

**T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POTANSİYEL ANTİNEOPLASTİK  
BİLEŞİKLER OLARAK BAZI  
HETEROSİKLIK MOLEKÜLLERİN  
MANNİCH BAZLARI**

**Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Programı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Ecz. Hüseyin İSTANBULLU**

**İZMİR  
2006**

**T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POTANSİYEL ANTİNEOPLASTİK  
BİLEŞİKLER OLARAK BAZI  
HETEROSİKLİK MOLEKÜLLERİN  
MANNİCH BAZLARI**

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Hüseyin İSTANBULLU

DANIŞMAN

Prof. Dr. Erçin ERCİYAS

İZMİR

2006

## ÖNSÖZ

*Bu çalışmayı çok değerli bilgi ve yardımlarıyla yöneten ve her türlü desteği sağlayan Sayın Prof. Dr. Erçin ERCİYAS'a sonsuz teşekkürlerimle, saygı ve şükranlarımı sunarım.*

*Biyolojik aktivite çalışmalarını yürüten Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Zeki TOPÇU'ya,*

*Sitotoksisite testlerindeki yardımlarından dolayı Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Erdem Göker'e ve biyolog Layka Abbasi'ye,*

*Kütle spektrumlarının alınmasında katkıda bulunan Prof.Dr.Seçkin Özden ve Yrd.Doç. Dr. Ercüment Karasulu'ya,*

*Spektrumların yorumlanmasında değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Vildan Alptüzün'e,*

*Ayrıca tezimin oluşumunda katkısı olan tüm değerli hocalarıma ve tez döneminde yaşadığım her türlü sıkıntımı paylaşan, desteklerini esirgemeyen, moral kaynağı olan değerli çalışma arkadaşlarıma*

*teşekkür eder, sonsuz şükranlarımı sunarım...*

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER, GRAFİKLER ve SPEKTRUMLAR DİZİNİ.....	VIII
BÖLÜM I.	
GENEL BİLGİLER	
1.1. KANSERİN DOĞASI.....	1
1.2. ANTİKANSER İLAÇLAR.....	6
1.2.1. ALKİLLEYİCİ BİLEŞİKLER.....	7
1.2.2. ANTİMETABOLİTLER.....	12
1.2.2.1. NÜKLEOTİD ANTAGONİSTLERİ.....	12
1.2.2.2. NÜKLEOZİD ANTAGONİSTLERİ.....	12
1.2.2.3. FOLİK ASİT ANTAGONİSTLERİ.....	12
1.2.3. ANTİBİYOTİKLER.....	14
1.2.4. VİNKA ALKALOİTLERİ.....	14
1.2.5. STEROİT HORMONLAR.....	14
1.2.6. DİĞER BİLEŞİKLER.....	14
1.3. URASİL VE TÜREVLERİNİN KANSER TEDAVİSİNDEKİ YERİ.....	15
1.3.1. 5-FLUOROURASİL.....	16
1.3.2. URASİL MUSTARD.....	16
1.3.3. TEGAFUR.....	18
1.3.4. FLOKSURİDİN.....	18

1.4. URASİL-MANNİCH BAZLARI ÜZERİNDE YAPILMIŞ ÇALIŞMALAR...	18
1.5. İLAÇ TASARLAMADA MOLEKÜLLERİN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN ÖNEMİ.....	19
1.6. SENTEZ TEPKİMELERİ.....	27
1.6.1. MANNİCH TEPKİMESİ.....	27
1.6.2. MANNİCH REAKTİFİ.....	30
1.7. BİYOAKTİVİTE TESTLERİ.....	32
1.7.1. TOPOİZOMERAZ ENZİM İNHİBİSYONU TESTİ.....	31
1.7.1.1. DNA TOPOLOJİSİ ve TOPOİZOMERAZ ENZİMİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER.....	32
1.7.1.2. TOPOİZOMERAZ I ENZİMİNİN İNHİBİSYONU.....	37
1.7.1.3. TOPOİZOMERAZ ENZİMİNİ İNHİBE EDEN BAZI BİLEŞİKLER.....	38
1.7.2. SİTOTOKSİK AKTİVİTE TAYİNİ AMACIYLA KULLANILAN BİYOAKTİVİTE TESTLERİ.....	40
1.8. PLANLANAN ÇALIŞMA.....	40
1.8.1. GİRİŞ.....	40
1.8.2. TEZ KAPSAMINDA PLANLANAN ÇALIŞMALAR.....	41
BÖLÜM II	
GEREÇ VE YÖNTEM	
2.1. GEREÇLER.....	46
2.2. YÖNTEMLER.....	47
2.2.1. KROMATOĞRAFİK ANALİZLER.....	47
2.2.1.1. İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ.....	47
2.2.1.2. SÜTUN KROMATOĞRAFİSİ.....	47
2.2.1.3. PREPARATİF İTK.....	47

2.2.2. SPEKTRAL ANALİZLER.....	48
2.2.2.1. ULTRAVİYOLE SPEKTROSKOPİSİ.....	48
2.2.2.2. İNFARED SPEKTROSKOPİSİ.....	48
2.2.2.3. NÜKLEER MAGNETİK REZONANS SPEKTROSKOPİSİ.....	48
2.2.2.4. KÜTLE SPEKTROSKOPİSİ.....	48
2.2.3. DİĞER GEREÇLER.....	49
2.2.4. BİLEŞİKLERİN SENTEZİ ve SPEKTRAL BULGULAR.....	49
2.2.4.1. A1 BİLEŞİĞİ.....	49
2.2.4.2. A2 BİLEŞİĞİ.....	51
2.2.4.3. A3 BİLEŞİĞİ.....	52
2.2.4.4. A4 BİLEŞİĞİ.....	54
2.2.4.5. A5 BİLEŞİĞİ.....	55
2.2.5. BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI ve BULGULAR.....	57
2.2.5.1. STABİLİTE ve KATIM TEPKİMESİ.....	57
2.2.5.2. TOPOİZOMERAZ ENZİM İNHİBİSYONU TESTİ.....	58
2.2.5.2.1. TOPOİZOMERAZ ENZİM İNHİBİSYONU TESTİ BULGULARI....	59
2.2.5.3. ANDROJENE BAĞIMLI OLMAYAN PROSTAT KANSERİ HÜCRE DİZİSİ ile SİTOTOKSİSİTE TESTİ.....	61
2.2.5.3.1. SİTOTOKSİSİTE TESTİ BULGULARI.....	63
BÖLÜM III	
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	86
3.1. A1 BİLEŞİĞİ.....	86
3.2. A2 BİLEŞİĞİ.....	90
3.3. A3 BİLEŞİĞİ.....	92
3.4. A4 BİLEŞİĞİ.....	93

3.5. A5 BİLEŞİĞİ.....	95
3.6. STABİLİTE ÇALIŞMASI.....	95
3.7. BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI.....	96
3.7.1. TOPOİZOMERAZ I ENZİM İNHİBİSYONU TESTİ.....	96
3.7.2. CANLILIK TESTİ ÇALIŞMALARI.....	97
ÖZET.....	98
ABSTRACT.....	100
KAYNAKLAR.....	102
ÖZGEÇMİŞ	

## ŞEKİLLER, GRAFİKLER VE SPEKTRUMLAR DİZİNİ

Şekil 1. Alkilleyici Bileşikler .....	8
Şekil 2. Mekloreタミンin Etki Mekanizması.....	9
Şekil 3. DNA'nın Azotlu Hardallar Tarafından Çapraz Alkillenmesi.....	11
Şekil 4. Antimetabolit Bileşikler .....	13
Şekil 5. Urasil ve Türevleri.....	15
Şekil 6. 5-FU'nun Etki Mekanizması .....	17
Şekil 7. Topliss'in Karar Ağacı.....	26
Şekil 8. Monometilasyon sonucu oluşan mono-mannich bazı ve diaminometilasyon sonucu oluşan bis-mannich bazı .....	27
Şekil 9. Halkalaşmış Mannich bazı .....	28
Şekil 10. Asit Katalizli Amino Metilleme.....	28
Şekil 11. Baz Katalizli Amino Metilleme .....	29
Şekil 12. Yan zincirden ve halkadan aminometilleme .....	30
Şekil 13. Mannich reaktifinin oluşumu .....	31
Şekil 14. Normal ve süper sarmal DNA'lar .....	33
Şekil15. Topoizomeraz I enzimi ile DNA'nın replikasyonu .....	36



Şekil 16. Urasil-Mannich bazlarından asit ortamda olası kinon-metid oluşum mekanizması.....	42
Şekil 17. Ardışık sitotoksik bileşiklerin oluşumu.....	43
Şekil 18. Sentezlenmesi Planlanan Bileşikler.....	45
Şekil 19. A2 ve A3 bileşiklerinin topoizomeraz enzimi üzerindeki etkileri.....	60
Şekil 20. CPT'nin topoizomeraz enzimi üzerindeki etkisi.....	60
Grafik 1. A1 Maddesinin 24 Saatteki % Sitotoksitesisi .....	64
Grafik 2. A1 Maddesinin 48 Saatteki % Sitotoksitesisi .....	64
Grafik 3. A1 Maddesinin 72 Saatteki % Sitotoksitesisi .....	65
Grafik 4. A4 Maddesinin 24 Saatteki % Sitotoksitesisi .....	65
Grafik 5. A4 Maddesinin 48 Saatteki % Sitotoksitesisi .....	66
Grafik 6. A4 Maddesinin 72 Saatteki % Sitotoksitesisi .....	66
Spektrum No 1. A1 Bileşiğinin UV Spektrumu.....	67
Spektrum No 2. A1 Bileşiğinin IR Spektrumu .....	67
Spektrum No 3. A1 Bileşiğinin <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu.....	68
Spektrum No 4. A1 Bileşiğinin <sup>13</sup> C-NMR Spektrumu.....	69
Spektrum No 5. A1 Bileşiğinin MS Spektrumu .....	70
Spektrum No 6. A2 Bileşiğinin UV Spektrumu.....	71
Spektrum No 7. A2 Bileşiğinin IR Spektrumu .....	71
Spektrum No 8. A2 Bileşiğinin <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu.....	72
Spektrum No 9. A2 Bileşiğinin <sup>13</sup> C-NMR Spektrumu.....	73

Spektrum No 10. A2 Bileşığının MS Spektrumu .....	74
Spektrum No 11. A3 Bileşığının UV Spektrumu.....	75
Spektrum No 12. A3 Bileşığının IR Spektrumu .....	75
Spektrum No 13. A3 Bileşığının <sup>13</sup> C-NMR Spektrumu.....	76
Spektrum No 14. A3 Bileşığının MS Spektrumu .....	77
Spektrum No 15. A4 Bileşığının UV Spektrumu.....	78
Spektrum No 16. A4 Bileşığının IR Spektrumu .....	78
Spektrum No 17. A4 Bileşığının <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu.....	79
Spektrum No 18. A4 Bileşığının <sup>13</sup> C-NMR Spektrumu.....	80
Spektrum No 19. A4 Bileşığının MS Spektrumu .....	81
Spektrum No 20. A5 Bileşığının UV Spektrumu.....	82
Spektrum No 21. A5 Bileşığının IR Spektrumu .....	82
Spektrum No 22. A5 Bileşığının <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu.....	83
Spektrum No 23. A5 Bileşığının <sup>13</sup> C-NMR Spektrumu.....	84
Spektrum No 24. A5 Bileşığının MS Spektrumu .....	85

# BÖLÜM I

## GENEL BİLGİLER

### 1.1. Kanserin Doğası

Kanser kalp-damar sistemi hastalıklarından sonra ikinci ölüm nedeni olarak bilinmektedir(1). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre her yıl ortalama 11 milyon kişiye kanser teşhisi konulmakta ve yılda ortalama 7 milyon ölüm (dünyadaki ölümlerin ortalama %12,5'i) kanser nedeniyle olmaktadır (2).

Dokular ve organlar, kollagen gibi hücreler arası salgılanan maddeler ile bir arada tutulan hücre topluluklarından oluşur. Doku ve organ büyümesinin, hücre sayısında artma, hücre boyutunda artma ya da her iki işlevin birden gerçekleşmesi sonucunda ortaya çıktığı bilinmektedir. İnsanda hücre sayısındaki artış gelişmede en önemli etkidir (3). Bir yetişkin döllenen tek bir hücreden  $10^{15}$  hücreye kadar büyür. Yeni doğandan yetişkin bir insan olana dek hücre boyutu 3-4 kat artsa bile büyüme büyük ölçüde hücre sayısındaki artışa bağlıdır. İnsanlar olgunluğa ulaştıktan sonra hücre sayısı temelde sabit kalır. Ancak yetişkinlerde bile hücre bölünmesi aktif bir hızla devam eder. Her gün yaklaşık  $10^{12}$  hücre ölür ve bu hücrelerin yenilenmesi gerekir. Ölen hücrelerin büyük bir kısmı gastrointestinal kanal, deri, kemik iliği gibi doku ve organlarda bulunur. Üretilen hücre sayısı ölen hücre sayısına eşittir. Bu basit eşitliğin bozulması normal ve anormal

büyümenin anlaşılması için esastır (3). Herhangi bir zaman diliminde, yapılan hücre sayısı ölen hücre sayısını aşarsa büyüme vardır.

Kanserin sebebi ve oluş mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Kanser bulaşıcı bir hastalık değildir. Görülme sıklığı coğrafi dağılım, cins, ırk, genetik yapı ve çevresel karsinojenlere maruz kalmakla ilişkilidir. Nedeni ne olursa olsun kanser, hücre çoğalması ve farklılaşmasını yöneten kontrol mekanizmalarında bir sapma ile karakterize edilen bir hücre hastalığıdır (4). Kanser açısından en önemli hücre işlevleri, çevreden gelen mesajlara göre çoğalma, farklılaşma ve apoptosis (önceden programlanmış ölüm olgularının düzenlenmesi) dir. Sürekli yapılması gereken çoğalma-farklılaşma-ölüm programları, sayıları yüzün üstünde olan değişik proteinler tarafından düzenlenmektedir. Bu proteinler üç gruba ayrılabilir:

- (I) Hücrenin çoğalmasını sağlayan,
- (II) Hücre çoğalmasını durduran,
- (III) Hücrenin ömrünü noktalayan yaşlanma ve ölüm proteinleridir.

Kanser olgusunun başlangıcı bu proteinleri kodlayan genlerden birinin bozulmasına (mutasyona uğraması) dayanmaktadır. Mutasyona uğramış genler ise;

- Kalıtım yolu ile geçebilir,
- Kanserojen maddeler ve çevresel faktörler (güneş ışığı) ile oluşabilir,
- Virüslere (örneğin papilloma virüsü, hepatit B virüsü, Epstein-Barr virüsü vb.) bağlı olarak gelişebilir,

- Özellikle yaşlılarda görülen kanserlerde hücre yaşlanması sırasında hücrelerde biriken toksik maddelerden kaynaklanabilir ya da kendiliğinden oluşabilir.

Buradan kanserin tek bir nedene değil, birçok nedene bağlı olarak gelişen bir hastalık olduğu sonucuna varılabilir.

Her hücre, hücre yazgısı (cell fate) olarak tanımlanan çoğalma (proliferation), yabancılaşma/ farklılaşma (differentiation), sönme / yaşlanma (senescence) ve ölüm (apoptosis, programmed cell death) seçeneklerini belirleyen genetik programlarla doğar.

Hücre çoğalma mekanizması dokudan dokuya ve zamana göre değişen genlerle ayarlanır. Çoğalmakta olan bir hücrenin yeni bir yavru hücre vermesi için geçirdiği evrelerin tümüne hücre döngüsü (siklus) adı verilir. Hücre döngüsü 4 ayrı evreden oluşur:

- S (sentez) evresi
- M (mitoz) evresi
- G1 evresi: M evresinden S evresine doğru ilerleyen ara evre
- G2 evresi: S evresinden M evresine doğru ilerleyen ara evre

Değişen çevre koşullarında ayakta kalabilmek için gerekli olan bu hızlı çoğalma sistemi, insanın kansere karşı en zayıf halkalarından birini oluşturur.

Normal hücrelerle kanserli hücreler karşılaştırıldığında bu dört evreden üçü (S, G2 ve M) arasında önemli bir değişiklik gözlenmez. En büyük fark G1

evresinde gözlenir. Hücre bu evrede bölünme ile bölünmeme arasındaki seçimini yapar. Normal bir hücre için aslında seçim söz konusu değildir; komşu ya da daha uzaktaki hücreler tarafından gönderilen 'çoğal' ya da 'çoğalma' mesajına uymak zorundadır. Kanseri hücrelerin en önemli özellikleri isyancı olmaları ve 'çoğalmayı durdur' buyruğunu dinlememeleridir. Hücreye çoğal / çoğalma mesajlarını getiren proteinler 3 grupta toplanabilir:

- Siklinler: Çoğalma için gereken enerjiyi sağlarlar.
- Sikline bağlı kinaz enzimleri (cdk) : Çoğalmayı yöneten enzimlerdir.
- Sikline bağlı kinaz enzimi susturucuları (cdki) : Yavaşlatıcı/durdurucu görevi yaparlar.

Kanseri hücreler sürekli bölünme eğilimindedirler. Proteinler tarafından iletilen çoğalmama emrini dinlemezler. Siklinlerin etkinliği artmış, cdki moleküllerinin etkinliği azalmış ya da tamamen ortadan kalkmıştır.

Kansere yol açan bozuklukları taşıyan genler onkogenler ve bunların tersi işlevi yapan tümör baskılayıcı genlerdir. Kanseri hücreler, normal hücrenin doğal işlevinden sapmasını önleyen tümör baskılayıcı genlerin görevini yapmasını engelleyerek onkogenleri salan hücrelerdir.

Normal hücrede gerektiği zaman meydana gelen apoptosiz durumunun kontrol edilemediği kanseri hücrelerinde çoğal / çoğalma emrinden başka, makrofajlar ve T-lenfositleri tarafından gerçekleştirilen "öl " emri de yerine getirilmez.

Neoplazmanın benign ve malignant olmak üzere iki biyolojik davranış biçimi vardır. Bu tipteki dokuların ayırıcı özellikleri şu şekilde özetlenebilir (1).

<b>Benign</b>	<b>Malignant</b>
Genellikle enkapsüllü	Enkapsülsüz
Genellikle noninvaziv	İnvaziv
Yüksek derecede farklılaşma	Zayıf farklılaşma
Ender mitoz	Yaygın mitoz
Anaplazi görülmez ya da çok azdır	Değişen oranda anaplazi görülür
Metastazik değildir	Metastazik

İdeal olarak kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçların sadece malign hücreleri etkilemesi amaçlanır. Ancak kullanımda olan ilaçlar kanser hücrelerine spesifik etki gösterememekte ve proliferen olan tüm normal ve anormal hücreleri etkilemektedirler. Bir antineoplastik ilacın spesifik etki yöresine ulaşması ve bu yörede seçici olarak kanserli hücreler üzerinde etki göstermesi, normal hücrelere karşı nontoksik olması yani “selektif” olması gerekir. Selektivite, bir ilacın yan yana iki komşu hücre olsalar bile diğer hücre üzerinde herhangi bir etki yapmaksızın belirli türdeki hücre grubunu kuvvetli biçimde etkileyebilmesi demektir (5). Yeni antineoplastik ilaç geliştirmede normal hücrelerin gelişmesi etkilenmeksizin kanserli hücreleri kodlayan DNA'nın selektif olarak etkilenmesi amaçlanır. Bir ilacın toksisitesi ancak selektif olduğu zaman değerlidir. Selektif toksisiteyi geliştirebilmek için normal ve neoplastik hücreler arasındaki biyokimyasal ve sitolojik farklılıkların belirlenmesi büyük önem taşır. Bu hücreler arasında saptanan kimi farklılıklar şöyle özetlenebilir:

1. Malignant hücreler normal doku hücrelerine göre daha asit olup, tümöral dokularda ortalama pH değeri 6.5 olarak kabul edilmektedir. Buna göre Mannich bazlarında olduğu gibi, asidik ortamda sitotoksik bileşiklere dönüşebilen bir ön-ilaç normal dokuda toksisite oluşturamazken, tümör hücrelerinde biyoaktif metabolitler üretmek suretiyle selektif letalite sağlayabilir.
2. Kanseri hücrelerinin redoks potansiyeli, normal hücrelerden daha küçüktür.
3. Larinks, dil, özefagus, mesane, kolon ve prostat karsinomları gibi belirli epitel tümörlerinde  $\gamma$ -glutamil transferaz (GGT) enzim aktivitesi normal hücrelere göre daha çok artmıştır (6). GGT aktivitesindeki bu artış, aminoasit miktarının artışına ve böylece kanser hücrelerinin normal hücrelere göre hızlı büyümelerine, proliferasyon artışına ya da glutatyon hidrolizine neden olabilir

## **1.2. Antikanser İlaçlar**

Kemoterapi, kanserin üç ana tedavi yönteminden biridir. Diğer iki yöntem ise cerrahi girişim ve ışın-tedavisi yöntemleridir. Doğal veya sentetik kimyasal maddeler, biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavilerin tümü kemoterapinin kapsamı içindedir. Antikanser ilaçlar, hücre siklusunda etki ettikleri fazlara göre (hücre siklusuna spesifik olanlar ve olmayanlar) sınıflandırılabilir gibi kimyasal yapılarına ve genel etki mekanizmalarına göre de 6 grupta sınıflandırılabilir (7, 8).



### 1.2.1. Alkilleyici Bileşikler

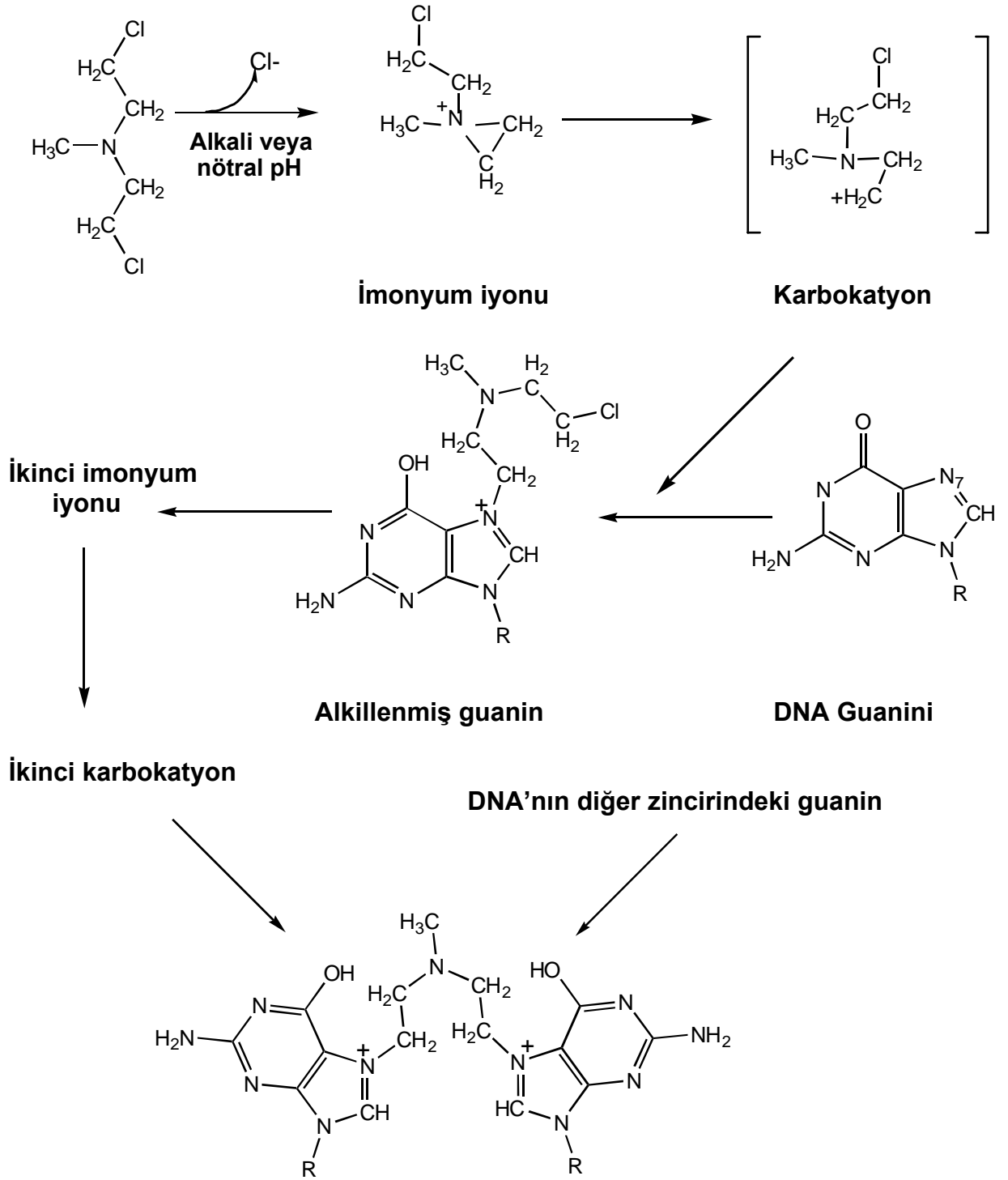
Alkilleyici bileşikler, malignant neoplazma tedavisinde klinik yararı ilk kez saptanan ve bugün de en yaygın kullanılan ilaç grubudur (9). Faza özgü olmayan sitotoksik maddeler olmalarına karşın, hücre siklusunun geç G1 ve S fazlarına en duyarlı olup G2 fazında blokaj yaparlar (4).

Alkilleyici bileşikler serbest elektron çifti ya da eksi yük taşıyan nükleofilik merkezlerle tepkimeye girebilen elektrofilik alkil katyonu üretmek suretiyle etki gösterirler. Alkilleme diye bilinen tepkime, alkil katyonu ile moleküler yapı arasında kovalent bağ oluşumu ile sonuçlanır. Klinik önemi olan bazı alkilleyici ajanlar *bis*(2-kloroetil)amin, etilenimin veya nitrozoüre grupları içeren kimyasal yapıları taşırlar (Şekil 1).

Antikanser ilaç geliştirme çalışmaları kapsamında, alkilleyici özellikteki farmakofor grupların aminoasitler, nükleik asit bazları, hormonlar, nitroksil radikalleri veya şeker parçaları gibi çeşitli taşıyıcı gruplara bağlanmak suretiyle molekülün, etki yöresine optimum konsantrasyonda taşınmasına yönelik tasarım ve sentez çalışmaları sürdürülmektedir. Ancak tam anlamıyla yöreye özgü alkilasyon başaramamıştır (4, 10).

Bir azotlu hardal olan mekloretaminin etki mekanizması (Şekil 2), alkilleyici bileşiklerin etki mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için örneklenmiştir (11).

**Şekil 1**



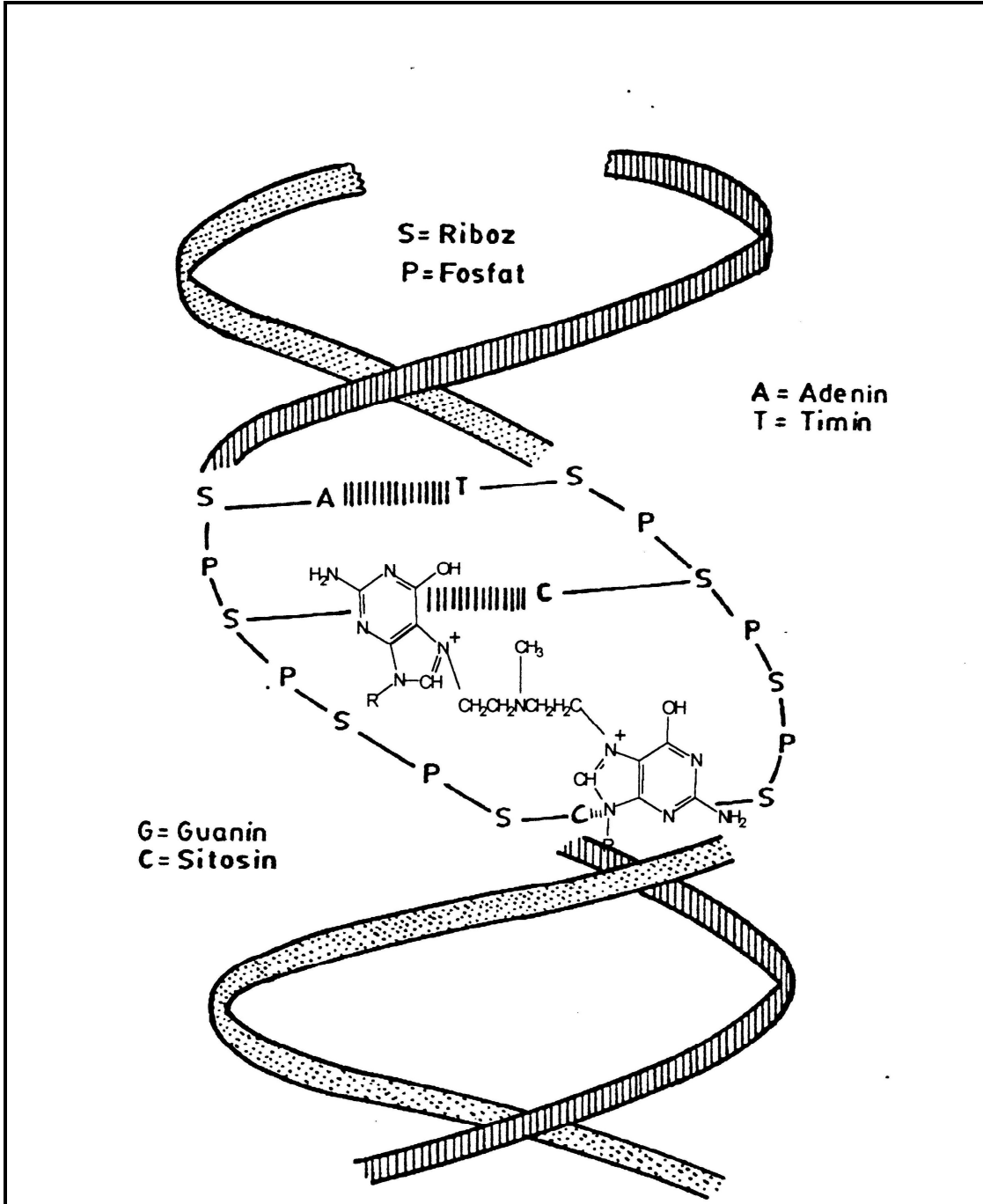
Şekil 2. Mekloretaminin etki mekanizması

Tepkime başlangıcında, alkali ya da nötral pH'da kloroetil yan zincirlerinin birinden bir klorür anyonu ayrılarak halkalaşmış imonyum iyonu şeklinde tanımlanan bir ara ürün oluşur. Bu üç üyeli, gergin halka birinci dereceden nükleofilik substitüsyon (SN1) tepkime mekanizmasına göre açılarak bir karbokatyon verir. Oluşan karbokatyon genellikle nükleik asitlerin guanin bazındaki <sup>7</sup>N azotunu alkilleyerek sitotoksik aktivite gösterir. Aynı şekilde ikinci kloroetil grubu da önce halkalaşır, daha sonra diğer bir nükleofille ya da yine guaninle tepkimeye girer. Bu tepkime DNA molekülünde heliks çiftindeki çapraz bağlanmayı koparır (Şekil 3). Böylece DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyonu etkilenerek hücre bölünmesi büyük ölçüde önlenir.

DNA üzerinde esas alkilasyon konumu guanin bazının N-7 konumu olmakla birlikte, DNA ile ilişkili proteinler ve fosfor atomları kadar guaninin O-6, sitozinin N-3, adeninin N-1 ve N-3 konumları da düşük derecelerde alkilenirler (4).

Alkilleyici bileşikler kendi aralarında şu şekilde sınıflandırılabilir:

- a) **Azotlu hardallar:** Mekloretamin, melfalan, klorambusil, siklofosfamid
- b) **Etileniminler:** Trietilenmelamin (TEM), trietilentiyofosforamid (tiyo-TEPA), heksametilenmelamin (HMM)
- c) **Nitrozoüreler:** Karmustin (BCNU), kloretilsikloheksilnitrozüre (CCNU), semustin (metil-CCNU).
- d) **Sülfonik asit esterleri:** Busulfan



Şekil 3. DNA'nın azotlu hardallar tarafından çapraz alkilenmesi

### **1.2.2. Antimetabolitler**

Bu grup ilaçlar, hücre içinde ya çeşitli enzimleri inhibe ederek pürin ve pirimidin sentezini durdurur ya da onların gerekli nükleozid ve nükleik asit kompleksleri içine girmelerine engel olarak DNA ve RNA sentezini engellerler. Bu grup bileşikleri (Şekil 4) başlıca üç grup altında inceleyebiliriz:

#### **1.2.2.1. Nükleotid Antagonistleri**

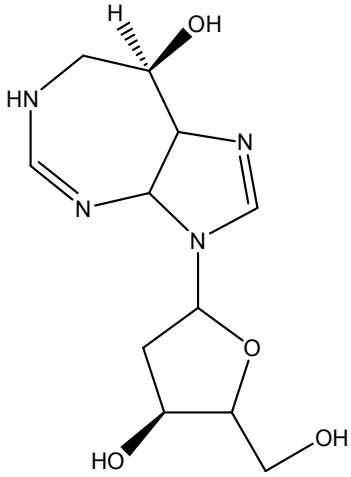
Pürin ve pirimidin nükleotidlerine benzer maddelerdir. Klinikte kullanılan antimetabolit ilaçlar arasında pürin antagonistlerinden en çok kullanılan 6-merkaptopürin, azotiyopürin ve tiyoguanin; pirimidin antagonistlerinden ise 5-florourasil (5-FU) dir. 5-FU, timidilat sentetazı bloke ederek urasilin timidine dönüşümünü ve böylece DNA sentezini engeller.

#### **1.2.2.2. Nükleozid Antagonistleri**

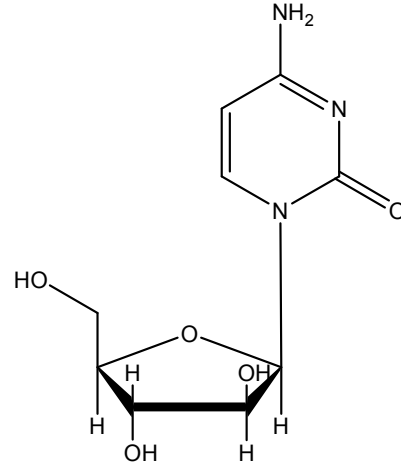
Bu grup bileşiklere örnek olarak sitarabin, tegafur ve pentostatin verilebilir. Sitarabin, şeker kısmının 2 numaralı konumundaki konfigürasyon ile sitinden farklıdır ve nükleozit riboz yerine arabinozdan oluşmuştur. Sonuçta DNA sentezi için gerekli DNA-polimerazı inhibe ederek etki gösterir.

#### **1.2.2.3. Folik Asit Antagonistleri**

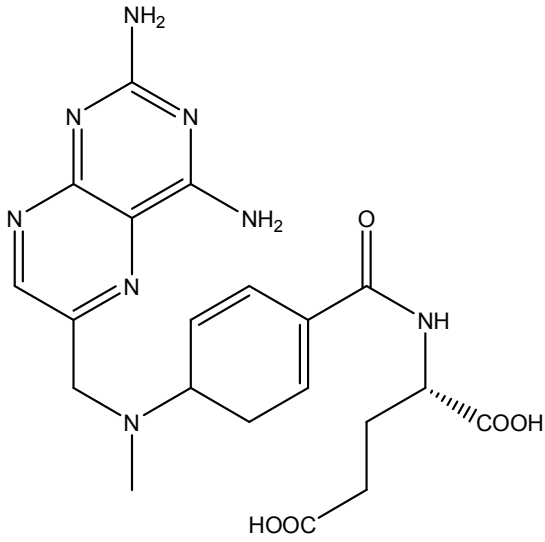
Antimetabolit ilaçlar arasında en eskisi folik asit antagonistleridir. Folik asit DNA/RNA sentezinde nükleotid ve bunlardan da DNA/RNA polimer oluşmasında önemli rol oynar. Bu ilaçlara örnek olarak metotreksat, aminopterin ve ametopterin verilebilir. Ametopterin, pürin halkası için gerekli olan bir karbon transferini inhibe etmek suretiyle etki gösterir.



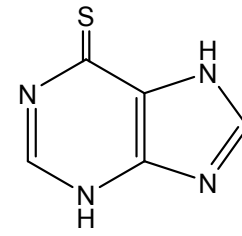
Pentostatin



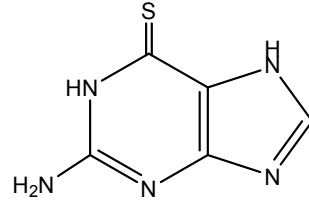
Sitarabin



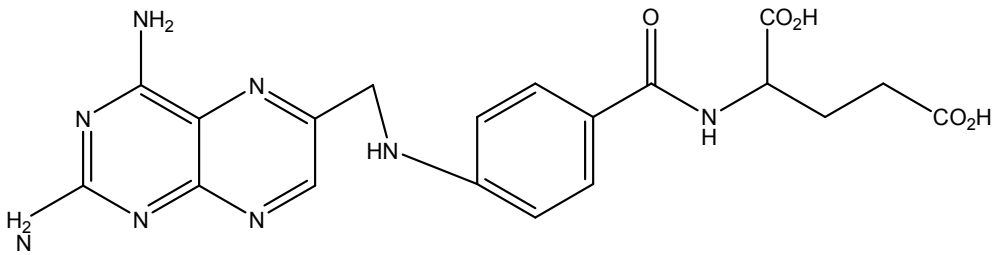
Metotreksat



6-Merkaptopürin



Tiyoguanin



Aminopterin

Şekil 4. Antimetabolit bileşikler

Antimetabolit ilaçlar, kanser hücrelerinin DNA sentezi ile normal hücrenin DNA sentezini ayıramamaktadır. Bu nedenle bu grup bileşiklerin sitostatik etkileri selektif olmayıp toksisiteyi yüksek ve klinikte kullanımları sınırlıdır.

### **1.2.3. Antibiyotikler**

Bu grup ilaçlar arasında aktinomisin-D, daunorubidomisin, bleomisin sayılabilir. Antibiyotikler, hücre kromozomu ile hücreye verilen metabolik ve işlevsel emirler zincirini bozar. Bu ya haberci-RNA, ya ribozomal-RNA ya da çözünebilir-RNA'yı etkileyerek olur.

### **1.2.4. Vinka Alkaloidleri**

Hücre çoğalmasının mitoz fazında etkiledikleri için mitostatik ajan da denebilir. Kanser tedavisinde en çok kullanılan mitostatik ilaçlar vinkristin ve vinblastin alkaloidleridir.

### **1.2.5. Steroid Hormonlar**

Steroid hormonlardan östrojen, androjen ve progesteronlar genellikle gelişme ve büyümeleri hormonal etkilere bağlı kanser türlerinde kullanılırlar. Etkilerini doğrudan kanserli dokuyu inhibe etmek veya dolaylı olarak diğer hormon salgılarını azaltmak suretiyle gösterirler.

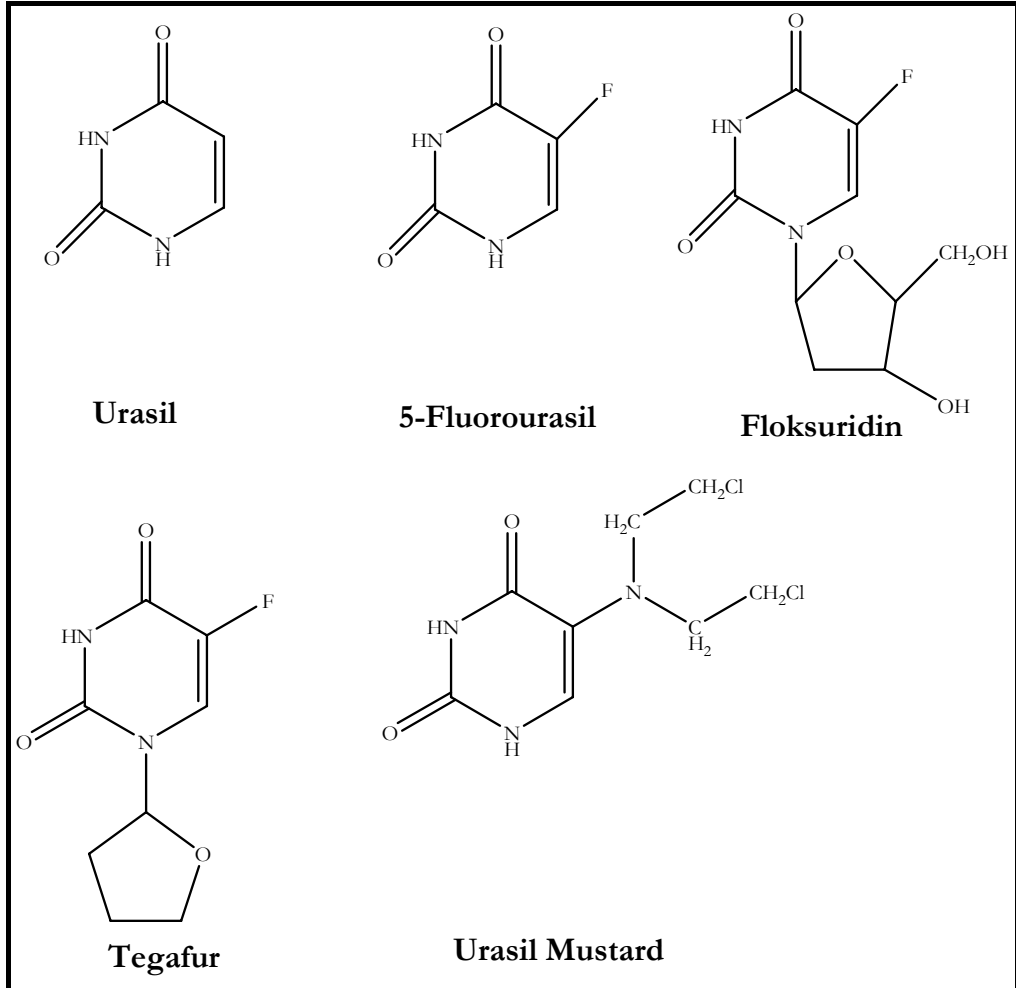
### **1.2.6. Diğer Bileşikler**

Metilhidrazin, hidroksiüre, kolsemid, karboksimit (DTIC), L-Asparaginaz, streptonigrin ve cis-platin bu grup ilaçlara örnek olarak verilebilir.



### 1.3.Urasil ve Türevlerinin Kanser Tedavisindeki Yeri

Urasil ve türevleri kanser tedavisinde önemli yere sahip bileşiklerdir. Türevlerin bir kısmı antimetabolit etki gösterirken bir kısmı da alkilleyici özelliindedir (Şekil 5). Urasilin kendisi tek başına kanser tedavisinde kullanılmaz. Tegafur ile kombine edildiğinde, urasilin 5-FU'nun katabolizmasını inhibe etmek suretiyle tümörlü dokuda 5-FU'nun düzeyini ve etkisini arttırdığı bilinmektedir.



Şekil 5. Tedavide kullanılan urasil ve türevleri

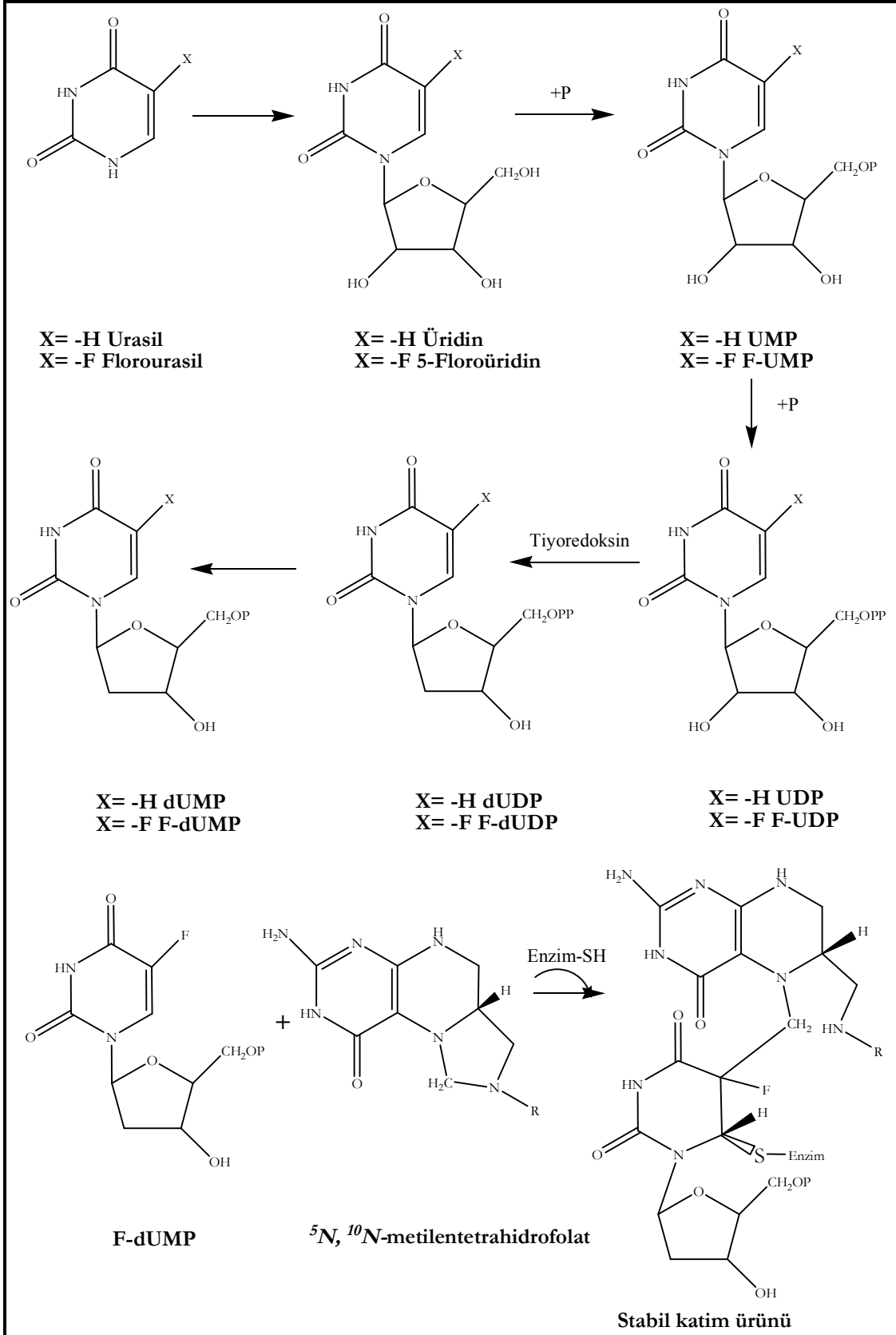
### 1.3.1. 5-Florourasil (5-FU)

5-FU, 1962'de FDA tarafından onaylanıp tedaviye girmiş bir bileşiktir. Yarılanma ömrü kısadır (0,5-1 saat) ve eliminasyonu böbrekler aracılığıyla olur. Döneme özgü bir antimetabolit etkili bir ilaç olan FU timidilat sentetaz enzim inhibisyonu ile DNA sentezini inhibe eder (S fazında maksimum aktivite gösterir).

5-FU, timidin nükleobaz biyosentezinde etki gösterir. Urasilin timidine değişiminde ön basamak deoksiüridin monofosfattır (dUMP). dUMP molekülünün 5 konumundan <sup>5</sup>N, <sup>10</sup>N-metilentetrahidrofolat ve timidilat sentetaz enzimleri ile metillenmesi sonucunda DNA sentezi için gerekli deoksitimidilat monofosfat (dTMP) oluşur. 5-FU'nun 5 konumunda bulunan flor atomu ile urasildeki 5 konumundaki hidrojen Van-der Waals etkileşmede benzerlik gösterir. 5-floroüridin monofosfat (F-UMP) substrat olarak 5-floro-2'-deoksiüridindifosfata (F-UDP) dönüşür. F-UDP'den bir fosfat koparak sitotoksik 5-fluoro2'-deoksiüridinmonofosfat (F-dUMP) oluşturur. F-dUMP'nin timidilat sentetaz enzimine afinitesi dUMP'nin afinitesinden daha fazla olduğundan, F-dUMP enzime stabil bir şekilde bağlanarak enzimi bloke eder (Şekil 6) ( F-UMP aynı zamanda RNA nın işleyişini yavaşlatan aktiviteye de sahiptir).

### 1.3.2. Urasil Mustard

Oral yoldan kullanılan azotlu hardal türevi alkilleyici antineoplastik bir ajandır. Kronik lenfositik lösemi, histiositik veya lenfositik tipte non-Hodgkin lenfoma ve kronik miyelojen lösemnin palyatif tedavisinde, erken dönemdeki polisitemi vera ve mikozis fungoides tedavisinde de kullanılır. Şekil 5'te görüldüğü gibi hardal yapısı pirimidin halkasına doğrudan bağlanmıştır.



Şekil 6. 5-FU'nun etki mekanizması

### **1.3.3. Tegafur**

Bir ön-ilaç olan Tegafur, vücutta kademeli olarak aktif metaboliti olan 5-FU'ya dönüşür. Tedavide urasil ile kombinasyonu (1:4 oranında) 5-FU'nun metabolizmasını azaltarak daha yüksek konsantrasyon sağlar. Kombinasyon, kolon/rektum, meme, mide, baş ve boyun, karaciğer, safra kesesi, safra kanalı, pankreas, mesane ve serviks kanserlerinin tedavisinde ekilidir.

### **1.3.4. Floksuridin**

5-FU'nun deoksiribonükleozid türevidir. İntrahepatik uygulamada 5-FU'ya tercih edilmesinin nedeni, karaciğerden geçişte sistemik dolaşımdan daha yüksek oranda uzaklaştırılması ve sistemik toksisite potansiyelinin daha düşük olmasıdır. Antimetabolit olarak etki gösterir.

## **1.4. Urasil-Mannich Bazları Üzerinde Yapılmış Çalışmalar**

Urasil-Mannich bazları üzerine çalışmalar 1960'lı yıllara kadar uzanmaktadır. Yapılan ilk çalışmaların bazılarında urasil molekülünün aminometillemesi Mannich tepkimesi yoluyla değil, alkilleme yoluyla yapılmıştır. Örneğin Ross ve arkadaşları 5-bis(2-kloroetil)aminometilurasil'in sentezini, 5-klorometilurasilin dietanolamin ile tepkimesinden elde ettiği 5-bis(2-hidroksietil)aminometilurasili tiyonil klorür ile klorlayarak elde etmiştir (12). Urasil molekülünün Mannich tepkimesi yolu ile hazırlanan 5-bis(2-kloroetil)aminometilurasil Elderfield ve arkadaşları tarafından (13); 5-(dimetilamino)metilurasil Delia ve arkadaşları tarafından (14), 5-morfolinometilurasil ve 5-piperidinometilurasil Burckhalter ve arkadaşları

tarafından (15) sentez edilmiştir. Farkas ve arkadaşları, bu bileşiklerden 5-bis(2-kloroetil)aminometilurasilin anlamlı sitotoksik aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir (16). Diğer urasil-Mannich bileşiklerinin biyolojik aktiviteleri üzerine çalışmalar yapılmamıştır.

### **1.5.İlaç Tasarlama da Moleküllerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Önemi**

Genel olarak biyolojik aktivite, ilaçların fizikokimyasal (yapısal, fiziksel ve kimyasal) özelliklerinin bir fonksiyonu şeklinde düşünüldüğünden, bir ilaç molekülünde bu özelliklerin herhangi birinin değişmesi biyoaktivitede değişikliklere neden olur. Nicel yapı-etki ilişkisi (QSAR) bileşiklerin biyolojik aktivitelerini nicel ve sistematik kalıplar içerisinde kendi fizikokimyasal özellikleri ile açıklar (17).

İlaç tasarlama da QSAR yaklaşımlarından yararlanılır. Bunlar:

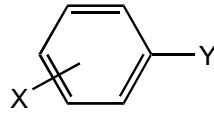
- a) Hammett Korelasyonu,
- b) Hansch Analizi,
- c) Log P,
- d) İyonlaşma Değişmezi ( $K_a$ ),
- e) Topliss Yaklaşımı

### a) Hammett Korelasyonu

Bu korelasyon homolog bir seride aromatik halka üzerindeki bir sübstitüentin elektronik yapısı (elektron-verme ya da elektron-çekme özellikleri) ile kimyasal tepkinliği arasındaki nicel ilişkiyi açıklar (18).

Hammett değişmezi ( $\sigma$ ) bir aromatik halkanın meta ve para konumlarındaki sübstitüentlerinin indüktif ve rezonans etkilerinin toplamı olan elektronik etkisinin nicel ifadesidir.  $\sigma$  elektron veren gruplar için (-), elektron çeken gruplar için (+) işaretini alır. Pek çok sübstitüentin Hammett değişmezleri çeşitli çalışmalarla deneysel olarak belirlenmiştir (19, 20).

Yeterli sayıda sentez yapıldıktan sonra bulunan değerlerin standart sapmaları ve hata oranları saptanır. Böylece istenildiği zaman artık başka sentez yapılmadan belirli molekül etkisini yönlendirecek ya da nicel olarak değiştirecek gruplar için bilgi edinilmiş olur. Bu tür incelemelerde fizikokimyasal parametreler kullanılır. Aşağıdaki formülde görülen genel yapıda Y yan zincirinin etkinliği ile X sübstitüentinin özelliği ve yeri arasında bir ilişki vardır.



Bu ilişki aşağıdaki denklemlerle verilir:

$$P_{\sigma} = k^X/k^H$$

Bu denklemde  $k^H$  nonsübstitüe bileşiğin reaksiyonları için denge değişmezidir.  $k^X$  sübstitüe olmuş bileşiğin reaksiyonları için denge değişmezidir.  $\sigma$ , yalnız X sübstitüentinin özelliğine ve yerine bağlı bir

değişmezdir. Sonuç olarak süstitüe olmuş bileşiğin etkinliği ( $\log K^X$  olarak verilen değer) doğrusal olarak  $\sigma$  ile ilişkilidir. P ise süstitüentin etkisini simgeler.

### **b) Hansch Analizi**

Hansch kavramına göre ilaç etkisi iki etkene bağlıdır. Biyolojik bakımdan aktif bileşiklerin uygulandığı yerden etkili oldukları yere taşınımı bileşiğin dağılım (partisyon) katsayısı ile ilgilidir. Etkili oldukları yöredeki ilaç ve reseptör etkileşmesi molekülde bulunan aktif işlevsel grupların tepkinliklerine bağlıdır. Hansch modeline göre; bileşiklerin hidrofobik, elektronik ve sterik özellikleri nicel biyolojik yanıtını belirler.

Herhangi bir bileşiğin X süstitüentinin çözünürlük üzerine etkisini araştırmak için,

$$\pi = \log P_X/P_H$$

eşitliğinden yararlanılır.

Bu eşitlikte  $P_H$ , nonsubstitüe bileşiğin,  $P_X$  süstitüe bileşiğin partisyon katsayısını,  $\pi$  ise Hansch hidrofobik süstitüent değişmezini gösterir.  $\pi$  değerinin pozitif bulunması incelenen X süstitüentinin molekülün yağdaki çözünürlüğünü ana bileşiğin yağdaki çözünürlüğüne göre arttırdığını gösterir.  $\pi$  değerinin negatif bulunması ise bunun aksini ifade eder. Hansch hidrofobik süstitüent değişmezinde gözlenen farklılıkların  $\sigma$  ile ifade edilen elektronik etkileşmeden kaynaklandığı kanıtlanmıştır (21). Optimum dağılım katsayılı ( $\log P$ ) bir bileşik, bu değerden daha büyük ya da daha küçük  $\log P$ 'ye sahip

bileşiklerden daha yüksek konsantrasyonda etki yöresine ulaşır. Bileşiklerin hem  $\pi$  değeri, hem de log P değeri ile biyolojik aktivite arasında bir korelasyon kurulabildiği için  $\pi$  değerinin literatür bilgileri arasında bulunmadığı durumlarda log P değeri ve bundan yararlanarak  $\pi$  değeri deneysel olarak saptanabilir.

### c) Dağılım (Partisyon) Katsayısı (P )

Kimyasal yapı ve biyoaktivite arasında ilişkiyi yönlendiren baskın parametrenin seçilmesi ilaç tasarımında önemlidir. Biyolojik açıdan aktif birçok bileşiğin biyoaktivitelerini yönlendiren en önemli özelliğinin onların lipofiliteleri olduğu anlaşılmıştır. Lipofiliteler genellikle oktanol-su çözücü sistemi kullanılarak partisyon katsayısının hesaplanması yoluyla ölçülebilir.

Bir ilacın dağılım katsayısı, o ilacın organik çözücü-su karışımında çalkalandığında organik çözücü ile suya geçen niceliğinin oranıdır.

$$P = C_1 / C_2$$

$C_1$  : Organik faza geçen madde miktarı

$C_2$  :Su fazında bulunan madde miktarı

Dağılım katsayısı bir ilacın yapı-etki ilişkisinin araştırılmasında, ve kemoterapötik bileşiklerin geliştirilmesinde önemlidir (22). Yapı-etki ilişkisi çalışmalarında sık kullanılan parametreler karşılaştırıldığında, regresyon analizi, biyoaktivite korelasyonunda log P (oktanol-su) değerinin çalışılan diğer parametrelerden daha önemli olduğunu göstermiştir (23).



#### d) İyonlaşma Değişmezi (Ka)

Her asit ya da baz sulu ortama alındığında, yapısına bağlı olarak değişik iyonizasyon oranlarında dissosiyeye olur. Asitlerin ya da bazların dissosiyasyonunu etkileyen nedenlerden birisi de içinde buldukları ortamın pH'sıdır. Eğer ortam asidik ise bazik ilaçlar katyonik durumda, eğer ortam bazik ise asidik ilaçlar anyonik durumda olmayı tercih ederler. Her iki pH derecesinde de söz konusu bileşikler iyonize durumdadır.

Zayıf asit ya da zayıf baz niteliğinde olan ilaçların lipoid nitelikteki zarlardan geçişleri ne kadar iyonize olduklarına bağlıdır. Bu nedenle; bu tip ilaçların yüzde kaçının iyonize yüzde kaçının noniyonize olduğunun hesaplanması gerekir. Noniyonize durumda olanlar, lipoid nitelikteki zarlardan kolay geçerler. Böylece oluşan konsantrasyonun biyolojik etki üzerindeki rolü büyüktür.

İlaçlar bilindiği gibi iyonize, noniyonize, kısmen iyonize ve kısmen noniyonize olmak üzere üç şekilde bulunabilirler. Belirli pH da bir ilacın iyonize ya da noniyonize şekillerinin bağlı konsantrasyonu Henderson-Hasselbach denklemi ile hesaplanabilir.

[iyonize olmamış ilaç]

Zayıf asitler için :  $\log \frac{\text{[iyonize olmamış ilaç]}}{\text{[iyonize ilaç]}} = \text{pKa} - \text{pH}$

[iyonize ilaç]

[iyonize olmamış ilaç]

Zayıf bazlar için:  $\log \frac{\text{[iyonize olmamış ilaç]}}{\text{[iyonize ilaç]}} = \text{pH} - \text{pKa}$

## [İyonize ilaç]

Bu denklemlerden çıkararak her zaman zayıf asit ya da zayıf baz özellikteki bir ilacın belirli bir pH' da iyonize ya da noniyonize kısımlarının konsantrasyonunu hesaplamak mümkündür.

(B)

$$\text{pH} = \log \frac{[\text{B}]}{[\text{BH}^+]} + \text{pKa}$$

Zayıf asit içeren çözeltinin pH'sı yükseldikçe, asidin iyonik şeklinin konsantrasyonu da yükselir. Zayıf bir baz içeren çözeltinin pH'ı yükseldikçe bazın moleküler şeklinin konsantrasyonu yükselir.

Hendersen-Hasselbach denklemiyle zayıf asit molekülünün iyonizasyon yüzdesi ya da fraksiyonu hesaplanabilir. Yüzde iyonize şekil aşağıdaki denklem ile bulunur.

$$\% \text{ İyonize şekil} = \frac{i \times 100}{i + N}$$

i: İlacın iyonik şeklinin konsantrasyonu

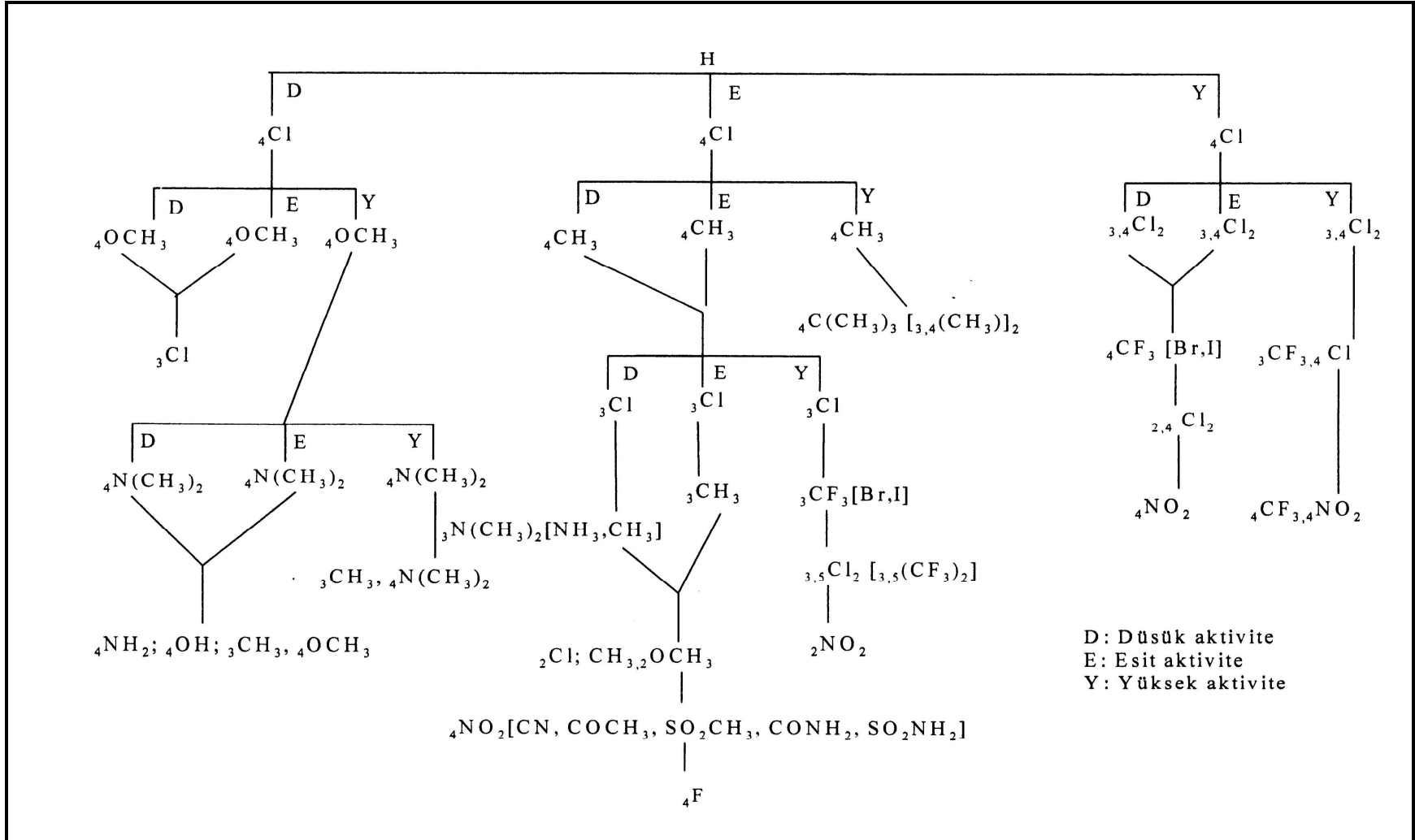
N: İlacın noniyonik (moleküler) şeklinin konsantrasyonu

Asitler, düşük pH değerinde yani asit pH'da daha güçlü biyolojik etki gösterir. pH arttıkça etki düşmeye başlar. Çünkü bu sahada iyonizasyon artmaktadır. Bunun tam tersi zayıf bazlar için doğrudur.

Moleküller genellikle hücre zarlarını parçalanmamış ve dissosiyeye olmamış şekilde geçerler. Zayıf asitler, düşük pH'larda nondissosiyeye durumda bulunacakları için bu pH'larda hücre zarlarını kolay geçerler. Aynı bileşikler yüksek pH değerinde iyonize olmaya başlarlar. Bu ise hücre zarlarını en zor geçebilecekleri durumdur. Bu nedenle daha düşük etki gösterirler. Bunun tam tersi durum da zayıf bazik bileşikler için söz konusudur.

#### **e) Topliss Yaklaşımı**

Topliss yaklaşımı Hansch analizine benzer bir yöntemdir. Hansch yönteminden farkı kompüterize olmamasıdır. Bu yaklaşım model bileşiğin aktivitesini optimize etmek için kullanılan nispeten basit ve matematiksel olmayan bir yoldur. Topliss'in "Karar Ağacı" yaklaşımı aromatik halkaları ve yan zincirleri modifiye etmek için kullanılır (24). Bu yöntem aromatik türev serilerinin hazırlanmasını ve adım adım sentez edilmesini içerir. Aril halkalı bileşiklerde önce 4-kloro analogu hazırlanır ve bunun biyolojik aktivitesi nonsüstitüe bileşiklerle karşılaştırılır. Eğer 4-kloro türevi daha aktifse bir sonraki basamakta 3,4-dikloro türevi sentezlenir. Böylece hem  $\pi$  hem de  $\sigma$  değerleri önemli ölçüde artırılmış olur. Eğer 4-kloro türevi ana bileşikten daha az aktifse  $\pi$  ve  $\sigma$  değerlerini ana bileşiğe göre daha düşürmek amacıyla 4-metoksi türevi hazırlanır. 4-kloro türevi ana bileşikle eşit aktiviteye sahipse 4-metil analogu hazırlanır.  $\pi$  ve  $\sigma$  değerleri göz önünde tutularak bu sistematik basamaklandırma işlemine optimum aktivite elde edilinceye kadar devam edilir.

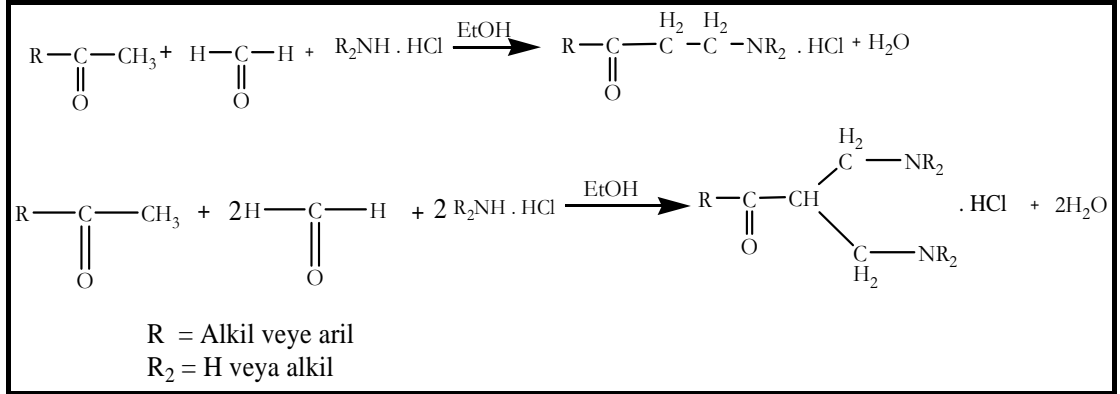


Şekil 7. Topliss'in karar ağacı

## 1.6. Sentez Tepkimeleri

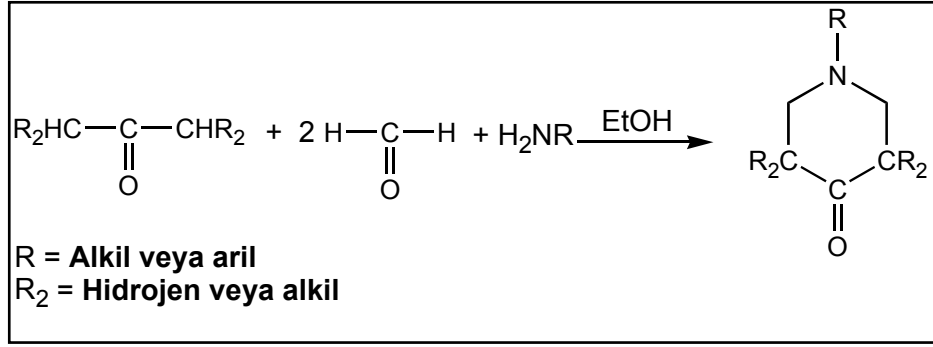
### 1.6.1. Mannich Tepkimesi

Klasik Mannich tepkimesi birincil ve ikincil aminlerin veya ender olarak amonyağın genellikle hidroklorür tuzları şeklinde bir aldehit (genellikle formaldehit) ve en az bir aktif hidrojen taşıyan bir bileşikle kondensasyonunu kapsar (25-27). Tepkimenin ana özelliği aktif hidrojen atomunun birincil, ikincil veya üçüncül amin türevlerini yani Mannich bazlarını vermek üzere aminometil ya da sübstitüe aminometil grupları ile yer değiştirmesidir. Eğer substratta birden çok aktif hidrojen varsa birden çok aminometilleme gerçekleşecektir (şekil 8).



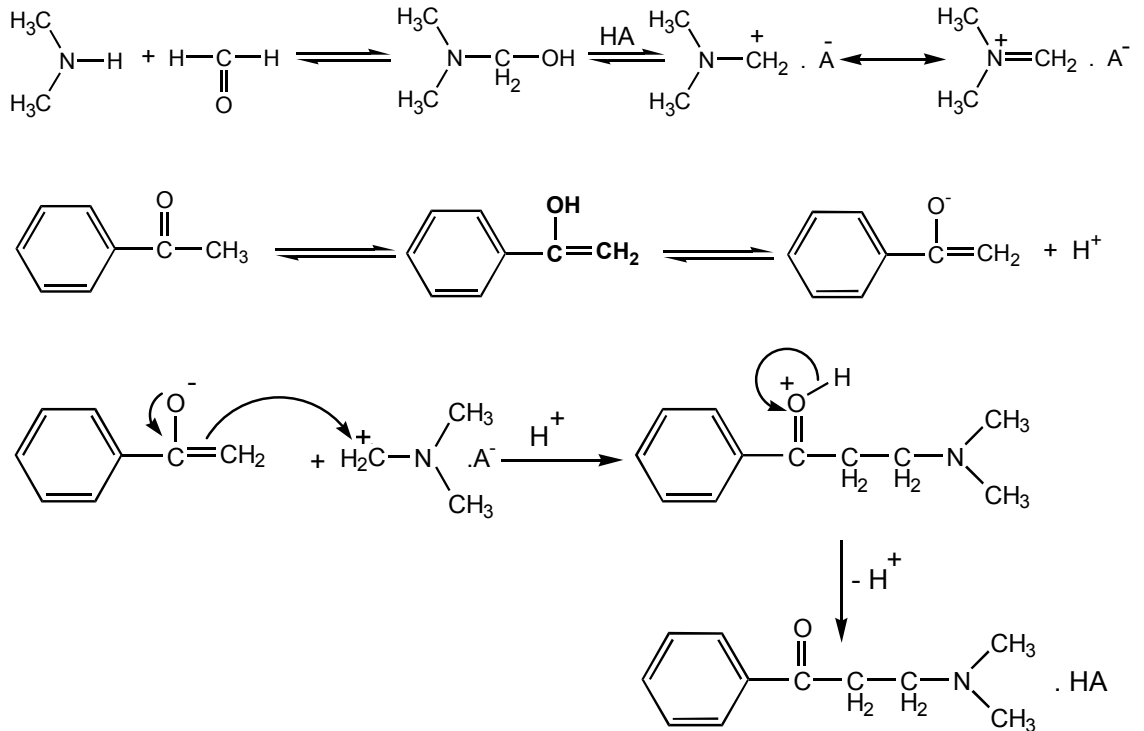
**Şekil 8. Monoaminometilleme sonucu oluşan mono-Mannich bazı ve diaminometilleme sonucu oluşan bis-Mannich bazı**

Aynı molekülde farklı yerlerde aktif hidrojenler varsa birincil amin ya da amonyakla yürütülen Mannich tepkimeleri ile halkalaşmış Mannich bazları elde edilir (28) (şekil 9).



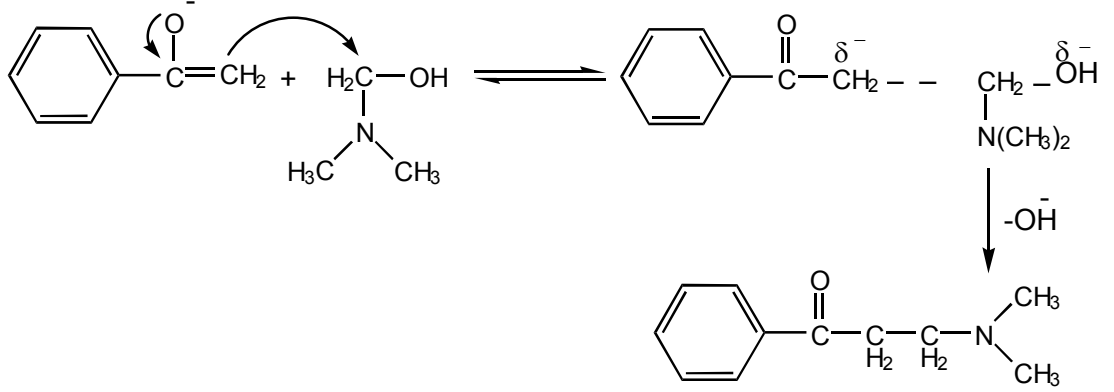
Şekil 9. Halkalaşmış Mannich Bazı

Mannich tepkimesi asidik veya bazik koşullarda uygun çözücüler (genellikle alkoller ve protik çözücüler) kullanılarak (geri çeviren soğutucu altında) yürür. Asetofenonun asit ve baz katalizli aminometilleme tepkime mekanizması aşağıda özetlenmiştir (şekil 10).



Şekil 10. Asit Katalizli Amino Metilleme

Asidik koşullarda amin büyük ölçüde tuz şeklinde bulunacağı için tepkime iminyum iyonu üzerinden yürür. Bununla birlikte bazik koşullarda mekanizma, iminyum iyonu yerine sadece dimetilaminometanol ara ürünündeki hidroksilin, oluşan asetofenon karbanyonu ile yer değiştirmesi şeklinde açıklanabilir. Tepkime mekanizması SN2'dir (şekil 11).



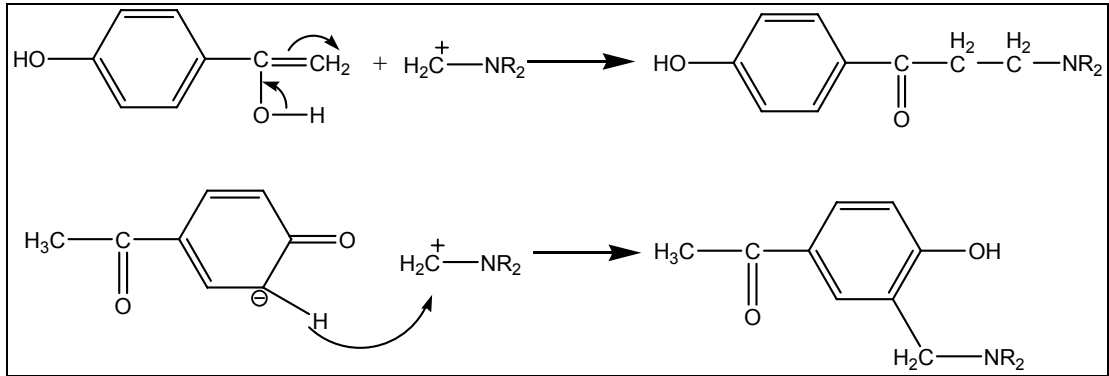
**şekil 11. Baz Katalizli Amino Metilleme**

Bifonksiyonel aminlerle ya da substratlarla yürütölen Mannich tepkimeleri polimerik makromolekülleri verir (29). NH-amitler Mannich tepkimelerinde amin reaktifi gibi davranan substratlardır.

Mannich tepkimelerinde genellikle formaldehit kullanılır. Bununla birlikte amino alkilleme amacıyla arilaldehitlerin de kullanılması olanaklıdır. Aktif hidrojen bileşiği olarak ketonların kullanıldığı bazı durumlarda molekül içi aminoalkilleme gerçekteşerek halkalı türevlerin olduğu bilinmektedir (30).

Mannich sentezinde birden çok yerde aminometillemeye elverişli merkezler taşıyan substratlarla çalışıldığı zaman kemoselektiviteyi sağlamak olanaklıdır. Örneğin alkil keton grubunun bağlı olduğu fenollerde tepkime ortamının pH'sına göre aminoalkilleme kemoselektivite gösterebilir. Asidik

koşullarda alkil-keto gruplarından, nötral ya da bazik koşullarda aromatik halkadan Mannich tepkimesi yürür (31) (şekil 12).



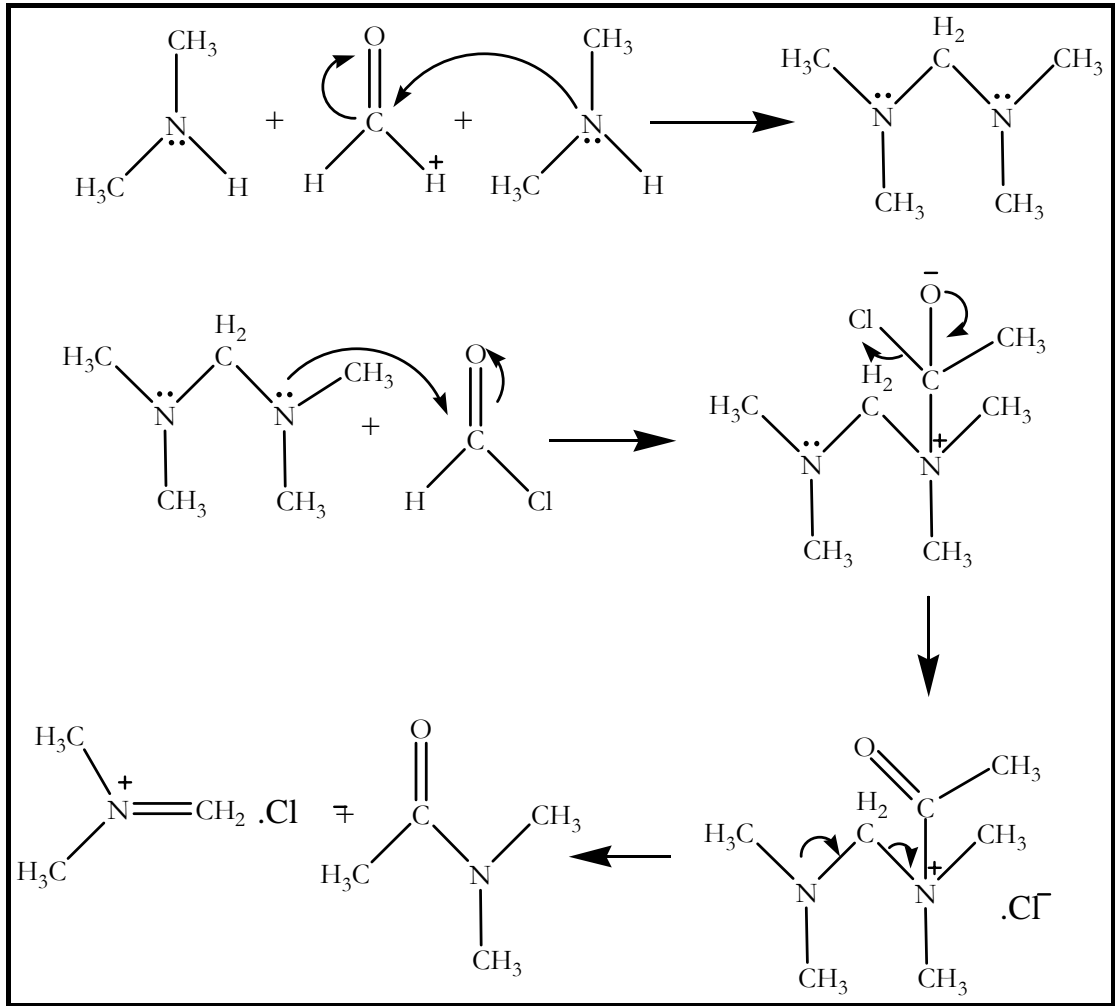
**Şekil 12. Yan zincirden ve halkadan aminometilleme**

Asimetrik ketonların  $\alpha$ - ya da  $\alpha'$ -CH' in hangisinden, fenollerde orto-, ya da para- konumlarının hangisinden veya heterosiklik moleküllerde CH ya da NH gruplarının hangisinden aminometillemenin gerçekleşeceği sorusu Mannich tepkimelerinde regioselektivite bakımından yanıt verilmesi gereken önemli bir sorudur. Bis-Mannich bazlarının sentezinde Mannich tepkimesi yavaş yürür. Bu tip tepkimelerde büyük oranda mono-Mannich bazlarının ve piperidinol türevlerinin oluşması nedeniyle verim düşük olmaktadır .

### 1.6.2. Mannich Reaktifi

Klasik Mannich tepkimesinin yeterli olmadığı durumlarda aminometilleyci olarak önceden hazırlanmış iminyum tuzları kullanılır. Bu tuzlara Mannich reaktifi adı verilir. Metilen iminyum tuzlarını en uygun hazırlama yöntemi uygun metilen-bisaminlerin asetil halojenürlerle tepkimesini içerir (32). Metilen iminyum tuzları susuz ortamlarda ve düşük sıcaklıkta yüksek verimle oluşur. Mannich reaktifinin oluşumuna ait tepkime mekanizması aşağıda (şekil 13) örneklenmiştir.





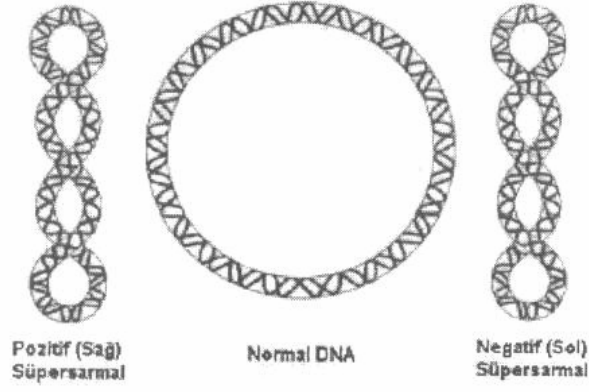
**Şekil 13. Mannich reaktifinin oluşumu**

## **1.7. Biyoaktivite Testleri**

### **1.7.1. Topoizomeraz I Enzim İnhibisyonu Testi**

#### **1.7.1.1. DNA Topolojisinin ve Topoizomeraz Enzimi Hakkında Genel Bilgiler**

Prokaryotik DNA ve ökaryotik hücre organellerindeki DNA molekülerinin çoğu, kapalı halkasal ve çift iplikli moleküllerden meydana gelmektedir. Bu, iki adet tamamlayıcı tek ipliğin bir halka içinde kaynaşması ve DNA'nın sarmal yol ile birbirleri etrafında bükülmeleri anlamına gelir. Halkasal çift iplikli DNA için, bir ipliğin diğeriyle kaç kez bağlandığına göre birden fazla izomerik şekil mevcut olup, bu da bağlantı sayısı (Lk) olarak ifade edilir. Topolojik bir parametre olan bağlantı sayısı, molekülün iki geometrik özelliği ile ilgilidir. Bunlar; sarmal eksen etrafında ipliğin dönmesi yani bükülme (Tw), uzayda sarmal eksen yolunun ölçüsü yani kıvrılma (Wr) dır. Bu özellikler  $Lk = Tw + Wr$  formülü ile ilişkilendirilir. DNA'nın bu zorunlu halkasal yapısındaki bükülme süper sarmallık olarak bilinir. Eğer, DNA'daki büküm (Tw), iki iplik ile aynı yönde olursa, yani heliks kapanmadan önce bükülmüşse süper sarmallık pozitif, heliks kapandıktan sonra bükülmüşse süper sarmallık negatif olarak ifade edilmektedir (Şekil 14) (33).



**Şekil 14. Normal ve süper sarmal DNA'lar**

Kapalı halkasal bir DNA'nın bağlantı sayısı topolojik bir özelliktir, bu özellik, DNA omurgasını oluşturan iplikçiklerden biri ya da ikisi kırılmadan değiştirilemez. Birbirinden farklı bağlantı sayısına sahip DNA molekülleri birbirlerinin izomerleri olarak adlandırılır. Bir başka deyişle topoizomerler, aynı çift yapılı, DNA moleküllerinin farklı konformasyonlarıdır. Hücrelerdeki DNA moleküllerinin hemen hepsi ortalama olarak süper sarmaldır. DNA, süper sarmallık sayesinde çok küçük bir hacim içerisinde oldukça yoğun bir şekilde bulunabilir. Belki daha da önemlisi, belirli proteinlerin DNA ile karşılıklı etkileşimini içeren pek çok *in vivo* DNA ilişkili süreçlerin üzerinde DNA süper sarmalının direk etkisinin olmasıdır. Proteinlerin DNA'ya bağlanması sıklıkla süper sarmallığa bağlıdır. Negatif süper sarmal DNA, sınırlandırılmamış DNA'yla kıyaslandığında yüksek enerjili bir şekle sahiptir. Buradaki fazla enerjinin protein bağlaması sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. DNA'nın sarmal yapısı ve onun kapalı-halkasal doğası replikasyon ve transkripsiyon gibi süreçlerde bir dizi soruna neden olabilmektedir. Bu sorunların çözümü için özel mekanizmalara gerek vardır. Topoizomerazlar, DNA'daki bu konformasyonel değişiklik sorununu çözmek için gelişmiş olabilirler.

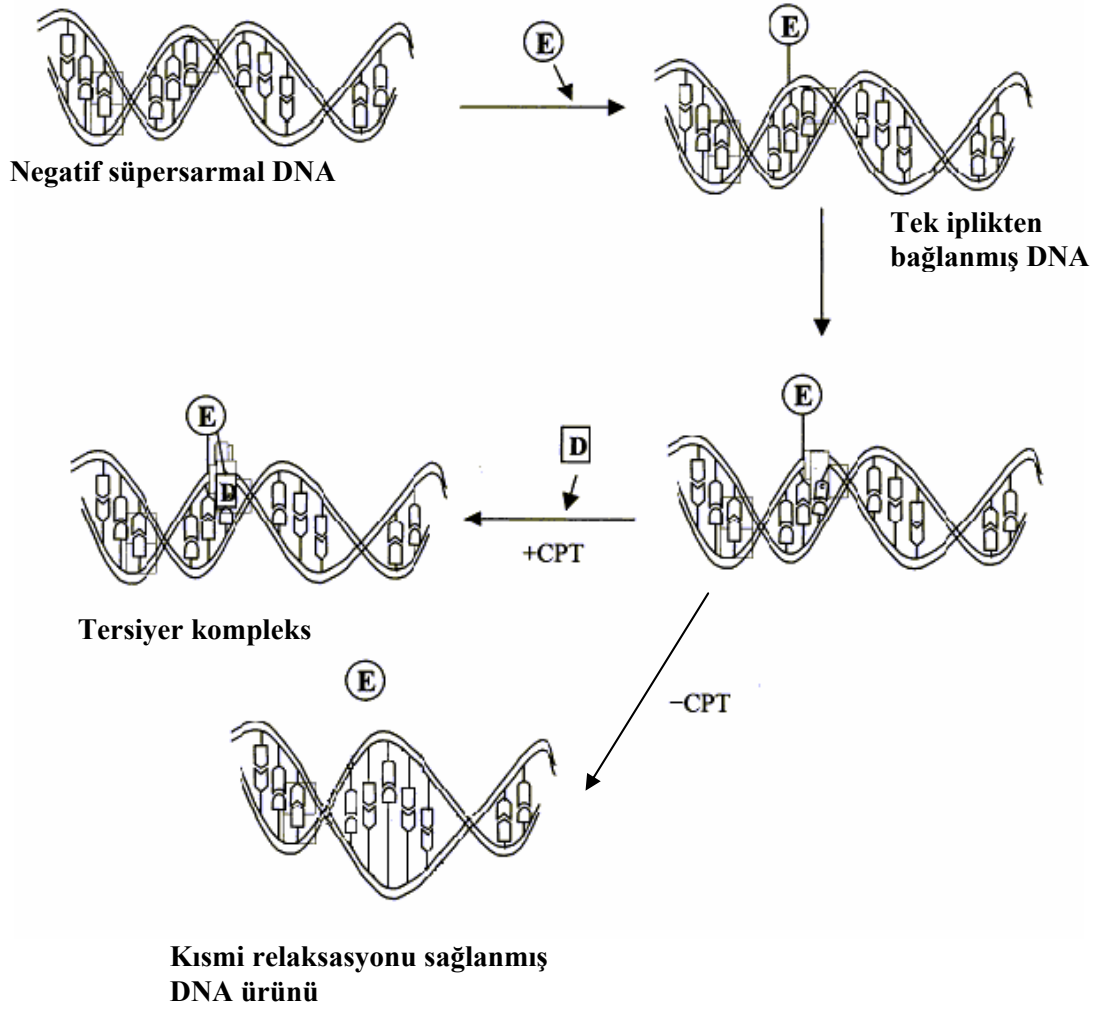
DNA'nın replikasyonu sırasında bu tür süper sarmalların oluşması **DNA topoizomerazlar** adı verilen bir grup enzim tarafından önlenmektedir. DNA molekülünün uzaydaki üç boyutlu geometrik şeklini değiştirdiği için DNA topoizomeraz olarak adlandırılan ve ilk olarak 1971 yılında Wang tarafından keşfedilmiş olan bu enzimler, bütün bakteri ve ökaryotik hücrelerde bulunmaktadır. DNA topoizomerazlar hücre bölünmesinde transkripsiyon, rekombinasyon, kromatin toplanması ve kromozom ayrılmasını içeren değişik hücresel süreçler sırasında ortaya çıkan topolojik problemleri çözeceği iddia edilen ve her yerde mevcut olan enzimlerdir. *E. Coli* topoizomeraz l'inin keşfinden beri araştırmacılar prokaryot ve ökaryotlardan başka birçok DNA topoizomerazları izole etmişlerdir. Topoizomerazlar DNA metabolizması ve kromozom yapısında önemli role sahiptirler, bundan dolayı da hücre döngüsünün hemen hemen tüm aşamalarında önemlidirler. Topoizomerazlar DNA'ya bağlanırlar ve bir yarık kompleksi oluştururlar. Enzimatik aktiviteleri DNA'nın katenasyon (birbirinin içine geçme), dekatasyon ve relaksasyonuna olanak sağlar (34, 35, 36, 37).

Süper sarmal oluşturan, uzaklaştıran veya her ikisini de yapan bu enzimlerin Tip I ve Tip II olmak üzere iki türü vardır:

**Tip I DNA topoizomerazlar:** DNA molekülünün bir zincirini geçici olarak koparan ve tekrar birleştiren bu enzimlerin hem nükleaz (zincir koparan) hem de ligaz (zincir bağlayan) aktiviteleri vardır. Bu işlem için herhangi bir enerjiye ihtiyaç duymazlar. Enzim, DNA'ya bağlanır ve bir zinciri keser. Kesilmiş DNA zinciri, kesilmemiş DNA zincirinin alt kısmından geçer ve kırılmış olan iplik tekrar kapatılır. Bu işlem sonunda negatif süper sarmal sayısında bir tane eksilme olur. Bu işlemde sorumlu enzim ailesi tip I

topoizomerazlar olarak adlandırılır. *E. Coli* topoizomeraz I enzimi, süper sarmal DNA'yı relaks (gevşek) haldeki DNA'ya dönüştürürken, ökaryotik topoizomeraz I enzimleri, hem negatif hem de pozitif süper sarmal DNA'yı relaks forma dönüştürebilirler (38).

Topoizomeraz I, DNA'da geçici tek iplik kırılmalarını başlatır ve kırılmanın tekrar kapanmasından önce diğer ipliği ayrığa doğru geçirir. Çift iplik DNA ile topoizomeraz I arasındaki reaksiyon genellikle ayrılabilen kompleks olarak tanımlanan bir kovalent bağ ile bağlanmış 3'-fosfotirozil ürününü oluşturur. Fizyolojik koşullarda enzim tarafından katalizlenen DNA ayrılma ve bağlanma reaksiyonları sıkı bir şekilde koordine edilmekte olup, kovalent ara ürünün tespiti ise oldukça zordur. Yarık, DNA çiftini sürekli yenilemek için tekrar uç uca gelerek çift oluşturur. Kamptotekin gibi birçok ilaç, hücre ölümünden sorumlu kalıcı DNA kırıklarının şekillenmesini arttırarak religasyon (yeniden uç uca gelme) basamağının önlenmesiyle topoizomeraz I'i bir hücre zehrine dönüştürebilir. Yeterli ve düzenli onarılabildikleri için tek iplik kırılmalarına, hücrelerde non-toksik olduğu düşünülen topoizomeraz I neden olmaktadır. Ancak, çift iplik kırıklarındaki dönüşüm, ayrılmış kompleksin hareketli bir replikasyon çatallıyla karşılaştığı zaman oluşur ki bu da potansiyel olarak ölümcül doku harabiyeti meydana getirmektedir (39). Topoizomeraz I enzimi ile DNA'nın replikasyonu aşağıda şematize edilmiştir (Şekil 15) (33).



**E = Topoizomeraz I**  
**CPT = Kamptotekin**

### Şekil 15. Topoizomeraz I enzimi ile DNA'nın replikasyonu

Topoizomerizasyon döngüsü, enzimin çift iplikli süper sarmal DNA'ya bağlanmasıyla başlar. Bu noktada etkileşim büyük ölçüde reaksiyona giren iki türün yüzey ve yük dengelenmesiyle kontrol edilir. İki kısmın konformasyonel adaptasyonu sıkı bir kompleks oluşumu ile sonuçlanırken, insan topoizomeraz I enzimidaki tirozin aktif bölgesi (Y723) DNA parçasının saldıracağı uygun bir pozisyona gelip kovalent bağlanma ile sonlanır. Topoizomeraz I'deki yarık DNA'da ancak kontrollü dönme adı verilen bir

mekanizma ile gevşetilebilen süper sarmal gerginliğin salınımını azaltır. DNA bir kez kısmi olarak gevşerse kovalent ara ürün, yapışma ve yarık açma katalitik sirkülasyonu için hazır olan Y723 artığını etkileşmek üzere bırakarak uç uca birleştirilir . Yarık oluşumunun öncesi ve sonrasında ilacın rol oynayacağı reaksiyon döngüsündeki noktaya bağlı olarak topoizomeraz I inhibitörleri DNA yarılmasının ölçüsünü azaltır veya arttırır (39).

**Tip II DNA topoizomerazlar:** DNA çift zincirine sıkıca bağlanarak her iki zincirde de geçici kırıklar oluştururlar. Sonra ikinci bir gerilime yol açarak gerilimin bu bölgeden çıkmasını sağlarlar. En sonunda kopuk uçları tekrar birleştirerek hem negatif hem de pozitif süper sarmalların birikimini önlerler. Bu işlem için ATP hidrolizi gereklidir. İlk olarak, *E. Coli*'den izole edilmiş olan enzim, *E. Coli* DNA topoizomeraz II ya da Jayraz (Gyrase) olarak isimlendirilmiştir. Bu enzim, pozitif süper sarmal DNA'yı önce relaks haldeki DNA'ya, sonra da ATP hidrolizi ile tekrar negatif süper sarmallı DNA'ya dönüşümünü katalizlemektedir. Ökaryotik DNA topoizomeraz II enzimi ise, ATP hidrolizin gerektiren bir reaksiyonla hem pozitif hem de negatif süper sarmal DNA'nın relaks forma dönüşümünü katalizlemektedir. Tip II topoizomerazlar, her iki DNA zincirini de kesebildikleri için, bu işlem sonunda negatif süper sarmal sayısında iki tane eksilme olmaktadır. Bu enzimlerin etkisi agaroz jel elektroforezi kullanılarak gösterilebilmektedir. Lk değeri 1 değer kadar farklı olan DNA'lar jelde farklı hızda hareket edeceği için bunlar ayrıştırılabilir (38).

#### 1.7.1.2. Topoizomeraz I Enziminin İnhibisyonu

DNA topoizomeraz I ve II, antikanser, antiviral ve antimikrobiyal aktiviteler için, önemli enzimlerdir (39). Topoizomerazlar, hücrel genetik

materyallerin replikasyonunun transkripsiyonu sırasında süper sarmal DNA'nın çift zincirinin topolojisini kontrol eden DNA enzimleridir. Topoizomeraz I enzimi, kanser hücresinde DNA replikasyonunu durdurarak hücrenin ölümüne sebep olur (40). Topoizomeraz I inhibitörü ilaçlar topoizomeraz I baskılayıcılar ve topoizomeraz I zehirleri olarak sınıflandırılırlar (39).

**I. Topoizomeraz I baskılayıcılar;** enzimi inhibe eden ancak DNA-topoizomeraz I kovalent kompleks ara ürününü stabilize etmeyen bileşiklere karşılık gelir. Bu grup bileşiklerin serbest enzimlerle etkileşimleri, DNA yarık bölgesine topoizomeraz I'in bağlanmasını inhibe ederek katalitik döngüdeki geri kalan tüm basamakları engellemek suretiyle gerçekleşmektedir.

**II. Topoizomeraz I zehirleri;** bu grup bileşiklere “zehir” denmesinin sebebi, enzimi güçlü bir hücrel toksine dönüştürmeleri nedeniyle. Bileşikler enzim yoluyla DNA'da yarık açılmasından sonra etki ederek ligasyonu inhibe ederler. Bu durumda ilaç, topoizomeraz I-DNA kompleksini üç yolakla dondurabilir. Bunlar şu şekilde özetlenebilir;

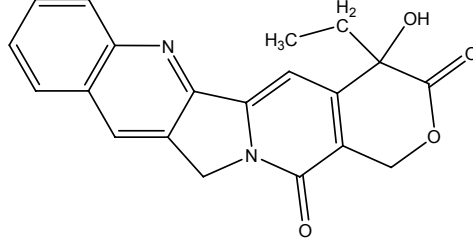
1. Enzim, oluşmuş ilaç-DNA kompleksine bağlanır,
2. İlaç, enzim-DNA ikili kompleksini spesifik olarak tanır,
3. İlaç-enzim birleşimi, DNA ile etkileşir.

### **1.7.1.3. Topoizomeraz I Enzimini İnhibe Eden Bazı Bileşikler**

Kamptotekin (CPT), *Camptoteka acuminatada*n izole edilmiş ilk topoizomeraz I inhibitörü ilaçtır. CPT günümüzde geniş spektrumlu bir antineoplastik ilaç olarak kullanılmaktadır (41). CPT'de bulunan lakton halkasının açılmış türevi ise topoizomeraz I'e karşı inaktif olarak

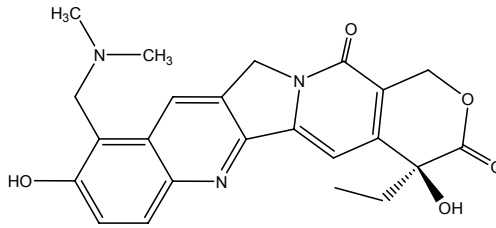


bulunmuştur. İnsan DNA topoizomeraz I'in, antikanser bir ilaç olan CPT için moleküler bir hedef olarak tanımlanması yeni topoizomeraz I hedefli ilaçların araştırılmasında tetikleyici olmuştur (42).

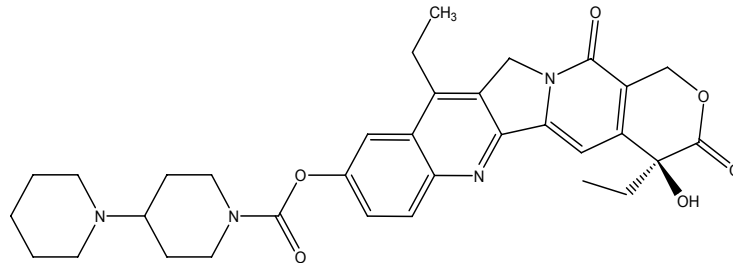


### Kamptotekin

CPT'in yarısentetik türevidir olan Topotekan günümüzde akciğer, göğüs, özafagus ve over kanseri, İrinotekan da kolon ve akciğer kanseri kemoterapisinde başarıyla kullanılmaktadırlar (40). Non-CPT inhibitörleri olan İntoplisin, Saintopin, İndolokarbazol ve benzeri bileşiklerin yakın gelecekte kanser tedavisinde önemli bir yere sahip olabilecekleri mümkün olarak görülmektedir.



### Topotekan



### İrinotekan

Netropsin ve Distomisin gibi diğer DNA minör oluk bağlayıcıları, A (Adenin)-T (Timin) içeriği yüksek olan ilaçla indüklenmiş bölünebilir bölgelere

seçicilik gösterirler, ancak, topoizomeraz I tarafından DNA bölünmesini stimüle edemezler. Distomisin DNA'nın topolojik durumuna bakmaksızın topoizomeraz I'in DNA'ya bağlanmasını engeller ancak, CPT benzeri zehir olarak davranmaz (39).

### **1.7.2. Sitotoksik Aktivite Tayini Amacıyla Kullanılan Biyoaktivite Testleri**

Sitotoksik aktivite tayini amacıyla kullanılan aktivite testleri in vivo ve in vitro yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır. En yaygın kullanılan in vitro yöntem, hücre kültüründe bileşiklerin referans bileşik kullanılarak çeşitli hücre hatlarına karşı test edilmesidir (43).

In vivo testler, çeşitli deney hayvanlarının (fare, sıçan, tavşan gibi) çeşitli vücut doku veya sıvılarındaki ilgili parametrelerin ölçülüp değerlendirilmesi ile yapılır (44).

## **1.8. Planlanan Çalışma**

### **1.8.1. Giriş**

Daha önceki araştırmalardan elde edilen veriler, yapı-etki ilişkisi kuralları içerisinde değerlendirilerek üzerinde çalışılmaya değer bileşik grubu belirlendikten sonra, bu bileşik serisi üzerinde sistematik yapısal modifikasyon çalışmaları yürütülür. Amaç, aday bileşiklerin biyoaktivitesini arttırmak ve farmakolojik-biyokimyasal etki mekanizmalarını aydınlatmaya yardımcı olmaktır. Yapısal modifikasyon çalışmalarından beklentiler genel anlamda aşağıda özetlenmiştir:

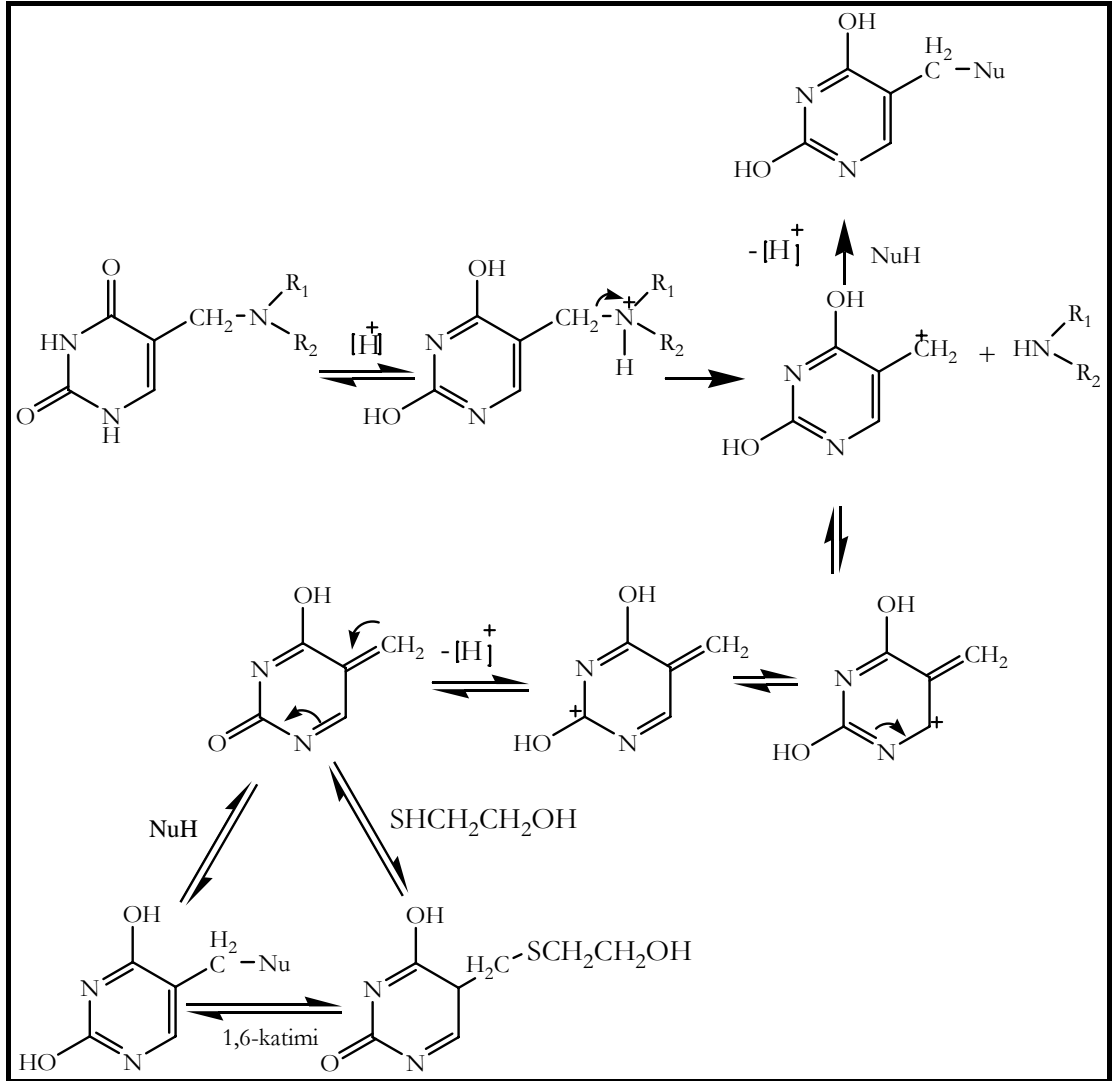
- Daha güçlü biyoaktiviteye sahip analogların geliştirilmesi

- Belirli yan etkilerden sorumlu toksisitenin en aza indirilmesi veya tamamen ortadan kaldırılması
- Etki spektrumu incelenerek biyoaktivitenin ve toksisitenin moleküler kaynaklarının belirlenmesi (selektif toksisite)
- Farklı dokularda spesifik etki oluşturan analogların geliştirilmesi
- Doz-etki veya zaman-konsantrasyon arasındaki ilişkiyi değiştirmek amacıyla bileşiğin farmakokinetik özelliklerinin belirlenmesi

### **1.8.2. Tez Kapsamında Planlanan Çalışmalar**

Daha önce de anlatıldığı gibi kanser hücrelerinin normal hücrelere oranla daha asidik yapıda olmasından ve urasil molekülünün asidik ortamda laktim (pirimidindiol) yapısını tercih etmesinden yararlanarak, asit ortamda urasilin aminometil türevlerinin (Mannich bazlarının) alkilleme yeteneği oldukça yüksek kinon-metid yapılarına dönüşür. Bu durum selektif toksisite anlamına gelir. Molekülün antikanser etkisi kanserli hücrelerde daha yüksek beklenmektedir. Urasil-Mannich bazlarının asit ortamda kimyasal davranışları şekil 16'da verilmiştir.

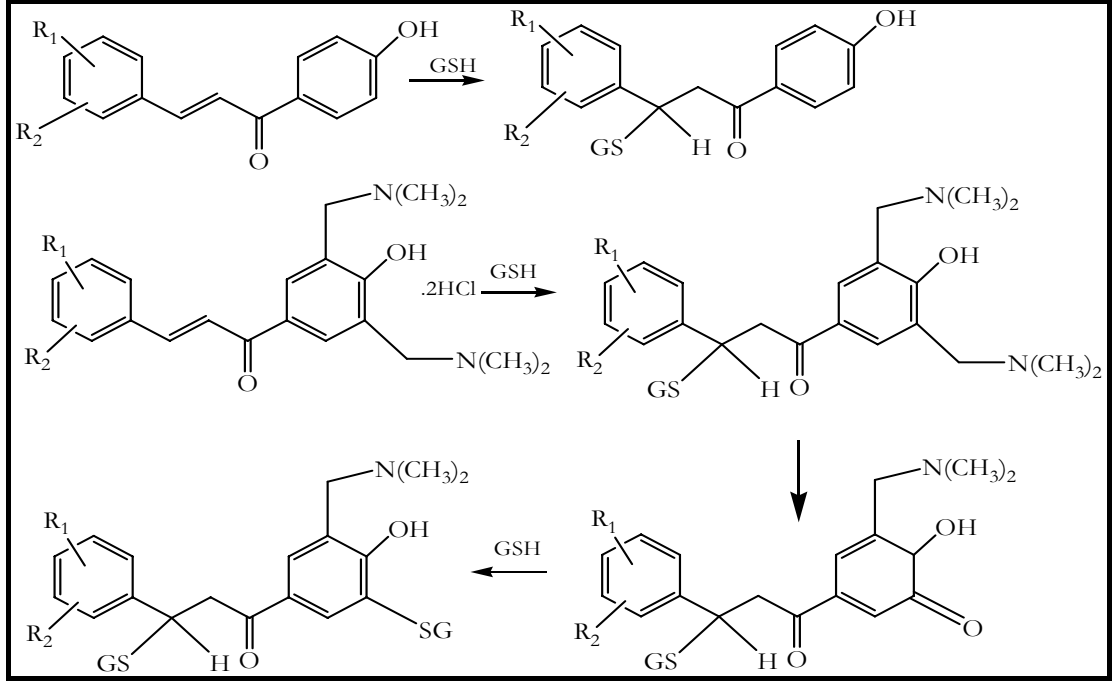
- 1) Mannich bazlarının biyoaktif parçalanma ürünleri vermeseler bile kendilerinin de antikanser aktivite gösterdikleri bilinmektedir (45 - 48).



**Şekil 16. Urasil-Mannich bazlarından asit ortamda olası kinon-metid oluşum mekanizması**

2) İlaç bulma ve geliştirme çalışmalarında aday moleküller belirlenirken biyoaktif birden çok maddenin aynı molekülde birleştirilmesi yöntem olarak uygulanır. Bu moleküllerin *in vivo* ortamda ardışık olarak sitotoksik maddeler üretmesi malignant dokuda daha büyük toksisite oluşumuna yol açar (şekil 17) (49). Planlanan çalışmada antikanser tedavide yaygın olarak kullanılan, antimetabolit etki mekanizmasına sahip urasil ile kuvvetli alkilleme yeteneği olan *bis*(2-kloroetil)amin (azotlu hardal, nor-mustard)

yapısı aynı molekülde birleştirilmesi planlanmıştır (şekil 18). Bilindiği gibi azotlu hardallar DNA bazlarını ardışık olarak alkilleyebilecek elektrofilik merkezler üretebilirler.



**Şekil 17. Ardışık sitotoksik bileşiklerin oluşumu (50)**

- 3) Moleküllerin alkilleme yetenekleri hakkında fikir sahibi olabilmek için yapılabilecek *in vitro* testler vardır. Bunlardan en uygunu biyolojik ortamın sıcaklık ( $37^{\circ}\text{C}$ ) ve pH (7,4) değerlerini koruyarak moleküllerin *in vitro* ortamdaki davranışı araştırılır. Bu çalışmada seçilecek örnek bir molekülün pH 7,4 olan tampon içerisindeki çözeltisi sıcaklığı  $37^{\circ}\text{C}$  olan bir su banyosunda çalkalanarak stabilitelerinin incelenmesi planlanmıştır. Ortama ayrıca glutatyon veya 2-merkaptetanol gibi hücre nükleofillerini taklit eden tiyoller

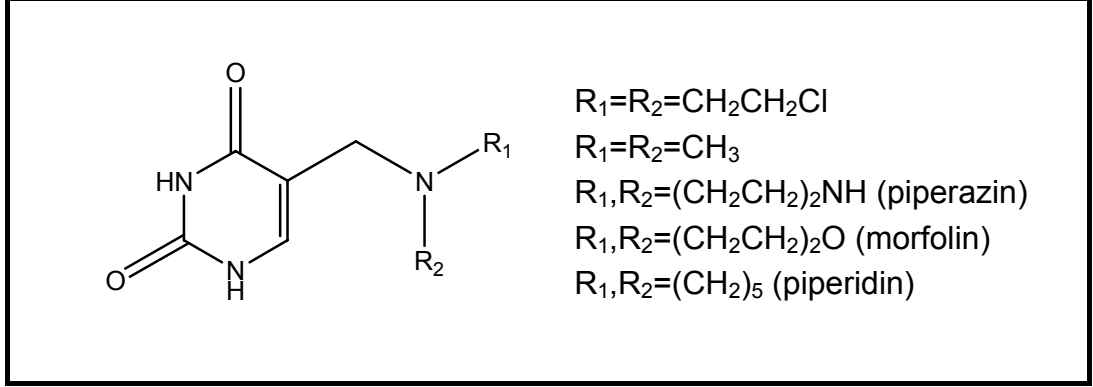
ilave edilerek ana molekülün ya da parçalanma ürünlerini nükleofillere karşı kimyasal ilgileri araştırılacaktır.

- 4) Mannich bazlarında deaminasyon oranları etki bakımından önemlidir. Bu nedenle farklı baziklikteki dimetilamin, morfolin, piperidin, piperazin gibi aminlerin Mannich bazlarının sentezi düşünülmüştür.

Amin	pKa
Dimetilamin	10,73
Piperazin	5,68, 9,82
Morfolin	8,33
Piperidin	11,22

- 5) İlaçların topik kullanımı sistemik toksisitesinin ve kullanılan yardımcı maddelerin (ör. Propilen glikol) toksisitesinin önlenmesi açısından önemlidir. Etkin biçimde topikal membranlardan geçecek bir ilaç molekülü için yüksek lipofilite gereklidir. Aynı zamanda hazırlanan ön-ilaç kolayca ana bileşiğe dönüşebilmelidir. Ön-ilaçların hazırlanmasında polar ve yüksek erime dereceli heterosiklik yapıdaki ilaçların lipofilik etkinliğini arttırmak için başvurulan başlıca yollar N-açiloksialkil türevleri (51) veya N-Mannich bazları (aminometil türevler) dir. Yapılan çalışmalar N-Mannich bazlarının NH asidik bileşikler için iyi prodruglar olduklarını (52) ve sulu ortamda kolaylıkla ana bileşiğe dönüştüğünü göstermiştir (53). Aralarında 5-FU'nun da bulunduğu bir grup biyoaktif molekülün morfolin, piperidin, dimetilamin, dietilamin, dipropilamin, pirolidin gibi çeşitli aminlerle aminometil türevleri hazırlanmış ve bu türevlerin membranlardan geçişinin ana bileşiğe göre dikkate değer oranda arttığı bulunmuştur (54). Bu çalışmada

sentezlenmesi düşünölen bileşiklerin topik membranlardan geçişlerinin artması planlanmıştır.



**Şekil 18. Sentezlenmesi Planlanan Bileşikler**

## BÖLÜM II

### GEREÇ VE YÖNTEM

#### 2.1.GEREÇLER

Sentez çalışmalarında kullanılan başlangıç maddelerinden urasil Acros firmasından; *bis*(2-kloroetil)amonyum klorür, morfolin, piperidin, piperazin, dimetilamin, 2-merkaptoetanol Merck firmasından, %35-37 formaldehit çözeltisi UPARC firmasından, paraformaldehit Riedel de Haen firmasından, potasyum dihidrojen fosfat Panreac firmasından, sodyum hidroksit Horasan Kimya firmasından temin edilmiştir. Kullanılan çözücülerin tamamı ise Merck firmasına aittir.



## **2.2. YÖNTEMLER**

### **2.2.1. Kromatografik Analizler**

#### **2.2.1.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)**

Sentez tepkimeleri esnasında tepkime yürüyüşünü izlemek, tepkime ürünlerinin saflıklarını kontrol etmek, sütun kromatografisinde fraksiyonlamayı yapabilmek amacıyla yararlanıldı. İTK çalışmalarında 0.25 mm kalınlığında, 20X20 cm boyutlarındaki Kieselgeal 60F<sub>254</sub> (Merck 5715) hazır kromatografi plakları kullanıldı. Çalışmalar oda sıcaklığında yapıldı ve developman işlemi kromatografi tanklarının çözücü buharı ile doyurulmasından sonra gerçekleştirildi. Sürüklenme işleminden sonra açık havada kurutulan plaklar üzerindeki lekelerin belirlenmesinde 254 nm dalga boyundaki UV ışığı ile iyot tankından faydalanıldı. Kullanılan hareketli faz sistemi A1 ve A3 için kloroform:metanol:amonyak (4:2:0,1), A2, A4 ve A5 için kloroform:metanol:amonyak (4:1:0,1) tır.

#### **2.2.1.2. Sütun Kromatografisi**

Sütun kromatografisinde adsorban olarak Silikajel 60H (Merck) kullanıldı. Ayırma tabi tutulan tepkime ürünlerinin 1 g 'ı için 20 g adsorban ve bu miktara uygun boyutlara sahip cam sütunlar seçildi. Sütun kromatografisinde yararlanılan çözücü sistemi kloroform:metanol ( 4:2 ) dür.

#### **2.2.1.3. Preparatif İTK**

Preperatif İTK'da Silikajel G (Merck) ve Silikajel HF254 (Merck) ile hazırlanan 0.5 mm kalınlığında 20x20 cm boyutlarındaki cam plaklardan yararlanıldı. Çözücü sistemi olarak İTK'da en iyi sonucu veren çözücü

sistemleri kullanıldı. Developman sonrasında plaklar UV ışığı altında incelendi. Belirlenen bantlar kloroform:metanol (8:2) karışımı ile elüe edildi. Çözücünün alçak basınçta distillenmesiyle bileşikler saf halde elde edildi.

## **2.2.2. Spektral Analizler**

### **2.2.2.1. Ultraviyole (UV) Spektroskopisi**

Spektrumlar Shimadzu 160-A spektrofotometresinde 1 cm'lik kuartz küvetlerde maddelerin metanoldeki çözeltileri halinde alındı.

### **2.2.2.2. İnfrared (IR) Spektroskopisi**

IR spektrumları , analitik saflıktaki potasyum bromür (Merck) pelletleri halinde Jasco FT/IR-430 Spektrofotometresinde alındı.

### **2.2.2.3. Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi**

Bileşiklerin <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları CD<sub>3</sub>OD, DMSO-d<sub>6</sub>, D<sub>2</sub>O ve CDCl<sub>3</sub> çözeltileri içinde Varian AS 400 Mercury Plus NMR Spektrometresinde, standart kullanılmadan alındı. Değerler δ skalasına göre verilmiştir.

### **2.2.2.4. Kütle Spektroskopisi (MS)**

Kütle spektrumları analitik saflıktaki metanol (Merck) çözeltisi içerisinde; A1, A2 ve A3 bileşikleri Waters 2695 Alliance Micromass ZQ marka LC/MS cihazında, A4 ve A5 bileşiklerinin spektrumları ise Agilent Technologies 1100 Series marka LC/MS cihazında elektrosprey iyonizasyon yöntemi ile *direkt inlet* olarak alındı.

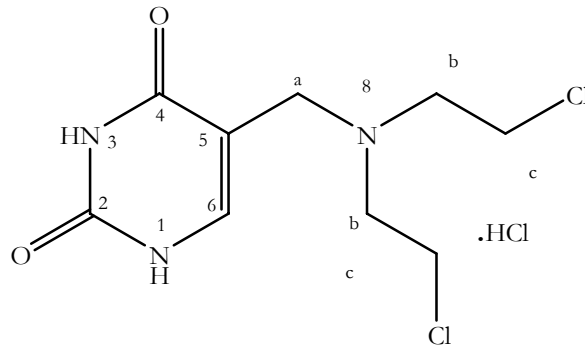
### 2.2.3. Diğer Gereçler

Bileşiklerin erime derecesi Buchi 510 marka erime derecesi tayin aleti ile yapılmıştır. Stabilitate çalışmasında termostatlı ve çalkalayıcılı Memmert marka su banyosu ve fosfat tamponunun pH'sının ölçümünde *ino-lab pH level 1* pH metresi kullanıldı.

### 2.2.4. Bileşiklerin Sentezi ve Spektral Bulgular

#### 2.2.4.1. 5-((bis(2-kloroetil)amino)metil)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion hidroklorür (A1)

Bileşik Mannich tepkimesine uygun olarak 1,12 g (0,01 mol) urasil, 3,5 g (0,02 mol) *bis*(2-kloroetil) amonyum klorür ve 0,6 g (0,02 mol) paraformaldehitin 30 ml tetrahidrofurandaki süspansiyon şeklindeki çözeltisi oda sıcaklığında 24 saat karıştırıldı. Daha sonra 70 °C'lik yağ banyosunda geri çeviren soğutucu altında 72 saat ısıtıldı. Tepkime İTK ile izlendi. Tetrahidrofuran alçak basınçta damıtıldı. Kalıntı metanolden iki kez kristallendirildi (%20 verim, erime derecesi 222 °C) [lit. 224-226 °C (dekompoze)(12)].



**5-((Bis(2-kloroetil)amino)metil)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion hidroklorür**

**UV Spektrum (Spektrum No 1)**

$\lambda_{\text{maks}}^{\text{MeOH}} (\log \epsilon)$  211 (3,921), 263 (4,066) nm

**IR Spektrumu ( Spektrum No 2 )**

$\nu_{\text{maks}} \text{ cm}^{-1}$  (KBr) 2978 (=C-H gerilme), 1714, 1675 (-C=O gerilme),  
1638 (-C=C- gerilme), 1464 (-C-H eğilme), 918  
(=C-H düzlem dışı eğilme)

 **$^1\text{H}$  NMR Spektrumu ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ( Spektrum No 3 )**

$\delta$ : 7,79 (1H, s, H-6)  
 $\delta$ : 4,25 (2H, s, H-a)  
 $\delta$ : 4,04 (2H, t,  $J = 5,9$  Hz, H-c)  
 $\delta$ : 3,66 (2H, t,  $J = 5,9$  Hz, H-b)

 **$^{13}\text{C}$  NMR Spektrumu ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ( Spektrum No 4 )**

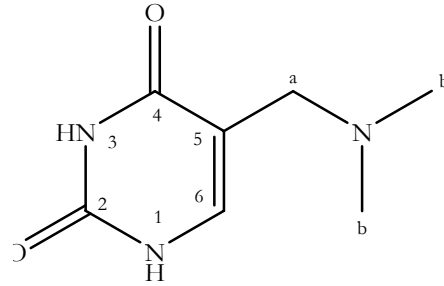
$\delta$ : 166,2 (C-4)  
 $\delta$ : 152,6 (C-2)  
 $\delta$ : 146,8 (C-6)  
 $\delta$ : 101,6 (C-5)  
 $\delta$ : 55,0 (C-c )  
 $\delta$ : 52,0 (C-a)  
 $\delta$ : 37,7 (C-b)

**MS Spektrumu ( Spektrum No 5 )**

m/z (% bağıl bolluk) : 266,1 (26,3), 268,1 (17,5), 169,2 (100), 147,2  
(71,3), 137,2 (25,0), 119,1 (28,1)

### 2.2.4.2. 5-((dimetilamino)metil)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (A2)

Bileşik literatürde belirtilen yöntemle göre sentez edildi (14). 1,1 g (0,01 mol) urasilin 15 ml etanoldeki süspansiyonu üzerine sırasıyla damla damla 0,6 g (2 ml, 0,02 mol) %35-37'lik formaldehit çözeltisi ve 0,9 g (2,5 ml, 0,02 mol) % 40 dimetilamin çözeltisi ilave edildi. Tepkime İTK ile izlenmek suretiyle oda sıcaklığında 48 saat karıştırıldı. 48 saat sonunda tepkime balonunun içeriğinin tamamen çözündüğü gözlemlendi. 72 saat sonra tepkimeye son verilerek çözücü alçak basınçta uçuruldu ve kalıntı metanol-eter karışımından kristallendirildi (550 mg, %35 verim, erime derecesi 155° C) [lit. 203-206 ° C (dekompoze) (55)].



5-((Dimetilamino)metil)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion

#### UV Spektrum (Spektrum No 6)

MeOH  
 $\lambda_{\text{maks}}$  (log  $\epsilon$ ) 262 (3,964) nm

#### IR Spektrumu (Spektrum No 7)

$\nu_{\text{maks}}$   $\text{cm}^{-1}$  (KBr) 3113 (-N-H gerilme), 2971-2947 (-C-H gerilme), 1730, 1702 (-C=O gerilme), 1674 (-C=C-gerilme), 1450 (-C-H eğilme) 818, 781 (=C-H düzlem dışı eğilme)

#### <sup>1</sup>H NMR Spektrumu (DMSO-d<sub>6</sub> ve CD<sub>3</sub>OD) (Spektrum No 8)

$\delta$ : 7,22 (1H, s, H-6)

$\delta$ : 3,01 (2H, s, H-a)

$\delta$ : 2,08 (6H, s, H-b)

**<sup>13</sup>C NMR Spektrumu (DMSO-d<sub>6</sub> ve CD<sub>3</sub>OD) ( Spektrum No 9 )**

δ: 164,9 (C-4)

δ: 151,8 (C-2)

δ: 140,8 (C-6)

δ: 109,2 (C-5)

δ: 54,3 (C-a)

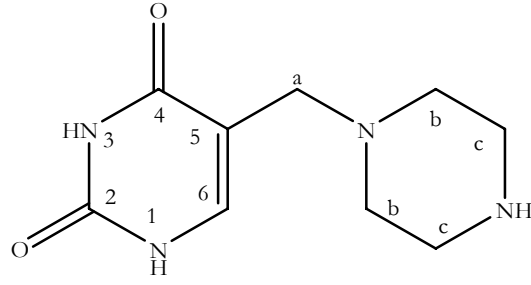
δ: 45,2 (C-b)

**MS Spektrumu ( Spektrum No 10 )**

m/z (% bağıl bolluk) : 170,2 (12,5), 169,2 (53,1), 147,2 (98,8), 137,1 (68,8), 119,1 (100), 105,0 (45)

**2.2.4.3. 5-(piperazinometil)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (A3)**

Bileşik klasik Mannich tepkimesine göre sentezlendi. Buna göre 0,9 g (0,01 mol, 1 ml) piperazin ve 0,03 g (0,01 mol, 1 ml) %35-37 formaldehit çözeltisi üzerine 1,014 g (0,01 mol) urasil azar azar ilave edildi. Tepkime İTK ile izlenmek suretiyle oda sıcaklığında 48 saat karıştırıldıktan sonra son verilerek çözücü alçak basınçta uçuruldu ve kalıntı metanol-eter karışımından kristallendirildi. (220 mg, %11 verim, erime derecesi 222 °C (dekompoze)) Aynı madde 25 ml etanol içerisinde 1,9 g (0,02 mol, 2 ml) piperazin, 0,06 g (0,02 mol, 2 ml) %35-37 formaldehit çözeltisi, 1,014 g (0,01 mol) urasil geri çeviren soğutucu altında 75-80 °C'de 12 saat karıştırılarak da elde edildi. (500 mg, %25 verim)



**5-(piperazinometil)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion**

**UV Spektrum (Spektrum No 11)**

$\lambda_{\text{maks}}^{\text{MeOH}}$  (log  $\epsilon$ ) 207 (3,005), 263 (2,547) nm

**IR Spektrumu (Spektrum No 12)**

$\nu_{\text{maks}} \text{ cm}^{-1}$  (KBr) 3415 (-N-H gerilme), 2935 (-C-H gerilme), 1705 (-C=O gerilme), 1660 (-C=C- gerilme), 1455 (-C-H eğilme), 831 (=C-H düzlem dışı eğilme)

**$^{13}\text{C}$  NMR Spektrumu ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Spektrum No 13)**

$\delta$ : 165,6 (C-4)

$\delta$ : 152,4 (C-2)

$\delta$ : 141,8 (C-6)

$\delta$ : 108,5 (C-5)

$\delta$ : 54,3 (C-a)

$\delta$ : 52,4 (C-b)

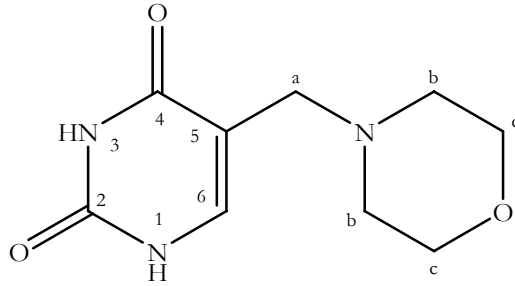
$\delta$ : 51,3 (C-c)

**MS Spektrumu (Spektrum No 14)**

m/z (% bağıl bolluk) : 211,2 (11,2), 169,2 (85), 147,2 (100), 137,1 (21),  
131,1 (21,9), 119,1 (34,4), 112,0 (11)

#### 2.2.4.4. 5-(Morfolinometil)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (A4)

Bileşik literatürde belirtilen yöntemle göre sentezlendi (54). Buna göre 2 ml (0,02 mol) morfolin, buz banyosunda 0,06 g (2 ml, 0,02 mol) %35-37'lik formaldehit çözeltisi üzerine ilave edilerek karıştırıldı ve 15 ml tetrahidrofur ile seyreltilti. 1,07 g (0,01 mol) urasil 30 dakika içinde küçük porsiyonlar halinde tepkime ortamına ilave edildi. Tepkime yürüyüşü İTK ile izlenerek oda sıcaklığında 48 saat karıştırıldı. Tepkime balonuna 25 ml aseton eklendi, çözücü alçak basınç altında uzaklaştırıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Kalıntı desikatörde kurutuldu ve metanolden kristallendirildi (300 mg, %15 verim, erime derecesi 208° C) [lit. 217° C (dekompoze) (15)].



**5-(Morfolinometil)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion**

#### UV Spektrum (Spektrum No 15)

MeOH  
 $\lambda_{\text{maks}}$  (log  $\epsilon$ ) 207 (4,295) , 263 (3,972) nm

#### IR Spektrumu (Spektrum No 15)

$\nu_{\text{maks}}$  cm<sup>-1</sup> (KBr) 3215 (-N-H gerilme), 3039-2813 (-C-H gerilme), 1722 (-C=O gerilme), 1670 (-C=C- gerilme), 1450 (-C-H eğilme), 1111 (-C-O-C gerilme), 867 (=C-H düzlem dışı eğilme)



**<sup>1</sup>H NMR Spektrumu (CD<sub>3</sub>OD ve DMSO-d<sub>6</sub>) ( Spektrum No 17 )**

- δ: 7,39 (1H, s, H-6)  
 δ: 3,67 (4H, t, *J*= 4,8 Hz, H-c)  
 δ: 3,23 (2H, s, H-a)  
 δ: 2,47 (4H, t, *J*= 4,8 Hz, H-b)

**<sup>13</sup>C NMR Spektrumu (CD<sub>3</sub>OD) ( Spektrum No 18 )**

- δ: 165,5 (C-4)  
 δ: 152,2 (C-2)  
 δ: 141,4 (C-6)  
 δ: 108,4 (C-5)  
 δ: 66,6 (C-c)  
 δ: 53,3 (C-a)  
 δ: 53,2 (C-b)

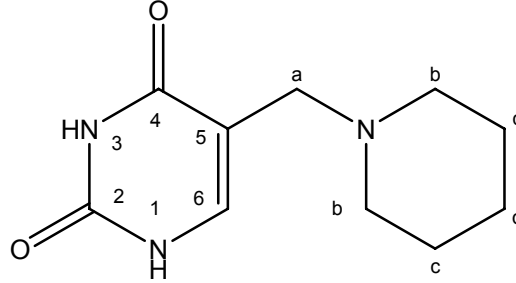
**MS Spektrumu ( Spektrum No 19 )**

*m/z* (% bağıl bolluk) : 213,0 (13,6), 212.1 (100), 203,1 (41,5), 198,2 (10,2), 180,2 (17,2), parçalanma ürünleri 125,0 (16,7), 88.3 (100)

**2.2.4.5. 5-(Piperidin-1-il-metil)pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (A5)**

Bileşik literatürde belirtilen yöntemle göre sentezlendi (54). Buna göre 2 ml (0,02 mol) piperidin buz banyosunda 0,06 g (2 ml, 0,02 mol) %35-37'lik formaldehit çözeltisi üzerine ilave edilerek karıştırıldı. 15 dakika sonra 1,01 g (0,01 mol) urasil eklendi. Oluşan süspansiyon oda sıcaklığında İTK ile izlenerek 72 saat karıştırıldı. 72 saat sonunda tepkimeye son verildi. Balon içeriği 100 ml diklorometan ile ekstre edildi. Diklorometan tabakası ayrıldı, susuz sodyum sülfat üzerinde kurutuldu. Daha sonra çözücü alçak basınç altında uçuruldu. Yağimsı sarı renkli kalıntı üzerine 5 ml susuz eter eklenerek

buzdolabında bir gece bekletildi. Oluşan çökelek süzüldü ve eterle yıkandı (3 x 5 ml). Çökelek desikatörde kurutuldu ve metanolden kristallendirildi. (210 mg, %10 verim, erime derecesi 149° C) [lit. >320° C (dekompoze) (15)]



**5-(piperidin-1-il-metil)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion**

### UV Spektrum (Spektrum No 20)

$\lambda_{\text{maks}}^{\text{MeoH}} (\log \epsilon)$  208 (4,013) , 263 (3,752) nm

### IR Spektrumu (Spektrum No 21)

$\nu_{\text{maks}} \text{ cm}^{-1}$  (KBr) 3282 (-N-H gerilme), 2938 (=C-H gerilme), 1732, 1706 (-C=O gerilme), 1669 (-C=C- gerilme), 1447 (-C-H gerilme) 1067 (=C-H düzlem dışı eğilme)

### <sup>1</sup>H NMR Spektrumu (CD<sub>3</sub>OD) (Spektrum No 22)

$\delta$ : 7,39 (1H, s, H-6)

$\delta$ : 3,24 (2H, s, H-a)

$\delta$ : 2,46 (4H, t,  $J=4,8$  Hz, H-b)

$\delta$ : 1,62-1,44 (6H, m,  $J=4,9$  Hz, H-c, H-d)

### <sup>13</sup>C NMR Spektrumu (CD<sub>3</sub>OD) (Spektrum No 23)

$\delta$ : 165,7 (C-4)

$\delta$ : 152,5 (C-2)

$\delta$ : 142,3 (C-6)

$\delta$ : 108,2 (C-5)

$\delta$ : 53,8 (C-b)

$\delta$ : 53,2 (C-a)

$\delta$ : 25,6 (C-d)

$\delta$ : 25,3 (C-b)

### **MS Spektrumu ( Spektrum No 24 )**

m/z (% bağıl bolluk) : 211,0 (13,6), 210,0 (100), 203,0 (26,4),  
parçalanma ürünleri 125,0 (11,4), 86.3 (100)

## **2.2.5.Biyoaktivite Çalışmaları ve Bulgular**

### **2.2.5.1. Stabilite ve Katım Tepkimesi**

Fizyolojik koşullara benzer koşulları sağlamak amacı ile katım tepkimesi pH'sı 7.4 olan tampon çözeltisinde 37 °C de gerçekleştirildi ve bu amaç için termostatlı çalkalayıcı su banyosu kullanıldı. A1 bileşiğinin (100 mg, 0,005 mol) tampon içerisindeki çözeltisine nükleofillere kimyasal ilgisini belirlemek amacıyla 2 damla 2-merkaptolanol ilave edildi. 37 °C de ,tepkime yürüyüşü İTK ile izlenerek, 72 saat çalkalandıktan sonra inkübasyona son verildi. Kloroform ile ekstre edildi. Kloroform fazı susuz sodyum sülfat üzerinde kurutulduktan sonra çözücü alçak basınç altında distillendi. Kalıntı, sütun kromatografisi ile saflaştırıldı. Solvan sistemi olarak klorofom: metanol:amonyak (4:1:0,1) kullanıldı. Elde edilen bileşik İTK'da karşılaştırıldı, erime derecesi (222°C) tayin edildi ve başlangıç maddesi ile aynı olduğu tespit edildi.

### **Fosfat tamponu çözeltisinin hazırlanışı:**

A : 0,68 g Potasyum dihidrojen fosfat (  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ) su ile 25 ml ye tamamlandı (0,2 M)

B : 0,1 g Sodyum hidroksit ( NaOH ) su ile 25 ml ye tamamlandı  
(0,1 M)

10 ml A çözeltilisinden alınıp pH-metrede pH 7.4' e gelene kadar B çözeltilisinden eklendi (son hacim ortalama 17 ml).

### **2.2.5.2. Topoizomeraz I Enzim İnhibisyonu Testi**

Biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan pUC19 plazmit DNA substratı ve BSA (Bovine serum albumine) Takara firmasından, Tris-HCl (Tri[hidroksimetil] aminometan hidroklorür), borik asit, magnezyum klorür, spermidin ve DTT (ditiyoeritrol) Sigma firmasından, Etidyum Bromür (EtdBr) Fluka firmasından, potasyum klorür ve sodyum hidroksit pelleti Atabay firmasından, EDTA Appli Chem firmasından, agaroz Proza firmasından, DMSO (Dimetilsülfoksit) Merck firmasından sağlanmıştır. Yatay agaroz jel düzeneği olarak Thermo EC250 kullanılmıştır.

Memeli DNA topoizomeraz I'in in vitro plazmid süpersarmal relaksasyon deneyleri Topcu ve Castora tarafından tanımlandığı şekilde yapılmıştır. (33) Bunun için, 20 µl reaksiyon hacmi 1 ünite enzim, 500 ng pUC19 plazmid DNA substratı 35 mM Tris-HCl, (pH :8.0), 72 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 5 mM spermidin ve % 0.1 BSA varlığında test bileşiklerimizle inkübe edilmiş ve reaksiyon ürünleri TBE tamponu (45 mM tri borat ve 1 mM EDTA pH :8.0) içerisinde %1'lik yatay agaroz jel düzeneği (5 V/cm) ile ayrıştırılmıştır. Agaroz jeli, EtdBr (0.5 µg/ml ) ile 30 dakika boyandıktan sonra UV ışığı altında görüntülenmiştir. Elde edilen fotoğraflara göre test bileşiklerinin konsantrasyonlarına karşılık DNA bant yoğunlukları

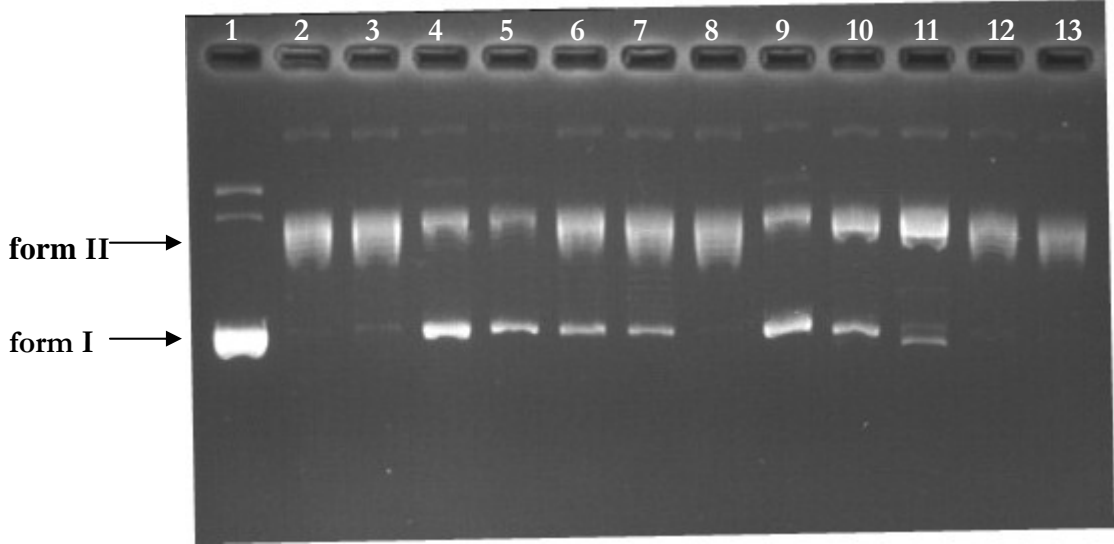
incelenmiş ve kalitatif olarak yorumlanmıştır. Test edilen bileşiğin etkisi benzer konsantrasyonda CPT'nin etkisi ile kıyaslanmıştır.

Reaksiyonların tamamı DNaz ve RNaz'dan temizlenmiş mikrosantrifüj tüpleri içerisinde gerçekleştirilmiştir.

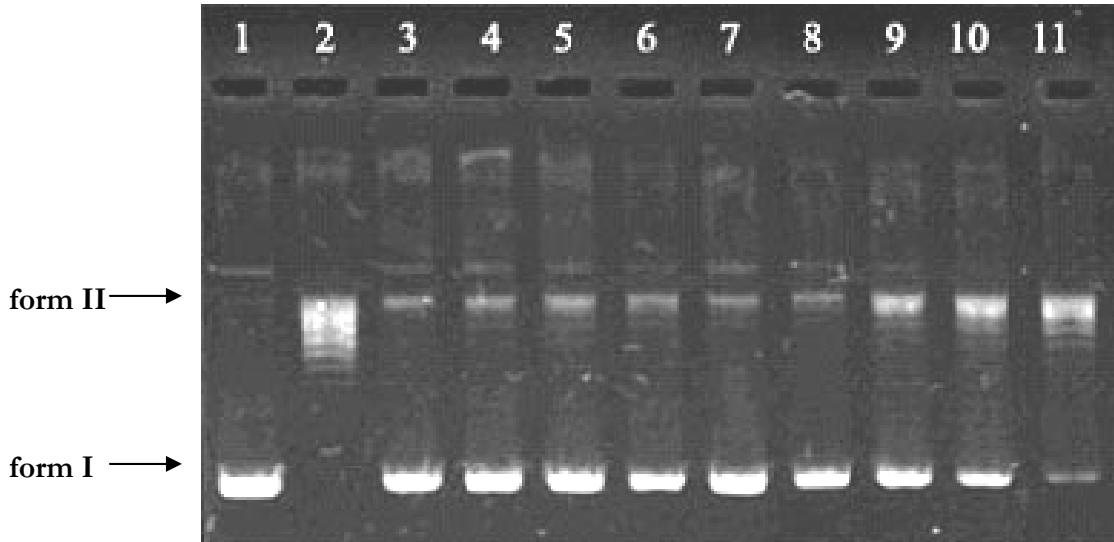
Tez çalışması sırasında sentezlenen bileşiklerin enzim aktiviteleri tayin edilirken çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. Kontrol amacıyla, topoizomerez I enzimi ile DMSO karıştırılarak test bileşikleri ile aynı anda ekim yapılmış ve çözücünden kaynaklanan herhangi bir inhibisyon olup olmadığı araştırılmıştır. Bunun sonucunda, DMSO ile enzim arasında bir etkileşme olmadığı belirlenmiştir.

#### **2.2.5.2.1. Topoizomerez I Enzim İnhibisyonu Testi Bulguları**

A1, A2 ve A3 bileşiklerinin biyolojik aktivite testleri memeli DNA topoizomerez I enzimi üzerindeki etkilerinin araştırılması ile yapılmıştır. Şekil19'da A2 ve A3 bileşiklerinin topoizomerez I enzimi reaksiyonları üzerindeki etkileri verilmiştir. Referans olarak kullanılan kamptotekin (CPT)'in aynı koşullarda topoizomerez I enzimi üzerindeki etkisi de şekil 20'de verilmiştir.



**Şekil 19. A2 ve A3 bileşiklerinin topoizomeraz enzimi üzerindeki etkileri**



**Şekil 20. CPT'nin topoizomeraz enzimi üzerindeki etkisi**

### 2.2.5.3. Androjene Bağımlı Olmayan Prostat Kanseri Hücre Dizisi

#### (PC-3) ile Sitotoksisite Testi

Androjene bağımlı olmayan prostat kanseri hücre dizisi (PC-3) kullanılarak sitotoksisite testi yapılmıştır. Hücreler 10.000 ünite/ ml penisilin, 10 mg/ ml streptomisin eklenen fosfat tamponu çözeltisi (PBS) ve %1 L-glutamin ve % 10 inaktif fetal sığır serum (FBS) eklenen RPMI-1640 besiyeri ortamında 37 °C ve %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub>'li humudifiye edilmiş ortamda inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücre kültürü ve sitotoksisite testi çalışmalarında tripan mavisini (*trypan blue*) (Sigma Chemical), Tripsin-EDTA solüsyonu (Biological Industries), XTT Cell proliferation kit I-XTT (Roche Diagnostics) steril hücre kültür kapları, flaskları, çok kuyucuklu plateler, santrifüj cihazı, vorteks cihazı, laminar hava akımlı kabin, CO<sub>2</sub>'li inkübatör, ışık mikroskobu, inverted mikroskop, sayım lamı ve Elisa okuyucu (spektrofotometre) kullanıldı.

Sitotoksisite testinde reaktif madde olarak sentezlediğimiz bileşiklerden A1 ve A4 kullanıldı. Reaktif maddelerin stok solüsyonu uygun şekilde besiyeri ile hazırlandı.

Hücre serisinin pasajlama işlemleri laminar hava akımlı kabinde, steril bir ortamda yapıldı. Pasajlar hücrelerin ikilenme zamanına uygun olarak 72 saatte bir gerçekleştirildi. Her pasaj sırasında hücreler, önce 5 ml Tripsin-EDTA solüsyonu ile 10 dakika 37 °C'de inkübe edildi ve flaskın yüzeyine yapışmış hücrelerin kalkması sağlandı. Daha sonra 5 ml besiyeri ilave edilerek Tripsin-EDTA solüsyonunun etkisi nötralize edildi ve bu karışım tüpe alınarak (1200 rpm'de, 5 dakika santrifüj edildi). Santrifüj sonunda tüpün dibinde toplanan hücreler üzerindeki besiyeri aktarılarak taze 10 ml besiyeri kondu ve

2 ayrı flaska bölündü. 5'er ml besiyeri içindeki hücre süspansiyonu üzerine 5'er ml besiyeri eklenerek son hacmin 10 ml olması sağlandı. Flask inkübatöre konmadan önce kapağı hafif gevşetildi ve hücreler 37 °C' de %5 CO<sub>2</sub> ortamında çoğaltıldı. Hücrelerin sayımı tripan mavisi ile (*trypan bleu dye*) boyanarak hemositometre yöntemi ile yapıldı. Hücre sayısı bir kültürün o andaki durumunun bir göstergesidir. Hücre sayımı pasaj yaparken ve deneysel işlemlerin hücrelere etkisinin saptanması için gereklidir. En çok kullanılan Neubauer hemositometresidir. Mevcut hücre sayısı, lamın üzerindeki çizgili bölmelerde sayılarak hesaplandı. Canlı hücreler tripan mavisi boyasına geçirgen olmayıp, ölü hücreler bu boyayı hücre içine aldıklarından mikroskopta mavi renkte görünmektedirler. Flakslar inverted mikroskop kullanılarak günlük olarak sitotoksisite, çoğalma ve enfeksiyon yönünden değerlendirildi. Bu işlemlerden sonra sitotoksisite testine geçildi.

Sitotoksisite testi için, tripan mavisi ile canlılığı doğrulanan hücreler, Neubauer lamında sayılarak her bir kuyucuğa ortalama  $2 \times 10^4$  hücre/ml düşecek şekilde ayarlandı. 96 kuyucuklu platete her kuyucuk içine 180 µl hücre süspansiyonu konuldu. Hücrelerin kuyucukların tabanına yapışabilmesi için 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra son hacim 200 µl olacak şekilde kontrol dışındaki kuyucuklara 20 µl reaktif maddeden, belli konsantrasyonlarda (100 µM, 10 µM, 1 µM, 0,1 µM, 10 nM, 1 nm ve 0,1 nm ) eklendi. Kontrol olarak reaktif madde içermeyen 200 µl hücre süspansiyonu kullanıldı. Hücreler, nemli, 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübasyona bırakıldı. Her ölçüm aşaması (24., 48., 72. saat) için ayrı bir mikroplate hazırlandı ve her bir plate uygun günlerde her bir kuyucuğa 50µL XTT solüsyonu [Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche, Cat. No. 11 465 015 001)]



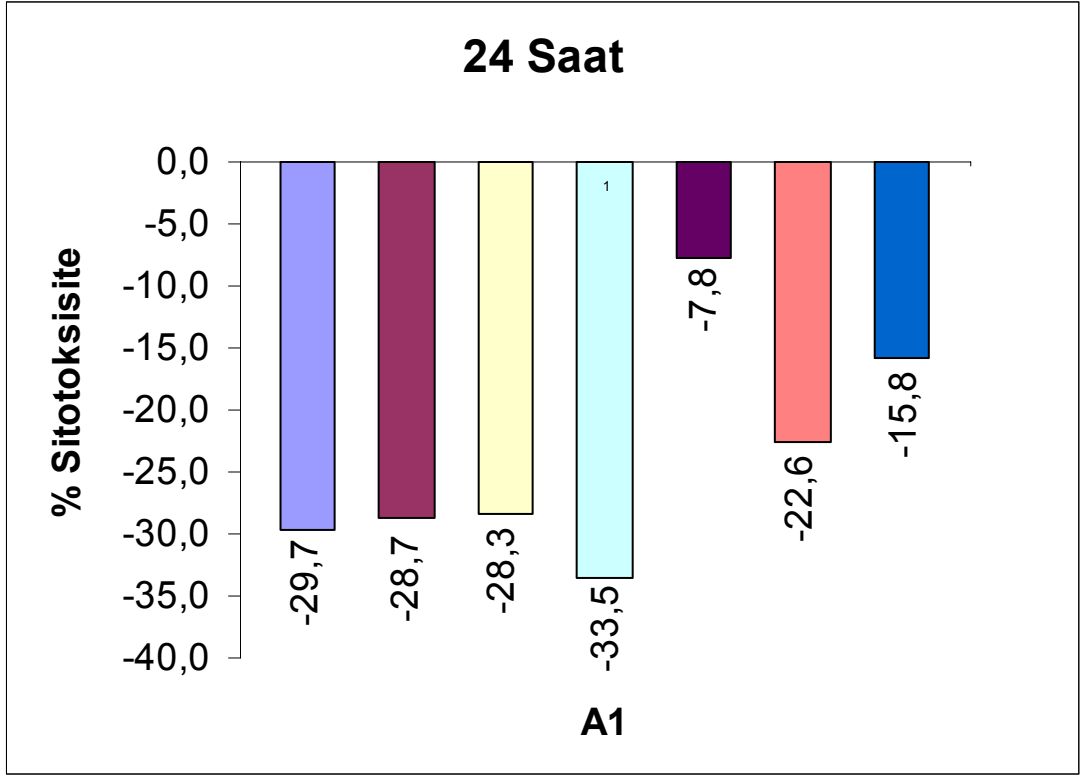
eklenerek dört saat inkübe edildi. Daha sonra plateler 490 nanometre dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında Elisa okuyucusu (spektrofotometre) kullanılarak absorbanslar ölçüldü. XTT suda çözünen bir tetrazolyum tuzudur. Kitin çalışma prensibi bu tetrazolyum tuzunun canlı hücre mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimi ile parçalanarak formazan tuzuna dönüşmesine ve formazan tuzundan kaynaklanan turuncu renk reaksiyonunun spektrofotometrik olarak kantite edilmesine dayanmaktadır. Boyanın yoğunluğu, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır. Okunan değerler Excel programına işlendi, ortalama absorbans değerleri bulundu ve medyumun ortalaması tüm değerlerden çıkarıldı. Platedeki hücrelerin % canlılığı;

$$\% \text{ Sitotoksisite} = [1 - (\text{Örnek absorbansı} / \text{Kontrol absorbansı})] * 100$$

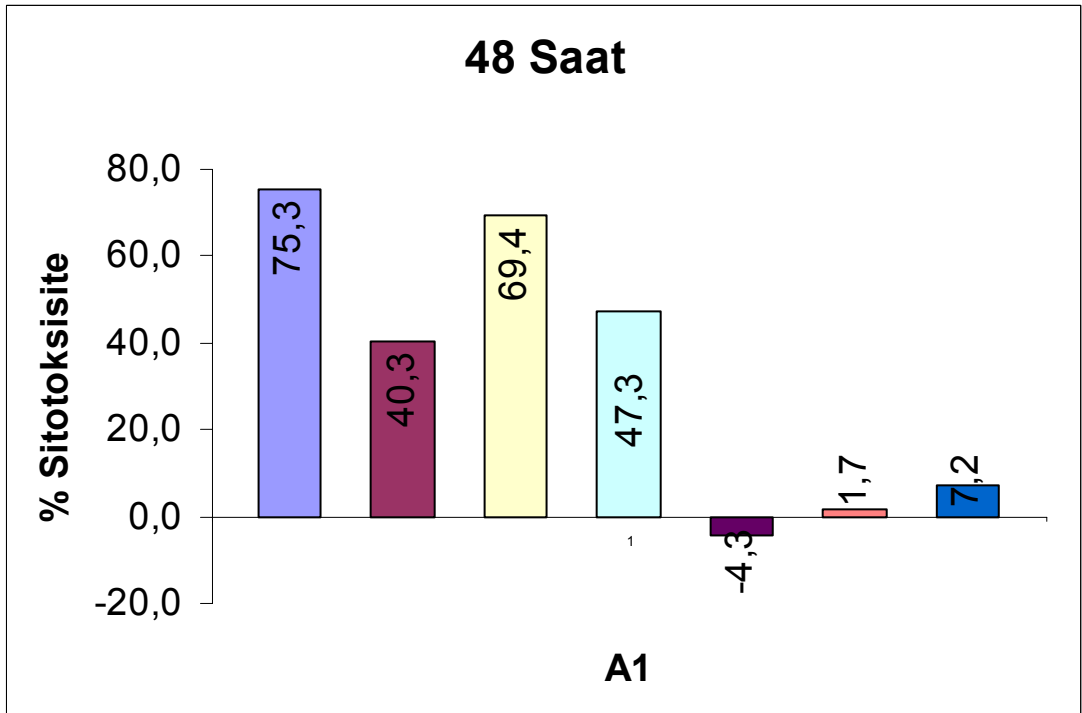
formülü ile hesaplandı.

#### **2.2.5.3.1. Sitotoksisite Testi Bulguları**

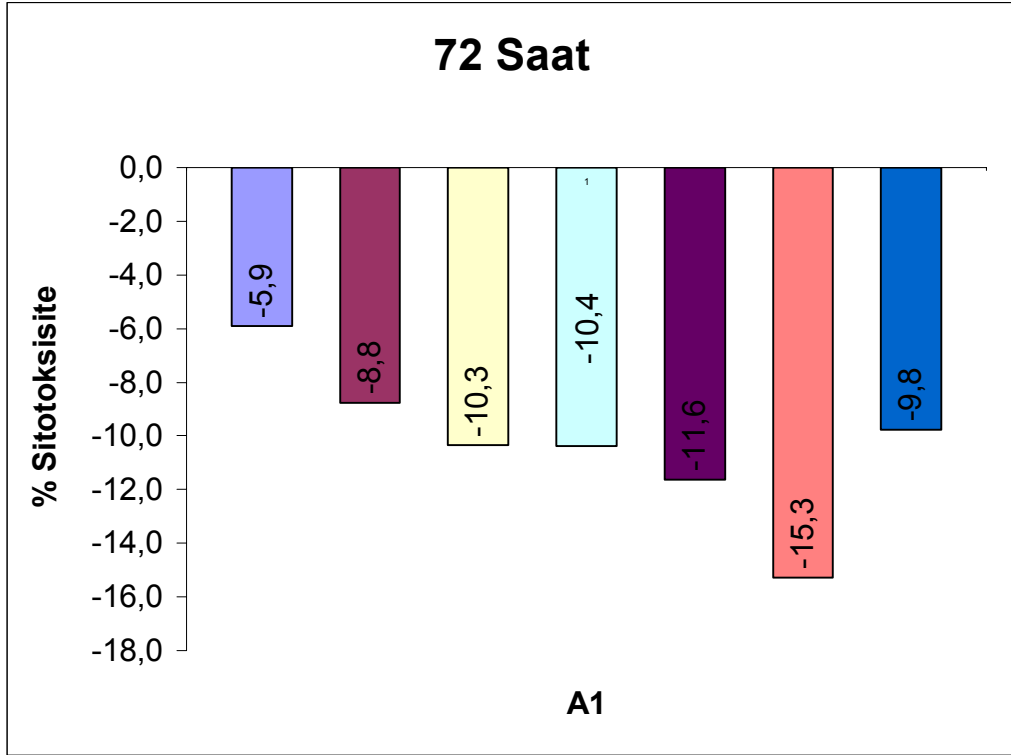
Sitotoksisite deneyinde, A1 ve A4 maddelerinin azalan konsantrasyonda ( $10^{-4}$ - $10^{-10}$ ) besiyeri içindeki çözeltilerinin 24., 48. ve 72. saat sonunda canlı kalan hücrelerin yüzdesi bulundu. Bu çalışmada uygulanacak doz ile ilgili literatür bilgisi bulunmadığından doz aralıkları geniş tutulmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen değerlerin standart sapması hesaplanmış ve konsantrasyona karşı (konsantrasyonlar sırasıyla  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  ve  $10^{-10}$  M) yüzde sitotoksisite olarak grafiğe geçirilmiştir.



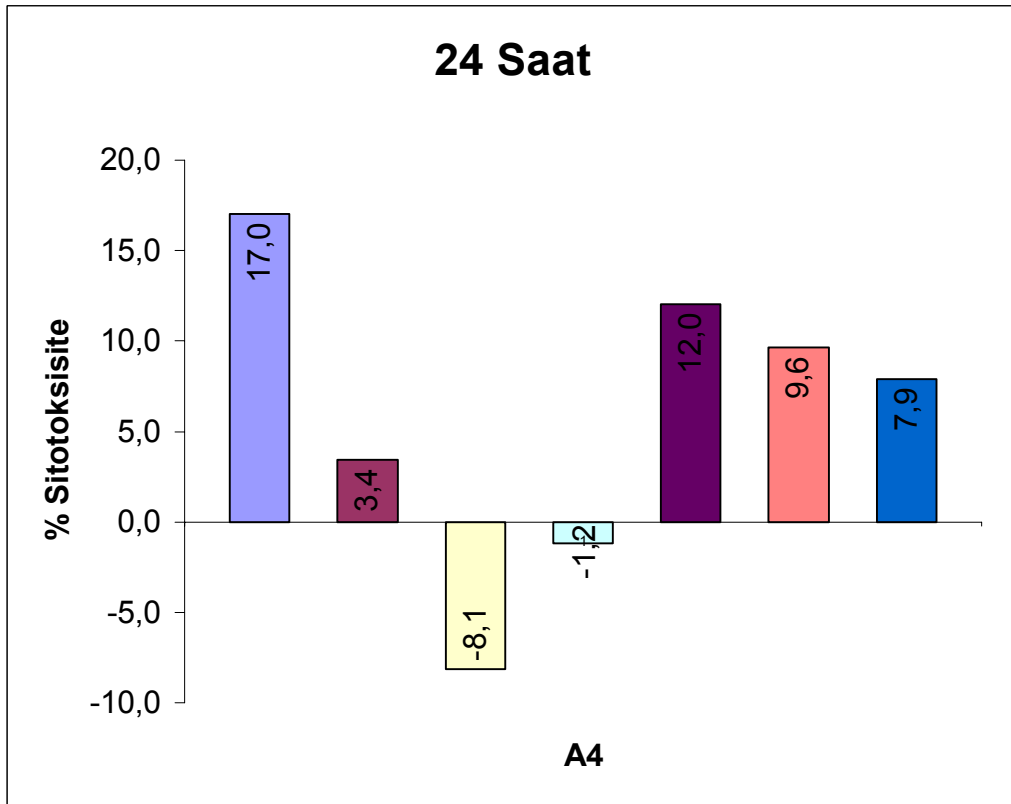
Grafik 1. A1 bileşğinin 24 saat sonraki sitotoksitesisi



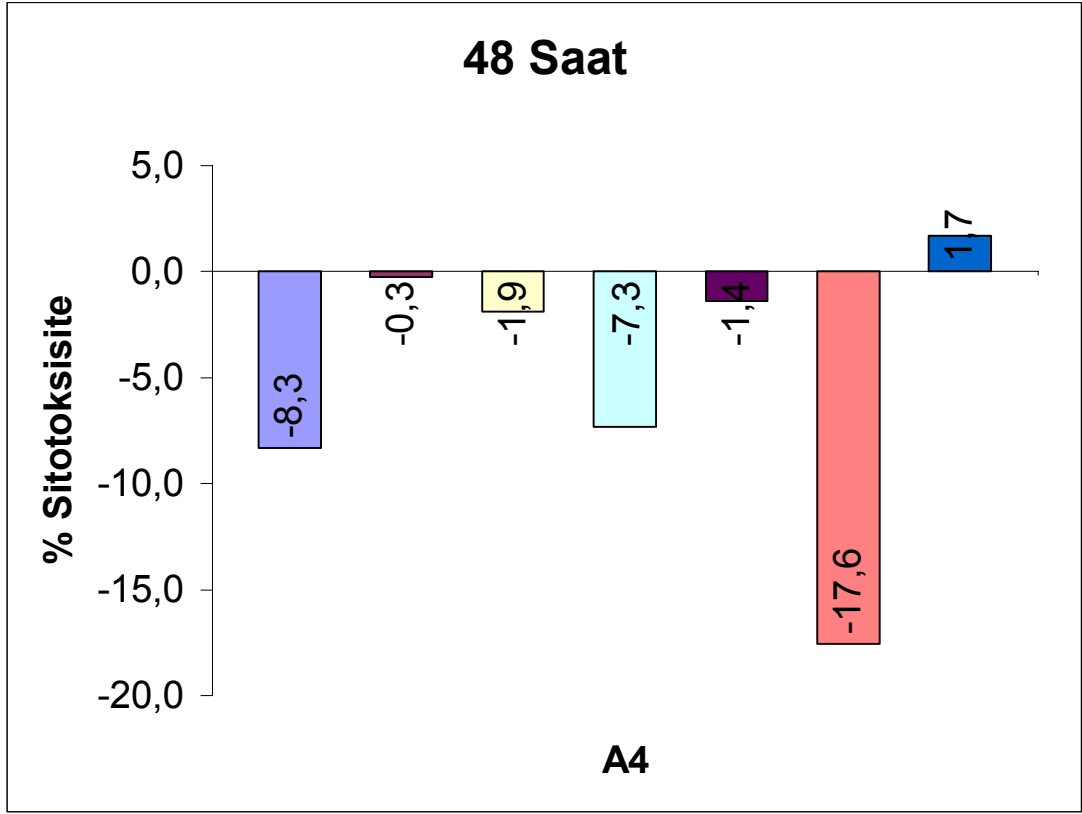
Grafik 2. A1 bileşğinin 48 saat sonraki sitotoksitesisi



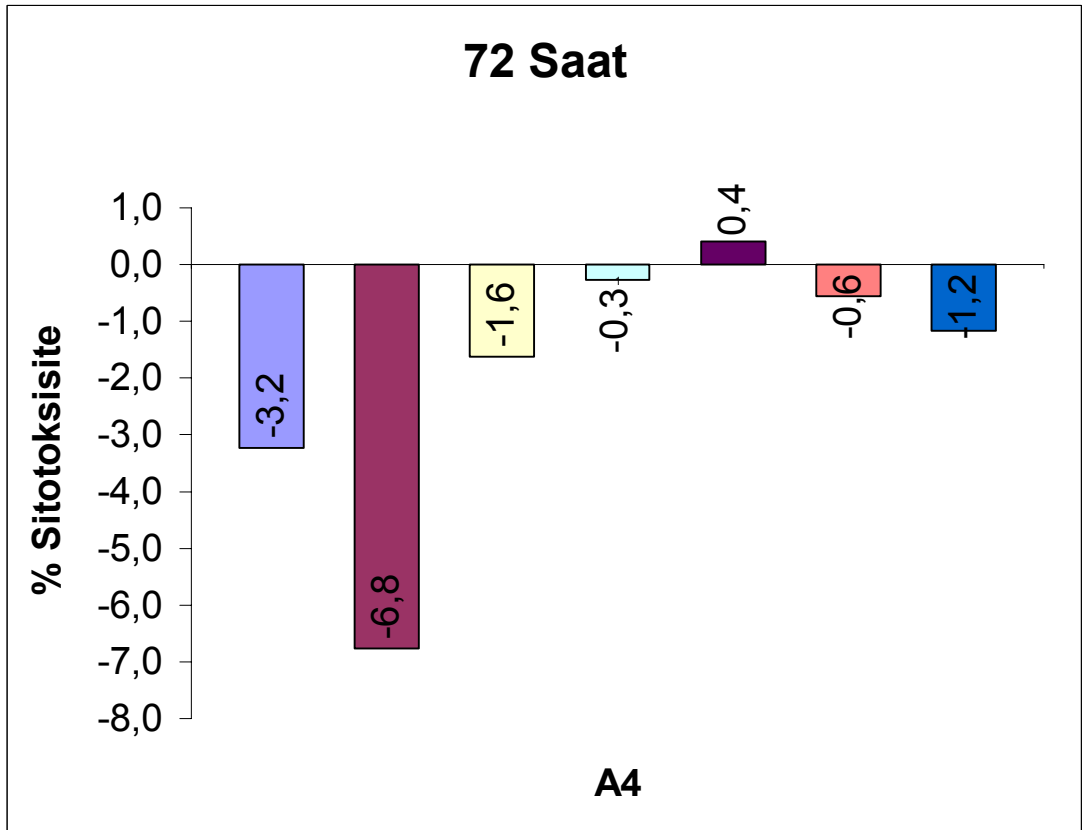
Grafik 3. A1 bileşğinin 72 saat sonraki sitotoksitesisi



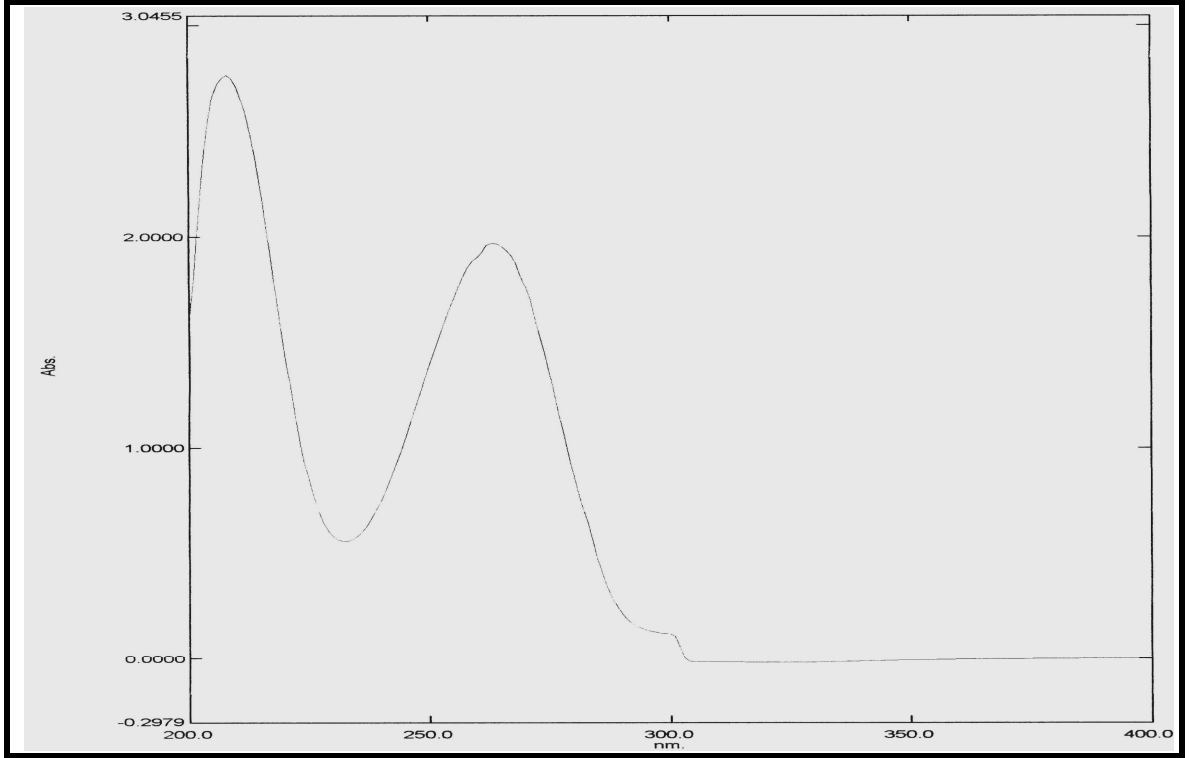
Grafik 4. A4 bileşğinin 24 saat sonraki sitotoksitesisi



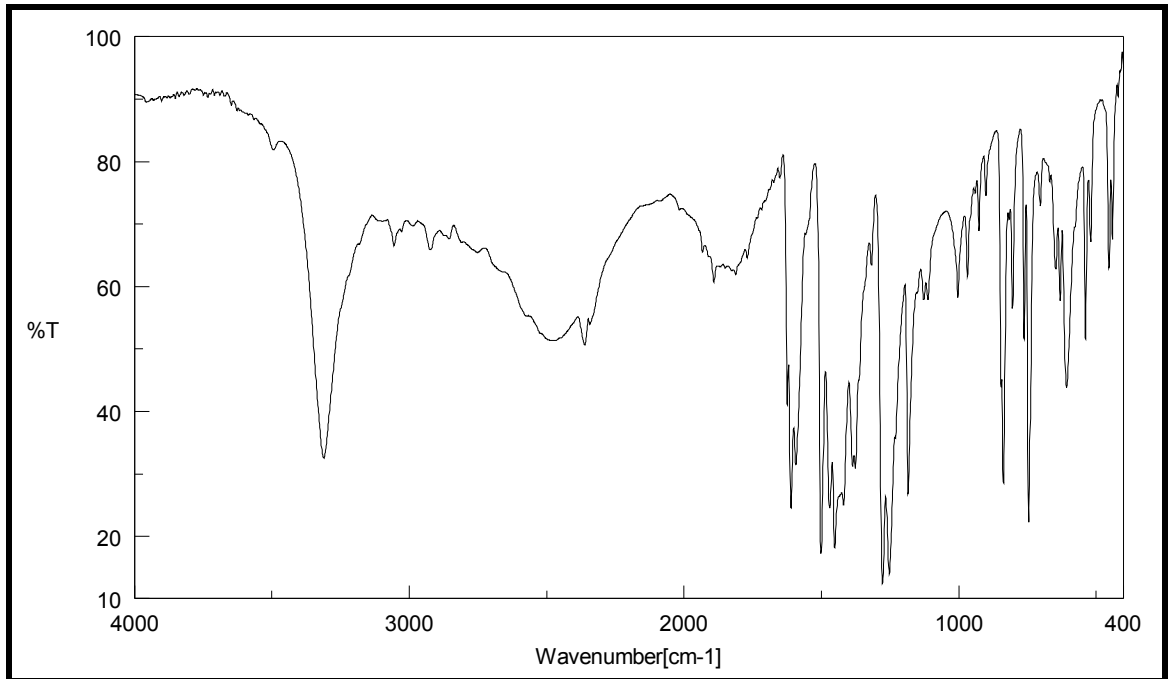
Grafik 5. A4 bileşğinin 48 saat sonraki sitotoksitesisi



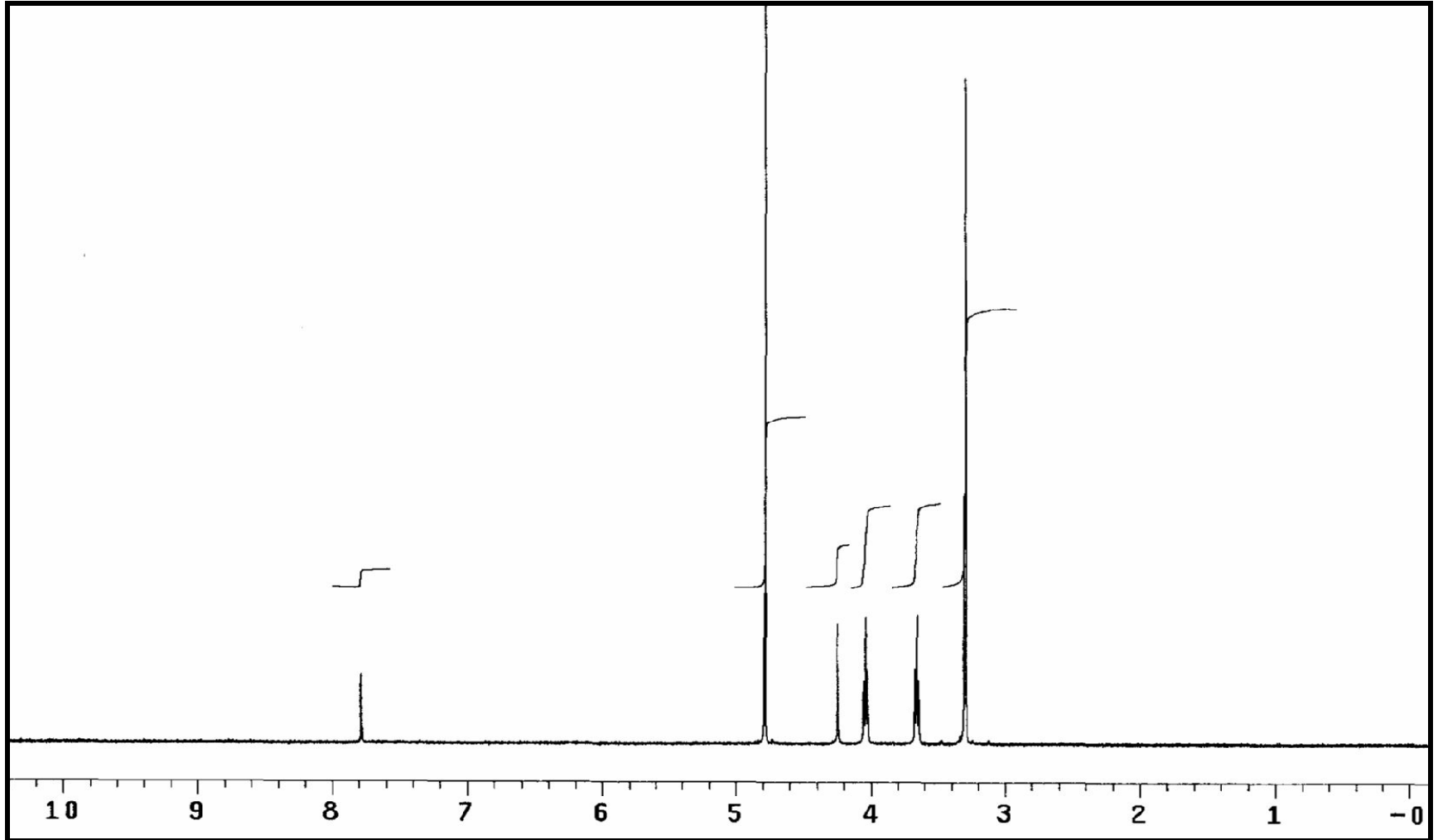
Grafik 6. A4 bileşğinin 72 saat sonraki sitotoksitesisi



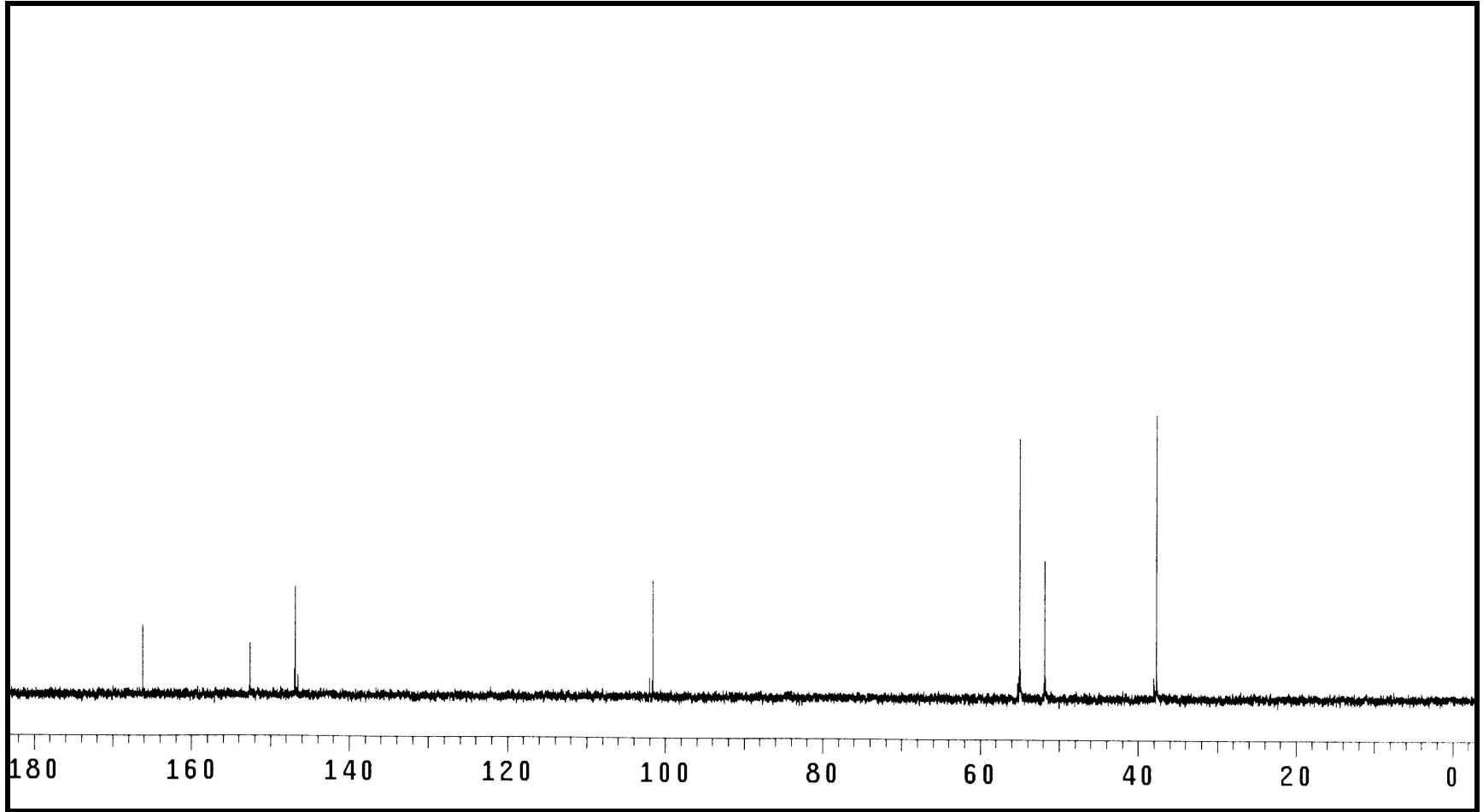
**Spektrum No 1. A1 Bileşğinin UV Spektrumu**



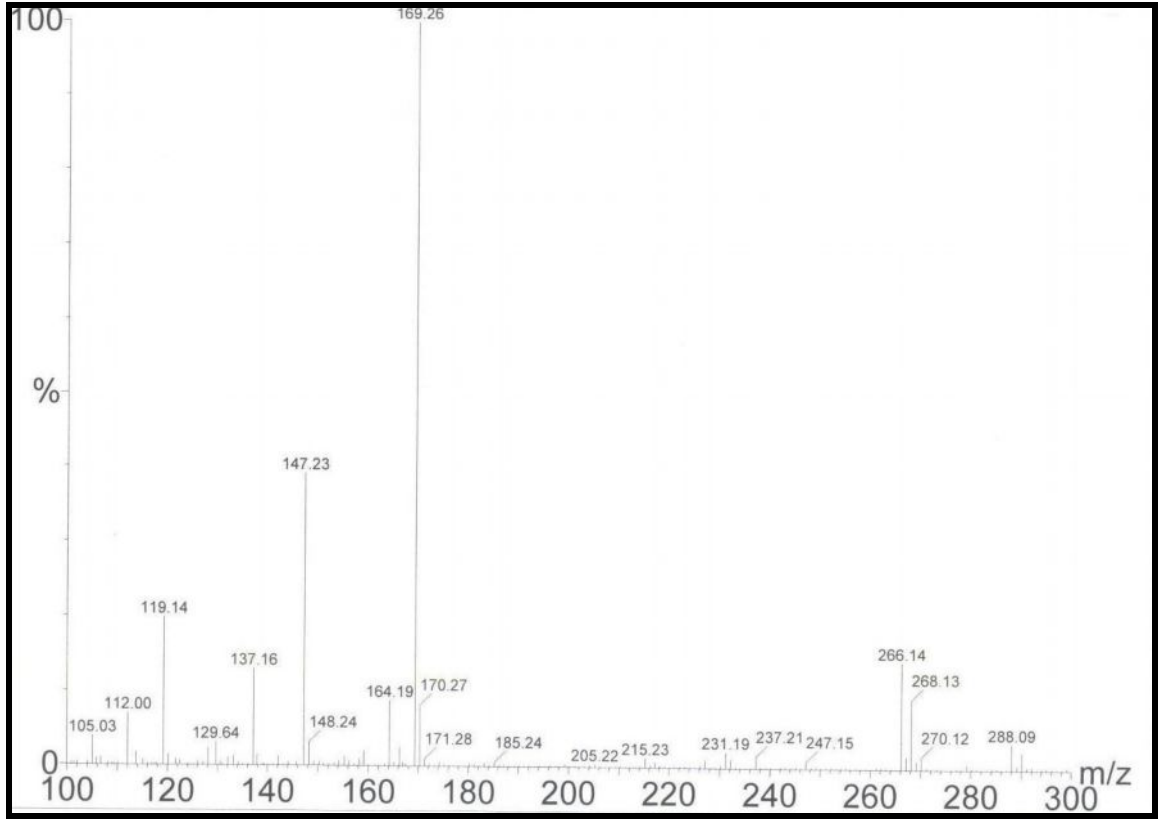
**Spektrum No 2. A1 Bileşğinin IR Spektrumu**



**Spektrum No 3. A1 Bileşğinin  $^1\text{H}$  NMR Spektrumu**

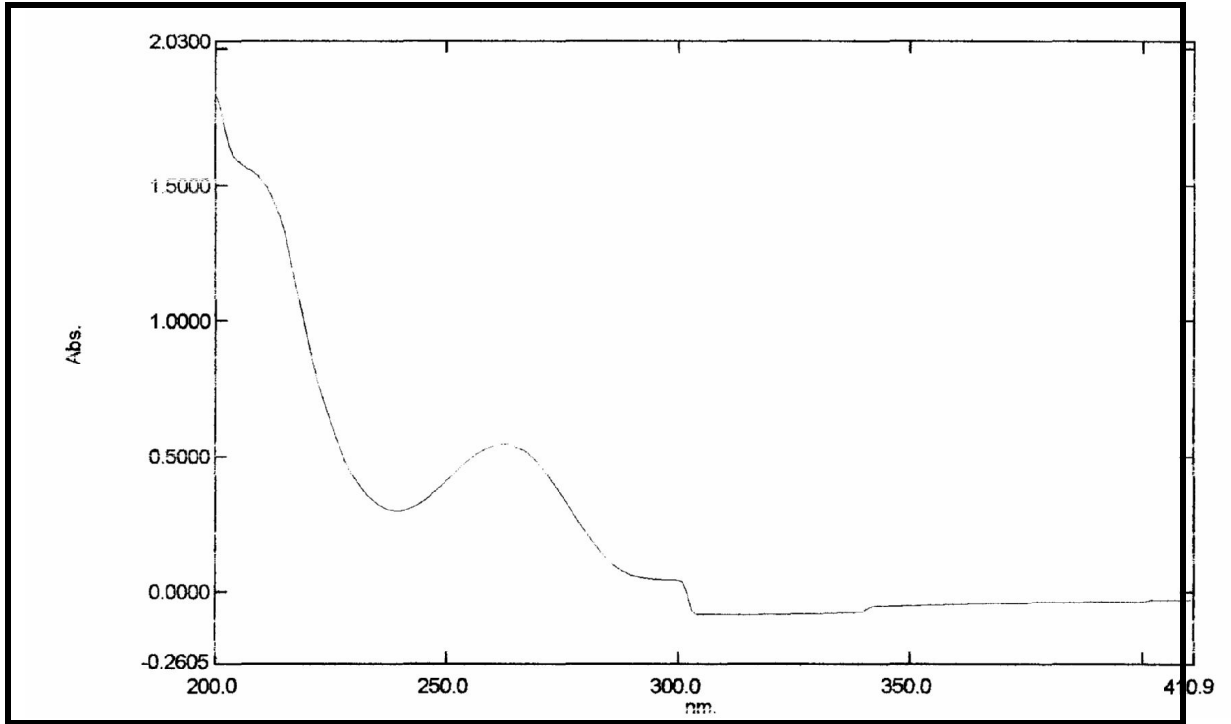


**Spektrum No 4. A1 Bileşğinin  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrumu**

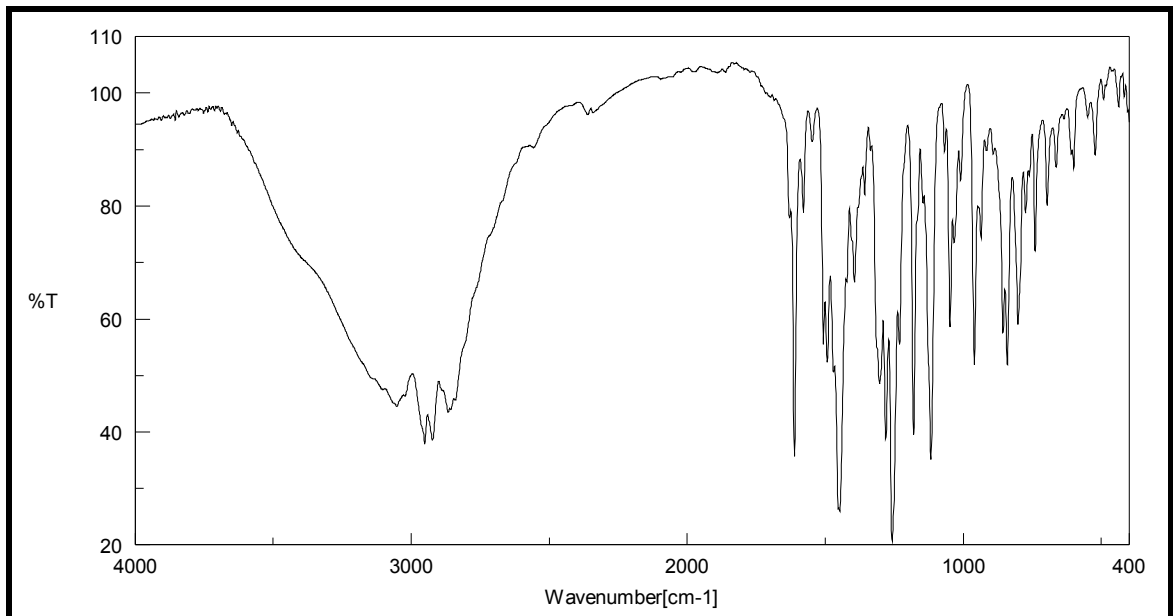


**Spektrum No 5. A1 Bileşğinin Kütle Spektrumu**

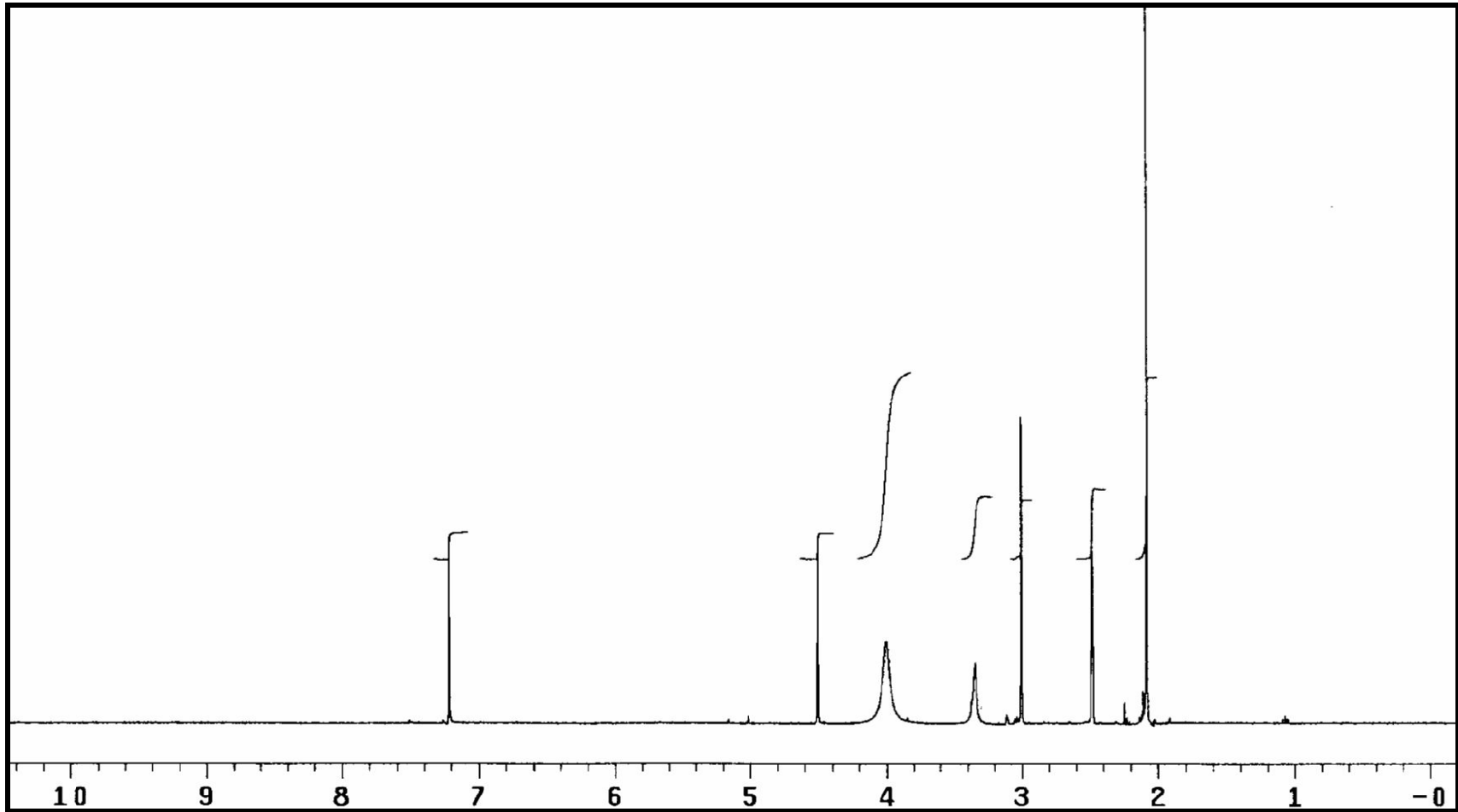




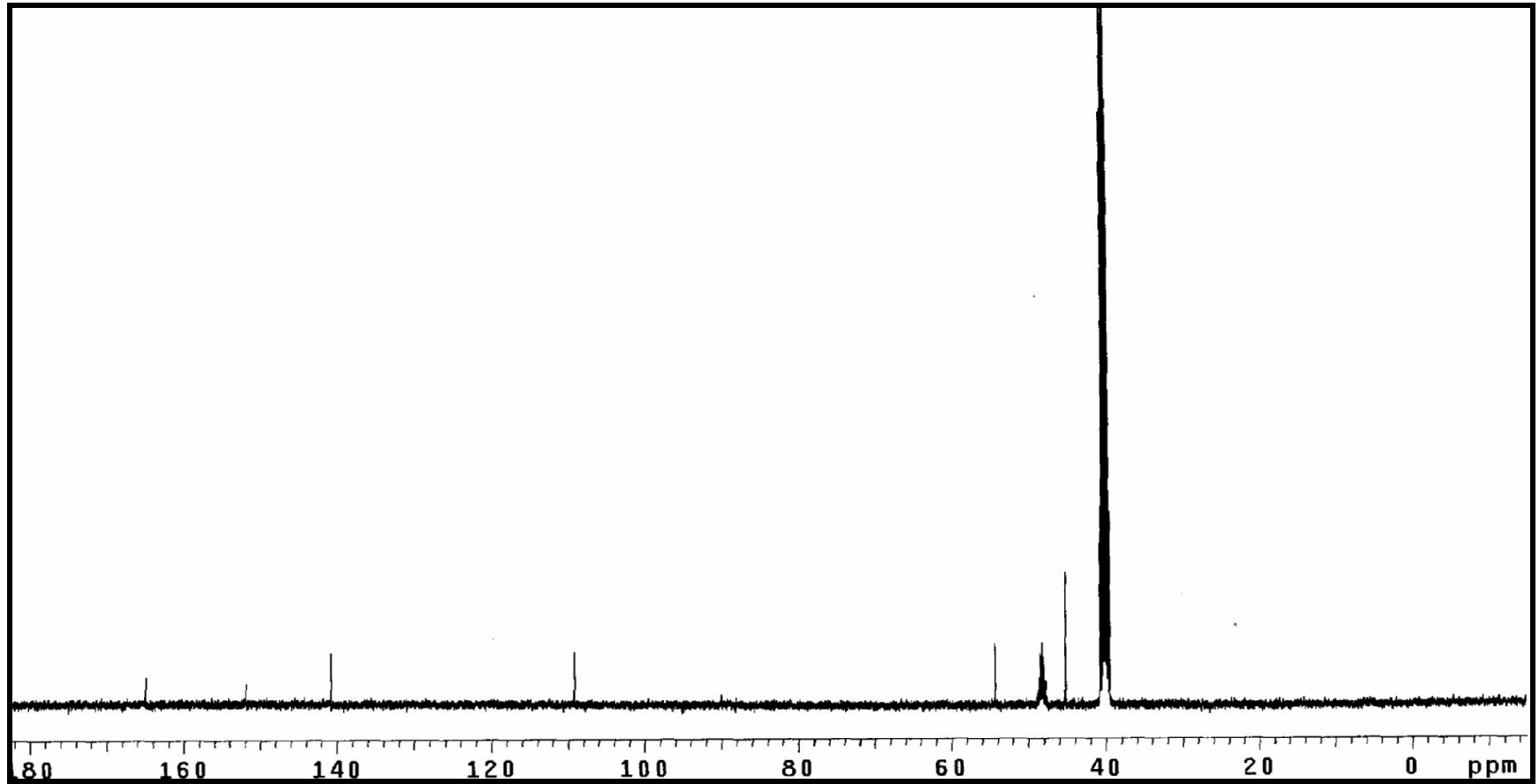
**Spektrum No 6. A2 Bileşğinin UV Spektrumu**



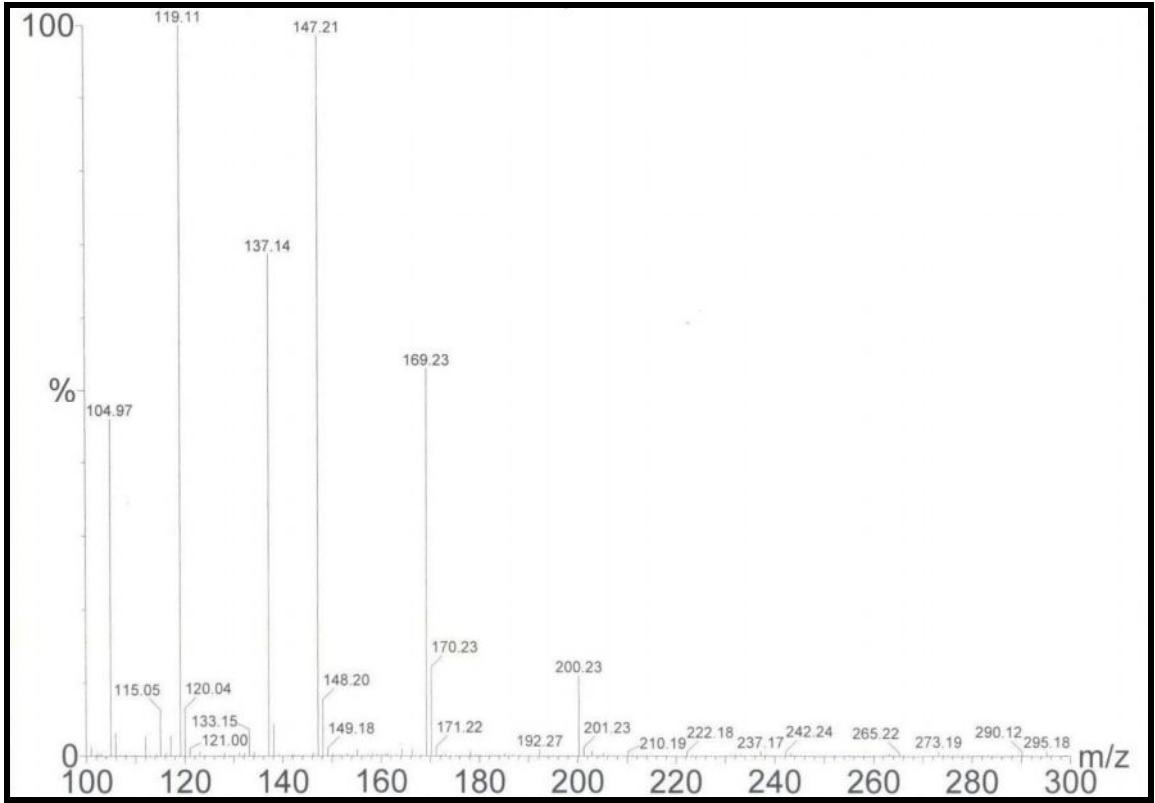
**Spektrum No 7. A2 Bileşğinin IR Spektrumu**



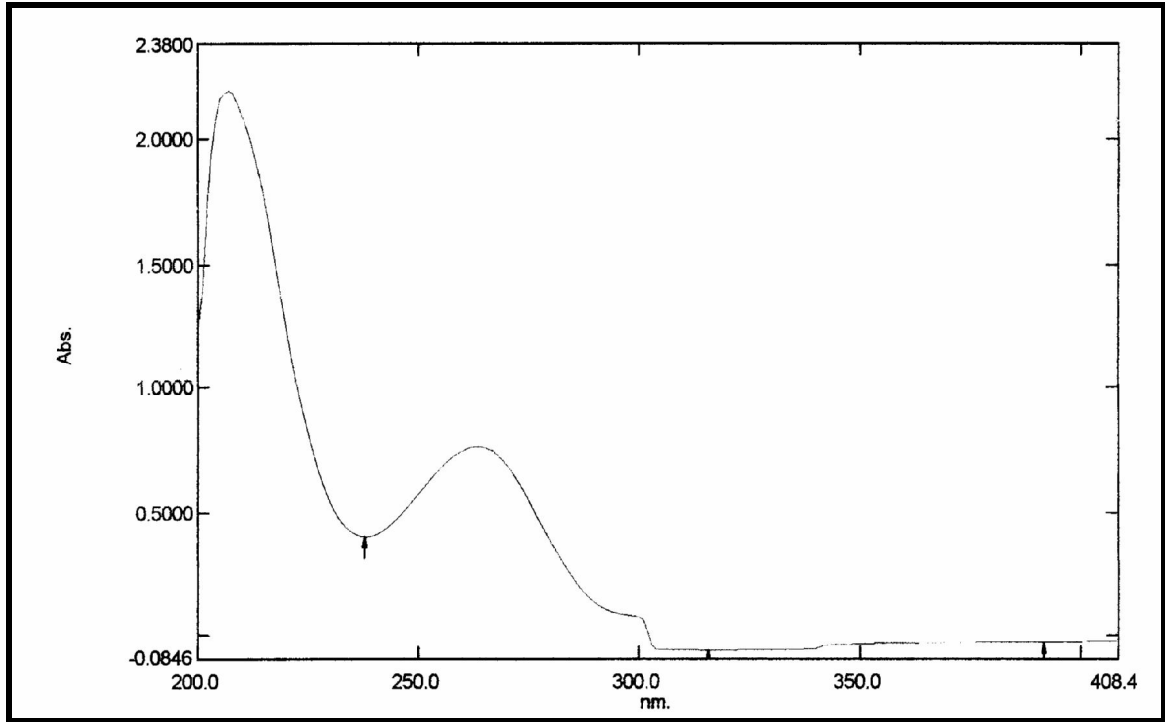
Spektrum No 8. A2 Bileşğinin  $^1\text{H}$  NMR Spektrumu



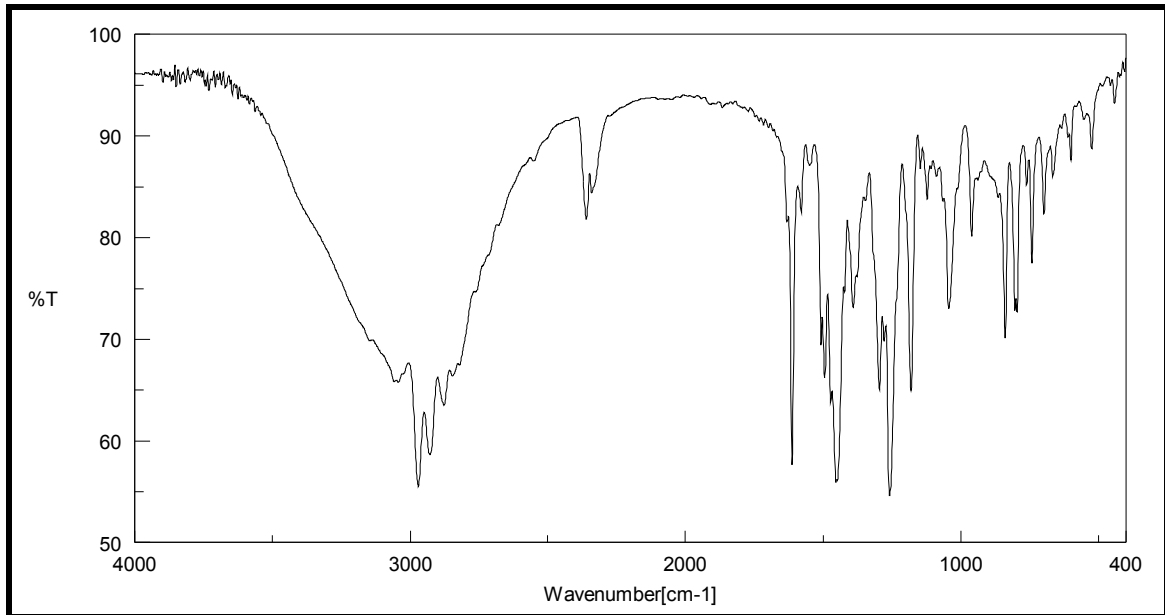
Spektrum No 9. A2 Bileşğinin  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrumu



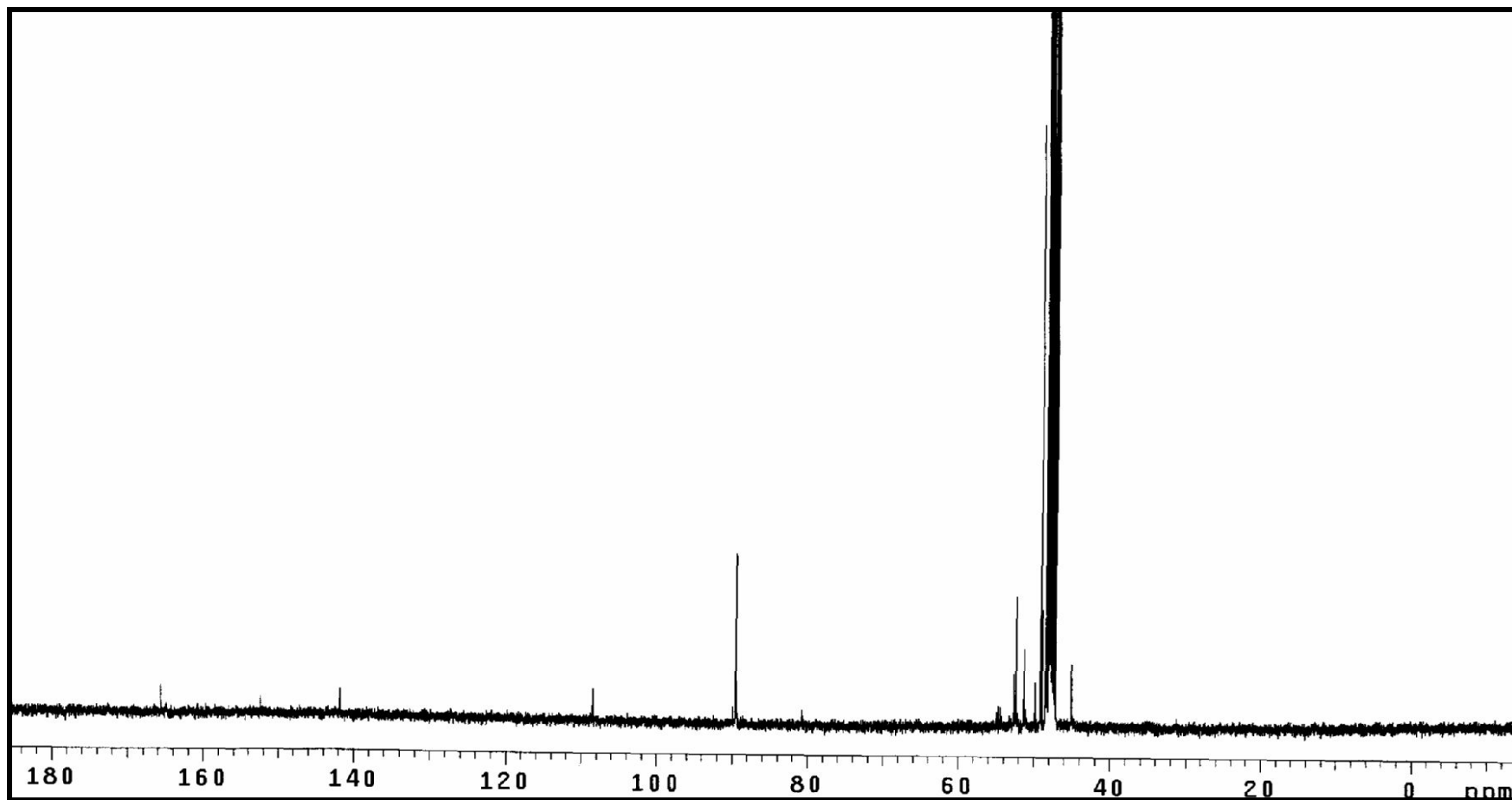
**Spektrum No 10. A2 Bileşğinin Kütle Spektrumu**



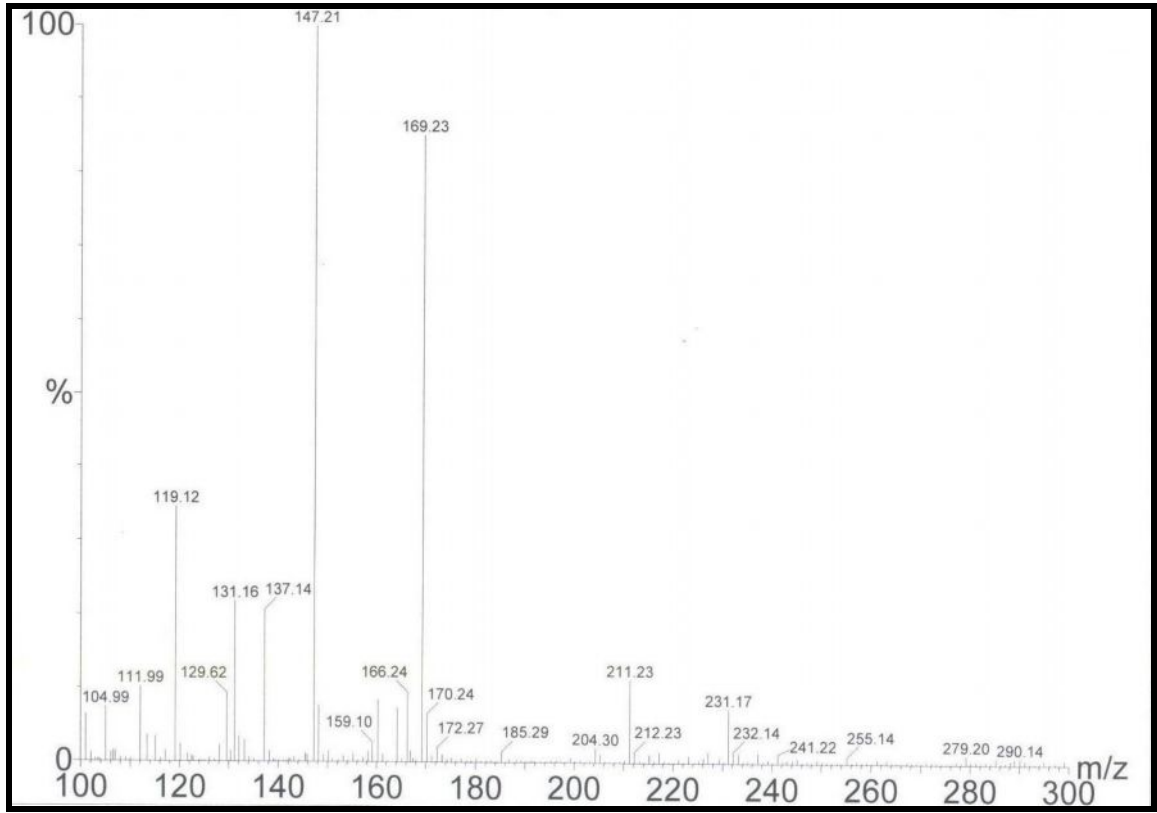
**Spektrum No 11. A3 Bileşğinin UV Spektrumu**



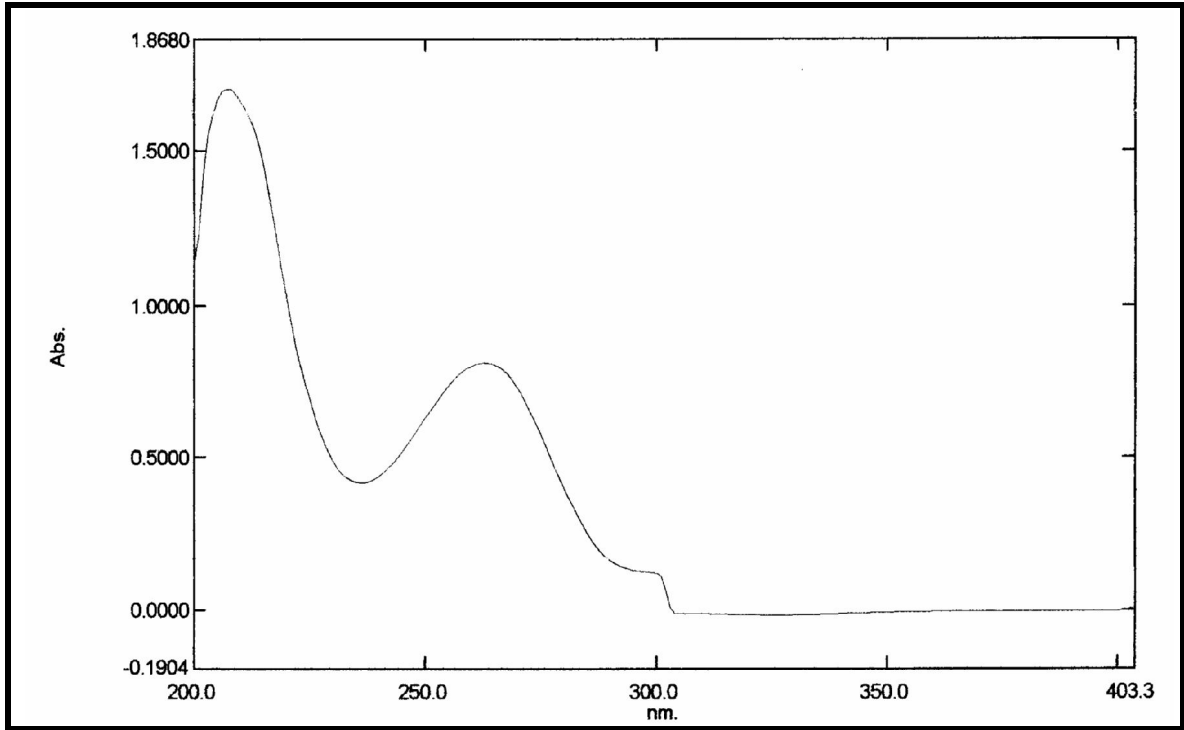
**Spektrum No 12. A3 Bileşğinin IR Spektrumu**



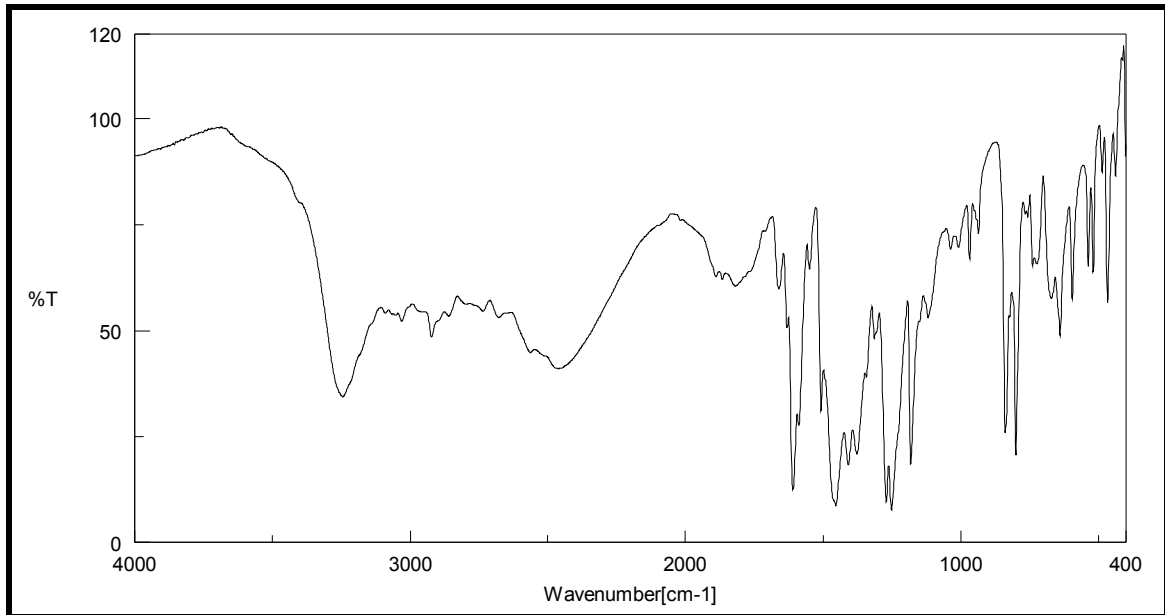
Spektrum No 13. A3 Bileşğinin  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrumu



**Spektrum No 14. A3 Bileşğinin Kütle Spektrumu**

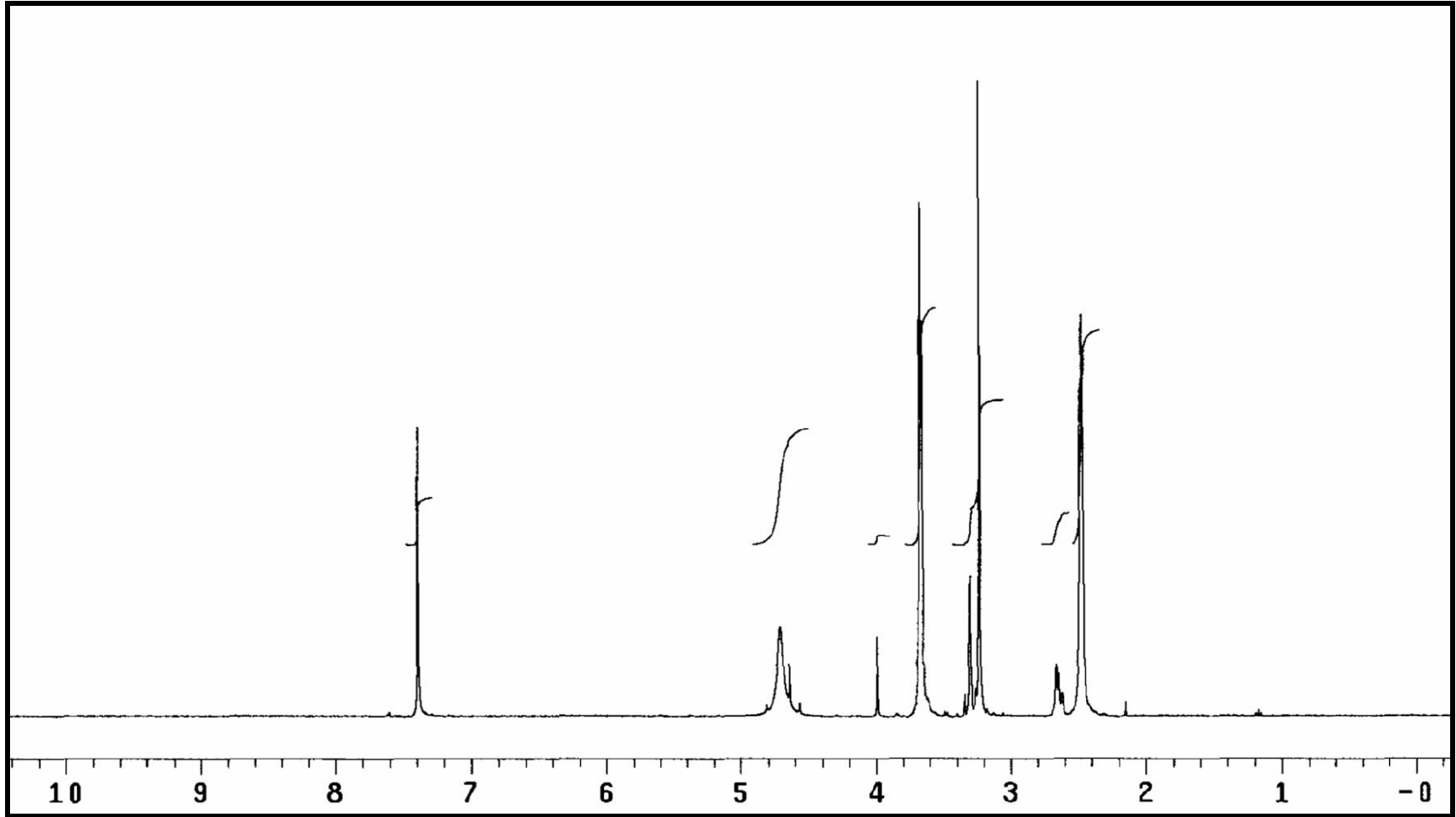


**Spektrum No 15. A4 Bileşğinin UV Spektrumu**

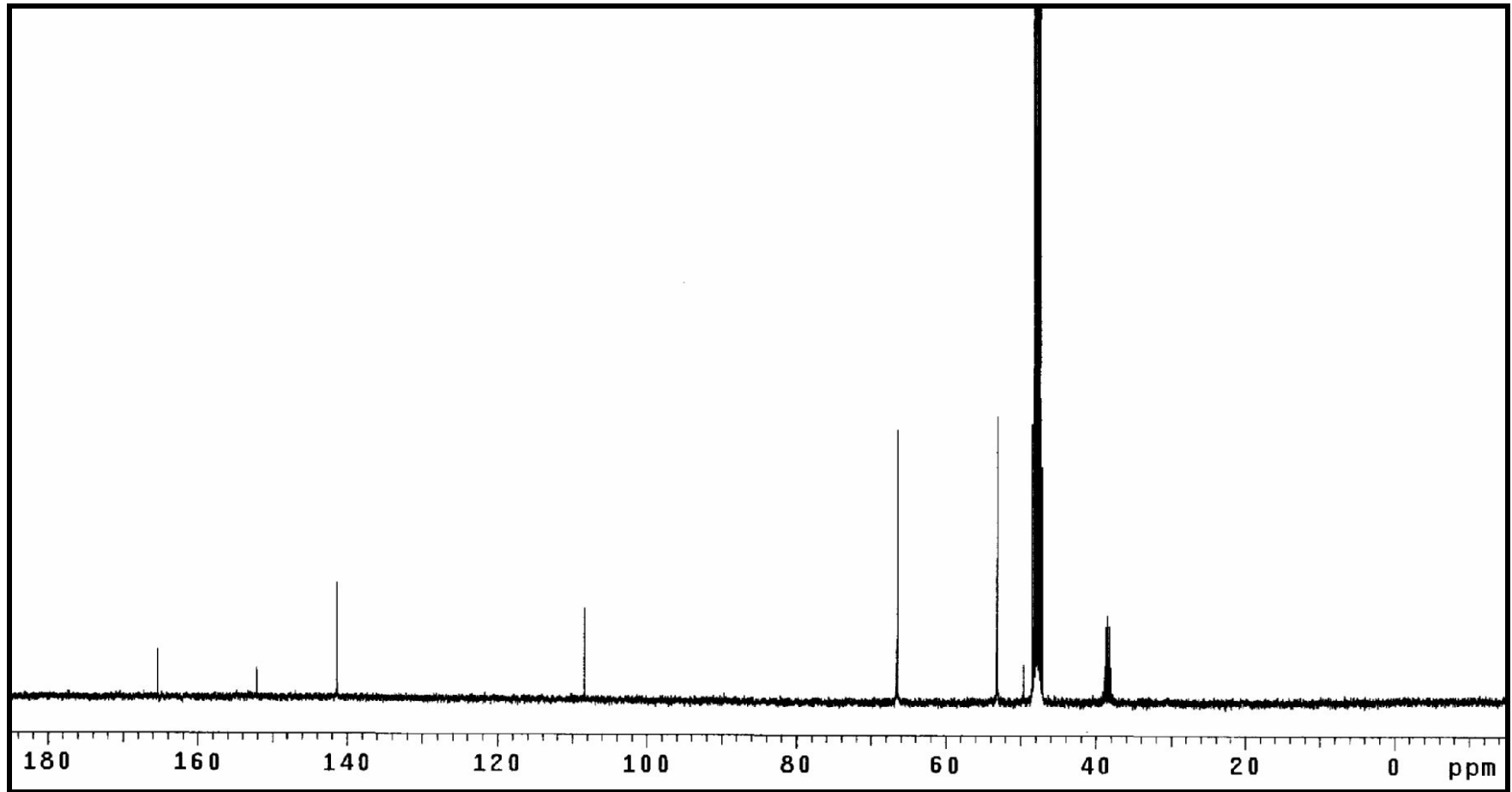


**Spektrum No 16. A4 Bileşğinin IR Spektrumu**

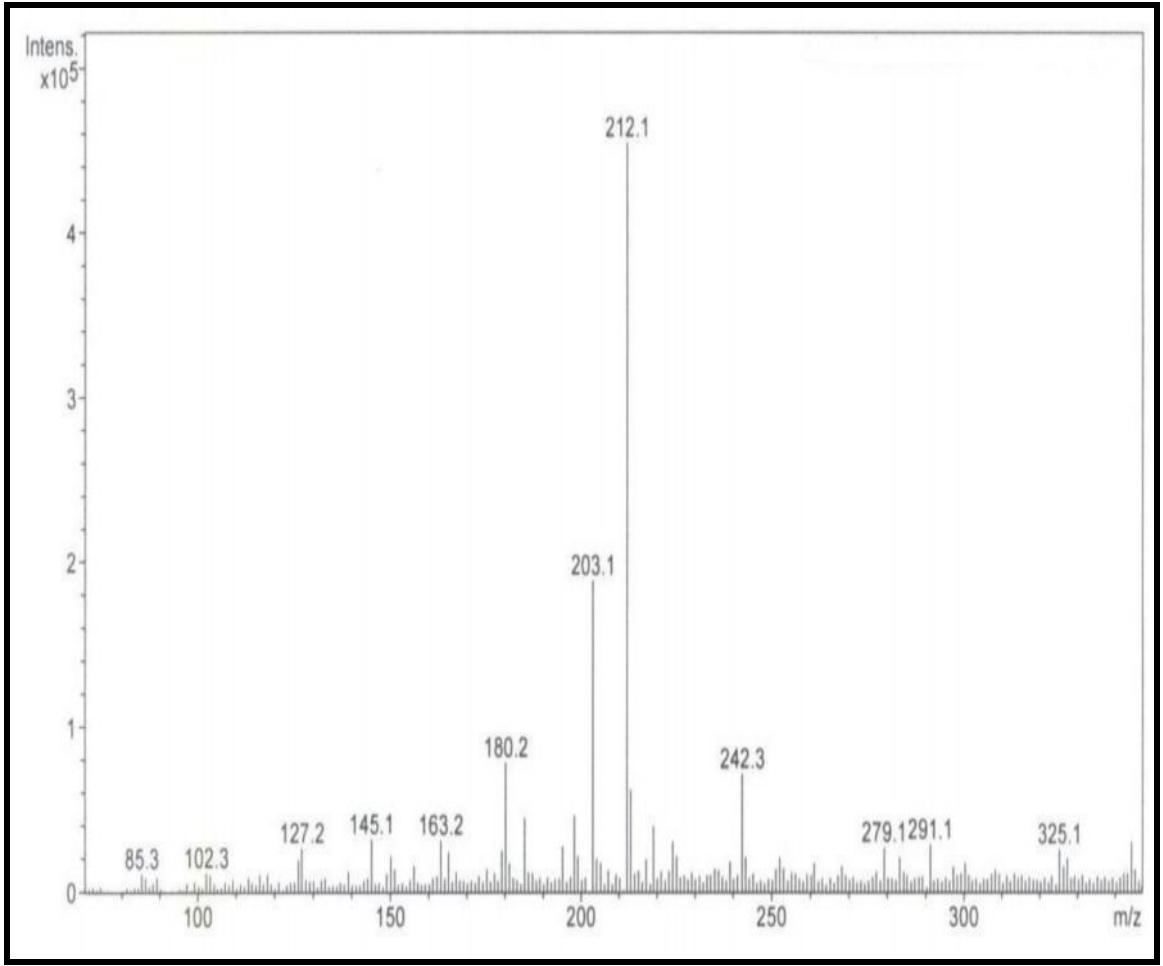




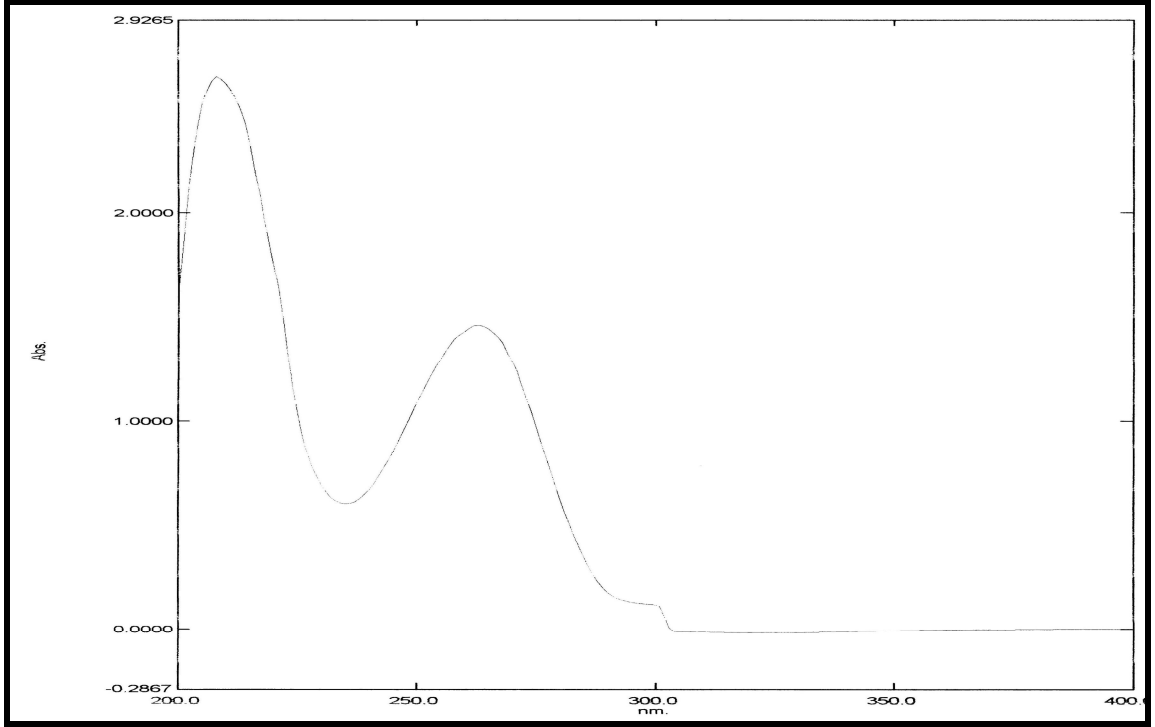
**Spektrum No 17. A4 Bileşğinin  $^1\text{H}$  NMR Spektrumu**



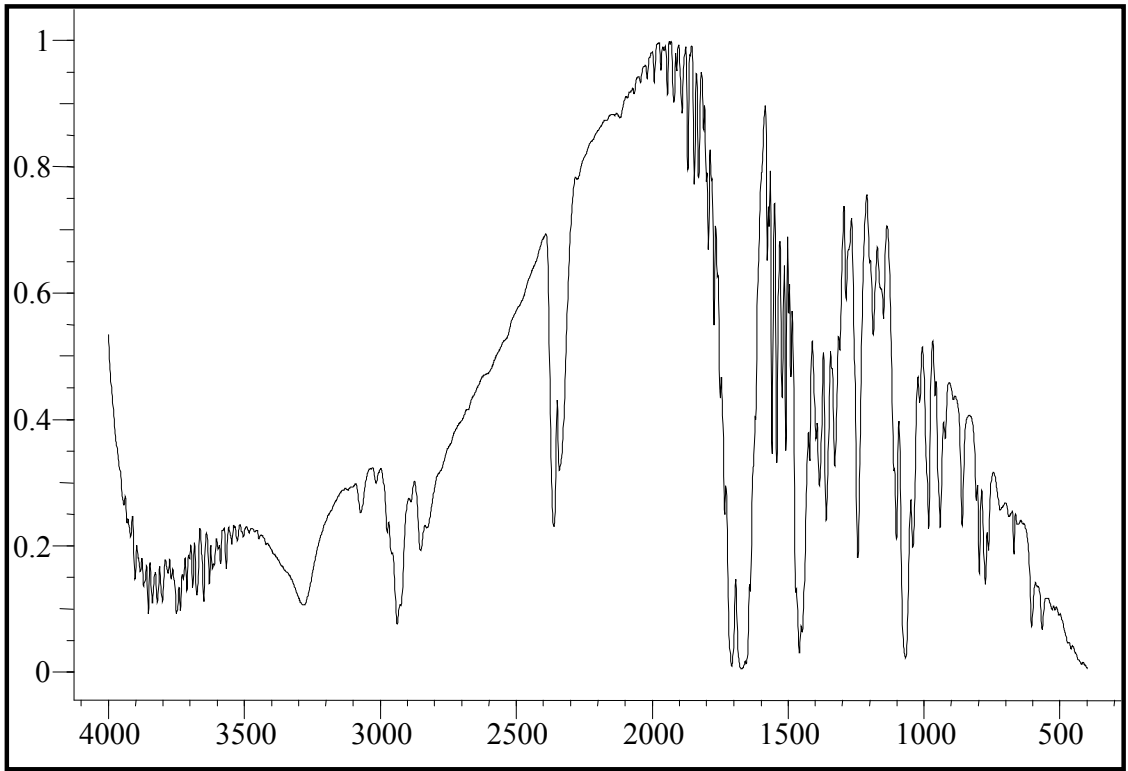
Spektrum No 18. A4 Bileşğinin  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrumu



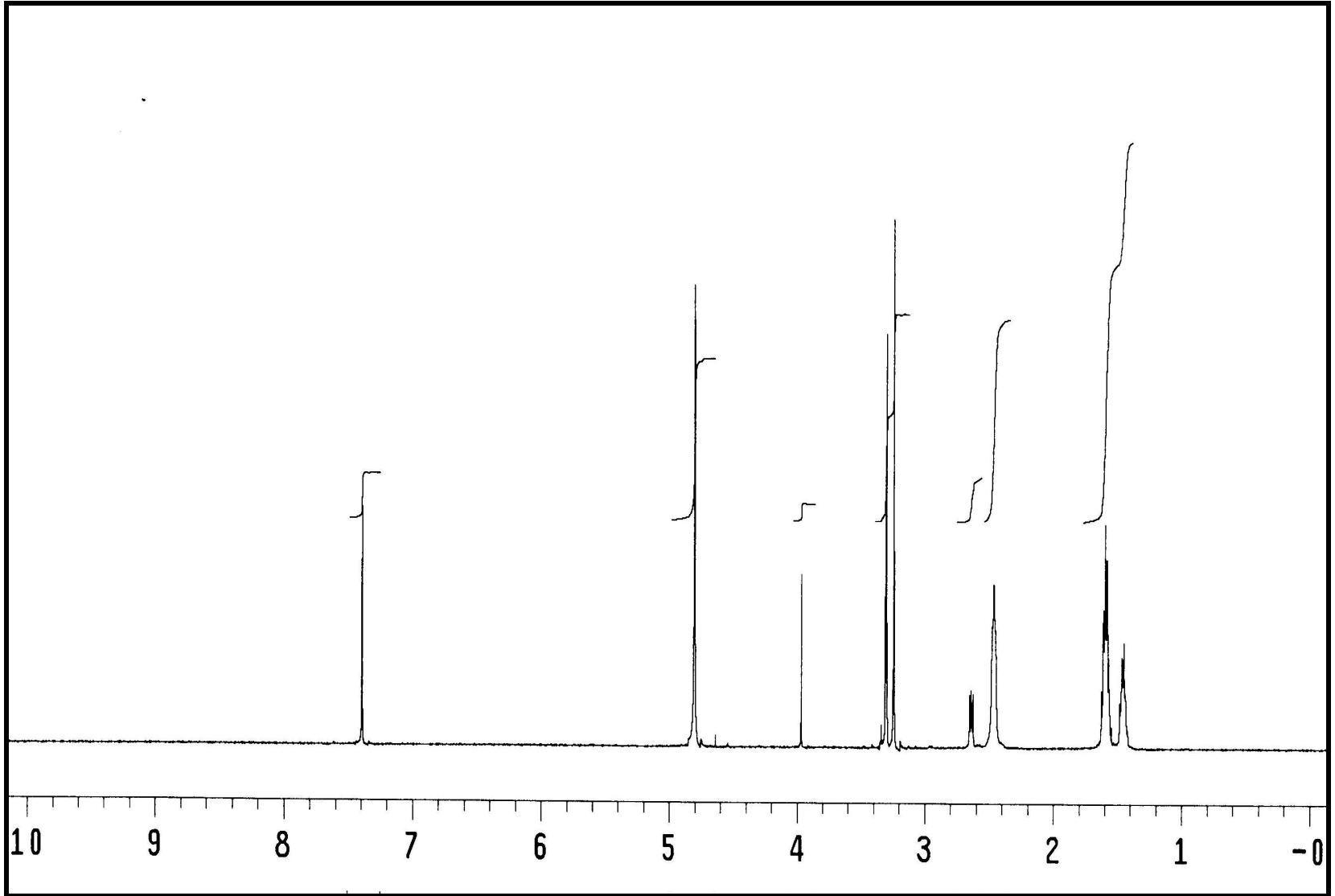
**Spektrum No 19. A4 Bileşğinin Kütle Spektrumu**



**Spektrum No 20. A5 Bileşğinin UV Spektrumu**

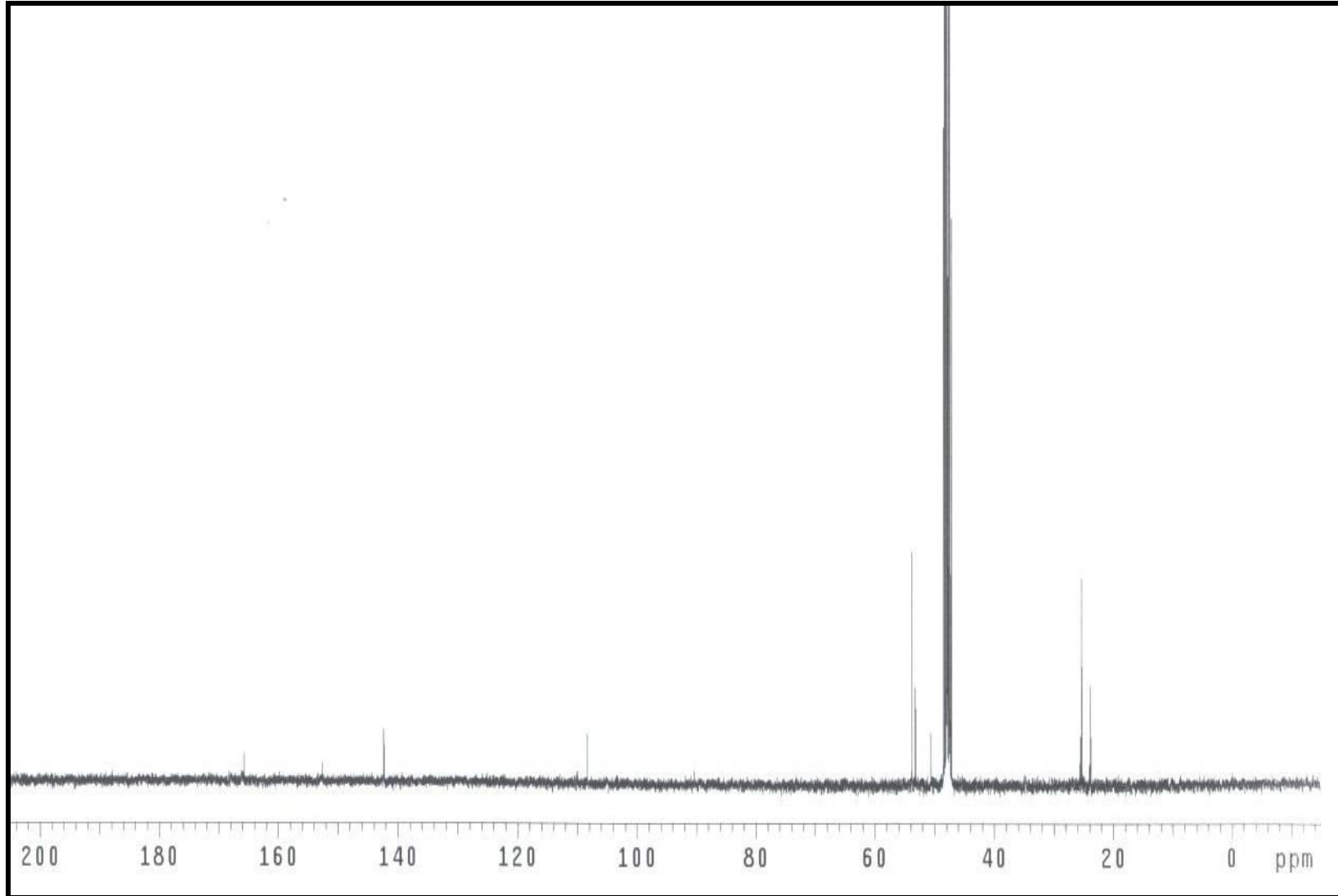


**Spektrum No 21. A5 Bileşğinin IR Spektrumu**

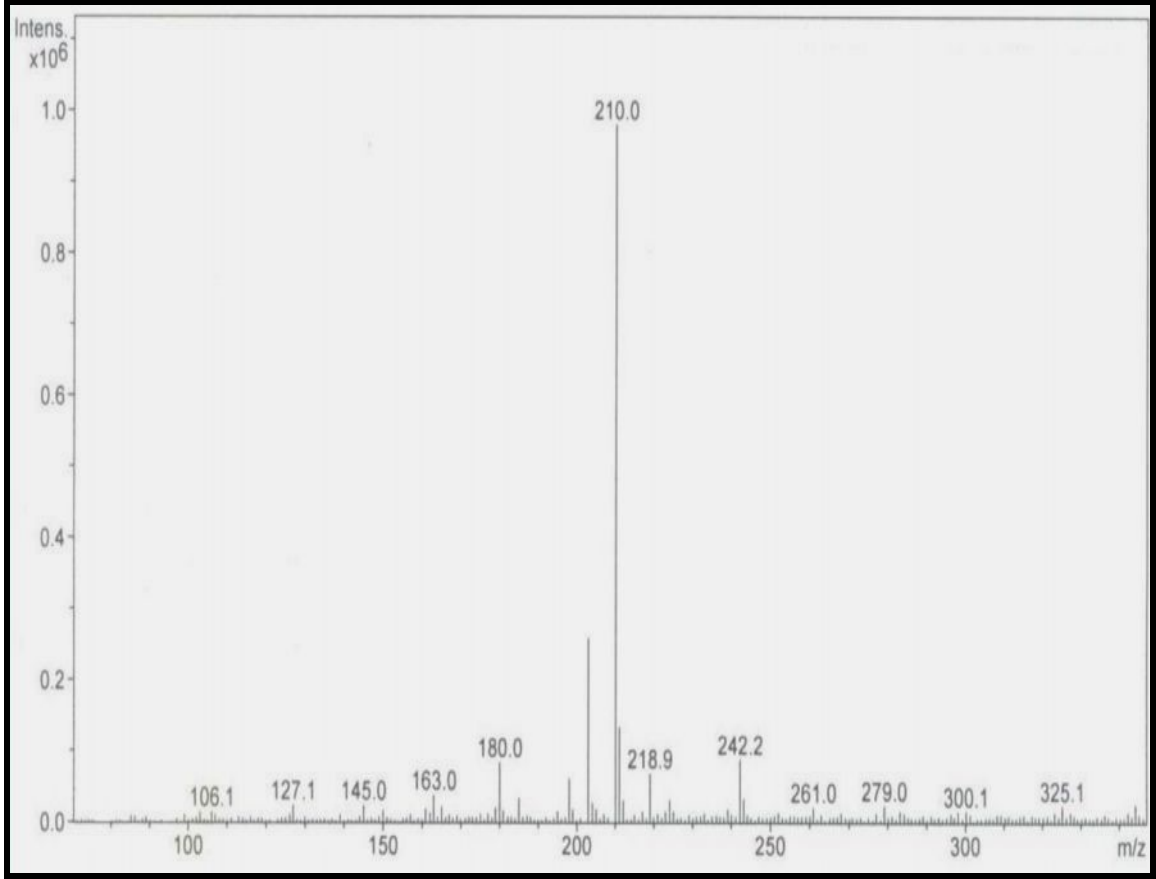


Spektrum No 22. A5 Bileşinin  $^1\text{H}$  NMR Spektrumu





**Spektrum No 23. A5 Bileşğinin  $^{13}\text{C}$  NMR Spektrumu**



**Spektrum No 24. A5 Bileşğinin Kütle Spektrumu**



## BÖLÜM III

### TARTIŞMA ve SONUÇ

#### 3.1. 5-(*Bis*(2-kloroetil)amino)metil)pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion hidroklorür (A1 Bileşiği)

A1 bileşiğinin sentezinde klasik Mannich tepkimesi yerine koşulları değiştirilmiş Mannich Tepkimesi uygulanmıştır. A1 molekülünün sentezinde kullanılan *bis*(2-kloroetil)amin baz şekli şekil 2'de gösterildiği gibi oldukça reaktiftir ve uygun laboratuvar koşulları sağlanmadıkça kuvvetli alkilleyici özellikte bir sıvı olması nedeniyle kullanılmaması gerekir. Bu nedenle *bis*(2-kloroetil)amin baz yerine katı bir madde olan hidroklorür tuzu ile tepkime yürütölmüştür. 1961 yılında Ross ve arkadaşları (5-((*bis*(2-kloroetil)amino)metil)pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion hidroklorür) bileşiğini Mannich tepkimesinden farklı bir yol izleyerek elde etmişlerdir (12). Buna göre 5-(klorometil)urasil önce dietanolamin ile etkileştirilerek dietanolamin grubu metilen köprüsü ile urasil halkasına bağlanmış, daha sonra tiyonil klorür ile hidroksil grupları klorlarla değiştirilmiştir. Sonuç bileşiğin kimyasal yapısı

elementel analiz sonuçları değerlendirilerek önerilmiştir. Aynı makalede bileşikle ilgili biyoaktivite çalışması rapor edilmemiştir.

Elderfield ve Wood, 1961 yılında A1 bileşiğini Mannich Tepkimesinden yararlanarak elde etmişlerdir (13). Buna göre urasil, *bis*(2-kloroetil)amin hidroklorür ve paraformaldehit glasiyel asetik asit içinde 110° C'de 2 saat süreyle ısıtılmıştır. Sonuç bileşik 5-(*bis*(2-kloroetil)amino)metil-2,4-pirimidindiol olarak rapor edilmiştir. Molekül yapısı erime derecesi, elementel analiz verileri değerlendirilerek açıklanmış ve IR spektrumunun bir çok bakımdan ilginç olduğu belirtilmesine karşın spektral veriler açıklanmamıştır. Farkas ve Sorm 5-hidroksimetilurasili tiyoniklorür ile klorlayıp, elde edilen 5-klorometilurasili *bis*(2-kloroetil)amin ile etkileştirerek A1 maddesini sentez ettiklerini bildirmişler, bu maddenin anlamlı sitotoksite gösterdiğini belirtmişlerdir (16). Bu çalışmada da moleküle ilişkin herhangi bir spektral veriye rastlanılmamıştır. 1966 yılında Werner, NH-asit grubu taşıyan bir seri heterosiklik molekül üzerinde tümör-inhibe edici özelliklerini test etmek amacıyla Mannich bazlarını hazırlamak istemiş, ancak 4-metilurasil ve 2-tiyourasilden çıkılarak düzenlenen Mannich Tepkimelerinin yürümediğini bildirmiştir (56).

Margot ve arkadaşları, 1969 yılında A1 bileşiğinin HeLa hücreleri üzerindeki etkisini incelemiş, maddenin DNA ile yaptığı katım tepkimesi ve mitotik prosese verdiği zarar ile hücre çoğalmasını durdurduğunu rapor etmiştir (57).

Fabrissin ve arkadaşları, A1 bileşiğini ve bunun <sup>1</sup>N-metil ve <sup>1</sup>N, <sup>3</sup>N-dimetil türevlerini Elderfield'in belirttiği yöntemle göre sentez ederek *in vivo* Ehrlich karsinoma ve *in vitro* KB hücreleri üzerine olan aktivitelerini

araştırmışlardır (58). Denenen bileşikler arasında hem *in vivo* hem de *in vitro* testlerde en iyi aktivite 5-((*bis*-(2-kloroetil)amino)metil)-6-propilurasil maddesinde saptanmıştır. Molekül yapılarının aydınlatılmasında bileşiklerin çözünürlük sorunu nedeniyle tatmin edici NMR spektrumu vermediklerini, spektrumlarda N-H protonlarını görmediklerini ve deneysel koşulların UV spektrumlarının alınmasını sınırladığını bildirmişlerdir.

A1 Maddesinin sentezi Bölüm II'de açıklandığı gibi önce oda sıcaklığında, daha sonra 70 °C' de yapılmıştır. Bu çalışma planlanırken *bis*-(2-kloroetil)amino yapısındaki azotlu hardal grubunun urasilin pirimidin azotundan/azotlarından bağlanması planlanmıştır. Böylece hardal yapısının *in vivo* ortamda daha kolay ayrılarak ardışık alkilleme yapması düşünülmüştür. Bu nedenle tepkime koşulları yüksek sıcaklık yerine oda sıcaklığından başlanarak ayarlanmış, deney İTK ile izlenmek suretiyle tepkimenin yürümediği durumlarda sıcaklık artışına gidilmiştir. Çalışılan koşullarda denenen tüm aminlerle aminometilleme pirimidin halkasının 5 konumundan gerçekleşmiştir. Laktam formundaki pirimidindion yapısının 4 konumunu oluşturan karbonil fonksiyonunun 5 konumundaki hidrojeni aktifleştirdiği görülmektedir. Bu nedenle Mannich bazları pirimidin halkasının 6 konumu yerine 5 konumundan oluşmuştur.

Bileşiğin proton ve karbon NMR spektrumları Bednarek ve arkadaşlarının belirttiği değerlerle uyumaktadır (59). <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda (Spektrum no. 3) 7.79 ppm de görülen singlet pirimidin halkasındaki H-6 protonuna işaret eder. Sübstitüsyon azotlar üzerinden gerçekleşmiş olsaydı aromatik bölgede H-5 ve H-6 protonlarına karşılık gelen iki ayrı dublet görmemiz gerekirdi. Maddenin proton NMR spektrumunda çalışılan

koşullarda asidik N-H protonları saptanamamıştır. Spektrumda 4.25 ppm de metilen köprüsüne ait 2 proton değerinde singlet mevcuttur. Klor atomlarının elektronegativiteleri nedeniyle klorlara bağlı yan zincir metilen protonları (c protonları) diğer metilen protonlarına göre daha aşağı alanda (4.04 ppm) ikişer protona karşılık gelen ve bölünmeleri  $J=5,9$  Hz değerinde bir triplet olarak görülmektedir. Azota bağlı yan zincir metilen protonları (b protonları) ise beklenildiği gibi 3.66 ppm de triplet olarak saptanmıştır.

Maddenin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumunda (Spektrum no. 4) 166,2 ve 152,6 ppm de görülen pikler sırasıyla C-4 ve C-2 karbonil karbonlarına aittir. Urasil halkasının diğer pikleri de 146,87 ve 101,60 (C-6 ve C-5) ppm de görülmekte ve literatür bilgilerine uygunluk göstermektedir (59). Klor atomlarının bağlı olduğu karbonlar (C-a), yan zincirdeki diğer karbonlara göre daha aşağı alanda, 55,0 ppm de, singlet şeklinde görülmektedir. Metilen karbonu (C-a) 52,0 ppm de, azota komşu karbonlar ise (C-b) 37,7 ppm'de görülmektedir.

IR spektrumunda (Spektrum no. 2) önerilen yapıya uygun olarak 1714 ve  $1675\text{ cm}^{-1}$  de karbonil gruplarına ait ( $-\text{C}=\text{O}$ ) gerilme sinyalleri,  $1638\text{ cm}^{-1}$  de olefinik karbon ( $-\text{C}=\text{C}-$ ) gerilme titreşim bandı saptanmıştır.

Maddenin UV spektrumunda (Spektrum no.1) molekülde bulunan konjuge karbonilen yapısındaki  $\pi-\pi^*$  elektron geçişlerinden kaynaklanan K bantları belirgin pikler halinde  $\lambda_{\text{maks}}$  211 ve 263 nm lerde görülmektedir.

Yukarıda açıklanan spektrofotometrik verilere ek olarak, A1 bileşiğinin kütle spektrumunda (Spektrum no.5) önerilen moleküle uygun m/z'de M+1 (266,1) ve M+2 (268,1) pikleri belirlenmiştir.

A1 bileşiği daha önce elementel analiz sonuçlarına dayanılarak bildirilmesine karşın, ilk kez bu çalışma ile sistematik spektral analizler

değerlendirilerek rapor edilmektedir. Bileşiğin saptadığımız erime derecesi ile literatürde bildirilen erime dereceleri arasında farklılıklar vardır.

### 3.2. 5-((dimetilamino)metil)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (A2 Bileşiği)

A2 bileşiği Farkas ve Sorm tarafından yapılan çalışmada 5-hidroksimetilurasilin tiyonil klorürle klorlanmasından sonra dimetilaminin sudaki çözeltisi ile tepkimesi sonucu elde edilmiştir (16). Delia ve arkadaşları urasil, paraformaldehit ve dimetilamin gibi birincil ve ikincil alkilaminlerin etanoldeki çözeltisini geri çeviren soğutucu altında 6-18 saat ısıtarak karşılık geldikleri Mannich bazlarını sentez ettiklerini bildirmişlerdir (14). Bileşiklerin karakterizasyonunda elementel analiz sonuçlarından ve 60 MHz <sup>1</sup>H NMR bulgularından yararlanmışlardır. Dimetilaminometil türevinin D<sub>2</sub>O içerisinde alınan <sup>1</sup>H NMR spektrumunda asidik N-H protonları rapor edilmemiştir. Aynı bileşiğin, L1210 lenfoid lösemi hücresi üzerindeki sitotoksiteleri incelenmiş, ancak antitümör aktivite saptanmamıştır.

Yapılan başka bir çalışmada 2,4-diamino-5-benzilpirimidinler ve analogları antibakteriyal amaçla sentez edilirken pirimidinlerin Mannich bazları ile C-alkillenmeleri sırasında 5-(dimetilaminometil)urasil'in de sentez edildiği bildirilmiş, ancak olduğu düşünülen Mannich bazı ile ilgili herhangi bir saflaştırma ve karakterizasyon çalışması yapılmadan ham ürün üzerinden sentezin ileri basamaklarına geçilmiştir (60).

Asherton ve arkadaşlarının 1980 yılında yaptıkları kapsamlı bir çalışmada polisiklik heteroaromatik bileşikler sentez edilirken 5-(N,N-dimetilaminometil)urasil yapısındaki Mannich bazı ara ürün olarak hazırlanmıştır (55). Sentezde susuz dimetilamin, formaldehit çözeltisi ile

soğukta etkileştirilerek dimetilaminometanol oluşturulduktan sonra oda sıcaklığında urasil ile tepkimeye girmiştir. Elde edilen bileşiğin erime derecesi bulduğumuz erime derecesi ile uyuşmamaktadır. Molekülün kimyasal yapısı belirlenirken, elementel analiz sonuçları, UV, IR ve NMR bulguları değerlendirilmiştir. Aynı çalışmada 5-morfolinometilurasil sentezinin Burckhalter ve arkadaşları (15) ile Bombardieri ve Taurins (61) tarafından bildirilen yöntemle yapıldığı, ancak yapının Bombardieri ve Taurins'in belirttiği şekilde N-1 ve N-3 üzerinden değil de Burckhalter ve arkadaşlarının belirttiği C-5 üzerinden tepkimeye girdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada 5-(piperidinometil)urasil ve 5-(morfolinometil)urasil yapısındaki Mannich bazlarının anilin ile tepkimelerinden anilin artığı taşıyan 5-(fenilaminometil)urasil yapısında yeni Mannich bazları elde edildiği bildirilmiştir. Bu durum yorumlanarak sentez mekanizması açıklanırken Mannich bazlarının önce eliminasyonla kinon metid yapılarına dönüştüğü, teorik anlamda olduğu düşünülen kinon metidlerin anilin katımı yaparak sırasıyla %59 ve % 80 verimle yeni Mannich bazlarını verdiği belirtilmiştir. Elde edilen bu sonuç Tez çalışması planlanırken düşündüğümüz moleküllerin alkilleme potansiyellerine ilişkin mekanizma önerimizi desteklemesi bakımından önemlidir (Şekil.16). Ayrıca tezimizde A2 olarak kodladığımız 5-(dimetilaminometil)urasil bileşiğinin beklemekle urasile dönüştüğünün saptanması son derece önemli bir veridir. Çünkü, Tez çalışması planlanırken düşündüğümüz birden çok biyoaktif molekülün aynı molekülde birleştirilmesi kavramı dikkate alınarak tasarlanan A1 bileşiğinin potansiyel sitotoksik etkisini destekler niteliktedir. Bu durumda urasil ve aminin ardışık sitotoksik etki oluşturması beklenebilir.

A2 maddesinin spektral verileri önerilen kimyasal yapıyı doğrulamaktadır.  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda (Spektrum no.8) aminometillemenin azotlar yerine karbonlardan olduğunu gösteren 7.22 ppm de bir proton değerinde bir singlet vardır. 3.01 ppm de görülen iki proton değerindeki singlet metilen protonlarına, 2.08 ppm de görülen altı proton değerindeki singlet ise metil protonlarına aittir. Bu değerler Asherson ve arkadaşlarının verileriyle de uyuşmaktadır (sırasıyla 7,50, 3,85, 2,75 ppm)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunda (Spektrum no.9) urasil halkasındaki karbonil gruplarına ait sinyaller 151.8 ve 164.9 ppm'de (sırasıyla C-2 ve C-4) görülmektedir. Ayrıca, 140.8 ve 109.2 ppm'lerde olefinik karbonlara, 54.3 ppm'de metilen karbonuna, 45.2 ppm'de metil karbonlarına ait sinyaller mevcuttur. Maddenin kütle spektrumunda (Spektrum no.10) m/z 169 da % 53,1 bağıl bollukta görülen pik M+1 piki olarak değerlendirilmiştir. Molekülün UV ve IR bulguları (Spektrum no.6 ve 7) A1 molekülünde tartışıldığı gibi, önerilen yapı ile uyumludur.

### 3.3. 5-(Piperazinometil)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (A3 Bileşiği)

A3 Bileşiğini sentez etmek için urasil:formaldehit:piperazin (1:1:1) oranında alınarak oda sıcaklığında karıştırıldı. Ayrıca ortama çözücü ilave edilmedi. Tepkime İTK ile izlendiğinde plak üzerinde kloroform:metanol:amonyak (4:2:0.1) çözücü sisteminde UV lambası altında iki leke belirdi. Bu kromatogram piperazin azotları üzerinden *mono* ve *bis*-Mannich bazlarının oluştuğunu düşündürdü. Kristallendirme yöntemi ile maddelerin saflaştırılamaması üzerine preparatif İTK yöntemi ile daha

kuvvetli ışımaya yapan alt leke kazanıldı. Aynı tepkime sadece *bis*-Mannich bazının oluşmasını sağlamak amacıyla bu kez urasil:formaldehit:piperazin (1:2:2) oranında etanol içerisinde geri çeviren soğutucu altında ısıtılarak incelendiğinde İTK de aynı lekeler belirdi.

Preparatif İTK yöntemi ile kazanılan bileşiğin UV spektrumunda (Spektrum no.11)  $\lambda_{maks}$  207 ve 263 nm lerde urasil halkasından kaynaklanan K bantları, IR spektrumunda (Spektrum no.12)  $3415\text{ cm}^{-1}$  frekansında piperazinin *mono*-Mannich bazını verdiği düşünöüren N-H gerilme titreşim bandı ve diğere beklenen karbonil ve olefinik gerilme bantları mevcuttur. Aynı maddeden çekilen  $^1\text{H}$  NMR spektrumlarında farklı sinyaller alınması nedeniyle bu spektrumlar Tez kapsamına alınmamıştır. Maddenin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunda (Spektrum no.13) göröülen 165.6 ve 152.4 ppm değereerinde karbonil karbonları, 141.8 ve 108.5 ppm değereerinde olefinik karbonlar, 52.4 ve 51.3 ppm değereerinde ise piperazin halkasını oluşturan metilen karbonları önerilen kimyasal yapıyı kanıtlamaktadır. A3 bileşiğinin kütle spektrumunda (Spektrum no.14) M+1 iyonunu gösteren m/z 211 piki saptanmıştır.

Piperazinin urasil ile verdiği *mono*-Mannich bazı yapısındaki A3 bileşiği ilk kez bu çalışma ile rapor edilmektedir.

### 3.4. 5-(Morfolinometil)pirimidin-2,4(1H,3H)-dion (A4 Bileşiği)

Bileşiğin ilk kez 1960 yılında Burckhalter ve arkadaşları tarafından klasik Mannich Tepkimesi koşullarında sentez edildiği bildirilmiştir (15). Etanolden kristallendirilen bileşik için bildirilen erime derecesi  $217\text{ }^\circ\text{C}$  dir. Bu çalışmada piperidinometil ve morfolinometil türevleri hazırlanarak hidrojenoliz



ile timin molekülü sentez edilmiştir. Sentez işlemleri sonucunda timinin oluşması Mannich bazlarının da 5 konumundan oluştuğuna kanıt olarak gösterilmiştir. 5-(Morfolinometil)urasil ve 5-(piperidinometil)urasil yapıları erime dereceleri ve elementel analiz verileri ile doğrulanmak istenmiştir. Bu durum yapısal izomerlerde ve stereoizomerlerde yanıltıcı olabildiği için bileşiklerin ayrıntılı spektral veriler ile kimyasal yapılarının aydınlatılması gerekir. Nitekim 1955 yılında Bombardieri ve arkadaşlarının (61) urasil, formalin ve morfolini 0° C'de karıştırarak etanolden kristallendirildikten sonra erime derecesi 208-209 °C olan 1-(morfolinometil)urasili elde ettiklerini rapor etmelerine karşın, Burckhalter ve arkadaşları (15) bileşiklerin erime derecelerindeki yakınlığı da göz önüne alarak süstitüsyonun N-1 azotu yerine kendi çalışmalarında olduğu gibi, 5 konumundan gerçekleştiğini öne sürmüşlerdir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda bileşiğe ait UV, IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR ve kütle spektrumları A4 maddesinin 5-(morfolinometil)urasil yapısında olduğunu, 0° C de çalışılsa bile aminometillemenin azotlardan gerçekleşmediğini kanıtlamaktadır. Aminometillemenin azotlardan gerçekleşmediğinin en önemli kanıtı urasil halkasının 5 ve 6 konumlarının serbest olması durumunda göreceğimiz birer proton değerindeki iki dubletin tüm bileşiklerin <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarında bulunmamasıdır.

A3 maddesinin erime derecesi Bombardieri ve arkadaşlarının (61) rapor ettikleri erime derecesi ile aynı ancak Burckhalter ve arkadaşlarının (15) rapor ettiği erime derecesi ile farklıdır. Urasil halkasının 5 konumunun kapalı olduğu 5-florourasil örneğinde oda sıcaklığında çalışılarak urasil

azotlarından sübstitüsyonun gerçekleştiği ve 1,3-*bis*(morfolinometil)-5-florourasilin sentez edildiği bildirilmiştir (54).

### 3.5. 5-(piperidin-1-il-metil)pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (A5 Bileşiği)

Bileşik A4 maddesinde açıklandığı gibi, ilk kez Burckhalter ve arkadaşları tarafından klasik Mannich Tepkimesine göre sentezlenmiştir (15).

Ayrıca A5 maddesi Carbon tarafından 5-(hidroksimetil)urasilden çıkılarak sentez edilmiştir (62). 5-(Hidroksimetil)urasilden 5-(bromometil)urasil elde edilmiş daha sonra da piperidinin alkilleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bileşiğin yapısı elementel analiz bulguları ile doğrulanmış ve rapor edilen erime derecesi bulduğumuz erime derecesi ile uyuşmamaktadır.

Diğer bileşiklerde olduğu gibi, A5 bileşiği için de UV, IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR ve kütle spektrum verileri ilk kez bu çalışma ile rapor edilmektedir. Elde edilen bulgular 5-(piperidinometil)urasil kimyasal yapısı ile uyumludur. Bileşiğe ait bulgular Bölüm II'de verilmiş, bulguların değerlendirilmesi A1, A2 ve A3 bileşiklerinde ayrıntılı olarak yapılmıştır.

### 3.6. Stabilite Çalışması

Planlanan çalışmanın amacına uygun olarak seçilen 5-(*Bis*(2-kloroetil)amino)metil)pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion hidroklorür (A1) maddesinin biyolojik koşullara benzer koşullar altındaki (37 °C, pH 7.4) stabilitesi incelendi. Molekülün eliminasyona uğrayabileceği düşünülerek ortama biyomimetik bir nükleofil olan 2-merkaptetanol ilave edildi. İnkübasyon İTK ile izlendi. 72 saat sonunda İTK verilerine göre, başlangıç maddesinden farklı R<sub>f</sub> değerine sahip yeni bir bileşiğin oluşmadığı saptandı.

### 3.7. Biyoaktivite Çalışmaları

#### 3.7.1. Topizomeraz I Enzim İnhibisyon Testi

A2 ve A3 bileşiklerinin memeli DNA topoizomeraz I enzimi üzerindeki etkilerinin araştırılması sonucu elde edilen bulgular, Şekil 19'da verilmiştir. Bölüm II'de açıklandığı gibi, süpersarmal formdaki plazmid DNA'sı, pUC19, %1'lik agaroz jelinde form 1 şeklinde gösterilen bir hareketlilik gösterirken (şekil 19, uyg 1), enzim etkisi ile süpersarmallık relaks forma (form 2) dönüşmüştür (şekil 19, uyg 2). Bileşikleri çözmede kullanılan DMSO reaksiyon üzerinde etkili olmamıştır (şekil 19, uyg 3). A3 bileşiğinin konsantrasyona bağımlı etkisi aynı şeklin 4-8 nolu uygulamalarında gösterilmiştir. A3 bileşiği, 1 mg/ml konsantrasyonda dikkate değer bir inhibisyon göstermekte (uyg 4), bu inhibitör etki 0,50 mg/ml'den başlayarak (uyg 5) 0,25 mg/ml (uyg 6) ve 0,13 mg/ml konsantrasyonlarda daha az göze çarpar hale gelmiştir. A3 bileşiğinin 0,06 mg/ml konsantrasyonda ise herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (uyg 8). A2 bileşiği 1 mg/ml ile 0,25 mg/ml konsantrasyon aralığında A3 bileşiğine benzer etki göstermişken (uyg 9-11) A3 bileşiğinden farklı olarak inhibitör etkisi 0,13 mg/ml'de sona ermiştir (uyg 12). Fizyolojik olarak anlamlılığı tartışılabilir olmakla beraber sonuçlar A3 bileşiğinin memeli topoizomeraz I enzimi üzerindeki etkisinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Aynı deney koşullarında A1 bileşiğinin de etkisi incelenmiş ancak alınan sonuçlarda tekrarlanabilir tutarlı bir inhibitör etki gözlenmemiştir.

Deneylerimizde referans olarak kullanılan kamptotekin (CPT)'in aynı koşullarda topoizomeraz I enzimi üzerindeki etkisi şekil 20'de verilmiştir. Saf

bir bileşik olması bakımından beklenildiği gibi CPT etkisi daha seyreltik konsantrasyonlarda da devam etmektedir.

### **3.7.2.Canlılık Testi Çalışmaları**

Androjene bağımlı olmayan prostat kanseri hücreleri olan PC- hücre hattı kullanılmıştır. Canlılık testlerinde istenen, uygulanan ilacın IC<sub>50</sub> değerini uygun konsantrasyonda vermesidir; bu nontoksik konsantrasyondur.

Canlılık testi ile A1 ve A4'ün üç ayrı zaman içerisinde farklı konsantrasyonlarda gösterdiği sitotoksosite, örneğin absorbansının kontrolün absorbansına oranı ile yaşayan hücrelerin yüzdesi hesaplanarak bulunmuştur. Bu çalışmada en anlamlı sonuç A1 bileşiğinin 48 saat sonra elde edilen sonuçtur. Diğer sonuçlar anlamlı bulunmamıştır. Bu çalışmada doz aralığının yüksek oluşu ( $10^{-4}$ - $10^{-10}$ ) daha sonra yapılacak olan IC<sub>50</sub> dozlarının bulunmasına yönelik çalışmalarda kullanılacak önemli bilgiler vermiştir.

## KAYNAKLAR

1. Pitot, H.C. (1976) **Fundamentals of Oncology** 3 Ed., Marcel Dekker Inc., New York, syf 22
2. <http://www.who.int/entity/cancer>
3. Baserga, R. (1993) **Principles of Molecular Cell Biology of Cancer**, DeVita VT, Hellman S, Rosemberg AS. (Ed) *Cancer: Principles and practice of oncology*. 4. ed. , J B Lippincott Co., Philadelphia, syf 60-66
4. Salmon, S. E., Sartorelli, A.C. (1989) **Basic and Clinical Pharmacology** Katzung, B.G. (Ed.), Prentice-Hall Int. Inc. , Connecticut, syf 683-715.
5. Albert, A. A. (1985) **Selective Toxicity The Physico-Chemical Basis of Therapy**, 7th Ed., Chapman and Hall, New York, syf 1-5
6. Fiala, S., Trout, E.C., Teague, Jr., Fiala, C.A. (1980) Gamma-glutamyltransferase, a common marker of human epithelial tumors, *Cancer Det. Prev.*, **3:471-485**
7. Frei.,E., (1974) **Effect of Dose and Schedule on Reponse**; *Cancer Medicine*, Lea and Febiger, Philadelphia, syf 1519-1526
8. Dowling, M.D., Krakoff, I. H., Karnofsky, D.D. (1970) **Mechanism of Action of Anfi-Cancer Drugs**, *Chemotepaphy of Cancer*, Warren, C. (Ed.), Lea and Febiger, Philadelphia, syf 1210-1230

9. Spiegel, R.J. (1984) **Anticancer and Interferon Agents, Synthesis and Properties**, Ottenbrite, R.M., Butler, G.B. (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, syf 253-256
10. Sosnovsky, G., Baysal, M., Erciyas, E. (1994). In the search for new anticancer drugs 28: Stnthesis and evaluation of highly active aminoxyl labeled amino acid derivatives containing the [N'-(2-chloroethyl)-N'-(nitrosoamino)] carbonyl group, *J. Pharm. Sci.* **83(7)**:999-1005.
11. Pratt, W.B., Ruddon, R.W. (1979) **The Anticancer Drugs**, Oxford University Press, New York, syf 56-66
12. Ross, O. L., Lee, W. W., Schelstraete, M. G. M., Goodman, L., Baker, B. R. (1961). Potencial anticancer agents LVI. Synthesis of 5-[Bis(2-chloroethyl)aminomethyl]uracil, *J. of Organic Chemistry*, **26**:3021-3022
13. Elderfield, R. C., Wood, J. R. (1961). Application of the Mannich Reaction with  $\beta,\beta$ -dichlorodiethylamine to derivatives of Uracil, *J. of Organic Chemistry*, **26**:3042-3043
14. Delia, T. J., Scovill, J. P., Munslow, W. D., Burckhalter, J. H. (1976). Synthesis of 5-substituted aminomethyluracils via the Mannich reaction, *Journal of Medicinal Chemistry*, **19(2)**, 344-346
15. Burckhalter, J. H., Seiwald, R. J., Scarborough, H. C. (1960) The Amino and Chloromethylation of Uracil, *J. of the Am. Chem. Soc.* **82**:991-994
16. Farkas, J., Sorm, F. (1961) Nucleic acid components and their analogs VIII. New derivatives of Thymine, *Collection of Czechoslovak Chemical Communication*, **26**:893-895
17. Chu, K. C. (1980) **Burger's Medicinal Chemistry** 4<sup>th</sup> Ed., Wolfif, M. A, (Ed.), John Wiley and Sons Inc. New Jersey, syf 393

18. Hammett, L. P. (1937) The effect of structure upon the reactions of organic compounds: Benzene derivatives, *J. Amer. Chem. Soc.* **59**:96-103
19. Lewis, E. S. (1986) **Techniques of Chemistry 6**, 4<sup>th</sup> Ed., Bernasconi C. F. (Ed), John Wiley and Sons Inc. New Jersey, syf 874
20. Hansch, C., Leo, A., Unger, S., Kim, H., Nikaitani, D., Lien, E. J. (1973) "Aromatic" substituent constants for structure-activity correlations, *J Med.Chem.* **16**:1207-1216
21. Fujita, T., Iwasa, J., Hansch, C. A. (1964) New substituent constant,  $\pi$ , derived from partition coefficients, *J. Amer. Chem. Soc.* **86**: 5175-5180
22. Cain, B. F. (1975) The role of structure-activity studies in the design of antitumor agents, *Cancer Chemother. Rep. Part 1* **59**: 679-683
23. Kozarich, J. M., Stubbe, J., Griffith, R. K., Sartorelli, A. C. (1979) *Methods Cancer Res.* **96**:127-133
24. Lee, K. H., Furukawa, H. (1972) Antitumor agents 3. Synthesis and cytotoxic activity of helenalin amine adducts and related derivatives, *J. Med. Chem.* **15**: 609-611
25. Blicke, F.F. (1942) *Organic Reactions* **1**:303
26. House, H. O. (1972) **Modern Synthetic Reactions**, 2 Ed., W.A. Benjamin Inc., California, syf 629
27. Cummings, T. F., Shelton, J. R. (1960) Mannich reaction mechanism, *J. Org. Chem.* **25**:419-423
28. Hansel, W., Haller, R. (1970) Structure of condensation products from acetone dicarboxylic acid esters and aldehydes, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **303**:334-338

29. Tramontini, M. Angiolini, L. , Ghedini , N. (1988) Mannich bases in polymer chemistry, *Polymer*, **29**:771-778
30. King, F.D. (1983) *Tetrahedron Lett.* **24**:3281
31. Gautier, J. A., Miocque, M., Quan, D. Q. (1964) Reaction de Mannich sur la p-hydroxyacetophenone, *Compt. Rend Acad. Sci.* **258** :3731-3734
32. Böhme, H., Hartke, K. (1960) "Über die Spaltung von Aminen und  $\alpha$ -dialkylamino-äthern mit Carbonsaurehalogeniden", *Chem. Ber.*, **93**:1305-1309
33. Topcu, Z., Castora, F. J. (1995). Mammalian Mitochondrial DNA Topoisomerase I Peripherally Relaxes Supercoils in Plasmids Containing Specific Mitochondrial DNA Sequences, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1264**: 377-387
34. Liu, X., Chen, H., Qu, F., Huang, X. (1999). Potassium Ferricyanide Oxidative Cyclization of Arylaldehyde with o-phenylenediamine and o-aminophenol to 2- arylbenzimidazoles and 2-arylbenzoxazoles, *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, **4(3)**: 355-357
35. Mekepati, S.B., Hansch, C. (2001). Comparative QSAR Studies on Bibenzimidazoles and Terbenzimidazoles Inhibiting Topoisomerase I, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **9**: 2885-289
36. Tolner, B., Hartley, J.A., Hochhauser, D. (2001). Transcriptional Regulation of Topoisomerase II $\alpha$  at Confluence and Pharmacological Modulation of Expression by bis-Benzimidazole Drugs, *Molecular Pharmacology*, **59**: 699-706
37. Wright, J., Downing, D., Heffner, T., Pugsley, T., et al. (1995). Discovery of Selective Dopamine D<sub>3</sub> Ligands: I. Dimeric 2-[4-(3-



- aminopropoxy)phenyl]benzimidazole antagonists, *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **5(21):2541-2546**
38. Poeta, M.D., Toffaletti, D., Rude, T.H., Dykstra, et al. (1999). Topoisomerase I Is Essential in *Cryptococcus neoformans*: Role in Pathobiology and as an Antifungal Target, *Genetics*, **152**: 167-178
39. Baily, C. (2000). Topoisomerase I Poisons and Suppressors as Anticancer Drugs, *Current Medicinal Chemistry*, **7(1)**: 39-58
40. Garcia-Domenech, R., Rios-Santamarina, I., Catala, A., Calabuig, C., et al. (2003). Application of Molecular Topology to the Prediction of Antifungal Activity for a Set of Dication-substituted Carbazoles, Furan and Benzimidazoles, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, **624**: 97-107
41. Tobey, R.A., Oishi, N., Crissman, H.A. (1990). Cell Cycle Synchronization: Reversible Induction of G2 Synchrony in Cultured Rodent and Human Diploid Fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 5104-51
42. Göker, H., Kuş, C., Boykin, D.W., Yıldız, S., Altanlar, N. (2002). Synthesis of Some New 2-Substituted-phenyl-1H-benzimidazole-5-carbonitriles and Their Potent Activity Against Candida Species, *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, **10**:2589- 2596
43. Quintero, A., Pelcastre, A., Solano, J. D. (1999). Antitumoral activity of new pyrimidine derivatives of sesquiterpene lactones, *J. Pharm. Sci.*, **2**:108-112
44. Onda, M., Wang, Q. C., Guo, H. F., Cheung, N. K., Pastan, I. (2004). In vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)-

- PE38 against breast cancer, osteosarcoma and neuroblastoma, *Cancer Res.*, **64**:1419-1424
45. Schoenenberger, H., Bastug, T., Bindl, L. Adam, A., et al. (1969). Action Mechanism of Antimicrobial  $\beta$ -Amino Ketones, *Pharm. Acta Helv.*, **44**:691-714
46. Werner, V. W., Jungst, W., Gutsche, W. (1970). Zusammenhänge Zwischen der Chemischen Struktur von Mannich-Basen mit und ohne Stickstofflostgruppen und ihrer Cytostatischen Wirksamkeit auf das Ehrlich-Ascites-Carcinom der Weissen Maus, *Arzneim. Forsch (Drug Res.)***20**:246-249
47. Maysinger, D., Ban, J., Movrin, M. (1980). Effects on Isatin N-Mannich Bases on HeLa Cells, *Arzneim. Forsch (Drug Res.)* **30**:932-935
48. Bundgaard, H. (1981). Formaldehyde Prodrugs as Potential Antitumor Agents,) *Arch. Pharm. Chem. Sci.* **9**:133-136
49. Dimmock, J.R., Sidhu, K.K., Chen, M., Reid, R.S., et al. (1993). Evaluation of some Mannich bases of cycloalkanones and related compounds for cytotoxic activity, *Eur. J. of Med. Chem.* **28(4)**:313-322
50. Dimmock, J. R.; Kandepu, N. M.; Hetherington, M.; Quail, et al. (1998). Cytotoxic Activities of Mannich Bases of Chalcones and Related Compounds, *J. Med. Chem.***41(7)**:1014-1026
51. Bodor; N.S., Sloan, K. B. (1977). Treating psoriasis with transient pro-drug forms of xanthine derivatives, *US Patent no: 4,061,753*
52. Bundgaard, H., Johansen, M. (1980). Prodrugs as drug delivery systems IV: N-Mannich bases as potential novel prodrugs for amides, ureides, amines, and other NH-acidic compounds, *J. of Pharm. Sci.* **69(1)**:44-46

53. Bundgaard, H., Johansen, M. (1980). Pro-drugs as drug delivery systems XV. Bioreversible derivatization of phenytoin, acetazolamide, chlorzoxazone and various other NH-acidic compounds by N-aminomethylation to effect enhanced dissolution rates, *Int. J. of Pharm.* **7(2):129-136**
54. Sloan, K. B. (1989). Aminomethyl derivatives of biologically active substances, and enhanced delivery thereof across topical membranes, *US patent no: 4,845,081*
55. Asherson, J. L. Bilgic, Orhan; Young, Douglas W. (1980). A general and practicable synthesis of polycyclic heteroaromatic compounds. Part 2. Reaction of quinone-methides of pyridones, pyrimidines, coumarin, and benzene with aromatic amines in a novel synthesis of polycyclic heteroaromatic compounds, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)* **2:522-528**
56. Werner, W. (1966).  $\alpha$ -Aminoalkylierungen mit Bis(2-chloroethyl)-amin III. Aminomethylierungen NH-acider Heterocyclen, *Arch. Pharm.*, **299(6):513-517**
57. Margot, T., Fakan, F., Muchnova, Z. (1969). Mitotic index and DNA synthesis in HeLa cells under the influence of a cytostatic agent, 5-[[bis(2-chloroethyl)amino]methyl]uracil-HCl. *Neoplasma*, **16(3):249-255**
58. Fabrissin, S. De, Nardo, M., Nisi, C., Dolfini, E., Franchi, G., Morasca, L. (1976). Synthesis and anticancer activity of 5-diethylaminomethyl derivatives and nitrogen mustards of uracil and 2-thiouracils. *Journal of Medicinal Chemistry*, **19(5):639-642**

59. Bednarek, E., Dobrowolska, J. Cz., Dobrosz-Teperek, K., Sitkowska, J., et al. (1999). Theoretical and experimental  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , and  $^{17}\text{O}$  NMR spectra of 5-nitro, 5-amino, and 5-carboxy uracils, *Journal of Molecular Structure*, **482-483**: 333-337
60. Roth, B., Strelitz, J. Z., Rauckman, B. S. (1980). 2,4-Diamino-5-benzylpyrimidines and analogs as antibacterial agents. 2. C-Alkylation of pyrimidines with Mannich bases and application to the synthesis of trimethoprim and analogs, *Journal of Medicinal Chemistry*, **23(4)**:379-384
61. Bombardieri, C. C., Taurins, A. (1955). The Mannich Condensation of Compounds Containing Acidic Imino Groups, *Can. J. of Chem.*, **33**:923-928
62. Carbon, A. (1960). Synthesis and Reactions of 5-Bromomethyl- and 5-Chloromethyluracil, *J. of Org. Chem.* **25**:1731-1734

## ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Antakya'da doğdum. 1998 yılında başladığım Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden 2003 Eylül ayında mezun oldum. 2004 yılının Şubat ayında Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans programına kayıtlandım. 2004 yılı Mayıs ayında Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi kadrosuna atandım. Halen Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.