



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(-)-GOSSYPOL TÜREVİ SCHİFF BAZLARININ SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU, ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ve *IN*
SILICO ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

İnci SURE

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
ŞUBAT - 2023



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(-)-GOSSYPOL TÜREVİ SCHIFF BAZLARININ SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU, ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ve *IN*
SILICO ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

İnci SURE
ORCID:0000-0002-9470-9920

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Doç. Dr. Neslihan BEYAZİT
ORCID: 0000-0002-5722-2400

HATAY
ŞUBAT - 2023

01/02/2023

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

İnci SURE

ÖZET

(-)-GOSSYPOL TÜREVİ SCHIFF BAZLARININ SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU, ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ve *IN SILICO* ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Bu çalışma kapsamında, öncelikle pamuk bitkisi (*Gossypium hirsutum* L.) tohumlarından rasemik gossypol bileşiği izole edildi. Ardından izole edilen rasemik gossypol bileşiği, kiral reaktif olarak L-triptofan metil ester hidroklorür bileşiği kullanılarak, diastereomerik rezolüsyon yöntemi yardımıyla enantiyomerik olarak saflaştırıldı. Elde edilen tüm diastereomer ve enantiyomerlerin yapısal karakterizasyonu FT-IR, NMR spektroskopisi, HPLC ve polarimetre analizi yardımıyla gerçekleştirildi. Biyolojik olarak aktif olan (-)-gossypol enantiyomerinin p-toluidin, o-anisidin ve 2-amino benzil alkol bileşikleriyle olan reaksiyonları sonucu yeni (-)-gossypol Schiff bazı türevleri elde edildi. Schiff bazı türevlerinin yapıları elementel analiz, polarimetre analizi, UV-Vis, FT-IR ve NMR spektroskopisi yöntemleriyle aydınlatıldı.

Sentezlenen bileşiklerin ve (-)-gossypol bileşiğinin antioksidan aktivitesi DPPH serbest radikal süpürme yöntemi yardımıyla araştırıldı. Sonuçlar, (-)-gossypol Schiff bazı türevleri IS-5, IS-7 ve IS-10 bileşiklerinin (IC_{50} değerleri sırasıyla, 2.68 $\mu\text{g/ml}$, 2.84 $\mu\text{g/ml}$ and 3.04 $\mu\text{g/ml}$), (-)-gossypol (IC_{50} , 4.60 $\mu\text{g/ml}$) bileşiğinden daha iyi bir aktiviteye sahip olduklarını gösterdi. Bu çalışmada, ayrıca, (-)-gossypol ve onun Schiff bazı türevlerinin EGRF (Epidermal Büyüme Faktörü) and LCK (Lenfosit spesifik kinase) inhibitörü olarak antikanser aktiviteleri moleküler kenetleme metodu yardımıyla araştırıldı. Ölçümler sonucu elde edilen bağlanma enerji skorları ve bağlanma modları, IS-10 ve IS-5 bileşiklerinin sırasıyla EGRF ve LCK'ya en iyi bağlanma ilgisini gösterdiklerini ortaya koydu.

2023, 60 sayfa

Anahtar Kelimeler: Gossypol, Schiff bazı, Antioksidan Aktivite, Antikanser Aktivite, Moleküler Kenetleme

ABSTRACT

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION and INVESTIGATION of ANTIOXIDANT and *IN SILICO* ANTICANCER ACTIVITY of (-)-GOSSYPOL DERIVATIVE SCHIFF BASES

In the scope of this study, firstly, we isolated racemic gossypol from the cotton seeds (*Gossypium hirsutum* L.). The racemic gossypol, then, was enantiomerically purified by using diastereomeric resolution method and L-tryptophan methyl ester hydrochloride was used as a chiral reagent. FT-IR, NMR spectroscopy, HPLC and polarimeter analysis were used for structural characterization of the obtained diastereomers and enantiomers. Biologically active (-)-gossypol enantiomer was used to synthesize new Schiff base derivatives by the reaction of p-toluidin, o-anisidine and 2-aminobenzyl alcohol with (-)-gossypol. The structures of (-)-gossypol Schiff base derivatives were characterized by using elemental analysis, polarimeter analysis, UV-Vis, FT-IR and NMR spectroscopy.

Antioxidant activity of the synthesized compounds and (-)-gossypol was determined by investigating DPPH free radical scavenging method. The results showed that (-)-gossypol Schiff base derivatives, IS-5, IS-7 and IS-10 (IC₅₀, respectively, 2.68 µg/ml, 2.84 µg/ml and 3.04 µg/ml) had a better ability to scavenge DPPH free radical than (-)-gossypol (IC₅₀, 4.6 µg/ml). We also investigated the anticancer activity of (-)-gossypol and its Schiff base derivatives as EGRF (Epidermal Growth Factor) and LCK (Lymphocyte specific kinase) inhibitors by using molecular docking method. According to their binding energy scores and binding modes, IS-10 and IS-5 showed the best binding affinity towards EGRF and LCK, respectively.

2023, 60 pages

Key Words: Gossypol, Schiff Base, Antioxidant Activity, Anticancer Activity, Molecular Docking

TEŞEKKÜR

Tez sürecimde öncelikle desteğini esirgemeyen her anlamda bana destek olan ve hayatım boyunca örnek alacağım danışman hocam Doç. Dr. Neslihan BEYAZİT'a teőekkürlerimi sunarım. Aynı zamanda Prof. Dr. Cahit DEMETGÜL hocama da değerli yardımları için minnettarım.

Eğitim hayatım boyunca gölgesini hep üzerimde hissetiğim, aldığım tüm kararlara saygı duyup her zaman arkamda olan aileme özellikle babam Kemal SURE'ye ve beni bu süreçte hiç yalnız bırakmayan Onur AŐKAROęLU'na, kız kardeőim Zebur SURE'ye çok teşekkür ederim.

Çalıőmamda her seferinde bana yol gösteren doktora öğencisi Müge MİRİOğLU'na teşekkür ederim.

Ayrıca Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi (HMKÜ) Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölüm Başkanlığı'na ve HMKÜ FBE Enstitüsü Müdürlüğü çalışanlarına teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Gossypol: Bir Sekonder Metabolit.....	2
1.1.1. Gossypol Bileşiğinin Yapısı ve Stereokimyası.....	2
1.1.2. Gossypol Bileşiğinin Biyolojik Aktivitesi.....	4
1.2. Schiff Bazları.....	5
1.3. Antioksidanlar.....	7
1.4. Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı.....	9
1.4.1. Moleküler Kenetleme (Docking).....	9
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. Bitki materyali.....	14
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	14
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	14
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. Rasemik Gossypol Bileşiğinin Pamuk Tohumlarından İzolasyonu.....	15
3.2.2. Rasemik Gossypol Bileşiğinin Enantiyomerik Olarak Saflaştırılması (Diastereomerik Rezolüsyon).....	16
3.2.2.1. Diastereomerlerin Sentezi.....	17
3.2.2.2. Diastereomerlerin Hidrolizi.....	18
3.2.3. HPLC Kromatografisi ile Enantiyomerlerin Tanınması.....	18
3.2.4. (-)-Gossypol bis- Schiff Bazlarının Sentezi.....	19
3.2.5. Antioksidan Aktivite Tayini.....	20
3.2.6. Moleküler Kenetleme Çalışması.....	20
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	22
4.1. Pamuk Tohumlarından İzole Edilen Rasemik Gossypol Bileşiğinin Yapısının Aydınlatılması.....	22
4.2. Rasemik Gossypol Bileşiğinin Diastereomerik Rezolüsyon Yardımıyla Enantiyomerlerine Ayrılması.....	24
4.2.1. (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı Diastereomerinin Yapısının Aydınlatılması.....	25
4.2.2. (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı Diastereomerinin Hidrolizi İle Elde Edilen (-)-Gossypol Enantiyomerinin Yapısının Aydınlatılması.....	28
4.2.3. HPLC Kromatografi Yöntemi İle Enantiyomerlerin Tanınması.....	30
4.3. Yeni (-)-Gossypol Schiff Bazlarının Sentezi ve Yapılarının Aydınlatılması.....	32
4.3.1. (-)-Gossypol <i>p</i> -toluidin Schiff Bazının Yapısının Aydınlatılması , IS-5.....	32
4.3.2. (-)-Gossypol <i>o</i> -anisidin Schiff Bazının Yapısının Aydınlatılması, IS-7.....	36
4.3.3. (-)-Gossypol 2-aminobenzil alkol Schiff Bazının Yapısının Aydınlatılması, IS-10.....	40

4.4. Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları.....	43
4.5. Moleküler Kenetleme Sonuçları.....	45
4.5.1. EGRF ile Yapılan Kenetleme Çalışması	46
4.5.2. LCK ile Yapılan Kenetleme İşlemi	50
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	60



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. DPPH Radikal Süpürme Yöntemi ile Elde Edilen % İnhibisyon Değerleri	44
Çizelge 4.2. 1M17 Hedef Proteini ile Kenetlenmiş Ligandların Autodock Vina ile Hesaplanan Bağlanma Enerjileri	47
Çizelge 4.3. 3KMM Hedef Proteini ile Kenetlenmiş Ligandların Autodock Vina ile Hesaplanan Bağlanma Enerjileri	51



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Gossypol Bileşiğinin Kimyasal Yapısı ve Enantiyomerleri	3
Şekil 1.2. Gossypolün tautomerik formları. Dialdehit 3, diketon 4, dilaktol 5	4
Şekil 1.3. Schiff Bazı Bileşiklerinin Genel Formülü	5
Şekil 1.4. Schiff Bazı Oluşumunun Reaksiyon Mekanizması	6
Şekil 1.5. Bazı doğal ve sentetik Schiff Bazlarının Yapıları.....	7
Şekil 1.6. DPPH• radikalının antioksidan ile reaksiyonu.....	9
Şekil 2.1. Gossypol bileşiğinin tautomer formları	11
Şekil 2.2. Gossypol hidrazon bileşiğinin tautomer formları	13
Şekil 3.1. Rasemik Gossypol Bileşiğinin Kimyasal Yapısı	16
Şekil 3.2. Gossypol enantiyomerlerinin ayrılma şeması.....	17
Şekil 3.3. (-)-Gossypol diastereomerinin hidrolizi ile (-)-gossypol bileşiğinin kazanılması.....	18
Şekil 3.4. (-)-Gossypol Schiff Bazlarının Sentez Şeması	20
Şekil 4.1. Rasemik gossypol bileşiğinin kimyasal yapısı	22
Şekil 4.2. Satın alınan referans gossypol (siyah) ile tarafımızca izole edilen gossypol (mavi) bileşiklerinin FT-IR spektrumları.....	23
Şekil 4.3. Rasemik gossypol bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃).....	23
Şekil 4.4. Rasemik gossypol bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu (CDCl ₃).....	24
Şekil 4.5. (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı bileşiğinin yapısı.....	25
Şekil 4.6. (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı bileşiğinin FT-IR spektrumu	26
Şekil 4.7. (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃).....	26
Şekil 4.8. (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (2.5-5.0 ppm aralığı büyütülmüş, CDCl ₃)	27
Şekil 4.9. (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (6.0-8.5 ppm aralığı büyütülmüş, CDCl ₃)	27
Şekil 4.10. (-)-Gossypol Bileşiğinin Kimyasal Yapısı.....	28
Şekil 4.11. (-)-Gossypol Bileşiğinin FT-IR Spektrumu	29
Şekil 4.12. (-)-Gossypol Bileşiğinin ¹ H NMR Spektrumu (CDCl ₃)	29
Şekil 4.13. Rasemik Gossypol Bileşiğinin HPLC Kromatogramı (Akiral kolon)	30
Şekil 4.14. Sigma Aldrich'ten satın alınan rasemik gossypol bileşiğinin diastereomerlerine ait HPLC kromatogramı	31
Şekil 4.15. Tarafımızca izole edilip saflaştırılmış olan rasemik gossypol bileşiğinin diastereomerlerine ait HPLC kromatogramı	31
Şekil 4.16. (-)-Gossypol Diastereomerinin HPLC Kromatogramı ve piklere ait alan oranları	32
Şekil 4.17. IS-5 Bileşiğinin Kimyasal Yapısı	33
Şekil 4.18. IS-5 Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR).....	33
Şekil 4.19. (a) Gossypol bileşiğinin CHCl ₃ içerisinde alınmış UV-Vis spektrumu (b)IS-5 bileşiğinin CHCl ₃ içerisinde alınmış UV-Vis spektrumu.....	34
Şekil 4.20. IS-5 Bileşiğinin ¹ H NMR Spektrumu (CDCl ₃).....	35
Şekil 4.21. IS-5 Bileşiğinin ¹³ C NMR Spektrumu (CDCl ₃).....	35
Şekil 4.22. IS-7 Bileşiğinin Kimyasal Yapısı	36
Şekil 4.23. IS-7 Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR).....	37

Şekil 4.24. (a) Gossypol bileşiğinin CHCl_3 içerisinde alınmış UV-Vis spektrumu (b) IS-7 bileşiğinin CHCl_3 içerisinde alınmış UV-Vis spektrumu.....	38
Şekil 4.25. IS-7 Bileşiğinin ^1H NMR Spektrumu (CDCl_3).....	38
Şekil 4.26. IS-7 Bileşiğinin ^{13}C NMR Spektrumu (CDCl_3).....	39
Şekil 4.27. IS-10 Bileşiğinin Kimyasal Yapısı	40
Şekil 4.28. IS-10 Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR).....	41
Şekil 4.29. (a) Gossypol bileşiğinin CHCl_3 içerisinde alınmış UV-Vis spektrumu (b) IS-10 bileşiğinin CHCl_3 içerisinde alınmış UV-Vis spektrumu.....	41
Şekil 4.30. IS-10 Bileşiğinin ^1H NMR Spektrumu (CDCl_3).....	42
Şekil 4.31. IS-10 Bileşiğinin ^{13}C NMR Spektrumu (CDCl_3).....	43
Şekil 4.32. DPPH Radikal % Süpürme Değerlerinin Antioksidan Konsantrasyonuna Karşı Grafiği.....	44
Şekil 4.33. 1M17 için Moleküler Kenetleme İşleminin Validasyonu. Mor = 1M17 ile birlikte kristallendirilmiş olan Erlotinib molekülü. Yeşil = Tarafımızca enzime kenetleme işlemi yardımıyla bağlanan Erlotinib molekülü.	47
Şekil 4.34. (-)-Gossypol Bileşiğinin 1M17 proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi.....	48
Şekil 4.35. IS-5 Bileşiğinin 1M17 proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi.....	48
Şekil 4.36. IS-7 Bileşiğinin 1M17 proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi.....	49
Şekil 4.37. IS-10 Bileşiğinin 1M17 proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi.....	49
Şekil 4.38. 3KMM için Moleküler Kenetleme İşleminin Validasyonu. Yeşil = 3KMM ile birlikte kristallendirilmiş olan inhibitör molekülü. Mor = Tarafımızca enzime kenetleme işlemi yardımıyla bağlanan inhibitör molekülü.	51
Şekil 4.39. (-)-Gossypol Bileşiğinin 3KMM proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi.....	52
Şekil 4.40. IS-5 Bileşiğinin 3KMM proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi.....	52
Şekil 4.41. IS-7 Bileşiğinin 3KMM proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi.....	53
Şekil 4.42. IS-10 Bileşiğinin 3KMM proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi.....	53

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Derece Celsius
µg	: mikrogram
mg	: miligram
g	: gram
mL	: mililitre
L	: litre
ppm	: part per million (milyon birimde bir birim)
µm	: mikrometre
Mm	: milimetre
ppm	: part per million (milyon birimde bir birim)
mmol	: milimol
ee	: enantiyomerik fazlalık

KISALTMALAR

UV-Vis	: Ultraviyole-Visible (Morötesi-Görünür)
FT-IR	: Fourier Transform Infrared
NMR	: Nükleer Magnetik Rezonans
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
EGRF	: Epidermal Büyüme Faktörü Tirozin Kinaz
LCK	: Lenfosit Spesifik Protein Tirozin Kinaz
RMS	: Karekök ortalama değeri (Root mean square)

1. GİRİŞ

Laboratuarda sentezlenmiş olan moleküllerin yanı sıra doğal ürünler, yıllardan beri, ilaç tasarımı ve geliştirilmesinde oldukça değerli birer ilham kaynağı olmuştur ve muhtemelen gelecekte de olmaya devam edecektir. Ancak kimi zaman doğal kaynaklardan izole edilen bileşikler istenen biyolojik aktiviteyi beklendiği ölçüde gösteremez veya önemli yan etkileri olabilir. Böyle durumlarda, istenen biyolojik aktiviteyi etkin bir şekilde elde edebilmek için, doğal kaynaklardan izole edilen bu moleküllerde bazı yapısal modifikasyonlar gerçekleştirilmelidir.

Bu duruma verilebilecek en klasik örnek; söğüt ağacının kabuklarından izole edilen salisilik asit bileşiğinin iyi bir ağrı kesici ve ateş düşürücü olmasına rağmen, mide çeperi için çok tahriş edici olması nedeniyle tıbbi kullanımının mümkün olmamasıdır. Ancak daha sonra fenolik –OH grubunun asetillenmesi şeklinde gerçekleştirilen kimyasal bir değişiklik sayesinde mideye salisilik asite nazaran daha az zararlı olan bir türev elde edilmiştir. Bu türev ise, bugün hala ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullandığımız ve asetil salisilik asit adıyla da bilinen Aspirinden başkası değildir.

Doğal kaynaklardan izole edilen ve ilaç tasarımı için ilham kaynağı olmuş bu tip moleküllere genel olarak **sekonder metabolit** adı verilir. Sekonder metabolitler, bitkilerin, hayvanların ve mikroorganizmaların yapılarında bulunan, bu organizmaların hayatta kalmasında, gelişmesinde ve çoğalmasında doğrudan etkili olmayıp, ancak savunma, hayatta kalma ve çevresine uyum sağlama gibi süreçlerine yardımcı olan moleküllerdir. Azotlu bileşikler, fenolik bileşikler, alkaloidler, terpenler ve tanninler olmak üzere sınıflandırılabilirler (Tiring ve ark., 2021).

Biz bu çalışmada, pamuk bitkisinin tohumlarında sekonder metabolit olarak bulunan gossypol bileşiğini rasemik karışım olarak izole ettikten sonra, bu karışımı diastereomerik rezolüsyon yardımıyla enantiyomerlerine ayırdık. Daha sonra literatürde biyolojik aktivitesi daha yüksek olduğu bilinen (-)-gossypol enantiyomerini primer aminlerle reaksiyona sokarak bis-Schiff bazı türevlerini sentezledik, yapılarını fiziksel ve spektroskopik yöntemler aracılığıyla aydınlattık ve sentezlemiş olduğumuz bu kiral bileşiklerin antioksidan aktivitelerini DPPH radikal süpürme yöntemi ile, antikanser aktivitelerini ise moleküler kenetleme yöntemiyle inceledik.

1.1. Gossypol: Bir Sekonder Metabolit

Pamuk bitkisinin tohumlarından elde edilen fenolik bileşik gossypol, bitkinin mantarlar, böcekler vb. tehlikelerden korunmak için bir savunma aracı olarak kullandığı bir sekonder metabolittir. İlk kez 19. yy'da Longmore ve Marchlewski tarafından bulunan bu fenolik bileşiğin önceleri bir boyar madde olarak kullanımı önerilmiş ve daha sonra ışıktta kararsız olduğu farkedilmiştir (Kenar, 2006).

Bu yıllarda yapılan araştırmalar, gossypol bileşiğinin, pamuk tohumu küspesinin toksik etkisinden sorumlu olabileceğini ve küspenin hayvan yemi olarak kullanılmasının tehlikeli olduğunu ortaya koymuştur. 1938-1941 arasında yaptıkları çalışmalar ile bileşiğin yapısını aydınlatan Adams ve arkadaşlarının ardından 1958'de Edwards, gossypol bileşiğini sentetik olarak üretmiştir. Bileşiğin yapısı ve özellikleri eksiksiz bir şekilde belirlendikten sonra, araştırmacılar pamuk yağının ve küspesinin kalitesini arttırmak için gossypol ve benzeri bileşikler uzaklaştırmanın yollarını aramaya başladılar (Kenar, 2006).

1960'lı yıllarda ise, gossypol bileşiğinin sitotoksik aktivitesi ve antitümör özelliği ortaya konmuş ve bu durum, bilim insanlarının gossypol bileşiğine olan bakış açılarını büyük ölçüde değiştirmeye başlamıştır. Yavaş yavaş gossypol bileşiğinin antikanser aktivitesini araştıran çalışmalar ortaya çıkmaya başlamıştır. Ancak Çinli bilim insanları, 1978 yılında, ağız yoluyla alındığında gossypolün erkeklerde kısırlığa yol açtığını bildirdiler. Bu tesadüfi keşif önceleri bileşiğin kontraseptif amaçlarla kullanılabileceği umudunu doğurmuş olsa da, sonrasında bu konuyla ilgili yapılan çok sayıda araştırma bileşiğin tehlikeli yan etkilere sahip olduğunu gösterdi. Bileşiğin toksisitesini azaltıp terapötik etkinliğini artırmak amacıyla gerçekleştirilen çok sayıda çalışma yeni gossypol türevlerinin sentezlenmesini ve bu gossypol türevlerinin büyük bir kısmının antikanser, antiparazitik, anti-HIV ve antimalaryal etkisi olduğunu ortaya koydu (Kenar, 2006).

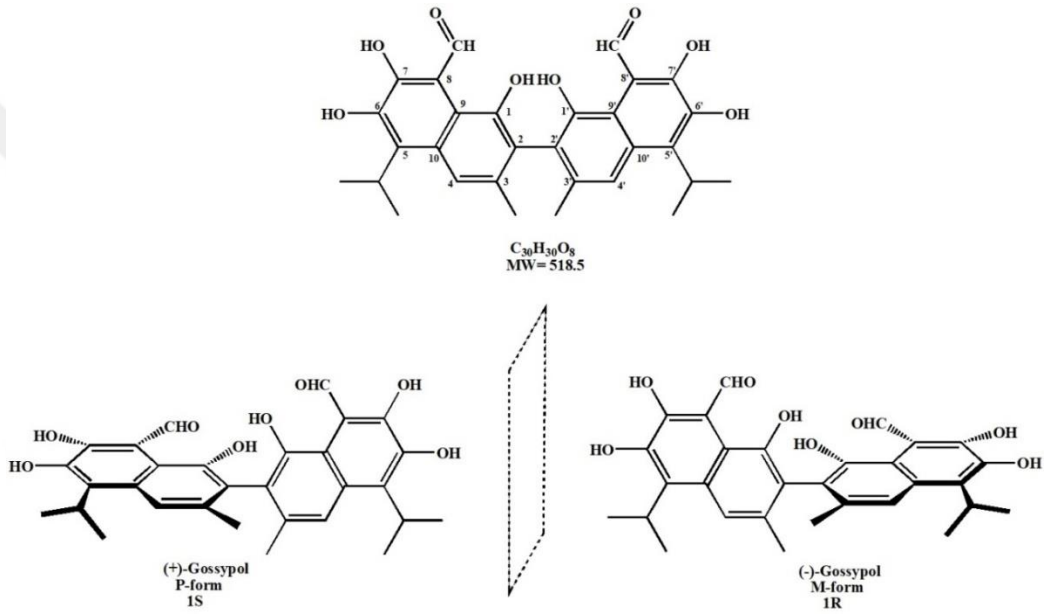
1.1.1. Gossypol Bileşiğinin Yapısı ve Stereokimyası

Gossypol bileşiği [1,1',6,6',7,7'-heksahidroksi-5,5'-diizopropil-3,3'-dimetil-(2,2'-binaftalen)-8,8'-dikarboksaldehit],

Şekil 1.1'de görüldüğü üzere iki naftalin halkasından oluşmaktadır. Bu iki naftalin halkası birbirine 2 ve 2' karbon atomları arasındaki bir sigma bağı aracılığı ile bağlıdır.

Bileşikteki 3,3'-metil ve 1,1'-hidroksil sübstitüentleri, naftil halkaları arasındaki 2 ve 2' konumları etrafında sterik bir kalabalığa yol açar ve bu bağın etrafındaki serbest dönme hareketini engeller. Bu durum, atropizomerizm adı verilen bir stereoizomeriye yol açar.

Şekil 1.1'de görüldüğü üzere C_2 simetrik gossypol enantiyomerleri ortaya çıkar. Gossypol molekülünün (-)- ve (+)- enantiyomerleri, sırasıyla R-Gossypol (M formu) ve S-Gossypol (P formu) konfigürasyonlarına denk gelmektedir. Pamuk bitkisinin tohumlarında her iki enantiyomer de bulunur, ancak birbirlerine göre bağıl oranları değişkenlik gösterir (Kenar, 2006).

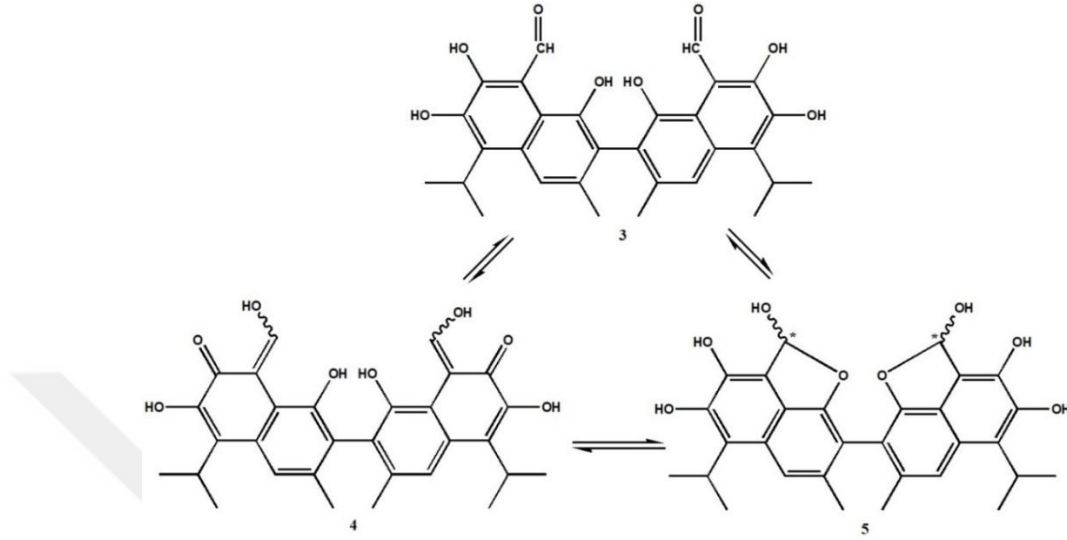


Şekil 1.1. Gossypol Bileşiğinin Kimyasal Yapısı ve Enantiyomerleri

Molekülde 1,1' konumlarında bulunan hidroksil grupları 6,6' ve 7,7' konumlarında yer alan hidroksil gruplarına göre daha reaktiftirler. Ayrıca 1 ve 1' konumlarında bulunan hidroksil grupları, 8 ve 8' konumlarında bulunan komşu aldehit oksijenleri ile molekül içerisinde doğal olarak hidrojen bağı yaparlar ve bu durum molekülün kimyasal yapısına zenginlik katar. Ayrıca aldehit grupları, gossypol bileşiğinin tautomerik formlarından ve toksisitesinden sorumludur (Kenar, 2006).

Yapılan çalışmalar gossypol bileşiğinin karmaşık bir reaksiyon kimyasına sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bunun da en önemli sebeplerinden birisi olarak bileşiğin çeşitli tautomerik yapılaraya sahip olmasıdır. Nitekim, bileşiğin önemli özelliklerini, kimyasal reaktivitesini ve bozunma ürünlerini açıklayan üç ana tautomerik yapı, Adams

ve ark. tarafından ortaya konmuştur. Bu üç adet tautomerik yapı keton (kinoid), aldehit ve laktol (hemiasetal) formu (Şekil 1.2) olarak gösterilmiştir (Adams ve Ark., 1938; Adams ve Ark., 1939; Adams ve Ark., 1960).



Şekil 1.2. Gossypolün tautomerik formları. Dialdehit 3, diketon 4, dilaktol 5

1.1.2. Gossypol Bileşiğinin Biyolojik Aktivitesi

Çin’de, özellikle kırsal kesimlerde, 1950’li yıllarda pamuk yağı kullanımına bağlı olarak doğum oranlarında düşme ve kısırlık vakaları görülmeye başlandı. Sonrasında yapılan pek çok çalışma, pamuk tohumlarında bulunan gossypol bileşiğinin memeli canlılarda kısırlığa neden olabileceğini doğrulamıştır. Gossypol bileşiği steroidal bir yapıda olmadığından doğrudan hormonlar üzerinde bir etkisi yoktur. Ancak bir enzim sistemini inhibe ederek, erkeklerde sperm üretimini ve sperm hareketliliğini engeller. Bu ve bunun gibi yan etkiler, gossypol bileşiğine olan bilimsel ve tıbbi ilginin o yıllarda bir süreliğine azalmasına neden oldu. (Qian ve Wang, 1984).

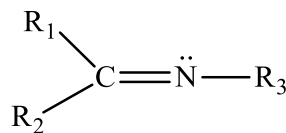
Ancak daha sonra, fenolik yapıdaki bu bileşiğin hem antioksidan özelliği hem de antitümör aktivitesi olduğunu ortaya koyan çok sayıda çalışma, bileşiği görünür kıldı (Keshmiri ve Negab, 2014). Yapılan çalışmalar, gossypolün göğüs, bağırsak ve prostat kanser hücrelerinin büyümesini durdurabildiği ve özellikle (-)-gossypol enantiyomerinin (+)-gossypol enantiyomerine nazaran daha etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bileşiğin kansere karşı olan etkisinin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, hücre apoptozisini uyardığı düşünülmektedir. Apoptozis “programlanmış hücre ölümü”

demektir. Bu, vücudun kendini onarılamayacak derecede hasar görmüş, anormal ve kullanılmayan hücrelerden kendini kurtarma yoludur. Yapılan çalışmalar, gossypol bileşiğinin apoptotik mekanizmasının antiapoptotik Bcl ailesi proteinlerin inhibisyonuyla ilgili olduğunu ortaya koymuştur (Liu ve ark., 2022). Lu ve ark., sentezledikleri bazı (-)-gossypol Schiff bazı türevlerinin, antiapoptotik Bcl-2 ve Mcl-1 proteinlerine karşı potansiyel inhibitör olarak rol oynayabileceklerini ortaya koymuşlardır (Lu ve ark., 2016). Zhang ve ark. ise (-)-gossypol bileşiğinin, antiapoptotik proteinler Bcl-X_L ve Bcl-2'nin heterodimerizasyonunu inhibe ederek, insan prostat kanser hücreleri (PC-3) üzerinde apoptozisi uyardığını bildirmişlerdir (Zhang ve ark., 2007). Bunlara ek olarak (-)-gossypol ve türevi bileşiklerin Anti-HIV, Anti-HSV (Herpes simplex virüsü), anti-parazitik, anti-malaryal (sıtmaya karşı) ve anti-enflamatuar olmak üzere çok sayıda biyolojik aktivite potansiyeline sahip önemli bir bileşik olduğunu ortaya koyan çalışmalar, bileşiğe olan ilginin zamanla artmasına neden olmuşlardır (Liu ve ark., 2022).

Gossypol bileşiğinin yan etkilerini ve toksisitesini azaltmak için pek çok türevlendirme çalışması yapılmıştır. Bunlar arasında, halojen türevleri, gossylik nitril türevleri, organik asit türevleri, azo türevleri, gossypolon türevleri, gossypol eter türevleri, gossypol ester türevleri, gossypolik asit türevleri, apogossypol türevleri ve özellikle Schiff baz türevleri sayılabilir (Liu ve ark., 2022). Biz de tez çalışmamızda, (-)-gossypol bileşiğini Schiff bazı türevlerini sentezleyerek modifiye etmeyi amaçladık.

1.2. Schiff Bazları

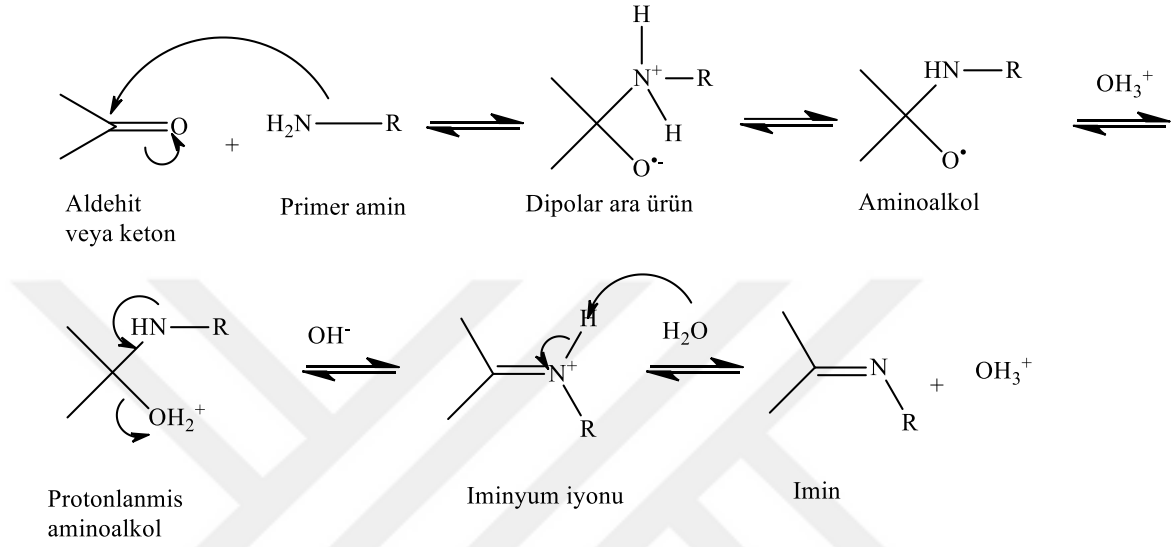
İsmini kimyager Hugo Schiff'ten alan Schiff bazları, bir primer aminin bir aldehit veya keton ile özel şartlar altında kondenzasyon reaksiyonu sonucu oluşurlar. Yapısal olarak, Schiff bazları (imin veya azometin olarak ta bilinirler) karbonil grubunun bir imin (veya azometin) grubu ile yer değiştirmiş olduğu yapılar (Şekil 1.3), yani aldehit veya ketonların azot analoglarıdır (Silva ve ark., 2011).



R₁, R₂ ve/veya R₃ = Alkil ve/veya Aril

Şekil 1.3. Schiff Bazı Bileşiklerinin Genel Formülü

İmin bileşiklerinin oluşum reaksiyonu bir karbinolamin ara ürününün oluştuğu geri dönüşümlü katılma basamağıyla başlar, daha sonra hız belirleyici basamakta su ayrılması gerçekleşerek imin yapısı oluşur. Ayrılan su genellikle sistemden kaldırıldığı için dengenin ürünlere doğru kaymasını sağlar (Şekil 1.4).

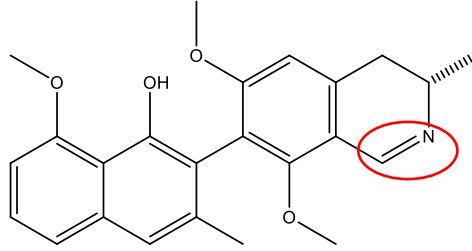


Şekil 1.4. Schiff Bazı Oluşumunun Reaksiyon Mekanizması

Reaksiyon hızı pH değerine karşı hassastır: ortalama miktardaki asit katalizör reaksiyonu hızlandırırken, aşırı asit reaksiyonu engeller. Çok düşük pH değerinde reaksiyon hızının düşmesi aminin protonlanmasından kaynaklanır. Bu durum, karbonile nükleofilik atağın gerçekleşmesini engeller. Katalitik miktardaki asit ise, karbonil grubunu protonlayarak, nükleofilik atağı kolaylaştırır. Reaksiyon aynı zamanda primer aminlerin varlığında asit katalizöre gerek kalmadan da gerçekleşebilir (Silva, 2020).

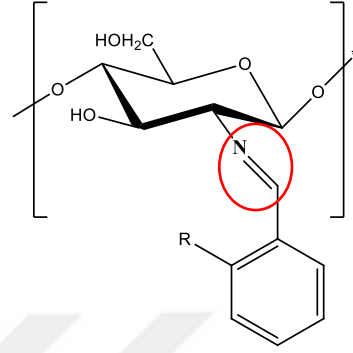
Schiff bazları, en yaygın olarak kullanılan organik bileşiklerdir. Pigment, boya, katalizör, organik sentezlerde ara ürün ve polimer stabilizatörü olmak üzere çok sayıda kullanım alanına sahiptir. Schiff bazları aynı zamanda, antifungal, antibakteriyel, antimalaryal, antiproliferatif, antiinflamatuvar, antiviral ve antipiretik olmak üzere çok sayıda biyolojik aktiviteye de sahip olma potansiyeli göstermektedir. İmin veya azometin grupları çok sayıda doğal, doğal kaynaklı ve doğal olmayan organik bileşiğin yapısında bulunur (Şekil 1.5). Bu tip bileşiklerde bulunan imin grubunun, biyolojik aktiviteye önemli bir katkısı olduğu da gösterilmiştir (Silva ve ark., 2011).

Doğal kaynaklı veya sentetik olsun, ilaç olarak tasarlanmış olan moleküllerin biyolojik aktivitelerinin tayini için geliştirilmiş pek çok yöntem bulunmaktadır. Bilgisayar destekli yöntemler de bunlardan bir tanesi olarak son yıllarda ön plana çıkmaktadır.



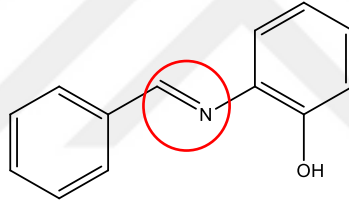
Ancistrocladidine (Anti-sıtma)

Doğal ürün



R= -H veya -OH, Kitosan türevi
(Antifungal)

Doğal kaynaklı



N-Salisiliden-2-hidroksianilin

(Antibakteriyel)

Sentetik

Şekil 1.5. Bazı doğal ve sentetik Schiff Bazlarının Yapıları

1.3. Antioksidanlar

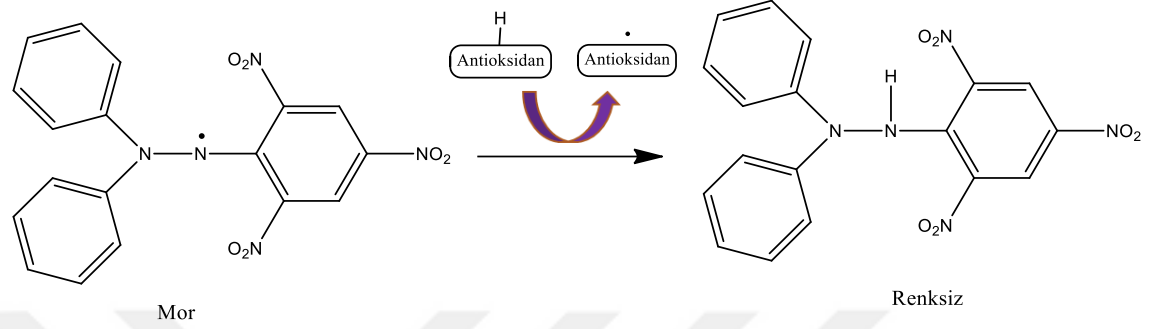
Serbest radikaller biyolojik sistemlerin içerisinde kaçınılmaz olarak üretilen ve aynı zamanda dış ortam aracılığıyla karşılaşılan, mutasyon, kanser, kardiyovasküler rahatsızlıklar ve yaşlanma gibi dejeneratif bozukluklara sebep olan türlerdir. Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren oldukça reaktif ve çok kararsız yapılardır. Fiyolojik veya patolojik koşullarda oluşabilen bu türlere reaktif klor türleri, reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) örnek olarak gösterilebilirler. Bu kararsız türler, canlı bir organizmada hücresel seviyede oksidatif

hasara sebep olarak pek çok hastalığa yol açabilirler. Bu nedenle serbest radikalleri yok edecek antioksidanların üretilmesi önemlidir. Antioksidanlar, serbest radikallerin yol açtığı oksidatif prosesin üç ana aşaması olan başlama (initiation), propagation (ilerleme) ve sonlanma (termination) basamaklarının herhangi birine müdahale ederek serbest radikallerle savaşabilen bileşiklerdir. Antioksidanlar aynı zamanda, biyolojik sistemler tarafından üretilen ve pek çok gıdada doğal olarak bulunan, oksidan ve antioksidan arasındaki dengeyi sağlayan bileşiklerdir (Kedare ve Singh 2011). Polifenoller, karotenoidler, E vitamini ve C vitamini bilinen en önemli ve en güçlü doğal kaynaklı antioksidan yapılarıdır. Bunların yanı sıra var olan doğal antioksidan bileşikler model alınarak veya bu bileşikler üzerinde modifikasyonlar yapılarak, daha güçlü biyolojik aktivitelere sahip moleküllerin geliştirilmesi ile ilgili çok sayıda çalışma da yapılmaktadır. Örneğin, tokoferoller olarak ta bilinen E vitamininin bir türevi olan α -tokoferil süksinatlar, E vitamininin fenolik oksijeninin bir dikarboksilik asitle esterifikasyonu sonucu elde edilmiş bir yapıdır. Yapılan çalışmalar, yapılan bu modifikasyonla, E vitamini türevi α -tokoferil süksinatın radikal inhibisyon aktivitesinin baskılandığını ancak buna karşılık DNA sentezini durdurarak ve apoptozisi uyararak antikanser aktiviteye sahip yeni bir bileşik olarak karşımıza çıktığını göstermiştir (Augustyniak ve ark., 2010). Canlı organizmalar için bu denli önemli bir işleve sahip olan antioksidanların tayin yöntemleri de oldukça önemlidir. Çok sayıda tayin yöntemi bulunmaktadır:

- 1) Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi Yöntemi (ORAC)
- 2) Toplam Radikal Yakalayıcı Parametre Yöntemi (TRAP)
- 3) Krosin Beyazlatma Yöntemi
- 4) Toplam Oksiradikal Söndürme Kapasite Yöntemi (TOSC)
- 5) Elektron Transfer Yöntemleri (ET)
- 6) Folin-Ciocalteu Ayırıcı ile Toplam Fenolik Yöntemi (FCR)
- 7) Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite Yöntemi (TEAC)
- 8) Oksidan Olarak Cu (II) Kullanılan Toplam Antioksidan Kapasite Yöntemi (CUPRAC)
- 9) 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi

Bu yöntemlerden DPPH Radikal Süpürme yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. DPPH, koyu mor renkli ve kararlı bir azot radikalidir. DPPH radikali bir antioksidan ile

karıştırıldığında, rengi mordan sarıya döner (Şekil 1.6). Antioksidanların DPPH•'ı indirgeme kabiliyetleri, 515-528 nm'deki absorbansın azalması izlenerek değerlendirilebilir. Sonuçlar IC₅₀ olarak veya DPPH• süpürme yüzdesi olarak verilir (Xiao ve ark., 2020).



Şekil 1.6. DPPH• radikalinin antioksidan ile reaksiyonu

1.4. Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı (Computer Aided Drug Design, CADD), ilaç tasarımının farklı aşamalarına yardımcı olacak aletler ve teknikler sağlayarak, ilaç araştırma alanı için gerekli olan uzun süreleri ve büyük maliyetleri düşürmeyi sağlayan önemli bir alandır. CADD'nin teorik temeli moleküler mekanik, kuantum mekaniği, moleküler dinamik, yapı tabanlı ilaç tasarımı, ligand tabanlı ilaç tasarımı, homoloji modelleme, moleküler kenetleme (docking), farmakofor modelleme, kantitatif yapı-etki ilişkileri ve ADMET (absorpsiyon, dağılım, metabolizma, eliminasyon ve toksisite) tahmini gibi yöntemlere dayanmaktadır. Moleküler kenetleme, sıklıkla başvurulan bir ilaç tasarım metodu olarak son yıllarda ön plana çıkmaktadır.

1.4.1. Moleküler Kenetleme (Docking)

Moleküler kenetlenme, iki veya daha fazla sayıda birbiriyle etkileşen molekülden oluşan komplekslerin yapılarının hesaplamalı (computational) modellemesidir. Yöntem, rasyonel ilaç tasarımında önemli bir rol oynar ve üç boyutlu yapıların tahminine dayalıdır. Aslında moleküler kenetlemenin amacı, hem ligandın (ilaç adayı), hem de proteinin (enzim, reseptör gibi ilaç hedefleri) optimize edilmiş konformasyonlarını biraraya

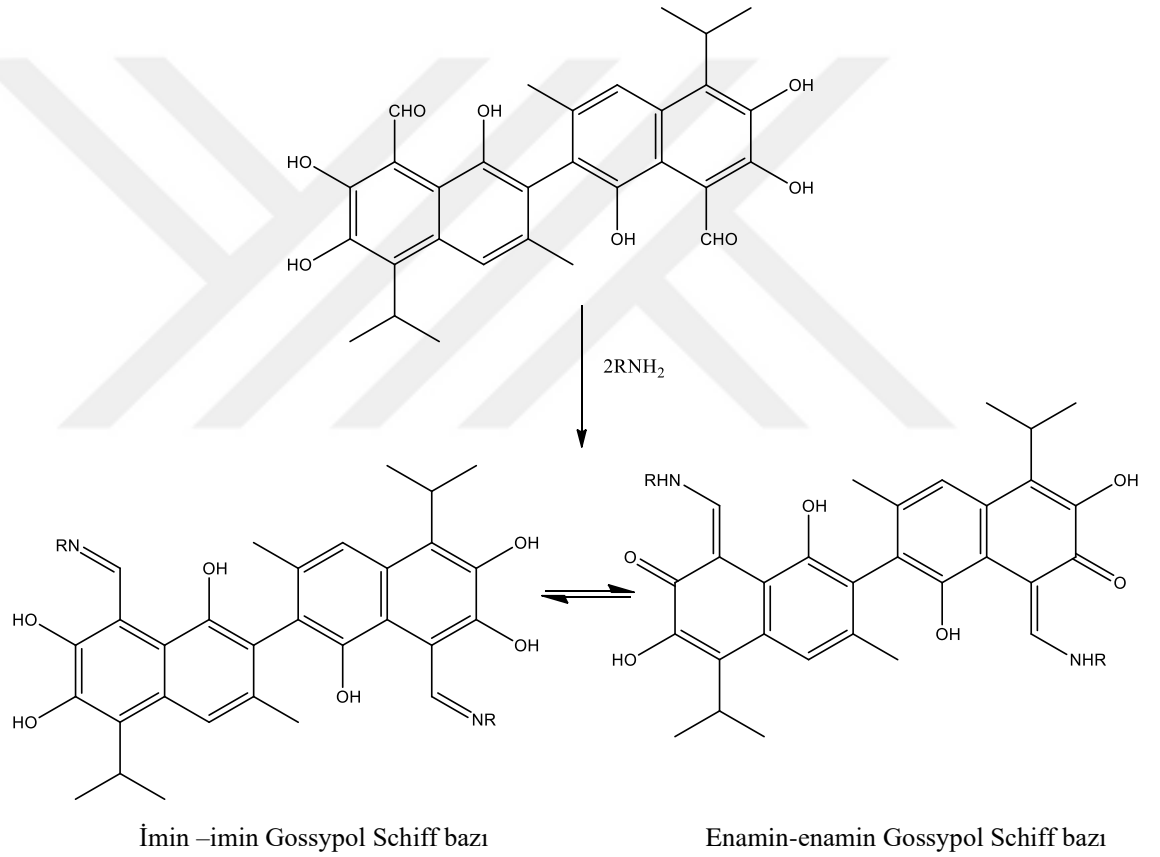
getirerek, tüm sistemin enerjisi minimum olacak şekilde, bu iki yapının birbirlerine göre optimum oryantasyonlarının bulunmasını sağlamaktır.

Moleküler kenetleme yaklaşımı, atomik seviyede hedef proteinlerin aktif bağlanma bölgesi ve küçük moleküller arasındaki etkileşmeyi modellemek için kullanılabilir. Bu da bize hedef proteinlerin bağlanma bölgesinde küçük moleküllerin nasıl davrandığını ve temel biyokimyasal prosesleri karakterize edebilme şansını sağlar. Kenetleme işlemi iki temel aşamadan oluşur: Ligandın aktif bağlanma bölgesindeki konformasyonunun, pozisyonunun ve oryantasyonunun tahmini ve bağlanma ilgisinin değerlendirilmesi.

İşleme başlamadan önce aktif bağlanma bölgesinin konumunun bilinmesi kenetleme etkinliğini önemli ölçüde artırır. Çoğu durumda, bu bölge bilinir. Ancak aynı zamanda, hedef protein ailesiyle benzer fonksiyonlara sahip proteinlerle veya proteinle birlikte kristallendirilmiş ligandlarla karşılaştırma yapılarak ta bağlanma bölgesi hakkında bilgi edinilebilir. Bu tarz bir bilgiye erişilemiyorsa, bağlanma bölgesini belirleyebilen bazı programlar ve çevrimiçi servisler de mevcuttur. Aktif bağlanma bölgesi bilinmeden yapılan kenetleme işlemine ise “kör kenetleme (blind docking)” adı verilir (Meng ve ark., 2011).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Razakantoanina ve ark. (2000) yılında gerçekleştirmiş oldukları çalışmada gossypol bileşiğinin tautomerik formlarını incelemişlerdir. Bu çalışma göstermiştir ki; gossypol bileşiğinin aldehit grubu serbest amino gruplarına kolayca bağlanarak gossypol Schiff bazlarını oluşturabilir. Gossypol Schiff bazları iki tautomerik formda bulunabilirler, enamin-enamin tautomeri ve imin-imin tautomeri (Şekil 2.1). İmin-imin tautomeri, yalnızca protonlanmış Gossypol Schiff bazlarında görünür, gossypole göre düşük toksisite ve daha iyi biyolojik aktivite gösterir.



Şekil 2.1. Gossypol bileşiğinin tautomer formları

Genellikle gossypol Schiff bazlarının sentezi ile ilgili yapılan çalışmalar, daha yüksek antikanser aktiviteye sahip yeni nesil gossypol türevlerinin elde edilebileceği potansiyelini sunmaktadır.

Zhang ve ark. (2009) çalışmalarında, sentezledikleri gossypol Schiff bazı türevlerinin epitelyal rahim kanseri hücreleri HeLa, kötü huylu beyin glioma hücreleri

U87 ve mide kanseri hücreleri M85 üzerindeki antikanser aktivitelerini incelediklerinde, (-)-türevlerin karşılık gelen (+)-türevlere göre daha etkin olduğunu gözlemlemişlerdir. Hatta bazı türevlerin, (-)-gossypolün kendisinden ve klinikte aktif olarak kullanılan kanser ilacı cisplatine göre daha etkin olduklarını bile bildirmişlerdir. Yine bu çalışmada, hidrofilik sübstitüentlerin aktiviteyi arttırdığını ve hacimli sübstitüentlerin ise aktiviteyi düşürdüğüne dair gözlemlerde bulunmuşlardır.

Yang ve ark. (2012) gerçekleştirmiş oldukları çalışmada, gossypol bileşiğindeki aldehit gruplarını L-triptofan, L-alanin, 2-amino-izobütirik asit, L-valin ve L-izolösin gibi amino asitlerle yer değiştirdiklerinde sitotoksitenin azaldığını ve HIV-1 ve H5N1 virüslerine karşı etkinliğin arttığını bildirmişlerdir,

Yang ve ark. (2013) çalışmalarında, amino asitlerle modifiye edildiklerinde, daha az aktif olan kiral gossypol bileşiğinin daha aktif kiral gossypol Schiff baz türevlerine dönüştürülebildiğini bildirmişler ve yeni türevlerin Kuş gribi olarak ta bilinen H5N1 virüsüne karşı etkin olduklarını gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada antikanser aktiviteden farklı olarak (+)-enantiyomer türevlerinin daha etkin oldukları bildirilmiştir. Kiralite ve sübstitüentlerin türü, aktiviteyi etkileyen önemli faktörlerdir.

Yang ve ark. (2014) sentezledikleri gossypol Schiff bazı türevlerinden yola çıkarak, gossypol bileşiğindeki aldehit gruplarının oligopeptitler ve D-glukozaminle yer değiştirilmesi sonucu gossypolün sitotoksitesinin azaldığını ve anti-HIV aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir. Bu bileşiklerin, hedef hücredeki HIV-1 IIIB girişini kapatmak suretiyle antiviral aktivite gösterdikleri düşünülmektedir.

Razakantoanina ve ark. (2000) sentezledikleri 13 adet gossypol Schiff bazı türevinin klorokine dirençli ve sıtmaya sebep olan bir parazit Plasmodium falciparum'un iki adet suşuna karşı etkin olduklarını gözlemlemişlerdir.

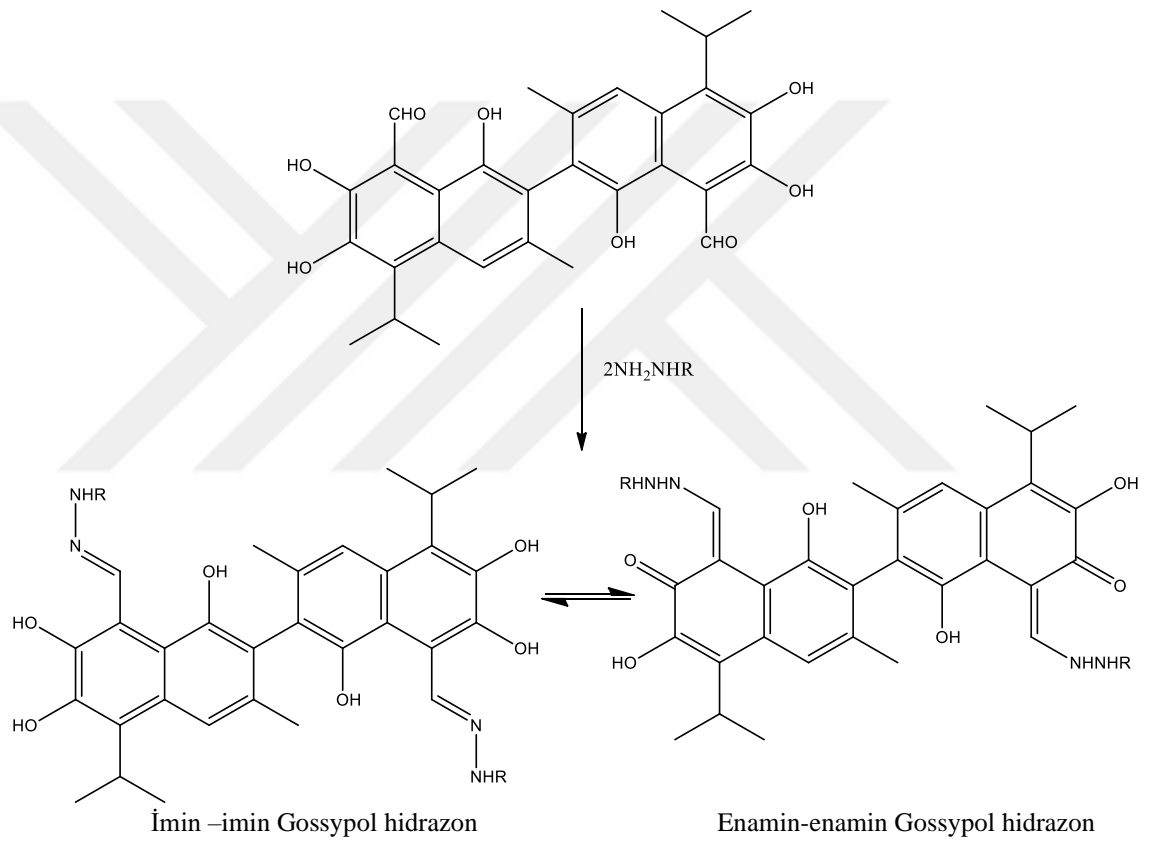
Liang ve ark. ise (1995) Schiff bazı yapısının gossypolün antitümör aktivitesini arttırdığını, özellikle izopropilamin sübstitüentinin (-)-gossypole göre daha yüksek etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Matamoros ve ark. (2019) çalışmalarında, Şekil 2.2'de gösterilen gossypol hidrazon bileşiğinin tautomer formları üzerinde incelemelerde bulunmuşlardır. Gossypol hidrazon bileşiği çözeltide her iki tautomere sahipken, katı halde sadece imin-imin formunda bulunur.

Przybylski ve ark. (2009) gossypol hidrazon türevlerinin antibakteriyel aktivitelerini incelediklerinde, oksaalkil zincir uzunluğunun aktiviteyi azalttığını tespit etmişlerdir.

Ilkevych ve ark. ise (2012) çalışmalarında gossypol hidrazonların gossypol bileşiğinden daha iyi bir antioksidan aktiviteye sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Vu ve ark. (2017) bir (-)-gossypol hidrazon türevinin karaciğer (hepatocellular carcinoma, HepG2), akciğer kanseri (LU1) ve meme kanserine (MCF-7) karşı oldukça etkin olduğunu gözlemlemişlerdir.



Şekil 2.2. Gossypol hidrazon bileşiğinin tautomer formları

Beyazit ve ark. (2020) yayınlanan çalışmalarında, düşük ve yüksek molekül ağırlıklı kitosanı (-)-gossypol ile modifiye ederek, kitosanın antioksidan aktivitesinin arttığını göstermişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Gossypium hirsutum (pamuk) bitkisinin tohumları, 2019 Haziran ayında Hatay'ın Amik bölgesinden, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Yaşar Akışcan gözetiminde toplandı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Gossypol bileşiğinin bitkiden izolasyonu, diastereomerik rezolüsyon, kromatografi, Schiff bazlarının sentezi ve antioksidan aktivite çalışmaları için Merck ve Sigma-Aldrich firmalarından temin edilen *n*-hekzan, aseton, asetik asit, petrol eteri, dietil eter, metanol, kloroform, etanol, 2-propanol, asetonitril, dimetilsülfoksit, *N,N*-dimetil formamit isimli organik çözücüler kullanıldı. Diastereomerik rezolüsyon için kullanılan *L*-triptofan metil ester HCl, referans standart olarak yararlanılan rasemik gossypol, HPLC analizleri için kullanılan *R*-2-amino-1-propanol, KH₂PO₄, Schiff bazlarının sentezi için kullanılan *p*-toluidin, *o*-anisidin ve 2-amino benzil alkol ve antioksidan aktivitenin tayininde kullanılan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Sigma-Aldrich firmasından satın alındı.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

İzole edilen ve sentezlenen bileşiklerin erime noktaları Thermo Scientific 9100 erime noktası tayin cihazı ile belirlendi. Çalışmalar sırasındaki ısıtma ve karıştırma işlemleri için bölümümüzdeki Are marka cihaz kullanıldı. Çalışmalar sırasında pamuk tohumlarının öğütülmesi için, IKA LABORTECHNIK A10 marka değirmen kullanıldı. Kurutma işlemleri için bölümümüzdeki Miprolab marka etüvden faydalandı. Heidolph marka HEI-VAP Advantage HL/G1 model Rotary Evaporatör cihazı, çözücülerin buharlaştırılması ve yeniden kazanılması amacıyla kullanıldı. Sentezlemiş olduğumuz Schiff bazlarının karakterizasyonu için, bölümümüzde bulunan Perkin Elmer Spectrum Two with U-ATR model FT-IR cihazından ve OPTIZEN α model UV-Vis spektrometre cihazından yararlandı. Aynı UV-Vis Spektrometre cihazı, antioksidan aktivite tayini

çalışmalarında da kullanıldı. İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nde bulunan Bruker Advance III HD Model NMR cihazından, sentezlenen Schiff bazlarının yapı tayini için yararlandı. HPLC analizleri için üniversitemizdeki Shimadzu marka PROVINENCE SPDM-20A model HPLC cihazı ve Inertsil (5µm, ODS-3, 4.6-250 mm) ters faz kolonundan yararlandı. Karbon, hidrojen ve azot yüzdelerini belirlemek amacıyla üniversitemizde bulunan THERMO SCIENTIFIC Flash 2000 Model cihaz kullanıldı. Sentezlenen ve izole edilen kiral bileşiklerin optik çevirme açılarının ölçülmesi amacıyla bölümümüzde bulunan WZZ-2S(2SS) marka Dijital Otomatik Polarimetre cihazı kullanıldı.

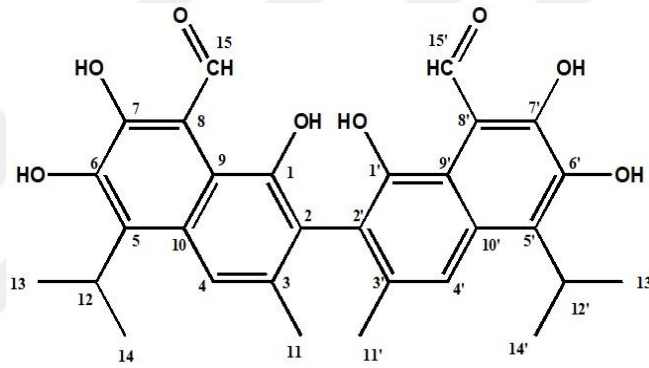
Moleküler kenetleme işlemleri için, Hewlett Packard marka Intel Core i5, 8th Gen dizüstü bilgisayar kullanıldı. Kenetleme işleminde kullanılan ligand bileşiklerin üç boyutlu yapıları Avogadro programı 1.2.0 versiyonu kullanılarak oluşturuldu. Bu programdan aynı zamanda bileşiklerin geometri optimizasyonları için de yararlandı (Hanwell ve ark., 2012). Protein ve ligandların, moleküler kenetleme işlemine hazırlanması için PyMol 2.4.0 (Schrödinger 2020; Schrödinger Release 2021) ve Maestro 13.0 (Schrödinger, LLC New York, ABD) yazılımları kullanıldı. Moleküler kenetleme işlemi Autodock Vina 1.2.0 yazılımı ile gerçekleştirilirken (Trott ve Olson, 2010; Eberhardt ve ark. 2021), sonuçların görselleştirilmesi için Biovia Discovery Studio 2020 kullanıldı (Dassault Systèmes, San Diego, ABD).

3.2. Yöntem

3.2.1. Rasemik Gossypol Bileşiğinin Pamuk Tohumlarından İzolasyonu

Gossypol bileşiği ısı ve UV ışığından etkilendiğinden dolayı, çalışmalar karanlık ortamda yapıldı (Nomeir ve Abou-Donia, 1985). Değirmende öğütülerek toz haline getirilen pamuk tohumları (500g), öğütülür öğütülmez hızlı bir şekilde koyu renkli bir şişeye alındıktan sonra üzerine yaklaşık 4L hekzan eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 4-5 gün süresince bekletildi. Bu şekilde pamuk yağı hekzana geçer ve apolar kısım bertaraf edilmiş olur. 5 gün sonra pamuk tohumları süzülerek hekzandan kurtarıldı. Pamuk yağından kurtarılmış olan tohumlar yine aynı şekilde koyu renkli bir şişeye alınarak 4 L aseton varlığında ve karanlıkta 4-5 gün boyunca bekletildi. 5 gün sonra aseton ekstresi süzülerek pamuk tohumlarından kurtarıldı. Gossypol bileşiği aseton

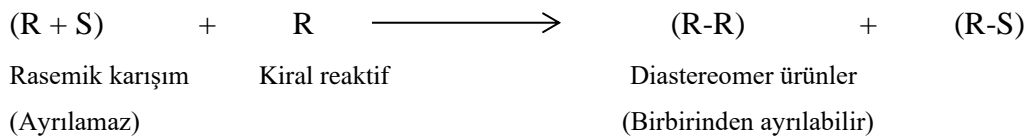
içerisinde iyi çözünmektedir. Aseton ekstresinin yarısı döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldıktan sonra, kalan hacmin 1/3'ü kadar glasiyal asetik asit eklendi ve karanlık gossypol-asetik asit kompleksi çökünceye kadar uzun bir süre bekletildi. Çöken gossypol-asetik asit kompleksi süzülerek asetondan kurtarıldı, 150 ml dietil eter içinde çözülerek, yıkama sularının pH değeri nötral olana kadar saf su ile yıkandı ve böylece gossypol kristalleri asetik asitten ayrıştırılmış oldu. Daha sonra eter döner buharlaştırıcıda buharlaştırılarak, kalan kısım dietil eter – petrol eteri karışımından kristallendirildi ve böylece 1 g rasemik gossypol elde edildi. Standart referans olarak temin edilen gossypol bileşiğinin FT-IR spektrumu ile karşılaştırılarak, bitkiden izole edilen rasemik gossypolün yapısı (Şekil 3.1) doğrulandı (Shelley ve ark. 1999).



Şekil 3.1. Rasemik Gossypol Bileşiğinin Kimyasal Yapısı

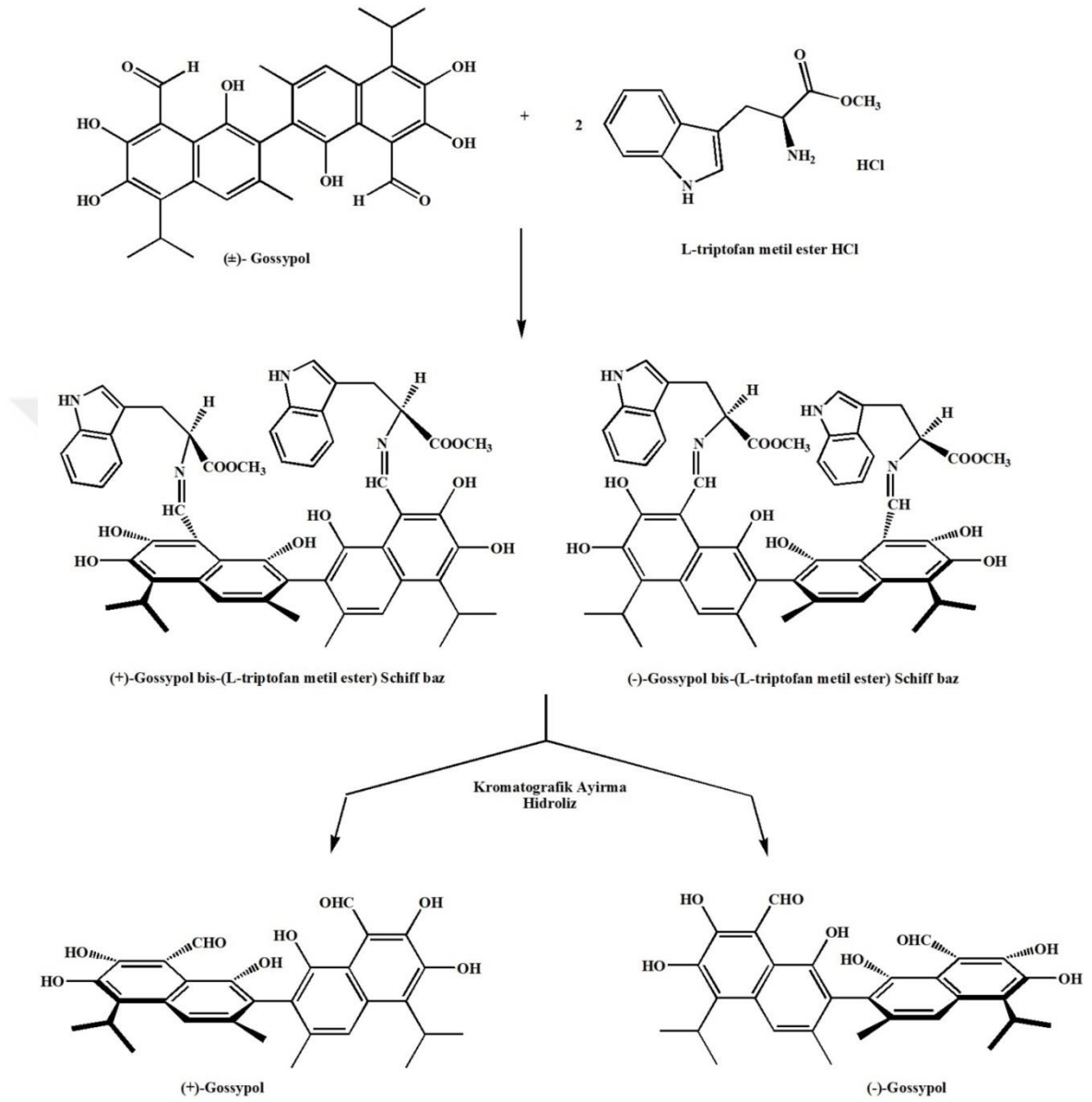
3.2.2. Rasemik Gossypol Bileşiğinin Enantiyomerik Olarak Saflaştırılması (Diastereomerik Rezolüsyon)

Bu çalışmada rasemik karışımı oluşturan enantiyomerler, kiral bir reaktif ile reaksiyona sokularak diastereomerlerine dönüştürülme vasıtasıyla ayrıldılar.



Kiral reaktif olarak L-triptofan metil ester HCl kullanıldı. Rasemik gossypol ile L-triptofan metil ester HCl reaksiyona sokulduğunda, oluşan diastereomerlerden (+)-

gossypol L-triptofan Schiff bazı metanolde çözünürken, (-)-gossypol L-triptofan Schiff bazı metanolde çökmektedir (Şekil 3.2) (Jiang ve ark. 2007; Nhung ve ark., 2018).



Şekil 3.2. Gossypol enantiyomerlerinin ayrılma şeması

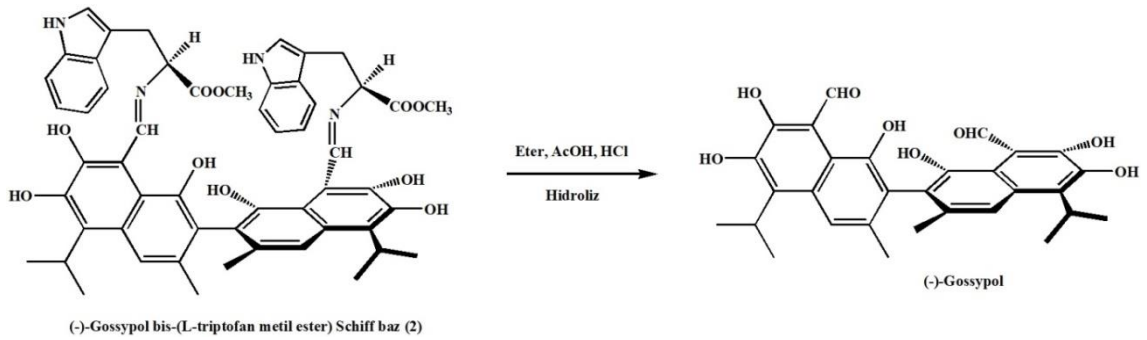
3.2.2.1. Diastereomerlerin Sentezi

0,08 g NaOH, oda sıcaklığında 10 mL metanol içerisinde çözüldükten sonra üzerine 0,5 g L-triptofan metil ester HCl ilave edildi. Daha sonra bu karışım, 50-55°C'lik su banyosuna alındı ve karışımın üzerine 0,5 g rasemik gossypol ilave edildi. Yaklaşık 10 mL daha metanol eklenerek, reaksiyon karışımı 2 saat boyunca 50-55°C'lik su banyosu

içinde karıştırıldı. Reaksiyon süreci ince tabaka kromatografisi ile takip edildi. 2 saatin sonunda çökme gerçekleşti ve çöken ürün süzüldü, kurutulmaya bırakıldı. Çökelti halinde elde edilen (-)-gossypol *L*-triptofan Schiff bazının yapısı, erime noktası ve spektroskopik yöntemler yardımıyla ve literatürle karşılaştırma yapılarak aydınlatıldı. Metanol içerisinde çözülmüş halde bulunan (+)-gossypol *L*-triptofan Schiff bazı ise, daha sonra başka çalışmalarda kullanılmak üzere saklandı ((Jiang ve ark., 2007; Nhung ve ark., 2018).

3.2.2.2. Diastereomerlerin Hidrolizi

Yukarıdaki gibi sentezlenmiş olan (-)-gossypol bis-(*L*-triptofan metil ester) Schiff bazı bileşiğinin 0,36 g'ı üzerine bir reaksiyon balonunda 17 ml eter, 3,6 ml asetik asit ve 2 damla HCl eklendi. Geri soğutucu altında ve oda sıcaklığında 2 saat 45 dakika boyunca karıştırıldı. Reaksiyonun gidişatı ince tabaka kromatografisi ile takip edildi. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra karışım ayırma hunisine alınarak, yıkama sularının pH değeri nötral olana kadar saf su ile defalarca yıkandı. Eter fazı MgSO₄ ile kurutulduktan sonra, eter uzaklaştırıldı ve (-)-gossypol saf bir şekilde elde edilmiş oldu (Jiang ve ark., 2007; Nhung ve ark., 2018). (-)-Gossypol bileşiğinin yapısı optikçe aktifliği ölçülerek ve spektroskopik yöntemler aracılığıyla aydınlatıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. (-)-Gossypol diastereomerinin hidrolizi ile (-)-gossypol bileşiğinin kazanılması

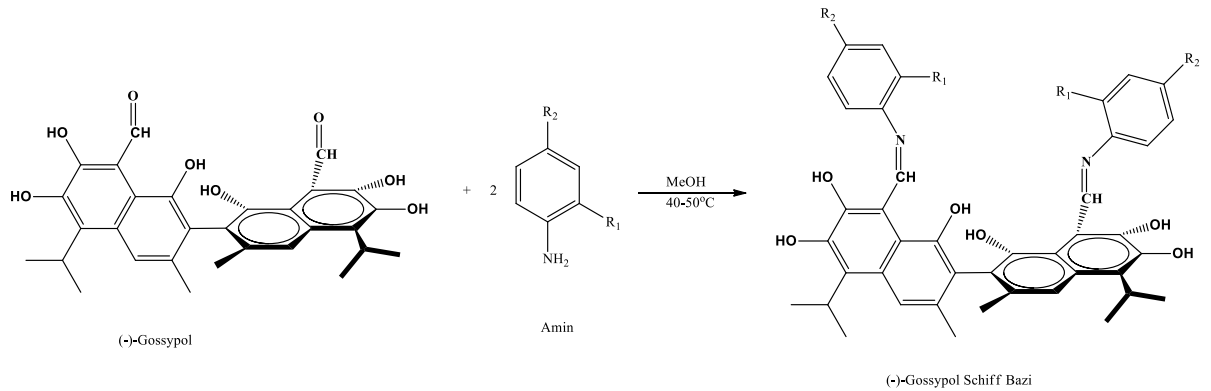
3.2.3. HPLC Kromatografisi ile Enantiyomerlerin Tanınması

Bu analizde Hron ve ark., 1999 ve Lin ve ark., 2012 tarafından gerçekleştirilmiş olan çalışmalardan yararlandı. Hem rasemik gossypol, hem de (-)-gossypol kiral bir

reaktif olan *R*-(-)-2-amino-1-propanol bileşiği ile reaksiyona sokularak diastereomerlerine dönüştürüldü ve bu sayede HPLC cihazında akıral bir kolon yardımı ile tanımlanabildi. Bu amaçla 0,1 mL *R*-(-)-2-amino-1-propanol, 0,5 mL glasiyal asetik asit ve 4,4 mL *N,N*-dimetilformamitten oluşan bir reaktif karışımı kullanıldı. Sırasıyla rasemik gossypol ve (-)-gossypol bu reaktif karışımı ile 30 dakika kaynar su banyosunda ısıtılarak reaksiyona sokuldu. Daha sonra reaksiyon karışımı hareketli faz ile seyreltilip, Whatman No. 2 filtre kağıdından süzülerek HPLC cihazına injekte edildi. Hareketli faz ise literatürdeki gibi, %80 oranında asetonitril ve pH değeri 3'e ayarlanmış %20 oranında KH₂PO₄ tampon çözeltisinden oluşmaktadır. Dakikada 1 mL hareketli faz akışı ile izokratik olarak yapılan analiz için Inertsil (5µm, ODS-3, 4.6-250 mm) ters faz kolonu kullanıldı.

3.2.4. (-)-Gossypol bis- Schiff Bazlarının Sentezi

(-)-Gossypol bis-(Schiff bazı) bileşiklerinin sentez şeması Şekil 3.4'de verilmiştir. Bu amaçla, 0,1 g (-)-Gossypol (0,19 mmol) bileşiği 10 mL metanol içerisinde çözüldü. Bu çözeltinin üzerine 0,38 mmol amin bileşiğinin 10-15 mL metanol içerisindeki çözeltisi yavaş yavaş damlatıldı. Reaksiyon karışımı 3 saat boyunca 40-50°C sıcaklıktaki su banyosu içerisinde karıştırıldı. Reaksiyonun bitişi ince tabaka kromatografisi ile doğrulandıktan sonra çöken Schiff bazı süzüldü, metanolla yıkandı ve etanolden kristallendirildi.



Schiff Bazı	Süstitüentler
IS-5	R ₁ = H; R ₂ = CH ₃
IS-7	R ₁ = OCH ₃ ; R ₂ = H
IS-10	R ₁ = CH ₂ OH; R ₂ = H

Şekil 3.4. (-)-Gossypol Schiff Bazlarının Sentez Şeması

3.2.5. Antioksidan Aktivite Tayini

Sentezlenen Schiff bazlarının antioksidan kapasiteleri literatürdeki DPPH radikal süpürme tayininden yararlanılarak gerçekleştirildi (Rahman ve ark., 2015; Beyazit ve ark., 2018). Schiff bazlarının DPPH üzerindeki süpürme aktivitesi UV-Vis spektrofotometre yardımıyla 517 nm'deki absorbans değişimi takip edilerek belirlendi. Bu amaçla, (-)-gossypol ve çalışmamızda sentezlemiş olduğumuz (-)-gossypol Schiff bazlarının mutlak etanol içerisinde beş farklı konsantrasyonda hazırlanmış olan çözeltileri, DPPH'nin mutlak etanol içerisindeki çözeltisine ilave edildi. Schiff bazları ve DPPH için, çözeltilerdeki son konsantrasyon sırasıyla 3.2, 6.4, 9.6, 12.8, 16.0 µg/ml ve 20 µg/mL olarak ayarlandı. Kontrol amaçlı kör çözeltiliye sadece DPPH eklendi. Bu çözeltiler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra, 517 nm'de ölçülen absorbans değerleri aşağıdaki formülde kullanılarak, (-)-gossypol ve her bir Schiff bazı için % süpürme değerleri hesaplandı:

$$\% \text{ süpürme aktivitesi} = [(Ab_{\text{kontrol}} - Ab_{\text{örnek}}) / Ab_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Bu şekilde hesaplanan % süpürme değerleri konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirildi ve bu grafikten IC₅₀ değerleri hesaplandı. Her konsantrasyon için deney üç kez tekrar edildi.

3.2.6. Moleküler Kenetleme Çalışması

Çalışmada kullanılan proteinlerin üç boyutlu yapıları Protein Data Bank veri tabanından indirildi (www.rscb.org/pdb). Proteinlerin kenetlemeye hazırlanma işlemi Maestro 13.0 (Academic use only) ve Autodock Vina 1.2.0 yazılımları ile gerçekleştirildi. Öncelikle proteinlerin yapısında bulunan ligandlar, çözücü molekülleri, su molekülleri ve diğer heteroatomlar kaldırıldı. Polar hidrojen atomları ve Kollman yükleri eklenerek her bir protein yapısı Autodock Vina kenetlemesi için kullanılan pdbqt uzantılı formuna dönüştürüldü. Her bir protein için kenetleme koordinatları, ya yapıda bulunan inhibitör temel alınarak veya literatür taraması ile belirlendi. Bu analizlerde esnek ligand ve katı reseptör yaklaşımı benimsendi.

Çalışmada kullanılan ligandların yapıları ise öncelikle Chem Draw Ultra 12.0 ile çizildikten sonra, Avogadro 1.2.0 yazılımı ile üç boyutlu hale dönüştürüldü. Ligandların geometri optimizasyonları da yine Avogadro 1.2.0 yardımıyla kuvvet alanı olarak Merck Molecular Force Field (MMF94) kullanılarak gerçekleştirildi ve ardından Autodock Vina 1.2.0 tarafından kenetlemeye hazırlandı.

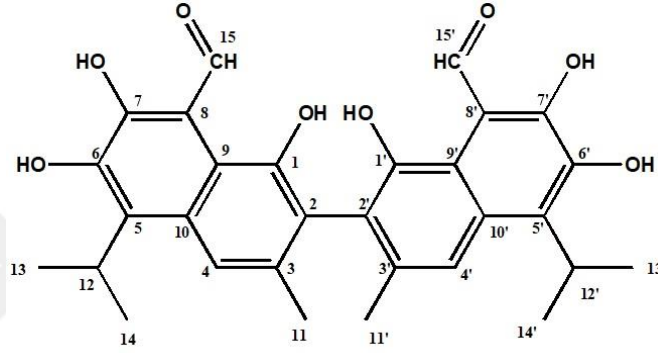
Her bir protein için uygulanan validasyon işleminin ardından kenetleme işlemi (-)-gossypol ve çalışmamızda sentezlemiş olduğumuz yeni ligandlar için gerçekleştirildi. Kenetlenen komplekslerin en düşük bağlanma enerjileri kcal/mol cinsinden hesaplandı ve bu şekilde değerlendirildi. Proteinlerin ligandlara olan bağlanma modları ise PyMol 2.4.0 ve Biovia Discovery Studio 2020 yardımıyla görselleştirilerek incelendi.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Pamuk Tohumlarından İzole Edilen Rasemik Gossypol Bileşiğinin Yapısının Aydınlatılması

Gossypium hirsutum L. (pamuk) tohumlarından izole edilen sarı renkli bileşiğin yapısı, erime noktası, NMR spektrumu ve FT-IR spektrumu hem literatür verileri, hem de standart referans olarak temin edilmiş olan gossypolünki ile karşılaştırılarak doğrulandı (Şekil 4.1).



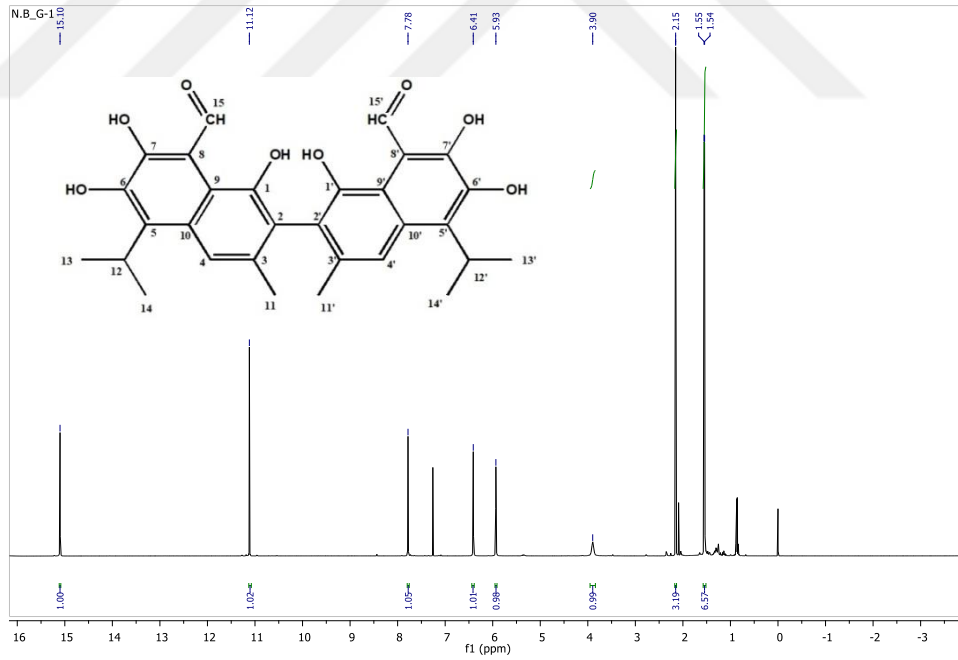
Şekil 4.1. Rasemik gossypol bileşiğinin kimyasal yapısı

Bulunan erime noktası değeri (177-182°C), literatürdeki veriyle uyum içerisindedir (Nawab ve Khan, 2014). Ayrıca şekilde görüldüğü üzere, tarafımızca izole edilmiş olan rasemik gossypol ile Sigma-Aldrich'ten satın almış olduğumuz rasemik gossypol bileşiklerinin FT-IR spektrumları birebir örtüşmektedir. Bu spektrumda 3518 ve 3422 cm^{-1} 'de fenolik -OH gruplarına ait bantlar, ayrıca 2959, 2924 cm^{-1} 'de alifatik C-H bantları gözlenmiştir. 1614 ve 1591 cm^{-1} 'deki gerilme bantları ise C=O ve C=C gruplarına aittir (Şekil 4.2).

CDCl_3 içerisinde alınan ^1H NMR spektrumu da yapıyı doğrulamaktadır. Bu spektrumda 1.54, 2.15 ve 3.90 ppm'de gözlenen sinyaller sırasıyla izopropil metil ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), aromatik metil ($\text{Ar}-\text{CH}_3$) ve izopropil metin ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) gruplarının varlığını göstermektedir. 5.93, 6.41 ve 15.100 ppm'deki singletler sırasıyla 1, 6 ve 7 konumlarında bulunan fenolik hidroksil protonlarına aittir. 7.78 ve 11.12 ppm'deki sinyaller ise, sırasıyla, 4 numaralı konumdaki aromatik hidrojenin ($\text{Ar}-\text{H}$) ve aldehit hidrojeninin ($\text{HC}=\text{O}$) varlığını kanıtlar niteliktedir. Bütün alan oranları, pikleri veren hidrojenlerin sayısı ile orantılıdır (Luna ve ark., 2004).



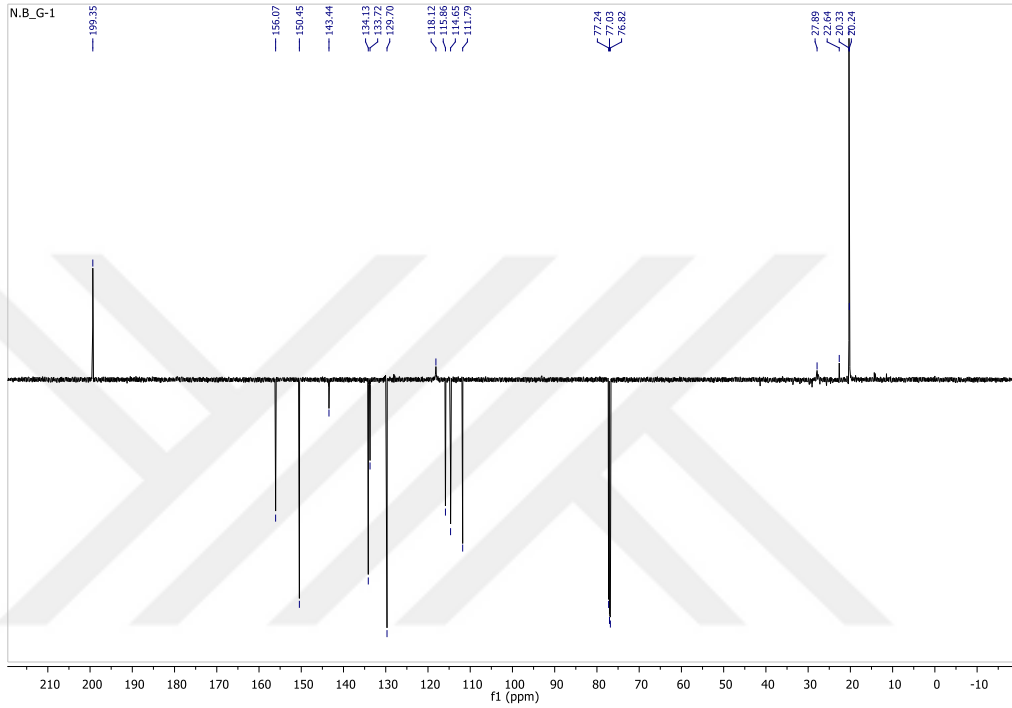
Şekil 4.2. Satın alınan referans gossypol (siyah) ile tarafımızca izole edilen gossypol (mavi) bileşiklerinin FT-IR spektrumları



Şekil 4.3. Rasemik gossypol bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3)

Yine CDCl_3 içerisinde alınan ^{13}C APT NMR spektrumu da hem ^1H NMR spektrumunu hem de rasemik gossypol bileşiğinin yapısını destekler niteliktedir (Şekil

4.4). 199.35 ppm’de gözlenen pik aldehit karbonunun varlığına işaret etmektedir. 20.23 ve 27.89 ppm arasındaki sinyaller alifatik –CH₃ ve –CH karbonlarına aittir. 111.79 ve 156.07 ppm arasındaki pikler ise naftalin halkalarında yer alan aromatik karbonların varlığını gösterirken, 143.44, 150.45 ve 156.07 ppm’deki pikler bu aromatik karbonlardan oksijene doğrudan bağlı olan (1, 6 ve 7 nolu karbonlar) karbonlara aittir.



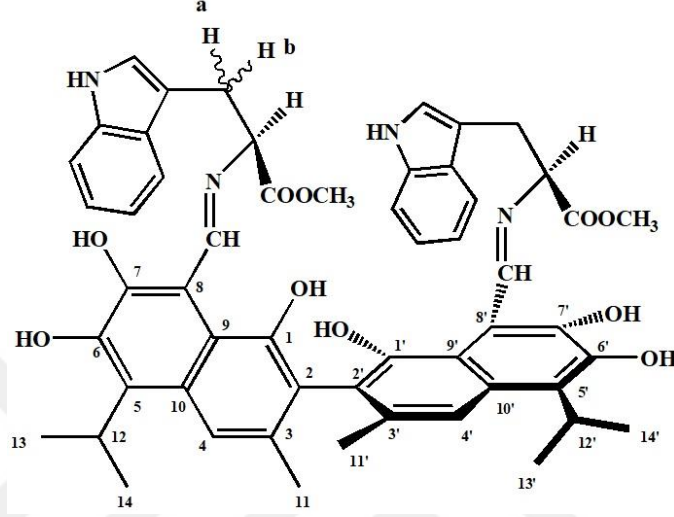
Şekil 4.4. Rasemik gossypol bileşiğinin ¹³C NMR spektrumu (CDCl₃)

4.2. Rasemik Gossypol Bileşiğinin Diastereomerik Rezolüsyon Yardımıyla Enantiyomerlerine Ayrılması

Bu aşamada, diastereomerleri sentezlemek amacıyla rasemik gossypol, kiral bir reaktif olan *L*-triptofan metil ester hidroklorürün 2 molü ile reaksiyona sokuldu. Elde edilen diastereomerlerin erime noktaları birbirlerinden çok farklı olduğundan, çözünürlük farkından yararlanılarak birbirlerinden kolayca ayrıldılar (Jiang ve ark., 2007; Nhung ve ark., 2018). Diastereomerin yapısı erime noktası, optik çevirme açısı, FT-IR ve NMR spektroskopisi yöntemleri yardımıyla aydınlatıldı.

4.2.1. (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı Diastereomerinin Yapısının Aydınlatılması

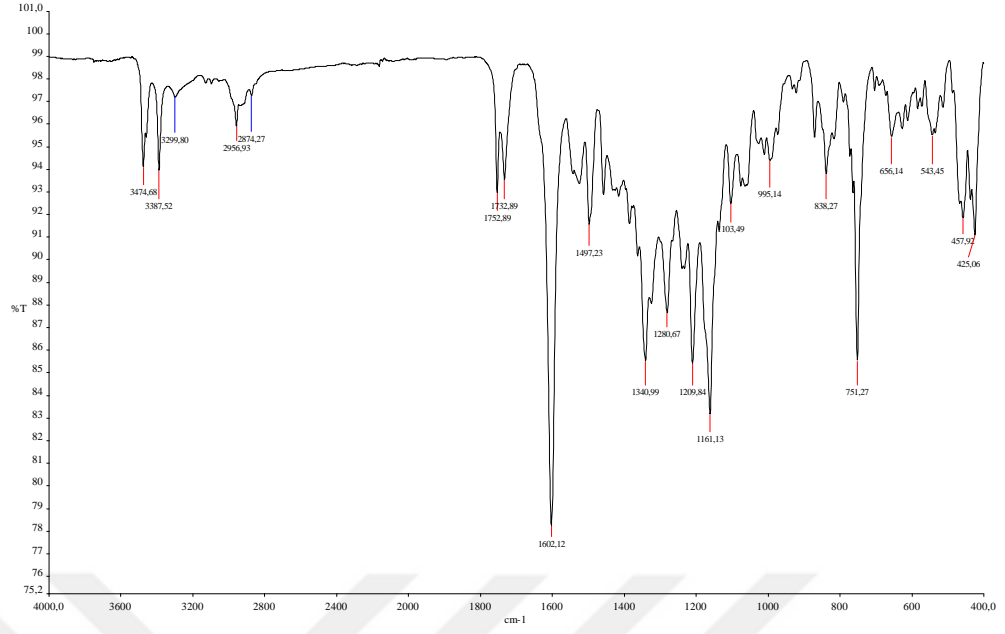
(-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı, Sarı katı. 0,75 g; Verim = % 43; $[\alpha]_D^{25} = -1053.5^\circ$ (*c* 0.0024, CHCl₃); E.N. = 230-235°C.



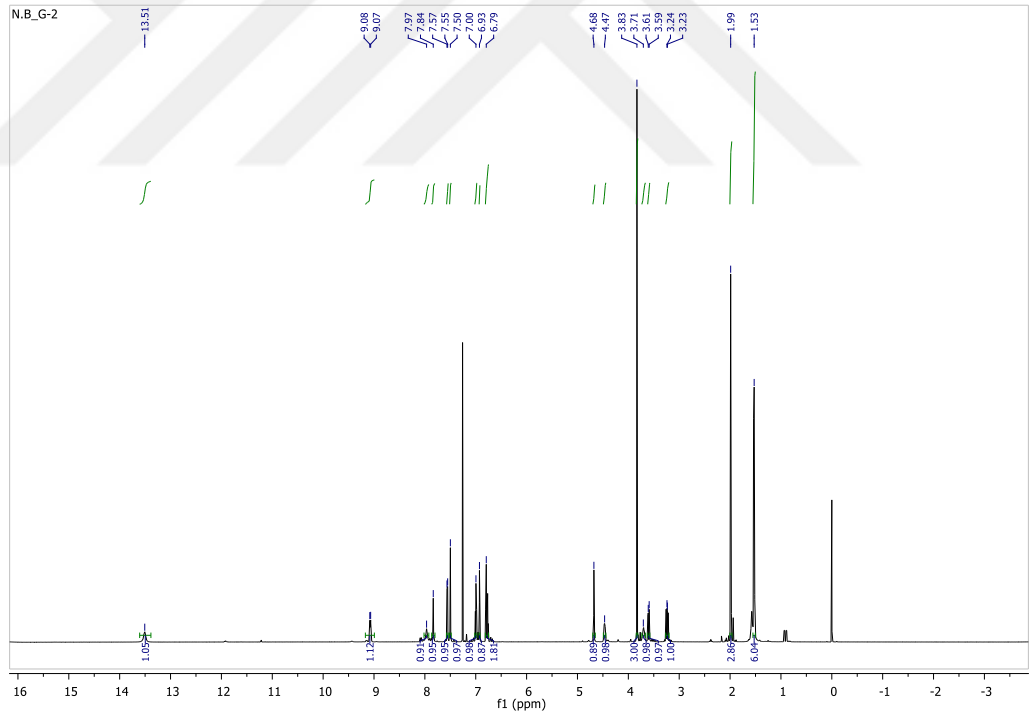
Şekil 4.5. (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı bileşiğinin yapısı

(-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı diastereomerinin FT-IR spektrumu (Şekil 4.6) yapıyı doğrulayan verilere sahiptir. Gossypol bileşiğinin FT-IR spektrumunda görülmeyen 1752 ve 751 cm⁻¹'deki yeni bantlar yapıya katılan triptofan yapısındaki sırasıyla, ester grubu ve indol halkasından kaynaklanmaktadır. 1602 cm⁻¹'de ise imin (C=N) gerilmesinden kaynaklı şiddetli bir pik ortaya çıkmıştır (Dodou ve ark., 2005).

(-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı bileşiğinin CDCl₃ içerisinde alınan ¹H NMR spektrumu literatür verileri ile tam bir uyum içerisindedir (Dodou ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2009). 1.53 ve 1.99 ppm'deki sinyaller sırasıyla izopropil metil ve aromatik metil gruplarının varlığını işaret etmektedir. İndol halkasındaki N-H protona ait geniş pik 7.97 ppm'de gözlenirken, Schiff bazı oluşumunun en önemli kanıtı olarak rasemik gossypol bileşiğinin ¹H NMR spektrumunda 11.12 ppm'de gözlenmiş olan aldehit protonunun kaybolması ve 9.07 ppm'de azometin (CH=N) protonuna ait yeni bir singletin ortaya çıkması gösterilebilir.

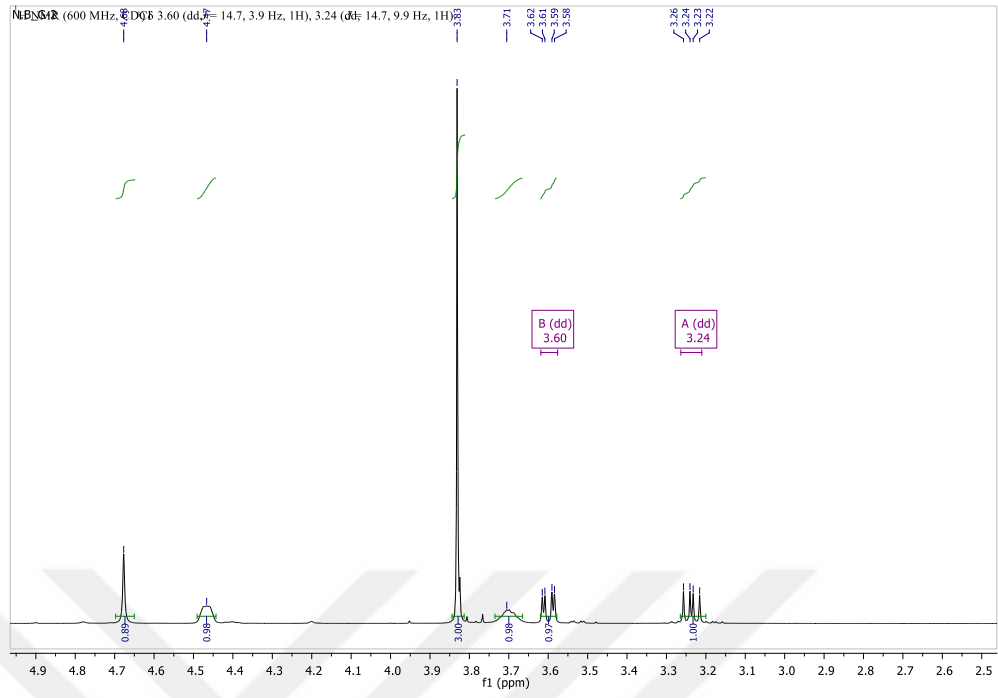


Şekil 4.6. (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı bileşiğın FT-IR spektrumu

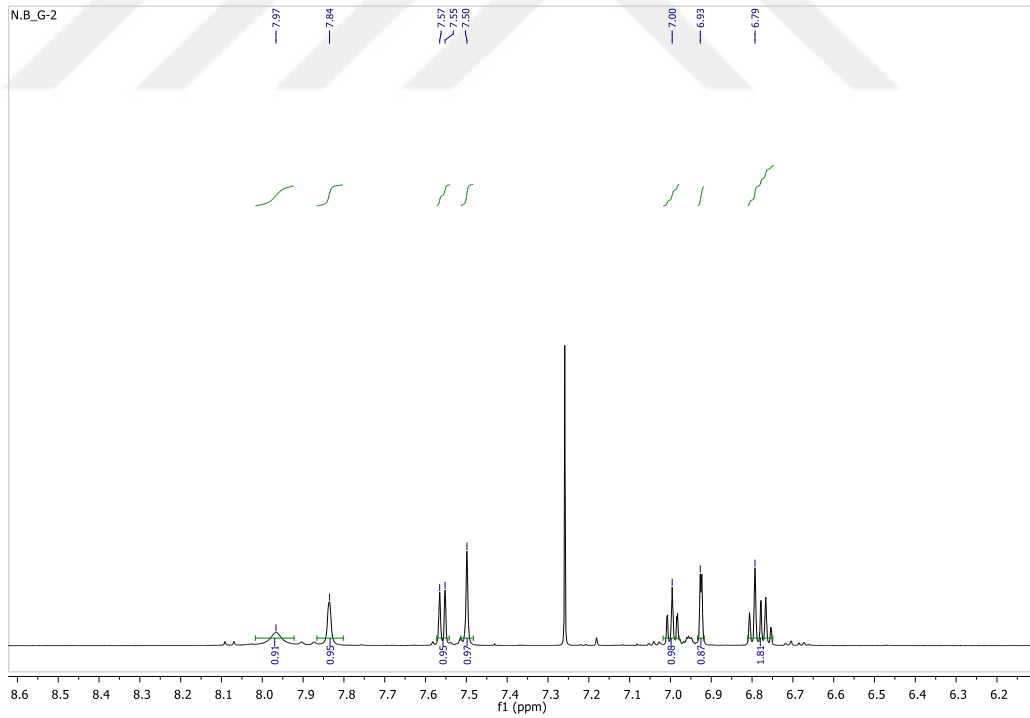


Şekil 4.7. (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı bileşiğının ¹H NMR spektrumu (CDCl₃)

3.24 ve 3.69 ppm'de dubletin dubleti olarak gözlemlenen sinyaller, triptofan yapısındaki diastereotopik (a ve b olarak gösterilen) protonlara aittir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (2.5-5.0 ppm aralığı büyütülmüş, CDCl_3)



Şekil 4.9. (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (6.0-8.5 ppm aralığı büyütülmüş, CDCl_3)

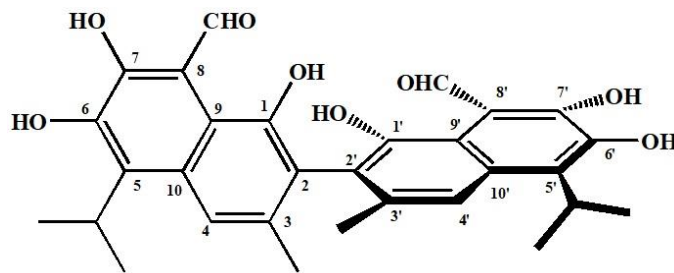
3.70 ppm'de multipler olarak gözlenen pik, izopropil metin gruplarının varlığını göstermektedir. 3.83 ppm'deki singlet triptofanın ester grubundaki metil protonlarına ve 4.46 ppm'deki multipler ise diastereotopik protonlara komşu olan metin protonuna aittir. 4.68 ppm, 7.84 ppm ve 13.51 ppm'deki singlet sinyaller gossypol halkarındaki –OH protonlarının varlığını kanıtlamaktadır. 6.79 ve 7.57 ppm arasındaki çok sayıda sinyal hem gossypol, hem de indol halkarındaki aromatik protonların varlıklarını işaret etmektedir (Şekil 4.9).

4.2.2. (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı Diastereomerinin Hidrolizi İle Elde Edilen (-)-Gossypol Enantiyomerinin Yapısının Aydınlatılması

Diastereomerin hidrolizi yardımıyla ele geçirilen (-)-Gossypol bileşiğinin yapısı, erime noktası, optikçe aktiflik tayini, FT-IR ve NMR spektroskopisi ve ayrıca HPLC analizi yardımıyla aydınlatıldı (

Şekil 4.10). Aynı işlemler (+)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazına da uygulanmıştır. Ancak o işlemler başka bir çalışmanın konusu olduğu için burada gösterilmeyecektir.

(-)-Gossypol: Kahverengi katı; 0,15 g (Verim = % 75); E.N. = 152-155°C; $[\alpha]_D^{25} = -317.44^\circ$ (c 0.0024, CHCl₃) (lit. $[\alpha]_D^{25} = -353^\circ$ (c, ca 0.055, CHCl₃)) (Huang vd., 1987)). (ee % 89,9; HPLC analizi ile doğrulandı).

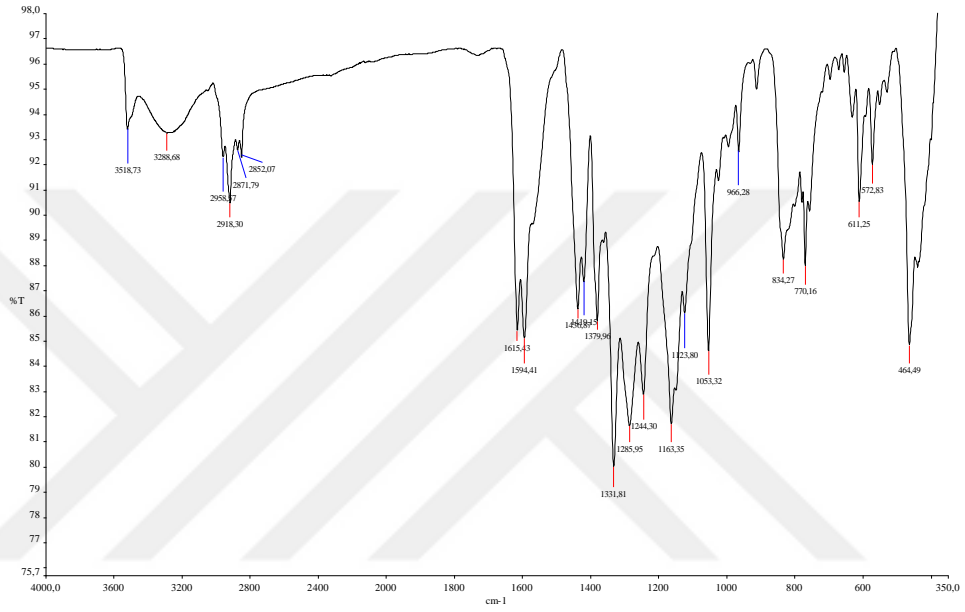


Şekil 4.10. (-)-Gossypol Bileşiğinin Kimyasal Yapısı

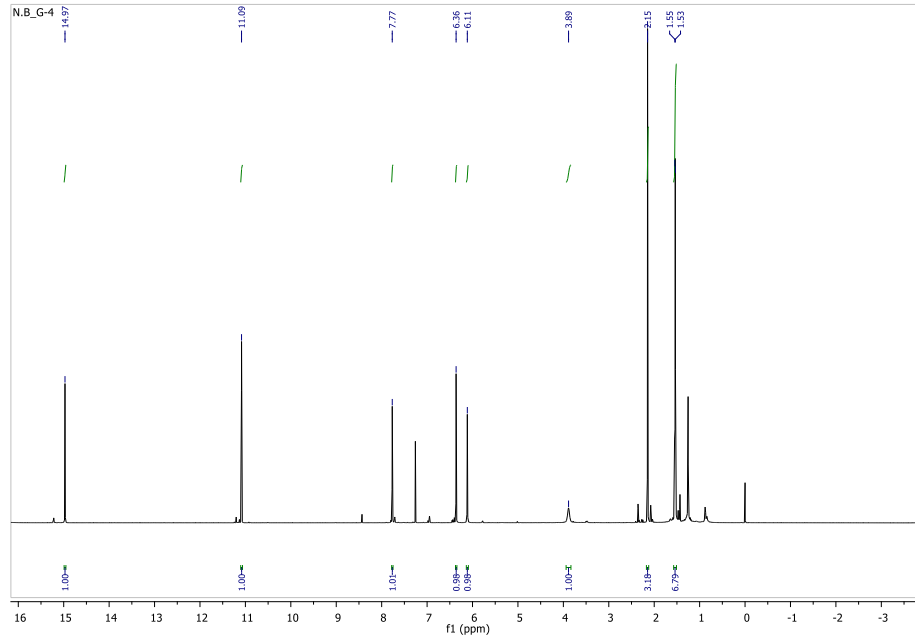
(-)-Gossypol bileşiğinin FT-IR spektrumu (Şekil 4.11), (-)-Gossypol bis(L-triptofan metil ester) Schiff bazı bileşiğinden ziyade rasemik gossypol bileşiğinin FT-IR spektrumuna benzemektedir. Bu da hidrolizin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini

göstermektedir. FT-IR spektrumunda 3518 ve 3288 cm^{-1} 'de fenolik –OH gruplarına ait bantlar, 1615 ve 1594 cm^{-1} 'de ise C=O grubuna ait bantlar görülmektedir.

Hidroliz sonrasında elde edilen (-)-Gossypol bileşiğinin CDCl_3 içerisinde alınmış olan ^1H NMR spektrumu (Şekil 4.12), rasemik gossypol bileşiğinin ^1H NMR spektrumu ile birebir bir şekilde örtüştüğü için hidrolizin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini söyleyebiliriz.



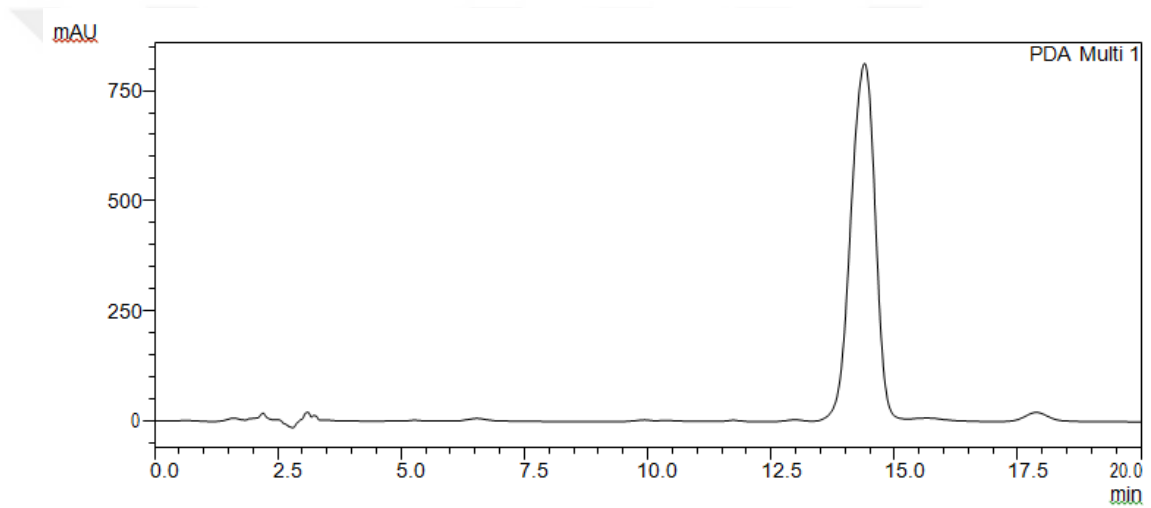
Şekil 4.11. (-)-Gossypol Bileşiğinin FT-IR Spektrumu



Şekil 4.12. (-)-Gossypol Bileşiğinin ¹H NMR Spektrumu (CDCl₃)

4.2.3. HPLC Kromatografi Yöntemi İle Enantiyomerlerin Tanınması

Bu işlemde, enantiyomerler diastereomerlerine dönüştürülerek akiral bir kolon yardımıyla HPLC cihazında analiz edildi. Her şeyden önce rasemik gossypol bileşiğinin N,N-dimetilformamit içerisindeki çözeltisi seyreltilerek ve Whatman No. 2 süzgeç kağıdından süzülerek cihaza enjekte edildi ve deneysel kısımda belirtilmiş olan hareketli faz yardımıyla HPLC analizi gerçekleştirildi. HPLC kromatogramında 14. dakikada bir adet pik gözlemlendi (Şekil 4.13).

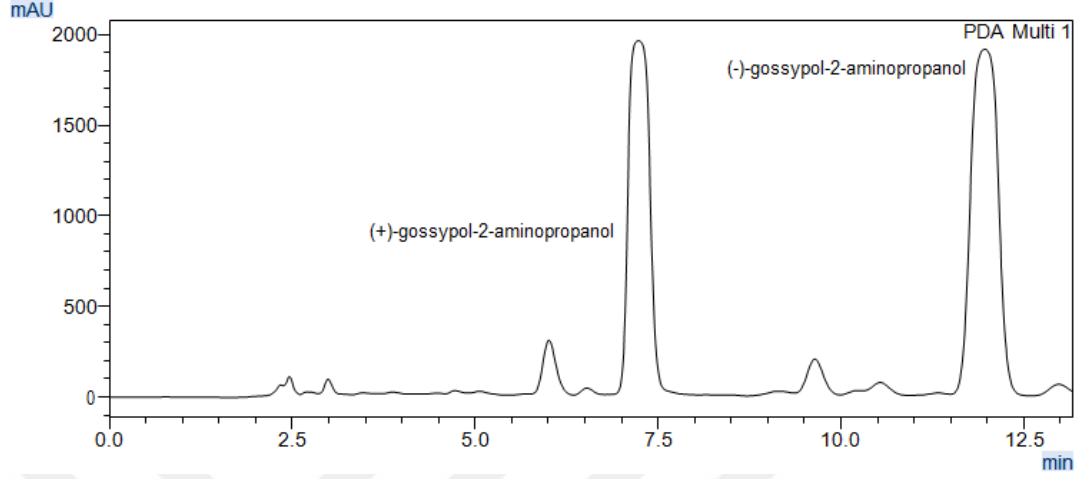


Şekil 4.13. Rasemik Gossypol Bileşiğinin HPLC Kromatogramı (Akiral kolon)

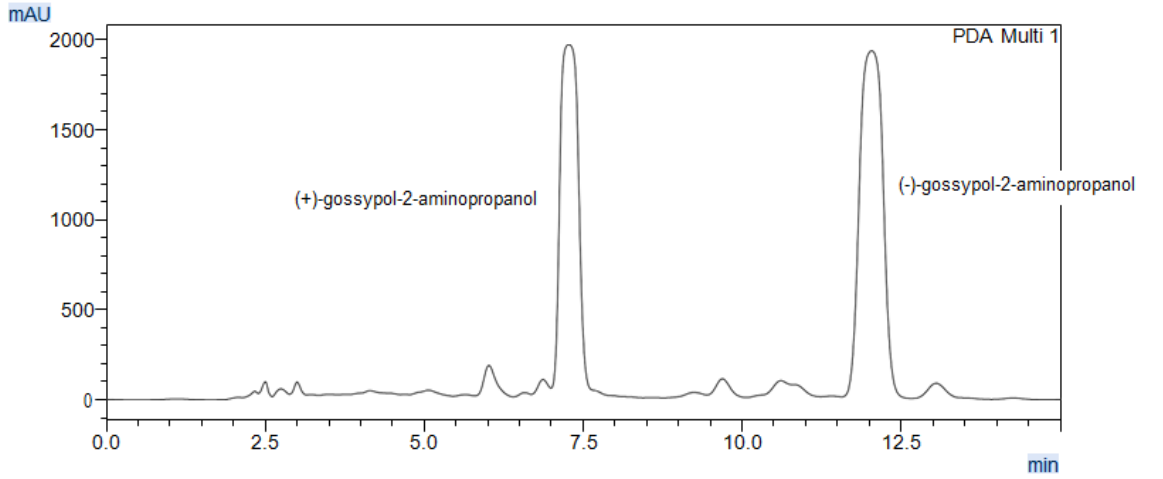
Daha sonra, hem SIGMA-ALDRICH'ten satın almış olduğumuz standart rasemik gossypol, hem de bitkiden tarafımızca izole edilen rasemik gossypol bileşiklerini *R*-(-)-2-amino-1-propanol kiral reaktifi yardımı ile diastereomerlerine dönüştürülerek, akiral bir kolon yardımıyla HPLC'de analiz edildi (Hron ve ark., 1999) **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.** ve Şekil 4.15'te sırasıyla standart gossypol ve bizim izole ettiğimiz gossypole ait diastereomerlerin HPLC kromatogramları görülmektedir.

Şekil 4.13'deki rasemik gossypole ait kromatogramda 14. dakikada tek bir pik gözlenirken, *R*-(-)-2-amino-1-propanol ile gerçekleştirilen diastereomerlerine dönüştürme reaksiyonundan sonra 14. dakikadaki pikin kaybolması ve 7. ve 12. dk civarında iki yeni pik oluşumu, diastereomerleştirme işleminin başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Analizlerin hepsi Inertsil (5µm, ODS-3, 4.6-250 mm) ters faz kolonu ve

%80 oranında asetonitril ve pH değeri 3'e ayarlanmış %20 oranında KH₂PO₄ tampon çözeltisinden oluşan hareketli faz karışımı ile gerçekleştirildi.



Şekil 4.14. Sigma Aldrich'ten satın alınan rasemik gossypol bileşiğinin diastereomerlerine ait HPLC kromatogramı

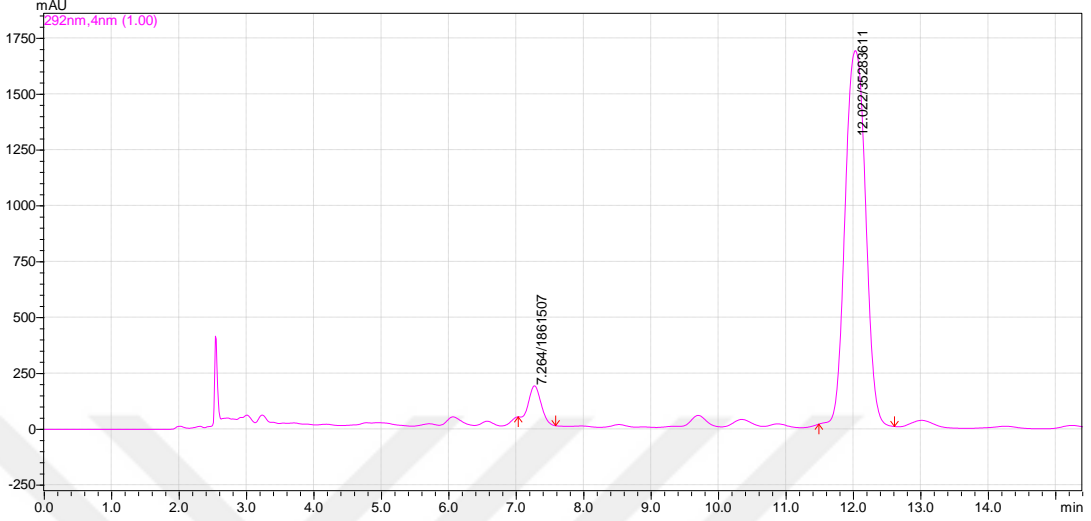


Şekil 4.15. Tarafımızca izole edilip saflaştırılmış olan rasemik gossypol bileşiğinin diastereomerlerine ait HPLC kromatogramı

R-(-)-2-amino-1-propanol ile diastereomerleştirme işlemini ve ardından HPLC analizini, daha önce izole etmiş olduğumuz ve polarimetre yardımıyla çevirme açısını $[\alpha]_D^{25} = -317.44^\circ$ olarak ölçtüğümüz (-)-Gossypol bileşiğine uyguladığımızda ise,

Şekil 4.16'daki gibi bir kromatogram gözlemlendi. O halde 7. dk civarında gözlenen pik (+)-Gossypol ve 12. dk civarında gözlenen pik ise (-)-Gossypol bileşiğine ait olmalıdır. Alan oranları yardımıyla, (-)-Gossypol bileşiğinin enantiyomerik fazlalık değeri %89,9 olarak hesaplandı.

$$\% ee = \frac{|R - S|}{R + S} \times 100 = \frac{|35283611 - 1861507|}{35283611 + 1861507} \times 100 = \%89.9$$



Alıkonma Zamanı	Alan oranı
7.264	1861507
12.022	35283611

Şekil 4.16. (-)-Gossypol Diastereomerinin HPLC Kromatogramı ve piklere ait alan oranları

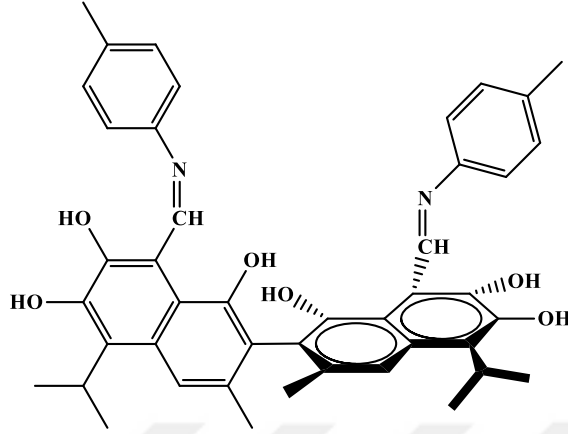
4.3. Yeni (-)-Gossypol Schiff Bazlarının Sentezi ve Yapılarının Aydınlatılması

4.3.1. (-)-Gossypol *p*-toluidin Schiff Bazının Yapısının Aydınlatılması , IS-5

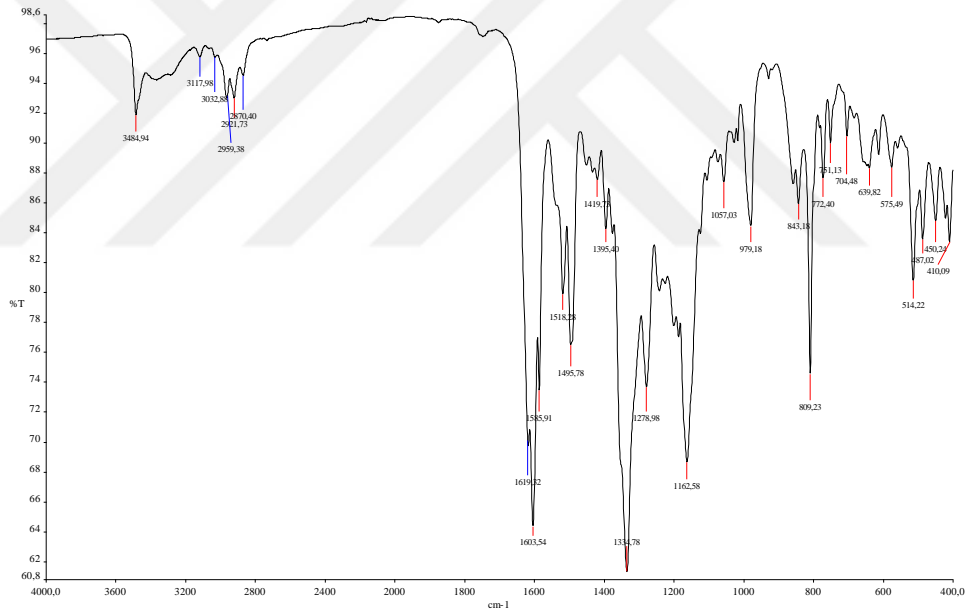
Elementel analiz ve spektroskopik analiz sonuçları **IS-5** bileşiğinin yapısının Şekil 4.17'deki gibi olduğunu göstermektedir. Kahverengi katı, 0,095g (Verim: %74,6), E.N.=265-267°C. $[\alpha]_D^{25} = -1911,11^\circ$ (*c* 0.00018, CHCl₃). **Elementel Analiz:** Hesaplanan C, 75,84; H, 6,36; N, 4,02. Bulunan C, 76,52; H, 6,88; N, 4,71.

IS-5 bileşiğinin FT-IR Spektrumu Şekil 4.18'de görülmektedir. 3300-3400 cm⁻¹ civarındaki pikler gossypol iskeletindeki O-H gruplarının varlığını göstermektedir. Özellikle 3484 cm⁻¹'deki pik literatür ile uyumludur (Matamoros ve ark., 2019). 3000 cm⁻¹ ve 2900 cm⁻¹ civarındaki çok sayıda pik, sırasıyla aromatik ve alifatik C-H gerilmelerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca imin azotu ile molekül içi hidrojen bağı yapan O-H grubuna ait O-H---N gerilmesinin de 2937 cm⁻¹'de gözlemlendiği bildirilmiştir.

Spektrumda ayrıca 1603 ve 1585 cm^{-1} 'de üstüste binmiş $\nu\text{C}=\text{N}$ and $\nu\text{C}=\text{C}$ titreşimleri de imin yapısını önermektedir (Matamoros ve ark., 2019).



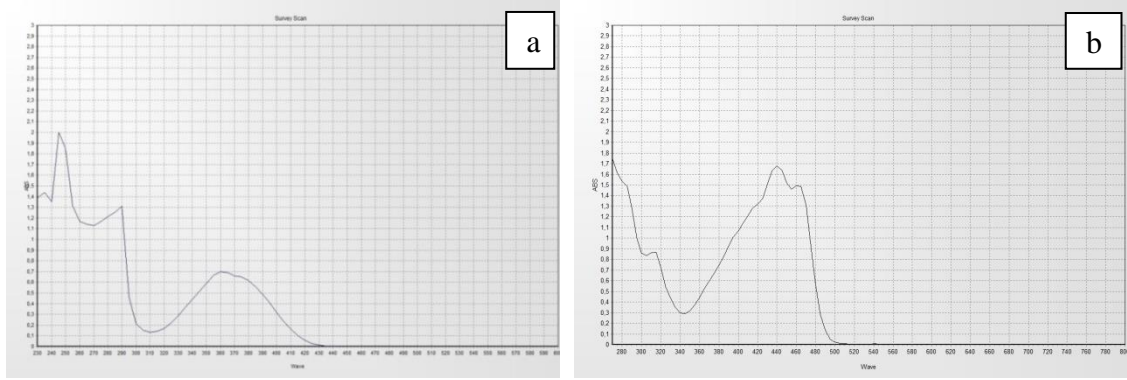
Şekil 4.17. IS-5 Bileşiğinin Kimyasal Yapısı



Şekil 4.18. IS-5 Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)

Şekil 4.19'da gossypol bileşiğinin (a) ve IS-5 bileşiğinin CHCl_3 içerisindeki 10^{-5} M'lık çözeltileri ile kaydedilmiş UV-Vis spektrumları görülmektedir. Gossypol bileşiğinin UV-Vis spektrumunda 245, 290 ve 360 nm'de gözlenen maksimum absorpsiyonlar literatürle uyumludur ve $\pi-\pi^*$ ile $n-\pi^*$ geçişlerinden kaynaklanmaktadır (Marciniak ve ark., 1990). IS-5 bileşiğinin CHCl_3 içerisinde kaydedilen UV-Vis spektrumu hem gossypol bileşiğinin spektrumundan oldukça farklıdır, hem de 440 ve 470

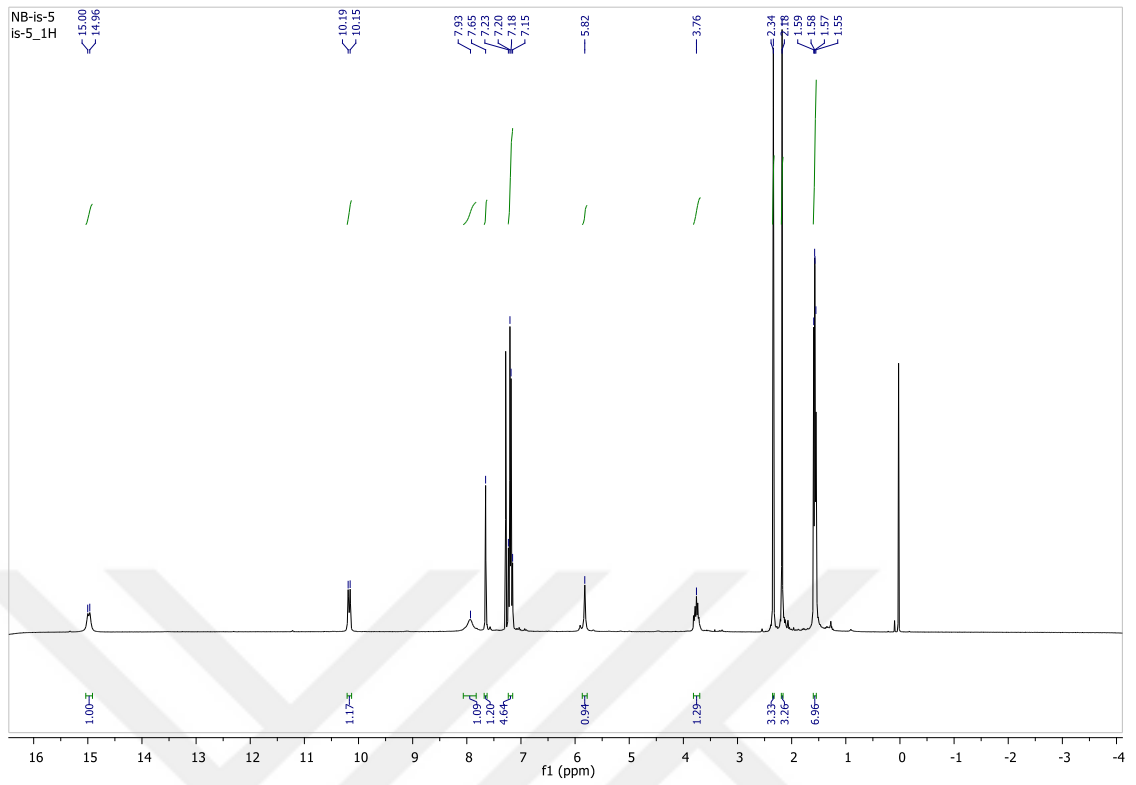
nm civarında ortaya çıkan ve $n-\pi^*$ geçişlerinden kaynaklanan yeni bantlar imin bağı oluşumunu kanıtlar niteliktedir.



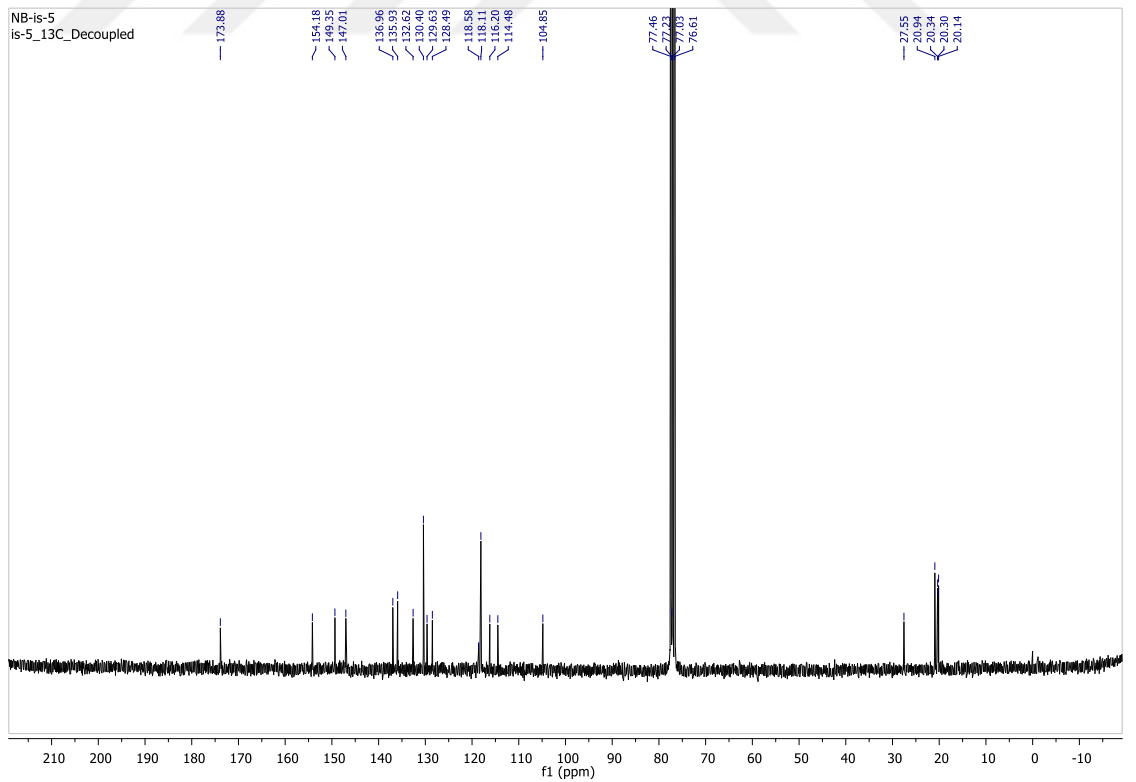
Şekil 4.19. (a) Gossypol bileşiğinin CHCl_3 içerisinde alınmış UV-Vis spektrumu (b)IS-5 bileşiğinin CHCl_3 içerisinde alınmış UV-Vis spektrumu

IS-5 bileşiğinin CDCl_3 içerisinde alınan ^1H NMR spektrumunda her bir pikin bağlı alan oranı, o piki veren proton sayısıyla orantılıdır (Şekil 4.20). Alan oranları di-imin yapısını açık bir şekilde doğrulamaktadır. 1.55-1.59 ppm’de görülen üst üste binmiş iki dublet, gossypol yapısındaki izopropil grubuna ait metil protonlarına aittir. 2.18 ppm ve 2.34 ppm’de görülen her biri 6H alan oranına sahip olan singletler ise sırasıyla gossypol iskeletindeki $\text{Ar}-\text{CH}_3$ ve *p*-toluidin iskeletindeki $\text{Ar}-\text{CH}_3$ protonlarının varlığını işaret etmektedir. Gossypol bileşiğindeki 1, 6 ve 7 numaralı $-\text{OH}$ protonları sırasıyla 5.82, 7.65 ve 15.00 ppm civarında birer sinyal vermiştir. 7 numaralı $-\text{OH}$ protonlarına ait sinyal imin azotuyla yaptığı hidrojen bağı nedeniyle düşük alana kaymıştır. 3.76 ppm’deki küçük yedili sinyal, izopropil grubundaki metil protonlarına aittir. (-)-Gossypol bileşiğinin ^1H NMR spektrumunda 11.09 ppm’de gözlenen aldehit protonu bu spektrumda kaybolmuş, bunun yerine 10.15 ve 10.19 ppm’de üst üste binmiş iki singlet gözlenmiştir. Bu sinyaller $-\text{CH}=\text{N}-$ protonlarının varlığını kanıtlamaktadır.

IS-5 bileşiğinin CDCl_3 içerisinde alınan ^{13}C NMR spektrumu da (Şekil 4.21), ^1H NMR spektrumunu destekler niteliktedir. 20 ppm civarında görülen çok sayıda pik, moleküldeki aromatik $-\text{CH}_3$ karbonlarının (gossypol ve *p*-toluidin halkarındaki) varlığını gösterirken, 27,55 ppm’de gözlenen sinyal gossypol iskeletindeki izopropil metil karbonlarına aittir.



Şekil 4.20. IS-5 Bileşiğinin ^1H NMR Spektrumu (CDCl_3)

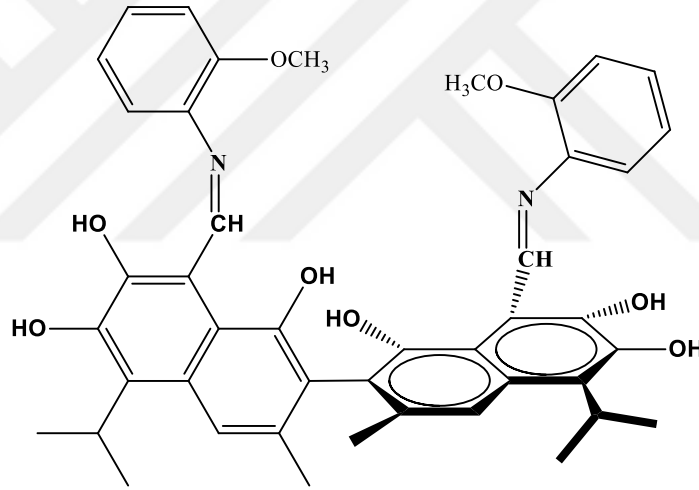


Şekil 4.21. IS-5 Bileşiğinin ^{13}C NMR Spektrumu (CDCl_3)

Spektrumda 104,85 ve 136,96 ppm aralığındaki sinyaller aromatik karbonlara aittir. 147,01, 149,35 ve 154,18 ppm’de gözlenen üç sinyal ise, gossypol halkasındaki fenolik –OH gruplarını taşıyan aromatik karbonların varlığını işaret etmektedir. 173,88 ppm’deki imin (CH=N) karbonuna ait pik, Schiff bazı oluşumunu destekleyen önemli kanıtlardan biridir.

4.3.2. (-)-Gossypol *o*-anisidin Schiff Bazının Yapısının Aydınlatılması, IS-7

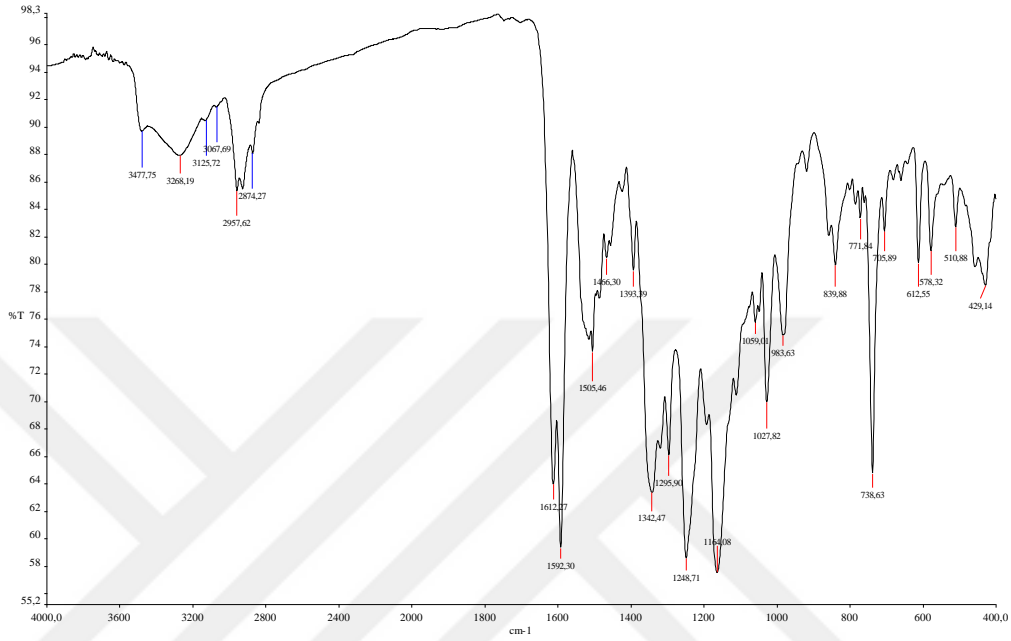
Elementel analiz ve spektroskopik analiz sonuçları IS-7 bileşiğinin yapısının Şekil 4.22’deki gibi olduğunu göstermektedir. Kahverengi katı, 0.086 g (Verim: % 61,4), E.N.=219-221°C. $[\alpha]_D^{25} = -2350^\circ$ (*c* 0.00012, CHCl₃). **Elementel Analiz:** Hesaplanan C, 72.51; H, 6,09; N, 3.84. Bulunan C, 71.94; H, 5.88; N, 3.97.



Şekil 4.22. IS-7 Bileşiğinin Kimyasal Yapısı

IS-7 bileşiğinin FT-IR spektrumu da (Şekil 4.23) IS-5’inkine benzemektedir. Literatürde belirtildiğine göre, yüksek dalga boylarındaki keskin pikler hidrojen bağı yapmayan –OH gruplarının (1 ve 1’ -OH grupları gibi) gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Bu spektrumda bu tür pikler 3477 ve 3265 cm⁻¹’de gözlenmiştir. Moleküller arası ve molekül içi hidrojen bağı yapan 6 ve 6’ konumlarındaki –OH gruplarına ait pikler ise daha düşük dalgaboylarında daha geniş pikler vermektedir. Özellikle Schiff bazı yapısındaki N atomu ile molekül içi hidrojen bağı yapabilen 7 ve 7’ konumlarındaki –OH grupları da 3000 cm⁻¹’in altındaki değerlerde pik vermektedir. Spektrumda 1612 ve 1592 cm⁻¹’de gözlenen pikler $\nu_{C=N}$ and $\nu_{C=C}$ titreşimlerinden

kaynaklanmaktadır (Przybylski ve ark., 2008). Gossypol bileşiminin FT-IR spektrumunda 1570 cm^{-1} civarındaki pikin kaybolması ve buradaki spektrumda 1505 cm^{-1} civarında ortaya çıkan yeni pikler Schiff bazı oluşumunu destekler niteliktedir (Przybylski ve ark., 2008).

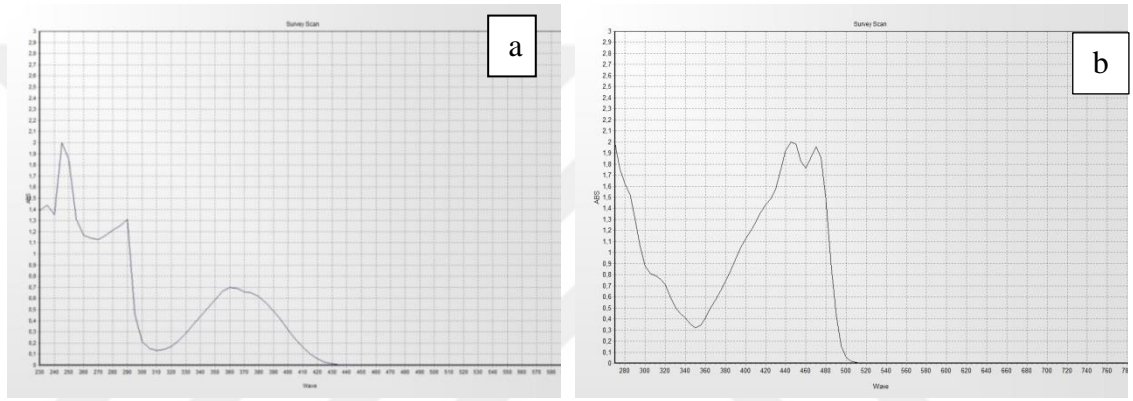


Şekil 4.23. IS-7 Bileşiminin FT-IR Spektrumu (ATR)

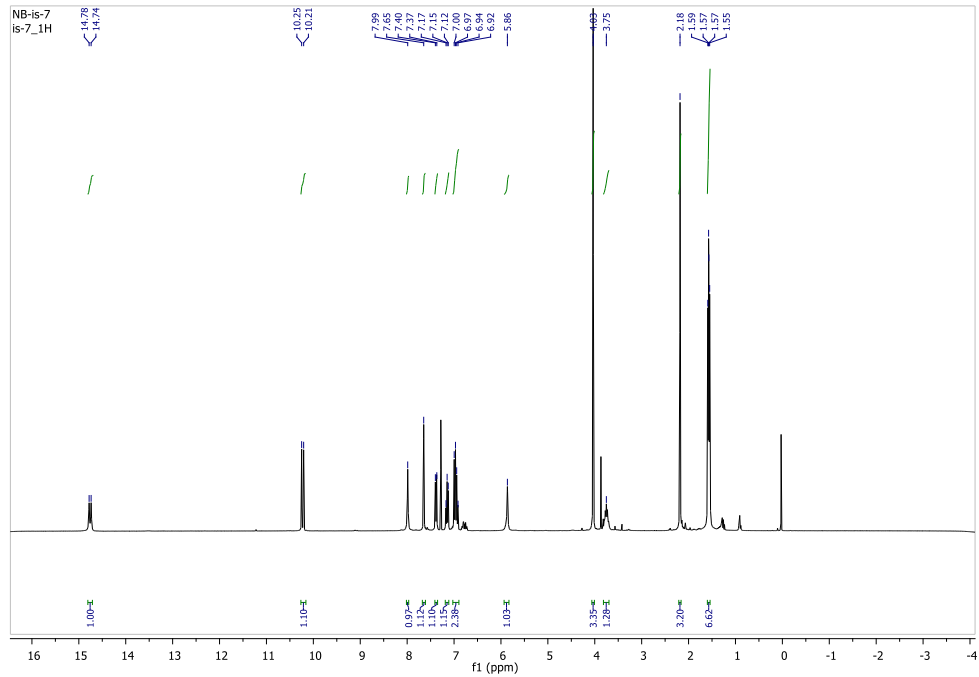
Şekil 4.24'te gossypol bileşiminin (a) ve IS-7 bileşiminin CHCl_3 içerisindeki 10^{-5} M'lık çözeltileri ile kaydedilmiş UV-Vis spektrumları görülmektedir. Daha önce de belirtildiği üzere, gossypol bileşiminin UV-Vis spektrumunda 245, 290 ve 360 nm'de gözlenen maksimum absorpsiyonlar literatürle uyumludur ve $\pi-\pi^*$ ile $n-\pi^*$ geçişlerinden kaynaklanmaktadır (Marciniak ve ark., 1990). IS-7 bileşiminin CHCl_3 içerisinde kaydedilen UV-Vis spektrumunda ortaya çıkan 450 ve 475 nm civarında ortaya çıkan ve $n-\pi^*$ geçişlerinden kaynaklanan yeni bantlar imin bağı oluşumunu kanıtlar niteliktedir.

IS-7 bileşiminin CDCl_3 içerisinde alınan ^1H NMR spektrumunda (**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**) her bir pikin bağıl alan oranı, o piki veren proton sayısı ile orantılıdır. Alan oranları di-imin yapısını açık bir şekilde doğrulamaktadır. 1.55-1.59 ppm'de görülen üst üste binmiş iki dublet, gossypol yapısındaki izopropil grubuna ait metil protonlarına aittir. 2.18 ppm'de görülen ve 6H alan oranına sahip olan singlet gossypol iskeletindeki $\text{Ar}-\text{CH}_3$ protonlarının varlığını işaret etmektedir. Gossypol

bileşindeki 1, 6 ve 7 numaralı –OH protonları sırasıyla 5.86, 7.65 ve 14.74 ppm civarında birer sinyal vermiştir. 7 numaralı –OH protonlarına ait sinyal imin azotuyla yaptığı hidrojen bağı nedeniyle düşük alana kaymıştır. 3.75 ppm’deki küçük yedili sinyal, izopropil grubundaki metin protonlarına aittir. (-)-Gossypol bileşiğinin ¹H NMR spektrumunda 11.09 ppm’de gözlenen aldehit protonu bu spektrumda kaybolmuş, bunun yerine 10.15 ve 10.19 ppm’de üst üste binmiş iki singlet gözlenmiştir. Bu sinyaller –CH=N- protonlarının varlığını kanıtlamaktadır. Ayrıca bu bileşiğin ¹H-NMR spektrumunda, IS-5 bileşiğinden farklı olarak 4.03 ppm’de, anisidin halkasındaki metoksi protonları alan oranı 6H olan bir singet vermişlerdir.

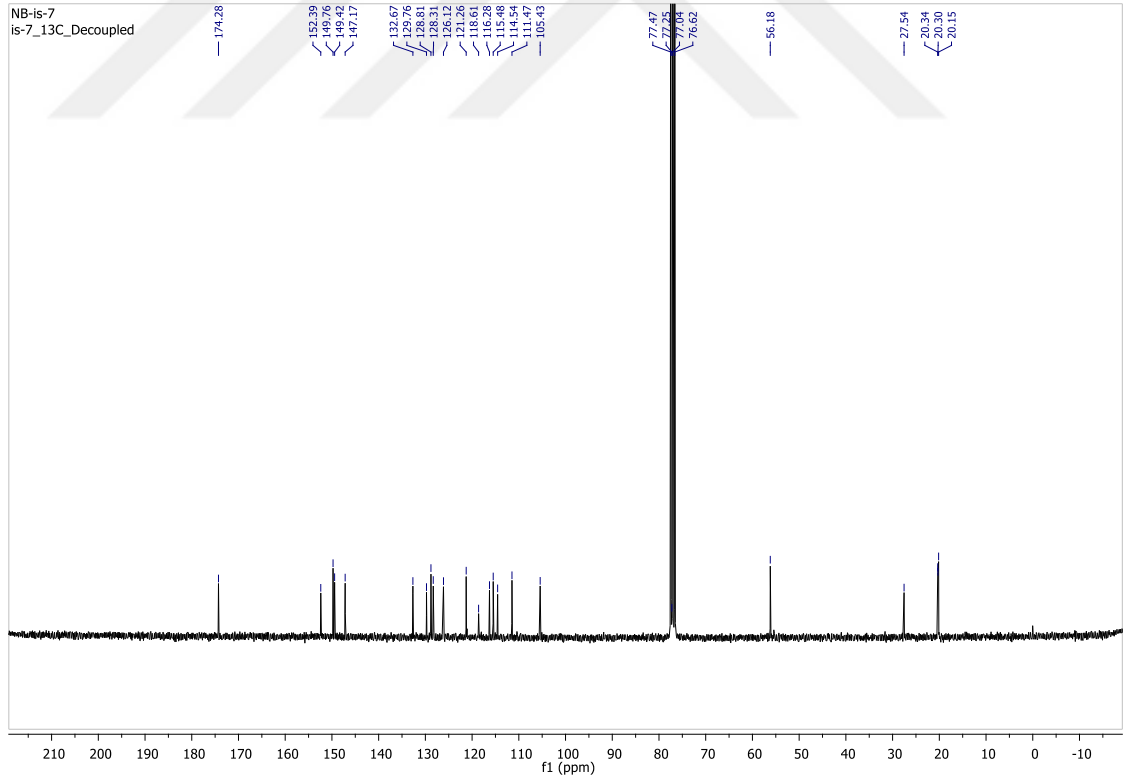


Şekil 4.24. (a) Gossypol bileşiğinin CHCl₃ içerisinde alınmış UV-Vis spektrumu (b) IS-7 bileşiğinin CHCl₃ içerisinde alınmış UV-Vis spektrumu



Şekil 4.25. IS-7 Bileşiğinin ^1H NMR Spektrumu (CDCl_3)

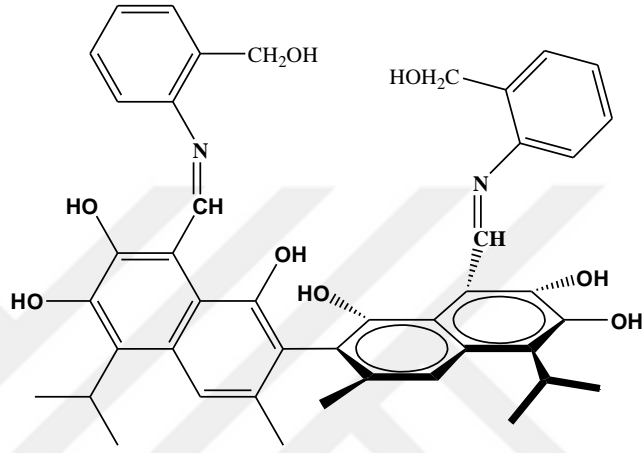
IS-7 bileşiğinin CDCl_3 içerisinde alınan ^{13}C NMR spektrumu da (Şekil 4.26), ^1H NMR spektrumunu destekler niteliktedir. 20 ppm civarında görünen çok sayıda pik, moleküldeki aromatik $-\text{CH}_3$ karbonlarının (gossypol iskeletindeki) varlığını gösterirken, 27,54 ppm'de gözlenen sinyal gossypol iskeletindeki izopropil metin karbonlarına aittir. **IS-7** bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumunda **IS-5** bileşiğinden farklı olarak 56.18 ppm'de görülen sinyal, anisidin halkarındaki $-\text{OCH}_3$ karbonuna aittir. Spektrumda 105,43 ve 132,67 ppm aralığındaki sinyaller aromatik karbonlara aittir. Yine **IS-5** bileşiğinden farklı olarak burada 147,17, 149,42, 149,76 ve 152,39 ppm'de gözlenen dört adet pik, gossypol halkasındaki fenolik $-\text{OH}$ gruplarını taşıyan ve anisidin halkarındaki $-\text{OCH}_3$ gruplarını taşıyan aromatik karbonların varlığını işaret etmektedir. Burada da, 174,28 ppm'deki imin ($\text{CH}=\text{N}$) karbonuna ait pik, Schiff bazı oluşumunu destekleyen önemli kanıtlardan biridir.



Şekil 4.26. IS-7 Bileşiğinin ^{13}C NMR Spektrumu (CDCl_3)

4.3.3. (-)-Gossypol 2-aminobenzil alkol Schiff Bazının Yapısının Aydınlatılması, IS-10

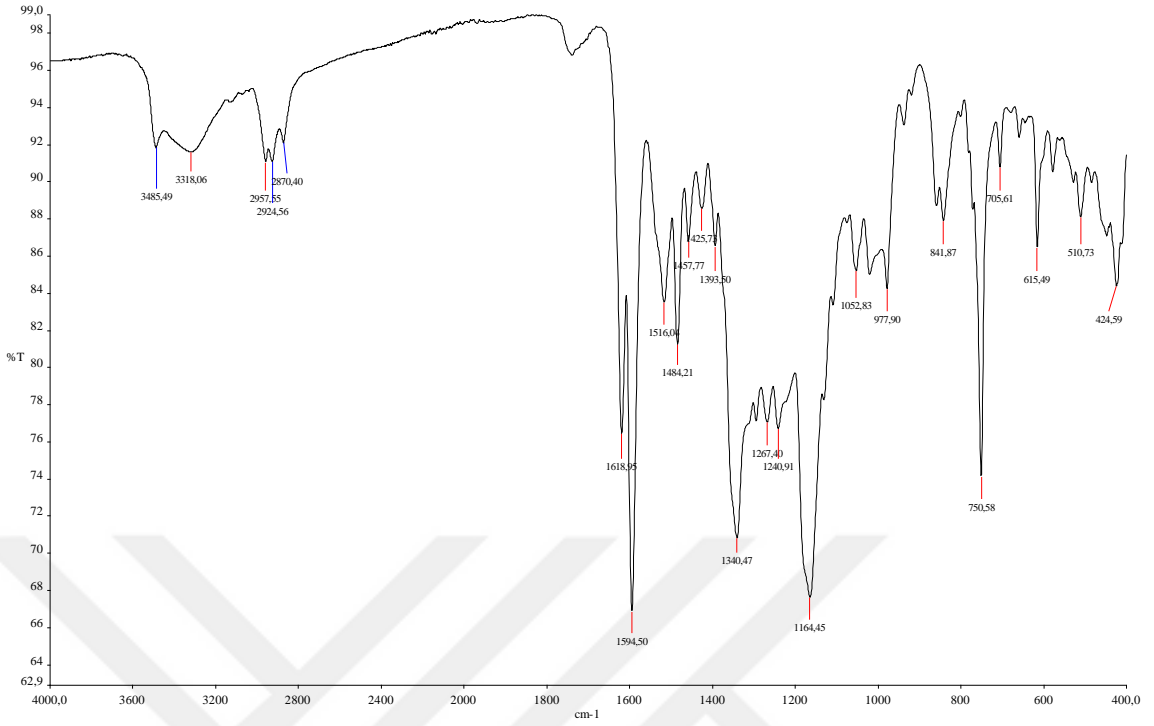
Elementel analiz ve spektroskopik analiz sonuçları IS-10 bileşiğinin yapısının Şekil 4.27'deki gibi olduğunu göstermektedir. Kahverengi katı, 0.097 g (Verim: %69), E.N.= 243-245°C. $[\alpha]_D^{25} = -2122^\circ$ (c 0.00021, CHCl₃). **Elementel Analiz:** Hesaplanan C, 72.51; H, 6.09; N, 3.84. Bulunan C, 72.03; H, 5.92; N, 3.69.



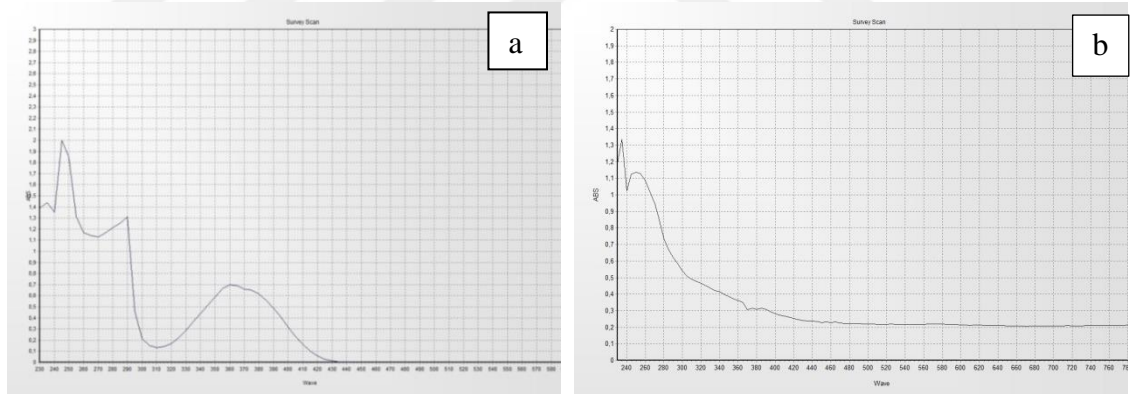
Şekil 4.27. IS-10 Bileşiğinin Kimyasal Yapısı

IS-10 bileşiğinin FT-IR spektrumu da (Şekil 4.28) IS-5 ve IS-7'ninkine benzemektedir. Bu spektrumda da 3485 ve 3318 cm⁻¹'de hidrojen bağı yapmayan –OH gruplarının (1 ve 1' -OH grupları gibi) gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Moleküller arası ve molekül içi hidrojen bağı yapan 6 ve 6' konumlarındaki –OH gruplarına ait pikler ise daha düşük dalgalı boylarında daha geniş pikler vermektedir. Spektrumda 1618 ve 1594 cm⁻¹'de gözlenen pikler $\nu C=N$ and $\nu C=C$ titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Przybylski ve ark., 2008). Gossypol bileşiğinin FT-IR spektrumunda 1570 cm⁻¹ civarındaki pikin kaybolması ve buradaki spektrumda 1516 cm⁻¹ civarında ortaya çıkan yeni pikler Schiff bazı oluşumunu destekler niteliktedir (Przybylski ve ark., 2008).

Şekil 4.29'da gossypol bileşiğinin (a) ve IS-10 bileşiğinin CHCl₃ içerisindeki 10⁻⁵ M'lık çözeltileri ile kaydedilmiş UV-Vis spektrumları görülmektedir. IS-7 ve IS-10'un UV-Vis spektrumlarına benzer şekilde IS-10 bileşiğinin de UV-Vis spektrumu Gossypolden oldukça farklı olup, 400 nm'den sonra ortaya çıkan ve n- π^* geçişlerinden kaynaklanan yeni bantlar imin bağı oluşumunu kanıtlar niteliktedir.



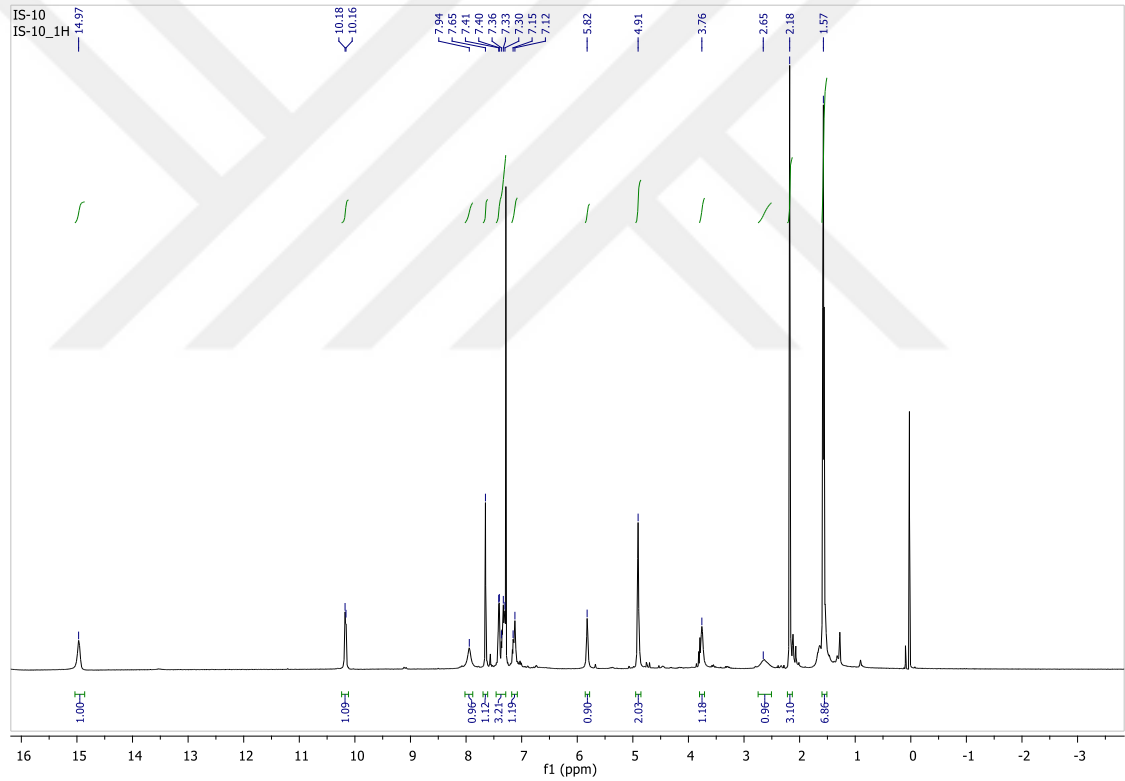
Şekil 4.28. IS-10 Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)



Şekil 4.29. (a) Gossypol bileşiğinin CHCl_3 içerisinde alınmış UV-Vis spektrumu (b) **IS-10** bileşiğinin CHCl_3 içerisinde alınmış UV-Vis spektrumu

IS-10 bileşiğinin CDCl_3 içerisinde alınan ^1H NMR spektrumunda (Şekil 4.30) her bir pikin bağıl alan oranı, o piki veren proton sayısı ile orantılıdır ve spektrum yapıyı doğrulamaktadır. 1.57 ppm'de görülen üst üste binmiş iki dublet, gossypol yapısındaki izopropil grubuna ait metil protonlarına aittir ve alan oranı nedeniyle 12 adet hidrojeni temsil etmektedir. 2.18 ppm'de görülen ve 6H alan oranına sahip olan singlet gossypol iskeletindeki Ar-CH_3 protonlarının varlığını işaret etmektedir. Gossypol bileşiğindeki 1, 6 ve 7 numaralı $-\text{OH}$ protonları sırasıyla 5.82, 7.65 ve 14.97 ppm civarında birer sinyal

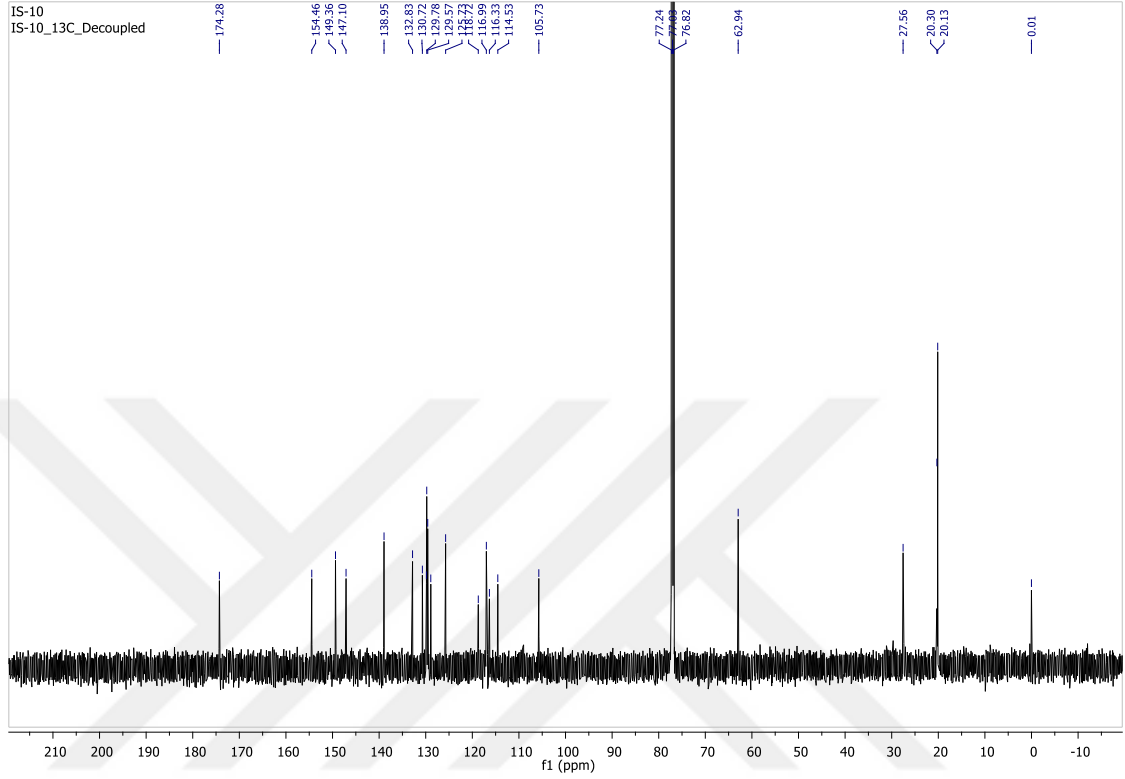
vermiştir. 7 numaralı –OH protonlarına ait sinyal burada da imin azotuyla yaptığı hidrojen bağı nedeniyle düşük alana kaymıştır. 3.76 ppm'deki küçük yedili sinyal, izopropil grubundaki metin protonlarına aittir. (-)-Gossypol bileşiğinin ^1H NMR spektrumunda 11.09 ppm'de gözlenen aldehit protonu bu spektrumda kaybolmuş, bunun yerine 10.16 ve 10.18 ppm'de üst üste binmiş iki singlet gözlenmiştir. Bu sinyaller –CH=N- protonlarının varlığını kanıtlamaktadır. Ayrıca bu bileşiğin ^1H -NMR spektrumunda, 4.91 ppm'deki sinyal –CH₂-OH grubundaki metilen hidrojenlerine, 2.65 ppm'deki sinyal ise –CH₂-OH grubundaki –OH protonlarına aittir. 7.12-7.41 ppm aralığındaki multipletler ise gossypol yapısına yeni katılan aromatik halkalardaki protonların varlığını işaret etmektedir.



Şekil 4.30. IS-10 Bileşiğinin ^1H NMR Spektrumu (CDCl_3)

^{13}C NMR spektrumu da (Şekil 4.31) hem ^1H NMR spektrumunu hem de IS-10 bileşiğinin yapısını desteklemektedir. Genel olarak IS-10 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu, IS-5 ve IS-7'ninkilere benzemekle birlikte burada –CH₂OH grubu karbonunda kaynaklı olarak 62.94 ppm'de yeni bir sinyal gözlenmektedir. Yine burada da 174.28 ppm'de imin karbonu, 105.73-154.46 ppm aralığında da aromatik karbonlara

ait pikler görülmektedir. 154.46, 149.36 ve 147.10 ppm'deki sinyaller, gossypol iskeletindeki –OH grubu taşıyan karbonlara aittir.



Şekil 4.31. IS-10 Bileşiğinin ¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃)

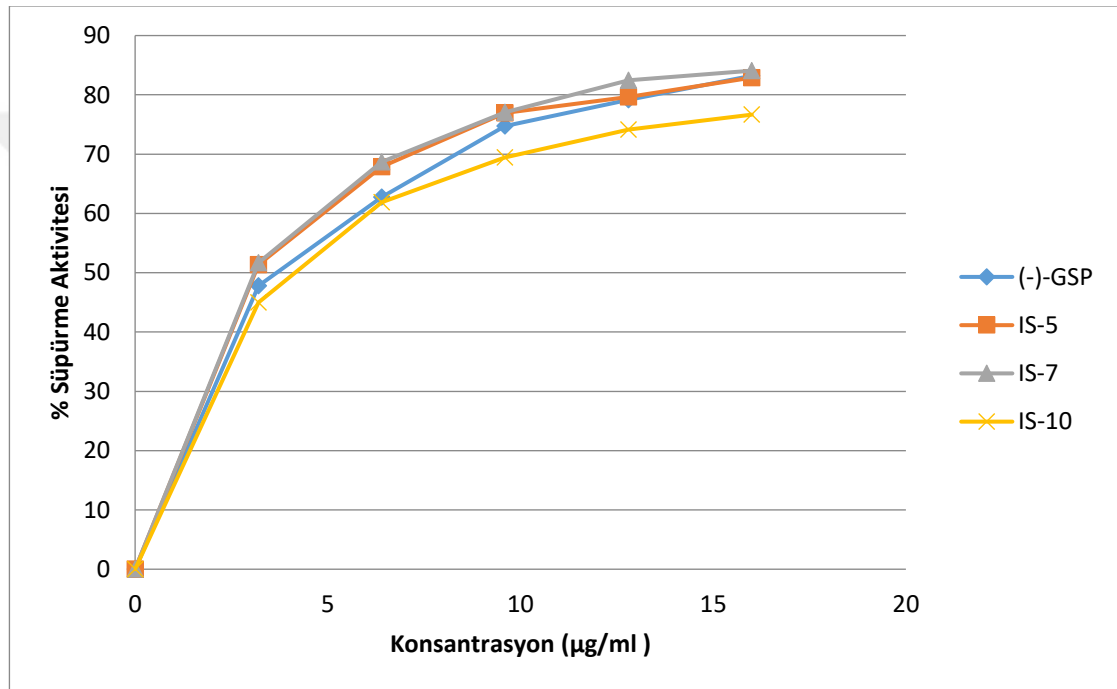
4.4. Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları

Çalışma kapsamında sentezlemiş olduğumuz (-)-gossypol Schiff bazı türevi bileşiklerin ve ayrıca (-)-gossypol bileşiğinin antioksidan aktiviteleri DPPH radikal süpürme yöntemi ile tespit edildi. Bu amaçla antioksidan aktivitesi değerlendirilecek olan her maddenin beş farklı konsantrasyonu için ve ayrıca aynı şartlar altında kör çözeltinin 517 nm'deki maksimum absorbansı ölçüldü ve her işlem üçer kez tekrarlandı. Elde edilen değerler formülde yerine konarak, her bileşiğin farklı konsantrasyonları için % süpürme aktiviteleri hesaplandı. Bu değerler Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Ardından elde edilen % inhibisyon değerleri konsantrasyona karşı grafiğe (Şekil 4.32) geçirilerek her bir bileşik için IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀ değeri, başlangıçtaki DPPH konsantrasyonunun %50'sinin indirgenmesi için gerekli antioksidan konsantrasyonu anlamına gelmektedir (Seyhan, 2019).

Çizelge 4.1. DPPH Radikal Süpürme Yöntemi ile Elde Edilen % İnhibisyon Değerleri

Bileşiğin ismi/ Konsantrasyonu	3,2 µg/ml	6,4 µg/ml	9,6 µg/ml	12,8 µg/ml	16,0 µg/ml
(-)-Gossypol	47,78 ± 0,8	62,75± 1,2	74,74±1,2	79,18 ±1,3	83,22 ±0,8
IS-5	51,36 ±1,3	67,88±1,3	76,97±0,9	79,66 ±1,2	82,90 ±1,2
IS-7	51,69 ± 1,6	68,70 ±1,5	77,07 ±0,9	82,46 ±1,5	84,08 ±1,4
IS-10	44,97 ±1,7	61,91 ±1,8	69,44 ±1,4	74,13 ±1,5	76,66 ±1,4



Şekil 4.32. DPPH Radikal % Süpürme Değerlerinin Antioksidan Konsantrasyonuna Karşı Grafiği

IC₅₀ değerleri, (-)-Gossypol için 4.60 µg/ml, IS-5 için 2.68 µg/ml, IS-7 için 2.84 µg/ml ve IS-10 için ise 3.04 µg/ml olarak hesaplandı. Gossypol bileşiğinin iyi bir antioksidan ve serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilecek polifenolik bir bileşik olduğu uzun zamandır bilinmektedir (Laughton ve ark., 1989). Buradaki IC₅₀ değerlerini karşılaştırdığımızda, DPPH radikal süpürme aktivitesi bakımından (-)-gossypol Schiff bazı türevlerinin, (-)-gossypol bileşiğine göre daha iyi bir aktivite gösterdiğini söylemek mümkündür. Literatürde de belirtildiği üzere, DPPH radikali, fenol veya imin gruplarındaki mobil hidrojenleri alarak kararlı DPPH-H formuna dönüşmektedir (Ilkevych ve ark., 2012). Bu da, hem imin hem de fenolik mobil hidrojenlere sahip Schiff

bazı bileşiklerinin (-)-gossypol bileşiğinin kendisine göre neden daha iyi bir radikal süpürücü olduğunu açıklamaktadır.

4.5. Moleküler Kenetleme Sonuçları

Kanser, günümüzde dünya çapında en önemli sağlık problemlerinden biri olarak kabul edilmekte ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra en yaygın ölüm nedeni olarak yerini almaktadır. Kanser tedavisinde son yıllarda dikkate değer pek çok gelişme olmasına rağmen, her geçen gün hastalık oranı ve ölüm sayılarının artması, araştırmacıları yeni antikanser bileşikler bulmaya yönlendirmektedir. Ayrıca, kanser kemoterapisindeki çoklu ilaç direnci bu alandaki en önemli zorluklardan biridir. Bunun üstesinden gelmek için geliştirilen bir yöntem olarak kombinasyon kemoterapisi, kanser hücrelerinde birden fazla hedefi vurmaya amaçlayan bir yaklaşımdır. Kanser tedavisinin güçlü öğelerinden biri olarak multikinaz inhibitörlerinin ortaya çıkışı, çoklu ilaç direncinin üstesinden gelmek için kullanılacak yeni bir strateji olarak gösterilmektedir (Abdelazeem ve ark., 2021).

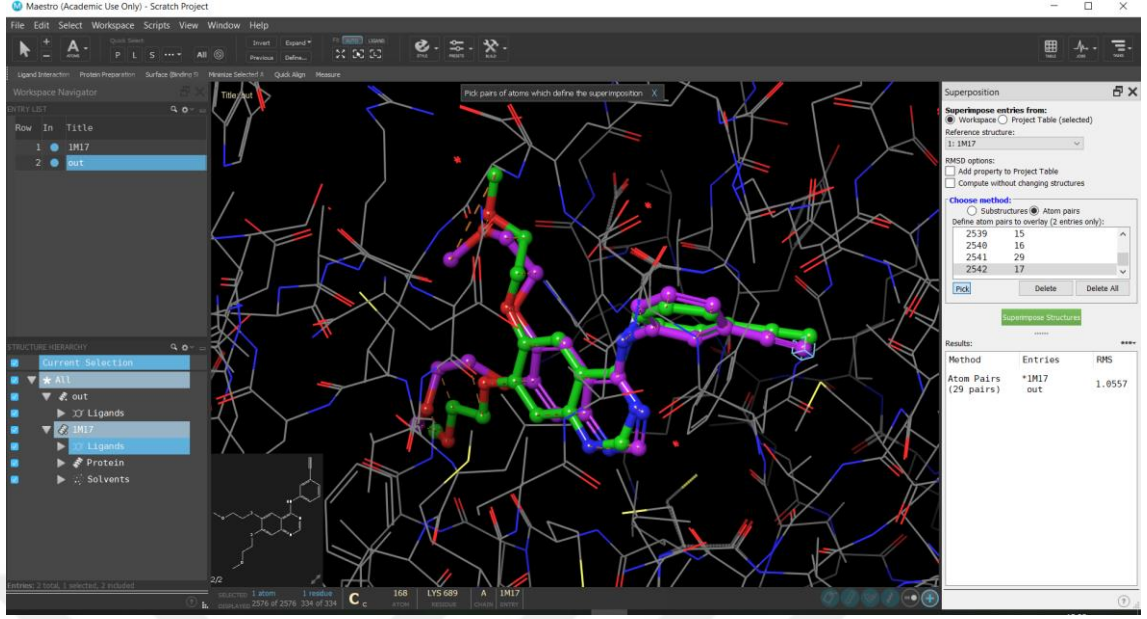
Kinaz enzimleri, yüksek enerjili, fosfat verici moleküllerden belirli substratlara fosfat gruplarının transferini katalize ederler. Bu işleme fosforilasyon adı verilir. Yüksek enerjili ATP (adenozin trifosfat) molekülü fosfat grubunu substrat molekülüne verir. Bu transesterifikasyon işlemi, fosforile edilmiş bir substrat ve adenzin di fosfat (ADP) molekülünün oluşumuna yol açar. Eğer fosforlanmış substrat fosfat grubunu ADP molekülüne verir ve onun ATP'ye dönüşümüne yol açarsa bu işleme de defosforilasyon adı verilir. O halde kinaz enzimleri, fosfotransferazlar olarak ta bilinen büyük bir enzim ailesinin önemli bir parçasıdır. Bir molekülün fosforilasyonu o molekül ister bir protein ister bir lipid veya karbohidrat olsun, molekülün aktivitesini, reaktivitesini ve diğer moleküllere bağlanma yeteneğini etkiler. Bu nedenle kinaz enzimleri metabolizma, hücre sinyalizasyonu, protein kontrolü, hücresel transport ve salınım işlemleri gibi pek çok hücresel işlemde önemli rol oynarlar. Kinaz enzimlerindeki mutasyonlar ise bazı fonksiyonların kaybolmasına ve bazı fonksiyonların artmasına neden olabilir ve bunun sonucunda da çeşitli kanser türleri ortaya çıkabilir (Torkamani ve ark., 2009).

Biz de çalışmamızın *in silico* antikanser aktivite tayini bölümünde hedef olarak bazı kinaz proteinlerini seçtik. Bunu seçerken de gossypol bileşiği ile daha önce yapılmış olan antikanser çalışmalarını taradık. Liang ve ark., 1995, yaptıkları çalışmada (-)-gossypol

Schiff bazı türevlerinin MCF-7 olarak bilinen meme kanseri hücre hattında umut verici sonuçlar gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca bunun yanısıra gossypol türevlerinin MCF-7 kanser hücre hattı üzerinde etkisi olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Liu ve ark., 2022). Yine (-)-Gossypol bileşiğinin baş ve boyun tümörlerinde de hem büyümeyi inhibe ederek hem de apoptozisi uyularak tedavi edici bir potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Wolter ve ark., 2006). Biz de bu bilgiler ışığında meme ve baş ve boyun kanserinde önemli bir rolü olduğu bilinen EGRF (epidermal growth factor receptor tirozin kinaz) (Miller ve ark., 1994; Rehmani ve Issaeva 2020), ayrıca yine meme kanserinde önemli rol oynayan (Chakraborty ve ark., 2006) Lenfosit spesifik protein tirozin kinaz (LCK) proteinlerini, kenetleme işlemleri için hedef proteinler olarak seçtik.

4.5.1. EGRF ile Yapılan Kenetleme Çalışması

Çalışmanın bu bölümünde Protein Data Bank sitesinde **1M17** kodu ile gösterilmiş olan Epidermal Büyüme Faktörü (EGRF) Tirozin Kinaz enzimi kullanıldı. Enzim, kendi doğal inhibitörü Erlotinib ([6,7 bis(2-metoksi-etoksi)kinazolin-4-il]-(3-etinilfenil)amin] bileşiği ile birlikte kristallendirilip yapısı aydınlatılmıştır (Stamos ve ark., 2002). Sentezlemiş olduğumuz bileşiklerin kenetleme işlemine başlamadan önce yöntemimizin validasyonu için hedef proteini, inhibitör Erlotinib ile yeniden kenetleme işlemine tabii tuttuk. Validasyon işlemi için Erlotinib molekülü Chem Draw Ultra 12.0 ile çizildikten sonra, Avogadro 1.2.0 yazılımı ile üç boyutlu hale dönüştürüldü ve geometri optimizasyonu yapıldı. Autodock Vina 1.2.0 yazılımı ile 1M17 ile Erlotinib molekülünün yeniden kenetleme işlemi gerçekleştirildikten sonra, deneysel olarak elde edilmiş olan sonuçla karşılaştırıldı (Şekil 4.33). Sonuçlar Maestro 13.0 yazılımında üstüste çakıştırıldı ve RMS (Root mean square, karekök ortalama) değeri 1.0557 olarak bulundu. RMS değerinin 1.0'a yakın bir değer olması yöntemimizin güvenilirliğini ortaya koymaktadır (Castro-Alvarez ve ark., 2017).



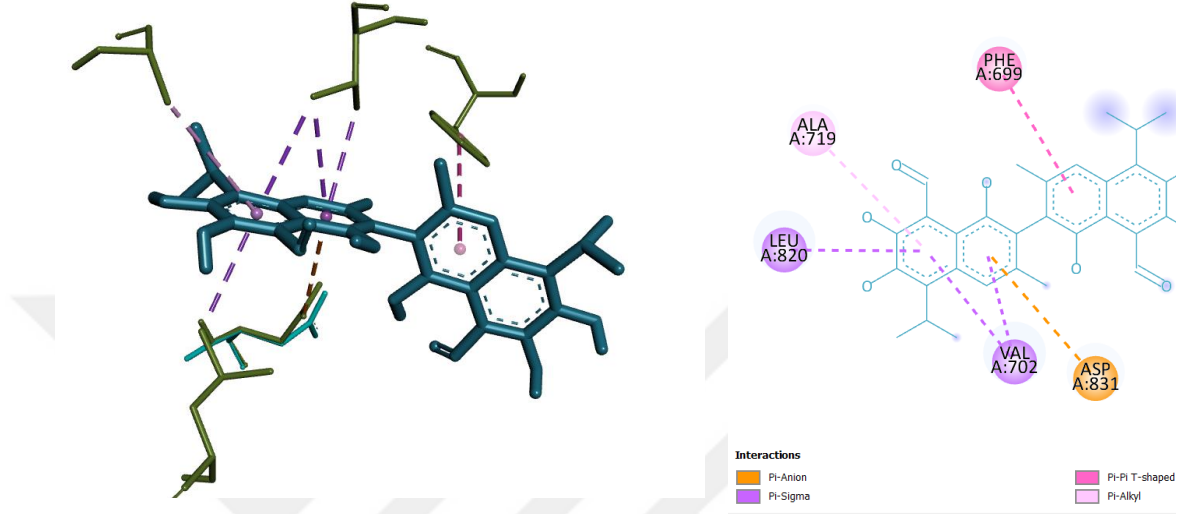
Şekil 4.33. 1M17 için Moleküler Kenetleme İşleminin Validasyonu. **Mor** = 1M17 ile birlikte kristallendirilmiş olan Erlotinib molekülü. **Yeşil** = Tarafımızca enzime kenetleme işlemi yardımıyla bağlanan Erlotinib molekülü.

Validasyon işleminin ardından (-)-Gossypol ve sentezlemiş olduğumuz yeni bileşiklerin de Epidermal Büyüme Faktörü (EGRF) Tirozin Kinaz ile olan kenetlenmelerini, bağlanma enerji değerlerini (Çizelge 4.2) ve bağlanma modlarını doğal inhibitör Erlotinib ile karşılaştırarak inceledik. Ligandların 1M17 hedef proteini ile etkileşmelerine ait bağlanma enerji değerleri incelendiğinde, hem (-)-Gossypol hem de sentezlemiş olduğumuz Schiff bazlarının proteine olan bağlanma ilgilerinin, Erlotinib molekülüne göre daha iyi oldukları göze çarpmaktadır.

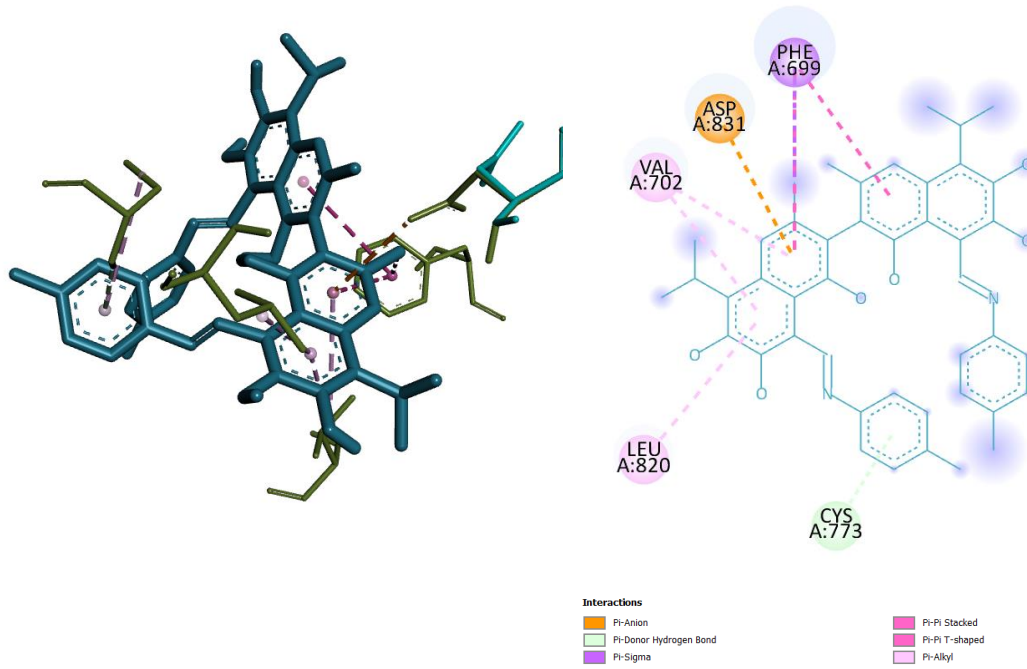
Çizelge 4.2. 1M17 Hedef Proteini ile Kenetlenmiş Ligandların Autodock Vina ile Hesaplanan Bağlanma Enerjileri

Ligandın ismi	Bağlanma enerjisi (kcal/mol)
Erlotinib	-7.5
(-)-Gossypol	-8.4
IS-5	-8.4
IS-7	-9.7
IS-10	-10.2

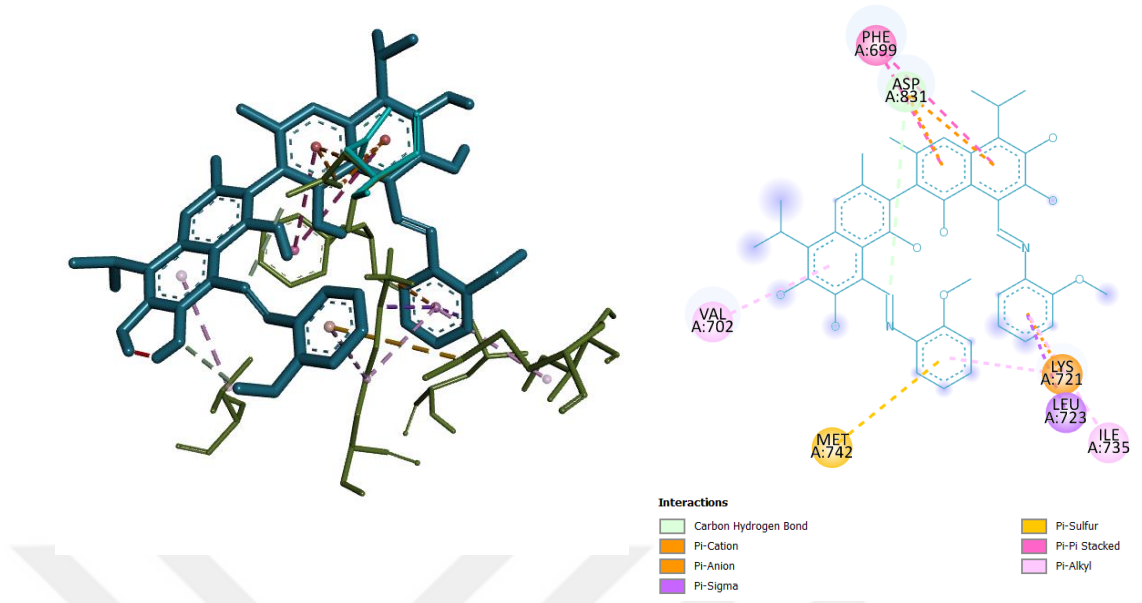
Erlotinib molekülünün 1M17 hedef proteini ile olan bağlanma modu literatürde incelendiği zaman, Erlotinib molekülünün, proteinin aktif bölgesindeki MET769, GLN767, THR766, THR830, LYS721 ve ASP831 aminoasitleriyle etkileştiği bildirilmiştir (Park ve ark., 2012).



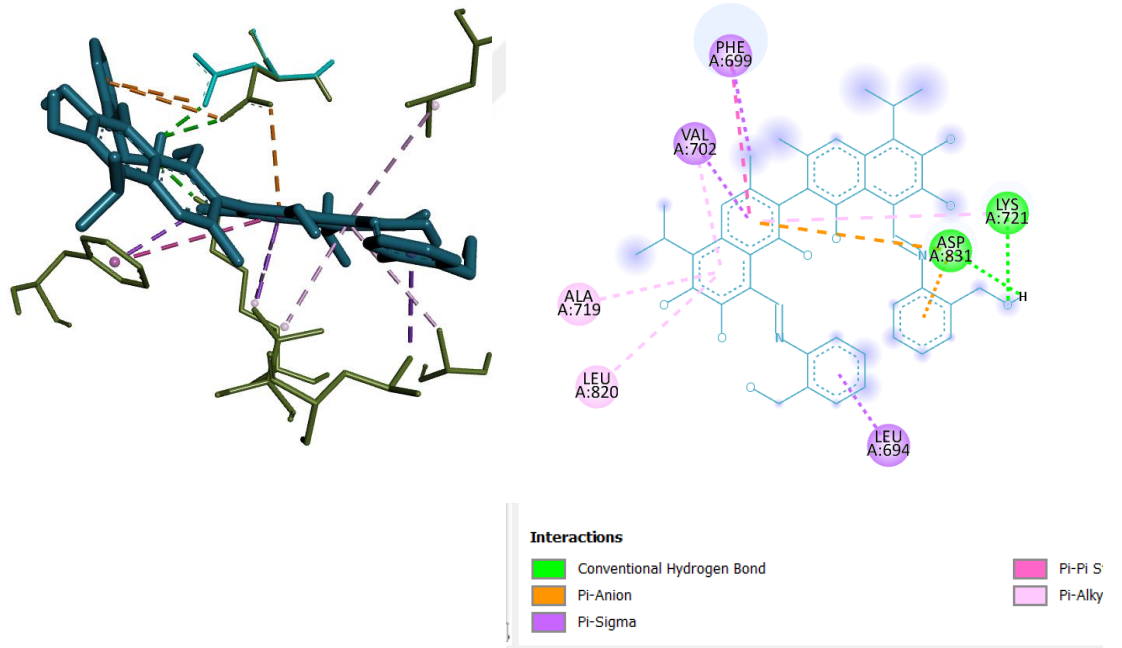
Şekil 4.34. (-)-Gossypol Bileşiğinin 1M17 proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi



Şekil 4.35. IS-5 Bileşiğinin 1M17 proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi



Şekil 4.36. IS-7 Bileşiğinin 1M17 proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi



Şekil 4.37. IS-10 Bileşiğinin 1M17 proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi

(-)-Gossypol ve sentezlediğimiz Schiff bazlarının Autodock Vina yazılımı ile elde edilmiş bağlanma modları ise (

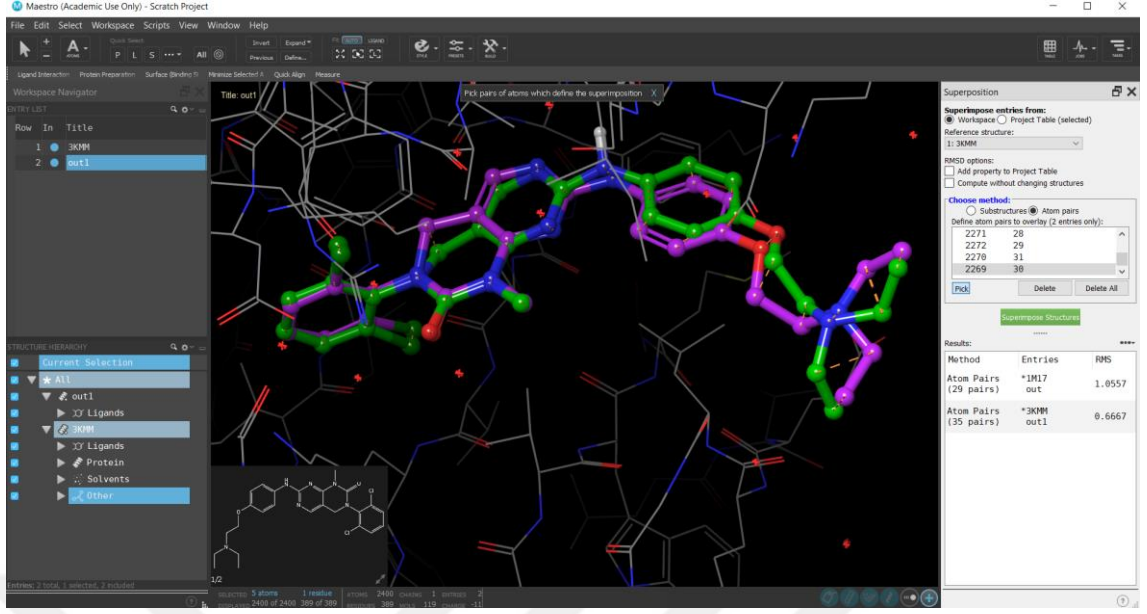
Şekil 4.34,

Şekil 4.35, Şekil 4.36 ve Şekil 4.37), tüm bileşiklerin tıpkı Erlotinib gibi ASP831 amino asiti ile etkileştiğini göstermektedir. Ancak IS-7 ve IS-10 bileşiklerinin bağlanma modlarında ASP831 aminoasitinin yanısıra LYS721 ile de etkileştikleri dikkati çekmektedir. Ayrıca bağlanma enerji değeri en düşük olan IS-10 bileşiğinin bu iki aminoasit ile hidrojen bağı yapmış olması, IS-10 molekülünün bu enzimin inhibitörü olarak bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

4.5.2. LCK ile Yapılan Kenetleme İşlemi

Çalışmanın bu bölümünde Protein Data Bank sitesinde **3KMM** kodu ile gösterilmiş olan Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase enzimi kullanıldı. Enzim, kendi inhibitörü olan molekül, 3-(2,6-diklorofenil)-7-({4-[2-(diethylamino)etoksi]fenil}amino)-1-metil-3,4-dihidropirimido[4,5-d]pirimidin-2(1H)-on bileşiği ile birlikte kristallendirilip yapısı aydınlatılmıştır. Sentezlemiş olduğumuz bileşiklerin kenetleme işlemine başlamadan önce yöntemimizin validasyonu için hedef proteini, inhibitör ile yeniden kenetleme işlemine tabii tuttuk. Validasyon işlemi için inhibitör molekülü Chem Draw Ultra 12.0 ile çizildikten sonra, Avogadro 1.2.0 yazılımı ile üç boyutlu hale dönüştürüldü ve geometri optimizasyonu yapıldı. Autodock Vina 1.2.0 yazılımı ile 3KMM ile inhibitörün yeniden kenetleme işlemi gerçekleştirildikten sonra, deneysel olarak elde edilmiş olan sonuçla karşılaştırıldı. Sonuçlar Maestro 13.0 yazılımında üstüste çakıştırıldı ve RMS (Root mean square, karekök ortalama) değeri 0.6667 olarak bulundu. RMS değerinin 1.0'den oldukça düşük bir değer olması yöntemimizin güvenilirliğini ortaya koymaktadır (Castro-Alvarez ve ark., 2017).

Validasyon işleminin ardından (-)-Gossypol ve sentezlemiş olduğumuz yeni bileşiklerin de Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK) ile olan kenetlenmelerini, bağlanma enerji değerlerini (Çizelge 4.3) ve bağlanma modlarını doğal inhibitör molekülü ile karşılaştırarak inceledik. Ligandların 3KMM hedef proteini ile etkileşmelerine ait bağlanma enerji değerleri incelendiğinde, (-)-Gossypol bileşiğinin kendisinin değil ama Schiff bazı türevlerinin inhibitöre göre daha iyi oldukları göze çarpmaktadır.



Şekil 4.38. 3KMM için Moleküler Kenetleme İşleminin Validasyonu. Yeşil = 3KMM ile birlikte kristallendirilmiş olan inhibitör molekülü. Mor = Tarafımızca enzime kenetleme işlemi yardımıyla bağlanan inhibitör molekülü.

Çizelge 4.3. 3KMM Hedef Proteinini ile Kenetlenmiş Ligandların Autodock Vina ile Hesaplanan Bağlanma Enerjileri

Ligandın ismi	Bağlanma enerjisi (kcal/mol)
İnhibitör	-8.7
(-)-Gossypol	-7.7
IS-5	-9.9
IS-7	-9.3
IS-10	-8.9

Sırasıyla

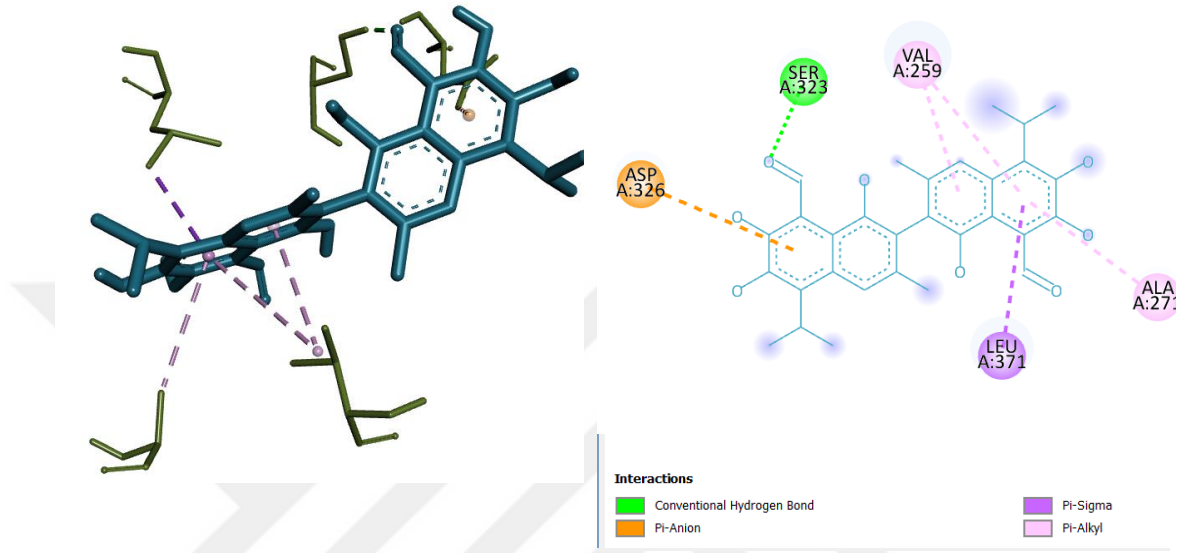
Şekil 4.39,

Şekil 4.40,

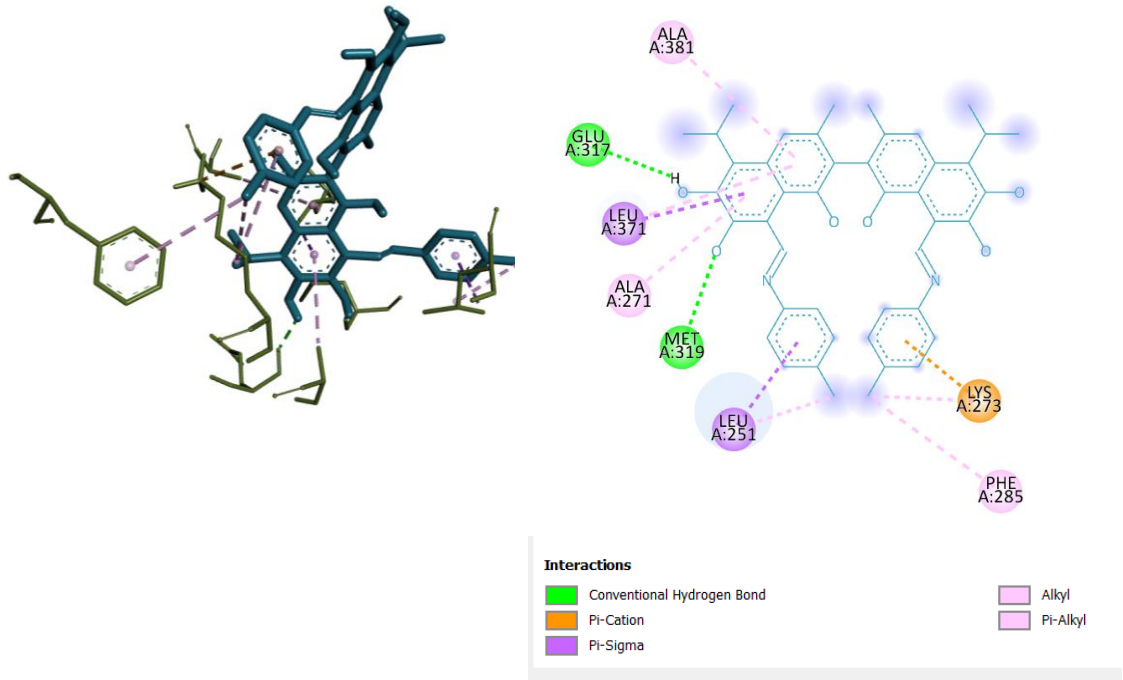
Şekil 4.41 ve

Şekil 4.42’de, (-)-Gossypol, IS-5, IS-7 ve IS-10 bileşiklerinin 3KMM kodlu LCK enzimine bağlanma modları görülmektedir. Literatürde, Staurosporine isimli inhibitörle LCK enziminin oluşturduğu kompleksin yapısı incelendiğinde, inhibitör molekülle enzime ait GLU317 ve MET319 aminoasitleri arasında hidrojen bağı olduğu bildirilmiştir (Zhu ve ark., 1999). Nitekim bizim sentezlemiş olduğumuz ligandların 3KMM ile

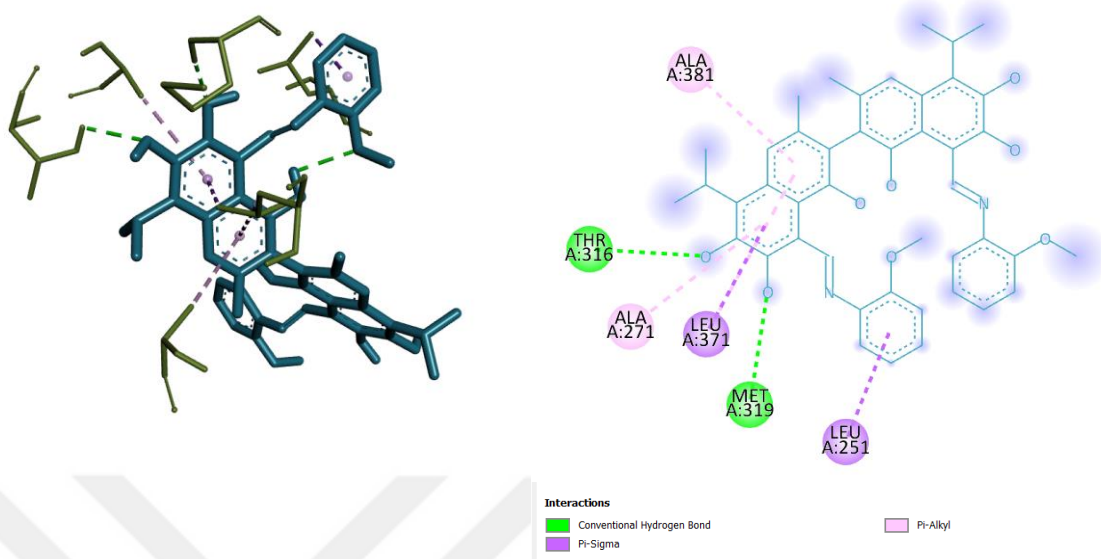
etkileşimlerine baktığımızda, en iyi bağlanma enerjisi değerine sahip IS-5 molekülünün de GLU317 ve MET319 aminoasitleri ile hidrojen bağı yaptıkları görülmektedir. Bu bilgiler ışığında IS-5 bileşiğinin Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase enzimiyle etkileşebilecek bir inhibitör potansiyeline sahip olduğu sonucuna varabiliriz.



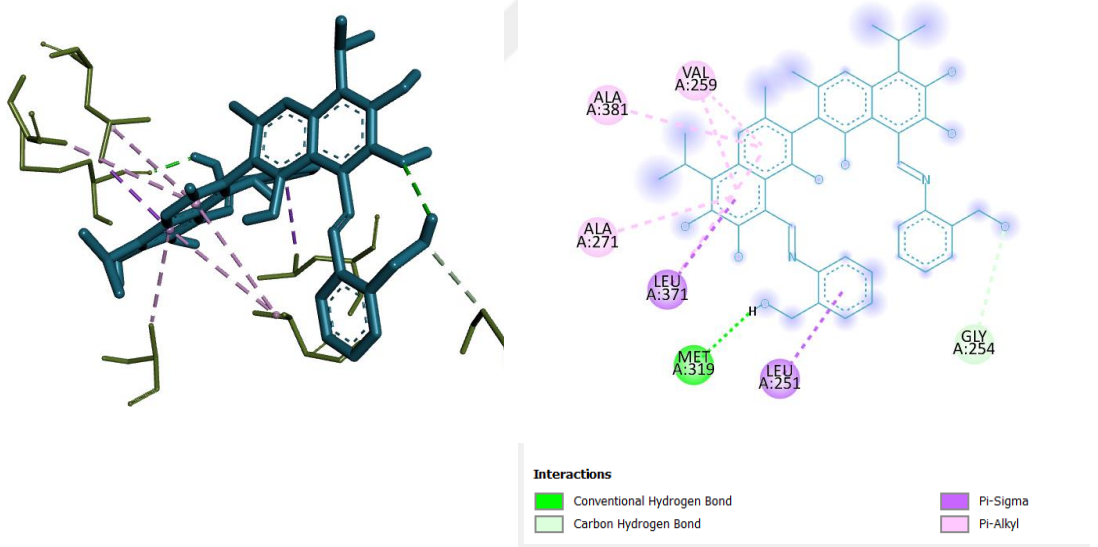
Şekil 4.39. (-)-Gossypol Bileşiğinin 3KMM proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi



Şekil 4.40. IS-5 Bileşiğinin 3KMM proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi



Şekil 4.41. IS-7 Bileşiğinin 3KMM proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi



Şekil 4.42. IS-10 Bileşiğinin 3KMM proteini ile etkileşiminin 3 boyutlu ve 2 boyutlu gösterimi

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Öncelikle bu çalışmada, çok sayıda farklı biyolojik aktiviteye sahip olduğu literatürden bilinen gossypol bileşiğini rasemik formda, pamuk tohumlarından, literatürde var olan izolasyon metotlarından yararlanarak geliştirdiğimiz bir yöntemle, yüksek saflıkta izole etmeyi başardık. İzole etmiş olduğumuz rasemik gossypol bileşiğinin yapısını spektroskopik yöntemler ve HPLC analizi ile, ayrıca SİGMA-ALDRİCH firmasından satın almış olduğumuz referans rasemik gossypol bileşiği ile karşılaştırarak doğruladık.

Ardından rasemik gossypol bileşiğini, yine literatürdeki yöntemlerden yararlanarak, diastereomerik rezolüsyon tekniği yardımıyla enantiyomerlerine saflaştırdık. Zhang ve ark., 2009, biyolojik aktivite açısından (-)-gossypol bileşiğinin (+)-gossypole göre daha üstün olduğunu bildirmiştir. Biz de çalışmamızda sentezlediğimiz bileşiklerin antioksidan ve antikanser aktivitelerini araştırmayı planladığımız için, çalışmanın geri kalanına (-)-gossypol ile devam ettik. Aslında çalışma kapsamında (+)-gossypol bileşiğini saflaştırmış olsak ta, o bileşik başka bir çalışmada kullanılacağı için, bu tez kapsamında verilmemiştir. Saflaştırmış olduğumuz (-)-gossypol bileşiğinin yapısı, polarimetre analizi, spektroskopik analizler ve HPLC analizi yardımıyla doğrulandı.

Çalışmamızın ana hedefi olan (-)-gossypol türevi yeni Schiff bazlarının sentezi de başarıyla gerçekleştirildi. Bu kapsamda, (-)-gossypol bileşiği sırasıyla o-toluidin, p-anisidine ve 2-aminobenzil alkol bileşikleriyle reaksiyona sokularak yeni Schiff bazı yapıları IS-5, IS-7 ve IS-10 sentezlendi. Sentezlenen bileşikler, elementel analiz ve spektroskopik teknikler yardımıyla karakterize edildi.

Çalışmamızın biyolojik aktivite ayağının bir parçası olarak, sentezlemiş olduğumuz bileşiklerin antioksidan aktivitelerini DPPH serbest radikal süpürme yöntemi yardımıyla araştırdık. Yapılan ölçümler ve hesaplamalar sonucu, (-)-Gossypol, IS-5, IS-7 ve IS-10 bileşikleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla, 4.60 µg/ml, 2.68 µg/ml, 2.84 µg/ml ve 3.04 µg/ml olarak bulundu. IC₅₀ değeri başlangıçtaki DPPH serbest radikal konsantrasyonunun yarısını indirmek için gerekli antioksidan miktardır. IC₅₀ değerlerine bakıldığında hem (-)-gossypol hem de Schiff bazı türevlerinin oldukça etkin birer radikal süpürücü olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca Schiff bazıları, (-)-gossypol bileşiğine göre daha yüksek bir antioksidan aktivite göstermiştir.

Çalışmamızda son olarak, (-)-gossypol ve onun Schiff bazı türevleri olan IS-5, IS-7 ve IS-10 bileşiklerinin antikanser aktivitelerini moleküler kenetleme yöntemi ile

araştırdık. Son yıllarda kanser, Alzheimer ve otoimmün hastalıklar gibi hastalıkların tedavisinde çoklu hedef inhibitörlerinin kullanımından ve bu inhibitörlerin sinerjisinden faydalanılarak daha güçlü tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Özellikle kanser tedavisinde, birden fazla kinaz enzimini hedef alan ilaç tasarımlarıyla karşımıza çıkan multikinaz inhibitörleri çok fazla araştırılmaktadır ve klinikte de kullanımları mevcuttur. Biz de bu bilgiler ışığından sentezlemiş olduğumuz bileşiklerin iki farklı kinaz enzimi EGRF (Epidermal Büyüme Faktörü) and LCK (Lenfosit spesifik kinase) enzimlerine bağlanma ilgilerini araştırdık. Elde etmiş olduğumuz moleküler kenetleme sonuçları, hem (-)-gossypol bileşiğinin hem de Schiff bazı türevlerinin bu enzimlere olan ilgilerinin, enzimlerin literatürdeki inhibitörlerine göre daha iyi olduğunu ortaya koydu. Ayrıca IS-5, IS-7 ve IS-10 bileşiklerinin enzimlere olan bağlanma enerjileri hesaplandığında, (-)-gossypolden daha iyi sonuçlar elde edildi.

Sonuç olarak çalışmamız kapsamında, hakemli dergilerde bir makeleye dönüştürülebilecek ve literatüre kazandırılabilir, orijinal ve yüksek biyolojik aktivite potansiyeline sahip bileşikler sentezledik ve karakterize ettik. Gelecekte sentezlemiş olduğumuz bileşiklerin antikanser aktivitelerinin *in vitro* ortamda araştırılması için gerekli girişimlerde bulunmayı planlamaktayız.

KAYNAKLAR

- Abdelazeem, A. H., Alqahtani, A.M., Arab, H.H., Gouda, A.M., El-Dina, A.G.S., 2021. Novel benzo[4,5]thiazolo[2,3-C][1,2,4]triazoles: Design, synthesis, anticancer evaluation, kinase profiling and molecular docking study. **Journal of Molecular Structure**, 1246 (131138): 1-10.
- Adams, R., Dial, W.R., 1939. Structure of Gossypol. XXII. Gossypol Ethers and their Reduction Products. **Journal of American Chemical Society**, 61, 2077–2082.
- Adams, R., Geissman, T.A., Edwards, J.D., 1960. Gossypol, a Pigment of Cottonseed. **Chemical Reviews**, 60, 555–574.
- Adams, R., Geissman, T.A., 1938. Structure of Gossypol. VII. Gossypol Dimethyl Ether. **J. Am. Chem. Soc.** 60, 2163–2166.
- Adams, R., Geissman, T.A., Morris, R.C., 1938. Structure of Gossypol. XVI. Reduction Products of Gossypolone Tetramethyl Ether and Gossypolonic Acid Tetramethyl Ether. **Journal of American Chemical Society**, 60, 2967–2970.
- Adams, R., Morris, R.C., Kirkpatrick, E.C., 1938. Structure of Gossypol. IX.1 Oxidation and Degradation of Gossypol Hexamethyl Ether; Gossic Acid. **Journal of American Chemical Society**, 60, 2170–2174.
- Augustyniak, A., Bartosz, G., Cipak, A., Duburs, G., Horáková, L., Luczaj, W., Majekova, M., Odysseos, A.D., Rackova, L., Skrzydlewska, E., Stefek, M., Strosová, M., Tirzitis, G., Venskutonis, P.R., Viskupicova, J., Vraka, P.S., Zarković, N., 2010. Natural and synthetic antioxidants: An updated overview. **Free Radical Research**, 44(10): 1216–1262.
- Beyazit, N., Çakran, H.S., Cabir, A., Akışcan, Y., Demetgül, C., 2020. Synthesis, characterization and antioxidant activity of chitosan Schiff base derivatives bearing (-)-gossypol. **Carbohydrate Polymers**, 240 (116333): 1-9.
- Chakraborty, G., Rangaswami, H., Jain, S., Kundu, G.C., 2006. Hypoxia regulates cross-talk between Syk and Lck leading to breast cancer progression and angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, 281(16):11322–31.
- Castro-Alvarez, A., Costa, A.M., Vilarrasa, J., 2017. The Performance of Several Docking Programs at Reproducing Protein–Macrolide-Like Crystal Structures, **Molecules**, 22(1):136.
- Dodou, K., Anderson, R.J., Lough, W.J., Small, D.A.P., Shelley, M.D., Groundwater, P.W., 2005. Synthesis of gossypol atropisomers and derivatives and evaluation of their anti-proliferative and anti-oxidant activity, **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 13:4228-4237.
- Eberhardt, J., Santos-Martins, E.J., D., Tillack, A.F., Forli, S., 2021. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 61(8):3891–3898.
- Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E. and Hutchison, G.R., 2012. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, 4(17): 1-17.
- Hron Sr., R.J., Kim, H.L., Calhoun, M.C., Fisher, G.S., 1999. Determination of (+)-, (-)- and Total Gossypol in Cottonseed by High-Performance Liquid Chromatography, **Journal of the American Oil Chemists Society**, 76(11):1351-1355.
- Huang, L., Zheng, D.K., Si, Y.K., 1987. Resolution of Racemic Gossypol, **Journal of Ethnopharmacology**, 20:13-20.

- Ilkevych, N. S., Schroeder, G., Rybachenko, V. I., Chotiyand K. Y., Makarova, R. A., 2012. Vibrational spectra, structure and antioxidant activity of gossypol imine derivatives. **Spectrochimica Acta Part A**, 86:328–335.
- Jiang, H.X., Cao, X.X., Huang, H., Jiang, B., 2007. An expedient route for the practical preparation of optically active (-)-gossypol. **Tetrahedron: Asymmetry**, 18:2437-2441.
- Kedare, S.B., Singh, R. P., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, 48(4):412–422
- Kenar, J.A., 2006. Reaction Chemistry of Gossypol and Its Derivatives. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 83:269-302.
- Keshmiri-Neghab. H., Goliaei, B., 2014. Therapeutic potential of gossypol: an overview. **Pharmaceutical Biology**, 52(1):124-128.
- Laughton, M.J. Halliwell, B. Evans, P.J. Hoult, J.R., 1989. Antioxidant and Pro-oxidant Actions of the Plant Phenolics Quercetin, Gossypol and Myricetin. **Biochemical Pharmacology**, 38(17):2859–2865.
- Liang, X., Rogers, A., Webber, C.L., Ormsby, T., Tiritan, M.E., Matlin S.A., Benz, C., 1995. Developing gossypol derivatives with enhanced antitumor activity. **Investigational New Drugs**, 13:181–186.
- Lin, H., Gounder, M.K., Bertino, J.R., Kong, A.N.T., DiPaola, R.S., Stein, M.N., 2012. A validated HPLC assay for the determination of R-(-)-gossypol in human plasma and its application in clinical pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 66:371-375.
- Liu, Y., Wang, L., Zhao, L., Zhang, Y., 2022. Structure, properties of gossypol and its derivatives—from physiological activities to drug discovery and drug design. **Natural Product Reports**, 39:1282-1304.
- Lu, Y.Z., Wu, S.C., Yue, Y., He, S., Li, J., Tang, J., Wang, W., Zhou, H.B., 2016. Gossypol with Hydrophobic Linear Esters Exhibits Enhanced Antitumor Activity as an Inhibitor of Antiapoptotic Proteins. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, 7:1185–1190.
- Luna, J.S., Bento, E.S., Sant'Ana, A. E. G., Hawkes, G. E., 2004. ¹H and ¹³C NMR Experiments and Chemical Shifts Calculations on Gossypol: a Compound Extracted from Cottonseeds, **Annals of Magnetic Resonance**, 3(1/2):17-19.
- Marciniak, B., Kozubek, H., Koput, J., Paszyc, S., 1990. Spectroscopic and Photochemical Studies of Gossypol in Solution. **Zeitschrift für Naturforsch**, 45a: 179-183.
- Matamoros, E., Cintas P., Palacios, J. C., 2019. Tautomerism and stereodynamics in Schiff bases from gossypol and hemigossypol with *N*-aminoheterocycles. **Organic and Biomolecular Chemistry**, 17:6229–6250.
- Meng, X., Zhang, H.X., Mezei, M., Cui, M., 2011. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computer-Aided Drug Design**, 7(2): 146–57.
- Miller, D.L., el-Ashry, D., Chevillat, A.L., Liu, Y., McLeskey, S.W., Kern, F.G., 1994. Emergence of MCF-7 cells overexpressing a transfected epidermal growth factor receptor (EGFR) under estrogen-depleted conditions: evidence for a role of EGFR in breast cancer growth and progression. **Cell Growth and Differentiation**, 5(12):1263-74.

- Nawab, N.N., Khan, A.A., 2014. Categorization and scaling of distinct gossypol classes with respect to gossypol content in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Environment and Earth Science**, 4(5):1-9.
- Nhung, T.T., Thanh, N.T., Tien, V.D., Huy, L.D., Vu, K., 2018. D-Tryptophan methyl ester as an effective reagent for the preparation of optically active (-)-gossypol. **Indian Journal of Chemistry**, 57B:722-726.
- Nomeir, A.A., Abou-Donia, M.B., 1985. Photodecomposition of gossypol by ultraviolet irradiation. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 62(1):87-89.
- Qian, S.Z, Wang, Z.G., 1984. Gossypol: a potential antifertility agent for males. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 24:329-60.
- Park, J.H., Liu, Y., Lemmon, M.A., Radhakrishnan, R., 2012. Erlotinib binds both inactive and active conformations of the EGFR tyrosine kinase domain. **Biochemical Journal**, 448(Pt 3):417-423.
- Przybylski, P., Pyta, K., Ratajczak-Sitarz, M., Katrusiak, A., Brzezinski, B., 2008. X-ray, FT-IR, ESI MS and PM5 studies of Schiff base of gossypol with allylamine and its complexes with alkali metal cations and perchlorate anion. **Structural Chemistry**, 19:983-995.
- Przybylski, P., Pyta, K., Stefańska, J., Ratajczak-Sitarz, M., Katrusiak, A., Huczyński A., Brzezinski, B., 2009. Synthesis, crystal structures and antibacterial activity studies of aza-derivatives of phytoalexin from cotton plant – gossypol. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44:4393-4403.
- Rahman, M., Islam, B., Biswas, M., Khurshid Alam, A. H. M., 2015. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of different parts of *Tabebuia pallida* growing in Bangladesh. **BMC Research Notes**, 8:621.
- Razakantoanina, V., Phung, N. K. P., Jaureguiberry, G., 2000. Antimalarial activity of new gossypol derivatives. **Parasitology Research**, 86:665-668.
- Rehmani, H.S, Issaeva, N. 2020., EGFR in head and neck squamous cell carcinoma: exploring possibilities of novel drug combinations. **Annals of Translational Medicine**, 8(13):813.
- Seyhan, S. A., 2019. DPPH Antioksidan Analizinin Yeniden Değerlendirilmesi. **Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi**, 9(2):125-135.
- Shelley, M.D., Hartley, L., Fish, R.G., Groundwater, P., Morgan, J.J.G., Mort, D., Mason, M., Evans, A., 1999. Stereo-specific cytotoxic effects of gossypol enantiomers and gossypolone in tumour cell lines. **Cancer Letters**, 135:171-180.
- Silva, C.M., Silva D.L., Modolo, L.V., Alves, R.B., Resende, M.A., Martins, C.V.B, Fatima, A., 2011. Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities, **Journal of Advanced Research**, 2(1):1-8.
- Silva, P.J., 2020. New insights into the mechanism of Schiff base synthesis from aromatic amines in the absence of acid catalyst or polar solvents. **PeerJ Organic Chemistry**, 2:e4, DOI 10.7717/peerj-ochem.
- Stamos, J., Sliwkowski, M.X., Eigenbrot, C., 2002. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, 277: 46265-46272.
- Tiring, G., Satar, S. ve Özkaya, O., 2021. Sekonder Metabolitler. **Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 35(1):203-215.
- Torkamani, A., Verkhivker, G., Schork, N.J., 2009. Cancer Driver Mutations in Protein Kinase Genes. **Cancer Letters**, 281(2):117-127.

- Trott, O., & Olson, A. J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, 31(2):455-461.
- Vu, V. V., Nhung, T. T., Thanh, N. T., Chinh, L. V., Tien, V. D., Thuy, V. T., Thi Thao, D., Nam, N. H., Koeckritz A., Vu, T. K., 2017. Synthesis and biological evaluation of new (-)-gossypol-derived Schiff bases and hydrazones. **Hindawi Journal of Chemistry**, 3687182:1-8.
- Wolter, K.G., Wang, S.J., Henson, B.S., Wang, S., Griffith, K.A., Kumar, B., Chen, J., Carey, T.E., Bradford, C.R., D'Silva, N.J., 2006. (-)-Gossypol Inhibits Growth and Promotes Apoptosis of Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma *in vivo*. **Neoplasia**, 8(3):163-172.
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., Liu, R., 2020. Guidelines for antioxidant assays for food components. **Food Frontiers**. 1(1):1-102.
- Yang, J., Chen, G., Li, L.L., Pan, W., Zhan, F., Yang, J., Wu, S., Tien, P., 2013. Synthesis and anti-H5N1 activity of chiral gossypol derivatives and its analogs implicated by a viral entry blocking mechanism. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 23:2619–2623.
- Yang, J., Li, J. R., Yang, J. X., Li, L. L., Ouyang, W. J., Wu S. W., Zhang, F., 2014. Synthesis and anti-HIV-1 activity of the conjugates of gossypol with oligopeptides and D-glucosamine. **Chinese Chemical Letters**, 25:1052–1056.
- Yang, J., Zhang, F., Li, J. R., Chen, G., Wu, S. W., Ouyang, W. J., Pan, W., Yu, R., Yang J. X., Tien, P., 2012. Synthesis and antiviral activities of novel gossypol derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 22:1415–1420.
- Zhang, L. Jiang, H. X. Cao, X. X. Zhao, H. Y. Wang, F. Cui Y. X. and Jiang, B., 2009. Chiral gossypol derivatives: evaluation of their anticancer activity and molecular modeling. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44:3961–3972.
- Zhang, M.C., Liu, H.P., Tian, Z.K., Griffith, B.N., Ji, M. Li, Q., 2007. Gossypol induces apoptosis in human PC-3 prostate cancer cells by modulating caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways. **Life Sciences**, 80:767–774.
- Zhang, L., Jiang, H., Cao, X., Zhao, H., Wang, F., Cui, Y., Jiang, B., 2009. Chiral gossypol derivatives: Evaluation of their anticancer activity and molecular modeling. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44:3961-3972.
- Zhu, X., Kim, J. L., Newcomb, J. R., Rose, P. E., Stover, D. R., Toledo, L. M., Morgenstern, K. A., 1999. Structural analysis of the lymphocyte-specific kinase Lck in complex with non-selective and Src family selective kinase inhibitors. **Structure**, 7(6):651–661.

ÖZGEÇMİŞ

İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimimi memleketim olan Iğdır'da tamamladım. 2014-2018 yılları arasında Bayburt Üniversitesi Eğitim Fakültesi'nde Fen Bilimleri Öğretmenliği okuyarak lisansımı bitirdim. 2020 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesinde Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladım.

