



T.C  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**4-AMİNO- 3, 5 - DİMETİL PİRAZOL' DEN TÜREYEN BAZI  
TİYOÜRE BİLEŞİKLERİNİN *İN VİVO* METABOLİZMASI**

UFUK YILMAZ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK KİMYA  
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Bedia KAYMAKÇIOĞLU

İSTANBUL-2007

Bilimsel düşünceyi geliştirici ve yapıcı eleştiriler ile tezimin planlanmasından yazımına kadar her aşamada önemli katkılarda bulunan Sevgili Hocam Sayın Doç. Dr. Bedia Kaymakçioğlu' na gösterdiği anlayış ve destek için teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarında bilgi, destek ve deneyimlerinden yararlandığım Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer hocam Prof. Dr. Sevim Rollas' a ve nezlinde tüm Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine saygı ve şükranlarımı sunarım. Hayvan metabolizma çalışmalarındaki yardımlarından dolayı sevgili hocam Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yazımındaki yardımlarından dolayı eşim Ecz. Nil Yılmaz'a, manevi desteklerinden dolayı Yılmaz ve Reşat ailelerine şükranlarımı sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>1. ÖZET</b> .....	1
<b>2. SUMMARY</b> .....	2
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	3
<b>4. GENEL BİLGİLER</b> .....	5
<b>4.1. Pirazol ve 4-Aminopirazoller Hakkında Genel Bilgiler</b> .....	5
<b>4.2. Sübstitüe Pirazol Türevlerinin Farmakolojik Etkileri</b> .....	7
<b>4.3. Tiyöreler hakkında Genel Bilgiler</b> .....	10
<b>4.3.1. N,N'-Disüstitüe Tiyöreler'in Sentezi</b> .....	10
<b>4.3.2. N,N'-Disüstitüe Tiyöreler'in Biyolojik Aktiviteleri</b> .....	10
<b>4.3.2.a. Antimikrobiyal aktivite gösteren tiyöreler</b> .....	10
<b>4.3.2.b. Antiviral aktivite gösteren tiyöreler</b> .....	15
<b>4.3.2.c. Antihipertansif aktivite gösteren tiyöreler</b> .....	18
<b>4.3.2.d. Antikonvülsan aktivite gösteren tiyöreler</b> .....	19
<b>4.3.2.e. Tiyörelerin diğer biyolojik aktiviteleri</b> .....	21
<b>4.4. N,N'-Disüstitüe Tiyöreler'in Metabolizması</b> Hakkında Genel Bilgiler .....	28
<b>5. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	32
<b>5.1. Araç ve Gereçler</b> .....	32
<b>5.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler</b> .....	32
<b>5.1.2. Kullanılan Elektronik Cihazlar</b> .....	32
<b>5.2. Genel Sentez Yöntemleri</b> .....	33

<b>5.2.1.</b> 2,3,4-Pentantrion 3-fenilhidrazon (Madde A1) .....	33
<b>5.2.2.</b> 4-(Fenilazo)-3,5-dimetilpirazol (Madde B1) .....	33
<b>5.2.3.</b> 2,3,4-Pentantrion 3-(4-karbetoksifenil)hidrazon (Madde A2) .....	33
<b>5.2.4.</b> 4-(4-Karbetoksifenilazo)-1,3,5-trimetilpirazol (Madde B2) .....	34
<b>5.2.5.</b> 4-amino-3,5-dimetilpirazol [1] .....	34
<b>5.2.6.</b> 4-Amino-1,3,5-trimetilpirazol [2] .....	34
<b>5.2.7.</b> N-Sübstitüe-N'-(3,5-di / 1,3,5-trimetilpirazol-4-il) tiyoüre'ler [T1,T2,T3,T4] .....	35
<b>5.2.8.</b> N-Sübstitüe-N'-(3,5-di / 1,3,5-trimetilpirazol-4-il) üre'ler [U1,U2,U3,U4] .....	35
<b>5.2.9.</b> 4-asetil amino-3,5-dimetilpirazol'ün hazırlanışı .....	35
<b>5.3.</b> Kromatografik Çalışmalar .....	36
<b>5.4.</b> Metabolizma Çalışmaları İçin Örneklerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü .....	37
<b>6. BULGULAR</b> .....	38
<b>6.1.</b> N, N'disübstitüe Tiyöüreler .....	38
<b>6.1.1.</b> N-(4-fluorofenil)-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)tiyoüre (T1) .....	38
<b>6.1.2.</b> N-(4-klorofenil)-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)tiyoüre (T4) .....	40
<b>6.1.3.</b> N-(4-fluorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyoüre (T2) .....	41
<b>6.1.4.</b> N-(4-klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyoüre (T3) .....	43
<b>6.2.</b> N, N'disübstitüe Üreler .....	45
<b>6.2.1.</b> N-(4-klorofenil)-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)üre(U1) .....	45
<b>6.2.2.</b> N-(4-fluorofenil)-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)üre(U2) .....	47
<b>6.2.3.</b> N-(4-klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)üre(U3) .....	49
<b>6.2.4.</b> N-(4-fluorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)üre(U4) .....	51
<b>6.3.</b> N-(4-klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyoüre 'nin(T3) <i>in vivo</i> Biotransformasyon Bulguları .....	53

<b>6.4. N-(4-fluorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyoüre 'nin(T2)</b>	
<i>in vivo</i> Biotransformasyon Bulguları .....	67
<b>7. TARTIŞMA</b> .....	76
<b>7.1. Tiyoüre ve Üre Bileşiklerinin Kimyasal Yapı Tayini</b> .....	77
<b>7.2. <i>İn-vivo</i> Biotransformasyon Bulgularının Değerlendirmesi</b> .....	79
<b>8. SONUÇ</b> .....	87
<b>9. KAYNAKLAR</b> .....	89
<b>10. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	96

**Kısaltmalar ve Simgeler**

DMSO-d<sub>6</sub> : Döterodimetilsülfoksit

d: dublet

e.b.: Eğilme bandı

e.d.: Erime derecesi

ED: Erime derecesi

g.b.: Gerilme bandı

Hz: Hertz

<sup>1</sup>H-NMR: Proton nükleer magnetik rezonans

INH: İzonikotinil hidrazid

IR: Infrared

j.: Etkileşme değişmezi

LT: Lökotrien

MES: Maksimal elektroşok

MHz: Megahertz

m: Multiplet

Ppm: Parts per million (milyonda bir)

PTZ: pentilentetrazol

RZ: Retensiyon zamanı

s: Singlet

t: Triplet

TB: Tüberküloz

UV: Ultraviyole

y.s.: Yaygın singlet

ν<sub>max</sub>: Maksimum absorpsiyon gösteren dalga sayısı

δ: Kimyasal kayma

**i. Şekillerin listesi**

**Şekil 1.** Madde T1' in IR Sektrumu

**Şekil 2.** Madde T1' in <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

**Şekil 3.** Madde T2'nin IR Spektrumu

**Şekil 4.** Madde T2'nin <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

**Şekil 5.** Madde T3'ün IR Spektrumu

**Şekil 6.** Madde T3'ün <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

**Şekil 7.** Madde U1'in IR Spektrum

**Şekil 8.** Madde U1'in <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

**Şekil 9.** Madde U2'nin IR Spektrumu

**Şekil 10.** Madde U2'nin <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

**Şekil 11.** Madde U3'ün IR Spektrumu

**Şekil 12.** Madde U3'ün <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

**Şekil 13.** Madde U4'ün IR Spektrumu

**Şekil 14.** Madde U4'ün <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

**Şekil 15.** Substrat ve olası metabolitlerinin HPLC kromatogramı

**Şekil 16.** Retensiyon zamanı 14,156 olan metabolit U3'ye ait UV spektrumu

**Şekil 17.** Retensiyon zamanı 13,644 olan metobolit U1'e ait UV spektrumu

**Şekil 18.** Retensiyon zamanı 13,292 olan substarta ait UV spektrumu

**Şekil 19.** Retensiyon zamanı 12,802 olan metobolit T4'e ait UV spektrumu

**Şekil 20.** Retensiyon zamanı 5,988 olan metobolit Asetilamin'e ait UV spektrumu

**Şekil 21.** Substrat ve olası metabolitlerinin boş plazmaya eklenmesi ile elde edilen HPLC kromatogramı

**Şekil 22.** Bir numaralı hayvanın 0. saat plazma örneğine ait kromatogram

**Şekil 23.** Bir numaralı hayvanın 30. dakika plazma örneğine ait kromatogram

**Şekil 24.** Bir numaralı hayvanın 1. saat plazma örneğine ait kromatogram

**Şekil 25.** Bir numaralı hayvanın 2. saat plazma örneğine ait kromatogram

**Şekil 26.** Bir numaralı hayvanın 2. saat plazma örneğine ait kromatogramda 13,22 (T3) ' de gelen pike (A) ve standartına (B) ait UV spektrumu

- Şekil 27:** Bir numaralı hayvanın 4. saat plazma örneğine ait kromatogram
- Şekil 28.** Bir numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogram
- Şekil 29:** Bir numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogramda 13,226 ' da gelen pike ait UV spektrumu
- Şekil 30.** Bir numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogramda 11,487 (T4) ' de gelen pike (A) ve standartına (B) ait UV spektrumu
- Şekil 31.** Bir numaralı hayvanın 8. saat plazma örneğine ait kromatogram
- Şekil 32:** Bir numaralı hayvanın 24. saat plazma örneğine ait kromatogram
- Şekil 33.** İki numaralı hayvanın 30. dakika plazma örneğine ait kromatogram
- Şekil 34.** İki numaralı hayvanın 1. saat plazma örneğine ait kromatogram
- Şekil 35.** İki numaralı hayvanın 2. saat plazma örneğine ait kromatogram
- Şekil 36.** İki numaralı hayvanın 4. saat plazma örneğine ait kromatogram
- Şekil 37.** İki numaralı hayvanın 4. saat plazma örneğine ait kromatogramda 12,780 (T4) ' da gelen pike (A) ve standartına (B) ait UV spektrumu
- Şekil 38.** İki numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogram
- Şekil 39.** İki numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogramda 12,790 (T4) ' da gelen pike (A) ve standartına (B) ait UV spektrumu
- Şekil 40.** İki numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogramda 13,226 (T3)' da gelen pike (C) ve standartına (D) ait UV spektrumu
- Şekil 41.** İki numaralı hayvanın 8. saat plazma örneğine ait kromatogram
- Şekil 42.** İki numaralı hayvanın 8. saat plazma örneğine ait kromatogramda 12,932 (T4) ' da gelen pike ve standartına ait UV spektrumu
- Şekil 43.** Substrat ve olası metabolitlerinin HPLC kromatogramı
- Şekil 44.** Retensiyon zamanı 16,414 olan metabolit U4' e ait UV spektrumu
- Şekil 45.** Retensiyon zamanı 14,184 olan metabolit U2' ye ait UV spektrumu
- Şekil 46.** Retensiyon zamanı 13,339 olan metabolit T2' ye ait UV spektrumu
- Şekil 47.** Retensiyon zamanı 11,596 olan metabolit T1' e ait UV spektrumu
- Şekil 48.** Retensiyon zamanı 6,072 olan metabolit asetilamine ait UV spektrumu
- Şekil 49.** Substrat ve olası metabolitlerinin boş plazmaya eklenmesi ile elde edilen HPLC kromatogramı
- Şekil 50.** Bir numaralı hayvanın 0. saat plazma örneğine ait kromatogram
- Şekil 51.** Bir numaralı hayvanın 30. dakika plazma örneğine ait kromatogram

**Şekil 52.** Bir numaralı hayvanın 1. saat plazma örneğine ait kromatogram

**Şekil 53.** Bir numaralı hayvanın 2. saat plazma örneğine ait kromatogram

**Şekil 54.** Bir numaralı hayvanın 2. saat plazma örneğine ait kromatogramda 13,132 (T2) ' de gelen pike (A) ve standartına (B) ait UV spektrumu

**Şekil 55.** Bir numaralı hayvanın 4. saat plazma örneğine ait kromatogram

**Şekil 56.** Bir numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogram

**Şekil 57.** Bir numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogramda 13,599 ' da gelen pike ait UV spektrumu

**Şekil 58.** Bir numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogramda 11,339 (T1) ' de gelen pike (A) ve standartına (B) ait UV spektrumu

**Şekil 59.** Bir numaralı hayvanın 8. saat plazma örneğine ait kromatogram

## **ii. Tabloların listesi**

**Tablo 1.** Substrat ve olası metabolitlerinin retensiyon zamanları

**Tablo 2.** Substrat ve olası metabolitlerinin retensiyon zamanları

## **iii. Şemaların listesi**

**Şema1.** 4-aminopirazollerin ve bu amin bileşiklerinden hareketle sentezi yapılan yeni bileşiklerin sentezi

**Şema2.** Substrat olarak seçilen T3 ve olası metabolitleri

**Şema 3.** T2 ve olası metabolitleri

## 1. ÖZET

Tiyöüre türevleri son yıllarda gösterdikleri antitüberküler, antibakteriyel, antifungal, anti HIV, antihipertansif ve özellikle antikonvulsan gibi önemli biyolojik aktiviteler nedeniyle dikkat çekmektedirler. Ancak çok sayıda biyolojik aktivite çalışması olmasına rağmen bu bileşiklerin metabolizmaları ile ilgili yayınlar oldukça az sayıdadır. Bu nedenle daha önce tarafımızdan sentezlenen ve antikonvulsan aktivite gösteren N-fenil-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)tiyöüre üzerinde *in vivo* metabolizma çalışması yapılmıştır. Bu araştırmada substratın plazmada büyük ölçüde değişmeden kaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca düşük konsantrasyonda bilinmeyen iki metabolit daha saptanmıştır. Bu çalışmada aromatik halka üzerinde süstitüent taşıyan tiyöüre bileşikleri seçilerek *in vivo* metabolizma yolları ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Substratlar, N-(4-fluoro/klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyöüre (**T2** ve **T3**) ve ilgili metabolitleri sentez edilerek yapı tayinleri elemental ve spektral analizler ile yapılmıştır. Substratlar %5'lik arap zambında çözülmüş ve sıçanlara 100 mg/kg doz ve 0.1 ml hacimde olacak şekilde intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Kan örnekleri substrat verilmeden ve verildikten sonra 30 dakika, 1., 2., 4., 8., 12. ve 24. saatlerde alınmıştır. Substrat ve ilgili metabolitlerinin kromatografik ayrımları Hichrom chromasil C<sub>18</sub> kolonda yapılmıştır. En uygun mobil faz bileşimi metanol ve suyun değişik oranlardaki karışımlarında sağlanmıştır. Tiyöüre bileşiklerinin metabolizma çalışmalarında N-dealkilasyon metabolitleri olan N-(4-fluoro/klorofenil)-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)tiyöüre (**T1** ve **T4**) ve plazmada değişmeden kalan substrat (**T2** ve **T3**) referans standartları ile kıyaslanarak HPLC-UV/DAD ile tespit edilmiştir. Ayrıca plazmada desülfürasyon metabolitleri saptanmamıştır. Bu bulgular farmakolojik aktif olan tiyöüre fonksiyonel grubunun desülfürasyon ile üreye dönüşmeyerek değişmeden plazmada kaldığını kanıtlamıştır.

**Anahtar kelimeler:** 4-amino-3,5-dimetil pirazol, tiyöüre, *in vivo* metabolizma.

## 2. SUMMARY

### *IN VIVO* METABOLISM OF SOME THIOUREAS COMPOUNDS FROM 4-AMINO-3,5 – DIMETHYL PYRAZOLE

Thiourea derivatives have attracted attention during the last decades due to their significant biological activities as antitubercular, antibacterial, antifungal, anti-HIV-I, antihypertensive as well as good anticonvulsant properties. However among numerous studies, there are very few concerning the metabolism of thioureas. We therefore investigated the *in vivo* metabolism of N-phenyl-N'-(3,5-dimethylpyrazole-4-yl)thiourea as potent anticonvulsant. In this investigation, the previous results had showed that the substrate was metabolized largely unchanged in the plasma. Only two unknown metabolites were determined with low concentration. So we choosed the bearing substituted phenyl ring at thiourea compounds and *in vivo* metabolism pathway was studied in details in this study.

Substrates, N-(4-fluoro/chlorophenyl)-N'-(1,3,5-trimethylpyrazole-4-yl)thioureas (**T2** and **T3**), and their possible metabolites were synthesized and the structures of the compounds were elucidated by spectral and elemental analysis. Substrates were dissolved in 5% gum arabica and administered intraperitoneally at 100 mg/kg doses in approximately 0.1 ml volume. Blood samples were withdrawn before and 30 min, 1., 2., 4., 8., 12. and 24. h after dosing. Chromatographic separation of substrate and its metabolites were performed using a Hichrom chromasil C<sub>18</sub> column (150 mm x 4.6 mm i.d., 5µm particle size), made of stainless steel. The optimal composition of the mobil phase was achieved by different mixtures of pure methanol and water. From the biotransformation of these thiourea compounds, N-dealkylation metabolites N-(4-fluoro/chlorophenyl)-N'-(3,5-dimethylpyrazole-4-yl)thioureas (**T1** and **T4**) were identified together with unchanged substrate (**T2** and **T3**) in plasma by comparing their to reference standards by HPLC-UV/DAD. Furthermore the desulfuration metabolites were not determined in plasma samples. These results proved that pharmacological active of thiourea functional group was unchanged in plasma due to not desulfuration to urea group.

**Key words:** 4-amino-3,5-dimethyl pyrazole, thiourea, *in vivo* metabolism.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Tiyöüre türevleri önemli farmakolojik aktiviteler gösteren ve son yıllarda oldukça fazla sayıda bileşiğin yapısında yer alan önemli bir fonksiyonel gruptur. Çok sayıda biyolojik aktivite ile ilgili literatür bulunmasına karşın bu bileşiklere ait metabolizma çalışması yok denecek kadar azdır. Daha önce tarafımızdan bir seri N-sübstitüe-N'-(3,5-di/1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyöüre türevi sentezlenmiş ve antikonvulsan aktiviteleri incelenmiştir. Bu bileşiklerin kaydadeğer antikonvulsan aktivite gösterdiği saptanmış ve antikonvulsan aktivite taramasında üre türevlerinin tiyöüre bileşiklerinden daha aktif olduğu gözlenmiştir. Tiyöüre bileşiklerinin desülfürasyon metabolik yolu ile üre türevlerini oluşturabileceği ve böylece daha uzun ve etkili bileşikler elde edilebileceği düşüncesinden hareketle prototip seçilen N-fenil N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)tiyöüre üzerinde *in vivo* metabolizma çalışması yapılmıştır. Sıçanlara madde intraperitoneal uygulanmış ve çeşitli zaman aralıklarında alınan kanların analizi HPLC ile yapılmıştır. Çalışmada substrat N-fenil N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)tiyöüre 30. dakika ile 12. saat arasında artış gösteren, 12. saat ile 48. saat arasında azalan konsantrasyonda tespit edilmiştir. İki tane tanımlanamayan pik bulunmuş ancak pik şiddeti çok küçük olduğu için izole edilerek yapı aydınlatılması yapılamamıştır. Bu çalışmada desülfürasyon metaboliti tespit edilememiştir. Bu bulgudan hareketle aromatik halka üzerinde sübstitüent taşımayan tiyöüre türevi yerine aromatik halka üzerinde klor yada fluor bulunan yeni tiyöüre bileşikleri sentezlenmesi ve *in vivo* metabolizmasının incelenmesi amaçlanmıştır. Böylece aromatik halka üzerindeki sübstitüentin desülfürasyon metabolitinin oluşumuna katkısı ve ayrıca tiyöüre bileşiklerinin genel metabolik yollarının daha ayrıntılı incelenmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla, 4-amino-3,5-di/1,3,5-trimetilpirazol bileşiklerinin uygun izotiyosiyanatlar ve izosiyanatlarla katımı sonucu yedisi literatürde kayıtlı olmayan toplam 8 adet tiyöüre ve üre bileşiği sentez edilmiş ve yapıları elemental analiz, IR ve <sup>1</sup>H-NMR yardımıyla aydınlatılmıştır. Substrat olarak N-(4-fluoro/klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyöüre seçilmiş (T2 ve T3) ve *in vivo* metabolizması incelenmiştir. Substrat 100 mg/kg dozda erkek sıçanlara intraperitoneal olarak uygulanmıştır. İlaç uygulanmasından sonra kan örnekleri 0., 30. dak., 1., 2., 4., 8., 12. ve 24. saatte

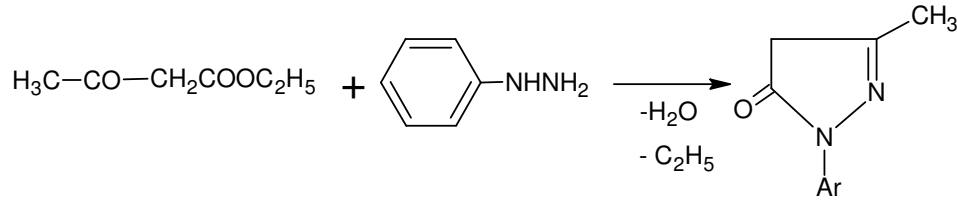
toplanmış ve plazma örneklerinin analizi Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi yardımıyla yapılmıştır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Pirazol ve 4-Aminopirazoller Hakkında Genel Bilgiler

Bu bölümde *in vivo* metabolizmasını inceleyeceğimiz substratlarımız olan N,N'-disübstitüe tiyoüre bileşiklerinin sentezinde kullandığımız 4-aminopirazollerin sentezi ve pirazol türevlerinin genel farmakolojik özellikleri üzerinde kısaca durulacaktır.

Pirazol halkası çok çeşitli farmakolojik aktiviteler ortaya çıkaran önemli heterosiklik bir halkadır. İlk kez 1883 yılında Knorr'un (31) etil asetoasetat ile hidrazinin tepkimesi sonucu kazandığı 1-fenil-3-metil-5-pirazolon ile ilaç etken maddesi olarak karşımıza çıkmakta ve günümüze kadar bir çok biyolojik aktif sentez maddesinin yapısında yer almaktadır.

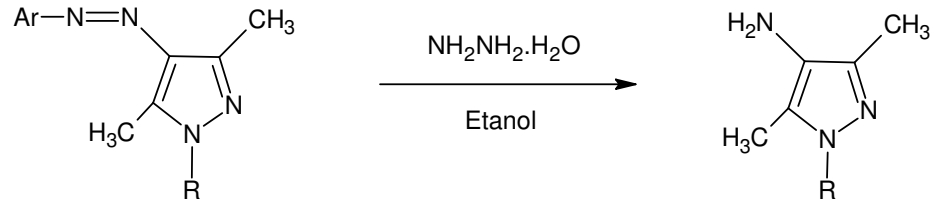


#### 1-Fenil-3-metil-5-pirazolon

Son yıllarda pirazol halkası üzerinde yapılan birçok çalışma vardır. Bunlardan 4-aminopirazoller biyolojik aktif moleküllerin sentezinde kullanılan küçük moleküllerdir. Genel olarak böyle küçük moleküllerin yeni biyolojik aktif bileşiklerin keşfinde önemli bir kaynak olduğu bilinen bir gerçektir. Daha önce tarafımızdan yapılan bir çalışmada da 4-aminopirazoller kullanılarak kaydadeğer antikonvülsan aktivite gösteren yeni pirazol türevleri elde edilmiştir (29).

Bizim çalışmalarımızda da kullandığımız 4-aminopirazol türevi olan 4-Amino-3,5-dimetilpirazol ilk kez 1914 yılında Morgan ve Reilly (37) tarafından sentez edilmiştir. Araştırmacılar 4-aminopirazol'un sentezini 3,5-dimetilpirazol'un önce

nitrolanması ve mütakiben redüklenmesi sonucu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada başlangıç maddesi olarak kullandığımız 4-aminopirazollerin sentezinde ise Morgan ve Reilly'den farklı olarak uygun azo bileşiklerinin redüksiyonu kullanılmıştır. Azo bileşiklerinden redüksiyonla amin hazırlama, alkol ya da dioksanlı ortamda bir katalizör ile yapılmaktadır. Litaratürde Raney Ni ile hidrazin hidratla redüksiyonda bulunmaktadır (59). Azo bileşiklerinden hidrazin hidrat ile katalizörsüz olarak redüksiyonla çeşitli pirazol amin bileşikleri ilk kez Rollas ve Ergenç tarafından kazanılmış ve araştırmacılar daha sonra ki yıllarda aynı yöntemle çeşitli pirazolamin bileşikleri sentezlemişlerdir (16-19, 43, 44).



## 4.2. Süstitüe Pirazol Türevlerinin Farmakolojik Etkileri

Pirazol türevlerinin farmakolojik etkilerine bakıldığında çok çeşitli aktiviteler içerdikleri gözlenmektedir (26, 48, 54, 20). 1967’de Orth (38) pirazollerin biyolojik aktiviteleri üzerine hazırladığı derlemede 3,5-dimetil pirazol’ün ve bunun karboksilik asit metabolitinin yağ ve glikoz metabolizması üzerine yoğun etkisi olduğunu; 3,5-dimetil-4-bromo ve 1,3,5-trimetil-4-nitropirazol’ün de kas gevşetici etkisi bulunduğunu ; basit histamin izomeri olan 3-(2-aminoetil)pirazol (betazol) ve 1-benzil-4-(2-aminoetil)pirazol’ün gastrik sekresyon üzerine histaminden daha fazla etki gösterdiğini; 3-metil-5-fenilpirazol’ün (fenomerazol) antikonvulsan etkisinin bulunduğunu; 4-aminopirazollerin deneysel olarak oluşturulan tümörlerde etkili olduğu ve ayrıca antikonvulsan etkilerinin de bulunduğunu; 3-fenil-5-aminopirazol ve 1-isopropil/1-(2-hidroksimetil)-5-aminopirazol’ün kas gevşetici etkisinin bulunduğunu; 1-(m-nitrofenil)-4-isotiyosiyano-3,5-dimetilpirazol’ün yüksek antifungal aktivite gösterdiğini bildirmiştir.

Soliman (49) 3,5-dimetilpirazol’ün ve bunun aktif metaboliti olan 5-metilpirazol-3-karboksilik asid’in kuvvetli hipoglisemik aktiviteye sahip olmasından hareketle sentezlediği 3,5-dimetilpirazolün sülfonilüre türevlerinin de kuvvetli hipoglisemik etki gösterdiklerini tespit etmiştir.

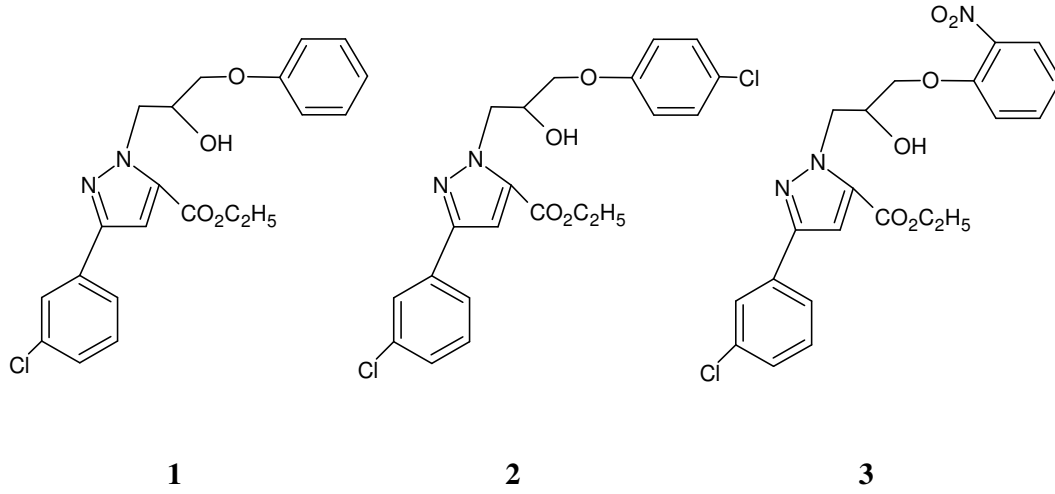
Tarzia ve arkadaşları (55) sentezini gerçekleştirdikleri 4-amino-5-arilpirazol-3-karboksilik asit türevlerinin antiagregan aktiviteye sahip olduklarını ayrıca ülser yapıcı etkilerinin bulunmamasını da ilginç bulduklarını kaydetmişlerdir.

Menozzi ve arkadaşları (36) hazırladıkları çok sayıda 1-fenil-1H-pirazol ve 4-karboksi-1-fenilpirazol propanoik asid türevlerinin salisilik asid ile kıyaslanabilir derecede antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkilerinin olduğunu ayrıca antiagregan aktivite gösterdiklerini de belirtmişlerdir.

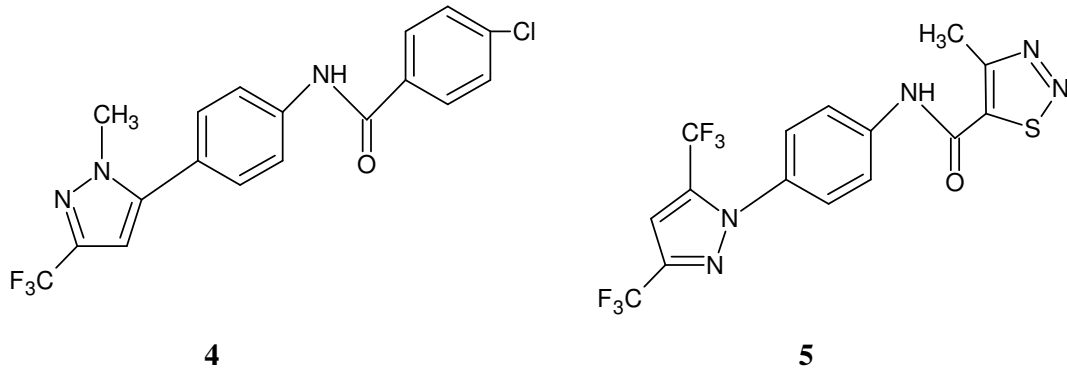
Bruno ve arkadaşları (3) 4-amino-3,5-difenil-1-(2-alkilamino)etil pirazol türevlerini sentezlemişler ve bileşiklerden bazılarının lokal anestezik, analjezik, antiinflamatuvar ve antiagregan aktiviteye sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Aynı araştırma grubu yaptıkları bir başka çalışmada (4) ise sentezledikleri 1-aril-3,4-difenil-5-aminopirazol türevlerinin bazılarında analjezik ve antiaritmik aktivite bulduklarını bildirmişlerdir.

El-Havash ve El-Mallah N-sübstitüe-5-amino-4-(3,4-dimetoksifenil)-3-hidroksipirazol türevlerini hazırlamışlar ve bu bileşiklerin antiinflamatuvar etkilerinin bulunmasının yanında ülser oluşturma risklerinin de oldukça düşük oranda olduğunu kaydetmişlerdir. (13)

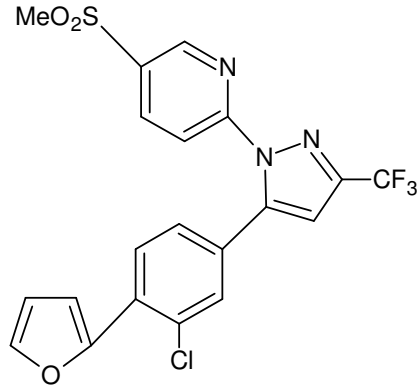
Wei ve arkadaşları (63) sentezledikleri, etil 1-(2'-hidroksi-3-aroksipiripil)-3-aryl-1H-pirazol-5-karboksilat türevlerinin A549 akciğer kanser hücrelerinin büyümesini baskıladığını bildirmişlerdir. Aralarından bileşik **1**, **2** ve **3**' ün A549 hücre büyümesinde en etkili moleküller olduğunu bildirmişlerdir.



Yonetoku ve arkadaşları (65) aril-3-trifluorometilpirazollerini sentezlemişlerdir. Bu bileşikler *in vitro* IL-2 üretiminin güçlü inhibitörleridir ve ağızdan alınımında da T-lenfosit aktivasyona bağlı farmakolojik hastalıkların inhibisyonunda etkilidirler. Bileşikler arasında **4** ve **5**' in en seçici ve en güçlü inhibitör etkiyi gösterdiği bildirilmiştir.

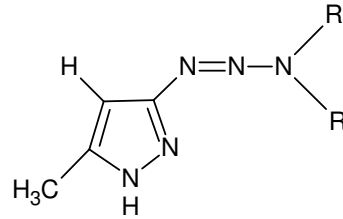


Heteroaril-fenil-substitüe pirazol türevlerinin de (6) seçici COX-2 inhibitörü olduğu gösterilmiştir (7).



6

Uygun aminopirazollerden hazırlanan triazenlerin K562, HL60, L1210 ve MCF7 hücre dizilerine karşı antiproliferatif etkileri test edilmiştir. Bütün biyolojik veriler bu kondensasyon ürünlerinin (7) antiproliferatif etki üzerinde pozitif bir rol oynadığını göstermiştir (10).



7

a, R= CH<sub>3</sub>

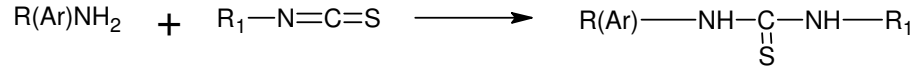
b, R= CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>

c, R,R= (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>

### 4.3. Tiyöürelere hakkında genel bilgiler

#### 4.3.1. N,N'-Disübstitüe Tiyöürelere'in Sentezi

Tiyöürelere sintezleri genel olarak uygun bir amin bileşiminin çeşitli izotiyosiyanatlarla bir çözücü varlığında katımı ile yapılmaktadır. Çözücü olarak; etanol (5, 21, 22, 39, 41), piridin (40, 53), dimetilformamid (1, 24), aseton (32, 56), piridin-su (14, 15), dioksan (46), dioksan:metanol (33), tetrahidrofuran (25) ve eter (12) kullanılmaktadır. Reaksiyonun mekanizması amin bileşikleri ile izotiyosiyanatlar arasında doymamış bir karbona nükleofilik katım esasına göre yürümektedir.



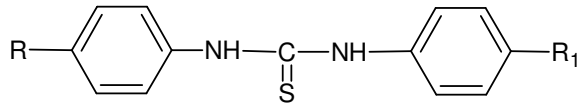
#### 4.3.2. N,N'-Disübstitüe Tiyöürelere'in Biyolojik Aktiviteleri

Tiyöüre grubu, biyolojik aktif bileşiklerin sentezinde başarıyla kullanılan bir fonksiyonel gruptur. Son yıllarda yapılan yoğun araştırmalar sonucu yeni antimikrobiyal, anti-HIV, antihipertansif, antikonvülsan ve diğere çeşitli farmakolojik aktiviteye sahip tiyöüre bileşikleri sentezlenmiştir. Rollas ve Kaymakçioğlu (47) 2003 yılında N,N-disübstitüe tiyöürelere biyolojik aktiviteleri ile ilgili bir derleme hazırlamışlar ve bu biyolojik aktiviteleri 5 ana başlık altında ayrıntılı olarak incelemişlerdir. Tezin bu bölümünde bu derleme esas alınarak ve yeni literatürler ilave edilerek N,N-disübstitüe tiyöürelere biyolojik aktiviteleri çeşitli aktivite başlıkları altında sunulmuştur.

##### 4.3.2.a. Antimikrobiyal aktivite gösteren tiyöürelere

Tüberküloz (TB) dünya üzerinde en yaygın ve tek enfeksiyon ajanı olan *Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu ölümcül hastalıklardan biridir. Dünya sağlık örgütünün raporlarına göre dünya üzerinde 2 milyar insan *M.tuberculosis* ile enfekte durumda ve her sene 30 milyon yeni insan bu sayıya katılmaktadır. Bu hücre içi

enfeksiyon her yıl 3 milyon kişinin ölüm sebebidir. Dünyanın büyük bir bölümünde TB'nin tedavisi; rifampisin, izoniazid (INH), etambutol, streptomisin ve pirazinamid isimli 5 ilacın'ın kombinasyonu ile sınırlıdır. Tüberkülozun kemoterapisinde görülen problem, insanların zamanla birinci grup ilaçlara karşı direnç kazanması ve etionamid, aminosalisilik asit, sikloserin, amikasin, kanamisin ve kapreomisin gibi ikinci grup ilaçların da çok toksik olmaları ve aynı anda kullanılamamalarıdır. TB enfeksiyonunun yenilenmesi artışla beraber, antitüberküloz ilaç tedavisine dirençli daha karışık bir durumu ortaya çıkarmaktadır. Diğer taraftan izoniazidin tekrarlanan dozlarda toksisite göstermesine karşın hala tüberkülozun kemoterapisinde kullanılan ilk ilaç olması dikkat çekmektedir. Son zamanlarda INH 'a direnç mekanizması, katG (katalaz/hidroperoksidaz)'nin mutasyonu ve yok olmasına ve ikinci olarak INHA'nın ve kasA (3-oksoaçil-(açil taşıyıcı protein)sentaz)'nın kromozal mutasyonuna bağlanmaktadır. İlaça karşı antibakteriyal direnç yeni türevlerin dizaynı ile engellenebilir. İleride ilacın farmokinetik özellikleri ve hücre geçme özellikleri geri alınabilir türevler geliştirilerek hidrazonlarda olduğu gibi modüle edilebilir (51). Tiyöüre türevlerinin birçok mikobakterilere karşı aktif olduğu bildirilmektedir. Bu düşünceye dayanarak birçok tiyöüre sentez edilmiş ve dirençli bakteri suşlarına karşı denenmiştir. Çalışmalardan elde edilen bulgular bu aktif komponentlerin geniş bir bölümünün 4,4' konumunda sübstitüent taşıyan benzen halkalarına sahip 1,3 difenil tiyöüreler olduğunu göstermiştir (47).

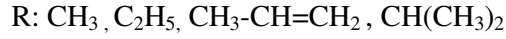
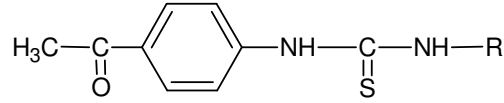


R: alkil, O-alkil, O-aril, halojen

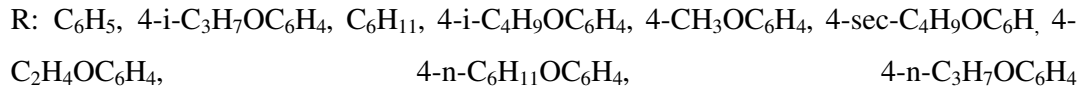
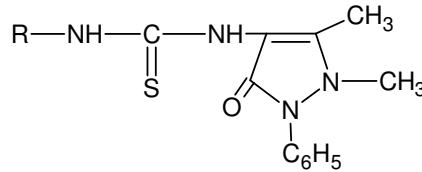
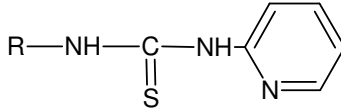
R<sub>1</sub>: etoksi, i-butoksi, dimetilamino,  
dimetilaminoetoksi

Bazı p-asetilfenil tiyöüreler antitüberküloz ajanı olarak hazırlanmıştır. Tiyöüre grubu azotu üzerinde kısa düz zincirli bir alkil grubu sübstitüe olan türevlerde daha

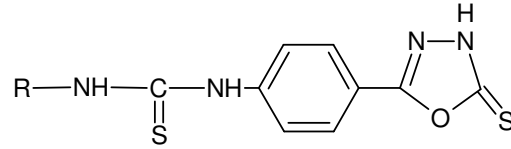
yüksek aktivite görülmüştür. Çok düşük dozlardaki tiyoüreler, aynı miktarda karşılaştırılabilir dozdaki streptomisin veya izoniazid'e göre çok daha aktif bulunmuş ve farelerin ortalama yaşama süresini bu maddelere göre daha çok arttırmıştır. Ayrıca bu tiyoüreler p-aminosalisilik asitten yaklaşık olarak iki kat daha etkili bulunmuştur.



Ayrıca tiyoüre türevlerinden; 2-piridil veya 4-(1-fenil-2,3-dimetil)-5-pirazolon gibi heterosiklik halka taşıyanların alkil veya p-alkoksifenil ile süstitüe olanlarının antitüberküloz etkisi araştırılmıştır. Maksimum aktivite, 2-piridil serilerinde fenil ve n-oktil türevlerinde; 5-pirazolon serilerinde izopropoksifenil türevlerinde görülmüştür. P-alkoksifenil türevlerinde kısa alkil zinciri aktiviteyi arttırmaktadır (47).

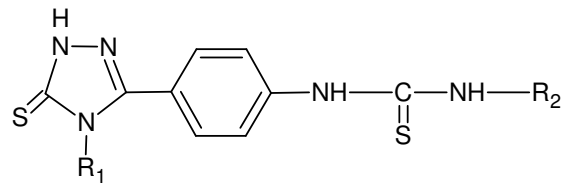


Rollas ve arkadaşları (46) antimikrobiyal etkilerini test etmek amacıyla N'-alkil veya aril N-[4-(3H)-1,3,4-oksadiazolin-2-tion-5-il]fenil] tiyoüre türevlerini hazırlamışlardır. Yeni bileşikler *in vitro* antibakteriyal aktiviteleri için bazı gram pozitif (*S.aureus* ATCC 6538, *B.subtilis* ATCC 6633, *B.cereus* ATCC 11778, *S.lutea* ATCC 9341) ve bazı gram negatif (*E.coli* ATCC 10536, *P.mirabilis* ATCC 14153, *K.pneumoniae* ATCC4352) bakterilere karşı; tüpte seyreltme metodu kullanılarak penisilin G ile karşılaştırmalı olarak test edilmişlerdir. En yüksek aktivite fenetil türevi olan bileşikte gözlenmiş, ayrıca bileşiklerden biri de *B.subtilis* ve *B.cereus* 'a karşı aktif bulunmuştur.

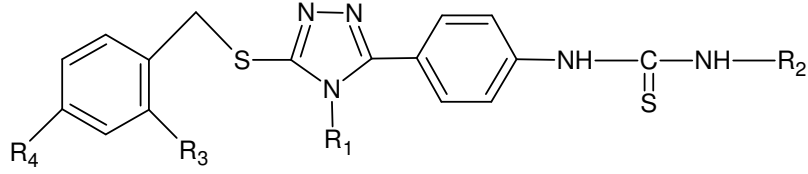


R: CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, Sikloheksil, fenil, 4-metilfenil, 4-klorofenil, fenetil

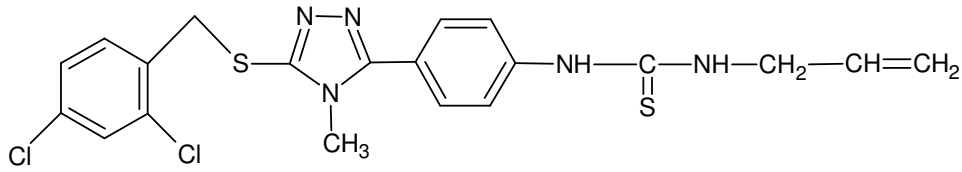
Küçüküznel ve arkadaşları tarafından bazı N-alkil/aril-N'-[4-(4-alkil/aril-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon-5-il)fenil]tiyoüre ve N-alkil/aril-N'-[4-(3-aralkiltiyo-4-alkil/aril-4H-1,2,4-triazol-3-tiyon-5-il)fenil]tiyoüre sentezlenmiş ve antimikobakteriyel aktiviteleri *M. tuberculosis H37Rv* ve *M. Fortuitum* ATCC 6841'e karşı test edilmiştir. Test edilen bileşikler içerisinde **8** nolu madde en aktif bulunmuştur (34).



N-alkil/aril-N'-[4-(4-alkil/aril-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tion-5-il)fenil]tiyoüreler

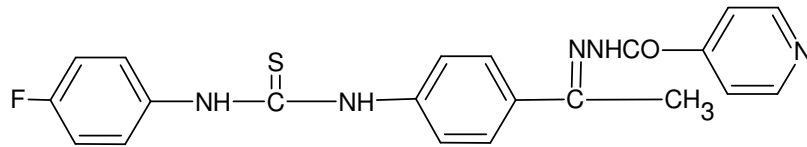


N-alkil/aryl-N'-[4-(3-aralkiltiyo-4-alkil/aryl-4H-1,2,4-triazol-3-tion-5-il)fenil]tiyoüreler  
 R<sub>1</sub>: CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> ; R<sub>2</sub>: CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,  
 CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> ; R<sub>3</sub>: H, Cl ; R<sub>4</sub>: H, Cl



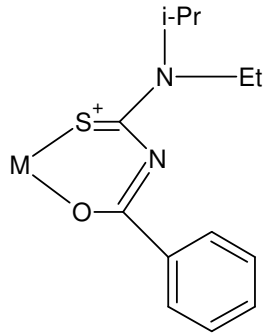
8

Çok sayıda tiyoüre türevi izonikotinil hidrazid [INH] ile 1-(4-asetilfenil)-3-[(4-sub)fenil] tiyoürenin reaksiyonuyla hazırlanmış ve *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> 'ye ve INH'a direncli *M.tuberculosis*'e karşı antibakteriyal etkisi *in vitro* olarak BACTEC 460 radiometrik sistemi kullanılarak test edilmiştir (51). Sentezlenen bileşikler arasında 1-(4-fluorofenil)-3-(4-{1-[(piridin-4-karbonil)-hidrazono]etil}fenil) tiyoüre (9) 0,49 µM minimum etkili konsantrasyonda *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> 'ye ve INH'a direncli *M.tuberculosis*'e karşı en güçlü etkiyi gösteren bileşiktir. INH ile karşılaştırıldığında 9 ; >300 indeksli seçicilikte *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> 'ye ve INH'a direncli *M.tuberculosis*'e karşı 3-185 defa daha etkili bulunmuştur.

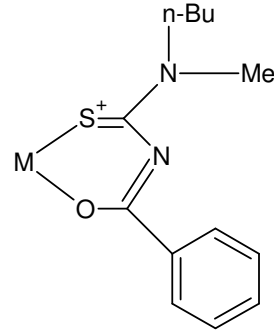


9

Tiyöüre türevlerinden *N*-butilmetilamin(3-benzoil-1-butil-1-metil-tiyöüre) (**10**), *N*-etilizopropilamin (3-benzoil-1-etil-1-izopropil tiyöüre) (**11**) ve bunların Ni(II), Co(III) ve Pt(II) ile olan benzer kompleksleri sentezlenmiştir (6). Bileşik 9 ve 10 'un ve benzer komplekslerinin *Penicillium digitatum* mantarı ve *Saccharomyces cerevisiae* mayasına karşı antifungal etkileri araştırılmıştır. Genelde bileşik 9 ve komplekslerinin mantar artışı engelleyici özelliği bileşik 10 dan ve Co(III) kompleksi hariç diğer komplekslerinden daha iyi bulunmuştur. Ayrıca, *N*-benzoil-*N'*-akiltiyöüreler ve *N*-benzoil-*N,N'*-dialkil tiyöüre bileşiklerinin çalışmaları; metal kationlarının konsantrasyonları ve ayrılmaları için yüksek seçicili güçlü belirteç olarak kullanılmaları yüzünden son zamanlarda dikkat çekmektedir. Bu maddelerin bir özel kullanımı da, organizmada bir veya daha fazla ligantlı yapılar meydana getiren zararlı elementlerin koordinasyonunu yapmalarıdır. Bu bakış açısı gelecekte, bu tür kompleks oluşturan toksik metal iyonlarının organizmadan kolayca atabilmeyi koordine edebilecek ajanların dizaynlarına öncü olması açısından önemli bir durumdur.



**10**

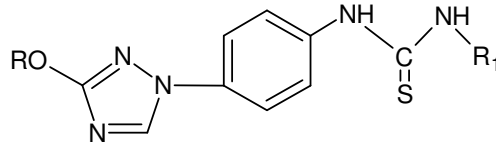


**11**

#### 4.3.2.b. Antiviral aktivite gösteren tiyöüreler

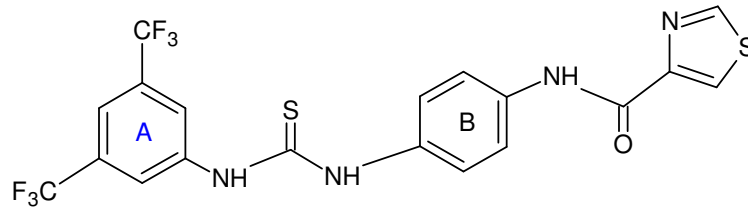
*N,N'*-disübstitüe tiyöürelerin hem *in vitro* hem *in vivo* antiviral aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Birçok tiyöüenin yapı-aktivite analizleri NH-(C=S)-NH grubunun varlığının antiviral etki için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır (47). Bu gözlemlere dayanılarak *N,N'*-disübstitüe tiyöüreler; *N'*de 3-alkoksi-1-fenil-1H-1,2,4-triazol sübstitüe olduğunda, *N'* ' ne farklı sübstitüent (aril, heteroaril, adamantanil veya

$\beta$ -1-D-glukopiranosil gibi) gelecek şekilde hazırlanmışlardır. Bu türevler *in vitro* olarak birçok myxo-virüse karşı (influenza A, influenza B ve solunumla ilgili benzer virüsler) aktiviteleri için denenmişlerdir. Bileşik **12** Hela hücrelerindeki solunum yolu virüsüne karşı spesifik etki göstermiştir. **13** nolu bileşiğinin de Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) hücrelerindeki influenza A'ya ve Hela hücrelerindeki solunum yolu virüsüne karşı aktif olduğu kanıtlanmıştır.

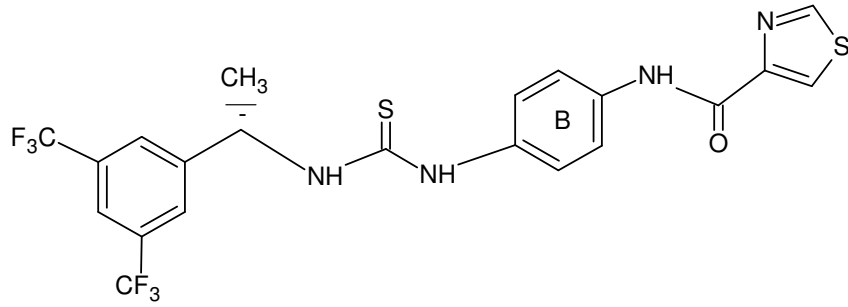


**12**(R:C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, R<sub>1</sub>:pirazinil), **13**(R: C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, R<sub>1</sub>: adamantanil)

Yakın zamana kadar bis-aril tiyoürerinin **14** insan sitomegalovirüsüne (HCMV) karşı olan aktiviteleri bildirilmiştir. Bu serideki aktiviteyi iyileştirmek için, aril-A halkası  $\alpha$ -metilbenzil A halkasına **15** dönüştürülerek bu virüse karşı mevcut gücü artırılmıştır (23).

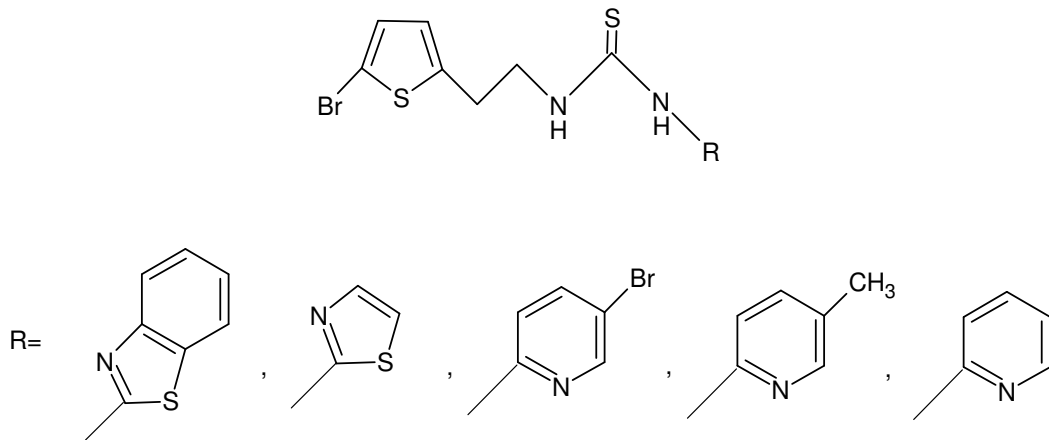


**14**

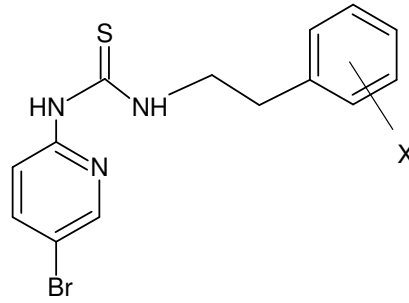


15

Venkatachalam ve arkadaşları tiofen halkası taşıyan yeni tiyoüre türevleri sentezlemişlerdir (60). Tiyöürelerin sentezinde kullanılan 5-bromotiofenetili regiospesifik olarak ve %40-60 verimle elde etmişlerdir. Tiofen halkasının bromlanması için gerekli regio seçicilik düşük sıcaklıkta asetik asit içinde brom kullanılarak yapılmıştır. X-ray kristal yapı brom atomunun gerçekten de tiofen halkasının beşinci pozisyonuna yerleştiğini göstermiştir. Güçlü anti-HIV etki birçok tiyoüre türevinde görülmüştür. 1995'te bildirilen ilk sınıf fenetil tiazolil tiyoüreden sonra birçok yeni türev sentezlenmiş ve anti-HIV ajan olarak etki gösterdikleri ispatlanmıştır.



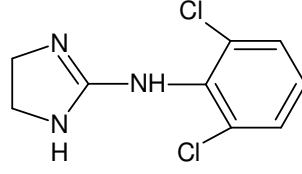
Bir grup yeni fenetiltiyazoliltiyöüre (PETT) türevleri non-nükleozit HIV-1 reverse transkriptaz (NNI) inhibitörü olarak hazırlanmış ve bunlar enzime bağlanacak yapıda dizayn edilmişlerdir (62). Bu yeni PETT türevlerinin yapıya bağlı dizaynları ve sentezleri anti-HIV aktivitelerinin analizi ile tamamlanmıştır. Gerçekçi ilaç dizaynı için model olan bu çalışmalar ile dokuz adet RT-NNI kristal yapısı incelenerek, NNI ve RT arasındaki yüzeyin tümüyle analizi yapılmıştır. NNI bileşiklerinin birleşme ceplerinin kullanımı, fenil halkasında *orto*-F (**16**), *orto*-Cl (**17**) ve *meta*-F (**18**) süstitüentli üç adet yapıya dayalı dizaynla üretilmiş PETT türevinin bulunmasını sağlamıştır. Bu yeni PETT türevleri AZT ya da trovirdinden daha aktif bulunmuş ve seçici güçlü anti-HIV etki göstermişlerdir.



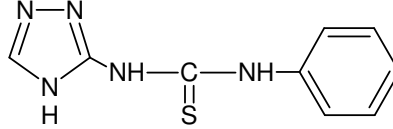
PETT türevleri (X=o-F=> **16**, X=o-Cl=> **17**, X=m-F=> **18**)

#### 4.3.2.c. Antihipertansif aktivite gösteren tiyöüreler

Klonidin, guanabenz ve guanifensin; hipertansiyonun tedavisinde kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte bu ajanların kullanımı sedasyon, ağız kuruluğu, uyku hali gibi yan etkileri yüzünden kısıtlıdır. Klonidinle benzer yapıda yeni hipertansif ajanlar bulmak için çok sayıda 3-süstitüe-1,2,4-triazoller sentezlenmiş ve antihipertansif aktiviteleri araştırılmıştır. Bu bileşikler arasından **19**, güçlü dopamin  $\beta$ -hidroksilaz (DBH) inhibitörü olarak bulunmuş, *in vivo* çalışmalar dopamin seviyesinin artmasıyla beraber farelerin beyinlerindeki noradrenalin miktarının düştüğünü göstermiştir (47).

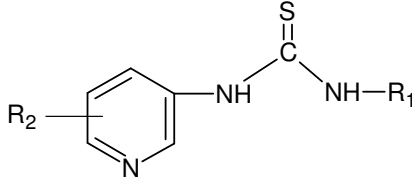


Klonidin



19

Bazı yeni bir seri N-(süstitüe -3-piridil)-N'-alkil tiyoüreler elde edilmiş, *in vitro* ve *in vivo* antihipertansif etkileri incelenmiştir. Bu serilerin yapı-etki ilişkilerinde, *in vitro* ve *in vivo* antihipertansif etki arasında korelasyon olduğu gözlemlenmiştir (47).



R<sub>1</sub>: Me, n-Bu, sikloheksil, CH<sub>2</sub>CHMe<sub>2</sub>, CHMeCMe<sub>3</sub>, CMe<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

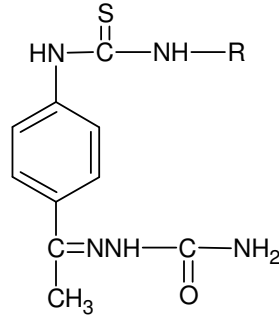
R<sub>2</sub>: 2/4-NH<sub>2</sub>, 6-SMe, 6-NHMe, 6-NHPh, 6-(1-piperidil), 6-(1-imidazolil),

6-CN, 6-CONH<sub>2</sub>, 6-NHNH<sub>2</sub>, 6-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>

#### 4.3.2.d. Antikonvülsan aktivite gösteren tiyoüreler

Antikonvülsan ilaçların, maksimal elektroşok denemesinde (MES) etkili olabilmeleri için birbirine yakın iki elektron verici atom taşıyan en az bir fenil veya benzer bir aromatik yapıya ve pentilentetrazol testinde (PTZ) etkili olabilmeleri için ise iki elektron verici atom taşıyan süstitüe alkil grubuna ihtiyaç duydukları varsayılmaktadır. Bu düşünceye dayanılarak bir dizi asetofenonsemikarbazon tiyoüre

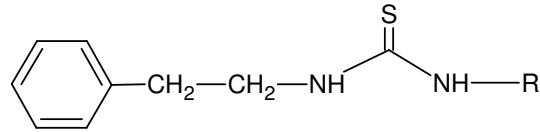
türevleri sentezlenmiş ve antikonvülsan etki için denenmiştir. Bazı bileşiklerin MES ve PTZ testinde oluşan konvülsiyonlara karşı önemli korumalar gösterdiği bulunmuştur. **20** nolu bileşik serinin içinde en etkili bileşik olarak bulunmuştur ve ED<sub>50</sub> 23,2 mgkg<sup>-1</sup> olan fenitoin ile aynı güçtedir. Tiyöüre azotuna alkil gruplarının süstitüsüonu aktif bileşikleri verirken tiyöüredeki aril gruplarının aktiviteyi yarıya indirdiği saptanmıştır (47).



**20**

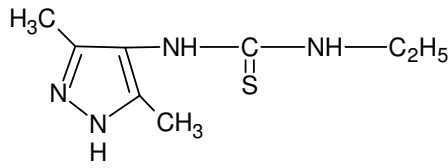
R: CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, 4-Cl C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-CH<sub>3</sub> C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 4-OCH<sub>3</sub> C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>

Benzer olarak Dimmorck ve arkadaşları (12), antikonvülsan etki gösterecek bazı tiyöüre **21** türevlerini sentezlemişlerdir. Bu bileşiklerin oral yoldan sıçanlara verildiğinde aktif oldukları ve kullanılan dozlarda nörotoksisite göstermediğini bildirmişlerdir.

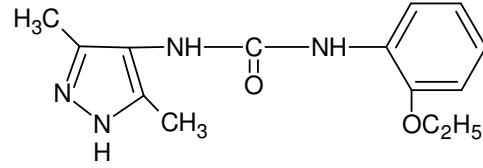


**21** R: (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

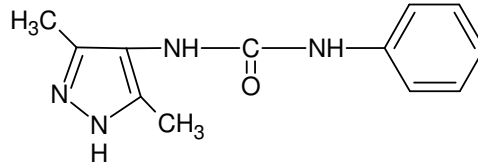
Kaymakçioğlu ve arkadaşları birçok tiyoüre ve üre türevlerini, çeşitli izotiyosiyanat veya izosiyanat ile sübstitüe 4-aminopirazollerin reaksiyonuyla hazırlamışlardır (29). Yeni bileşiklerin antikonvülsan etkileri PTZ ve MES yöntemleri kullanılarak test edilmiştir. Test edilen bileşikler arasından, tiyoüre türevi **22** 50mg/kg dozda PTZ ve MES testlerinde sırasıyla %90 ve %100 koruma göstermiştir. Üre türevlerinden **23** ve **24** de hem 25 hem 50 mg/kg da %82 ve %100 koruma göstermiştir.



**22**



**23**

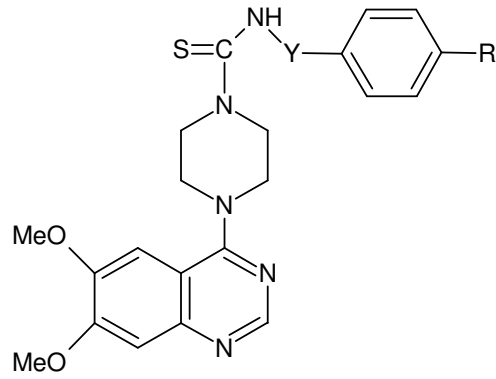


**24**

#### 4.3.2.e. Tiyoürelerin diğer biyolojik aktiviteleri

N,N-disübstitüe tiyoüre türevleri antimikrobiyal, antiviral, antihipertansif ve antikonvulsan aktivite dışında değişik farmakolojik aktiviteler de göstermektedir. Bu etki çeşitliliği diğer biyolojik aktiviteler başlığı altında bu bölümde incelenmiştir.

Bir seri 4-[4-(N-sübstitüetiyokarbamoil)-1-piperazinil]-6,7-dimetoksikinazolin türevleri sentezlemiş ve bileşiklerin **25** güçlü platelet türevi büyüme faktör reseptörlerinin fosforilasyon inhibitörü oldukları bildirilmiştir (47).

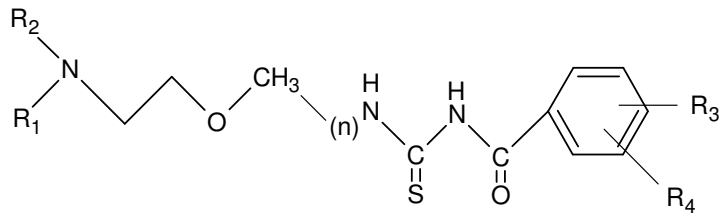


**25**

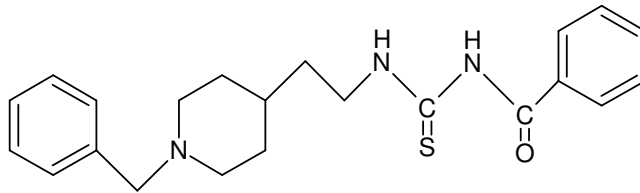
R: H, 4-Cl, 3-Cl, 2-Cl, 4-Br, 4-Me, 4-iPr, 4-tert-Bu, 4-MeO, 4-PhO, 3,4-(MeO)<sub>2</sub>, 3,4-(O-CH<sub>2</sub>O), 2-piridil, furfuril, sikloheksil, Ph, 4-ClPh

Y: CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, NMeCH<sub>2</sub>, NHCO

Bir seri 1-(2-aminoetoksi)-3-ar(o)il tiyoüre türevleri sentezlenmiş ve antiasetilkolinesteraz etki için değerlendirilmiştir. En etkili bileşikler **26** ve **27** olarak bulunmuştur. Bu bileşikler fizostigmin, galantamin, takrin, huperzin gibi referans bileşiklerinden daha etkili inhibitör etki göstermişlerdir (47).

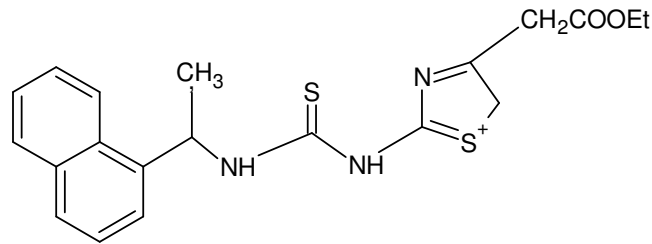


**26**

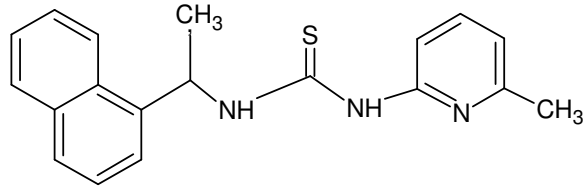


**27**

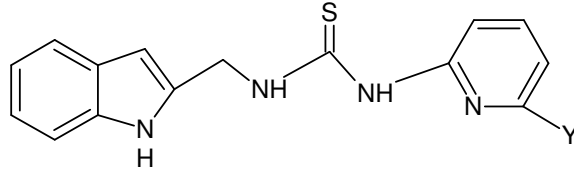
Mast hücre türevi lökotrien (LT) alerji ve astım patofizyolojisinde hayati bir rol oynamaktadır. Venkatachalam ve arkadaşları halopidril, tiazolil ve benziltiazol tiyoürelerle süstitüe olan indolil, naftil ve pentenilin çeşitli analoglarını sentezlemiş ve bunların lökotrien salınımlı mast hücrelerine yüksek affinite gösteren IgE ve Fcε RI resöptörlerine olan etkilerini *in vitro* olarak incelemişlerdir (61). 22 naftiletil tiyoüre bileşiği test edilmiş ve 7 tanesi aktif bulunmuştur. Bunlardan *N*-[1-(1-naftil)etil]-*N'*-[2-(etil-4-asetiltiazolil)]tiyoüre (**28** ve **29**) ve *N*-[1-(1*R*)-naftiletil]-*N'*-[2-(5-metilpiridil)] tiyoüre (**30**) önder bileşikler olarak tanımlanmıştır. Arada 11 tane indoliletil tiyoüre bileşiği test edilmiş ve burada da 7 tane aktif bileşik bulunmuştur. Bunlardan halopiridil bileşikler olan *N*-[2-(3-indoliletil)]-*N'*-[2-(5-kloropiridil)]tiyoüre (**31**) ve *N*-[2-(3-indoliletil)]-*N'*-[2-(5-bromopiridil)]tiyoüre (**32**) en aktif ajanlardır ve LTC<sub>4</sub> salınımını inhibe etmişlerdir. Hidroksifenil süstitüe bileşiklerinden *N*-[2-(4-hidroksifenil)etil]-*N'*-[2-(5-kloropiridil)] (**33**) tiyoüre, *N*-[2-(4-hidroksifenil)etil]-*N'*-[2-(5-bromopiridil)] tiyoüre (**34**) ve *N*-[2-(4-hidroksifenil)etil]-*N'*-[2-(piridil)] tiyoüre (**35**) en aktif piridil tiyoüre ajanlar olarak bulunmuştur. Bu tiyoüre türevlerinin biyolojik aktivitesinde eloktron alıcı ve verici grupların ve ayrıca süstitüentlerin Hammet sigma değerlerinin de rol oynadığı saptanmıştır. Bu sonuçlar süstitüe halopiridil, indolil ve naftil tiyoüre bileşiklerinin mast hücrelerine bağlanan IgE/Fcε RI resöptörlerini inhibe eden yeni sınıf kimyasal anti-alerjik ajan olarak kullanılabilceğini göstermiştir. İleride bu araştırmalar klinik olarak alerjik astımı önlemede yeni ve daha efektif ilaç etken maddesi keşfine yol gösterici olacaktır.



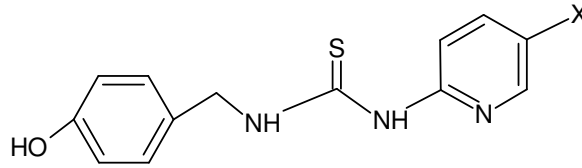
**28** (S izomer) ve **29** (R izomer)



**30**

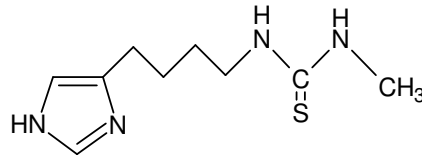


**31** (y=Cl) ve **32** (y=Br)

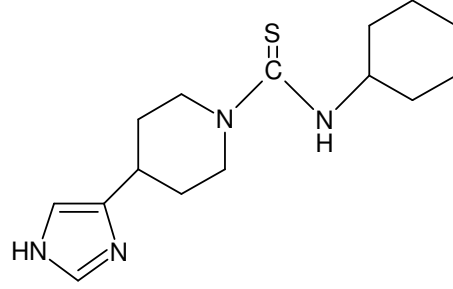


**33** (X=Cl), **34** (X=Br), **35** (X=H)

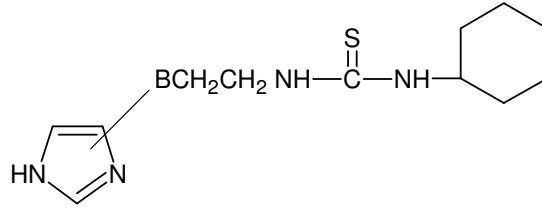
İlk güçlü ve seçici H<sub>3</sub> reseptör histamin antagonisti olan tioperamid'ten başlanarak çeşitli analogları sentezlenmiş ve *in vitro* olarak sıçan serebral korteksinde test edilmişlerdir (47). En güçlü analog bileşik zincirde üç metil taşıyan **36'** dir. En güçlü homolog ise, bir burimamid analogu olan bileşik **37'**dir.



burimamid



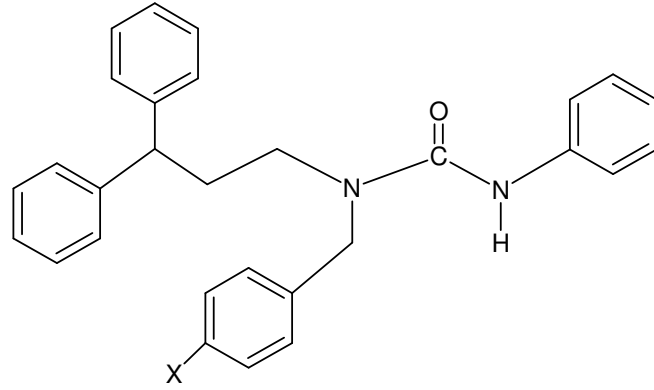
tioperamid



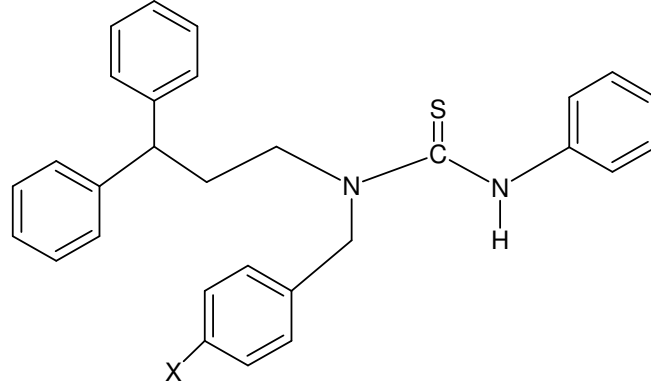
**36** (B= CH<sub>2</sub>), **37** (B= CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)

Literatürde pirazolil-üreler P38 kinaz inhibitörü olarak, benzilürelerde yeni güçlü etkili kanser ilaçları olarak tanımlanmaktadır (50). Son zamanlarda hidroksiürenin de akut ve kronik lösemi gibi geniş kapsamlı sıvı tümörlerin tedavisinde klinik olarak kullanıma elverişli olduğu belirtilmiştir.

Üre ve tiyoüre türevleri aynı zamanda insan DNA-topoizomeras II 'nin potansiyel inhibitörü olarak beyin kanseri tedavisinde kullanılmışlardır. Bundan başka üre türevlerine atfedilen diğer bir özellik de HIV-1 proteaz ve kolesterol asetiltransferaz (ACAT) inhibitörü etkisidir. Ayrıca hiperkolesteromi ve aterosklerozun tedavisinde de etkilidirler. Yeni seri *N*-3,3-difenilpropil-*N*-(*p*-X-benzil)-*N'*-fenilüreler (**38a-g**) ve tiyoüreler (**39a-g**), sekonder aminler ve fenil izosiyonat veya izotiyosiyanatın reaksiyonlarıyla sentezlenmişlerdir (50). Üre ve tiyoüre türevlerinin sitotoksik etkileri MTT tarafından Ehrlich karsinomu ve K562 insan lösemi hücrelerine karşı denenmiştir. Daha sonra bileşiklerin aktivitesi DNA topoizomeras I ve II- $\alpha$  nın inhibisyonu için test edilmiştir. Sonuçlar bu bileşiklerin önemli ve tedaviye yardımcı etkilerinin olduğunu göstermiştir.



**38a-g**



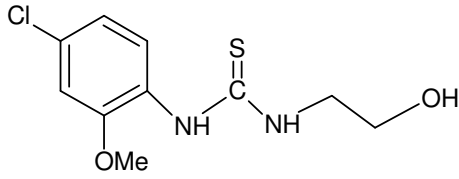
**39a-g**

a:X=H, b:X=CH<sub>3</sub>, c:X=N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, d:X=OCH<sub>2</sub>O, e:X=Br, f:CN, g:X=NO<sub>2</sub>

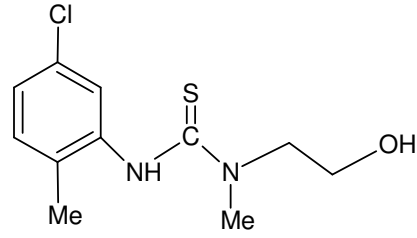
Kardiovasküler hastalık Amerika’ da ve benzeri endüstri ülkelerinde ölüm sebeplerinin başında gelmektedir ve bu ölümlerinin büyük bölümü aterosklerozise bağlıdır. Aterosklerotik kardiovasküler hastalık için en büyük riskin, LDL kolesterolün yükselmesi, HDL kolesterolün düşük olması ve trigliserid düzeyinin yüksek seviyede olmasına bağlı olan dislipidemi olduğu iyi bilinmektedir. Aterosklerozis arter duvarındaki kolesterol akım miktarının artması sonucu koroner ya da serebral arterlerin tıkanması ve buna bağlı olarak da miyokard infarktüsü ya da krizle sonuçlanan kompleks bir hastalıktır. Kapsamlı epidemiyolojik araştırmalar, serum HDL kolesterol düzeyiyle koroner kalp hastalığının arasında büyük bir ters ilişki olduğunu göstermiştir. Framingham kalp çalışması, HDL kolesterol düzeyindeki 10mg/dl ’lik düşüşün koroner

arter hastalığı ölümlerini %19 ve tüm ölüm nedenlerini de %12 azalttığını göstermiştir. Helsinki kalp çalışması, dislipidemili erkek hastaların temel korunmasında, kardiovasküler oran sonuçlarının azalmasında PPAR $\alpha$  agonisti gemfibrozilin tedaviye en iyi cevabı verdiğini göstermiştir.

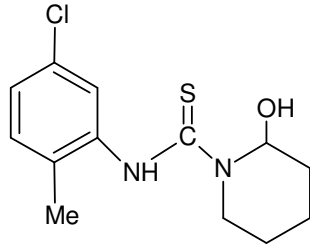
Bundan hareketle bir seri 1-hidroksialkil-3-fenil tiyoüre analogları hazırlanarak HDL ve Apo A-I düşürücü ajan olarak denenmiştir (9). Türevlerden **40**, **41**, **42** ve **43** gemfibrozil kadar ya da daha etkili bulunmuşlardır.



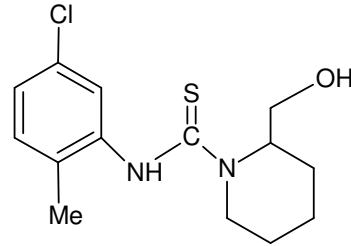
**40**



**41**



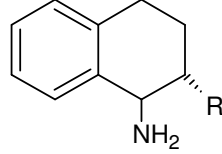
**42**



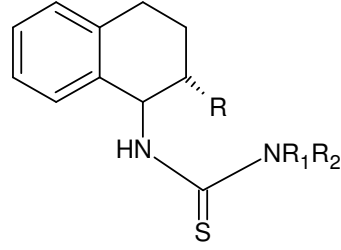
**43**

Yeni modern dünyada obezite ciddi bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya genelindeki epidemiyolojik verilerin analizi bu rahatsızlığın hızlı ve aşırı şekilde artmakta olduğunu göstermektedir. Dünya üzerinde obezite vakaları hızla artmasına rağmen, problemi çözebilecek antiobezite ilaç sayısı oldukça azdır. Bunlardan orlistat ve sibutramin obezitenin tedavisinde uzun zamandır kullanılan FDA'nın onayladığı iki ilaçtır. Bu iki ilacın da etkinliği limitlidir ve yan etkileri vardır. Bu yüzden hala yüksek terapötik indeksli ve minimum yan etkili ilaçlara ihtiyaç vardır. Birçok indanil tiyoüre, indanil aminoalkol ve tetrahidronaftil aminoalkollerin

anoreksijenik aktiviteye sahip olmalarından hareketle, Bhandari ve arkadaşları tarafından bir seri 1-aminotetrahidronaftelen (**44**) tiyöüre ve 1-amino-2-hidroksitetrahidronaftelen türevleri (**45**) sentezlenmiş ve anoreksijenik etkileri incelenmiştir (2). Bu bileşikler arasında **46**, **47** ve **48** hiçbir antidepresan etki göstermeksizin anoreksijenik aktivite göstermiş ve iştah baskılayıcı olarak denenmiştir.



**44** (R=H), **45** (R=OH)



**46** (R=OH, NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>=sikloheksilamino)

**47** (R=OH, NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>=2-feniletilamino)

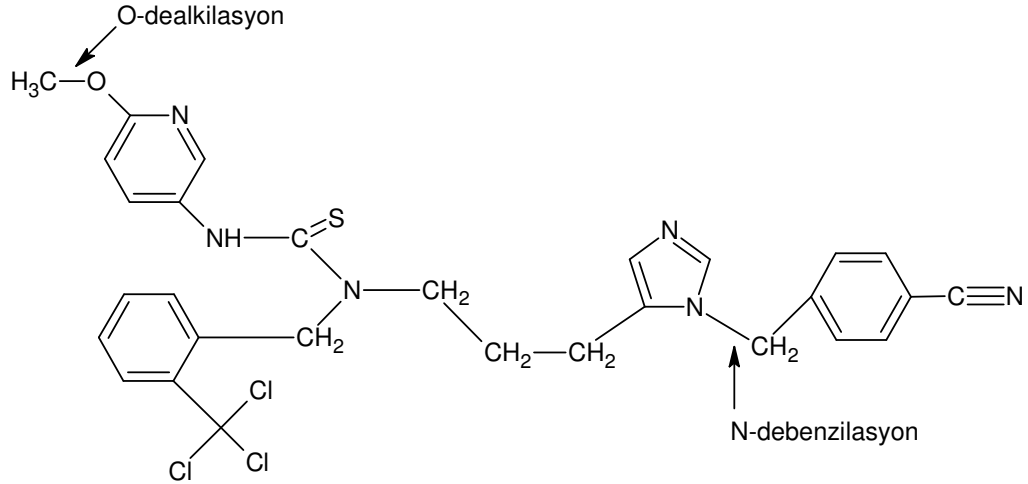
**48** (R=H, NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>=sikloheksilamino)

#### 4.4. N,N'-Disübstitüe Tiyöürel'er'in Metabolizması Hakkında Genel Bilgiler

Tiyöüre türevlerini incelediğimizde farmakolojik aktiviteye ait literatürlerinin oldukça fazla sayıda olmasına rağmen bu bileşiklere ait metabolizma çalışmalarının yok denecek kadar az olduğu gözlenir. Bu nedenle farmakolojik etki çeşitliliği bulunan bu bileşikler üzerinde metabolizma çalışmalarının yapılarak metabolitlerinin aydınlatılmasının gerekliliği göz ardı edilemez.

Lee J. ve arkadaşları tarafından 1-[3[3-(4-siyanobenzil)-3H-imidazol-4-il]propil]-3-(6-metoksipiridin-3-il)-1-(2-triflorometilbenzil)tiyöüre'nin (YH3945) ratlarda metabolizması incelenmiştir (35). Safra, plazma, feçez ve idrar toplanarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile ultraviyole ve kütle radyoaktivite dedektörleri kullanılarak analiz yapılmıştır. Madde hayvanlara intravenöz uygulanmıştır. YH 3945'in glukuronid metabolitini de içeren 21 değişik metabolite metabolize olduğu ve

bu metabolitlerin de kütle ve NMR spektral analizler ile tanımlandığı bildirilmiştir. Major metabolik yolun metoksipiridindeki O-demetilasyon ve imidazol halkasında N-debenzilasyon ve hidroksilasyon olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bileşikte non-enzimatik olarak da siklizasyon meydana geldiği bildirilmiştir.

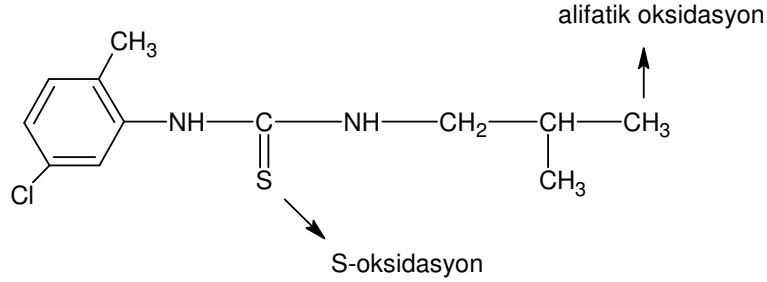


1(3(3-(4-siyanobenzil)3H-imidazol-4-il)propil)-3-(6-metoksipiridin-3-il)-1-(2-triflorometilbenzil)tiyoüre

Yegba ve arkadaşları (64) tiyobarbitat serisinde 2 metabolik yol olan oksidasyon ve desülfürasyonun karşılaştırmasını yapmışlardır. Tiyobarbitat serisinde hepatik hidroksilasyon ve desülfürasyon karşılaştırması amacıyla yan zincirde tersiyer karbon atomu taşıyan 2 bileşik seçilmiş ve sıçanlara bileşikler bir hafta boyunca uygulanmıştır. İdrar ve gaita toplanarak ekstraksiyon yapılmıştır. Metabolitler izole edilerek yapılan çalışma da desülfürasyonun major metabolik yol olmadığı, desülfürasyon gözlemlendiği zaman da minör metabolik yol olduğu ve  $\gamma$ -hidroksilasyonla oluşan tersiyer alkol metaboliti ile beraber gözlemlendiği bildirilmiştir.

SDZ HDL 376 aterosklerozun tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiş bir maddedir. SDZ HDL 376 'ın sıçan, maymun, insan karaciğer mikrozomlarıyla (insan ve sıçan karaciğeri dilimleri üzerinde) *in vitro* metabolizma araştırması yapılmıştır (52).

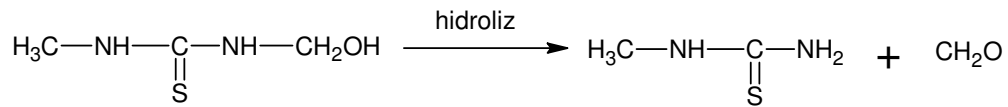
SDZ HDL 376'nın insan hariç diğer türlerde değişik şekilde metabolize olduğu tespit edilmiştir. İnsan ve maymun mikrozomları ile karbon hidroksilasyonun daha baskın olduğu görülmüştür. Sıçan mikrozomlarında ise S-oksidasyonun major metabolik yol olduğu tespit edilmiştir.



N-(5-kloro-2-metilfenil)-N'-(2-metilpropil)tiyoüre (SDZ HDL 376)

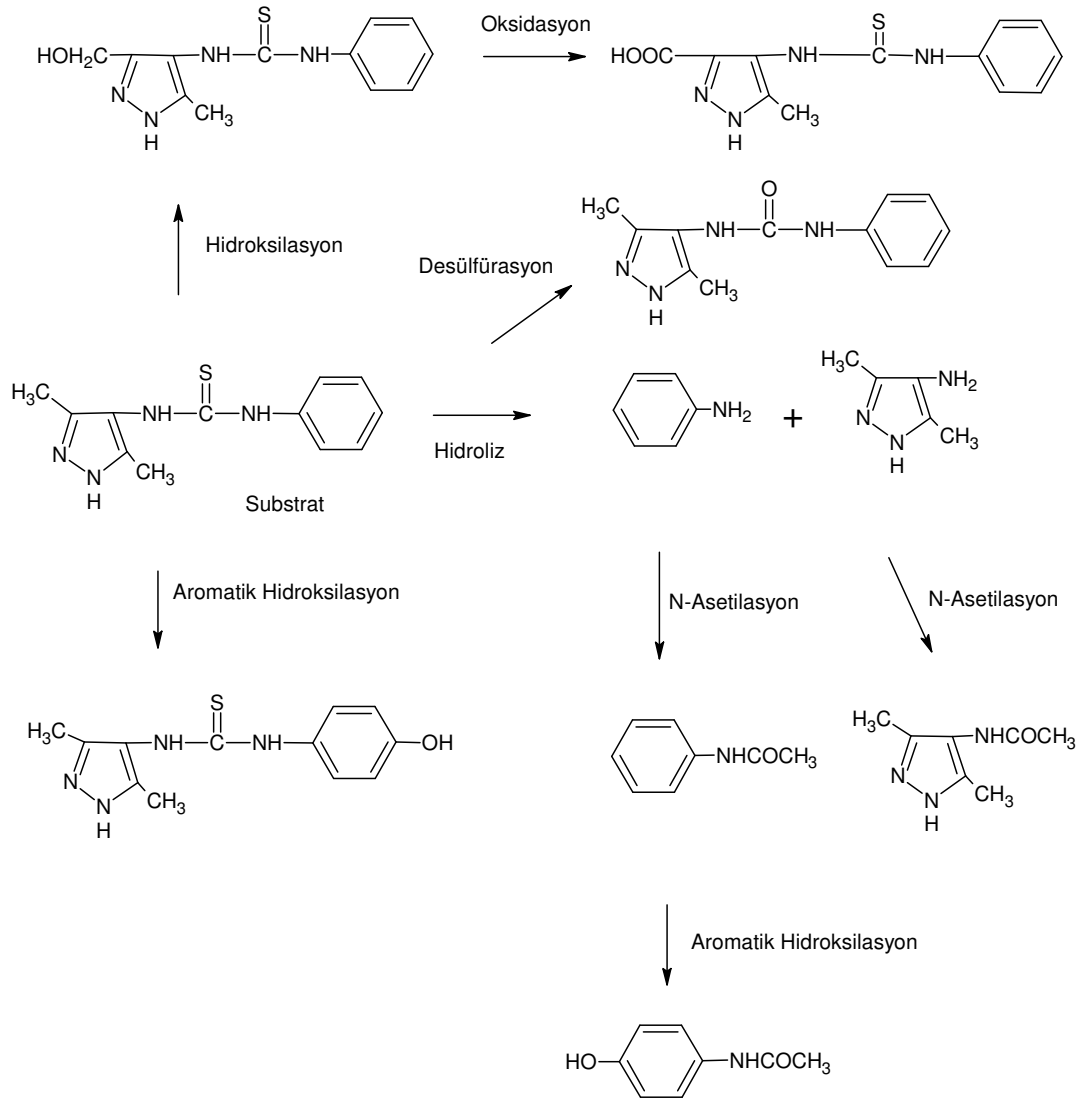
Debruyne ve arkadaşları da 1-metil-2-tiyürenin serum düzeylerini ve metabolitlerini araştırmak üzere insan ve tavşanlarda yapılan çalışmalarda kan örnekleri toplamışlar ve kromatografik olarak incelemişlerdir (11). Çalışmada 1-metil-2-tiyüre'nin serum düzeyleri tespit edilerek hem insanda hem de tavşanda bilinmeyen bir metabolitin saptandığı ancak bu metabolitin de yapısının aydınlatılmadığı bildirilmiştir.

Jones ve arkadaşları N-metil-N'-(hidroksimetil) tiyürenin erkek spague-dawley sıçanlarda metabolizmasını incelemişlerdir (28). Bileşiğin N-metiltiyüre ve formaldehite dönüştüğü tespit edilmiştir. N-metiltiyürenin minör metabolit olarak tespit edildiği, formaldehitin de CO<sub>2</sub> 'e dönüşmesi ve gaz olarak ortama yayılmadan dolayı tespit edilemediği gözlenmiştir. Bunun yanında N-metil-N'-(hidroksimetil) tiyürenin büyük ölçüde değişmeden atıldığı, düşük oranda N-metiltiyüreye hidroliz olduğu saptanmıştır.



Kaymakçioğlu ve arkadaşları kaydadeğer antikonvulsan aktivite gösteren N-fenil-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)tiyürenin sıçanlardaki *in vivo* metabolizmasını

incelemiştirler (30). Substrat intraperitoneal olarak (50 mg/kg) verilmiş ve kan örnekleri 0., 1., 2., 4., 8., 12., 24. ve 48. saatlerde alınmıştır. Substrat ve potansiyel metabolitler ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılarak ayrılmıştır. Substrat 30. dakika ile 12. saat arasında artış gösteren, 12. saat ile 48. saat arasında azalan konsantrasyonda tespit edilmiştir. Substrat yanında iki adet bilinmeyen metabolit saptanmış ancak izole edilemediği için yapı tayini de yapılamamıştır. Araştırmacılar tarafından substrata ait öngörülen metabolik yollar aşağıda verilmiştir.



## 5-GEREÇ VE YÖNTEM

### 5.1.Araç ve Gereçler

#### 5.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Anilin (Merck), Aseton (Merck), Asetilaseton (Merck), Benzokain (Merck), Etanol (Merck), Eter (Merck), 4-Fluoro izosiyanat (Fluka), 4-Fluorofenil izotiyosiyanat (Aldrich), Glasiyel asetik asit (Merck), Hidrazin hidrat (Fluka), Hidroklorik asit (Merck), 4-Klorofenil izotiyosiyanat (Fluka), 4-Kloroizosiyanat (Fluka), Metilhidrazin (BDH Chemicals), Petrol eteri (Merck), Silikajel (Merck Kieselgel 60 F- 0,2 mm), Sodyum asetat (Merck), Sodyum nitrit (Merck), Sodyum sülfat (Merck).

#### 5.1.2. Kullanılan Elektronik Cihazlar

İnfrared Spektrofotometre.....Pekin Elmer 1600  
FITR

Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometre.....Bruker AVANC-DPX  
400

Elementel Analiz Cihazı.....Leco CHNS-932

Erime Derecesi Aleti.....Büchi 530

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi Cihazı.....Agilent 1100 Serisi  
Enjektör: Rheodyne Model 7125  
Dedektör: Agilent 1100 Serisi Diode-Array Dedektör G1315B

Pompa: Agilent 1100 Serisi G1311A

Kolon: Hichrom Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> (5µm-250mm x 4,6 mm ID)

Kolon Isıtıcı: Agilent 1100 Serisi G1316A

Gaz giderici: Agilent 1100 Serisi G1379A

## **5.2.Genel Sentez Yöntemleri**

### **5.2.1. 2,3,4-Pentantrion 3-fenilhidrazon (Madde A1)**

Literatürde (19) verilen yönteme göre çalışılarak 0.01 mol (1 ml) anilin'in 2 ml derişik HCl 'deki çözeltisine soğukta 10 ml NaNO<sub>2</sub>  zeltisi damla damla ilave edilir. Oluşan diazonyum tuzunu ihtiva eden çözelti ve 0.01 mol (1 ml) asetilaseton, 30 gr sodyum asetat ve 25 ml etanol (%50) içeren soğuk karışma ilave edilir. Oluşan  kelti su ile yıkanarak süzülür, kurutulur ve etanolden billurlandırılır. Verim %78.

Koyu sarı renkte, iğne şeklinde billuri bir maddedir, e.d. 78-80  C. Su, eter ve kloroformda  z nmez. Etanolde sıcakta  z n r.

### **5.2.2. 4-(Fenilazo)-3,5-dimetilpirazol (Madde B1)**

Literatürde (16) verilen yönteme göre çalışılarak 0.9 g (4,4 mmol) madde A1  zerine 1 ml hidrazin hidrat (%99) ve 5 ml glasiyel asetik asit ilave edilerek geri eviren soğutucu altında kaynar su banyosunda 4 saat ısıtılır. Süre bitiminde ortama su ilave edilir, oluşan çökelti süzülerek alınır, kurutulur ve etanolden billurlandırılır. Verim % 83.

Sarı renkli, iğne şeklinde billuri bir maddedir, e.d. 126  C. Etanolde  z n r, suda  z nmez.

### **5.2.3. 2,3,4-Pentantrion 3-(4-karbetoksifenil)hidrazon (Madde A2)**

Literatürde (19) verilen yönteme göre çalışılarak 0.01 mol (1,65g) benzokain' in 2 ml derişik HCl'deki çözeltisine soğukta 10 ml NaNO<sub>2</sub>  zeltisi damla damla ilave

edilir. Oluşan diazonyum tuzunu ihtiva eden çözelti ve 0.01 mol (1ml) asetilaseton, 30 gr sodyum asetat ve 25 ml etanol (%50) içeren soğuk karışıma ilave edilir. Oluşan çökelti su ile yıkanarak süzülür, kurutulur ve etanolden billurlandırılır. Verim % 79.

Koyu sarı renkli amorf toz, e.d. 125 °C. Sıcakta etanolde çözünür. Su ve eterde çözünmez.

#### **5.2.4. 4-(4-Karbetoksifenilazo)-1,3,5-trimetilpirazol (Madde B2)**

Literatürde (16) verilen yönteme göre çalışılarak 0.9g (3,1 mmol) madde A2 üzerine 1 ml metilhidrazin ve 5 ml glasiyel asetik asit ilave edilerek geri çeviren soğutucu altında kaynar su banyosunda 4 saat ısıtılır. Süre bitiminde ortama sulave edilir, oluşan çökelti süzülerek alınır, kurutulur ve etanolden billurlandırılır. Verim % 85.

Parlak turuncu renkli billuri madde, e.d. 165 °C. Sıcakta etanolde çözünür. Su ve eterde çözünmez.

#### **5.2.5. 4-amino-3,5-dimetilpirazol [1]**

Literatürde (16) verilen yönteme göre çalışılarak 1g (5 mmol) madde B1'in etanoldeki çözeltisine 0.7 ml hidrazin hidrat (%99) ilave edilir ve 50 °C'de magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılır. Başlangıçta turuncu olan renk hafif pembeye dönünce İnce Tabaka Kromatografisi ile de kontrol edilerek reaksiyon bitirilir. Ortama bir miktar su ilave edilerek eterle ekstraksiyon yapılır (anilin ayrılır) ve sulu-alkollü ortamda kalan amin billurlandırılarak kazanılır. Verim % 82.

Parlak beyaz renkli pul şeklinde billuri madde, e.d. 209 °C. Su, etanol ve asetonda çözünür. Eter ve petrol eterinde çözünmez.

#### **5.2.6. 4-Amino-1,3,5-trimetilpirazol [2]**

Literatürde (16) verilen yönteme göre çalışılarak 1g (3.5 mmol) mdde B2' nin etanoldeki çözeltisine 0.7 ml hidrazin hidrat (%99) ilave edilir,50 °C'de magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılır. Başlangıçta turuncu olan renk açık sarıya dönünce İnce

Tabaka Kromatografisi ile de kontrol edilerek reaksiyon bitirilir. Ortama bir miktar su ilave edilerek eterle ekstraksiyon yapılır (benzokain ayrılır). Sulu-alkollü ortamda kalan amin çözücüsü yoğunlaştırılarak kazanılır. Verim %66 .

Turuncu renkli billuri madde, e.d. 98 °C. Su, etanol ve asetonda çözünür. Eter ve petrol eterinde çözünmez.

#### **5.2.7. N-Süstitüe-N'-(3,5-di/1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyoüre'ler [T1,T2,T3,T4]**

0.085 Mol 100 ml susuz asetonda çözülmüş uygun izotiyosiyanat, 100 ml susuz asetonda çözülmüş 0.085 mol amin üzerine damla damla ilave edilir. Karışım 4-5 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtılır. Çözücü vakum altında uçurulur, kalan madde uygun bir çözücüden billurlandırılır (29).

#### **5.2.8. N-Süstitüe-N'-(3,5-di/1,3,5-trimetilpirazol-4-il)üre'ler [U1,U2,U3,U4]**

3.5 mmol 4-amino-3,5-di/1,3,5-trimetilpirazol 7.0 mmol uygun izosiyanatla 80°C'de iki saat ısıtılır. Süre bitiminde elde edilen katı ürün petrol eteri ile yıkanır, kurutulur ve etanolden billurlandırılır (29).

#### **5.2.9. 4-asetil amino-3,5-dimetilpirazol'ün hazırlanışı**

0.001 mol 4-amino-3,5-dimetilpirazol üzerine 5 ml asetik anhidrit ilave edilir ve 30 dakika elektrikli mantoda ısıtılır. Süre bitiminde çökmüş olan ürün süzülerek distile su ile yıkanır. Katı etanolden tekrar kristallendirme ile saflaştırılır. Erime derecesi 136 °C; verim %75.20 (30).

### 5.3. Kromatografik Çalışmalar

#### Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Elde edilen bütün maddelerin saflığı Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YSBK) kullanılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla sentezlenen substrat ve olası metabolitler 1 mg tartılır ve 1 ml metanolde çözülür. Bu çözeltilerden 50 µl alınır, metanol ile 1 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan seyreltik standart çözeltilerden 10-100 µl hacimler' de uygun çözücü karışımlarının geçtiği sisteme injekte edilerek ayrımları gerçekleştirilmiş ve kolonda tutulma zamanları (Retansiyon Zamanı, RZ) tespit edilmiştir. Kullanılan çözücü sistemleri aşağıda verilmiştir.

Çalışma Koşulları:

Dedektör : Diode-Array dedektör

Dalga Boyu :210 nm, 254 nm

Akış Hızı : 0.7 ml/dk

Kullanılan Mobil Faz Sistemi:

N-(4-Klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyoüre 'nin(T3) *in vivo* metabolizma çalışmasında substrat ve metabolitlerin ayrımı için aşağıdaki mobil faz sistemi kullanılmıştır.

ZAMAN	METANOL	SU(%)
0	48	52
5	48	52
6	70	30

N-(4-Fluorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyoüre 'nin (T2) *in vivo* metabolizma çalışmasında substrat ve metabolitlerin ayırımı için metanol: su (48:52 h/h) karışımı kullanılmıştır.

#### **5.4 Metabolizma Çalışmaları İçin Örneklerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü**

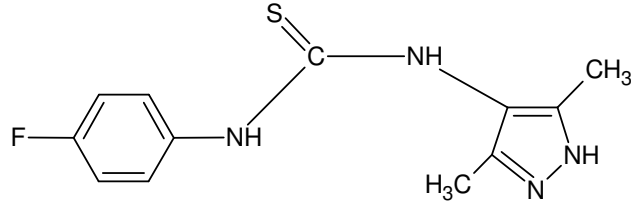
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu tarafından izin verilen bu çalışmada 200-250 g. ağırlığında Wistar Albino suşu erişkin erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar Marmara Üniversitesi Deney Hayvanı Yetiştirme Ünitesi'nden temin edilmiş ve deneyler süresince 12 saat aydınlık - 12 saat karanlık döngü içerisinde yem ve su alımları serbest bırakılarak, sıcaklığı sabit tutulan ( $21 \pm 3$  C°) odada, her kafeste bir sıçan olacak şekilde barındırılmıştır. Çalışma protokolü için Marmara Üniversitesi Deney Hayvanı Etik Kurulu onayı alınmasından sonra deneylere başlanmış ve tüm deney boyunca Helsinki deklarasyonuna uygun davranılmıştır.

Sıçanlar substratın uygulanmasından önceki gece aç bırakılmıştır. Substrat (%5'lik arap zambında) çözeltisi 100 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Kan örnekleri hafif eter anestezisi altında substrat uygulanmadan hemen önce 0. dakika, 30. dakika, 1., 2., 4., 8., 12. ve 24. saatlerde intrakardiyak veya gözden alınmıştır. Kan örnekleri 5000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüje edilerek plazma ve kan hücreleri ayrılmıştır.

## 6.BULGULAR

### 6.1. N, N'disübstitüe tiyöürelör

#### 6.1.1.- N-(4-fluorofenil)-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)tiyöüre (T1)



0,19 g (1,70 mmol) madde [1] ve 0,24 ml (1,70mmol) 4-florofenil izotiyosiyanat'tan hareketle 5.2.7.'de verilen yöntemle göre elde edilir. Sırasıyla kaynar su ve kaynar petrol eteri ile yıkanır, etanolden billurlandırılır. Verim %50,00. Beyaz renkli toz madde, e.d. 196-198 °C. Su, petrol eteri ve kloroformda çözünmez. Sıcakta, etanolde ve dimetilsülfoksitte çözünür.

Analiz : C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>4</sub>S için

Hesaplanan: C, 54.53 ; H, 4.96 ; N, 21.20 ; S, 12.13

Bulunan : C, 53.79 ; H, 4.36 ; N, 20.69 ; S, 11.97

#### Spektral bulgular:

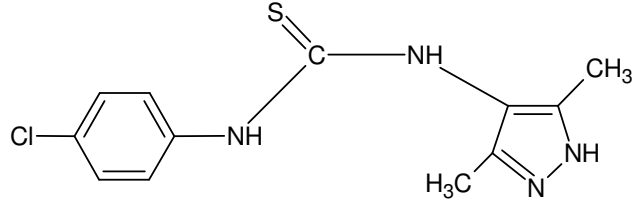
**IR spektrumu** (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3266-3166 (tiyöüre grubu ve pirazol halkası N-H g. b.); 2966 (aromatik halka C-H g. b.); 1542-1508 (pirazol halkası C=N g. b., tiyöüre N-H e. b.); 1361 (tiyöüre C=S g. b.); 1270-1236 (tiyöüre C-N g. b.)

**Şekil 1.** Madde T1' in IR Sektrumu

**<sup>1</sup>H-NMR Spektrumu** (400 MHz) (DMSO-d<sub>6</sub> /TMS), δ (ppm): 1.93 (s, 3H, pirazol C5 metil); 2.07 (s, 3H pirazol C3 metil); 7.07 (t, 2H aromatik protonlar) ;7.44 (m, 2H aromatik protonlar ve tiyoüre NH); 8.38 (s, 1H, tiyoüre NH)

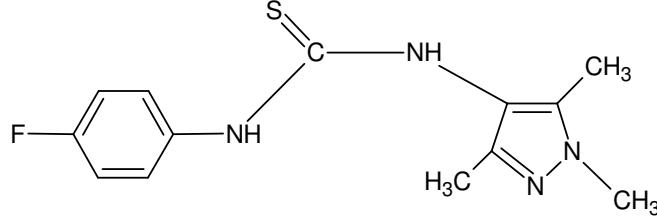
**Şekil 2.** Madde T1' in <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

### 6.2.2. N-(4-klorofenil)-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)tiyoüre (T4)



0,19 g (1,70 mmol) madde [1] ve 0,24 ml (1,70mmol) 4-Klorofenil izotiyosiyanat'tan hareketle 5.2.7.'de verilen yönteme göre elde edilir. Sırasıyla kaynar su ve kaynar petrol eteri ile yıkanır, etanolden billurlandırılır. Verim %52,77. Beyaz renkli toz madde, e.d. 212 °C (29).

### 6.1.3. N-(4-fluorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyoüre (T2)



0,21 g (1,70 mmol) Madde 2 ve 0,17 ml (1,70 mmol) 4-fluorofenil izotiyosiyanattan hareketle 5.2.7.'de verilen yönteme göre elde edilir. Sırasıyla kaynar su ve kaynar petrol eteri ile yıkanır, etanolden billurlandırılır. Verim %65,00. Beyaz renkli toz madde, e.d. 210 °C. Su, petrol eteri ve kloroformda çözünmez. Sıcakta etanolde ve dimetilsülfoksitte çözünür.

Analiz : C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>4</sub>S için

Hesaplanan: C, 56.09 ; H, 5.43 ; N, 20.13

Bulunan : C, 55.60 ; H, 4.43 ; N, 20.60

#### Spektral Bulgular:

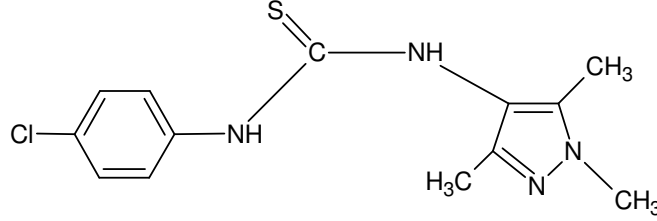
**IR spektrumu** (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3172 (tiyoüre grubu NH g. b.); 1549-1490 (pirazol halkası C=N gerilme ve tiyoüre N-H e. b.); 1304 ( tiyoüre C=S g. b.); 1267-1230 (C-N tiyoüre g. b.)

**Şekil 3.** Madde T2'nin IR Spektrumu

**<sup>1</sup>H-NMR Spektrumu** (400 MHz) (DMSO-d<sub>6</sub>/TMS),  $\delta$  (ppm): 1.91 (s, 3H, pirazol C5 metil); 1.98 (s, 3H, pirazol C3 metil); 3.54 (s, 3H, pirazol N-CH<sub>3</sub>); 7.04 (t, 2H, J= 7.75 Hz aromatik protonlar); 7.27 (m, 2H, aromatik protonlar); 8.17 (2H, NH-CS-NH)

**Şekil 4.** Madde T2'nin <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

#### 6.1.4. N-(4-klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyoüre (T3)



0,21 g (1,70 mmol) Madde 2 ve 0,17 ml (1,70 mmol) 4-klorofenil izotiyosiyanattan hareketle 5.2.7.'de verilen yöntemle göre elde edilir. Sırasıyla kaynar su ve kaynar petrol eteri ile yıkanır, etanolden billurlandırılır. Verim %45. Beyaz renkli toz madde, e.d. 205-207 °C. Su, petrol eteri ve kloroformda çözünmez. Sıcakta etanolde ve dimetilsülfoksitte çözünür.

Analiz : C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>S için

Hesaplanan: C, 52.96 ; N, 19.00

Bulunan : C, 52.12 ; N, 18.42

#### Spektral Bulgular:

**IR spektrumu** (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3157 (tiyoüre grubu N-H g. b.); 2974 (aromatik halka C-H g. b.); 1588-1490 (pirazol halkası C=N g. b. ve tiyoüre N-H e. b.); 1334 (tiyoüre C=S g. b.); 1261, 1232 (tiyoüre C-N g. b.)

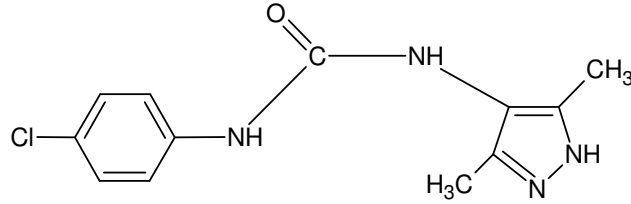
**Şekil 5.** Madde T3'ün IR Spektrumu

**<sup>1</sup>H-NMR Spektrumu** (400 MHz) (DMSO-d<sub>6</sub>/TMS),  $\delta$  (ppm): 1.90 (s, 3H, pirazol C5 metil); 2.07 (s, 3H, pirazol C3 metil); 3.55 (s, 3H, pirazol N-CH<sub>3</sub>); 7.35 (2d, 4H, J=7.57 Hz aromatik protonlar); 8.25-9.36 (2H, NH-CS-NH)

**Şekil 6.** Madde T3'ün <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

## 6.2. N, N'disübstitüe üreler

### 6.2.1. N-(4-klorofenil)-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)üre(U1)



0,19 g (1,70 mmol) Madde 1 ve 4-klorofenil izosiyanat'tan hareketle 5.2.8'de verilen yöntemle elde edilir. Kaynar petrol eteri ile yıkanır ve etanolden billurlandırılır. Verim 45. Beyaz renkli toz madde, e.d. 225-226 °C. Su, petrol eteri ve kloroformda çözünmez. Etanolde ve dimetilsülfoksitte çözünür.

Analiz : C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub>O için

Hesaplanan: C, 54.45 ; H, 4.95 ; N, 21.17

Bulunan : C, 53.98 ; H, 4.53 ; N, 20.66

#### Spektral Bulgular:

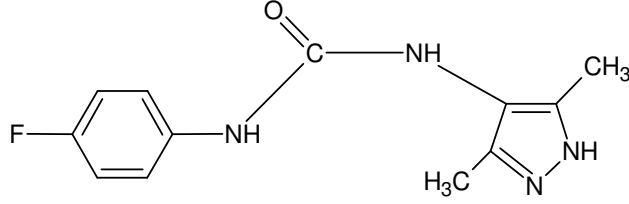
**IR spektrumu** (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3278 (üre grubu ve halkası N-H g. b.); 1639 (üre C=O g. b.); 1590-1474 (aromatik halka C=C ve pirazol halkası C=N g. b., pirazol ve üre N-H e. b.); 1238 (üre C-N g. b.)

**Şekil 7.** Madde U1'in IR Spektrum

**<sup>1</sup>H-NMR Spektrumu** (400 MHz) (DMSO-d<sub>6</sub>/TMS),  $\delta$  (ppm): 2.04 (s, 6H, pirazol 3,5-dimetil); 7.28 (d, 2H, J= 8,84 Hz aromatik protonlar ); 7.47 (d, 2H, J= 8,88 Hz aromatik protonlar); 7.43 (s, 1H, üre NH); 8.42 (s, 1H, üre NH); 12.05 (s, 1H, pirazol NH)

**Şekil 8.** Madde U1'in <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

### 6.2.2. N-(4-fluorofenil)-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)üre(U2)



0,19 g (1,70 mmol) Madde 1 ve 4-fluorofenil izosiyanat'tan hareketle 5.2.8'de verilen yöntemle elde edilir. Kaynar petrol eteri ile yıkanır ve etanolden billurlandırılır. Verim 40. Beyaz renkli toz madde, e.d. 215-217 °C. Su, petrol eteri ve kloroformda çözünmez. Etanolde ve dimetilsülfoksitte çözünür.

Analiz : C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>FN<sub>4</sub>O için

Hesaplanan: C, 58.06 ; N, 22.57

Bulunan : C, 58.88 ; N, 21.76

#### Spektral Bulgular:

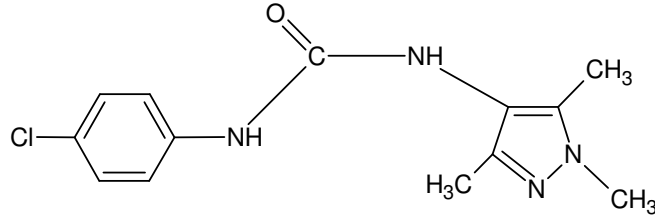
**IR spektrumu** (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3267-3270 (üre NH ve pirazol NH g. b.); 1650 (üre C=O g. b.); 1609-1500 (aromatik C=C ve pirazol halkası C=N g. b. ve üre N=H e. b.); 1213 (üre C=N g. b.)

**Şekil 9.** Madde U2'nin IR Spektrumu

**<sup>1</sup>H-NMR Spektrumu** (400 MHz) (DMSO-d<sub>6</sub>/TMS),  $\delta$  (ppm): 1.92 (s, 3H, pirazol C5 metil); 1.97 (s, 3H, pirazol C3 metil); 6.98 (t, 2H, aromatik protonlar); 7.27-7.37 (m, 3H, aromatik protonlar ve üre NH); 8.32 (s, 1H, üre NH); 11.87 (s, 1H, pirazol NH)

**Şekil 10.** Madde U2'nin <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

### 6.2.3. N-(4-klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)üre(U3)



0,21 g (1,70 mmol) Madde 2 ve 0,17 ml (1,70 mmol) 4-Klorofenil izosiyanat'tan hareketle 5.2.8.'de verilen yöntemle elde edilir. Sırasıyla kaynar su ve kaynar petrol eteri ile yıkanır, etanolden billurlandırılır. Verim %60. Beyaz renkli toz madde, e.d. 242-244 °C. Su, petrol eteri ve kloroformda çözünmez. Sıcakta etanolde ve dimetilsülfoksitte çözünür.

Analiz : C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>O için

Hesaplanan: C, 56.02 ; H, 5.42 ; N, 20.10

Bulunan : C, 55.49 ; H, 4.17 ; N, 19.59

#### Spektral Bulgular:

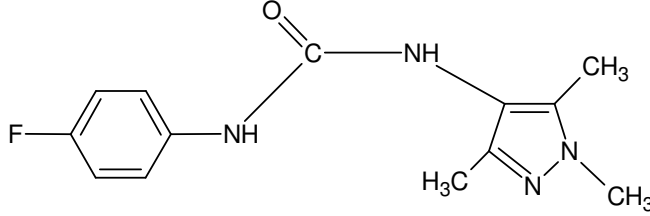
**IR spektrumu** (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3286 (üre grubu N-H g. b.); 1649 (üre C=O g. b.); 1592 (üre N-H e. b.); 1576-1490 (aromatik halka C=C ve pirazol halkası C=N g. b., üre N-H e. b.); 1236 (üre C-N g. b.)

**Şekil 11.** Madde U3'ün IR Spektrumu

**<sup>1</sup>H-NMR Spektrumu** (400 MHz) (DMSO-d<sub>6</sub>/TMS),  $\delta$  (ppm): 1.90 (s, 3H pirazol C5 metil); 2.02 (s, 3H pirazol C3 metil); 3.52 (s, 3H pirazol N-CH<sub>3</sub>); 7.28 (d, 2H, J=8.87 Hz aromatik protonlar); 7.47 (d, 2H, J=8.88 aromatik protonlar ve üre N-H); 8.45 (s, 1H, üre N-H)

**Şekil 12.** Madde U3'ün <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

#### 6.2.4. 2-N-(4-fluorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)üre(U4)



0,21 g (1,70 mmol) Madde 2 ve 0,17 ml (1,70 mmol) 4-Fluorofenil izosiyanat'tan hareketle 5.2.8.'de verilen yönteme göre elde edilir. Sırasıyla kaynar su ve kaynar petrol eteri ile yıkanır, etanolden billurlandırılır. Verim %52. Beyaz renkli toz madde, e.d. 230 °C. Su, petrol eteri ve kloroformda znmez. Sıcakta etanolde ve dimetilsülfoksitte znr.

Analiz : C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>4</sub>O için

Hesaplanan: C, 59.53 ; H, 5.76 ; N, 21.36

Bulunan : C, 59.41 ; H, 4.88 ; N, 20.06

#### Spektral Bulgular:

**IR spektrumu** (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3279 (re grubu N-H g. b.); 2950 (aromatik halka C-H g. b.); 1638 (re C=O g. b.); 1609-1478 (aromatik halka C=C ve pirazol halkası C=N g. b., re N-H e. b.)

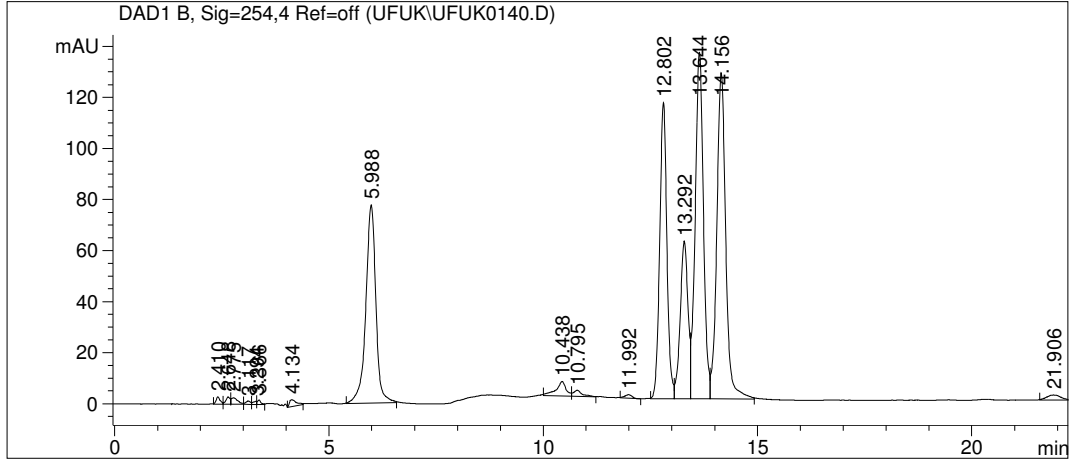
**Şekil 13.** Madde U4'ün IR Spektrumu

**<sup>1</sup>H-NMR Spektrumu** (400 MHz) (DMSO-d<sub>6</sub>/TMS),  $\delta$  (ppm): 1.90 (s, 3H pirazol C5 metil); 2.05 (s, 3H pirazol C3 metil); 3.65 (s, 3H pirazol N-CH<sub>3</sub>); 7.05 (t, 2H, J=8.87 Hz aromatik protonlar); 7.40 (m, 2H, aromatik protonlar ); 7.45 (s, 1H, üre N-H); 8.22 (s, 1H, üre N-H)

**Şekil 14.** Madde U4'ün <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

### 6.3. N-(4-Klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyoüre 'nin(T3) *in vivo* Biotransformasyon Bulguları

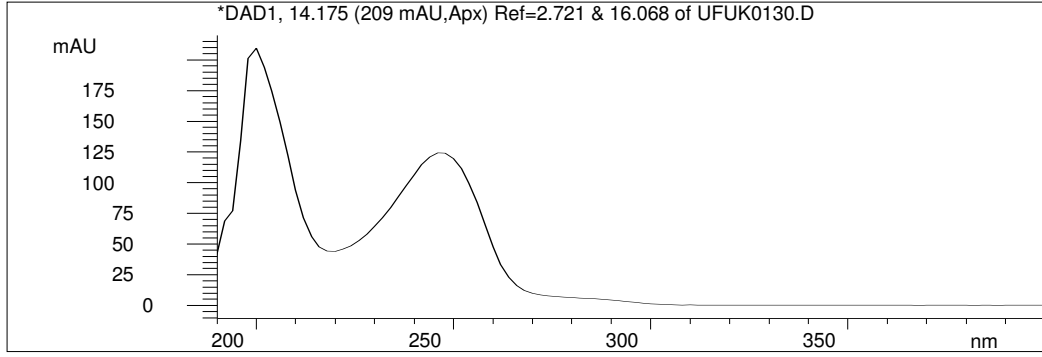
Substrat (T3) sıçanlara intraperitoneal verilmeden önce ve verildikten 30 dakika 1, 2, 4, 6, 8 ve 24 saat sonra kan örnekleri iki hayvandan kapiller boru ile gözden alınmıştır. Alınan kan örneklerinin üzerine soğuk asetonitril:metanol karışımı (50:50 h/h) eklenerek plazma proteinleri çöktürülüp, 14000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Üst kısım ayrılarak oda sıcaklığında uçurulduktan sonra kalan kısım metanolde çözülerek Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografa enjekte edilmiştir.



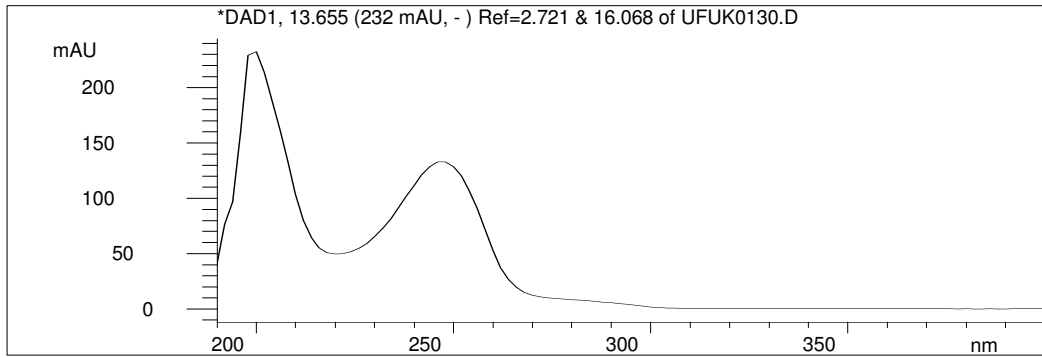
Şekil 15. Substrat ve olası metabolitlerinin HPLC kromatogramı

Tablo 1: Substrat ve olası metabolitlerinin retensiyon zamanları

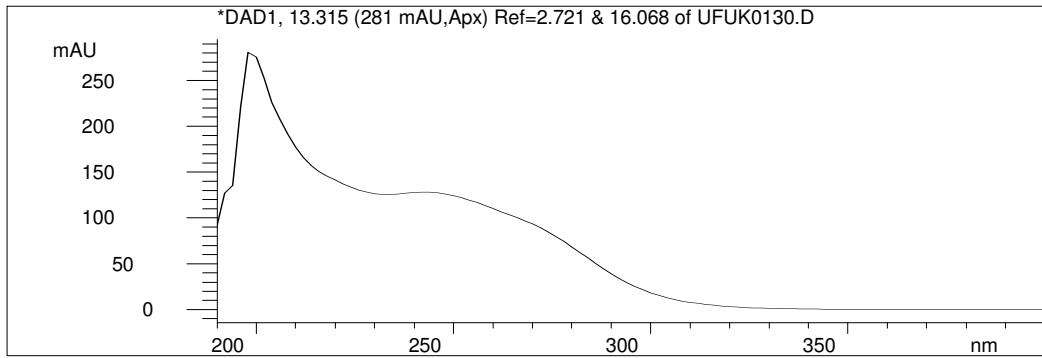
BİLEŞİK	RETENSİYON ZAMANI (RZ)
U3	14,156
U1	13,644
T3	13,292
T4	12,802
Asetilamin	5,988



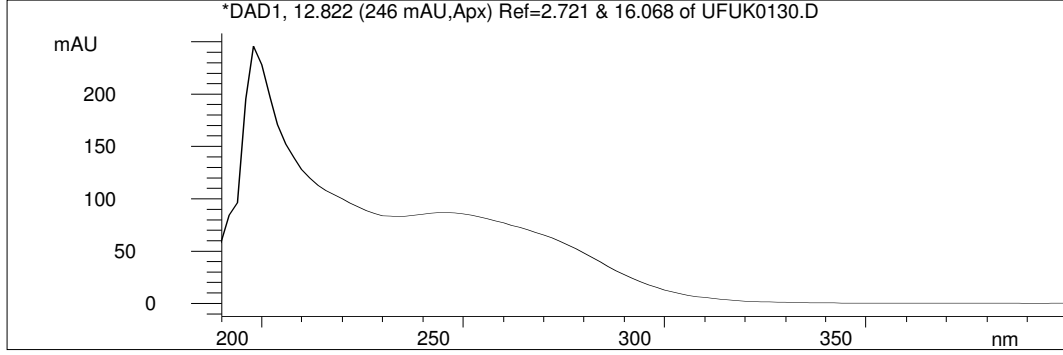
**Şekil 16.** Retensiyon zamanı 14,156 olan metabolit U3'ye ait UV spektrumu



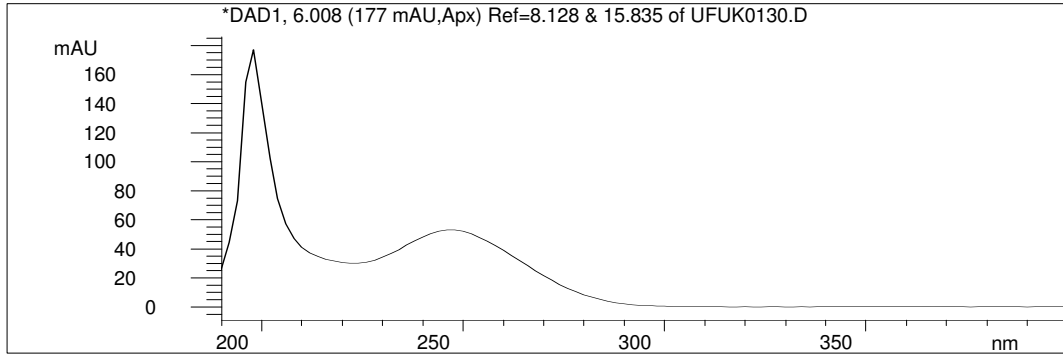
**Şekil 17.** Retensiyon zamanı 13,644 olan metabolit U1'e ait UV spektrumu



**Şekil 18.** Retensiyon zamanı 13,292 olan substarta ait UV spektrumu

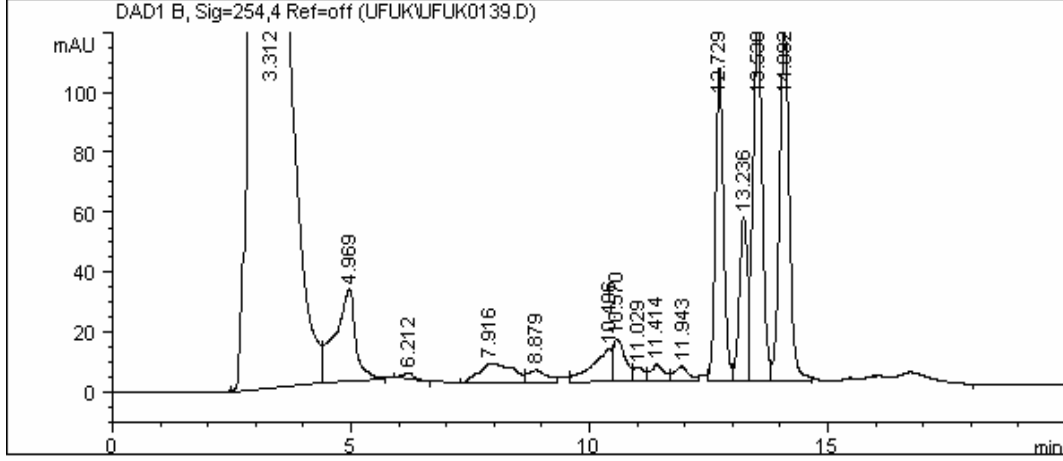


**Şekil 19.** Retensiyon zamanı 12,802 olan metabolit T4'e ait UV spektrumu



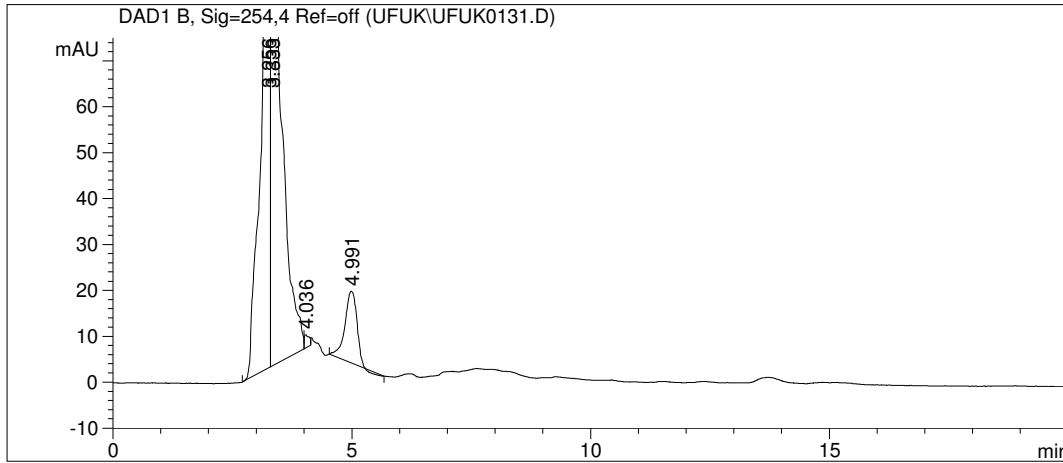
**Şekil 20.** Retensiyon zamanı 5,988 olan metabolit Asetilamin'e ait UV spektrumu

Boş plazma içinde anlatılan şekilde hazırlanan substrat (T3) ve metabolitler N-(4-klorofenil)-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)tiyoüre (T4), N-(4-klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)üre (U3), N-(4-klorofenil)-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)üre (U1) ve asetilamin'in HPLC enjekte edildikten sonra elde edilen kromatogram şekil 21' de verilmiştir.

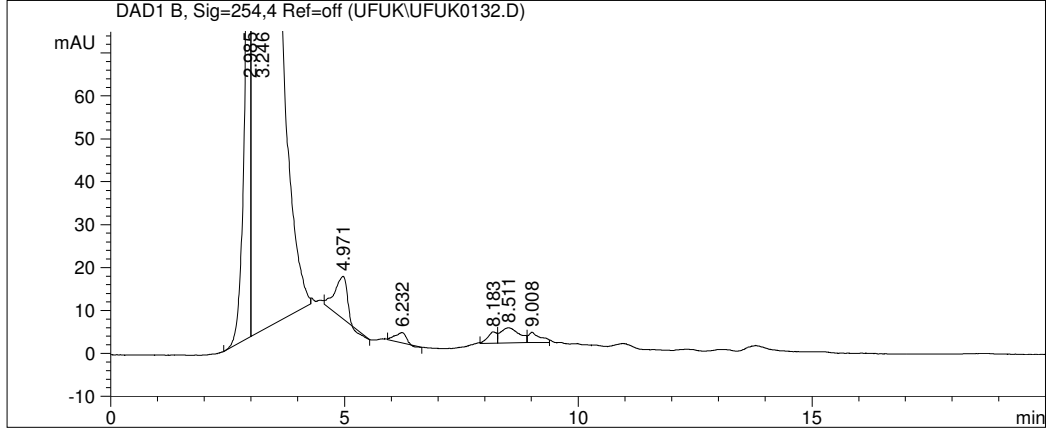


**Şekil 21.** Substrat ve olası metabolitlerinin boş plazmaya eklenmesi ile elde edilen HPLC kromatogramı

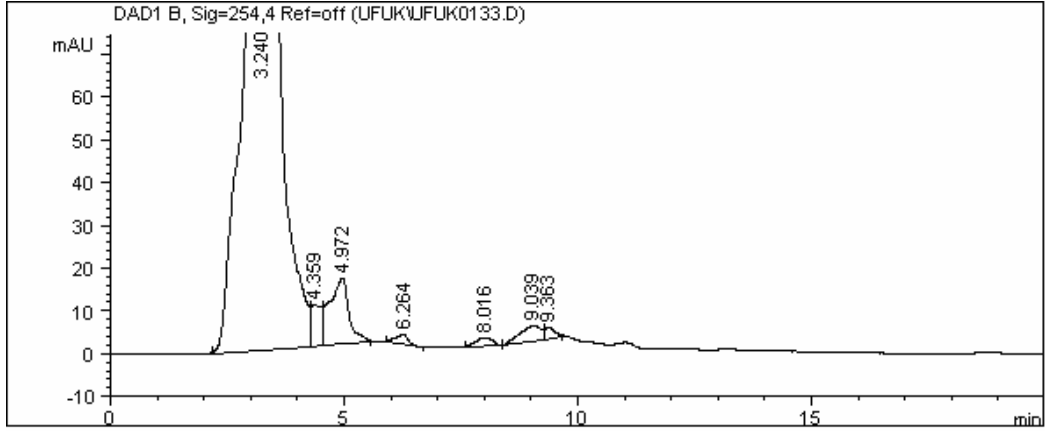
Madde (T3) bir numaralı hayvana verilmeden önce ve verildikten sonra belli saat aralıklarıyla alınan kan örnekleri santrifüjlenerek plazma ayrılır. Ayrılan plazma (200µl) üzerine soğuk asetonitril:metanol (50:50 h/h) (200µl) ilave edilerek plazma proteinleri çöktürülür, santrifüjlenir. Üst faz oda sıcaklığında uçurulduktan sonra 50 µl metanolde çözülerek HPLC enjekte edilir. Bir numaralı hayvana ait kan örneklerinde tespit edilen substrat ve olası metabolitlerinin kromatogramları ve spektrumları şekil 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32' de ve retensiyon zamanları tablo 1' de verilmiştir.



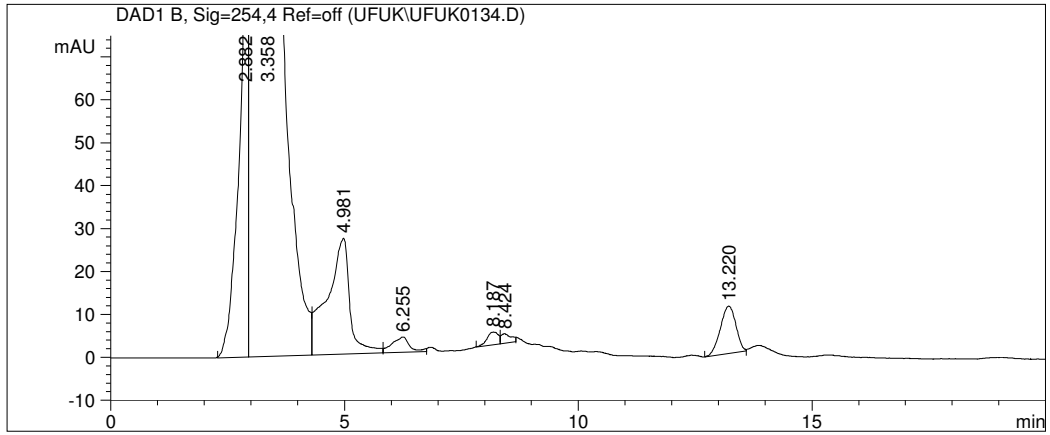
**Şekil 22.** Bir numaralı hayvanın 0. saat plazma örneğine ait kromatogram



Şekil 23. Bir numaralı hayvanın 30. dakika plazma örneğine ait kromatogram

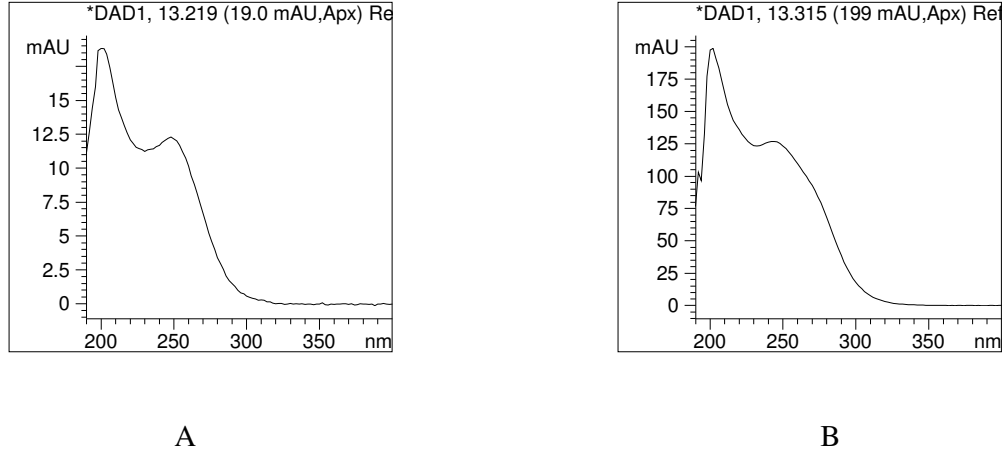


Şekil 24. Bir numaralı hayvanın 1. saat plazma örneğine ait kromatogram

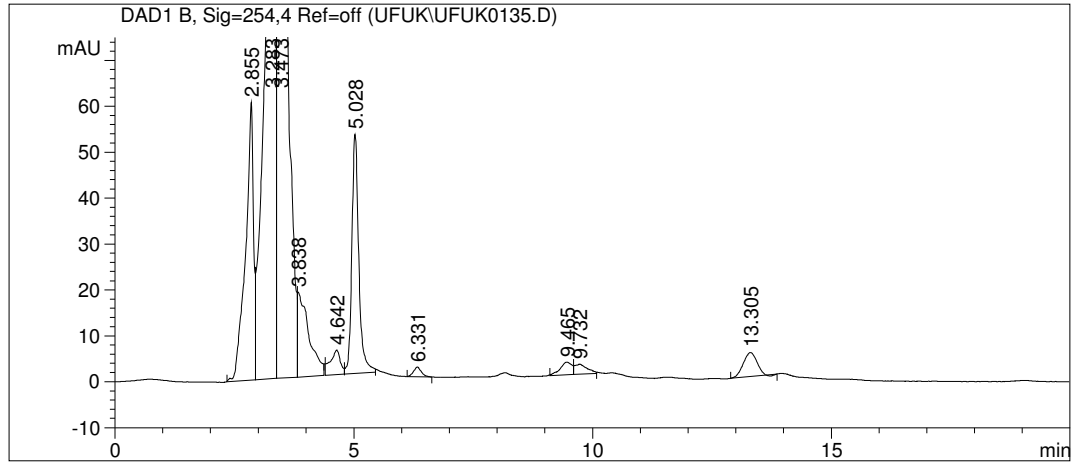


Şekil 25. Bir numaralı hayvanın 2. saat plazma örneğine ait kromatogram

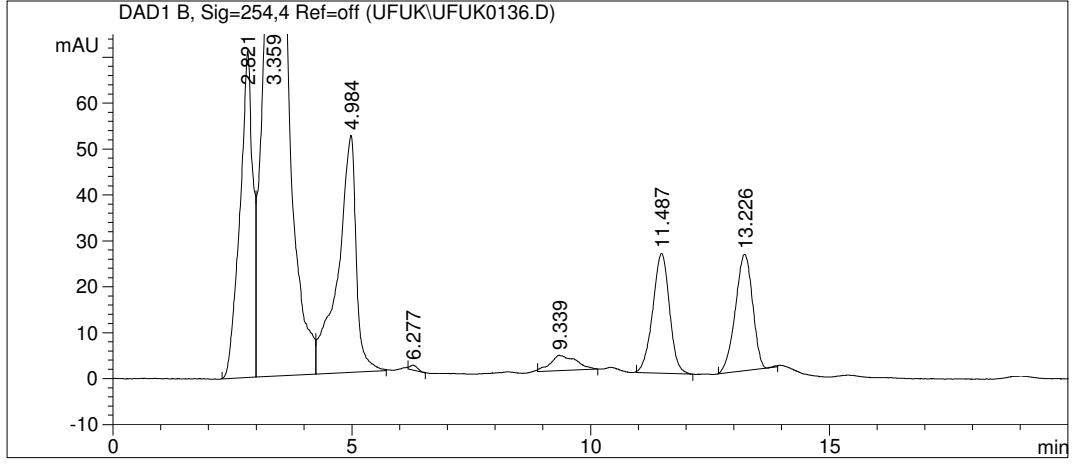
Bir numaralı hayvanın 2. saat plazma örneğine ait kromatogramda 13,22 (T3) ' de gelen pike ve standartına ait UV spektrumu yan yana Şekil 26 'de verilmiştir.



Şekil 26. Bir numaralı hayvanın 2. saat plazma örneğine ait kromatogramda 13,22 (T3) ' de gelen pike(A) ve standartına (B) ait UV spektrumu

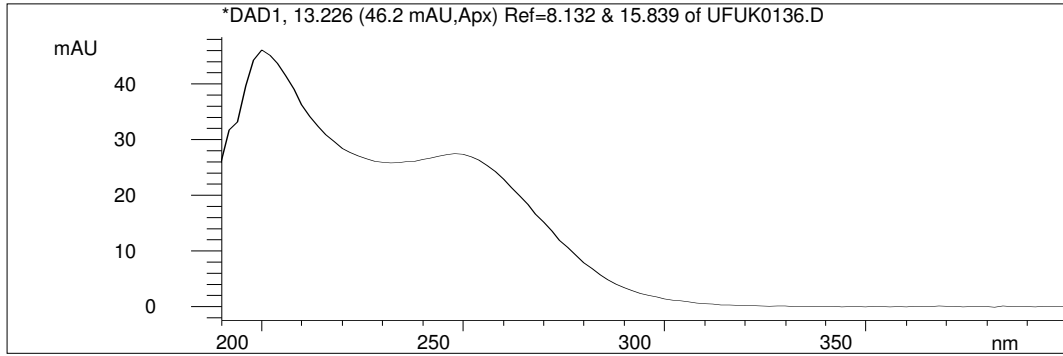


Şekil 27.: Bir numaralı hayvanın 4. saat plazma örneğine ait kromatogram

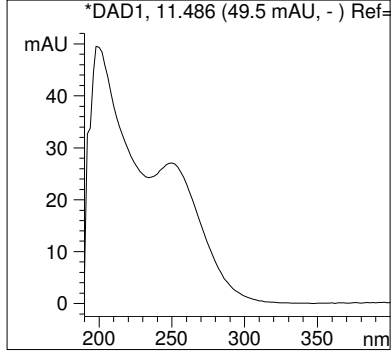


**Şekil 28.** Bir numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogram

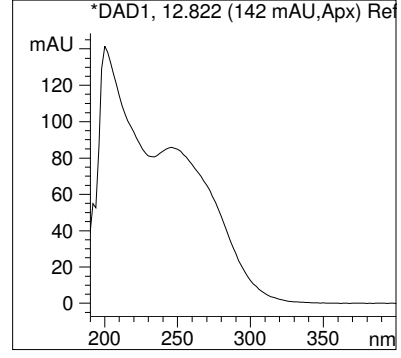
Bir numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogramda 13,226 ' da gelen pike ve 11,487'de (T4) gelen pike ait UV spektrumu Şekil 29 ve Şekil 30 'de yan yana verilmiştir.



**Şekil 29.:** Bir numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogramda 13,226 ' da gelen pike (substrat) ait UV spektrumu

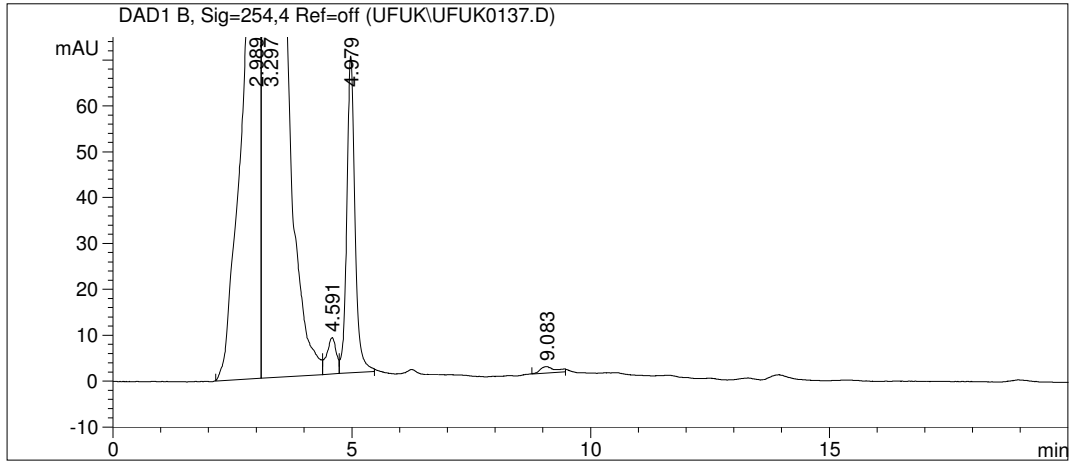


A

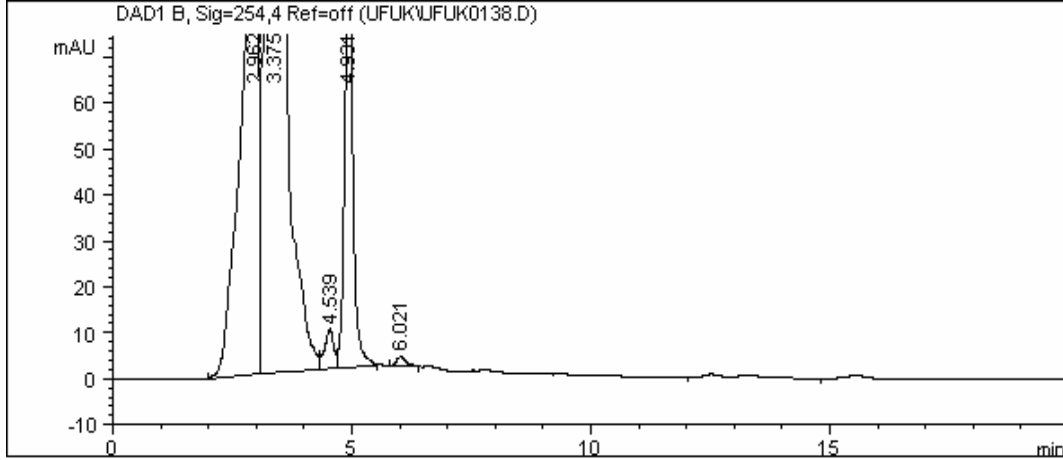


B

**Şekil 30.** Bir numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogramda 11,487 (T4) ' de gelen pike (A) ve standartına (B) ait UV spektrumu

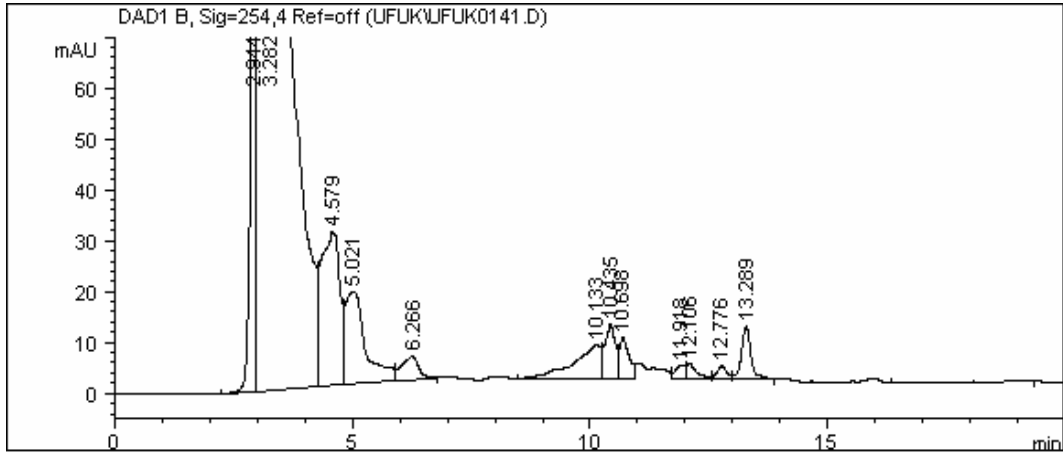


**Şekil 31.** Bir numaralı hayvanın 8. saat plazma örneğine ait kromatogram

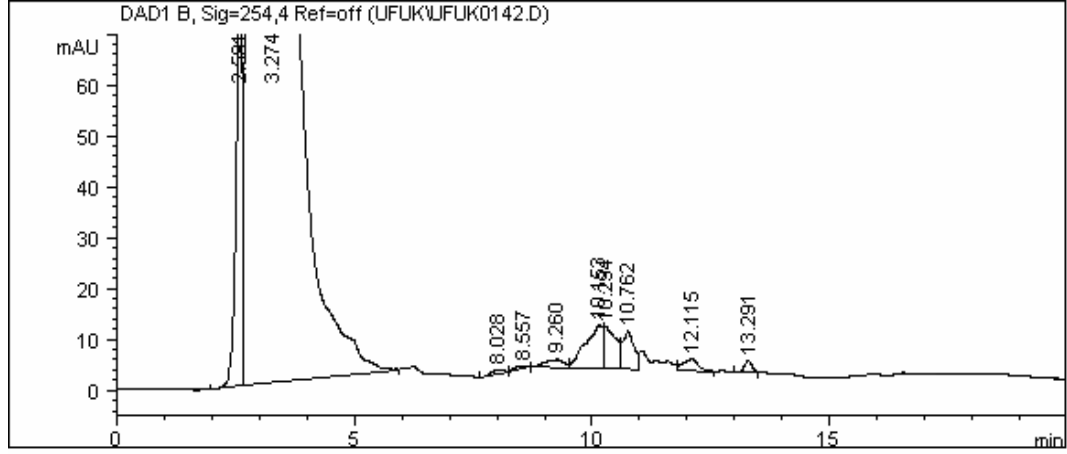


Şekil 32.: Bir numaralı hayvanın 24. saat plazma örneğine ait kromatogram

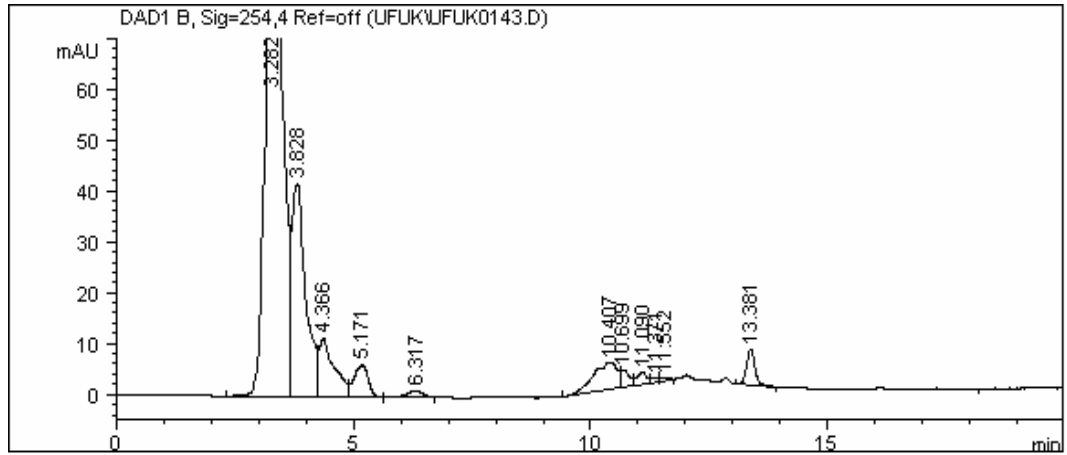
Madde (T3) iki numaralı hayvana verilmeden önce ve verildikten sonra belli saat aralıklarıyla alınan kan örnekleri santrifüjlenerek plazma ayrılır. Ayrılan plazma (200 µl) üzerine soğuk asetonitril:metanol (50:50 h/h) (200 µl) ilave edilerek plazma proteinleri çöktürülür, santrifüjlenir. Üst faz oda sıcaklığında uçurulduktan sonra 50 µl metanolde çözülerek HPLC enjekte edilir. İki numaralı hayvana ait kan örneklerinde tespit edilen substrat ve olası metabolitlerinin kromatogramları ve spektrumları şekil 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 ve 42’ de verilmiştir.



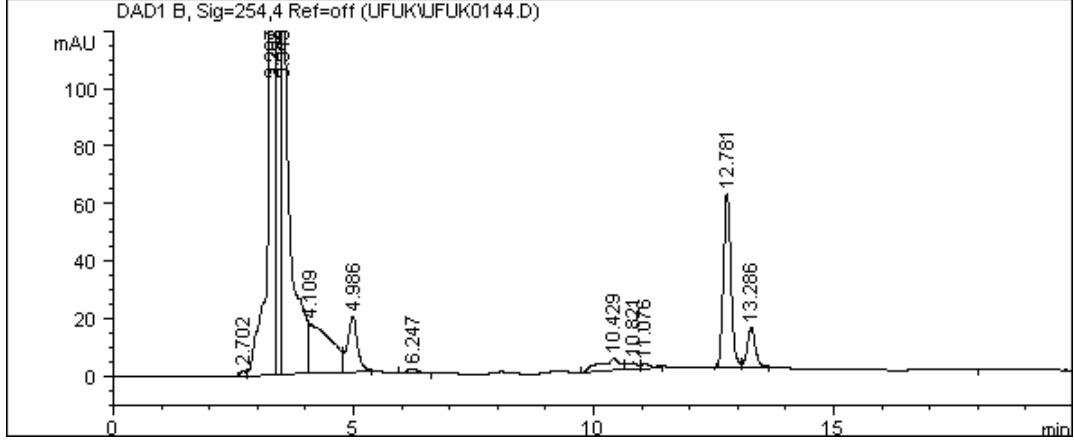
Şekil 33. İki numaralı hayvanın 30. dakika plazma örneğine ait kromatogram



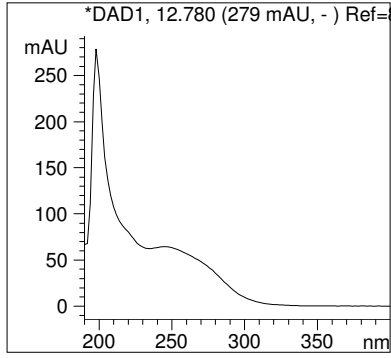
Şekil 34. İki numaralı hayvanın 1. saat plazma örneğine ait kromatogram



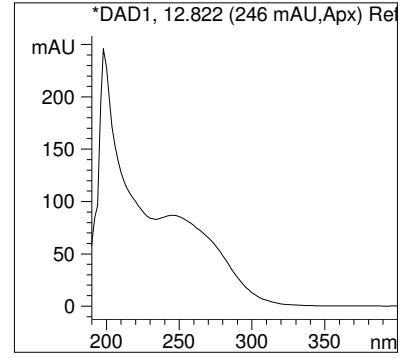
Şekil 35. İki numaralı hayvanın 2. saat plazma örneğine ait kromatogram



Şekil 36. İki numaralı hayvanın 4. saat plazma örneğine ait kromatogram

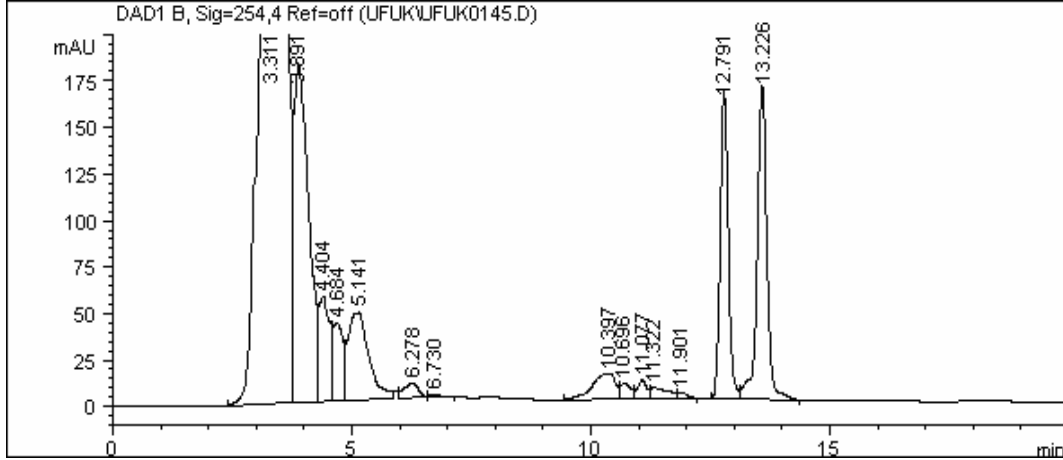


A

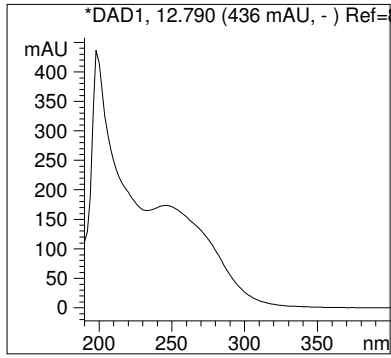


B

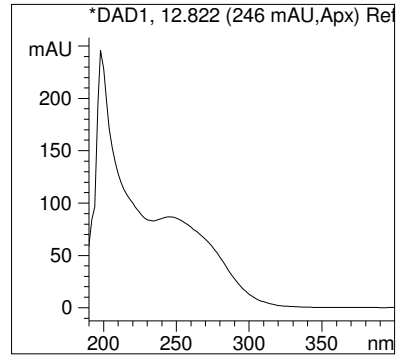
Şekil 37. İki numaralı hayvanın 4. saat plazma örneğine ait kromatogramda 12,780 (T4) 'de gelen pike (A) ve standartına (B) ait UV spektrumu



Şekil 38. İki numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogram

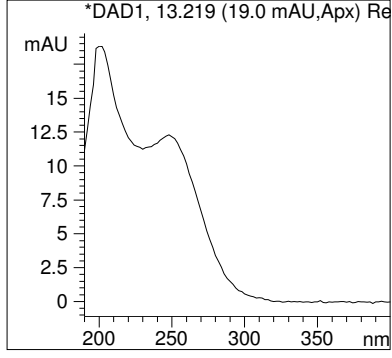


A

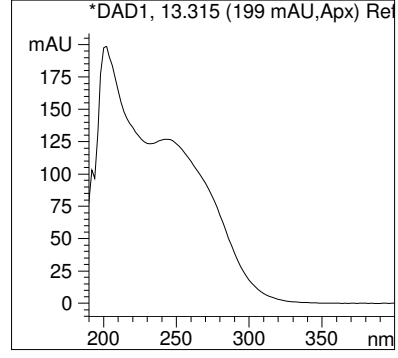


B

Şekil 39. İki numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogramda 12,790 (T4) 'da gelen pike (A) ve standartına (B) ait UV spektrumu

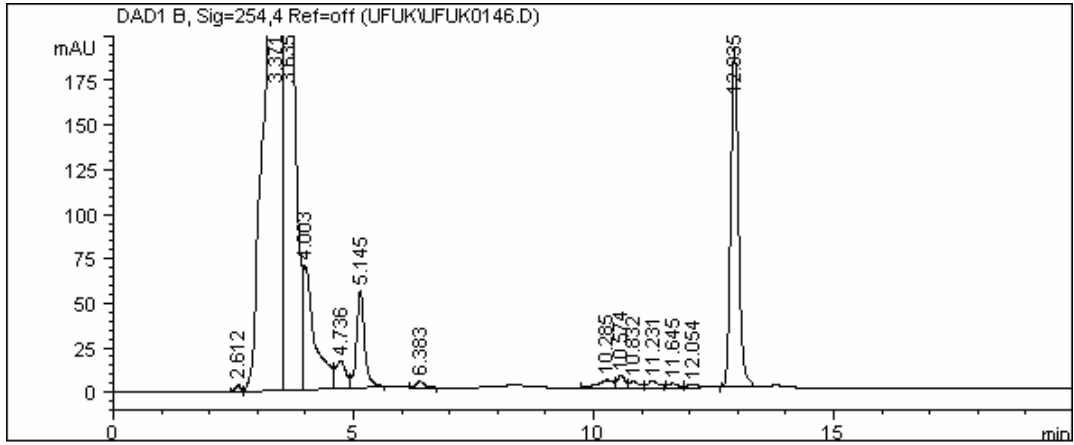


C

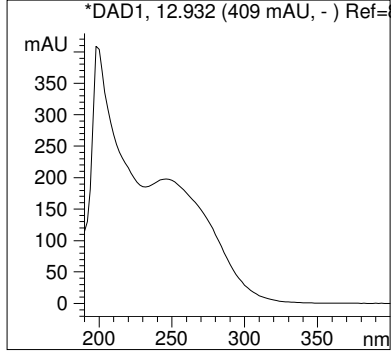


D

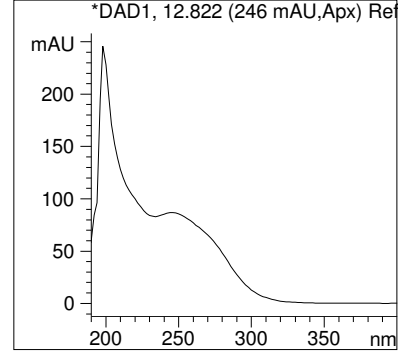
**Şekil 40.** İki numaralı hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogramda 13,226 (T3)' da gelen pike (C) ve standartına (D) ait UV spektrumu



**Şekil 41.** İki numaralı hayvanın 8. saat plazma örneğine ait kromatogram



A



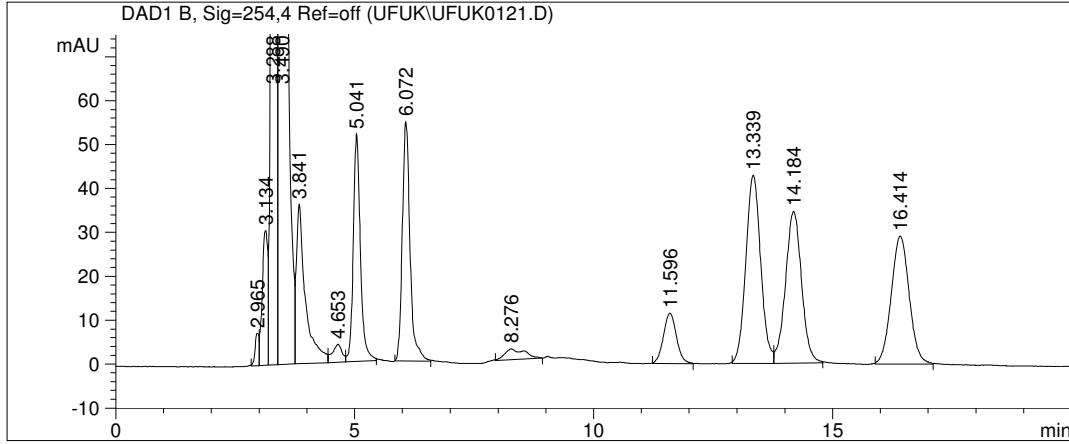
B

**Şekil 42.** İki numaralı hayvanın 8. saat plazma örneğine ait kromatogramda 12,932 (T4) 'de gelen pike ve standartına ait UV spektrumu

İkinci hayvan 8. saatte öldüğü için daha sonraki saatlere ait kromatogram bilgileri bulunmamaktadır.

#### 6.4. N-(4-fluorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyöüre 'nin (T2) *in vivo* Biotransformasyon Bulguları

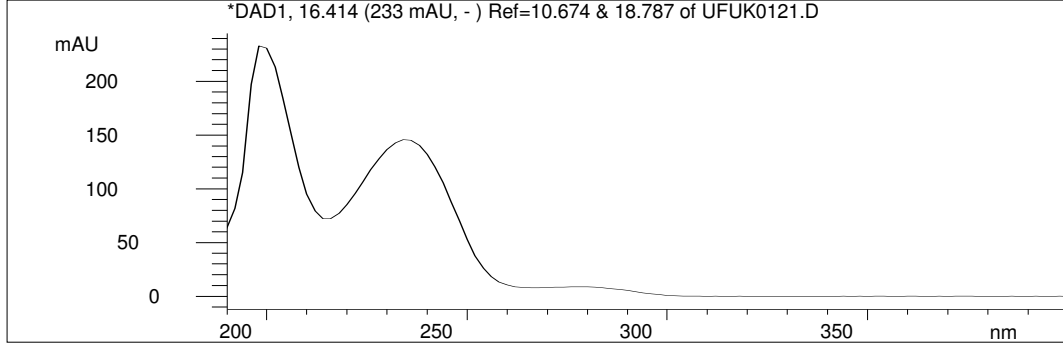
Substrat (T2) sıçana intraperitoneal verilmeden önce ve verildikten 30. dakika 1., 2., 4., 6. ve 8. saatlerde kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örneklerinin üzerine soğuk asetonitril:metanol karışımı (50:50 h/h) eklenerek plazma proteinleri çöktürülüp, 14000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Üst kısım ayrılarak oda sıcaklığında uçurulduktan sonra kalan kısım metanolde çözülerek Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografa enjekte edilmiştir.



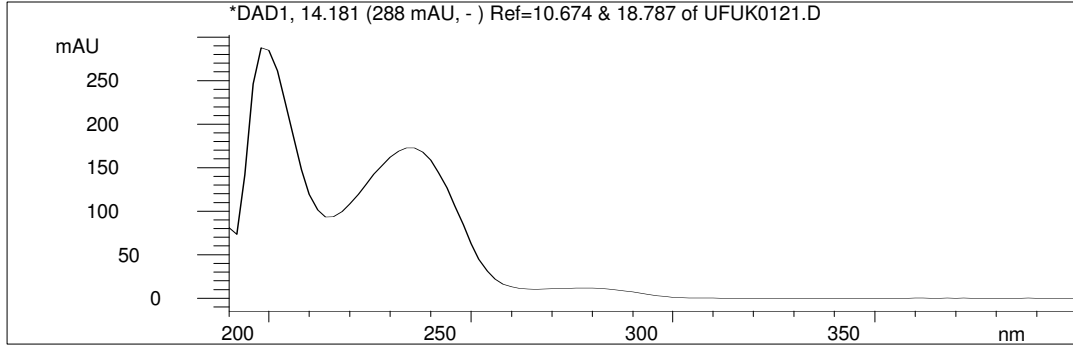
Şekil 43. Substrat ve olası metabolitlerinin HPLC kromatogramı

Tablo 2. Substrat ve olası metabolitlerinin retensiyon zamanları

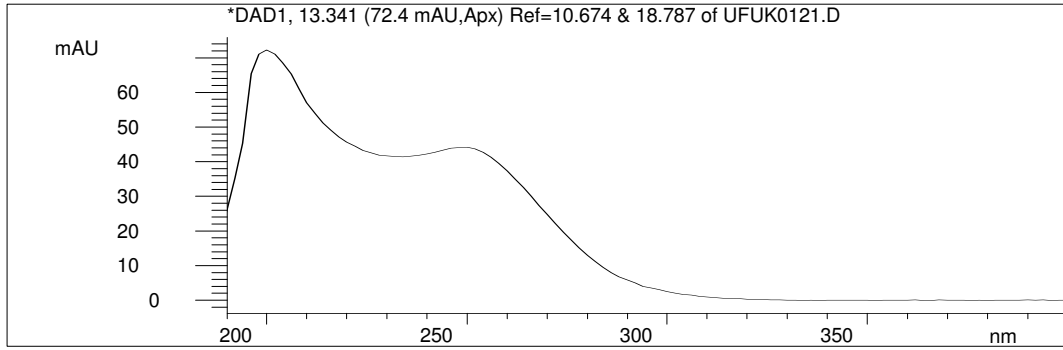
BİLEŞİK	RETENSİYON ZAMANI (RZ)
U4	16,414
U2	14,184
T2	13,339
T1	11,596
Asetilamin	6,072



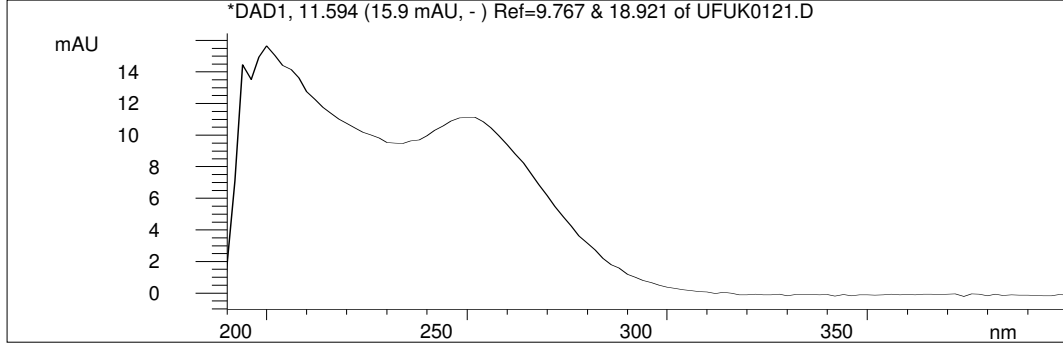
**Şekil 44.** Retensiyon zamanı 16,414 olan metabolit U4' e ait UV spektrumu



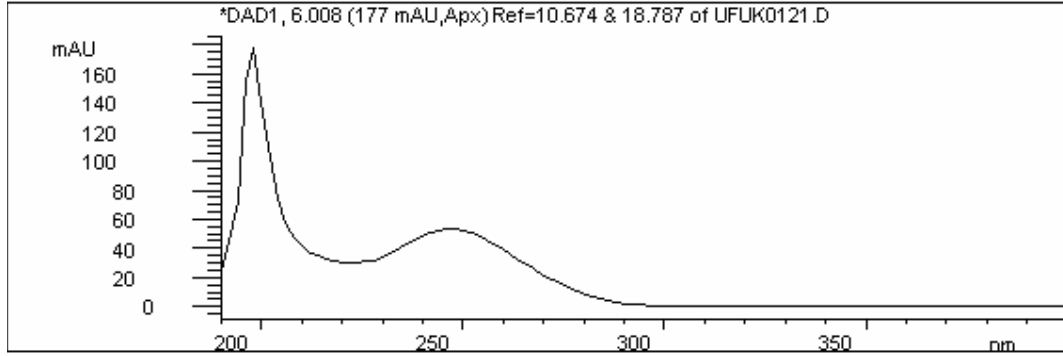
**Şekil 45.** Retensiyon zamanı 14,184 olan metabolit U2' ye ait UV spektrumu



**Şekil 46.** Retensiyon zamanı 13,339 olan metabolit T2' ye ait UV spektrumu

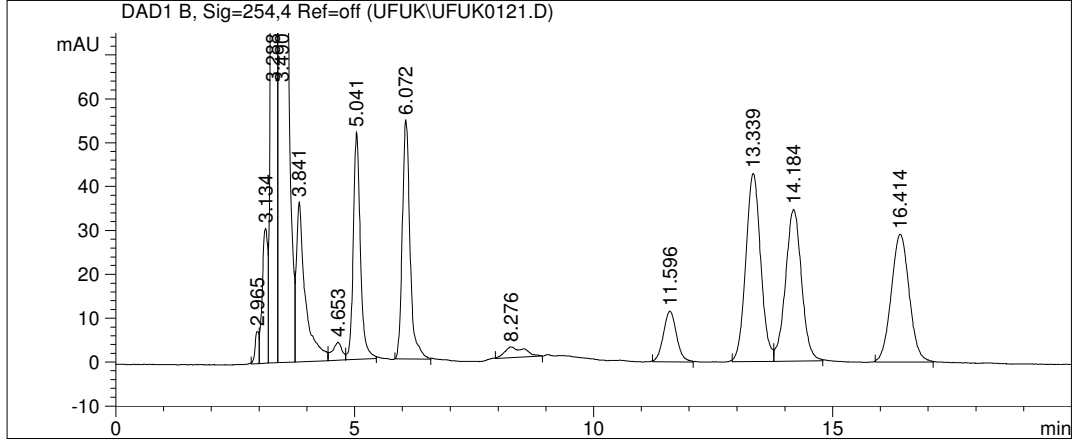


**Şekil 47.** Retensiyon zamanı 11,596 olan metabolit T1' e ait UV spektrumu



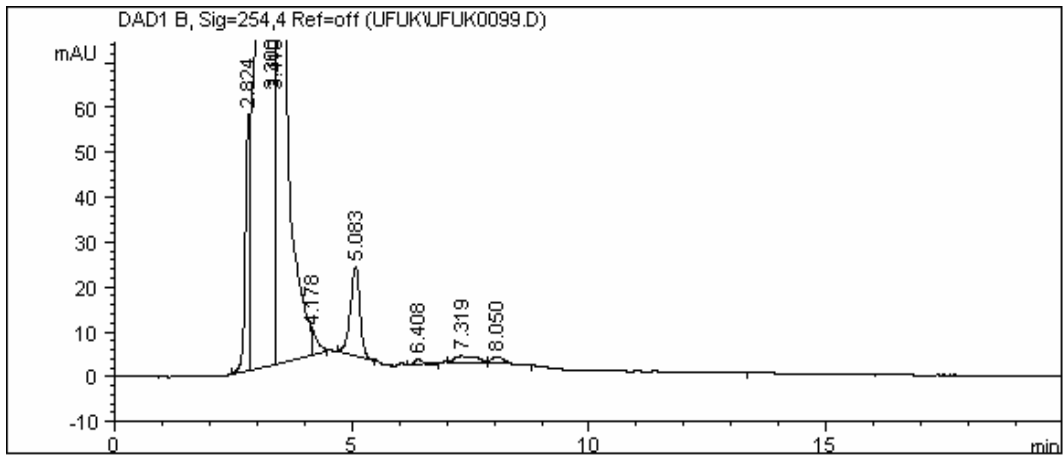
**Şekil 48.** Retensiyon zamanı 6,072 olan metabolit asetilamin' e ait UV spektrumu

Boş plazma içinde anlatılan şekilde hazırlanan substrat (T2) ve metabolitler N-(4-florofenil) - N' - (3,5-dimetilpirazol-4-il) tiyoüre (T1), N-(4-fluorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)üre (U4), N-(4-fluorofenil)-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)üre (U2) ve asetilamin'in HPLC enjekte edildikten sonra elde edilen kromatogram şekil 49' da verilmiştir.

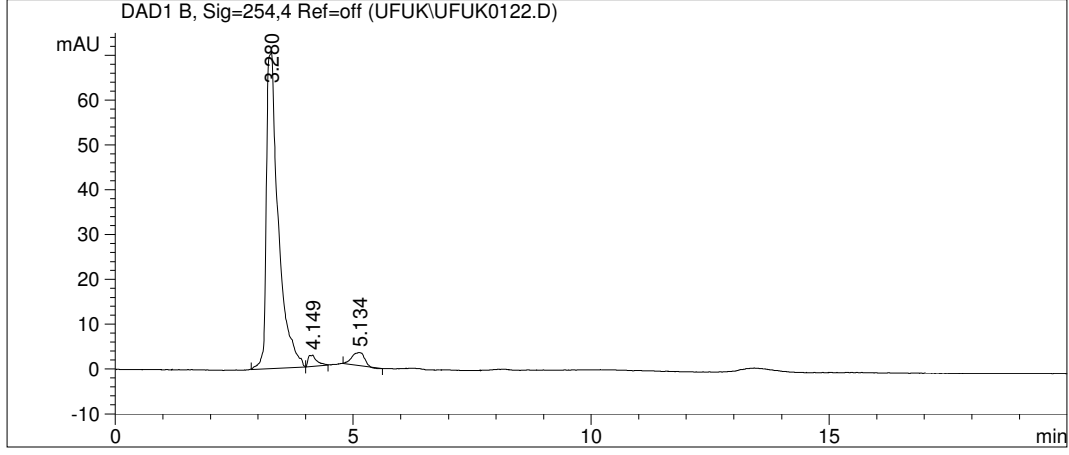


**Şekil 49.** Substrat ve olası metabolitlerinin boş plazmaya eklenmesi ile elde edilen HPLC kromatogramı

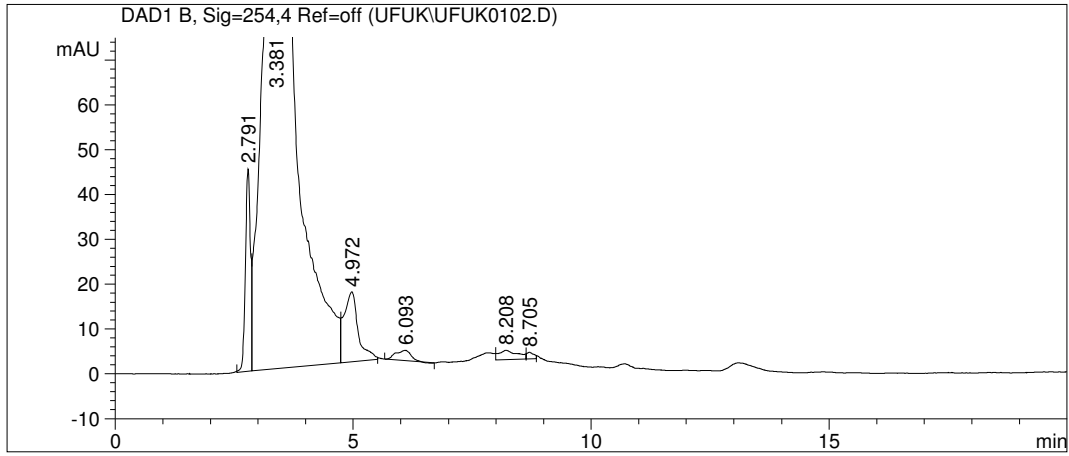
Madde (T2) hayvana verilmeden önce ve verildikten sonra belli saat aralıklarıyla alınan kan örnekleri santrifüjlenerek plazma ayrılır. Ayrılan plazma (200µl) üzerine soğuk asetonitril:metanol (50:50 h/h) (200µl) ilave edilerek plazma proteinleri çöktürülür, santrifüjlenir. Üst faz oda sıcaklığında uçurulduktan sonra 50 µl metanolde çözülerek HPLC enjekte edilir. Bir numaralı hayvana ait kan örneklerinde tespit edilen substrat ve olası metabolitlerinin kromatogramları ve spektrumları şekil 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59'da ve retensiyon zamanları tablo 2' de verilmiştir.



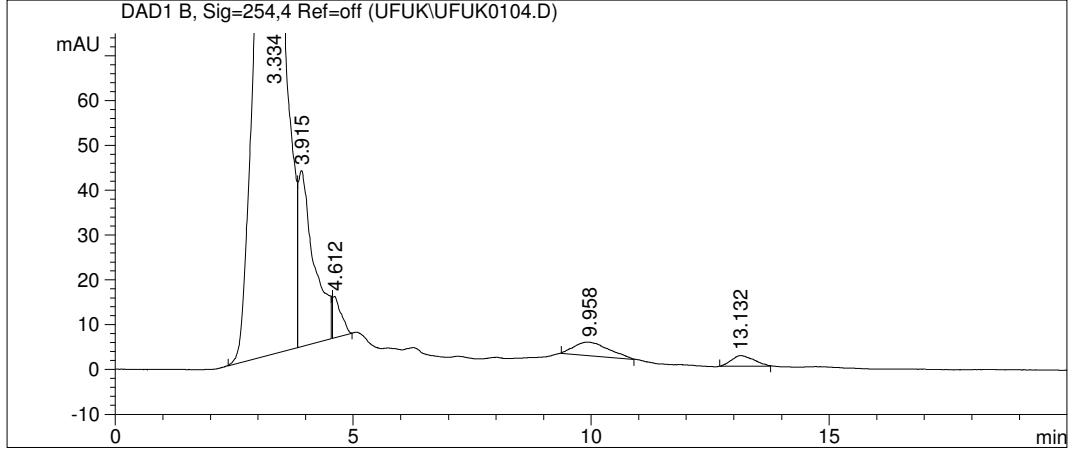
**Şekil 50.** Hayvanın 0. saat plazma örneğine ait kromatogram



Şekil 51. Hayvanın 30. dakika plazma örneğine ait kromatogram

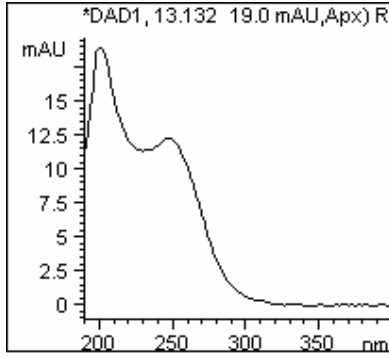


Şekil 52. Hayvanın 1. saat plazma örneğine ait kromatogram

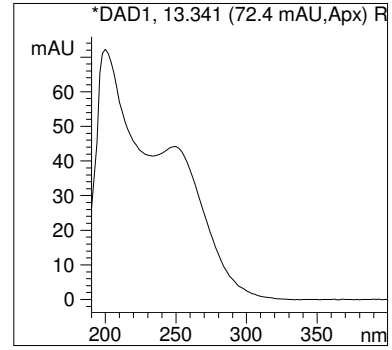


**Şekil 53.** Hayvanın 2. saat plazma örneğine ait kromatogram

Hayvanın 2. saat plazma örneğine ait kromatogramda 13,132 (T2) ' de gelen pike ve standartına ait UV spektrumu yan yana Şekil 54 'te verilmiştir.

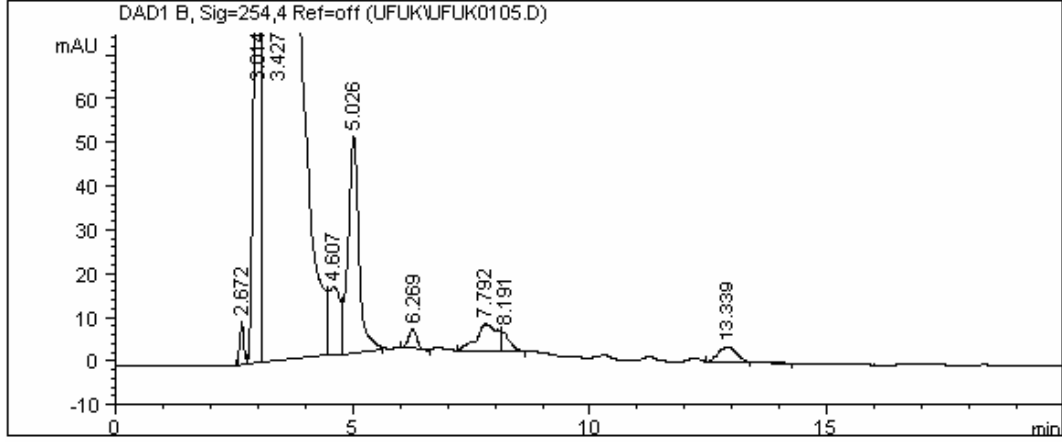


A

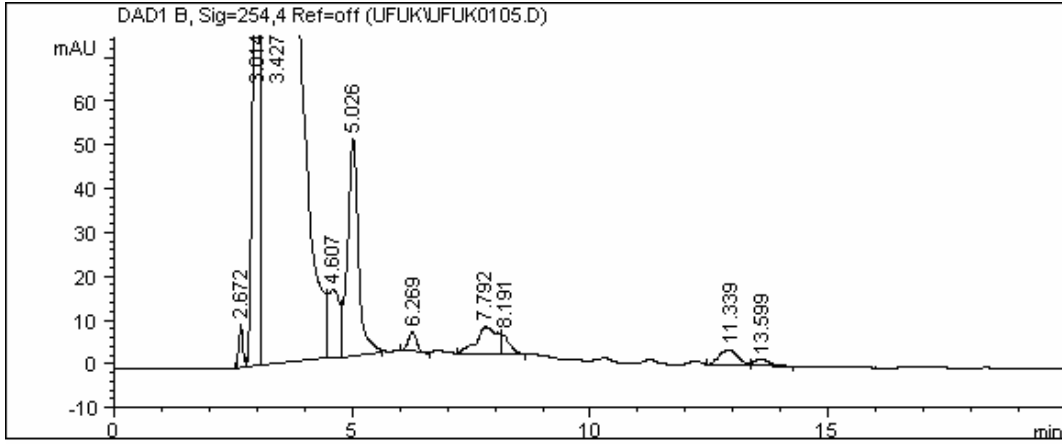


B

**Şekil 54.** Hayvanın 2. saat plazma örneğine ait kromatogramda 13,132 (T2) ' de gelen pike (A) ve standartına (B) ait UV spektrumu

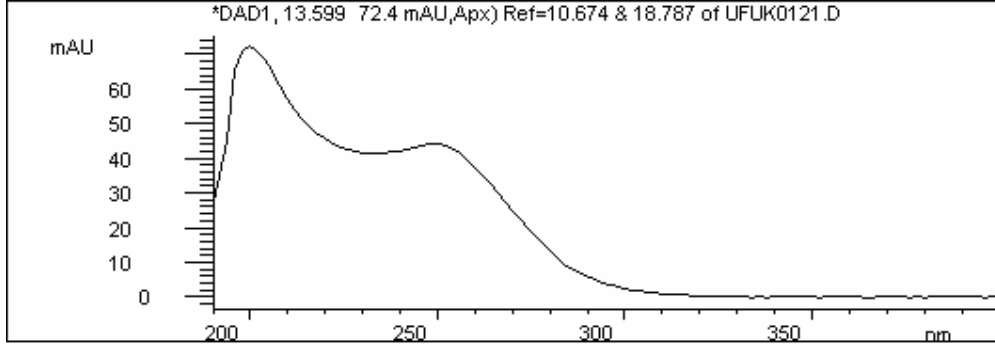


Şekil 55. Hayvanın 4. saat plazma örneğine ait kromatogram

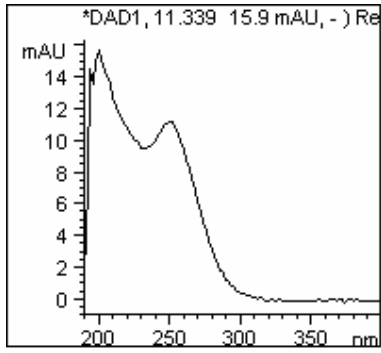


Şekil 56. Hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogram

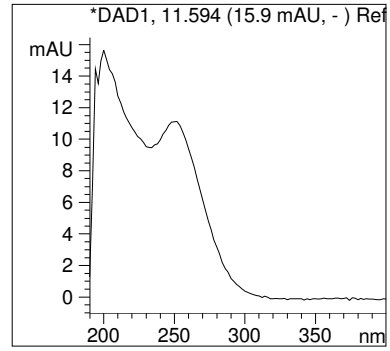
Hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogramda 13,599' da gelen pike ve 11,339' da (T1) gelen pike ait UV spektrumu Şekil 57 ve Şekil 58 'de yan yana verilmiştir.



**Şekil 57.** Hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogramda 13,599 ' da gelen pike (substart) ait UV spektrumu

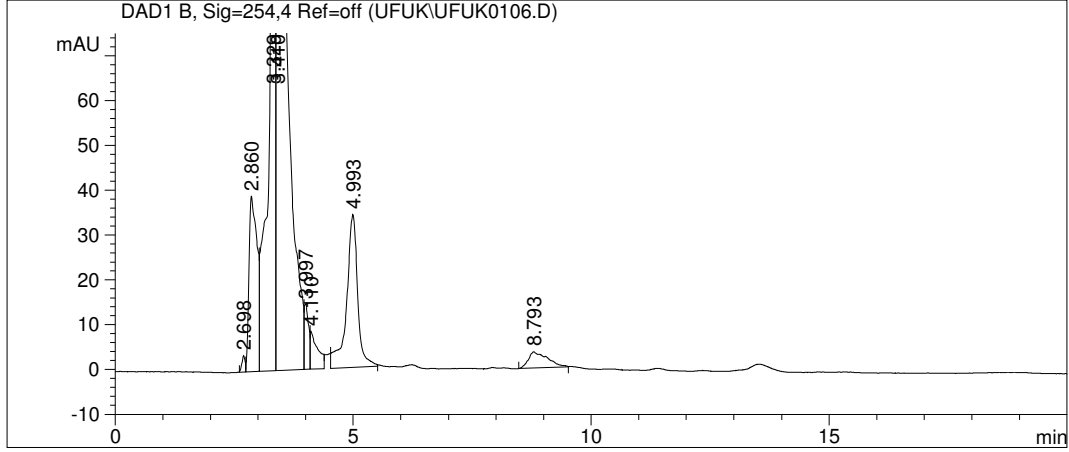


A



B

**Şekil 58.** Hayvanın 6. saat plazma örneğine ait kromatogramda 11,339 (T1) ' de gelen pike (A) ve standartına (B) ait UV spektrumu

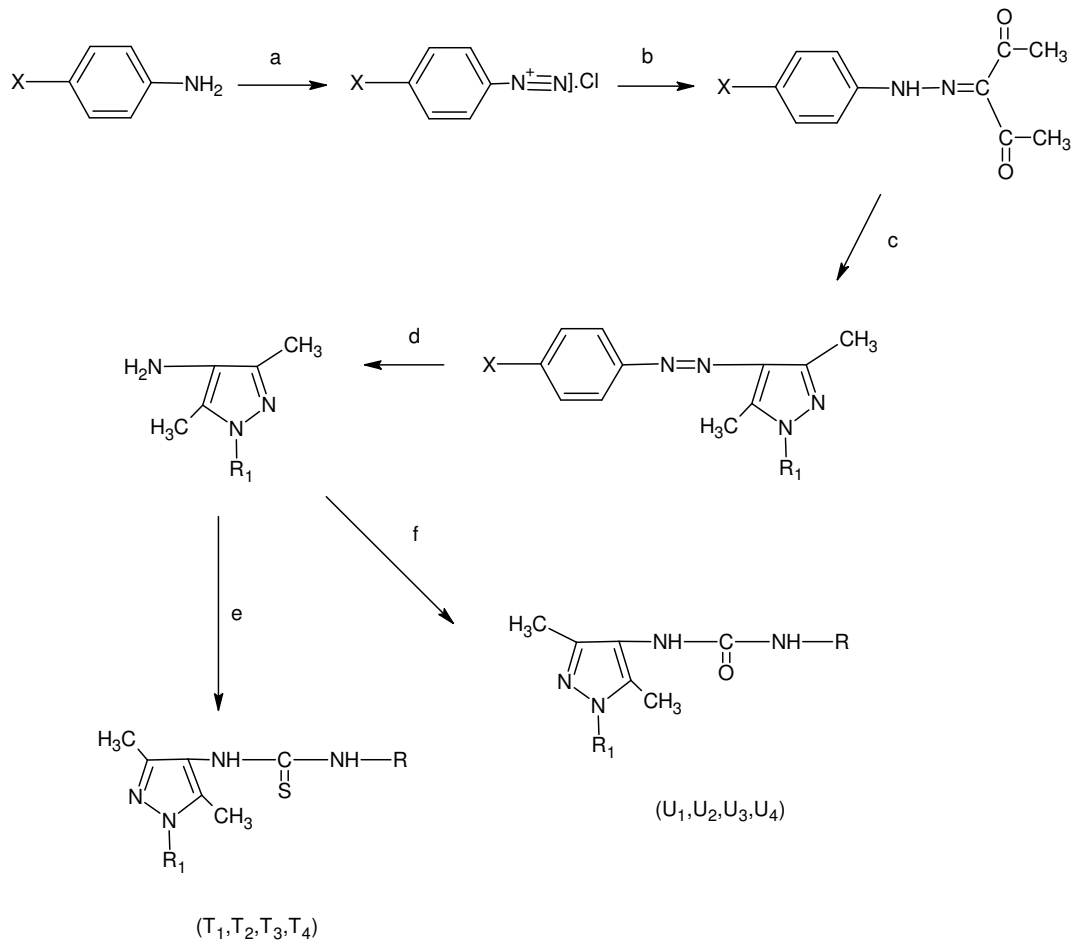


**Şekil 59.** Hayvanın 8. saat plazma örneğine ait kromatogram

Hayvan 8. saatte öldüğü için daha sonraki saatlere ait kromatogram bilgileri bulunmamaktadır.

## 7. TARTIŞMA

Çalışmamızda substrat ve olası metaboliti olarak düşünülen tiyüre ve üre bileşikleri 4-amino-3,5-di/1,3,5-trimetilpirazol bileşiklerinin uygun izotiyosiyanatlar ve izosiyanatlarla katımı sonucu kazanılmıştır. Yedisi literatürde kayıtlı olmayan toplam 8 adet tiyüre ve üre bileşiği sentez edilmiş ve yapıları elemental analiz, IR ve  $^1\text{H-NMR}$  yardımıyla aydınlatılmıştır. Çalışmamızın ana hareket maddeleri olan 4-aminopirazol bileşikleri uygun arildiazonyum tuzlarının asetilasetonla kenetlenmesi ve mütabiken uygun hidrazinle siklizasyonu sonucu oluşan azo bileşiğinin etanollü ortamda hidrazin hidrat ile redüksiyonu neticesinde kazanılmıştır. 4-Aminopirazollerin ve bu amin bileşiklerinden hareketle sentezi yapılan yeni bileşiklerin sentezi aşağıda Şema 1' de verilmiştir.

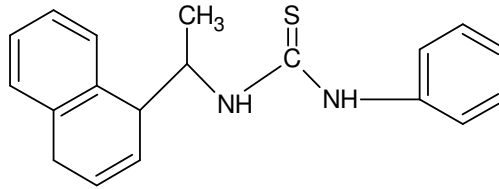


**Şema1.** (a) NaNO<sub>2</sub>, HCl, 0-5 °C; (b) asetilaseton, CH<sub>3</sub>COONa; (c) hidrazinhidrat, asetik asit (d) hidrazinhidrat, etanol, 50 °C; (e) RNCS, aseton; (f) RNCO, 80 °C

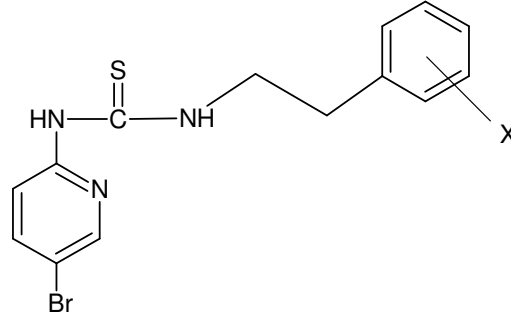
Tezin tartışma bölümü sentezi yapılan yeni bileşiklerin kimyasal yapı tayini ve *in vivo* metabolizma bulgularının değerlendirilmesi olmak üzere iki kısımda incelenmiştir.

## 7.1 Tiyöüre ve Üre Bileşiklerinin Kimyasal Yapı Tayini

Sentezlenen tiyöüre bileşiklerinin Infrared spektrumlarında tiyöüre NH bandları **T1**' de  $3266-3166\text{ cm}^{-1}$  de, C=S gerilme bandı  $1361\text{ cm}^{-1}$  de; **T2**' de aynı bandlar sırasıyla  $3172\text{ cm}^{-1}$  ve  $1304\text{ cm}^{-1}$  de; **T3**' de  $3157\text{ cm}^{-1}$  ve  $1334\text{ cm}^{-1}$  de tespit edilmiştir. Venkatachalam ve ark. (61) sentezledikleri ve aşağıda formülü verilen tiyöüre bileşiğinde NH gerilme bandlarını  $3423-3170\text{ cm}^{-1}$  de, C=S gerilme bandlarını ise  $1447-1336\text{ cm}^{-1}$  bölgesinde tespit etmişlerdir.

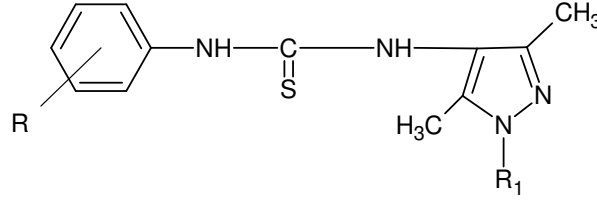


Maddelerin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumları  $\text{DMSO-d}_6$  içinde alınmıştır. Tiyöüre türevlerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumları incelendiğinde tiyöüre NH protonları bileşik **T1**'de 7.44 ve 8.38 ppmde iki ayrı singlet olarak tespit edilmiştir. Madde **T2**'de aynı protonlar 8.17 ppm'de 2H büyüklüğünde singlet olarak bulunmuştur. Madde **T3**'de ise NH protonları 8.25-9.36 ppm bölgesinde 2H büyüklüğünde saptanmıştır. Vig ve arkadaşları (62) elde ettikleri fenetil-5-bromopiridil tiyöüre türevlerinde NH piklerini 11.30 ve 9.25 ppm'de yaygın iki ayrı singlet olarak tespit etmişlerdir.



Bir başka araştırma grubunda (60) tiyoüre grubuna ait NH protonlarını 11.29 ve 10.73 ppm de iki ayrı singlet olarak gözlediklerini bildirmişlerdir.

Kaymakçioğlu ve arkadaşları (29) N-sübstitüe-N'-(3,5-di/1,3,5-trimetilpirazol-4-il) tiyoüre bileşiklerinde NH gerilme bandlarını 3271-3170  $\text{cm}^{-1}$  ve C=S gerilme bandlarını da 1350-1330  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde saptamışlardır. Bu bileşiklerin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumlarında tiyoüre NH protonlarını 8.75-10.05 ppm bölgesinde 2H büyüklüğünde yaygın pikler halinde tespit etmişlerdir.



Tiyoüre türevlerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumlarında tiyoüre grubu dışındaki diğer protonlar literatüre uygun olarak beklenen alanlarda gözlenmiştir (29). Pirazol halkası metil protonları 1.90-2.07 ppm bölgesinde gözlenmiştir. Birinci konumda metil sübstitüenti taşıyan bileşik **T2** ve **T3**' de metil protonları sırasıyla 3.54 ve 3.55 ppm de singlet olarak gözlenmiştir. Bu bileşiklerin aromatik halka protonları da 6.90-7.50 ppm de tespit edilmiştir.

Tiyoüre bileşiklerinin olası metabolitleri olarak düşünölen üre bileşiklerinde C=O gerilme bandı ve NH gerilme bandları **U1** bileşiginde sırasıyla 1639  $\text{cm}^{-1}$  ve 3278  $\text{cm}^{-1}$  de; **U2** bileşiginde 1650  $\text{cm}^{-1}$  ve 3270-3267  $\text{cm}^{-1}$ ; **U3** bileşiginde 1649  $\text{cm}^{-1}$  ve 3286  $\text{cm}^{-1}$ ; **U4** bileşiginde 1638  $\text{cm}^{-1}$  ve 3279  $\text{cm}^{-1}$  de saptanmıştır. Üre bileşiklerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumlarında da pirazol halkası metil protonları tiyoüre bileşiklerinde

olduğu gibi 1.91-1.98 ppm de saptanmıştır. Üre NH protonları **U1** bileşiğinde 7.43 ve 8.42 ppm'de, **U2** bileşiğinde 7.37 ve 8.32 ppm'de, **U3** bileşiğinde 7.47 ve 8.45 ppm'de, **U4** bileşiğinde 7.45 ve 8.22 ppm'de iki ayrı singlet olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular literatür verileri ile de uygunluk içindedir (29).

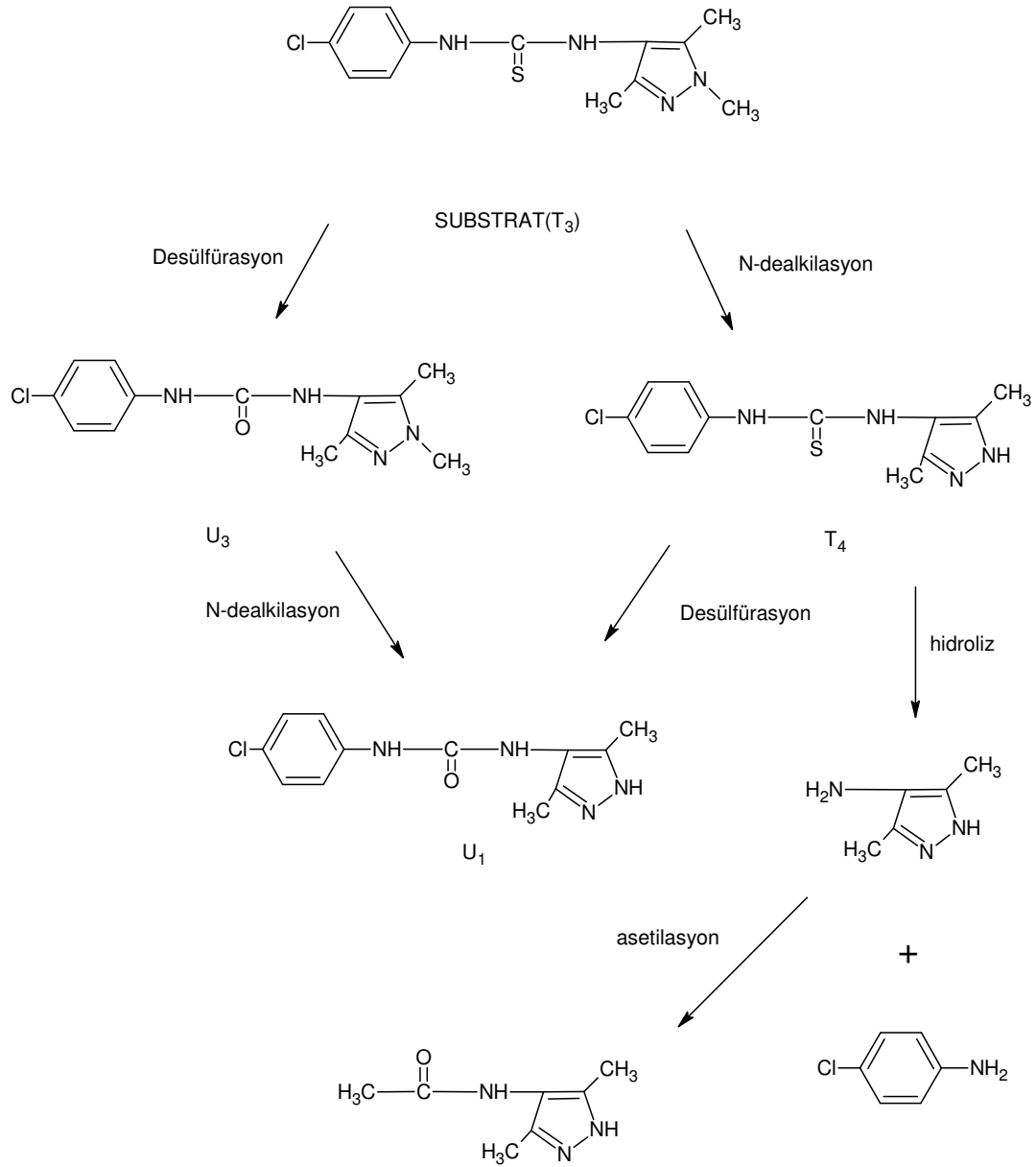
## 7.2. *In-vivo* Biyotransformasyon Bulgularının Değerlendirmesi

Bu çalıřmada substrat olarak N-(4-fluoro/klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyoüre sečilmiř (**T2** ve **T3**) ve *in vivo* metabolizması incelenmiřtir.

Substrat olarak sečililen N-(4-Klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyoüre (**T3**) ve olası metabolitleri řema 2' de gösterilmiştir. Substrat 100mg/kg dozda erkek sıçanlara intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Bu çalışmada iki hayvan kullanılmış ve elde edilen bulgular değerlendirilmiştir. İlaç uygulanmasından sonra kan örnekleri 0., 1., 2., 4., 8., 12., ve 24. saatlerde toplanmıştır. Birinci hayvanda 12. saatte kan alınamamış, ikinci hayvanın ise 8. saatten sonra ölmesi nedeniyle daha sonraki plazma örnekleri alınamamıştır. Plazma örnekleri protein çöktürme yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Proteinleri çöktürmek için 50:50 (h/h) asetonitril:metanol karışımı kullanılmıştır. Bu yöntemle örnek hazırlama likit-likit ekstraksiyonu ya da katı faz ekstraksiyonuna göre daha kolay ve daha kısa sürede gerçeleştirilmiştir. Substrat ve metabolitlerinin HPLC ile ayrılması için bir çok mobil faz karışımı denenmiş ve metanol:su karışımının bir gradient tablo halinde kullanıldığı mobil faz karışımı ayırımı sağlayan en iyi sistem olmuştur. Hayvanlardan alınan boş plazma üzerine substrat ve olası metabolitler ilave edilerek hazırlanan spike örneklerinde substrat **T3** 13.236 dakikada, **T4** 12.729 dakikada, **U1** 13.539 dakikada, **U3** 14.092 dakikada ve 6,212 dakikada asetilamin tespit edilmiştir. Pikler herhangi bir plazma pikiyle interfere olmamıştır. Substrat ve metabolitlerinin UV spektrumları da alınarak şekil 16, 17, 18, 19, 20 de gösterilmiştir.

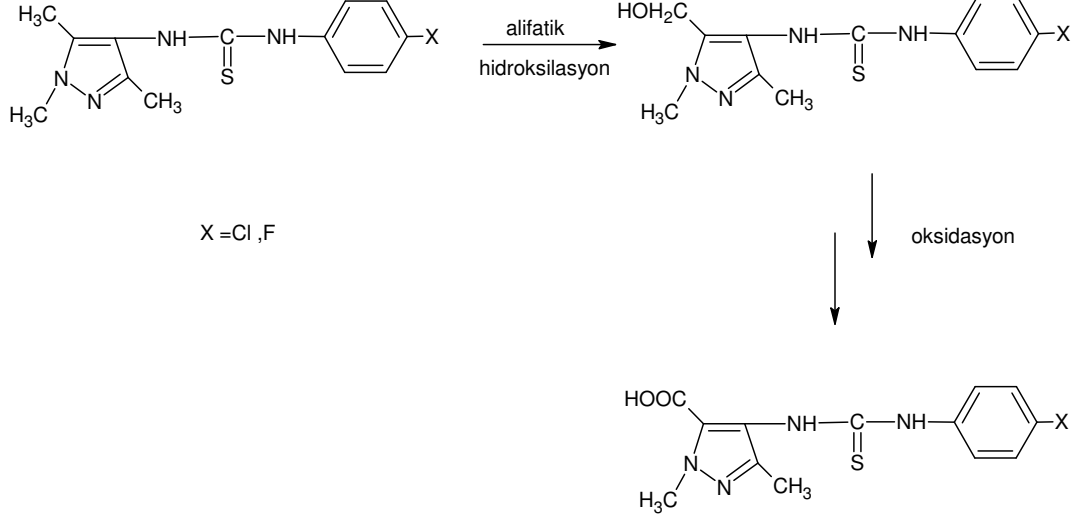
Bir numaralı hayvandan alınan plazma örnekleri incelendiğinde; substrat 2., 4. ve 6. saatlerde sırasıyla 13.220, 13.305 ve 13.226 dakikalarda saptanmıştır (şekil 25, 27, 28). Diğer saatlerde substrat saptanmamıştır. N-dealkilasyon metaboliti olan **T4** birinci hayvanda 6. saatte 11.487 dakikada gözlenmiştir (şekil 28). Aynı metabolit ikinci hayvanın plazma örneklerinde 4., 6. ve 8. saatlerde sırasıyla 12.781, 12.791 ve 12.932 dakikalarda tespit edilmiştir (şekil 36, 38, 41). İki hayvanda da tespit edilen bu piklerin

Ultraviole-Diode Array dedektörden (DAD) elde edilen UV spektrumu ile standart **T4**'ün spektrumunun karşılaştırıldığında aynı olması da substratın N-dealkilasyon ile **T4**'ü oluşturduğunu göstermiştir. Her iki hayvanda da substrat üzerinden oluşması beklenen desülfürasyon metaboliti **U3** ya da N-dealkilasyon metaboliti üzerinden oluşması beklenen desülfürasyon metaboliti olan **U1** tespit edilememiştir. Ayrıca hidrolitik reaksiyonla pirazolamin ve bu metabolit üzerinden oluşması beklenen asetilpirazolaminde kromatogramlarda gözlenmemiştir.

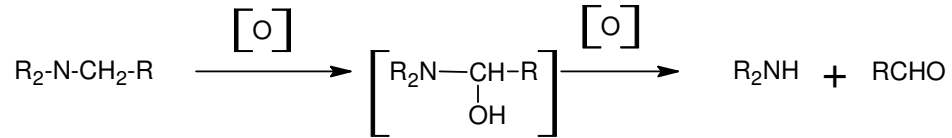


**Şema2.** N-(4-klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyoüre ve olası metabolitleri

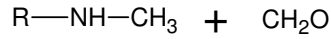
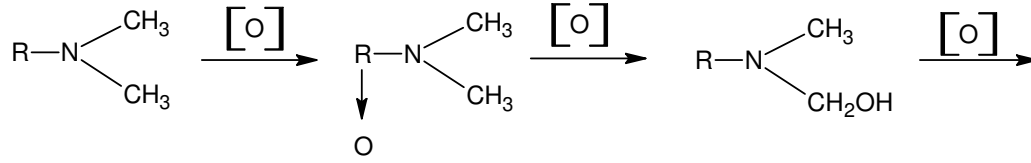
Substrattaki pirazol halkası metil protonlarında alifatik hidroksilasyon görülmesi mümkündür (49) ancak bu kromatografik koşullarda saptanamamıştır.



N-dealkilasyon birçok ilaç etken maddesinde gözlenen yaygın bir metabolik yoldur. Genellikle küçük alkil grubu (metil, etil gibi) taşıyan bileşikler dealkilasyona uğrarlar. Yapılarında metil grubu taşıyan amitriptilin, imipramin, maprotilin, mepivakain, mianserin; etil grubu taşıyan etotoin, klorokin, lidokain N-dealkilasyon yoluyla metabolize olurlar. (45) Bu olayı katalizleyen enzim sistemi sitokrom P-450 karma fonksiyonlu oksidazlardır. N- Dealkilasyonun iki basit mekanizma üzerinden yürüdüğü bildirilmiştir (45). İlk mekanizma karbinolamin oluşumu üzerinden yürüyen;

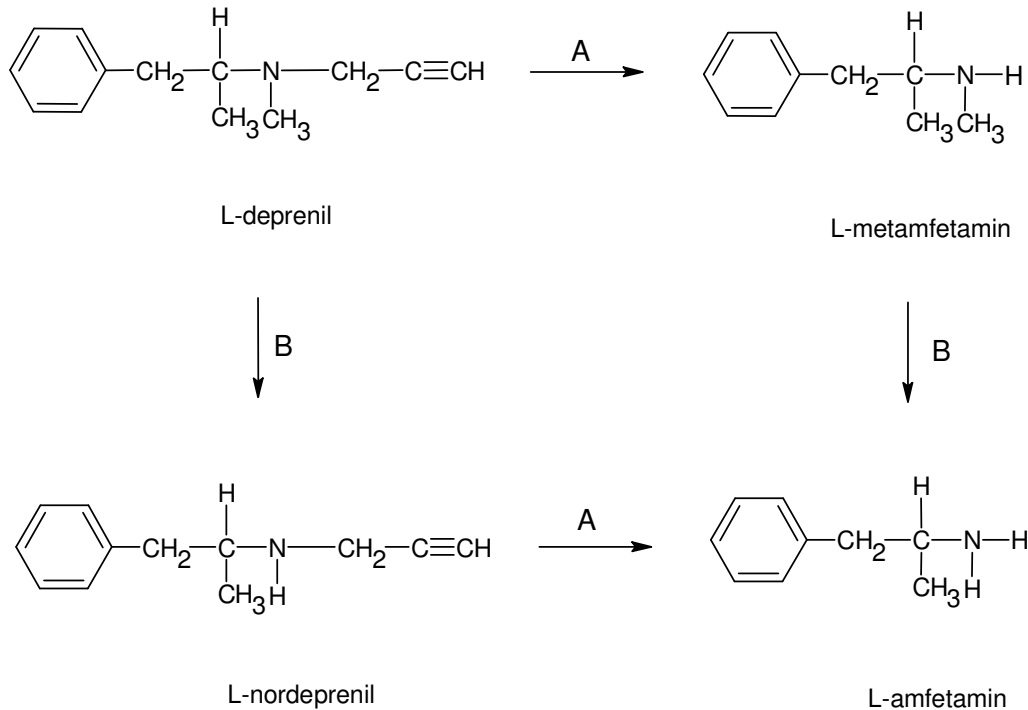


İkinci mekanizma karbonilamine tekrar dönüşen N-oksit üzerinden ilerleyen;



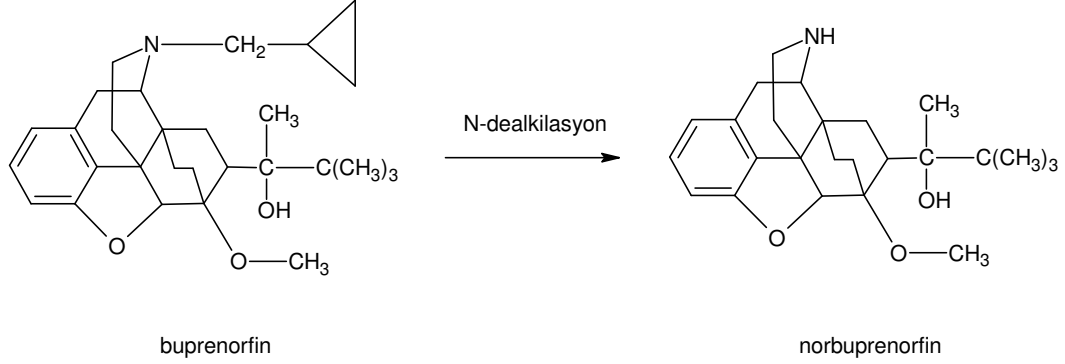
mekanizması olup, birinci mekanizma üzerinden yürüyen varsayım daha kuvvetlidir.

Monoamin oksidaz inhibitörlerinden L-deprenil Parkinson hastalığının idiopatik semptomlarının başlangıcının tedavisi için kullanılan terapötik bir ajandır. Bu etkinin ortaya çıkmasında monoamino oksidaz B etkisinden bağımsız olduğu ve bazı metabolitlerinin bunda etkili olduğu düşünülmektedir. L-deprenil Sitokrom P450' nin etkisiyle N-depropinilasyon ile metamfetamini, N-demetilasyon ile nordeprenili oluşturmaktadır (58).

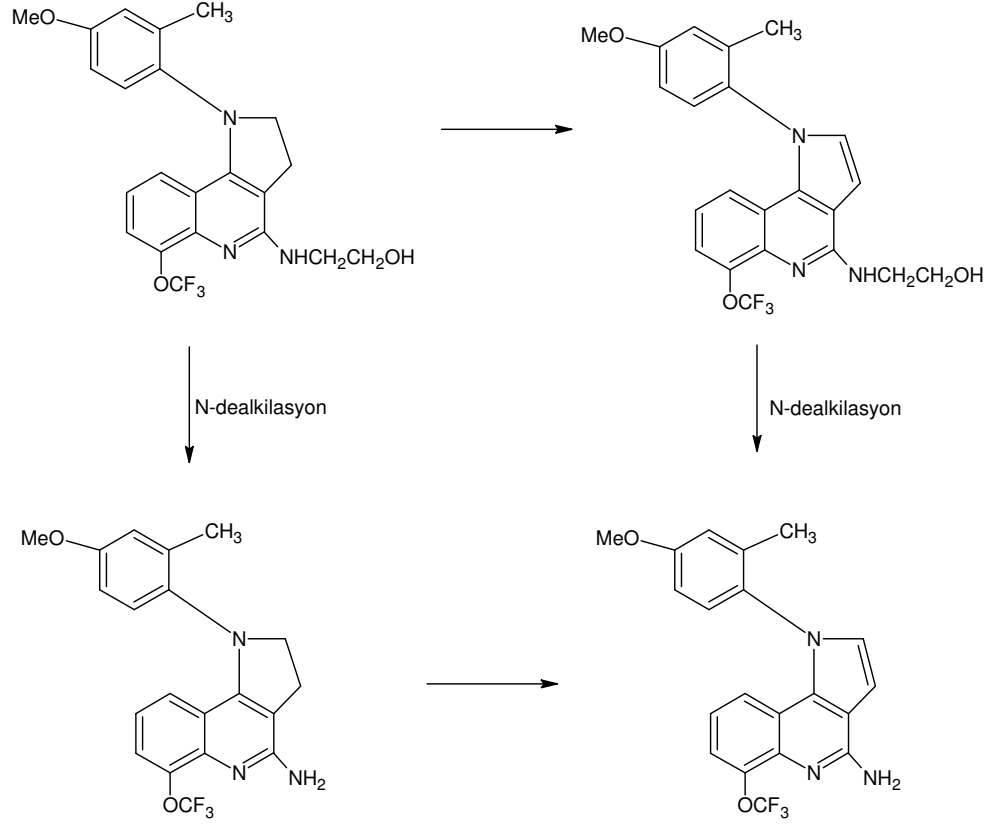


L-deprenilin N-dealkilasyon yolları: A) N-depropinilasyon B) N-demetilasyon

Buprenorfin opiat ailesinden uzun etkili analjeziklerindendir. Son zamanlarda opioidlere bağılı tedaviler kapsamlı olarak önerilmektedir. İlaç insan hepatik sitokrom P450 tarafından kapsamlı olarak metabolize edilmekte ve *N*-dealkilasyonla meydana gelen norbuprenorfin metabolitini vermektedir (27).



Yeni H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaz inhibitörü KR-60436 [1-(4-metoksi-2-metil-fenil)-4-[(2-hidroksietil)amino]-6-triflorometoksi-2,3-dihidropirrol[3,2-*c*]kinolin]' in metabolizma çalışmaları Choi ve arkadaşları tarafından LC elektrosprey kütle spektrometresi ile yapılmıştır (8). KR-60436'nın metabolizmasında başlıca 4 metabolik yol tanımlanmaktadır; dihidropirrol halkasının pirole oksidasyonu, metoksi grubunun *O*-demetilasyonu, kinolin kısmının hidroksilasyonu ve hidroksietilamino grubunun *N*-dealkilasyonudur.

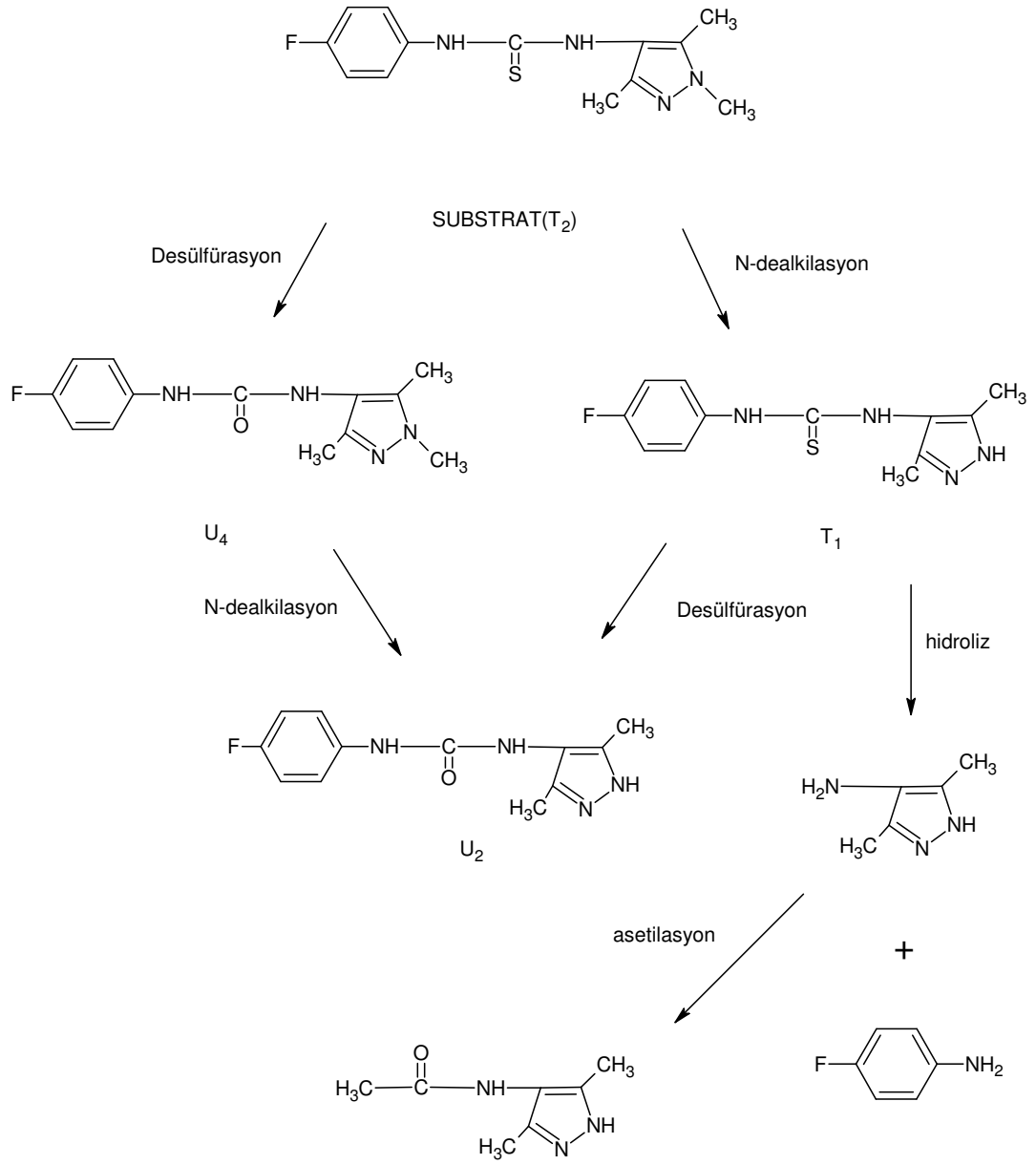


Tiyöureler üzerinde yapılan metabolizma çalışmaları kısıtlı olmakla beraber desülfürasyon metabolik yolunun gözlenmediği bildirilmiştir. Tarafımızdan yapılan N-fenil-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)tiyöürenin metabolizmasında da desülfürasyon metaboliti olan N-fenil-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)üre'nin saptanamaması tiyöürelerde desülfürasyon metabolik yolunun gözlenmediğini ortaya koymuştur (30). Tiyöüreler üzerinde yapılan çalışmalarda desülfürasyonun major metabolik yol olmadığı, bileşikteki diğer fonksiyonel grup reaksiyonlarının; örneğin N-dealkilasyon, O-dealkilasyon, aromatik hidraksilasyon, alifatik hidraksilasyon gibi (28, 35) gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Desülfürasyon metabolik yolunun gözlenip gözlenemeyeceği bir başka tiyöüre bileşiği olan N-(4-fluorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyöüre (**T2**) üzerinde de incelenmiştir. Seçilen tiyöüre bileşiği ve düşünülen metabolitleri şema 3' te gösterilmiştir. Hayvanlardan alınan boş plazma üzerine substrat ve olası metabolitler ilave edilerek hazırlanan spike örneklerinde substrat (**T2**) 13.339, **T1** 11.596, **U2**

14.184, **U4** 16.414 ve asetilamin 6,072 dakikada tespit edilmiştir. Substrat ve metabolitlerinin UV spektrumları da alınarak şekil 44, 45, 46, 47, 48' de gösterilmiştir.

İncelenen plazma örneklerinde substrat 2., 4. ve 6. saatlerde sırasıyla 13.132, 13.339 ve 13.599 dakikalarda tespit edilmiştir. N-dealkilasyon ürünü olan N-(4-fluorofenil)-N'-(3,5-dimetilpirazol-4-il)tiyüre (**T1**) 6. saatte 11.339. dakikada bulunmuştur (şekil 56). Desülfürasyon metabolitleri olan N-(4-fluorofenil)-N'-(3,5-di/1,3,5-trimetilpirazol-4-il)üre (**U2** ve **U4**) saptanmamıştır. Boş plazma ve diğer plazma örnekleri incelendiğinde substrat ve N-dealkilasyon metaboliti dışında başka bir metabolit veya tanımlanamayan bir pik gözlenmemiştir (şekil 51).



**Şema 3.** N-(4-fluoro)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyoüre ve olası metabolitleri

## 8.SONUÇ

Tiyöüre türevleri önemli farmakolojik aktiviteler ortaya çıkaran ve son yıllarda oldukça fazla sayıda bileşiğin yapısında yer alan önemli bir gruptur. Çok sayıda biyolojik aktivite ile ilgili literatür bulunmasına karşın bu bileşiklere ait metabolizma çalışması yok denecek kadar azdır. N,N'-disübstitüe tiyöüre bileşiklerinin *in vivo* metabolik yollarının araştırılması amacıyla yapılmış bu çalışmada substrat ve metaboliti olacak toplam 8 adet tiyöüre ve üre bileşiği sentezlenmiş ve substrat olarak N-(4-fluoro/klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyöüre seçilmiş ve *in vivo* metabolizması incelenmiştir.

Substrat olarak N-(4-klorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)tiyöüre'nin (**T3**) kullanıldığı plazma örneklerinde madde 2., 4. ve 6. saatlerde tespit edilmiştir. Diğer saatlerde gözlenmemiştir. N-dealkilasyon metaboliti olan **T4** 4., 6. ve 8. saatlerde saptanmıştır. Elde edilen UV spektrumu ile standart **T4**'ün spektrumunun aynı olması da substratın N-dealkilasyon ile **T4**'ü oluşturduğunu göstermiştir. Substrat üzerinden oluşması beklenen desülfürasyon metaboliti **U3** ya da N-dealkilasyon metaboliti üzerinden oluşması beklenen desülfürasyon metaboliti olan **U1** tespit edilememiştir. Ayrıca hidrolitik reaksiyonla pirazolamin ve bu metabolit üzerinden oluşması beklenen asetilpirazolamin de kromatogramda gözlenmemiştir.

Substrat olarak seçilen bir diğer bileşik olan N-(4-fluorofenil)-N'-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il) tiyöüre'nin (**T2**) incelenen plazma örneklerinde substrat ve N-dealkilasyon ürünü olan N-(4-fluorofenil)-N'-(3,5-dimetil pirazol-4-il)tiyöüre (**T1**) tespit edilmiştir. Desülfürasyon metaboliti olan N-(4-fluorofenil)-N'-(3,5-di/1,3,5-trimetilpirazol-4-il)üre (**U2** ve **U4**) saptanmamıştır. Boş plazma ve plazma örnekleri incelendiğinde substrat ve N-dealkilasyon metaboliti dışında başka bir metabolit veya tanımlanamayan bir pik gözlenmemiştir.

Elde edilen sonuçlar, N,N'-disübstitüe tiyöürelerde desülfürasyon metabolik yolunun gözlenmediği ya bileşiğin değişmeden atıldığı yada molekül üzerindeki diğer fonksiyonel gruplar üzerinden yürüyen örneğin N-dealkilasyon, O-dealkilasyon, aromatik hidroksilasyon gibi metabolik yolların gözlendiğini göstermiştir. Ayrıca aromatik halka üzerinde elektron çeken bir sübstitüentin bulunmasının da üre metabolitinin oluşmasına katkısı olmadığı saptanmıştır. Bu bulguda bize her ne kadar

üre türevlerinin tiyoüre türevlerinden antikonvulsan aktivitesinin daha iyi olmasına karşın organizmada tiyoürelerin biyotransformasyon sonucu daha aktif üre türevlerine dönüşmediğini göstermiştir.

## 9. KAYNAKLAR

- (1) Bell F.W., Contrell A.S., Högberg M., Jaskinas S.R., Johanssen N.G., Jordan C.L., Kinnick M.D., Morin J.M., Noreen R., Öberg B., Palkowitz J.A., Parrish C.A., Pranc P., Sahlberg C., Ternansky R.J., Vasileff R.T., Vrong L., West S.J., Zhang H., Zhou X.X.: Phenethylthiazolethiourea (PETT) compounds, a new class of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. 1. Synthesis and basic structure-activity relationship studies of PETT analogs. *J. Med. Chem.*, 38: 4929-4936, 1995.
- (2) Bhandari K., Srivastava S., Shankar G.: Synthesis of tetrahydronaphthyl thioureas as potent appetite suppressant. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12: 4189-4196, 2004.
- (3) Bruno O., Ranise A., Bondavalli F., Schenone S., D'Amico M., Falciani M., Vacca C., Flipelli A.: 3-5-Diphenyl-1H-pyrazole derivatives. XII. N-substituted-4-amino-1-(2-hydroxy-2-alkylaminoethyl)-3-5-diphenyl-1H pyrazole with local anesthetic, analgesic and platelet antiaggregating activities. *IL Farmaco Ed. Sci.*, 49(9): 533-540, 1994.
- (4) Bruno O., Schenone S., Ranise A., Bondavalli F., Falcone G., Flipelli W., Marabese I., Motula G.: N-Arylsubstituted-1-aryl-3,4-diphenyl-5-pyrazole amines with analgesic and antiarrhythmic properties. *IL Farmaco Ed. Sci.*, 52(10): 615-618, 1997.
- (5) Buu-Hoi PH., Xuong D., Nam H.: N,N'-Diarylthioureas and related compounds of potential biological interest. *J. Chem. Soc.*: 1573-1581, 1955.
- (6) Campo R.D., Criado J.J., Gheorghe R., Gonzales F.J., Hermosa M.R., Sanz F., Manzano J.L., Monte E., Fernandez E.R.: N-benzoyl-N'-alkylthioureas and their complexes with Ni(II), Co(III) and Pt(II) – crystal structure of 3-benzoyl-1-butyl-1-methyl-thiourea: activity against fungi and yeast. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98: 1307-1314, 2004.
- (7) Cheng H., DeMello K.M.L., Li J., Sakya S.M., Ando K., Kawamura K., Kato T., Rafka R.J., Jaynes B.H., Ziegler C.B., Stevens R., Lund L.A., Mann D.W., Kilroy C., Haven M.L., Nimz E.L., Dutra J.K., Li C., Minich M.L., Kolosko N.L., Petras C., Silvia A.M., Seibel S.B.: Synthesis and SAR of heteroaryl-phenyl-substituted pyrazole derivatives as highly selective and potent canine COX-2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16: 2076-2080, 2006.

- (8) Choi S.J., Ji H.Y., Soo K. Baek S.K., Lee H.-Y., Choi J.-K., Cheon H.G., Lee D.H., Lim H., Lee H.S.: LC-MS/MS identification of in vitro metabolites of a new H<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup> ATPase inhibitor, KR-60436 produced by rat and human liver microsomes. *J. Pharm. Biomed. Analysis.*, 28: 897-902, (2002).
- (9) Coppola G.M., Damon R.E., Eskesen J.B., France D.S., Paterniti J.R.: 1-Hydroxyalkyl-3-phenylthioureas as novel HDL-elevating agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15: 809-812, 2005.
- (10) Daidone G., Raffa D., Maggio B., Raimondi M.V., Plescia F., Schillaci D.: Synthesis and antiproliferative activity of triazenoindazoles and triazenopyrazoles: a comparative study. *Eur. J. Med. Chem.*, 39: 219-224, 2004.
- (11) Debryne D., Moulin M.A., Bricard H., Bigot M.C.: Liquid chromatographic determination of noxytiolin and 1-methyl-2-thiourea in serum: application to pharmacokinetic studies in rabbits and humans. *J. Pharm. Sci.*, 74(2): 224-6, 1985.
- (12) Dimmorck J.R., Vashista S.C., Stables J.P.: Ureylene anticonvulsants and related compounds. *Pharmazie*, 55(7): 490-494, 2000.
- (13) El-Hawash S.A.M., El-Mallah A.I.: Synthesis of some novel pyrazole derivatives as potential antiinflammatory agents with minimum ulcerogenic activity. *Pharmazie*, 53(6): 368-373, 1998.
- (14) Emilsson H., Selander H.: Synthesis and antihypertensive activity of some 3-substituted 4H-1,2,4-triazoles. *Acta Pharm. Suec.*, 20: 419-433, 1983.
- (15) Emilsson H., Selander H., Gaarder J.: Synthesis and antihypertensive activity of some 3-substituted 4H-1,2,4-triazoles. *Acta Pharm. Suec.*, 24: 123-134, 1987.
- (16) Ergenç N., Rollas S.: Bazı azopirazoller 1. *J. Fac. Pharm. İstanbul*, 11: 138-157, 1975.
- (17) Ergenç N., Rollas S.: Bazı azopirazoller 2. *J. Fac. Pharm. İstanbul*, 11: 177-182, 1975.
- (18) Ergenç N., Rollas S.: Bazı azopirazoller 4. *J. Fac. Pharm. İstanbul*, 13: 139-145, 1977.
- (19) Ergenç N., Rollas S.: The coupling products of aliphatic active C-H compounds with diazonium salts. *J. Fac. Pharm. İstanbul*, 11: 8-23, 1975.

- (20) Fevig J.M., Cacciola J., Buriak J., Rossi K.A., Knabb R.M., Luetzgen J.M., Wong P.C., Bai S.A., Wexler R.R., Lam P.Y.S.: Preparation of 1-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7(6H)-ones as potent, selective and bioavailable inhibitors of coagulation factor Xa. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16: 3755-3760, 2006.
- (21) Ganellin C.R., Hosseini S.K., Khalof Y.S., Tertiuk W., Arrang J.M., Garbarg M., Ligneau X., Schwartz J.C.: Design of potent non-thioureas H<sub>3</sub>-receptor histamine antagonists. *J. Med. Chem.*, 38: 3342-3350, 1995.
- (22) Glasser A.C., Doughty R.M.: Substituted heterocyclic thioureas 1. *J. Pharm. Sci.*, Vol., 51(11): 1031-1033, 1962.
- (23) Grandi M.J.D., Curran K.J., Feigelson G., Prashad A., Ross A.A., Visalli R., Fairhurst J., Feld B., Bloom J.D.: Thiourea inhibitors of herpes viruses. Part 3: Inhibitors of varicella zoster virus. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 4157-4160, 2004.
- (24) Hazzaa A.B., Labouta I.M., Kassem M.G.: Synthesis of some triazolylthiourea derivatives as potential antimicrobial agents. *Arch. Pharm. Sci. Ed.*, 11: 43-47, 1983.
- (25) Heinisch G., Matuszczak B., Ralkowitz D., Tantisina B.: Synthesis of N-aryl-N'-heteroaryl-substituted urea and thiourea derivatives and evaluation of their anticonvulsant activity. *Arch. Pharm. Med. Chem.*, 330: 207-210, 1997.
- (26) Holla B.S., Mahalinga M., Karthikeyan M.S., Akberali P.M., Shetty N.S.: Synthesis of some novel pyrazolo[3,4-*d*] pyrimidine derivatives as potential antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 2040-2047, 2006.
- (27) Iribarne C., Picart D., Dreano Y., Bail J.-P., Berthou F.: Involvement of cytochrome P450 3A4 in N-dealkylation of buprenorphine in human liver microsomes. *Life Sciences*, Vol. 60: 1953-1964, 1997.
- (28) Jones A.R., Mashford P.M.: The fate of N-methyl-N'-(hydroxymethyl)thiourea in the rat. *Xenobiotica*, 13(2): 73-9, 1983.
- (29) Kaymakçioğlu B.K., Rollas S., Körçeğez E., Arıcıoğlu F.: Synthesis and biological evaluation of new N-substituted-N'-(3,5-di/ 1,3,5-trimethylpyrazole-4-yl) thiourea/urea derivatives. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 26: 97-103, 2005.
- (30) Kaymakçioğlu B.K., Rollas S., Arıcıoğlu F.: *In vivo* metabolism of N-phenyl-N'-(3,5-dimethylpyrazole-4-yl) thiourea in rats. *Eur. J. Drug Met. And Pharmacokinetics.*, 28 (4): 273-278, 2003.
- (31) Knorr L.: Einwirkung von acetessiger. *Ber.*, 16:2597,1883.

- (32) Kubata S., Horie K., Mısra K.H., Toyooka K., Uda M., Shibuya M., Tereda H.: Synthesis and uncoupling activities of hydrophobic thioureas. *Chem. Pharm. Bull.*, 33(2): 662-666, 1985.
- (33) Küçükgülzel İ., Rollas S., Ülgen M.: Synthesis and characterization of some thiourea derivatives from 1,2,4-triazoline-3-thioureas. *J. Pharm. Univ. Mar.*, 10(1): 17-25, 1994.
- (34) Küçükgülzel İ., Küçükgülzel S.G., Rollas S., Kiraz M.: Some 3-Thioxo/alkylthio-1,2,4-triazoles with a substituted thiourea moiety as possible antimycobacterials. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11: 1703-1707, 2001.
- (35) Lee J., La S., Ahn B.R., Jeong T.C., Kim D.H.: Metabolism of 1-{3-[3-(4-cyanobenzyl)-3H-imidazol-4-yl]-propyl}-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-1-(2-trifluoromethylbenzyl) thiourea (YH3945), a novel anticancer drug, in rats using the C-14-labeled compound. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18 (17): 1901-1910, 2004.
- (36) Menozzi G., Mosti L., Schenone P.: N-substituted 4-carboxy-1-phenyl-1H-pyrazole-5-propanamides with antiinflammatory, analgesic, antipyretic and platelet antiaggregating activities. *IL Farmaco*, 48(4): 539-549, 1993.
- (37) Morgan G.T., Reilly J.: Non-aromatic diazonium salt. III. 3,5-dimethylpyrazole-4-diazonium salts and their azo derivatives. *J. Chem. Soc.*, 105: 435-443, 1914 (*Chem. Abst.* 8:1749, 1914).
- (38) Orth R.E.: Biologically active pyrazoles. *J. Pharm. Sci.*, 57(4): 537-555, 1968.
- (39) Pandeya S.N., Mishra V., Sign P.N., Rupainwar D.C.: Anticonvulsant activity of thioureido derivatives of acetophenone semicarbazone. *Pharmacol. Res.*, 37(1): 17-22, 1998.
- (40) Puşçaru E., Terfas D., Bereket A., Chirita C.: Derivatives of the thiourea type possessing an antitrichomonadic action. *Farmacia.*, 7: 513-520, 1959 (*Chem Abst.* 54: 14163b).
- (41) Rida S.M., Labouta I.M., Saloma H.M., Ghany Y.S.A., El Ghazzau E., Kader O.: Synthesis and *in vitro* antimicrobial evaluation of some benzimidazol-2-yl methylthioureas, benzimidazol-2-yl acethylthiosemicarbazides and products of their condensation with monochloroacetic acid. *Pharmazie*, 41(H7): 475-478, 1986.

- (42) Rollas S.: Synthesis of 3H-1,3,4-oxadiazoline-2-thione derivatives and reductive cleavage with hydrazine hydrate. *J. Fac. Pharm. İstanbul*, 19:83-87, 1983.
- (43) Rollas S.: Reductive cleavage of azo compounds with hydrazine hydrate and some new 1,2,4-triazole derivatives 2. *M.Ü.Fen Bilimleri Dergisi*, 3: 195-200,1986.
- (44) Rollas S.: Reductive cleavage of azo compounds with hydrazine hydrate and some new 1,3,4-thiadiazole derivatives. *J. Pharm. Univ. Mar.*, 1(1-2): 59-68,1985.
- (45) Rollas S.: İlaçların Metabolizması (biyotransformasyon). 20-23 Marm. Üni. Ecz. Fak., İstanbul, 1992.
- (46) Rollas S., Büyüktimkin S., Çevikbaş A.: N-[4-(3H-1,3,4-oxadiazoline-2-thion-5-yl)phenyl]-N'-substituted thioureas synthesis and antimicrobiological activities. *Arch. Pharm. (weinheim)*, 324: 189-190, 1991.
- (47) Rollas, S., Koçyiğit-Kaymakçioğlu, B.: Biological activity of disubstituted thiourea derivatives. *Current Topics in Med. Chem.*, 3: 121-134, 2003.
- (48) Sivaprasad G., Perumal P.T., Prabavathy V.R., Mathivanan N.: Synthesis and antimicrobial activity of pyrazolylbisindoles-Promising anti-fungal compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16: 6302-6305, 2006.
- (49) Soliman R.: Preparation and antidiabetic activity of some sulfonylurea derivatives of 3,5-disubstituted pyrazoles. *J. Med. Chem.*, 22(3): 321-325, 1979.
- (50) Souza A.E., Pissinate K., Nascimento M.D.G., Grynberg N.F., Echevarria A.: Synthesis, cytotoxicity and DNA-topoisomerase inhibitory activity of new asymmetric ureas and thioureas. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 492-499, 2006.
- (51) Sriram D., Yogeewari P., Madhu K.: Synthesis and in vitro antitubercular activity of some 1-[4-substituted)phenyl]-3-(4-{ 1-[(pyridine-4-carbonyl)hydrazono] ethyl}phenyl) thiourea; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16: 876-878, 2006.
- (52) Stevens G.J., Hitchcock K., Wang Y.K., Coppala G.M., Versace R.W., Chin J.A., Shapiro M., Suwanrumpha S., Mangold B.L.K.: In vitro metabolism of N-(5-chloro-2-methylphenyl)-N'-(2-methylpropyl)thiourea: Species comparison and identification of a novel thiocarbamide-glutathione adduct. *Chem. Research in Toxicology*, 10 (7): 733-741, 1997.

- (53) Takemoto T., Eda M., Okada T., Sakashita H., Matzno S., Godha M., Ebisu H., Nakamura N., Fukaya C., Hihara M., Eiraku M., Yamnouchi K., Yokoyama K.: Novel potassium channel openers: Synthesis and pharmacological evaluation of new N-(substituted-3-piridyl)-N'-alkylthioureas and related compounds. *J. Med. Chem.*, 37: 18-25, 1994.
- (54) Tan J.H., Zhang Q.-X., Huang Z.-S., Chen Y., Wang X.-D., Gu L.-Q., Wu J.Y.: Synthesis, DNA binding and cytotoxicity of new pyrazole emodin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 41: 1041-1047, 2006.
- (55) Tarzia G., Panzone G., De Paoli A., Schiatti P., Selva D.: Anti-inflammatory properties of series of 4-amino-5-arylpyrazoles. *Farmaco Ed. Sci.*, 39(7): 618-636, 1984.
- (56) Todoulou O.G., Papadaki-Valiraki A.E., Flilippatos E.C., Ikeda S. Clercq De.E.: Synthesis and anti-myxovirus activity of some novel N,N'-disubstituted thioureas. *Eur. J. Med. Chem.*, 29: 127-131, 1994.
- (57) Vajragupta O., Pathomsakul A., Matayatsuk C., Ruangreangyingyod L., Wongkrajang Y., Foye W.O.: Synthesis and antihypertensive activity of N-(alkyl/akenyl/aryl)-N'-heterocyclic ureas and thioureas. *J. Pharm. Sci.*, 85(3): 258-261, 1996.
- (58) Valoti M., Fusi F., Frosini M., Pessina F., Tipton K.F., Sgaragli G.P.: Cytochrome P450-dependent N-dealkylation of L-deprenyl in C57BL mouse liver microsomes: effects of *in vivo* pretreatment with ethanol, phenobarbital,  $\beta$ -naphthoflavone and L-deprenyl: *European Journal of Pharmacology*, 391: 199-206, (2000).
- (59) Vass A., Dudás J., Tóth J., Varma R.S.: Solvent-free reduction of aromatic nitro compounds with alumina-supported hydrazine under microwave irradiation. *Tetrahedron Lett.*, 42: 5347-5349.
- (60) Venkatachalam T.K., Sudbeck E.A., Uckun F.M.: Regiospecific synthesis, X-ray crystal structure and biological activities of 5-bromothiophenethyl thioureas. *Tetrahedron Lett.*, 42: 6629-6632, 2001.

- (61) Venkatachalam T.K., Qazi S., Samuel P., Uckun F.M.: Substituted Heterocyclic Thiourea Compounds as a New Class of Anti-allergic Agents Inhibiting IgE/FcεRI Receptor Mediated Mast Cell Leukotriene Release. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11: 1095-1105, 2003.
- (62) Vig R., Mao C., Venkatachalam T.K., Ahlgren L.T., Sudbeck E.A., Uckun F.M.: Rational Design and Synthesis of Phenethyl-5-bromopyridyl Thiourea Derivatives as Potent Non-nucleoside Inhibitors of HIV Reverse Transcriptase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 6: 1789-1797, 1998.
- (63) Wei F., Zhao B.X., Huang B., Zhang L., Sun C.H., Dong W.L., Shin D.S., Miao J.Y.: Design, synthesis and preliminary biological evaluation of novel ethyl 1-(2'-hydroxy-3'-aroxypopyl)-3-aryl-1H-pyrazole-5-carboxylate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16: 6342-6347, 2006.
- (64) Yegba A., Menager S., Verite P., Farnoux C.C., Lafont O.: Competition between two metabolic pathways: oxidation and desulfuration in the thiobarbiturate series. *Lab. Pharm. Biopharm.*, 11: 1295-1296, 1995.
- (65) Yonetoku Y., Kubota H., Okamoto Y., Ishikawa J., Takeuchi M., Ohta M., Tsukamoto S.: Novel potent and selective calcium-release-activated calcium channel inhibitors. Part 2: Synthesis and inhibitory activity of aryl-3-trifluoromethylpyrazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14: 5370-5383, 2006.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Sakıp Sabancı Yıldız İlköğretim Okulu'nda, ortaokul ve liseyi Burak Bora Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 1998 yılında öğrenimine başladığım İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden 2002 yılında mezun oldum. 2003 yılında İstanbul Kartal'da kendi adımla eczane açtım. 2004 yılında Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Halen eczacı olan eşimle beraber eczanemde çalışmaktayım.