



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETODOLAK ÜZERİNDEN HİDRAZİT-HİDRAZONLARIN
SENTEZİ VE BİYOLOJİK ETKİLERİ**

HANDE CEVHER KOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ş. GÜNİZ KÜÇÜKGÜZEL

2021-İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ETODOLAK ÜZERİNDEN HİDRAZİT-HİDRAZONLARIN
SENTEZİ VE BİYOLOJİK ETKİLERİ**

HANDE CEVHER KOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ş. GÜNİZ KÜÇÜKGÜZEL

2021-İSTANBUL

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Hande Cevher KOÇ

Tez çalışmam boyunca bilgi birikimi, yol göstericiliği ve tecrübesi ile zamanını ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ş. Güniz Küçükgül'e; değerli Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. İlkey Küçükgül'e ve Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'ndaki bütün hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Antikanser etki çalışmaları için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Oya Orun'a, Doç. Dr. Pınar Mega Tiber'e ve İrem Atlıhan'a; laboratuvar çalışmalarım sırasındaki tüm yardımları için Kaan Birgül'e teşekkür ederim.

Son olarak da hayatım boyunca bana her konuda destek olan ve bugünlere gelmemi sağlayan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR VE SİMGELER	V
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	ix
RESİM LİSTESİ	x
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Etodolak Hakkında Genel Bilgiler	5
4.1.1. Fiziksel, kimyasal ve spektroskopik özellikleri.....	5
4.1.2. Sentezi ve metabolizması	8
4.1.3. Farmakolojik özellikleri	11
4.2. Kanser Hakkında Genel Bilgiler	12
4.2.1. Siklooksijenaz enzimi ve kanser ilişkisi.....	14
4.2.2. Etodolak etkin maddesinin antikanser etkinlikteki yeri	15
4.2.3. Hidrazit-hidrazonların antikanser etkinlikteki yeri.....	16
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	27
5.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	27
5.1.1. Kimyasal maddeler	27
5.1.2. Elektronik cihazlar.....	27
5.2. Sentez Çalışmaları	27
5.2.1. Metil (1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetat [1]	27
5.2.2. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetohidrazit [2] .	28
5.2.3. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit [(sübstitüefenil)metilen] hidrazidi [3a-1]	28
5.3. Kromatografik Çalışmalar	29
5.4. Biyolojik Çalışmalar.....	30
5.4.1. Antikanser etki çalışmaları	30
5.4.2. Apoptoz etki çalışmaları	30
5.4.2.1. Mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi.....	30

5.4.2.2. Annexin V/PI apoptoz tayini	31
6. BULGULAR	33
6.1. Fiziksel, Kimyasal ve Spektroskopik Bilgiler	33
6.1.1. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,4-diklorofenil)metilen] hidrazidi [3a]	33
6.1.2. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,6-diklorofenil)metilen] hidrazidi [3b]	35
6.1.3. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(3,4-diklorofenil)metilen] hidrazidi [3c]	38
6.1.4. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(4-bromofenil)metilen] hidrazidi [3d]	40
6.1.5. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2-kloro-3-metoksifenil)metilen] hidrazidi [3e]	43
6.1.6. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(4-metoksi-3-nitrofenil)metilen] hidrazidi [3f]	45
6.1.7. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(5-bromo-2-metoksifenil)metilen] hidrazidi [3g]	48
6.1.8. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(3-hidroksi-4-metoksifenil)metilen] hidrazidi [3h]	50
6.1.9. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,5-dimetoksifenil)metilen] hidrazidi [3i]	53
6.1.10. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,6-dimetoksifenil)metilen] hidrazidi [3j]	55
6.1.11. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(3,4-dimetoksifenil)metilen] hidrazidi [3k]	58
6.1.12. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,4,6-trimetilfenil)metilen] hidrazidi [3l]	60
6.2. Biyolojik Bulgular	63
6.2.1. Antikanser etki bulguları	63
6.2.2. Apoptoz etki bulguları	65
6.2.2.1. Mitokondriyal membran potansiyeli bulguları	65
6.2.2.2. Annexin V/PI apoptoz bulguları	66

7. TARTIŞMA	70
7.1. Sentez ve Yapı Aydınlatılması	70
7.1.1. Metil (1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetat [1]	72
7.1.2. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetohidrazit [2]	73
7.1.3. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit [(süstitüefenil)metilen] hidrazitleri [3a-l]	74
7.2. FT-IR Bulguları	78
7.3. ¹ H-NMR Bulguları	82
7.4. Biyolojik Etkiler	93
7.4.1. Antikanser etkiler	93
7.4.2. Apoptoz etkiler	96
8. SONUÇ	98
9. KAYNAKLAR	99
10. ÖZGEÇMİŞ	117

KISALTMALAR ve SİMGELER

Ar	:	Aromatik
ark.	:	Arkadaşları
$\text{BF}_3\text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	:	Bor triflorür dietil eter
CDCl_3	:	Döterokloroform
CD_3OD	:	Döterometanol
COX	:	Siklooksijenaz
d.	:	Dublet
DCM	:	Diklorometan
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
DMSO-d_6	:	Döterodimetilsülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
e.b.	:	eğilme bandı
E.n.	:	Erime noktası
FT-IR	:	Fourier Transform Infrared
g	:	Gram
g.b.	:	Gerilme bandı
GI_{50}	:	% 50 büyüme inhibisyonu
HCl	:	Hidroklorik asit
$^1\text{H-NMR}$	:	Proton nükleer manyetik rezonans
H_2SO_4	:	Sülfürik asit
IC_{50}	:	% 50 inhibitör konsantrasyonu
İ.T.K.	:	İnce tabaka kromatografisi
J	:	Etkileşme sabiti
KOH	:	potasyum hidroksit
m	:	Multiplet
M.A.	:	Molekül ağırlığı
mg	:	Miligram
MHz	:	Megahertz
mL	:	Mililitre
m/z	:	Kütle/yük

NaNO ₂	:	Sodyum nitrit
nm	:	Nanometre
nM	:	Nanomolar
NSAİ	:	Non-steroidal antiinflamatuvar
ppm	:	parts per million (milyonda bir)
q	:	Kuartet
R _f	:	Retensiyon faktörü
RNA	:	Ribonükleik asit
rpm	:	revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
s	:	Singlet
SnCl ₂	:	Kalay klorür
t	:	Triplet
TMS	:	Tetrametilsilan
UPLC-MS/MS	:	Çok yüksek basınçlı sıvı kromatografi-kütle/kütle spektrometresi
UV	:	Ultraviyole ışınım
v _{maks}	:	Maksimum absorbsiyon gösteren dalga sayısı
μM	:	Mikromolar
μL	:	Mikrolitre
δ	:	Kimyasal kayma

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Etodolak etkin maddesinin UV spektrumu (Passananti ve ark., 2015).....	6
Şekil 2. Etodolak etkin maddesinin FT-IR spektrumu (Shabaraya ve ark., 2019).....	6
Şekil 3. UPLC-MS/MS spektrumu (Yaman ve ark., 2018)	8
Şekil 4. Etodolak etkin maddesinin metabolitleri	11
Şekil 5. Hidrazit-hidrazon yapısı ve azometin protonu.....	16
Şekil 6. 3a bileşiğinin FT-IR spektrumu.....	34
Şekil 7. 3a bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	35
Şekil 8. 3b bileşiğinin FT-IR spektrumu	36
Şekil 9. 3b bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	37
Şekil 10. 3c bileşiğinin FT-IR spektrumu	39
Şekil 11. 3c bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	40
Şekil 12. 3d bileşiğinin FT-IR spektrumu	41
Şekil 13. 3d bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	42
Şekil 14. 3e bileşiğinin FT-IR spektrumu	44
Şekil 15. 3e bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	45
Şekil 16. 3f bileşiğinin FT-IR spektrumu	46
Şekil 17. 3f bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	47
Şekil 18. 3g bileşiğinin FT-IR spektrumu.....	49
Şekil 19. 3g bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	50
Şekil 20. 3h bileşiğinin FT-IR spektrumu	51
Şekil 21. 3h bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	52
Şekil 22. 3i bileşiğinin FT-IR spektrumu.....	54
Şekil 23. 3i bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	55
Şekil 24. 3j bileşiğinin FT-IR spektrumu	56
Şekil 25. 3j bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	57
Şekil 26. 3k bileşiğinin FT-IR spektrumu	59
Şekil 27. 3k bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	60
Şekil 28. 3l bileşiğinin FT-IR spektrumu.....	61
Şekil 29. 3l bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	62
Şekil 30. Bileşiklerin PC-3 hücre hattındaki konsantrasyon-absorbans grafikleri	64

Şekil 31. Bileşiklerin DU-145 hücre hattındaki konsantrasyon-absorbans grafikleri	64
Şekil 32. Bileşiklerin LNCaP hücre hattındaki konsantrasyon-absorbans grafikleri.	65
Şekil 33. Etodolak ve 3b 'nin PC-3 hücre hattı üzerindeki mitokondriyal membran testi sonuçları	65
Şekil 34. Etodolak ve 3b 'nin DU-145 hücre hattı üzerindeki mitokondriyal membran testi sonuçları	66
Şekil 35. Etodolak ve 3b 'nin LNCaP hücre hattı üzerindeki mitokondriyal membran testi sonuçları	66
Şekil 36. Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin genel sentez şeması (3a-l)	70
Şekil 37. Bileşik 1 'in genel sentez mekanizması	73
Şekil 38. Bileşik 2 'nin genel sentez mekanizması	74
Şekil 39. 3a-l bileşiklerinin genel sentez mekanizması	77
Şekil 40. Bileşik 1 , 2 ve 3d 'nin FT-IR spektrumlarının karşılaştırılması.....	81
Şekil 41. 3a-k bileşiklerinin azometin, hidrazon N-H ve indol N-H protonlarının sırasıyla spektrum görüntüleri.....	89
Şekil 42. Bileşik 3f 'nin spektrumdaki azometin protonu.....	90
Şekil 43. 3l 'nin spektrumdaki indol, hidrazon N-H ve azometin protonları.....	90
Şekil 44. Merkптоasetilhidrazonlarda belirlenen izomerler (Ershov ve ark., 2009)	91
Şekil 45. 3e-k bileşiklerinin metoksi yapılarının sırasıyla spektrum görüntüleri	92
Şekil 46. 3a-l 'nin -CH ₃ protonlarının sırasıyla spektrum görüntüleri.....	92
Şekil 47. Etodolak, hidrazit (2) ve 3a-l bileşiklerinin PC-3 kanser hücresi üzerinde belirlenen IC ₅₀ değerlerinin kıyaslanması.....	94
Şekil 48. Etodolak, hidrazit (2) ve 3a-l bileşiklerinin DU-145 kanser hücresi üzerinde belirlenen IC ₅₀ değerlerinin kıyaslanması.....	95
Şekil 49. Etodolak, hidrazit (2) ve 3a-l bileşiklerinin LNCaP kanser hücresi üzerinde belirlenen IC ₅₀ değerlerinin kıyaslanması.....	95

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Etodolak etkin maddesinin ¹ H-NMR kimyasal kayma değerleri (a: Çıkla, 2011; b: Vincenzo ve Franco, 1997; c: Passananti ve ark., 2015)	7
Tablo 2. Etodolak, etodolak hidrazidi (2) ve 3a-l bileşiklerinin IC ₅₀ değerleri (μM) 63	
Tablo 3. Sentezlenen hidrazit-hidrazonlarda yer alan aromatik yapılar	71
Tablo 4. Bileşik 1 'e ait özellikler	72
Tablo 5. Bileşik 2 'ye ait özellikler	73
Tablo 6. Tez kapsamında sentezlenen 3a-l hidrazit-hidrazon bileşikleri.....	75
Tablo 7. Sentezlenen 3a-l bileşiklerinin fiziksel ve elementel analiz verileri	78
Tablo 8. 3a-l bileşiklerinin FT-IR bulguları	80
Tablo 9. 3a-l bileşiklerinin süstitüentlerine ait FT-IR bulguları	81
Tablo 10. 3a-l bileşiklerinin ¹ H-NMR bulguları.....	88
Tablo 11. Literatürdeki etodolak hidrazit-hidrazonlarının prostat kanseri hücresi üzerinde sergilediği antikanser etkiler	93
Tablo 12. Bileşik 3b ve etodolak hidrazidi (2) için PC-3 hücre hattındaki baskın hücre ölüm türleri.....	97
Tablo 13. Bileşik 3b ve etodolak hidrazidi (2) için DU-145 hücre hattındaki baskın hücre ölüm türleri.....	97
Tablo 14. Bileşik 3b ve etodolak için DU-145 hücre hattındaki baskın hücre ölüm türleri.....	97

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Nekroz ve apoptoza giden PC-3 hücre hattının floresans mikroskobu altındaki görüntüsü.....	67
Resim 2. Nekroz ve apoptoza giden DU-145 hücre hattının floresans mikroskobu altındaki görüntüsü.....	68
Resim 3. Nekroz ve apoptoza giden LNCaP hücre hattının floresans mikroskobu altındaki görüntüsü.....	69
Resim 4. 31'ye ait İ.T.K. plağındaki iki nokta.....	91



1. ÖZET

Etodolak üzerinden hidrazit-hidrazonların sentezi ve biyolojik etkileri

Öğrencinin Adı: Hande Cevher KOÇ

Danışmanı: Prof. Dr. Ş. Güniz KÜÇÜKGÜZEL

Anabilim Dalı: Farmasötik Kimya

Amaç: Non-steroidal antiinflamatuvar etkin madde olan etodolak üzerinden yeni hidrazit-hidrazon bileşiklerinin sentezlenmesi, saflıklarının kontrol edilmesi, yapılarının kanıtlanması ve PC-3, DU-145, LNCaP prostat kanseri hücrelerine karşı olası antikanser etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Etodolak metil ester [1]; etodolak ve metanolün derişik sülfürik asit varlığında gerçekleşen tepkimesi ile sentezlenmiştir. Bileşik [1] ve hidrazin hidrat metanol ortamında ısıtılarak etodolak hidrazidi [2] elde edilmiştir. Bu hidrazit bileşiğinin ve süstitüe benzaldehitlerin etanol ortamındaki kondensasyon reaksiyonu ile etodolak hidrazit-hidrazonları [3a-l] sentezlenmiştir.

Bulgular: Sentezlenen bileşiklerin saflık kontrolleri İ.T.K. ve elementel analiz ile gerçekleştirilmiş, sahip olduğı yapıların karakterizasyonları FT-IR ve ¹H-NMR spektroskopisi kullanılarak belirlenmiştir. Etodolak, etodolak hidrazidi [2], etodolak hidrazit-hidrazon bileşiklerinin [3a-l] sitotoksik etkileri ve [3b] türevinin apoptotik etkileri Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda çalışılmıştır.

Sonuç: Uygulanan WST-8 testine göre, [3b] bileşiğinin PC-3, DU-145 ve LNCaP prostat kanser hücreleri üzerindeki sitotoksitesinin; etodolak ve etodolak hidrazidinden [2] daha yüksek olduğı sonucuna varılmıştır. Bu hücre hatları üzerindeki apoptotik etki çalışmaları sonucunda; 3b mitokondriyal membran potansiyelinde depolarizasyon yapmıştır ve apoptotik hücre ölümünün meydana gelmesini sağlamıştır.

Anahtar Sözcükler: Etodolak, hidrazit-hidrazon, antikanser etkinlik, apoptoz.

2. SUMMARY

Synthesis and biological effects of hydrazide-hydrazones derived from etodolac

Student Name: Hande Cevher KOÇ

Name of Supervisor: Prof. Dr. Ş. Güniz KÜÇÜKGÜZEL

Department: Pharmaceutical Chemistry

Objective: It was aimed to synthesize new hydrazide-hydrazone compounds derived from etodolac which is non-steroidal anti-inflammatory active pharmaceutical ingredient, to check their purity, to prove their structures and to determine their potential anticancer activities against PC-3, DU-145, LNCaP prostate cancer cells.

Material and methods: Etodolac methyl ester [1] was synthesized by the reaction of etodolac and methanol in the presence of concentrated sulfuric acid. Etodolac hydrazide [2] was obtained by heating compound [1] and hydrazine-hydrate in methanol medium. Etodolac hydrazide-hydrazones [3a-l] were synthesized by the condensation reaction of this hydrazide compound [2] and substituted benzaldehydes in ethanol medium.

Results: The purity control of the synthesized compounds was carried out by TLC and elemental analysis, the characterization of their structures was determined by using FT-IR and ¹H-NMR spectroscopy. The cytotoxic effects of etodolac, etodolac hydrazide [2], etodolac hydrazide-hydrazone compounds [3a-l] and the apoptotic effects of [3b] derivative were studied in Marmara University Faculty of Medicine, Department of Biophysics.

Conclusion: According to the applied WST-8 test, it was concluded that the cytotoxicity of compound [3b] on PC-3, DU-145 and LNCaP prostate cancer cells is higher than that of etodolac and etodolac hydrazide [2]. As a result of apoptotic effect studies on these cell lines, 3b made depolarization on mitochondrial membrane potential and enabled apoptotic cell death to occur.

Keywords: Etodolac, hydrazide-hydrazone, anticancer activity, apoptosis.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser; vücutta değişen hücrelerin birden fazla dokuya yerleştiği, burada gelişim gösterdiği ve kendisinden daha uzakta yer alan dokulara yayıldığı bir hastalık çeşididir (Clark, 1995).

İstatistikler incelendiğinde; kanser vakaları ve bundan kaynaklı ölümler giderek artma eğilimi göstermektedir. Örneğin Türkiye’de cinsiyet bazında yapılan ve 2009-2017 yılları arasını kapsayan bir araştırmaya göre; kadınlarda göğüs, karaciğer, pankreas, kolon, yumurtalık ve rahim kanserinden kaynaklanan ölümlerde artış olduğu tespit edilmiştir. Erkeklerde ise aynı durum; karaciğer, pankreas, kolon, ağız boşluğu, yutak ve mesane kanseri sonucunda gözlenmiştir (Doğan ve ark., 2020). Amerika’da ise; 2017 yılında kadınlarda akciğer, meme, kalın bağırsak, pankreas ve yumurtalık kanseri ölümleri en fazla iken; erkeklerde akciğer, prostat, kalın bağırsak, pankreas ve karaciğer kanseri ölümlerinin yaygın olduğu belirlenmiştir (Siegel ve ark., 2020).

Bu şekilde bir tablonun katlanarak daha da çoğalmasını engellemek için tercih edilen tedavi yöntemlerinden biri; antikanser özelliğe sahip ilaçlar ile gerçekleştirilir. Ancak, kanserli hücrelerin vücutta hızlı bir şekilde ilerlemesi de kaçınılmaz bir durum olduğu için; hep aynı kanser ilaçları tercih edilerek yapılan tedavi her zaman verimli olamamaktadır. Ayrıca, ilaçlara karşı gelişen direnç de bu duruma eklenince; hem yetişkinlerde hem de çocuklarda kanser ölümleri engellenememektedir. Bu direncin nedenleri olarak; ilaç aktifliğinin bitmesi, ilacın sahip olduğu yeteneklerin farklılaşması, ilaçta oluşan dışatım durumu, DNA’da meydana gelen hasarlara karşı yapılan onarım, hücre ölümünün durdurulması, epitelyal mezenkimal geçiş, kanser hücresinin homojen olmayan yapısı ve epigenetik durumlar gösterilebilir (Housman ve ark., 2014). Ayrıca inhibitörün aktif yapıya geçişinde azalma, inhibitörün bozulması, durdurulmuş enzimin sentezinin çoğalması, enzimin inhibitöre daha az hassas davranması ve direnç kazanan kanser hücrelerinin inhibitöre olan geçirgenliğinin az olması da bu önemli durumu etkilemektedir (Brockman, 1963).

Etodolak; kimyasal yapısında indol ve piranokarboksilik asit içeren non-steroidal antiinflamatuvar etkin maddedir ve tercihe bağlı şekilde seçici COX-2 inhibitörü olarak etkisini gösterir (Glaser, 1995; Dannhardt ve Kiefer, 2001; Sharma ve ark.,

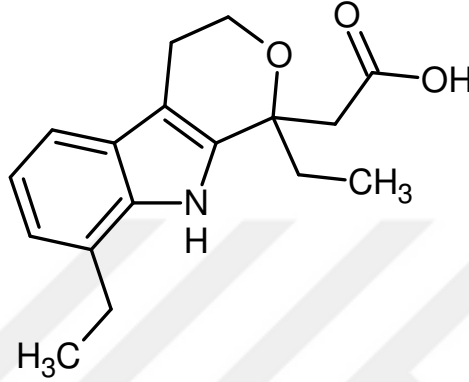
2019). Ayrıca etodolak etkin maddesinin kanser hücrelerine karşı sergilediği antikanser özelliği de yapılan çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Ishizaki ve ark., 2006; Hakozaiki ve ark., 2007; Roy ve ark., 2010; Orun ve ark., 2017).

Ancak bilim insanları tarafından hem yeni hem de etki düzeyi daha yüksek olan moleküllerin gerekli olduğu düşünülerek; bilinen etkin maddeler üzerinden sentezlenebilecek ve antikanser etkinliğe sahip olabilecek türevler üzerine çeşitli değerlendirmeler yapılmıştır. Hidrazit-hidrazon yapısı belirlenen bu türevlerin arasında yer alan kuvvetli adaylardan biridir. Gerçekleştirilen pek çok çalışma neticesinde; aralarında etodolak etkin maddesinin de bulunduğu çeşitli başlangıç bileşikleri üzerinden sentezlenen hidrazit-hidrazon türevlerinin tespit edilen antikanser etki bulguları da bu yapının önemli bir yere sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Çıkla ve ark., 2013; Aydın ve ark., 2013; Küçükgülzel ve ark., 2015; Şenkardeş ve ark., 2016; Han ve ark., 2021). Bu bilgiler doğrultusunda, literatürde kayıtlı olmadığı belirlenen hidrazit-hidrazonların da antikanser özellik gösterebileceği düşünülerek; kimyasal adı (1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetik asit olan etodolak etkin maddesi üzerinden yeni on iki adet hidrazit-hidrazon bileşiklerinin sentezlenmesi, saflıklarının belirlenmesi, yapılarının aydınlatılması ve prostat kanseri hücrelerine karşı antikanser etkinliklerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Etodolak Hakkında Genel Bilgiler

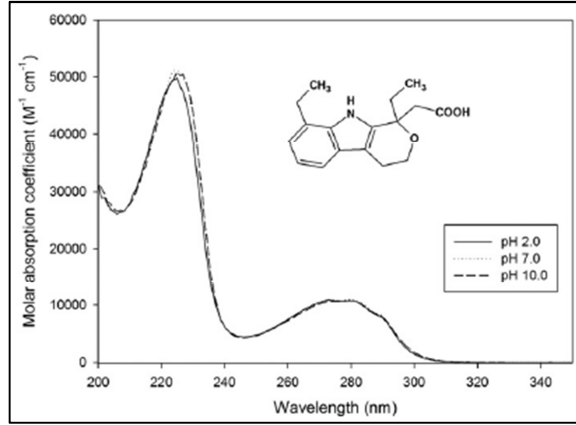
4.1.1. Fiziksel, kimyasal ve spektroskopik özellikleri



- Kapalı formülü: $C_{17}H_{21}NO_3$
- Moleküler ağırlığı: 287,35 g/mol
- Erime noktası: 146-147 °C (Demerson ve Humber, 1986)
- Kimyasal okunuşu: (1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetik asit
- Beyaz renkte billur madde; kloroform, dimetil sülfoksit (DMSO) gibi çözücülerde çözünür.

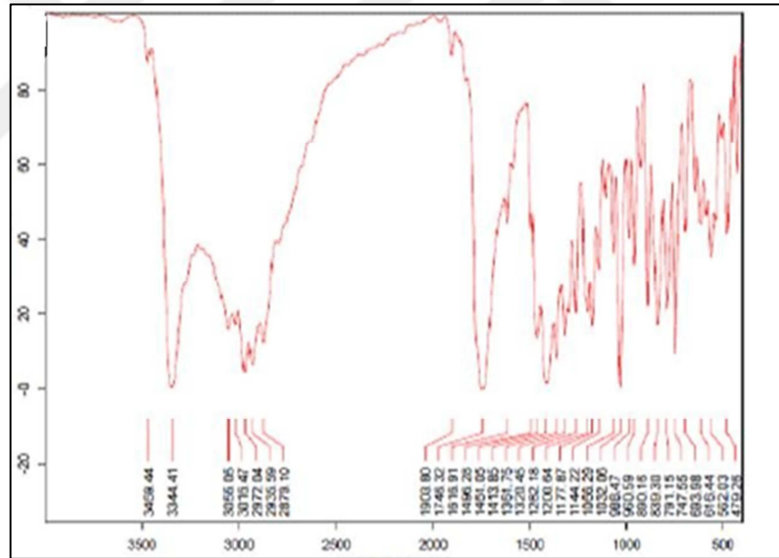
Ayrıca, etodolak etkin maddesinin 298,15 K sıcaklıkta on iki farklı çözücü içerisindeki çözünürlüğü de değerlendirilmiştir. Buna göre belirlenen çözünürlükler en fazladan en aza doğru sırasıyla aseton, metil asetat, n-bütül asetat, n-bütanol, n-amil asetat, izobütül asetat, n-propanol, izoamil asetat, izopropanol, izobütanol, diklorometan ve toluen çözücülerini ile elde edilmiştir (Hu ve ark., 2020).

Passananti ve ark. etodolak etkin maddesi ile farklı pH değerlerinde yaptıkları UV çalışmasında; bu etkin maddenin 225 nm ve 272 nm’de maksimum absorpsiyon yaptığını tespit etmişlerdir (Şekil 1) (Passananti ve ark., 2015).



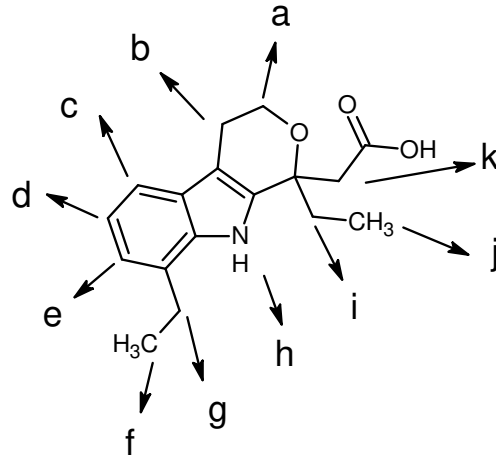
Şekil 1. Etodolak etkin maddesinin UV spektrumu (Passananti ve ark., 2015).

Shabaraya ve ark. etodolak etkin maddesi ile gerçekleştirdikleri FT-IR çalışmasında (Şekil 2); N-H, C-O, C=C gerilme bandlarını sırasıyla 3344,41 cm⁻¹, 1144,22 cm⁻¹ ve 1616,91 cm⁻¹ değerlerinde saptamışlardır (Shabaraya ve ark., 2019).



Şekil 2. Etodolak etkin maddesinin FT-IR spektrumu (Shabaraya ve ark., 2019).

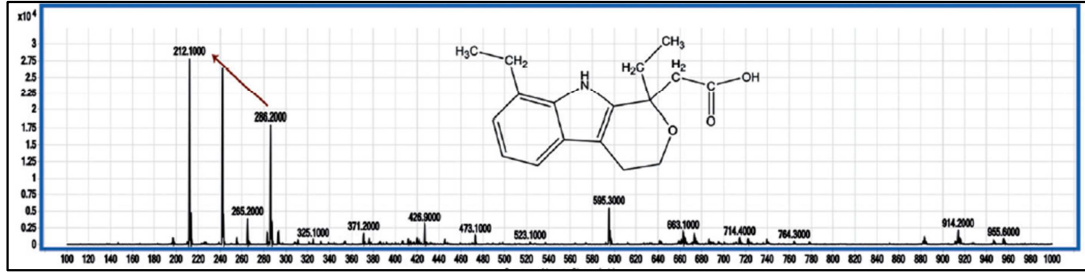
Gerçekleştirilen ¹H-NMR çalışmalarında; döterodimetil sülfoksit (DMSO-d₆), döterometanol (CD₃OD) ve döterokloroform (CDCl₃) içerisinde çözölen etodolak için spektrumlar elde edilerek, etodolak yapısındaki hidrojenlerin kimyasal kayma değerleri ppm cinsinden tespit edilmiştir (Tablo 1) (Vincenzo ve Franco, 1997; Çıkla, 2011; Passananti ve ark., 2015).



Tablo 1. Etodolak etkin maddesinin $^1\text{H-NMR}$ kimyasal kayma değerleri (a: Çıkla, 2011; b: Vincenzo ve Franco, 1997; c: Passananti ve ark., 2015).

Yapıdaki Hidrojen Kodu	$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) ^a	$^1\text{H-NMR}$ (CDCl ₃) ^b	$^1\text{H-NMR}$ (CD ₃ OD) ^c
a	3,88-4,00 ppm	4,08 ppm	3,96-4,09 ppm
b	2,57-2,95 ppm	2,80-3,05 ppm	2,63-2,83 ppm
c	6,87-7,24 ppm	7,00 ppm	6,90 ppm
d	6,87-7,24 ppm	7,08 ppm	6,93 ppm
e	6,87-7,24 ppm	7,36 ppm	7,24 ppm
f	1,26 ppm	1,31 ppm	1,30 ppm
g	2,57-2,95 ppm	2,80-3,05 ppm	2,86 ppm
h	10,47 ppm	8,62 ppm	4,62 ppm
i	2,03-2,08 ppm	2,04 ppm	2,11 ppm
j	0,63 ppm	0,88 ppm	0,74 ppm
k	2,57-2,95 ppm	2,80-3,05 ppm	2,87-3,00 ppm

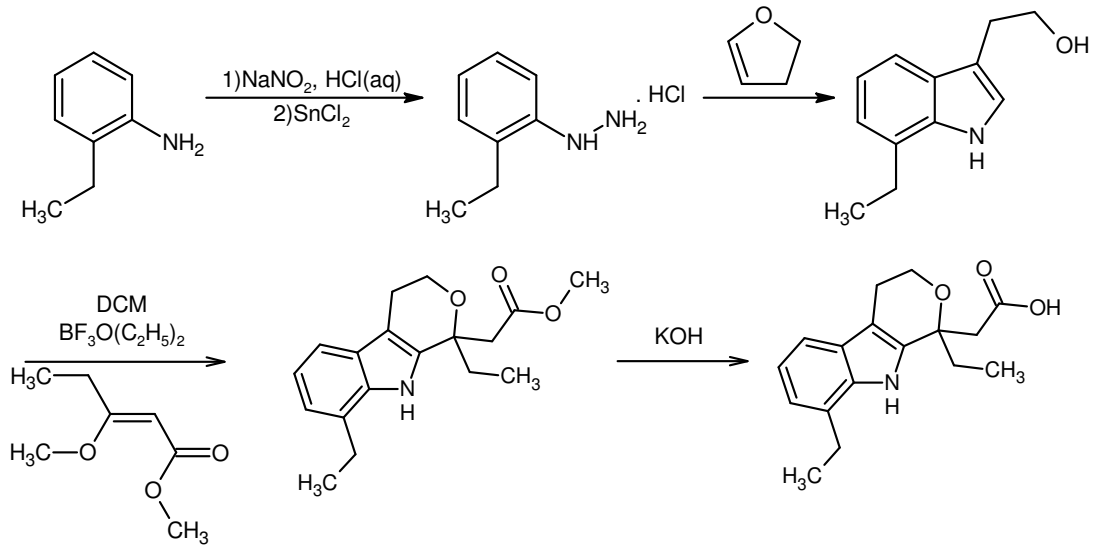
Yaman ve ark. çok yüksek basınçlı sıvı kromatografi-kütle/kütle spektrometresi (UPLC-MS/MS) kullanarak; laboratuvar faresi plazmasında etodolak etkin maddesini tayin etmişlerdir. Bu çalışmada; kütle spektrumu (Şekil 3) için etodolak pik yoğunluğunun, negatif iyon modu ile daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır. Spektrumdaki $[\text{M-H}]^-$ iyonuna ait m/z değeri 286,2 iken; oluşan öncü ürünün m/z değeri ise 212,1 olarak saptanmıştır (Yaman ve ark., 2018). Elde edilen bu değer $[\text{M-H-(CH}_3\text{CH}_2\text{COOH)}]^-$ iyonuna karşılık geldiği belirtilmiştir (Koupai-Abyazani ve ark., 1999).



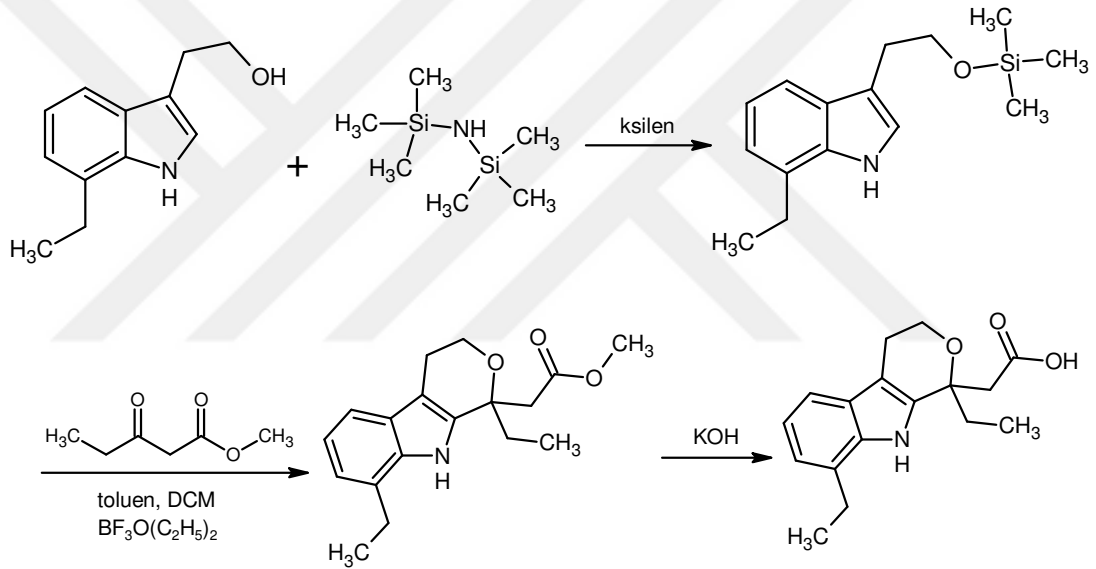
Şekil 3. UPLC-MS/MS spektrumu (Yaman ve ark., 2018).

4.1.2. Sentezi ve metabolizması

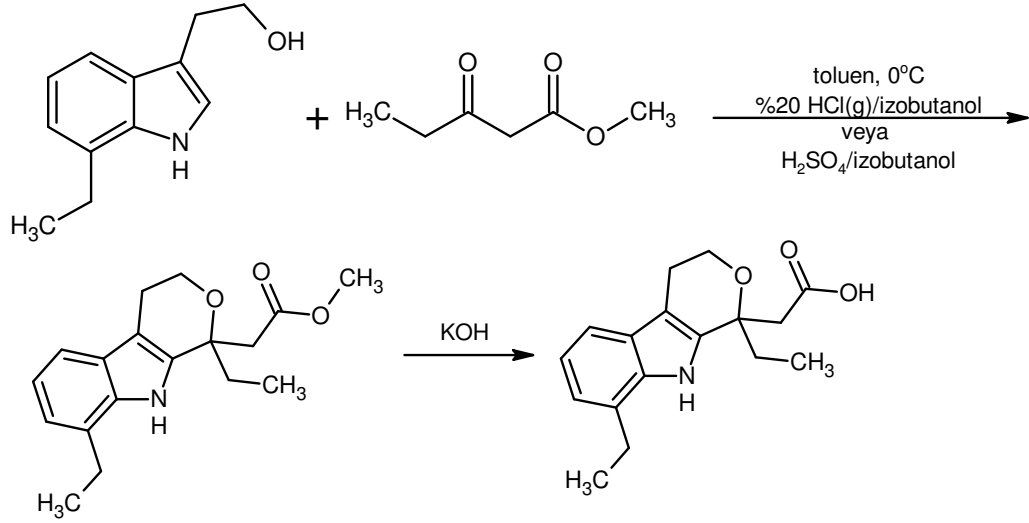
Demerson ve Humber; etodolak sentezi için 7-etiltriptofol ve 3-metoksi-2-pentenoik asit metil esteri başlangıç maddesi olarak seçmişlerdir ve yaptıkları çalışmada ilk önce bu başlangıç maddelerinin sentezlerini ele almışlardır. Buna göre; 2-etilfenilhidrazin ile NaNO_2 ve HCl(g) çözeltisinin reaksiyonu sonucu oluşan diazonyum tuzu, SnCl_2 çözeltisi ile 2-etilfenilhidrazin hidroklorür maddesini meydana getirmiştir. Bu bileşiğin; 2,3-dihidrofuran ile tepkimesi ve flaş kromatografi yardımıyla saflaştırılması sonucunda da 7-etiltriptofol başlangıç maddesi sentezlenmiştir. Diğer madde olan 3-metoksi-2-pentenoik asit metil esteri ise; metil propiyonilasetat ve trimetil ortoformat maddelerinin H_2SO_4 ortamında reaksiyonu sonrası elde edilmiştir. Sentezlenen bu başlangıç maddeleri de $\text{BF}_3\text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ varlığında reaksiyon vererek, etodolak metil esteri oluşturmaktadır. En son olarak da ester, KOH çözeltisi ile baz hidrolizi geçirerek etodolak yapısına dönüşmüştür (Demerson ve Humber, 1986).



Vincenzo ve Franco; belirtilen bu ilk yöntemdeki etodolak sentezinde 7-etiltriptofol yapısına uygulanan flaş kromatografinin, ilaç sanayisindeki üretim için büyük bir sorun yaratabileceğini ifade etmişlerdir. Yapılan araştırmalar sonucu flaş kromatografi tercih edilmeyen başka bir sentez yolu belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre; 7-etiltriptofol ve hekzametildisilazan maddelerinin ksilen ortamındaki tepkimesi sonucu 3-(2-trimetilsililoksi)etil-7-etil-1H-indol bileşiği meydana gelmiştir. Daha sonra bu bileşik ile 3-oksopentanoat arasındaki reaksiyon, $\text{BF}_3\text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ varlığında etodolak metil esterini oluşturmuştur. Ester de baz hidrolizine uğrayarak etodolak sentezlenmesini sağlamaktadır (Vincenzo ve Franco, 1997).

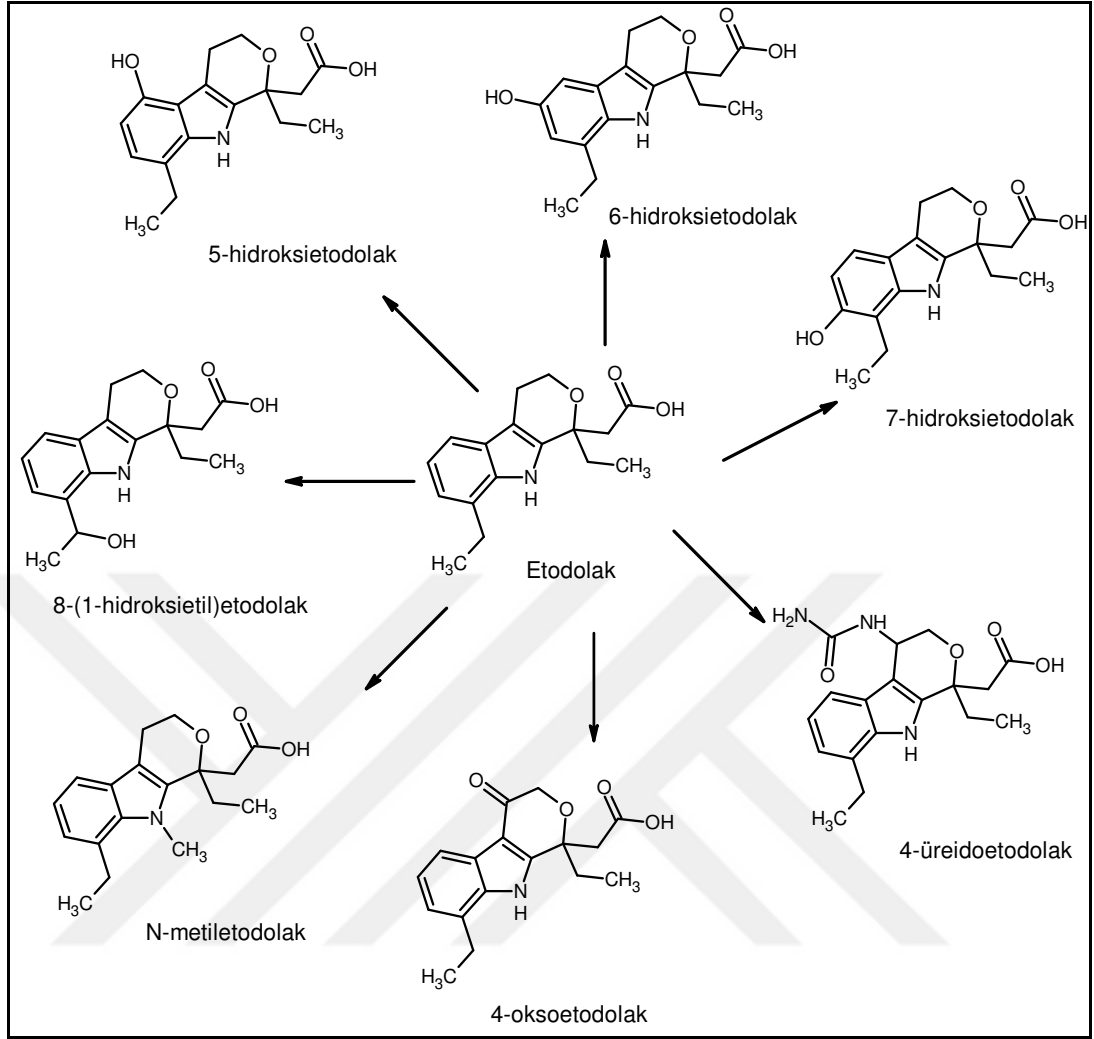


Vigano ve Colombo; $\text{BF}_3\text{O}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ kullanımının getirdiği zorluklara değinmişlerdir ve bu kimyasalı tercih etmeden de düşük sıcaklıklarda etodolak sentezinin mümkün olduğunu ifade etmişlerdir. Burada da 7-etiltriptofol ve metil 3-oksopentanoat reaksiyona girmiştir. Ama bu tepkime; 0 °C'de ve izobütanolde çözünmüş HCl veya H_2SO_4 ortamında yürütülmüştür. Ayrıca, kullanılan asit:7-etiltriptofol oranının 3:1 şeklinde olmasına dikkat edilmiştir. Oluşan etodolak metil esterden etodolak dönüşümü de diğer çalışmalardaki aynı yol üzerinden gerçekleştirilmiştir (Vigano ve Colombo, 2000).



Etodolak büyük bir oranda karaciğerde metabolize olmaktadır (Strickmann ve Blaschke, 2001). Genel olarak etodolak etkin maddesine ait yarılanma ömrünün 6-8 saat arasında olduğu belirtilmiştir (Brocks ve Jamali, 1994).

Etodolak metabolit yapılarının belirlenmesi için birçok deneysel çalışma yapılmıştır. Tespit edilen metabolitler (Şekil 4); 5-hidroksietodolak, 6-hidroksietodolak, 7-hidroksi etodolak, 8-(1-hidroksietil)etodolak, 4-üreidoetodolak, N-metiletodolak, 4-oksoetodolak ve bunların glukronit konjugatları şeklindedir (Ferdinandi ve ark., 1986; Ferdinandi ve ark., 1987; Humber ve ark., 1988; Strickmann ve Blaschke, 2001).



Şekil 4. Etodolak etkin maddesinin metabolitleri.

4.1.3. Farmakolojik özellikleri

Etodolak; piranokarboksilik asit yapısında olan bir non-steroidal antiinflamatuvar (NSAİ) etkin maddedir (Jones, 1999). Bu ilaç grubunun etki mekanizması incelendiğinde; prostaglandinlerin sentezini durdurarak vücuttaki yangıyı azalttığı sonucuna varılmıştır (Vane, 1971). Antiinflamatuvar etkisinin dışında, analjezik etkinliği de bulunur (Demerson ve ark.,1976). Fransa’da altı haftalık yapılan çalışmaların sonuçlarına bakıldığında; tıp dilinde romatoid artrit olarak geçen iltihaplı romatizma ve osteoartrit denilen kireçlenme tedavisi için etkili olduğu saptanmıştır (Benhamou, 1990).

Romatoid artrit hastalığına sahip 1446 kişi ile yapılan ve üç yıl süren bir çalışmaya göre; etodolak kullanımı sonucu oluşan gastrointestinal sistemdeki ülser ve kanama,

sadece çalışmanın ilk 100-140 günü içerisinde hafif olarak gözlenmiştir (Neustadt, 1997).

Arnold ve ark. sağlıklı kişilerden alınan dışkıları üzerinde mikro düzeyde gerçekleşen kanama ile ilgili bir araştırma gerçekleştirmişlerdir ve günde 1200 mg'den daha fazla dozda etodolak kullanımı sonrası, mikro kanamada önemli bir artış tespit etmemişlerdir (Arnold ve ark., 1985). Günde 1000 mg'den fazla oranda kullanımı sonucunda da gastrointestinal ülserde bir yükselme olmamıştır (Lanza ve ark., 1987).

Ayrıca; etodolak, yapısında bir kiral karbonu bulundurur ve rasemat şeklindedir (Demerson ve ark., 1983). Böylece (R)-etodolak ve (S)-etodolak enantiyomerleri elde edilebilir (Adger ve ark., 1998). Etodolak enantiyomerlerinin farmakinetik özellikleri üzerine yapılan bir çalışma sonucunda da; (R)-etodolak yapısının plazmada daha fazla oranda olduğu tespit edilmiştir (Brocks ve ark., 1992; Brocks ve Jamali, 1994).

4.2. Kanser Hakkında Genel Bilgiler

Çok sayıda insanın ölümüne sebep olarak gösterilen kanser; vücudun karar verme mekanizmasında meydana gelen bir problem sonucu, hücre işlevlerindeki olağan düzenin bozulması olarak tanımlanabilir. Mekanizmaya göre; hücrelerin durumu için iki seçenek bulunmaktadır. İlki; gelen sinyaller ile aradaki bağlantılar ortadan kaldırılarak, hücre için herhangi bir şey yapılmaz. İkincisi; hücre ölümü, çoğalma gibi işlevler devreye alınarak, hücre için bir değişiklik yapılır. Ancak bu karar verme sisteminin yapısında bir olumsuzluk gözlenir ise; mekanizma çalışmaz ve hücreler bağımsız olarak hareket etmeye başlar. Ayrıca hücre ölümü ve hücre çoğalması arasındaki dengeli düzen ortadan kaybolur. Kanseri hücrelerinin de durmadan çoğalmasının ve vücut dokularında toplanmasının temel nedeni, bu durumdan kaynaklanmaktadır (Kopper ve ark., 1997). Mekanizmada bahsedilen hücre ölümü de; apoptoz, otofaji ve nekroz olarak üç çeşittir. Hepsi aynı görevi yerine getirir; ancak morfolojik olarak farklı tanımlanır (Clarke, 1990; Baehrecke, 2002).

Tümör oluşması olarak bilinen karsinogenez ise; başlama (inisiyasyon), yükselme (promosyon) ve ilerleme (progresyon) aşamaları ile gerçekleşmektedir. Başlama aşaması; hücrelerde meydana gelen ilk farklılaşmayı ve hücrenin bölünmesini içerir.

Bunlar geri dönüşümsüz oluşmaktadır ve kimyasal durumlardan etkilenir. Ancak bu hücreler bağımsız olarak çoğalma göstermez. Yükselme aşaması; yapıda geri dönüşümlü farklılıklar oluşturur. Bazı uyaranların etkisi ile başlama aşamasında oluşan hücrelerin artışı sağlanır ve bunların da bir dokuda birikmesi sonucu nodül benzeri yapılar oluşur. Beslenme durumu ve hormonlar bu aşamayı tetiklemektedir. Son aşama olan ilerleme ise; geri dönüşümsüz olarak değişim içerir. Hücrelerin kendiliğinden ilerleme durumu söz konusudur. Kötü huylu tümörün yapısındaki değişiklikleri de göstermektedir (Pitot, 1989; Foulds, 1954; Farber, 1988).

Tümörün, vücutta yayılma durumu için de bazı süreçlerden geçmesi gereklidir. İlk önce; bulunduğu ana yapıdan ayrılır ve konak dokuya ulaşır. Buradaki lenf ve kan damarlarının içine sızarak ve dolaşımda kalarak; istediği yere göç etme şansı elde etmektedir. Tümör; daha sonra geldiği organların kılcal damarlarına ulaşır ve dokularına yerleşir. Burada ise; iki davranış biçiminden birini sergiler. Geldiği bu yeni dokuya ya uyum sağlar ya da eski düzeni ortadan kaldırarak kendi ortamını oluşturur. Son olarak da bölünerek tümör hücrelerinin çoğalmasına devam eder (Bacac ve Stamenkovic, 2008).

Kanseri tetikleyen etkenler de bu hastalığın anlaşılması için önemli bir yere sahiptir. Araştırmalara göre; hormonlar, vücutta oluşan DNA hasarları, enfeksiyonlar, kişinin beslenme tarzı ve tütün ürünleri kullanımı kanser oluşumunda oldukça etkilidir. Kişinin sahip olduğu meslek, güneşte uzun süre kalma, tıbbi müdahale ve kirlilik daha az etkilemektedir. Ayrıca, kalıtsal durumların da etkisi söz konusudur (Ames ve ark., 1995; Henderson ve ark., 1991; Doll ve Peto, 1981). Yapılan bir çalışma sonucunda; dokuz kanser nedeninin, 2001'de kanserden vefat eden kişilerin % 35'ini etkilediği saptanmıştır. Buna göre; alkol alımı % 5, sigara % 21, meyve ve sebzenin az tüketilmesi % 5, fiziksel aktivitenin az yapılması % 2, zührevi nedenler % 3, şehir yaşamındaki hava kirliliği % 1, kilo fazlalığı ve obezite % 2, katı yakıt ile alınan duman % 0,5'ten az, sağlık bakım hizmetlerinden bulaşan enjeksiyon % 2 oranlarında etkilidir (Danaei ve ark., 2005).

4.2.1. Siklooksijenaz enzimi ve kanser ilişkisi

Siklooksijenaz enzimi (COX) veya prostaglandin H sentaz, araşidonik asitten prostaglandin oluşumunu sağlamaktadır. İlk önce; bu enzimin iki formu olan COX-1 ve COX-2 insan dokularında saptanmıştır. COX-1; temel yapıda ve fizyolojik olaylarda etkindir. COX-2 ise uyarılabilir ve iltihap durumlarında rol oynar (Taketo, 1998; O'Neill ve Ford-Hutchinson, 1993). Daha sonra yapılan çalışmalar ile bu enzimin üçüncü formu olan COX-3 tespit edilmiştir (Chandrasekharan ve ark., 2002).

Kanser hücrelerinde yapılan araştırmalarda ise; COX-2'nin daha etkin olduğunu gösteren sonuçlara ulaşılmıştır. Kanserli hücrelerin % 86'sında COX-2 mesajcı RNA oranı oldukça fazla iken; normal ve tümörlü dokularda COX-1 mesajcı RNA aynı oranda gözlenmiştir. Kalın bağırsak tümörü hücrelerinin % 43'ünde de COX-2 varlığı saptanmıştır (Eberhart ve ark., 1994). Ayrıca kolon kanserinin % 80'inden daha fazlasında ve mide kanseri tümörlerinin % 70'inde COX-2 oranı artışı gözlenmiştir (Williams ve ark., 1997; Yamamoto ve ark., 1999).

Chan ve ark. baş ve boyun skuamöz kanser hücrelerindeki COX-2 mesajcı RNA oranının, sağlıklı ağız mukozasına göre yaklaşık 150 kat olduğunu saptamışlardır (Chan ve ark., 1999). Beyin tümörleri incelendiğinde ise; glial hücrelerde gelişen yüksek dereceli tümörlerdeki COX-2 varlığının fazla olduğu anlaşılmıştır (Nishimura ve ark., 2000). Ayrıca baş ve boyun kanseri tümörlerindeki damar oluşumunun, COX-2 ile artabileceği sonucuna varılmıştır (Gallo ve ark., 2001).

Yapılan diğer araştırmalara bakıldığında; pankreas kanalı tümörlerinin % 57'sinde ve tükürük bezi tümöründe COX-2 varlığında artış olduğu tespit edilmiştir (Kokawa ve ark., 2001; Sakurai ve ark., 2001).

Ali-Fehmi ve ark. yumurtalık kanseri görülen 125 hastanın % 68'inde fazla oranda COX-2 varlığı elde etmişlerdir (Ali-Fehmi ve ark., 2003). Ayrıca Chen ve ark. mide kanserine sahip 30 vakanın 16'sında COX-2 saptamışlardır (Chen ve ark., 2006).

4.2.2. Etodolak etkin maddesinin antikanser etkinlikteki yeri

Etodolak etkin maddesi seçici COX-2 inhibitörüdür (Jones, 1999). Ayrıca, COX-2 enzimini ne oranda etkilediği ve seçici davrandığı; yapılan deneysel çalışmalar ile de desteklenmiştir. Örneğin; farelerin rekombinant insan COX izoenzimlerine sahip yumurtalık hücreleri üzerinde bir çalışma yapılmıştır. Etodolak etkin maddesinin bu hücrelerdeki COX-2'ye etkisinin, COX-1'in 1000 katı kadar olduğu saptanmıştır (Riendeau ve ark., 1997). Başka bir araştırmada; romatoid artrit hastalarından alınan sinovyal sıvı hücresindeki COX-2 ve sağlıklı kişilerdeki trombositte bulunan COX-1 incelenmiştir. Buna göre de 179 kat COX-2'ye seçici davrandığı sonucuna varılmıştır (Kawai ve ark., 1998).

Böylece kanser hücrelerindeki COX-2'ye karşı da etki edebileceği düşünülerek, etodolak etkin maddesinin antikanser etkinliği çeşitli araştırmalara konu olmuştur. Chen ve ark. etodolak sayesinde kolon kanser hücrelerinin karaciğere yayılmasının durduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, uzun süre kullanımı ile de kolon kanseri SW620, Lovo, HT-29, HT-29/Inv3 hücrelerinin artışı engellenmiştir (Chen ve ark., 2001). Prostat kanseri LNCaP ve C4-2 hücreleri üzerinde; hem in vitro hem de in vivo olarak antikanser özellik sağlamıştır (Shigemura ve ark., 2005).

Magari ve ark. *Helicobacter pylori* ile enfeksiyona uğramış dokuda; etodolak sonrası mide kanseri oluşumunun ortadan kalktığını belirlemişlerdir (Magari ve ark., 2005). Kronik gastrit görülen hastalarda ise; uzun bir süre etodolak kullanımı sonucu metakron kanser oluşumunda azalma tespit edilmiştir (Yanaoka ve ark., 2010).

Kobayashi ve ark., Burkitt lenfoma hücrelerindeki apoptozun aktifleştğini saptamışlardır (Kobayashi ve ark., 2005).

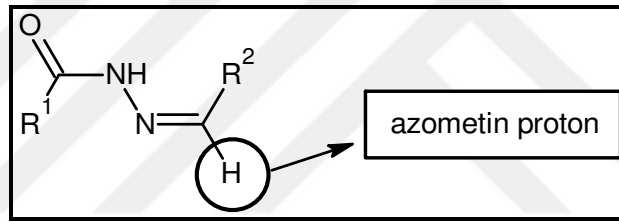
Bir kemik iliği kanseri olan myelom hastalığında; 50-100 µM konsantrasyonda etodolak ile kanserli hücrelerin artışının gerilediği tespit edilmiştir (Nakamura ve ark., 2006).

Okamoto ve ark. etodolak etkin maddesinin; COX-2 mesajcı RNA oranı çok fazla olan T24 mesane kanser hücrelerini oldukça azalttığını ve apoptozu aktifleştirdiğini saptamışlardır. Ayrıca, altı günde T24 hücrelerinin gelişimi büyük oranda durmuştur (Okamoto ve ark., 2008). de Souza Thiago ve ark. Nalm-16 lösemi kanser

hücresinin artışına da engel olduğunu belirtmişlerdir (de Souza Thiago ve ark., 2009).

4.2.3. Hidrazit-hidrazonların antikanser etkinlikteki yeri

Hidrazit-hidrazonlar; başta antikanser olmak üzere, antikonvülsan, antimikrobiyal, analjezik, antienflamatuvar, antiplatelet ve antitüberküler özellikleri sayesinde uzun zamandır bilim insanlarının dikkatini çekmektedir. Genel olarak hidrazit-hidrazonlar; -CO-NH-N=CH- yapısı ile bilinmektedir ve hidrazitlerin etanol, glasiyal asetik asit gibi çözücülerde aldehit veya ketonlar ile kondensasyonu sonucunda oluşmaktadır. Bu reaksiyonda karbonil grubu içeren yapı olarak aldehit kullanılır ise; reaksiyon sonucunda oluşan yapı azometin protonu içerir (Şekil 5) (Rollas ve Küçükgül, 2007).

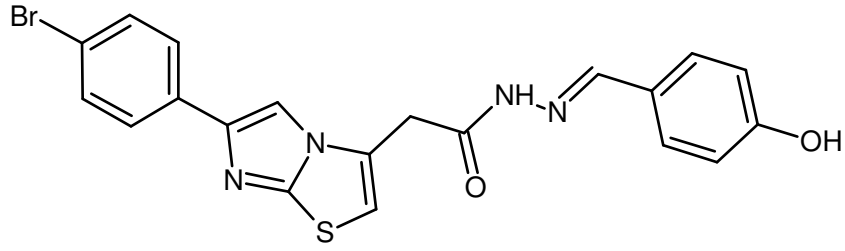


Şekil 5. Hidrazit-hidrazon yapısı ve azometin protonu.

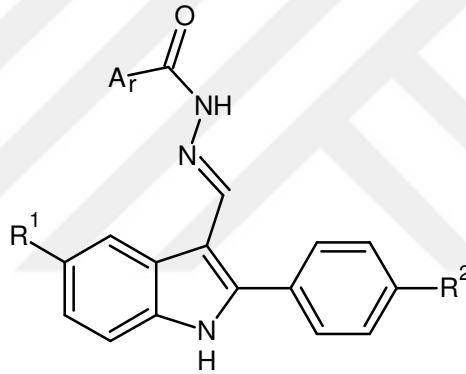
Hidrazon yapısı incelendiğinde; hidrazit yapısında yer alan -NH₂ grubu bloke edildiği için hidrazide oranla daha az toksik özellik gözlemlendiği bildirilmiştir (Buu-Hoi ve ark., 1953). Ayrıca, hidroliz ile başlangıçtaki yapılara dönüşebildiği için de ön ilaç olarak ilaç geliştirme aşamalarında tercih edilebileceği sonucuna varılmıştır (Rollas ve Küçükgül, 2008).

Hidrazit-hidrazonların sentez ve antikanser etkinlik çalışmaları üzerine literatürde pek çok çalışma mevcuttur. Ulaşılan sonuçlar da oldukça umut verici niteliktedir.

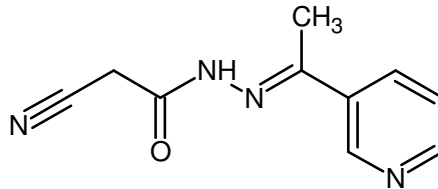
Gürsoy ve Ulusoy Güzeldemirci; [6-(4-bromofenil)imidazo[2,1-b]tiyazol-3-il] asetik asit hidrazit ve 4-hidroksibenzaldehit ile sentezledikleri hidrazon bileşiğinin, PC-3 prostat kanser hücresi üzerindeki log₁₀GI₅₀ değerini -8,00'dan küçük olarak tespit etmişlerdir ve bu bileşiğin en etkin türev olduğunun sonucuna varmışlardır (Gürsoy ve Ulusoy Güzeldemirci, 2007).



Vogel ve ark. farklı sübstitüentler içeren 2-fenilindol-3-karbaldehit kullanarak çeşitli hidrazit-hidrazon yapıları sentezlemiştir. Elde edilen bazı bileşiklerin ise; MDA-MB 231 ve MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde en iyi antikanser etkinliği gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu sitotoksik etkinin de 20-30 nM konsantrasyon aralığında olduğu saptanmıştır (Vogel ve ark., 2008).

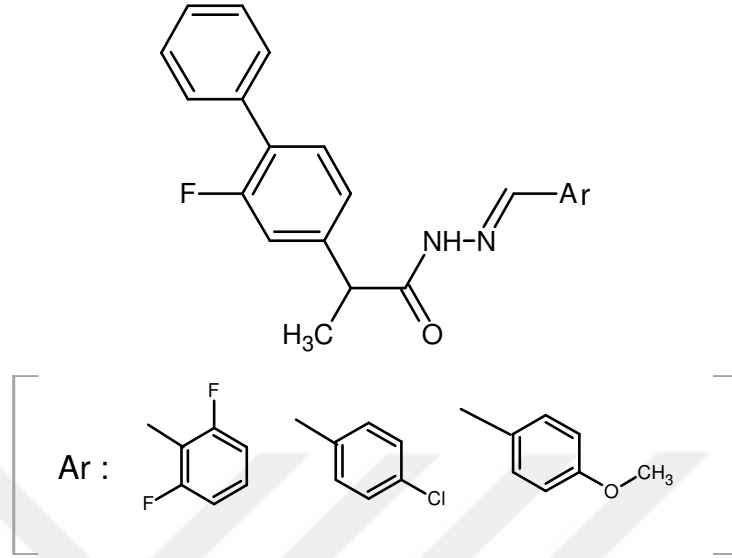


Mohareb ve ark. 2-siyano-N'-(1-(piridin-3-il)etiliden)asetohidrazit bileşiğinin; meme kanseri MCF-7, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri NCI-H460 ve merkezi sinir sistemi kanseri SF-268 hücrelerine karşı gösterdiği etkiyi araştırmışlardır. Üç kanser hattında da tatmin edici sonuçlara varılmıştır (Mohareb ve ark., 2011).

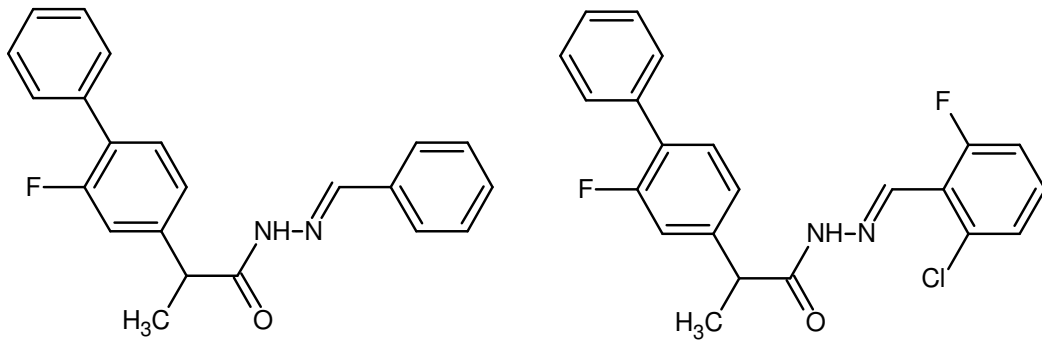


Çıkla ve ark. sentezledikleri flurbiprofen hidrazonları içerisinde üç molekülün; SK-MEL-2 cilt kanseri hücresi, COLO-205 ve HCC-2998 kolon kanseri hücreleri

üzerindeki antikanser etkinliğinin oldukça yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (Çıkla ve ark., 2013).

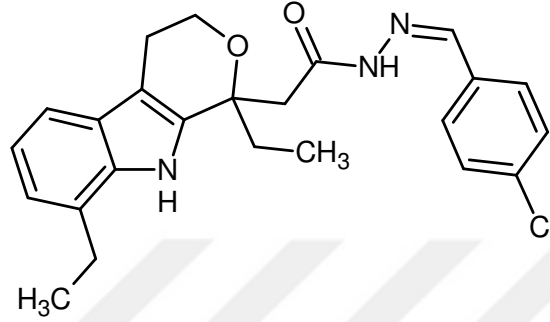


Aydın ve ark. flurbiprofen hidrazit-hidrazonlarını mikrodalga yöntemi ile sentezlemişlerdir. Bu bileşiklerden 2-(2-fluorobifenil-4-il)-N'-(fenilmetiliden)propan hidrazit; HL-60 lösemi kanser hücrelerindeki büyümeyi % 66,37 oranında durdurmuştur. Ayrıca, N'-[(2-kloro-6-florofenil)metiliden]-2-(2-florobifenil-4-il)propanhidrazit bileşiği ise; OVCAR-4 yumurtalık kanseri hücrelerinde oluşan ilerlemeyi % 77,34 oranında ortadan kaldırmıştır (Aydın ve ark., 2013).

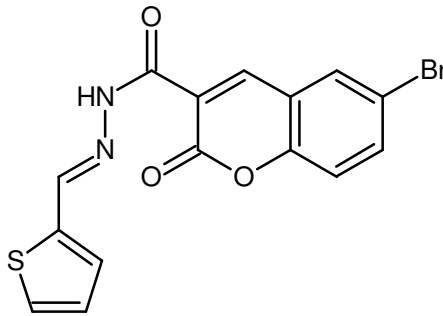


Çıkla ve ark. etodolak etkin maddesinden başlayarak, çeşitli hidrazit-hidrazonları sentezlemişlerdir. Bu moleküllerden 2-(1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetik asit[(4-klorofenil)metilen]hidrazit yapısı, PC-3 prostat kanseri

hücresindeki büyümeyi % 58,24 oranında yok ederek; en iyi sonucu sağlamıştır. Ayrıca bu bileşiğin, SK-MELL-28 cilt kanseri hücrelerinde kuvvetli öldürücü etkisi gözlenmiştir (Çıkla ve ark., 2013). Kummari ve ark. aynı bileşiğin A549 akciğer kanseri hücre hattında da sitotoksik etki yaptığı sonucuna varmıştır (Kummari ve ark., 2018).

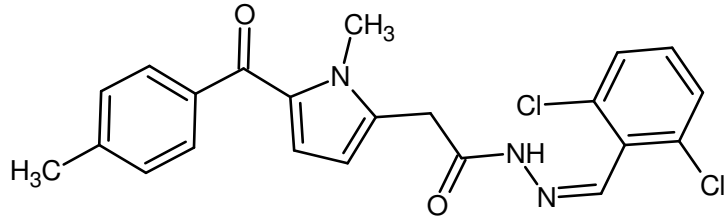


Nasr ve ark. kumarin yapısı içeren hidrazit-hidrazonlar üzerine çeşitli sentezler gerçekleştirmişlerdir ve bunların CCRF lösemi, Panc-1 pankreas, Hep-G2 karaciğer kanser hücre hattındaki etkilerini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre; 6-bromo-2-okso-N'-((tiyofen-2-il)metilen)-2H-kromen-3-karbohidrazit molekülünün, çalışılan tüm kanser hücrelerine karşı 3,6-6,5 μ M konsantrasyon aralığında sitotoksik etki yaptığı belirtilmiştir (Nasr ve ark., 2014).

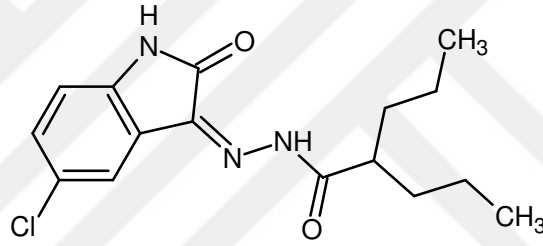


Küçüküz el ve ark. tolmetin etkin maddesinden başlayarak, çeşitli hidrazit-hidrazonlar sentezlemişlerdir. Bu moleküllerden N'-[(2,6-diklorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit yapısının antikanser özelliği HT-29 kolon kanseri hücre hattında in vitro olarak incelendiğinde; IC₅₀ değeri 76 μ M

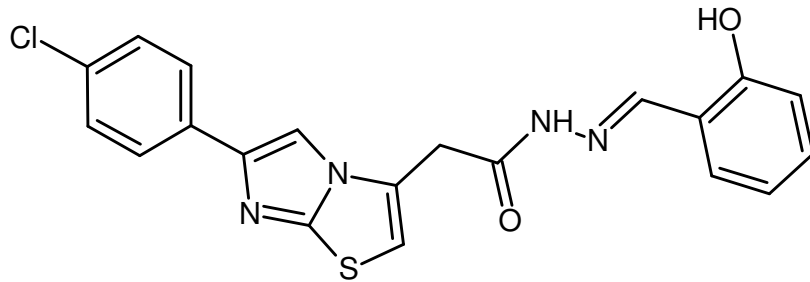
tespit edilmiştir. Ayrıca, apoptozu da aktif hale getirdiği belirlenmiştir (Küçükgül ve ark., 2015).



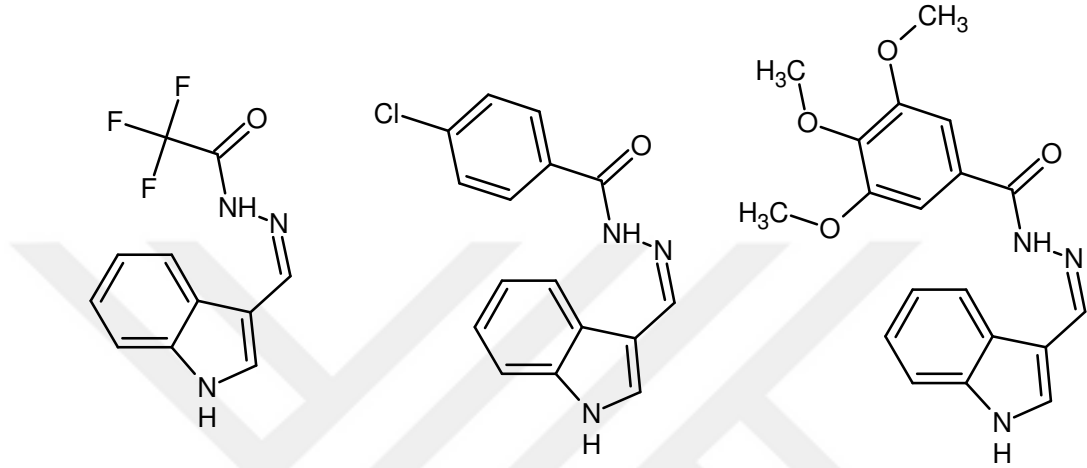
El-Faham ve ark. sentezledikleri N'-(5-kloro-2-oksoindolin-3-iliden)-2-propilpentan hidrazit bileşiğinin; HepG2 karaciğer, Jurkat lösemik T ve HEK-293 embriyonik böbrek kanser hücreleri üzerinde etkili olduğunu saptamışlardır (El-Faham ve ark., 2015).



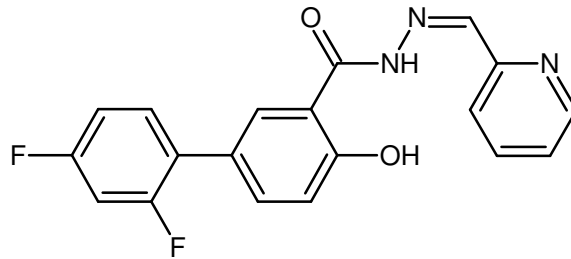
Karaman ve Ulusoy Güzeldemirci; [6-(4-klorofenil)imidazo[2,1-b]tiyazol-3-il] asetik asit hidrazit bileşiği üzerinden sentezledikleri 2-hidroksifenil yapısına sahip hidrazit türevinin; yumurtalık kanseri OVCAR-3, kolon kanseri HCT-15, böbrek kanseri CAKI-1 ve UO-31, lösemi CCRF-CEM ve SR hücre hatları üzerindeki $\log_{10}GI_{50}$ değerlerini sırasıyla -6,44, -6,33, -6,11, -6,30, -6,13, -6,22 şeklinde saptamışlardır (Karaman ve Ulusoy Güzeldemirci, 2016).



Sundaree ve ark. 1H-indol-3-karbaldehit ve aromatik/alifatik yapıdaki hidrazitlerin tepkimesi ile çeşitli hidrazit-hidrazon yapıları sentezlemiştir. Bunlardan triflorometil, 4-klorofenil ve 3,4,5-trimetoksifenil yapılarını içeren bileşiklerin, MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı IC₅₀ değerleri sırasıyla; 0,99 µM, 0,42 µM ve 0,87 µM olarak tespit edilmiştir (Sundaree ve ark., 2016).

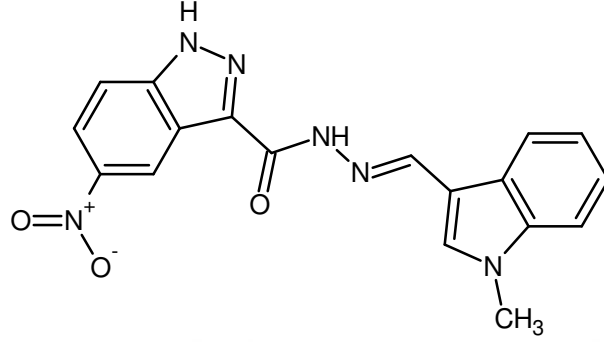


Şenkardeş ve ark. sentezledikleri diflunisal hidrazit-hidrazonlarının antikanser aktivitelerini incelemiştir ve bu bileşiklerden 2',4'-difluoro-4-hidroksi-N'-[(piridin-2-il)metiliden]bifenil-3-karbohidrazit yapısının, altı karaciğer kanser hücre hattında (Mahlavu, Huh7, HepG2, Hep3B, SNU-475, FOCUS) sitotoksik özelliğe sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Hücre çoğalmasını; 4,74 µM ve 16,21 µM arasındaki konsantrasyonlarda durdurduğu belirlenmiştir. En iyi sonuç Mahlavu kanser hattında 4,74 µM IC₅₀ değeri ile elde edilmiştir (Şenkardeş ve ark., 2016).

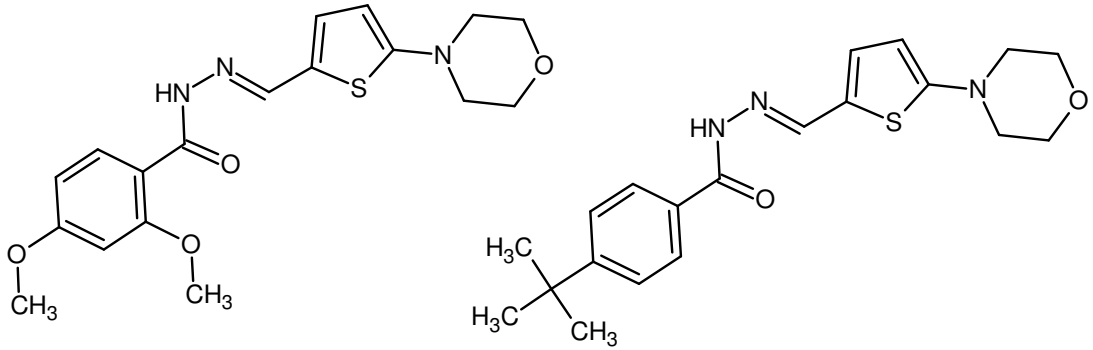


Sreenivasulu ve ark. indol ve indazol yapısına sahip on adet hidrazit-hidrazon molekülleri sentezlemiştir. Bileşiklerden biri olan N'-[(E)-(1-Metil-1H-indol-3-

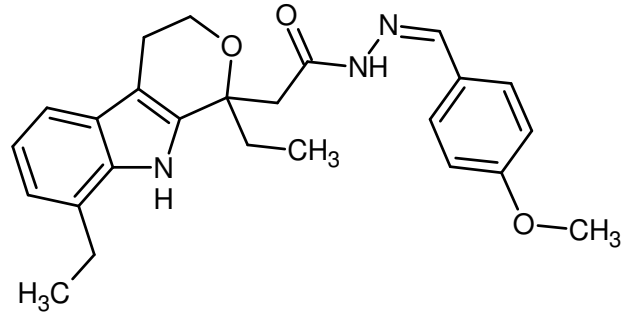
il)metiliden]-5-nitro-1H-indazol-3-karbohidrazit yapısının; 6,86-9,88 μM konsantrasyon aralığında HeLa rahim ağzı, MDA-MB-231 ve MCF-7 göğüs ve A549 akciğer kanser hücreleri üzerinde antikanser etkinliği tespit edilmiştir (Sreenivasulu ve ark., 2017).



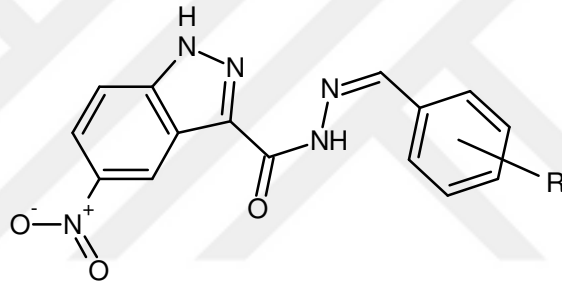
Taha ve ark. morfolinotiyofen yapısına sahip hidrazonları sentezlemişlerdir. Bunlardan (*E*)-2,4-dimetoksi-*N'*-((5-morfolinotiyofen-2-il)metilen)benzohidrazit bileşiği MCF-7 meme kanseri hücrelerinde; (*E*)-4(ter-butyl)-*N'*-((5-morfolinotiyofen-2-il)metilen)benzohidrazit ise HepG2 karaciğer hücrelerinde oldukça etkili sonuçlar vermiştir (Taha ve ark., 2017).



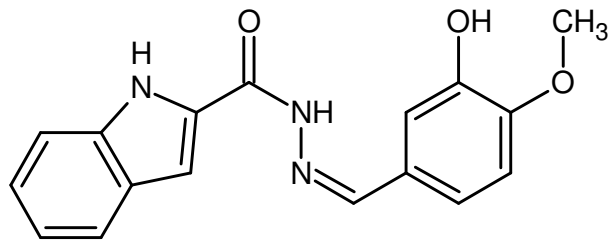
Koçyiğit Sevinç ve ark. bir etodolak hidrazit-hidrazon türevi olan 2-(1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetik asit[(4-metoksifenil)metilen] hidrazit molekülünün; HT-29 kolon kanser hattındaki IC_{50} değerini 70 μM olarak saptamışlardır (Koçyiğit Sevinç ve ark., 2018).



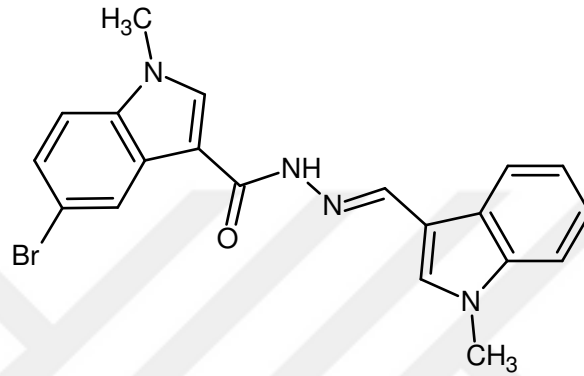
Rudavath ve ark. 5-nitro-1H-indazol-3-karbohidrazit bileşiğinin farklı süstitüentlere sahip benzaldehit ile tepkimesi sonucu oluşan hidrazonları sentezlemişlerdir. Bu yapıların dört kanser hücresindeki antikanser etkinliği farklıdır ve 0,37-32,7 μ M konsantrasyon aralığındadır (Rudavath ve ark., 2018).



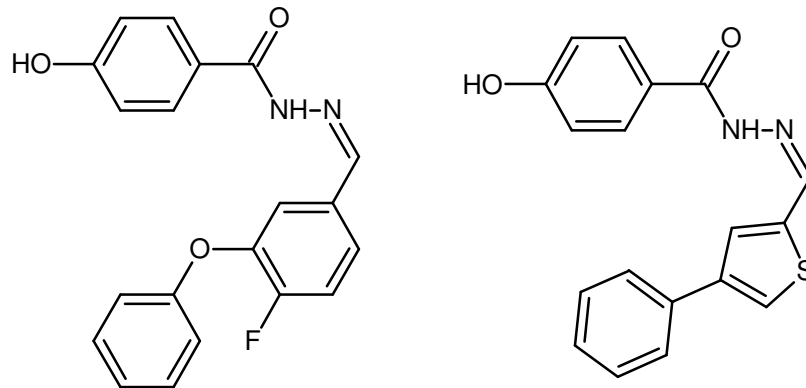
Demurtas ve ark. 1H-indol-2-karbohidrazitten türeyen hidrazonları sentezlemişlerdir. Lösemi K562 ve cilt kanseri Colo-38 hücrelerinde görülen yüksek antikanser etkinlik, N'-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-1H-indol-2-karbohidrazit yapısında tespit edilmiştir. Ayrıca, bu molekülde 4-metoksi süstitüenti yer almadığı durumlarda; antikanser etkinin oldukça azaldığı belirlenmiştir (Demurtas ve ark., 2019).



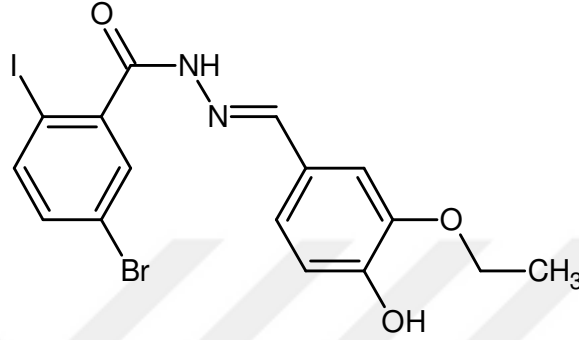
Sreenivasulu ve ark. bis(indolil) hidrazit-hidrazonları üzerine sentez ve antikanser çalışmaları yapmışlardır. Bu türevlerden biri olan 5-bromo-1-metil-N'-[(*E*)-(1-metil-1H-indol-3-il)metiliden]-1H-indol-3-karbohidrazit molekülünün, çeşitli kanser hücrelerine karşı çok iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Örneğin; A549 akciğer kanser hücrelerindeki IC₅₀ değeri 0,793 µM olarak saptanmıştır (Sreenivasulu ve ark., 2019).



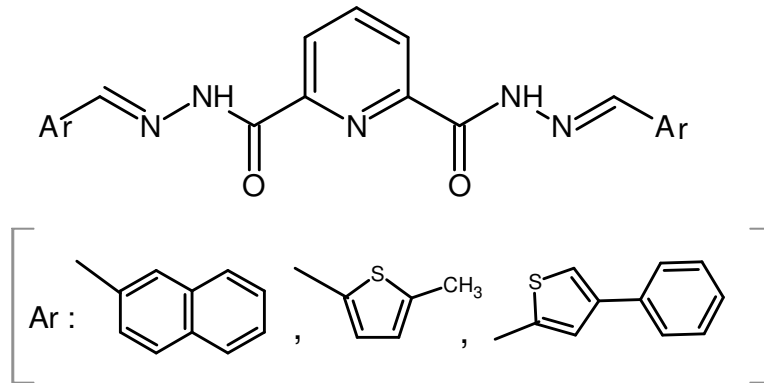
Han ve ark. etil parabenden başlayarak, hidrazit-hidrazon yapılarını sentezlemişlerdir ve bu bileşiklerin HepG2 karaciğer kanser hattındaki antikanser etkinliklerini değerlendirmişlerdir. Bunlardan N'-{[4-feniltiyofen-2-il]metiliden}-4-hidroksibenzohidrazit bileşiğinin IC₅₀ değerinin 37,4 µM; N'-{[4-floro-3-(fenoksi)fenil]metiliden}-4-hidroksibenzohidrazit yapısının ise 42,4 µM olduğu tespit edilmiştir (Han ve ark., 2020).



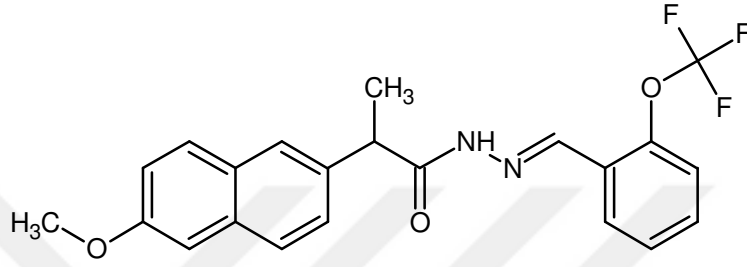
Popiolek ve ark. 5-bromo-2-iyodobenzoik asit yapısından başlayarak sentezledikleri hidrazit-hidrazonlarının; 769-P böbrek ve HepG2 karaciğer kanser hücreleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bu moleküllerden 5-bromo-2-iyodo-N-[(3-etoksi-4-hidroksifenil)metiliden]benzhidrazit, kanser hücrelerinin artışı önemli bir oranda ortadan kaldırmıştır (Popiolek ve ark., 2020).



Şenkardeş ve ark. 2,6-disüstituent piridin hidrazonlarını sentezlemişlerdir. Bunlardan N^2, N^6 -bis(naftalen-2-ilmetiliden)piridin-2,6-dikarbohidrazit yapısının, HT-29 kolon kanseri hattındaki IC_{50} değerinin $6,78 \mu M$ olduğu saptanırken; N^2, N^6 -bis[(4-feniltiyofen-2-il)metiliden]piridin-2,6-dikarbohidrazit için ise; $8,88 \mu M$ olduğu sonucuna varılmıştır. Ishikawa endometrial kanser hücresi incelendiğinde de; N^2, N^6 -bis[(5-metiltiyofen-2-il)metiliden]piridin-2,6-dikarbohidrazit molekülünün $8,26 \mu M$ değer ile antikanser özelliği belirlenmiştir. Ayrıca bu bileşiklerin, programlı hücre ölümünü de aktifleştirdiği tespit edilmiştir (Şenkardeş ve ark., 2021).



Han ve ark. (S)-Naproksen üzerinden çeşitli hidrazit-hidrazonlar sentezlemişlerdir ve bu bileşiklerin MDA-MB-231 ve MCF-7 göğüs kanseri hücre hatları üzerindeki antikanser etkilerini incelemişlerdir. En iyi sonucu; MDA-MB-231 ve MCF-7 kanser hücrelerine karşı sırasıyla 22,42 μ M ve 59,81 μ M IC₅₀ değerleri ile etki gösteren (S)-2-(6-metoksinaftalen-2-il)-N'-{(E')-[2-(triflorometoksi)fenil]metiliden} propanhidrazit türevinin verdiği belirlenmiştir (Han ve ark., 2021).



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

5.1.1. Kimyasal maddeler

Etodolak^{*}, hidrazin hidrat, 2,4-diklorobenzaldehit, 2,6-diklorobenzaldehit, 3,4-diklorobenzaldehit, 4-bromobenzaldehit, 2-kloro-3-metoksibenzaldehit, 4-metoksi-3-nitrobenzaldehyt, 5-bromo-2-metoksibenzaldehit, 3-hidroksi-4-metoksibenzaldehit, 2,5-dimetoksibenzaldehit, 2,6-dimetoksibenzaldehit, 3,4-dimetoksibenzaldehit, 2,4,6-trimetilbenzaldehyt, derişik sülfürük asit, sodyum bikarbonat, petrol eteri, metanol, etil asetat, aseton, kloroform, etanol (CuSO₄ ile kurutulmuş).

5.1.2. Elektronik cihazlar

Su Banyosu	GFL-1042, Memmert
Erime Derecesi Cihazı	Schmelzpunktbestimmer SMP II
FT-IR Spektrofotometresi	Perkin Elmer FT-IR Spectrum BX
Terazi	Sartorius A200S, Mettler Toledo
Elementel Analiz Cihazı	LECO CHNS-932
¹H-NMR Spektroskopisi	BRUKER 300 MHz Ultrashield TM

5.2. Sentez Çalışmaları

5.2.1. Metil (1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetat [1]

Metanol (16 mL) içinde çözüldürülen etodolak (0,01 mol) üzerine derişik sülfürük asit (0,5 mL) ilavesi ile elde edilen reaksiyon karışımı; 3 saat geri çeviren soğutucu altında su banyosunda ısıtılır. İnce tabaka kromatografisi takibi ile reaksiyon bitirildikten sonra ortam soğutulur. Sonra buz banyosu içerisinde % 5'lik NaHCO₃ ile ortam nötralize edilir ve ardından su ile yıkanır. Elde edilen ürün petrol eteri ile yıkanarak saflaştırılır.

^{*}: Etken madde Bilim İlaç A. Ş.'den temin edilmiştir.

5.2.2. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetohidrazit [2]

Metanol (20 mL) içinde çözüldürülen bileşik [1] (0,01 mol) üzerine hidrazin hidrat (%80'lik, 7 mL) ilave edilir. Oluşan reaksiyon karışımı; geri çeviren soğutucu altında su banyosunda ince tabaka kromatografisi takibinde 3 saat ısıtılır. Reaksiyon bitiminden sonra ortam soğutularak elde edilen katı madde; süzülür, kurutulur ve petrol eteri ile yıkanarak saflaştırılır.

5.2.3. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit [(süstitüefenil)metilen] hidrazidi [3a-l]

Etanolde (CuSO₄ ile kurutulmuş) çözüldürülen bileşik [2] (0,0075 mol) üzerine yine etanolde çözüldürülen süstitüe benzaldehit (0,0075 mol) ilave edilmesi ile hazırlanan reaksiyon karışımı; geri çeviren soğutucu altında su banyosu üzerinde 3 saat ısıtılır. İnce tabaka kromatografisi takibi ile reaksiyon bitirildikten sonra elde edilen katı madde; süzülür, kurutulur ve etanol ile kristallendirilir.

3a: 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,4-diklorofenil)metilen] hidrazidi

3b: 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,6-diklorofenil)metilen] hidrazidi

3c: 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(3,4-diklorofenil)metilen] hidrazidi

3d: 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(4-bromofenil)metilen] hidrazidi

3e: 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2-kloro-3-metoksifenil)metilen] hidrazidi

3f: 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(4-metoksi-3-nitrofenil)metilen] hidrazidi

3g: 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(5-bromo-2-metoksifenil)metilen] hidrazidi

- 3h:** 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(3-hidroksi-4-metoksifenil)metilen] hidrazidi
- 3i:** 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,5-dimetoksifenil)metilen] hidrazidi
- 3j:** 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,6-dimetoksifenil)metilen] hidrazidi
- 3k:** 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(3,4-dimetoksifenil)metilen] hidrazidi
- 3l:** 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,4,6-trimetilfenil)metilen] hidrazidi

5.3. Kromatografik Çalışmalar

Sentezlenen maddelerin reaksiyon takibi ve safsızlık kontrolleri ince tabaka kromatografisi metodu ile yapılmıştır. İ.T.K. çalışmalarında, adsorban olarak 0,2 mm kalınlığındaki 20×20 cm hazır silikajel plakları (Merck F-254) kullanılmıştır. Kullanılan çözücü sistemleri kromatografik çalışmalara uygun olarak hazırlanıp; oranları aşağıdaki gibidir:

- M₁: Petrol eteri: Aseton (60:40, h:h)
- M₂: Petrol eteri: Etil asetat (60: 40, h:h)
- M₃: Petrol eteri: Etil asetat (30:70, h:h)

Kromatografi tanklarına belirtilen çözücülerden uygun olanı (yaklaşık 10 mL) konularak çözücü buharıyla doyması sağlanmıştır. Doygunluğa ulaşıldıktan sonra; etodolak ve sentez maddeleri etanol ile seyreltilerek plağa tatbik edilmiştir. Sürüklenme bittikten sonra $R_f \times 100$ değerleri (25 °C’de), dalga boyu 254 nm olan UV lambası altında lekeler işaretlendikten sonra hesaplanmıştır. Sentezlenen bileşikler UV ışık altında mor renk vermiştir.

5.4. Biyolojik Çalışmalar

5.4.1. Antikanser etki çalışmaları

Etodolak, etodolak hidrazidi [2] ve etodolak etkin maddesi üzerinden sentezlenen hidrazit-hidrazon yapısına sahip bileşiklerin [3a-1]; PC-3, DU-145 ve LNCaP prostat kanseri hücre hatları üzerindeki canlılık ve sitotoksosite çalışmaları in vitro olarak Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

PC-3, DU-145 ve LNCaP prostat kanseri hücreleri 37 °C'de % 5 CO₂ içeren ortamda, RPMI-1640 besiyerinde inkübe edilmiştir. Hücreler; ilaç uygulanmayan kontrol grubu ve artan konsantrasyonlarda (10, 25, 50, 75, 100 µM) etodolak ve etodolak türevi bileşiklerin uygulandığı deney grubu olacak şekilde çalışılmıştır. Hücre canlılık ve sitotoksosite analizi için; WST-8 tetrazolyum tuzunun, turuncu formazan ürününe indirgenmesi prensibine dayanan WST-8 kolorimetrik yöntemi kullanılmıştır. Bu testte; her kuyuda 3000 hücre ve 100 µL besiyeri olacak şekilde 96 kuyulu plakaya ekim yapılmıştır ve hücrelerin yapışması için plakalar gece boyu inkübasyona kaldırılmıştır. Bileşikler (etodolak ve etodolak türevleri) uygun konsantrasyonlarda hazırlanarak; kontrol ve deney grubuna 3 tekrar olacak şekilde uygulanmıştır. İnkübasyon periyodu olarak 24 saatin geçmesinin ardından; kuyulardaki besiyeri, taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Her kuyuya 10 µL WST-8 solüsyonu eklenmiştir (Cell Counting Kit-8, KTC011001, Abbkine). Bu işlemten 4 saat sonra ise; plakaların 450 nm'de absorbans ölçümü mikroparka okuyucusu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Synergy H1, BioTek Instruments Inc., USA). İstatiksel analizler için GraphPad Prism 8 programı kullanılmıştır.

5.4.2. Apoptoz etki çalışmaları

5.4.2.1. Mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi

Etodolak etkin maddesinin ve sentezlenen **3b** bileşiğinin PC-3, DU-145, LNCaP hücre hatlarındaki apoptotik etkileri, JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli testi kullanılarak Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda incelenmiştir. Bu JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli testi; [5,5,6,6-tetrakloro-1,1,3,3-tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür] kimyasal yapısına sahip JC-1 boyasının, mitokondriye girerek sağlıklı ve apoptotik hücrelerde farklı floresans

yoğunluğu vermesine dayanmaktadır (JC-1 Mitochondrial Membrane Assay Kit, 10009172, Cayman Chemical). Bu boya sağlıklı hücrelerde J agregaları oluşturarak kırmızı floresans verirken, apoptotik hücrelerde monomerik yapıda kalarak yeşil floresans vermektedir. Yeşil/kırmızı floresans oranına bakılarak apoptoza bağlı depolarizasyon hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. Bu bilgiye dayanılarak; her kuyuda 50 000 hücre ve 100 µL RPMI-1640 besiyeri olacak şekilde 96 kuyulu siyah plakaya ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması için plakalar 37 °C, % 5 CO₂ içeren ortamda gece boyu inkübasyona kaldırılmıştır. Besiyeri tazesıyla değiştirildikten sonra; **3b** ve etodolak bileşikleri farklı konsantrasyonlarda (10, 25, 50, 75, 100 µM) hazırlanıp hücrelere uygulanmıştır ancak kontrol grubuna uygulanmamıştır. Besiyeri 24 saat sonra tekrar değiştirilmiştir ve JC-1 boyası RPMI-1640 besiyerinde 1:9 oranında seyreltilmiştir. Her kuyuya seyreltilmiş JC-1 boyasından 5'er µL eklenmiştir ve 30 dakika inkübe edilmiştir. Plakalar 2100 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant atılmıştır. Her kuyuya 150 µL tampon solüsyonu eklendikten sonra santrifüj ve tamponlama işlemi bir kez daha tekrarlanmıştır. Son kez daha santrifüj yapılmıştır ve her kuyuya 100 µL tampon solüsyonu eklenmiştir. Mikroplaka okuyucu kullanılarak floresans yoğunluğu sırasıyla sağlıklı hücrelerde 535/595 nm; apoptotik hücrelerde 485/535 nm uyarma ve emisyon dalga boylarında ölçülmüştür.

5.4.2.2. Annexin V/PI apoptoz tayini

Etodolak, etodolak hidrazidi [2] ve sentezlenen **3b** bileşiğinin PC-3, DU-145, LNCaP hücre hatlarındaki apoptotik etkileri, Annexin V/PI yöntemi ile Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda çalışılmıştır. Apoptotik ve nekrotik hücreleri görüntülemek için; PC-3, DU-145 ve LNCaP hücre hatlarında Annexin V ve propidyum iyodür (PI) ile boyama yapılmıştır (Tali Apoptosis Kit, A10788, Invitrogen). Apoptotik hücrelerde Annexin V, membranın dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserinlere bağlanmaktadır ve yeşil floresans vermektedir. Nekrotik hücrelerde ise; membran bütünlüğü kaybolmaktadır ve PI hücre çekirdeğine girerek kırmızı floresans vermektedir. Bu prensibe dayanarak; hücreler her kuyuda 500 000 hücre ve 2 mL RPMI-1640 besiyeri olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekilmiştir. Plakalar bir gece boyunca 37 °C, % 5 CO₂ içeren etüvde bekletilmiştir. Ertesi gün

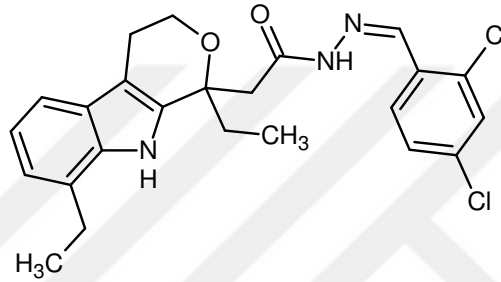
besiyeri tazeisiyle değiştirilmiştir ve uygun konsantrasyonlarda ilaç eklenmiştir. Hücreler, 24 saatlik inkübasyon sonrası tripsinizasyon işlemi ile kaldırılmıştır ve eppendorflara alınmıştır. Daha sonra 2400 rpm’de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Her eppendorfa 100 μ L 1X Annexin bağlama tamponu ve 5 μ L Annexin V eklenerek pipetaj yapılmıştır. Karanlık ortamda 20 dakika inkübe edildikten sonra 2400 rpm’de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Bu kez her eppendorfa 100 μ L 1X Annexin bağlama tamponu ve 1 μ L PI eklenip pipetaj gerçekleştirilmiştir. Karanlık ortamda 5 dakikalık inkübasyonun ardından floresans mikroskopunda incelenen apoptotik ve nekrotik hücre görüntüleri bilgisayara kaydedilmiştir (CKX41, Olympus LS).

6. BULGULAR

6.1. Fiziksel, Kimyasal ve Spektroskopik Bilgiler

6.1.1. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,4-diklorofenil)metilen] hidrazidi [3a]

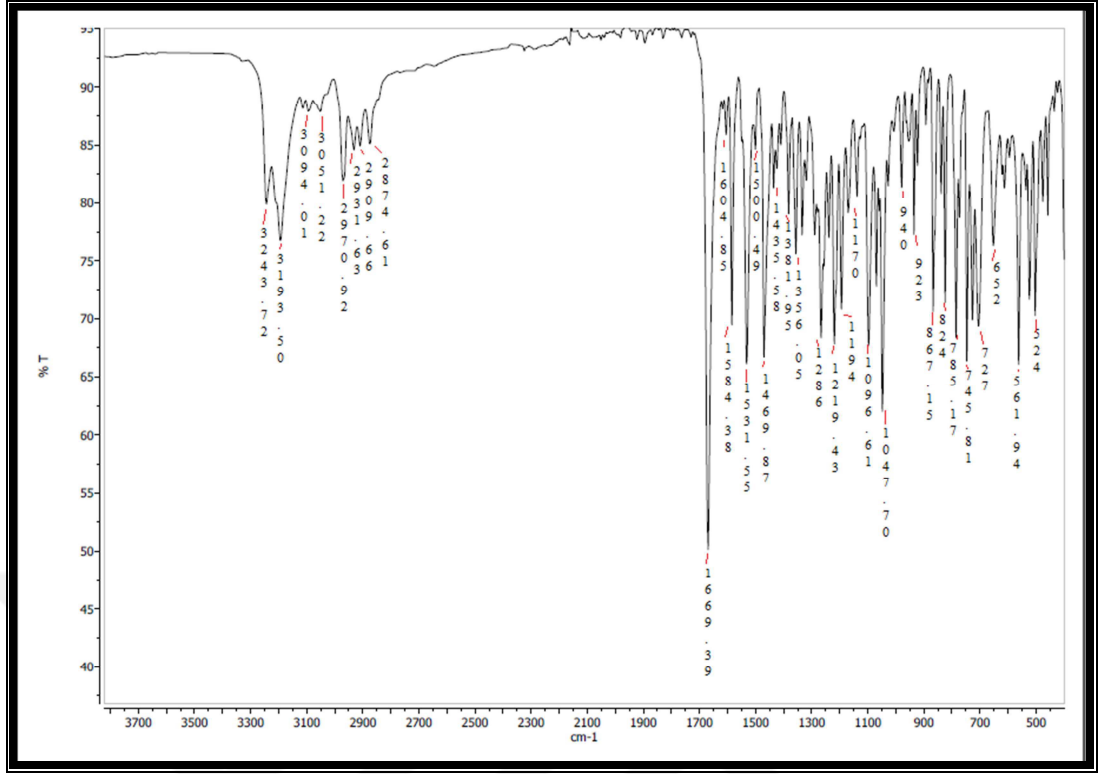
Bileşik 2'den 2,26 g (0,0075 mol) tartılır, 30 mL etanol ve 1,31 g (0,0075 mol) 2,4-diklorobenzaldehit'ten hareketle 5.2.3'te verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün etanol ile kristallendirilerek saflaştırılır.



- Verim: % 44,77
- $R_f \times 100$: 63 (M_2), t: 25 °C
- Açık krem renkte toz madde
- E.n.: 177-178 °C
- Su, metanol, etanolde çözünmez; aseton, kloroform, DMSO içerisinde çözünür.
- Analiz: $C_{24}H_{25}Cl_2N_3O_2$ (M.A.: 458,380 g/mol)
Hesaplanan (%): C (62,89); H (5,50); N (9,17)
Bulunan (%) : C (62,37); H (5,44); N (9,13)

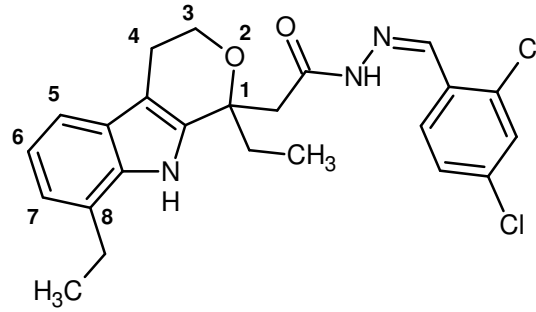
FT-IR Spektrumu:

ν_{maks} (cm^{-1}): 3244, 3194 (indol ve hidrazon N-H g.b.); 3094, 3051 (aromatik =C-H g.b.); 2971, 2932 (-CH₃ asimetrik C-H g.b.); 2875 (-CH₃ simetrik C-H g.b.); 1669 (hidrazon C=O g.b.); 1605 (hidrazon C=N g.b.); 1584, 1531, 1500, 1470, 1436 (aromatik C=C g.b., indol ve hidrazon N-H e.b. C-N g.b.); 1381, 1356 (-CH₃ asimetrik ve simetrik C-H e.b.); 1219 (piran halkasındaki C-O g.b.); 1096 (Ar-Cl); 923 (1,2,3 trisüstitüe benzen); 785, 745 (monosüstitüe benzen) (Şekil 6).

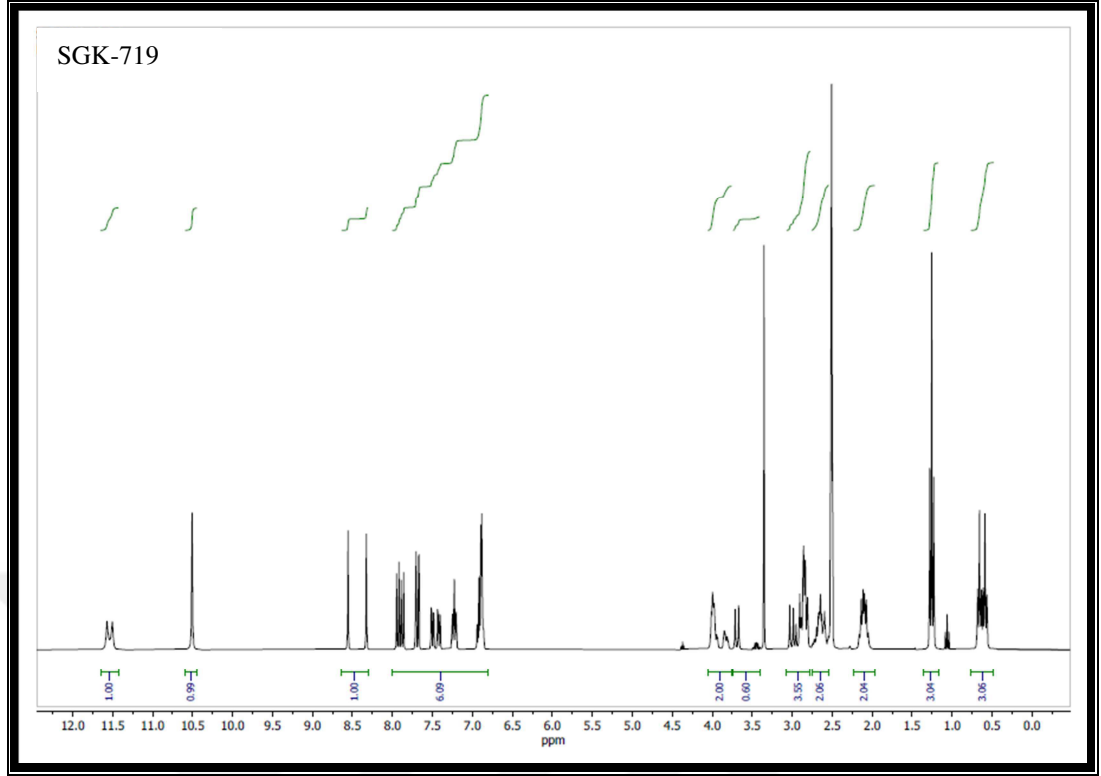


Şekil 6. **3a** bileşiğinin FT-IR spektrumu.

¹H-NMR Spektrumu:



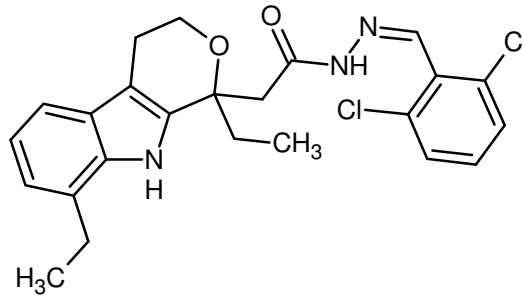
(300 MHz) (DMSO-*d*₆/TMS) δ ppm: 0,59, 0,66 (3H, tt, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,25 (3H, t, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,05-2,16 (2H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,52 (çözücü piki); 2,58-2,70 (2H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,81-3,71 (4H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CO-NH-, 4 konumundaki -CH₂- ve çözücüye ait su piki); 3,81-4,01 (2H, m, 3 konumundaki -CH₂); 6,85-7,95 (6H, m, Ar-H); 8,33, 8,56 (1H, ss, -N=CH); 10,51 (1H, s, indol N-H); 11,54 (1H, d, $J=19,8$ Hz, -CO-NH-) (Şekil 7).



Şekil 7. **3a** bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.

6.1.2. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,6-diklorofenil)metilen] hidrazidi [**3b**]

Bileşik **2**'den 2,26 g (0,0075 mol) tartılır, 30 mL etanol ve 1,31 g (0,0075 mol) 2,6-diklorobenzaldehit'ten hareketle 5.2.3'te verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün etanol ile kristallendirilerek saflaştırılır.

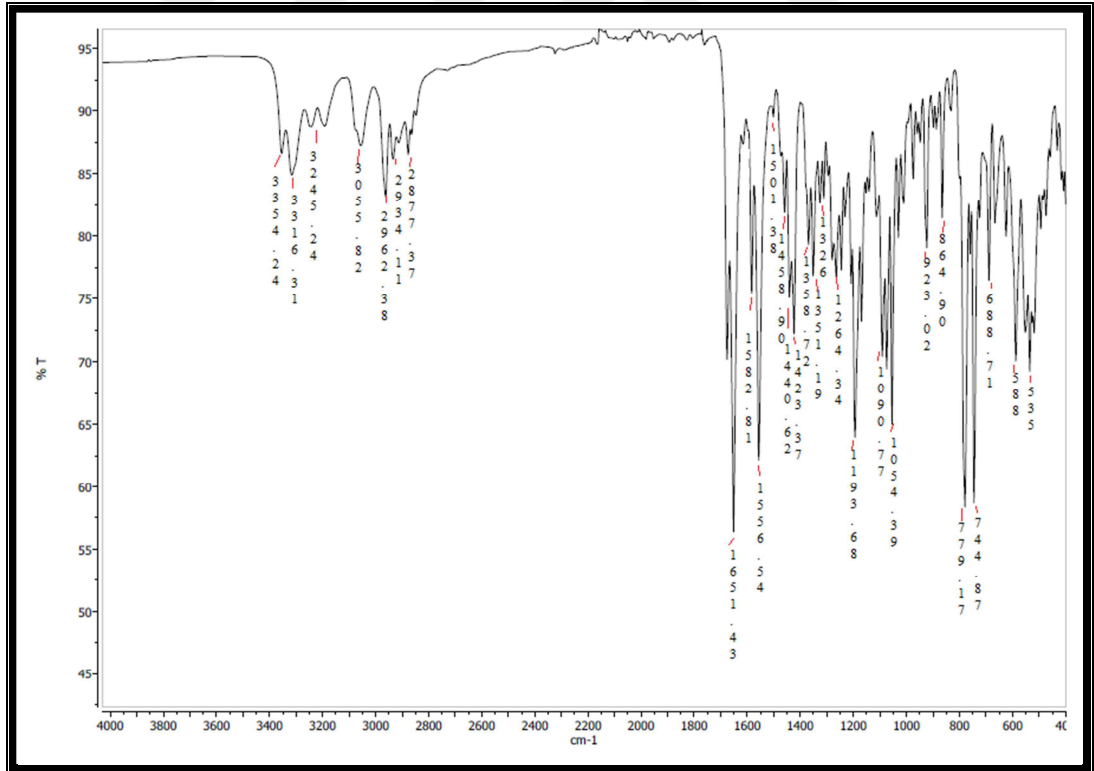


- Verim: % 51,74
- $R_f \times 100$: 66 (M_2), t: 25 °C
- Beyaz renkte toz madde

- E.n.: 166 °C
- Su, metanol, etanolde çözünmez; aseton, kloroform, DMSO içerisinde çözünür.
- Analiz: $C_{24}H_{25}Cl_2N_3O_2$ (M.A.: 458,380 g/mol)
Hesaplanan (%): C (62,89); H (5,50); N (9,17)
Bulunan (%) : C (62,21); H (5,37); N (9,18)

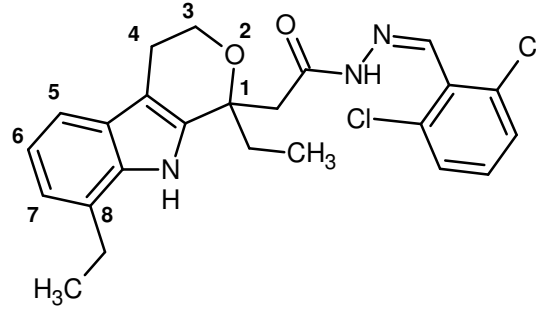
FT-IR Spektrumu:

ν_{maks} (cm^{-1}): 3354, 3316, 3245 (indol ve hidrazon N-H g.b.); 3056 (aromatik =C-H g.b.); 2962, 2934 (-CH₃ asimetrik C-H g.b.); 2877 (-CH₃ simetrik C-H g.b.); 1651 (hidrazon C=O g.b.); 1583 (hidrazon C=N g.b.); 1556, 1459, 1441, 1423 (aromatik C=C g.b., indol ve hidrazon N-H e.b. C-N g.b.); 1351, 1326 (-CH₃ asimetrik ve simetrik C-H e.b.); 1193 (piran halkasındaki C-O g.b.); 1091 (Ar-Cl); 923 (1,2,3 trisüstitüe benzen); 779, 744 (monosüstitüe benzen) (Şekil 8).

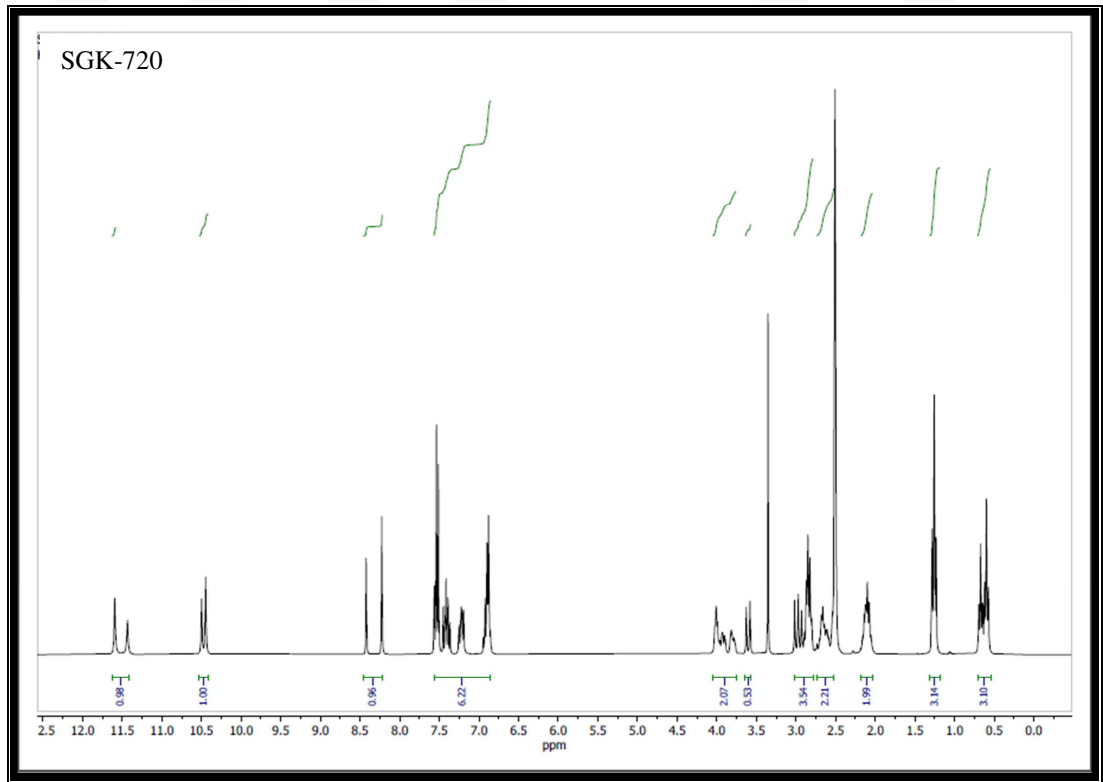


Şekil 8. **3b** bileşiğinin FT-IR spektrumu.

¹H-NMR Spektrumu:



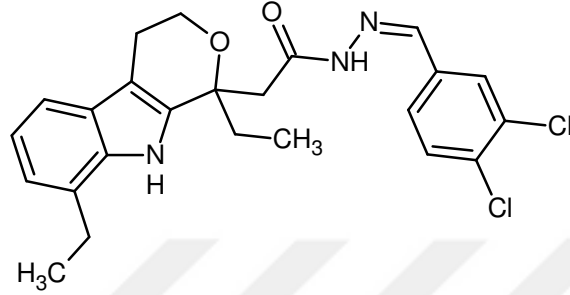
(300 MHz) (DMSO-*d*₆/TMS) δ ppm: 0,60, 0,67 (3H, tt, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,23-1,29 (3H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,05-2,16 (2H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,50 (özücü piki); 2,59-2,82 (2H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,85-3,63 (4H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CO-NH-, 4 konumundaki -CH₂- ve çözücüye ait su piki); 3,78-4,00 (2H, m, 3 konumundaki -CH₂); 6,86-7,56 (6H, m, Ar-H); 8,22, 8,42 (1H, ss, -N=CH); 10,47 (1H, d, $J=15,3$ Hz, indol N-H); 11,43, 11,59 (1H, ss, -CO-NH-) (Şekil 9).



Şekil 9. **3b** bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

6.1.3. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(3,4-diklorofenil)metilen] hidrazidi [3c]

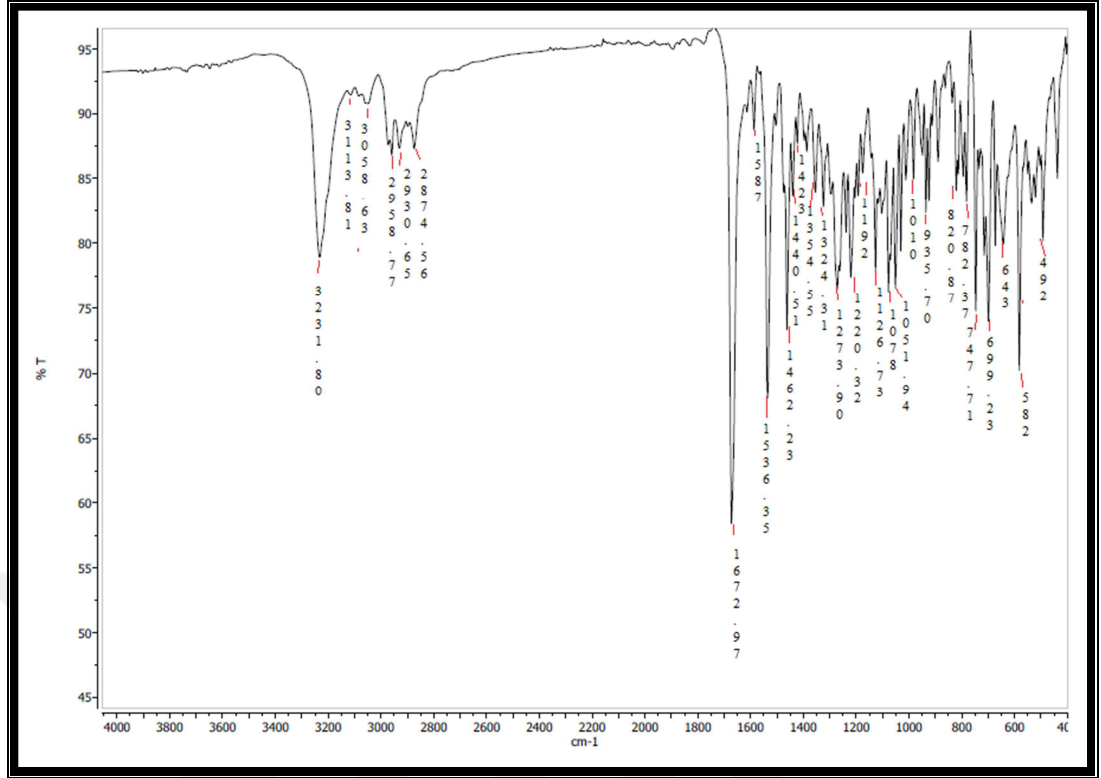
Bileşik 2'den 2,26 g (0,0075 mol) tartılır, 30 mL etanol ve 1,31 g (0,0075 mol) 3,4-diklorobenzaldehit'ten hareketle 5.2.3'te verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün etanol ile kristallendirilerek saflaştırılır.



- Verim: % 49,78
- $R_f \times 100$: 48 (M_2), t: 25 °C
- Beyaz renkte toz madde
- E.n.: 197-201 °C
- Su, metanol, etanolde çözünmez; aseton, kloroform, DMSO içerisinde çözünür.
- Analiz: $C_{24}H_{25}Cl_2N_3O_2 \cdot 1/2H_2O$ (M.A.: 467,388 g/mol)
Hesaplanan (%): C (61,67); H (5,61); N (8,99)
Bulunan (%) : C (61,93); H (5,04); N (9,05)

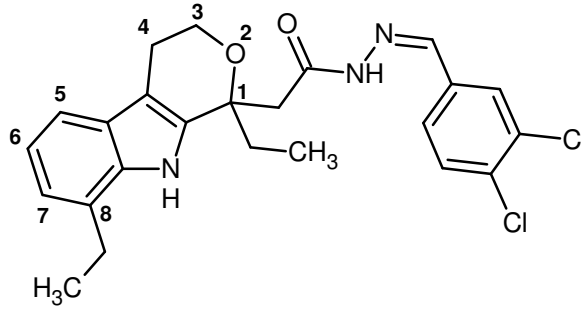
FT-IR Spektrumu:

ν_{maks} (cm^{-1}): 3750-3400 (molekölün tuttuğu suyun OH g.b.); 3232 (indol ve hidrazon N-H g.b.); 3114, 3059 (aromatik =C-H g.b.); 2959, 2931 (-CH₃ asimetric C-H g.b.); 2874 (-CH₃ simetric C-H g.b.); 1673 (hidrazon C=O g.b.); 1587 (hidrazon C=N g.b.); 1536, 1462, 1440, 1423 (aromatik C=C g.b., indol ve hidrazon N-H e.b. C-N g.b.); 1354, 1324 (-CH₃ asimetric ve simetric C-H e.b.); 1220 (piran halkasındaki C-O g.b.); 1078 (Ar-Cl); 936 (1,2,3 trisüstitüe benzen); 794, 747 (monosüstitüe benzen) (Şekil 10).

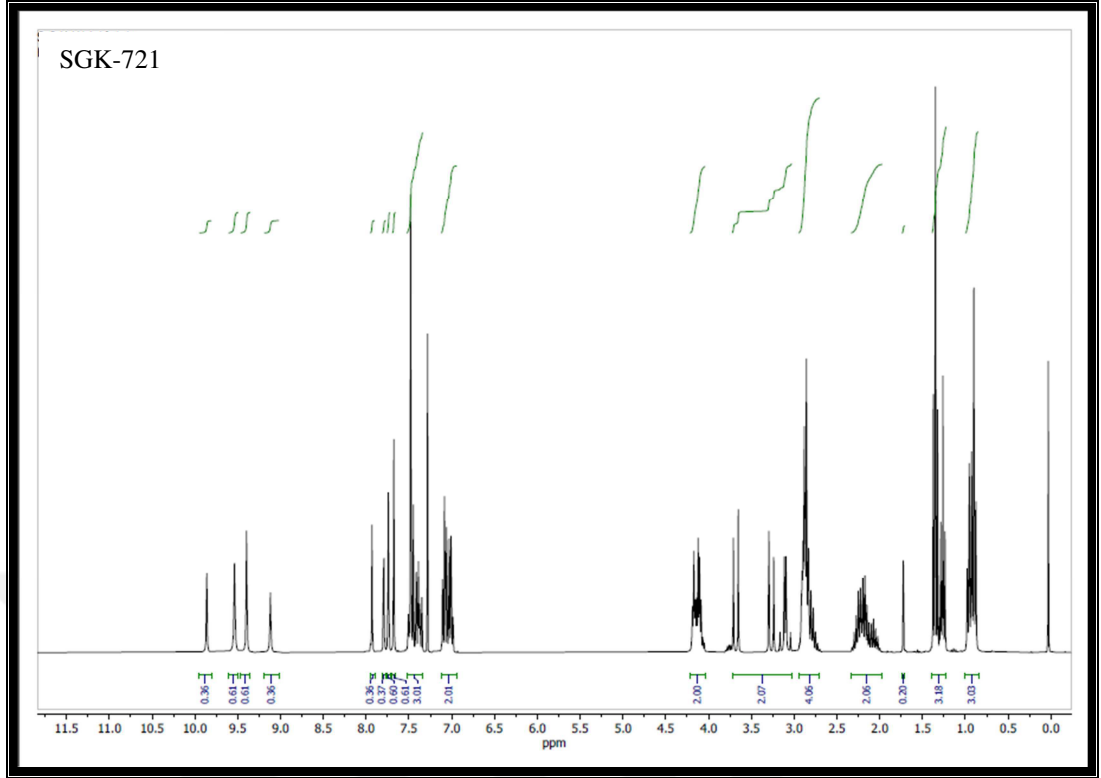


Şekil 10. **3c** bileşiğinin FT-IR spektrumu.

¹H-NMR Spektrumu:



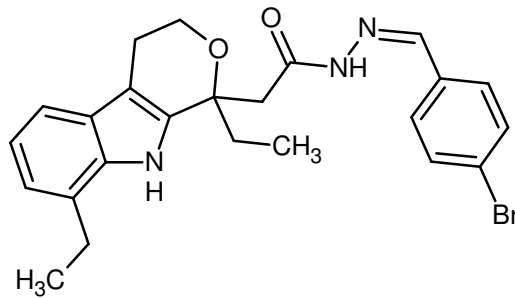
(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 0,88-0,98 (3H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,24-1,37 (3H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,72 (çözücüye ait su piki); 2,02-2,27 (2H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,79-3,71 (6H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CO-NH, 4 konumundaki -CH₂); 4,07-4,19 (2H, m, 3 konumundaki -CH₂); 6,99-7,51, 7,79-7,93 (6H, m, Ar-H ve çözücü piki); 7,68, 7,74 (1H, ss, -N=CH); 9,40, 9,54 (1H, ss, indol N-H); 9,12, 9,86 (1/2 H, ss, -CO-NH-) (Şekil 11).



Şekil 11. **3c** bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.

6.1.4. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(4-bromofenil)metilen] hidrazidi [**3d**]

Bileşik **2**'den 2,26 g (0,0075 mol) tartılır, 30 mL etanol ve 1,39 g (0,0075 mol) 4-bromobenzaldehit'ten hareketle 5.2.3'te verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün etanol ile kristallendirilerek saflaştırılır.

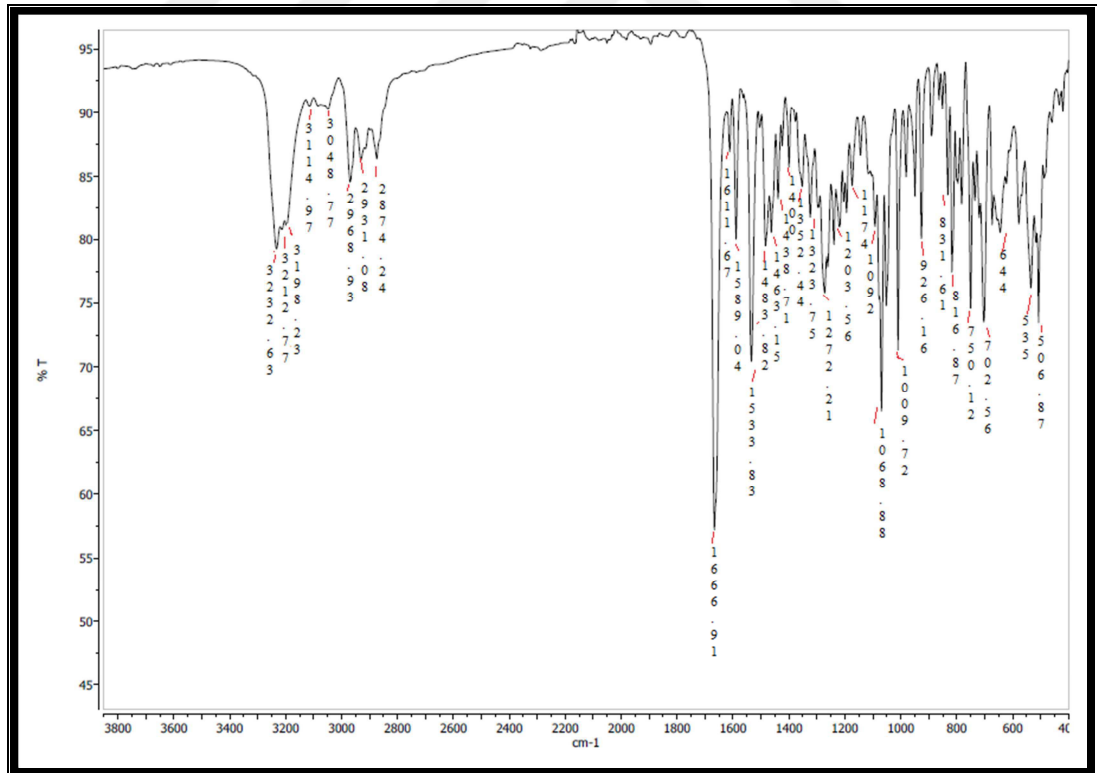


- Verim: % 46,15
- $R_f \times 100$: 43 (M_2), t: 25 °C
- Beyaz renkte toz madde

- E.n.: 182 °C
- Su, metanol, etanolde çözünmez; aseton, kloroform, DMSO içerisinde çözünür.
- Analiz: $C_{24}H_{26}BrN_3O_2$ (M.A.: 468,386 g/mol)
Hesaplanan (%): C (61,54); H (5,60); N (8,97)
Bulunan (%) : C (61,68); H (5,37); N (9,03)

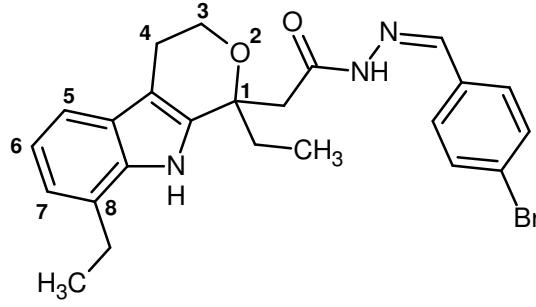
FT-IR Spektrumu:

ν_{maks} (cm^{-1}): 3233, 3213, 3198 (indol ve hidrazon N-H g.b.); 3115, 3049 (aromatik =C-H g.b.); 2969, 2931 (-CH₃ asimetrik C-H g.b.); 2874 (-CH₃ simetrik C-H g.b.); 1667 (hidrazon C=O g.b.); 1612 (hidrazon C=N g.b.); 1589, 1534, 1484, 1463, 1438, 1400 (aromatik C=C g.b., indol ve hidrazon N-H e.b. C-N g.b.); 1352, 1324 (-CH₃ asimetrik ve simetrik C-H e.b.); 1204 (piran halkasındaki C-O g.b.); 1069 (Ar-Br); 832 (1,4 disüstitüe benzen); 750 (monosüstitüe benzen) (Şekil 12).

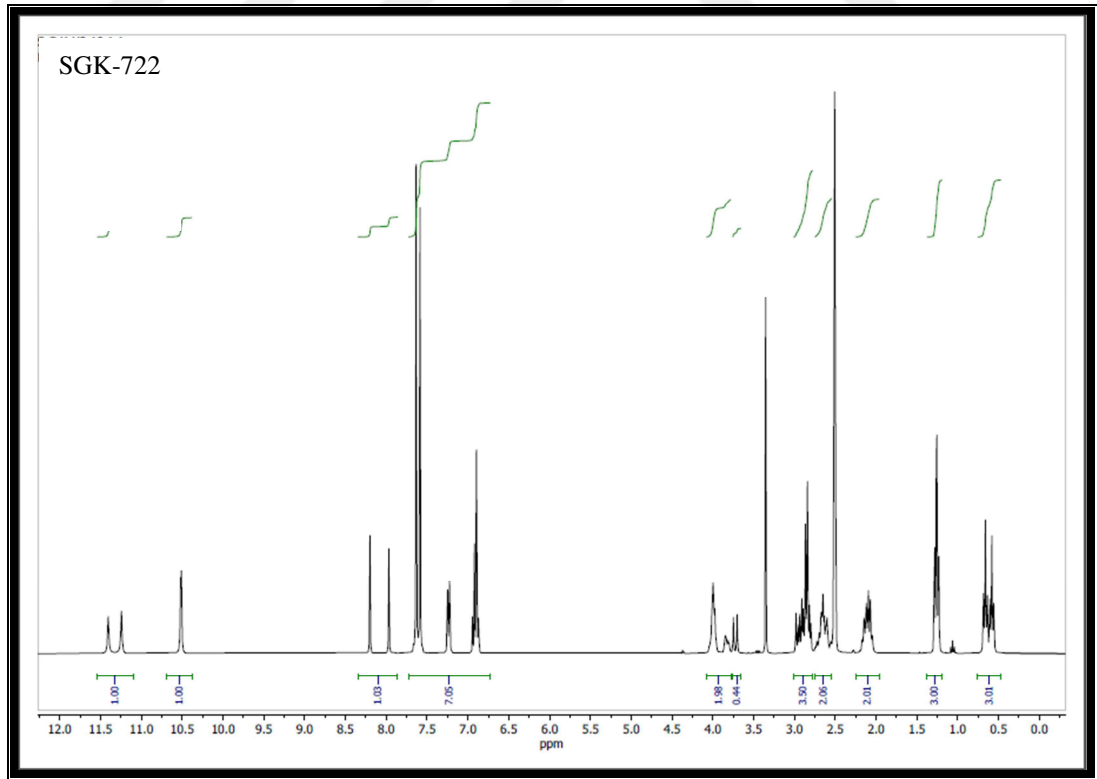


Şekil 12. **3d** bileşiğinin FT-IR spektrumu.

¹H-NMR Spektrumu:



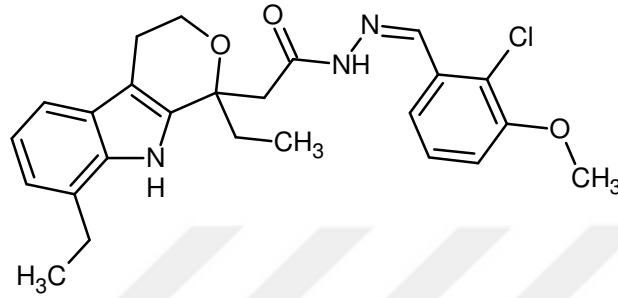
(300 MHz) (DMSO-d₆/TMS) δ ppm: 0,58, 0,66 (3H, tt, 1 no.lu karbona bağı -CH₂-CH₃); 1,23-1,29 (3H, m, 8 no.lu karbona bağı -CH₂-CH₃); 2,05-2,17 (2H, m, 1 no.lu karbona bağı -CH₂-CH₃); 2,51 (çözücü piki); 2,60-2,73 (2H, m, 8 no.lu karbona bağı -CH₂-CH₃); 2,80-3,75 (4H, m, 1 no.lu karbona bağı -CH₂-CO-NH-, 4 konumundaki -CH₂- ve çözücüye ait su piki); 3,80-4,04 (2H, m, 3 konumundaki -CH₂); 6,87-7,63 (7H, m, Ar-H); 7,97, 8,21 (1H, ss, -N=CH); 10,51 (1H, d, $J=2,4$ Hz, indol N-H); 11,24, 11,41 (1H, ss, -CO-NH-) (Şekil 13).



Şekil 13. **3d** bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

6.1.5. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2-kloro-3-metoksifenil)metilen] hidrazidi [3e]

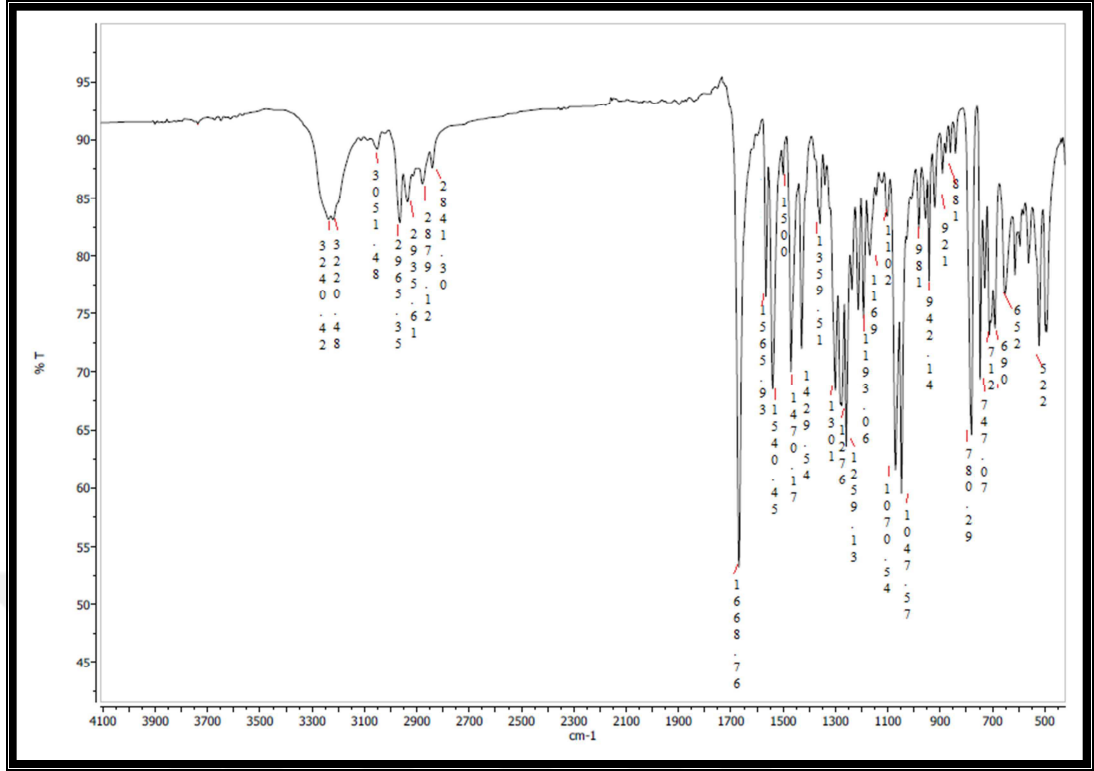
Bileşik 2'den 2,26 g (0,0075 mol) tartılır, 30 mL etanol ve 1,28 g (0,0075 mol) 2-kloro-3-metoksibenzaldehit'ten hareketle 5.2.3'te verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün etanol ile kristallendirilerek saflaştırılır.



- Verim: % 52,34
- $R_f \times 100$: 58 (M_2), t: 25 °C
- Açık krem renkte toz madde
- E.n.:183 °C
- Su, metanol, etanolde çözünmez; aseton, kloroform, DMSO içerisinde çözünür.
- Analiz: $C_{25}H_{28}ClN_3O_3 \cdot 1/2H_2O$ (M.A.: 462,969 g/mol)
Hesaplanan (%): C (64,86); H (6,31); N (9,08)
Bulunan (%) : C (65,23); H (5,79); N (9,24)

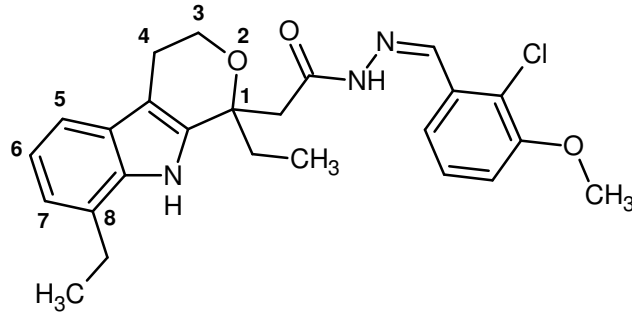
FT-IR Spektrumu:

ν_{maks} (cm^{-1}): 3750-3400 (molekülün tuttuğu suyun OH g.b.); 3240, 3220 (indol ve hidrazon N-H g.b.); 3051 (aromatik =C-H g.b.); 2965, 2936 (-CH₃ asimetric C-H g.b.); 2879, 2841 (-CH₃ simetric C-H g.b.); 1669 (hidrazon C=O g.b.); 1566 (hidrazon C=N g.b.); 1540, 1500, 1470, 1430 (aromatik C=C g.b., indol ve hidrazon N-H e.b. C-N g.b.); 1359, 1341, 1301 (-CH₃ asimetric ve simetric C-H e.b.); 1259 (eter asimetric C-O g.b.); 1193 (piran halkasındaki C-O g.b.); 1070 (Ar-Cl); 1048 (eter simetric C-O g.b.); 942 (1,2,3 trisüstitüe benzen); 780, 747 (monosüstitüe benzen) (Şekil 14).

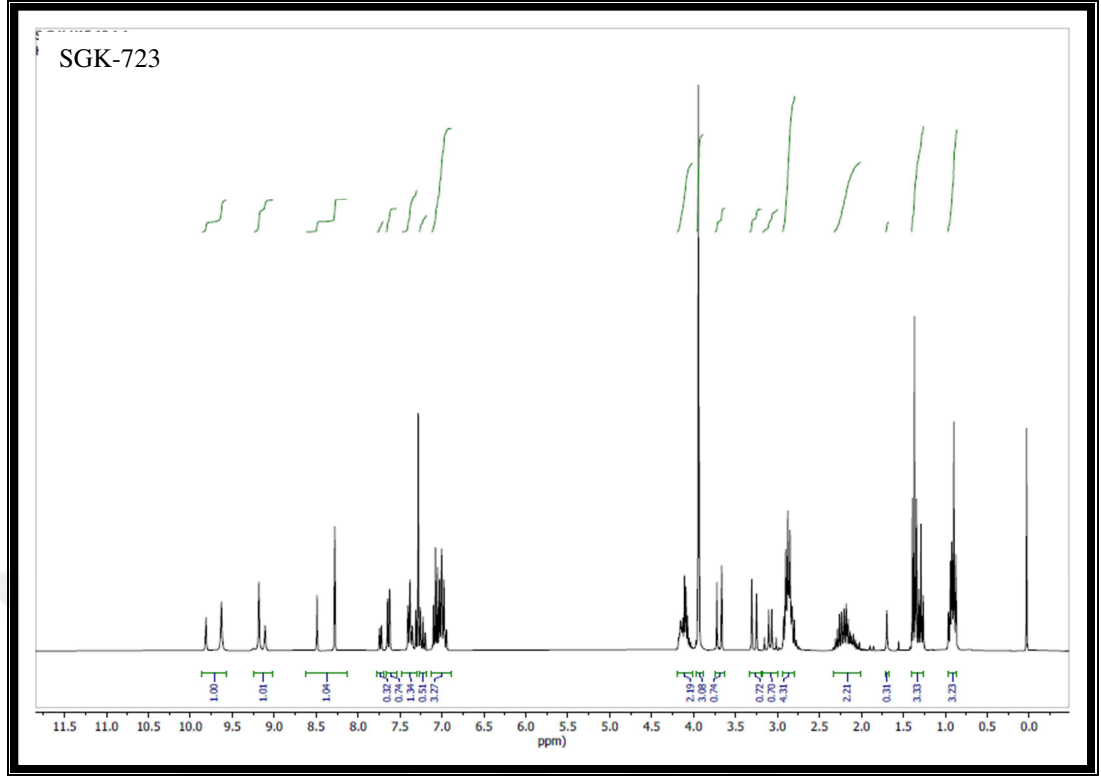


Şekil 14. **3e** bileşiğinin FT-IR spektrumu.

¹H-NMR Spektrumu:



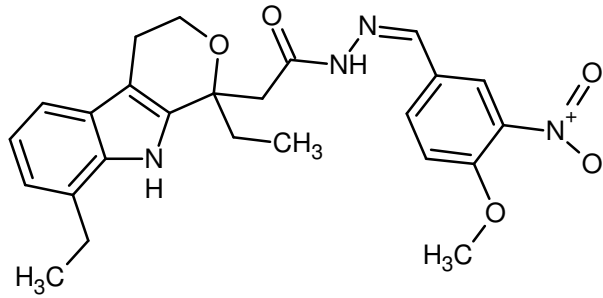
(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 0,87-0,96 (3H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,26-1,39 (3H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,70 (çözücüye ait su piki); 2,07-2,31 (2H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,80-3,72 (6H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CO-NH ve 4 konumundaki -CH₂-); 3,94 (3H, d, $J=3$ Hz, fenil halkasına bağlı -OCH₃); 4,07-4,16 (2H, m, 3 konumundaki -CH₂); 6,94-7,75 (6H, m, Ar-H ve çözücü piki); 8,28, 8,49 (1H, ss, -N=CH); 9,11, 9,18 (1H, ss, indol N-H); 9,63, 9,81 (1H, ss, -CO-NH-) (Şekil 15).



Şekil 15. **3e** bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.

6.1.6. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(4-metoksi-3-nitrofenil)metilen] hidrazidi [**3f**]

Bileşik **2**'den 2,26 g (0,0075 mol) tartılır, 30 mL etanol ve 1,36 g (0,0075 mol) 4-metoksi-3-nitrobenzalhit'ten hareketle 5.2.3'te verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün etanol ile kristallendirilerek saflaştırılır.

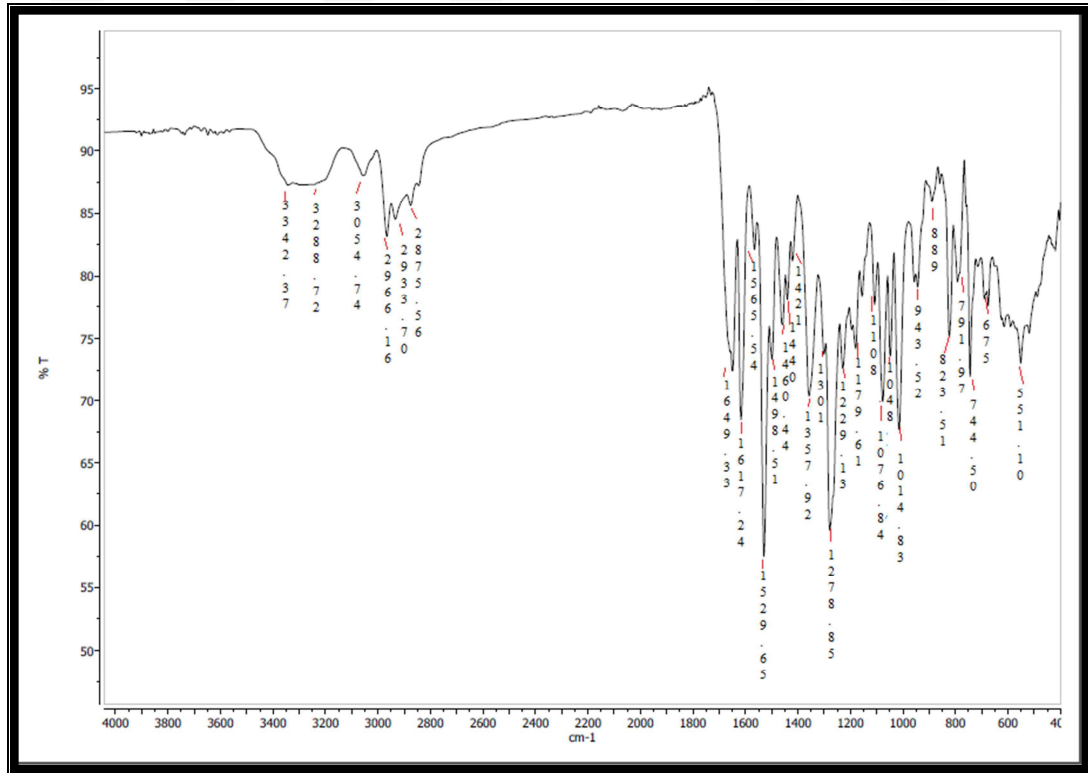


- Verim: % 36,85
- $R_f \times 100$: 63 (M_3), t: 25  C
- Koyu sarı renkte toz madde

- E.n.: 162-165 °C
- Su, metanol, etanolde çözünmez; aseton, kloroform, DMSO içerisinde çözünür.
- Analiz: $C_{25}H_{28}N_4O_5 \cdot 1/2H_2O$ (M.A.: 473,522 g/mol)
Hesaplanan (%): C (63,41); H (6,17); N (11,83)
Bulunan (%) : C (63,19); H (6,38); N (11,63)

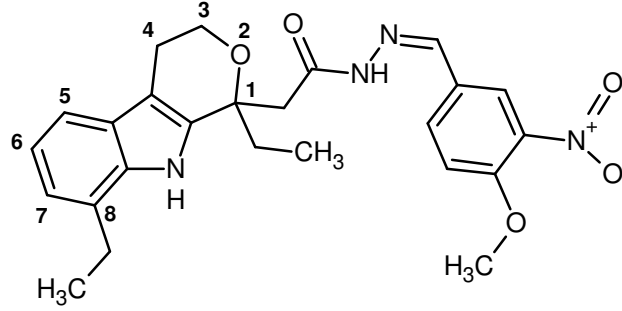
FT-IR Spektrumu:

ν_{maks} (cm^{-1}): 3750-3400 (molekülün tuttuğu suyun OH g.b.); 3342, 3289 (indol ve hidrazon N-H g.b.); 3055 (aromatik =C-H g.b.); 2966, 2934 (-CH₃ asimetrik C-H g.b.); 2876 (-CH₃ simetrik C-H g.b.); 1649 (hidrazon C=O g.b.); 1617 (hidrazon C=N g.b.); 1566, 1530, 1498, 1460, 1440, 1421 (aromatik C=C g.b., indol ve hidrazon N-H e.b., asimetrik NO₂ g.b. ve C-N g.b.); 1358, 1301 (-CH₃ asimetrik ve simetrik C-H e.b. ve simetrik NO₂ g.b.); 1279 (eter asimetrik C-O g.b.); 1180 (piran halkasındaki C-O g.b.); 1077 (eter simetrik C-O g.b.); 944 (1,2,3 trisüstitüe benzen); 792, 744 (monosüstitüe benzen) (Şekil 16).

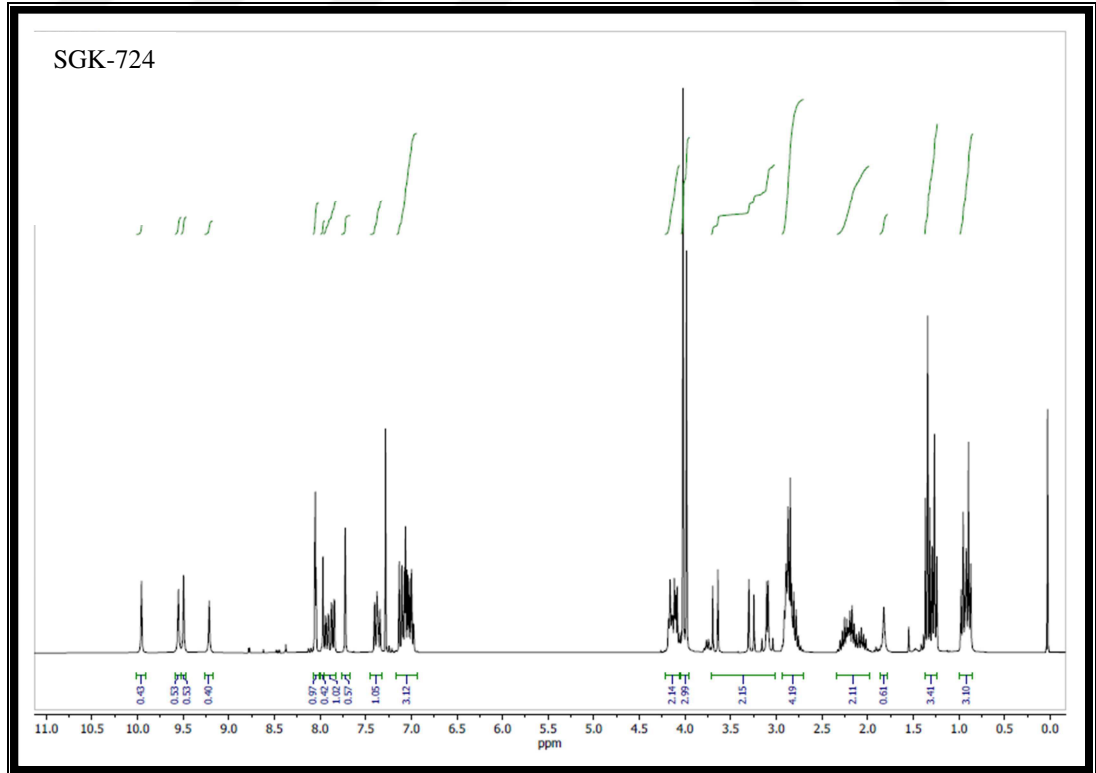


Şekil 16. **3f** bileşiğinin FT-IR spektrumu.

¹H-NMR Spektrumu:



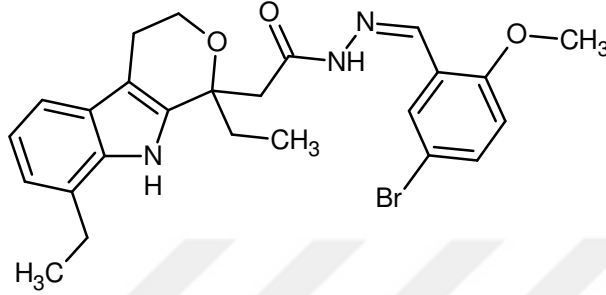
(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 0,89, 0,95 (3H, tt, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,24-1,36 (3H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,82 (çözücüye ait su piki); 2,02-2,30 (2H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,76-3,70 (6H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CO-NH ve 4 konumundaki -CH₂-); 3,98, 4,02 (3H, ss, fenil halkasına bağlı -OCH₃); 4,09-4,18 (2H, m, 3 konumundaki -CH₂); 6,98-7,97 (6H, m, Ar-H ve çözücü piki); 8,05 (1H, t, -N=CH); 9,50, 9,55 (1H, ss, indol N-H); 9,21, 9,96 (1H, ss, -CO-NH-) (Şekil 17).



Şekil 17. **3f** bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

6.1.7. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(5-bromo-2-metoksifenil)metilen] hidrazidi [3g]

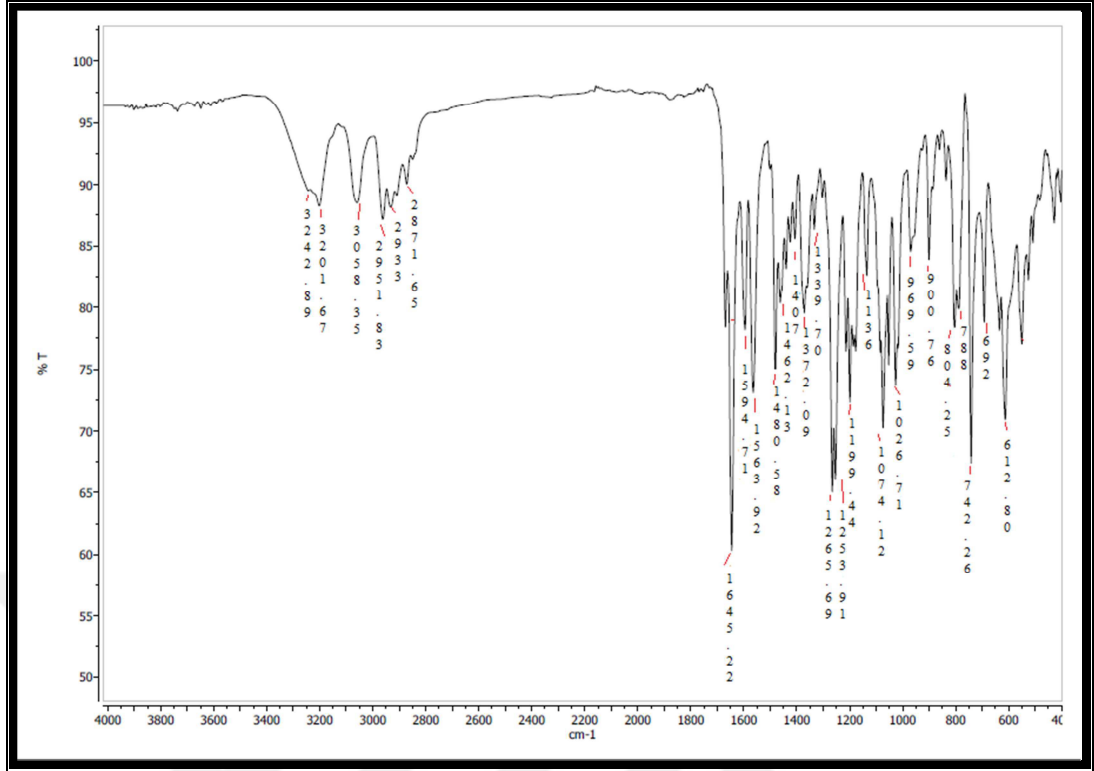
Bileşik 2'den 2,26 g (0,0075 mol) tartılır, 30 mL etanol ve 1,61 g (0,0075 mol) 5-bromo-2-metoksibenzaldehit'ten hareketle 5.2.3'te verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün etanol ile kristallendirilerek saflaştırılır.



- Verim: % 43,17
- $R_f \times 100$: 81 (M_3), t: 25 °C
- Beyaz renkte toz madde
- E.n.: 164-165 °C
- Su, metanol, etanolde çözünmez; aseton, kloroform, DMSO içerisinde çözünür.
- Analiz: $C_{25}H_{28}BrN_3O_3 \cdot 1/2H_2O$ (M.A.: 507,420 g/mol)
Hesaplanan (%): C (59,18); H (5,76); N (8,28)
Bulunan (%) : C (59,24); H (5,19); N (8,35)

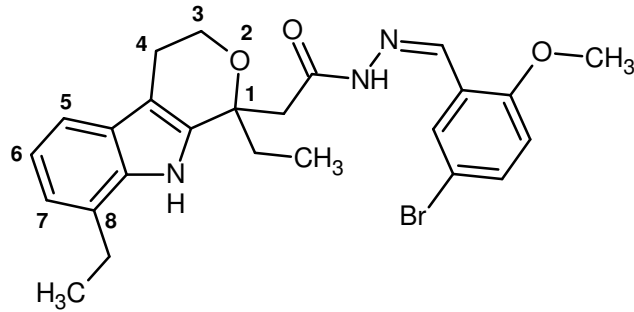
FT-IR Spektrumu:

ν_{maks} (cm^{-1}): 3750-3400 (molekülün tuttuğu suyun OH g.b.); 3243, 3202 (indol ve hidrazon N-H g.b.); 3058 (aromatik =C-H g.b.); 2952, 2933 (-CH₃ asimetric C-H g.b.); 2872 (-CH₃ simetric C-H g.b.); 1645 (hidrazon C=O g.b.); 1595 (hidrazon C=N g.b.); 1564, 1481, 1462, 1407 (aromatik C=C g.b., indol ve hidrazon N-H e.b. C-N g.b.); 1372, 1340 (-CH₃ asimetric ve simetric C-H e.b.); 1265 (eter asimetric C-O g.b.); 1199 (piran halkasındaki C-O g.b.); 1074 (Ar-Br); 1027 (eter simetric C-O g.b.); 970 (1,2,3 trisubstitue benzen); 788, 742 (monosubstitue benzen) (Şekil 18).

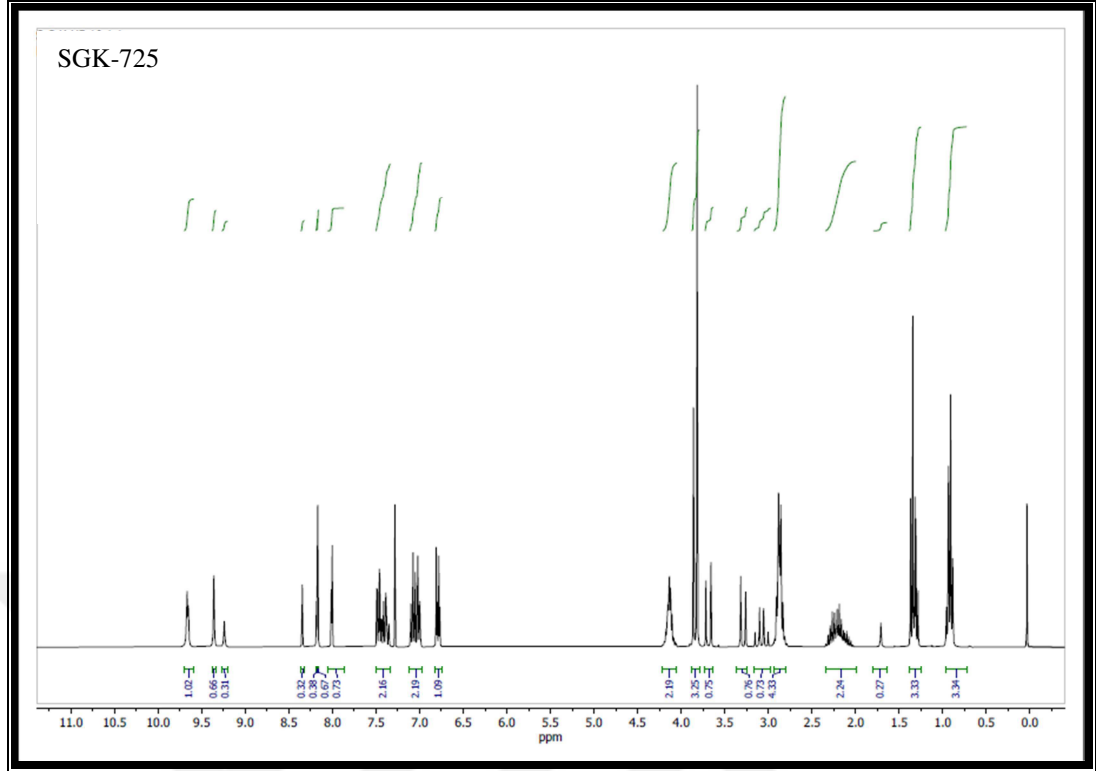


Şekil 18. **3g** bileşiğinin FT-IR spektrumu.

¹H-NMR Spektrumu:



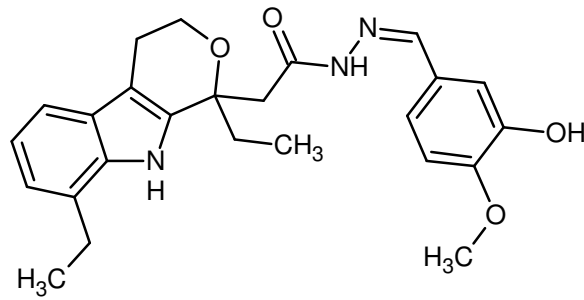
(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 0,92 (3H, q, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,28-1,37 (3H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,71 (çözücüye ait su piki); 2,05-2,32 (2H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,81-3,72 (6H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CO-NH ve 4 konumundaki -CH₂-); 3,82, 3,86 (3H, ss, fenil halkasına bağlı -OCH₃); 4,10-4,18 (2H, m, 3 konumundaki -CH₂); 6,78-8,01, 8,18-8,19 (6H, m, Ar-H ve çözücü piki); 8,17, 8,34 (1H, ss, -N=CH); 9,24, 9,36(1H, ss, indol N-H); 9,66 (1H, d, $J=4,5$ Hz, -CO-NH-) (Şekil 19).



Şekil 19. **3g** bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.

6.1.8. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(3-hidroksi-4-metoksifenil)metilen] hidrazidi [**3h**]

Bileşik **2**'den 2,26 g (0,0075 mol) tartılır, 30 mL etanol ve 1,14 g (0,0075 mol) 3-hidroksi-4-metoksibenzaldehit'ten hareketle 5.2.3'te verilen yöntemle göre elde edilir. Elde edilen ürün etanol ile kristallendirilerek saflaştırılır.

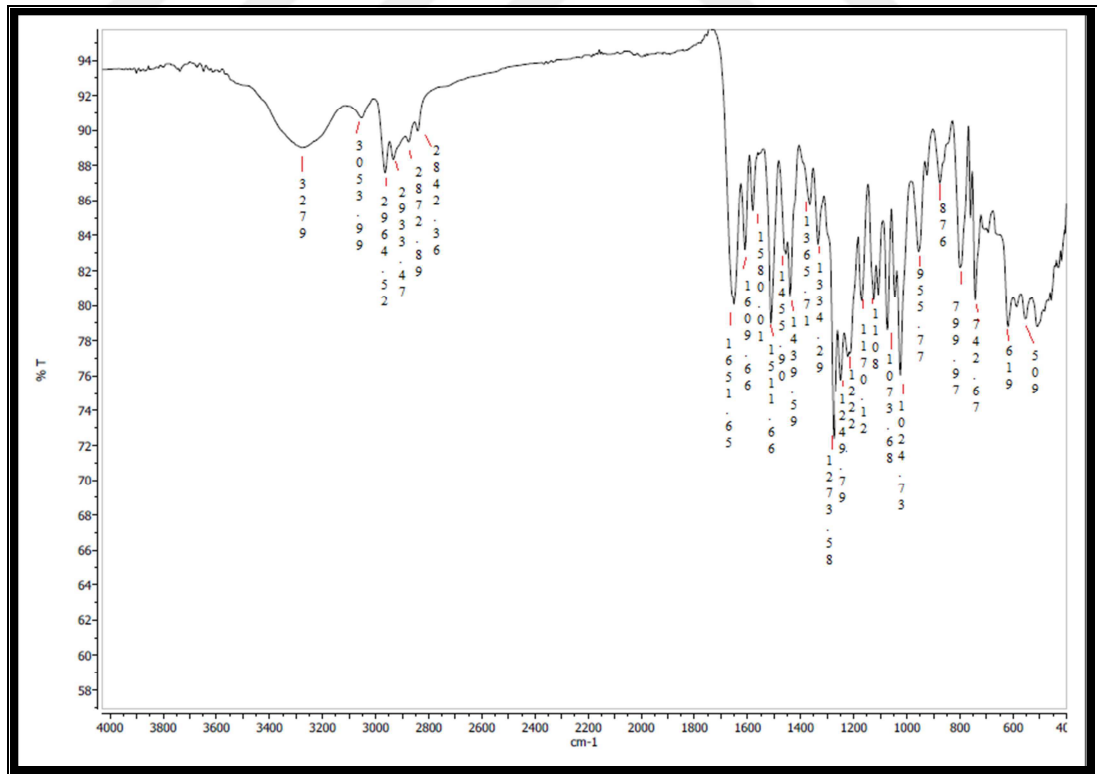


- Verim: % 24,59
- $R_f \times 100$: 71 (M_3), t: 25 °C
- Koyu krem renkte toz madde

- E.n.: 110 °C
- Suda çözünmez; etanol, aseton, kloroform, DMSO içerisinde çözünür.
- Analiz: $C_{25}H_{29}N_3O_4 \cdot H_2O$ (M.A.: 453,531 g/mol)
Hesaplanan (%): C (66,21); H (6,89); N (9,27)
Bulunan (%) : C (66,46); H (7,22); N (9,09)

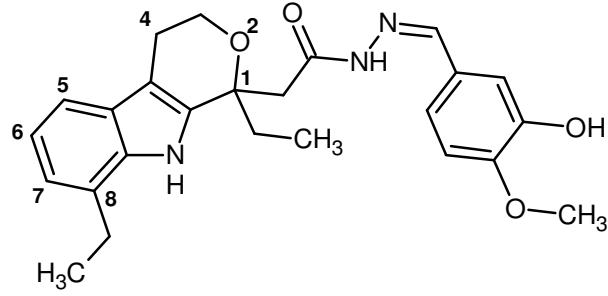
FT-IR Spektrumu:

ν_{maks} (cm^{-1}): 3750-3400 (molekülün tuttuğu suyun OH g.b.); 3279 (Bağ yapmış fenol O-H g.b., indol ve hidrazon N-H g.b.); 3054 (aromatik =C-H g.b.); 2964, 2934 ($-CH_3$ asimetrik C-H g.b.); 2873, 2842 ($-CH_3$ simetrik C-H g.b.); 1652 (hidrazon C=O g.b.); 1610 (hidrazon C=N g.b.); 1580, 1512, 1456, 1440 (aromatik C=C g.b., indol ve hidrazon N-H e.b. C-N g.b.); 1366, 1334 ($-CH_3$ asimetrik ve simetrik C-H e.b.); 1274 (eter asimetrik C-O g.b.); 1250 (fenol O-H e.b. ve C-O g.b.); 1170 (piran halkasındaki C-O g.b.); 1025 (eter simetrik C-O g.b.); 956 (1,2,3 trisüstitüe benzen); 800, 743 (monosüstitüe benzen) (Şekil 20).

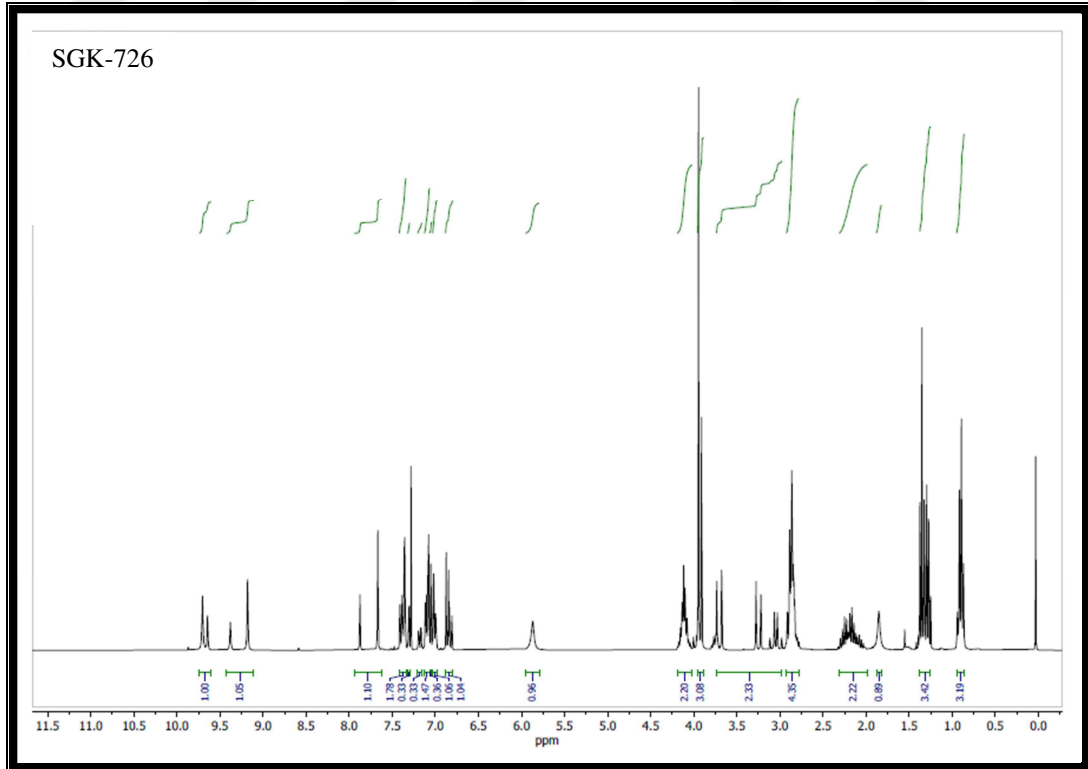


Şekil 20. **3h** bileşiğinin FT-IR spektrumu.

¹H-NMR Spektrumu:



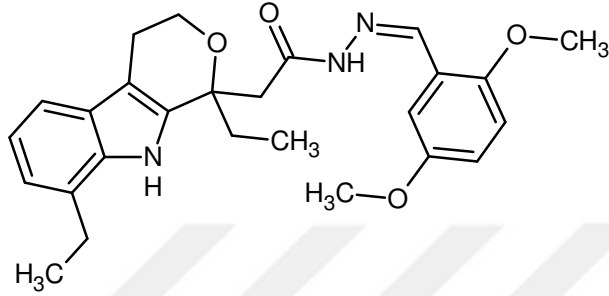
(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 0,90 (3H, q, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,25-1,38 (3H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,85 (çözücüye ait su piki); 2,05-2,30 (2H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,81-3,73 (6H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CO-NH ve 4 konumundaki -CH₂-); 3,92 (3H, d, $J=10.5$ Hz, fenil halkasına bağlı -OCH₃); 4,08-4,16 (2H, m, 3 konumundaki -CH₂); 5,87 (1H, s, fenil halkasına bağlı -OH); 6,81-7,41 (6H, m, Ar-H ve çözücü piki); 7,67, 7,88 (1H, ss, -N=CH); 9,18, 9,38 (1H, ss, indol N-H); 9,64, 9,70 (1H, ss, -CO-NH-) (Şekil 21).



Şekil 21. **3h** bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

6.1.9. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,5-dimetoksifenil)metilen] hidrazidi [3i]

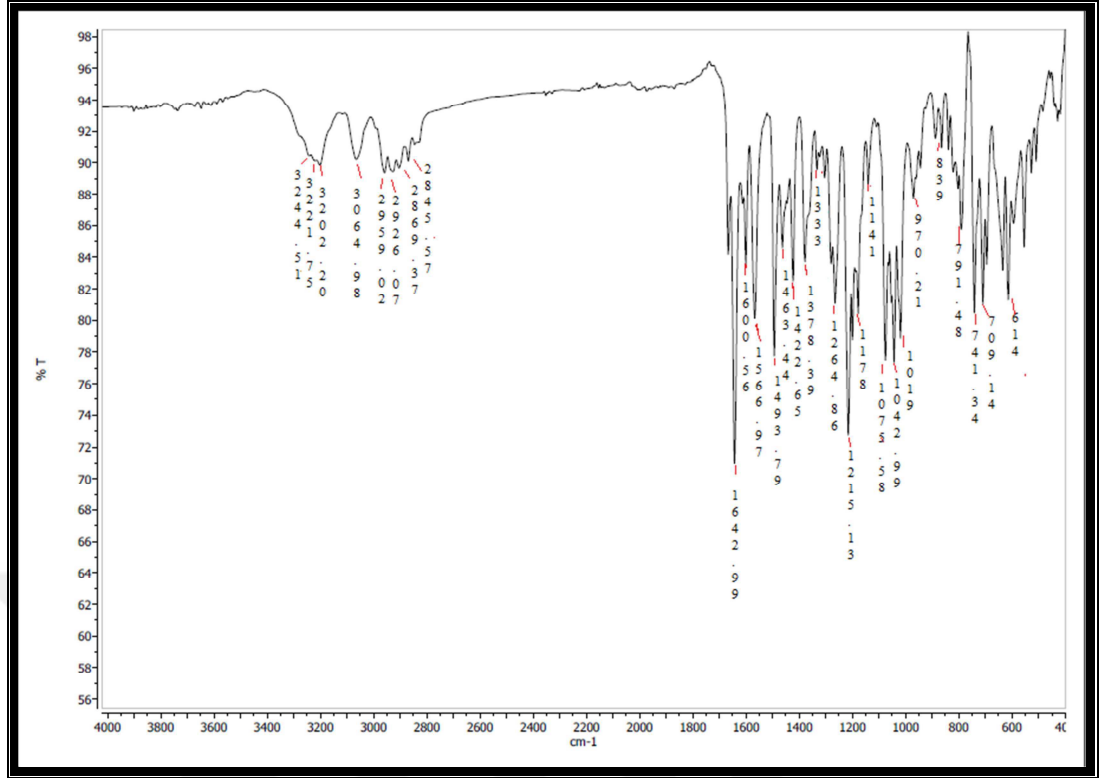
Bileşik 2'den 2,26 g (0,0075 mol) tartılır, 30 mL etanol ve 1,25 g (0,0075 mol) 2,5-dimetoksibenzaldehit'ten hareketle 5.2.3'te verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün etanol ile kristallendirilerek saflaştırılır.



- Verim: % 26,67
- $R_f \times 100$: 79 (M_3), t: 25  C
- Beyaz renkte toz madde
- E.n.: 170-171  C
- Su, metanol, etanolde         ; aseton, kloroform, DMSO içerisinde         .
- Analiz: $C_{26}H_{31}N_3O_4 \cdot 1/2H_2O$ (M.A.: 458,550 g/mol)
Hesaplanan (%): C (68,10); H (7,03); N (9,16)
Bulunan (%) : C (68,25); H (6,28); N (9,19)

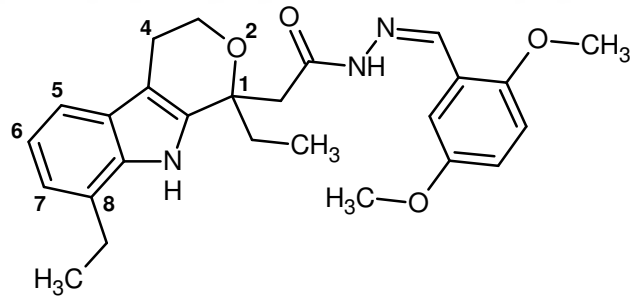
FT-IR Spektrumu:

ν_{maks} (cm^{-1}): 3750-3400 (molek l n tuttuğu suyun OH g.b.); 3244, 3222, 3202 (indol ve hidrazon N-H g.b.); 3065 (aromatik =C-H g.b.); 2959, 2926 (-CH₃ asimetrik C-H g.b.); 2869, 2846 (-CH₃ simetrik C-H g.b.); 1643 (hidrazon C=O g.b.); 1601 (hidrazon C=N g.b.); 1567, 1494, 1463, 1423 (aromatik C=C g.b., indol ve hidrazon N-H e.b. C-N g.b.); 1378, 1333 (-CH₃ asimetrik ve simetrik C-H e.b.); 1265 (eter asimetrik C-O g.b.); 1215 (piran halkasındaki C-O g.b.); 1043 (eter simetrik C-O g.b.); 970 (1,2,3 trisübstitüe benzen); 791, 741 (monos bstit e benzen) (Şekil 22).

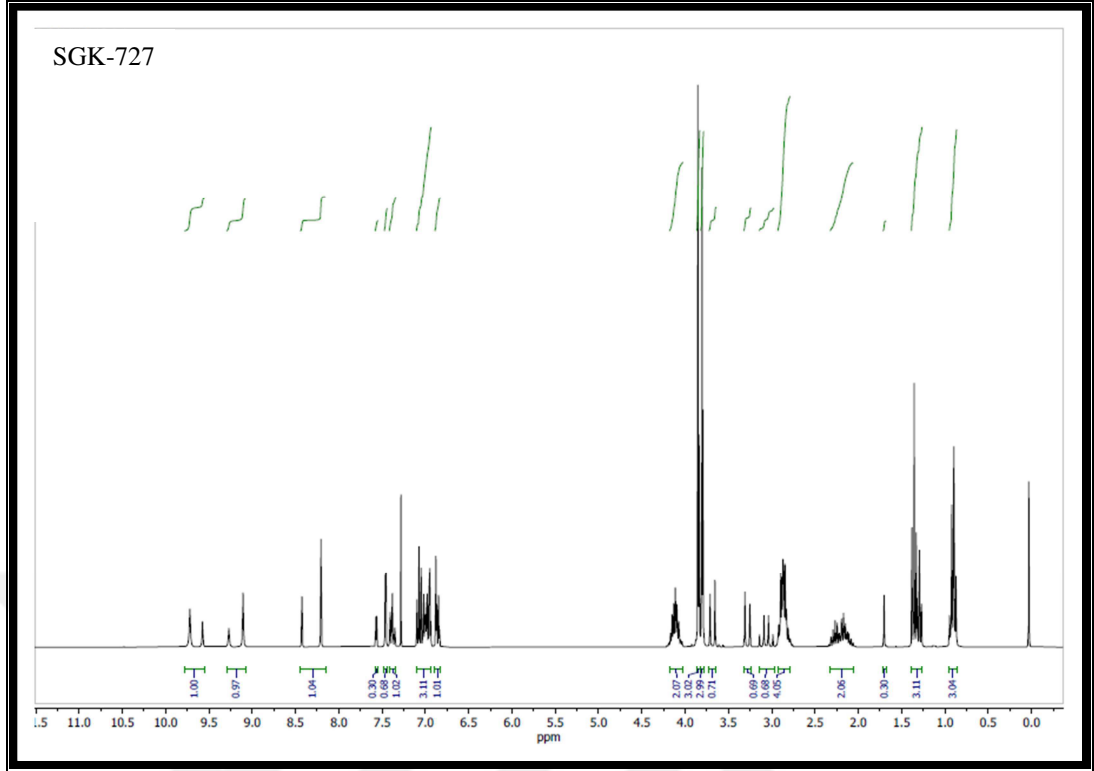


Şekil 22. **3i** bileşiğinin FT-IR spektrumu.

¹H-NMR Spektrumu:



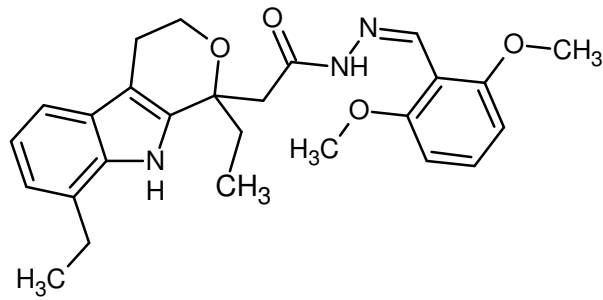
(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 0,91 (3H, q, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,27-1,38 (3H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,70 (çözücüye ait su piki); 2,06-2,27 (2H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,78-3,79 (6H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CO-NH ve 4 konumundaki -CH₂-); 3,80, 3,84 (6H, dd, $J=3,3$ Hz, $J=4,2$ Hz, fenil halkasına bağlı -OCH₃); 4,05-4,17 (2H, m, 3 konumundaki -CH₂); 6,84-7,57 (6H, m, Ar-H ve çözücü piki); 8,21, 8,42 (1H, ss, -N=CH); 9,10, 9,27 (1H, ss, indol N-H); 9,57, 9,72 (1H, ss, -CO-NH-) (Şekil 23).



Şekil 23. **3i** bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.

6.1.10. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,6-dimetoksifenil)metilen] hidrazidi [**3j**]

Bileşik **2**'den 2,26 g (0,0075 mol) tartılır, 30 mL etanol ve 1,25 g (0,0075 mol) 2,6-dimetoksibenzaldehit'ten hareketle 5.2.3'te verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün etanol ile kristallendirilerek saflaştırılır.

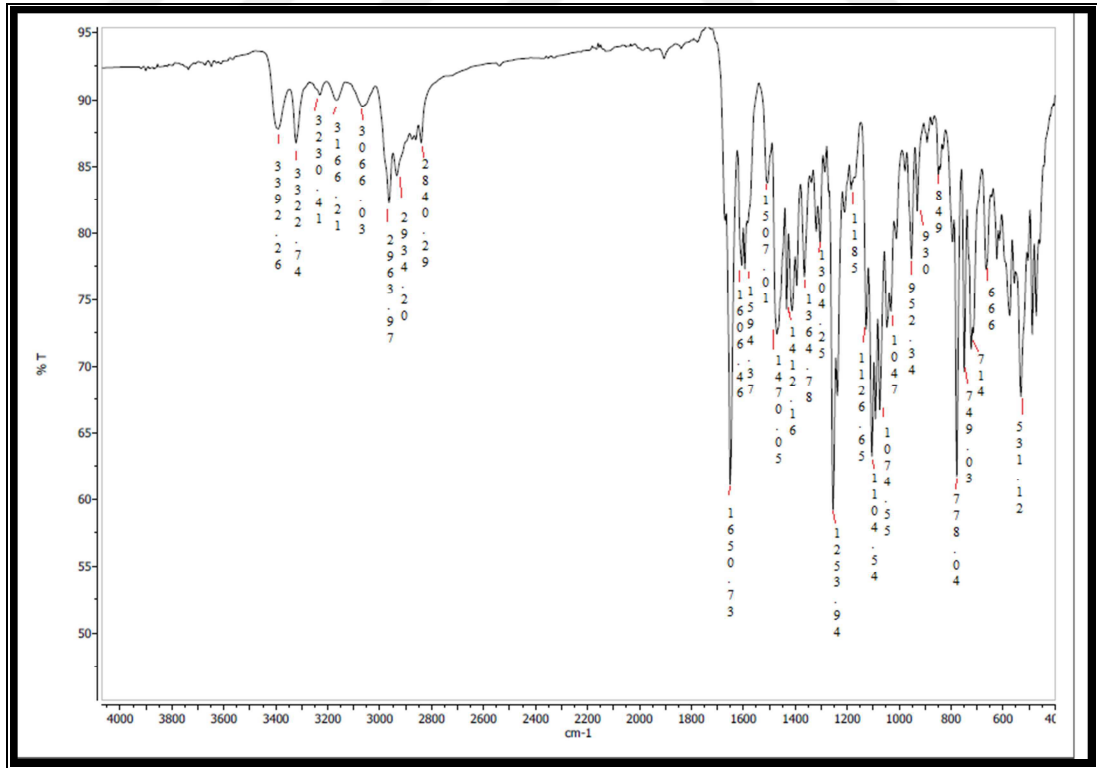


- Verim: % 55,99
- $R_f \times 100$: 69 (M_3), t: 25 °C
- Krem renkte toz madde

- E.n.: 194-195 °C
- Su, metanol, etanolde çözünmez; aseton, kloroform, DMSO içerisinde çözünür.
- Analiz: $C_{26}H_{31}N_3O_4 \cdot 1/2H_2O$ (M.A.: 458,550 g/mol)
Hesaplanan (%): C (68,10); H (7,03); N (9,16)
Bulunan (%) : C (68,29); H (6,20); N (9,21)

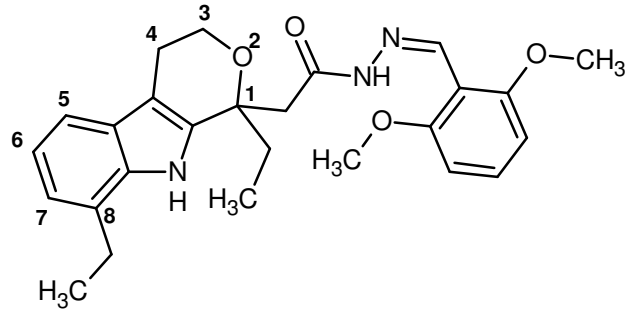
FT-IR Spektrumu:

ν_{maks} (cm^{-1}): 3750-3400 (molekölün tuttuğu suyun OH g.b.); 3392, 3323, 3230 (indol ve hidrazon N-H g.b.); 3166, 3066 (aromatik =C-H g.b.); 2964, 2934 (-CH₃ asimetrik C-H g.b.); 2840 (-CH₃ simetrik C-H g.b.); 1651 (hidrazon C=O g.b.); 1606 (hidrazon C=N g.b.); 1594, 1507, 1470, 1412 (aromatik C=C g.b., indol ve hidrazon N-H e.b. C-N g.b.); 1365, 1304 (-CH₃ asimetrik ve simetrik C-H e.b.); 1254 (eter asimetrik C-O g.b.); 1127 (piran halkasındaki C-O g.b.); 1074 (eter simetrik C-O g.b.); 952 (1,2,3 trisüstitüe benzen); 778, 749 (monosüstitüe benzen) (Şekil 24).

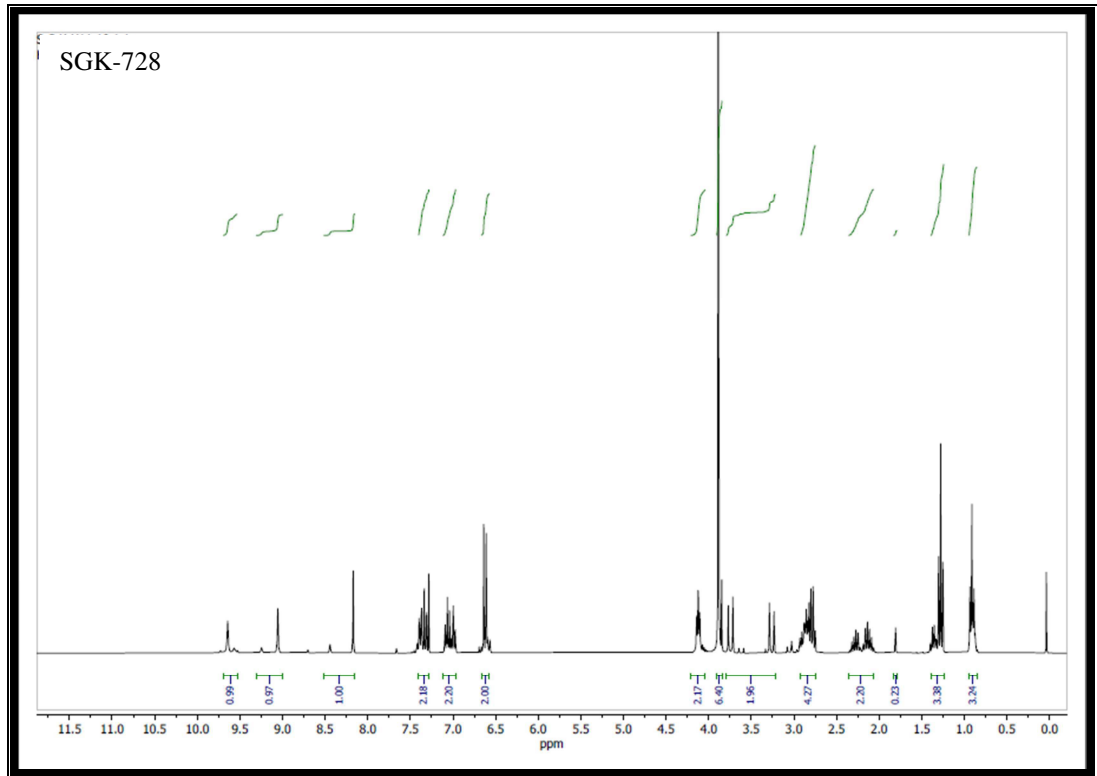


Şekil 24. **3j** bileşiğinin FT-IR spektrumu.

¹H-NMR Spektrumu:



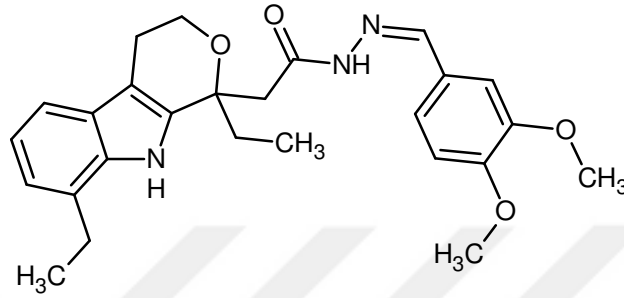
(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 0,89-0,94 (3H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,25-1,40 (3H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,81 (özücüye ait su piki); 2,06-2,32 (2H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,75-3,77 (6H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CO-NH ve 4 konumundaki -CH₂-); 3,85, 3,89 (6H, ss, fenil halkasına bağlı -OCH₃); 4,10-4,14 (2H, m, 3 konumundaki -CH₂); 6,57-7,42 (6H, m, Ar-H ve çözücü piki); 8,17, 8,44 (1H, ss, -N=CH); 9,06, 9,25 (1H, ss, indol N-H); 9,55, 9,64 (1H, ss, -CO-NH-) (Şekil 25).



Şekil 25. 3j bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

6.1.11. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(3,4-dimetoksifenil)metilen] hidrazidi [3k]

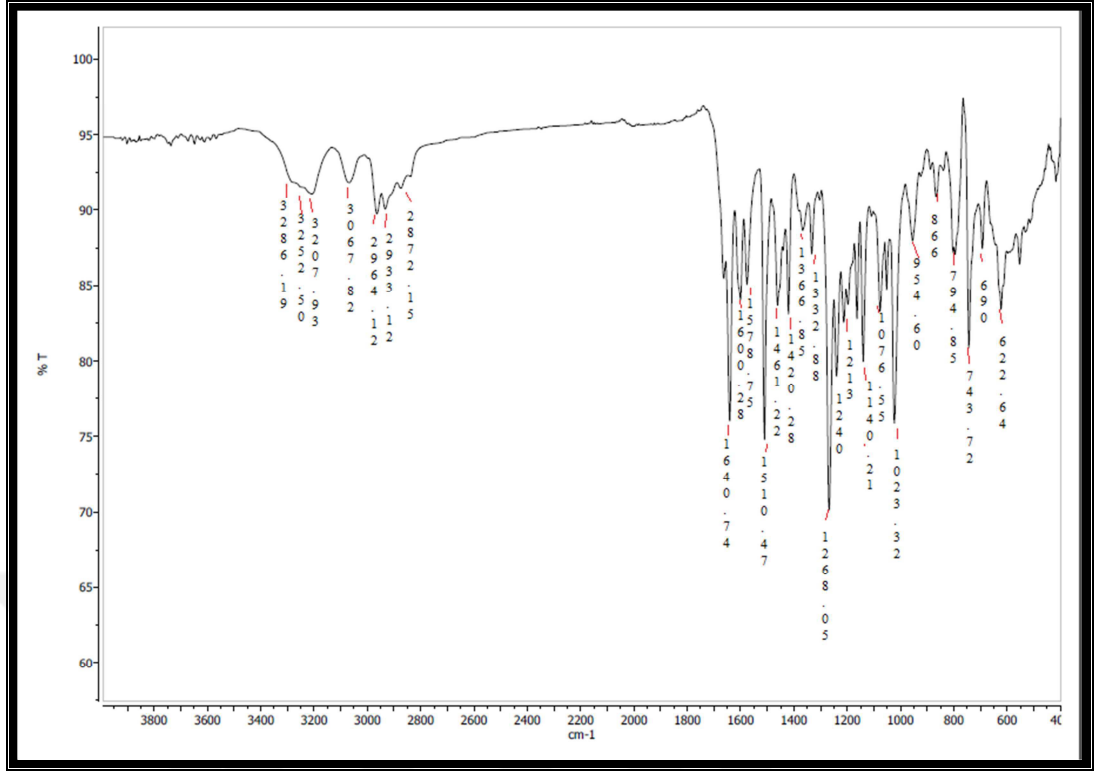
Bileşik 2'den 2,26 g (0,0075 mol) tartılır, 30 mL etanol ve 1,25 g (0,0075 mol) 3,4-dimetoksibenzaldehit'ten hareketle 5.2.3'te verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün etanol ile kristallendirilerek saflaştırılır.



- Verim: % 45,74
- $R_f \times 100$: 60 (M_3), t: 25 °C
- Açık krem renkte toz madde
- E.n.: 140-142 °C
- Su, metanol, etanolde  z nmez; aseton, kloroform, DMSO içerisinde  z n r.
- Analiz: $C_{26}H_{31}N_3O_4 \cdot H_2O$ (M.A.: 467,558 g/mol)
Hesaplanan (%): C (66,79); H (7,11); N (8,99)
Bulunan (%) : C (67,03); H (6,62); N (8,81)

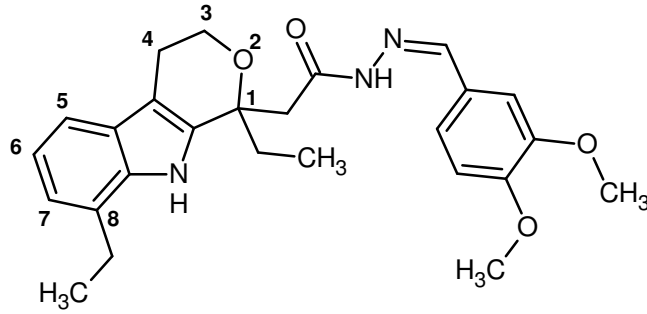
FT-IR Spektrumu:

ν_{maks} (cm^{-1}): 3750-3400 (molek l n tuttuğu suyun OH g.b.); 3286, 3252, 3208 (indol ve hidrazon N-H g.b.); 3068 (aromatik =C-H g.b.); 2964, 2933 (-CH₃ asimetrik C-H g.b.); 2872 (-CH₃ simetrik C-H g.b.); 1641 (hidrazon C=O g.b.); 1600 (hidrazon C=N g.b.); 1578, 1510, 1461, 1420 (aromatik C=C g.b., indol ve hidrazon N-H e.b. C-N g.b.); 1367, 1333 (-CH₃ asimetrik ve simetrik C-H e.b.); 1268 (eter asimetrik C-O g.b.); 1140 (piran halkasındaki C-O g.b.); 1023 (eter simetrik C-O g.b.); 955 (1,2,3 trisübstitüe benzen); 795, 744 (monos bstit e benzen) (Şekil 26).

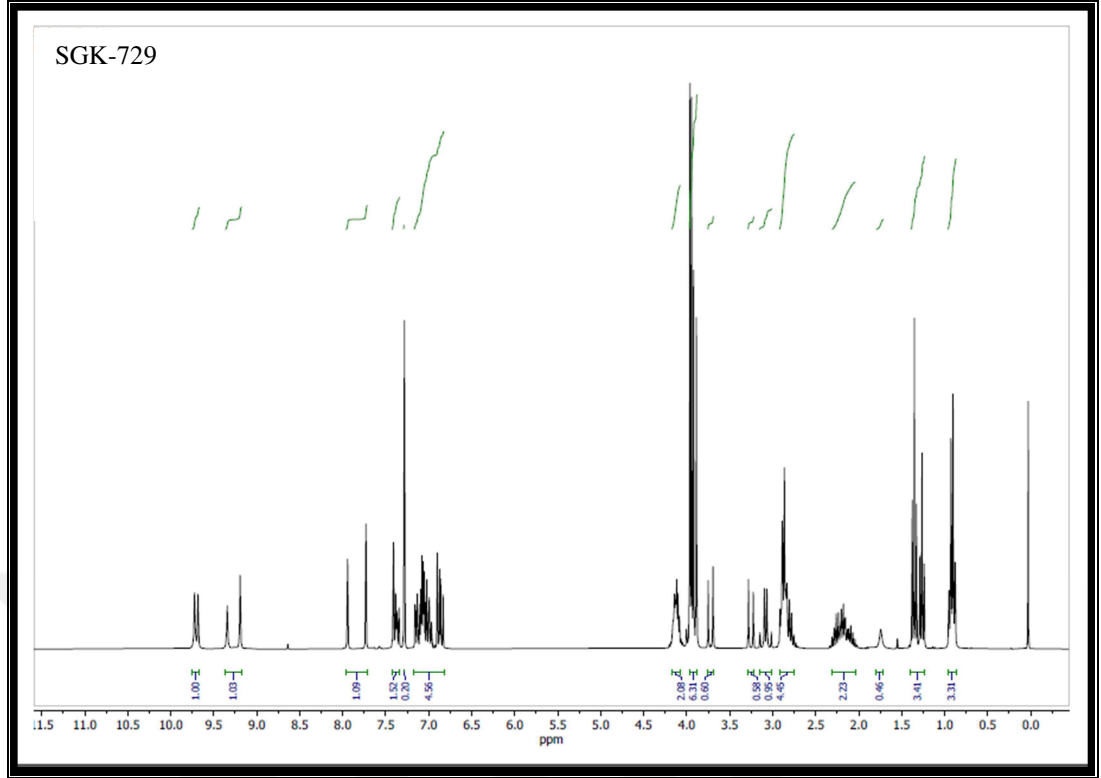


Şekil 26. **3k** bileşiğinin FT-IR spektrumu.

¹H-NMR Spektrumu:



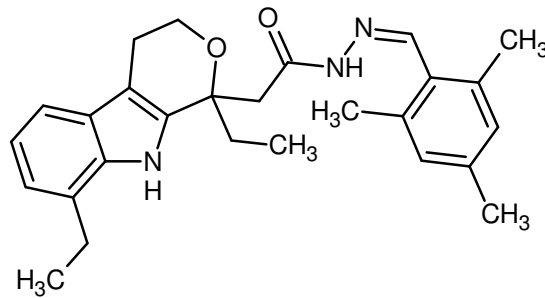
(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 0,91 (3H, q, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,26, 1,35 (3H, tt, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,74 (çözücüye ait su piki); 2,07-2,31 (2H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,78-3,75 (6H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CO-NH ve 4 konumundaki -CH₂-); 3,89-3,96 (6H, m fenil halkasına bağlı -OCH₃); 4,08-4,16 (2H, m, 3 konumundaki -CH₂-); 6,83-7,41 (6H, m, Ar-H ve çözücü piki); 7,73, 7,94 (1H, ss, -N=CH); 9,19, 9,34 (1H, ss, indol N-H); 9,70 (1H, d, $J=11,7$ Hz, -CO-NH-) (Şekil 27).



Şekil 27. **3k** bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.

6.1.12. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,4,6-trimetilfenil)metilen] hidrazidi [3l]

Bileşik **2**'den 2,26 g (0,0075 mol) tartılır, 30 mL etanol ve 1,13 mL (0,0075 mol) 2,4,6-trimetilbenzaldehit'ten hareketle 5.2.3'te verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün etanol ile kristallendirilerek saflaştırılır.

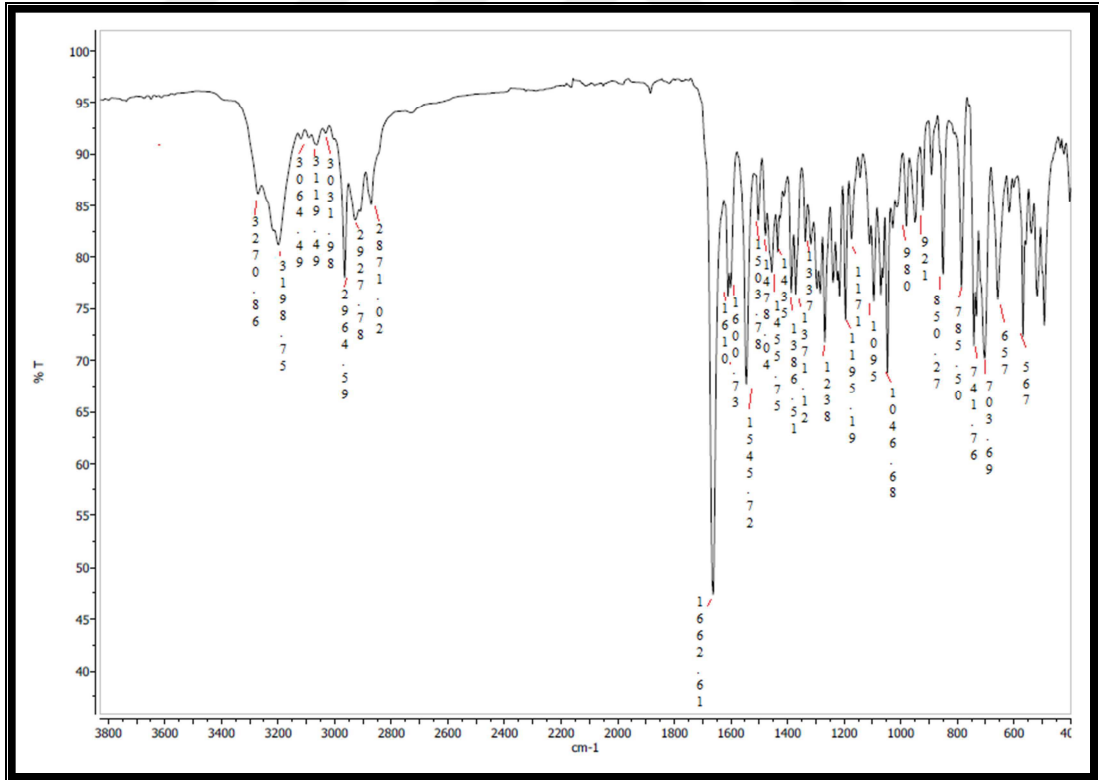


- Verim: % 43,83
- $R_f \times 100$: 63 ve 35 (M_2), t: 25 °C
- Beyaz renkte toz madde

- E.n.: 173 °C
- Su, metanol, etanolde çözünmez; aseton, kloroform, DMSO içerisinde çözünür.
- Analiz: $C_{27}H_{33}N_3O_2$ (M.A.: 431,569 g/mol)
Hesaplanan (%): C (75,14); H (7,71); N (9,74)
Bulunan (%) : C (74,68); H (7,27); N (9,88)

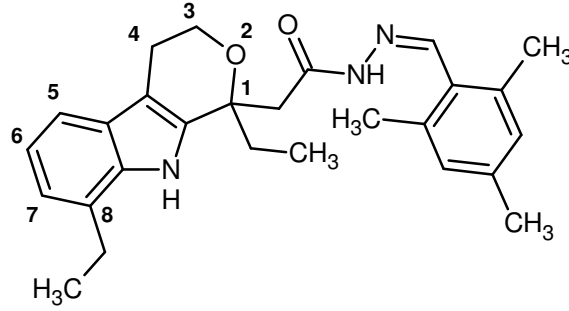
FT-IR Spektrumu:

ν_{maks} (cm^{-1}): 3271, 3199 (indol ve hidrazon N-H g.b.); 3120, 3064, 3032 (aromatik =C-H g.b.); 2965, 2928 (-CH₃ asimetrik C-H g.b.); 2871 (-CH₃ simetrik C-H g.b.); 1663 (hidrazon C=O g.b.); 1610 (hidrazon C=N g.b.); 1600, 1546, 1504, 1478, 1456, 1435 (aromatik C=C g.b., indol ve hidrazon N-H e.b. C-N g.b.); 1386, 1371, 1337 (-CH₃ asimetrik ve simetrik C-H e.b.); 1238 (piran halkasındaki C-O g.b.); 921, 850 (1,2,3,4 tetrasüstitüe benzen); 785, 741 (monosüstitüe benzen) (Şekil 28).

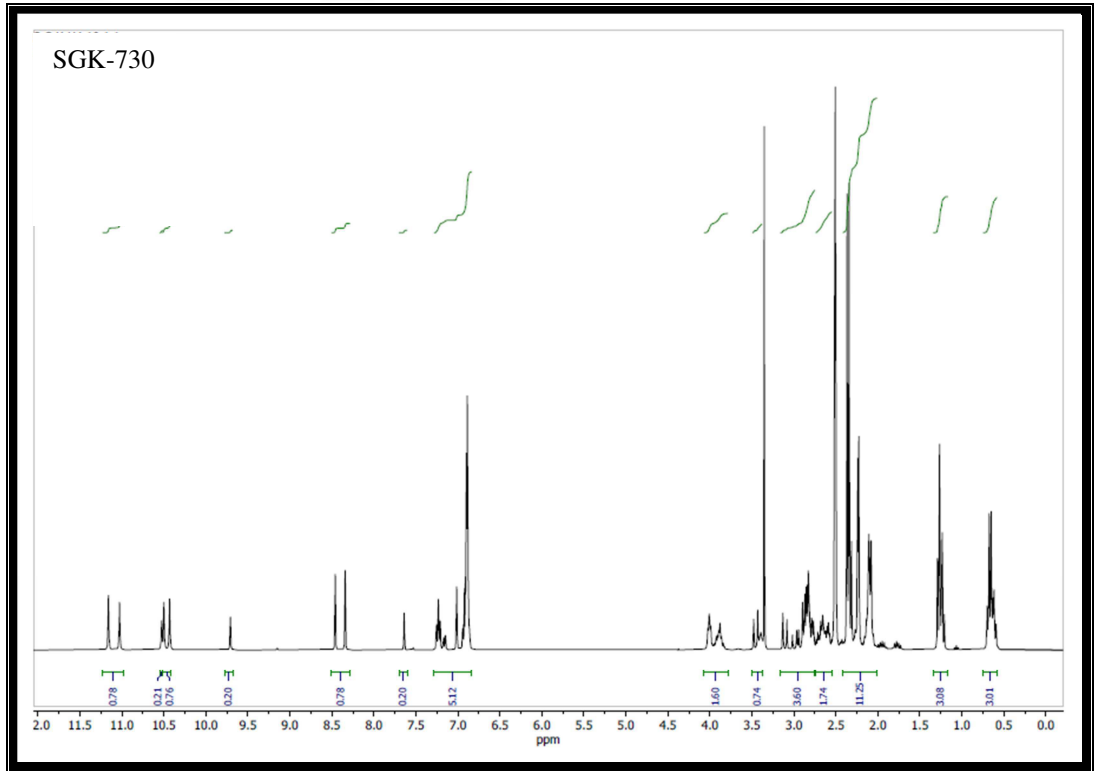


Şekil 28. **31** bileşiğinin FT-IR spektrumu.

¹H-NMR Spektrumu:



(300 MHz) (DMSO-d₆/TMS) δ ppm: 0,59-0,70 (3H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 1,21-1,29 (3H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,08-2,37 (11H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃ ve fenil halkasına bağlı -CH₃); 2,51 (özücü piki); 2,58-2,72 (2H, m, 8 no.lu karbona bağlı -CH₂-CH₃); 2,77-3,48 (4H, m, 1 no.lu karbona bağlı -CH₂-CO-NH-, 4 konumundaki -CH₂- ve çözücüye ait su piki); 3,86-4,02 (2H, m, 3 konumundaki -CH₂); 6,86-7,26 (5H, m, Ar-H); 7,64, 8,34, 8,46 (1H, sss -N=CH); 10,43-10,53 (1H, m, indol N-H); 9,71, 11,03, 11,16 (1H, sss, -CO-NH-) (Şekil 29).



Şekil 29. 31 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu.

6.2. Biyolojik Bulgular

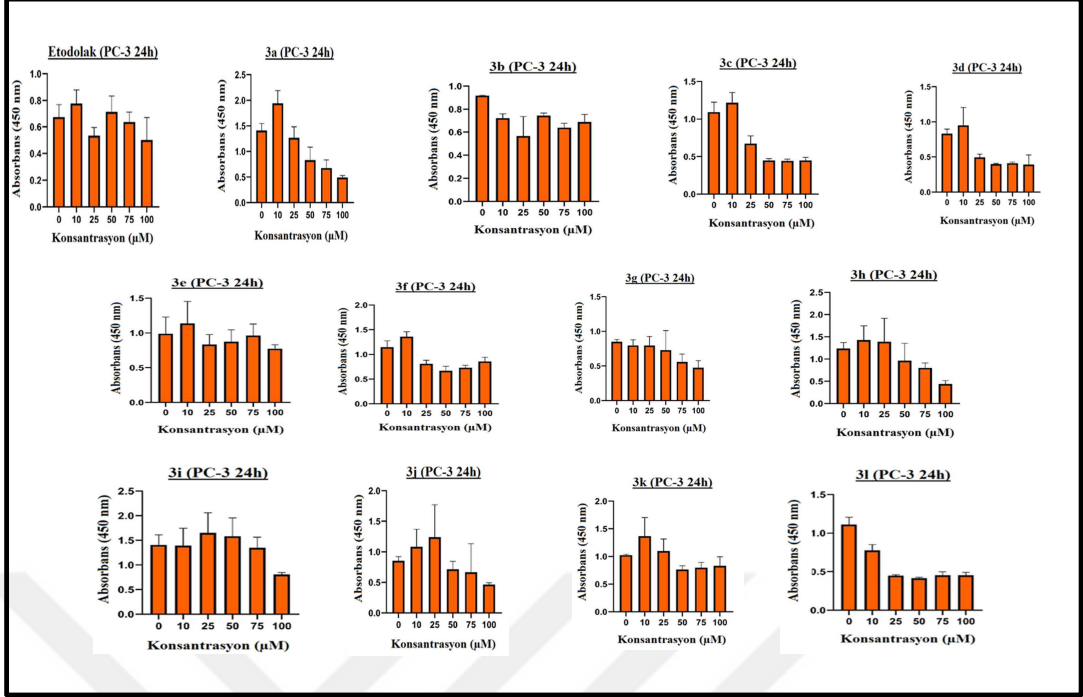
6.2.1. Antikanser etki bulguları

Prostat kanseri PC-3, DU-145 ve LNCaP hücreleri ile 24 saat muamele edilen etodolak, etodolak hidrazidi [2] ve etodolak hidrazit-hidrazon [3a-l] bileşiklerinin; bu hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri WST-8 testi ile belirlenmiştir ve tespit edilen IC₅₀ değerleri Tablo 2’de verilmiştir.

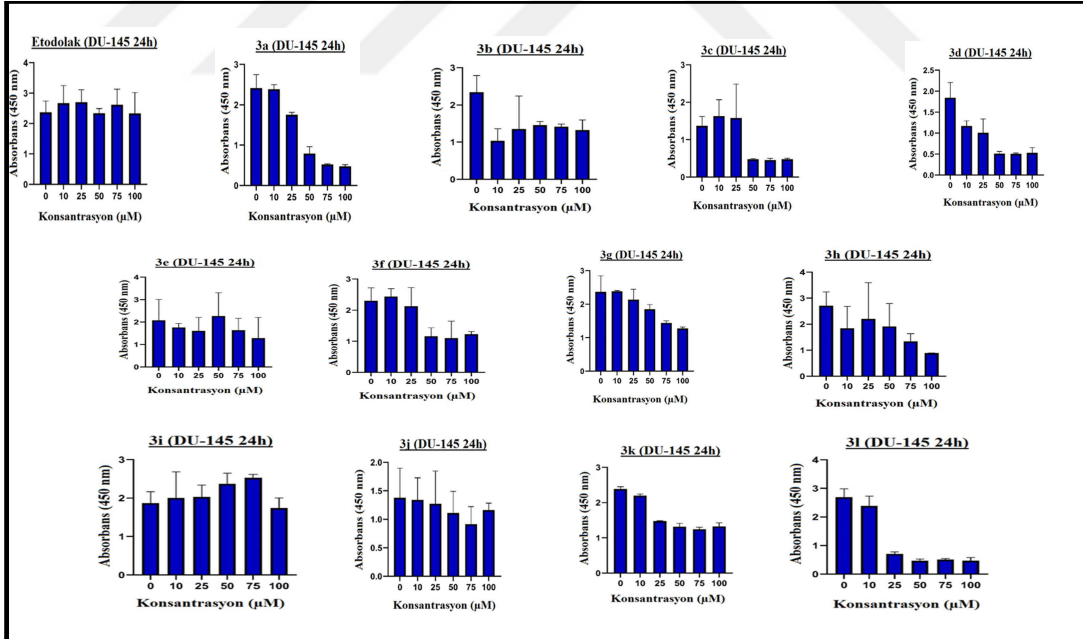
Tablo 2. Etodolak, etodolak hidrazidi (2) ve 3a-l bileşiklerinin IC₅₀ değerleri (μM)

Bileşikler	PC-3	DU-145	LNCaP
Etodolak	27,21	46,17	19,82
Etodolak Hidrazidi (2)	12,37	7,80	41,18
3a	28,68	30,38	20,48
3b	10,36	5,24	15,53
3c	22,31	33,65	25,46
3d	20,79	11,39	19,81
3e	17,22	21,60	37,91
3f	21,27	30,44	28,94
3g	57,29	45,75	38,70
3h	54,82	29,45	67,16
3i	76,92	40,35	>100
3j	45,20	43,51	45,89
3k	25,62	16,51	29,93
3l	10,20	15,33	34,11

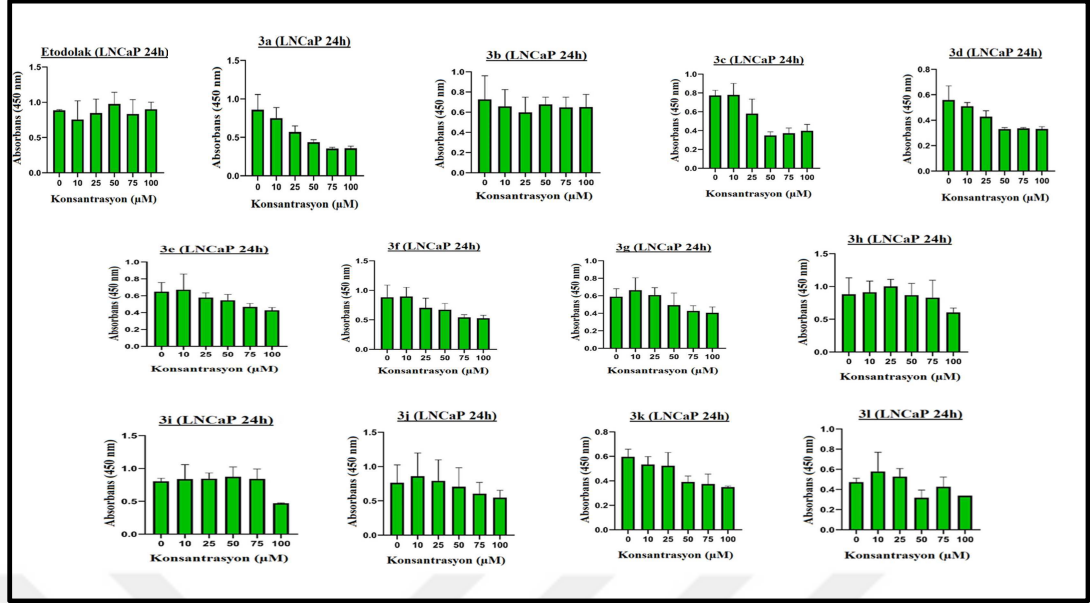
Bu bileşiklerin PC-3, DU-145 ve LNCaP hücreleri üzerindeki IC₅₀ değerlerinin elde edilmesini sağlayan konsantrasyon-absorbans grafikleri de Şekil 30, Şekil 31 ve Şekil 32’de gösterilmektedir.



Şekil 30. Bileşiklerin PC-3 hücre hattındaki konsantrasyon-absorbans grafikleri.



Şekil 31. Bileşiklerin DU-145 hücre hattındaki konsantrasyon-absorbans grafikleri.

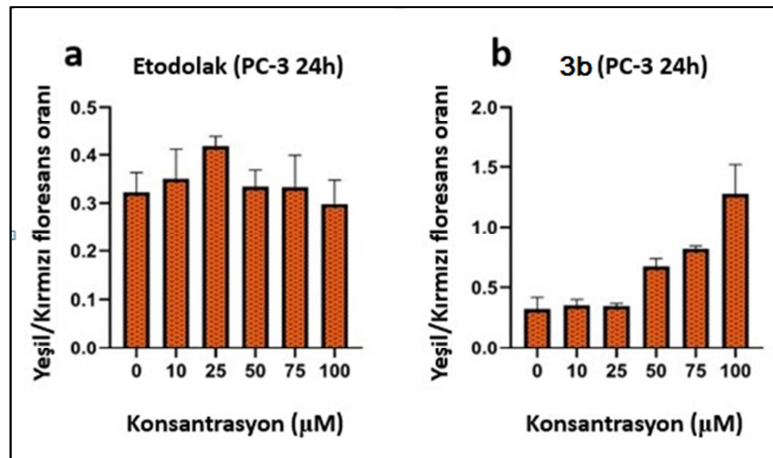


Şekil 32. Bileşiklerin LNCaP hücre hattındaki konsantrasyon-absorbans grafikleri.

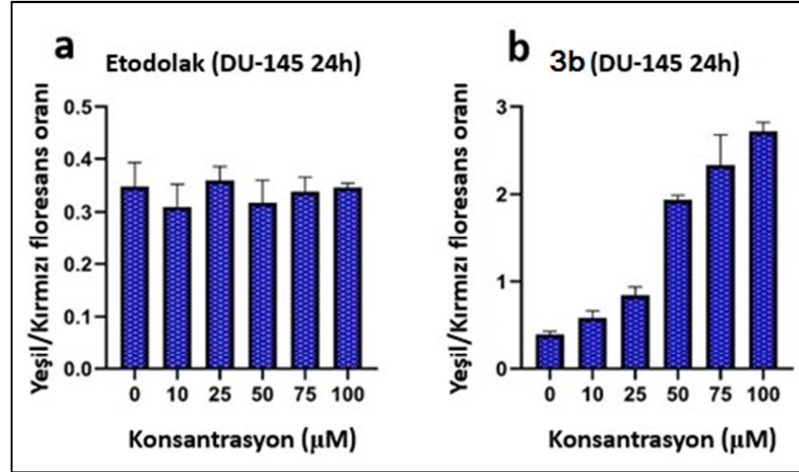
6.2.2. Apoptoz etki bulguları

6.2.2.1. Mitokondriyal membran potansiyeli bulguları

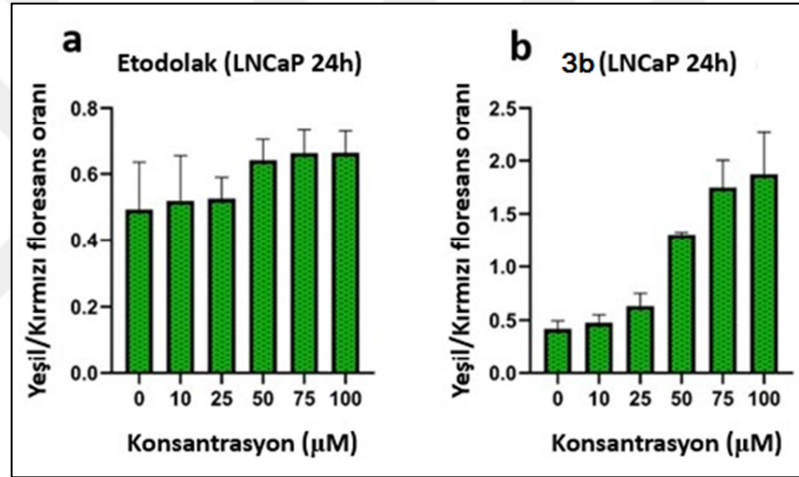
Etodolak ve **3b** bileşiklerinin PC-3, DU-145, LNCaP prostat kanseri hücre hatlarındaki mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri incelendiğinde; etodolak anlamlı bir etki göstermemiştir. Ancak **3b** bileşiği, düşük konsantrasyonlardan itibaren mitokondriyal membran potansiyelinde depolarizasyona neden olmuştur. Bu sonuçlar Şekil 33, Şekil 34 ve Şekil 35'te verilmiştir.



Şekil 33. Etodolak ve **3b**'nin PC-3 hücre hattı üzerindeki mitokondriyal membran testi sonuçları.



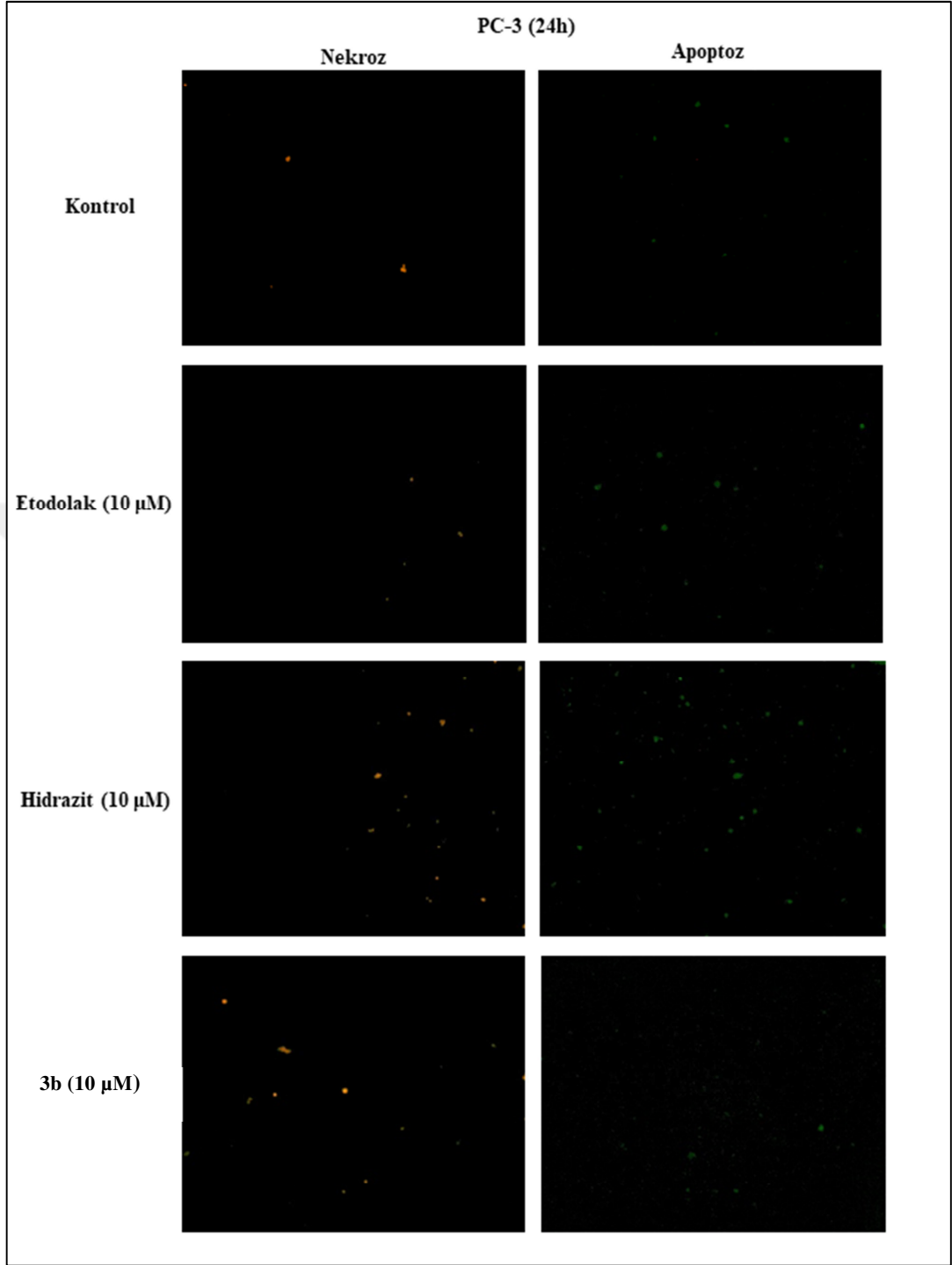
Şekil 34. Etodolak ve **3b**'nin DU-145 hücre hattı üzerindeki mitokondriyal membran testi sonuçları.



Şekil 35. Etodolak ve **3b**'nin LNCaP hücre hattı üzerindeki mitokondriyal membran testi sonuçları.

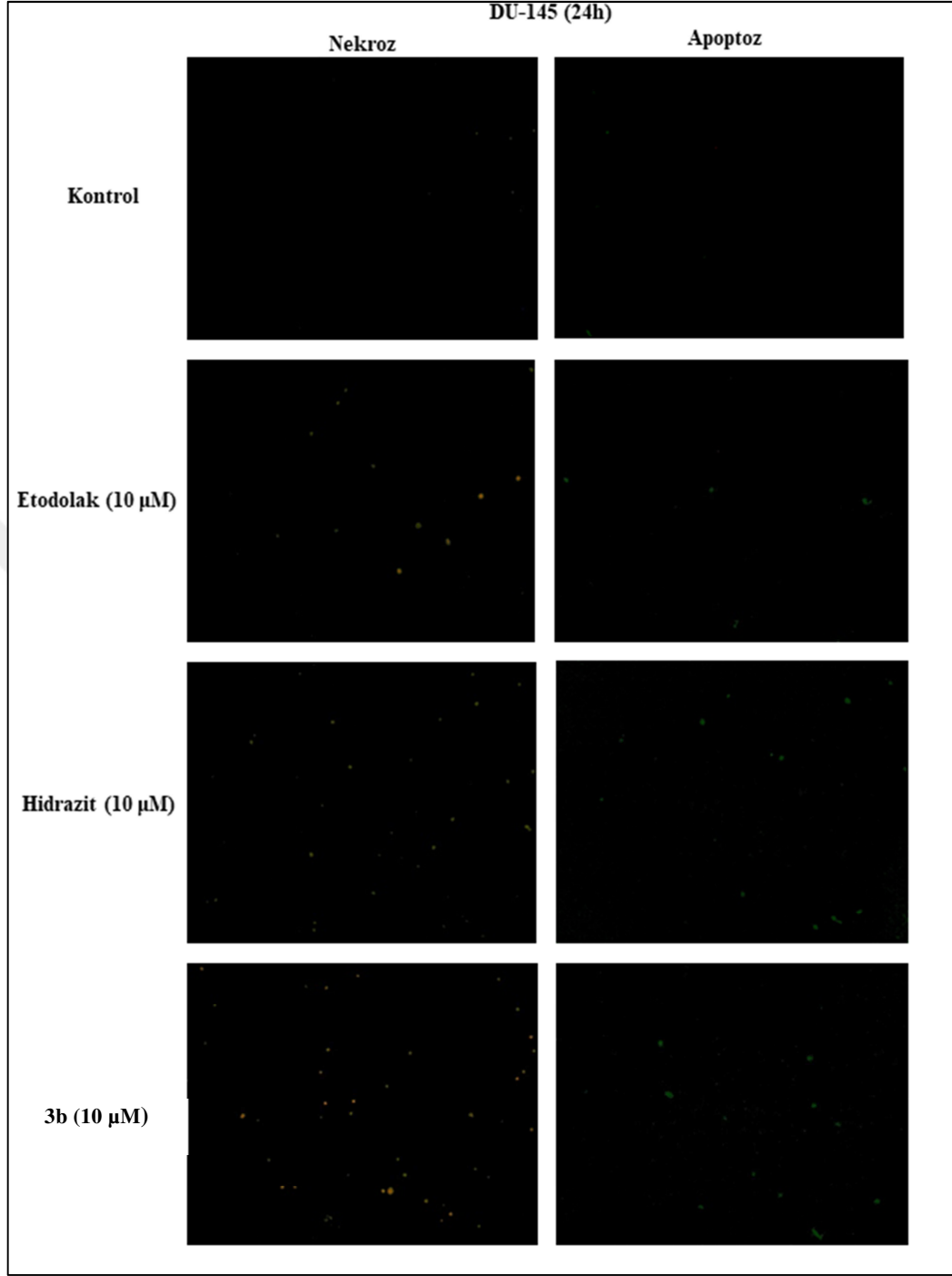
6.2.2.2. Annexin V/PI apoptoz bulguları

Prostat kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmalara göre; 10 μM etodolak hidrazidi [2] ve 10 μM **3b** bileşiği ile 24 saat muamele edildikten sonra Annexin V ve PI ile boyanan PC-3 hücre hattında; nekroza ve apoptoza giden hücre sayısı, kontrol grubuna göre artmıştır. Bileşik **3b** ile inkübe edilip nekroza giden PC-3 hücreleri, hidrazit ile inkübe edilip nekroza giden PC-3 hücrelerinden yaklaşık % 35 daha azdır. Ayrıca **3b** ile inkübasyon sonrası apoptoza giden PC-3 hücre sayısı, hidrazide kıyasla % 12 daha fazladır. Buna göre; bileşik **3b** apoptotik hücre ölümüne neden olurken; hidrazidin etkisi ise daha çok nekrotik hücre ölümü ile ilişkilidir. Floresans mikroskobu altında incelenen PC-3 hücreleri Resim 1'de gösterilmiştir.



Resim 1. Nekroz ve apoptoza giden PC-3 hücre hattının floresans mikroskobu altındaki görüntüsü.

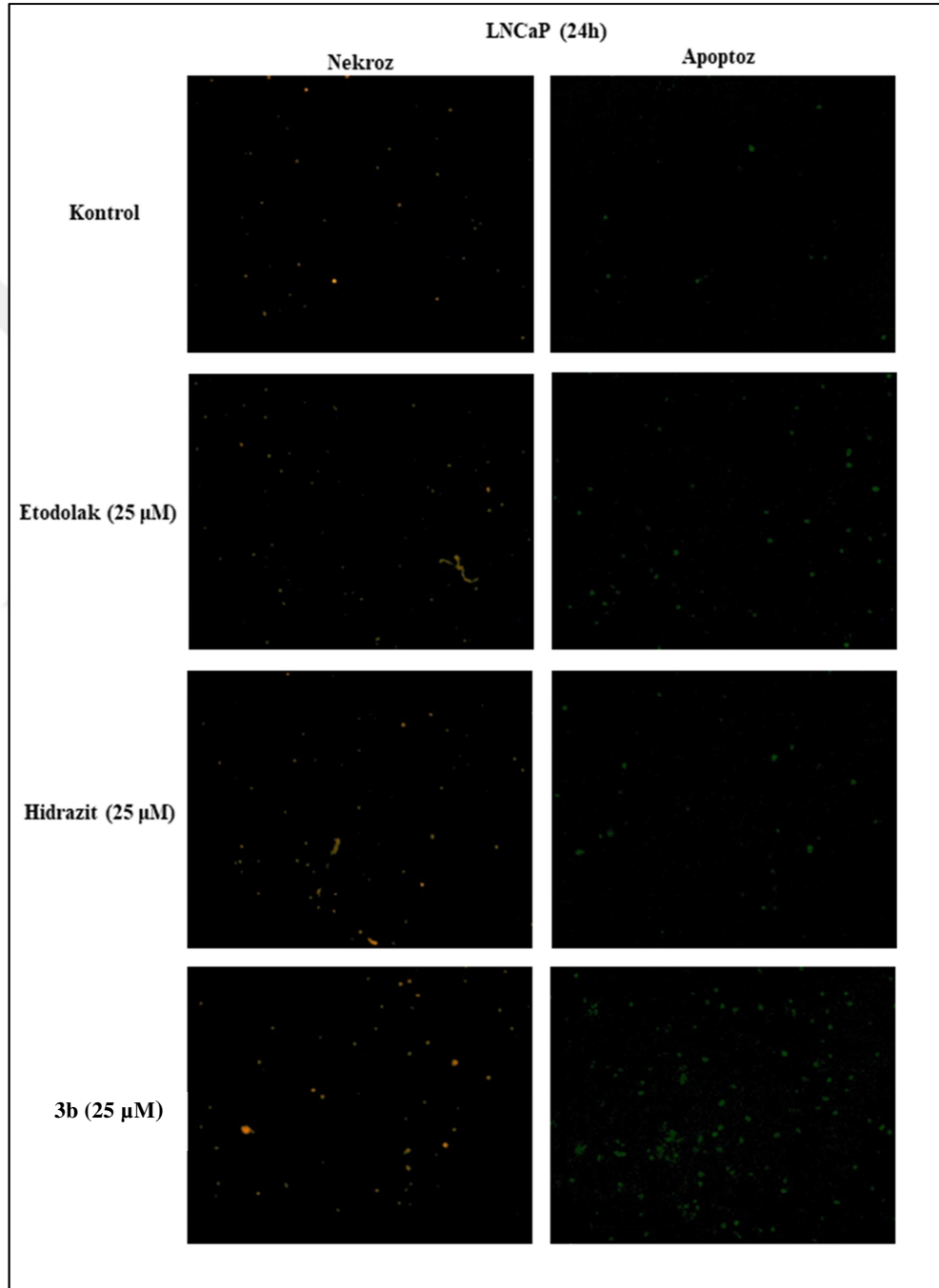
Aynı işlem DU-145 hücre hattında gerçekleştirildiğinde; **3b** bileşiğinin nekroza giden hücre sayısı, hidrazide göre yaklaşık % 12 daha fazla iken; apoptoza giden hücre sayısı yaklaşık % 21 daha fazladır. Floresans mikroskobu altında incelenen DU-145 hücreleri Resim 2’de gösterilmiştir.



Resim 2. Nekroz ve apoptoza giden DU-145 hücre hattının floresans mikroskobu altındaki görüntüsü.

LNCaP hücre hattında belirlenen IC_{50} değerlerine göre bileşikler 25 μM konsantrasyonda hazırlanıp uygulanmıştır ve 24 saatlik inkübasyon sonrası Annexin V ve PI ile boyanan LNCaP hücre hattı incelenmiştir. Buna göre; etodolak ve **3b** bileşiği en etkili sonuçları vermiştir. Özellikle **3b** bileşiği uygulanan LNCaP hücre hattında; apoptoza giden hücre sayısı, kontrole kıyasla neredeyse dokuz katına

çıkmiştir. Ayrıca etodolak ile inkübasyon sonrası nekroza giden LNCaP hücre sayısı, **3b** bileşiğine kıyasla yaklaşık % 60 daha fazla iken; apoptoza giden hücre sayısı yaklaşık % 46 daha azdır. Bu sonuçlara göre etodolak daha çok nekrotik, **3b** bileşiği ise apoptotik hücre ölümüne neden olmaktadır. Floresans mikroskobu altında incelenen LNCaP hücreleri Resim 3'te gösterilmiştir.



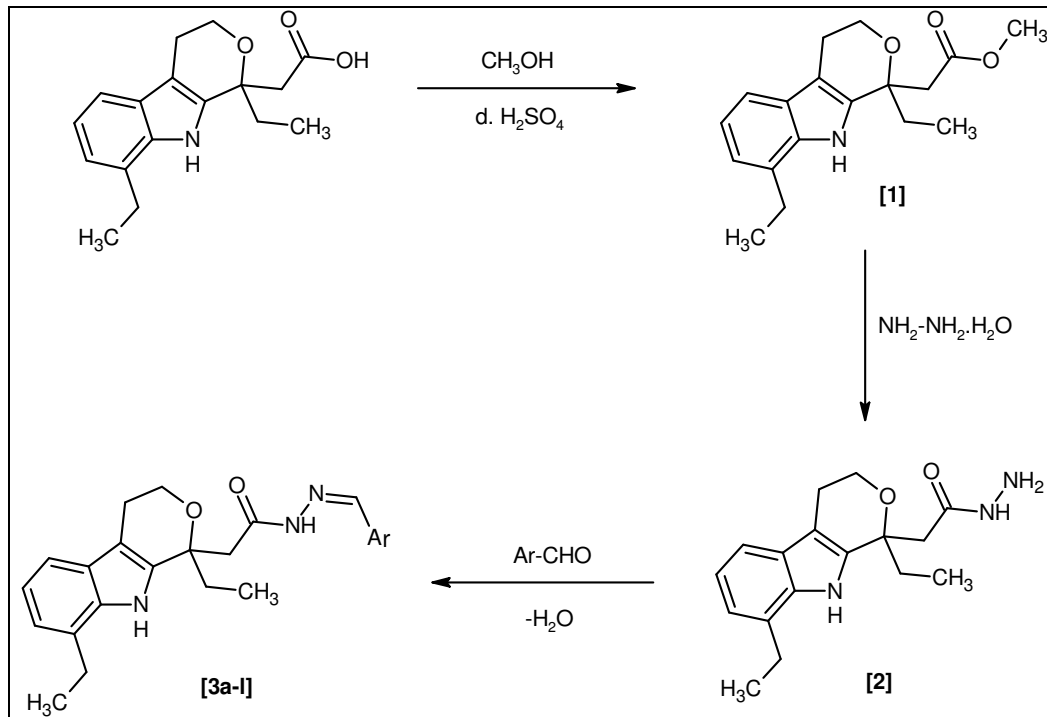
Resim 3. Nekroz ve apoptoza giden LNCaP hücre hattının floresans mikroskobu altındaki görüntüsü.

7. TARTIŞMA

7.1. Sentez ve Yapı Aydınlatılması

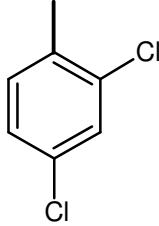
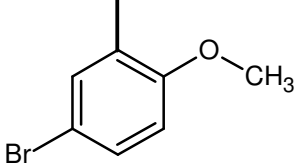
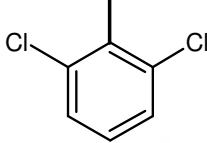
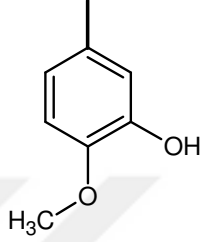
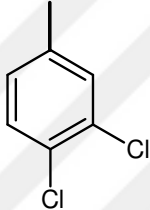
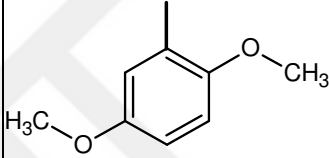
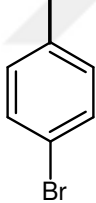
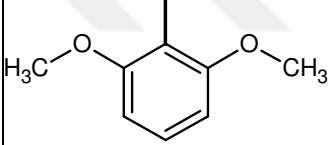
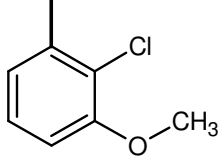
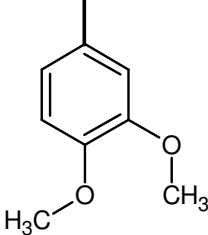
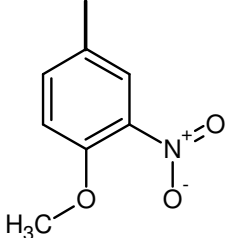
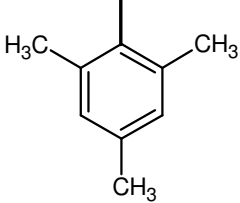
Etodolak; (1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetik asit non-steroidal antiinflamatuvar etkin madde üzerinden hidrazit-hidrazon yapısına sahip on iki adet yeni bileşikler sentezlenmiştir.

Etodolak yapısında bulunan karboksilik asit fonksiyonel grubunun; metanol ortamında ve sülfürik asit katalizörlüğünde gerçekleşen tepkime ile ester grubuna dönüşmesi sonucunda, metil (1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetat [1] elde edilmiştir. Ester yapısında olan bileşik 1'in, metanol varlığında hidrazin hidrat ile olan reaksiyonu; hidrazit fonksiyonel grubunun oluşmasını sağlayarak 2-(1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetohidrazit [2] kazanılmıştır. Bileşik 2'nin yapısındaki hidrazit üzerinden de, süstitüe benzaldehitler ile etanol ortamında gerçekleşen kondensasyon sonucu hidrazit-hidrazon yapılarının oluşması sağlanmıştır ve 2-(1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit [(süstitüefenil)metilen] hidrazitleri [3a-l] sentezlenmiştir. (Şekil 36) (Tablo 3).



Şekil 36. Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin genel sentez şeması (3a-l).

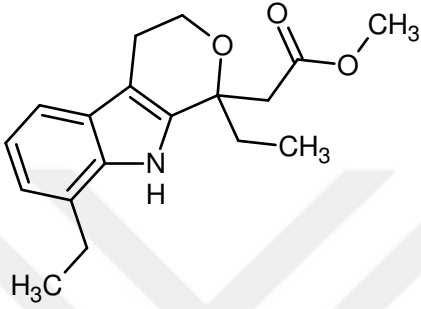
Tablo 3. Sentezlenen hidrazit-hidrazonlarda yer alan aromatik yapılar.

Bileşik Kodu	Ar	Bileşik Kodu	Ar
3a		3g	
3b		3h	
3c		3i	
3d		3j	
3e		3k	
3f		3l	

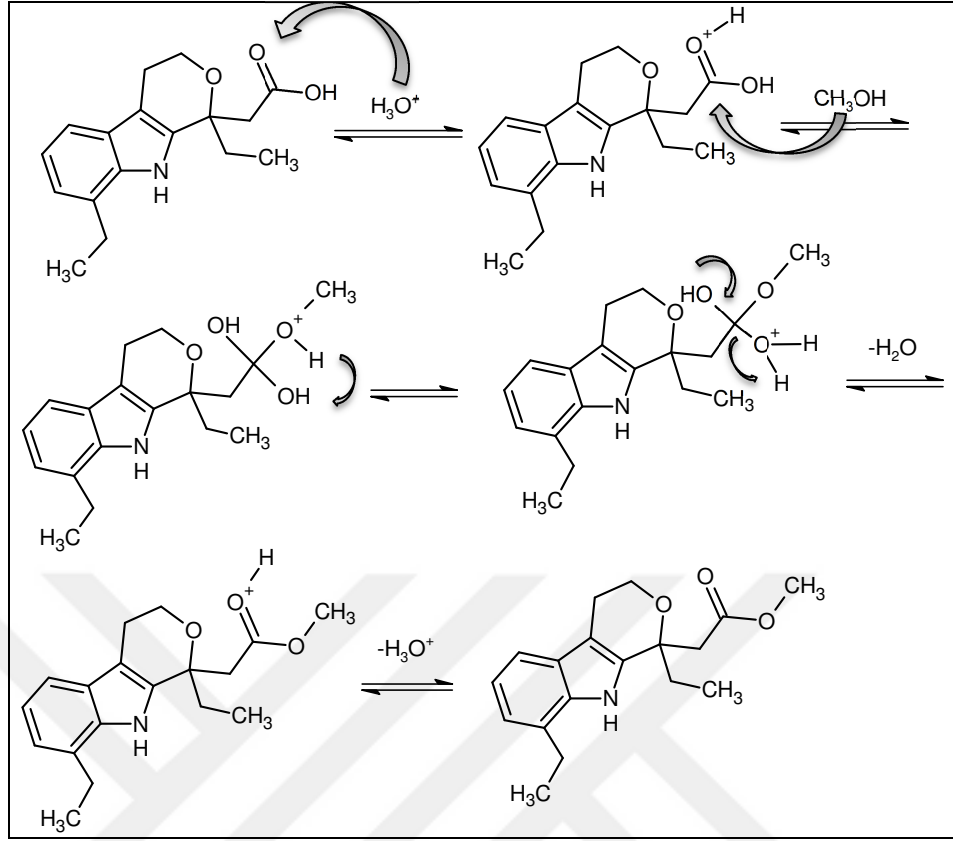
7.1.1. Metil (1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetat [1]

Etodolak olarak bilinen (1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-*b*]indol-1-il)asetik asit bileşiğinin; metanol ve derişik sülfürik asit varlığında reaksiyon vermesi sonucu literatürde kayıtlı olan bileşik **1** sentezlenmiştir (Tablo 4) (Vincenzo ve Franco, 1997; Raghavan ve ark., 2001; Çıkla ve ark., 2013).

Tablo 4. Bileşik 1'e ait özellikler.

	$C_{18}H_{23}NO_3$
	M.A.: 301,380 g/mol
	Verim: % 66
	$R_f \times 100$: 91 (M_1 , t: 25°C)
	E.n.: 126-130°C (128-130°C, Raghavan ve ark., 2001)

Reaksiyonun mekanizmasına göre; etodolak etkin maddesinin yapısında bulunan karboksilik asidin, katalizör olarak kullanılan derişik sülfürik asitten bir proton alması sonucu; karbonil yapısı elektrofilik duruma gelmektedir. Metanolün nükleofilik karakterdeki oksijeni, bu karbonile hamle yaparak bağlanır ve protone olduğu duruma geçer. Bu oksijenden ayrılan proton da, karbonildeki -OH yapılarından birine aktarılır. Yapıdaki diğer -OH grubundaki oksijen ise, ortaklanmamış elektronları sayesinde karbonla arasında çift bağ oluştururken; aynı sırada yapıdan su molekülü ayrılır ve protone durumda olan karbonile sahip ester yapısı oluşur. Reaksiyonun ilk başında kullanılan asitten bir proton alınması ile oluşan baz yapısı da; esterdeki bu protonu alarak katalizörün tekrar kazanılmasını ve etodolak metil esterinin oluşumunu sağlamaktadır (Şekil 37).



Şekil 37. Bileşik 1'in genel sentez mekanizması.

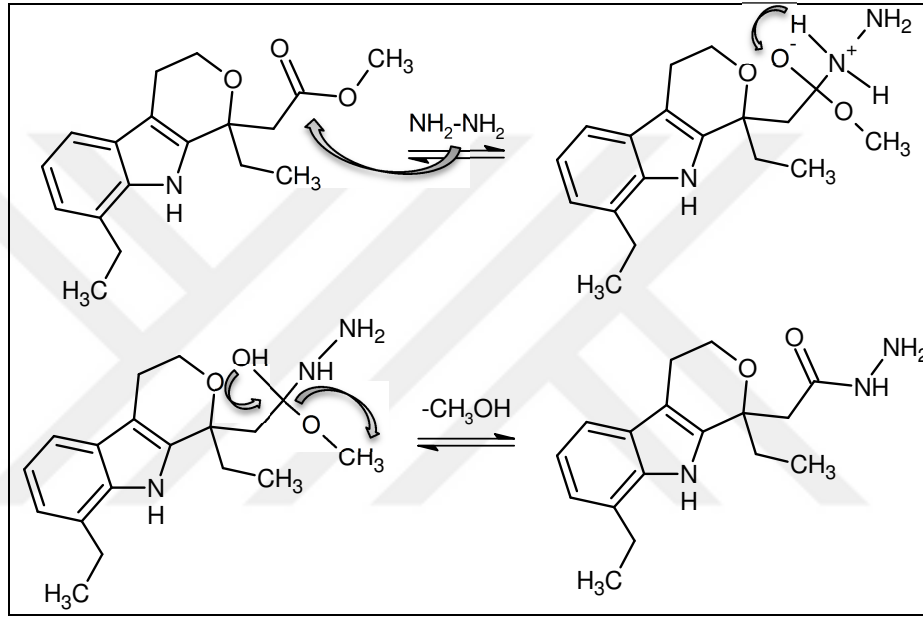
7.1.2. 2-(1,8-Dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetohidrazit [2]

Etodolak metil esterı olarak bilinen metil (1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetat [1] bileşiğinin, hidrazin hidrat ile metanol varlığında ısıtılması sonucu gerçekleşen tepkime ile sentezlenen bileşik 2 literatürde kayıtlıdır (Tablo 5) (Çıkla ve ark., 2013).

Tablo 5. Bileşik 2'ye ait özellikler.

	$C_{17}H_{23}N_3O_2$
	MA: 301,383 g/mol
	Verim % 80
	$R_f \times 100$: 59 (M_1 , t: 25°C),
	E.n.: 185-188 °C (186-188 °C, Çıkla ve ark., 2013)

Reaksiyon mekanizmasına göre; kuvvetli nükleofilik karakterde olan hidrazin yapısı, etodolak metil esterinin karboniline atak yapar ve onun dipollerine ayrılmasını kolaylaştırır. Hidrazinin estere bağlanan yapısındaki azot atomundaki fazla proton, esterdeki oksijen tarafından alınır. Daha sonra yapıdaki -OH grubunun oksijeninin ortaklanmamış elektronları, C-O bağına aktarılarak çift bağ oluşturur. Bu sırada -OCH₃ grubunun da karbonildeki protonu alması sonucu; yapıdan metanol ayrılır ve etodolak hidrazidi elde edilir (Şekil 38).



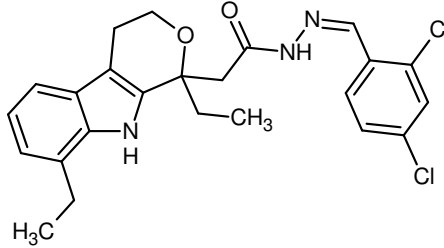
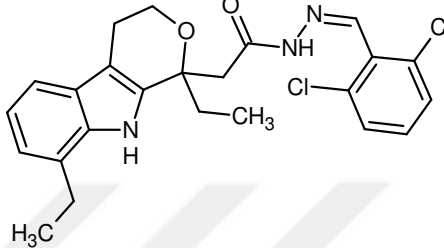
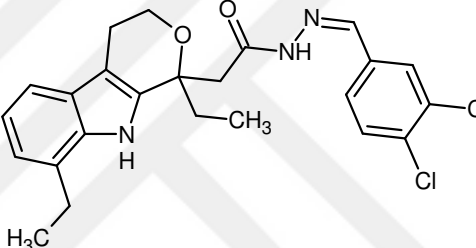
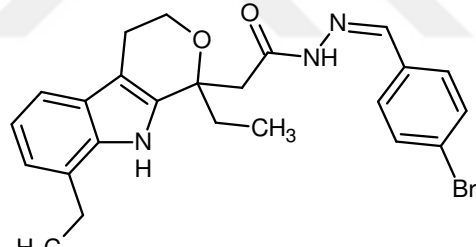
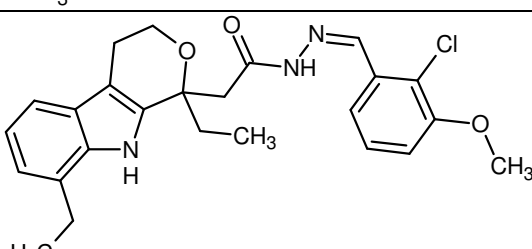
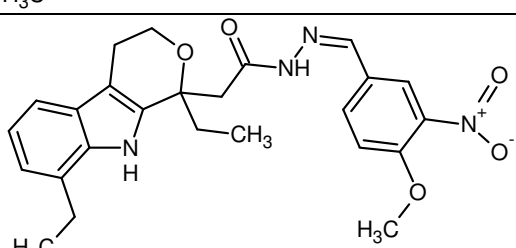
Şekil 38. Bileşik 2'nin genel sentez mekanizması.

7.1.3. 2-(1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit

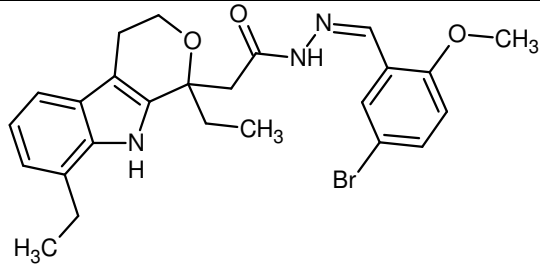
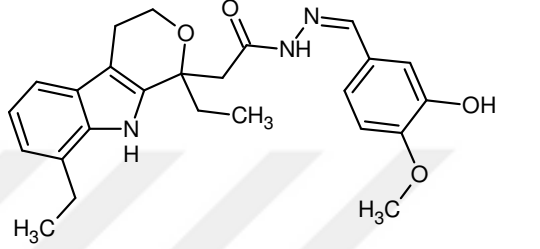
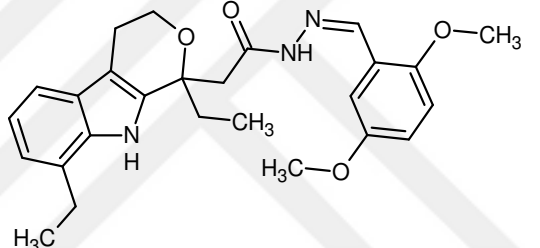
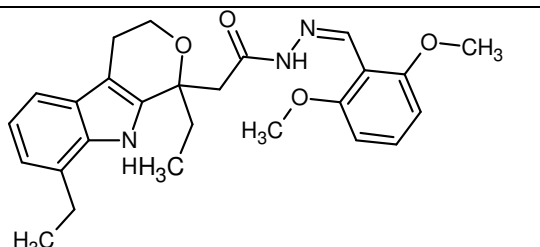
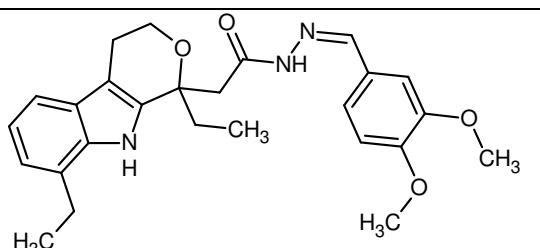
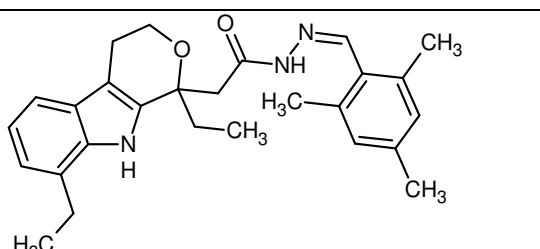
[(süstitüefenil)metilen] hidrazitleri [3a-l]

Etodolak hidrazidi olarak bilinen 2-(1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetohidrazit [2] bileşiğinin, süstitüe benzaldehitler ile etanollü ortamda geri çeviren soğutucu altında ısıtılması sonucu oluşan hidrazit-hidrazon yapısındaki yeni **3a-l** bileşikleri sentezlenmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Tez kapsamında sentezlenen **3a-l** hidrazit-hidrazon bileşikleri.

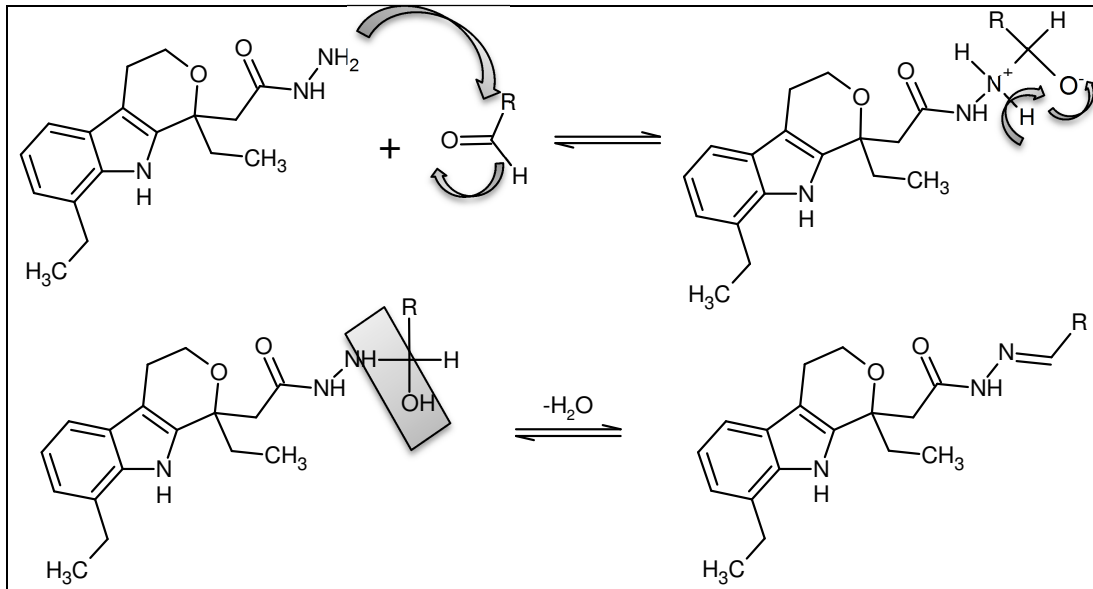
Bileşik Kodu	Laboratuvar Kodu	Bileşik
3a	SGK-719	
3b	SGK-720	
3c	SGK-721	
3d	SGK-722	
3e	SGK-723	
3f	SGK-724	

Tablo 6. Tez kapsamında sentezlenen **3a-l** hidrazit-hidrazon bileşikleri (devam).

Bileşik Kodu	Laboratuvar Kodu	Bileşik
3g	SGK-725	
3h	SGK-726	
3i	SGK-727	
3j	SGK-728	
3k	SGK-729	
3l	SGK-730	

Hidrazon sentezleri; hidrazit bileşiğinin aldehit ile geri çeviren soğutucu altında ısıtılması yöntemi baz alınarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ortamı olarak da etanol kullanılmıştır. Çözücü olarak etanol yerine; metanol (Deep ve ark., 2010), glasiyal asetik asit (Sreenivasulu ve ark., 2019), etanol-glasiyal asetik asit (El-Faham ve ark., 2015), tetrahidrofuran (Szarvasi ve ark., 1973) veya izopropanol (Özdemir ve ark., 2010) de tercih edilebilmektedir. Karbonil bileşiği açısından da keton yerine aldehit tercih edildiği için; oluşan hidrazit-hidrazon yapıları bileşiklerde azometin protonu ($-N=CH-$) bulunmaktadır. Sahip olunan bu hidrojen, yapı karakterizasyonunda ayırt edici niteliğe sahiptir. Eğer keton bileşiği ile sentez yapılsaydı; azometin protonu oluşmazdı ve onun yerine aynı konumda alifatik veya aromatik bir yapı gözlenirdi. Bu nedenle hidrazon sentezinde aldehit kullanılmasının avantaj sağladığı söylenebilmektedir.

Gerçekleştirilen hidrazon sentezinin reaksiyon mekanizması incelendiğinde ise; etodolak hidrazidindeki nükleofilik karaktere sahip $-NH_2$ yapısının, aldehitin karbonil grubuna atak yapması ile reaksiyon başlamaktadır. Oluşan yapıdan su molekülünün ayrılması sonucu da reaksiyon tamamlanmaktadır (Şekil 39).



Şekil 39. **3a-I** bileşiklerinin genel sentez mekanizması.

Sentezi gerçekleştirilen **3a-I** bileşiklerin saflıkları ince tabaka kromatografisinde 25 °C’de M₂ ve M₃ sistemlerinde kontrol edilmiştir ve elde edilen R_f ×100 değerleri Bölüm 6.1’de verilmiştir. Bu bileşiklere ait R_f ×100 ve erime noktası değerlerinin,

etodolak hidrazidi olan **2** bileşiğinin sahip olduğu değerlerden farklı olduğu saptanmıştır. Ayrıca sentezlenen **3a-l** bileşiklerin saflıkları da elementel analiz ile kanıtlanmıştır. Bu bileşiklerin belirlenen fiziksel ve elementel analiz bulguları Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Sentezlenen **3a-l** bileşiklerinin fiziksel ve elementel analiz verileri.

Bileşik Kodu	Molekül Formülü	Verim ^a (%)	Erime Noktası ^b (°C)	Elementel Analiz (%)		
				Hesaplanan	Bulunan	
				C	H	N
3a	C ₂₄ H ₂₅ Cl ₂ N ₃ O ₂	44,77	177-178	62,89 62,37	5,50 5,44	9,17 9,13
3b	C ₂₄ H ₂₅ Cl ₂ N ₃ O ₂	51,74	166	62,89 62,21	5,50 5,37	9,17 9,18
3c	C ₂₄ H ₂₅ Cl ₂ N ₃ O ₂ .1/2H ₂ O	49,78	197-201	61,67 61,93	5,61 5,04	8,99 9,05
3d	C ₂₄ H ₂₆ BrN ₃ O ₂	46,15	182	61,54 61,68	5,60 5,37	8,97 9,03
3e	C ₂₅ H ₂₈ ClN ₃ O ₃ .1/2H ₂ O	52,34	183	64,86 65,23	6,31 5,79	9,08 9,24
3f	C ₂₅ H ₂₈ N ₄ O ₅ .1/2H ₂ O	36,85	162-165	63,41 63,19	6,17 6,38	11,83 11,63
3g	C ₂₅ H ₂₈ BrN ₃ O ₃ .1/2H ₂ O	43,17	164-165	59,18 59,24	5,76 5,19	8,28 8,35
3h	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₄ .H ₂ O	24,59	110	66,21 66,46	6,89 7,22	9,27 9,09
3i	C ₂₆ H ₃₁ N ₃ O ₄ .1/2H ₂ O	26,67	170-171	68,10 68,25	7,03 6,28	9,16 9,19
3j	C ₂₆ H ₃₁ N ₃ O ₄ .1/2H ₂ O	55,99	194-195	68,10 68,29	7,03 6,20	9,16 9,21
3k	C ₂₆ H ₃₁ N ₃ O ₄ .H ₂ O	45,74	140-142	66,79 67,03	7,11 6,62	8,99 8,81
3l	C ₂₇ H ₃₃ N ₃ O ₂	43,83	173	75,14 74,68	7,71 7,27	9,74 9,88

^a Verimler saflaştırılmış madde üzerinden hesaplanmıştır.

^b Erime noktaları düzeltilmemiştir.

7.2. FT-IR Bulguları

Hidrazit yapısına sahip bileşik **2**’nin süstitüe benzaldehitler ile kondensasyon reaksiyonu sonucu elde edilen **3a-l** etodolak hidrazit-hidrazonlarının FT-IR spektrum bulgularına göre; indol ve hidrazon N-H gerilme bandları 3392-3194 cm⁻¹’lerde saptanmıştır. Hidrazit-hidrazon yapısına ulaşıldığını ifade eden keskin C=O gerilme bandlarının 1673-1641 cm⁻¹’lerde, C=N gerilme bandlarının da 1617-1566 cm⁻¹’lerde

olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, aromatik C=C gerilme, N-H ve C-N eğilme bandlarının 1600-1400 cm^{-1} 'lerde olduğu sonucuna varılmıştır. Kıyaslama yapabilmek adına; literatürde yer alan farklı hidrazit-hidrazonların FT-IR bulguları da değerlendirilmiştir.

Rollas ve ark. 4-florobenzoik asit hidrazidi üzerinden sentezledikleri hidrazonların N-H gerilme bandlarını 3210-3170 cm^{-1} 'lerde, C=O gerilme bandlarını 1680-1670 cm^{-1} 'lerde saptamışlardır (Rollas ve ark., 2002).

Küçükgülzel ve ark. diflunisal üzerinden sentezledikleri hidrazit-hidrazonlarının C=N gerilme bandlarını 1625-1600 cm^{-1} 'lerde, C=O gerilme bandlarını 1662-1639 cm^{-1} 'lerde tespit etmişlerdir (Küçükgülzel ve ark., 2003). Şenkardeş ve ark. ise; diflunisal üzerinden yeni hidrazit-hidrazon yapıları sentezlemişlerdir ve C=O, C=N gerilme bandlarının sırasıyla 1647-1633, 1614-1583 cm^{-1} 'lerde olduğunu belirlemişlerdir (Şenkardeş ve ark., 2016).

Kaplancikli ve ark. sentezledikleri hidrazit-hidrazonların N-H, C=O, C=N gerilme bandlarını sırasıyla 3220-3195, 1670-1645, 1605-1545 cm^{-1} 'lerde tespit etmişlerdir (Kaplancikli ve ark., 2008).

Çıkla ve ark. flurbiprofen başlangıç maddesinden sentezledikleri hidrazit-hidrazonlarının N-H, C=O, C=N gerilme bandlarını sırasıyla 3227-3171, 1682-1647, 1645-1601 cm^{-1} 'lerde saptamışlardır (Çıkla ve ark., 2013). Aydın ve ark. ise; mikrodalga yöntemi ile sentezledikleri flurbiprofen hidrazit-hidrazonlarına ait N-H, C=O, C=N gerilme bandlarına sırasıyla 3338-3117, 1688-1641, 1647-1593 cm^{-1} 'lerde ulaşmışlardır (Aydın ve ark., 2013).

Küçükgülzel ve ark. tolmetin üzerinden sentezledikleri hidrazit-hidrazon bileşiklerinin sahip olduğu N-H gerilme bandlarını 3231-3069 cm^{-1} 'lerde, C=O gerilme bandlarını 1692-1660 cm^{-1} 'lerde, C=N gerilme bandlarını da 1628-1597 cm^{-1} 'lerde tespit etmişlerdir (Küçükgülzel ve ark., 2015).

Han ve ark. sentezledikleri benzokain hidrazit-hidrazonlarına ait N-H, C=O, C=N gerilme bandlarını sırasıyla 3198-3045, 1653-1643, 1620-1600 cm^{-1} 'lerde saptamışlardır (Han ve ark., 2017).

Han ve ark. sentezledikleri etil paraben hidrazit-hidrazonlarının N-H gerilme bandlarının 3088-3041 cm^{-1} 'lerde, C=O gerilme bandlarının 1687-1645 cm^{-1} 'lerde,

C=N gerilme bandlarının da 1622-1602 cm^{-1} 'lerde olduğunu belirlemişlerdir (Han ve ark., 2020).

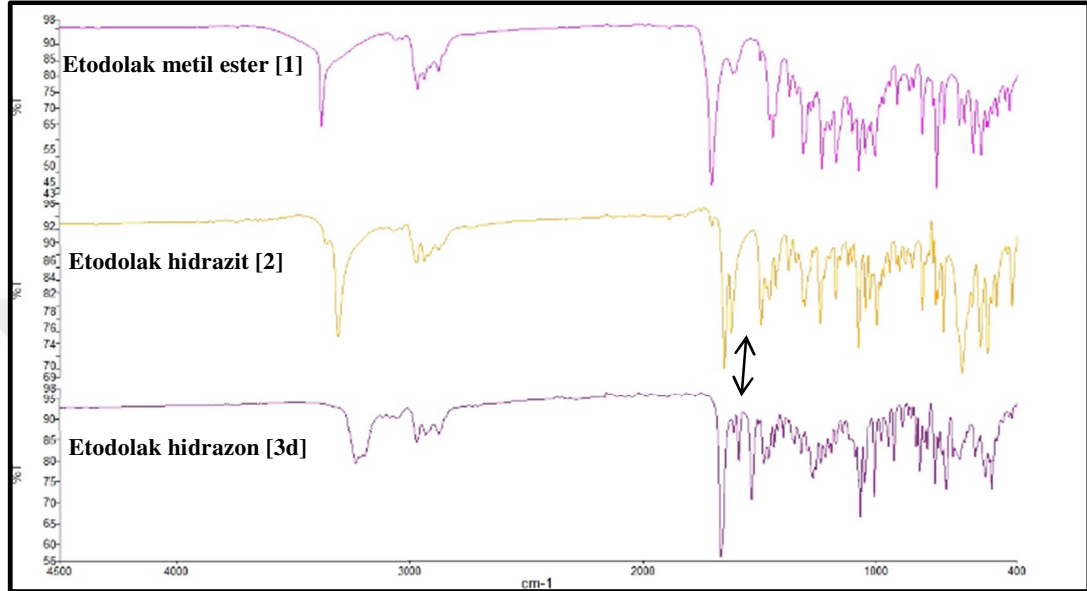
Literatürde yer alan etodolak hidrazit-hidrazonlarının da FT-IR bulguları incelendiğinde; Çıkla ve ark. C=O gerilme bandlarını 1667-1639 cm^{-1} 'lerde, C=N gerilme bandlarını 1630-1601 cm^{-1} 'lerde saptamışlardır. İndol ve hidrazon N-H gerilme bandlarını ise; 3449-3213 cm^{-1} 'lerde tespit etmişlerdir (Çıkla ve ark., 2013). Kummari ve ark. indol ve hidrazon N-H, C=O, C=N gerilme bandlarını sırasıyla 3379-3204 cm^{-1} , 1661-1637 cm^{-1} , 1608-1600 cm^{-1} olarak belirlemişlerdir (Kummari ve ark., 2018). Hassan ve Sarsam ise; indol ve hidrazon N-H, C=O, C=N gerilme bandlarına sırasıyla 3417-3247, 1672-1641, 1622-1589 cm^{-1} 'lerde ulaşmışlardır (Hassan ve Sarsam, 2019).

Literatürde hidrazon yapıları için verilen bu belirgin bandların, sentezlenen **3a-l** bileşiklerinin değerleri (Tablo 8) ile uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 8. **3a-l** bileşiklerinin FT-IR bulguları.

Bileşik	İndol ve hidrazon N-H g.b.	C=O g.b. (hidrazon) C=N g.b.	C=C g.b., N-H e.b., C-N g.b.	Aromatik e.b.
3a	3244, 3194	1669, 1605	1584, 1531, 1500, 1470, 1436	923, 785, 745
3b	3354, 3316, 3245	1651, 1583	1556, 1459, 1441, 1423	923, 779, 744
3c	3232	1673, 1587	1536, 1462, 1440, 1423	936, 794, 747
3d	3233, 3213, 3198	1667, 1612	1589, 1534, 1484, 1463, 1438, 1400	832, 750
3e	3240, 3220	1669, 1566	1540, 1500, 1470, 1430	942, 780, 747
3f	3342, 3289	1649, 1617	1566, 1530, 1498, 1460, 1440, 1421	944, 792, 744
3g	3243, 3202	1645, 1595	1564, 1481, 1462, 1407	970, 788, 742
3h	3279	1652, 1610	1580, 1512, 1456, 1440	956, 800, 743
3i	3244, 3222, 3202	1643, 1601	1567, 1494, 1463, 1423	970, 791, 741
3j	3392, 3323, 3230	1651, 1606	1594, 1507, 1470, 1412	952, 778, 749
3k	3286, 3252, 3208	1641, 1600	1578, 1510, 1461, 1420	955, 795, 744
3l	3271, 3199	1663, 1610	1600, 1546, 1504, 1478, 1456, 1435	921, 850, 785, 741

Ayrıca, bileşik **1**, **2** ve **3d**'nin FT-IR spektrumları karşılaştırıldığında; bileşikler arasındaki farklılıklar daha fazla göze çarpmaktadır. Örneğin; hidrazit yapıli bileşik **2**'nin spektrumunda olmayan C=N gerilme bandının, hidrazon yapıli bileşik **3**'ün spektrumunda yer aldığı gözlenmektedir (Şekil 40).



Şekil 40. Bileşik **1**, **2** ve **3d**'nin FT-IR spektrumlarının karşılaştırılması.

Elde edilen bu bilgiler, hidrazit bileşiğinden hidrazon yapısının sentezlendiğini kanıtlamıştır. Ayrıca, sentezlenen **3a-l** hidrazit-hidrazon bileşikleri çeşitli süstitüentlere sahip olduğu için; bunlara karşılık gelen bandlar da FT-IR spektrumu açısından özeldir. Tespit edilen değerler Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. **3a-l** bileşiklerinin süstitüentlerine ait FT-IR bulguları.

Bileşik	Ar	Süstitüentlere ait bandlar
3a	2,4-diklorofenil	1096 (Ar-Cl g.b.)
3b	2,6-diklorofenil	1091 (Ar-Cl g.b.)
3c	3,4-diklorofenil	1078 (Ar-Cl g.b.)
3d	4-bromofenil	1069 (Ar-Br g.b.)
3e	2-kloro-3-metoksifenil	1070 (Ar-Cl g.b.), 1259 (eter asimetrik C-O g.b.) 1048 (eter simetrik C-O g.b.)
3f	4-metoksi-3-nitrofenil	1530 (asimetrik NO ₂ g.b.) 1358 (simetrik NO ₂ g.b.) 1279 (eter asimetrik C-O g.b.) 1077 (eter simetrik C-O g.b.)

Tablo 9. **3a-l** bileşiklerinin süstitüentlerine ait FT-IR bulguları (devam).

Bileşik	Ar	Süstitüentlere ait bantlar
3g	5-bromo-2-metoksifenil	1074 (Ar-Br g.b.) 1265 (eter asimetrik C-O g.b.) 1027 (eter simetrik C-O g.b.)
3h	3-hidroksi-4-metoksifenil	3279 (bağ yapmış fenol O-H g.b.) 1250 (fenol O-H e.b. ve C-O g.b.) 1274 (eter asimetrik C-O g.b.) 1025 (eter simetrik C-O g.b.)
3i	2,5-dimetoksifenil	1265 (eter asimetrik C-O g.b.) 1043 (eter simetrik C-O g.b.)
3j	2,6-dimetoksifenil	1254 (eter asimetrik C-O g.b.) 1074 (eter simetrik C-O g.b.)
3k	3,4-dimetoksifenil	1268 (eter asimetrik C-O g.b.) 1023 (eter simetrik C-O g.b.)
3l	2,4,6-trimetilfenil	2965 (CH ₃ asimetrik C-H g.b.) 2871 (CH ₃ simetrik C-H g.b.)

7.3. ¹H-NMR Bulguları

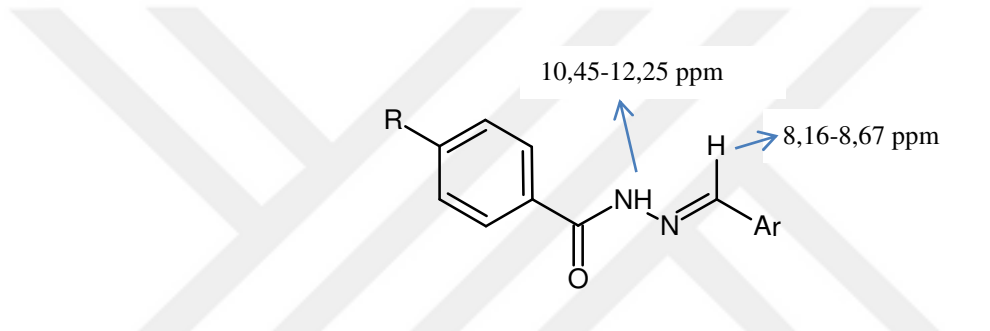
Etodolak üzerinden sentezlenen **3a-l** yeni hidrazit-hidrazon türevlerinden; **3a**, **3b**, **3d** ve **3l** bileşiklerinin ¹H-NMR spektrumları 300 MHz'lik frekansta DMSO-d₆ çözücüsü içerisinde çalışılmıştır ve CO-NH protonları 9,71-11,59 ppm'lerde, azometin (CH=N) protonları 7,64-8,56 ppm'lerde, indol N-H protonları da 10,43-10,53 ppm'lerde saptanmıştır. Kalan diğer bileşiklerin spektrumları da 300 MHz'lik frekansta CDCl₃ çözücüsü ile elde edilmiştir ve CO-NH protonları 9,12-9,96 ppm'lerde, azometin (CH=N) protonları 7,67-8,49 ppm'lerde, indol N-H protonları da 9,06-9,55 ppm'lerde tespit edilmiştir.

Hidrazit yapısındaki bir bileşikten hidrazon yapısının oluşması için; hidrazidin sahip olduğu -NH₂'deki iki hidrojene karşılık gelen pikin, hidrazonun ¹H-NMR spektrumunda gözlenmemesi gerekmektedir. Çıkla ve ark. etodolak hidrazidine ait -NH₂ yapısındaki iki protonun, DMSO-d₆ içerisindeki kimyasal kayma değerini yayvan singlet olarak 4,27 ppm'de tespit etmişlerdir (Çıkla ve ark., 2013). Kumari ve ark. ise; aynı yapıyı CDCl₃ çözücüsünde 3,93 ppm'de singlet olarak saptamışlardır (Kumari ve ark., 2018). Sentezlenen **3a-l** bileşiklerinin DMSO-d₆ ve

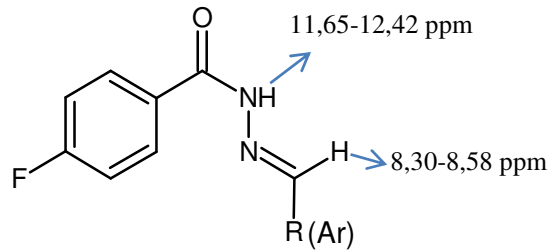
CDCl_3 içerisinde çalışılan ^1H -NMR spektrumları incelendiğinde ise; singlet olarak iki protona karşılık gelen ve bu değerlere sahip olan bir pik gözlenmemiştir.

Hidrazon yapısının oluştuğuna dair diğer en önemli kanıtlardan biri de; ^1H -NMR spektrumunda $-\text{CO}-\text{NH}$ protonunun ve azometin protonunun ($\text{CH}=\text{N}$) yerinin belirlenmesidir. Bu yüzden literatürdeki hidrazonlara ait tespit edilen spektrum bulguları da değerlendirme yapabilmek adına incelenmiştir.

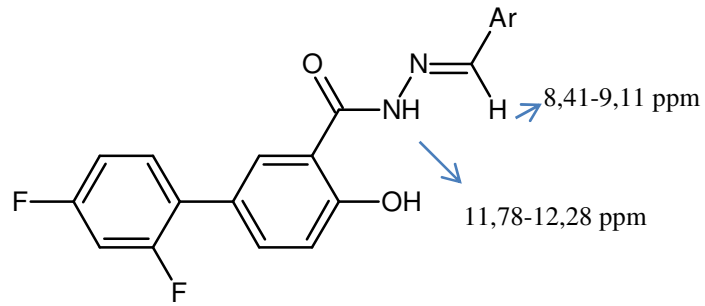
Koçyiğit-Kaymakçioğlu ve ark. sentezledikleri hidrazit-hidrazon bileşiklerindeki azometin ve N-H protonlarını sırasıyla 8,16-8,67 ppm, 10,45-12,25 ppm değerlerinde saptamışlardır (Koçyiğit-Kaymakçioğlu ve ark., 2006).



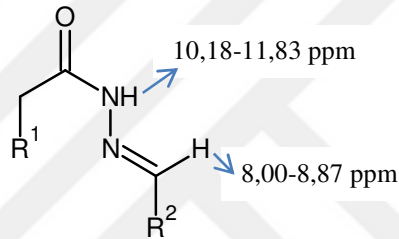
Koçyiğit-Kaymakçioğlu ve ark. 4-florobenzoik asit hidrazidi kullanarak sentezledikleri hidrazon bileşiklerine ait azometin protonlarını 8,30-8,58 ppm’lerde, N-H protonlarını 11,65-12,42 ppm’lerde singlet olarak tespit etmişlerdir (Koçyiğit-Kaymakçioğlu ve ark., 2009).



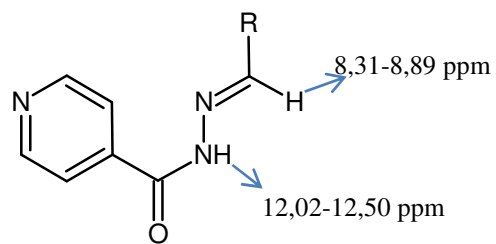
Şenkardeş ve ark. diflunisal üzerinden sentezledikleri yeni hidrazit-hidrazonlardaki azometin protonlarını 8,41-9,11 ppm’lerde, N-H ve O-H protonlarını 11,78-12,28 ppm’lerde saptamışlardır (Şenkardeş ve ark., 2016).



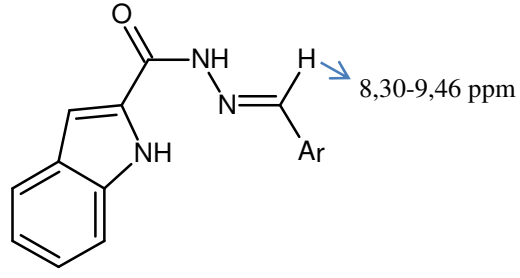
Popiolek ve Biernasiuk sentezledikleri hidrazit-hidrazonların N-H ve azometin protonlarını sırasıyla 10,18-11,83 ppm, 8,00-8,87 ppm değerlerinde singlet olarak belirlemişlerdir (Popiolek ve Biernasiuk, 2016).



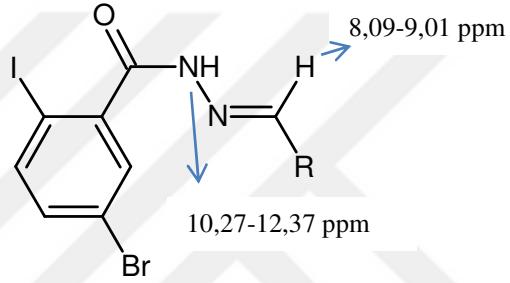
Popiolek ve ark. izonikotinic asit bileşiğinin hidrazit-hidrazon türevlerine ait N-H ve azometin protonlarını sırasıyla 12,02-12,50, 8,31-8,89 ppm'lerde tespit etmişlerdir (Popiolek ve ark., 2018).



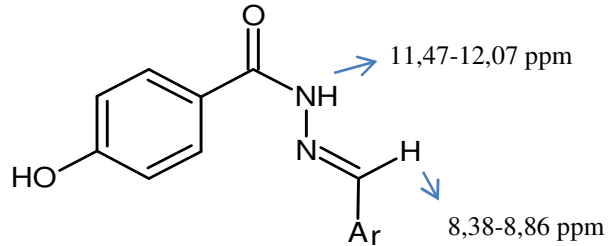
Demurtas ve ark. indol yapısına sahip hidrazit-hidrazonlardaki azometin protonlarını 8,30-9,46 ppm'lerde singlet olarak saptamışlardır (Demurtas ve ark., 2019).



Popiolek ve ark. sentezledikleri yeni hidrazit-hidrazon bileşiklerinin azometin protonlarına 8,09-9,01 ppm’lerde, N-H protonlarına 10,27-12,37 ppm’lerde singlet olarak ulaşmışlardır (Popiolek ve ark., 2020).



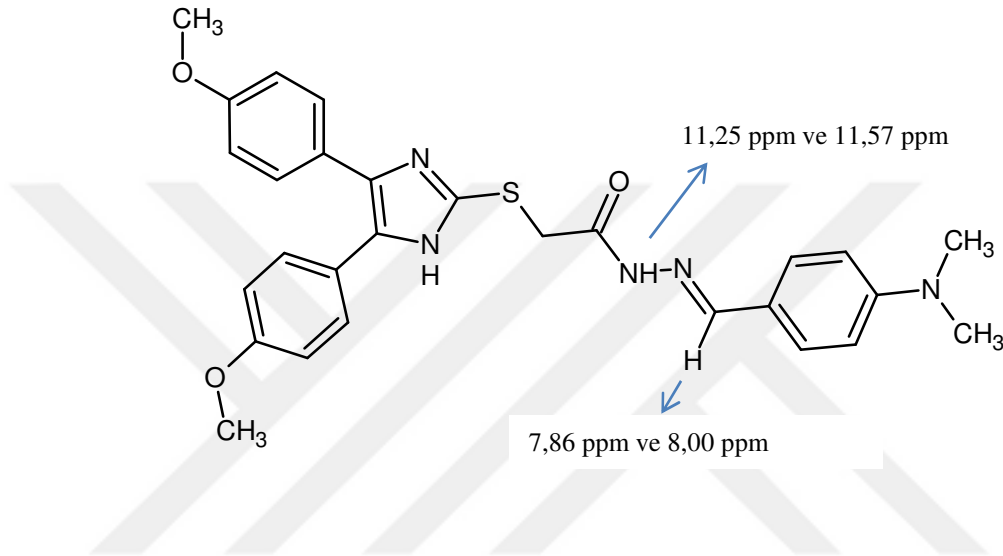
Han ve ark. etil paraben bileşiğinin hidrazit-hidrazon türevlerindeki azometin protonlarını 8,38-8,86 ppm’lerde, N-H protonlarını 11,47-12,07 ppm’lerde singlet olarak tespit etmişlerdir (Han ve ark., 2020).



Hidrazit-hidrazon bileşiklerinin; azometin yapısında bulunan C=N bağı sonucunda *E/Z* geometrik izomeriye ve amit yapısı sonucunda da *cis/trans* izomeriye sahip olabileceği saptanmıştır. Ayrıca, bazı hidrazit-hidrazonların DMSO- d_6 kullanılarak elde edilen ^1H -NMR spektrumlarında; -CO-NH, -CH=N gibi yapılar için bir hidrojene karşılık gelen pik, tek singlet yerine çift pik olarak gözlenmiştir. Bu duruma göre; CO-NH protonuna ait piklerin daha yüksek alanda olanı Z izomerini;

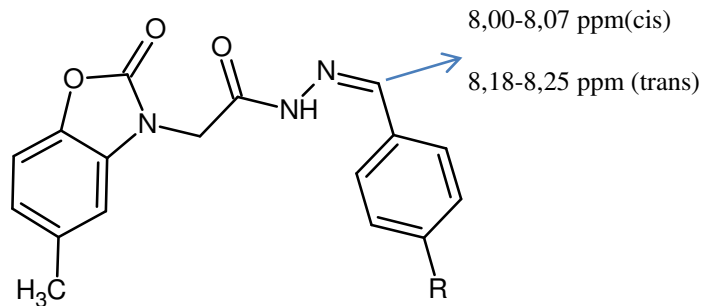
azometin protonuna ait piklerin daha düşük alanda olanı da E izomerini ifade ettiği bildirilmiştir (Rutavichyus ve ark., 1995; Rutavichyus ve ark., 2000).

Gürsoy ve ark. sentezledikleri hidrazit-hidrazon yapısına ait azometin protonunu 7,86 ppm ve 8,00 ppm'de bir protona karşılık iki singlet olarak; hidrazon N-H protonunu da 11,25 ppm ve 11,57 ppm'de aynı şekilde saptamışlardır. Yapıda E ve Z izomeri olduğu sonucuna varmışlardır (Gürsoy ve ark., 1997).

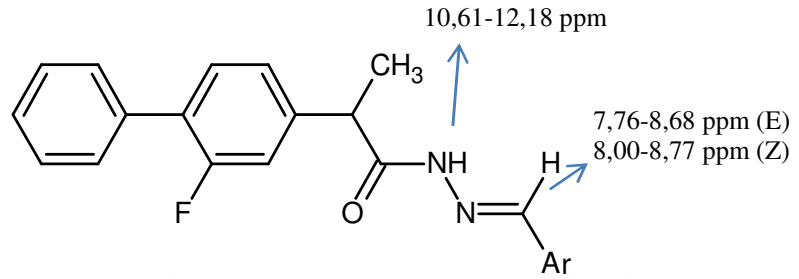


Easmon ve ark. 2-benzoksazolil hidrazit-hidrazonlarının N-H protonlarına ait E izomerinin 9-12 ppm'de, Z izomerinin de 14-15 ppm'de olduğunu bildirmişlerdir (Easmon ve ark., 2006).

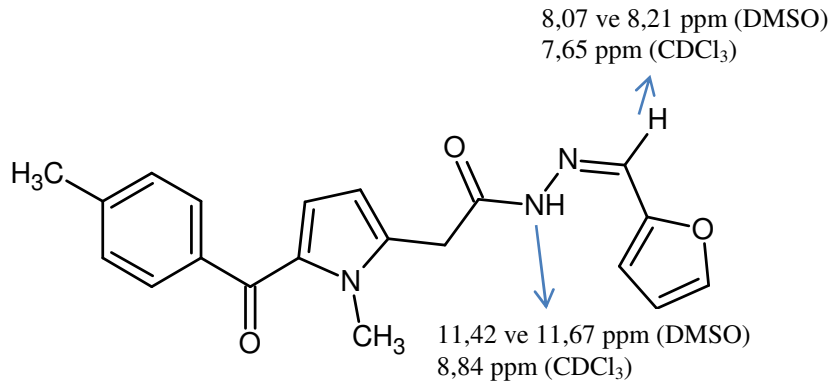
Salgın-Gökçen ve ark. sentezledikleri hidrazonların ^1H -NMR spektrumlarını değerlendirdiklerinde; amit yapısı sonucu azometin protonlarında cis ve trans konformerlerinin olduğu sonucuna varmışlardır.. Bu protonların yüksek alanda gözleneni (8,00-8,07 ppm) cis yapıda ; düşük alanda gözleneni (8,18-8,25 ppm) trans yapıda tespit edilmiştir (Salgın-Gökçen ve ark., 2007).



Aydın ve ark. mikrodalga yöntemi ile sentezledikleri flurbiprofen hidrazit-hidrazonlarına ait N-H protonlarını ikişer singlet olarak 10,61-12,18 ppm’lerde saptamışlardır. Yine iki singlet olarak gözlenen azometin protonlarının E izomerlerini 7,76-8,68 ppm’lerde, Z izomerlerini 8,00-8,77 ppm’lerde belirlemişlerdir (Aydın ve ark., 2013).



Küçüküznel ve ark. sentezledikleri tolmetin hidrazit-hidrazon bileşiklerinin CDCl_3 çözücüsünde alınan spektrumlarında; N-H protonlarını 9,58-11,43 ppm’lerde, azometin protonlarını da 7,79-8,20 ppm’lerde singlet olarak saptamışlardır. Ancak 2-furfuril süstitüentine sahip hidrazonun ^1H -NMR spektrumu, $\text{DMSO}-d_6$ çözücüsü ile elde edildiğinde; bu bileşiğe ait N-H protonunun 11,42 ppm ve 11,67 ppm’de, $\text{CH}=\text{N}$ protonunun da 8,07 ppm ve 8,21 ppm’de ikişer singlet olarak gözleendiği ve bu bileşiğin E izomerine sahip olduğı bildirilmiştir. Ayrıca ikişer pik oluşumunun da yapıdaki cis-trans konformerlerinden kaynaklı olduğı ifade edilmiştir. Aynı bileşiğin ^1H -NMR spektrumu CDCl_3 ile alındığında ise; N-H ve azometin protonlarının piklerinin tek singlet olduğı belirlenmiştir. Bu protonların iki çözücüde farklı şekillerde gözlenmesi de yapıda meydana gelen kanonik durum ile ilişkilendirilmiştir (Küçüküznel ve ark., 2015).



Literatürde yer alan etodolak hidrazit-hidrazonlarının spektrum bulguları da incelenmiştir.

Çıkla ve ark. etodolak hidrazit-hidrazonlarını, DMSO-d₆ çözücüsü ile alınan ¹H-NMR spektrumlarındaki bulgulara göre değerlendirmişlerdir. Azometin protonlarının 7,92-8,30 ppm'de E izomeri, 8,15-8,46 ppm'de Z izomeri formunda; yapıdaki N-H protonlarının da 11,04-11,55 ppm'de Z izomeri, 11,21-11,74 ppm'de E izomeri formunda olduğu tespit edilmiştir. Hesaplanan izomer yüzdelere göre; sentezlenen hidrazon yapılı bileşiklerde Z izomerinin daha fazla yüzdeye sahip olduğu belirlenmiştir (Çıkla ve ark., 2013).

Kummari ve ark. sentezledikleri etodolak hidrazit-hidrazonlarının ¹H-NMR spektrumlarını CDCl₃ çözücüsü kullanarak elde etmişlerdir. Yapıdaki hidrazon N-H, indol N-H, azometin protonlarını sırasıyla 9,56-10,10, 8,89-9,63, 7,70-8,42 ppm'lerde tespit etmişlerdir (Kummari ve ark., 2018).

Hassan ve Sarsam hidrazit-hidrazon yapısındaki üç yeni etodolak türevi bileşiklerine ait hidrazon N-H ve azometin protonlarını; DMSO-d₆ çözücüsü içinde sırasıyla 11,00-11,54 ppm'de ve 7,83-8,22 ppm'de ikiye singlet pik olarak saptamışlardır ve böyle bir pik durumunun oluşmasını E/Z izomeriye bağlamışlardır (Hassan ve Sarsam, 2019).

Sentezlenen yeni etodolak hidrazit-hidrazonlarının ¹H-NMR bulguları, bu bilgiler baz alınarak değerlendirilmiştir ve izomer durumunun olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 10).

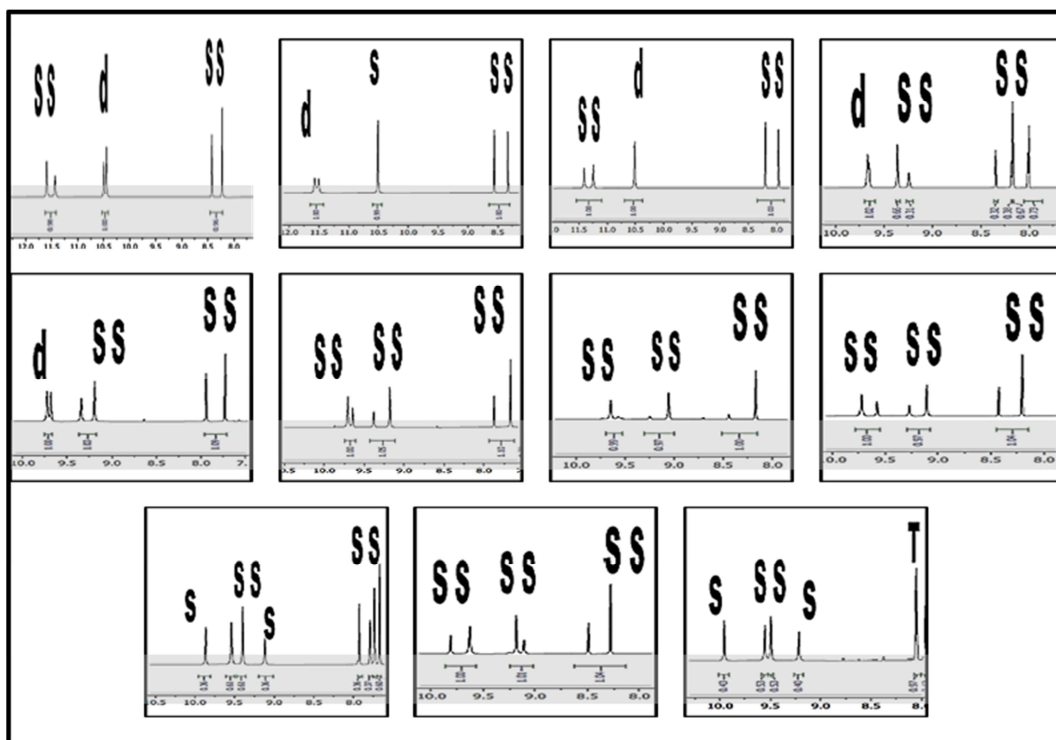
Tablo 10. **3a-l** bileşiklerinin ¹H-NMR bulguları.

Bileşik	-CH=N	-CO-NH	-NH (indol)	-OCH ₃
3a	8,33 (s) (E) 8,56 (s) (Z)	11,54 (d) (EZ) <i>J</i> =19,8 Hz	10,51 (s)	-
3b	8,22 (s) (E) 8,42 (s) (Z)	11,43 (s) (Z) 11,59 (s) (E)	10,47 (d) <i>J</i> =15,3 Hz	-
3c	7,68 (s) (E) 7,74 (s) (Z)	9,12 (s) (Z) 9,86 (s) (E)	9,40 (s) 9,54 (s)	-
3d	7,97 (s) (E) 8,21 (s) (Z)	11,24 (s) (Z) 11,41 (s) (E)	10,51 (d) <i>J</i> =2,4 Hz	-

Tablo 10. **3a-l** bileşiklerinin ¹H-NMR bulguları (devam).

Bileşik	-CH=N	-CO-NH	-NH (indol)	-OCH ₃
3e	8,28 (s) (E) 8,49 (s) (Z)	9,63 (s) (Z) 9,81 (s) (E)	9,11 (s) 9,18 (s)	3,94 (d) <i>J</i> =3 Hz
3f	8,05 (t) (EZ)	9,21 (s) (Z) 9,96 (s) (E)	9,50 (s) 9,55 (s)	3,98 (s) 4,02 (s)
3g	8,17 (s) (E) 8,34 (s) (Z)	9,66 (d) (EZ) <i>J</i> =4,5 Hz	9,24 (s) 9,36 (s)	3,82 (s) 3,86 (s)
3h	7,67 (s) (E) 7,88 (s) (Z)	9,64 (s) (Z) 9,70 (s) (E)	9,18 (s) 9,38 (s)	3,92 (d) <i>J</i> =10,5 Hz
3i	8,21 (s) (E) 8,42 (s) (Z)	9,57 (s) (Z) 9,72 (s) (E)	9,10 (s) 9,27 (s)	3,80 ve 3,84 (dd) <i>J</i> =3,3 ve 4,2 Hz
3j	8,17 (s) (E) 8,44 (s) (Z)	9,55 (s) (Z) 9,64 (s) (E)	9,06 (s) 9,25 (s)	3,85 (s) 3,89 (s)
3k	7,73 (s) (E) 7,94 (s) (Z)	9,70 (d) (EZ) <i>J</i> =11,7 Hz	9,19 (s) 9,34 (s)	3,89-3,96 (m)
3l	7,64 (s) 8,34 (s) (EZ) 8,46 (s)	9,71 (s) 11,03 (s) (EZ) 11,16 (s)	10,43-10,53 (m)	-

Bileşiklerdeki (**3l** hariç) azometin, hidrazon N-H ve indol N-H protonları; dublet, triplet veya ikiyeşer singlet şeklinde gözlenmiştir (Şekil 41).



Şekil 41. **3a-k** bileşiklerinin azometin, hidrazon N-H ve indol N-H protonlarının sırasıyla spektrum görüntüleri.

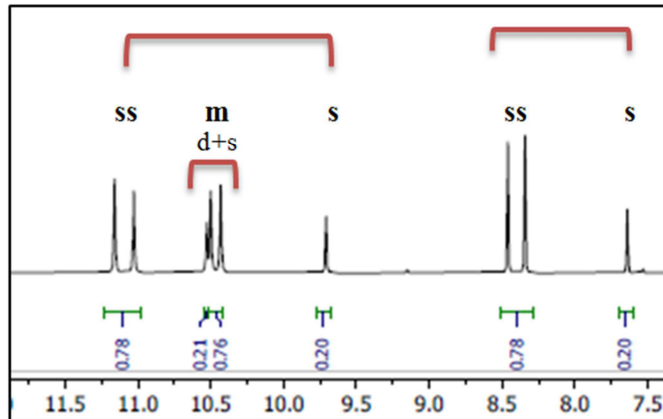
İndol protonlarında gözlenen dublet veya iki singlet şeklindeki piklerin, diğer etodolak hidrazonlarında da olduğu bildirilmiştir (Çıkla ve ark., 2013).

Spektrumlarda sadece bileşik **3f**'ye ait azometin protonu triplet olarak tespit edilmiştir (Şekil 42).



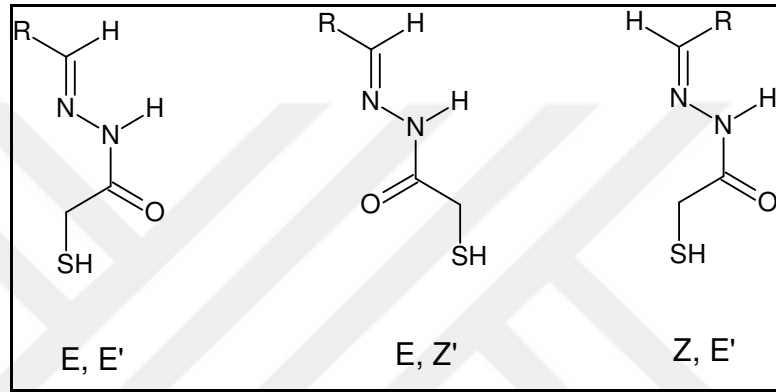
Şekil 42. Bileşik **3f**'nin spektrumdaki azometin protonu.

Bileşik **3l**'de ise; -CH=N ve -CO-NH protonlarının her biri üç singlet olarak, indol N-H protonu da multiplet olarak belirlenmiştir (Şekil 43).



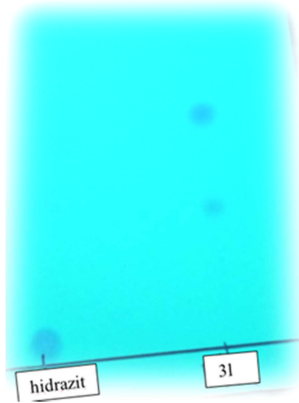
Şekil 43. **3l**'nin spektrumdaki indol, hidrazon N-H ve azometin protonları.

Gözlenen böyle bir durum literatürdeki hidrazon yapılarında da bulunmaktadır. Ershov ve ark. sentezledikleri merkptoasetilhidrazonlarının bazılarında; azometin ve hidrazon N-H protonlarının her birini üç singlet olarak belirlemişlerdir ve bu oluşumu geometrik (E,Z)-konformasyonel (E',Z') izomerler ile ilişkilendirmişlerdir (Şekil 44). Ayrıca bazı bileşiklerde de azometin protonlarının triplet şeklinde olduğunu bildirmişlerdir (Ershov ve ark., 2009). Bu bilgiler doğrultusunda, bileşiklerimizin de ^1H -NMR spektrum sonuçlarına göre bu şekilde davranış gösterdiğini ifade edebiliriz.



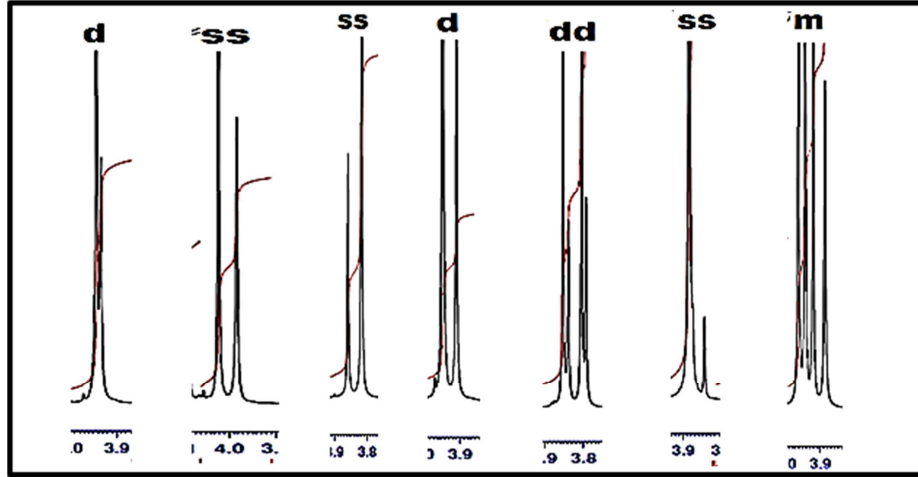
Şekil 44. Merkptoasetilhidrazonlarda belirlenen izomerler (Ershov ve ark., 2009).

Ayrıca **31** bileşiğinin İ.T.K. saflık kontrolünde de iki nokta gözlenmiştir. Bu da yapıda izomer oluşumunun düşünülmesini desteklemektedir (Resim 4).



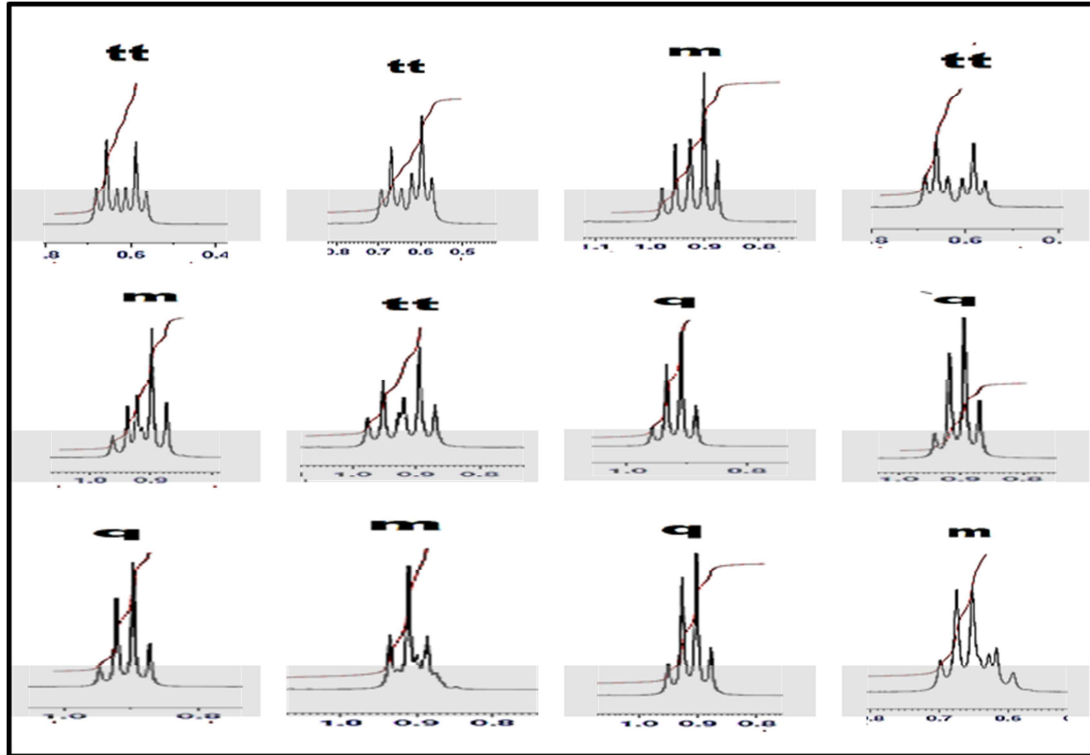
Resim 4. **31**'ye ait İ.T.K. plağındaki iki nokta.

Sentezlenen hidrazonlar arasından metoksi sübstitüenti içeren bileşiklerdeki (**3e-k**) $-\text{OCH}_3$ protonlarının da 3,80-4,02 ppm'lerde olduğu belirlenmiştir. Bu bileşiklerin spektrum görüntüleri Şekil 45'te gösterilmektedir.



Şekil 45. **3e-k** bileşiklerinin metoksi yapılarının sırasıyla spektrum görüntüleri.

Sentezlenen bazı bileşiklerde $-CH_3$ protonları ikiyeşer triplet olarak gözlenmiştir ve bu durum izomer oluşumu ile ilişkilendirilebilmektedir. Bazılarında da bu protonlar kuartet veya multiplet olarak tespit edilmiştir (Şekil 46). Diğer çalışmalarda ise; oluşan bu farklılık durumu, çözünürlük sonucu benzer kimyasal kayma değerlerine sahip olan izomer yapıdaki iki pikin birleşmesi şeklinde açıklanmıştır (Aydın, 2010; Çıkla, 2011).



Şekil 46. **3a-l**'nin $-CH_3$ protonlarının sırasıyla spektrum görüntüleri.

7.4. Biyolojik Etkiler

7.4.1. Antikanser etkiler

Etodolak etkin maddesinin prostat kanser hücreleri üzerinde antikanser etkinliği, hem in vivo hem de in vitro olarak gerçekleştirilen çalışmalarla kanıtlanmıştır (Shigemura ve ark., 2005; Kolluri ve ark., 2005; Carson ve ark., 2006).

Literatürde yer alan etodolak üzerinden sentezlenmiş hidrazit-hidrazon türevlerinin de in vitro olarak prostat kanseri hücrelerine karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Tablo 11).

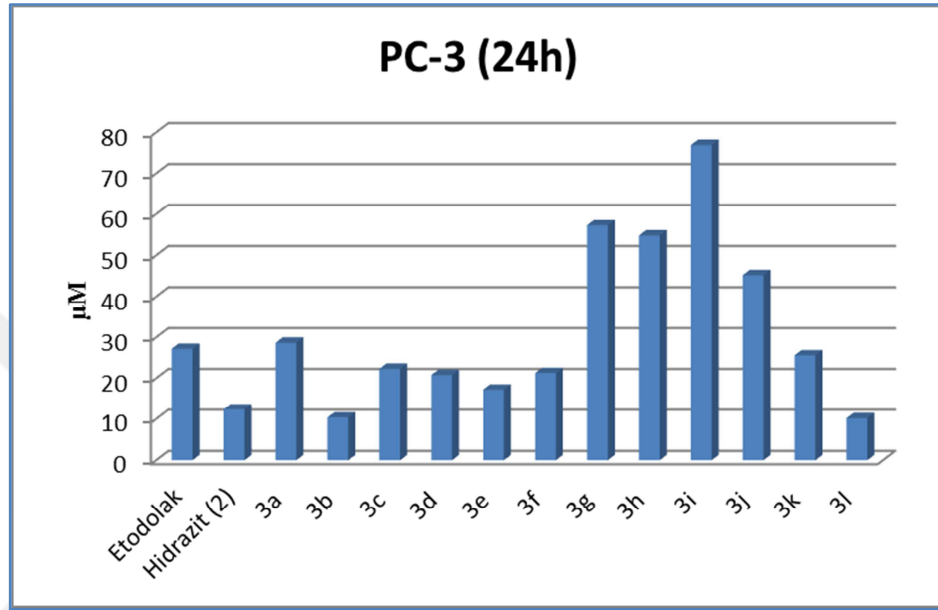
Tablo 11. Literatürdeki etodolak hidrazit-hidrazonlarının prostat kanseri hücresi üzerinde sergilediği antikanser etkiler.

etodolak hidrazon sübstitüenti	IC ₅₀ (µM)	Prostat kanser hücresi	Süre (h)	Yöntem	Kaynak
4-kloro	54,00	PC-3	24	MTT	Çıkla ve ark., 2013
4-kloro	1,77	PC-3	48	MTT	Kummari ve ark., 2018
4-floro	6,58	PC-3	48	MTT	Kummari ve ark., 2018
4-metoksi	40,00	PC-3	24	MTT	Koçyiğit Sevinç ve ark., 2018

Ayrıca, 4-kloro sübstitüenti içeren etodolak hidrazit-hidrazon bileşiğinin, sıçanlardaki sperm kalitesi vb. üzerinde nasıl bir etki oluşturabileceği in vivo olarak incelenmiştir. Yüksek dozlarda olumsuz sonuçlanmasına rağmen; bu sonuca sağlıklı hayvanlar üzerinde ulaşıldığı ve daha geniş çapta araştırmaların yapılmasının farklı sonuçlar gösterebileceği ifade edilmiştir (Sarıözkan ve ark., 2015).

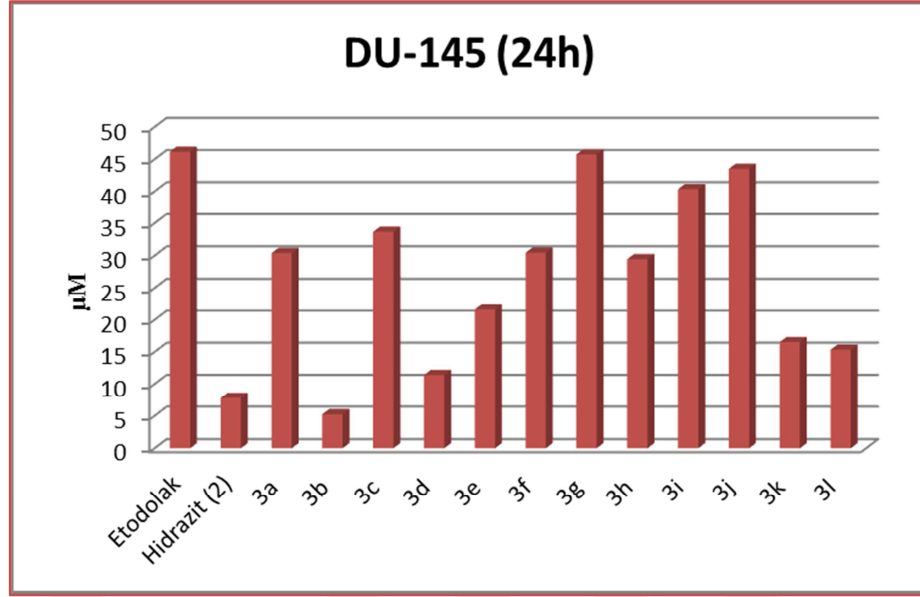
Sentezlen **3a-l** yeni etodolak hidrazit-hidrazonlarının ve kıyaslama yapabilmek adına etodolak ve etodolak hidrazidinin [2] de; PC-3, DU-145 ve LNCaP prostat kanseri hücreleri üzerinde oluşturduğu sitotoksik etkileri in vitro olarak incelenmiştir. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda WST-8 kolorimetrik yöntemi ile elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi ise; etodolak ve etodolak hidrazidinden daha fazla antikanser etki gösterebilecek hidrazon türevlerinin tespit edilmesi yönünde gerçekleştirilmiştir.

Prostat kanseri PC-3 hücre hattına bakıldığında (Şekil 47); **3b**, **3c**, **3d**, **3e**, **3f**, **3k**, **3l** bileşiklerinin etodolaktan daha etkin IC_{50} değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir. Hidrazit [2] de bu kıyaslamaya eklendiğinde ise; en iyi sonuçlar **3b** ve **3l** bileşikleri sayesinde elde edilmiştir ($IC_{50}=10,36 \mu M$ ve $10,20 \mu M$ sırasıyla).



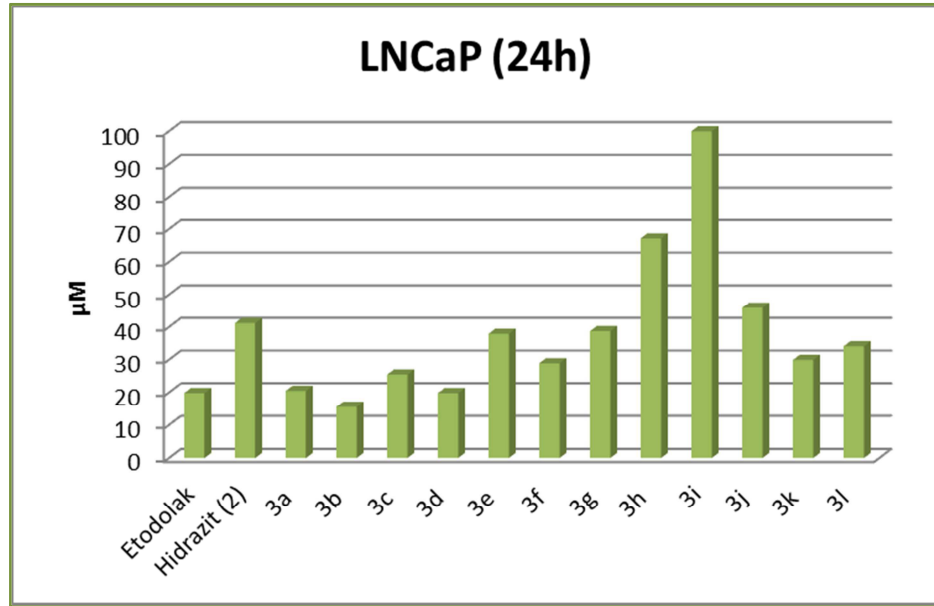
Şekil 47. Etodolak, hidrazit (2) ve **3a-l** bileşiklerinin PC-3 kanser hücresi üzerinde belirlenen IC_{50} değerlerinin kıyaslanması.

Prostat kanseri DU-145 hücre hattı için (Şekil 48); sentezlenen **3a-l** bileşiklerinin sitotoksik etkileri $5,24-45,75 \mu M$ konsantrasyon aralığında tespit edilmiştir ve tüm hidrazit-hidrazonların etodolaktan daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak sadece 2-(1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetikasit[(2,6-diklorofenil)metilen] hidrazidinin [**3b**]; etodolak ve hidrazidinden daha fazla etkili türev olduğu belirlenmiştir ($IC_{50}=5,24 \mu M$).



Şekil 48. Etodolak, hidrazit (2) ve **3a-l** bileşiklerinin DU-145 kanser hücresi üzerinde belirlenen IC₅₀ değerlerinin kıyaslanması.

Prostat kanseri LNCaP hücre hattı incelendiğinde de (Şekil 49); hidrazidin sitotoksik etkisinin etodolaktan daha az olduğu tespit edilmiştir. Hidrazon bileşiği olan **3d**'nin, etodolak ile benzer sitotoksik etkinlik gösterdiği gözlenirken; sadece **3b**'nin etodolaktan daha iyi olduğu belirlenmiştir (IC₅₀=15,53 µM). Diğer hidrazon türevlerinde ise; böyle bir antikanser etkinin oluşmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 49. Etodolak, hidrazit (2) ve **3a-l** bileşiklerinin LNCaP kanser hücresi üzerinde belirlenen IC₅₀ değerlerinin kıyaslanması.

Bu üç hücre hattı genel olarak değerlendirildiğinde ise; etodolak ve etodolak hidrazidinden daha fazla sitotoksik etkiye sahip olan tek bileşik 2,6-dikloro sübstitüentini içeren **3b** olarak belirlenmiştir.

7.4.2. Apoptoz etkiler

Sentezlenen **3a-l** hidrazit-hidrazon türevleri arasından; **3b** bileşiğinin PC-3, DU-145 ve LNCaP prostat kanseri hücrelerinde yüksek sitotoksite gösterdiğinin tespit edilmesi sonucunda; bu bileşiğin apoptotik etkileri JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli testi ve Annexin V/PI deneyi ile Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda incelenmiştir.

Bileşik **3b**'nin ve kontrol amacıyla etodolak etkin maddesinin mitokondriyal membran potansiyeli üzerinde gösterdiği etkiler değerlendirildiğinde; etodolaktan farklı olarak, **3b** bileşiğinin üç kanser hattının mitokondriyal membran potansiyelinde önemli değişimler yaptığı ve apoptotik etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır.

Etodolak, etodolak hidrazidi [2] ve **3b**'nin Annexin V/PI deneyi ile elde edilen sonuçlarının değerlendirilmesi, **3b**'nin diğer bileşikler ile kıyaslaması yapılarak gerçekleştirilmiştir. Böylece daha baskın olan hücre ölüm türünün apoptotik mi nekrotik mi olduğunun daha net anlaşılması sağlanmıştır.

Apoptozun özellikleri sıralandığında; kontrolünün sağlanması mümkündür, enerjiye bağlı olarak gerçekleşir, hücrede büzülme durumu söz konusudur ve hücre membranında bozulma yoktur. Nekrozun özelliklerine bakıldığında ise; kontrolü mümkün değildir, pasif bir şekilde gerçekleşir, hücrede şişme durumu vardır ve hücre membranında bozulma gözlenir (Elmore, 2007).

Prostat kanseri PC-3 hücre hattı incelendiğinde; **3b** bileşiği ve etodolak hidrazidi [2] birbirine yakın IC₅₀ değerlerine sahiptir. Ancak **3b** için apoptotik hücre ölümü daha baskın iken; hidrazit bileşiği için nekrotik hücre ölümü daha belirgin olarak gözlenmiştir (Tablo 12).

Tablo 12. Bileşik **3b** ve etodolak hidrazidi (**2**) için PC-3 hücre hattındaki baskın hücre ölüm türleri.

Bileşik	IC ₅₀ (μM)	Baskın hücre ölümü türü
3b	10,36	apoptotik
etodolak hidrazidi (2)	12,37	nekrotik

Prostat kanseri DU-145 hattına bakıldığında; **3b**'nin hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölümü, etodolak hidrazidine [**2**] göre daha baskın olduğu saptanmıştır. Bu sonuçların IC₅₀ değerleri ile uyumlu olduğu düşünülmektedir (Tablo 13).

Tablo 13. Bileşik **3b** ve etodolak hidrazidi (**2**) için DU-145 hücre hattındaki baskın hücre ölüm türleri.

Bileşik	IC ₅₀ (μM)	Baskın hücre ölümü türü
3b	5,24	apoptotik, nekrotik
etodolak hidrazidi (2)	7,80	-

Prostat kanseri LNCaP hattı incelendiğinde ise; **3b** için apoptotik, etodolak için de nekrotik hücre ölümü daha baskın olarak gözlenmiştir (Tablo 14).

Tablo 14. Bileşik **3b** ve etodolak için DU-145 hücre hattındaki baskın hücre ölüm türleri.

Bileşik	IC ₅₀ (μM)	Baskın hücre ölümü türü
3b	15,53	apoptotik
etodolak	19,82	nekrotik

Böylece bileşik **3b**'nin apoptotik etkiye sahip olduğu iki ayrı yöntemle kanıtlanmıştır.

8. SONUÇ

Reaksiyonun başlangıç maddesi olarak seçilen etodolak etkin maddesinin asit katalizli esterleşme tepkimesi ile etodolak metil esteri [1] kazanılmıştır. Ester fonksiyonel grubuna sahip bu bileşiğin, hidrazin hidrat ile verdiği reaksiyon sonrası etodolak hidrazidi [2] elde edilmiştir. Bu hidrazit bileşiğinin ve farklı süstitüe benzaldehitlerin arasında geçen kondensasyon ile de orijinal on iki adet etodolak hidrazit-hidrazon türevleri [3a-l] sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin İ.T.K. ve elementel analiz ile saflıkları belirlenmiş, FT-IR ve ¹H-NMR spektroskopisi kullanılarak yapıları karakterize edilmiştir.

Sentezlenen hidrazit-hidrazonlarının [3a-l] PC-3, DU-145, LNCaP prostat kanser hücre hatlarına karşı antikanser aktiviteleri Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda incelenmiştir. Bu yeni bileşiklerin ve kıyaslama yapabilmek adına etodolak ve etodolak hidrazidinin [2] sitotoksite çalışmaları WST-8 kolorimetrik yöntemi baz alınarak değerlendirilmiş, hidrazonlar arasından da [3b]'nin daha etkin bir türev olduğu belirlenmiştir. Bu bileşiğin; PC-3, DU-145, LNCaP hücreleri üzerindeki tespit dilen IC₅₀ değerleri sırasıyla 10,36 µM, 5,24 µM ve 15,53 µM'dir. Ayrıca JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli testi ve Annexin V/PI deney sonuçlarına göre; 3b'nin apoptotik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen bu çalışma; 2,6-dikloro süstitüentine sahip [3b] etodolak hidrazit-hidrazonunun prostat kanserinde antikanser etki gösterebileceğini düşündüren bir ön çalışma niteliğini taşımaktadır. Araştırmaların ilerletilmesi ile de daha kapsamlı ve daha etkin sonuçlara ulaşılabileceği düşünülmektedir.

9. KAYNAKLAR

Adger BA, Dyer UC, Woods M, Andrews JFP, Baker HF. Process for the resolution of etodolac using glucamine derivatives. Patent No: US5811558 A, 1998.

Ali-Fehmi R, Che M, Khalifeh I, Malone JM, Morris R, Lawrence WD, Munkarah AR. The effect of cyclooxygenase-2 expression on tumor vascularity in advanced stage ovarian serous carcinoma. *Cancer*. 2003;98(7):1423-1429.

Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:5258-5265.

Arnold JD, Salom IL, Berger AE, Meinders JD, Jacob G, Hayden D, Mullane JF. Comparison of gastrointestinal microbleeding associated with use of etodolac, ibuprofen, indomethacin, and naproxen in normal subjects. *Curr Ther Res*. 1985;37:730-738.

Aydın S, Kaushik-Basu N, Arora P, Basu A, Nichols DB, Talele TT, Akkurt M, Çelik İ, Büyükgüngör O, Küçükgülzel ŞG. Microwave assisted synthesis of some novel flurbiprofen hydrazide-hydrazones as anti-HCV NS5B and anticancer agents. *Marmara Pharm J*. 2013;17:181-189.

Aydın, S. Mikrodalga Yöntemi ile Flurbiprofen'den Hareketle Yeni Hidrazit-Hidrazonların Sentezi ve Biyolojik Etkileri. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Ş. Güniz Küçükgülzel).

Bacac M, Stamenkovic I. Metastatic cancer cell. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2008;3:221-247.

Baehrecke EH. How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(10):779-787.

Benhamou CL. Large-scale open trials with etodolac (Lodine) in France: an assessment of safety. *Rheumatol Int.* 1990;10 (Supl):29-34.

Brockman RW. Mechanisms of resistance to anticancer agents. *Adv Cancer Res.* 1963;7:129-234.

Brocks DR, Jamali F, Russell AS, Skeith KJ. The stereoselective pharmacokinetics of etodolac in young and elderly subjects, and after cholecystectomy. *J Clin Pharmacol.* 1992;32(11):982-989.

Brocks DR, Jamali F. Etodolac clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 1994;26(4):259-274.

Buu-Hoi PH, Xuong D, Nam H, Binon F, Royer R. Tuberculostatic hydrazides and their derivatives. *J Chem Soc.* 1953;48:1358-1364.

Carson DA, Cottam HB, Adachi S, Leoni LM. Use of etodolac for the treatment of prostate cancer. Patent No: US7105561 B2, 2006.

Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner BM, Masferrer JL, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of head and neck. *Cancer Res.* 1999;59(5):991-994.

Chandrasekharan NV, Dal H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(21):13926-13931.

Chen JH, Wu CW, Kao HL, Chang HM, Li AFY, Liu TY, Chi CW. Effect of COX-2 inhibitor on growth of human gastric cancer cells and its relation to hepatocyte growth factor. *Cancer Lett.* 2006; 239:263-270.

Chen WS, Wei SJ, Liu JM, Hsiao M, Kou-Lin J, Yang WK. Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2-selective inhibitor, etodolac. *Int J Cancer*. 2001;91:894-899.

Clark WH. The nature of cancer: morphogenesis and progressive (self)-disorganization in neoplastic development and progression. *Acta Oncol*. 1995;34(1):3-21.

Clarke PGH. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol*. 1990;181(3):195-213.

Çıkla P, Özsavcı D, Bingöl-Özakupınar Ö, Şener A, Çevik Ö, Özbaş-Turan S, Akbuğa J, Şahin F, Küçükgülzel ŞG. Synthesis, cytotoxicity, and pro-apoptosis activity of etodolac hydrazide derivatives as anticancer agents. *Arch Pharm (Weihheim)*. 2013;346:367-379.

Çıkla P, Tatar E, Küçükgülzel İ, Şahin F, Yurdakul D, Basu A, Krishnan R, Nichols DB, Kaushik-Basu N, Küçükgülzel ŞG. Synthesis and characterization of flurbiprofen hydrazide derivatives as potential anti-HCV, anticancer and antimicrobial agents. *Med Chem Res*. 2013;22:5685-5699.

Çıkla P. Etodolak Üzerinden Heterosiklik Bileşiklerin Sentezi, Hepatit-C NS5B Polimeraz İnhibitörü Ve Antikanser Aktivitelerinin Araştırılması. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2011, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. Ş. Güniz Küçükgülzel).

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*. 2005;366(9499):1784-1793.

Dannhardt G, Kiefer W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. *Eur J Med Chem.* 2001;36(2):109-126.

de Souza Thiago L, da Costa ES, Lopes DV, Borojevic R. Racemic etodolac is cytotoxic and cytostatic for B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. *Biomed Pharmacother.* 2009;63(7):548-551.

Deep A, Jain S, Sharma PC, Verma P, Kumar M, Dora CP. Design and biological evaluation of biphenyl-4-carboxylic acid hydrazide-hydrazone for antimicrobial activity. *Acta Pol Pharm.* 2010;67(3):255-259.

Demerson CA, Humber LG, Abraham NA, Schilling G, Martel RR, Pace-Asciak C. Resolution of etodolac and antiinflammatory and prostaglandin synthetase inhibiting properties of the enantiomers. *J Med Chem.* 1983;26(12):1778-1780.

Demerson CA, Humber LG, Dobson TA, Jirkovsky IL. Certain pyrano[3,4-b]indoles and thiopyrano[3,4-b]indoles. Patent No: US3939178 A, 1976

Demerson CA, Humber LG. Process for preparing 1,8-diethyl-1,3,4,9-tetrahydropyrano(3,4-b)-indole-1-acetic acid, etodolac. Patent No: US4585877 A, 1986.

Demurtas M, Baldisserotto A, Lampronti I, Moi D, Balboni G, Pacifico S, Vertuani S, Manfredini S, Onnis V. Indole derivatives as multifunctional drugs: Synthesis and evaluation of antioxidant, photoprotective and antiproliferative activity of indole hydrazones. *Bioorg Chem.* 2019;85:568-576.

Doğan N, Kaçan T, Doğan İ. Analysis of trends in cancer-related mortality in Turkey. *Turk J Oncol.* 2020;35(1):52-57.

Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst.* 1981;66(6):1191-1308.

Easmon J, Pürstinger G, Thies KS, Heinisch G, Hofmann J. Synthesis, structure-activity relationships, and antitumor studies of 2-benzoxazolyl hydrazones derived from alpha-(N)-acyl heteroaromatics. *J Med Chem.* 2006;49(21):6343-6350.

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, Dubois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology.* 1994; 107(4):1183-1188.

El-Faham A, Farooq M, Khattab SN, Abutaha N, Wadaan MA, Ghabbour HA, Fun HK. Synthesis, characterization, and anti-cancer activity of some new N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-2-propylpentane hydrazide-hydrazones derivatives. *Molecules.* 2015;20:14638-14655.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.

Ershov AY, Lagoda IV, Yakimovich SI, Pakal'nis VV, Zerova IV, Dobrodumov AV, Shamanin VV. Tautomerism and mercaptoacetylhydrazones of aliphatic and aromatic aldehydes. *Russ J Org Chem.* 2009;45(5):678-684.

Farber E. Cancer development and its natural history a cancer prevention perspective. *Cancer.* 1988;62 (Suppl 1):676-1679.

Ferdinandi ES, Cochran D, Gedamke R. Identification of the etodolac metabolite, 4-ureido etodolac, in mouse, rat, dog, and man. *Drug Metab Dispos.* 1987;15(6):921-924.

Ferdinandi ES, Sehgal SN, Demerson CA, Dubuc J, Zilber J, Dvornik D, Cayen MN. Disposition and biotransformation of 14C-etodolac in man. *Xenobiotica.* 1986;16(2):153-166.

Foulds L. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res.* 1954;14:327-339.

Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, Chiarugi V, Masini E. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia.* 2001;3(1):53-61.

Glaser KB. Cyclooxygenase selectivity and NSAIDs: cyclooxygenase-2 selectivity of etodolac (Lodine). *Inflammopharmacology.* 1995;3(4):335-345.

Gürsoy A, Terzioğlu N, Ötük G. Synthesis of some new hydrazide-hydrazones, thiosemicarbazides and thiazolidinones as possible antimicrobials. *Eur J Med Chem.* 1997;32:753-757.

Gürsoy E, Ulusoy Güzeldemirci N. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new imidazo[2,1-b]thiazole derivatives. *Eur J Med Chem.* 2007;42(3):320-326.

Hakozaki M, Hojo H, Kikuchi S, Abe M. Etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis by activating caspases in human malignant rhabdoid tumor cells (FRTK-1). *Oncol Rep.* 2007;17(1):169-173.

Han Mİ, Atalay P, İmamoğlu N, Küçükgül ŞG. Synthesis, characterization and anticancer activity of novel hydrazide-hydrazones derived from ethyl paraben. *J Res Pharm.* 2020;24(3):341-349.

Han Mİ, Atalay P, Tunç CÜ, Ünal G, Dayan S, Aydın Ö, Küçükgül ŞG. Design and synthesis of novel (S)-naproxen hydrazide-hydrazones as potent VEGFR-2 inhibitors and their evaluation in vitro/in vivo breast cancer models. *Bioorg Med Chem.* 2021;37:116097.

Han Mİ, Gürol G, Yıldırım T, Kalaycı S, Şahin F, Küçükgülzel ŞG. Synthesis and antibacterial activity of new hydrazide-hydrazones derived from benzocaine. *Marmara Pharm J.* 2017;21(4):961-966.

Hassan OM, Sarsam SW. Synthesis, characterization and preliminary anti-inflammatory evaluation of new etodolac derivatives. *Iraqi J Pharm Sci.* 2019;28(1):106-112.

Hausman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers.* 2014;6:1769-1792.

Henderson BE, Ross RK, Pike MC. Toward the primary prevention of cancer. *Science.* 1991;254(5035):1131-1138.

Hu X, Gong Y, Cao Z, Huang Z, Sha J, Li Y, Li T, Ren B. Solubility, Hansen solubility parameter and thermodynamic properties of etodolac in twelve organic pure solvents at different temperatures. *J Mol Liq.* 2020;316:113779.

Humber LG, Ferdinandi E, Demerson CA, Ahmed S, Shah U, Mobilio D, Sabatucci J, De Lange B, Labbadia F, Hughes P, Devirgilio J, Neuman G, Chau TT, Weichman BM. Etodolac, a novel antiinflammatory agent. The syntheses and biological evaluation of its metabolites. *J Med Chem.* 1988;31(9):1712-1719.

Ishizaki T, Katsumata K, Tsuchida A, Wada T, Mori Y, Hisada M, Kawakita H, Aoki T. Etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits liver metastasis of colorectal cancer cells via the suppression of MMP-9 activity. *Int J Mol Med.* 2006;17(2):357-362.

Jones RA. Etodolac: an overview of a selective COX-2 inhibitor. *Inflammopharmacology.* 1999;7(3):269-275.

Kaplancikli ZA, Turan-Zitouni G, Ozdemir A, Teulade JC. Synthesis and antituberculosis activity of new hydrazide derivatives. Arch Pharm Chem Life Sci. 2008;341:721-724.

Karaman B, Ulusoy Güzeldemirci N. Synthesis and biological evaluation of new imidazo[2,1-b]thiazole derivatives as anticancer agents. Med Chem Res. 2016;25:2471-2484.

Kawai S, Nishida S, Kato M, Furumaya Y, Okamoto R, Koshino T, Mizushima Y. Comparison of cyclooxygenase-1 and -2 inhibitory activities of various nonsteroidal anti-inflammatory drugs using human platelets and synovial cells. Eur J Pharmacol. 1998;347(1):87-94.

Kobayashi M, Nakamura S, Shibata K, Sahara N, Shigeno K, Shinjo K, Naito K, Ohnishi K. Etodolac inhibits EBER expression and induces Bcl-2 regulated apoptosis in Burkitt's lymphoma cells. Eur J Haematol. 2005;75:212-220.

Koçyiğit Sevinç S, Orun O, Mega Tiber P, Çıkla-Süzgün P, Küçükgülzel ŞG. Anti-cancer activity of etodolac and its derivatives on prostate and colorectal cancer cell lines. Proceedings. 2018;2:1573.

Koçyiğit-Kaymakçioğlu B, Oruç E, Unsalan S, Kandemirli F, Shvets N, Rollas S, Anatholy D. Synthesis and characterization of novel hydrazide-hydrazones and the study of their structure-antituberculosis activity. Eur J Med Chem. 2006;41:1253-1261.

Koçyiğit-Kaymakçioğlu B, Oruç-Emre EE, Unsalan S, Rollas S. Antituberculosis activity of hydrazones derived from 4-fluorobenzoic acid hydrazide. Med Chem Res. 2009;18:277-286.

Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, Kosuge T, Yoshida S. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and

potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer*. 2001;91(2):333-338.

Kolluri SK, Corr M, James SY, Bernasconi M, Lu D, Liu W, Cottam HB, Leoni LM, Carson DA, Zhang XK. The R-enantiomer of the nonsteroidal antiinflammatory drug etodolac binds retinoid X receptor and induces tumor-selective apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(7):2525-2530.

Kopper L, Petak I, Sebestyen A. Molecular genetic basis of cancer development. *Ann New York Acad Sci*. 1997;824:1-7.

Koupai-Abyazani MR, Esaw B, Laviolette B. Etodolac in equine urine and serum: determination by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, confirmation, and metabolite identification by atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 1999;23:200-209.

Kummari B, Ramesh P, Parsharamulu R, Allaka TR, Anantaraju H, Yogeeswari P, Balasubramanian S, Guggilapu SD, Babu BN, Anireddy JS. Design and synthesis of new etodolac-pyridazinones as potent anticancer agents using $Pb(OAc)_4$ to assist N-N bond formation. *ChemistrySelect*. 2018;3:5050-5054.

Küçükgülzel ŞG, Koç D, Çıkla-Süzgün P, Özşavcı D, Bingöl-Özakpınar Ö, Mega-Tiber P, Orun O, Erzincan P, Sağ-Erdem S, Şahin F. Synthesis of tolmetin hydrazide-hydrazones and discovery of a potent apoptosis inducer in colon cancer cells. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2015;348:730-742.

Küçükgülzel ŞG, Mazi A, Sahin F, Öztürk S, Stables J. Synthesis and biological activities of diflunisal hydrazide-hydrazones. *Eur J Med Chem*. 2003;38:1005-1013.

Lanza F, Rack MF, Lynn M, Wolf J, Sanda M. An endoscopic comparison of the effects of etodolac, indomethacin, ibuprofen, naproxen, and placebo on the gastrointestinal mucosa. *J Rheumatol*. 1987;14(2):338-341.

Magari H, Shimizu Y, Inada K, Enomoto S, Tomeki T, Yanaoka K, Tamai H, Arai K, Nakata H, Oka M, Utsunomiya H, Tsutsumi Y, Tsukamoto T, Tatematsu M, Ichinose M. Inhibitory effect of etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on stomach carcinogenesis in helicobacter pylori-infected mongolian gerbils. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334:606-612.

Mohareb RM, Fleita DH, Sakka OK. Novel synthesis of hydrazide-hydrazone derivatives and their utilization in the synthesis of coumarin, pyridine, thiazole and thiophene derivatives with antitumor activity. *Molecules.* 2011;16:16-27.

Nakamura S, Kobayashi M, Shibata K, Sahara N, Shigeno K, Shinjo K, Naito K, Hayashi H, Ohnishi K. Etodolac induces apoptosis and inhibits cell adhesion to bone marrow stromal cells in human myeloma cells. *Leuk Res.* 2006;30:123-135.

Nasr T, Bondock S, Youns M. Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide-hydrazone derivatives. *Eur J Med Chem.* 2014;76:539-548.

Neustadt DH. Double blind evaluation of the long-term effects of etodolac versus ibuprofen in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1997;24 (Suppl 47):17-22.

Nishimura G, Yanoma S, Sateke K, Ikeda Y, Taguchi T, Nakamura Y, Hirose F, Tsukuda M. An experimental model of tumor dormancy therapy for advanced head and neck carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 2000;91(11):1199-1203.

O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett.* 1993;330(2):156-160.

Okamoto A, Shirakawa T, Bito T, Shigemura K, Hamada K, Gotoh A, Fujisawa M, Kawabata M. Etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces upregulation of e-cadherin and has antitumor effect on human bladder cancer cells in vitro and in vivo. *Urology.* 2008;71:156-160.

Orun O, Mega Tiber P, Koçyiğit Sevinç S. Apoptotic effects of etodolac in breast cancer cell cultures. In: Al-kaf AGA ed. *Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs*. Rijeka: IntechOpen; 2017, p.133-151.

Özdemir A, Kaplancıklı ZA, Turan-Zitouni G, Revial G. Synthesis of some novel hydrazone derivatives and evaluation of their antituberculosis activity. *Marmara Pharm J*. 2010;14(2):79-83.

Passananti M, Lavorgna M, Iesce MR, DellaGreca M, Brigante M, Criscuolo E, Cermola F, Isidori M. Photochemical fate and eco-genotoxicity assessment of the drug etodolac. *Sci Total Environ*. 2015;518-519:258-265.

Pitot HC. Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res*. 1989;80:599-607.

Popiolek L, Biernasiuk A, Berecka A, Gumieniczek A, Malm A, Wujec M. New hydrazide-hydrazones of isonicotinic acid: synthesis, lipophilicity and in vitro antimicrobial screening. *Chem Biol Drug Des*. 2018;91:915-923.

Popiolek L, Biernasiuk A. Design, synthesis, and in vitro antimicrobial activity of hydrazide-hydrazones of 2-substituted acetic acid. *Chem Biol Drug Des*. 2016;88:873-883.

Popiolek L, Patrejko P, Gawronska-Grzywacz M, Biernasiuk A, Berecka-Rycerz A, Natarska-Chomicka D, Piatkowska-Chmiel I, Gumieniczek A, Dudka J, Wujec M. Synthesis and in vitro bioactivity study of new hydrazide-hydrazones of 5-bromo-2-iodobenzoic acid. *Biomed Pharmacother*. 2020;130:110526.

Raghavan BV, Ramana KV, Khera B, Kumar N. Process for the preparation of 1,8-disubstituted-1,3,4,9-tetrahydropyrano (3,4-b)-indole-1-acetic acid esters. Patent No: US6331638 B1, 2001.

Riendeau D, Percival MD, Boyce S, Brideau C, Charleson S, Cromlish W, Ethier D, Evans J, Falgout JP, Ford-Hutchinson AW, Gordon R, Greig G, Gresser M, Guay J, Kargman S, Leger S, Mancini JA, O'Neill G, Ouellet M, Rodger IW, Therien M, Wang Z, Webb JK, Wong E, Xu L, Young RN, Zamboni R, Prasit P, Chan CC. Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as highly selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol.* 1997;121(1):105-117.

Rollas S, Gulerman N, Erdeniz H. Synthesis and antimicrobial activity of some new hydrazones of 4-fluorobenzoic acid hydrazide and 3-acetyl-2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazolines. *Il Farmaco.* 2002;57:171-174.

Rollas S, Küçükgülzel ŞG. Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules.* 2007;12:1910-1939.

Rollas S, Küçükgülzel ŞG. Hydrazone, amide, carbamate, macromolecular and other prodrugs of doxorubicin. *Open Drug Deliv J.* 2008;2:77-85.

Roy D, Arason GA, Chowdhury B, Mitra A, Calaf GM. Profiling of cell cycle genes of breast cells exposed to etodolac. *Oncol Rep.* 2010;23(5):1383-1391.

Rudavath D, Sreenivasulu R, Pinapati SR, Raju RR. Synthesis and anticancer evaluation of indazole-aryl hydrazide-hydrazone derivatives. *J Indian Chem Soc.* 2018;95:1-6.

Rutavichyus A, Valiulene S, Kuodis Z. Isomerism of hydrazones of (2-benzothiazolylthio)- and (2-benzoxazolylthio)acetic acids. *Chem Heterocycl Comp.* 1995;31(5):629-633.

Rutavichyus A, Valiulene S, Kuodis Z. Synthesis and structure of hydrazones obtained from hydrazides of [5-(4-pyridyl)-1,3,4-oxadiazol-2-ylthio]acetic or 2-[5-(4-pyridyl)-1,3,4-oxadiazol-2-ylthio]propionic acids. *Chem Heterocycl Comp.* 2000;36(7):851-856.

Sakurai K, Urade M, Noguchi K, Kishimoto H, Ishibashi M, Yasoshima H, Yamamoto T, Kubota A. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human salivary gland tumors. *Pathol Int*. 2001;51(10):762-769.

Salgin-Gökşen U, Gökhan-Kelekçi N, Göktaş O, Köysal Y, Kiliç E, Işık S, Aktay G, Ozalp M. 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, 1,3,4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Bioorg Med Chem*. 2007;15:5738-5751.

Sarıözkan S, Türk G, Çıkla-Süzgün P, Güvenç M, Yüce A, Yay AH, Cantürk F, Küçükgülzel ŞG. Effect of etodolac hydrazone, a new compound synthesised from etodolac, on spermatozoon quality, testicular lipid peroxidation, apoptosis and spermatozoon DNA integrity. *Andrologia*. 2015;48:177-188.

Shabaraya AR, Parulkar AS, Shripathy D, Shetty P. Design and characterization of mucoadhesive microspheres of etodolac. *Int J Pharm Sci Drug Res*. 2019;11(3):78-84.

Sharma V, Bhatia P, Alam O, Naim MJ, Nawaz F, Sheikh AA, Jha M. Recent advancement in the discovery and development of COX-2 inhibitors: insight into biological activities and SAR studies (2008-2019). *Bioorg Chem*. 2019;89:103007.

Shigemura K, Shirakawa T, Wada Y, Kamidono S, Fujisawa M, Gotoh A. Antitumor effects of etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, against human prostate cancer cell lines in vitro and in vivo. *Urology*. 2005;66:1239-1244.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer Clin J*. 2020;70:7-30.

Sreenivasulu R, Reddy KT, Sujitha P, Kumar CG, Raju RR. Synthesis, antiproliferative and apoptosis induction potential activities of novel

bis(indolyl)hydrazide-hydrazone derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2019;27:1043-1055.

Sreenivasulu R, Sujitha P, Jadav SS, Ahsan MJ, Kumar CG, Raju RR. Synthesis, antitumor evaluation, and molecular docking studies of indole-indazolyl hydrazide-hydrazone derivatives. *Monatsh Chem.* 2017;148(2):305-314.

Strickmann DB, Blaschke G. Isolation of an unknown metabolite of the non-steroidal anti-inflammatory drug etodolac and its identification as 5-hydroxy etodolac. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;25(5-6):977-984.

Sundaree S, Vaddula BR, Tantak MP, Khandagale SB, Shi C, Shah K, Kumar D. Synthesis and anticancer activity study of indolyl hydrazide-hydrazones. *Med Chem Res.* 2016;25:941-950.

Szarvasi E, Fontaine L, Betbeder-Matibet A. Antimicrobials. New nitrofurans derivatives. *J Med Chem.* 1973;16(3):281-287.

Şenkardeş S, Kaushik-Basu N, Durmaz İ, Manvar D, Basu A, Atalay R, Küçükgülzel ŞG. Synthesis of novel diflunisal hydrazide-hydrazones as anti-hepatitis C virus agent and hepatocellular carcinoma inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2016;108:301-308.

Şenkardeş S, Türe A, Ekrek S, Durak AT, Abbak M, Çevik Ö, Kaşkatepe B, Küçükgülzel İ, Küçükgülzel ŞG. Novel 2,6-disubstituted pyridine hydrazones: synthesis, anticancer activity, docking studies and effects on caspase-3-mediated apoptosis. *J Mol Struct.* 2021;1223:128962.

Taha M, Shah SAA, Afifi M, Zulkeflee M, Sultan S, Wadood A, Rahim F, Ismail NH. Morpholine hydrazone scaffold: synthesis, anticancer activity and docking studies. *Chin Chem Lett.* 2017;28:607-611.

Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part I). J Natl Cancer Inst. 1998; 90(20):1529-1536.

Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat New Biol. 1971,231(25):232-235.

Vigano E, Colombo P. Process for the preparation of etodolac. Patent No: US6066741 A, 2000.

Vincenzo G, Franco P. 3-(2-trialkylsilyloxy)ethyl-7-ethyl-1H-indoles and method for their preparation. Patent No: US5599946 A, 1997.

Vogel S, Kaufmann D, Pojarova M, Müller C, Pfaller T, Kühne S, Bednarski PJ, von Angerer E. Aroyl hydrazones 2-phenylindole-3-carbaldehydes as novel antimitotic agents. Bioorg Med Chem. 2008;16:6436-6447.

Williams CS, Smalley W, Dubois RN. Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention. J Clin Invest. 1997;100(6):1325-1329.

Yamamoto H, Itoh F, Fukushima H, Hinoda Y, Imai K. Overexpression of cyclooxygenase-2 protein is less frequent in gastric cancers with microsatellite instability. Int J Cancer. 1999;84(4):400-403.

Yaman ME, Kocak OM, Atila A, Kadioglu Y, Diyarbakir B, Halici Z. Rapid and sensitive UPLC-MS/MS method for the determination of etodolac in small-volume rat plasma: Application to rat real samples. J Liq Chromatogr Relat Technol. 2018;41(9):474-480.

Yanaoka K, Oka M, Yoshimura N, Deguchi H, Mukoubayashi C, Enomoto S, Maekita T, Inoue I, Ueda K, Utsunomiya H, Iguchi M, Tamai H, Fujishiro M, Nakamura Y, Tsukamoto T, Inada K, Takeshita T, Ichinose M. Preventive effects of etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on cancer development in extensive

metaplastic gastritis, a *Helicobacter pylori*-negative precancerous lesion. *Int J Cancer*. 2010;126:1467-1473.

