



**5-METİL-2-İZOPROPİLFENOL'ÜN MANNİCH  
BAZLARININ SENTEZİ VE SİTOKSİK  
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**Asiye Tuğçe YAŞA**

**Farmasötik Kimya Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Halise İnci GÜL**

**Yüksek Lisans Tezi-2016**

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**5-METİL-2-İZOPROPİLFENOL'ÜN MANNİCH  
BAZLARININ SENTEZİ SİTOTOKSİK  
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**Asiye Tuğçe YAŞA**

**Farmasötik Kimya Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez danışmanı  
Prof. Dr. Halise İnci GÜL**

**ERZURUM  
2016**

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

5-METİL-2-İZOPROPİLFENOL'ÜN MANNİCH  
BAZLARININ SENTEZİ VE SİTOTOKSİK  
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Asiye Tuğçe YAŞA

Tez Savunma Tarihi: 24/03/2016

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Halise İnci GÜL

Jüri Üyesi: Prof. Dr. Halise İnci GÜL

Jüri Üyesi: Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

Jüri Üyesi: Yrd. Doç. Dr. Sinan BİLGİNER

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM  
Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi  
ERZURUM-2016

# İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>III</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>VI</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>VIII</b>
<b>TABLOLAR DİZİNİ</b> .....	<b>IX</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Kanser .....	4
2.1.1. Kemoterapide Kullanılan İlaçların Sınıflandırılması.....	4
2.1.1.1. Alkilleyici Ajanlar .....	4
2.2. Mannich Bazları.....	8
2.2.1.Mannich Bazlarının Sınıflandırılması.....	9
2.2.2. Mannich Bazlarının Rapor Edilen Biyoaktiviteleri .....	11
2.3. İlaç Tasarımında Fizikokimyasal Parametrelerin Önemi .....	11
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>13</b>
3.1.1. Sentez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar .....	13
3.1.2. Yöntemler .....	13
3.2. 5-Metil-2-izopropilfenol'ün Mannich Bazlarının Genel Sentez Yöntemi.....	13
3.2.1. 5-Metil-4-[(dimetilamino)metil]-2-(propan-2-il)fenol, Bileşik 1 .....	15
3.2.2. 3-Metil-2-[(dipropilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol, Bileşik 2 .....	15
3.2.3. 3-Metil-2-[(benzilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol, Bileşik 3 .....	16
3.2.4. 3-Metil-2-[(dibenzilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol, Bileşik 4.....	16
3.3. Biyoaktivite Çalışmaları .....	17
3.3.1. Gereç ve Yöntem .....	17
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>18</b>
4.1. Deneysel ve Spektral Bulgular .....	18
4.2. Biyoaktivite Bulguları .....	20
<b>5.TARTIŞMA</b> .....	<b>23</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>27</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>28</b>

<b>EKLER</b> .....	<b>32</b>
<b>EK-1. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>32</b>
<b>EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU</b> .....	<b>33</b>
<b>EK-3. SPEKTRUMLAR</b> .....	<b>34</b>



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalıőmayı çok değerli bilgi ve yardımları ile yöneten, tezimin her aőamasında yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Halise İnci GÜL'e en derin saygı ve őükranlarımı sunarım.

Deneysel çalışmalarda tecrübelerinden yararlandığım Arő. Gör. Cem YAMALI'ya sitotoksite testlerimi yapan Prof. Sakagami'ye, çalıőmalarım sırasında ilgi ve desteğini esirgemeyen aileme ve emeği geçen herkese sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

**Asiye Tuğçe YAŞA**

## ÖZET

### **5-Metil-2-izopropilfenol'ün Mannich Bazlarının Sentezi ve Sitotoksik Aktivitelerinin İncelenmesi**

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, 5-metil-2-izopropilfenol (timol)'ün çeşitli Mannich bazlarının sentezi ve sitotoksik aktivitelerinin bazı kanserli hücre hatları ve normal hücrelere karşı incelenmesidir.

**Materyal ve Metot:** 5-Metil-2-izopropilfenol bileşiğinin Mannich bazı türevleri konvansiyonel yöntem ile sentezlenmiştir. Timol, formalin solusyonu ve amin karışımı 1:1:1 mol oranında metanol içerisinde ısıtılmıştır. Elde edilen viskoz madde kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Bileşiklerin kimyasal yapıları spektral analiz yöntemleri ile aydınlatılmıştır. Bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri kanserli ve normal hücre hatlarına karşı test edilmiştir. Kullanılan hücre hatları; kanser hücre hatları [Ca9-22 (diş eti), HSC-2 (ağız), HSC-3 (dil), HSC-4 (dil)] ve normal hücreler [HGF (diş eti fibroblast), HPC (pulpus hücreleri), HPLF (periodontal ligament fibroblastları)]'dır.

**Bulgular:** Bileşiklerin kimyasal yapıları  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR ve HRMS yardımı ile aydınlatılmıştır. Bileşiklere ait NMR verileri Tablo 4.1.' de, sitotoksik aktivite sonuçları Tablo 4.2. ve Tablo 4.3.' de sunulmuştur.

**Sonuç:** Sentezlenen bileşikler (1-4) %6-15 verimle başarıyla sentezlenmiştir. 2 ve 3 nolu bileşikler yenidir. Bileşiklerin sitotoksisite ve tümör selektivite ilk kez bu çalışma ile rapor edilmiştir. Dipropilamino grubu taşıyan 2 nolu bileşik kanserli hücre hatlarına düşük konsantrasyonda seçicilik göstermiştir. Bileşik 2 kanserli hücre hatlarının büyümesini 7.8-15.6  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyon aralığında azaltırken, normal hücre hatlarının büyümesini 16-31 kat daha fazla konsantrasyonda (250  $\mu\text{g/ml}$ ) azaltmıştır. Bu durum bileşik 2'nin sitotoksik bir bileşik olarak ileri araştırmalarda kullanılabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antikanser, Mannich bazı, sitotoksisite, timol

## ABSTRACT

### Synthesis of Mannich Base Derivatives of 5-Methyl-2-Isopropylphenol and Investigation of Their Cytotoxicity Activities

**Aim:** The aim of this thesis is to synthesize of Mannich bases of 5-methyl-2-isopropylphenol and to investigate their cytotoxicity against on some cancer cell lines and normal cells.

**Material and Method:** A series of Mannich base derivatives of 5-methyl-2-isopropylphenol synthesized by the conventional heating method. The mixture of thymol, formalin solution and amine was refluxed in methanol in 1:1:1 mole ratios. The obtained compounds were purified by column chromatography. The cytotoxicity of the compounds were tested against a series of cancer cell line and normal cells. The cancer cell lines used were in Ca9-22 (gum), HSC-2 (mouth), HSC-3 (tongue), HSC-4 (tongue), and normal cells were HGF (tooth ethyl fibroblast), HPC (pulpus cells) HPLF (periodontal ligament fibroblasts).

**Results:** The chemical structures of the compounds were confirmed by  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and HRMS. The results of the NMRs were presented in Table 4.1 and results of the cytotoxic activities of the compounds were presented in Table 4.2 and Table 4.3.

**Conclusion:** The compounds **1-4** were successfully synthesized in the range of 6-15% yield. Compounds **2** and **3** are reported here for the first time. The cytotoxicities and tumour selectivities of the compounds (**2** and **3**) were reported here for the first time. Compound **2** which is carrying dipropylamino group showed some selectivity against human oral squamous cell lines, especially at lower concentration. The growth of all four OSCC cell lines declined at 7.8~15.6  $\mu\text{g/ml}$ , whereas the growth of all three normal cells declined at 16~32-fold higher concentration (250  $\mu\text{g/ml}$ ). This suggests that compound **2** can be considered as cytotoxicity enhancing drug candidate for further investigations

**Key Words:** Anticancer, Mannich base, cytotoxicity, thymol.



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b><sup>1</sup>H NMR</b>	: <sup>1</sup> H Nükleer Manyetik Rezonans
<b><sup>13</sup>C NMR</b>	: <sup>13</sup> C Nükleer Manyetik Rezonans
<b>brs</b>	: Broad Singlet
<b>Ca9-22</b>	: Diş Eti
<b>CC<sub>50</sub></b>	: Hücrelerin %50' Sini Öldüren Konsantrasyon
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	: Dötorokloroform
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	: Kloroform
<b>DMEM</b>	: Dulbecco' S Modified Eagle' S Medium
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>FBS</b>	: Fetal Bovin Serum
<b>HGF</b>	: Diş Eti Fibroblast
<b>HPC</b>	: Pulpus Hücreleri
<b>HPLF</b>	: Periodontal Ligament Fibroblastları
<b>HRMS</b>	: High Resolution Mass Spectrometry
<b>HSC-2</b>	: Ağız Normal Hücreleri
<b>HSC-3</b>	: Dil Normal Hücreleri
<b>HSC-4</b>	: Dil Normal Hücreleri
<b>Hz</b>	: Hertz
<b>İTK</b>	: İnce Tabaka Kromatografisi
<b>J</b>	: Etkileşme Sabiti
<b>MS</b>	: Kütle Spektroskopisi
<b>Nm</b>	: Nanometre
<b>P</b>	: Partisyon Katsayısı

<b>ppm</b>	: Milyonda Bir Kısım
<b>QSAR</b>	: Kantitatif Yapı Aktivite İlişkileri
<b>R<sub>2</sub>NH</b>	: Sekonder Alifatik Aminler
<b>SiO<sub>2</sub></b>	: Silikajel
<b>TS</b>	: Tümör selektivitesi
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>°C</b>	: Santigrat Derece
<b>π</b>	: Hansch Hidrofobik Süstitüent Sabiti
<b>μM</b>	: Mikromolar

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1 Alkilleyici İlaçlar .....	5
Şekil 2.2 Mekloreタミンin Etki Mekanizması.....	7
Şekil 2.3. Karbon Mannich bazı türevleri.....	9
Şekil 2.4. N-Mannich bazları.....	9
Şekil 2.5. S-Mannich bazları .....	10
Şekil 2.6. P-Mannich bazlar .....	10
Şekil 2.7. Double (çift) Mannich bazları .....	10
Şekil 2.8. Bis ve Tris Mannich bazları .....	11
Şekil 3.1. 5-Metil-2-izopropilfenol'ün Mannich bazlarının genel sentez şeması.....	14
Şekil 3.2. 5-Metil-4-[(dimetilamino)metil]-2-(propan-2-il)fenol, bileşik 1 .....	15
Şekil 3.3. 3-Metil-2-[(dipropilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol, bileşik 2 .....	15
Şekil 3.4. 3-Metil-2-[(benzilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol, bileşik 3.....	16
Şekil 3.5. 3-Metil-2-[(dibenzilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol, bileşik 4 .....	16

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b><u>Tablo No</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 4.1.</b> Sentezlenen bileşiklerin $^1\text{H}$ NMR ve $^{13}\text{C}$ NMR verileri .....	19
<b>Tablo 4.2.</b> Bileşik 1-4'ün sitotoksik aktivite sonuçları .....	21
<b>Tablo 4.3.</b> Bileşik 2'nin kanserli ve sağlıklı hücelere karşı sitotoksikite sonuçları .....	22



# 1. GİRİŞ

Kemoterapi, kanserli hücre ve/veya dokuların tedavisinde kullanılan, genellikle çok sayıda ilacın kombine edilerek uygulandığı en yaygın tedavi yöntemlerinden biridir. Kemoterapide kullanılan ilaçların hastada ciddi yan etkiler oluşturması kanser hastalığının tedavisinde karşılaşılan en önemli sorundur. Çünkü tedavide kullanılan ilaçlar sistemik etki göstererek tüm kanser hücrelerine sitotoksik etki ederken bazı normal hücreleri de yok eder. Bu sebeplerden dolayı hem seçici toksisitesi olan hem de tedavi süreci ve sonrası ortaya çıkan yan etkileri azaltan, hastanın yaşam standardını iyileştiren yeni bileşiklere ihtiyaç vardır.<sup>1,2</sup>

Alkilasyon ajanları kanser tedavisinde kullanılan önemli bir gruptur. Ticari olarak kullanımı olan en önemli alkilasyon ajanlarından biri, bis(kloretilamin) grubu taşıyan Melfalan molekülüdür. Alkilasyon ajanları hücre döngüsüne spesifik ilaçlar olmadığı için normal hücrelerdeki nükleik asit ve protein artıklarını da alkilleyerek istenmeyen yan etkilere yol açmaktadır. Bu nedenle yeni alkilasyon ajanlarının geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.<sup>1,2</sup>

Medisinal kimyada ilaç/aday ilaç moleküllerinin farmakodinamik ve farmakokinetik özelliklerini iyileştirmek ve/veya aktif ilaç moleküllerinin tasarım ve sentezinde kullanılan tepkimelerden birisi Mannich tepkimesi olup bu tepkime ile moleküle alkilamin grubu takılmaktadır.<sup>3</sup>

Mannich bazları selektif toksisite açısından çok önemli bileşiklerdir. Şöyle ki, bu bileşikler nükleik asitlerde bulunan amin ve hidroksil gruplarıyla çok az veya hiç etkileşmezken, tiyol gruplarının alkilasyonunda çok başarılı bulunmuşlardır. Bu nedenle Mannich bazlarının genotoksik özelliklerden yoksun olduğu düşünülür.<sup>4</sup>

Mannich bazlarının antimikrobiyal<sup>5</sup>, antifungal<sup>6</sup>, antiviral<sup>7</sup>, antikonvulzan<sup>8</sup>, antiinflamatuvar<sup>9</sup>, analjezik<sup>10</sup>, antioksidan<sup>11</sup>, asetilkolinesteraz inhibisyonu<sup>12</sup>, karbonik anhidraz inhibisyonu<sup>13</sup> gibi geniş bir biyoaktivite spektrumu vardır. Bu aktivitelere ilave olarak Mannich bazlarının sitotoksik<sup>3,4,14,21-23</sup> ve antikanser<sup>3,15</sup> aktiviteleri de kayıtlı olup, bölümümüz tarafından da uzun yıllardır konu ile ilgili çalışmalar yapılmış ve yapılmaya devam edilmektedir.

Bu tez kapsamında alkilleyici ajanlar olarak tasarlanan ve sitotoksik etki umulan çeşitli mono Mannich bazı bileşiklerinin sentezi gerçekleştirilerek ve bunların sitotoksisiteleri Ca9-22 (diş eti), HSC-2 (ağız), HSC-3 (dil), HSC-4 (dil) kanser hücre hatlarına ve HGF (diş eti fibroblast), HPC (pulpus hücreleri) ve HPLF (periodontal ligament fibroblastları) gibi kanser olmayan normal hücrelere karşı referans bileşik Melfalan ile karıştırılarak araştırılacaktır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin denetimden çıkıp bağımsız ve kontrolsüz olarak büyümeye başladığı bir hastalıktır. Kanserli hücrelerin aniden çoğalmasının birçok kompleks nedeni vardır ve bunlar henüz tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Bu durum, kişinin ruhsal durumu, beslenmesi, hormonal dengesi gibi iç faktörlerle ve radyasyon, çevre kirliliği gibi dış faktör kaynaklı olabilir.<sup>1,2</sup>

Kanserde önce hastalıklı hücreler büyümeye başlar, çevrelerindeki dokulara nüfuz ederek vücudun belli bir bölgesine yerleşir. Kanserin başladığı bu evreye primer kanser evresi denilir. Kanserin ikinci evresinde hastalıklı hücreler vücudun bağışıklık, ya da savunma sisteminin bir parçası olan en yakın bezlerden birine sıçrayarak vücudun diğer kısımlarına doğru yola çıkarlar (metastaz). Yerleştikleri bu ikinci bölgede tekrar büyümeye başlar ve çoğu kez çevrelerini büyük bir süratle istila ederler.<sup>1</sup>

Kanserin tedavi planı hastalığın evresine, metastaz olup olmadığına ve hastanın performans durumuna göre belirlenir. Kanser tedavisinde cerrahi tedavi, radyasyon tedavisi ve kemoterapi olmak üzere üç temel yöntem kullanılmaktadır.<sup>1,2</sup>

Kemoterapi, kanserli hücrelerin çoğalmasını önleyen ve sitotoksik etkiye sahip ve bu hücreleri öldürebilen ilaçlarla uygulanan bir tedavi biçimidir. Kemoterapi sistemik etkiye sahiptir ve tüm kanser hücrelerine etki eder. Farklı ilaçlar geliştirildikçe değişik ilaçların kombine edilerek kullanılması zamanla yaygın hale gelmiştir.<sup>1,2</sup>

### **2.1.1. Kemoterapide Kullanılan İlaçların Sınıflandırılması**

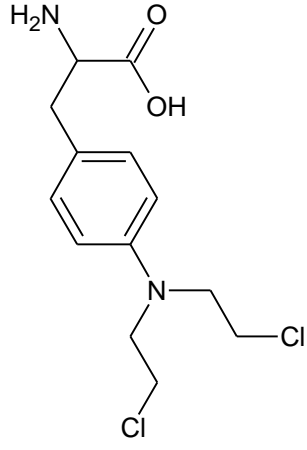
Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar kimyasal yapılarına ve genel etki mekanizmalarına göre alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, sitotoksik antibiyotikler, vinka alkaloidleri, bitkisel kaynaklı ilaçlar, hormonlar ve hormon antagonistleri ve diğer kemoterapötik ilaçlar olmak üzere sınıflandırılabilir.<sup>1,2</sup>

#### **2.1.1.1. Alkilleyici Ajanlar**

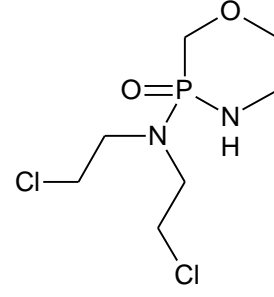
Kanser tedavisinde kullanılan en eski ilaçlardır. Bu grupta bulunan azot mustard, klinik olarak önemli antitümör aktivite gösteren ve hormonal olmayan ilk kimyasal maddedir. İnsan ve deney hayvanlarının hematopoietik ve lenfatik sistemlerinde depresyona neden olduğu görülmüştür. Daha sonra daha az toksik ve klinik olarak daha etkin azotlu bileşikler ve başka türde alkilleyici ajanlar geliştirilmiştir.<sup>1,2</sup>

Klinikte kullanılan alkilleyici ajanlar yapılarında, bis(kloroetil)amin, etilenimin veya nitrozoüre sübstitüenti taşır. Bis(kloroetil) amin içeren ilaçlar arasında mekloreタミン, melfalan ve klorambusil en çok kullanılan ilaçlardır.<sup>2,16</sup> Değişik alkilleyici ajanların kimyasal formülleri Şekil 2.1'de verilmiştir.<sup>2</sup>

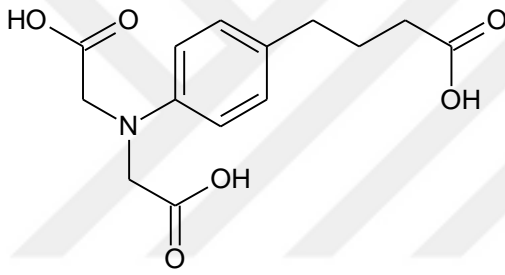




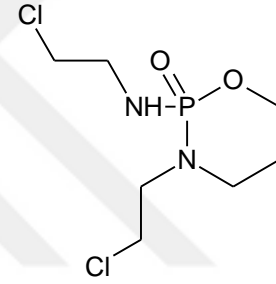
Melfalan



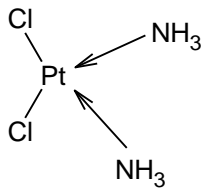
Siklofosfamid



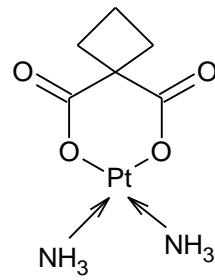
Klorambusil



İfosfamid



Sisplatin



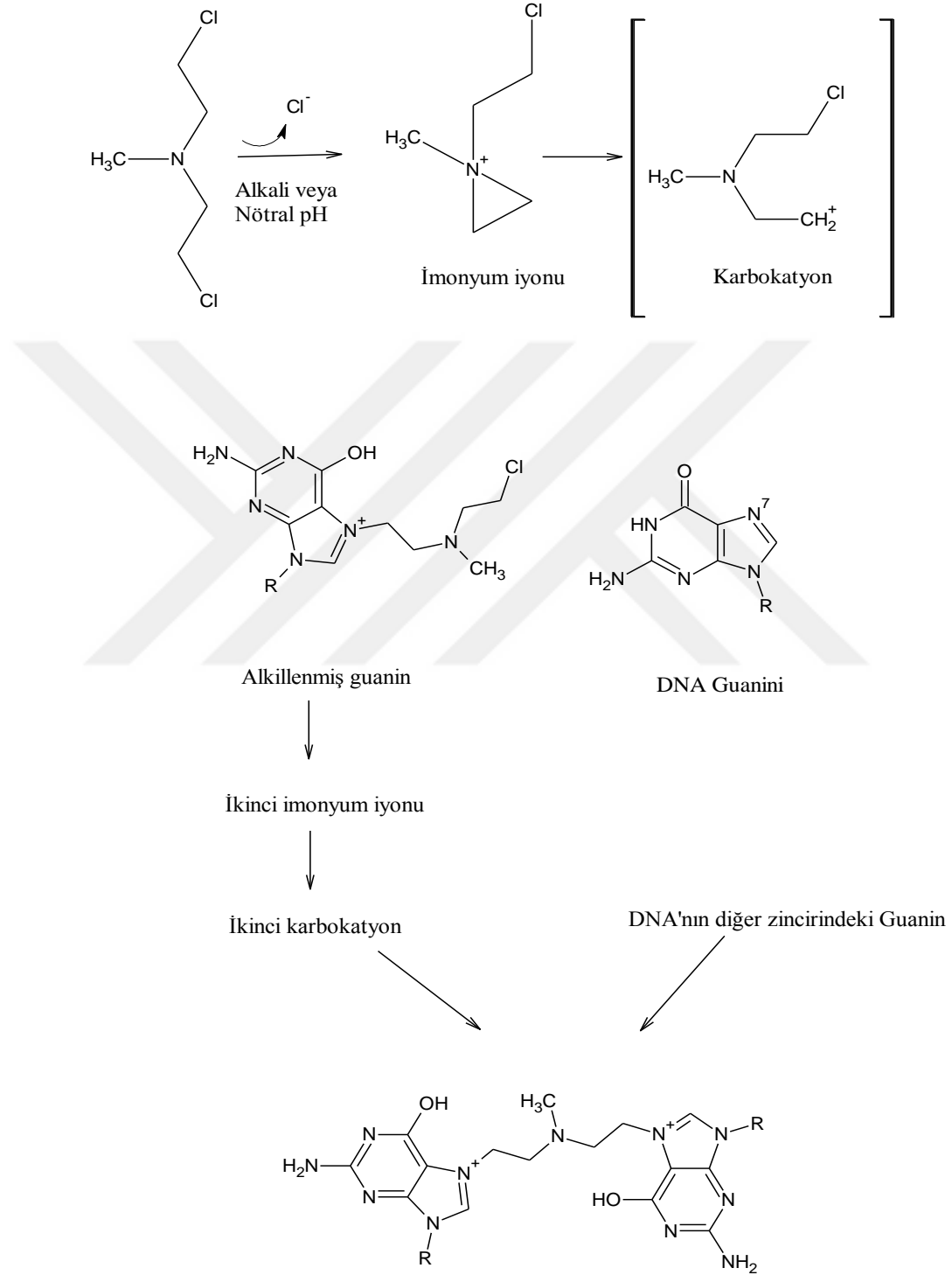
Karboplatin

Şekil 2.1 Alkilleyici İlaçlar

Alkilleyici ilaçlar, sitotoksik etkilerini moleküldeki alkil gruplarını çeşitli hücrel yapılar transfer etmek suretiyle gösterir. Çekirdek içerisindeki DNA'nın alkilasyonu hücre ölümüne yol açan majör etkileşimleri ortaya çıkartır. Önce etilenimonyum iyonunu oluşturacak şekilde intramoleküler bir siklizasyon gerçekleşir. Bu mekanizma, hücrel bir yapıya alkil grubunun transferini sağlayacak karbonyum iyonunun oluşumu ile sonuçlanır. DNA içerisinde majör alkilasyon yöreni guanin bazının 7 numaralı azotudur. Ayrıca daha az öncelikli olmak üzere adenin bazının 1 ve 3, sitozinin 3 numaralı azot ve guaninin 6 numaralı oksijen atomu da alkilenebilir. Bu etkileşimler, çapraz bağı DNA heliksinin tek bir veya her iki dizisinde gerçekleşebilir. Her iki dizide alkillemeyi gerçekleştiren ilaçlar bifonksiyonel ilaçlardır. Guaninin alkilasyonu yanlış kodlamaya veya guanin kısmının kesilip çıkartılması yoluyla depurinasyon ile sonuçlanabilir. Diğer bir etki, DNA'nın şeker-fosfat omurgasının bölünmesi vasıtasıyla DNA dizisinin kırılmasıdır. Alkilleyici ajanların sitotoksik etkisi için DNA'nın çapraz bağlanması majör öneme sahiptir ve bu ilaçlara en duyarlı hücreler replikasyonu sağlayan hücrelerdir.<sup>17,18</sup>

Alkilleyici ajanlar hücre döngüsüne spesifik ilaçlar değildir. DNA lezyonlarını onarma kapasitesinin artmış olması, hücrenin alkilleyici ajana geçirgenliğinin azalması ve glutatyon üretiminin artışı alkilleyici ajanlara rezistans kazanılmasına neden olabilir.<sup>16</sup>

Alkilleyici bir bileşik olan mekloretaminin etki mekanizması (Şekil 2.2), bu grup ilaçların etki mekanizmalarına bir örnek olması amacıyla aşağıda gösterilmiştir.<sup>19</sup>



Şekil 2.2 Mekloretaminin etki mekanizması

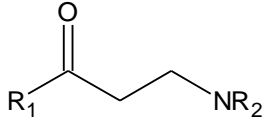
Antikanser ilaç geliştirme çalışmaları kapsamında, alkilleyici özellik gösteren farmakofor grupların hormonlar, aminoasitler, nükleik asit bazları veya şeker parçaları gibi çeşitli taşıyıcı gruplara bağlanarak molekülün etki yöresine optimum konsantrasyonda taşınması için tasarım ve sentez çalışmaları devam etmektedir. Ancak bugüne dek yöreye özgü alkilasyon tam anlamıyla başarılamamıştır.<sup>19,20</sup>

## 2.2. Mannich Bazları

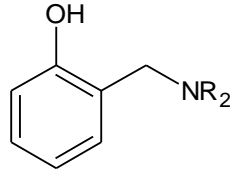
Klasik Mannich reaksiyonu, üç komponentin kondensasyonudur. En az, aktif bir hidrojen taşıyan madde, aldehit ve amin gerekir. Mannich reaksiyonu ile oluşan bileşiğe Mannich bazı denir. Mannich bazlarına aminoalkilasyon reaksiyonu ile elde edildiğinden substrat türevleri olarak bakılır. Aldehit eğer formaldehitse aminometilasyon gerçekleşir. Primer aminler, hatta amonyak (amonyum tuzu formunda) da amin bileşiği olarak kullanılabilir. Sekonder alifatik aminler ( $R_2NH$ ) en sık kullanılan aminlerdir.<sup>3</sup>

Mannich Reaksiyonunda, aktive edici fonksiyonel gruplar substratı aktive ettiği için hayati öneme sahiptir. Ketonlarda karbonil, fenollerde fenolik hidroksil, alkinlerde terminal karbon-karbon üçlü bağı, heterosikliklerde heteroatom, karboksilatta  $\alpha$ -konumunda ki elektron çekici grup süstitüe karbon atomu, alifatik karboksilik asitlerin esterleride uygun substrat taşıyanlar aktive edici gruplarıdır.<sup>3</sup>

### 2.2.1. Mannich Bazlarının Sınıflandırılması



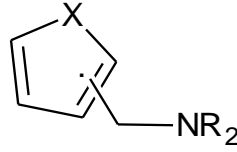
Ketonik Mannich bazları



Fenolik Mannich bazları

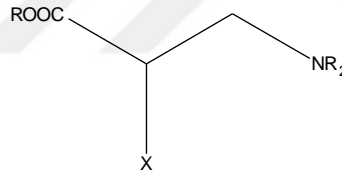


Alkin Mannich bazları



X: NH, O, S

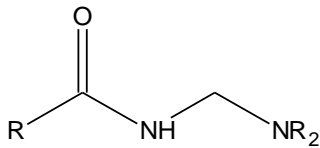
Beş üyeli heterosiklik aromatik halkaların Mannich bazları



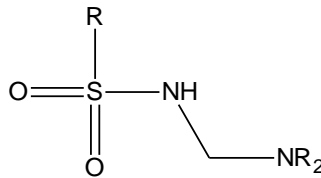
X: COR<sup>1</sup>, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>, CN, COOR (Elektron çekici grup)

Karboksilik asit türevlerinin Mannich bazları

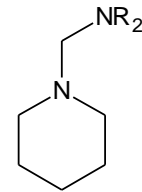
### Şekil 2.3. Karbon Mannich bazı türevleri



Amitlerin Mannich bazları

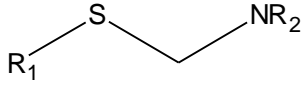


Sülfonamitlerin Mannich bazları



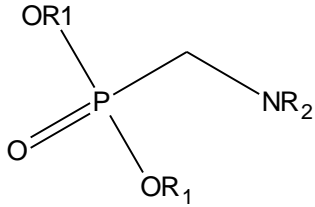
NH-Mannich bazları

### Şekil 2.4. N-Mannich bazları



Tiyollerin Mannich bazları

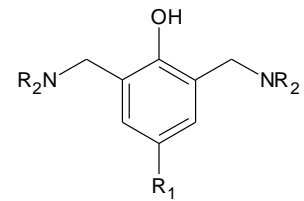
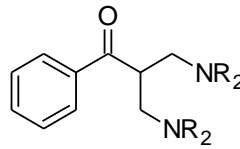
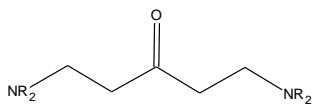
**Şekil 2.5.** S-Mannich bazları



Dialkil fosfitlerin Mannich bazları

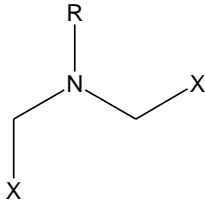
**Şekil 2.6.** P-Mannich bazları

Normal koşullarda substratın tek aminometil ile sübstitüsyonu mono-Mannich bazı oluşumu ile sonuçlanır. Uygun koşullarda substratta birden fazla aktif hidrojen atomu varsa çift (double) Mannich bazları oluşabilir. Substrat X-H'ı sekonder aminler dışında NH<sub>3</sub> gibi üç reaktif hidrojen atomu azot üzerinde olduğu ya da R-NH<sub>2</sub> tipindeki gibi iki reaktif hidrojen atomunun azot üzerinde olduğu durumlarda tris ve bis Mannich bazları oluşur.<sup>3</sup>

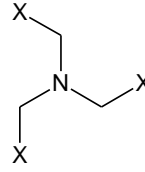


Double (çift) Mannich bazları

**Şekil 2.7.** Double (çift) Mannich bazları



Bis Mannich bazları



Tris Mannich bazları

**Şekil 2.8.** Bis ve Tris Mannich bazları

### 2.2.2. Mannich Bazlarının Rapor Edilen Biyoaktiviteleri

Mannich bazlarının antimikrobiyal<sup>5</sup>, antifungal<sup>6</sup>, antiviral<sup>7</sup>, antikonvulzan<sup>8</sup>, antiinflamatuar<sup>9</sup>, analjezik<sup>10</sup>, antioksidan<sup>11</sup>, antiülser<sup>10</sup>, asetilkolinesteraz inhibisyonu<sup>12</sup>, karbonik anhidraz inhibisyonu<sup>13</sup>, sitotoksik<sup>3,4, 14, 21-23</sup> ve antikanser<sup>3,15</sup> aktiviteleri kayıtlıdır.

### 2.3. İlaç Tasarımında Fizikokimyasal Parametrelerin Önemi

Biyolojik aktivite, ilaçların fizikokimyasal parametrelerinin bir fonksiyonudur. Bu nedenle 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 açıklar.<sup>2,24</sup> İlaç tasarlamada QSAR kapsamında muhtelif korelasyon ve yaklaşımlardan yararlanılır. Bunlar; Hammett korelasyonu, log P, Hansch analizi, Topliss yaklaşımıdır.<sup>2</sup>

Hammett korelasyonu homolog bir seride aromatik halka üzerindeki bir sübstitüentin elektronik yapısı (elektron verme ya da elektron çekme özellikleri) ile kimyasal reaksiyonlara olan yatkınlığının arasındaki kantitatif ilişkiyi açıklar.<sup>2,25</sup>

Hansch korelasyonu ilk kez 1964 yılında *in vivo* biyolojik sistemlere uygulanmıştır.<sup>2,26</sup> Biyolojik bakımdan aktif bileşiklerin uygulandığı yerden etkili oldukları yere taşınımı bileşiğin dağılım (partisyon) katsayısı ile ilgilidir. Herhangi bir

bileşğin X süstitüentinin çözünürlük üzerine etkisini araştırmak için  $\pi = \log(P_X/P_H)$  eşitliğinden yararlanılır. Bu eşitlikte  $P_H$  nonsüstitüe bileşğin,  $P_X$  süstitüe bileşğin dağılım katsayısını,  $\pi$  ise Hansch hidrofobik süstitüent değışmezini gösterir.  $\pi$  değerini pozitif bulunması incelenen X süstitüentinin molekülün yağdaki çözünürlüğünü ana bileşğin yağdaki çözünürlüğüne göre arttırdığını gösterir.<sup>2,26</sup>

Biyolojik açıdan aktif birçok bileşğin en önemli özelliklerinden biri lipofiliteleridir. Lipofilite oktanol-su çözücü sistemi kullanılarak dağılım katsayısı yoluyla ölçülebilir. Bir ilacın dağılım katsayısı, o ilacın organik çözücü-su karışımında çalkalandığında organik çözücü ile suya geçen niceliğinin oranıdır. Dağılım katsayısı bir ilacın yapı-etki ilişkisinin araştırılmasında, kemoterapötik bileşiklerin geliştirilmesinde önemlidir.<sup>2,27</sup>

Topliss yöntemi Hansch analizine benzer bir yöntemdir. Bu yaklaşım model bileşğin aktivitesini optimize etmek için kullanılan basit ve matematiksel olmayan bir yoldur. Topliss'in "Karar Ağacı" yaklaşımı aromatik halkaları ve yan zincirleri modifiye etmek için kullanılır.<sup>2,28</sup>



### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Kimyasallar ve Yöntemler

##### 3.1.1. Sentez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar

Bileşiklerin sentezinde timol (Merck, Germany), dimetilamin (Fluka, Germany), dipropilamin (Merck, Germany), benzilamin (Acros, Belgium), dibenzilamin (Merck, Germany), formalin 37% (J.T. Baker, Holland), metanol (Sigma, USA) kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Yöntemler

###### Kromatografik Analizler

Sentez çalışmaları sırasında tepkimeyi izlemek ve sentezlenen bileşiklerin saflıklarını kontrol etmek amacıyla ince tabaka kromatografisinden (İTK) yararlanıldı. İTK için 0.25 mm kalınlıktaki silikajel 60 HF254 (Merck Art 5715) hazır kromatografi plakları kullanıldı. Kromatografi işlemi oda sıcaklığında yapıldı. Sürükleme işleminden sonra açık havada kurutulan plaklar üzerindeki lekelerin belirlenmesinde 254 nm dalga boyundaki UV ışığından (Mineralight Lamp UVGL-58) faydalanıldı.

###### Spektral Analizler

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz) ve  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spektrumları Varian Mercury Plus spektrometre (Varian inc., Palo Alto, California, U.S.) cihazı ile alınmıştır. Kimyasal kaymalar ( $\delta$ ) ppm olarak verilmiştir. Bileşiklerin HRMS spektrumları Shimadzu's LCMS-TOF-ESI (Shimadzu, Kyoto, Japan) cihazı ile alınmıştır.

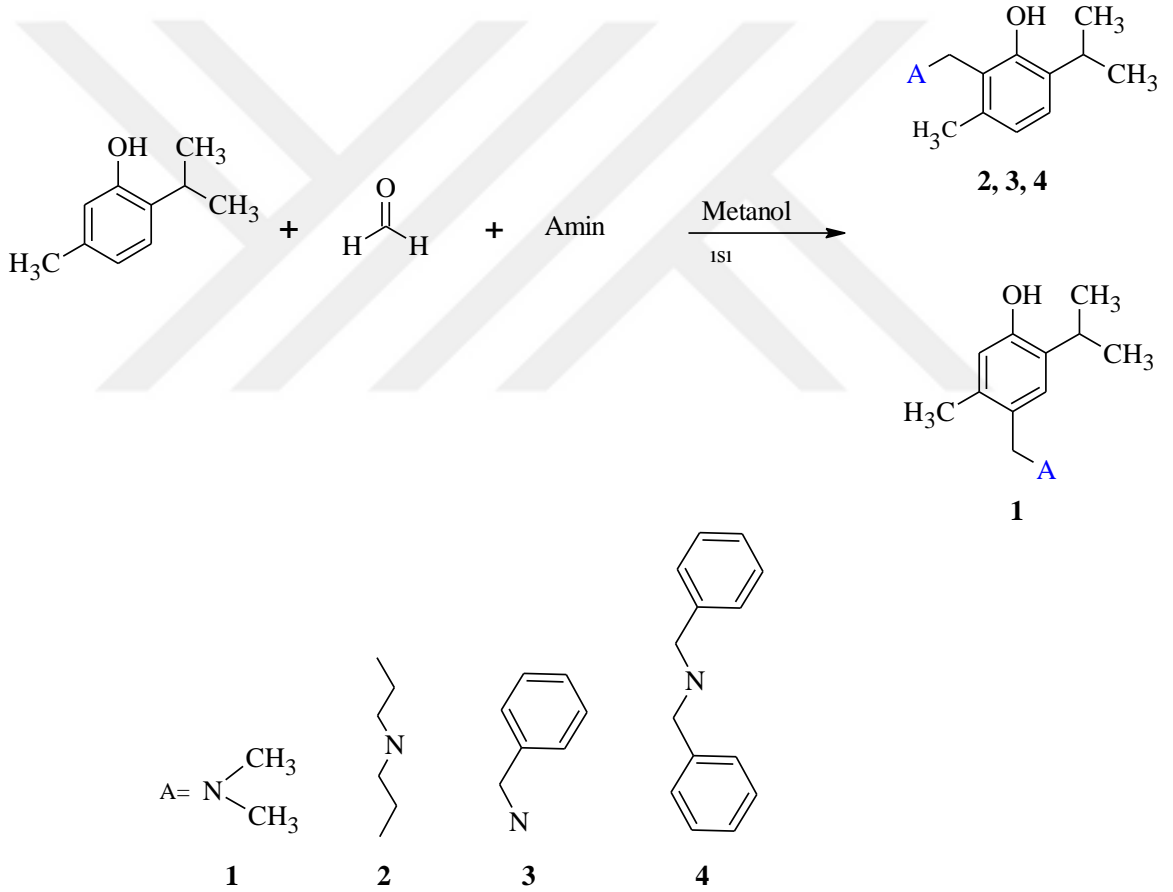
#### 3.2. 5-Metil-2-izopropilfenol (Timol) 'ün Mannich Bazlarının Genel Sentez

##### Yöntemi (1-4)

Timol (6.6 mmol), formalin (6.6 mmol, 37%) ve amin (6.6 mmol) [dimetilamin (1), dipropilamin (2), benzilamin (3), dibenzilamin (4)] metanolde (15 ml) geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı [1 (20 saat), 2 (20 saat), 3 (21 saat), 4 (16 saat)]. Tepkime

ilerleyişi İTK ile takip edildi. Reaksiyon sonunda çözücü alçak basınçta uzaklaştırıldı. Elde edilen viskoz karışım, bileşik (1-4) elde edebilmek için silika üzerinden kolon kromatografisi yöntemi ile kloroform çözücüsü kullanılarak saflaştırıldı.<sup>29</sup>

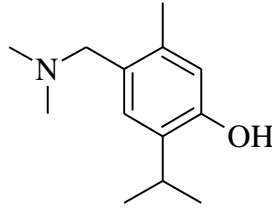
Bileşiklerin kimyasal yapıları <sup>1</sup>H NMR (bileşik 1-4), <sup>13</sup>C NMR (bileşik 2,3) ve HRMS (bileşik 2,3) spektrumları ile aydınlatılmıştır. Bileşiklere ait spektral veriler aşağıda, bileşiklere ait spektrumlar ise bulgular bölümünde sunulmuştur. Bileşiklerin genel sentez şeması Şekil 3.1’de verilmiştir.



Amin: A grubuna karşılık gelen aminlerdir. 1 (dimetilamin), 2 (dipropilamin), 3 (benzilamin), 4 (dibenzilamin).

Şekil 3.1. 5-Metil-2-izopropilfenol’ün Mannich bazlarının genel sentez şeması

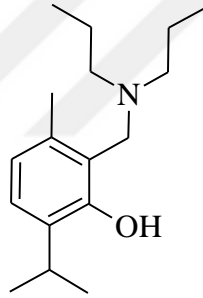
### 3.2.1. 5-Metil-4-[(dimetilamino)metil]-2-(propan-2-il)fenol, Bileşik 1<sup>30</sup>



#### Şekil 3.2. 5-Metil-4-[(dimetilamino)metil]-2-(propan-2-il)fenol

Viskoz, verim 15 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.99 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 3.33 (s, 2H), 3.20-3.15 (m, 1H), 2.31-2.20 (m, 9H), 1.23-1.20 (m, 6H).

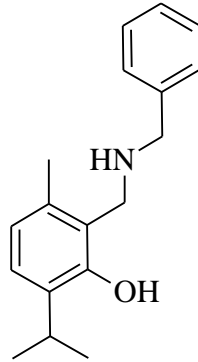
### 3.2.2. 3-Metil-2-[(dipropilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol, Bileşik 2



#### Şekil 3.3. 3-Metil-2-[(dipropilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol

Viskoz, verim 6 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.99 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.60 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.75 (s, 2H), 3.33-2.26 (m, 1H), 2.49-2.45 (m, 4H), 2.21 (s, 3H), 1.62-1.53 (m, 4H), 1.21 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H), 0.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 156.1, 133.7, 133.5, 124.5, 120.6, 119.9, 55.7, 54.4, 26.6, 22.9, 19.8, 12.1. HRMS (ESI-MS) Hesaplanan C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>NO [M+H]<sup>+</sup> 264.2322; bulunan 264.2346.

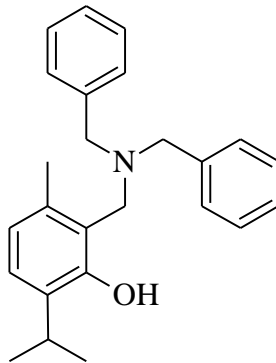
### 3.2.3. 3-Metil-2-[(benzilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol, Bileşik 3



**Şekil 3.4.** 3-Metil-2-[(benzilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol

Viskoz, verim 10 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7.39-7.28 (m, 5H), 7.01 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 6.72 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 3.91 (s, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.28-3.25 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.23 (d,  $J = 6.6$  Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 151.6, 138.6, 133.9, 133.7, 129.3, 128.7, 127.6, 123.8, 121.8, 118.4, 81.6, 56.2, 48.8, 26.5, 22.9, 18.3. HRMS (ESI-MS) Hesaplanan  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  270.1852; bulunan 270.1855.

### 3.2.4. 3-Metil-2-[(dibenzilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol, Bileşik 4



**Şekil 3.5.** 3-Metil-2-[(dibenzilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol

Viskoz, verim 6 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11.40 (brs, 1H, -OH), 7.38-7.27 (m, 10H), 7.00 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.63 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.62 (s, 2H), 3.58 (s, 1H), 3.49 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 3.35-3.33 (m, 1H), 2.24 (s, 2H), 1.24 (d,  $J = 6.6$  Hz, 6H).

### **3.3. Biyoaktivite Çalışmaları**

#### **3.3.1. Gereç ve Yöntem**

##### **Materyal**

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD); fetal bovine serum (FBS, SAFC Biosciences, St. Louis, MO, ABD); RPMI1640 medium, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) dimetil sülfoksit (DMSO, Wako Pure Chemical, Osaka, Japonya), melfalan (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, ABD) kullanılmıştır.

##### **Yöntem**

Bileşiklerin sitotoksiteleri kanserli hücre hatlarına (Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4) ve normal hücrelere karşı (HGF, HPLF, HPC) literatürde verilen modifiye yöntem ile ölçülmüştür.<sup>31</sup> Bütün hücreler, DMEM içerisinde 10% fetal bovin serum (FBS) ile inkübe edilmiştir. Dimetiksülfoksit içerisindeki (DMSO) bileşikler aşağıda belirtilen konsantrasyonlardaki medyuma ilave edildikten sonra 37°C sıcaklıkta 48 saat inkübe edildi. (Bileşik **1-4**, 0.32, 1, 3.2, 10, 31.6, 100, 316, 1000 µM ve Melfalan, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 µM). Medyumla birlikte, belirtilen konsantrasyonlarda DMSO (0.0078, 0.156, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 veya 1%) kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Canlı hücre sayısı MTT yöntemi ile belirlenmiştir. CC<sub>50</sub> değerleri doz-yanıt eğrisinden elde edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Deneysel ve Spektral Bulgular

Tez kapsamında sentezi tasarlanan bileşikler başarıyla sentezlenmiş ve saflaştırılmıştır. Bileşiklere ait  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, HRMS spektrum değerleri sırasıyla Tablo 4.1.' de sunulmuştur. Bileşiklere ait spektrumlar ve değerlendirmeleri deneysel bölümde detaylı bir biçimde verilmiştir.



**Tablo 4.1.** Sentezlenen bileşiklerin <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR verileri

<b>Bileşik Kodu</b>	<b><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ</b>
<b>1</b>	6.99 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 3.33 (s, 2H), 3.20-3.15 (m, 1H), 2.31-2.20 (m, 9H), 1.23-1.20
<b>2</b>	6.99 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 6.60 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 3.75 (s, 2H), 3.33-2.26 (m, 1H), 2.49-2.45 (m, 4H), 2.21 (s, 3H), 1.62-1.53 (m, 4H), 1.21 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 6H), 0.90 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 6H).
<b>3</b>	7.39-7.28 (m, 5H), 7.01 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 6.72 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 3.91(s, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.28-3.25 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.23 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 6H).
<b>4</b>	11.40 (brs, 1H, -OH), 7.38-7.27 (m, 10H), 7.00 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 6.63 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.62 (s, 2H), 3.58 (s, 1H), 3.49 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 3.35-3.33 (m, 1H), 2.24 (s, 2H), 1.24 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 6H).
<b>Bileşik Kodu</b>	<b><sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ</b>
<b>2</b>	156.1, 133.7, 133.5, 124.5, 120.6, 119.9, 55.7, 54.4, 26.6, 22.9, 19.8, 12.1
<b>3</b>	151.6, 138.6, 133.9, 133.7, 129.3, 128.7, 127.6, 123.8, 121.8, 118.4, 81.6, 56.2, 48.8, 26.5, 22.9, 18.3

## 4.2. Biyoaktivite Bulguları

Bu tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin **1-4** sitotoksiteleri Ca9-22 (diş eti), HSC-2 (ağız), HSC-3 (dil), HSC-4 (dil) kanser hücre hatlarına ve HGF (diş eti fibroblast), HPC (pulpus hücreleri) ve HPLF (periodontal ligament fibroblastları) gibi kanser olmayan normal hücrelere karşı referans bileşik olarak Melfalan kullanılarak test edilmiştir. Bileşiklere ait sitotoksite sonuçları Tablo 4.2' de verilmiştir.





**Tablo 4.2.** Bileşik 1-4'ün sitotoksik aktivite sonuçları

Bileşik	CC <sub>50</sub> (µM)										
	Kanser hücre hatları					Sağlıklı oral hücreler					
	Ca9-22	HSC-2	HSC-3	HSC-4	Ortalama CC <sub>50</sub>	HGF	HPLF	HPC	Ortalama CC <sub>50</sub>	TS	TS
(A)				(B)	(C)			(D)	(D/B)	(C/A)	
1	734	698	632	719	696±45	726	785	791	767±36	1,1	1
2	125	250	54	281	178±106	271	417	276	321±83	1,8	2,2
3	98	150	102	99	112±25	220	207	203	210±9	1,9	2,2
4	467	>1000	>1000	>1000	>867±267	>1000	>1000	>1000	>1000	><1.2	>2.1
Melfalan	27,8	11,2	10,9	11,1	15.3±8.4	144	168	198	170±27	11,1	5,2

Kanser hücre hattı olarak HSC-2 (ağız), HSC-3 (dil), HSC-4 (dil) hücreleri; kanser olmayan normal hücre hattı olarak HGF (diş eti fibroblast), HPC (pulpus hücreleri) ve HPLF (periodontal ligament fibroblastları) kullanılmıştır. CC<sub>50</sub> : Hücrelerin %50' sini öldüren konsantrasyon (µM).  
TS: Tümör selektivitesi.

**Tablo 4.3.** Bileşik 2'nin kanserli ve sağlıklı hücelere karşı sitotoksosite sonuçları

Canlı hücre sayısı (%)							
Konsantrasyon $\mu\text{M}$	Kanser hücre hatları				Sağlıklı oral hücreler		
	Ca9-22	HSC-2	HSC-3	HSC-4	HGF	HPLF	HPC
0	100	100	100	100	100	100	100
7,8	72	107	58	73	94	100	98
15,6	68	80	55	72	94	98	109
31,3	63	61	58	67	103	99	127
62,5	54	58	43	60	99	102	103
125	50	54	48	62	94	105	107
250	40	50	45	57	54	125	55
500	4	1	1	0	6	13	7
1000	3	3	1	0	2	5	7

## 5.TARTIŞMA

Tez kapsamında timolden türevlenen mono Mannich bazları türevi bileşikler (**1**, **2**, **3** ve **4**); timol: formalin çözeltisi: amin bileşiklerinin mol oranları sırasıyla 1:1:1 şeklinde alınarak metanol içerisinde konvansiyonel yöntemle ısıtılmak suretiyle sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşikler (**1**, **2**, **3** ve **4**) sütun kromatografisi yöntemi ile sabit faz olarak SiO<sub>2</sub>, mobil faz olarak CHCl<sub>3</sub> kullanılarak saflaştırılmıştır. Ürün verimleri %6-15 [**1**(15%) , **2**(6%), **3** (10%), **4**(6%)] olarak değişmektedir. Bileşikler oda ısısında viskoz karakterde olduğu için erime derecelerine bakılamamıştır. Bileşiklerin kimyasal yapıları <sup>1</sup>H NMR (**1**, **2**, **3** ve **4**), <sup>13</sup>C NMR (**2** ve **3**) ve HRMS (**2** ve **3**) ile aydınlatılmıştır. **2** ve **3** nolu bileşikler ilk kez bu çalışmayla rapor edilmiştir.

Bileşiklere ait spektral veriler incelendiğinde **2**, **3** ve **4** nolu bileşiklerde aminometilasyon reaksiyonunun fenol grubunun *orto* konumundan gerçekleştiği; **1** nolu bileşikte ise aminometilasyon reaksiyonunun fenol grubunun *para* konumundan gerçekleştiği görülmüştür. Fenolik Mannich reaksiyonlarında hidroksil grubu 1. sınıf yani *orto-para* yönlendirici olduğu için elektrofilleri halkanın *orto* veya *para* pozisyonlarına yönlendirdiği bilinmektedir. Sentezlerde dipropilamin (**2**), benzilamin (**3**), dibenzilamin (**4**) kullanıldığında fenol grubuna göre *orto* pozisyonundan, dimetilmin (**1**) kullanıldığında fenolun *para* pozisyonundan gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan bazlar primer amin (benzilamin) ve sekonder amin (dimetilamin, dipropilamin, dibenzilamin) olarak değiştirilmiştir. Sekonder amin olan Dimetilamin'in kullanıldığı reaksiyonda aminometilasyon *para* konumunu tercih ederken, diğer sekonder aminler olan dipropilamin ve dibenzilamin'in kullanıldığı reaksiyonda aminometilasyon fenol sübstitusyonu grubunun *orto* konumunu tercih etmiştir. Sonuç olarak kullanılan aminin

sekonder veya primer amin olmasından ziyade halkaya bağlanmada başka faktörlerin etkili olduğu anlaşılır.

Amin türevleri sterik ve serbest rotasyonel özellikleri bakımından incelenecek olursa, dimetilamin türevi azot atomu üzerinde iki küçük hacimli metil grubu taşırken; dipropilamin, benzilamin ve dibenzilamin türevleri azot atomu üzerinde geniş hacimli ve serbest rotasyona sahip gruplar taşımaktadır. Bu da süstitüentlerin hacmi ve serbest dönüşe elverişli olup olmamasının fenol grubuna göre aminometil grubunun bağlanacağı pozisyonunu etkilemiş olabileceğini düşündürür.

Bileşiklerin <sup>1</sup>H NMR verileri incelendiğinde, aminlerin *orto* konumundan halkaya bağlandığı durumlarda fenil halkasının 4 ve 5 nolu karbonlarına bağlı olan protonların iki dublet vermesi gerekir. **2**, **3** ve **4** nolu bileşiklerin spektrumları incelendiğinde bu durum doğrulanmıştır. Bileşik **2** için [6.99 ppm ( $J=7.7$  Hz) ve 6.60 ppm ( $J=7.7$  Hz)], bileşik **3** için [7.01 ppm ( $J=8.1$  Hz) ve 6.72 ppm ( $J=8.1$  Hz)] ve bileşik **4** için [7.00 ppm ( $J=7.9$  Hz) ve 6.63 ppm ( $J=7.9$  Hz)] şeklinde 4 ve 5 nolu aromatik protonlara ait sinyaller dublet şeklinde görülmüştür. Fenol grubunun *para* yönlendirici etkisinin gözlemlendiği **1** nolu bileşikte ise [6.99 ppm ve 6.37 ppm] 3 ve 6 nolu aromatik protonlara ait sinyaller beklendiği gibi singlet şeklinde görülmüştür.

Biyoaktivite çalışmalarında kanser hücre hattı olarak Ca9-22 (diş eti), HSC-2 (ağız), HSC-3 (dil), HSC-4 (dil) hücreleri kullanılırken, kanser olmayan normal hücreler olarak HGF (diş eti fibroblast), HPC (pulpus hücreleri) ve HPLF (periodontal ligament fibroblastları) kullanılmıştır. Bileşiklere ait sitotoksisite sonuçları Tablo 4.2 ve Tablo 4.3’de verilmiştir.

Bileşiklerin tümör selektivitesi (TS) normal hücrelere karşı gösterilen sitotoksisitesinin ortalama CC<sub>50</sub> değerinin (Kolon D, Tablo 4.2), bileşiklerin tümör hücrelerine karşı gösterilen sitotoksisitesinin ortalaması olan CC<sub>50</sub> değerine (Kolon B, Tablo 4.2) bölünmesiyle (D/B)

hesaplanmıştır (Tablo 4.2). Bu değer bileşiklerin tümör hücrelerine karşı seçiciliği hakkında fikir verir. TS değeri en yüksek olan bileşik **3** ve 1.9 olan bileşik çalışılan bileşikler içinde tümör hücrelerine karşı en seçici bileşiktir.

Ca9-22 insan dişeti karsinom hücresidir. HGF ise insan normal dişeti fibroblast hücresidir ve Ca9-22'ye karşılık gelen kanser olmayan yani sağlıklı hücrelerdir. Bu sebeple her bir bileşikte HGF hücrelerine karşı gözlemlenen  $CC_{50}$  değerlerinin (Kolon C, Tablo 4.2), Ca9-22 hücrelerine karşı gözlemlenen  $CC_{50}$  değerine (Kolon A, Tablo 4.2) bölünmesiyle (C/A) bulunan TS değerleri de çok anlamlı olacaktır (Tablo 4.2) Bu yolla hesaplanan tümör selektivite değerleri göz önünde bulundurulduğunda bileşik **2** ve **3** diğer türevlere kıyasla kanserli hücre hattına karşı 2.2 olan TS değeri ile daha fazla seçiciliği olan bileşikler olarak ortaya çıkmaktadır.

Bileşikler tümör selektivitesi açısından referans bileşik olan Melfalan ile kıyaslandığında bileşiklerin, Melfalan'dan daha düşük tümör selektivitesine sahip olduğu görülür. Dipropilamin grubu taşıyan **2** nolu bileşik çok düşük konsantrasyonlarda kanserli hücre hatlarına karşı diğer türevlere kıyasla daha fazla seçicilik göstermiştir, bu durum Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'den anlaşılabilir.

Bileşik **2**, kanserli hücre hatlarının büyümesini 7.8-15.6  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyon aralığında azaltırken, normal hücre hatlarının büyümesini 16-31 kat daha fazla konsantrasyonda (250  $\mu\text{g/ml}$ ) azaltmıştır (Tablo 4.3). Bu durum bileşik **2**'nin sitotoksik bir bileşik olarak ileri araştırmalarda kullanılabilceğini göstermektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Timol bileşiginden hareketle sentezlenen Mannich bazlarından **2** ve **3** nolu bileşikler ilk kez bu çalışma ile rapor edilmiştir. Fenolik Mannich bazlarının sitotoksisite çalışmaları sonucunda bileşik **2** tümör selektif bir bileşik olarak ileriki çalışmalarda kullanılabilir.



## KAYNAKLAR

1. Kayaalp O. *Akılclı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Pelikan Yayıncılık, 2012:332-362.
2. Akgün H, Balkan A, Bilgin AA, Çalış Ü ve ark. *Farmasötik Kimya*. 2.Baskı. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 2004:73-108.
3. Roman G. Mannich bases in medicinal chemistry and drug design. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 89:743-816.
4. Tugrak M, Gul HI, Sakagami H. Synthesis and cytotoxicities of 2-[4-hydroxy-(3,5-bis-aminomethyl)-benzylidene]-indan-1-ones. *Letters in Drug Design and Discovery*, 2015, 12:806.
5. Gul HI, Denizci AA, Erciyas E. Antimicrobial evaluation of some Mannich bases of acetophenones and representative quaternary derivatives. *Arzneimittelforschung*, 2002, 52:773-777.
6. Gul HI, Ojanen T, Hanninen O. Antifungal evaluation of bis Mannich bases derived from acetophenones and their corresponding piperidinols and stability studies. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, 25:1307-1310.
7. Giampieri M, Balbi A, Mazzei M, La Colla P, Ibba C, Loddo R. Antiviral activity of indole derivatives. *Antiviral Research*, 2009, 83:179-185.
8. Gul HI, Calis U, Ozturk Z, Tutar E, Calikiran L. Evaluation of anticonvulsant activities of bis(3-aryl-3-oxo-propyl) ethylamine hydrochlorides and 4-aryl-3-arylcarbonyl-1-ethyl-4-piperidinol hydrochlorides. *Arzneimittelforschung*, 2007, 57:133-136.
9. Koksall M, Yarim M, Erdal A, Bozkurt A. Synthesis and anti-inflammatory activities of novel 5-(3,4-dichlorophenyl)-3-[(4-substitutedpiperazin-1-yl)methyl]-1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thiones. *Drug Research*, 2014, 64:66-72.

10. Sivakumar KK, Rajasekaran A, Senthilkumar P, Wattamwar PP. Conventional and microwave assisted synthesis of pyrazolone Mannich bases possessing anti-inflammatory, analgesic, ulcerogenic effect and antimicrobial properties. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2014, 24:2940-2944.
11. Bhupendra M, Young SK, Rafi N, Enkhtaivan G, Doo HK. Synthesis of piperazine based *N*-Mannich bases of berberine and their antioxidant and anticancer evaluations. *Journal of Iran Chemistry Society*. 2015, Doi.10.1007/s13738-015-0762-1
12. Liu HR, Huang XQ, Lou DH, Liu XJ, Liu WK, Wang QA. Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of Mannich base derivatives flavokawain B. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2014, 24:4749-4753.
13. Buyukkidan N, Buyukkidan B, Bulbul M, Ozer S, Gonca Yalcin H. Synthesis and characterization of phenolic Mannich bases and effects of these compounds on human carbonic anhydrase isozymes I and II. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2013, 28:337-342.
14. Tugrak M, Yamali C, Sakagami H, Gul HI. Synthesis of mono Mannich bases of 2-(4-hydroxybenzylidene)-2,3-dihydroinden-1-one and evaluation of their cytotoxicities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2015, Doi: 10.3109/14756366.2015.1070263
15. Chen Y, Cass SL, Kutty SK, et al. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship studies of isoflavene based Mannich bases with potent anti-cancer activity. *Bioorganic and Medicinal Chem Letters*, 2015, 25:5377-5383.
16. Katzung BG. *Basic and clinical pharmacology*. USA: Mc-Graw-Hill. 2007, 878-879.
17. Chichester GJ. *The Biology of Cancer*. John Wiley and Sons, West Sussex, 2<sup>nd</sup> edition, 2007.
18. Weber GF. *Molecular mechanisms of cancer*. Dordrecht, Springer, 2007.



19. Pratt WB, Ruddon RW. *The anticancer drugs*. New York, Oxford University Press, 1979.
20. Roche FR, Lemke TL, Williams DA, Zito SW. *Cancer and chemotherapy*. 6th edition, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2007.
21. Dimmock JR, Chamankhah M, Das U, et al. Cytotoxic and topographical properties of 6-arylidene-2-dimethylaminomethylcyclohexanone hydrochlorides and related compounds. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2004, 19:1-10.
22. Dimmock JR, Jha A, Zello GA, et al. 3,5-Bis(phenylmethylene)-1-(N-arylmaleamoyl)-4-piperidones: a novel group of cytotoxic agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2003,18:325-332.
23. Yerdelen KO, Gul HI, Sakagami H, Umemura N. Synthesis and biological evaluation of 1,5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one and its aminomethyl derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2015, 30:383-388.
24. Hammett LP. The effect of structure upon the reactions of organic compounds: benzene derivatives. *Journal of American Chemistry Society*,1937,59.
25. Lewis ES. *Techniques of chemistry*. New York, John Wiley and Sons Inc, 1986.
26. Fujita T, Iwasa J, Hansch CA. New substituent constant  $\pi$  derived from partition coefficients. *Journal of American Chemistry Society*,1964, 86:5175-5180.
27. Burger A. Drug design and development. A realistic appraisal. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1978, 21:1-4.
28. Lee KH, Furukawa H, Huang ES. Antitumor agents. 3. Synthesis and cytotoxic activity of helenalin amine adducts and related derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1972, 15: 609-611.

29. Shen AY, Huang MH, Liao LF, and Wang TS. Thymol analogues with antioxidant and L-type calcium current inhibitory activity. *Drug Development Research*. 2005, 64:195-202.
30. Zhibin C, Kainian J, Yongping HMC. Mannich reaction of thymol and antibacterial activity of it's Mannich bases. *Huaxue Yanjiu Yu Yingyong Bianjibu*, 2008, 20:1626-1629.
31. Motohashi NWH, Kurihara T, Fukushima H, Yamada T, Kawase M, Sohara Y, Tani S, Shirataki Y, Sakagam H, Satoh K, Nakashima H, Molnar A, Spengler G, Gyemant N, Ugocsai K, Molnar J. Biological activity of barbados cherry (acerola fruits, fruit of malpighia emarginata dc.) extracts and fractions. *Anticancer Research*. 2004, 24:3569-3570.

## EKLER

### EK-1. ÖZGEÇMİŞ

<b>Kişisel Bilgiler</b>
<b>Adı Soyadı :</b> Asiye Tuğçe YAŞA <b>Doğum tarihi :</b> 03.11.1989 <b>Doğum yeri :</b> Erzurum <b>Medeni hali :</b> Bekar <b>Uyruğu :</b> T.C <b>Adres :</b> Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM <b>Tel :</b> 0537 301 37 92 <b>E-mail :</b> tgc_yasa@hotmail.com
<b>Eğitim</b>
<b>Lise :</b> Nevzat Karabağ Anadolu Öğretmen Lisesi (2007)
<b>Lisans :</b> Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2008-2013)
<b>Yüksek lisans :</b> Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
<b>Yabancı Dil Bilgisi</b>
<b>İngilizce :</b> Orta derece
<b>Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar</b>
18. Bölge Trabzon Eczacı Odası
<b>İlgi Alanları ve Hobiler</b>
Yüzme

## EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı  
Etik Alt Kurulu



Sayı : 93722986.12/385  
Konu: Etik Alt Kurul Kararı

30/04/2015

Sayın Prof. Dr. Halise İnci GÜL

İlgi: 27.04.2015 tarih ve 414 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Etik Alt Kurulunun 04.05.2015 tarihinde almış olduğu 04' nolu kararı ile "5-Metil-2-izopropilfenol'ün Mannich Bazlarının sentezi ve sitotoksik aktivitelerinin incelenmesi" başlıklı Yüksek Lisans öğrenciniz Asiye Tuğçe YAŞA ile beraber yürüteceğiniz çalışmanızın etik kurulunuz tarafından kabulüne karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Zühal GÜVENALP  
Etik Alt Kurul Başkanı

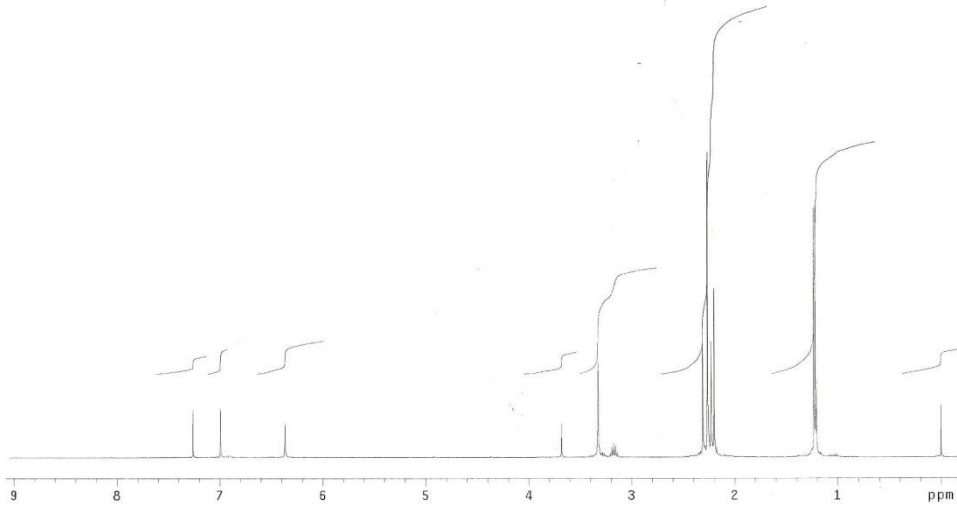
TOPLANTI TARİHİ: 04.05.2015  
TOPLANTI SAYISI: 4

**Karar -04-** Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. H. İnci GÜL'ün yürütücülüğünde Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında yürütülecek olan "5-Metil-2-izopropilfenol'ün Mannich Bazlarının sentezi ve sitotoksik aktivitelerinin incelenmesi" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 27.04.2015 tarih ve 414 sayılı yazısı ile ekleri görüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğunun mevcut oybirliği ile kabulüne karar verildi.

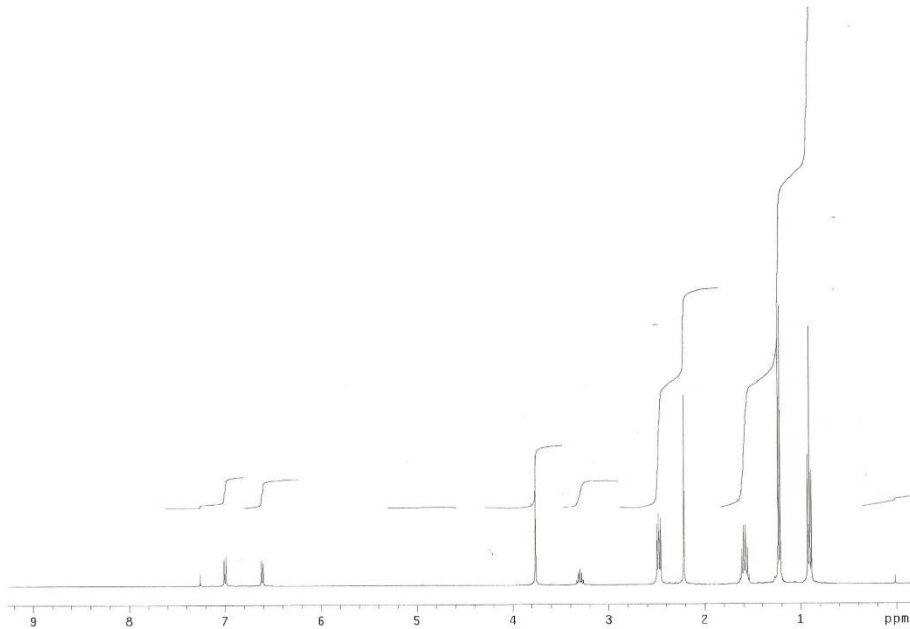
### EK-3. SPEKTRUMLAR

#### 5-Metil-4-[(dimetilamino)metil]-2-(propan-2-il)fenol, Bileşik 1

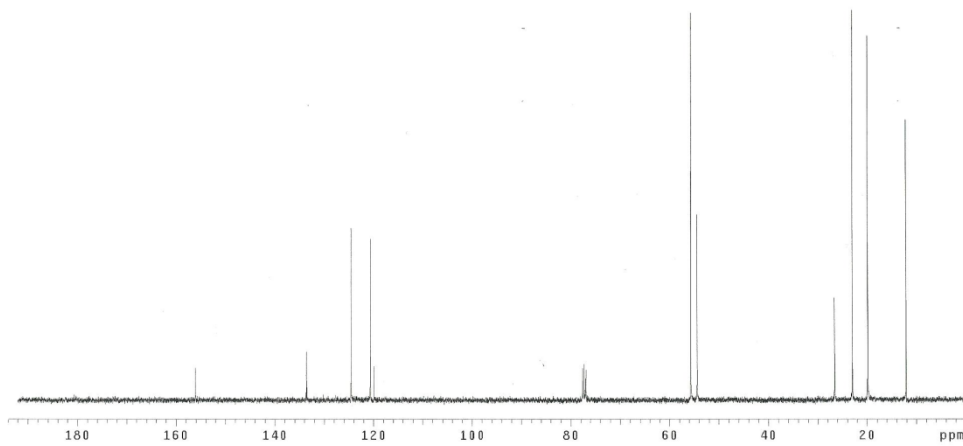


Bileşik 1-<sup>1</sup>H NMR spektrumu

#### 3-Metil-2-[(dipropilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol, Bileşik 2

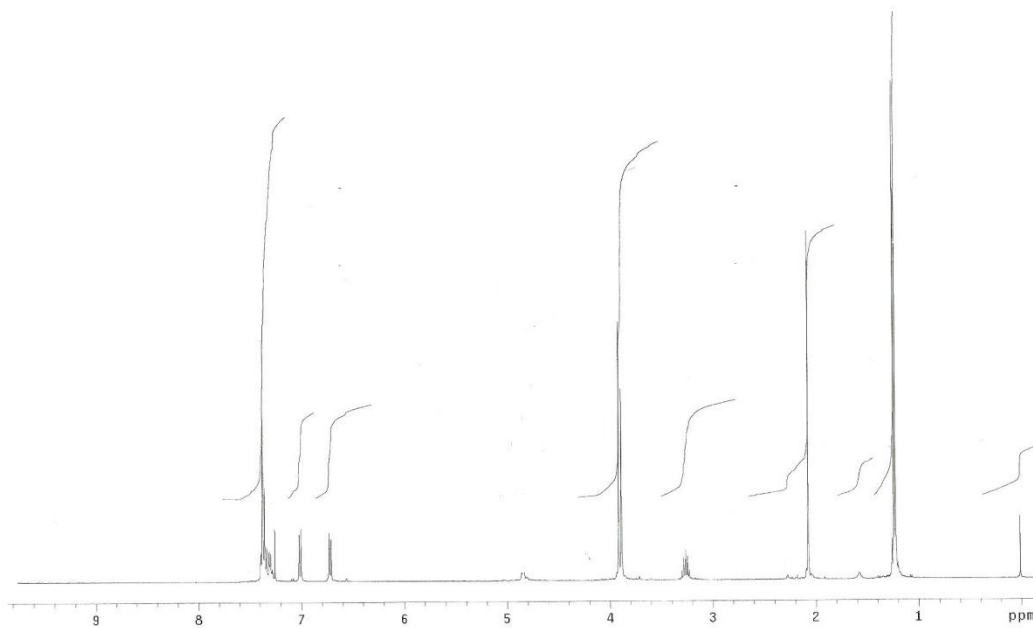


Bileşik 2-<sup>1</sup>H NMR spektrumu

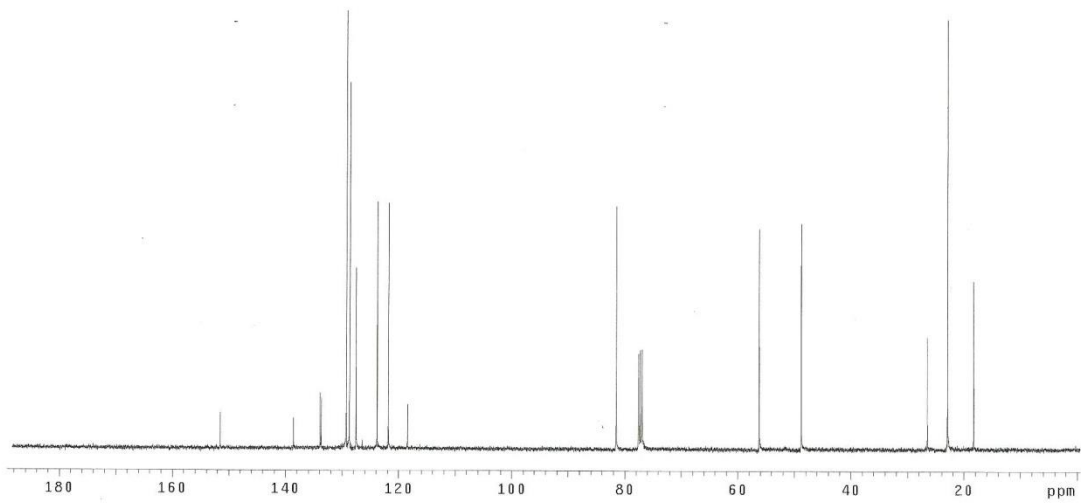


**Bileşik 2- $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu**

**3-Metil-2-[(benzilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol, Bileşik 3**

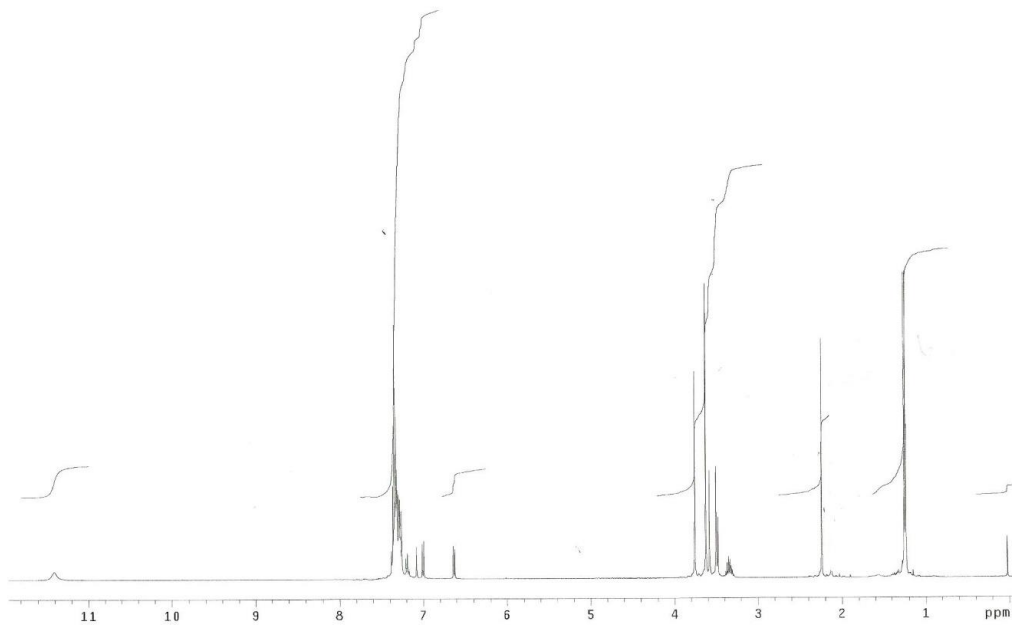


**Bileşik 3- $^1\text{H}$  NMR spektrumu**



**Bileşik 3- $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu**

**3-Metil-2-[(dibenzilamino)metil]-6-(propan-2-il)fenol, Bileşik 4**



**Bileşik 4- $^1\text{H}$  NMR spektrumu**