



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOLMETİN ÜZERİNDEN
HİDRAZİT-HİDRAZONLARIN SENTEZİ
ve BİYOLOJİK ETKİLERİ**

DERYA KOÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ş. Güniz KÜÇÜKGÜZEL

İSTANBUL-2013



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOLMETİN ÜZERİNDEN
HİDRAZİT-HİDRAZONLARIN SENTEZİ
ve BİYOLOJİK ETKİLERİ**

DERYA KOÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ş. Güniz KÜÇÜKGÜZEL

İSTANBUL-2013

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Derya KOÇ
Tez Başlığı : Tolmetin Üzerinden Hidrazit-Hidrazonların Sentezi ve Biyolojik Etkileri
Sınav Yeri : Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 27.11.2013

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Ş. Güniz KÜÇÜKGÜZEL

Kurumu

Marmara Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Ş. Güniz KÜÇÜKGÜZEL

Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Mert ÜLGEN

Acıbadem Üniversitesi

Prof. Dr. Bedia KAYMAKÇIOĞLU

Marmara Üniversitesi

İmza



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 05./11./2013 tarih ve 37. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

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

06.12.2013

Derya KOÇ

İmza



I

Çalışmalarında her an yanımda olarak bana destek veren, bilgi ve tecrübelerinden daima yararlandığım Sayın Hocam Prof. Dr. Ş.Güniz Küçükgül'e, değerli Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İlkay Küçükgül'e, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Pelin Çıkla'ya ve tüm Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkürü bir borç bilirim.

Sentez ilkel maddesinin teminini sağlayan Santa Farma İlaç Sanayii A.Ş.'ye teşekkür ederim. Ayrıca, tez konumu kabul edip (Proje no: SAG-C-YLP-161111-0297) analizlerin yapılmasını sağlayan Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, antikanser ve apoptoz çalışmaları için Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'na da teşekkür ederim.

Son olarak maddi manevi desteklerini benden esirgemeyen canım aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

II

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Tolmetin Hakkında Genel Bilgiler.....	5
4.1.1. Fiziksel, kimyasal ve spektroskopik özellikleri	5
4.1.2. Sentezi ve metabolizması.....	6
4.1.3. Bozunma Ürünleri.....	9
4.1.4. Farmakolojik Özellikleri	10
4.2. Kanser Hakkında Genel Bilgiler	11
4.2.1. Tolmetin Antikanser Etkinlikteki Yeri	12
4.2.2. Hidrazit-Hidrazonlarının Antikanser Etkinlikteki Yeri	12
4.2.3. Apoptoz ve Hidrazit-hidrazonlar	22
5. DENEYSEL BÖLÜM (GEREÇ ve YÖNTEM)	33
5.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	33
5.1.1. Kimyasal maddeler	33
5.1.2. Elektronik cihazlar	33
5.2. Sentez Çalışmaları.....	34
5.2.1. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetik asit [1]	34
5.2.2. Metil 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetat [2]	34
5.2.3. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit [3]	34
5.2.4. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]-N'- [(piridinil/sübstitüefenil/2-furil)metiliden]asetohidrazit [4a-1].....	34
5.3. Kromatografik Çalışmalar.....	36
5.4. Biyolojik Çalışmalar	36
5.4.1. Anti-kanserojenik Etki Çalışması	36
5.4.2. Bileşiklerin HT-29 Hücrelerinde Apoptoz Etkilerinin Çalışması.....	38
5.4.3. Bileşiklerin Annexin V Bağlanması.....	39

6. BULGULAR	40
6.1. Fiziksel, Kimyasal ve Spektroskopik Bilgiler.....	40
6.1.1. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetik asit (1)	40
6.1.2. Metil 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetat (2)	41
6.1.3. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit (3)	43
6.1.4. N'-[Furan-2-il-metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit (4a)	46
6.1.5. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]-N'-[piridin-3-il-metiliden]asetohidrazit (4b)	48
6.1.6. N'-[(2-Fluorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit (4c)	50
6.1.7. N'-[(4-Fluorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit (4d)	52
6.1.8. N'-[(4-Klorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit (4e)	54
6.1.9. N'-[(2,4-Diklorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit (4f)	56
6.1.10. N'-[(2,6-Diklorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit (4g)	58
6.1.11. N'-[(4-Bromofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit (4h)	60
6.1.12. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]-N'-[(4-nitrofenil)metiliden]asetohidrazit(4i)	62
6.1.13. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]-N'-[fenilmetiliden]asetohidrazit (4j)	64
6.1.14. N'-[(4-Metoksifenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit (4k)	66
6.1.15. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]-N'-[3-fenoksifenil-metiliden]asetohidrazit (4l)	68
6.2. Biyolojik Bulgular.....	71
6.2.1 Anti-kanserojenik Etki Çalışması	71

6.2.2. Bileşiklerin HT-29 Hücrelerinde Apoptoz Etkilerinin Araştırılması.....	72
7. TARTIŞMA	75
7.1. Sentez ve Yapı Aydınlatılması.....	75
7.1.1. 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetik asit [1]	78
7.1.2. Metil 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetat [2]	79
7.1.3. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit [3]	83
7.1.4. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]-N'-[(piridinil/sübstitüefenil/2-furil)metiliden]asetohidrazit [4a-1]	90
7.2. UV Bulguları.....	94
7.3. IR Bulguları.....	96
7.4. ¹ H-NMR Bulguları.....	100
7.5. Biyolojik Etkiler.....	109
7.5.1. Anti-kanserojenik Etkinin Araştırılması	109
7.5.2. Apoptoz Etkileri.....	110
8. SONUÇ.....	114
9. KAYNAKLAR	116
10. ÖZGEÇMİŞ.....	126

III KISALTMALAR ve SİMGELER

Ar	: Aromatik
ark.	: Arkadaşları
Bkz.	: Bakınız
COX	: Siklooksijenaz
d.	: Dublet
DAC	: 4-dimetilaminosinnamaldehit
dk.	: Dakika
DMSO-d ₆	: Döterodimetilsülfoksit
CDCl ₃	: Döterokloroform
e.b.	: Eğilme bandı
EI	: Elektron impact
E.n.	: Erime noktası
g	: Gram
g.b.	: Gerilme bandı
GHz	: Gigahertz
¹ H-NMR	: Proton nükleer manyetik rezonans
IR	: Infrared
IC ₅₀	: % 50 İnhibitör Konsantrasyon
İ.T.K.	: İnce tabaka kromatografisi
J	: Etkileşme Değişmezi
kat.	: Katalizör
LC-MS	: Likit Kütle Spektroskopisi
MHz	: Megahertz
M.A.	: Molekül ağırlığı
MS	: Kütle spektrumu
m/z	: Kütle / Yük
s	: Singlet
t	: Triplet

m	: Multiplet
ppm	: Parts per million (milyonda bir)
q	: Quartet
Rf	: Retensiyon faktörü
RNA	: Ribonükleik asit
TMS	: Tetrametilsilan
TLC	: Thin Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)
UV	: Ultraviyole ışınım
W	: Watt
ν maks	: Maksimum absorpsiyon gösteren dalga sayısı
λ maks.	: Maksimum absorpsiyon gösteren dalga boyu
ϵ	: Maksimum absorpsiyon gösteren dalga boyundaki molar absorptivite katsayısı
δ	: Kimyasal kayma

IV

İ. Şekillerin Listesi

Şekil 1	: Tolmetin'in IR spektrumu.....	5
Şekil 2	: Tolmetin'in UV spektrumu.....	6
Şekil 3	: Tolmetin'in LC-MS/MS spektrumu.....	6
Şekil 4	: 1 bileşiğinin IR spektrumu.....	41
Şekil 5	: 2 bileşiğinin IR spektrumu.....	42
Şekil 6	: Bileşik 2 'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	43
Şekil 7	: 3 bileşiğinin IR spektrumu.....	44
Şekil 8	: Bileşik 3 'ün ¹ H-NMR spektrumu.....	45
Şekil 9	: Bileşik 3 'ün kütle spektrumu.....	45
Şekil 10	: 4a bileşiğinin IR spektrumu.....	47
Şekil 11	: Bileşik 4a 'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	47
Şekil 12	: 4b bileşiğinin IR spektrumu.....	49
Şekil 13	: Bileşik 4b 'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	50
Şekil 14	: 4c bileşiğinin IR spektrumu.....	51
Şekil 15	: Bileşik 4c 'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	52
Şekil 16	: 4d bileşiğinin IR spektrumu.....	53
Şekil 17	: Bileşik 4d 'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	54
Şekil 18	: 4e bileşiğinin IR spektrumu.....	55
Şekil 19	: Bileşik 4e 'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	56
Şekil 20	: 4f bileşiğinin IR spektrumu.....	57
Şekil 21	: Bileşik 4f 'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	58
Şekil 22	: 4g bileşiğinin IR spektrumu.....	59
Şekil 23	: Bileşik 4g 'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	60
Şekil 24	: 4h bileşiğinin IR spektrumu.....	61
Şekil 25	: Bileşik 4h 'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	62
Şekil 26	: 4i bileşiğinin IR spektrumu.....	63
Şekil 27	: Bileşik 4i 'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	64

Şekil 28	: 4j bileşiğinin IR spektrumu.....	65
Şekil 29	: Bileşik 4j 'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	66
Şekil 30	: 4k bileşiğinin IR spektrumu.....	67
Şekil 31	: Bileşik 4k 'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	68
Şekil 32	: 4l bileşiğinin IR spektrumu.....	69
Şekil 33	: Bileşik 4l 'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	70
Şekil 34	: Tolmetin ve 4g bileşiklerinin hücre büyümesini inhibisyonu.....	71
Şekil 35	: Bileşiklerin Annexin V bağlanması.....	72
Şekil 36	: Bileşiklere ait kaspaz-8 aktivitesi.....	73
Şekil 37	: Bileşiklere ait kaspaz-3 aktivitesi.....	73
Şekil 38	: Bileşiklere ait kaspaz-9 aktivitesi.....	74
Şekil 39	: Reddy ve ark. tarafından yapılan olmetin sentezi.....	79
Şekil 40	: [2] bileşiğinin UV spektrumu.....	81
Şekil 41	: Tolmetin[1] ve Tolmetin metil esteri[2] bileşiklerinin IR spektrum çakıştırması.....	81
Şekil 42	: [3] bileşiğinin UV spektrumu.....	84
Şekil 43	: [2] ve [3] bileşiklerinin UV spektrumlarının çakıştırılması.....	84
Şekil 44	: [2] ve [3] bileşiklerinin IR spektrum çakıştırılması.....	85
Şekil 45	: [3] bileşiğinin kütle parçalanma yolları.....	89
Şekil 46	: [3] bileşiğinin kütle parçalanma yollarının devamı.....	90
Şekil 47	: [4g] bileşiğinin UV Spektrumu.....	96
Şekil 48	: [3] ve [4g] bileşiklerinin UV spektrumlarının çakıştırılması.....	96
Şekil 49	: [3] ve [4e] bileşiklerinin IR spektrum çakıştırması.....	98
Şekil 50	: 4a bileşiğinin -CH=N protonları.....	106
Şekil 51	: 4a bileşiğinin -NH protonları.....	106
Şekil 52	: 4a bileşiğinin DMSO-d ₆ ve CDCl ₃ çözeltilerindeki N-CH ₃ protonları.....	107
Şekil 53	: 4a bileşiğinin CDCl ₃ çözeltilerindeki ¹ H-NMR spektrumu.....	108
Şekil 54	: Kaspaz kaskadı.....	111
Şekil 55	: Apoptoz mekanizması.....	112

İİ. Tabloların listesi

Tablo 1	: Tolmetin metil esteri [2] ¹ H-NMR bulgularının literatür ile karşılaştırılması.....	82
Tablo 2	: 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit [3] spektroskopik bilgileri.....	85
Tablo 3	: Tolmetin hidrazit-hidrazonlarının formülleri [4a-1].....	91
Tablo 4	: Tolmetin hidrazit-hidrazonlarının [4a-1] fiziksel bulguları.....	94
Tablo 5	: Hidrazon yapılı [4g] bileşiğine ait UV spektrumu dalga boyları.....	95
Tablo 6	: [4a-1] bileşiklerinin IR bulguları.....	99
Tablo 7	: [4a-1] bileşiklerinin CH=N, -CH ₃ ve -CONH gruplarının ¹ H-NMR değerleri.....	109
Tablo 8	: Bileşiklerin konsantrasyon-büyüme inhibisyon yüzdesi.....	110

1. ÖZET

Biyoaktif heterosiklik bileşiklerin sentezinde ara bileşik olan hidrazit-hidrazonlar, çeşitli biyolojik ve klinik uygulamalarından dolayı araştırmacılar arasında oldukça geniş bir ilgi odağı olmuştur. Hidrazon yapısındaki bu bileşiklerin aktivitesinin, aktif farmakofor grup (-CONH-N=C-) ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Çeşitli hidrazit-hidrazonların hidrazitlerden daha az toksik olabileceği, bu durumun da hidrazit yapısında yer alan -NH₂ grubunun bloke edilmesi sonucuna varılması nedeniyle, hidrazit-hidrazonların sentezi önem kazanmıştır. Yapılan çalışmalarda hidrazit-hidrazonların antibakteriyel, antikonvülsan, antitüberküler, antitümöral ve analjezik etkileri olduğu bildirilmiştir. Laboratuvarımızda daha önceden sentezlenen çeşitli hidrazit-hidrazonların da belirtilen farmakolojik etkilere sahip oluşu, bize yeni hidrazit-hidrazonların sentezlenmesine yöneltmiştir. Bununla birlikte tolmetin 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetik asit, prostaglandinlerin sentezini inhibe eden non-steroidal antiinflamatuvar etkili bir etken madde olup, günümüzde kolon kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda ana yapısı hidrazit-hidrazon olan 12 adet bileşik tolmetin etken maddesi üzerinden sentezlenmiştir. Tolmetin [1], tolmetin sodyum dihidrat'ın asitli ortamda hidroliz edilmesi sonucunda elde edilmiştir. Tolmetin'in metanol içinde derişik sülfürik asit katalizörlüğü ile tepkimesinden elde edilen metil 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetat [2], hidrazin hidrat ile metanollü ortamda ısıtılarak 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetohidrazit [3], hidrazidin susuz etanollü ortamda süstitüe aldehitler ile ısıtılarak kondensasyonu ile de 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]-N'-[(piridinil/süstitüefenil/2-furil) metiliden] asetohidrazitler sentezlenmiştir [4a-1]. Elde edilen bileşiklerin yapıları, UV, IR, ¹H-NMR ve LC-MS (EI) (sadece 3) ile kanıtlanmış, saflıkları ise elementel analiz ve İ.T.K. ile kontrol edilmiştir. Tolmetin [1] ve tolmetin hidrazit hidrazonu [4g] bileşiklerinin kanser ve apoptoz çalışmaları M.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antikanser aktivite, apoptoz, tolmetin, hidrazit-hidrazon

2. SUMMARY

Synthesis of Novel Hydrazone-Hydrazones Derived from Tolmetin and Biological Effects

Hydrazone-hydrazones, which are intermediates in the synthesis of biologically active compounds, are widely drawing attention in the scientific community due to their several biological and clinical applications. Activity of hydrazones are known to be associated with the active pharmacophoric group (-CONH-N=C<). Synthesis of hydrazone-hydrazones has become important due to the conclusion that several hydrazones may be less toxic than hydrazides due to the masking of -NH₂ group. In the previous studies, antibacterial, anticonvulsant, antitubercular, antitumour and analgesic effects of hydrazone-hydrazones have been reported. The fact that several hydrazone-hydrazones previously synthesized in our laboratory possessed the above mentioned pharmacological effects, has led us to the synthesis of novel hydrazone-hydrazones. Tolmetin, 2-[1-methyl-5-(4-methylbenzoyl)-1H-pyrrol-2-yl]acetic acid, is a non-steroidal antiinflammatory drug which inhibits prostaglandin synthesis and it has been reported to prevent proliferation of colon cancer cells. In the light of these knowledge, twelve compounds which possess hydrazone-hydrazone main structure have been synthesized in this study starting from tolmetin. Tolmetin [1] was obtained by acid treatment of tolmetin sodium hydrate. Methyl 2-[1-methyl-5-(4-methylbenzoyl)-1H-pyrrol-2-yl]acetate [2], which was prepared by the sulfuric acid catalyzed reaction of tolmetin with methanol, was refluxed with hydrazine hydrate in methanolic medium to give 2-[1-methyl-5-(4-methylbenzoyl)-1H-pyrrol-2-yl]acetohydrazide [3]. 2-[1-methyl-5-(4-methylbenzoyl)-1H-pyrrol-2-yl]-N'-[(pyridinyl/substituted phenyl/2-furyl) methylidene]acetohydrazides [4a-1] were synthesized by refluxing the hydrazide [3] with substituted aldehydes in dry ethanolic medium. Structures of the synthesized compounds were confirmed by UV, IR, ¹H-NMR ve LC-MS (EI) (only 3) and their purity was checked by elemental analysis and TLC. Anticancer and apoptosis studies on tolmetin [1] and tolmetin hydrazone-hydrazone 4g have been performed in the Department of Biochemistry, Marmara University Faculty of Pharmacy.

Keywords: Anticancer activity, apoptosis, tolmetin, hydrazone-hydrazone.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasdır. Günde, vücudumuzda (DNA'da) yaklaşık 10.000 mutasyon olmasına rağmen immün sistemimiz her milisaniye vücudumuzu tarar ve kanserli hücreleri yok eder. Bağışıklık sistemi tarafından yok edilmemiş olan bu hücreler ise; kontrolsüz biçimde üreyerek buldukları dokuyu işgal ederken, sadece o dokuyla sınırlı kalmayıp komşu dokulara da yayılırlar (invazyon). Kan ve lenf dolaşımı yoluyla vücudun ilgisiz bölgelerine de taşınabilirler (metastaz).

Kanserin esas nedeni hücre bölünmesi esnasında DNA replikasyonunun (eşlenmesi) hatalı olması sonucu hücrenin farklılaşmasıdır. DNA replikasyon anormalsine sebep olduğu sanılan birçok faktör mevcuttur. Hücre bölünmesi, doku tamiri ve yenilenmesi amacıyla yapılır. Doku tamiri ve yenilenmesini hızlandıran tüm etmenler aslında bir kanser hazırlayıcısı olabilir. Normal hücreler tamir edilemeyecek şekilde hasarlandığında, apoptoz tarafından elimine edilirler. Kanserli hücreler ise apoptozdan uzak durarak gelişigüzel çoğalmalarına devam ederler. Ülkemizde 1970'li yıllardan beri bilinen ölümler arasında 4. sırada yer alan, günümüzde ise kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra 2. sıraya yükselen kansere yakalanan hastaların % 25'den azı tek başına cerrahi veya radyoterapi ile tedavi edilebilmektedir. Geriye kalan hastaların büyük çoğunluğunda hastalığın herhangi bir evresinde kemoterapi uygulanmaktadır.

Tolmetin olarak bilinen 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetik asit, prostaglandinlerin sentezini inhibe ederek anti-enflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkileri olan bir non-steroidal anti-enflamatuvar etkili bir etken maddedir.

Günümüzde tolmetin etken maddesinin kolon kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiş; ayrıca antikanser ilaç kullanımındaki düzenleyici etkisi test edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda; tolmetin ve diğer bazı NSAID etkili maddelerin, antikanser etkili ilaçların sitotoksikite etkilerini arttırdığı bildirilmiştir.

Bazı araştırmacılar tolmetinin de içinde bulunduğu çeşitli NSAID etkili etken maddelerin, β -katenin fonksiyonlarını engellediğini ve bu sebeple de yeni antikanser

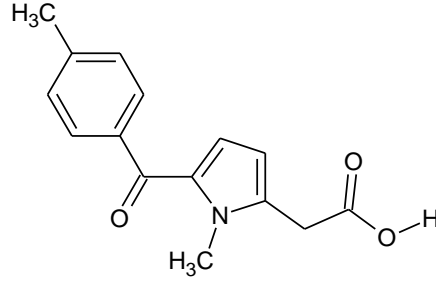
ilaç geliştirmede kullanılabileceğini, antikanser ilaçların sitotoksisitesini arttırdığını, kanser tedavisinde kombine kullanımları için fayda sağladığını belirtmişlerdir. Kanser tedavisindeki bu yardımcı etkilerinden dolayı; 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetik asit (Tolmetin) yapısında yer alan karboksilik asit grubundan elde edilen 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit üzerinden hidrazit-hidrazonlar sentezlenmiş, sentezlenen bu bileşiklerin yapı aydınlatılması çeşitli spektroskopik ve kimyasal çalışmalarla yapılmıştır. Yapısı tayin edilen bileşiklerden seçilen hidrazon türevi, tolmetin etken maddesine karşı kıyaslanarak belirli konsantrasyonlarda kolon kanser hücrelerine karşı sitotoksik ve apoptotik etkinlikleri Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalında çalışılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Tolmetin Hakkında Genel Bilgiler

4.1.1. Fiziksel, kimyasal ve spektroskopik özellikleri

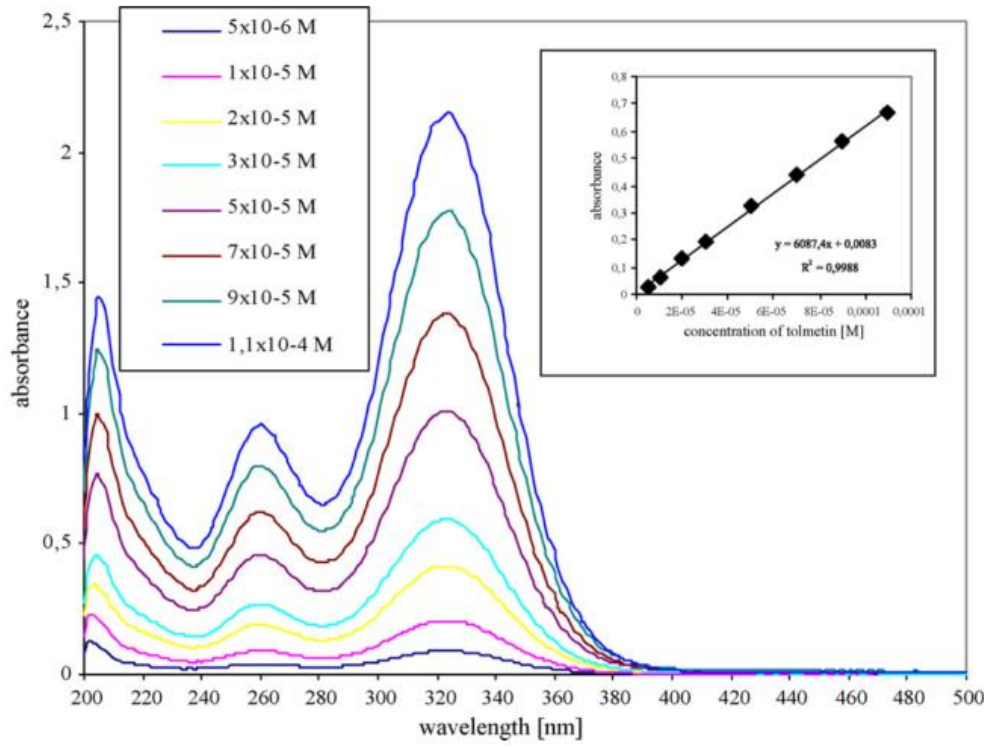
- Kapalı formülü: $C_{15}H_{15}NO_3$
- Moleküler ağırlığı: 257.284 g/mol
- Erime Noktası: 155-157 °C (1)
- Kimyasal Okunuşu: 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetik asit
- Beyaz renkte billur madde; metanol, dimetil sülfoksit (DMSO) ve dimetilformamit (DMF) gibi çözücülerde çözünür.



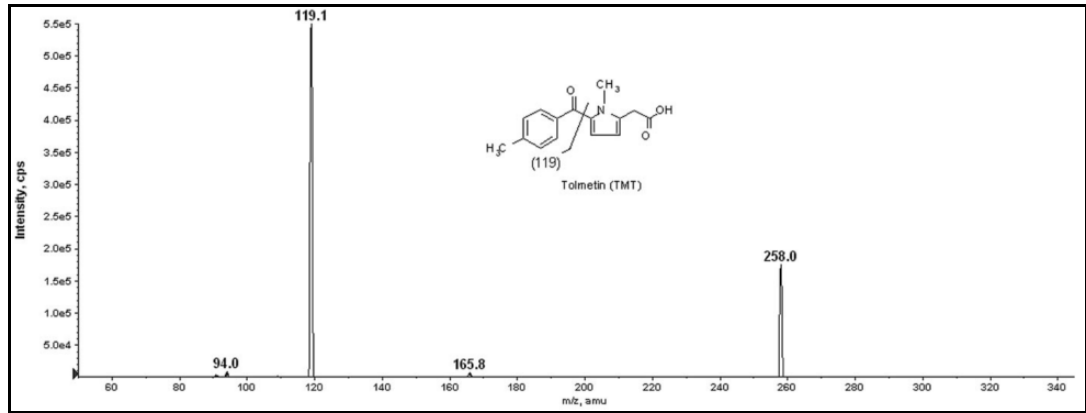
Şekil 1: Tolmetin'in yapısı

• Spektroskopik Özellikleri:

Tolmetin etken maddesi üzerinde literatürde yapılmış olan spektroskopik çalışmaları bulunmaktadır. Tito ve ark. (2) 2009 yılında yapmış oldukları bir çalışmada UV spektrumunda fosfat tamponu (pH 7) içinde çözünmüş olan tolmetine ait 201, 260 ve 325 nm dalga boylarında absorpsiyon gösterdiğini tespit etmişlerdir (Şekil 2). Yapılan bir diğer spektroskopik çalışmada da tolmetine ait kütle spektrum bilgileri aydınlatılmıştır. Bu çalışmada m/z 258.0 olan moleküler iyon piki ile m/z 119.1 parçasının ana parçalanma yolu olduğunu bildirmişlerdir (Şekil 3) (3).



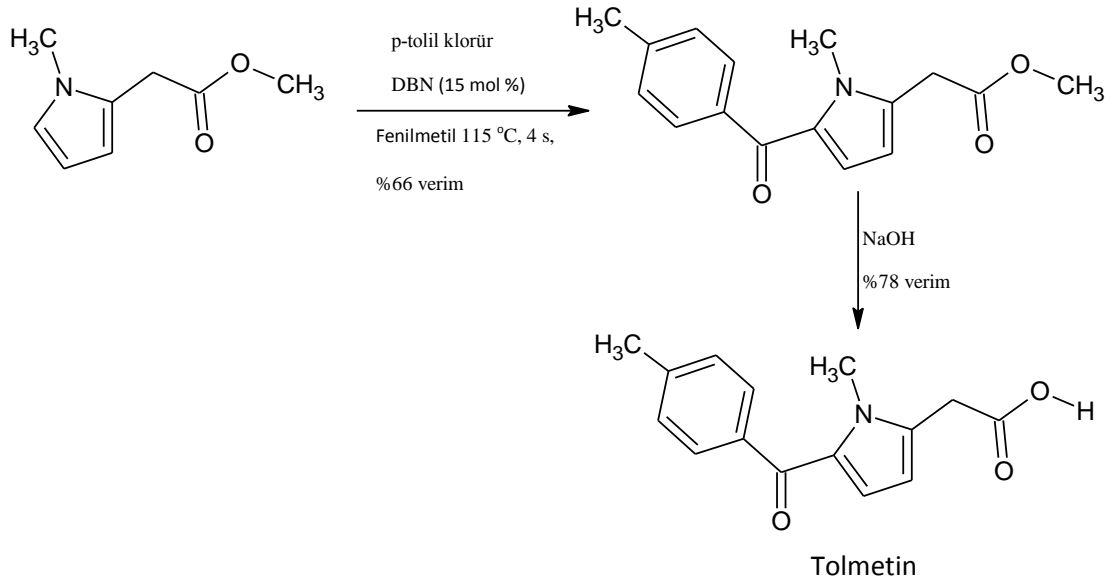
Şekil 2: Tolmetin'in UV spektrumu (2).



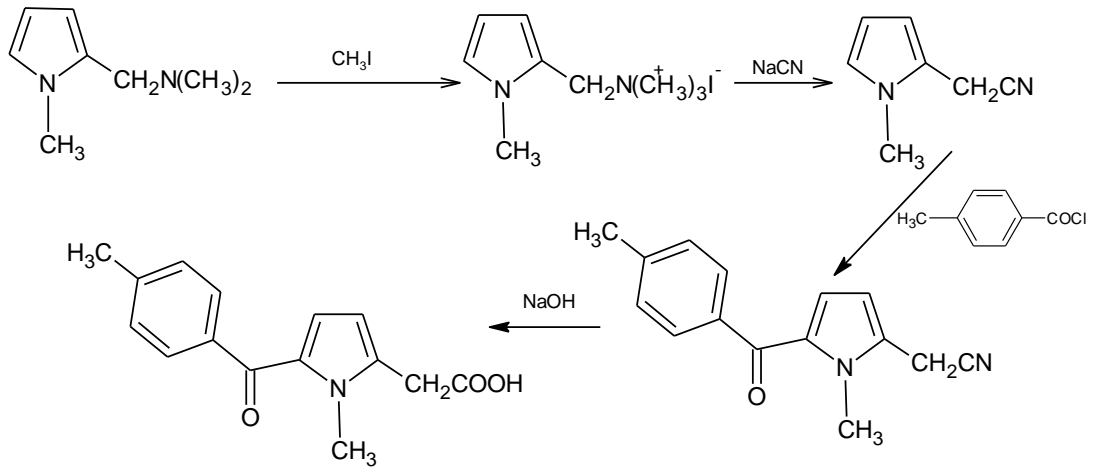
Şekil 3: Tolmetin'in LC-MS/MS spektrumu (3).

4.1.2. Sentezi ve metabolizması

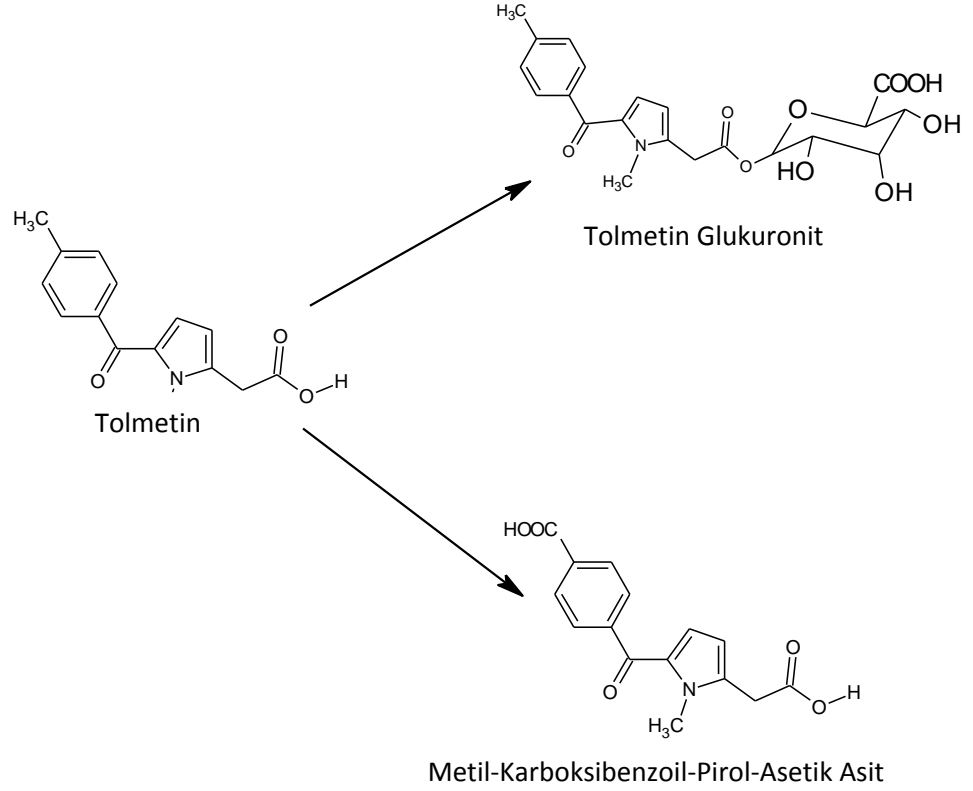
Tolmetin sentezinde ilk olarak; Taylor ve ark. (4) metil (1-Metil-1H-pirol-2-il)asetat, 1,5-diazabisiklo[5.4.0]non-5-en (DBN) ve p-tolil klorür ile toluen içinde katalize edilerek metil [1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetat % 66 verim ile sentezlemiştirler ve bu bileşiğin de hidroliz edilmesiyle tolmetini % 78 verimle elde etmişlerdir.



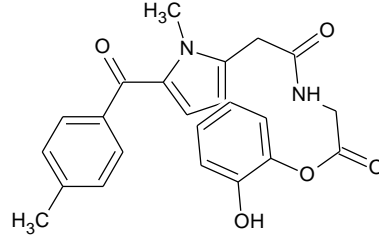
Bir diğer sentez yolu ise, Carson ve ark. tarafından 1-metilindol'dan hareketle yapılmıştır (1).



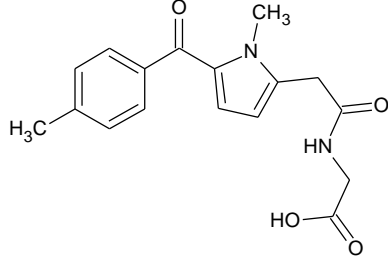
Tolmetin bileşiminin metabolizma çalışmaları incelendiğinde; insanlarda, açıl (ester) glukuronid oluşturmak üzere glukuronik asit ile metabolizasyona uğradığı ve benzik karbonda oksidasyon metabolizma yolu ile 5-(p-karboksibenzoil)-1-metilpirol-2-asetik asit (MCPA) metaboliti oluştuğu bildirilmiştir (5, 6).



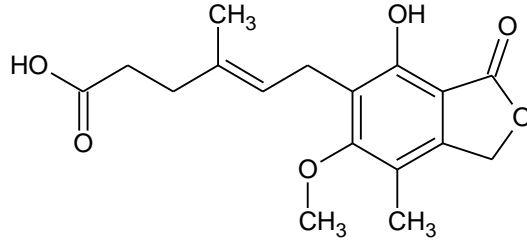
Tolmetin insanlarda ağız yoluyla alınmasından sonra 30-60 dakika içerisinde tamamen emilir. AUC ve c_{max} değerlerinde doza bağımlı bir artış sergilememektedir. Tolmetin plazmada 1-2 saatlik yarı ömre sahip hızlı fazı takiben 5 saat yarı ömre sahip yavaş fazı içeren bifazik eliminasyon sergiler. Tüm doz 24 saat sonunda idrarda inaktif oksidatif metabolit (1-metil-5-[4-karboksibenzoil]-1H-pirol-2-asetik asit, MCPA) ya da tolmetin konjugatları olarak geri kazanılır. Tolmetin de diğer NSAID ilaçlar gibi, gastrointestinal yan etkilere sahip olduğu için, tolmetinin asidik olmayan bir ön ilacı amtolmetin guasil (AMG) sentezlenmiştir. Amtolmetin guasil, tolmetin ile aynı NSAID özelliklere sahip olmasının yanında, gastrointestinal kanalda koruyucu özellikler de sergiler. Farelerde alınan AMG hidrolize olarak tolmetin, MED-5 (1-metil-5-p-metilbenzoil-pirol-2-asetamido asetik asit) ve gayakola dönüşür. İnsanlarda ise bunun tersi olarak AMG nin oral alımından sonra, tolmetin ve MED5 plazmada düşük konsantrasyonlarda bulunur (3).



Amtolmetin guasil (AMG)



MED-5



Mikofenolik asit (IS)

In vitro çalışmalar, tolmetin-açıl glukoronidin (Tol-O-G) reaktif bir metabolit olduğunu ve insan serum albümindeki lizin, serin, arginin gibi amino asit yan zincirleri ile reaksiyona girdiğini göstermiştir (7). Tol-protein eklentilerinin bulunduğu insan plazmasında tolmetinin kovalent bağlanması da çalışılmıştır (5,8). Kovalent plazma protein eklentileri ve Tol-O-G'ye mazur kalma arasında iyi bir ilişki tespit edildiğinden bu yana, plazmadaki Tol-protein eklentilerinin açıl glukoronidin plazma proteinleri ile reaksiyonu sonucu oluştuğuna inanılmaktadır (5). Karaciğerdeki diğer metabolik yollar da Tol-protein eklentilerinin oluşumuna katkıda bulunuyor olabilir (9).

4.1.3. Bozunma Ürünleri

Araştırma aşamasındaki yeni aktif bileşiklerin kimyasal davranışları kadar onların bozunma ürünleri de ilaç gelişimi için her zaman çok önemli olmuştur. Bu sebeple, Giuffrida ve ark.'nın yaptığı çalışmada tolmetinin fotosensitize özellikleri, ilaç varlığında *in vitro* ortamda UV ışık altında fosfat tampon çözeltileri içinde eritrositlerin hücre çözümleri incelenerek araştırılmıştır. İlacın fototoksik özellikleri azot içinde önemsiz, gazlı ortam içinde önemli derecede bulunmuş fakat oksijene doymuş çözeltilerde bu özelliğin azaldığı tespit edilmiştir. İlaç fotolizini incelediklerinde, tolmetinin fotodekarboksilasyona uğrayarak azot içinde p-tolil-1.2-

dimetil-5-pirolil-ketona ve havada da p-tolil-1-metil-2-pirolkarbaldehide dönüştüğünü ortaya koymuşlardır. Bu ışığa duyarlı ürünler de aynı zamanda fotodegradasyona da uğramaktadırlar. Fotoliz sonuçları karşılaştırıldığında; sodyum azit, mannitol, bütillenmiş hidroksi-anisol, indirgenmiş glutasyon, süperoksit dismutaz ve bakır (II) gibi uygun katkı maddelerinin etkisi tolmetinin fototoksitesinin, başlangıç basamağındaki oksijene ve ışık absorpsiyonu sırasında oluşan ürünlerin başlangıç maddesiyle yarışmasına dayandırıldığını tespit etmişlerdir. Fotohemolizi % 50 elde etmek için gerekli olan dozların karşılaştırması sonucunda bunların fototoksik etkisinin tolmetine göre çok daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (10).

Yapılan bir diğer çalışmada ise, Chen ve ark. yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılarak tolmetin etken maddesinin bozunmasını çalışmış ve asidik, bazik ortamlarda fotosensitizasyon koşullarında valide etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada; 60 °C'de asidik ve bazik inkübasyonda strese uğratılan tolmetinin 3 gün sonundaki geri kazanım sırasıyla % 62.4 ve % 98.1 olmuş iken, Hg lamba altında 1.5 saat ışınlama sonrasında ise bu miktarın % 7.9 olduğunu ortaya koymuşlardır (11).

4.1.4. Farmakolojik Özellikleri

Aril alkanoik asit yapısında ve karboksilik asit grubu taşıyan bir etken madde olan tolmetin, non-steroidal antiinflamatuar etkili (NSAID) bir ilaçtır. Non-steroidal antiinflamatuar etkili ilaçların esas hedefi, hücrelerde araşidonik asitin prostaglandinlere dönüşümünü katalize eden siklooksijenaz (prostaglandin sentetaz) enzimini inhibe ederler. Bu enzim, prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanların sentezi için biyokimyasal bir prekürsördür.

Tolmetin romatoid artirit (12), osteoartrit (13), ağrı (14) ve ankilozan spondilit (15) tedavisinde güvenle kullanılmaktadır.

Hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalarda, tolmetinin sıçanlarda karragenan ya da kaolin nedeniyle oluşan pençe ödemini ve adjuvan kaynaklı artrit sonucu eklemlerdeki enflamatuar değişiklikleri inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, tolmetinin *in vitro* olarak ağır seminal vezikül prostaglandin sentezinin güçlü bir inhibitörü olduğu bildirilmiştir. Tolmetin, diğer birçok non-steroidal

antiinflamatuar ajanlar gibi, mide ve ince bağırsak mukozasında lezyonlar meydana getirebilir. Ancak, bu etki aspirin veya indometazin ile karşılaştırıldığında daha az belirgindir (16).

4.2. Kanser Hakkında Genel Bilgiler

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasdır. Günde vücudumuzda (DNA'da) yaklaşık 10.000 mutasyon olmasına rağmen immün sistemimiz her milisaniye vücudumuzu tarar ve kanserli hücreleri yok eder. Sağlıklı vücut hücreleri bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar. Fakat bu yetenekleri de sınırlıdır. Sonsuz bölünemezler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre ne zaman ve nerede bölünebileceğini bilme yeteneğine sahiptir. Buna karşın kanser hücreleri, bu bilinci kaybeder, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Bağışıklık sistemi tarafından yok edilmemiş olan bu hücreler ise; kontrolsüz biçimde üreyerek buldukları dokuyu işgal ederken, sadece o dokuyla sınırlı kalmayıp komşu dokulara da yayılırlar (invazyon). Kan ve lenf dolaşımı yoluyla vücudun ilgisiz bölgelerine de taşınabilirler (metastaz).

Kanserin esas nedeni hücre bölünmesi esnasında DNA replikasyonunun (eşlenmesi) hatalı olması sonucu hücrenin farklılaşmasıdır. DNA replikasyon anormalisine sebep olduğu sanılan birçok faktör mevcuttur. Hücre bölünmesi, doku tamiri ve yenilenmesi amacıyla yapılır. Doku tamiri ve yenilenmesini hızlandıran tüm etmenler aslında bir kanser hazırlayıcısı olabilir. Normal hücreler tamir edilemeyecek şekilde hasarlandığında, apoptoz tarafından elimine edilirler. Kanserli hücreler ise apoptozdan uzak dururlar ve gelişigüzel çoğalmalarına devam ederler. Kanser vakalarının çok azı ailesel faktörlerden etkilenir. Bu nadir grupta kansere duyarlı genler ailenin diğer üyelerine geçer. Bu genler direkt olarak kansere neden olmaz; fakat bu tür genleri taşıyan kişileri, kansere neden olan çevresel faktörlere daha duyarlı hale getirir. Ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında 4. sırada yer alan, günümüzde ise kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra 2. sıraya yükselen kansere yakalanan hastalarının, % 25'den azı tek başına cerrahi veya

radoterapi ile tedavi edilebilmektedir. Geriye kalan hastaların büyük çoğunluğunda hastalığın herhangi bir evresinde kemoterapi uygulanmaktadır.

4.2.1. Tolmetin Antikanser Etkinlikteki Yeri

Literatürde yapılmış olan epidemiyolojik çalışmalar, NSAID'lerin kanserden korunmak için potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Günümüzde tolmetin etken maddesinin *in vitro* olarak HT-29, SW480 ve DLD-1 kolon kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyici etkiye sahip olduğu, fakat bu etkinin çalışmada incelenen diğer NSAID ilaçlara göre daha düşük düzeyde gözlemlendiği (17) bildirilmiştir. Ayrıca antikanser ilaç kullanımındaki düzenleyici etkisi 72 saat boyunca MTT yöntemi ile test edilmiştir (18). Duffy ve ark. (19), NSAID etkili ilaçların çeşitli insan akciğer kanser hücreleri üzerindeki sitotoksitesitelerini incelemişler, tolmetin gibi NSAID etkili ilaçların antikanser ilaçlarının sitotoksitesitelerini arttırdığını, kanser tedavisinde kombine kullanımlarının fayda sağladığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada tolmetin düşük konsantrasyonda HL60/ADR lösemi hücreleri üzerinde % 50 inhibisyon göstermektedir.

Lu ve ark. (20), kolorektal kanseri gelişiminde kritik role sahip olan ve prostat ve meme kanseri ile de ilişkili bulunan β -katenin proteininin baskılanmasını araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, insan embriyonik böbrek hücre hattı olan HEK293 hücrelerinde tolmetinin de içinde bulunduğu çeşitli NSAID etkili etken maddelerin β -katenin fonksiyonlarını engellediğini ve bu sebeple de yeni antikanser ilaç geliştirmede kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

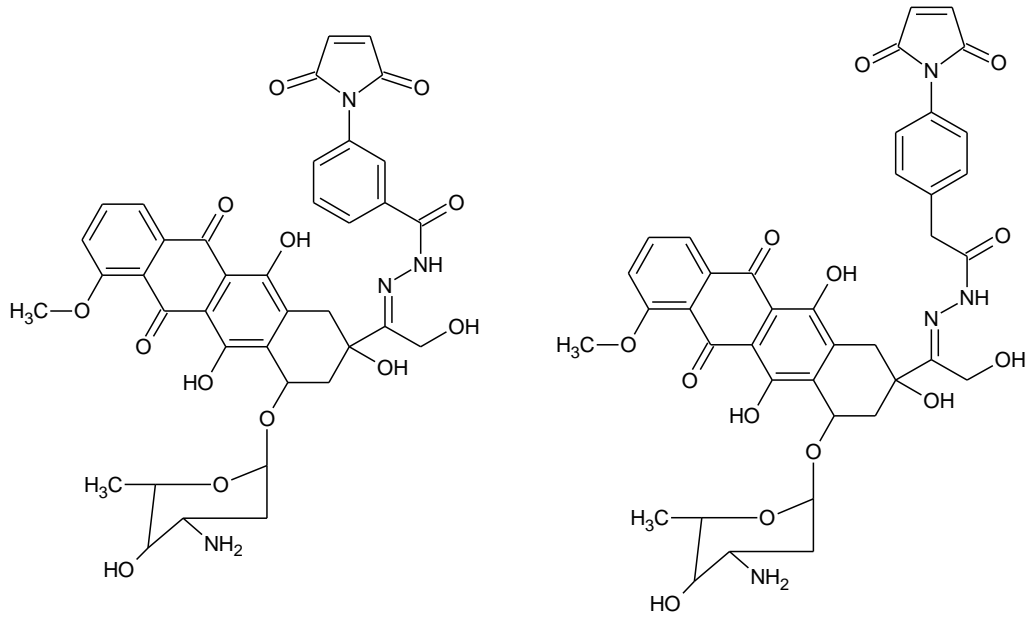
4.2.2. Hidrazit-Hidrazonlarının Antikanser Etkinlikteki Yeri

Çeşitli biyolojik ve klinik uygulamalarından dolayı ve biyoaktif heterosiklik bileşiklerin sentezinde ara bileşik olarak kullanılmasına bağlı olarak hidrazit-hidrazonlar araştırmacılar arasında oldukça geniş bir ilgi odağı olmuştur. Hidrazon yapısındaki bu bileşiklerin aktivitesinin, aktif farmakofor grup (-CONH-N=C-) ile ilişkili olduğu bilinmektedir.

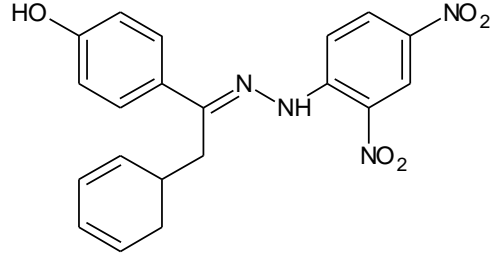
Hidrazit-hidrazonlar hakkında birçok çalışma yapılmış ve bu yapıyı içeren bileşiklerde antikonvülsan, antidepresan, antimalaryal, antiviral, vazodilatör,

antimikrobiyal ve antitümöral etkiler görülmüştür (21). Hidrazonların hidroliz ile aktif metabolite dönüşebilmesi ön ilaç sentezinde yararlı bir metot olduğu ve $-NH_2$ grubunun bloke edilmesiyle de hidrazitlerden daha az toksik olduğu ortaya çıkmıştır (22). Son yıllarda yapılan araştırmalarda, daha etkili, daha az toksik yeni kematerapötik ajanların gelişimini hızlandırmak amacıyla, hidrazit-hidrazon içeren yeni bileşikler üzerinde antikanser etki üzerine tarama çalışmaları önem kazanmıştır (23).

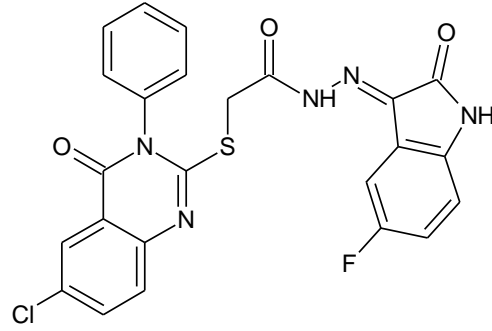
Kratz ve ark. (22, 24), pek çok kanser vakalarında kullanılan doksorubisinin yapısındaki keton grubu üzerinden, 3-maleimidobenzoik asit hidrazidi ve 4-maleimidofenilasetik asit hidrazidi ile yeni hidrazonlar sentezlemişlerdir. Aktiviteleri kıyaslandığında, MDA-MB-468 göğüs kanser hücresi ve U937 lösemi kanser hücresine karşı antitümöral aktivitenin doksorubisinden daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir.



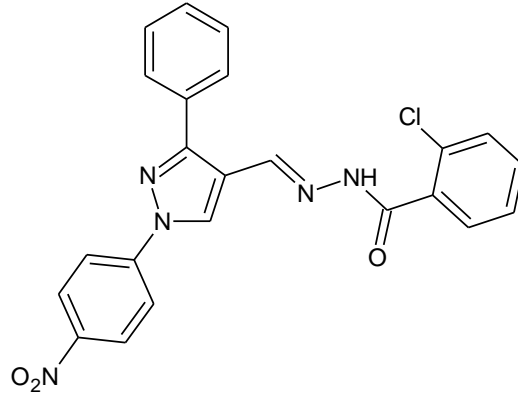
2002 yılında Pandey ve ark. (25), elde ettikleri diaril ve triaril hidrazonların MCF-7 ve ZR-75-1 insan malign göğüs kanserinde % 50-70 inhibisyon yaptıklarını tespit etmişlerdir.



Gürsoy ve Karalı (26), 3-[[[(6-kloro-3-fenil-4(3H)-kinazolinon-2-il)merkптоasetil]hidrazono]-5-fluoro-1H-2-indolinon bileşiginin UO-31 renal hücre serisine karşı iyi bir sitotoksisite gösterdiğini bildirmişlerdir.

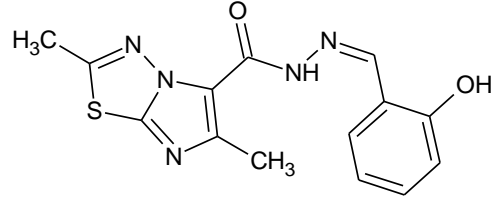


Abadi ve ark. (27), *N'*-(1-{1-[4-nitrofenil]-3-fenil-1H-pirazol-4-il}metilen)2-klorobenzohidrazidin antitümöral etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

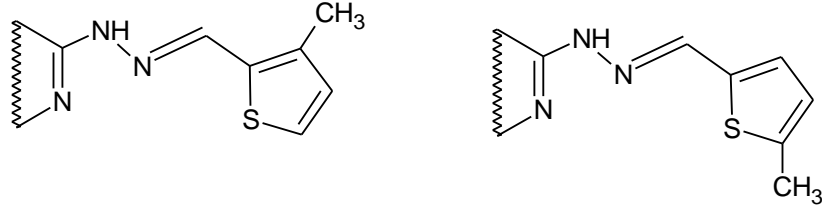


Terzioğlu ve Gürsoy (28), 2,6-dimetil-*N'*-süstitüefenilmetilen-imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiyadiazol-5-karbohidrazit üzerinden hidrazit-hidrazonlar sentezlemişlerdir. Sentezlenen bu bileşiklerin National Cancer Institute'de bazı kanserli hücelere etki ettiğii gözlenmiştir. En iyi sitotoksisite sonucunu, (2,6-dimetil-*N'*-(2'-

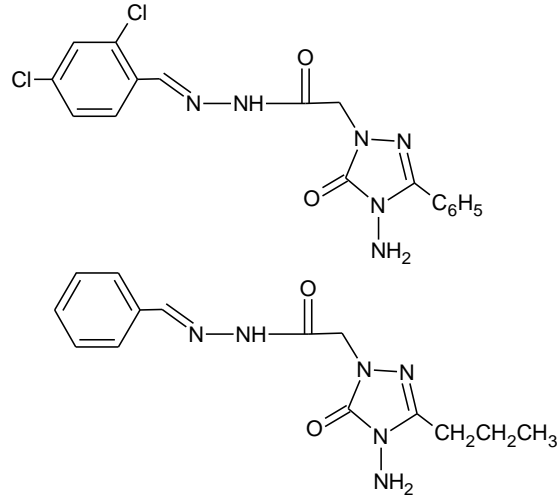
hidroksifenilmetilen) imidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiyadiazol-5-karbohidrazit bileşiğinde saptamışlardır.



2004 yılında Savini ve ark. (29), 1.63-36.5 μM konsantrasyon aralığında sentezlemiş oldukları 3- ve 5-metiltiyofen-2-karboksaldehit α -(*N*)-heterosiklikhidrazon türevlerinin, tüm tümör gelişimlerini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

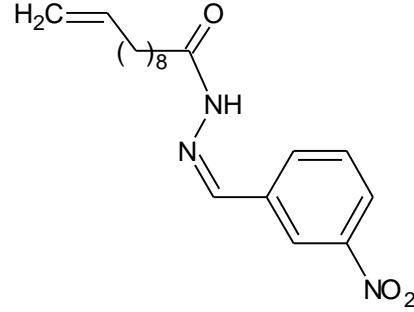


Demirbaş ve ark. (30), 1,2,4-triazol halkası taşıyan aşağıda formüle edilmiş olan sentezledikleri bu hidrazit-hidrazonların göğüs kanserine karşı antitümör etkiye sahip olduklarını saptamışlardır.

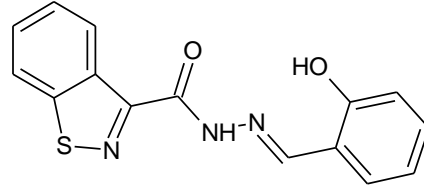


2005 yılında Rahman ve ark. (31), uzun zincirli bir karboksilli asiti üzerinden hidrazit-hidrazon ve hidrazit-hidrazonlar üzerinden de tiyazolidin-4-on ve tiyazan-4-on türevleri sentezlemişlerdir. Bu bileşiklerin sitotoksitelerini MCF7 göğüs kanser

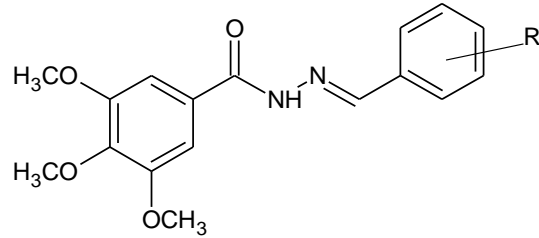
hücresi, NCI-H460 akciğer hücresi ve SF-268 santral sinir sistemi hücreleri incelenerek değerlendirilmişler ve bileşiklerin, % 32 civarında kanser hücrelerinde büyümeyi azalttığını saptamışlardır.



Vicini ve ark. (32), sentezledikleri benzo[d]isotiyazol hidrazonlarının hematolojik tümörlerde 6-merkaptopürin kadar eşit etki gösterdiğini, benziliden kısmının o-pozisyonda hidroksi grubu taşıyan türevin en etkili bileşik olduğunu tespit etmişlerdir.

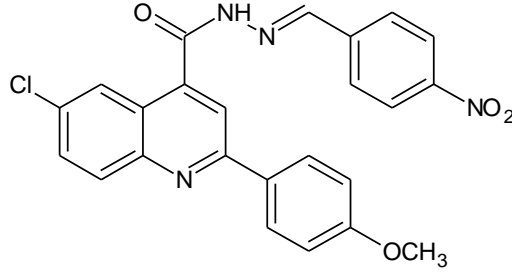


2006 yılında yapılmış olan bir çalışmada da Jin ve ark., *N'*-süstitübenziliden-3,4,5-trimetoksibenzohidrazitlerinin antitümör etkinliğe sahip olduklarını tespit etmişlerdir (33).

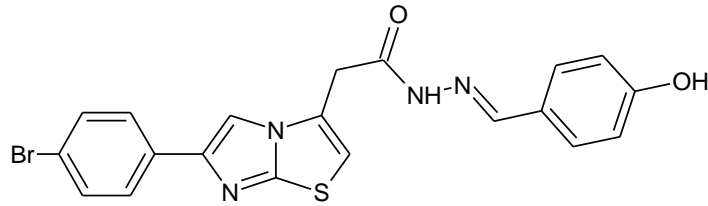


Metwally ve ark. (34), bir seri 2-arilkinolin-4-karboksilik asit hidrazit-hidrazon türevleri sentezleyerek aşağıda formülü görülen bileşiğin sitotoksitesini

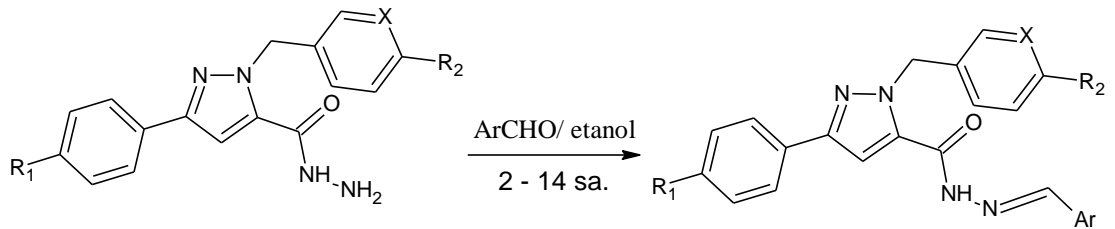
incelediklerinde; bileşiğin sitotoksisite göstermediğini, buna rağmen Hep-G2 hücrelerinin proliferasyon oranını düşürdüğünü saptamışlardır.



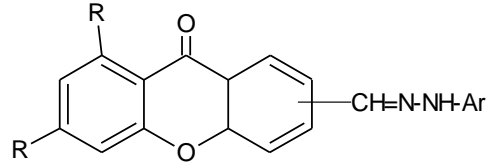
El-Hawash ve ark. (35), sentezlemiş oldukları çeşitli ariliden hidrazitlerin National Cancer Institute'de bazı kanserli hücelere etki ettiğini ve özellikle, benziliden kısmının p-konumunda hidroksi taşıyan türevin prostat kanserinde etkili bileşik olduğunu tespit etmişlerdir.



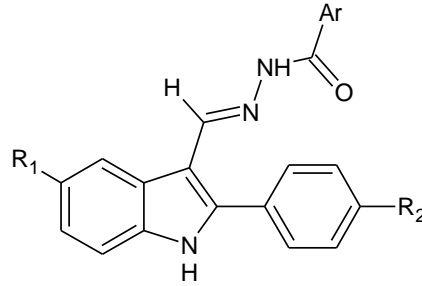
Xia ve ark. (36, 37), 1-arilmetil-3-aril-1H-pirazol-5-karbohidrazidi ve bu hidrazitten hareketle sentezlenen bazı hidrazonların A549 akciğer kanser hücrelerine etkisini incelenmişlerdir. 2008 yılında yaptıkları çalışmada (37), sentezledikleri hidrazon yapıli bileşikleri yapı-aktivite açısından değerlendirdiklerinde log P değeri 4.12-6.80 arasında olan bileşiklerin A549 akciğer kanser hücrelerinde inhibitör etki gösterdiklerini bildirmişlerdir. Xia ve ark., aynı zamanda bu etkinliğin, hücre büyümesinde önemli rol oynayan metal iyonları ile kelat yapan bileşiklerin kapasitesine bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir.



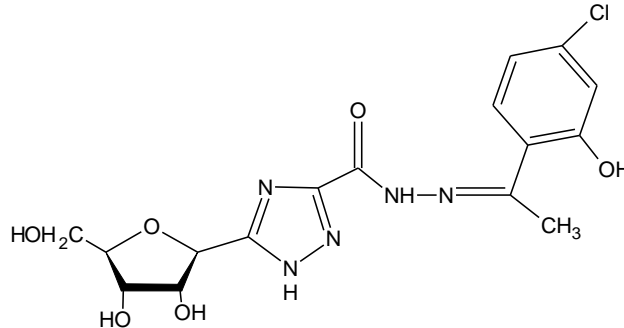
Lembege ve ark. (38), ksanton karbaldehitden türeyen bir seri hidrazit-hidrazonlar sentezlemişler, antitümöral etkinlikleri için MCF-7, göğüs kanser hücresi, ve KB 3.1, skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde 24 saat ve 72 saatlik değerlendirmişler, bileşiklerden dört tanesinin her iki kanser hücresine karşı inhibitör etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.



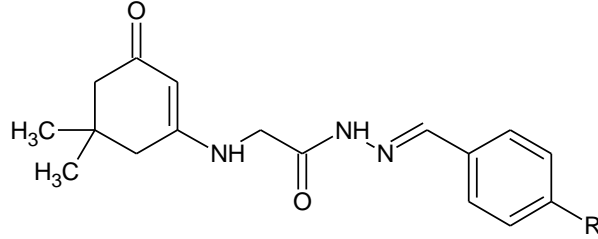
2008 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise; Vogel ve ark. (39), 2-fenilindol-3-karbaldehit türevlerini sentezleyerek MDA-MB 231 ve MCF-7 göğüs kanserinde etkili inhibisyon sağladığını ve U-373 MG glioblastoma hücrelerinin proliferasyonunda engelleyici olduklarını tespit etmişlerdir.



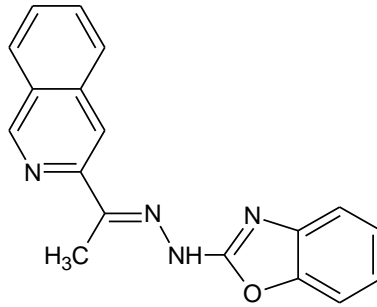
2009 yılında ribavirin üzerinden bir seri hidrazon türevleri sentezlenmiş ve 2-hidroksi-4-kloro fenil yapısı taşıyan bileşikte 20 µM konsantrasyonda A549 akciğer kanser hücresine etkili olduğu tespit edilmiştir (40).



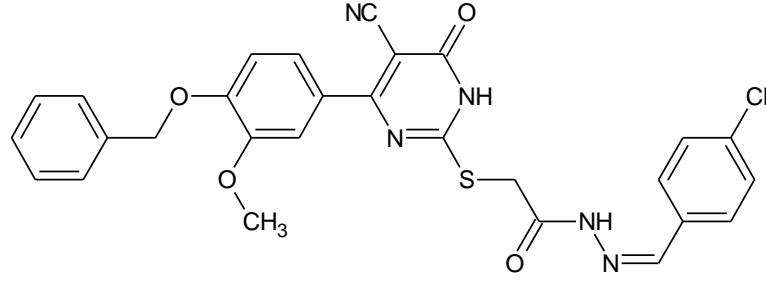
El-Sabbagh ve ark. ise (41), siklik β -diketonlardan türeyen akridin ve hidrazonların sitotoksitesi ve antiviral aktivitesini incelemişlerdir. Sentezlenen bileşiklerin, hepatoma hücre serisine karşı (HepG2) yüksek sitotoksik aktivite gösterdiklerini tespit etmişlerdir.



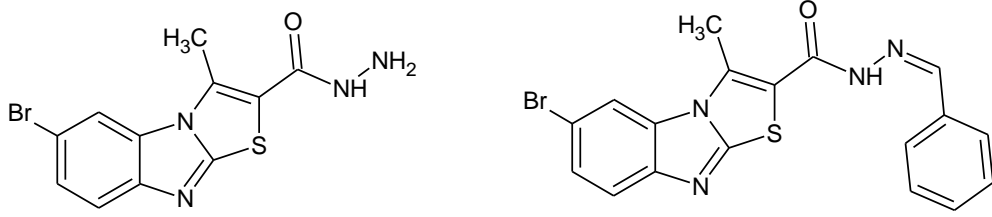
Hofmann ve ark. (42), sentezlemiş oldukları *N*-benzoksazol-2-il-*N'*-1-(izokinolin-3-il-etiliden)hidrazin (EPH136) bileşiğinin *in vivo* ve *in vitro* ortamda antitümöral aktivite gösterdiğini ve ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe ederek bu etkiyi sergilediğini ortaya koymuşlardır. Bu bileşik göz önüne alındığında, antitümör ajanlar içinde bisiklik hidrazonlar daha da önem kazanmıştır.



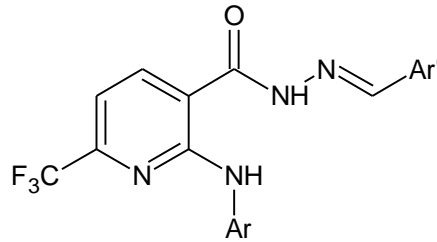
Rostom ve ark. (43), polisüstitüe pirimidin halkasını kullanarak sentezlemiş oldukları yeni bileşikleri antimikrobiyal ve antikanser etkileri açısından incelediklerinde, hidrazon yapısı taşıyan bileşikte HT29 kolon kanser hücresi, HepG2 hepatokarsinom ve MCF7 göğüs kanser hücresinde değişik derecelerde sitotoksik aktivite gözlemlediklerini bildirmişlerdir.



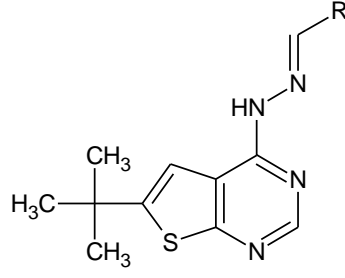
2009 yılında yapılmış olan bir başka çalışmada ise; Abdel-Aziz ve ark. (44), bir seri 2-süstitüe-6-bromo-3-metiltiyazolo[3,2-a] benzimidazol bileşikleri sentezleyerek antikanser aktivitelerini incelemişlerdir. Hidrazit yapılu bileşik için HCT-116 kolon hücreleri ile Hep-G2 hepatokarsinom hücrelerinde, hidrazon yapısı taşıyan bileşik için, 88.2-94.2 µg/ml konsantrasyonlarında T-lenfositlere karşı sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.



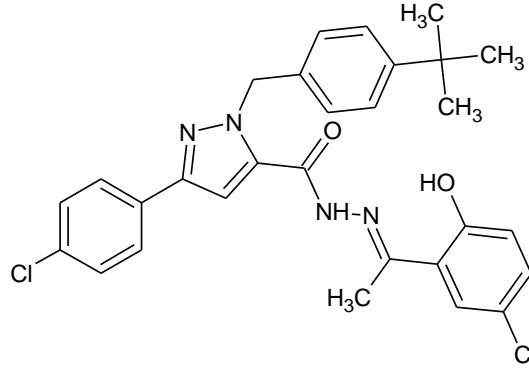
Bir diğer çalışmada; 2-arilamino-6-trifluorometil-3-(hidrazonokarbonil)piridin türevlerinin antikanser aktiviteleri incelendiğinde, çoğu bileşiklerin birçok kanser türünde üstün inhibitör aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir (45).



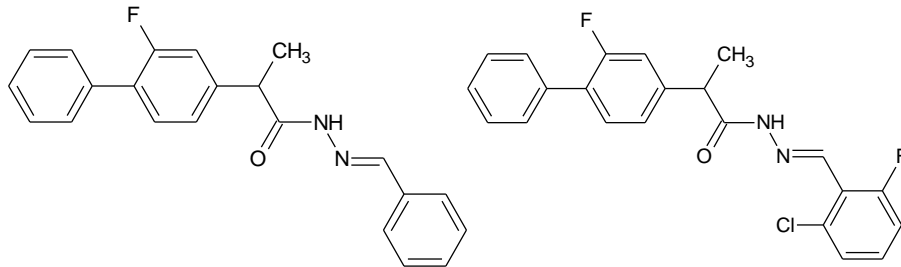
Horiuchi ve ark. (46), bir seri [2,3-*d*]pirimidin-4-il hidrazon analogları sentezleyerek, bazı hidrazon türevlerinin HCT116 kolon kanser hücresine karşı etkili olduklarını saptamışlardır.



Zheng ve ark. (47), 3-aryl-1-(4-tert-bütilbenzil)-1H-pirazol-5-karbohidrazitler üzerinde yaptıkları çalışmada, (*E*)-1-(4-tert-bütilbenzil)-*N'*-(1-(5-kloro-2-hidroksifenil)etiliden)-3-(4-klorofenil)-1H-pirazol-5-karbohidrazit bileşiğinin A549 akciğer kanser hücrelerine karşı inhibitör etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

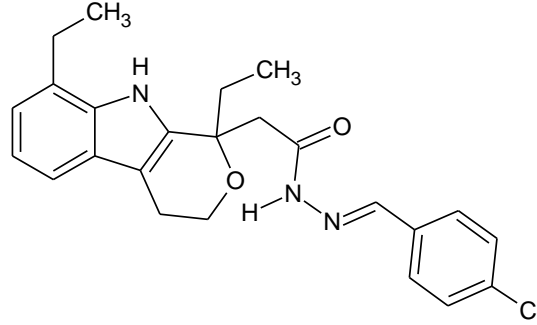


Aydın ve ark. (48), flurbiprofen üzerinden, mikrodalga yöntemi kullanarak bir dizi yeni hidrazit-hidrazon sentezlemişler (2-fluorobifenil-4-il)-*N'*-(fenilmetilen)propanhidrazit ve 2-(2-fluorobifenil-4-il)-*N'*-[(2-kloro-6-fluorofenil)metilen]propanhidrazit bileşiklerinin HL-60 (TB) lösemi hücresinde % 66.37 ve OVCAR-4 yumurtalık kanser hücresinde % 77.34 oranlarında hücre büyümesini inhibe ettiklerini bildirmişlerdir.



Çıkla ve ark. (49), etodolak etken maddesinden hareketle bir dizi yeni hidrazit-hidrazonlar sentezlemişlerdir. Bu etodolak hidrazit-hidrazonlardan National Cancer

Institute tarafından seçilmiş olanlar, uygulanan protokole göre tek dozda 60 insan tümör hücre dizisine karşı taranmış olup; bu bileşiklerden en etkili türev olan 2-(1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-*b*]indol-1-il)asetik asit[(4-klorofenil)metilen] hidrazit bileşiğinin PC-3 prostat kanser hücresine karşı 10^{-5} M (10 μ M) konsantrasyonda % 58.24 büyüme inhibisyonu gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, bu etadolak türevinin apoptozu indüklediği de bu çalışmada belirtilmiştir.



4.2.3. Apoptoz ve Hidrazit-hidrazonlar

Yüksek organizmalarda yaşamakta olan hücrelerin ölümü iki farklı mekanizma ile gerçekleşir. Klasik hücre ölümüne nekroz adı verilir ve nekroz patolojik bir olaydır. Hücre ölümünün diğer şekli olan apoptoz, programlı bir hücre ölümü olup, hücre intiharı olarak da bilinen fizyolojik bir olaydır. Apoptoz, canlının kendi otonom mekanizması tarafından ayarlanan zararlı, yaşlanmış, bakteri/virüslerle enfekte veya istenmeyen kendi hücrelerinin enerji kullanımlı (ATP) öldürülmesi olup, genetik olarak kontrol edilen programlı bir hücre ölümüdür. Apoptozun gelişim biyolojisinde, normal doku dinamiğinde ve immun sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları gibi bazı önemli fizyolojik süreçlerdeki rolü ortaya çıktıkça önemi hızla artmıştır. Apoptoz, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayarak yaşam boyu devam eder. Apoptotik hücreler, organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşur, bu oluşum ömür boyu devam eden hücre ölümlerinin fizyolojik bir formudur. Böylece doku homeostazisi, yani yeniden yapım (mitozis) ve yıkımın (apoptoz) bir düzen içinde oluşu, apoptoz/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (50).

Malign hastalıklar, klasik olarak kontrolsüz aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Oysa aşırı proliferasyonun yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malignite gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptoza gidemeyen ve bundan dolayı beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler, genomlarında mutasyonların sona ermesiyle malign hücrelere dönüşme potansiyeli taşırlar.

Her saniyede yaklaşık bir milyon hücre apoptozla vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Mitoz ve apoptoz arasında kontrollü bir denge vardır. İşte bu dengenin apoptozun lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogenezinde katkıda bulunur. Apoptozun gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı hastalıklara örnek olarak; AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip diabet, hepatit C enfeksiyonu, MI, ateroskleroz gibi hastalıklar verilirken, apoptozun yavaşladığı hastalıklara örnek olarak ise otoimmün hastalıklar ve kanser verilebilir (51).

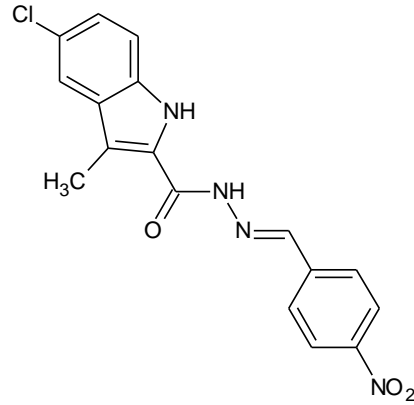
Apoptoz çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Bazı mediatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler. Fakat hücreye kalsiyum girişi apoptozun gerçekleşmesi için esansiyel değildir. Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozu indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_L), bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X_L) geniş bir ailedir. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax'ın (ikisinin oranının) bazı hematolojik malignensilerde prognostik değer taşıdığı rapor edilmiştir. Çünkü, oranın artması ya da azalması apoptozun inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Seramid, membrana bağlı asid sfingomyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür. Plasma membran hasarına karşı bir sinyal olduğu düşünülmektedir. p53, hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı olduğunda, eğer

hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozu indükler. p53'ün apoptozu indüklemesi Bax'ın ekspresyonunu artırması, böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Bazı virüsler ya p53'ü inaktive ederek ya da Bax'a bağlanarak apoptozu bloke ederler, böylece bu hücrelerin enfekte ettikleri hücreler doğal hücre ölüm mekanizmasından kurtulduklarından virüsle-indüklenen karsinogenezise bu yolla katkıda bulunurlar. Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteini'dir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptoz sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi apoptoz yoluna girmiş bir hücrede dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret eder.

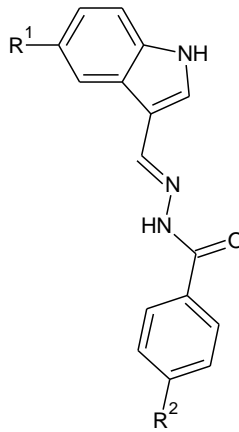
Kaspazlar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozda rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskada neden olurlar. Bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim ICE (interlökin 1- β dönüştürücü enzim)'dir ve prokaspaz 1 olarak bilinir. Kaspaz kaskadı, sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesiyle prokaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom c'nin salıverilmesine neden olabilirler.

Birçok hastalığın, hücrelerin ölümü ya da yaşaması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, apoptotik sürece müdahale edilerek yeniden düzenlenmesi, özellikle kanser tedavisi için yeni tedavi yöntemlerini gündeme getirmektedir. Bugüne kadar non-steroidal anti-enflamatuvar ilaçlar gibi apoptoz düzeyini değiştirdiği bilinen birçok ilaç ve bu konuda yapılan çalışmalar mevcuttur. Son yıllarda yapılan araştırmalarda da, antikanser etkinlikleri olan hidrazit-hidrazon türevi bileşiklerin apoptoz özellikleri ön plana çıkmıştır.

2004 yılında hidrazonlar üzerinde yapılmış bir çalışmada Zhang ve ark., bir hücre bazlı yüksek verimli tarama deneyi (HTS) kullanarak, indol-2-karboksilik asit benzilidin-hidrazitleri içeren bir dizi güçlü apoptoz indükleyicileri tespit etmişler ve özellikle indol halkasının 3 konumundaki süstitüsyonun apoptotik etkinlik için önemli olduğunu bildirmişlerdir. Flow-sitometrik analizi kullanılarak 5-kloro-3-metil-indol-2-karboksilik asit (4-nitrobenziliden)-hidrazidin T47D meme kanseri hücrelerini G2/M fazında engellemek için apoptoza neden olduğu sonucuna ulaşmışlardır (52).

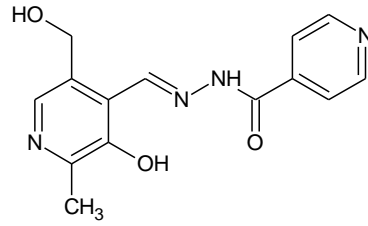


2008 yılında Vogel ve ark. 2-Fenilindol-3-karbaldehitlerin aroil hidrazonları kanser tedavisi için önemli olan hücre siklusunun durdurması ve apoptoz ile iki ayrı göğüs kanser hücrelerine (MDA-MB 231 ve MCF-7) etkili olduklarını tespit etmişlerdir (39).



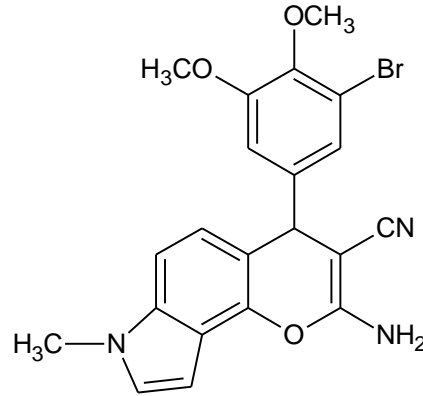
Piridoksal izonikotinoil hidrazon (PIH) analogları, demir bağlayıcı özellikleri nedeniyle hematopoetik hücrelerde apoptozu indüklediği; PIH analogları ve bunların

demir komplekslerinin, Jurkat T lenfosit ve K-562 hücrelerinde konsantrasyon ve zamana bağımlı apoptoz oluşturduğu bildirilmiştir (53).



Putt ve ark. prokaspaz aktive edici bileşik adı verilen (PAC-1) küçük bir molekülünün *in vitro* olarak prokaspaz-3'ü kaspaz-3'e aktive ederek birincil kolon tümörlerinden izole edilen kanser hücrelerini indüklediğini tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar, kanser biyopsilerinde prokaspaz-3 konsantrasyonlarının değerlendirilmesinin basit ve hızlı olabileceğini ve burada sunulan veriler prokaspaz-3'ün hücrel konsantrasyonlarının PAC-1 etkinliğini öngörmek için kullanılabileceğini göstermektedir (54).

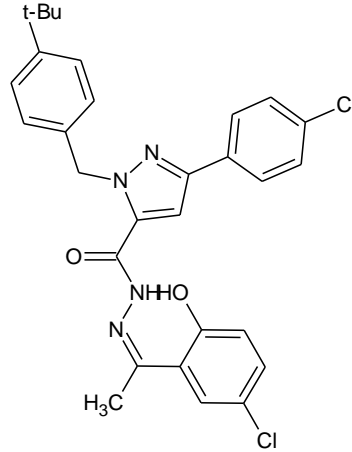
2008 yılında Kemnitzer ve ark. yaptıkları bir yapı-aktivite çalışması sonucunda pirol halkası taşıyan 7-metil-4H-pirol[2,3-*h*] kromen bileşiklerinin T47D, HCT116, and SNU398 hücrelerinde apoptoz indükleyicisi ve hücre büyümesi inhibitörü olarak yüksek etkili olduğunu tespit etmişlerdir (55).



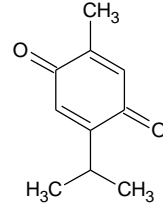
Fan ve ark.ları salisilaldehit pirazol hidrazon (SPH) türevlerinden demir bileşikleri hazırlamışlar ve bunların etkilerini A549 hücrelerine karşı test ettiklerinde A549 hücrelerinin büyümesine apoptozu indüklemekte etki eden bağlayıcı SPH'lardan daha fazla etki ettiklerini görmüşlerdir (56). Cu-16 olarak alandırılan (*E*) *N'*-(2-hidroksibenziliden)-1-(4-tert-butylbenzil)-3-fenil-1H-pirazol-5-karbohidrazit,

tümör progresyonu sağlayan sinyalizasyon ağlarında önemli rol oynayan integrin $\beta 4$ protein seviyesini yükselterek H322 akciğer kanser hücrelerinde apoptozu teşvik ettiği bildirilmiştir. Western boyama tekniği ile, Cu16' nın H322 hücrelerinde 10 μM konsantrasyondaki integrin $\beta 4$ ün regülasyonunu indüklediğini doğrulanmıştır.

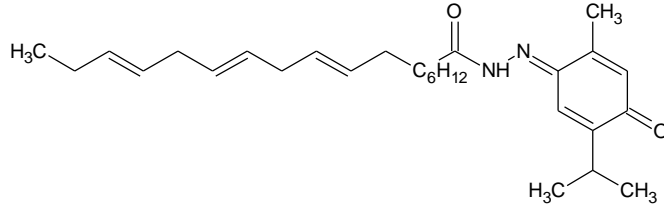
Zheng ve ark., bir seri yeni 3-aryl-1-(4-tert-bütilbenzil)-1H-pirazol-5-karbohidrazit hidrazon türevleri sentezlemişler ve bu bileşiklerin etkilerini A549 akciğer kanser hücrelerine karşı incelemişlerdir. (*E*)-1-(4-tert-butylbenzil)-*N'*-(1-(5-kloro-2-hidroksifenil)etiliden)-3-(4-klorofenil)-1H-pirazol-5-karbohidrazit bileşiğinin en etkili hücre büyümesini engelleyici etkiye sahip olduğu ve A549 hücre nükleer kondensasyonunu ve parçalanmasını indüklediği TUNEL tekniği kullanılarak tespit edilmiş; bu sonuçlara göre A549 akciğer kanser hücrelerinde apoptozu başlattığı bildirilmiştir. (47).



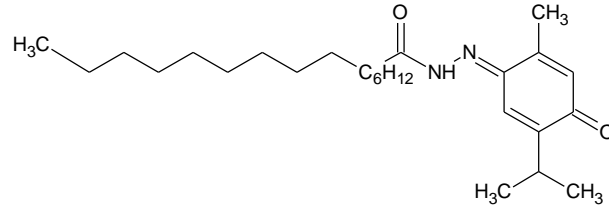
Wirries ve ark., birçok insan kanser modellerinde pro-apoptotik sinyal yollarının timokinon (TQ) tarafından uyarılmasından dolayı, sentezledikleri TQ hidrazon türevlerini hücre çoğalması ve propidyum iyodür boyaması sonrası flow sitometri ile apoptoz yolağına etkilerini kolorektal kanser hücrelerinde değerlendirmişlerdir (57). Bu sonuçlar, p53-bağlı HCT116 hücrelerinde TQ-hidrazon türevlerinin düşük konsantrasyonlarda (10 μM) büyüme inhibisyonunu inhibe ettiğini göstermektedir.



TQ

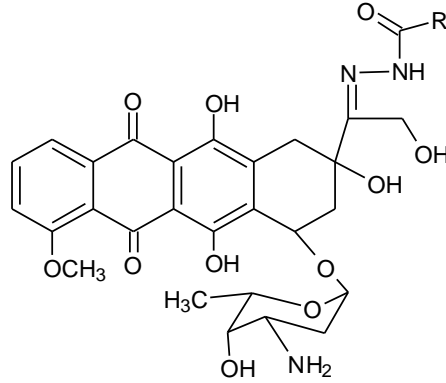


TQ-H-10

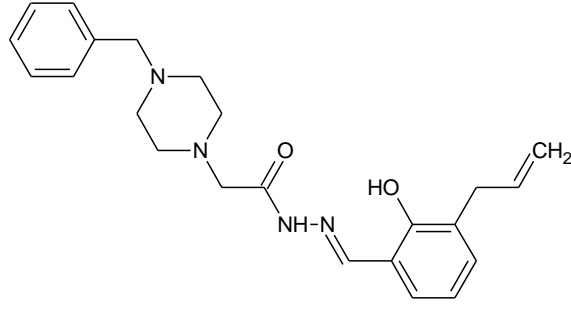


TQ-H-11

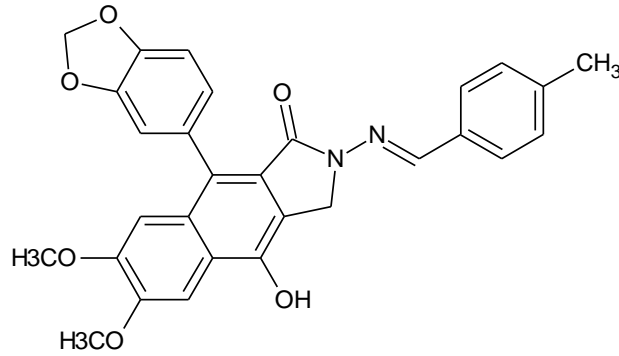
Doksorubisin ve türevlerinin, lösemi hücrelerinde (HL-60 lösemi) kaspaz-8 aktivasyonu ile, melanoma hücrelerinde (518A2 melanom) kaspaz-9 aktivasyon yolu ile apoptozu uyardığı tespit edilmiştir (58).



Bununla birlikte; Aziz ve ark., prokaspaz aktive edici bileşiğin (PAC-1), kaspaz-3 etkinliğini ve kaspaz-3-bağımlı hücre ölümünü indüklediğini belirtmişlerdir (59).

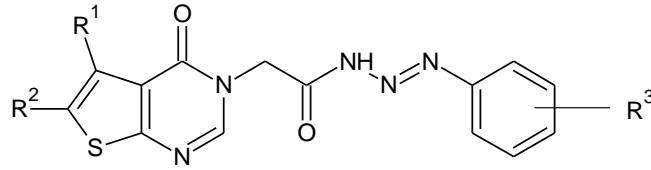


Zhao ve ark. benzoisindol hidrazon türevi bileşiğin insan kolon kanser hücresi olan HCT-116 hücrelerinde apoptozu indüklediğini tespit etmişlerdir (60). 4'-(3'',4''-metilendioksifenil)-6',7'-dimetoksil-1'-hidroksil-benzil-2,3-dihidro-izindol-1-on-hidrazin'in süstitüe aldehitlerle etanollü ortamda reaksiyonundan bir dizi yeni benzoindol hidrazonları sentezlenmiş ve *in vitro* ortamda KB, A549 ve HCT-116 kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkileri MTT testi ile değerlendirilmiştir. *N*-(4-Metilbenzilidenil)-4'-(3'',4''-metilendioksifenil)-6',7'-dimetoksil-1'-hidroksil-benzil-2,3-dihidro-izindol-1-hidrazon bileşiğinin HCT-116 hücrelerinde apoptozu indükleyici etkisini Hoechst 33342-PI boyama tekniği, AO-EB boyama yöntemi ve Western blot yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Bu bulgulardan, bu türevin mitokondriyel yolak üzerinden Bax düzeyini arttırıp, Bcl-2 düzeyini azaltarak apoptozu indüklediği sonucunu çıkarmışlardır.

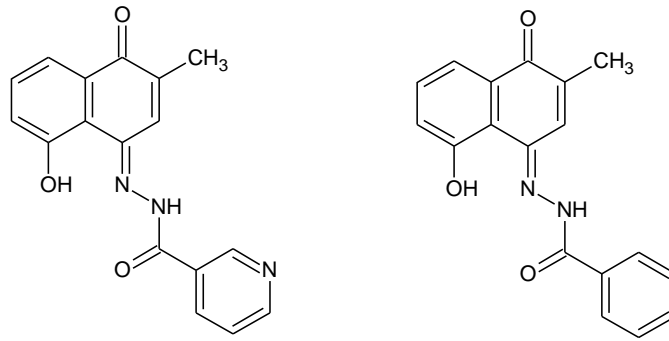


Lou ve ark. *N'*-benziliden-2-(4-oksotiyano[2,3-*d*] pirimidin-3(4*H*)-il)asetohidrazon türevleri sentezlemişler ve A549, HeLa, MBA-MD-231 kanser hücrelerine karşı standart MTT testi ile sitotoksik etkilerini değerlendirmişlerdir. Flow sitometri analizleri ile en etkili bileşiklerin (IC₅₀ değeri 10-20 µM olan) kaspaz

aktivasyonu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, tümör hücrelerinde apoptozu kaspaza bağlı mekanizma ile indüklediklerini ispatlamışlardır (61).

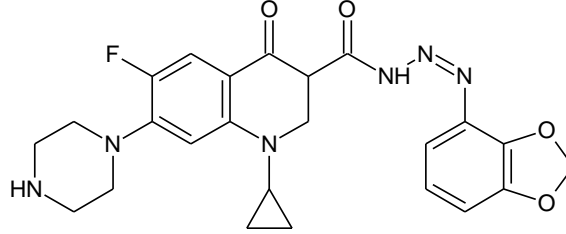


Dandawate ve ark. sentezlemiş oldukları yeni plumbagin hidrazonlarını, östrojen pozitif reseptör MCF-7 ve üçlü negatif MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 göğüs kanser hücre dizisine karşı 48 saat boyunca MTT testi ile değerlendirmişlerdir. Bu bileşiklerin western blot analizi yöntemi kullanarak, MDAMB-231 hücrelerinde NF- α B p65-alt ünite inhibisyonu yaptığını belirlemişlerdir. Belirtilen kanserli hücreler 1.5 μ M konsantrasyonundaki bileşiklerle 48 saat boyunca muamele edilmiş olup, sentezlenen iki bileşik (11*E*)-*N'*-(5-hidroksi-2-metil-1-oksonaftalen-4(1H)-iliden)nikotinohidrazit ve (11*E*)-*N'*-(5-hidroksi-2-metil-1-oksonaftalen-4(1H)-iliden)benzohidrazit, plumbaginın antikanser özelliğinin en önemli hedeflerinden biri olan NF- α B düzeyini engellemede daha etkili oldukları bulunmuştur (62).

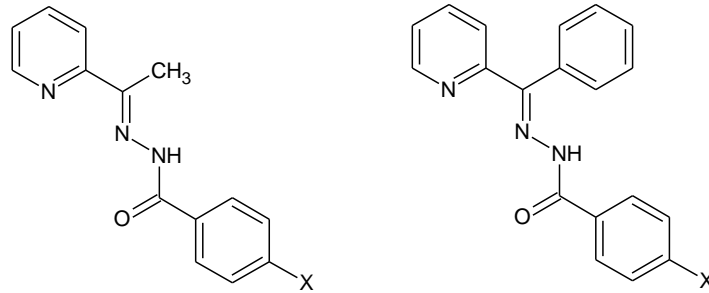


Shi ve ark. sentezledikleri piperonal siprofloksasin hidrazon (1-siklopropil-6-floro-4-okso-7-piperazin-1,4-dihidro-kinolin-3-karboksilik asit benzo[1,3]dioksol-5-iletillen-hidrazit) bileşiğinin dışsal mitokondriyal apoptoz yolağı ile insan karaciğer kanser hücresi olan SMMC-7721 hücrelerinde apoptozu indüklediğini Hoechst 33258 floresans boyama TUNEL testi, agaroz jel elektroforezi yöntemleri kullanarak tespit etmişlerdir. Piperonal siprofloksasin hidrazon, IC₅₀ değeri 2.411 μ mol/L ile SMMC-7721 hücrelerine karşı güçlü sitotoksikite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yaptıkları bu çalışma piperanol sipofloksasin hidrazon'un SMMC-7721 hücrelerinde p53, Bax, kaspaz-9, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ile kaspaz-3'ün yarılan aktif formlarının protein düzeylerini yükselttiğini göstermektedir (63).



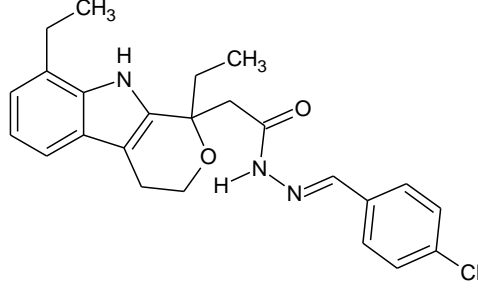
Despaigne ve ark. 2-asetilpiridin-fenilhidrazon ile para-klorofenilhidrazon ve paranitrofenilhidrazon analoglarını, karşılık gelen 2-benzoilpiridin türevi hidrazonları ve bu türevlerin galyum (III) komplekslerinin, U87 ve T98 beyin tümörü hücrelerine karşı sitotoksik etkilerini değerlendirmişlerdir. Sonuçlar, hidrazon türevlerinin etkilerinin onların komplekslerinden daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, hidrazonlarla ($1 \mu\text{mol L}^{-1}$) U87, T98 kanser hücreleri ve MRC5 (insan fetal akciğer fibroblast) hücreleri muamele edilmiş ve hücre yuvarlaklaşması, hücre büzülmesi, tomurcuk oluşumu gibi apoptozun karakteristik morfolojik değişiklikleri ve floresans mikroskopu ile gözlemlenmiştir (64).



X=H, Cl, NO₂

Çıkla ve ark. (49), yaptıkları çalışmada etodolak hidrazit-hidrazonlarından NIH tarafından %58.24 büyüme inhibisyonu gösteren 2-(1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]indol-1-il)asetik asit[(4-klorofenil)metilen]hidrazit bileşiğinin ileri kanser araştırmalarını PC-3 prostat kanser hücresi ve L929 fibroblast hücresinde farklı dozlarda hücre canlılığı ve büyüme inhibisyonu için MTT kolorimetrik metot ile değerlendirmişlerdir. 4-kloro süstitüenti taşıyan hidrazon türevinin etodolak ile karşılaştırıldığında; L929 sağlıklı hücrede sitotoksikite göstermezken PC-3 prostat

kanser hücresinde 54 μM (22.84 $\mu\text{g/ml}$) dozda IC_{50} değeri ile antikanser etkinlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, bu bileşiği apoptoz açısından değerlendirdiklerinde, kaspaz-3 ve Bcl-2 aktivasyonu için PC-3 prostat kanser hücrelerinde mitokondriyal yol üzerinden apoptozu uyardığını bildirmişlerdir.



5. DENEYSEL BÖLÜM (GEREÇ ve YÖNTEM)

5.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

5.1.1. Kimyasal maddeler

Tolmetin sodyum dihidrat*, hidrazin-hidrat, 2,4-diklorobenzaldehit, 2,6-diklorobenzaldehit, 2-fluorobenzaldehit, 3-piridinkarboksialdehit, 4-bromobenzaldehit, 4-fluorobenzaldehit, 4-klorobenzaldehit, 4-metoksibenzaldehit, 4-nitrobenzaldehit, benzaldehit, furfural, 3-fenoksibenzaldehit, derişik sülfirik asit, derişik hidroklorik asit, petrol eteri, etilasetat, sodyum bikarbonat, metanol, etanol (CuSO₄ ile kurutulmuş).

5.1.2. Elektronik cihazlar

Su Banyosu	GFL-1042, Memmert
Erime Derecesi Cihazı	Schmelzpunktbestimmer SMP II
Ultrasonik Banyo	Branson 221
Terazi	Sartorius A200S, Mettler Toledo
FTIR Spektrofotometresi	Schimidzu FTIR 8400S
Elementel Analiz Cihazı	CHNS-932 (LECO)
¹ H NMR Spektroskopisi	Bruker 300 MHz Ultrashield TM, Bruker 600 MHz UltrashieldPlus TM
Kütle Spektrometresi	Jeol JMS-700

*: Tolmetin sodyum dihidrat etken maddesinin sağlanmasında olanak sağlayan Santa Farma İlaç Sanayii A.Ş. 'e teşekkür ederim.

5.2. Sentez Çalışmaları

5.2.1. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetik asit [1]

Tolmetin sodyum dihidrat (0.01 mol) distile suda (22 ml) çözündürülür. Oluşan çözelti üzerine çökme işlemi tamamlanıncaya kadar HCl (% 37) ilave edilerek, mavi turnusol kağıdı ile kontrol edilir. Oluşan beyaz renkli çökelti süzülür, distile su ile yıkanır, kurutulur ve etanol ile kristallendirilir

5.2.2. Metil 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetat [2]

Metanolde (20 ml) çözülen tolmetin (0.01 mol) üzerine derişik sülfürik asit (1 ml) ilave edilen reaksiyon karışımı, 3 saat geri çeviren soğutucu altında su banyosunda ince tabaka kromatografisi takibinde ısıtılır, soğutulur. Buz banyosu içinde NaHCO₃ (% 5) ile nötralizasyon sağlandıktan sonra su ile yıkanır. Etanol ile kristallendirilir.

5.2.3. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit [3]

Bileşik 2 (0,01 mol) metanolde (50 ml) çözündürülür. Üzerine hidrazin-hidrat (% 80'lik, 5 ml) ilave edilerek geri çeviren soğutucu altında su banyosunda ince tabaka kromatografisi takibinde 3 saat ısıtılır, soğutulur. Reaksiyon bitiminde elde edilen katı madde süzülerek, kurutulur ve etanol ile kristallendirilir.

5.2.4. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]-N'-[(piridinil/sübstitüefenil/2-furil)metiliden]asetohidrazit [4a-l]

Etanolde (CuSO₄ ile kurutulmuş) (20 ml) çözülen bileşik 3 (0,0025 mol) üzerine yine etanolde çözülen sübstitüe aldehitler (0,0025 mol) ilave edilir. Bu karışım, ince tabaka kromatografisi takibinde 2 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtılır. Reaksiyon bitiminde elde edilen katı madde süzülerek su ile yıkanır, kurutulur ve etanol ile yıkanarak saflaştırılır.

- 4a:** *N'*-[furan-2-il-metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-*1H*-pirol-2-il]asetohidrazit
- 4b:** 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-*1H*-pirol-2-il]-*N'*-[piridin-3-il metiliden]asetohidrazit
- 4c:** *N'*-[(2-fluorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-*1H*-pirol-2-il]asetohidrazit
- 4d:** *N'*-[(4-fluorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-*1H*-pirol-2-il]asetohidrazit
- 4e:** *N'*-[(4-klorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-*1H*-pirol-2-il]asetohidrazit
- 4f:** *N'*-[(2,4-diklorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-*1H*-pirol-2-il]asetohidrazit
- 4g:** *N'*-[(2,6-diklorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-*1H*-pirol-2-il]asetohidrazit
- 4h:** *N'*-[(4-bromofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-*1H*-pirol-2-il]asetohidrazit
- 4i:** 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-*1H*-pirol-2-il]-*N'*-[(4-nitrofenil)metiliden]asetohidrazit
- 4j:** 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-*1H*-pirol-2-il]-*N'*-[fenilmetiliden]asetohidrazit
- 4k:** *N'*-[(4-metoksifenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-*1H*-pirol-2-il]asetohidrazit
- 4l:** 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-*1H*-pirol-2-il]-*N'*-[3-fenoksifenil-metiliden]asetohidrazit

5.3. Kromatografik Çalışmalar

Sentezlenen maddelerin reaksiyon takibi ve safsızlık kontrolleri ince tabaka kromatografisi metodu ile yapılmıştır. İ.T.K. çalışmalarında, adsorban olarak 0.2 mm kalınlığındaki 20x20 cm hazır silika jel plakları (Merck-F-254) kullanılmıştır.

Kullanılan çözücü sistemleri kromatografik çalışmalara uygun olarak hazırlanıp, oranları aşağıdaki gibidir:

M₁: Kloroform: Metanol (40: 60, h:h)

M₂: Petrol eteri: Etil asetat (50: 50, h:h)

M₃: Petrol eteri: Etil asetat (30: 70, h:h)

Kromatografi tanklarına belirtilen çözücülerden uygun olanı (yaklaşık 10 ml) konularak çözücü buharıyla doyması sağlanmıştır. Doymuluğa ulaştıktan sonra, Tolmetin ve sentez maddeleri metanol ile seyreltilerek plağa tatbik edilmiştir. Sürüklenme bittikten sonra R_f100 değerleri (21 °C’de), dalga boyu 254 nm olan UV lambası altında lekeler işaretlendikten sonra hesaplanmıştır. Lekelerin belli olması için DAC belirteci (4-dimetilaminosinnamaldehit’in 1 M hidroklorik asit (50 ml) ve etanoldeki (50 ml) % 0.2’ lik çözeltisi) kullanılmıştır.

5.4. Biyolojik Çalışmalar

5.4.1. Anti-kanserojenik Etki Çalışması

Tolmetin ve tolmetin etken maddesi üzerinden sentezlediğimiz; tolmetin hidrazit-hidrazon yapısında (*N*'-[(2,6-diklorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit) (**4g**) (**SGK 417**) bileşiklerinin HCT-116 (ATCC, CCL-247) ve HT-29 (ATCC, HTB-38) insan kolon kanseri hücre hatları üzerinde antikanserojenik etkileri; MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] testi [Cell Proliferation Kit I (MTT), Roche-Germany] ile, M.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’nda tayin edilmiştir.

MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür), hücre proliferasyonunu, canlılığını ve sitotoksisteyi ölçmede kullanılan kantitatif bir yöntemdir. Bu yöntem, mitokondriyal enzim sistemleri tarafından kataliz edilen tetrazolium tuzlarının indirgenmesine dayanmaktadır ve hücre büyümesi ile

ksenobiyotik sitotoksositeyi yansıtır. Tetrazolium tuzları (MTT, XTT, WST-1), genelde substrat olarak renksiz, canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi sonucu renkli ürünler veren maddelerdir. MTT bu amaçla kullanılan bir tetrazolium tuzudur, ve substrat olarak sarı renkte olmasına rağmen canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlandığında suda çözünmeyen mavi-mor formazan tuzları oluşturur. Formazan tuzları, DMSO, izopropanol gibi organik solventlerde kolayca çözünürler. Solventte çözünen materyalin optik dansitesi, çözülmüş olan formazan kristallerinin konsantrasyonunun verdiği absorbansa göre spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Ölçülen değer direkt olarak kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini verir ve bu değer de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir.

Kolon kanseri hücrelerinin çoğaltılması için % 10 fetal sığır serumu, 100 mM L-Glutamin ve % Penisilin-Streptomisin içeren Dulbecco's modifiye Eagle medium (DMEM) kullanılmıştır. MTT çalışmaları, Vybrant® MTT hücre proliferasyon kiti (Invitrogen) kullanılarak 96 kuyucuklu doku kültür kaplarında gerçekleştirilmiştir. Hücreler çözüldükten sonra kültür medyumunda kültüre edilmişlerdir. 3. Pasajdan sonra hücreler % 0.25'lik Tripsin-EDTA solüsyonuyla kaldırılmışlardır. Daha sonra 15 ml'lik Falcon tüpe alınarak 2000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmişlerdir. Santrifüj sonrası tüp içerisinde bulunan üst faz dökülmüştür. Hücre pelleti 1 ml kültür medyumuna ile süspanse edildikten sonra hücre sayımı yapılmıştır. Bunun için % 1'lik Tripan mavisi kullanılmıştır. Hücre sayımından sonra her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre ekilmiş ve 37 °C'de % 95 nem ve % 5 CO₂'li ortamda 24 saat inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Bu sürenin bitiminde, sentez bileşikleri çeşitli konsantrasyonlarda eklenerek 37 °C'lik inkübatöre kaldırılmışlardır. Kültürün 48. saatinde kültür kabında bulunan medyum çıkarılmış ve her bir kuyucuğa 100 µl taze kültür medyumuna konulduktan sonra 10 µl MTT boyası (5 mg/ml) eklenerek hücreler 37 °C'de 4 saat daha inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda, canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözülmesi için her bir kuyuya 100 µl solubilizasyon çözeltisi eklenmiş ve 37 °C'de 12 saat bekletilmiştir. Kültür plağı mikropłaka okuyucusuna konularak absorbans değerleri 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Referans dalga boyu olarak 630 nm dalga boyu kullanılmıştır. Hiçbir madde eklenmeyen kontrol kültürlerinden elde edilen absorbans değerlerinin

ortalaması alınarak bu değer % 100 kabul edilmiştir. Sentez bileşikleri içeren kültürlerden elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlanmış ve hücrelerin canlılık oranları % olarak ifade edilmiştir.

Kullanılan czeltiler:

1. Hücre kültür medyumu: % 10 FBS (İnvitrogen), % 1 streptomisin/penisilin (Hyclone) ve 2 mM glutamin (Hyclone) içeren düşük glukozlu DMEM (İnvitrogen) içerisinde hazırlanmıştır.

2. Stok MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolyum bromür) czeltisi: Kit içerisinde bulunan 1 vial MTT zerine 1 ml steril fosfat tampon czeltisi (PBS) eklenerek 12 mM stok czelti hazırlanmıştır.

3. DMSO (Sigma)

5.4.2. Bileşiklerin HT-29 Hücrelerinde Apoptoz Etkilerinin alışması

Çalışmamızda sentezlediğimiz tolmetin [1] ve tolmetin üzerinden sentezlediğimiz hidrazit-hidrazon yapısındaki [4g] bileşiklerinin apoptotik etkileri, M.. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda araştırılmış ve MTT sonuçlarına göre etkin olduğu HT-29 (ATCC, HTB-38) insan kolon kanseri hücre hattı kullanılmıştır.

Apoptoz belirteci olarak kaspaz 3, 8 ve 9 aktivitesinin ölçülmesi hedeflenmiştir. Bunun için [1] ve [4g] bileşiklerinin 75, 100 ve 150 µM'lık konsantrasyonları kullanılmıştır. Kaspaz 3, 8 ve 9 aktivitesinin belirlenebilmesi için kanser hücreleri 6'lı kültür kaplarına her bir kuyuda 1×10^6 hücre olacak şekilde ekilmiş ve bir gece bekledikten sonra, 24 saat süresince 75, 100 ve 150 µM konsantrasyonlardaki tolmetin [1] ve 2,6-diklorofenil sübstitüenti taşıyan tolmetin hidrazit-hidrazonu [4g] bileşiğiyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bittiğinde kuyucuklar, soğuk PBS ile yıkanmış ve hücreler kazınarak eppendorf tüplerde toplanmıştır. Hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra üst faz dökülmüş ve pellet üzerine hücre lizis tamponu eklenmiştir. Soğuk buz üzerinde 10 dakika bekletilen hücreler 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. stte bulunan süpernatant kısmı alınarak temiz tüplere aktarılmıştır. Analizler bu örneklerde çalışılmıştır.

Kaspaz 3 aktivitesinin belirlenmesi için kolorimetrik kit kullanılmıştır (Milipore, MA). Kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivasyonu için de kolorimetrik kitler kullanılmıştır (ApoTarget, İnvitrogen). Sonuçlar, kontrole göre kıyaslanarak kat artışı şeklinde verilmiştir.

5.4.3. Bileşiklerin Annexin V Bağlanması

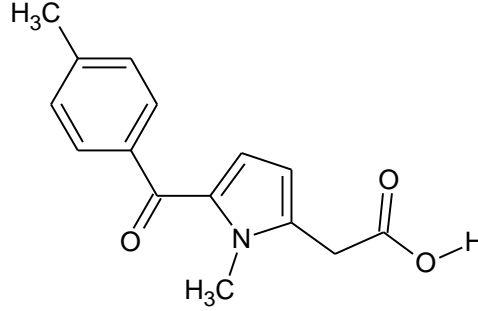
Annexin V, apoptoza uğrayan hücrelerin yüzeyinde bulunan bir proteindir. Çalışmamızda bağlanma deneyleri, FITC-Annexin V kullanılarak Zhao ve ark. (60) modifiye metodu ile yapılmıştır. Hücre kaplarında 6 kuyucuklu bulunan hücreler üzerine soğuk PBS eklenmiş ve hücreler yıkanmıştır. Daha sonra bir scraper yardımıyla hücreler alınmış ve ependorflara yerleştirilmiştir. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra üst fazları atılarak, hücreler kitin içeriğinde bulunan bağlanma çözeltisine alınmıştır. 200 µl'lik hücre çözeltisine 3 µl Annexin V, eklenerek, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Hücreler boyanın uzaklaştırılması için 3 kez PBS ile yıkanmış ve florespektrofotometre ile analiz edilmiştir.

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 6 programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arası farklılıkların belirlenmesinde iki yönlü ANOVA ve Tukey's posthoc testleri kullanılmıştır. İstatistiksel $p < 0.05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Fiziksel, Kimyasal ve Spektroskopik Bilgiler

6.1.1. 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetik asit (1)

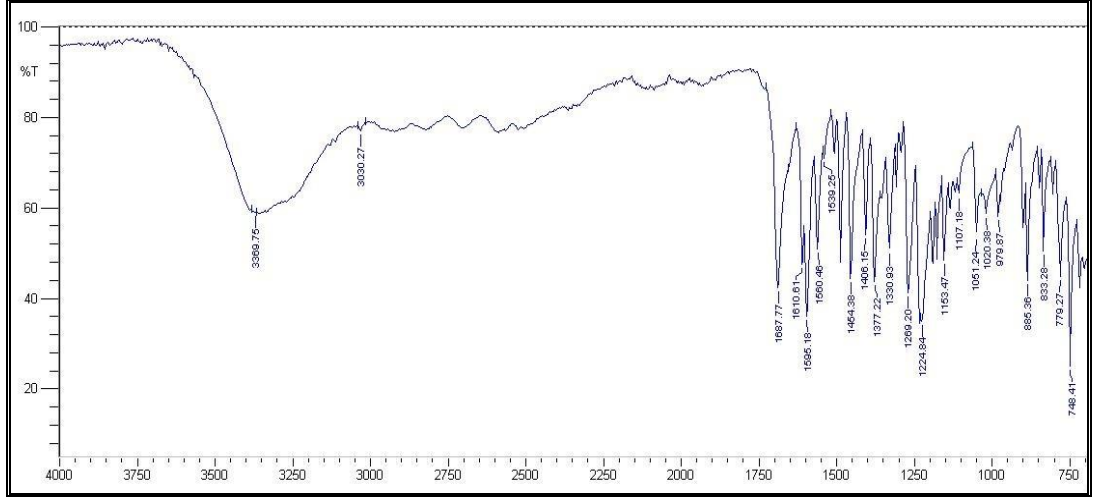


Tolmetin sodyum dihidrat 3.153 g (0.01 mol) tartılır, distile suda (22 ml) çözündürülür. Çökme bitinceye kadar HCl (% 37) ilave edilir ve asitliği mavi turnusol kağıdıyla kontrol edilir. Oluşan beyaz renkli çökelti süzülür, distile su ile yıkanır, kurutulur. C₁₅H₁₅NO₃ (M.A.= 257.284 g/mol)

- Verim: % 95
- Rf x100: 70 (M₁), t: 21 °C
- Kirli beyaz renkte toz madde
- E.n. 157 °C
- Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonda az, kloroform ve DMSO'de tamamen çözünür.

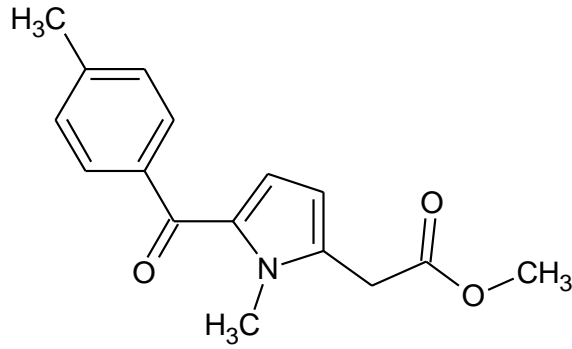
IR Spektrumu:

$\bar{\nu}$ maks. (cm⁻¹): 3370 (karboksilik asidin -OH g.b.); 3030 (aromatik =C-H g.b.); 1688 (karboksilik asit, C=O g.b.); 1595, 1560, 1454, 1406 (aromatik C=C g.b.) 1225 (karboksilik asit, C-O g.b.); 1377 (-CH₃ grubu asimetrik C-H e.b.); 885 (1,4 disubstitüe benzen) (Şekil 4).



Şekil 4: 1 bileşiğinin IR spektrumu

6.1.2. Metil 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetat (2)



Metanolde (20 ml) çözülen 2.573 g tolmetin (0.01 mol) üzerine derişik sülfürik asit (1 ml) ilave edilen reaksiyon karışımı, 3 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtılır, soğutulur. Buz banyosu içinde NaHCO₃ (% 5) ile nötralizasyon sağlandıktan sonra su ile yıkanır. Etanol ile kristallendirilir. C₁₆H₁₇NO₃ (M.A.= 271.311 g/mol)

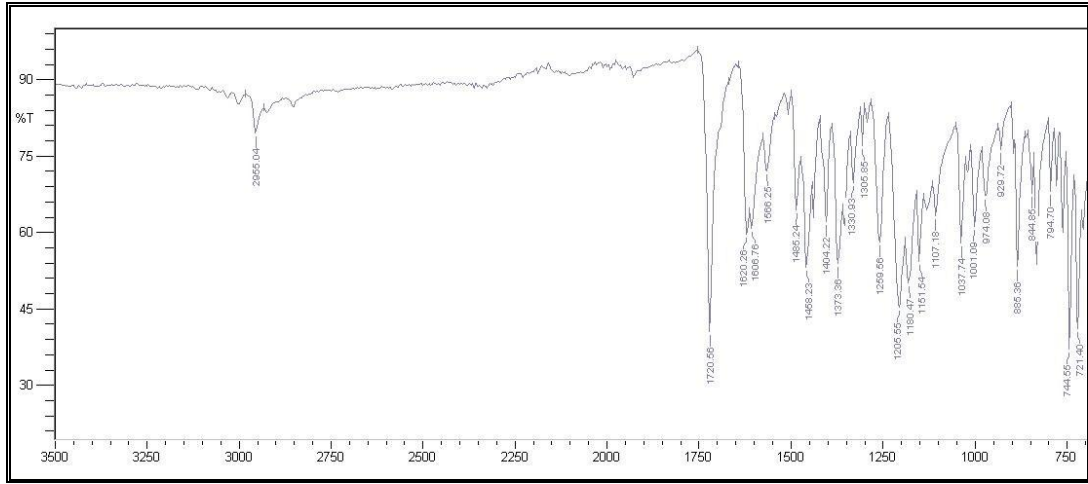
- Verim: % 77
- R_f x100: 32 (M₂), t: 21 °C
- Kirli beyaz renkte toz madde
- E.n. 121-123°C (121-122 °C) (65)
- Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonda az, kloroform ve DMSO'de tamamen çözünür.

UV Spektrumu:

$\lambda_{\text{maks.}}$ (nm) (ϵ): 318 (32172), 311 (32421); 306 (32082); 299 (44585); 256 (30454); 211 (30024); 195 (13497) (100 ml'sinde 1.2 mg madde içeren etanollü çözelti).

IR Spektrumu:

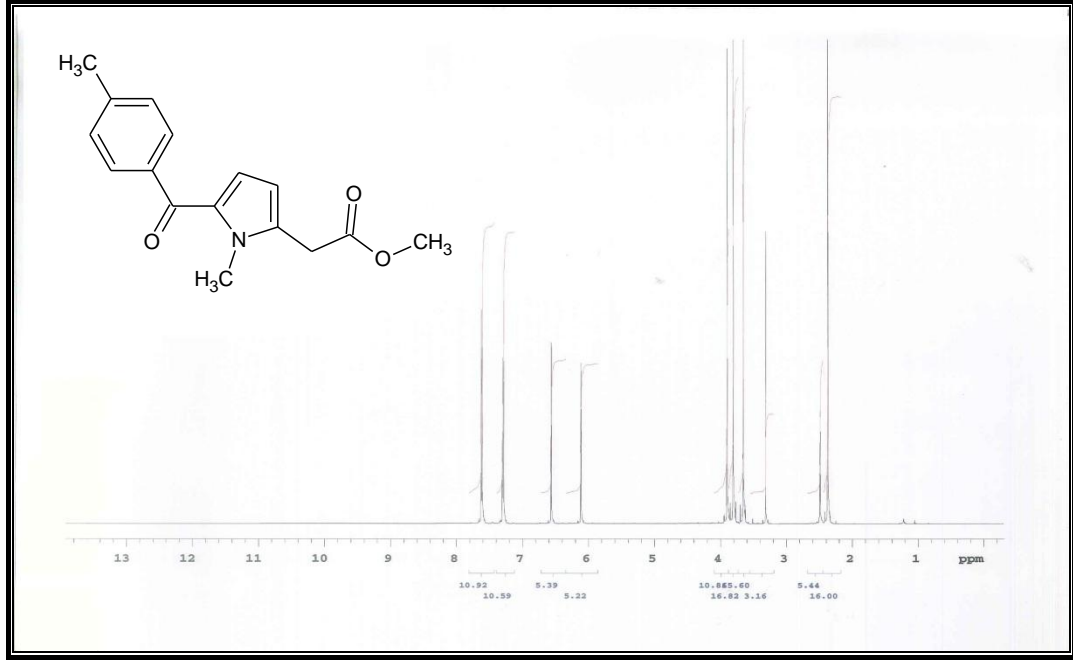
$\bar{\nu}$ maks. (cm^{-1}): 2955 (-CH₃ grubu asimetric C-H g.b); 1720 (ester, C=O g.b.); 1620, 1606, 1566, 1485 (aromatik C=C g.b.); 1458, 1404, 1373 (-CH₃ grubu asimetric C-H e.b.) 1205 (ester, C-O g.b.); 885 (1,4 disubstitue benzen) (**Şekil 5**).



Şekil 5: 2 bileşiminin IR spektrumu

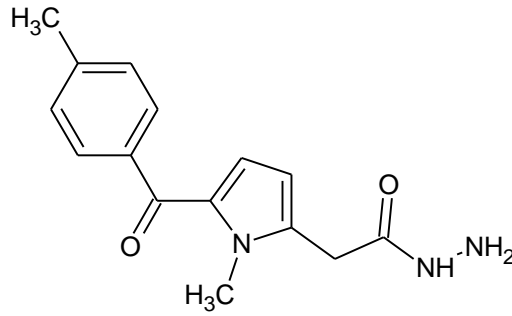
¹H-NMR Spektrumu :

(500 MHz) (DMSO-d₆/TMS) δ ppm: 2.49 (3H, s, -CH₃); 3.66 (3H, s, N-CH₃); 3.81 (3H, s, O-CH₃); 3.90 (2H, s, -CH₂-); 6.11 (1H, d, $J=3.9$ Hz, CH₂ komşu pirol halkası protonları); 6.56 (1H, d, $J=3.9$ Hz, C=O komşu pirol halkası protonları); 7.29 (2H, d, $J=7.81$ Hz, benzen halkası metile göre o-protonları); 7.62 (2H, d, $J=7.81$ Hz, benzen halkası karbonile göre o-protonları) (**Şekil 6**).



Şekil 6: Bileşik 2'nin ¹H-NMR spektrumu

6.1.3. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit (3)



Bileşik 2 2.713 g (0.01 mol) tartılır, metanolde (50 ml) çözündürülür. Üzerine hidrazin-hidrat (% 80'lik, 5 ml) ilave edilerek geri çeviren soğutucu altında su banyosunda ince tabaka kromatografisi takibinde 3 saat ısıtılır, soğutulur. Reaksiyon bitiminde elde edilen katı madde süzülerek, kurutulur. Etanol ile kristallendirilir.

- Verim: % 84
- R_f x100: 24.5 (M₃), t: 21 °C
- Kirlili beyaz renkte toz madde
- E.n. 185-186°C
- Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonunda az, kloroform ve DMSO'de tamamen çözünür.

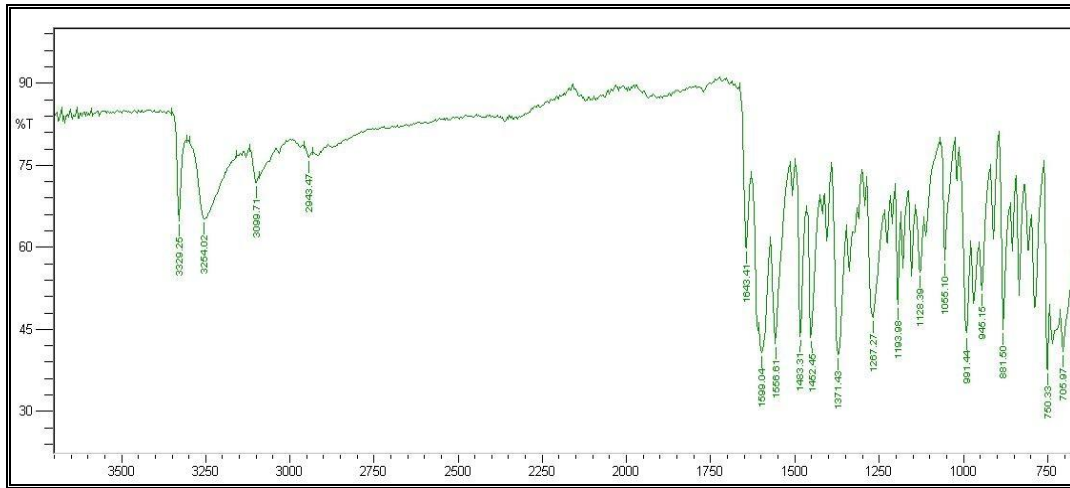
- Analiz: C₁₅H₁₇N₃O₂ (M.A.= 271.31438 g/mol)

UV Spektrumu:

λ maks. (nm) (ϵ): 320 (29012), 312 (29033); 305 (28198); 300 (40555); 254 (28490); 214 (33590) (100 ml'sinde 1.3 mg madde içeren etanollü çözelti).

IR Spektrumu:

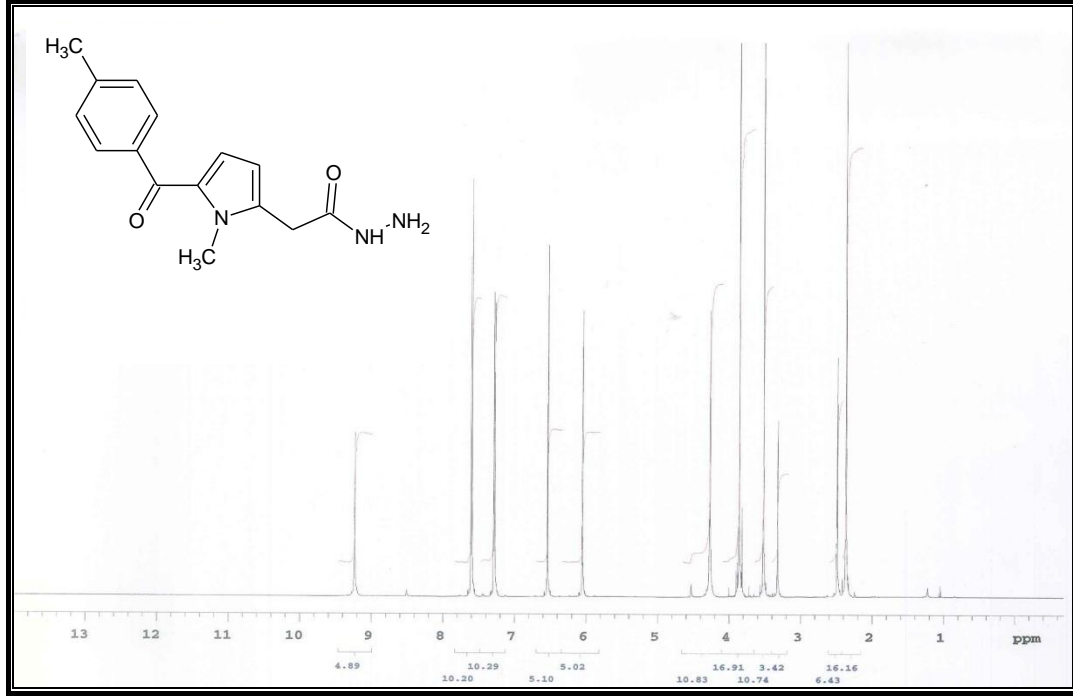
$\bar{\nu}$ maks. (cm⁻¹): 3329, 3254 (hidrazit asimetrik ve simetrik N-H g.b.); 3099 (aromatik =C-H g.b.); 2943 (-CH₃ grubu asimetrik C-H g.b.); 1643 (hidrazit, C=O g.b.); 1599, 1556, 1483, 1452 (aromatik C=C g.b., hidrazit N-H e.b.); 1371 (hidrazit, C-N g.b.); 881 (1,4-disübstitüebenzen) (**Şekil 7**).



Şekil 7: 3 bileşiğinin IR spektrumu

¹H-NMR Spektrumu :

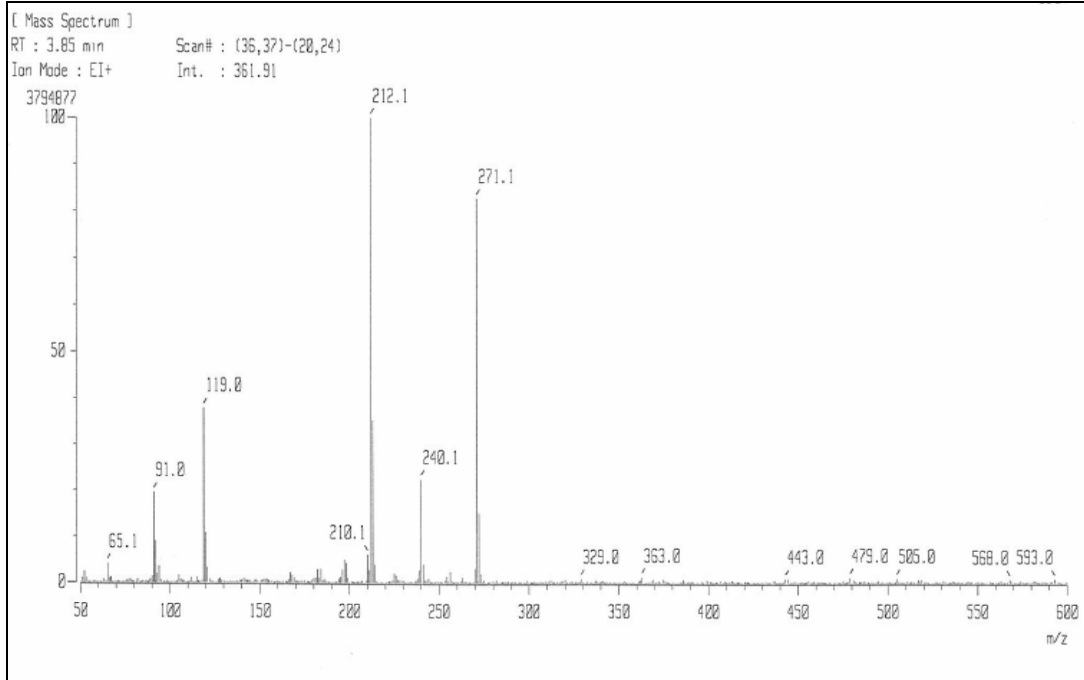
(500 MHz) (DMSO-d₆/TMS) δ ppm: 2.37 (3H, s, -CH₃); 3.52 (2H, s, -CH₂CO-); 3.86 (3H, s, N-CH₃); 4.27 (2H, s, -NH₂); 6.06 (1H, d, $J=3.9$ Hz, CH₂ komşu pirol halkası protonları); 6.54 (1H, d, $J=3.9$ Hz, C=O komşu pirol halkası protonları); 7.29 (2H, d, $J=7.81$ Hz, benzen halkası metile göre o-protonları); 7.61 (2H, d, $J=8.3$ Hz, benzen halkası karbonile göre o-protonları); 9.23 (1H, s, -NH) (**Şekil 8**).



Şekil 8: Bileşik 3'ün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

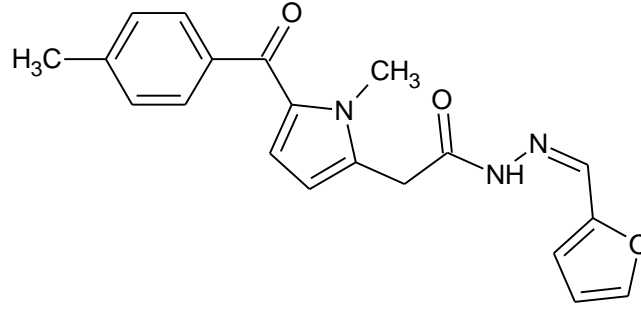
Kütle Spektrumu:

(EI, m/z, %): 271.1 [M^+] (% 62), 240.1 (% 18), 212.1 (% 100), 119 (% 27), 91 (% 14). (Şekil 9).



Şekil 9: Bileşik 3'ün kütle spektrumu

6.1.4. *N'*-[furan-2-il-metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetohidrazit (4a)



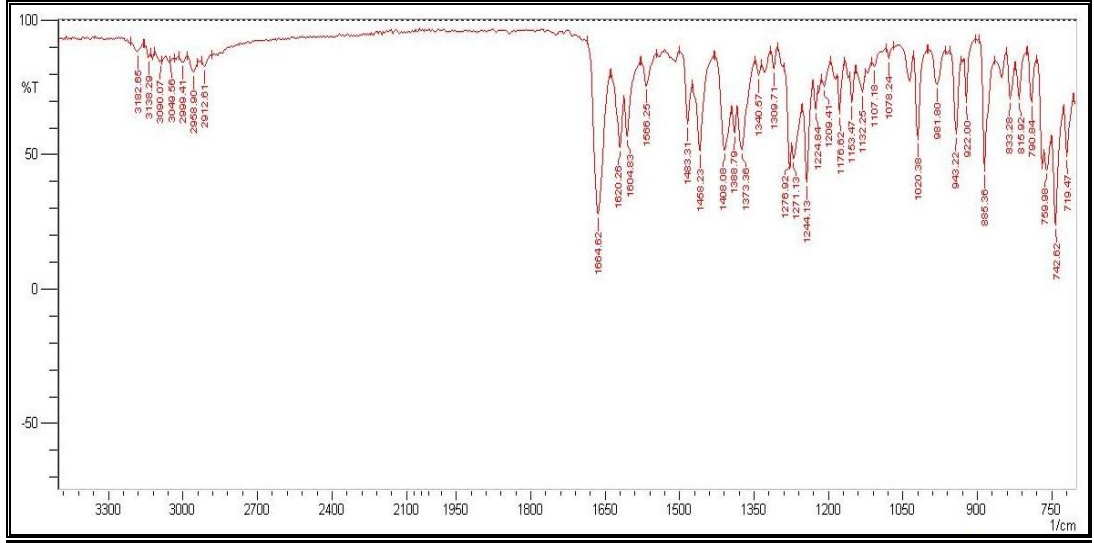
Bileşik 3'den 0.678 g (0.0025 mol) tartılır, 20 ml etanol ve etanolde çözülen 0.2402 g (0.0025 mol) 2-furaldehit'den hareketle 5.2.4.'de verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün, etanol ile iki kez kristallendirilerek saflaştırılır.

- Verim: % 93
- R_f x100: 28 (M₂), t: 21 °C
- Kirli beyaz renkte toz madde
- E.n. 222-224°C
- Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonunda az, kloroform ve DMSO'de tamamen çözünür.

- Analiz: C₂₀H₁₉N₃O₃ (M.A.= 349.38316 g/mol)
Hesaplanan (%) : C (68.75); H (5.48); N (12.03)
Bulunan (%) : C (68.24); H (5.25); N (11.89)

IR Spektrumu:

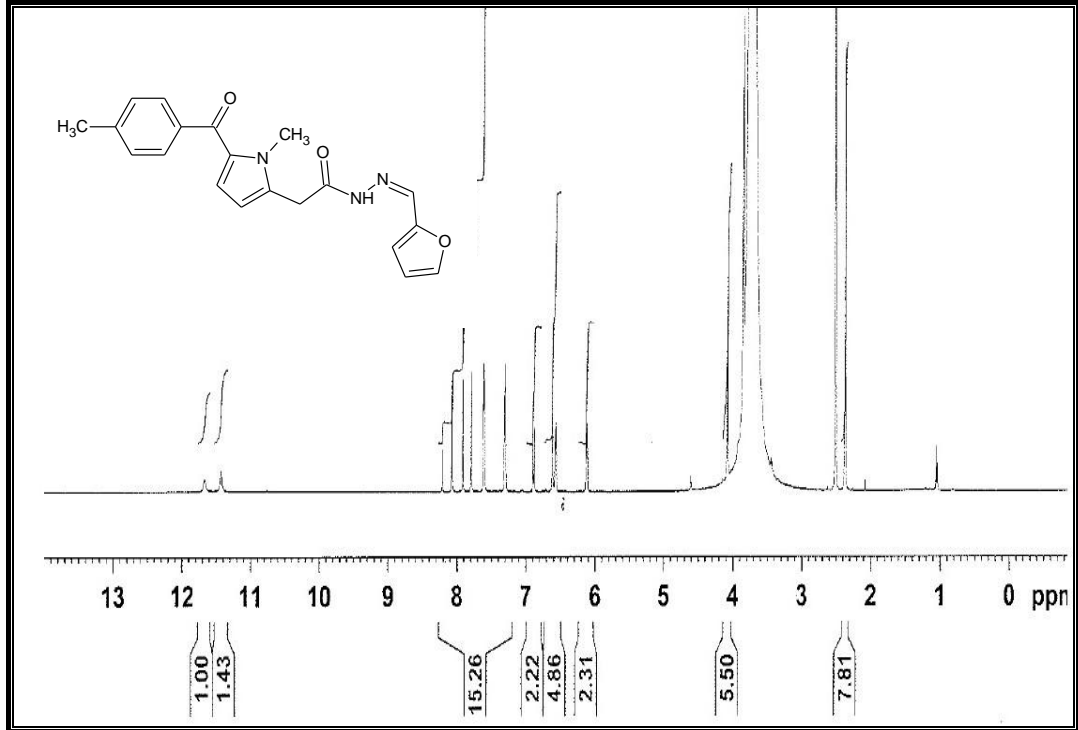
$\bar{\nu}$ maks. (cm⁻¹): 3183 (hidrazon, N-H g.b.); 3090, 3050 (aromatik =C-H g.b.); 2959, 2913 (-CH₃ grubu asimetric C-H g.b.); 1665 (hidrazon, C=O g.b.); 1620 (hidrazon, C=N g.b.); 1566, 1483, 1458, 1408 (aromatik C=C g.b. ve hidrazon N-H e.b.); 1376 (hidrazon, C-N g.b.); 1277, 1244 (aromatik, C-O g.b.); 885 (1,4-disüstitüe benzen) (Şekil 10).



Şekil 10: 4a bileşiğinin IR spektrumu

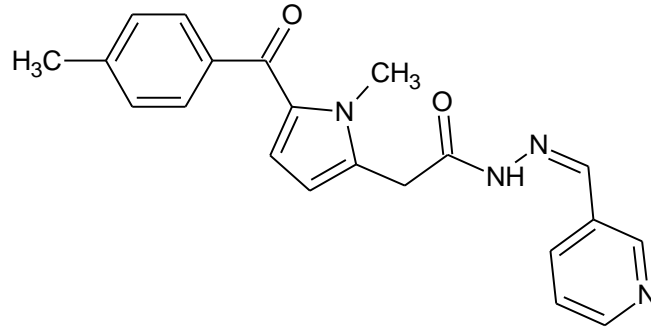
¹H-NMR Spektrumu :

(600 MHz) (DMSO-d₆/TMS) δ ppm: 2.36 (3H, s, -CH₃); 3.84 (çözücü piki içinde N-CH₃); 4.07 (2H, s, -CH₂); 6.10-7.58 (9H, m, pirol ve furan halkasındaki protonlar, Ar-H); 8.07, 8.21 (1H, ss, -CH=N); 11.42, 11.67 (1H, ss, -NH) (Şekil 11).



Şekil 11: Bileşik 4a'nin ¹H-NMR spektrumu

6.1.5. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]-N'-[piridin-3-il metiliden]asetohidrazit (4b)



Bileşik 3'den 0.678 g (0.0025 mol) tartılır, 20 ml etanol ve etanolde çözülen 0.2678 g (0.0025 mol) 3-piridinkarboksaldehit'den hareketle 5.2.4.'de verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün, etanol ile iki kez kristallendirilerek saflaştırılır.

- Verim: % 74
- R_f x100: 17 (M₂), t: 21 °C
- Kirlili beyaz renkte toz madde
- E.n. 191-193°C
- Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonunda az, kloroform ve DMSO'de tamamen çözünür.

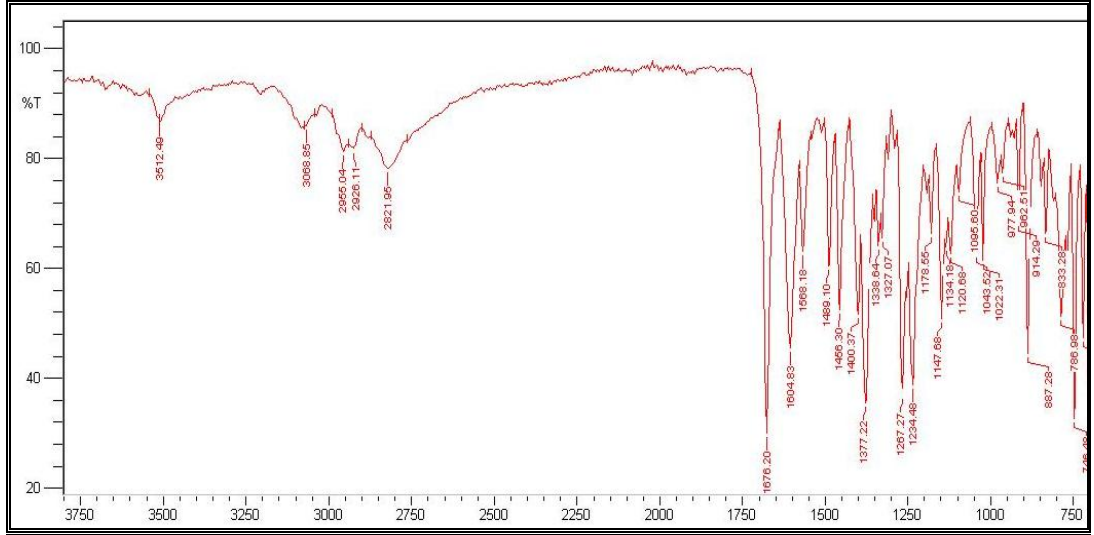
- Analiz: C₂₁H₂₀N₄O₂.1/2H₂O.1/2C₂H₅OH (M.A.= 392.451 g/mol)

Hesaplanan (%) : C (67.33); H (6.16); N (14.28)

Bulunan (%) : C (67.73); H (5.52); N (15.17)

IR Spektrumu:

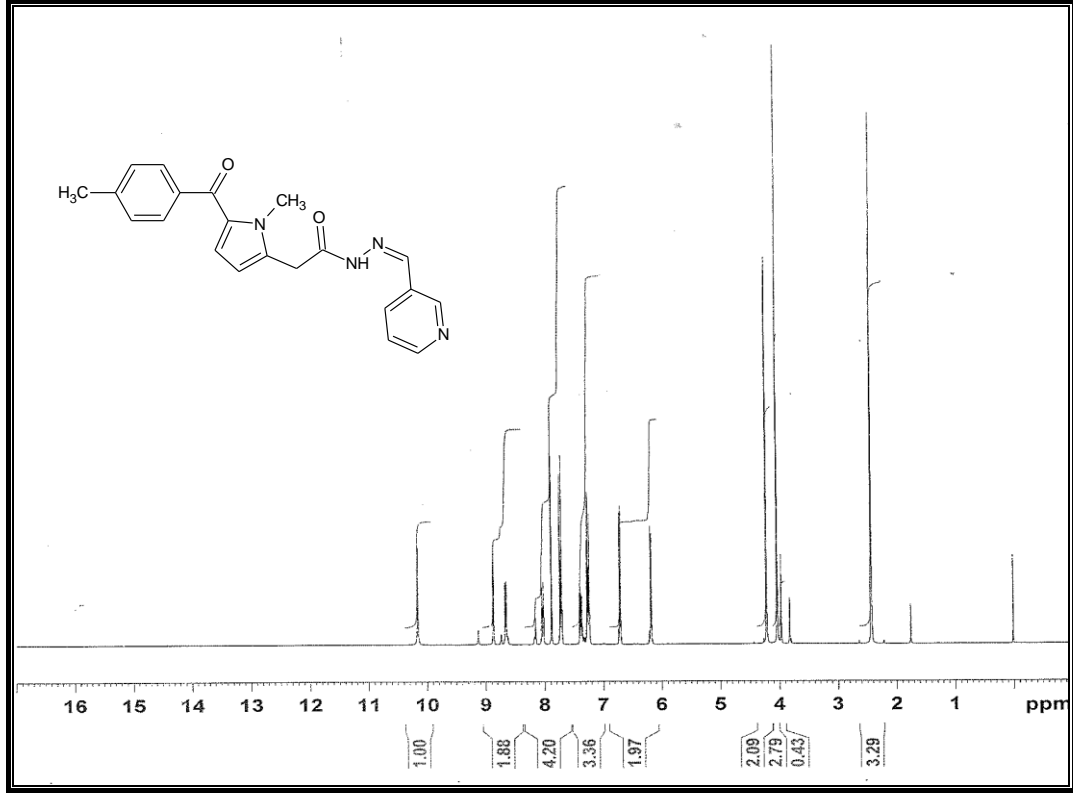
$\bar{\nu}$ maks. (cm⁻¹): 3512 (molekülün tuttuğu suyun OH g.b.) 3069 (hidrazon, N-H g.b.); 2955, 2926 (-CH₃ grubu asimetric C-H g.b.); 2822 (-CH₃ grubu simetric C-H g.b.); 1676 (hidrazon, C=O g.b.); 1604 (hidrazon, C=N g.b.); 1588, 1489, 1456, 1400 (aromatik C=C g.b. ve hidrazon N-H e.b.); 1377 (hidrazon, C-N g.b.); 887 (1,4 disubstitüe benzen) (Şekil 12).



Şekil 12: 4b bileşiğinin IR spektrumu

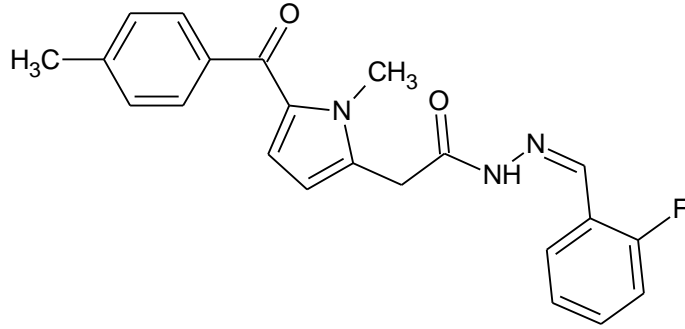
¹H-NMR Spektrumu :

(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 1.78 (s, molekülün tuttuğu etanolün –CH₃ piki) 2.44 (3H, s, -CH₃); 3.83 (s, molekülün tuttuğu etanolün –CH₂ piki), 3.97 (s, molekülün tuttuğu etanolün –OH piki) 4.04 (3H, s, N-CH₃); 4.22 (2H, s, -CH₂); 6.19 (1H, d, $J=4.06$ Hz, CH₂ komşu pirol halkası protonları); 6.71 (1H, d, $J=4.04$ Hz, C=O komşu pirol halkası protonları); 7.24-7.74;8.02-8.06 (8H, m, Ar-H); 7.89 (1H, s, -CH=N); 10.16 (1H, s, -NH-) (Şekil 13).



Şekil 13: Bileşik **4b**'nin ¹H-NMR spektrumu

6.1.6. *N*'-[2-fluorofenil]metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetohidrazit (**4c**)



Bileşik **3**'den 0.678 g (0.0025 mol) tartılır, 20 ml etanol ve etanolde çözülen 0.3103 g (0.0025 mol) 2-fluorobenzaldehit'den hareketle 5.2.4.'de verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün, etanol ile iki kez kristallendirilerek saflaştırılır.

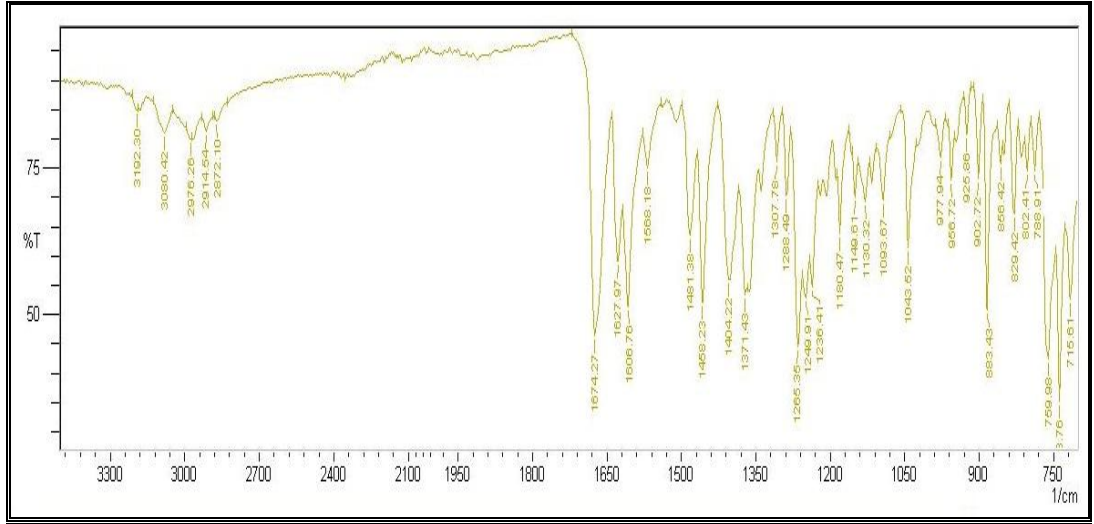
- Verim: % 50
- R_f x100: 32 (M₂), t: 21 °C
- Kirli beyaz renkte toz madde

- E.n. 185°C
- Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonunda az, kloroform ve DMSO'de tamamen çözünür.

- Analiz: $C_{22}H_{20}FN_3O_2 \cdot 1/2 C_2H_5OH$ (M.A.= 400.445 g/mol)
 Hesaplanan (%) : C (68.98); H (5.79); N (10.49)
 Bulunan (%) : C (69.33); H (5.28); N (11.03)

IR Spektrumu:

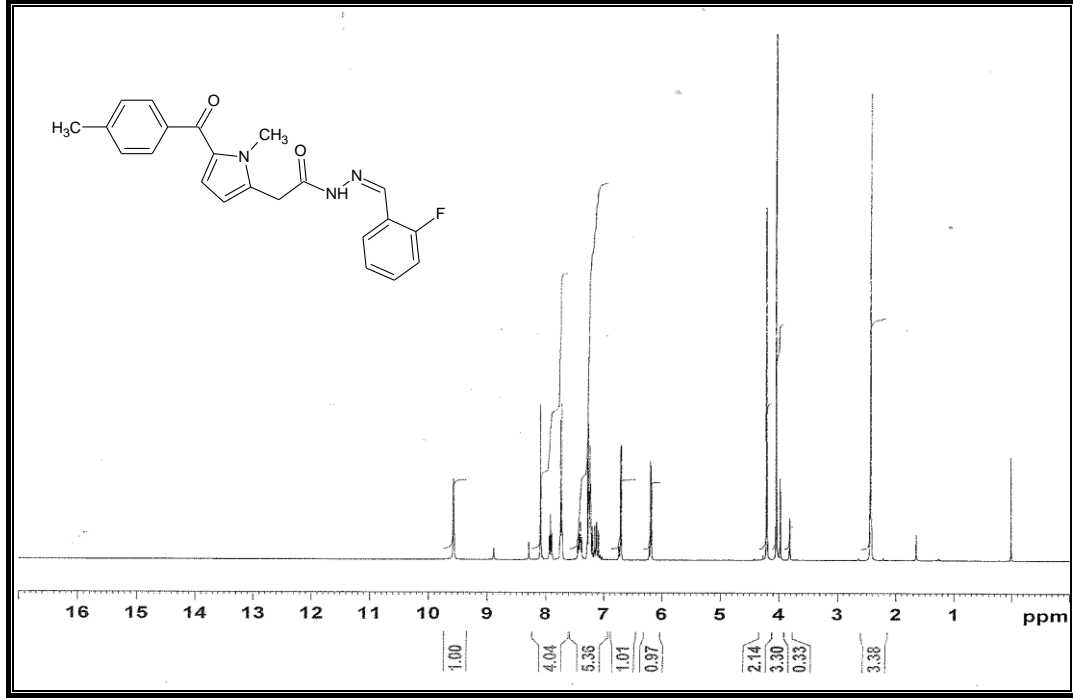
$\bar{\nu}$ maks. (cm⁻¹): 3192 (hidrazon, N-H g.b.); 3080 (aromatik =C-H g.b.), 2976, 2914, (-CH₃ grubu asimetrik C-H g.b.); 2872 (-CH₃ grubu simetrik C-H g.b.); 1674 (hidrazon, C=O g.b.); 1628 (hidrazon, C=N g.b.); 1607, 1568, 1481, 1458 (aromatik C=C g.b. ve hidrazon N-H e.b.); 1371 (hidrazon, C-N g.b.); 1265 (Ar-F g.b.); 883 (1,2 disubstitüe benzen) (Şekil 14).



Şekil 14: 4c bileşiğinin IR spektrumu

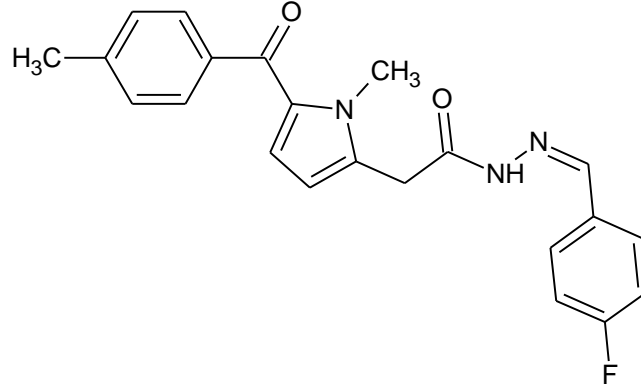
¹H-NMR Spektrumu :

(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 1.66 (s, molekülün tuttuğu etanolün -CH₃ piki), 2.44 (3H, s, -CH₃); 3.83 (s, molekülün tuttuğu etanolün -CH₂ piki), 3.99 (s, molekülün tuttuğu etanolün -OH piki), 4.05 (3H, s, N-CH₃); 4.21 (2H, s, -CH₂); 6.19 (1H, d, $J=4.05$ Hz, CH₂ komşu pirol halkası protonları); 6.71 (1H, d, $J=4.05$ Hz, C=O komşu pirol halkası protonları); 7.10-7.44 (8H, m, Ar-H) 8.09 (1H, s, -CH=N); 9.58 (1H, s, -NH) (Şekil 15).



Şekil 15: Bileşik 4c'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

6.1.7. *N'*-[(4-fluorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetohidrazit (4d)



Bileşik 3'den 0.678 g (0.0025 mol) tartılır, 20 ml etanol ve etanolde çözülen 0.3103 g (0.0025 mol) 4-fluorobenzaldehit'den hareketle 5.2.4.'de verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün, etanol ile iki kez kristallendirilerek saflaştırılır.

- Verim: % 83
- $R_f \times 100$: 30 (M_2), t: 21 °C
- Kirlili beyaz renkte toz madde
- E.n. 200-201°C

• Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonunda az, kloroform ve DMSO'de tamamen çözünür.

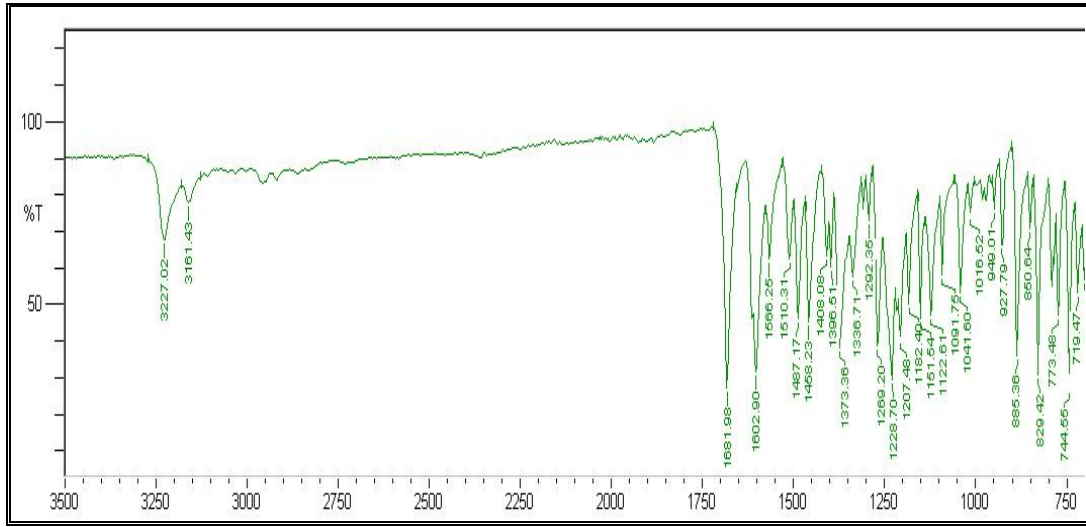
• Analiz: $C_{22}H_{20}FN_3O_2 \cdot 1/2 C_2H_5OH$ (M.A.= 400.445- g/mol)

Hesaplanan (%) : C (68.98); H (5.79); N (10.49)

Bulunan (%) : C (69.04); H (5.33); N (11.33)

IR Spektrumu:

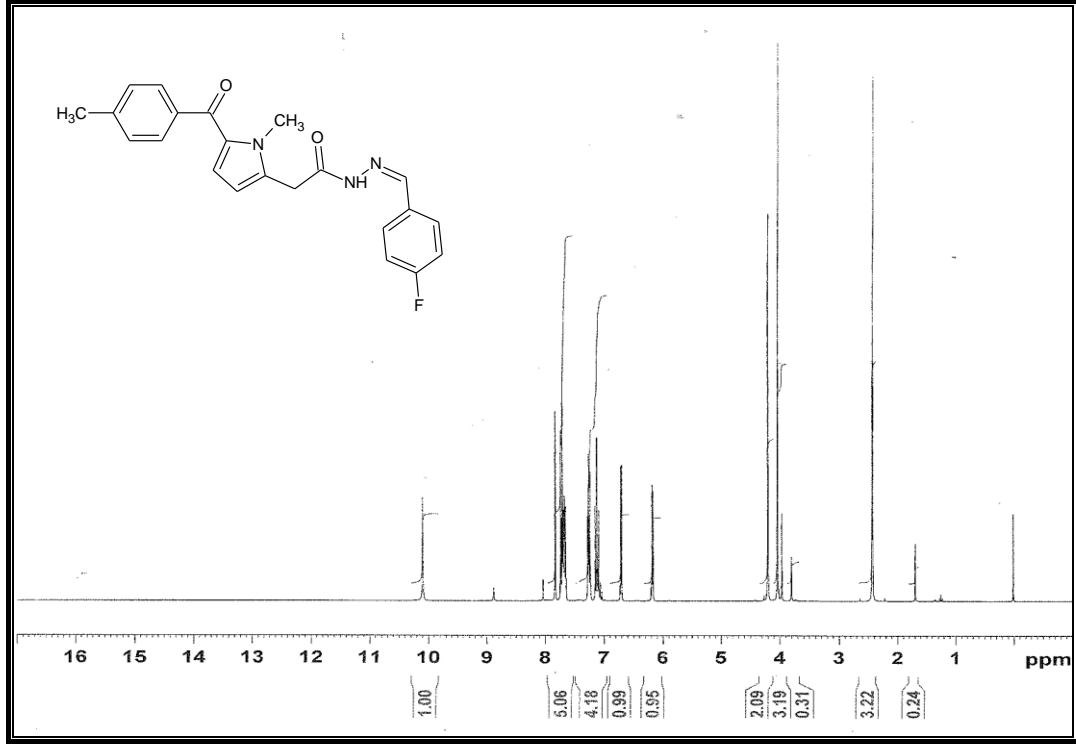
$\bar{\nu}$ maks. (cm^{-1}): 3227 (hidrazon, N-H g.b.); 3161 (aromatik, =C-H g.b.) 1682 (hidrazon, C=O g.b.); 1603 (hidrazon, C=N g.b.); 1566, 1510, 1487, 1458 (aromatik C=C g.b. ve hidrazon N-H e.b.); 1373 (hidrazon, C-N g.b.); 1228 (Ar-F g.b.); 885 (1,4 disubstitüe benzen) (Şekil 16).



Şekil 16: 4d bileşiğinin IR spektrumu

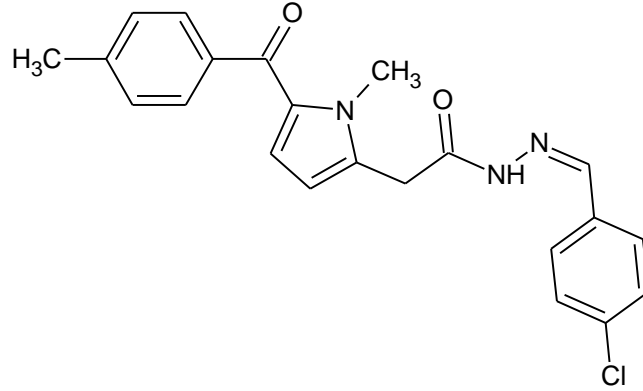
¹H-NMR Spektrumu :

(300 MHz) ($CDCl_3/TMS$) δ ppm: 1.7 (s, molekülün tuttuğu etanolün $-CH_3$ piki), 2.44 (3H, s, $-CH_3$); 3.81 (s, molekülün tuttuğu etanolün $-CH_2$ piki), 3.97 (s, molekülün tuttuğu etanolün $-OH$ piki), 4.04 (3H, s, N- CH_3); 4.21 (2H, s, $-CH_2-$); 6.19 (1H, d, $J=4.05$ Hz, CH_2 komşu pirol halkası protonları); 6.72 (1H, d, $J=4.05$ Hz, C=O komşu pirol halkası protonları); 7.07-7.75 (8H, m, Ar-H) 7.84 (1H, s, $-CH=N$); 10.10 (1H, s, $-NH$) (Şekil 17).



Şekil 17: Bileşik **4d**'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

6.1.8. *N*'-[4-klorofenil]metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetohidrazit (**4e**)



Bileşik **3**'den 0.678 g (0.0025 mol) tartılır, 20 ml etanol ve etanolde çözülen 0.3514 g (0.0025 mol) 4-klorobenzaldehit'den hareketle 5.2.4.'de verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün, etanol ile iki kez kristallendirilerek saflaştırılır.

- Verim: % 70
- $R_f \times 100$: 45 (M_2), t: 21 °C
- Kirli beyaz renkte toz madde
- E.n. 198-200°C

• Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonunda az, kloroform ve DMSO'de tamamen çözünür.

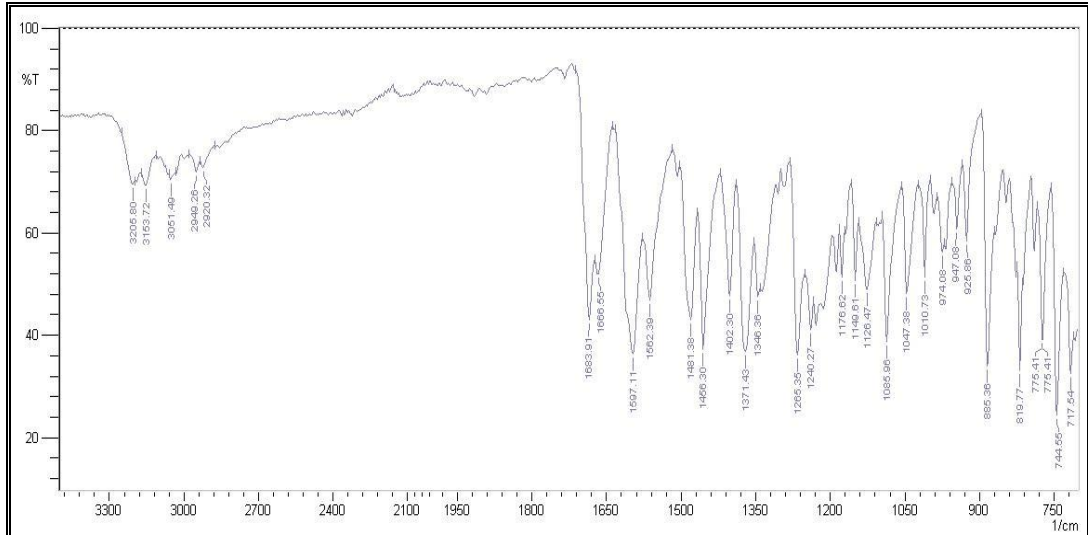
• Analiz: $C_{22}H_{20}ClN_3O_2 \cdot 1/2 C_2H_5OH$ (M.A.= 416.900 g/mol)

Hesaplanan (%) : C (66.26); H (5.56); N (10.08)

Bulunan (%) : C (65.74); H (5.070); N (10.51)

IR Spektrumu:

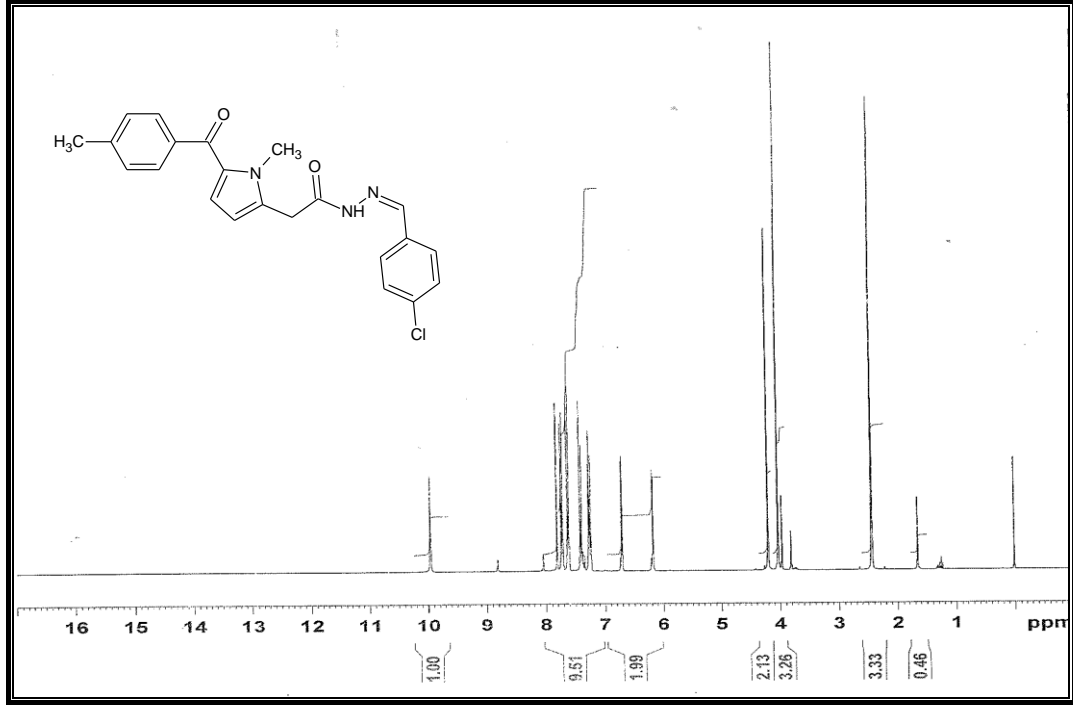
$\bar{\nu}$ maks. (cm^{-1}): 3206 (molekülün tuttuğu etanolün -OH g.b.); 3154 (hidrazon, N-H g.b.); 3051 (aromatik =C-H g.b.); 2949, 2920 (-CH₃ grubu asimetrik C-H g.b.); 1684, 1666 (hidrazon, C=O g.b.); 1597 (hidrazon, C=N g.b.); 1562, 1481, 1456, 1402 (aromatik C=C g.b. ve hidrazon N-H e.b.); 1371 (hidrazon, C-N g.b.); 1346 (-CH₃ grubu asimetrik C-H e.b.); 1086 (Ar-Cl g.b.); 885 (1,4 disubstitüe benzen) (**Şekil 18**).



Şekil 18: 4e bileşiğinin IR spektrumu

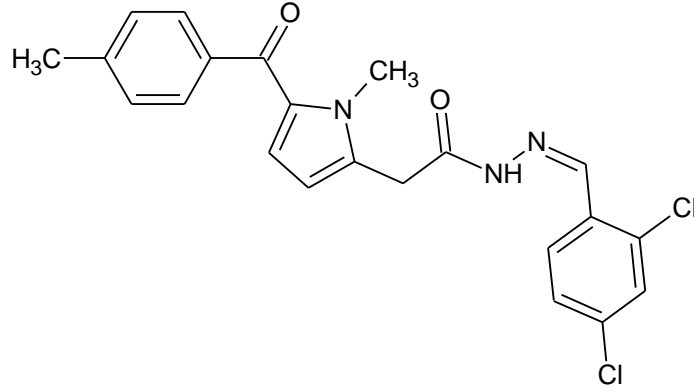
¹H-NMR Spektrumu :

(300 MHz) ($CDCl_3/TMS$) δ ppm: 1.67 (s, molekülün tuttuğu etanolün -CH₃ piki); 2.44 (3H, s, -CH₃); 3.82 (s, molekülün tuttuğu etanolün -CH₂ piki), 3.98 (s, molekülün tuttuğu etanolün -OH piki); 4.04 (3H, s, N-CH₃); 4.21 (2H, s, -CH₂); 6.18 (1H, d, $J=4.06$ Hz, CH₂ komşu pirol halkası protonları); 6.71 (1H, d, $J=4.04$ Hz, C=O komşu pirol halkası protonları); 7.24-7.75 (8H, m, Ar-H); 7.82 (1H, s, -CH=N), 9.97 (1H, s, -NH) (**Şekil 19**).



Şekil 19: Bileşik 4e'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

6.1.9. *N'*-[(2,4-diklorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoyl)-1*H*-pirol-2-il]asetohidrazit (4f)



Bileşik 3'den 0.678 g (0.0025 mol) tartılır, 20 ml etanol ve etanolde çözülen 0.4375 g (0.0025 mol) 2,4-diklorobenzaldehit'den hareketle 5.2.4.'de verilen yöntemle elde edilir. Elde edilen ürün, etanol ile iki kez kristallendirilerek saflaştırılır.

- Verim: % 82
- $R_f \times 100$: 50 (M_2), t: 21 °C
- Kirli beyaz renkte toz madde
- E.n. 202-206°C

- Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonunda az, kloroform ve DMSO'de tamamen çözünür.

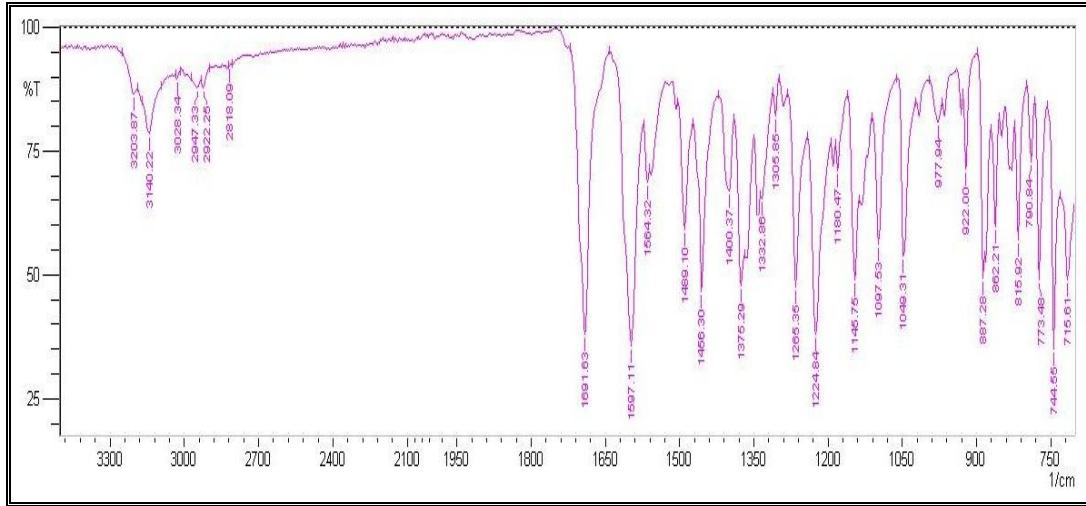
- Analiz: $C_{22}H_{19}Cl_2N_3O_2 \cdot 1/2 C_2H_5OH$ (M.A.= 451.345 g/mol)

Hesaplanan (%) : C (61.20); H (4.91); N (9.31)

Bulunan (%) : C (60.75); H (4.42); N (9.65)

IR Spektrumu:

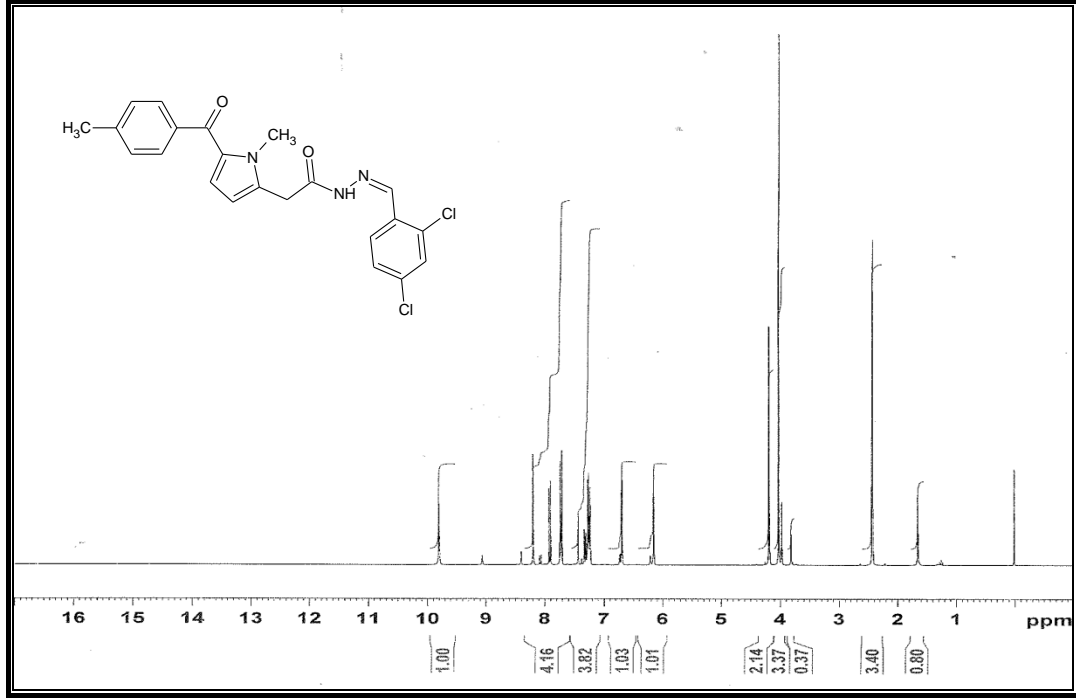
$\bar{\nu}$ maks. (cm^{-1}): 3204 (molekülün tuttuğu etanolün -OH g.b.); 3140 (hidrazon, N-H g.b.); 3028 (aromatik, =C-H g.b.); 2947, 2922 (-CH₃ grubu asimetric C-H g.b.) 1692 (hidrazon, C=O g.b.); 1597 (hidrazon, C=N g.b.); 1564, 1489, 1456, 1400 (aromatik C=C g.b. ve hidrazon N-H e.b.); 1375 (hidrazon, C-N g.b.); 1097 (Ar-Cl g.b.); 887 (1,4 disüstitüe benzen) (Şekil 20).



Şekil 20: 4f bileşiğinin IR spektrumu

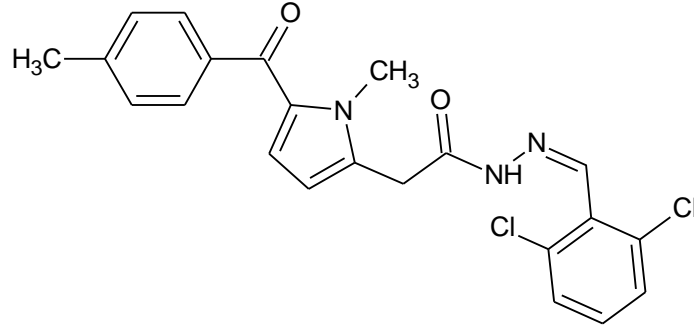
¹H-NMR Spektrumu :

(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 1.66 (s, molekülün tuttuğu etanolün -CH₃ piki), 2.44 (3H, s, -CH₃); 3.82 (s, molekülün tuttuğu etanolün -CH₂ piki), 3.98 (s, molekülün tuttuğu etanolün -OH piki), 4.03 (3H, s, N-CH₃); 4.19 (2H, s, -CH₂-); 6.16 (1H, d, $J=4.06$ Hz, CH₂ komşu pirol halkası protonları); 6.70 (1H, d, $J=4.05$ Hz, C=O komşu pirol halkası protonları); 7.24-7.93 (7H, m, Ar-H) 8.20 (1H, s, -CH=N); 9.81 (1H, s, -NH) (Şekil 21).



Şekil 21: Bileşik 4f'nin ¹H-NMR spektrumu

6.1.10. *N'*-[(2,6-diklorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetohidrazit (4g)



Bileşik 3'den 0.678 g (0.0025 mol) tartılır, 20 ml etanol ve etanolde çözülen 0.4375 g (0.0025 mol) 2,6-diklorobenzaldehit'den hareketle 5.2.4.'de verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün, etanol ile iki kez kristallendirilerek saflaştırılır.

- Verim: % 86
- R_f x100: 60 (M₂), t: 21 °C
- Kirli beyaz renkte toz madde
- E.n. 225-226°C
- Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonunda az, kloroform ve DMSO'de

tamamen çözünür.

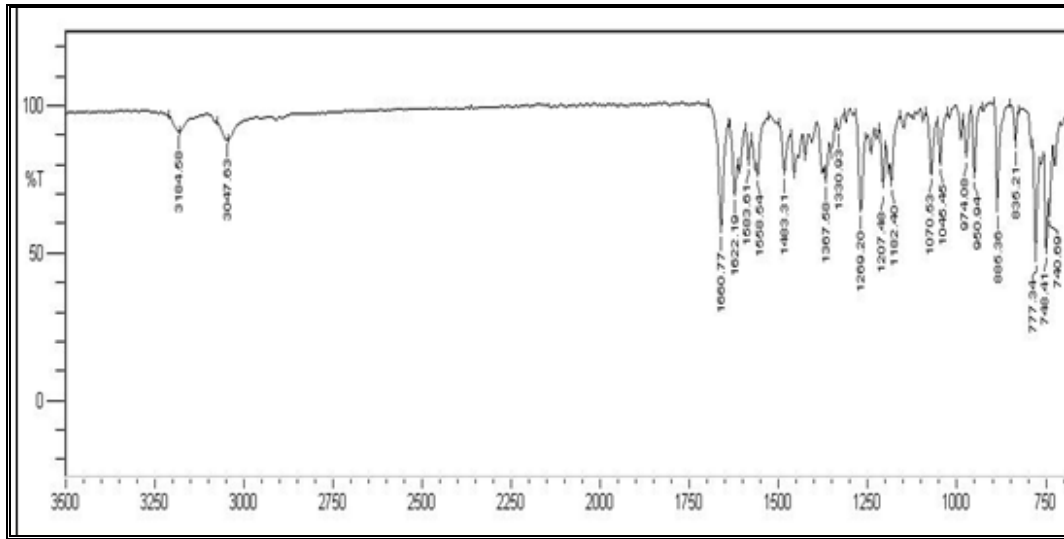
- Analiz: $C_{22}H_{19}N_3O_2$ (M.A.= 428.311 g/mol)
Hesaplanan (%) : C (61.69); H (4.47); N (9.81)
Bulunan (%) : C (60.84); H (4.44); N (9.83)

UV Spektrumu:

$\lambda_{maks.}$ (nm) (ϵ): 310 (26438), 259 (24418); 220 (32955); 200 (15391); 196 (14259)
(100 ml'sinde 1.4 mg madde içeren etanollü çözelti).

IR Spektrumu:

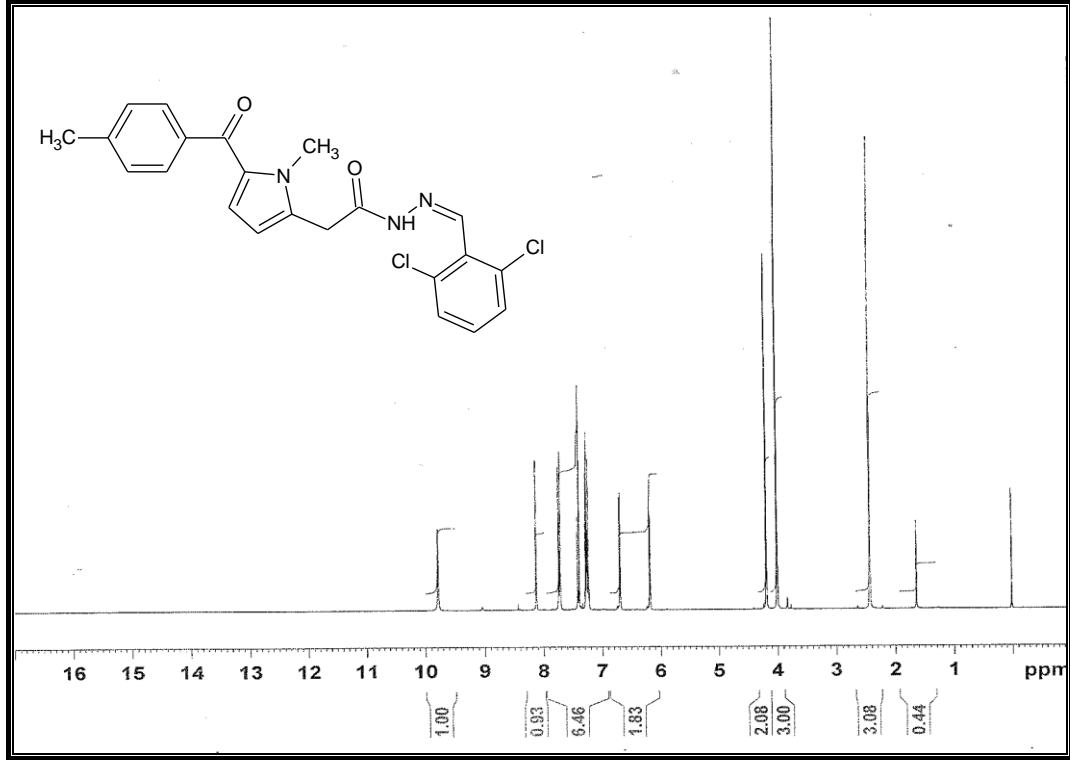
$\bar{\nu}$ maks. (cm^{-1}): 3184 (hidrazon, N-H g.b.); 3048 (aromatik, =C-H g.b.); 1660 (hidrazon, C=O g.b.); 1622 (hidrazon, C=N g.b.); 1584, 1558, 1483, 1453 (aromatik C=C g.b. ve hidrazon N-H e.b.); 1367 (hidrazon, C-N g.b.); 1070 (Ar-Cl g.b.); 885 (1,4 disubstitüe benzen) (**Şekil 22**).



Şekil 22: 4g bileşiğinin IR spektrumu

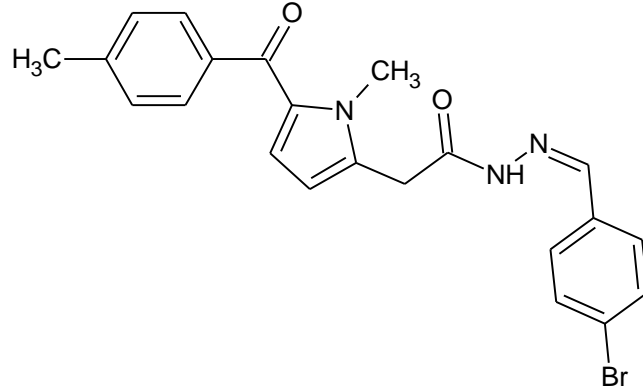
1H -NMR Spektrumu :

(300 MHz) ($CDCl_3/TMS$) δ ppm: 2.44 (3H, s, $-CH_3$); 4.01 (3H, s, N- CH_3); 4.20 (2H, s, $-CH_2-$); 6.19 (1H, d, $J=4.06$ Hz, CH_2 komşu pirol halkası protonları); 6.70 (1H, d, $J=4.05$ Hz, C=O komşu pirol halkası protonları); 7.24-7.74 (7H, m, Ar-H) 8.13 (1H, s, $-CH=N$); 9.79 (1H, s, $-NH$) (**Şekil 23**).



Şekil 23: Bileşik 4g'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

6.1.11. *N'*-[(4-bromofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetohidrazit (4h)



Bileşik 3'den 0.678 g (0.0025 mol) tartılır, 20 ml etanol ve etanolde çözülen 0.4625 g (0.0025 mol) 4-bromobenzaldehit'den hareketle 5.2.4.'de verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün, etanol ile iki kez kristallendirilerek saflaştırılır.

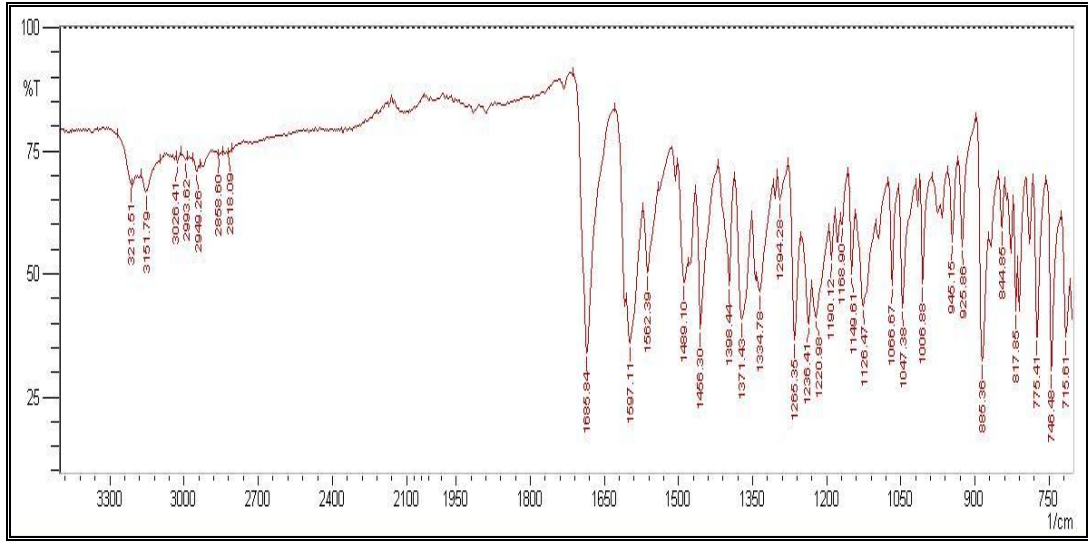
- Verim: % 70
- $R_f \times 100$: 35 (M_2), t: 21 °C
- Kirli beyaz renkte toz madde

- E.n. 206-207°C
- Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonunda az, kloroform ve DMSO'de tamamen çözünür.

- Analiz: $C_{22}H_{20}BrN_3O_2 \cdot 1/2 C_2H_5OH$ (M.A.= 461.351 g/mol)
 Hesaplanan (%) : C (60.28); H (4.60); N (9.59)
 Bulunan (%) : C (59.54); H (4.57); N (9.62)

IR Spektrumu:

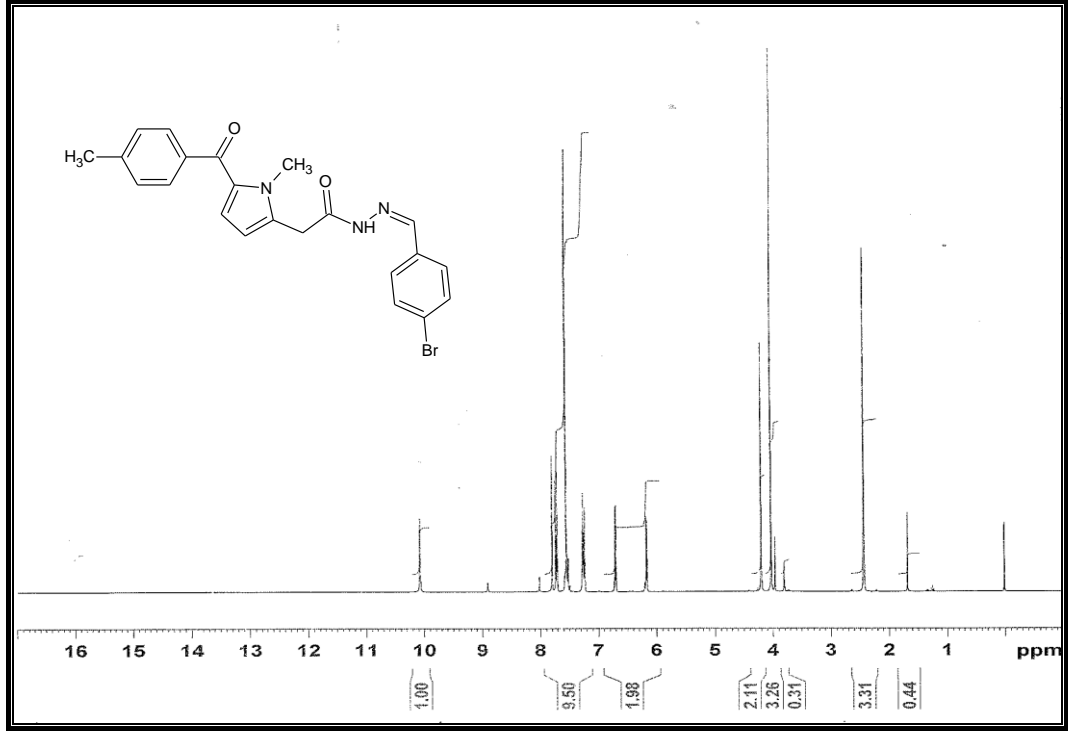
$\bar{\nu}$ maks. (cm⁻¹): 3213 (molekülün tuttuğu etanolün -OH g.b.); 3152 (hidrazon, N-H g.b.); 3026 (aromatik =C-H g.b.); 2949 (-CH₃ grubu asimetrik C-H g.b.); 2859 (-CH₃ grubu simetrik C-H g.b.) 1686 (hidrazon, C=O g.b.); 1597 (hidrazon, C=N g.b.); 1562, 1489, 1477, 1456 (aromatik C=C g.b. ve hidrazon N-H e.b.); 1371 (hidrazon, C-N g.b.); 1047 (Ar-Br g.b.); 885 (1,4 disubstitüe benzen) (**Şekil 24**).



Şekil 24: 4h bileşiğinin IR spektrumu

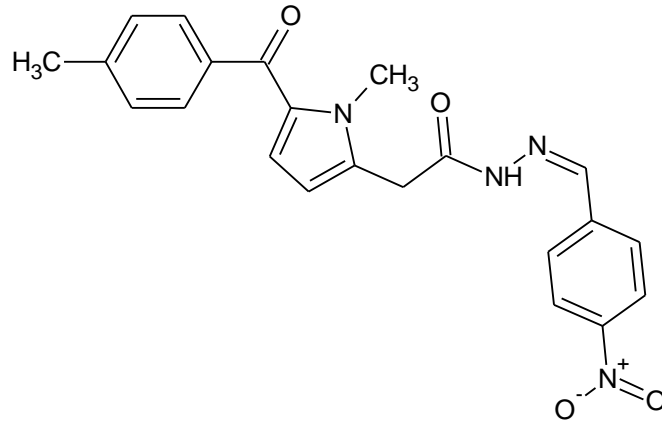
¹H-NMR Spektrumu :

(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 1.69 (s, molekülün tuttuğu etanolün -CH₃ piki) 2.44 (3H, s, -CH₃); 3.81 (s, molekülün tuttuğu etanolün -CH₂ piki); 3.97 (s, molekülün tuttuğu etanolün -OH piki); 4.04 (3H, s, N-CH₃); 4.21 (2H, s, -CH₂.CO-); 6.18 (1H, d, $J=4.06$ Hz, CH₂ komşu pirol halkası protonları); 6.71 (1H, d, $J=4.05$ Hz, p C=O komşu pirol halkası protonları); 7.24-7.74 (8H, m, Ar-H) 7.80 (1H, s, -CH=N-); 10.08 (1H, s, -NH-) (**Şekil 25**).



Şekil 25: Bileşik **4h**'nin ¹H-NMR spektrumu

6.1.12. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoi)-1H-pirol-2-il]-N'-[(4-nitrofenil)metiliden]asetohidrazit (**4i**)



Bileşik **3**'den 0.678 g (0.0025 mol) tartılır, 20 ml etanol ve etanolde çözülen 0.3780 g (0.0025 mol) 4-nitrobenzaldehit'den hareketle 5.2.4.'de verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün, etanol ile iki kez kristallendirilerek saflaştırılır.

- Verim: % 88
- Rf x100: 34 (M₂), t: 21 °C
- Mat sarı renkte toz madde
- E.n. 225-228 °C

- Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonunda az, kloroform ve DMSO'de tamamen çözünür.

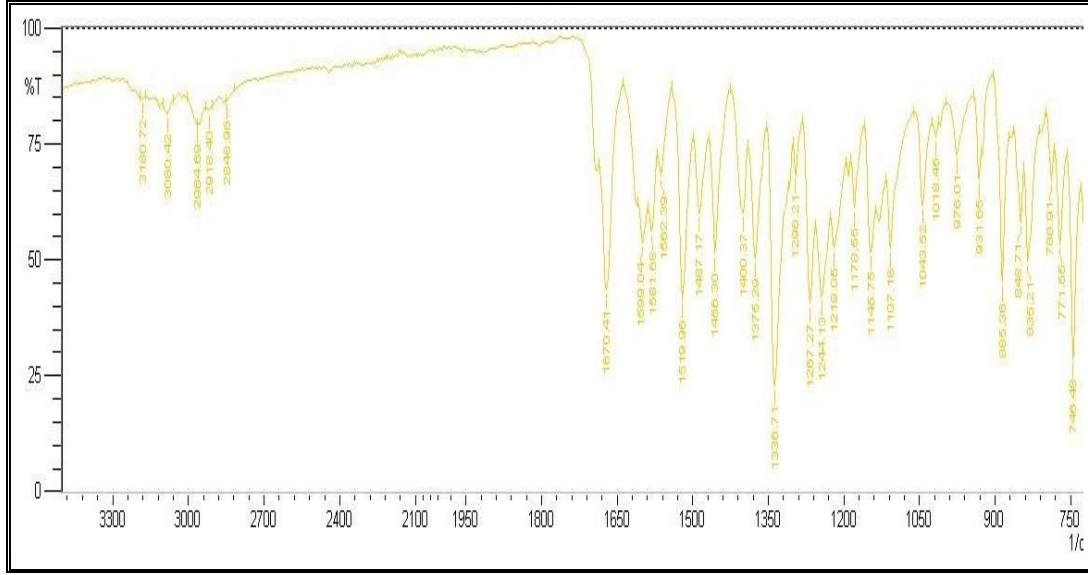
- Analiz: $C_{22}H_{20}N_4O_4 \cdot 1/2 H_2O$ (M.A.= 413.427 g/mol)

Hesaplanan (%) : C (63.91); H (5.12); N (13.55)

Bulunan (%) : C (64.49); H (4.95); N (13.73)

IR Spektrumu:

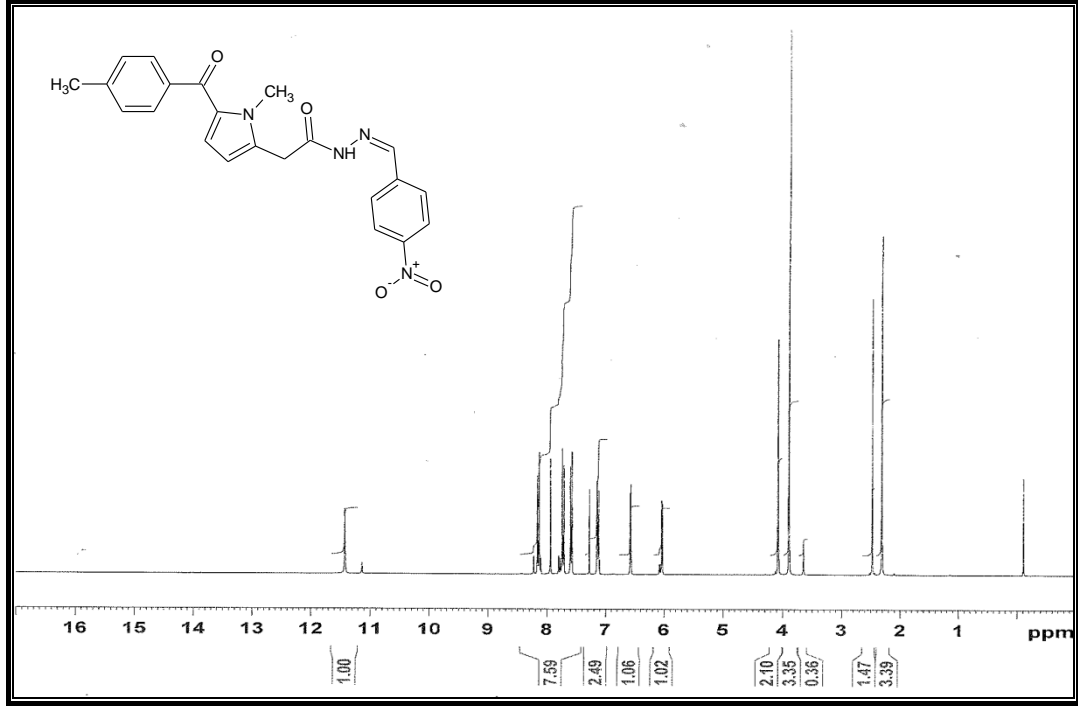
$\bar{\nu}$ maks. (cm^{-1}): 3180 (hidrazon, N-H g.b.); 3080 (aromatik =C-H g.b.) 2965, 2918 (-CH₃ grubu asimetrik C-H g.b.); 2857 (-CH₃ grubu simetrik C-H g.b.); 1670 (hidrazon, C=O g.b.); 1599 (hidrazon, C=N g.b.); 1582, 1520, 1487, 1456 (aromatik C=C g.b. ve hidrazon N-H e.b. ve NO₂ grubu asimetrik g.b.); 1375 (hidrazon, C-N g.b.); 1337 (NO₂ grubu simetrik g.b.); 885 (1,4 disubstitüe benzen) (**Şekil 26**).



Şekil 26: 4i bileşiğinin IR spektrumu

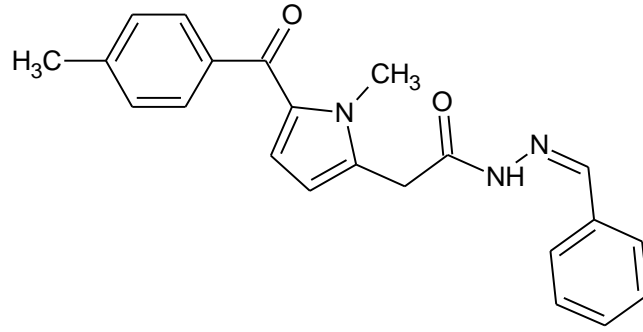
¹H-NMR Spektrumu :

(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 2.32 (3H, s, -CH₃); 3.90 (3H, s, N-CH₃); 4.08 (2H, s, -CH₂); 6.04 (1H, d, $J=4.06$ Hz, CH₂ komşu pirol halkası protonları); 6.58 (1H, d, $J=4.04$ Hz, C=O komşu pirol halkası protonları); 7.12-7.81; 8.11-8.23 (8H, m, Ar-H); 7.95 (1H, s, -CH=N); 11.43 (1H, s, -NH) (**Şekil 27**).



Şekil 27: Bileşik 4i'nin ¹H-NMR spektrumu

6.1.13. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]-N'-[fenilmetiliden]asetohidrazit (4j)



Bileşik 3'den 0.678 g (0.0025 mol) tartılır, 20 ml etanol ve etanolde çözülen 0.2653 g (0.0025 mol) benzaldehit'den hareketle 5.2.4.'de verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün, etanol ile iki kez kristallendirilerek saflaştırılır.

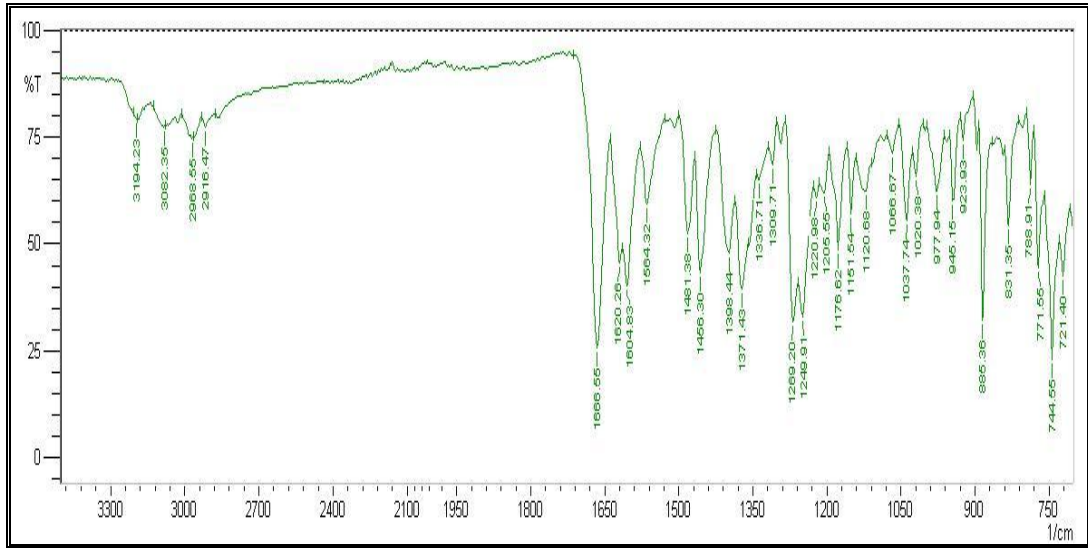
- Verim: % 71
- R_f x100: 36 (M₂), t: 21 °C
- Kirliliği beyaz renkte toz madde
- E.n. 168-172 °C
- Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonunda az, kloroform ve DMSO'de

tamamen çözünür.

- Analiz: $C_{22}H_{21}N_3O_2 \cdot 1/2 C_2H_5OH$ (M.A.= 382.45526 g/mol)
Hesaplanan (%) : C (72.23); H (6.32); N (10.99)
Bulunan (%) : C (72.32); H (5.761); N (11.65)

IR Spektrumu:

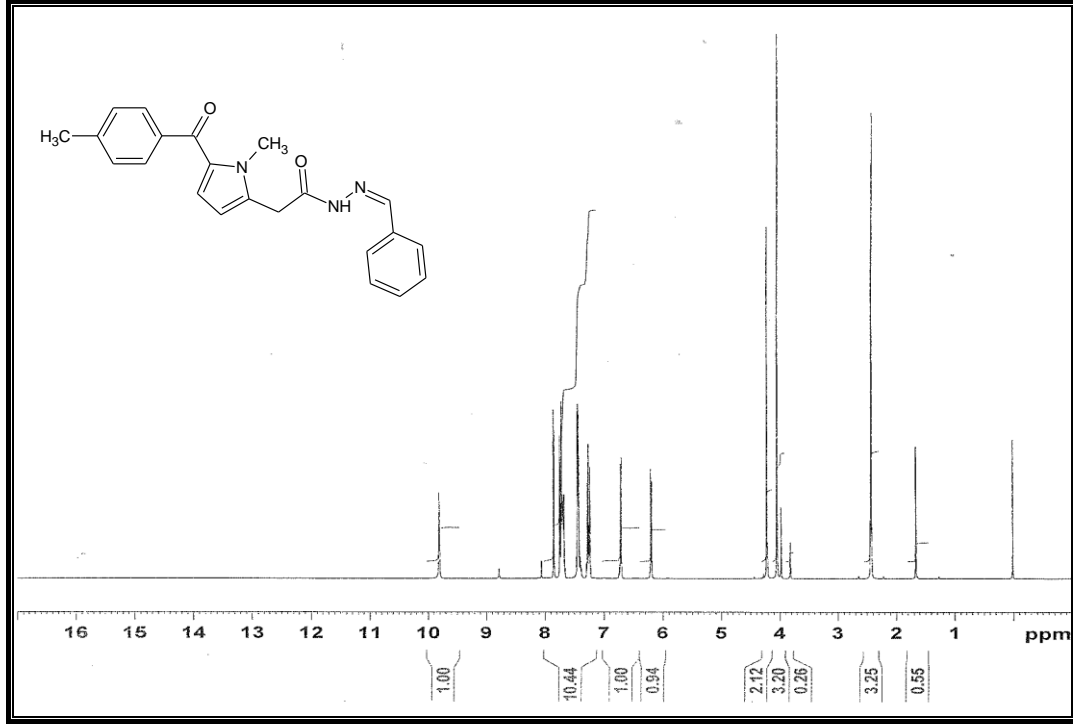
$\bar{\nu}$ maks. (cm^{-1}): 3194 (hidrazon, N-H g.b.); 3082 (aromatik =C-H g.b.) 2969, 2916 (-CH₃ grubu asimetrik C-H g.b.) 1667 (hidrazon, C=O g.b.); 1605 (hidrazon, C=N g.b.); 1564, 1481, 1456 (aromatik C=C g.b. ve hidrazon N-H e.b.); 1269 (hidrazon, C-N g.b.); 978–744 (aromatik C-H e. bandları) (**Şekil 28**).



Şekil 28: 4j bileşiğinin IR spektrumu

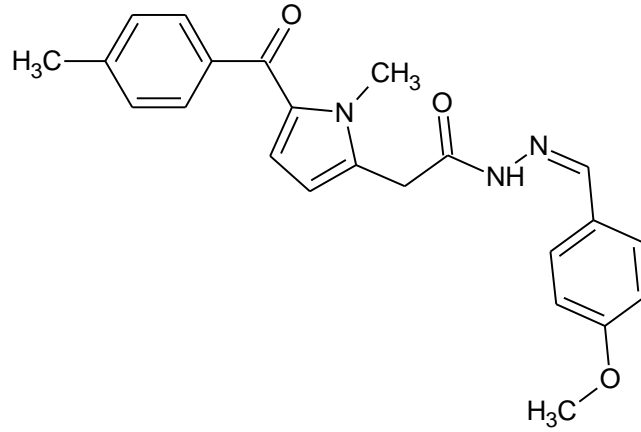
¹H-NMR Spektrumu :

(300 MHz) ($CDCl_3/TMS$) δ ppm: 1.68 (s, molekülün tuttuğu etanolün -CH₃ piki) 2.44 (3H, s, -CH₃); 3.83 (s, molekülün tuttuğu etanolün -CH₂ piki), 3.98 (s, molekülün tuttuğu etanolün -OH piki) 4.05 (3H, s, N-CH₃); 4.23 (2H, s, -CH₂); 6.20 (1H, d, $J=4.06$ Hz, CH₂ komşu pirol halkası protonları); 6.72 (1H, d, $J=4.04$ Hz, C=O komşu pirol halkası protonları); 7.24-7.75 (9H, m, Ar-H) 7.85(1H, s, -CH=N-); 9.82 (1H, s, -NH-) (**Şekil 29**).



Şekil 29: Bileşik 4j'nin ¹H-NMR spektrumu

6.1.14. *N'*-[(4-Metoksifenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetohidrazit (4k)



Bileşik 3'den 0.678 g (0.0025 mol) tartılır, 20 ml etanol ve etanolde çözülen 0.3404 g (0.0025 mol) 4-metoksibenzaldehit'den hareketle 5.2.4.'de verilen yöntemle göre elde edilir. Elde edilen ürün, etanol ile iki kez kristallendirilerek saflaştırılır.

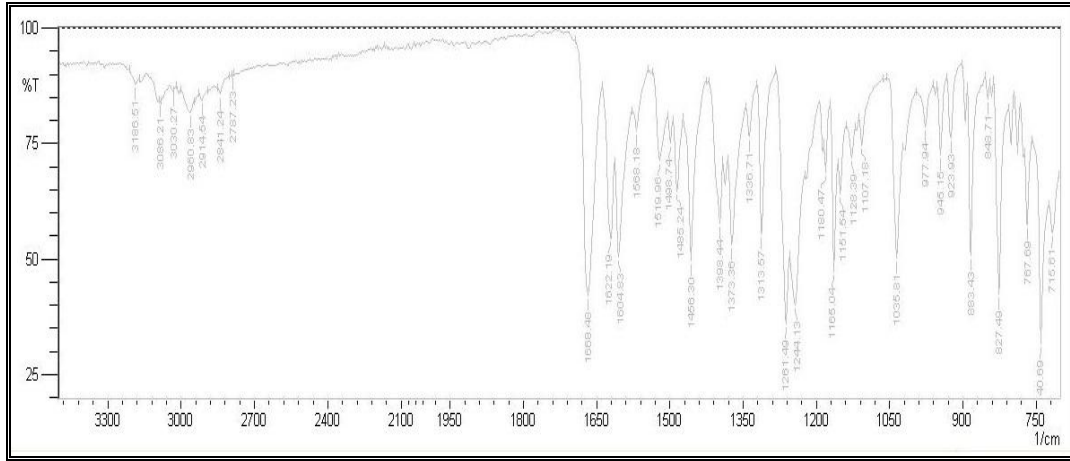
- Verim: % 84
- R_f x100: 31 (M₂), t: 21 °C
- Kirli beyaz renkte toz madde

- E.n. 189 °C
- Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonunda az, kloroform ve DMSO'de tamamen çözünür.

- Analiz: $C_{23}H_{23}N_3O_3 \cdot 1/2 C_2H_5OH$ (M.A.= 412.481 g/mol)
 Hesaplanan (%) : C (69.88); H (6.35); N (10.19)
 Bulunan (%) : C (70.67); H (5.876); N (10.94)

IR Spektrumu:

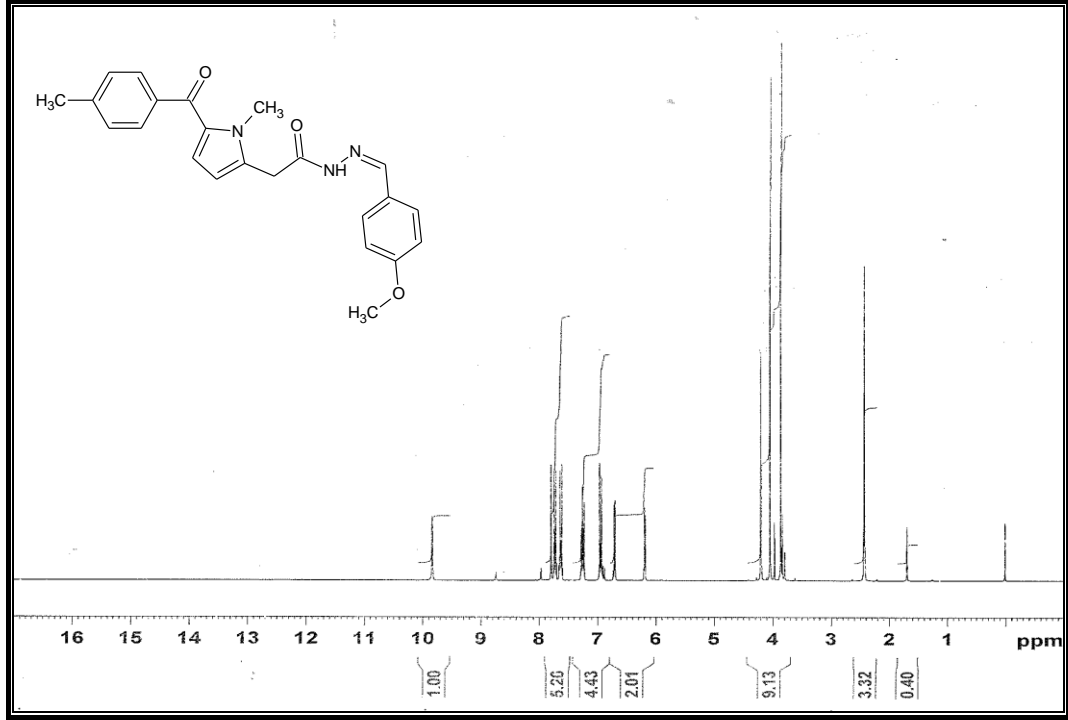
$\bar{\nu}$ maks. (cm⁻¹): 3186 (hidrazon, N-H g.b.); 3086 (aromatik =C-H g.b.) 2960, 2914, (-CH₃ grubu asimetrik C-H g.b.); 2841 (-CH₃ grubu simetrik C-H g.b.); 1668 (hidrazon, C=O g.b.); 1622 (hidrazon, C=N g.b.); 1568, 1520, 1485, 1456 (aromatik C=C g.b. ve hidrazon N-H e.b.); 1373 (hidrazon, C-N g.b.); 1261 (eter grubu C-O asimetrik g.b.); 1036 (eter grubu C-O simetrik g.b.); 883 (1,4 disubstitüe benzen) (**Şekil 30**).



Şekil 30: 4k bileşiğinin IR spektrumu

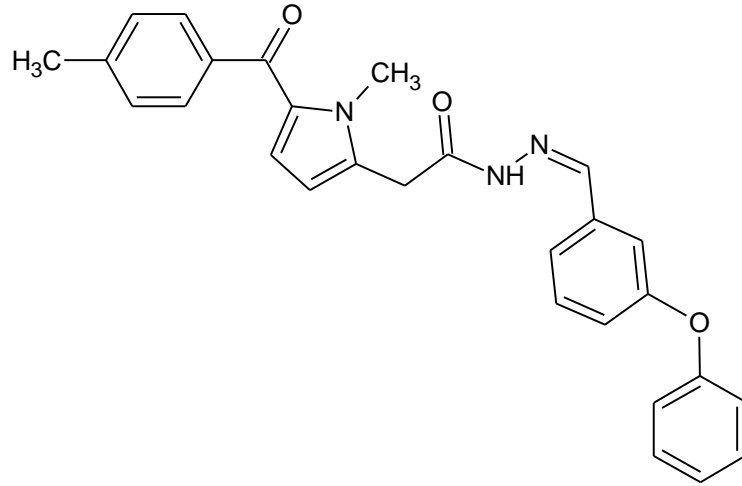
¹H-NMR Spektrumu :

(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 1.71 (s, molekülün tuttuğu etanolün -CH₃ piki) 2.44 (3H, s, -CH₃); 3.81 (s, molekülün tuttuğu etanolün -CH₂ piki), 3.84 (3H, s, N-CH₃); 3.98 (s, molekülün tuttuğu etanolün -OH piki); 4.05 (3H, s, -OCH₃); 4.21 (2H, s, -CH₂); 6.20 (1H, d, $J=4.06$ Hz, CH₂ komşu pirol halkası protonları); 6.71 (1H, d, $J=4.05$ Hz, C=O komşu pirol halkası protonları); 6.89-7.75 (8H, m, Ar-H); 7.80 (1H, s, -CH=N-); 9.84 (1H, s, -NH-) (**Şekil 31**).



Şekil 31: Bileşik 4k'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

6.1.15. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoi)-1H-pirol-2-il]-N'-[3-fenoksifenil-metiliden]asetohidrazit (4l)



Bileşik 3'den 0.678 g (0.0025 mol) tartılır, 20 ml etanol ve etanolde çözülen 0.4955 g (0.0025 mol) 3-fenoksibenzaldehit'den hareketle 5.2.4.'de verilen yönteme göre elde edilir. Elde edilen ürün, etanol ile iki kez kristallendirilerek saflaştırılır.

- Verim: % 62
- $R_f \times 100$: 67 (M_2), t: 21 °C

- Beyaz renkte toz madde
- E.n. 172 °C
- Su, metanol ve etanolde çözünmez, asetonunda az, kloroform ve DMSO'de tamamen çözünür.

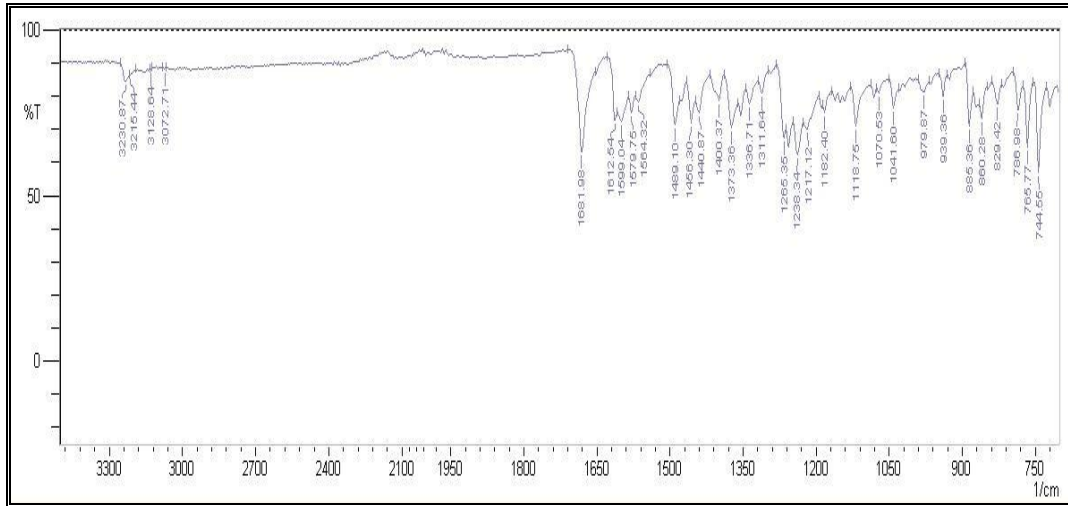
- Analiz: $C_{28}H_{25}N_3O_3 \cdot 1/2 C_2H_5OH$ (M.A.= 474.550 g/mol)

Hesaplanan (%) : C (73.4); H (5.95); N (8.85)

Bulunan (%) : C (73.76); H (5.51); N (9.26)

IR Spektrumu:

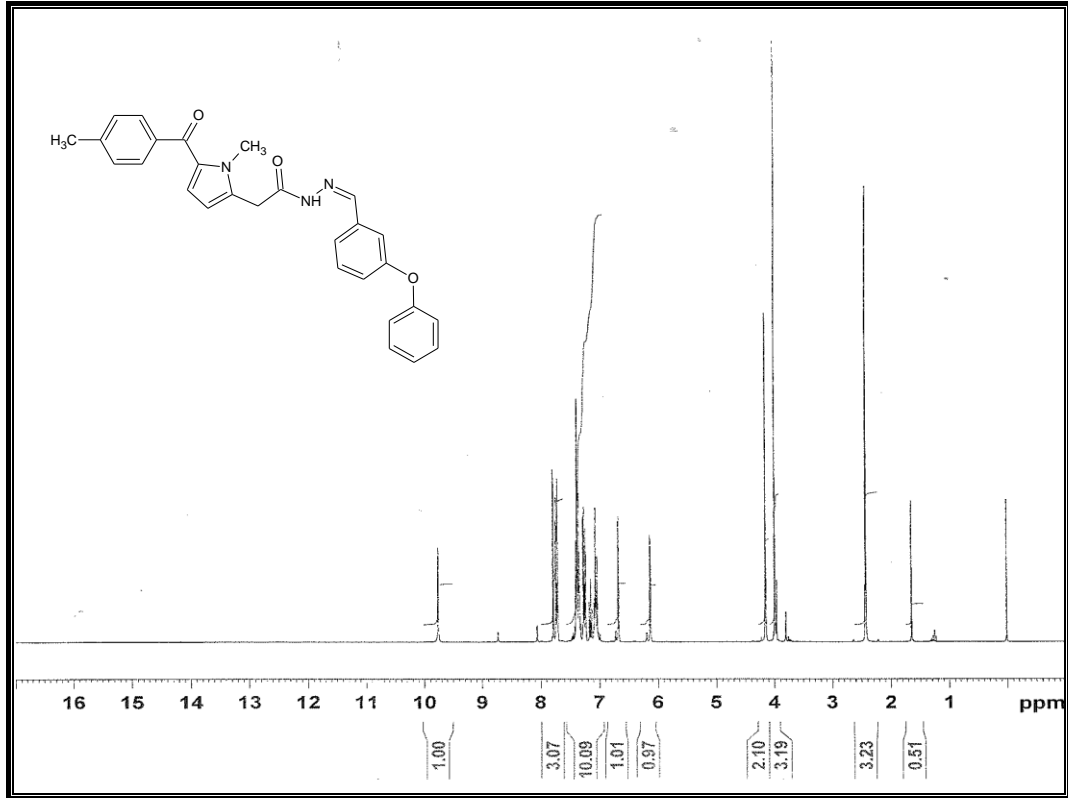
$\bar{\nu}$ maks. (cm⁻¹): 3231 (hidrazon, N-H g.b.); 3129 (aromatik =C-H g.b.) ; 1682 (hidrazon, C=O g.b.); 1612 (hidrazon, C=N g.b.); 1580, 1489, 1456, 1400 (aromatik C=C g.b. ve hidrazon N-H e.b.); 1373 (hidrazon, C-N g.b.); 1238 (C-O g.b.); 885 (1,4-disüstitüe benzen) (Şekil 32).



Şekil 32: 4I bileşiğinin IR spektrumu

¹H-NMR Spektrumu :

(300 MHz) (CDCl₃/TMS) δ ppm: 1.66 (s, molekülün tuttuğu etanolün -CH₃ piki) 2.44 (3H, s, -CH₃); 3.81 (s, molekülün tuttuğu etanolün -CH₂ piki), 3.97 (s, molekülün tuttuğu etanolün -OH piki); 4.00 (3H, s, N-CH₃); 4.16 (2H, s, -CH₂); 6.140 (1H, d, $J=4.07$ Hz, CH₂ komşu pirol halkası protonları); 6.68 (1H, d, $J=4.06$ Hz, C=O komşu pirol halkası protonları); 7.07-7.74 (13H, m, Ar-H); 7.79 (1H, s, -CH=N-); 9.77 (1H, s, -NH-) (Şekil 33).



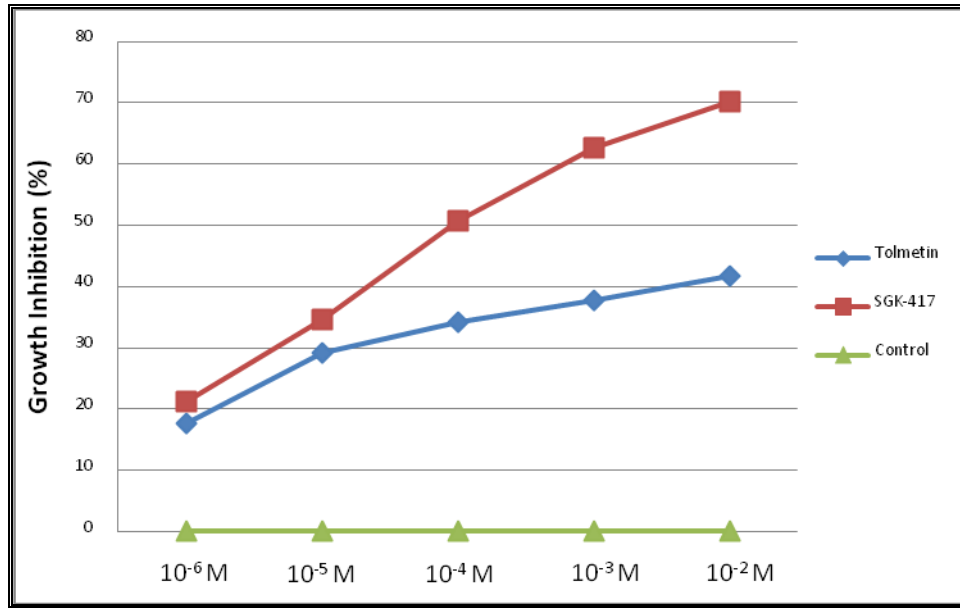
Şekil 33: Bileşik 4I'nin ¹H-NMR spektrumu

6.2. Biyolojik Bulgular

6.2.1. Anti-kanserojenik Etki Çalışması

Çalışmamızda, HCT-116 (ATCC, CCL-247) ve HT-29 (ATCC, HTB-38) insan kolon kanseri hücre hatları kullanılmıştır. Tolmetin ve [4g] (SGK 417) bileşiklerinin anti-kanserojenik etkileri 10^{-2} - 10^{-6} doz aralığında çalışılmıştır. Sitotoksitesisi denenecek sentez bileşikleri dışında deney grubunda; negatif kontrol (-) olarak hücre içermeyen besiyeri; pozitif kontrol (+) olarak bileşik uygulanmamış hücre ve DMSO (Çözücünün sitotoksitesisinin araştırılması için hücrelere bileşik yerine % 0.05-0.1 DMSO uygulanmış grup) % 0.05-0.1 DMSO (hücrelere çözülmüş sentez bileşikleri ile uygulanan DMSO final konsantrasyon değeridir) grubu da yer almaktadır.

Yapılan MTT deneyleri sonucunda kullanılan hücre hatlarından sadece HT-29 hücre serisinde bileşiklerin etkili olduğu belirlenmiştir. Bu hücre hattında, bileşiklere ait 10^{-2} - 10^{-6} doz aralığındaki büyüme inhibisyon grafiği Şekil 34'de verilmiştir.

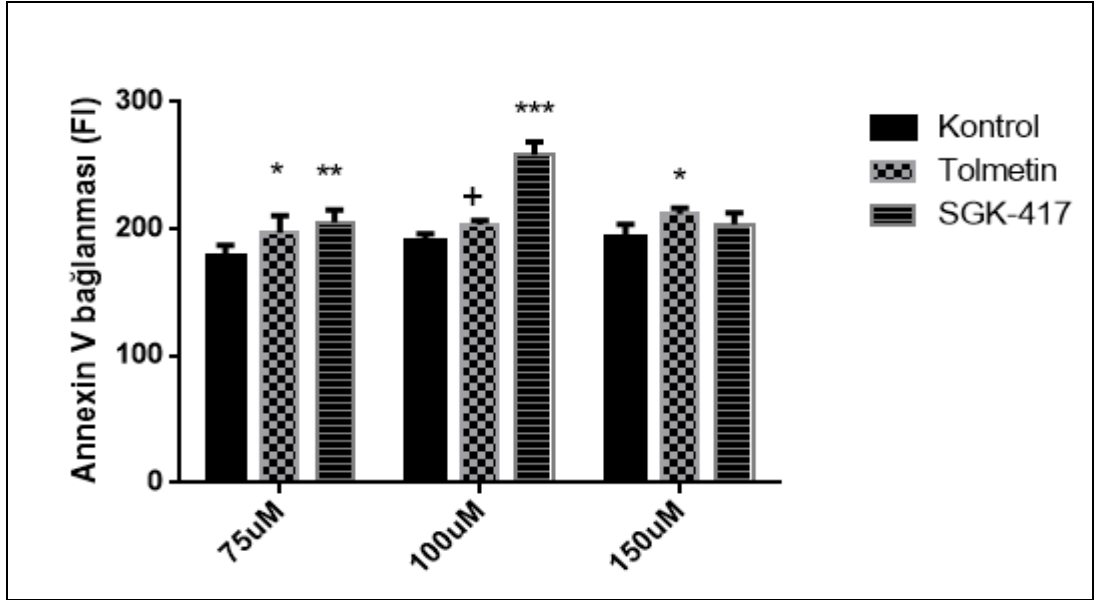


Şekil 34: Tolmetin ve [4g] (SGK 417) bileşiklerinin hücre büyümesini inhibisyonu

Tolmetin hidrazonu olan [4g] (SGK 417) bileşiğinin sadece HT-29 hücre hattında etkili olduğu ve IC_{50} dozunun 76 μ M olduğu belirlenmiştir.

6.2.2. Bileşiklerin HT-29 Hücrelerinde Apoptoz Etkilerinin Araştırılması

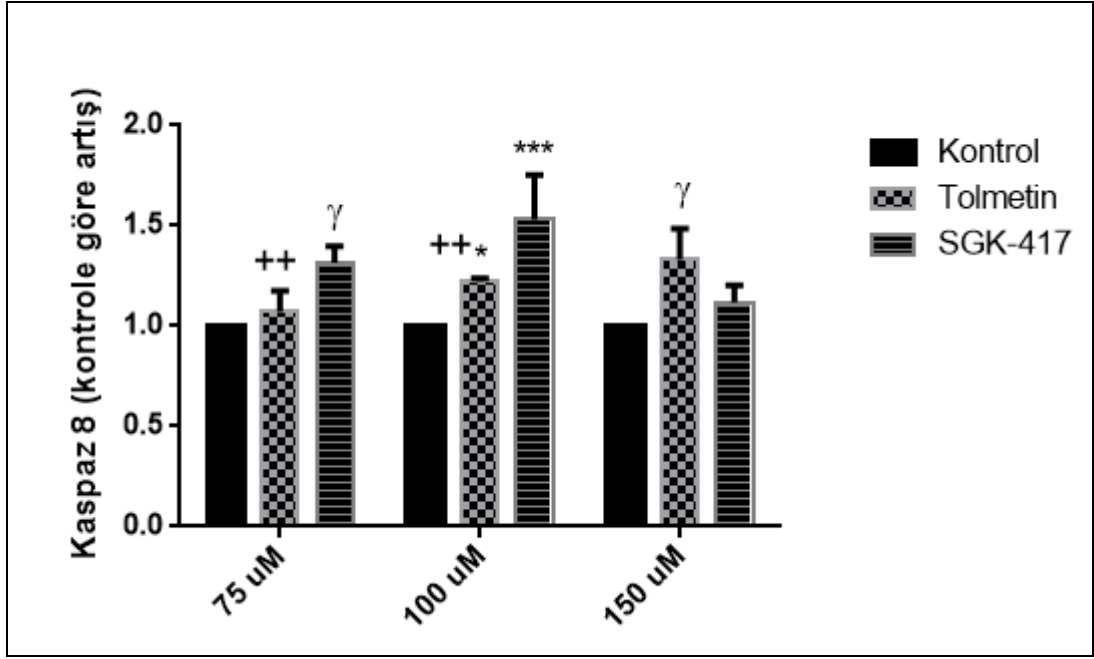
Tolmetin ve tolmetinden hareketle sentezlenmiş olan 2,6-diklorofenil sübstitüenti taşıyan [4g] (SGK 417) bileşiğinin MTT sonuçlarına göre; sadece HT-29 hücre hattında etkili olması sebebiyle, doku kanserleşmesinin yeni mekanizması olan apoptotik mekanizmanın araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, HT-29 hücre hattı *in vitro* olarak muamele edilmiş ve apoptoz yüzdeleri Annexin V-FITC (fluoresein isotiyosiyanat) ile boyanarak bu hücredeki apoptoz etkisi çalışılmıştır (Şekil 35). Bununla birlikte apoptoz mekanizmasının önemli bileşenleri olan annexin-V, kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktiviteleri araştırılmıştır (Şekil 36-38).



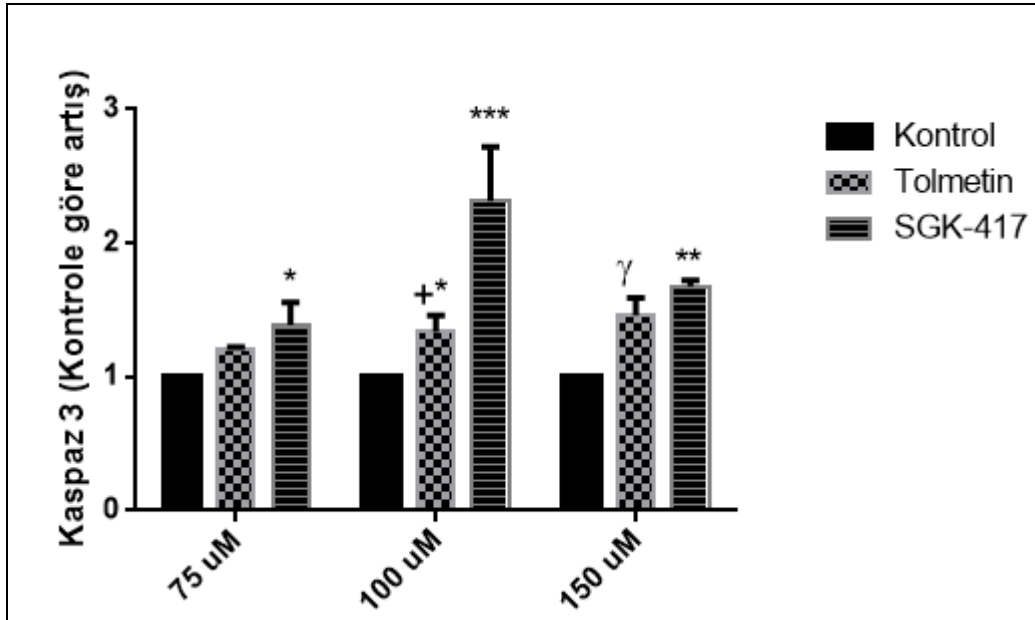
Şekil 35: Bileşiklerin Annexin V bağlanması

*p<0,05; ** p<0,001; *** p<0,0001 kontrol ile karşılaştırıldığında

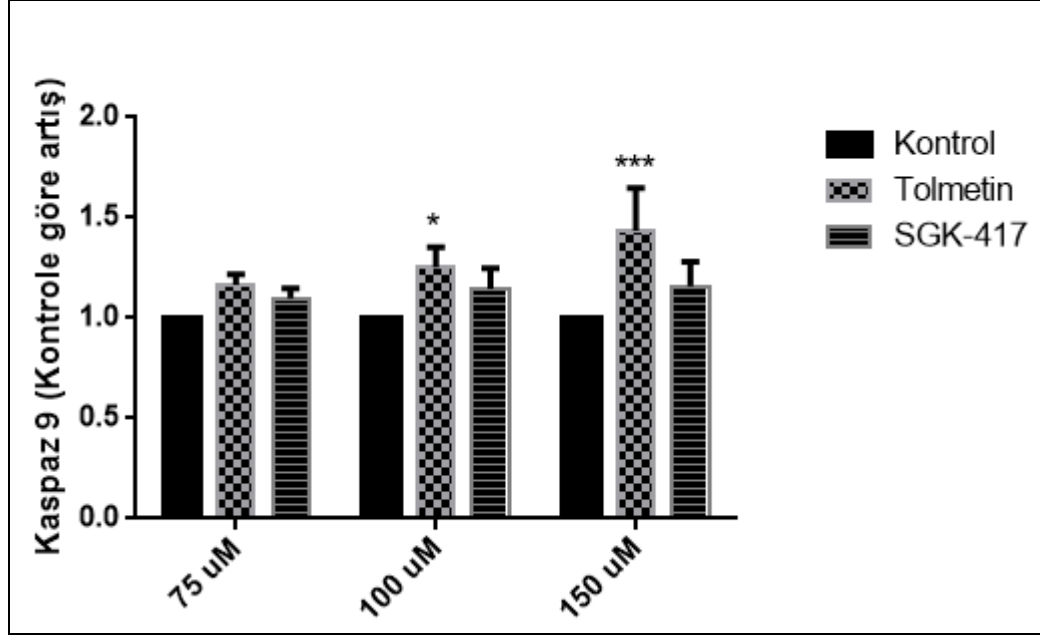
+p<0,0001 [4g] (SGK 417) ile karşılaştırıldığında



Şekil 36: Bileşiklere ait kaspaz-8 aktivitesi
 *p<0,05; ***p<0,0001; γp<0,01 kontrol ile karşılaştırıldığında
 ++p<0,05 [4g] (SGK 417) ile karşılaştırıldığında



Şekil 37: Bileşiklere ait kaspaz-3 aktivitesi
 *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001; γp<0,01 kontrol ile karşılaştırıldığında
 +p<0,0001 [4g] (SGK 417) ile karşılaştırıldığında



Şekil 38: Bileşiklere ait kaspaz-9 aktivitesi

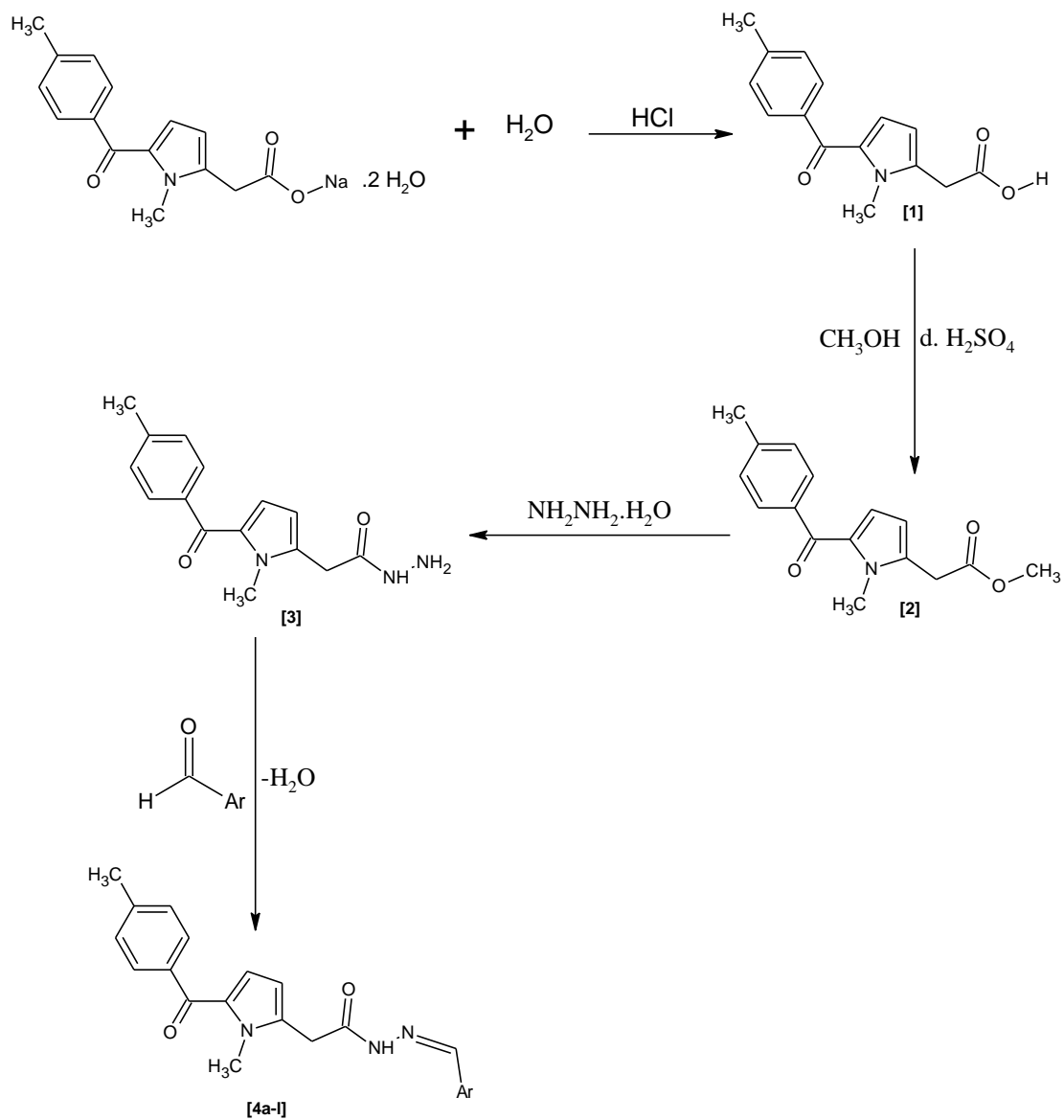
* $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$ kontrol ile karşılaştırıldığında


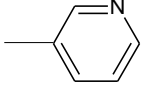
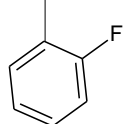

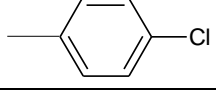
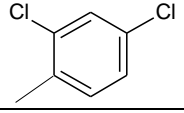
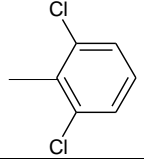
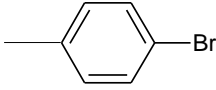
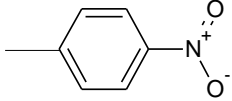
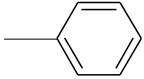
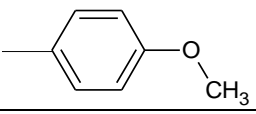
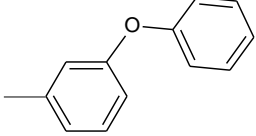
7. TARTIŞMA

7.1. Sentez ve Yapı Aydınlatılması

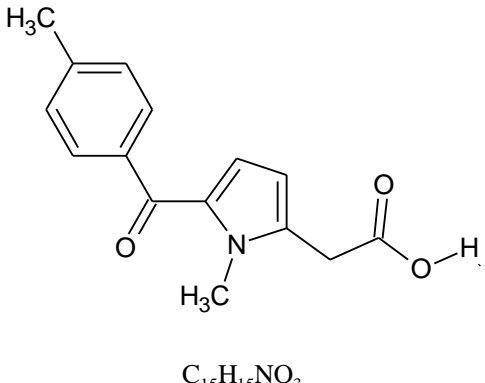
Prostaglandinlerin sentezini inhibe eden non-steroidal antienflamatuvar etkili bir etken madde olan 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetik asit (tolmetin), bileşiğinden hareketle elde edilen tolmetin hidraziti üzerinden hidrazit-hidrazon yapısında yeni on iki adet bileşik sentezlenmiştir.

Sentez şemasında da görüldüğü üzere, tolmetin sodyum dihidrat'ın asitli ortamda hidrolizi ile elde edilen tolmetin'in [1] 1-konumundaki karboksilik asit üzerinden metanol ile derişik sülfürik asit beraberliğindeki tepkimesinden metil 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetat [2] kazanılmıştır. Ester yapısındaki bileşik 2'nin hidrazin-hidrat ile metanollü ortamdaki reaksiyonundan 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetohidrazit [3] elde edilmiştir. Hidrazit yapısındaki bileşik 3, süstitüe aldehitler ile geri çeviren soğutucu altında reaksiyon sonucu hidrazit-hidrazon yapısında 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]-*N'*-[(piridinil/süstitüefenil/2-furil)metiliden]asetohidrazitler [4a-1] sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin reaksiyon takibi ince tabaka kromatografisi ile yapılmıştır. Saflıkları elementel analiz verileri ile, yapıları ise ¹H-NMR, FT-IR, LC-MS (EI) (sadece bileşik 3) spektroskopik yöntemleri ile aydınlatılmıştır.



Bileşik	Laboratuvar Kodu	Ar
4a	SGK 434	
4b	SGK 421	
4c	SGK 418	
4d	SGK 424	
4e	SGK 426	
4f	SGK 415	
4g	SGK 417	
4h	SGK 430	
4i	SGK 429	
4j	SGK 433	
4k	SGK 428	
4l	SGK 471	

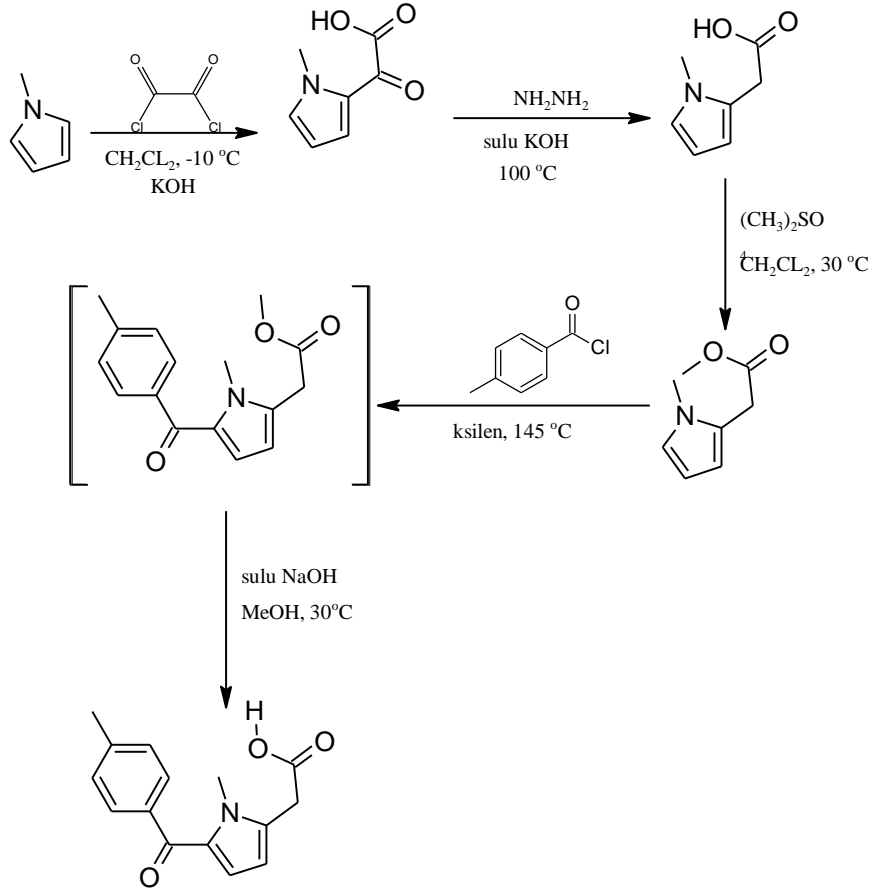
7.1.1. 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetik asit [1]

 C ₁₅ H ₁₅ NO ₃	Verim: % 95
	Rf x100: 70 (M ₁)(21 °C)
	M.A. : 257.284 g/mol
	E.n. : 157 °C

Tolmetin sodyum dihidrat, distile suda çözüldürüldükten sonra çökme bitinceye kadar HCl (% 37) ilave edilir ve oluşan beyaz renkli çökelti, turnusol kağıdı ile kontrol edilir. Tolmetin [1] olarak % 95 verimle elde edilmiştir.

2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetik asit [1] bileşiminin, spektroskopik bilgileri incelendiğinde; IR spektrumunda karboksilik asit grubuna ait C=O g.b 1688 cm⁻¹'lerde, O-H g.b 3370 cm⁻¹'lerde ve C-O g.b. 1225 cm⁻¹'lerde gözlemlenmiştir.

Reddy ve ark. (66), yüksek verimli ve düşük maliyetli tolmetin sentez yöntemi (Şekil 39) amacıyla yaptıkları çalışmada, tolmetin bileşimini % 55 verimle elde ederek erime derecesini 155-158 °C olarak tespit etmişlerdir. Carson ve ark. (1), Friedel Crafts yöntemiyle sentezini yaptıkları tolmetin bileşiminin erime derecesini 155-157 °C olarak tespit etmişlerdir. Bu değerler, tezimiz kapsamında sentezlemiş olduğumuz tolmetin ile de uygunluk göstermektedir.



Şekil 39: Reddy ve ark. tarafından yapılan tolmetin sentezi (66)

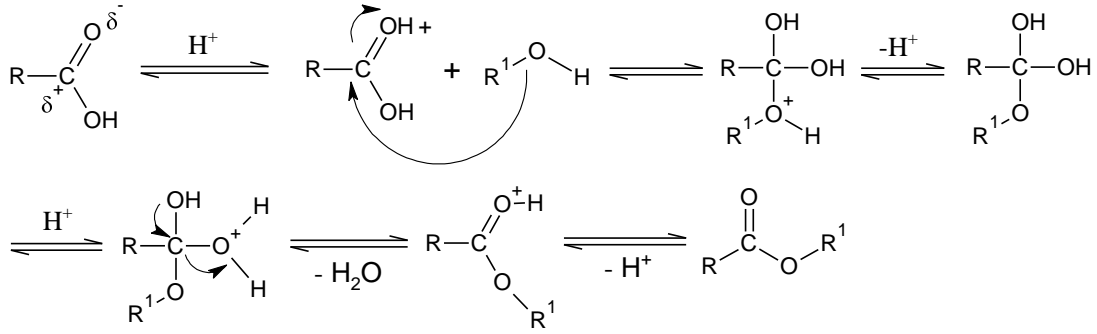
7.1.2. Metil 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetat [2]

<p style="text-align: center;">$C_{16}H_{17}NO_3$</p>	Verim: % 77
	Rf x100: 32 (M_2)(21 °C)
	M.A. : 271.311 g/mol
	E.n. : 121-123 °C

2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetik asit (Tolmetin) derişik sülfürik asit varlığında metanol ile tepkimesi sonucu % 77 verimle ester yapısında metil 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetat [2] bileşigi elde edilmiştir. Çalışmamızda sentezlediğimiz bileşik [2], literatürde tespit edilmiş olup, orijinal bir

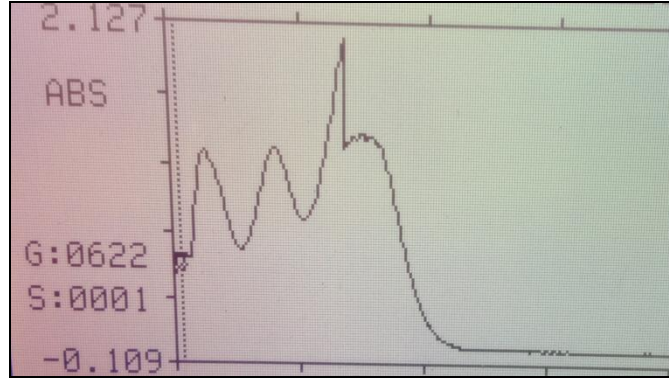
bileşik değildir. Reddy ve ark. (66) tarafından 2010 yılında tolmetin sentezi sırasında bir ara bileşik olarak sentezlenmiştir.

Çalışmamızda, karbonil grubunu daha elektrofilik hale getirebilmek amacıyla tepkime sırasında sülfürik asit kullanılmıştır. Derişik sülfürik asit, Tolmetin'in yapısında bulunan karbonil grubunu protone eder; böylece karbonil grubu üzerindeki pozitif yük artar. Bu artan pozitif yük bileşiği tepkimeye daha yatkın hale getirir. Metanolün oksijen atomu nükleofilik olduğundan karbonil grubuna saldırır ve yeni bir C-O bağı oluşur. Oksijen protone olur ve bir proton ayrılır; bu ayrılan proton –OH ile su oluşturur. Bu esnada karbona bağlı diğer –OH grubu da pozitif yük almış olur. Sonuçta –OH⁺ üzerinden proton ayrılır ve ester oluşur. Tepkime sonunda katalizör olarak giren asit yeniden kazanılmış olur.



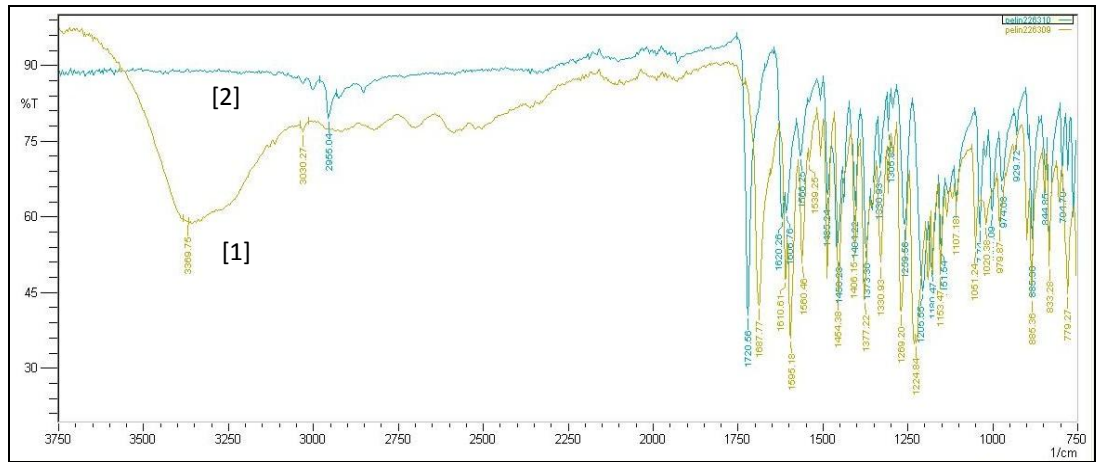
Tolmetin metil esterinin erime derecesi Bundgaard ve ark. tarafından 121-122 °C olarak verilmiştir. Tezimiz sırasında sentezlenen tolmetin metil esterinin erime derecesi 121-123 °C olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla literatür ile uyumludur. Tolmetin metil esterinin, tolmetinin erime derecesinden farklı oluşu farklı bir bileşik olarak kazanıldığını ilk aşamada kanıtlamaktadır.

Tolmetin metil esterinin [2] etanol içinde UV spektrumu alınmıştır. Maksimum absorbans değerleri 256 nm ve 299 nm'lerde tespit edilmiş, 311 nm ve 318 nm'lerde ise omuz yaptığı görülmüştür. Ayrıca, 256 nm'de gözlenen maksimum absorbansın C=O grubunun π → π* geçişine ait olduğu düşünülmektedir (**Şekil 40**).



Şekil 40: [2] bileşiğinin UV spektrumu

Bileşiğin IR spektrumu incelendiğinde; ester grubuna ait C=O gerilme bandı 1720 cm^{-1} 'de, yine ester grubuna ait C-O gerilme bandı ise 1205 cm^{-1} 'lerde tespit edilmiştir. Ayrıca, tolmetinin karboksilli asit grup yapısına ait 3370 cm^{-1} 'de görülmüş olan O-H gerilme bandının kaybolduğu tespit edilmiştir. Tolmetin [1] ve tolmetin metil esterinin [2] IR spektrumlarının üstüste çakıştırılması **Şekil 41**'de gösterilmiş olup, iki yapı arasındaki farklılıklar tespit edilmiştir.



Şekil 41: Tolmetin[1] ve Tolmetin metil esterini [2] bileşiklerinin IR spektrum çakıştırması

Tolmetin esterinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunu incelediğimizde; ester fonksiyonel grubunda yer alan metil protonlarının 3.81 ppm 'de integral değeri üç proton olarak singlet pik vermesi ve tolmetin yapısındaki karboksilik asidin OH protonuna ait olabilecek bir pikin olmaması tolmetin üzerinden ester oluştuğunun spektroskopik kanıtlarından biridir. Bununla birlikte, yapıda bulunan diğer protonlardan benzen halkasına bağlı $-\text{CH}_3$ protonları 2.49 ppm 'de üç proton değerinde singlet, N- CH_3 protonlarına integrasyon değeri üç proton değerinde 3.66 ppm 'de singlet ve $-\text{CH}_2-$

protonları ise integrasyon değeri iki proton olacak şekilde 3.90 ppm’de singlet olarak tespit edilmiştir. Pirel halkası protonları 6.11 (1H, $J=3.9$ Hz) ve 6.56 ppm’lerde (1H, $J=3.9$ Hz) dublet olarak pikler görülmüştür. Yapıya ait aromatik protonları incelediğimizde 7.29 ppm (2H, $J=7.81$ Hz) ve 7.62 ppm’lerde (2H, $J=7.81$ Hz) dublet şeklinde pikler tespit edilmiştir.

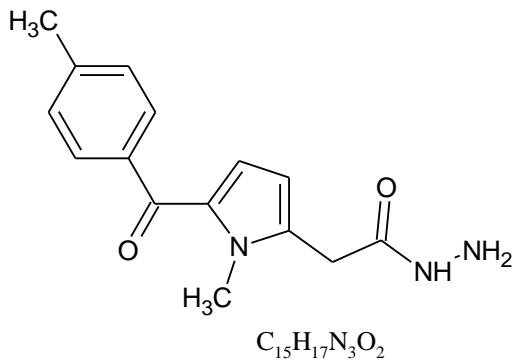
Reddy ve ark. (66), yaptıkları çalışmada tolmetin esteri [2] bileşiğini sentezlemişler ve 400 MHz’da CDCl_3 çözücüsü içinde aldıkları $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda; benzen halkasına bağlı $-\text{CH}_3$ protonlarını singlet olarak 2.42 ppm’de, $-\text{CH}_2-$ protonlarını singlet olarak 3.72 ppm’de, N- CH_3 protonlarını singlet olarak 3.75 ppm’de, O- CH_3 protonlarını ise yine singlet olarak 3.94 ppm’de tespit etmişlerdir. Pirel halkası protonlarını dublet olarak 6.67 ($J=4.3$ Hz, 1H) ve 6.11 ($J=3.9$ Hz, 1H) ppm’lerde, benzen halkası protonlarını ise 7.71 ($J=8.2$ Hz, 2H), 7.25 ($J=7.8$ Hz, 2H) ppm’lerde gözlemlenmiştir. Literatürde görülen bu değerler bileşiğimizle karşılaştırıldığında uyumlu olduğu görülmüştür (**Tablo 1**).

Tablo 1: Tolmetin metil esteri [2] $^1\text{H-NMR}$ bulgularının literatür ile karşılaştırılması

Reddy-2010* (CDCl_3, 400 MHz)	Bileşik 2 (DMSO-d_6, 500 MHz)
2.42 (s, 3H)	2.49 (s, 3H)
3.72 (s, 2H)	3.90 (s, 2H)
3.75 (s, 3H)	3.66 (s, 3H)
3.94 (s, 3H)	3.81 (s, 3H)
6.11 (d, $J=3.9$ Hz, 1H)	6.11 (d, $J=3.9$ Hz, 1H)
6.67 (d, $J=4.3$ Hz, 1H)	6.56 (d, $J=3.9$ Hz, 1H)
7.25 (d, $J=7.8$ Hz, 2H)	7.29 (d, $J=7.81$ Hz, 2H)
7.71 (d, $J=8.2$ Hz, 2H)	7.62 (d, $J=7.81$ Hz, 2H)

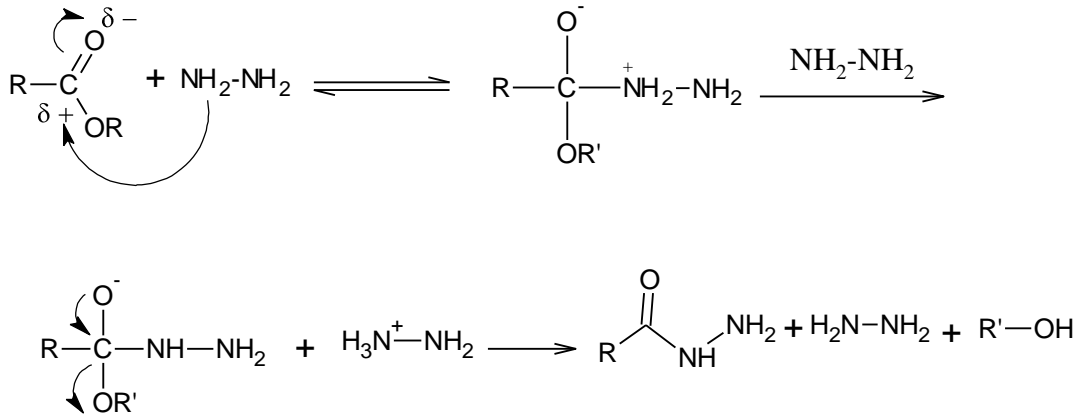
*: Lit. no (66).

7.1.3. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit [3]

 <p style="text-align: center;">C₁₅H₁₇N₃O₂</p>	Verim: % 84
	Rf x100: 24.5 (M ₃) (21 °C)
	M.A. : 271.314 g/mol
	E.n: 185-186 °C

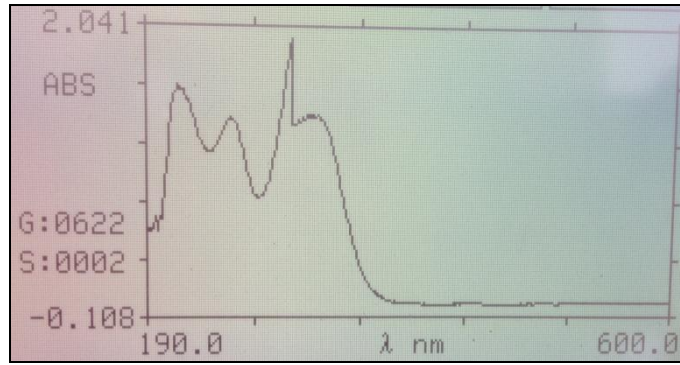
Bileşik [3], metil 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetat [2]'in hidrazin-hidrat ile metanollü ortamda su banyosu üzerinde geri çeviren soğutucu altında 3 saat reaksiyonu sonucunda % 84 verimle elde edilen, literatürde kayıtlı olmayan orjinal bir bileşiktir.

Hidrazit sentezi için, ester fonksiyonel grubunun hidrazin-hidrat ile tepkimesi kullanılmıştır. Nükleofilik bir bileşik olan hidrazin hidrat, esterin kısmi pozitif yüklü karboniline saldırır ve reaksiyon sonunda alkol ve hidrazin çıkışı olur.

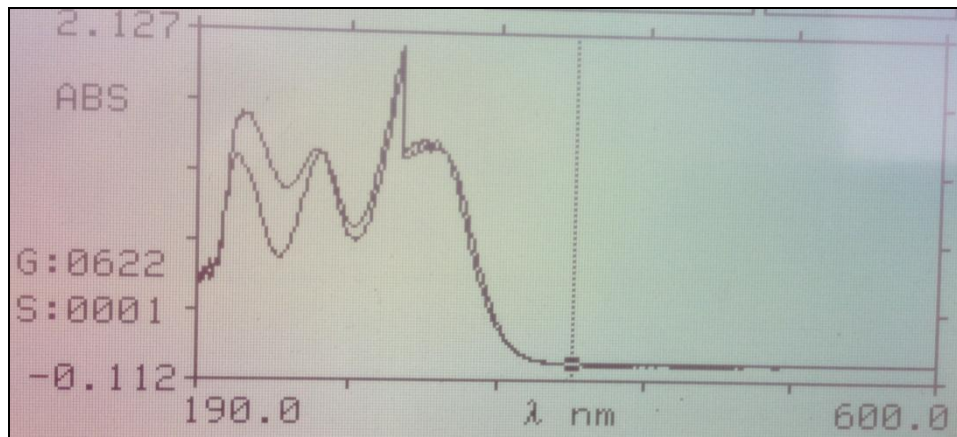


Bileşik [3]'ün Rfx100 değeri M₃ sisteminde 21°C'de incelenmiş olup, 24.5 olarak bileşik [2]'nin Rfx100 değerinden farklı olduğu tespit edilmiştir. İnce tabaka kromatografisinde DAC belirteci püskürtüldüğünde sarı renk vermektedir. Elde edilen hidrazit bileşiği, iyotlu suyun rengini gidermektedir. Ayrıca, 185-186 C'de gözlenen erime noktası da bileşik [2]'den farklı bulunmuştur.

Tolmetin hidraziti olan [3] bileşiğinin UV spektrumu etanol içinde alınmış ve maksimum absorptans değerleri 254 nm ve 300 nm olarak tespit edilmiştir. Ester bileşiği 311 nm ve 318 nm’lerde omuz yaparken; hidrazit bileşiği için bu değerler 312 nm ve 320 nm’lerde gözlenmiştir. Hidrazit bileşiğindeki 254 nm’deki bandın C=O grubunun $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişine ait olduğu düşünülmektedir (Şekil 42). Ester yapılu bileşik [2] ile hidrazit yapılu bileşiğin [3] UV spektrumları benzerdir. Fakat, hidrazit bileşiğinde 211-214 nm’deki absorptans belirginleşmiştir. Bunun sebebinin ester yapısından hidrazit yapısına geçmesi olduğu ve -NH-NH₂ grubunun hiperkromik etki yaptığı düşünülmektedir. Bu iki bileşiğin UV spektrumlarının üst üste çakıştırılması Şekil 43’de gösterilmektedir.



Şekil 42: [3] bileşiğinin UV spektrumu



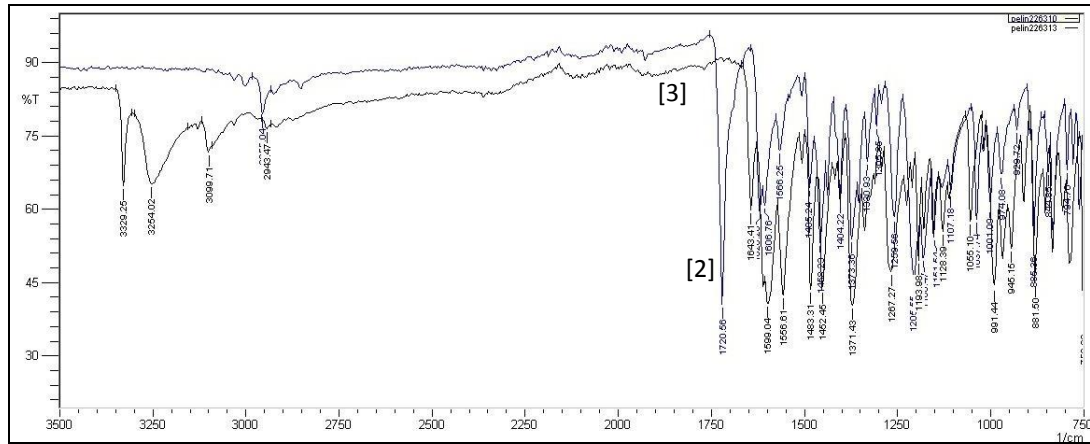
Şekil 43: [2] ve [3] bileşiklerinin UV spektrumlarının çakıştırılması

Fiziksel ve kimyasal bulguları ile oluşturduğu kanıtlanmış hidrazit yapısındaki 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazidin [3] ester yapısından farkını ifade eden spektroskopik bilgileri (IR, ¹H-NMR) ise **Tablo 2**’de verilmiştir.

Tablo 2: 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetohidrazit [3] spektroskopik bilgileri

Bileşik	IR (cm ⁻¹)		¹ H-NMR	
	C=O	-NH	-CONH-	-CONH-NH ₂
3	1643	3329, 3254	9.23 (s 1H)	4.27 (y.s., 2H)

Bileşik [3]'ün IR spektrumu incelendiğinde, hidrazit fonksiyonel grubuna ait gerilme bandının 3300 cm⁻¹ civarında olduğunun görülmesi, bileşiğin hidrojen bağı yaptığını göstermektedir. Bileşik [2]'in ester grubuna ait C=O gerilme bandı 1720 cm⁻¹'de tespit edilmiş iken, bileşik [3]'ün hidrazit grubuna ait C=O gerilme bandı ise 1643 cm⁻¹'de bulunmuştur. Sentezlenen orijinal olan bileşik [3]'ün karbonil gerilme titreşiminin ester yapısındaki bileşikten farklı olması ve hidrazide ait N-H g.b.'nin görülmesi, hidrazit bileşiğinin oluştuğunun spektroskopik kanıtlarından biridir. Aynı zamanda tolmetin esteri ile tolmetin hidrazitinin IR spektrumları üst üste çakıştırıldığında da karbonil gerilme titreşiminin değiştiği tespit edilmiştir (Şekil 44).



Şekil 44: [2] ve [3] bileşiklerinin IR spektrum çakıştırılması

Bununla birlikte literatürde sentezlenmiş olan hidrazit yapısındaki bileşikleri incelediğimizde; C=O gerilme bandı 1600-1700 cm⁻¹, N-H gerilme bandı ise 3000-3350 cm⁻¹'lerde bildirilmiş olup tolmetin hidrazidi ile kıyaslandığında uyumlu olduğu görülmüştür (36, 49, 67).

Ş.G.Küçükgül ve ark. (68), sentezini yaptıkları diflunisal hidrazidinde C=O gerilme bandını 1641 cm⁻¹'de, N-H gerilme bandını ise 3365 cm⁻¹'de tespit etmişlerdir.

Gürsoy ve ark. (26), sentezledikleri hidrazit yapıları bileşiklerde C=O gerilme bandını 1651 cm⁻¹'de bildirmişlerdir.

Xia ve ark (36), sentezledikleri hidrazit yapılı 3-(4-klorofenil)-1-((6-kloropiridin-3-il)metil)-1H-pirazol-5-karbohidrazit bileşiğinde C=O gerilme bandını 1675 cm⁻¹'de, N-H ve NH₂ gerilme titreşimlerini ise 3203 ve 3300-3260 cm⁻¹'lerde gözlemlemişlerdir

Abdel-Aziz ve ark. (44), 6-bromo-3-metil-1,3-tiyazolo[3,2-a]benzimidazol-2-karboksilik asit hidrazidi sentezlemişler ve bu bileşiğin IR spektrumunda NH ve NH₂ gerilme titreşimlerini 3305, 3220, 3150 cm⁻¹ lerde, C=O gerilme titreşimini 1631 cm⁻¹ de bildirmişlerdir.

Çıkla ve ark. (49), yaptıkları çalışmada sentezledikleri etodolak hidrazitinin C=O gerilme bandını 1651 cm⁻¹'de, N-H gerilme titreşimini ise 3310 cm⁻¹'de tespit etmişlerdir.

Bileşik [3] için DMSO-d₆ çözücüsünde alınan ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde; ester yapılı bileşik [2]'de gözlemlediğimiz 3.81 ppm'de integral değeri üç proton olan singlet yapıdaki O-CH₃ protonlarına ait pik kaybolmuştur. Tolmetin hidrazidinin ¹H-NMR spektrumunda, 4.27 ppm'de iki protonluk singlet yapıda bir -NH₂ piki ve 9.23 ppm'de bir protonluk singlet yapıda -NH piki tespit edilmiştir. Bu bize ester yapısından hidrazit yapısına geçişin sağlandığını ve hidrazit (CONHNH₂) yapısının oluştuğunu göstermektedir. Diğer protonlar da beklenen değerlerde uygun alanda çıkmıştır.

Ş.G.Küçükgüzel ve ark. (68), sentezini yaptıkları diflunisal hidrazidinde -NH₂ protonlarını 4.15-5.74 ppm'de integral değeri iki proton, -NH protonunu 11.77-13.66 ppm'de integral değeri bir proton olan pikler şeklinde tespit etmişlerdir.

Zhao ve ark. (60), yaptıkları çalışmada sentezledikleri hidrazit yapılı 4'-(3',4'-metilendioksifenil)-6',7'-dimetoksil-1'-hidroksil-benzil-2,3-dihidro-izoindol-1-on-hidrazin bileşiğinde -NH₂ protonlarını integral değeri iki proton olan iki singlet pik olarak 4.81, 4.46 ppm'de tespit etmişlerdir.

Xia ve ark. (36), yeni hidrazit yapılı 3-(4-klorofenil)-1-((6-kloropiridin-3-il)metil)-1H-pirazol-5-karbohidrazit bileşiğini sentezlemişler ve bu bileşiğe ait -NH₂ protonlarını 4.11 ppm'de iki protona karşılık gelen singlet pik olarak gözlemlemişlerdir.

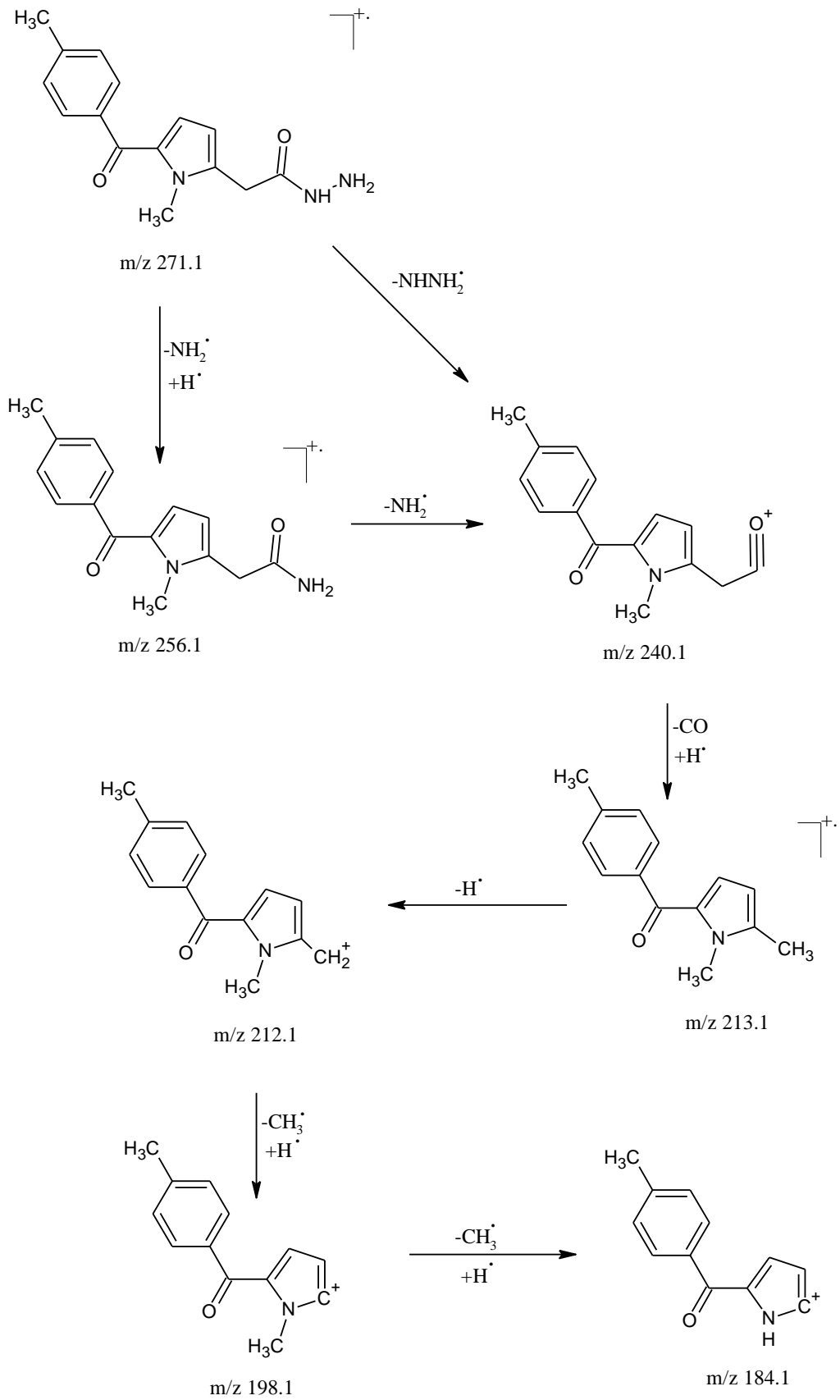
Çıkla ve ark. (49), sentezledikleri etodolak hidrazidinin DMSO- d_6 'da alınan ^1H -NMR spektrumunda; $-\text{NH}_2$ protonlarını 4.27 ppm'de iki protona tekabül eden singlet ve $-\text{NH}$ protonunu ise 8.94 ppm'de bir protona tekabül eden singlet pik olarak tespit etmişlerdir.

Bu literatür bilgileri dikkate alındığında, literatürde daha önce sentezlenmemiş hidrazit yapılı orjinal [3] bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu hidrazit yapılı bir birleşik için uygun değerlerde görünmektedir.

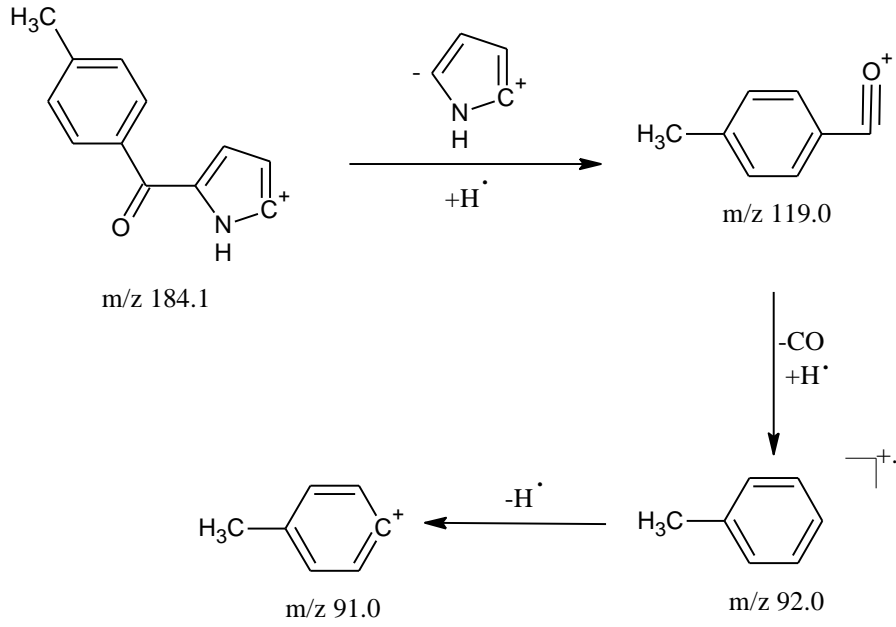
Hidrazit yapısındaki [3] bileşiğinin elektron çarpma tekniği ile alınan kütle spektroskopisi sonuçları değerlendirildiğinde; bileşiğin molekül ağırlığı ve elementel kompozisyonu ile birlikte, kütle bölünmeleri sonucu oluşan parçalara ait m/z değerleri gösterilmiştir (**Şekil 45 ve Şekil 46**). Hidrazit bileşiğine ait moleküler iyon piki $[\text{M}^+]$ m/z 271.1 olarak tespit edilmiş olup, hem molekül ağırlığı hem de kapalı formülü ile yapısı doğrulandığından, bileşiğin sentezinin gerçekleştiğinin spektroskopik kanıtlarından biri olmuştur.

Tolmetin hidrazidinin [3] elektron iyonizasyon yöntemi ile yapılan kütle spektromu incelendiğinde, m/z 271.1'de moleküler iyon piki ve m/z 212.1'de temel pik (% 100) tespit edilmiştir. Hidrazit bileşiğinin moleküler iyon piki üzerinden $-\text{NH}_2$ radikalinin ayrılıp hidrojen radikalinin yapıya katılmasıyla m/z değeri 256.1 olan parçanın oluşabileceği düşünülmektedir. Hidrazit bileşiğinin ana yapısından [M-32] parçası olan hidrazin atılmasıyla, m/z değeri 240.1 olan parçanın oluştuğu görülmüştür. Oluşan bu parça, m/z değeri 256.1 olan parçadan $-\text{NH}_2$ radikalinin atılmasıyla da oluşmuş olabileceği düşünülmektedir. Tespit ettiğimiz m/z değeri 240.1 olan parçadan $-\text{CO}$ nötral olarak atılıp hidrojen radikalinin de yapıya katılmasıyla, m/z değeri 213.1 parçanın oluştuğu görülmüştür. Bu parça üzerinden hidrojen radikalinin atılmasıyla m/z değeri 212.1 olan parça belirlenmiştir. Bu parçadan $-\text{CH}_3$ radikalinin ayrılıp, yapıya bir hidrojen radikalinin katılmasıyla m/z değeri 198.1 olan parça gözlenmiştir. Daha sonra oluştuğu düşünülen bu parça üzerinden $-\text{CH}_3$ radikali ayrılarak hidrojen radikalinin eklenmesiyle, m/z değeri 184.1 olan kütle parçasının oluştuğu düşünülmektedir. Bu parçadan m/z değeri 66.0 olan parçanın atılması ve yapıya bir hidrojen radikalinin katılmasıyla m/z değeri 119.0 olan parçanın oluştuğu görülmüştür. Bu parçadan $-\text{CO}$ nötral olarak ayrılmış

ve yapıya hidrojen radikalinin katılmasıyla m/z değeri 92.0 olan parçanın oluştuğu düşünülmektedir. Gözlenmiş olan bu parçadan hidrojen radikalinin atılması ile m/z değeri 91.0 olan parçanın oluştuğu belirlenmiştir.

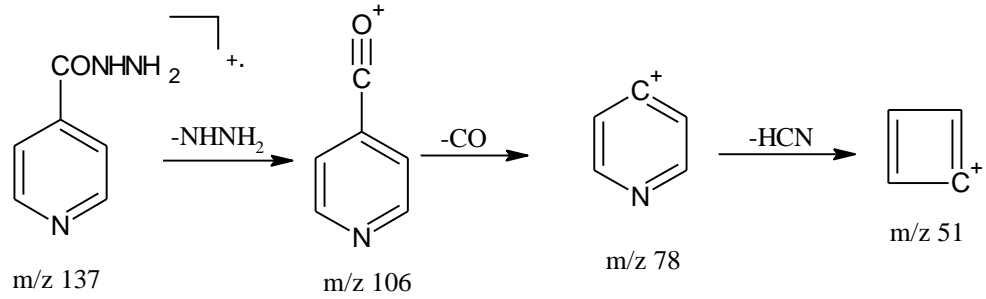


Şekil 45: [3] bileşiğinin kütle parçalanma yolları



Şekil 46: [3] bileşiğinin kütle parçalanma yollarının devamı

Hidrazit yapılu bir bileşik olan İzonyazid'in parçalanma şekli (69) gözönüne alındığında hidrazit yapılu [3] bileşiğinin parçalanma yolu uygun görünmektedir.



7.1.4. 2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]-N'-[(piridinil/sübstitüefenil/2-furil)metiliden]asetohidrazit [4a-1]

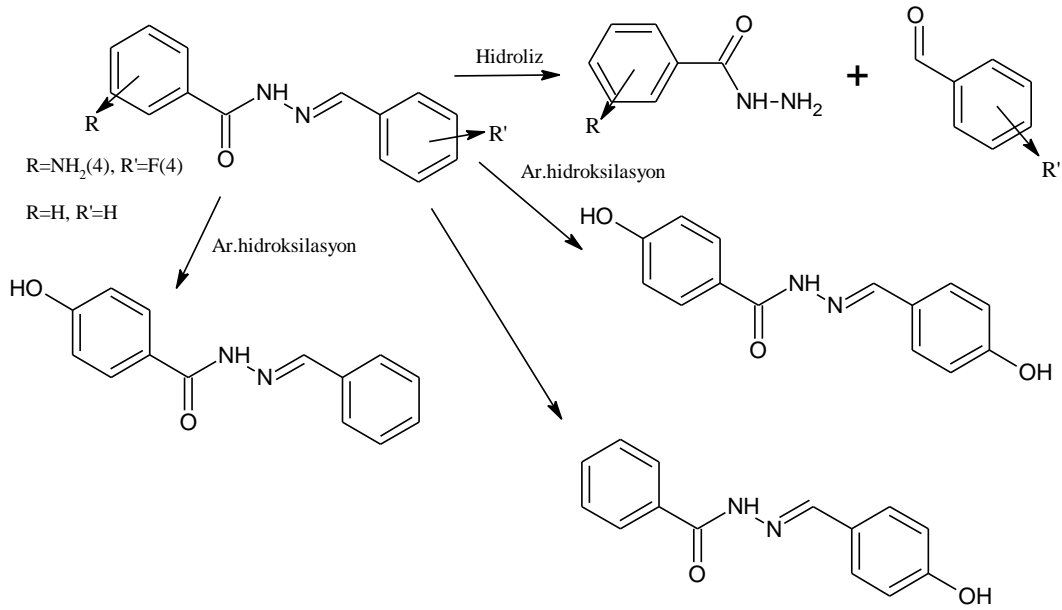
2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazidin [3], sübstitüe aldehitler ile etanollü ortamda geri çeviren soğutucu altında 2 saat ısıtılması sonucu hidrazit-hidrazon yapısındaki bileşikler [4a-1], % 50-93 verimle sentezlenmişlerdir (Tablo 3).

Tablo 3: Tolmetin hidrazit-hidrazonlarının formülleri [4a-l]

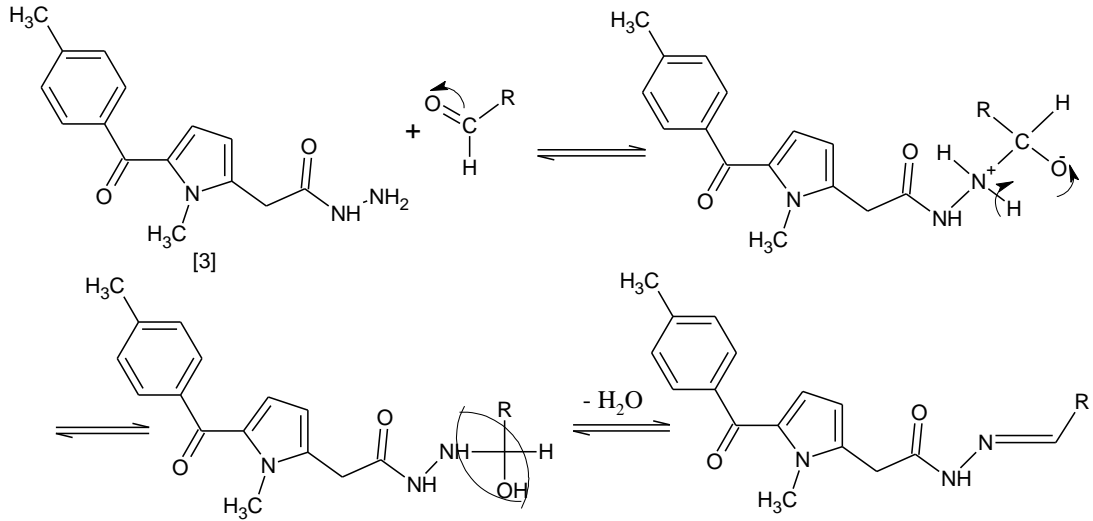
Bileşik	Formül	Bileşik	Formül
4a		4g	
4b		4h	
4c		4i	
4d		4j	
4e		4k	
4f		4l	

Hidrazon sentezi için, literatürde genellikle hidrazidin aldehitlerle olan geri çeviren soğutucu altında ısıtılmak suretiyle olan tepkimesinden yararlanılmıştır. Aldehit yerine bir diğer karbonil bileşiği olan keton da kullanılabilir. Bu durumda, hidrazondaki C=N grubundaki karbona hidrojen yerine aril/alkil grubu bağlanmış olur. Çözücü olarak etanol (48, 49, 68, 70, 71), metanol (72), tetrahidrofuran (73), bütanol (74), glasiyal asetik asit (75), etanol-glasiyal asetik asit (76), isopropanol (77) kullanılabilir. Yapılan bu tez çalışmasında kullanılan çözücü ise etanoldür.

Hidrazit-hidrazonların *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda metabolizması hakkında yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Bunlardan *in vitro* metabolizma çalışmalarında azometin kısmında hidrolitik reaksiyona uğradığı ve aromatik metabolitleri tespit edilmiştir (78, 79). *In vivo* metabolizma çalışmalarında ise hidrazon yapısının amit kısmından hidrolitik reaksiyona uğradığı görülmüştür (80).

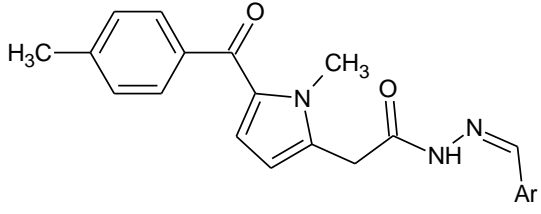


Tolmetin'in yapısındaki karboksilik asit üzerinden sentezlenen hidrazit yapısındaki madde nükleofilik merkez taşır. Hidrazon sentezi, bu nükleofilik aldehit molekülündeki karbonil grubunun elektronegatifliğinden dolayı protone olmuş karbona hücumu ile başlar. Reaksiyon sonunda da su çıkışı olur.



İnce tabaka kromatografisinde M₂ sisteminde 21 °C’de sentezlediğimiz **[4a-l]** bileşiklerinin R_f100 değerleri Bölüm 6.1’de verilmiştir. Bu bileşiklerin, R_f100 ve erime noktası değerlerinin tolmetin hidraziti **[3]**’den farklı olduğu tespit edilmiş olup elementel analiz sonuçları ile de saflıkları kanıtlanmıştır. Bu bileşiklere ait fiziksel bulgular **Tablo 4**’de verilmiştir.

Tablo 4: Tolmetin hidrazit-hidrazonlarının [4a-l] fiziksel bulguları

Bileşik kodu		Verim (%)	Erime noktası (°C)
3	2-[1-Metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]asetohidrazit	84	185-186
4a	Ar = 2-furaldehit	93	222-224
4b	Ar = 3-piridinkarboksaldehit	74	191-193
4c	Ar = 2-fluorobenzaldehit	50	185
4d	Ar = 4-fluorobenzaldehit	83	200-201
4e	Ar = 4-klorobenzaldehit	70	198-200
4f	Ar = 2,4-diklorobenzaldehit	82	202-206
4g	Ar = 2,6-diklorobenzaldehit	86	225-226
4h	Ar = 4-bromobenzaldehit	70	206-207
4i	Ar = 4-nitrobenzaldehit	88	225-228
4j	Ar = Benzaldehit	71	168-172
4k	Ar = 4-metoksibenzaldehit	84	189
4l	Ar = 3-fenoksibenzaldehit	62	172

7.2. UV Bulguları

Tolmetin hidrazonlarından prototip olarak seçilen 2,6-dikloro süstitüenti taşıyan *N'*-[(2,6-diklorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetohidrazit [4g] bileşiğinin UV spektrumu incelendiğinde 310 nm'de görülen maksimum absorpsiyon C=N kromoforik grubuna ait $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişini ifade eden K bandı olduğu düşünülmektedir (Şekil 47). Bu bant hidrazit yapısındaki bileşikte gözlenmemiştir. Hidrazona ait UV verilerinin literatür ile de uygunluk içerisinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 48).

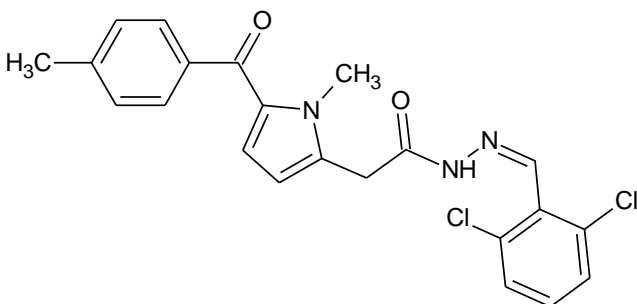
Küçüküzöl ve ark. (81), 4-aminobenzoik asit hidrazonlarının C=N grubuna ait $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişinin 369-402 nm'lerde olduğunu belirtmişlerdir.

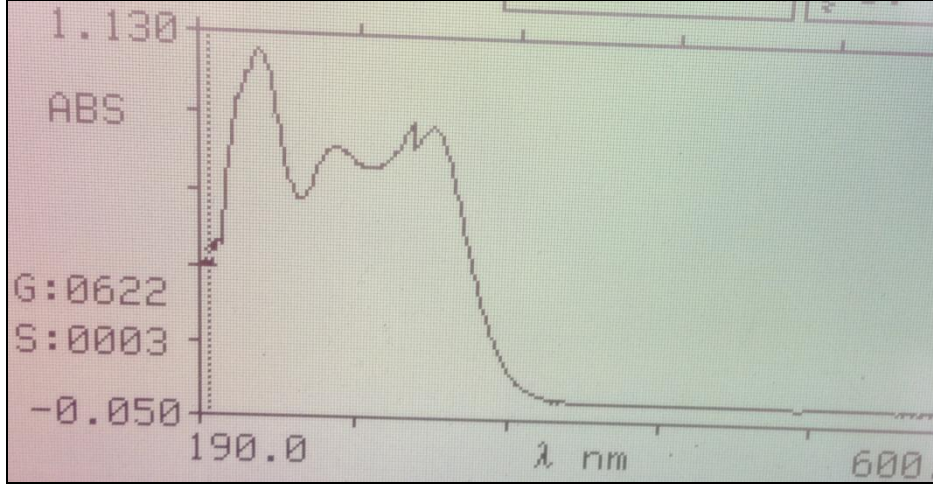
Z.Cesur ve ark. (82), 4-[(2-metilimidazo[1,2-a]piridin-3-il)azo]benzoik asit hidrazitinden hareketle sentezledikleri hidrazonların UV spektrumlarında 294-304 nm'de $-N=CH$ yapısına ait maksimum absorbans tespit etmişlerdir.

Kaymakçioğlu ve ark. (83), 4-amino-3,5-di/1,3,5-trimetilpirazollerden yola çıkarak hidrazon yapılı bileşikler sentezlemişler ve bu bileşiklerin UV spektrumlarında 376-399 nm ve 230-299 nm'lerde maksimum absorbanslar saptamışlardır.

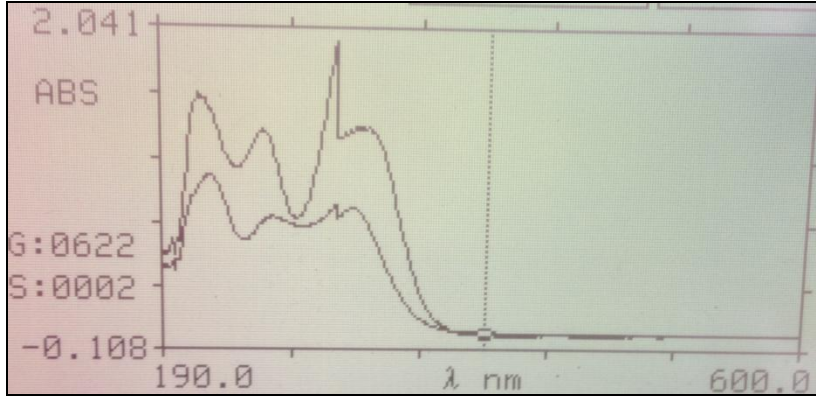
Ayrıca, 259 nm'de gözlenen maksimum absorbans ise C=O grubunun $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişine aittir (**Şekil 47**). Bileşikte gözlenen diğer maksimum absorpsiyon veren dalga boyları, aromatikliğe ait $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişini ifade eden bantlar olduğu tespit edilmiştir (**Tablo 5**).

Tablo 5: Hidrazon yapılı **[4g]** bileşiğine ait UV spektrumu dalga boyları

Bileşik kodu		UV (ϵ) λ_{maks} , nm
4g	<p><i>N'</i>-[(2,6-diklorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1<i>H</i>-pirol-2-il]asetohidrazit</p> 	310 (26438) 259 (24418) 220 (32955) 200 (15391) 196 (14259)



Şekil 47: [4g] bileşiğinin UV spektrumu



Şekil 48: [3] ve [4g] bileşiklerinin UV spektrumlarının karşılaştırılması

7.3. IR Bulguları

Hidrazit yapısındaki bileşik [3]'ün süstitüe aldehitler ile kondensasyonu sonucu geri soğutucu altında su banyosunda ısıtarak sentezlediğimiz hidrazit-hidrazon türevi olan [4a-1] bileşiklerinin IR spektrum bulguları incelendiğinde; hidrazon yapısındaki N-H gerilme bantları $3069-3231\text{ cm}^{-1}$ 'lerde görülmüştür. Hidrazon $-\text{CONHN}=\text{CH}$ yapısındaki C=O gerilme bandı olan amid I bandı $1660-1692\text{ cm}^{-1}$ 'lerde keskin bir bant şeklinde, C=N gerilme titreşimi de $1597-1628\text{ cm}^{-1}$ 'lerde tespit edilmiştir. Bu bantlar, hidrazon yapısında bileşiklerin oluştuğunun kanıtı olmuştur. Hidrazit-hidrazonların $-\text{CONHN}=\text{CH}$ yapısındaki N-H eğilme ve aromatik C=C gerilme titreşimleri, $1400-1607\text{ cm}^{-1}$ arasında, hidrazon yapısına ait C-N gerilme bantları ise $1269-1377\text{ cm}^{-1}$ 'lerde gözlemlenmiştir (Tablo 7).

Bazı bileşiklere ait N-H gerilme bantlarının düşük cm^{-1} 'lerde tespit edilmesi, yapıdaki N-H grubunun hidrojen bağı yaptığını göstermektedir. Rollas (84), sentezlediği hidrazit-hidrazonların N-H gerilme bantlarını $3200-2990 \text{ cm}^{-1}$ 'lerde tespit etmiştir. Bunun nedeninin de, molekül içi hidrojen bağı oluşumundan kaynaklandığını bildirmiştir. Küçükgüzel ve ark. (68), diflunisal hidrazonlarının N-H gerilme bantlarını intermoleküler hidrojen bağ yapması nedeniyle $3263-3090 \text{ cm}^{-1}$ 'lerde tespit etmişlerdir.

Literatürde sentezlenmiş olan hidrazon yapısındaki bileşikleri incelediğimizde, Küçükgüzel ve ark. (68), diflunisal hidrazonlarının C=N gerilme bantlarını $1625-1602 \text{ cm}^{-1}$ 'lerde, Terzioğlu ve ark. (28), N-H ve C=O gerilme bantlarını sırasıyla $3460-3446 \text{ cm}^{-1}$ ve $1695-1690 \text{ cm}^{-1}$ 'lerde bildirmişlerdir.

Vicini ve ark. (32), sentezledikleri benzo[d]izotiyazol hidrazonlarının N-H gerilme bantlarını $3330-3060 \text{ cm}^{-1}$ 'lerde, C=O gerilme bantlarını $1690-1640 \text{ cm}^{-1}$ 'lerde ve C=N gerilme bantlarını ise $1550-1600 \text{ cm}^{-1}$ 'lerde tespit etmişlerdir.

Xia ve ark. (37), sentezledikleri hidrazit-hidrazonların C=O gerilme bantlarını $1649-1680 \text{ cm}^{-1}$ 'lerde, N-H gerilme bantlarını ise $3480-2892 \text{ cm}^{-1}$ 'lerde tespit etmişlerdir.

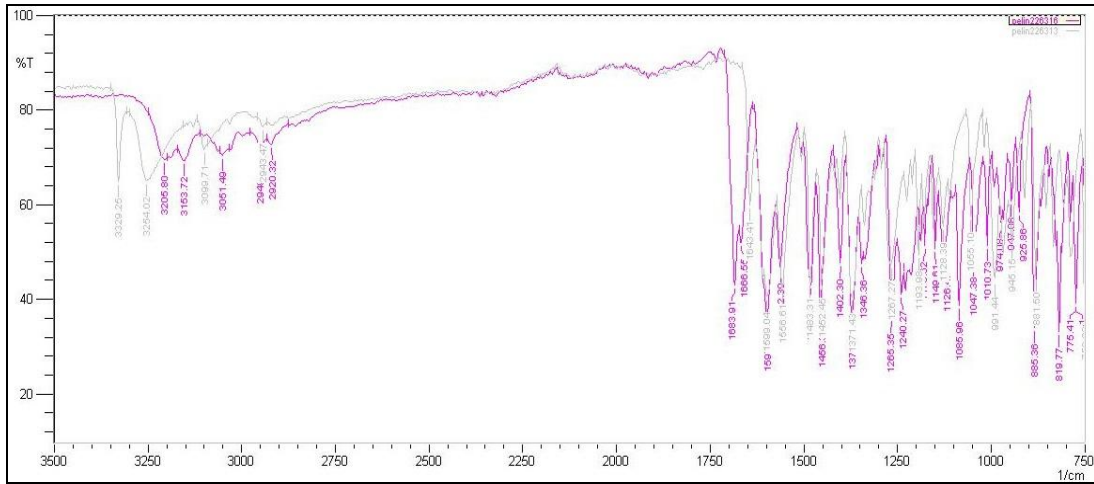
Zheng ve ark. (47), sentezledikleri hidrazon yapılı 1-(4-tert-butilbenzil)-N'-(1-(5-kloro-2-hidroksifenil)etiliden)-3-(4-metoksifenil)-1H-pirazol-5-karbohidrazit bileşiğinin IR spektrumunda C=O gerilmesini 1694 cm^{-1} 'de ve N-H gerilme bantlarını ise $3000-2834 \text{ cm}^{-1}$ 'lerde tespit etmişlerdir.

Aydın ve ark. (48), sentezledikleri flurbiprofen hidrazit-hidrazonlarının N-H gerilme bantlarını $3338-3117 \text{ cm}^{-1}$ lerde, C=O gerilme bantlarını $1688-1618 \text{ cm}^{-1}$ 'lerde ve C=N gerilme bantlarını $1647-1593 \text{ cm}^{-1}$ 'lerde bildirmişlerdir.

Çıkla ve ark. (49), ise sentezledikleri etodolak hidrazonlarının IR spektrumlarında C=O gerilme titreşimlerini $1667-1639 \text{ cm}^{-1}$ lerde, C=N gerilme titreşimlerini ise $1630-1601 \text{ cm}^{-1}$ lerde tespit etmişlerdir.

Tezimizde tolmetin hidrazit-hidrazonların sentezinde ilkel madde olarak kullanılan hidrazitin IR spektrumunda görülen CONHNH₂ yapısından ileri gelen 3329 ve 3254 cm^{-1} 'lerdeki NH₂ grubuna ait olan asimetrik ve simetrik gerilme

bandları, sentezlediğimiz hidrazit-hidrazonların IR spektrumlarında kaybolmuştur. Tolmetin hidrazitine [3] ait C=O gerilme bandı 1643 cm^{-1} 'de görülürken, tolmetin hidrazit-hidrazonlarına [4a-1] ait C=O gerilme bantları 1660-1692 cm^{-1} lerde tespit edilmiştir. Sentez ilkel maddesi olan tolmetin hidrazidi [3] ile prototip olarak seçilen hidrazon yapılı *N'*-(4-klorofenil)metiliden]-2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-*IH*-pirol-2-il]asetohidrazit [4e] bileşiğinin IR spektrumlarının karşılaştırıldığında, aradaki bu farklar görülmektedir (Şekil 49). Ayrıca, sentezlediğimiz hidrazon yapılı [4a-1] bileşiklerinin IR spektrumlarında azometin yapısına (-CH=N-) ait 1597-1628 cm^{-1} 'lerde C=N gerilme bandları gözlenmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, hidrazit-hidrazonların oluştuğu sonucuna varılmıştır. Literatür değerleri ile de uygunluk içerisinde olan sentezlediğimiz hidrazon bileşiklerinin IR bulguları ve sübstitüentlere ait özel bantlar ise **Tablo 6**'de gösterilmiştir.



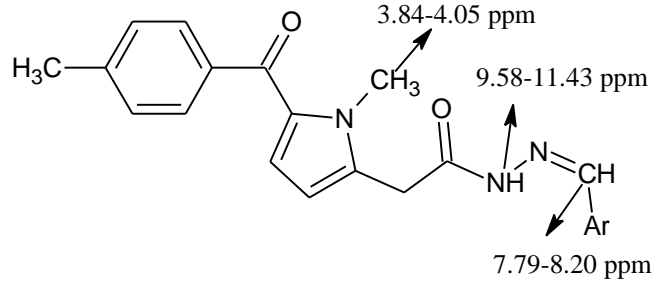
Şekil 49: [3] ve [4e] bileşiklerinin IR spektrum karşılaştırması

Tablo 6: [4a-l] bileşiklerinin IR bulguları

Bileşik	Ar	N-H g.b	C=O g.b. (hidrazon) C=N g.b.	C=C g.b. ve N-H e.b.	C-N g.b. (hidrazon)	Süstitüentlere ait bantlar
4a	2-furil	3183	1665, 1620	1566,1483, 1458,1408	1376	1277, 1244 (furan, C-O g.b.)
4b	3-piridinil	3069	1676, 1604	1588,1489, 1456,1400	1377	
4c	2-fluorofenil	3192	1674, 1628	1607,1568, 1481,1458	1371	1265 (Ar-F g.b.)
4d	4-fluorofenil	3227	1682, 1603	1566,1510, 1487,1458	1373	1228 (Ar-F g.b.)
4e	4-klorofenil	3154	1684, 1597	1562,1481, 1456,1402	1371	1086 (Ar-Cl g.b.)
4f	2,4- diklorofenil	3140	1692, 1597	1564,1489, 1456,1400	1375	1097 (Ar-Cl g.b.)
4g	2,6- diklorofenil	3184	1660, 1622	1584,1558, 1483,1453	1367	1070 (Ar-Cl g.b.)
4h	4- bromofenil	3152	1686, 1597	1562,1489, 1477,1456	1371	1047 (Ar-Br g.b.)
4i	4-nitrofenil	3180	1670, 1599	1582,1520, 1487,1456	1375	1337 (NO ₂ grubu simetrik. g.b.)
4j	fenil	3194	1667, 1605	1564,1481, 1456	1269	
4k	4- metoksifenil	3186	1668, 1622	1568,1520, 1485,1456	1373	1261 (eter grubu asimetrik C-O g.b.) 1036 (eter grubu simetrik C-O g.b.)
4l	3- fenoksifenil	3231	1682, 1612	1580,1489, 1456,1400	1373	1238 (C-O g.b.)

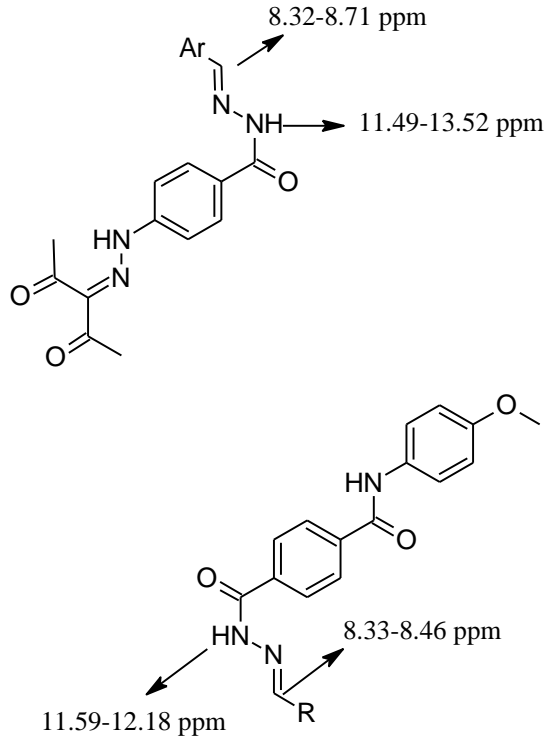
7.4. ¹H-NMR Bulguları

Çalışmamızda sentezlediğimiz 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1H-pirol-2-il]-N'-[(piridinil/sübstitüefenil/2-furil)metiliden]asetohidrazit [**4b-1**] bileşiklerinin 300 MHz'lik frekansta CDCl₃ çözücüsünde alınan ¹H-NMR spektrumları incelendiğinde, N-H protonlarının 9.58-11.43 ppm'lerde bir protona karşılık gelen singlet ve azometin protonlarına ait (CH=N) piki ise yaklaşık 7.79-8.20 ppm'lerde bir protona karşılık singlet pikler şeklinde tespit edilmiştir. Bununla birlikte 3.84-4.05 ppm'lerde pirazol halkasındaki N-CH₃ sinyali integrasyonu üç proton olan singlet ve -CH₂ protonları ise 4.08-4.23 ppm'lerde integral değeri iki proton olan singlet pikler verdiği görülmüştür (**Tablo 7**).

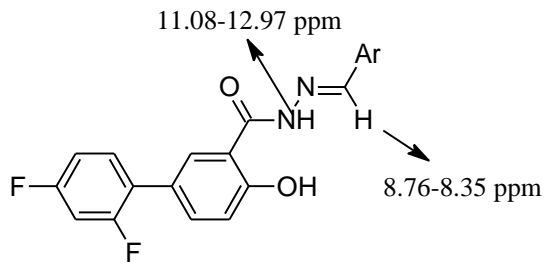


¹H-NMR spektrumunda hidrazitten hareketle hidrazon oluştuğuna karar verebilmek için, hidrazit yapısından (CONHNH₂) ileri gelen NH₂ ait olan 3.00-5.00 ppm'lerde integral değeri iki protona karşılık gelen pikin kaybolması ve azometin protonuna (-CH=N-) ait integral değeri bir protona karşılık gelen 8.00-9.00 ppm'lerde bir pikin gözlenmesi gerekir. Literatürde sübstitüe hidrazidin sübstitüe aldehitlerle kondensasyonundan oluşan hidrazit-hidrazonların azometin protonlarının da düşük alanda ve 9.00-10.00 ppm'lerde gözlenebildiği bildirilmiştir (49, 85, 86, 87, 88).

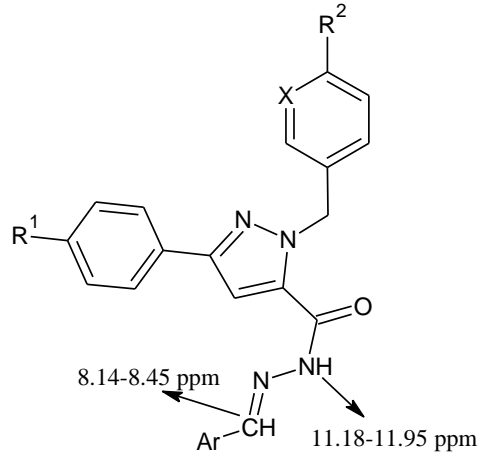
ŞG. Küçükgül ve ark. (81), 4-aminobenzoik asit hidrazonlarının kenetlenme ürünlerinin N=CH protonlarını 8.32-8.71 ppm'de bir protona ve hidrazon yapısına ait NH protonlarını 11.49-13.52 ppm'de bir protona karşılık gelen singlet pikler şeklinde tespit etmişlerdir. 2002 yılında yapmış oldukları bir başka çalışmada ise (89), N'-[4-(4-metoksibenzamido)-benzoil]-N²-sübstitüe akliliden hidrazin türevlerinde N=CH protonlarını 8.33-8.46 ppm'de, hidrazon yapısına ait NH protonlarını ise 11.59-12.18 ppm'de gözlemlemişlerdir.



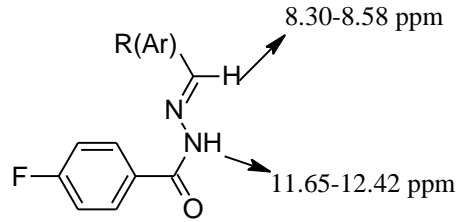
ŞG. Küçükgül ve ark. (68), 2003 yılında yaptıkları bir başka çalışmada ise; diflunisal hidrazitinden hareketle sentezlemiş oldukları hidrazon türevlerinin ^1H -NMR spektrumunda $\text{N}=\text{CH}$ protonlarını 8.76-8.35 ppm'de bir protona ve NH protonlarını 11.08 ve 12.97 ppm'lerde bir protona karşılık gelen singlet şeklinde pikler bildirmişlerdir.



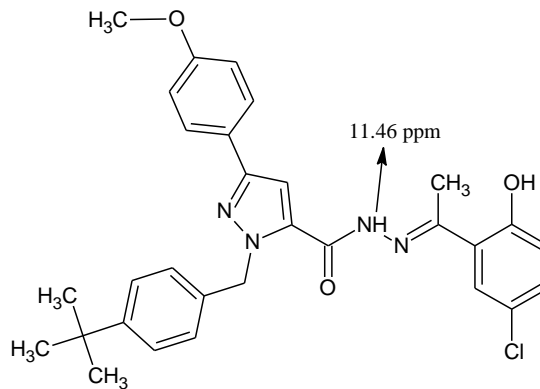
Xia ve ark. (37), sentezledikleri bir seri 1-arilmetil-3-aril-1H-pirazol-5-karbohidrazit hidrazon türevlerinin ^1H -NMR spektrumlarında $\text{N}-\text{H}$ protonlarını 11.18-11.95 ppm'de singlet, $\text{N}=\text{CH}$ protonlarını ise singlet pik olarak 8.14-8.45 ppm'lerde gözlemlemişlerdir.



Kaymakçioğlu ve ark. (90), 4-fluorobenzoik asit hidrazitlerinden hareketle sentezledikleri hidrazonların N=CH protonlarını 8.30-8.58 ppm’lerde, NH protonlarını 11.65-12.42 ppm’lerde integral değeri bir proton olan singlet pik olarak tespit etmişlerdir.

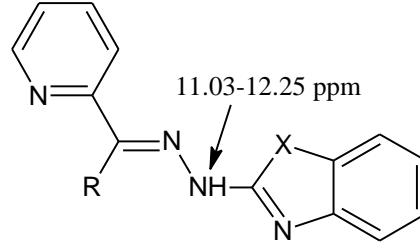


Zheng ve ark. (47), sentezledikleri hidrazon yapılı 1-(4-tert-butilbenzil)-N’-(1-(5-kloro-2-hidroksifenil)etiliden)-3-(4-metoksifenil)-1H-pirazol-5-karbohidrazit bileşiginde N-H protonunu 11.46 ppm’de integral değeri bir protona karşılık gelen singlet pik olarak tespit etmişlerdir.

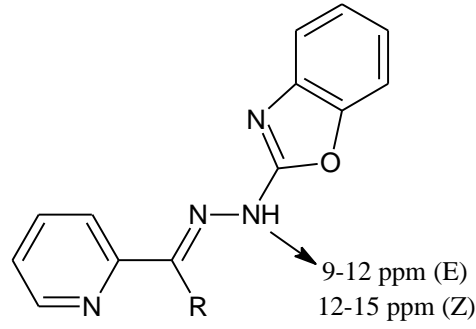


Bununla birlikte, literatürde sentezlenmiş olan hidrazit-hidrazonların $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarını incelediğimizde azometin grubu nedeniyle geometrik izomeriye (*E*, *Z*) ve amit grubu nedeniyle de konformasyonel isomeriye sahip olduğu bildirilmiştir. σ bağı etrafında dönerek birbirine kolayca dönüşebilen stereoizomerler olarak tanımlanabilen konformasyonel isomerlerdeki amit grubundaki rezonans durum sonucu oluşan kanonik yapı nedeniyle dönme sınırlanmıştır. Bazı literatürlerde hidrazit-hidrazonların $\text{DMSO-}d_6$ çözücüsünde alınan $^1\text{H-NMR}$ spektrumları incelendiğinde, yapısında yer alan CH=N , CO-NH , CH-CO , $-\text{CH}_2-$ gruplarındaki ilgili protonların görülmesi gereken integral değerine karşılık dubletler şeklinde olduğu tespit edilmiştir (91, 92). Ayrıca bu çalışmalarda, CO-NH , CH-CO , $-\text{CH}_2-$ protonların daha yüksek alanda tespit edilen piklerinin hidrazonun *Z*- isomerine ve CH=N grubuna ait olan protonun daha düşük alanda görülen pikinin ise hidrazonun *E*- isomerine ait olduğu bildirilmiştir.

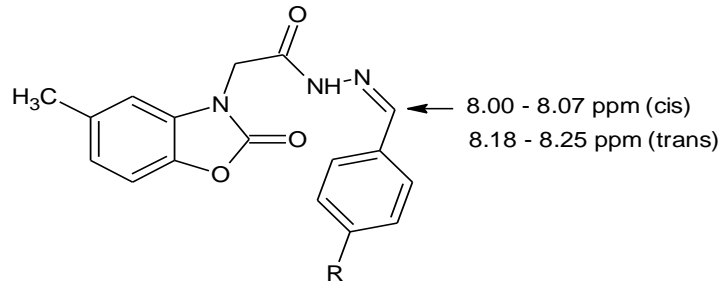
Easmon ve ark. (93), benzoksazol-2-il ve benzimidazol-2-il yapıları hidrazonları sentezlemişler ve $\text{DMSO-}d_6$ çözeltisi içinde aldıkları $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarında *E* formundaki hidrazonların $-\text{NH}$ protonlarını 11.03-12.25 ppm'lerde tespit ettiklerini belirtmişlerdir.



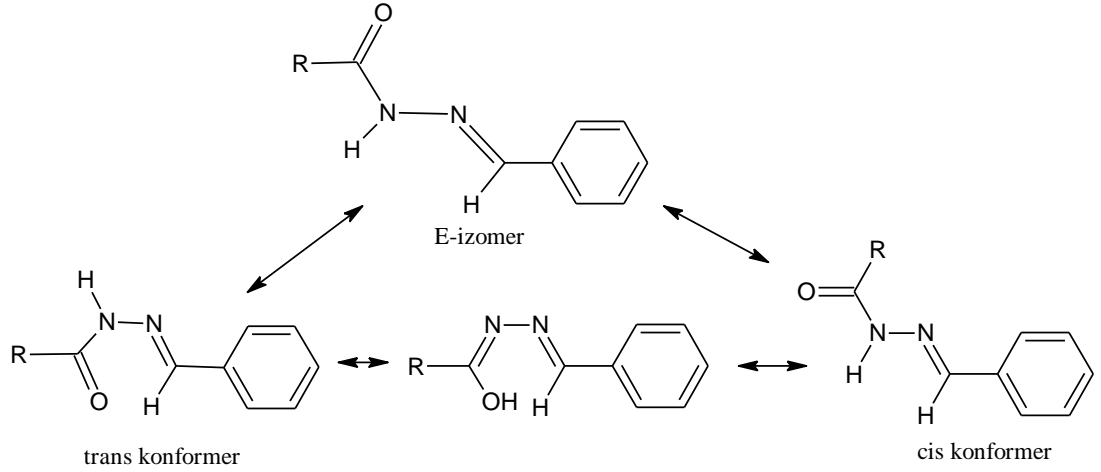
Easmon ve ark. (94), 2006 yılında sentezledikleri antikanser etkili 2-benzoksazolil hidrazonların $^1\text{H-NMR}$ spektrum çalışmalarında 9-12 ppm'de tespit edilen NH protonunun *E* izomerine, 12-15 ppm'lerde tespit edilen NH protonunun *Z* izomerine ait olduğunu NOE çalışmasıyla kanıtlamışlar.



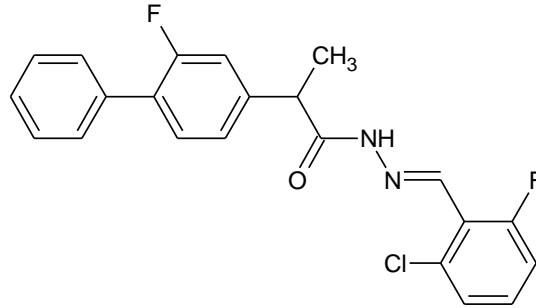
Salgın-Gökçen ve ark. (95), 5-metil-2-benzoksazolinonlardan türeyen hidrazonların $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarında, *Z* izomeri sinyallerine rastlamadıklarını, bu durumda minimizasyon enerji çalışmasında, *E* konfigürasyonunun *Z*'den daha az enerjili olması şeklinde açıklamışlardır. Sentezledikleri hidrazon yapısındaki bileşiklerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarında CH_2 ve $=\text{CH}$ gruplarının cis-trans konformerlerine ait iki seri piklerin 4.60-4.85; 8.18-8.25 ve 5.02-5.05; 8.00-8.07 ppm'lerde bulmuşlardır. Azometin protonlarının yüksek alandaki piki amit yapısındaki cis-konformerinden dolayı, düşük alandaki piki ise amit yapısının trans-konformerinden dolayı olduğunu vurgulamışlardır.



Tatar ve ark. (96), ise 2-aroilamino-3-metilbütanohidrazit hidrazonlarını sentezlemişler, NH protonunun ppm değerine göre yapıların *E* izomerinde olup, amit grubundaki rezonans nedeniyle oluşan kanonik durumdan ortaya çıkan cis ve trans konformerleri nedeniyle azometin ve amit protonlarının bir protona tekabül eden ikişer singletin görülme nedenini bu şekilde açıklamışlardır.

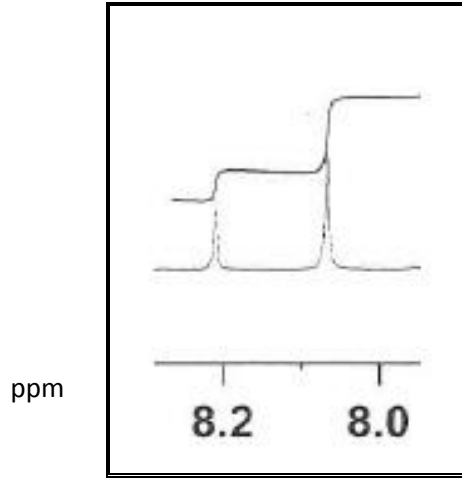


Aydın ve ark. (48), 2013 yılında mikrodalga yöntemiyle sentezledikleri flurbiprofen hidrazit hidrazonlarından 2-kloro-6-floro süstitüenti taşıyan türevinin X-Ray kristallografi çalışmasını yapmışlardır. Belirtilen bu türevin X-Ray kristallografi çalışmasında yapının *E* formunda olduğunu belirtmişlerdir.

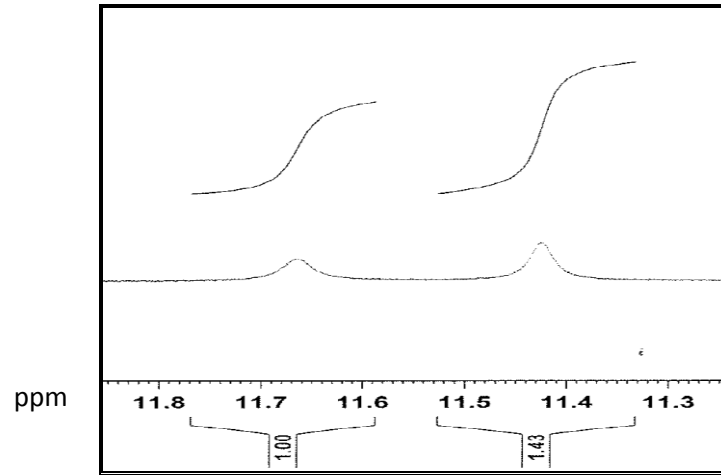


Tolmetinden türeyen 2-furil süstitüenti taşıyan **[4a]** bileşiğinin DMSO- d_6 çözücüsü içinde yapılan $^1\text{H-NMR}$ çalışmasında hidrazon N-H protonuna ait 11.42 ve 11.67 ppm'lerde, CH=N protonuna ait 8.07 ve 8.21 ppm'lerde integrasyon değeri bir olan ikişer singlet tespit edilmiştir (**Şekil 50, 51**). Bu bilgiler ışığında, literatür bilgileri doğrultusunda (48, 93, 94) hidrazon yapısındaki N-H protonuna ait 11.42 ve 11.67 ppm'lerdeki değerlere göre yapımızın *E* izomeri şeklini tercih ettiği düşünülmüştür. *E* izomeri tercih eden yapımız amit grubundaki rezonans nedeni ile oluşan kanonik durumdan ortaya çıkan cis ve trans konformerleri nedeni ile ikişer singlet halinde bir protona tekabül eden pikler görülmüştür. Aynı bileşiğin, CDCl_3 çözücüsü içinde yapılan $^1\text{H-NMR}$ çalışmasında hidrazon N-H protonuna ait 8.84

ppm'lerde, CH=N protonuna ait 7.65 ppm'lerde integrasyon değeri bir olan singlet tespit edilmiştir.

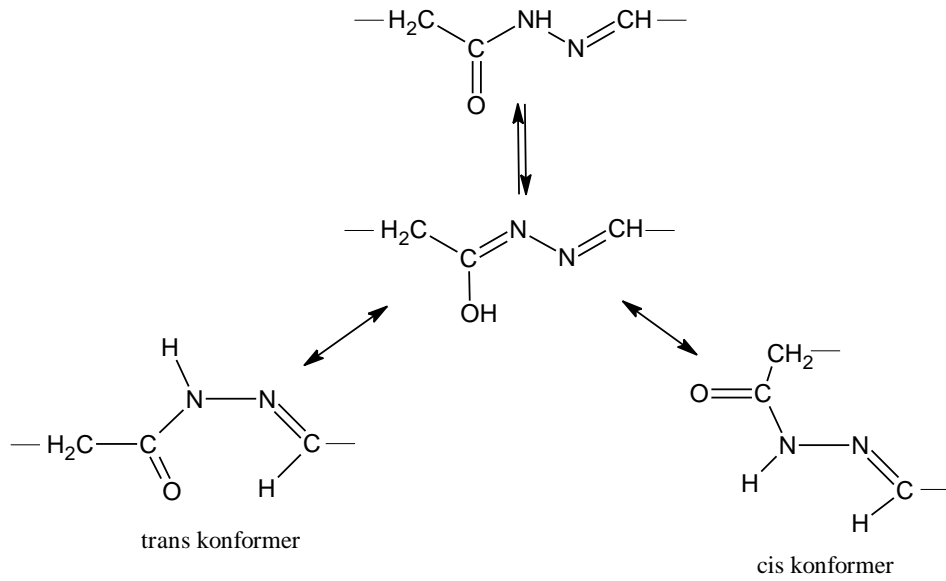


Şekil 50: 4a bileşiğinin -CH=N protonları

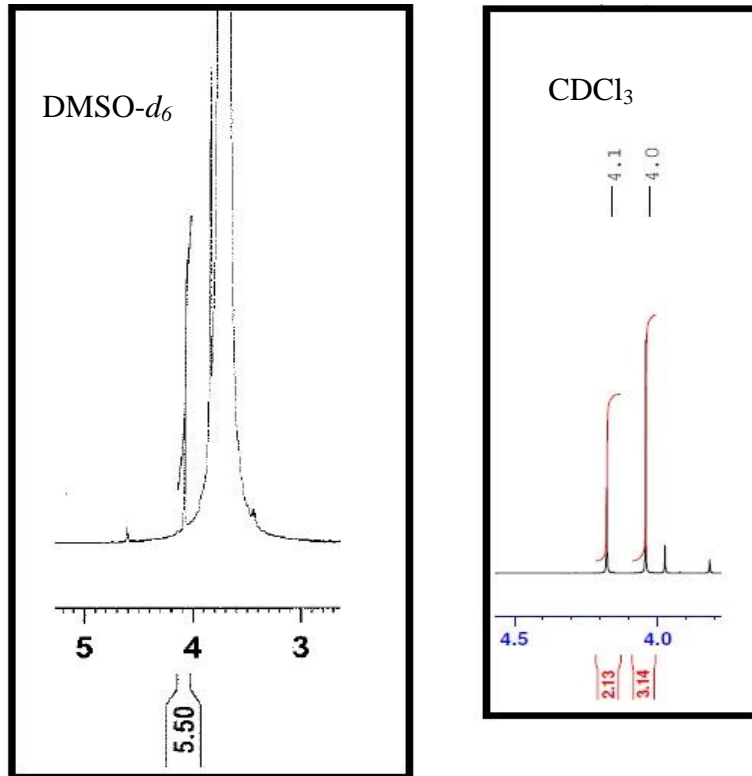


Şekil 51: 4a bileşiğinin -NH protonları

Aynı bileşiğin DMSO- d_6 ve $CDCl_3$ içindeki 1H -NMR spektrumlarındaki N-H ve CH=N protonları için farklı davranış halini, DMSO- d_6 çözücüsü içinde amit grubundaki rezonans nedeni ile oluşan kanonik durumun neden olabileceği şeklinde açıklayabiliriz. Ayrıca, hidrazon ve kanonik yapının çözücü içinde oluşma oranları da, pik integrasyonu üzerine etkili olduğunu düşündürmüştür.

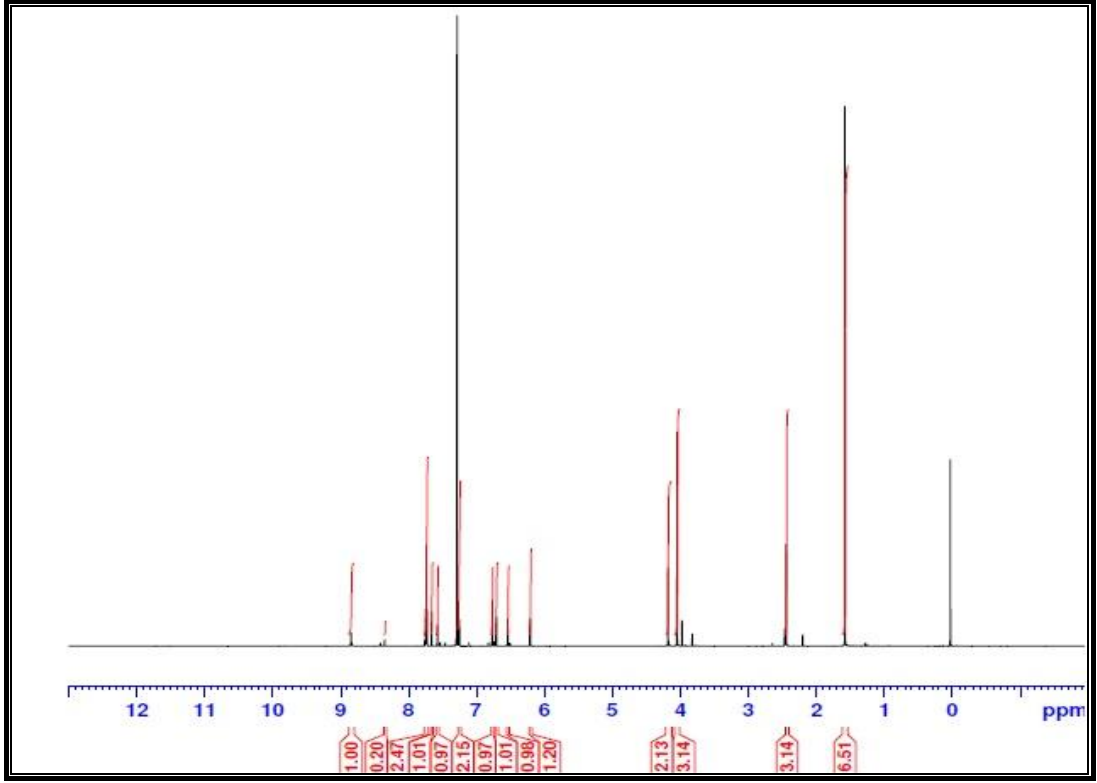


2-Furfuril süstitüenti taşıyan [4a] bileşiğinin 600 MHz'da DMSO- d_6 çözücüsü içinde alınan $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda pirol halkasındaki N-CH₃ protonları çözücü piki içinde yer almıştır. Bu nedenle, bu bileşiğin CDCl₃ içinde $^1\text{H-NMR}$ spektrumu çalışması yapılmıştır. CDCl₃ çözücüsü içinde yapılan çalışmada N-CH₃ protonlarının varlığı 4.04 ppm'de tespit edilmiştir (Şekil 52).



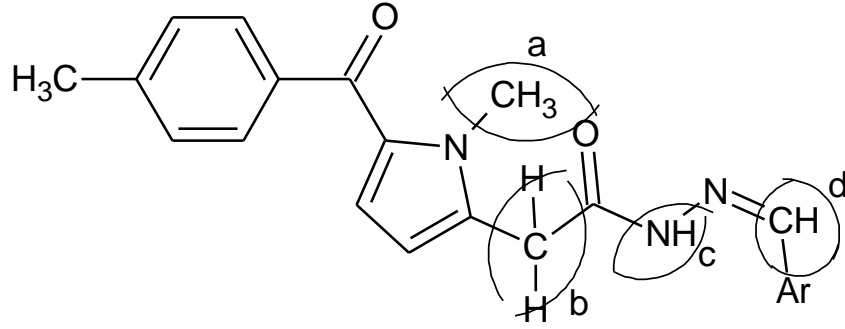
Şekil 52: 4a bileşiğinin DMSO- d_6 ve CDCl₃ çözeltilerindeki N-CH₃ protonları

2-Furfuril süstitüenti taşıyan [4a] bileşğinin N-CH₃ protonlarının varlığı için yapılan 600 MHz'deki CDCl₃ çözücüsü içinde alınan ¹H-NMR spektrumunda, azometin CH=N ve hidrazit-hidrazon N-H protonlarına ait pikler bir singlet olarak tespit edilmiştir (Şekil 53).



Şekil 53: 4a bileşğinin CDCl₃ çözeltisindeki ¹H-NMR spektrumu

Tablo 7: 4a-l bileşiklerinin CH=N, -CH₃ ve -CONH gruplarının ¹H-NMR değerleri



Bileşik kodu	a	b (2H, s)	c (1H, s)	d (1H, s)
4a	3.84 (3H, d)	4.07 (2H,s)	11.42, 11.67	8.07, 8.21
4b	4.04 (3H, s)	4.22	10.16	7.89
4c	4.05 (3H, s)	4.21	9.58	8.09
4d	4.04 (3H, s)	4.21	10.10	7.84
4e	4.04 (3H,s)	4.21	9.97	7.82
4f	4.03 (3H, s)	4.19	9.81	8.20
4g	4.01 (3H, s)	4.20	9.79	8.13
4h	4.04 (3H, s)	4.21	10.08	7.80
4i	3.90 (3H, s)	4.08	11.43	7.95
4j	4.05 (3H, s)	4.23	9.82	7.85
4k	3.84 (3H, s)	4.21	9.84	7.80
4l	4.00 (3H, s)	4.16	9.77	7.79

7.5. Biyolojik Etkiler

7.5.1. Anti-kanserojenik Etkinin Araştırılması

Günümüzde tolmetin etken maddesinin kolon kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyici etkiye sahip olduğu (17) bildirilmiştir. Antikanser ilaç kullanımındaki düzenleyici etkisi (18) ise literatürde araştırılmıştır. Tolmetin ve diğer bazı NSAID etkili maddelerin, antikanser etkili ilaçların sitotoksosite etkilerini arttırdığı tespit

edilmiş (19); β -katenin fonksiyonlarını engellediği ve bu sebeple de yeni antikanser ilaç geliştirmede kullanılabilmesi belirtilmiştir (20).

Bütün bu bilgiler ışığında, antikanser etkinliği bildirilmiş olan başlangıç maddesi tolmetin [1] ve literatürde antikanser etkinlikleri bildirilmiş, bu çalışmada orijinal sentezlediğimiz hidrazit-hidrazon yapısı taşıyan [4g] bileşiğinin antikanser etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu etkiye sahip olup olmadıklarını değerlendirmek amacıyla, HCT-116 (ATCC, CCL-247) ve HT-29 (ATCC, HTB-38) insan kolon kanseri hücre hatları kullanılmıştır.

M.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapılan, literatürde bildirilen yöntemlere göre (97) MTT deneyleri sonucunda tolmetin hidrazonu olan [4g] bileşiğinin, sadece HT-29 hücre hattında etkili olduğu ve IC_{50} dozunun $76 \mu M$ olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte test sonuçlarına göre **Tablo 8**'de görüldüğü üzere, tolmetin üzerinden sentezlediğimiz hidrazit-hidrazonun doza bağlı olarak HT-29 kolon kanser hücresi üzerine daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

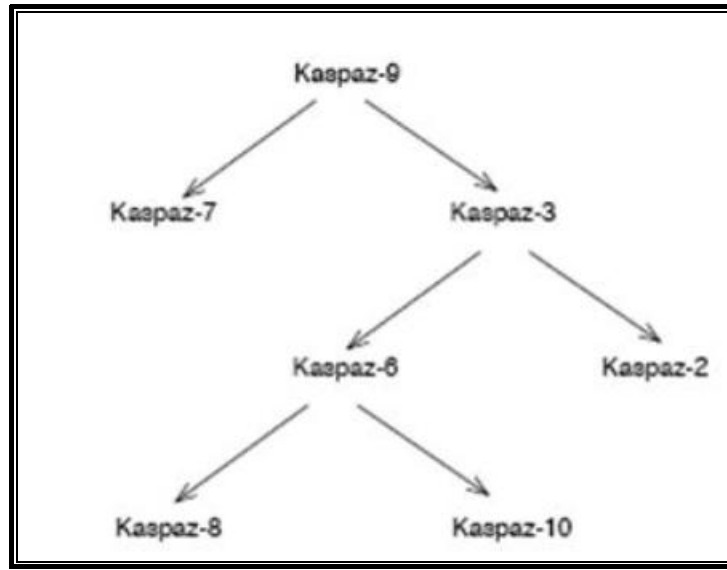
Tablo 8: Bileşiklerin konsantrasyon-büyüme inhibisyon yüzdesi

Konsantrasyon	Büyüme İnhibisyon Yüzdesi	
	Tolmetin	4g
10^{-6}	17,58	21,3
10^{-5}	29,23	34,57
10^{-4}	34,15	50,66
10^{-3}	37,76	62,69
10^{-2}	41,62	70,23

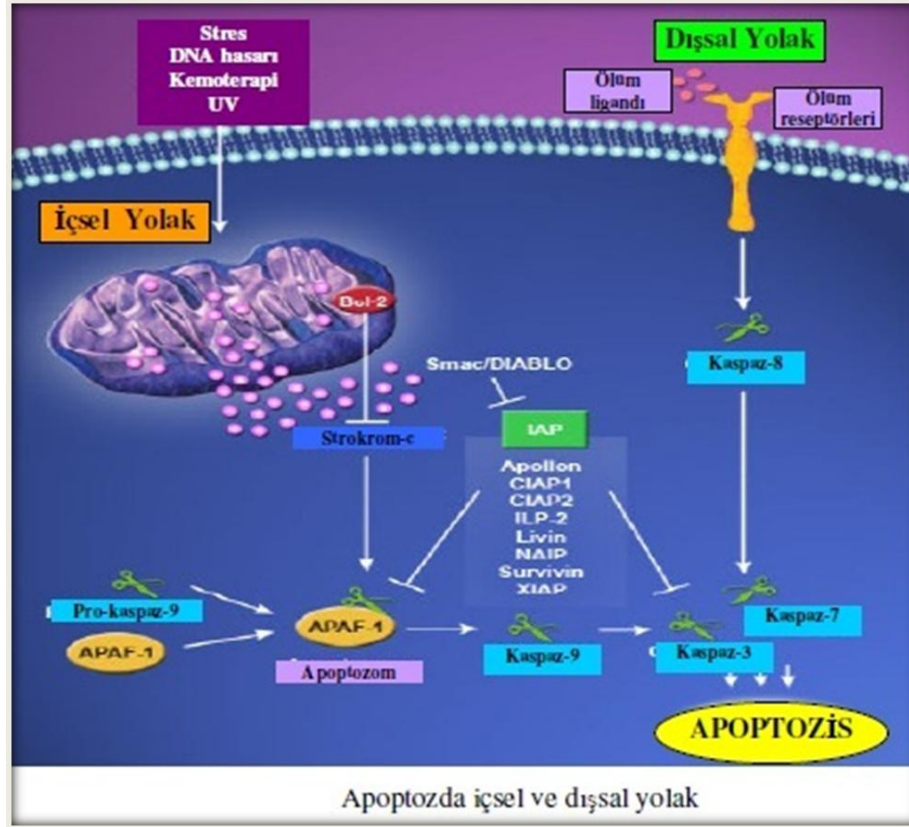
7.5.2. Apoptoz Etkileri

Apoptoz mekanizması oldukça karmaşık enerji bağımlı moleküler bir dizi olaylar zincirini içermektedir. Yapılan araştırmalar, içsel ya da mitokondriyal yolak ve dışsal ya da ölüm reseptörlerine bağlı yolak olmak üzere iki ana apoptotik yolunun olduğunu, bu iki yolun birbiri ile bağlantılı olduğu ve bir yolda rol alan moleküllerin diğer yolaktakini etkilediğini göstermiştir. Mitokondri aracılığıyla düzenlenen hücre içi yol aslında hücre dışı ve hücre içi etkenlerin ortaklaştığı bir mekanizma oluşturur. **Şekil 54**'de de görüldüğü üzere; ister hücre içi, isterse hücre dışı mekanizmayla başlamış olsun, apoptotik süreç kaspazlar adı verilen proteolitik

enzimler tarafından gerçekleştirilir. Apoptotik süreçte, kaspaz-3'ün önemli rolü üstlendiği ve kaspaz-9'un da kaspaz-3'e benzer özellikler taşıdığı son çalışmalarda gösterilmiştir. **Şekil 55**'de de görüldüğü üzere apoptozda kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek süreçte önemli rol oynar. Kaspaz-3 birçok hücrel anahtar proteinin spesifik bölünmesini katalizleyebilen ve çoğunlukla uyarılmış bir ölüm proteazıdır ve bu aktivasyon, kaspaz-8 ve kaspaz-9 parçalamasıyla başlamaktadır. Kaspaz-8, TNF aile üyeleri tarafından dışsal hücre ölüm yolağının başlatılması için temel bir bileşendir. Kaspaz-9 mitokondriyal (içsel) yolda anahtar bileşendir. Kaspaz-9 diğer kaspaz'ları aktive eder.



Şekil 54: Kaspaz kaskadı



Şekil 55: Apoptoz mekanizması (http://imgenex.com/view_data_page.php?id=108, Erişim tarihi: 14 Ağustos 2013).

Tolmetin etken maddesinin kolon kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyici etkiye sahip olduğunun bildirilmesi üzerine apoptoz çalışmaları için HCT-116 (ATCC, CCL-247) insan kolon kanseri hücre hattı kullanılmıştır (17). Hidrazonların apoptoz üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar (45, 49, 64) literatürde bulunmaktadır. Bu çalışmada, tolmetin üzerinden sentezlenen hidrazit-hidrazonlar arasından 2,6-dikloro türevi olan hidrazit-hidrazon [4g] tercih edilmiştir.

Tolmetin hidrazonu olan [4g] bileşiğinin büyüme yüzdesi inhibisyon sonuçlarına bağlı olarak, sentez ilkel bileşiği olan tolmetin ile kıyaslayarak şekil 35-38'de belirtildiği üzere, apoptotik mekanizması araştırılmış ve apoptotik süreci katalizleyen enzimler üzerinde çalışılmıştır (BKZ bölüm 6.2.2).

Tolmetin (100 μ M) [1] ve [4g] ile inkübe edilen kolon kanseri hücrelerinde Annexin V, kaspaz 3, kaspaz 8 seviyelerinin anlamlı düzeyde yükseldiği belirlenmiştir. Kaspaz 9 aktivitesinin sadece Tolmetin bileşiğinin dozuna bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında [4g] bileşiğinin kanser

hücreleri üzerinde Kaspaz 8 yolağını kullanarak apoptozu tetiklediği; tolmetin bileşiminin [1] ise doza bağlı olarak hem kaspaz 8 hem de kaspaz 9 yollarını üzerinden apoptoz üzerinde etkili olduğu sonucuna varılabilir.

Tüm bu bilgiler ışığında değerlendirildiğinde apoptoz yolağında etkili olan kaspaz-3 ve kaspaz 8 aktivasyonunu sağlayan tolmetin hidrazonunun [4g], HT-29 hücre hattında antikanserojenik etkinliği olduğu görülmesi sebebiyle hem tolmetinin hem de hidrazon yapısındaki bileşikte; daha önce literatürde bildirilmiş olan tolmetinin kolon kanserine etkilerinin yapıya katılan kromofor grup ile devam edebileceği düşünülmektedir.

8. SONUÇ

Prostaglandinlerin sentezini inhibe ederek anti-enflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkileri olan bir non-steroidal anti-enflamatuvar etkili bir etken madde olan tolmetin (2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetik asit) üzerinde yapılan çalışmalar kolon kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiş olup; ayrıca antikanser ilaç kullanımındaki düzenleyici etkisi test edilmiştir. Aynı zamanda, biyoaktif heterosiklik bileşiklerin sentezinde ara bileşik olan ve birçok farmakolojik etkiye sahip olduğu bildirilen hidrazit-hidrazon fonksiyonel grubunu taşıyan bileşiklerin aktif farmakofor grubundan dolayı antikanser etkileri daha etkili, daha az toksik yeni kematerapötik ajanların gelişimini hızlandırmak amacıyla dikkat çekmiştir. Bu bilgiler ışığında, kanser hücrelerinde antitümör özellik gösterebileceği düşünülmüş olan yeni hidrazit-hidrazon yapılı bileşikler, tolmetin etken maddesinde yer alan karboksilik asit grubundan hareketle sentezlenen 2-[1-metil-5-(4-metilbenzoil)-1*H*-pirol-2-il]asetik asit hidrazidi üzerinden tolmetin hidrazit-hidrazonları sentezlenmiş ve yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmıştır. Hidrazit-hidrazonların metabolizma çalışmalarında, hidrazit ve aldehit, hidrazit üzerinden de karboksilik asit metabolitine dönüşebileceği bildirilmiştir. Tümör, virüs ve mikrobik enfeksiyonların neticesinde ortaya çıkabilecek doku hasarı sonucu ortaya çıkan ağrılara, tolmetin hidrazit-hidrazonlarının metaboliti olarak düşünülen tolmetinin analjezik etki edebilecek olması da konuya ayrı bir önem kazandırmıştır.

M.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda başlangıç maddesi tolmetin [1] ve literatürde antikanser etkinlikleri bildirilmiş heterosiklik yapılar olan hidrazit-hidrazon yapısı taşıyan [4g] bileşiğinin antikanser etkinlikleri araştırılması amaçlanarak, HCT-116 (ATCC, CCL-247) ve HT-29 (ATCC, HTB-38) insan kolon kanseri hücre hatları kullanılmıştır. MTT deneyleri sonucunda tolmetin hidrazonu olan [4g] bileşiğinin, doza bağlı olarak sadece HT-29 kolon hücre hattında etkili olduğu ve IC₅₀ dozunun 76 µM olduğu belirlenmiştir. Kanser oluşumunun önemli mekanizmalarından biri olan apoptoz üzerine etkilerini değerlendirmek için MTT sonuçlarına göre etkili olduğu tespit edilmiş olan kolon hücre hattı olan HT-29 hücre hattında apoptotik mekanizması araştırılmış ve apoptotik süreci katalizleyen enzimler

olan kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 seviyelerinin değişimi gözlenmiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında özellikle hidrazon yapısındaki [4g] bileşiğinin kanser hücreleri üzerinde Kaspaz 8 yolağını kullanarak apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir. Apoptotik süreçte önemli bir bileşen olan kaspaz-8 aktivasyonu ile apoptozun başladığı ve hücrenin ölüme gittiği bilinmektedir. Bu sebeple hidrazit-hidrazon yapısındaki bu bileşiğin, HT-29 kolon kanseri hücre hattında apoptoz yolağında etkili olduğu görölmüştür. Hem tolmetin hem de hidrazon yapısındaki bileşikte daha önce literatürde bildirilmiş olan kolon kanserine etkilerinin, tolmetinden sentezlenmiş türevinde de apoptozu indüklemesi sebebiyle umut vaat ettiği düşünölmektedir.

9.KAYNAKLAR

1. Carson JR, McKinstry DN, Wong S. (1971). 5-Benzoyl-1-methylpyrrole-2-acetic acids as antiinflammatory agents. *J Med Chem*, 14(7): 646-647.
2. Tito A, Jimenez-Lopez C, Kowalska A, Wysocki S. (2009). A study of the intermolecular interactions of tolmetin/N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester complex. *Spectrochimica Acta*, 72(A): 1000-1006.
3. Hotha KK, Bharathi DV, Kumar SS, Reddy YN, Chatki P, Ravindranath LK, Veera KNJ, Mullangi R. (2010). Validation and clinical application of an LC-ESI-MS/MS method for simultaneous determination of tolmetin and MED5, the metabolites of amtolmetin guacil in human plasma. *Biomed Chromatogr*, 24: 1100-1107.
4. Taylor JE, Jones MD, Williams JMJ, Bull SD. (2010). Friedel-Crafts acylation of pyrroles and indoles using 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene (DBN) as a nucleophilic catalyst. *Org Lett*, 12(24): 5740-5743.
5. Hyneck ML, Smith PC, Munafo A, McDonagh AF, Benet LZ. (1988). Disposition and irreversible plasma protein binding of tolmetin in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 44: 107-114.
6. Hyneck ML, Smith PC, Unseld E, Benet LZ. (1987). High-Performance liquid chromatographic determination of tolmetin, tolmetin glucuronide and its isomeric conjugates in plasma and urine. *J Chromatogr*, 420: 349-356.
7. Ding A, Ojingwa JC, McDonagh AF, Burlingame AL, Benet LZ. (1993). Evidence for covalent binding of acyl glucuronides to serum albumin via an imine mechanism as revealed by tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 3797-3801.
8. Zia-Amirhosseini P, BS, Ojingwa JC, PhD, Spahn-Langguth H, PhD, McDonagh AF, PhD, Benet LZ, PhD. (1994). Enhanced covalent binding of tolmetin to proteins in humans after multiple dosing. *Clin Pharmacol Ther*, 55: 21-27
9. Olsen J, Li C, Skonberg C, Bjornsdottir I, Sidenius U, Benet LZ, Hansen SN. (2007). Studies on the metabolism of tolmetin to the chemically reactive acyl-coenzyme a thioester intermediate in rats. *Drug Metab Dispos*, 35(5): 758-764.

10. Giuffrida S, De Guidi G, Sortino S, Chillemi R, Costanzo LL, Condorelli G. (1995). Molecular mechanism of drug photosensitization. Part 6. Photohaemolysis sensitized by tolmetin. *J Photochem Photobiol B*, 29(2-3): 125-133.
11. Chen FA, Chen CY, Chen CJ, Wu AB. (2003). Quantitation of tolmetin by high-performance liquid chromatography and method validation. *J Chromatogr Sci*, 41(7): 381-384.
12. Cordrey LJ. (1976). Tolmetin sodium, a new anti-arthritis drug: double-blind and long-term studies. *J Am Geriatr Soc*, 24(10): 440-446.
13. Liyanage SP, Steele CE. (1977-1978). Tolmetin in osteoarthritis of the hip and knee: double-blind crossover trials. *Curr Med Res Opin*, 5(4): 299-305.
14. Stacher G, Bauer P, Ehn I, Schreiber E. (1979). Effects of tolmetin, paracetamol, and of two combinations of tolmetin and paracetamol as compared to placebo on experimentally induced pain. *Int J Clin Pharmacol Biopharm*, 17(6): 250-255.
15. Calin A. (1983). Clinical use of tolmetin sodium in patients with ankylosing spondylitis: a review. *J Clin Pharmacol*, 23(7): 301-308.
16. Brogden RN, Heel RC, Speight TM, Avery GS. (1978). Tolmetin: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in rheumatic diseases. *Drugs*, 15(6): 429-450.
17. Hixson LJ, Alberts DS, Krutzsch M, Einsphar J, Brendel K, Gross PH, Paranka NS, Baier M, Emerson S, Pamukcu R, Burt RW. (1994). Antiproliferative effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs against human colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 3: 433-438.
18. Kobayashi S, Okada S, Yoshida H, Fujimura S. (1997). Indomethacin enhances the cytotoxicity of VCR and ADR in human pulmonary adenocarcinoma cells. *Tohoku J Exp Med*, 181: 361-370.
19. Duffy CP, Elliott CJ, O'Connor RA, Heenan MM, Coyle S, Cleary IM, Kavanagh K, Verhaegen S, O'Loughlin CM, NicAmhlaoibh R, Clynes M. (1998). Enhancement of chemotherapeutic drug toxicity to human tumour cells in vitro by a subset of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Eur J Cancer*, 34(8): 1250-1259.
20. Lu D, Cottam HB, Corr M, Carson DA. (2005). Repression of β -catenin function in malignant cells by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(51): 18567-18571.

21. Rollas S, Küçükgülzel ŞG. (2007). Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules*, 12: 1910-1939.
22. Rollas S, Küçükgülzel ŞG. (2008). Hydrazone, amide, carbamate, macromolecular and other prodrugs of doxorubicin. *Open Drug Deliv J*, 2: 77-85.
23. Hofmann J, Heinisch G, Easmon J, Pürstinger G, Fiebig HH. (2006) Heterocyclic hydrazones for use as anti-cancer agents. Patent No: US 7,112,680.
24. Kratz F, Beyer U, Roth T, Tarasova N, Collery P, Lechenault F, Cazabat A, Schumacher P, Unger C, Falken U. (1998). Transferrin conjugates of doxorubicin: synthesis, characterization, cellular uptake, and in vitro efficacy. *J Pharm Sci*, 87(3): 338-346.
25. Pandey J, Pal R, Dwivedi A, Hajela K. (2002). Synthesis of some new diaryl and triaryl hydrazone derivatives as possible estrogen receptor modulators. *Arzneimittelforschung*, 52(1): 39-44.
26. Gürsoy A, Karalı N. (2003). Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of 3-[[[3-phenyl-4(3H)-quinazolinone-2-yl]mercaptoacetyl]hydrazono]-1H-2-indolinones. *Eur J Med Chem*, 38(6): 633-643.
27. Abadi AH, Eissa AAH, Hassan GS. (2003). Synthesis of novel 1,3,4-trisubstituted pyrazole derivatives and their evaluation as antitumor and antiangiogenic agents. *Chem Pharm Bull*, 51(7): 838-844.
28. Terzioğlu N, Gürsoy A. (2003). Synthesis and anticancer evaluation of some new hydrazone derivatives of 2,6-dimethylimidazo[2,1-b]-[1,3,4]thiadiazole-5-carbohydrazide. *Eur J Med Chem*, 38: 781-786.
29. Savini L, Chiasserini L, Travagli V, Pellerano C, Novellino E, Cosentino S, Pisano MB. (2004). New alpha-(N)-heterocyclichydrazones: evaluation of anticancer, anti-HIV and antimicrobial activity. *Eur J Med Chem*, 39(2): 113-122.
30. Demirbas N, Karaoglu SA, Demirbas A, Sancak K. (2004). Synthesis and antimicrobial activities of some new 1-(5-phenylamino-[1,3,4]thiadiazol-2-yl)methyl-5-oxo-[1,2,4]triazole and 1-(4-phenyl-5-thioxo-[1,2,4]triazol-3-yl)methyl-5-oxo-[1,2,4]triazole derivatives. *Eur J Med Chem*, 39(9): 793-804.
31. Rahman VP, Mukhtar S, Ansari WH, Lemiere G. (2005). Synthesis, stereochemistry and biological activity of some novel long alkyl chain substituted thiazolidin-4-ones and thiazan-4-one from 10-undecenoic acid hydrazide. *Eur J Med Chem*, 40(2): 173-184.

32. Vicini P, Incerti M, Doytchinova IA, La Colla P, Busonera B, Loddo R. (2006). Synthesis and antiproliferative activity of benzo[d]isothiazole hydrazones. *Eur J Med Chem*, 41(5): 624-632.
33. Jin L, Chen J, Song B, Chen Z, Yang S, Li Q, Hu D, Xu R. (2006). Synthesis, structure, and bioactivity of N¹-substituted benzylidene-3,4,5-trimethoxybenzohydrazide and 3-acetyl-2-substituted phenyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazole derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 16(19): 5036-5040.
34. Metwally KA, Abdel-Aziz LM, Lashine El-SM, Husseiny MI, Badawy RH. (2006). Hydrazones of 2-aryl-quinoline-4-carboxylic acid hydrazides: synthesis and preliminary evaluation as antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem*, 14(24): 8675-8682.
35. El-Hawash SA, Abdel Wahab AE, El-Demellawy MA. (2006). Cyanoacetic acid hydrazones of 3-(and 4-)acetylpyridine and some derived ring systems as potential antitumor and anti-HCV agents. *Arch Pharm Chem Life Sci*, 339(1): 14-23.
36. Xia Y, Dong Z.W, Zhao B.X, Ge X, Meng N, Shin D.S, Miao J.Y. (2007). Synthesis and structure-activity relationships of novel 1-arylmethyl-3-aryl-1H-pyrazole-5-carbohydrazide derivatives as potential agents A549 lung cancer cells. *Bioorg Med Chem*, 15: 6893-6899.
37. Xia Y, Fan CD, Zhao BX, Zhao J, Shin DS, Miao JY. (2008). Synthesis and structure-activity relationships of novel 1-arylmethyl-3-aryl-1H-pyrazole-5-carbohydrazide derivatives as potential agents against A549 lung cancer cells. *Eur J Med Chem*, 43: 2347-2353.
38. Varache-Lembège M, Moreau S, Larrouture S, Montaudon D, Robert J, Nuhrich A. (2008). Synthesis and antiproliferative activity of aryl- and heteroaryl-hydrazones derived from xanthone carbaldehydes. *Eur J Med Chem*, 43(6): 1336-1343.
39. Vogel S, Kaufmann D, Pojarová M, Müller C, Pfaller T, Kühne S, Bednarski PJ, von Angerer E. (2008). Aryl hydrazones of 2-phenylindole-3-carbaldehydes as novel antimitotic agents. *Bioorg Med Chem*, 16(12): 6436-6447.
40. Liu WY, Li HY, Zhao BX, Shin DS, Lian S, Miao JY. (2009). Synthesis of novel ribavirin hydrazone derivatives and anti-proliferative activity against A549 lung cancer cells. *Carbohydr Res*, 344(11): 1270-1275.

41. El-Sabbagh OI, Rady HM. (2009). Synthesis of new acridines and hydrazones derived from cyclic β -diketone for cytotoxic and antiviral evaluation. *Eur J Med Chem*, 44(9): 3680-3686.
42. Hofmann J, Easmon J, Puerstinger G, Heinisch G, Jenny M, Shtil AA, Hermann M, Condorelli DF, Sciré S, Musumarra G. (2009). N-benzoxazol-2-yl-N'-1-(isoquinolin-3-yl-ethylidene)-hydrazine, a novel compound with antitumor activity, induces radicals and dissipation of mitochondrial membrane potential. *Invest New Drugs*, 27(3): 189-202.
43. Rostom SA, Ashour HM, Abd El Razik HA. (2009). Synthesis and biological evaluation of some novel polysubstituted pyrimidine derivatives as potential antimicrobial and anticancer agents. *Arch Pharm (Weinheim)*, 342(5): 299-310.
44. Abdel-Aziz HA, Gamal-Eldeen AM, Hamdy NA, Fakhr IM. (2009). Immunomodulatory and anticancer activities of some novel 2-substituted-6-bromo-3-methylthiazolo[3,2-a]benzimidazole derivatives. *Arch Pharm (Weinheim)*, 342: 230-237.
45. Onnis V, Cocco MT, Fadda R, Congiu C. (2009). Synthesis and evaluation of anticancer activity of 2-arylamino-6-trifluoromethyl-3-(hydrazonocarbonyl) pyridines. *Bioorg Med Chem*, 17(17): 6158-6165.
46. Horiuchi T, Nagata M, Kitagawa M, Akahane K, Uoto K. (2009). Discovery of novel thieno[2,3-d]pyrimidin-4-yl hydrazone-based inhibitors of cyclin D1-CDK4: synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships. Part 2. *Bioorg Med Chem*, 17(23): 7850-7860.
47. Zheng LW, Wu LL, Zhao BX, Dong WL, Miao JY. (2009). Synthesis of novel substituted pyrazole-5-carbohydrazide hydrazone derivatives and discovery of a potent apoptosis inducer in A549 lung cancer cells. *Bioorg Med Chem*, 17(5): 1957-1962.
48. Aydın S, Kaushik-Basu N, Arora P, Basu A, Nichols DB, Talele TT, Akkurt M, Çelik İ, Büyükgüngör O, Küçükgüzel ŞG. (2013). Microwave assisted synthesis of some novel flurbiprofen hydrazide-hydrazones as anti-hcv NS5B and anticancer agents. *Marmara Pharm J*, 17(1): 26-34.
49. Çıkla P, Özsvacı D, Bingöl-Özakupınar Ö, Şener A, Çevik Ö, Özbaş-Turan S, Akbuğa J, Şahin F, Küçükgüzel ŞG. (2013). Synthesis, cytotoxicity, and pro-apoptosis activity of etodolac hydrazide derivatives as anticancer agents. *Arch Pharm (Weinheim)*, 346(5): 367-379.

50. Wright SC, Wei QS, Kinder DH, Larrick JW. (1996). Biochemical pathways of apoptosis: nicotinamide adenine dinucleotide-deficient cells are resistant to tumor necrosis factor or ultraviolet light activation of the 24-kD apoptotic protease and DNA fragmentation. *J Exp Med*, 183(2): 463-471.
51. Kosova F, Ari Z. (2011). The relationship between prostate cancer and apoptosis. *J Clin Exp Invest*, 2(1): 124-131.
52. Zhang HZ, Drewe J, Tseng B, Kasibhatla S, Cai SX. (2004) Discovery and SAR of indole-2-carboxylic acid benzylidene-hydrazides as a new series of potent apoptosis inducers using a cell-based HTS assay. *Bioorg Med Chem*, 12(13): 3649-3655.
53. Buss JL, Neuzil J, Gellert N, Weber C, Ponka P. (2003) Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs induce apoptosis in hematopoietic cells due to their iron-chelating properties. *Biochem Pharmacol*, 65(2): 161-172.
54. Putt KS, Chen GW, Pearson JM, Sandhorst JS, Hoagland MS, Kwon JT, Hwang SK, Jin H, Churchwell MI, Cho MH, Doerge DR, Helferich WG, Hergenrother PJ. (2006). Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy. *Nat Chem Biol*, 2(10): 543-550.
55. Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, Zhang H, Crogan-Grundy C, Labreque D, Bubenick M, Attardo G, Denis R, Lamothe S, Gourdeau H, Tseng B, Kasibhatla S, Cai SX. (2008). Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high throughput screening assay. 4. Structure-activity relationships of N-alkyl substituted pyrrole fused at the 7,8-positions. *J Med Chem*, 51(3): 417-423.
56. Fan C, Su H, Zhao J, Zhao B, Zhang S, Miao J. (2010) A novel copper complex of salicylaldehyde pyrazole hydrazone induces apoptosis through up-regulating integrin beta4 in H322 lung carcinoma cells. *Eur J Med Chem*, 45(4): 1438-1446.
57. Wirries A, Breyer S, Quint K, Schobert R, Ocker M. (2010) Thymoquinone hydrazone derivatives cause cell cycle arrest in p53-competent colorectal cancer cells. *Exp Ther Med*, 1(2): 369-375.
58. Effenberger K, Breyer S, Ocker M, Schobert R. (2010). New doxorubicin N-acyl hydrazones with improved efficacy and cell line specificity show modes of action different from the parent drug. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 48(7): 485-486.

59. Aziz G, Akselsen ØW, Hansen TV, Paulsen RE. (2010). Procaspase-activating compound 1 induces a caspase-3-dependent cell death in cerebellar granule neurons. *Toxicol Appl Pharmacol*, 247(3): 238-242.
60. Zhao Y, Hui J, Wang D, Zhu L, Fang JH, Zhao XD. (2010). Synthesis, cytotoxicity and pro-apoptosis of novel benzoisindolin hydrazones as anticancer agents. *Chem Pharm Bull*, 58(10): 1324-1327.
61. Lou J, Liu Z, Li Y, Zhou M, Zhang Z, Zheng S, Wang R, Li J. (2011). Synthesis and anti-tumor activities of N'-benzylidene-2-(4-oxothieno[2,3-d]pyrimidin-3(4H)-yl)acetohydrazone derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 15;21(22): 6662-6666.
62. Dandawate P, Khan E, Padhye S, Gaba H, Sinha S, Deshpande J, Venkateswara Swamy K, Khetmalas M, Ahmad A, Sarkar FH. (2012) Synthesis, characterization, molecular docking and cytotoxic activity of novel plumbagin hydrazones against breast cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 22(9): 3104-3108.
63. Shi ZY, Li YQ, Kang YH, Hu GQ, Huang-fu CS, Deng JB, Liu B (2012). Piperonal ciprofloxacin hydrazone induces growth arrest and apoptosis of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells. *Acta Pharmacol Sin*. 33(2): 271-278.
64. Despaigne AA, Parrilha GL, Izidoro JB, da Costa PR, Dos Santos RG, Piro OE, Castellano EE, Rocha WR, Beraldo H. (2012). 2-Acetylpyridine- and 2-benzoylpyridine-derived hydrazones and their gallium(III) complexes are highly cytotoxic to glioma cells. *Eur J Med Chem*, 50: 163-172.
65. Bundgaard H, Nielsen NM. (1988). Glycolamide esters as a novel biolabile prodrug type for non-steroidal anti-inflammatory carboxylic acid drugs. *Int J Pharm*, 43(1-2): 101-110.
66. Reddy LA, Chakraborty S, Swapna R, Bhalerao D, Malakondaiah GC, Ravikumar M, Kumar A, Reddy GS, Naram J, Dwivedi N, Roy A, Himabindu V, Babu B, Bhattacharya A, Bandichhor R. (2010). Synthesis and process optimization of amtolmetin: an antiinflammatory agent. *Org Process Res Dev*, 14(2): 362-368.
67. Amir M, Kumar S. (2005). Synthesis of some new 2-(2-fluoro-4-biphenyl)propionic acid derivatives as potential anti-inflammatory agents. *Pharmazie*, 60(3): 175-180.
68. Küçükgülzel ŞG, Mazi A, Sahin F, Öztürk S, Stables J. (2003). Synthesis and biological activities of diflunisal hydrazide-hydrazones. *Eur J Med Chem*, 38: 1005-1013.

69. Ergenç N, Gürsoy A, Ateş Ö. (1989). İlaçların Tanınması ve Kantitatif Tayini. 4. baskı, İstanbul Üniv. Yayınları, İstanbul, s.428.
70. Çıkla P, Tatar E, Küçükgüzel İ, Şahin F, Yurdakul D, Basu A, Krishnan R, Nichols DB, Kaushik-Basu N, Küçükgüzel ŞG. (2013). Synthesis and characterization of flurbiprofen hydrazide derivatives as potential anti-HCV, anticancer and antimicrobial agents. *Med Chem Res*, 22(12): 5685-5699.
71. Koçyiğit-Kaymakçioğlu B, Oruç E, Unsalan S, Kandemirli F, Shvets N, Rollas S, Anatholy D. (2006). Synthesis and characterization of novel hydrazide-hydrazones and the study of their structure-antituberculosis activity. *Eur J Med Chem*, 41(11): 1253-1261.
72. Deep A, Jain S, Sharma PC, Verma P, Kumar M, Dora CP. (2010). Design and biological evaluation of biphenyl-4-carboxylic acid hydrazide-hydrazone for antimicrobial activity. *Acta Pol Pharm*, 67(3): 255-259.
73. Szarvasi E, Fontaine L, Betbeder-Matibet A. (1973). Antimicrobials. New nitrofurane derivatives. *J Med Chem*, 16(3): 281-287.
74. Turan-Zitouni G, Kaplancıklı ZA. (1998). 5-Acetyllindan aryloxyacetohydrazone derivatives: Synthesis and antituberculosis activity. *Acta Pharm Turc*, XXXX(2): 67-71.
75. Ismaiel AM, Yousif MY, Metwally MA, El-Kerdawy MM. (1984). Syntheses of substituted 3-mercapto-1,2,4-triazoles as potential antimicrobial agents. *Indian J Chem*, 23B: 489-491.
76. Singh V, Srivastava VK, Palit G, Shanker K. (1992). Coumarin congeners as antidepressants. *Arzneimittelforschung*, 42(8): 993-996.
77. Özdemir A, Kaplancıklı ZA, Turan-Zitouni G, Revial G. (2010). Synthesis of some novel hydrazone derivatives and evaluation of their antituberculosis activity. *Marmara Pharm J*, 14: 79-83.
78. Komurcu SG, Rollas S, Ulgen M, Gorrod JW, Cevikbas A. (1995). Evaluation of some arylhydrazones of p-aminobenzoic acid hydrazide as antimicrobial agents and their in vitro hepatic microsomal metabolism. *Boll Chim Farm*, 134(7): 375-379.
79. Ulgen M, Durgun BB, Rollas S, Gorrod JW. (1997). The in vitro hepatic microsomal metabolism of benzoic acid benzylidenehydrazide. *Drug Metabol Drug Interact*, 13(4): 285-294.

80. Koçyiğit-Kaymakçioğlu B, Ünsalan S, Küçükgüzel ŞG, Şener G, Rollas S. (2007). HPLC analysis of *in vivo* metabolites of 4-nitrobenzoic acid [(5-nitro-2-thiophenyl)methylene]hydrazide in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 32(4): 197-203.
81. Küçükgüzel ŞG, Rollas S, Küçükgüzel İ, Kiraz M. (1999). Synthesis and antimycobacterial activity of some coupling products from 4-aminobenzoic acid hydrazones. *Eur J Med Chem*, 34: 1093-1100.
82. Cesur Z, Büyüktimkin S, Büyüktimkin N, Derbentli Ş. (1990) Synthesis and antimicrobial evaluation of some arylhydrazones of 4-[(2-methylimidazol[1,2-a]pyridine-3-yl)azo]benzoic acid hydrazide. *Arch Pharm (Weinheim)*, 323(3): 141-144.
83. Koçyiğit-Kaymakçioğlu B, Rollas S. (2002). Synthesis, characterization and evaluation of antituberculosis activity of some hydrazones. *Farmaco*, 57(7): 595-599.
84. Rollas S. (1981). Synthesis and spectrometric analysis of some hydrazide hydrazones. *J Fac Pharm İstanbul*, 17: 41-50.
85. Da Settimo A, Primofiore G, DA Settimo F, Calzolari L, Cazzulani P, Passoni A, Tofanetti O. (1992). 1-substitued-2-benzylaminobenzimidazole derivatives.:compounds wiyh H₁-antihistaminic activity. *Eur J Med Chem*, 27: 395-400.
86. İlhan E, Ergenç N, Ulusoy N, Ötük-Sarı G. (1996). Synthese und antimikrobielle Untersuchung einiger 4-Arylidenamino-3-(α,α -diphenyl- α -hydroxy-methyl)-1,4-dihydro-5H-1,2,4-triazo-5-thione und 6-Aryl-3-(α,α -diphenyl- α -hydroxymethyl)-7H-s-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazine. *Pharmazie*, 51(2): 123-124.
87. Küçükgüzel ŞG, Rollas S, Erdeniz H, Kiraz M, Ekinci AC, Vidin A.(2000). Synthesis, characterization and pharmacological properties of some 4-arylhyaazono-2-pyrazoline-5-one derivatives obtained from heterocyclic amines. *Eur J Med Chem*, 35: 761-771.
88. Özkırmırlı S. (1981). Sythesis of some imidazoletrione derivatives. *J Pharm İstanbul*, 17: 164-174.
89. Küçükgüzel ŞG, Oruç EE, Rollas S, Şahin F, Özbek A. (2002). Synthesis, characterisation and biological activity of novel 4-thiazolidinones, 1,3,4-oxadiazoles and some related compounds. *Eur J Med Chem*, 37(3): 197-206.
90. Koçyiğit-Kaymakçioğlu B, Oruç-Emre EE, Unsalan S, Rollas S. (2009). Antituberculosis activity of hydrazones derived from 4-fluorobenzoic acid hydrazide. *Med Chem Res*, 18(4): 277-286.

91. Rutavichyus A, Valiulene S, Kuodis Z. (1995). Isomerism of hydrazones of (2-benzothiazolylthio)- and (2-benzoxazolylthio)acetic acids. *Chem Heterocycl Comp*, 31(5): 629-633.
92. Rutavichyus A, Valiulene S, Kuodis Z. (2000). Synthesis and structure of hydrazones obtained from hydrazides of [5-(4-pyridyl)-1,3,4-oxadiazol-2-ylthio]acetic or 2-[5-(4-pyridyl)-1,3,4-oxadiazol-2-ylthio]propionic acids. *Chem Heterocycl Comp*, 36(7): 851-856.
93. Easmon J, Puerstinger G, Roth T, Fiebig HH, Jenny M, Jaeger W, Heinisch G, Hofmann J. (2001). 2-benzoxazolyl and 2-benzimidazolyl hydrazones derived from 2-acetylpyridine: a novel class of antitumor agents. *Int J Cancer*, 94(1): 89-96.
94. Easmon J, Pürstinger G, Thies KS, Heinisch G, Hofmann J. (2006). Synthesis, structure-activity relationships, and antitumor studies of 2-benzoxazolyl hydrazones derived from alpha-(N)-acyl heteroaromatics. *J. Med. Chem*, 49(21): 6343-6350.
95. Salgin-Gökşen U, Gökhan-Kelekçi N, Göktaş O, Köysal Y, Kiliç E, Işık S, Aktay G, Ozalp M. (2007). 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, 1,3,4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Bioorg Med Chem*, 15: 5738-5751.
96. Tatar E, Küçükgülzel I, Daelemans D, Talele TT, Kaushik-Basu N, De Clercq E, Pannecouque C. (2013). Some hydrazones of 2-arylamino-3-methylbutanohydrazide: synthesis, molecular modeling studies, and identification as stereoselective inhibitors of HIV-1. *Arch Pharm (Weinheim)*, 346(2): 140-153.
97. Woerdenbag HJ, Moskal TA, Pras N, Malingre TM. (1993). Cytotoxicity of Artemisinin-Related Endoperoxides to Ehrlich Ascites Tumor Cells. *J Nat Prod*. 56(6): 849-856.

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Derya	Soyadı	Koç
Doğum Yeri	Kadıköy	Doğum Tarihi	27.10.1984
Uyruğu	T.C.	Tel	05376757548
E-mail	deryaaa_koc@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	-	
Yüksek Lisans	Marmara Üni. Eczacılık Fak. Farmasötik Kimya A.B.D.	-
Lisans	Marmara Üni. Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü	2006
Lise	Kadir Has Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırmacı	Biofarma İlaç San. Tic. A.Ş.	2012-2013
2.	Ar-Ge Analisti	Mikrogen İlaç San. Tic. Ltd. Şti.	2007-2009
3.			

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu

KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75.289	68.988	72.948
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

