ısıtılarak, genel sentez yöntemine göre yürütülen reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, etanolden kristallendirilerek 5.05 g saf bileşik elde edildi.

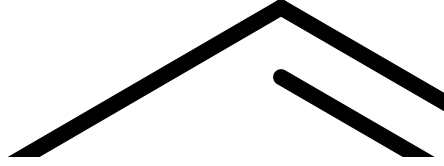
Verim : % 51

Erime Noktası: 163°C (Lit: 158°C¹⁴⁸)

IR spektrumunda (cm⁻¹), 3600-2300 (N-H, aromatik = C-H, alifatik -C-H gerilimleri), 2530-2580 (S-H gerilim), 1619 (C=N gerilim), 1600-1400 (aromatik C=C gerilimLeri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim).

¹H NMR spektrumu (DMSO- d₆) δ ppm, 4.10-4.40 (2H, s, CH₂SH), 7.10-7.20 (2H, m, H⁵, H⁶), 7.50 (2H, m, H⁴, H⁷), 12.60 (1H, yayvan s, -NH).

4.1.6 2-Aminometilbenzimidazol (Bileşik No: 6)



10.80 g (0.1 mol) 1,2-fenilendiamin ve 11.25g (0.15 mol) glisinin 50 mL 5N hidroklorik asit içinde 30 saat ısıtılması sonucu oluşan tuz halindeki madde bu sürenin sonunda reaksiyon ortamından süzülerek ayrıldı. Elde edilen ham ürün, etanol rekristallendirilerek 17.60 g saf bileşik elde edildi.

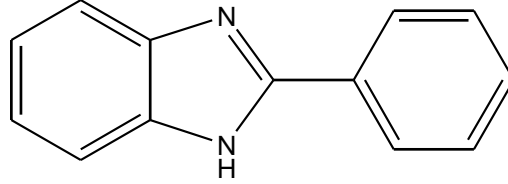
Verim : % 85

Erime Noktası: 255 °C (dekompoze), (Lit: 253°C¹⁴⁹(dekompoze))

IR spektrumu (cm⁻¹), 3600-2200 (N-H gerilim, aromatik = C-H gerilim, alifatik -C-H gerilim), 1615 (C=N gerilim), 1600-1400 (aromatik C=C gerilimLeri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim), 755 cm⁻¹ (benzen =C-H plan-dışı eğilim).

¹H NMR spektrumu (D₂O) δ ppm, 4.50 (2H, s, CH₂), 7.40-7.42 (2H, dd, J=6.1 ve 3.1 Hz, H⁵, H⁶), 7.70-7.80 (2H, dd, J=9.3 ve 3.2 Hz, H⁴, H⁷), 9.25 (3H, s, NH₃⁺).

4.1.7 2-Fenilbenzimidazol (Bileşik No: 7)



6.54 g (0.06 mol) 1,2-fenilendiamin ve 7.81 g (0.064 mol) benzoik asitin 40 g PPA içinde genel sentez yöntemine göre yürütülen reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, benzen kristallendirilerek, 9.10 g saf bileşik elde edildi.

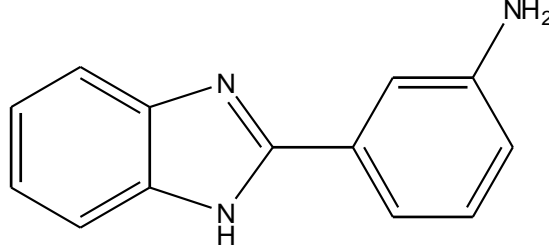
Verim : % 78

Erime Noktası: 293°C (Lit: 278-301°C⁹³)

IR spektrumunda(cm^{-1}), 3600-2300 (N-H, aromatik =C-H gerilim), 1614 (C=N gerilim), 1600-1400 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim).

¹H NMR spektrumunda (DMSO- d_6) δ ppm, 7.19-7.22 (2H, d, H⁵, H⁶), 7.49-7.60 (5H, m, 2. konumdaki fenil halkası protonları), 8.10-8.20 (2H, d, H⁴, H⁷), 12.89 (1H, yayvan s, -NH).

4.1.8 2-(3-aminofenil)-1H-benzimidazol (Bileşik No: 8)



10.80 g (0.1 mol) 1,2-fenilendiamin ve 20.55g (0.15 mol) 3-aminobenzoik asit 40 g PPA içinde genel sentez yöntemine göre yürütülen reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, metanolden kristallendirilerek 7.30 g saf bileşik elde edildi.

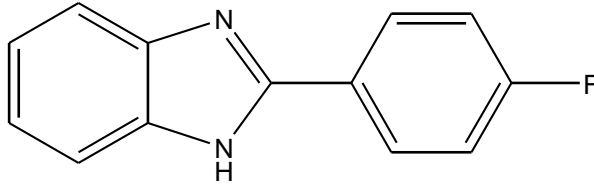
Verim : % 35

Erime Noktası: 255 °C , (Lit: 255°C⁷)

IR spektrumu (cm⁻¹), 3280-2600 (N-H gerilim, aromatik = C-H gerilim, alifatik -C-H gerilim), 1625 (C=N gerilim), 1620-1580 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim) bantları görüldü.

¹H NMR spektrumu (DMSO-d₆) δ ppm, 7.15-7.13 (2H, m), 7.19-7.16 (2H, m), 7.25-7.27 (1H, m), 7.42 (1H, m), 7.58-7.56 (2H, m), 12.95 (1H, yayvan s) pikleri görüldü.

4.1.9 2-(4-Fluorofenil)benzimidazol (Bileşik No: 9)



6.48 g (0.06 mol) 1,2-fenilendiamin ve 8.96 g (0.064 mol) 4-Fluorobenzoik asitin 40 g PPA içinde genel sentez yöntemine göre yürütülen reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, etanolden kristallendirilerek 11.06 g saf bileşik elde edildi.

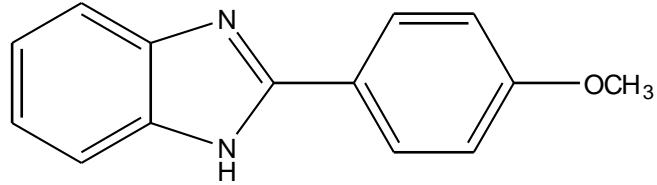
Verim : % 87

Erime Noktası: 250°C (Lit. 247-248°C¹⁵⁰)

IR spektrumunda(cm^{-1}), 3600-2300 (N-H, aromatik =C-H gerilim), 1622 (C=N gerilim), 1600-1400 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim).

¹H NMR spektrumunda (DMSO- d_6) δ ppm, 7.13-7.28 (m, 2H), 7.30-7.72 (m, 4H), 8.13-8.32 (m, 2H), 12.91 (yayvan, s, 1H).

4.1.10 2-(4-Metoksifenil)benzimidazol (Bileşik No: 10)



6.48 g (0.06 mol) 1,2-fenilendiamin ve 9.72 g (0.064 mol) 4-metoksibenzoik asitin 40 g PPA içinde genel sentez yöntemine göre yürütülen reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, metanolden kristallendirilerek 9.95 g saf bileşik elde edildi.

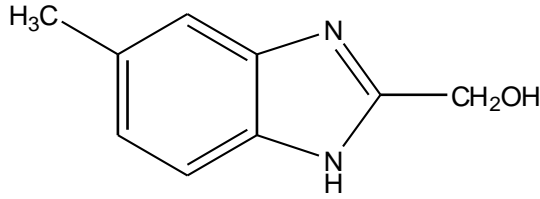
Verim : % 74

Erime Noktası: 225 °C (Lit. 224-226 °C¹⁵⁰⁻¹⁵²)

IR spektrumunda (cm^{-1}), 3600-2300 (N-H, aromatik =C-H gerilim), 1625 (C=N gerilim), 1600-1400 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim).

¹H NMR spektrumunda (DMSO- d_6) δ ppm, 3.84 (s, 3H), 7.24 (m, 4H), 7.48 (d, 1H), 7.74 (d, 1H), 8.28 (d, 2H), 12.88 (yayvan, s, 1H).

4.1.11 5(6)-Metil-2-hidroksimetilbenzimidazol (Bileşik No: 11)



12.20 g (0.1 mol) 4-metil-1,2-fenilendiamin hidroklorürü ve 7.60 g (0.1 mol) glikolik asitin 80 mL 5N hidroklorik asit çözeltisi içinde, 2 saat ısıtılarak, genel sentez yöntemine göre yürütülen reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, etanol kristallendirilerek 6.48 g saf bileşik elde edildi.

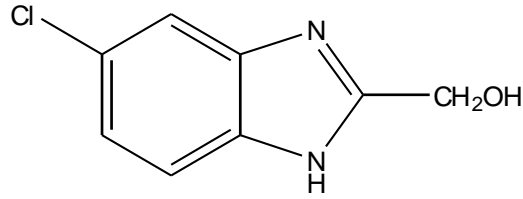
Verim : % 40

Erime Noktası: 198°C (Lit: 202-203°C^{153,154})

IR spektrumunda (cm⁻¹), 3600-2200 (N-H, O-H gerilimleri), 3050 (aromatik =C-H gerilim), 2910 (alifatik -C-H gerilim), 1612 (C=N gerilim), 1600-1500 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim), 760-750 cm⁻¹ (benzen =C-H plan-dışı eğilim) bantları görülür.

¹H NMR spektrumunda (DMSO- d₆) δ ppm, 2.38 (3H, s, -CH₃), 4.64 (2H, s, -CH₂OH), 6.91-6.95 (1H, d, H⁶), 7.21-7.41 (2H, m, H⁴, H⁷) pikleri görüldü.

4.1.12 5(6)-Kloro-2-hidroksimetilbenzimidazol (Bileşik No: 12)



14.25 g (0.1 mol) 4-kloro-1,2-fenilendiamin ve 7.60 g (0.1 mol) glikolik asitin 80 mL 5N Hidroklorik asit çözeltisi içinde, 2 saat ısıtılarak, genel sentez yöntemine göre yürütülen reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, etanol kristallendirilerek 7.30 g saf bileşik elde edildi.

Verim : % 40

Erime Noktası: 208°C (Lit: 210°C¹⁵⁵)

IR spektrumunda (cm⁻¹), 3600-2300 (N-H, O-H gerilimleri), 3050 (aromatik =C-H gerilim), 2915 (alifatik -C-H gerilim), 1618 (C=N gerilim), 1600-1500 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim), 750 cm⁻¹ (benzen =C-H plan-dışı eğilim).

¹H NMR spektrumunda (DMSO- d₆) δ ppm, 4.68 (2H, s, -CH₂OH), 5.61 (1H, s, -OH), 7.16-7.25 (1H, dd, H⁶), 7.35-7.70 (2H, m, H⁴, H⁷), 12.37 (1H,s, -NH).

4.2. BİYOLOJİK BULGULAR

Bu çalışmada benzimidazol halkasının 2 numaralı konumunda alkil veya aromatik gruplar taşıyan 12 adet benzimidazol türevi bileşik hiyaluronidaz enzim inhibitör etkileri karşılaştırılmak amacıyla sentezlenmiştir. Sentezlenen benzimidazol 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 Tablo 2’de verilmektedir.

Table 2: Sentezlenen Bileşiklerin Hiyaluronidaz İnhibitör Etkileri

Bileşik No	% inibisyon (100 µM)		IC ₅₀ [µM]	
	Stains- all Testi pH7	Morgan- Elson Testi pH 3.5	Stains- all Testi pH7	Morgan- Elson Testi pH3.5
1	1	0	n.d	n.d
2	35	0	n.d	n.d
3	35	0	n.d	n.d
4	34	0	n.d	n.d
5	33	0	n.d	n.d
6	0	0	n.d	n.d
7	6	0	n.d	n.d
8	40	0	n.d	n.d
9	2	0	n.d	n.d
10	3	0	n.d	n.d
11	31	0	n.d	n.d
12	25	0	n.d	n.d

Askorbik asit
Palmitat

99%

99%

18

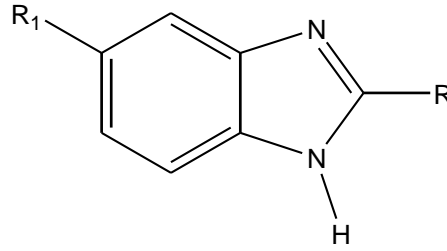
8

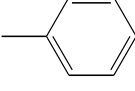
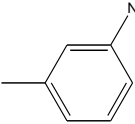
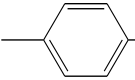
n.d: test edilmedi.

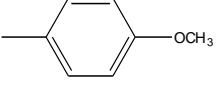
5. TARTIŞMA

Bu çalışmada 2 numaralı konumlarında hidrojen atomu, metil, etil, hidroksimetil, merkaptometil, aminometil, fenil, 3-aminofenil, 4-fluorofenil, 4-metoksifenil ile 2 numaralı konumlarında hidroksimetil grubuyla birlikte 5(6) konumlarında metil ve klor taşıyan benzimidazol türevi bileşikler olmak üzere 12 adet bileşik sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin formülleri Tablo 3’de verilmiştir.

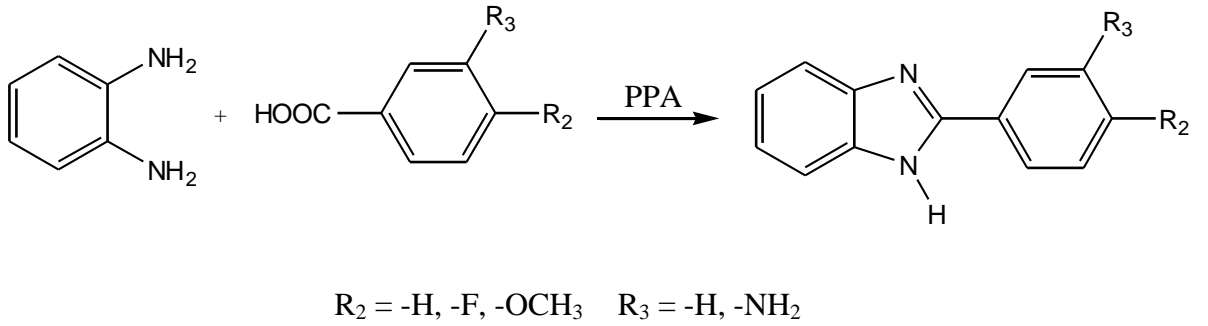
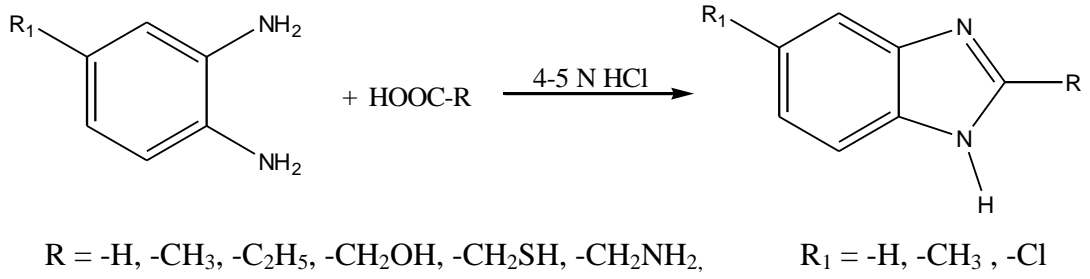
Tablo 3: Sentezlenen Bileşiklerin Formülleri



Bileşik No	R	R1
1	-H	-H
2	-CH ₃	-H
3	-C ₂ H ₅	-H
4	-CH ₂ OH	-H
5	-CH ₂ SH	-H
6	-CH ₂ NH ₂	-H
7		-H
8		-H
9		-H

10		-H
11	-CH ₂ OH	-CH ₃
12	-CH ₂ OH	-Cl

Sentezi yapılan bileşikler daha önce bazı araştırmacılar tarafından sentezlenmiş, literatürde kayıtlı bileşiklerdir. Bileşik 1-6 ile Bileşik 11-12'nin sentezleri, 2-alkilsüstitüe benzimidazol türevlerinin eldesi için kolaylığı, sentez veriminin yüksek oluşu gibi nedenler ile çok kullanılan bir yöntem olan Phillips Yöntemi uygulanarak yapılmıştır¹⁵⁻¹⁸. Bileşik 7-10'un eldesi için ise 2-arilsüstitüebenzimidazol türevlerinin sentezi için uygun olduğu literatürde bildirilen yöntemine göre 1,2-fenilendiamin ve benzoik asit ve uygun türevlerinin PPA içinde ısıtılması ile elde edilmiştir (54). Şema (2)'de bu çalışmada sentezlenen bileşiklerin sentez şeması verilmektedir.



Şema 2: Bileşiklerin Sentez Şeması

Sentezlenen bileşiklerin erime dereceleri, IR ve ¹H-NMR spektrumları literatür verileri ile uygunluk göstermektedir. Bu nedenle bileşiklerin elementel analiz sonuçlarının alınmasına gerek duyulmamıştır.

Bileşiklerin IR spektrumları FT-IR spektrofotometresi ile ATR yardımıyla toz veya kristal örnek üzerinde alınmıştır. Bileşiklere ait spektrumların 3500-2300 cm^{-1} bölgesinde kuvvetli, yayvan multipllet absorpsiyon bandları görülmektedir. Bu bölgede bileşiklerin 2 numaralı konumlarındaki süstitütüente bağlı olarak O-H gerilim, N-H gerilim, aromatik $=\text{C}-\text{H}$ 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 $-\text{CH}_2$ grubu taşıyan bileşikler için, C-H eğilim bandları görülmektedir.

Elde edilen bileşiklerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları DMSO- d_6 içinde alınmıştır. İmidazol halkasına ait N-H protonu spektrumları δ 9.10 ila 12.50 ppm arasında yayvan bir single halinde görülmektedir. Benzimidazolün imidazol halkası üzerindeki proton $\text{N}^1-\text{C}-\text{N}^3$ boyunca eşit olarak delokalize olmaktadır. Bu protonun “piridin azotu” ile “pirol azotu” arasındaki değişimi çok hızlı olduğu için NMR spektrumunda N-H protonuna ait sinyal oda ısısında yayvan singlet halinde görülmektedir (156).

Benzimidazol halkasının aromatik protonlarına ait pikler imidazol hidrojeninin iki azot atomu arasında hızlı değişimi nedeni ile multiplletler halinde 6.91-8.32 ppm aralığında görülmektedir (156).

Çözücü olarak kullanılan DMSO- d_6 içinde H_2O 'ya ait δ 3.34 ppm civarında ve kullanılan DMSO- d_6 'nın en iyi şartlarda % 99.9 oranında döteryum içermesi nedeni ile $\text{CD}_3\text{SOD}_2\text{H}$ 'a ait δ 2.50 ppm'de gözlenen pikler tüm spektrumlarda vardır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada sentezlenen 12 adet benzimidazol türevi bileşiklerin *in vitro* antihiyaluronidaz aktivite çalışmalarında başlıca üç konunun araştırılması amaçlanmıştır.

1. Sentezlenen bileşiklerin *in vitro* antihiyaluronidaz etkiye sahip olup olmadıklarının belirlenmesi
2. Benzimidazol halkasının 2 numaralı konumunda yer alan alifatik ve aromatik grupların aktivite üzerindeki rolünün araştırılması
3. Benzimidazol halkasının 2 numaralı konumundaki fenil grubu üzerindeki süstitütentler ile benzimidazol halkasındaki 5(6) konumlarındaki süstitütentlerin aktivite üzerindeki rolünün araştırılması.

Bu amaçla sentezlenen 12 adet benzimidazol 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 mM konsantrasyonda % inhibisyon değerleri incelendiğinde, Bileşik 2-5, 8, 11,12 pH 7’de %25-40 arasında olduğu görülmektedir.

Benzimidazol halkasının 2 numaralı konumunda herhangi bir süstitüsüonu aktivitenin artmasına neden olmaktadır. 2 numaralı konumda süstitüent taşıyan türevlerin (2-5,7-12) hidrojen taşıyan türevden (1) daha aktif olduğu görülmektedir.

Benzimidazol halkasının 2 numaralı konumlarında alifatik süstitüsyon taşıyan türevlerin aktiviteleri arasında belirgin bir fark bulunmamaktadır.

Benzimidazol halkasının 2 numaralı konumunda aromatik süstitüsyonun aktivite sonuçlarında değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Fenil halkasının nonsüstitüe ve para süstitüe durumlarında aktivite çok yüksek olmadığı halde, meta süstitüe durumda aktivite yükselmektedir. Ancak bu aktivite artışının $-NH_2$

sübstitüentine mi bağlı olduğu ya da meta pozisyonundan mı kaynaklandığını sadece bu çalışmanın sonuçlarına dayalı olarak yorumlamak mümkün görünmemektedir.

Benzimidazol halkasının 5(6) konumlarında CH₃ veya Cl sübstitüsyonu aktivitede önemli bir değişiklik meydana getirmediği, ancak her iki sübstitüentten Cl sübstitüsyonunda aktivitenin daha düşük olduğu görülmektedir. Dolayısıyla 5(6) konumlardaki sübstitüsyonun aktiviteye bir katkısının olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Ancak farklı sübstitüsyonlarında sentezlenerek aktivitelerinin belirlenmesi bu konumun aktiviteye katkısının olup olmadığının net olarak belirlenmesini sağlayacaktır.

Bu çalışmada sentezlenen 2-(3-aminofenil)benzimidazol (Bileşik No:8) bileşiğinin en yüksek antihyaluronidaz etkiye sahip bileşik olduğu belirlenmiştir. Bileşik 1,9 ve 10 aktivite göstermemektedirler. Ancak antihyaluronidaz aktiviteye sahip bileşiklerin in vitro antihyaluronidaz etkilerinin varlığı daha ileri çalışmalar ile desteklenmesi ve kanıtlanması gerekmektedir.

Benzimidazol ana yapısı taşıyan antihyaluronidaz aktivite çalışmalarının ilk adımını oluşturan bu çalışma bundan sonraki çalışmalara yol göstereceğine inanmaktayız. Ayrıca Almanya'da bir araştırma grubuyla olan ortak çalışma girişimimiz bundan sonraki çalışmaların daha etkin bileşiklerin bulunmasının yanı sıra metastaz etki mekanizmaların açıklaması ve antihyaluronidaz-metastaz ilişkisinin ortaya konulmasında katkıda bulunacağı kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

- 1) **Matrisian LM.** The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays*, **1992**; 14: 455-462.
- 2) **Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA.** Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1993**; 541-573.
- 3) **Kreil G.** Hyaluronidases -a group of neglected enzymes. *Proein Sci.*, **1995**; 4: 1666-1669.
- 4) **Duran-Reynolds F.** Exaltation de l'activite du virus vaccinal par les extraits de certains organes. *C. R. Soc. Biol.*, **1928**; 99: 6-7.
- 5) **Liu D, Pearlman E, Diaconu E, Guo K, Mori H, Haqqi T, Markowitz T S, Wilson S, Sy M-S.** Expression of hyaluronidase by tumor cells induces angiogenesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.*, **1996**; 93: 7832-7837.
- 6) **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.
- 7) **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.
- 8) **Hoffmann, K.** Imidazole and Its Derivatives. New York, Interscience Publishers, INC, **1953**.
- 9) **Hisano T, Ichikawa M.** Properties of benzimidazoles and substituents effects. Correlation between acid dissociations and hydrogen bondings of some benzimidazoles. *Chem. Pharm. Bull.*, **1974**; 22(8): 1923-1927.
- 10) **Elquero J, Liouquet G, Marzin C.** Annular tautomerism of benzimidazoles, effect of a hydrogen bond on the prototropic rate. *Tetrahedron Letters*, **1975**; 46: 4085-4086.
- 11) **Wright JB.** The chemistry of the benzimidazoles. *Chem. Rev.*, **1951**; 48: 397-541.
- 12) **Rogers KS, Clayton CC.** Effects of pH on benzimidazole fluorescence. *Anal. Biochem.*, **1972**; 48: 199-201.

- 13) **Green H, Day AR.** The tautomeric Character of the imidazol ring. *J. Am. Chem. Soc.*, **1942**; 64: 1167-1173.
- 14) **Rabinowitz JL, Wagner EC.** Restriction of tautomerism in the amidine system by hydrogen bonding. The case of 4(7)-nitrobenzimidazole. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**; 73: 3030-3037.
- 15) **Howell JR, Rasmussen M.** Heterocyclic ambident nucleophiles. V. Alkylation of benzimidazoles. *Aus. J. Chem*, **1993**; 46: 1177-1191.
- 16) **Arnau N, Arredondoy Y, Moreno-Manas M, Pleixats R, Villaryoya M.** Palladium(0)-catalyzed allylation of 4(5)-substituted imidazoles, 5(6)-substituted benzimidazoles, benzimidazoles, benzotriazoles and 5(6)-methylbenzotriazole. *J. Heterocyclic. Chem.*, **1995**; 32: 1325-1334.
- 17) **Lee In-SH, Jeoung EH,** Synthesis and tautomerism of 2-aryl- and 2-heteroaryl derivatives of benzimidazole. *J. Heterocyclic. Chem.*, **1996**; 33: 1711-1716.
- 18) **Iemura R, Hori M, Othaka H.** Syntheses of the metabolites of 1-(2-ethoxyethyl)-2-(hexahydro-4-methyl-1H-1,4-diazepin-1-yl)-1H-benzimidazole difumarate(KG-2413) and related compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**; 37(4): 962-966.
- 19) **Alcalde E, Dinares I, Frigola J.** NMR studies of N-(benzimidazol-2-yl) pyridinium derivatives: QSAR with the anti-leishmanial activity and their carbon-13 NMR chemical shifts. *Eur. J. Med. Chem.*, **1991**; 26: 633-642.
- 20) **Alcalde E, Perez-Garcia L, Dinares I, Coombs GH, Frigola J.** Synthesis and antitrichomonal activity of azolium (azolium) 4-nitrobenzimidazol-2-yl betains and their derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **1992**; 27: 171-177.
- 21) **Katritzky AR, Rachwall S.** New routes to selectively methylated benzimidazoles. *J. Heterocyclic Chem.*, **1994**; 31: 775-779.
- 22) **Phillips MA.** The formation of 2-methylbenzimidazoles. *J. Chem Soc.*, **1928**; 172-177.
- 23) **Phillips MA.** The formation of 2-substituted benzimidazoles. *J. Chem Soc.*, **1928**; 2393-2399.
- 24) **Wagner AF, Wittreich PE, Lusi A, Folkers K.** Benzimidazoles and novel use of 2-formylbenzimidazoles in syntheses. *J. Org. Chem.*, **1962**; 27: 3236-3239.
- 25) **Holan G, Samuel EL, Enis BC, Hinde RV.** 2-trihalogenomethylbenzazoles. Part I. Formation. *J. Chem. Soc. (C)*, **1967**; 20-25.
- 26) **Fieser L F, Fieser M.** Polyphosphoric acid. R. for *Org. Syn.*, (1), **1955**; 894-905.

- 27) **Hein DW, Alheim RJ, Leavitt JJ.** The use of polyphosphoric acid in the synthesis of 2-aryl and 2-alkyl substituted benzimidazoles, benzoxazoles and benzothiazoles. *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**; 79: 427-429.
- 28) **Kanaoka Y, Yonemitsu O, Tanizawa K, Ban Y.** Polyphosphate ester as a synthetic reagent I. Synthesis of 2-substituted benzimidazoles. *Chem. Pharm. Bull*, **1964**; 12: 773-778.
- 29) **Wegner H, Nordstorm L, Rudolf Wiedenhagen.** Über eine neue darstellung von N-alkylierten imidazoloverbindungen. *Berichte*, **1942**; 12: 1936-1948.
- 30) **Popp FD, Mcewen WE.** Polyphosphoricacid. *Chem. Rev.*, **1958**; 58: 321.
- 31) **Noyanalpan N, Işıkdag İ.** Synthesis of some 2-(heterocyclic-substituted) benzimidazole derivatives. *Chim Acta. Turcica*, **1983**; 11: 357-361.
- 32) **Gümüş F, Altuntaş T G, Saygun N, Özden T, Özden S.** In vitro tuberculostatic activities of some 2-benzylbenzimidazole and 2-phoxymethylbenzimidazole derivatives. *J. Pharm. Belg.*, **1989**; 44(5): 398-402.
- 33) **Algül Ö.** Bazı 1,2-disubstitüe benzimidazol türevlerinin Platin(II) kompleksleri üzerinde çalışmalar. *Doktora Tezi, Gazi Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Ankara. 2000.*
- 34) **Langheld K.** Über metaphosphorsäure-äthylester und dessen anwendung in der organischen chemie. *Chem. Ber.*, **1910**; 43: 1987-1860.
- 35) **Langheld K.** Über ester und amide der Phosphorsäuren II. *Chem Ber.*, **1911**; 44: 2076.
- 36) **Cramer F, Hettler H.** Ester der trimetaphosphorsäure. *Chem Ber.*, **1958**; 91: 1181.
- 37) **Pool WO, Harwood HJ, Ralston AW.** 2-alkylbenzimidazoles as derivatives for the identification of aliphatic acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **1937**; 59: 178-179.
- 38) **McCoy G, Day AR.** Ortho condensation which lead to oxazole or imidazole formation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1943**; 65: 2159.
- 39) **Roeder CH, Day AR.** Benzimidazoles studies I. The mechanism of benzimidazole formation from o-fenilendiamine. *J. Org. Chem.*, **1941**; 6: 25-35.
- 40) **Hughes GK, Lions F.** The synthesis of 2-aminomethylbenzimidazole and related substances. *J. Proc. Roy. Soc. New South Wales*, **1938**; 71: 209-222.
- 41) **Bloom A, Day AR.** The preparation of 2-alkylaminobenzimidazoles. *J. Org. Chem.*, **1939**; 4: 14-19.

- 42) **Skolnik H, Miller JG, Day AR.** The allylic character of 2-(α -chloroalkyl)-benzimidazoles. *J. Am. Chem. Soc.*, **1943**; 65: 1854-1858.
- 43) **Phillips MA.** The hydrolysis of diacetyl-o-diamines. *J. Chem. Soc.*, **1930**; 1409-1419.
- 44) **Noyanalpan N, Işıkdag İ.** 2-sübstitüe-benzimidazol türevlerinin sentezleri, yapı aydınlatmaları ve yapı etki ilişkileri üzerinde çalışmalar. *Doğa Bilim Dergisi, C*, **1985**; 9(2): 183-193.
- 45) **Öğretir C, Demirayak Ş.** Benzimidazol çalışmaları I. Bazı 2- veya 5-sübstitüe benzimidazol türevlerinin proton alma davranışlarının incelenmesi ve Hammett ilişkileri. *Doğa Tr. Kim. D.*, **1986**; 10(2): 112-117.
- 46) **Bera BC, Chakrabartty MM.** Spectrophotometric determination of palladium with 2-mercaptomethylbenzimidazoles. *Microchim. Acta.*, **1966**; 6: 1094-1100.
- 47) **Milner ES, Synder S. Joulli'e MM.** Synthesis of benzimidazol-2-il-alkanethiols and some derivatives. *J. Chem. Soc.*, **1964**; 4151-4153.
- 48) **Schoenleber J, Lochon MP, Champetier MG.** Synthèse et caractérisation de plusieurs mercaptoalcoly-2-benzimidazoles. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **1974**; 278(20):1235-1238.
- 49) **Lochon P, Schoenleber J.** Comparasion de l'action catalytique de thiols monofonctionnels et de certains thiols bifonctionnels (les mercaptoalcoly-2 benzimidazoles) aur l'hydrolyse de l'acetate de p-nitrophenyle. *Tetrahedron*, **1976**; 32: 2023-2030.
- 50) **Bachman GB, Heisey LV.** Monomers and polymers: The preperation of vinyl derivatives of five-atom heretocyclic rings. *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**; 71: 1985-1988.
- 51) **Chup NK, Tsupak EB, Simonov AM.** Benzimidazole derivatives. Reaction 2-aminomethylbenzimidazole and its 1-methyl derivative with nitrous acid. *Khim. Geterosikl. Soedin.*, **1970**; 10: 1393-1396.
- 52) **Noyanalpan N, Işıkdag İ.** 2-Sübstitüe-benzimidazol türevlerinin sentezlerinde değişik reaksiyon ajanlarının denenmesi ve bulguların karşılaştırılması. *J. Fac. Pharm. Gazi*, **1984**; 1(2): 61-68.
- 53) **Hunger A, Kebrle J, Rossi A, Hoffman K.** Synthese basisch substituiertes, analgetisch wirksamer benzimidazole derivative. *Experien*, **1957**; 16: 400.
- 54) **Hunger A, Kebrle J, Rossi A, Hoffman K.** Benzimidazole-derivative und verwandte heterocylen synthese von 1-aminoalkyl, 2-benzylbenzimidazolen. *Helv. Chim. Acta*, **1960**; 43: 800.

- 55) **Işıklıdağ İ.** 2 nolu konumda heterosiklik halkalarla süstitüe edilmiş benzimidazol türevlerinin sentezi, yapı aydınlatması ve yapı-etki ilişkileri üzerindeki çalışmalar. *Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Ankara. 1982.*
- 56) **Jerchel VD, Kracht M, Krucker K.** Untersuchungen über benzimidazole. *Ann.*, **1954**; 590: 232-241.
- 57) **Deselms RC.** Benzimidazoles I. (2-heterocyclic substituted)benzimidazoles. *J. Org. Chem.*, **1962**; 27: 2163.
- 58) **Stephens FF, Bower JD.** The preparation of benzimidazoles and benzoxazoles from Schiff bases. *Part I, J. Chem Soc.* **1949**; 27: 2971-2972.
- 59) **Weidenhagen R, Train G.** Über eine neue darstellung von N-alkyllierten imidazolo verbindungen. IX. Mitteil. Über Imidazole. *Chem. Ber.* **1942**; 75: 1936-1948.
- 60) **Stephens FF, Bower JD.** The preparation of benzimidazoles and benzoxazoles from Schiff bases. *Part II, J. Chem Soc.*, **1950**; 1722.
- 61) **Weidenhagen R.** Eine Neue synthese von benzimidazol-derivaten. *Ber.*, **1936**; 69B: 2263-2272.
- 62) **Elderfield RC, Kreysa FJ.** The reaction of o-phenylenediamine and of 8-amino-1,2,3,4-tetrahydroquinoline derivatives with carbonyl compunds. *J. Am. Chem Soc.*, **1948**; 70: 44-48.
- 63) **Elderfield RC, McCarthy JR.** . The reaction of o-phenylenediamine with carbonyl compunds, aliphatic ketones. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**; 73: 975-984.
- 64) **Gümüş F, Özden S, Abbasoğlu U, Özden T,** 2',4',5'-trisüstitüe-2-fenilbenzimidazol türevlerinin sentez ve in vitro antitüberküloz etkileri üzerinde çalışmalar-I. *A.Ü., Ecz. Fak. Der.*, **1986**; 16(1): 1-13.
- 65) **Kanaoka Y, Hamada T, Yonemitsu O.** Syntheses of 2-süstitued-benzoxales and benzthiazoles with PPE. *Chem. Pharm. Bull.*, **1970**; 18: 587.
- 66) **Smith LI, Haris SA.** Studies on the polymethylbenzenes. The nitration of pentamethylbenzene and of hexamethyl and hexaethylbenzene. *J. Am. Chem. Soc.*, 1935; 57: 1289-1292.
- 67) **Smith L, Haris S.** The jacobsen reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**; 58: 1-10.
- 68) **King FE, Achenson RM.** The synthesis of benzimidazoles from ortho-phenylenediamines and imino-ethers. *J. Chem. Soc.*, **1949**; 1396-1400.
- 69) **Porai-Koshits BA, Kvitko IY, Shutkova EA.** Synthesis of aminoesters of benzimidazole derivatives. *Zh. Prikl. Khim.*, **1964**; 37(6): 1386-1388.

- 70) **Thomas PR, Tyler GJ.** Some new benzimidazole derivatives. *J. Chem. Soc.*, **1957**; 2197-2202.
- 71) **Hölljes EL, Wagner EC.** Some reactions of nitriles as acid anammonides. *J. Org. Chem.*, **1944**; 9: 31-49.
- 72) **Wagner EC.** Some reactions of amidines as ammonio carboxylic acids or esters. *J. Org. Chem.*, **1940**; 5: 133-141.
- 73) **Charlton PT, Maliphant GK, Oxley P, Peak DA.** Antituberculous compounds. Part VII. Some further N-substituted amidines and analogues. *J. Chem. Soc.*, **1951**; 484-492.
- 74) **Jerchel VD, Fischer M, Krucker K.** Zur darstellung der benzimidazole. *Ann. Chem.*, **1952**; 575: 162-173.
- 75) **Lane ES.** A modified benimidazole synthesis. *J. Chem. Soc.*, **1953**; 2238-2240.
- 76) **Ried W, Stahlhofen P.** Umsetzung von o-phenylendiamin mit α,β -ungesättigten carbonylverbindungen. *Chem. Ber.*, **1957**; 90: 815-824.
- 77) **Kumar PR.** Polyethyleneglycol catalysed N-sulphonylation & N-benzolation of substituted benzimidazoles. *Indian J. Chem.*, **1986**; 25B: 1273-1274.
- 78) **Kröhnke F, Leister H.** Heterocyclen aus aroylcyanid-anilen. *Chem. Ber.*, **1958**; 91: 1479-1488.
- 79) **Partridge MW, Turner HA.** Cyclic amidines Part VII. Preparation of benzimidazoles from N'-aryl-N-hydroxyamidines. *J. Chem. Soc.*, **1958**; 2086-2092.
- 80) **Barltrop JA, Richards CG, Russell DM, Ryback G.** Seven-membered Heterocyclic compounds. Part I. 1:5-benzodiazepines and derivatives of 3:6-diaza-4:5-benzotropone. *J. Chem. Soc.* **1959**; 1132-1142.
- 81) **Krbecek L, Takimoto H.** The thermal decomposition of benzyllidene-2-azidoanilines. *J. Org. Chem.*, **1964**; 29(2): 3630-3632.
- 82) **Stacy GW, Ettlign BV, Papa AJ.** Reaction of benzaldehyde with o-nitroaniline. *J. Org. Chem.*, **1964**; 26(6): 1537-1540.
- 83) **Ridley HF, Spickett RGW, Timmis GM.** A new synthesis of benzimidazoles and aza-analogs. *J. Het. Chem.*, **1965**; 2(4): 453-456.
- 84) **Grenda VJ, Jones RE, Gal G, Sletzinger M.** Novel preparation of benzimidazoles from N-arylamidines. New synthesis of Thiabendazole. *J. Org. Chem.*, **1965**; 30(1): 259-261.

- 85) **Büyükbingöl E, Şafak C, Öztürk Y, Şahin MF.** Quantitative structure activity relationship (QSAR) of smooth muscle relaxation and 2-substituted. Benzimidazole derivatives. *Gazi Ecz. Fak. Der.*, **1986**; 3(2): 119-131.
- 86) **İscan MY, Büyükbingöl E, İscan M, Şahin MF, Şafak C.** Effects of 2-arylbenzimidazoles on rat hepatic microzomal monooxygenase system. *Comp Biochem. Physiol.*, **1989**; 92C(1): 109-115.
- 87) **Paglietti G, Pirisi MA, Loriga M, Grella GE.** Preparation E attivita' farmacologica di 2-(4'R')fenil-5R-benzimidazoli E 2-(4'-piridinil)-5R-benzimidazoli. *IL Farmaco-Ed.Sc.*, **1988**; 43(3): 215-226.
- 88) **Haruki E, Inaika T, Imoto E.** Some reaction of N-Haloamidines. *Bull. Chem. Japan.* **1968**; 41: 1361-1367.
- 89) **Suzuki N, Vamabayashi T, Izaway Y.** A single-step synthesis of 2-substituted benzo-azoles. *Bull. Chem. Japan.*, **1976**; 49(1): 353-354.
- 90) **Cohen VI.** A new method of synthesis of some 2-aryl and 2-heterocyclic benzimidazole, benzoxazole and benzothiazole derivatives. *J. Het. Chem.*, **1979**; 16(1): 13-16.
- 91) **Ichikawa M, Nabeya S, Muraoka K, Hisano T.** Acidic properties of benzimidazoles and substituent effects. IV. Relationship between the acidities of N'-(substitutedphenyl) arylamidines and ring closures to imidazole. *Chem. Pharm. Bull.*, **1979**; 27(5): 1255-1264.
- 92) **Abdelhamid AO, Parkanyi C, Rashid SMK, Lloyd WD.** Synthesis of fused ring heterocycles from aromatic amines with Hydroximoyl chlorides. *J. Het. Chem.*, **1988**; 25(2): 403-405.
- 93) **Perry RJ, Wilson B.** A novel palladium-catalyzed synthesis of 2-arylbenzimidazoles. *J. Org. Chem.*, **1993**; 58(25): 7016-7021.
- 94) **Pamuk İ.** Bazı 5(6) 2-Disubstitübenzimidazol türevlerinin platin(II) kompleksleri üzerinde çalışmalar. *Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Ankara.* **1997**
- 95) **Toole BP.** Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1990**; 2: 839-844.
- 96) **West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S.** Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic-acid . *Science*, **1985**; 228: 1324-1326.
- 97) **West DC, Kumar S.** The effect of hyaluronate and its oligosaccharides on endothelial-cell proliferation and monolayer integrity .*Exp. Cell. Res.*, **1989**; 183: 179-196.
- 98) **Meyer K.** The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol. Rev.*, **1947**; 27: 335-359.

- 99) **Fishman WH, Anlyan AJ, Gordon E.** β -Glucuronidase activity in human tissues. Some correlations with processes of malignant growth and with the physiology of reproduction. *Cancer Res.*, **1947**; 7: 808-817.
- 100) **Balazs EA, Vonueuler JV.** The hayluronidase content of necrotic tumor and testis tissue. *J Cancer Res.*, **1951**; 4: 326-329
- 101) **Cobbin LB, Dicker SE.** Some characteristics of plasma and urine `hyaluronidase'. *J. Physiol. (London)*, **1962**; 163: 168-174.
- 102) **Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, Forgacs E, Minna JD, Block NL, Nadji, Lokeshwar BL.** Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells *J. Biol. Chem.*, **2001**; 276: 11922-11932.
- 103) **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.
- 104) **Patel S, Turner PR, Stubberfield C, Barry E, Rohlff CR, Stamps A, McKenzie E, Young K, Tyson K, Terrett J, Box G, Eccles S, Page MJ.** Hyaluronidase gene profiling and role of HYAL-1 overexpression in an orthotopic model of prostate cancer. *Int. J. Cancer*, **2002** ; 97: 416-424.
- 105) **Donovan J, Slingerland J.** Transforming growth factor-beta and breast cancer.: Cell cycle arrest by transforming growth factor-beta and its disruption in cancer. *Breast Cancer Res.*, **2000**; 2, 116-124.
- 106) **Wikstrom P, Bergh A, Damber JE.** Transforming growth factor-beta I and prostate cancer. *Scand. U. Urol. Nephrol.***2000**; 34: 85-94.
- 107) **Dijke T, Miyazono PK, Heldin CH.** Signaling inputs converge on nuclear effecters in TGF-beta signaling. *Trends Biochem. Sci.*, **2000**; 25: 64-70.
- 108) **Letterio JJ, Roberts AB.** Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunolo.*, **1998**; 16: 137-161.
- 109) **Roberts AB, Mccune BK, Sporn MB.** TGF-beta-regulation of extracellular-matrix. *Kidney Int.*, **1992**; 41: 557-559.
- 110) **Chang NS.** Transforming growth factor-beta protection of cancer cells against tumor necrosis factor cytotoxicity is counteracted by hyaluronidase. *Int. J. Mol. Med.*, **1998**; 2: 653-659.

- 111) **Chang NS.** Hyaluronidase enhancement of TNF-mediated cell death is reversed by TGF-beta 1. *Am. J., Physiol.*, **1997**; 273: C1987- C1994.
- 112) **Nathanson MA.** Basic science and pathology-hyaluronates in developing skeletal tissues. *Clin. Orthop.*, **1990**; 25: 275-289.
- 113) **Sampson PM, Rocheste CL, Freundlich B, Elias JA.** Cytokine regulation of human lung fibroblast hyaluronan (hyaluronic-acid) production - evidence for cytokine-regulated hyaluronan (hyaluronic-acid) degradation and human lung fibroblast-derived hyaluronidase. *J. Clin. Invest.*, **1992**; 90: 1492-1503.
- 114) **Stair-Nawy S, Csoka AB, Stern R.** Hyaluronidase expression in human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**; 266: 268-273.
- 115) **Lokeshwar VB, Young MJ, G, Goudaarzi, Lida N, Yudin AJ, Cherr GN, Selze MG.** Mediation of hyaluronic acid functions and signaling in endothelial cells by an HA receptor RHAMM. *Cancer Res.*, **1999**; 59: 4464-4470.
- 116) **Coppes MJ.** Serum biological markers and paraneoplastic syndromes in wilms-tumor. *Med. Pediatr. Oncol.*, **1993**; 21: 213-221.
- 117) **Stern M, Longaker MT, Adzicki NS, Harrison MR, Stern RJ.** Hyaluronidase levels in urine from Wilms' Tumor patients. *Natl. Cancer. Int.*, **1991**; 83: 1569-1574.
- 118) **Herrlich P, Zoller M, Pals S T, Ponta H.** CD44 splice variants-metastases meet lymphocytes. *Immunology Today*, **1993**; 14: 395-399.
- 119) **Tanabe KK, T Nishi, Saya H.** Novel variants of cd44 arising from alternative splicing-changes in the cd44 alternative splicing pattern of mcf-7 breast-carcinoma cells treated with hyaluronidase. *Mol. Carcinog*, **1993**; 7: 212-220.
- 120) **Madan AK, Pang Y, Wilkiemeyer MB, Yu D, Beech DJ.** Increased hyaluronidase expression in more aggressive prostate adenocarcinoma. *Oncol. Rep.*, 1999; 6: 1431-1433.
- 121) **Bertrand P, Girard N, Duval CC, D'Anjou J, Cahuzyi C, Menard J F, Delpech B.** Increased hyaluronidase levels in breast tumor metastases. *Int. J. Cancer*, **1997**; 73,327-331.
- 122) **Lokeshwar VB, Lokeshwar BL, Pharm HT, Block NL.** Association of elevated levels of hyaluronidase, a matrix-degrading enzyme, with prostate cancer progression. *Cancer Res.*, **1996**; 56: 651-657.
- 123) **Tamakoshi K, Kikkawa F, Maeda O, Suganuma N, Yamagata S, Yamagata T, Tomoda Y.** Hyaluronidase activity in gynaecological cancer tissues with different metastatic forms. *Br. J. Cancer*, **1997**; 75: 1807-1811.

- 124) **Jeong SJ, Higuchi R, Ono M, Kuwano M, Kim YC, Miyamoto T.** Cis-Hinokiresinol, a norlignan from *Anemarrhena asphodeloides*. *J. Nature(London)*, **1990**; 348: 555-557.
- 125) **Gore M, A'Hern R, Stankiewicz M, Slevin M.** Tumour marker levels during marimastat therapy. *Lancet*, **1996**; 348: 263-264.
- 126) **Fong TAT, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang , Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahan 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: 99-106.
- 127) **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.
- 128) **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 G(2)/M phase whereas it stimulates smooth-muscle cells by inhibiting p21 and p27 expression *Int. J. Cancer*, **2000**; 85: 691-696.
- 129) **Asada M, Sugie M, Inoue M, Nakagomi K, Hongo S, Murata K, Irie S, Takeuchi T, Tomizuka N, Oka S.** Inhibitory effect of alginic acids on hyaluronidase and on histamine release from mast cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1997**; 61: 1030-1032.
- 130) **Sawabe Y, Nakagomi K, Iwagami S, Suzuki S, Nakazawa H.** Inhibitory effects of pectic substances on activated hyaluronidase and histamine-release from mast-cells *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**; 1137: 274-278.
- 131) **Toido T, Ogita Y, Suzuki A, Toyoda H, Imanari T.** Inhibition of hyaluronidase by fully o-sulfonated glycosaminoglycans. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1999**; 370: 176-182.
- 132) **Kuppusamy UR, Khoo HE, Das NP.** Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochem. Pharmacol.*, **1990**; 40: 397-401.
- 133) **Furuya T, Yamagata S, Shimoyama Y, Fujihara M, Morishima N, Ohtsuki K.** Biochemical characterization of glycyrrhizin as an effective inhibitor for hyaluronidases from bovine testis *Biol. Pharm. Bull.*, **1997**; 20: 973-977.
- 134) **Facino RM, Carini M, Stefani R, Aldini G, Saibene L.** Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and sapogenins from *hedera-helix*, *aesculus-hippocastanum*, and *ruscus-aculeatus*-factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. *Arch. Pharm.*, **1995**; 328: 720-724.
- 135) **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.

- 136) **Dirscherl W, Bergmeyer HU, Kruskemper HL.** Effects of steroid hormones on catalase preparation of different degrees of purity. *Biochemische Zeitschrift*, **1952**; 322:269-279.
- 137) **Asboe-Hansen G.** Hormonal influence on mesenchyme. *Acta Medica Scandinavica*, **1956**; 154(312): 372-375.
- 138) **Huntimer E, Halaweish F.** 38th Midwest Regional Meeting of the Am. Chem. Soc. Columbia, MO, US, November, **2003**; 5-7.
- 139) **Zimmermann K, Preinl G, Ludwig H, Greulich KO.** Inhibition of hyaluronidase by dextran sulfate and its possible application in anti-cancer treatment *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **1983**; 105 (2): 189-190.
- 140) **Diczfalusy E, Femo OB, Fex HJ, Hogberg B, Kneip P, Leo AB, Halsingborg SS.** *Acta Chemica Scandinavica*, **1959**; 13: 1011-1018.
- 141) **Olgen S, Kaessler A, Nebioglu D, Jose J.** New potent indole derivatives as hyaluronidase inhibitors. *Chem. Biol. & Drug Design*. **2007**; 70(6): 547-551.
- 142) **Kaessler A, Algul O, Jose J.** A microplate based screening of benzimidazole derivatives on hyaluronidase inhibition at pH 7 and 3.5. *Letters in Drug Design & Discovery*, **2007**; 4(8): 562-569.
- 143) **Feithelson BN, Mamalis P, Moualim RJ, Petrow V, Stephenson O, Sturgeon B.** Some benzimidazole derivatives. *J. Chem. Soc.*, **1952**; 2389-2398.
- 144) **Rabiger DJ, Joullie MM.** The ionization constants, ultraviolet and infrared spectra of some substituted benzimidazoles. *J. Org. Chem.*, **1964**; 29: 476-482.
- 145) **Preston PN, Smith DM, Tennant G.** Benzimidazoles and Congeneric Tricyclic Compounds. Weissberger A, Taylor EC, Ed. New York: JohnWiley&Sons, , **1981**.
- 146) **Kukushkin YN, Sedava GN, Khamnuev GK., Garnovskii AD.** Thermal transformations of platinum (II) Halide complexes with imidazoles in the solid phase. *Zh. Neorg Khim.*, **1981**; 26 (10): 2866-2868.
- 147) **Callaghan V, Goodgame DML, Tooze RP.** Platinum and other metal complexes of 2-methyl-5-nitrobenzimidazole and metronidazole. *Inorg. Chim. Acta.*, **1983**; 78(1): 51-54.
- 148) **Brocklehurst K, Kowlessur D, O'Driscoll M, Patel G, Quenby S, Salih E, Templeton W, Thomas EW, Willenbrock F.** Substrate derived two protonic state electrophiles as sensitive kinetic specificity probes for cysteine proteinases. *Biochem. J.*, **1987**; 244(1): 173-181.
- 149) **Irving H, Weber OA.** Metal complexes of 2-aminometil-benzimidazoles. *J. Chem. Soc.*, **1959**; 2560-2565.

- 150) **Getvoldsen G, Fredriksson A, Elander N, Stone-Elander S.** Microwave-assisted cyclocondensation of 1,2-diaminobenzene with [4-¹⁸F]fluorobenzoic acid: microwave synthesis of 2-([4-¹⁸F]fluorophenyl)benzimidazole. *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **2004**; 47: 139-145.
- 151) **Du LH, Wang YG.** A rapid and efficient synthesis of benzimidazoles using hypervalent iodine as oxidant. *Synthesis* **2007**; 5: 675-678.
- 152) **Arslan H, Algul O.** Vibrational spectrum and assignments of 2-(4-methoxyphenyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazole by ab initio Hartree–Fock and density functional methods. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* doi:10.1016/j.saa.2007.07.027. (**2007**).
- 153) **Mamalis P, Petrow W, Sturgeon B.** Some Benzimidazolyl-alanines. *J. Chem. Soc.*, **1950**; 1600-1603.
- 154) **Siegart R, Day AR.** Metabolite analogs VII. The preparation of some benzimidazolyl analogs of ethylpretoylglutamate. *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**; 79:4391-4394.
- 155) **Bahner CT, Rutter HA, Tives LM.** Substituted benzimidazoles. *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**; 74: 3689-3690.
- 156) **Thompson LK, Ramaswami BS, Seymour EA.** Cobalt(II) and zinc(II) complexes of the tripod derivatives and some with mixed stereochemistries. *Can J Chem.*, **1977**; 55: 878-888.

ÖZGEÇMİŞ

1983 Mersin doğumluyum. Liseyi Mersin Fen Lisesinde okudum. Üniversite eğitimimi ise Mersin Üniversitesi Eczazılık Fakültesini birincilikle bitirerek tamamladım. Şu an Mersin de Apçin Eczanesinin sahibi ve mesul müdürü olarak çalışmaktayım.