

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİDRAZON TEMELLİ BAZI HİBRİT MOLEKÜLLERİN SENTEZİ VE
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra ÇEÇEN

KİMYA BÖLÜMÜ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ahmet ÇETİN

BİNGÖL-2024



T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİDRAZON TEMELLİ BAZI HİBRİT MOLEKÜLLERİN SENTEZİ VE
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Prof. Dr. Ahmet ÇETİN danışmanlığında, Esra ÇEÇEN tarafından hazırlanan bu çalışma 07.05.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ahmet ÇETİN İmza :

Üye : Doç. Dr. Sinan BAYINDIR İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Fatih COŞKUN İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun// tarih ve/
nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimi planlayıp yöneten, bilgi ve tecrübesi ile çalışmalarına yön veren, tezimin her aşamasında anlayışı ile yanımda olan ve desteğini hiç esirgemeyen kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇETİN'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca desteğini eksik etmeyen değerli hocam Doç. Dr. Sinan BAYINDIR'a destekleri için şükranlarımı sunarım.

Bu zamana kadar emeklerini ve dualarını esirgemeyen, bu günlere gelmemde çok büyük emeği ve desteği olan aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Esra ÇEÇEN

Bingöl 2024

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLER.....	3
2.1. Genel Bilgiler	3
2.1.1. Hidrazonların Genel Özellikleri ve Yapıları	3
2.1.2. Hidrazonların Sentez Yöntemleri	4
2.1.2.1. Aldehitve Ketonların Hidrazinler ile Kondenzasyonu.....	4
2.1.2.2. Heteroaromatik Diazonyum ve Aktif Metilen Bileşikleri ile Aromatik Tuzlarının Birleşmesi.....	5
2.2. Hidrazit-Hidrazon Birleşiklerinin Aktiviteleriyle İlgili Yapılmış Çalışmalar	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Kullanılan Materyaller	15
3.2. Kullanılan Kimyasallar	15
3.3. Saflaştırma.....	16
3.4. Biyolojik Aktivite Analizleri.....	16
3.4.1. İn Vitro Antioksidan Aktivite İçin Difenilpikrilhidrazil (DPPH) Radikali Süpürme Aktivitesi:.....	16
3.4.2. Antikanserojen Aktivite Analizleri:	18
3.4.2.1. Hücre Hatları.....	18
3.4.2.2. Hücre Açma Protokolü	18
3.4.2.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	19
3.4.2.4. Hücrelerin Ekilmesi	20
3.4.2.5. Hücrelere Etken Madde Uygulanması ve MTT testi	20

3.4.2.6. Hücrelerin Görüntülenmesi.....	20
3.4.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	21
3.4.5. Fibroblast (L929) Hücre Kültüründe Yeni Sentezlenen Bileşiklerin Uygulanmasıyla Birlikte Hücrelerin Oksidatif Stresinin Tespit Edilmesi..	22
3.4.5.1. Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Analizi	23
3.4.5.2. Toplam Antioksidan Seviye (TAS) Analizi.....	23
3.4.5.3. Toplam Oksidan Seviye (TOS) Analizi	23
3.4.5.4. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Analizi	23
3.4.5.5. DNA Hasarını Önleyici Aktivite	24
3.4.4.5. İstatistiksel Analiz.....	27
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1. Genel sentez yöntemi	28
4.1.1. N'-(furan-2-ilmtilen)tiyofen-2-karbohidrazit (3a)	28
4.1.2. 2-kloro-N'-(furan-2-ilmtilen)benzohidrazit (3b).....	30
4.1.3. N'-(furan-2-ilmtilen)-3-metoksibenzohidrazit (3c)	33
4.1.4. N'-(furan-2-ilmtilen)benzohidrazit (3d).....	36
4.1.5. N'-(furan-2-ilmtilen)-2-hidroksibenzohidrazit (3e)	38
4.1.6. N'-(furan-2-ilmtilen)izonikotinohidrazit (3f).....	41
4.1.7. N'-(furan-2-ilmtilen)-1H-indol-7-karbohidrazit (3g).....	43
4.1.8. N'-((1H-pirol-2-il)metilen)-2-klorobenzohidrazit (3h).....	45
4.1.9. N'-((1H-pirol-2-il)metilen)-3-metoksibenzohidrazit (3i)	47
4.1.10. N'-((1H-pirol-2-il)metilen)-3-hidroksi-2-naftohidrazit (3j).....	50
4.1.11. N'-((1H-pirol-2-il)metilen)izonikotinohidrazit (3k)	53
4.1.12. N'-((1H-pirol-2-il)metilen)-1H-indol-7-karbohidrazit (3l).....	56
4.2. Sentezlenen Bileşiklerin Biyolojik Aktivite Bulguları	59
4.2.1. İn Vitro Antioksidan Aktivitelerin Değerlendirilmesi	59
4.2.2. . <i>In Vitro</i> Anti-kanserojen Özelliklerin Değerlendirilmesi	61
4.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	66
4.2.4. L929 Hücre Kültüründe Hücrelerin Oksidatif stresinin Değerlendirilmesi Analiz Sonuçları	67
4.2.4.1. Lipidperoksidasyonunun göstergesi Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	67
4.2.4.2. Toplam Antioksidan Seviyenin Değerlendirilmesi.....	68

4.2.4.2. Toplam Oksidan Seviyenin (TOS) Değerlendirilmesi.....	69
4.2.4.3. L929 Hücrelerinde Test Bileşikleri Uygulanmasıyla Oksidatif Stres İndeksindeki Değişmeler	70
4.2.5. DNA hasarını önleyici aktivite sonuçları	71
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	74
KAYNAKLAR	79

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

δ	: Kimyasal kayma
$^{\circ}\text{C}$: Santigrad derece
g	: Gram
J	: Etkileşme sabiti
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mmol	: Milimol
^{13}C NMR	: Karbon 13 nükleer manyetik rezonans
^1H NMR	: Proton nükleer manyetik rezonans
Ar	: Aril
E.n	: Erime noktası
EtOH	: Etanol
FT	: Fouriertransforminfrared
Hz	: Hertz
MHz	: Megahertz
ppm	: Milyonda bir
R	: Alkil
Ger. Tit	: Gerilme Titreşimi
Eğ. Tit	: Eğilme Titreşimi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. DPPH• analizi sırasında 96 wellplate görünümü	18
Şekil 3.2. Mikroplate içinde minimum inhibisyon konsantrasyon testi.....	22
Şekil 3.3. Plazmid DNA formları.....	25
Şekil 4.1. 3a molekülünün FT-IR spektrumu.....	29
Şekil 4.2. 3a molekülünün ¹ H-NMR spektrumu	29
Şekil 4.3. 3a molekülünün ¹³ C-APT. NMR spektrumu	30
Şekil 4.4. 3b molekülünün FT-IR spektrumu.....	31
Şekil 4.5. 3b molekülünün ¹ H-NMR spektrumu	32
Şekil 4.6. 3b molekülünün ¹³ C-APT. NMR spektrumu	33
Şekil 4.7. 3c molekülünün FT-IR spektrumu.....	34
Şekil 4.8. 3c molekülünün ¹ H-NMR spektrumu	35
Şekil 4.9. 3c molekülünün ¹³ C-APT NMR spektrumu	36
Şekil 4.10. 3d molekülünün FT-IR spektrumu.....	37
Şekil 4.11. 3d molekülünün ¹ H-NMR spektrumu	37
Şekil 4.12. 3d molekülünün ¹³ C-APT. NMR spektrumu	38
Şekil 4.13. 3e molekülünün FT-IR spektrumu.....	39
Şekil 4.14. 3e molekülünün ¹ H-NMR spektrumu	40
Şekil 4.15. 3e molekülünün ¹³ C-APT NMR spektrumu	41
Şekil 4.16. 3f molekülünün FT-IR spektrumu	42
Şekil 4.17. 3f molekülünün ¹ H-NMR spektrumu.....	42
Şekil 4.18. 3f molekülünün ¹³ C-APT. NMR spektrumu.....	43
Şekil 4.19. 3g molekülünün FT-IR spektrumu.....	44
Şekil 4.20. 3g molekülünün ¹ H-NMR spektrumu	45
Şekil 4.21. 3h molekülünün FT-IR spektrumu.....	46
Şekil 4.22. 3h molekülünün ¹ H-NMR spektrumu	46
Şekil 4.23. 3h molekülünün ¹³ C-APT NMR spektrumu	47
Şekil 4.23. 3i molekülünün FT-IR spektrumu	48
Şekil 4.24. 3i molekülünün ¹ H-NMR spektrumu.....	49
Şekil 4.25. 3i molekülünün ¹³ C-APT NMR spektrumu	50

Şekil 4.26. 3j molekülünün FT-IR spektrumu	51
Şekil 4.27. 3j molekülünün ¹ H-NMR spektrumu.....	52
Şekil 4.28. 3j molekülünün ¹³ C-APT NMR spektrumu	53
Şekil 4.29. 3k molekülünün FT-IR spektrumu.....	54
Şekil 4.30. 3k molekülünün ¹ H-NMR spektrumu.....	55
Şekil 4.31. 3k molekülünün ¹³ C-APT NMR spektrumu	56
Şekil 4.32. 3l molekülünün FT-IR spektrumu	57
Şekil 4.33. 3l molekülünün ¹ H-NMR spektrumu.....	58
Şekil 4.34. 3l molekülünün ¹³ C-APT NMR spektrumu	59
Şekil 4.35. Yeni sentezlenen bileşiklerin (3a-1) DPPH• radikalini süpürme kapasiteleri	60
Şekil 4.36. Yeni sentezlenen bileşiklerin hücre hatlarındaki % Hücre canlılık sonuçları. Aktiviteler 24 saatlik inkübasyon sonucunda değerlendirilmiştir (**p<0,001; *p<0,01; *p<0,05).....	62
Şekil 4.37. Test bileşiklerinin MCF-7 hücrelerinde uygulama sonrası hücre morfolojileri. (Ölü hücreler kırmızı ok ile işaretlenmiştir. 10X görüntüler için ölçek çubuğu: 100 µm ve 20X görüntüler için ölçek çubuğu: 200 µm'dir.).....	64
Şekil 4.38. Test bileşiklerinin SW-620 hücrelerinde uygulama sonrası hücre morfolojileri. (Ölü hücreler kırmızı ok ile işaretlenmiştir. 10X görüntüler için ölçek çubuğu: 100 µm ve 20X görüntüler için ölçek çubuğu: 200 µm'dir.).....	65
Şekil 4.39. Test bileşiklerinin DNA koruyucu aktivitesinin agaroz jelde görüntülenmesi. (1.Sütun: M: DNA büyüklük belirteci, K1 Sütunu: Plazmit DNA + distile su, K2 Sütunu: Plazmit DNA + distile su+ UV, K3 Sütunu: Plazmit DNA + distile su + UV+ Hidrojen peroksit, K4 Sütunu: Plazmit DNA + distile su + Hidrojen peroksit, 3a-3l: Plazmit DNA + UV+ Hidrojen peroksit + 100µM konsantrasyonda sırasıyla bileşikler kullanılmıştır.....	73
Şekil 5.1. Genel sentez şeması	74

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1.	DNA hasarına karşı sentezlenen bileşiklerin aktivitelerinin belirlenmesi deneyi.....	26
Tablo 4.1.	Test bileşikleri ve standart antioksidanların DPPH süpürme aktiviteleri..	60
Tablo 4.2.	Yeni sentezlenen bileşiklerin in vitrositotoksik aktivitesini gösteren IC50 değerleri	61
Tablo 4.3.	Test bileşiklerinin L929, MCF-7 ve SW620 hücre hatlarındaki IC50 değerlerinin karşılaştırılmasından elde edilen Seçicilik İndeksi (SelectivityIndex).....	66
Tablo 4.4.	Yeni sentezlenen bileşiklerin antimikrobiyal etkisi	67
Tablo 4.5.	L929 hücre hatlarında 100 µM konsantrasyonda test bileşiği uygulandığında 24 saat sonrasında MDA seviyeleri (* p<0,05).....	68
Tablo 4.6.	Farklı konsantrasyonlarda test bileşikleri uygulanmış L929 hücre hatlarında TAS düzeyleri.....	69
Tablo 4.7.	Farklı konsantrasyonlarda test bileşikleri uygulanmış L929 hücre hatlarında TOS düzeyleri	70
Tablo 4.8.	Test bileşikleri uygulanmış L929 hücre hatlarında OSİ düzeyler.....	71

HİDRAZON TEMELLİ BAZI HİBRİT MOLEKÜLLERİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Bu tez çalışmasında, belirlenen hidrazit birleşiklerinden 12 adet açilhidrazon türevi sentezlenerek biyolojik aktivite testleri gerçekleştirildi. Bu çalışmanın ilk aşamasında hazırlanan hidrazit türevleri (**2a-1**) asit katalizörlüğünde furan-2-karboksialdehit ve Pürol-2-karboksialdehit ile tepkimeye sokularak açilhidrazon türevleri (**3a-1**) sentezlendi. Sentezlenen moleküller FT-IR, ¹H-NMR ve ¹³C APT-NMR gibi spektroskopik teknikler kullanılarak kimyasal yapıları aydınlatıldı.

Çalışmamızın son aşamasında sentezlenen türevlerin antioksidan, antimikrobiyal ve anti kanser aktiviteleri biyokimyasal yöntemlerle araştırıldı. Deneysel çalışmalar sonucunda kullanılan bileşiklerin anti kanser aktivite denemelerinde bütün maddelerin, kullanılan mikroorganizmalar üzerinde belirgin bir etkiye sahip oldukları belirlendi. Bileşiklerin *in vitro* şartlarda önemli ve farklı biyolojik aktivitelere sahip olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: hidrazit, hidrazon, antimikrobiyal, antioksidan, anti kanser.

SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SOME HYDRAZON-BASED HYBRID MOLECULS

ABSTRACT

In the thesis study, 12 acylhydrazone derivatives were synthesized from the hydrazide compounds determined and biological activity tests were carried out. In the first stage of the study, acylhydrazone derivatives (**3a-1**) were synthesized by reacting the prepared hydrazide derivatives (**2a-1**) with furan-2-carboxyaldehyde and Pyrrole-2-carboxaldehyde under acid catalysis. The chemical structures of the synthesized molecules were elucidated using spectroscopic techniques such as FT-IR, ¹H-NMR and ¹³C APT-NMR.

In the final stage of our study, antioxidant, antimicrobial and anti-cancer activities of the synthesized derivatives were investigated using biochemical methods. As a result of experimental studies, it was determined that all substances had a significant effect on the microorganisms used in the anti-cancer activity trials of the compounds used. It was determined that the compounds had important and different biological activities under *in vitro* conditions.

KeyWords: hydrazide, hydrazone, antimicrobial, antioxidant, anti-cancer.

1. GİRİŞ

Günümüzde organik kimya bilim dalında çok sayıda bilimsel çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar sırasında sentezlenen birleşiklerin kimyasal formülleri, yapı analizleri ve biyolojik aktiviteleri belirlenebilmektedir. Bunların arasında hidrazon birleşiklerini konu alan çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Fiziksel ve kimyasal etmenler sonucu oksijenli ortamlarda metabolik reaksiyonlar neticesinde oksijen radikalleri oluşur. Biyolojik sistemlerin doğal bileşeni olan reaktif oksijen türleri serbest radikaller olarak önemini korumaktadır. Hücre içerisinde oluşan bu kararsız radikaller canlı organizmalardaki fonksiyonel moleküllere saldırarak doku hasarlarına ve hatta yaşamın sonlanmasına neden olabilirler. Buna neden olan reaktif karakterli serbest radikaller “oksidan veya prooksidan” olarak tanımlanmaktadır (Mecocive ark. 1997).

Serbest radikaller vücutta oluştuğunda organizmayı oksidatif etkilerden korumak için antioksidan savunma sistemi devreye girer. Vitamin E ve Vitamin C gibi radikal süpürücü antioksidanlar ile vücutta zincirleme radikalite tepkimelerinin önlenmesi önemli antioksidan yöntemlerden biridir (Sönmez Gürer, 2022).

Hidrazon birleşiklerinin antimikrobiyal, antikonvülsan, analjezik, antiinflamatuvar, antiplatelet, antitüberküloz ve antitümoral aktivitelere sahip olduğu araştırmalar sonucunda gösterilmiştir (Rollas ve ark. 2002).

Yapılan bazı çalışmalarda da hidrazon birleşiklerinin kanser üzerindeki biyolojik aktivitelerine bakılmıştır. Kanser hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğaldığı ve bazı türlerinin ölümle sonuçlandığı bir hastalık türüdür. Kanser hastalığının tedavisi için çok sayıda araştırma yapılmaktadır ve çeşitli yöntemler denemektedir (Kayaalp, 1998).

Tüm dünyada her geçen gün kanser tanısı alan hasta sayısı artışı görülmektedir. Aynı durum ülkemizde de görülmektedir. Kanser vakaları geçtiğimiz 30 yılda iki kat arttığına altı çizilmektedir (Ovayolu, 2019).

Bu tez çalışmasında da belirlenen çeşitli hidrazidlerin, heteroaromatikaldehit (Furan-2-karbaldehit ve Piro-2-karboksaldehit) birleşikleriyle tepkimesi sonucu sentezlenen açilhidrazon türevlerinin in vitro antioksidan aktiviteleri, DPPH süpürme kapasiteleri, in vitro antikanser ölçümleri, antimikrobiyal aktivite testleri, DNA hasarı önleyici aktiviteleri gibi aktivite testleri biyokimyasal yöntemlerle incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLER

2.1. Genel Bilgiler

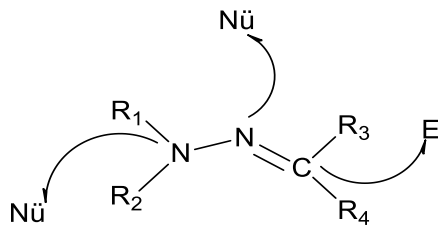
2.1.1. Hidrazonların Genel Özellikleri ve Yapıları

Karbonil bileşiklerin primeraminlerle tepkimesi sonucunda imin yapıları oluşur. Aldehit ve ketonlar hidrazin türevleri asit katalizli ortamda tepkimemeleri sonucunda hidrazon bileşikleri elde edilir (Knepe ve ark. 1997).

Aldazinler ve ketazinlerhidrazinin iki mol karbonil bileşiği ile reaksiyonundan elde edilen hidrazon birleşikleridirler. Bu tip bileşikler karbonil bileşiğinin sonuna azinkelimesi getirilerek; asetonazin [(CH₃)₂C=N-N=C(CH₃)₂] asetaldehitazin (phCH=N-N=CHph) gibi aldazin ve ketazin son eklerini kullanarak adlandırılabilirler (Çakıcı, 2009).

Hidrazid-hidrazon bileşikleri tepkime sırasında ara ürünler olabilmelerinin yanı sıra kendi başlarına çok etkili organik bileşiklerdir. Ara madde olarak kullanıldıkları takdirde bağlanma ürünleri –CONHN=CH-azometin grubunun aktif hidrojen bileşeni kullanılarak sentezlenebilirler (Singh ve ark. 1992).

Hidrazon yapıları birbirine bağlı iki azot atomu ve terminal azot atomunun yalnız elektron çifti ile konjuge bir C=N çift bağı içerirler.



Hidazonlar yapılarındaki karbon zinciri küçüldükçe suda çözünürlükleri artar ve alkil hidrazonlar genellikle sıvı formdadırlar. Fenilhidrazonlar katı olmalarına rağmen alifatik

türevlerin çoğu düşük erime noktasına sahiptir. Azinler yapısındaki moleküller ise genellikle katı formundadır (Şentürk, 2019).

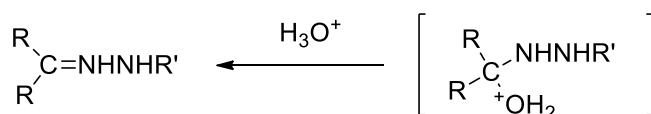
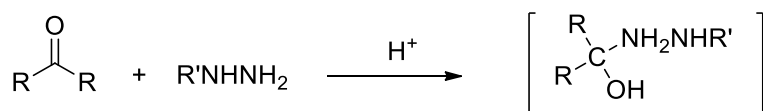
Azot atomunun bazikliği hidrazon oluşumu sırasında çift bağ oluşumundan kaynaklı azalmaktadır. Fenilhidrazonlar ve semikarbazonlar, kendilerini meydana getiren hidrazin ve semikarbazitlere nazaran bazik özelliği çok az olan bileşikleridir (Çakıcı 2009).

Hidrazonbirleşiklerinin yapısında bulunan karbon atomlarının göstermiş oldukları nükleofilik özellik sayesinde daha aktif birleşikle elde edilmektedir. Karbon atomu sayesinde pek çok tepkime rahatlıkla gerçekleşebilmektedir. Literatür çalışmaları incelendiğinde azot atomlarına güçlü nükleofilik ataklar, karbon atomlarına ise zayıf nükleofilik atakların gerçekleştiği rapor edilmiştir (Gül, 2009).

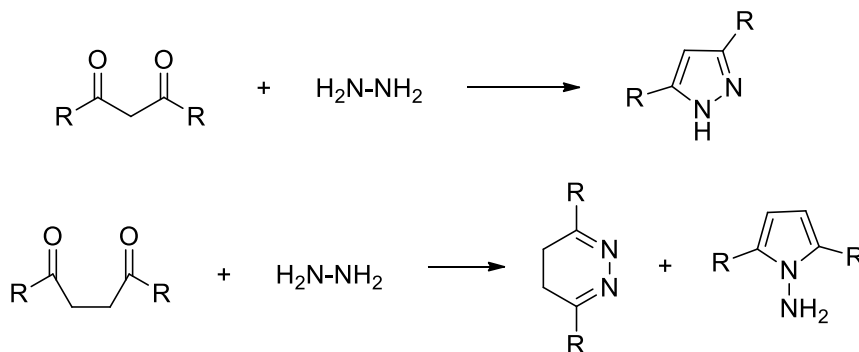
2.1.2. Hidrazonların Sentez Yöntemleri

2.1.2.1. Aldehit ve Ketonların Hidrazinler ile Kondenzasyonu

Hidrazon birleşikleri, aldehit ve ketonların karbonil gruplarının hidrazinlerin katılmasıyla elde edilmektedirler. Hidrazinlere katılma reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için en az bir primer amin fonksiyonu içermesi gerekmektedir. Uç azot atomu üzerindeki serbest elektron çifti polarize haldeyken karbonil grubuna atak yapar, reaksiyon daha sonrasında suyun ayrılmasıyla devam eder (Oveberger, 1966).

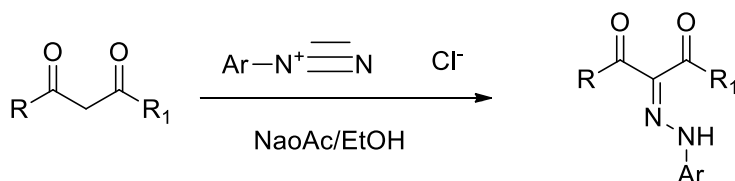


Diketon yapısındaki moleküller hidrazinler reaksiyonu sonucunda halkalı azinleri veya onların izomerik eşdeğerlerini meydana getirirler (Refat ve ark. 2013).



2.1.2.2. Heteroaromatik Diazonyum ve Aktif Metilen Bileşikleri ile Aromatik Tuzlarının Birleşmesi

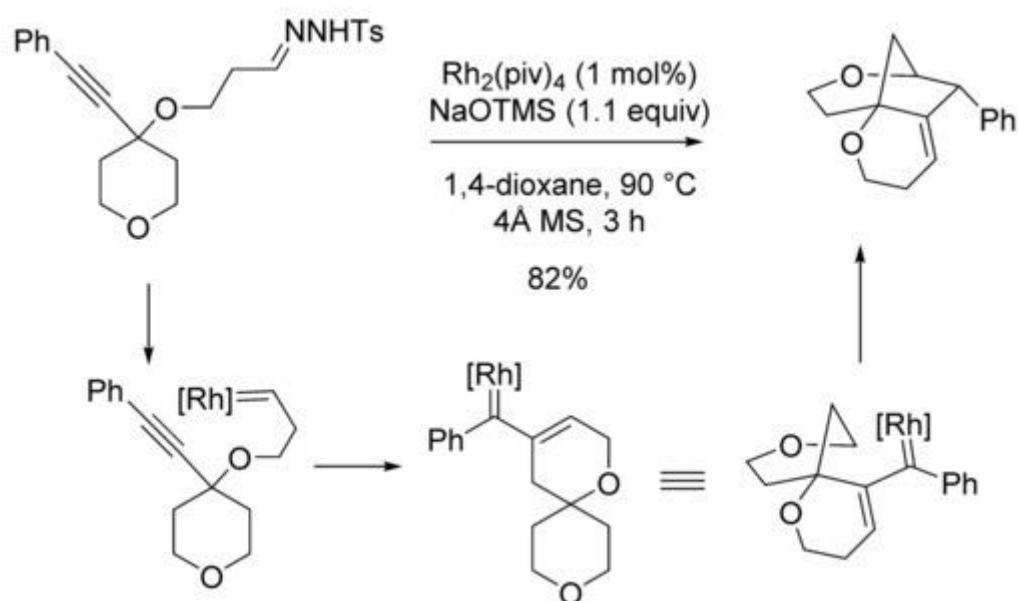
Aromatik ve heteroaromatik diazonyum tuzlarının aktif metilen bileşikleri ile reaksiyonu genellikle ortama baz ekleyerek ve organik çözücü içerisinde gerçekleşir. Reaksiyon genellikle oda sıcaklığında gerçekleşmektedir.



2.2. Hidrazit-Hidrazon Birleşiklerinin Aktiviteleriyle İlgili Yapılmış Çalışmalar

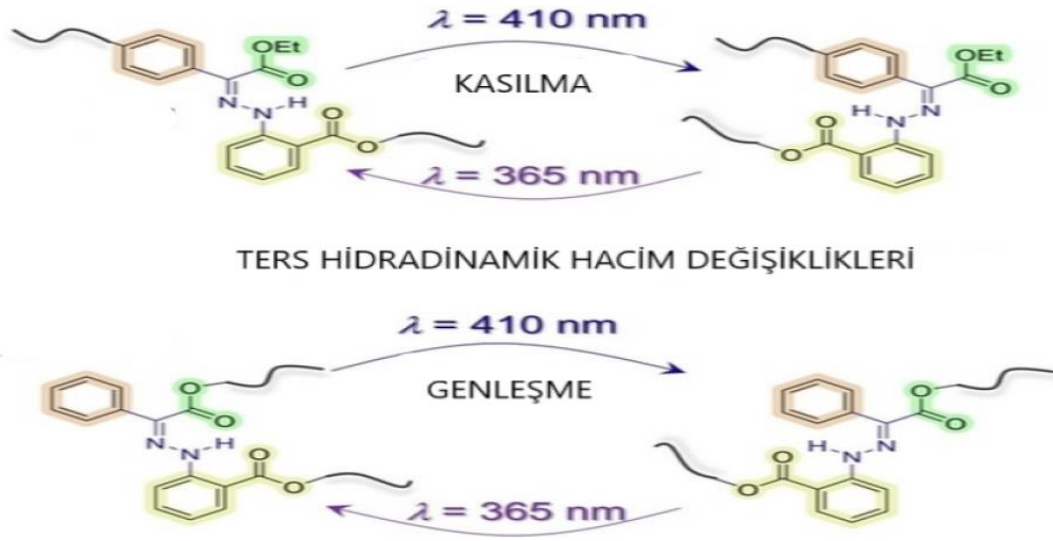
2016 yılında Po-An Chen ve Jeremy A. May, hidrazon ilişkili Cascades reaksiyonlarıyla ilgili bir derleme çalışması literatüre kazandırılmışlardır. Hidrazonlar, aynı süreçte birden fazla dönüşümü gerçekleştiren, kademeli ve tandem reaksiyonların başlatılmasında kullanılan tanıdık fonksiyonel gruplardır. Eschenmoser-Tanabefragmentasyonu ve Shapiro reaksiyonu (Bamford-Stevens reaksiyonunun bir çeşidi), iyi bilinen iki klasik örnektir. Son yıllarda hidrazonlarla başlayan kademeli ve tandem reaksiyonların sürekli gelişimi söz konusudur. Bu çok adımlı reaksiyonların çoğu, reaksiyon sırasında bir hidrazonun bir diazo grubuna dönüşümünü içerir; bu daha sonra dinitrojen ekstrüzyonu yoluyla güçlü bir itici güç sağlar. Hidrazonların çekici yönlerinden biri, bunların diazo bileşiklerine göre önemli ölçüde daha güvenli işlenmesidir. Daha ziyade odak noktası,

hidrazonla başlatılan reaksiyonların çok yönlülüğünü ve bunların birçok farklı reaksiyon mekanizmasıyla uyumluluğunu göstermektedir: Sigmatropik yeniden düzenlemeler, en-yne metatezleri, C–H bağı eklemeleri, ilid eklemeleri ve bağlanma reaksiyonları bunlara örnektir. Bu nedenle, yalnızca gizli diazo grupları olarak kullanılan değil aynı zamanda tek bir reaksiyonda çoklu bağ oluşumu, yeniden düzenleme ve/veya parçalanma için bir başlangıç noktası görevi gören hidrazon örnekleri literatürlerde önem kazanmaktadır (Po-AnChen ve Jeremy A. 2016).



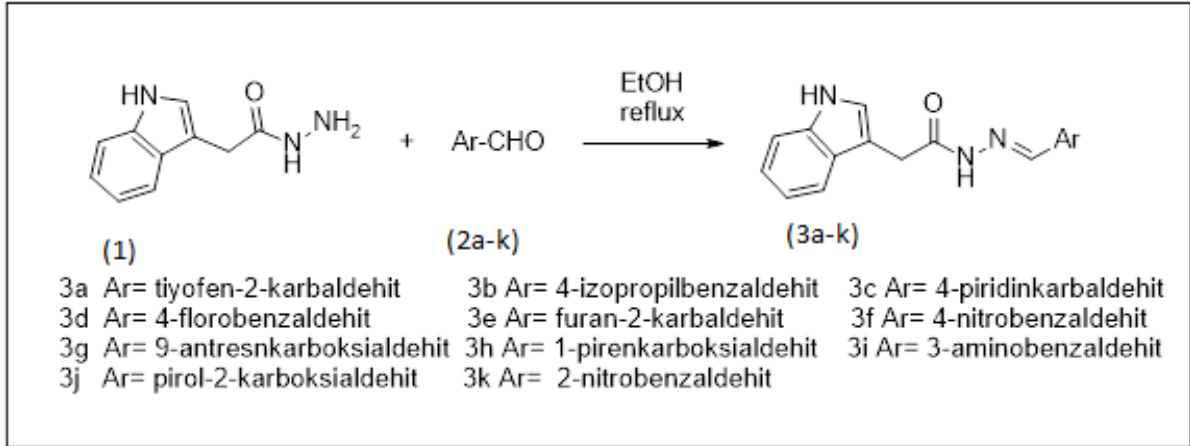
Azo-hidrazon tautomerizmi keşfedildiğinden bu yana pek çok araştırmanın ve hararetli tartışmanın konusu olmuştur. Yalnızca modern spektroskopik yöntemler açık deneysel kanıtlara yol açmıştır. Yapılan bir incelemenin ilk bölümünde spektroskopik yöntemler (U V/VIS, IR, kütle, NMR ve X-ışını kristal yapı analizi) açıklanmakta ve bunun kesinliği daha ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Bu şekilde elde edilen sonuçların Nükleer Manyetik Rezonansın genel olarak uygulanabilir bir araç olduğu ve en güvenilir sonuçlara yol açtığı gösterilmiştir. İkinci bölümde, p-hidroksinzo-benzenler, fenilazonapltoller ve pirazolonlar ve p-diketonların azokuplaj ürünlerinin tautomerizmi üzerine bir araştırma yapılmıştır. İkame edicilerin, analasyonun ve H-bowling'in etkileri özetlenmiştir. Totomerik yapılara ve çözücü maddelere ilişkin çeşitli varsayımlar, göstergeler ve kanıtlar eleştirel bir şekilde tartışılmıştır (Mustroph, 1987).

Hidrazon foto anahtarlarının bir polimer ana zincirine tekrar eden üniteler olarak yerleştirilmesi, foto anahtarın polimer omurgasına kovalent olarak dokunduğu konumun dikkatli bir şekilde tasarlanması yoluyla foto izomerizasyon sonrasında hidrodinamik hacim değişikliklerinin kontrol edilmesine olanak sağladığı rapor edilmiştir (Thai ve ark. 2024).

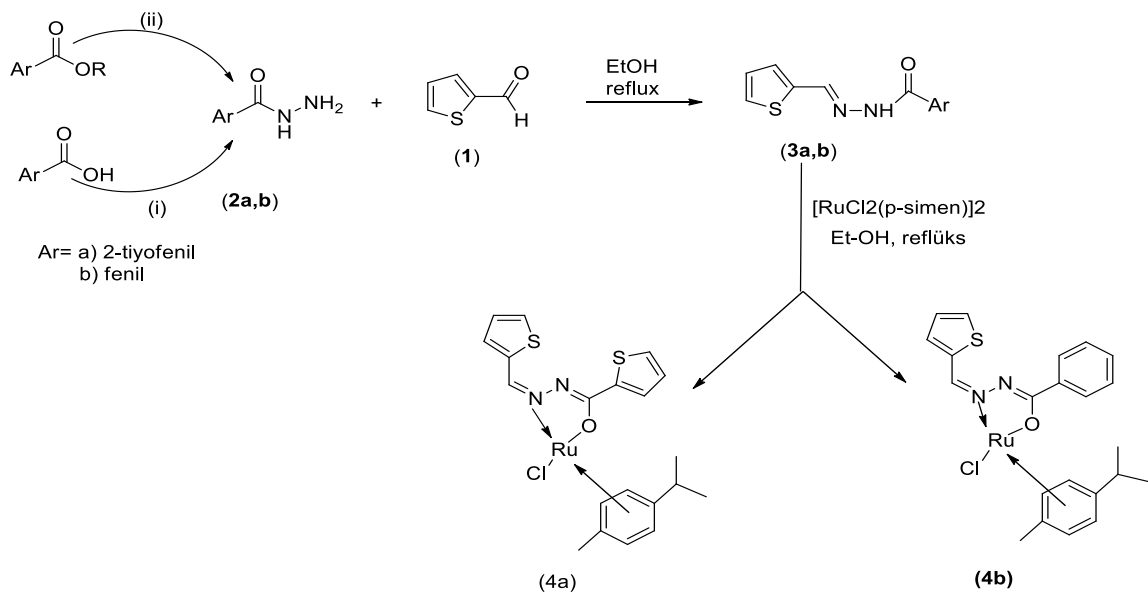


Rapor edilen bir başka çalışmada asetilasyon reaksiyonları, şelasyonun asetilyum iyonu (Bronsted asit katalizi) veya metal kompleksi oluşumu ile bozulmasıyla gerçekleştirildi. Glioksalbis(fenilhidrazon)'un asetik anhidrit ile işlenmesi oda sıcaklığında piridin (seçici O-asetilasyonu için uygun koşullar)sakaritosazonlarmonoasetat elde edildi. Oluşan ürün asetik anhidrit varlığında bir keton analogu ile reaksiyona sokularak biasetilbis(fenilhidrazon) elde edildi (Laszlo, 1985).

Çalışma grubumuz tarafından yapılan tez çalışmasında 1*H*-indol modifiyeli biyoaktif hidrazon türevleri sentezlenerek kimyasal yapıları aydınlatıldı. Nihai ürünlerin *in vitro* antioksidan, *in vitro* antikanser, antimikrobiyal, antifungal, oksidatif stres ve DNA hasarını önleyici aktivite çalışmaları yapılmıştır. Bu türevlerin önemli derecede biyolojik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Yalçın Kayantaş, 2024).



Çalışma grubumuz tarafından 2024 yılında yapılan bir başka tez çalışmasının ilk aşamasında, açilhidrazit bileşiklerinin (1a,b) 2-tiyofenaldehit(2) ile asidik ortamdaki reaksiyonu sonucunda karbohidrazontürevleri (3a,b) elde edildi. Sentezlenen ligantlar $[\text{RuCl}_2(\text{p-simen})]_2$ ile tepkimesi sonucu kompleks yapılar literatüre kazandırıldı. Bu çalışmanın ikinci aşamasında Sentezlenen Rutenyum Komplekslerinin, sulu ortamda 2-Nitroanilin (2NA) ve 4-Nitroanilin (4NA) substratlarının NaBH_4 varlığındaki katalitik hidrojenasyon tepkimesindeki etkinliği incelenmiştir. Herikikompleksin de 2-Nitroanilin ve 4-Nitroanilin'in NaBH_4 varlığındaki hidrojenasyon tepkimesinde etkin katalizör olduğu tespit edilmiştir (Kahraman, 2024)

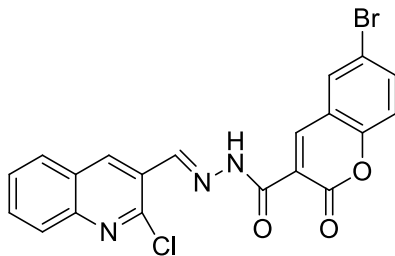


Kanser, vücudun farklı kısımlarını ortaya çıkabilecek halk dilinde kötü hastalık olarak bilinmektedir. Kanser anormal hücrelerin hızlı ve kontrolsüz oluşumuyla birlikte, bu hücreler bir araya gelerek bir tümör oluşturabilmektedir. Oluşan bu tümoral yapılar vücutta yayılarak diğer bölgelerde yayılmaya başlayabilir. Bu süreç kontrol altına alınmazsa ölümlerle sonuçlanabilmektedir. Antikanser ajanları hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Thurston ve ark. 2021).

Yapılan çalışmada hidrazid-hidrazon kısmının nitrojen içeren heterosik yapı içeren birleşiklerin antikanser aktivitesinde çok önemli bir rol oynadığını ortaya koyuldu (Salum ve ark. 2015).

Yapılan bir çalışmada farklı süstitüentler içeren 2-fenilindol-3-karbaldehit kullanarak çeşitli hidrazit-hidrazon yapıları sentezlemişlerdir. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda sitotoksik etkiye bakılmıştır. Elde edilen bazı bileşiklerin ise; MDAMB 231 ve MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde en iyi antikanser etkinliği gösterdiği sonucuna varılmıştır (Vogel ve ark. 2008).

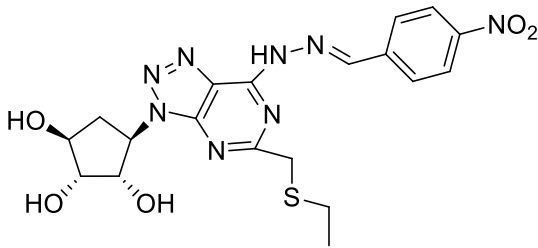
İlaç direnci kanser tedavisi için önemli bir sorundur. Bunun üstesinden gelmek için Nars ve arkadaşları hidrazid-hidrazon kısmı taşıyan on altı kumarin tasarlamış ve sentezledikleri birleşikleri ilaca dirençli pankreas karsinomu (Panc-1) hücrelerine ve ilaca duyarlı (hepatik karsinom; Hep-1) karşı değerlendirmişler. İn vitro 6-bromlu kumarin hidrazid-hidrazon türevleri ve diğer tüm kumarin hidrazid-hidrazon türevleri ile karşılaştırıldığında test edilen tüm hücrelere karşı anlamlı sitotoksik özellik gösterdiğini gözlemlemişler (Nars ve ark. 2014).



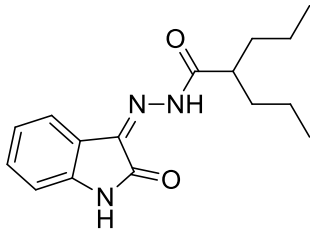
Karaman ve Ulusoy Güzeldemirci yaptıkları çalışmada [6-(4-klorofenil)imidazo[2,1-b]tiyazol-3-il] asetik asit hidrazit bileşiği üzerinden sentezledikleri 2-hidroksifenil yapısına sahip hidrazit türevini, yumurtalık kanseri OVCAR-3, kolon kanseri HCT-15,

böbrek kanseri CAKI-1 ve UO-31, lösemi CCRF-CEM ve SR hücre hatları üzerinde denemiştir (Karaman ve ark. 2016).

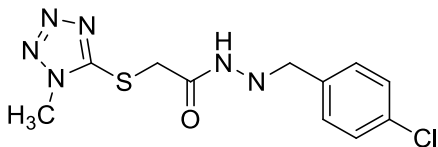
Başka bir çalışmada 8-azapurin karboksilik nükleozithidrazonlar sentezlenmiş ve bu türevlerin Huh-7 insan karaciğer kanseri ve A549 insan akciğer kanseri hücre dizilerine karşı antikanser etkileri değerlendirilmiştir. Gösterilen bileşiğin Huh-7 hücre dizisine karşı aktif olduğu belirlenmiştir (Wang ve ark. 2015).



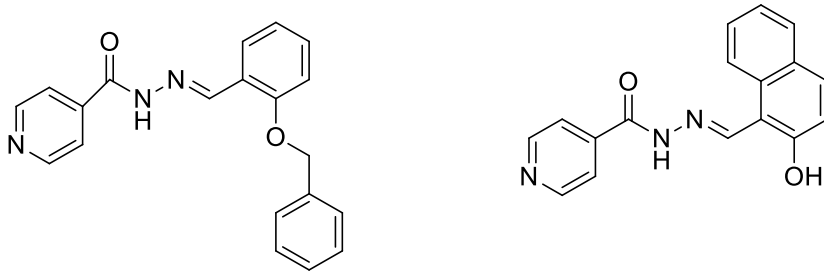
Yapılan başka bir çalışmada çalışmacılar tarafından N'-(2-oksoindolin-3-iliden)-2-propilpentan hidrazit-hidrazon türevleri sentezlenmiş ve bu türevlerin HepG2 insan karaciğer kanseri ve Jurkat lösemi hücre dizileri üzerine antikanser etkileri değerlendirilmiştir. Sentezlenen birleşik, lösemi hücreleri üzerine seçici antikanser etki göstermiştir (El-Faham ve ark. 2015).



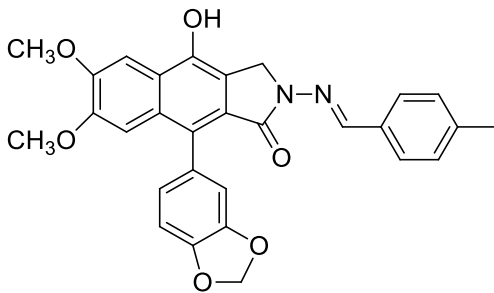
Yapılan diğer çalışmada tetrazol halkası taşıyan hidrazon türevleri sentezlenmiş ve bu bileşiklerin A549 insan akciğer adenokarsinom ve NIH/3T3 fare embriyonik fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Cisplatin (IC₅₀= 0.0316 mM) ile kıyaslandığında sentezlenen birleşimin A549 hücre dizisine karşı bu serideki etkili antikanser ajan olduğu belirlenmiştir (Altıntop ve ark. 2012).



Naveen Kumar ve arkadaşları tarafından izonikotinoilhidrazon türevleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bu bileşiklerin HCT-116 insan kolon kanser hücreleri üzerine antikanseraktiviteleri değerlendirilmiştir. 5-Florourasil ($IC_{50}= 5 \mu M$) ile karşılaştırıldığında, (E)-N'-(2-(benziloksi)benziliden) izonikotinohidrazit ($IC_{50}=3.1\mu M$) ve (E)-N'-((2- hidroksinaftalen-1-il)metilen) izonikotinohidrazit ($IC_{50}=0,29 \mu M$) HCT-116 hücre dizisine karşı kayda değer antikanser etki göstermişlerdir (Naveen Kumar ve ark. 2014).



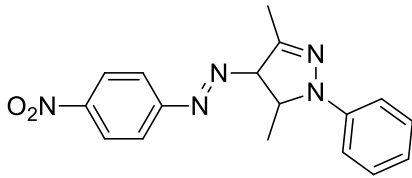
Yapılan başka bir araştırmada benzoizindolinhidrazonlar sentezlenmiştir. Sentezlenen bu bileşiklerin KB oral skuamöz, A549 akciğer ve HCT-116 kolon kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkileri incelenmiştir. Etopozit ($IC_{50}= 13,5 \mu M$) ile kıyaslandığında, sentezlenen bileşiğin özellikle HCT-116 kanser hücre dizisi ($IC_{50}= 5,6 \mu M$) üzerine oldukça etkili olduğu belirlenmiştir (Zhao ve ark. 2010).



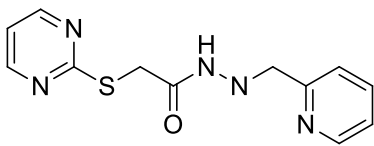
Mikrobiyal kaynaklı hastalıkların artması günümüzde halk sağlığı üzerindeki ciddi olumsuz etkileri bulunmaktadır. İnsanlarda ve hayvanlarda aşırı kullanımı nedeniyle kullanılan çoğu antibiyotiğe karşı bakteriler yavaş yavaş direnç geliştirmektedirler. Bu durum mikrobiyal hastalıklarının tedavisini zorlaştırmaktadır. u dirençle mücadele için acilen yeni ve başarılı ilaçların üretilmesi gerekmektedir. Hidrazonlar ve hidrazidler, önemli biyolojik ve farmakolojik profilleri nedeniyle aktif ilaçların geliştirilmesinde

önem arz etmektedirler. Hidrazonlar, çeşitli araştırmacılar tarafından hastalıklarla mücadele etmek için maksimum etki ve minimum toksisite ile ilaç olarak üretilmektedir.

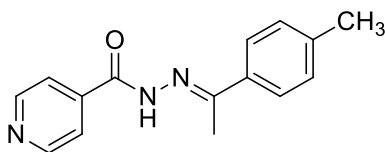
Yapılan bir çalışmada pirimidin ve pirazol türevlerini içeren yeni bir fenilhidrazon dizisini araştırılmıştır. Sentezlenen birleşikleri antibakteriyel aktiviteleri açısından testler yapılmıştır. Hazırlanan türevlerin maksimumu güçlü antibakteriyel aktivite sergiledi. Bunlar arasında sentezlenen bir birleşik 6,25 µg/ml ve 1,56 µg/ml MİK değerleriyle *B. cereus* ve *B. subtilis*'e karşı en umut verici antibakteriyel aktiviteyi göstermiştir (Sing ve ark. 2013).



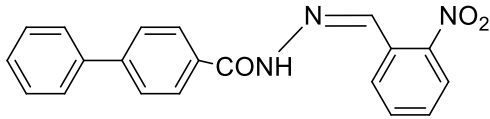
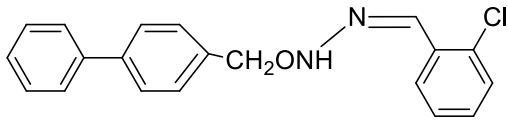
Diğer bir çalışmada bazı yeni pirimidinhidrazon türevlerini araştırılmış ve bunların antimikrobiyal özellikleri *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *S. marcescens*, *S. epidermidis* ve *C. utilis* gibi çeşitli türlere karşı değerlendirilmiştir. Sentezlenen tüm türevler güçlü antimikrobiyal aktivite sergilediği gözlemlenmiştir (Kaplancikli ve ark. 2014).



Cordeiro ve arkadaşları bazı izoniazid türevli hidrazon analoglarını tanımlamış ve bunların *Coccidioidesposadasii*'ye karşı invitroantifungal aktiviteleri açısından test etmiştir. Sentezlenen birleşiklerin çoğu iyi antifungal aktivite sergilediği çalışma sonrasında gözlemlenmiştir (Cordeiro ve ark. 2016).

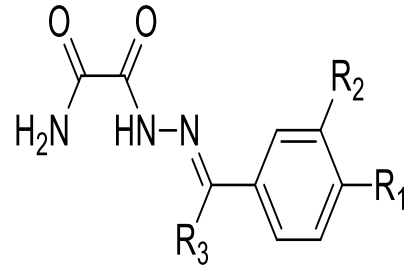
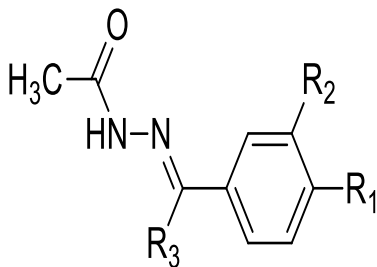


Başka bir çalışmada araştırmacılar yeni bir bifenil-4-karboksilik asit hidrazid-hidrazon analogları dizisi sentezlemişler ve bunları çeşitli yöntemler kullanarak karakterize etmiştir. Bunlar, iki Gram-pozitif bakteri suşuna (*B. subtilis* ve *S. aureus*) ve iki Gram-negatif bakteri suşuna (*P. aeruginosa* ve *E. coli*) ve iki mantar suşuna (*A. niger* ve *C. albicans*) karşı invitroantimikrobiyal aktiviteleri açısından değerlendirildi. Analogların çoğu etkili antimikrobiyal aktivite sergilediği gözlemlenmiştir (Derin ve ark. 2010).



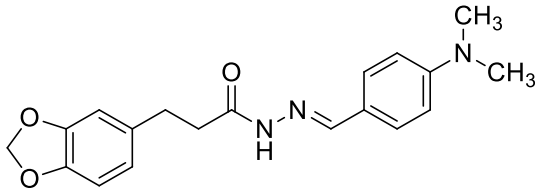
Epilepsi yaygın bir nörolojik hastalıktır. Beyindeki spontan, aralıklı, anormal elektriksel aktivite ile ortaya çıkan sendroma epilepsi hastalığı denir. Son yirmi yıldır yeni antiepileptik ilaçlar klinik uygulamaya girmiştir (Rolas ve ark. 2007).

Yapılan bir başka çalışmada antikonvülzan etkisinin araştırılması için aril aldehitlerin bir dizi asetilhidrazon, oksamoilhidrazon ve semikarbazonlarının ve ilgili bileşiklerin sentezi rapor edilmiştir. Biyolojik sonuçlar genel olarak asetilhidrazonlar konvülsiyonlara karşı iyi koruma sağladığını, oksamoilhidrazonlar ise önemli ölçüde daha az aktif olduğunu ortaya çıkardı (Dimmukt ve ark.2000).

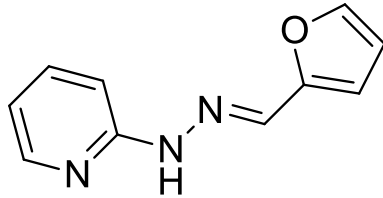


Antiinflamatuvar etkisi gösteren birleşklerinflamasyonu ve inflamasyon bölgelerindeki ödemi azaltılmasında rolalmaktadırlar. Antiinflamatuvar etkili birçok ilaç bulunmaktadır. İnflamasyonu azaltarak ağrıyı azaltmayı amaçlarlar.

Yapılan bir diğer çalışmada yeni sentezlenen 2-piridilarilhidrazon analjezik, antiinflamatuvar ve anti-trombosit olarak farmakolojik etkileri araştırılmıştır. N-heterosiklik türevlerin bu sınıfı, analjezik ve antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Sentezlenen piridinhidrazon türevlerinin antiinflamatuvar ve analjezik aktivitelerinin muhtemelen araşidonik asit metabolizması üzerindeki bir müdahaleden kaynaklandığını göstermekterilmiştir. En önemli antiinflamatuvar türev olan 2-(2-formilfuran)piridilhidrazon 80,1 µmol/kg dozunda plöreziyi %79 oranında inhibe etmiştir (Todeschini ve ark. 1998).



Yapılan bir çalışmada N-açılarilhidrazon (NAH) sınıfına ait yeni bir dizi antinosiseptif bileşik, doğal safrolden sentezlendi. Tüm N-açılarilhidrazon türevlerinin analjezik profilinin değerlendirilmesi klasik asetik asitle indüklenen farelerde karın daralma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. [(4'-N,N-Dimetilaminobenziliden-3-(3',4'-metilendioksifenil)popiyonilhidrazin], dipirondan daha güçlüydü ve indometazin standart antiinflamatuvar/antinosiseptif ilaçlar olarak kullanılmaktadır (Lima ve ark. 2000).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Materyaller

- Tartım için; GecAvery ve Chyo JL 180 model terazi,
- ^1H -NMR spektrumu için Bruker 400 MHz ^1H -NMR spektrometre (Fırat Üniversitesi, Elazığ),
- IR spektrumları için Thermo FT-IR spektrometre (Fırat Üniversitesi, Elazığ),
- ^{13}C -APT NMR spektrumu için Bruker 100 MHz ^{13}C -NMR spektrometre (Fırat Üniversitesi, Elazığ),
- Elektro-Mag M 50 model etüv.
- Cam malzeme olarak; damlatma hunileri, soğutucular, ayırmahunileri, huniler, farklı büyüklükte balonlar, büretler ve kılcal borular, erlenmayerler, beherler,
- Vakum pompası,
- CaCl_2 kurutma tüpü
- Soğutucu olarak; Kriostat, tuz-buz banyoları,
- Termostat
- Erime noktası tayin cihazı (Stuart SMP50),
- 100 ve 360 °C'lik termometreler
- Desikatör
- Döner buharlaştırıcı,
- Manyetik ve mekanik karıştırıcılar,

3.2. Kullanılan Kimyasallar

- Sodyum hidroksit,
- Potasyum hidroksit.
- Hidroklorik asit,
- N'-(furan-2-ilmetilen)-1H-indol-7-karbohidrazit,
- Kurşun asetat,

- N'-(furan-2-ilmetilen)tiyofen-2-karbohidrazit
- 2-Kloro-N'-(furan-2-ilmetilen)benzohidrazid
- N'-(furan-2-ilmetilen)-3-metoksibenzohidrazit
- Furan-2-karboksialdehit
- N'-(furan-2-ilmetilen)benzohidrazit
- N'-(furan-2-ilmetilen)-2-hidroksibenzohidrazit
- N'-(furan-2-ilmetilen)izonikotinohidrazit
- N'-((1H-pirol-2-il)metilen)-2-klorobenzohidrazit
- Pirol-2-karboksialdehit,
- N'-((1H-pirol-2-il)metilen)-3-hidroksi-2-naftohidrazid
- Etanol,
- Metanol,
- Petrol eter,
- Dioksan,
- Dietileter,
- N'-((1H-pirol-2-il)metilen)izonikotinohidrazit,
- Aseton,
- N'-((1H-pirol-2-il)metilen)-1H-indol-7-karbohidrazid,
- Kloroform

3.3. Saflaştırma

Deneyde kullanılan bütün kimyasallar ve çözücüler literatürde yer aldığı gibi saflaştırılmıştır (Erdik, 1987; Fessenden, 1992).

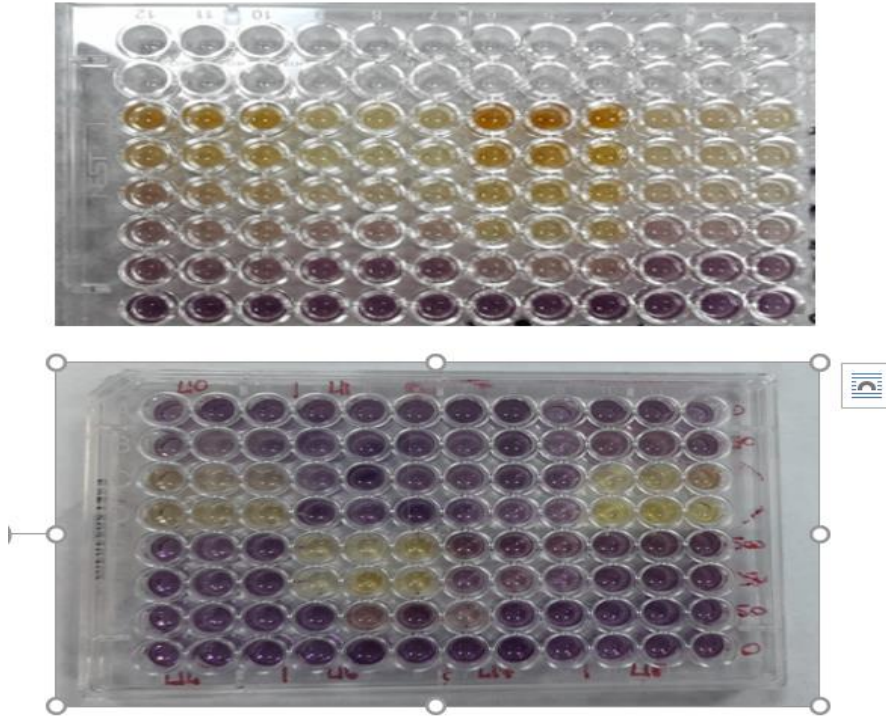
3.4. Biyolojik Aktivite Analizleri

3.4.1. İn Vitro Antioksidan Aktivite İçin Difenilpikrilhidrazil (DPPH) Radikali Süpürme Aktivitesi:

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen kararlı organik azot atomu radikalidir. (VIS) 517 nm'de görünür alanda maksimum absorbanza sahiptir

(Huang et al. 2005; Albayrak et al. 2010; Uzunhan ve Çelik 2014). Molekülde bulunan bir serbest elektronun yer değiştirmesi sonucunda menekşe rengi gözlemlenmektedir. DPPH solüsyonu hidrojen sağlayıcı bir başka deyişle antioksidan raktif ile tepkimeye girdiğinde menekşe renkli indirgenmiş formu elde edilir (MacDonald-Wicks et al. 2006; Scalzo 2008; Albayrak vd 2010). Serbest radikal DPPH• metodu (Cuendet vd. 1997), pratik ve güvenilirliği yüksek ve literatürde en sık başvurulan antioksidanların serbest radikalini giderme kapasitesini belirleyen bir yöntemdir. DPPH• yapısal olarak kararlı bir azot atomu içermekte olan ticari bir üründür. DPPH•'ın etil alkol içerisinde 517 nm absorbanansa mor renk verir. Bu çözeltiye antioksidanların eklenmesi ile indirgenme tepkimesi sonucunda sarı renk oluşur. Reaksiyonun takibi spektrofotometre ile izlenir (Frankel ve Meyer, 2000; Eren, 2011)

Hem kararlı serbest radikal olarak hem de ticari olarakta bulunabilen DPPH molekülünün elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan maddelerinin varlığında, bu kimyasallar tarafından süpürülmesi ile karakteristik mor rengin değişiminin spektrofotometrik olarak ölçüm sonuçlarıyla antioksidan aktivite özellikler tespit edildi (Cuendet et al. 1997). Senezlenen nihai hidrazon bileşikleri, damla damla 0,1 M Sodyum hidroksit ilavesiyle etil alkol içerisinde farklı derişimlerde hazırlanarak DPPH'ın seyreltik metanol çözeltisiyle (%0,004) karıştırılarak 30 dk inkübe edildi ve 517 nm dalga boyunda Elisa spektrofotometrede (Epoch) absorbanları ölçüldü (Şekil 3.1). Sonuçlar, ortalama ± standart sapma olarak alındı ve istatistiksel değerlendirme ve hesaplamalarda GraphPad Data Analysis programı kullanıldı. Pozitif kontrol olarak BHT, askorbik asit kullanıldı ve herbir maddenin IC₅₀ değeri hesaplandı. 2,2-difenilpikrilhidrazil Radikali yakalama aktivitesini karşılaştırmak için, % İnhibisyon = [(AKontrol – ANumune) / AKontrol] x 100 formülü kullanıldı.



Şekil 3.1. DPPH• analizi sırasında 96 wellplate görünümü

3.4.2. Antikanserojen Aktivite Analizleri:

3.4.2.1. Hücre Hatları

Deneylerimizde Meme Kanseri Hücre Hattı (MCF-7), ve kolorektal kanser (SW620 colorectal cancer) hücre hatları kullanıldı. Sağlıklı hücre olarak fibroblast hücreleri olan L929 hücre hattı kullanıldı.

3.4.2.2. Hücre Açma Protokolü

Donmuş halde cryo tüpte bulunan hücreler su banyosu üzerinde buharın etkisiyle çözüldü. Hücreler falkonlara aktarılarak üzerlerine 20 mL DMEM konularak, falkonlar 5 dakika 800 rpm de satrifüjlendi. İşlem sonunda üst katmandaki sıvı atıldı. Falkonda kalan hücrelerin üzerine 15 mL DMEM eklenerek ortam 75'lik flasklara aktarıldı. Flaskın içerisine 5 mL FBS vebirkaç damla antibiyotik konuldu. Flaskın kapağı kapatılarak, CO₂ inkübatöre kaldırıldı. Flasklar içerisine gerekli solüsyonlar konulduğunda hücreler inkübatörde hızlı bir şekilde büyüdüğü ve sayılarının arttığı görülür. Bununla birlikte flask içerisinde besiyerleri azalır ve hücre ölümleri başlar. Hücre ölümlerinin önüne geçmek

için belirli aralıklarla hücrelerin bakımı yapılmaktadır. Eğer hücreler flaskın tamamını kaplamamış ve içerisinde bulunan besiyerinin rengi değişmişse yıkama işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem flow kabinde yapılmalıdır. Bunun için çalışmalarımız esnasında, 75'lik flaskta bulunan ortam boşaltıldı. Flaskın içerisine 15 mL DMEM konuldu. Flaskın içerisine 5 mL FBS eklendi ve üzerine 3-5 damla L- Glutamin ilave edilerek flask inkübatöre kaldırıldı.

3.4.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücre ölümlerinin gerçekleşmemesi için flask içerisinde çoğaltılmalıdırlar. Hücreler flaskın bütün yüzeyini kapladığı anda yeni bir flaska pasajlanması gerekmektedir. Eğer yeni flaska pasajlanmazsa hücreler besin yetersizliği ve alan darlığı nedeniyle kontamine olmaya başlayacak ve kısa bir süre sonra da ölecektir. Pasajlama işlemi için, flaskta bulunan ortam boşaltıldı. Flaska 5 mL Tripsin konuldu. Hücreler yüzeye, yapılarında bulunan proteinler aracılığı ile tutunarak yapıştılar. Tripsin proteaz kaynaklı tipik bir enzim olduğundan flaska yapışan hücrelerin proteinlerini parçalayarak ortamdan ayrılmasını sağlar. Tripsinin üzerine 15 mL DMEM konuldu. Bir flask yeni bir flask olacak şekilde pasajlama yapıldı. Flaskın içerisinde toplam 20 ml ortam bulunduğundan eski flasktan 10 mL çoklu pipet yardımıyla alındı ve yeni flaska aktarıldı. Bütün flaskların içerisine 8 mL DMEM konuldu. Flaskların tamamına 4 mL FBS eklendi ve içlerine birkaç damla L-glutamin konularak flasklar inkübatöre kaldırıldı.

İncelenecek hücreler tripan mavi ile boyanarak, thoma lamı ile sayım yapıldı. Bu boya, canlı hücreler tarafından dışa atılırken ölü hücreleri koyu mavi renge boyamaktadır. Sayım işlemi aşağıda belirtilen basamak sırasıyla gerçekleşmiştir.

- 1) Çözünen hücreler, içerisinde 1:1 oranında olacak şekilde besiyeri bulunan steril 15mL'lik falkona aktarıldı.
- 2) 50 pl hücre, 50 pl tripan mavi ile birlikte mikrofütüpüne konuldu. Tüpte hafifçe pipetaj yapıldı. 50 pl hücre /tripan mavi karışımı pipet ile çekildi. 20 mikrolitresi kılcal hareket ile lamele emdirilerek lamın her kenarına yayıldı.

3) Thoma lamı fazkontrastinverted mikroskoba yerleştirildi. 1 mm'lik alandaki 16 karedeki canlı hücrelersayıldı. Toplam hücre sayısına göre hücreler flaska alındı. Uygulamalarımızda bu oranlar düşünülerek pasajlamalargerçekleştirildi.

3.4.2.4. Hücrelerin Ekilmesi

Literatüre uygun bir şekilde yapıldı (Kayantaş D, 2024)

3.4.2.5. Hücelere Etken Madde Uygulanması ve MTT testi

InvitroSitotoksisite için 96 wellplate'eMCF-7, L929 ve SW620 hücreleri 7500 hücre/ml olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin tutunması için 24 saat beklenmiştir. Süre sonrasında besiyeri uzaklaştırılarak 0.01, 0.05, 0.1, 1, 10 μ M derişim aralığında yeni sentezlenen 3a-3l kodları ile işaretlenmiş olan 12 adet test bileşikleri serisi olarak ilaç adayı kompleksler ve kontrol olarak da DMSO uygulanmıştır. 24 saat sonrasında büyüme ortamı uzaklaştırılmış ve her bir kuyulara 5 mg/L MTT reaktifinden 100 μ L eklenmiştir. 4 saat inkübasyon sonrasında MTT çözeltisini içeren besiyortamı uzaklaştırılmış ve her bir kuyuya 100 μ L DMSO eklenmiştir. 570 nm'de okuma alınmış (Şekil 5) ve yaşayan hücre sayısı % olarak aşağıda verilen eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır. % yaşayan hücre sayısına karşı konsantrasyon grafiği çizilerek komplekslerin IC50 değeri ayrı ayrı belirlenmiştir. Okumalar 5 tekrarlı yapılmış (Subaşı ve ark. 2020)

MTT'nin içerisinde tetrazolium tuzu bulunmaktadır. Canlı hücrelerin tespiti için bu tuz metabolik aktiviteye sahip olan hücreler tarafından formazana dönüştürülerek yapılmaktadır. MTT suda çözünme özelliğinesahip bir formazan tuzudur. Tetrazolium halkasının dehidrojenaz ile parçalanması sonucunda MTT formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin sahip olduğu mitokondriler aracılığı ile olmaktadır (Mosman 1983; Doyle and Griffiths 1998).

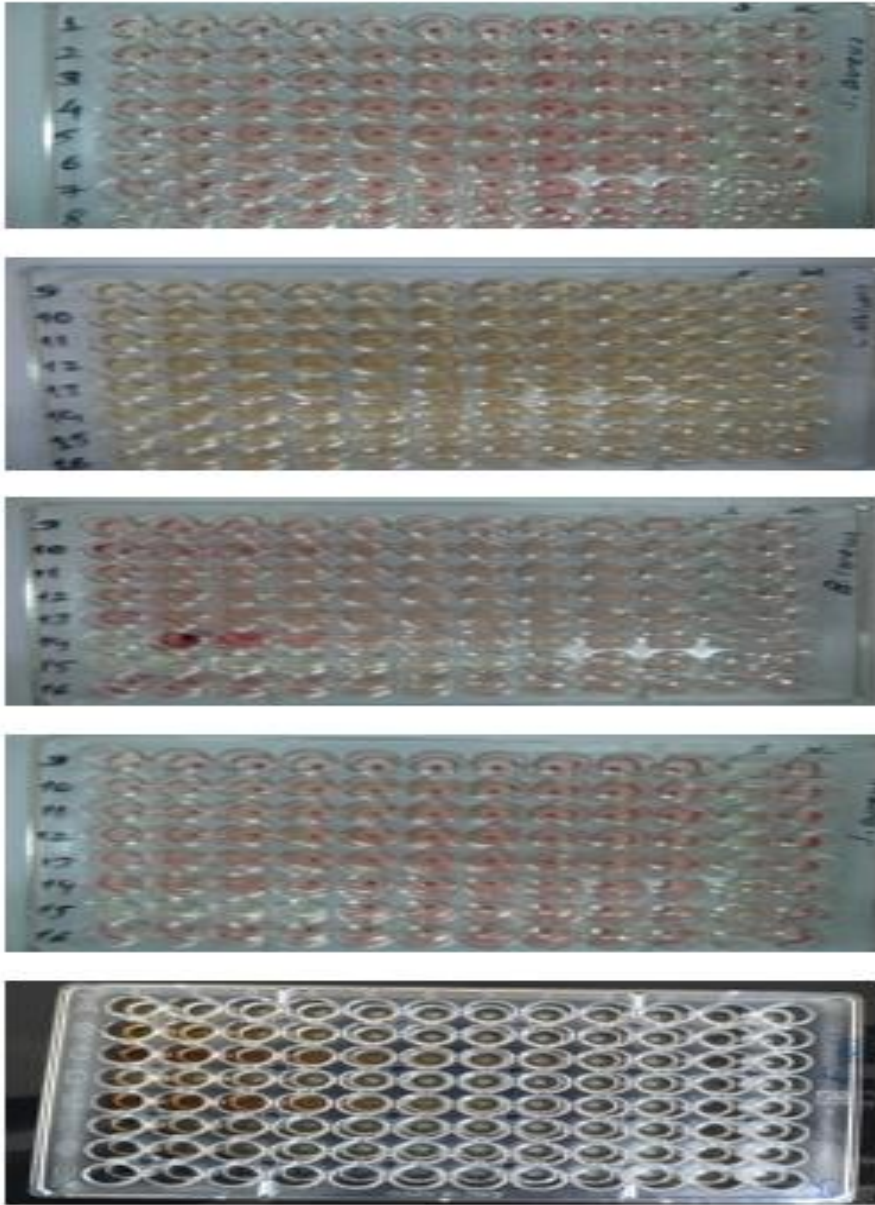
3.4.2.6. Hücrelerin Görüntülenmesi

İnkübasyon sonrasında, Zeiss Axio inverted mikroskop (10x)'lu görüntüleme sistemi kullanılarak hücre büyüme performanslarının fotoğrafları çekildi. Yaşayan ve büyüyen

hücrelerin sayısının belirlenmesi için metilen mavi boyası kullanıldı. Hücreler % 1 SDS içeren PBS tamponu içinde izole edildi ve metilen mavisi solüsyonu ile boyandı. 2×10^4 hücre 24 well plakanın her bir kuyusuna ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından 3a-1 kodlu moleküller IC50 değerleri kadar uygulanmıştır. Kontrol grubunda sadece RPMI vardır. 24 saat inkübasyon sonrasında hücre morfolojileri floresans mikroskobu (parlak alanda) 10X ve 20X büyütmelede görüntülenmiştir.

3.4.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Bu tez çalışması kapsamında belirlenen test bileşiklerinin (3a-1) incelediğimizde antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri, Mikrodilüsyon Broth yöntemi (Eloff, 1998) kullanılarak, Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin bulunması ile değerlendirildi. Test edilen mikroorganizmalar olarak *Staphylococcus aureus*, *Escherichiacoli*, *Pseudomonasaeruginosa*, *Bacillus cereus* ve *Candidaalbicans* örnekleri kullanıldı. Bakteriyal suşlar gece boyunca (overnight) 37 °C'te MuellerHintonAgar (Accumix® AM1072) besiyeri içinde kültüre edildi. Mantar örnekleri ise gece boyunca 30 °C'te Sabouraud Dextrose Agar (Himedia ME033) besiyeri içinde kültüre edildi. 96'lık mikrolitre plakalarının ilk sırasındaki kuyucuklara 90 µl, diğer kuyucuklara 50'şer µl besiyeri eklendi. 11. Sıradaki kuyucuklar sterilite kontrol olarak kullanıldı ve 100 µl besiyeri eklendi. 12. Sıradaki kuyucuklar ise üreme kontrol olarak kullanıldı. İlk sıradaki kuyucuklar üzerine 10 µl ekstre eklendi ve seri sulandırma işlemi yapıldı. MHB Kanlı agar besiyerinde üreyen mikroorganizmalardan öze ile alınarak mikroorganizmalardan McFarland 0.5 bulanıklığında süspansiyon hazırlandı. Bakteriler için 5×10^5 CFU/mL, *Candidaalbicans* için $0.5-2.5 \times 10^3$ CFU/mL olacak şekilde her kuyucuğa 50 µl mikroorganizma süspansiyonu eklendi. Bakteri eklenen plaklar 37 °C'de, *Candidaalbicans* eklenen plaklar 35 °C'de 16-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üremenin görünür hale gelmesi için her kuyucuğa 50 µl 2 mg/ml 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Merck, Germany) eklendi ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Testler 3 tekrarlı olarak yapıldı. Renk değişiminin olmadığı ilk kuyucuklar MİK değeri olarak kabul edildi.



Şekil 3.2. Mikroplate içinde minimum inhibisyon konsantrasyon testi

3.4.5. Fibroblast (L929) Hücre Kültüründe Yeni Sentezlenen Bileşiklerin Uygulanmasıyla Birlikte Hücrelerin Oksidatif Stresinin Tespit Edilmesi

Çalışmamız kapsamında farklı konsantrasyonlarda sentezlenen bileşikler (**3a-1**) L929 hücre hattına uygulanması sonucu, en etkin test bileşiği konsantrasyonunun da sağlıklı fibroblast hücrelerinde oluşan değişimlerin bazı biyokimyasal parametreler ve analiz kitleri kullanılarak belirlenmesi amaçlandı. Araştırmamızda sentezlediğimiz türev bileşiklerinin, fibroblast hücrelerindeki lipid peroksidasyonunun son ürünü olan

malondialdehit (MDA) düzeyinin belirlenmesi vetiyol düzeylerinin tayini şeklinde analizler yapıldı. RelAssay marka ticari kitler kullanılarak sentezlenen açilhidrazon mleküllerinin (**3a-1**), TAS, TOS, OSİ nindeğişimi incelendi. Biyokimyasal parametrelerin analizlerinin yapılabilmesi için, hücre kültürleri üzerinde test bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla birlikte, öncelikle hücre numunelerine 1/9 (v/v) oranında fosfat tamponu (pH=7,4; 50 mM) eklendikten sonra soğutuculu ortamda homojenizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Homojenizasyon işeminden elde edilen örnekleri, 15 dakika 3000 rpm de santrifüjlenerek biyokimyasal analizler süpernatantlar hazırlandı.

3.4.5.1. Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Analizi

Lipit peroksidasyon sonucu oluşan MDA düzeyleri literatüre uygunbir şekilde belirlendi (Dastan et al. 2014).

3.4.5.2. Toplam Antioksidan Seviye (TAS) Analizi

L929 hücre kültürlerinde yeni sentezlenen nihai türevlerinin uygulanmasıylabirlikte oluşan TAS, (Erel, 2004) tarafından geliştirilen yöntemle belirlendi.

3.4.5.3. Toplam Oksidan Seviye (TOS) Analizi

L929 hücre kültürlerindeki TOS, tam otomatikkolorimetrik ölçüm yöntemi kullanılarak literatüre uygun bir şekilde belirlendi (Erel, 2005).

3.4.5.4. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Analizi

Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) belirleyebilmek için Total Oksidan Seviye (TOS)'nin, Total Antioksidan Seviye (TAS)'ye oranlanması gerekmektedirve bu oran, Total Oksidan Seviye (TOS)/Total Antioksidan Seviye (TAS) şeklinde gösterilmektedir (Harma et al. 2003). Hesaplamalar yapılırken öncelikle, TAS değerleri pmol/l' ye çevrildi.

3.4.5.5. DNA Hasarını Önleyici Aktivite

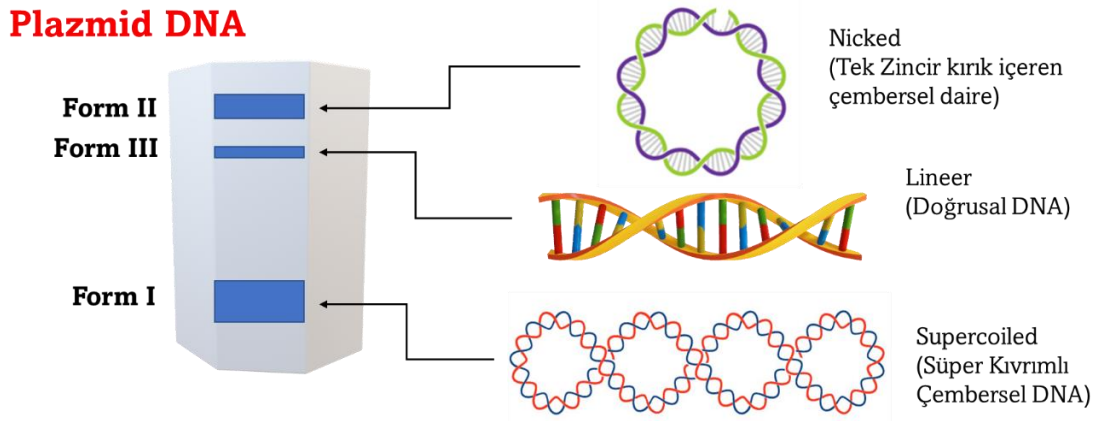
Yeni sentezlenmiş ya da saflaştırılmış bir etken maddenin, türev bileşiğın DNA hasarının önlenmesindeki etkisinin belirlenmesinde veya DNA koruyucu aktivitelerin belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılsa da tüm laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan en basit yöntemlerden biri jel elektroforezidir(Sönmez Gürer, 2022). Agarozjel elektroforez tekniğı, çeşitli amaçlarla izole edilen DNA ve RNA'ların tanımlanması, hangi formda olduklarının belirlenmesi, boyutlarının belirlenmesi ve özellikle değışiklikler sonrası elde edilen yeni formların incelenmesi açısından moleküler genetik alanında önemli bir deneysel sistemdir (Takım, 2010).

Plazmit DNA'sının üç formu vardır:

- i) Süper sarmal (süpercoiled, DNA üzerinde kırık zincir yoktur ve çok yoğun dairesel komplekstir, Form I);
- ii) açık dairesel (DNA zincirlerinden birinde kırık bir zincir var ve DNA molekülü hala dairesel DNA, Form II);
- iii) lineer (DNA dubleks zincirinde iki kırık zincir vardır, yani dairesel değildir, lineer çift gerilmiş DNA'ya dönüşür, Form III)

Agaroz Jel Elektroforezinde bu formlar farklı hızlarda hareket eder (Takım, 2010). Form I, yük yoğunluğunun azlığı ve küçük hacmi nedeniyle jelde en hızlı hareket eder. Form II biraz daha yoğun olduğu için daha yavaş hareket eder. Form III, Form I ve Form II arasında bir hacimde olduğu için her iki bandın arasında bir seviyede konumlanır (Takım, 2010).

Bu yönteme göre, bitki ekstrelerinin DNA hasarını önleme yeteneğı, DNA'ya zarar veren faktörler olan hidrojen peroksit (H₂O₂) ve UV ışığı varlığında değerlendirilmiştir. Form I, sağlam kovalent olarak kapalı dairesel formdadır ve hızlı hareket eder. Eğer bir zincir üzerinde değışiklik meydana gelirse, süper-sarmal form, daha yavaş hareket eden bir açık dairesel form II oluşturmak için gevşeyecektir. Her iki çift zincir de herhangi bir faktör tarafından bölünürse, form I ve form II arasında geç eden lineer form III oluşmaktadır.



Şekil 3.3. Plazmid DNA formları

Türev bileşiklerin (3a-1), DNA'yı UV ve oksidatif kaynaklı hasarlardan koruma etkinliklerinin tespiti için pBR322 plazmit DNA'si (Thermo) kullanıldı. Plazmit DNA'si, ekstraların varlığında H₂O₂ ve UV uygulamasına maruz bırakılarak hasar oluşmasına çalışıldı. Russo vd. (2000) tarafından belirlenen metotta bir miktar değişiklik yapılarak Takım (2010) ve Berk (2012) tarafından optimize edilen yöntem kullanıldı (Sönmez Güner, 2022; Berk, 2012; Takım, 2010; Russo vd., 2000) %1,5'lik agaroz jel hazırlanarak, DNA bantlarının görüntülenmesine çalışıldı.

DNA koruyucu aktivite için türev bileşiklerden 100 mikromolar stok derişimler hazırlanması yoluna gidildi. Stoğun tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra seyreltme işlemi gerçekleştirildi.

Plazmit DNA'sında hasar oluşturma ve bitki ekstralarının etkisinin incelenmesi için: 2 ml'lik eppendorf tüpler sırasıyla etiketlendi ve içlerine aşağıdaki bileşenler konularak deney prosedürü uygulandı.

Tablo 3.1. DNA hasarına karşı sentezlenen bileşiklerin aktivitelerinin belirlenmesi deneyi.

Numune	Plazmit DNA (pBR322)	Distile su dH ₂ O	H ₂ O ₂	UV	Stok türev bileşik çözeltileri (3a-1)
1. Kontrol	3 µl	6 µl			
2. Kontrol	3 µl	6 µl		5 dk	
3. Kontrol	3 µl	6 µl	1µl	5 dk	
4. Kontrol	3 µl	6 µl	1µl		
Sentez bileşikler (3a)	3 µl	-	1µl	5 dk	5 µl (3a)
Sentez bileşikler (3b)	3 µl	-	1µl	5 dk	5 µl (3b)
Sentez bileşikler (3c)	3 µl	-	1µl	5 dk	5 µl (3c)
Sentez bileşikler (3d)	3 µl	-	1µl	5 dk	5 µl (3d)
Sentez bileşikler (3e)	3 µl	-	1µl	5 dk	5 µl (3e)
Sentez bileşikler (3f)	3 µl	-	1µl	5 dk	5 µl (3f)
Sentez bileşikler (3g)	3 µl	-	1µl	5 dk	5 µl (3g)
Sentez bileşikler (3h)	3 µl	-	1µl	5 dk	5 µl (3h)
Sentez bileşikler (3i)	3 µl	-	1µl	5 dk	5 µl (3i)
Sentez bileşikler (3j)	3 µl	-	1µl	5 dk	5 µl (3j)
Sentez bileşikler (3k)	3 µl	-	1µl	5 dk	5 µl (3k)
Sentez bileşikler (3l)	3 µl	-	1µl	5 dk	5 µl (3l)

Yeni sentezlenen türev bileşiklerin olduğu tüpler, 3. ve 4. tüpler ile birlikte 5 dk süresince UV ışınlarına maruz bıraktıktan sonra 2.0 µl yükleme tamponu eklenerek %1,5'lik agaroz jele yüklendi. Işık kaynağı olarak oda sıcaklığında 302 nm dalga boyunda ve 8000 µW/cm² yoğunlukta ışık üreten UV translüminatör cihazı kullanıldı. Bu test sisteminde UV ışığına maruz bırakılarak ortamda bulunan H₂O₂' nin OH radikaline parçalanması ve plazmit DNA' da hasar oluşturması ve yeni sentezlenen bileşiklerin koruyucu özelliğinin ortaya çıkarılması hedeflendi.

Agaroz jelin hazırlanması aşamasında aşağıdaki prosedür uygulandı: 1. Elektroforez cihazına ait plastik plaka ile bir kalıp oluşturuldu ve plaka yatay konumda, düzgün bir yere yerleştirildi. Örnek sayısına uygun olacak şekilde tarak plastiği yerleştirildi. Agaroz (1,5 g), 250 mL'lik bir erleniçerisinde bulunan 100 mL 1x Tris Borik asit EDTA (TBE) tamponuna ilave edildi ve erlenagaroza eriyene kadar mikrodalga fırında tutuldu. Daha sonra 1.5 µletidyum bromür (10 mg/mL) ilave edildi ve karıştırıldı. Agaroz çözeltisi, tarak yerleştirilmiş plastik plakaya döküldü. Örneklerin agaroz jele yüklenmesi, jelin yürütülmesi ve görüntülenmesi aşamalarında aşağıdaki prosedür uygulandı:

UV' den çıkarılan eppendorf tüplerine 5 µl yükleme tamponu (6x loading dye) ilave edildi. Tarak aparatının çıkarılmasıyla oluşan jelin kuyucuklarının elektroforez tamponu ile iyice temas etmesi, doldurulması sağlandı. Bu işlem sırasında jelin üzerini kaplayacak şekilde 1x TBE tamponu olmasına dikkat edildi. Hazırlanan DNA örnekleri uygun bir pipet ile tampon dolu kuyucuklara dikkatlice yüklendi. Tankın kapağı kapatıldı ve elektrik bağlantıları yapıldı. Elektroforez 40 V'ta 500 mA akım uygulanarak 3 saat süreyle yürütüldü. Agaroz jel, fotoğrafını çekerek, DNA bantlarının incelenmesi amacıyla UV transilluminatör cihazı üzerine alındı. Burada jele, alttan ultraviyole ışık verilerek, etidyumbromidin bağlandığı DNA fragmentlerinin gözle görülmesi sağlandı. Ve etidyumbromid floresan bir madde olup ultra viyole (UV) ışık altında ışımaya yaparak görünmektedir. Bu basamakta DNA fragmentlerinin arasına etidyumbromid kimyasalı girerek bağlandığı için UV ışıkta incelendiğinde jel üzerindeki DNA'ların da görülmesi sağlanmış olur. Daha sonra jelin fotoğrafı jel görüntüleme sistemi ile çekildi.

3.4.4.5. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde SPSS 23.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, Amerika Birleşik Devletleri) programı kullanıldı. IC50 değerleri Graphpad programı kullanılarak hesaplandı. Nicel veriler ortalama \pm S.D. (standart sapma) değerler tablolarında ifade edilmiştir. Kategorik veriler n (sayı) ve yüzde (%) olarak ifade edildi. Veriler %95 güven düzeyinde analiz edildi ve p değeri 0,05'ten küçükse anlamlı kabul edilmiştir.

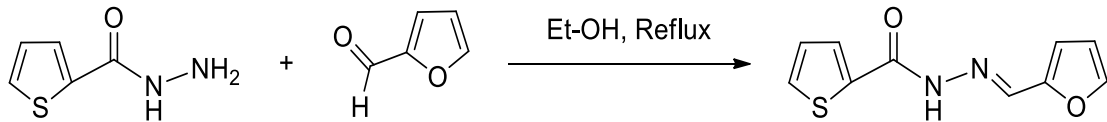
4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Genel sentez yöntemi

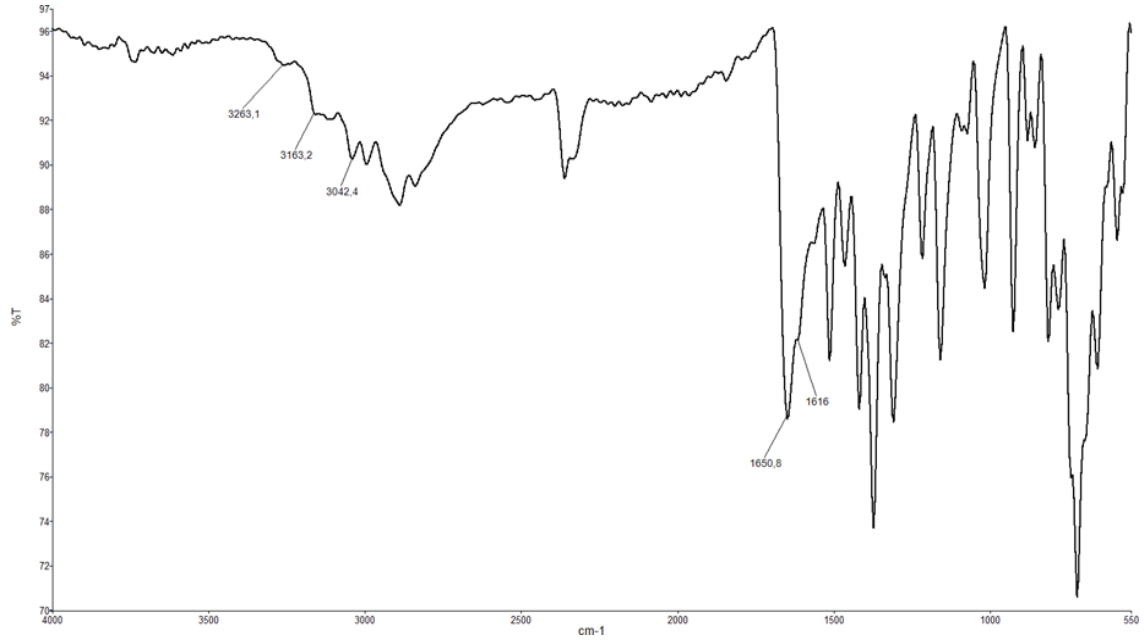
Karboksilik asit ve ester türevlerinden hidrazit moleküllerinin sentezi (i, ii) literatüre göre yapılmıştır (Bulut ve ark. 2018).

1 mmol aromatik aldehit bileşiği 30 ml mutlak etanolde çözülür. Reaksiyon ortamına 3,4 damla glasiyal asetik asit ile ortamın pH sı ayarlanır. 30 ml alkolde çözülmüş 1 mmol hidrazit türevi reaksiyon ortamına damlatılarak ilave edilir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra (TLC ile reaksiyon takibi yapılır) düşük basınç altında çözücü ortamdan uzaklaştırılır ve oluşan katı süzülür, soğuk dietileter ile yıkanır. Oluşan katı ürünler etanol, heksan, dioksan veya bunların karışımında kristallendirilir.

4.1.1. N'-(furan-2-ilmetilen)tiyofen-2-karbohidrazit (3a)

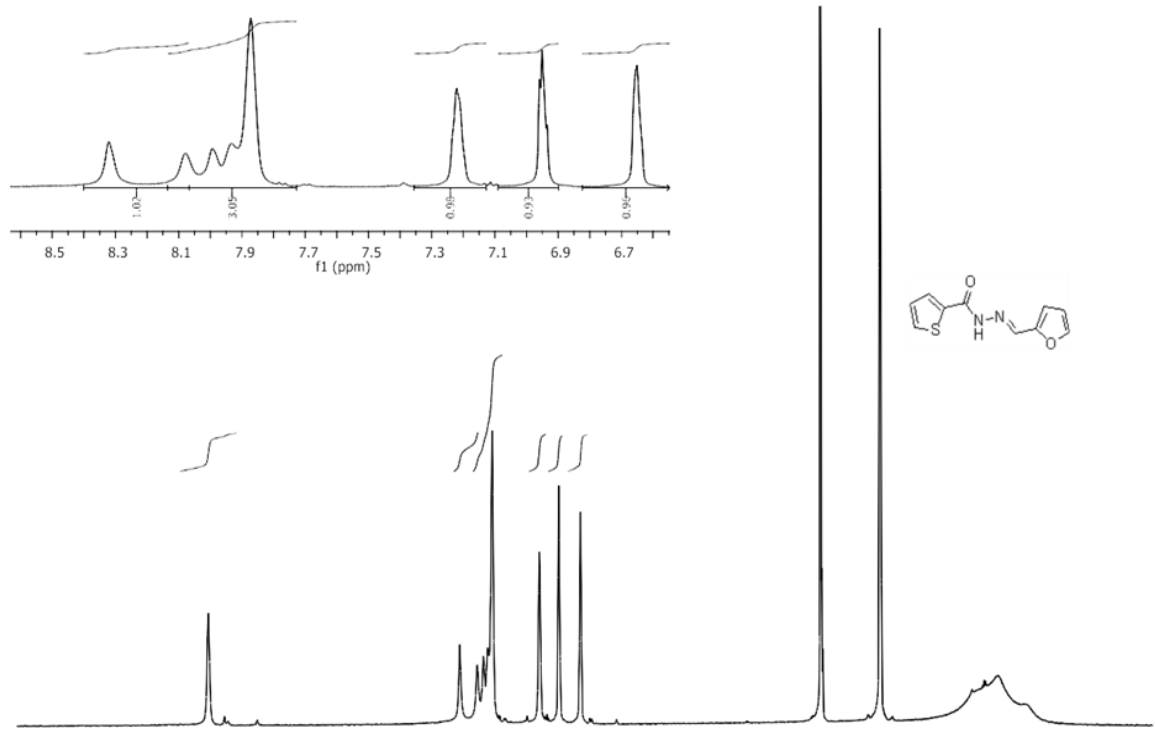


1 mmol tiyofenkarboksilikasithidrazit (1.42 gr) ve 1 mmol 2-furaldehit (0.82 ml) mutlak etanolde çözülür. Reaksiyon ortamı glasiyel asetik asit ile asitlendirildikten sonra 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Fazla çözücü ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra oluşan katı süzülür, soğuk dietileter ile yıkanır. Katı etanol-dioksan (1:1) karışımında kristallendirilir. Verim:%86, renk: kirli sarı, e.n: 155-158⁰C.



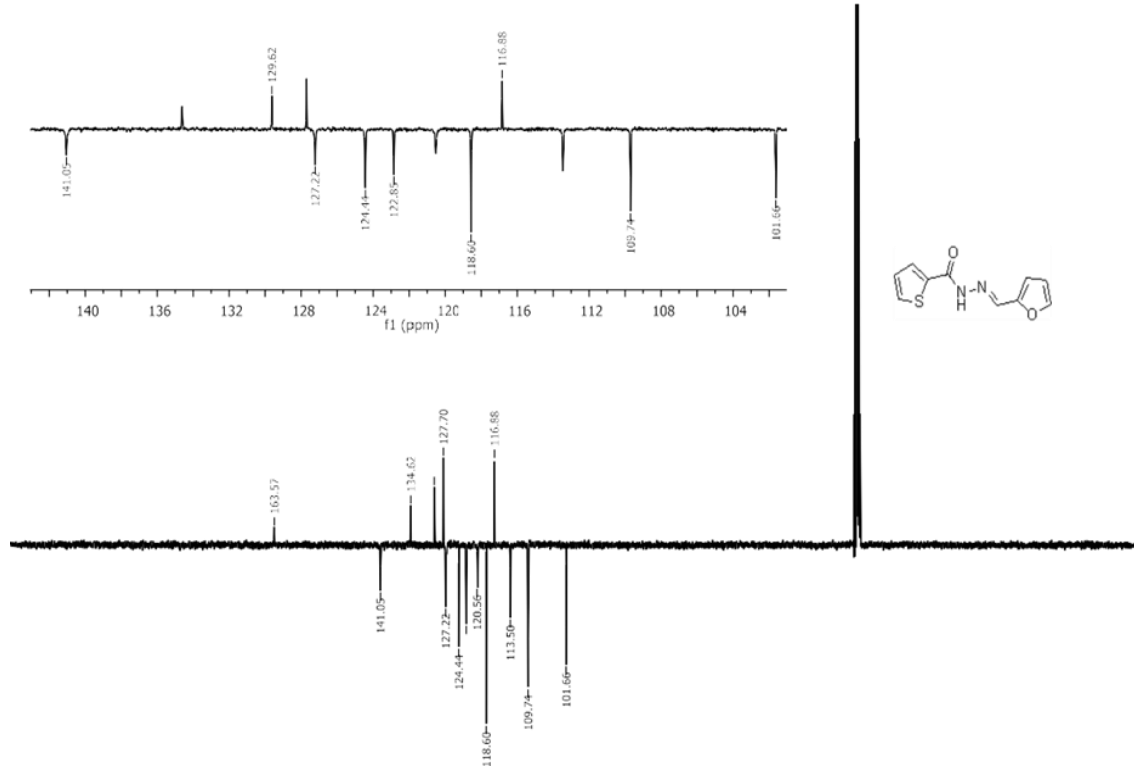
Şekil 4.1. 3a molekülünün FT-IR spektrumu

FT-IR (ATR, cm^{-1} , ν): 3263(N-H asimetric ger. tit.), 3163 (N-H simetrik ger, tit.), 3042–2996 (Ar. C-H ger. tit.), 1651 (C=O ger. tit. (amit 1. band)), 1616(N-H düzlem içi eğ. tit. (amit 2. band)).



Şekil 4.2. 3a molekülünün ^1H -NMR spektrumu

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 11.81 (s, amit-NH, 1H), 8.36,8.09(s, $-\text{C}=\text{NH}$, 1H), 8.04-7.80(m, Ar-CH, 3H), 7.24(s, tiyofen-H4, 1H), 6.95(s, furan-H3, 1H), 6.65(s, furan-H4, 1H).



Şekil 4.3. 3a molekülünün $^{13}\text{C-APT}$ NMR spektrumu

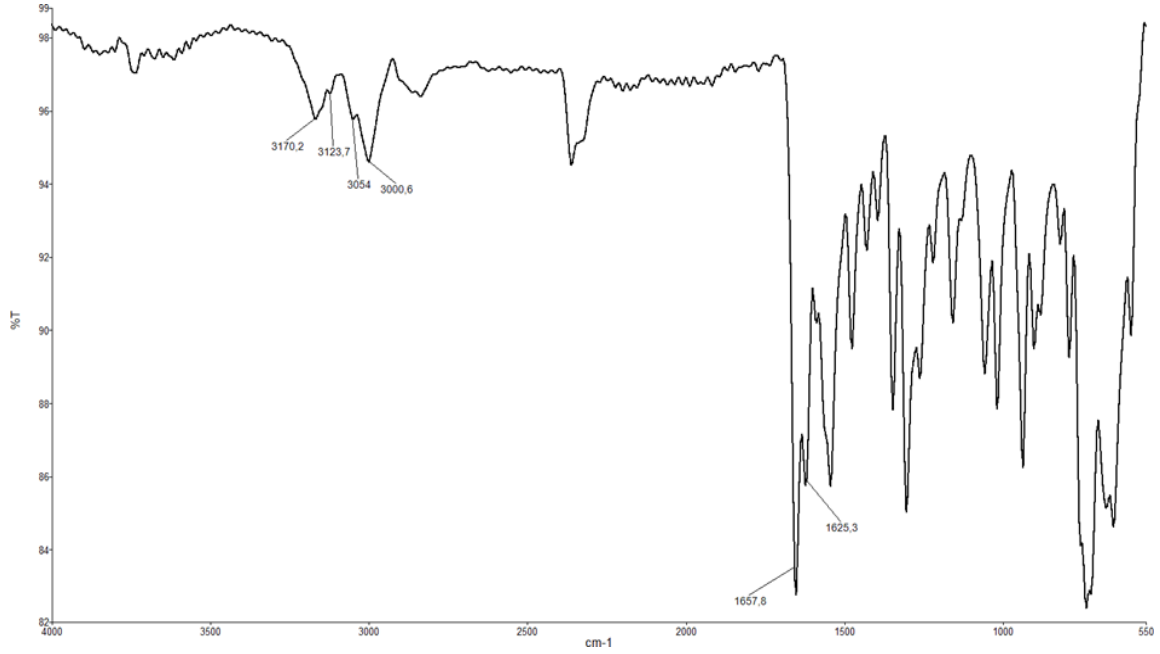
$^{13}\text{C-APT}$ NMR (DMSO-d_6) δ : 163.57, 141.05, 134.62(izomer), 129.62, 127.70(izomer), 127.22, 124.44, 122.85,120.56(izomer), 118.60, 116.88, 113.50(izomer), 109.74, 101.66.

4.1.2. 2-kloro-N'-(furan-2-ilmetilen)benzohidrazid (3b)



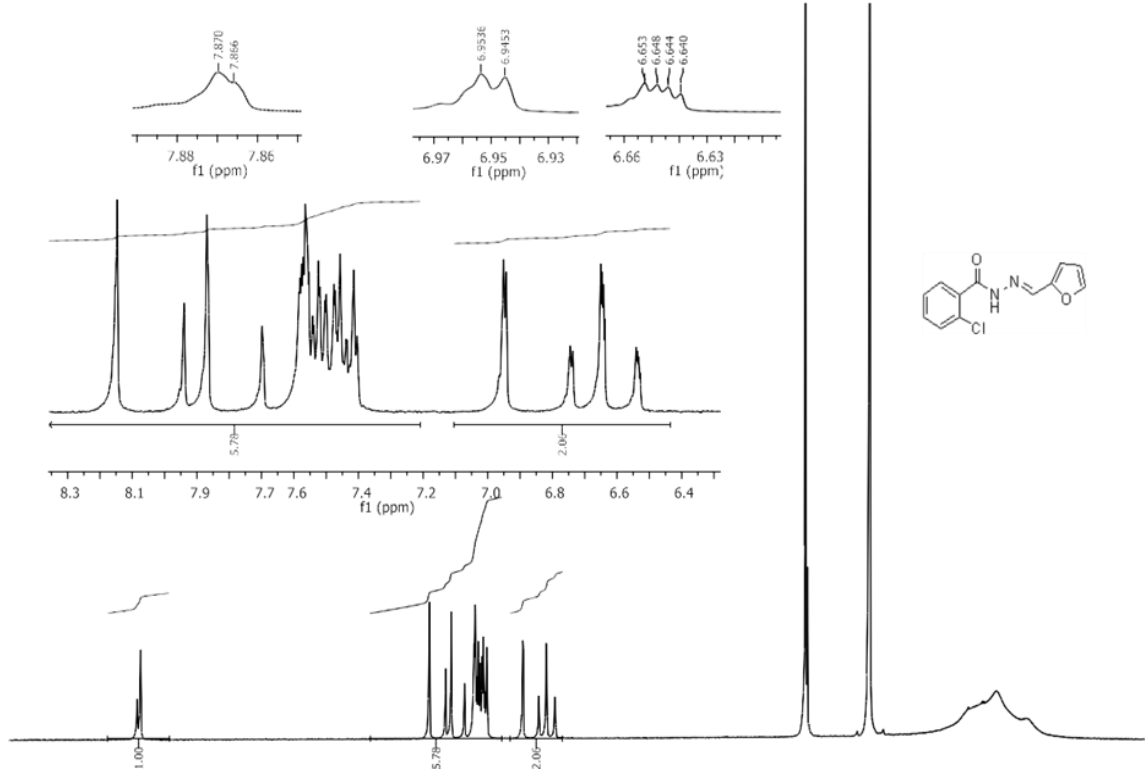
1 mmol 2-klorobenzohidrazit (1.7gr) ve 1 mmol 2-furaldehit (1 ml) mutlak etanolde çözülür. Reaksiyon ortamı glasiyel asetik asit ile asitlendirildikten sonra 8 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Fazla çözücü ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra oluşan katı

süzülür, soğuk dietileter ile yıkanır. Katı etanol-dioksan (1:3) karışımında kristallendirilir. Renk: kirli beyaz, e.n: 162-163⁰C.



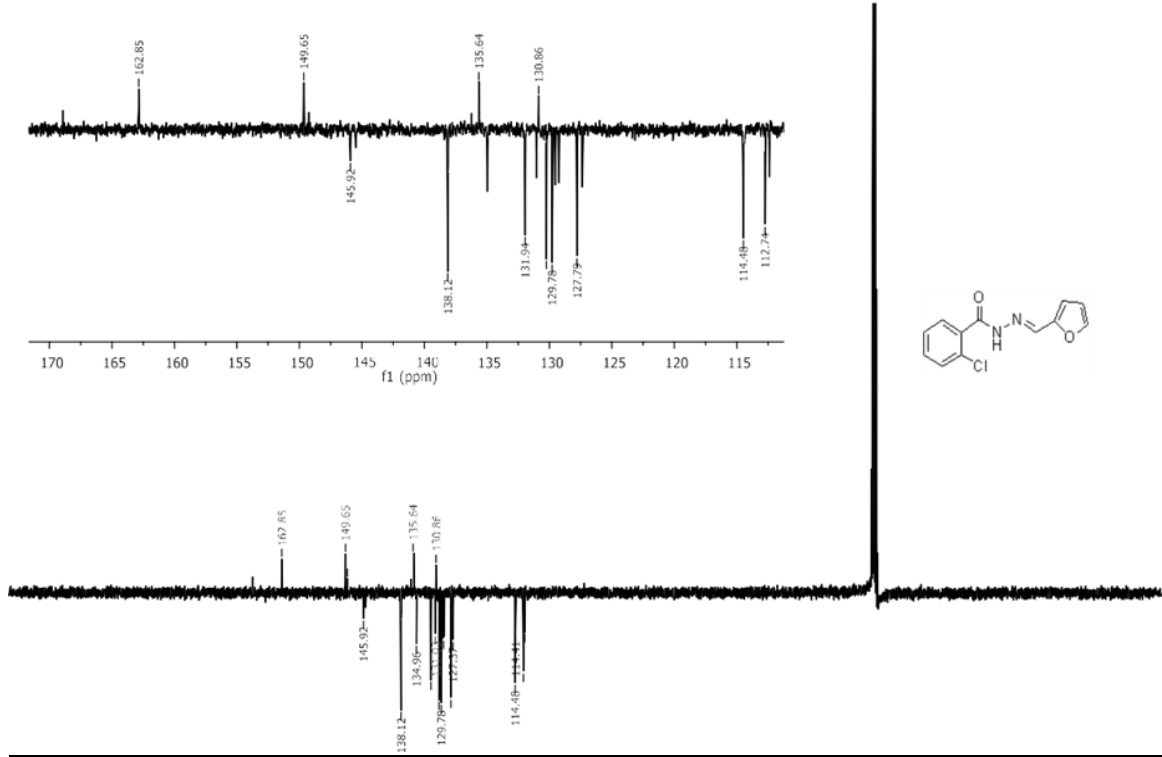
Şekil 4.4. 3b molekülünün FT-IR spektrumu

FT-IR (ATR, cm⁻¹, ν): 3171(N-H asimetric ger. tit.), 3124 (N-H simetrik ger. tit.), 3054-3001 (Ar. C-H ger. tit.), 1658(C=O ger. tit. (amit 1. Band), 1625 (N-H düzlem içi eğ. tit. (amit 2. Band)), 738 (C-Cl ger. tit.).



Şekil 5.5. 3b molekülünün ¹H-NMR spektrumu

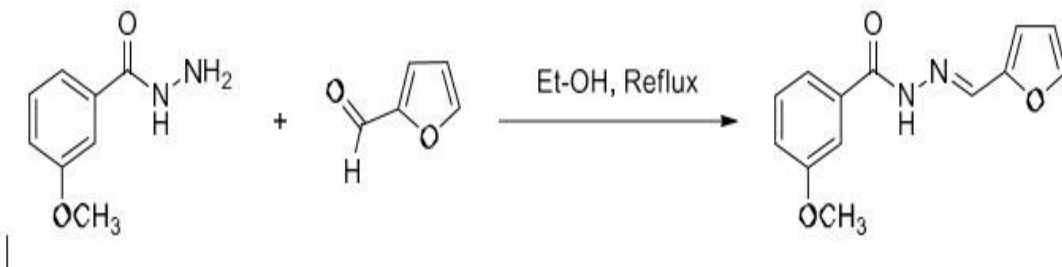
¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 11.86 (s, amit-NH, 1H), 8.22,7.96 (s, C=NH 1H), 7.91,7.74(d, *J*= 1.60 Hz,furan-H5, 1H), 7.68-7.40(m, Ar-CH, 4H), 6.97,6.78(d, *J*= 3.32 Hz, furan-H3, 1H), 6.65,6.55(dd, *J*= 1.60, 1.60 Hz, furan-H4, 1H).



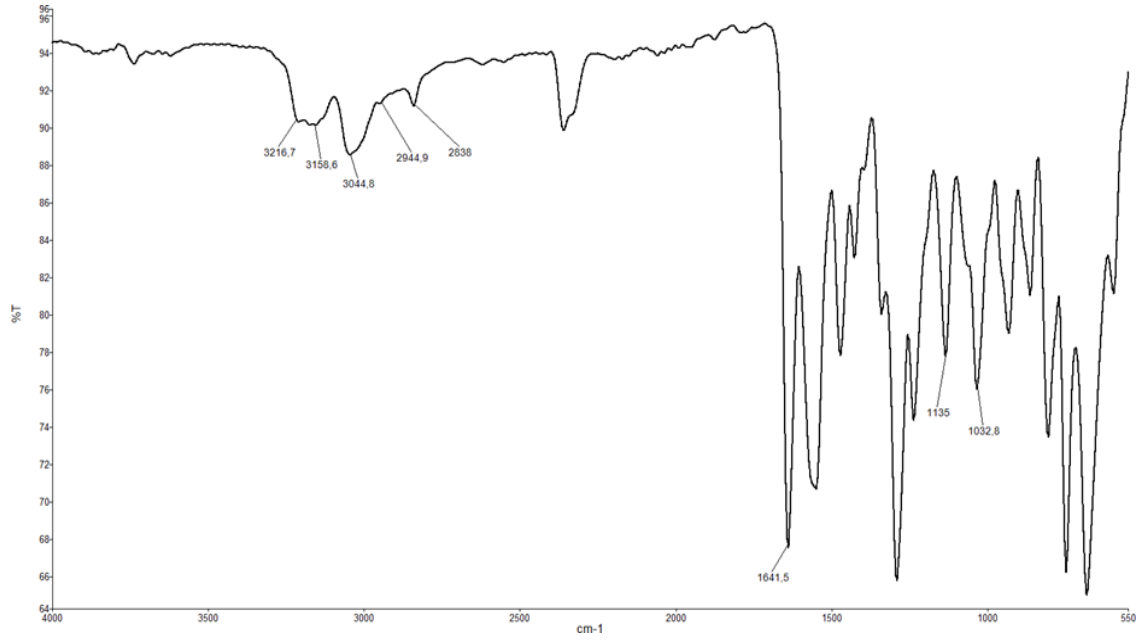
Şekil 4.6. 3b molekülünün ^{13}C -APT NMR spektrumu

^{13}C -APT NMR (DMSO- d_6) δ : 162.85, 149.65, 145.92, 138.12, 135.64, 131.94, 130.86, 129.78, 129.52, 129.23, 127.79, 114.48, , 112.74.

4.1.3. N'-(furan-2-ilmetlen)-3-metoksibenzohidrazit (3c)

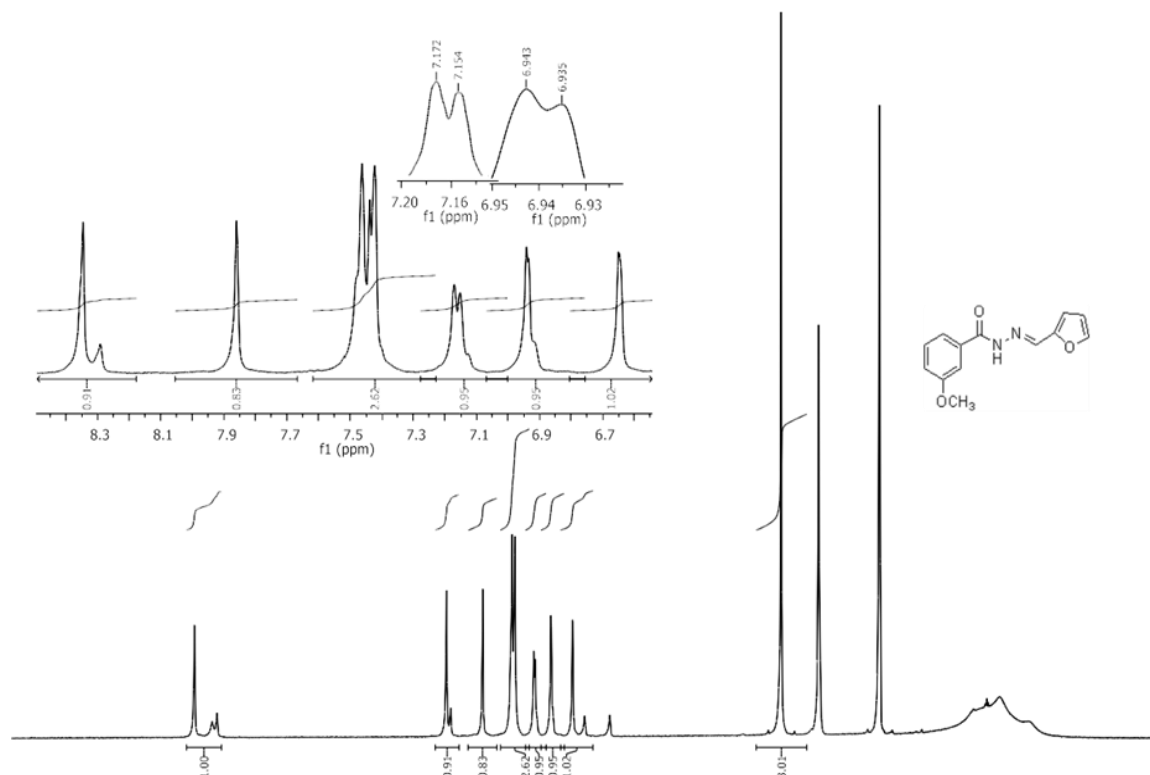


1 mmol 3-metoksibenzohidrazit (1.66 gr) ve 1 mmol 2-furaldehit (1 ml) mutlak etanolde çözülür. Reaksiyon ortamı glasiyel asetik asit ile asitlendirildikten sonra 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Fazla çözücü ortamdandan uzaklaştırıldıktan sonra oluşan katı süzülür, soğuk dietileter ile yıkanır. Katı etanolde kristallendirilir. Renk: kahve, e.n: 175-177°C.



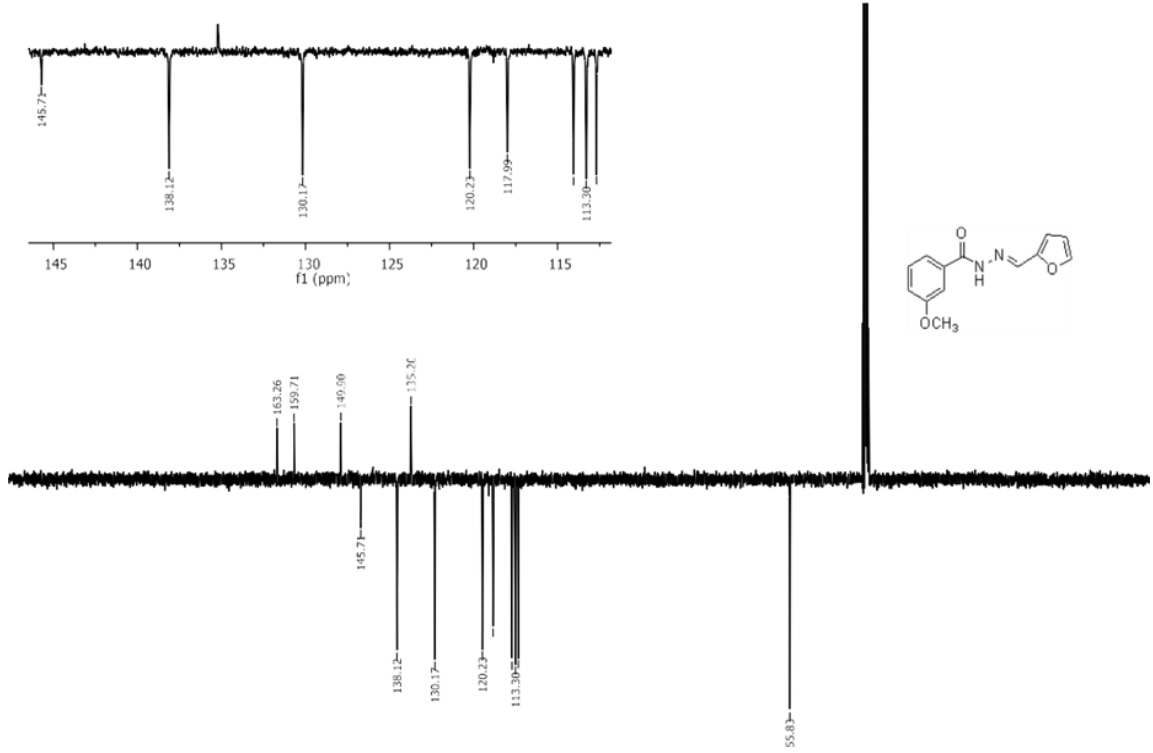
Şekil 4.7. 3c molekülünün FT-IR spektrumu

FT-IR (ATR, cm⁻¹, ν): 3218(N-H asimetric ger. tit.), 3159 (N-H simetric ger. tit.), 3060–3022 (Ar. C-H ger. tit.), 2945-2840 (Ar-OCH₃ C-H asimetric ger. tit.), 1642 (C=O ger. tit. (amit 1. band)), 1135 (C-O titreşimi), 1033 (C-N tit.).



Şekil 4.8. 3c molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

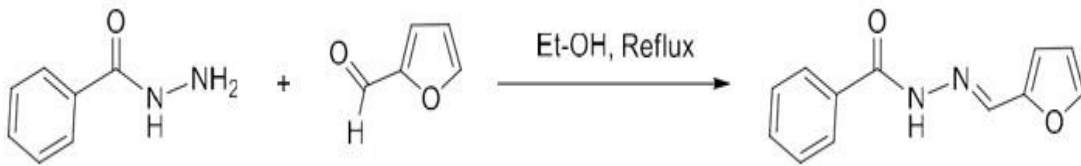
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 11.75, 11.42 (s, amit-NH, 1H), 8.36, 8.32 (s, $-\text{C}=\text{NH}$, 1H), 7.87 (s, furan-H5, 1H), 7.52-7.40 (m, Ar-CH, 3H), 7.17 (d, $J=7.2$ Hz, o-metoksi-H, 1H), 6.94 (d, $J=3.2$ Hz, furan-H3, 1H), 6.85 (m, furan-H4, 1H)



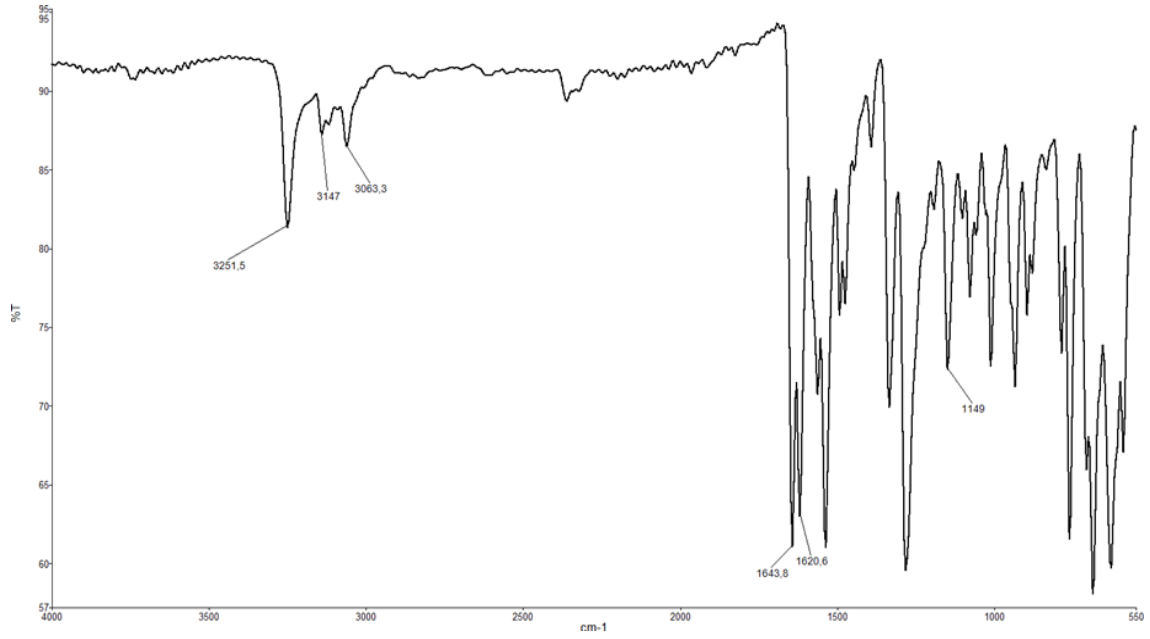
Şekil 4.9. 3c molekülünün ¹³C-APT NMR spektrumu

¹³C-APT NMR (DMSO-*d*₆)δ: 163.26, 159.71, 149.90, 145.71, 138.12, 135.20, 130.17, 120.23, 117.99, 114.06, 113.30, 112.70, 55.83.

4.1.4. N'-(furan-2-ilmetilen)benzohidrazit (3d)

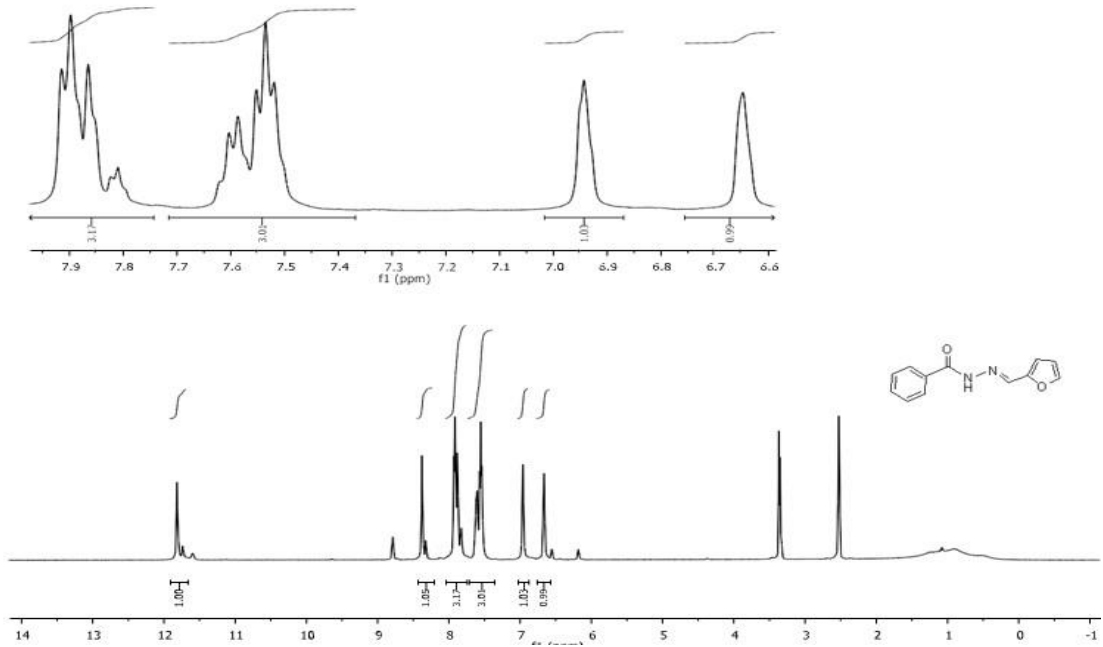


1 mmol benzohidrazit (1.36gr) ve 1 mmol 2-furaldehit (1ml) mutlak etanolde çözülür. Reaksiyon ortamı glasiyel asetik asit ile asitlendirildikten sonra 6 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Fazla çözücü ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra oluşan katı süzülür, soğuk dietileter ile yıkanır. Katı etanol-dioksan (1:2) karışımında kristallendirilir. Renk: kahve, e.n: 179-181°C.



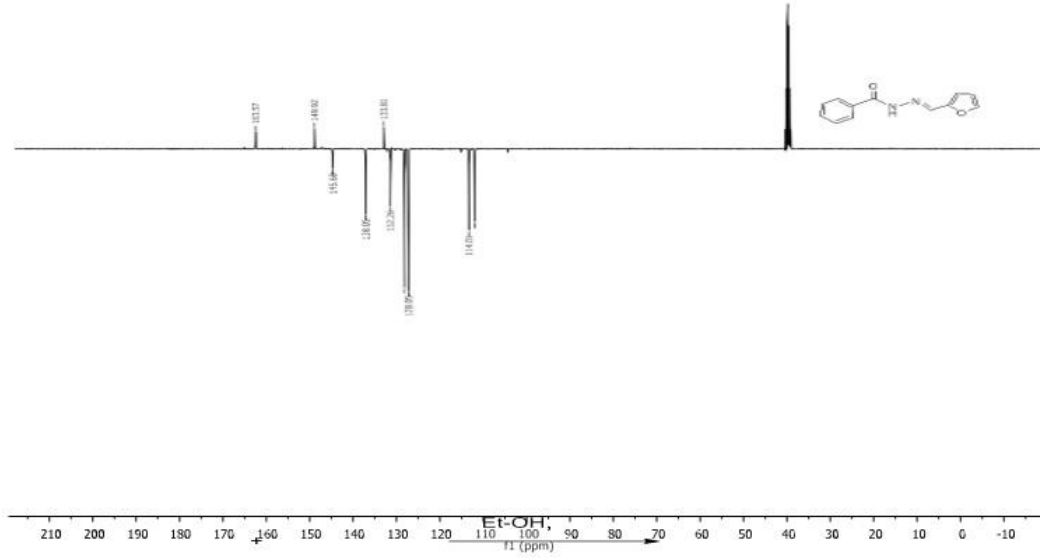
Şekil 4.10. 3d molekülünün FT-IR spektrumu

FT-IR (ATR, cm^{-1} , ν): 3252 (N-H asimetric ger. tit.), 3147 (N-H simetric ger. tit.), 3100-3063 (Ar. C-H ger. tit.), 1644 (C=O ger. tit. (amit 1. band)), 1621 (N-H düzlem içi eğ. tit. (amit 2. band)).



Şekil 4.11. 3d molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

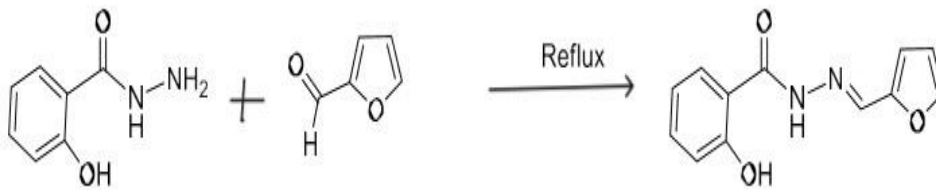
¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 11.80,11.73 (s, amit-NH, 1H), 8.74,8.37(s, -C=NH, 1H), 7.98-7.80 (m,o,p-phCH, 3H), 7.98-7.80 (m, m-phCH, furan-H5, 3H), 6.94(s, furan-H3, 1H), 6.69(s, furan-H4, 1H).



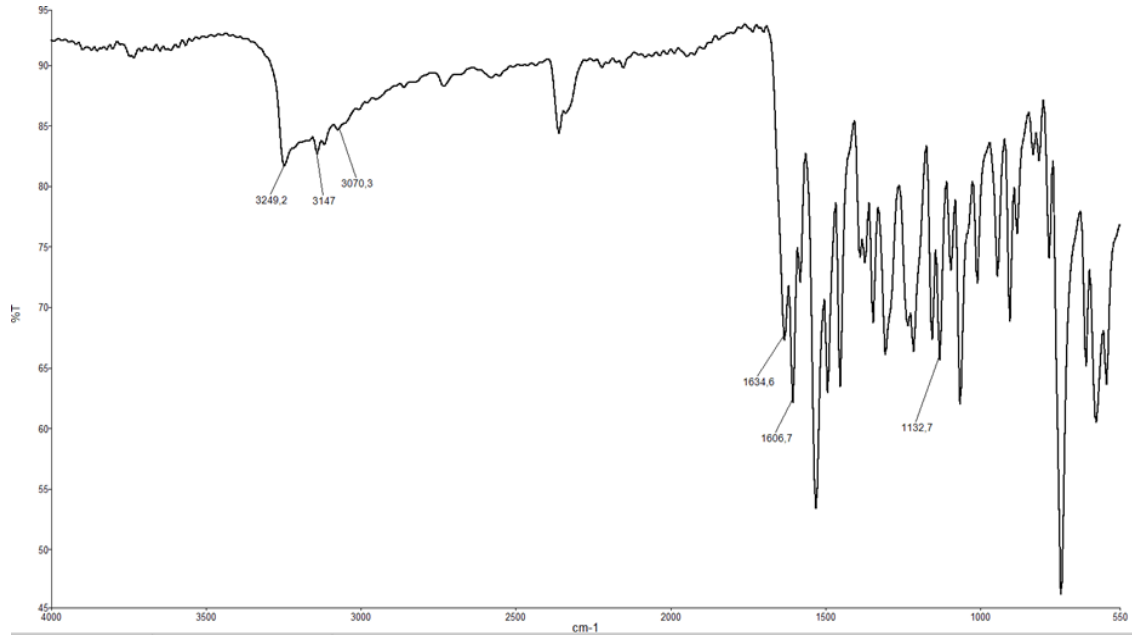
Şekil 4.12. 3d molekülünün ¹³C-APT. NMR spektrumu

¹³C-APT NMR (DMSO-d₆)δ: 163.57, 149.92, 145.68, 138.05, 133.81, 132.26, 128.98, 128.05, 114.01, 112.69.

4.4.5. N'-(furan-2-ilmetlen)-2-hidroksibenzohidrazit (3e)

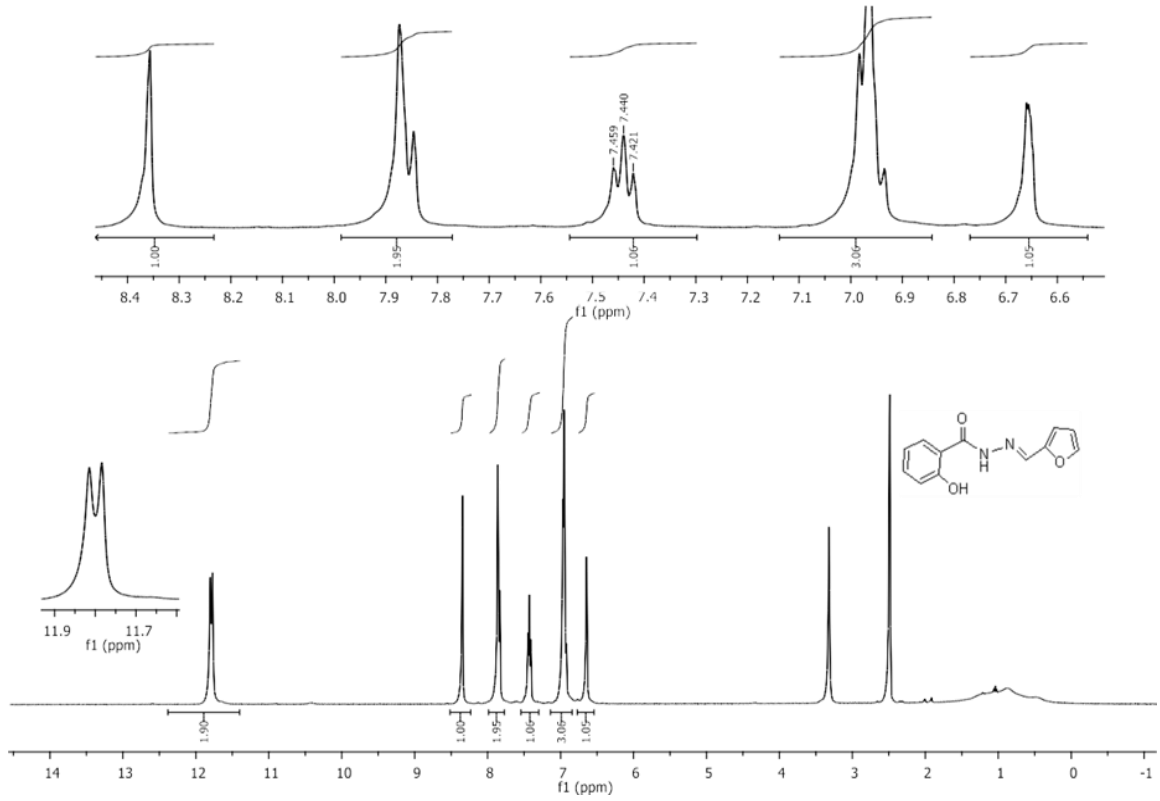


1 mmol 2- hidroksibenzohidrazit(1.52gr) ve 1 mmol 2-furaldehit (1 ml) mutlak etanolde çözülür. Reaksiyon ortamı glasiyel asetik asit ile asitlendirildikten sonra 6 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Fazla çözücü ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra oluşan katı süzülür, soğuk dietiler ile yıkanır. Katı etanol-heksan (1:2) karışımında kristallendirilir. Renk: kahve, e.n: 213-216°C.



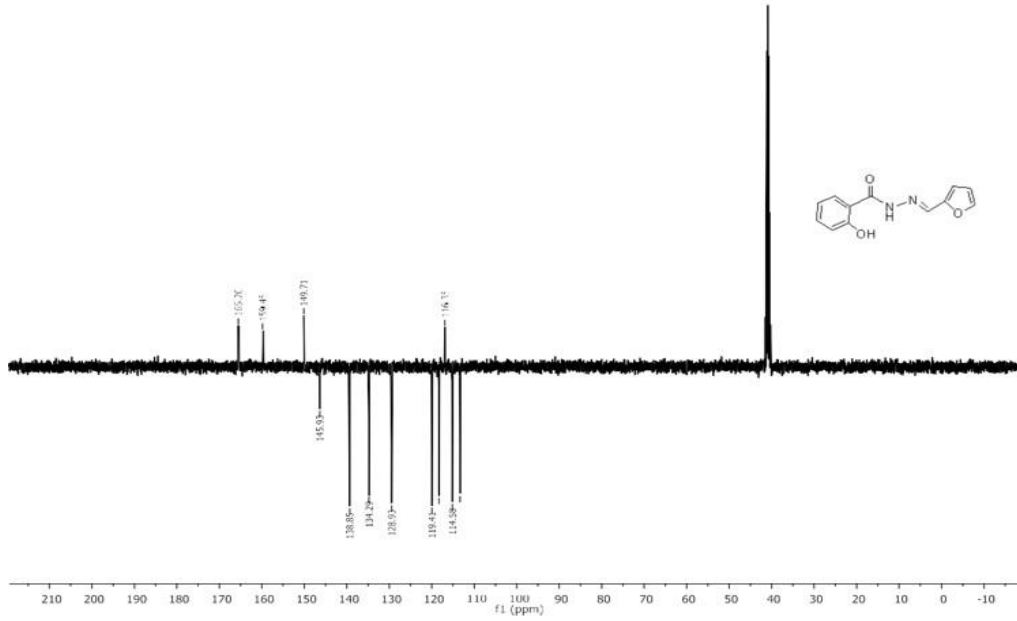
Şekil 4.13. 3e molekülünün FT-IR spektrumu

FT-IR (ATR, cm⁻¹, ν): 3250(OH ve N-H asimetrik ger. tit.), 3147 (N-H simetrik ger. tit.), 3073-3032 (Ar. C-H ger. tit.), 1635 (C=O ger. tit. (amit 1. Band)), 1607 (N-H düzlem içi eğ. tit. (amit 2. Band)).



Şekil 4.14. 3e molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

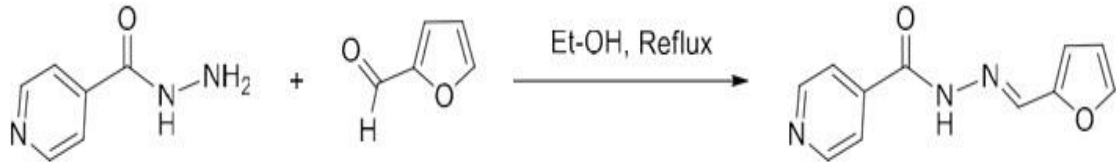
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 11.82 (s, amit-NH, 1H), 11.78 (s, OH, 1H), 8.36(s, $-\text{C}=\text{NH}$, 1H), 7.92-7.84 (m, sly-H3 ve furan-H5, 2H), 7.45(t, $J= 7.60$ Hz, sly-H5, 1H) 7.05-6.91 (m, sly-H4, H6 ve furan-H3, 3H), 6.65(s, furan-H4, 1H).



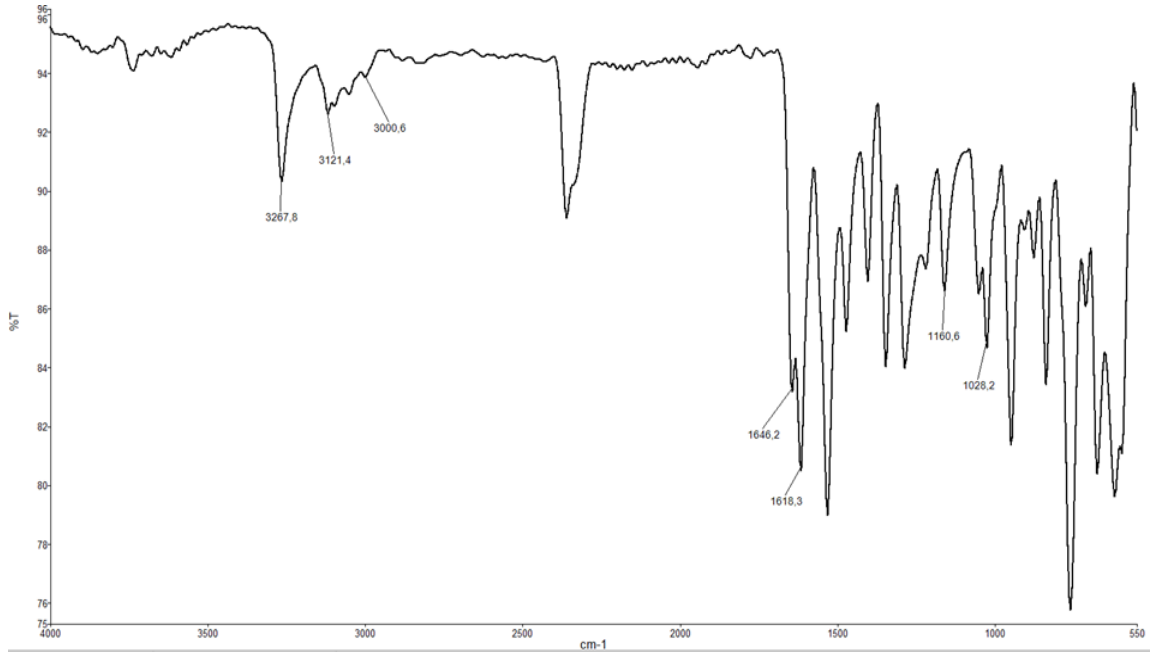
Şekil 4.15. 3e molekülünün ^{13}C -APT NMR spektrumu

^{13}C -APT NMR (DMSO- d_6) δ : 165.20, 159.45, 149.71, 145.93, 138.85, 134.29, 128.93, 119.41, 117.73, 116.35, 114.58, 112.74.

4.1.6. N'-(furan-2-ilmetilen)izonikotinohidrazit (3f)

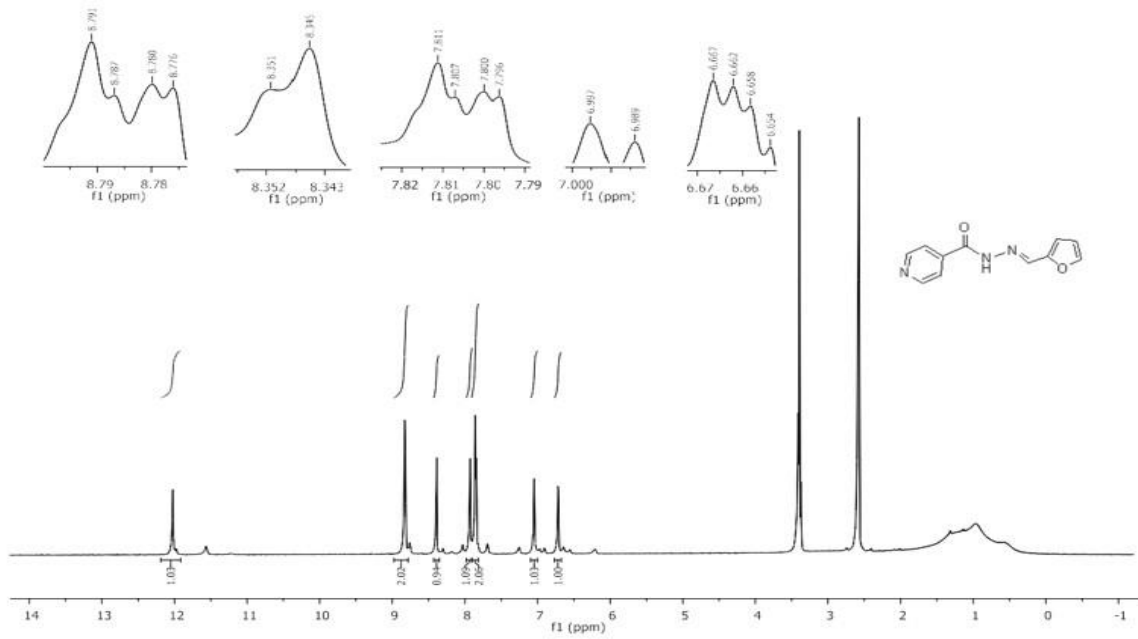


1 mmol Piridinkarboksilasidehidrazid (1.37gr) ve 1 mmol 2-furaldehit (1 ml) mutlak etanolde çözülür. Reaksiyon ortamı glasiyel asetik asit ile asitlendirildikten sonra 5 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Fazla çözücü ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra oluşan katı süzülür, soğuk dietileter ile yıkanır. Katı etanol-dioksan (1:2) karışımında kristallendirilir. Renk: kirli beyaz, e.n: 215-217 °C.



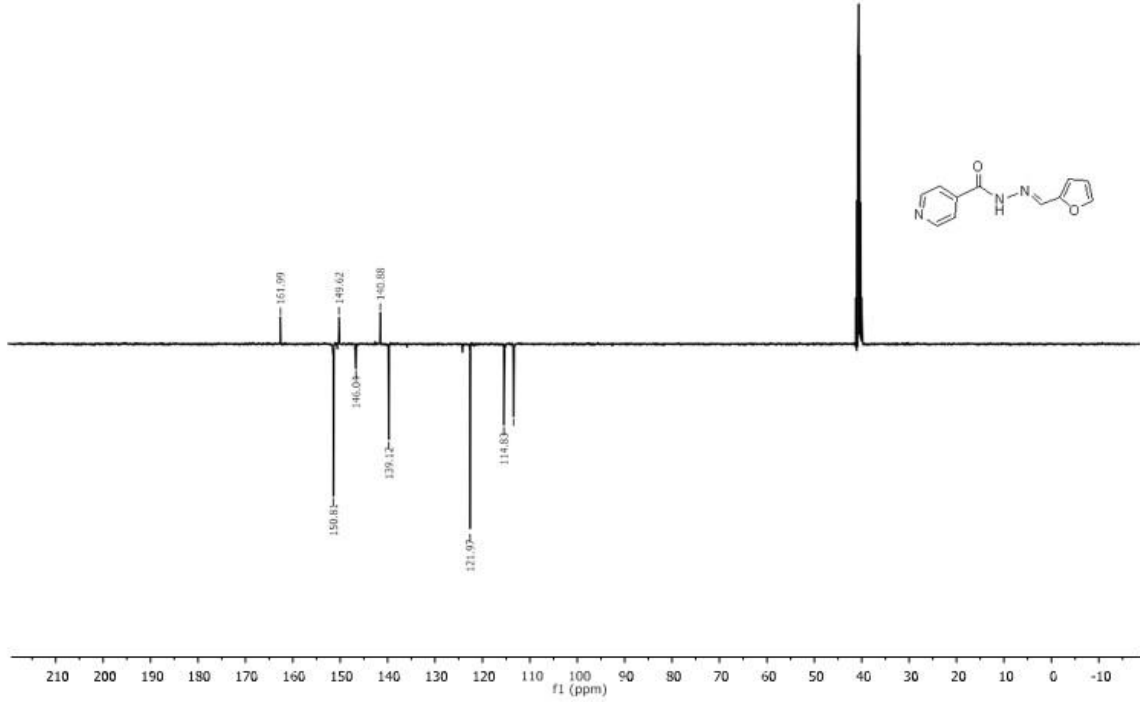
Şekil 4.16. 3f molekülünün FT-IR spektrumu

FT-IR (ATR, cm^{-1} , ν): 3268 (N-H asimetric ger. tit.), 3121 (N-H simetric ger. tit.), 3081-2996 (Ar. C-H ger. tit.), 1648 C=O ger. tit. (amit 1. Band), 1618 (N-H düzlem içi eğ. tit. (amit 2. Band)).



Şekil 4.17. 3f molekülünün ^1H -NMR spektrumu

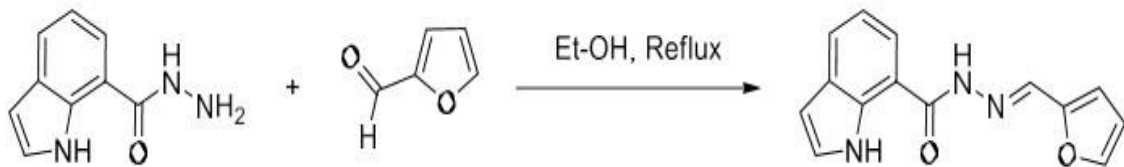
¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 12.03 (s, amit-NH, 1H), 8.79 (dd, *J*=4.40, 1.00, py. N-CH, 2H), 8.35(s, -C=NH, 1H), 7.81 (dd, *J*=4.40, 1.60, 2H, py. C-CH), 7.88 (d, *J*=1.80, furil-H5, 1H), 6.99 (d, *J*=3.20, furil-H3, 1H), 6.69 (dd, *J*=1.60, 1.60, furil-H4, 1H).



Şekil 4.18. 3f molekülünün ¹³C-APT NMR spektrumu

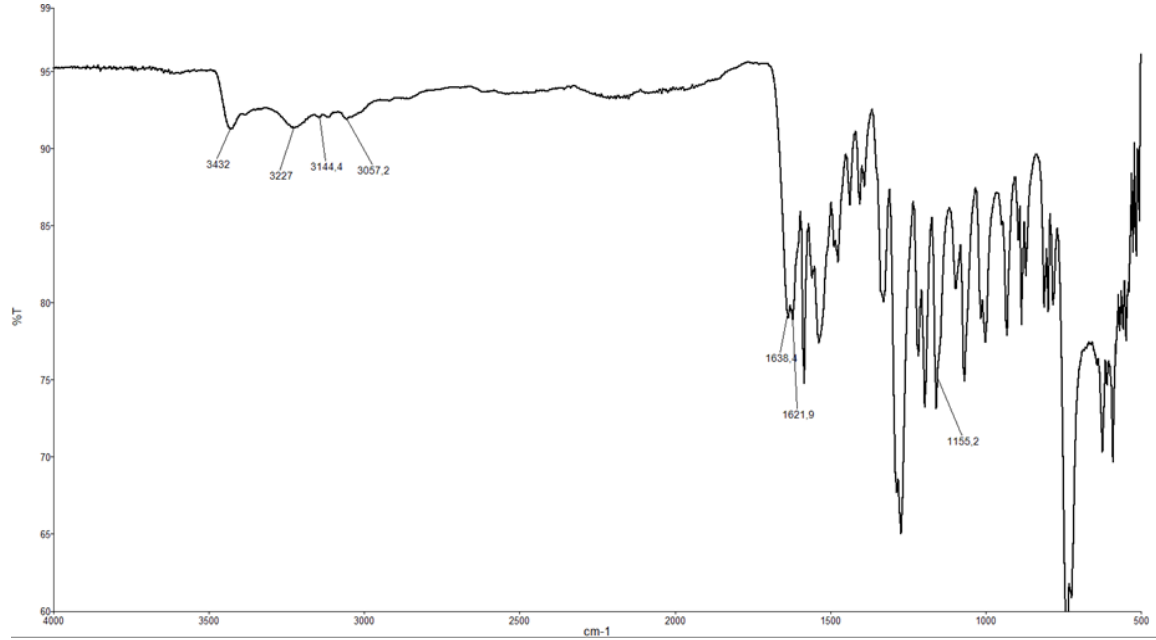
¹³C-APT NMR (DMSO-d₆) δ: 161.99, 150.81, 149.62, 146.04, 140.88, 139.12, 121.97, 114.83, 112.79

4.1.7. N'-(furan-2-ilmetilen)-1H-indol-7-karbohidrazit (3g)



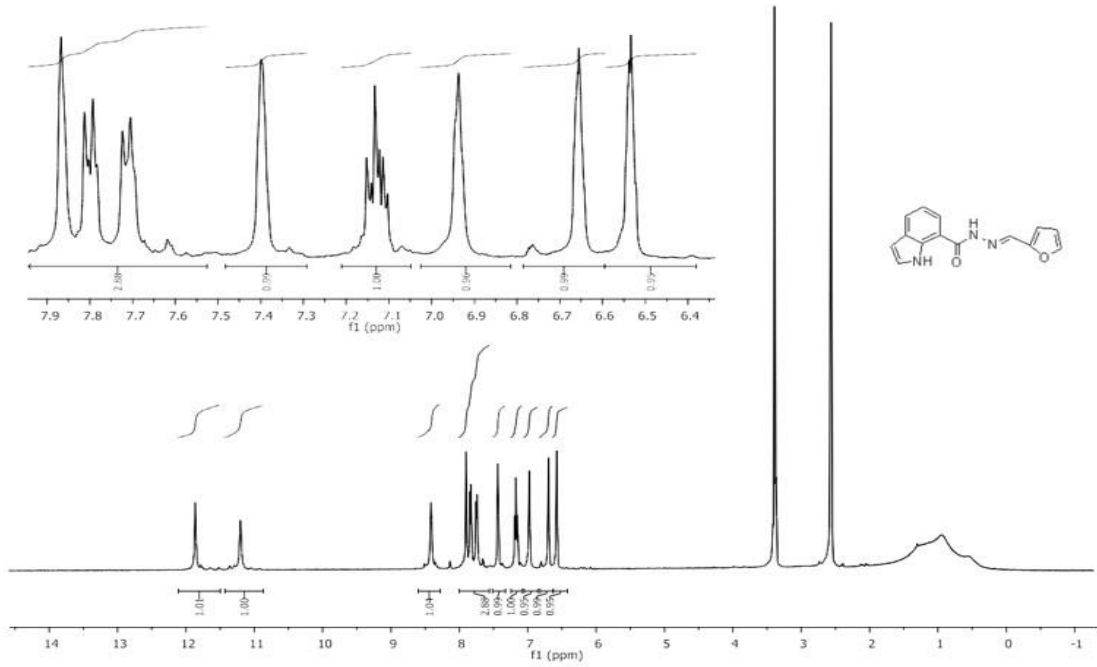
1 mmol 1H-indol-7-karbohidrazit (0.87gr) ve 1 mmol 2-furalaldehit (1 ml) mutlak etanolde çözülür. Reaksiyon ortamı glasiyel asetik asit ile asitlendirildikten sonra 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Fazla çözücü ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra oluşan

katı süzülür, soğuk dietileter ile yıkanır. Katı etanol-dioksan (2:1) karışımında kristallendirilir. Renk: açık kahve, e.n: 129-132 °C.



Şekil 4.19. 3g molekülünün FT-IR spektrumu

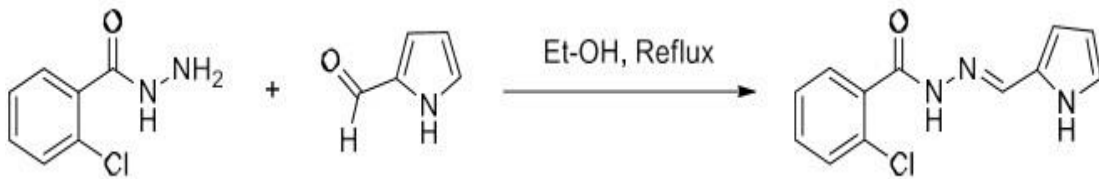
FT-IR (ATR, cm^{-1} , ν): 3422 (indol N-H ger. tit.), 3227 (amit N-H asimetric ger. tit.), 3145 (amit N-H simetric ger. tit.), 3111-3010 (Ar. C- H ger. tit.), 1638 (C=O ger. tit. (amit 1. Band)), 1623 (N-H düzlem içi eğ. tit. (amit 2. Band)).



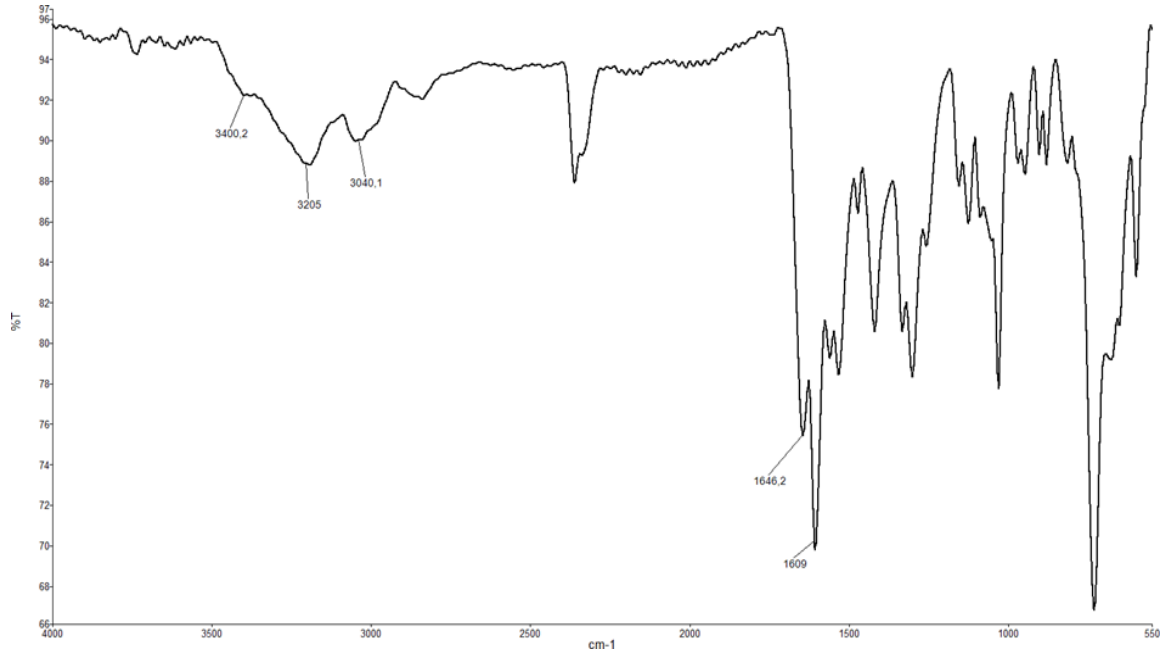
Şekil 4.20. 3g molekülünün ¹H-NMR spektrumu

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 11.85 (s, amit-NH, 1H), 11.15 (s, indol-NH, 1H), 8.38 (s, -C=NH, 1H), 7.88-6.54 (m, Ar.CH, 6H), 6.99 (d, *J*=3.20, furil-H3, 1H), 6.69 (dd, *J*=1.60, 1.60, furil-H4, 1H).

4.1.8. N'-((1H-pirol-2-il)metilen)-2-klorobenzohidrazit (3h)

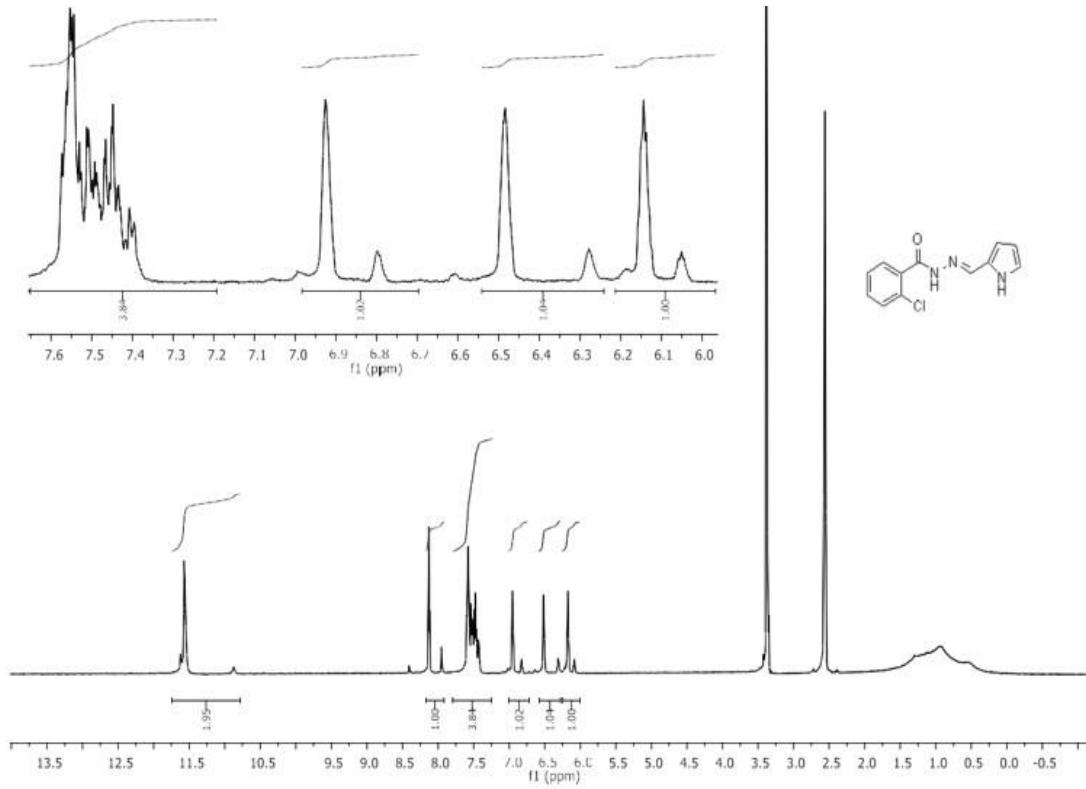


1 mmol 2-klorobenzohidrazid (1.7gr) ve pirol-2- karboksaldehit (0.95 gr) mutlak etanolde çözülür. Reaksiyon ortamı glasiyel asetik asit ile asitlendirildikten sonra 8 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Fazla çözücü ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra oluşan katı süzülür, soğuk dietileter ile yıkanır. Katı etanol-dioksan (1:1) karışımında kristallendirilir. Renk: koyu kahve, e.n: 104-107°C.



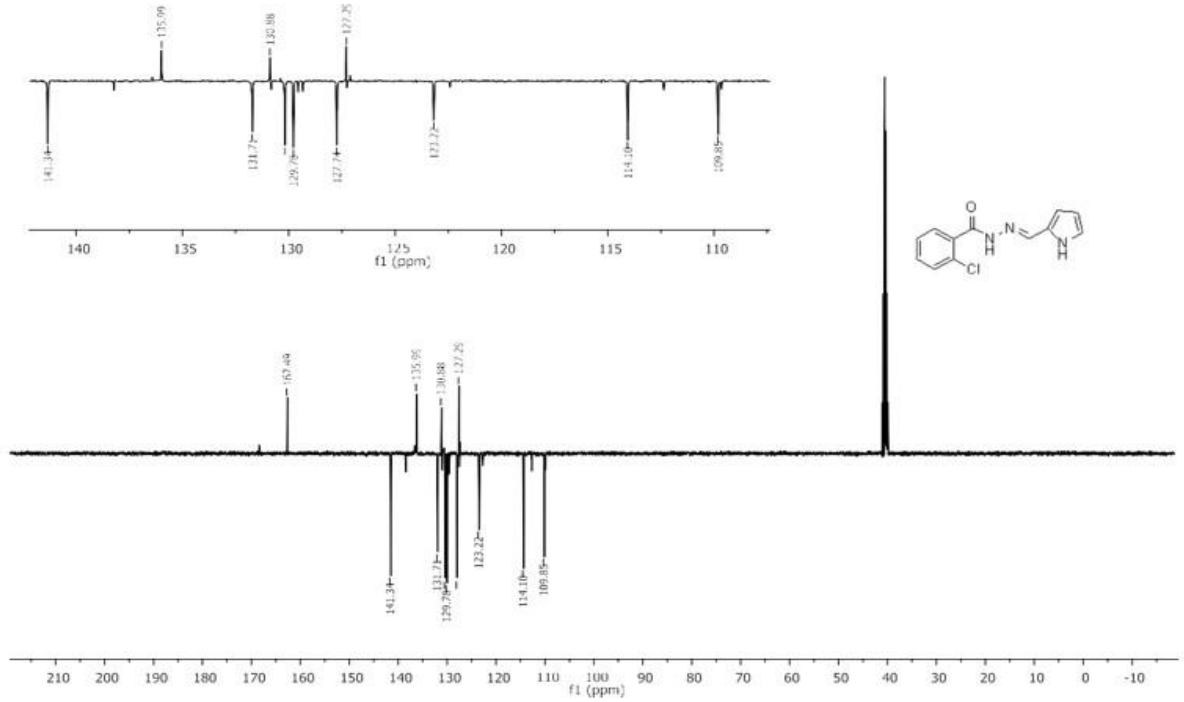
Şekil 4.21. 3h molekülünün FT-IR spektrumu

FT-IR (ATR, cm^{-1} , ν): 3400 (pirol N-H ger. tit.), 3205 (amit N-H ger. tit.), 3070-3005 (Ar. C-H ger. tit.), 1642 (C=O ger. tit. (amit 1. Band)), 1609 (N-H düzlem içi eğ. tit. (amit 2. Band)).



Şekil 4.22. 3h molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

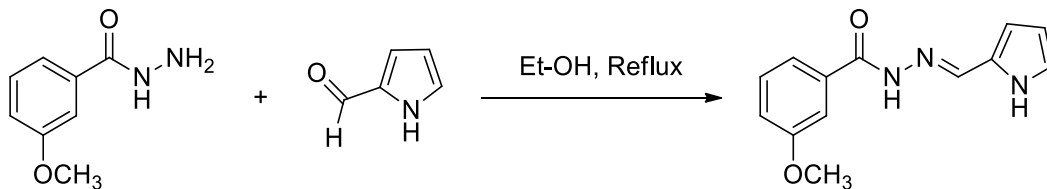
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 11.56 (s, amit-NH, 1H), 11.55 (s, pirol-NH, 1H), 8.10(s, -C=NH, 1H), 7.56-7.48 (m, Ar.CH, 4H), 6.93 (s, pirol-H5, 1H), 6.49 (s, pirol-H3, 1H), 6.15 (s, pirol- H4, 1H).



Şekil 4.23. 3h molekülünün ^{13}C -APT NMR spektrumu

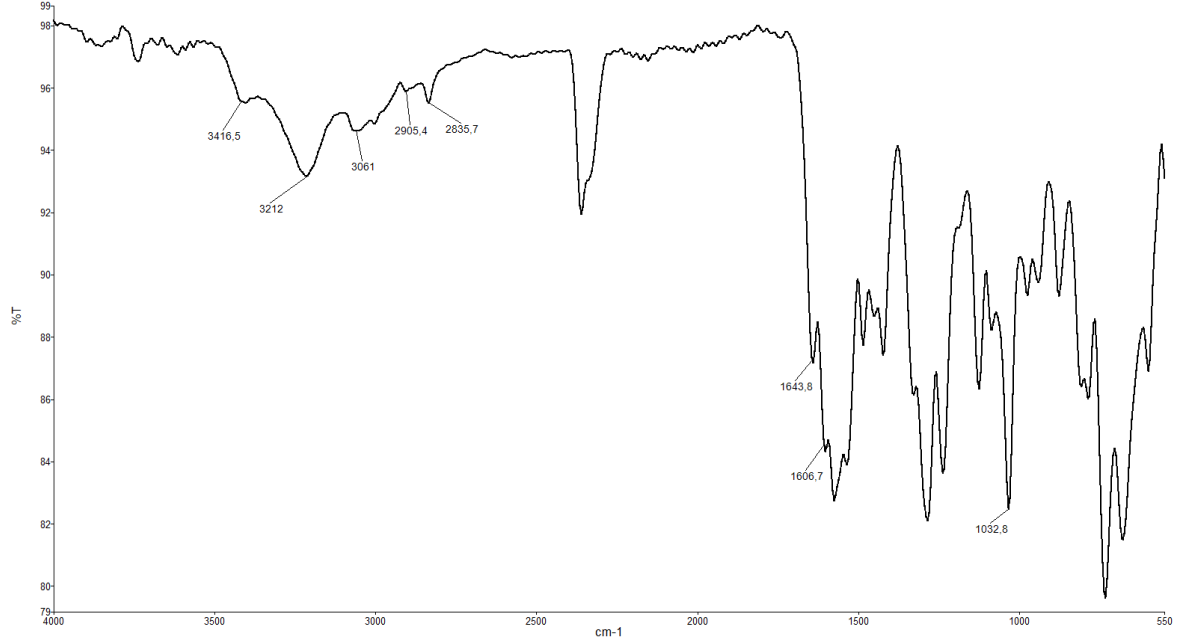
^{13}C -APT NMR (DMSO-d_6) δ : 162.49, 141.34, 135.99, 131.71, 130.88, 130.18, 129.78, 127.74, 127.29, 123.22, 114.10, 109.85.

4.1.9. N'-((1H-pirol-2-il)metilen)-3-metoksibenzohidrazit (3i)



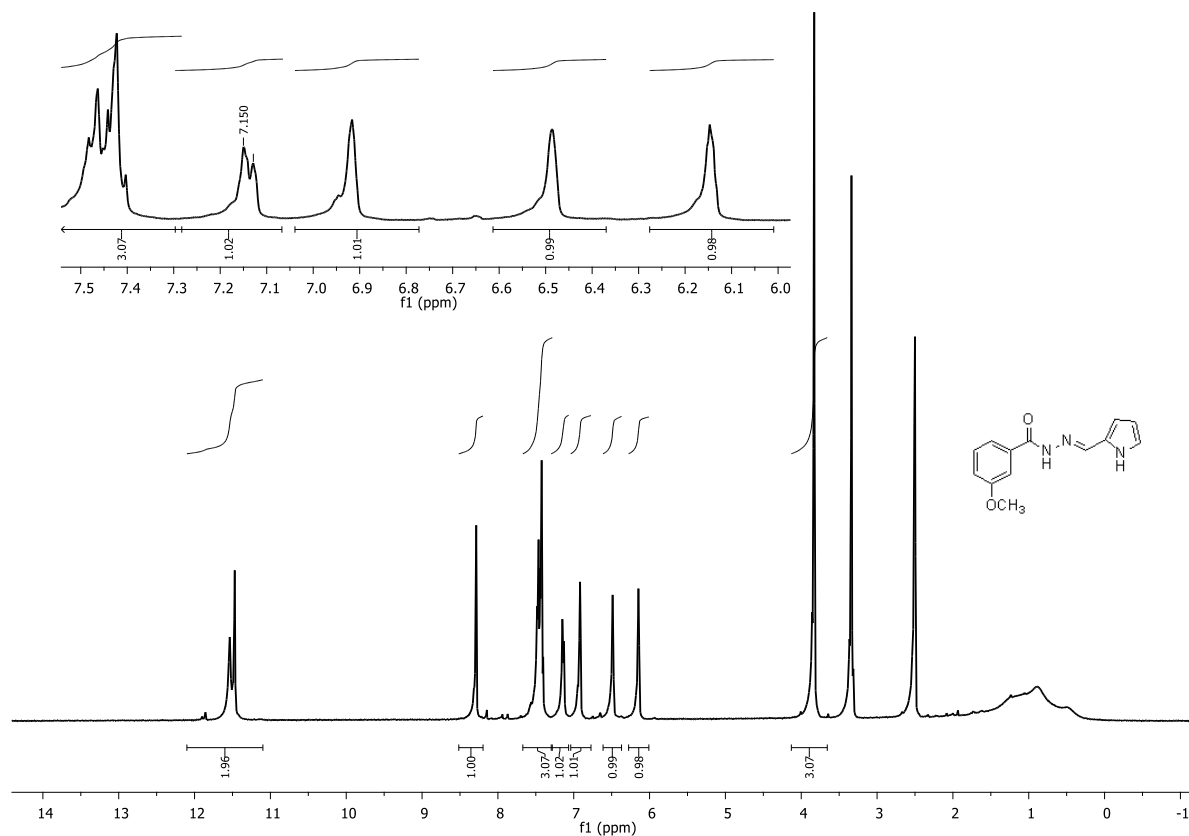
1 mmol 3-metoksibenzohidrazid (1.66 gr) ve pirol-2-karboksaldehit (0.95 gr) mutlak etanolde çözülür. Reaksiyon ortamı glasiyel asetik asit ile asitlendirildikten sonra 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Fazla çözücü ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra oluşan

katı süzülür, soğuk dietileter ile yıkanır. Katı etanolde kristallendirilir. Renk: koyu kahve, e.n: 147-150 °C



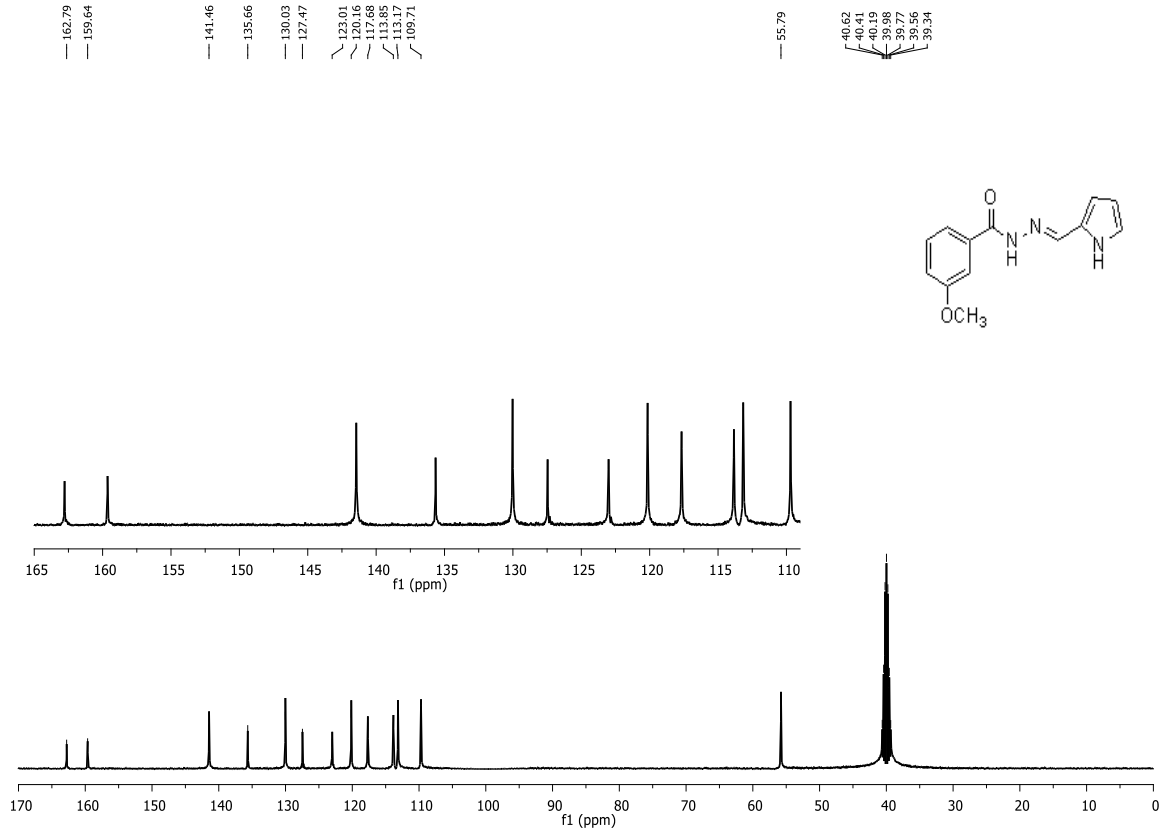
Şekil 4.23. 3i molekülünün FT-IR spektrumu

FT-IR (ATR, cm^{-1} , ν): 3417 (pirol N-H ger. tit.), 3212 (N-H ger. tit.), 3072–3020 (Ar. C-H ger. tit.), 2905-2837(Ar-OCH₃ C-H asimetrik ger. tit.), 1644 (C=O ger. tit.) (amit 1. band) 1607 (N-H düzlem içi eğ. tit.) (amit 2. band)



Şekil 4.24. 3i molekülünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

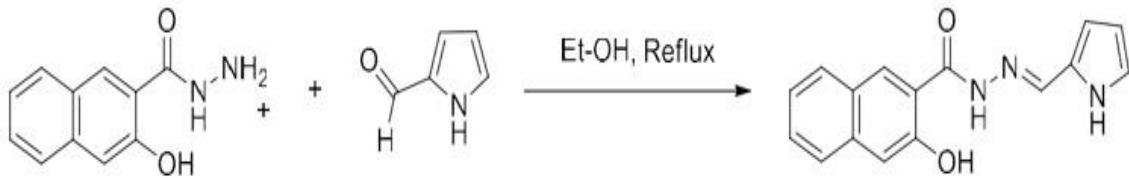
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ : 11.54 (s, amit-NH, 1H), 11.47(s, pirol-NH, 1H), 8.28(s, C=NH, 1H), 7.50-7.39 (m, Ar.CH, 3H), 7.14 (d, $J=7.2$ Hz, o-hidroksi CH, 1H), 6.96 (s, pirol-H₅, 1H), 6.54 (s, pirol-H₃, 1H), 6.16 (s, pirol-H₄, 1H), 3.86 (s, -OCH₃, 3H)



Şekil 4.25. 3i molekülünün ^{13}C -APT NMR spektrumu

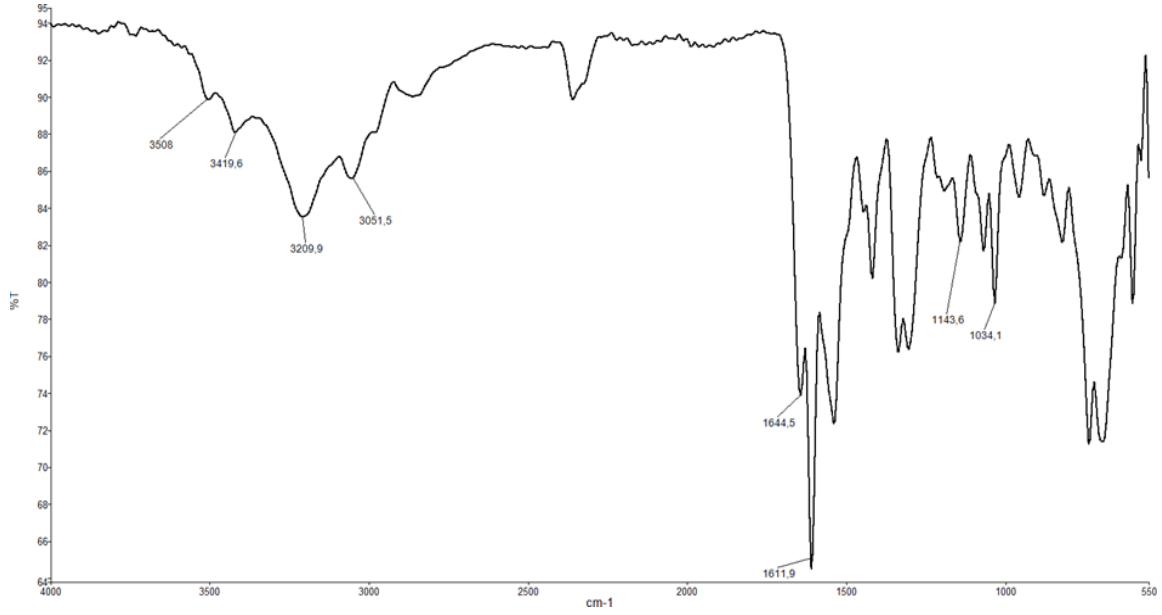
^{13}C -APT NMR (DMSO-d_6) δ : 162.79, 159.64, 141.46, 135.66, 130.03, 127.47, 123.01, 120.16, 117.68, 113.85, 113.17, 109.71, 55.79.

4.1.10. N'-((1H-pirol-2-il)metilen)-3-hidroksi-2-naftohidrazid (3j)



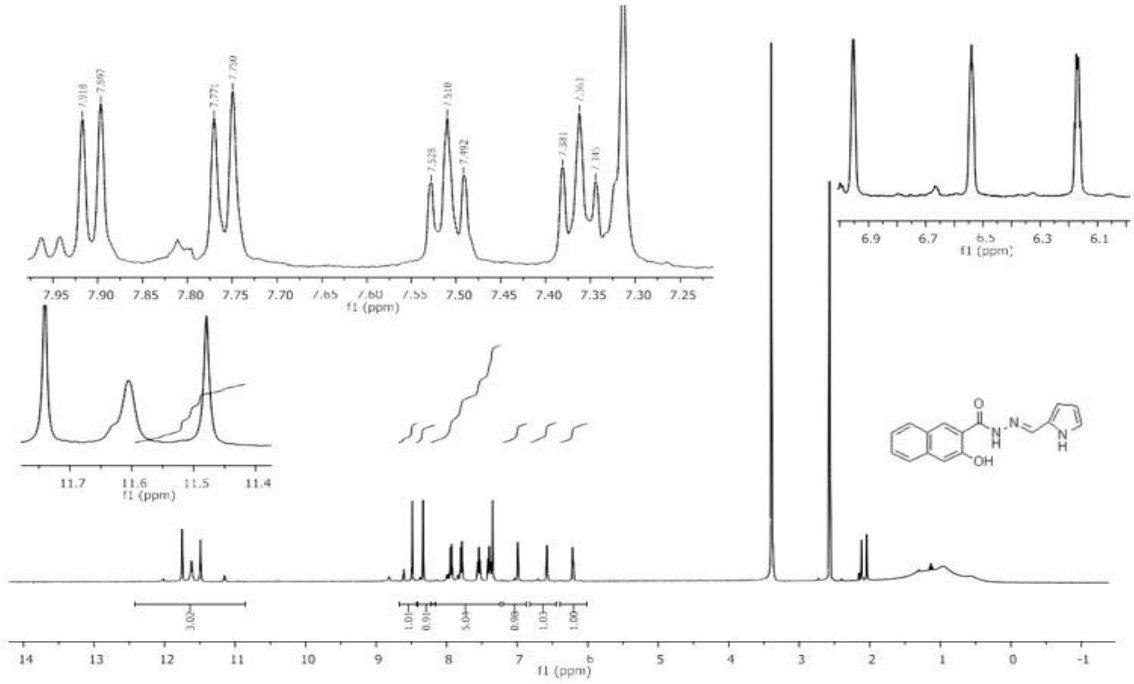
1 mmol 3-hidroksi-2-naftoikasithidrazit (2.02 gr) ve pirol-2-karboksaldehit (0.95 gr) mutlak etanolde çözülür. Reaksiyon ortamı glasiyel asetik asit ile asitlendirildikten sonra 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Fazla çözücü ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra

oluşan katı süzülür, soğuk dietileter ile yıkanır. Katı heksanda kristallendirilir. Renk: açık kahve, e.n: 189-190 °C



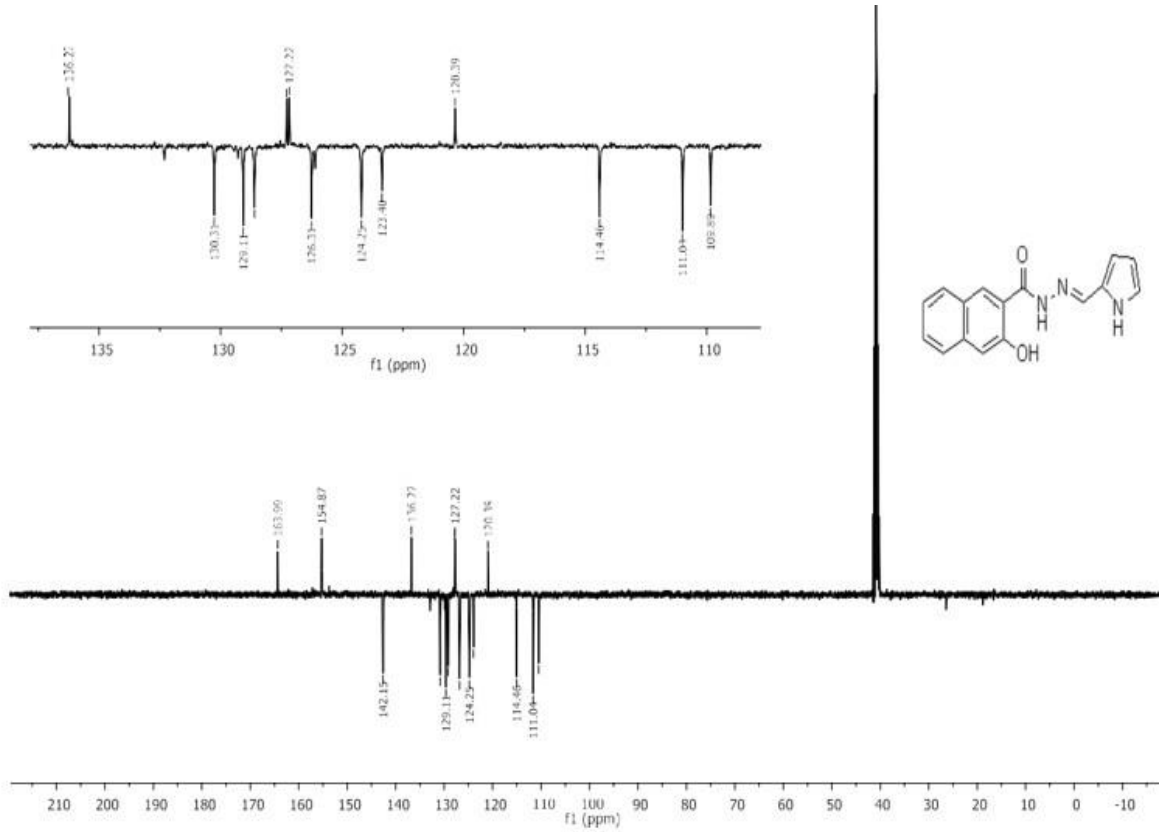
Şekil 4.26. 3j molekülünün FT-IR spektrumu

FT-IR (ATR, cm^{-1} , ν): 3508 (O-H ger. tit.), 3420 (pirol N-H ger. tit.), 3210 (N-H ger. tit.), 3072–3010 (Ar. C-H ger. tit.), 1645 (C=O ger. tit.(amit 1. band)), 1612 (N-H düzlem içi eğ. tit. (amit 2. band)).



Şekil 4.27. 3j molekülünün ¹H-NMR spektrumu

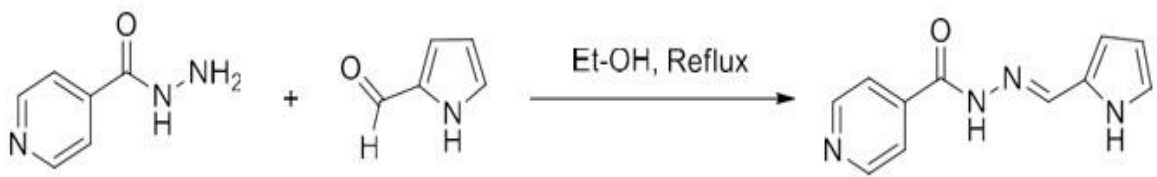
¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 11.75(s, amit-NH, 1H), 11.61(y, OH, 1H), 11.49(s, pirol-NH, 1H), 8.46(s, -C=NH, 1H), 8.44 (s, naftil-H3, 1H), 7.91 (d, *J*=8.4, naftil-H4, 1H), 7.76 (d, *J*=8.4, naftil-H7, 1H), 7.36 (t, *J*=7.2, naftil-H5, 1H), 7.52 (t, *J*=7.2, naftil-H6, 1H), 7.32 (s, naftil-H8, 1H), 6.96 (s, pirol-H5, 1H), 6.54 (s, pirol-H3, 1H), 6.16 (s, pirol-H4, 1H).



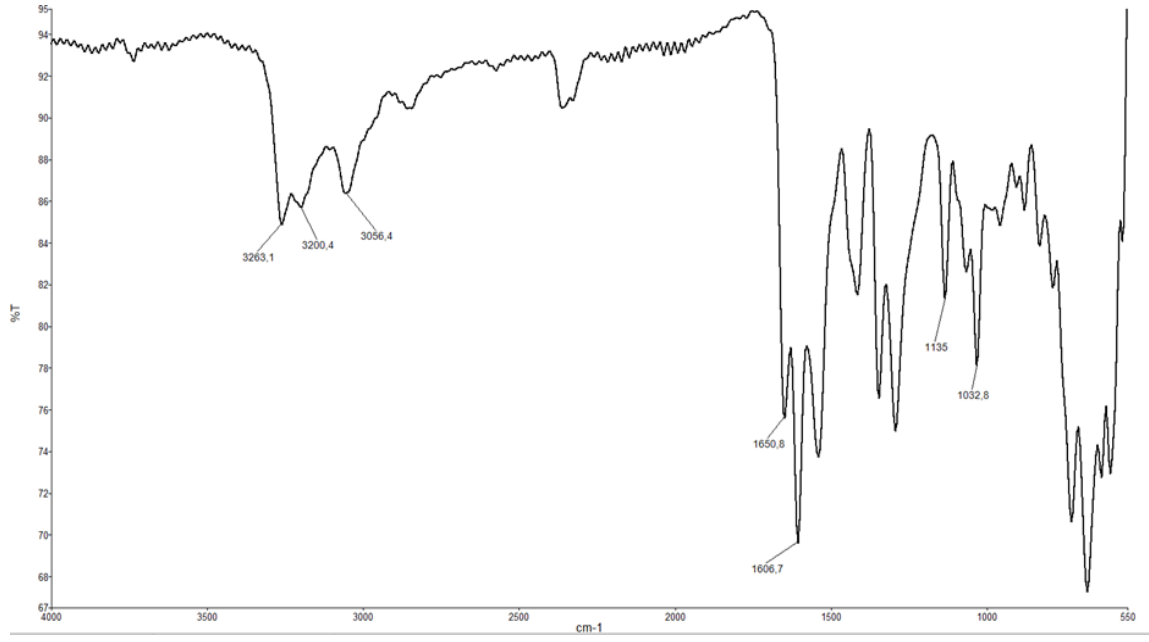
Şekil 4.28. 3j molekülünün ^{13}C -APT NMR spektrumu

^{13}C -APT NMR (DMSO- d_6) δ : 163,99, 154,87, 142,15, 136,27, 130,31, 129,11, 128,65, 127,32, 127,22, 126,31,124,25, 123,40, 120,39, 114,46, 111,04, 109,89.

4.1.11. N'-((1H-pirol-2-il)metilen)izonikotinohidrazit (3k)

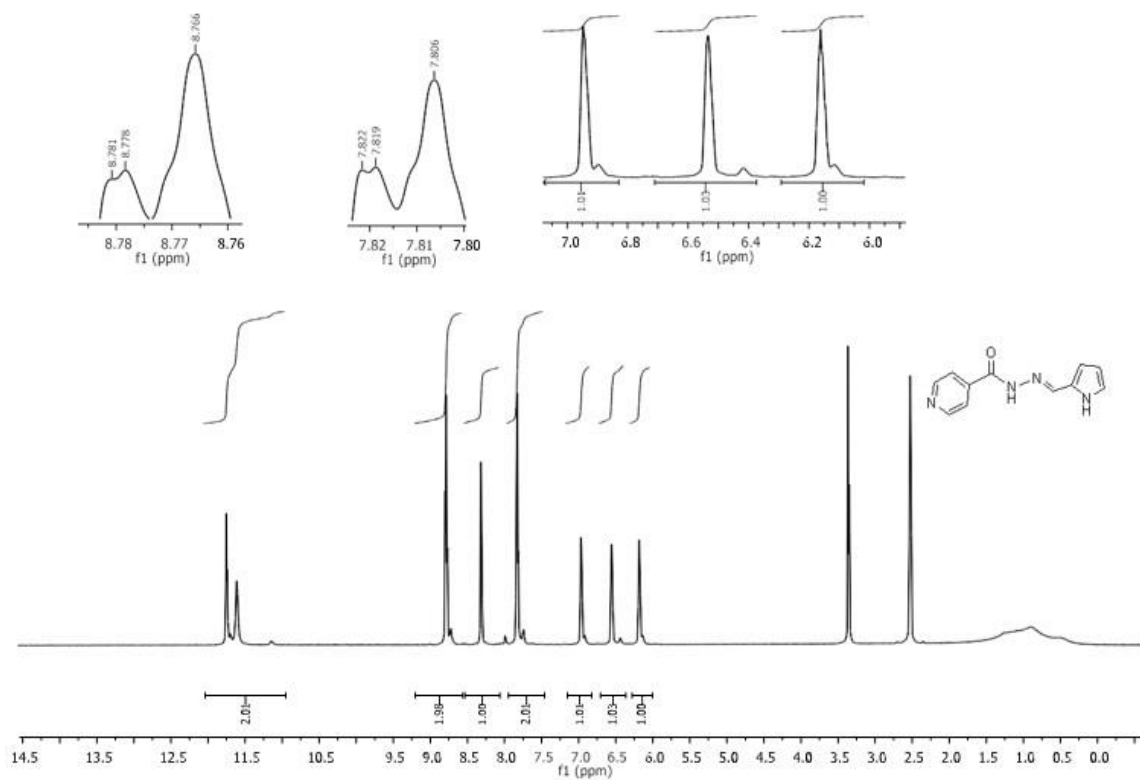


1 mmol 4- Piridinkarboksilikasithidrazid(1.37gr) ve Pirol-2- karboksaldehit (0.95 gr) mutlak etanolde çözülür. Reaksiyon ortamı glasiyel asetik asit ile asitlendirildikten sonra 12 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Fazla çözücü ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra oluşan katı süzülür, soğuk dietiler ile yıkanır. Katı etanol-dioksan (1:1) karışımında kristallendirilir. Renk: kiremit, e.n: 230-233 °C.



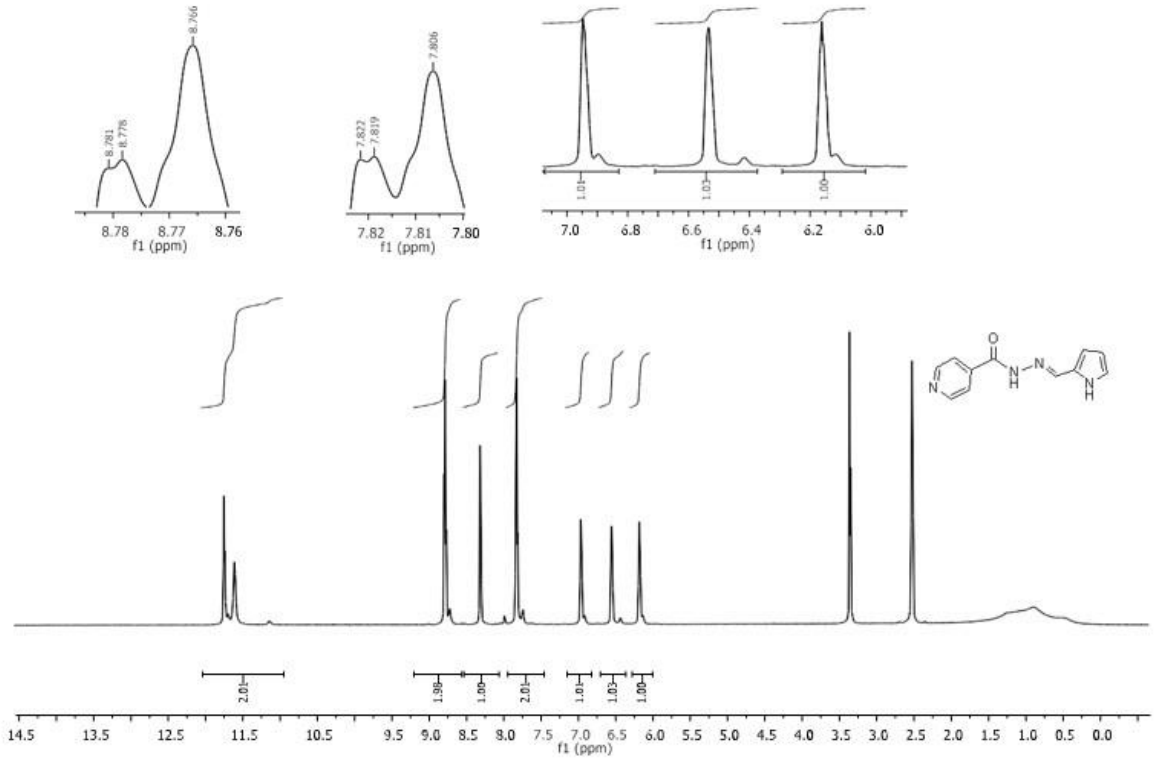
Şekil 4.29. 3k molekülünün FT-IR spektrumu

FT-IR (ATR, cm^{-1} , ν): 3263 (pirol N-H ger. tit.), 3200 (amit N-H ger. tit.), 3076-3034 (Ar. C-H ger. tit.), 1650 (C=O ger. tit. (amit 1. band)), 1606 (N-H düzlem içi eğ.tit. (amit 2. band)).



Şekil 4.30. 3k molekülünün ¹H-NMR spektrumu

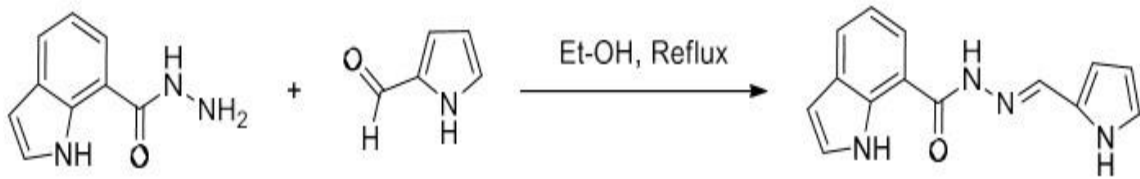
¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 11.53(s, amit-NH, 1H), 11.51(s, pirol-NH, 1H), 8.77 (dd, $J=5.00, 1.20$, py. N-CH, 2H), 8.35(s, -C=NH, 1H), 7.81 (dd, $J=5.00$, 1.60, 2H, py. C-CH), 6.95 (s, pirol-H1, 1H), 6.72 (s, pirol-H3, 1H), 6.15 (s, pirol-H2, 1H).



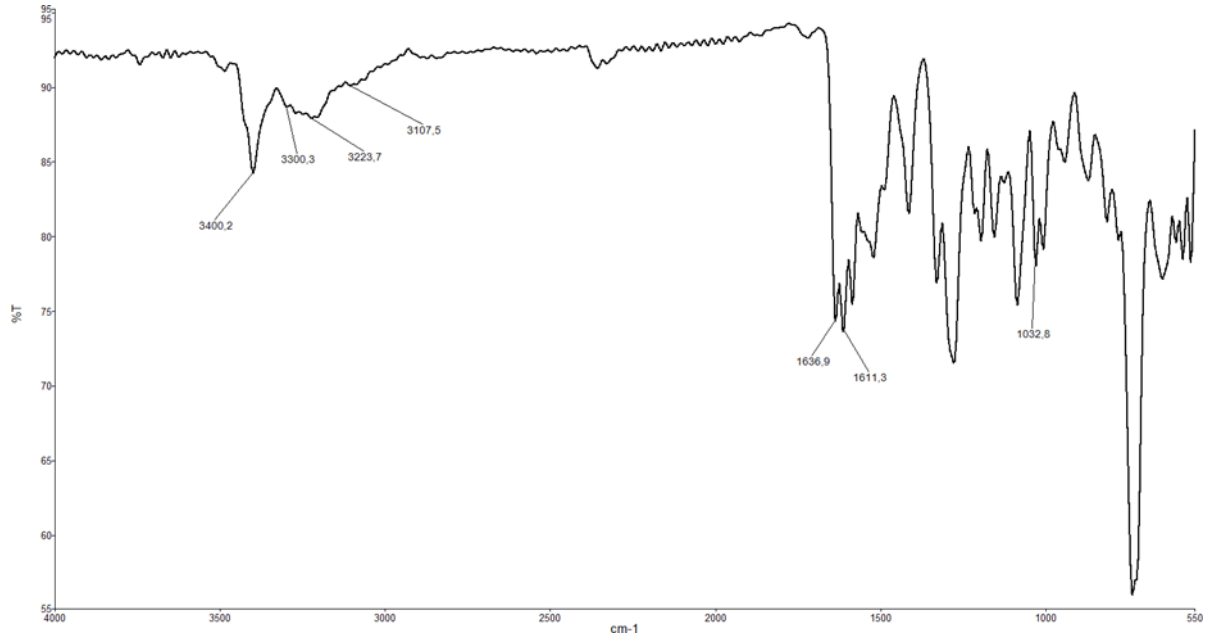
Şekil 4.31. 3k molekülünün ^{13}C -APT NMR spektrumu

^{13}C -APT NMR (DMSO- d_6) δ : 161.48, 150.73, 142.43, 141.27, 127.25, 123.43, 121.96, 114.44, 109.89.

4.1.12. N'-((1H-pirol-2-il)metilen)-1H-indol-7-karbohidrazid (3l)

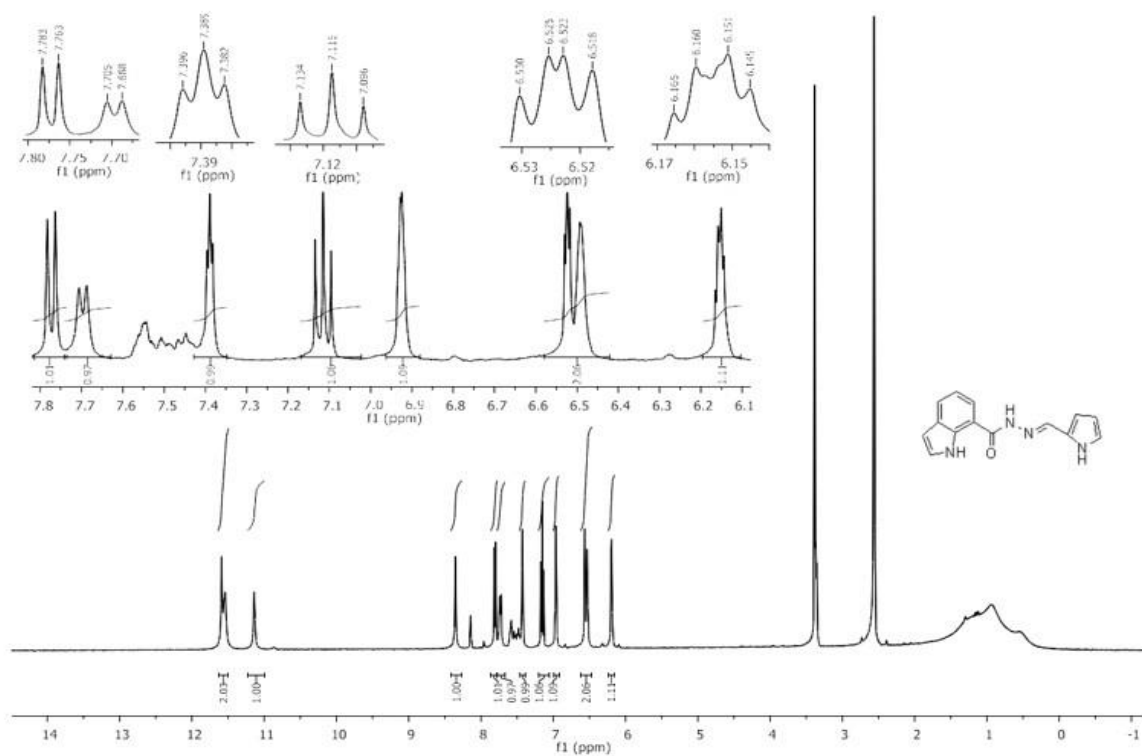


1 mmol 1H-indol-7-karbohidrazid (1.75 gr) ve pirol-2-karboksaldehit (0.95 gr) mutlak etanolde çözülür. Reaksiyon ortamı glasiyel asetik asit ile asitlendirildikten sonra 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Fazla çözücü ortamdandan uzaklaştırıldıktan sonra oluşan katı süzülür, soğuk dietileter ile yıkanır. Katı etanol-dioksan (1:2) karışımında kristallendirilir. Renk: bej, e.n: 206-209°C.



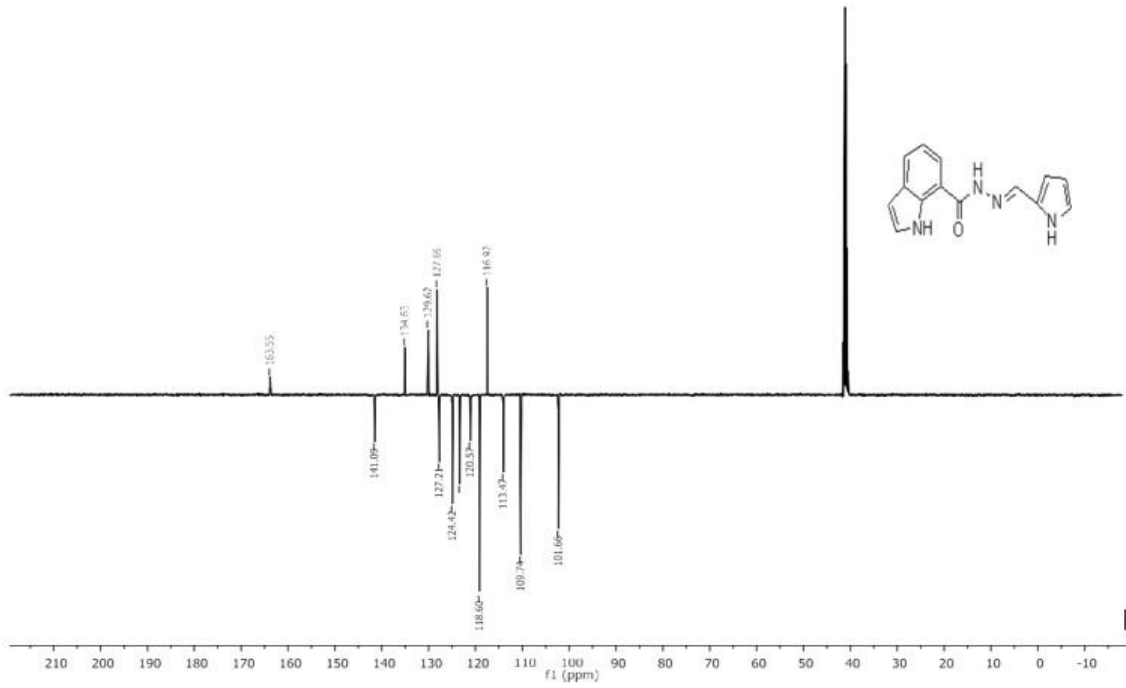
Şekil 4.32. 31 molekülünün FT-IR spektrumu

FT-IR (ATR, cm^{-1} , ν): 3400 (indol N-H ger. tit.), 3300 (pirol N-H ger. tit.), 3223 (amit N-H ger. tit.), 3107- 3028 (Ar. C-H ger. tit.), 1637 (C=O ger. tit. (amit 1. band)), 1611 (N-H düzlem içi eğ. tit. (amit 2. band)).



Şekil 4.33. 31 molekülünün ¹H-NMR spektrumu

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 11.58(s, amit-NH, 1H), 11.53(s, indol-NH, 1H), 11.13(s, pirol-NH, 1H), 8.33(s, -C=NH, 1H), 7.77 (d, $J = 7.80$ Hz, indol H4, 1H), 7.70 (t, $J = 2.8$ Hz, indol H2, 1H), 7.39 (d, $J = 7.80$ Hz, indol H6, 1H), 7.12 (t, $J = 7.80$ Hz, indol H5, 1H), 6.93 (s, pirol-H5, 1H), 6.52 (dd, $J = 2.00, 1.20$ Hz, pirol-H3), 6.16 (s, indol-H3, 1H), 6.16 (dd, $J = 3.6, 2.0$ Hz, pirol-H4, 1H).



Şekil 4.34. 3l molekülünün ¹³C-APT NMR spektrumu

¹³C-APT NMR (DMSO-d₆) δ: 163.55, 141.09, 134.63, 129.62, 127.69, 127.21, 124.42, 122.84, 120.57, 118.60, 116.92, 113.47, 109.74, 101.66.

4.2. Sentezlenen Bileşiklerin Biyolojik Aktivite Bulguları

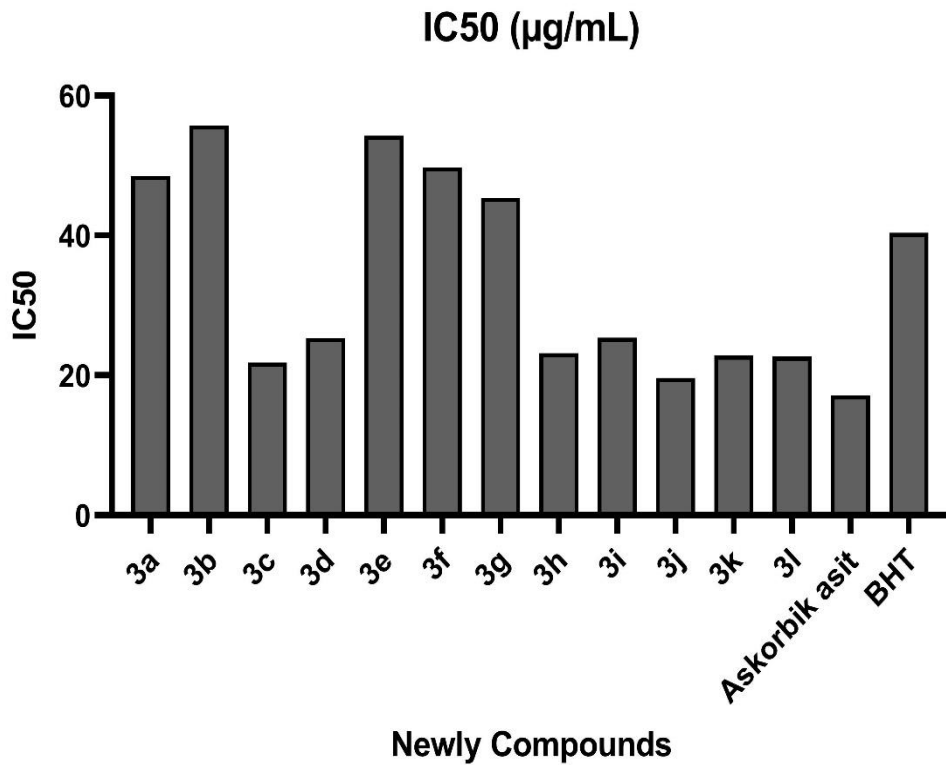
4.2.1. İn Vitro Antioksidan Aktivitelerin Değerlendirilmesi

DPPH Süpürme Aktivitesi bakımından sentezlenen tüm bileşikler değerlendirilmiştir. Bileşiklerin DPPH radikalini temizleme özellikleri birbirinden ve standartlardan çok farklı ve değişken bulunmuştur.

3b, 3d, 3e bileşikleri en düşük DPPH temizleme aktivitesi gösterirken, diğer bileşikler çok daha yüksek aktivite göstermiştir. Hatta bileşiklerin standart olarak kullandığımız BHT ve Askorbik asit çözeltilerine yakın aktivite göstermişlerdir. DPPH metoduna göre en yüksek antioksidan özellik gösteren askorbik asit standardı olmuştur. Bileşikler için DPPH radikalini temizleme aktivitesi sırasıyla şu şekilde tespit edilmiştir: Askorbik Asit>3a>3c>3f>3g>BHT>3h>3i>3j>3k>3b>3d>3e

Tablo 4.1. Test bileşikleri ve standart antioksidanların DPPH süpürme aktiviteleri

Bileşikler	IC50 (Mikrogram/mL) ($\mu\text{g/mL}$)
3a	48,5 \pm 5,3
3b	55,7 \pm 5,7
3c	21,8 \pm 6,4
3d	25,3 \pm 4,9
3e	54,3 \pm 8,5
3f	49,7 \pm 8,2
3g	45,4 \pm 7,3
3h	23,2 \pm 7,6
3i	25,4 \pm 5,5
3j	19,6 \pm 5,2
3k	22,8 \pm 5,2
3l	22,7 \pm 6,4
Askorbik asit	17,1 \pm 2,6
BHT	40,4 \pm 5,4



Şekil 4.35. Yeni sentezlenen bileşiklerin (3a-l) DPPH• radikalini süpürme kapasiteleri

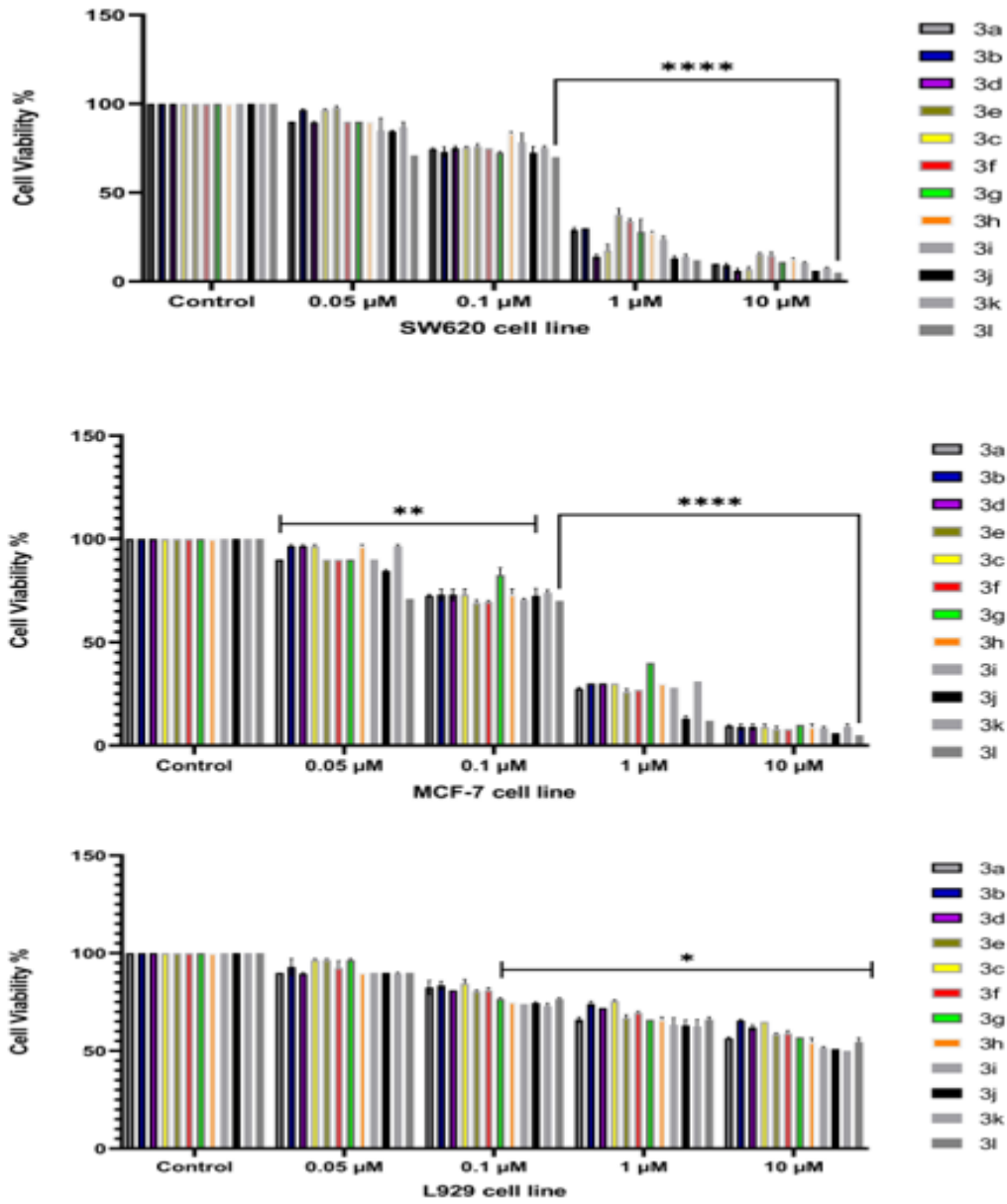
4.2.2. . *In Vitro* Anti-kanserojen Özelliklerin Değerlendirilmesi

MCF-7, SW620 ve L929 hücrelerinde, test edilen bileşiklerin (3a-1) sitotoksitesi, MTT yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Hemen hemen tüm bileşikler 24 saat süresince SW620 ve MCF-7 hücrelerinde yüksek derecede sitotoksik aktivite göstermiştir. Tüm bileşiklerin IC50 değerleri 10 μ M değerinin oldukça aşağısındadır.

Tablo 4.2. Yeni sentezlenen bileşiklerin in vitro sitotoksik aktivitesini gösteren IC50 değerleri

IC 50 DEĞERLERİ (μ M)			
	SW620	MCF-7	L929
3a	6,75	6,35	25,8
3b	4,51	4,33	40,6
3c	0,72	4,61	55,5
3d	0,62	4,89	37,3
3e	3,58	5,03	35,2
3f	3,01	5,26	38,6
3g	6,63	0,83	23,7
3h	2,3	4,09	20,9
3i	1,97	5,38	22,4
3j	0,47	0,35	19,8
3k	0,82	4,26	16,9
3l	0,18	0,2	20,3

Buna rağmen bileşiklerin, L929 fibroblast hücre hattında ise sitotoksik aktivitesinin bulunduğu fakat MCF7 ve SW620 hücre hatlarında bulunan sitotoksik aktivite değerlerine nazaran daha zayıf olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.2.1.). Buna ilaveten, yeni sentezlenen 12 adet bileşiğinin normal fibroblast hücrelerinden oluşan L929 hücre hattında sadece yüksek konsantrasyonlarda (>15 μ M) sitotoksik etkili olduğu gösterilmiştir. İnkübasyon süresinin uzamasıyla hücrelerin etken madde ile daha fazla etkileşim halinde kaldıkları dikkatte alındığında, bileşiklerin anti-kanser aktivitesinin orantılı olarak artacağı literatür verileri tarafında desteklenmektedir.

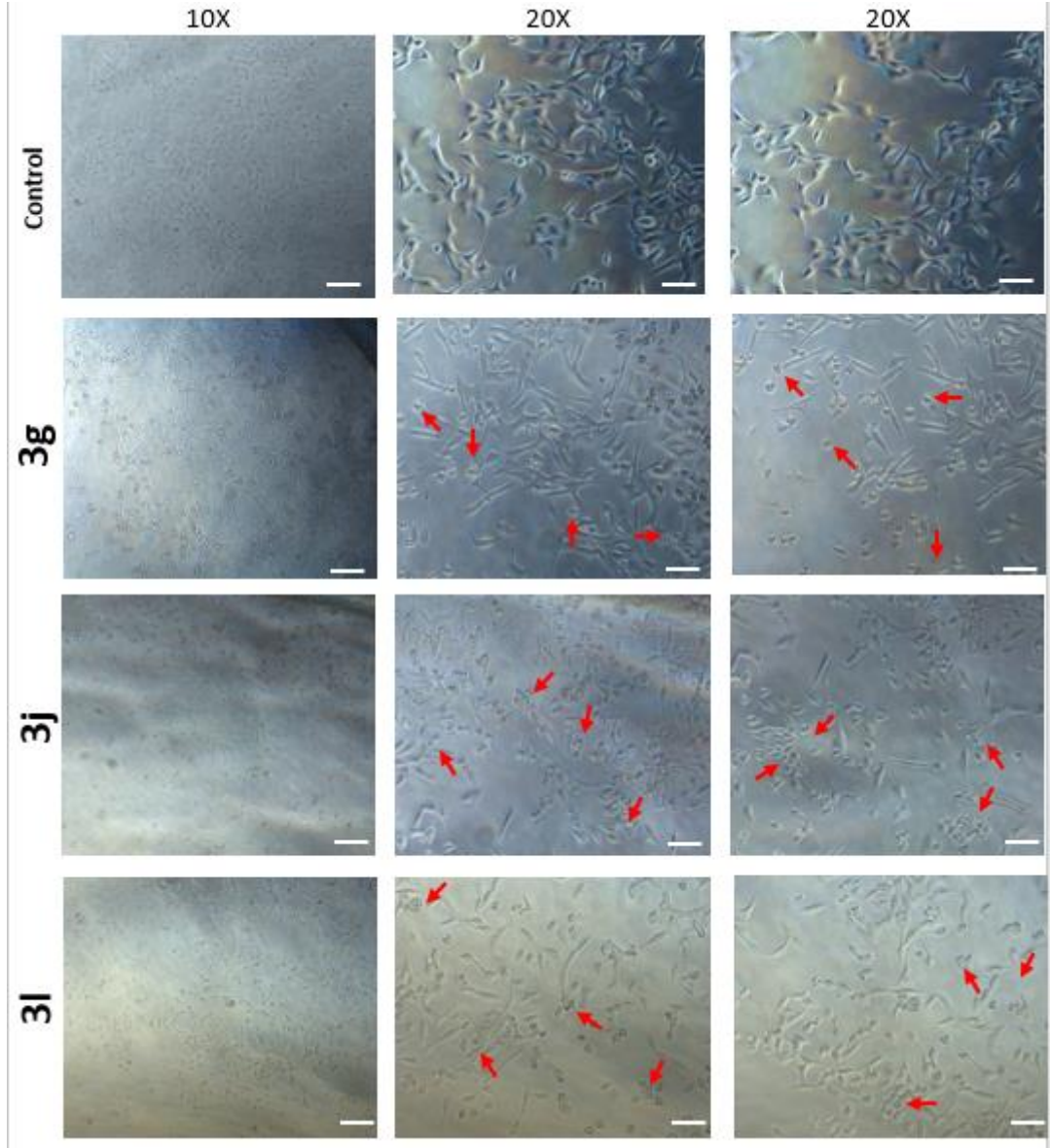


Şekil 4.36. Yeni sentezlenen bileşiklerin hücre hatlarındaki % Hücre canlılık sonuçları. Aktiviteler 24 saatlik inkübasyon sonucunda değerlendirilmiştir (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

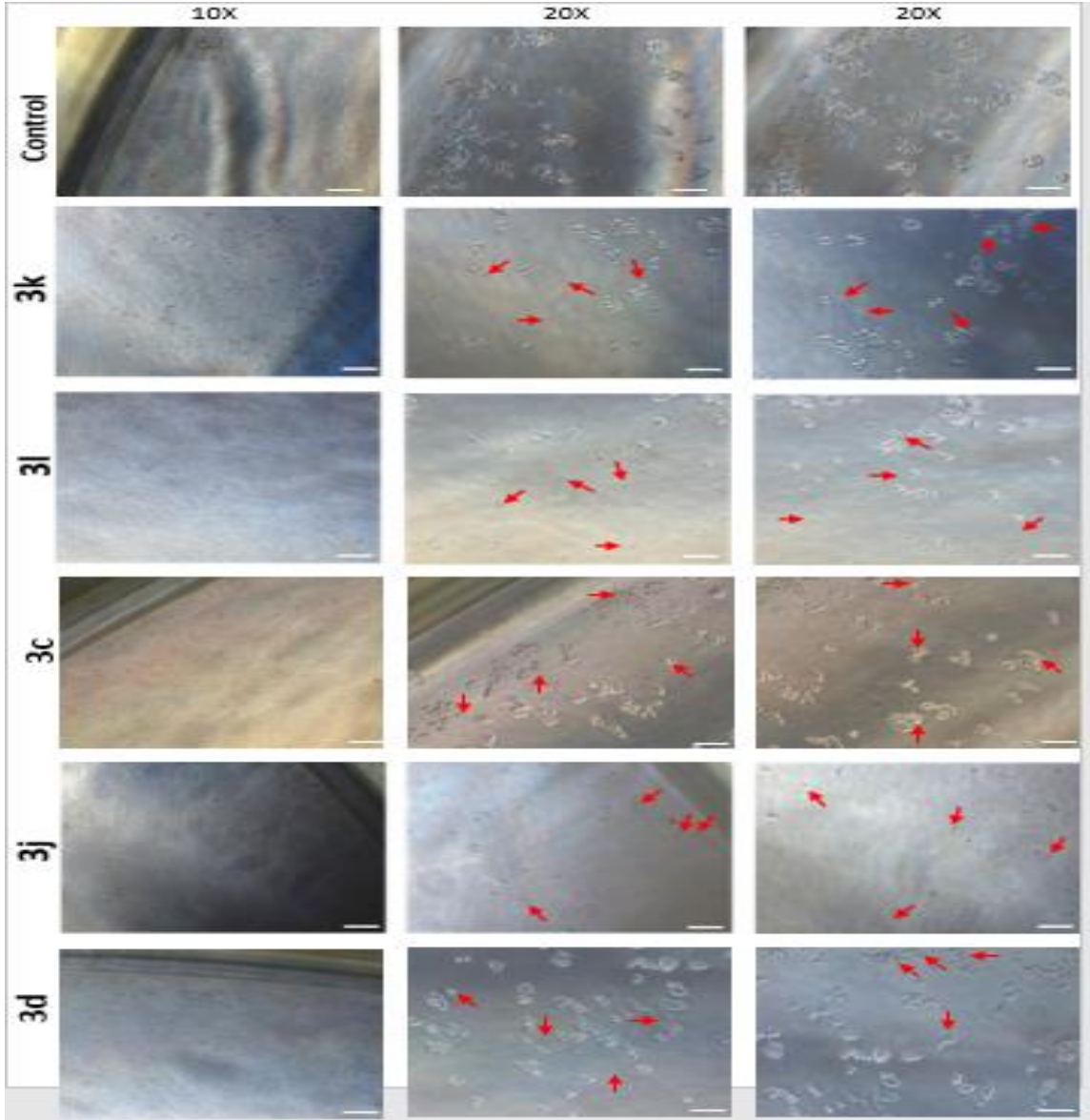
Sonuç olarak; bileşiklerin SW620 ve MCF-7 hücre hatları üzerinde iyi düzeyde sitotoksik aktivitelerinin bulunduğu ve SW620 hücresi üzerinde yeni sentezlenen bileşiklerin daha etkili olduğu gözlenmiştir.

IC₅₀ dozlarında test bileşikleri ile muamele edilmiş MCF-7 ve SW620 hücre hatlarının morfolojik görünümü, ZeissAxioinverted mikroskop (10x) ile görüntülenmiştir ve

hücrelerdeki değişimlerin görüntülenmesi sağlanmıştır (şekil 10). Yeni sentezlenen test bileşiklerinin serisi (**3a-1**) moleküllerin SW620 hücrelerine 24 saat uygulandıktan sonra hücrelerin morfolojisi, apoptotik vezikül oluşunu açısından floresans mikroskobu (parlak alanda) ile incelenmiştir. Moleküller IC50 değerinde hücrelere uygulanmıştır. Apoptozda hücre ölümü sırasında hücre morfolojisinde bazı karakteristik değişiklikler gözlenmektedir (Hessler et al., 2005). şekilde gösterildiği gibi, kontrol grubundaki biręok hücre, şeklini ve membran bütünlüğünü korumuştur. Bunun aksine, moleküller uygulandıktan sonra hücre zarı bütünlüğünün bozulması ve hücre sel büzülme gibi morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. Bazı hücrelerde küçük küçük vezikül oluştuğu görülmüştür. Ölü hücrelere benzer karakteristik özellikler sergileyen hücreler şekil üzerinde kırmızı ok ile işaretlenmiştir. şekilde gözlenen morfolojik değişiklikler apoptoz ile uyumlu bulunmuştur. Kısacası, moleküllerin membran yapısında bozulmaya neden olduğu, dolayısıyla hücre içi moleküllerin de ayrışmasına neden olduğu düşünölmektedir. Morfolojik değişiklikler apoptotik hücre ölümünü gösterebilir. Test bileşiklerinden etkilenen hücreler normal yapışık hücre şeklini kaybeder ve birkaç saat içinde birbirinden ayrılmış yuvarlak hücrelere dönüşür. Bu tür ayrı hücreler, plaka yüzeyinden ayrılır. Bu gruplarda gözlenen hücrelerin ayrılması, şekil değiştirmeleri ve yuvarlak, kırık bağımsız hücrelere dönüşmeleri apoptoz görünümü olarak kabul edilmiştir. Sağlıklı fibroblast L929 hücrelerinde test bileşiklerinin 24 saat süresince uygulanması sonucunda elde edilen IC50 değerlerinin >15 μ M olduğu görülmüştür. Yine L929 hücrelerinin morfolojik yapıları ve büyümesi ZeissAxio ters mikroskobu (10x) ile görüntülenmiş olup, test bileşiklerinin olumsuz bir etkisi belirlenmemiştir.



Şekil 4.37. Test bileşiklerinin MCF-7 hücrelerinde uygulama sonrası hücre morfolojileri. (Ölü hücreler kırmızı ok ile işaretlenmiştir. 10X görüntüler için ölçek çubuğu: 100 μm ve 20X görüntüler için ölçek çubuğu: 200 μm 'dir.)



Şekil 4.38. Test bileşiklerinin SW-620 hücrelerinde uygulama sonrası hücre morfolojileri. (Ölü hücreler kırmızı ok ile işaretlenmiştir. 10X görüntüler için ölçek çubuğu: 100 μm ve 20X görüntüler için ölçek çubuğu: 200 μm 'dir.)

Yeni sentezlenen bileşiklerin uygulandığı kanser hücre hatları olan MCF-7 ve SW620 hücre hatları ile sağlıklı L929 hücre hattından gelen IC50 değerlerinin birbirine orantılanması sonucu bitki ekstralarının en iyi hangi hücreler üzerinde etkili olduğuna dair karşılaştırma sonuçları elde edilmiştir.

Seçicilik indeksi olarak tanımlanan bu karşılaştırma da bileşiklerin seçicilik indeksi olarak 112,77 değeri ile 3l bileşiğinin SW620 hücre hattında en iyi antikanserojen aktivite gösterdiği, yine 3l bileşiğinin ise 101,5 seçicilik indeksi değeriyle MCF-7 hücre hattında

en yüksek antikanserojen aktiviteyi gösterdiği görülmektedir. Yine yeni sentezlenen bileşiklerin Seçicilik indeksi değerlerinin SW620 hücrelerinde 3,82 ile 112,77 değerleri arasında dağılım gösterdikleri ve MCF-7 hücre hattında ise 3,97 ile 101,5 değerleri arasında dağılım gösterdikleri ve birbirine göreli olarak benzer olduğu da Tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 4.3. Test bileşiklerinin L929, MCF-7 ve SW620 hücre hatlarındaki IC50 değerlerinin karşılaştırılmasından elde edilen Seçicilik İndeksi (Selectivity Index)

Seçicilik İndeksi (Selectivity Index)		
Bileşikler	IC50 (L929/SW620)	IC50 (L929/MCF-7)
3a	3,82	4,06
3b	9,01	9,38
3c	77,08	12,04
3d	60,16	7,63
3e	9,83	7,00
3f	12,82	7,34
3g	3,57	28,55
3h	9,09	5,11
3i	11,37	4,16
3j	42,13	56,57
3k	20,61	3,97
3l	112,77	101,5

4.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Sentezlenen 12 açilhidrazon (**3a-l**) bileşiği, 5 farklı patojene karşı antimikrobiyal aktiviteleri bakımından test edilmiş olup bu kimyasalların dendiğimiz patojenlere karşı herhangi bir önemli antimikrobiyal etkisi belirlenmemiştir (Tablo 5). MİK değerleri $\leq 0,1$ mg/mL olduğunda madde önemli etkili; MİK değerleri $0,1 < \text{MİK} \leq 0,625$ mg/mL olduğunda orta etkili, MİK değeri $> 0,625$ mg/mL olanlar ise düşük etkili olarak sınıflandırılır (Kuate, 2010; Awouafack vd., 2013). Mevcut bulgular neticesinde; **3a-l** bileşiklerinin genel olarak bazı mikroorganizmalar üzerinde orta düzeyde antimikrobiyal

aktivite gösterdiği ortaya çıkmıştır. Sentezlenen bileşiklerin tümünün *B. cereus* mikroorganizması üzerinde etkili olmadığı görülmüştür.

Tablo 4.4. Yeni sentezlenen bileşiklerin antimikrobiyal etkisi

Mikroorganizmalar					
Bileşikler	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. auroginosa</i>	<i>B.cereus</i>	<i>C. albicans</i>
3a	0,6	>5	>5	>5	>5
3b	>5	0,6	>5	>5	>5
3c	0,3	0,3	0,6	>5	0,6
3d	0,3	0,3	0,3	>5	0,6
3e	0,6	0,6	>5	>5	0,6
3f	>5	>5	>5	>5	>5
3g	>5	>5	>5	>5	0,6
3h	>5	>5	>5	>5	>5
3i	0,6	0,6	>5	>5	0,6
3j	0,3	0,3	0,6	>5	0,6
3k	0,6	0,3	0,6	>5	0,6
3l	0,3	0,3	0,6	>5	0,6

4.2.4. L929 Hücre Kültüründe Hücrelerin Oksidatif stresinin Değerlendirilmesi Analiz Sonuçları

4.2.4.1. Lipidperoksidasyonunun göstergesi Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Yeni sentezlenen 12 farklı türev bileşiklerinin (3a-1) 100mikromolar konsantrasyonlarda çalışmadaki sağlıklı kontrol hücre hattı olan L929 fibroblast hücre hatlarına uygulanmasıyla birlikte, genel olarak hücrelerdeki MDA değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel farklılıklar bulunmamıştır. Ancak 3c, 3d, 3i, 3j, 3k, 3l bileşiklerinde kontrol grubuna göre bir miktar fazla artış gözlenmiştir ve kontrol grubuna göre bu bileşiklerin uygulandığı hücrelerdeki lipit peroksidasyonunun göstergesi olan MDA

değerlerindeki artışlar istatistiksel olarak da önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; diğer bileşiklerde ise hemen hemen tüm doz gruplarında benzer değerler elde edilmiştir.

Tablo 4.5. L929 hücre hatlarında 100 μ M konsantrasyonda test bileşiği uygulandığında 24 saat sonrasında MDA seviyeleri (* $p<0,05$)

L929 Hücre Hattı MDA seviyesi (nmol/gP)	
Bileşikler	Ortalama \pm SH
Kontrol	4,5 \pm 0,9
3a	4,7 \pm 1,0
3b	4,9 \pm 0,9
3c	5,6 \pm 1,3*
3d	6,5 \pm 1,7*
3e	4,8 \pm 1,6
3f	4,7 \pm 1,5
3g	4,6 \pm 0,9
3h	4,9 \pm 0,9
3i	6,9 \pm 1,8*
3j	6,8 \pm 1,3*
3k	6,5 \pm 1,8*
3l	6,8 \pm 1,5*

4.2.4.2. Toplam Antioksidan Seviyenin Değerlendirilmesi

Yapılan deneysel çalışma sonucunda saptanan verilere göre, 100 μ M konsantrasyonlarda test bileşiği (**3a-l**) uygulanan L929 hücre hatlarında, TAS değerlerinde kontrol grubu verilerine göre bazı bileşiklerde istatistiksel olarak anlamlı ($P<0,05$) değişiklikler tespit edilmiştir (Tablo 7). Ancak genel olarak uygulanan test bileşiklerinin L929 hücre hattında antioksidan kapasite üzerinde önemli değişimler oluşturmadığı söylenebilir.

Tablo 4.6. Farklı konsantrasyonlarda test bileşikleri uygulanmış L929 hücre hatlarında TAS düzeyleri

L929 Hücre Hattı TAS seviyesi (milimol/L)	
Bileşikler	Ortalama±SH
Kontrol	0,40±0,05
3a	0,41±0,03
3b	0,44±0,05*
3c	0,47±0,04*
3d	0,45±0,05*
3e	0,43±0,05*
3f	0,41±0,11
3g	0,38±0,06
3h	0,39±0,06
3i	0,38±0,04
3j	0,39±0,05
3k	0,36±0,06*
3l	0,35±0,05*

* İşaretiyle gösterilen gruplarda kontrol grubuna göre TAS seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artma ve azalmalar görülmüştür ($p<0,05$).

4.2.4.2. Toplam Oksidan Seviyenin (TOS) Değerlendirilmesi

100µM konsantrasyonlarda test bileşikleri uygulanmış L929 hücre hatlarında toplam oksidan seviyeleri (TOS) kontrol grubu verileri ile karşılaştırıldığında, tüm deneysel gruplarda istatistiksel olarak anlamlı azalmaların ve artışların ($P<0,05$) olduğu saptanmıştır (Dastan, 2017). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, **3c**, **3d**, **3i**, **3j**, **3k** ve **3l** bileşiklerinde en yüksek TOS değerleri tespit edilmiştir ($P<0,05$). Genel olarak diğer bileşiklerinin uygulandığı gruplarda kontrol grubuna göre TOS miktarlarında istatistiksel anlamlı değişimler görülmemektedir.

Tablo 4.7. Farklı konsantrasyonlarda test bileşikleri uygulanmış L929 hücre hatlarında TOS düzeyleri

L929 Hücre Hattı TOS seviyesi ($\mu\text{mol/L}$)	
Bileşikler	Ortalama \pm SH
Kontrol	0,89 \pm 0,14
3a	0,87 \pm 0,14
3b	0,86 \pm 0,13
3c	0,99 \pm 0,14*
3d	0,98 \pm 0,15*
3e	0,88 \pm 0,13
3f	0,86 \pm 0,11
3g	0,89 \pm 0,15
3h	0,89 \pm 0,12
3i	0,99 \pm 0,13**
3j	0,98 \pm 0,10**
3k	0,99 \pm 0,11**
3l	0,99 \pm 0,10**

** işaretiyle gösterilen gruplarda kontrol grubuna göre TOS seviyesinde artma görülmüştür ($p < 0,05$).

4.2.4.3. L929 Hücrelerinde Test Bileşikleri Uygulanmasıyla Oksidatif Stres İndeksindeki Değişmeler

Yapılan deneysel çalışmaya göre, 100 μM konsantrasyonlarda test bileşikleri (3a-1) uygulanan L929 hücre hatlarında, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında OSİ değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0,05$) azalmalar ve artmalar tespit edilmiştir (Dastan,

2017). Sadece **3b** ve **3e** bileşiklerinin uygulandığı L929 hücrelerinde kontrol grubuna göre oksidatif stres indeksinin istatistiksel anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Yine **3i**, **3j**, **3k** ve **3l** bileşiklerinin uygulandığı L929 hücre hattında toplam oksidatif stres indeksinin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$) ve diğer bileşiklerin uygulandığı hücre hatlarında ise oksidatif stres indeksinin kontrol grubuyla anlamlı bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir.

Tablo 4.8. Test bileşikleri uygulanmış L929 hücre hatlarında OSI düzeyler

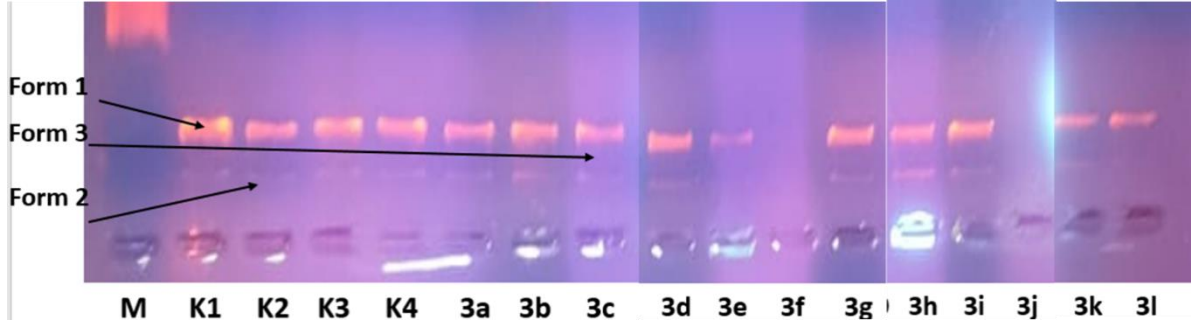
L929 Hücre Hattı OSI seviyesi	
Bileşikler	Ortalama \pm SH
Kontrol	0,22 \pm 0,09
3a	0,21 \pm 0,05
3b	0,20 \pm 0,09*
3c	0,21 \pm 0,09
3d	0,22 \pm 0,05
3e	0,20 \pm 0,04*
3f	0,21 \pm 0,05
3g	0,23 \pm 0,07
3h	0,23 \pm 0,06
3i	0,26 \pm 0,08**
3j	0,25 \pm 0,05**
3k	0,28 \pm 0,05**
3l	0,26 \pm 0,05**

* işaretiyle gösterilen gruplarda kontrol grubuna göre Oksidatif stres indeksi değerlerinde azalmalar olduğu görülmüştür ($p<0,05$). ** işaretiyle gösterilen gruplarda kontrol grubuna göre Oksidatif stres indeksi değerlerinde artmalar görülmüştür ($p<0,05$).

4.2.5. DNA hasarını önleyici aktivite sonuçları

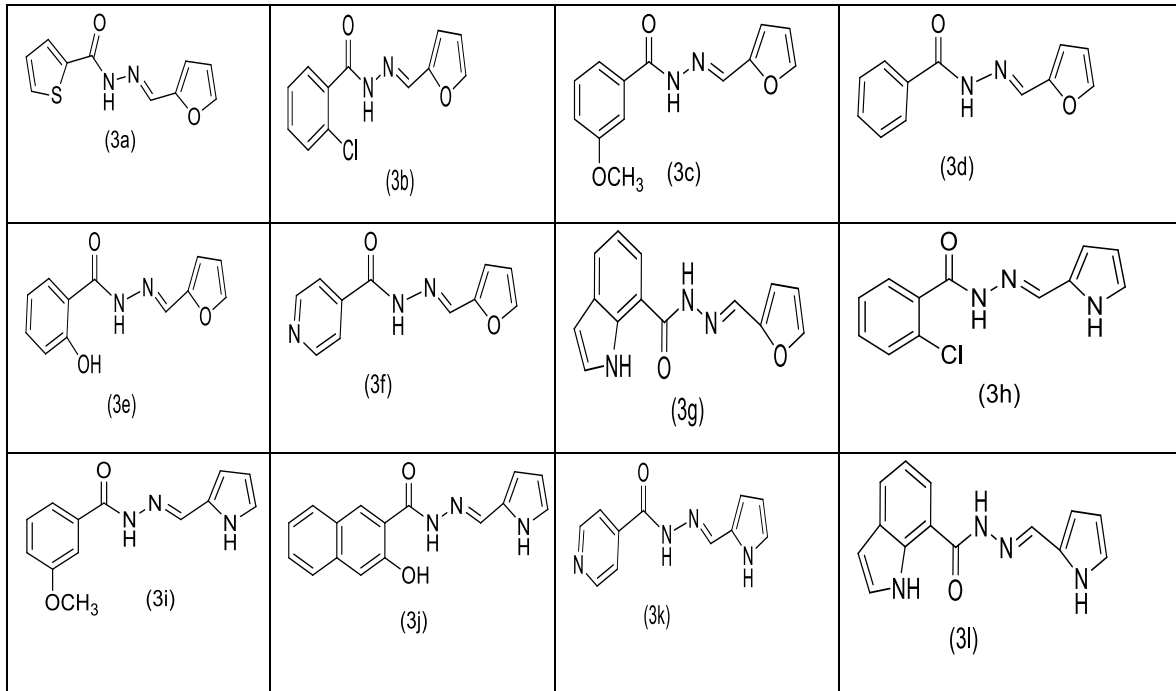
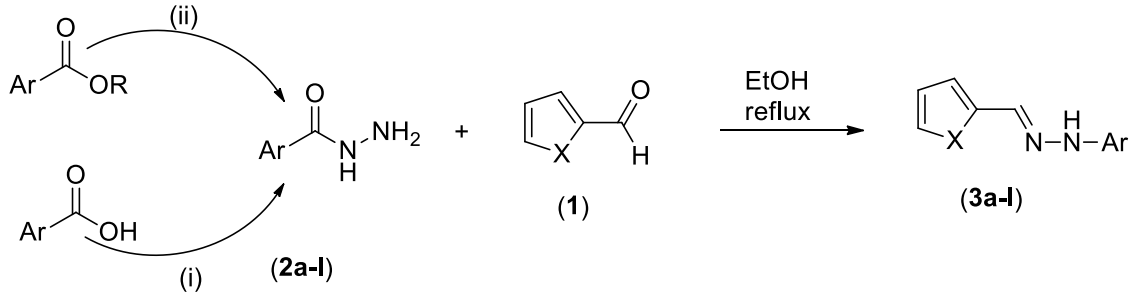
Bu tez çalışmamızda; pBR322 plazmit DNA'sına H₂O₂ ve UV maruziyeti eşliğinde hasar meydana getirilmiş ve oluşan hasarın 12 farklı yeni sentezlenmiş bileşik ile muamele

edilmiş deney ortamında kapalı dairesel pBR322 plazmit DNA'sının süper sarmalını modifiye etme yetenekleri araştırılmıştır. Bu yöntemle göre, türev bileşiklerin DNA hasarını önleme yeteneği, DNA'ya zarar veren faktörler olan hidrojen peroksit (H₂O₂) ve UV ışığı varlığında değerlendirilmiştir. DNA hasarına karşı türev bileşiklerin koruyucu etkisinin görüldüğü resimlerde, jel üzerinde plazmit DNA'sının 2 bandı arasında form I ve form II bantlarının yoğunluğunun azalmasıyla birlikte, form III bandının ortaya çıktığı görülmektedir (Şekil 12). Genel olarak bileşikler 100 µM ve 10 µM dozlarda olacak şekilde 2 farklı yüksek doz konsantrasyonda uygulanmıştır. Bileşiklerin plazmit DNA'sı üzerindeki koruyucu aktivitesinin genel olarak iyi olduğu, bununla birlikte plazmit DNA'sını yüksek dozlarda daha iyi bir şekilde hasardan korudukları ama düşük dozlarda biraz daha az aktivite gösterdikleri bulunmuştur. Bileşiklerin plazmit DNA'sının süper sarmal DNA yapısını koruyabildiği, jel üzerinde Form 1 bantlarının varlığı ile gösterilmiştir. Aynı zamanda bileşiklerin uygulandığı örneklerden 3f ve 3j bileşiklerinde ise tamamen plazmit DNA'sının eridiği, jel üzerinde görüntülenemediği belirlenmiştir. Bu durumda **3f** ve **3j** bileşiklerinin DNA molekülünü H₂O₂ ve UV hasarına karşı koruyamadığı söylenebilir. Diğer taraftan **3e**, **3k** ve **3l** bileşiklerinin de plazmit DNA'sının Form 1 bandında yoğunluğun azaldığı gözlenmekle birlikte Form 3 bandının daha belirginleştiği söylenebilir. Diğer bileşiklerin oksidatif hasara karşı plazmit DNA'sını daha iyi koruyabildikleri jel üzerindeki bant görünümüne göre söylenebilmektedir. Genel olarak **3f** ve **3j** bileşiğinin kullanıldığı deney grubu dışındaki tüm örneklerde Form 1 bantlarının bulunduğu ama parlaklık seviyesinin değiştiği görülmektedir. Aynı zamanda silik bile olsa Form 2 bandı **3f** ve **3j** dışındaki tüm bileşiklerin kullanıldığı tüplerde tespit edilmiştir. Plazmit DNA'sının Form 3 bandı ise jel üzerinde bazı örneklerde oldukça zayıf olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.39. Test bileşiklerinin DNA koruyucu aktivitesinin agaroz jelde görüntülenmesi. (1.Sütun: M: DNA büyüklük belirteci, K1 Sütunu: Plazmit DNA + distile su, K2 Sütunu: Plazmit DNA + distile su+ UV, K3 Sütunu: Plazmit DNA + distile su + UV+ Hidrojen peroksit, K4 Sütunu: Plazmit DNA + distile su + Hidrojen peroksit, 3a-3l: Plazmit DNA + UV+ Hidrojen peroksit + 100 μ M konsantrasyonda sırasıyla bileşikler kullanılmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER



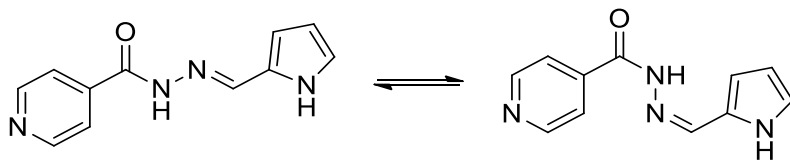
Şekil 5.1. Genel sentez şeması

Bu tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin erime noktaları tespit edildi. Kristalize edilen sonuç maddelerin spektral yapılarının aydınlatılması FT-IR, ¹H-NMR ve ¹³C-APT NMR spektroskopik yöntemlerle gerçekleştirildi. (3a-l) bileşiklerin yapısında yer alan 3140-3280 cm⁻¹ aralığında amit NH simetrik ve asimetrik gerilme titreşimleri, 1638-1678 cm⁻¹ aralığında amit karbonil grubuna soğurma bantları ile pirol halkasına ait 3400-3420 cm⁻¹

aralığındaki yayvan NH gerilme bandı reaksiyonun gerçekleştiğine işarettir ve literatür ile uyum içindedir.

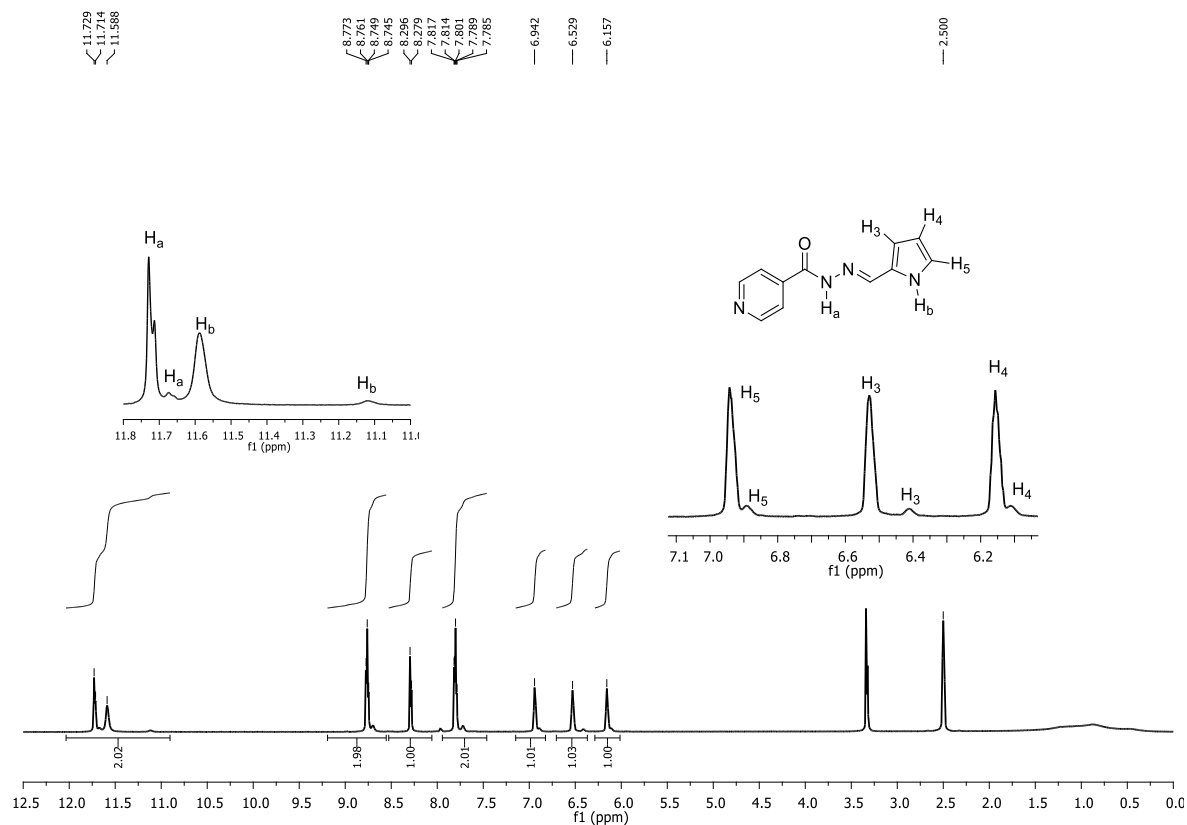
Sentezlenen moleküllerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları incelendiğinde: 2-furan/2-pirolkarbaldehitin (**1a-b**) farklı aromatik hidrazit türevleri (**2a-l**) ile tepkimesinden oluşan hidrazon türevlerinin (**3a-l**) oluşunu belirleyen karakteristik pik $\text{CH}=\text{N}$ bağına karşılık gelen bir protona eşdeğer azometin protonuna ait sinyaldir. Singlet şeklinde 8.10-8.45 ppm aralığında çıkan bu sinyal bazen tek pik şeklinde olmakla birlikte çoğu zaman stereoizomer durum kaynaklı iki sinyal olarak spektrumlarda yer almaktadır. Final moleküllerine ait (**3a-l**) 11.90-10.82 ppm aralığında integral değeri bir protona denk gelen bir singletami NH (stereoizomerik yapıdan dolayı bazen ikili pikler), 11.47-11.51 ppm aralığında bir protona denk pirol halkasına ait yayvan olarak görünen NH sinyalleridir. 6.96 (s, pirol- H_5 , 1H), 6.54 (s, pirol- H_3 , 1H), 6.16 (s, pirol- H_4 , 1H) kimyasal kaymalara karşılık gelen singlet pikler pirol halkasının varlığını, 7.88 (d, $J=1.80$, furil- H_5 , 1H), 6.99 (d, $J=3.20$, furil- H_3 , 1H), 6.69 (dd, $J=1.60$, 1.60, furil- H_4 , 1H) kimyasal kayma ve eşleşme sabitleri furan halkasının varlığına işaret eder ve bu değerler literatür ile uyum içindedir.

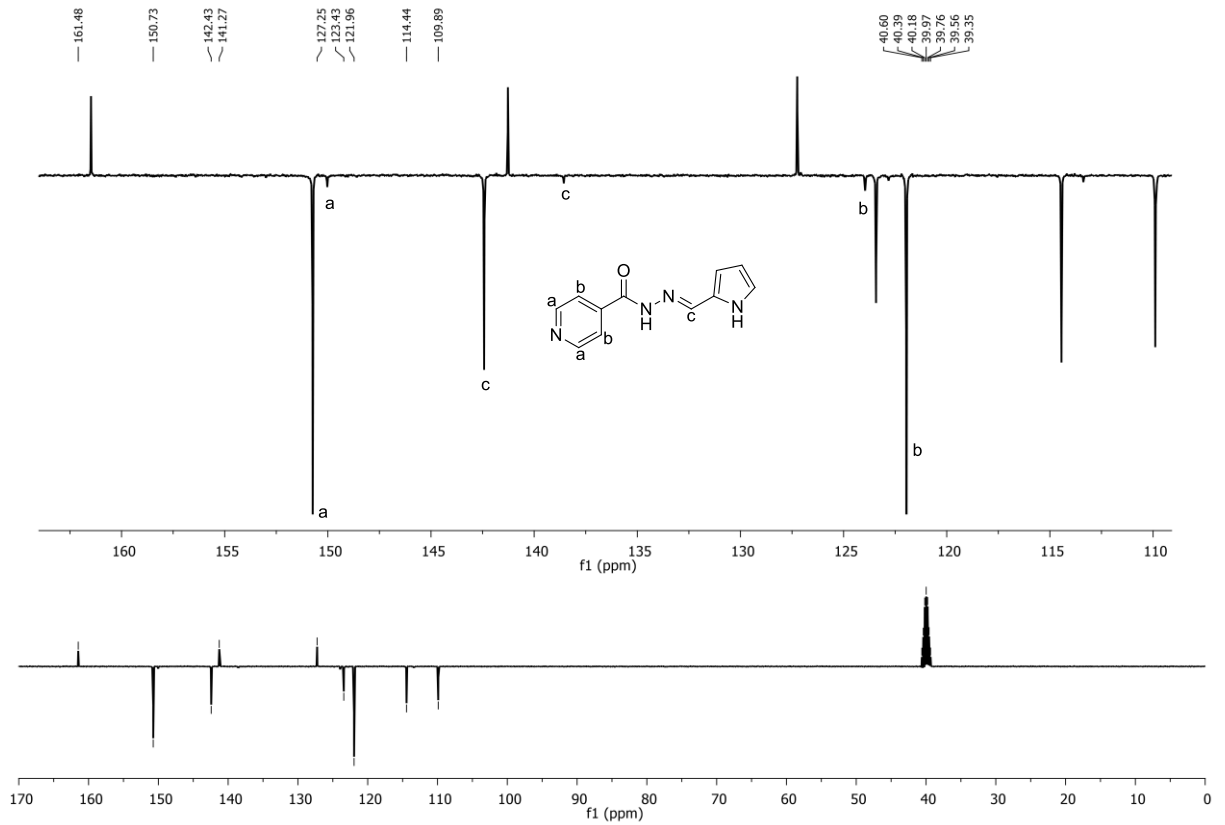
Yine aynı şekilde $^{13}\text{C-APT}$ NMR spektrumlarını incelediğimizde: literatür bulgularına uygun olarak 164-162 ppm aralığında amit karbonil grubuna ait temel sinyal ve 168 ppm civarında aynı grubun izomer piki görülmektedir. 146-144 ppm bant aralığında temel pik ve 138 ppm civarında izomer sinyaline karşılık gelen izomerik iki pik ürün oluşumunun varlığına ait azometin karbonuna ($-\text{N}=\text{CH}$) aittir. Karbonil grubunun direk aromatik halkaya bağlı olması karbonil grubunun halkadan mezomerik olarak elektron çekmesi sonucu aktifliği azalmasından kaynaklanır. Daha aktif bir karbonil izomerizasyonu daha belirgin kılar. Sonuç olarak NMR spektrumlarında bu sinyal çiftleri, bu bileşiklerin, daha önce tarif edilen diğer izomerler gibi iki stereo izomerik formda var olduğunu açıkça göstermektedir.



(*E*)-*N'*-((1*H*-pyrrol-2-yl)methylene)isonicotinohydrazide

(*Z*)-*N'*-((1*H*-pyrrol-2-yl)methylene)isonicotinohydrazide





Bu çalışma kapsamında yeni sentezlenmiş olan bileşiklerinin deney ortamında *in vitro* koşullarda çeşitli biyolojik özelliklerinin anlaşılması ve deney ortamındaki hücre içinde çeşitli biyokimyasal faaliyet süreçlerindeki etkinliklerinin belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Yaptığımız deney çalışmaları kapsamında ilk olarak yeni sentezlenen bileşiklerinin *in vitro* antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Sentezlediğimiz maddelerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için genel olarak çalışmalarda bir veya birkaç farklı analiz yöntemi kullanılmaktadır. *In vitro* antioksidan aktivite sonuçlarına göre 12 bileşikte farklı derecelerde antioksidan kapasitesi bakımından aktif bulunmuştur. Sitotoksik aktivite ve *in vitro* antitümör çalışmalarında ise sentezlediğimiz bileşiklerinin SW620 kolon kanseri ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ve normal fibroblast hücrelerde (L929) uygulamaları yapılmıştır. Buna göre tüm bileşiklerin MCF-7 ve SW620 kanser hücrelerinde sitotoksik aktivitelerinin güçlü etkinliği saptanmıştır.

Tüm bileşikler kanser hücrelerinin üzerinde sitotoksik etki göstermelerinin yanında aynı zamanda normal fibroblast hücrelerinde de zayıf da olsa toksik etkili bulunmuştur. Normal hücreler üzerinde gözlemlenen bu durum bizim istemediğimiz bir durumdur.

Kanserin engelenmesi veya yavaşlatılması ile ilgili öneme binaen antioksidan ve antitümöral testler büyük bir önem arz etmektedir. Tam da bu noktada bu tez çalışması ile sentezlenen bir seri hidrazon bileşiği hem antioksidan özellikleri bakımından hem de antitümöral özellikleri bakımından birlikte bütün olarak incelenmiştir. Yaptığımız bu tez çalışması sırasında sentezlenip farklı biyoaktif farmakolojik özelliklerini ortaya koymaya çalıştığımız birleşiklerle ilgili araştırmanın halihazırda bulunan literatür bilgisine katkı sağlayacağı aşikardır. Sentezlenen türev bileşiklerin bu çalışma kapsamında her tür hücre için kesin antioksidan ya da kesin oksidan madde oldukları netleşmiş olmasa da, bu konu kapsamında daha sonrasında yapılacak çalışmalar için rol-model niteliktedir.

KAYNAKLAR

Altıntop, M. D., Özdemir, A., Turan-Zitouni, G., Ilgın, S., Atlı, Ö., İşcan, G., ve Kaplancıklı, Z. A. (2012). Synthesis and biological evaluation of some hydrazone derivatives as new anticandidal and anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry*, 58, 299-307.

Asim, Kaplancıklı, Z., Yurttas, L., Turan-Zitouni, G., Göger, G., Demirci, F., and Abu Mohsen, U. (2014). Synthesis and antimicrobial activity of new pyrimidine-hydrazones. *Letters in Drug Design & Discovery*, 11(1), 76-81.

Çakıcı, H. T. (2009). Hidrazon Taşıyan Oksim Türevlerinin Metal Komplekslerinde Yapı Aydınlatılması, Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı, Adnan Menderes Üniversitesi, 1-143.

de Aguiar Cordeiro, R., de Melo, C. V. S., de Farias Marques, F. J., Serpa, R., de Jesus Evangelista, A. J., Caetano, E. P., and Sidrim, J. J. C. (2016). Synthesis and in vitro antifungal activity of isoniazid-derived hydrazones against *Coccidioides posadasii*. *Microbial pathogenesis*, 98, 1-5.

Deep, A., Jain, S., Sharma, P. C., Verma, P., Kumar, M., and Dora, C. P. (2010). Design and biological evaluation of biphenyl-4-carboxylic acid hydrazide-hydrazone for antimicrobial activity. *Synthesis*, 182, 1830C.

Dimmock, J. R., Vashishtha, S. C., and Stables, J. P. (2000). Anticonvulsant properties of various acetylhydrazones, oxamoylhydrazones and semicarbazones derived from aromatic and unsaturated carbonyl compounds. *European journal of medicinal chemistry*, 35(2), 241-248.

El-Faham, A., Farooq, M., Khattab, S. N., Abutaha, N., Wadaan, M. A., Ghabbour, H. A., and Fun, H. K. (2015). Synthesis, characterization, and anti-cancer activity of some new N'-(2-Oxoindolin-3-ylidene)-2-propylpentane hydrazide-hydrazone derivatives. *Molecules*, 20(8), 14638-14655.

Erdik, E. (1987). *Denel Organik Kimya*, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Ankara.

Gül, M. (2009). Yeni Trisiklik Bileşiklerinin Senztezlenmesi, Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı, Yıldız Teknik Üniversitesi, 1-291.

Karaman, B., and Ulusoy Güzeldemirci, N. (2016). Synthesis and biological evaluation of new imidazo [2, 1-b] thiazole derivatives as anticancer agents. *Medicinal Chemistry Research*, 25, 2471-2484.

Kayaalp, S. O. (1998). Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 1(8), 1007-1072.

Knipe, A. C., and Watts, W. E. (1997). *Organic Reaction Mechanisms*, United States of America: John WileySons, Chapter 1, 1-10.

Lima, P. C., Lima, L. M., da Silva, K. C. M., Léda, P. H. O., de Miranda, A. L. P., Fraga, C. A., and Barreiro, E. J. (2000). Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. *European journal of medicinal chemistry*, 35(2), 187-203.

Nasr, T., Bondock, S., and Youns, M. (2014). Anticancer activity of new coumarin substituted hydrazide–hydrazone derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 76, 539-548.

Nasr, T., Bondock, S., Rashed, H. M., Fayad, W., Youns, M., and Sakr, T. M. (2018). Novel hydrazide-hydrazone and amide substituted coumarin derivatives: Synthesis, cytotoxicity screening, microarray, radiolabeling and in vivo pharmacokinetic studies. *European journal of medicinal chemistry*, 151, 723-739.

Naveen, Kumar, H. S., Parumasivam, T., Jumaat, F., Ibrahim, P., Asmawi, M. Z., and Sadikun, A. (2014). Synthesis and evaluation of isonicotinoyl hydrazone derivatives as antimycobacterial and anticancer agents. *Medicinal Chemistry Research*, 23, 269-279.

Bulut, N., Kocyigit, U. M., Gecibesler, I. H., Dastan, T., Karci, H., Taslimi, P., ... and Cetin, A. (2018). Synthesis of some novel pyridine compounds containing bis-1, 2, 4-triazole/thiosemicarbazide moiety and investigation of their antioxidant properties, carbonic anhydrase, and acetylcholinesterase enzymes inhibition profiles. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 32(1), e22006.

Ovayolu, Ö., and Ovayolu, N. (2019). Antineoplastik ilaçlara güvenli yaklaşım. *ERÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 6(2), 41-47.

Overberger, C. G., Anselme, J. T., and Lonbardino, J. G. (1966), *Organic Compounds with Nitrogen-Nitrogen Double Bonds*, Ronald Press Company, New York.

Refat, H. M., and Fadda, A. A. (2013). Synthesis and antimicrobial activity of some novel hydrazide, benzochromenone, dihydropyridine, pyrrole, thiazole and thiophene derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 70, 419-426.

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

Salum, L. B., Mascarello, A., Canevarolo, R. R., Altei, W. F., Laranjeira, A. B., Neuenfeldt, P. D., and Nunes, R. J. (2015). N-(1'-naphthyl)-3, 4, 5-trimethoxybenzohydrazide as microtubule destabilizer: Synthesis, cytotoxicity, inhibition of cell migration and in vivo activity against acute lymphoblastic leukemia. *European journal of medicinal chemistry*, 96, 504-518.

Singh, U. P., Bhat, H. R., Verma, A., Kumawat, M. K., Kaur, R., Gupta, S. K., and Singh, R. K. (2013). Phenyl hydrazone bearing pyrazole and pyrimidine scaffolds: design and discovery of a novel class of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) against HIV-1 and their antibacterial properties. *RSC advances*, 3(38), 17335-17348.

Singh, V., Khanna, R., Srivastava, V. K., Palit, G., and Shanker, K. (1992). Synthesis and pharmacological evaluation of some phenothiazines as antidepressants. *Arzneimittelforschung*, 42(3), 277-280.

Şentürk, E. (2019). Farklı yapıdaki ketonların hidrazon ve semikarbazonlarının sentezi (Master'sthesis, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü).

Thurston, D. E., and Pysz, I. (2021). *Chemistry and pharmacology of anticancer drugs*. CRC press.

Todeschini, A. R., de Miranda, A. L. P., da Silva, K. C. M., Parrini, S. C., and Barreiro, E. J. (1998). Synthesis and evaluation of analgesic, antiinflammatory and antiplatelet properties of new 2-pyridylarylhydrazone derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 33(3), 189-199.

Wang, Y., Yan, H., Ma, C., and Lu, D. (2015). Synthesis and anticancer activities of novel 8-azapurine carbocyclic nucleoside hydrazones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 25(20), 4461-4463.

Zhao, Y., Hui, J., Wang, D., Zhu, L., Fang, J. H., and Zhao, X. D. (2010). Synthesis, cytotoxicity and pro-apoptosis of novel benzoisindolin hydrazones as anticancer agents. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(10), 1324-1327.

Subasi, E., Atalay, E. B., Erdogan, D., Sen, B., Pakyapan, B., and Kayali, H. A. (2020). Synthesis and characterization of thiosemicarbazone-functionalized organoruthenium (II)-arene complexes: Investigation of antitumor characteristics in colorectal cancer cell lines. *Materials Science and Engineering: C*, 106, 110152.

Hessler, J. A., Budor, A., Putschakayala, K., Mecke, A., Rieger, D., Banaszak Holl, M. M., and Baker, J. (2005). Atomic force microscopy study of early morphological changes during apoptosis. *Langmuir*, 21(20), 9280-9286.

Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., and Dyatmiko, W. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80(4), 1144-1152.

Dastan, T., (2017). Bazı Bis (A-Aminoalkil-Fosfinik Asit) Türevlerinin Sentezi Ve Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Bingöl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Danışman: Ahmet Çetin.

Dastan, S. D., Dastan, T., Gulhan, M. F., Kirkbes, A., and Talas, Z. S. (2014). Biochemical changes in muscle and gill tissues of rainbow trout treated with various concentrations of pollen extract.

Erel, O. (2004). A Novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry* 37: 112-119.

Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry* 38: 1103-11.

Doyle, A, Griffiths J. B (1998). *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. John Wiley Sons 57–61: 62–6456.

Harma, M. (2005). Oxidative stress in women with preeclampsia. *American Journal of Obstetrics Gynecology* 192: 656-657.

Mosman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55–63.

Esterbauer, H., Cheeseman K. H (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymology* 186: 407-421.

Hu, M. L, Louie S, Cross C. E, Motchnik, P, and Halliwell, B. (1993). Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 121: 257-62.

Orhan, I., Ozcelik, B., and Sener, B. (2011). Evaluation of antibacterial, antifungal, antiviral, and antioxidant potentials of some edible oils and their fatty acid profiles. *Turkish Journal of biology* 35: 251-258.

Awouafack, M. D., McGaw, L. J., Gottfried, S., Mbouangouere, R., Tane, P., Spiteller, M., and Eloff, J. N. (2013). Antimicrobial activity and cytotoxicity of the ethanol extract, fractions and eight compounds isolated from *eriosema robustum* (fabaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13: 289.

Eloff, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64:711-713.

Eren, E. (2011). Bazı soğanslı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Frankel, E. N., and Meyer, A. S. (2000). The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 80:1925-1941.

Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M. L., and Vanella, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and dna cleavage protectors. *Cell biology and toxicology*, 16(2): 91–98.

Takım, K., (2010). Kiraz yaprağı ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin ve oksidatif dna hasarı üzerine etkisinin belirlenmesi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

Kuete, V. (2010). Potential of cameronian plants and derived products against microbial infections. *Planta Medica*, 76:1479-1491.

Berk, Ş. (2012). *Myrtus communis*, *Pistacia vera*, *Arum maculatum*, *Ceterach officinarum*, *Inula oculus-christi* türlerinin antioksidan, anti-mikrobiyal ve dna koruyucu aktivitelerinin araştırılması. Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, p: 93.

Sönmez, Gürer, E., (2022). *Aronia Melanocarpa* Türü Üzerine Farmakognozik İncelemeler T6YDoktora Tezi. Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi. 2022

Kısmalı G., Sel, T., (2012) Paraquat ile oluşturulmuş oksidatif stresin hep2 hücrelerinde apoptozis üzerine etkisinin araştırılması. Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi 26(2): 79–85.

Sayın, V. I, Ibrahim, X., M, Larsson E, Nilsson A. J, Lindahl P, and Bergo, O. M., (2014) Antioxidants Accelerate Lung Cancer Progression in Mice. *Science Translational Medicine* 6: 221-225.