T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

5-KLOROBENZOTİYAZOLİN ARTIĞI TAŞIYAN SPİROİNDOLİNONLARIN SENTEZİ VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

GÖRKEM ERMUT

DANIŞMAN
PROF. DR. NİLGÜN KARALI

FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

03 / 08 / 2010

Prof.Dr.Tamer DEMİRALP
Müdür

Kurum	: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı	: Farmasötik Kimya
Programın seviyesi	: Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı	: Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Tez Sahibi	: Görkem Ermut
Tez Başlığı	: 5-Klorobenzotiyazolin Artığı Taşıyan Spiroindolinonların Sentezi ve Antioksidan Etkilerinin İncelenmesi
Sınav Yeri	: İ.Ü.Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi	: 29 / 07 / 2010

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

1.Prof.Dr.Sevim Rollas (Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı)

2.Prof.Dr.Aydın Salman (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı)

3.Prof.Dr.Gültaze Çapan (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı)

4.Prof.Dr.Nesrin Cesur (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı)

5.Prof.Dr.Nilgün Karalı (Tez Danışmanı, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı)

BEYAN

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

Görkem Ermut

İTHAF

Canım Annem ve Babam' a…

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımda Farmasötik Kimya Anabilim Dalı' nın bütün olanaklarından yararlanma fırsatı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Sumru Özkırımlı' ya, tez çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, bana karşı her zaman anlayışlı davranan ve her konuda yardımcı olan değerli hocam sayın Prof. Dr. Nilgün Karalı' ya saygı ve teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Antioksidan aktivite incelemelerinden dolayı Yard. Doç. Dr. Nurten Özsoy' a ve mikrobiyolojik incelemelerindeki yardımlarından dolayı Yard. Doç. Dr. Seher Birteksöz' e teşekkür ederim.

Çalışmam süresince manevi desteklerini hissettiğim Yard. Doç. Dr. Özlen Güzel' e, Arş. Gör. Dr. Füsun Ur Göktaş' a ve Araş. Gör. Gökçe Cihan' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi olan, sevgi ve desteklerini esirgemeyen annem Nurcan Ermut ve babam Sadullah Ermut' a, ağabeyim Erdem Ermut' a yürekten teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-2474

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİİ
ÖZET XV
ABSTRACT ..... XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Antioksidanlar 3
2.1.1. Serbest Radikaller 3
2.1.1.1. Singlet Oksijen ($O_2^{\downarrow}$): 6
2.1.1.2. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet -}$): 6
2.1.1.3. Nitrik Oksit Radikali 9
2.1.1.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) 11
2.1.1.5. Hidroksil Radikali 12
2.1.2. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri 14
2.1.2.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkisi 14
2.1.2.2. Serbest Radikallerin DNA' ya Etkileri 15
2.1.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları 16
2.1.4. Endojen ve Eksojen Kaynaklı Antioksidanlar 16
2.1.4.1. İndol Yapısındaki Antioksidanlar 18
2.2. 1*H*-İndol-2,3-dion ve Türevleri 26
2.3. 2-Aril/2-Spirobenzotiyazoller 30
2.4. Spiroindolinonlar 39
3. GEREÇ VE YÖNTEM 52
3.1. Araç ve Gereçler 52

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 52
3.1.1.1. Sentez İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler 52
3.1.1.2. Antioksidan Etki Araştırmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler 52
3.1.2. Kullanılan Elektronik Cihazlar 53
3.2. Kromatografik Çalışmalar 53
3.3. Sentez Yöntemleri 53
3.3.1. Genel Sentez Şeması 53
3.3.2. 5-Kloro-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on Türevlerinin Genel Sentez Yöntemi 53
3.4. Biyolojik Etki Araştırma Yöntemleri 54
3.4.1. Antioksidan Etki Araştırması 54
3.4.1.1. Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etki Tayini 54
3.4.1.2. Süperoksit Radikali Giderici Etki Tayini 55
3.4.1.3. DPPH Radikali Giderici Etki Tayini 56
3.4.1.4. TEAC (Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasite) Tayini 56
3.4.1.5. Ferri İyonu Redükleyici Gücü Tayini 57
3.4.2. Antikanser Etki Araştırması 58
4. BULGULAR 60
4.1. Sentezi Yapılan Maddelere Ait Bulgular 60
4.1.1. 5-Kloro-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3a) 60
4.1.2. 5-Kloro-5'-metil-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3b) 66
4.1.3. 5-Kloro-5'-(triflorometoksi)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3c) 69
4.1.4. 5-Kloro-5'-floro-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3d) 71
4.1.5. 5,5'-Dikloro-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3e) 75
4.1.6. 5'-Bromo-5-kloro-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3f) 80
4.1.7. 5-Kloro-5'-nitro-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3g) 82
4.2. X-Işını Tek Kristal Kırınım Çalışması 85
4.3. Biyolojik Etki Araştırma Bulguları 85
4.3.1. Antioksidan Etki Araştırma Bulguları 85
4.3.1.1. Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etki Bulguları 85
4.3.1.2. Süperoksit Radikali Giderici Etki Bulguları 86
4.3.1.3. DPPH Radikali Giderici Etki Bulguları 87

4.3.1.4. TEAC Bulguları 88
4.3.1.5. Ferri İyonu Redükleyici Gücü Bulguları 89
4.3.1.6. İstatiksel Değerlendirme 90
4.3.2. Antikanser Etki Araştırma Bulguları 90
5. TARTIŞMA 94
5.1. 5-Kloro-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on' lar (3a-g) 94
5.2. Spektral Verilerin Değerlendirilmesi 101
5.2.1. UV Verileri 101
5.2.2. IR Verileri 105
5.2.3. ^{1}H-NMR Verileri 110
5.2.4. HSQC ve HMBC Verileri: 117
5.2.5. Kütle Verileri 131
5.3. Biyolojik Aktivite Verilerinin Değerlendirilmesi 137
5.3.1. Antioksidan Etki Verileri 137
5.3.1.1. Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etkisi 137
5.3.1.2. Süperoksit Radikali Giderici Etkisi 138
5.3.1.3. DPPH Radikali Giderici Etkisi 139
5.3.1.4. TEAC Etkisi 139
5.3.1.5. Ferri İyonu Redükleyici Gücü 140
5.3.2. Antikanser Etki Verileri 141
KAYNAKLAR 143
ÖZGEÇMİŞ 167

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Çeşitli serbest radikaller 5
Tablo 5-1: Bileşik 3a-g' nin fiziksel özellikleri ve verimleri 100
Tablo 5-2: 3a-g Bileşiklerinin UV bulguları 102
Tablo 5-3: İsatin ve N-metilisatinin UV verileri 102
Tablo 5-4: Arilbenzotiyazollerin absorpsiyon maksimumları 102
Tablo 5-5: 2-Arilbenzotiyazollerin absorpsiyon maksimumları ve sübstitüent etkisi .. 103
Tablo 5-6: Spirobenzotiyazolinlerin absorpsiyon maksimumları 104
Tablo 5-7: İsatin ve türevlerinin visibl absorpsiyonları 105
Tablo 5-8: İsatin ve sübstitüe isatinlerin IR bandları (cm^{-1}) 106
Tablo 5-9: 3a-g Bileşiklerinin IR bulguları 107
Tablo 5-10: Benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinonların IR bulguları 109
Tablo 5-11: 3a-g Bileşiklerinin R sübstitüentlerine ait gerilme bandları 110
Tablo 5-12: Bazı isatin türevlerinin kimyasal kaymaları (ppm) 111
Tablo 5-13: 3a-g Bileşiklerinin ^{1}H-NMR verileri 114
Tablo 5-14: Benzotiyazolin protonlarının kimyasal kaymalarına sübstitüent etkisi 115
Tablo 5-15: 5-Nitro-1*H*-indol-2,3-dion türevlerinin kimyasal kayma değerleri 116
Tablo 5-16: 5-/7-Floro-1*H*-indol-2,3-dion türevlerinin kimyasal kayma değerleri 117
Tablo 5-17: Bileşik a-k' nın ^{13}C-NMR verileri 118
Tablo 5-18: Benzotiyazolin ve benzotiyazol türevlerinin ^{13}C-NMR verileri 119
Tablo 5-19: Benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinonların HSQC bulguları 120
Tablo 5-20: 3a Bileşiğinin HSQC bulguları 125
Tablo 5-21: 3b Bileşiğinin HSQC bulguları 126
Tablo 5-22: 3d Bileşiğinin HMBC bulguları 127
Tablo 5-23: 3e Bileşiğinin HMBC bulguları 128
Tablo 5-24: 3a, 3b ve 3d Bileşiklerinin kütle bulguları 136
Tablo 5-25: 3a-g Bileşiklerinin antioksidan aktivite verileri 137

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Oksijen molekülü ve bazı oksidan moleküllerin spin durumlarının şematik gösterimi 4
Şekil 2-2: Mitokondriyal elektron transfer zinciri ve elektron kaçağı 7
Şekil 2-3: Fagositik solunumsal patlama sırasında oluşan serbest radikaller ve reaksiyonları 8
Şekil 2-4: Memeli hücrelerinde oksijen, nitrojen ve diğer reaktif türlerin üretimi 10
Şekil 2-5: Reaktif oksijen türlerinin rejenerasyonu ve antioksidan savunma mekanizmaları 12
Şekil 4-1: Madde 3a' nın IR Spektrumu 60
Şekil 4-2: Madde 3a' nın $CHCl_3$'deki IR Spektrumu 61
Şekil 4-3: Madde 3a' nın ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm) 62
Şekil 4-4: Döteryumlanmış Madde 3a' nın ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm) 62
Şekil 4-5: Madde 3a' nın ^{1}H-NMR Spektrumu (6.5-7.6 ppm) 63
Şekil 4-6: Döteryumlanmış Madde 3a' nın ^{1}H-NMR Spektrumu (6.5-7.6 ppm) 63
Şekil 4-7: Madde 3a' nın HSQC Spektrumu (0-200 ppm) 64
Şekil 4-8: Madde 3a' nın HSQC Spektrumu (106-134 ppm) 64
Şekil 4-9: Madde 3a' nın Kütle Spektrumu (ESI+) 65
Şekil 4-10: Madde 3a' nın MS-MS Spektrumu (ESI+) 65
Şekil 4-11: Madde 3b' nin IR Spektrumu 66
Şekil 4-12: Madde 3b' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm) 67
Şekil 4-13: Madde 3b' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (6.5-8.0 ppm) 67
Şekil 4-14: Madde 3b' nin HSQC spektrumu (0-200 ppm) 68
Şekil 4-15: Madde 3b' nin HSQC spektrumu (106-136 ppm) 68
Şekil 4-16: Madde 3b' nin Kütle Spektrumu (APCI+) 69
Şekil 4-17: Madde 3c' nin IR Spektrumu 70
Şekil 4-18: Madde 3c' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm) 70
Şekil 4-19: Madde 3c' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (6.5-7.6 ppm) 71
Şekil 4-20: Madde 3d' nin IR Spektrumu 72
Şekil 4-21: Madde 3d' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm) 72
Şekil 4-22: Madde 3d' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (6.5-7.6 ppm) 73

Şekil 4-23: Madde 3d' nin HMBC Spektrumu (0-220 ppm) 73
Şekil 4-24: Madde 3d' nin HMBC Spektrumu (70-170 ppm) 74
Şekil 4-25: Madde 3d' nin HMBC Spektrumu (105-165 ppm) 74
Şekil 4-26: Madde 3d' nin Kütle Spektrumu (ESI+) 75
Şekil 4-27: Madde 3e' nin IR Spektrumu 76
Şekil 4-28: Madde 3e' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm) 77
Şekil 4-29: Madde 3e' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (6.5-7.6 ppm) 77
Şekil 4-30: Madde 3e' nin HMBC Spektrumu (0-200 ppm) 78
Şekil 4-31: Madde 3e' nin HMBC Spektrumu (70-180 ppm) 78
Şekil 4-32: Madde 3e' nin HMBC Spektrumu (105-150 ppm) 79
Şekil 4-33: Madde 3e' nin Kütle Spektrumu (ESI-) 79
Şekil 4-34: Madde 3e' nin MS-MS Spektrumu (ESI-) 80
Şekil 4-35: Madde 3f' nin IR Spektrumu 81
Şekil 4-36: Madde 3f' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm) 81
Şekil 4-37: Madde 3f' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (6.5-7.7 ppm) 82
Şekil 4-38: Madde 3g' nin IR Spektrumu 83
Şekil 4-39: Madde 3g' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm) 83
Şekil 4-40: Madde 3g' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (7.5-8.3 ppm) 84
Şekil 4-41: Madde 3g' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (6.55-7.15 ppm) 84
Şekil 4-42: Madde 3a' nın X-ışını tek kristal kırınım yöntemi ile elde edilen molekül modeli 85
Şekil 4-43: Bileşik 3a-g' nin lipid peroksidasyonu inhibisyonu 86
Şekil 4-44: Bileşik 3a-g' nin süperoksit radikali giderici etkileri 87
Şekil 4-45: Bileşik 3a-g' nin DPPH radikali giderici etkisi 88
Şekil 4-46: Bileşik 3a-g' nin ABTS radikal giderici etkisi 89
Şekil 4-47: Troloks standart eğrisi ve regresyon denklemi 89
Şekil 4-48: Bileşik 3a-g' nin ferri iyonu redükleyici gücü 90
Şekil 4-49: Bileşik 3a' nın Tek Doz Ortalama Grafikleri 91
Şekil 4-50: Bileşik 3d' nin Tek Doz Ortalama Grafikleri 92
Şekil 4-51: Bileşik 3e' nin Tek Doz Ortalama Grafikleri 93
Şekil 5-1: 2-(2'-Hidroksifenil) benzotiyazol türevlerinin absorpsiyon spektrumları ... 104
Şekil 5-2: İsatin (a), 5-nitroisatin (b), 5-floroisatin (c), 5-kloroisatin (d), 5-bromoisatin (e), 5-iyodoisatin (f) ve 5-metilisatin (g) nin karbonil gerilme bandları 107

Şekil 5-3: Madde 3a' nın HSQC spektrumu (106-134 ppm)..... 122
Şekil 5-4: Madde 3b' nin HSQC spektrumu (106-136 ppm)..... 122
Şekil 5-5 Madde 3d' nin HMBC spektrumu (70-180 ppm)..... 123
Şekil 5-6: Madde 3d' nin HMBC spektrumu (105-165)..... 123
Şekil 5-7: Madde 3e' nin HMBC spektrumu (70-180 ppm)..... 124
Şekil 5-8: Madde 3e' nin HMBC spektrumu (105-152 ppm)..... 124
Şekil 5-9: 3d' nin ^{13}C-^{1}H ve ^{1}H-^{13}C ilişkileri 131
Şekil 5-10: 3e' nin ^{13}C-^{1}H ve ^{1}H-^{13}C ilişkileri..... 131
Şekil 5-11: İsatinin EI kütle spektrumunda izlenen parçalar..... 132
Şekil 5-12: 1*H*-2-indolinonun EI kütle spektrumunda izlenen parçalar..... 132
Şekil 5-13: 3-(4-Aminofenilimino)-1*H*-2-indolinonun EI kütle spektrumunda izlenen parçalar..... 133
Şekil 5-14: İsatinin ESI (+) modda alınan kütle spektrumu 135
Şekil 5-15: İsatinin ESI (+) modda alınan kütle spektrumu 135
Şekil 5-16: İsatinin ESI (-) modda alınan kütle spektrumu 135

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABTS	2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
ADP	Adenozin difosfat
Ar.	Aromatik
ATP	Adenozin trifosfat
bt.	Benzotiyazolin
DMAc	N,N-Dimetil asetamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH	2,2-Difenil-2-pikrilhidrazil
e.b.	Eğilme bandı
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ESI	Electrospray Ionisation
$FADH_2$	Flavin adenin dinükleotid
g.b.	Gerilme bandı
GI_{50}	%50 Büyüme inhibisyonu
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
5-HTP	5-Hidroksitriptofan
IR	Infrared
ind.	İndol
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
LC_{50}	Hücrelerin yarısını öldüren konsantrasyon
LP	Lipid Peroksidasyonu
MDA	Malondialdehit
MS	Mass Spectrometry
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NBT	Nitroblue tetrazolium
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü, ABD

NMP	N-Metil-2-pirolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
PG	% Büyüme
PPA	Polifosforik Asit
PPE	Polifosfat Ester
RAT	Reaktif Azot Türleri
R_f	Rezolüsyon Faktörü
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
SRB	Sülforodamin B
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif türleri
TCA	Trikloroasetik asit
TEAC	Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasite
TGI_{50}	%50 Total Büyüme İnhibisyonu
THF	Tetrahidrofuran
TPH	Triptofan-5-hidroksilaz
UV	Ultraviole

ÖZET

Ermut, G. (2010). 5-Klorobenzotiyazolin Artığı Taşıyan Spiroindolinonların Sentezi ve Antioksidan Etkilerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Kanser, diabet, kardiovasküler hastalıklar, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma ve diğer hastalıklarda serbest radikallerin önemi yeni tedavi yaklaşımlarına rehberlik etmektedir. Serbest radikal giderici aktiviteye sahip sentetik bileşiklerin geliştirilmesi serbest radikaller ve oksidatif stresle ilgili bu hastalıkların tedavisinde ümit verici olabilir. Bu çalışmada 5-kloro-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on türevleri **(3a-g)**, 1*H*-indol-2,3-dionların **(1a-g)** 2-amino-4-klorotiyofenol **(2)** ile etanollü ortamda etkileştirilmesiyle sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapıları elementel analiz, spektral (UV, IR, ^{1}H NMR, HSQC-2D, HMBC-2D, LCMS-ESI ve LCMS-APCI) veriler ve X-ışını tek kristal analizi ile doğrulanmıştır. Tüm bileşiklerin, demir ve askorbik asit ile indüklenmiş lipid peroksidasyonunu inhibe edici, $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ ve süperoksid radikallerini giderici aktiviteleri ve Fe^{3+}'ü Fe^{2+}'e redükleyici güçleri araştırılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, bileşiklerin potansiyel antioksidan olarak demir ve askorbik asit ile indüklenmiş lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini, $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ ve süperoksit radikallerini giderdiğini, indirgeyici güç gösterdiğini ve antioksidan olarak tıp ve endüstride kullanılabileceğini göstermiştir. Bileşik **3a**, **3d** ve **3e** antikanser tarama için seçilmiş ve ön testlerde tüm bileşiklerin lösemi (K-562 and RPMI-8226), prostat (PC-3) ve meme (MCF7 and T-47D) kanser hücrelerine karşı sitotoksik olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler : 1*H*-indol-2,3-dionlar, benzotiyazolinler, spiroindolinonlar, antioksidan aktivite, sitotoksisite.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-2474

ABSTRACT

Ermut, G. (2010). Synthesis and Antioxidant Activity Evaluation of Spiroindolinones Incorporating a 5-Chlorobenzothiazoline Moiety. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Pharmaceutical Chemistry. MS. thesis. Istanbul.

The role of free radicals in cancer, diabetes, cardiovascular diseases, autoimmune diseases, neurodegenerative disorders, aging and other diseases has led to new medical insight. The development of synthetic compounds, capable of scavenging free radicals may be promising alternative in the treatment of these diseases involving free radicals and oxidative stress. In this study, 5-chloro-3*H*-spiro-[1,3-benzothiazole-2,3'-indole]-2'(1'*H*)-one derivatives (**3a-g**) were synthesized from treatment of 1*H*-indole-2,3-diones (**1a-g**) with 2-amino-4-chlorothiophenol (**2**) in ethanol. Structures of the synthesized compounds were confirmed by elemental analysis, spectral (UV, IR, ^{1}H NMR, HSQC-2D, HMBC-2D, LCMS-ESI and LCMS-APCI) data and single crystal X-ray analysis. All compounds were tested for their abilities to inhibit lipid peroxidation, induced by Fe^{3+}/ascorbate system, scavenge $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ and superoxide radicals, and to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+}. The results presented in this study showed that all compounds possess high degrees of potency in inhibiting lipid peroxidation and demonstrate scavenging activities against the $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ and superoxide radicals, indicating their possible value as antioxidants in medicine and industry. Compounds **3a**, **3d** and **3e** were selected for anticancer screening and all compounds were found to be cytotoxic against leukemia cell lines (K-562 and RPMI-8226), prostate cancer cell line (PC-3) and breast cancer cell lines (MCF7 and T-47D) in the primary screen.

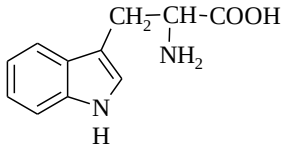
Key Words: 1*H*-indole-2,3-diones, benzothiazolines, spiroindolinones, antioxidant activity, cytotoxicity.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. T-2474

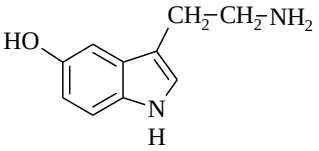
1. GİRİŞ VE AMAÇ

Serbest radikaller, normal fizyolojik şartlarda veya artan oksidatif stres sonucu oluşabilir. Yüksek seviyedeki serbest radikaller, hücre ve dokulardaki lipid, protein, enzim ve DNA gibi biyomoleküllere zarar vererek, tümörle sonuçlanabilecek mutasyonlara neden olabilir. Serbest radikallerin kanser, diabet, kardiovasküler, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanmadaki rolünün keşfi yeni tedavi yaklaşımlarına rehberlik etmektedir [1].

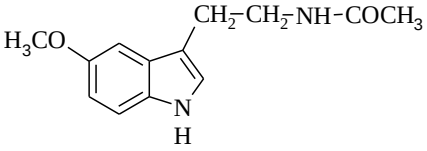
2-Amino-3-(1*H*-indol-3-il)propiyonik asit yapısındaki triptofan ve türevi indolaminler, serotonin (3-(2-aminoetil)-1*H*-indol-5-ol), nörohormon melatonin (N-[2-(5-metoksi-1*H*-indol-3-il)etil]asetamid), ayrıca bitki hormonları indol-3-asetik asit ve indol-3-propiyonik asit serbest radikal yakalama özelliğine sahip, düşük konsantrasyonlarda bile yüksek etkili antioksidanlardandır [2].



Triptofan

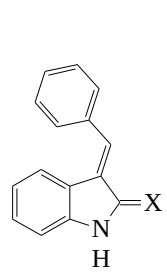


Serotonin

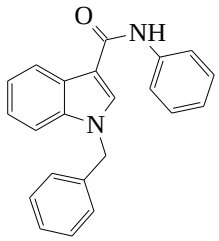


Melatonin

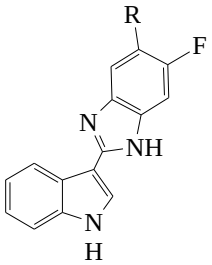
Melatoninin radikal yakalama kapasitesinin tespit edildiği günden günümüze değin gerçekleştirilen çalışmalar, elektronca zengin bir halka sistemine sahip indol halkasının antioksidan etki için gereken esas yapı olduğunu, bu özelliğinden dolayı indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarını kolaylıkla verebileceğini ve elektron donörü olarak davranabileceğini göstermiştir [3, 4]. Araştırma sonuçları, serbest radikal yakalama özelliği yüksek yeni indol türevlerinin sentezlenmesinde yol gösterici olmuştur. Son yıllarda yapılan araştırmalarda sübstitüe indolin-2-on ve indolin-2-tiyon, indol-3-karboksamid ve benzimidazol artığı taşıyan indol türevlerinin serbest radikal yakalama kapasitelerinin yüksek olduğu, oksidatif stresin neden olduğu hastalıklarda etkili olabileceği bildirilmiştir [4-6].



İndolin-2-on/tiyon

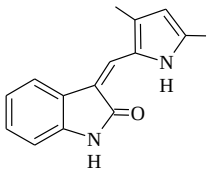


İndol-3-karboksamid

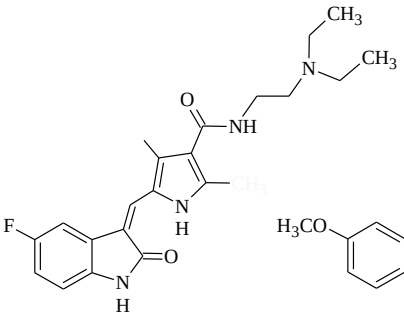


İndolilbenzimidazoller

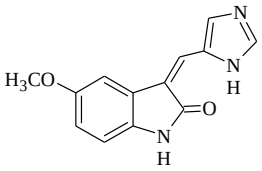
3-Sübstitüe 2-indolinon türevleri SU-5416 (semaksanib), SU-11248 (sunitinib) ve SU-9516 tirozin kinaz inhibitörleridir [7-9]. Değişik reseptör tirozin kinazlarını selektif olarak inhibe eden, antikanser ve antianjiojenik aktiviteye sahip sunitinibin, ilerlemiş renal ve gastrointestinal stromal kanserlerinin tedavisi için kullanımı son yıllarda onaylanmıştır [10-13].



SU-5416

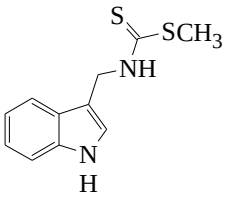


SU-11248

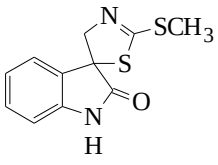


SU-9516

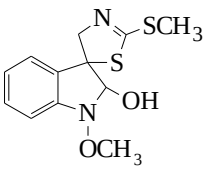
Oksidatif stres veya patojen etkenler sonucunda bitkilerde sekonder metabolit olarak sentezlenen brassinin, spirobrassinin, 1-metoksispirobrassinol ve kamaleksin gibi indol türevi fitoaleksinlerin [14] solid tümor ve lösemi hücre kültürlerine karşı *in vivo* sitotoksik etkilerinin ispat edilmesi [15, 16], sentetik 1-metoksispirobrassinol türevlerinin kanser hücrelerine karşı önemli sitotoksite göstermesi, antioksidanların kanser tedavisindeki önemini destekler niteliktedir [17, 18].



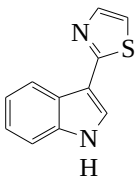
Brassinin



Spirobrassinin



1-Metoksibrassinol



Kamaleksin

Bu bilgilerden hareketle, bu çalışmada yeni 5-klorobenzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinon türevlerinin sentezlenmesi, lipid peroksidasyonu inhibe edici, radikal giderici aktiviteleri ve redükleyici güçlerinin, ayrıca sitotoksik etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antioksidanlar

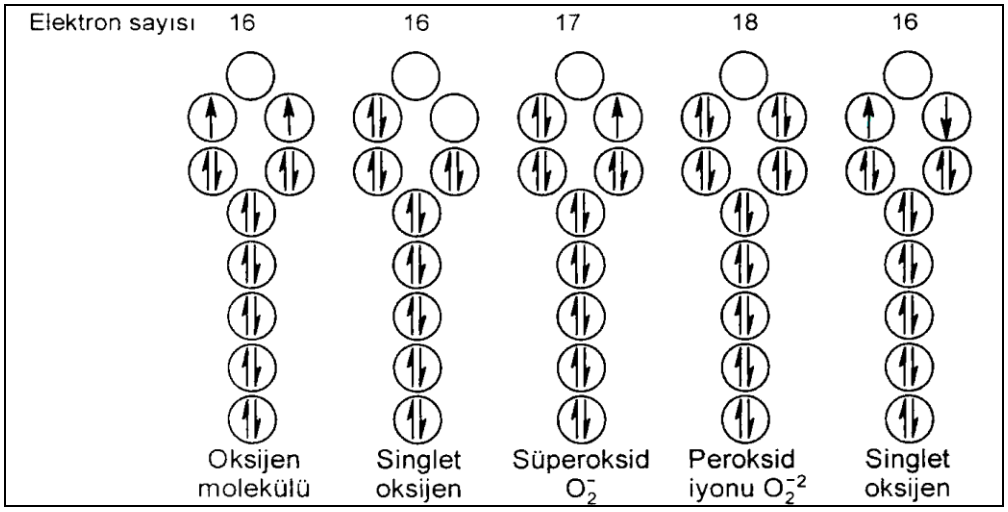
2.1.1. Serbest Radikaller

Aerobik canlılar yaşamları için mutlaka moleküler oksijene gereksinim duyarlar. Total oksijen tüketimimizin %90' ından fazlasından elektron taşıma sistemi (ETS), %5-10' undan da diğer oksijen gerektiren reaksiyonlar sorumludur. Aerobik hücrelerin mitokondrilerinde meydana gelen moleküler oksijen, yakıtlardan (glukoz, yağ asiti ve amino asitlerin karbon iskeleti) türeyen nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) ve flavin adenine dinükleotidden ($FADH_2$) elektronları alarak suya indirgenir. Bu yolda oksijen molekülünün kuvvetli oksitleyici gücü, adenozin trifosfatın (ATP) yüksek enerjili fosfat bağı haline dönüştürülür. Anaerobik canlılar ise büyüme ve çoğalmaları için oksijene bağımlı değildirler, sadece oksijensiz ortamda yaşayabilirler. Anaerobik canlılardaki oksijenin toksik etkisinin nedeni, oksijenden kaynaklanan bazı reaktif türlerin biyolojik molekülleri oksitlemesi ve bu reaktif türlere karşı anaerobik türlerde savunma sisteminin bulunmamasıdır. Oksijen sadece anaerobik türlerde değil, yaşamları için mutlaka moleküler oksijene bağımlı olan yüksek yapılı canlılarda da toksik etkilidir. İlk kez 1954 yılında, oksijenin biyolojik sistemlerde görülen toksik etkilerinin oksijenin bazı reaktif türlerinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Bugün, oksijenin canlılardaki toksik etkisinin oksijen radikalleri olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması sırasında oluşan reaktif türlerden kaynaklandığı bilinmektedir [19, 20].

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. Radikaller, dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren kimyasal türlerdir.

Atom yapısı, bir çekirdek ve çevresinde bulunan değişik sayıda elektronlardan oluşmaktadır. Enerji düzeylerine göre belirli bir düzende yerleşen elektronlar, orbital adı verilen yörüngelerde hareket etmektedirler. Her orbitalde yerleşik iki elektron, birbirine zıt yönde kendi ekseni etrafında dönmektedir. Buna uygun olarak her bir orbitale bir tane aynı yönde dönen elektron yerleşmekte ve atom numarasına göre

sayıları artan elektronlar tekrar aynı sıra ile ters yönde dönecek şekilde orbitale yerleşmektedir. Oksijen atomunun atom numarası olan 8, elektron sayısını vermektedir. Oksijen molekülündeki aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2p son orbitali önem taşımaktadır. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron bir orbitalden diğerine geçtiğinde veya farklı orbitallerde farklı yönde döndüğünde singlet oksijen oluşmaktadır. Orbitallerden birine veya ikisine ters dönüşlü bir veya ters dönüşlü iki elektron yerleştirilmesi ile radikal elde edilmektedir. Halliwell ve Gutteridge oksijen molekülü ve oksijen molekülünden meydana gelen bazı oksidan moleküllerin spin durumlarının şematik gösterimini şekil halinde vermiştir (Şekil 2-1) [21]. Doğal oksijen molekülünden değişik sayıda oksidan molekül meydana gelmektedir [19, 20, 22].



Şekil 2-1: Oksijen molekülü ve bazı oksidan moleküllerin spin durumlarının şematik gösterimi

Reaktif oksijen türleri (ROT), çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller, peroksit radikalleri, alkoksil radikalleri gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Halliwell çeşitli serbest radikalleri Tablo 2-1' de vermiştir [20].

Radikaller başlıca üç temel mekanizma ile oluşurlar [19, 20]:

1. Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşur. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi ile süperoksit radikali oluşur. Bazı araştırıcılara göre oksijen toksisitesi süperoksit radikalin oluşumuna bağlıdır.

Tablo 2-1: Çeşitli serbest radikaller

Serbest Radikaller	**Radikal Olmayan Reaktif Türleri**	
Reaktif Oksijen Türleri	**Reaktif Oksijen Türleri**	
Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$)	Singlet oksijen ($O_2^{\downarrow}$) Ozon (O_3)	
Hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)	
Alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$)	Organik peroksitler (ROOH)	
Peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$)	Peroksinitrit ($ONOO^-$)	
Hidroperoksil radikali ($HO_2^{\bullet}$)	Peroksinitrik asit (ONOOH)	
Karbonat radikali ($CO_3^{\bullet -}$)	Peroksonitrat (O_2NOO^-)	
Karbon dioksit radikali ($CO_2^{\bullet -}$)	Peroksomonokarbonat ($HOOCO_2^-$)	
	Hipobromik asit (HOBr)	
	Hipoklorik asit (HOCl)	
Reaktif Klor Türleri	**Reaktif Klor Türleri**	
Klor radikali ($Cl^{\bullet}$)	Hipoklorik asit (HOCl)	Klor gazı (Cl_2)
	Nitril klorit (NO_2Cl)	Brom klorür (BrCl)
	Kloraminler	Klor dioksit (ClO_2)
Reaktif Brom Türleri	**Reaktif Brom Türleri**	
Brom radikali ($Br^{\bullet}$)	Hipobromik asit (HOBr)	
	Brom gazı (Br_2)	
	Brom klorür (BrCl)	
Reaktif Azot Türleri	**Reaktif Azot Türleri**	
Azot dioksit ($NO_2^{\bullet}$)	Nitrik asit (HNO_2);	Peroksinitrat (O_2NOO^-)
Diazo trioksit ($N_2O_3^{\bullet}$)	Nitrosil katyonu (NO^+)	Peroksinitrik asit (ONOOH
Nitrat radikali ($NO_3^{\bullet}$)	Nitrosil anyonu (NO^-)	Nitronyum katyonu (NO_2^+)
Nitrik oksit ($NO^{\bullet}$)	Dinitrojen tetra oksit (N_2O_4)	Alkil peroksinitritler (ROONO)
	Dinitrojen trioksit (N_2O_3)	Alkil peroksinitratlar (RO_2ONO)
	Peroksinitrit ($ONOO^-$)	Nitril klorit (NO_2Cl)
		Peroksiasetil nitrat [$CH_3C(O)OONO_2$]

2. Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (450 - 600°C) şartlarında kovalent bağların kırılması sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür yıkılmaya homolitik kırılma denir. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda zıt yüklü iyon çiftleri oluşur ve bu türler de reaktiftir.

3. Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit,

glutatiyon ve tokoferoller gibi hücresel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formları oluşur. Glutatiyon radikalleri indirgerken, kendisinin tiyil radikali ($GS^{\bullet}$) oluşur. İki tiyil radikalinin birbiriyle tepkimesi sonucu oluşan tür ise glutatiyonun oksitlenmiş (GSSG) formudur [23].

2.1.1.1. Singlet Oksijen ($O_2^{\downarrow}$):

Bir radikal oksijenin elektronlarından birisinin enerji alarak spini değişmesi ile singlet oksijen oluşur. Zıt spinli elektronlar aynı orbitalde (delta formu) veya ayrı ayrı orbitallerde (sigma formu) bulunabilirler. Singlet oksijen, paylaşılmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Enerji verilmek suretiyle meydana gelebilen oksijenin oldukça reaktif şekli olan singlet oksijen serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır [19, 20].

2.1.1.2. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet -}$):

Süperoksit radikali hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda oluşur [22].

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

Süperoksit radikali başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

1. İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavonlar, tiyoller, katekolaminler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.
2. Başta çeşitli dehidrojenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.
3. Memeliler, hücrelerindeki ATP üretiminin büyük bir kısmını mitokondriyal elektron taşıma sisteminde, oksijenin dört elektronunun su oluşturmak üzere indirgenmesiyle elde ederler [20].

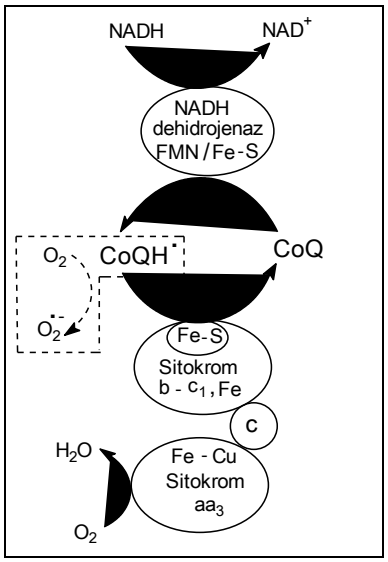
$$O_2 \xrightarrow{2e^-,\ 2H^+} H_2O_2\ (O_2^{2-}\text{ nin protonlaşmış şekli})$$

$$O_2 \xrightarrow{4e^-,\ 4H^+} 2H_2O\ (O^{2-}\text{ nin protonlaşmış şekli})$$

Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijenin %95' i suya indirgenirken %1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının

nedeni nikotinamid adenine dinükleotid (NADH) dehidrojenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır (Şekil 2-2). Oksijenin mitokondri solunumu sırasında bağlandığı ve suya indirgendiği sitokrom oksidaz basamağında radikal yapımı gösterilmemiştir. Sitokrom oksidaz Fe, Cu, Zn, Mg atomlarını 2:2:1:1 oranında içeren bir protein olup, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve peroksidaz aktivitelerine sahiptir. Bu sayede sitokrom oksidaz, içerdiği enzimatik aktivite sayesinde oluşan süperoksit anyonunu ve hidrojen peroksiti hızla ortamdan temizler [19, 20, 22].

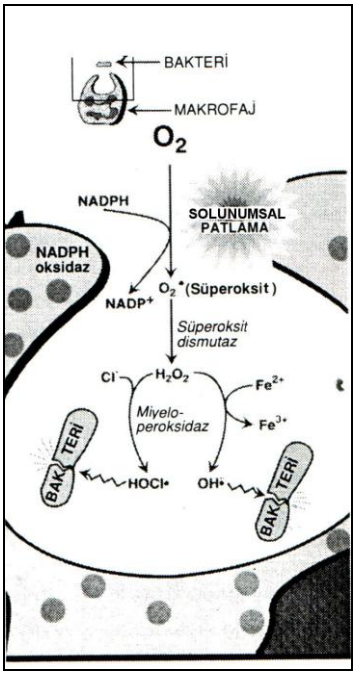
$$sit_c\ (Fe^{3+}) + O_2^{\bullet -} \longrightarrow O_2 + sit_c\ (Fe^{2+})$$



Şekil 2-2: Mitokondriyal elektron transfer zinciri ve elektron kaçağı

4. Süperoksit radikali ve fagositik aktivite

Champe ve Harvey aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama sırasında çeşitli serbest radikallerin oluşumunu şekil halinde vermiştir (Şekil 2-3) [24]. İnfeksiyöz olaylarda başta *Staphylococcus aureus* gibi patojenler ayrıca lökotrienler, prostaglandinler gibi mediyatör maddeler nötrofil, eozinofil ve makrofajları aktive ederek membrana bağlı NADPH oksidaz enzimi yoluyla ROT salgılanmasına yol açarlar. Solunumsal patlama sırasında elektron vericisi olarak NADPH kullanılır. Moleküler oksijenin süperoksit radikaline indirgenmesi sonucu $NADP^+$ üretimi artar ve heksoz monofosfat yolu aktive olur.



Şekil 2-3: Fagositik solunumsal patlama sırasında oluşan serbest radikaller ve reaksiyonları

Heksoz monofosfat yolunun aktivasyonuna neden olan $NADP^+$'nin diğer kaynağı hidrojen peroksitin detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemidir.

Nötrofiller tarafından kullanılan antibakteriyel savunma mekanizması miyeloperoksidaz (MPO) enzimidir. Miyeloperoksidaz, hidrojen peroksit varlığında klorür (Cl^-), iyodür (I^-) ve bromür (Br^-)' ün oksidasyonunu katalizleyerek hipoklorik asit (HOCl), hipoiyodik asit (HOI) ve hipobromik asit (HOBr) oluşturur. Bu bileşikler ve bunların tuzları güçlü oksidanlardır, biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerek mikroorganizmayı etkileyen toksik ajanlar meydana getirirler.

Aktive olan makrofajlar, nötrofiller ve eozinofiller, süperoksit anyonu üretirler. Süperoksit radikalinin dismutasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit miyeloperoksidaz enzimi aracılığıyla, klorür iyonuyla reaksiyona girerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan hipoklorik asiti oluşturur [22].

5. Süperoksit radikali ve endotelyum

Vasküler tonüsün düzenlenmesi için süperoksit ve nitrik oksit arasındaki fizyolojik dengenin önemli olduğu ileri sürülmektedir. Süperoksit radikalinin vazoregülasyonda fizyolojik rolüne ilişkin düşünceler de vardır. Vasküler endotelyum tarafından sentezlenen endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) vazodilatatör yanıttan sorumludur ve nitrik oksitle eşdeğerdir. Vasküler endotelyum aynı zamanda az miktarda

süperoksit radikali sentez yeteneğine de sahiptir. Süperoksit radikalinin nitrik oksit (NO) ile reaksiyonu sonucu bazı radikal olmayan ürünler meydana gelir.

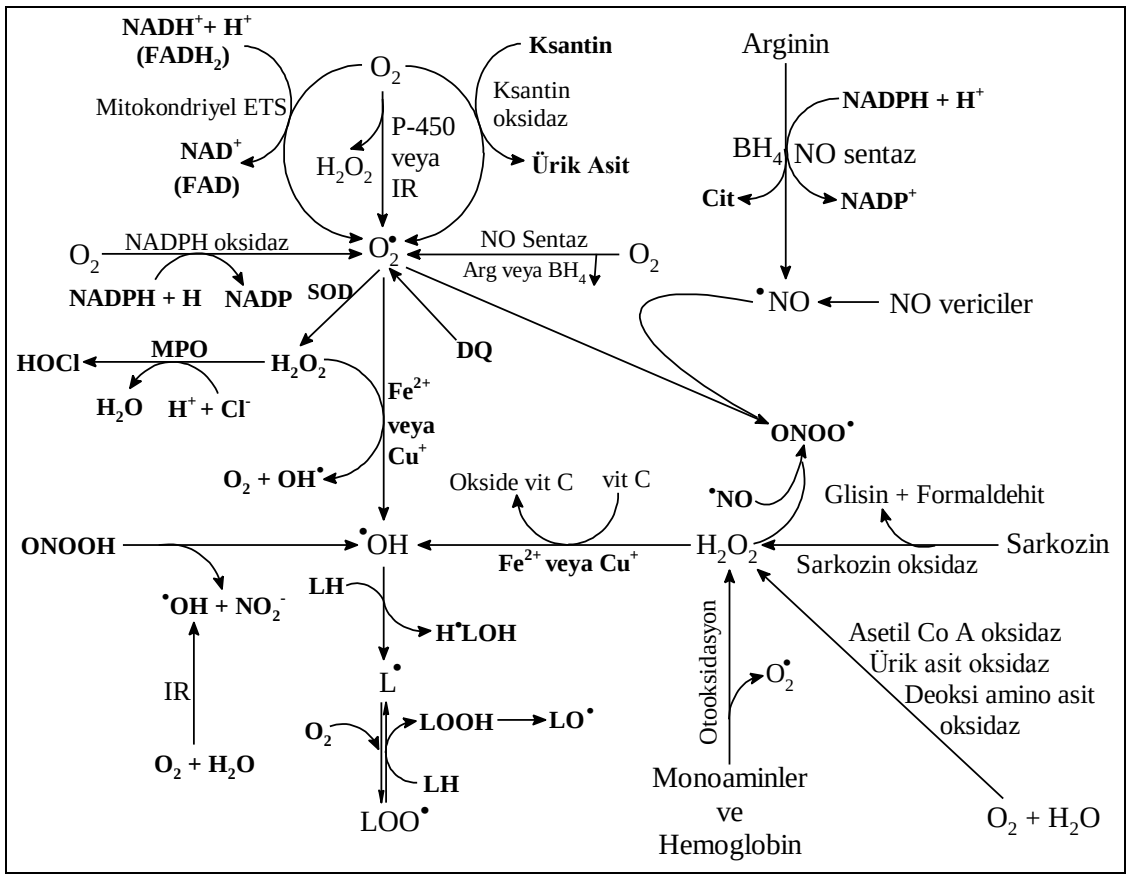
$$NO + O_2^{\bullet -} \longrightarrow \text{ara metabolitler} \longrightarrow NO_3^{-} \text{ (radikal özelliği yok)}$$

Vasküler endotelyum tarafından üretilen NO ve süperoksit radikali etkileşiminin vasküler tonüs düzenlenmesi ve kan basıncı üzerine yararlı etkilerinin olduğu bildirilmiştir [22, 25]. Bu gösteriyor ki vücudumuzda üretilen radikaller her zaman tehlikeli ve "kötü" kimyasal türler olarak değerlendirilmemelidir. Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılması için, reaktif formlarına çevrilmesi zorunludur. Oksijen radikalleri gibi, nitrik oksit radikalinin yapımı da vazgeçilmez bir biyolojik olaydır [19].

2.1.1.3. Nitrik Oksit Radikali

Nitrik oksit, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, düz kasların gevşemesi, vazodilatasyon ve nörotransmisyonu içeren çeşitli fizyolojik süreçlerde görev alan önemli bir sinyal molekülü olduğu gibi aynı zamanda çok reaktif bir radikaldir. Nitrik oksit bir adet paylaşılmamış elektrona sahiptir ve bu nedenle ROT olarak kabul edilebilir. Yarı ömrü çok kısa olan (10-20 sn) lipofilik özellikteki bu serbest radikalin damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından L-argininden sentezlendiği şekilde görülmektedir (Şekil 2-4). Bu enzimin nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere üç formu vardır. nNOS ve eNOS enzimleri tarafından üretilen çok düşük derişimdeki nitrik oksit sinir sistemi ve düz kaslarda hücre içi ve hücreler arası haberci molekül olarak sitoplazmik guanilat siklazı aktive ederek hücrelerde siklik guanazin monofosfat (cGMP) derişimini arttırır. cGMP ise çeşitli enzimler aracılığı ile hücre içi kalsiyum derişiminin düzenlenmesini sağlar [26].

Nitrik oksit sentazların indüklenebilir (iNOS) formu ise başta fagositik lökositler olmak üzere çeşitli hücrelerde bulunur ve sentezi sitokinler ile bakteriyel toksinler tarafından indüklenir. iNOS enziminin aktivitesi kalsiyumdan bağımsız olup kontrol edilemediğinden, ortamda arginin bulunduğu sürece aktif olup, uzun süreli ve yüksek derişimde nitrik oksit sentezini katalizler. Radikal olarak reaktivitesi düşük olan nitrik oksit, metal içeren merkezler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girer. Özellikle



Şekil 2-4: Memeli hücrelerinde oksijen, nitrojen ve diğer reaktif türlerin üretimi

IR: İyonize radyasyon; P-450: sitokrom P-450; ETS: Elektron taşıma sistemi (solunum zinciri); MPO: Miyeloperoksidaz; LH: Lipit (doymamış yağ asiti); $L^{\bullet}$: Lipit radikali; $H^{\bullet}LOH$: Hidroksi lipit radikali; LOOH: Lipit hidroperoksit; $LO^{\bullet}$: Lipit alkoksil radikali; $LOO^{\bullet}$: Lipit peroksil radikali; BH_4: Tetrahidrobiyopterin, HOCl: Hipoklorik asit; $ONOO^-$: Peroksinitrit.

lipit radikaller ($L^{\bullet}$) ile (örneğin hücre zarında) tepkimeye girmesi nitrik oksite antioksidan bir etki kazandırır. Nitrik oksitin SOD enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit radikaliyle etkileşmesi sonucu peroksinitrit oluşur. Böylece nitrik oksitin fizyolojik etkisi inhibe edilir, oksidatif etkisi ortaya çıkar. Nitrik oksitin toksisitesinden sorumlu olan peroksinitrit, hidroksil radikalinin potansiyeline sahiptir ve azot dioksit (NO_2), hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), nitronyum katyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilir. Nitrik oksit radikalinin stabil son ürünleri nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-)' tır. Fizyolojik (düşük) derişimde üretilen nitrik oksit esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksiti ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Plazma gibi çoğu vücut sıvısında nitritin çoğu nitrata dönüşmüştür. Nitrik oksit Fe-S proteinlerindeki demirin yerine kendisini bağlayarak Fenton reaksiyonunu stimüle eder ve bu mekanizma ile karsinojenezde rol oynar [26].

2.1.1.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz. Hidrojen peroksit, süperoksitin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton ile birleşmesi sonucu meydana gelir.

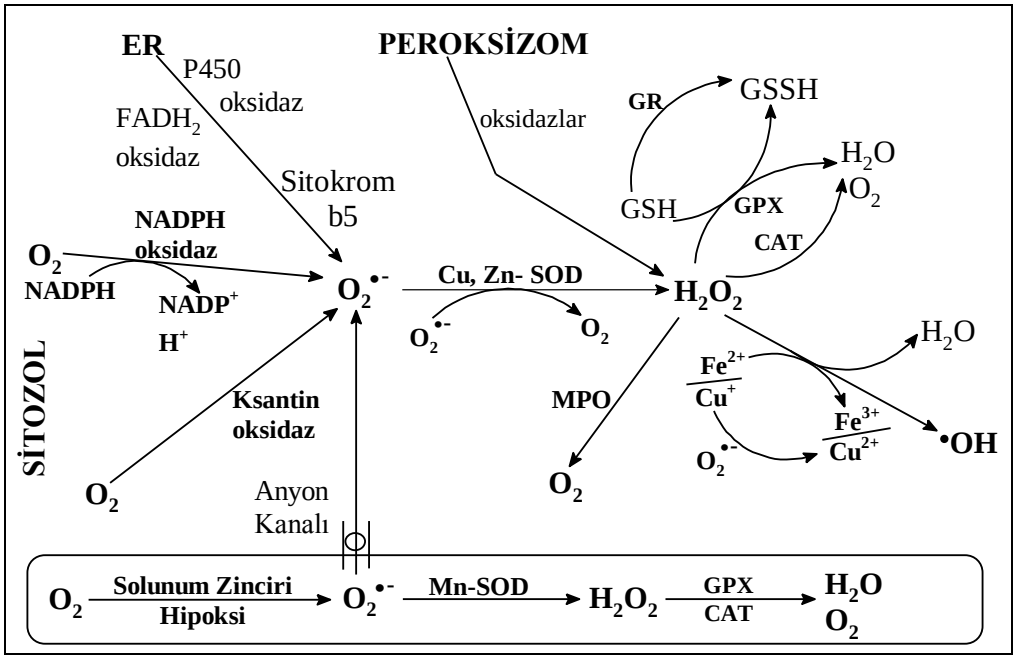
$$O_2^{\bullet -} + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$$
$$O_2 + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi, süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksitin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar.

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

Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da SOD enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4.8' de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH' da daha belirgindir. Süperoksit radikalinin lipit çözünürlüğü sınırlı olduğu halde hidrojen peroksitin lipit çözünürlüğü yüksektir. Bu nedenle hidrojen peroksit kendisinin oluştuğu yerden uzakta olan fakat Fe^{2+} içeren membranlarda hasar oluşturabilir [21].

Peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır. Peroksizomlardaki D-amino asit oksidaz, ürat oksidaz, L-hidroksi asit oksidaz ve yağ asiti açil-CoA oksidaz gibi oksidazların, süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit üretimine neden olduğu şekilde görülmektedir (Şekil 2-5) [27]. Ancak peroksizomlarda katalaz (CAT) enziminin aktivitesi çok yüksektir ve hücrede oluşan hidrojen peroksitin hidroksil radikali oluşumunu önlemek için suya ve oksijene ayrışmasını sağlar. Çok önemli bir antioksidan olan glutatyon ise, dokularda açığa çıkan hidrojen peroksit, lipit peroksitleri, askorbik asit ve serbest radikalleri indirger ve glutatyon peroksidaz enzimi için kofaktör olarak görev yaparak sonuçta okside olur [26]. Glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidazın (GPX) etkisiyle hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutatyonun tekrar indirgenmiş glutatyona dönüşümünü katalize eder [23].



Şekil 2-5: Reaktif oksijen türlerinin rejenerasyonu ve antioksidan savunma mekanizmaları

ER: Endoplazmik retikulum; GR: Glutatyon redüktaz; GPX: Glutatyon peroksidaz; SOD: Süperoksit dismutaz; CAT: Katalaz; MPO: Miyeloperoksidaz; $^1O_2$: Singlet oksijen; $O_2^{-\bullet}$: Süperoksit radikali; ·OH: Hidroksil radikali.

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında **Fenton reaksiyonu** sonucu, süperoksit radikalinin varlığında **Haber-Weiss reaksiyonu** sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturur.

2.1.1.5. Hidroksil Radikali

Fenton tepkimesini katalizleyen en aktif metal iyonları demir ve bakırdır. Mangan ve kobalt da bu bakımdan aktif olsalar da, vücuttaki derişimlerinin düşüklüğü nedeniyle demir ile kıyaslandıklarında çok daha az etkindirler. Serbest metal iyonlarının vücut sıvılarındaki derişimi pratik olarak sıfır kabul edilir, ölçülemeyecek kadar azdır. Demir, metabolizmasının her aşamasında mutlaka ya bir proteine (ferritin, transferin, laktoferrin gibi) bağlı durumda ya da küçük organik moleküllerle (sitrat, ADP, ATP gibi) kompleks oluşturmuş şekilde bulunur. Bakır, serüloplazmine sıkı bağlıdır; metal iyonlarının proteinlere bağlı şekilde tutulmaları, hidroksil radikali yapımını önlemenin en güvenli yoludur. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır (10^{-9} sn) [19].

Fenton reaksiyonu: Hidrojen peroksitteki kovalent bağların homolitik kırılması veya suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda hidroksil radikali oluşur. Demir tuzları ve hidrojen peroksit varlığında aşağıdaki reaksiyonlar meydana gelebilir:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + OH^{-}$$

$$Fe^{3+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{2+} + O_2^{-} + H^{+}$$

$$HO^{\bullet} + H_2O_2 \longrightarrow H_2O + H + O_2^{-}$$

$$O_2^{-} + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$HO^{\bullet} + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{-}$$

Bu reaksiyonların sonucunda demir tuzları varlığında hidrojen peroksit, su ve oksijene dönüşmektedir:

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{Demir Tuzları}} 2H_2O + O_2$$

Bakır (I) tuzları da hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturmaktadır:

$$Cu^{+} + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + HO^{\bullet} + OH^{-}$$

Hidroksil radikali reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür. Oluştuğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton koparark tiyil radikalleri, karbon merkezli organik radikaller, organik peroksitler gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur [21].

Haber-Weiss reaksiyonu:

$$H_2O_2 + O_2^{-} \longrightarrow O_2 + HO^{\bullet} + OH^{-}$$

Demir tuzları ile katalizlenen Haber-Weiss reaksiyonu [21]:

$$Fe^{3+} + O_2^{-} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

(O_2^{-} demir tuzlarını indirger)

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + OH^{-}$$

(Fenton reaksiyonu)

$$\text{Net: } O_2^{-} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Demir tuzları}} O_2 + HO^{\bullet} + OH^{-}$$

Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamlarda oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden, hidrojen peroksitten hidroksil radikali yapımı sürekli bir duruma gelir:

$$H_2O_2 + \text{Askorbat (veya } O_2^{\bullet -}) \xrightarrow{\text{Fe, Cu}} HO^{\bullet} + \text{semiaskorbat}$$

Haber-Weiss tepkimesi ya da Fenton tepkimesi ile hidroksil radikali oluşumu, vücutta üretilen hidrojen peroksit derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır [19].

2.1.2. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri

2.1.2.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkisi

Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar.

Hücre membranlarında çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir. Lipit peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipit radikalleri ve lipit peroksit radikalleri ($LOO^{\bullet}$)'nin oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna nonenzimatik lipit peroksidasyonu denir. Nonenzimatik lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur.

Lipit peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asiti zincirinin bir lipit radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipit radikallerinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikalleri oluşur. Lipit peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit peroksitlerine dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder [21, 28].

$$\text{Lipit-H} + \text{HO}^{\bullet} \longrightarrow \text{Lipit}^{\bullet} + \text{H}_2\text{O}$$

$$\text{Lipit}^{\bullet} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Lipit-O}_2^{\bullet}$$

$$\text{Lipit-O}_2^{\bullet} + \text{Lipit-H} \longrightarrow \text{Lipit-O}_2\text{H} + \text{Lipit}^{\bullet}$$

Plazma membranında ve subsellüler organellerde lipit peroksidasyonu serbest radikal ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten Fenton reaksiyonu sonucunda hidroksil radikalinin oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir.

$$\underset{\text{(hidroperoksit)}}{\text{Lipit-O}_2\text{H}} + \text{Fe}^{2+}\text{- kompleks} \longrightarrow \text{Fe}^{3+}\text{- kompleks} + \text{OH}^{-} + \underset{\text{(alkoksil radikali)}}{\text{Lipit-O}^{\bullet}}$$

$$\underset{\text{(hidroperoksit)}}{\text{Lipit-O}_2\text{H}} + \text{Fe}^{3+}\text{- kompleks} \longrightarrow \underset{\text{(peroksil radikali)}}{\text{Lipit-O}_2^{\bullet}} + \text{H}^{+} + \text{Fe}^{2+}\text{- kompleks}$$

Oksidasyona uğrayan lipitler de, serbest radikal oluşturarak hücresel makromoleküllere hasar verebilmektedir. Membranın integral veya periferal proteinlerine ve DNA'ya çok yakın mesafede bulunan lipitlerden oluşan lipit alkoksil ve lipit peroksil radikalleri, hücrenin kritik önem taşıyan moleküllerinde hidroksil radikalinden daha etkin olarak hasar oluşturabilmektedir. Hidroksil radikaline göre daha düşük reaktiviteye sahip oldukları için hücreler ve dokular arasında taşınabilecek kadar uzun yarı ömürlü olan lipit hidroperoksitler (LOOH) ve karbonil bileşikleri, başlamış olan serbest radikal reaksiyonlarını ilerletme ve oksidatif stresi hücre/dokuda yaygınlaştırma potansiyeline sahiptirler [29].

Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesine yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonuyla da çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana gelir. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine enzimatik lipit peroksidasyonu denir.

2.1.2.2. Serbest Radikallerin DNA' ya Etkileri

Bir canlıya ait tüm genetik bilgiyi taşıyan DNA molekülü doğal olarak veya çevresel faktörlerin etkisiyle sürekli hasara maruz kalmaktadır. İyonize radyasyon, yüksek oksijen konsantrasyonu, otooksidasyona uğrayan kimyasallar (dihidroksifumarat, dopamin, L-DOPA, noradrenalin, adrenalin), ksantin oksidaz ve

substratları ve tümör nekroz faktörü-alfanın (TNF-α) etkisi sonucunda insan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde 10^3 kez kimyasal oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmektedir. Bu etkenler, DNA' nın yapısını ve dahası diğer nesillere aktarılan genetik bilgiyi değiştirebilirler. DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, sağlıklı bireylerde de çok düşük düzeylerde hasar saptanmaktadır. ROT oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerinde azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması, oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir [29]. DNA hasarı replikasyon sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa, kanser ve yaşlanmaya neden olur [30].

2.1.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için çeşitli savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak bilinirler. Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

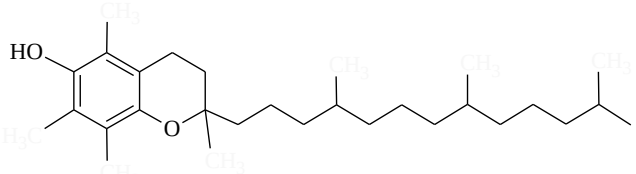
- Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme toplayıcı etkidir.
- Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastırıcı etkidir.
- Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir.
- Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir.

2.1.4. Endojen ve Eksojen Kaynaklı Antioksidanlar

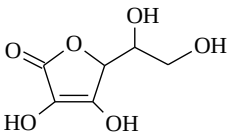
Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferin, serüloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içinde süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon transferaz, sitokrom oksidaz gibi enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır [31].

Antioksidanlar vücutta üretildikleri (endojen kaynaklı) gibi, dışarıdan (eksojen kaynaklı) gıda yolu ile de alınabilmektedir. Gıda yolu ile alınan antioksidanlar doğal antioksidanlar ve sentetik antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Bitkiler doğal antioksidan içeriği yüksek olan önemli eksojen kaynaklardır ve antioksidan etkileri yapılarındaki enzimler, aminoasitler, vitaminler, karotenoitler, flavonoitler ve diğer fenolik bileşiklerden ileri gelir.

Doğal antioksidanlardan olan karotenoitler, α-tokoferol (E vitamini) ve askorbik asit (C vitamini) en iyi bilinen ve en geniş kapsamlı kullanılan antioksidanlardır. Hemen hemen tüm gıdalarda eser miktarda dahi olsa bulunurlar. Karotenoitler 40 karbonlu izoprenoid veya tetraterpen yapıları ve konjuge çift bağların getirdiği doymamışlık derecelerinden dolayı antioksidan özellik gösterirler [32]. Bu yapının sağladığı radikal toplama özelliği, çoğu epidemiyolojik olmak üzere, yapılan araştırmalarda bazı kanser tiplerinde, kalp rahatsızlıklarında ve dejeneratif hastalıklarda koruyucu etkilerinin tespitiyle ortaya konmuştur [33]. E vitamini, yağda çözünebilen, güçlü antioksidan aktiviteye sahip biyolojik bir antioksidandır. E vitamini, yapısındaki fenolik hidroksil grubundan dolayı güçlü bir antioksidan özellik gösterir. Zincir kırıcı antioksidatif etkinliği ile membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal hasarından koruyan ilk savunma hattını oluşturur [26]. E vitamini süperoksiti, hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksil radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Düşük dansisiteli lipoproteinlerin (LDL-kolesterol) peroksidasyonu aterosklerozun ilerlemesine neden olduğu için peroksidasyonu engelleyen E vitamini hücre dışı ortamda önemli bir role sahiptir [26, 32]. Askorbik asit, güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikali ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler [32].



E vitamini



C vitamini

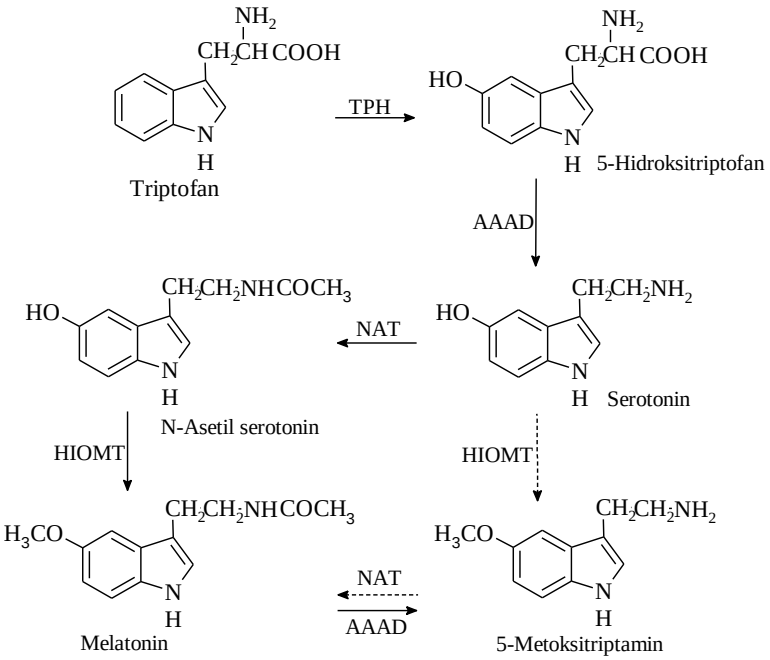
Besinlere koruyucu olarak eklenen butil hidroksi toluen (BHT), butil hidroksi anizol (BHA), etoksikuin (EQ), propilgallat (PG), dodesilgallat (DG) gibi eksojen kaynaklı sentetik antioksidanların organizmadaki antioksidan mekanizmayı destekleyici etkileri bulunmaktadır. Antioksidan madde içeren gıda maddelerinin tüketimi

sonucunda kanser, kalp ve damar hastalıklarının oranında büyük ölçüde azalma görüldüğü saptanmıştır.

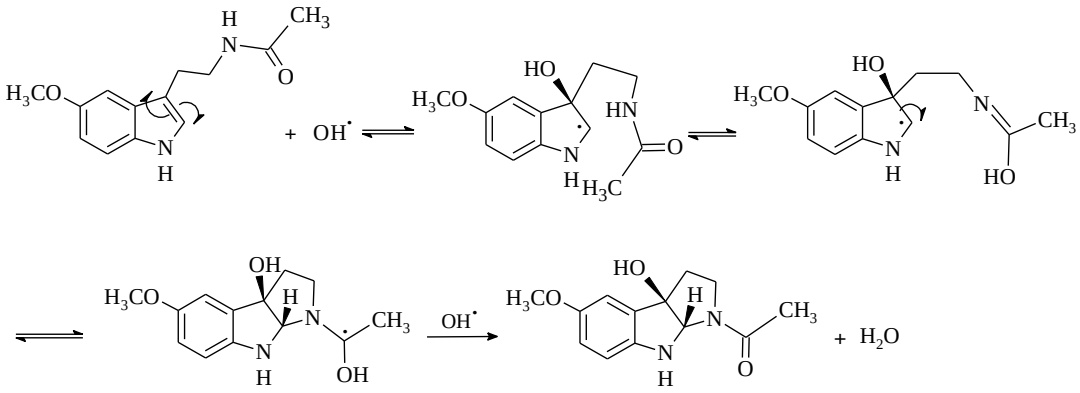
2.1.4.1. İndol Yapısındaki Antioksidanlar

Triptofan türevi 3-sübstitüe indol türevleri serbest radikal yakalama özelliğine sahip, düşük konsantrasyonlarda bile yüksek etkili endojen antioksidanlardır [3]. Serotonin önemli bir nörotransmiter maddedir. Melatonin beyinde bulunan pineal salgı bezinden salgılanan bir hormondur. Bu hormon uyku, serebrovasküler, nöroendokrin ve nöroimmünolojik sistemi içeren birçok fizyolojik fonksiyonu düzenler. Melatoninin, geniş etki spektrumu sayesinde uyku bozuklukları, dejeneratif hastalıklar, endokrin sistemdeki ritim bozuklukları, immün yanıtta azalma, hipertansiyon ve kanser gibi yaşlılıkta daha sıkça gözlenen bazı patolojilerin tedavisinde rolü olabileceği düşünülmektedir [4].

Melatonin biyosentezi beyinde pineal bezde triptofandan başlar. Triptofan (TP), triptofan-5-hidroksilaz (TPH) ile 5-hidroksitriptofana (5-HTP), 5-HTP aromatik L-amino asit dekarboksilaz (AAAD) etkisiyle serotonine dönüşür. N-Asetiltransferaz (NAT) ile asetillenen serotoninden hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) ile melatonin sentezlenir [3].

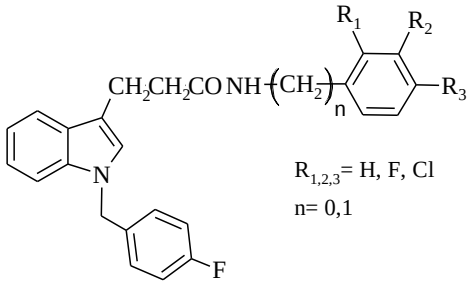


Melatonin sentez yolağındaki bileşiklerin hepsi belli düzeyde antioksidan etkiye sahiptir. 5-HTP nin melatonin ve askorbik asitle karşılaştırıldığında en etkili radikal yakalayıcı olduğu kaydedilmiştir. N-Asetilserotonin lipid peroksidasyonunu azaltır, serbest radikal yakalayıcı özelliktedir. Melatoninin en zararlı serbest radikal olan hidroksil radikalini yakalama gücü α-tokoferolden ve serotoninden daha fazladır. Yapılan çalışmalar melatoninin hidroksil radikali ile reaksiyona girdikten sonra azot atomundan bir elektron ayrılması ile bir indolil katyon radikaline dönüştüğünü, bunun da ortamdaki süperoksit radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir [5].

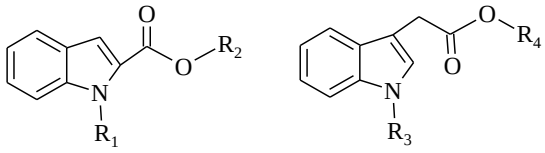


Metatonin hormonunun radikal yakalama etkisi 1993 yılında tespit edilmiş [4] ve o günden günümüze değin melatonin türevi indol analogları üzerinde çalışmalar sürmektedir. Yapı aktivite çalışmaları indol halkasının antioksidan etki için gereken esas yapı olduğunu göstermiş, bu özelliğin indol halkasının yüksek rezonans stabilitesi ve serbest radikal ataklarına karşı düşük aktivasyonlu enerji bariyerine sahip olmasından kaynaklandığı belirtilmiş, elektronca zengin bir halka sistemine sahip olması nedeniyle indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarını kolaylıkla verebileceği ve elektron donörü olarak davranabileceği bildirilmiştir [6].

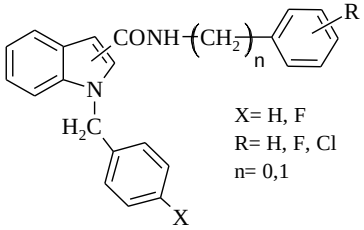
Bitki hormonları, indol-3-asetik asit ve indol-3-propiyonik asitin oksidatif stresi engellediği bulunmuş [34, 35], bu bileşiklerin radikal yakalama kapasitesinin melatonin de dahil olmak üzere bir çok bilinen antioksidan bileşikten fazla olduğu belirlenmiştir [36]. Bu bulgular ışığında sentezlenen indol-2 ve 3-karboksamid [37-39], indol-3-propanamid [40], indol 2 ve 3-ester [41, 42] türevlerinin de radikal yakalama kapasitelerinin yüksek olduğu kaydedilmiştir.



$R_{1,2,3}$= H, F, Cl
n= 0,1

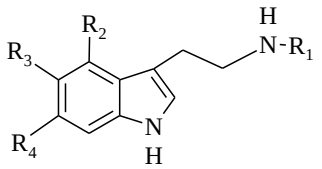


R_1, R_3= H, fenil, benzil, benzoil türevleri
R_2, R_4= Fenil, pirolidin, siklopropil, piperidin, pirolidin türevleri

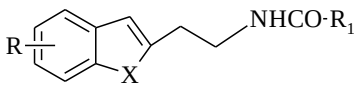


X= H, F
R= H, F, Cl
n= 0,1

İndol-3-aminoetil ve açilaminoetil türevlerinin antioksidan etkilerinin test edildiği çalışmada melatonin analoğu N-[2-(5-metoksi-1H-indol-3-il)etil]asetamid [43] 2-N-açilaminoetil türevi bileşiklerde de 5-alkoksi türevler [44] en etkili türev olarak belirlenmiştir.

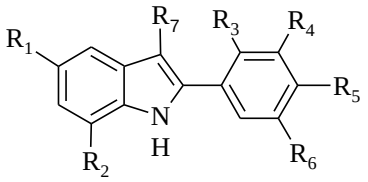


R_1= H, $COCH_3$, COC_2H_5
R_2= H, Br
R_3= H, OH, OCH_3, OCH_2CH_2OH
R_4= H, OCH_3



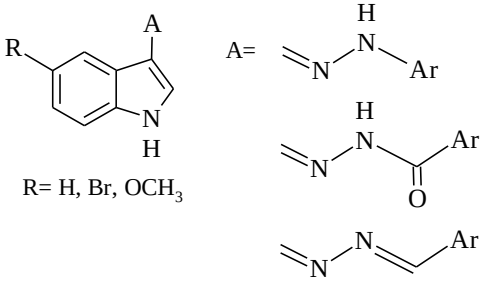
X= NH, S, N-CH_3
R= H, F, CH_3, OCH_3
R_1= CH_3, CH_2COOH

Sentezlenen 2-fenil indol türevlerinin yüksek oranda lipid peroksidasyonunu önlediği, hidroksil radikali yakalayıcısı oldukları saptanmış, fenil halkasında flor, klor, nitro gibi elektron çeken grupların varlığında en yüksek aktivite elde edildiği belirlenmiştir [45, 46].



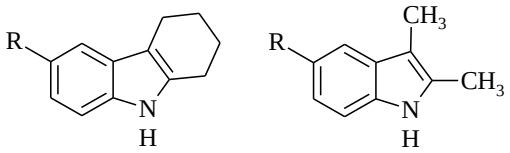
$R_{1,2}$= H, NO_2
$R_{3,4,5,6}$= H, OH, Cl, NO_2, NH_2, CH_3
R_7= H, CHO

İndol-3-fenilhidrazon türevlerinin DPPH radikali yakalama kapasitelerinin melatoninden çok daha fazla, süperoksit radikali yakalama kapasitelerinin melatonine eşdeğer olduğu bulunmuş, en aktif türevlerin fenilhidrazon artığının 4 konumunda klor veya brom ya da 2 ve 4 konumlarında diklor içeren türevler olduğu kaydedilmiştir. İndol halkasında nonsübstitüe veya 5 konumunda metoksi veya brom taşıyan bu türevlerde benzer yüksek antioksidan etkinin gözlenmesi, 5 konumundaki sübstitüsyonun etkiden direkt sorumlu olmadığını göstermiştir [47, 48].



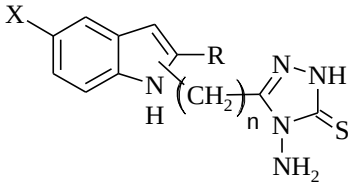
R= H, Br, OCH_3

Alkil sübstitüe indol türevlerinin radikal oksidasyonlarda eritrosit ve DNA ya etkilerinin araştırıldığı çalışmada, metoksi, metil ve sikloheksil gruplarının etkisi incelenmiş, sikloheksil ve metoksi gibi elektron veren gruplarının varlığında indol türevlerinin serbest radikal yakalama gücünün en yüksek olduğu belirlenmiştir [49].



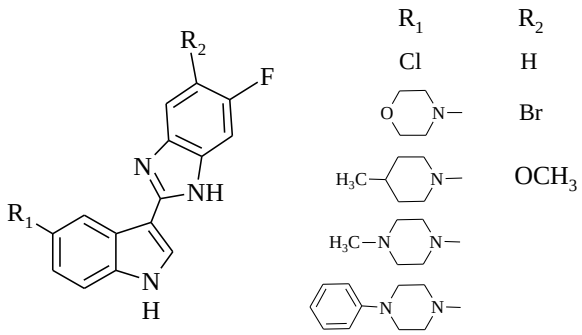
R= H, OCH_3

Triazol yapısı içeren indol türevleri etkili antioksidan aktivite gösteren bileşikler olarak tanımlanmıştır [50, 51].

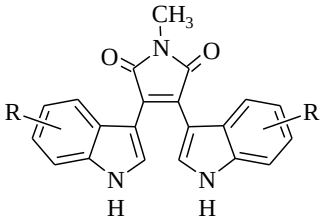


X= H, Br, Cl, NO_2
R= H, CH_3

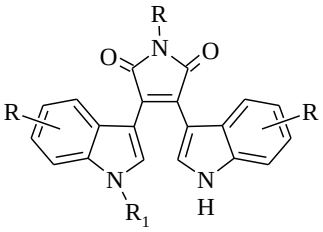
Benzimidazol artığı taşıyan indol türevleri de antioksidan aktivite gösteren bileşiklerdir. 6-Floro-5-sübstitüe benzimidazol türevlerinin çok etkili süperoksit anyon yakalayıcısı olduğu bulunmuştur [52].



Bisindolilmaleimid türevi bileşiklerin oksidatif strese bağlı hücre ölümlerini önlediği belirlenmiştir [53-55].

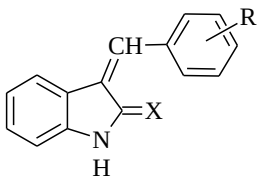


R= H, CH_3, OCH_3, Br, Cl, F

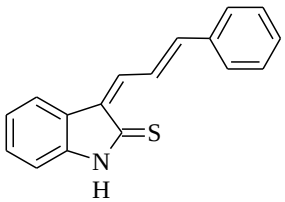


R= H, CH_3
R_1= H, $(CH_2)_3$-NH_2, $(CH_2)_3N(CH_3)_2$

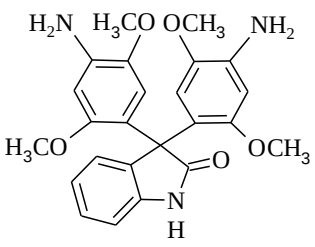
Sübstitüe indolin-2-on ve indolin-2-tiyon türevlerinin reaktif oksijen türlerini yakalama kapasitelerinin test edildiği çalışmada, 2-indolinon türevlerinin çoğunun trolokstan daha yüksek antioksidan etkili olduğu saptanmış, en etkili türevin 3-(2-hidroksibenziliden-2-indolinon olduğu kaydedilen çalışmada bu türevlerin oksidatif stresle mücadelede etkili olabileceği bildirilmiştir [56].

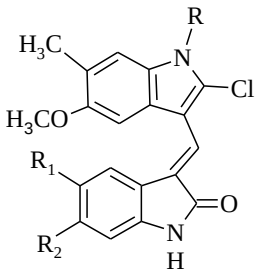


R= CH_3, $N(CH_3)_2$, OH, NO_2, COOH, F, Cl
X= O, S



3,3-Bis-(4-amino-2,5-dimetoksifenil)-2-indolinon bileşiği ve üç antikanser etkili 2-indolinon türevinin total antioksidan kapasitelerinin test edildiği çalışmada, bu bileşiklerin iyi antioksidan özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir [57, 58].



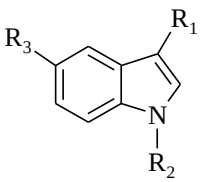


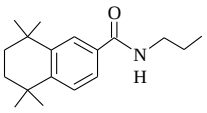
R= CH_3, H_2C-CH_2-

R_1= OH

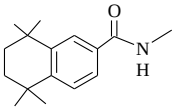
R_2= H, CH_3

Bilinen doğal yada sentetik antioksidan bileşiklerle kondanse edilen indol yada melatonin halkası taşıyan bileşiklerde antioksidan aktivitede artış gözlenmiştir. Antioksidan aktiviteye sahip retinoid türevi bileşiklerin indol türevleri sentezlenmiş, tetrahidronaftalen türevi bu bileşiklerde lipid peroksidasyon inhibe edici etki saptanmıştır [59].

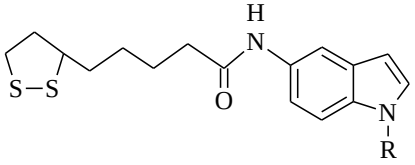


R_1= H, $COCF_3$, 

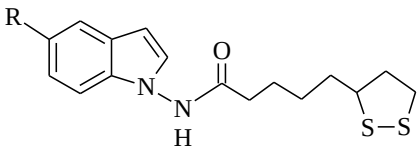
R_2= H, CH_3, C_2H_5, *i*-C_3H_7, *n*-C_4H_9, C_6H_5, 4-FC_6H_4, 2,4-diC_6H_3

R_2= H, OCH_3, Br, 

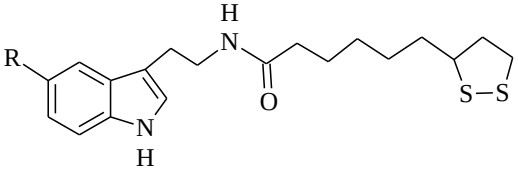
İndol-lipoik asit türevi bileşiklerde de önemli antioksidan aktivite belirlenmiş, bazı türevlerin lipoik asitten daha etkili antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır [60].



R= alkil ve fenil türevleri

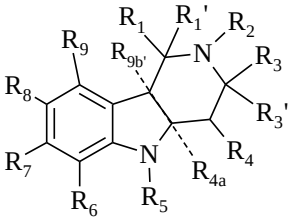


R= H, OCH_3, Br, NO_2, CH_3



R= H, OCH_3

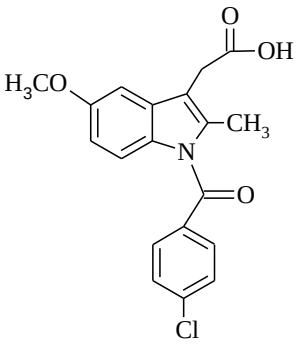
1*H*-Pirido[4,3-b]indol yapısındaki stobadin antioksidan, serbest radikal yakalayıcı ve nöroprotektif etkileri iyi bilinen bir maddedir. Stobadin molekülü benzen halkasında elektron veren sübstitüentler ve N-2 de alkoksi-karbonil sübstitüsyonu ile modifiye edilmiş, oksidatif strese bağlı nöroprotektif etkileri test edilmiştir. İndol azotunun asetil sübstitüsyonunun antioksidan etkinin tamamen kaybına neden olduğu belirlenen çalışmada, birçok bileşiğin özellikle benzen halkasında 4-metoksi sübstitüe türevlerin piridoindol bileşiği stobadinden daha etkili ve daha iyi özelliklere sahip olduğu, oksidatif strese bağlı akut ve kronik hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır [61].



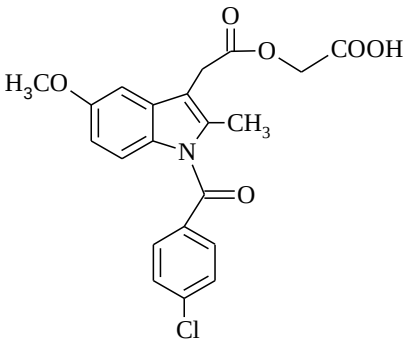
$R_1 = R_{1'} = R_3 = R_{3'} = R_6 = R_7 = R_9 = H$
$R_2 = R_8 = CH_3$
$H_{4a} = H_{9b}$ = (-)-cis

stobadin

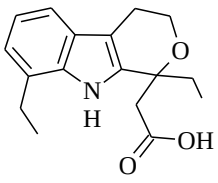
Tedavide önemli bir yere sahip indol yapısındaki bazı ilaç etken maddelerinin de antioksidan etkili olduğu belirlenmiştir. Organizmada siklooksijenaz aktivitesinin uyarılması sonucunda biyolojik sıvılarda peroksit radikallerinin oluştuğu saptanmıştır. Siklooksijenaz-2 inhibisyonu enflamasyonun önlenmesinde kritik bir rol oynarken, bu inhibisyon nörodejeneratif hastalıklar ve bazı kanser tiplerinin önlenmesi ile de ilişkilendirilmiştir. Elektron spin rezonans çalışmaları ile, indol yapısı taşıyan nonsteroidal antienflamatuvar ilaçlardan etodolak ve indometazin in süperoksit yakalama kapasitesinin olduğu kanıtlanmış [62], ayrıca indometazin, asemetazin ve etodolakın antienflamatuvar etkilerinin bir ölçüde de serbest radikal yakalama kapasitesine bağlı olduğu belirlenmiştir [63, 64].



indometazin

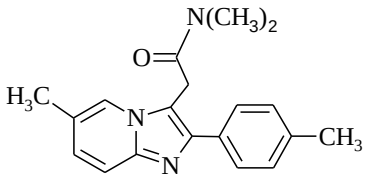


asemetazin

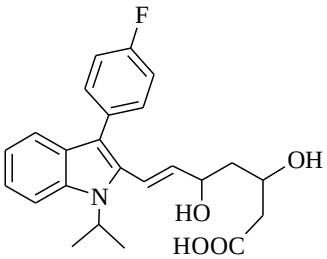


etodolak

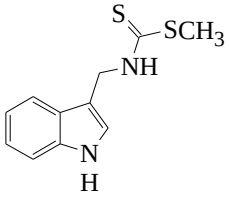
Hipnotik etkili zolpidemin melatonin kadar etkili bir lipid peroksidasyonunu önleyici bir bileşik olduğu bulunmuştur [65].



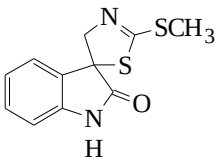
Statin sınıfı bir ilaç olan fluvastatin hiperkolesterolemi ve kardiovasküler hastalıkların önlenmesinde kullanılır. Serbest radikalleri yakalama yeteneği olan bu bilesiğin NADPH oksidaz aktivitesini inhibe edebildiği ve oksidatif stresi önlediği bulunmuştur. Bu bulgu fluvastatinin aterosklerozun önlenmesinde kullanılması gereken önemli ilaçlardan biri olduğunu kanıtlamıştır [66].



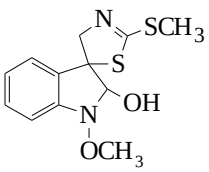
Oksidatif stress veya patojen etkenlere karşı *Cruciferous* familyasındaki bitkilerde sekonder metabolit olarak oluşan brassinin, spirobrassinin, 1-metoksibrassinol ve kamaleksin gibi indol türevi fitoaleksinler bitkilerin kimyasal ve biyokimyasal savunma mekanizmalarının önemli bir parçasıdır [14]. Bu doğal indol türevlerinin solid tümör ve lösemi kültürlerine karşı *in vivo* antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin saptanması [15, 16], 1-metoksibrassinolün 2-piperidil ve 2-fenilamino türevlerinin kanser hücrelerine seçici ve yüksek sitotoksisite göstermesi, antioksidanların sitotoksik önemi açısından dikkat çekicidir [17, 18].



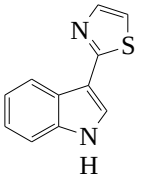
brassinin



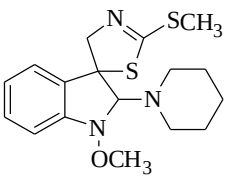
spirobrassinin

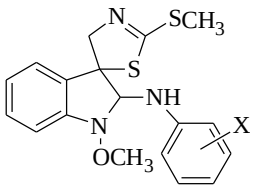


1-metoksibrassinol



kamaleksin

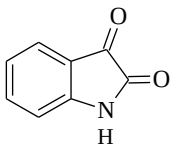




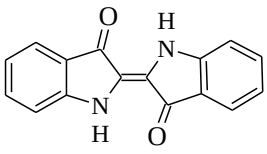
X= 4-CH_3, 3,4-diCH_3,
4-Cl, 3,4-diCl,
4-NO_2, 4-CF_3

2.2. 1*H*-İndol-2,3-dion ve Türevleri

1*H*-İndol-2,3-dion (isatin) ilk kez 1840' da Erdmann ve Laurent tarafından bitkisel kaynaklı bir madde olan indigonun nitrik asit veya nitrik asit, kromik asit karışımı ile oksidasyonuyla elde edilmiştir [67, 68].

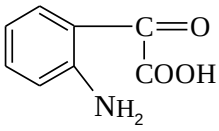


isatin



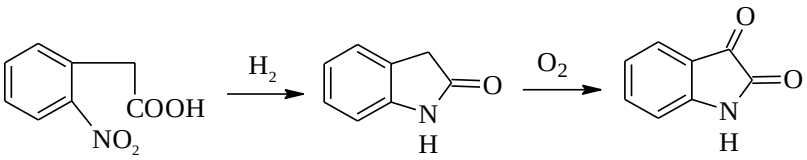
indigo

İsatin alkali ortamda ısıtıldığında halka açılmasıyla isatik asit tuzunu vermektedir. Kekulè 1869' da isatik asidin *o*-aminobenzoil formik asit, isatinin de bunun laktamı olduğunu ileri sürmüş, *o*-aminofenilasetik asidden sentezlenebileceğini savunmuştur [69].

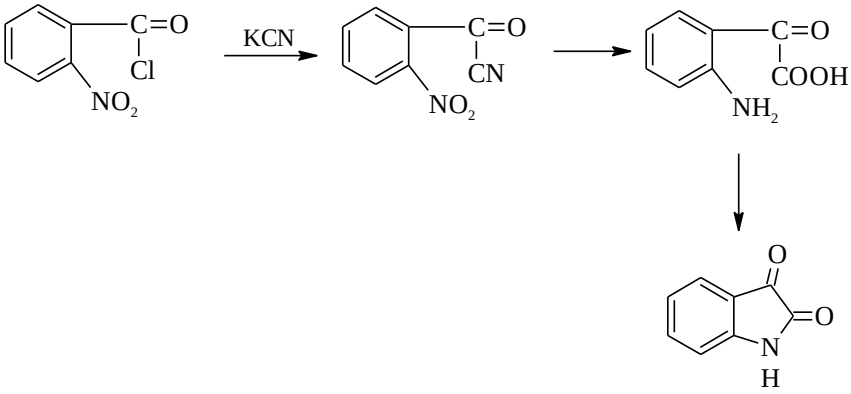


isatik asit

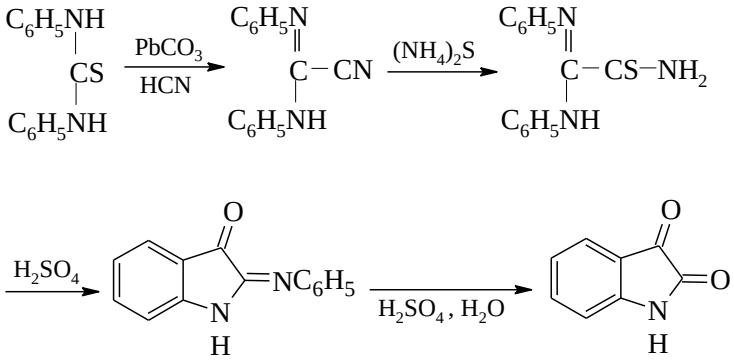
Baeyer 1878' de Kekule' nin önerdiği yapının doğruluğunu kanıtlamış, oks-indol, isatin ilişkisini tanımlamıştır [70, 71].



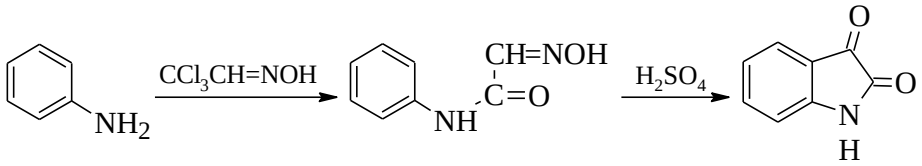
o-Nitrobenzoil klorürden isatinin sentezi Claisen ve Shadwell tarafından 1879' da gerçekleştirilmiş, bu çalışma Kekule' nin çalışmasını doğrulamıştır [72].



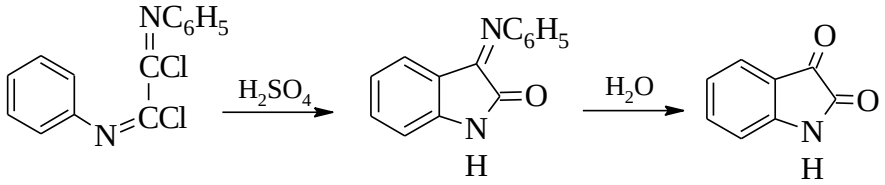
İsatin ve türevlerinin sentezi Sandmeyer tarafından geliştirilen iki yöntemin kullanılması ile de gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemlerin ilki tiyokarbanilid ile başlar, isatin-*a*-anilidin kolaylıkla hidroliz olması ile isatin elde edilmektedir [73].



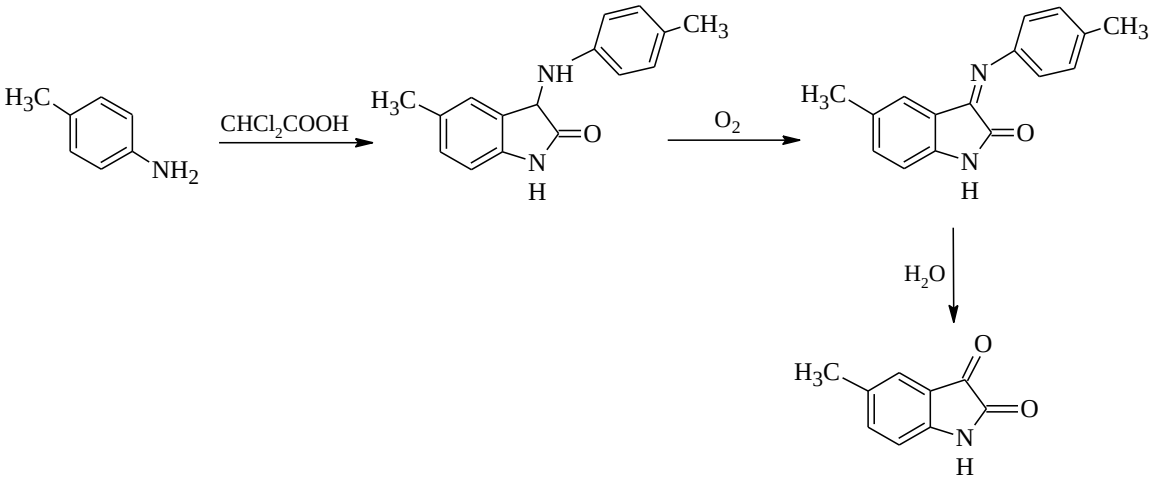
Sandmeyer yönteminin ikincisinde isatin anilin, kloralhidrat ve hidroksilaminden elde edilen isonitrosoasetanilidin derişik sülfirik asid ile etkileştirilmesi ile isatin kazanılmış [74], bu metod birçok isatin türevinin sentezi için kullanılmıştır [75].



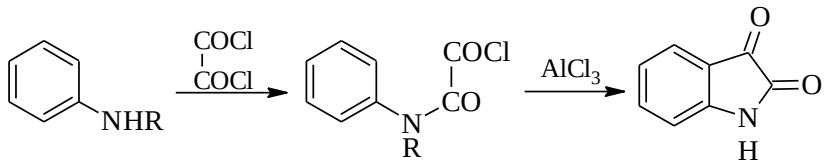
İsatin ve türevleri ayrıca Bauer tarafından oksalik asidin sübstitüe imid klorürü olarak isimlendirilen ara üründen hazırlanmıştır [76-78].



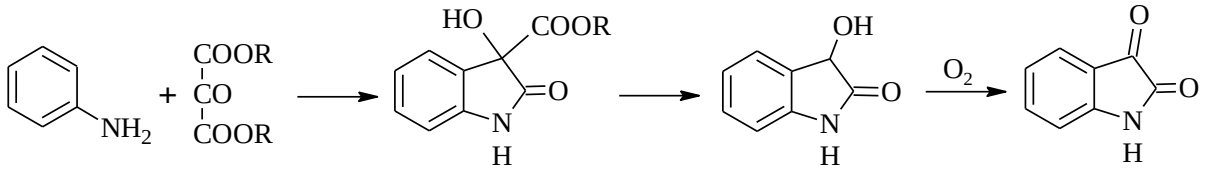
Bu metod 1908' de Ostromisslensky tarafından kullanılmış, *p*-toluidin ve dikloroasetik asidin ısıtılması ile oluşan oksindol ara ürününden oksidasyonu takiben hidroliz ile benzer şekilde 5-metilisatin sentezlenmiştir [79, 80].



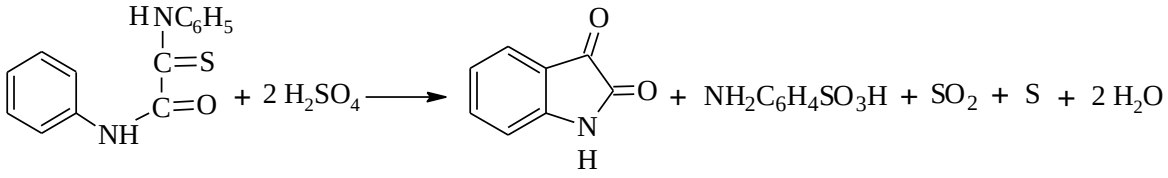
Stollè' nin geliştirdiği kendi adı ile anılan metodda N-sübstitüe anilinin oksalil klorür ile etkileştirilmesiyle oluşan ara ürün, aluminyum klorür varlığında isatine siklize olmaktadır [81].



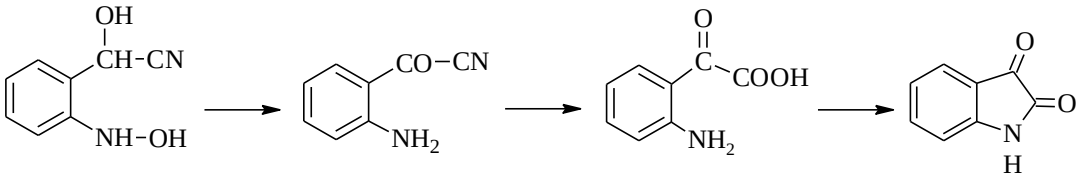
İsatin türevlerinin sentezi için diğer bir yöntem Martiner ve ark. tarafından geliştirilmiştir [75]. Bu yöntemde anilin veya sübstitüe aromatik aminler oksomalonik asidin etil veya metil esteri ile kondanse edilmiş, alkali ile etkileştirildiğinde elde edilen üründen oksijensiz ortamda hidroksi indolinon, hava varlığında isatin kazanılmıştır.



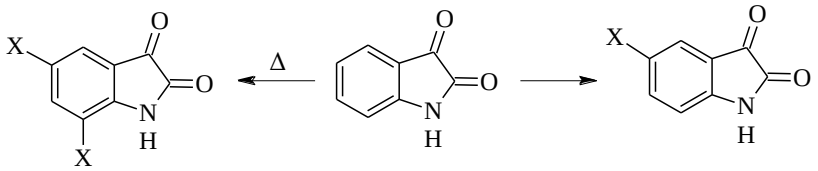
1904' de Reissert' in geliştirdiği sentez, tiyooksoanilidin derişik sülfirik asid ile ısıtılmasıyla yürütülmüştür [82].



Heller 1906’ da isatini *o*-hidroksiaminomandelik asid nitrilini hidroklorik asit ile ısıtarak elde etmiştir [83].



İsatinin klorlanması 5-kloroisatin ve 5,7-dikloroisatini vermektedir. İsatin ya da 5-kloroisatinin sodyum hipokloritle etkileştirilmesi ile elde edilen 1,5-dikloroisatin, sodyumbisülfitli ve asitli ortamda soğukta 5-kloroisatine [67, 75, 84], ısıtıldığında 5,7-dikloroisatine dönüşmektedir [85-87]. 5-Kloroisatin ayrıca isatinin sülfürilklorür veya fosforpentaklorür ile etkileştirilmesiyle de sentezlenmektedir [88, 89]. İsatinin alkollü ortamda bromlanması ile soğukta 5-bromoisatin, sıcakta bromlanması ile 5,7-dibromoisatin elde edilmektedir [84, 90-93].



X = Cl, Br

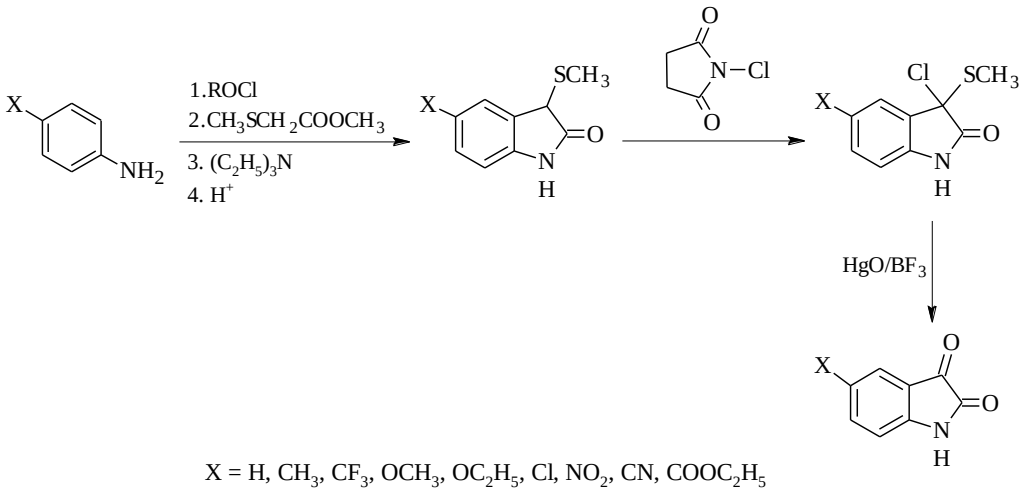
5-Floroisatin ve diğer florlanmış isatinler Yen ve ark. tarafından 2. Sandmayer yöntemi [8] kullanılarak sentezlenmiştir [94].



R= H, F

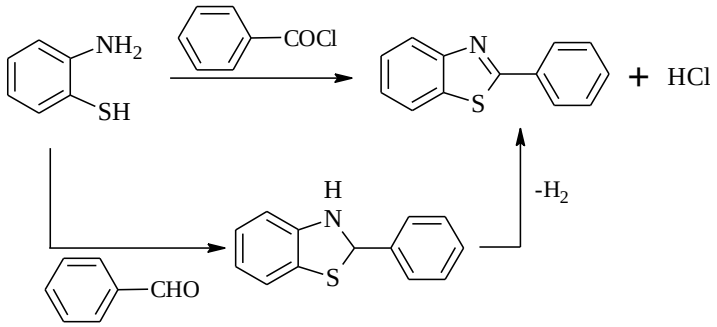
1879’ da Baeyer derişik sülfürik asidli ortamda isatini potasyum nitrat ile etkileştirmiş, elde ettiği bileşiği 5-nitroisatin olarak rapor etmiştir [95]. Daha sonra yapılan çalışmalar Baeyer’ in tanımladığı bileşiğin doğruluğunu kanıtlamıştır [96, 97].

3-Metiltiyo-2-oksoindol ara ürününden sübstitüe isatin türevleri elde edildiği yöntem Gassman yöntemi olarak kayıtlıdır [98, 99].

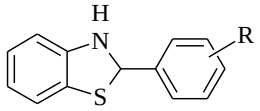


2.3. 2-Aril/2-Spirobenzotiyazoller

2-Arilbenzotiyazolerin sentezi için tanımlanan birçok metodun en basiti ve en çok tercih edileni Hoffmann tarafından geliştirilmiştir. Bu metodda Hoffman 2-aminotiyofenol.HCl tuzunu benzoil klorür ile etkileştirerek 2-fenilbenzotiyazolü sentezlemiş [100], benzoil klorür yerine benzaldehit kullandığında 2-fenilbenzotiyazolinin elde edileceğini belirleyen araştırıcı, bu türevin tiyazole kolaylıkla okside olması nedeniyle kazanılmasının zor olduğunu ileri sürmüştür [101].



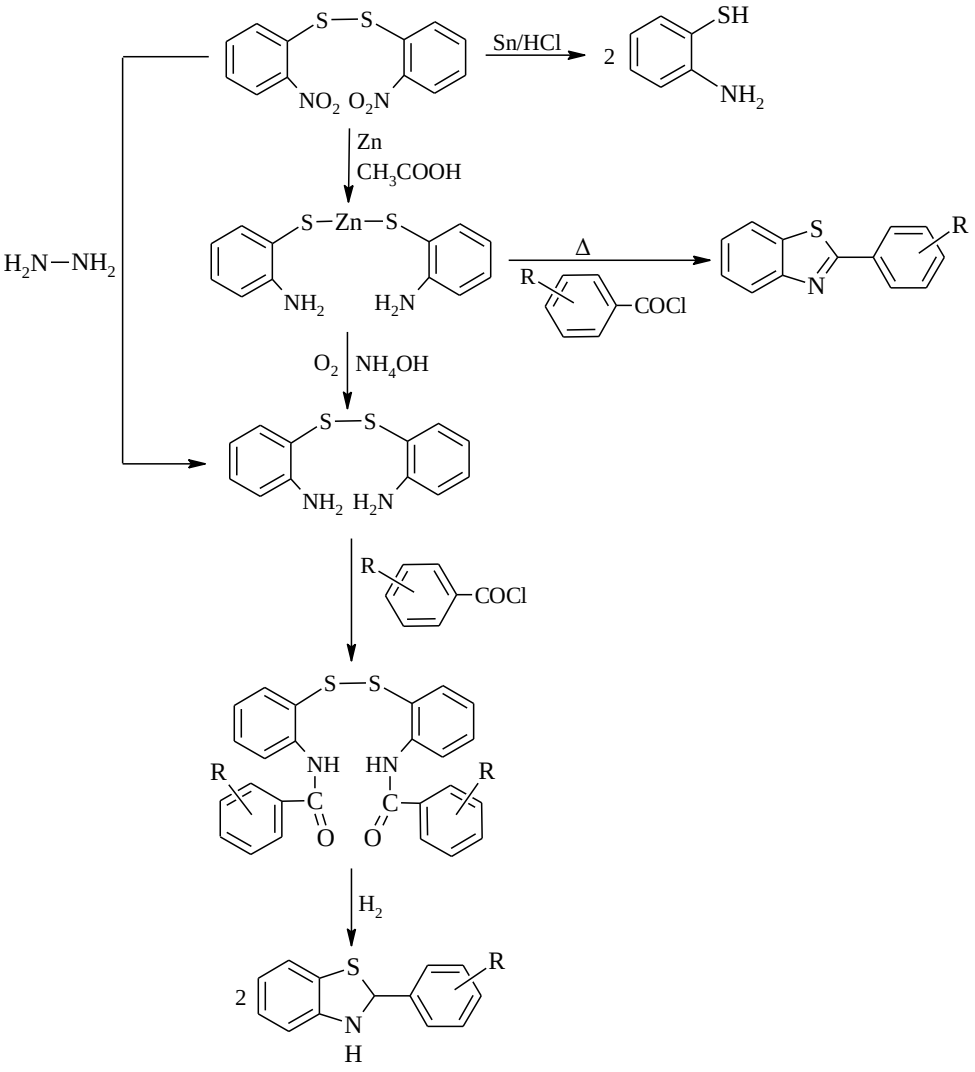
Claasz, Hoffmann'ın formülasyonunun doğru olmadığını, 2-aminotiyofenol. HCl ve benzaldehidden alkollü ortamda elde edilen ürünün 2-sübstitüe arilbenzotiyazolinler olduğunu rapor etmiştir [102].



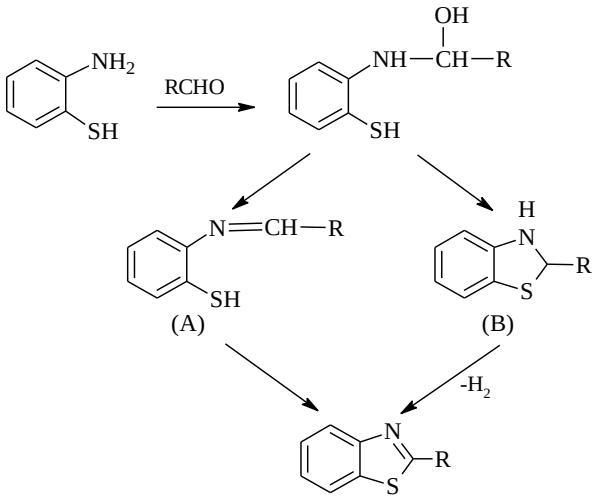
R= H; 2-OH; 4-OCH_3; 3-OCH_3; 4-OH

2-Aminotiyofenolün oksidasyona çok hassas olduğu hava ortamında bile hızla disülfide dönüştüğü, bu nedenle disülfidlerin serbest tiyofenollerin yerine birçok

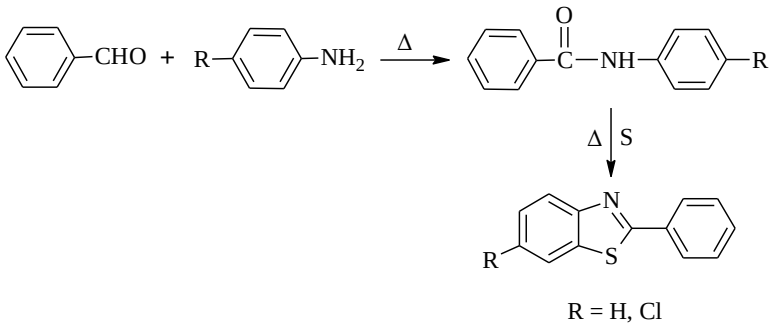
benzotiyazol sentezinde sıklıkla kullanılabileceği rapor edilmiş, disülfidlerden redüksiyonla, 2-aminotiyofenollerin elde edildiği bildirilmiştir [103, 104]. 2-Nitroklorobenzenden sentezledikleri 2,2'-dinitrofenil disülfidin derişik hidroklorik asit ve kalay ile redüksiyonu 2-aminotiyofenolü glasiyel asetik asidli ortamda çinko ile etkileştirildiğinde 2-aminotiyofenolün çinko tuzunu verdiğini kaydeden Bogert ve Snell benzotiyazollerin kolayca ve iyi verimle bu bileşikten ve disülfidden sentezlenebileceğini kaydetmişlerdir [105].



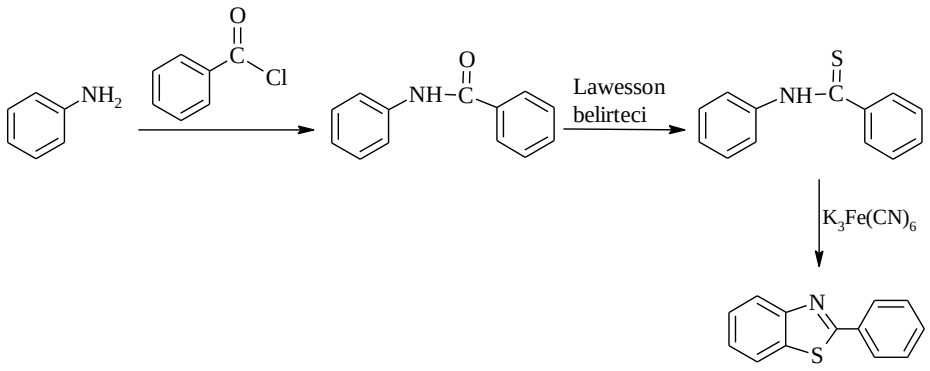
Benzotiyazollerin 2-aminotiyofenolden sentezi için iki mekanizma öneren Bogert ve ark. reaksiyonun aynı koşullarda ketonlar ile yürümediğini aldehitler ile daha çok A mekanizması ile gerçekleştiğini savunmuşlardır [105-107].



2-Arilbenzotiyazolleri benzanilid ve kükürdü 250°C de ısıtarak elde eden araştırıcılar, bu yöntemin daha ekonomik ve hızlı bir metod olduğunu, ayrıca saf ürün kazanıldığını bildirmişlerdir [107, 108].

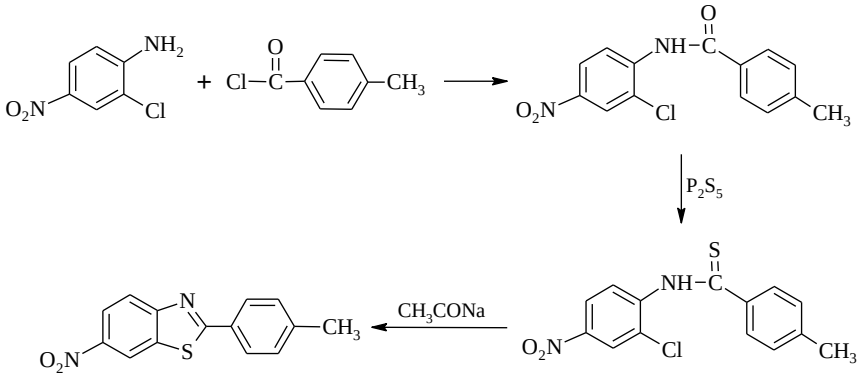


Sübstitüe benzotiyazollerin sentezi için kullanılan diğer bir metod Jacobson sentezidir. Bu yöntemde *o*-nonsübstitüe ariltiyoamidler bazik ortamda potasyum ferrisiyanür ile oksidatif siklizasyona uğramaktadır [109].

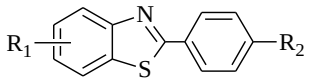


Daha sonraki çalışmalarda Hoffmann sentezi polifosforik asit (PPA) veya polifosfat ester (PPE) katalizörlüğünde benzoik asit ya da karşılık gelen ester, amid veya nitrille gerçekleştirilmiş [110, 111], Jacobson sentezinde anilidin tiyoanilide dönüşümünde Lawesson belirteci yerine fosfor pentasülfür (P_2S_5) de kullanılmış, 6-

nitrobenzotiyazoller alternatif bir yol kullanılarak tiyoanilidlerinin N-metil-2-pirolidon (NMP) lu ortamda sodyum metoksid ile etkileştirilmesiyle kazanılmıştır [111].



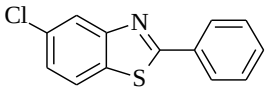
Perry ve Wilson 2-arilbenzotiyazollerin sentezi için yeni bir metod tanımlamışlar, aril halojenür ile 2-aminotiyofenolleri N,N-dimetilasetamidli (DMAc) ortamda, karbon monoksid ve palladyum katalizörü varlığında etkileştirmişlerdir [112].



R_1= 5-CH_3, 5-Cl, 5-CF_3, 6-CH_3, 6-Cl

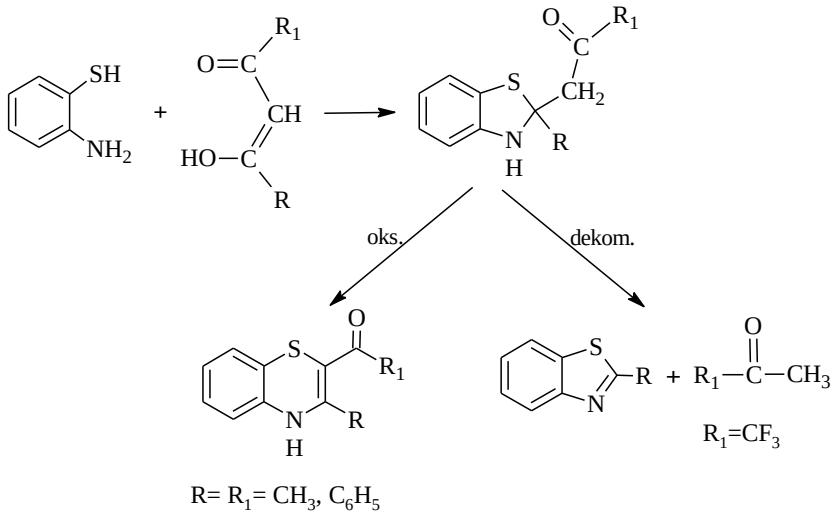
R_2= H, CH_3, OCH_3, Cl, $COCH_3$, CN, C_6H_5, $COOCH_3$

Lankelma ve ark. 2-fenil-5-klorobenzotiyazolü 2-amino-4-klorotiyofenol.HCl ve benzoil klorürden dimetilanilinli ortamda elde etmişler [113], 2-amino-4-klorotiyofenol ile aldehidlerin reaksiyonundan dimetilanilin veya piridinli ortamda elde edilen benzotiyazolinlerin hızla benzotiyazole okside olduğunu, oksidasyonun aromatik türevlerde çok kolay gerçekleştiğini bildirmişlerdir [114].



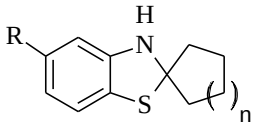
Alyea ve Malek benzotiyazolinleri elde etmek için 2-aminotiyofenolü β-diketonlar ile etanollü ortamda etkileştirmişler, reaksiyon koşullarına ve sübstitüentlere bağlı olarak bazı tiyazolinlerin oksidatif halka genişlemesi ile benzotiyazinlere veya dekompoze olarak benzotiyazollere dönüştüğünü saptamışlardır. Bu çalışmada araştırıcılar benzotiyazolinin etanoldeki çözeltisinin birkaç gün oda ısısında bekletilmesi, reaksiyonun birkaç damla asetik asid içeren etanolde veya dimetilsülfoksidli ortamda yürütülmesi durumunda benzotiyazinlerin kazanıldığını, reaksiyon triflorometil gibi kuvvetli elektron çeken sübstitüentler taşıyan β-diketonlar

ile gerçekleştirildiğinde benzotiyazolinlerin dekompoze olarak benzotiyazol formlarının elde edildiğini kaydetmişlerdir [115].



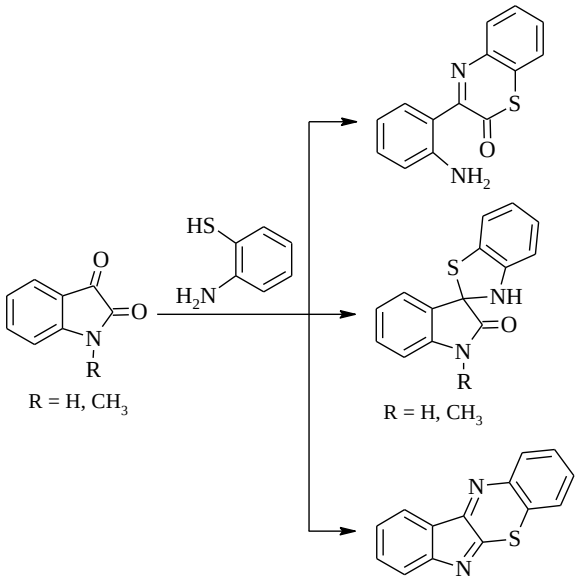
R= R_1= CH_3, C_6H_5

Spirobenzotiyazolinler 2-aminotiyofenol ve 2-amino-4-klorotiyofenolün siklik ketonlar ile etanollü veya piridinli ortamda kondenzasyonu ile sentezlenmiştir. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için ısıtma süresinin 6 saate kadar uzatılması gerektiği kaydedilmiştir [116-118].

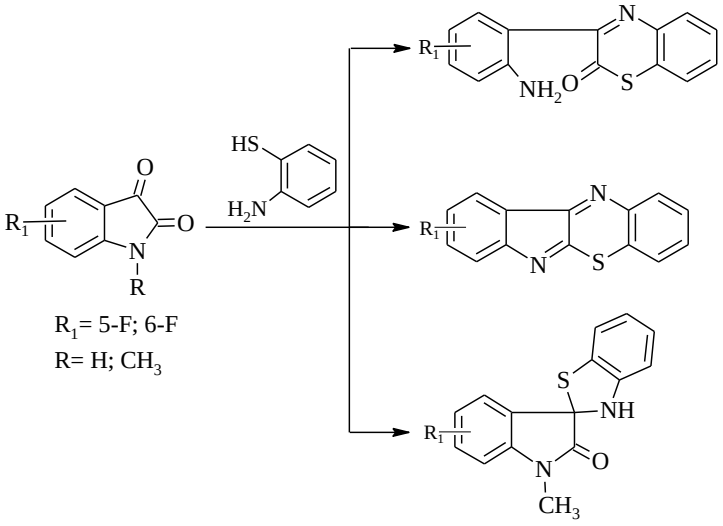


R = H, Cl
n = 1, 2, 3

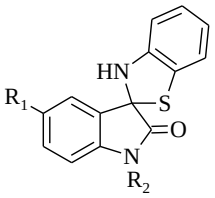
İsatin türevlerinin 2-aminotiyofenol ile reaksiyonunda reaksiyon koşullarına bağlı olarak farklı ürünler elde edilmiştir [119-121]. İsatinlerin 2-aminotiyofenol ile reaksiyonu kuru ksilende, susuz çinko klorür ($ZnCl_2$) varlığında, oda ısısında yürütüldüğünde C_2 konumundan atak ile benzotiyazinon, C_3 konumundan atak ile spirobenzotiyazol kazanılmıştır. Aynı reaksiyon geri çeviren soğutucu altında yürütüldüğünde oluşan ürünlerin benzotiyazinon, spirobenzotiyazol ve indolobenzotiyazin olduğu kaydedilmiştir. 1-Metilisatinin geri çeviren soğutucu altındaki benzer reaksiyonu yalnız spiro bileşiği vermiştir [119-121].



Floroisatinlerin benzer koşullarda 2-aminotiyofenol ile reaksiyonu oda ısısında yürümemiş, geri çeviren soğutucu altında benzotiyazinon ve indolobenzotiyazin türevlerinin sentezlendiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada nonsübstitüe isatinden major ürün olarak elde edilen spiro bileşiğin florlu türevlerde elde edilmediği, spiro türevlerin 1-metilisatin türevlerinden aynı koşullarda ilk tek ürün olarak kazanıldığı spektral bulgular ile kanıtlanmıştır [120].

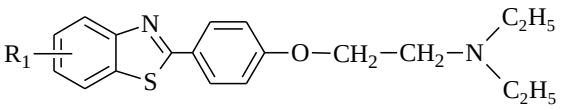


İsatinin spirobenzotiyazolin türevlerinin yüksek verimle sentezlendiği ve tek ürün olarak elde edildiği diğer çalışmalarda isatin ve 2-aminotiyofenol etanollü ortamda etkileştirilmiş, spiro bileşiklerin yapıları spektral analizler ve X-ışını tek kristal analiziyle doğrulanmıştır [121, 122].



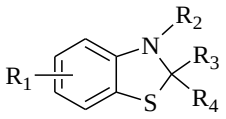
R_1= H, CH_3, CF_3O, Cl, Br, NO_2
R_2= H, CH_3

Birçok araştırıcı sentezledikleri 2-arilbenzotiyazol türevlerinde biyolojik aktivite taramaları yapmış ve önemli sonuçlar elde etmiştir. Cossey ve ark. topik fungusid olarak kullanım için seçilen 5-kloro-2-(p-dietilaminoetoksifenil)benzotiyazol.HCl (Episol) ve sentezledikleri benzotiyazol eterlerinin antimikrobiyal etkilerini test etmişler, yapı etki ilişkilerini belirlemişler, benzotiyazol halkasının 5 veya 6 konumundaki klor sübstitüsyonunun bakteri ve funguslara karşı aktiviteyi arttırdığını kaydetmişlerdir [123, 124].



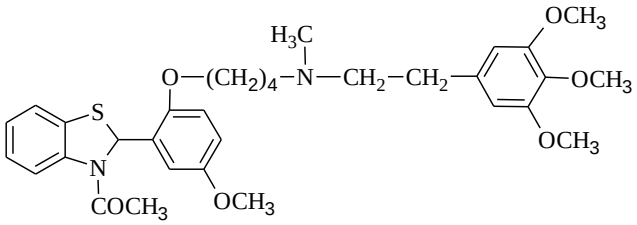
R_1 = H, 5-Cl, 6-Cl
R_2 = H, Cl, Br

Palmer ve ark. elde ettikleri benzotiyazolin türevlerinin çoğunun *Mycobacterium tuberculosis*' e karşı *in vitro* yüksek etkili olduğunu saptamışlar, benzotiyazol halkasındaki N-sübstitüsyonunun aktiviteyi azaltırken, benzen halkasındaki sübstitüsyonların aktiviteyi arttırdığını kaydetmişlerdir. Bu çalışmada en yüksek etkili bileşiğin 6-metoksi-2-(3-piridil) benzotiyazolin.HCl olduğu belirlenmiştir [125].



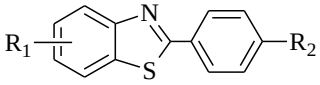
R_1 = 5-CH_3, 5-Cl, 5-CF_3, 5-NO_2, 6-Cl, 6-CH_3O
R_2 = H, CH_3, C_2H_5
R_3 = R_4= H, CH_3, C_2H_5, C_6H_5, benzil, 2-piridinil, 3-piridinil, 4-piridinil, 2-benzotiyazolil, 2-benzimidazolil, 2-furil, 2-pirolil, 2-kinolil

Yamamoto ve ark. sübstitüe benzaldehid ve 2-aminotiyofenolden hareketle sentezledikleri benzotiyazolin iskeleti taşıyan bir seri bileşiği kalsiyum antagonisti olarak test etmişler ve yapı-etki ilişkilerini belirlemişlerdir. En yüksek etkili bileşiğin SA2572 olduğunu, bu türevin ayrıca *in vivo* çalışmalarda uzun süreli hipotensif etki gösterdiğini saptamışlardır [126].



SA2572

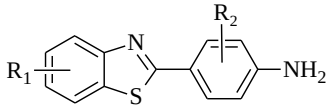
Stevens ve ark. sitotoksitelerini inceledikleri, etkili tirozin kinaz inhibitörü olarak tasarladıkları benzotiyazoller içinde en etkili türevin 4,6-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)benzotiyazol olduğunu kaydetmişlerdir [127].



R_1= H; 5-OH; 6-OH; 4,6-diOH; 5,6-diOH

R_2= H; 3-OH; 4-OH; 3,4-diOH

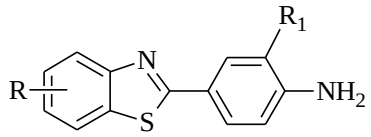
Bradshaw ve ark. nın 2-(4-aminofenil)benzotiyazol türevleri ile ilgili çalışmalarında antikanser etkili bir seri bileşiği sentezlemişler, *in vitro* ve *in vivo* göğüs kanserine karşı aktivitelerini test etmişlerdir. R_1 ve R_2 nonsübstitüe ana molekülün (CJM 126) göğüs kanser hücrelerine *in vitro* nanomolar dozda inhibitor etki gösterdiğini, R_2' de 3-metil veya 3-halojen (Cl, Br, I) sübstitüe 4-benzotiyazol türevlerinin göğüs kanseri yanı sıra ovaryum, böbrek ve kolon kanser hücrelerine *in vivo* ve *in vitro* yüksek etkili ve seçici antitümör etkili olduklarını saptamışlardır [128-132].



R_1= H, 6-CH_3, 5-OH, 6-OH, 5,7-diOH, 4-OCH_3, 5-OCH_3, 6-OCH_3, 7-OCH_3, 4,6-diOCH_3, 5,6-diOCH_3, 5,7-diOCH_3, 5-benziloksi, 7-benziloksi

R_2= H; 3-CH_3; 3-C_2H_5; 3-OH; 2-Cl; 3-Cl; 5-CH3; 3,5-diCl; 3-Br; 3,5-diBr; 3-I; 3-CN

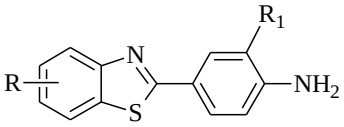
Hutchinson ve ark. sentezledikleri mono ve difloro sübstitüe 2-(4-amino-3-sübstitüe fenil)benzotiyazollerin göğüs kanser hücrelerine karşı *in vitro* sitotoksik (GI_{50}<1nM) etkili olduğunu belirlemişler, 2-(4-amino-3-metilfenil)-5-florobenzotiyazolün kanser hücrelerine karşı en geniş spektrumlu ve yüksek sitotoksisiteye sahip olduğunu kaydetmişlerdir [133, 134].



R= H; 4-F; 5-F; 6-F; 7-F; 5,6-diF

R_1= H; CH_3; I; Cl; Br; F; CF_3

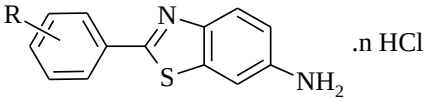
Hutchinson ve ark. diğer çalışmalarında antitümör etkili 2-(4-aminofenil)-benzotiyazollerin siyano ve alkinil grubu taşıyan yeni bir serisini sentezlemişler, göğüs kanser hücrelerine karşı *in vitro* test ettikleri bileşiklerden 5-floro türevlerin en yüksek etkili olduklarını belirlemişlerdir [135].



R= H, 4-F, 5-F, 6-F

R_1= CN, C≡CH

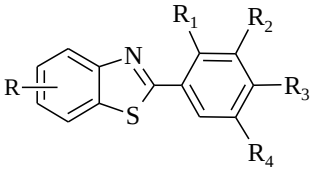
Racane ve ark. sentezledikleri 6-amino-2-fenilbenzotiyazol. HCl tuzlarının malin kanser hücrelerine karşı sitotoksisitelerini incelemişler, tümünün test ettikleri hücrelere karşı orta etkili olduğunu belirlemişlerdir [136].



n = 1, 2

R= 2-NH_2, 3-NH_2, 4-NH_2, 4-$N(CH_3)_2$, 3-F, 4-F

Mortimer ve ark. sentezledikleri bir seri 2-fenilbenzotiyazol türevinden 2-(3,4-dimetoksifenil)-5-florobenzotiyazolün akciğer, kolon ve meme kanser hücrelerine selektif inhibitör etki gösterdiğini rapor etmişlerdir [137].



R = H, 5-F, 5-Cl, 6-F

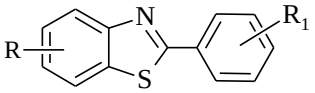
R_1= H, OCH_3

R_2 = H, CH_3, F, Cl, Br, OH, OCH_3, OC_2H_5

R_3 = H, OH, OCH_3, OC_2H_5

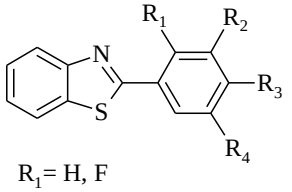
R_4 = H, OH, OCH_3

Aiello ve ark. tarafından göğüs kanser hücrelerine etkileri incelenen 2-aril benzotiyazolin türevlerinden R= 5-F sübstitüe R'= 3-OH ve R'= 4-OH türevlerinin submikromolar düzeyde etkili olduğu rapor edilmiştir [138].



R = 5-F, 5-CF_3,6-F, 6-Cl, 6-Br, 6-C_2H_5, 6-OCH_3, 6-OC_2H_5, 6-SO_2CH_3
R_1 = 3-OH, 4-OH

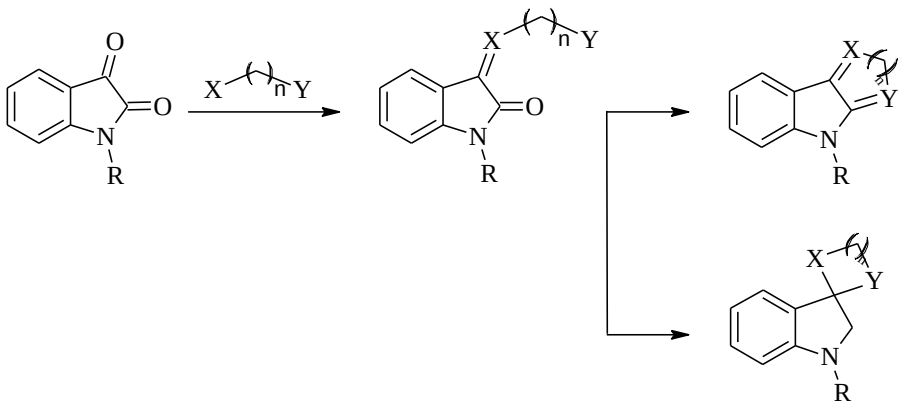
Devmurari ve ark. nın sentezlediği 2-arilbenzotiyazol türevlerinin antikanser tarama sonuçları bu türevlerden amino ve halosübstitüe türevlerin yüksek sitotoksik etkili olduğunu göstermiştir [139].



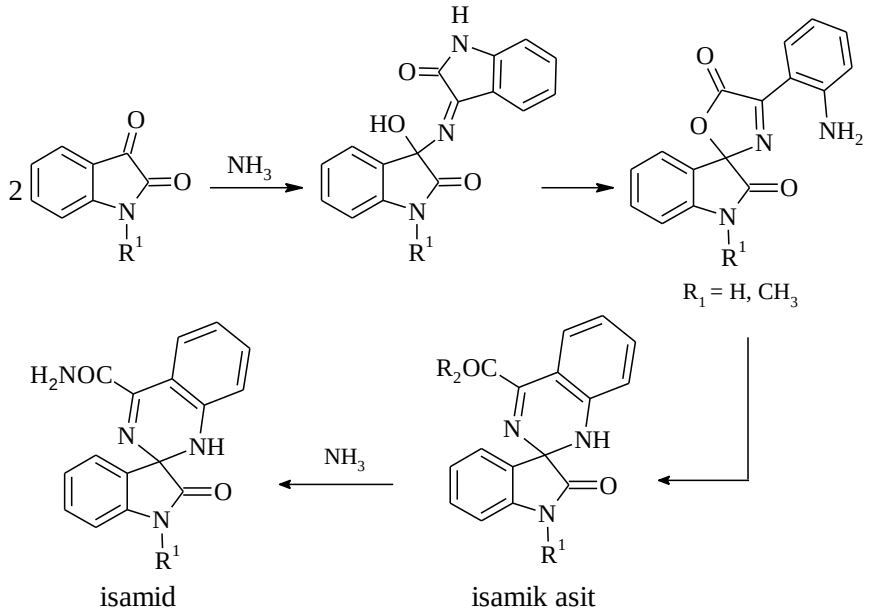
R_1= H, F
R_2= H, Cl, NH_2
R_3= NH_2, Cl, $N(CH_2CH_2Cl)_2$
R_4= H, NH_2

2.4. Spiroindolinonlar

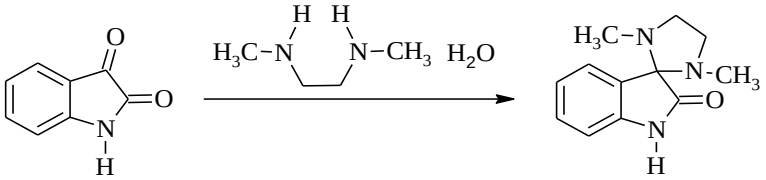
İsatin ve türevleri, nükleofilin yapısına, isatin çekirdeğine, özellikle azot atomuna bağlanan sübstitüentlerin yapısına, solvent ve temperatüre bağlı olarak C_2 ve/veya C_3 konumundan nükleofilik atağa uğrayabilir. Elde edilen ilk ürün ikinci nükleofil varlığında isatinlerin C_3 konumundan nükleofilik katım reaksiyonları sonucunda elde edilen ilk ürün ikinci nükleofil varlığında N_1-C_2 bağı kırılmaksızın bir siklizasyon ürünü veya spiro bileşik verebilir.



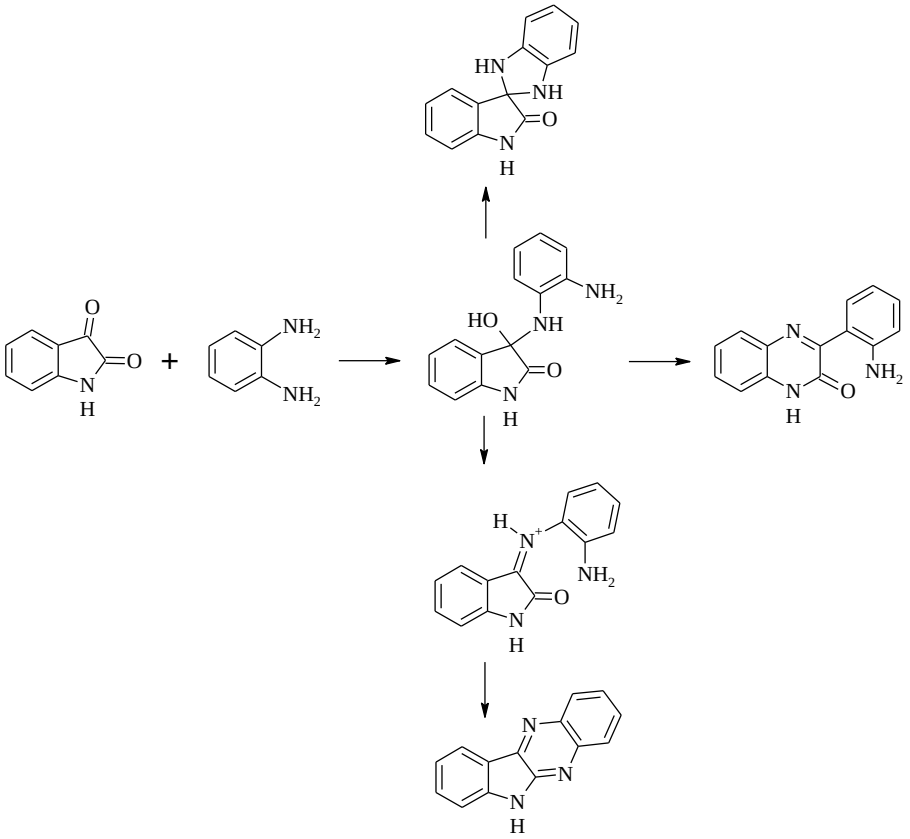
İsatinin amonyum hidroksid veya amonyum asetat ile reaksiyonu sonucunda elde edilen spiroindolinon türevi isamik asid ve isamid 1877' de tanımlanmış, 1976' da Conforth kimyasal ve spektroskopik bulgular ile bu yapıların doğruluğunu kanıtlamıştır [140]. 2 Mol isatinin 1 mol amonyak ile nükleofilik katımı/kondensasyonu ile oluşan ara ürün, laktonlaşma ve takiben nükleofilik atak ile isamik asidi vermektedir. İsamik asid 1 mol amonyak ilavesi ile isamide dönüşmektedir.



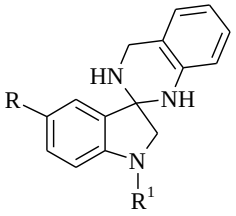
İsatinin N,N-dimetiletilendiamin ile sulu ortamda reaksiyonundan spirodiazolonoksindoller sentezlenmektedir [141].



İsatinin 2-fenilendiaminle reaksiyonundan solvent polaritesine bağlı olarak üç farklı ürünün sentezlendiği bildirilmiştir. İndofenazinler asetik asitli ortamda elde edilirken, tetrahidrofuran (THF) veya benzen kullanıldığında major ürün olarak kinoksalinonlar kazanılmıştır. Halka açılması ile oluşan bu ürün sulu alkali ortamda yüksek verimle saf olarak sentezlenmiştir. İsatinlerin 2-fenilendiamin ile reaksiyonunda DMAc veya NMP kullanıldığında spirobenzimidazoller yüksek verimle kazanılmıştır [142, 143].

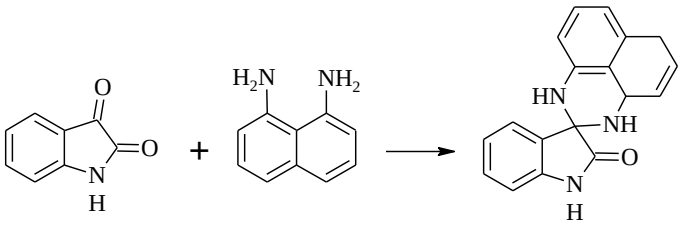


2-Aminobenzilaminin metanollü ortamda, oda ısısında benzer etkileşiminde ise spiro bileşik tek ürün olarak elde edilmiştir [143].

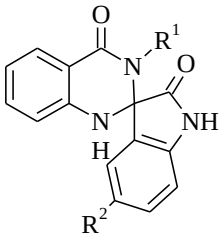


R = R^1 = H, CH_3

1,8-Diaminonaftalenin isatin türevleri ile reaksiyonu farklı çözücü ve solid sistemler kullanılarak mikrodalga yöntemi ile gerçekleştirilmiş, sentezlenen spiro bileşiklerde orta düzeyde antikanser etkinliğin bulunduğu saptanmıştır [144].

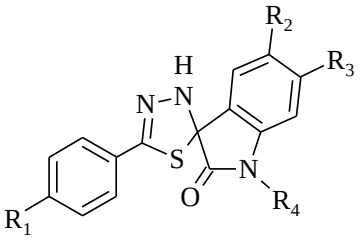


İsatinlerin 2-aminobenzamidler ile etanollü ortamda katalizör varlığında etkileşimi spiro kinazolinleri vermiştir [145].



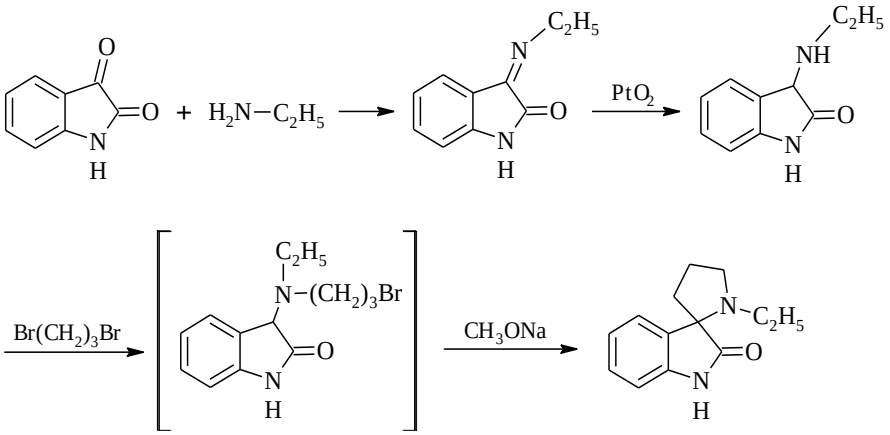
R^1 = H, C_6H_5, 4-$CH_3C_6H_4$, 4-$CH_3OC_6H_4$, 4-BrC_6H_4, 4-ClC_6H_4, $C_6H_5CH_2$
R^2 = H, Br

Osteoartrite etkili olduğu belirlenen spirotiyadiazol türevleri ariltiyohidrazidlerin etanollü ortamda isatinler ile reaksiyonuyla sentezlenmiştir [146].

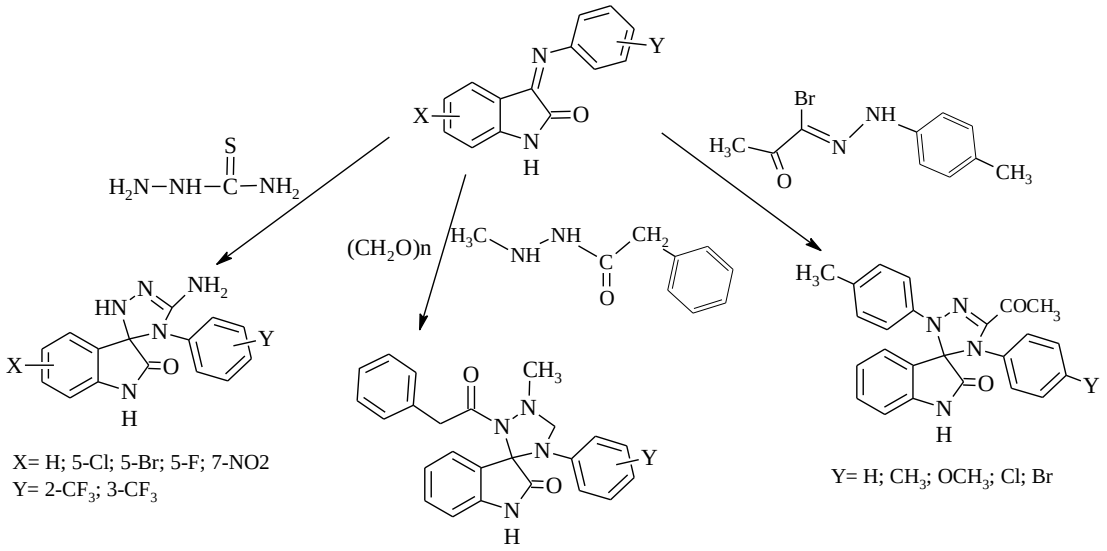


R_1= H; CH_3; OCH_3
R_2= H; CH_3; C_2H_5; OCF_3; Cl; Br
R_3= H; CH_3; Cl; n-C_3H_7
R_4= CH_3; i-C_3H_7; C_6H_5; 2-$CH_3C_6H_4$; $CH_2C_6H_5$; 4-ClC_6H_4

İsatinin spiropirolidin türevi lokal anestezik aktivitesini test etmek için sentezlenmiş, lidokaindeki gibi aromatik halka, amid bağı ve bazik amino grubu taşıyan bu bileşiğin yüksek etkili, düşük toksisiteli olduğu rapor edilmiştir [147].



Spirotriazoller, 3-ariliminoisatinlerin tiyosemikarbazid [148] veya 1-metil-2-fenilasetilhidrazin ve paraformaldehid ile [149] mikrodalga radyasyonu kullanılarak etkileştirilmesiyle veya hidrazinoil bromür ile susuz kloroform ve kuru trietilaminli ortamda ısıtılmasıyla sentezlenmiştir [150].

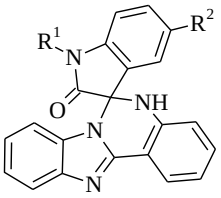


X= H; 5-Cl; 5-Br; 5-F; 7-NO2
Y= 2-CF_3; 3-CF_3

Y= H; CH_3; OCH_3; Cl; Br

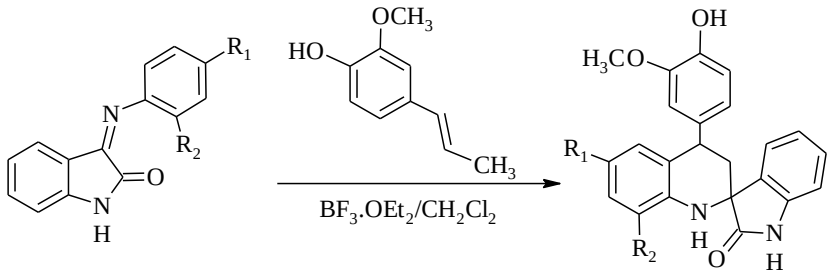
Y= H; 2-OCH_3; 3-CH_3; 3-NO_2;
4-CH_3; 4-OCH_3; 4-Br

2-(2-Aminofenil)benzimidazolün etanol ve asetik asidli ortamda isatin ile reaksiyonu imin ara ürünü üzerinden renksiz kristalize spiro ürünler ile sonuçlanmış, yapıları spektral bulgular ve X-ışını tek kristal analizi ile kanıtlanmıştır [151].



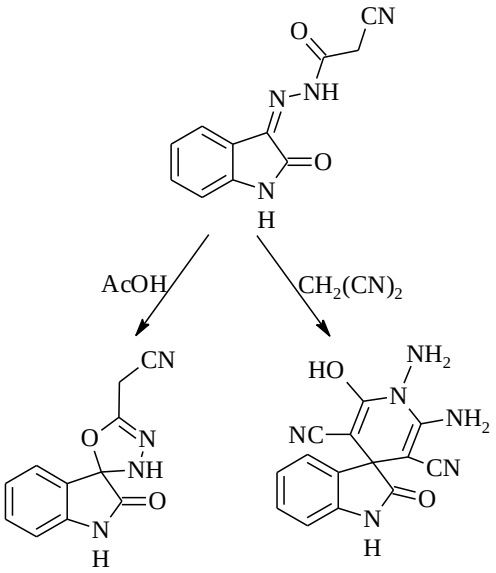
R_1= H; CH_3; $CH_2C_6H_5$
R_2= H; CH_3

3-Ariliminoisatinlerin, trans-isoöjenol ile Diels-Alder siklokatımının, spiro dihidrokinolin türevlerinin sentezi için kolay, hızlı ve ucuz bir yol olduğu bildirilmiştir [152].

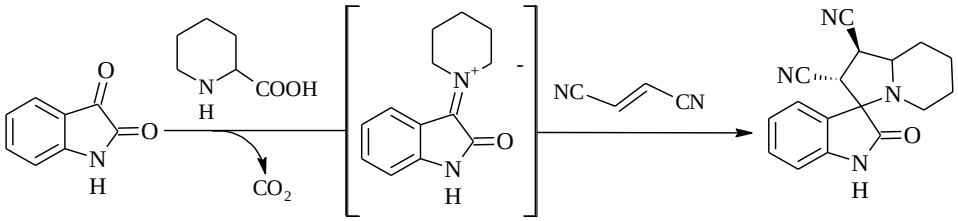


R_1= H; CH_3; C_2H_5; Cl; Br
R_2= H; CH_3; C_2H_5; OCH_3

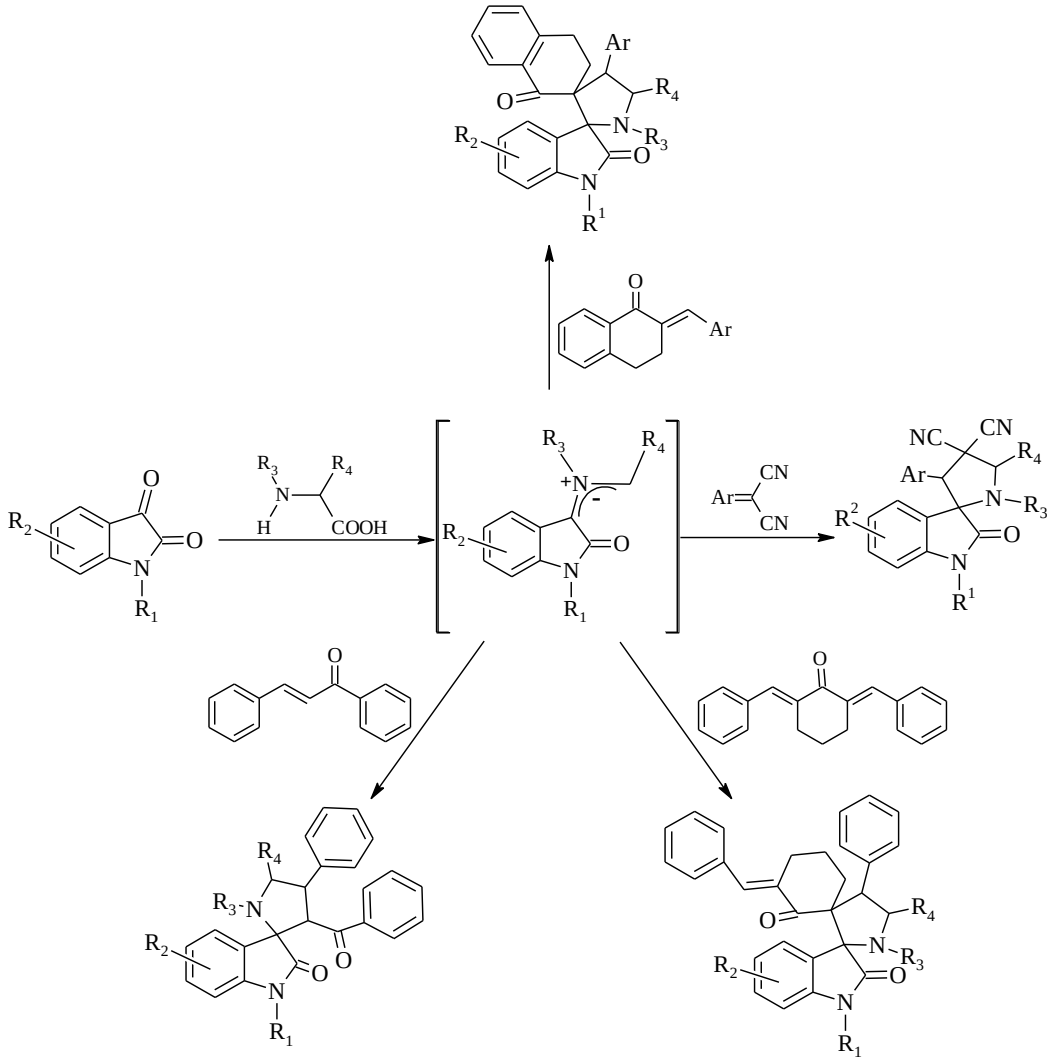
İsatinlerin siyanoasetilhidrazonlarından asidli ortamda spiro siyanometiloksadiazol, trietilaminli ortamda malononitril ile spiropiridin türevleri sentezlenmiştir [121, 122].



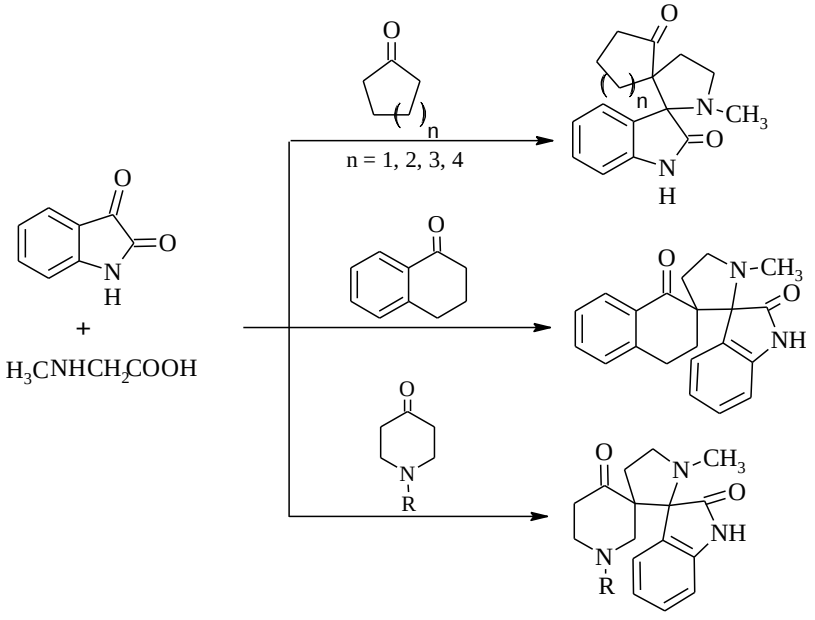
Siklik bir aminoasid, pipekolik asidin isatin ile reaksiyonundan dekarboksilasyon ile oluşan azometin artığı taşıyan ara ürün, fumaronitril ile etkileştirildiğinde spiro türevler kazanılmıştır [153].



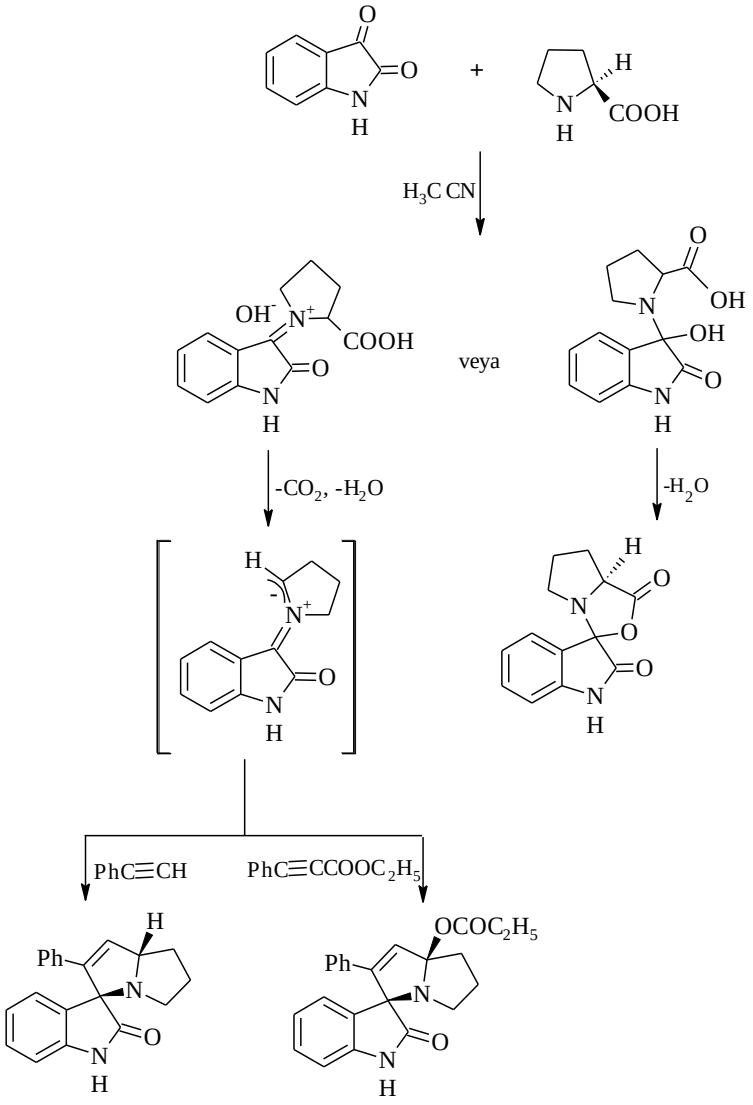
İsatinin aminoasidler ile dekarboksilatif kondensasyonu ile oluşan ara ürünün şalkonlar ve ariliden malononitriller ile reaksiyonundan spiropirolidin türevleri elde edilmiştir [154-156].



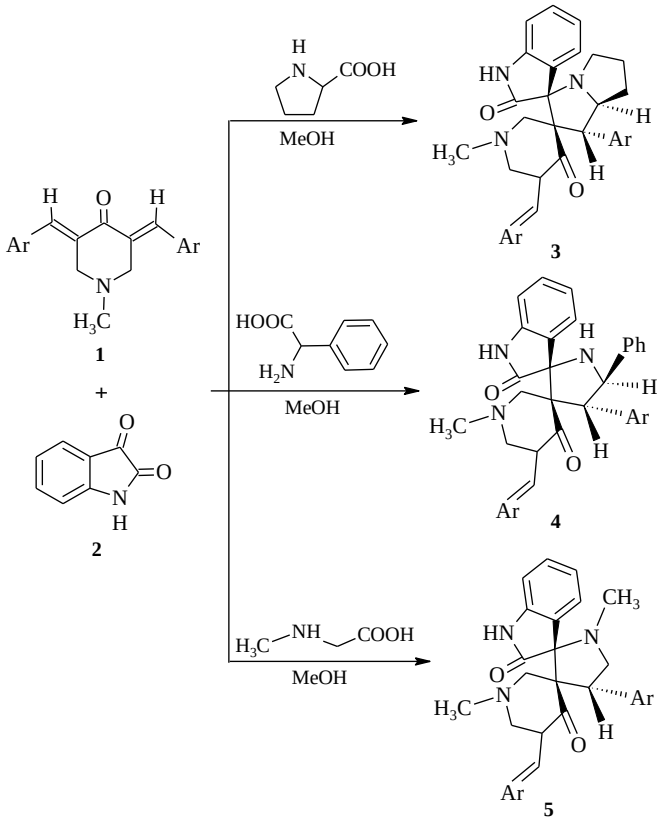
Dispiropirolidinler, isatinin sarkosin ve siklik ketonlar ile metanollü ortamda siklik katımı ile sentezlenmiştir [157, 158].



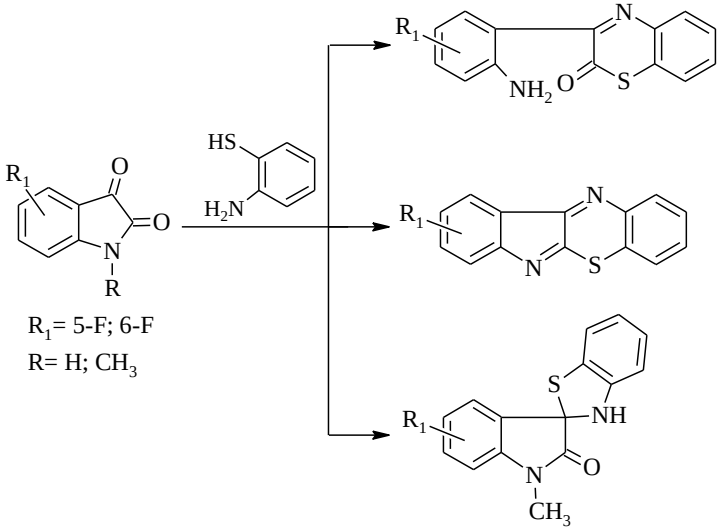
Ortamda dipolarofillerin varlığı ve yokluğu durumunda L-pirolin ile isatinin siklizasyon ürünleri araştırılmış, fenilasetilen veya etilfenilpropionatların varlığında dekarboksilasyon ile (2R,5S)-spiro[1-aza-bisiklo[3.3.0]-3-okten-2,3'-indol]-2'-on türevlerinin, dipolarofillerin yokluğunda ise (2S,5S)-spiro-[1-aza-3-oksabisiklo[3.3.0]oktan-2,3'-indol]-4,2'-dionun elde edildiği bildirilmiştir [159].



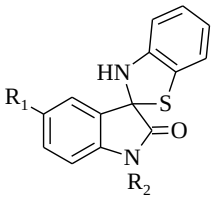
İsatinin 1-metil-3,5-bis[(E)-aril-metiliden]tetrahidro-4(1*H*)-piridinon türevleri ile α-aminoasid (pirolin, fenilglisin ve sarkosin) varlığında stereoselektif sentezi antimikrobial etkili spiro piperidin-4-onların eldesi ile sonuçlanmıştır. *İn vitro* ve *in vivo M. tuberculosis* H37Rv (MTB) ve multi-rezistan MTB' yi inhibe eden bu yeni türevlerin tüberküloz tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada en etkili türevin 0.07 μM MİK değerine sahip **4** (Ar = 4-florofenil) olduğu belirlenmiştir [160].



İsatinlerin 2-aminotiyofenol reaktivitesi ile ilgili çalışma sonuçları reaksiyon koşullarına bağlı olarak spirobenzotiyazolinlerin yanında farklı ürünlerin de elde edildiğini göstermiştir [119-121].

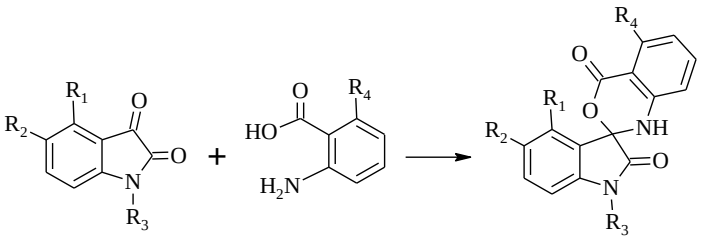


İsatinin spirobenzotiyazolin türevlerinin yüksek verimle sentezlendiği ve tek ürün olarak elde edildiği diğer çalışmalarda isatin ve 2-aminotiyofenol etanollü ortamda etkileştirilmiştir [121, 122].



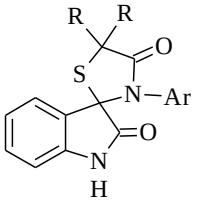
R_1= H, CH_3, CF_3O, Cl, Br, NO_2
R_2= H, CH_3

Spirobenzoksazinler 6-alkilantranik asidler ile isatinlerin susuz etanollü veya mikrodalga radyasyonunda etkileştirilmesiyle kazanılmıştır [161, 162].



R_1= H, Cl
R_2= H, CH_3 ,F, Br
R_3= H, CH_3
R_4= CH_3

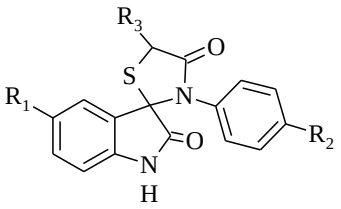
2-Alkil/aril spiro-4-tiyazolidinonlar ilgili çalışmalar incelendiğinde, çalışmaların büyük çoğunluğunda reaksiyonların isatin-3-ariliminlerin ayrı bir yöntemle sentezlenmesi ve izolasyonundan sonra merkaptoalkanoik asit ile etkileştirilmesi sonucunda iki aşamada [163-169] ya da reaksiyon ortamına amin ve isatin ilavesinden sonra aynı ortama merkaptoalkanoik asidin katılması ile aynı reaksiyon ortamında gerçekleştirildiği görülmektedir [166-170]. Reaksiyon çözücüsü olarak toluen, benzen, dioksan, alkol kullanılmış, ortamda oluşan su genellikle Dean Stark su tuzağı aracılığı ile ortamdan uzaklaştırılmıştır [164, 166-168].



R = H, CH_3, CH_2COOH

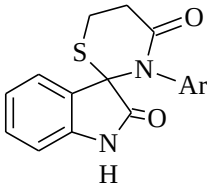
Son yıllarda isatin-3-spiro-4-tiyazolidinonlar sıvı ve katı fazda mikrodalga uygulaması ile de kazanılmış, araştırıcılar bu yöntem ile reaksiyon süresinin kısaldığını, ürün veriminin ve saflığının arttığını bildirmişlerdir [171-175].

Sentezlenen spirotiyozolidinonlardan I lösemiye etkili bulunurken [164], II türevleri *Staphylococcus albus ve Escherichia coli*'ye karşı test edilmiş, sonuçlar flor sübstitüsyonunun antibakteriyel etkiyi arttırdığını göstermiştir [166].

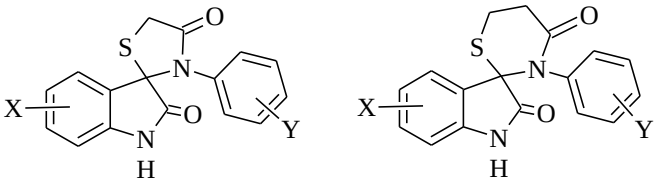


I $R_1 = R_3 = CH_3$; R_2 = 4-Cl
II R_1 = H, F, Cl ; R_2 = 4-F, 3-Cl; R_3 = H

İsatin-3-ariliminlerin 3-merkaptopropanoik asit ile etkiletirilmesi ile spiro-1,3-tiyazinonlar sentezlenmiş, bu reaksiyon kuru toluenli ortamda [164, 176, 177] ya da mikrodalga uygulaması ile de [173, 178] gerçekleştirilmiştir.

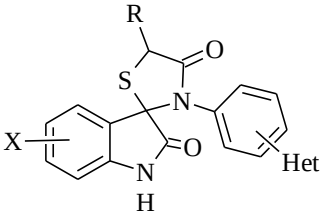


Dandia ve ark. sentezledikleri spirotiyazolidinon ve tiyazinonların *Rhizoctonia soloni, Fusarium oxysuorum ve Collectotrichum capsici'* ye karşı antifungal ve *M. tuberculosis'* e karşı antitüberküloz etkili olduklarını belirtmişlerdir.

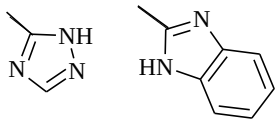


X = 5-CH_3, 5-Br , 5,7-diCH_3
Y = H, 2-Cl, 3-Cl 4-CH_3, 2-COOH, 4-COOH

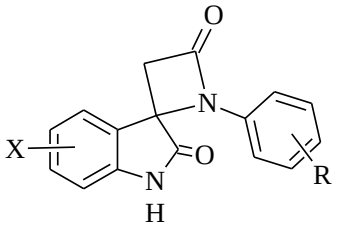
Aynı araştırmacılar tarafından yürütülen başka bir çalışmada triazol veya benzimidazol artığı taşıyan spirotiyazolidinonların benzer patojen funguslara karşı önemli antifungal etki gösterdiğini bildirmişlerdir [174].



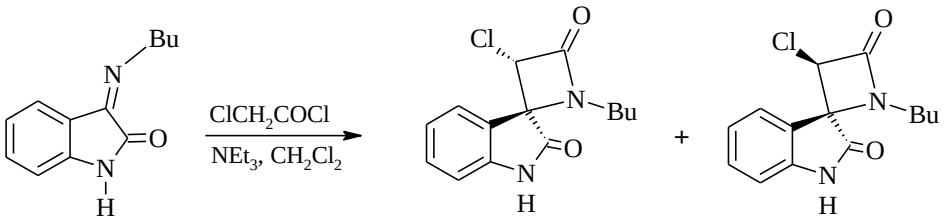
X = H, 5-CH_3, 5-F, 5-Cl, 5-Br , 5,7-diCH_3
R = H, CH_3
Het =



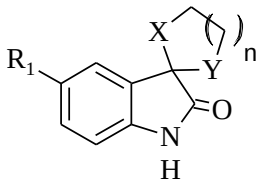
Spiro-β-laktamlar isatinin 3-fenilimino türevlerinin trietilaminli ortamda asetil klorürle siklizasyonu ile sentezlenmiş, bu bileşiklerin antifungal aktiviteleri test edilmiştir [179]. Aynı reaksiyon koşullarında açilklorürlerden hareketle kazanılan N-benzilisatin spiro-β-laktamların yapıları spektral ve X-ışını kristal analizi ile kanıtlanmıştır [180].



3-Butilimino isatine kloroasetilklorürün siklik katımı ile α-kloro-β-laktamların stereoizomerik karışımı yüksek verimle elde edilmiştir [181].

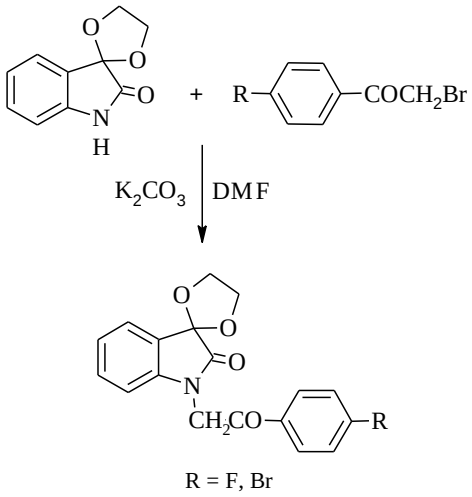


İsatinin p-toluensülfonik asid katalizörlüğünde benzenli ortamda etilen glikol, 2-merkaptoetanol, 1,2-etanditiyol, 1,3-propandiol ile reaksiyonundan sırasıyla spiro-1,3-dioksolan, 1,3-oksatiyolan, 1,3-ditiyolan, 1,3-dioksan türevleri sentezlenmiş, antikonvülsan aktiviteleri MES ve Sc-Met testleri ile incelenen bileşiklerden 1,3-dioksolanların yüksek etkili, yeni bir sınıf antikonvülsanlar olabileceği rapor edilmiştir [182].



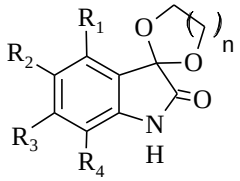
R = H, 5-CH_3, 7-CF_3, 4-Cl, 5-Cl, 6-Cl, 5-Br, 5-I, 5-NO_2
X = O, S
Y = O, S
n = 1, 2

Spiro 1,3-dioksolan türevlerinin sentezlendiği diğer bir çalışmada N-sübstitüe iki türevin benzodiazepine eşdeğer anksiyolitik etkili olduğu belirlenmiştir [183].



R = F, Br

İsatinin dioksolan ve dioksan ketal türevlerinin sentezlendiği çalışmada ise, asid katalize toluen veya benzenli ortamda etilen glikol ve 1,3-propandiol kullanılmış, sedatif, hipnotik ve anestezik etkileri test edilen bileşiklerden dioksolanların dioksan türevlerinden daha etkili olduğu saptanmıştır. Test sonuçları bu bileşiklerin kardiyovasküler ve solunum sistemine toksik etkili olmayan anestezik ve santral sinir sistemine etkili yeni bileşikler olabileceğini göstermiştir [184].



R_1 = H; Cl; Br; F

R_3 = H; Br

R_4 = H; Cl; CF_3; OCH_3; Br

n= 1; 2

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. Sentez İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

İsatin (Fluka)

5-Metilisatin (Sigma)

5-Triflorometoksiisatin (Aldrich)

5-Floroisatin (Aldrich)

5-Kloroisatin (Aldrich)

5-Bromoisatin (Aldrich)

5-Nitroisatin (Aldrich)

2-Amino-4-klorotiyofenol (Aldrich)

3.1.1.2. Antioksidan Etki Araştırmasında Kullanılan Kimyasal Maddeler

Soya L-α-fosfatidilkolini (Tip IV-S; Sigma)

L-Askorbik asit (Sigma)

Trikloroasetik asit (Merck)

Tiyobarbitürik asit (Merck)

Butillenmiş hidroksitoluen (Fluka)

1,1,3,3-Tetraetoksipropan (Fluka)

2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (Sigma)

Nitroblue tetrazolium (Fluka)

Etilendiamin tetraasetik asit (Sigma)

Ksantin (Fluka)

Ksantin oksidaz (Sigma)

2,2-Azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) amonyum tuzu (Fluka)

Potasyum peroksodisülfat (Merck)

6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit, Troloks (Fluka)

Sodyum fosfat dibazik (Sigma)

Sodyum fosfat monobazik (Sigma)

Potasyum dihidrojen fosfat (Sigma)

Dipotasyum hidrojen fosfat (Sigma)

3.1.2. Kullanılan Elektronik Cihazlar

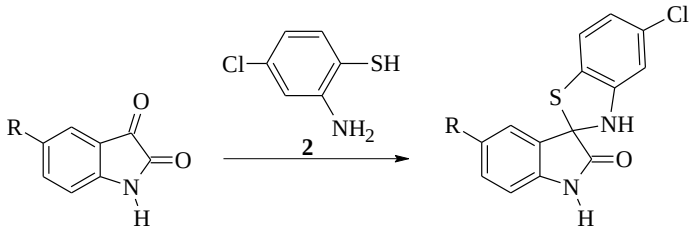
Ultraviyole Spektrofotometre*	Shimadzu UV-1601S
İnfrared Spektrofotometre	Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR Spectrometer Shimadzu IRAffinity-1 FTIR Spectrophotometer
Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometre	Varian^{UNITY} INOVA (500 MHz)
Kütle Spektrometre	Finnigan LCQ Advantage Max Agilent 1100 MSD
Elemental Analiz Aygıtı	Thermo Finnigan Flash EA 1112
Erime Derecesi Aleti**	Büchi Melting Point B-540

3.2. Kromatografik Çalışmalar

Sentez çalışmaları sırasında reaksiyonu izlemek, elde edilen bileşiklerin saflık kontrolünü yapmak amacıyla ince tabaka kromatografisinden (İTK) yararlanılmıştır. Bu amaçla reaksiyon ortamından alınan örnekler ve son ürün, adsorban olarak 0.25 mm kalınlığında silikajel HF_{254} kaplanmış alüminyum plaklarda ve etil asetat-siklohekzan (50:50) çözücü sistemi kullanılarak kontrol edilmiştir. Lekelerin belirlenmesinde 254 nm dalga boyundaki UV ışığından yararlanılmıştır. Kromatogramlar UV ışık altında incelendiğinde lekeler mor renkli gözlenmiştir.

3.3. Sentez Yöntemleri

3.3.1. Genel Sentez Şeması



R= H, CH_3, CF_3O, F, Cl, Br, NO_2

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

5-Sübstitüe 1*H*-indol-2,3-dion' un **1** (3.5 mmol) absolü etanoldeki (15 mL) çözeltisine 2-amino-4-klorotiyofenol **2** (3.5 mmol) ilave edilir. Karışım su banyosunda reaksiyon sonlanıncaya kadar geri çeviren soğutucu altında ısıtılır, oluşan ürün süzülerek ayrılır ve etanolden billurlandırılarak saflaştırılır.

* Spektrumlar 1 mg madde 100 ml etanolde çözülerek alınmıştır.

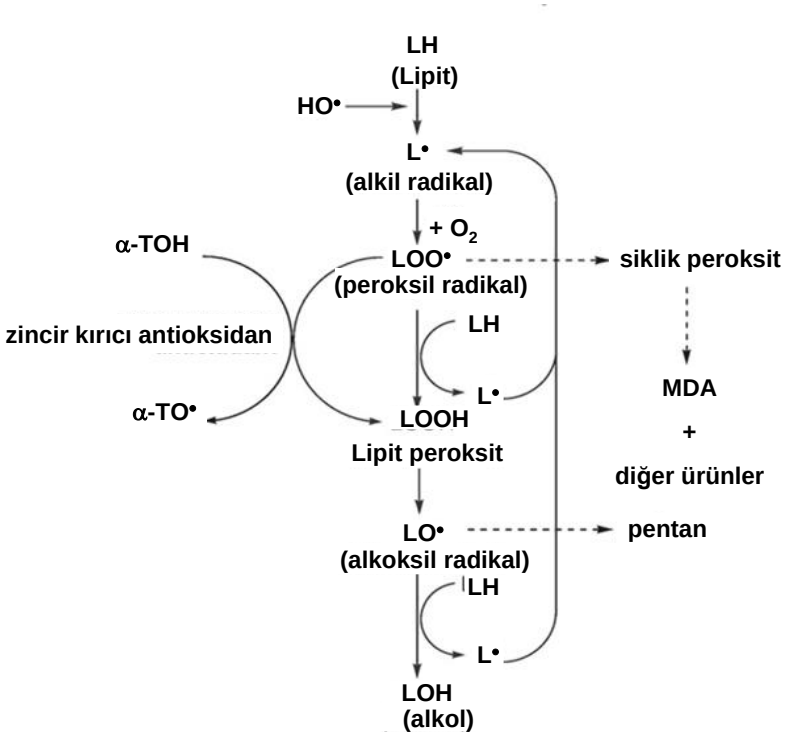
** Maddelerin erime dereceleri açık kapiler tüplerde saptanmış ve düzeltilmemiştir.

3.4. Biyolojik Etki Araştırma Yöntemleri

3.4.1. Antioksidan Etki Araştırması

Sentezlenen bileşiklerin antioksidan etki araştırmaları Yrd. Doç. Dr. Nurten Özsoy tarafından İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı' nda yapılmıştır.

3.4.1.1. Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etki Tayini



Bu testin amacı ekstrenin, soya fosfatidilkolininden (lesitinden) hazırlanan lipozomlardan oluşturulan suni lipit sisteminin $FeCl_3$ ve askorbik asit ile inkübasyonu sonucunda oluşan peroksit radikallerini giderme kapasitesini ölçmektir. Fosfolipitlerden oluşturulan lipozomlar, demir (III) ve askorbik asit varlığında lipit peroksidasyonuna uğrarlar ve biyolojik olarak aktif aldehitler (malondialdehit) oluşur. Malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA)' in reaksiyona girmesiyle oluşan TBA reaktif türleri (TBARS)' nin pembe rengi 532 nm' de ölçülerek bileşik **3a-g** nin lipit peroksidasyonuna karşı inhibisyonu tayin edilmiştir. Duh ve ark. nın geliştirdiği bu metoda göre 300 mg lesitin 30 mL, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0) ile süspansyon haline getirilmiş, buz içeren kapta her 30 saniyede dinlendirilerek toplam 10 dakika sonikatörde muamele edilmiş (9 cycle/ 26% power) ve 10 mg/mL fosfolipit lipozomları içeren bir süspansyon elde edilmiştir [185]. Deney 3.25 mL'lik reaksiyon

ortamında gerçekleştirilmiştir. 0,25 mL İndol türevi veya standart olarak kullanılan α-tokoferol (0.1 - 0.4 mM)'e 1 mL 10 mg/mL lipozom süspansiyonu (3,08 mg/mL), 1 mL 400 μM $FeCl_3$ (123 μM) ilave edilmiş ve reaksiyon 1 mL 400 μM askorbik asit (123 μM) ilavesi ile başlatılmıştır. Karışım 37°C'de 60 dakika inkübe edildikten sonra lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA metodu ile tayin edilmiştir [186]. 500 μL Reaksiyon karışımına 1000 μL TCA (trikloroasetik asit) - TBA ayıracı (%15 w/v TCA ve %0,375 TBA' nın 0.25 N HCl' deki çözeltisi) ve 14 μL %2' lik butillenmiş hidroksi toluen (BHT)' nin absolü etanoldeki çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı vortekste karıştırılmış ve 100°C' de 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Soğutulduktan sonra 1,5 mL n-butanol ilave edilmiş ve 3000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst kısımdaki organik tabakanın pembe renginin absorbansı 532 nm' de ölçülmüştür. Bileşiklerin lipit peroksidasyonunu inhibe edici yüzdesi aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

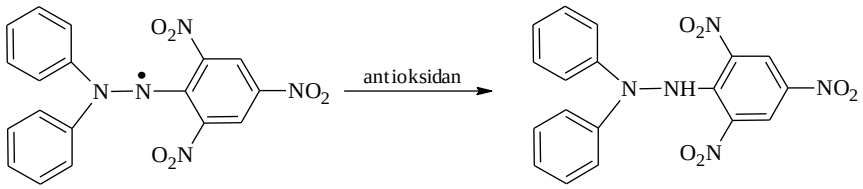
$$İnhibisyon\ (\%) = (1 - \frac{İndol\ \ türevinin\ 532\ nm'deki\ absorbansı}{Kontrolün\ \ 532\ nm'deki\ absorbansı}) \times 100$$

3.4.1.2. Süperoksit Radikali Giderici Etki Tayini

Bileşik **3a-g** nin süperoksit radikali giderici etkisi Aruoma ve ark. nın [187] geliştirdiği metoda göre tayin edilmiştir. Deney ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi sonucunda oluşan mavi - mor renkli formazonların 560 nm' de absorbanslarının okunması esasına dayanmaktadır. Deney 3 mL' lik reaksiyon ortamında gerçekleştirilmiştir. 100 μL indol türevi (6.25 - 50 mM) veya askorbik asid (0.1 - 1.6 mM), 100 μL 30 mM etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (1 mM), 10 μl 50 mM KOH' de çözünmüş 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, 100 μL 1U ksantin oksidaz ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır. 5 dakika 25°C' de bekletildikten sonra absorbanslar 560 nm' de köre karşı okunmuştur. Deney üç kez tekrarlanmış ve ortalaması alınmış, süperoksit radikali giderici aktivitesi aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

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

3.4.1.3. DPPH Radikali Giderici Etki Tayini

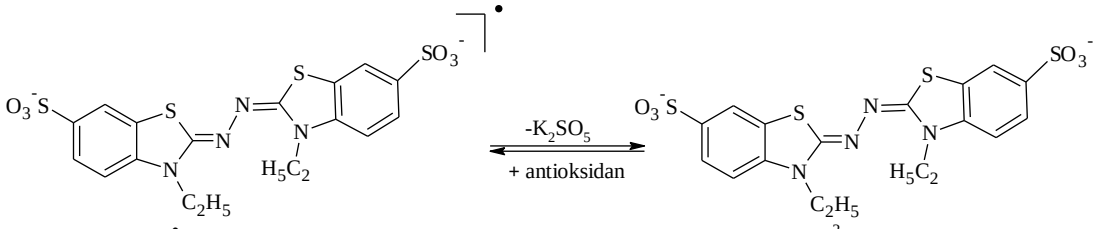


2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil ($DPPH^{\bullet}$)

Bileşiklerin DPPH radikali giderici aktivitesi Brand-Williams ve ark. [188] tarafından geliştirilen metoda göre tayin edilmiştir. 0,1 mL İndol türevinin 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 (6 x 10^{-5} M) ilave edilmiş, karışım 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Absorbanslar 517 nm'de spektrofotometrede metanole karşı okunmuştur. Pozitif ve negatif kontroller paralel olarak çalışılmış, pozitif kontrolde indol türevinin yerine standart (α-tokoferol ve askorbik asit), negatif kontrolde ise DMSO kullanılmıştır. Deney üç kez tekrarlanmış ve ortalaması alınmıştır. DPPH radikali giderici aktivitesi aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

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

3.4.1.4. TEAC (Troloks Ekivalan Antioksidan Kapasite) Tayini



$ABTS^{\bullet}$ (λ_{max}=734 nm) $ABTS^{2-}$ (renksiz)

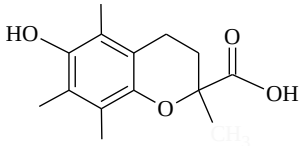
Bileşiklerin total antioksidan etkisinin araştırıldığı bu yöntem, mavi-yeşil renkli dayanıklı bir bileşik olan $ABTS^{\bullet+}$ [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asid)] radikalinin giderilmesi sonucu, renkte meydana gelen azalmanın spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. $ABTS^{\bullet+}$radikali, ABTS nin persülfatla oksidasyonu sonucu meydana gelmektedir.

Bileşiklerin total antioksidan aktivitesi Re ve ark. [189] tarafından önerilen Troloks' a ekivalan antioksidan kapasitesi (TEAC) yöntemine göre yapılmıştır. Bu yöntemde 7 mmol/L ABTS amonyum suda çözülmüş ve 2.45 mmoL/L potasyum

persülfatla reaksiyona sokularak hazırlanan $ABTS^{\bullet+}$ stok çözeltisi, oda sıcaklığında koyu mavi bir renk meydana gelmesini sağlamak için 12-16 saat bekletilmiştir. Deney gününde, $ABTS^{\bullet+}$ stok çözeltisi, 734 nm' de absorbansı 0.70 (± 0.02) olacak şekilde etanol ile seyreltilerek $ABTS^{\bullet+}$ çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltinin 990 μL' sinin 10 μL indol türevi (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)' a ilave edilmesi ile renkte meydana gelen azalma spektrofotometrik olarak 734 nm' de 6. dakikada ölçülmüştür. Diğer taraftan kontrol deneyleri, indol türevi veya standart çözeltileri yerine aynı miktarda DMSO veya etanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ABTS radikali giderici aktivitesi aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

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

Troloks Standart Eğri Denkleminin Elde Edilmesi



Troloks

Troloks standart eğri denkleminin elde edilmesi için önce Troloks'un 10 mM' lık çözeltisi hazırlanmış, bu çözeltinin 75 mM' lık fosfat tamponu (pH 7,4) ile seyreltilmesiyle konsantrasyonları, 1,5 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM ve 0,125 mM olan çözeltiler elde edilmiştir. Çözeltilere TEAC deneyi uygulandıktan sonra renkte meydana gelen azalma spektrofotometrik olarak 734 nm' de 6. dakikada ölçülmüş ve Troloks' un ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi yüzdeleri hesaplanmış, deney beş kez tekrarlanmıştır.

3.4.1.5. Ferri İyonu Redükleyici Gücü Tayini

Ferri iyonu redükleyici gücü Chung ve ark. [190] tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır. 0.1 mL İndol türevi (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 50°C de 20 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda reaksiyon 0.25 mL TCA ile durdurulmuş, karışım 5 dakika 3000 rpm de santrifüj edilmiş, ayrı tüplere alınan 0.25 ml supernatant' a 0.25

mL distile su ve 0.5 mL %0.1 $FeCl_3$ ilave edilmiş ve absorbanslar 700 nm' de okunmuştur.

3.4.2. Antikanser Etki Araştırması

Bileşiklerimizden **3a**, **3d** ve **3e** Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından antikanser aktivite araştırması için seçilmiştir. Bileşiklerin antikanser etkileri klinik olarak izole edilmiş dokuz kanser tipinden elde edilmiş 60 değişik insan hücre dizisine karşı *in vitro* olarak test edilmiştir. Araştırmada yer alan kanser tipleri; lösemi (Leukemia), akciğer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC), kolon (Colon Cancer, CC), santral sinir sistemi (CNS Cancer, CNSC), melanoma (Melanoma, M), yumurtalık (Ovarian Cancer, OC), böbrek (Renal Cancer, RC), prostat (Prostate Cancer, PC) ve meme (Breast Cancer, BC) kanserleridir. Her bir kanser tipine ait hücre dizisi NCI tarafından verilen sembollerle belirtilmiştir. Numuneler DMSO' da çözülmüş, 10^{-5} M konsantrasyonda değerlendirmeler yapılmıştır.

Testin esası, belirli konsantrasyon aralığında çözeltileri hazırlanan test bileşiğinin kanserli hücrelere karşı büyümeyi inhibe edici (protein artışını durduran) etkilerinin saptanmasıdır. Hücreler protein boyası sülforodamin B (SRB) ile boyanır ve spektrofotometrik yöntemle kontrol grubuna karşı ölçülerek sonuçlar değerlendirilir [191]. Test sonuçları hücre büyümesini %50 inhibe eden molar konsantrasyonun logaritması ($logGI_{50}$), total büyüme inhibisyonuna neden olan konsantrasyonun logaritması (logTGI) veya hücrelerin yarısını öldüren konsantrasyonun logaritması ($logLC_{50}$) olarak tanımlanır.

%Büyüme (Percentage Growth) (PG) hesabı şu şekilde yapılır:

Eğer (ortalama OD_{test}-ortalama OD_{tzero}) ≥0 ise,

PG= 100x(ortalama OD_{test}-ortalama OD_{tzero}) / (ortalama OD_{ctrl}-ortalama OD_{tzero})

Eğer (ortalama OD_{test}-ortalama OD_{tzero}) <0 ise,

PG= 100x(ortalama OD_{test}-ortalama OD_{tzero}) / ortalama OD_{tzero}

Ortalama (Optical Dencity) OD_{tzero}: Hücrelerin test bileşiğine maruz kalmasından hemen önceki SRB ile oluşturulan rengin optik dansite ölçüm değerlerinin ortalaması.

Ortalama OD_{test}: Hücrelerin test bileşiğine maruz kalmasından 48 saat sonra SRB ile oluşturulan rengin optik dansite ölçüm değerlerinin ortalaması.

Ortalama OD_{ctrl}: Hücrelerin test bileşiğine maruz bırakılmaksızın 48 saat sonra SRB ile oluşturulan rengin optik dansite ölçüm değerlerinin ortalaması.

Veri tablosu: Bu tablo her bir hücre dizisine karşı elde edilen deneysel verileri içerir. Tablodaki ilk kolon kanser türlerini ve hücre dizilerini gösterir. Sonraki kolon hesaplanan PG değerlerinin listesidir. GI_{50} (%50 büyüme inhibisyonu), TGI_{50} (%50 total büyüme inhibisyonu), LC_{50} (hücrelerin yarısını öldüren konsantrasyon) cevap parametreleridir.

Ortalama Grafikleri: Ortalama grafikleri seçilen bir cevap parametresiyle ilgili olarak her bir hücre dizisi veya her bir kanser türü için verileri anlaşılır hale getirir. Ortalama grafikleri temel cevap parametrelerinin GI_{50}, TGI_{50}, LC_{50} her birindeki ortalama değerleri gösterir. Sağa doğru uzanan koyu çizgiler test bileşiğine hücre dizisinin duyarlılığını gösterir. Sola doğru uzanan koyu çizgiler ortalamadan daha az duyarlılığı gösterir [192-195].

4. BULGULAR

4.1. Sentezi Yapılan Maddelere Ait Bulgular

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

1*H*-İndol-2,3-dion (3.5 mmol) ile 2-amino-4-klorotiyofenolden (3.5 mmol) absolü etanollü ortamda 3.2' de verilen yönteme göre 3 saat ısıtılarak sentez edilir. 0.87 g (Verim %86).

Sarı renkli katı madde, 241°C de erir. Su ve kloroformda çözünmez; etanol, eter ve asetonda çözünür.

Kromatografi: R_f = 0.56

Elementel Analiz: $C_{14}H_9ClN_2OS$ (MA= 288.75 g/mol)

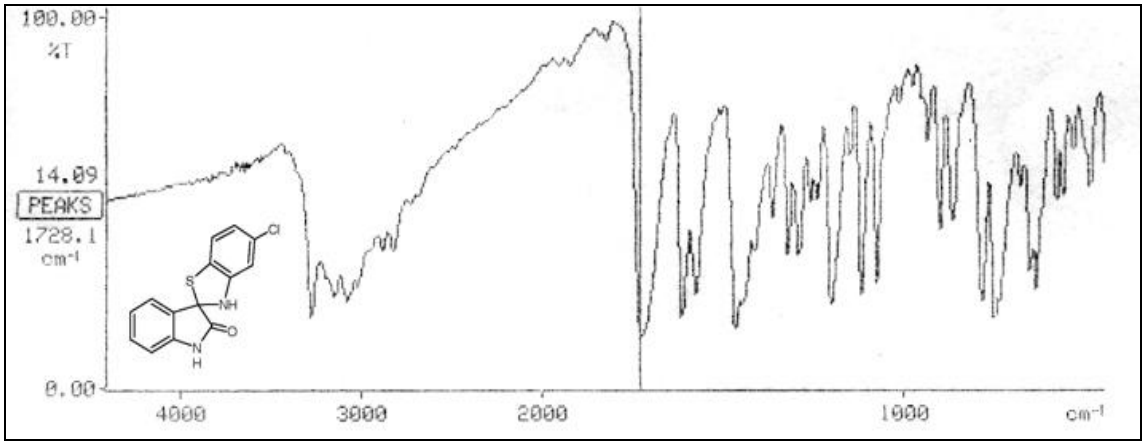
Hesaplanan C: 58.23; H: 3.14; N: 9.70.

Bulunan C: 58.06; H: 3.14; N: 9.52.

Spektral Bulgular:

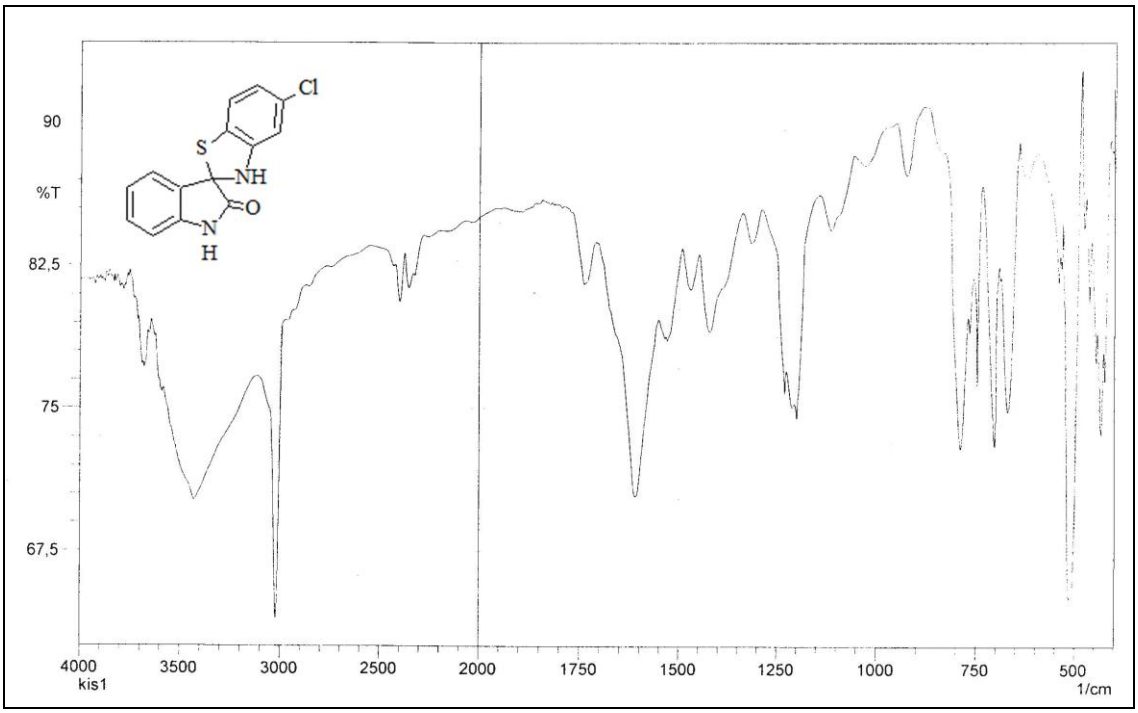
UV λ (EtOH)$_{maks}$ nm (ε): 226.4 (101756.24); 253.2 (19653.18); 320.0 (11040.46).

IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 3281, 3149 (N-H g.b.); 3083, 3027 (Ar. C-H g.b.); 1728 (C=O g.b.); 1617, 1577, 1469 (N-H e.b. ve Ar. C=C g.b.); 1294 (C-N g.b.); 1079 (C-Cl g.b.); 786 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 753 (1,2-disübstitüe benzen C-H e.b.); 637 (C-S g.b.).



Şekil 4-1: Madde **3a**' nın IR Spektrumu

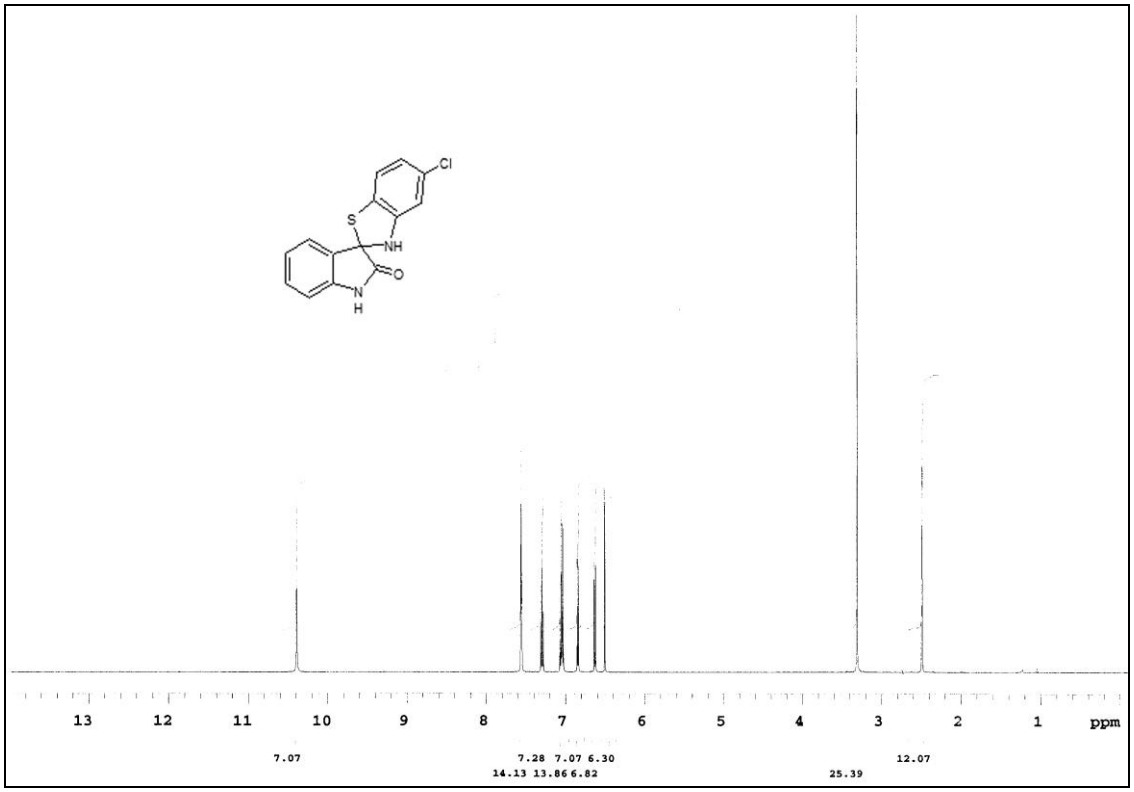
IR ($CHCl_3$) ν_{maks} (cm^{-1}): 3427 (N-H g.b.); 3020 (Ar. C-H g.b.); 1739 (C=O g.b.); 1608, 1531, 1423 (N-H e.b. ve Ar. C=C g.b.); 1230 (C-N g.b.); 1112 (C-Cl g.b.); 790 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 748 (1,2-disübstitüe benzen C-H e.b.); 671 (C-S g.b.)



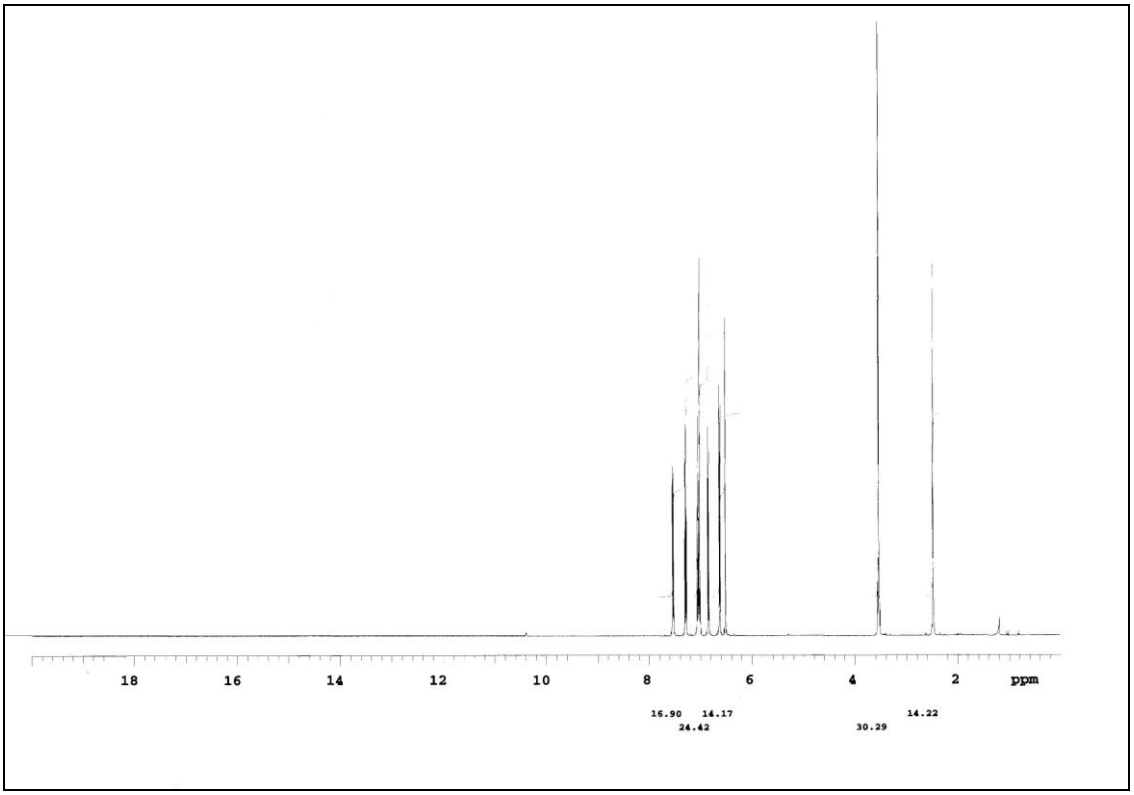
Şekil 4-2: Madde **3a**' nın $CHCl_3$'deki IR Spektrumu

^{1}H-NMR (400 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 6.50 (1H, d, J=1.96 Hz, bt. C_4-H); 6.62 (1H, dd, J=8.30, 2.44 Hz, bt. C_6-H); 6.84 (1H, d, J=7.81 Hz, ind. C_7-H); 7.03 (1H, d, J=8.30 Hz, bt. C_7-H); 7.05 (1H, ddd (td), J=7.81, 7.32, 0.98 Hz, ind. C_5-H); 7.29 (1H, ddd (td), J=7.81, 7.32, 1.47 Hz, ind. C_6-H); 7.55 (1H, d, J=2.92 Hz, ind. C_4-H); 7.56 (1H, s, bt. N-H); 10.39 (1H, s, ind. N-H) (D_2O değişmesi ile 7.56 ve 10.39 ppm deki pikler gözlenmemiştir).

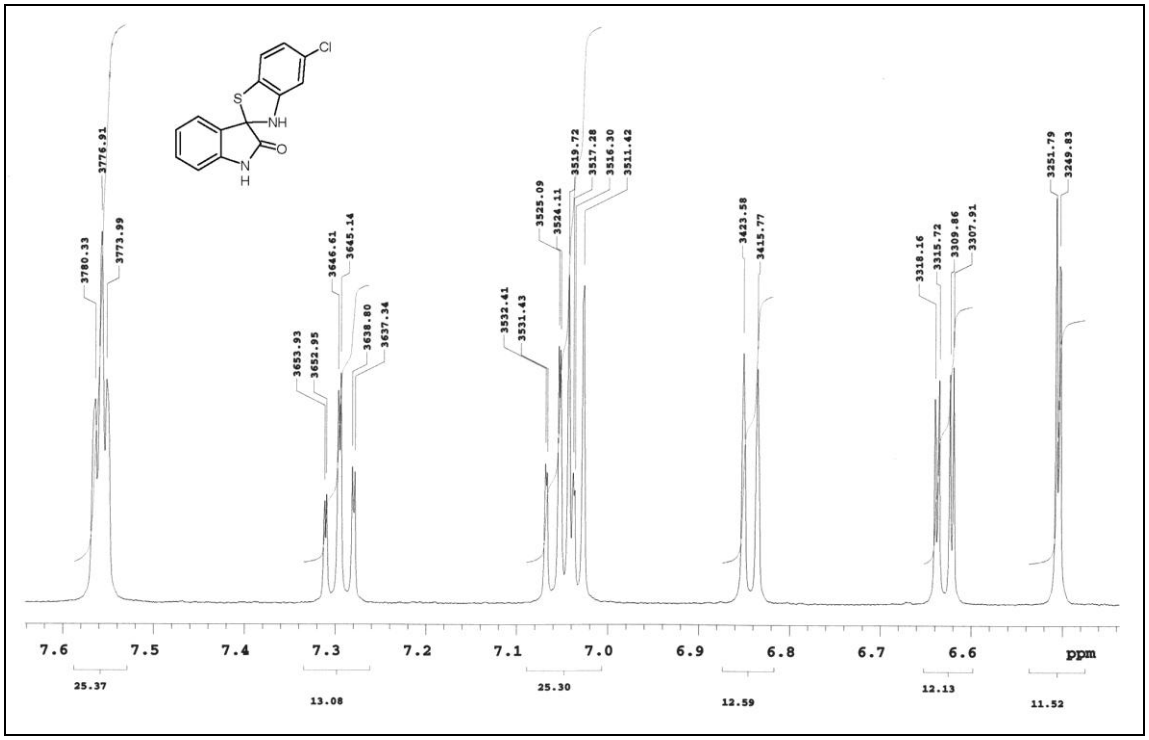
^{13}C-NMR (HSQC) (125 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 75.64 (spiro C); 108.40 (bt. C_4); 110.88 (ind. C_7); 118.52 (bt. C_6); 122.70 (bt. C_7); 123.28 (ind. C_5); 123.99 (ind. C_{3a}); 126.38 (ind. C_4); 129.86 (bt. C_{7a}); 130.92 (bt. C_5); 131.43 (ind. C_6); 142.03 (ind. C_{7a}); 149.43 (bt. C_{3a}); 176.53 (ind. C=O).



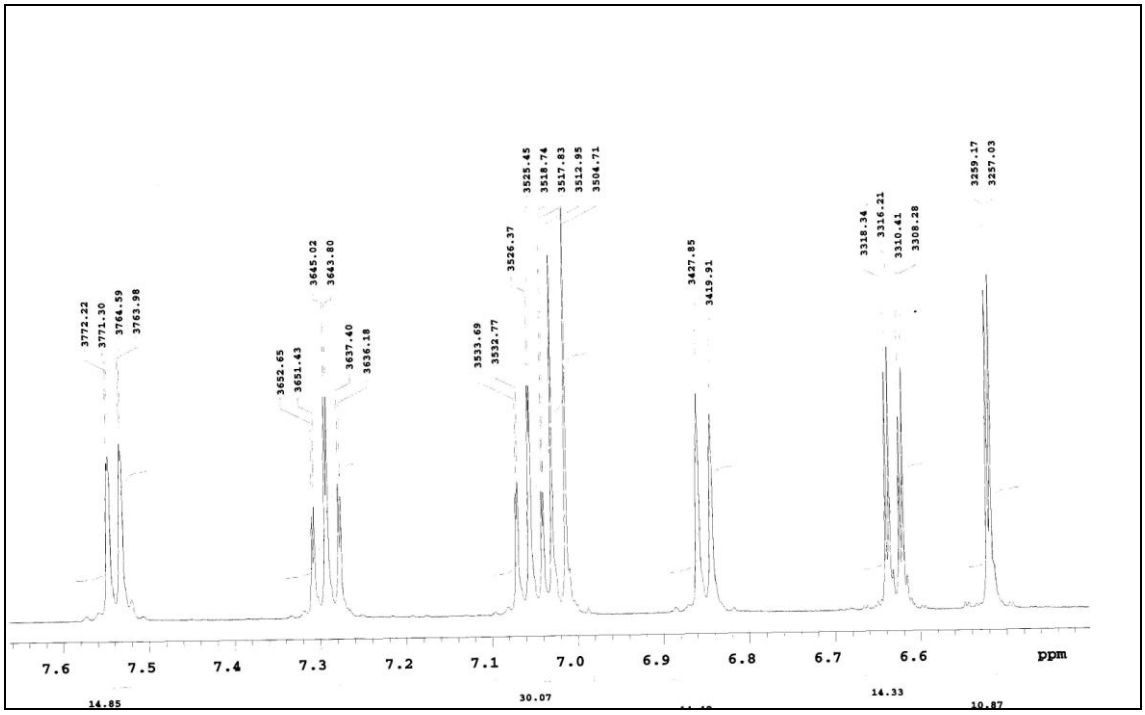
Şekil 4-3: Madde **3a**' nın ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm)



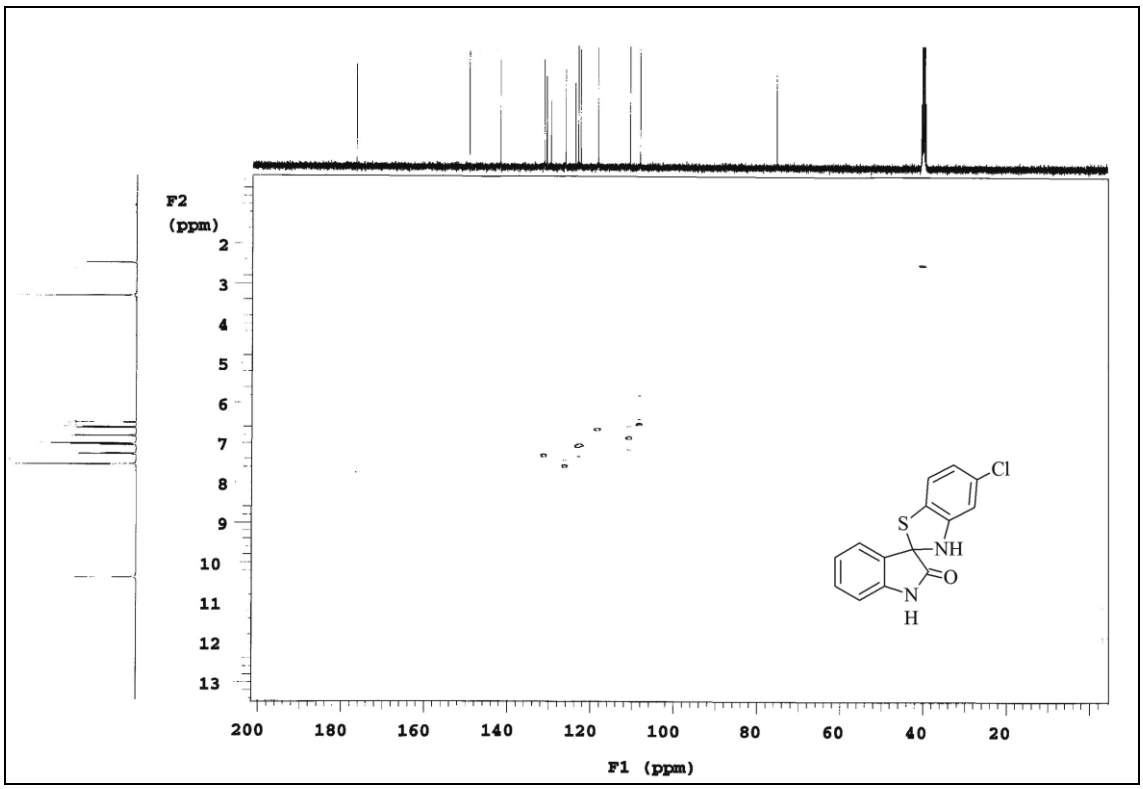
Şekil 4-4: Döteryumlanmış Madde **3a**' nın ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm)



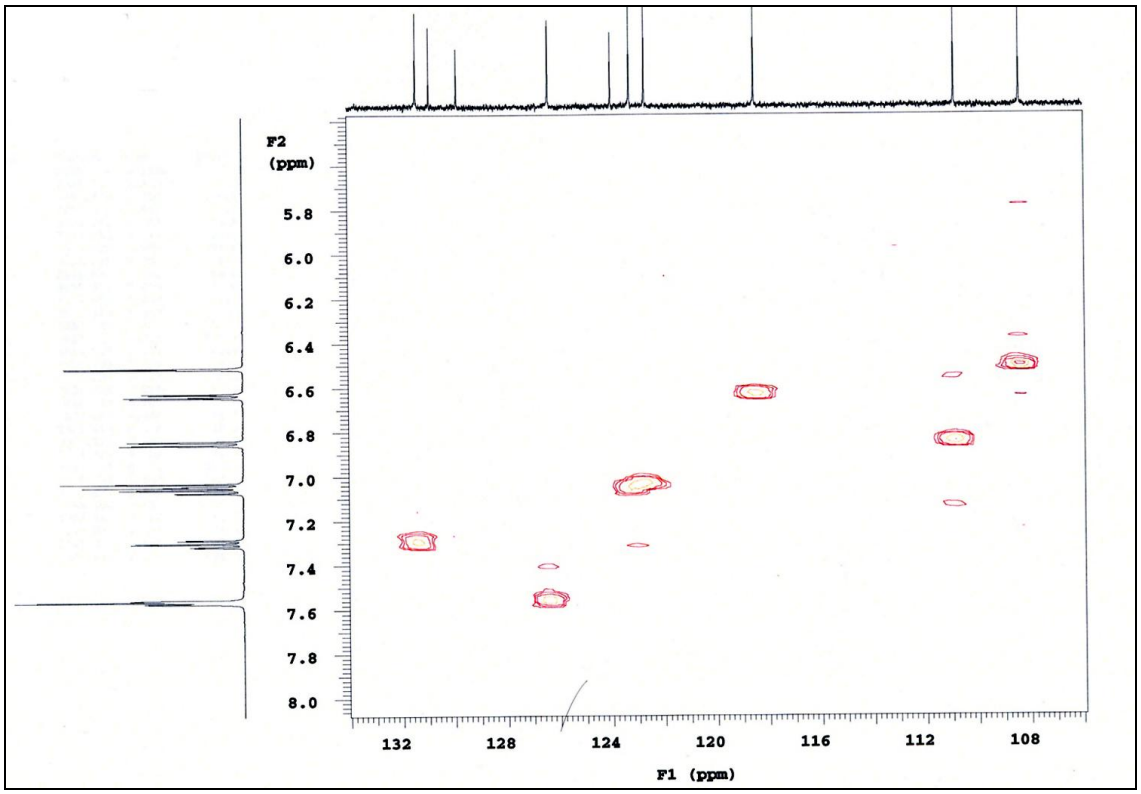
Şekil 4-5: Madde **3a**' nın ^{1}H-NMR Spektrumu (6.5-7.6 ppm)



Şekil 4-6: Döteryumlanmış Madde **3a**' nın ^{1}H-NMR Spektrumu (6.5-7.6 ppm)

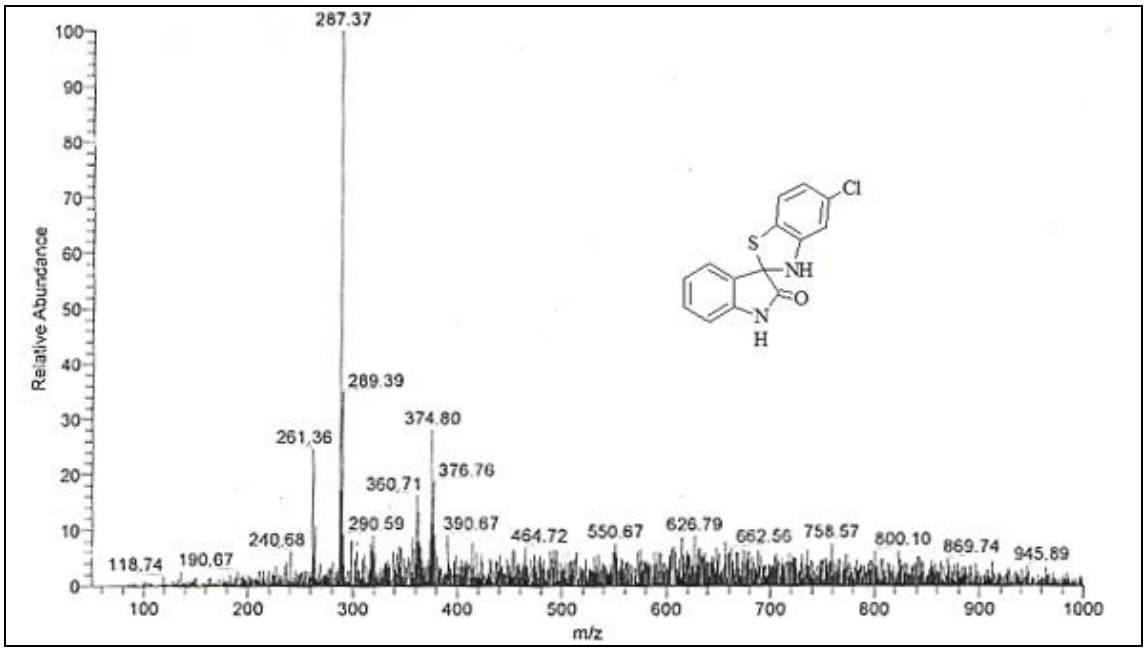


Şekil 4-7: Madde **3a**' nın HSQC Spektrumu (0-200 ppm)



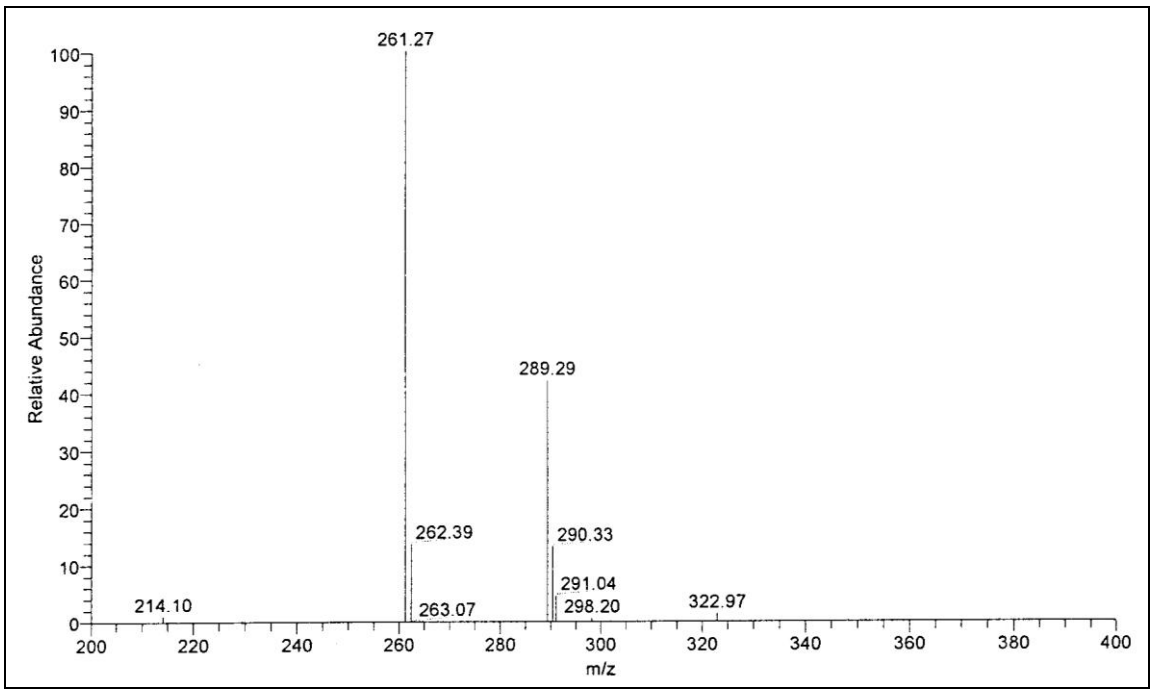
Şekil 4-8: Madde **3a**' nın HSQC Spektrumu (106-134 ppm)

Kütle Spektrumu (ESI+) m/z (%): 289, 291 ($[M+H]^+$; 35, 9.2); 287, 289 (100, 35); 261, 263 (25, 11).



Şekil 4-9: Madde **3a**' nın Kütle Spektrumu (ESI+)

Kütle Spektrumu MS-MS (ESI+) m/z (%): 289,291 ($[M+H]^+$; 42, 5); 261 (%100).



Şekil 4-10: Madde **3a**' nın MS-MS Spektrumu (ESI+)

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

5-Metil-1*H*-indol-2,3-dion (3.5 mmoL) ile 2-amino-4-klorotiyofenolden (3.5 mmol) absolü etanollü ortamda 3.2' de verilen yönteme göre 4 saat ısıtılarak sentez edilir. 0.76 g (Verim %72).

Sarı renkli katı madde, 242°C de erir. Su ve kloroformda çözünmez; etanol, eter ve asetonda çözünür.

Kromatografi: R_f = 0.35

Elementel Analiz: $C_{15}H_{11}ClN_2OS$ (MA= 302.78 g/mol)

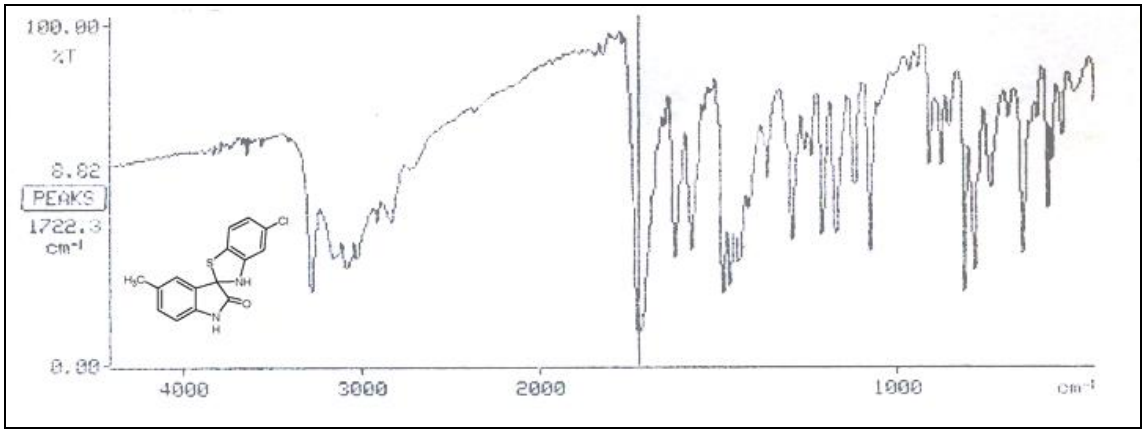
Hesaplanan C: 59.50; H: 3.66; N: 9.25.

Bulunan C: 59.35; H: 3.68; N: 9.07.

Spektral Bulgular:

UV λ (EtOH)$_{maks}$ nm (ε): 227.4 (94734.04); 256.0 (194489); 320.8 (10904.24).

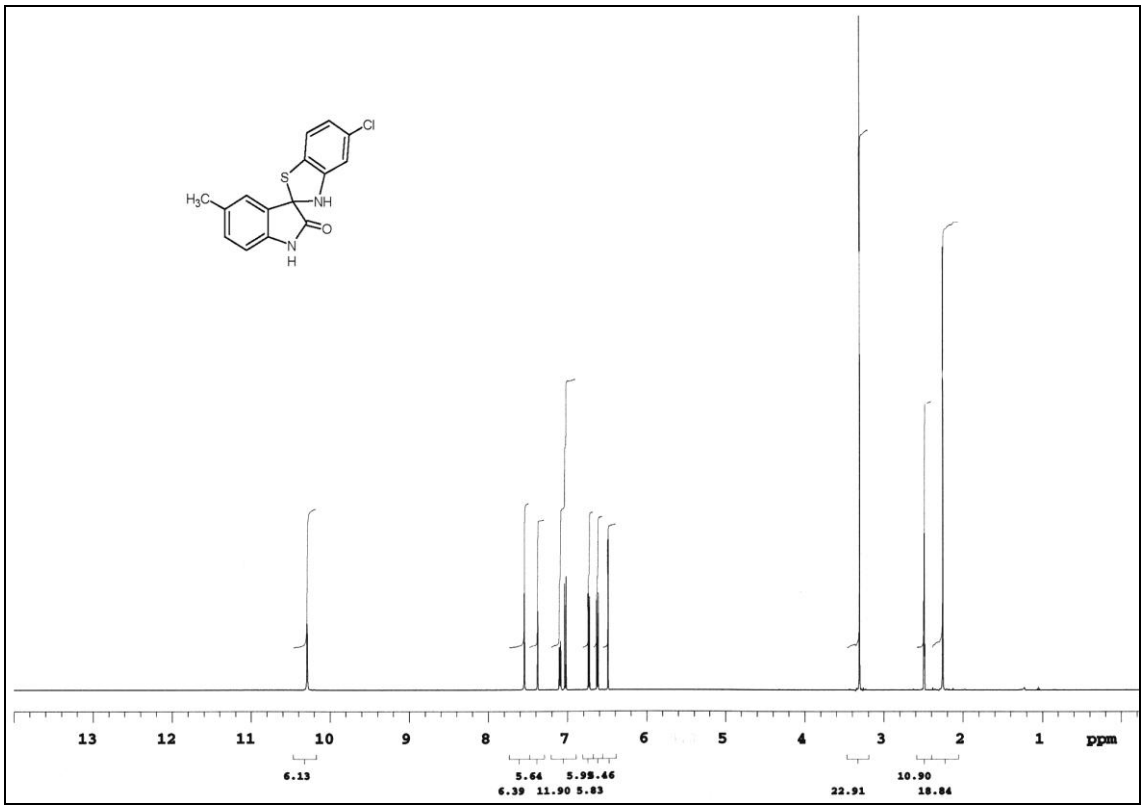
IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 3288, 3161 (N-H g.b.); 3084, 3030 (Ar. C-H g.b.); 2919, 2838 (alifatik, C-H g.b.); 1722 (C=O g.b.); 1625, 1577, 1491, 1471 (N-H e.b. ve Ar. C=C g.b.); 1446, 1367 (alifatik, C-H e.b.); 1298 (C-N g.b.); 1078 (C-Cl g.b.); 786 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 649 (C-S g.b.).



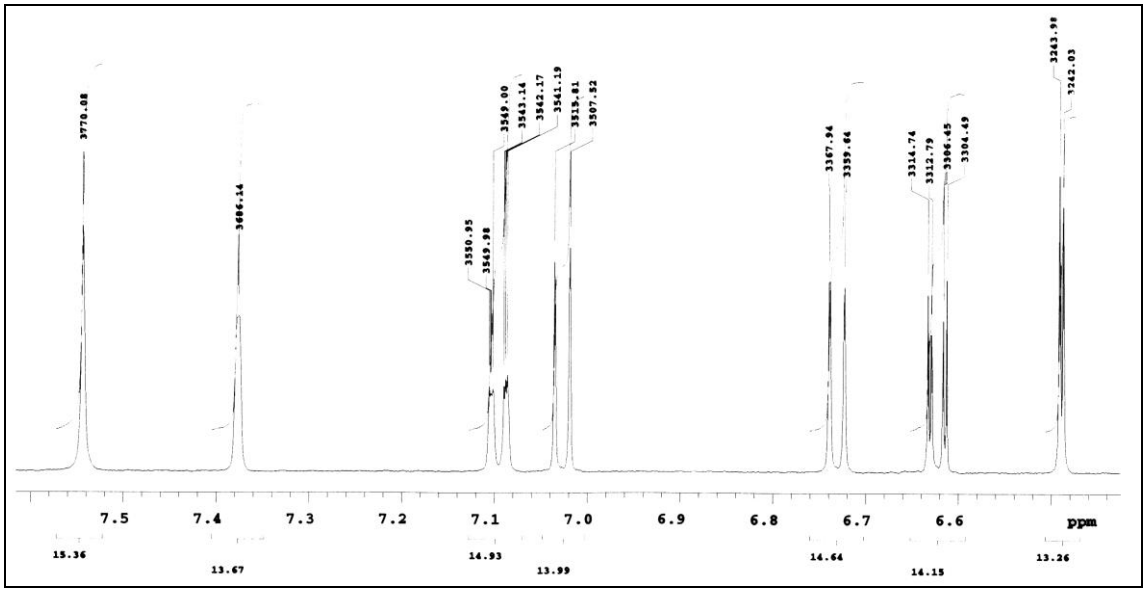
Şekil 4-11: Madde **3b**' nin IR Spektrumu

^{1}H-NMR (500 MHz) (DMSO-d$_6$/TMS) δ (ppm): 2.26 (3H, s, CH_3); 6.50 (1H, d, J=1.35 Hz, bt. C_4-H); 6.62 (1H, dd, J=8.29, 1.95 Hz, bt. C_6-H); 6.73 (1H, d, J=8.30 Hz, ind. C_7-H); 7.03 (1H, d, J=8.29 Hz, bt. C_7-H); 7.09 (1H, dd, J=7.81, 0.98 Hz, ind. C_6-H); 7.37 (1H, yaygın s, ind. C_4-H); 7.54 (1H, s, bt. N-H); 10.29 (1H, s, ind. N-H).

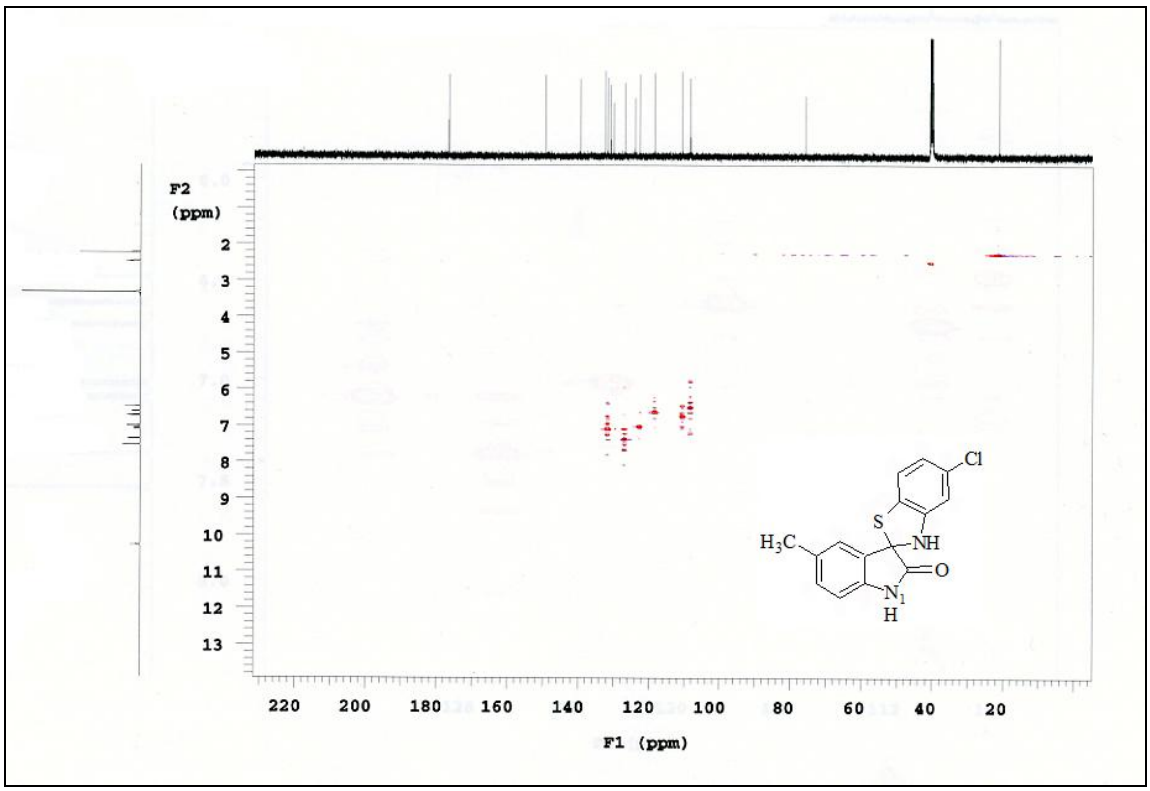
^{13}C-NMR (HSQC) (125 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 21.18 (CH_3); 75.75 (spiro C); 108.30 (bt. C_4); 110.66 (ind. C_7); 118.46 (bt. C_6); 122.64 (ind. C_6); 123.98 (ind. C_{3a}); 126.82 (ind. C_4); 129.97 (ind. C_5); 130.87 (bt. C_{7a}); 131.67 (bt. C_7); 132.38 (bt. C_5); 139.44 (ind. C_{7a}); 149.41 (bt. C_{3a}); 176.56 (ind. C=O).



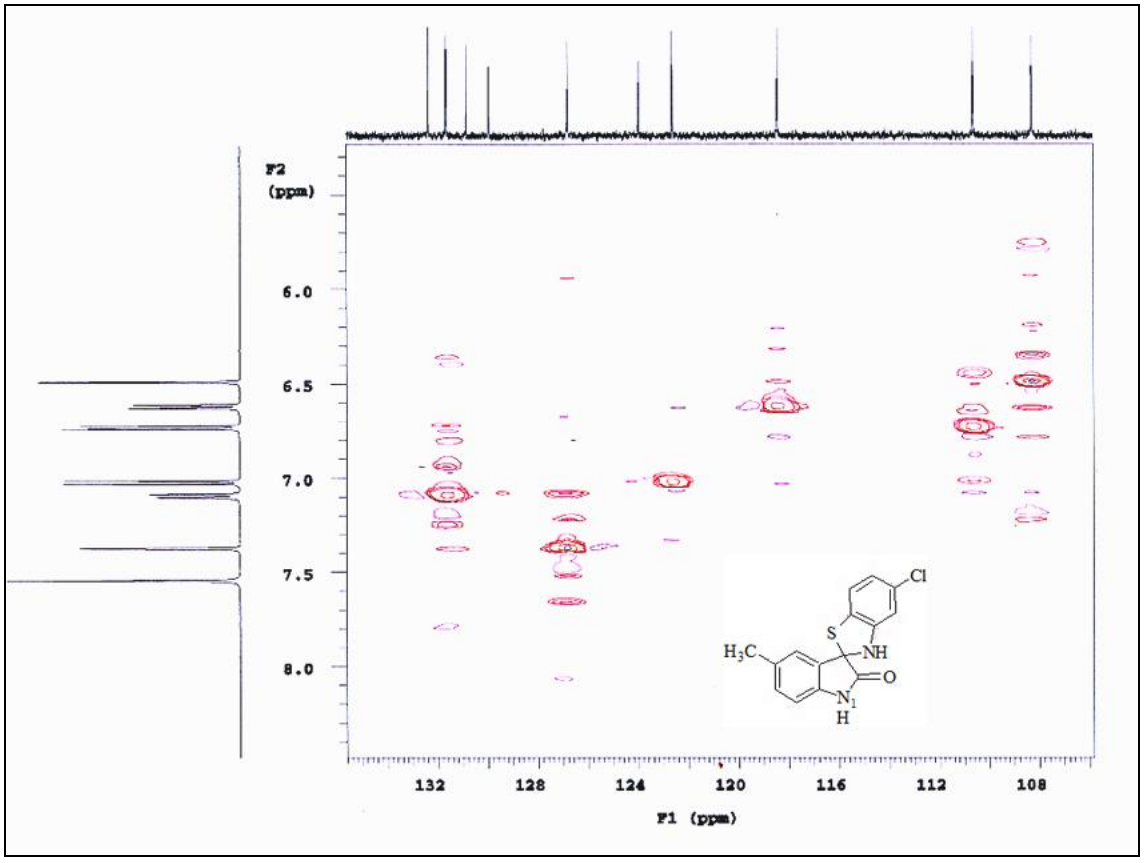
Şekil 4-12: Madde **3b**' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm)



Şekil 4-13: Madde **3b**' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (6.5-8.0 ppm)

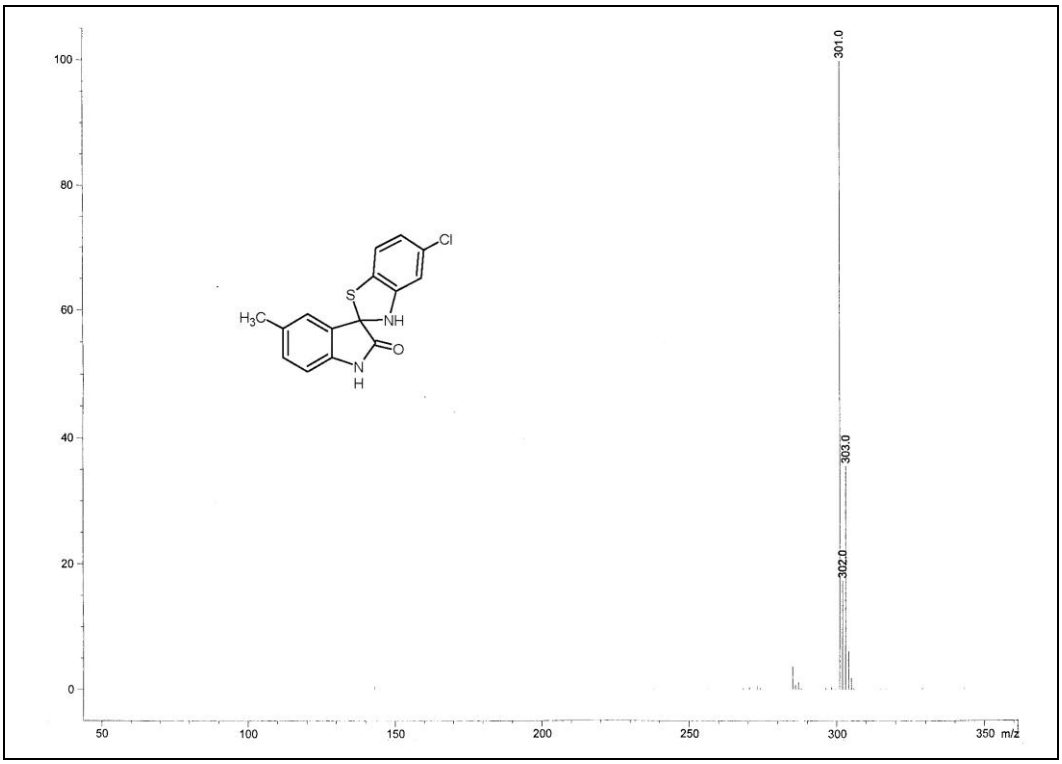


Şekil 4-14: Madde **3b**' nin HSQC spektrumu (0-200 ppm)



Şekil 4-15: Madde **3b**' nin HSQC spektrumu (106-136 ppm)

Kütle Spektrumu (APCI+): 303, 305 ($[M+H]^+$; 35, 1.9); 302, 304 (17, 6); 301, 303 (100, 35).



Şekil 4-16: Madde **3b**' nin Kütle Spektrumu (APCI+)

4.1.3. 5-Kloro-5'-(triflorometoksi)-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on (3c)

5-Triflorometoksi-1*H*-indol-2,3-dion (3.5 mmol) ile 2-amino-4-klorotiyofenolden (3.5 mmol) absolü etanollü ortamda 3.2' de verilen yönteme göre 4 saat ısıtılarak sentez edilir. 0.71 g (Verim %54).

Kırmızı renkli katı madde, 244°C de erir. Su ve kloroformda çözünmez; etanol, eter ve asetonda çözünür.

Kromatografi: R_f= 0.63

Elementel Analiz: $C_{15}H_8ClF_3N_2O_2S$ (MA= 372.75 g/mol)

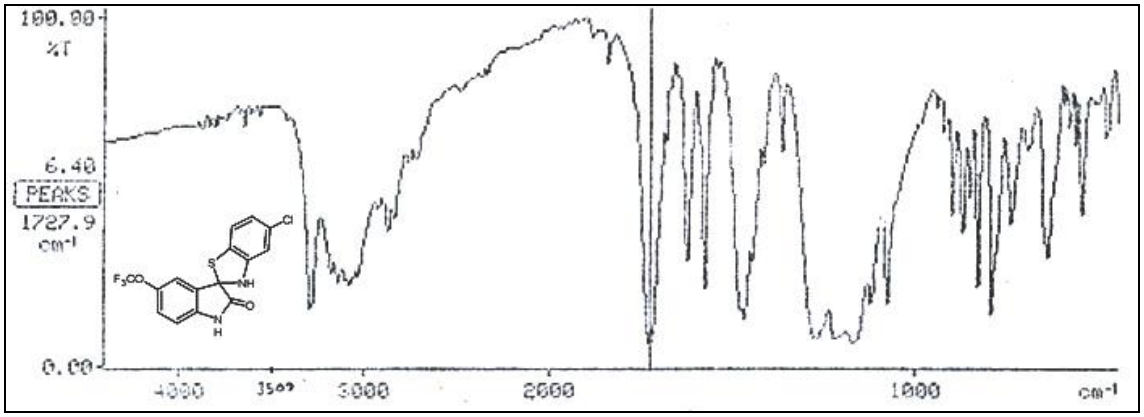
Hesaplanan C: 48.33; H: 2.16; N: 7.52.

Bulunan C: 48.35; H: 2.85; N: 7.67.

Spektral Bulgular:

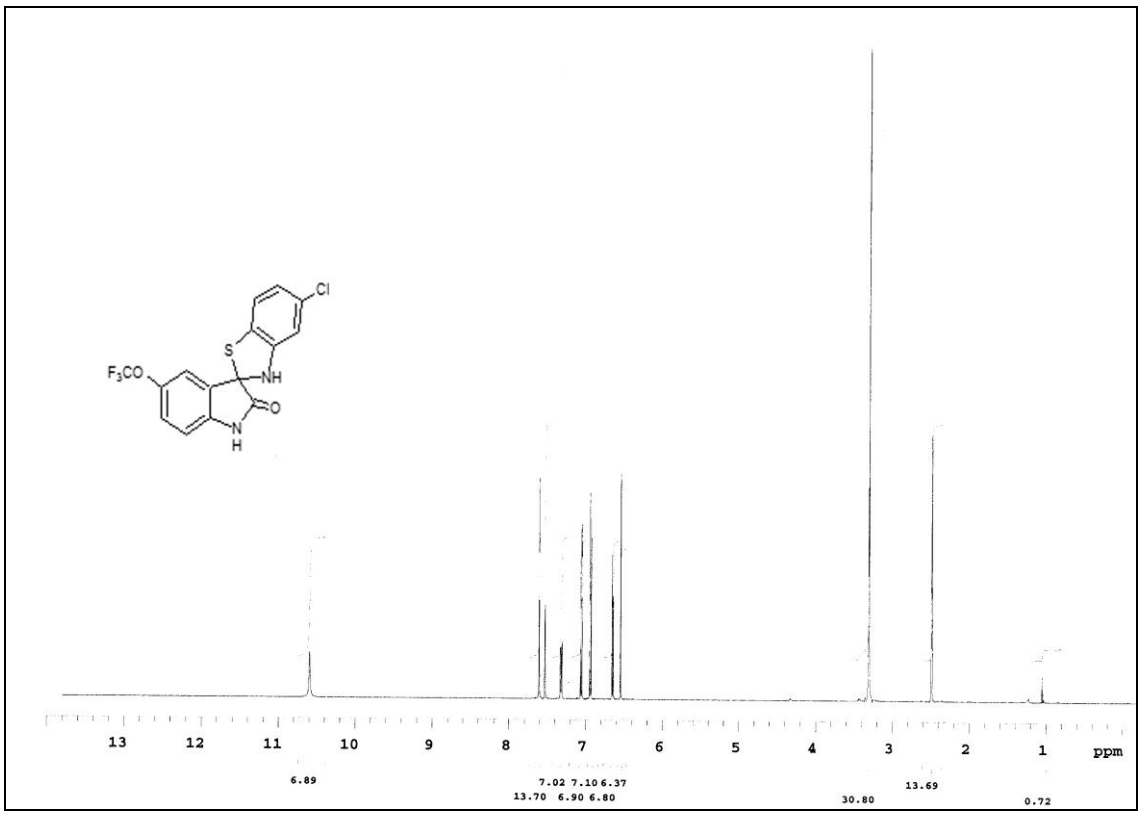
UV λ $(EtOH)_{maks}$ nm (ε): 225.0 (105357.14); 256.6 (204128.57); 318.8 (11000).

IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 3291, 3180 (N-H g.b.); 3084 (Ar. C-H g.b.); 1727 (C=O g.b.); 1627, 1579, 1471 (N-H e.b. ve Ar. C=C g.b.); 1278 (C-N g.b.); 1080 (C-O g.b.); 1172 (C-F g.b.); 1089 (C-Cl g.b.); 796 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 642 (C-S g.b.).

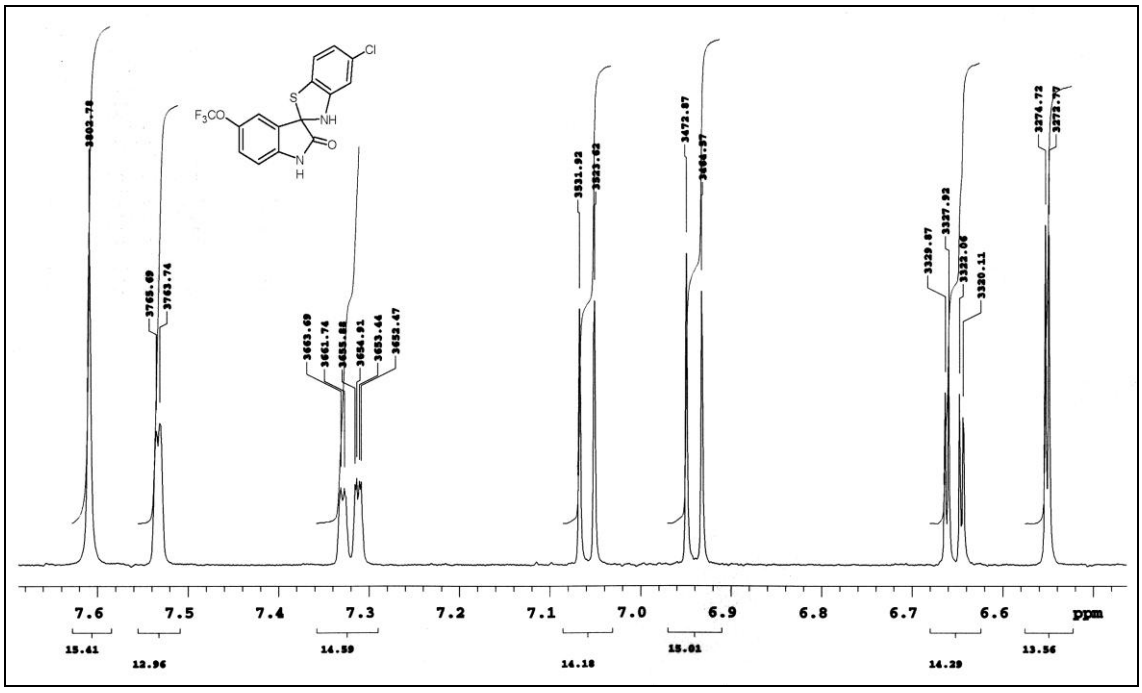


Şekil 4-17: Madde **3c**' nin IR Spektrumu

^{1}H-NMR (400 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 6.55 (1H, d, J=1.95 Hz, bt. C_4-H); 6.65 (1H, dd, J=7.81, 1.95 Hz, bt. C_6-H); 6.95 (1H, d, J=8.30 Hz, ind. C_7-H); 7.06 (1H, d, J=8.30 Hz, bt. C_7-H); 7.31 (1H, dd, J=8.30, 1.95 Hz, ind. C_6-H); 7.53 (1H, d, J=1.95 Hz, ind. C_4-H); 7.61 (1H, s, bt. N-H); 10.60 (1H, s, ind. N-H).



Şekil 4-18: Madde **3c**' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm)



Şekil 4-19: Madde **3c**' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (6.5-7.6 ppm)

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

5-Floro-1*H*-indol-2,3-dion (3.5 mmol) ile 2-amino-4-klorotiyofenolden (3.5 mmol) absolü etanollü ortamda 3.2' de verilen yönteme göre 4 saat ısıtılarak sentez edilir. 0.60 g (Verim %56).

Kırmızı renkli katı madde, 238°C de erir. Su ve kloroformda çözünmez; etanol, eter ve asetonda çözünür.

Kromatografi: R_f = 0.58

Elementel Analiz: $C_{14}H_8ClFN_2OS$ (MA= 306.74 g/mol)

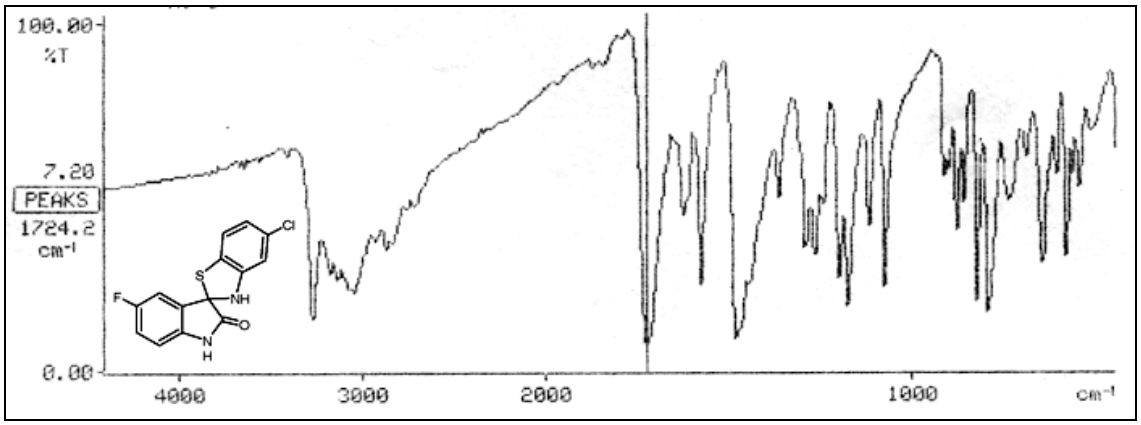
Hesaplanan C: 54.82; H: 2.63; N: 9.13.

Bulunan C: 54.52; H: 2.79; N: 9.11.

Spektral Bulgular:

UV λ (EtOH)$_{maks}$ nm (ε): 226.4 (86534.09); 257.2 (17670.45); 320.0 (10568.18).

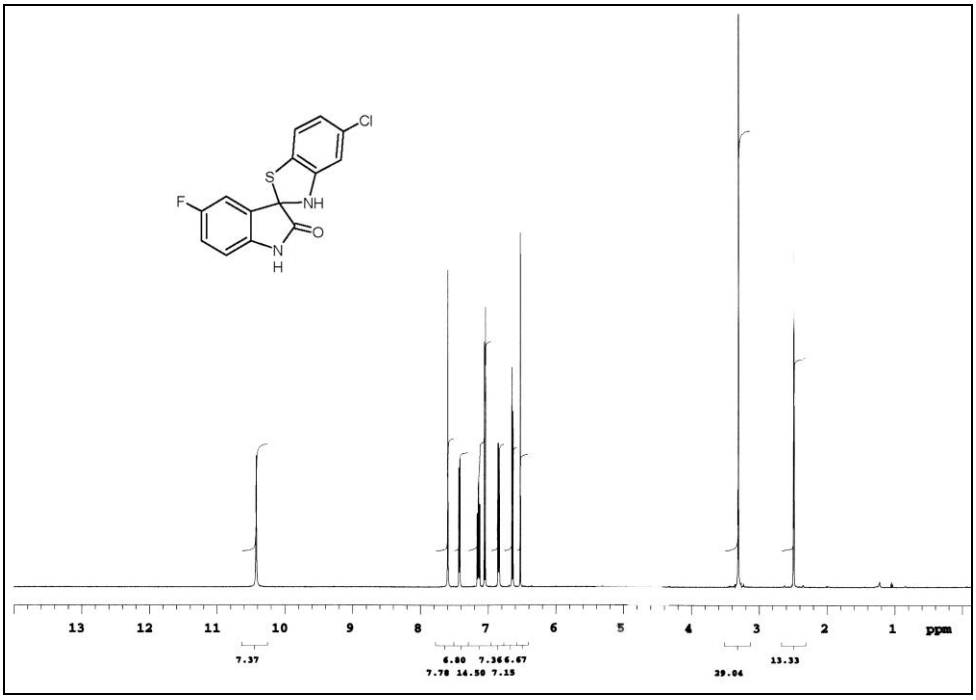
IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 3277, 3179, 3138 (N-H g.b.); 3052 (Ar. C-H g.b.); 1724 (C=O g.b.); 1627, 1578, 1483 (N-H e.b. ve Ar. C=C g.b.); 1293 (C-N g.b.); 1178 (C-F g.b.); 1078 (C-Cl g.b.); 795 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 647 (C-S g.b.).



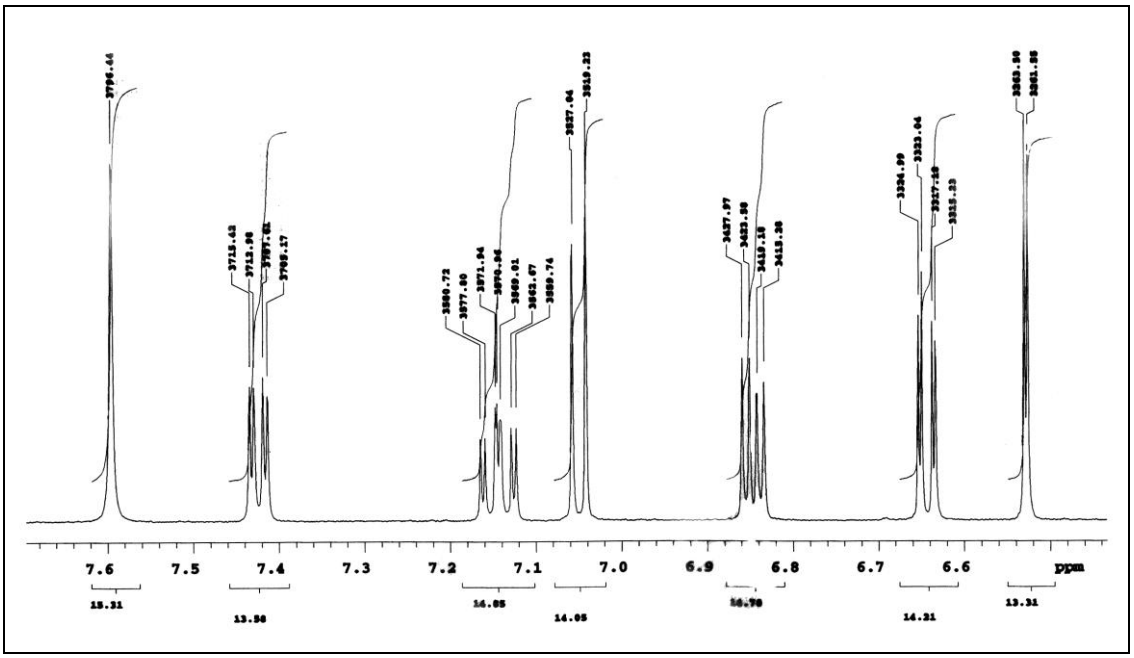
Şekil 4-20: Madde **3d**' nin IR Spektrumu

^{1}H-NMR (400 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 6.53 (1H, d, J=1.95 Hz, bt. C_4-H); 6.64 (1H, dd, J=7.81, 1.95 Hz, bt. C_6-H); 6.85 (1H, dd, J=8.54, 4.14 Hz, ind. C_7-H); 7.05 (1H, d, J=7.81 Hz, bt. C_7-H); 7.15 (1H, ddd (td), J=8.78, 8.29, 2.92 Hz, ind. C_6-H); 7.43 (1H, dd, J=7.81, 2.44 Hz, ind. C_4-H); 7.60 (1H, s, bt. N-H,); 10.42 (1H, s, ind. N-H).

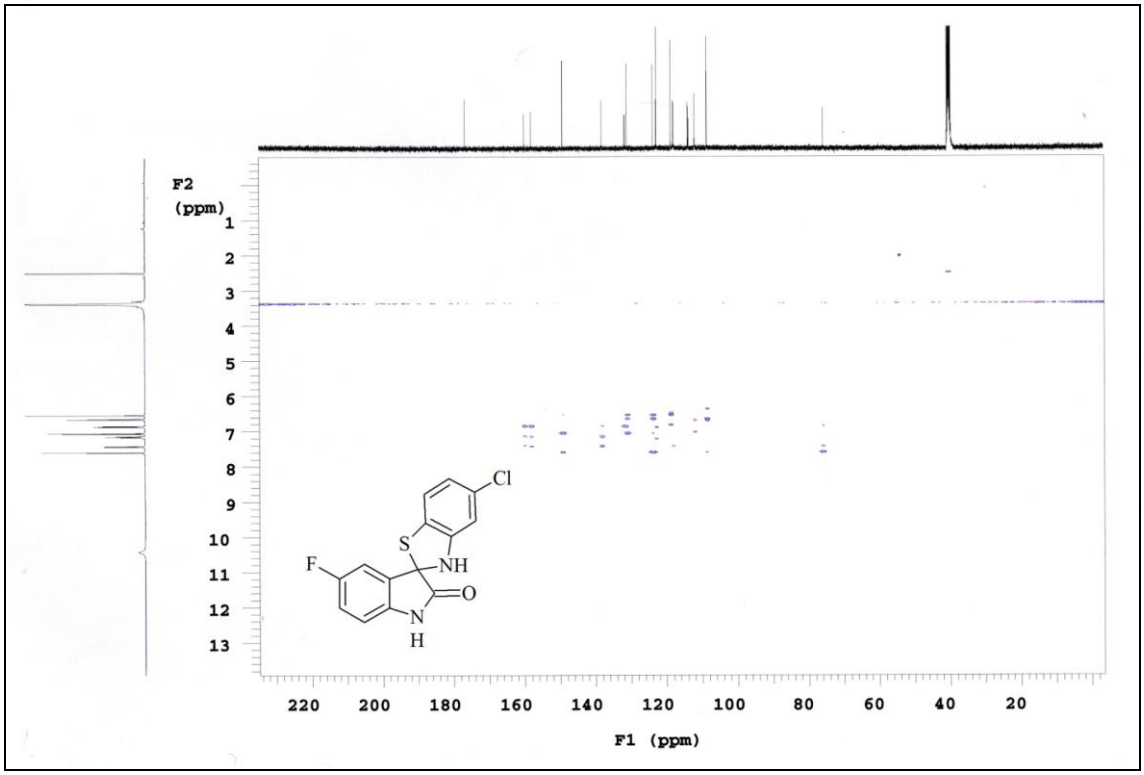
^{13}C-NMR (HMBC)(125 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 75.77 (spiro C, d, J =1.44); 108.56 (bt. C_4); 111.98 (ind. C_7, d, J=7.67 Hz); 113.79 (ind. C_4, d, J = 24.93 Hz); 117.96 (ind. C_6, d, J = 23.49); 118.70 (bt. C_6); 122.76 (bt. C_7); 123.75 (bt. C_{7a}); 131.18 (bt. C_5); 131.66 (ind. C_{3a}, d, J=7.67 Hz); 138.13 (ind. C_{7a}, d, J= 1.92 Hz); 149.21 (bt. C_{3a}); 159.04 (ind. C_5, d, J=238.68); 176.66 (ind. C=O).



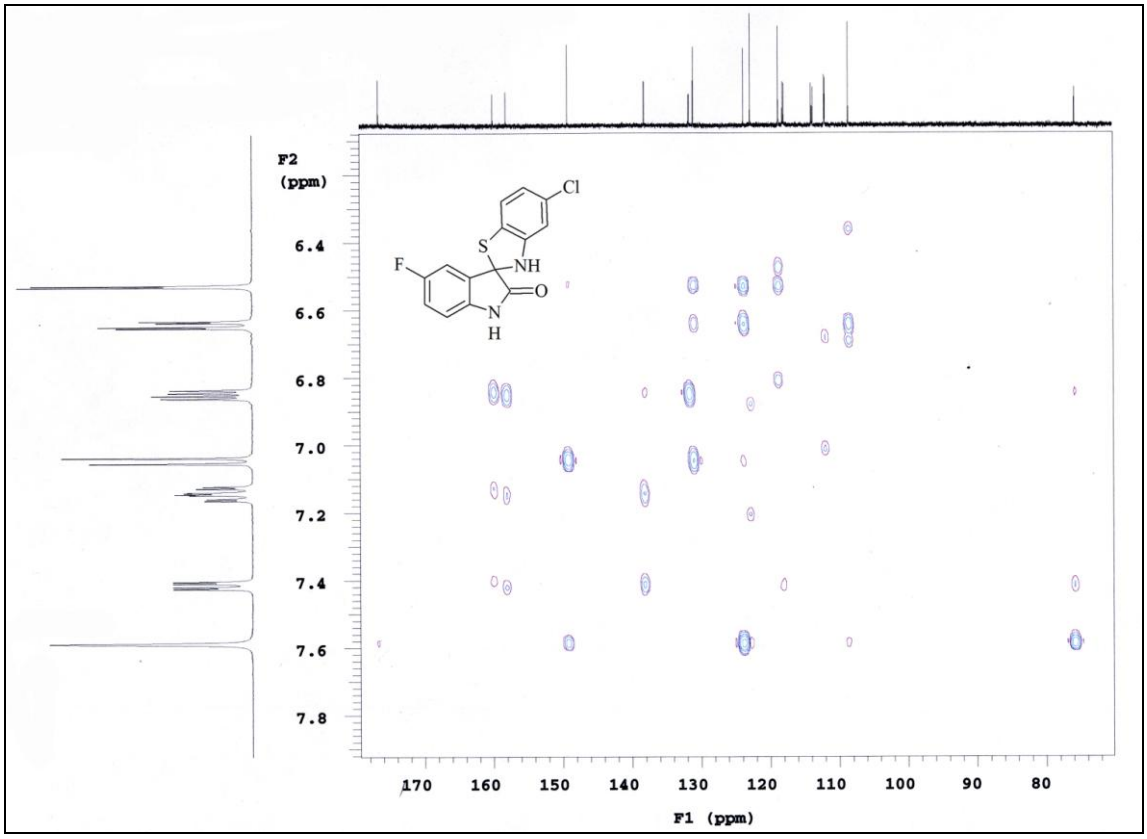
Şekil 4-21: Madde **3d**' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm)



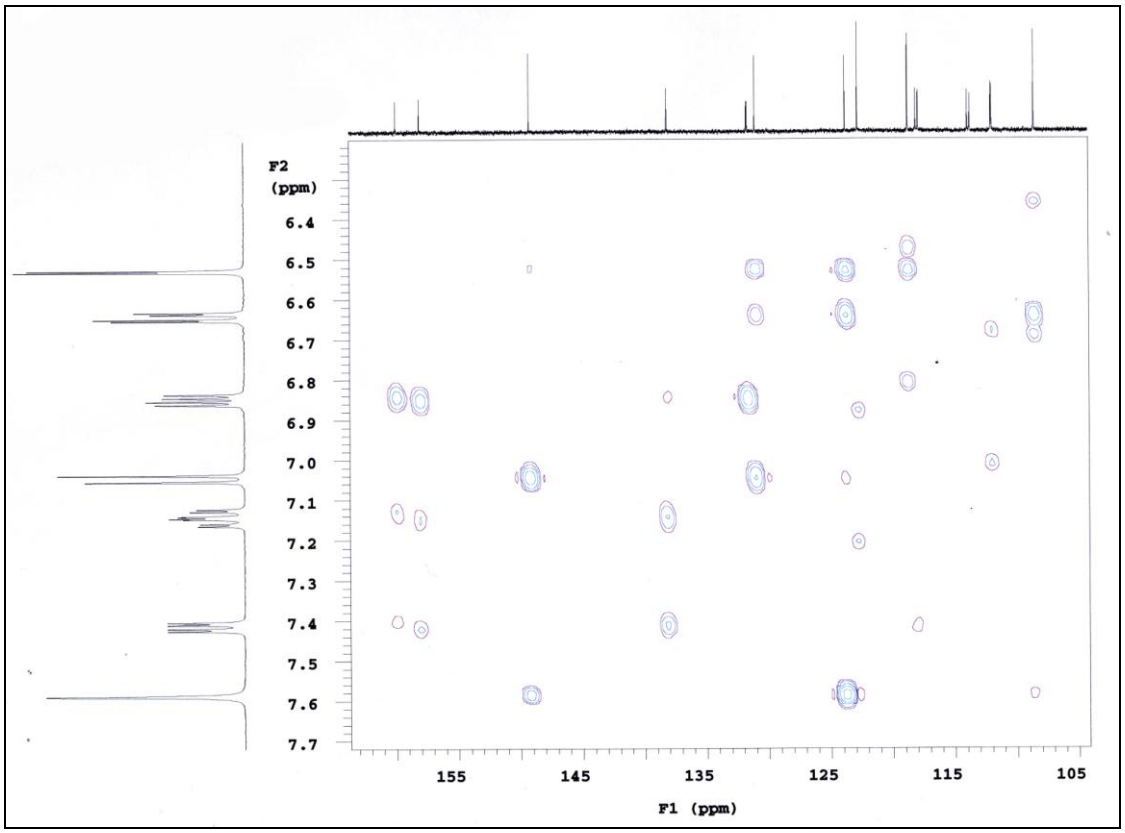
Şekil 4-22: Madde **3d**' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (6.5-7.6 ppm)



Şekil 4-23: Madde **3d**' nin HMBC Spektrumu (0-220 ppm)

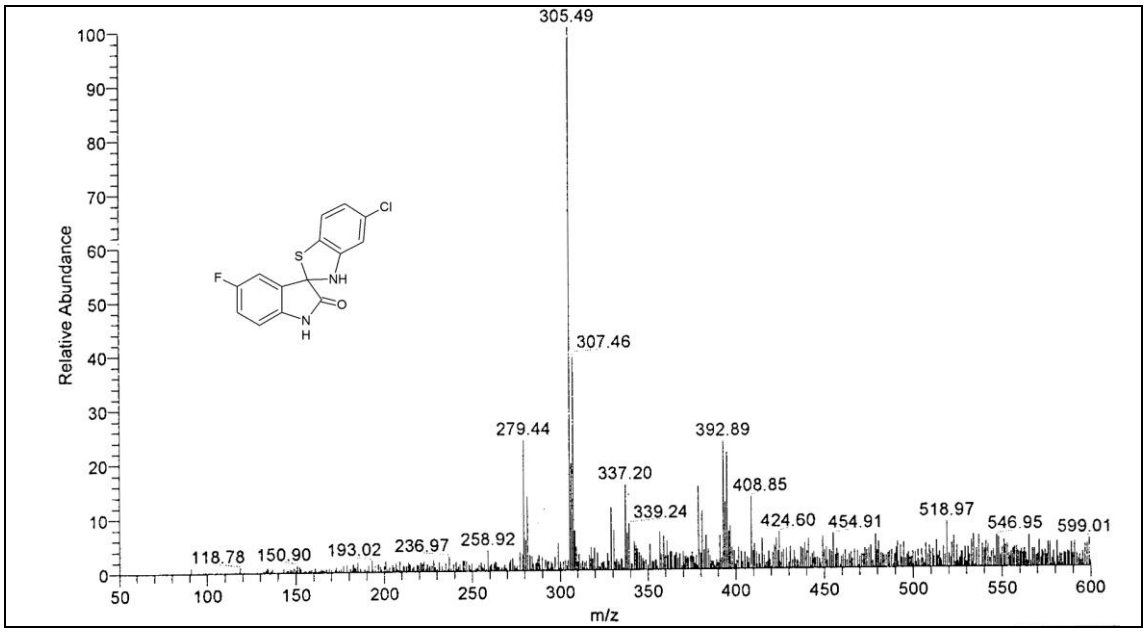


Şekil 4-24: Madde **3d**' nin HMBC Spektrumu (70-170 ppm)



Şekil 4-25: Madde **3d**' nin HMBC Spektrumu (105-165 ppm)

Kütle Spektrumu (ESI+) m/z (%): 307, 309 ($[M+H]^+$; 40, 9); 306, 308 (20, 7); 305, 307 (100, 40); 279, 281 (25, 13).



Şekil 4-26: Madde **3d**' nin Kütle Spektrumu (ESI+)

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

5-Kloro-1*H*-indol-2,3-dion (3.5 mmol) ile 2-amino-4-klorotiyofenolden (3.5 mmol) absolü etanollü ortamda 3.2' de verilen yönteme göre 4 saat ısıtılarak sentez edilir. 0.71 g (Verim %63).

Sarı renkli katı madde, 238°C de erir. Su ve kloroformda çözünmez; etanol, eter ve asetonda çözünür.

Kromatografi: R_f = 0.40

Elementel Analiz: $C_{14}H_8Cl_2N_2OS$ (MA= 323.20 g/mol)

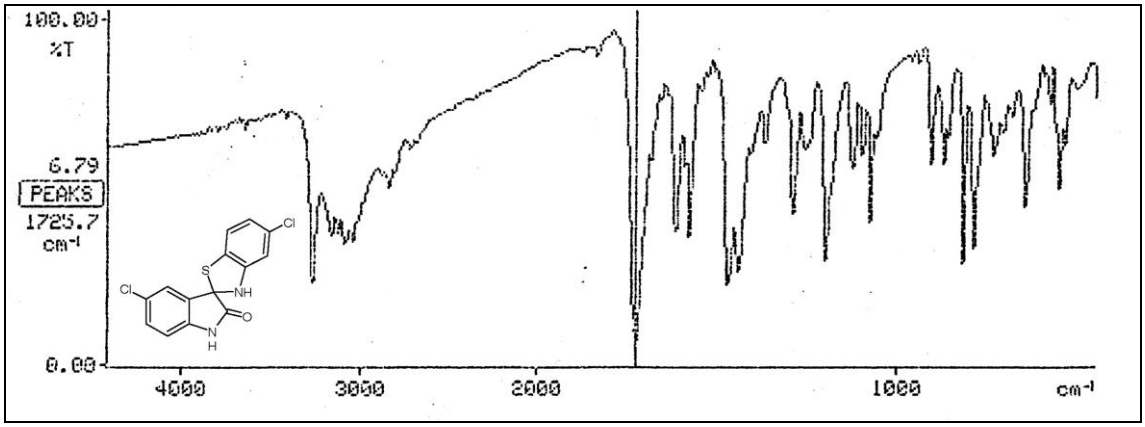
Hesaplanan C: 52.03; H: 2.49; N: 8.67.

Bulunan C: 51.91; H: 2.95; N: 8.72.

Spektral Bulgular:

UV λ $(EtOH)_{maks}$ nm (ε): 226.2 (101556.89); 260.0 (21317.37); 320.2 (10479.04).

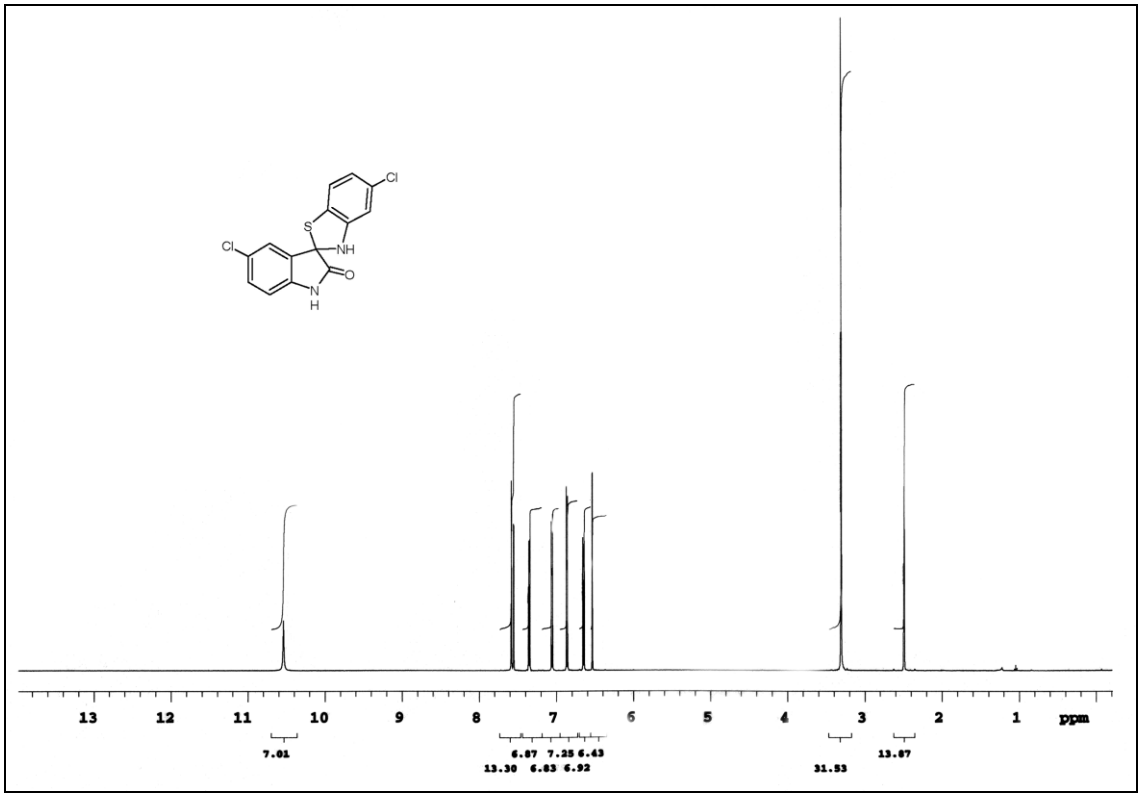
IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 3276, 3168, 3133 (N-H g.b.); 3095, 3047 (Ar. C-H g.b.); 1725 (C=O g.b.); 1616, 1589, 1577, 1470 (N-H e.b. ve Ar. C=C g.b.); 1292 (C-N g.b.); 1078 (C-Cl g.b.); 792 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 648 (C-S g.b.).



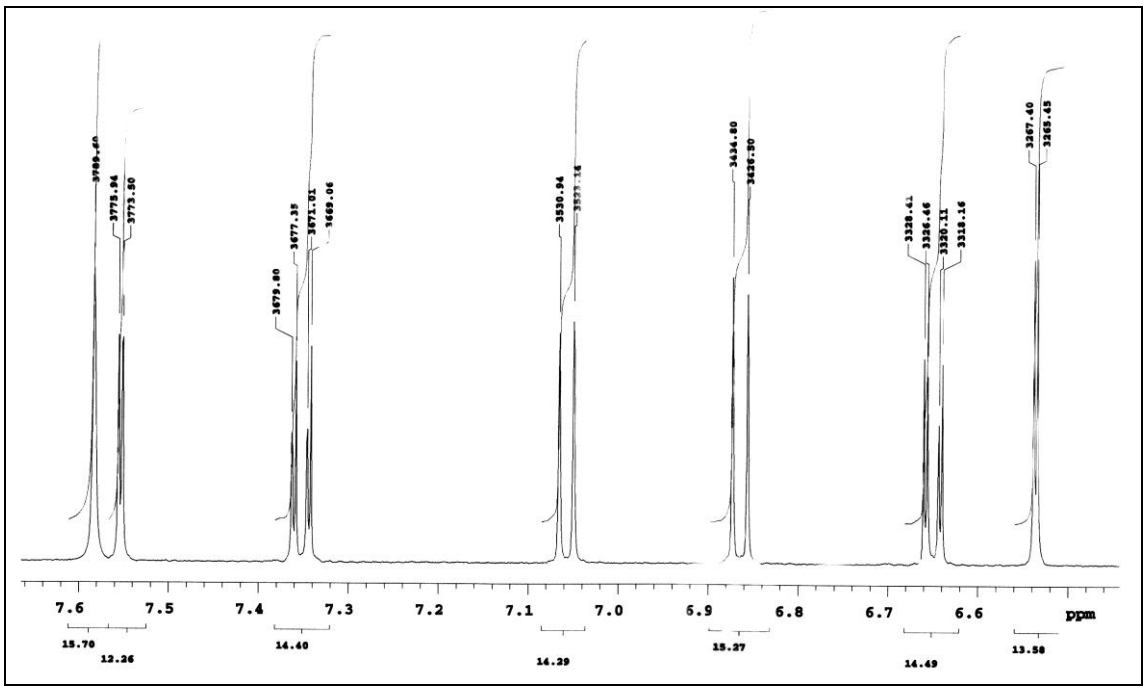
Şekil 4-27: Madde **3e**' nin IR Spektrumu

^{1}H-NMR (400 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 6.53 (1H, d, J=1.95 Hz, bt. C_4-H); 6.65 (1H, dd, J=8.30, 1.95 Hz, bt. C_6-H); 6.86 (1H, d, J=8.30 Hz, , ind. C_7-H); 7.06 (1H, d, J=7.8 Hz, bt. C_7-H); 7.35 (1H, dd, J=8.54, 1.95 Hz, , ind. C_6-H); 7.55 (1H, d, J=2.44 Hz, , ind. C_4-H); 7.58 (1H, s, bt. N-H); 10.54 (1H, s, ind. N-H).

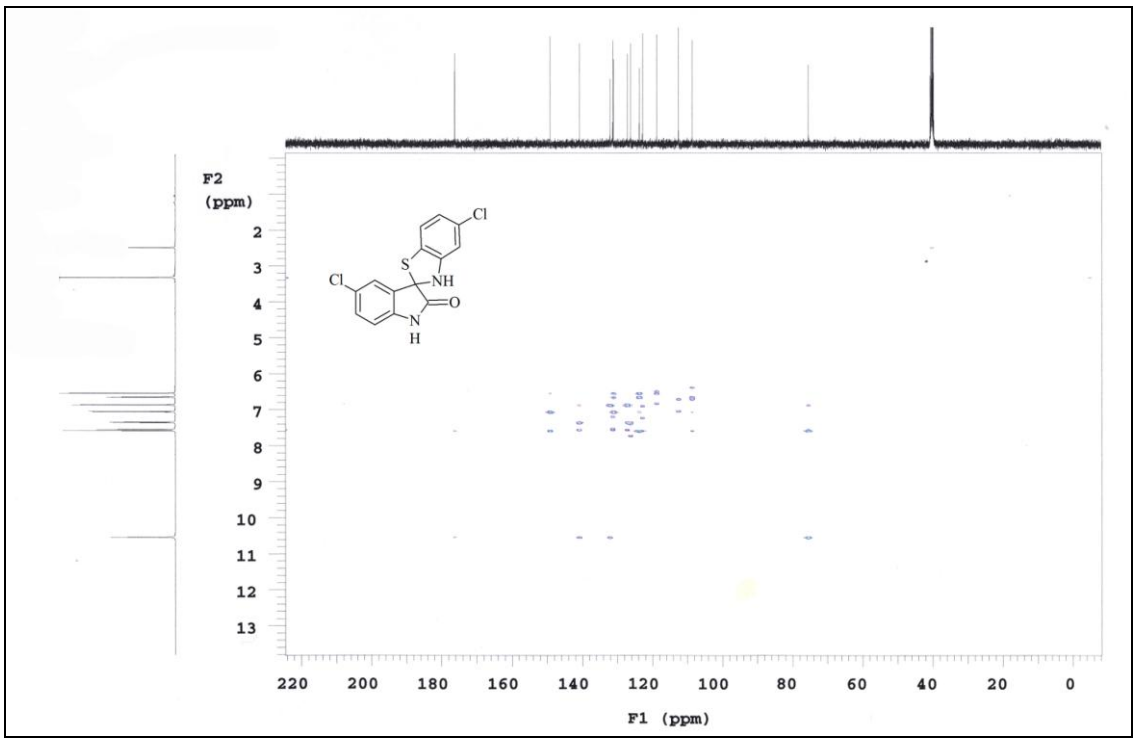
^{13}C-NMR (HMBC)(125 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 75.54 (spiro C); 108.62 (bt. C_4); 112.51 (ind. C_7); 118.76 (bt. C_6); 122.78 (bt. C_7); 123.72 (bt. C_{7a}); 126.21 (ind. C_4); 127.16 (ind. C_5); 131.05 (ind. C_6); 131.29 (bt. C_5); 132.11 (ind. C_{3a}); 140.86 (ind. C_{7a}); 149.12 (bt. C_{3a}); 176.31 (ind. C=O).



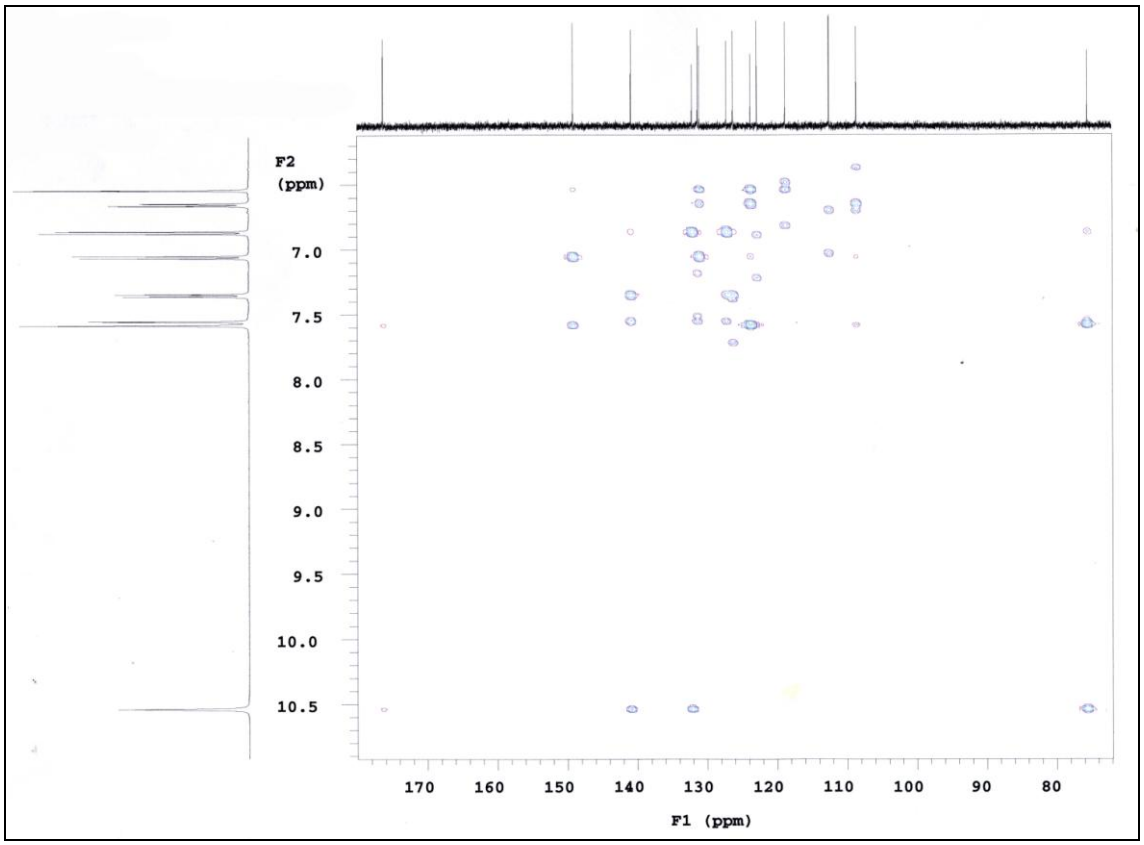
Şekil 4-28: Madde **3e**' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm)



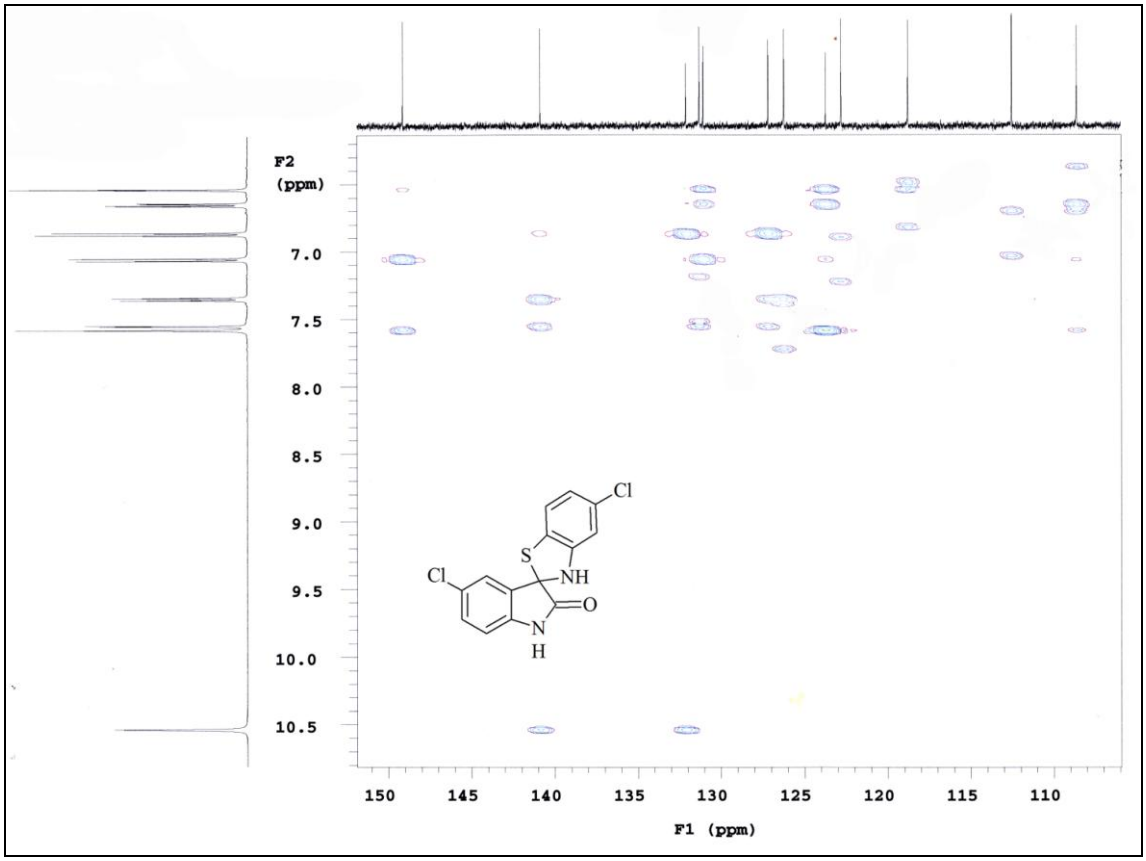
Şekil 4-29: Madde **3e**' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (6.5-7.6 ppm)



Şekil 4-30: Madde **3e**' nin HMBC Spektrumu (0-200 ppm)

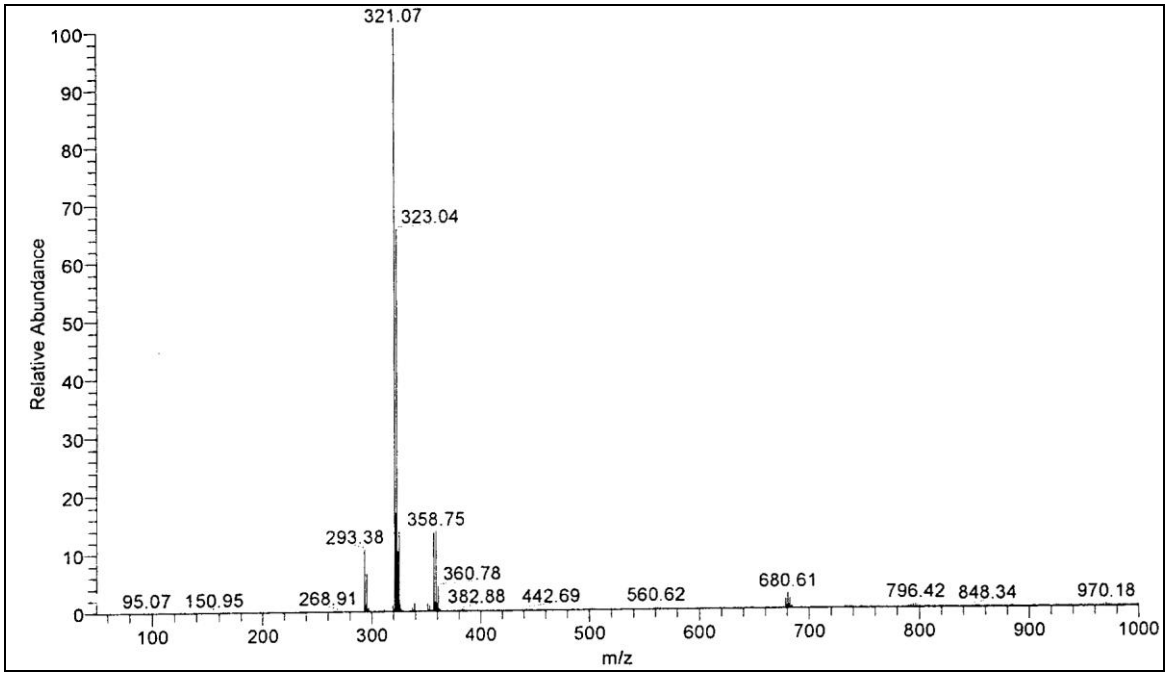


Şekil 4-31: Madde **3e**' nin HMBC Spektrumu (70-180 ppm)



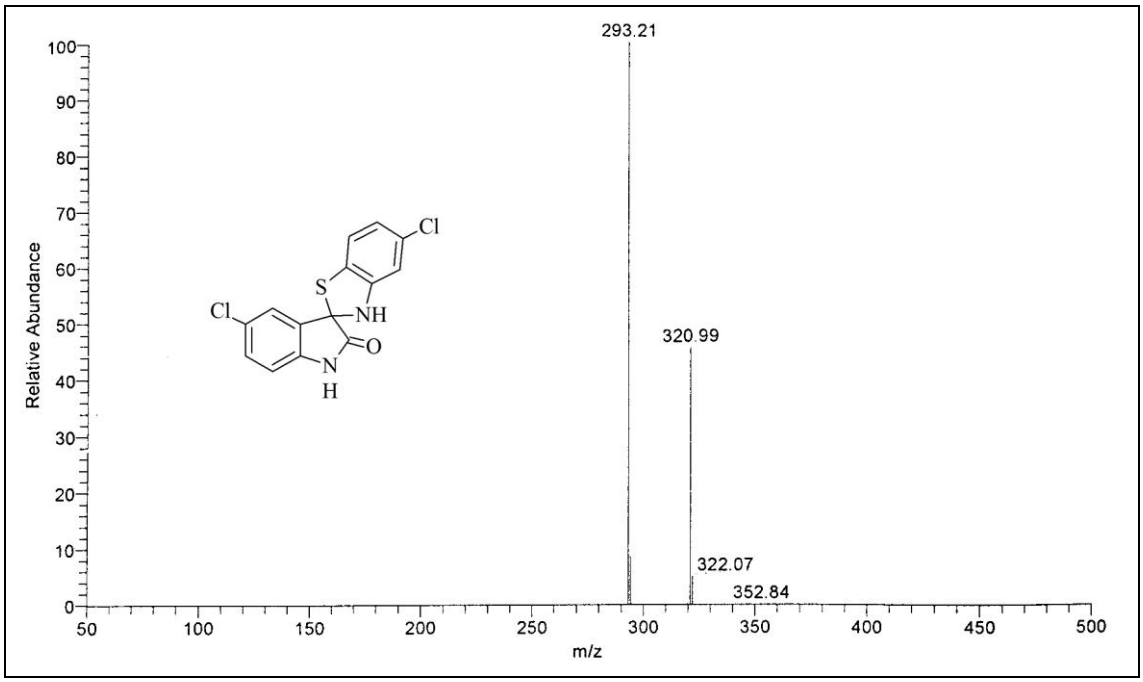
Şekil 4-32: Madde **3e**' nin HMBC Spektrumu (105-150 ppm)

Kütle Spektrumu (ESI-) m/z (%): 321, 323, 325 ([M-H]$^-$; 100, 65, 13); 293, 295, 297 (11, 6.5, 1.2).



Şekil 4-33: Madde **3e**' nin Kütle Spektrumu (ESI-)

Kütle Spektrumu MS-MS (ESI-) m/z (%): 321([M-H]$^-$, 45); 293 (100).



Şekil 4-34: Madde **3e**' nin MS-MS Spektrumu (ESI-)

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

5-Bromo-1*H*-indol-2,3-dione (3.5 mmol) ile 2-amino-4-klorotiyofenolden (3.5 mmol) absolü etanollü ortamda 3.2' de verilen yönteme göre 4 saat ısıtılarak sentez edilir. 0.72g (Verim %56).

Koyu sarı renkli katı madde, 237°C de erir. Su ve kloroformda çözünmez; etanol, eter ve asetonda çözünür.

Kromatografi: R_f= 0.59

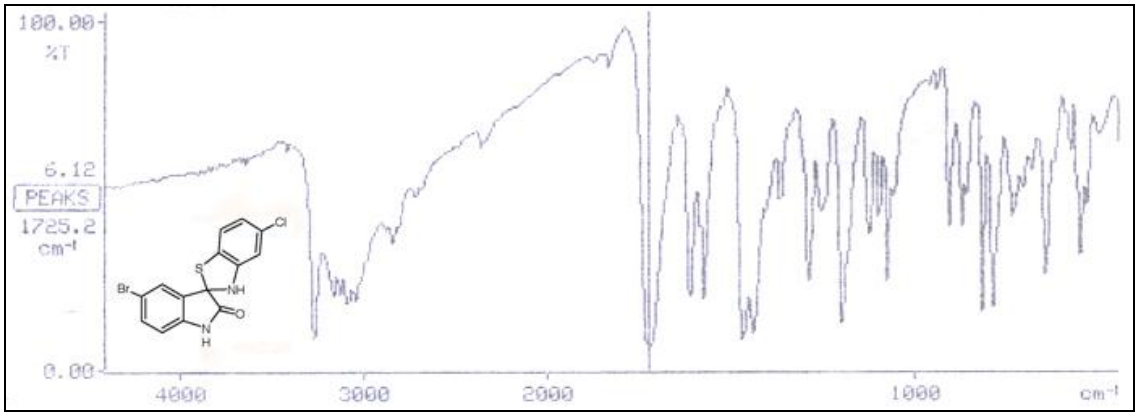
Elementel Analiz: $C_{14}H_8BrClN_2OS$ (MA= 367.65 g/mol)
Hesaplanan C: 45.74; H: 2.19; N: 7.62.

Bulunan C: 45.55; H: 1.73; N: 7.29.

Spektral Bulgular:

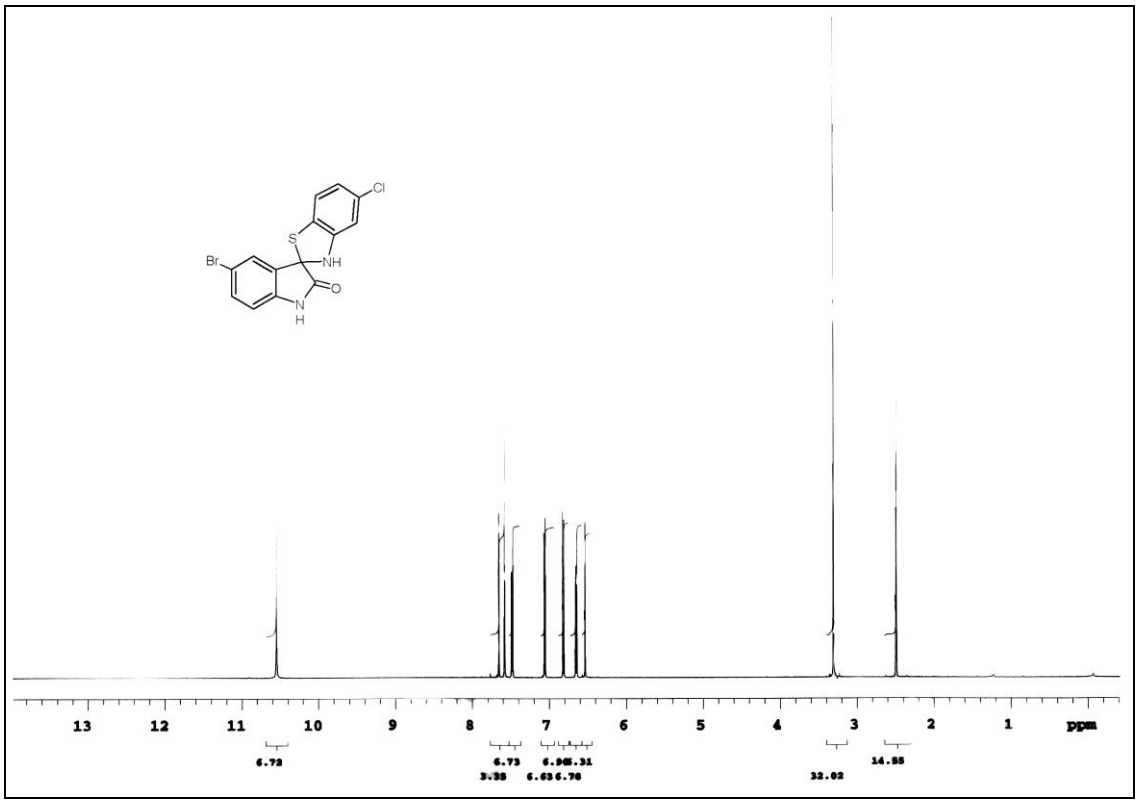
UV λ (EtOH)$_{maks}$ nm (ε): 226.4 (101456.33); 261.0 (21805.56); 319.8 (9930.56).

IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 3276, 3168, 3133 (N-H g.b.); 3096, 3047 (Ar. C-H g.b.); 1725 (C=O g.b.); 1616, 1589, 1577,1470 (N-H e.b. ve Ar. C=C g.b.); 1292 (C-N g.b.); 1178 (C-F g.b.); 1078 (C-Cl g.b.); 792 (1,2,4-trisübstitüye benzen C-H e.b. ve C-Br g.b.); 648 (C-S g.b.).

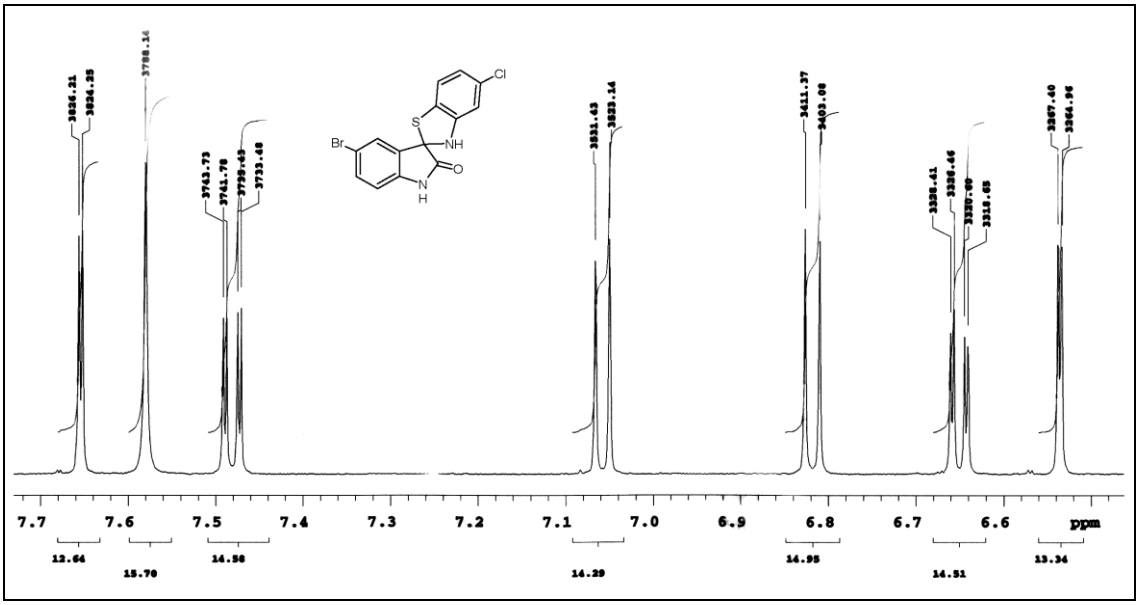


Şekil 4-35: Madde **3f**' nin IR Spektrumu

^{1}H-NMR (400 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 6.53 (1H, d, J= 2.44 Hz, bt. C_4-H); 6.65 (1H, dd, J= 7.81, 1.95 Hz, bt. C_6-H); 6.82 (1H, d, J= 8.29 Hz, ind. C_7-H); 7.06 (1H, d, J= 8.29 Hz, bt. C_7-H); 7.48 (1H, dd, J= 8.30, 1.95 Hz, ind. C_6-H); 7.58 (1H, s, bt. N-H); 7.65 (1H, d, J= 1.96 Hz, ind. C_4-H); 10.55 (1H, s, ind. N-H).



Şekil 4-36: Madde **3f**' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm)



Şekil 4-37: Madde **3f**' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (6.5-7.7 ppm)

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

5-Nitro-1*H*-indole-2,3-dion **(**3.5 mmol) ile 2-amino-4-klorotiyofenolden (3.5 mmol) absolü etanollü ortamda 3.2' de verilen yönteme göre 6 saat ısıtılarak sentez edilir. 0.68g (Verim %58).

Kahverengi renkli katı madde, 227°C' de erir. Su ve kloroformda çözünmez; etanol, eter ve asetonda çözünür.

Kromatografi: R_f= 0.74

Elementel Analiz: $C_{14}H_8ClN_3O_3S$ (MA= 333.75 g/mol)

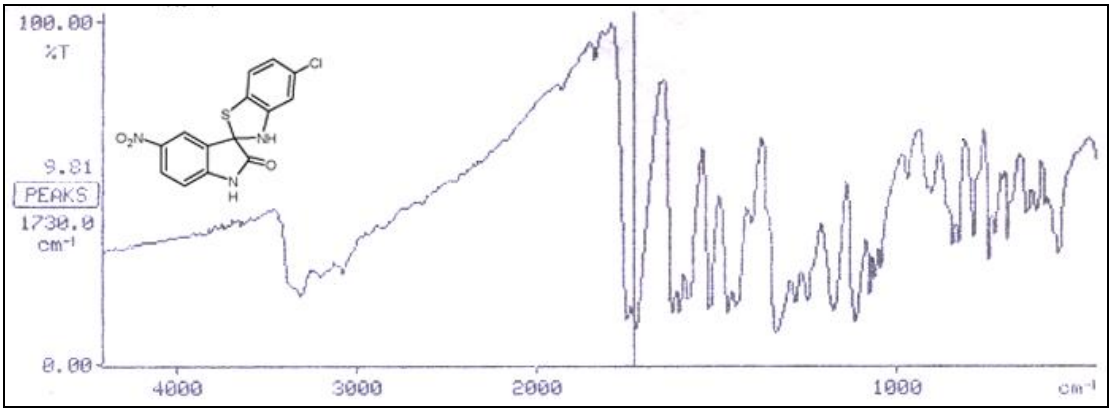
Hesaplanan C: 50.38; H: 2.42; N: 12.59.

Bulunan C: 50.48; H: 2.27; N: 12.27.

Spektral Bulgular:

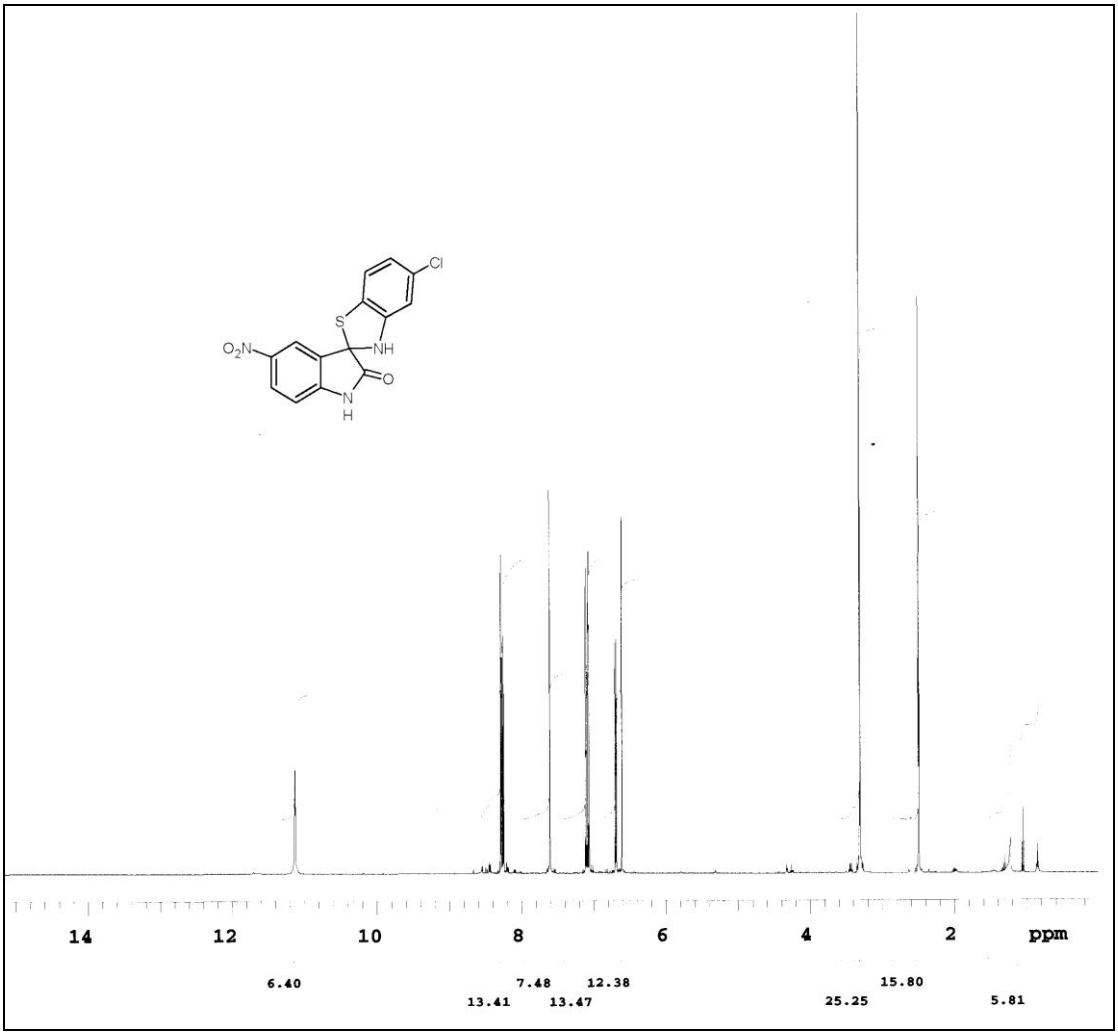
UV λ (EtOH)$_{maks}$ nm (ε): 226.4 (90745.34); 256.0 (21385.54); 322.0 (31863.35).

IR (KBr) ν_{maks} (cm^{-1}): 3312, 3189 (N-H g.b.); 3083 (Ar. C-H g.b.); 1730 (C=O g.b.); 1606, 1580, 1446 (N-H e.b. ve Ar. C=C g.b.); 1522, 1336 (N=O g.b.); 1285 (C-N g.b.); 1080 (C-Cl g.b.); 793 (1,2,4-trisübstitüe benzen C-H e.b.); 645 (C-S g.b.).

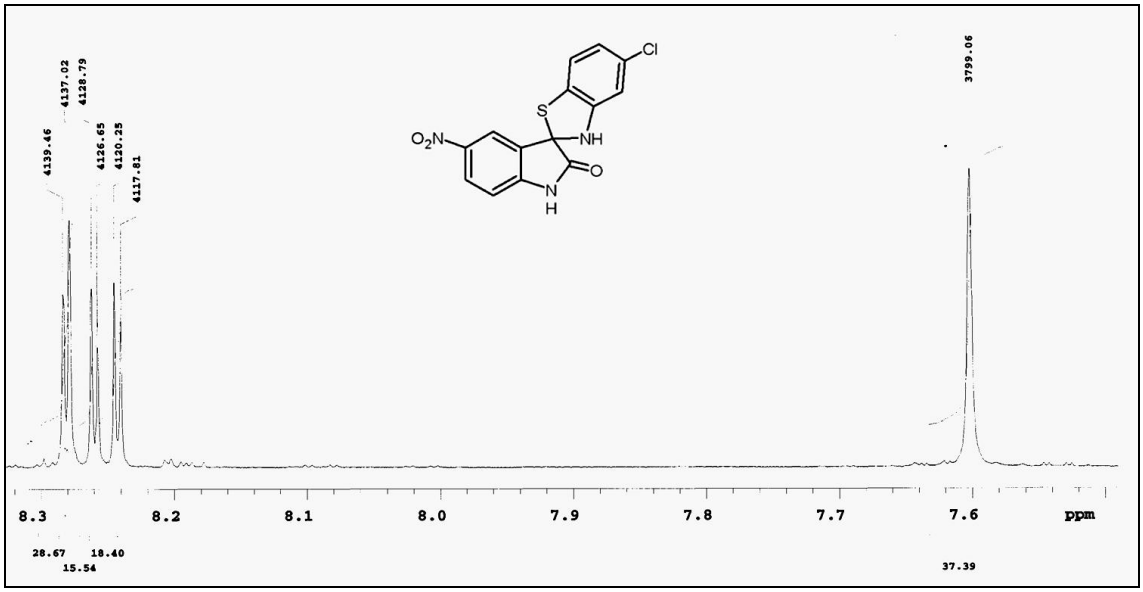


Şekil 4-38: Madde **3g**' nin IR Spektrumu

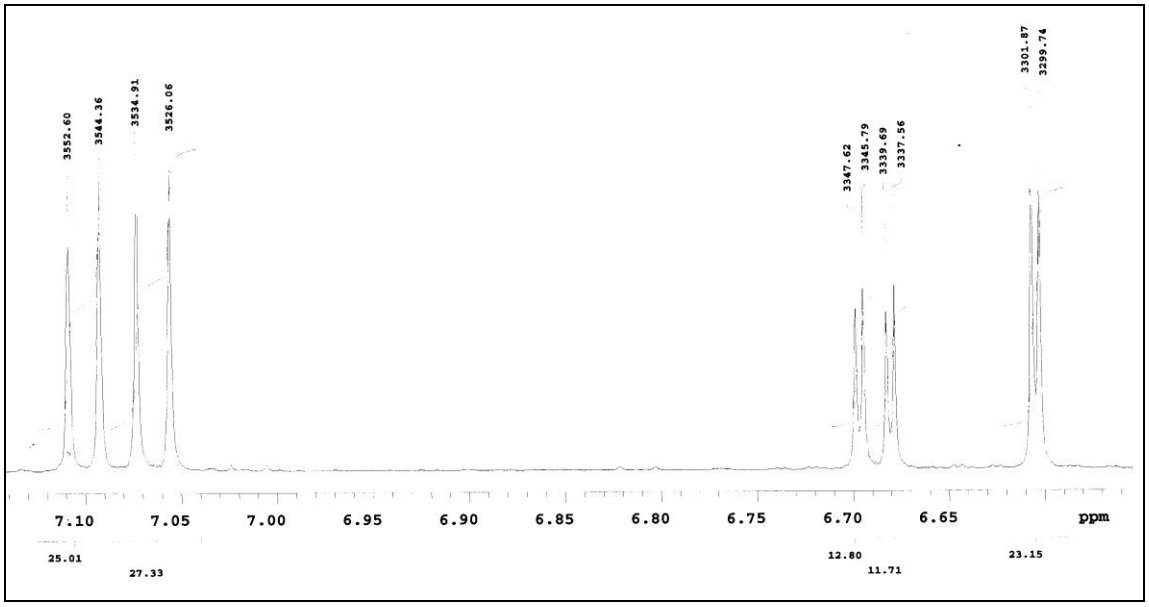
^{1}H-NMR (400 MHz) (DMSO-d_6/TMS) δ (ppm): 6.60 (1H, d, J= 2.13 Hz, bt. C_4-H); 6.69 (1H, dd, J= 8.23, 2.13 Hz, bt. C_6-H); 7.06 (1H, d, J= 8.85 Hz, ind. C_7-H); 7.10 (1H, d, J= 8.24 Hz, bt. C_7-H); 7.60 (1H, s, bt. NH); 8.25 (1H, dd, J= 8.25, 2.44 Hz, ind. C_6-H); 8.28 (1H, d, J= 2.44 Hz, ind. C_4-H); 11.12 (1H, s, ind. NH).



Şekil 4-39: Madde **3g**' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (0-14 ppm)



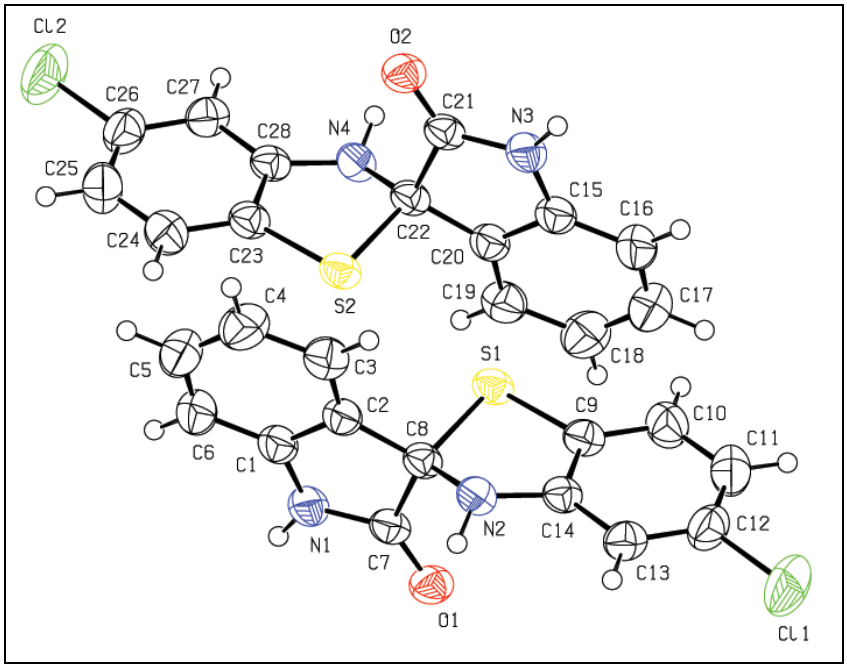
Şekil 4-40: Madde **3g**' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (7.5-8.3 ppm)



Şekil 4-41: Madde **3g**' nin ^{1}H-NMR Spektrumu (6.55-7.15 ppm)

4.2. X-Işını Tek Kristal Kırınım Çalışması

Benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinon yapısının doğrulanması, hidrojen bağlarının belirlenmesi için **3a** bileşiği X-ışını tek kristal kırınım yöntemi ile incelenmiştir. Veriler öngörülen yapıyı doğrulamaktadır (Bkz. Şekil 4-40).



Şekil 4-42: Madde **3a**' nın X-ışını tek kristal kırınım yöntemi ile elde edilen molekül modeli (%20 olasılıklı ORTEP çizimi)

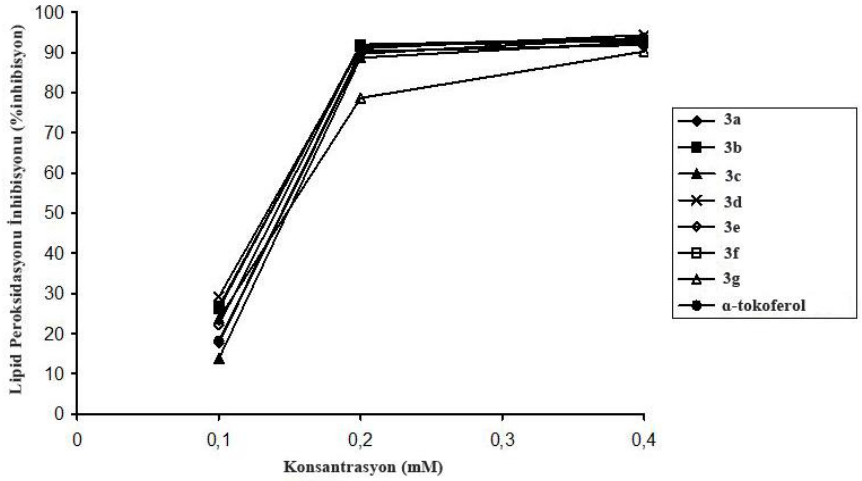
4.3. Biyolojik Etki Araştırma Bulguları

4.3.1. Antioksidan Etki Araştırma Bulguları

4.3.1.1. Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etki Bulguları

Suni lipid sisteminin $FeCl_3$ ve askorbik asit ile inkübasyonu sonucunda oluşan peroksit radikallerini giderme kapasitesinin ölçüldüğü bu testte, MDA ile TBA'nın reaksiyona girmesiyle oluşan TBARS' nin pembe rengi 532 nm' de ölçülerek bileşik **3a-g** nin lipit peroksidasyonuna karşı inhibisyonu tayin edilmiştir. EC_{50} değeri (%50 TBARS oluşumunun inhibisyonunu sağlayan bileşik veya standart konsantrasyonu) absise antioksidan miktarı, ordinata inhibisyon yüzdeleri verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin linear kısmından elde edilen regresyon denkleminden hesaplanmıştır. Deneyler üç kez tekrarlanmştır ve elde edilen veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3). Standart antioksidan olarak α-tokoferol kullanılmıştır. 0.4 mM konsantrasyonunda **3a** (%93.6 ± 0.82), **3b** (%93.0 ± 1.52), **3c** (%92.6±1.14), **3d**

(%94.2±1.64), **3e** (%93.4±0.80), **3f** (%92.9±0.71) ve **3g** (%90.2±1.37)' nin anti lipid peroksidaz aktiviteleri arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Şekil 4-41 incelendiğinde test edilen bileşiklerin tümünün peroksit radikallerini giderme kapasitesinin standart olarak kullanılan α-tokoferol (%91.84±1.69) ile kıyaslanabilir olduğu, **3b**, **3d**, **3e** ve **3f** bileşiklerinin α-tokoferolden daha etkili olarak lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, en etkili türevin floro sübstitüe **3d** olduğu görülmektedir.

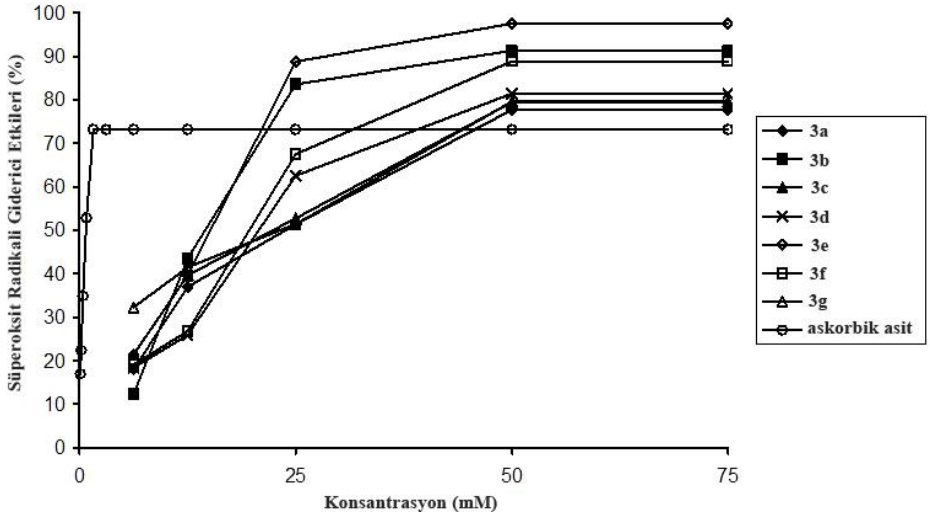


Şekil 4-43: Bileşik **3a-g**' nin lipid peroksidasyonu inhibisyonu

4.3.1.2. Süperoksit Radikali Giderici Etki Bulguları

Bileşik **3a-g** nin süperoksit radikali giderici etkisi ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi sonucunda oluşan mavi - mor renkli formazonların 560 nm' de absorbanslarının okunması ile tayin edilmiştir. EC_{50} değeri (%50 süperoksit radikali giderici etki sağlayan bileşik veya standart konsantrasyonu) absise antioksidan miktarı, ordinata inhibisyon yüzdeleri verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin linear kısmından elde edilen regresyon denkleminden hesaplanmıştır. Deneyler üç kez tekrarlanmştır ve elde edilen veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3). Standart antioksidan olarak askorbik asit kullanılmıştır.

Test edilen bileşiklerin NBT indirgeme hızını doza-bağımlı olarak inhibe ettikleri ve 50 mM konsantrasyonunda %77.6±1.38, 91.2±0.56, 79.4±1.05, 81.4±0.69, 97.5±1.36, 98.0±0.73 and 79.5±0.96 maksimum inhibisyon gösterdikleri, süperoksid radikali giderici aktivitelerinin askorbik asidin 1.6 mM de (%73.3±0.38) gösterdiği aktiviteye yakın olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4-42).

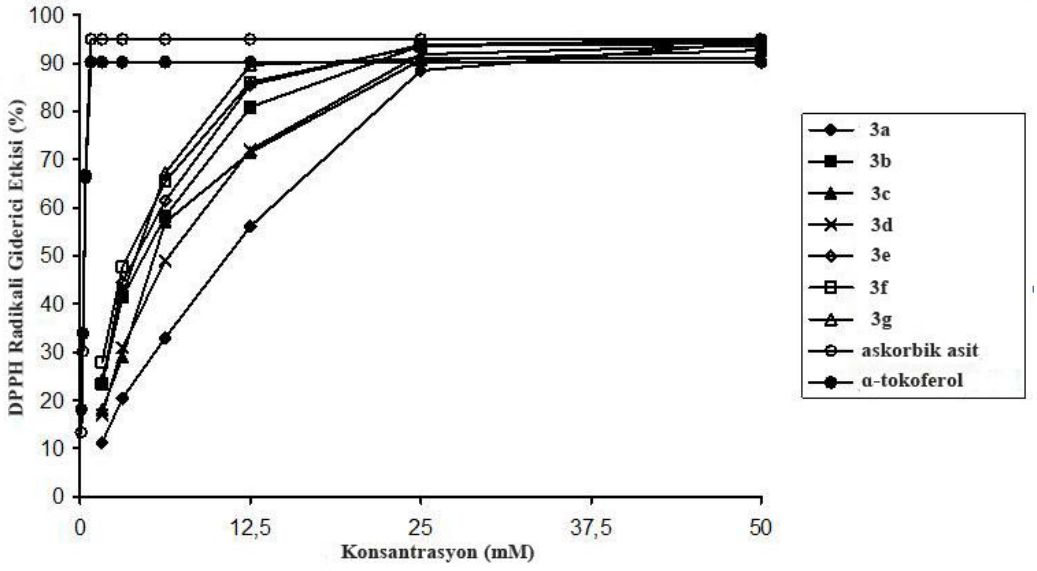


Şekil 4-44: Bileşik **3a-g**' nin süperoksit radikali giderici etkileri

4.3.1.3. DPPH Radikali Giderici Etki Bulguları

Bileşiklerin DPPH radikali giderici aktivitesinin tayini için absorbanslar 517 nm' de okunmuş, pozitif ve negatif kontroller paralel olarak çalışılmış, pozitif kontrolde indol türevinin yerine standart (α-tokoferol ve askorbik asit), negatif kontrolde ise DMSO kullanılmıştır. Deneyler üç kez tekrarlanmştır ve elde edilen veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3). Antioksidanın EC_{50} konsantrasyonu (antioksidan numunenin %50 DPPH radikali giderici aktivitesi göstermesi için gerekli olan antioksidan miktarı), absise antioksidan miktarı, ordinata % DPPH radikali giderici aktivitesi verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin lineer kısmından elde edilen regresyon denkleminden hesaplanmıştır.

Şekil 4-43 incelendiğinde 25 mM de **3a-g** bileşiklerinin askorbik asidin (%94.9± 1.55) ve α-tokoferolün (%90.2±1.18) 0.8 mM de gösterdikleri DPPH radikali giderici aktivitesine yakın ($p>0.05$), sırasıyla %88.4±0.61, 93.6±0.92, 90.6±2.54, 91.8±1.73, 93.7±1.21, 94.2±0.78 ve 90.9±0.50 aktivite gösterdikleri görülmektedir.

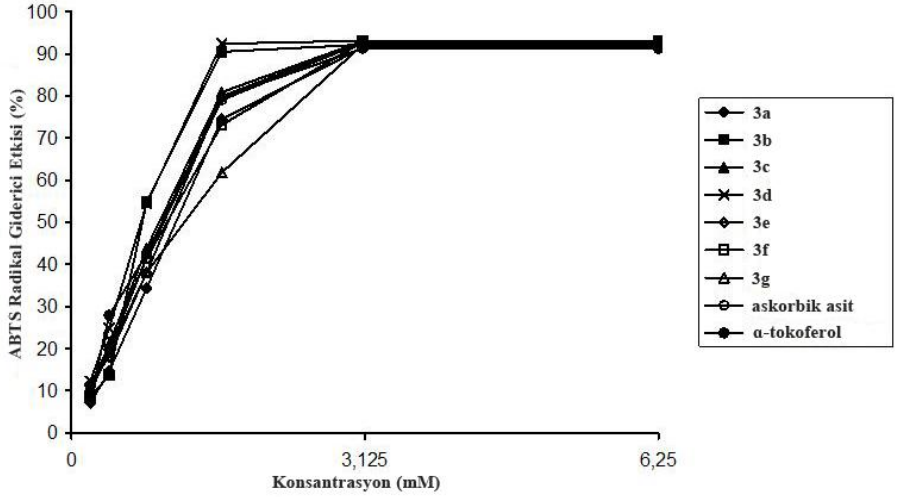


Şekil 4-45: Bileşik **3a-g'** nin DPPH radikali giderici etkisi

4.3.1.4. TEAC Bulguları

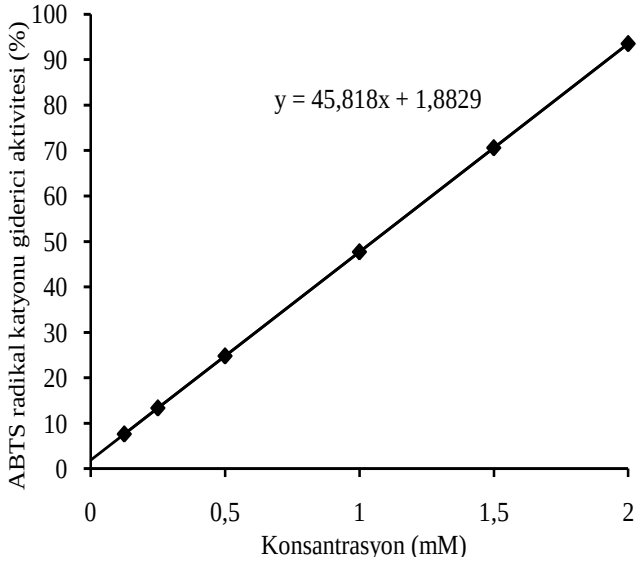
Bileşiklerin total antioksidan etkisinin araştırıldığı bu yöntem, mavi-yeşil renkli dayanıklı bir bileşik olan $ABTS^{\bullet+}$ radikalinin giderilmesi sonucu, renkte meydana gelen azalmanın spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Antioksidanın EC_{50} konsantrasyonu (antioksidanın %50 ABTS radikali giderici aktivitesi göstermesi için gerekli olan antioksidan miktarı), absise antioksidan miktarı, ordinata %ABTS radikali giderici aktivitesi verilerinin uygulanması ile çizilen eğrinin lineer kısmından elde edilen regresyon denkleminden hesaplanmıştır. ABTS radikali giderici aktivitesi yüzdelerinin Troloks standart eğrisine ait değerlerle karşılaştırılmasıyla, 1 mM indol türevinin gösterdiği ABTS radikali giderici aktivitesi yüzdesine eşdeğer radikal giderici yüzdesi göstermesi için gerekli Troloks konsantrasyonu hesaplanmış ve TEAC değeri olarak ifade edilmiştir. Yüksek TEAC değeri yüksek antioksidan aktivitenin göstergesidir. Deneyler üç kez tekrarlanmştır ve elde edilen veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3). Standart antioksidan olarak askorbik asit ve α-tokoferol kullanılmıştır.

3.1 mM de bileşik **3a-g** nin sırasıyla %91.4±0.70, 92.1±0.98, 92.9±1.09, 93.0±1.20 , 92.7±0.82 , 92.8±0.21 ve 92.1±1.44 ABTS radikal katyonu giderici aktivite gösterdikleri belirlenmiş, test edilen bileşiklerin aralarında anlamlı bir farklılık gözlenmeyen etkilerinin askorbik asid (%92.7±0.18) ve α-tokoferolün (%91.2±1.41) aynı konsantrasyonda gösterdikleri etkiye yakın ($p>0.05$) olduğu görülmüş, en etkili türevin flor sübstitüe **3d** olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4-44).



Şekil 4-46: Bileşik **3a-g**' nin ABTS radikal giderici etkisi

Troloks standart eğri denkleminin elde edilmesi için Troloks'un ABTS radikal katyonu giderici aktivitesi yüzdeleri hesaplanmıştır. Deney beş kez tekrarlanmış ve bulunan değerlerden, en küçük kareler yönteminin uygulanmasıyla Troloks standart eğrisi çizilmiş ve regresyon denklemi elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4-45).



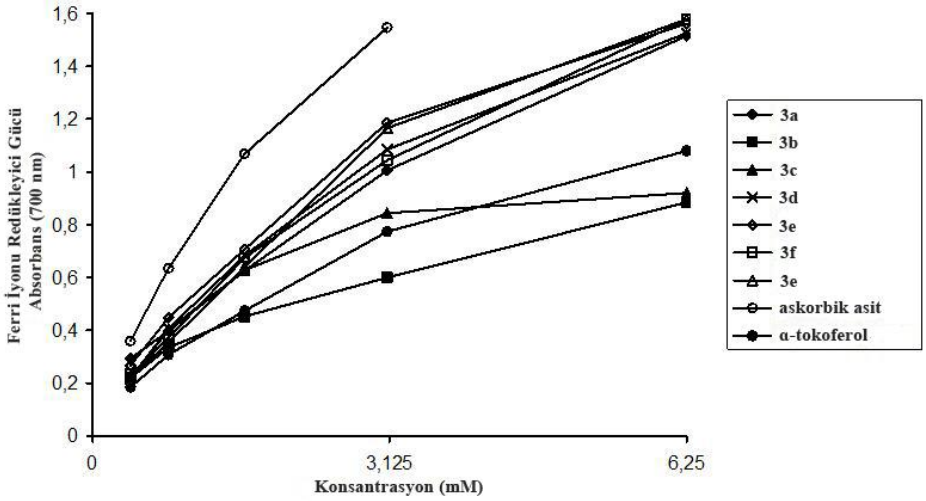
Şekil 4-47: Troloks standart eğrisi ve regresyon denklemi

4.3.1.5. Ferri İyonu Redükleyici Gücü Bulguları

Bu testte indol türevleri tarafından potasyum ferrisiyanürün (Fe^{3+}) ferrosiyanüre (Fe^{2+}) redüklenmesi esasına dayanan kolorimetrik metod kullanılmış, incelenen bileşiklerin 0.4-6.25 mM konsantrasyon sınırları arasında 700 nm de 0.200 den 1.5 kadar artan absorbansları olarak ifade edilen redükleyici güç gösterdikleri belirlenmiştir.

Deneyler üç kez tekrarlanmıştır ve elde edilen veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n=3). Standart antioksidan olarak askorbik asit ve α-tokoferol kullanılmıştır.

En yüksek antioksidan aktiviteyi 0.625 nm de absorbansları sırasıyla 1.51±0.04, 1.52±0.033, 1.56±0.020, 1.57±0.007 ve 1.57±0.014 olan **3a**, **3d**, **3e**, **3f** ve **3g** bileşikleri gösterirken, absorbansları 0.85±0.046, 0.92 ± 0.022 ve 1.08 ± 0.026 olarak saptanan **3b**, **3c** ve α-tokoferolün en düşük etkili oldukları belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4-46).



Şekil 4-48: Bileşik **3a-g**' nin ferri iyonu redükleyici gücü

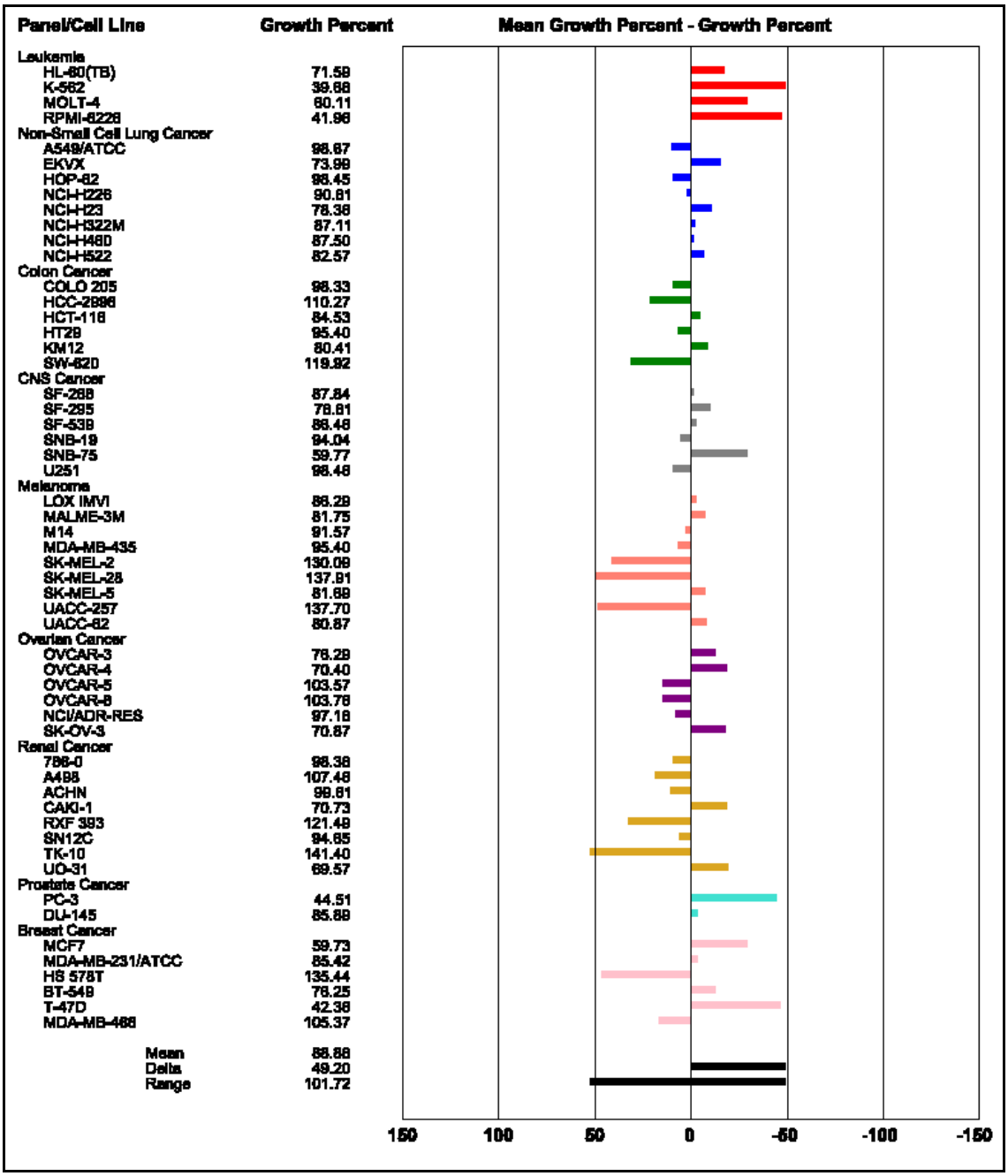
4.3.1.6. İstatiksel Değerlendirme

Çalışma sonucunda elde edilen veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiş, test edilen maddelerin arasındaki farkın değerlendirilmesinde Student's t testinden yararlanılmıştır. Anlamlık sınırı olarak $p < 0,05$ kabul edilmiştir. Değişkenler arasındaki ilişki ise kolerasyon analizi ile değerlendirilmiştir.

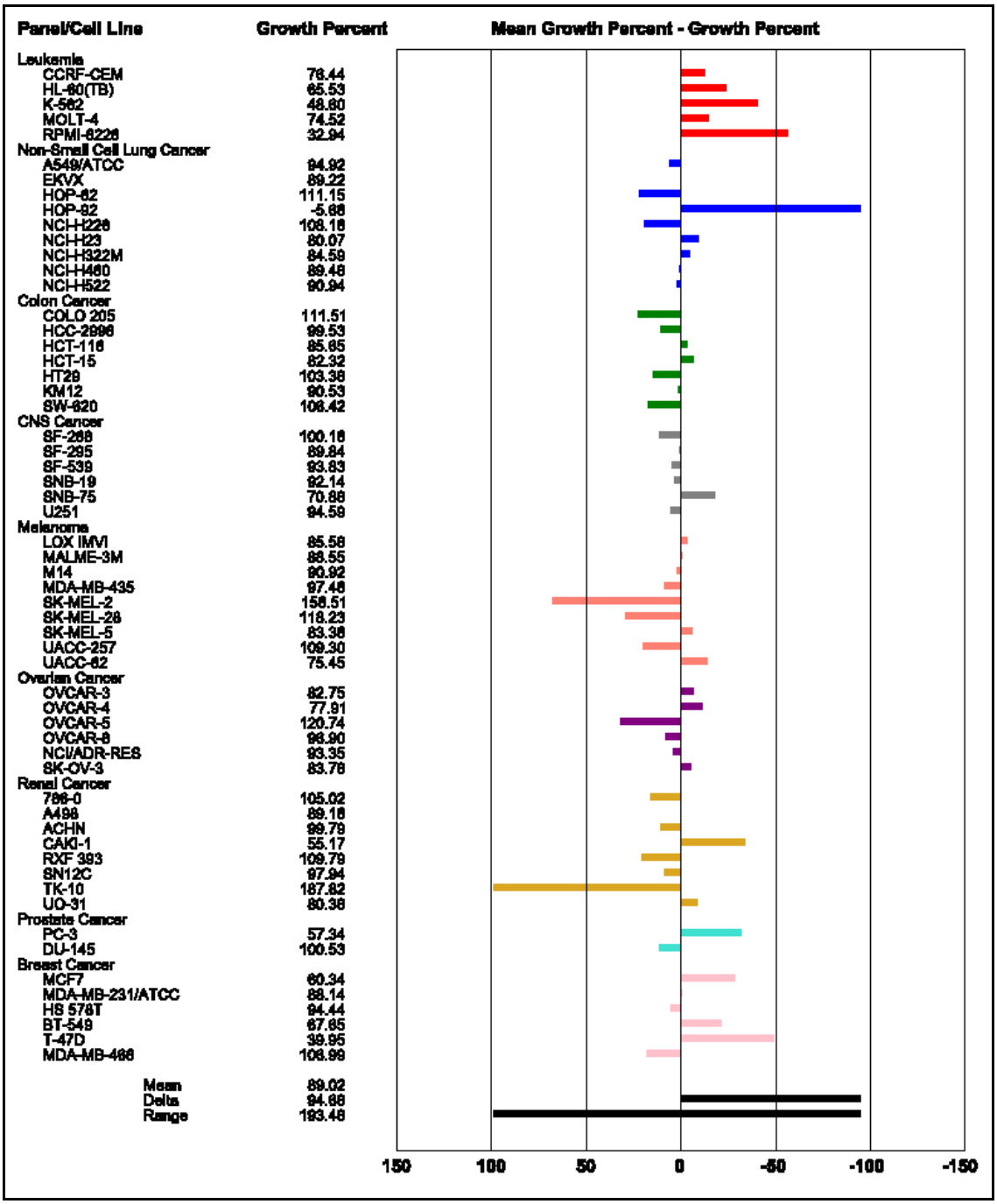
4.3.2. Antikanser Etki Araştırma Bulguları

NCI tarafından seçilen **3a, 3d** ve **3e** bileşiklerinde lösemi (Leukemia, L), akciğer (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC), kolon (Colon Cancer, CC), santral sinir sistemi (CNS Cancer, CNSC), melanoma (Melanoma, M), yumurtalık (Ovarian Cancer, OC), böbrek (Renal Cancer, RC), prostat (Prostate Cancer, PC) ve meme (Breast Cancer, BC) kanserlerinden izole edilen 60 hücre tipine karşı 10^{-5} Molar konsantrasyonda hücre büyümesini önleyici etki araştırılmıştır. Bileşiklere ait 10^{-5} Molar konsantrasyonda tek doz ortalama grafikleri şekil 4-47, 4-48 ve 4-49' da verilmiştir.

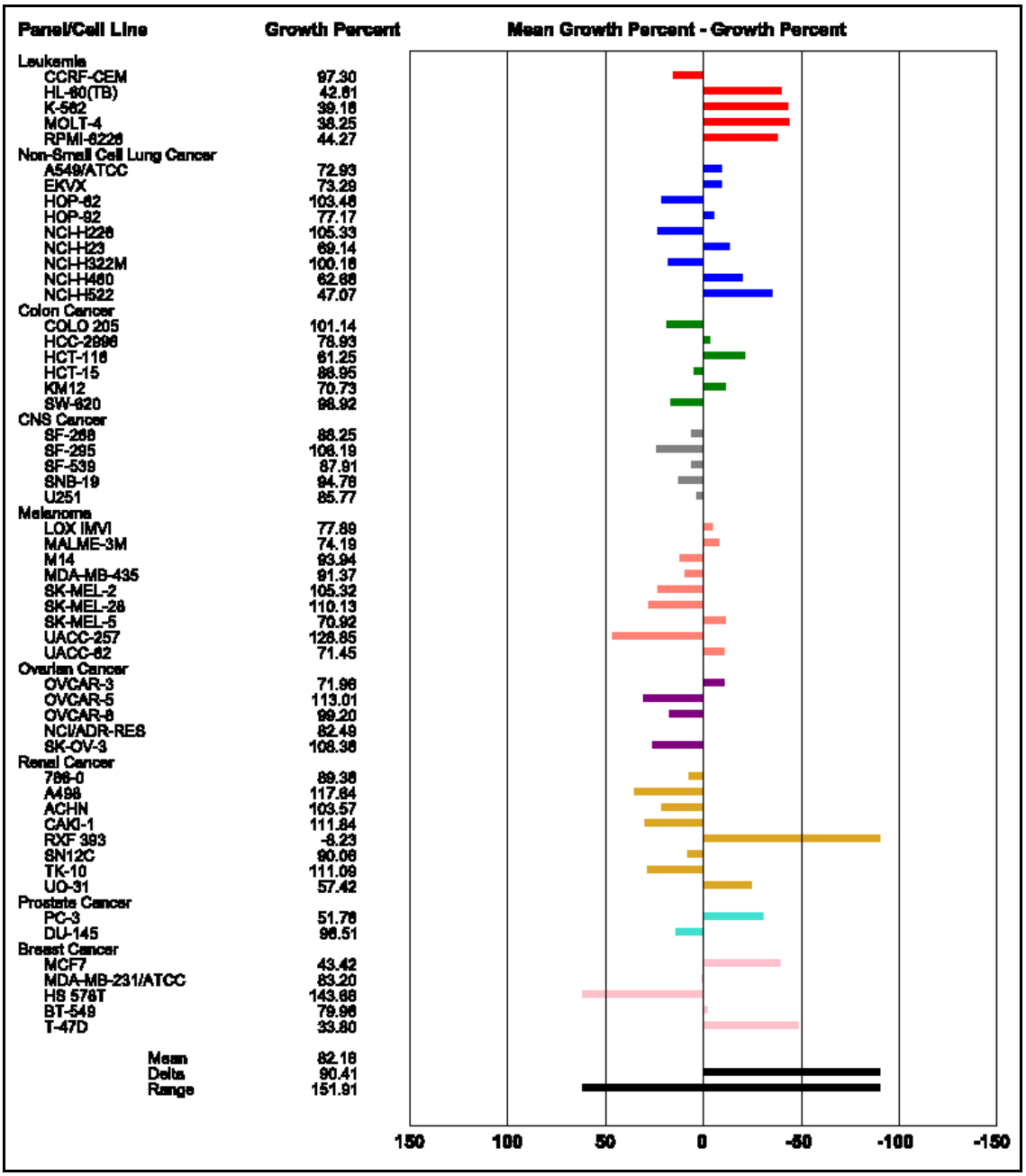
Şekil 4-49: Bileşik **3a**' nın Tek Doz Ortalama Grafikleri



Şekil 4-50: Bileşik **3d**' nin Tek Doz Ortalama Grafikleri



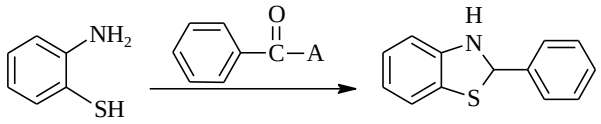
Şekil 4-51: Bileşik **3e**’ nin Tek Doz Ortalama Grafikleri



5. TARTIŞMA

5.1. 5-Kloro-3*H*-spiro[1,3-benzotiyazol-2,3'-indol]-2'(1'*H*)-on' lar (3a-g)

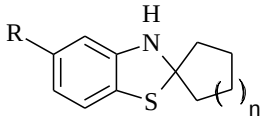
2-Arilbenzotiyazolin türevlerinin sentezi için tanımlanan birçok metodun en basiti ve en fazla tercih edileni 2-aminotiyofenole karbonil bileşiklerinin katımıyla yürütülen yöntemdir.



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

Genellikle alkollü ortamda benzaldehid veya benzoil klorür ile gerçekleştirilen bu sentez yönteminde [100-102] değişik çözücü sistemleri ve katalizörler de kullanılmıştır. Dimetilanilin veya piridin [113, 114, 127] asetik asit-etanol veya DMSO [115, 196], nitrobenzen veya asetik asit-amonyumasetat [123], PPA [139], DMAc li ortamda Pd katalizörü [112] kullanılarak sentezlenen 2-arilbenzotiyazolin türevleri bunlardan bazılarıdır.

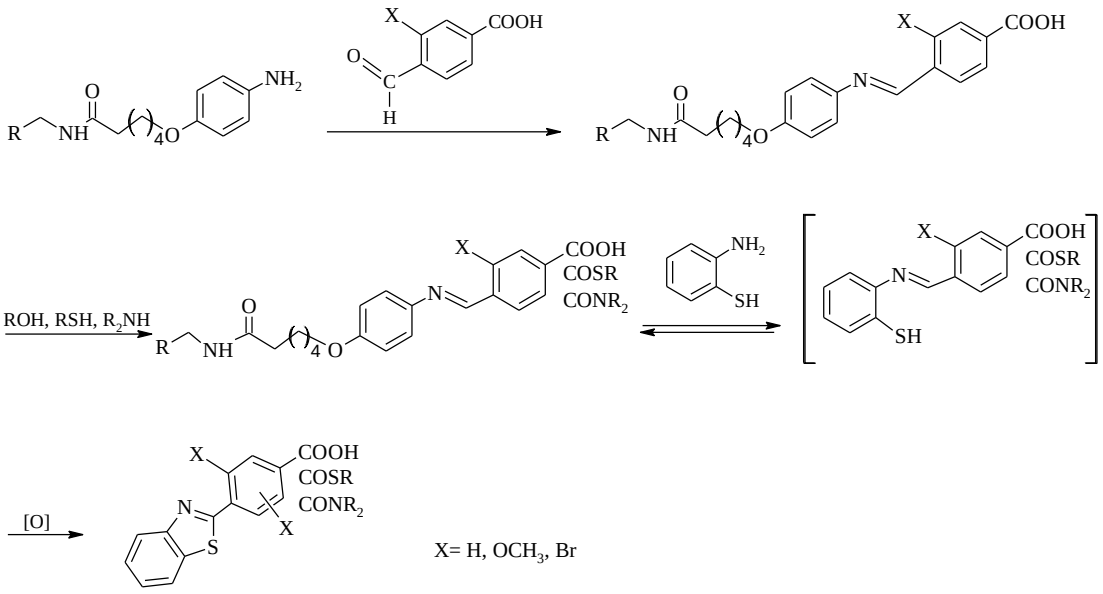
Karbonil bileşiği olarak aldehid kullanıldığında kolay yürüyen, yüksek verimle sonuçlanan reaksiyonlar, keton ile çalışıldığında yüksek sıcaklık ve daha uzun reaksiyon süresi gerektirebilir. 2-Spirobenzotiyazolinler, 2-aminotiyofenolün siklik ketonlar ile etanollü veya piridinli ortamda kondensasyonu ile kazanılmış, bu bileşiğin elde edilmesi için ısıtma süresinin 6 saate kadar uzatılması gerektiği bildirilmiştir [116-118].



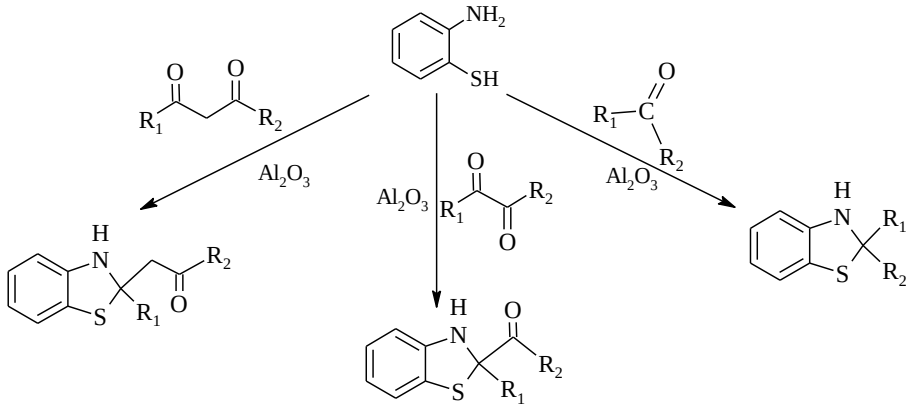
R= H, Cl
n= 1, 2, 3

2-Aminotiyofenolle yürütülen bu sentez metodunda seyrek de olsa bazı çalışmalarda 2-aminotiyofenolün hidroklorik asit ve çinko tuzlarının da kullanıldığı kaydedilmiştir [123]. Son yıllarda 2-arilbenzotiyazollerin sentezi sıvı fazdaki reaksiyonlar dışında daha çok katı faz [197, 198] ve yine sıvı fazda oksijen atmosferinde aktifleştirilmiş karbon yardımıyla veya Pd katalizörlüğünde [199] argon atmosferinde NMP veya azot atmosferinde p-toluen sülfonik asid katalizörlüğünde [200] ve mikrodalga uygulaması ile 2-aminotiyofenolden hareketle gerçekleştirilmiştir

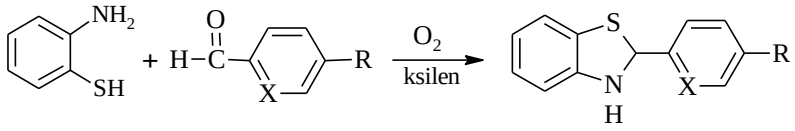
[201-203]. Hioki ve ark. nın çalışmalarında 4-alkoksianilin türevlerinden hareketle 2-arilbenzotiyazoller katı fazda kombinatoryal sentez metodu ile kazanılmıştır [197].



Kodomori ve ark. keton ve β-ketoesterleri, katı fazda aluminyum oksit (Al_2O_3) katalizörlüğünde yüksek verimle benzotiyazolinleri elde etmişlerdir. Al_2O_3 katalizörlüğünde solventsiz yürütülen bu reaksiyonun asid veya toksik katalizörler kullanımını gerektirmeden düşük ısı ve kısa sürede yürüyen bir reaksiyon olması nedeniyle son yıllarda popüler bir metod olacağı vurgulanmıştır [198].

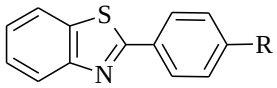


Kawashita ve ark. arilaldehidlerden oksijen atmosferinde aktifleştirilmiş karbon yardımıyla veya Pd katalizörlüğünde 2-arilbenzotiyazolinleri elde etmişlerdir [199].



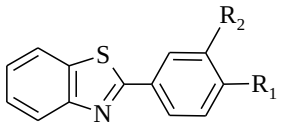
X = CH, N
R = H, CH_3, OCH_3, Cl, CN, NO_2

Chen ve ark. 2-arilbenzotiyazolleri Jacobson siklizasyonuyla üç farklı yol kullanarak yüksek verimle sentezlemişlerdir [200]. İlk metodda 2-aminotiyofenol argon atmosferinde NMP lu ortamda benzoilklorürler ile etkileştirilmiştir.



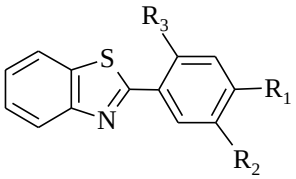
R = F, CN, Bu

İkinci metodda 2-aminotiyofenol ve benzaldehid türevleri argon armosferinde DMSO lu ortamda ısıtılmıştır.



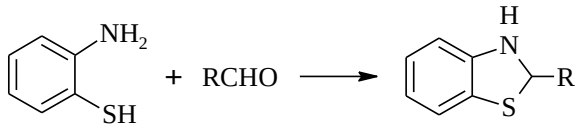
R_1 = H, CH_3, Cl, Br, I
R_2 = H, Br

Üçüncü metodda ise 2-aminotiyofenol metoksi sübstitüe benzaldehidler ile azot atmosferinde *p*-toluensülfonik asit katalizörlüğünde etkileştirilmiştir.



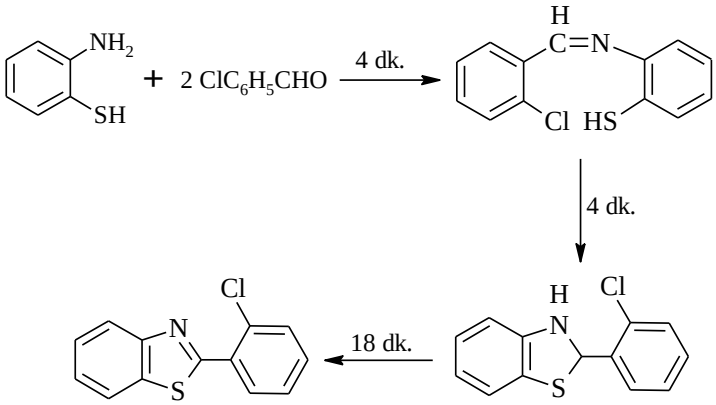
R_1= R_2= R_3= H, OCH_3

Ben-Alloum ve ark. 2-aminotiyofenol ve aldehitleri silikajel/nitrobenzen veya montmorillonit x10/nitrobenzenli ortamda mikrodalga radyasyonu altında etkileştirerek 2-arilbenzotiyazolinleri yüksek verimle sentezlemişlerdir [201].

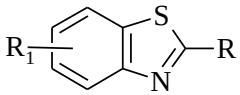


R= C_6H_5; 4-$C_3C_6H_4$; 4-$CH_3OC_6H_4$; 3,4,5,-$(CH_3O)3C_6H_2$; 2-HOC_6H_4;
2-ClC_6H_4; 4-ClC_6H_4; 4-$NO_2C_6H_4$; 2-foranil; 2-piridil

Mukhopadhyay ve Datta 2-arilbenzotiyazolleri aromatik aldehitlerden katalizörsüz ve çözücüsüz mikrodalga yöntemi ile sentezlemişler, reaksiyonun 3 aşamada gerçekleştiğini öne sürmüşlerdir. Ariliminlerin oluşumuyla başlayan reaksiyon, halka kapanmasıyla benzotiyazoline dönüşmekte ve son olarak dehidrojenasyona uğrayan üründen benzotiyazoller elde edilmektedir [202].

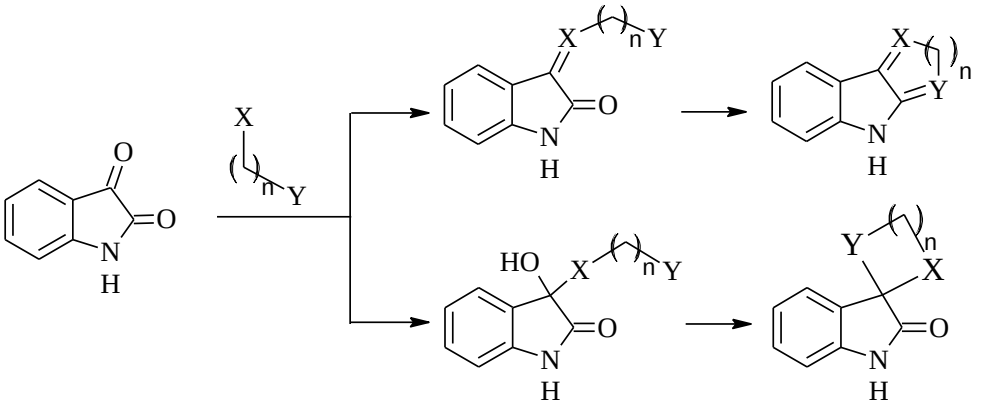


Lim. ve ark. 2-aminotiyofenoller ve ester bileşiklerini mikrodalga uygulaması ile etkileştirerek 2-arilbenzotiyazolleri yüksek verimle sentezlemişlerdir. Bu kondenzasyon 1,2-diklorobenzenli ortamda metansülfonikasid katalizörlüğünde gerçekleştirilmiş, hatta daha az nükleofilik olan 4-triflorometil-2-aminotiyofenolden de istenilen ürünler iyi verimle kazanılmıştır [203].

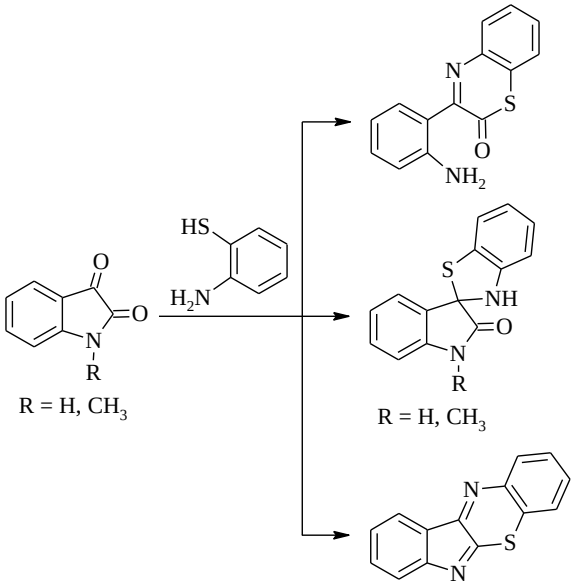


R = Fenil, 3-piridinil, pentil, sikloheksil
R_1 = H, 4-Cl, 4-CF_3

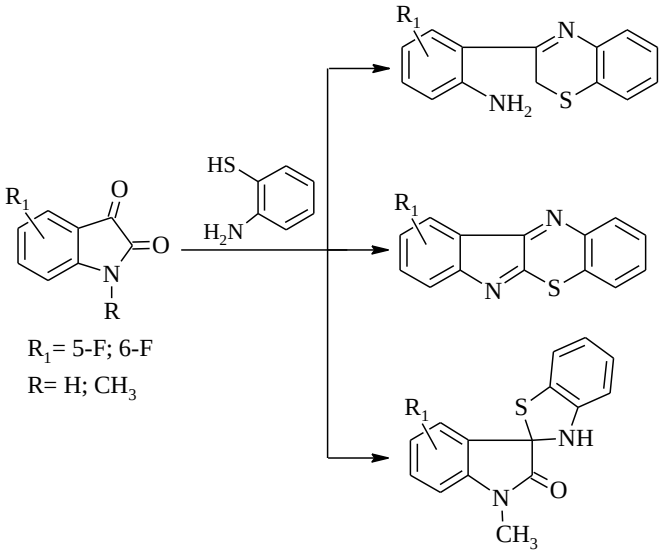
İsatinlerin C_3 konumundan nükleofilik katım reaksiyonları N_1-C_2 bağı kırılmaksızın, isatin çekirdeğine, nükleofilin yapısına, solvent ve temperatüre bağlı olarak bir siklizasyon ürünü veya spiro bileşik ile sonuçlanabilir.



İsatinlerin 2-aminotiyofenol ile etkileşiminin incelendiği çalışmalarda reaksiyon koşullarına bağlı olarak spirobenzotiyazolin türevleri ile birlikte benzotiyazinon ve indolobenzotiyazin türevlerinin de sentezlendiği kaydedilmiştir. İsatinlerin *o*-aminotiyofenol ile reaksiyonu kuru ksilende, susuz $ZnCl_2$ varlığında, oda ısısında yürütüldüğünde C_2 ve C_3 konumlarından nükleofilik katım ile benzotiyazinon, C_3 konumundan nükleofilik katım ile spirobenzotiyazol türevleri kazanılmıştır. Aynı reaksiyon geri çeviren soğutucu altında yürütüldüğünde oluşan ürünlerin benzotiyazinon, spirobenzotiyazol ve indolobenzotiyazin olduğu kaydedilmiştir. 1-Metilisatinin geri çeviren soğutucu altındaki benzer reaksiyonu yalnız spiro bileşiği vermiştir [119-121].



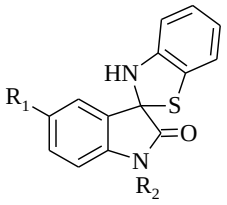
Floroisatinlerin benzer koşullar altında *o*-aminotiyofenol ile reaksiyonu oda ısısında yürümemiş, geri çeviren soğutucu altında benzotiyazinon ve indolo benzotiyazin türevlerinin sentezlendiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada nonsübstitüe isatinden major ürün olarak elde edilen spiro bileşiğin florlu türevlerde elde edilmediği, spiro türevlerin 1-metilisatin türevlerinden aynı koşullarda ilk tek ürün olarak kazanıldığı spektral bulgular ile kanıtlanmıştır [120].



R_1= 5-F; 6-F

R= H; CH_3

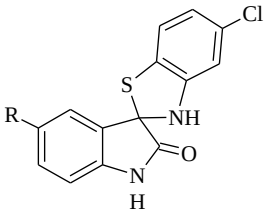
İsatinin spirobenzotiyazolin türevlerinin yüksek verimle sentezlendiği ve tek ürün olarak elde edildiği diğer çalışmalarda isatin ve 2-aminotiyofenol etanollü ortamda etkileştirilmiş, spiro bileşiklerin yapıları spektral analizler ve X-ışını tek kristal analiz yöntemiyle doğrulanmıştır [121-122].



R_1= H, CH_3, CF_3O, Cl, Br, NO_2

R_2= H, CH_3

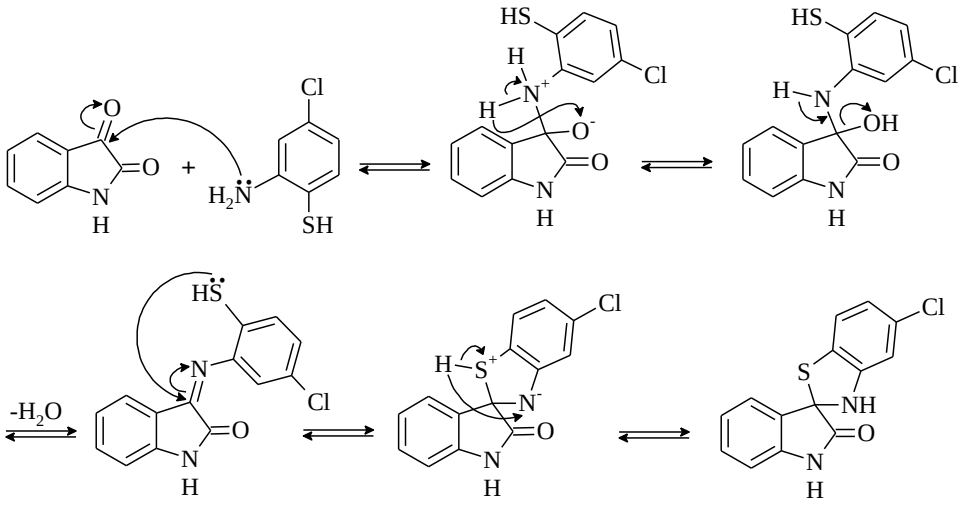
Bu bilgiler ışığında tez kapsamındaki **3a-g** bileşikleri 1*H*-indol-2,3-dion türevlerinin (**1a-g**) 4-kloro-2-aminotiyofenol (**2**) ile susuz etanollü ortamda geri çeviren soğutucu altında ısıtılması ile elde edilmiştir (Bkz. Bölüm 3.3.1 Genel Sentez Şeması ve Tablo 5-1).



Tablo 5-1: Bileşik **3a-g**' nin fiziksel özellikleri ve verimleri

Bileşik	R	Formül (M.A.)	Verim %	e.d. °C	Elementel Analiz% Hesaplanan/ Bulunan		
					C	H	N
3a	H	$C_{14}H_9ClN_2OS$	86	241	58.23	3.14	9.70
		(288.75)			58.06	3.14	9.52
3b	CH_3	$C_{15}H_{11}ClN_2OS$	72	242	59.50	3.66	9.25
		(302.78)			59.35	3.68	9.07
3c	OCF_3	$C_{15}H_8ClF_3N_2O_2S$	54	244	48.33	2.16	7.52
		(372.75)			48.35	2.85	7.67
3d	F	$C_{14}H_8ClFN_2OS$	56	227	54.82	2.63	9.13
		(306.74)			54.52	2.79	9.11
3e	Cl	$C_{14}H_8Cl_2N_2OS$	63	238	52.03	2.49	8.67
		(323.20)			51.91	2.95	8.72
3f	Br	$C_{14}H_8BrClN_2OS$	56	238	45.74	2.19	7.62
		(367.65)			45.55	1.73	7.29
3g	NO_2	$C_{14}H_8ClN_3O_3S$	58	237	50.38	2.42	12.59
		(333.75)			50.48	2.27	12.27

Amin ve keton fonksiyonları arasındaki kondensasyon reaksiyonu, amin grubunun ortaklanmamış elektron çiftinin keton karboniline nükleofilik hücumu ile başlar. Oluşan ara üründe (+) yüklü azot protonu, (-) yüklü oksijen üzerine göç eder. Katım ürünü su kaybeder ve imin yapısı oluşur. İmin yapısında azot Π elektronlarını kendi üzerine çekerek karbon üzerindeki elektron yoğunluğunu azaltmakta, elektrofilik bir merkez (karbokatyon) oluşmaktadır. Reaksiyonun ikinci aşamasında sülfidril grubunun ortaklanmamış elektron çiftinin karbokatyona yönelmesi ile kükürt ve karbon arasında bağ oluşur. Katım ara üründe (+) yüklü kükürt protonu, (-) yüklü azot üzerine göç eder ve benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinonlar kazanılır [174].



5.2. Spektral Verilerin Değerlendirilmesi

5.2.1. UV Verileri

Bileşik **3a-g**' nin etanollü çözeltilerinin spektrumlarında ikincisi omuz şeklinde olmak üzere üç absorpsiyon maksimumu 225.0-227.4, 253.2-261.0 ve 318.8-322.0 nm dalga boyu aralığında gözlenmiştir. Birinci ve ikinci maksimumlar fenil gruplarından kaynaklanan, Π→Π* geçişinin sebep olduğu etilenik (E_2) ve benzenoid (B) bandlardır. Benzen halkasındaki oksokrom ve kromofor grupların varlığı E_2 ve B bandında batokromik kaymaya neden olurken, bu bandların absorpsiyon şiddetini de arttırmıştır. Bu bandların ε_{max} değerleri sırasıyla 86534-105357 ve 17670-21805 aralığındadır. C=O gruplarının n→Π* geçişinden ileri gelen R bandları **3a-g**' nin spektrumlarında üçüncü maksimum olarak tanımlanmıştır. Bu bandın ε_{max} değerleri **3a-f** bileşiklerinde 9930-11040, **3g** bileşiğinde indol molekülüne katılan nitro kromoforu nedeniyle belirgin şekilde artarak 31863 olarak saptanmıştır (Bkz. Tablo 5-2).

Ault ve ark. [206] isatin ve N-metilisatinin etanoldeki çözeltilerinde üç maksimum belirlerken (Bkz. Tablo 5-3), Mangini ve Passerini [207] isatin ve metil, kloro, metoksi sübstitüe isatinlerin konsantre sülfürik asidli ortamda benzer dalga boylarında üç absorpsiyon maksimumu (242-261, 298-320 ve 400 nm) verdiğini kaydetmişlerdir. Bu bandların sırasıyla benzen halkası, C=O kromoforu ve iki C=O grubunun etkileşiminden kaynaklandığı belirtilen çalışmada 4, 5, 6, 7 konumundaki sübstitüentlerin bu absorpsiyonlara etkileri tartışılmıştır.

Tablo 5-2: 3a-g Bileşiklerinin UV bulguları

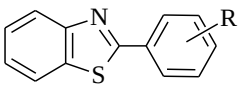
Bileşik	**R**	**λ (EtOH)$_{maks}$ nm (ε)**
3a	H	226.4 (101756.24); 253.2 (19653.18)*; 320.0 (11040.46)
3b	CH_3	227.4 (94734.04); 256.0 (194489)*; 320.8 (10904.24)
3c	OCF_3	225.0 (105357.14); 256.6 (204128.57)*; 318.8 (11000)
3d	F	226.4 (86534.09); 257.2 (17670.45)*; 320.0 (10568.18)
3e	Cl	226.2 (101556.89); 260.0 (21317.37)*; 320.2 (10479.04)
3f	Br	226.4 (101456.33); 261.0 (21805.56)*; 319.8 (9930.56)
3g	NO_2	226.4 (90745.34)*; 256.0 (21385.54); 322.0 (31863.35)

* omuz

Tablo 5-3: İsatin ve N-metilisatinin UV verileri

	λ_{max}	**log ε**	**λ_{max}**	**log ε**	**λ_{max}**	**log ε**
İsatin	243	4.4	296	3.5	413	2.8
N-Metil isatin	245	4.35	299	3.37	420	2.70

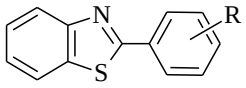
2-Arilbenzotiyazolinlerin UV bulguları ile ilgili literatür verilerinde, Charles ve Fraiser [208] bu bileşiklerin etanolde 260 ve 300 nm' de iki absorpsiyon maksimumu gözlendiğini kaydetmiş, Goetz [209] 315±5 nm (ε 3000-10000) maksimumun benzotiyazolin yapısını kanıtladığını, bu bandın karşılık gelen benzotiyazollerde 300-350 nm bölgesinde çok şiddetli (ε 20000-25000) bandlar olarak belirlendiğini bildirmiş, Palmer ve ark. [125] sentezledikleri 2-piridil ve 3-indolilbenzotiyazol ve benzotiyazolinlerin absorpsiyon maksimumları ile bu bulguları doğrulamışlardır. Abdelhamid ve ark. nın [210] 2-arilbenzotiyazol türevlerinin elektronik absorpsiyon bulgularının kaydedildiği çalışmalarında, bu maksimumlar etanolde üç veya dört maksimum olarak izlenmiştir (Bkz. Tablo 5-4).



Tablo 5-4: Arilbenzotiyazollerin absorpsiyon maksimumları

R	**λ_{max} nm (log ε)**
H	224 (3.95, 252 (3.44), 294 (3.97)
4-Cl	244 (4.00), 253 (3.99), 298 (4.41)
2-NO_2	219 (4.75), 249 (4.20), 270 (4.23), 294 (4.25)

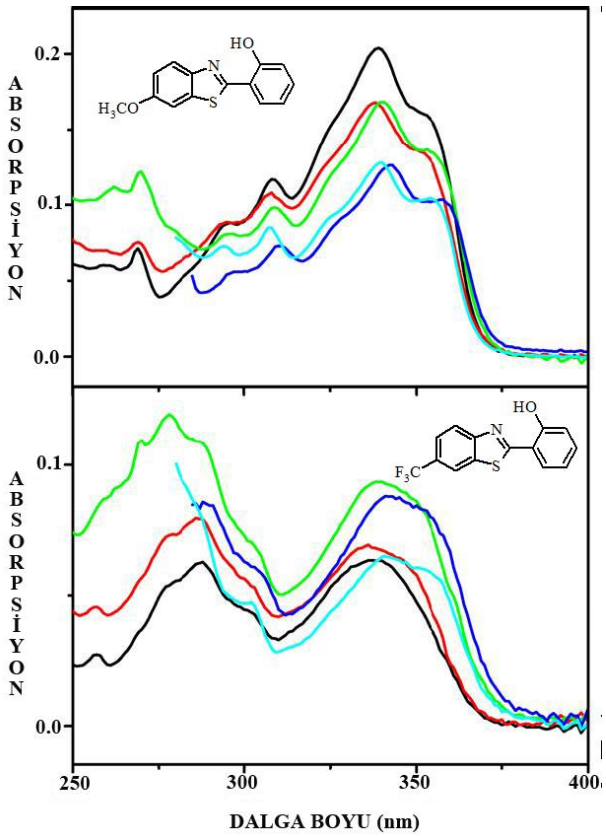
Chen ve ark. [200] 2-arilbenzotiyazollerin diklorometandaki absorpsiyon spektrumlarında 290-340 nm alanında geniş bir absorpsiyon bandı gözlemişler, benzotiyazol halkasındaki elektron çeken ve elektron veren grupların bu absorpsiyon maksimumuna etkisini araştırmışlardır (Bkz. Tablo 5-5).



Tablo 5-5: 2-Arilbenzotiyazollerin absorpsiyon maksimumları ve sübstitüent etkisi

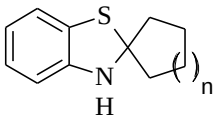
R	**λ_{max}**		**R**	**λ_{max}**	
	nm	**log ε**		**nm**	**log ε**
4-CH_3O	295	4.0	4-I	309	3.9
4-C_4H_9	298	3.9	4-CN	322	3.9
4-CH_3	307	3.8	3-Br	333	4.0
4-F	300	4.1	2-CH_3O	308	4.2
4-Cl	303	3.8	3-CH_3O	321	3.8
4-Br	306	4.3	2,4-diCH_3O	338	4.1

Wang ve ark. [211] 2-(2'-hidroksifenil)benzotiyazol türevlerinde elektron veren veya çeken sübstitüentlerin ve farklı solventlerin elektronik absorpsiyon spektrumlarına etkilerini inceledikleri çalışmalarında Π→Π* transisyonundan kaynaklandıklarını ileri sürdükleri 270-290 ve 320-340 nm alanında iki absorpsiyon maksimumu saptamışlar, CF_3 sübstitüe türevin absorpsiyon spektrumunda polar ve aprotik etanolden nonpolar heksan veya toluene geçildiğinde 10 nm lik hipsokromik kayma gözlemişlerdir. Çalışmada bu durumun, bu türevin konformasyonal dengesinin solvent polaritesine diğer analoglardan daha hassas olmasına bağlı olabileceği bildirilmiştir (Bkz. Şekil 5-1).



Şekil 5-1: 2-(2'-Hidroksifenil) benzotiyazol türevlerinin absorpsiyon spektrumları

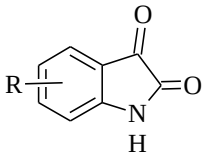
Treuber ve Waider [117] spirobenzotiyazolin türevlerinin metanol veya etanoldeki absorpsiyonlarını kaydetmişlerdir (Bkz. Tablo 5-6).



Tablo 5-6: Spirobenzotiyazolinlerin absorpsiyon maksimumları

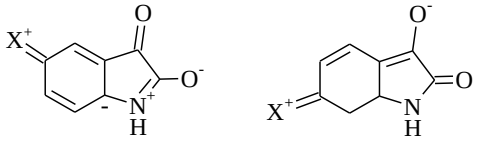
n	λ_{max} (log ε)		
1	223 (4.36)	256 (3.56)	312 (3.59)
2	224 (4.34)	255 (3.51)	312 (3.58)
3	223 (4.44)	255 (3.59)	312 (3.62)

İndol halkasındaki sübstitüentlerin visibl absorpsiyonlara olan etkisini araştırdığı çalışmasında 5 konumundaki sübstitüsyonların batokromik kaymaya neden olduğunu belirleyen Sadler [212], bu kaymanın nedeninin –CO-NH- grubunun 5 konumundaki sübstitüentler ile konjugasyonuna bağlamıştır. Sübstitüentler 6- veya 7-konumunda yer aldığında konjugasyonun olamaması nedeniyle hipsokromik kayma gözlenmiştir (Bkz. Tablo 5-7).



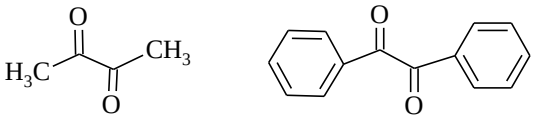
Tablo 5-7: İsatin ve türevlerinin visibl absorpsiyonları

R	**λ_{max}**	**R**	**λ_{max}**
H	416	6-CH_3	416
5-CH_3	424	6-Cl	405
5-Cl	430	6-OCH_3	404
5-OCH_3	460	7-Cl	405



X= CH_3, Cl, OCH_3

α-Diketonlardan biasetil ve bifenilin spektrumunda n→Π* geçişinden ileri gelen 275 nm deki absorpsiyon ile birlikte sırasıyla 450 nm ve 350 nm de karbonil gruplarının etkileşmesinden ileri gelen zayıf bir band da bulunmaktadır [213].



λ_{max}= 275.450 nm λ_{max}= 275.370 nm

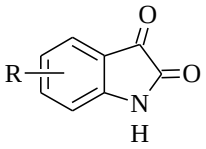
3a-g Bileşiklerinin spektrumlarında 2-indolinon ve benzotiyazolin halkalarını tanımlayan absorpsiyonlar gözlenirken, karbonil gruplarının etkileşiminden kaynaklanan bandların gözlenmemesi yapıların doğruluğunu destekler niteliktedir.

5.2.2. IR Verileri

Sentezlenen bileşiklerin ilkel maddesi olan isatin ve 5-sübstitüe isatinlerin katı fazda ve seyreltik çözeltideki IR spektrumları, ayrıca X-ışını kristal analiz bulguları bu bileşiklerin laktam formunda olduğunu N-H ve C=O grupları arasında moleküller arası hidrojen bağı oluştuğunu göstermektedir [214-219].

Benzen halkasındaki sübstitüentlerin isatin frekanslarında yalnız minor değişiklikler yaptığı belirlenen O'Sullivan ve Sadler' in çalışmasında [214] isatin ve sübstitüe isatinlerin kloroformda N-H, C=O, C=C gerilme ve N-H eğilme bandları

belirlenmiştir (Bkz. Tablo 5-8). Bu veriler incelendiğinde isatinin 3450 cm^{-1} de gözlenen N-H gerilme bandının, kuvvetli moleküller arası hidrojen bağları nedeniyle 3230 cm^{-1} de kaydedildiği görülmektedir. İsatinlerin α-dikarbonil gerilme titreşimlerin kloroformda 1755 ve 1740 cm^{-1} de iki ayrı band olarak gözlendiği çalışmada, 2-konumundaki amid C=O grubuna uyan, daha düşük frekanstaki absorpsiyonun her zaman çok keskin ve şiddetli iken, 3 konumundaki keton C=O gerilme bandının daha az şiddette olduğu vurgulanmıştır. Genellikle iyi ayrılan bir band olarak saptanan keton C=O gerilmesinin, bazen yalnız bir omuz olarak da tanımlandığı kaydedilmiştir. Bu çalışmada benzen halkasının C=C gerilmeleri 1621 cm^{-1} de çok kuvvetli, 1450 cm^{-1} de zayıf bandlar ile saptanmıştır. Kloroformda 1450 cm^{-1} de gözlenen, katı diskte çok daha şiddetli olarak 1469 cm^{-1} de tanımlanan bu bandın, aynı zamanda laktam grubu N-H eğilme ve C-N gerilme (amid II) bandı olarak yapıyı kanıtladığı belirtilmiştir.

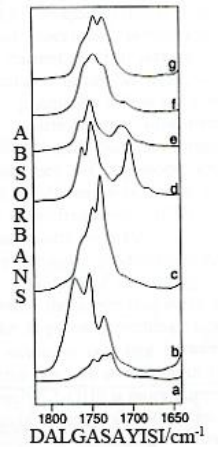


Tablo 5-8: İsatin ve sübstitüe isatinlerin IR bandları (cm^{-1})

R	N-H g.b.	C=O g.b.	N-H e.b. ve C=C g.b.
5-F	3458, 3230	1755, 1744	1630, 1480
5-OCH_3	3455, 3250	1757, 1738	1627, 1492
5-Me	3460, 3250	1758, 1739	1631, 1480
6-Br	3440, 3230	1765, 1744	1618, -
6-Cl	3450, 3230	1755, 1743	1618, -
6-F	3450, 3230	1764, 1743	1624, 1450
6-OCF_3	3455, 3250	1756, 1734	1622, 1458
6-CH_3	3460, 3240	1755, 1738	1628, -

Cogrossi [220] 2 ve 3 konumlarında karbonil grupları taşıyan pentasiklik bileşiklerin IR absorpsiyonlarını incelediği çalışmasında, isatinin katı fazda (KBr) 3 konumundaki karbonilin ketonik karakteri nedeniyle yüksek frekansta (1742 cm^{-1}), 2 konumundaki amidik karbonilin ise daha düşük frekansta (1722 cm^{-1}) band verdiğini saptamış, O'Sullivan ve Sadler' in bulgularını doğrulamıştır. 5-Metil ve 5-nitroisatinin katı fazdaki spektrumlarında N-H gerilme bandlarının 3288 ve 3336 cm^{-1}, C=O gerilme bandlarının 1745, 1726 ve 1772, 1751 cm^{-1} de gözlenmesi bu bulguları destekler niteliktedir [221, 222].

Naumov ve Anastasova 5 konumundaki sübstitüsyonun (NO_2, F, Cl, Br, I, CH_3) katı fazda isatinlerin moleküler yapısı ve IR spektrumlarına etkilerini incelemişler, sübstitüentlerin kütlesi ve elektronik özelliklerinin amid C=O gerilmesini nispeten az etkilerken, bundan keton C=O gerilmesinin çok fazla etkilendiğini vurgulamışlardır (Bkz. Şekil 5-2) [223].



Şekil 5-2: İsatin (a), 5-nitroisatin (b), 5-floroisatin (c), 5-kloroisatin (d), 5-bromoisatin (e), 5-iyodoisatin (f) ve 5-metilisatin (g) nin karbonil gerilme bandları

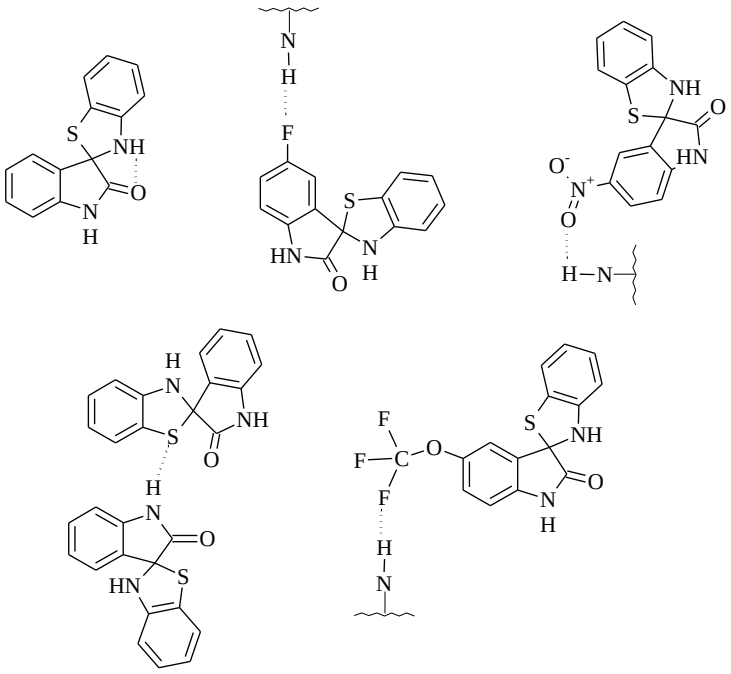
Castiñeiras ve ark. [224] benzotiyazolin türevinin intermoleküler hidrojen bağlı N-H grubunun 3201 cm^{-1} de kuvvetli bir band olarak gözlendiğini, 695 cm^{-1} de C-S gerilmelerini tanımlayan bandların belirlendiğini kaydetmişlerdir. Taşal ve ark. nın [225] IR çalışmasında benzotiyazolin molekülünün katı fazda N-H gerilme bandı 3421 cm^{-1} de saptanırken, aromatik C=C gerilme ve N-H eğilme bandları 1600-1270 cm^{-1} alanında belirlenmiş, 2,2'-bibenzotiyazolinin katı fazda alınan spektrumunda ise N-H gerilme bandları 3410, 3380, 3276 cm^{-1} de üç ayrı band olarak saptanmıştır [226].

3a-g Bileşiklerinin katı fazda (KBr) alınan IR spektrumlarında N-H gerilme bandları 3312-3276 cm^{-1} ve 3189-3138 cm^{-1} bölgelerinde indol ve benzotiyazol N-H gerilmelerinden kaynaklanan iki ayrı band olarak gözlenmektedir. Spektrumlarda keton C=O grubu gerilme bandının gözlenmemesi, laktam grubunu kanıtlayan tek C=O gerilme (amid I) bandının 1730-1722 cm^{-1} bölgesinde izlenmesi yapının doğruluğunu kanıtlayan önemli bir bulgudur (Bkz. Tablo 5-9).

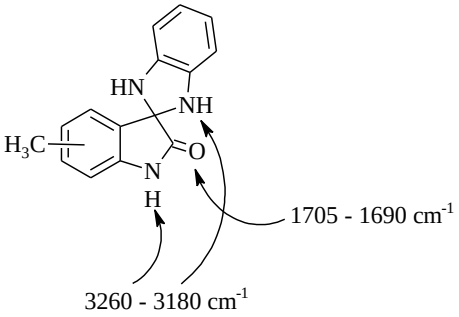
3a-g Bileşiklerinde benzotiyazolin N-H grubu ile indol C=O grubu arasında molekül içi hidrojen bağı oluşabilir, ayrıca moleküller arası N-H…O, N-H…S hidrojen bağlarının varlığından söz edilebilir. [167, 217, 219, 224, 227, 228]. **3c** ve **3d** Bileşiklerinde ayrıca indol halkasındaki flor atomları, **3g** bileşiğindeki nitro atomu elektronegatif özellikleri nedeniyle indol ve benzotiyazolin N-H grupları ile hidrojen bağı oluşturabilir [214, 229-231].

Tablo 5-9: 3a-g Bileşiklerinin IR bulguları

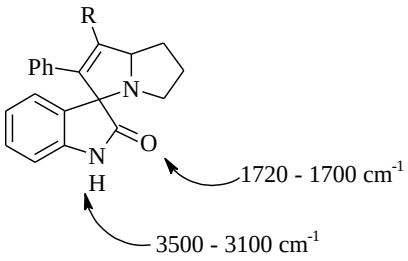
Madde	R	N-H g.b.*	Ar. C-H g.b.	C=O g.b.	N-H e.b. ve Ar. C=C g.b.	C-N g.b.	1,2,4-trisübs. benzen C-H e.b.	C-Cl g.b.	C-S g.b.
3a	H	3281 3149	3083 3027	1728	1617 1577 1469	1294	786	1079	637
3b	CH_3	3288 3161	3084 3030	1722	1625 1577 1491 1471	1298	786	1078	649
3c	OCF_3	3291 3180	3084	1727	1627 1579 1471	1278	796	1089	642
3d	F	3277 3179 3138	3052	1724	1627 1578 1483	1293	795	1078	647
3e	Cl	3276 3168 3133	3095 3047	1725	1616 1589 1577 1470	1292	792	1078	648
3f	Br	3276 3168 3133	3096 3047	1725	1616 1589 1577 1470	1292	792	1078	648
3g	NO_2	3312 3189	3083	1730	1606 1580 1446	1285	793	1080	645



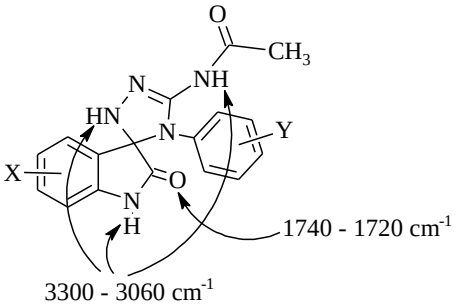
İsatin ve benzotiyazol türevlerinin X-ışını tek kristal analiz bulguları ve IR çalışmaları bu maddelerin moleküller arası hidrojen bağlı N-H gerilme bandlarının 3250-3200 cm^{-1} bölgesinde kuvvetli bir band olarak gözlendiğini kanıtlamaktadır [215, 216, 218, 224, 227]. Benzotiyazol artığı taşıyan spiroindolinon türevlerinin [119-122, 232] ve diğer spiroindolinonların [144, 148, 159] IR bulguları bu bilgileri destekler niteliktedir (Bkz. Tablo 5-10).



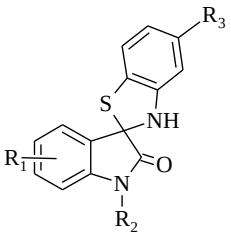
[144]



[159]



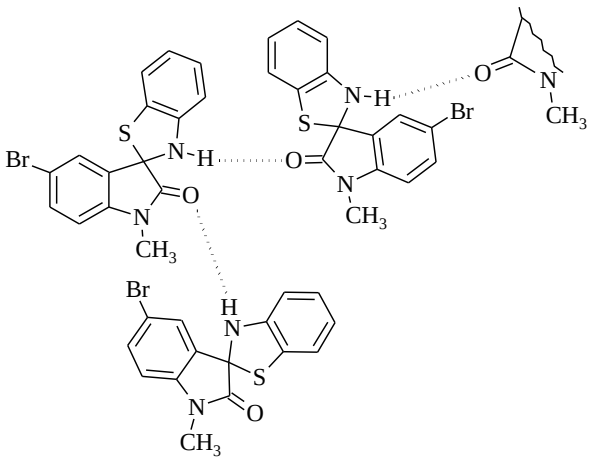
[148]



Tablo 5-10: Benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinonların IR bulguları

R_1	R_2	R_3	NH g.b.	C=O g.b.	Kaynak
H	H	H	3200	1700	[122]
H	CH_3	H	3240	1704	[119]
5-F	CH_3	H	3210	1700	[120]
6-F	CH_3	H	3200	1710	[120]
5- CH_3	H	H	3299	1711	[121]
5-Cl	H	H	3302	1714	[121]
5-NO_2	H	H	3354	1732	[121]
5- CH_3	CH_3	H	3303	1696	[121]
5-OCF_3	CH_3	H	3307	1703	[121]
5-Cl	CH_3	H	3307	1698	[121]
5-Br	CH_3	H	3327	1719	[121]
5-NO_2	CH_3	H	3348	1727	[121]
H	H	Cl	3281, 3149	1728	[232]

Karalı ve ark. [121] benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinon bileşiğinin kristal yapısını tanımladıkları çalışmalarında molekülün planar değil, spiro formda olduğunu kanıtlamışlar, intermoleküler hidrojen bağının yalnız benzotiyazolin N-H ı ve indol C=O grupları arasında olduğunu saptamışlardır.



Bu bilgilere göre maddelerimizin yapısını açıklamak, yapıdaki bağ türlerini saptamak amacıyla **3a** bileşiğinin ORTEP çizimi belirlenmiş, kristal yapıda moleküller arası isatin N-H…O ve benzotiyazolin N-H…S hidrojen bağlarının varlığı kanıtlanmıştır (Bkz. Şekil 4-40) [121]. **3a**' nın kloroformda alınan spektrumunda N-H ve C=O gerilme bandlarında yüksek frekansa kayma gözlenmiş, (Bkz Şekil 4-2), katı fazda 3281 ve 3149 cm^{-1} de izlenen N-H gerilme bandları 3427 cm^{-1} de, 1728 cm^{-1} de izlenen C=O gerilme bandı 1739 cm^{-1} de belirlenmiştir. Bu bulgular X-ray bulgularının doğruluğunu desteklemektedir. Bileşik **3a-g**' nin aromatik =C-H gerilme bandı 3096-3027 cm^{-1} de bir ya da iki ayrı band olarak gözlenmekte, spektrumlardaki 1627-1446 cm^{-1} bölgesindeki bandlar moleküllerdeki laktam ve benzotiyazol N-H eğilme (amid II) ve aromatik C=C gerilme bandları olarak yorumlanmaktadır [214, 218, 225]. C-N gerilme (1298-1278 cm^{-1}), 1,2,4-trisübstitüe benzen C-H eğilme (796-786 cm^{-1}), benzotiyazolin halkasındaki C-Cl gerilme (1078-1089 cm^{-1}) ve C-S gerilme (637-649 cm^{-1}) bandları spektrumlarda belirlenen ve literatürdeki verilerle kıyaslanarak değerlendirilen diğer bandlardır [144, 173, 175, 224, 233, 234]. İndol halkasının 5-konumundaki sübstitüentlere ait gerilme bandları literatürde verilen değerlere uymaktadır [144, 234-237] (Bkz. Tablo 5-11).

Tablo 5-11: 3a-g Bileşiklerinin R sübstitüentlerine ait gerilme bandları

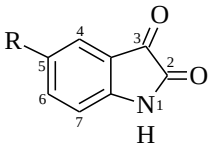
Bileşik	R	g.b.
3b	CH_3	2918, 2838 (alifatik C-H g.b.)
3c	OCF_3	1172 (C-F g.b.); 1080 (C-O g.b.)
3d	F	1178 (C-F g.b.)
3c	Cl	1078 (C-Cl g.b.)
3f	Br	792 (C-Br g.b.)
3g	NO_2	1522, 1336 (N=O g.b.)

5.2.3. ^{1}H-NMR Verileri

Tez kapsamında sentezlenen **3a-g** bileşiklerinin hareket maddesi olan isatinin kimyasal kayma değerlerinin incelendiği çalışmalarda karbonil grubunun orto ve para konumundaki protonların, heteroatomun (NH) orto ve para konumundaki protonlardan daha düşük alanda absorpsiyon yaptığı kaydedilmiştir, C=O grubunun anisotropik etkisi ile diğer protonlara kıyasla elektron bulutu ile daha az gölgelenen C_4 ve C_6 protonlarının

düşük alanda (δ 7.59 ve 7.69 ppm) pik verdiği, C_5 ve C_7 protonlarının yüksek alanda (δ 7.16 ve 7.03 ppm) rezonansa geldiği görülmektedir. Bu çalışmalarda C_5-H ın C_4-H, C_6-H ın C_5-H ve C_7-H ın C_6-H ile orto, C_6-H ın C_4-H ve C_7-H ın C_5-H ile meta (J= 1.34 ve 0.92 Hz), C_7-H ın C_4-H ile para (J= 0.58 Hz) eşleşmesi ile bölündüğü kaydedilen diğer bulgulardır [238, 239].

İsatin ve 5-sübstitüe isatinlerin indol NH, C_4-H, C_5-H, C_6-H ve C_7-H protonlarının kimyasal kayma değerleri Tablo 5-12 de verilmektedir [217, 240-242].

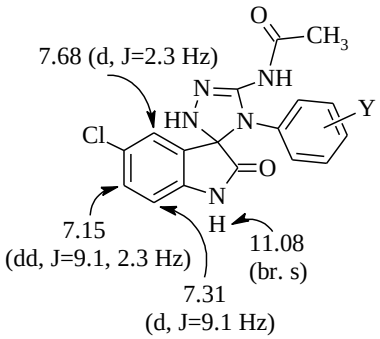


Tablo 5-12: Bazı isatin türevlerinin kimyasal kaymaları (ppm)

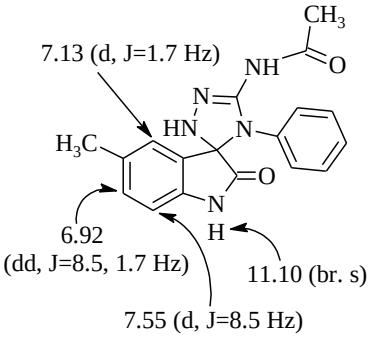
R	NH	C_4-H	C_5-H	C_6-H	C_7-H	Çözücü	Kaynak
H	11.08 (s)	7.51 (d)	7.09 (td)	7.61 (td)	6.94 (d)	DMSO-d_6	240
CH_3	10.92 (s)	7.30 (s)	-	7.39 (ddd)	6.80 (d)	DMSO-d_6	243
Br	11.16 (s)	7.61 (s)	-	7.72 (dd)	6.86 (dd)	DMSO-d_6	217
NO_2	11.70 (s)	8.18 (s)	-	8.42 (dd)	7.08 (d)	DMSO-d_6	217
NO_2	11.68 (s)	8.20 (d)	-	8.44 (dd)	7.09 (dd)	DMSO-d_6	241

Tablo 5-12 incelendiğinde isatin türevlerinde indol halkasındaki protonların kimyasal kaymalarının bazı sübstitüentlerin etkisi ile değiştiği görülmektedir. Kimyasal kayma değerlerinde halojenler önemli bir değişiklik yapmazken, CH_3 grubunun hiperkonjugasyonu ile tüm sinyallerde düşük ppm değerlerine kayma gözlenmekte, NO_2 grubu ise elektron çekici etkisi nedeniyle proton rezonanslarını belirgin bir şekilde yüksek ppm değerlerine kaydırmaktadır.

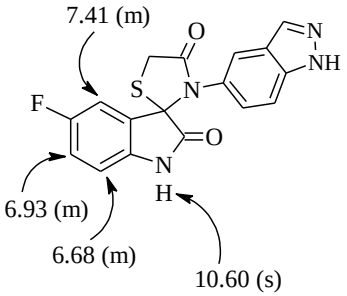
Literatürde yer alan spiroindolinon türevlerinde de indol halka protonlarının absorpsiyonlarında sübstitüent etkisi ile benzer değişiklikler gözlenmektedir [148, 168].



[148]

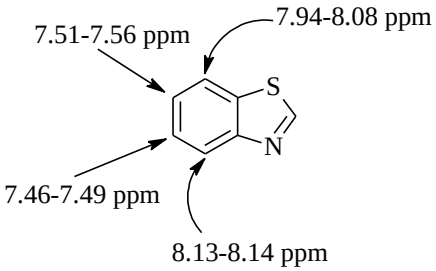


[148]

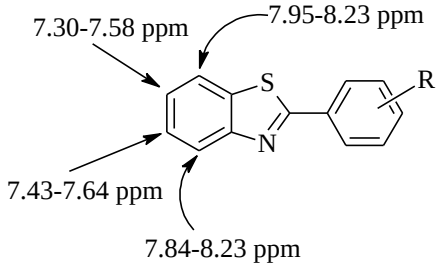


[168]

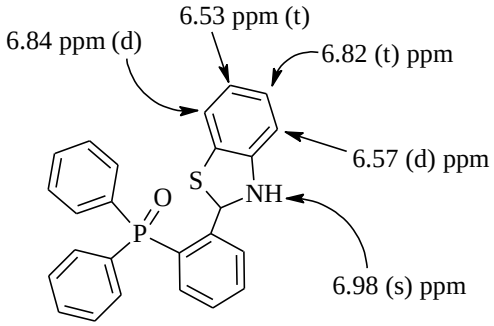
Benzotiyazol türevlerinin literatürde kayıtlı kimyasal kayma değerleri incelendiğinde, benzotiyazol halka protonları için değişik kimyasal kayma değerlerinin kayıtlı olduğu görülmekte [210, 224, 244-246], 5-kloro-2-metilbenzotiyazolde bu sinyaller yüksek alandan başlamak üzere C_4, C_7, C_6 sırasıyla gözlenmektedir [246, 247], döteryumlama ile kanıtlanan benzotiyazolin NH' ı ise δ 5.50-6.98 ppm' de izlenmektedir [224, 248].



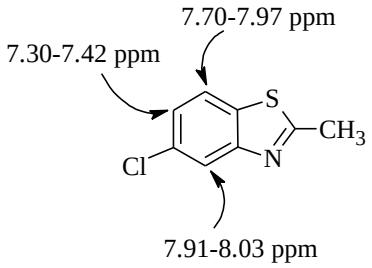
[245, 246]



[210, 244]



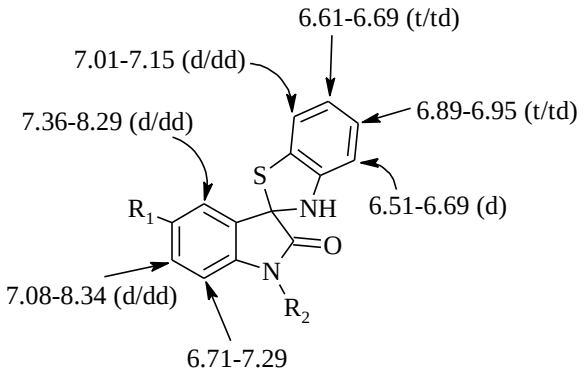
[224]



[246, 249]

Benzotiyazol artığı taşıyan spiroindolinon türevlerinin bazı NMR spektrumlarında benzotiyazol NH ı 5.52 ve 5.96, indol NH ı 9.15 ppm de singlet olarak izlenirken [119, 120], D_2O değişimi ile kanıtlanan bu piklerin diğer çalışmalarda molekül içi veya moleküller arası hidrojen bağları nedeniyle protonun etrafındaki elektron yoğunluğunun azalmasına bağlı olarak sırasıyla 7.18-7.56 ve 10.22-11.08 ppm

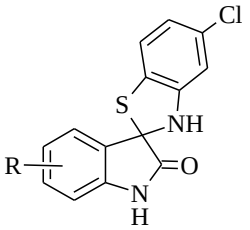
alanında sinyal verdiği belirlenmiştir [121, 122, 232]. Bu bileşiklerin indol ve benzotiyazolin halka protonlarının absorpsiyonları incelendiğinde yüksek alandan başlamak üzere indol sinyalleri C_7, C_6, C_4, benzotiyazolin sinyalleri C_4, C_6, C_5, C_7 sırasıyla gözlenmektedir [121, 232].



[121]

3a-g Bileşiklerinin ^{1}H-NMR spektrumlarında başlangıç maddesi 4-kloro-2-aminotiyofenolün δ 3.4 ve 6.7 ppm' de izlenen SH ve NH_2 rezonanslarının izlenmemesi, döteryumlama ile kanıtlanan δ 10.29-11.12 ppm de gözlenen indol NH proton sinyali yanısıra spirobenzotiyazolin artığının NH protonunu karakterize eden ikinci NH sinyalinin δ 7.54-7.60 ppm de gözlenmesi, benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinon yapısının doğruluğunu kanıtlamaktadır. Benzotiyazolin NH ve laktam NH gerilme bandlarının sırasıyla δ 3-6 ve 5-9.5 ppm alanında izlenmesi beklenirken, bu proton sinyallerinin düşük alana kayması moleküller arası hidrojen bağlarının bu protonların etrafındaki elektron yoğunluğunu azaltmasına bağlanabilir [250-252]. **3a-g** Bileşiklerinin indol ve benzotiyazol halka protonlarının kimyasal kayma değerleri, sübstitüent etkileri, sinyallerin bölünme şekilleri ve spin-spin etkileşme değerleri dikkate alınarak literatür verileri ile kıyaslanarak saptanmış, HSQC ve HMBC bulguları ile doğrulanmıştır (Bkz. Tablo 5-13). Bu veriler incelendiğinde benzotiyazolin artığındaki C_4-H ve C_6-H protonlarının NH grubu etkisi ile en fazla gölgelenen protonlar olduğu izlenmekte, bu protonlar **3a-g** bileşiklerinde sırasıyla δ 6.50-6.60 ppm de dublet (*m*-eşleşmesi, J=1.35-2.44 Hz) ve δ 6.62-6.69 ppm de dublet dublet (*o* ve *m*-eşleşmesi, J=7.81-8.30 Hz ve J=1.95-2.44 Hz) olarak absorpsiyon yapmaktadır.

Tablo 5-13: 3a-g Bileşiklerinin ^{1}H-NMR verileri



Madde	R	Benzotiyazol protonları	1*H*-indol-2,3-dion protonları	N-H (bt)	N-H (ind)
3a	**H**	6.50 (1H, d, J=1.96 Hz, C_4-H) 6.62 (1H, dd, J = 8.30, 2.44 Hz, C_6-H) 7.03 (1H, d, J = 8.30 Hz, C_7-H)	6.84 (1H, d, J = 7.81 Hz, C_7-H) 7.05 (1H, ddd, J = 7.81, 7.32, 0.98 Hz, C_5-H) 7.29 (1H, ddd, J = 7.81,7.32, 1.47 Hz, C_6-H) 7.55 (1H, d, J = 2.92 Hz , C_4-H)	7.56 (1H, s)	10.39 (1H, s)
3b	**CH_3**	6.50 (1H, d, J = 1.35 Hz, C_4-H) 6.62 (1H, dd, J = 8.29, 1.95 Hz, C_6-H) 7.09 (1H, d, J =7.81 Hz, C_7-H)	6.73 (1H, d, J = 8.30 Hz, C_7-H) 7.03 (1H, dd, J = 8.29, 0.98 Hz, C_6-H) 7.37 (1H, yaygın s, C_4-H)	7.54 (1H, s)	10.29 (1H, s)
3c	**OCF_3**	6.55 (1H, d, J = 1.95 Hz, C_4-H) 6.65 (1H, dd, J = 7.81, 1.95 Hz, C_6-H) 7.06 (1H, d, J = 8.30 Hz, C_7-H)	6.95 (1H, d, J = 8.30 Hz, C_7-H) 7.31 (1H, dd, J = 8.30, 1.95 Hz, C_6-H) 7.53 (1H, d, J = 1.95 Hz, C_4-H)	7.61 (1H, s)	10.60 (1H, s)
3d	**F**	6.53 (1H, d, J = 1.95 Hz, C_4-H) 6.64 (1H, dd, J = 7.81, 1.95 Hz, C_6-H) 7.05 (1H, d, J = 7.81 Hz, C_7-H)	6.85 (1H, dd, J = 8.54, 4.14 Hz, C_7-H) 7.15 (1H, ddd, J = 8.78, 8.29, 2.92 Hz, C_6-H) 7.43 (1H, dd, J = 7.81, 2.44 Hz, C_4-H)	7.60 (1H, s)	10.42 (1H, s)
3e	**Cl**	6.53 (1H, d, J = 1.95 Hz, C_4-H) 6.65 (1H, dd, J = 8.30, 1.95 Hz, C_6-H) 7.06 (1H, d, J = 7.80 Hz, C_7-H)	6.86 (1H, d, J = 8.30 Hz, C_7-H) 7.35 (1H, dd, J = 8.54, 1.95 Hz, C_6-H) 7.55 (1H, d, J = 2.44 Hz, C_4-H)	7.58 (1H, s)	10.54 (1H, s)
3f	**Br**	6.53 (1H, d, J = 2.44 Hz, C_4-H) 6.65 (1H, dd, J = 7.81, 1.95 Hz, C_6-H) 7.06 (1H, d, J = 8.29 Hz, C_7-H)	6.82 (1H, d, J = 8.29 Hz, C_7-H) 7.48 (1H, dd, J = 8.30, 1.95 Hz, C_6-H) 7.65 (1H, d, J = 1.96 Hz, C_4-H)	7.58 (1H, s)	10.55 (1H, s)
3g	**NO_2**	6.60 (1H, d, J = 2.13 Hz, C_4-H) 6.69 (1H, dd, J = 8.23, 2.13 Hz, C_6-H) 7.10 (1H, d, J = 8.24 Hz, C_7-H)	7.06 (1H, d, J = 8.85 Hz, C_7-H) 8.25 (1H, dd, J = 8.25, 2.44 Hz, C_6-H) 8.28 (1H, d, J = 2.44 Hz, C_4-H)	7.60 (1H, s)	11.12 (1H, s)

Benzotiyazol artığının C_7-H protonunun etrafındaki elektron yoğunluğu S atomunun indüktif etkisi ile azaldığından, daha az gölgelenerek daha düşük alan şiddetinde (δ 7.03-7.10 ppm) rezonansa gelmekte, bu proton sinyali dublet (*o*-eşleşmesi, J=7.81-8.30 Hz) olarak izlenmektedir. Hesaplanan değerler benzotiyazolin halkasında sübstitüent etkisini doğrulamaktadır [253] (Bkz. Tablo 5-14).

Tablo 5-14: Benzotiyazolin protonlarının kimyasal kaymalarına sübstitüent etkisi

H	**-NH-**	**-Cl**	**-S-**
C_4	-0.75	0.03	0.1
C_6	-0.65	0.03	0.2
C_7	-0.65	-0.02	0.37

C_4-H→ 7.27 - 0.75 + 0.03 + 0.1= 6.65

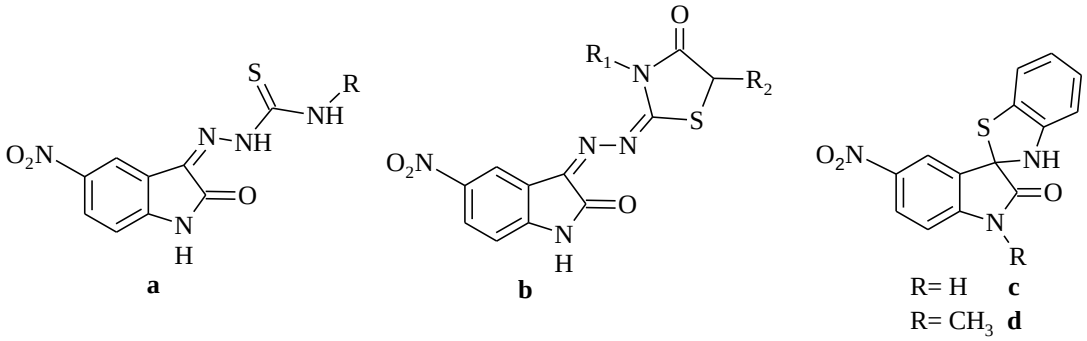
C_6-H→ 7.27 - 0.65 + 0.03 + 0.2= 6.85

C_7-H→ 7.27 - 0.65 - 0.02 + 0.37= 6.93

3a Bileşiğinin indol artığındaki protonların kimyasal kayma değerleri incelendiğinde indol protonlarının yukarı alandan başlamak üzere C_7, C_5, C_6, C_4 sırasıyla izlendiği görülmektedir. C_7-H ve C_5-H protonları –CONH- grubunun mezomerik etkisi ile gölgelenmekte ve bu nedenle literatüre uygun olarak bu absorpsiyonlar yüksek alan şiddetine (δ 6.84 ve 7.05 ppm) kaymakta, indol C_6-H ve C_4-H protonlarının kimyasal kaymaları daha yüksek ppm değerinde (δ 7.29 ve 7.55 ppm) izlenmektedir. C_4-H protonunun *m*-eşleşmesi ile dublet, C_5-H ve C_6-H protonlarının *o*- ve *m*- eşleşmesi ile dublet dublet dublet (tripletin dubleti, J=7.81, 7.32, 0.98 Hz ve 7.81, 7.32, 1.47 Hz), C_7-H protonunun *o*- eşleşmesi ile dublet (J=7.81 Hz) şeklinde bölünmesi ve bu piklere ait etkileşme değişmezi değerlerinin literatüre uygun olması bulgularımızı doğrulamaktadır.

3b-g Bileşiklerinde indol halkasının 5-konumundaki sübstitüentlerin indol halka protonlarının kimyasal kaymalarına etkileri incelendiğinde, indol halka protonlarının absorpsiyon pozisyonlarının nonsübstitüe türeve benzer şekilde yukarı alandan başlamak üzere C_7, C_6, C_4 sırasını izlediği görülmektedir. Bu bileşiklerde CH_3, OCF_3 ve halojenlerin (F, Cl, Br) kimyasal kaymayı fazla etkilemediği, oysa **3g** bileşiğinde NO_2 grubunun çevresindeki elektron yoğunluğunu azaltması nedeniyle indol proton rezonanslarını daha düşük alan şiddetine kaydırdığı belirlenmektedir. İndol artığının C_7,

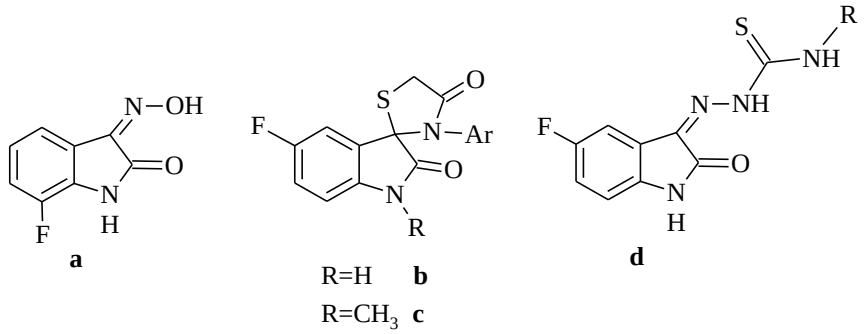
C_6, C_4 protonlarında gözlenen bu kayma, aynı zamanda indol NH absorpsiyonunu da etkilemekte, **3a-f** bileşiklerinde δ 10.29-10.60 ppm alanında gözlenen indol NH protonu NO_2 grubunun indüktif etkisi ile **3g** bileşiğinde 11.12 ppm de sinyal vermektedir. Literatürde yer alan çeşitli 5-nitro-1*H*-indol-2,3-dion türevlerinin kimyasal kayma değerleri bu verileri destekler niteliktedir (Bkz. Tablo 5-15) [121, 217, 242, 254, 255].



Tablo 5-15: 5-Nitro-1*H*-indol-2,3-dion türevlerinin kimyasal kayma değerleri

Bileşik	İndol NH	C_4-H	C_6-H	C_7-H	Kaynak
a	11.74-11.80 (br. s)	8.56-8.70 (d)	8.26-8.29 (dd)	7.09-7.14 (d)	[254]
b	11.28-11.43 (s)	7.98-8.94 (d)	8.18-8.30 (dd/m)	6.98-7.07 (d)	[255]
c	11.07 (s)	8.27 (d)	8.25 (dd)	7.07 (d)	[121]
d	-	8.29 (d)	8.34 (dd)	7.29 (d)	[121]

3a-g Bileşiklerinde (**3d** hariç) indol C_7-H protonu, C_6-H protonu ile *o*-eşleşmesi yaparak δ 6.73-7.06 ppm alanında dublet (J=8.29-8.85 Hz) olarak gözlenirken, indol halkasının 5-konumunda flor içeren **3d** bileşiğinde C_6-H ve F ile sırasıyla *o*- ve *m*-eşleşmesi yaparak δ 6.85 ppm de dublet dublet (J=8.54, 4.14 Hz) şeklinde sinyal vermektedir. İndol C_6-H protonu **3d** bileşiği hariç C_7-H ile *o*-eşleşmesi, C_4-H ile *m*-eşleşmesi yaparak δ 7.03-8.25 ppm alanında dublet dublet (J=7.81-8.54 ve 0.98-2.44 Hz) olarak gözlenmiştir. Bu proton **3d** bileşiğinde C_7-H ve F ile *o*-eşleşmesi ve C_4-H ile *m*-eşleşmesi yaparak 7.15 ppm de dublet dublet dublet (J=8.78, 8.29, 2.92 Hz) şeklinde pik vermektedir. C_4-H protonu 5-CH_3 sübstitüe **3b** bileşiğinde δ 7.37 ppm de yaygın singlet olarak gözlenirken, **3d** bileşiği hariç diğer bileşiklerde C_6-H ile *m*-eşleşmesi ile yaparak δ 7.53-8.28 ppm alanında dublet (J=1.95-2.44 Hz) olarak izlenmiştir. Bu proton **3d** bileşiğinde F ve C_6-H ile sırasıyla *o*- ve *m*- eşleşmesi yaparak δ 7.43 ppm de dublet dublet (J=7.81, 2.44 Hz) olarak bölünmektedir. Literatürde kayıtlı 5-/7-floro-1*H*-indol-2,3-dion türevlerinin kimyasal kayma değerleri saptadığımız bulguları doğrulamaktadır (Bkz. Tablo 5-16) [168, 234, 256].



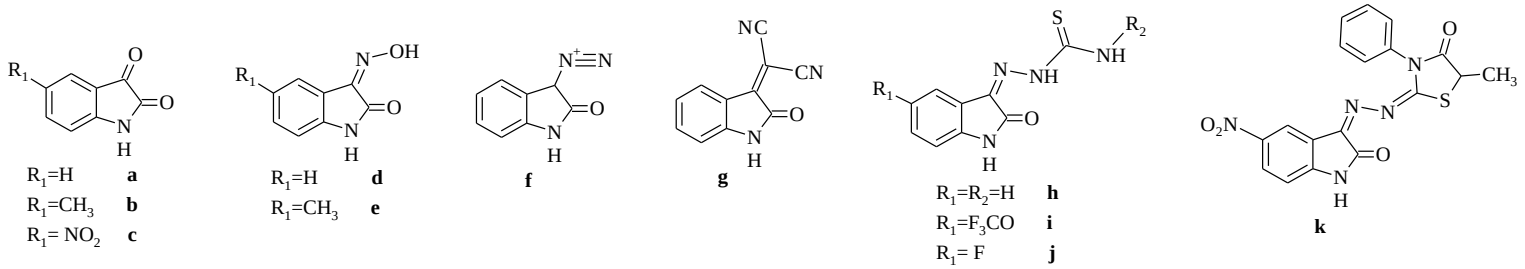
Tablo 5-16: 5-/7-Floro-1*H*-indol-2,3-dion türevlerinin kimyasal kayma değerleri

Bileşik	İndol NH	C_4-H	C_5-H	C_6-H	C_7-H	Kaynak
a	10.14 (br. s)	7.83 (dd) (J=7.0, 1.0 Hz)	7.06 (ddd) (J=8.5, 7.5, 4.6 Hz)	7.20 (ddd) (J=10.1, 8.5, 1.1 Hz)	-	[234]
b	10.60 (s)	7.41 (m)	-	6.93 (m)	6.68 (m)	[168]
c	-	7.43 (m)	-	7.06 (m)	6.86 (m)	[168]
d	11.09-11.30 (s)	7.44-7.65 (dd) (J=8.08-8.14 Hz 2.44-2.74 Hz)	-	7.03-7.2 (dt) (J=8.42-9.30 Hz 2.28-2.97 Hz)	6.78-6.95 (dd) (J=8.54-8.70 4.10-4.27)	[256]

5.2.4. HSQC ve HMBC Verileri:

3a-g Bileşiklerinin ^{1}H-NMR bulgularını desteklemek, moleküllerdeki karbon rezonanslarını değerlendirerek yapıyı doğrulamak için seçilen örneklerin ^{13}C-NMR spektrumları alınmış, tek bağ uzaklığında ^{13}C-^{1}H ilişkisini gösteren HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation), iki ve üç bağ etkileşimlerini gösteren katerner ve protonlanmış karbon sinyallerini tanımlamak için HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) deneyleri uygulanmıştır.

İsatinin halka karbonlarına ait literatürdeki değerler incelendiğinde, rezonans sırasının yukarı alandan başlamak üzere C_7, C_{3a}, C_5, C_4, C_6, C_{7a}, C_2, C_3 şeklinde olduğu, ketonik yapıdaki C_3, amidik yapıdaki C_2 ve laktam NH ına bağlı C_{7a} karbonlarının en yüksek ppm değerinde izlendiği, C_3 ün *o*- ve *p*- konumundaki karbonların (C_4 ve C_6), NH ın *o*- ve *p*- konumundaki karbonlardan (C_5 ve C_7) daha düşük alanda pik verdiği görülmektedir. İsatin ve türevlerinde kimyasal kaymanın çözücü polaritesinden etkilenmediği, 3 ve 5-konumundaki sübstitüent etkisi ile değiştiği gözlenmektedir (Bkz.Tablo 5-17).

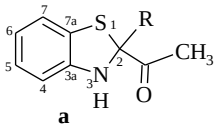


Tablo 5-17: Bileşik **a-k**' nın ^{13}C-NMR verileri

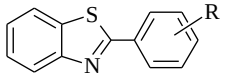
Bileşik	C_2	C_3	C_{3a}	C_4	C_5	C_6	C_7	C_{7a}	Çözücü	Kaynak
a	159.3	184.4	117.7	124.6	122.7	138.4	112.2	150.7	$CDCl_3$	[257]
	159.3	184.4	117.7	138.3	122.8	124.6	112.4	150.8	$CDCl_3$	[258]
	159.4	184.4	117.8	124.7	122.8	138.4	112.2	150.7	DMSO-d_6	[240]
	159.3	184.3	117.7	124.6	122.7	138.3	112.2	150.7	DMSO-d_6	[259]
b	159.4	184.5	117.7	124.7	132.0	138.8	112.0	148.5	DMSO-d_6	[259]
c	159.36	184.48	117.66	124.69	131.90	138.69	111.92	148.44	DMSO-d_6	[260]
	159.72	182.33	117.96	119.53	142.67	133.05	112.53	155.18	DMSO-d_6	[261]
d	164.5	144.2	116.0	127.1	122.0	132.0	110.2	142.6	DMSO-d_6	[259]
e	164.6	144.3	116.0	127.5	130.8	132.2	110.0	140.3	DMSO-d_6	[259]
f	168.0	60.1	117.0	125.1	121.2	119.0	110.0	132.8	$CDCl_3$	[258]
g	163.6	150.4	118.5	125.7	122.8	137.7	111.6	146.4	DMSO-d_6	[240]
h	162.6	132.2	119.9	120.9	122.3	131.3	111.1	142.3	DMSO-d_6	[262]
i	163.12-163.46	141.50-142.12	121.93-122.16	114.18-117.19	143.97-144.31	124.26-124.99	112.55-112.94	130.88-132.21	DMSO-d_6	[263]
j	163.13-163.17	138.87-138.91	121.83-121.86 (d, J=9.20-9.41 Hz)	108.17-108.60 (d, J=25.7-25.8 Hz)	158.68-158.70 (d, J=237.4-237.7 Hz)	117.69-117.76 (d, J=24.1 Hz)	112.46-112.50 (d, J=8.09-8.10 Hz)	131.37-131.57 (d, J=3.09-3.23 Hz)	DMSO-d_6	[256]
k	165.00	149.00	116.00	128.78	142.00	122.88	110.55	142.00	DMSO-d_6	[255]

Literatürde kayıtlı benzotiyazolin ve benzotiyazol türevlerinin ^{13}C kimyasal kayma değerleri belirlenmiş, bu karbon sinyalleri yüksek alandan başlamak üzere C_4, C_6, C_7, C_5, C_{7a}, C_{3a} [243]; C_7, C_4, C_6, C_5, C_{7a}, C_{3a} [244, 264] veya C_4, C_7, C_6, C_5, C_{7a}, C_{3a} [265-268] sırası ile izlenmiştir. Kükürt ve amin gruplarının gölgelemelerindeki farklılıklar nedeniyle bileşiklerin tümünde C_{7a} sinyali C_{3a} sinyalinden yukarı alanda kaydedilmiş, 125.6-127.15 ppm de gözlenen C_5 sinyali **c** bileşiğinde klor atomunun varlığında 130.4-131.95 ppm e kaymıştır (Bkz. Tablo 5-18) [265-269].

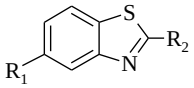
Tablo 5-18: Benzotiyazolin ve benzotiyazol türevlerinin ^{13}C-NMR verileri



a



b

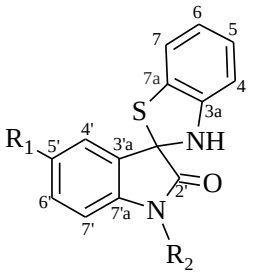


c

Bileşik	**3a**	**4**	**5**	**6**	**7**	**7a**	**Çözücü**	**Kaynak**
a, R=CH_3	145.5	112.1	126.0	121.3	121.5	131.6	$CDCl_3$	[243]
a, R=C_6H_5	145.9	112.0	126.1	121.4	121.7	125.0	$CDCl_3$	[243]
b, R=H	153.77	123.09	126.8	125.69	122.47	134.67	DMSO-d_6	[244]
	150.2	119.9	126.4	125.5	124.9	131.9	DMSO-d_6	[268]
b, R=4-OCH_3	153.0	121.6	125.9	124.5	121.9	133.7	DMSO-d_6	[268]
b, R=4-Br	153.96	123.22	126.4	125.35	122.56	134.93	DMSO-d_6	[244]
b, R=2-Cl	152.14	123.41	126.74	125.86	122.16	135.56	DMSO-d_6	[244]
b, R=4-Cl	153.2	122.2	126.5	125.5	122.7	135.8	DMSO-d_6	[268]
b, R=2,4-diCl	152.0	123.41	126.89	126.17	122.41	135.53	DMSO-d_6	[244]
b, R=2-Cl, 4-F	152.11	123.29	126.95	126.06	122.37	135.5	DMSO-d_6	[244]
b, R=2-Cl, 5-NO_2	151.74	123.49	127.15	126.44	122.29	135.69	DMSO-d_6	[244]
b, R=2-Br, 5-OCH_3	152.3	123.37	126.78	125.96	122.27	135.69	DMSO-d_6	[244]
c, R_1= R_2=H	152.6	122.1	125.8	125.1	122.7	133.2	DMSO-d_6	[265, 268]
	153.2	123.52	126.02	125.38	121.76	133.66	$CDCl_3$	[264]
c, R_1=H, R_2=CH_3	152.6	121.5	125.6	124.3	121.5	134.9	DMSO-d_6	[265, 268]
c, R_1=Cl, R_2=CH_3	153.5	121.1	130.4	124.4	122.9	133.6	DMSO-d_6	[265]
	154.26	122.05	131.95	125.16	122.3	133.92	$CDCl_3$	[269]

Benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinon türevlerinin HSQC bulgularının kaydedildiği çalışmada spiro karbon rezonansının 74.10-74.80 ppm de izlendiği,

literatüre uygun olarak katerner karbonlardan $C_{2'}$, C_{3a} ve $C_{7a'}$ rezonanslarının en düşük alanda sinyal verdiği bildirilmekte, indol halkasının sinyallerinde 5-konumundaki sübstitüentlerin etkisi ile rezonans sırasında değişiklikler görülmekte, benzotiyazolin karbon sinyalleri yüksek alandan başlamak üzere C_4, C_6, C_7, C_5, C_{7a}, C_{3a} sırası ile gözlenmektedir (Bkz. Tablo 5-19) [121].



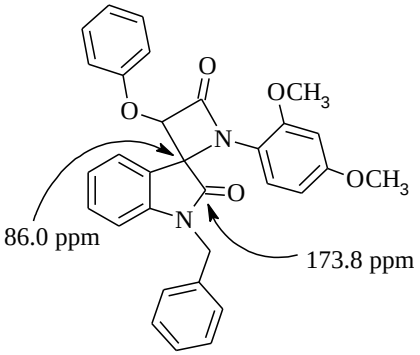
$R_1=R_2=CH_3$			**a**
$R_1=CF_3O$	$R_2=CH_3$		**b**
$R_1=Cl$	$R_2=CH_3$		**c**
$R_1=Br$	$R_2=CH_3$		**d**
$R_1=NO_2$	$R_2=CH_3$		**e**

Tablo 5-19: Benzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinonların HSQC bulguları

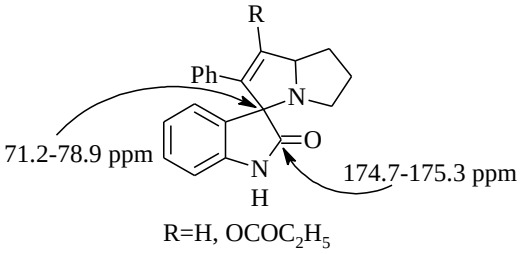
	a	**b**	**c**	**d**	**e**
$C_{2'}$	175.12	175.18	174.88	174.75	175.62
$C_{3a'}$	124.77	124.45	124.54	124.53	124.35
$C_{4'}$	126.41	119.34	125.77	128.46	120.90
$C_{5'}$	130.04	144.77	127.75	115.30	143.78
$C_{6'}$	131.43	124.58	131.07	133.93	128.13
$C_{7'}$	109.46	110.97	111.43	111.93	110.35
$C_{7a'}$	141.04	142.64	142.34	142.35	149.39
C_{3a}	147.68	147.38	147.40	147.37	147.07
C_4	109.17	109.43	109.75	109.45	109.74
C_5	126.46	126.59	126.57	126.58	126.74
C_6	119.40	119.71	119.71	119.72	120.02
C_7	121.74	121.89	121.89	121.90	122.04
C_{7a}	132.96	131.93	132.12	132.46	131.41
Spiro C	74.80	74.55	74.56	74.51	74.10

3a ve **3b** bileşiklerinin HSQC, **3d** ve **3e** bileşiklerinin HMBC spektrumlarında isatinin 3 konumundaki 184.4 ppm de gözlenen keton C=O karbonuna (C_3) ait rezonansın gözlenmemesi, yalnız laktam C=O karbonuna (C_2) ait rezonansın 176.31-176.66 ppm de izlenmesi, 75.54-75.77 ppm alanında spiro C nu tanımlayan sinyalin varlığı spiroindolinon yapısını doğrulamaktadır (Bkz. Şekil 4-21, 4-22, 4-28, 4-29).

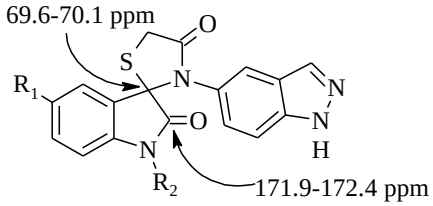
Bu bulguların literatürde yer alan spiroindolinonların rezonansları ile uyumlu olması [153, 159, 168, 172, 173, 266, 267], HMBC spektrumları incelendiğinde C_2 rezonansının **3d** bileşiğinde benzotiyazolin NH ı, **3e** bileşiğinde benzotiyazolin ve indol NH ı ile ilişkili olması, spiro C nun ise her iki bileşikte indol C_7-H ve C_4-H ı ile ilişki göstermesi, ayrıca **3d** bileşiğinde benzotiyazolin NH ı nın **3e** bileşiğinde indol NH ı ile ilişkili olması, bu verileri destekler niteliktedir.



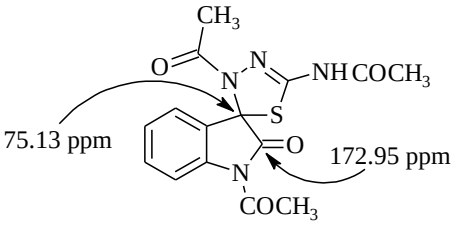
[153, 266]



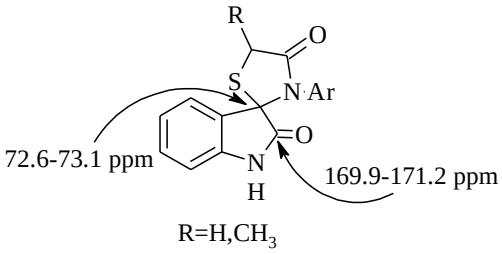
[159]



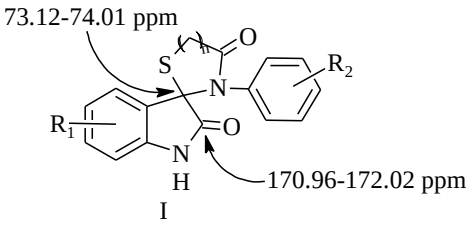
[168]



[267]

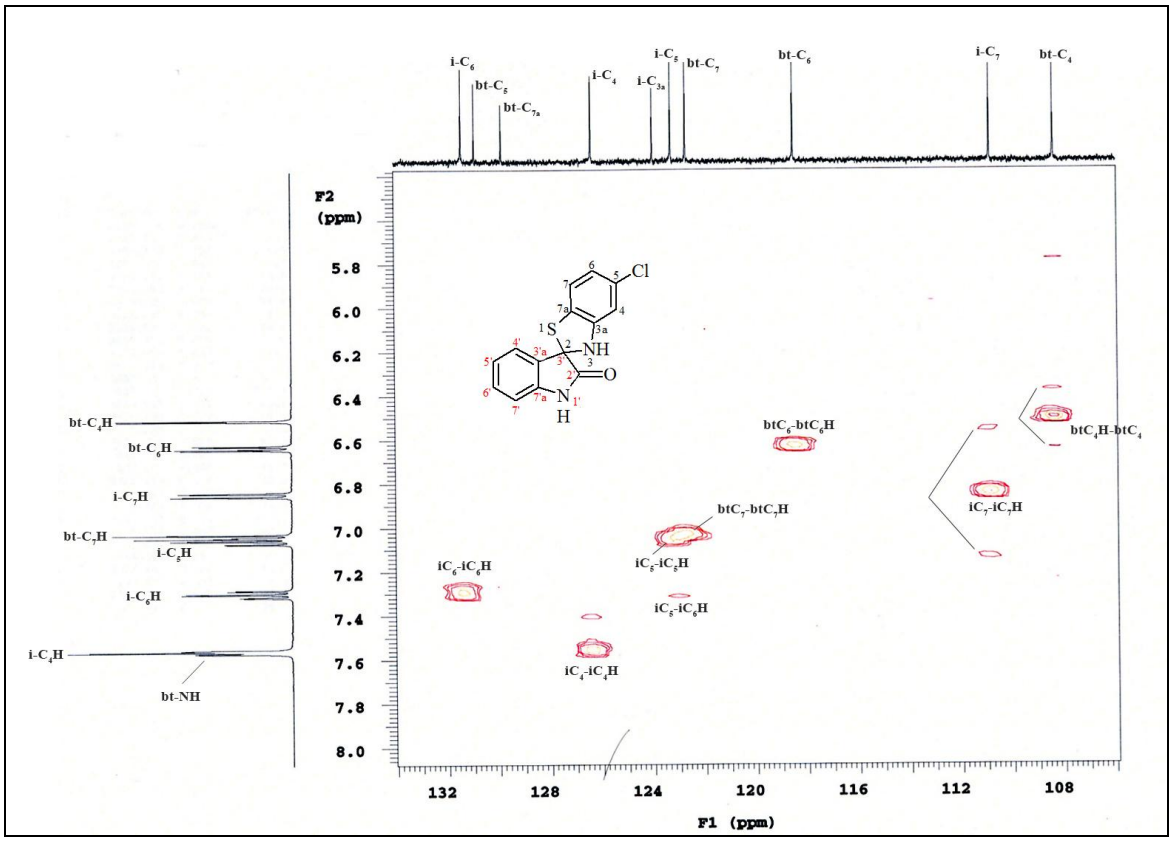


[172]

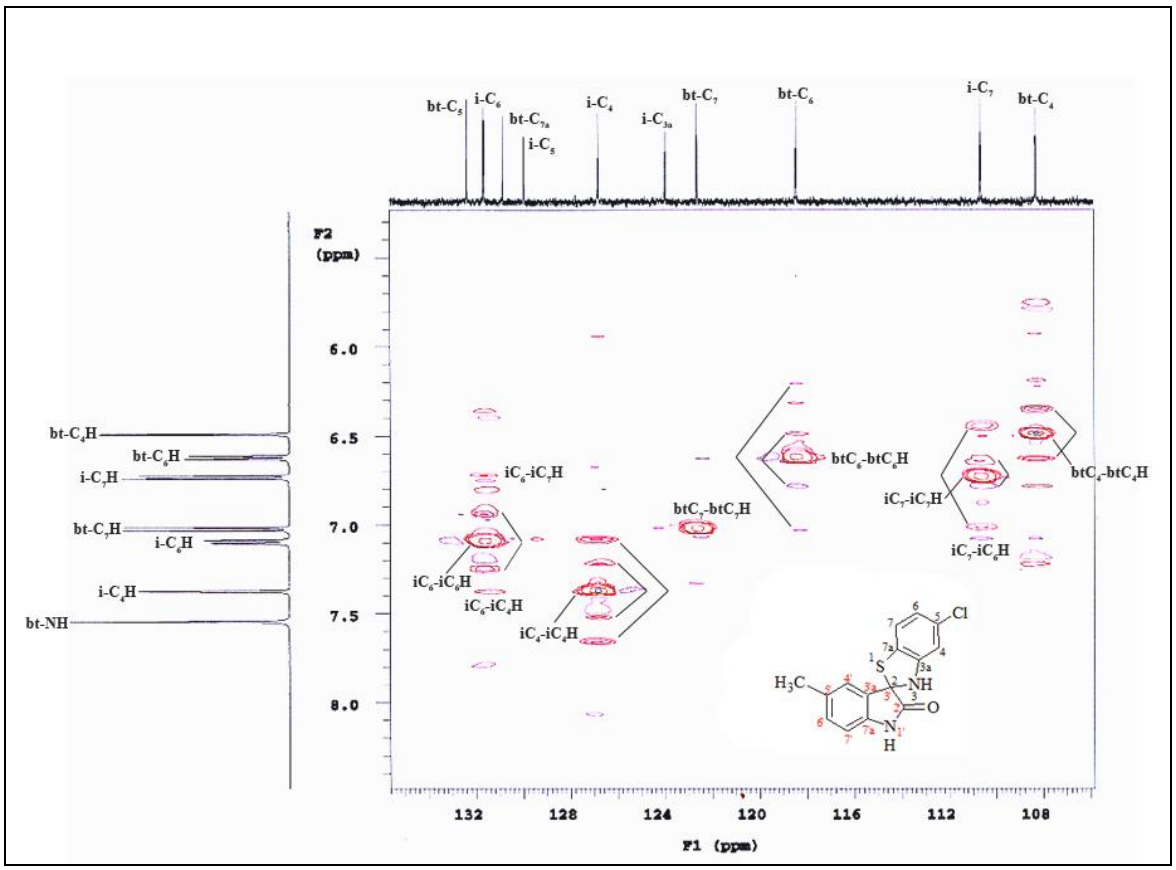


[173]

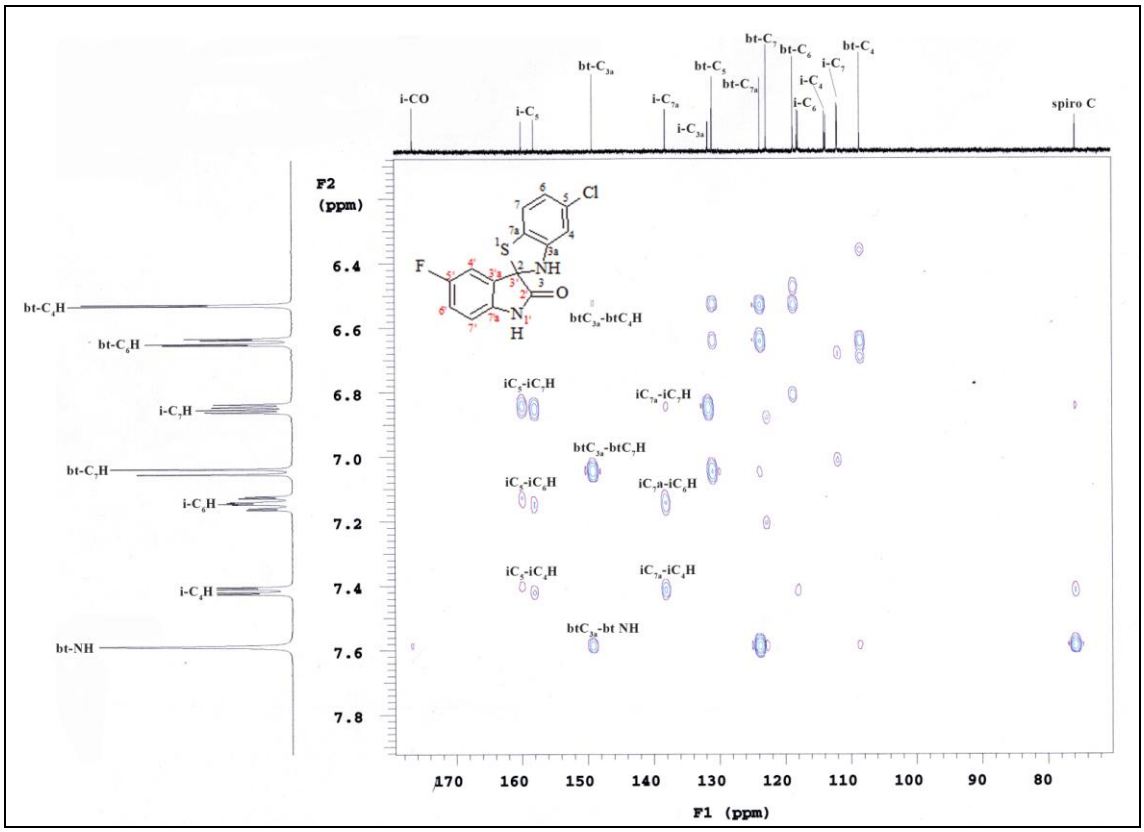
3a, **3b**, **3d** ve **3e** Bileşiklerinde benzotiyazoline ait hidrojen taşıyan C_4 (δ 108.30-108.62 ppm), C_6 (δ 118.46-118.76 ppm) ve C_7 (δ 122.64-122.78 ppm) karbonlarına ait rezonansları HSQC deneyleri doğrulamış, uzun alan ^{13}C-^{1}H ilişkisini gösteren HMBC deneyleri ile bu veriler kesinlik kazanmıştır (Bkz. Şekil 5-3, 5-4, 5-5, 5-6, 5-7, 5-8; Tablo 5-20, 5-21, 5-22, 5-23). Bu bulgular incelendiğinde amin grubunun *o*- ve *p*-, klorun *o*- konumunda bulunan C_4 ve C_6 nın benzotiyazol karbonları arasında



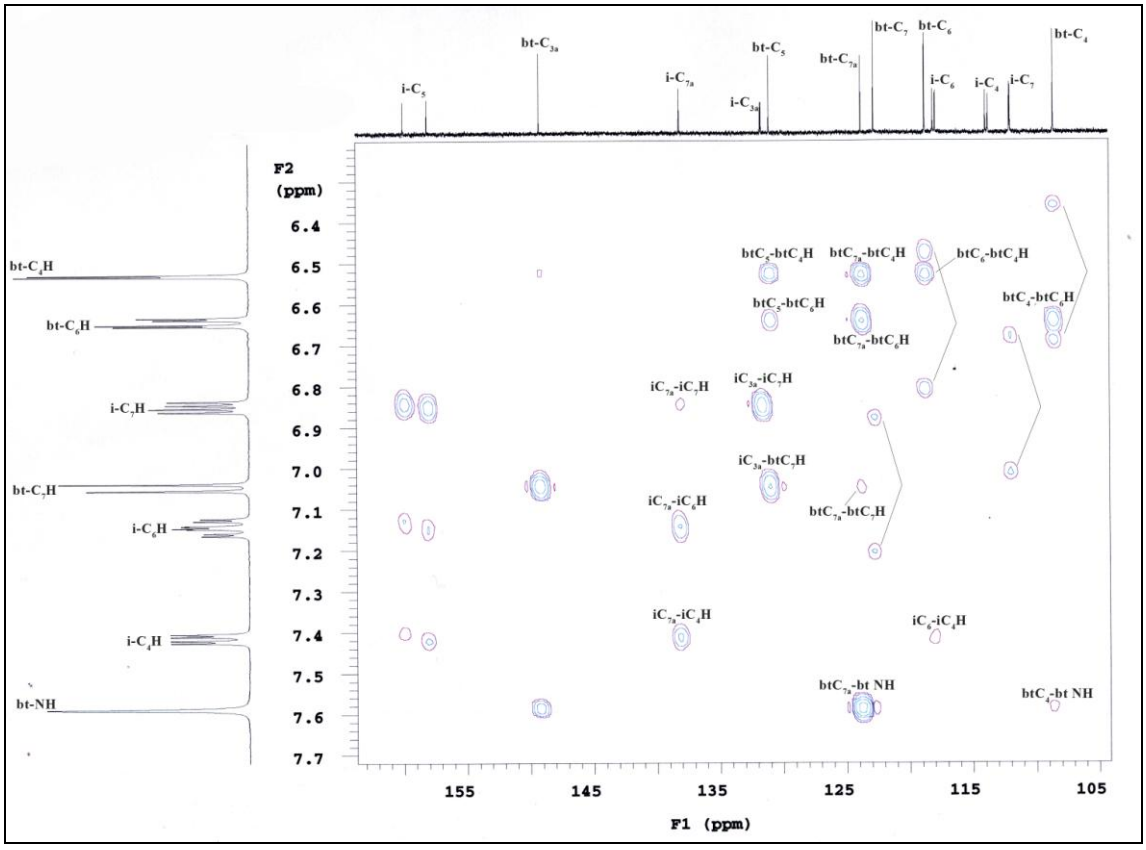
Şekil 5-3: Madde **3a**' nın HSQC spektrumu (106-134 ppm)



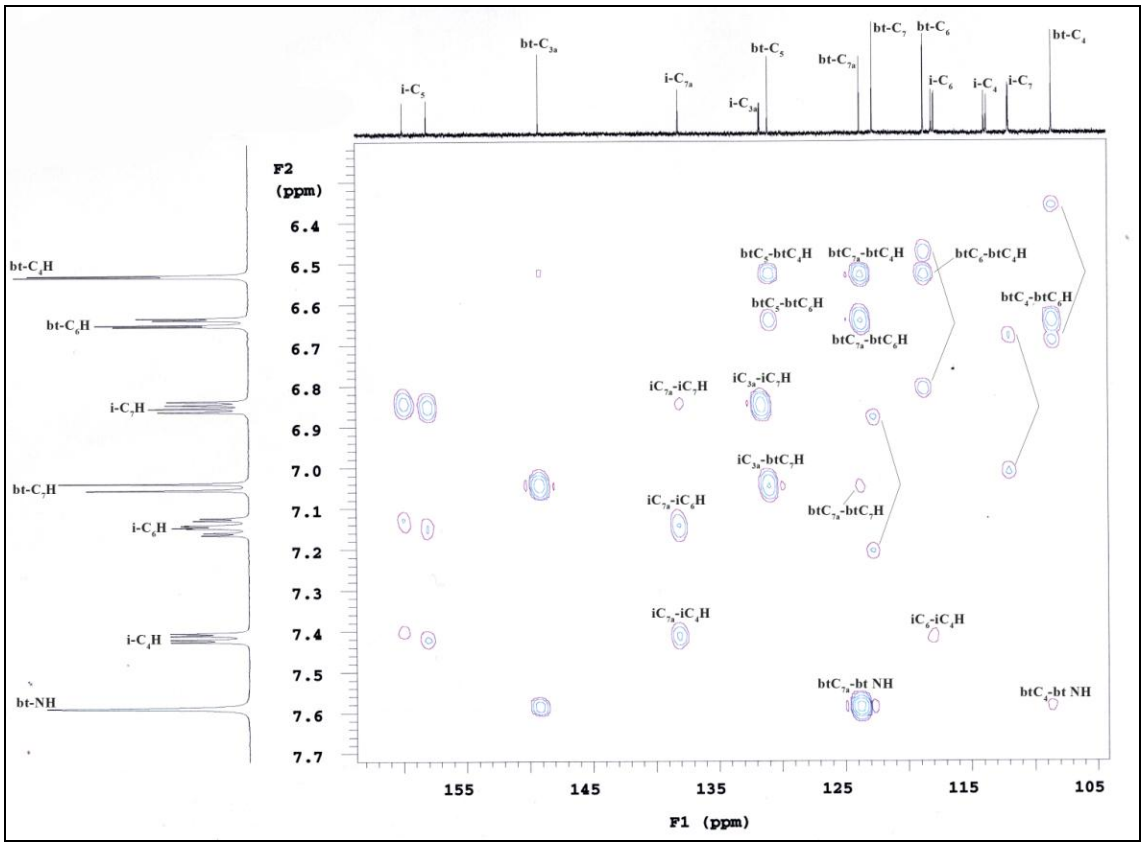
Şekil 5-4: Madde **3b**' nin HSQC spektrumu (106-136 ppm)



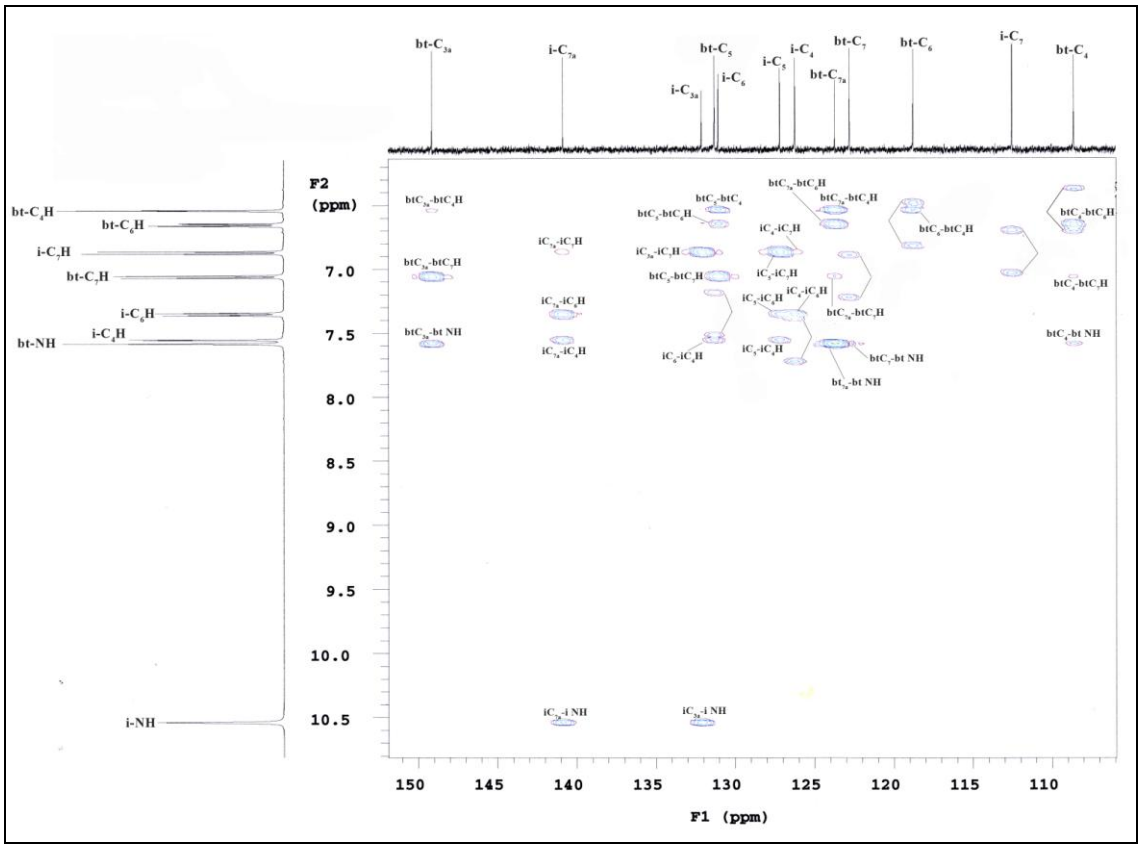
Şekil 5-5 Madde **3d**' nin HMBC spektrumu (70-180 ppm)



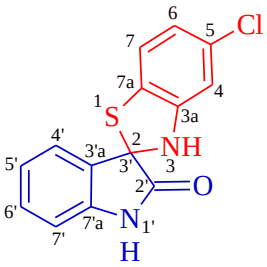
Şekil 5-6: Madde **3d**' nin HMBC spektrumu (105-165)



Şekil 5-7: Madde **3e**' nin HMBC spektrumu (70-180 ppm)

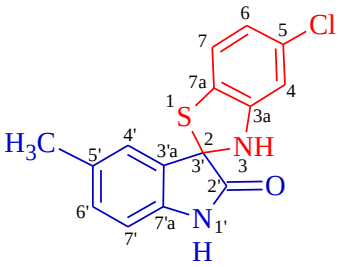


Şekil 5-8: Madde **3e**' nin HMBC spektrumu (105-152 ppm)



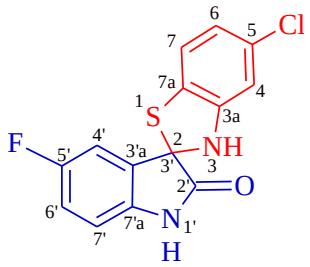
Tablo 5-20: 3a Bileşiğinin HSQC bulguları

No	^{1}H-NMR	^{13}C-NMR	^{13}C-^{1}H ilişkileri	^{1}H-^{13}C ilişkileri
i-C_2	-	176.53	-	-
bt-C_{3a}	-	149.43	-	-
i-C_{7a}	-	142.03	-	-
i-C_6	7.29	131.43	i-C_6H	i-C_6
bt-C_5	-	130.92	-	-
i-C_{3a}	-	129.86	-	-
i-C_4	7.55	126.38	i-C_4H	i-C_4
bt-C_{7a}	-	123.99	-	-
i-C_5	7.05	123.28	i-C_5H ; i-C_6H	i-C_5
bt-C_7	7.03	122.70	bt-C_7H	bt-C_7
bt-C_6	6.62	118.52	bt-C_6H	bt-C_6
i-C_7	6.84	110.88	i-C_7H	i-C_7
bt-C_4	6.50	108.40	bt-C_4H	bt-C_4
Spiro C	-	75.64	-	-
bt-NH	7.56	-	-	-
i-NH	10.39	-	-	-



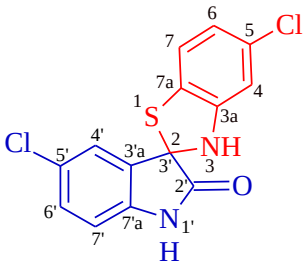
Tablo 5-21: 3b Bileşiğinin HSQC bulguları

No	^{1}H-NMR	^{13}C-NMR	^{13}C-^{1}H ilişkileri	^{1}H-^{13}C ilişkileri
i-C_2	-	176.56	-	-
bt-C_{3a}	-	149.41	-	-
i-C_{7a}	-	139.44	-	-
bt-C_5	-	132.38	-	-
i-C_6	7.09	131.67	i-C_6H	i-C_6
i-C_{3a}	-	130.87	-	-
i-C_5	-	129.97	-	-
i-C_4	7.37	126.82	i-C_4H	i-C_4
bt-C_{7a}	-	123.98	-	-
bt-C_7	7.03	122.64	bt-C_7H	bt-C_7
bt-C_6	6.62	118.46	bt-C_6H	bt-C_6
i-C_7	6.73	110.66	i-C_7H ; i-C_6H	i-C_7
bt-C_4	6.50	108.30	bt-C_4H	bt C_4
Spiro C	-	75.75	-	-
CH_3	2.26	21.18	-	-
i-NH	10.29	-	-	-
bt-NH	7.54	-	-	-



Tablo 5-22: 3d Bileşiğinin HMBC bulguları

No	^{1}H-NMR	^{13}C-NMR	^{13}C-^{1}H ilişkileri	^{1}H-^{13}C ilişkileri
i-C_2	-	176.66	bt-NH	-
i-C_5	-	159.04	i-C_7H; i-C_6H; i-C_4H	-
bt-C_{3a}	-	149.21	bt-C_4H; bt-C_7H; bt NH	-
i-C_{7a}	-	138.13	i-C_7H; i-C_6H; i-C_4H	-
i-C_{3a}	-	131.66	i-C_7H	-
bt-C_5	-	131.18	bt-C_4H; bt- C_6H; bt C_7H	-
bt-C_{7a}	-	123.75	bt-C_4H ; bt- C_6H; bt C_7H; bt-NH	-
bt-C_7	7.05	122.76	-	bt-C_{3a}; bt-C_5; bt-C_{7a}
bt-C_6	6.64	118.70	bt-C_4H	bt-C_5; bt-C_{7a}; bt-C_4
i-C_6	7.15	117.96	i-C_4H	i-C_5; i-C_{7a}
i-C_4	7.43	113.79	-	i-C_5; i-C_{7a}; i-C_6; Spiro C
i-C_7	6.85	111.98	-	i-C_5; i-C_{7a}; i-C_{3a}; Spiro C;
bt-C_4	6.53	108.56	bt-C_6H; bt-NH	bt-C_{3a}; bt C_5; bt- C_{7a}; bt-C_6
Spiro C	-	75.77	i-C_7H; i-C_4H; bt-NH	-
bt-NH	7.59	-	-	i-C_2; bt-C_{3a}; bt-C_{7a}; bt C_4; Spiro C
i-NH	10.42	-	-	-



Tablo 5-23: 3e Bileşiğinin HMBC bulguları

No	^{1}H-NMR	^{13}C-NMR	^{13}C-^{1}H ilişkileri	^{1}H-^{13}C ilişkileri
i-C_2	-	176.31	bt-NH; i-NH	-
bt-C_{3a}	-	149.12	bt-C_4H; bt-C_7H; bt-NH	-
i-C_{7a}	-	140.86	i-C_7H; i-C_6H; i-C_4H; i-NH	-
i-C_{3a}	-	132.11	i-C_7H ; i-NH	-
bt-C_5	-	131.05	bt-C_4H; bt-C_6H; bt-C_7H	-
i-C_6	7.35	131.29	i-C_4H	i-C_{7a}; i-C_5; i-C_4
i-C_5	-	127.16	i-C_7H; i-C_6H; i-C_4H	-
i-C_4	7.55	126.21	i-C_7H; i-C_6H	i-C_{7a}; i-C_6; i-C_5; spiro C
bt-C_{7a}	-	123.72	bt-C_4H; bt-C_6H; bt-C_7H; bt-NH	-
bt-C_7	7.06	122.78	bt-NH	bt-C_{3a}; bt-C5; bt-C7a; bt-C4
bt-C_6	6.65	118.76	bt-C_4H	bt-C_5; bt-C_{7a}; bt-C_4; spiro C
i-C_7	6.86	112.51	-	i-C_{7a}; i-C_{3a}; i-C_5 ; i-C_4
bt-C_4	6.53	108.62	bt-C_6H; bt-C_7H; bt-NH	bt-C_{3a}; bt-C_5; bt-C_{7a}; bt-C_6
Spiro C	-	75.54	i-C_7H; i-C_4H; i-NH	-
i-NH	10.54	-	-	i-C_2; i-C_{7a}; i C_{3a}; spiro C
bt-NH	7.58	-	-	i-C_2; bt-C_{3a}; bt C_{7a}; bt-C_7

en fazla gölgelendiği, kükürde göre *o*-, amine ve klora göre *m*- konumunda bulunan C_7 nin C_4 ve C_6 ya göre daha düşük alanda izlendiği görülmektedir. Bu karbon sinyallerinden C_4, **3d** bileşiğinde benzotiyazolin C_6-H ve NH ı, **3e** bileşiğinde benzotiyazolin C_6-H, C_7-H ve NH ile ilişkilidir. C_6 her iki bileşikte benzotiyazolin C_4-H ile, C_7 **3e** bileşiğinde benzotiyazolin NH ı ile ilişki göstermektedir. Benzotiyazol artığındaki δ 123.72-123.99 ppm, δ 130.92-132.38 ppm ve δ 149.12-149.43 ppm de izlenen ve hidrojen ilişkisi göstermeyen katerner karbonlar sırasıyla C_{7a}, C_5 ve C_{3a} olarak değerlendirilmiş, **3d** ve **3e** bileşiklerinin HMBC spektrumlarında C_{7a} rezonansının benzotiyazolin C_4-H, C_6-H, C_7-H ve NH ı ile, C_5 rezonansının benzotiyazolin C_4-H, C_6-H ve C_7-H ı ile, C_{3a} rezonansının benzotiyazolin C_4-H, C_7-H ve NH ı ile ilişki göstermesi önerilen değerlendirmeyi doğrulamıştır. Kükürt atomunun bağlı olduğu C_{7a}, *o*-konumundaki amin ve *p*-konumundaki klor atomu nedeniyle yüksek alanda rezonansa gelirken, amin grubunun bağlı olduğu C_{3a}, *o*-konumundaki kükürt ve *m*-konumundaki klor atomu nedeniyle düşük alanda sinyal vermektedir. Klor atomunun bağlı olduğu C_5 ise *p*-konumundaki kükürt ile biraz gölgelenmektedir. Benzotiyazol karbonlarında sübstitüent etkisi hesaplanan değerler ile desteklenmektedir [270].

Benzotiyazol C	**-NH-**	**-Cl**	**-S-**
C_{3a}	19.2	1.0	-2.0
C_4	-12.4	0.2	0.1
C_5	1.3	6.4	-3.7
C_6	-9.5	0.2	0.1
C_7	1.3	1.0	-2.0
C_{7a}	-12.4	-2.0	9.9

C_{3a}→128.5 + 19.2 + 1.0 - 2.0= 146.7

C_4→128.5 - 12.4 + 0.2 + 0.1= 116.4

C_5→128.5 + 1.3 + 6.4 - 3.7= 132.5

C_6→128.5 - 9.5 + 0.2 + 0.1= 119.3

C_7→128.5 + 1.3 + 1.0-2.0= 128.8

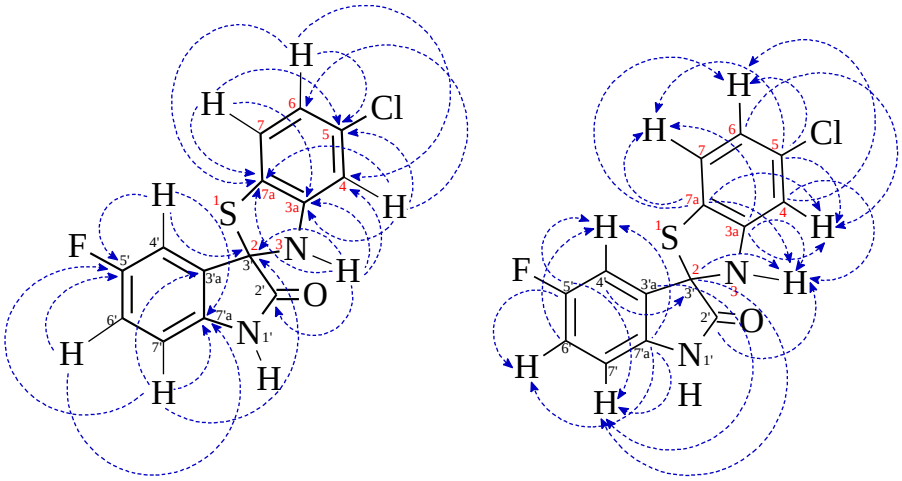
C_{7a}→128.5 - 12.4 - 2.0 + 9.9= 124.0

Nonsübstitüe indolinon artığı taşıyan **3a** bileşiğinin HSQC spektrumunda hidrojen taşıyan indol halka karbonları literatürde kayıtlı isatin karbon reazonanslarına [240, 257] uygun olarak yukarı alandan başlamak üzere C_7, C_5, C_4, C_6 sırasıyla pik vermekte, δ 110.88, 123.28, 126.38 ve 131.43 ppm de izlenen bu karbon sinyalleri indol halkası hidrojenleri ile ilişki göstererek ^{1}H-NMR değerlendirmesini doğrulamaktadır (Bkz. Tablo 5-20).

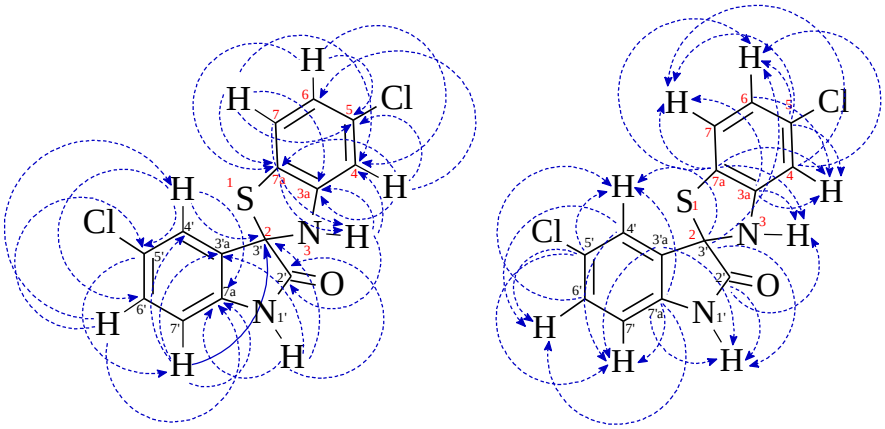
3b, **3d** ve **3e** Bileşiklerinin spektrumlarında indolinon artığının 5-konumundaki sübstitüentlerin (CH_3, F, Cl) etkisi ile indol karbon rezonanslarında kayma

gözlenmekte; fakat C_7, C_4, C_6 karbon sinyallerinin rezonans sırası değişmemektedir. **3b** bileşiğinin HSQC spektrumunda metil taşıyan C_5 karbonuna ait rezonans δ 129.97 ppm de izlenirken, C_7, C_4 ve C_6 karbonlarından kaynaklanan sinyaller sırasıyla δ 110.66, 126.82 ve 131.67 ppm de belirlenmektedir (Bkz. Tablo 5-21). **3d** ve **3e** nin HMBC spektrumları özellikle benzer kimyasal çevreye sahip benzotiyazolin ve indolinon halka karbonlarına ait rezonansları tam olarak belirlememize olanak sağlamış, **3d** nin spektrumda ^{13}C-^{19}F etkileşmesi göstererek dublet şeklinde bölünen ve etkileşme değişmezleri ile konumları doğrulanan sinyaller indolinon halka karbonlarının kimyasal kayma değerlerine kesinlik kazandırmıştır. **3d** bileşiğinin HMBC spektrumunda δ 159.04 ppm de gözlenen etkileşme değişmezi 238.68 Hz olan dublet flor taşıyan C_5 karbonunu tanımlamakta, bu karbon sinyali indol C_7-H, C_6-H, C_4-H ile ilişki göstermekte, δ 111.98 ppm de izlenen dublet (J=7.67 Hz) flora göre meta konumda bulunan C_7 karbon sinyalinden kaynaklanmaktadır. Florun orto konumundaki C_4 ve C_6 karbonları flor etkisi ile gölgelenerek δ 113.79 ve 117.96 ppm de dublet (J=24.93 ve 23.49 Hz) olarak gözlenmekte, C_6 rezonansının indol C_4-H ile ilişkili olduğu belirlenmektedir (Bkz. Tablo 5.22). **3e** bileşiğinin HMBC spektrumunda δ 112.51, 126.51, 127.16, 131.29 ppm' deki rezonanslar C_7, C_4, C_5 ve C_6 olarak değerlendirilmekte, bu karbon rezonanslarından C_4 ün indol C_7-H, ve C_6-H ile, C_5 in indol C_7-H, C_6-H ve C_4-H ile C_6 nın indol C_4-H ile, ilişki göstermesi bu değerlendirmeyi doğrulamaktadır (Bkz. Tablo 5-23) [271, 272].

3a ve **3b** nin HSQC spektrumlarında katerner karbonlar C_{3a} ve C_{7a} ile ilişkilendirilen, **3d** ve **3e** nin HMBC bulguları ile doğrulanan karbon sinyalleri δ 129.86-132.11 ve 138.13-142.03 ppm de gözlenmiştir. **3d** bileşiğinde C_{3a} ve C_{7a} karbon sinyalleri ^{13}C-^{19}F etkileşmesi göstererek, etkileşme değişmezleri ile doğrulanan dubletler (J=7.67 ve 1.92 Hz) şeklinde izlenmişlerdir. **3d** bileşiğinin HMBC spektrumu incelendiğinde C_{3a} rezonansının C_7-H, C_{7a} rezonansının indol C_7-H, C_6-H, ve C_4-H ile ilişkili olduğu, bu bileşikte benzotiyazolin NH sinyalinin indol C_2, benzotiyazol C_{3a}, C_{7a}, C_4 ve spiro C ile ilişki gösterdiği belirlenmektedir. **3e** Bileşiğinde C_{3a} sinyalinin indol C_7-H ve NH, C_{7a} sinyalinin indol C_7-H, C_6-H, C_4-H ve NH ile ilişkili olması bu verileri destekler niteliktedir. Şekil 5-9 ve 5-10' da **3d** ve **3e** nin ^{13}C-^{1}H ve ^{1}H-^{13}C ilişkileri formüller üzerinde görülmektedir.



Şekil 5-9: 3d' nin ^{13}C-^{1}H ve ^{1}H-^{13}C ilişkileri

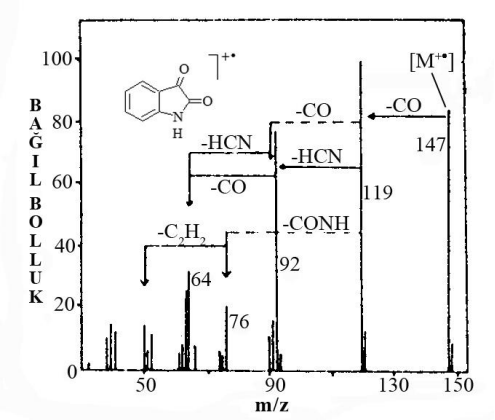


Şekil 5-10: 3e' nin ^{13}C-^{1}H ve ^{1}H-^{13}C ilişkileri

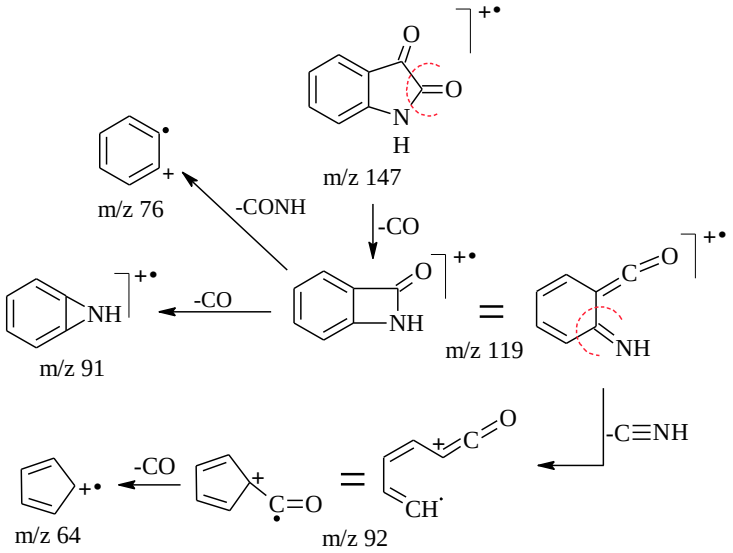
5.2.5. Kütle Verileri

Sentezlenen bileşiklerin molekül ağırlıklarını doğrulamak için elektrospray iyonizasyon (ESI) yöntemi **3a** ve **3d** bileşiklerine pozitif iyonizasyon, **3e** bileşiğine negatif iyonizasyon tekniği uygulanarak kütle spektrumları alınmış, **3b** bileşiğinin kütle spektrumu ise atmosfer basıncında kimyasal iyonlaştırma (Atmospheric Pressure Chemical Ionization=APCI) yöntemi ile pozitif iyonizasyon uygulanarak kaydedilmiştir.

Literatürde isatin ve türevleri ile ilgili çeşitli iyonizasyon yöntemi kullanılarak elde edilen birçok kütle bulgusu kayıtlıdır. Elektron çarptırma (Electron Impact= EI) tekniği kullanılarak yapılan kütle çalışmalarında isatin çekirdeğindeki esas parçalanmanın iki konumundaki karbon monoksit (CO) kaybı ile oluştuğu, bu parçanın temel pik olarak gözlendiği kaydedilmiş, bunu takiben oluşan diğer parçalar Şekil 5-11 ve Şema 5-1 de görüldüğü gibi yorumlanmış, hazırlanan N-d-isatin ve 3-^{13}C-isatin türevleri ile bu bulgular kanıtlanmıştır [273-279].

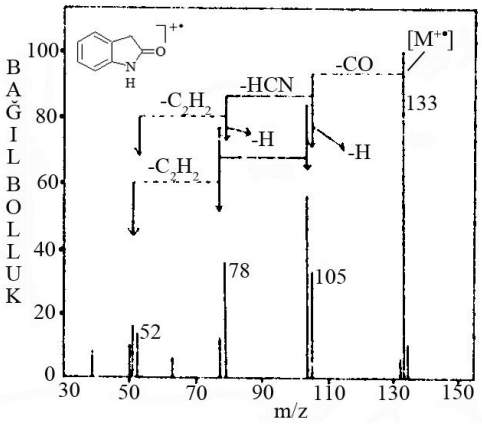


Şekil 5-11: İsatinin EI kütle spektrumunda izlenen parçalar

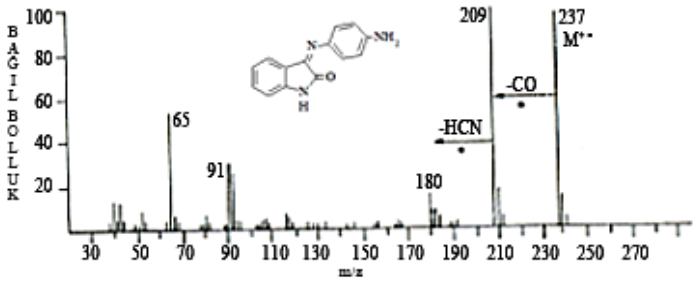


Şema 5-1: İsatin EI kütle spektrumunda izlenen parçalanmalar

1*H*-2-indolinon türevlerinin kütle spektrumlarında benzer bağ kırılmaları sonucu oluşan parçalar gözlenmekte, isatin halkasından CO kaybı ile oluşan parçalar genellikle temel pik olarak belirlenmektedir (Bkz. Şekil 5-12 ve 5-13) [254, 273, 275, 280, 281].

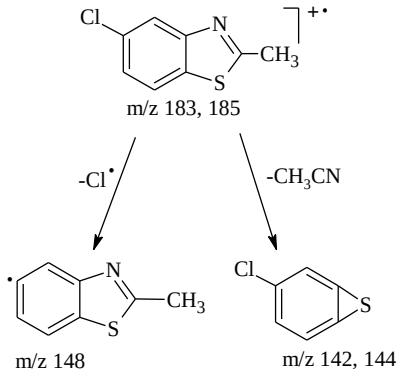


Şekil 5-12: 1*H*-2-indolinonun EI kütle spektrumunda izlenen parçalar

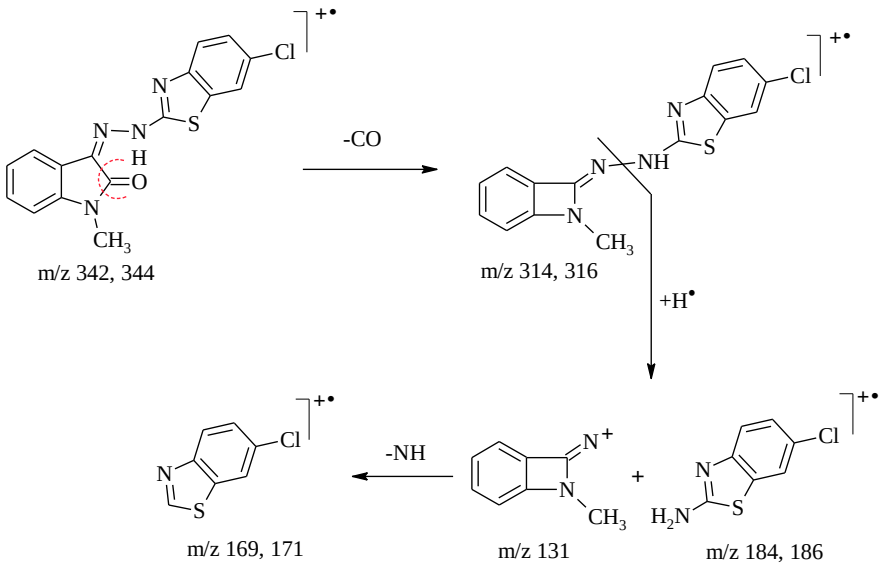


Şekil 5-13: 3-(4-Aminofenilimino)-1*H*-2-indolinonun EI kütle spektrumunda izlenen parçalar

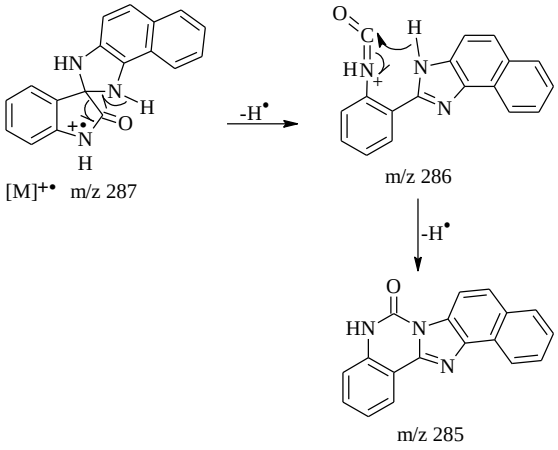
5-Kloro-2-metilbenzotiyazolün kütle spektrumunda moleküler iyon pikinin temel pik olduğu, benzotiyazol halkasından klor radikali ve asetonitrilin kaybı ile aşağıdaki parçaların oluştuğu görülmektedir [282].



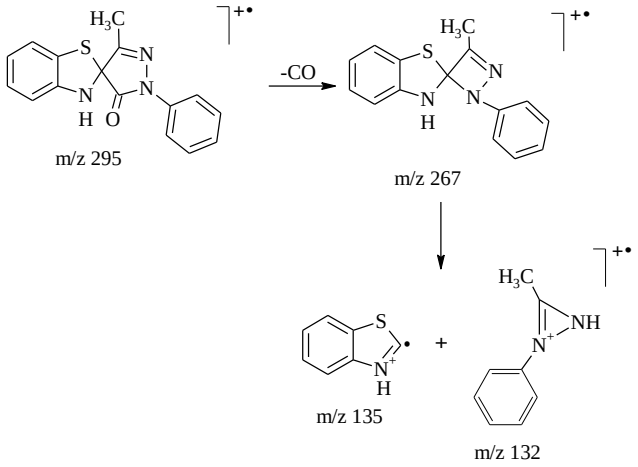
3-(2-Benzotiyazolilhidrazono)-2-indolinon türevlerinin EI kütle parçalanma yollarının incelendiği çalışmada başlıca bölünmelerin CO kaybı, N-N bağ kırılması, benzotiyazol artığından **:**NH kaybı ile gerçekleştiği ve aşağıdaki parçaların oluştuğu belirlenmekte, klor taşıyan iyonlarda izotop piklerinin saptanmasının molekül ağırlığını doğruladığı bildirilmektedir [283].



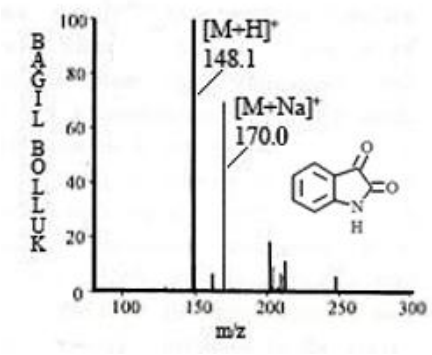
1,2-Diaminonaftil taşıyan spiroindolinon türevinin üç NH grubunun döteryumla işaretlenerek alınan spektrumunda moleküldeki iki proton kaybı aşağıdaki gibi yorumlanmış ve bu pik spektrumda temel pik olarak belirlenmiştir [280].



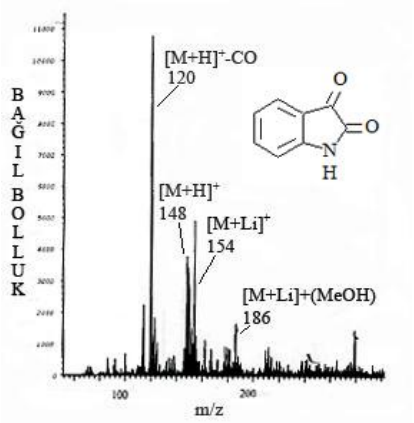
Pirazolin artığı taşıyan spirobenzotiyazolin bileşiğinden aşağıdaki parçaların oluştuğu bildirilmektedir [284].



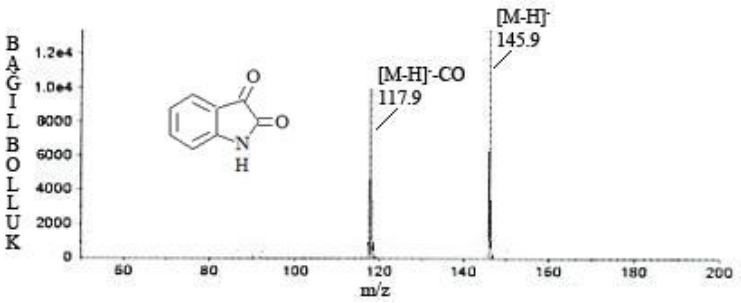
İsatinin ESI yöntemiyle alnınan spektrumlarında pozitif modda tek yüklü protonlanmış moleküler iyon $[M+H]^+$, ayrıca $[M+Na]^+$, $[M+Li]^+$ katım ürünleri, negatif modda proton ayrılması ile $[M-H]^-$ oluşmuş, $[M+H]^+$ ve $[M-H]^-$ iyonlarından CO ayrılması ile oluşan iyonlar spektrumlarda belirlenmiş (Bkz. Şekil 5-14 , 5-15 ve 5-16) [283-288], 2-(2'-hidroksifenil)benzotiyazol türevlerinin ESI pozitif mod spektrumlarında saptanan $[M+H]^+$ ve $[M+Na]^+$ iyonları bileşiklerin molekül ağırlıklarını doğrulamıştır [211].



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

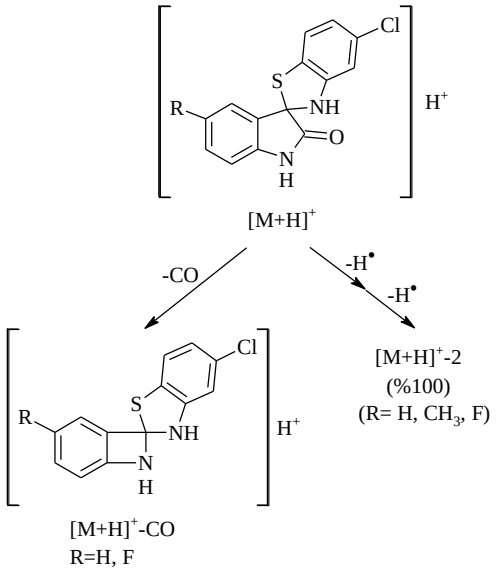


Şekil 5-15: İsatinin ESI (+) modda alınan kütle spektrumu



Şekil 5-16: İsatinin ESI (-) modda alınan kütle spektrumu

3a, **3b** ve **3d** Bileşiklerinin pozitif modda alınan kütle spektrumlarında $[M+H]^+$, ayrıca klor ve kükürt atomlarının izotopik katkısından kaynaklanan $[M+H]^+$+2 pikleri izlenmekte, $[M+H]^+$ iyonundan iki proton ayrılması ile oluşan iyonlar spektrumlarda temel pik olarak belirlenmektedir. **3a** ve **3d** bileşiklerinde $[M+H]^+$ iyonundan CO ayrılması ile oluşan parçalara da rastlanmakta, izotop piklerinin varlığı molekül ağırlıklarını doğrulamaktadır (Bkz. Tablo 5-24).



Tablo 5-24: 3a, **3b** ve **3d** Bileşiklerinin kütle bulguları

Bileşik	**R**	**$[M+H]^+$** **% Bağıl bolluk**	**$[M+H]^+$-2** **% Bağıl bolluk**	**$[M+H]^+$-CO** **% Bağıl bolluk**
3a	H	289, 291 (35, 9.2)	287, 289 (100, 35)	261, 263 (25, 11)
3b	CH_3	303, 305 (35, 1.9)	301, 303 (100, 35)	-
3d	F	307, 309 (40, 9)	305, 307 (100, 40)	279, 281 (25, 13)

3a Bileşiğinde m/z 289 (%42) iyonuna uygulanan MS/MS, $[M+H]^+$ dan CO kaybıyla oluştuğu düşünülen m/z 261 (%100) i vermektedir (Bkz. Şekil 4-10).

Yapısında iki klor atomu taşıyan **3e** bileşiğinin monoizotopik kütlesi 322.307 dir. $[M-H]^-$ m/z 321 (%100), $[M-H]^-$+2 m/z 323 (%65) ve $[M-H]^-$+4 m/z 325 (%13) olarak izlenmekte ve klor taşıyan moleküllerdeki 9:6:1 izotopik oranı molekül ağırlığını doğrulamaktadır. m/z 293 (%11) iyonu $[M-H]^-$ dan CO kaybı ile oluşmakta, izotop pikleri spektrumda sırasıyla %6.5 ve %1.2 bağıl bollukta gözlenmektedir. m/z 321 (%45) iyonuna uygulanan MS/MS $[M-H]^-$ dan CO ayrılması ile temel pik olarak izlenen m/z 293 ü vermektedir (Bkz. Şekil 4-32).

5.3. Biyolojik Aktivite Verilerinin Değerlendirilmesi

5.3.1. Antioksidan Etki Verileri

Çalışmamızda, bileşik **3a-g** nin, demir ve askorbik asit ile indüklenmiş lipid peroksidasyonu inhibe edici, hidrojen atomu verici ve serbest radikal giderici etkileri ile indirgeyici güçleri tayin edilerek *in vitro* antioksidan etkileri incelenmiştir. Test edilen bileşiklerin ve pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asid ve α-tokoferol'ün antioksidan aktivitelerini kıyaslayabilmek için efektif konsantrasyonları (EC_{50}) hesaplanmıştır. Düşük EC_{50} değeri yüksek antioksidan aktivitesinin göstergesidir (Bkz. Tablo 5-25).

Tablo 5-25: 3a-g Bileşiklerinin antioksidan aktivite verileri

	EC_{50} (mM)				
Bileşik	**Anti-LP**	**Süperoksit Anyon**	**DPPH**	**ABTS**	**İndirgeme Gücü**
3a	0.15 ± 0.004^{a}	26.2 ± 0.63^{a}	12.1 ± 1.23^{a}	1.35 ± 0.05^{a}	1.15 ± 0.01^{a}
3b	0.12 ± 0.007^{b}	18.3 ± 0.41^{b}	8.33 ± 0.85^{b}	1.16 ± 0.03^{b}	2.44 ± 0.18^{b}
3c	0.16 ± 0.005^{a}	25.2 ± 0.78^{a}	12.1 ± 1.17^{c}	1.21 ± 0.08^{a}	$1.37 \pm 0.10^{a,c}$
3d	0.11 ± 0.006^{b}	25.4 ± 0.26^{a}	13.0 ± 0.73^{c}	0.99 ± 0.01^{c}	0.99 ± 0.12^{a}
3e	0.13 ± 0.004^{b}	17.3 ± 0.32^{b}	$6.96 \pm 0.35^{b,d}$	1.28 ± 0.03^{a}	1.00 ± 0.10^{a}
3f	0.12 ± 0.006^{b}	13.3 ± 0.12^{c}	$7.19 \pm 0.62^{b,d}$	1.30 ± 0.02^{a}	1.26 ± 0.07^{a}
3g	0.12 ± 0.006^{b}	24.4 ± 1.28^{a}	8.05 ± 0.13^{b}	1.42 ± 0.08^{a}	1.13 ± 0.10^{a}
Askorbik asid	-	0.85 ± 0.02^{d}	0.36 ± 0.04^{e}	1.20 ± 0.03^{b}	0.65 ± 0.10^{d}
α-tokoferol	0.15 ± 0.04^{a}	-	0.35 ± 0.007^{e}	1.20 ± 0.01^{b}	1.95 ± 0.04^{c}

5.3.1.1. Lipozom Peroksidasyonu Üzerine Antioksidan Etkisi

Lipid peroksidasyonu ve süperoksid radikali oluşumu normal metabolik yolların işleyişi sırasında, hücrenin sitoplazma, mitokondri, endoplazmik retikulum ve hücre membranı gibi bölümlerinde meydana geldiği için indol türevlerinin lipid peroksid ve süperoksid radikalleri giderici etkileri biyolojik sistemdeki antioksidan aktivitelerini yansıtmaktadır. Membran fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif

yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ve lipid peroksid radikallerinin oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir [28]. Bu nedenle ilk olarak fosfolipitlerden oluşturulan lipozomlar kullanılarak bileşik **3a-g** nin, demir (III) ve askorbik asit ile indüklenen lipit peroksidasyonunu inhibe edici etkileri incelenmiş ve bu testte standart olarak α-tokoferol kullanılmıştır. α-Tokoferol zincir kırıcı antioksidatif etkisi ile membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asidlerini serbest radikal hasarından koruyan ilk savunma hattını oluşturan doğal bir antioksidandır.

Bileşik **3a-g** nin EC_{50} değerleri (%50 TBARS oluşumunun inhibisyonunu sağlayan bileşik veya standart konsantrasyonu), EC_{50} değeri 0.153 ± 0.01 mM olan α-tokoferol kadar etkili lipid peroksidasyon inhibitörleri olduklarını, hidrojen atomunu kolayca vererek serbest radikalleri ve özellikle lipid peroksid radikallerini gidererek lipid peroksidasyonunu devam ettiren zincir reaksiyonunu durdurabildiklerini göstermektedir. En etkili türevlerin EC_{50} değerleri sırasıyla 0.126 ± 0.007, 0.118 ± 0.006, 0.134 ± 0.004 ve 0.125 ± 0.006 mM olan **3b**, **3d**, **3e** ve **3f** bileşikleri olduğu, bu bileşiklerinin α-tokoferolden daha etkili olarak lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, en etkili türevin floro sübstitüe **3d** olduğu Tablo 5-25 de görülmektedir. Bu test ile tüm bileşiklerin TBARS oluşumunu ve dolayısıyla fosfolipid yıkımını doza bağımlı olarak inhibe ettikleri belirlenmiştir.

5.3.1.2. Süperoksit Radikali Giderici Etkisi

Süperoksit radikali, normal hücre metabolizmasında, mitokondrial, endoplazmik retiküler ve nükleer membran elektron transport işlemleri sırasında oluşan bir ara üründür. Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz aracılığı ile hidrojen peroksit'e indirgenir [21].

$$O_2 \longrightarrow O_2^{\bullet -}$$

$$2\, O_2^{\bullet -} + 2\, H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da, bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olmasıdır ve geçiş metalleri varlığında, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu ile en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikaline dönüşerek hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilmekte ve tokoferol gibi zarsal antioksidanları oksitleyebilmesidir. İskemi-reperfüzyon (İ/R) koşullarında ise, hipoksantin ve ksantin katabolizması sırasında aktivitesi artan ksantin oksidaz enziminin katalize ettiği bir reaksiyonla oluşmaktadır [26]

Normal şartlarda:

Hipoksanti Reperfüzyon ile $\xrightarrow{\text{Ksantin dehidrojenaz (NAD+ yı kullanarak)}}$ Ksantin ve ürik asid

Hipoksantin $\xrightarrow{\text{Ksantin oksidaz } (O_2 \text{ i kullanarak})}$ Ksantin + O_2

Bu test ile bileşik **3a-g** nin ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikallerini giderici etkisi incelenmiştir. Test edilen bileşiklerin EC_{50} değerleri (bileşiğin %50 süperoksid radikali giderici aktivitesi göstermesi için gerekli olan miktarı) ile askorbik asidin (0.85±0.02 mM) EC_{50} değerleri kıyaslandığında, indol türevlerinin süperoksid giderici aktivitelerinin askorbik asiden daha düşük olduğu, α-tokoferolün süperoksit giderici etki göstermediği görülmektedir.

5.3.1.3. DPPH Radikali Giderici Etkisi

Sentetik olan $ABTS^{\bullet+}$ ve $DPPH^{\bullet}$ radikalleri **3a-g** bileşiklerinin biyolojik sistemlerdeki hidrojen verici etkisini tayin etmek için kullanılmıştır. Test edilen bileşikler ile askorbik asidin (0.36 ± 0.04 mM) ve α-tokoferolün (0.35 ± 0.007 mM) EC_{50} değerleri (bileşiğin %50 DPPH radikali giderici aktivitesi göstermesi için gerekli olan miktarı) ile kıyaslandığında bileşiklerin DPPH radikali giderici aktivitelerinin askorbik asidin ve α-tokoferolün aktivitelerinden daha düşük olduğu saptanmış, süperoksid ve DPPH giderici aktiviteleri arasında yüksek korelasyon gözlenmiştir (**3a-g** için sırayla r^2= 0.9372, 0.9714, 0.8193, 0.9128, 0.8853, 0.9614 ve 0.7922).

5.3.1.4. TEAC Etkisi

Total antioksidan etkinin araştırıldığı bu testte bileşik **3a-g** nin antioksidan kapasitesi TEAC değeri olarak değerlendirilmiş, 1 TEAC 1 mM/L troloks ekivalan test edilen bileşik veya pozitif kontrolün konsantrasyonu olarak ifade edilmiştir. Bileşiklerin

hidrojen veya elektron verici etkisini yansıdığı için yüksek TEAC değeri yüksek antioksidan aktivitesinin göstergesidir.

Tablo 5-25 deki EC_{50} değerleri (bileşiğin %50 ABTS radikali giderici etki göstermesi için gerekli olan miktarı) incelendiğinde, benzer etkiye sahip olan **3a** (1.35±0.05 mM), **3b** (1.16±0.03 mM), **3c** (1.21±0.08 mM), **3d** (0.99±0.01 mM), **3e** (1.28±0.03 mM), **3f** (1.30±0.02 mM) ve **3g** (1.42±0.08 mM) bileşiklerinin ABTS radikal katyonu giderici etkileri açısından askorbik asid (1.20±0.03 mM) ve α-tokoferol (1.20±0.01 mM) kadar etkin oldukları görülmektedir.

5.3.1.5. Ferri İyonu Redükleyici Gücü

İndol türevlerinin redükleyici gücü potansiyel antioksidan aktivitelerinin göstergesi olarak kabul edilmektedir ve elektron verici yeteneklerini yansıtmaktadır. Redükleyici gücü yüksek olan bileşikler serbest radikallere elektron vererek ve onları zararsız hale getirerek radikal reaksiyonları sonlandırabilirler. Bu çalışmada test bileşikleri tarafından potasyum ferrisiyanürün (Fe^{3+}) ferrosiyanüre (Fe^{2+}) redüklenmesi esasına dayanan kolorimetrik metod kullanarak **3a-g** bileşiklerinin redükleyici güç gösterdikleri belirlenmiştir. Tablo 5-25 deki EC_{50} değerleri (bileşiğin 0.5 absorbans değeri göstermesi için gerekli olan miktarı) incelendiğinde **3a** (1.15±0.01 mM), **3c** (1.37±0.10 mM), **3d** (0.99±0.12 mM), **3e** (1.00±0.10 mM), **3f** (1.26±0.07 mM) ve **3g** (1.13±0.10 mM) nin redükleyici güçlerinin α-tokoferol (1.95±0.04 mM) den daha yüksek ($p<0.05$), askorbik asid (0.65±0.10 mM) den daha zayıf olduğu belirlenmektedir. Bu test ile incelenen bütün bileşiklerin Fe (III)' ü redükleme ve dolayısıyla elektron verici yeteneğine sahip oldukları sonucuna varılmıştır. İndol türevlerinin $ABTS^{\bullet+}$ giderici aktiviteleri ile redükleyici güçleri arasında yüksek korelasyon gözlenmiştir **3a-g** için sırasıyla r^2= 0.9479, 0.9241, 0.9834, 0.8930, 0.9349, 0.9808 ve 0.9856).

Bu çalışmada 5-klorobenzotiyazolin artığı taşıyan spiroindolinonların antioksidan aktiviteleri 5 metod kullanılarak incelenmiştir. **3a-g** bileşiklerinin ABTS radikal katyonu giderici aktivitelerinin DPPH radikali giderici aktivitelerinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni DPPH radikalinin daha stabil olması nedeniyle daha fazla antioksidanın reaksiyona girmesi ile açıklanabilir. EC_{50} değerleri kıyaslandığında indol türevlerinin ABTS radikal katyonu giderici aktiviteleri ve

redükleyici güçlerinin birbirine çok yakın olduğu ve bu etkilerinin lipid peroksidasyonu inhibe edici aktivitelerinden 10 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar indol türevlerinin etkili elektron verici olduklarını göstermektedir. Test edilen bileşiklerin çoğunun α-tokoferolden daha etkili olarak lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, tüm testlerde en etkili türevin floro sübstitüe **3d** olduğu saptanan bulgulardandır. Bu etki artışı yapıdaki flor atomunun lipofiliteyi arttırmasına bağlanabilir.

Bu çalışmada elde edilen test sonuçları ile incelenen spiroindolinon türevlerinin herbirinin potansiyel antioksidan olarak demir ve askorbik asit ile indüklenmiş lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, ABTS, DPPH ve süperoksit radikallerini giderdiği, indirgeyici güç gösterdiği ve antioksidan olarak tıp ve endüstride kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

5.3.2. Antikanser Etki Verileri

NCI tarafından seçilen **3a**, **3d** ve **3e** bileşiklerinin lösemi, akciğer, kolon, santral sinir sistemi, melanoma, yumurtalık, böbrek, prostat ve meme kanserlerinden izole edilen 60 hücre tipine karşı 10^{-5} molar konsantrasyonda *in vitro* ön tarama testi ile hücre büyümesini önleyici etkileri araştırılmıştır. PG değerleri ilaç uygulanmamış kontrollerle kıyaslanarak spektrofotometrik olarak saptanmıştır. SRB protein deneyi hücre büyümesini ölçmek için kullanılmıştır. Yüzde inhibisyon değerleri, PG değerlerinin 100' den çıkartılması ile hesaplanmakta, sıfırın altındaki -PG değerleri hücre ölümünü göstermektedir [192-195]. İndol halkasında sübstitüent taşımayan **3a** bileşiğinde ön taramada lösemi hücreleri K-562, MOLT-4, RPMI-8226 için sırasıyla %39.68, 60.11 ve 41.96, CNS kanser hücreleri SNB-75 için %59.77, prostat kanser hücreleri PC-3 için %44.51, meme kanser hücreleri MCF7 ve T-47D için % 59.73 ve 42.36 büyüme değerleri saptanmıştır (Bkz. Şekil 4-47). Floro sübstitüe **3d** bileşiğinde ise bu testlerde, lösemi hücreleri K-52 ve RPMI-8226 için %48.60 ve 32.94, akciğer kanser hücresi HOP-92 için %-5.66, renal kanser hücresi CAKI-1 için %55.17, prostat kanser hücresi PC-3 için %57.34, meme kanser hücreleri MCF7 ve T-47D için %60.34 ve 39.95 büyüme değerleri belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4-48). Klor sübstitüe **3e** bileşiğinde % büyüme değerleri lösemi kanser hücreleri HL-60(TB), K-562 ve MOLT-4, RPMI-8226 için sırasıyla %42.61, 39.16, 38.25 ve 44.27, akciğer kanser hücresi NCI-H522 için %47.07, böbrek kanser hücresi RXF-393 için % -8.23, prostat kanser hücresi PC-3 için

%51.76 ve meme kanser hücreleri MCF7 ve T-47D için %43.42 ve %33.80 büyüme değerleri elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4-49).

Bu bulgular incelendiğinde test edilen bileşiklerin tümünün lösemi hücreleri K-562 ve RPMI-8226, prostat kanser hücresi PC-3, meme kanser hücreleri MCF7 ve T-47D nin büyümesini inhibe ettiği görülmekte, en yüksek inhibisyonun akciğer kanser hücresi HOP92 ve böbrek kanser hücresi RXF-393 e karşı flor sübstitüe **3d** bileşiği ile elde edildiği belirlenmektedir.

Oksidatif stres sonucu DNA' nın zarar görmesinin kanserin önemi bir nedeni olduğu kanıtlanmış bir bulgudur. Ön sitotoksisite testlerinden elde edilen sonuçların antioksidan etki tarama sonuçları ile paralellik göstermesi, bu bulguyu destekler niteliktedir.

KAYNAKLAR

1. Ratnam D V, Ankola D D, Bhardwaj V, Sahana D K, Kumar M N V R. Role of Antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Controlled Release* 2006; **113**: 189-207.
2. Peyrot F, Ducrocq C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res* 2008; **45**: 235-246.
3. Tan D, Manchester L C, Terron M P, Flores L J, Reiter R J. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res* 2007; **42**: 28-42.
4. Süzen S. Antioxidant Activities of Synthetic Indole Derivatives and Possible Activity Mechanisms. *Top Heterocycl Chem* 2007; **11**: 145-178.
5. Tan D, Manchester L C, Reiter R J, Plummer B F, Hardies L J, Weintraub S T ve ark. A Novel Melatonin Metabolite, Cyclic 3-Hydroxymelatonin: A Biomarker of *in Vivo* Hydroxyl Radical Generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **253**: 614-620.
6. Aboul-Enein H Y, Kruk I, Lichszteld K, Michalska T, Kladna A, Slawomir M, ve ark. Scavenging of reactive oxygen species by N-substituted indole-2 and 3-carboxamides. *Luminescence* 2004; 19: 1-7.
7. Lane M E, Yu B, Rice A, Lipson K E, Liang C, Sun L ve ark. A Novel cdk2-selective Inhibitor, SU9516, INDUCES Apoptosis in Colon Carcinoma Cells. *Cancer Res* 2001; **61**: 6170-6177.
8. O'Donnell A, Padhani A, Hayes C, Kakkar A J, Leach M, Trigo J M ve ark. A Phase I study of the angiogenesis inhibitor SU5416 (semaxanib) in solid tumours, incorporating dynamic contrast MR pharmacodynamic end points. *Br J Canc* 2005; 93: 876-883.
9. Chow L Q M, Eckhardt S G. Sunitinib: From Rational Design to Climical Efficacy. *J Clin Oncol* 2007; **25(7)**: 884-896.
10. Demetri G D, Oosterom A T, Garret C R, Blackstein M E, Shah M H, Verweij J ve ark. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomized controlled trial. *The Lancet* 2006; **368(9544)**: 1329-1338.

11. Motzer R J, Hutson T E, Pharm D, Tomczak P, Michaelson M D, Bukowski R M ve ark. Sunitib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2007; **356(2)**: 115-124.
12. Veldt A A M, Boven E, Helgason H H, Wouwe M, Berkhof J, Gast G. Predictive factors for severe toxicity of sunitinib in unselected patients with advanced renal cell cancer. *Bri J Canc* 2008; 99: 259-265.
13. Motzer R J, Michaelson M D, Redman B G, Hudes G R, Wilding G, Figlin R A ve ark. Activity of SU11248, a Multitargeted Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor and Platelet-Derived Growth Factor Receptor, in Patients with Metastatic Renal Call Carcinoma. *J Clin Onkol* 2006; **24(1)**: 16-24.
14. Pedras M S C, Nycholat C M, Montaut S, Xu Y, Khan A Q. Chemical defences of crucifers: elicitation and metabolism of phytoalexins and indole-3-acetonitrile in brown mustard and turnip. *Phytochemistry* 2002; **59**: 611-625.
15. Monde K, Taniguchi T, Miura N, Kutschy P, Curillova Z, Pilatova M ve ark. Chiral cruciferous phytoalexins: Preparation absolute configuration and biological activity. *Bioorg Med Chem* 2005; 13: 5206-5212.
16. Pilàtovà M, Sarissky M, Kutschy P, Mirossay A, Mezencev R, Curillova Z ve ark. Cruciferous phytoalexins: antiproliferative effects in T-Jurkat leukemic cells. *Leukemia Res* 2005; **29**: 415-421.
17. Mezencev R, Kutschy P, Salayova A, Curillova Z, Mojzis J, Pilàtovà M ve ark. Anticancer Properties of 2-Piperidyl Analogues of the Natural Indole Phytoalexin 1-Methoxyspirobrassinol. *Chemotherapy* 2008; **54(5)**: 372-378.
18. Kutschy P, Salayova A, Curillova Z, Kozar T, Mezencev R, Mojzis J ve ark. 2-(Substituted phenyl)amino analogs of 1-methoxyspirobrassinol methyl ether: Synthesis and anticancer activity. *Bioorg Med Chem* 2009; **17**: 3698-3712.
19. Kılınç K, Kılınç A. Temel tıptan kliniğe. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; **33**: 110-118.
20. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006; **141**: 312-322.
21. Halliwell B, Gutteridge M C. Review article: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; **219**: 1-14.
22. Halliwell B. Tell me about about free radicals, doctor: a review. *J Roy Soc Med* 1989; **82**: 747-752.

23. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: From chemical to biochemical mechanism. *Food Chem Toxicol* 1999; **37**: 949-962.
24. Champe P C, Harvey R A. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. 2nd ed. Bursa: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı; 1997.
25. Aruoma O I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc* 1998; **75**: 199-212.
26. Fang Y Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; **18**: 872-879.
27. Matés J M, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; **32**: 595-603.
28. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxiation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clinic Nut* 1993; **57**: 715S-725S.
29. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004; **35**: 159-169.
30. Müftüoğlu M. DNA tamiri ve erken yaşlanma sendromları. *Türk Biyokimya Dergisi* 2003; **28:** 20-24.
31. Altan N, Dinçel A S, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; **31**: 51-56.
32. Reische D W, Lillard D A, Eitenmiller R R. *Antioxidants. Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 2nd ed. New York, USA: Marcel Dekker Incorporated; 2002. (s. 489-516).
33. Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1740(2)**: 101-107.
34. Pugine S M P, Brito P P, Alba-Loureiro T C, Costa E J X, Curi R, De Melo M P. Effect of indole-3-acetic acid administration by gavage and by subcutaneous injection on rat leukocytes. *Cell Biochem Funct* 2007; **25**: 723-730.
35. Karbownik M, Stasiak M, Zasada K, Zygmunt A, Lewinski A. Comparison of Potential Protective Effects of Melatonin, Indole-3-Propionic Acid, and Propylthiouracil Against Lipid Peroxidation Caused by Potassium Bromate in the Thyroid Gland. *J Cell Biochem* 2005; **95**: 131-138.
36. Chyan Y J, Poeggeler B, Omar R A, Chain D G, Frangione B, Ghiso J ve ark. Potent Neuroprotective Properties against the Alzheimer β-Amyloid by an

Endogenous Melatonin-related Indole Structure, Indole-3-propionic Acid. *J Biol Chem* 1999; **274(31)**: 21937-21942.

37. Bozkaya P, Ölgen S, Çoban T, Nebioğlu D. Synthesis of N-substituted indole-2-carboxamides and investigation of their biochemical responses against free radicals. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2007; **22(3)**: 319-325.
38. Ölgen S, Kılıç Z, Ada A O, Çoban T. Synthesis and evaluation of novel N-H and N-substituted indole-2- and 3-carboxamide derivatives as antioxidants agents. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2007; **22(4)**: 457-462.
39. Ölgen S, Varol P, Çoban T, Nebioğlu D. Synthesis and evaluation of N-substituted indole-3-carboxamide derivatives as inhibitors of lipid peroxidation and superoxide anion formation. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2008; **23(3)**: 334-340.
40. Ölgen S, Kılıç Z, Ada A O, Çoban T. Synthesis and Antioxidant Properties of Novel *N*-H and *N*-Substituted Propanamide Derivatives. *Arch Pharm Chem Life Sci* 2007; **340**: 140-146.
41. Ölgen S, Çoban T. Antioxidant Evaluations of Novel *N*-H and *N*-Substituted Indole Esters. *Biol Pharm Bull* 2003; **26(5)**: 736- 738.
42. Kruk I, Aboul-Enein H Y, Michalska T, Lichszteld K, Kubasik-Kladna K, Ölgen S. In vitro scavenging activity for reactive oxygen species by N-substituted indole-2-carboxylic acid esters. *Luminescence* 2007; **22**: 379-386.
43. Mor M, Silva C, Vacondio F, Plazzi P V, Bertoni S, Spadoni G ve ark. Indole-based analogs of melatonin: in vitro antioxidant and cytoprotective activities. *J Pineal Res* 2004; **36**: 95-102.
44. Spadoni G, Diamantini G, Bedini A, Tarzia G, Vacondio F, Silva C ve ark. Synthesis, antioxidant activity and structure–activity relationships for a new series of 2-(*N*-acylaminoethyl)indoles with melatonin-like cytoprotective activity. *J Pineal Res* 2006; **40**: 259-269.
45. Süzen S. Recent Developments of Melatonin Related Antioxidant Compounds. *Comb Chem High Throughput Screening* 2006; **9(6)**: 409-419.
46. Suzen S, Bozkaya P, Coban T, Nebioğlu D. Investigation of the in vitro antioxidant behaviour of some 2-phenylindole derivatives: discussion on possible antioxidant mechanisms and comparison with melatonin. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2006; **21(4)**: 405-411.

47. Gürkök G, Çoban T, Süzen S. Melatonin analogue new indole hydrazine/hydrazone derivatives with antioxidant behavior: Synthesis and structure-activity relationships. *J EnzI Inhib Med Chem* 2009; **24(2)**: 506-515.
48. Shirinzadeh H, Eren B, Gürer-Orhan H, Süzen S, Özden S. Novel Indole-Based Analogs of Melatonin: Synthesis and in Vitro Antioxidant Activity Studies. *Molecules* 2010; **15**: 2187-2202.
49. Zhao F, Zai-Qun L. Indole and Its Alkyl-Substituted Derivatives Protect Erythrocyte and DNA against Radical-Induced Oxidation. *J Biochem Molecular Toxicology* 2009; **23(4)**: 273-279.
50. Andreadou I, Tasouli A, Bofilis E, Chrysselis M, Rekka E, Tsantili-Kakoulidou A ve ark. Antioxidant Activity of Novel Indole Derivatives and Protection of the Myocardial Damage in Rabbits. *Chem Pharm Bull* 2002; **50(2)**: 165-168.
51. Andreadou I, Tsantili-Kakoulidou A, Spyropoulou E, Siatra T. Reactions of Indole Derivatives with Cardioprotective Activity with Reactive Oxygen Species. Comparison with Melatonin. *Chem Pharm Bull* 2003; **51(10)**: 1128-1131.
52. Ateş-Alagöz Z, Kuş C, Çoban T. Synthesis and antioxidant properties of novel benzimidazoles containing substituted indole or 1,1,4,4-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydro-naphthalene fragments. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2005; **20(4)**: 325-331.
53. Asakai R, Aoyama Y, Fujimoto T. Bisindolylmaleimide I and V inhibit necrosis induced by oxidative stress in a variety of cells including neurons. J *Neurosci Res* 2002; **44**: 297-304.
54. Katoh M, Dodo K, Fujitab M, Sodeoka M. Structure–activity relationship of N-methyl-bisindolylmaleimide derivatives as cell death inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; **15**: 3109-3113.
55. Dodo K, Katoh M, Shimizu T, Takahashia M, Sodeokaa M. Inhibition of hydrogen peroxide-induced necrotic cell death with 3-amino-2-indolylmaleimide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; **15**: 3114-3118.
56. Aboul-Enein H Y, Kladna A, Kruk I, Lichszteld K, Michalska T, Ölgen S. Scavenging of Reactive Oxygen Species by Novel Indolin-2-one and Indoline-2-Thione Derivatives. *Biopolymers* 2005; **78**: 171-178.

57. Andreani A, Burnelli S, Granaiola M, Leoni A, Locatelli A, Morigi R ve ark. Substituted E-3-(2-Chloro-3-indolylmethylene)1,3-dihydroindol-2-ones with Antitumor Activity. Effect on the Cell Cycle and Apoptosis. *J Med Chem* 2007; **50**: 3167-3172.
58. Andreani A, Burnelli S, Granaiola M, Leoni A, Locatelli A, Morigi R ve ark. New isatin derivatives with antioxidant activity. *Eur J Med Chem* 2010; **45**: 1374-1378.
59. Ates-Alagoz Z, Coban T, Buyukbingol E. Synthesis and Antioxidant Activity of New Tetrahydro-Naphthalene-Indole Derivatives as Retinoid and Melatonin Analogs. *Arch Pharm Chem Life Sci* 2006; **339**: 193-200.
60. Gürkan S A, Karabay A, Buyukbingol Z, Adejarec A, Büyükbingol E. Syntheses of Novel Indole Lipoic Acid Derivative and Their Antioxidant Effects on Lipid Peroxidation. *Arch Pharm Chem Life Sci* 2005; **338**: 67-73.
61. Stolc S, Snirc V, Majekova M, Gasparova Z, Gajdosikova A, Stvrtina S. Development of the New Group of Indole-Derived Neuroprotective Drugs Affecting Oxidative Stress. *Cell Mol Neurobiol* 2006; **26**: 1495-1504.
62. Ikeda Y, Matsumoto K, Dohi K, Jimbo H, Sasaki K, Satoh K. Direct Superoxide Scavenging Activity of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Determination by Electron Spin Resonance Using the Spin Trap Method. *Headache* 2001; **41**: 138-141.
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. In Vitro Study of the Antioxidant Properties of Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs by Chemiluminescence and Electron Spin Resonance (ESR). *Free Rad Res* 2000; **33(5)**: 607-621.
64. Dannhardt G, Kiefer W. Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects. Eur *J Med Chem* 2001; **36**: 109-126.
65. Garcia-Santos G, Herrera F, Martin V, Rodriguez-Blanco J, Antolin I, Fernandez-Mari F ve ark. Antioxidant Activity and Neuroprotective Effects of Zolpidem and Several Synthesis Intermediates. *Free Radical Res* 2004; **38(12)**: 1289-1299.
66. Bandoh T, Sato E F, Mitani H, Nakashima A, Hoshi K, Inoue M. Antioxidative Potential of Fluvastatin via the Inhibition of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) Oxidase Activity. *Biol Pharm Bull* 2003; **26(6)**: 818-822.

67. Erdmann O L. Untersuchungen über den indigo. *J Prakt Chem* 1840; **19(1)**: 321-362.
68. Laurent A. Recherches sur l'indigo. *Ann Chim Phys* 1840; **3(3)**: 371-394.
69. Kekulè A. Ueber die constitution des isatins, der isatinsäure und des indols. *Ber* 1869; **2**: 748-749.
70. Baeyer A. Synthese des oxindols. *Ber* 1878; **11**: 582-584.
71. Baeyer A. Synthese des isatins und des indigblaus. *Ber* 1878; **11**: 1228-1229.
72. Claisen L, Shadwell J. Synthese des isatins. *Ber* 1879; **12**: 350-354.
73. Sandmeyer T. Sandmeyer Diphenylurea Isatin Synthesis. *Z Farb Textile Chem* 1903; **2**: 129.
74. Sandmeyer T. Über Isonitrosoacetanilide und deren Kondensation zu Isatinen. *Helvetica Chim Acta* 1919; **2**: 234-242.
75. Sumpter W C. The Chemistry of Isatin. *Chem Rev* 1944; **34(3)**: 393-434.
76. Bauer R. Über Oxalsäure-imidchloride. *Ber* 1907; **40**: 2650-2662.
77. Bauer R. Berichtigung. *Ber* 1908; **41**: 450.
78. Bauer R. Über Oxalsäure-imidchloride. 1909; **42**: 2111-2118.
79. Ostromisslensky I. Über die Einwirkung von Dichloressigsäure auf Anilin und seine Homologen. *Ber* 1907; **40**: 4972-4979.
80. Ostromisslensky I. Über die Einwirkung der Gloxylsäure bezw. der Diacetyl-gloxlsäure auf Anilin und seine Homologen. *Ber* 1908; **41**: 3029-3034.
81. Stollè R. Über eine neue Methode zur Darstellung *N*-substituierter Isatine. *Ber* 1913; **46**: 3915-3916.
82. Reissert A. Die geschwefelten Anilide der : Oxalsäure und ihre Umwandlungsproducte. *Ber* 1904; **37**: 3708-3733.
83. Heller G. Ueber eine neue Reductionsstufe der Nitrogruppe. *Ber* 1906; **39**: 2339-2346.
84. Liebermann C, Krauss R. Über die indigo-ähnlichen Gruppen von blauen Farbstoffen aus isatin. *Ber* 1907; **40**: 2492-2515.
85. Kalb L. Über Dehydro-indigo. II Dehydro-indigo-Bisulfite und ein neues Verfahren zur Erzeugung von indigo-färbungen. *Ber* 1909; **42**: 3653-3664.
86. Grandmougin E, Seyder P. Über Indigo. V) Über halogenierte Indigo und Derivative. *Ber* 1914; **47**: 2365-2373.
87. Heller G. Neue isomerien in der isatin-reihe. *Ber* 1922; **55B**: 2681-2697.

88. Kambil E. Die Halogenierung von Isatin-α-chloriden. *Helv Chim Acta* 1941; **24**: 93E-99E.
89. Helmut J. Verfahren zur Herstellung von 5-Chloroisatin. *Deutches Patentamt* 1973; P21 58 955.9.
90. Hofmann A W. Metamorphosen des Indigo's. Erzeugung organischer Basen, welche Chlor und Brom enthalten. *Ann* 1845; **53**: 1-57.
91. Baeyer A, Oekonomides S. Ueber das Isatin. *Ber* 1882; **15**: 2093-2102.
92. Grandmougin E. Zur Kenntnis der bromierten Indigotine. *Ber* 1910; **43**: 937-941.
93. Lindwall H G, Bandes J, Weinberg I. Preparation of Certain Brominated Cinchophens. *J Am Chem Soc* 1931; **53**: 317-319.
94. Yen V Q, Buu-Hoi N P, Xuong N D. Fluorinated Isatins and Some of Their Heterocyclic Derivatives. *J Org Chem* 1958; **23**: 1858-1861.
95. Baeyer A. Untersuchungen über die Gruppe des Indigblaus. *Ber* 1879; **12**: 1309-1319.
96. Calvery H O, Noller C R, Adams R. Arsonophenyl-cinchoninic Acid (arsonocinchophen) and Derivatives. *J Am Chem Soc* 1925; **47**: 3058-3060.
97. Sumpter W C, Jones W F. The Nitration of Isatin. *J Am Chem Soc* 1943; **65**: 1802-1803.
98. Gassman P G, Cue B W Jr, Tien-Yau Luh. A General Method for the Synthesis of Isatins. *J Org Chem* 1977; **42(8)**: 1344-1348.
99. Gassman P G, Halweg K M. Air oxidation of oxindoles to isatins. *J Org Chem* 1979; **44(4):** 628-629.
100. Hofmann A W. Ueber die Einwirkung des schwefels auf phenylbenzamid. *Ber* 1879; **12**: 2359-2365.
101. Hofmann A W. Zur kenntniss des amidophenylmercaptans oder sulfhydranilins. *Ber* 1880; **13**: 1223-1238.
102. Claasz M. Über die Einwirkung von Aldehyden auf *o*-Amino-phenylmercaptan. Darstellung von Benzthiazolinen. *Ber* 1916; **49**: 1141-1147.
103. Claasz M. Der Thionylindigo. *Ber* 1912; **45**: 1015-1033.
104. Kehrmann, Nossenko O. Über Nitro-Derivative des Thiodiphenylamins. *Ber* 1913; **46**: 2809-2820.

105. Bogert M T, Snell F D. Researches on Thiazoles. IV. The Synthesis of Benzothiazoles from Ortho-nitrochlorobenzene. *J Am Chem Soc* 1924; **46**: 1309-1311.
106. Bogert M T, Stull A. Researches on Thiazoles. VII. The Behavior of *o*-Aminophenyl Mercaptan with Aldehydes, Ketones and *gem*-dihalides. The Synthesis of Benzothiazoles. *J Am Chem Soc* 1925; **47**: 3078-3083.
107. Bogert M T, Corbitt H B. Researches on Thiazoles. IX. Further Studies on Derivatives of 2-Phenyl-benzothiazole *J Am Chem Soc* 1926; **48**: 783-788.
108. Bogert M T, Abrahamson E M. Researches on Thiazoles. I Derivatives of 2-phenyl-benzothiazole. Synthesis of an Analog of Cinchophen (Atophan). *J Am Chem Soc* 1922; **44**: 826-837.
109. Jacobson B. Ueber Bildung von Anhydroverbinungen des Orthoamidophenylmercaprans aus Thioaniliden. *Ber* 1886; **19**: 1067-1077.
110. Hein D W, Alheim R J, Leavitt J J. The use of Polyphosphoric Acid in the Synthesis of 2-Aryl- and 2-Alkyl-substituted Benzimidazoles, Benzoxazoles and Benzothiazoles. *J Am Chem Soc* 1957; **79(2)**: 427-429.
111. Yoshino K, Kohno T, Uno T, Morita T, Tsukamoto G. Organic Phosphorus Compounds. 1. 4-(Benzothiazol-2-yl)Benzylphosphonate as Potent calcium Antagonistic Vasodilator. *J Med Chem* 1986; **29**: 820-825.
112. Perry R J, Wilson B D. Palladium-Catalyzed Syntheses of 2-arylbenzothiazoles. *Organometallics* 1994; **13**: 3346-3350.
113. Lankelma H P, Knauf A E. The Migration of Acyl from Sulfur to Nitrogen. *J Am Chem Soc* 1931; **53**: 309-312.
114. Lankelma H P, Sharnoff P X. The Condensation of Aldehydes with ortho-aminothiophenols, benzothiazolines and benzothiazoles. *J Am Chem Soc* 1931; **53**: 2654-2657.
115. Alyea E C, Malek A. Reaction of 2-Aminobenzenethiol with some β-Diketones. *J Heterocycl Chem* 1985; **22**: 1325-1327.
116. Lankelma H P, Sharnoff P X. The Condensation of Aldehydes and Ketones with ortho-aminothiophenols, benzothiazolines and benzothiazoles II. *J Am Chem Soc* 1932; **54**: 379-381.
117. Teuber H J, Waider H. Zur Kenntnis der aus *o*-Amino-thiophenol und Ketonen erhältlichen Benzthiazoline. *Ber* 1958; **91**: 2341-2344.

118. Elderfield R C, McClenachan E C. Pyrolysis of the Products of the reaction of *o*-Aminobenzenethiols with Ketones. *J Am Chem Soc* 1960; **82**: 1982-1988.
119. Joshi K C, Dandia A, Khanna S. Studies in spiroheterocycles: Part XXIII-Investigation on the reactions of indole-2,3-diones with 2-aminothiophenol and 2-aminophenol. *Indian J Chem Sect B: Org Chem Incl Med Chem* 1990; **29B**: 824-829.
120. Dandia A, Khanna S, Joshi K C. Reactions of Fluorinated Isatin Derivatives with 2-Aminothiophenol. *J Ind Chem Soc* 1990; **67**: 824-826.
121. Karalı N, Güzel Ö, Özsoy N, Özbey S, Salman A. Synthesis of new spiroindolinones incorporating a benzothiazole moiety as antioxidant agents. *Eur J Med Chem* 2010; **45**: 1068-1077.
122. S14 Allam Y A, Nawwar A M. Facile Synthesis of 3-Spiroindolines. *Heteroat Chem* 2002; **13(3)**: 207-210.
123. Cossey H D, Sharpe C J, Stephens F F. Some Anti-microbial Compounds in the Heterocyclic Series. Part III. Basic Ethers of the Benzothiazole and Benzoxazole Series. *J Chem Soc* 1963; **30**: 4322-4330.
124. Cossey H D, Gartside R N, Stephens F F. The Antimicrobial Activity of Benzothiazole basic ethers and related compounds. *Arzneim-Forsch* 1966; **16(1)**: 33-40.
125. Palmer P J, Trigg R B, Warrington J V. Benzothiazolines as antituberculous agents. *J Med Chem* 1971; **14(3)**: 248-251.
126. Yamamoto K, Fujita M, Tabashi K, Kawashima Y, Kato E, Oya M ve ark. Novel Calcium Antagonists. Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of Benzothiazoline Derivatives. *J Med Chem* 1988; **31**: 919-930.
127. Stevens M F G, McCall C J, Lelieveld P, Alexander P, Richter A, Davies D E. Structural Studies on Bioactive Compounds. 23. Synthesis of Polyhydroxylated 2-Phenylbenzothiazoles and a Comparison of Their Cytotoxicities and Pharmacological Properties with Genistein and Quercetin. *J Med Chem* 1994; **37**: 1689-1695.
128. Shi D F, Bradshaw T D, Wrigley S, McCall C J, Lelieveld P, Fichtner I ve ark. Antitumor Benzothiazoles 3. Synthesis of 2-(4-Aminophenyl)benzothiazoles and Evaluation of Their Activities against Breast Cancer Cell Lines *in Vitro* and *in Vivo*. *J Med Chem* 1996; **39(17)**: 3375-3384.

129. Bradshaw T D, Shi D F, Schultz R J, Schultz R J, Paul K D, Kelland L, Wilson A ve ark. Influence of 2-(4-aminophenyl)benzothiazoles on Growth of human ovarian carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Br J Cancer* 1998; **78(4)**: 421-429.
130. Chua M S, Shi D F, Wrigley S, Bradshaw T D, Hutchinson I, Shaw N P ve ark. Antitumor Benzothiazoles.7. Synthesis of 2-(4-Acylaminophenyl)benzothiazoles and Investigations into the Role of Acetylation in the Antitumor Activities of the Parent Amines. *J Med Chem* 1999; **42**: 381-392.
131. Kashiyama E, Hutchinson I, Chua M S, Stinson S F, Philips L R, Kaur G ve ark. Antitumor Benzothiazoles. 8. Synthesis, Metabolic Formation, and Biological Properties of the *C*- and *N*-Oxidation Products of Antitumor 2-(4-Aminophenyl)-benzothiazoles. *J Med Chem* 1999; **42**: 4172-4184.
132. Bradshaw T D, Stevens M F G, Westwell A D. The Discovery of the Potent and Selective Antitumor Agent 2-(4-Amino-3-methylphenyl)benzothiazole (DF 203) and Related Compounds. *Curr Med Chem* 2001; **8**: 203-210.
133. Hutchinson I, Stevens M F G, Westwell A D. The regiospecific synthesis of 5- and 7-monosubstituted and 5,6-disubstituted 2-arylbenzothiazoles. *Tetrahedron Lett* 2000; **41**: 425-428.
134. Hutchinson I, Chua M S, Browne H L, Trapani V, Bradshaw T D, Westwell A D ve ark. Antitumor Benzothiazoles. 14. Synthesis and *in vitro* Biological Properties of Fluorinated 2-(4-Aminophenyl)benzothiazoles. *J Med Chem* 2001; **44**: 1446-1455.
135. Hutchinson I, Bradshaw T D, Matthews C S, Stevens M F G, Westwell A D. Antitumour Benzothiazoles. Part 20: 3'-Cyano and 3'-Alkynyl-Substituted 2-(4'-Aminophenyl)benzothiazoles as New Potent and Selective Analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; **13**: 471-474.
136. Racane L, Stojkovic R, Tralic-Kulenovic V, Karminski-Zamola G. Synthesis and Antitumor Evaluation of Novel Derivatives of 6-Amino-2-phenylbenzothiazoles. *Molecules* 2006; **11**: 325-333.
137. Mortimer C G, Wells G, Crochard J P, Stone E L, Bradshaw T D, Malcolm F G ve ark. Antitumor benzothiazoles. 26. 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-fluorobenzothiazole (GW 610, NSC 721648), a Simple Fluorinated 2-Arylbenzothiazole, Shows Potent and Selective Inhibitory Activity against Lung, Colon, and Breast Cancer Cell Lines. *J Med Chem* 2006; **49**: 179-185.

138. Aiello S, Wells G, Stone E L, Kadri H, Bazzi R, Bell D R ve ark. Synthesis and Biological Properties of Benzothiazole, Benzoxazole, and Chromen-4-one Analogues of the Potent Antitumor Agent 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-fluorobenzothiazole (PMX 610, NSC 721648). *J Med Chem* 2008; **51**: 5135-5139.

139. Devmurari V P, Shivanand P, Goyani M B, Nandanwar R R, Jivani N P, Perumal P. Synthesis and Anticancer Activity of Some Novel 2-Substituted Benzothiazole Derivatives. *Int J Chem Tech Res* 2010; **2(1)**: 681-689.

140. Cornforth. Structures of isamic acid and methylisatoid. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1976; 2004-2009.

141. Bergman J, Stalhandske C, Vallberg H. Studies of the Reaction between Indole-2,3-diones (Isatins) and Secondary Aliphatic Amines. *Acta Chem Scand* 1997; **51**: 753-759.

142. Niume K, Kurosawa S, Toda F, Hasegawa M, Iwakura Y. The Condensation of Isatin with o-Phenylenediamine. *Bull Chem Soc Jpn* 1982; **55**: 2293-2294.

143. Bergman J, Engqvist R, Stàlhandske C, Wallberg H. Studies of the reactions between indole-2,3-diones (isatins) and 2-aminobenzylamine. *Tetrahedron* 2003; **59**: 1033-1048.

144. Arya K, Dandia A. Regioselective Synthesis of Biologically Important Scaffold Spiro [Indole-Perimidines]: An Antitumor Agents. *Lett Org Chem* 2007; **4**: 378-383.

145. Dabiri M, Mohammadi A A, Qaraat H. An efficient and convenient protocol for the synthesis of novel 1'*H*-spiro[isoindoline-1,2'-quinazoline]-3,4'(3'*H*)-dione derivatives. *Monatsh Chem* 2009; **140**: 401-404.

146. Bursavich M G, Gilbert Adam A M, Lombardi S, Georgiadis K E, Reifenberg E, Flannery C R ve ark. 5'-Phenyl-3'*H*-spiro[indoline-3,2'-[1,3,4]thiadiazol]-2-one inhibitors of ADAMTS-5 (Aggrecanase-2). *Bioorg Med Chem Let* 2007; **17**: 5630-5633.

147. Kornet M J, Thio A P. Oxindole-3-spiropyrrolidines and –piperidines. Synthesis and Local Anesthetic Activity. *J Med Chem* 1976 **19(7)**: 892-898.

148. Dandia A, Singh R, Sachdeva H, Arya K. Microwave assisted one pot synthesis of a series of trifluoromethyl substituted spiro [indole-triazoles]. *J Fluorine Chem* 2001; **111**: 61-67.

149. Azizian J, Morady A V, Soozangarzadeh S, Asadi A. Synthesis of novel spiro-[3H-indole-3,3'-[1,2,4]triazolidine]-2-ones via azomethine imines. *Tetrahedron Lett* 2002; **43**: 9721-9723.

150. Prajapati D, Gadhwal S. Synthesis of dihydropyrazolo[3',4':3,4]pyrrolo[1,2-a]indoles and spiro-[3*H*-indole-3,3'-[Δ^2-1,2,4]-triazolin]-2-ones via intra and intermolecular 1,3-dipolar cycloadditions. *Tetrahedron* 2004; **60**: 4909-4913.

151. Morozov P G, Kurbatov S V, Dolgushin F M, Antipin M Y, Olekhnovich L P. Synthesis and structures of substituted 5,6-dihydro-spiro(benz[4,5]imidazo[1,2-*c*]quinazoline-6,3'-indolin)-2'-ones. *Russ Chem Bull Int Ed* 2004; **53(9)**: 2071-2074.

152. Kouznetsov V V, Forero J S B, Torres D F A. A simple entry to novel spiro dihydroquinoline-oxindoles using Povarov reaction between 3-*N*-aryliminoisatis and isoeugenol. *Tetrahedron Lett* 2008; **49**: 5855-5857.

153. Grigg R, Aly M F, Sridharan V, Thianpatanagul S. Decarboxylative Transamination. A New Route to Spirocyclic and Bridghead-Nitrogen Compounds. Relevance to α-Amino Acid Decarboxylases. *J Chem Soc Chem Commun* 1984; 182-183.

154. Fokas D, Ryan W J, Casebier D S, Coffen D L. Solution Phase Synthesis of a Spiro[pyrrolidine-2,3'-oxindole] Library via a Three Component 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction. *Tetrahedron Lett* 1998; **39**: 2235-2238.

155. El-Ahl A A S. Three-Component 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions in Synthesis of Spiro[pyrrolidine-2,3'-oxindoline] Derivatives. *Heteroat Chem* 2002, **13(4)**: 324-329.

156. Raj A A, Raghunathan R, SrideviKumari M R, Raman N. Synthesis, Antimicrobial and Antifungal Activity of a New Class of Spiro Pyrrolidines. *Bioorg Med Chem* 2003, **11**: 407-419.

157. Kumar R S, Perumal S. Novel three-component tandem reactions of cyclic mono ketones, isatin and sarcosine: Formation of dispiropyyrolidines. *Tetrahedron Lett* 2007; **48**: 7164-7168.

158. Kumar R S, Rajesh S M, Perumal S, Banerjee D, Yogeeswari P, Sriram D. Novel three-component domino reactions of ketones, isatin and amino acids: Synthetic and discovery of antimycobacterial activity of highly fuctionalised novel dispiropyrrolidines. *Eur J Med Chem* 2010; **45**: 411-422.

159. Pardasani R T, Pardasani P, Chaturvedi V, Yadav S K, Saxena A, Sharma I. Theoretical and Synthetic Approach to Novel Spiroheterocycles Derived from Isatin Derivatives and L-proline via 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Heteroat Chem* 2003; **14(1)**: 36-41.

160. Kumar R R, Perumal S, Senthilkumar P,Yogeeswari P, Sriram D. Discovery of Antimycobacterial Spiro-piperidin-4-ones: An Atom Economic, Stereoselective Synthesis, and Biological Intervention. *J Med Chem* 2008; **51(18**): 5731-5735.

161. Saxena A, Goswami R, Khanna P, Bhagat S, Jain S C. One pot synthesis of novel 1,2-dihidro-5-methyl-spiro[4H-3,1-benzoxazine-2,3'[3H]indol]-4,2'-diones. *Indian J Chem Sect B: Org Chem Incl Med Chem* 2004; **43B**: 2381-2385.

162. Saxena A, Khanna P, Bhagat S, Gupta A, Jain S C. One pot facile synthesis of 5-alkyl-1,2-dihidro-spiro[4*H*-3,1-benzoxazine-2,3'[3*H*]indol]-4,2'-diones under microwave irradiation. *Indian J Chem Sect B: Org Chem Incl Med Chem* 2006; **45B**: 1504-1510.

163. Rajopadhye M, Popp F D. Potential Anticonvulsants. VII. Synthesis of 5'-Methylspiro[3*H*-indole-3,2'-thiazolidine]-2,4'(1*H*)-diones. *J Heterocycl Chem* 1984; **21**: 289-291.

164. Rajopadhye M, Popp F D. Synthesis and Antileukemic Activity of Spiro[indoline-3,2'-thiazolidine]-2,4'-diones. *J Heterocycl Chem* 1987; **24**: 1637-1642.

165. Ali R, Mishra B, Nizamuddin. Synthesis and fungicidal activity of some 1'-(substituted aryloxyaceto)spiro-[3*H*-indole-3,2'-thiazolidine]-2,2'-(1*H*)-diones and 2-aryl-[1,3,4]oxadiazino[5,6-*b*]indoles. *Indian J Chem Sect B: Org Chem Incl Med Chem* 1989; **28B**: 526-528.

166. Joshi K C, Dandia A, Bhagat S. Studies in Spiroheterocycles: Part XXV-Synthesis of new fluorine containing 3'-phenylspiro[3*H*-indole-3,2'-thiazolidine]-2,4'(1*H*)-diones and novel (2,3-dihidro-2-oxo-3-phenylamino-1*H*-indol-3-ylthio)ethanoic acid as antibacterial agents. *Indian J Chem Sect B: Org Chem Incl Med Chem* 1990; **29B**: 766-770.

167. Jain S C, Sinha J, Bhagat S, Errington W, Olsen C E. A Facile Synthesis of Novel Spiro-[Indole-pyrazolinyl-thiazolidine]-2,4'-dione. *Synth Commun* 2003; **33(4)**: 563-577.

168. Jain S C, Khanna P, Bhagat S, Jain M, Sakhuja R. Novel Fluorinated Spiro [indole-indazolyl-thiazolidine]-2,4'-diones: Design and Synthesis. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem* 2005; **180(8)**: 1829-1839.

169. Hanna M A, El-Sherbiny M F, Al-Sarawy A A, El-Sayed M A F. Simple Approach to Some New Arylazo Spiro Indoline-Based Dyes as Alternatives for Benzidine-Based Dyestuffs. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem* 2007; **182(10)**: 2371-2391.

170. Joshi K C, Dandia A, Ahmed N. Studies in spiroheterocycles: Part XI-Synthesis of novel fluorine containing 4',5'-dihydrospiro[3*H*-indole-3',2'(1*H*)-pyrazolo-[3,2-*d*][1,3,5]thiadiazepine]-2(1*H*),5'-diones from isatins. *Indian J Chem Sect B: Org Chem Incl Med Chem* 1989; **28B**: 639-641.

171. Dandia A, Saha M, Taneja H. Improved one-pot synthess of 3-spiro indolines under microwave irritation. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem* 1998; **139(1)**: 77-85.

172. Dandia A, Singh R, Arya K. Solvent-free synthesis of spiro[3*H*-indole-3,2'-thiazolidines]. *Org Prep Proced Int* 2003; **35(4)**: 401-408.

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

174. Dandia A, Singh R, Khaturia S, Mèrienne C, Morgant G, Loupy A. Efficient microwave enhanced regioselective synthesis of a series of benzimidazolyl/triazolyl spiro [indole-thiazolidinones] as potent antifungal agents and crystal structure of spiro[3*H*-indole-3,2'-thiazolidine]-3'(1,2,4-triazol-3-yl)-2,4'(1*H*)-dione. *Bioorg Med Chem* 2006; **14**: 2409-2417.

175. Kapil A, Dandia A. Synthesis of biologically important novel fluorinated spiro heterocycles under microwaves catalized by montmorillonite KSF. *J Fluorine Chem* 2007, **128**: 224-231.

176. Rajopadhye M, Popp F D. Synthesis of Spiro[3*H*-indole-3,2'-tetrahydro-1,3-thiazine]-2,4'(1*H*)-diones. *J Heterocycl Chem* 1985; **22**: 93-96.

177. Joshi K C, Dandia A, Ahmed N. Studies in Spiroheterocycles: Part IX: A New elegant synthesis and reactions of some novel fluorine-containing spiro[3*H*-indole-3,2'-tetrahydro-1,3-thiazine]-2,4'(1*H*)-diones. *Heterocycles* **24(9)**: 2479-2485.

178. Dandia A, Saha M, Rani B. Microwave-induced Synthesis of Spiro[indoline-3,2'-[1,3]thiazinane]-2,4'-diones. *J Chem Research* 1998; **(S)**: 360-361.

179. Kumar R, Giri S, Nizamuddin. Synthesis of some 1'-(substituted phenyl)spiro[indole-3,4'-azetidine]-2(3*H*),2'-diones as potential fungicides. *J Agric Food Chem* 1989; **37(4)**: 1094-1096.

180. Jarrahpour A, Khalili D. Synthesis of some mono- and bis-spiro-β-lactams of benzylisatin. *Tetrahedron Lett* 2007; **48**: 7140-7143.

181. Lin X, Weinreb S M. Model studies on total synthesis of the chartellines, spirocyclic β-lactam alkaloids from a marine bryozoans. *Tetrahedron Lett* 2001; **42**: 2631-2633.

182. Rajopadhye M, Popp F D. Potential Anticonvulsants. 11. Synthesis and Anticonvulsant Activity of Spiro[1,3-dioxolane-2,3'-indolin]-2'-ones and Structural Analogues. *J Med Chem* 1988; **31**: 1001-1005.

183. Geronikaki A, Babaev E, Dearden J, Dehaen W, Filimonov D, Galaeva I ve ark. Design, synthesis, computational and biological evaluation of new anxiolytics. *Bioorg Med Chem* 2004; **12**: 6559-6568.

184. Zapata-Sudo G, Pontes L B, Gabriel D, Mendes T C F, Ribeiro N M, Pinto A C ve ark. Sedative-hypnotic profile of novel isatin ketals. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; **86**: 678-685.

185. Duh P D, Tu Y Y, Yen G C. Antioxidant activty of water extract of harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensm-Wiss U-Technol* 1999; **32**: 269-277.

186. Buege J A, Aust S D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; **52**: 302-310.

187. Aruoma O I, Halliwell B, Hoey B M, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biol Med* 1989; **6**: 593-597.

188. Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmıttel-Wıssenschaft und Technologıe* 1995; ***28*:** 25-30.

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

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

191. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D ve ark. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Nat Can Inst* 1991; **83:** 757-766.

192. Alley M C, Scudiero D A, Monks A, Hursey M L, Czerwinski M J, Fine D L ve ark. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Res* 1988; **48**: 589-601.

193. Grever M R, Schepartz S A, Chabner B A. The National Cancer Institute: cancer drug discovery and development program. *Semin Oncol* 1992; **19(6)**: 622-638.

194. Boyd M R, Paull K D. Some practical considerations and applications of the national cancer institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev Res* 1995; **6**: 91-109.

195. Shoemaker R H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 813-823.

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

197. Hioki H, Matsushita K, Kubo M, Kodama M. Combinatorial Synthesis of Benzothiazoles and Benzimidazoles Using a Traceless Aniline Linker. *J Comb Chem* 2006; **8**: 462-463.

198. Kodomari M, Satoh A, Nakano R. Solvent-Free Synthesis of Benzothiazolines in the Presence of Alumina. *Synth Comm* 2007; **37**: 3329-3335.

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

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

201. Ben-Alloum A, Bakkas S, Soufiaoui M. Nouvelle Voie de Synthese des 2-Arylbenzothiazoles Transfert d'Electrons Active par Micro-ondes. *Tetrahedron Lett* 1997; **38(36)**: 6395-6396.

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

203. Lim H J, Myung D, Lee I Y C, Jung M H. Microwave-Assisted Synthesis of Benzimidazoles, Benzoxazoles, and Benzothiazoles from Resin-Bound Esters. *J Comb Chem* 2008; **10**: 501-503.

204. Silverstein R M, Bassler G C, Morrill T C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 4th ed. New York, USA: John Wiley & Sons Inc; 1981 (s. 321-326).

205. Erdik E. *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler*. 4. Basım. Ankara: Gazi Kitabevi; 2007 (s. 36-38).

206. Ault R G, Hirst E L, Morton R A. Absorption Spectra in Relation to the constitution of Derivatives of Isatin and Carbostyril. *J Chem Soc* 1935, 1653-1657.

207. Mangini A, Passerini R. Absorption spectra in isatin series. *Bolletino Scientifico della Facolta di Chimica Industriale di Bologna*. 1951; **9**: 51-52.

208. Charles R G, Fresier H. Synthesis of 2-(*o*-hydroxyphenyl)benzothiazole and of 2-(*o*-Hydroxyphenyl)benzothiazoline. *J Org Chem* 1953; **18**: 422-425.

209. Goetz F J. Heterocyclic tautomerisms. III. An investigation of the 2-arylbenzothiazoline-2-(benzylideneamino)thiophenol tautomerism. Part 3. *J Heterocycl Chem* 1968; **5(4)**: 509-512.

210. Abdelhamid A O, Parkanyi C, Rashid S M K, Lloyd W D. Synthesis of fused Ring Heterocycles from Aromatic Amines with Hydroximoyl Chlorides. *J Heterocycl Chem* 1988; **25(2)**: 403-405.

211. Wang R, Liu D, Xu K, Li J. Substituent and solvent effects on excited state intramolecular proton transfer in novel 2-(2'-hydroxyphenyl)benzothiazole derivatives. *J Photochem Photobiol A* 2009; **205(1)**: 61-69.

212. Sadler P W. Absorption Spectra of Indigoid Dyes. *J Org Chem* 1956; **21(3)**: 316-318.

213. Erdik E. *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler.* 4. Basım. Ankara: Gazi Kitabevi; 2007. (s. 33-34).

214. O'Sullivan D G, Sadler P W. The Structure of Isatin and Substituted Isatins. *J Chem Soc* 1956; 2202-2207.

215. O'Sullivan D G. Vibrational Frequency Correlations in Heterocyclic Molecules. Part VI. Spectral Features of a Range of Compounds Poessessing a Benzene Ring Fused to a Five-membered Ring. *J Chem Soc* 1960; 3278-3284.

216. Bigotto A, Galasso V. Infrared and Raman spectra of phthalimide and isatin. *Spectrochim Acta Part A* **35A**: 725-732.

217. Laatsch H, Thomson R H, Cox P J. Spectroscopic Properties of Violacein and Related Compounds: Crystal Structure of Tetramethylviolacein. *J Chem Soc Perkin Trans II* 1984; **8**: 1331-1339.

218. Petrov I, Grupce O, Stafilov T. The N-H Streching region of some imides and thioimides. *J Mol Struct* 1986; **142**: 275-278.

219. Naumov P, Anastasova F, Drew M G B, Ng S W. 5-Fluoroindoline-2,3-dione. *Acta Cryst*; 2000, **C56**: e406-e407.

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

221. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 21417 (IR).

222. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 23383 (IR).

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

224. Castiñeiras A, Gómez M C, Sevillano P. 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. *J Mol Struct* 2000; **554**: 301-306.

225. Taşal E, Sıdır İ, Gülseven Y, Öğretir C, Önkol T. 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* 2009; **72**: 801-810.

226. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 10972 (IR).
227. Snavely Fred A, Un S. A study of the structure of hydrazones of indole-2,3-dione and 1-methylindole-2,3-dione with nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Org Chem* 1981; **46(13)**: 2764-2766.
228. Bain G A, West D X, Krejci J, Valdès-Martinez J, Hernández-Ortega S, Toscano R A. Synthetic and spectroscopic investigations of N(4)-substituted isatin thiosemicarbazones nad their copper(II) complexes. *Polyhedron* 1997; **16(5)**: 855-862.
229. March J. Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure. 4th ed. New York: John Wiley & Sons; 1992.
230. Howard J A K, Hoy V J, O'Hagan D, Smith G T. How good is fluorine as a hydrogen bond acceptor? *Tetrahedron* 1996; **52**: 12613-12622.
231. Sakai T, Miki Y, Nakatani M, Ema T, Uneyama K, Utaka M. Lipase-Catalysed kinetic resolution of 2-acyloxy-2-(pentafluorophenyl)acetonitrile. *Tetrahedr Lett* 1998; **39**: 5233-5236.
232. Akkurt M, Karaca S, Ermut G, Karalı N, Büyükgüngör O. 5-Chlorobenzothiazole-2-spiro-3'-indolin-2'-one. *Acta Cryst* 2010; **E66**: o399-o400.
233. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 8046 (IR).
234. Kollmar M, Parlitz R, Oevers S R, Helmchen G. 2-Amino-3-fluorobenzoic acid. *Org Synth* 2002; **79**: 196-204.
235. Bratulescu G. A new efficient one-pot synthesis of indoles. *Tetrahedron Lett* 2008; **49**: 984-986.
236. Erdik E. *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler.* 4. Basım. Ankara: Gazi Kitabevi; 2007. (s. 109-125).
237. Silverstein R M, Bassler G C, Morrill T C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 4th ed. New York, USA: John Wiley & Sons Inc; 1981. (s. 124-132).

238. Sterk H, Holzer H. Beziehungen zwischen chemischer Verschiebung und Ladungsdichte. *Magn Reson Chem* 1974; **6**: 133-143.

239. Galasco V, Pellizer G, Lisini A, Bigotto A. The Proton Magnetic Resonance of Heterocyclic Diketones. *Magn Reson Chem* 1975; **7**: 591-595.

240. Morales-Rios M S, Joseph-Nathan P. ^{1}H and ^{13}C NMR Study of 1-Substituted Isatins and Their Corresponding 3-(dicyanomethylidene)indol-2-ones. *Magn Reson Chem* 1991; **29**: 893-896.

241. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 21417 (^{1}H-NMR).

242. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 23383 (^{1}H-NMR).

243. Santes V, Rojas-Lima S, Santillan R L, Farfàn N. Synthesis and Study of Isomeric Benzo[1,4]oxazines and Benzothiazolines by NMR Spectroscopy and X-Ray Crystallography. *Monatsh Chem* 1999; **130**: 1481-1486.

244. Billeau S, Chatel F, Robin M, Faure R, Galy J P. Spectral Assignment and Reference Data. ^{1}H and ^{13}C chemical shifts for 2-aryl and 2-*N*-arylamino benzothiazole derivatives. *Magn Reson Chem* 2006; **44**: 102-105.

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

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

247. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 8046HSP-48-929 (^{1}H-NMR).

248. Babudri F, Florio S, Ingrosso G, Turco A M. "Cross-Coupling" of 2-chlorobenzothiazole with benzothiazolylalkyl-magnesium bromide: Synthesis of bis(2-benzothiazolyl)alkanes. *Heterocycles* 1986; **24(8)**: 2215-2218.

249. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 8046HPM-02-416 (^{1}H-NMR).

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

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

252. Silverstein R M, Bassler G C, Morrill T C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 4th ed. New York, USA: John Wiley & Sons Inc; 1981 (s. 197-199).

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

254. Karalı N. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-nitroindole-2,3-dione derivatives. Eur *J Med Chem* 2002; **37**: 909-918.

255. Terzioğlu N, Karalı N, Gürsoy A, Pannecouque C, Leysen P, Paeshuyse J ve ark. Synthesis and primary antiviral activity evaluation of 3-hydrazono-5-nitro-2-indolinone derivatives. *Arkivoc* 2006; **(i)**: 109-118.

256. Karalı N, Gürsoy A, Kandemirli F, Shvets N, Kaynak B, Özbey S ve ark. Synthesis and structure-antituberculosis activity relationship of 1*H*-indole-2,3-dione derivatives. *Bioorg Med Chem* 2007; **15**: 5888-5904.

257. Winkler T, Ferrini P G, Haas G. The ^{13}C NMR Spectrum of comarandione. *Magn Reson Chem* 1979; **12(2)**: 101-102.

258. Albright T A, Freeman W J. Nuclear Magnetic Resonance Studies VII-^{13}C and ^{15}N N.m.r. of Diazo Compounds. *Magn Reson Chem* 1977; **9(2)**: 75-79.

259. Holzer W, Györgydeàk Z. NMR Spectroscopic Investigations with Isatin Guanylhydrazones. *J Heterocyclic Chem* 1996; **33**: 675-680.

260. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 21417CDS-09-363 (^{1}H-NMR).

261. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 23383CDS-11-313 (^{1}H-NMR).

262. Rodríguez-Argüelles M C, Sánchez A, Ferrari M B, Fava G G, Pelizzi C, Pelosi G ve ark. Transition-metal complexes of isatin-β-thiosemicarbazone. X-ray crystal structure of two nickel complexes. *J Inorg Biochem* 1999; **73**: 7-15.

263. Güzel Ö, Karalı N, Salman A. Synthesis and antituberculosis activity of 5-methyl/trifluoromethoxy-1*H*-indole-2,3-dione 3-thiosemicarbazone derivatives. *Bioorg Med Chem* 2008; **16**: 8976-8987.

264. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 1723CDS-03-218 (^{1}H-NMR).

265. Sawhney S N, Boykin D W. Transmission of substituent effects in heterocyclic systems by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance. Benzothiazoles. *J Org Chem* 1979; **44(7)**: 1136- 1142.

266. Pınar Ş, Akkurt M, Jarrahpour A A, Khalili D, Büyükgüngör O. 1'-Benzyl-1-(2,4-dimethoxyphenyl)-3-phenoxy-spiro[azetidine-2,3'(3*H*)-indole]-2',4(1*H*)-dione. *Acta Cryst* 2006; **E62**: o804-o806.

267. Larina L I, Elokhina V N, Yaroshenko T I, Nakhmanovich A S, Dolgushin G V. Spectral Assignments and Refernce Data. ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N and ^{19}F NMR study of acetylation products of heterocyclic thiosemicarbazones. *Magn Reson Chem* 2007; **45**: 667-673.

268. Solcániová E, Culak I. Effect of substituents on the ^{13}C NMR chemical shifts of 2-R-3-methylbenzothiazolium quaternary salts and 2-R-benzothiazoles. *Magn Reson Chem* 1989; **27(7)**: 663-665.

269. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 8046CDS-10-525 (^{1}H-NMR).

270. Erdik E. *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler.* 4. Basım. Ankara: Gazi Kitabevi; 2007 (s. 340).

271. Cihan G. İndol türevi spiroheterosiklik bileşikler üzerinde çalışmalar. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Kimya A.D. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. (2005).

272. Williams D H, Fleming I. Spectroscopic Methods in Organic Chemistry. 4th ed. McGraw-Hill Book Company Europe England; 1989.

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

274. Butcher. The Loss of CO and HCN in the Fragmentation of isatin and the methyl isatins. *J Mass Spectrom* 1971; **5**: 759-760.

275. Peet N P, Barbuch R J. Mass Spectral Fragmentation and Rearrangement of Isatin Derivatives. *J Mass Spectrom* 1984; **19(4)**: 171-175.

276. Barbuch R J, Peet N P, Coutant J E. Tandem Mass Spectrometry Study of 1-Methylisatin. *J Mass Spectrom* 1986; **21**: 521-522.

277. Barbuch R J, Peet N P. Tandem Mass Spectrometry Study of 1-Methylisatin. *J Mass Spectrom* 1987; **22**: 59-60.

278. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 21417 (MS).
279. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 23383 (MS).
280. Ballantine J A, Fenwick R G, Popp F D. 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 derivatives and their 2,3-quinoxaline heterocyclic analogues. *J Mass Spectrom* 1971; **5**: 1003-1014.
281. Karalı N, Gürsoy A. Synthesis and Anticonvulsant Activity of some new thiosemicarbazone and 4-thiazolidone derivatives bearing an isatin moiety. *IL FARMACO* 1994; **49(12)**: 819-822.
282. SDBS web: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, spectrum no: 8046 (MS).
283. Varma R S, Singh A P, Singh S P. Electron Impact Mass Spectra of 1-Methyl-3-(2-benzothiazolylhydrazono)-2-indolinones. *J Mass Spectrom* 1992; **27**: 17-18.
284. Coutts R T, El-Hawari A M, Pound N J, Abramovitch R A. Derivatives of 2-pyrazolin-5-one.IV. Preparation and properties of two spiro[benzothiazoline-2,4'-[2]pyrazoline] derivatives. *Can J Chem* 1976; **54**: 993-1001.
285. Brum J, Dell'Orco P, Lapka S, Muske K, Sisko J. Monitoring organic reactions with on-line atmospheric pressure ionization mass spectrometry: the hydrolysis of isatin. *Rapid Commun in Mass Spectrom* 2001; **15**: 1548-1553.
286. Unger M, Jacobsen W, Holzgrabe U, Benet L Z. Quantitative Liquid Chromatography-mass spectrometry determination of isatin in urine using automated on-line extraction. *J Chromatogr B* 2002 **767**: 245-253.
287. Puchalska M, Polec-Pawlak K, Zadrona I, Hryszko H, Jarosz M. Identification of indigoid dyes in natural organic pigments used in historical art objects by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2004; **39**: 1441-1449.
288. Zou P, Koh H L. Determination of indican, isatin, indirubin and indigotin in *Isatis indigotica* by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007; **21**: 1239-1246.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Görkem	**Soyadı**	Ermut
Doğ.Yeri	Lüleburgaz/Kırklareli	**Doğ.Tar.**	21.05.1983
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	19145388324
Email	egorkem@istanbul.edu.tr	**Tel**	05052106078

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora	-	-
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2010
Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi	2006
Lise	Yeşilköy Anadolu Lisesi	2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi	2009-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	çok iyi	iyi	iyi	77.5	
Rusça	iyi	orta	orta	-	

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	77.966	73.137	76.244
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Word, Excel, Power Point	iyi
Chemsketch	iyi
Adobe Photoshop	orta

Yayınları:

Akkurt M, Karaca S, Ermut G, Karalı N, Büyükgüngör O. 5-Chlorobenzothiazole-2-spiro-3'-indolin-2'-one. *Acta Cryst* 2010; **E66**: o399-o400.

Tebliğleri:

1. Ermut G, Karalı N. Synthesis and Characterization of 5-Chloro-1*H*-indole-2,3-dione 3-Thiosemicarbazone Derivatives. *9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS),* 23-26 Haziran 2009, Ankara.

2. Ermut G, Karalı N, Akkurt M, Karaca S, Büyükgüngör O. 5-Chloro-Benzothiazole-2-Spiro-3'-Indolinones. *1st Turkish-Russian Joint Meeting on Organic and Medicinal Chemistry (JMOMC),* 14-17 Ekim 2009, Antalya.

3. Ermut G, Özsoy N, Karalı N , Can A. Antioxidant Activity of Spiroindolinones Incorporating a 5-Chlorobenzothiazoline Moiety. *Third International Meeting on Pharmacy & Pharmaceutical Sciences (IMPPS-3),* 9-12 Haziran 2010, İstanbul.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Kitap Okumak, müzik dinlemek, spor yapmak, tiyatro ve sinemaya gitmek.