NİDA KARABAĞ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2023

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BENZOTİYAZOLİN ARTIĞI TAŞIYAN SPİROİNDOLİNONLAR: SENTEZ, YAPI TAYİNİ VE BİYOLOJİK ETKİ ARAŞTIRMALARI

NİDA KARABAĞ

DANIŞMAN
PROF. DR. NİLGÜN KARALI

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2023

İTHAF

Sevgili Annem ve Babam'a ithafen

TEŞEKKÜR

Çalışmam için Farmasötik Kimya Anabilim Dalı olanaklarından yararlanma imkanı tanıyan, pandemi koşullarında dahi çalışmalarımı devam ettirebilmem için fırsatlar oluşturan, her zaman anlayışlı davranan, her koşulda ve her ihtiyacım olduğunda yardımcı olan benim için pek sevgili saygı değer hocam Prof. Dr. Nilgün Karalı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Biyolojik aktivite çalışmalarını yürüten Prof. Dr. Nurten Özsoy, Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı Arda, Doç.Dr. Murat Pekmez ve Dr.Öğr.Üyesi Elif Mertoğlu'na teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen içtenlikte yardımcı olan Asu Büşra Temizer'e teşekkürlerimi sunarım.

İnanç ve güvenlerini asla kaybetmek istemediğim, her zaman yanımda olan, sevgi ve saygıyle beni bugünlere getiren annem Nurten Karabağ ve babam Bilal Karabağ'a, tez süresince desteğini eksik etmeyen eşim Doğan Demir'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TSA-2020-37008

İÇİNDEKİLER

BEYAN ..... HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF ..... **İİ**
TEŞEKKÜR ..... **İİİ**
İÇİNDEKİLER ..... **İV**
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **X**
SEMBOL / KISALTMA LİSTESİ ..... **XV**
ÖZET ..... **XX**
ABSTRACT ..... **XXİ**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. Serbest Radikaller ve Radikal Olmayan Reaktif Türleri 4
2.1.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) 5
2.1.2. Hidrojen Peroksit Radikali (H_2O_2) 7
2.1.3. Hidroksil Radikali ($OH^{\bullet}$) 8
2.1.4. Reaktif Nitrojen Bileşikleri ($NO^{\bullet}$) 9
2.1.5. Radikal Olmayan Reaktif Bileşikleri 9
2.2. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri 9
2.2.1. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkisi 10
2.2.2. Serbest Radikallerin Lipit Peroksidasyonu 11
2.2.3. Serbest Radikaller ile Bazı Hastalıkların ilişkisi 11
2.3. Antioksidan Savunma Mekanizması 14
2.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) 15
2.3.2. Katalaz (CAT) 16
2.3.3. Glutatyon Peroksidaz 17
2.3.4. Bitkisel Kaynaklı Antioksidanlar 17
2.3.5. İndol Yapısındaki Endojen Antioksidanlar 18
2.4. İndol Bileşiğinin Kimyasal Özellikleri ve Sentez Yöntemleri 21
2.4.1. 1*H*-indol-2,3-dion ve Türevleri 23
2.4.2. 3-Spiro-2-indolinon Bileşikleri 31
2.5. 2-Sübstitüe Benzotiyazol Bileşikleri 40

3. GEREÇ VE YÖNTEM 44
3.1. Araç ve Gereçler 44
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 44
3.1.2. Kullanılan Elektronik Cihazlar 44
3.2. Kromotografik Çalışmalar 44
3.3. Sentez Yöntemi 45
3.3.1. Genel Sentez Şeması 45
3.3.2. 5-Triflorometil-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on Türevlerinin (3a-h) Genel Sentez Yöntemi 45
3.4. Biyolojik Etki Araştırma Yöntemleri 45
3.4.1. Antioksidan Etki Araştırması 45
3.4.1.1. DPPH Radikali Giderici Etki Tayini 45
3.4.1.2. Süperoksit Radikali Giderici Etki Tayini 46
3.4.1.3. TEAC (Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasite) Tayini 46
3.4.1.4. Ferri İyonu Redükleyici Gücü Tayini 47
3.4.1.5. Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etki Tayini (Anti-Lipid Peroksidasyon Aktivitesinin Belirlenmesi) 47
3.4.1.6. CUPRAC Testi: Kuprik (Cu2+) İyonunu İndirgeme Kapasitesinin Belirlenmesi 48
3.4.2. Sitotoksisite Analizi 48
3.4.3. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Belirlenmesi 50
3.4.4. Protein İzolasyonu ve Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi 50
3.4.5. Protein Karbonillerinin (Protein Hasarının) Belirlenmesi 50
3.4.6. DNA Hasarının (DNA Oksidasyon Düzeyinin) Belirlenmesi 51
3.4.7. İstatistiksel Analizler 52
3.5. *In silico* ADME Kriterlerinin İncelenmesi 52
4. BULGULAR 54
4.1. Sentezi Yapılan Maddelere Ait Bulgular 54
4.1.1. 5'-Bromo-5-(triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]2'(1'*H*)-on(3a) 54
4.1.2. 5'-İyodo-5-(triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]2'(1'*H*)-on (3b) 57

4.1.3. 7’-Metil-5-(triflorometil)-3*H* -spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol] 2'(1'*H*)-on (3c) 60
4.1.4. 7’-Floro-5-(triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3d) 63
4.1.5. 7’-Kloro-5-(triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]2'(1'*H*)-on (3e) 66
4.1.6. 7’-Bromo-5-(triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]2'(1'*H*)-on (3f) 69
4.1.7. 5’-Kloro-7-metil-5-(triflorometil)-3*H*-spiro [1,3-benzotiyazol-2,3'-indol] 2' (1'*H*)-on (3g) 73
4.1.8. 5’,7’-Dikloro-5-(triflorometil)-3*H*-spiro [1,3-benzotiyazol-2,3'-indol] 2'(1'*H*)-on (3h) 76
4.2. Sentezlenen Spiroindol Bileşiklerinin Biyolojik Etki Araştırma Bulguları.....79
4.2.1. DPPH radikal giderici aktivitelerinin incelenmesi.....79
4.2.2. Süperoksit Anyon Radikali Giderici Aktivitesinin İncelenmesi.....81
4.2.3. Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasitesinin (TEAC Deneyi) İncelenmesi.....82
4.2.4. Ferri İyonu Redükleyici Gücü.....83
4.2.5. Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etki Tayini (Anti-Lipid Peroksidasyon Aktivitesinin Belirlenmesi).....84
4.2.6. CUPRAC Testi: Kuprik (Cu^{2+}) İyonunu İndirgeme Kapasitesinin Belirlenmesi 85
4.2.7. Sitotoksisite Analizi 86
4.2.8. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Düzeyinin Belirlenmesi 87
4.2.9. Protein Karbonillerinin (Protein Hasarının) Belirlenmesi 88
4.2.10. DNA Hasarının (DNA Oksidasyon Düzeyinin) Belirlenmesi 90
4.3. *In silico* ADME Kriterlerinin Belirlenmesi 90
5. TARTIŞMA.....92
5.1. 5-(Triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3’-indol]-2’(1’*H*)-on Türevlerinin Sentezi (3a-h).....92
5.2. Spektral Bulguların Değerlendirilmesi 97
5.2.1. IR Bulguları.....97
5.2.2. ^{1}H-NMR Bulguları 102
5.2.3. ^{13}C-NMR Bulguları 110
5.2.4. HMBC-2D Bulguları.....120

5.2.5. Kütle Bulguları.....123
5.3. Biyolojik Etki Bulgularının Değerlendirilmesi.....134
5.3.1. DPPH Radikal Giderici Aktivite Bulgularının Değerlendirilmesi.....134
5.3.2. Süperoksit Anyon Radikali Giderici Aktivite Bulgularının Değerlendirilmesi 134
5.3.3. Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasitesi Bulgularının Değerlendirilmesi....135
5.3.4. Ferri İyonu Redükleyici Gücü Bulgularının Değerlendirilmesi 135
5.3.5. Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etki Bulgularının Değerlendirilmesi.....136
5.3.6. Kuprik İyonunu İndirgeme Kapasitesi Bulgularının Değerlendirilmesi.....137
5.3.7. Sitotoksisite Bulgularının Değerlendirilmesi.....137
5.3.8. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Belirlenmesi Bulgularının Değerlendirilmesi.....137
5.3.9. Protein Karbonillerinin (Protein Hasarının) Belirlenmesi Bulgularının Değerlendirilmesi.....138
5.3.10. DNA Hasarının (DNA Oksidasyon Düzeyinin) Belirlenmesi Bulgularının Değerlendirilmesi.....139
5.4. *In Silico* ADME Kriterlerinin Değerlendirilmesi 139
KAYNAKLAR.....141
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 165

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Reaktif Oksijen ve Nitrojen Bileşikleri 4
Tablo 2-2: Bazı Serbest Radikallerin Vücutta Yarılanma Ömrü 5
Tablo 2-3: Enzimatik özelliklerine göre antioksidanlar 15
Tablo 2-4: Bazı isatin-hidrazon bileşiklerinin genel yapıları ve etki mekanizmaları 28
Tablo 4-1: Bileşik 3a-h'nin antioksidan aktiviteleri 80
Tablo 4-2: Bileşik 3a-h'nin lipid peroksidasyonunu inhibe etme ve Cu2+ iyonunu indirgeme kapasitesi sonuçları 85
Tablo 4-3: 3a-c ve 3f-h bileşiklerinin HFF hücrelerindeki sitotoksik etkileri 87
Tablo 4-4: 3a-c ve 3f-h bileşiklerinin HFF hücrelerinde hidrojen peroksitle indüklenen ROT oluşumu üzerine bağıl etkisi 88
Tablo 4-5: 3a-c ve 3f-h bileşiklerinin HFF hücrelerinde hidrojen peroksitle indüklenen protein karbonilleri üzerindeki etkisi 89
Tablo 4-6: Bileşik 3a-h'nin Lipinski kurallarına uygunluğunun incelenmesi……91
Tablo 4-7: Bileşik 3a-h'nin bazı farmakokinetik parametrelerinin incelenmesi……..91
Tablo 5-1: Sentezlenen 3a-h bileşiklerinin analitik özellikleri ve elementel analiz bulguları 96
Tablo 5-2: 1*H*-indol-2,3-dion ve sübstitüe 1*H*-indol-2,3-dionların IR bandları (cm^{-1}) .. 97
Tablo 5-3: Sentezlenen bileşik 3a-h bileşiklerinin IR bulguları 99
Tablo 5-4: Benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinonların IR bulguları 101
Tablo 5-5: 1*H*-indol-2,3-dion ve türevlerinin proton sinyalleri (ppm) 102
Tablo 5-6: Benzendeki sübstitüentlerin kaydırma değerleri 103
Tablo 5-7: Bileşik 3a-h'nin 1H NMR verileri (DMSO-d_6, ppm) 106
Tablo 5-8: Benzotiyazolin proton rezonanslarına sübstitüent etkisi 107
Tablo 5-9: Bileşik 3a'nın indol proton rezonanslarına sübstitüent etkisi 108
Tablo 5-10: Bileşik 3b'nin indol proton rezonanslarına sübstitüent etkisi 108
Tablo 5-11: Bileşik 3c'nin indol proton rezonanslarına sübstitüent etkisi 109
Tablo 5-12: 1*H*-indol-2,3-dion ve türevlerinin ^{13}C-NMR verileri (δ ppm) 111
Tablo 5-13: Benzenin ^{13}C kimyasal kayma değerlerine sübstitüentlerin etkileri 112
Tablo 5-14: Benzotiyazolin ve benzotiyazol türevlerinin ^{13}C-NMR verileri 112
Tablo 5-15: Benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinonların ^{13}C NMR bulguları 113
Tablo 5-16: Bileşik 3a-h'nin ^{13}C-NMR Bulguları 114
Tablo 5-17: Benzen halkası ^{13}C kayma değerleri üzerinde sübstitüent etkileri 116

Tablo 5-18: Benzotiyazolin karbon rezonanslarına sübstitüent etkisi 117
Tablo 5-19: Bileşik 3f'nin HMBC-2D Bulguları 122
Tablo 5-20: Bileşik 3a-h'nin LC-MS Bulguları 124

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: ROS/ RNS bileşiklerinin neden olduğu hasarlar 5
Şekil 2-2: Hidroksil radikalinin DNA ile reaksiyonu 10
Şekil 2-3: Lipid peroksidasyonu 11
Şekil 2-4: Dopaminin pH değişiklikleri etkisiyle oluşturduğu nörodejenerasyon 13
Şekil 2-5: İnsanlarda bulunan SOD enzim yapıları ve aktif bölgeleri 16
Şekil 2-6: α-tokoferol (E vitamini) molekül yapısı 17
Şekil 2-7: Askorbik asit (C vitamini) molekül yapısı 17
Şekil 2-8: β-karoten molekül yapısı 18
Şekil 2-9: İndol-3-karbinol bileşiği molekül yapısı 18
Şekil 2-10: Seratonin, triptofan ve brassinin molekül yapıları 19
Şekil 2-11: İndol-3-propiyonik asidin antioksidan mekanizması ve oksidasyonu 19
Şekil 2-12: Melatonin hormonu molekül yapıs 20
Şekil 2-13: Melatoninin hidroksil radikaline karşı antioksidan etkisi 20
Şekil 2-14: İndol halkasının yapısal formülü 21
Şekil 2-15: Baeyer-Emmerling yöntemiyle indol sentezi 22
Şekil 2-16: Fisher yöntemiyle indol sentezi 22
Şekil 2-17: Leimrruber-Batcho yöntemiyle indol sentezi 23
Şekil 2-18: İndol bileşiğinin oksitlenme mekanizması 23
Şekil 2-19: İsatinin molekül yapısı 24
Şekil 2-20: Sandmeyer yöntemiyle isatin sentezi 24
Şekil 2-21: Stolle yöntemiyle isatin sentezi 24
Şekil 2-22: Gassman yöntemiyle isatin sentezi 25
Şekil 2-23: İsatinin elektrokatalitik reaksiyonu 25
Şekil 2-24: İsatin bileşiğinin kimyasal oksidasyon reaksiyonu 26
Şekil 2-25: Fotokimyasal oksidasyon yöntemiyle isatin sentezi 26
Şekil 2-26: İsatin bileşiğinin fonksiyonel grupları 26
Şekil 2-27: İsatin türevlerinin 1951-2020 yılları arasındaki farmakolojik kullanım alanları 27
Şekil 2-28: İsatin-β-tiyosemikarbazon türevlerinin genel yapısı 29
Şekil 2-29: FDA tarafından onaylanan bazı isatin türevi bileşikler ve bu türevlerin etki ettikleri hedef bölgeleri 30

Şekil 2-30: Metisazonun moleküler yapısı 30
Şekil 2-31: Flueindolin bileşiğinin molekül yapısı 31
Şekil 2-32: Doğal spiroksindol bileşiklerinin yapısal formülleri 31
Şekil 2-33: MDM2-p53 inhibitörü spiroindol bileşikleri 32
Şekil 2-34: Antiproliferatif etkili spiroindol bileşikleri 33
Şekil 2-35: Apoptoz indükleyen spiroindol bileşiklerinin yapısal formülü 33
Şekil 2-36: Siklopropan türevi spirooksindol bileşiklerinin yapısal formülleri 34
Şekil 2-37: Michael reaksiyonuyla elde edilen spirooksindol bileşiğinin yapısal formülü 34
Şekil 2-38: Spirooksindol-pirolo-karbazol bileşiğinin yapısı 34
Şekil 2-39: Antiproliferatif etkili spiroindol bileşiklerinin yapısal formülleri 35
Şekil 2-40: Spiro[pirolidin-3,3'-oksindol] türevlerinin yapısal formülü 35
Şekil 2-41: Spiro[pirolidin-3,3'-oksindol] ve morfolin-1,2,3-triazol bileşiklerinin yapısal formülleri 36
Şekil 2-42: İndenospiro 2-indolinon bileşikleri yapısal formülleri 36
Şekil 2-43: Dihidropiridin-spirooksindol bileşiklerinin yapısal formülleri 37
Şekil 2-44: Spiropiranopirazol bileşiğinin yapısal formülü 37
Şekil 2-45: Spiro-benzodiazepin bileşiğinin yapısal formülü 38
Şekil 2-46: Spiro-kromeno türevlerinin yapısal formülü 38
Şekil 2-47: Yeni nesil spirooksindol-pirolidin türevlerinin yapısal formülleri 38
Şekil 2-48: Spiropirazol-oksindol bileşiğinin yapısal formülü 39
Şekil 2-49: Krisin-kromenespirooksindol bileşiğinin yapısal formülü 39
Şekil 2-50: Benzotiyazol bileşiğinin yapısal formülü 40
Şekil 2-51: 2-Aminotiyofenolden 2-fenilbenzotiyazol sentezi 40
Şekil 2-52: 2-Aminotiyofenolden 2-sübstitüe benzotiyazol sentez mekanizmaları 41
Şekil 2-53: N-fenilbenzamidden hareketle 2-fenilbenzotiyazol türevlerinin sentezi 41
Şekil 2-54: N-fenilbenzotiyoamidden hareketle 2-fenilbenzotiyazol sentezi 42
Şekil 2-55: 2-(4-Metilfenil)-6nitrobenzotiyazol sentezi 42
Şekil 2-56: 2-Aminotiyofenolden hareketle benzotiyazol sentezi 42
Şekil 2-57: Çevre dostu teknikle benzotiyazol sentezi 43
Şekil 2-58: Silika jel üzerinde benzotiyazol sentezi 43
Şekil 4-1: Madde 3a'nın IR Spektrumu (cm^{-1}) 54
Şekil 4-2: Madde 3a'nın ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-14 ppm) 55

Şekil 4-3: Madde 3a'nın ^{1}H-NMR Spektrumu (δ 6.6-8.0 ppm) 55
Şekil 4-4: Madde 3a'nın ^{13}C-NMR spektrumu (δ 0-200 ppm) 56
Şekil 4-5: Madde 3a'nın LC-MS spektrumu 56
Şekil 4-6: Madde 3b'nin IR spektrumu (cm^{-1}) 57
Şekil 4-7: Madde 3b'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-14 ppm) 58
Şekil 4-8: Madde 3b'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6.6-8.0 ppm) 58
Şekil 4-9: Madde 3b'nin ^{13}C-NMR spektrumu (δ 0-200 ppm) 59
Şekil 4-10: Madde 3b'nin LC-MS spektrumu 59
Şekil 4-11: Madde 3c'nin IR spektrumu (cm^{-1}) 60
Şekil 4-12: Madde 3c'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-14 ppm) 61
Şekil 4-13: Madde 3c'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6.4-8.2 ppm) 61
Şekil 4-14: Madde 3c'nin ^{13}C-NMR spektrumu (δ 0-200 ppm) 62
Şekil 4-15: Madde 3c'nin LC-MS spektrumu 62
Şekil 4-16: Madde 3d'nin IR spektrumu (cm^{-1}) 63
Şekil 4-17: Madde 3d'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-14 ppm) 64
Şekil 4-18: Madde 3d'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6.6-7.6 ppm) 64
Şekil 4-19: Madde 3d'nin ^{13}C-NMR spektrumu (δ 0-180 ppm) 65
Şekil 4-20: Madde 3d'nin LC-MS spektrumu 65
Şekil 4-21: Madde 3e'nin IR Spektrumu (cm^{-1}) 66
Şekil 4-22: Madde 3e'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-14 ppm) 67
Şekil 4-23: Madde 3e'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6.6-8.0 ppm) 67
Şekil 4-24: Madde 3e'nin ^{13}C-NMR spektrumu (δ 0-190 ppm) 68
Şekil 4-25: Madde 3e'nin LC-MS spektrumu 68
Şekil 4-26: Madde 3f'nin IR Spektrumu (cm^{-1}) 69
Şekil 4-27: Madde 3f'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-12 ppm) 70
Şekil 4-28: Madde 3f'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6.6-8.0 ppm) 70
Şekil 4-29: Madde 3f'nin ^{13}C-NMR (APT) spektrumu (δ 120-136 ppm) 71
Şekil 4-30: Madde 3f'nin ^{13}C-NMR (APT) spektrumu spiro karbon sinyali 71
Şekil 4-31: Madde 3f'nin HMBC-2D spektrumu (6.0 - 11.0 ppm) 72
Şekil 4-32: Madde 3f'nin HMBC-2D spektrumu (6.60 - 8.0 ppm) 72
Şekil 4-33: Madde 3f'nin LC-MS spektrumu 73
Şekil 4-34: Madde 3g'nin IR spektrumu (cm^{-1}) 74
Şekil 4-35: Madde 3g'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-14 ppm) 74

Şekil 4-36: Madde 3g'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6.6-8,0 ppm)..... 75
Şekil 4-37: Madde 3g'nin ^{13}C-NMR spektrumu (δ 0-200 ppm)..... 75
Şekil 4-38: Madde 3g'nin LC-MS spektrumu 76
Şekil 4-39: Madde 3h'nin IR spektrumu (cm^{-1})..... 77
Şekil 4-40: Madde 3h'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-14 ppm)..... 77
Şekil 4-41: Madde 3h'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6.6-8,0 ppm)..... 78
Şekil 4-42: Madde 3h'nin ^{13}C-NMR spektrumu (δ 0-200 ppm)..... 78
Şekil 4-43: Madde 3h'nin LC-MS spektrumu 79
Şekil 4-44: 3a-h bileşiklerinin, tokoferol ve BHT'nin doza bağlı DPPH giderici aktivite yüzdeleri..... 80
Şekil 4-45: 3a-h bileşiklerinin, tokoferol ve BHT'nin doza bağlı süperoksit radikali giderici aktivite yüzdeleri 81
Şekil 4-46: 3a-h bileşiklerinin, tokoferol ve BHT'nin doza bağlı ABTS radikal katyonu giderici aktivite yüzdeleri 82
Şekil 4-47: 3a-h bileşiklerinin, tokoferol ve BHT'nin doza bağlı TEAC değerleri 83
Şekil 4-48: 3a-h bileşiklerinin, BHT ve tokoferol'ün doza bağlı FRAP değerleri 84
Şekil 4-49: 3a-c ve 3f-h bileşiklerinin HFF hücrelerindeki % canlılık grafikleri..... 86
Şekil 4-50: 3a-c ve 3f-h bileşiklerinin HFF hücrelerinde oluşan ROT oranları 87
Şekil 4-51: 3a-c ve 3f-h bileşiklerinin HFF hücrelerinde protein hasarına etkisi..... 88
Şekil 4-52: 3a-c ve 3f-h bileşiklerinin HFF hücrelerinde oluşan protein karbonil oranları 89
Şekil 4-53: ELISA kiti içeriğindeki standartlarla oluşturulan 8-OHdG standart grafiği 90
Şekil 5-1: 2-Arilbenzotiyazollerin genel sentezi 92
Şekil 5-2: İsatin ve 2-aminobenzentiyolün reaksiyon ürünleri..... 93
Şekil 5-3: Benzotiyazolin artığı taşıyan spiro-5-bromo-1-metil-2-indolinonun X-ışını tek kristal kırınım molekül modeli ve sentezlenen diğer türevler 94
Şekil 5-4: 5-Klorobenzotiyazolin artığı taşıyan 2-spiroindolinonun X-ışını tek kristal kırınım molekül modeli ve sentezlenen diğer türevler 95
Şekil 5-5: 3a-h Bileşiklerinde olası moleküller arası hidrojen bağları 96
Şekil 5-6: 5-Nonsübsstitüe (a), 5-nitro (b), 5-floro (c), 5-kloro (d), 5-bromo (e), 5-iyodo (f) ve 5-metil-1H-indol-2,3-dion (g) türevlerinin karbonil gerilme bandları..... 98
Şekil 5-7: 3a-h bileşiklerinde olası moleküller arası hidrojen bağları 100

Şekil 5-8: Benzotiyazol-2-spiro-5'-bromo-1'-metil-3'spiroindolin-2'-on bileşiğinin moleküller arası hidrojen bağları 100
Şekil 5-9: Bileşik 3f'nin HMBC-2D spektrumu (6,60- 8,00 ppm)..... 121
Şekil 5-10: Bileşik 3f'nin HMBC-2D spektrumu (6,60 – 7,20 ppm)..... 123
Şekil 5-11: İsatinin EI kütle spektrumunda gözlenen pikler..... 126
Şekil 5-12: İsatin EI kütle spektrumunda gözlenen parçalanmalar 126
Şekil 5-13: 2,3-Dihidro-1*H*-2-indolinonun spektrumunda gözlenen pikler 126
Şekil 5-14: İsatinin ESI (+) modda alınan kütle spektrumları..... 127
Şekil 5-15: İsatinin ESI (-) modda alınan kütle spektrumu 127
Şekil 5-16: 5-Kloro-2-metilbenzotiyazol bileşiğinin parçalanma ürünleri..... 128
Şekil 5-17: 5-Floro-1*H*-indol-2,3-dion 3-[4-(2-florofenil)tiyosemikarbazon] bileşiğinin parçalanma ürünleri 128
Şekil 5-18: 3-[3-(4-metilfenil)-4-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-2(3*H*)-ilidenhidraziniliden]-5-(triflorometoksi)-1*H*-indol-2,3-dion bileşiğinin parçalanma ürünleri..... 129
Şekil 5-19: 1-Metil-3-(6-kloro-2-benzotiyazolilhidrazono)-2-indolinon bileşiğinin parçalanma ürünleri 129
Şekil 5-20: 2,3-Dihidro-1*H*-nafto[1,2-*d*]imidazol artığı taşıyan spiro-2-indolinon bileşiğinin parçalanma ürünleri 130
Şekil 5-21: 5-Metil-2-fenil-3-okso-3,4-dihidro-2*H*-pirazol artığı taşıyan spirobenzotiyazolin bileşiğinin parçalanma ürünleri..... 130
Şekil 5-22: Amid gruplarının parçalanma ürünleri..... 131
Şekil 5-23: (Triflorometil)benzenin parçalanma ürünleri..... 131
Şekil 5-24: m/z 325 iyonunun olası oluşum mekanizması 132
Şekil 5-25: Bileşik 3a'nın olası parçalanma ürünleri..... 132
Şekil 5-26: Bileşik 3b'nin olası parçalanma ürünü..... 133
Şekil 5-27: Bileşik 3g'nin olası parçalanma ürünü..... 133

SEMBOL / KISALTMA LİSTESİ

A-10	Akciğer kanser hücresi
A549	Akciğer adenokarsinom epitel hücresi
ABTS	2,2’-Azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asid)
Açil-CoA	Açil-Koenzim A
Ade	Adenin
ADME	Absorpsiyon, dağılım, metabolizma, atılım
Al	Alifatik
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
APT	Bağlı proton testi
Ar	Aromatik
ATP	Adenozin trifosfat
BAX	Pro-apoptik protein
BCA	Bikinkoninik asit
Bcl-2	B hücreli lenfoma 2
BHT	Butil hidroksi toluen
bt	Benzotiyazol
CARP-1/CCAR1	Hücre döngüsü ve apoptozis düzenleyici protein 1
CAT	Katalaz
CD135	Farklılaşma antijen kümesi 135
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CFM-1	Kistik fibröz değiştirici 1
COS-7	Maymun fibroblast hücre hattı
COX	Siklooksijenaz
COX-2	Siklooksijenaz-2
Cu(II)-NC	Bakır(II)-neokuproin
CUPRAC	Kuprik (Cu^{2+}) İyonunu İndirgeme Kapasitesi
d	Dublet
DA	Dopamin
DA-Q	Dopamin-Kinon
DCM	Diklorometan
dd	Dublet dublet

DMEM	Dulbecco'nun modifiye edilmiş kartal besiyeri
DMF	Dimetilfosfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNP	Dinitrofenol
DNPH	Dinitrofenilhidrazin
DPPH	2,2-Difenil-2-pikrilhidrazil
DU-145	Prostat kanseri hücre hattı
e.b.	Eğilme bandı
EC_{50}	Maksimum etkinin %50'sini oluşturan ilaç dozu
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EI	Elektron iyonizasyonu
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent deneyi
ESI	Elektrosprey iyonizasyonu
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FRAP	Ferri iyonu redükleyici antioksidan güç
g.b.	Gerilme bandı
G_0	Kanser hücre döngüsü dinlenme dönemi
G_1	Kanser hücre döngüsü büyüme dönemi
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GPx	Glutatyon peroksidaz
GSH	Glutatyon
Gua	Guanin
H_2DCFDA	2',7'-Diklorodihidrofloressein diasetat
HBSS	Hanks'ın dengeli tuz çözeltisi
HCC	Hepatosellüler kanser hücresi
HCT-116	Kolon kanseri hücresi
HeLa	Epitel karsinom hücresi
HepG2	Karaciğer hepatosellüler hücresi
HFF	İnsan fibroblast hücresi
HIV	İmmün yetmezlik virüsü
HMBC	Heteronükleer çoklu bağ korelasyonu

HMEC	İnsan meme epitel hücresi
HOP-92	Akciğer kanseri hücresi
HP	Hidrojen peroksit
HRP	Horseradish peroksidazı
Hz	Hertz
IC_{50}	Tam inhibisyon sağlayacak ilaç konsantrasyonunun yarısı
IR	İnfrared spektroskopisi
İnd	İndol
İTK	İnce tabaka kromatografisi
KB-V1	Vinblastin dirençli epidermal karsinoma
KIT	Kök hücre reseptörü
LA	Lewis asidi
LC-MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
LNCaP	Prostat adenokarsinom kanser hücresi
logKhsa	İnsan serum albuminine bağlanma sabiti
logKp	Deri geçirgenliği sabiti
LogP	Oktanol/su dağılım katsayısı
logS	Suda çözünürlük katsayısı
m/z	Kütle-yük oranı
M	Molar
MA	Molekül ağırlığı
MCF10A	Tümörjenik olmayan meme epitel hücresi
MCF-7	Meme kanser hücresi
MCF-73	Meme kanseri hücresi
MCF-9	Meme kanser hücresi
MCT	Mast hücreli tümör
MDA-MB-231	Üçlü insan meme kanseri hücre dizisi
MDA-MB-435	Üçlü insan meme kanseri hücre dizisi
MDM2	İnsan düzenleyici hormon proteini
MHz	Megahertz
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromürün indirgenmesine dayalı test

NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	Nitroblue tetrazolyum testi
NEAA	Esansiyel olmayan amino asitler
NIH/3T3	Fare fibroblast hücre hattı
NK	Negatif kontrol
NMR	Nükleer manyetik rezonans
p2	Tümör baskılayıcı gen 2
p53	Tümör baskılayıcı gen 53
PBS	Fosfatlı tampon solüsyonu
PC3	Prostat kanseri hücre hattı
PCC	Piridinyum klorokromat
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGFR	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü
P-gp	P-glikoprotein enzimi
pH	Potansiyel hidrojen
PI3K	Fosfoinositid-3-kinaz
PK	Pozitif kontrol
PLK4	Polo benzeri kinaz 4- Serin/treonin-protein kinaz 4
PPA	Polifosforik asit
PPE	Polifosfat ester
ppm	Milyonda birlik kısım
q	Kuartet
Q10	Koenzim Q10-ubikinon
RCC	Renal hücreli karsinom
RO5	Lipinski'nin 5 kuralı
ROT	Reaktif oksijen türleri
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
RXF-393	Renal kanser hücre hattı
s	Singlet
S1	Solvent 1
S2	Solvent 2
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi

SGC-19	Adenokarsinom kanser hücresi
SGC-7901	Mide karsinomu
SJSA-4	İnsan sinovyal sarkom-4 hücre hattı
SNB-75 MSS	Merkezi sinir sistemi kanser hücre hattı
SOD	Süperoksit Dizmutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Trikloroasetik asit
TEAC	Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasite
TFIIH	Transkripsiyon Faktörü
TMS	Tetrametilsilan
U251	İnsan gluiblastoma hücre hattı
U53OS-plv	Osteosarkom epitelyal hücreleri
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
ε_{TR}	Trolox'un ekstinksiyon katsayısı
ν_{maks}	Maksimum dalga boyu
µL	Mikrolitre
3-OHM	3-Hidroksimelatonin
5-LOX	5-Lipoksijenaz
8-OHdG	8-Hidroksi-2’-deoksiguanozin

ÖZET

Karabağ, N. (2023). Benzotiyazolin Artığı Taşıyan Spiroindolinonlar: Sentez, Yapı Tayini ve Biyolojik Etki Araştırmaları. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul

Hücrelerde metabolik reaksiyonlar sonucunda serbest radikaller ve reaktif oksijen bileşikleri (ROT)'nin üretiminin artması çok çeşitli DNA hasarlarına neden olabilmektedir. Bu hasar ile ilişkili patojenik sonuçlardan en önemlisinin karsinogenezis olduğu, DNA'da oluşan mutasyonun Alzheimer, demans, parkinson vb. nörodejeneratif hastalıklar, ayrıca diyabet, inflamasyon, kardiyovasküler ve otoimmün hastalıklarla da ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Serbest radikallerin bu hastalıklardaki rolünün keşfi yeni tedavi yaklaşımlarına rehberlik etmektedir. Bu çalışmada, 1*H*-indol-2,3-dionların (**1a-h**) 2-amino-4-(triflometil)benzentiyol (**2**) ile etanollü ortamda etkileştirilmesiyle 5-(triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on bileşikleri (**3a-h**) sentezlenmiştir. Sentezlenen yeni **3a-h** bileşiklerinin yapıları elementel analiz, spektral (IR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR-APT, HMBC-2D ve LCMS-APCI) veriler ile doğrulanmıştır. **3a-h** bileşiklerinin süperoksid ve DPPH radikallerini giderici etkileri, troloks ekivalan antioksidan kapasiteleri, Fe^{3+} ve Cu^{2+} iyonlarını redükleyici güçleri ve lipid peroksidasyonunu inhibe edici güçleri araştırılmıştır. Antioksidan etkileri ön plana çıkan **3a-c** ve **3f-h** bileşiklerinin sağlıklı insan fibroblast (HFF) hücrelerinde sitotoksisiteleri incelenmiştir. Oksidatif stresin indüklendiği hücrelerde hücre içi ROT oluşumunu en etkili şekilde düşüren iki bileşiğin sırasıyla **3h** ve **3g**, protein hasarını en etkili şekilde düşüren bileşiğin **3g** olduğu saptanmıştır. Hücre kültürü deneyleri bileşik **3g**'nin hem hücre içi ROT oluşumunu, hem de ROT'a bağlı protein hasarlarını azaltmada etkin ve nontoksik bir bileşik olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: 1*H*-indol-2,3-dion, benzotiyazolin, spirooksindol, antioksidan etki, sitotoksisite.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TSA-2020-37008

ABSTRACT

Karabağ, N. (2023). Spiroindolinones Bearing Benzothiazoline Moiety: Synthesis, Structure Determination and Biological Effects Studies. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Chemistry, MS. thesis. Istanbul.

The increase in the production of free radicals and reactive oxygen compounds (ROS) as a result of metabolic reactions in cells can cause a wide variety of DNA damage. The most important of the pathogenic consequences associated with this damage is carcinogenesis, and the mutation in DNA can cause Alzheimer's, dementia, Parkinson's, etc. It has been found to be associated with neurodegenerative diseases, as well as diabetes, inflammation, cardiovascular and autoimmune diseases. The discovery of the role of free radicals in these diseases guides new treatment approaches. In this study, 5-(trifluoromethyl)-3*H*-spiro[1,3-benzothiazole- 2,3'-indole]-2'(1'*H*)-one compounds (**3a-h**) were synthesized from treatment of 1*H*-indole-2,3-diones (**1a-h**) with 2-amino-4-(trifluoromethyl)benzenethiol (**2**) in ethanol. The structures of the newly synthesized compounds **3a-h** were confirmed by elemental analysis and spectral (IR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR-APT, HMBC-2D and LCMS-APCI) data. The scavenging effects on superoxide and DPPH radicals, trolox equivalent antioxidant capacities, reducing powers of Fe^{3+} and Cu^{2+} ions, and inhibitory powers of lipid peroxidation of compounds **3a-h** were investigated. The cytotoxicities of compounds **3a-c** and **3f-h**, which have prominent antioxidant effects, were investigated at healthy human fibroblast (HFF) cells. It was determined that the two compounds that most effectively reduced the formation of intracellular ROS in cells where oxidative stress was induced were **3h** and **3g**, respectively. The compound that most effectively reduced protein damage was **3g**. Cell culture experiments have shown that compound **3g** is an effective and nontoxic compound in reducing both intracellular ROS formation and ROS-induced protein damage.

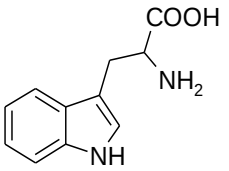
Key Words: 1*H*-indole-2,3-dione, benzothiazoline, spirooxindole, antioxidant effect, cytotoxicity.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: TSA-2020-37008

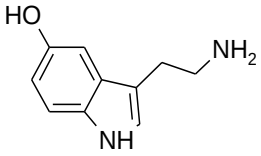
1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser için etkili bir tedavi yönteminin bulunamaması biyolojik çeşitliliğinin oldukça fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Yapılan araştırmalar, solunum ve sindirim olaylarından enerji kazanılmasını sağlayan serbest radikaller ve reaktif oksijen bileşikleri (ROS)'nin bu kadar fazla biyojik çeşitlilik görülmesinde önemli rolleri olduğunu göstermiştir (Fang ve ark. 2002). ROS ve serbest radikaller metabolizmanın temel işlevlerini sürdürürken vücudumuzun sürekli olarak oksidatif stres altında olmasına sebep olmaktadır. Oksidatif stresin protein, lipit veya DNA'ya geri dönüşümsüz hasar oluşturarak kanser, alzheimer, demans, parkinson, diyabet, kardiyovasküler vb. birçok hastalığa neden olabildiği saptanmıştır (Şimşek 1999; Szalay 2016).

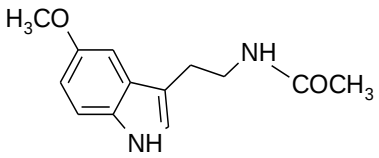
Canlılar, oksidatif stresi dengede tutmaya yarayan savunma sistemine sahiptir. Bitkilerde indol-3-asetik asit ve indol-3-propiyonik asit, insanlarda triptofan ve türevi indolaminler, serotonin ve melatonin serbest radikal yakalama özelliği tespit edilmiş, düşük dozda yüksek antioksidan etkili önemli indol türevleridir (Peyrot ve Ducrocq 2008).



Triptofan

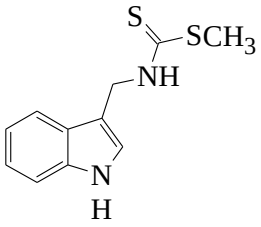


Serotonin

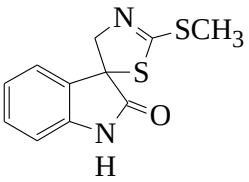


Melatonin

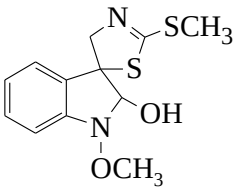
Brassinin, spirobrassinin, 1-metoksispirobrassinol ve kamaleksin gibi indol türevi fitoaleksinlerin *Cruciferous* familyasındaki bitkilerde oksidatif stres veya patojen etkenlere karşı sekonder metabolit olarak sentezlendiği (Pedras ve ark. 2002), kimyasal ve biyokimyasal açıdan bitkilerin savunma sistemlerinin önemli bir parçası olan bu metabolitlerin solid tümor ve lösemi hücrelerinde *in vivo* sitotoksik etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Monde ve ark. 2005; Pilàtovà ve ark. 2005). Bu bulgudan yola çıkarak geliştirilen sentetik 1-metoksispirobrassinol türevlerinin kanser hücrelerinde önemli sitotoksik etkileri saptanmıştır (Mezencev ve ark. 2008; Kutschy ve ark. 2009).



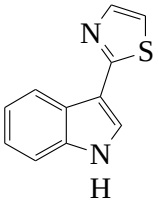
Brassinin



Spirobrassinin

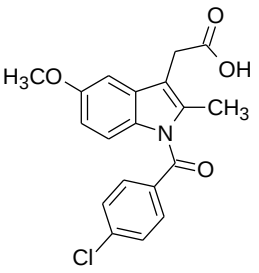


1-Metoksibrassinol

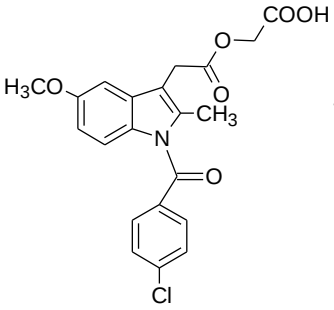


Kamaleksin

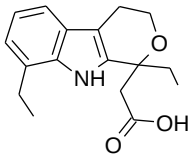
Antioksidanlar hücre sinyal yolaklarında düzenleyici etki de gösterirler. İnflamasyon, tümör invazyonu, proliferasyon ve anjiyogenezinin inhibisyonu gibi kanserden korunmayı sağlayıcı görevleri de vardır (Hashim ve Zarina 2012). Siklooksijenaz (COX) enzim aktivitesinin uyarılmasıyla biyolojik sıvılarda peroksit radikallerinin oluştuğunu belirlenmiş, inflamasyonun önlenmesinde kritik bir rol oynayan COX-2 inhibisyonunun, nörodejeneratif hastalıklar ve bazı kanser türlerinin inhibisyonu ile bağlantısı araştırılmıştır. İndol halkası taşıyan nonsteroidal antienflamatuvar ilaçlar, indometazin, asemetazinin ve etodolakın süperoksit yakalama kapasitesine sahip olduğu (Ikeda ve ark. 2001), antienflamatuvar etkilerinin serbest radikal yakalama kapasiteleri ile bir ölçüde ilişkili olduğu belirlenmiştir (Mouithys-Mickalad ve ark. 2000; Dannhardt ve Kiefer 2001). Hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan fluvastatinin serbest radikal yakalama kapasitesine sahip olduğu, NADPH oksidaz enzimini ve oksidatif stresi inhibe ettiği saptanmıştır (Bandoh ve ark. 2003).



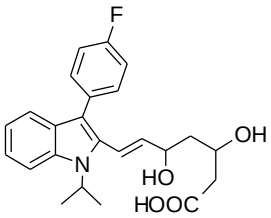
İndometazin



Asemetazin



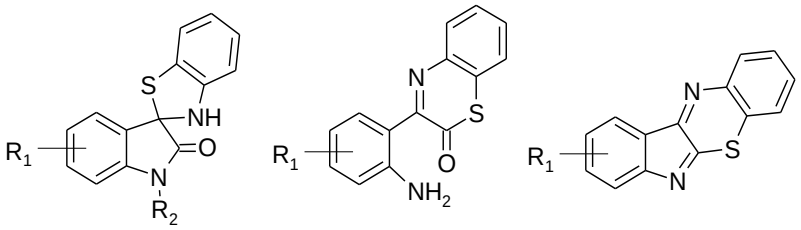
Etodolak



Fluvastatin

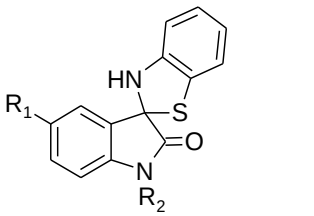
Yapılan araştırmalar, elektronca zengin indol halkasının antioksidan etki için ana yapı olduğunu, elektron donörü özelliği nedeniyle indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarında önemli rol oynayabileceğini göstermiştir (Süzen 2007; Tan ve ark. 2007). Bu sonuçlar, serbest radikal yakalama kapasitesi yüksek yeni indol türevlerinin sentezlenmesine önderlik etmiş, son yıllarda yapılan araştırmalarda birçok antikanser ve antioksidan etkili spirooksindol türevi geliştirilmiştir (Kumar ve ark. 2020; Soliman ve ark. 2020; Espadinha ve ark. 2022).

1*H*-indol-2,3-dionların 2-aminobenzentiyol ile reaksiyonundan, koşullara göre spirobenzotiyazolin, ayrıca benzotiyazinon ve indolobenzotiyazin türevlerinin de elde edildiği, 1-metil-1*H*-indol-2,3-dion türevlerinden yalnız spiro bileşiğin sentezlendiği belirlenmiştir (Dandia ve ark. 1990; Joshi ve ark. 1990).

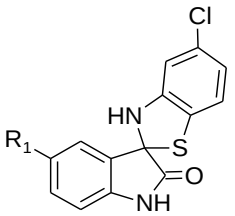


R_1 = H, 5-F, 6-F ; R_2 = H, CH_3

1*H*-indol-2,3-dion türevleri ve 2-aminobenzentiyolün etanollü ortamda reaksiyonuyla tek ürün olarak elde edilen spiro-2-indolinon türevlerinin yapıları spektral analizler ve X-ışını tek kristal analiz yöntemiyle doğrulanmış, α-tokoferole kıyasla antioksidan etkilerinin çok daha üstün olduğu belirlenmiş, 5-metil ve 5-triflorometoksi sübstitüe türevlerin sitotoksisiteyi attırdığı saptanmıştır (Karalı ve ark. 2010). 5-Klorobenzotiyazolin artığı bulunan spiroindolinon türevlerinin sentezlendiği çalışmada 5-flor sübstitüe türevin α-tokoferolden daha etkili olduğu, ayrıca bu türevin ve 5-klor sübstitüe türevin sitotoksik etki gösterdiği kaydedilmiştir (Ermut ve ark. 2014).



R_1= H, CH_3, OCF_3, Cl, Br, NO_2
R_2= H, CH_3



R_1= H, CH_3, OCF_3, Cl, Br, NO_2

Bu çalışmada, 5-(triflorometil)benzotiyazolin artığı taşıyan yeni spiroindolinon türevlerinin sentezlenmesi, yapılarının aydınlatılması, radikal giderici etkileri, antioksidan kapasiteleri, redükleyici ve lipid peroksidasyonu inhibe edici güçlerinin, ayrıca sağlıklı hücrelerde sitotoksisitelerinin, ROT oluşumu ve ROT'a bağlı protein hasarlarını azaltmadaki etkilerinin araştırılması, benzotiyazol halkasının 5- konumundaki triflorometil grubunun, ayrıca indol halkasının 5- ve/veya 7- konumundaki sübstitüentlerin antioksidan etkiye katkılarının incelenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller ve Radikal Olmayan Reaktif Türleri

Serbest radikallerin vücudumuzda hem yararlı hem zararlı etkileri vardır. Enerji üretimi, hücresel solunum gibi yararlı etkiler, radikallerin düşük veya orta konsantrasyonlarında görülürken, yüksek konsantrasyonlarında geri dönüşü olmayan hasarlara neden olurlar. Radikallerin biyolojik hasara neden olan zararlı etki seviyeleri oksidatif stres ve nitrozatif stres olarak tanımlanır. Vücudumuz, biyolojik olaylar sırasında stres artışına aksi yönde cevap verebilen antioksidan olarak tanımlanan biyomoleküller bulundurur. Yani oksijenli solunum yapan canlılar prooksidan/antioksidan reaksiyonlar dengesine sahiptir. Bir taraftan prooksidanların aşırı üretimi diğer taraftan enzimatik/enzimatik olmayan antioksidanların eksikliği stresin hasar verici boyutlara gelmesiyle sonuçlanır. Oksidatif stres üreten bileşikler, azot ve oksijen merkezli yapılardır (Tablo 2-1) (Valko ve ark. 2007).

Tablo 2-1: Reaktif oksijen ve nitrojen bileşikleri

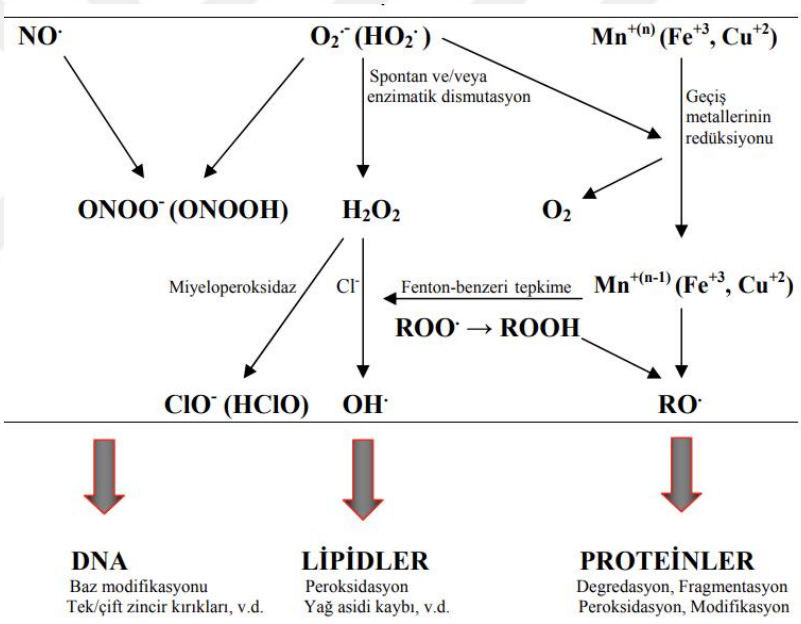
Reaktif Oksijen Türleri (ROT)		**Reaktif Nitrojen Bileşikleri (RNS)**
Serbest Radikaller	**Radikal Olmayanlar**	-
Hidroksil $OH^{\cdot}$	Peroksinitrit $ONOO^-$	Nitröz oksit N_2O
Süperoksit $O_2^{\cdot -}$	Hipokloröz asit HOCl	Peroksinitrit $OONO^-$
Nitrik oksit NO	Hidrojen Peroksit H_2O_2	Peroksinitröz asit ONOOH
Alkil $R^{\cdot}$	Ozon O_3	Nitroksil anyon NO^-
Alkoksi $RO^{\cdot}$	Lipid Perkosit LOOH	Nitril klorür NO_2Cl
Peroksil $ROO^{\cdot}$	Aldehitler HCOR	Nitrozil NO^+
Organik Peroksit $RCOO^{\cdot}$		Nitrojen dioksit NO_2
Perhidroksil $HOO^{\cdot}$		Dinitrojen trioksit N_2O_3
Tiyil $RS^{\cdot}$		Nitröz asit HNO_2

Serbest radikaller çok kısa yarılanma ömrüne sahip olan kimyasal türlerdir. Bu yüzden yüksek konsantrasyonlardayken vücutta çeşitli tepkimelerin inhibe edilmesine veya kontrolsüz şekilde devam etmesine neden olurlar (Tablo 2-2).

Tablo 2-2: Bazı serbest radikallerin vücutta yarılanma ömrü

Serbest Radikal	Sembol	Yarılanma Ömrü (s)
Süperoksit	$O_2^{\bullet-}$	10^{-6}
Hidroksil	$OH^{\bullet}$	10^{-10}
Alkoksi radikal	$RO^{\bullet}$	10^{-6}
Peroksi Radikal	$ROO^{\bullet}$	17
Nitrik oksit	$NO^{\bullet}$	Birkaç dakika
Azot oksit	$NO_2^{\bullet}$	Birkaç dakika

Reaktif oksijen ve nitrojen bileşiklerin Şekil 2-1'de gösterildiği gibi yaşamsal moleküllere ciddi zararları vardır. Radikaller kısa sürede geçiş metallerini redükte ederek veya bir dizi biyolojik gerekliliği olmayan reaksiyonun başlamasını sağlayarak DNA, lipidler ve proteinlerde hasar oluşturmaktadır.



Şekil 2-1: ROS/ RNS bileşiklerinin neden olduğu hasarlar

2.1.1. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$)

Oksijen, 2.2 milyar yıl önce dünya atmosferinde, siyanobakteriler tarafından fotosentezin evrimi nedeniyle önemli miktarlarda ortaya çıkmıştır. Başlangıçta, O_2'nin çoğu, kayalarda ve cevherlerde bulunan metalik oksit birikintilerinin oluşumu ile tüketilmiştir. Bu birikim tamamlandığında atmosferde O_2 birikmeye başlamıştır (Lane 2002).

Oksijenli solunum yapan yani aerobik canlılar için moleküler oksijen yaşamsal bir ihtiyaçtır. Aerobik hücrelerin mitokondrilerinde oksijen molekülü, bir dizi döngü içerisinde suya dönüşür ve bu sırada enerji üretimi gerçekleşir. Bazen mitokondri içindeki enzimatik prosesler veya indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonunda elektron kaçağı meydana gelir ve bunun sonucunda süperoksit oluşur. Süperoksit anyonunun neredeyse tamamı mitokondride gerçekleşen elektron transferi sonucunda oluşur; en yaygın görülen serbest radikaldir (Halliwell 2006).

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$$

Vücudumuzda süperoksit radikali üreten tepkimeler şunlardır:

- ✓ Mitokondri iç zarında bulunan elektron taşıma zincirinden her 4 elektron geçtiğinde bir oksijen molekülü indirgenir ve iki mol su meydana gelir. Oksijenin neredeyse tamamı suya dönüşürken %1-4'ü kadarı süperoksit yapımıyla sonlanır. Radikal üretimi NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcıların etkisiyle gerçekleşir. Bu aşamada oluşan süperoksitlerle sitokrom oksidaz proteinleri oldukça kuvvetli bir reaksiyona girer ve radikalin ortamdan uzaklaştırılması için kuvvetli bir savunma hattı oluşturur (Johnson ve Giulivi 2005; Halliwell 2006; Kılınç ve Kılınç, 2022).

$$(sit_c)\ Fe^{+3} + O_2^{\bullet -} \rightarrow (sit_c)\ Fe^{+2} + O_2$$

- ✓ Hidrokinon, flavon, tiyol ve katekolamin yapısındaki indirgen nitelikteki biyomoleküller, bir elektronlarını oksijene vererek oksitlenir ve süperoksit radikali oluştururlar (Halliwell 2006).
- ✓ Enzimlerin katalitik reaksiyonları sırasında süperoksit radikalleri meydana gelebilir.

Bitkiler, aerobik bakteriler ve insanlar normalden yüksek oksijen konsantrasyonlarına maruz kaldıklarında zarar görürler. Süperoksit radikalinin biyomoleküllerle reaksiyon kabiliyeti oldukça düşüktür; fakat başka serbest radikallerin üretildiği reaksiyonları oldukça hızlı verir. Lipid peroksidasyonuna neden olur ve katalaz ve glutatyon gibi antioksidan sistemi zayıflatır. Ribonükleotidlere zarar vererek DNA sentezini, dolayısıyla protein sentezini bozar (Johnson ve Giulivi 2005; Halliwell 2006).

2.1.2. Hidrojen Peroksit Radikali (H_2O_2)

Hidrojen peroksit radikali, paylaşılmamış elektron bulundurmadığından; radikal olmayan bir reaktif oksijen türüdür. Son derece güçlü bir oksitleyici olmasına rağmen süperoksite göre daha yavaş reaksiyon verir. Radikalin pK değeri 10,6 olduğu için nötr ve asidik koşullarda net yük taşımaz ve biyolojik zarları rahatça geçebilir. H_2O_2 üretimi temelde üç farklı mekanizm ile oluşur. Bu mekanizmaların ilkinde oksijen veya süperoksitin indirgenmesi sonucu oluşur (Johnson ve Giulivi 2005).

$$O_2^{\bullet-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$$

Radikal olmayan reaktif oksijen bileşiği üretilen reaksiyonlara dismutasyon denir. Hidrojen peroksit üretiminin çoğu süperoksitlerin enzimatik (süperoksit dismutaz, SOD) veya nonenzimatik (spontane) dismutasyon tepkimesiyle oluşabilir. Reaksiyonda iki süperoksit molekülü proton alarak hidrojen peroksit ve radikal olmayan oksijen molekülü oluşturur. Oksijen miktarı arttıkça hidrojen peroksit oluşumu da artar (Valko ve ark. 2004; Çağlayan 2012).

$$2\ O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Glikolat oksidaz, D-aminoasit oksidaz, ürat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz veya açil-CoA gibi bazı peroksizomal enzimler de bol miktarda hidrojen peroksit üretir. Katalaz (CAT) enziminin aktivitesi peroksizomlarda çok yüksektir. Bu enzim hidrojen peroksitin hidroksile dönüşmesini engellemek için oksijen ve su ayrışmasını sağlamaktır. Peroksizomal hidrojen peroksitin en yaygın üretildiği organ karaciğer olmakla birlikte diğer organlarda da hidrojen peroksit üretici mekanizmaya sahiptir (Mates ve ark. 1999).

Hidrojen peroksit zayıf oksidan bir ajan olmasına rağmen oldukça büyük hasarlara neden olur. Protein tiyollerini oksitlemesi ve DNA'da saniyeler içerisinde zincir kırılmaları meydana getirmesi nedeniyle çok tehlikelidir (Valko ve ark. 2004). Glikolitik yolak enzimlerinden olan gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz enzimini (GAPDH) inaktive eder böylece kofaktörü olan nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) seviyesinde azalma ya da hücrelerde pH değişikliğine neden olur ve ATP boşalmasına yol açar. Piruvat gibi bazı keto asitleri nonenzimatik olarak oksitler. Bu etkiler radikalin yavaş reaksiyon vermesi nedeniyle hafif geçebilir. Hidrojen peroksitin lipit çözünürlüğü süperoksite göre

oldukça yüksek olduğu için Fe^{2+} içeren membranlarda hızlıca hidroksil radikali oluşturur (Mates ve ark. 1999; Çağlayan 2012; Değermenci ve ark. 2014).

2.1.3. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilebilen hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) canlılarda lipid çözünürlüğü oldukça düşük ve çok kısa yarı ömre sahip en reaktif serbest radikaldir. Hidroksil radikali oluşur oluşmaz hızlı bir şekilde çevredeki tiyol (R-SH) ve yağ asitleri gibi moleküllerden proton koparır ve tiyil ($RS^{\bullet}$), organik peroksit (RCOO) radikallerini üretir (Djordjević 2004).

Hidroksil radikali üreten tepkimelerin birincisi suyun enerji etkisiyle iyonlaşmasıdır. Reaksiyon sonucu oluşan uyarılmış su molekülü ($H_2O^{\bullet}$) homolitik yıkımla; H_2O^{+} katyonu da bir su molekülüyle tepkimeye girerek radikalik hidroksil anyonunu üretir. Reaksiyon oldukça hızlı gerçekleştiğinden radyasyonun toksik etkilerinden hidroksil radikalinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Valko ve ark. 2004).

$$2H_2O \rightarrow H_2O^{+} + e^{-} + H_2O^{\cdot}$$

Radikali oluşturan ikinci mekanizma hidrojen peroksit radikalinin indirgenmesidir. Hidroksil radikal üretiminin en fazla olduğu tepkimedir. Bakır, demir gibi geçiş metalleri katalizlenerek güçlü oksidan hidroksili oluşturan bu tepkimeleri Fenton Reaksiyonu denir. Ortamda askorbik asit süperoksit gibi indirgeyici başka moleküllerin varlığı radikal sentezini sürekli hale getirir (Valko ve ark. 2004).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-} + OH^{\cdot}$$

$$OH^{\cdot} + H_2O_2 \rightarrow H_2O + H^{+} + O_2^{\bullet-}$$

$$O_2^{\bullet-} + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + OH^{\cdot} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-}$$

Hidroksil üretilen diğer mekanizma ise süperoksit radikali ve hidrojen peroksit arasında gerçekleşir. Bu reaksiyon Haber-Weiss reaksiyonu olarak tanımlanır. Kontrolsüz hidroksil radikal sentezi inflamasyon, teratojenezis, hücre ölümü, fagositoz gibi hücresel olaylara da neden olur (Matés ve ark. 1999).

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + OH^{+} + O_2$$

2.1.4. Reaktif Nitrojen Bileşikleri ($NO^{\cdot}$)

Bir tane eşleşmemiş elektron bulunduran, radikalik çapı küçük reaktif bileşik türleridir. Biyolojik dokulardan spesifik nitrik oksit sentezi sırasında oluşabilir. Nörotransmisyon, düz kas gevşemesi, savunma mekanizması ve kan basıncı regülasyonu gibi çok önemli olaylar sırasında bol miktarda görülür. Bu olağanüstü görevleri nedeniyle 1992 yılı *Science Magazine* dergisinde yılın molekülü olarak belirlenmiştir (Koshland 1992; Kılınç ve Kılınç 2022).

Radikalin yarılanma ömrü birkaç dakikadır ve suda, lipit ortamda çok kolay çözünür. Bu yüzden hücre membranlarından rahatlıkla geçebilir ve sitoplazmada bulunabilir. Su ve oksijenle reaksiyona girerek nitrat veya nitrit anyonlarını oluşturup; sinir hücreleri arası iletim ve merkezi sinir sistemindeki sinaptik plastisitenin sağlanması görevlerinde rol oynar (Bergendi ve ark. 1999; Chiueh 1999).

$$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet -} \rightarrow ONOO^{-}$$

Nitrojenik stres, organik bileşikleri nitroso (R-N=O) türevlerine dönüştüren nitrosilasyon reaksiyonlarında hasara ve proteinlerin yapısının bozulmasına neden olabilir (Bergendi ve ark. 1999).

2.1.5. Radikal Olmayan Reaktif Bileşikleri

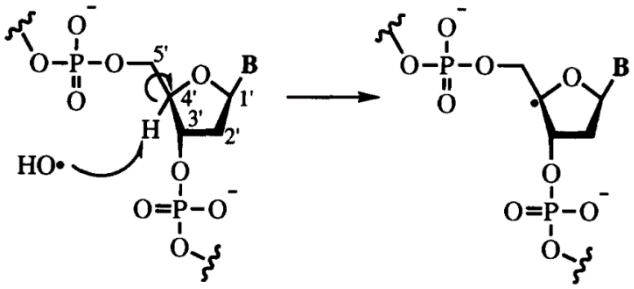
Radikal olmayan bileşikler katyonik moleküller veya nötr haldeki organik bileşiklerdir. Bu grupların temel özelliği serbest radikal oluşturan reaksiyonlara sebep olmalarıdır. Radikal olmayan türler arasında singlet oksijen (O_2), ozon (O_3), hipokloröz asit (HOCl), hipobromöz asit (HOBr), organik peroksitler (ROOH), nitröz asit (HNO_2), diazottetraoksit (N_2O_4), diazot trioksit (N_2O_3), nitril klorit (NO_2Cl) bileşikleri yer alır. Ayrıca NO^+, NO^- ve $ONOO^-$ gibi iyonlar da radikal olmamasına rağmen serbest radikal reaksiyonlarını hızlandırırlar (Valko ve ark. 2007).

2.2. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri

Reaktif türlerin miktarındaki artış ve antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalması sonucunda çok sayıda patolojik olay meydana gelmektedir. Bu patolojik olaylar hücre zarında , hücre içi protein yapı ve fonksiyonlarının değişmesi ve DNA'da yapısal bozulmalar olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.2.1. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkisi

Çeşitli nedenlerle ortaya çıkan oksidatif stres çekirdek DNA'sı ve mitokondriyal DNA yapısında hasara yol açmaktadır (Ghafourifar ve Cadenas 2005). Hidroksil radikali elektrofilik yapıya sahip, oldukça yüksek reaktiviteli bir radikal olduğu için 2'-deoksiribofuranozun $C_{4'}$ karbonuna bağlı H radikalini koparır. DNA ile bu etkileşim sonucu oluşan baz radikalleri yeni oksidasyon ürünlerine dönüşür ve mutasyon zincirleme şekilde devam ederek mutasyonun boyutu artar (Şekil 2-2) (Sancar ve Reardon 2004).



Şekil 2-2: Hidroksil radikalinin DNA ile reaksiyonu

DNA bazılarından guanin, iyonizasyon değerinin en az olması sebebiyle oksidasyona en yatkın modifiye bazdır. Hidroksil radikali, guanin bazının 4, 5 ve 8 numaralı karbonuna atak ederek 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) molekülünü oluşturur. Ayrıca Cu^{+} iyonlarının, DNA'nın guanin bazlarıyla bağlanma kapasitesi oldukça yüksektir.Yüksek affinite özelliğindeki Cu^{+}, H_2O_2 ile etkileşime girerek DNA'nın hidroksil radikali tarafından hasarına katkıda bulunurlar. Oksidatif kökenli DNA hasarının belirlenmesi için 8-OHdG mutajenik yapı analizi önemli bir belirteç olarak kullanmaktadır (Breen ve Murphy, 1995). Hidroksil radikalleri DNA bazlarına doğrudan atak ettiği gibi DNA'da bulunan şekerden hidrojen (H) atomu koparak ve şeker modifikasyonlarına ve bununla birlikte DNA'da zincir kırılmalarına yol açar (Hu ve ark. 1995).

Oksidatif stresin DNA üzerindeki etkilerinden bir diğeri de radikal haldeki DNA bazlarıyla, proteinlerin aromatik asitleri arasında çapraz bağlar oluşturmasıdır. Bu çapraz bağlar ile DNA-protein yapıları meydana gelir (Cooke ve ark. 2003). Sonuç olarak, hücresel metabolizmalar sonucunda oluşan radikaller çok çeşitli DNA hasarlarını oluşturduğu gibi DNA tamiri mekanizmalarında da zarar vererek hasarın zincirleme şekilde devam ettirir. Bu hasar ile ilişkili patojenik sonuçlardan en önemlisi karsinogenezis olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra DNA'da oluşan mutasyonun

Alzheimer, demans vb. nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Helbock ve ark. 1999; Cooke ve ark. 2003; Burçak ve Andican 2004).

2.2.2. Serbest Radikallerin Lipit Peroksidasyonu

Hücre membranlarında çoklu doymamış kimyasal yapıya sahip kolesterol ve yağ asitleri bulunur. Serbest radikaller hücre membranında bulunan doymamış yapılar ile kolayca reaksiyona girebilir. Yağ asitlerinin reaktif oksijen bileşikleri tarafından oksidatif yıkıma uğramasına lipit peroksidasyonu denir. Lipit peroksidasyonu aynı zamanda ikincil bir serbest radikalin oluşmasıyla sonuçlanır.

Lipitler, yapılarında çifte bağlar arasında metilen grubu taşıdıkları için serbest radikallere karşı en hassas biyomoleküllerdir. Hücrelerde çoklu doymamış yağ asit yapılarının fazla olması serbest radikal zincir tepkimelerinin hızlıca başlamasına neden olur. Lipid peroksidasyonu nitrojen, hidroksil gibi radikaller veya geçiş metalleriyle ile başlayabilmektedir. Geçiş metalleri, lipid peroksidasyonunun zincir tepkimelerini katalize eder ve oluşan Lipid-$OO^{\cdot}$ molekülü, ardarda gelen ayrılma, yeniden düzenlenme ve oksidasyon reaksiyonları ile stabilitesi yüksek karbonillere dönüşür (Şekil 2-3) (Müftüoğlu 2003; Djordjević 2004).

$$\text{Lipid-OOH} + Fe^{+2}\ (Cu^{+}) \rightarrow \text{Lipid-}O^{\cdot} + Fe^{+3}\ (Cu^{+2}) + OH^{\cdot}$$

$$\text{Lipid-OOH} + Fe^{+3}(Cu^{+2}) \rightarrow \text{Lipid-}OO^{\cdot} + Fe^{+2}\ (Cu^{+}) + H^{+}$$

Şekil 2-3: Lipid peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu sonucunda membran akışkanlığının değişmesi, iyonlara karşı geçirgenliğinin artması, yırtıklarının oluşması ve takiben hücre içeriği ve çeşitli enzimlerin dışarıya salınması gibi hasarlar görülür.

2.2.3. Serbest Radikaller ile Bazı Hastalıkların ilişkisi

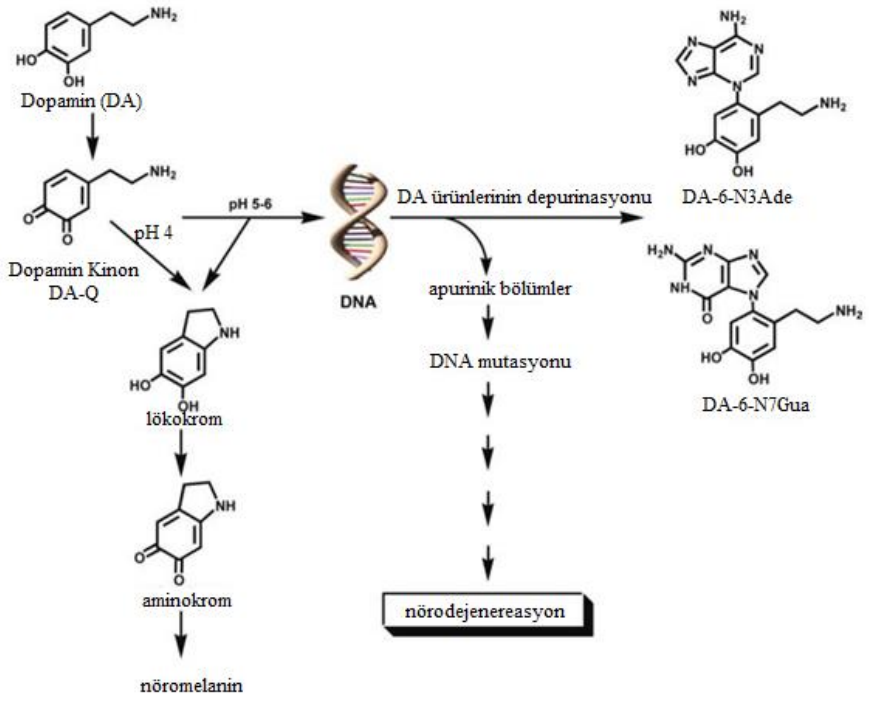
Serbest radikaller ve ROS bileşikleri diyabet, nörolojik-kardiyovasküler hastalıklar, kanser, astım, romatoid artrit, iltihap, bağırsak yolu hastalıkları ve damar tıkanıkları gibi birçok önemli hastalığın nedenleri arasında yer alır. Bu hastalıklardan bazılarının serbest radikal ve ROS ile ilişkiler yapılan birçok araştırma sonucunda aşağıdaki gibi açıklanmıştır.

Merkezi sinir sisteminin büyük çoğunluğunu su oluşturur. İnsan beyninin kuru ağırlığı ve sinir hücreleri miyelin kılıfı lipid ve proteinler içerir. Sinir sistemindeki

lipitlerin çoğunu fosfolipit geri kalanı ise serbest kolesterol, glikolipit ve sülfatitler bileşikleri oluşturur (Neurauter ve ark. 2008). Sinir sisteminin lipid protein ve sudan oluşan biyokimyasal kompozisyonu oksijen tüketimiyle bir döngü içerisindedir. Oldukça yoğun oksijen tüketilen sinir sisteminde antioksidan enzimler hayli azdır bu yüzden ROS bileşiklerinin lipid peroksidasyonu sonucu oluşan membran akışkanlığı hasarı ve iyon geçirgenliğinde dengenin bozulması sonucu sinir sistemi hastalıklarına neden olur. Tıpkı sinir hücreleri gibi beynin bazı bölümleri de serbest radikallere karşı oldukça savunmasızdır. Oksidatif stresin sinir sisteminde yoğunlaşması Alzheimer, parkinson, lateral amyotropik skleroz gibi ciddi hastalıkların başlamasına neden olur (Neurauter ve ark. 2008; Rivas-Arancibia ve ark. 2010).

Parkinson hastalığı hafıza, öğrenme ve motor kontrol gibi görevlerden sorumlu olan dopaminerjik nöronların hasarı sonucunda oluşur (Rivas-Arancibia ve ark. 2010). Dopamin (DA) pH azalmasıyla dopamin kinonlara (DA-Q) dönüşür. DA-Q yapıları nötr pH ortamlarında molekül içi siklizasyonu gerçekleşir ve bir dizi oksidasyon tepkimeleri sonucunda sırasıyla lökokrom, aminokron ve nöromelanin oluşturur. Daha düşük pH ortamlarında (pH=4 gibi) DA'nın amino grubu kısmen protonlanır ve DNA'daki adenin ve guanin ile moleküller arası pürinasyon giderici adüktler dopamin-adenin (DA-6-N3-Ade) ve dopamin-guanin (DA-7-Gua) oluşturabilir (Zahid ve ark. 2011) (Şekil 2-4). Zahid ve ark. tarafından yapılan çalışma DA-6-N3Ade ve DA-7Gua moleküllerinin etkinliği sonucu oluşan parkinson hastalığının N-asetilsistein ve resveratrol gibi antioksidanlarla önlenebileceği tespit edilmiştir.

Dopamin aynı zamanda metaller ile kolaylıkla kordine kovalent bağ yapabilen endojen bir maddedir. Bu özelliği sebebiyle demir gibi metalleri üzerinde tutup yüksek miktarda H_2O_2 varlığında fenton reaksiyonuyla daha fazla radikal oluşturur. Hücre içerisinde Fe^{+3} iyonu ve hidroksil radikali miktarını arttırma gibi endojen kaynaklı serbest radikal oluşumları dopaminerjik nöronların zarar görmesine ve Parkinson hastalığının görülmesine neden olur (Zahid ve ark. 2011).



Şekil 2-4: Dopaminin pH değişiklikleri etkisiyle oluşturduğu nörodejenerasyon

Alzheimer hastalık etkenleri oldukça çeşitlidir, fakat beyindeki oksidatif stres sonucunda amiloid beta protein metabolizmasının bozulması en önemli etkendir. Amiloid beta protein Na^{+} ve Zn^{2+} gibi birçok metalin geçişini düzenler, bu sırada H_2O_2 kullanılır ve hidroksil iyonları üretilir. Amiloid beta proteinin oksidasyonu bir dizi reaksiyonun kontrolsüz ilerilemesin sebep olup endojen kaynaklı serbest radikalleri oluşturur. Alzeimer ve oksidatif hasar arasındaki ilişki protein oksidasyon markerları olarak bilinen karbonil grupları ve 3-nitrotirozinlerin artışı üzerinden değerlendirilebilir (Olivieri ve ark. 2011).

DNA mutasyonu sonucu oluşan bir diğer önemli hastalık olan kanserde, hücreler yüksek hızda bölünme ve bozuk hücresel fonksiyona sahip olduğu için normal hücrelere göre daha fazla ROS üretir, bu yüzden vücudun tümünde oksidatif stres seviyesini arttırır. Kanser ve oksidatif stres arasındaki ilişkiyi birkaç kanser hastalığı üzerinden örneklendirebiliriz.

Kolon kanseri en yaygın kanser türlerden biridir. Bağırsak mukozası sürekli olarak endojen ekzojen kaynaklı ROS akışına maruz kalır, prooksidan/antioksidan dengenin bozulması sebebiyle hastalık tümörlerinde $NO^{\cdot}$ ve lipidperoksitleri yüksek miktarda bulunur (Butterfield ve ark. 2006).

Meme kanserinde görülen en önemli oksidatif etken, hidroksil radikalinin DNA'nın pürin bazlarında halka açılması reaksiyonu vermesidir. Öte yandan hücre içi H_2O_2 birikimi de hidroksil radikal oluşumunu tetiklediği için meme dokusunda DNA hasarlarına neden olmaktadır (Harris ve ark. 1992). Meme epitelin yapısında oluşan bozulma fibroblastların çoğalmasına, epitel hiperlazisine ve meme kanserine yol açmaktadır (Nicholas ve ark. 2014). Meme karsinomlarında genel olarak, timidini timine ve 2-deoksi-D-riboz-1-fosfata katabolize eden timidin fosforilaz enziminde artış görülmüştür. Bu artışın oksidatif stres ve proteinleri hızla glikasyona uğratarak karsinom hücresi içinde oksijen radikalleri üreten güçlü bir indirgeyici şeker olduğu düşünülmektedir (Murrel 1991).

Akciğer kanseri dünya üzerinde en sık görülen ve kansere bağlı ölümlerin %30'unu kapsayan bir kanser türüdür. Oksidatif stres ve akciğerde iltihaplı hastalık geçmişi akciğer kanserinde önemli rol oynar. Sigara gibi çok sayıda uzun ömürlü ROS içeren eksojen kaynaklar akciğer hücrelerinde DNA hasarına neden olmaktadır (Brown ve ark. 2000).

Katarakt, dünya üzerinde 25 milyon insanı etkileyen yaygın bir görme bozukluğudur (Azad ve ark. 2008). Katarakt oluşumunda genetik faktörler, diyabet, yaşlanma, radyasyon (röntgen ve UV ışınları) ve hem endokrin hem de enzimatik dengedeki değişiklikler gibi bir dizi faktörün yanı sıra oksidatif stres de etkilidir. Katarakt lensleri protein, lipit ve DNA içerdiği için oksidatif strese bağlı hasarlara burada da rastlanır. Lipit peroksidasyon toksik ürünleri, lensin opaklığına katkıda bulunan lens proteinlerinin parçalanmasını indükler (Beebe ve ark. 2010; Hashim ve Zarina 2012). Katarakt lens, normal lensten farklı olarak hücre içi iyonik dengesizliğe sahiptir. Güneş ışığında UV ışınlarının neden olduğu ROS, iyonik dengeyi bozar ve lens içindeki kalsiyum seviyelerinin artmasına neden olur. Artmış kalsiyum hem α hem de β kristal proteinler gibi lens proteinlerini parçalayan lizozomal olmayan calpain enzimini aktive eder ve katarakt oluşumuna neden olur (Bhuyan ve ark. 1986).

2.3. Antioksidan Savunma Mekanizması

Vücudumuz serbest radikallerin olası hasarlarına karşı korunmak için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Düşük miktarlarda serbest radikalin oksidasyonunu engelleyen bu moleküllere antioksidan denir (Azad ve ark. 2008). Antioksidanlar görevlerine göre enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere ikiye

ayrılır. SOD, Glutatyon Peroksidaz (GPx), Katalaz (CAT) vb. enzimatik gruba ait yapılarken, askorbik asit (C vitamini), α-tokoferol (E vitamini), flavonoidler…vb. ise enzimatik olmayan gruba aittir. Enzimatik grup daha çok hücre içi oksidatif strese karşı savunma ve zincir reaktif oksijen türü tepkimelerini sonlandırmadan sorumluyken; enzimatik olmayan antioksidanlar da çoğunlukla zincir tepkimelerini kırıcı etkiden sorumludur (Hashim ve Zarina 2012). Lipid peroksidasyonu gibi zincir tepkimelerde; bölgedeki uygun antioksidan radikalden elektron alarak/vererek zincir kırıcı etki gösterir. Görevlerine göre enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların bir kısmı vücutta üretilirken (endojen) bir kısmı da dışarıdan gıda yoluyla (eksojen) alınmaktadır (Beebe ve ark. 2010).

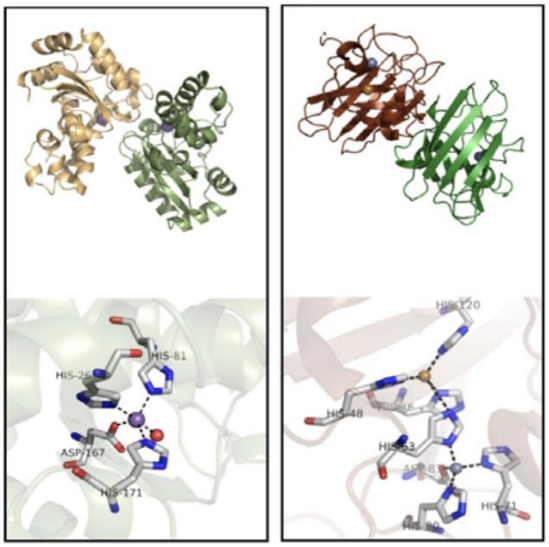
Antioksidanlar, direkt olarak serbest radikallerin süpürülmesinde etkili olduğu gibi hücre haberleşme yolaklarında düzenleyici etki gösterirler. Ayrıca inflamasyonun inhibe edilmesi, tümör invazyonu, proliferasyonun inhibisyonu, anjiyogenezinin inhibisyonu gibi kanserden korunmayı sağlayıcı görevleri de vardır (Hashim ve Zarina 2012) (Tablo 2-3).

Tablo 2-3: Enzimatik özelliklerine göre antioksidanlar

Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar
	Yağ fazında bulunan antioksidanlar α-tokoferol, β-karoten, α-lipoik asit
Katalaz (CAT) **Glutatyon peroksidaz (GPx)** **Süperoksit dismutaz (SOD)** **Hidroperoksidaz** **Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi**	**Su fazında (sitoplazma/kan plazması) bulunan antioksidanlar** Albümin, Askorbik asit, Ferritin, Glutatyon, Melatonin, Laktoferrin, Metiyonin, Bilirubin, Miyoglobin, Seruloplazmin, Sistein, Ürik asit, Hemoglobin, Transferin

2.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Enzimatik-endojen antioksidanlardan SOD, mitokondri iç membranın her iki yüzünde üretilen **s**üperoksit radikalinin hidrojen peroksit veya moleküler oksijene dönüşmesini sağlayan enzim grubudur. Aktif bölgesinde çeşitli metal iyonları bulunduran metal proteinleridir. Memelilerde substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzimdir. İnsanlarda SOD'un Cu-Zn ve Mn kapsayan iki izoenzimi bulunmaktadır. Organizmada, Cu ve Zn içeren izoenzime sitozolde, Mn içeren izoenzime ise mitokondride rastlanır (Şekil 2-5) (Bhuyan ve ark. 1986; Dilsiz ve ark. 2000; Somogyi ve ark. 2007).



Şekil 2-5: İnsanlarda bulunan SOD enzim yapıları ve aktif bölgeleri (Valko ve ark., 2007)

2.3.2. Katalaz (CAT)

Yapısında dört adet hem grubuna sahip; antioksidan savunmada iki işlevi olan, peroksizom organellerinde görülen bir hemoproteindir. Katalaz (CAT) enziminin birinci işlevi, yüksek konsantrasyondaki hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayarak katalitik aktivite sağlamaktır. Enzimin katalitik aktivitesi dakikada 6 milyon H_2O_2 molekülünü su ve oksijene ayırabilecek kadar yüksektir (Beebe ve ark. 2010). İkinci işleviyse, H_2O_2'nin düşük konsantrasyonlarında metanol, etanol, formik asit, fenoller gibi küçük molekül ağırlığı olan redükleyici donörlerin varlığında peroksidaz gibi davranarak peroksidatif aktivite oluşturmaktır. CAT'ın peroksidatif etkisi oldukça yavaştır (Berek ve Hacker 2000; Young ve Woodside 2001).

$$2\ H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$$

Katalaz aktivitesinin artması/ azalmasının çeşitli rahatsızlık ve hastalıklarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Endotoksemi, hepatit, hemolitik rahatsızlıklar, karaciğer rahatsızlıkları, akut pankreatit, malign hastalıklar, diyabet…vb. hastalıkların CAT aktivitesindeki değişikliklerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Miller 2004).

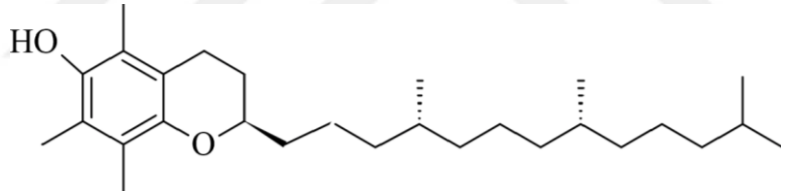
2.3.3. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz sitozolde bulunan intrasellüler bir antioksidan enzimdir. Dört adet selenyum atomu içeren tetramerik bir yapıya sahiptir. Görevi indirgenmiş glutatyonu oksitleyerek peroksit ve organik peroksitlerin redüksiyonunu katalizler (Miller 2004).

2.3.4. Bitkisel Kaynaklı Antioksidanlar

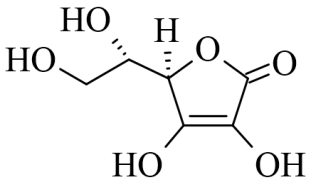
Enzimatik olmayan eksojen kaynaklı doğal antioksidanlardan α-tokoferol (E vitamini), β-karoten ve askorbik asit (C vitamini) en bilinen ve yaygın kullanılan bitkisel antioksidanlardır.

E vitamini yağda çözünebilen aktivitesi en yüksek antioksidandır (Şekil 2-6). Yapısında bulunan fenol grubu antioksidan aktivite sağlayan gruptur. Bitkisel yağlar ve tohumlarda bol miktarda bulunur. Serbest radikalleri ve peroksitleri indirgeyerek kendisi bir radikale dönüşür ve böylece doymamışlık seviyesi yüksek yağların korunmasını sağlar. Radikal haline dönüşen E vitamini glutatyon (GSH), askorbik asit (vitamin C) ve koenzim ubikinon (Q10) ile yenilenir (Fridovich 1975).



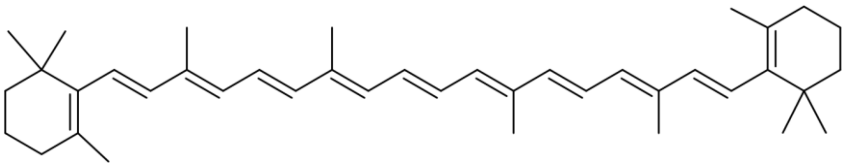
Şekil 2-6: α-tokoferol (E vitamini) molekül yapısı

Askorbik asit suda çözünen en güçlü eksojen ve enzimatik olmayan antioksidandır (Şekil 2-7). Vücuda alındığında dehidroaskorbik aside oksitlenerek süperoksit, hidroksil gibi tehlikeli radikallerle reaksiyona girer. Suda çözünebilen bir antioksidan olmasına rağmen lipit peroksidasyonunu başlatıcı radikalleri süpürerek oksidan hasarı önlemektedir (Fridovich 1975).



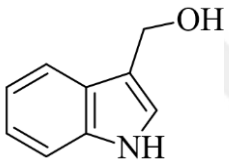
Şekil 2-7: Askorbik asit (C vitamini) molekül yapısı

β-karoten vücut tarafından gerektiğinde A vitaminine dönüştürüldüğü için A vitamininin öncülü olarak bilinir. β-karoten antioksidan karaktere sahip olmasına rağmen A vitaminin antioksidan bir özelliği yoktur. Hatta aşırı A vitamini alınması vücutta toksik etkilere neden olabilir. β-karoten bileşiğinin antioksidan etkisinin en önemli yönü peroksit radikaliyle direkt olarak etkileşmesidir (Şekil 2-8) (Handelmann 2001).



Şekil 2-8: β-karoten molekül yapısı

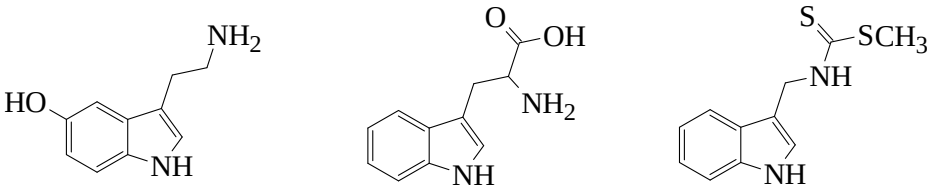
İndol-3-karbinol *Brassica* ailesine ait östrojen düzenleyici etkiye sahip olması sebebiyle antikanser ve antioksidan etkisi yüksek bir bileşiktir. Meme kanseri başta olmak üzere birçok kanser türlerinde tedavi edici etkileri bulunmaktadır (Şekil 2-9) (Abreu ve Cabelli 2010).



Şekil 2-9: İndol-3-karbinol bileşiği molekül yapısı

2.3.5. İndol Yapısındaki Endojen Antioksidanlar

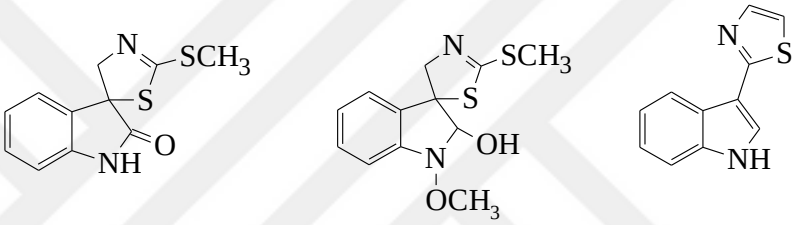
Vücudumuzda birçok biyolojik olayın gerçekleşmesini sağlayan triptofan, serotonin, melatonin gibi endojen moleküller, indol yapısındaki antioksidan aktiviteli maddelerdir (Şekil 2-10). Seratonin psikolojik durum ve iştah gibi olayların düzenlenmesinde görev alan sinirsel iletim maddesidir. Triptofan proteinlerin yapısında bulunan önemli bir aminoasittir. Diğer indol türevi endojen bileşiklerin de yapısına katılan triptofan temel endojen indol molekülüdür (Foster ve Heind 1961). Bitkilerde üretilen ve mikroorganizmalara karşı koruyucu etkiye sahip diğer indol türevi bileşik Brassininin kanseri önlediği yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (Humphrey ve Kuethe 2006).



Seratonin Triptofan Brassinin

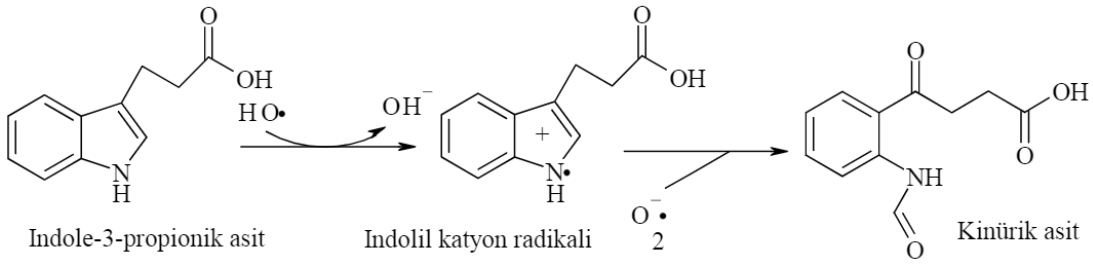
Şekil 2-10: Seratonin, triptofan ve brassinin molekül yapıları

Cruciferous familyasındaki bitkilerin savunma sisteminde kritik öneme sahip brassinin, spirobrassinin, 1-metoksibrassinol ve kamaleksin gibi indol türevi bileşiklerin, insanlarda solid tümör ve lösemi hücrelerinde antiproliferatif ve sitotoksik etkileri olduğu görülmüştür (Monde ve ark. 2005; Pilàtovà ve ark. 2005).



Spirobrassinin 1-Metoksibrassinol Kamaleksin

İndol-3-propiyonik asit nöroprotektif ve antioksidan özelliğe sahip bir indol bileşiğidir. Hidroksil radikaliyle reaksiyona girerek hidroksil anyonu oluşumunu sağlar, bu sırada da indolil katyon radikaline dönüşür. Yeni oluşan bu katyon radikali de süperoksit radikaliyle reaksiyona girerek kinürik aside yükseltgenir. Bu radikal süpürücü reaksiyonda hem iki farklı serbest radikale karşı koruma sağlanırken hem de indol-3-propiyonik asidin oksidasyonu gerçekleşir (Şekil 2-11) (Karbownik ve ark. 2005).

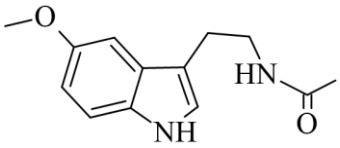


Indole-3-propionik asit Indolil katyon radikali Kinürik asit

Şekil 2-11: İndol-3-propiyonik asidin antioksidan mekanizması ve oksidasyonu

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) bileşiği tüm canlılarda bulunan bir hormondur (Şekil 2-12). Bir indol türevi olan melatonin de elektronca zengin bir halkalı

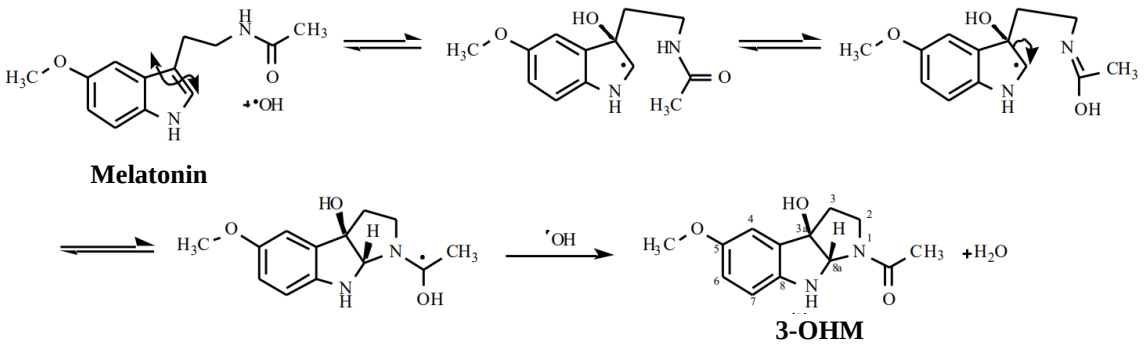
yapıya sahiptir ve kolayca indirgenme yükseltgenme tepkimesi verebilir (Joule ve Mills 2000).



Şekil 2-12: Melatonin hormonu molekül yapısı

İnsanlarda melatonin hormonu beyin ve gastrointestinal sistem gibi vücudun birçok noktasında üretilmektedir. Üretim noktalarından biri beyindeki pineal bezdir ve burada triptofanın 5-hidroksiindol-O-metil tranferaz enzimi ile reaksiyonu sonucu gerçekleşir. Melatoninin bünyedeki konsantrasyonu gece yüksektir, bu yüzden uykunun düzenlenmesi başta olmak üzere birçok fizyolojik olayda rol alır (Sundberg 1996). Suda ve yağda iyi çözünerek hücre zarlarından kolayca geçebilmesi melatonin hormonunun serbest radikalleri yakalama kapasitesini arttırır, bu sayede lipid, protein ve DNA'nın korunmasında etkilidir (Young 2007). Rajendra tarafından 1995 yılında yayınlanan çalışmaya göre; yapılan *in vivo* ve *in vitro* deneylerde melatoninin karsinojen etki sonucu oluşan oksidatif hasara karşı koruyucu ve makromoleküllere yönelik oksidatif hasarı azaltıcı etkiye sahip olduğunun altı çizilmiştir.

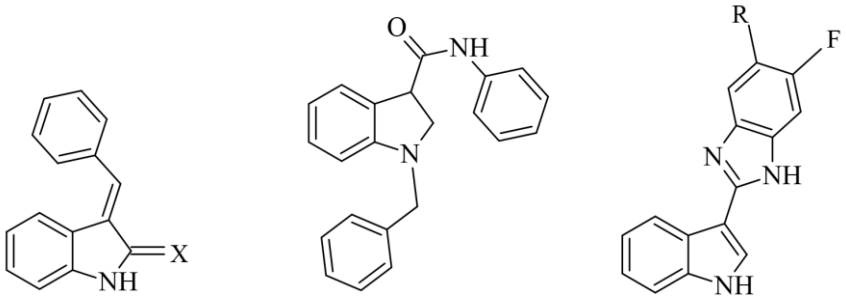
Melatonin hormonu ile hidroksil radikali etkileşimi indol halkasının en verimli konumu 3 üzerinden gerçekleşir. Melatonin hormonu iki hidroksil radikalini süpürür ve sonuçta kararlı 3-hidroksimelatonin (3-OHM) bileşiğini oluşturur (Şekil 2-13) (Hyan ve ark. 1999).



Şekil 2-13: Melatoninin hidroksil radikaline karşı antioksidan etkisi

Melatoninin radikal yakalama kapasitesini inceleyen çalışmalar, indol türevlerinde elektronca zengin halka yapılarına dikkat çekmeyi sağlamıştır. Elektronca zengin halkalar elektron donörü olduğu için indirgenme yükseltme tepkimelerini

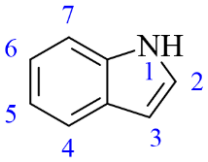
rahatlıkla vermekte bu sayede antioksidan etkiyi arttırmaktadır (Süzen 2007; Tan 2007). Bu bilgi ışığında günümüzde yapılan araştırmalar, 3-ariliden-2-indolin-2-on/tiyon, indol-3-karboksamid, ve benzimidazol halkası taşıyan indol türevlerinin antioksidan etkisinin yüksek ve oksidatif stres kaynaklı hastalıkların tedavisinde etkili olduğunu göstermiştir (Aboul-Enein 2004; Süzen 2007).



İndolin-2-on/tiyon İndol-3-karboksamid İndolilbenzimidazoller

2.4. İndol Bileşiğinin Kimyasal Özellikleri ve Sentez Yöntemleri

İndol ilk olarak Baeyer tarafından indigo boyasının yağ ile etkileşimi sonucu elde edilmiştir. İsmi indigo (çivit) ve oleum (yağ) sözcüklerinin bileşiminden meydana gelmiştir. İndol kimyası indigo boyasının çalışmalarıyla başlamış ve 19. yüzyıl ortalarına kadar boyar madde olarak kullanılmıştır (Şekil 2-14) (Chaudiere ve Ferrari 1999).



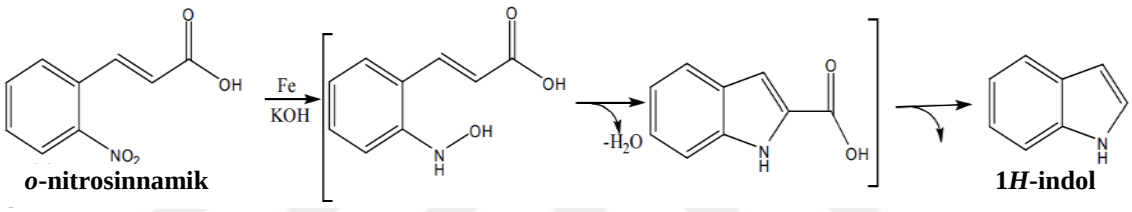
Şekil 2-14: İndol halkasının yapısal formülü

İndol bileşikleri pirol halkası ve benzen halkasının kaynaşması sonucu oluşan aromatik heterosiklik bir yapıdır. İndoller diğer amin bileşiklerinden farklı olarak çok düşük bazik özellik gösterir (Scandalios 2005).

İndol bileşikleri nükleofilik sübstitüsyon reaksiyonlarına karşı oldukça dayanıklıdır. Fakat bileşiğinin 2-3 konumundaki karbonlarda bulunan çift bağ moleküle yüksek elektrofilik karakter kazandırır, bu yüzden pirol halkası azot sübstitüe olsa da en reaktif kısımdır (Halliwell ve Gutteridege, 1999; Djordjević 2004). Benzenin aromatik yapısını bozmadan 3. konuma yönelik elektrofilik sübstitüsyon reaksiyonları oldukça kararlı yeni yapılar oluşturur. Ayrıca 2-3 konumundaki çift bağ, intramoleküler halka

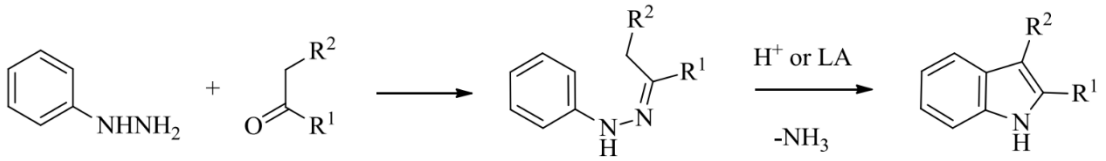
reaksiyonlarına da imkan verir. Oluşan ürünlerin antioksidan antikanser, antifungal ve antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olması farmasötik kimya için önemli kondanse halkalı yapıdır (Chaudiere ve Ferrari 1999).

İndol bileşiklerinin sentezlenmesi için kullanılan birçok yöntem vardır. Yaygın kullanılan yöntemlerden Baeyer–Emmerling indol sentezi, 1869 yılında Adolf Von Baeyer ve A. Emmerling tarafından kuvvetli bazik ortamda sübstitüe ve sübstitüe olmayan *o*-nitrosinnamik asit ten yola çıkarak gerçekleştirilmiştir. *o*-sinnnamik asidin demir ile reaksiyonu sonucu ara ürün olarak hidroksilamin türevi, daha sonra bu ara üründen bir mol su kaybıyla 1*H*-indol-2-karboksilik asit elde edilmiştir. Oluşan indol karboksilik asit ara ürünün dekarboksile olması ile 1*H*-indol oluşmuştur (Şekil 2-15) (Michnovicz ve Bradlow 1990).



Şekil 2-15: Baeyer–Emmerling yöntemiyle indol sentezi

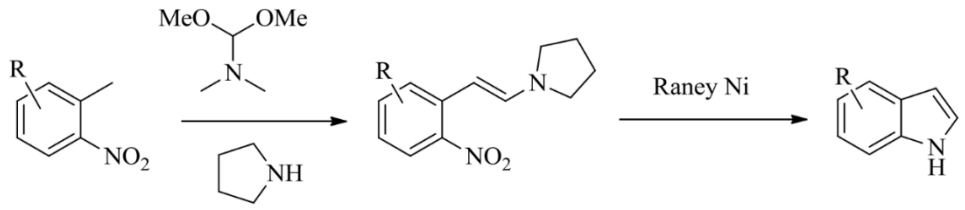
1883 yılında Fischer; HCl, H_2SO_4 gibi Bronsted asitleri veya $FeCl_2$, $AlCl_3$ gibi Lewis asitleri (LA) katalizörlüğünde fenilhidrazinin aldehit veya keton türevleri ile reaksiyonundan yola çıkarak önce bir aril hidrazon, ardından bir mol amonyak kaybıyla sübstitüe 2,3-disübstitüe 1*H*-indolü sentezlemiştir. Fisher indol sentezi olarak tanımlanan bu yöntem halen kullanılan ve bilinen en eski güvenilir indol sentez yöntemidir (Şekil 2-16) (İkizler 1985).



Şekil 2-16: Fisher indol yöntemiyle indol sentezi

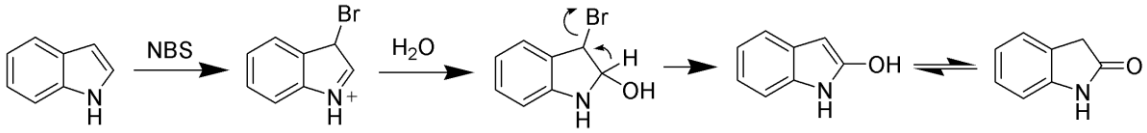
Leimrruber-Batcho indol sentezi, *o*-nitrotoluenden başlangıç maddesinden hareketle geliştirilen bir yöntemdir. 1976 yılında yayınlanan yöntem oldukça yüksek verimle indol sentezlenmesine olanak sağladığı için ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmıştır. Bir dizi organik reaksiyon içeren bu yöntemde birinci aşamada 1,1,-

dimetoksi-N,N-dimetilamin ve pirolidin kullanılarak enamin oluşmaktadır ve ikinci aşamada ise redüktif siklizasyon reaksiyonuyla indol bileşiği elde edilmektedir (Şekil 2-17) (Tüzün 1989; Jiang 2006).



Şekil 2-17: Leimrruber-Batcho yöntemiyle indol sentezi

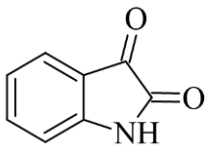
İndol halkası azot üzerindeki ortaklanmamış elektronları da göz önünde bulundurulduğunda elektronca zengin yapısı sebebiyle N-bromosüksinimit gibi basit oksidanlarla kolayca oksitlenir. Oksitlenme sonucunda oksindol bileşiği oluşur (Şekil 2-18) (Houlihan 1972).



Şekil 2-18: İndol bileşiğinin oksitlenme mekanizması

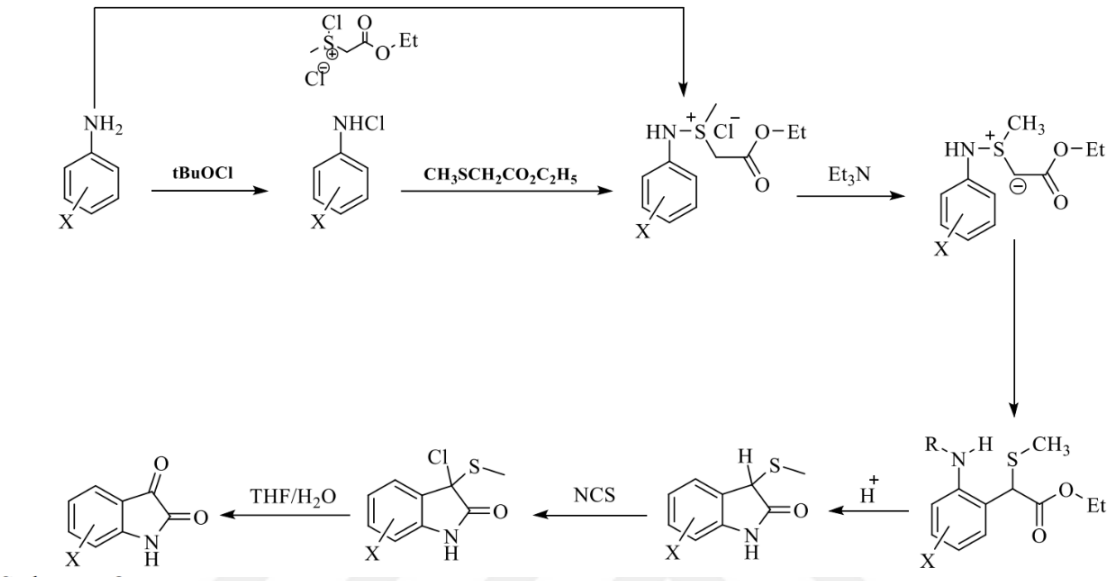
2.4.1. 1*H*-indol-2,3-dion ve Türevleri

1*H*-indol-2,3-dion (isatin) Erdmann ve Laurent tarafından 1840 yılında indigo maddesinin kromik asit ve nitrik asitle oksidasyonu sonucunda elde edilen kırmızı-turuncu renkli heterosiklik bir bileşiktir (Şekil 2-19) (Reiter 1997; Tan ve ark. 2002). İndol oksidasyon ürünü olmasının yanı sıra isatis cinsi bitkilerde *Couroupita guianensis*'te, Bufo cinsi kurbağaların parotis bezi salgısında ve insanlarda adrenalinin metabolik bir türevi olarak bulunan bir doğal bileşiktir (Ferreira ve ark. 1971).



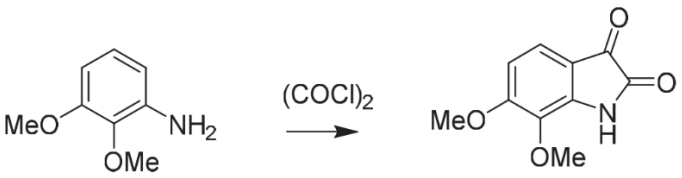
Şekil 2-19: İsatinin molekül yapısı

İsatin bileşiklerinin sentezinde en yaygın kullanılan yöntem Sandmeyer yöntemidir (Şekil 2-20). Anilin ile klorat hidrat arasında gerçekleşen tepkimede hidroksilamin hidroklorür varlığında isatin türevleri elde edilmektedir (Feniuk ve Humphrey 1992).



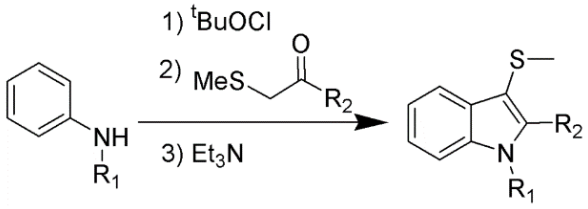
Şekil 2-20: Sandmeyer yöntemiyle isatin sentezi

Yaygın kullanılan Sanmeyer yöntemi dışında Stolle yöntemi, anilinler ile bir Lewis asidi ($AlCl_3$, BF_3) arasında gerçekleşen isatin eldeli bir tepkimedir (Şekil 2-21) (Karale ve ark. 2015).



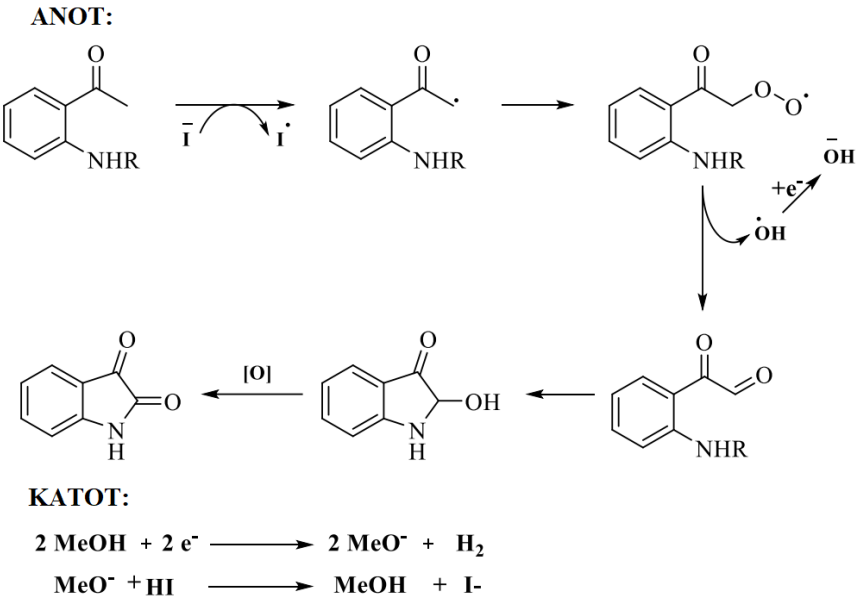
Şekil 2-21: Stolle yöntemiyle isatin sentezi

Gassman yöntemi isatin sentez tepkimeleri içerisinde farklı bir yaklaşımı olan reaksiyondur. Anilin ile tiyoeter taşıyan bir keton arasında gerçekleşen isatin sentez yöntemidir. Bu yöntemde aromatik halkaya bağlı olan grupların elektron yoğunluğu önemlidir. Elektron çeken ve elektron verebilen grup ilişkisi üzerinden yürüyen bir dizi kimyasal reaksiyonu içermektedir (Şekil 2-22) (Menvedev ve ark. 2018; Sumrra ve ark. 2018).



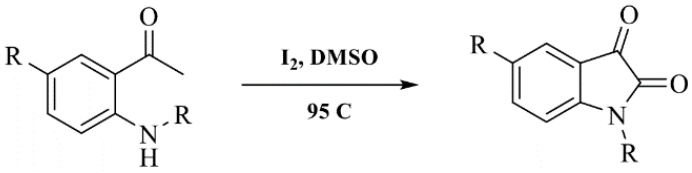
Şekil 2-22: Gassman yöntemiyle isatin sentezi

Günümüzde kullanılan modern yöntemlerden biri de indol türevlerinin oksidasyonu sonucu N-alkillenmiş isatin türevlerinin elde edilmesidir. 2017'de Qian ve ark. tarafından özellikle 2'-aminoasetofenonların elektrokatalitik oksidasyonlarıyla farklı sübstitüe isatinlerin iyi bir verimle sentezlenebileceği gösterilmiştir. 2'-aminoasetofenon bileşiği önce C-H oksidasyonuna, ardından molekül içi basit bir elektrokimyasal oksidasyon yoluyla bir intramoleküler C-N bağı oluşumuna maruz kalır. Bu reaksiyon n-Bu_4NI içerisinde ve elektrolit olarak metanol kullanılarak gerçekleştirmiştir (Şekil 2-23) (Qian ve ark. 2017).



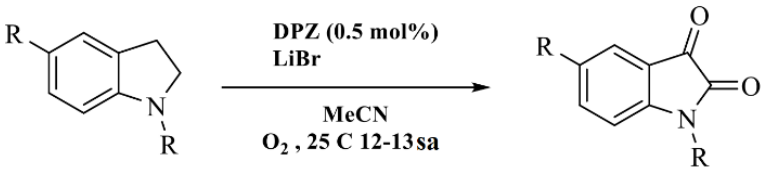
Şekil 2-23: İsatinin elektrokatalitik reaksiyonu

2-Aminoasetofenondan isatin sentezi yöntemleri içinde metal kullanmadan gerçekleştirilen kimyasal oksidasyon sentezleri de bulunmaktadır. Bu reaksiyonlarda C-H bağı aktive edilir ve sonrasında molekül içi siklizasyon ile N-alkillenmiş veya N-arillenmiş isatinler elde edilebilir (Şekil 2-24) (Reddy ve ark. 2014).



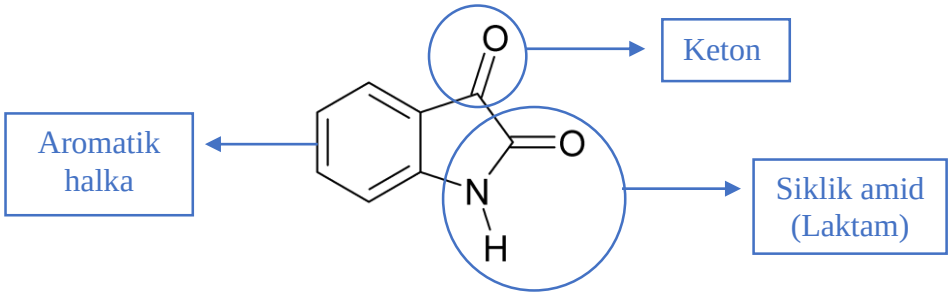
Şekil 2-24: İsatin bileşiğinin kimyasal oksidasyon reaksiyonu

Zhang ve ark. 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada oksidasyon reaksiyonuyla isatin sentezlerine doğa dostu bir yaklaşım getirmişler, disiyano türevlerin ışığa duyarlı özellikleri sayesinde oksijen varlığında bir fotokimyasal oksidasyon ile isatin türevlerini elde etmişlerdir (Şekil 2-25).



Şekil 2-25: Fotokimyasal oksidasyon yöntemiyle isatin sentezi

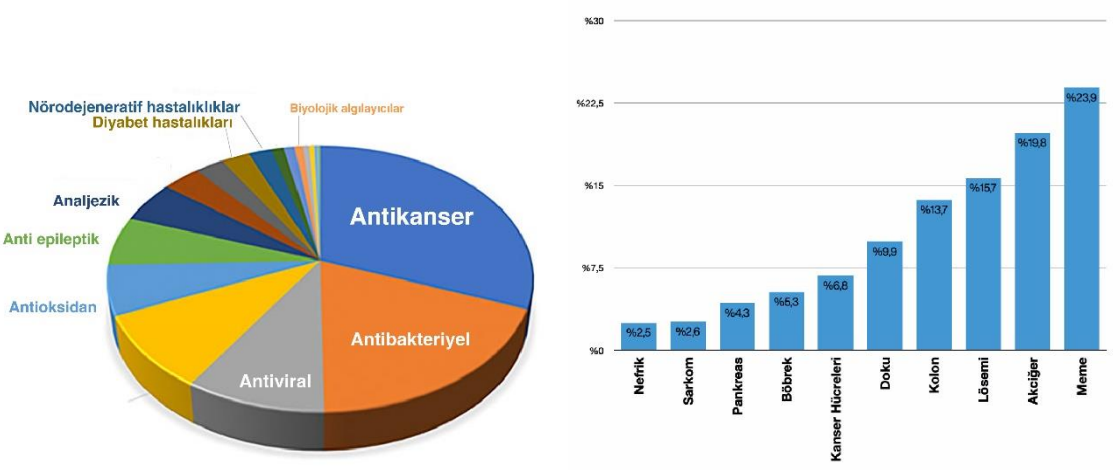
İsatin bileşiklerinde aromatik halka, keton ve alkanoik asitten türetilmiş bir siklik amid gruplarının bulunması yapının hem elektrofilik hem de nükleofilik karakter kazanmasını sağlamaktadır. Azot atomu ve benzen halkasının C-5 ve C-7 karbonları elektrofilik, C-3 karbonundaki keton grubu nükleofilik katılmaları kolaylıkla verir. İsatin bu yüzden organik reaksiyonlarda yapıtaşı olarak kullanılan önemli bir bileşiktir (Şekil 2-26) (Pinto 2001).



Şekil 2-26: İsatin bileşiğinin fonksiyonel grupları

İsatinin heterosiklik halka yapısı; antiviral, antibakteriyel ve antifungal çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçların sentezlenmesine olanak sağlayan bir iskelet yapısına sahiptir. Ayrıca isatin türevlerinin farmakolojik açıdan çok sayıda antiproliferatif ve antikanser etkileri keşfedilmiştir. Bu sebeple antikanser araştırmaların

yaygınlaşmasına ve çok sayıda çalışmaya yol açmış bazı isatin türevleri klinik çalışmalarla onaylanmış antikanser ilaçlar olarak kullanılmaya başlanmıştır (Şekil 2-27).



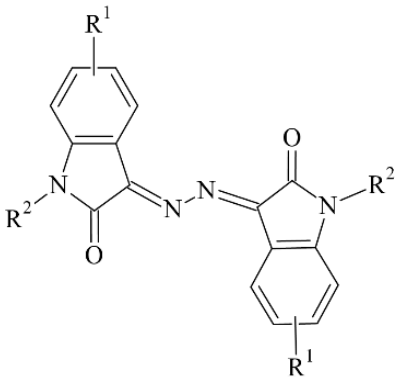
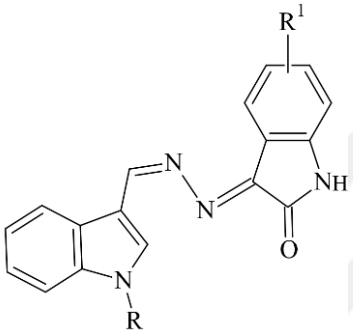
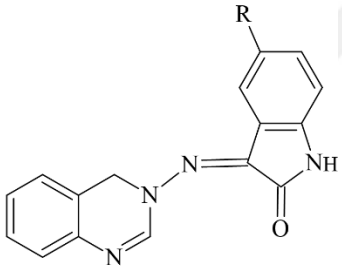
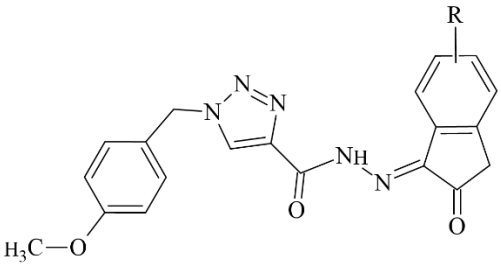
Şekil 2-27: İsatin türevlerinin 1951-2020 yılları arasındaki farmakolojik kullanım alanları (SciFinder'dan elde edilmiştir)

Yaygın olarak kullanılan yaklaşım manganez (II), kobalt (II), nikel (II) ve bakır (II) gibi metal iyonlarının isatin bazlı ligandlar ile oluşturduğu metal kompleksleridir. Ding ve ark. yayınladığı çalışma (2020) isatinin imin, azol, kinolin, kinazolin, sülfonamid ve kumarin gibi moleküllerle oluşturduğu hibrit yapıların antikanser etkinlik açısından daha etkili ve daha az toksik olduğuna dair bir yaklaşım sunmuştur (Vine ve ark. 2013; Varun ve ark. 2019).

İsatin bazlı imidazol bileşiklerinin inflamasyona sebep olan enzim siklooksijenaz-2 (COX-2) ve meme kanserinde görülen enzim fosfoinositid-3-kinaz (PI3K) enzimlerini *in vitro* olarak inhibe ettiğini belirtilmiştir (Kumar ve ark. 2020). Oksindoliminlerin ise kemiklerde osteosarkom epitelyal U53OS-plv hücreleri üzerinden tümör baskılayıcı gen olan p2'yi stabilize ettiği bildirilmiştir (Davidovich ve ark. 2015). İsatinin 3-imin türevlerinin ise metal iyonlarının bağlanmasını kolaylaştırarak farklı kanser türlerine karşı tümör çoğalmasını önleyici etkileri olduğu belirtilmiştir (Farooq ve ark. 2018).

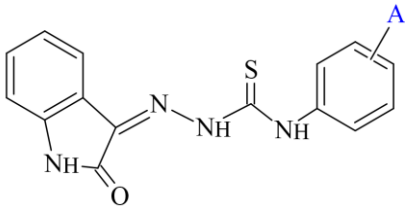
İsatinlerin hidrazon türevleri yapısal olarak çok yönlüdür ve bu sebeple reaktiviteleri diğer türevlere göre daha yüksektir. Sahip oldukları antikanser özellik isatin melezlerine de yansımış ve literatürde çok sayıda çalışma tanımlanmıştır (Tablo 2-4) (Scoot ve ark. 2010; Elder ve ark. 2011).

Tablo 2-4: Bazı isatin-hidrazon bileşiklerinin genel yapıları ve etki mekanizmaları

	**A549:** akciğer adenokarsinomu epitel hücre; **Hela:** epitel karsinom hücre; **HepG2:** karaciğer hepatosellüler hücre; **U251:** glioma hücre; **SGC-7901:** mide karsinomu hücrelerinin inhibe etme (Liang ve ark. 2014)
	Akciğer, meme, lösemi gibi kanser hücrelerine karşı anti tümör etki; ROS bileşiklerine karşı kaspaz 3 ve kaspaz 9 yollarını aktive ederek anti-apoptotik protein Bcl-2'nin ekspresyonunu baskılama; Pro-apoptotik protein BAX'ın ekspresyonunu arttırma (Fares ve ark. 2015; Eldehna ve ark. 2017; Eldehna ve ark. 2018).
	CFM-1, CARP-1/CCAR1 inhibitörü görevi yaparak kanser hücrelerini inhibe etme (Alafeefy ve ark. 2015)
	Hepatosellüler kanserle (HCC) ilişkili meme kanserlerinde hücrelerin metastaz yapmasını sağlayan MARK4'ü inhibe etme ROS oluşumunu indükleme (Naz ve ark. 2013).

İsatin β-tiyosemikarbazon bileşiklerinin sahip oldukları çok yönlü yapı karakteri, sentetik ürünler için önemli bir yapıtaşı olarak kullanılmasına sebep olmuştur. Ayrıca antikanser biyolojik özellikleri nedeniyle çalışmalarda önemli bir yer tutan isatin β-tiyosemikarbazon türevlerinden bazılarının servikal adenokarsinom hücrelerinde (KB-

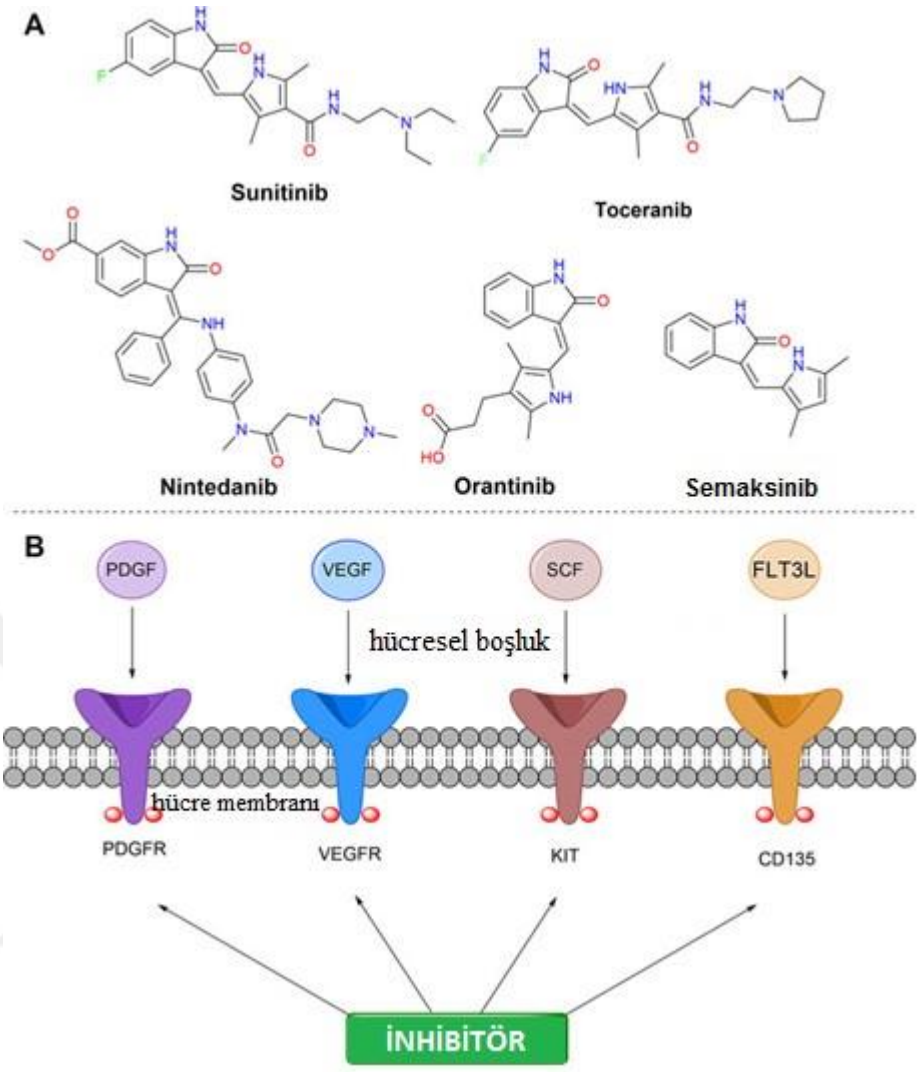
V1) P-gp (P-glikoprotein) ekspesyonunu inhibe ettiği ve ayrıca HeLa hücrelerine karşı sitotoksik etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2-28) (Hall ve ark. 2011).



Şekil 2-28: İsatin β-tiyosemikarbazon türevlerinin genel yapısı

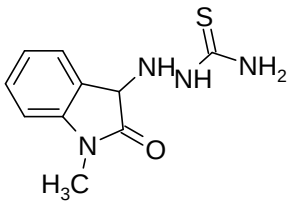
İsatinin klinik olarak onaylanmış olan 3-ariliden-2-indolinon türevleri çok yüksek antikanser aktiviteye sahiptir. Bunlardan en yaygın olanlar sunitinib ve toceranib bileşikleridir. Sunitinib hedef proteinlerin ATP bağlanma bölgesine geri dönüşümlü olarak bağlanır, proteinlerin fosforilasyonunda rol oynayan kinazların katalitik aktivitesini inhibe eder (Roskoski 2007). Sunitinibin FDA tarafından 2006 yılında gastrointestinal stromal tümörlerin ve ileri renal hücreli karsinomun (RCC) tedavisi, 2011 yılında nadir görülen pankreas kanseri türü için, 2017 yılında tekrarlayan böbrek karsinomu riski yüksek hastaların tedavisinde adjuvan olarak kullanımı onaylanmıştır. Halen immünoterapötiklerle birlikte klinik olarak test edilmektedir (Rizzo ve Porta 2017). Diğer isatin türevi olan toceranib ise 2009 yılında FDA tarafından cannine mast hücreli tümörün (MCT) tedavisi için onaylanmıştır (London ve ark. 2009).

Sunitinib ve toceranib gibi FDA tarafından onaylanmış diğer 2-indolinon türevleri (Şekil 2-29A), trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR), vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), kök hücre reseptörü (KIT) ve çeşitlilik arttıran faktör reseptörü (CD135) gibi hedef reseptörleri (Şekil 2-29B) inhibe ederek tümör büyümesini azaltma veya durdurma gibi antikanser etkiler göstermiştir (Le Tourneau ve ark. 2007).



Şekil 2-29: FDA tarafından onaylanan bazı isatin türevi bileşikler (A) ve bu türevlerin etki ettikleri hedef bölgeleri (B)

İsatin günümüzde antikanser etkili ilaç etkin maddeleri yanı sıra antiviral etkili bazı isatin β-tiyosemikarbazon türevlerinin de yapı taşıdır. Herpes virüs replikasyonunu inhibe ederek etki ettiği belirlenen 1-metilisatin β-tiyosemikarbazon (metisazon), FDA tarafından çiçek hastalığında profilaktik olarak kullanımı onaylanan ilk antiviral ajandır. (Şekil 2-30) (Bauer ve Sadler 1960; Sadler 1965).

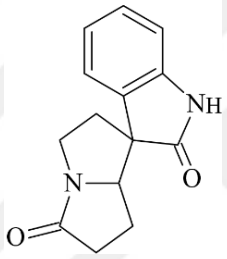


Şekil 2-30: Metisazonun moleküler yapısı

2.4.2. 3-Spiro-2-indolinon Bileşikleri

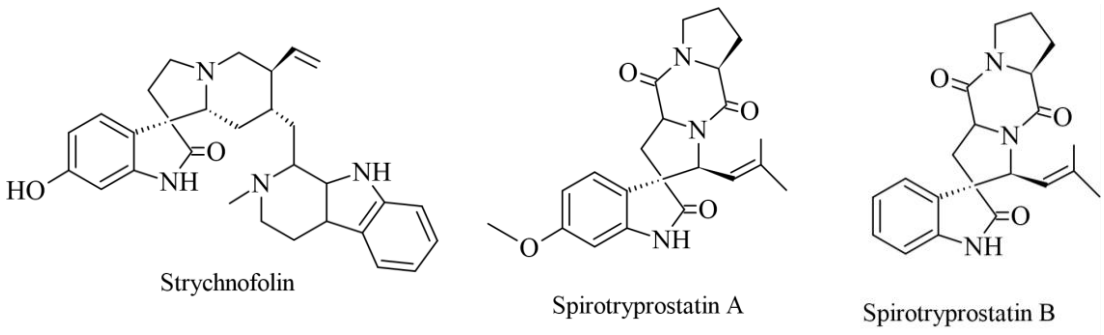
1911 yılında Pictet ve Spengler tarafından ilk kez bildirilen spiroindoller organik bileşikler içerisinde önemli bir yere sahiptir. Doğada bulunan spiroindollerin yanı sıra isatinden elde edilen 3-spiro-2-indolinon bileşikleri antienflamatuar ve sıtma önleyici etkiden, antihiperglisemik, antileishmanial, antikanser ve antibakteriyel özelliklere kadar çeşitli biyolojik etkilere sahip türevlerdir (Bariwal ve ark. 2018).

Flueggea virosa bitkisinin meyvelerinden ekstre edilerek elde edilen Flueindoline C bileşiği doğadan elde edilen etkili spiroindol bileşiklerine örnektir (Şekil 2-31). Flueindole C, antiproliferatif özelliği gözlenen doğal bir spiroindol bileşiğidir. Bileşiğin hepatoma (HepG6), meme (MCF-73) ve adenokarsinom (SGC-19) kanser hücrelerine etkili olduğu görülmüştür (Liu ve ark. 2020).



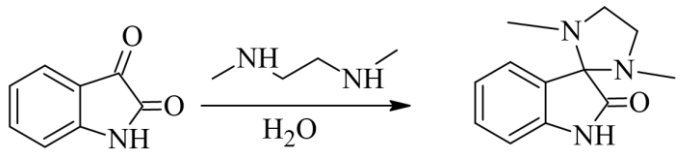
Şekil 2-31: Flueindolin bileşiğinin molekül yapısı

Apocynaceae ve *Rubiacae* familyalarına ait bitkilerden izole edilen spiroindol alkaloidler doğadan elde edilen spiroindol türevleridir (Bindra 1973). Spirooksindol iskeleti antikanser biyoaktivite açısından avantajları sebebiyle ayrıcalıklı bir spiro türevi olarak değerlendirilir. Strychnofoline, spirotryprostatin A ve B antikanser aktivitelerine sahip doğal spirooksindoller için diğer örneklerdir (Şekil 2-32) (Heravi ve ark. 2018).

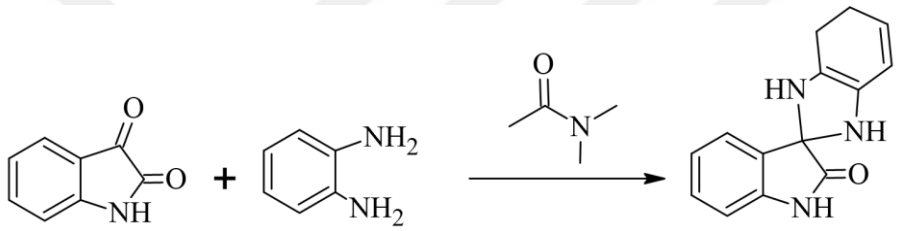


Şekil 2-32: Doğal spiroksindol bileşiklerinin yapısal formülleri

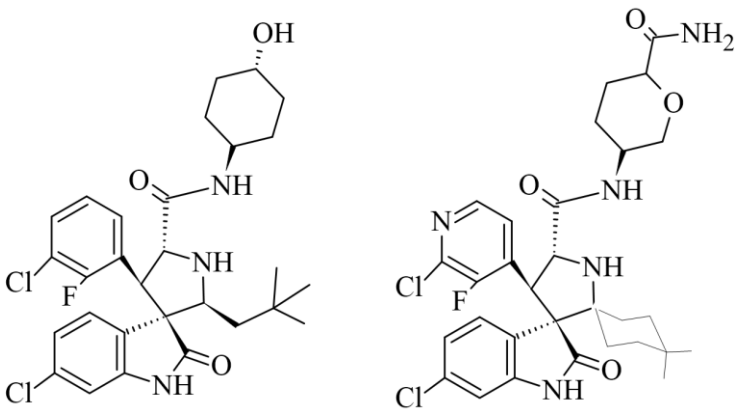
Doğal spiroindolinonların dışında isatin türevlerinden hareketle sentezlenen, antikanser ve antioksidan etkinliği incelenen birçok türev de bulunmaktadır. İsatinin N,N-dimetiletilendiamin ile sulu ortamda reaksiyonu ile spirodiazolonoksiindol türevleri elde edilmiştir (Bergman ve ark. 1997).



2-Fenilendiamin ile isatinin reaksiyon ortamına N,N-dimetil asetamid veya N-metil-2-pirolidon eklendiğinde spirobenzimidazol türevleri elde edilmektedir (Niume ve ark. 1982).



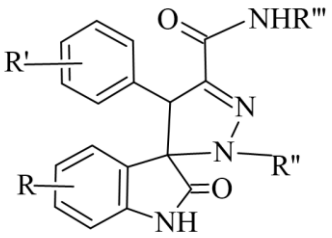
Spiroindol bileşikleri antikanser etkili bileşikler içerisinde de önemli bir yere sahiptir. MDM2 onkoproteini hedef noktalarının en önemlisidir. MDM2 proteini, p53 tümör baskılayıcı proteini negatif olarak düzenler. MDM2-p53 etkileşiminin bloke olması kanserin ilerlemesinin önüne geçmek için oldukça kritiktir. Bazı spiroindol bileşiklerinin klinik çalışmalarda MDM2-p53 etkileşimini inhibe ettiği gözlenmiştir (Şekil 2-33) (Wurz ve Cee 2019).



Şekil 2-33: MDM2-p53 inhibitörü spiroindol bileşikleri

Kanser tedavilerinde hedef nokta benzerliği gösteren bir başka spiroindol bileşiği olan spiropirazol-oksindol bileşikleri üzerinde yapılan çalışmalarda bu bileşiklerin

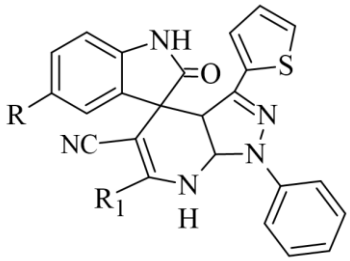
MDM2-p53 ve benzer özellikteki MDM1-P7 etkileşimlerini inhibe etme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Osteosarkom (SJSA-4), prostat (LNCaP) ve meme (MCF-53) kanser hücrelerine karşı antiproliferatif etkileri olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2-34) (Espadinha ve ark. 2022).



R: 5-F,6-Cl;R': 3-ClC_6H_4, 3-FC_6H_4,3-Cl-2-FC_6H_3, 3-OHC_6H_4; R'': siklohekzil, ter-butil, fenil, 4-Cl-C_6H_4; R''': $N(CH_2)_2NHMe$, $N(4\text{-}OHC_6H_4)$, $N(CH_2)_2$-$(4\text{-}OHC_6H_4)$

Şekil 2-34: Antiproliferatif etkili spiroindol bileşikleri

Biyoaktif spirooksindol alkaloidlerinin izolasyonu araştırmacılara ilham vermiş, antikanser ve antioksidan gibi umut verici biyolojik aktivitelere sahip çeşitli spirooksindol bazlı küçük moleküllerin tasarlanması ve sentezlenmesinin yolunu açmıştır. Tasarlanan spirooksindol türevlerinin üçlü negatif meme (MDA-MB-231), karaciğer (HepG2) ve prostat (PC3) kanser hücrelerine karşı apoptozu indükledikleri belirlenmiştir (Şekil 2-35) (Eldehna ve ark. 2018; Al-Rashood ve ark. 2020).

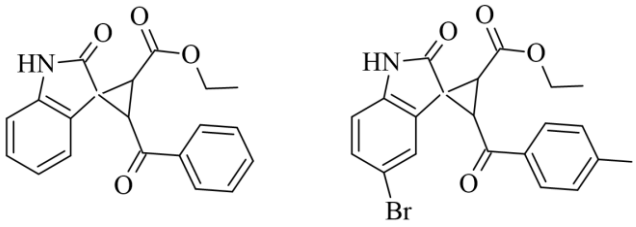


R: H, Cl, Br, OMe; R': Fenil, 4-MeC_6H_4, 4-$MeOC_6H_4$, 4-ClC_6H_4

Şekil 2-35: Apoptozu indükleyen spirooksindol bileşiklerinin yapısal formülü

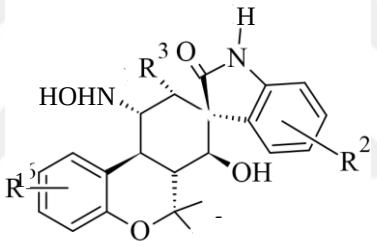
Kamal ve ark. 2015 yılında yayımladıkları spirooksindollerin siklopropan türevlerinin antikanser ve antiproliferatif aktiviteleri belli kanser hücre hatlarında incelendikleri çalışmada spiroindol bileşiklerinin kanser hücrelerinin hücre döngüsü G_0-G_1 fazında durmasına yol açarak hücre ölümüne neden olan kaspaz-3 aktivitesini sağladığını kaydetmişlerdir. Aynı bileşikler üzerinde yapılan başka bir çalışmada hücre döngüsünde önemli bir yer tutan serin ve tireonin aminoasitleriyle ilişkili PLK4 ekspresyonuna, meme kanser ve HMEC katı tümör hücre hatlarına karşı kanser hücresi

büyüme inhibitörü olarak davranıp iyileştirici etkili oldukları tespit edilmiştir (Şekil 2-36) (Sampson ve ark. 2015).



Şekil 2-36: Siklopropan türevi spirooksindol bileşiklerinin yapısal formülleri

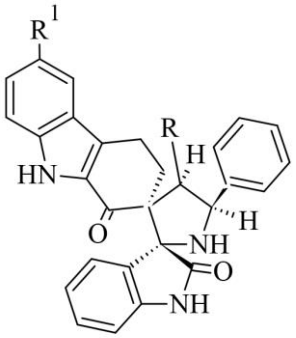
Kroman ve spirooksindol bileşiklerinden Michael reaksiyonuyla elde edilen spiroksindol türevlerinin farklı kanser hücre hatlarında etkileri incelenmiş, özellikle MCF-7 meme kanser hücre tipine son derece seçici etkili oldukları tespit edilmiştir. Hidroksil amin grubu bileşiğin antikanser aktivitesini attırıcı bir etki yapmıştır (Şekil 2-37) (Zhou ve ark. 2015).



R^1: H, 7-F; R^2: H, 5-CH_3, 5-F,5-Cl; R^3: CO_2Et, COOi-Pr

Şekil 2-37: Michael reaksiyonuyla elde edilen spirooksindol bileşiğinin yapısal formülü

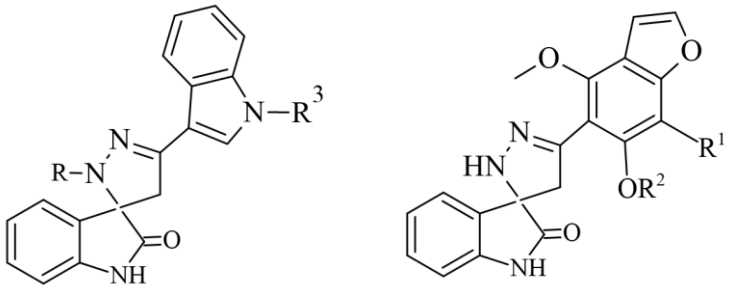
Spirooksindol-pirolo-karbazoller antiproliferatif etkinlik gösteren bir başka spirindol türevleridir. Bu analogların içerisinde 2-tieniliden-1*H*-karbazol-1-on türevi meme (MCF-9) ve akciğer (A-10) kanserlerine karşı en etkili türev olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2-38) (Murali ve ark. 2018).



R: Fenil, 4-$MeOC_6H_4$, 2-tienil; R': H, Cl, Me

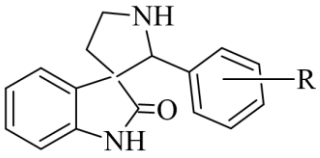
Şekil 2-38: Spirooksindol-pirolo-karbazol bileşiğinin yapısal formülü

Soliman ve ark. nın 2020 yılında yayınladığı çalışmalarında, 2-oksindolün spiroindol türevlerinin antikanser ve antioksidan etkilerini incelemişlerdir. DPPH yoluyla radikal süpürme kabiliyeti açısından askorbik aside kıyasla etkileri değerlendirilen bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin %69-99 arasında değişen oranda orta derecede olduğu belirlenmiştir. Ayrıca insan meme (MCF-7), insan kolon (HCT-116) ve insan karaciğer (HepG2) kanser hücrelerine karşı *in vitro* antiproliferatif aktivitelerine dair yapılan incelemede HCT-116 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı seçiçi sitotoksik etki gösterdiği ve %84-98 arasında değişen oranda antiproliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 2-39) (Soliman ve ark. 2020).



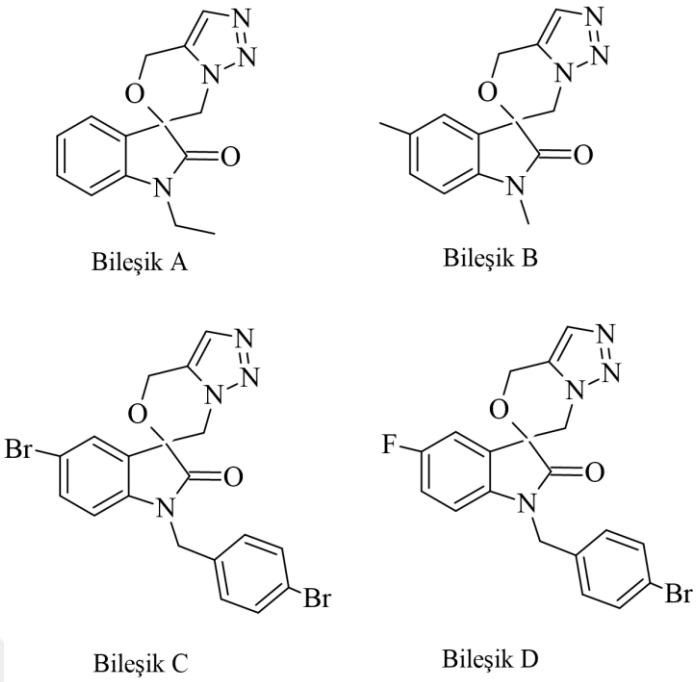
Şekil 2-39: Antiproliferatif etkili spiroindol bileşiklerinin yapısal formülleri

Hati ve ark. nın 2016 yılında yayınladığı çalışmada tanımlanan spiro[pirolidin-3,3'-oksindol] türevlerinin MCF-7, COS-7 ve MCF10A kanser hücre hatları üzerinde yapılan antikanser etki analizleri bu bileşiklerin COS-7 ve MCF10A hücre hatlarında antikanser etkili olduklarını göstermiştir (Şekil 2-40).



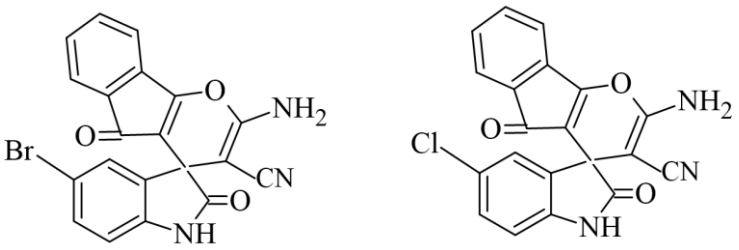
Şekil 2-40: Spiro[pirolidin-3,3'-oksindol] türevlerinin yapısal formülü

Bora ve ark. nın 2021 yılında yayınladığı çalışmada 1,2,3-triazol kondanse morfolin artığı taşıyan spiro-2-indolinon bileşikleri sentezlenmiş, A549, MCF-7, HeLa ve DU-145 kanser hücre hatlarında 5-florourasile karşı antikanser etkileri incelenmiştir. Bileşik A ve B'nin A549 hücre kanser hücre hattında, Bileşik C ve D'nin ise A-549, MCF-7 ve HeLa hücre hatlarında yüksek antikanser etkili oldukları saptanmıştır (Şekil 2-41).



Şekil 2-41: Spiro[pirolidin-3,3'-oksindol] ve morfolin-1,2,3-triazol bileşiklerinin yapısal formülleri

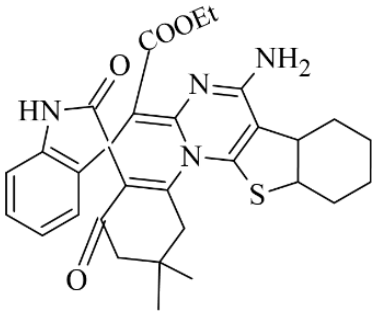
Patravale ve ark. nın 2016'da yayımlanan çalışmalarında Knoevenagel kondenzasyonu ve ardından Michael katılması reaksiyonu ile sentezlenen indenospiro 2-indolinon bileşiklerinin antikanser etkileri incelenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin antikanser etkileri meme kanseri hücre hatlarında, doksorubisin ve tamoksifen referans standart olarak kullanılmıştır. Aşağıda yapısal formülleri verilen iki bileşik ile MDA-MB-435 hücre hattında kanserli olmayan hücre hatlarına göre yüksek seçicilikte sitotoksik etkiler gözlenmiştir (Şekil 2-42).



Şekil 2-42: İndenospiro 2-indolinon bileşiklerinin yapısal formülleri

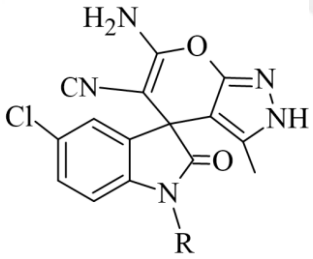
Ghozlan ve ark. 2015 yılında yayımladıkları çalışmarında sentezledikleri spiro 2-oksindol bileşiklerinin antikanser aktivitelerini MCF-7 ve HEPG-2 kanser hücrelerinde doksorubisine karşı incelemişlerdir. Molekül yapısında ester olan türevlerin elektron yoğunluğu fazla olan türevlere göre aktiviteyi maksimum düzeye çıkardığı, antikanser

etkilerin kaspaz-9 ve tümör baskılayıcı protein p53'ün indüksiyonu ve DNA fragmantasyonu VEGF ekspresyon sekresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Şekil 2-43).



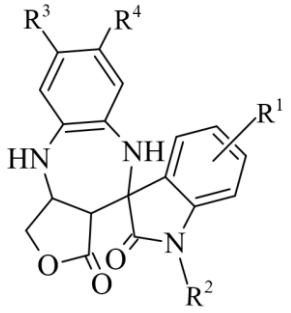
Şekil 2-43: Dihidropiridin-spirooksindol bileşiklerinin yapısal formülleri

Bhatia ve ark. tarafından yayımlanan çalışmada (2016) spiropiranopirazol türevlerinin 5-florourasil bileşiğine karşılık antikanser etkileri incelenmiştir. İnsanlarda hücre bölünmesinden sorumlu enzim siklin bağlımlı kinaz (CDK) ve transkripsiyon faktörü (TFIIH) bileşenlerinin en büyük parçası CDK7'yi inhibe ettiği, bu sayede hücre çoğalmasını yavaşlattığı tespit edilmiştir. Elde edilen türevlerin ayrıca MCF-7 kanser hücre hattına yüksek sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 2-44).



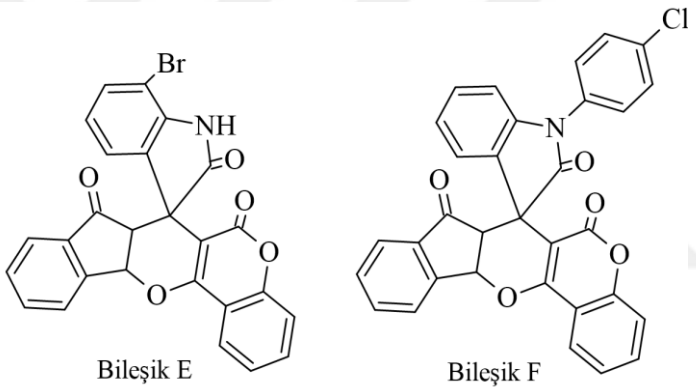
Şekil 2-44: Spiropiranopirazol bileşiğinin yapısal formülü

Gangarapu ve ark. (2017) antiproliferatif özellikte olduğu bilinen spiro-benzodiazepin türevilerinin doksorubisin ve etoposid referans ilaçlarına karşılık antikanser etkilerini incelemişlerdir. Sentezlenen bileşiklerin özellikle DU-145 kanser hücresine karşı yüksek derecede antikanser etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2-45).



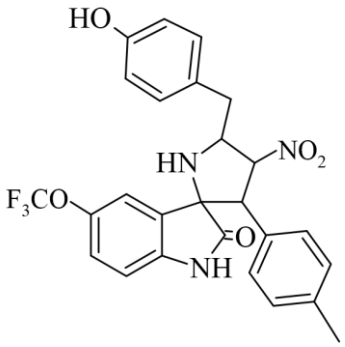
Şekil 2-45: Spiro-benzodiazepin bileşiğinin yapısal formülü

Dhayabaran ve ark. (2018) sentezledikleri spiro-kromeno indolinon bileşiklerinin PC-3, LNCaP ve MCF-10 kanser hücre hatlarındaki antikanser etkilerini incelemişlerdir. Bileşik E ve F'nin PC-3, LNCaP kanser hücrelerinde bikalutamid referans standardına göre dikkat çekici oranda antikanser etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 2-46).



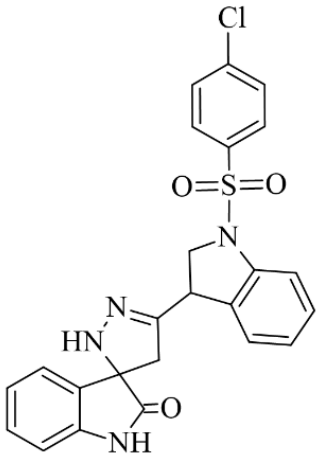
Şekil 2-46: Spiro-kromeno türevlerinin yapısal formülleri

Kumar ve ark. (2020) tek kap yöntemiyle 1,3-siklokatılma reaksiyonuyla elde ettikleri yeni nesil spirooksindol-pirolidin türevlerinin A549 ve akut T lösemi (Jurkat) hücrelerinde yüksek seçicilikte ve çok güçlü antiproliferatif aktivite gösterdiklerini saptamışlardır (Şekil 2-47).



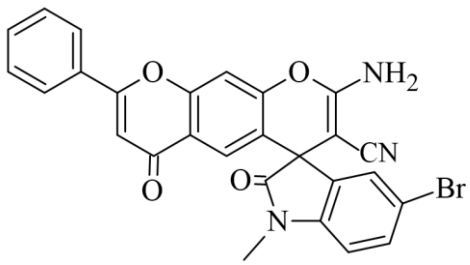
Şekil 2-47: Yeni nesil spirooksindol-pirolidin türevlerinin yapısal formülleri

2020 yılında Abo-salem ve ark. yayımladıkları çalışmalarında aldol reaksiyonuyla sentezlenen spiro pirazol-oksindol türevlerinin MCF-7, HCT-116 ve HepG2 hücre hatlarında antikanser aktivitelerini doksorubisin referans ilacına karşı incelemişlerdir. Bu calışmada, aşağıda yapısal formülü verilen bileşiğin aktif kaspaz-3, p-53 ve Bax protein ekspresyonlarını arttırarak apoptozu uyardığı, aynı zamanda Bcl-2 proretin seviyesini azaltarak mitokondriyal apoptoziye sebep olduğu belirlenmiştir (Şekil 2-48).



Şekil 2-48: Spiropirazol-oksindol bileşiğinin yapısal formülü

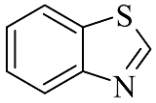
Zhou ve ark. (2019) sentezledikleri krisin-kromenespirooksindol bileşiklerinin A549 kanser hücrelerine karşı antikanser etkilerini incelemişler, bileşiklerin antikanser etkileri p53 sinyal yolakları, 5-LOX ve MDM2 protein seviyeleri üzerinden değerlendirmişlerdir. Bileşilerin Bax seviyesini arttırdığı ve Bcl-2 protein seviyelerini azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 2-49).



Şekil 2-49: Krisin-kromenespirooksindol bileşiğinin yapısal formülü

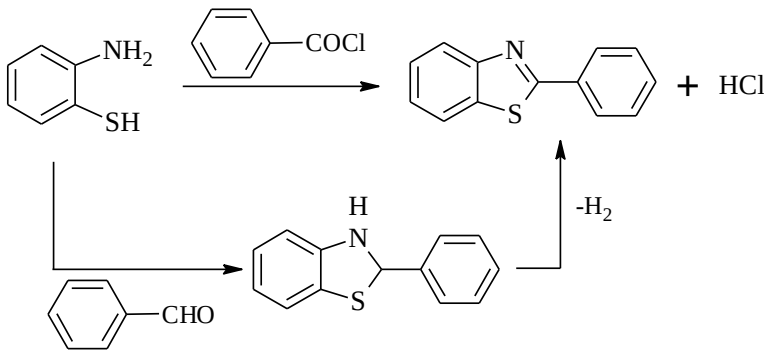
2.5. 2-Sübstitüe Benzotiyazol Bileşikleri

Benzotiyazol bileşikleri, kondanse benzen ve tiyazol halkalarının oluşturduğu aromatik bileşiklerdir (Şekil 2-50). Yapısında bulunan kükürt ve azot sebebiyle elektronca zengindir ve bu yüzden biyolojik açıdan çok sayıda bileşiğin sentezlenmesinde başlangıç maddesi olarak kullanılmaktadır. Benzotiyazolden türetilen organik bileşikler antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antikanser etkilere sahip oldukları için farmasötik açıdan önemli bir yer tutmaktadır (Brantley ve ark., 2004).



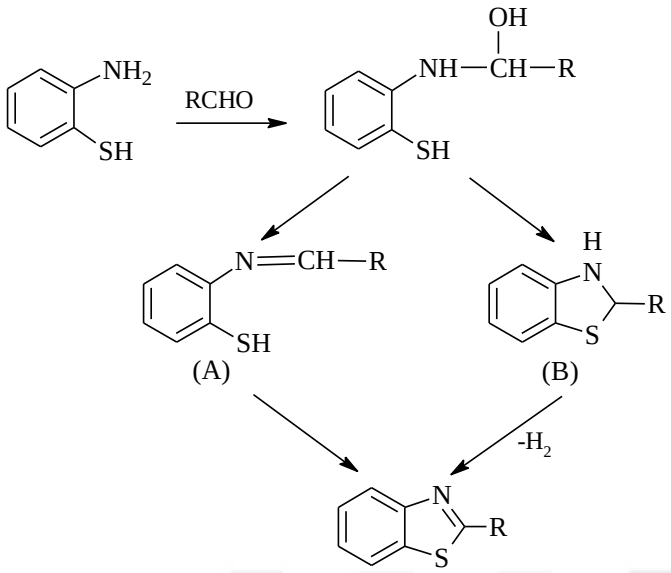
Şekil 2-50: Benzotiyazol bileşiğinin yapısal formülü

Benzotiyazol bileşikleri ilk olarak 1887'de Hantzsch ve Waber tarafından sentezlenmiş, 1889'da Popp tarafından yapısı bildirilmiştir. 2-Arilbenzotiyazolerin sentezi için en yaygın kullanılan yöntem Hoffman tarafından bulunmuştur. Bu yöntemde 2-aminotiyofenolün benzoil klorürle reaksiyonu ile 2-fenilbenzotiyazol kazanılmıştır (Hoffmann 1879). 2-Aminotiyofenol benzaldehit ile etkileştirildiğinde 2-fenilbenzotiyazolinin elde edilmiş, bu türevin kolaylıkla 2-fenilbenzotiyazole okside olduğu kaydedilmiştir (Şekil 2-51) (Hoffmann 1880; Claasz 1916).



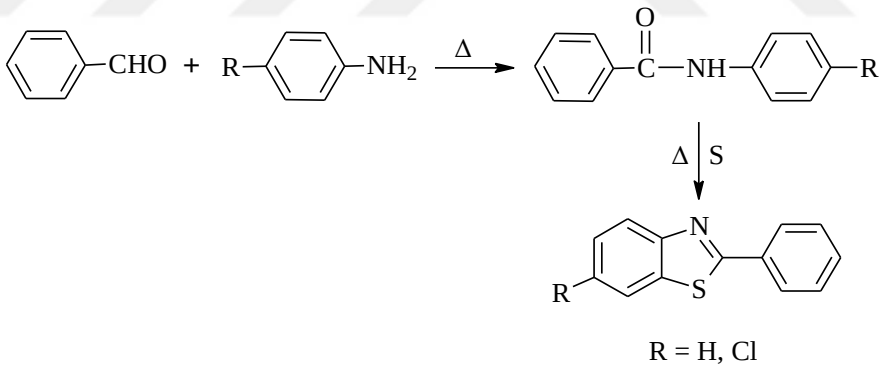
Şekil 2-51: 2-Aminotiyofenolden 2-fenilbenzotiyazol sentezi

2-Aminotiyofenolden benzotiyazollerin sentezinin ketonlar ile yürümediğini, A mekanizması ile aldehitler ile benzotiyazollerin kazanıldığını savunmuşlardır (Şekil 2-52) (Bogert ve ark. 1924; 1925; 1926).



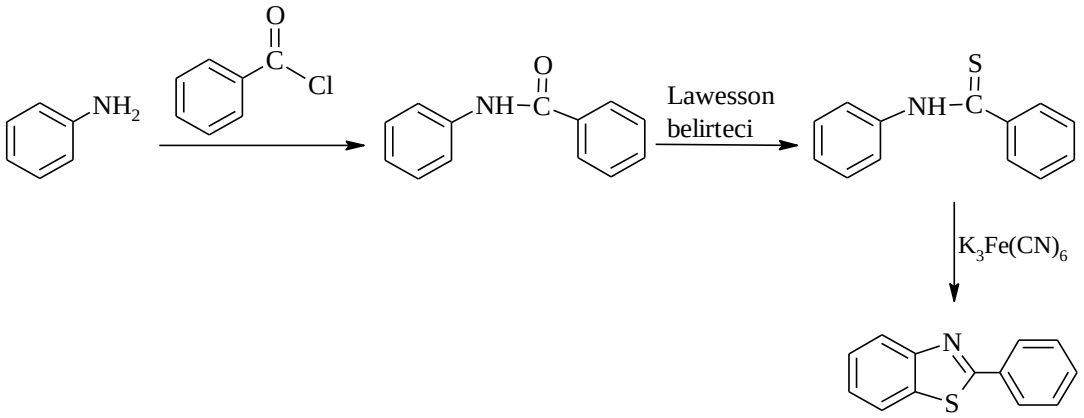
Şekil 2-52: 2-Aminotiyofenolden 2-sübstitüe benzotiyazol sentez mekanizmaları

2-Fenilbenzotiyazol türevlerini, benzaldehid ve anilin türevlerinden hareketle elde ettikleri N-fenilbenzamid türevlerini kükürtlü ortamda 250°C de ısıtarak sentezleyen araştırıcılar, bu sentez yönteminin saf ürün eldesi için ekonomik ve hızlı bir metod olduğunu kaydetmişlerdir (Şekil 2-53) (Bogert ve ark. 1922; 1926).



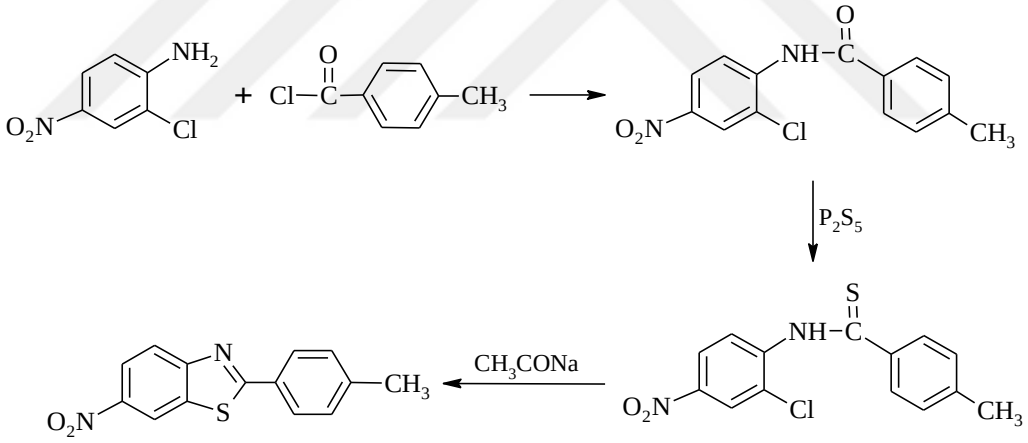
Şekil 2-53: N-fenilbenzamidden hareketle 2-fenilbenzotiyazol türevlerinin sentezi

Jacobson sentezi ile 2-arilbenzotiyazolün sentezinde anilin benzoil klorür ile etkileştirilerek önce N-fenilbenzamid elde edilmekte, Lawesson belirteci ile kazanılan N-fenilbenzotiyoamidden potasyum ferrisiyanür katalizörlüğünde oksidatif siklizasyonla hedef ürün kazanılmaktadır (Şekil 2-54) (Jacobson 1886).



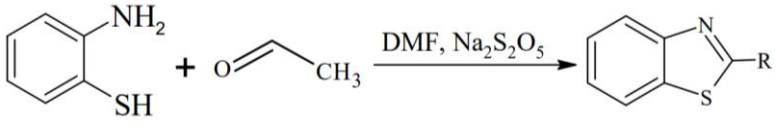
Şekil 2-54: N-fenilbenzotiyoamidden hareketle 2-fenilbenzotiyazol sentezi

Hoffmann sentezi katalizör olarak polifosforik asit (PPA) veya polifosfat ester (PPE) kullanılarak benzoik asit veya ester, amid, nitril türevleri ile gerçekleştirilmiş (Hein ve ark. 1957; Yoshino ve ark. 1986) Jacobson sentezinde fosfor pentasülfür (P_2S_5) Lawesson belirteci yerine katalizör olarak kullanılmış, sodyum metoksidli ortamda 6-nitrobenzotiyazoller elde edilmiştir (Şekil 2-55) (Yoshino ve ark., 1986).



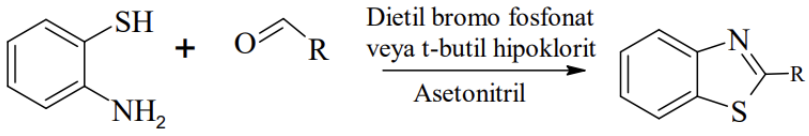
Şekil 2-55: 2-(4-Metilfenil)-6-nitrobenzotiyazol sentezi

Günümüzde yaygın olarak kullanılan yöntemlerin çoğu klasik metotlardan oluşmaktadır. Bu metotlardan biri 2-aminotiyofenol ve aldehitlerin dimetilformamit (DMF) ortamında sodyum metabisülfit ($Na_2S_2O_5$) katalizörlüğünde reaksiyonu ile 2-sübstitüe benzotiyazollerin sentezidir (Şekil 2-56) (Rahim ve ark. 2015).



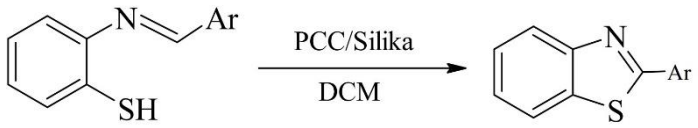
Şekil 2-56: 2-Aminotiyofenolden hareketle benzotiyazol sentezi

Asetonitrilli ortamında, dietil bromo fosfonat ve ter-butil hipoklorit katalizörlüğünde 2-aminotiyofenol ve aldehitlerden doğa dostu bir yöntemle de benzotiyazoller elde edilmektedir (Şekil 2-57) (Patil ve Bobade 2009).



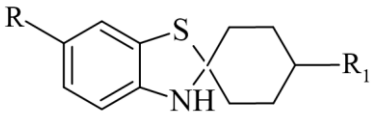
Şekil 2-57: Çevre dostu teknikle benzotiyazol sentezi

2-Arilbenzotiyazoller silika jel üzerinde piridinyum klorokroma (PCC) katalizörlüğünde, diklorometanlı (DCM) ortamda tiyofenolik ve fenolik schiff bazlarının oksidatif siklizasyonu ile de sentezlenmektedir (Şekil 2-58) (Praveen ve ark. 2008).



Şekil 2-58: Silika jel üzerinde benzotiyazol sentezi

Üstündağ ve ark. (2017) tarafından sentezlenen siklohekzan artığı taşıyan yeni spirobenzotiyazolin türevlerinin indirgeme gücü, $DPPH^{\bullet}$ ve $ABTS^{\bullet+}$ radikal süpürücü aktivite ve lipid peroksidasyonunu inhibe edici özelliklerinin α-tokoferol ile eş düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Siklohekzan halkasına etil grubu eklendiğinde sentezlenen bileşikler içerisinde en kuvvetli antioksidan etkili türevin elde edildiği bildirilmiştir. Etil siklohekzan artığı taşıyan spirobenzotiyazol türevinin sağlıklı fare fibroblast (NIH/3T3) hücre hattında sitotoksik konsantrasyonlardan daha düşük konsantrasyonda lipid peroksidasyonunu redükleyici ve $DPPH^{\bullet}$ radikal süpürücü etkisi belirlenmiştir.



R= H, Cl

R_1= H, C_2H_5, C_3H_7, $C(CH_3)_3$, C_6H_5, 4-C_6H_4(OH)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

5-Bromoisatin (%90, Aldrich), 5-iyodoisatin (%99, Aldrich), 7-metilisatin (%99, Abcr), 7-floroisatin (%96, Aldrich), 7-kloroisatin (%97, Aldrich), 7-bromoisatin (%96, Aldrich), 5-kloro-7-metilisatin (%97, Abcr), 5,7-dikloroisatin (%95, Aldrich), 2-amino-4-(triflorometil)tiyofenol (Aldrich)

3.1.2. Kullanılan Elektronik Cihazlar

İnfrared Spektrofotometre	Shimadzu IRAffinity-1 FTIR Spectrophotometer
Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometre	Bruker Advance Neo (500 Hz)
	Varian Mercury (Agilent) (400 MHz)
Elemental Analiz Cihazı	Thermo Finnigan Flash EA 1112
Erime Derecesi Aleti	Büchi Melting Point B-540
	Büchi Melting Point M-560
Kütle Spektrometresi	Agilent Infinity 1260 II LC-MS

3.2. Kromotografik Çalışmalar

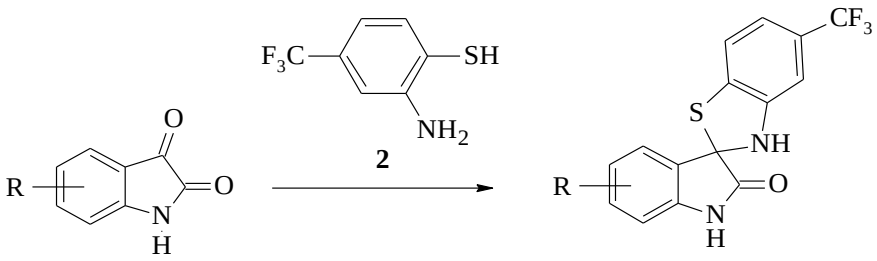
Sentezler sırasında reaksiyon takibi ve oluşan maddelerin saflığının kontrolü için ince tabaka kromatografisi (İTK) kullanılmıştır. 0,25 mm kalınlığında silikajel HF254 ile kaplanmış alüminyum plaklar ve mobil faz olarak farklı çözücü sistemleri kullanılarak reaksiyon takipleri yapılmıştır. Reaksiyon ortamından belirli aralıklarla alınan örnekler başlangıç maddesi ile kıyaslanmış ve UV ışık altında mor renkli lekeler şeklinde gözlenmiştir.

Kullanılan çözücü sistemleri: S1: Etilasetat – Siklohekzan (20:30)

S2: Etilasetat – Siklohekzan (25:25)

3.3. Sentez Yöntemi

3.3.1. Genel Sentez Şeması



R= 5-Br, 5-I, 7-CH_3, 7-F, 7-Cl, 7-Br, 5-Cl-7-CH_3, 5,7-diCl

3.3.2. 5-Triflorometil-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on Türevlerinin (3a-h) Genel Sentez Yöntemi

1*H*-indol-2,3-dion türevlerinin **(1a-h)** (2,5 mmol) absolü etanoldeki (15 ml) çözeltisine 2-amino-4-(triflorometil)benzentiyol **2** (2,5 mmol) ilave edilir. Elde edilen karışım geri çeviren soğutucu altında reaksiyon sonlanıncaya kadar ısıtılır, elde edilen ürün buzlu suya dökülerek çöktürülür, çöken katı madde süzülerek ayrılır ve etanolden billurlandırılarak saflaştırılır (Karalı ve ark. 2010).

3.4. Biyolojik Etki Araştırma Yöntemleri

Sentezlenen **3a-h** bileşiklerinin biyolojik etki araştırmaları İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü araştırıcıları tarafından yapılmıştır.

3.4.1. Antioksidan Etki Araştırması

3.4.1.1. DPPH Radikali Giderici Etki Tayini

1995 yılında Brand-Williams ve ark. nın geliştirdiği yönteme göre **3a-h** bileşiklerinin DPPH radikali giderici etki tayinleri yapılmıştır. Bileşik **3a-h**'ın (0,1 ml) dimetilsülfoksit (DMSO)'daki çözeltisine (1,6 - 50 Mm), askorbik asid (0,1 – 0,8 Mm) veya α-tokoferol (0,1 – 0,8 Mm)'e 3,9 ml $DPPH^{\bullet}$'ın metanoldeki çözeltisi ($6x10^{-5}$ M) ilave edilmesiyle elde edilen karışım karanlıkta (30 dakika) bekletilmiştir. Spektrofotometrede standart olarak metanol kullanılarak absorbanslar 517 nm'de ölçülmüştür. Pozitif kontrolde **3a-h** bileşiklerinin yerine α-tokoferol ve askorbik asit

standartları, negatif kontrolde DMSO kullanılarak paralel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Üç deney tekrarında elde edilen sonuçların ortalaması değerlendirilmiştir.

$$DPPH\ radikali\ giderici\ aktivitesi(\%) = (1 - \frac{İndol\ türevinin\ 517nm'deki\ absorbansı}{Kontrolün\ 517\ nm'deki\ \ absorbansı}) \times 100$$

3.4.1.2. Süperoksit Radikali Giderici Etki Tayini

1989 yılında Aruoma ve ark. nın geliştirdiği yönteme göre **3a-h** bileşiklerinin süperoksit radikali giderici etki tayinleri gerçekleştirilmiştir. 100 µL bileşik **3a-h** (6,25 - 50 Mm) veya askorbik asid (0,1 – 1,6 Mm), 100 µl 30 mM etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (1 mM), 10 µl 50 mM KOH de çözündürülmüş, 30 mM ksantin (0,1 mM), 100 µl 3 mM NBT (0,1 mM) ve 2,59 ml 57,5 mM KH_2PO_4 – KOH, pH 7,4 (50 mM) karıştırılmış, ardından 100 µl 1U ksantin oksidaz ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Absorbanslar 5 dakika 25 ^oC'de bekletildikten sonra köre karşı 560 nm'de ölçülmüştür. Üç deney tekrarında elde edilen sonuçların ortalaması değerlendirilmiştir.

$$Süperoksit\ \ radikali\ \ giderici\ \ aktivitesi\ \ (\%) = (1 - \frac{İndol\ türevinin\ \ 560\ nm'deki\ absorbansı}{Kontrolün\ \ \ 560\ nm'deki\ absorbansı}) \times 100$$

3.4.1.3. TEAC (Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasite) Tayini

Total antioksidan etkinin tayin edildiği bu metod, $ABTS^{\bullet+}$ [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asid)] radikalinin giderilmesine bağlı olarak renkte oluşan azalmanın spektrofotometrik olarak ölçülmesi yöntemidir. ABTS'nin persülfatla oksidasyonu ile $ABTS^{\bullet+}$radikali oluşmaktadır. Bileşiklerin total antioksidan aktivitesi 1999 yılında Re ve ark. nın önerdiği yönteme göre Troloks'a ekivalan antioksidan kapasitesi (TEAC) tayin edilmiştir. $ABTS^{\bullet+}$ stok çözeltisi 7 mmol/l ABTS amonyum suda çözüldürülerek ve 2,45 mmol/l potasyum persülfatla etkileştirilerek hazırlanmış, oda sıcaklığında 12-16 saat bekletilerek koyu mavi bir renk meydana gelmesini sağlanmıştır. $ABTS^{\bullet+}$ stok çözeltisi, 734 nm'de absorbansı 0,70 (± 0,02) olacak şekilde etanol ile seyreltilerek deney gününde hazırlanmıştır. Bu çözeltinin 990 µl'si 10 µl bileşik **3a-h** (0,2 – 3,1 mM), askorbik asid (0,2 – 3,1 mM), α-tokoferol (0,2 – 3,1 mM), veya troloks (suda çözünen sentetik vitamin E)'ye ilave edilmiştir. Renkte oluşan azalma 6. dakikada 734 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Kontrol deneyleri, bileşik **3a-h** veya standart çözeltiler yerine eşit miktarda DMSO veya etanol kullanılarak yapılmıştır.

$$ABTS\ radikali\ giderici\ aktivitesi\ (\%) = (1 - \frac{İndol\ türevinin\ 734\ nm'deki\ absorbansı}{Kontrolün\ 734\ nm'deki\ absorbansı}) \times 100$$

Troloks Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi

Troloks standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce troloksun 10 mM'lık çözeltisi hazırlanmış, bu stok çözeltisi konsantrasyonları 1,5 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM ve 0,125 mM olan çözeltilerini elde etmek için 75 mM'lık fosfat tamponu (pH 7,4) ile seyreltilmiştir. Çözeltilere TEAC deneyi uygulandıktan sonra renkte oluşan azalma 6. dakikada 734 nm'de spektrofotometrik olarak tayin edilmiş, beş deney tekrarında elde edilen sonuçların ortalaması ile troloksun ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi yüzdeleri hesaplanmıştır.

3.4.1.4. Ferri İyonu Redükleyici Gücü Tayini

2005 yılında yayımlanan Chung ve ark. tarafından yapılan çalışmada geliştirilen yönteme göre Ferri iyonu redükleyici gücü tayini gerçekleştirilmiştir. 0,1 ml bileşik **3a-h** (0,4-12,5 mM) veya standart olarak kullanılan askorbik asid (0,4-3,1 mM) ve α-tokoferol (0,4-6,25 mM), 0,25 ml fosfat tamponu (pH= 6,6) ve 0,25 ml potasyum ferrisiyanür ile karıştırılmış ve 20 dakika 50 ^{o}C de inkübe edilmiştir. Devamında 0,25 ml TCA ile reaksiyon durdurulmuş, karışım 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek, ayrı tüplere alınan 0,25 ml supernatanta 0,25 ml distile su ve 0,5 ml %0,1 $FeCl_3$ ilave edilmiş ve 700 nm'de absorbanslar ölçülmüştür.

3.4.1.5. Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etki Tayini (Anti-Lipid Peroksidasyon Aktivitesinin Belirlenmesi)

Bu test ile bileşik **3a-h**'ın, soya fosfatidilkolininden hazırlanan lipozomlardan oluşan, suni lipit sisteminin $FeCl_2$ ve askorbik asit ile inkübasyon ile oluşan peroksit radikallerini giderme kapasitesini tayin etmek hedeflenmiştir. Lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) tiyobarbitürik asit (TBA) ile etkileştirilmiş ve oluşan pembe renkli TBA-reaktif türler (TBARs) spektrofotometrik olarak 532 nm'de ölçülmüştür.

İndol türevi bileşiklerin lipit peroksidasyonunu inhibe etme kapasitesinin (anti-lipit peroksidasyon aktivitesinin) belirlenmesinde Patro ve ark. tarafından 2002 yılında geliştirilen ve Hamad ve ark. tarafından (2010) modifiye edilen yöntem uygulanmıştır. Buna göre, 300 mg fosfatidilkolin 30 ml, 10 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,4) ile

süspanse edilmiş, 2 saat buz üzerinde ultrasonik banyoda tutularak fosfolipit lipozomları içeren bir süspansiyon elde edilmiştir. 250 µl lipozom ve farklı konsantrasyonlarda (5; 2,5; 1; 0,5 ve 0,1 mM) 450 µl test bileşiği indol türevini (veya kontrol olarak DMSO'yu) içeren karışımın üzerine, toplam hacim 1 ml olacak şekilde, son konsantrasyonları 125 µM olan $FeCl_2$, H_2O_2 ve askorbik asit ilave edilmiştir. Karışım 30 °C'de 4 saat inkübe edildikten sonra, nihai karışımın 250 µl'si 500 µl TCA (trikloroasetik asit) - TBA-HCl reaktifine (%15 w/v, TCA; %0,375 w/v, TBA; 0,25 M HCl) eklenmiştir. Reaksiyon karışımı vortekslenmiş ve 100 °C'de 15 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiştir. 3000 g'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra üst kısımda kalan pembe renkli organik fazın absorbansı 532 nm'de ölçülmüştür. Referans antioksidan olarak α-Tokoferol kullanılmıştır. Lipid peroksidasyon inhibisyonu (% cinsinden) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$İnhibisyon\,(\%) = (1 - \frac{İndol\ \ türevinin 532\ nm'deki\ absorbansı}{Kontrolün\ \ 532\ nm'deki\ absorbansı}) \times 100$$

3.4.1.6. CUPRAC Testi: Kuprik (Cu2+) İyonunu İndirgeme Kapasitesinin Belirlenmesi

Bileşiklerin kuprik (Cu^{2+}) iyonunu indirgeme kapasitesi, Apak ve ark. tarafından 2008 yılında geliştirilmiş CUPRAC yöntemi ile belirlenmiştir. Yöntem, reaktif içindeki bakır(II)-neokuproin [Cu(II)-NC] kompleksinin ortamdaki antioksidanlar ile reaksiyona girerek indirgenmesine ve 450 nm'de maksimum absorbsiyon yapan kromojenik bir bileşiğin oluşumuna dayanmaktadır. Yöntemin uygulanması için 10^{-2} M $CuCl_2$, $7{,}5x10^{-3}$ M neokuproin, 1 M amonyum asetat (NH_4-Ac) (pH 7,0), örnek ve saf sudan oluşan reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışım, 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek 450 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometrede ölçülmüştür. Kontrol olarak örneğin hazırlandığı çözücü (DMSO), referans olarak etanol içinde hazırlanan E vitamini türevi Trolox (TR) çözeltisi kullanılmıştır. Her bir örneğin absorbans değeri, Trolox'un ekstinksiyon katsayısına (ε_{TR}) bölünmüş ve sonuçlar mM TR birimiyle ifade edilmiştir.

3.4.2. Sitotoksisite Analizi

Bu çalışmada, hücre hattı olarak sağlıklı insan fibroblast hücreleri (Human foreskin fibroblasts, HFF) kullanılmıştır. Bu hücrelerin alt kültürlemeleri 75 cm^2'lik kültür kaplarında ısıyla inaktive edilmiş %10 FBS (Fetal Bovine Serum, fetal sığır serumu), %1 NEAA (Non-Essential Amino Acids, esansiyel olmayan amino asitler), %1

antibiyotik-antimikotik solüsyonu, %1 sodyum piruvat (100 mM), %1 GlutaMAX (200 mM) ve içeriğinde 4,5 g/L D-glukoz bulunduran DMEM (Dulbecco'nun modifiye kartal besi yeri) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler 37 °C'da ve %5 CO_2 içeren etüvde tutulmuştur. Hücrelerin altkültürleme aşamasında, kültür kabı içindeki besiyeri uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine 5 ml PBS (Phosphate Buffered Saline , fosfatlı tampon solüsyonu) eklenmiş ve hücreler dikkatli bir şekilde yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra PBS dökülüp kültür kabı içine 1 ml Tripsin-EDTA (%0,2 tripsin, %0,04 EDTA) eklenmiş ve hücreler 37 °C`lık etüvde hücreler ayrışıncaya kadar inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra hücrelerin üzerine 5 ml besiyeri eklenerek süspanse hale getirilmiştir. Yeni bir kültür kabına alınmadan önce hemositometre (Neubauer lamı) yardımıyla sayılan hücreler, süspansiyondan istenilen sayıda alınarak yeni kültür kabına aktarılmıştır. Hücreler 37 °C'lık %5 CO_2 sağlayan etüve kaldırılarak alt kültürleme işlemleri üç ilâ dört günde bir tekrarlanmıştır (Freshney 2000).

In vitro testler sonucunda en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenen 6 bileşiğin (**3a-c** ve **3f-h**) HFF hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri, 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum (MTT) yöntemi ile saptanmıştır. Mosmann tarafından 1983 yılında önerilen ve Önay Uçar ve ark. tarafından 2012 modifiye edilmiş şekliyle uygulanan yöntem, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi sonucu MTT'nin suda çözünmeyen formazan kristallerine çevirmesi ve bu kristallerin de DMSO'da çözündürülmesi ve 540 nm dalga boyundaki absorbasının spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Bu amaçla hücreler 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek 24 saat boyunca 37 °C'da ve %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda kültür kabına tutunmuş olan hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak, deney grubu hücrelerin üzerine farklı konsantrasyonlarda **3a-h** bileşiği içeren besiyerlerinden (kontrol grubu için sadece besiyeri) eklenip etüvde bekletilmiştir. Test edilen bileşik eklendikten sonraki 48. saatte hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak tüm kuyucuklara 30 µl MTT stok çözeltisinden (5 mg/ml, PBS içinde) eklenmiştir. Hücreler 4 saat etüvde tutulduktan sonra, her bir kuyucuğa 150 µl DMSO eklenerek karışım homojen hale gelinceye kadar çalkalanmıştır. Oluşan renkli ürünlerin absorbansları mikroplaka okuyucuda (Multiplate Reader UV/Vis Reader-BioTek) ölçülmüş ve % canlılık değeri aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır:

$$\%\ Canlılık = 100\ x\ \frac{Deney\ grubu\ hücrelere\ ait\ A540}{Kontrol\ grubu\ hücrelere\ ait\ A540}$$

Elde edilen sitotoksisite sonuçlarına göre, test edilen tüm bileşikler için hücre canlılığını %100'ün altına düşürmeyen bir doz olarak 15 µM seçilmiş ve sonraki deneylerde (bileşiklerin hücre içi ROT oluşumu, protein ve DNA hasarları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi) hücreler bu konsantrasyonda hazırlanan test bileşikleriyle işleme sokulmuştur. Hücrelere uygulanacak olan bileşiklerin stok solüsyonları DMSO içinde çözülerek hazırlandığından, DMSO'nun besiyerindeki son konsantrasyonu hücreler üzerindeki toksisitesini elimine etmek amacıyla %1'in altında kalacak şekilde ayarlanmıştır. İstatistiksel analiz için, GraphPad Prism 8.0 yazılımı kullanılmış, IC_{50} değerini hesaplamak için sigmoidal doz-cevap eğrisine lineer olmayan regresyon analizi uygulanmıştır.

3.4.3. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Belirlenmesi

Ölçümden önce oksidatif stres (hücre içi ROT oluşumu) 96 kuyucuklu kültür kaplarında 24 saat büyütülen hücrelerin 2 saat boyunca 200 µM H_2O_2'ye maruz bırakılmasıyla indüklenmiştir. Ardından deney grubu hücrelere her bir test bileşiğinden 15 µM uygulanmış ve 48 saat inkübasyona devam edilmiştir. H_2O_2 ve/veya test bileşiği uygulanmamış kontrol grubu hücreler de aynı şartlarda inkübe edilmiştir. Hücre içi reaktif oksijen türleri (ROT), 2',7'-diklorodihidrofloresin diasetat (H_2DCFDA) aracılığıyla spektroflorometrik olarak belirlenmiştir. Bu amaçla deney ve kontrol grubu hücreler üzerindeki sıvı uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra hücreler üzerine her bir kuyucukta 200 µl olacak şekilde dengelenmiş tuz solüsyonu (Hank's balanced salt solution, HBSS) içinde hazırlanmış 10 µM H_2DCFDA uygulanmış ve kültür kapları 37 °C'da %5 CO_2 içeren etüvde 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 100'er µl HBSS eklenmiştir. Spektroflorometrede 495 nm eksitasyon ve 525 nm emisyon dalga boylarında, 37 °C'de 2 saat boyunca kinetik ölçüm alınmıştır. ROT düzeyi, kuyucuklardaki hücre sayısına göre normalize edilerek hesaplanmış ve bağıl olarak değerlendirilmiştir.

3.4.4. Protein İzolasyonu ve Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

HFF hücrelerinde oksidatif stres sonucu oluşan hücre içi protein hasarlarının belirlenmesinde kullanılacak proteinlerin izolasyonu aşağıda anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Deney ve kontrol grubu hücreler; 25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl,

1% NP-40, 1% Triton X-100, %1 sodyum deoksikolat, %1 SDS, EDTA içermeyen proteaz inhibitör kokteyli (1 tablet/50 ml), 1 mM PMSF içeren RIPA tamponu ile tekrarlanan periyotlarda ultrasonik su banyosu ve buz içinde tutularak parçalanmıştır. Homojenat 4 °C'de 20000xg hızda 20 dakika santrifüj edilmiş ve hücresel proteinleri içerek berrak üst sıvı protein hasarlarının belirlenmesinde kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Örneklerin protein konsantrasyonları bikinkoninik asit (BCA) yöntemiyle, BCA Protein Assay (SMART^{TM} BCA Protein Assay Kit, iNtRON Biotechnology) kiti kullanılarak belirlenmiştir. Kit içinde bulunan BSA (Bovine Serum Albumin, Sığır Serum Albumini) farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak, protein standardı olarak kullanılmıştır. Gerekli hacimdeki BCA belirteci, kit içinde bulunan reaktif A ve reaktif B solüsyonları 50:1 (v:v) oranında karıştırılarak hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikroplakanın kuyucuklarına önce 200 µL BCA belirteci, daha sonra 25'er µL seyreltilmiş örnek/kör/standart eklenerek, mikroplaka 30 dakika 37 °C'lık etüvde bekletilmiştir. Oluşan renkli ürünün 562 nm dalga boyundaki absorbansı mikroplaka okuyucu ile ölçülerek absorbans değerleri kaydedilmiştir. BSA kullanılarak oluşturulan standart grafik yardımıyla, tüm örneklerin protein konsantrasyonları belirlenmiş ve bir sonraki adımda (protein hasarının belirlenmesi için) yapılacak deneyde Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)'ye uygulanacak hücresel protein miktarlarını (15 µg) içeren örnek hacimleri bu verilere dayanarak hesaplanmıştır.

3.4.5. Protein Karbonillerinin (Protein Hasarının) Belirlenmesi

Hücrelerdeki protein hasarı, oksidatif stres sonucu ortaya çıkan karbonil gruplarının immünolojik olarak değerlendirildiği SDS-PAGE ve Western blotlama analizleri yapılarak belirlenmiştir (Hamad ve ark. 2010). Bu analizde OxyBlot Protein Detection Kit kullanılmıştır. Üretici firmanın önerilerine göre her bir örneğe ait 15 µg hücresel protein, dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile 15 dakika oda sıcaklığında işleme sokulmuştur. Daha sonra proteinler SDS-PAGE yöntemi ile %10'luk jel hazırlanarak ayrıştırılmış ve ayrıştırılan proteinler, elektroblot yöntemi ile polivinilidin diflorür (PVDF) membrana aktarılmıştır. Membran %5 yağsız süt tozu (%0,05 Tween-20 içeren TBS içinde) ile bloke edildikten sonra, proteindeki DNP'lere özgü primer antikorla (anti-DNP antikoru) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından, primer antikor kalıntılarını ortamdan uzaklaştırmak amacıyla, yıkama tamponu (%0,05 Tween-20 içeren TBS) ile beşer dakika aralıklarla 5 kez yıkanmıştır. Membran daha sonra, HRP işaretli

sekonder antikor ile oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Tekrarlanan yıkama işleminin ardından, membrandaki görüntüler kaydedilmiş ve Western Blotting Detection Kit kullanılarak ChemiDoc MP (Bio-Rad) kemolüminesans görüntüleme sisteminde ImageLab yazılımıyla değerlendirilmiştir.

3.4.6. DNA Hasarının (DNA Oksidasyon Düzeyinin) Belirlenmesi

Hücrelerdeki DNA hasarı, DNA'da oluşan oksidatif hasar belirteçlerinden biri olan 8-OHdG miktarının ELISA kiti (Elabscience®) yardımıyla ölçülmesiyle belirlenmiştir. Ölçüm öncesinde kitin içeriğindeki referanslarla standart bir grafik hazırlanmıştır. Deney sürecinde kullanılacak kitlerin pahalı olması nedeniyle önce deney koşullarında DNA hasarı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bu amaçla oksidatif stresin H_2O_2 ile indüklendiği pozitif kontrol ve H_2O_2 uygulanmamış negatif kontrol grubundaki hücrelerden High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) ile üretici firmanın önerilerine göre DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA miktarları Nanodrop cihazı ile ölçülmüştür. Kontrol gruplarında DNA hasarı oluşmadığı gözlendiğinden deney grubu hücreler bu çalışmaya alınmamıştır.

3.4.7. İstatistiksel Analizler

Deneysel çalışmalara ait tüm sayısal veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sitotoksik aktivite analizinde IC_{50} değerini hesaplamak için, sigmoidal doz-cevap eğrisinin lineer olmayan regresyon analizi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki farkların anlamlı olup olmadığını belirlemek için ANOVA (analysis of varyans, varyans analiz testi) testi yapılmış ve üst testler olarak Dunnett's veya Tukey testleri kullanılmıştır. Bu istatistiksel işlemler GraphPad Prism yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.5. *In silico* ADME Kriterlerinin İncelenmesi

İlaç tasarımı ve geliştirme çalışmalarında aday bileşiklerin vücuttaki absorbsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım aşamalarını tanımlayan ADME (absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım) özelliklerinin *in silico* değerlendirilmesi *in vitro* tarama testlerinin süresini ve maliyetini en aza indirebilmek amacıyla kullanılmaktadır. Büyük molekül kütüphanesinden ilaç olma potansiyeli en güçlü adayları belirlemeyi hedefler, potansiyel ilaç adayı moleküllerinin *in vivo* farmakokinetik özelliklerinin ön görülmesine olanak sağlar (Alqahtani 2017).

Lipinski ve ark. (1997) tarafından küçük lipofilik ilaç molekülleri üzerindeki incelemeleri ile tanımlanan Lipinski'nin beş kuralı (RO5), ilaç adayı moleküllerin vücuttaki absorbsiyon, dağılma, metabolizma ve atılım vb. olmak üzere birçok farmakokinetik özelliklerini içerir, ancak farmakolojik olarak aktivitesini tanımlamayan ilkelerden oluşur. Oral biyoyararlanım ve ilaç benzeri özellikleri değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bu kurallar dizisidir. Bu kurallar, günümüzde geliştirilen yeni kurallar ile bazı ilkelerini ve değerini biraz yitirmiş olsa da oral yolla kullanılması hedeflenen yeni ilaç moleküllerinin tasarımı ve geliştirilmesi çalışmalarında temel kriterler olarak önemini korumaktadır.

4 kuraldan oluşan RO5 en fazla bir kurala uyulmamasına izin vermektedir. RO5, aday bir molekülün oral yolla kullanılabilmesi ve ilaç benzeri özelliklere sahip olabilmesi için aşağıdaki kriterleri karşılaması gerektiğini bildirir:

- Hidrojen bağı donör grubu 5 den fazla olmamalıdır .
- Hidrojen bağı akseptörü grubu 10 dan fazla olmamalıdır .
- Molekül ağırlığı 500 daltondan az olmalıdır .
- Oktanol/su dağılım katsayısı (logP) 5'in altında olmalıdır.
- Birden fazla kuralı ihlal etmemelidir.

3a-h bileşiklerinin bazı farmakokinetik parametreleri ve Lipinski kurallarına uygunluğu Qikprop modülü (Schrödinger LLC 2015) kullanılarak incelenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Sentezi Yapılan Maddelere Ait Bulgular

4.1.1. 5'-Bromo-5-(triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3a)

5-Bromo-1*H*-indol-2,3-dion (0,62 g, 2,5 mmol) ile 2-amino-4-(triflorometil)-benzentiyolden (0,59 g, 2,5 mmol) 3.3.2'de verilen yönteme göre 5 saat ısıtılarak sentezlenir. Açık turuncu renkli ürünün erime derecesi 217-219 °C'dir (0,98 g, verim %98).

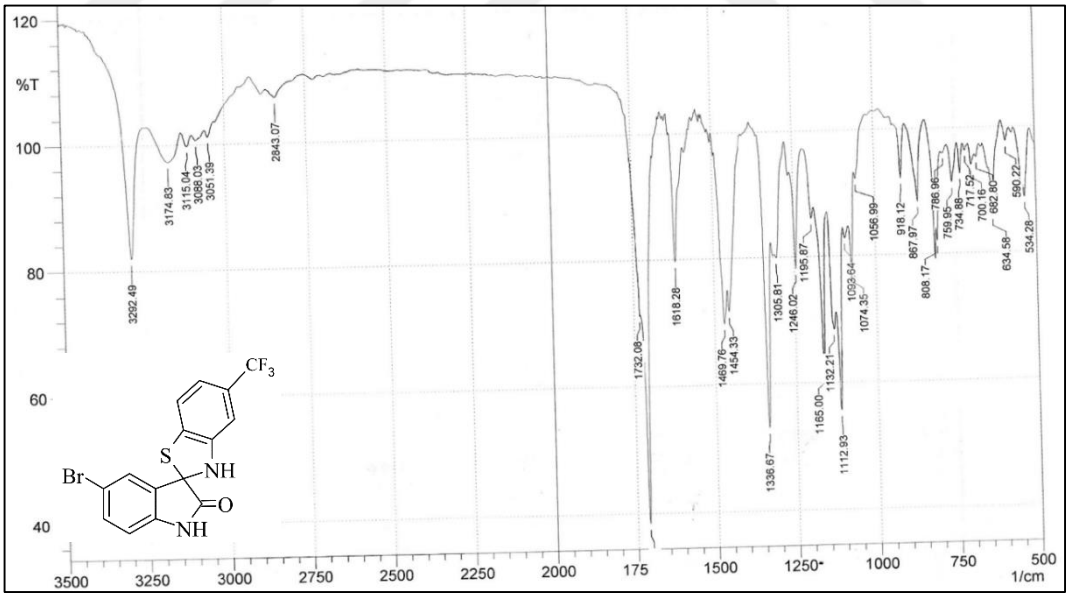
Elementel Analiz: $C_{15}H_8BrF_3N_2OS$ (MA=401,20 g/mol)

Hesaplanan C: 44,91 H: 2,01 N: 6,98 S: 7,99

Bulunan C: 44,88 H: 2,03 N: 7,04 S: 7,89

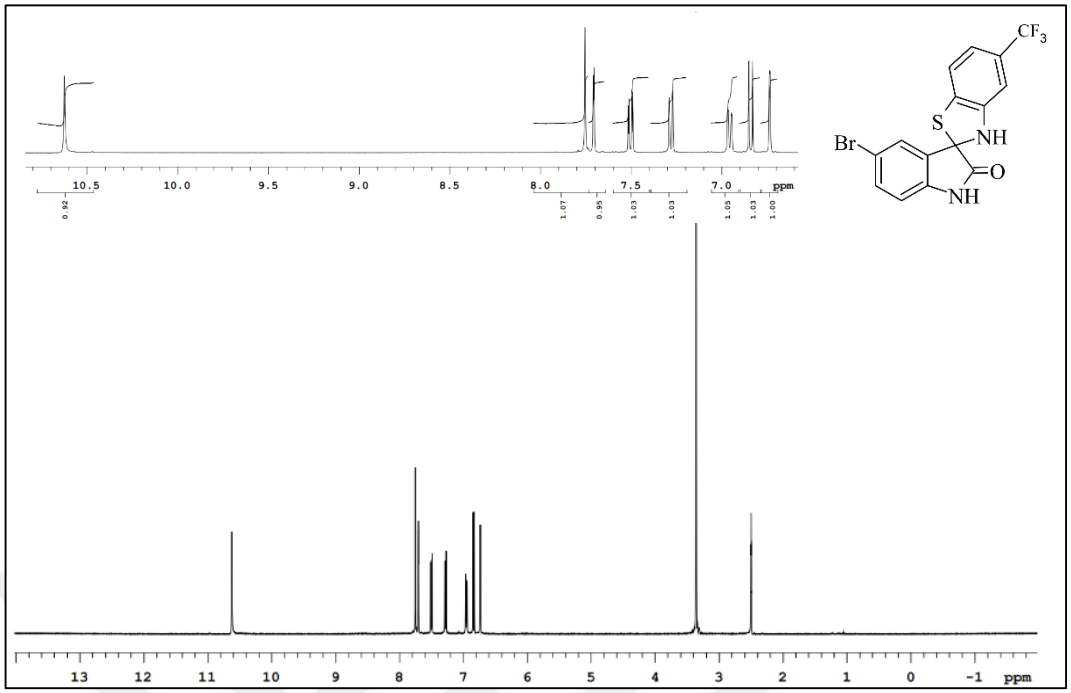
Spektral Bulgular

IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 634 (C-S g.b.); 790 (C-Br g.b.); 808 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 1165 (C-F g.b.); 1265 (C-N g.b.); 1465, 1452, 1618 (N-H e.b. ve Ar. C=C g.b.); 1712 (C=O g.b.); 3088 (Ar. C-H g.b.); 3290 (N-H g.b.).

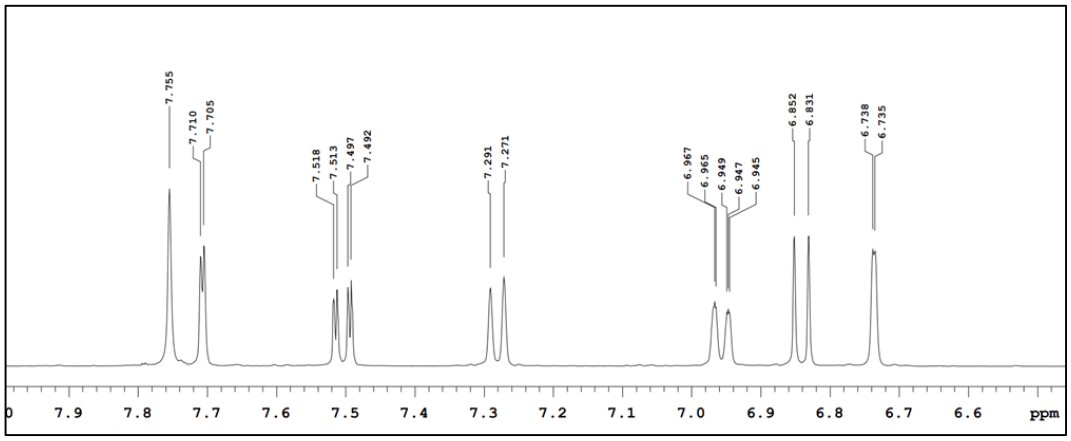


Şekil 4-1: Madde 3a'nın IR spektrumu (cm^{-1})

^{1}H-NMR (500 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 6,74 (1H, d, *J*= 2,0 Hz, b.t. C_4-H); 6,84 (1H, d, *J*= 8,4 Hz, ind. C_7-H); 6,95 (1H, d, *J*= 8,0 Hz, b.t. C_6-H); 7,28 (1H, d, *J*= 8,0 Hz, b.t. C_7-H); 7,50 (1H, dd, *J*= 8,4; 2,0 Hz, ind. C_6-H), 7,71 (1H, d, *J*= 2,0 Hz, ind. C_4-H); 7,75 (1H, s, b.t. N-H); 10,63 (1H, s, ind. N-H).

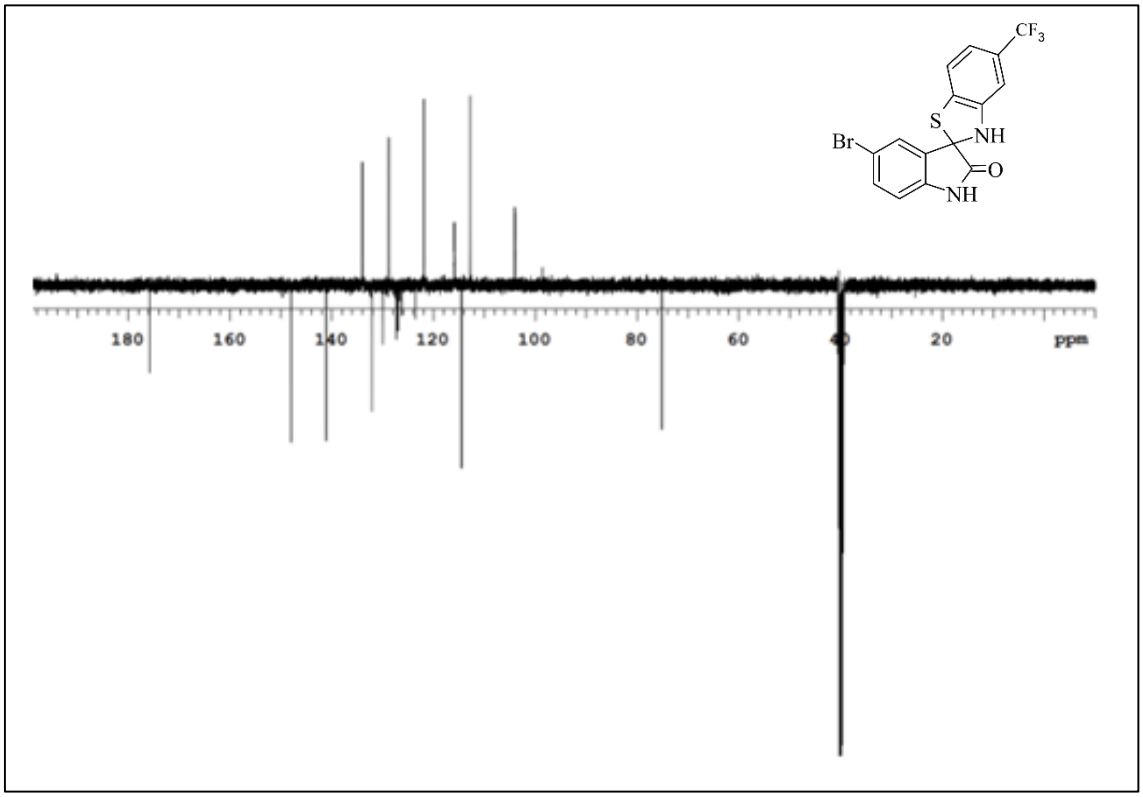


Şekil 4-2: Madde 3a'nın ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-14 ppm)



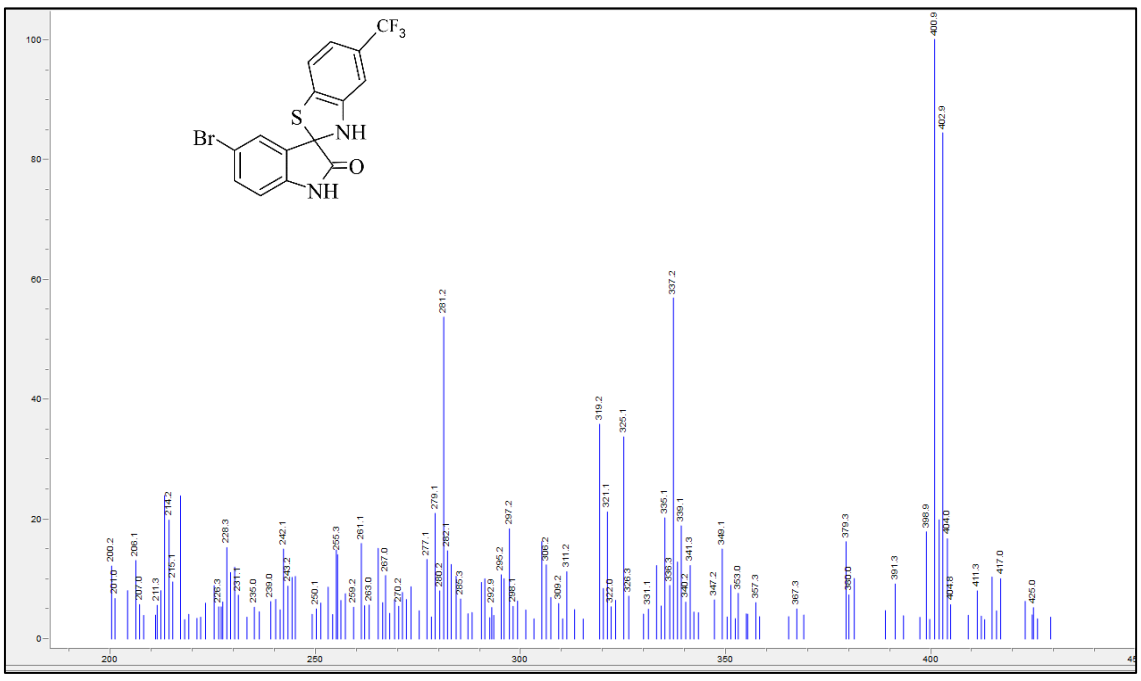
Şekil 4-3: Madde 3a'nın ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6,6-8,0 ppm)

^{13}C-NMR (APT) (125 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 74,69 (spiro C); 103,57 (q, *J*=3,8 Hz, b.t. C_4); 112,38 (ind. C_7); 114,08 (ind. C_5); 115,47 (q, *J*=3,9 Hz, b.t. C_6); 121,45 (b.t. C_7); 124,47 (q, *J*= 274,3 Hz, CF_3); 128,41 (ind. C_4); 126,72 (b.t. C_5, q, *J*=31,0 Hz); 131,67 (b.t. C_{7a}); 133,56 (ind. C_6); 129,54 (ind. C_{3a}); 140,64 (ind. C_{7a}); 147,58 (b.t. C_{3a}); 175,41 (ind. C_2).



Şekil 4-4: Madde 3a'nın ^{13}C-NMR (APT) spektrumu (δ 0-200 ppm)

Kütle Spektrumu LC-MS (ESI+) m/z (%): 415,0; 417,0 ([M+2Li]$^+$; 10, 9); 400,9; 402,9 ([M+H]$^+$; 100, 82); 335,1; 337,2; 339,1 (22, 59, 18); 325,1 (35); 319,2; 321,1 (37, 22); 281,2 (55).



Şekil 4-5: Madde 3a'nın LC-MS spektrumu

4.1.2. 5'-İyodo-5-(triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3b)

5-İyodo-1*H*-indol-2,3-dion (0,68 g, 2,5 mmol) ile 2-amino-4-(triflorometil)-benzentiyolden (0,59 g, 2,5 mmol) 3.3.2'de verilen yönteme göre 8 saat ısıtılarak sentezlenir. Açık turuncu renkli ürünün erime noktası 221-222 °C'dir (0,95 g, verim %84).

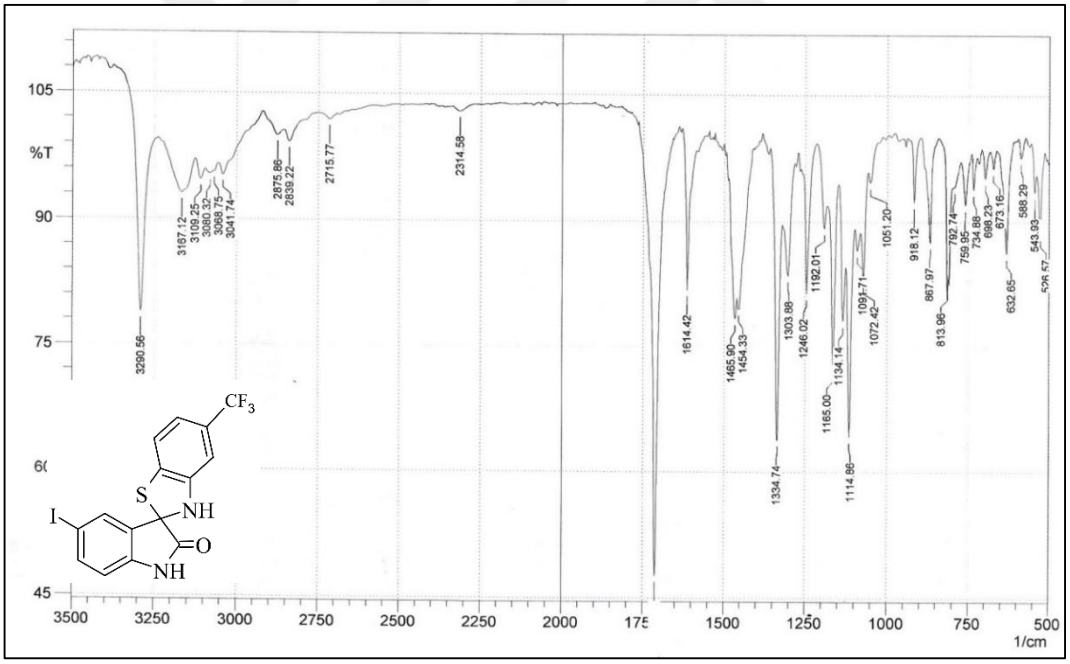
Elementel Analiz: $C_{15}H_8F_3IN_2OS$ (MA= 448,20 g/mol)

Hesaplanan C: 40,20 H: 1,80 N: 6,25 S: 7,15

Bulunan C: 40,17 H: 1,84 N: 6,44 S: 7,11

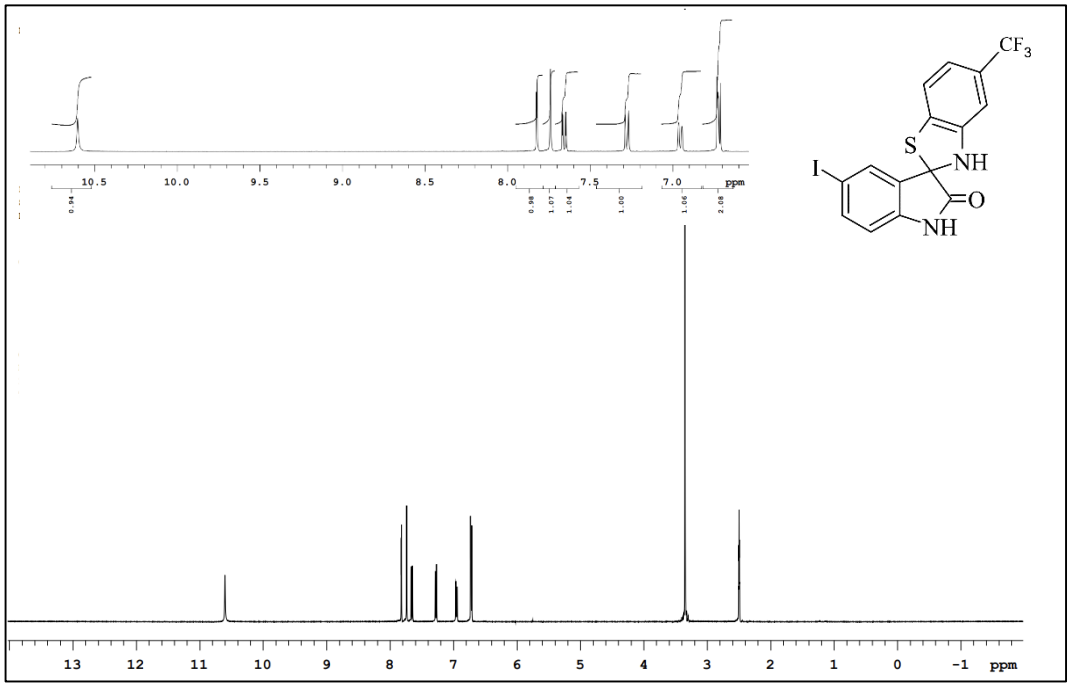
SPEKTRAL BULGULAR

IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 632 (C-S g.b., C-I e.b.); 813 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 1165 (C-F g.b.); 1265 (C-N g.b.); 1464, 1454, 1614 (N-H e.b. ve Ar. C=C g.b.); 1712 (C=O g.b.); 3090 (Ar. C-H g.b.); 3290 (N-H g.b.).

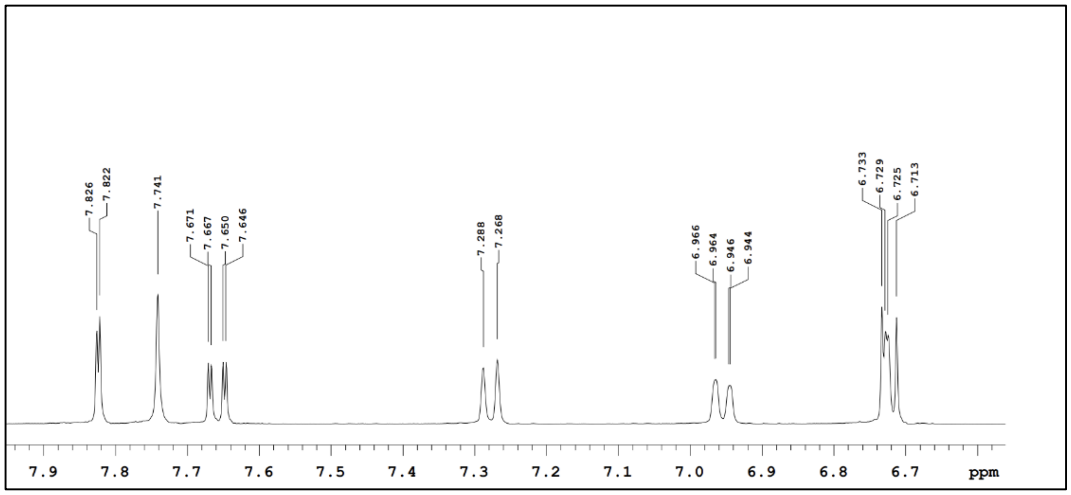


Şekil 4-6: Madde 3b'nin IR spektrumu

^{1}H-NMR (500 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 6,72 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, ind. C_7-H); 6,73 (1H, d, *J*= 1,6 Hz, b.t. C_4-H); 6,95 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, b.t. C_6-H); 7,27 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, b.t. C_7-H); 7,65 (1H, dd, *J* = 8,4; 1,6 Hz, ind. C_6-H); 7,74 (1H, s, b.t. N-H); 7,82 (1H, d, *J* = 1,6 Hz, ind. C_4-H); 10,60 (1H, s, ind. N-H).

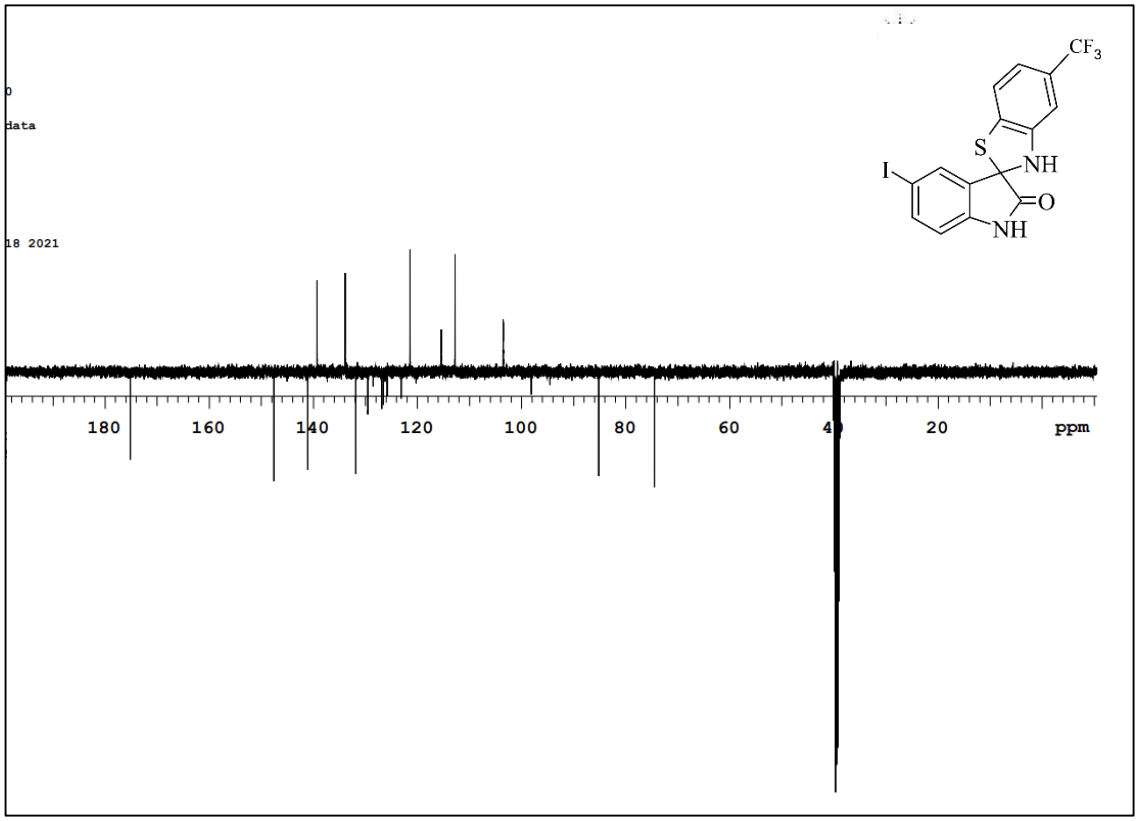


Şekil 4-7: Madde 3b'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-14 ppm)



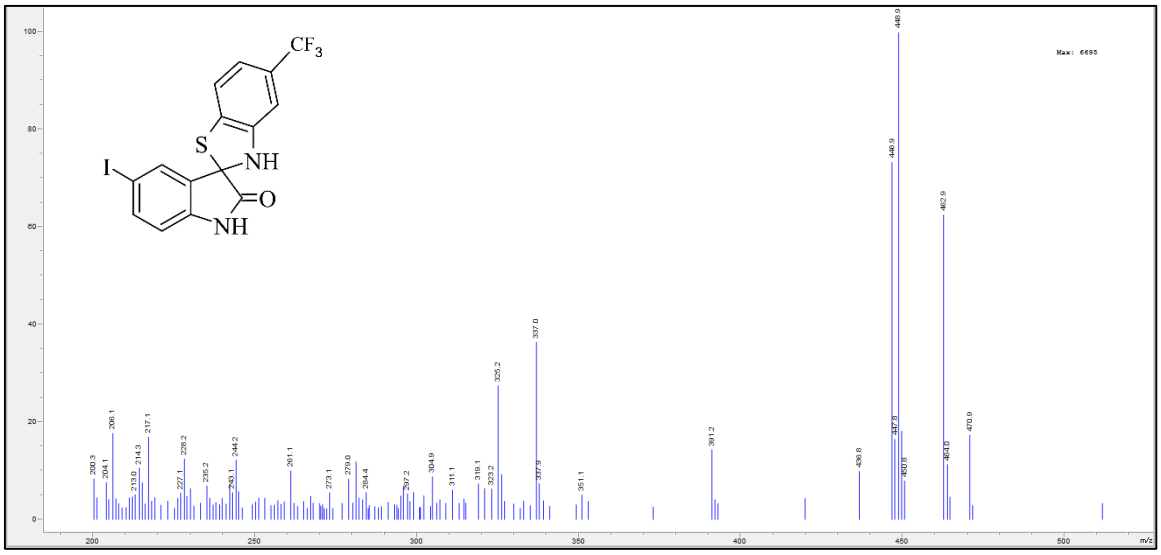
Şekil 4-8: Madde 3b'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6,6-8,0 ppm)

^{13}C-NMR (APT) (125 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 74,69 (spiro C); 85,19 (ind. C_5); 103,53 (q, *J*= 3,2 Hz, b.t. C_4); 112,79 (ind. C_7); 115,44 (q, *J*= 4,5 Hz, b.t. C_6); 121,43 (b.t. C_7); 124.48 (q, *J*= 271,7 Hz, CF_3); 126,70 (q, *J*= 31,0 Hz, b.t. C_5); 129,55 (ind. C_{3a}); 131,86 (b.t. C_{7a}); 133,90 (ind. C_4); 139,30 (ind. C_6); 141,08 (ind. C_{7a}); 147,58 (b.t. C_{3a}); 175,16 (ind. C_2).



Şekil 4-9: Madde 3b'nin ^{13}C-NMR (APT) spektrumu (δ 0-200 ppm)

Kütle Spektrumu LC-MS (ESI+) m/z (%): 470,9 ($[M+Na]^+$, 18); 462,9 ($[M+2Li]^+$, 59); 448,9 ($[M+H]^+$, 100); 446,9 (75); 337,0 (35); 325,2 (28).



Şekil 4-10: Madde 3b'nın LC-MS spektrumu

4.1.3. 7’-Metil-5-(triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3c)

7-Metil-1*H*-indol-2,3-dion (0,40 g, 2,5 mmol) ile 2-amino-4-(triflorometil)-benzentiyol (0,59 g 2,5 mmol) 3.3.2’de verilen yönteme göre 6 saat ısıtılarak reaksiyon sentezlenir. Açık turuncu renkli ürünün erime noktası 246-247 °C’dir (0,59 g, verim %70).

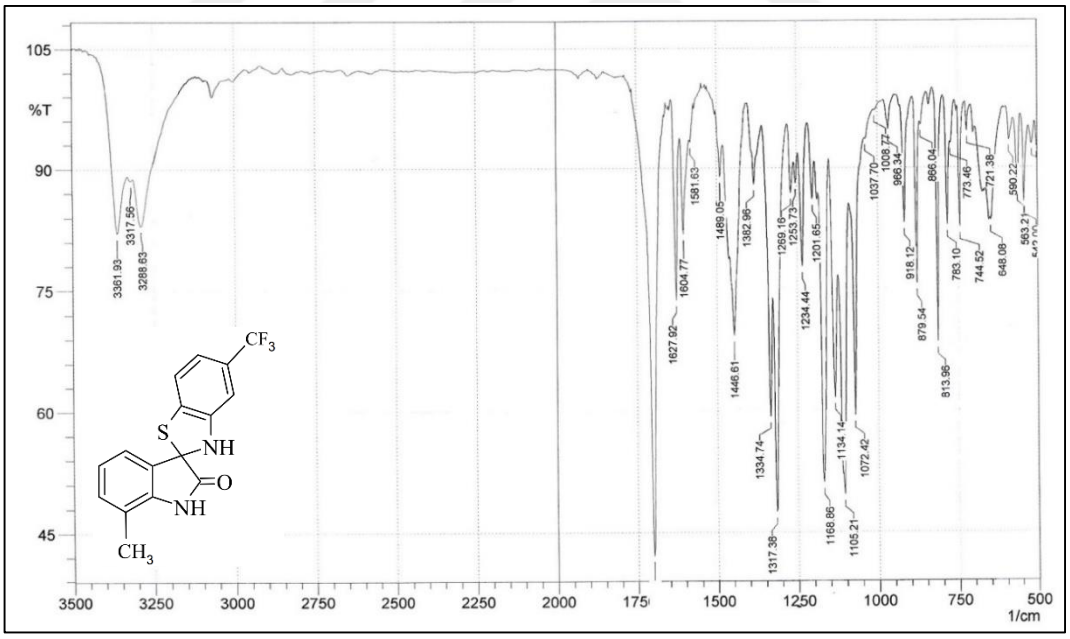
Elementel Analiz: $C_{16}H_{11}F_3N_2OS$ (MA= 336,33 g/mol)

Hesaplanan C: 57,14 H: 3,30 N: 8,33 S: 9,53

Bulunan C: 57,21 H: 3,28 N: 8,46 S: 9,42

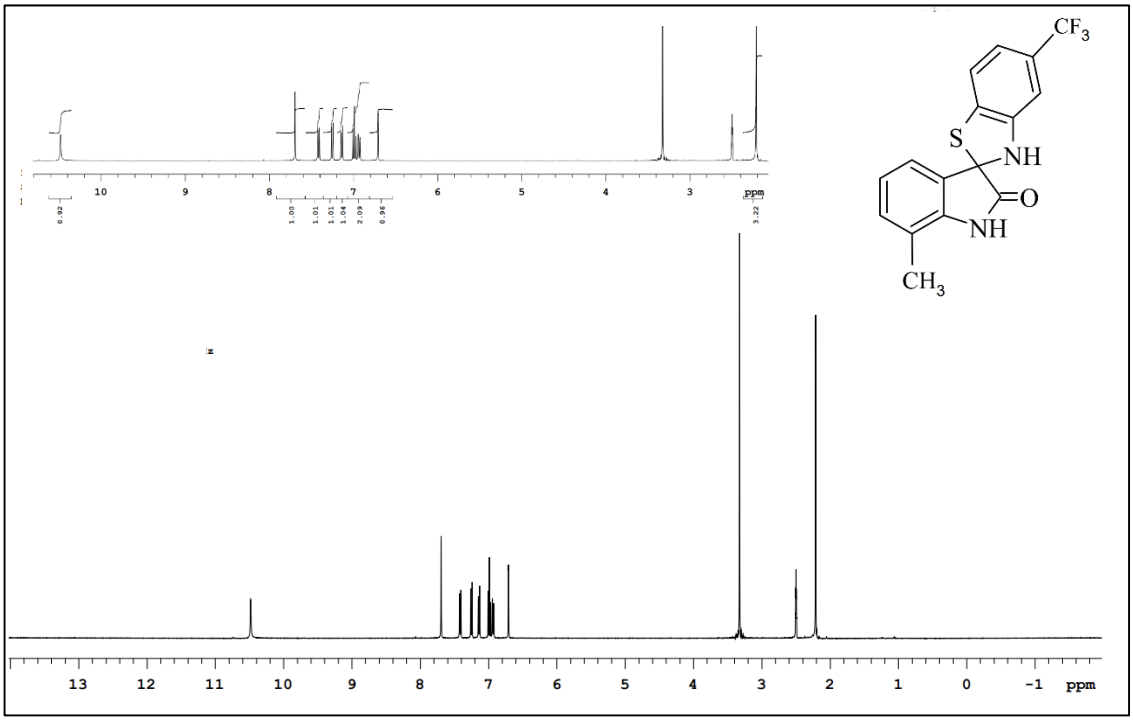
SPEKTRAL BULGULAR

IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 648 (C-S g.b.); 783 (1,2,3-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 813 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 1168 (C-F g.b.); 1269 (C-N g.b.); 1489, 1446, 1627, (Ar. C=C g.b. ve N-H e.b.); 1701 (C=O g.b.); 2950 (Al. C-H g.b.); 3100 (Ar. C-H g.b.); 3288, 3361 (N-H g.b.).

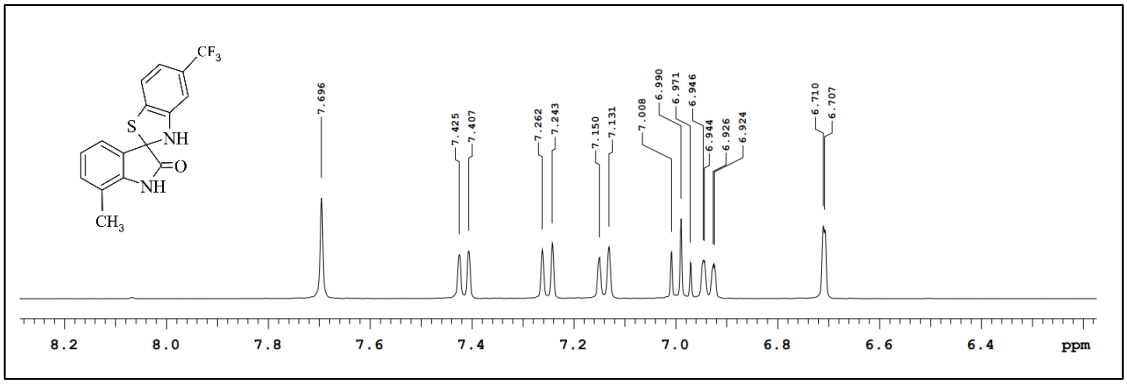


Şekil 4-11: Madde 3c’nin IR spektrumu

^{1}H-NMR (500 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 3,32 (3H, s, CH_3); 6,73 (1H, d, *J*= 2,0 Hz, b.t. C_4-H); 6,93 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, b.t. C_6-H); 6,99 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, ind. C_5-H); 7,14 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, ind. C_6-H); 7,26 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, b.t. C_7-H); 7,41 (1H, d, *J* = 7,2 Hz, ind. C_4-H); 7,60 (1H, s, b.t. N-H); 10,48 (1H, s, ind. N-H).

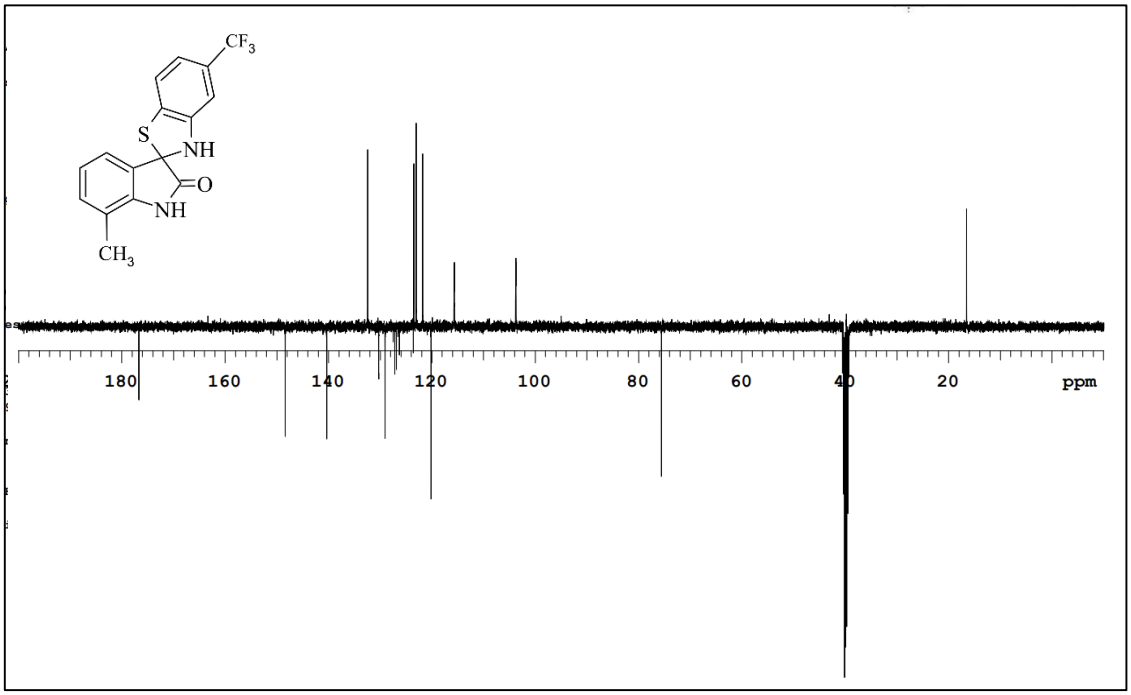


Şekil 4-12: Madde 3c'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-14 ppm)



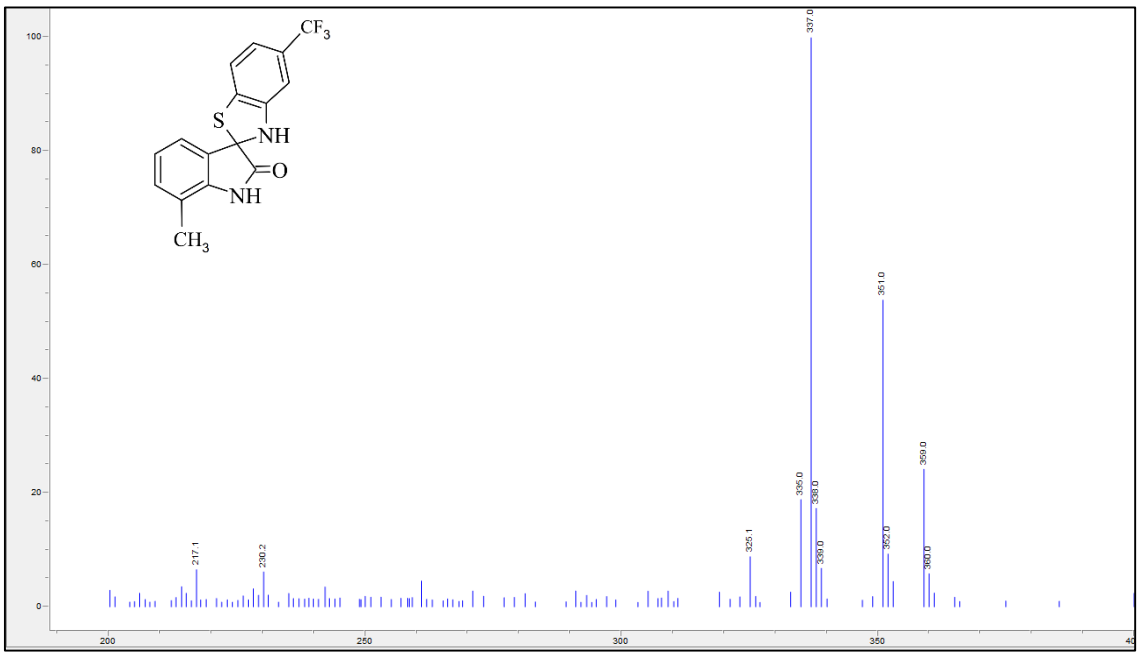
Şekil 4-13: Madde 3c'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6,4-8,2 ppm)

^{13}C-NMR (125 MHz) (DMSO-d$_6$/TMS) δ (ppm): 16,00 (CH_3); 74,60 (spiro C); 103,33 (q, *J*= 3,8 Hz, b.t. C_4); 115,24 (q, *J*= 3,3 Hz, b.t. C_6); 119,74 (ind. C_7); 121,37 (b.t. C_7); 122,62 (ind. C_4); 123,07 (ind. C_5); 124,52 (q, *J*= 271,7 Hz, CF_3); 126,60 (q, *J*= 30,9 Hz, b.t. C_5); 128,64 (ind. C_{3a}); 129,87 (b.t. C_{7a}); 132,00 (ind. C_6); 139,92 (ind. C_{7a}); 147,96 (b.t. C_{3a}); 176,28 (ind. C_2).



Şekil 4-14: Madde 3c'nin ^{13}C-NMR (APT) spektrumu (δ 0-200 ppm)

Kütle Spektrumu LC-MS (ESI+) m/z (%): 359,0 ([M+Na]$^+$, 22), 351,0 (([M+2Li]$^+$, 53); 337,0 ([M+H]$^+$, 100); 338,0 (18); 335,0 (20); 325,1 (8).



Şekil 4-15: Madde 3c'nın LC-MS spektrumu

4.1.4. 7'-Floro-5-(triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3d)

7-Floro-1*H*-indol-2,3-dion (0,41 g, 2,5 mmol) ile 2-amino-4-(triflorometil)-benzentiyol (0,59 g, 2,5 mmol) 3.3.2'de verilen yönteme göre 10 saat ısıtılarak sentezlenir. Açık turuncu renkli ürünün erime noktası 158-161 °C'dir (0,53 g, verim %61).

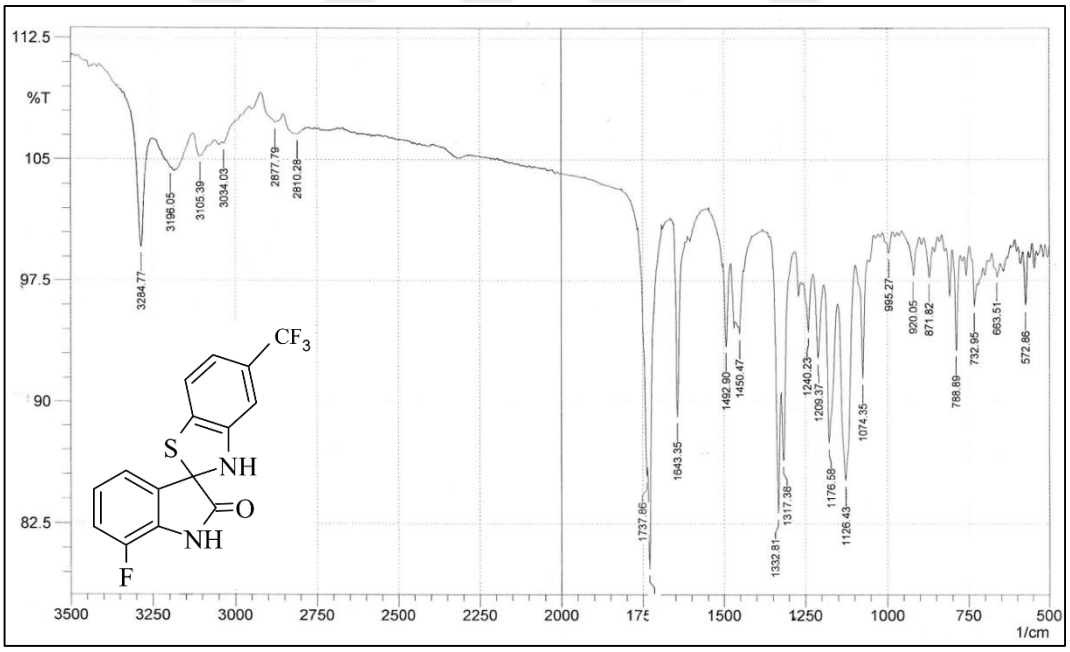
Elementel Analiz: $C_{15}H_8F_4N_2OS.{}^1/_4H_2O$ (MA= 344,80 g/mol)

Hesaplanan C: 52,25 H: 2,48 N: 8,12 S: 8,75

Bulunan C: 52,29 H: 2,48 N: 8,38 S: 9,30

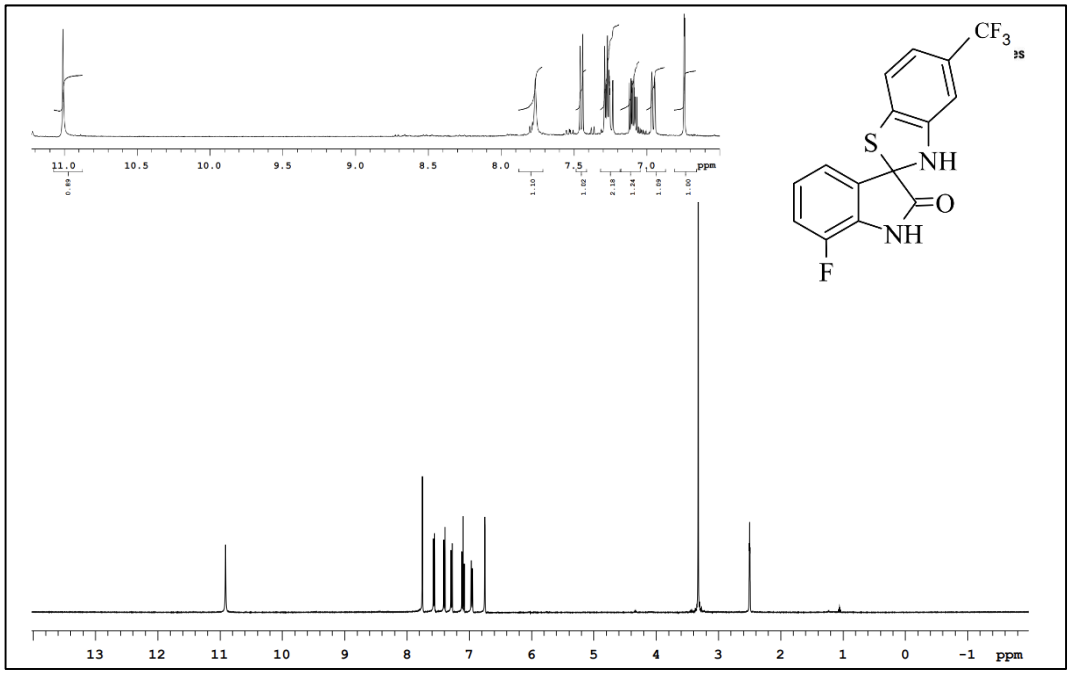
SPEKTRAL BULGULAR

IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 663 (C-S g.b.); 788 (1,2,3-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 812 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 1126 (ind. C-F g.b.); 1176 (b.t. C-F g.b.); 1240 (C-N g.b.); 1492, 1450, 1643 (Ar. C=C g.b. ve N-H e.b.); 1730 (C=O g.b.); 3034 (Ar. C-H g.b.); 3196 ve 3284 (N-H g.b.).

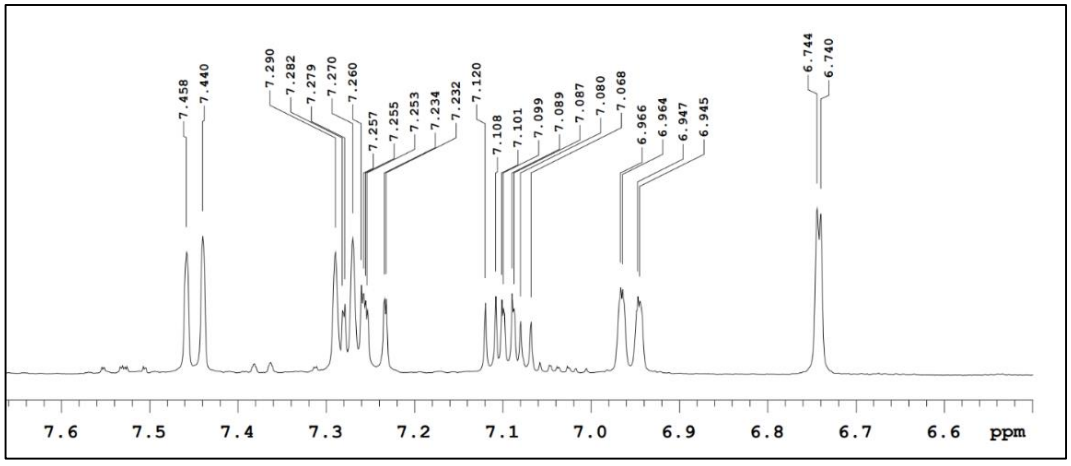


Şekil 4-16: Madde 3d'nin IR spektrumu (cm^{-1})

^{1}H-NMR (500 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 6,74 (1H, d, *J*= 1,6 Hz, b.t. C_4-H); 6,95 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, b.t. C_6-H); 7,08 (1H, td, *J*= 8,0; 7,6; 4,8 Hz, ind. C_5-H); 7,23-7,29 (1H, m, ind. C_6-H); 7,28 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, b.t. C_7-H); 7,44 (1H, d, *J* = 7,60 Hz, ind. C_4-H); 7,76 (1H, s, b.t. N-H); 11,0 (1H, s, ind. N-H).

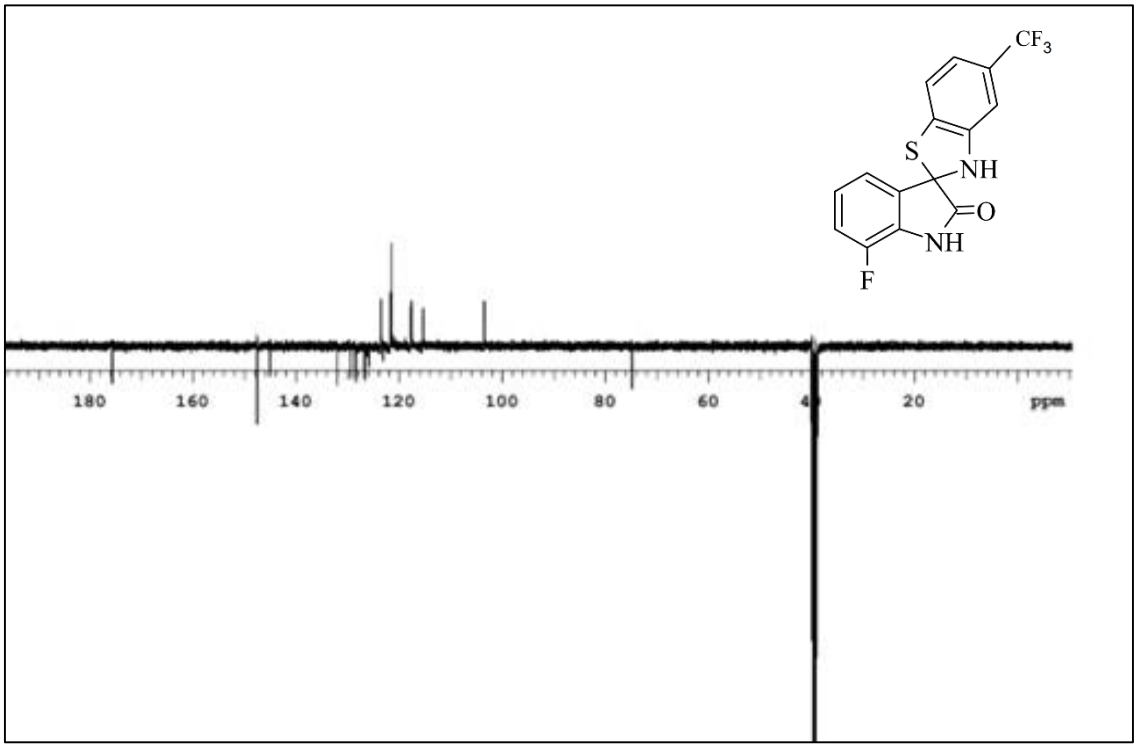


Şekil 4-17: Madde 3d'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-14 ppm)



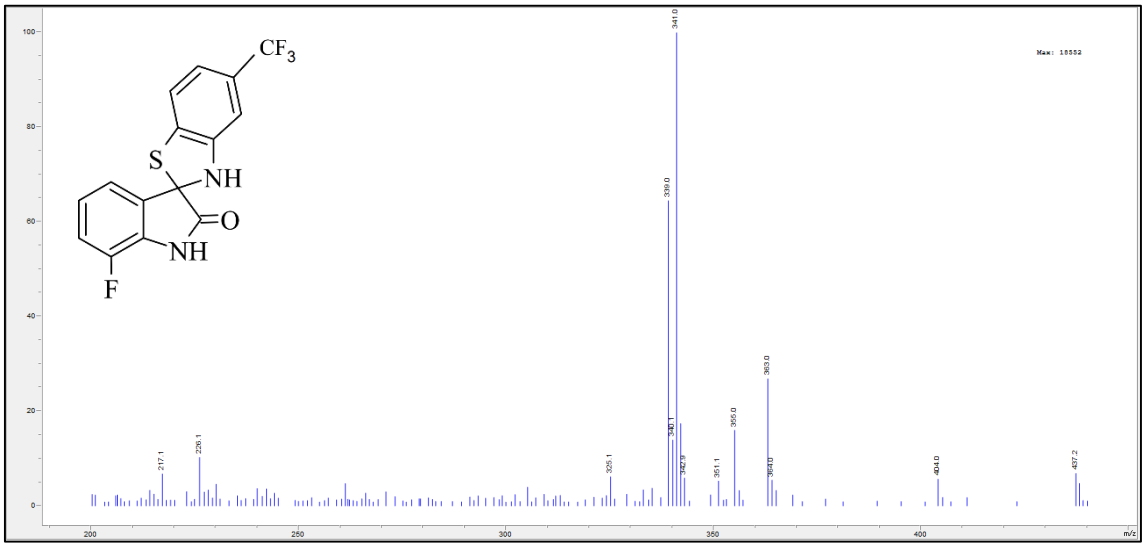
Şekil 4-18: Madde 3d'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6,6-7,6 ppm)

^{13}C-NMR (APT) (125 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 74,82 (spiro C); 103,49 (q, *J*= 3,8 Hz, b.t. C_4); 115,44 (q, *J*= 4,5 Hz, b.t. C_6); 117,71 (d, *J*= 17,0 Hz, ind. C_6); 121,47 (b.t. C_7); 121,75 (d, *J*= 3,2 Hz, ind. C_4); 123,54 (d, *J*= 5,8, ind. C_5); 124,48 (q, *J*= 271,6 Hz, CF_3); 126,74 (q, *J*= 31,6 Hz, b.t. C_5); 129,50 (b.t. C_{7a}); 132,04 (d, *J*= 3,2 Hz, ind. C_{3a}); 128,50 (d, *J*= 13,5 Hz, ind. C_{7a}); 146,32 (d, *J*= 243,8 Hz, ind. C_7); 147,63 (b.t. C_{3a}); 175,69 (ind. C_2).



Şekil 4-19: Madde 3d'in ^{13}C-NMR (APT) spektrumu (δ 0-180 ppm)

Kütle Spektrumu LC-MS (ESI+) m/z (%): 363,0 ($[M+Na]^+$, 28); 355,0 ($[M+2Li]^+$, 18); 341,0 ($[M+H]^+$, 100), 339 (63); 325,1 (6); 226,1 (10).



Şekil 4-20: Madde 3d'nın LC-MS spektrumu

4.1.5. 7’-Kloro-5-(triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3e)

7-kloro-1*H*-indol-2,3-dion (0,46 g, 2,5 mmol) ile 2-amino-4-(triflorometil)-benzentiyol (0,59 g, 2,5 mmol) 3.3.2’de verilen yönteme göre 8 saat ısıtılarak sentezlenir. Sarı-turuncu renkli ürünün erime noktası 201-204 °C’dir (0,62 g, verim %68).

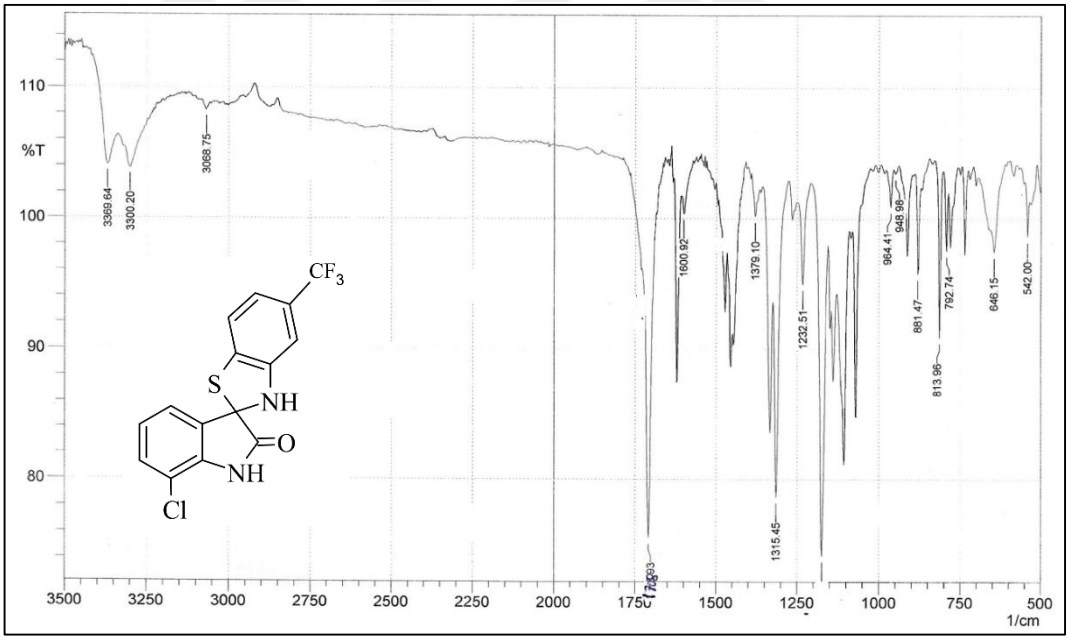
Elementel Analiz: $C_{15}H_8ClF_3N_2OS.{}^1/_2H_2O$ (MA= 365,76 g/mol)

Hesaplanan C: 49,26 H: 2,48 N: 7,65 S: 8,76

Bulunan C: 49,61 H: 2,37 N: 7,81 S: 8,85

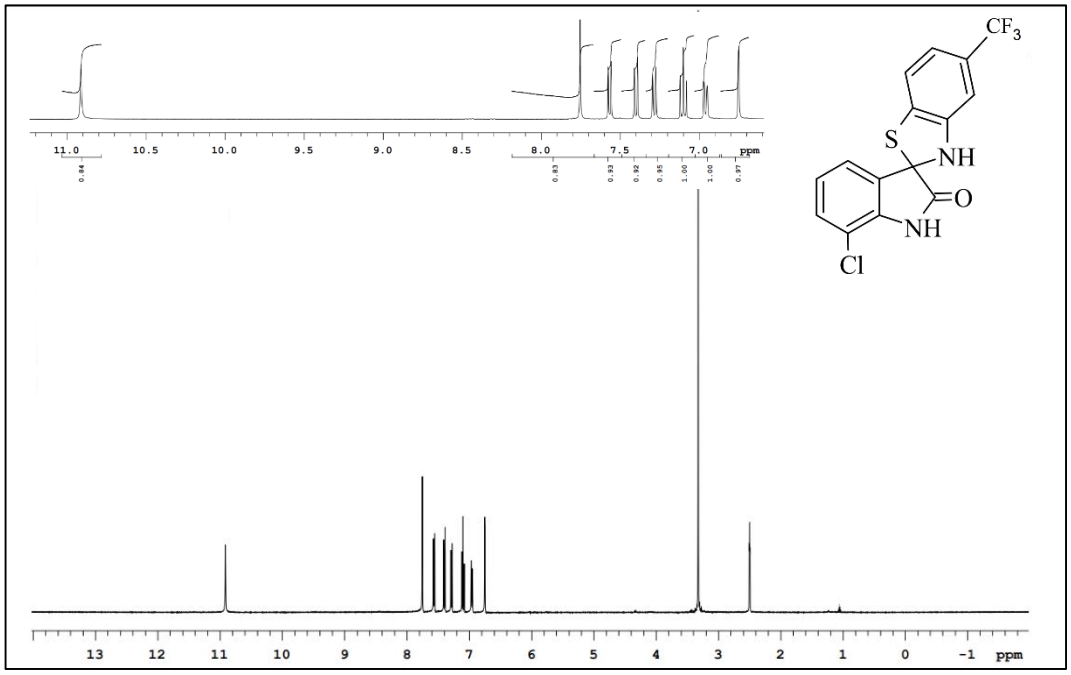
Spektral Bulgular

IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 646 (C-S g.b.); 792 (1,2,3-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 813 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 1078 (C-Cl e.b.); 1165 (C-F g.b.); 1232 (C-N g.b.); 1454, 1446, 1622 (Ar. C=C g.b. ve N-H e.b.); 1708 (C=O g.b.); 3068 (Ar. C-H g.b.); 3300, 3369 (N-H g.b.).

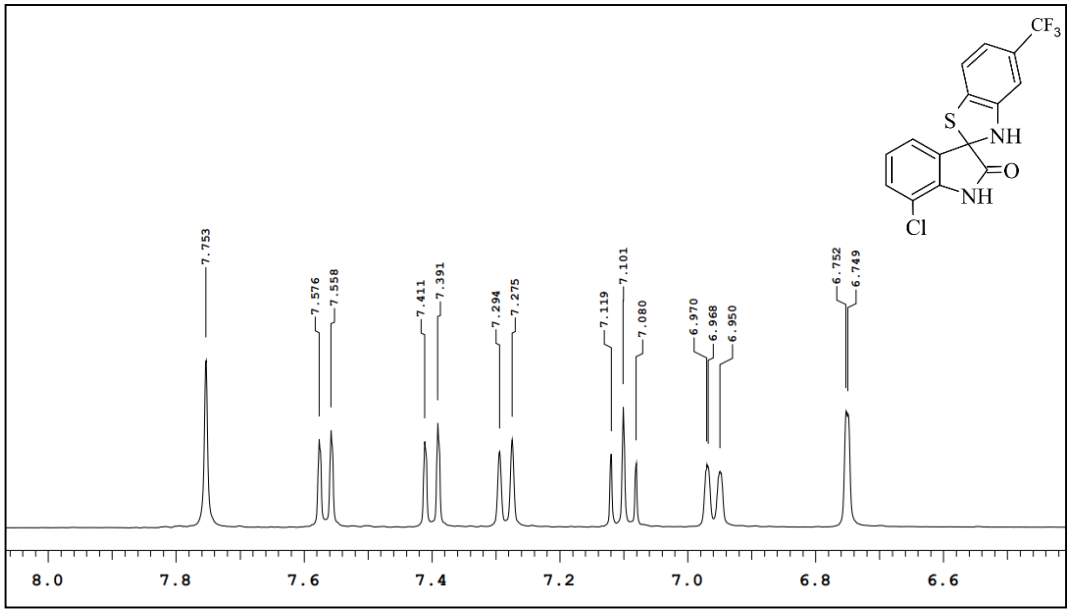


Şekil 4-21: Madde 3e’nin IR spektrumu

^{1}H-NMR (500 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 6,75 (1H, d, *J*= 1,6 Hz, b.t. C_4-H); 6,96 (1H, dd, *J* = 7,6 Hz, b.t. C_6-H); 7,10 (1H, dd, *J*= 8,0; 7,6 Hz, ind.C_5-H); 7,28 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, b.t. C_7-H); 7,40 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, ind. C_6-H); 7,56 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, ind. C_4-H); 7,75 (1H, s, b.t. N-H); 10,91 (1H, s, ind. N-H).

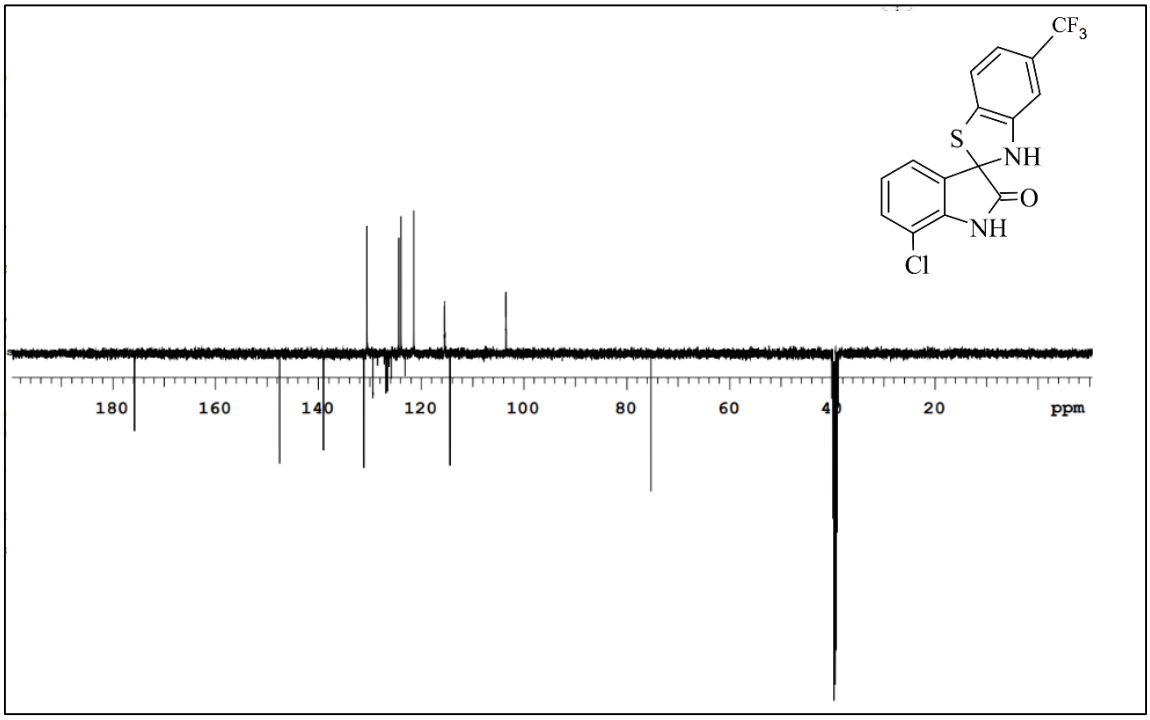


Şekil 4-22: Madde 3e'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-14 ppm)



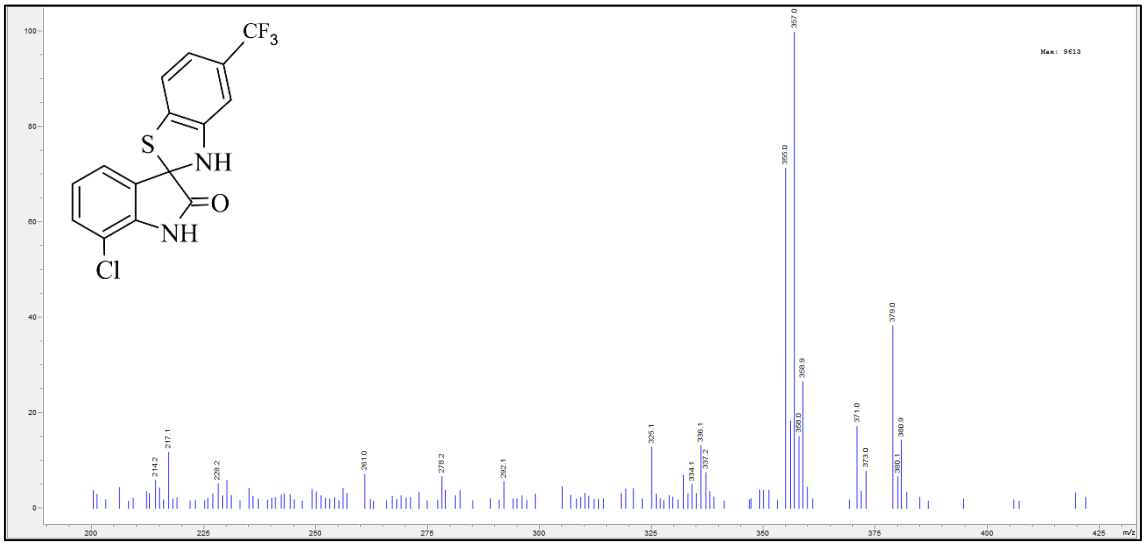
Şekil 4-23: Madde 3e'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6,6-8,0 ppm)

^{13}C-NMR (APT) (125 MHz) (DMSO-d$_6$/TMS) δ (ppm): 75,28 (spiro C); 103,89 (q, *J*= 3,8 Hz, b.t. C_4); 114,40 (ind. $C_{7'}$); 115,42 (q, *J*= 3,9 Hz, b.t. C_6); 121,45 (b.t. C_7); 124,38 (ind. $C_{4'}$); 123,94 (ind. $C_{5'}$); 126,73 (q, *J*= 31,7 Hz, b.t. C_5); 129,46 (ind. $C_{3a'}$); 130,59 (ind. $C_{6'}$); 131,18 (b.t. C_{7a}); 139,03 (ind. $C_{7a'}$); 147,57 (b.t. C_{3a}); 175,82 (ind. $C_{2'}$).



Şekil 4-24: Madde 3e'nin ^{13}C-NMR (APT) spektrumu (δ 0-190 ppm)

Kütle Spektrumu LC-MS (ESI+) m/z (%): 379,0; 380,9 ($[M+Na]^+$; 43, 14), 371,0; 373,0 ($[M+2Li]^+$;18, 7); 357,0; 358,9 ($[M+H]^+$, 100, 28); 355 (75); 336,1 (15); 325,1 (15).



Şekil 4-25: Madde 3e'nın LC-MS spektrumu

4.1.6. 7'-Bromo-5-(triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3f)

7-Bromo-1*H*-indol-2,3-dion (0,58 g, 2,5 mmol) ile 2-amino-4-(triflorometil)-benzentiyol (0,59 g, 2,5 mmol) 3.3.2'de verilen yönteme göre 8 saat ısıtılarak sentezlenir. Sarı-turuncu renkli ürünün erime noktası 206-207°C'dir (0,59 g, verim %59).

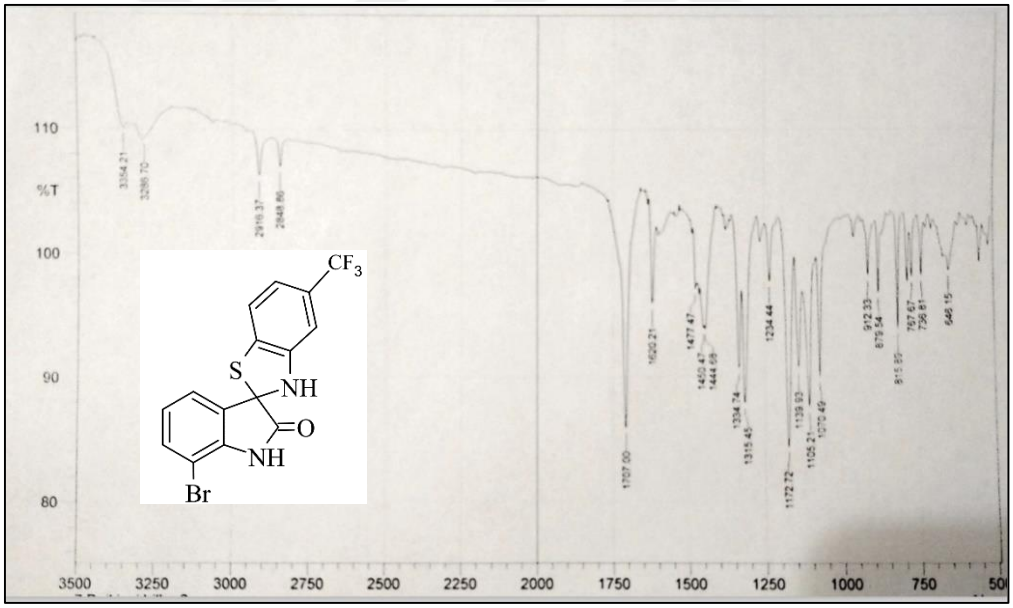
Elementel Analiz: $C_{15}H_8BrF_3N_2OS$ (MA= 401,20 g/mol)

Hesaplanan C: 44,91 H: 2,01 N: 6,98 S: 7,99

Bulunan C: 45,03 H: 2,05 N: 7,25 S: 8,04

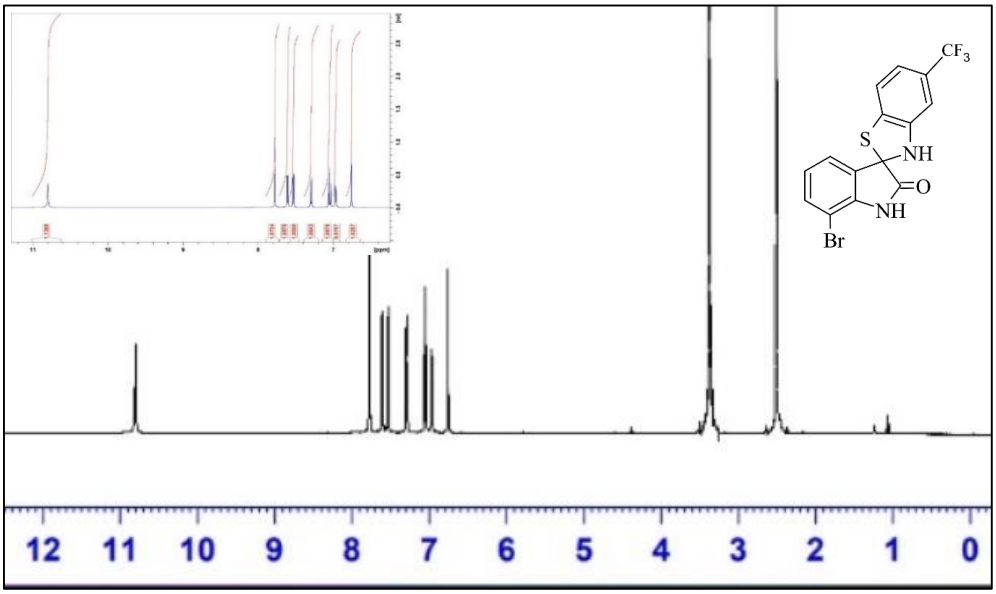
Spektral Bulgular

IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 646 (C-S g.b.); 767 (C-Br e.b.); 788 (1,2,3-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 815 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 1172 (C-F g.b.); 1234 (C-N g.b.); 1450, 1477, 1620 (Ar. C=C g.b. ve N-H e.b.); 1707 (C=O g.b.); 2916 (Ar. C-H g.b.); 3286 ve 3354 (N-H g.b.).

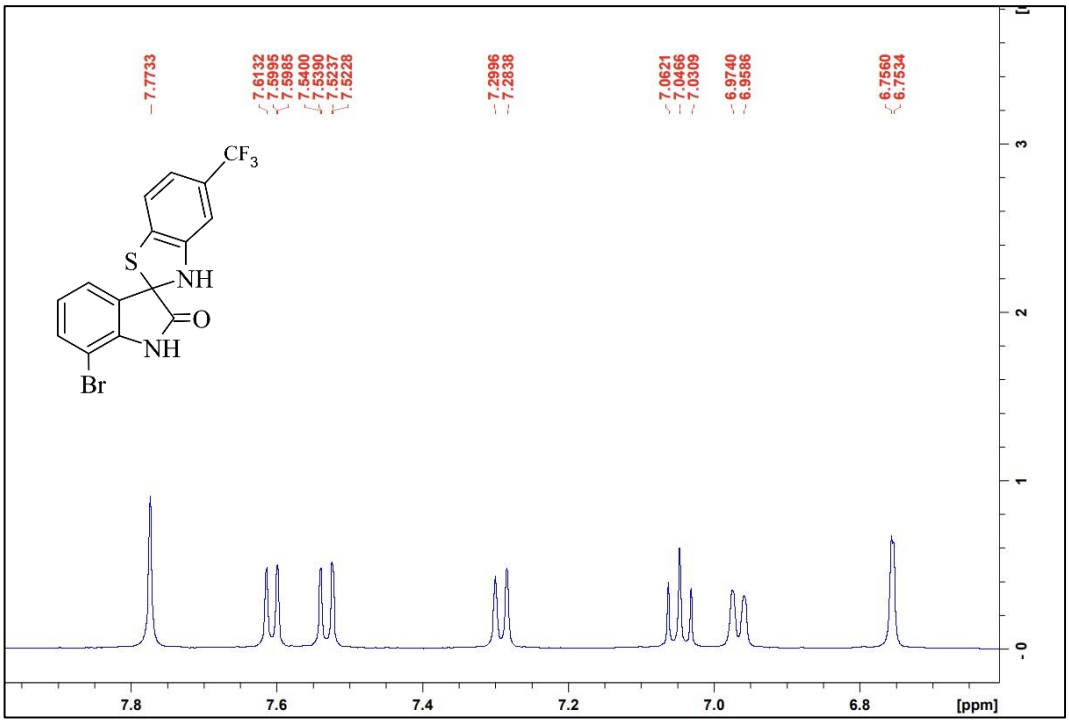


Şekil 4-26: Madde 3f'nin IR spektrumu

^{1}H-NMR (500 MHz) (DMSO-d6/TMS) δ (ppm): 6,75 (1H, d, *J*= 1,3 Hz, b.t. C_4-H); 6,96 (1H, d, *J* = 7,7 Hz, b.t. C_6-H); 7,04 (1H, dd, *J*= 7,7; 7,8 Hz ind. C_5-H); 7,29 (1H, d, *J* = 7,9 Hz, b.t. C_7-H); 7,53 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, ind. C_6-H); 7,60 (1H, d, *J* = 7,1 Hz, ind. C_4-H); 7,77 (1H, s, b.t. N-H); 10,80 (1H, s, ind. N-H).

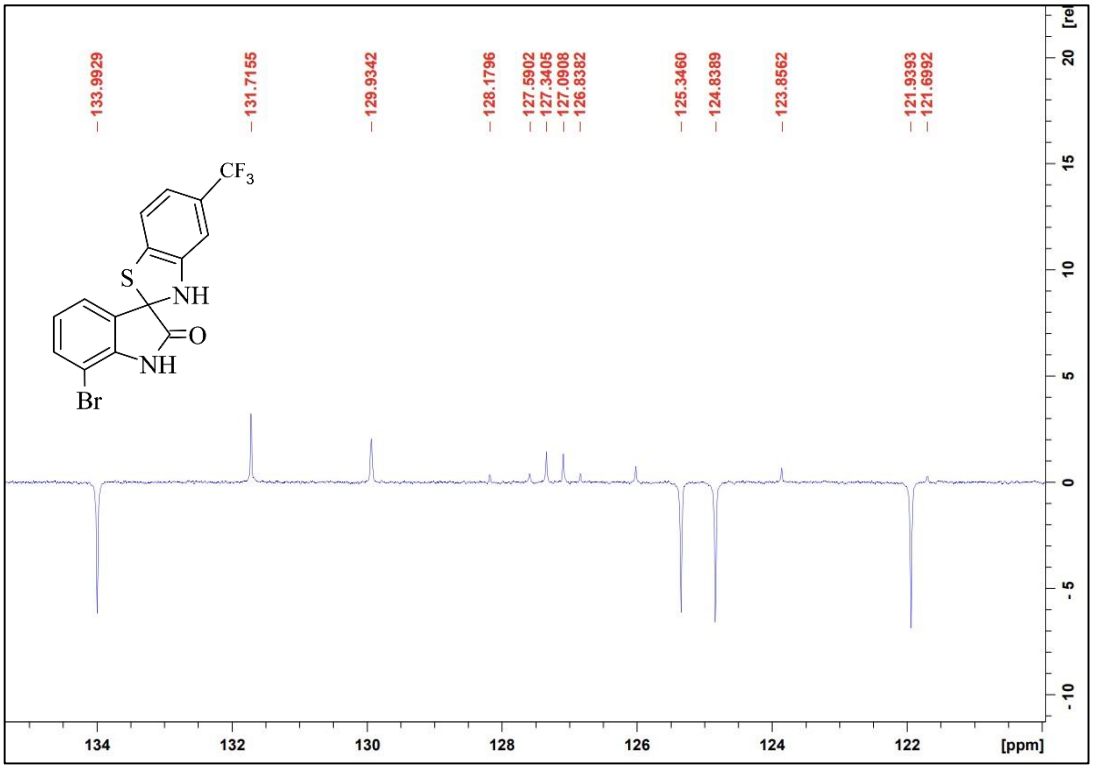


Şekil 4-27: Madde 3f'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-12 ppm)

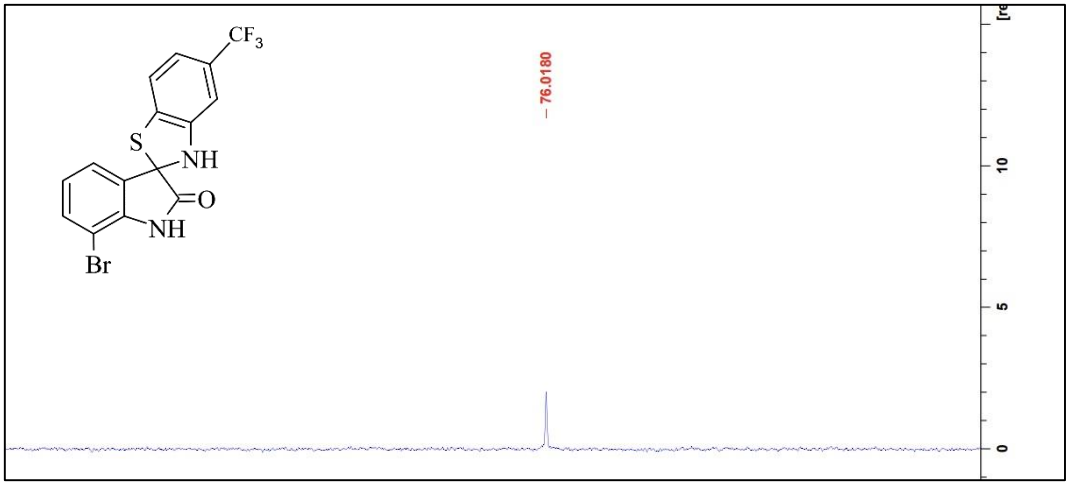


Şekil 4-28: Madde 3f'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6,6-8,0 ppm)

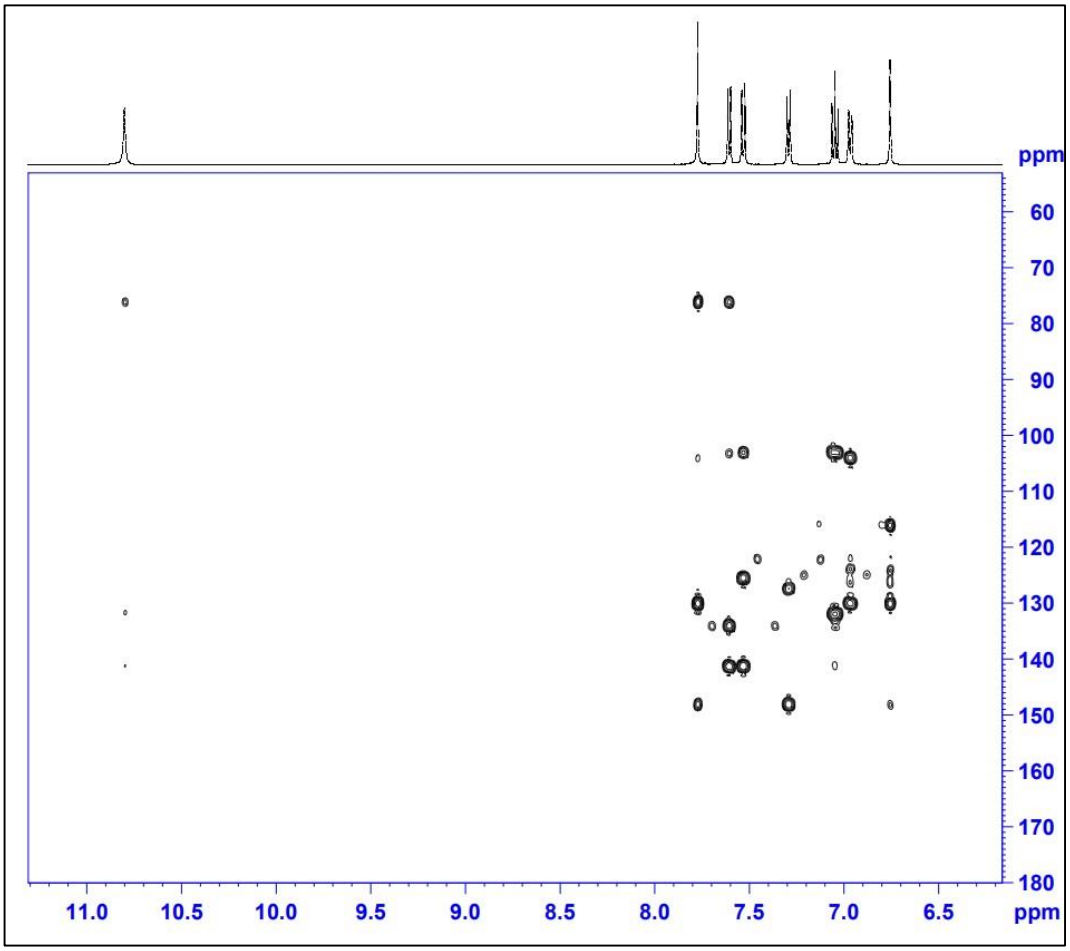
^{13}C-NMR (APT) (125 MHz) (DMSO-d6/TMS) δ (ppm): 76,02 (spiro C); 103,06 (ind. C_7); 103,95 (q, *J*= 3,5 Hz, b.t. C_4); 115,91 (q, *J*= 4,0 Hz, b.t. C_6); 121,94 (b.t. C_7); 124,93 (q, *J*= 271,6 Hz, CF_3); 124,84 (ind. C_4); 125,35 (ind. C_5); 127,21 (q, *J*= 31,4 Hz, b.t. C_5); 129,93 (b.t. C_{7a}); 131,71 (ind. C_{3a}); 133,99 (ind. C_6); 141,19 (ind. $C_{7a'}$); 148,05 (b.t. C_{3a}); 176,26 (ind. C_2).



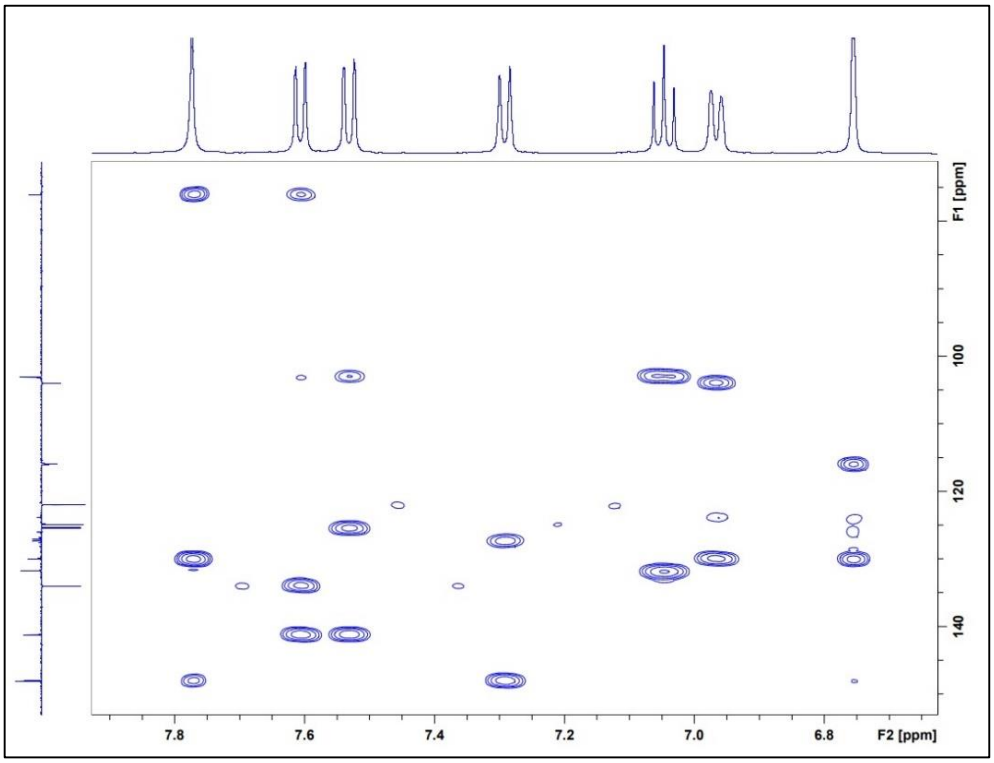
Şekil 4-29: Madde 3f'nin ^{13}C-NMR (APT) spektrumu (δ 120-136 ppm)



Şekil 4-30: Madde 3f'nin ^{13}C-NMR (APT) spektrumu spiro karbon sinyali

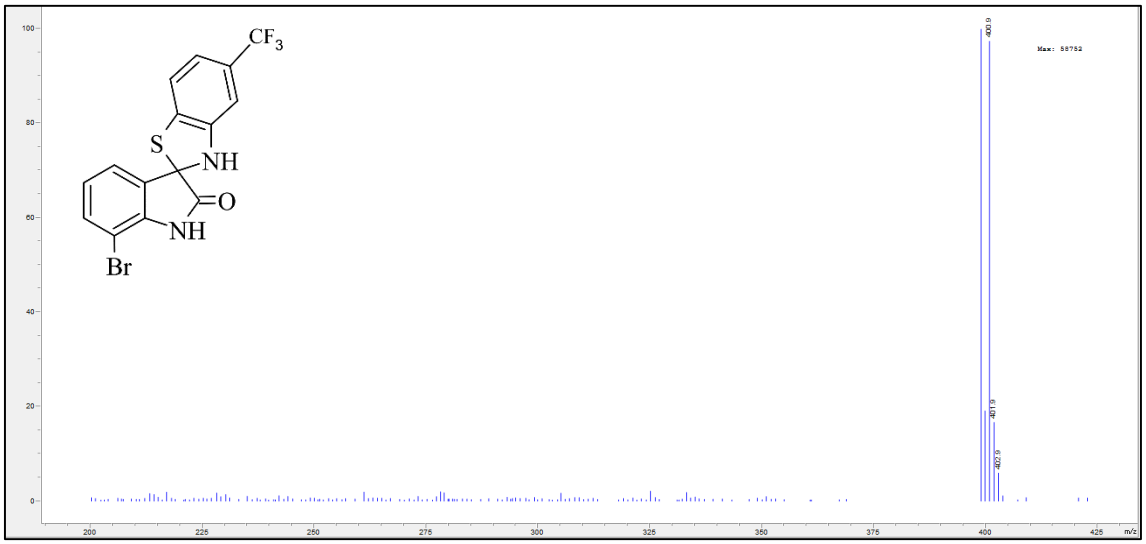


Şekil 4-31: Madde 3f'nin HMBC-2D spektrumu (6,0 – 11,0 ppm)



Şekil 4-32: Madde 3f'nin HMBC-2D spektrumu (6,60 – 8,0 ppm)

Kütle Spektrumu LC-MS (ESI-) m/z (%): 400,9; 403,0 ([M+H]$^+$, 100, 98), 399,9; 401,9 (20, 18).



Şekil 4-33: Madde 3f'nin LC-MS spektrumu

4.1.7. 5'-Kloro-7'-metil-5-(triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3g)

5-Kloro-7-metil-1*H*-indol-2,3-dion (0,49 g, 2,5 mmol) ile 2-amino-4-(triflorometil)benzentiyol (0,59 g, 2,5 mmol) 3.3.2'de verilen yönteme göre 10 saat ısıtılarak sentezlenir. Sarı-turuncu renkli ürünün erime noktası 254-257 °C'dir (0,63 g, verim %68).

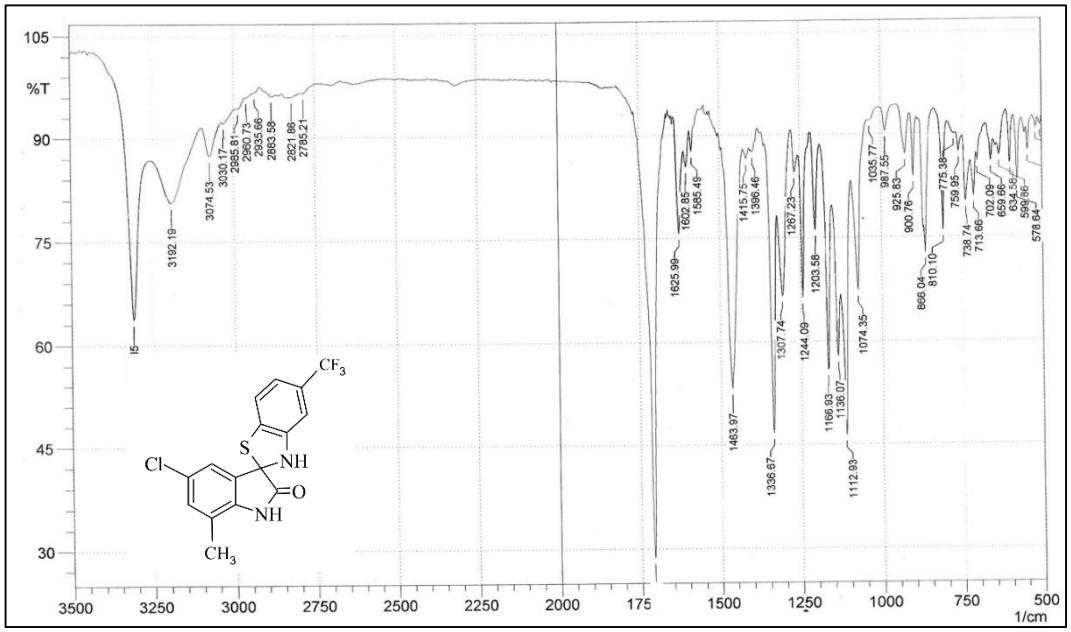
Elementel Analiz: $C_{16}H_{10}ClF_3N_2OS$ (MA= 370,77)

Hesaplanan C: 51,83 H: 2,72 N: 7,56 S: 8,65

Bulunan C: 52,04 H: 2,74 N: 7,68 S: 8,52

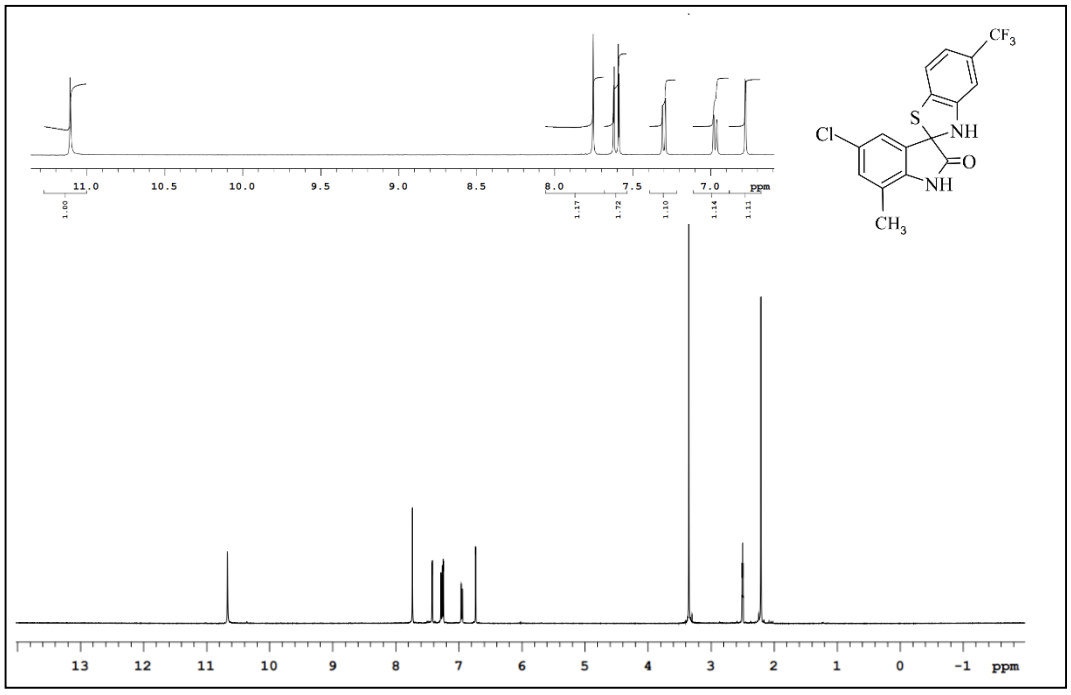
Spektral Bulgular

IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 634 (C-S g.b.); 713, 738 (1,2,3,5-tetrasübstitüe benzen C-H e.b.); 810 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 1074 (C-Cl e.b.); 1166 (C-F g.b.); 1244 (C-N g.b.); 1415, 1463, 1625 (Ar. C=C g.b. ve N-H e.b.); 1710 (C=O g.b.); 2921, 2985 (Al. C-H g.b.); 3074 (Ar. C-H g.b.); 3309 (N-H g.b.).

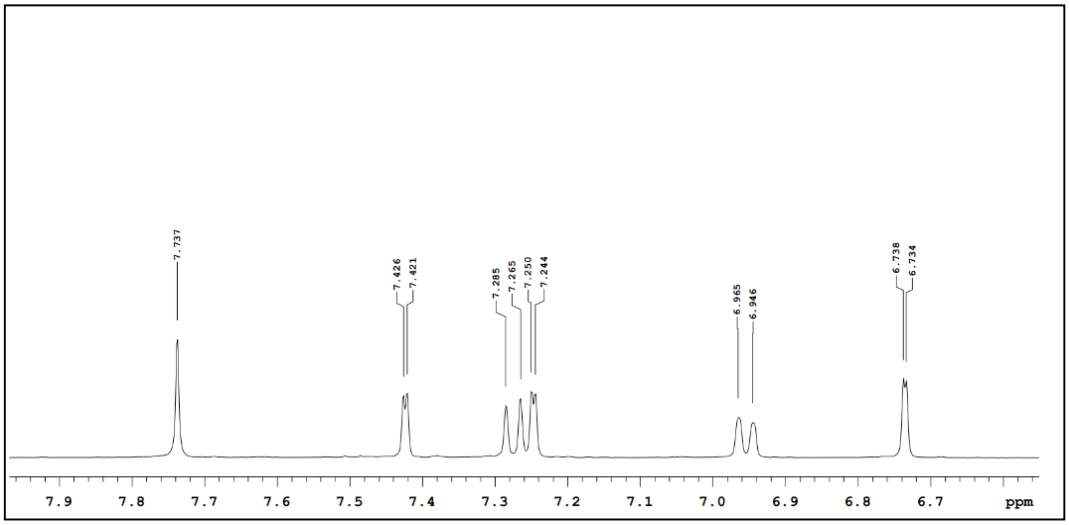


Şekil 4-34: Madde 3g'nin IR spektrumu

^{1}H-NMR (500 MHz) (DMSO-d$_6$/TMS) δ (ppm): 2,21 (3H, s, CH_3); 6,74 (1H, d, *J*= 2,0 Hz, b.t. C_4-H), 6,95 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, b.t. C_6-H); 7,24 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, ind. C_6-H); 7,27 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, b.t. C_7-H); 7,42 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, ind. C_4-H); 7,74 (1H, s, b.t. N-H); 10,67 (1H, s, ind. N-H).

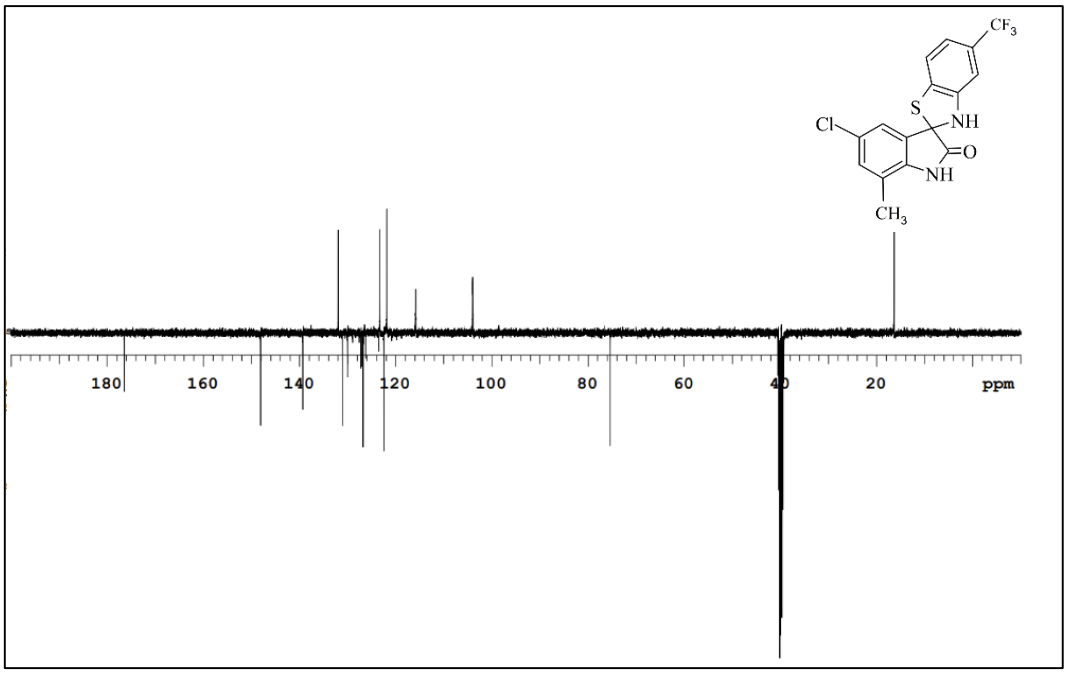


Şekil 4-35: Madde 3g'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-14 ppm)



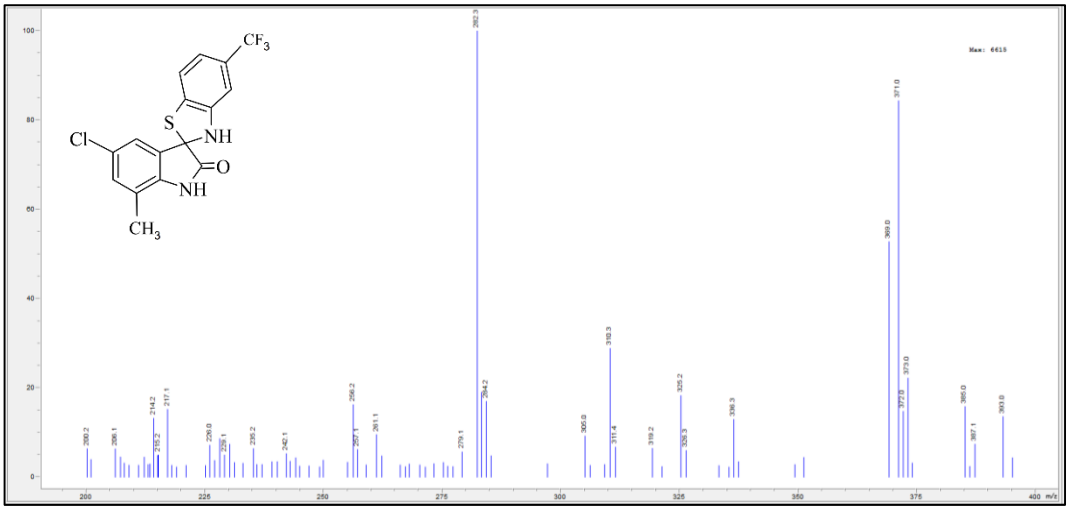
Şekil 4-36: Madde 3g'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6,6-8,0 ppm)

^{13}C-NMR (APT) (125 MHz) (DMSO-d6/TMS) δ (ppm): 16,34 (CH_3); 75,40 (spiro C); 103,99 (q, *J*= 3,8 Hz, b.t. C_4); 115,88 (q, *J*= 3,9 Hz, b.t. C_6); 121,88 (b.t. C_7); 122,48 (ind. C_7); 123,28 (ind. C_4); 124,92 (q, *J*= 271,7 Hz, CF_3); 126,82 (ind. C_5); 127,15 (q, *J*= 31,0 Hz, b.t. C_5); 130,03 (ind. C_{3a}); 131,84 (ind. C_6); 131,11 (b.t. C_{7a}); 139,32 (ind. C_{7a}); 148,11 (b.t. C_{3a}); 176,48 (ind. C_2).



Şekil 4-37: Madde 3g'nin ^{13}C-NMR spektrumu (δ 0-200 ppm)

Kütle Spektrumu LC-MS (ESI+) m/z (%): 393,0; 395,0 ([M+Na]$^+$; 13, 4); 385,0; 387,1 (([M+2Li]$^+$; 15, 6); 371,0; 373,0 ([M+H]$^+$, 88, 25), 369,0 (58); 336,3 (18); 325,2 (20); 310 (32); 282,3; 284,2 (100, 18).



Şekil 4-38: Madde 3g'nın LC-MS spektrumu

4.1.8. 5',7'-Dikloro-5-(triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3h)

5,7-Dikloro-1*H*-indol-2,3-dion (0,55 g, 2,5 mmol) ile 2-amino-4-(triflorometil)-benzentiyol (0,59 g, 2,5 mmol) 3.3.2'de verilen yönteme göre 9,5 saat ısıtılarak sentezlenir. Sarı-turuncu renkli ürünün erime noktası 191-194 °C'dir (0,77 g, verim %95).

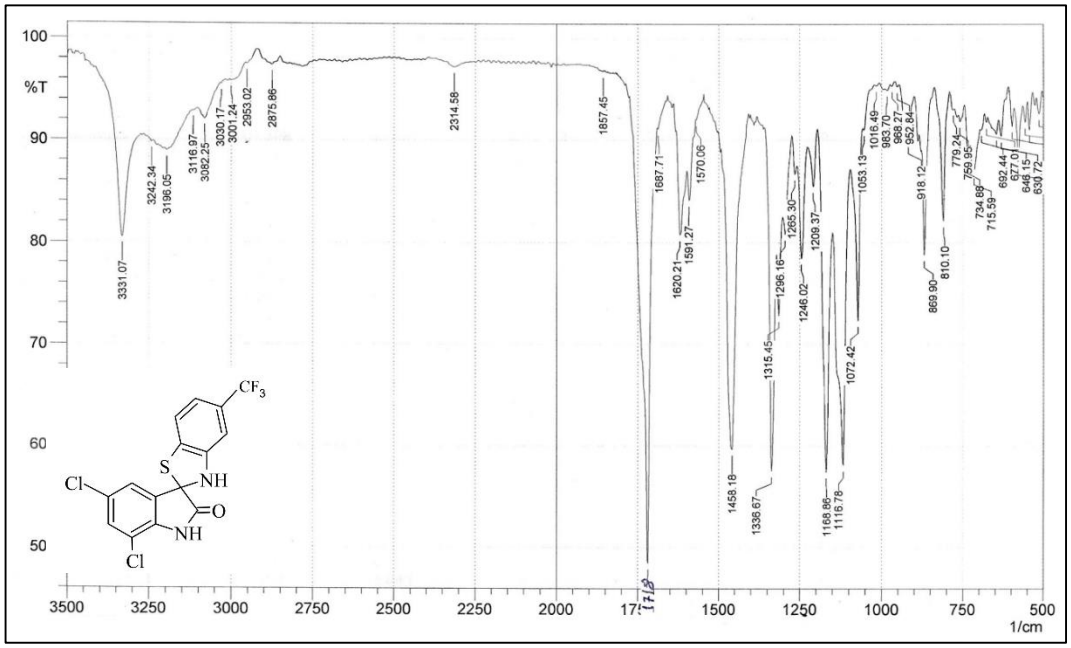
Elementel Analiz: $C_{15}H_7Cl_2F_3N_2OS$ (MA= 391,19)

Hesaplanan C: 46,06 H: 1,80 N: 7,16 S: 8,20

Bulunan C: 46,10 H: 1,85 N: 7,23 S: 8,20

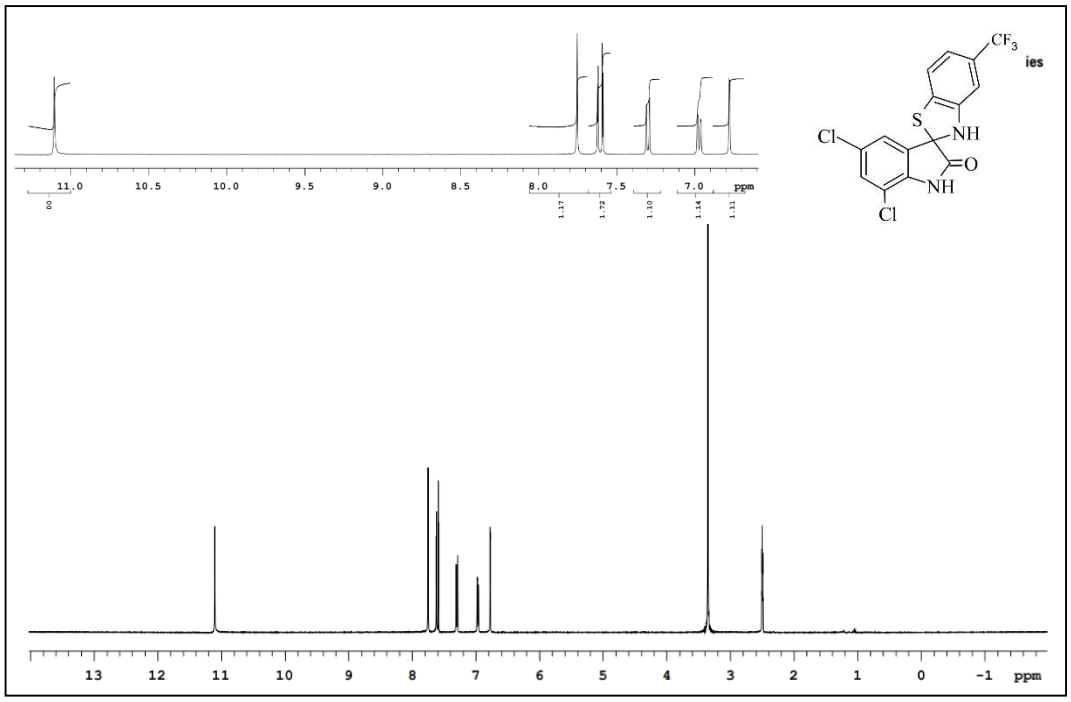
Spektral Bulgular

IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 646 (C-S g.b.); 779 (1,2,3,5-tetrasübstitüe benzen C-H e.b.);. 810 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 1072 (C-Cl e.b.); 1168 (C-F g.b.); 1246 (ind. C-N g.b.); 1458, 1620 (Ar. C=C g.b. ve N-H e.b.); 1718 (C=O g.b.); 3080 (Ar. C-H g.b.); 3331, (N-H g.b.).

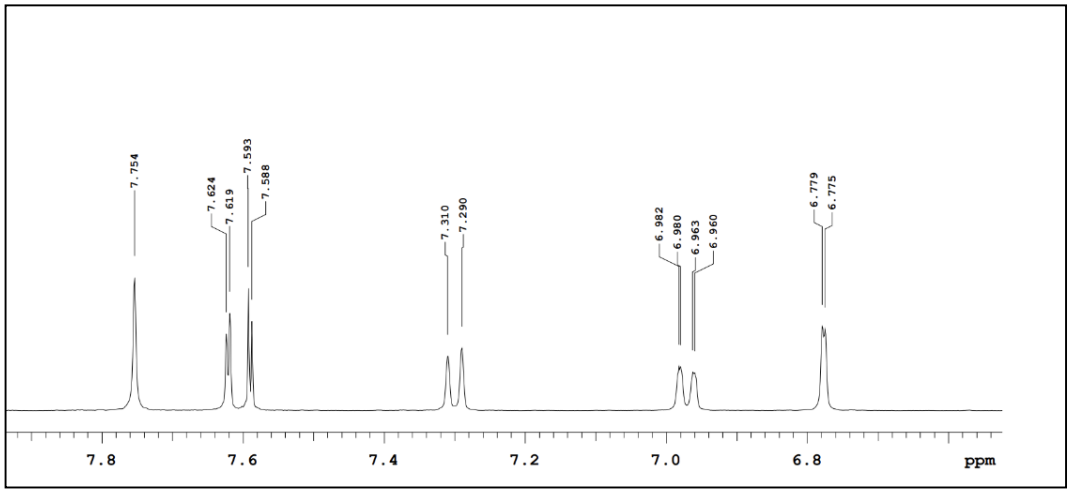


Şekil 4-39: Madde 3h'nin IR spektrumu (cm^{-1})

^{1}H-NMR (500 MHz) (DMSO-d6/TMS) δ (ppm): 6,77 (1H, d, *J*= 1,6 Hz, b.t. C_4-H); 6,97 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, b.t. C_6-H); 7,30 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, b.t. C_7-H); 7,59 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, ind. C_6-H); 7,60 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, ind. C_4-H); 7,75 (1H, s, b.t. N-H); 11,11 (1H, s, ind. N-H).

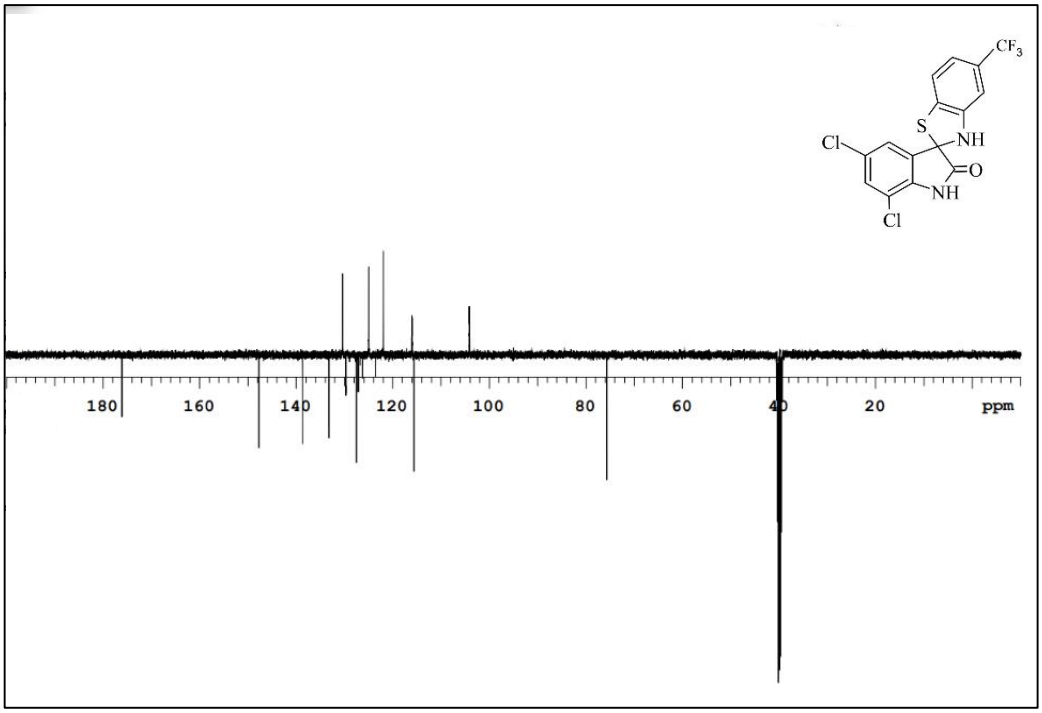


Şekil 4-40: Madde 3h'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 0-14 ppm)



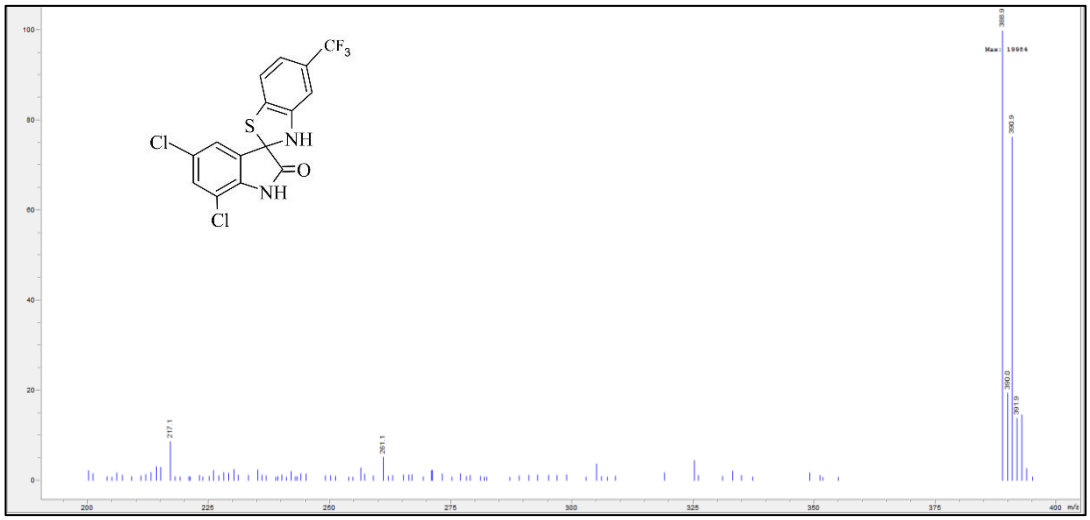
Şekil 4-41: Madde 3h'nin ^{1}H-NMR spektrumu (δ 6,6-8,0 ppm)

^{13}C-NMR (APT) (125 MHz) (DMSO-d6/TMS) δ (ppm): 75,25 (spiro C); 103,70 (q, *J*= 4,0 Hz b.t. C_4); 115,20 (ind. C_7); 115,58 (q, *J*= 3,8 Hz b.t. C_6); 121,51 (b.t. C_7); 124,47 (q, *J*= 271,7 Hz, CF_3); 124,56 (ind. C_4); 126,81 (q, *J*= 31,7 Hz b.t. C_5); 127,09 (C_5); 129,29 (b.t. C_{7a}); 130,01 (ind. C_6); 132,81 (ind. C_{3a}); 138,27 (ind. C_{7a}); 147,32 (b.t. C_{3a}); 175,66 (ind. C_2).



Şekil 4-42: Madde 3h'nin ^{13}C-NMR (APT) spektrumu (δ 0-200 ppm)

Kütle Spektrumu LC-MS (ESI-) m/z (%): 388,9; 390,9; 392,9 ([M-H]$^-$, 100, 78, 13), 390,0; 391,9; 393,9 ([M]$^+$, 18, 13, 4).

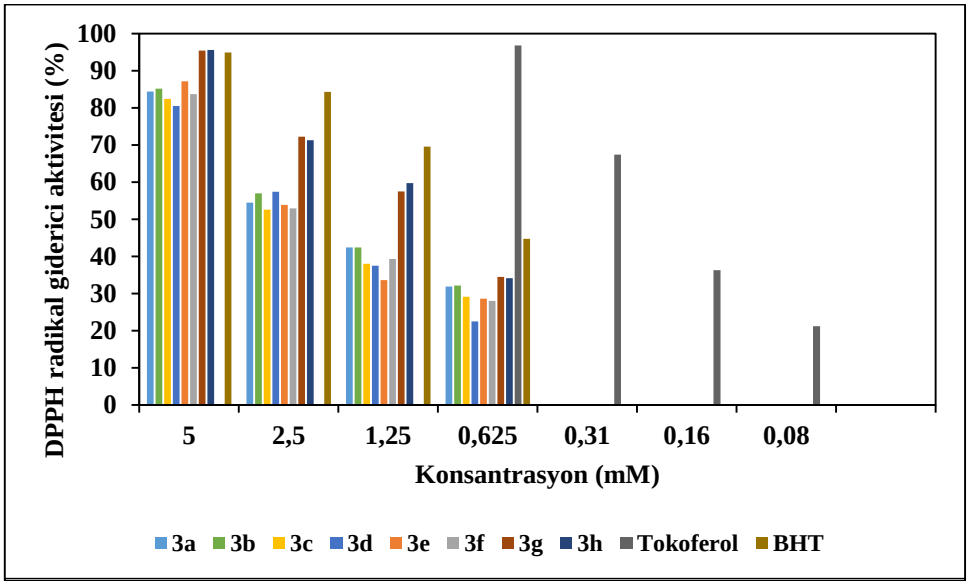


Şekil 4-43: Madde 3h'nın LC-MS spektrumu

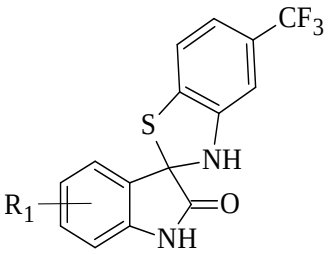
4.2. Sentezlenen Spiroindol Bileşiklerinin Biyolojik Etki Araştırma Bulguları

4.2.1. DPPH radikal giderici aktivitelerinin incelenmesi

3a-h bileşiklerinin DPPH radikali giderici aktiviteye sahip oldukları ve 0,625-5 mM konsantrasyon sınırları arasında maksimum antioksidan aktiviteye ulaştıkları belirlenmiştir. **3a** (%84,43 ± 0,81), **3b** (%85,14 ± 0,43), **3c** (%82,41 ± 0,72), **3d** (%80,52 ± 1,07), **3e** (%87,16 ± 0,41), **3f** (%83,73 ± 2,53), **3g** (%95,44 ± 0,79) ve **3h** (%95,58 ± 1,11) bileşiklerinin DPPH radikali giderici aktiviteleri, BHT'nin 5 mmol/l de (%84,33 ± 0,45) ve α-tokoferolün (%96,61 ± 0,17) 0,625 mmol/l'de gösterdiği aktiviteye yakın olduğu gözlenmiştir. **3a-h** bileşikleri, tokoferol ve BHT'nin doza bağlı DPPH giderici aktiviteleri Şekil 4-44'te gösterilmiştir. Bileşiklerin EC_{50} değerleri (bileşiğin %50 DPPH radikali giderici aktivitesi göstermesi için gerekli olan miktarı) kıyaslandığında en etkili DPPH radikal gidericilerinin aralarında anlamlı bir farklılık bulunmayan ($p > 0.05$) **3g** ve **3h** bileşikleri olduğu, onları aralarında anlamlı bir farklılık bulunmayan ($p > 0.05$) **3a** ve **3b** bileşiklerinin takip ettiği ve en az etkili bileşiklerin ise aralarında anlamlı bir farklılık bulunmayan ($p > 0,05$) **3c-f** bileşikleri olduğu saptanmıştır. Bileşiklerin EC_{50} değerleri kıyaslandığında DPPH giderici aktivitelerinin tokoferol aktivitesinden daha düşük ($p < 0,05$), **3g** ve **3h** bileşiklerinin ise BHT aktivitesine yakın olduğu belirlenmiştir ($p > 0,05$) (Tablo 4-1).



Şekil 4-44: 3a-h bileşikleri, tokoferol ve BHT'nin doza bağlı olarak DPPH giderici aktivite yüzdeleri



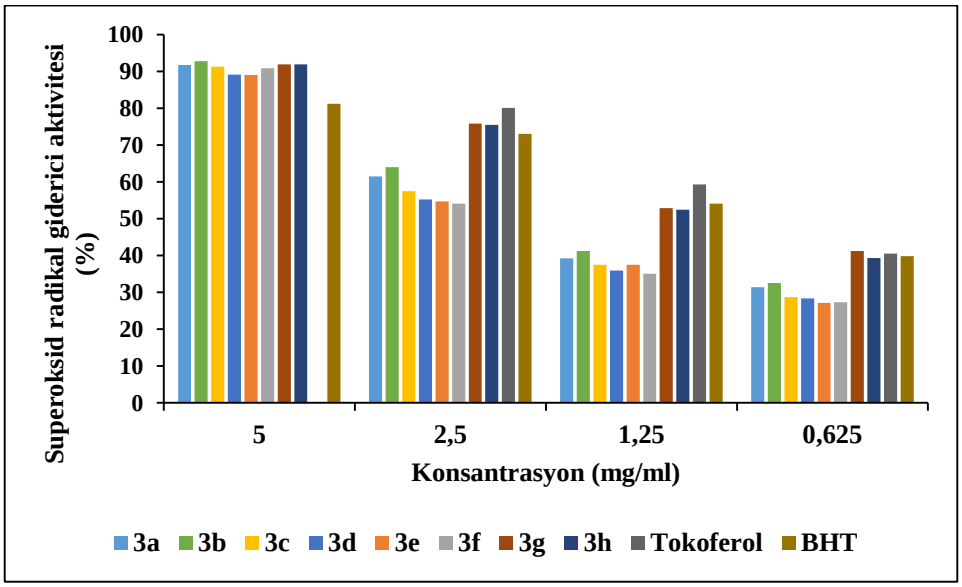
Tablo 4-1: Bileşik 3a-h'nin antioksidan aktiviteleri

Bileşik	R_1	∗EC_{50} (µM/ml)			∗∗TEAC (mM/L Troloks)	∗∗∗FRAP (mM/L Fe^{2+})
		DPPH	Superoksid	ABTS		
3a	5-Br	2,07 ± 0,06^b	1,91 ± 0,02^b	2,04 ± 0,07^b	**1,73 ± 0,02^a**	**3,06 ± 0,06^b**
3b	5-I	1,98 ± 0,04^b	1,78 ± 0,03^b	1,93 ± 0,25^b	**1,80 ± 0,02^a**	**3,08 ± 0,07^b**
3c	7-CH_3	2,29 ± 0,04^a	2,17 ± 0,02^a	2,37 ± 0,11^a	**1,68 ± 0,03^a**	**2,49 ± 0,06^a**
3d	7-F	2,38 ± 0,01^a	2,17 ± 0,03^a	2,34 ± 0,09^a	**1,62 ± 0,01^a**	**2,40 ± 0,09^a**
3e	7-Cl	2,28 ± 0,02^a	2,18 ± 0,07^a	2,23 ± 0,19^a	**1,63 ± 0,01^a**	**2,53 ± 0,09^a**
3f	7-Br	2,26 ± 0,09^a	2,21 ± 0,01^a	2,35 ± 0,07^a	**1,67 ± 0,02^a**	**2,52 ± 0,04^a**
3g	5-Cl-7-CH_3	**1,16 ± 0,06^c**	**1,09 ± 0,02^c**	**1,04 ± 0,10^c**	**1,90 ± 0,04^b**	**3,03 ± 0,02^b**
3h	5,7-diCl	**1,14 ± 0,02^c**	**1,15 ± 0,03^c**	**1,01 ± 0,08^c**	**1,94 ± 0,01^b**	**3,02 ± 0,09^b**
BHT		1,20 ± 0,02^c	1,18 ± 0,03^d	1,28 ± 0,03^d	1,73 ± 0,02^a	2,59 ± 0,04^a
α-Tokoferol		0,17 ± 0,01^d	0,49 ± 0,04^e	0,61 ± 0,01^e	2,01 ± 0,01^c	3,99 ± 0,08^c

∗EC_{50} değerler %50 DPPH, superoksid anyon ve ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi göstermesi için gerekli olan antioksidan miktarı olarak ifade edildi.
∗∗TEAC değerleri mM/L Troloks ekivalanı olarak ifade edildi.
∗∗∗FRAP değeri mM/L Fe (II) iyonları ekivalanı olarak ifade edildi.
Bileşiklerin ve BHT'nin 5 mM, α-tokoferolün ise 2,5 µM konsantrasyonundaki TEAC ve FRAP değerleri gösterildi. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. Anlamlık sınırı olarak $p < 0.05$ kabul edildi. Ayni sütün içindeki farklı harfler verilerin anlamlı olarak farklı olduklarını göstermektedir.

4.2.2. Süperoksit Anyon Radikali Giderici Aktivitesinin İncelenmesi

3a-h bileşiklerinin nitroblue tetrazolyum (NBT) indirgeme hızını doza-bağımlı olarak inhibe ettikleri bulunmuştur. 5 mM'de maksimum inhibitör etkiye ulaşan **3a** (%91,80 ± 0,33), **3b** (%92,79 ± 0,21), **3c** (%91,3 ± 0,16), **3d** (%89,19 ± 0,32), **3e** (%89,06 ± 1,71), **3f** (%90,87 ± 0,37), **3g** (%91,90 ± 0,22) ve **3h** (%91,91 ± 0,65) bileşiklerin süperoksit radikali giderici aktivitesi BHT'nin 5 mmol/l de (%81,21 ± 1,02) ve α-tokoferolün (%80,07 ± 1,85) 2,5 mmol/l'de gösterdiği aktiviteye yakın olduğu gözlenmiştir. **3a-h** bileşikleri, tokoferol ve BHT'nin doza bağlı süperoksit radikali giderici aktiviteleri Şekil 4-45'te gösterilmiştir**.**

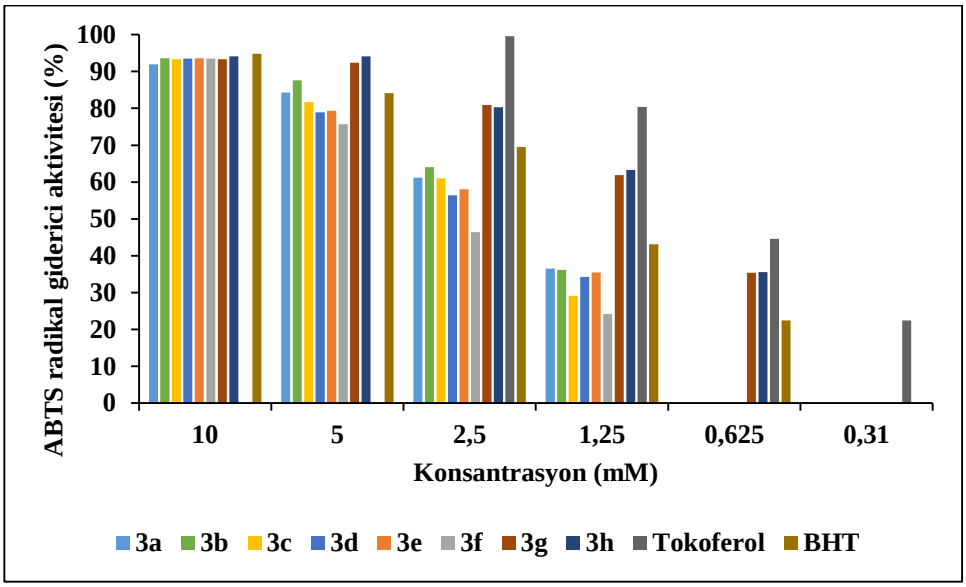


Şekil 4-45: 3a-h bileşikleri, tokoferol ve BHT'nin doza bağlı süperoksit radikali giderici aktivite yüzdeleri

Bileşiklerin EC_{50} değerleri (bileşiğin %50 süperoksit radikali giderici aktivitesi göstermesi için gerekli olan miktarı) kıyaslandığında en etkili süperoksit radikal gidericilerinin aralarında anlamlı bir farklılık bulunmayan ve BHT kadar etkin süperoksit radikal giderici olan ($p > 0,05$) **3g** ve **3h** bileşikleri olduğu, onları aralarında anlamlı bir farklılık bulunmayan ($p > 0,05$), **3a** ve **3b** bileşiklerinin takip ettiği, en az etkili bileşiklerin ise aralarında anlamlı bir farklılık bulunmayan ($p > 0,05$) **3c-f** bileşikleri olduğu saptanmıştır. EC_{50} değerleri kıyaslandığında bileşiklerin süperoksit radikal giderici aktivitelerinin α-tokoferol aktivitesinden daha düşük ($p < 0,05$) olduğu belirlenmiştir (Tablo 4-1).

4.2.3. Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasitesinin (TEAC Deneyi) İncelenmesi

3a-h bileşiklerinin ABTS radikali giderici aktivitesine sahip oldukları, 0,625-10 mM sınırları arasında maksimum antioksidan aktiviteye ulaştıkları belirlenmiştir. Aralarında anlamlı farklılık ($p > 0,05$) bulunmayan **3g** (%92,41 ± 2,03) ve **3h** (%94,10 ± 0,35) bileşikleri 5 mM'de, **3a** (%91,98 ± 0,12) ve **3b** (%93,58 ± 0,68), **3c** (%93,38 ± 0,90), **3d** (%93,56 ± 0,44), **3e** (%93,58 ± 0,84) ve **3f** (%93,35 ± 0,25) bileşikleri ise 10 mM konsantrasyonda etkili bulunmuştur. Bileşiklerin ABTS radikali giderici aktivitelerinin BHT' nin 10 mmol/l de (%94,93 ± 0,45) ve α-tokoferolün 2,5 mM'de (%99,61 ± 0,17) gösterdiği aktiviteye yakın oldukları gözlenmiştir. **3a-h** bileşikleri, tokoferol ve BHT'nin doza bağlı ABTS giderici aktiviteleri Şekil 4-46'da gösterilmiştir.

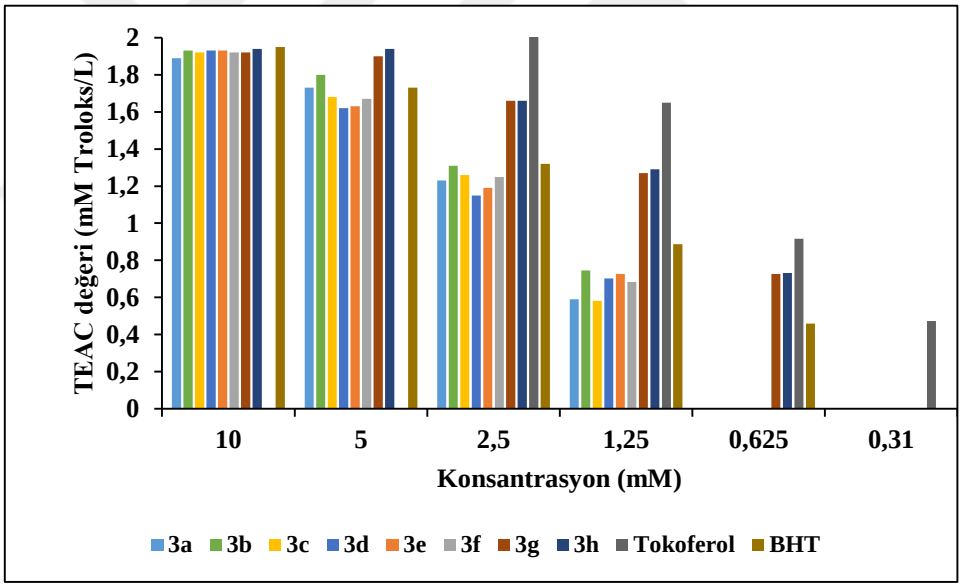


Şekil 4-46: 3a-h bileşikleri, tokoferol ve BHT'nin doza bağlı ABTS radikal katyonu giderici aktivite yüzdeleri

Bileşiklerin EC_{50} değerleri (bileşiğin %50 ABTS radikali giderici aktivitesi göstermesi için gerekli olan miktarı) kıyaslandığında en etkili ABTS radikal gidericilerinin aralarında anlamlı bir fark bulunmayan ($p>0,05$) ve BHT kadar etkin oldukları gözlenen **3g** ve **3h** bileşikleri olduğu, onları aralarında anlamlı bir farklılık bulunmayan ($p>0,05$) **3a** ve **3b** bileşiklerinin takip ettiği, en az etkili bileşiklerin ise aralarında anlamlı bir farklılık bulunmayan ($p>0,05$) **3c-f** bileşikleri olduğu saptanmıştır. Bileşiklerin ve α-tokoferol'ün EC_{50} değerleri kıyaslandığında **3a-h** bileşiklerinin ABTS

giderici aktivitelerinin α-tokoferolün aktivitesinden daha düşük ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir (Tablo 4-1).

Bileşiklerin antioksidan kapasitesi, TEAC değeri (Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasite) olarak değerlendirildiğinde, 5 mM'de aralarında anlamlı bir farklılık ($p>0,05$) bulunmayan **3a-f** bileşiklerinin TEAC değeri, BHT'nin aynı konsantrasyondaki TEAC değerine yakın, α-tokoferolün TEAC değerinden daha düşük olduğu ($p<0,05$) saptanmıştır. 5 mM'de en yüksek değeri, aralarında anlamlı bir fark bulunmayan **3g** ve **3h** bileşiklerinin gösterdiği saptanmıştır. 10 mM'de **3a** (1,89 ± 0,01 mM), **3b** (1,93 ± 0,01), **3c** (1,92 ± 0,01 mM), **3d** (1,93 ± 0,01 mM), **3e** (1,93 ± 0,01 mM), **3f** (1,92 ± 0,01 mM) bileşiklerin, 5 mM'de ise **3g** ve **3h** bileşiklerinin gösterdikleri TEAC değeri, α-tokoferolün 2,5 mM de gösterdiği TEAC değerine yakın olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$). **3a-h** bileşikleri, tokoferol ve BHT'nin 0,625-10 mM konsantrasyon sınırları arasında doza bağlı olarak TEAC değerleri Şekil 4-47'de gösterilmiştir.

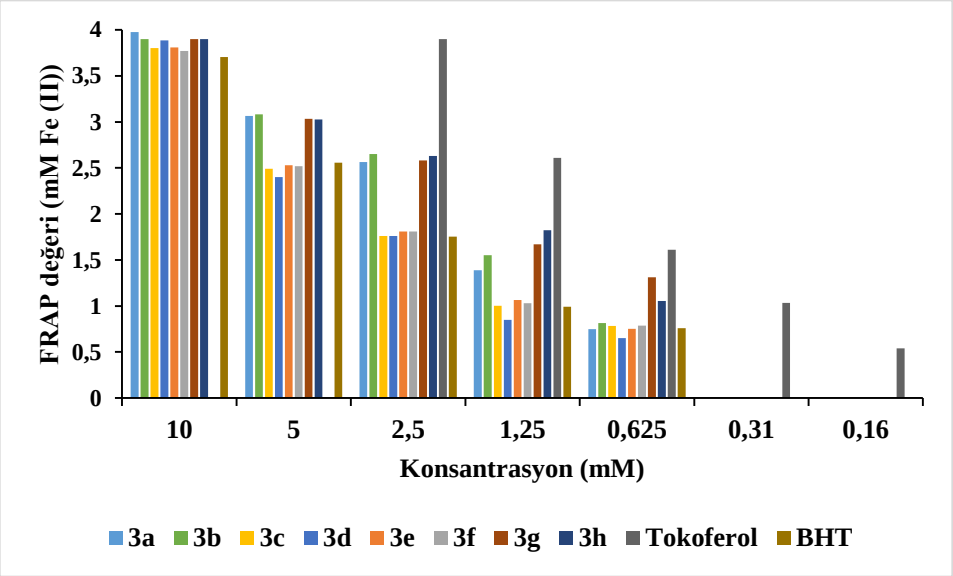


Şekil 4-47: 3a-h bileşikleri, tokoferol ve BHT'nin doza bağlı TEAC değerleri

4.2.4. Ferri İyonu Redükleyici Gücü

5 mM'de incelenen bileşiklerden aralarında anlamlı bir fark bulunmayan ($p>0,05$) **3a**, **3b**, **3h** ve **3g** bileşikleri en yüksek Fe^{3+}'ü Fe^{2+}'ye indirgeyici gücü gösterirken, onları aralarında anlamlı bir fark bulunmayan ($p>0,05$) **3c-f** bileşikleri takip etmiştir. 5 mM konsantrasyonda **3a**, **3b**, **3h** ve **3g** bileşiklerinin gösterdikleri indirgeme gücünün, BHT'nin aynı konsantrasyonda gösterdiği indirgeme gücünden daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). 10 mM'de **3a** (3,97 ± 0,01 mM), **3b** (3,90 ± 0,01 mM),

3c (3,80 ± 0,05 mM), **3d** (3,88 ± 0,15 mM), **3e** (3,81 ± 0,01 mM), **3f** (3,80 ± 0,04 mM), **3g** (3,90 ± 0,01 mM) ve **3h** (3,90 ± 0,08 mM) bileşiklerin gösterdikleri redükleyici gücün, α-tokoferolün (3,75 ± 0,05 mM) 2,5 mM/ml de gösterdiği redükleyici güce yakın olduğu gözlenmiştir ($p > 0,05$). **3a-h** bileşikleri, tokoferol ve BHT'nin 0,625-10 mM konsantrasyon sınırları arasında farklı konsantrasyonlardaki doza bağlı olarak redükleyici güçleri Şekil 4-48'de gösterilmiştir.



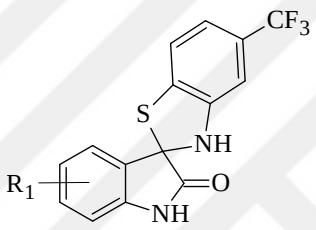
Şekil 4-48: 3a-h bileşiklerinin, BHT ve tokoferol'ün doza bağlı FRAP değerleri

4.2.5. Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etki Tayini (Anti-Lipid Peroksidasyon Aktivitesinin Belirlenmesi)

3a-h bileşiklerinin lipit peroksidasyonunu inhibe etme kapasitelerinin (anti-lipit peroksidasyon aktivitesinin) belirlenmesinde Patro ve ark. (2002) tarafından geliştirilen ve Hamad ve ark. (2010) tarafından modifiye edilen yöntem uygulanmıştır. Bu testte bileşiklerin, soya fosfatidilkolininden hazırlanan lipozomlardan oluşan suni lipit sisteminin $FeCl_2$ ve askorbik asit ile inkübasyonu sonucunda oluşan peroksit radikallerini giderme kapasitesi ölçülmüştür. Tablo 4-2'de görüldüğü gibi **3e**, **3f** ve **3h** bileşiklerinin 5 mM konsantrasyonda lipid peroksidasyonunu inhibe etme % kapasiteleri sırasıyla 53,09 ± 2,97, 51,49 ± 8,28 ve 48,21 ± 10,67'dir ve bu değerler standart olarak kullanılan α-tokoferolün 5 mM konsantrasyondaki % kapasitesinden (46,93 ± 3,43) daha yüksektir. Bileşik **3a-d** ve **3g**'nin lipid peroksidasyonunu inhibe etme % kapasiteleri 45,81 ± 4,33-35,07 ± 2,15 aralığında belirlenmiştir. Bu tayinde lipozom peroksidasyonu üzerine etkili en güçlü inhibitör maddenin **3e** olduğu saptanmıştır.

4.2.6. CUPRAC Testi: Kuprik (Cu^{2+}) İyonunu İndirgeme Kapasitesinin Belirlenmesi

3a-h bileşiklerinin kuprik (Cu^{2+}) iyonunu indirgeme kapasitesi Apak ve ark. (2008) tarafından geliştirilmiş CUPRAC yöntemi ile belirlenmiştir. Yöntem, reaktif içindeki bakır(II)-neokuproin [Cu(II)-NC] kompleksinin ortamdaki antioksidanlar ile reaksiyona girerek indirgenmesine ve kromojenik bir bileşiğin oluşumuna dayanmaktadır. Sonuçlar mM TR birimiyle ifade edilmiştir (Tablo 4-2). **3c**, **3f** ve **3h** bileşikleri 1 mM konsantrasyonda sırasıyla 1,31 ± 0,05, 1,44 ± 0,17 ve 1,37 ± 0,16 mM TR değerleri ile ön plan çıkmıştır. **3a**, **3b**, **3d**, **3e** ve **3g** bileşiklerinin 1,19 ± 0,12, 0,97 ± 0,08 mM TR aralığında Cu^{2+}) iyonunu indirgeme kapasitesine sahip oldukları belirlenmiştir.



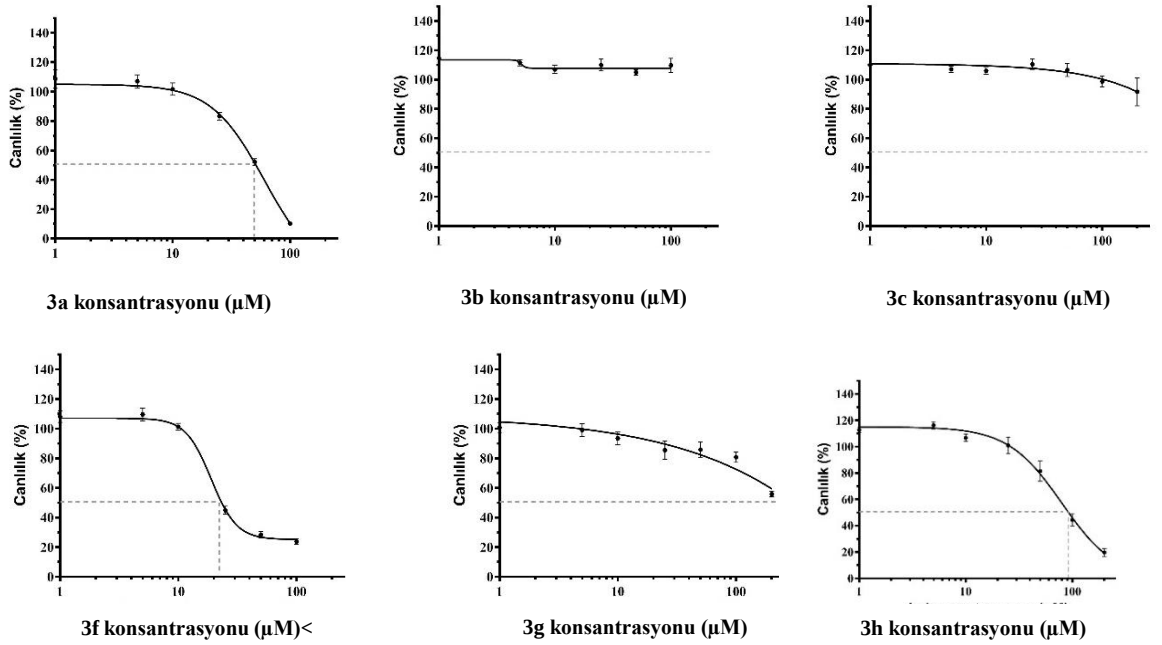
Tablo 4-2: Bileşik 3a-h'nin lipid peroksidasyonunu inhibe etme ve Cu^{2+} iyonunu indirgeme kapasiteleri

Bileşik	R_1	*Lipid Peroksidasyonu İnhibisyonu Aktivitesi (%)	**CUPRAC (mM TR)
3a	5-Br	37,13±11,85	0,97±0,08
3b	5-I	37,88±5,04	1,05±0,07
3c	**7-CH_3**	36,59±7,85	**1,31±0,05**
3d	7-F	35,07±2,15	0,80±0,06
3e	**7-Cl**	**53,09±2,97**	1,19±0,12
3f	**7-Br**	**51,49±8,28**	**1,44±0,17**
3g	5-Cl,7-CH_3	45,81±4,33	0,99±0,18
3h	**5,7-diCl**	**48,21±10,67**	**1,37±0,16**
α-Tokoferol		46,93±3,43	-

* Test edilen bileşiklerin ve α-tokoferolün konsantrasyonu 5 mM'dır.
** Test edilen bileşiklerin konsantrasyonu 1 mM'dır.

4.2.7. Sitotoksisite Analizi

Bu çalışmada, hücre hattı olarak sağlıklı insan fibroblast HFF hücreleri kullanılmıştır (Freshne 2000). *In vitro* testler sonucunda en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenen **3a-c** ve **3f-h** bileşiklerinin HFF hücreleri üzerindeki sitotoksisiteleri MTT yöntemi ile saptanmıştır (Mosmann tarafından önerilen ve Önay Uçar ve ark. 2012). İstatistiksel analiz için, GraphPad Prism 8.0 yazılımı kullanılmış, IC_{50} değerini hesaplamak için sigmoidal doz-cevap eğrisine lineer olmayan regresyon analizi uygulanmıştır. Elde edilen % canlılık grafikleri Şekil 4-49'da, IC_{50} değerleri Tablo 4-3'de verilmiştir. IC_{50} değerleri **3b**, **3c** ve **3g** bileşikleri için >200 µg/ml ve **3h** bileşiği için 92,26±1,24 µg/ml olarak belirlenmiştir. Oysa brom sübstitüe türevlerde sitotoksisitenin arttığı, **3a** ve **3f** bileşiklerinin IC_{50} değerlerinin sırasıyla 51,29±1,39 ve 23,17±1,08 µg/ml olduğu saptanmıştır. Elde edilen sitotoksisite sonuçlarına göre, test edilen tüm bileşikler için hücre canlılığını %100'ün altına düşürmeyen bir doz olarak 15 µM seçilmiş ve bileşiklerin hücre içi ROT oluşumu, protein ve DNA hasarları üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde hücreler bu konsantrasyonda hazırlanan test bileşikleriyle işleme sokulmuştur.



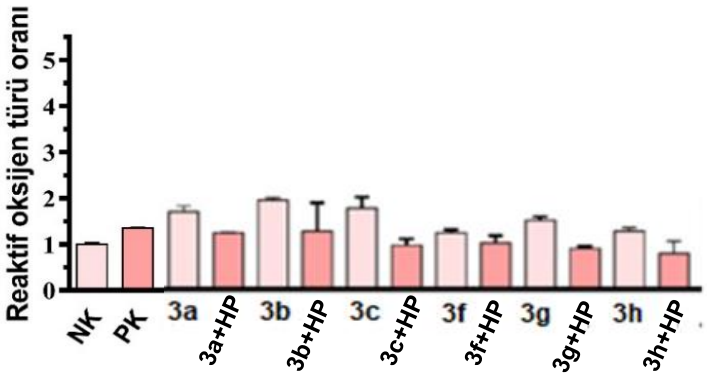
Şekil 4-49: 3a-c ve 3f-h bileşiklerinin HFF hücrelerindeki % canlılık grafikleri

Tablo 4-3: 3a-c ve 3f-h bileşiklerinin HFF hücrelerindeki sitotoksik etkileri

Bileşik	R_1	IC_{50} (µM)
3a	5-Br	51,29±1,39
3b	5-I	>200
3c	7-CH_3	>200
3f	7-Br	23,17±1,08
3g	5-CI-7-CH_3	>200
3h	5,7-diCl	92,26±1,24

4.2.8. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Düzeyinin Belirlenmesi

Hücre içi reaktif oksijen türleri (ROT) düzeyi, 2',7'-diklorodihidrofloresin diasetat (H_2DCFDA) aracılığıyla spektroflorometrik olarak saptanmıştır. ROT düzeyi, kuyucuklardaki hücre sayısına göre normalize edilerek hesaplanmış ve bağıl olarak değerlendirilmiştir. 200 µM H_2O_2 ve/veya 15 µM bileşik uygulaması sonucunda **3a-c** ve **3f-h** bileşiklerinin HFF hücrelerinde hidrojen peroksit ile indüklenen ve indüklenmeyen oksidatif strese karşı koruyucu etkisini saptamak için gerçekleştirilen ROT analizinde elde edilen veriler Şekil 4-50'de bağıl olarak (negatif kontrole göre kaç kat arttığı ya da azaldığı) gösterilmiştir. Ayrıca, H_2O_2 varlığında test edilen bileşiklerin bu stresi ne kadar değiştirdiği Tablo 4-4'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre bileşik **3b**'nin ROT miktarını arttırdığı, diğer bileşiklerin (**3a**, **3c** ve **3f-h**) ise azalttığı gözlenmiştir. Oksidatif stresin indüklendiği hücrelerde ROT oluşumunu en etkili şekilde düşüren iki bileşiğin sırasıyla **3h** ve **3g** olduğu saptanmıştır.



Şekil 4-50: 3a-c ve 3f-h bileşiklerinin HFF hücrelerinde oluşan ROT oranları (Negatif kontrol 1 olarak kabul edilmiş, bileşiklere ait ROT verileri kat artış/azalış şeklinde ifade edilmiştir) (NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol, HP: Hidrojen peroksit)

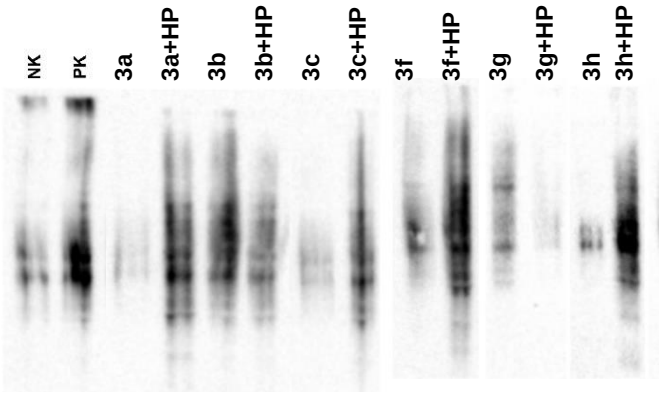
Tablo 4-4: 3a-c ve 3f-h bileşiklerinin HFF hücrelerinde hidrojen peroksitle indüklenen ROT oluşumu üzerine bağıl etkisi

Hücrelere uygulanan bileşikler	ROT miktarındaki değişim
HP*	1
3a+HP	0.08 ↓
3b+HP	0.27 ↑
3c+HP	0.03 ↓
3f+HP	0.24 ↓
3g+HP	**0.34** ↓
3h+HP	**0.42**↓

*Hidrojen peroksit (HP) uygulanan örneğin (pozitif kontrol) ROT düzeyi 1 olarak kabul edilmiştir, veriler kat artışı/azalış olarak oklarla ifade edilmiştir.

4.2.9. Protein Karbonillerinin (Protein Hasarının) Belirlenmesi

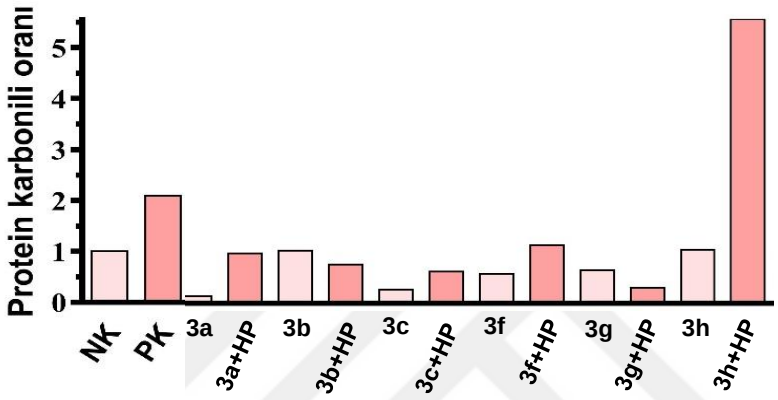
Hücrelerdeki protein hasarı, oksidatif stres sonucu ortaya çıkan karbonil gruplarının immünolojik olarak değerlendirildiği SDS-PAGE ve Western blotlama analizleri yapılarak belirlenmiştir (Hamad ve ark. 2010). **3a-c** ve **3f-h** bileşiklerinin HFF hücrelerinde hidrojen peroksit ile indüklenen ve indüklenmeyen oksidatif stres sonucunda meydana gelen protein hasarlarına (protein karbonillerine) etkisini saptamak için gerçekleştirilen analizlerde, 15 µM bileşik ve/veya 200 µM H_2O_2 uygulaması sonucunda HFF hücrelerinde oluşan protein hasarına ait Western blot görüntüleri Şekil 4-51'de verilmiştir.



Şekil 4-51: 3a-c ve **3f-h bileşiklerinin HFF hücrelerinde protein hasarına etkisi** (NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol, HP: Hidrojen peroksit)

Bu görüntülere ait bant yoğunlukları ImageLab programı ile hesaplanarak, karbonil oluşumunun negatif kontrole göre kaç kat arttığı ya da azaldığı belirlenmiştir. 15 µM bileşik ve/veya 200 µM H_2O_2 uygulaması sonucunda HFF hücrelerinde oluşan

protein karbonil oranları Şekil 4-52'de görülmektedir. Ayrıca, H_2O_2 varlığında test edilen bileşiklerin bu stresi ne kadar değiştirdiği Tablo 4-5'te verilmiş ve bu sonuçlara göre **3h**'ın protein oksidasyonunu arttırdığı, **3a-c**, **3f** ve **3g** bileşiklerinin ise azalttığı sonucuna varılmıştır. Oksidatif stresin indüklendiği hücrelerde protein hasarını (protein karbonillerini) en etkili şekilde düşüren bileşiğin **3g** olduğu saptanmıştır. Ayrıca, hücre kültüründe yürütülen deneylerde **3g**'nin hem hücre içi ROT oluşumunu hem de ROT'a bağlı protein hasarlarını azaltmada etkin bir bileşik olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4-52: 3a-c ve 3f-h bileşiklerinin HFF hücrelerinde oluşan protein karbonil oranları (negatif kontrol 1 olarak kabul edilmiştir, veriler kat artışı/azalışı olarak ifade edilmiştir) (NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol, HP: Hidrojen peroksit)

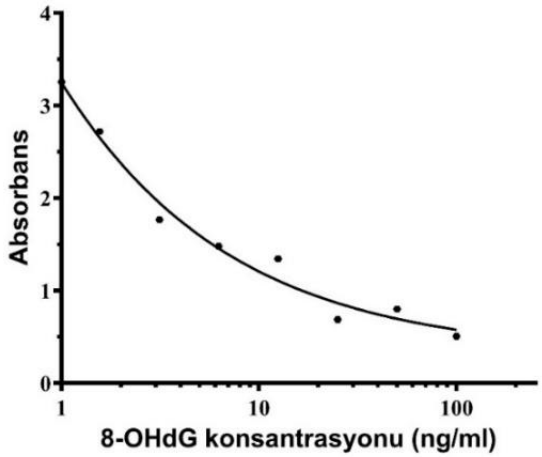
Tablo 4-5: 3a-c ve 3f-h bileşiklerinin HFF hücrelerinde hidrojen peroksitle indüklenen protein karbonilleri üzerindeki etkisi

Hücrelere uygulanan bileşikler	Protein karbonil miktarındaki kat değişim
HP*	1
3a+HP	0,53 ↓
3b+HP	0,64 ↓
3c+HP	0,70 ↓
3f+HP	0,45 ↓
3g+HP	**0,86** ↓
3h+HP	1,65 ↑

*Hidrojen peroksit (HP) uygulanan örnek (pozitif kontrol) 1 olarak kabul edilmiştir, veriler kat artış/azalış olarak oklarla ifade edilmiştir.

4.2.10. DNA Hasarının (DNA Oksidasyon Düzeyinin) Belirlenmesi

Hücrelerdeki DNA hasarının belirlenmesi için kullanılan 8-OHdG ELISA kitinin (Elabscience®) içeriğindeki standartlarla oluşturulan 8-OHdG standart grafiği Şekil 4-53'te verilmiştir. Oksidatif stresin H_2O_2 ile indüklendiği pozitif kontrolün absorbansı 3,466; H_2O_2 uygulanmamış negatif kontrolün absorbansı 3,394 olarak ölçülmüştür. Bu verilere göre, 2 saat boyunca 200 µM H_2O_2 ile indüklenen oksidatif stres koşulunun hücrelerde DNA hasarı oluşturmadığı anlaşılmıştır. Bu koşullarda hücrelerde DNA hasarı bulunmadığından bileşiklerin DNA hasarına karşı koruyucu etkisine ilişkin bir veriye ulaşmak da mümkün olmamıştır. Bu bileşiklerin DNA hasarı üzerindeki etkisi ancak gelecek çalışmalarda oksidatif stres şartları hücresel DNA hasarına yol açacak şekilde optimize edilerek araştırılabilir.



Şekil 4-53: ELISA kiti içeriğindeki standartlarla oluşturulan 8-OHdG standart grafiği

4.3. *In silico* ADME Kriterlerinin Belirlenmesi

3a-h bileşiklerinin Lipinski kurallarına uygunlukları ve bazı farmakokinetik parametreleri Qikprop modülü kullanılarak incelenmiş, hidrojen bağı donör ve akseptörler sayıları, n-oktanol/su partison katsayıları (logP), uyulmayana RO5 kuralı sayıları (Tablo 4-6), ayrıca suda çözünürlükleri (logS), deri geçirgenlikleri (logKp), insan serum albümine bağlanma oranları (logKp), insanda oral absorpsiyon yüzdeleri belirlenmiştir (Tablo 4-7) (Schrödinger LLC 2015).

Tablo 4-6: Bileşik 3a-h'nin Lipinski kurallarına uygunluğunun incelenmesi

Bileşik	R	M.A. (g/mol)	Hidrojen bağı donörü sayısı	Hidrojen bağı akseptörü sayısı	logP	Uyulmayan RO5 kuralı sayısı
3a	5-Br	401,20	2	4	3,20	0
3b	5-I	448,20	2	4	3,29	0
3c	7-CH_3	336,33	2	4	2,99	0
3d	7-F	340,29	2	4	2,93	0
3e	7-Cl	356,75	2	4	3,18	0
3f	7-Br	401,20	2	4	3,25	0
3g	5-CI,7-CH_3	370,77	2	4	3,44	0
3h	5,7-diCl	391,19	2	4	3,66	0

logP: n-Oktanol/su partisyon katsayısı [Referans: <5].

Tablo 4-7: Bileşik 3a-h'nin bazı farmakokinetik parametrelerinin incelenmesi

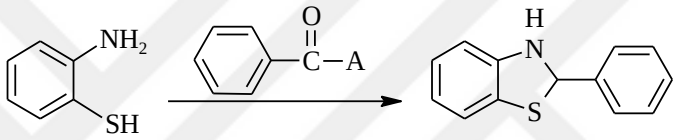
Bileşik	R	log S	logKp	logKhsa	İnsanda oral absorpsiyon yüzdesi
3a	5-Br	-4,43	-4,55	0,32	90,31
3b	5-I	-4,59	-4,54	0,34	90,92
3c	7-CH_3	-4,44	-4,55	0,35	88,88
3d	7-F	-4,19	-4,48	0,24	88,76
3e	7-Cl	-4,60	-4,53	0,31	89,98
3f	7-Br	-4,72	-4,53	0,33	90,42
3g	5-CI,7-CH_3	-5,08	-4,79	0,45	91,10
3h	5,7-diCl	-5,32	-4,70	0,42	92,80

logS: Sudaki çözünürlüğü (S: suda doymuş çözeltisindeki konsantrasyon (mol/dm^3)) [Referans: (-6,5)-0,5].
logKp: Deri geçirgenliği [Referans: (-8)-(-1)].
logKp:: İnsan serum lbumin bağlanma oranı [Referans: (-1,5)-1,5].
Oral absorpsiyon yüzdesi [Referans: >80 yüksek aktivite, <25 zayıf aktivite].

5. TARTIŞMA

5.1. 5-(Triflorometil)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on Türevlerinin Sentezi (3a-h)

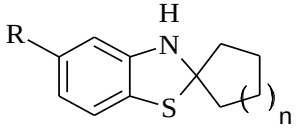
2-Aminobenzentiyole karbonil bileşiklerinin katımıyla 2-arilbenzotiyazolin türevleri elde edilmektedir. Bu yöntem tanımlanan en basit ve en çok tercih edilen metoddur (Hofmann 1879; Hoffmann 1880; Claasz 1916). Dimetilanilin veya piridin (Lankelma ve Sharnoff 1931; Stevens ve ark., 1994), asetik asit-etanol veya DMSO (Alyea ve Malek 1985; Hedge ve ark., 2006), nitrobenzen veya asetik asit-amonyumasetat (Cossey ve ark., 1963), PPA (Devmurari ve ark., 2010) gibi değişik çözücü sistemleri ve katalizörler kullanılarak 2-arilbenzotiyazolin türevleri sentezlenmektedir (Şekil 5-1).



A= H, R, Cl, $CONH_2$, OCOR

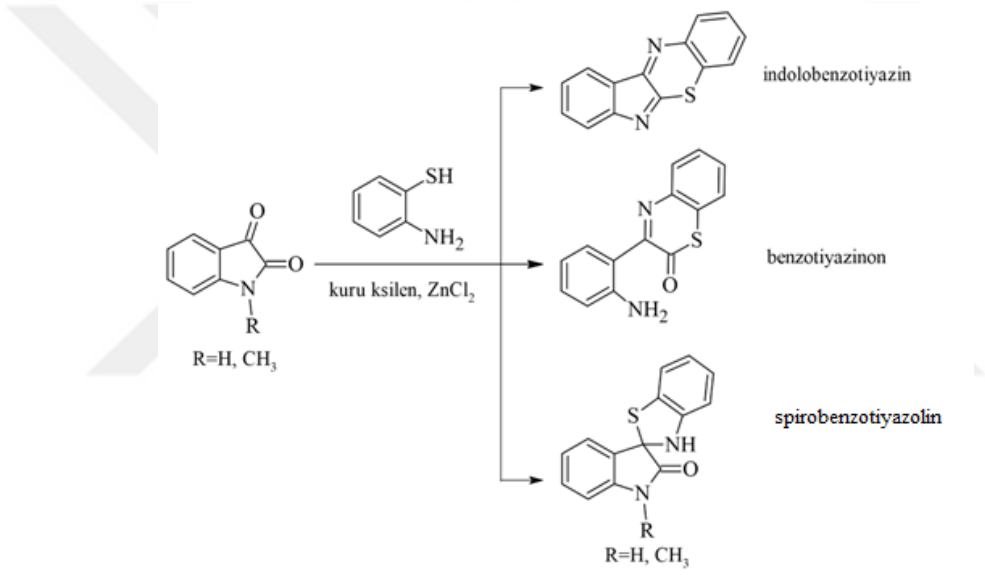
Şekil 5-1: 2-Arilbenzotiyazollerin genel sentezi

2-Aminobenzentiyolün siklik ketonlar ile reaksiyonuyla 2-spirobenzotiyazolinler sentezlenmiş, benzaldehidler ile yürütülen reaksiyondan daha zor yürüyen bu sentezin tamamlanabilmesi için ısıtma süresi uzatılmıştır (Lankelma ve Sharnoff 1932; Teuber ve Waider, 1958; Elderfield ve McClenachan 1958). Bu reaksiyonun hidroklorik asitli ortamda, çinko tuzlarının katalizörlüğünde (Cossey ve ark., 1963), Pd katalizörlüğünde (Kawashita ve ark., 2006), aluminyum oksit (Al_2O_3) (Kodomari ve ark., 2007), argon veya azot atmosferinde N-metilpirolidon (NMP) veya p-toluen sülfonik asid katalizörlüğünde (Chen ve ark. 2007), mikrodalga sentez yöntemi kullanılarak da gerçekleştirildiği kaydedilmiştir (Ben-Alloum ve ark. 1997; Mukhopadhyay ve Arup 2007; Lim ve ark. 2008).



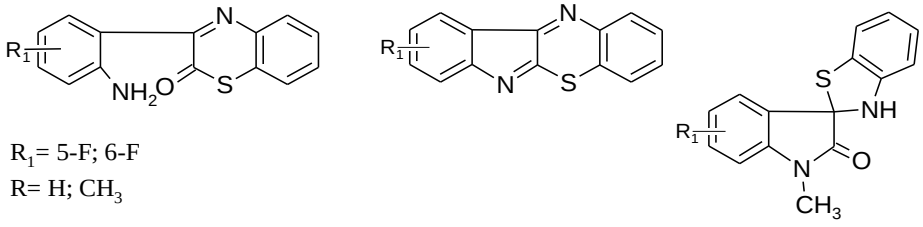
R= H, Cl
n= 1, 2, 3

Joshi ve ark. nın 1990 yılında yaptığı çalışmada isatin ve 2-aminobenzentiyol kullanılarak reaksiyon koşullarında yapılan değişikliklerle spirobenzotiyazolin, indolobenzotiyazin ve benzotiyazinon türevlerinin sentezlenebileceğini bildirmişlerdir. Çalışmada susuz $ZnCl_2$, kuru ksilen varlığında ve oda sıcaklığında reaksiyon gerçekleştirilmiş, isatinin C_2 ve C_3 konumlarından 2-aminobenzentiyolün nükleofilik katılımı ile benzotiyazinon, yalnız C_3 konumundan katılım ile spirobenzotiyazol türevleri elde edilmiştir. Tepkime ısıtılarak yürütüldüğünde benzotiyazinon ve spirobenzotiyazolin bileşiklerine ek olarak indolobenzotiyazin türevinin de elde edildiği kaydedilmiştir. Fakat aynı reaksiyonun 1-metilisatin ile denendiğinde yalnızca spiro bileşikleri verdiği gözlenmiştir (Şekil 5-2) (Karalı 2010).



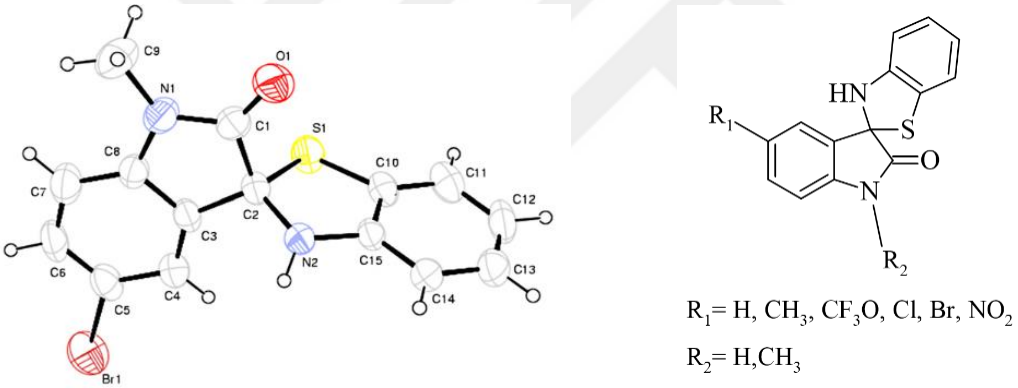
Şekil 5-2: İsatin ve 2-aminobenzentiyolün reaksiyon ürünleri

Dandia ve ark. yaptıkları çalışmada (2003), benzer reaksiyon koşullarında *o*-aminotiyofenol ve floroisatin türevlerinden geri çevirici soğutucu altında ısıtılarak gerçekleştirilen reaksiyon ile indolobenzotiyazin ve benzotiyazin-2-on türevlerinin sentezlendiğini saptamışlardır. Bu çalışmada 1-metil sübstitüe floroisatin türevlerinden aynı koşullarda spiro türevlerinin saf olarak elde edildiğini kaydetmişlerdir.



R_1= 5-F; 6-F
R= H; CH_3

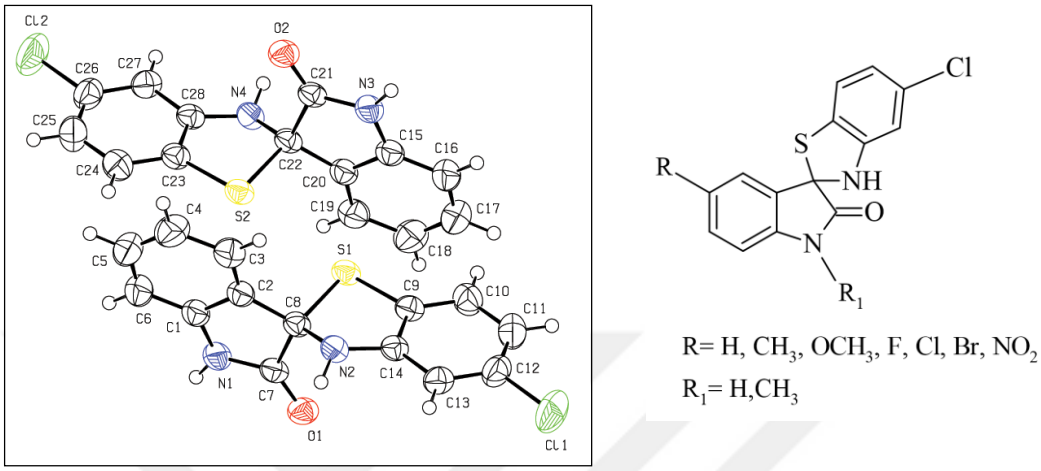
Karalı ve ark. nın çalışmasında (2010) etanollü ortamda isatin ile 2-aminotiyofenol reaksiyonuyla tek ürün olarak elde edilen spiro-2-indolinon türevlerinin antioksidan etkileri incelenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin, α-tokoferole kıyasla antioksidan etkilerinin üstün olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada N-sübstitüe isatin türevleri de aynı reaksiyon koşullarında 2-aminotiyofenol ile etkileştirilmiş, elde edilen spirobenzotiyazolin türevlerinin tek ürün olduğu 5-bromo-1-metilindolin-2-on türevinin X-ışını tek kristal analizi ile saptanmıştır. Sentezlenen bileşikler içerisinde en kuvvetli antioksidan etki R_1 ve R_2'de dimetil sübstitüe türevde gözlenmiştir, bu türevin antioksidan aktivitesinin α-tokoferolden 4,5 kat ve lipid peroksidasyonu indirgeme gücünün 3,8 kat daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. Aynı zamanda sentezlenen bileşikler içerisinde R_1 = Cl, R_2 = H ve R_1 = OCF_3, R_2 = CH_3 artığı taşıyan türevlerin SNB-75 MSS kanseri hücre hattına karşı sitotoksik etkisi tespit edilmiştir (Şekil 5-3) (Karalı ve ark. 2010).



Şekil 5-3: Benzotiyazolin artığı taşıyan spiro-5-bromo-1-metil-2-indolinonun X-ışını tek kristal kırınım molekül modeli ve sentezlenen diğer türevler

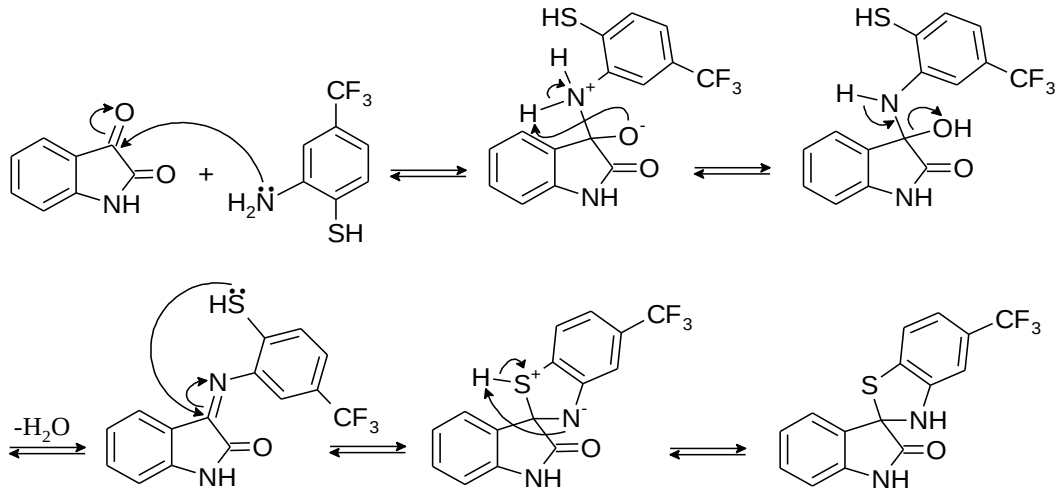
5-Klorobenzotiyazolin artığı taşıyan 2-spiroindolinon bileşiğinin X-ışını tek kristal kırınım yöntemiyle elde edilen molekül modeli ile spiro formda olduğu kanıtlanmış (Şekil 5-4) (Akkurt ve ark. 2010), spiroindolinon türevlerinin sentezlendiği çalışmada bu türevlerin antioksidan etkileri $DPPH^{\bullet}$ ve $ABTS^{\bullet+}$ radikallerini süpürme, lipid peroksidasyonu ve indirgeme gücü açısından α-tokoferolle karşılaştırılmıştır. Sentezlenen bileşiklerden R_1=flor türevinin α-tokoferolden daha etkili olduğu ve en yüksek antioksidan etki gösterdiği tespit edilmiştir. İndol halkasının 1- konumunda metilasyon, bileşiklerin $DPPH^{\bullet}$ ve $ABTS^{\bullet+}$ radikallerini süpürme ve lipid peroksidasyonu kapasitelerinde önemli bir değişiklik oluşturmazken, indirgeme güçlerini önemli ölçüde azaltmıştır. 1'-Metil-5'-florlu türevde indirgeme gücü 1'-nonsübstitüe türeve göre önemli

derecede azalırken diğer 1'-metil sübstitüe türevlerde aktivite tamamen ortadan kalkmıştır. 5'-Flor sübstitüe türevin malign olmayan akciğer kanseri hücre hattı HOP-92'ye, 5'-klor sübstitüe türevin ise renal kanser hücre hattı RXF-393'e karşı antikanser etkileri de kaydedilmiştir. (Ermut ve ark. 2014).

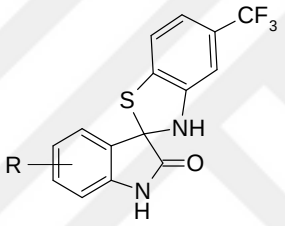


Şekil 5-4: 5-Klorobenzotiyazolin artığı taşıyan 2-spiroindolinonun X-ışını tek kristal kırınım molekül modeli ve sentezlenen diğer türevler

Bu bilgiler ışığında tez kapsamındaki **3a-h** bileşikleri 1*H*-indol-2,3-dion türevlerinin (**1a-h**) 4-(triflorometil)-2-aminotiyofenol (**2**) ile susuz etanollü ortamda geri çeviren soğutucu altında ısıtılması ile elde edilmiştir (Bkz. Bölüm 3.3.1 Genel Sentez Şeması ve Tablo 5-1). 2-Amino-4-(triflorometil)benzentiyoldeki amino grubu ile 1*H*-indol-2,3-dion türevlerinin 3- konumundaki keton grupları arasındaki kondensasyon reaksiyonu, amin grubunun ketonun kısmi pozitif yüklü karbonil karbonuna nükleofilik hücumu ile başlar. Oluşan ara üründe (+) yüklü aminyum protonuna, (-) yüklü alkoksit hücum eder. Oluşan 3-hidroksi-3-anilino-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-on katım ürününün su kaybetmesi ile 3-fenillimino-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-on oluşur. İmin azotu Π elektronlarını kendi üzerine çekerek imin karbonundaki elektron yoğunluğunu azaltır ve elektrofilik bir merkez (karbokatyon) oluşturur. 4-(triflorometil)benzentiyoldeki sülfidril grubu bu karbokatyona hücum eder, kükürt ile karbon atomları arasında yeni bir bağ oluşur. Spirobenzotiyazolin ara üründe (+) yüklü tiyoeter grubu elektronları kendi üzerine çekerek nötralize olurken, (-) yüklü sekonder amin tiyoeter protonuna hücum eder ve 5-(triflorometil)benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinonlar kazanılır (Şekil 5-5) (Dandia ve ark., 2006).



Şekil 5-5: 3a-h bileşiklerinin sentez mekanizması



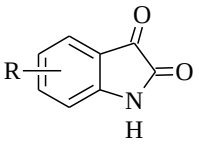
Tablo 5-1: Sentezlenen 3a-h bileşiklerinin analitik özellikleri ve elementel analiz bulguları

Bileşik	R_1	Molekül Formülü (MA)	Erime derecesi (ºC)	Elementel Analiz (%) Hesaplanan / Bulunan			
				C	H	N	S
3a	5-Br	$C_{15}H_8BrlF_3N_2OS$	217-219	44,91	2,01	6,98	7,99
		(401,20)		44,88	2,03	7,04	7,89
3b	5-I	$C_{15}H_8F_3N_2OS$	221-222	40,20	1,80	6,25	7,15
		(448,20)		40,17	1,84	6,44	7,11
3c	7-CH_3	$C_{16}H_{11}F_3N_2OS$	246-247	57,14	3,30	8,33	9,53
		(336,33)		57,21	3,28	8,46	9,42
3d	7-F	$C_{15}H_8F_4N_2OS.^1/_4H_2O$	158-161	52,25	2,48	8,12	8,75
		(344,80)		52,29	2,48	8,38	9,30
3e	7-Cl	$C_{15}H_8ClF_3N_2OS.^1/_2H_2O$	201-204	49,26	2,48	7,65	8,76
		(365,76)		49,61	2,37	7,81	8,85
3f	7-Br	$C_{15}H_8BrF_3N_2OS$	206-207	44,91	2,01	6,98	7,99
		(401,20)		45,03	2,05	7,25	8,04
3g	5-Cl-7-CH_3	$C_{16}H_{10}ClF_3N_2OS$	254-257	51,83	2,72	7,56	8,65
		(370,77)		52,04	2,74	7,68	8,52
3h	5,7-diCl	$C_{15}H_7Cl_2F_3N_2OS$	191-194	46,06	1,80	7,16	8,20
		(391,19)		46,10	1,85	7,23	8,20

5.2. Spektral Bulguların Değerlendirilmesi

5.2.1. IR Bulguları

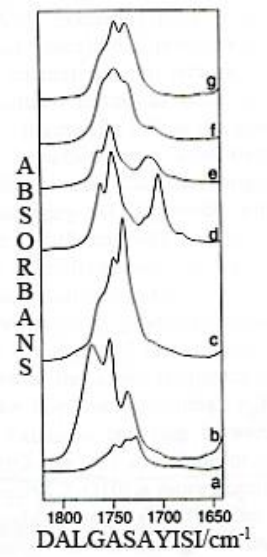
1*H*-indol-2,3-dion ve sübstitüe 1*H*-indol-2,3-dion türevlerinin katı fazda (KBr) ve seyreltik çözeltideki IR spektrumları ve X-ışını tek kristal analiz verileri incelenmiş, sübstitüentlerin 1*H*-indol-2,3-dion frekanslarında yalnız minor değişiklikler yaptığını, bu bileşiklerin N-H ve C=O grupları arasında moleküller arası hidrojen bağı oluşturduğunu göstermiştir. 3450 cm^{-1} de gözlenmesi gereken N-H gerilme bandının , N-H ve C=O grupları arasında intermoleküller hidrojen bağları nedeniyle 3230 cm^{-1} de sinyal verdiği belirlenmiştir. 1*H*-indol-2,3-dion türevlerinin kloroform da seyreltik çözeltide alınan IR spektrumlarında keton ve amid C=O gerilme titreşimleri sırasıyla 1755 ve 1740 cm^{-1} de iki ayrı band olarak saptanmıştır. Keton C=O gerilme bandının şiddetinin amid C=O grubu sinyaline göre düşük şiddette olduğu, bazen yalnız omuz olarak saptandığı belirlenirken, amid C=O grubu absorpsiyonun her zaman çok keskin ve şiddetli olarak sinyal verdiği kaydedilmiştir. İndol halkasının C=C gerilme bandları çok kuvvetli (1621 cm^{-1}) ve zayıf (1450 cm^{-1}) bandlar olarak gözlenmiştir. Katı fazda çok daha şiddetli olarak 1450 cm^{-1} den 1469 cm^{-1} ye kayan bu band, laktam grubu N-H eğilme ve C-N gerilme bandı olarak da tanımlanmıştır (Tablo 5-2) (O'Sullivan ve Sadler 1956; O'Sullivan 1960; Bigotto ve ark. 1979; Laatsch ve ark. 1984; Petrov ve ark. 1986; Naumov ve ark. 2000; SDBS 51489)



Tablo 5-2: 1*H*-indol-2,3-dion ve sübstitüe 1*H*-indol-2,3-dionların IR bandları (cm^{-1})

R	N-H g.b.	C=O g.b.	N-H e.b. ve C=C g.b.
5-CH_3	3460, 3250	1758, 1739	1631, 1480
5-F	3458, 3230	1755, 1744	1630, 1480
6-CH_3	3460, 3240	1755, 1738	1628, -
6-F	3450, 3230	1764, 1743	1624, 1450
6-Cl	3450, 3230	1755, 1743	1618, -
6-Br	3440, 3230	1765, 1744	1618, -
7-F	3272, 3202	1743	1639, 1497, 1455

Başka bir çalışmada, 1*H*-indol-2,3-dionun katı fazda (KBr) alınan spektrumlarında keton karbonil bandı 1742 cm^{-1} de gözlenirken, amid karbonil bandının 1722 cm^{-1} de sinyal verdiğini saptanmıştır (Cogrossi 1973). 5-Metil/nitro-1*H*-indol-2,3-dion türevlerinin katı fazdaki spektrumlarında N-H gerilme bandları sırasıyla 3288 ve 3336 cm^{-1}, keton ve amid C=O gerilme bandları sırasıyla 1745, 1726 ve 1772, 1751 cm^{-1} de gözlenmiştir (SDBS 21417, SDBS 23383). 5-Sübstitüe 1*H*-indol-2,3-dion türevlerinin katı fazdaki IR spektrumlarına sübstitüent etkilerinin incelendiği çalışmada, sübstitüentlerin elektronik özelliklerine ve kütlesine bağlı olarak keton C=O gerilme bandlarının çok fazla etkilendiği, amid C=O gerilme bandlarının sübstitüentlerden daha az etkilendiği saptanmıştır (Şekil 5-6) (Naumov ve Anastasova 2001).

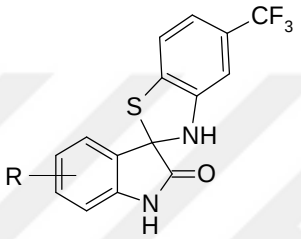


Şekil 5-6: 5-Nonsübsstitüe (a), 5-nitro (b), 5-floro (c), 5-kloro (d), 5-bromo (e), 5-iyodo (f) ve 5-metil-1*H*-indol-2,3-dion (g) türevlerinin karbonil gerilme bandları

Benzotiyazolin bileşiğinin IR spektrumunda 3421 cm^{-1} de N-H gerilme bandı, 1600-1270 cm^{-1} alanında aromatik C=C gerilme ve N-H eğilme bandları saptanmış (Taşal ve ark., 2009), başka bir çalışmada benzotiyazolin türevinin moleküller arası hidrojen bağlı N-H ve C-S gerilme bandları 3201 ve 695 cm^{-1} de belirlenmiştir (Castiñeiras ve ark. 2000). 5-Klorobenzotiyazolin-2-spiroindolin-2'-on bileşiğinin ORTEP çizimi belirlenmiş (Şekil 5-3), kristal yapıda moleküller arası isatin N-H…O ve benzotiyazolin N-H…S hidrojen bağlarının varlığı doğrulanmıştır (Akkurt ve ark. 2010). 5-Klorobenzotiyazolin-2-spiroindolin-2'-on bileşiğinin kloroformda alınan IR

spektrumunda N-H ve C=O gerilme bandlarının yüksek frekansa kaydığı belirlenmiş, katı fazda 3281 ve 3149 cm^{-1} de gözlenen N-H gerilme bandlarının 3427 cm^{-1} de, 1728 cm^{-1} de gözlenen C=O gerilme bandının 1739 cm^{-1} de sinyal verdiği belirlenmiştir (Görkem ve ark. 2014).

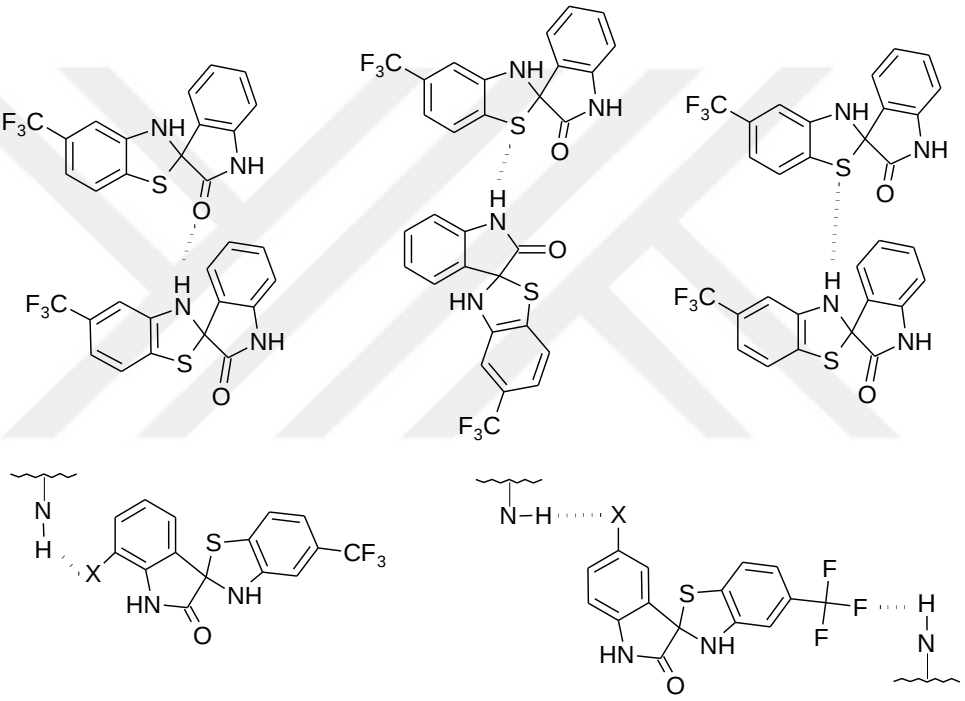
3a-h bileşiklerinin katı fazda (KBr) alınan IR spektrumlarında indol ve benzotiyazol N-H gerilme bandları 3369-3167 cm^{-1} alanında gözlenirken, 1*H*-indol-2,3-dionun keton grubunu karakterize eden C=O gerilme bandının gözlenmemesi , yalnız laktam grubu C=O gerilme (amid I) bandının 1730-1701 cm^{-1} alanında sinyal vermesi spiroindolinon yapısının doğruluğunu kanıtlamaktadır (Tablo 5-3).



Tablo 5-3: Sentezlenen bileşik 3a-h bileşiklerinin IR bulguları

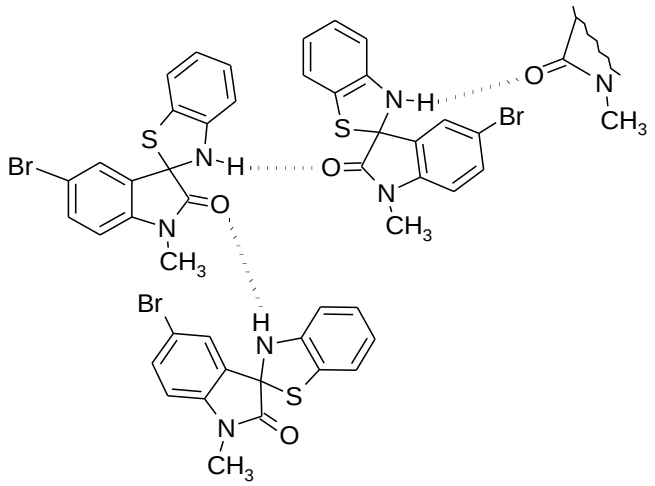
Bileşik	R	N-H g.b.	Ar. C-H g.b.	C=O g.b.	Ar. C=C g.b. ve N-H e.b.	C-N g.b.	C-F g.b.	C-S g.b.	R
3a	5-Br	3290 3172	3088, 3051 3030	1712	1618, 1600 1465,1452	1265	1165	634	790
3b	5-I	3290 3167	3080, 3068	1712	1614, 1464 1454	1265	1165	632	632
3c	7-CH_3	3361 3288	3085	1701	1627, 1489 1446	1269	1168	648	2950
3d	7-F	3284 3196	3034	1730	1643, 1492 1450	1240	1176	663	1126
3e	7-Cl	3369 3300	3068	1708	1622, 1600 1454, 1446	1232	1165	646	1078
3f	7-Br	3354 3286	3036	1707	1620, 1477 1450,1444	1234	1172	646	767
3g	5-Cl-7-CH_3	3309 3194	3074 3030	1710	1625, 1585 1505, 1463	1244	1166	634	2985 2821 1074
3h	5,7-diCl	3331 3242 3196	3082 3030	1718	1620, 1591 1470, 1458	1246	1168	646	1072

3a-h bileşiklerinde indol ve benzotiyazolin N-H grupları ile indol C=O, benzotiyazolin tiyoeter ve triflorometil flor grupları arasında N-H…O, N-H…S ve N-H…F intermoleküler hidrojen bağları oluşabilir (Jain ve ark., 2003; Laatsch ve ark., 1984 ; Naumov ve ark., 2000; Castiñeiras ve ark., 2000; Snavely ve ark., 1981; Bain ve ark., 1997). İndol halkasının 7- konumunda metil grubu taşıyan **3c** hariç, indol halkasının 5 ve/veya 7- konumlarında halojen taşıyan **3a**, **3b** ve **3d-h** bileşiklerinde halojen atomları elektronegatif özellikleri nedeniyle indol ve benzotiyazolin N-H grupları ile moleküller arası hidrojen bağı yapabilir (Şekil 5-7) (O'Sullivan ve Sadler, 1956 ; March 1992; Howard ve ark. 1996; Sakai ve ark. 1998).



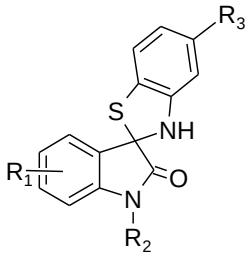
Şekil 5-7: 3a-h bileşiklerinde olası moleküller arası hidrojen bağları

Benzotiyazol-2-spiro-5'-bromo-1'-metil-3'spiroindolin-2'-on bileşiğinin tek kristal analizinde molekülün spiro formda olduğu aydınlatılmış, molekülde benzotiyazolin N-H ve indol C=O grupları arasında yalnız moleküler arası N-H…O hidrojen bağlarının oluştuğu saptanmıştır (Şekil 5-8) (Karalı ve ark. 2010).



Şekil 5-8: Benzotiyazol-2-spiro-5'-bromo-1'-metil-3'spiroindolin-2'-on bileşiğinin moleküller arası hidrojen bağları

IR çalışmaları ve X-ışını tek kristal analiz bulguları moleküller arası hidrojen bağlı N-H gerilme bandlarının 3250-3200 cm^{-1} bölgesinde kuvvetli bir band olarak gözlendiğini göstermekte (O'Sullivan, 1960; Bigotto ve Galasso, 1979; Petrov ve ark., 1986; Castiñeiras ve ark., 2000; Snavely ve ark., 1981). Benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinon türevlerinin IR bulguları bu bilgilerin doğruluğunu kanıtlamaktadır (Tablo 5-4) (Joshi ve ark. 1990; Dandia ve ark. 1990; Karalı ve ark. 2010; Allam ve ark 2002; Akkurt ve ark. 2010; Görkem ve ark. 2014).



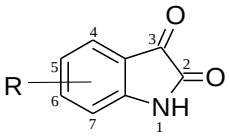
Tablo 5-4: Benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinonların IR bulguları

R_1	R_2	R_3	NH g.b.	C=O g.b.	R_1	R_2	R_3	NH g.b.	C=O g.b.
H	H	H	3200	1700	5-Cl	CH_3	H	3307	1698
H	CH_3	H	3240	1704	5-Br	CH_3	H	3327	1719
5-F	CH_3	H	3210	1700	H	H	Cl	3281, 3149	1728
5-CH_3	H	H	3299	1711	5-CH_3	H	Cl	3288, 3161	1722
5-Cl	H	H	3302	1714	5-F	H	Cl	3277, 3179	1724
5-CH_3	CH_3	H	3303	1696	5-Cl	H	Cl	3276, 3168	1725

Bileşik **3a-h**'nin aromatik =C-H gerilme bandları 3088-3030 cm^{-1} alanında gözlenmekte, 1643-1444 cm^{-1} alanındaki bandlar moleküllerdeki 2-indolinon laktam ve benzotiyazol N-H eğilme (amid II) ve aromatik C=C gerilme bandlarını karakterize etmektedir (O'Sullivan ve Sadler, 1956; Petrov ve ark. 1986; Taşal ve ark. 2009; Görkem ve ark. 2010). Bileşik **3a-h**'nin C-N gerilme (1269-1232 cm^{-1}), 1,2,4-trisübstitüe benzen C-H eğilme (815-808 cm^{-1}), benzotiyazolin halkasındaki triflorometil grubu C-F gerilme (1176-1165 cm^{-1}) ve C-S gerilme (663-632 cm^{-1}) bandları ve indol halkasının 5- ve/veya 7- konumundaki sübstitüentlere ait gerilme bandları literatür verileri ile uyumlu bölgelerde sinyal vermişlerdir (Tablo 5-3) (Silverstein ve ark., 1981; Castiñeiras ve ark. 2000; Kollmar ve ark., 2002; Dandia ve ark. 2004; Arya ve Dandia, 2007; Erdik 2007; Kapil ve Dandia 2007; Bratulescu, 2008; Ermut ve ark. 2014; SDBS 8046).

5.2.2. ^{1}H-NMR Bulguları

1*H*-indol-2,3-dion ve türevlerinde indol halkasının 3- konumundaki keton karbonilin *orto* (*o*-) ve *para* (*p*-) konumlarındaki protonlar (C_4 ve C_6) C=O grubunun anisotropik etkisi ile, indol halkasının laktam NH'ının *o*- ve *p*- konumlarındaki protonlar (C_5 ve C_7)'den daha düşük alanda absorpsiyon yapmaktadır. Bu nedenle indol C_4 ve C_6 protonları sırasıyla δ 7,59 ve 7,69 ppm'de sinyal verirken, laktam NH'ı tarafından gölgelenen C_5 ve C_7 protonları sırasıyla δ 7,16 ve 7,03 ppm'de gözlenmektedir (Sterk ve Holzer 1974; Galasco ve ark. 1975). 1*H*-indol-2,3-dion ve türevlerinin proton sinyalleri Tablo 5-5'te görülmektedir (Laatsch ve ark. 1984; Morales-Rios ve Joseph-Nathan, 1991; Santes ve ark. 1999; SDBS 2597, 21417, 51489, 52016).



Tablo 5-5: 1*H*-indol-2,3-dion ve türevlerinin proton sinyalleri (ppm)

R	NH	C_4-H	C_5-H	C_6-H	C_7-H
H*	11.08 (s)	7.51 (d)	7.09 (td)	7.61 (td)	6.94 (d)
H*	11,02 (s)	7,50 (d)	7,07 (td)	7,58 (dt)	6,91 (d)
5-CH_3*	10.92 (s)	7.30 (s)	-	7.39 (ddd)	6.80 (d)
5-F*	11,00 (s)	7,38 (dt)	-	7,44 (dt)	6,92 (dt)
5-Cl*	11,11 (s)	7,52 (s)	-	7,59 (dd)	6,91 (d)

5-Br*	11,16 (s)	7,61 (s)	-	7,72 (dd)	6,86 (dd)
7-F**	8,11 (s)	7;456	7,366	7,110	-

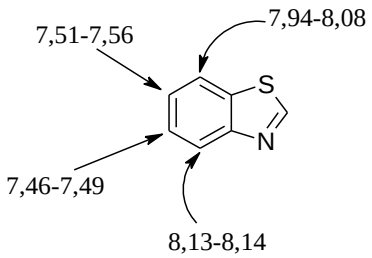
*Çözücü: DMSO-d_6 ** Çözücü: $CDCI_3$

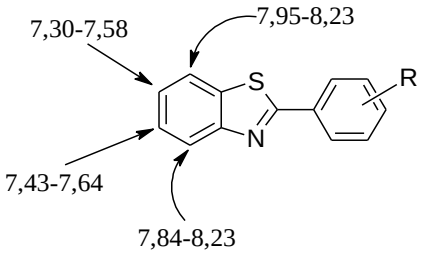
İndol halkasındaki protonların kimyasal kayma değerlerinde sübstitüentlere bağlı olarak bazı değişiklikler gözlenmiştir. Metil grubu elektron verici etkisi ile tüm sinyalleri yüksek alana kaydırırken, klor sübstitüsyonunun önemli bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Oysa, florun çevresindeki elektron yoğunluğunu arttırması nedeniyle *o*- ve *p*- konumunlarındaki protonlarının kimyasal kayma değerlerini daha yüksek alana kaydırdığı, *meta* (*m*-) konumundaki proton sinyallerinde 5-floro sübstitüe türevde önemli bir değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır. Brom sübstitüsyonu indol halkası rezonanslarında küçük farklılıklar oluşturmakta, elektron çekici etkisi nedeniyle özellikle *o*- konumundaki proton rezonanslarını yüksek ppm değerlerine kaydırmakta, *m*- konumundaki proton sinyallerinde az miktarda düşük ppm değerlerine kayma gözlenmektedir. Benzendeki sübstitüentlerin kaydırma değerleri bu verileri doğrular niteliktedir (Tablo 5-6) (Erdik 2007 pp. 276; Balcı 2013 pp.57).

Tablo 5-6: Benzendeki sübstitüentlerin kaydırma değerleri

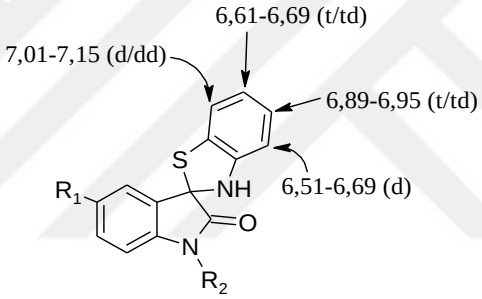
Sübstitüent	**Sübstitüentin pozisyonu**		
	orto	***meta***	***para***
CH_3	-0,20	-0,12	-0,22
F	-0,26	-0,00	-0,04
	-0,29	-0,02	-0,23
Cl	0,03	-0,02	-0,09
	-0,01	-0,06	-0,12
Br	0,18	-0,08	-0,04
	0,17	-0,11	-0,06
I	0,39	-0,21	0,00
	0,38	-0,23	-0,01

Benzotiyazol ve 2-fenil sübstitüe benzotiyazol türevlerinin kimyasal kayma değerlerinin kaydedildiği çalışmalarda, benzotiyazol halka protonlarından azometin ve tiyoeter gruplarına komşu protonların (C_4 ve C_7) en az gölgelenen protonlar oldukları ve δ 7,84-8,23 ppm alanında sinyal verdikleri belirlenmiş, benzotiyazol C_5 ve C_6 protonlarının δ 7,30-7,64 ppm alanlarında gözlendikleri saptanmıştır (Abdelhamid ve ark. 1988; Billeau ve ark. 2006; HSP-03-931, HPM-02-130).

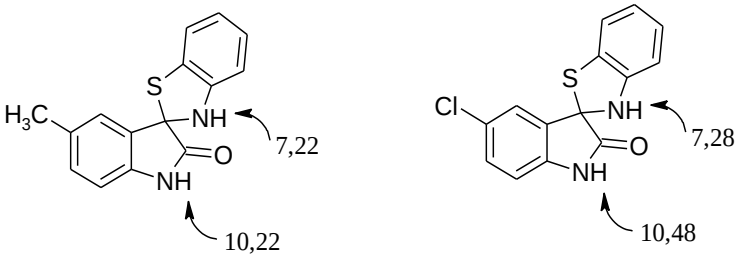




Benzotiyazol artığı taşıyan spiroindolinon türevlerinin benzotiyazolin halka protonlarının absorpsiyonları incelendiğinde düşük alandan başlamak üzere benzotiyazolin proton sinyallerinin C_7, C_5, C_6 ve C_4 sırasıyla gözlendiği belirlenmiştir. Kükürt atomunun elektronegatif etkisi ile kükürde göre *o*- ve *p*- konumlarda yer alan protonlar (C_7 ve C_5) en az gölgelenmekte, sekonder aminin elektron yoğunluğunu arttırması nedeniyle en yüksek alanda amine göre *o*- konumda yer alan C_4 protonları sinyal vermektedir (Akkurt ve ark. 2010; Karalı ve ark. 2010).



Benzotiyazol artığı taşıyan spiroindolinonların benzotiyazol NH proton sinyali δ 5.52 ve 5.96 ppm'de izlenirken, indol NH proton sinyali δ 9.15 ppm'de gözlenmiştir (Dandia ve ark. 1990; Joshi ve ark. 1990;). Hidrojen bağları nedeniyle elektron yoğunluğunun azalmasına bağlı olarak aşağıda yapısal formülleri verilen iki bileşiğin benzotiyazol ve indol NH sinyalleri düşük alana kaymıştır (Karalı ve ark. 2010).



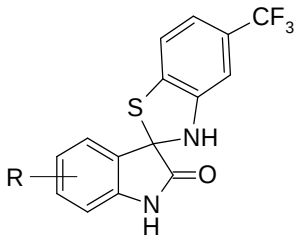
3a-h bileşiklerinin spektrumlarında sentez ilkel maddesi 4-(triflorometil)-2-aminotiyofenolün SH ve NH_2 rezonanslarının izlenmemesi, δ 10,48-11,11 ppm de gözlenen indol NH proton sinyali yanısıra spirobenzotiyazolin artığının NH protonunu karakterize eden ikinci NH sinyalinin δ 7,60-7,77 ppm de gözlenmesi, döteryum değişimi

ile bu verilerin kanıtlanması benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinon yapısını karakterize etmektedir. **3a-g** Bileşiklerinin indol ve benzotiyazol halka protonlarının kimyasal kayma değerleri, sübstitüent etkileri, sinyallerin bölünme şekilleri ve spin-spin etkileşme değerleri ve literatür verileri dikkate alınarak değerlendirilmiş ve bileşik **3f**'nin HMBC-2D bulguları ile doğrulanmıştır (Silverstein ve ark., 1981; Erdik, 2007).

3a-g bileşiklerinde benzotiyazolin artığındaki sekonder amine göre *o*- konumdaki C_4-H protonları amin grubunun elektron verici etkisi ile en fazla gölgelenmekte, δ 6,71-6,77 ppm de dublet (*m*- eşleşmesi) olarak sinyal vermektedir. Sekonder amin grubunun *p*- pozisyonundaki C_6-H protonları tiyoeter ve triflorometil gruplarının elektron yoğunluğunu azaltması nedeniyle δ 6,93-6,97 ppm de dublet (*o*- eşleşmesi) şeklinde absorpsiyon yapmaktadır. Benzotiyazolin halkasında sekonder amin grubuna göre *m*-pozisyonda yer alan ve en az gölgelenen C_7 protonunun, güçlü elektron çekici tiyoeter ve triflorometil grupları ile elektron yoğunluğu azaldığından, benzotiyazol C_4 ve C_6 protonlarına kıyasla daha az gölgelenerek δ 7,26-7,30 ppm de dublet (*o*- eşleşmesi) şeklinde sinyal verdiği belirlenmiştir (Tablo 5-7).

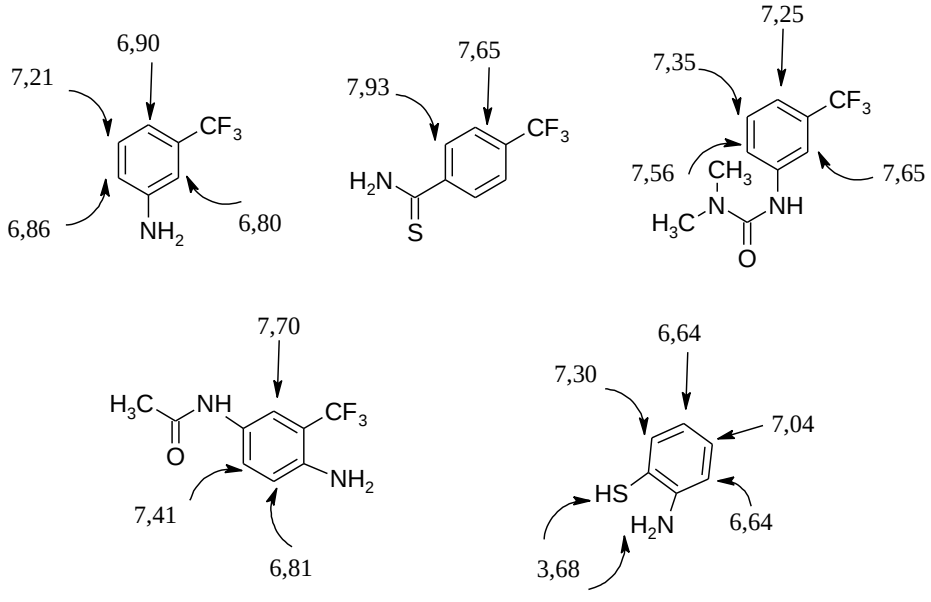
Triflorometil grubu taşıyan 3-(triflorometil)anilin (SDBS 3865), 4-(triflorometil) tiyobenzamid (SDBS 52987) ve 1,1-dimetil-3-(3-(triflorometil)fenil)üre (SDBS 52382) bileşiklerinin $CDCl_3$'da, 4-amino-3-(triflorometil)asetanilid (SDBS 51380) bileşiğinin DMSO-d_6'da alınan ^{1}H NMR spektrumlarında fenil protonlarının kimyasal kayma değerleri bu değerlendirmeleri doğrulamaktadır. Bu değerlendirmeler 2-aminobenzentiyolün $CDCl_3$'te alınan ^{1}H NMR verileri ile de uyumludur (SDBS 2159).

3-(Triflorometil)anilin (SDBS 3865) bileşiğinin fenil protonlarının kimyasal kayma değerleri ile amin grubunun sübstitüent etkisi dikkate alınarak hesaplanan triflorometil grubu kaydırma parametresi ile kükürt ve aminin kaydırma parametreleri ile hesaplanan değerler, saptanan benzotiyazolin halka protonlarının kimyasal kayma değerlerini ve benzotiyazolin halkasında sübstitüent etkisini doğrulamaktadır (Tablo 5-8) (Erdik 2007 pp. 277).



Tablo 5-7: Bileşik 3a-h'nin ^{1}H NMR verileri (DMSO-d_6, ppm)

Madde	R	Benzotiyazol protonları	1*H*-indol-2,3-dion protonları	N-H (bt)	N-H (ind)
3a	**5-Br**	6.74 (1H, d, *J*= 2.0 Hz, C_4-H) 6.95 (1H, dd, *J* = 8.0 Hz, C_6-H) 7.28 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, C_7-H)	6.84 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, C_7-H) 7.50 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, C_6-H) 7.71 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, C_4-H)	7.75 (1H, s)	10.63 (1H, s)
3b	**5-I**	6.73 (1H, d, *J*= 1.6 Hz, C_4-H) 6.95 (1H, dd, *J* = 8.0 Hz, C_6-H) 7.27 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, C_7-H)	6.72 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, C_7-H) 7.65 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, C_6-H) 7.82 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, C_4-H)	7.74 (1H, s)	10.60 (1H, s)
3c	**7-CH_3**	6.71 (1H, d, J = 2.0 Hz, C_4-H) 6.93 (1H, dd, *J* = 8.0 Hz, C_6-H) 7.26 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, C_7-H)	6.99 (1H, dd, *J* = 7.6, 7.2 Hz, C_5-H) 7.14 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, C_6-H) 7.41 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, C_4-H)	7.60 (1H, s)	10.48 (1H, s)
3d	**7-F**	6.74 (1H, d, *J*= 1.6 Hz, C_4-H) 6.95 (1H, dd, *J* = 7.6 Hz, C_6-H) 7.28 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, C_7-H)	7.08 (1H, td, *J*= 8,0; 7,6; 4,8 Hz, C_5-H) 7.23-7.29 (1H, m, C_6-H) 7.44 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, C_4-H)	7.76 (1H, s)	11.01 (1H, s)
3e	**7-Cl**	6.75 (1H, d, *J*= 1.6 Hz, C_4-H) 6.96 (1H, dd, *J* = 7.6 Hz, C_6-H) 7.28 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, C_7-H)	7.10 (1H, dd, *J* = 8.0, 7.6 Hz, C_5-H) 7.40 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, C_6-H) 7.56 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, C_4-H)	7.75 (1H, s)	10.91 (1H, s)
3f	**7-Br**	6,75 (1H, d, *J*= 1.3 Hz, C_4-H) 6,96 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, C_6-H) 7,29 (1H, d, *J* = 7.9 Hz, C_7-H)	7,04 (1H, dd, *J* = 7,7; 7.8 Hz, C_5-H) 7,53 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, C_6-H) 7,60 (1H, d, *J* = 7,1 Hz, C_4-H)	7,77 (1H, s)	10,80 (1H, s)
3g	**5-Cl-7-CH_3**	6.74 (1H, d, *J*= 2.0 Hz, C_4-H) 6.95 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, C_6-H) 7.27 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, C_7-H)	7.24 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, C_6-H) 7.42 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, C_4-H)	7.74 (1H, s)	10.67 (1H, s)
3h	**5,7-diCl**	6.77 (1H, d, *J*= 1.6 Hz, C_4-H) 6.97 (1H, dd, *J* = 7.6 Hz, C_6-H) 7.30 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, C_7-H)	7.59 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, C_6-H) 7.60 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, C_4-H)	7.75 (1H, s)	11.11 (1H, s)

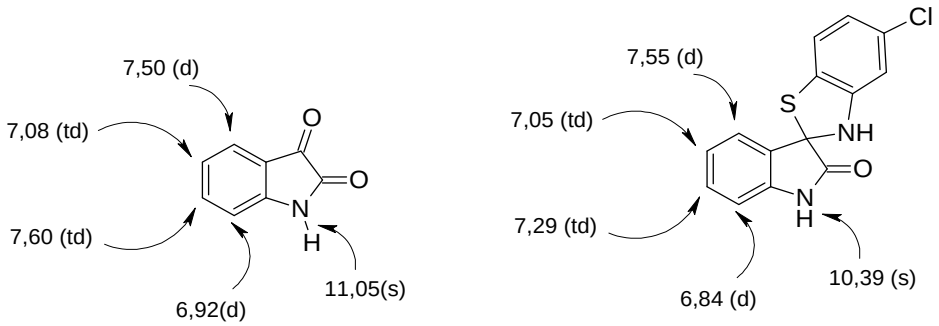


Tablo 5-8: Benzotiyazolin proton rezonanslarına sübstitüent etkisi

H	-S-	-NH-	-CF_3
C_4	0,10	-0,75	0,28
C_6	0,20	-0,65	0,28
C_7	0,37	-0,65	0,19

C_4-H→ 7,27 + 0,10 – 0,75 + 0,28 = 6.90
C_6-H→ 7,27 + 0,20 – 0,65 + 0,28 = 7,00
C_7-H→ 7,27 + 0,37 – 0.65 + 0,19 = 7,18

2-İndolinon halkası proton sinyallerine spirobenzotiyazol halkasının etkisini incelemek amacı ile 1*H*-indol-2,3-dionun DMSO-d_6'da alınan iki spektrumundaki proton sinyallerinin ortalamaları, 5-klorobenzotiyazol artığıtaşıyan spiro-2-indolinon bileşiğinin indol proton sinyalleri ile karşılaştırılmış indol proton sinyallerinin kayma değerleri belirlenmiştir (Laatsch ve ark. 1984; Santes ve ark. 1999; Görkem ve ark. 2014). Bu verilere göre spiro türevde indol NH sinyali 0,66 ppm yüksek alana, indol C_4 proton sinyali 0,05 ppm düşük alana kayarken, indol C_5, C_6 ve C_7 protonları sırasıyla 0,03, 0,31 ve 0,08 ppm yüksek alan şiddetine kayan sinyaller vermiştir. Bu kaydırma değerleri **3a-h** bileşiklerinin indol halkası kimyasal kayma değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.



2-İndolinon halkasındaki anilid NH grubunun mezomerik etkisiyle en çok *o*- ve *p*- konumundaki C_5 ve C_7 protonlarını gölgelenmektedir. Bu nedenle nonsübstitüe 1*H*-indol-2,3-dion bileşiğinde indol halkası proton sinyalleri yüksek alandan başlamak üzere C_7, C_5, C_4 ve C_6 sırası ile δ 6,94, 7,09, 7,51 ve 7,61 ppm de izlenmektedir. 5-Brom ve 5-iyod sübstitüe spiroindolinon türevleri **3a** ve **3b**'nin spektrumları incelendiğinde elektron çeken indüktif etkisi ile brom ve özellikle iyodun *o*- konumundaki indol C_4 ve C_6 proton sinyallerini düşük alana kaydırdıkları, *m*- konumundaki indol C_7 proton sinyalinin

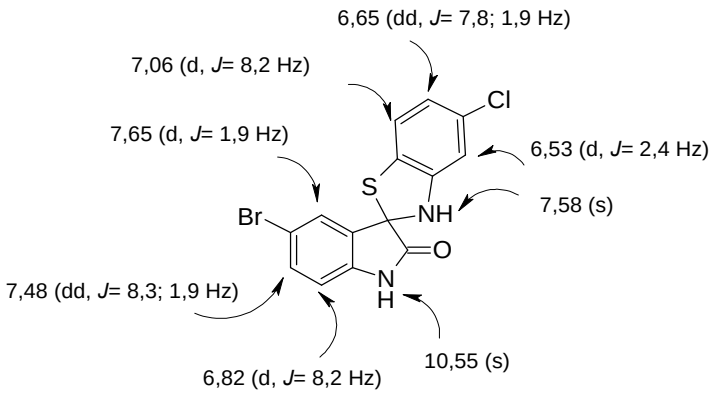
kimyasal kayma değerine brom önemli bir etki yapmazken iyodun bu protonu gölgeleyerek daha yüksek alanda gözlenmesine neden olduğu belirlenmiştir. Kükürt ve amine bağlı olan spiro karbonun indol proton sinyallerine önemli bir yapmadığı, **3a** ve **3b**'nin spektrumlarında indol C_4 proton sinyalleri sırasıyla δ 7,71 ve 7,82 ppm de dublet (*m*- eşleşmesi), indol C_6 proton sinyalleri sırasıyla δ 7,50 ve 7,65 ppm de dublet dublet (*o*- ve *m*- eşleşmeleri), indol C_7 proton sinyalleri sırasıyla δ 6,84 ve 6,72 ppm de dublet (*o*- eşleşmesi) olarak belirlenmiştir. 5-Bromo sübstitüe spiro-2-indolinon türevinin kimyasal kayma değerleri bu verileri desteklemekte (Görkem ve ark. 2014), kaydırma parametreleri ile hesaplanan değerler, saptanan indol protonlarının kimyasal kayma değerlerini ve sübstitüent etkilerini doğrulamaktadır (Tablo 5-9 ve 5-10) (Erdik 2007 pp. 276).

Tablo 5-9: Bileşik 3a'nın indol proton rezonanslarına sübstitüent etkisi

H	Br	NHCO	Spirob.t.	Hesaplanan	Bulunan
C_4	0,18	0,12	0,05	7,62	7,71
C_6	0,18	0,12	-0,31	7,26	7,50
C_7	-0,08	-0,07	-0,08	7,04	6,84

Tablo 5-10: Bileşik 3b'nin indol proton rezonanslarına sübstitüent etkisi

H	I	NHCO	Spiro b.t.	Hesaplanan	Bulunan
C_4	0,39	0,12	0,05	7,83	7,82
C_6	0,39	0,12	-0,31	7,47	7,65
C_7	-0,21	-0,07	-0,08	6,91	6,72

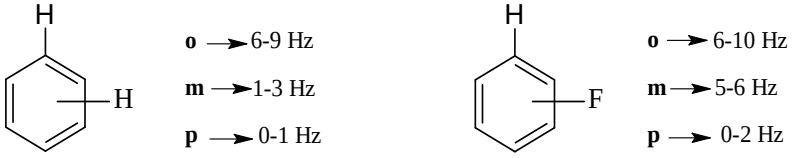


7-Metil sübstitüe spiroindolinon türevi **3c**'de indol halkasındaki metil grubunun elektron veren indüktif etkisi nedeniyle özellikle *o*- ve *p*- konumları olmak üzere indol protonlarının elektron yoğunluğunu arttırması nedeniyle kimyasal kayma değerlerini daha yüksek alan şiddetine kaydırdığı gözlenmiştir. İndol C_4, C_6 ve C_5 protonları sırasıyla δ 7,41 (dublet, *o*- eşleşmesi), δ 7,14 (dublet, *o*- eşleşmesi) ve δ 6,99 (dublet dublet, *o*- eşleşmeleri) ppm de sinyal verdiği saptanmıştır. Kaydırma parametreleri ile hesaplanan değerler, bulunan indol protonlarının kimyasal kayma değerleri ve sübstitüent etkileri ile uyumludur (Tablo 5-11) (Erdik 2007 pp. 276).

Tablo 5-11: Bileşik 3c'nin indol proton rezonanslarına sübstitüent etkisi

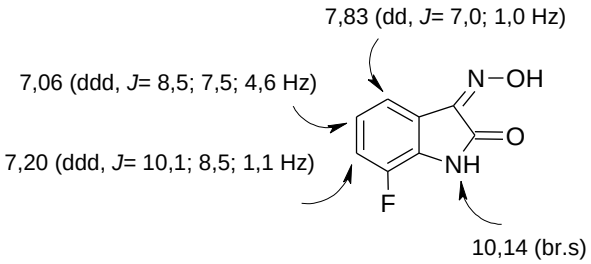
H	CH_3	NHCO	Spirob.t.	Hesaplanan	Bulunan
C_4	-0,22	0,12	0,05	7,22	7,41
C_5	-0,12	-0,07	-0,03	7,05	7,14
C_6	-0,20	-0,28	-0,31	6.48	6,99

Florun da spin kuantum sayısı hidrojen çekirdeği gibi ½' dir, ^1H ve ^{19}F spinleri etkileşim gösterir. Fenil halkasındaki *o*-, *m*-, *p*- ^1H-^1H ve ^1H-^{19}F spin etkileşimleri aşağıda görülmektedir (Silverstein ve ark., 1981).



Flor grubu elektron veren mezomerik etkisi ile *o*- konumdaki indol C_6 ve C_4 proton sinyallerini gölgelerken, *m*- konumdaki indol C_7 proton sinyalinin kimyasal kayma değerinde önemli bir değişiklik yapmamaktadır. 7-Flor sübstitüe 2-spiroindolinon türevi **3d**'nin spektrumunda indol C_4 protonu C_5 protonu *o*- eşleşmesi yaparak δ 7,44 ppm de dublet olarak gözlenmiş, indol C_6 protonu indol C_5 protonu ve F ile *o*-, indol C_4 protonu ile *m*- eşleşmesi yaparak δ 7,23-7,29 ppm alanında multiplet şeklinde sinyal vermiştir. İndol C_5 protonu indol C_4 ve C_6 protonları ile *o*- ve F ile *m*- eşleşmeleri yaparak δ 7,08 ppm de tripletin dubleti (dublet dublet dublet) olarak saptanmıştır.

7-Floro-3-(hidroksiimino)-1,3-dihidro-2*H*-indol-2-on bileşiğinin kimyasal kayma değerleri saptadığımız bulguları doğrulamaktadır (Jain ve ark., 2005).



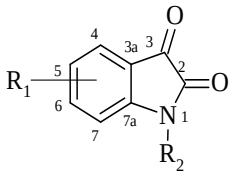
Klor sübstitüsyonunun indol proton sinyallerinin kimyasal kayma değerlerinde önemli farklılıklar oluşturmadığı belirlenmiş, brom sübstitüsyonu ile *o*- konumdaki proton sinyallerinin kimyasal kayma değerlerinde biraz düşük alana kayma gözlenmiştir. **3e** ve **3f**'nin spektrumlarında indol C_4 proton sinyalleri sırasıyla δ 7,56 ve 7,60 ppm de dublet (*o*- eşleşmesi), indol C_6 proton sinyalleri sırasıyla δ 7,40 ve 7,53 ppm de dublet (*o*- eşleşmesi), indol C_5 proton sinyalleri sırasıyla δ 7,10 ve 7,04 ppm de dublet dublet (*o*- eşleşmeleri) olarak belirlenmiştir.

5-Klor-7-metil sübstitüe **3g** bileşiğinde metil grubunun elektron veren indüktif etkisi nedeniyle özellikle *o*- ve *p*- konumlarındaki indol C_4 ve C_6 protonlarının elektron yoğunluğunu arttırması nedeniyle bu protonlarının kimyasal kayma değerlerinin daha yüksek alan şiddetine kaydığı ve sırasıyla δ 7,42 (dublet, *m*- eşleşmesi) ve 7,24 (dublet, *m*- eşleşmesi) ppm değerlerinde sinyal verdikleri gözlenmiştir. 5,7-dikloro sübstitüe **3h** bileşiğinde klor indol protonların kimyasal kayma değerlerinde önemli bir değişikliğe sebep olmamamış, indol C_4 ve C_6 protonları sırasıyla δ 7,60 (dublet, *m*- eşleşmesi) ve 7,59 (dublet, *m*- eşleşmesi) ppm değerlerinde sinyal vermiştir.

5.2.3. ^{13}C-NMR Bulguları

1*H*-indol-2,3-dion karbon rezonanslarının düşük alandan başlamak üzere C_3, C_2, C_{7a}, C_6, C_4, C_5, C_{3a}, C_7 sırası ile sinyal verdiği, keton C_3, amid C_2 ve laktam NH ına bağlı C_{7a} karbonları en yüksek ppm değerinde gözlenirken, C_3 ün *o*- ve *p*- konumundaki C_4 ve C_6 karbonları, NH ın *o*- ve *p*- konumundaki C_5 ve C_7 karbonlardan daha düşük alanda pik vermektedir. 1*H*-indol-2,3-dion ve türevlerinde kimyasal kayma değerleri çözücü polaritesi ile değişmemekte, sübstitüentlerin etkisi ile kaymalar gözlenmektedir. İpso karbonun ppm değeri en fazla flor olmak üzere metil ve klor sübstitüsyonları ile düşük alana kaymakta, brom sübstitüsyonu ile ipso karbon yüksek alanda sinyal vermektedir. *o*- konumundaki karbonların kimyasal kaymasını metil ve klor sübstitüsyonları etkilemezken, bu sinyal flor sübstitüsyonu ile yüksek alana, brom sübstitüsyonu ile düşük alana kaymaktadır. Bu sübstitüsyonlar *m*- konumundaki karbonların kimyasal kayma

değerlerini fazla etkilememektedir. *p*- konumundaki karbon sinyalini klor ve brom sübstitüsyonu önemli derecede etkilemezken, metil ve flor sübstitüsyonu ile bu sinyaller yüksek alana kaymaktadır (Tablo 5-12) (Albright ve Freeman 1977; Winkler ve ark. 1979; Morales-Rios ve Joseph-Nathan 1991; Holzer ve Györgydeák 1996; SDBS 52016, 51489, 51426, 53707).



Tablo 5-12: 1*H*-indol-2,3-dion ve türevlerinin ^{13}C-NMR verileri (δ ppm)

R_1	R_2	C_2	C_3	C_{3a}	C_4	C_5	C_6	C_7	C_{7a}
H**	**H**	159,3	184,3	117,7	124,6	122,7	138,3	112,2	150,7
5-CH_3**	**H**	159,4	184,5	117,7	124,7	132,0	138,8	112,0	148,5
5-F**	**H**	159,3 (d, *J*= 1,0 Hz)	183,8 (d, *J*= 2,0 Hz)	118,4 (d, *J*= 7,0 Hz)	111,28 (d, *J*= 24,0 Hz)	158,0 (d, *J*= 239,0 Hz)	124,4 (d, *J*= 24,0 Hz)	113,4 (d, *J*= 7,0 Hz)	146,9 (d, *J*= 2,0 Hz)
7-F*	**H**	157,89	181,54 (d, *J*= 4,0 Hz)	120,12 (d, *J*= 3,0 Hz)	121,48 (d, *J*= 4,0 Hz)	124,52 (d, *J*= 5,0 Hz)	125,36 (d, *J*= 17,0 Hz)	147,64 (d, *J*= 246,9 Hz)	136,15 (d, *J*= 13,0 Hz)
6-Cl**	**H**	159,27	182,84	116,64	126,10	122,60	142,21	112,08	151,71
5-Br*	**CH_3**	157,23	182,16	118,64	128,08	116,68	140,61	111,64	150,19

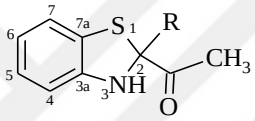
* Çözücü: $CDCl_3$

** Çözücü: DMSO-d_6

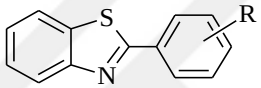
Sübstitüentlerin benzenin ^{13}C kimyasal kayma değerlerine etki değerleri bu verileri doğrulamaktadır (Tablo 5-13) (Balcı 2013 pp. 330; Erdik 2007 pp. 340). Benzotiyazolin ve benzotiyazol türevlerinin karbon sinyalleri yüksek alandan başlamak üzere C_4, C_6, C_7, C_5, C_{7a}, C_{3a} (Santes ve ark., 1999); C_7, C_4, C_6, C_5, C_{7a}, C_{3a} (Billeau ve ark., 2006) veya C_4, C_7, C_6, C_5, C_{7a}, C_{3a} (Solcániová ve Culak, 1989) sırası ile sinyal vermiş, kükürt ve amin gruplarının gölgelemelerindeki farklılıklar nedeniyle bileşiklerin tümünde C_{7a} sinyali C_{3a} sinyalinden yüksek alanda gözlenmiştir (Tablo 5-14).

Tablo 5-13: Benzenin ^{13}C kimyasal kayma değerlerine sübstitüentlerin etkileri

Sübstitüent	Sübstitüentin pozisyonu			
	ipso	orto	meta	para
CH_3	9,3	0,6	0,0	-3,1
	9,3	-0,1	0,7	-3,0
F	35,1	-14,3	0,9	-4,4
	35,0	-14,4	0,9	-4,4
Cl	6,4	0,2	1,0	-2,0
	6,4	0,2	1,0	-2,0
Br	-5,4	3,3	2,2	-1,0
	-5,9	3,0	1,5	-1,5
I	-32,3	9,9	2,6	-0,4
	-32,3	9,9	2,6	-0,4



a



b

Tablo 5-14: Benzotiyazolin ve benzotiyazol türevlerinin ^{13}C-NMR verileri

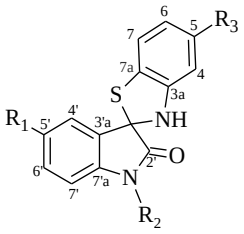
Bileşik	3a	4	5	6	7	7a
a, R=CH_3*	145,5	112,1	126,0	121,3	121,5	131,6
a, R=C_6H_5*	145,9	112,0	126,1	121,4	121,7	125,0
b, R=H**	153,77	123,09	126,8	125,69	122,47	134,67
	150,2	119,9	126,4	125,5	124,9	131,9
b, R=4-OCH_3**	153,0	121,6	125,9	124,5	121,9	133,7
b, R=4-Br**	153,96	123,22	126,4	125,35	122,56	134,93
b, R=2-Cl**	152,14	123,41	126,74	125,86	122,16	135,56
b, R=4-Cl**	153,2	122,2	126,5	125,5	122,7	135,8
b, R=2,4-diCl**	152,0	123,41	126,89	126,17	122,41	135,53
b, R=2-Cl, 4-F**	152,11	123,29	126,95	126,06	122,37	135,5
b, R=2-Cl, 5-NO_2**	151,74	123,49	127,15	126,44	122,29	135,69
b, R=2-Br, 5-OCH_3**	152,3	123,37	126,78	125,96	122,27	135,69

* Çözücü: $CDCl_3$

** Çözücü: DMSO-d_6

Benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinon türevlerinde yapılan HSQC-2D analizlerinde Tablo 5-14'de görüldüğü gibi spiro karbon sinyalinin δ 74,51-75,77 ppm, katerner karbonlardan $C_{2'}$, C_{3a} ve $C_{7a'}$ rezonanslarının en düşük alanda gözlendiği kaydedilmiş, benzotiyazolin karbon sinyallerinin yüksek alandan başlamak üzere C_4, C_6,

C_7, C_5, C_{7a} ve C_{3a} sırası ile izlendiği, indol halkası karbon rezonanslarında sübstitüentlerin etkisi ile kimyasal kaymalar gözlendiği bildirilmiştir (Tablo 5-15) (Karalı ve ark. 2010; Ermut ve ark. 2014).



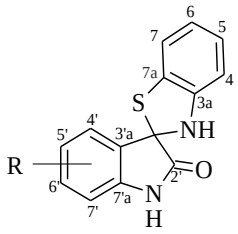
R_1=CH_3	R_2=CH_3	R_3= H	**a**
R_1=Cl	R_2=CH_3	R_3= H	**b**
R_1=Br	R_2=CH_3	R_3= H	**c**
R_1=H	R_2=H	R_3= Cl	**d**
R_1=CH_3	R_2=H	R_3= Cl	**e**
R_1=F	R_2=H	R_3= Cl	**f**
R_1=Cl	R_2=H	R_3= Cl	**g**

Tablo 5-15: Benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinonların ^{13}C NMR bulguları

	a	**b**	**c**	**d**	**e**	**f**	**g**
$C_{2'}$	175,12	174,88	174,75	176,53	176,56	176,66	176,31
$C_{3a'}$	124,77	124,54	124,53	129,86	130,87	131,66 (d, *J*=7,7 Hz)	132,11
$C_{4'}$	126,41	125,77	128,46	126,38	126,82	113,79 (d, *J*=24,9 Hz)	126,21
$C_{5'}$	130,04	127,75	115,30	123,28	129,97	159,04 (d, *J*= 238,7 Hz)	127,16
$C_{6'}$	131,43	131,07	133,93	131,43	131,67	117,96 (d, *J*=23,5 Hz)	131,29
$C_{7'}$	109,46	111,43	111,93	110,88	110,66	111,98 (d, *J*=7.7 Hz)	112,51
$C_{7a'}$	141,04	142,34	142,35	142,03	139,44	138,13 (d, *J*=1,9 Hz)	140,86
C_{3a}	147,68	147,40	147,37	149,43	149,41	149,21	149,12
C_4	109,17	109,75	109,45	108,40	108,30	108,56	108,62
C_5	126,46	126,57	126,58	130,92	132,38	131,18	131,05
C_6	119,40	119,71	119,72	118,52	118,46	118,70	118,76
C_7	121,74	121,89	121,90	122,70	122,64	122,76	122,78
C_{7a}	132,96	132,12	132,46	123,99	123,98	123,75	123,72
Spiro C	74,80	74,56	74,51	75,64	75,75	75,77	75,54

3a-h bileşiklerinin ^{13}C NMR-APT ve **3f** bileşiğinin HMBC-2D spektrumlarında isatinin 3 konumundaki keton C=O karbonuna (C_3) ait sinyalin (δ 181,5-184,5 ppm) gözlenmemesi, yalnız laktam C=O karbonuna (C_2) ait sinyalin δ 175,16-176,48 ppm de

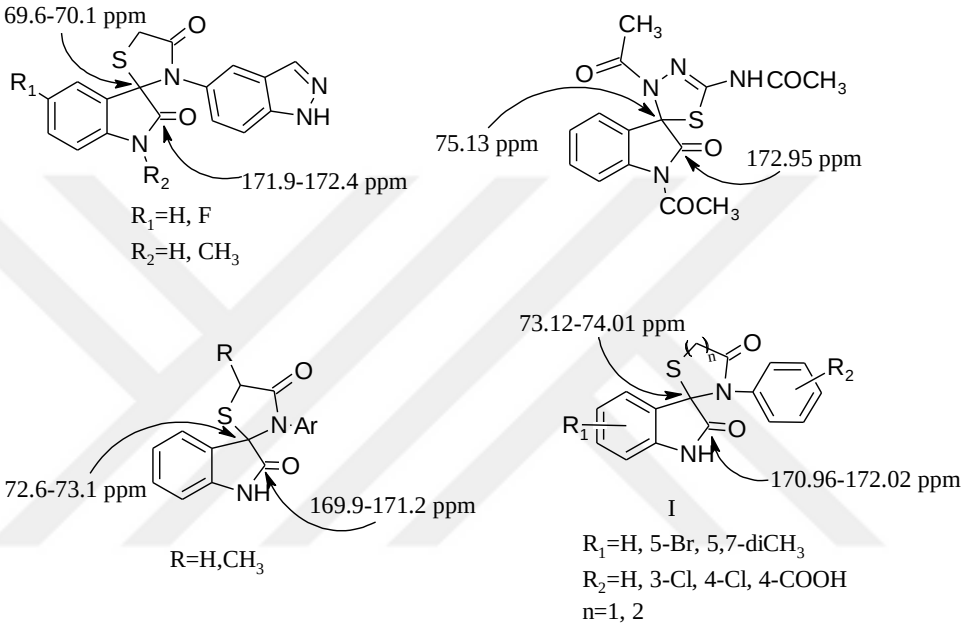
saptanması, δ 74,49-76,02 ppm alanında spiro C rezonansının saptanması spiroindolinon yapısını karakterize etmektedir (Tablo 5-16).



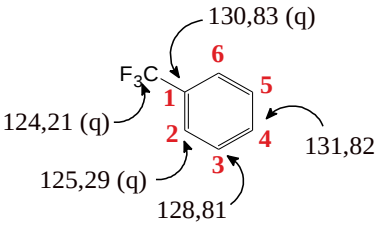
Tablo 5-16: Bileşik 3a-h'nin ^{13}C-NMR Bulguları

R	3a (5-Br)	3b (5-I)	3c (7-CH_3)	3d (7-F)	3e (7-Cl)	3f (7-Br)	3g (5-Cl-7-CH_3)	3h (5,7-diCl)
$C_{2'}$	175,41	175,16	176,28	175,69	175,82	176,26	176,48	175,66
$C_{3a'}$	129,54	129,55	128,64	132,04 (d, *J*= 3,92 Hz)	129,46	131,71	130,03	132,81
$C_{4'}$	128,41	133,90	122,62	121,75 (d, *J*= 3,21 Hz)	124,38	124,84	123,28	124,56
$C_{5'}$	114,08	85,19	123,07	123,54 (d, *J*= 5,83 Hz)	123,94	125,35	126,82	127,09
$C_{6'}$	133,56	139,30	132,00	117,71 (d, *J*= 17,00 Hz)	130,59	133,99	131,84	130,01
$C_{7'}$	112,38	112,79	119,74	146,32 (d, *J*= 243,80 Hz)	114,40	103,06	122,48	115,20
$C_{7a'}$	140,64	141,08	139,92	128,50 (d, *J*= 13,48 Hz)	139,03	141,19	139,32	138,27
C_{3a}	147,58	147,58	147,96	147,63	147,57	148,05	148,11	147,32
C_4	103,57 (q, *J*= 3,82 Hz)	103,53 (q, *J*= 3,22 Hz)	103,33 (q, *J*= 3,82 Hz)	103,49 (q, *J*= 3,82 Hz)	103,48 (q, *J*= 3,82 Hz)	103,95 (q, *J*= 3,5 Hz)	103,99 (q, *J*= 3,82 Hz)	103,70 (q, *J*= 4,02 Hz)
C_5	126,72 (q, *J*= 30,99 Hz)	126,70 (q, *J*= 30,99 Hz)	126,60 (q, *J*= 30,89 Hz)	126,74 (q, *J*= 31,59 Hz)	126,73 (q, *J*= 31,69 Hz)	127,21 (q, *J*= 31,4 Hz	127,15 (q, *J*= 30,99 Hz)	126,81 (q, *J*= 31,69 Hz)
C_6	115,47 (q, *J*= 3,92 Hz)	115,44 (q, *J*= 4,52 Hz)	115,24 (q, *J*= 3,32 Hz)	115,44 (q, *J*= 4,53 Hz)	115,42 (q, *J*= 3,92 Hz)	115,91 (q, *J*= 4,0 Hz)	115,88 (q, *J*= 3,92 Hz)	115,58 (q, *J*= 3,82 Hz)
C_7	121,45	121,43	121,37	121,47	121,45	121,94	121,88	121,51
C_{7a}	131,67	131,86	129,87	129,50	131,18	129,93	131,11	129,29
CF_3	124,47 (q, *J*= 274,28 Hz)	124,48 (q, *J*= 271,67 Hz)	124,52 (q, *J*= 271,67 Hz)	124,48 (q, *J*= 271,57 Hz)	124,45 (q, *J*= 271,57 Hz)	124,93 (q, *J*= 271,6 Hz)	124,92 (q, *J*= 271,67 Hz)	124,47 (q, *J*= 271,67 Hz)
Spiro C	74,69	74,49	74,60	74,82	75,28	76,02	75,40	75,25
CH_3	-	-	16,00	-	-	-	16,34	-

Bu bulguları literatürde yer alan spiroindolinonların spiro karbon ve 2-indolinon laktam karbonil rezonansları doğrulamaktadır (Dandia ve ark. 1990; Dandia ve ark. 2004; Jain ve ark. 2005; Larina ve ark. 2007). Bileşik **3f**'nin HMBC-2D spektrumunda spiro C sinyalinin benzotiyazolin NH ve indol C_4 proton sinyalleri ile ilişki göstermesi, indol NH proton sinyalinin spiro karbon, indol C_{3a} ve indol C_{7a} karbon sinyalleri ile ilişkili olması spiroindolinon yapısının doğruluğunu desteklemektedir.



Triflorometil sübstitüentinin benzen halkasındaki karbon sinyallerini kaydırma değerlerinin belirlenmesi için (triflorometil)benzen bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (50 MHz, $CDCl_3$) incelenmiş (SDBS 1727), triflorometil grubunun ipso ve *p*- konumundaki karbon sinyallerini düşük alana kaydırdığı, *m*- konumundaki karbonların kimyasal kayma değerlerini değiştirmediği, *o*-konumundaki karbon sinyallerini yüksek alana kaydırdığı belirlenmiştir. Triflorometil karbon sinyali δ 124,21 ppm de (q, *J*= 272,0 Hz) gözlenirken, triflorometil grubunun *o*- konumundaki fenil $C_{2,6}$ ve *ipso* C_1 karbon rezonansları kuartet şeklinde bölünerek sırasıyla δ 125,29 (*J*= 3,5 Hz) ve δ 130,83 (*J*= 32,6 Hz) ppm de gözlenmiştir. Triflorometil grubunun *m*- konumundaki $C_{3,5}$ ve *p*- konumundaki C_4 karbon sinyalleri sırasıyla δ 128,81 ve 131,82 ppm de singlet şeklinde saptanmıştır.



Benzotiyazolin halkasındaki güçlü elektron verici sekonder amin grubu, ayrıca tiyoeter grubu *o*- ve *p*- konumundaki karbon sinyallerini gölgelerken, ipso karbonun elektron yoğunluğunu önemli derecede azaltmakta, *m*- konumundaki karbon sinyalini yüksek alana kaydırmaktadır. Söz konusu bu sübstitüent etkileri tiyoeter grubuna kıyasla sekonder amin için çok daha güçlüdür, benzen halkasının kimyasal kayma değerlerini önemli miktarda değiştirmektedir. (Triflorometil)benzen bileşiğinin ^{13}C NMR verilerinden hareketle triflorometil grubunun benzen halkası karbon sinyallerine sübstitüent etkileri belirlenmiş ve Tablo 5-17'de tiyoeter ve sekonder amin gruplarının kaydırma değerleri ile birlikte sunulmuştur.

Tablo 5-17: Benzen halkası ^{13}C kayma değerleri üzerinde sübstitüent etkileri

Sübstitüent	Sübstitüentin pozisyonu			
	ipso	**orto**	**meta**	**para**
SCH_3	9,90	-2,00	0,10	-3,70
-NH-	19,2	-12,4	1,3	-9,5
CF_3	2,33	-3,21	0,31	3,32

3a-h bileşiklerinde triflorometil ve amin gruplarının *o*- konumunda bulunan ve bu gruplar tarafından en fazla gölgelenen benzotiyazolin C_4 karbon sinyali δ 103,33-103,99 ppm alanında, triflorometil grubu etkisiyle kuartet şeklinde izlenen piklerdendir. Kuartet şeklinde gözlenen diğer sinyal, triflorometil grubuna *o*-, amin grubuna *p*- konumda yer alan benzotiyazolin C_6 karbon rezonansıdır. Bu sinyal triflorometil ve amin grupları tarafından gölgelendiğinden δ 115,24-115,91 ppm alanında sinyal vermiştir. Tiyoeter grubunun *p*- konumunda yer alan, quartet şeklinde rezonans veren diğer sinyal, triflorometil grubunun bağlı olduğu ipso C_5 karbon sinyalidir. Bu karbon sinyali tiyoeter grubu tarafından gölgelenirken, triflorometil ve *m*- konumundaki amin grupları tarafından yüksek alana kaydırıldığı için δ 126,60-127,21 ppm de gözlenmiştir. Tiyoeter grubuna *o*-, triflorometil ve amin grubuna *m*- pozisyonda yer alan benzotiyazolin C_7 karbon rezonansı tiyoeter grubu tarafından gölgelenmiş, triflorometil ve amin grupları tarafından

yüksek alana kaydırılmıştır. Bu sinyal singlet şeklinde δ 126,60-127,21 ppm'de gözlenmiştir. Triflorometil grubunun *m*- ve *p*- pozisyonlarında bulunan katerner karbonlar, benzotiyazolin C_{3a} ve C_{7a} rezonansları singlet şeklinde sinyal veren diğer benzotiyazolin karbonlarıdır. Tiyoeter grubunun bağlı olduğu benzotiyazolin C_{7a} karbon sinyali tiyoeter ve triflorometil grupları tarafından düşük alana kaydırılırken, *o*-pozisyonunda yer alan amin grubu tarafından gölgelenmektedir. Bu nedenle benzotiyazolin C_{7a} rezonansları **3a-h** bileşiklerinde δ 129,29-131,67 ppm alanında saptanmıştır. **3a-h** bileşiklerinde δ 147,57-148,11 ppm alanında saptanan, amin grubunun bağlı olduğu benzotiyazolin C_{3a} karbonu benzotiyazolin karbonları arasında en düşük alanda rezonans veren karbondur. Bu karbon sinyali *o*- pozisyonlarında bulunan tiyoeter grubu tarafından biraz gölgelense de özellikle amin grubu olmak üzere *m*-pozisyonundaki triflorometil grubu tarafından düşük alana kaydırılmaktadır (Tablo 5-18).

Tablo 5-18: Benzotiyazolin karbon rezonanslarına sübstitüent etkisi

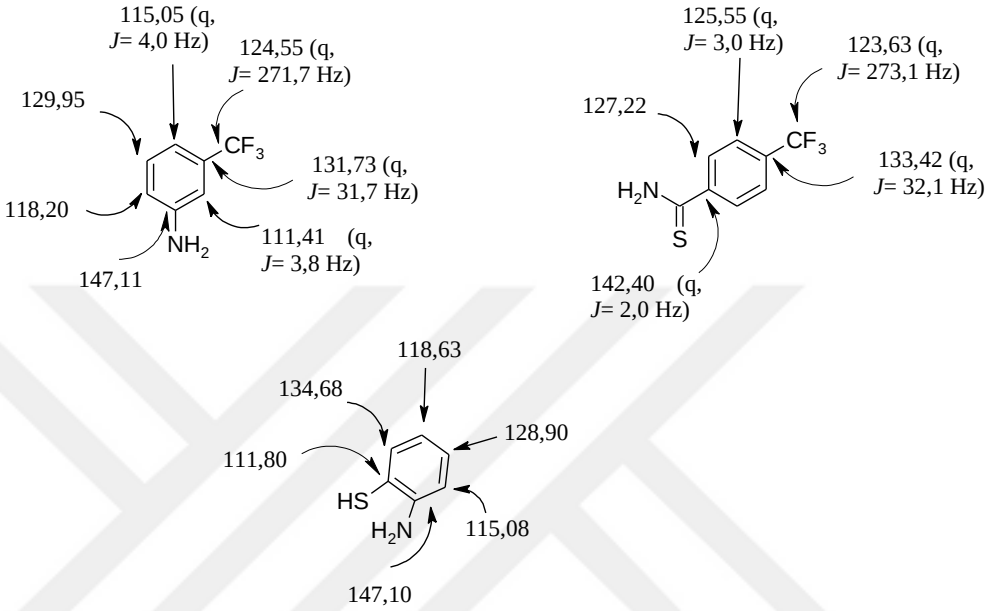
Benzotiyazol C	-S-	-NH-	$-CF_3$
C_{3a}	-2,00	19,2	0,31
C_4	0,10	-12,4	-3,21
C_5	-3,70	1,30	2,33
C_6	0,10	-9,50	-3,21
C_7	-2,00	1,30	0,31
C_{7a}	9,90	-12,4	3,32

$C_{3a} \rightarrow 128,5 - 2,0 + 19,2 + 0,31 = 146,01$
$C_4 \rightarrow 128,5 + 0,1 - 12,4 - 3,21 = 112,99$
$C_5 \rightarrow 128,5 - 3,70 + 1,30 + 2,33 = 128,43$
$C_6 \rightarrow 128,5 + 0,10 - 9,50 - 3,21 = 115,89$
$C_7 \rightarrow 128,5 - 2,00 + 1,30 + 0,31 = 128,11$
$C_{7a} \rightarrow 128,5 + 9,9 - 12,4 + 3,32 = 129,32$

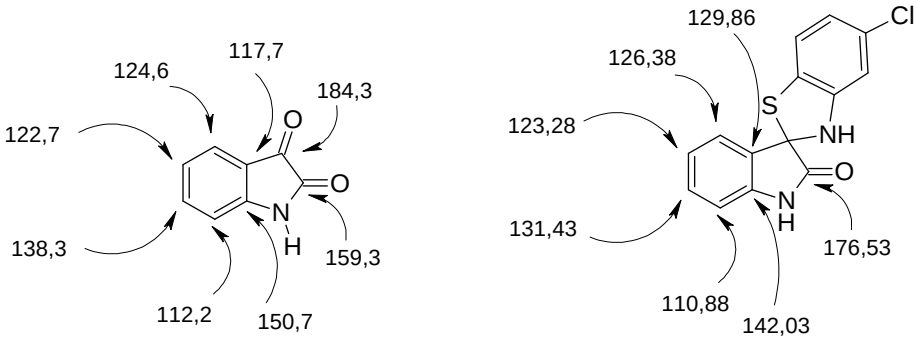
Değerlendirilen benzotiyazolin karbon rezonansları, hesaplanan değerler ve sübstitüent etkileri ile uyumludur, ayrıca sinyallerin bölünme şekilleri ve etkileşme değişmezi değerleri bu verileri doğrulamaktadır. Bulunan kimyasal kayma değerleri ile hesaplanan rezonanslar arasında bazı küçük farklılıklar gözlense de benzotiyazolin karbonlarının kimyasal kayma sırası hesaplanan değerler ve sübstitüent etkileri ile uyumludur. Ayrıca **3f** bileşiğinin HMBC-2D analizi karbon rezonanslarının kimyasal kayma değerlerine kesinlik kazandırmaktadır.

Bileşik **3a-h**'nin ^{13}C NMR-APT spektrumlarında benzotiyazolin halkasının 5-konumundaki triflorometil grubu δ 124,47-124,94 ppm alanında quartet şeklinde sinyal vermiş, 7-metil sübstitüe bileşik **3c** ve 5-klor-7-metil sübstitüe bileşik 3**g**'nin metil

rezonansları sırasıyla δ 16,00 ve 16,34 ppm'de gözlenmiştir. Triflorometil grubu taşıyan 3-(triflorometil)anilin (SDBS 3865), 4-(triflorometil)tiyobenzamid (SDBS 52987) ve 2-aminobenzentiyolün (SDBS 2159) bileşiklerinin $CDCl_3$'te alınan ^{13}C NMR spektrumlarında fenil karbonlarının kimyasal kayma değerleri benzotiyazolin halkası karbon rezonansları ile ilgili değerlendirmeleri doğrulamaktadır.



Nonsübstitüe 2-indolinon karbon rezonansları düşük alandan başlamak üzere C_2, C_{7a}, C_6, C_4, C_5, C_{3a}, C_7 sırası ile rezonans vermekte, amid C_2 ve laktam NH'ına bağlı C_{7a} karbonları en düşük alanda izlenirken, C_3 ün *o*- ve *p*- konumundaki C_4 ve C_6 karbonları, NH ın *o*- ve *p*- konumundaki C_5 ve C_7 karbonlarından daha düşük alanda sinyal vermektedir. 2-İndolinon halkası karbon sinyallerine spirobenzotiyazol halkasının etkisini incelemek amacı ile 1*H*-indol-2,3-dionun DMSO-d_6'da alınan spektrumundaki karbon sinyalleri, 5-klorobenzotiyazol artığı taşıyan spiro-2-indolinon bileşiğinin indol karbon sinyalleri ile karşılaştırılmış ve indol karbon sinyallerinin kayma değerleri belirlenmiştir (Laatsch ve ark. 1984; Santes ve ark. 1999; Görkem ve ark. 2014). Bu verilere göre spiro türevde indol C_2, C_{3a} ve C_4 karbon sinyalleri sırasıyla 17,23, 12,16 ve 1,78 ppm düşük alana kayarken, indol C_5, C_6, C_7 ve C_{7a} karbonları sırasıyla 0,58, 6,87, 1,32 ve 8,67 ppm yüksek alan şiddetine kayan sinyaller vermiştir. Bu kaydırma değerleri **3a-h** bileşiklerinin indol halkası kimyasal kayma değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.



Bileşik **3a-h**'nin ^{13}C NMR-APT spektrumlarında indol C_{3a}, C_{4-7} ve C_{7a} karbon rezonanslarında indol halkasındaki sübstitüentlerin etkisi ile kaymalar gözlenmektedir. İndol C_{3a} karbon sinyalleri indol halkasındaki sübstitüent değişiminden en az etkilenirken, δ 175,16-176,48 ppm de izlenen indol C_2 karbon rezonansları gibi benzotiyazol artığı tarafından düşük alana en fazla kaydırılan karbonlardandır. Bu karbon sinyalleri **3a-h** bileşiklerinde δ 128,64-132,81 ppm alanında saptanmış, 7-flor sübstitüe **3d** bileşinde bu sinyal florun etkisi ile δ 132,04 ppm'de dublet şeklinde izlenmiştir. İndol C_4 karbon rezonansı δ 121,75-133,90 ppm alanında sinyal vermiş, 7-flor sübstitüe **3d** bileşinde florun etkisi ile bu rezonans en fazla gölgelenmiş ve δ 121,75 ppm'de dublet şeklinde gözlenmiştir. İndol C_4 karbon sinyali ayrıca *p*- konumundaki metil ve klor grupları ile gölgelenirken, bu sinyal özellikle iyod olmak üzere brom atomları tarafından düşük alana kaydırılmıştır.

İndol C_5 karbon sinyali 5-brom ve 5-iyod sübstitüe **3a** ve **3b** bileşiklerinde yüksek alanda gözlenmekte, sırasıyla bu katerner karbon sinyali δ 114,08 ve 85,19 ppm'de rezonans vermektedir. 7-sübstitüe **3c-f** bileşiklerinde bu karbon rezonansları δ 123,07-125,35 ppm alanında gözlenmiş, 7-flor sübstitüe **3d** bileşinde florun etkisi ile bu rezonans dublet şeklinde izlenmiştir. 5,7-disübstitüe **3g** ve **3h** bileşiklerinde klor atomu taşıyan katerner indol C_5 karbonu sırasıyla δ 126,82 ve 127, 09 ppm'de sinyal vermiştir.

İndol C_6 rezonansı flor atomu tarafından gölgelenmiş, 7-flor sübstitüe **3d** bileşiğinde bu sinyal δ 117,71 ppm'de dublet şeklinde, diğer türevlerde bu sinyal benzotiyazol artığının da gölgelemesi ile δ 130,01-139,30 ppm alanında gözlenmiştir. Bu karbon sinyalinin kimyasal kayma değeri *o*- pozisyonundaki metil ve klor sübstitüsyonu önemli derecede değişmezken, özellikle iyod olmak üzere brom sübstitüsyonu ile düşük alana kaymıştır. İndol karbonları arasında laktam NH'ı etkisi ile en fazla gölgelenen indol C_7 karbon rezonansı, 7-flor sübstitüe **3d** bileşiğinde güçlü elektron çekici flor atomu

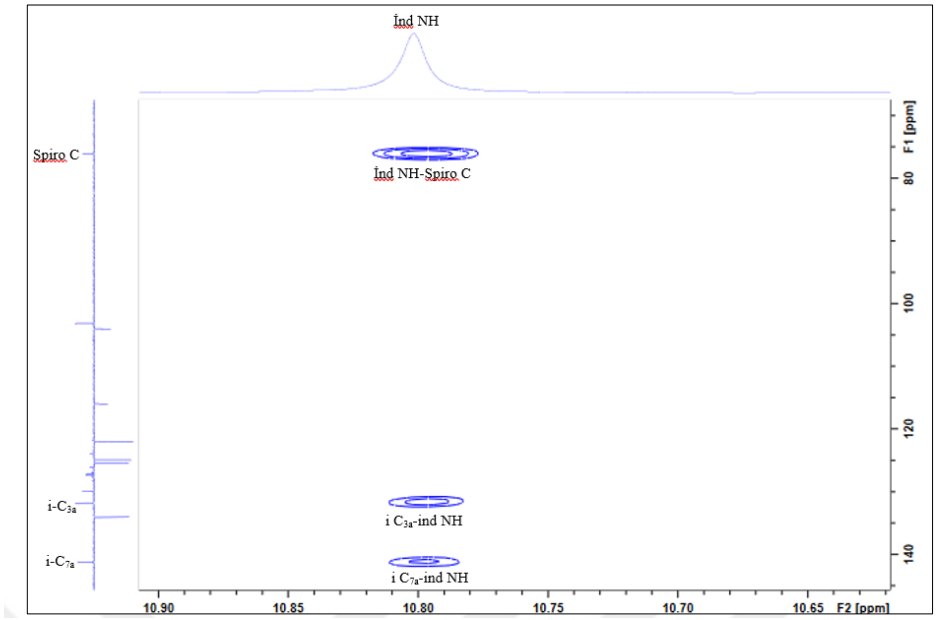
tarafından düşük alana kaydırılmış ve δ 146,32 ppm'de dublet şeklinde gözlenmiştir. 7-Metil ve 5-klor-7-metil sübstitüe **3c** ve **3g** bileşiklerinde metil grubu indol C_7 karbon sinyalinin gölgelenmesini azaltmış ve bu karbon sinyalleri sırasıyla 119,74 ve 122,48 ppm'de izlenmiştir. Oysa 7-brom sübstitüe **3f** bileşiğinde katerner indol C_7 karbon sinyali yüksek alana kaymış ve bu sinyal δ 103,06 ppm'de rezonans vermiştir. **3a**, **3b, 3e** ve **3h** bileşiklerinde indol C_7 karbon sinyali δ 112,38-115,20 ppm'de gözlenmiştir.

İndol C_2 karbonundan sonra indol karbonları arasında en az gölgelenen C_{7a} karbonu rezonansı, 7-flor sübstitüe **3d** bileşiğinde flor atomu tarafından gölgelenerek yüksek alana kaydırılmış ve δ 128,50 ppm'de dublet şeklinde gözlenmiştir. Diğer bileşiklerde bu sinyal benzotiyazol artığı tarafından en fazla gölgelenmekte, *o*- ve/veya *p*- konumundaki sübstitüentlerin kimyasal kayma değerlerine önemli derecede etki etmemesi nedeniyle δ 138,27-141,19 ppm alanında rezonans vermiştir (Tablo 5-19).

3f bileşiğinin HMBC-2D bulguları, özellikle benzer kimyasal çevreye sahip 2-indolinon ve benzotiyazolin proton ve karbon rezonanslarını doğrulamış, benzotiyazolin halkasının 5- konumunda yer alan triflorometil grubu ile kuartet şeklinde bölünenen benzotiyazolin C_4, C_5 ve C_6 karbon sinyallerinin konumları etkileşme değişmezleri ile belirlenmiş, 7-flor sübstitüe **3d** bileşiğinin ^{13}C NMR-APT spektrumda ^{13}C-^{19}F etkileşmesi göstererek dublet şeklinde bölünen ve etkileşme değişmezleri ile konumları doğrulanan sinyaller 2-indolinon karbonlarının kimyasal kayma değerlerine kesinlik kazandırmıştır.

5.2.4. HMBC-2D Bulguları

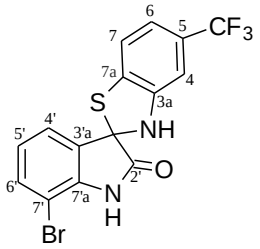
3f bileşiğinin iki ve/ veya üç bağ uzun alan etkileşimlerini gösteren katerner ve protonlanmış karbon sinyallerini tanımlamak, ^1H-NMR ve ^{13}C NMR-APT bulgularına kesinlik kazandırmak için HMBC-2D analizi yapılmıştır. DMSO-d_6'da alınan spektrumda benzotiyazolin ve 2-indolinon halkalarının proton ve karbon sinyalleri aralarındaki korelasyonlar belirlenmiş ve katerner karbon sinyalleri kanıtlanmıştır. **3f** bileşiğinin HMBC-2D spektrumu incelendiğinde ^1H ekseninde izlenen, δ 10,80 ppm de gözlenen indol NH protonunun sırasıyla ^{13}C skalasında δ 141,19 ve 131,71 ppm'de gözlenen indol C_{7a} ve C_{3a} karbonları ve δ 76, 02 ppm'de gözlenen spiro karbon ile etkileşmesi benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinon yapısını doğrulayan önemli bulgulardır (Şekil 5-9 ve Tablo 5-19).



Şekil 5-9: Bileşik 3f'nin HMBC-2D spektrumu (10,62- 10,90 ppm)

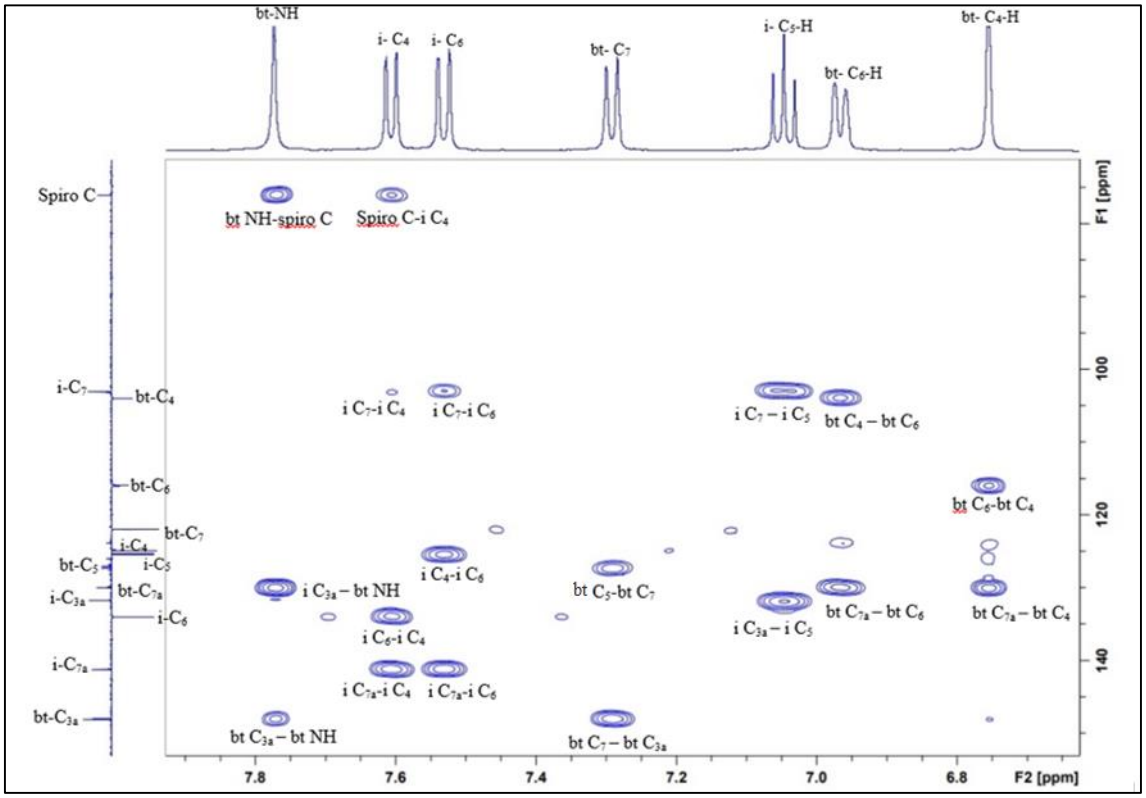
3f bileşiğinin spektrumunda ^{1}H ekseninde δ 7,04 ppm'de izlenen indol C_5 protonun sırasıyla ^{13}C skalasında δ 103,06 ve 131,71 ppm'de sinyal veren indol C_7 ve C_{3a} karbonları ile etkileştiği, ^{1}H skalasında δ 6,96 ppm'de izlenen benzotiyazolin C_6 protonun sırasıyla ^{13}C skalasında δ 103,95 ve 123,93 ppm'de sinyal veren benzotiyazolin C_4 ve C_{7a} karbonları ile korelasyon oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca, ^{1}H skalasında δ 6,75 ppm'de izlenen benzotiyazolin C_4 protonun sırasıyla ^{13}C ekseninde 115,91 ve 123,93 ppm'de gözlenen benzotiyazolin C_6 ve C_{7a} karbonları ile etkileştiği saptanmıştır (Şekil 5-10 ve Tablo 5-19).

3f bileşiğinin spektrumunda ^{1}H skalasında δ 7,77 ppm'de izlenen benzotiyazolin NH protonunun ^{13}C ekseninde δ 76,02 ppm'de gözlenen spiro karbon, sırasıyla δ 129,93 ve 148,05 ppm'de izlenen benzotiyazolin C_{7a} ve C_{3a} karbonları ile korelasyon oluşturması benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinon yapısını karakterize etmektedir. Ayrıca, ^{1}H ekseninde δ 7,60 ppm'de gözlenen indol C_4 protonunun ^{13}C ekseninde sırasıyla δ 133,99 ve 141,19 ppm'de sinyal veren indol C_6 ve C_{7a} karbonları ile etkileştiği, ^{1}H skalasında δ 7,53 ppm'de gözlenen indol C_6 protonunun sırasıyla ^{13}C ekseninde δ 103,06, 128,84 ve 141,19 ppm'de sinyal veren indol C_7, C_4 ve C_{7a} karbonları ile etkileşim gösterdiği, ^{1}H ekseninde δ 7,29 ppm'de izlenen benzotiyazolin C_7 protonun ^{13}C skalasında sırasıyla δ 127,21 ve 148,05 ppm'de sinyal veren benzotiyazolin C_5 ve C_{3a} karbonları ile korelasyon oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 5-10 ve Tablo 5-19).



Tablo 5-19: Bileşik 3f'nin HMBC-2D Bulguları

	^{1}H-NMR	^{13}C-NMR	^{13}C-^{1}H/ ^{1}H -^{13}C ilişkileri
bt-C_{3a}	-	148.05	bt-C_7H; bt NH
i-C_{7a}	-	141.19	i-C_4H; i-C_6H; i-NH
i-C_6	7.53 (1H, d, *J*= 8.1 Hz)	133.99	i-C_4H
i-C_{3a}	-	131.71	i-C_5H; i-NH
bt-C_{7a}	-	129.93	bt-C_6H; bt-C_4H; bt NH
bt-C_5	-	127.21 (q, *J*= 31.4 Hz)	Bt-C_7H
i-C_5	7.04 (1H, dd, *J* = 7.7, 7.8 Hz)	125.35	
CF_3	-	124.93 (q, *J*= 271.6 Hz)	bt-C_4H; bt-C_6H
i-C_4	7.60 (1H, d, *J* = 7.1 Hz)	128.84	i-C_6H
bt-C_7	7.29 (1H, d, *J* = 7.9 Hz)	121.94	-
bt-C_6	6.96 (1H, d, *J*= 7.7 Hz)	115.91 (q, *J*= 4.0 Hz)	bt-C_4H
bt-C_4	6.75 (1H, d, *J*= 1.3 Hz)	103.95 (q, *J*= 3.5 Hz)	bt-C_6H
i-C_7	-	103.06	i-C_5H; i-C_6H; i-C_4H
Spiro C	-	76.02	i-C_4H; i-NH; bt-NH
bt-NH	7.77	-	bt-C_{3a}; bt-C_{7a}; spiro C
i-NH	10.80	-	i-C_{7a}; i-C_{3a}; spiro C



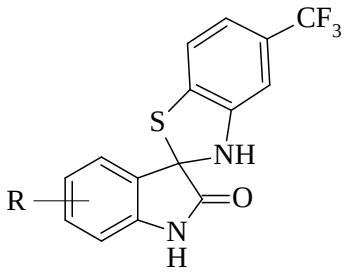
Şekil 5-10: Madde 3f'nin HMBC-2D spektrumu (6,60 – 8,0 ppm)

5.2.5. Kütle Bulguları

3a-h bileşiklerinin molekül ağırlıklarını ve yapı tayini bulgularını doğrulamak amacıyla Elektrospray İyonizasyon (ESI) yöntemini ile kütle analizleri pozitif $[M+H]^+$ veya negatif $[M-H]^-$ iyonlaştırma teknikleri ile alınmıştır. **3a-g** bileşiklerinin pozitif modda alınan spektrumlarında $[M+H]^+$ pikleri, **3g** bileşiği hariç temel pik olarak saptanmış, klor ve brom sübstitüe **3a** ve **3e-g** bileşiklerinin spektrumlarında ayrıca klor ve brom atomlarının izotopik katkısından kaynaklanan $[M+H]^+$+2 pikleri izlenmiştir. 5,7-dikloro sübstitüe **3h** bileşiğinin negatif modda alınan spektrumunda ise temel pik olarak gözlenen $[M-H]^-$, $[M-H]^-$ +2 ve $[M-H]^-$ +4 pikleri yapıyı doğrulamıştır (Tablo 5-20).

Atmosferik basınçta gaz fazı iyonlarının parçalanmadan elde edilmesinde yararlanılan yumuşak bir iyonizasyon tekniği olan ESI ile, polaritesi, kaynama derecesi ve molekül ağırlığı yüksek moleküllerin iyonizasyonu ile bileşiklerin moleküler iyonları saptanmaktadır (Wilm 2011). Bu yöntemde maddenin kimyasal yapısına bağlı olarak pozitif veya negatif iyonlaştırma tekniği seçilmekte, pozitif iyonlaştırma için oksidasyon, negatif iyonlaştırma için redüksiyon reaksiyonları esas alınmaktadır. Pozitif iyonizasyon tekniğinin protein, inorganik katyon ve protonlanmış bazik bileşikler için, negatif iyonizasyon tekniğinin ise inorganik anyon veya deprotone olmuş asidik bileşikler için

daha uygun olduğu belirlenmiştir (Henriksen ve ark. 2005). Molekülün yapısında yük oluşturabilecek asidik veya bazik gruplar bulunmaması durumunda çözeltiye pozitif iyonlaştırma tekniğinde Na^+, Li^+, NH_4^+ ya da diğer katyonik tuzlar, negatif iyonlaştırma tekniğinde kloroform vb. klorlanmış solventler veya Cl^- tuzları katılarak iyonlaştırma sağlanmaktadır (Cole ve Zhu 1999; Cech ve Enke 2001).



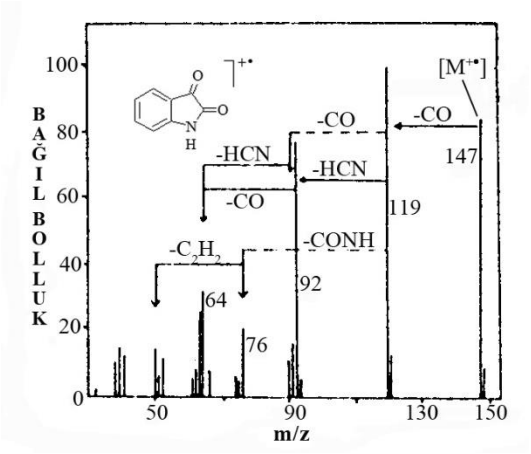
Tablo 5-20: Bileşik 3a-h'nin LC-MS bulguları

Bileşik	R	M.A. (g/mol)	$[M+H]^+$/ $[M-H]^-$ m/z (%)	$[M+Na]^+$ m/z (%)	$[M+2Li]^+$ m/z (%)	Diğer İyonlar m/z (%)
3a	5-Br	401,20	400,9; 402,9 (100, 82)	-	415,0; 417,0 (10, 9)	335,1; 337,2; 339,1 (22, 59, 18); 325,1 (35); 319,2; 321,1 (37, 22); 281,2 (55)
3b	5-I	448,20	448,9 (100)	470,9 (18)	462,9 (59)	446,9 (75); 337,0 (35); 325,2 (28)
3c	7-CH_3	336,33	337,0 (100)	359,0 (22)	351,0 (53)	338,0 (18); 335,0 (20); 325,1 (8)
3d	7-F	340,29	341,0 (100)	363,0 (28)	355,0 (18)	339 (63); 325,1 (6); 226,1 (10)
3e	7-Cl	356,75	357,0; 358,9 (100, 28)	379,0; 380,9 (43, 14)	371,0; 373.0 (18, 7)	355 (75); 336,1 (15); 325,1 (15)
3f	7-Br	401,20	400,9; 403,0 (100, 98)	-	-	399,9; 401,9 (20, 18)
3g	5-Cl-7-CH_3	370,77	371,0; 373,0 (88, 25)	393,0; 395,0 (13, 4)	385,0; 387,1 (15, 6)	369,0 (58); 336,3 (18); 325,2 (20); 310 (32); 282,3; 284,2 (100, 18)
3h	5,7-diCl	391,19	388,9; 390,9; 392,9 (100, 78, 13)	-	-	390,0; 391,9, 393,9 (18, 13, 4)

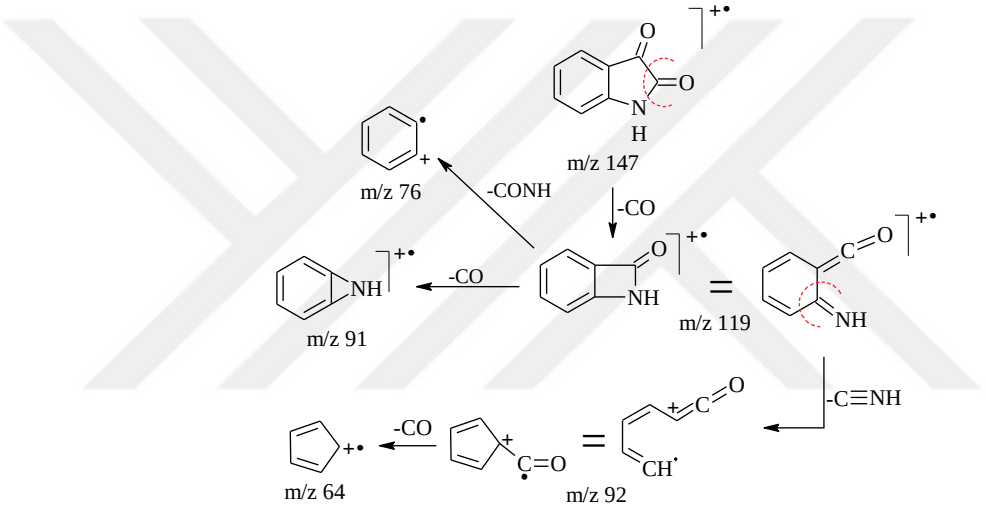
Brom sübstitüe **3a** ve **3f** bileşiklerinin pozitif modda alınan kütle spektrumlarında $[M+H]^+$, ayrıca bromun atomunun 79 ve 81 izotoplarından kaynaklanan yaklaşık 1:1 bağıl bolluk oranında $[M+H]^+$+2 pikleri temel pik olarak izlenmekte, 5-brom sübstitüe **3a** bileşiğinin spektrumunda ayrıca düşük bağıl bollukta $[M+2Li]^+$ ve $[M+2Li]^+$ +2 pikleri de yapının doğruluğunu kanıtlamaktadır (Şekil 4-5, Şekil 4-33 ve Tablo 5-20). Klor sübstitüe **3e** ve **3g** bileşiklerinin pozitif modda alınan kütle spektrumlarında da $[M+H]^+$ ve klor atomunun 35 ve 37 izotoplarından kaynaklanan yaklaşık 3:1 bağıl bolluk oranında $[M+H]^+$+2 piklerinin varlığı molekül ağırlıklarını doğrulamaktadır. Bu sinyal 7-klor sübstitüe **3e** bileşiğinin spektrumunda temel pik olarak gözlenmektedir. Bu bileşiklerin spektrumlarında $[M+Na]^+$ ve $[M+2Li]^+$ pikleri, ayrıca klor izotopundan kaynaklanan $[M+Na]^+$ +2 ve $[M+2Li]^+$ +2 pikleri de izlenmiştir (Şekil 4-25, Şekil 4-38 ve Tablo 5-20).

Sırasıyla 5-iyot, 7-metil ve 7-flor sübstitüe **3b-d** bileşiklerinin pozitif modda alınan kütle spektrumlarında molekül ağırlıklarını doğrulayan ve temel pik olarak gözlenen $[M+H]^+$ sinyalleri yanısıra değişik bağıl bollukta $[M+Na]^+$ ve $[M+2Li]^+$ pikleri de izlenmiştir (Şekil 4-10, Şekil 4-15, Şekil 4-20 ve Tablo 5-20). 5,7-dikloro sübstitüe **3h** bileşiğinin negatif modda alınan kütle spektrumunda 9:6:1 izotopik oranındaki $[M-H]^-$, $[M-H]^-$ +2 ve $[M-H]^-$ +4 pikleri molekül ağırlığını doğrulamaktadır (Şekil 4-43 ve Tablo 5-20).

Elektron çarptırma (Electron Impact= EI) tekniği ile isatin halkasındaki esas bölünmenin iki konumundaki lactam karbonilinden karbon monoksit (CO) kaybı ile gerçekleştiği, bu parçanın temel pik olarak gözlendiği belirlenmiş, ardından CO, HCN vb. ayrılması ile oluşan diğer parçalar izlenmiş, N-d-isatin ve 3-^{13}C-isatin türevleri ile gerçekleştirilen çalışmalar ile bu bulgular doğrulanmıştır (Şekil 5-11 ve 5-12) (Ballantine ve ark. 1968; Butcher 1971; Peet ve Barbuch 1984; Barbuch ve ark. 1986; Barbuch ve Peet 1987; SDBS 21417; SDBS 23383).

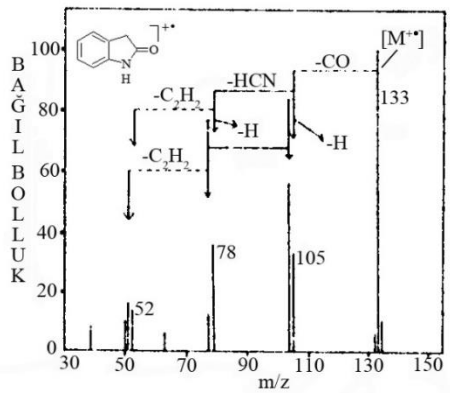


Şekil 5-11: İsatinin EI kütle spektrumunda gözlenen pikler



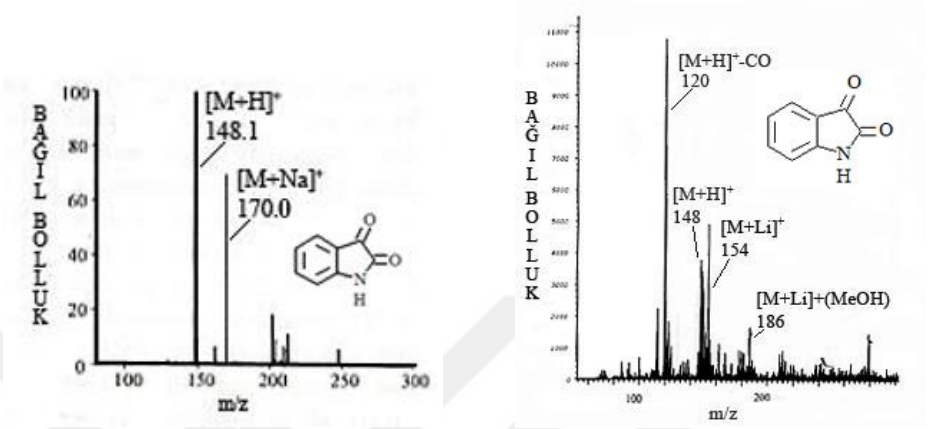
Şekil 5-12: İsatin EI kütle spektrumunda gözlenen parçalanmalar

2,3-Dihidro-1*H*-2-indolinon bileşiğinin EI kütle spektrumunda gözlenen benzer bağ kırılmaları sonucu oluşan parçalar yapıyı karakterize etmektedir (Şekil 5-13) (Ballantine ve ark., 1968; Peet ve Barbuch, 1984; Karalı, 2002).

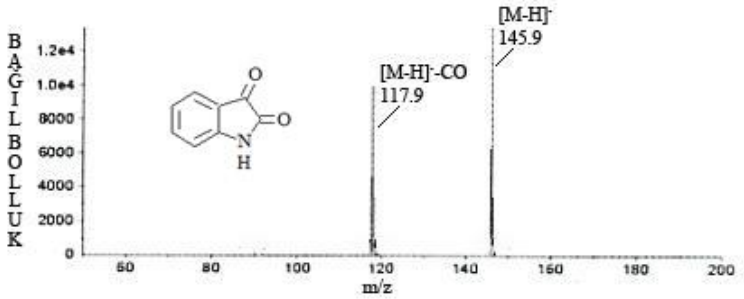


Şekil 5-13: 2,3-Dihidro-1*H*-2-indolinonun spektrumunda gözlenen pikler

İsatinin ESI yöntemiyle alınan spektrumlarında pozitif modda moleküler iyon $[M+H]^+$, ayrıca $[M+Na]^+$, $[M+Li]^+$ katım ürünleri, negatif modda $[M-H]^-$ oluşmuş, $[M+H]^+$ ve $[M-H]^-$ iyonlarından CO ayrılması ile oluşan iyonlar spektrumlarda gözlenmiştir (Şekil 5-14 ve 5-15) (Coutts ve ark. 1976; Varma ve ark. 1992; Brum ve ark. 2001; Unger ve ark. 2002; Puchalska ve ark. 2004; Zou ve Koh 2007).

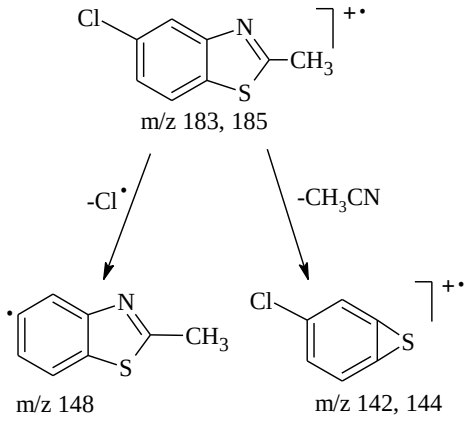


Şekil 5-14: İsatinin ESI (+) modda alınan kütle spektrumları



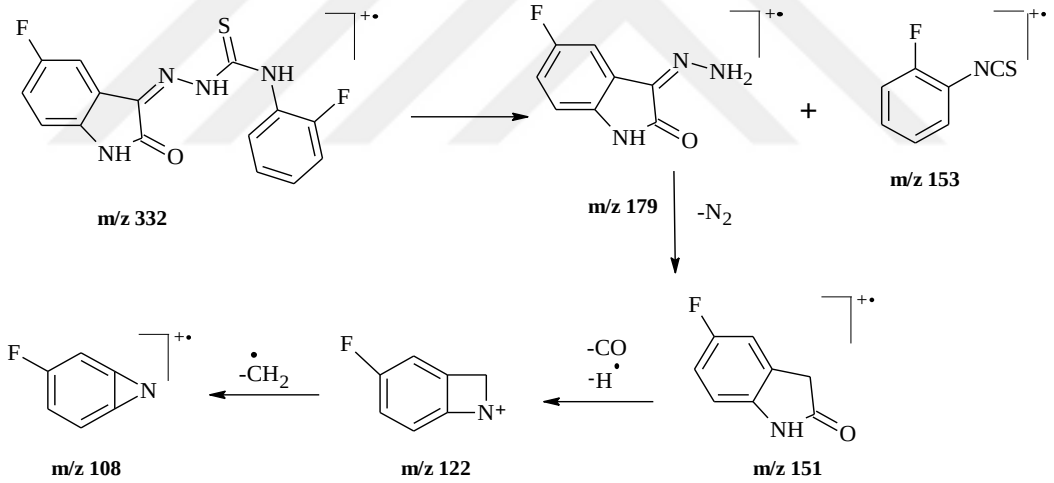
Şekil 5-15: İsatinin ESI (-) modda alınan kütle spektrumu

5-Kloro-2-metilbenzotiyazolün kütle spektrumunda temel pik olarak moleküler iyon pikinin ve klor izotopundan kaynaklanan M+2 pikinin gözlendiği, ayrıca klor radikali ve asetonitril kaybı ile aşağıdaki radikal ve nötral ürünlerin oluştuğu kaydedilmiştir (Şekil 5-16) (SDBS 8046).



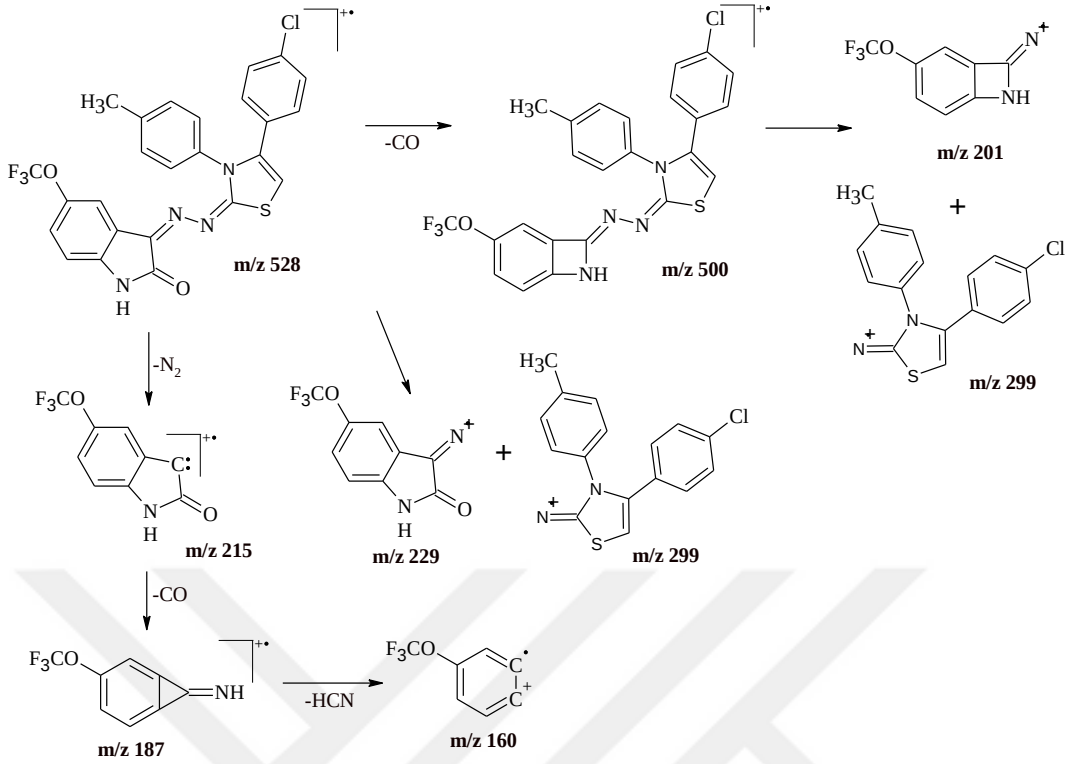
Şekil 5-16: 5-Kloro-2-metilbenzotiyazol bileşiğinin parçalanma ürünleri

EI tekniği kullanılarak alınan 5-floro-1*H*-indol-2,3-dion 3-[4-(2-florofenil)-tiyosemikarbazon] bileşiğinin kütle spektrumunda tiyoamid bağının kırılmasıyla oluşan 3-hidrazono-5-floro-1*H*-indol-2,3-dion nötral parçasından sırasıyla N_2, CO ve CH_2 radikalinin kaybı ile oluşan parçalanma ürünleri Şekil 5-17'de görülmektedir (Pervez ve ark. 2013).



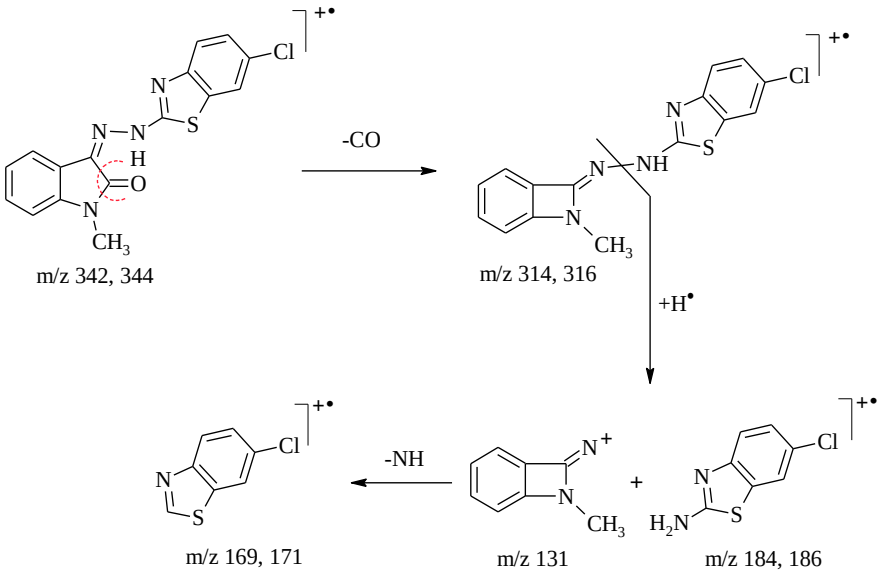
Şekil 5-17: 5-Floro-1*H*-indol-2,3-dion 3-[4-(2-florofenil)tiyosemikarbazon] bileşiğinin parçalanma ürünleri

EI kütle spektrumunda 3-[3-(4-metilfenil)-4-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-2(3*H*)-ilidenhidraziniliden]-5-(triflorometoksi)-1*H*-indol-2,3-dion bileşiğin hidrazon N-N ve azometin C=N bağlarından kırılma ve CO ayrılması ile oluşan parçalanma ürünleri izlenmiştir (Şekil 5-18) (Ahmad ve ark. 2016).



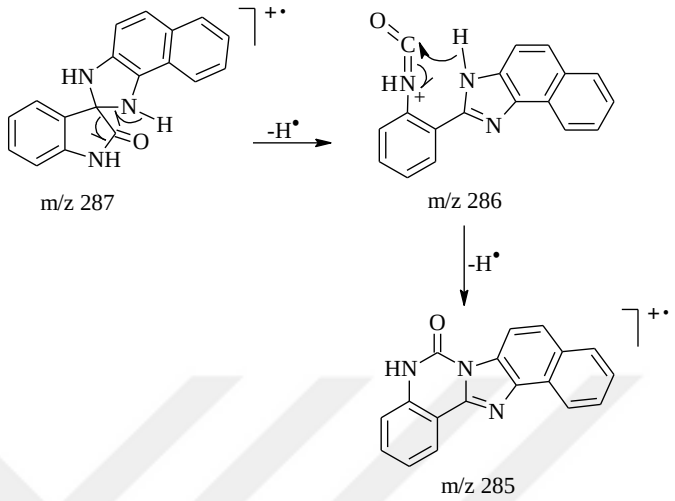
Şekil 5-18: 3-[3-(4-metilfenil)-4-(4-klorofenil)-1,3-tiyazol-2(3*H*)-ilidenhidraziniliden]-5-(triflorometoksi)-1*H*-indol-2,3-dion bileşiğinin parçalanma ürünleri

1-Metil-3-(6-kloro-2-benzotiyazolilhidrazono)-2-indolinonun EI kütle spektrumunda CO kaybı, N-N bağ kırılması ve ardından benzotiyazol halkasından **:**NH ayrılması ile gerçekleştiği, klor sübstitüe iyonlarda izotop piklerinin belirlenmesinin yapıyı doğruladığı saptanmıştır (Şekil 5-19) (Varma ve ark. 1992).



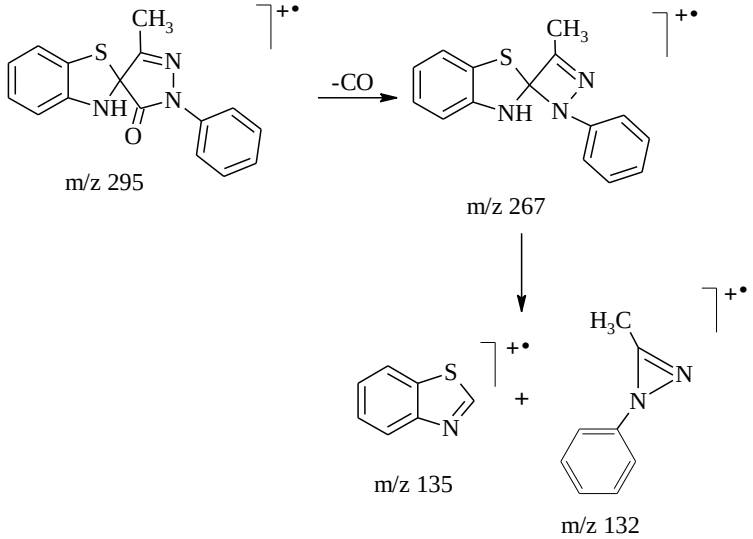
Şekil 5-19: 1-Metil-3-(6-kloro-2-benzotiyazolilhidrazono)-2-indolinon bileşiğinin parçalanma ürünleri

2,3-Dihidro-1*H*-nafto[1,2-*d*]imidazol artığı taşıyan spiro-2-indolinon bileşiğinin döteryumla işaretlenerek alınan spektrumunda iki proton radikalinin ayrılması aşağıdaki şekilde görüldüğü gibi tanımlanmıştır (Şekil 5-20) (Ballantine ve ark. 1971).



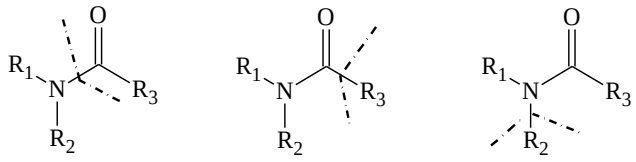
Şekil 5-20: 2,3-Dihidro-1*H*-nafto[1,2-*d*]imidazol artığı taşıyan spiro-2-indolinon bileşiğinin parçalanma ürünleri

5-Metil-2-fenil-3-okso-3,4-dihidro-2*H*-pirazol artığı taşıyan spirobenzotiyazolin bileşiğinin kütle spektrumunda CO ayrılmasının ardından bağ kırılmasıyla aşağıda görülen iyonların oluştuğu saptanmıştır (Şekil 5-21) (Coutts ve ark. 1976).



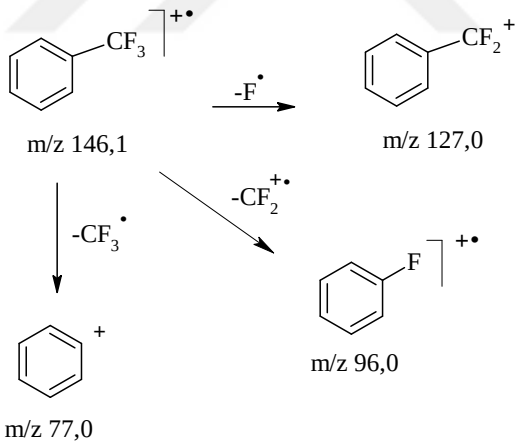
Şekil 5-21: 5-Metil-2-fenil-3-okso-3,4-dihidro-2*H*-pirazol artığı taşıyan spirobenzotiyazolin bileşiğinin parçalanma ürünleri

Birçok fonksiyonel grup taşıyan binden fazla küçük organik bileşiğin ESI (+)-MS-MS tekniği ile bağ kırılmalarının incelendiği çalışmada, N,N-disübstitüe amid gruplarında protonlanmanın azot atomundan olduğu, genellikle kırılmanın NH-CO bağından gerçekleştiği, oluşan açil iyonundan CO kaybı ile oluşan iyonların, ayrıca N-dealkilasyon ürünlerinin de belirlendiği kaydedilmiştir (Şekil 5-22) (Weissberg ve Dagan 2011).



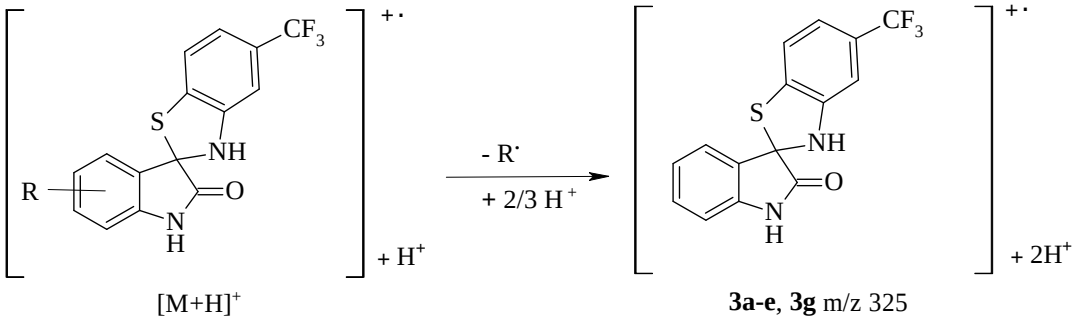
Şekil 5-22: Amid gruplarının parçalanma ürünleri

Triflorometil grubu taşıyan bileşiklerin kütle spektrumları incelemiş, (triflorometil)benzen bileşiğinden (SDBS 1727) flor ve triflorometil radikallerinin, ayrıca diflorometil artığının ayrılması ile oluşan iyonlar saptanmıştır. 3-(Triflorometil)anilin (SDBS 3865) spektrumunda benzer şekilde flor ve diflorometil radikallerinin ayrılması ile oluşan parçalar izlenmiştir (Şekil 5-23).



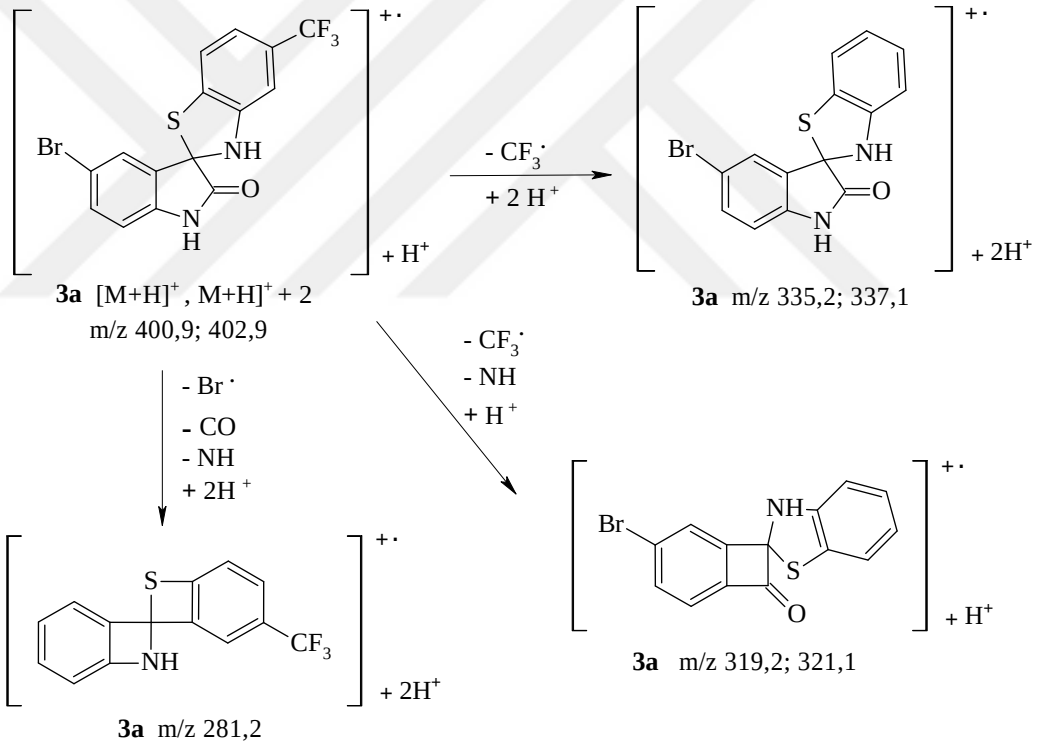
Şekil 5-23: (Triflorometil)benzenin parçalanma ürünleri

Bu bilgiler doğrultusunda **3a-h** bileşiklerinin parçalanma ürünleri incelenmiş, moleküler iyon ve katım ürünlerine ait sinyaller dışında bileşiklerin çoğunda (**3f** ve **3h** hariç) gözlenen m/z 325 iyonunun 2-indolinon halkasındaki sübstitüentlerin ayrılması ve ardından protonlanma ile oluşabileceği değerlendirilmiştir (Şekil 5-24).



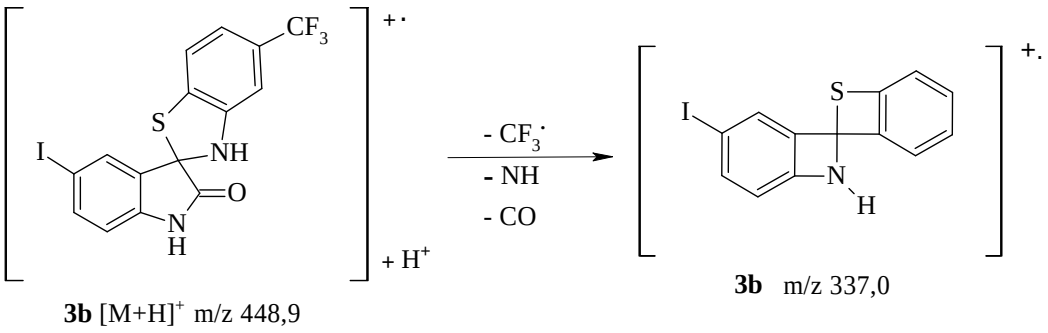
Şekil 5-24: m/z 325 iyonunun olası oluşum mekanizması

Bileşik **3a**'nın spektrumundaki diğer parçalanma ürünlerinin aşağıda Şekil 5-25'de görülen olası mekanizmalar ile oluşabileceği öngörülmüştür.



Şekil 5-25: Bileşik 3a'nın olası parçalanma ürünleri

Bileşik **3b**'nin kütle spektrumunda gözlenen m/z 337,0 nötral parçasının benzotiyazol halkasından CF_3 ve NH, 2-indolinon halkasından CO ayrılması ile oluştuğu öngörülmüştür (Şekil 5-26).

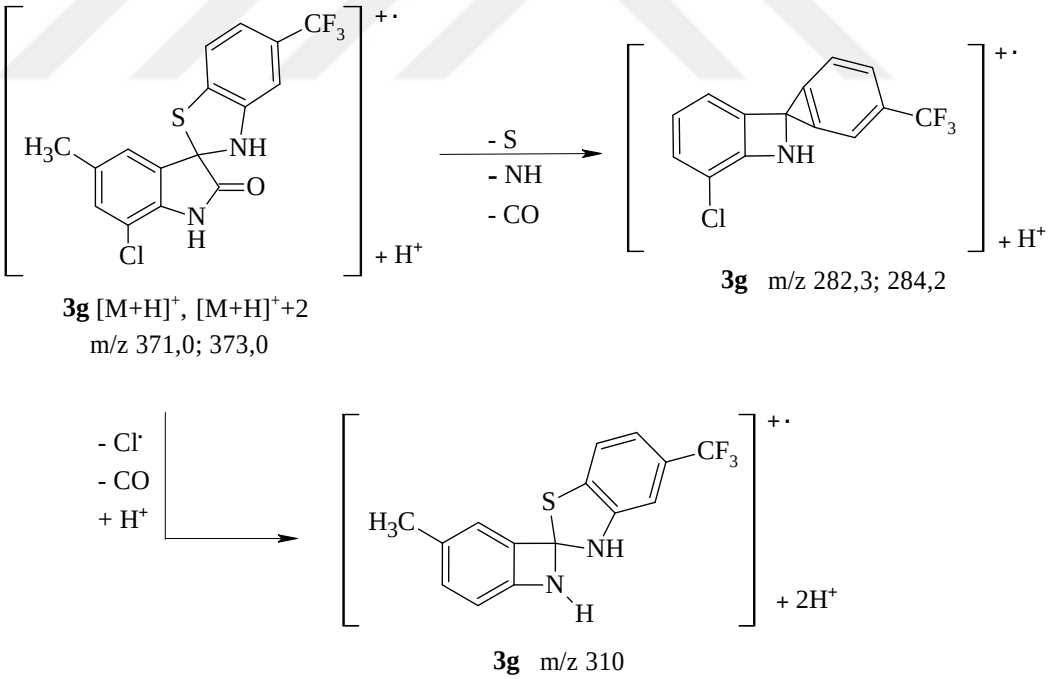


3b $[M+H]^+$ m/z 448,9

3b m/z 337,0

Şekil 5-26: Bileşik 3b'nin olası parçalanma ürünü

Bileşik **3g**'nin kütle spektrumunda temel pik olark gözlenen m/z 282,3 ve 284,2 iyonlarının benzotiyazol halkasından S ve NH, 2-indolinon halkasından CO ayrılması ile oluştuğu öngörülmüş, m/z 310 parçasının ise 2-indolinon halkasından CO ve Cl radikalinin ayrılması ve protonlanma ile oluştuğu değerlendirilmiştir (Şekil 5-27).



3g $[M+H]^+$, $[M+H]^+$+2
m/z 371,0; 373,0

3g m/z 282,3; 284,2

3g m/z 310

Şekil 5-27: Bileşik 3g'nin olası parçalanma ürünü

5.3. Biyolojik Etki Bulgularının Değerlendirilmesi

5.3.1. DPPH Radikal Giderici Aktivite Bulgularının Değerlendirilmesi

Sentezlenen spiroindolinon türevi **3a-h** bileşiklerinin 1995 yılında Brand-Williams ve ark. tarafından geliştirilen metoda göre DPPH radikali giderici aktiviteleri tayin edilmiş, standart olarak BHT ve α-tokoferol kullanılan testlerin sonuçları Bölüm 4.2.1'de Şekil 4-44 ve Tablo 4-1'de paylaşılmıştır. Test sonuçları **3a-h** bileşiklerinin DPPH radikali giderici aktiviteye sahip olduklarını ve 0,625-5 mM konsantrasyon sınırları arasında maksimum antioksidan aktivitelerine ulaştıklarını göstermiştir. En etkili DPPH radikal giderici aktiviteye 5-kloro-7-metil sübstitüe **3g** (EC_{50}= 1,16 ± 0,06 μM) ve 5,7-diklorosübstitüe **3h** (EC_{50}= 1,14 ± 0,02 μM) bileşiklerinin sahip oldukları saptanmış, bu bileşiklerin aktivitelerinin BHT (EC_{50}= 1,20 ± 0,02 μM) aktivitesi ile kıyaslanabilir, α-tokoferolden (EC_{50}= 0,17 ± 0,01 μM) daha düşük olduğu bulunmuştur. 5-Brom sübstitüe **3a** ve 5-iyod sübstitüe **3b** bileşiklerinin bu testlerde EC_{50} değerleri sırasıyla 2,07 ± 0,06 ve 1,98 ± 0,04 μM olarak belirlenmiştir. 7-Sübstitüe bileşikler **3c-f**'nin EC_{50} değerleri 2,26 ± 0,09 – 2,38 ± 0,01 μM aralığında belirlenmiştir. Test sonuçları 5,7-dikloro ve 5-kloro-7-metil sübstitüe türevlerde DPPH radikali giderici aktivitelerin arttığını, özellikle 7-metil ve halojen sübstitüe türevler olmak üzere 5-brom ve iyod sübstitüe türevlerde biraz azaldığı saptanmıştır.

5.3.2. Süperoksit Anyon Radikali Giderici Aktivite Bulgularının Değerlendirilmesi

3a-h bileşiklerinin süperoksit radikali giderici aktiviteleri Aruoma ve ark. nın 1989 yılında geliştirdiği metoda göre tayin edilmiş, standart olarak BHT ve α-tokoferol kullanılan testlerin sonuçları Bölüm 4.2.2'de Şekil 4-45 ve Tablo 4-1'de paylaşılmıştır. **3a-h** bileşiklerinin NBT indirgeme hızını doza-bağımlı olarak inhibe ettikleri, 5 mM'de maksimum inhibitör etki gösterdikleri saptanmıştır. En etkili inhibitör etkiye 5-kloro-7-metil sübstitüe **3g** (EC_{50}= 1,09 ± 0,02 μM) ve 5,7-dikloro sübstitüe **3h** (EC_{50}= 1,15 ± 0,03 μM) bileşiklerinin sahip oldukları saptanmış, bu bileşiklerin aktivitelerinin BHT (EC_{50}= 1,18 ± 0,03 μM) aktivitesi ile kıyaslanabilir, α-tokoferolden (EC_{50}= 0,49 ± 0,04 μM) daha düşük olduğu bulunmuştur. 5-Brom sübstitüe **3a** ve 5-iyod sübstitüe **3b** bileşiklerinin bu testlerde EC_{50} değerleri sırasıyla 1,91 ± 0,02 ve 1,78 ± 0,03 μM olarak belirlenmiştir. 7-Sübstitüe bileşikler **3c-f**'nin EC_{50} değerleri 2,17 ± 0,02 – 2,21 ± 0,01 μM

aralığında belirlenmiştir. Test sonuçları 5,7-dikloro ve 5-kloro-7-metil sübstitüe türevlerde süperoksit radikali giderici aktivitelerin arttığını, özellikle 7-metil ve halojen sübstitüe türevler olmak üzere 5-brom ve iyod sübstitüe türevlerde biraz azaldığı saptanmıştır.

5.3.3. Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasitesi Bulgularının Değerlendirilmesi

3a-h bileşiklerinin Troloks'a ekivalan antioksidan kapasiteleri Re ve ark. tarafından 1999 yılında önerilen yönteme göre yapılmış, standart olarak BHT ve α-tokoferol kullanılan testlerin sonuçları Bölüm 4.2.3'te Şekil 4-46, Şekil 4-47 ve Tablo 4-1'de paylaşılmıştır. **3a-h** bileşiklerinin ABTS radikali giderici aktiviteye sahip oldukları, 0,625-10 mM sınırları arasında maksimum antioksidan aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. En etkili inhibitör etkiye 5-kloro-7-metil sübstitüe **3g** (EC_{50}= 1,04 ± 0,10 μM) ve 5,7-diklorosübstitüe **3h** (EC_{50}= 1,01 ± 0,08 μM) bileşiklerinin sahip oldukları saptanmış, bu bileşiklerin aktivitelerinin BHT (EC_{50}= 1,28 ± 0,03 μM) aktivitesinden daha yüksek, α-tokoferolden (EC_{50}= 0,61 ± 0,01 μM) daha düşük olduğu bulunmuştur. 5-Brom sübstitüe **3a** ve 5-iyod sübstitüe **3b** bileşiklerinin bu testlerde EC_{50} değerleri sırasıyla 2,04 ± 0,07 ve 1,93 ± 0,25 μM olarak belirlenmiştir. 7-Sübstitüe bileşikler **3c-f**'nin EC_{50} değerleri 2,23 ± 0,19 – 2,37 ± 0,11 μM aralığında belirlenmiştir.

Bileşiklerin antioksidan kapasitesi, TEAC değeri olarak değerlendirildiğinde, 5 mM'de **3a-f** bileşiklerinin TEAC değeri (1,62 ± 0,01 - 1,94 ± 0,01 mM/L Troloks), BHT'nin aynı konsantrasyondaki TEAC değerine (1,73 ± 0,02 mM/L Troloks) yakın, α-tokoferolün TEAC değerinden (2,01 ± 0,01 mM/L Troloks) daha düşük olduğu saptanmıştır. 5 mM'de en yüksek değer, aralarında anlamlı bir fark bulunmayan **3g** (1,90 ± 0,04 mM/L Troloks) ve **3h** (1,94 ± 0,01 mM/L Troloks) bileşiklerinin gösterdiği saptanmıştır.

Test sonuçları 5,7-dikloro ve 5-kloro-7-metil sübstitüe türevlerde antioksidan kapasitenin arttığını, özellikle 7-metil ve halojen sübstitüe türevler olmak üzere 5-brom ve iyod sübstitüe türevlerde biraz azaldığını göstermiştir.

5.3.4. Ferri İyonu Redükleyici Gücü Bulgularının Değerlendirilmesi

3a-h bileşiklerinin ferri iyonu redükleyici gücü Chung ve ark. tarafından 2005 yılında yayımlanan çalışmada geliştirilen metoda göre yapılmış, standart olarak BHT ve α-tokoferol kullanılan testlerin sonuçları Bölüm 4.2.4'de Şekil 4-48 ve Tablo 4-1'de

paylaşılmıştır. 5 mM'de incelenen **3a**, **3b**, **3h** ve **3g** bileşiklerinin en yüksek ferri iyonu indirgeyici gücü gösterirdiği, bu etkinin BHT (2,59 ± 0,04 mM/L Fe^{2+})'nin aynı konsantrasyonda gösterdiği indirgeme gücünden daha yüksek olduğu bulunmuştur. 10 mM'de **3a-h** bileşiklerin gösterdikleri redükleyici gücün, α-tokoferolün (3,99 ± 0,08 mM/L Fe^{2+}) 2,5 mM/ml de gösterdiği redükleyici gücüne yakın olduğu gözlenmiştir. En yüksek etkinliğe sahip oldukları belirlenen **3a**, **3b**, **3h** ve **3g** bileşiklerinin redükleyici güçlerinin 3,02 ± 0,09 - 3,08 ± 0,07 mM/L Fe^{2+} aralığında, bileşik **3c-f**'nin redükleyici güçlerinin 2,40 ± 0,09 - 2,52 ± 0,04 mM/L Fe^{2+} aralığında olduğu belirlenmiştir.

Test sonuçları 5-bromo, 5-iyodo, 5,7-dikloro ve 5-kloro-7-metil sübstitüe türevlerde redükleyici gücün arttığını, bu etkinin BHT'den daha güçlü olduğunu, 7-metil ve halojen sübstitüe türevlerde BHT'nin redükleyici gücü ile kıyaslanabilir düzeye biraz azaldığını göstermiştir.

5.3.5. Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etki Bulgularının Değerlendirilmesi

3a-h bileşiklerinin lipit peroksidasyonunu inhibe etme kapasitesi Patro ve ark. (2002) tarafından geliştirilen ve Hamad ve ark. (2010) tarafından modifiye edilen yöntem ile tayin edilmiş, standart olarak α-tokoferol kullanılan testlerin sonuçları Bölüm 4.2.5'de Tablo 4-2'de paylaşılmıştır. **3e**, **3f** ve **3h** bileşiklerinin 5 mM konsantrasyonda lipid peroksidasyonunu inhibe etme % kapasiteleri sırasıyla 53,09 ± 2,97, 51,49 ± 8,28 ve 48,21 ± 10,67 olarak belirlenmiştir ve bu değerler standart olarak kullanılan α-tokoferolün 5 mM konsantrasyondaki % kapasitesinden (46,93 ± 3,43) daha yüksektir. Bileşik **3a-d** ve **3g**'nin lipid peroksidasyonunu inhibe etme % kapasiteleri ise 45,81 ± 4,33-35,07 ± 2,15 aralığında α-tokoferolün % kapasitesinden biraz düşük olarak saptanmıştır. Bu tayinde lipozom peroksidasyonu üzerine etkili en güçlü inhibitör maddenin 7-kloro sübstitüe **3e** olduğu saptanmıştır.

Test sonuçları 7-kloro, 7-bromo ve 5,7-dikloro sübstitüe türevlerde lipid peroksidasyonunu inhibe etme % kapasitelerinin arttığını, bu etkinin α-tokoferol'den daha güçlü olduğunu, özellikle 5-kloro-7-metil sübstitüe türevde biraz azaldığını, 7-floro sübstitüe türev başta olmak üzere 5-brom, 5-iyod ve 7-metil sübstitüe türevlerde azaldığını göstermiştir.

5.3.6. Kuprik İyonunu İndirgeme Kapasitesi Bulgularının Değerlendirilmesi

3a-h bileşiklerin kuprik iyonunu indirgeme kapasitesi, 2008'de Apak ve ark. tarafından (2008) geliştirilmiş CUPRAC yöntemi ile tayin edilmiş, sonuçlar mM TR birimiyle ifade edilmiş, Bölüm 4.2.6'da Tablo 4-2'de paylaşılmıştır. En güçlü kuprik iyonunu indirgeme kapasitesine sahip olan **3c**, **3f** ve **3h** bileşiklerinin 1 mM konsantrasyonda indirgeme kapasitelerinin sırasıyla 1,31 ± 0,05, 1,44 ± 0,17 ve 1,37 ± 0,16 mM TR olduğu belirlenmiştir. Test edilen **3a**, **3b**, **3d**, **3e** ve **3g** bileşiklerinin 1,19 ± 0,12 - 0,97 ± 0,08 mM TR aralığında indirgeme kapasitesine sahip oldukları saptanmıştır.

Test sonuçları 7-metil, 7-bromo ve 5,7-dikloro sübstitüe türevlerde kuprik iyonunu indirgeme kapasitelerinin arttığını, 7-floro sübstitüe türev başta olmak üzere 5-brom, 5-iyod, 7-kloro ve 5-kloro-7-metil sübstitüe türevlerde azaldığını göstermiştir.

5.3.7. Sitotoksisite Bulgularının Değerlendirilmesi

Antioksidan aktivitelerinin tayini için test edilen **3a-h** bileşiklerinden *in vitro* testler sonucunda en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenen **3a-c** ve **3f-h** bileşiklerinin sağlıklı insan fibroblast HFF hücrelerinde sitotoksisiteleri MTT yöntemi ile tayin edilmiştir (Önay Uçar ve ark. 2012). Elde edilen % canlılık grafikleri Bölüm 4.2.7'de Şekil 4-49'da, IC_{50} değerleri Tablo 4-3'de verilmiştir. 5-iyodo sübstitüe **3b**, 7-metil sübstitüe **3c** ve 5-kloro-7-metil sübstitüe **3g** bileşiklerinin insan fibroblast HFF hücrelerinde sitotoksisite göstermediği bu bileşiklerin IC_{50} değerlerinin >200 μM olduğu belirlenmiştir. 5,7-dikloro sübstitüe **3h** bileşiğinde sitotoksisitenin **3b**, **3c** ve **3d** bileşiklerine kıyasla biraz arttığı ve IC_{50} değerinin 92,26 ± 1,24 μM olduğu saptanmıştır. Brom sübstitüe türevlerde sitotoksisitenin önemli miktarda arttığı, 5-bromo sübstitüe **3a** ve 7-bromo sübstitüe **3f** bileşiklerinin IC_{50} değerlerinin sırasıyla 51,29 ± 1-39 ve 23,17 ± 1,08 μM olduğu Tablo 4-3'deki verilerden görülmektedir.

5.3.8. Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Belirlenmesi Bulgularının Değerlendirilmesi

3a-c ve **3f-h** bileşiklerinin HFF hücrelerinde hidrojen peroksit ile indüklenen ve indüklenmeyen oksidatif strese karşı koruyucu etkisini saptamak için gerçekleştirilen hücre içi reaktif oksijen türleri (ROT) analizi 2',7'-diklorodihidrofloresin diasetat (H2DCFDA) aracılığıyla spektroflorometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Bölüm 4.2.8'de Şekil 4-50'de bağıl olarak negatif kontrole göre kaç kat arttığı ya

da azaldığı gösterilmiş, H_2O_2 varlığında test edilen bileşiklerin bu stresi ne kadar değiştirdiği Bölüm 4.2.8'de Tablo 4-4'de paylaşılmıştır. 200 µM H_2O_2 ve/veya 15 µM bileşik uygulaması sonucunda HFF hücrelerinde oluşan ROT oranları belirlenmiştir. Hidrojen peroksit (HP) uygulanan örneğin (pozitif kontrol) ROT düzeyi 1 olarak kabul edilmiştir, veriler kat artışı/azalış olarak oklarla ifade edilmiştir. Elde edilen sitotoksisite sonuçlarına göre, test edilen tüm bileşikler için hücre canlılığını %100'ün altına düşürmeyen bir doz olarak 15 µM seçilmiş ve bileşiklerin hücre içi ROT oluşumu üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde hücreler bu konsantrasyonda hazırlanan test bileşikleriyle işleme sokulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre test edilen bileşiklerin tümünün (**3b** hariç) ROT miktarını 0,42-0,03 aralığında azalttığı, oksidatif stresin indüklendiği hücrelerde ROT oluşumunu en etkili şekilde düşüren iki bileşiğin sırasıyla 5,7-dikloro sübstitüe **3h** (0,42) ve 5-kloro-7-metil sübstitüe **3g** (0,34) olduğu saptanmıştır. Bileşik **3b**'nin diğer bileşiklerin aksine ROT miktarını 0,27 arttırdığı belirlenmiştir.

Test sonuçları 5,7-dikloro ve 5-kloro-7-metil sübstitüe türevlerin ROT oluşumunu en etkili şekilde düşürdüğünü, 7-bromo sübstitüsyonunda bu etkinlik biraz azalırken, 7-metil ve 5-bromo sübstitüe türevlerde önemli miktarda azalma olduğunu göstermektedir.

5.3.9. Protein Karbonillerinin (Protein Hasarının) Belirlenmesi Bulgularının Değerlendirilmesi

Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan karbonil gruplarının immünolojik olarak değerlendirildiği SDS-PAGE ve Western blotlama analizleri ile hücrelerdeki protein hasarı saptanmıştır (Hamad ve ark. 2010). **3a-c** ve **3f-h** bileşiklerinin HFF hücrelerinde hidrojen peroksit ile indüklenen ve indüklenmeyen oksidatif stres sonucunda meydana gelen protein hasarlarına (protein karbonillerine) etkisini saptamak için gerçekleştirilen analizlerin sonuçları Bölüm 4.2.9'da Şekil 4-51'de, karbonil oluşumunun negatif kontrole göre kaç kat arttığı ya da azaldığı Şekil 4-52'de, H_2O_2 varlığında test edilen bileşiklerin bu stresi ne kadar değiştirdiği Tablo 4-5'te paylaşılmıştır. Elde edilen sitotoksisite sonuçlarına göre, test edilen tüm bileşikler için hücre canlılığını %100'ün altına düşürmeyen bir doz olarak 15 µM seçilmiştir ve bileşiklerin hücrelerdeki protein hasarının belirlenmesinde hücreler bu konsantrasyonda hazırlanan test bileşikleriyle işleme sokulmuştur. 15 µM bileşik ve/veya 200 µM H_2O_2 uygulaması sonucunda HFF

hücrelerinde oluşan protein karbonil oranları belirlenmiştir. Negatif kontrol 1 olarak kabul edilmiştir, veriler kat artışı/azalışı olarak ifade edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre test edilen bileşiklerin tümünün (**3h** hariç) oksidatif stresin indüklendiği hücrelerde protein hasarını 0,86-0,45 aralığında azalttığı, protein karbonillerini en etkili şekilde düşüren bileşiğin 5-kloro-7-metil sübstitüe **3g** (0,86) olduğu saptanmıştır. 5,7-dikloro sübstitüe bileşik **3h**'nin diğer bileşiklerin aksine protein karbonilleri 1,65 arttırdığı belirlenmiştir. Test sonuçları HFF hücrelerinde hidrojen peroksitle indüklenen protein karbonilleri üzerindeki etkinliğin 5-kloro-7-metil sübstitüsyonu ile arttığını, 7-bromo sübstitüsyonunda bu etkinlik biraz azalırken, 7-bromo sübstitüsyonu başta olmak üzere 5-bromo, 5-iyodo ve 7-metil süstitüsyonlarında aktivitede azalmaya neden olduğunu göstermektedir.

5.3.10. DNA Hasarının (DNA Oksidasyon Düzeyinin) Belirlenmesi Bulgularının Değerlendirilmesi

Hücrelerdeki DNA hasarı, DNA'da oluşan oksidatif hasar belirteçlerinden biri olan 8-OHdG miktarının ELISA kiti (Elabscience®) yardımıyla tayin edilmiştir. 8-OHdG standart grafiği Bölüm 4.2.10'da Şekil 4-53'de paylaşılmıştır. Elde edilen sitotoksisite sonuçlarına göre, test edilen tüm bileşikler için hücre canlılığını %100'ün altına düşürmeyen bir doz olarak 15 µM seçilmiştir ve bileşiklerin hücrelerdeki DNA hasarının belirlenmesinde hücreler bu konsantrasyonda hazırlanan test bileşikleriyle işleme sokulmuştur. Elde edilen sonuçlar 200 µM H_2O_2 ile indüklenen oksidatif stres koşulunun hücrelerde DNA hasarı oluşturmadığını göstermiştir. Hücrelerde DNA hasarı bulunmadığından bileşiklerin DNA hasarına karşı koruyucu etkilerini belirlemek mümkün olmamıştır. Oksidatif stres şartlarının hücresel DNA hasarına yol açacak şekilde optimize edilmesiyle bu bileşiklerin DNA hasarı üzerindeki etkisinin araştırılması daha ileri çalışmalarda planlanmaktadır.

5.4. *In Silico* ADME Kriterlerinin Değerlendirilmesi

Spiroindolinon bileşikleri **3a-h**'nin bazı fizikokimyasal parametreleri ve Lipinski kurallarına uygunlukları *in silico* olarak SwissADME modülü kullanılarak incelenmiş, elde edilen veriler Tablo 4-6'da paylaşılmıştır. **3a-h** bileşiklerinin molekül ağırlıklarının 336,33-448,20 aralığında, 500 daltondan az olduğu ve kriterlere uyduğu belirlenmiştir. Bileşiğin hedef protein ile etkileşme kapasitesinin bir ölçüsü olan hidrojen bağı donör ve akseptör sayılarının yüksek olduğu bileşiklerin hedef proteine daha kuvvetle bağlanacağı

için daha yüksek biyolojik aktiviteye sahip olacağı öngörülmektedir. Bileşiklerin taşıdıkları hidrojen bağı donör ve akseptör grup sayıları incelendiğinde, hidrojen bağı donörü sayılarının 2, hidrojen bağı akseptörü sayılarının 4 olduğu ve kriterlere uyduğu saptanmıştır. Lipofilliği tanımlayan n-oktanol/ su partisyon katsayısı (log P) bileşiğin organik ve sulu faz kompartmanlarındaki denge halindeki dağılımını ifade etmektedir, ideal lipofiliteli bileşikler yüksek absorpsiyon kapasitesine sahiptir. **3a-h** bileşiklerinin <5 olması gereken logP değerlerinin 3,61-4,36 aralığında olduğu ve kritere uyduğu belirlenmiştir.

Uyulmayan Lipinski kuralı sayısı açısından değerlendirildiğinde **3a-h** bileşiklerinin tüm kriterlere uyduğu, uyulmayan RO5 kuralı sayısının 0 olduğu saptanmıştır. Bu kurala göre bileşiklerin ilaç benzerliği ve ilaç olabilme özelliklerinin uygunluğu açısından RO5 sayısı en fazla bir olmalıdır, bu nedenle **3a-h** bileşikleri bu kriterler açısından ilaç adayı olabilecek bileşiklerdir (Tablo 4-6).

3a-h bileşiklerinin suda çözünürlük (logS), deri geçirgenliği (logKp), insan serum albumine bağlanma oranı (logKhsa) ve insanda oral absorpsiyon yüzdesi değerleri de *in silico* hesaplanmıştır (Tablo 4-7). **3a-h** bileşiklerinin suda çözünürlüğünü ve kan dolaşımına ulaşma kapasitelerini tanımlayan, (-6,5)-0,5 aralığında olması gereken logS değerleri incelendiğinde tüm bileşikler için bu değer (-4,19)-(-5,32) olarak belirlenmiş ve kritere uyduğu saptanmıştır. **3a-h** bileşiklerinin deri geçirgenliğini tanımlayan ve (-8)-(-1) aralığında olması gereken logKp değeri (-4,48)-(-4,79) aralığındadır. Bileşiğin insan serum albumine bağlanma kapasitesini tanımlayan, kan dolaşımında dağılma ve etki bölgesine ulaşma yeteneğini ifade eden, (-1,5)-1,5 aralığında olması gereken logKhsa değeri 0,24-0,45 aralığında belirlenmiştir. İnsan serum albumine daha yüksek bağlanma afinitesine sahip olan bileşiklerin sistemik dolaşımda daha düşük konsantrasyonda olacağı öngörülmektedir. **3a-h** bileşiklerinin logKhsa değerleri bu kriterlere uymaktadır. İnsanda oral absorbsiyon yüzdesi > 80 için yüksek, < 25 için zayıf oral aktivite olarak ifade edilmektedir. Bu değer tüm bileşikler için 88,76-92,80 olarak saptanmıştır ve bileşiklerin yüksek oral absorpsiyona sahip olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

Abdelhamid A.O., Parkanyi C., Rashid S.M.K., Lloyd W.D. (1988). Synthesis of fused ring heterocycles from aromatic amines with hydroximoyl chlorides. *Journal Heterocyclic Chemistry,***25(2)**: 403-405.

Abo-Salem H.M., Nassrallah A., Soliman A.A.F., Ebied M.S., Elawady M.E., Abdelhamid S.A. ve ark. (2020). Synthesis and bioactivity assessment of novel spiropyrazole-oxindole congeners exhibiting potent and selective in vitro anticancer effects. *Molecules*, **25**:1124.

Aboul-Enein H.Y., Kruk I., Lichszteld K., Michalska T., Kladna A., Slawomir M. ve ark. (2004). Scavenging of reactive oxygen species by n-substituted indole-2 and 3-carboxamides. *Luminescence*, **19**: 1-7.

Abreu I.A. ve Cabelli D.E. (2010). Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica Biophysica Acta*, **1804**: 263- 274.

Ahmad M., Pervez H., Zaib S., Yaqub M., Naseer M.M., Khan S.U. ve ark. (2016). Synthesis, biological evaluation and docking studies of some novel isatin-3-hydrazonothiazolines. *Royal Society of Chemistry Advances*, **6(65)**: 60826-60844.

Akkurt M., Ermut G., Karalı N. (2010). 5-Chlorobenzothiazole-2-spiro-3'-indolin-2'-one. *Acta Crystallographica*, **66**: 399-400.

Alafeefy A.M., Ashour A.E., Prasad O., Sinha L., Pathak S., Alasmari F.A. ve ark. (2015). Development of certain novel N-(2-(2-(2-oxoindolin-3-ylidene)-hydrazinecarbonyl)phenyl)benzamides and 3-(2-oxoindolin-3-ylideneamino)-2-substituted quinazolin-4(3H)-ones as CFM-1 analogs: design, synthesis, QSAR analysis and anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **92**: 191–201.

Albright T.A. ve Freeman W.J. (1977). Nuclear magnetic resonance studies VII-13C and 15N NMR of diazo compounds. *Organic Magnetic Resonance*, **9(2)**: 75-79.

Al-Rashood S.T., Hamed A.R., Hassan G.S., Alkahtani H.M., Almehizia A.A., Alharbi A. ve ark. (2020). Antitumor properties of certain spirooxindoles towards hepatocellular carcinoma endowed with antioxidant activity, *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, **35**: 831–839.

Alyea E.C. ve Malek A. (1985). Reaction of 2-Aminobenzenethiol with some β-Diketones. *Journal Heterocyclic Chemistry*, **22**: 1325-1327.

Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Çelik S.E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, **160**: 413–419.

Aruoma O.I., Halliwell B., Hoey B.M., Butler J. (1989). The antioxidant action of n-acetylcysteine: ıts reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, **6**: 593-597.

Arya K. ve Dandia A. (2007). Regioselective synthesis of biologically ımportant scaffold spiro [ındole-perimidines]: an antitumor agents. *Letters in Organic Chemistry*, **4**: 378-383.

Azad N., Rojanasakul Y., Vallyathan V. (2008). Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. *Journal Toxicol Environmental Health*, **11(1)**: 1–15.

Bain G.A., West D.X., Krejci J., Valdès-Martinez J., Hernández-Ortega S., Toscano R.A. (1997). Synthetic and spectroscopic investigations of N(4)-substituted isatin thiosemicarbazones nad their copper(II) complexes. *Polyhedron*, **16(5)**: 855-862.

Balcı, M. (2013). Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi. Kimyasal Kayma. (4. Basım). Ankara: ODTÜ Yayıncılık; s. 57, 330.

Ballantine J.A., Fenwick R.G., Alam M. (1968). Fragmentations in the mass spectra of 2-oxo-3-indolyl derivatives. *Journal Mass Spectrometry*, **1**: 467-481.

Ballantine J.A., Fenwick R.G., Popp F.D. (1971). Rearrangement and cyclization reactions in the mass spectra of a series of isatin carbonyl derivatives of medicinal interest: 2-Oxo-3-indolinylidene anils (n-arylketimines), 2-oxo-3-indolinylidene phenylhydrazones, 2-oxo-3,3-bis-(*o*-diaminoaryl) indolyl deriv-atives and their 2,3-quinoxaline heterocyclic analogues. *Journal Mass Spectrometry*, **5**: 1003-1014.

Bandoh T., Sato E.F., Mitani H., Nakashima A., Hoshi K., Inoue M. (2003). Antioxidative potential of fluvastatin via the ınhibition of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **26(6)**: 818-822.

Barbuch R.J., Peet N.P., Coutant J.E. (1986). Tandem mass spectrometry study of 1-methylisatin. *Journal Mass Spectrometry*, **21**: 521-522.

Barbuch R.J. ve Peet N.P. (1987). Tandem mass spectrometry study of 1-methylisatin. *Journal Mass Spectrometry*, **22**: 59-60.

Bariwal J., Voskressensky L.G., Van Der Eycken E.V. (2018). Recent advances in spirocyclization of indole derivatives. *Chemical Society Reviews*, **47**:3831–3848.

Bauer, D.J. ve Sadler, P.W. (1960). The structure-activity relationships of the antiviral chemotherapeutic activity of isatin β-thiosemicarbazone. *British Journal of Pharmacology*, **15(1)**: 101-110.

Beebe D., Holekamp N., Shui Y. (2010). Oxidative damage and the prevention of age-related cataracts. *Ophthalmic Researh*, **44(3)**:155–165.

Ben-Alloum A., Bakkas S., Soufiaoui M. (1997). Nouvelle voie de synthese des 2-arylbenzothiazoles transfert d'electrons active par micro-ondes. *Tetrahedron Letter*, **38(36)**: 6395-6396.

Berek J.S. ve Hacker N.F. (2000). *Practical Gynecologic Oncology*. (3rd ed.). ABD: Lippincott Williams&Wilkins, s.3-38.

Bergendi L., Bene L., Durackova, Z., Ferencik M., (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Science*, **65**: 1865–1874.

Bergman J., Stalhandske C., Vallberg H. (1997). Studies of the reaction between ındole-2,3-diones (isatins) and secondary aliphatic amines. *Acta Chemica Scandinavica*, **51**: 753-759.

Bhatia M.S., Kumbhar S.S., Kawade V.S., Choudhari P.B., Bhatia N.M., Patil S.B. (2016). Exploration of anticancer potential of spiropyranopyrazole derivatives as cdk7 inhibitors. *Pharmacy Research*, **15**: 74.

Bhuyan K., Bhuyan D., Podos S. (1986). Lipid peroxidation in cataract of the human. *Life Science*, **38(16)**:1463–1471.

Bigotto A. ve Galasso V. (1979). Infrared and Raman spectra of phthalimide and isatin. *Spectrochimica Acta Part A* **35A**: 725-732.

Billeau S., Chatel F., Robin M., Faure R., Galy JP. (2006). Spectral Assignment and Reference Data. ^{1}H and ^{13}C chemical shifts for 2-aryl and 2-*N*-arylamino benzothiazole derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry,* **44**: 102-105.

Bindra J. (1973). *The Alkaloids Oxindol Alkaloids* (14th ed.). New York: Academic Press; s.12,84.

Bora D., Kaushal A., Shankaraiah N. (2021). Anticancer potential of spirocompounds in medicinal chemistry: a pentennial expedition. *European Journal of Medicinal Chemistry,* **215:** 113263.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie, **28:*** 25-30.

Brantley E., Trapani V., Alley M. C., Hose C. D., Bradshaw T. D., Stevens, M. F. G. Ve ark. (2004). Fluorinated 2-(4-amino3methylphenyl) benzothiazoles ınduce cyp1a1 expression, become metabolized, and bind to macromolecules in sensitive human cancer cells. *Drug Metabolism and Disposition,* **32**: 392-1401.

Bratulescu G. (2008). A new efficient one-pot synthesis of indoles. *Tetrahedron Letter,* **49**: 984-986.

Breen A. and Murphy J. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biology and Medicine,* **18**:1033-1077.

Bogert M.T. ve Abrahamson E.M. (1922). Researches on thiazoles I: derivatives of 2-phenyl-benzothiazole. synthesis of an analog of cinchophen (Atophan). *Journal of the American Chemical Society,* **44**: 826-837.

Bogert M.T. ve Snell F.D. (1924). Researches on thiazoles. IV: the synthesis of benzothiazoles from ortho-nitrochlorobenzene. *Journal of the American Chemical Society,* **46**: 1309-1311.

Bogert M.T. ve Stull A. (1925). Researches on thiazoles VII: the behavior of *o*-aminophenyl mercaptan with aldehydes, ketones and *gem*-dihalides, the synthesis of benzothiazoles. *Journal of the American Chemical Society,* **47**: 3078-3083.

Bogert M.T. ve Corbitt H.B. (1926). Researches on Thiazoles IX: further studies on derivatives of 2-phenyl-benzothiazole. *Journal of the American Chemical Society,* **48**: 783-788.

Brown N., Jones A., Fujiyama C., Harris A., Bicknell R., (2000). Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes secretion of angiogenic factors. *Journal Cancer Research,* **60(22)**: 6298–6302.

Brum J., Dell'Orco P., Lapka S., Muske K., Sisko J. (2001). Monitoring organic reactions with on-line atmospheric pressure ionization mass spectrometry: the hydrolysis of isatin. *Rapid Commun in Mass Spectrom*, **15**: 1548-1553.

Burçak G. ve Andican G. (2004). Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, **35**:159-169.

Butcher M. (1971). The loss of CO and HCN in the fragmentation of isatin and the methyl isatins. *Journal Mass Spectrometry*, **5**: 759-760.

Butterfield D., Perluigi M., Sultana R. (2006). Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insights from redox proteomics, **545(1)**: 39–50.

Castiñeiras A., Gómez M.C., Sevillano P. (2000). 2-(2,3-Dihydro-1,3-benzothiazol-2-yl)phenyl(diphenyl) phosphine oxide synthesis and characterization by IR and NMR spectroscopy and X-ray diffractometry. *Journal Molecular Structure*, **554**: 301-306.

Cech N.B. ve Enke C.G. (2001). Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, **20(6)**: 362-387.

Chaudiere J. ve Ferrari-Iliou R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, **37**: 949-962.

Chen L., Yang C., Li S., Qin J. (2007). Synthesis and electronic absorpsion and fluorescence of 2-arylbenzothiazole derivatives. *Spectrochimica Acta Part A*, **68A**: 317-322.

Chiueh, C. C. (1999). Neuroprotective properties of nitric oxide, *Annals of the New York Academy Sciences*, **890**: 301–311.

Chung, Y.C., Chen, S.J., Hsu, C.K., Chang, C.T., Chou, S.T., Walther, E. (2005). Studies on the antioxidative activitives of graptopetalum paraguayense. *Food Chemistry*, **91(3)**: 419-424.

Claasz M. (1916). Über die einwirkung von aldehyden auf o-amino-phenylmercaptan. darstellung von benzthiazolinen. *Journal für Praktische Chemie*, **49:** 1141-1147.

Cogrossi C. (1973). Diagnostic investigation in IR of cyclic imides and polyimides. *Annali di Chimica*; **63**: 309-318.

Cole R.B. ve Zhu J. (1999). Chloride anion attachment in negative ion electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **13(7):** 607-611.

Cooke Ms., Evans Md., Dizdaroglu M., Lunec J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, **17**:1195-214.

Cossey H.D., Sharpe C.J., Stephens F.F. (1963). Some anti-microbial compounds in the heterocyclic series. part ııı. basic ethers of the benzothiazole and benzoxazole series. *Journal Chemistry Society*, **30**: 4322-4330.

Coutts R.T., El-Hawari A.M., Pound N.J., Abramovitch R.A. (1976). Derivatives of 2-pyrazolin-5-one IV. preparation and properties of two spiro[benzothiazoline-2,4'-[2]pyrazoline] derivatives. *Canadian Journal of Chemistry*, **54**: 993-1001.

Çağlayan A. (2012). Epitelyal over kanserinde oksidan/antioksidan statü değişikliklerinin prognostik etmenler ile birlikte değerlendirilmesi. *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, **4:3**.

Dandia A., Khanna S., Joshi K C. (1990). reactions of fluorinated ısatin derivatives with 2-aminothiophenol. *Journal Indian Chemistry Society*, **67:** 824-826.

Dandia A., Singh R., Arya K. (2003). Solvent-free synthesis of spiro[3*H*-indole-3,2'-thiazolidines]. *Organic Preparations and Procedures International*, **35(4):** 401-408.

Dandia A., Singh R., Arya K. (2004). Microwave induced dry-media synthesis of spiro[indole-thiazolidinones/thiazinones] as potential antifungal and antitubercular agents and study of their reactions. *Phosphorus Sulfur Silicon*, **179:** 551-564.

Dandia A., Singh R., Khaturia S., Merienne C., Morgant G., Loupy A. (2006). Eficient microwave enhanched regioselective synthesis of a series of benzimidazolyl/triazolyl spiro [indole-thiazolidinones] as potent antifungal agents and crystal structure of spiro[3H-indole-3,2'-thiazolidine]-3'(1,2,4-triazol-3-yl)-2,4'(1H)-dione. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **14:**2409-2417.

Dannhardt G., Kiefer W. (2001). Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects. *European Journal of Medicinal Chemistry,* **36:** 109-126.

Davidovich P., Aksenova V., Petrova V., Tentler D., Orlova D., Smirnov S., et al. (2015). Discovery of novel isatin-based p53 inducers. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **6:** 856–860.

Değermenci G.D., Bayhan Y.K., Değermenci N. (2014). Yüksek organik madde içeren endüstriyel bir atıksuyun fenton prosesi ile arıtılabilirliğinin araştırılması. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* **4(2):**17-22.

Devmurari V.P., Shivanand P., Goyani M.B., Nandanwar R.R., Jivani N.P., Perumal P. (2010). Synthesis and anticancer activity of some novel 2-substituted benzothiazole derivatives. *International Journal of ChemTech Research,* **2(1):** 681-689.

Dhayabaran V.V., Kumar M.R., Manikandan A., Sivakumar A. (2018). An eco-friendly catalytic system for multicomponent, one-pot synthesis of novel spiro-chromeno indoline-triones and their anti-prostate cancer potentials evaluated via alkaline phosphatase inhibition mechanism. *Bioorganic Chemistry*, **81**: 44-54.

Dilsiz N., Olcucu A., Atas M. (2000). Determination of calcium, sodium, potassium and magnesium concentrations in human senile cataractous lenses. *Cell Biochemistry and Function,* **18(4):** 259–262.

Ding Z., Zhou M., Zeng C. (2020). Recent advances in isatin hybrids as potential anticancer agents. *Archive Der Pharmazie,* **353(3):** 1900367.

Djordjević V.B. (2004). Free radicals in cell biology. *International Review Cytology,* **237:**57-89.

Eldehna W. M., Almahli H., Al-Ansary G. H., Ghabbour H. A., Aly M. H., Ismael O. E., et al. (2017). Synthesis and in vitro anti-proliferative activity of some novel isatins conjugated with quinazoline/phthalazine hydrazines against triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells as apoptosis-inducing agents. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry,* **32:** 600–613.

Eldehna W.M., El-Naggar D.H., Hamed A.R., Ibrahim H.S., Ghabbour H.A., Abdel-Aziz H.A. (2018). One-pot three-component synthesis of novel spirooxindoles with potential

cytotoxic activity against triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, **33:**309–318.

Elder D.P., Snodin D., Teasdale A. (2011). Control and analysis of hydrazine, hydrazides and hydrazones-Genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients (APIs) and drug products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **54:** 900–910.

Elderfield R.C., McClenachan E.C. (1958). Pyrolysis of the products of the reaction of *o*-aminobenzenethiols with ketones. *Journal of the American Chemical Society*, **82:** 1982-1988.

Erdik E. (2007). *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler.* (4. Basım). Ankara: Gazi Kitabevi; s. 109-125.

Erdik E. (2007). *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler.* (4. Basım). Ankara: Gazi Kitabevi; s. 204.

Erdik E. (2007). *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler.* (4. Basım). Ankara: Gazi Kitabevi; s. 241-244.

Erdik E. (2007). *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler.* (4. Basım). Ankara: Gazi Kitabevi; s. 276-277.

Ermut G., Karalı N., Özsoy N., Can A. (2014). New spiroindolinones bearing 5-chlorobenzothiazole moiety. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **29(4):** 457-468.

Espadinha M., Lopes E.A., Marques V., Amaral J.D., Dos Santos D.J.V.A., Mori M., et al. (2022). Discovery of MDM2-p53 and MDM4-p53 protein-protein interactions small molecule dual inhibitors. *European Journal of Medicinal* Chemistry, **241:**114637.

Fang Y.-Z., Yang S., Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, **18(10):** 872–879.

Fares M., Eldehna W. M., Abou-Seri S.M., Abdel-Aziz H.A., Aly M.H., Tolba M. F. (2015). Design, synthesis and in vitro antiproliferative activity of novel isatin-quinazoline hybrids. *Archive Der Pharmazie*, **348:** 144–154.

Farooq M., Al Marhoon Z.M., Taha N. A., Baabbad A.A., Al-Wadaan M.A., El-Faham A. (2018). Synthesis of novel class of n-alkyl-isatin-3-iminobenzoic acid derivatives and their biological activity in zebrafish embryos and human cancer cell lines. *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* **41:** 350–359.

Feniuk W. ve Humphrey P.P.A. (1992). The development of a highly selective 5-HT1 receptor agonist, sumatriptan, for the treatment of migraine. *Drug Development Research,* **26:** 235.

Ferreira S.H., Moncada S., Vane J.R. (1971). Indomethacin and aspirinabolish prostaglandin release from the spleen. *Nature: New Biology,* **231(25):** 237.

Foster H.M. ve Heın D.W. (1961). Notes- phenol-formaldehyde condensation. *Journal of Organic Chemistry,* **26(7):** 2539-2541.

Freshney R.I. (2000). *Culture Of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* (4th Ed.). New York: Wiley-Liss Press, 978-0471348894.

Fridovich I. (1975). Superoxide dismutase. *Annals of the New York Academy Sciences*, **44:**147- 159.

Galasco V., Pellizer G., Lisini A., Bigotto A. (1975). The proton magnetic resonance of heterocyclic diketones. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **7:** 591-595.

Gangarapu K., Thumma G., Manda S., Jallapally A., Jarapula R., Rekulapally S. (2017). Design, synthesis and molecular docking of novel structural hybrids of substituted isatin based pyrazoline and thiadiazoline as antitumor agents. *Medicinal Chemistry Research*, **26:** 819-829.

Ghafourifar P. ve Cadenas E. (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends in Pharmacological Science*, **26:** 190–195.

Ghozlan S.A.S., Mohamed M.F., Ahmed A.G., Shouman S.A., Attia Y.M., Abdelhamid I.A. (2015). Cytotoxic and antimicrobial evaluations of novel apoptotic and anti-angiogenic spirocyclic 2-oxindole derivatives of 2-amino-tetrahydroquinolin-5-one. *Archiv Der Pharmazie,* **348(2):**113-24.

Hall M.D., Brimacombe K.R., Varonka M.S., Pluchino K.M., Monda J.K., Li J., et al. (2011). Synthesis and structure-activity evaluation of isatin-β-thiosemicarbazones with

improved selective activity toward multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein. *Journal of Medicinal Chemistry,* **54:** 5878–5889.

Halliwell B. ve Gutteridege M. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. (5th ed.). Oxford University Press.

Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. redox biology ıs a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, **141(2):**312-22.

Hamad I., Arda N.., Pekmez M., Karaer S., Temizkan G. (2010). Intracellular scavenging activity of trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) in the fission yeast. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine,* **1(1):** 16-21.

Harris M.l., Schiller H., Reilly P., Donowits M., Grisham M., Bulkley Gb. (1992). Free radicals and other reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease: Cause, consequence or epiphenomenon. *Department of Medicine The Johns Hopkins University School of Medicine,* **53:** 375–408.

Hashim Z. ve Zarina S. (2012). Osmotic stress induced oxidative damage: Possible mechanism of cataract formation in diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*, **26(4):** 275–279.

Hati S., Tripathy S., Dutta P.K., Agarwal R., Srinivasan R., Singh A., et.al. (2016). Spiro[Pyrrolidine-3, 3’-Oxindole] as potent anti-breast cancer compounds: their design, synthesis, biological evaluation and cellular target identification. *Scientific Reports,* **6:**32213.

Hedge V.S., Kolavi G.D., Lamani R.S., Khazi I.A.M. (2006). Mannich bases novel benzothiazole derivatives of imidazo[2,1-b][1,3,4]thiazoles and their biological evaluation. *Journal Sulfur Chemistry,* **27(6):** 553-569.

Hein D.W., Alheim R.J., Leavitt J.J. (1957). The use of polyphosphoric acid in the synthesis of 2-aryl- and 2-alkyl-substituted benzimidazoles, benzoxazoles and benzothiazoles. *Journal American Chemistry Society,* **79(2)**: 427-429.

Helbock H., Beckman K., Ames B. (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-Hydroxy-guanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods in Enzymol,* **300:**156-166.

Handelmann G.J. (2001). The evolving role of carotenoids in human biochemis-try. *Nutrition,* **17:** 818–822

Henriksen T., Juhler R.K., Svensmark B., Cech N.B. (2005). The relative influences of acidity and polarity on responsiveness of small organic molecules to analysis with negative ion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry,* **16(4):** 446-455.

Heravi M., Zadsirjan V., Malmir M. (2018). Application of the asymmetric pictet–spengler reaction in the total synthesis of natural products and relevant biologically active compounds. *Molecules,* **23:** 943.

Hofmann A.W. (1879). Ueber die Einwirkung des schwefels auf phenylbenzamid. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft,* **12:** 2359-2365.

Hofmann A.W. (1880). Zur kenntniss des amidophenylmercaptans oder sulfhydranilins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft,* **13:** 1223-1238.

Holzer, W. ve Györgydeák Z. (1996). NMR spectroscopic investigations with isatin guanylhydrazones. *Journal of Heterocyclic Chemistry,* **33:** 675-678.

Houlihan W.J. *The Chemistry of Heterocyclic Compounds: a Series of Monographs: Indoles.* New York: Wiley & Sons; 1972.

Howard J.A.K., Hoy V.J., O'Hagan D., Smith G.T. (1996). How good is fluorine as a hydrogen bond acceptor? *Tetrahedron,* **52:** 12613-12622.

Hu Jj., Dubin N., Kurland D., Ma Bl., Roush Gc. (1995). The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities. *Mutation Research,* **336:**193-201.

Humphrey G.R., Kuethe J.T. (2006). Practical Methodologies for the Synthesis of Indoles. *Chemical Reviews,* **106 (7):** 2875.

Hyan Y.J., Poeggeler B., Omar R.A., Chaın D.G., Frangıone B., Ghıso J., etc al. (1999). Potent neuroprotective properties against the alzheimer beta-amyloid by an endogenous melatonin-related ındole structure, ındole-3-propionic acid. *Journal of Biological Chemistry,* **30:** 21937-21942.

Ikeda Y., Matsumoto K., Dohi K., Jimbo H., Sasaki K., Satoh K. (2001). Direct superoxide scavenging activity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: determination by electron spin resonance using the spin trap method. *Headache,* **41:** 138-141.

İkizler A. (1985). *Organik Kimyaya Giriş*. Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları; s. 398.

Jacobson B. (1886). Ueber bildung von anhydroverbinungen des orthoamidophenylmercaprans aus thioaniliden. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*; **19:** 1067-1077.

Jain S.C., Sinha J., Bhagat S., Errington W., Olsen C.E. (2003). A facile synthesis of novel spiro-[Indole-pyrazolinyl-thiazolidine]-2,4'-dione. *Synthetic Communications*, **33(4)**: 563-577.

Jain S.C., Khanna P., Bhagat S., Jain M., Sakhuja R. (2005). Novel fluorinated spiro [indole-indazolyl-thiazolidine]-2,4'-diones: design and synthesis. *Phosphorus Sulfur Silicon Related Elements*, **180(8)**: 1829-1839.

Jiang B. ve Gu X. (2006). syntehesis and bioactivity evaluation of ethyl-6-amino-2-substituent indole-3-carboxylates and their derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, **26(09):** 1248-1253.

Johnson F. ve Giulivi C. (2005). Superoxide dismutases and their effects on human health. *Molecular Aspects of Medicine*, **26:** 340–352.

Joshi K.C., Dandia A., Khanna S. (1990). Studies in spiroheterocycles: part xxıı-ınvestigation on the reactions of indole-2,3-diones with 2-aminothiophenol and 2-aminophenol. *Indian Journal Chemistry Sect B: Organic Chemistry Include Medicinal Chemistry*, **29B:** 824-829.

Joule J. ve Mills K. (2000). *Heterocyclic Chemistry*. (5th ed.). Oxfort: Wiley; s. 629-645.

Kamal A., Suresh K., Vardhan V., Hussaini A., Mahesh R., Shaik S.P. et all. (2015). Sulfamic acid promoted one-pot three-component synthesis and cytotoxic evaluation of spirooxindoles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **25(10)**: 2199-2202

Kapil A. ve Dandia A. (2007). Synthesis of biologically important novel fluorinated spiro heterocycles under microwaves catalized by montmorillonite KSF. *Journal Fluorine Chemistry*, **128**: 224-231.

Karale B., Takate S., Salve S., Zaware B., Jadhav S. et al. (2015). Synthesis and antibacterial screening of novel fluorine containing heterocycles. *Oriental Journal of Chemistry*, **31:** 307-315.

Karalı N. (2002). Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-nitroindole-2,3-dione derivatives. *Europan Journal Medicinal Chemistry,* **37:** 909-918.

Karalı N., Güzel Ö., Özsoy N., Özbey S., Salman A., (2010). Synthesis of new spiroindolinones incorporating a benzothiazole moiety as antioxidant agents. *European Journal of Medicinal Chemistry,* **45:** 1068-1077.

Karbownik M., Stasiak M., Zasada K., Zygmunt A., Lewinski A. (2005). Comparison of Potential Protective Effects of Melatonin, Indole-3-Propionic Acid, and Propylthiouracil Against Lipid Peroxidation Caused by Potassium Bromate in the Thyroid Gland. *Journal Cell Biochemistry,* **95:** 131-138.

Kawashita Y., Ueba C., Hayashi M. (2006). A simple synthesis of 2-arylbenzothiazoles and its application to palladium-catalyzed Mizoroki-Heck reaction. *Tetraheron Letters*, **47**: 4231-4233.

Kılınç, K. ve Kılınç, A. (2002). Temel tıptan kliniğe. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi, **33**, 110–118.

Kodomari M., Satoh A., Nakano R. (2007). Solvent-free synthesis of benzothiazolines in the presence of alumina. *Synthesis Communication*, **37**: 3329-3335.

Kollmar M., Parlitz R., Oevers S.R., Helmchen G. (2002). 2-Amino-3-fluorobenzoic acid. *Organic Synthesis*, **79**: 196-204.

Koshland D. E. (1992). The molecule of the year. *Science*, **258:** 1861.

Kumar M.R., Dhayabaran V., Sudhapriya N., Manikandan A., Gideon DA., Annapoorani S., (2020). p-TSA.H2O mediated one-pot, multi-component synthesis of isatin derived imidazoles as dual-purpose drugs against inflammation and cancer. *Biyoorganic Medicinal Chemistry Letter*, **102**: 104046.

Kutschy P., Salayova A., Curillova Z., Kozar T., Mezencev R., Mojzis J. etc. al. (2009). 2-(Substituted phenyl)amino analogs of 1-methoxyspirobrassinol methyl ether: Synthesis and anticancer activity. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **17**: 3698-3712.

Laatsch H., Thomson R.H., Cox P.J. (1984). Spectroscopic properties of violacein and related compounds: crystal structure of tetramethylviolacein. *Journal Chemistry Society Perkin Trans II*, **8**: 1331-1339.

Lane N. (2002). *Oxygen, the Molecule That Made the World*. London: Oxford University Press; s.16-29.

Lankelma H.P. ve Sharnoff P.X. (1931). The condensation of aldehydes with ortho-aminothiophenols, benzothiazolines and benzothiazoles. *Journal of the American Chemical Society*, **53**: 2654-2657.

Lankelma H.P. ve Sharnoff P.X. (1932). The Condensation of aldehydes and ketones with ortho-aminothiophenols, benzothiazolines and benzothiazoles II. *Journal of the American Chemical Society*, **54**: 379-381.

Larina L.I., Elokhina V.N., Yaroshenko T.I., Nakhmanovich A.S., Dolgushin G.V. (2007). Spectral assignments and refernce data. ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N and ^{19}F NMR study of acetylation products of heterocyclic thiosemicarbazones. *Magnetic Resonance Chemistry*, **45**: 667-673.

Le Tourneau C., RaymondnE., Faivre S. (2007). Sunitinib: A novel tyrosine kinase inhibitor: a brief review of its therapeutic potential in the treatment of renal carcinoma and gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Therapeutics and Clinical Risk Management*, **3**: 341–348.

Liang C., Xia J., Lei D., Li X., Yao Q., Gao J. (2014). Synthesis, in vitro and in vivo antitumor activity of symmetrical bis-schiff base derivatives of isatin. *European journal of medicinal chemistry*, **74**: 742–750.

Lim H.J., Myung D., Lee I.Y.C., Jung M.H. (2008). Microwave-assisted synthesis of benzimidazoles, benzoxazoles, and benzothiazoles from resin-bound esters. *Journal of Combinatorial Chemistry*, **10**: 501-503.

Liu Y., Jiang H.B., Liu Y., Algradi A.M., Naseem A., Zhou Y.Y. etc al. (2020). New indole alkaloids from phytotherapia's seeds. *Fitoterapia*, **146**: 104726.

London C.A., Malpas P.B., Wood-Follis S.L., Boucher J.F., Rusk A.W., Rosenberg M.P., etc al. (2009). Multi-center, placebo-controlled, double-blind, randomized study of oral toceranib phosphate (SU11654), a receptor tyrosine kinase inhibitor, for the treatment of dogs with recurrent (either local or distant) mast cell tumor following surgical excision. *Clinical Cancer Research*, **15:** 3856–3865.

March J. (1992). *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*. (4th ed.) New York: John Wiley & Sons.

Matés J.M., Pérez-Góme C., Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry,* **32:** 595–603.

Mezencev R., Kutschy P., Salayova A., Curillova Z.., Mojzis J, Pilàtovà M etc al. (2008). Anticancer properties of 2-piperidyl analogues of the natural ındole phytoalexin 1-methoxyspirobrassinol. *Chemotherapy,* **54(5):** 372-378.

Michnovicz J.J., Bradlow H.L. (1990). Induction of estradiol metabolism by dietary indole3-carbinol in humans. *Journal of the National Cancer Institute,* **82:** 947-949.

Miller A.F. (2004). Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Current Opinion in Chemical Biology,* **8:** 162-168.

Monde K., Taniguchi T., Miura N., Kutschy P.., Curillova Z, Pilatova M. etc al. (2005). Chiral cruciferous phytoalexins: preparation absolute configuration and biological activity. *Bioorganic Medicinal Chemistry,* **13:** 5206-5212.

Morales Ríos M.S. ve Joseph-Nathan P. (1991). 1H and 13C NMR study of 1-substituted isatins and their corresponding 3-(dicyanomethylidene) indol-2-ones. *Magnetic Resonance in Chemistry,* **29:** 893-896.

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal Of Immunological Methods,* **65(1-2):** 55-63.

Mouithys-Mickalad A.M.L., Zheng S.X., Deby-Dupont G.P., Deby C.M..T, Lamy M.M., Reginster J.Y.Y, Henrotin Y.E. (2000). In vitro study of the antioxidant properties of non steroidal anti-ınflammatory drugs by chemiluminescence and electron spin resonance (esr). *Free Radical Research,* **33(5):** 607-621.

Mukhopadhyay C. ve Arup D. (2007). A green method for the synthesis of 2-arylbenzothiazoles. *Heterocycles*, **71(8)**: 1837-1842.

Murali K., Sparkes H.A., Prasad K.J.R. (2018). Regio- and stereoselective synthesis of dispirooxindolepyrrolocarbazole hybrids via 1,3-dipolar cycloaddition reactions: Cytotoxic activity and SAR studies. *European journal of medicinal chemistry*, **143**: 292–305.

Murrell Tg. (1991). Epidemiological and biochemical support for a theory on the cause and prevention of breast cancer. *Medical Hypotheses*, **36(4):** 389–396.

Müftüoğlu M. (2003). DNA tamiri ve erken yaşlanma sendromları. *Türk Biyokimya Dergisi*, **28**: 20-24.

Naumov P., Anastasova F., Drew M.G.B. (2000). 5-Fluoroindoline-2,3-dione. *Acta Crystallographica*, **C56**: 406-407.

Naumov P. ve Anastasova F. (2001). Experimental and theoretical vibrational study of isatin, its 5-(NO_2, F, Cl, Br, I, CH_3) analogues and the isatinato anion. *Spectrochimica Acta Part A*, **57**: 469-481.

Naz F., Anjum F., Islam A., Ahmad F., Hassan M. (2013). Microtubule affinity-regulating kinase 4: structure, function, and regulation. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **67:** 485–499.

Neurauter G., Grahmann A.V., Klieber M., Zeimet A., Ledochowski M., Sperner-Unterweger B. etc al. (2008). Serum phenylalanine concentrations in patients with ovarian carcinoma correlate with concentrations of immune activation markers and of isoprostane-8. *Cancer Letter*, **272:** 141-147.

Nicholas Z., Hu N., Ying J., Soisson P., Dodson M., Gaffney D.K. (2014). Impact of Comorbid Conditions on Survival in Endometrial Cancer. *American Journal of Clinical Oncology*, **25:** 2679–2689,

Niume K., Kurosawa S., Toda F., Hasegawa M., Iwakura Y. (1982). The condensation of ısatin with o-phenylenediamine. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **55:** 2293-2294.

Olivieri S., Conti A., Iannaccone S., Cannistraci C., Campanella A., Barbariga M. et al. (2011). Ceruloplasmin oxidation, a feature of Parkinson's disease CSF, inhibits ferroxidase activity and promotes cellular iron retention. *The Journal of neuroscience,* **31**:18568–18577.

O'Sullivan D.G. ve Sadler P.W. (1956). The structure of ısatin and substituted ısatins. *Journal Chemistry Society*; 2202-2207.

O'Sullivan D.G. (1960). Vibrational frequency correlations in heterocyclic molecules. part vı. spectral features of a range of compounds poessessing a benzene ring fused to a five-membered ring. *Journal Chemistry Society,* 3278-3284.

Önay Uçar E., Arda N., Aitken A. (2012). An extract from mistletoe, viscum album l. reduces hsp27 and 14-3-3 proteins expression and induces apoptosis in c6 rat glioma cells. *Genetics And Molecular Research,* **11:** 2801-2813.

Patil S. ve Bobade V. (2009) Simple and efficient one-pot synthesis of 2-substituted benzoxazole and benzothiazole. *Synthetic Communications,* **40(2):** p. 206-12.

Patravale A., Gore A.H., Kolekar G.B., Deshmukh M.B., Choudhari P.B., Bhatia M.S. et al. (2016). Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of some novel indenospiro derivatives as anticancer agents. *Journal Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **68**.

Patro B.S., Rele S., Chintalwar G.J., Chattopadhyay S., Adhikari S., Mukherjee T. (2002). Protective activities of some phenolic 1, 3- diketones against lipid peroxidation: possible involvement of the 1, 3- diketone moiety. *Chembiochem*, **3(4)**: 364–370.

Pedras M.S.C., Nycholat C.M., Montaut S., Xu Y., Khan A.Q. (2002). Chemical defences of crucifers: elicitation and metabolism of phytoalexins and indole-3-acetonitrile in brown mustard and turnip. *Phytochemistry*; **59**: 611-625.

Peet N.P. ve Barbuch R.J. (1984). Mass spectral fragmentation and rearrangement of ısatin derivatives. *Journal Mass Spectrometry,* **19(4)**: 171-175.

Pervez H., Saira N., Iqbal M.S., Yaqub M., Khan K.M. (2013). Synthesis and biological evaluation of some N_4-aryl-substituted 5-fluoroisatin-3-thiosemicarbazones. *Medicinal Chemistry Research,* **22(12):** 5878-5889.

Petrov I., Grupce O., Stafilov T. (1986). The N-h streching region of some imides and thioimides. *Journal Molecule Structure,* **142**: 275-278.

Peyrot F. ve Ducrocq C. (2008). Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Pineal Research*, **45:** 235-246.

Pilàtovà M., Sarissky M., Kutschy P., Mirossay A., Mezencev R., Curillova Z. et al. (2005). Cruciferous phytoalexins: antiproliferative effects in t-jurkat leukemic cells. *Leukemia Research*, **29:** 415-421.

Pinto A. C. (2001). The chemistry of isatins: a review from 1975 to 1999. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **12(3):** 273.

Praveen C., Kumar K., Muralidharan D., Perumal P. (2008). Oxidative cyclization of thiophenolic and phenolic Schiff's bases promoted by PCC: a new oxidant for 2-substituted benzothiazoles and benzoxazoles. *Tetrahedron*, **64(10)**: 2369-2374.

Puchalska M., Polec-Pawlak K., Zadrona I., Hryszko H., Jarosz M. (2004). Identification of indigoid dyes in natural organic pigments used in historical art objects by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Joyrnal Mass Spectrometry*, **39**: 1441-1449.

Rahim F., Samreen S., Taha M., Saad S., Perveen S., Khan D. etc al. (2015). Antileishmanial activities of benzothiazole derivatives. *Journal of The Chemical Society of Pakistan*, **37**: 157-61.

Rajendra G.M. (1995). Cancer chemopreventive activity of brassinin, a phytoalexin from cabbage. *Carcinogenesis*, **16 (2):** 399-404.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannal A.A., Yang M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med*, **26(9)**: 1231-1237.

Reddy B.K., Lokesh V., Vidyasagar M.S., Shenoy K., Babu K.G., Shenoy A., et al. (2014). Nimotuzumab provides survival benefit to patients with inoperable advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: A randomized, open-label, phase IIb, 5-year study in Indian patients. *Oral Oncology*, **50:** 498-505

Reiter R.J. (1997). Antioxidant actions of melatonin. *Advances in Pharmacology*, **38:**103 - 117.

Rivas-Arancibia S., Guevara-Guzmán R., López-Vidal Y., Rodríguez-Martínez E., Zanardo-Gomes M., Angoa-Pérez M. et al. (2010). Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **113(1):** 187–197.

Rizzo M. and Porta C. (2017). Sunitinib in the treatment of renal cell carcinoma: an update on recent evidence. *Therapeutic Advances in Urology*, **9(8):** 195–207.

Roskoski R. (2007). Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **356:** 323–328.

Sadler, P. (1965). Antiviral chemotherapy with isatin-β-thiosemicarbazone and its derivatives. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **130(1)**: 71-79.

Sakai T., Miki Y., Nakatani M., Ema T., Uneyama K., Utaka M. (1998). Lipase-Catalysed kinetic resolution of 2-acyloxy-2-(pentafluorophenyl)acetonitrile. *Tetrahedron Letters*, **39:** 5233-5236.

Sampson P.B., Y. Liu, Forrest B., Cumming G., Li S.-W., Patel N.K. et al (2015). The discovery of polo-like kinase 4inhibitors: identification of (1R,2S)-2-(3-((E)-4-(((cis)-2,6-dimethylmorpholino)methyl)styryl)-1H-indazol-6-yl)-50-methoxyspiro [cyclopropane-1,30-indolin]-20-one (CFI-400945) as a potent, orally active antitumor agent. *Journal Medicinal Chemistry*, **58:**147-169.

Sancar A. ve Reardon Jt. (2004). Nucleotide Excision Repair in E.Coli and Man. *Advancea in Protein Chemistry*, **69:** 43-71.

Santes V., Rojas-Lima S, Santillan R.L., Farfàn N. (1999). Synthesis and study of ısomeric benzo[1,4]oxazines and benzothiazolines by nmr spectroscopy and x-ray crystallography. *Monatshefte für Chemie,* **130**: 1481-1486.

Scandalios J.G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **38:** 995-1014.

Schrödinger LLC. (2015). QikProp, version 4.4. Erişim: 14.08.2023, http://gohom.win/ManualHom/Schrodinger/Schrodinger_2015-2_docs/qikprop/qikprop_user_manual.pdf

SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 1723HSP-03-931 (1H-NMR).

SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 1723HPM-02-130 (1H-NMR).

SDBS. web: http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_disp.cgi?sdbsno=1727, spectrum no: 1727

SDBS. web: http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_disp.cgi?sdbsno=2159, spectrum no: 2159

SDBS. web: http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_disp.cgi?sdbsno=2597, spectrum no: 2597

SDBS. web: http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_disp.cgi?sdbsno=3865, spectrum no: 3865

SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 8046 (IR).

SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 21417 (IR).

SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 23383 (IR).

SDBS. web: http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_disp.cgi?sdbsno=51380, spectrum no: 51380

SDBS. web: http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_disp.cgi?sdbsno=51489, spectrum no: 51489

SDBS. web: http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_disp.cgi?sdbsno=52016, spectrum no: 52016

SDBS. web: http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_disp.cgi?sdbsno=52382, spectrum no: 52382

SDBS. web: http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_disp.cgi?sdbsno=52987, spectrum no: 52987

Silverstein R.M., Bassler G.C., Morrill T.C. (1981). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. (4th ed.) New York, USA: John Wiley & Sons Inc; s. 124-132.

Snavely Fred A. ve Un S. (1981). A study of the structure of hydrazones of indole-2,3-dione and 1-methylindole-2,3-dione with nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal Organic Chemistry,* **46(13)**: 2764-2766.

Solcániová E. ve Culak I. (1989). Effect of substituents on the ^{13}C NMR chemical shifts of 2-R-3-methylbenzothiazolium quaternary salts and 2-R-benzothiazoles. *Magnetic Resonance Chemistry*, **27(7)**: 663-665.

Soliman A.A.F., Abo-Salem H.M., Nassrallah A., Ebıed M.S., Elawady M.E., Abdelhamıd S.A. et al. (2020). Synthesis and bioactivity assessment of novel spiro pyrazole-oxindole congeners exhibiting potent and selective in vitro anticancer effects. *Molecules*, **25(5):** 1124.

Somogyi A., Rosta K., Pusztai P., Tulassay Z., Nagy G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*, **28:** R41-R55.

Stevens M.F.G., McCall C.J., Lelieveld P., Alexander P., Richter A., Davies D.E. (1994). Structural studies on bioactive compounds. 23. synthesis of polyhydroxylated 2-phenylbenzothiazoles and a comparison of their cytotoxicities and pharmacological properties with genistein and quercetin. *Journal Medicinal Chemistry*, **37**: 1689-1695.

Sterk H. ve Holzer H. (1974). Beziehungen zwischen chemischer Verschiebung und Ladungsdichte. *Magnetic Resonance Chemistry*, **6**: 133-143.

Sumrra S.H., Atif A.H., Zafar M.N., Khalid M., Tahir M.N., et al. (2018) Synthesis, crystal structure, spectral and DFT studies of potent isatin derived metal complexes. *Journal of Molecular Structure*, **1166(15):** 110-120.

Sundberg Rj. (1996). *Indoles*. (1st ed.). ABD: San Diego: Academic press; s. 79-89.

Süzen S. (2007). Antioxidant activities of synthetic ındole derivatives and possible activity mechanisms. *Heterocyclic Chemistry*, **11**: 145-178.

Szalay J. (2016). What are free radicals? *Live Science*, 54151.

Şimşek F. (1999). Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipit peroksidasyonu. *Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi,* **8:(1)** 42-47.

Tan D., Manchester L.C., Terron M.P., Flores L J, Reiter R J. (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Journal Pineal Research*, **42:** 28-42.

Tan D.X., Reıter R.J., Manchester L.C., Yan M.T., El-Sawı M., Saın RM. et al (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad

spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2:**181-197.

Taşal E., Sıdır İ., Gülseven Y., Öğretir C., Önkol T. (2009). Experimental and density functional theory and ab initio Hartree-Fock study on the vibrational spectra of 5-chloro-6-(4-chlorobenzoyl)-2-benzothiazolinone molecule. *Spectro Chim Acta Part A*, **72:** 801-810.

Teuber H.J. ve Waider H. (1958). Zur Kenntnis der aus *o*-Amino-thiophenol und Ketonen erhältlichen Benzthiazoline. *Ber*, **91**: 2341-2344.

Tüzün C. *Organik Kimya*. (4.basım). Ankara: Okan Yayınları; 1989. p 485.

Qian P., Su J.H., Wang Y., Bi M., Zha Z., Wan Z. (2017). Electrocatalytic C–H/N–H Coupling of 2′- Aminoacetophenones for the Synthesis of Isatins. *The Journal of Organic Chemistry*, **82(12):** 6434-6440.

Unger M., Jacobsen W., Holzgrabe U., Benet L.Z. (2002). Quantitative Liquid Chromatography-mass spectrometry determination of isatin in urine using automated on-line extraction. *Journal Chromatography B*, **767**: 245-253.

Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **266:** 37-56.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39:** 44-84.

Varun V., Sonam S., Kakkar R. (2019). Isatin and its derivatives: a survey of recent syntheses, reactions, and applications. *Medicinal Chemistry Communication*, **10:** 351–368.

Vine K.L., Matesic L., Locke J. M., Skropeta D. (2013). Recent highlights in the development of isatin-based anticancer agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **2:** 254–312.

Wilm M. (2011). Principles of electrospray ionization. *Molecular & Cellular Proteomics*, **10:(7)** M111.009407-1-M111.009407-8.

Winkler T., Ferrini P.G., Haas G. (1979). The 13C NMR spectrum of coumarandione. *Organic Magnetic Resonance*, **12(2):** 101-102.

Weissberg A. ve Dagan S. (2011). Interpretation of ESI (+)-MS-MS spectra-towards the identification of unknowns. *International Journal of Mass Spectrometry,* **299(2-3):** 158-168.

Wurz R.P. ve Cee V.J. (2019). Targeted degradation of MDM2 as a new approach to improve the efficacy of MDM2-p53 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, **62:** 445–447.

Varma R.S., Singh A.P., Singh S.P. (1992). Electron ımpact mass spectra of 1-Methyl-3-(2-benzothiazolylhydrazono)-2-indolinones. *Journal Mass Spectrometry,* **27**: 17-18.

Yoshino K., Kohno T., Uno T., Morita T., Tsukamoto G. (1986). Organic phosphorus compounds. 1. 4-(benzothiazol-2-yl)benzylphosphonate as potent calcium antagonistic vasodilator. *Journal Medicinal Chemistry,* **29**: 820-825.

Young I.S. ve Woodside J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, **54:** 176-186.

Young Sn. (2007). How to increase serotonin in the human brain without drugs. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, **32 (6):** 394–99.

Zahid M., Saeed M., Yang L., Beseler C., Rogan E., Cavalieri E. (2011). Formation of dopamine quinone-dna adducts and their potential role in the etiology of parkinson's disease. *Life,* **63(12):** 1087-93.

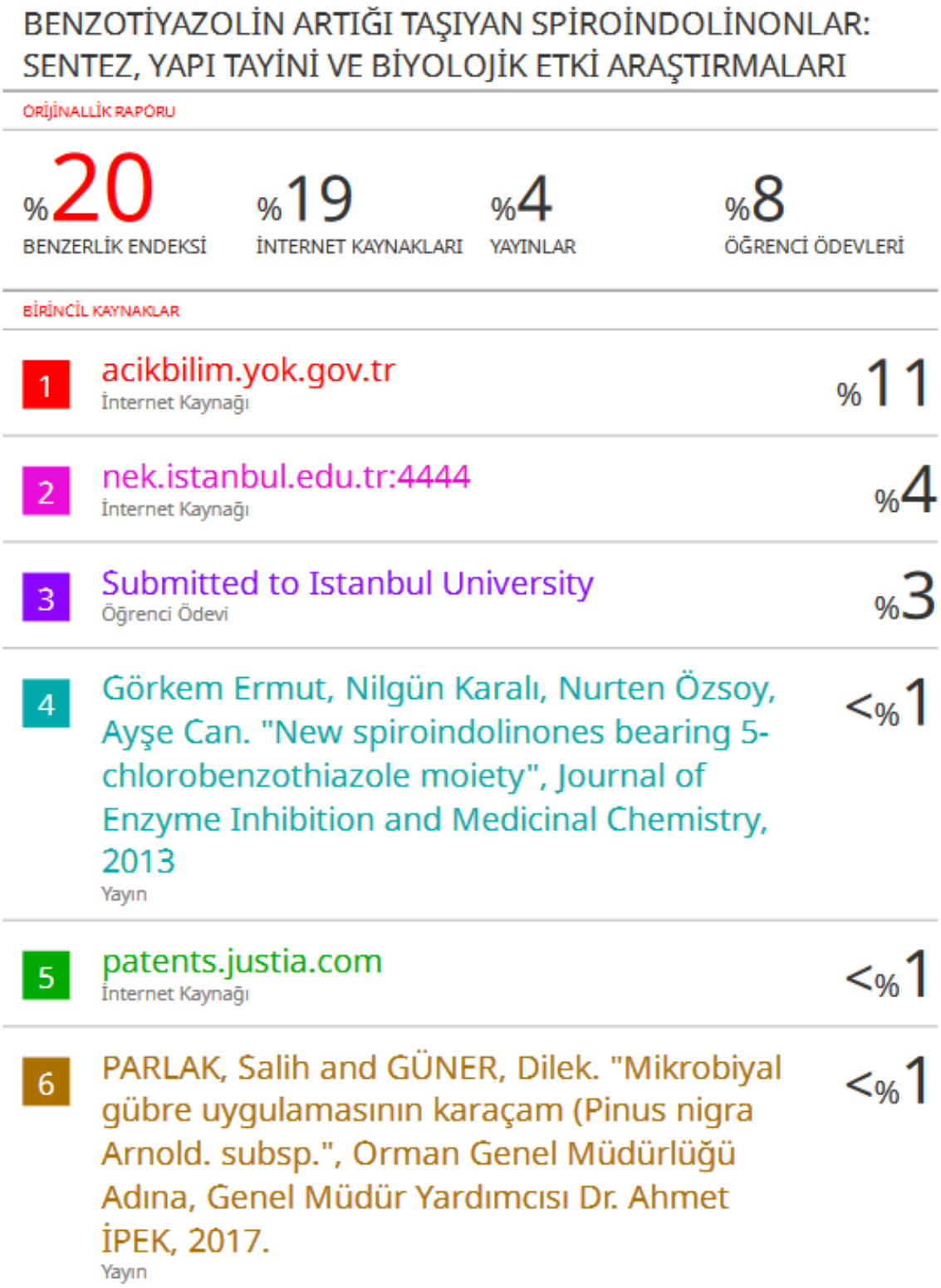
Zhang C., Li S., Bureš F., Lee R., Ye X., Jiang Z. (2016). Visible light photocatalytic aerobic oxygenation of ındoles and ph as a chemoselective switch. *ACS Catalysis*, **6(10):** 6853-6860.

Zhou R., Wu Q., Guo M., Huang W., He X., Yang L., Peng F., He G., Han B. (2015). Organocatalytic cascade reaction for asymmetric synthesis of novel chroman-fused spirooxindoles that potently inhibit cancer cell proliferation. *Journal of Organic Chemistry,* **79**.

Zhou Y., Zhang W.H., Chena S., Liu X.L., Feng T.T., Yang W.D. (2019). Design, synthesis and evaluation of structurally diverse chrysin-chromenespirooxindole hybrids as anticancer agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry,* **27:**115109.

Zou P. ve Koh H.L. (2007). Determination of indican, isatin, indirubin and indigotin in *Isatis indigotica* by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrometry*; **21**: 1239-1246.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



BENZOTİYAZOLİN ARTIĞI TAŞIYAN SPİROİNDOLİNONLAR: SENTEZ, YAPI TAYİNİ VE BİYOLOJİK ETKİ ARAŞTIRMALARI

ORİJİNALLİK RAPORU

%20	%19	%4	%8
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%11
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%4
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%3
4	Görkem Ermut, Nilgün Karalı, Nurten Özsoy, Ayşe Can. "New spiroindolinones bearing 5-chlorobenzothiazole moiety", Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2013 Yayın	<%1
5	patents.justia.com İnternet Kaynağı	<%1
6	PARLAK, Salih and GÜNER, Dilek. "Mikrobiyal gübre uygulamasının karaçam (Pinus nigra Arnold. subsp.", Orman Genel Müdürlüğü Adına, Genel Müdür Yardımcısı Dr. Ahmet İPEK, 2017. Yayın	<%1