



**ANTİKANSER ETKİLİ YENİ HİDRAZON TÜREVLERİNİN SENTEZİ,
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ VE YAPI-ETKİ İLİŞKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Zahra Maryam

Eskişehir 2024

**ANTİKANSER ETKİLİ YENİ HİDRAZON TÜREVLERİNİN SENTEZİ,
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ VE YAPI-ETKİ İLİŞKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Zahra Maryam

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ocak 2024

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Zahra MARYAM'ın “Antikanser Etkili Yeni Hidrazon Türevlerinin Sentezi, Biyolojik Aktiviteleri Ve Yapı-Etki İlişkilerinin Değerlendirilmesi” başlıklı tezi 18.01.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Yeterlik Tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) :

Üye :

Üye :



Prof. Dr. Saime ÖNCE

Enstitü Müdür

ÖZET

ANTİKANSER ETKİLİ YENİ HİDRAZON TÜREVLERİNİN SENTEZİ, BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ VE YAPI-ETKİ İLİŞKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Zahra MARYAM

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2024

Danışman: Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI

Kanser, dünya çapında ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Mide kanseri tüm kanserlerin %5,6'sını oluşturmaktadır. *H. Pylori* ise mide kanserine neden olan en önemli patojendir. Üreaz ise nitrojen döngüsü için önemli bir enzim olarak bilinir ve mikrobiyal protein sentezi ve mikroorganizmaların büyümesi için oldukça önemlidir. Özellikle *H. pylori*'nin asidik pH'nın üstesinden gelip, mide ortamının mukus tabakasındaki bakterileri kolonize etmesini sağlar.

Bu tez çalışmasında, 10 yeni hidrazon türevi (**3a-3j**) sentezlendi ve kimyasal yapıları NMR spektroskopisi kullanılarak aydınlatıldı. Daha sonra sentezlenen bileşiklerin antikanser etkileri iki farklı mide kanseri (SNU1 ve AGS) hücresi kullanılarak değerlendirildi. Bileşiklerin *H. pylori*'ye karşı antibakteriyel etkileri incelendi ve üreaz enzimine karşı inhibisyon potansiyelleri değerlendirildi. Antikanser aktivite sonuçları incelendiğinde, özellikle **3c** bileşiği her iki kanser hücresine karşı ($IC_{50} = 54,10 \pm 1,72$ ve $44,51 \pm 1,80 \mu M$) referans ilaç sisplatinden ($IC_{50} = 84,80 \pm 3,31$ $91,85 \pm 2,24 \mu M$) daha etkili olduğu bulunmuştur. Antibakteriyel aktivite sonucuna göre yine **3c** bileşiğinin $4 \mu g/mL$ MIC değeri ve $8 \mu g/mL$ MBK değeri ile bileşikler arasında *H. pylori*'ye karşı en etkili bileşik olarak bulunmuştur. Bileşiklerin üreaz enzimine karşı inhibisyon potansiyelleri tiyoüre ile kıyaslanmıştır. Özellikle **3b**, **3c**, **3f** ve **3j** bileşiklerinin üreaza karşı pozitif kontrol olarak tiyoüreden daha yüksek etki gösterdiği bulunmuştur. Moleküler doking çalışması ise enzimin aktif bölgesi (üreaz) ile bileşik **3c** arasındaki etkileşimi analiz etmek için gerçekleştirildi.

Anahtar Sözcükler: Hidrazon, Helikobakter pilori, üreaz, antikanser.

ABSTRACT

SYNTHESIS OF NEW HYDRAZONE DERIVATIVES WITH ANTI-CANCER EFFECT, EVALUATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES AND STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS

Zahra MARYAM

Department of Pharmaceutical Chemistry

Anadolu University, Institute of Graduate Education, January 2024

Supervisor: Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. Stomach cancer accounts for 5.6% of all cancers. *H. Pylori* is the most important pathogen that causes stomach cancer. Urease is known as an important enzyme for the nitrogen cycle and is very important for microbial protein synthesis and growth of microorganisms. In particular, it enables *H. pylori* to overcome the acidic pH and colonize bacteria in the mucus layer of the stomach environment.

In this thesis study, 10 new hydrazone derivatives (**3a-3j**) were synthesized and their chemical structures were elucidated using NMR spectroscopy. Then, the anticancer effects of the synthesized compounds were evaluated using two different gastric cancer cells (SNU1 and AGS). The antibacterial effects of the compounds against *H. pylori* were examined and their inhibition potential against the urease enzyme was evaluated. When the anticancer activity results were examined, especially compound **3c** was more effective against both cancer cells ($IC_{50} = 54.10 \pm 1.72$ and $44.51 \pm 1.80 \mu M$) than the reference drug cisplatin ($IC_{50} = 84.80 \pm 3.31$ $91.85 \pm 2.24 \mu M$) was found to be more effective. According to the antibacterial activity results, compound **3c** was found to be the most effective compound against *H. pylori* among the compounds, with a MIC value of 4 $\mu g/mL$ and an MBK value of 8 $\mu g/mL$. The inhibition potentials of the compounds against the urease enzyme were compared with thiourea. In particular, compounds **3b**, **3c**, **3f**, and **3j** were found to be more effective than thiourea as a positive control against urease. Molecular docking study was carried out to analyze the interaction between the active site of the enzyme (urease) and compound **3c**.

Keywords: Hydrazone, Helicobacter pylori, urease, anticancer.

TEŞEKKÜR

First of all, I'm thankful to ALLAH almighty for all that I'm today. Then, I'm deeply thankful to my supervisor Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI for providing me with the opportunity to conduct my master research. I want to show my gratitude towards him as he helped me throughout in conducting my research.

Then I'm thankful to Assoc. Prof. Dr. Ulviye ACAR ÇEVİK, whose continuous support, motivation, encouragement, guidance, and unwavering support had enabled me to conduct this research and write my thesis. Without their support and guidance, I would not have been able to complete my thesis.

18/01/2024

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Zahra MARYAM

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	1
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	2
İÇİNDEKİLER	3
TABLolar DİZİNİ.....	5
ŞEKİLLER DİZİNİ	6
KISALTMALAR DİZİNİ.....	10
1. GİRİŞ VE AMAÇ	11
1.1. H. pilori Virülans Faktörleri ve Kanseri Mekanizmaları	14
2. KAYNAK BİLGİSİ	22
2.1. Hidrazon	22
2.2. Hidrazon ve Hidrazid Türevlerinin Organik Kimyada Kullanımı	23
2.3. Hidrazid-hidrazonların biyotransformasyonu.....	25
2.4. Üreaz İnhibisyon Aktivitesine Konu Olmuş Hidrazon Türevleri.....	25
3. GEREÇLER	32
3.1. Kullanılan Maddeler	32
3.1. Kullanılan Cihazlar.....	34
4. YÖNTEMLER	35
4.1. Sentez Çalışmaları.....	35
4.1.1. Etil 3-siklopentilpropanoat Türevinin Sentezi	35
4.1.2. 3-Siklopentilpropanhidrazit Türevinin Sentezi.....	35
4.1.3. Hedef bileşiklerinin sentezi (3a-3j)	35
4.2. İTK Çalışmaları ve Rf Değerlerinin Saptanması.....	36
4.3. Erime Noktalarının Tespiti	36
4.4. ¹ H NMR Spektrumlarının Alınması	36
4.5. ¹³ C NMR Spektrumlarının Alınması.....	36
4.6. Antikanser Aktivite Çalışmaları	36
4.7. Antibakteriyel Aktivite.....	37
4.8. Üreaz İnhibisyon Aktivitesi.....	37
4.9. Moleküler Doking	37
5. BULGULAR ve TARTIŞMALAR	39

5.1. Sentez Çalışmaları.....	39
5.1.1. Etil 3-siklopentilpropanoat Türevinin Sentezi.....	39
5.1.2. 3-Siklopentilpropanhidrazit Türevinin Sentezi	39
5.1.3. Hedef Bileşiklerinin Sentezi (3a-3j).....	40
5.1.4. 3-Siklopentil-N'-(furan-2-ilmetilen)propanhidrazit (3a).....	41
5.1.5. 3-Siklopentil-N'-(tiyofen-2-ilmetilen)propanhidrazit (3b).....	43
5.1.6. 3-Siklopentil-N'-(5-nitrotiyofen-2-ilmetilen)propanhidrazit (3c).....	45
5.1.7. 3-Siklopentil-N'-((5-(hidroksimetil)furan-2-il)metilen)propanhidrazit (3d)	47
5.1.8. 3-Siklopentil-N'-((1H-pirol-2-il)metilen)propanhidrazit (3e).....	49
5.1.9. 3-Siklopentil-N'-((1-metil-1H-pirol-2-il)metilen)propanhidrazit (3f)	51
5.1.10. 3-Siklopentil-N'-(piridin-2-ilmetilen)propanhidrazit (3g).....	53
5.1.11. 3-Siklopentil-N'-(piridin-3-ilmetilen)propanhidrazit (3h).....	55
5.1.12. 3-Siklopentil-N'-(piridin-4-ilmetilen)propanhidrazit (3i).....	57
5.1.13. 3-Siklopentil-N'-(5-metiltiyofen-2-ilmetilen)propanhidrazit (3j).....	59
5.2. Sentez Çalışmalarının Değerlendirilmesi	61
5.3. Spektral Verilerin Değerlendirilmesi.....	61
5.4. Antikanser Aktivite Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	62
5.5. Antibakteriyel Aktivite Çalışmalarının Değerlendirilmesi	63
5.6. Üreaz İnhibisyon Aktivitesinin Değerlendirilmesi	63
5.7. Moleküler Doking	64
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	67
KAYNAKÇA	68

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 5.1. Bileşiklerin SNU1, AGS ve L929 hücre dizilerine ait IC ₅₀ değerleri (μM).....	63
Tablo 5.2. Bileşiklerin (3a-3j) H. pilori'ye karşı MIC ve MBK değerleri (μg/mL).....	64
Tablo 5.3. Bileşiklerin Üreaz İnhibisyon Aktivitesi (3a-3j).....	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Helikobakter Piloni	1
Şekil 1.2. Mide anatomisi	2
Şekil 1.3. Helikobakter pilori'nin anatomisi ve enfeksiyon şekli.....	3
Şekil 1.4. Kan grubu antijen bağlayıcı yapışma A (BabA); sialik asit bağlama yapışması A (SabA); ısı şoku proteini (Hsp); vakuolleştirici sitotoksin geni A; sitotoksinle ilişkili gen A (CagA); tip IV salgı sistemi (T4SS); ROS (reaktif oksijen türleri); IL (interlökin); makrofaj inflamatuvar proteini (MIP); aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kapp-hafif zincir artırıcısı (NF-kB); TLR (ücret benzeri reseptör); maPK (mitojenle aktifleştirilen protein kinaz)	4
Şekil 1.5. H. pylori, mide kanserinin gelişimi sırasında mide epitel hücrelerini hem doğrudan hem de dolaylı olarak etkilemektedir. Kısaltmalar arasında interlökin anlamına gelen IL kısaltmaları; aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kapp hafif zincir güçlendiricisi için NF-B; Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri için sırasıyla ROS ve RNS; Annelerin dekapentaplejiye karşı baskılayıcısı için Smad7 7. Spesifik olarak, H. pylori enfeksiyonunun, bağırsak displazisine, metaplaziye ve sonuçta mide kanserine yol açabilen kalıcı atrofik olmayan gastrite neden olduğu kabul edilmektedir.....	5
Şekil 1.6. Hidrazon yapısı	6
Şekil 1.7. Hidrazonun tıbbi etkileri	7
Şekil 1.8. Elde edilmesi planlanan bileşiklere (3a-3j) ait genel sentez şeması .	7
Şekil 2.1. Hidrazonların Elde Edilmesine İlişkin Genel Sentez Yöntemi	8
Şekil 2.2. İzonikotinik Asit Hidrazid ve Hidrazonun Moleküler Şekli	8
Şekil 2.3. Hidrazonların Birleşme ve İndirgeme Reaksiyonları	9
Şekil 2.4. Oksadiazol Halkasının Elde Edilmesi	9

Şekil 2.5. Oksadiazol Halkasının Elde Edilmesi	10
Şekil 2.6. Triazol Halkasının Edinilmesi	10
Şekil 2.7. 4-Tiazolidinon ve 2-Azethidione Türevlerinin Sentezi	10
Şekil 2.8. Hidrazonların Tanımlanmış Metabolik Yolları	11
Şekil 2.9. Barbitürat-aril hidrazon türevi bileşiğinin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.10. (E)-N'-benziliden-2-(2-floro-[1,1'-bifenil]-4-il) propanhidrazit bileşiğinin kimyasal yapısı	11
Şekil 2.11. Benzofuran-hidrazon türevi bileşiklerin genel yapısı	11
Şekil 2.12. Kinazolinon-hidrazon türevi bileşiklerin genel kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.13. Hidrazonotiyazolin türevi bileşiklerin genel yapısı	12
Şekil 2.14. Kinazolinon-Hidrazon türevi bileşiklerin genel yapısı	13
Şekil 2.15. Benzimidazole-hidrazon türevi bileşiklerin genel yapısı.....	13
Şekil 2.16. Hidrazon türevi bileşiklerin genel yapısı	14
Şekil 2.17. Benzophenone hidrazon türevi bileşiklerin genelyapısı.....	14
Şekil 4.1. Etil 3-siklopentilpropanoat Türevinin eldesi için reaksiyon denklemi.	26
Şekil 4.2. 3-Siklopentilpropanhidrazit Türevinin eldesi için reaksiyon denklemi	26
Şekil 4.3. Hedef Bileşiklerin eldesi için reaksiyon denklemi.....	
Şekil 5.1. Etil 3-siklopentilpropanoat bileşiğinin mekanizması	27
Şekil 5.2. 3-Siklopentilpropanhidrazit bileşiğinin mekanizması	29
Şekil 5.3. Hedef bileşiklerinin sentez mekanizması	29
Şekil 5.4. 3a kodlu bileşiğin molekül şekli	30

Şekil 5.5. 3a Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu.....	32
Şekil 5.6. 3a Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu.....	32
Şekil 5.7. 3b kodlu bileşiğin molekül şekli	33
Şekil 5.8. 3b Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu	35
Şekil 5.9. 3b Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu	35
Şekil 5.10. 3c kodlu bileşiğin molekül şekli	36
Şekil 5.11. 3c Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu	38
Şekil 5.12. 3c Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu	38
Şekil 5.13. 3d kodlu bileşiğin molekül şekli	39
Şekil 5.14. 3d Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu	41
Şekil 5.15. 3d Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu	41
Şekil 5.16. 3e kodlu bileşiğin molekül şekli	42
Şekil 5.17. 3e Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu	44
Şekil 5.18. 3e Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu	44
Şekil 5.19. 3f kodlu bileşiğin molekül şekli	45
Şekil 5.20. 3f Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu	47
Şekil 5.21. 3f Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu	47
Şekil 5.22. 3g kodlu bileşiğin molekül şekli	48
Şekil 5.23. 3g Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu	50
Şekil 5.24. 3g Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu	50

Şekil 5.25. 3h kodlu bileşiğin molekül şekli	51
Şekil 5.26. 3h Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu	53
Şekil 5.27. 3h Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu	53
Şekil 5.28. 3i kodlu bileşiğin molekül şekli	54
Şekil 5.29. 3i Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu	56
Şekil 5.30. 3i Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu	56
Şekil 5.31. 3j kodlu bileşiğin molekül şekli	57
Şekil 5.32. 3j Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu	59
Şekil 5.33. 3j Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu	59
Şekil 5.34. Üreazın (a) Arg439, Hie492, Arg609 ile hidrojen bağlarını ve Arg609 ve Ni^{++} ile tuz köprüsünü gösteren bileşik 3c ve (b) Arg439 ile bir hidrojen bağı oluşturan bileşik 3j ile bağlanma etkileşimlerini görüntüler. Sırasıyla (c) 3c ve (d) 3j için 2 boyutlu etkileşim haritaları. (PDB Kimliği: 4H9M).....	55

KISALTMALAR DİZİNİ

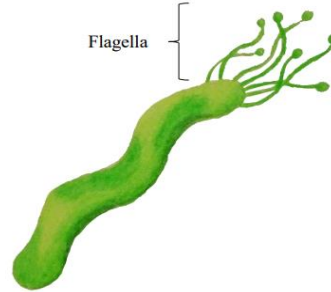
AGS	: Mide kanseri hücre dizisi
BabA	: Kan grubu antijen bağlayıcı yapışma A
CagA	: Sitotoksinle ilişkili gen A
DMSO	: Dimetilsülfoksit
HIF-1 α	: Hipoksi ile indüklenen faktör-1 α
IC ₅₀	: Inhibitory Concentration 50
L929	: Normal fare fibroblast hücre dizisi
MBC	: Minimum Bactericidal concentration
MHC	: Majör histo-uyumluluk kompleksine
MIC	: Minimum Inhibitory concentration
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SabA	: sialik asit bağlama yapışması A
SAR	: Structure Activity relationship
SNU 1	: Mide kanseri hücre dizisi
TMS	: Tetrametilsilana
VacA	: Vakuolleştirici sitotoksin A

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, günümüzde dünya çapında ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Vücutta belirli bir dokuya ait bir veya daha fazla hücrenin normal özelliklerinden saparak kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucu ortaya çıkar [1, 2]. Tanımlanan en yaygın maligniteler akciğer kanseri (%11,4), prostat malignitesi (%7,3) ve mide kanserleridir (%5,6). Mide kanseri, her yıl milyonlarca ölüme neden olan dünyadaki en ölümcül malignitelerden biridir. Kansere bağlı ölümlerin dördüncü en sık nedenidir [4]. Küresel olarak 2020 yılında 1,09 milyon mide kanseri vakası meydana geldi [5]. Mide kanserleri vakalarının çoğu (%90) ileri bir aşamada tespit edilir ve bu hastaların kötü prognozuna katkıda bulunur. Geç mide kanserinin tespitinin ardındaki neden, rutin mide kanser taramasının olmayışı ve mide karsinogenezini düzenleyen altta yatan mekanizmalar hakkındaki bilgi eksiklikleridir. Adenokarsinom, mide kanseri vakalarının %95'ini oluşturur ve bu da en sık görülen mide kanseri türüdür.

Anatomik olarak mide kanseri, kardiya dışı veya kardiya kanseri olarak ikiye ayrılır. Kardiya dışı bölgesi midenin üst kısmı, kardiya bölgesi ise distal kısmıdır. Mide kanseri histolojisine göre yaygın veya bağırsak kanseri olarak sınıflandırılabilir. Mide kanserinin evresi, tümörün boyutu, lenf düğümlerine kadar büyüme yeteneği ve akciğerler, kemikler veya karaciğer gibi uzak anatomik bölgelere mi göç ettiği gibi çeşitli faktörler tarafından belirlenir. *Helikobakter Piloni* (*H. Pylori*) enfeksiyonu, kardiya dışı mide kanseri vakalarının yaklaşık %90'ına neden olur [6]. Coğrafi olarak mide kanseri prevalansı dünya çapında farklılık göstermektedir. İnsidans Kuzey Amerika, Batı Avrupa, Avustralya ve Afrika'da en düşük iken, Asya, Doğu Avrupa ve Latin Amerika'da en yüksektir [7]. Gelişmekte olan ülkelerin en yüksek mide kanseri prevalansına ve en yüksek *H. pilori* enfeksiyonu oranlarına sahip olması sürpriz değildir. Mide kanseri vakalarının düşük olduğu ancak *H. pilori* enfeksiyonu sıklığının yüksek olduğu Afrikalılarda ilgi çekici bir bulgu gözlemlendi. 2017 yılında, 1970 ve 2016 yılları arasındaki yayınlardan elde edilen verileri eleştirel bir şekilde analiz ederek *Helikobakter pilori*'nin küresel yaygınlığını haritalamak için bir meta-analitik çalışma yürütüldü [8]. Bu çalışmanın sonuçları Afrika (%79,1), Nijerya (%87,7), Portekiz (%86,4), Estonya (%82,5) ve Orta Asya'nın (%79,5) dünya çapında en yüksek prevalansa sahip olduğunu, Okyanusya'nın (%24,4) olduğunu gösterdi. Batı Avrupa (%34,3), İsviçre (%18,9), Danimarka (%22,1), Yeni Zelanda (%24,0) ve Kuzey Amerika (%37,1) en düşük yaygınlığa sahiptir [8]. Üstelik yaşlı kişilerde *H. pilori* sıklığı genç yetişkinlere göre daha

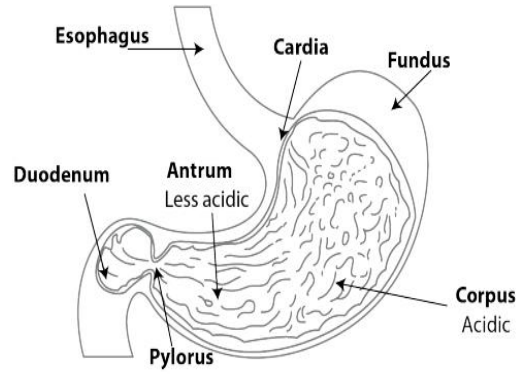
yüksek olma eğilimindedir [9]. *H. pilori* mide kanserinin ana nedenidir. 1994 yılında sınıf I kanserojen olarak sınıflandırılan spiral şekilli, mikroaerofilik Gram negatif bir bakteridir.



Şekil 1.1. *Helikobakter Piloni*.

H. pilori, dünya nüfusunun neredeyse yarısını veya dünya çapında yaklaşık 4,4 milyar insanı etkilediği için en başarılı insan patojenidir [8]. *H. pilori* dünya çapındaki tüm kanser vakalarının %5,5'ini oluşturmaktadır [10]. Tek doğal *H. pilori* rezervuarı insan midesidir. Aslında, genetik araştırmalar *H. pilori*'nin en az 58.000 yıldır insanları kolonileştirdiğini ileri sürüyor ve bu da bakterilerin binlerce yıldır insanlarla birlikte var olduğu teorisini destekleyen kanıtlar sağlıyor [11]. *H. pilori*, kronik gastrit ve peptik ülser hastalığının ana nedeni olarak ilk kez 1982 yılında Avustralyalı bilim adamları Robin Warren ve Barry Marshall tarafından fark edilmiştir [12]. Mide biyopsi örneklerinden *H. Piloni*'yi kültürlediler [13]. Bulguları, tıpta stres ve yaşam tarzı seçimlerinin ülserlerin başlıca nedenleri olduğuna dair yaygın inanışla çelişiyordu. 1.526 Japon hastayı içeren bir çalışma da dahil olmak üzere birçok çalışma, *H. pilori* enfeksiyonunun mide kanseri insidansını önemli ölçüde artırdığına dair önemli kanıtlar sağlamıştır [14]. Uemura ve ark. *H. pilori* enfeksiyonu olan bireylerin %3'ünde mide kanseri geliştiğini, ancak enfekte olmayan hastaların hiçbirinde bu durumu yaşamadığını gösterdi. Premalign lezyonları olmayan *H. pilori* enfeksiyonu olan kişiler için enfeksiyonun ortadan kaldırılması mide kanseri riskini büyük ölçüde azaltır. Toplu olarak değerlendirildiğinde bu bulgular, *H. pilori*'nin mide kanseri gelişiminde açık bir rol oynadığını ortaya koymakta ve anti-*H. pilori*'nin varlığını akla getirmektedir. *H. pilori* tedavisi mide kanserini önlemek için yararlı bir strateji olabilir.

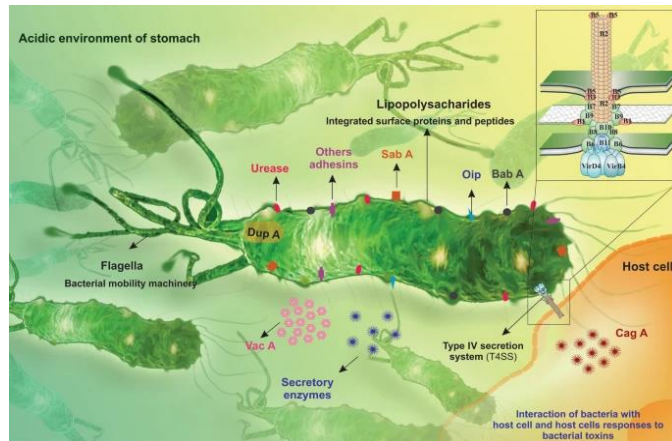
Az gelişmiş ülkelerde *H. pilori* enfeksiyonunun prevalansı %90'dır [8], ancak gelişmiş ülkeler en düşük enfeksiyon oranlarına sahiptir. Tipik olarak *H. pilori* enfeksiyonuna çocukluk çağında yakalanır, ancak uygun bakım alınmazsa enfeksiyonlar ömür boyu devam edebilir. Artan yeniden enfeksiyon oranları ve antibiyotik direnci nedeniyle *H. pilori* enfeksiyonunu sınırlamak neredeyse imkansızdır. *H. pilori* kaynaklı mide kanserinin ilginç bir özelliği, *H. pilori*'den etkilenen kişilerin yalnızca %1-3'ünde mide kanseri olması, çoğunluğun asemptomatik kalmasıdır. Semptomatik hastalarda *H. pilori* enfeksiyonu, mukozal dokuyla ilişkili lenfoma, Peptik Ülser Hastalığı, kronik gastrit ve nihayetinde mide kanseri gibi klinik açıdan önemli bir dizi durumla ilişkilendirilmiştir. Pelayo Correa'ya göre tedavi edilmeyen kronik gastrit, atrofik gastrite, bağırsak metaplazisine ve kanser öncesi lezyonlara yol açabilir [15]. *H. pilori* enfeksiyonu, midenin kronik yüzeysel enflamasyonundan başlayarak atrofik gastrit, bağırsak metaplazisi ve displaziye doğru ilerleyerek sonuçta mide kanserine yol açan aşamalar halinde gelişen bir dizi histolojik değişikliği başlatır. Mide ve özellikle midenin daha az asidik olan distal kısmı (antrum) ilk olarak *H. pilori* tarafından kolonize edilir. Enfeksiyon kötüleştikçe aşırı salgı, pH'ın ilk düşüşüne neden olur ve bu da *H. pilori*'nin bağırsağın en erken bölümlerinden biri olan duodenuma girmesine neden olabilir. Bu alan enfeksiyona daha yatkındır; dolayısıyla peptik ülser gelişimi mümkündür. Salgıların uzun süreli aşırı üretimi, mukozal atrofik gastrite, asit üreten paryetal hücrelerin kaybına ve midede yüksek pH seviyelerine yol açabilir. Ek olarak atrofi, bazen mide kanserinin belirtisi olabilen mide ülserinin gelişmesine de yol açabilir. Enfekte kişilerin yaklaşık %10'unda peptik ülser hastalığı, %1 ila %3'ünde mide adenokarsinomu ve %0,1'den azı mukozayla ilişkili lenfoma görülür [16]. Özellikle *H. pilori* enfeksiyonu öyküsü olanlar için, bu mide kanseri ilerleme modeli, kronik gastritin erken tespitinin ve tedavisinin önemini vurgulamaktadır. Bu da daha iyi prognoza yol açabilir.



Şekil 1.2. Mide anatomisi.

1.1. *H. pylori* Virülans Faktörleri ve Kansere Mekanizmaları

Bir bakterinin enfeksiyona neden olma kapasitesi virülans olarak bilinir. Dolayısıyla virülans faktörlerinin varlığı ve durumu, bakteriyel enfeksiyonun şiddetinin nasıl olacağını belirlemede önemli rol oynar. *H. pylori*'nin gen çeşitliliği ve değişkenliği, *H. pylori*'nin hastalık, yaş, ulus ve etnik kökene göre farklılık gösteren birçok virülans değişkeniyle yansıtılmaktadır [17]. *H. pylori*, vücudun en zorlu ortamına dayanabilmesini sağlayan bir hastalık oluşturma mekanizmaları sahiptir. Bu virülans faktörleri nedeniyle *H. pylori* mide mukozasında kolonize olabilir, epitelyumun yapısal bütünlüğünü değiştirebilir, tekrarlayan bir enfeksiyon geliştirebilir ve patolojiye neden olabilir [18]. Virulent faktörler aynı zamanda konak tepkisini de zayıflatabilir.



Şekil 1.3. *Helikobakter pylori*'nin anatomisi ve enfeksiyon şekli.

Toksinler ve enzimler gibi çok sayıda bakteriyel bileşen, bakterilerin konakçı hücrelerle etkileşime girmesinde ve bağışıklık sisteminden kaçmasında rol oynar. Bakteriyel toksinlerin ve enzimlerin önemli işlevleri şunlardır:

- 1) Üreaz enzimi, midenin asidik ortamına karşı koymak için amonyak üretir.
- 2) Mukozal membran hasarı VacA ekzotoksin tarafından meydana gelir. Bakteriler, kendisini konakçı hücrelere bağlayan Vakuolleştirici sitotoksin A'yı (VacA) serbest bırakır. VacA, konakçı mide epitel hücreleri tarafından içselleştirildikten sonra erken ve geç endozomların yanı sıra erken lizozomlara benzeyen dev keseciklerin toplanmasıyla karakterize edilen ciddi bir vakuolasyona neden olabilir. Üstelik VacA'nın p33 alt birimi mitokondriye nüfuz edebilir ve normal işleyişine müdahale edebilir. Ayrıca VacA, okludin, claudin ve JAM-1 gibi sıkı bağlantı bileşenlerine etki ederek mide hücreleri arasındaki bağlantılara zarar verebilmektedir.
- 3) CagA apoptozu önler ve aktini değiştirir. CagA mide hücrelerine dahil edildikten sonra E-kadherin ile fiziksel etkileşime girebilir, bu da β -katenin salınımı ve çekirdeğe aktarılmasıyla sonuçlanır. *H. pilori*, p 120 proteininin nükleer translokasyonunu indüklediğinde β -katenin daha yüksek bir seviyede salınabilir. β -katenin, çekirdekte tcf/LEF birikmesine neden olabilir ve bu da hücre proliferasyonunu önemli ölçüde artırır [19].

Başarılı kolonizasyon ve konakçının midesinde kalıcı enfeksiyonun meydana gelmesi için *H. Pilori* için dört temel adım kritik öneme sahiptir:

- (i) asidik mide ortamında hayatta kalmak;
- (ii) flagella aracılı hareketlilik yoluyla epitel hücrelerine doğru ilerlemek;
- (iii) mikrobiyal adezinlerin ve konakçı hücre reseptörlerinin konjugasyonu yoluyla konakçı hücrelere bağlanma;
- (iv) toksinlerin salınması yoluyla doku hasarına neden olmak [20].

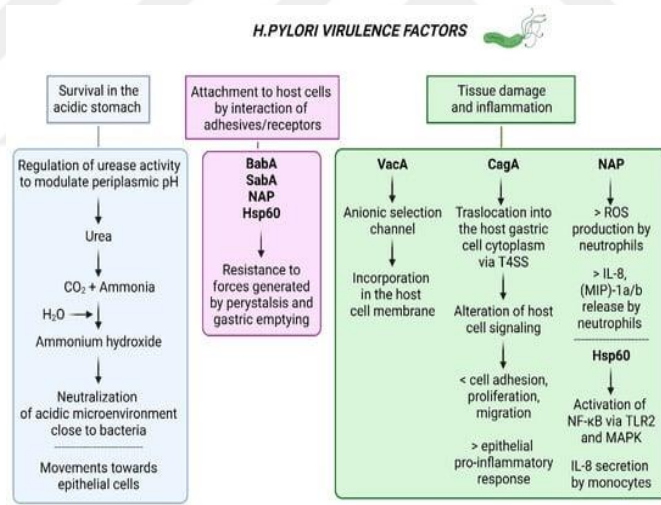
H. pilori, bakterilerin üreaz aktivitesini kontrol etmesini ve periplazmik pH'ı değiştirmesini sağlayarak midenin asidik ortamında gelişebilir. Üreazların gen kümesi yedi genden oluşur. Bu genler yardımcı montaj proteinlerini (ureE-H), asit kapılı üre kanalını (ureI) ve katalitik alt birimleri (ureA/B) içerir [21].

Konakçı hücrede aşağıdaki reaksiyonlar meydana gelir;

1) *H. pylori*'nin aside dirençli olabilmesi için bakteri içi üreaz aktivitesine ihtiyacı vardır ve bu aktivite proton üreli UreI kanalı tarafından kontrol edilir. Kanal, yalnızca asidik ortamlarda üre girişine izin vererek, göreceli nötrlük zamanlarında ölümcül alkalileşmeyi önler. Üre, üreaz tarafından parçalandığında amonyak ve karbondioksit üretilir. Daha sonra bunların karıştırılmasıyla amonyum hidroksit üretilir. Sonuç olarak amonyum hidroksit, bakterileri çevreleyen asidik mikro ortamı dengeleyerek *H. pylori*'nin mide suyu yoluyla güvenli bir şekilde geçişine olanak tanır [22].

2) *H. pylori* 4-7 polar flagella hareketi ile mide epitelinin 7.0'a sahip taban tabakasına doğru ilerler.

3) Daha hareketli olan *H. pylori* türleri daha hızlı bir şekilde daha yüksek bakteri yoğunluklarına ulaşır. Bu durum bağırsağın üst bölgesinde daha ciddi bir iltihaplanmaya ve patolojilere yol açar.



Şekil 1.4. Kan grubu antijen bağlayıcı yapışma A (BabA); sialik asit bağlama yapışması A (SabA); ısı şoku proteini (Hsp); vakuoleştirici sitotoksin geni A; sitotoksinle ilişkili gen A (CagA); tip IV salgı sistemi (T4SS); ROS (reaktif oksijen türleri); IL (interlökin); makrofaj inflammatuar proteini (MIP); aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir arttırıcısı (NF-kB); TLR (ücret benzeri reseptör); maPK (mitojenle aktive edilen protein kinaz) [23].

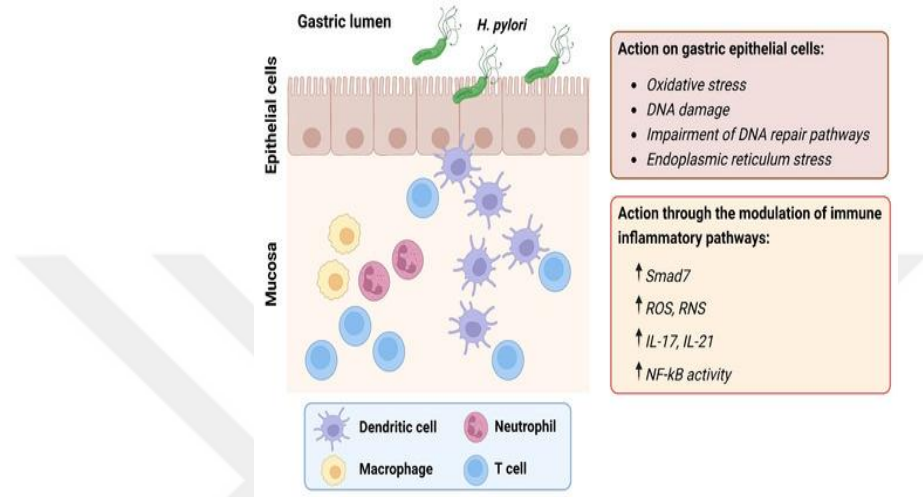
Üreaz: *H. pylori*'nin hareket için üç ila beş kutuplu kamçısı vardır. Üreaz, katalaz ve oksidaz için pozitifdir. *H. pylori*'nin patojenitesinin önemli bir bileşeni *H. pylori* üreazıdır. Ağırlıkça toplam proteinin %10-15'ini oluşturan en yaygın proteindir. *H. pylori* üreaz enzimi, sırasıyla 29,5 kilo Dalton ve 66 kilo Dalton büyüklüğünde iki alt birime (α

ve β) sahiptir. *H. pylori*, mide asidinden kaçmak için üreazın kemotaktik ve yüzme özelliklerini kullanıyor.

Üreaz, büyük bir 1.1-MDa kompleksine sahiptir ve ürenin karbonik asit ve amonyağa ayrışmasına neden olan multimerik nikel içeren bir enzimdir. HCO_3^- pH'ı 6,1'de sabit tutmak için bir tampon görevi görürken, NH_3 periplazmadaki protonları nötralize eder [17, 24]. Üre hidrolizi sırasında oluşan amonyak pH'ı hafifçe yükseltir ve bu da *H. pylori*'ye güvenli bir yaşam alanı sağlar. Bakteriyel hücreler parçalandıklarında içten ve dıştan tamponlanırlar ve canlı bakteri ortamına üreaz ve tamponlar salarlar [24]. Müsinin reolojik özellikleri de bu nötralizasyonla değiştirilir, bu da *H. pylori*'nin nüfuzunu kolaylaştırır. *H. pylori* üreazı enzimatik fonksiyonunun yanı sıra patogeneizde de katkıda bulunabilir. Üreaz, inflamasyona ve epitelyal hasara neden olarak konakçı tepkisini etkileyen polimorfonükleer lökositleri ve monositleri aktive eder [25]. Bakteri yüzeyinin tüm üreazların %30'unu içerdiği tahmin edilmektedir [26]. Üreazın yüzey konumu, sonraki etkilere aracılık etmek için epitel hücrelerinin dış katmanlarında bulunan diğer proteinlerle etkileşime girmesini sağlar. Mide epitel hücrelerinin apoptotik süreci, bu mide hücrelerinde bulunan sınıf II majör histo-uyumluluk kompleksine (MHC) üreazın bağlanmasıyla başlatılır [27]. Üreaz A alt birimi bu etkileşime aracılık eder [28]. Üreaz B alt birimi ayrıca *H. pylori*'nin, alt birim B'nin CD74 ile etkileşimi yoluyla mide epitel hücrelerine bağlanmasında da rol oynar [29]. Üreaz B alt ünitesinin mide epitel hücreleri üzerindeki CD74'e bağlanması, NF- κ B aktivasyonunu tetikler ve interlökin-8 (IL-8) oluşumunu uyarır [29]. CD74'ün monoklonal antikorlar yoluyla inhibisyonu bu reaksiyonları azaltır.

Yakın zamanda yapılan bir çalışma, üreazın, hipoksi ile indüklenen faktör-1 α 'yı (HIF-1 α) indükleyerek *H. pylori*'nin kanserojen potansiyelini potansiyel olarak artırabileceğini ortaya çıkardı [30]. HIF-1, α ve β alt birimleri tarafından bir heterodimer olarak oluşan bir transkripsiyonel faktördür. Hipoksik koşullarda sitoplazmadaki α alt biriminin seviyeleri yükselir. HIF-1 α tipik olarak mide kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin başlangıcı ve ilerlemesi sırasında gözlemlenir [31]. HIF-1 α , Siklin D1 yarı ömrünün azalmasına ve hücre döngüsünün bozulmasına [32] ve ayrıca anjiyogenezin artmasına neden olur [33]. Araştırmacılar, üreazın, üreaz B ile TLR2'yi aktive ederek HIF-1 α 'yı etkilediğini gösterdi [34]. Wu ve arkadaşları tarafından yapılan ilgi çekici araştırma, *H. pylori* üreaz B alt ünitesinin, kemik iliği kaynaklı makrofajlar

üzerindeki miyozin ağır zinciri 9'un (Myh9) yüzeyine bağlanabildiğini ve dolayısıyla B7-H1 ekspresyonunu indükleyebildiğini ortaya çıkardı [35]. Myh9 ve üreaz B'nin etkileşimi mTORC1'i aktive eder ve bu da makrofajlarda B7-H1 ifadesini yükseltir. Bu, diğer virülans ajanlarının neden olduğu T hücrelerinin toplam inhibisyonuna katkıda bulunur.



Şekil 1.5. *H. pylori*, mide kanserinin gelişimi sırasında mide epitel hücrelerini hem doğrudan hem de dolaylı olarak etkilemektedir. Kısaltmalar arasında interlökin anlamına gelen IL kısaltmaları; aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa hafif zincir güçlendiricisi için NF-κB; Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri için sırasıyla ROS ve RNS; Annelerin dekapentaplejiye karşı baskılayıcısı için Smad7. Spesifik olarak, *H. pylori* enfeksiyonunun, bağırsak displazisine, metaplaziye ve sonuçta mide kanserine yol açabilen kalıcı atrofik olmayan gastrite neden olduğu kabul edilmektedir [36].

Mide kanserini hedef alan yeni ilaçlar oluşturmak için son birkaç yılda küresel olarak kapsamlı araştırmalar yapıldı. Hızla artan hasta popülasyonu, toksisite, reçeteli ilaçların önemli olumsuz etkileri ve ilaca direnç geliştiren kanserler gibi çeşitli sorunlar nedeniyle bu araştırmalar artık her zamankinden daha önemli. Kemoterapi, tümör hücreleri üzerindeki etkisi nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir antikanser tedavidir. Bununla birlikte, birçok antikanser ilacının toksik olduğu ve önemli yan etkileri olduğu iyi bilinmektedir. Bu nedenle, sağlıklı hücreleri tehlikeye atmadan kanser hücrelerini yok eden veya çoğalmasını engelleyen yeni antikanser ilaçları yaratmak çok önemlidir. Üreaz inhibitörleri, insanlarda ürenin parçalanmasını önlemek için gereklidir; bu, üreolitik bakteriyel enfeksiyonların zararlı sonuçlarını sınırlamaya yardımcı olur. Tıbbi kimyagerler, enzimleri durdurmak için organik inhibitörlerin kullanılmasının önemini ve kullanışlılığını fark etmeye başlamış, böylece daha yüksek biyolojik aktiviteye sahip

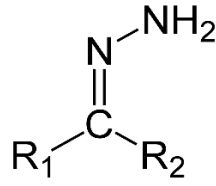
farmasötiklerin tasarımını ve üretimini kolaylaştırmıştır. Son yıllarda, üreazı inhibe etmek için hidroksamat kompleksi, homoserin lakton türevi, tiyofosforik triamidler, oksadiazol türevleri, tiyoüre, etil 4-(3-benzotiyoyüreido) benzoat türevleri, oksindol türevleri ve tiyobarbitürik asit türevleri dahil olmak üzere bir dizi organik bileşik kullanılmıştır. Tıbbi kimyagerler, ilgi çekici ve uyarlanabilir kimyasal karakterlerinden dolayı heterosiklik yapı iskelelerine çok dikkat ediyorlar. Güçlü anti-ülser ilaçlarının üreaz inhibitörleri olduğu bilinmektedir. Bu güçlü üreaz inhibitörleri genellikle iki gruba ayrılır:

1. Hidroksamik asit gibi substrat yapısal analogları

2. kininler, tiyol bileşikler, lansoprazol, omeprazol, fosforamidat ve Schiff bazı türevleri gibi etki modunu değiştiren maddeler.

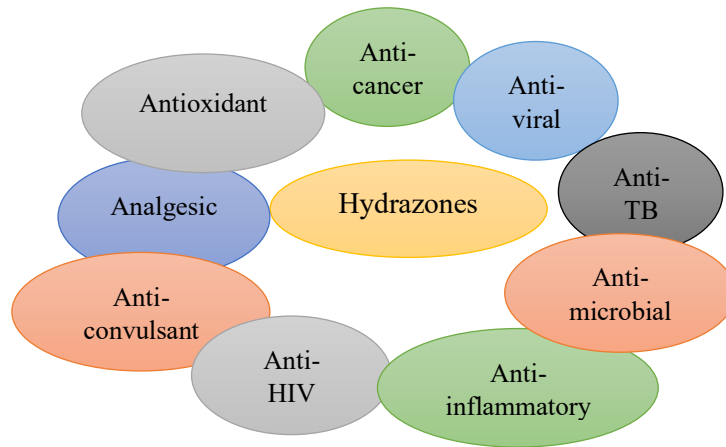
Hidrazonlar, geniş bir farmakolojik etki yelpazesine sahip, öne çıkan bir motiftir ve birçok biyoaktif bileşik yapısında bulunur [37]. Hidrazonun işlevi, çok çeşitli özellikleri ve tıbbi, farmasötik ve analitik kimyadaki olası uygulamaları nedeniyle kapsamlı araştırmaların konusu olmuştur [38,39]. Esnek yapıları, hidrojen bağı donörleri ve alıcılarının mevcudiyeti ile birleştiğinde, çeşitli antikanser ilaçları için önemli bir yapı taşı oldukları anlamına gelir [40]. Bu bağlamda yeni bir hidrazon türevleri sınıfı geliştirmek amacımızdı. Daha sonra hidrazon bileşiklerinin kanser hücre hattına karşı *in vitro* sitotoksik aktivitesi, potansiyel antikanser ilaçların belirlenmesi amacıyla değerlendirilmiştir.

Hidrazonlar Schiff baz ailesine aittir. Hidrazonlar $R_1R_2C=NNR_3R_4$ temel yapısına sahiptirler [41]. Hidrazon iki nükleofilik nitrojen atomu içerir ancak amino grubundaki nitrojen atomu daha reaktiftir. Karbon atomu hem elektrofilik hem de nükleofilik özellikler sergiler. Hidrazonlar elektrofillere ve nükleofillere karşı reaktif olduklarından organik heterosiklik bileşiklerin sentezinde kullanılırlar. Hidrazonların fiziksel ve kimyasal özellikleri öncelikle aktif merkezlerine, karbon ve nitrojene atfedilir [42]. Hidrazon "azometin" $R-C(H)=N-N(H)-Ar$ grubu, oksijen atomunun $=NNH_2$ grubu ile değiştirilmesi yoluyla ketonlardan ve aldehitlerden türetilir. Yenilikçi ilaçların geliştirilmesi sürecinde hidrazonlar aynı zamanda bir ara madde olarak da görev yapar [43].



Şekil 1.6. Hidrazon yapısı.

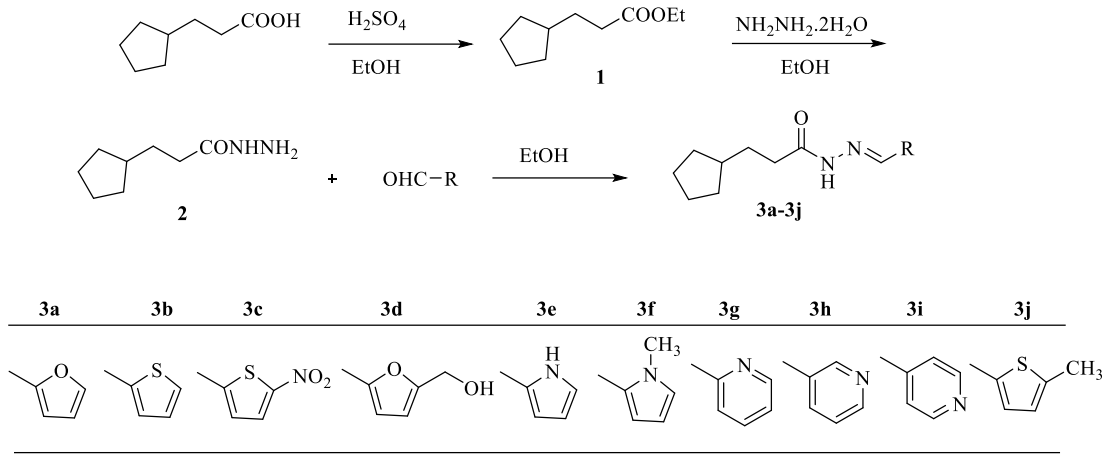
Hidrazonların uyarlanabilirliği, onları çeşitli geçiş metalleri ile geniş bir yelpazede kompleksler oluşturmak üzere birleşebilen etkili kenetleme maddeleri haline getirmiştir [44]. Literatürde hidrazonlarla ilgili yapılan çalışmalar, bu sınıftaki bileşiklerin anti-HIV, antelmintik, antidiyabetik, antiprotozoal, antitripanozomal, kanser için kemoterapi, ağrı kesici, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antiplatelet, kardiyoprotektif/kalp koruyucu/ vazodilatör ve anti-HIV farmakolojik etkilerini göstermektedir [45]. Kimyacılar, sentetik esnekliği, seçiciliği ve geçiş metal iyonlarına karşı duyarlılığı nedeniyle yıllardır hidrazon üzerinde çalışıyorlar. Geçtiğimiz birkaç on yılda sentetik kimyagerler büyük ilgi göstermiş ve hidrazonlar üzerine araştırmalar, farmakolojik özelliklere sahip yeni moleküllerin sentezinde kemoterapötik ajanlar olarak potansiyelleri nedeniyle devam etmiştir.



Şekil 1.7. Hidrazonun tıbbi etkileri.

Bu tez çalışmasında hidrazon türevi 10 yeni bileşik sentezlenmiş ve yapıları ^1H NMR ve ^{13}C NMR ile aydınlatılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin antikanser özellikleri SNU 1 (mide kanseri hücre dizisi), AGS (mide kanseri hücre dizisi) ve L929 (normal fare

fibroblast hücre dizisi) hücre dizilerine karşı değerlendirildi. Bileşiklerin üreaz enzimine karşı önleyici etkileri değerlendirildi. Ayrıca bileşiklerin *H. pylori*'ye karşı etkileri de incelenmiştir.



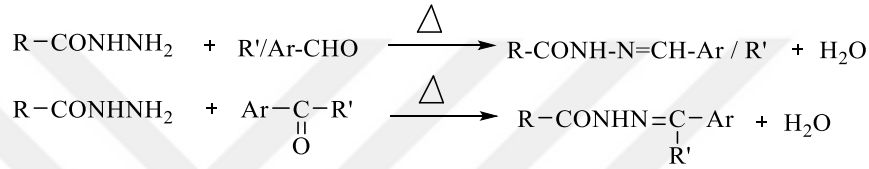
Şekil 1.8. 3a-3j bileşiklerine ait sentez şeması

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1.Hidrazon

Hidrazonlar, $-C=N-N-$ yapısı içeren ve azometinler olarak bilinirler ve organik kimyanın önemli bir sınıfını oluştururlar. İmin ve oksim gibi diğer moleküllerden birbirine bağlı iki nitrojen atomuna sahip olmaları nedeniyle farklılık gösterirler [46].

Hidrazonların sentezi, hidrazitlerin karbonil bileşikleri ile ikame reaksiyonu nedeniyle terminal amin grubu ile karbonil karbonu arasında bir Schiff bazının oluşmasına dayanır. Hidrazonlar keton veya aldehit türevleridir ve türetildiği keton veya aldehitin sonuna hidrazon kelimesinin eklenmesiyle isimlendirilirler [47,48].



Şekil 2.1. Hidrazonların Elde Edilmesine İlişkin Genel Sentez Yöntemi.

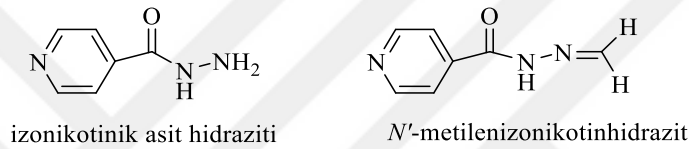
Hidrazonlar, hidrazitlerin aldehitler ve ketonlarla metanol, etanol, asetonitril, aseton, dioksan ve benzen gibi çözücüler kullanılarak reaksiyonuyla elde edilebilir. Hidrazon türevi bileşiklerin sentezinin hem polar hem de polar olmayan çözücülerde gerçekleştirilebildiği gözlemlenmiştir. Hidrazon üretiminde katalizör olarak hidroklorik asit, buzlu asetik asit, sülfürik asit gibi asidik ajanlar ile piridin ve trietilamin gibi bazik bileşikler kullanılabilir.

Hidrazonlarda totomerizmin olasılığı uzun yıllardır tartışılmaktadır. Bu olasılığı kanıtlayabilecek fiziksel yöntemler de ortaya çıkmıştır. En az bir α -hidrojene sahip monosübstitüe hidrazonların, azo bileşikleri veya vinil hidrazinlerin totomerleri olduğu düşünülmüyordu, ancak 1H -NMR, bu ifadelerin aslında doğru olmadığını ve hidrazon yapısındaki $C=N$ çift bağı nedeniyle gözlemlenen formların polimorfik değişiklikler, trimerler ve geometrik izomerler olabileceğini açıkça gösterdi.

Küçük karbon sayısına sahip hidrazonlar suda çözünmektedir ve basit alkil hidrazon türevleri genellikle sıvıdır. Hidrazon oluşumu nitrojen atomunun bazik yapısını azaltır, bu da çift bağ oluşumunu sağlar. Kendilerini oluşturan hidrazinlere göre hidrazonlar daha zayıf bir baz yapısına sahiptirler [48].

Hidrazon yapısının antimikrobiyal [50], tüberkülostatik [51], antimalaryal [52] ve anti-inflamatuar [53] gibi farklı farmakolojik etkileri içermesi, hidrazonlarla ilgili çalışmaların sayısının artmasına neden olmuştur.

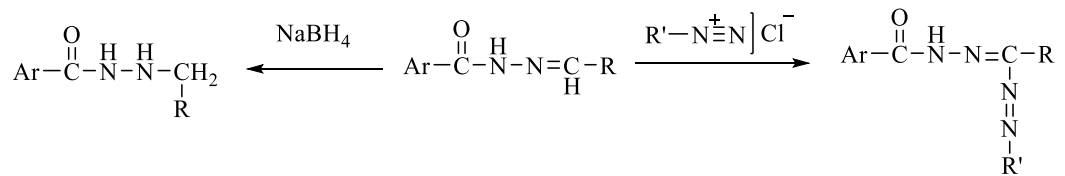
İzoniazit, hidrazid yapısı içeren ilaçlardan biridir. İzoniazit, J. Mally ve H. Meyer tarafından 1912 yılında sentezlenmiştir. 1951 yılında ise, tüberkülostatik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Hala günümüzde tüberküloz tedavisinde kullanılmaktadır [54]. İzoniazidin farklı keton ve aldehitlerle reaksiyonu sonucunda izonikotinik asit hidrazid-hidrazon türevleri elde edilmiştir. Bu türevlerin M. tuberculosis'in farklı türlerine karşı etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, $-NH_2$ grubunu bloke ederek izoniazide göre daha düşük toksisiteye sahip olduğu bulunmuştur [55].



Şekil 2.2. İzonikotinik Asit Hidrazid ve Hidrazonun Moleküler Şekli.

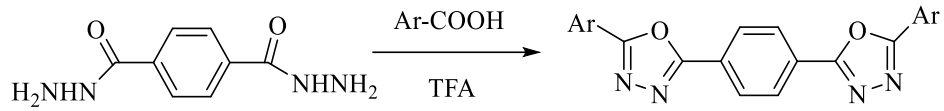
2.2.Hidrazon ve Hidrazid Türevlerinin Organik Kimyada Kullanımı

Ara ürün olarak kullanılan hidrazon-hidrazitlerin, $CH=N$ grubunun $NaBH_4$ ile indirgenmesi ile N-alkil hidrazitler elde edilmektedir [55].



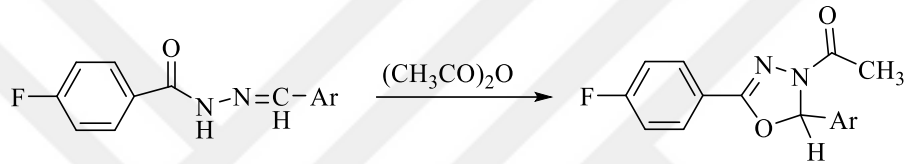
Şekil 2.3. Hidrazonların Birleşme ve İndirgeme Reaksiyonları

Hidrazonlardan farklı halka sistemlerinin sentezi gerçekleştirilebilmektedir ve literatürde bulunla ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Aromatik asitlerin tereftalik dihidrazit ile reaksiyonu ile trifloroasetik asit varlığında oksadiazol halkasının elde edildiği görülmüştür [55].



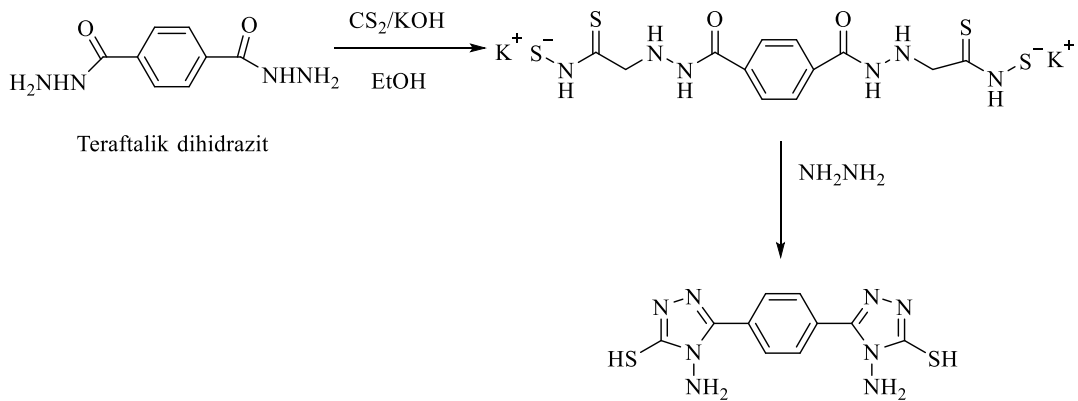
Şekil 2.4. Oksadiazol Halkasının Elde Edilmesi.

4-Florobenzoik asit hidrazidlerin çeşitli aldehitlerle reaksiyonundan elde edilen hidrazonların 140-200 °C'de 45 dakika asetik anhidrit ile reaksiyonundan elde edilen hidrazonların kaynatılması nedeniyle oksadiazol halkasının kapalı olduğu rapor edilmiştir [55].



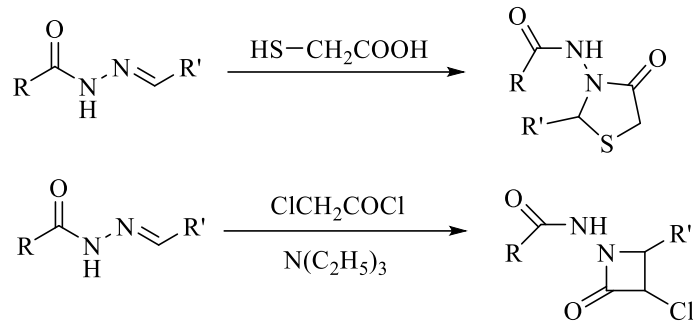
Şekil 2.5. Oksadiazol Halkasının Elde Edilmesi

Triazol halkası, tereftalik dihidrazidin karbon disülfid ve potasyum hidroksit ile etanolik ortamda reaksiyonundan elde edilen bistiokarbazinat tuzunun hidrazin hidrat ile reaksiyonu ile kapatılır [47].



Şekil 2.6. Triazol Halkasının Edinilmesi

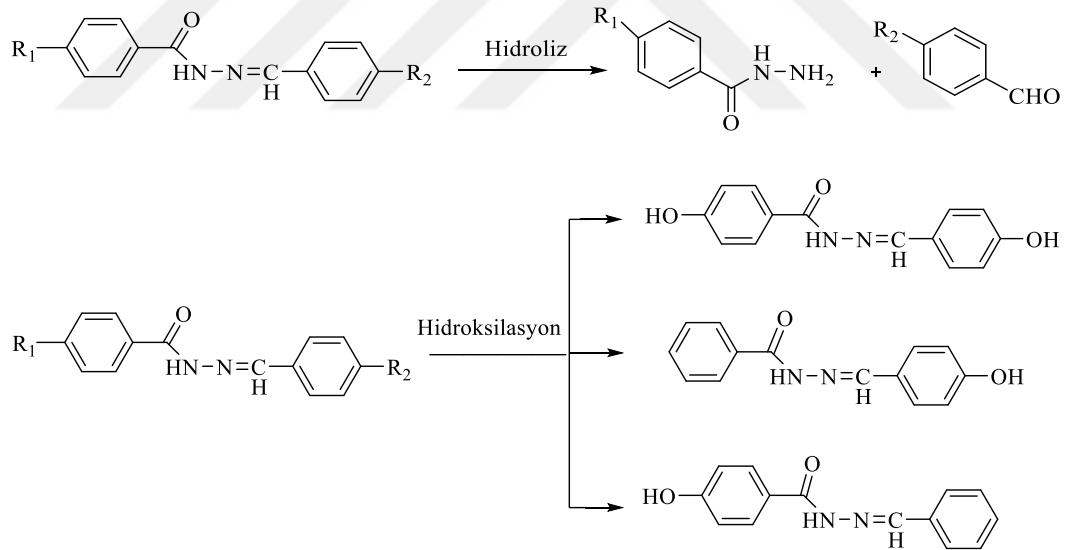
Hidrazonların trietilamin/kloroasetil klorür ile reaksiyonu sonucunda 2-azetidinon türevleri, tiyoglikolik asit ile reaksiyonu sonucunda 4-tiyazolidinon türevleri elde edilmektedir [47].



Şekil 2.7. 4-Tiyazolidinon ve 2-Azethidione Türevlerinin Sentezi

2.3. Hidrazid-hidrazonların biyotransformasyonu

Hidrazon ve hidrazitlerin *in vitro* metabolizması araştırılmıştır. Araştırma sonucunda aromatik hidroksilasyon ve hidroliz reaksiyonları meydana geldiği görülmüştür.

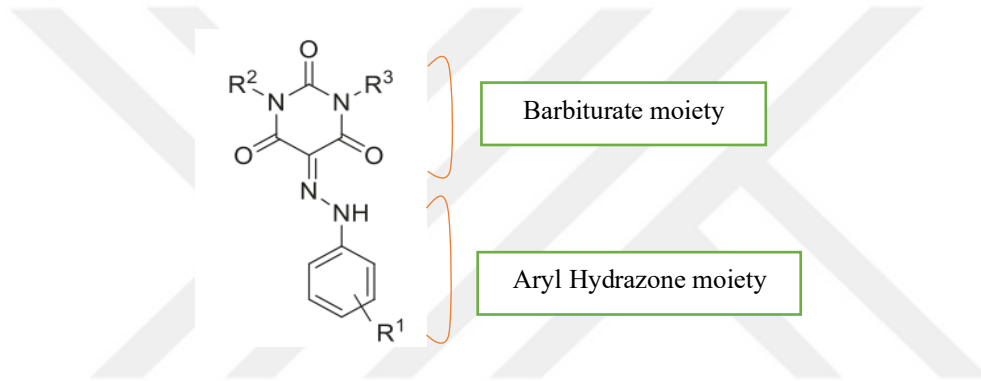


Şekil 2.8. Hidrazonların Tanımlanmış Metabolik Yolları

2.4. Üreaz İnhibisyon Aktivitesine Konu Olmuş Hidrazon Türevleri

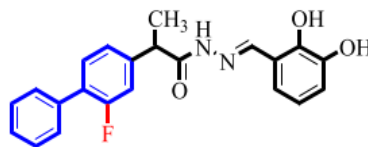
Mollazadeh ve ark. yeni bir barbitürat-aril hidrazon bileşiği sınıfı sentezledi ve bunların jack fasulye üreazının aktivitesini ne kadar iyi inhibe ettiğini değerlendirdi. Bu serideki tüm bileşikler, 8,43-10,91 μM aralığında bir IC_{50} değeriyle üreaza karşı olağanüstü derecede yüksek bir potansiyele sahipti. Sentezlenen bileşiklerin inhibitör

konsantrasyonunun, pozitif kontroller olan hidroksiüre ($IC_{50}=100 \pm 0,15 \mu M$) ve tiyoüreden ($IC_{50}=23 \pm 1,7 \mu M$) çok daha düşük olduğu bulundu. R2 ve R3 lokasyonlarında H içeren serinin ilk bileşiği olan **4a**, hidroksiüreninkinden neredeyse on kat daha fazla etki gösterdi. Hidrazon kısmındaki ikame gruplarının etkisi, R2 ve R3'ün sabit tutulması ve R1 grubuna elektron veren grupların eklenmesiyle belirlendi. Bulgular, **4a** ile karşılaştırıldığında, elektron veren grupların eklenmesiyle inhibitör aktivitenin marjinal olarak arttığını gösterdi. 4-NO₂, 4-Cl ve 4-Br gibi elektron çekici gruplar R1'de ikame edildiğinde, inhibitör etkiler elektron veren gruplarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha fazla gelişti [56].



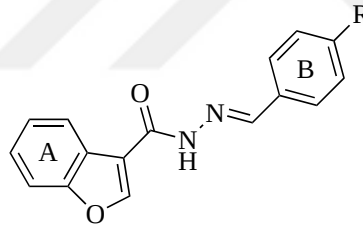
Şekil 2.9. Barbitürat-aril hidrazon türevi bileşiğinin kimyasal yapısı.

Ahmad ve arkadaşları, (E)-N'-benziliden-2-(2-floro-[1,1'-bifenil]-4-il) propanhidrazit türevi bileşikler sentezlemişlerdir. Sentezlenen analogların aktivitesi standart tiyoüre ile karşılaştırılmıştır. ($IC_{50} = 21,14 \pm 0,42 \mu M$). Tüm bileşikler $IC_{50}=18,92 \pm 0,61$ ila $90,75 \pm 7,71 \mu M$ aralığında iyi inhibitör aktivite göstermiştir. Serideki tüm bileşikler arasında fenil halkasında elektron veren gruba sahip bileşiğin en aktif olduğu ve pozitif kontrol tiyoüreden daha iyi performans gösterdiği bulunmuştur. Bileşiğin olağanüstü aktivitesinin, benzen halkasının *orto* ve *meta* konumlarına bağlı elektron veren hidroksil (OH) grubuna atfedildiği bulunmuştur [57].



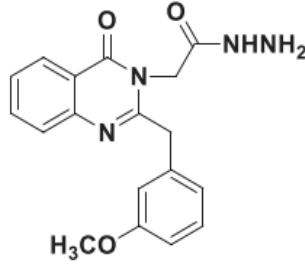
Şekil 2.10. (E)-N'-benziliden-2-(2-floro-[1,1'-bifenil]-4-il) propanhidrazit bileşiğinin kimyasal yapısı

Mohammadi ve arkadaşları, benzofuran-hidrazon yapısına sahip 25 bileşikten oluşan yeni bir seri bileşik sentezlemişlerdir. Bileşikler, üreaz inhibisyonu profillerini belirlemek için *in vitro* testlere tabi tutulmuştur. Özellikle bileşikler, üreaza karşı değerlendirildiğinde, referans inhibitör olarak görev yapan standart tiyoürenin aksine, IC₅₀ değerleri 0,20 ± 0,01 ila 36,20 ± 0,70 mM arasında değişen orta ila iyi inhibitör profilleri göstermiştir (IC₅₀ = 21,86 ± 0,40 mM). Sentezlenen bileşiklerin SAR'ı, üç ana yapısal bileşenin sentetik yapı iskelelerini oluşturduğunu ortaya çıkardı: hidrazon kısmı, değiştirilmiş fenil halkası B ve benzofuran halkası A. Bu bileşenler, üreaz enzimlerinin baskılanmasında çok önemlidir. İkame edilmiş fenil halkası B etrafındaki konum, grup sayısı ve ikame edicilerin türü, üretilen yapı iskelelerinin inhibitör potansiyellerinde küçük bir dalgalanmaya yol açtı. Üreaz enziminin aktif bölgesi ile H-bağına katılmaları nedeniyle, fenil halkasında hidroksi veya floro gruplarına (elektron veren gruplar) sahip bileşiklerin, enzimin en aktif rakipleri olduğu gösterilmiştir [58].



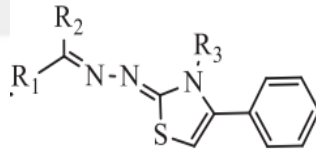
Şekil 2.11. Benzofuran-hidrazon türevi bileşiklerin genel yapısı

Baltaş, açıl hidrazon iskeletlerine sahip kinazolinon türevlerinden oluşan eşsiz bir yapı iskelesinden oluşan on bileşiği sentezlemiştir. Dört bileşik (3a, 3b, 5a ve 5b), tipik inhibitör olan tiyoürenin (IC₅₀ = 14,86 ± 0,23 µg/mL) aksine, 1,86 ± 0,07 ila 6,38 ± 0,11 µg/mL arasında değişen IC₅₀ değerleriyle mükemmel anti-üreaz etki göstermiştir. Substrat olarak üre varlığında, bileşik 3a, 3b, 5a ve 5b, üreaza karşı mükemmel rekabetçi inhibitör etkinlik göstermiştir [59].



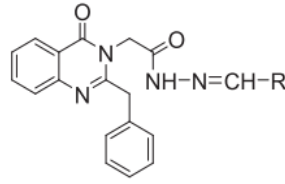
Şekil 2.12. Kinazolinon-hidrazon türevi bileşiklerin genel kimyasal yapısı

Shehzad ve arkadaşları yeni bir hidrazonotiyazolin serisi sentezlemişlerdir. Bileşikler anti-üreaz aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde, etkisiz olduğu belirlenen bir bileşik dışında tüm bileşikler, $5,69 \pm 0,473$ ila $13,7 \pm 1,54$ μM aralığındaki IC_{50} değerleri ile kayda değer aktivite sergilemişlerdir. Sonuçlar, R pozisyonundaki büyük I-e sikloheksan gruplarının sterik engellere neden olabileceğini ve bunun da aktivitenin düşmesine neden olabileceğini ortaya çıkardı. R grubundaki elektron veren gruplar, bileşiğin üreaz potansiyelini aktive ediyor gibi görünse de, bileşik 3d, tipik tiyoüreye göre 12 kat iyileşmeye işaret etmiştir ($\text{IC}_{50} = 20,8 \pm 0,75$ μM) [60].



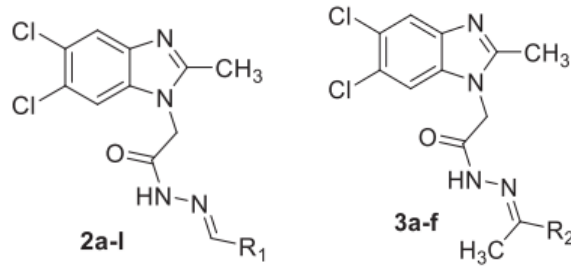
Şekil 2.13. Hidrazonotiyazolin türevi bileşiklerin genel yapısı

Akyüz ve arkadaşları hidrazon yapısına sahip on iki yeni kinazolinon bileşiği sentezlemişlerdir ve bunların üreazı inhibe etme yeteneklerini test etmişlerdir. Sentezlenen tüm kinazolinon-hidrazonların Jack fasulyesi üreazına karşı *in vitro* inhibitör aktivitesi, standart inhibitör tiyoüreye ($\text{IC}_{50} = 14,90 \pm 0,67$ $\mu\text{g/mL}$) karşı değerlendirilmiştir. Bileşikler, $\text{IC}_{50} = 2,950 \pm 0,11$ ila $8,77 \pm 0,15$ $\mu\text{g/mL}$ aralığında üreaz enzimine karşı etkili bir inhibitör etki göstermiştir. Fenil halkasında hidroksi grupları, klor, brom gibi farklı ikame edicilere sahip bileşikler güçlü inhibisyon göstermiştir. $2,90 \pm 0,11$ $\mu\text{g/mL}$ ila $8,77 \pm 0,15$ $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen IC_{50} değerleri ile bileşiklerin çoğu, geleneksel inhibitör tiyoüre ($\text{IC}_{50}=14.90 \pm 0,67$ $\mu\text{g/mL}$) ile karşılaştırıldığında olağanüstü aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur. Bu bulgular hidrazon iskeleti ve kinazolinon çekirdeğini içeren yeni enzim inhibitörlerinin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır [61].



Şekil 2.14. Kinazolinon-Hidrazon türevi bileşiklerin genel yapısı

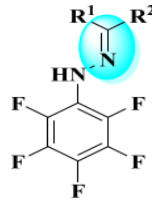
Menteşe ve Sökmen, benzimidazol yapısı içeren hidrazon sınıfı bileşikler sentezlemişler ve üreaz inhibitör özellikleri açısından test etmişlerdir. Hedef bileşiklerin üreazı engelleme yeteneği, tipik bir üreaz önleyici kimyasal olan tiyoüre kullanılarak değerlendirilmiştir. Benzimidazol bazlı hidrazon bileşikler, güçlü üreaz önleyici etki sergiledi. Geleneksel tiyoüre ile karşılaştırıldığında tüm hedef bileşikler tarafından daha fazla aktivite göstermişlerdir. Üreaz enzimine karşı en yüksek inhibitör etki, araştırılan bileşiklerin fenil halkasında nitro grupları içermesi ile gösterilmiştir. Bu, fenil halkasındaki nitro grubunun, üreazın inhibitör aktivitesini diğer gruplara göre daha fazla olumlu yönde etkilediğini ortaya koydu. Üreaz önleme etkinliği, bir ikame maddesi olmayan bir fenil halkasına sahip olan bileşikte en düşüktü. Bu verilerden elde ettiğimiz gözlemler, aktivitenin fenil halkası üzerindeki halojen atomları veya hidroksil grupları tarafından arttırıldığını göstermektedir. Belki de bu artan aktiviteden H-bağı sorumludur. Yakın zamanda yayımlanan *in silico* yerleştirme çalışmaları, üreaz inhibisyonu mekanizmasında H-bağının diğer faktörlerden daha önemli olduğunu göstermiştir [62].



Şekil 2.15. Benzimidazole-hidrazon türevi bileşiklerin genel yapısı

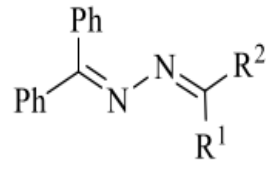
Khan ve arkadaşları yirmi yedi hidrazon türevi bileşik sentezlemişlerdir. Sentezlenen tüm türevlerin üreaz inhibitör aktivitesi incelenmiştir. Standart inhibitör tiyoüre ile karşılaştırıldığında hemen hemen tüm türevler, $IC_{50} = 14,09 \pm 0,23$ ila $78,69 \pm 1,56 \mu M$ aralığında iyi ila orta derecede üreaz inhibitör aktivitesi göstermiştir. Çoğu

bileşiğin tipik tiyoüreden daha fazla güce sahip olduğu keşfedilmiştir. Çoğu aktif analogun yapısında bir veya daha fazla hidroksi grubu bulunur. Mono-hidroksi grubuna sahip analoglar, standarda kıyasla orta düzeyde aktivite göstermiştir. En etkili analogların, benzen halkası boyunca çeşitli noktalarda bulunan hidroksi gruplarına sahip dihidroksi analogları olduğu keşfedilmiştir. *Meta* ve *para* nitro grubuyla ikame edilen analoglar, standardinkine eşdeğer inhibitör potansiyel göstermiştir. Benzen halkasına bir hidroksi grubu ve nitro grubunun eklenmesi güçlü inhibitör etkilere sahiptir. Polar olmayan bir metil grubunun eklenmesi, azaltılmış aktiviteyi vurgular. Bileşiklerin üreaz enziminin aktif bölgesine bağlanma yeteneği, ekstra polar olmayan metil grubu tarafından engellenebilir. Hidroksi grup sayısında bir artış, daha yüksek bir inhibitör potansiyele yol açar. Hidroksi grubunun ardından nitro grubu da aktivite açısından eşit derecede önemlidir. Ayrıca Khan'ın çalışmasında metoksi, N, N-dimetil ve halojen içeren bileşiklerin orta derecede aktif olduğu keşfedilmiştir [63].



Şekil 2.16. Hidrazon türevi bileşiklerin genel yapısı

Khalid Mohammed Khan ve arkadaşları yirmi beş benzofenon hidrazon türevi bileşik sentezlemişlerdir. Bileşikler üreaz enzimi kullanılarak taramaya tabi tutulmuştur. Standart tiyoüre ile karşılaştırıldığında bu kalıntılar, $36,36 \pm 0,94$ ile $425,62 \pm 2,36$ μM arasında değişen IC_{50} değerleri ile çeşitli derecelerde üreaz inhibitör aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Seriler arasında trihidroksi ve dihidroksi ikameli analoglar güçlü inhibitör etki sergilemişlerdir. Aynı sayıda aynı ikame ediciye sahip ancak farklı konumlara sahip bileşiklerin aktivitesindeki değişiklik, bu çalışma sırasında yapılan bir başka gözlemdir. Bunun, hidroksil gruplarının pozisyonlarındaki bir değişiklikten kaynaklandığı varsayılmıştır; bu, hidroksil gruplarının fenil halkasındaki pozisyonlarının da üreaz inhibitör aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir [64].



Şekil 2.17. *Benzophenone hidrazon türevi bileşiklerin genel yapısı*

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

Siklopentilpropanoik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Metanol	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sülfürik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Hidrazin hidrat	: Alfa Aesar, ABD
Furfural	: Merck, Almanya
5-(Hidroksimetil)furan-2-karbaldehit	: Merck, Almanya
Tiyofen-2-karbaldehit	: Sigma-Aldrich, Almanya
5-Nitro-tiyofen-2-karbaldehit	: Merck, Almanya
5-Metil-tiyofen-2-karbaldehit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Pirol-2-karbaldehit	: Merck, Almanya
1-Metil-pirol-2-karbaldehit	: Sigma-Aldrich, Almanya
2-Piridin-karbaldehit	: Merck, Almanya
3-Piridin-karbaldehit	: Sigma-Aldrich, Almanya
4-Piridin-karbaldehit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Eter	: Merck, Almanya
Petrol eteri	: Merck, Almanya
Ethanol	: Tekim, Türkiye
Etil asetat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Silikajel 60 F254 kaplı alüminyum İTK plağı	: Merck, Almanya
Tripsin	: Sigma, Almanya
Fetal bovine serum	: Capricorn, Güney Amerika
DMEM	: Merck, Almanya
RPMI	: Merck, Almanya
PBS	: Gibco, Birleşik Krallık
MTT Boyası	: Sigma, Almanya

DMSO	: Sigma, Almanya
L929 Hücre Hattı	: ATCC, ABD
AGS	: ATCC, ABD
SNU1	: ATCC, ABD
Tiyoüre	: Thermo-Fischer, ABD



3.1. Kullanılan Cihazlar

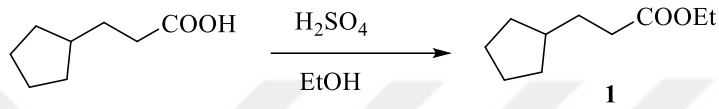
Magnetik tabanlı ısıtıcı karıştırıcı	: Heidolph, MR 3003, Almanya
Elektronik terazi	: Shimadzu, Libror EB-330 HU, Japonya
Ultraviyole lambası	: Camag, Cabinet, İsviçre
Erime derecesi tayin cihazı	: Mettler Toledo-MP90 Melting Point System
Nükleer magnetik rezonans spektrometresi	: Bruker, UltraShield 300 MHz, ABD
Kütle spektrometresi	: Shimadzu, LCMS-IT-TOF, Japonya
Mikroplaka okuyucu	: BioTek-Synergy H1, ABD
Vorteks	: Wisemix, Güney Kore
Steril Kabin	: Class II TypeA2 (CHC-222A2-60), Güney Kore
İnkübatör	: Heraeus, Almanya

4. YÖNTEMLER

4.1. Sentez Çalışmaları

4.1.1. Etil 3-siklopentilpropanoat Türevinin Sentezi

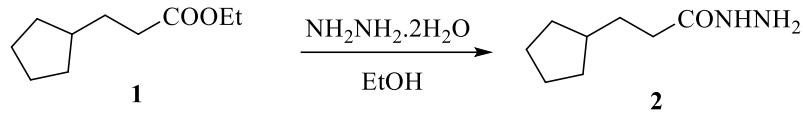
3-Siklopentilpropanoik asit türevi bileşik (0.025 mol) metanolde çözündürülerek üzerine birkaç damla sülfürik asit ilave edilmiştir. Karışım geri çeviren soğutucu altında 72 saat kaynatılmış, reaksiyon bitiminde çözücü uçurularak ürün elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Etil 3-siklopentilpropanoat Türevinin eldesi için reaksiyon denklemi

4.1.2. 3-Siklopentilpropanhidrazit Türevinin Sentezi

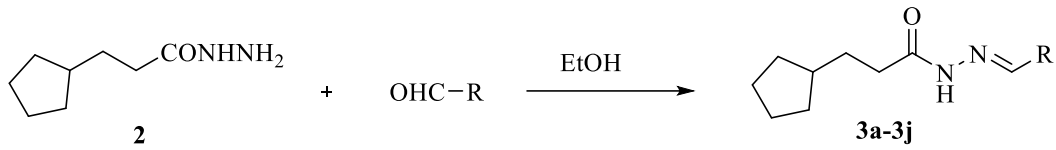
Etil 3-siklopentilpropanoat (1) etanol içerisinde çözülerek üzerine hidrazin hidrat ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı geri çeviren soğutucu altında kaynatılmış ve reaksiyon bitiminde çözücü uçurulmuş, kalan ürün su ile yıkanarak alınmıştır.



Şekil 4.2. 3-Siklopentilpropanhidrazit Türevinin eldesi için reaksiyon denklemi

4.1.3. Hedef bileşiklerinin sentezi (3a-3j)

Hidrazit türevi bileşik (2) etanolde çözündürülmüş ve üzerine uygun aldehit türevleri ilave edilmiştir. Reaksiyon geri çeviren soğutucu altında kaynatılmış ve çöken ürün süzülerek alınmıştır.



Şekil 4.3. Hedef Bileşiklerin eldesi için reaksiyon denklemi

4.2. İTK Çalışmaları ve Rf Değerlerinin Saptanması

Gerçekleştirilen bütün sentez çalışmalarının kontrolü İTK uygulamaları ile yapılmıştır. İTK için hazırlanan numunelerde etanol çözücü olarak kullanılmıştır. Numuneler silika jel 60 F254 kaplı, önceden uygun çözücü karışımları ile doyurulmuş alüminyum plaklara kılcal boru ile uygulanmıştır. Petrol eteri: Etil asetat (3:1) karışımı hareketli faz olarak kullanılmıştır. Lekeler UV ışığı altında (254 nm ve 366 nm) saptanmıştır. İTK kontrolüne göre reaksiyonlar sonlandırılmıştır.

4.3. Erime Noktalarının Tespiti

Sentezlenen final bileşikleri bir ucu kapalı kılcal borulara ½ cm kadar konulup Mettler Toledo-MP90 Melting Point System kullanılarak erime dereceleri tespit edilmiştir.

4.4. ¹H NMR Spektrumlarının Alınması

Sentezlenen final bileşiklerin DMSO-d₆ içindeki çözeltilerinin ¹H-NMR spektrumları Bruker 400 MHz'lik NMR spektrometresi kullanılarak elde edilmiştir.

4.5. ¹³C NMR Spektrumlarının Alınması

Sentezlenen final bileşiklerin DMSO-d₆ içindeki çözeltilerinin ¹³C-NMR spektrumları Bruker 400 MHz'lik NMR spektrometresi kullanılarak elde edilmiştir.

4.6. Antikanser Aktivite Çalışmaları

Hücrelerin Çoğaltılması: Hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin *in vitro* ortamda yaşayıp, çoğalabilmeleri için uygun koşullar ve gerekli besiyeri maddeleri sağlanmıştır. Meme kanseri hücreleri ve sağlıklı hücreler L-Glutaminli, % 10 FBS, % 1 penisilin+streptomisin içeren DMEM besiyerinde, % 5 CO₂ ortamında, 37 °C' de, T-25 ve T-75' lik flasklarda, inkübatörde çoğaltılmıştır.

Sitotoksisite Testleri: DMSO'da hazırlanan bileşik çözeltilerinin iki farklı mide kanser hücresi (SNU1 ve AGS) ve normal şıçan fibroblast hücrelerindeki (L929)

sitotoksik etkileri XTT yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, hücreler sırasıyla 5×10^3 hücre / kuyucuk olacak şekilde plaklara ekilmiştir. Bütün hücrelere farklı konsantrasyonlarda bileşik çözeltileri uygulanarak 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, XTT çözeltisi ilave edilip 2 saat boyunca inkübe edilmiştir.

4.7. Antibakteriyel Aktivite

Bileşiklerin antibakteriyel potansiyelleri micro-broth dilüsyon yöntemiyle test edilmiştir (MIC ve MBC). MIC ve MBC değerleri sırasıyla kısaca, gözle görülür bakteri üremesi olmayan minimum inhibe edici konsantrasyon ve bakteri üremesinin durduğu minimum inhibe edici konsantrasyona olarak tanımlanmıştır. Kısaca, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan maddeler LB besiyeri içeren steril düz tabanlı mikropalakaya pipetlenmiştir. Daha sonra kuyucuklara bakteri hücreleri (O.D=0.5) yüklenmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyon sonrası MİK değerleri belirlenmiştir. Bileşiklerin MBC'sini incelemek için, mikro-broth testinin kuyucuklarından alınan test solüsyonları, LB agar plakalarında alt kültürlenmiş ve gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Ardından gözlemlenen üreme durumlarına göre MBC değerleri belirlenmiştir.

4.8. Üreaz İnhibisyon Aktivitesi

Sentezlenen bileşiklerin 100 µL'si, substrat olarak 850 µL üreye ve fosfat tamponu içindeki 50 µL üreaza (3 mg/mL, pH = 7,4) eklendi. 30 dakika sonra, inkübe edilen çözeltinin 100 µL'sine, 500 µL çözelti I (5,0 g fenol ve 500 mL su içinde 25,0 mg sodyum nitroprussid) ilave edildikten sonra 37 °C'de inkübe edilen 500 uL çözelti II (2,5 g sodyum hidroksit, 4,2 mL sodyum hipoklorit ve 500 mL su içinde %5 klorin) ilave edildi. 30 dakika boyunca her hücrenin mavi renkli indofenolün absorbansı ölçülerek IC₅₀ değerleri hesaplandı.

4.9. Moleküler Doking

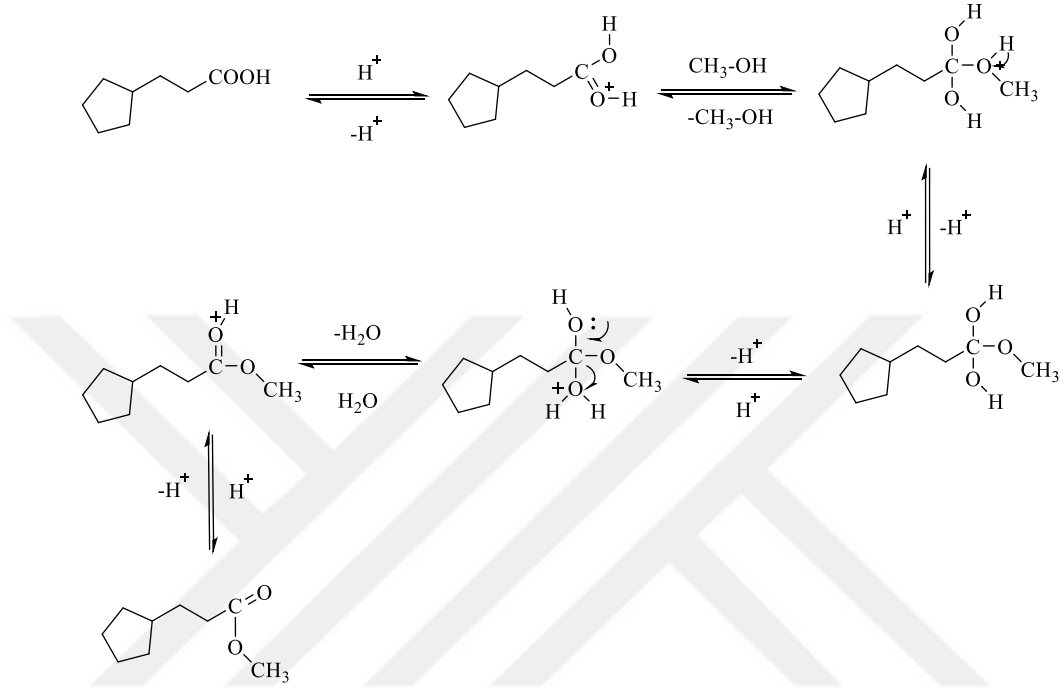
Moleküler modelleme ve yerleştirme çalışmalarının yürütülmesi için Schrödinger Suite v2022.2'nin Maestro v13.3 arayüzü kullanıldı. Üreaz protein kristal yapısı (PDB ID: 4H9M), araştırılan biyolojik aktiviteyle ilgisi nedeniyle ilk yapısal hazırlık için seçildi. Kenetlenmeden önce nikel (Ni⁺⁺) iyonu dışındaki tüm heteroatomlar protein yapısından çıkarıldı [66]. Yapısal eksiklikleri gidermek için eksik kalıntıları ekledik ve

bunları paket içindeki Prime modülünü kullanarak optimize ettik. Potansiyel ligand formlarının kapsamlı bir temsilini sağlamak için 3 boyutlu yapılar oluşturmayı, uygun protonasyon durumlarını atamayı ve tatomerler ve stereoizomerler oluşturmayı içeren LigPrep modülünü kullanarak ligandları hazırladık. Reseptör ızgarası, Ni^{++} iyonunun ağırlık merkezi olarak belirlendiği Izgara Oluşturma modülü kullanılarak enzimin aktif bölgesi çevresinde üretildi [67]. Bu ızgara, yerleştirme simülasyonları için uzamsal parametreler sağlayarak Glide Ligand Yerleştirme modülünün Standart Hassas (SP) yerleştirme gerçekleştirmesini sağladı [68]. Bu yöntem, ligandların bağlanma pozisyonlarını ve afinitelerini değerlendirerek üreazın aktif bölgesine kesin bir uyum sağladı. Yerleştirme sonrasında, bağlanan ligandlar ile aktif bölge kalıntıları arasındaki kovalent olmayan etkileşimleri analiz etmek ve görselleştirmek için Ligand Etkileşimi modülünü kullandık. Moleküler etkileşimlerin daha rafine bir görsel temsilini sağlamak amacıyla, bileşiklerin bağlanma yönelimlerini ve etkileşim profillerini gösteren yüksek kaliteli rakamlar oluşturmak için PyMOL sürüm 2.4'ü kullandık.

5. BULGULAR ve TARTIŞMALAR

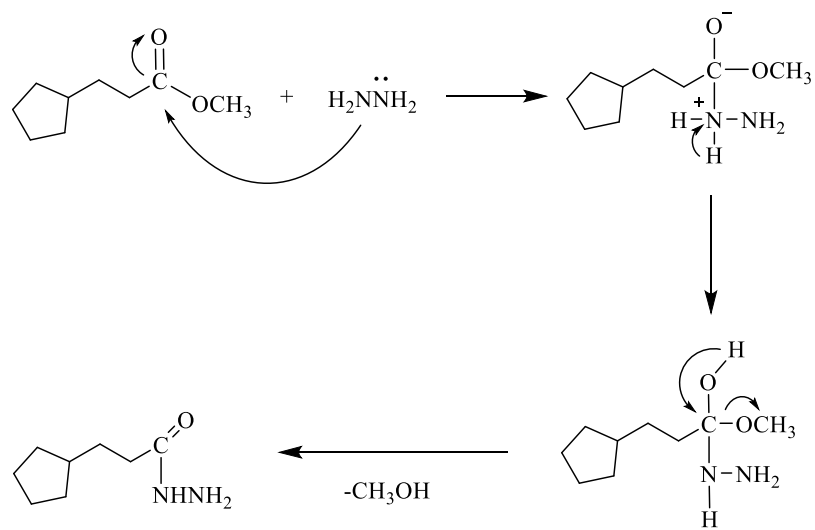
5.1. Sentez Çalışmaları

5.1.1. Etil 3-siklopentilpropanoat Türevinin Sentezi



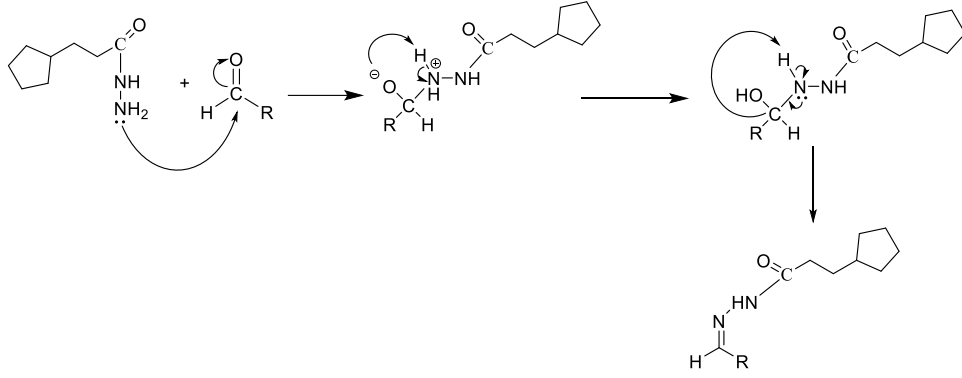
Şekil 5.1. Etil 3-siklopentilpropanoat bileşiğinin mekanizması

5.1.2. 3-Siklopentilpropanhidrazit Türevinin Sentezi



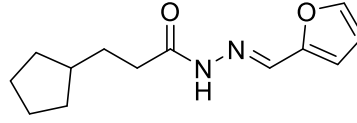
Şekil 5.2 3-Siklopentilpropanhidrazit bileşiğinin mekanizması

5.1.3. Hedef Bileşiklerinin Sentezi (3a-3j)



Şekil 5.3. Hedef bileşiklerinin sentez mekanizması

5.1.4. 3-Siklopentil-N'-(furan-2-ilmetilen)propanhidrazit (3a)

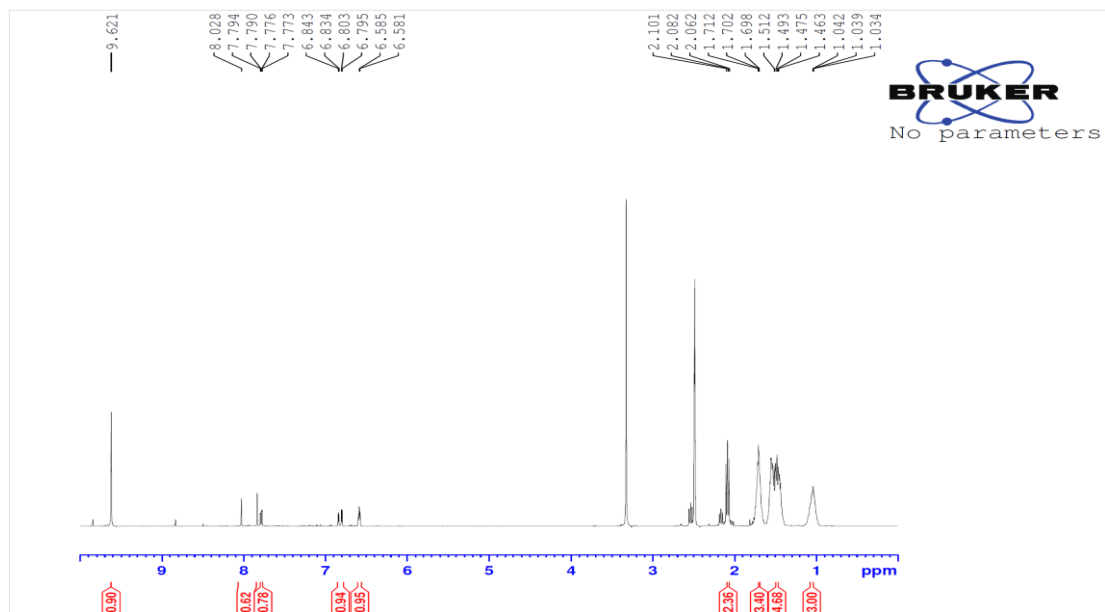


Şekil 5.4. 3a kodlu bileşiğin molekül şekli

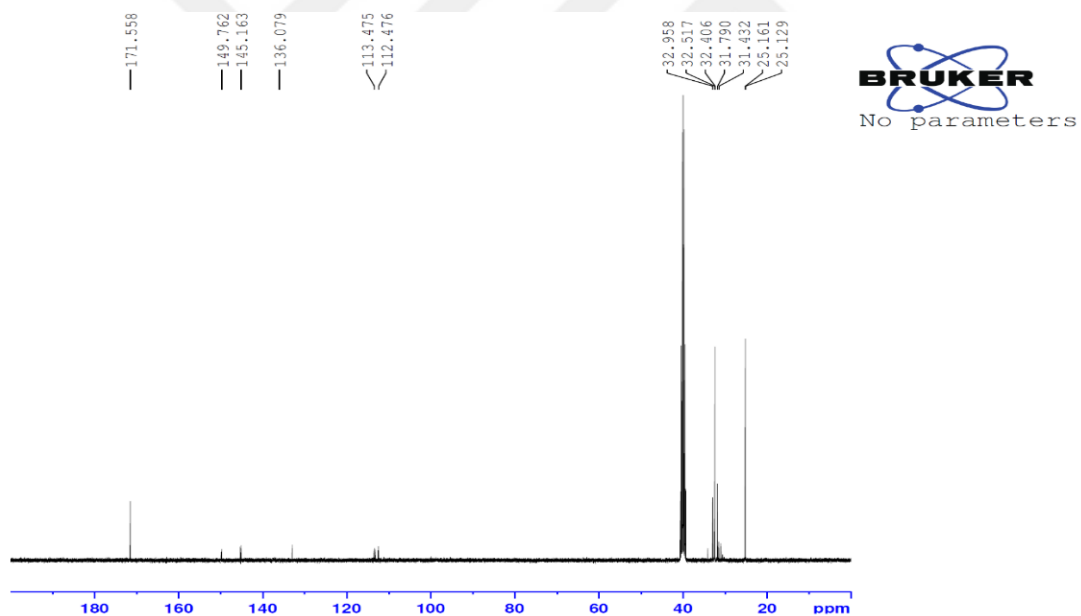
Verim: % 75. E.n. 164.8 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.03-1.04 (3H, m, siklopentil CH), 1.46-1.51 (5H, m, siklopentil CH, CH_2), 1.70-1.71 (3H, m, siklopentil CH), 2.08 (2H, t, $J=7.44$ Hz, CH_2), 6.58-6.59 (1H, m, furan CH), 6.79-6.84 (1H, m, furan CH), 7.77-7.79 (1H, m, furan CH), 8.03 (1H, s, $\text{CH}=\text{N}$), 9.62 (1H, s, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta(\text{ppm})$: 23.12, 25.16, 31.43, 31.79, 32.41, 32.52, 32.96, 112.48 (furan C), 113.48 (furan C), 136.08 ($\text{CH}=\text{N}$), 145.16 (furan C), 149.76 (furan C), 171.56 ($\text{C}=\text{O}$).

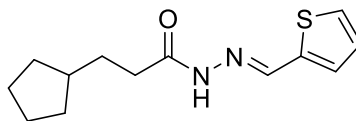


Şekil 5.5. 3a Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu



Şekil 5.6. 3a Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu

5.1.5. 3-Siklopentil-N'-(tiyofen-2-ilmetilen)propanhidrazid (3b)

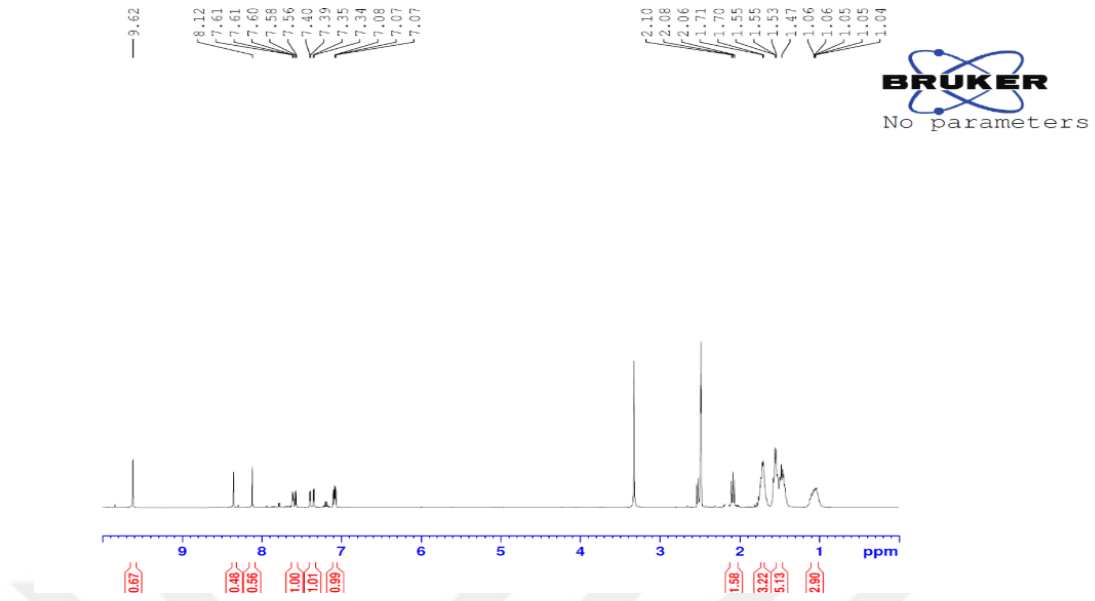


Şekil 5.7. 3b kodlu bileşiğin molekül şekli

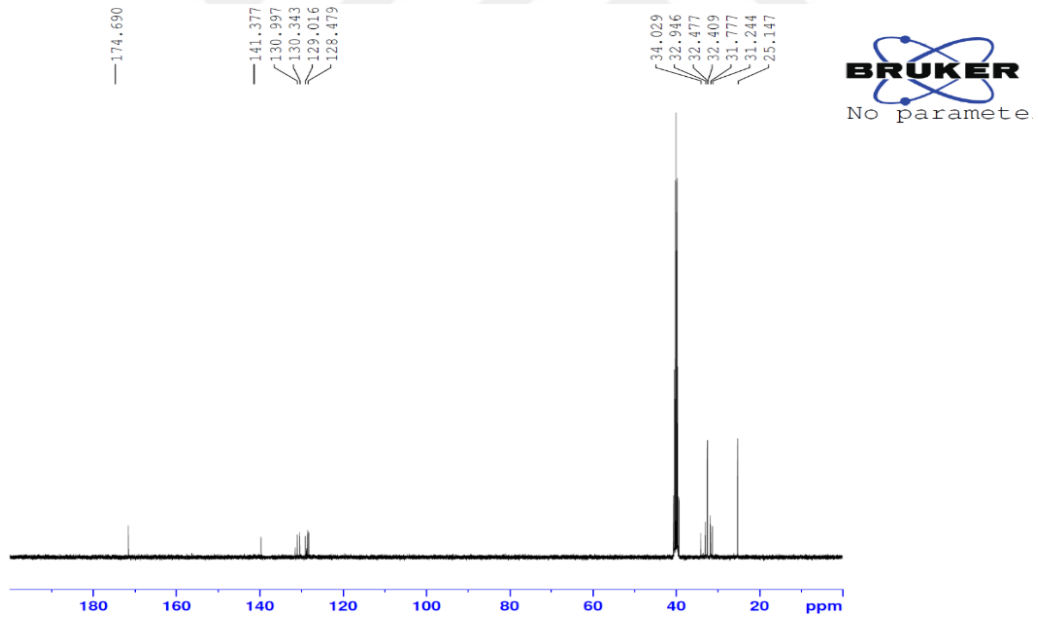
Verim: % 78. E.n. 130.5 °C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.03-1.07 (3H, m, siklopentil CH), 1.48-1.56 (5H, m, siklopentil CH, CH₂), 1.70-1.71 (3H, m, siklopentil CH), 2.08 (2H, t, *J*=7.44 Hz, CH₂), 7.08-7.09 (1H, m, tiyofen CH), 7.34-7.40 (1H, m, tiyofen CH), 7.57-7.62 (1H, m, tiyofen CH), 8.12 (1H, s, CH=N), 9.62 (1H, s, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm): 25.15, 31.24, 31.78, 32.41, 32.48, 32.95, 34.03, 128.48 (tiyofen C), 129.02 (tiyofen C), 130.34 (tiyofen C), 130.99 (tiyofen C), 141.38 (CH=N), 174.69 (C=O).

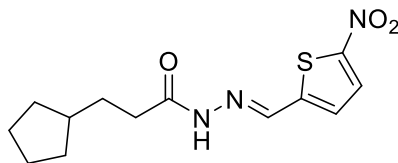


Şekil 5.8. 3b Bileşiğine ait ¹H NMR spektrumu



Şekil 5.9. 3b Bileşiğine ait ¹³C NMR spektrumu

5.1.6. 3-Siklopentil-N'-(5-nitrotiyofen-2-ilmetilen)propanhidrazit (3c)

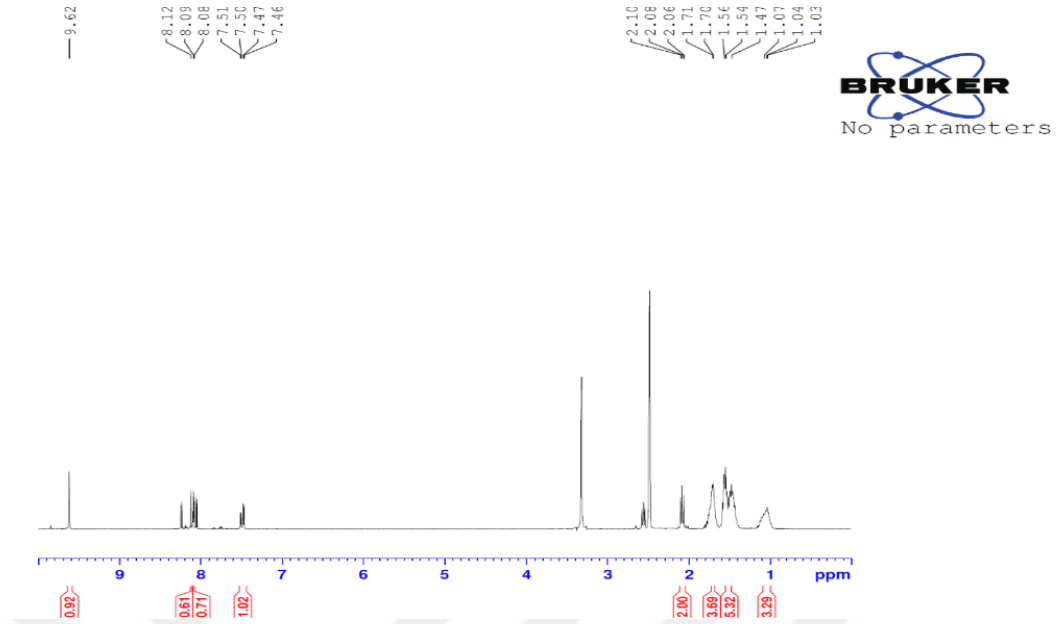


Şekil 5.10. 3c kodlu bileşiğin molekül şekli

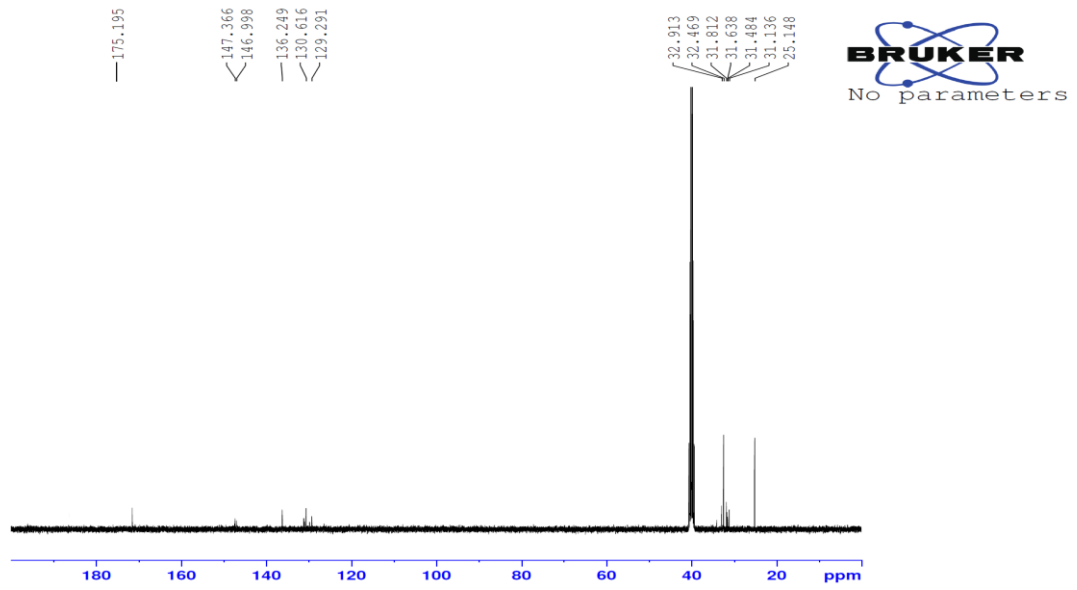
Verim: % 80. E.n. 145.2 °C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.03-1.07 (3H, m, siklopentil CH), 1.48-1.57 (5H, m, siklopentil CH, CH₂), 1.70-1.71 (3H, m, siklopentil CH), 2.08 (2H, t, J=7.44 Hz, CH₂), 7.47-7.51 (1H, m, tiyofen CH), 8.08-8.09 (1H, m, tiyofen CH), 8.12 (1H, s, CH=N), 9.62 (1H, s, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm): 25.15, 31.14, 31.48, 31.64, 31.81, 32.47, 32.91, 129.29 (tiyofen C), 130.62 (tiyofen C), 136.25 (CH=N), tiyofen (thiophen C), 147.37 (tiyofen C), 175.20 (C=O).

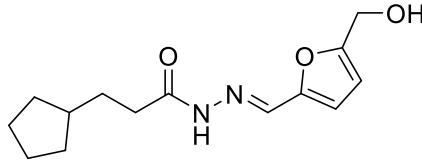


Şekil 5.11. 3c Bileşiğine ait ¹H NMR spektrumu



Şekil 5.12. 3c Bileşiğine ait ¹³C NMR spektrumu

5.1.7. 3-Siklopentil-N'-((5-(hidroksimetil)furan-2-il)metilen)propanhidrazit (3d)

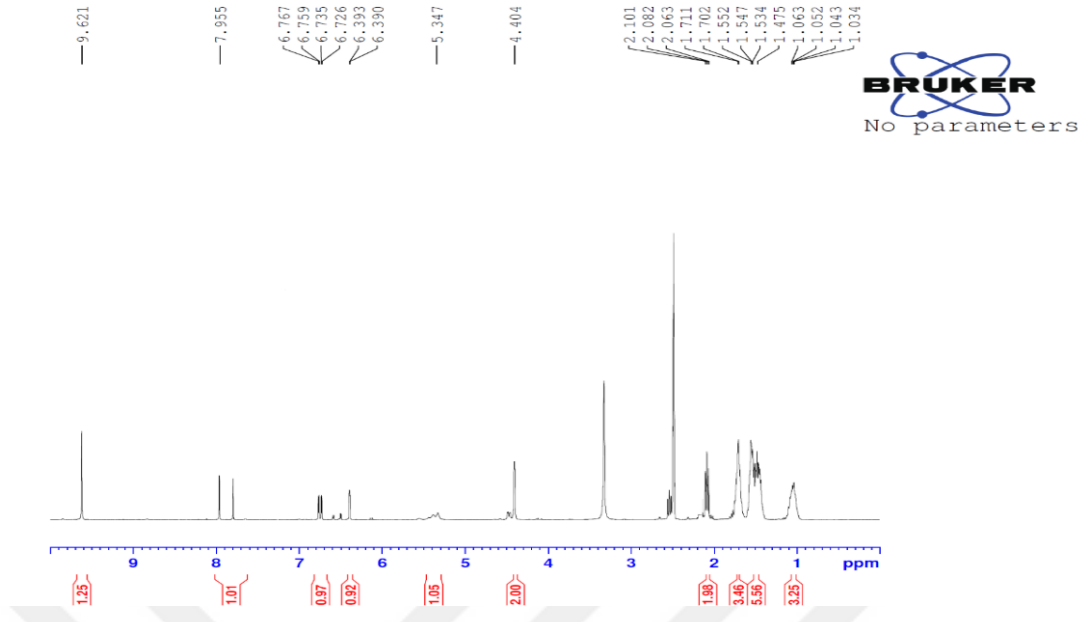


Şekil 5.13. 3d kodlu bileşiğin molekül şekli

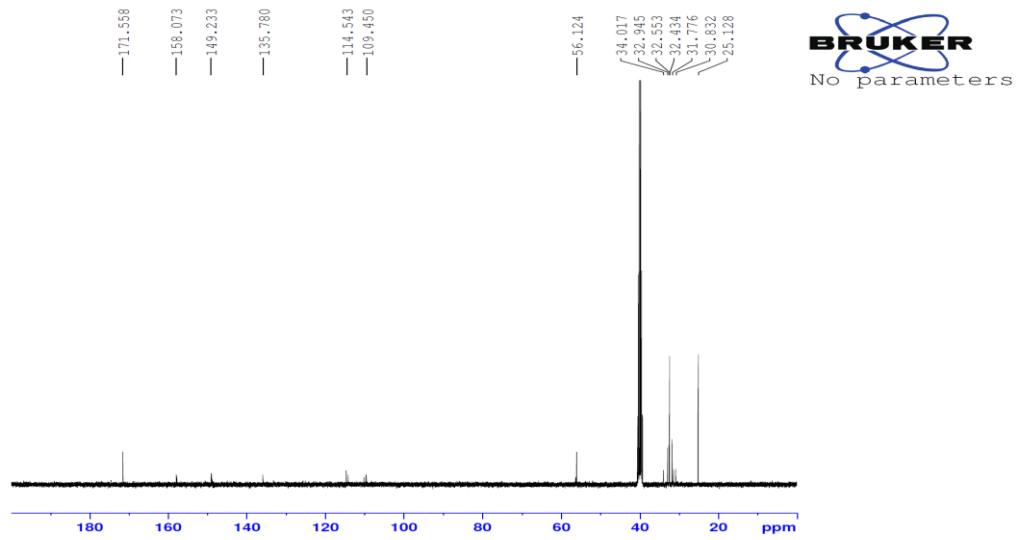
Verim: % 78. E.n. 148.2 °C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.02-1.06 (3H, m, siklopentil CH), 1.47-1.55 (5H, m, siklopentil CH, CH₂), 1.70-1.71 (3H, m, siklopentil CH), 2.08 (2H, t, J=7.40 Hz, CH₂), 4.40 (2H, s, CH₂), 5.35 (1H, s, OH), 6.39 (1H, s, furan CH), 6.73-6.77 (1H, m, furan CH), 7.96 (1H, s, CH=N), 9.62 (1H, s, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm): 25.13, 30.83, 31.78, 32.43, 32.55, 32.95, 34.02, 56.12 (C-OH), 109.45 (furan C), 114.54 (furan C), 135.78 (CH=N), 149.23 (furan C), 158.07 (furan C), 171.56 (C=O).

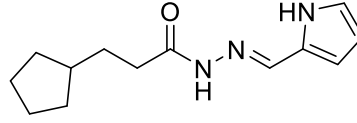


Şekil 5.14. 3d Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu



Şekil 5.15. 3d Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu

5.1.8. 3-Siklopentil-N'-((1H-pirol-2-il)metilen)propanhidrazid (3e)

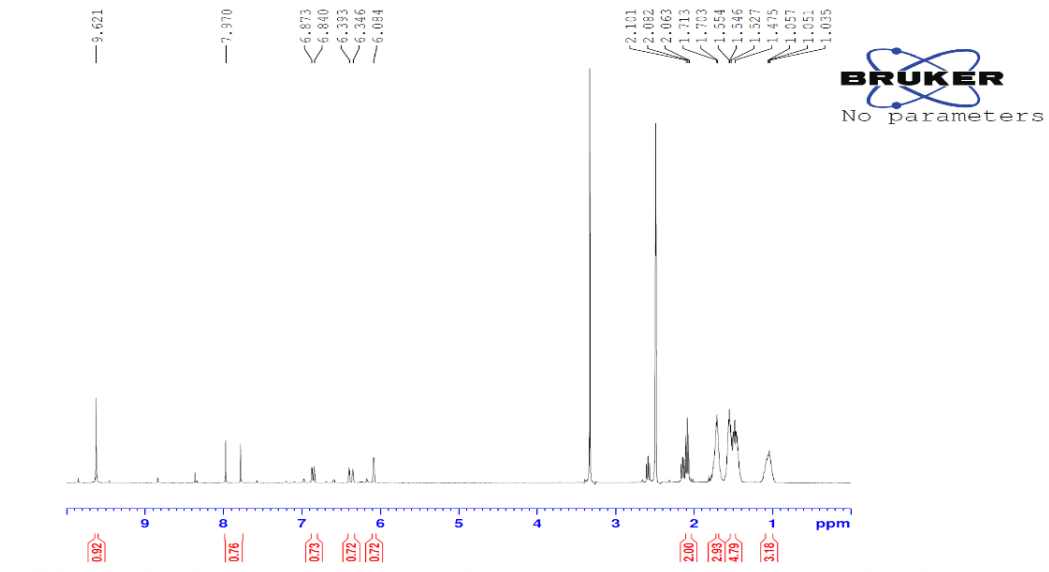


Şekil 5.16. 3e kodlu bileşiğin molekül şekli

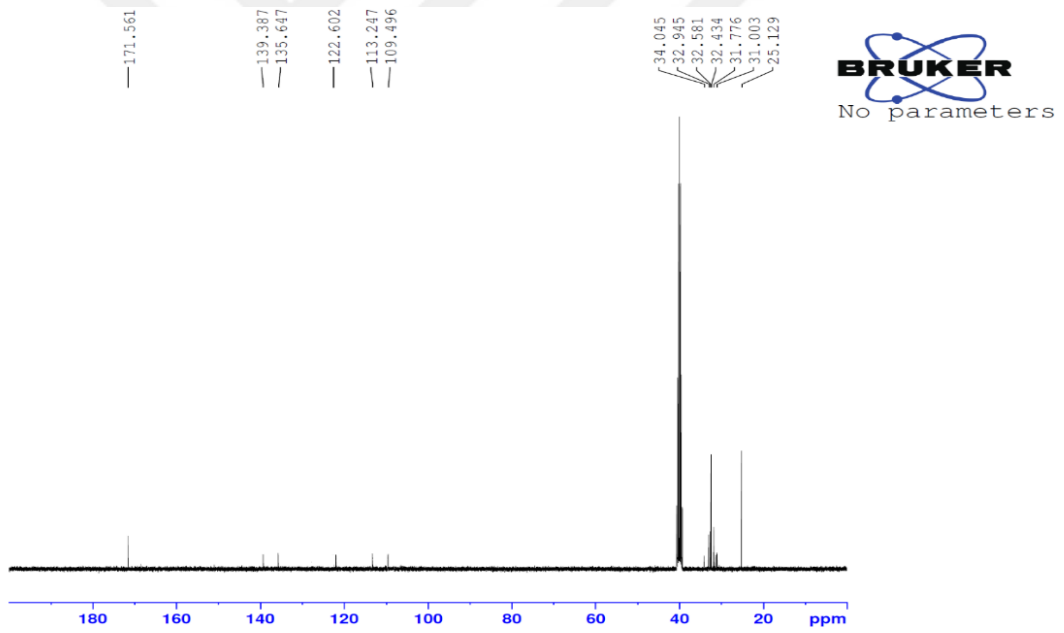
Verim: % 81. E.n. 153.3 °C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.04-1.06 (3H, m, siklopentil CH), 1.48-1.55 (5H, m, siklopentil CH, CH₂), 1.70-1.71 (3H, m, siklopentil CH), 2.08 (2H, t, J=7.44 Hz, CH₂), 6.08 (1H, s, pirol CH), 6.35-6.39 (1H, m, pirol CH), 6.84-6.87 (1H, m, pirol CH), 7.97 (1H, s, CH=N), 9.62 (1H, s, NH), 10.97 (1H, s, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm): 25.13, 31.00, 31.78, 32.43, 32.58, 32.95, 34.05, 109.50 (pirol C), 113.25 (pirol C), 122.60 (pirol C), 135.65 (pirol C), 139.39 (CH=N), 171.56 (C=O).

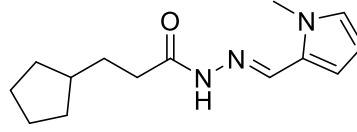


Şekil 5.17. 3e Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu



Şekil 5.18. 3e Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu

5.1.9. 3-Siklopentil-N'-((1-metil-1H-pirol-2-il)metilen)propanhidrazid (3f)

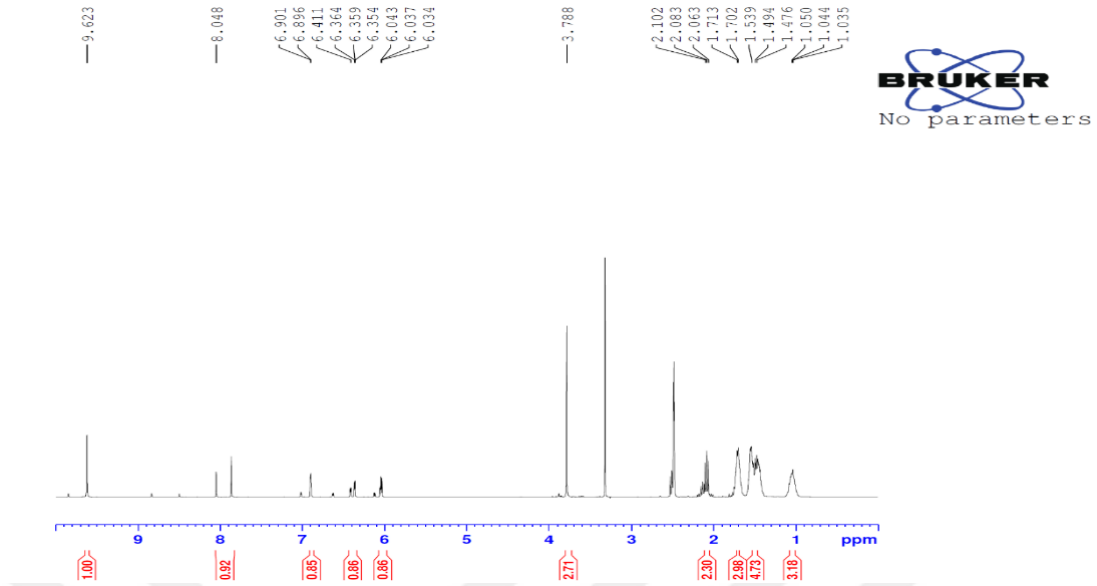


Şekil 5.19. 3f kodlu bileşiğin molekül şekli

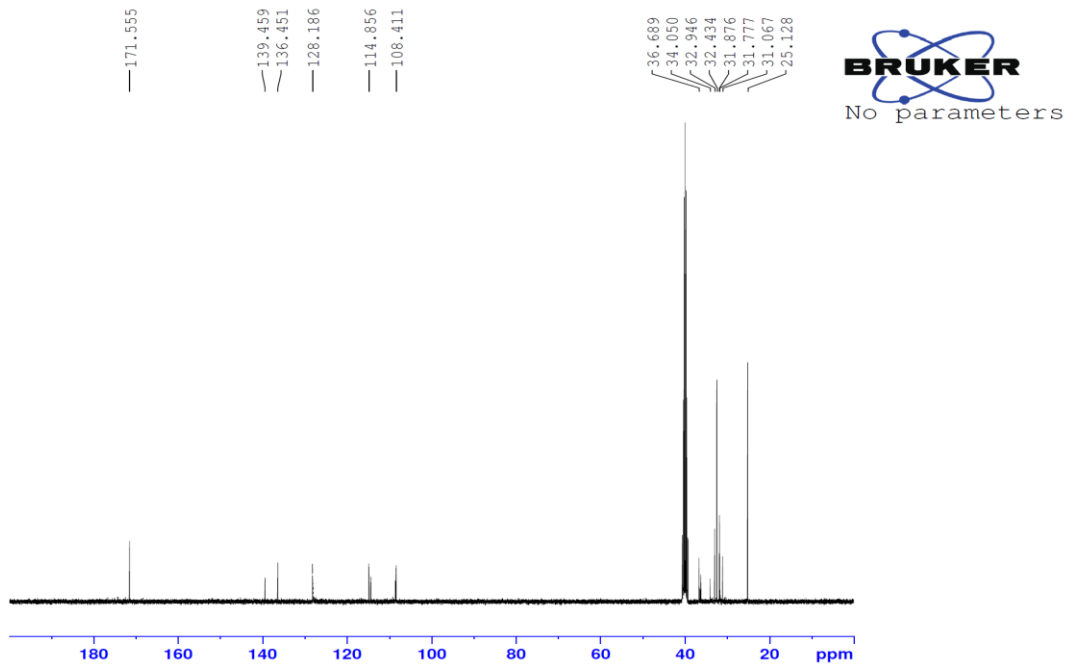
Verim: % 82. E.n. 142.7 °C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.04-1.05 (3H, m, siklopentil CH), 1.48-1.54 (5H, m, siklopentil CH, CH₂), 1.70-1.71 (3H, m, siklopentil CH), 2.08 (2H, t, J=7.40 Hz, CH₂), 3.79 (3H, s, CH₃), 6.03-6.04 (1H, m, pirol CH), 6.35-6.41 (1H, m, pirol CH), 6.89-6.90 (1H, m, pirol CH), 8.04 (1H, s, CH=N), 9.62 (1H, s, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm): 25.13, 31.07, 31.78, 31.88, 32.43, 32.95, 34.05, 36.69, 108.41 (pirol C), 114.86 (pirol C), 128.19 (pirol C), 136.45 (pirol C), 139.46 (CH=N), 171.56 (C=O).

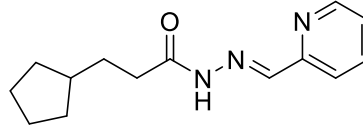


Şekil 5.20. 3f Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu



Şekil 5.21. 3f Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu

5.1.10. 3-Siklopentil-N'-(piridin-2-ilmetilen)propanhidrazit (3g)

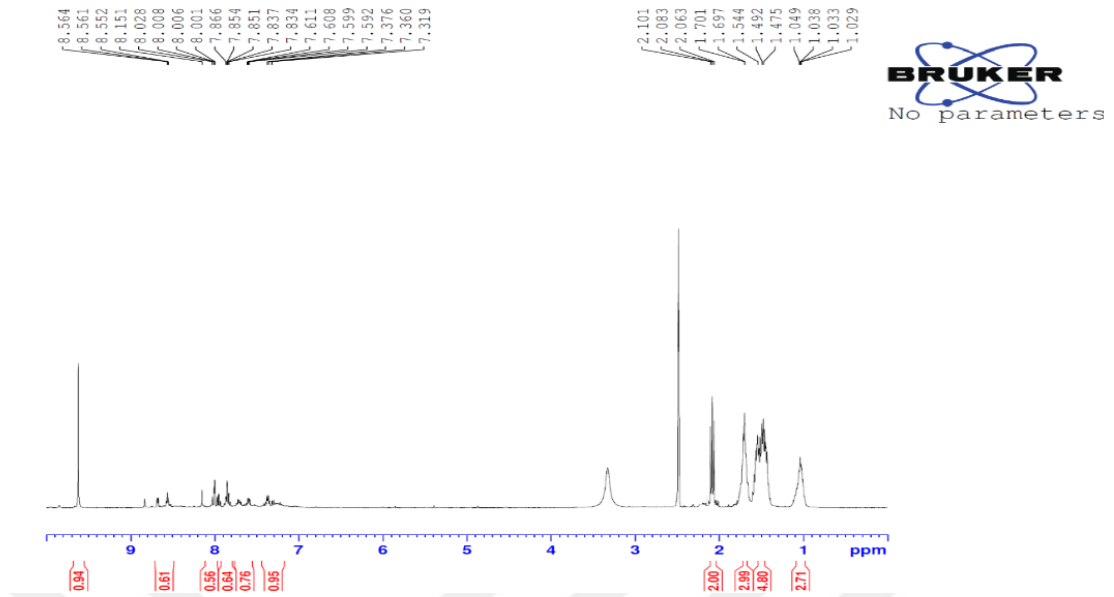


Şekil 5.22. 3g kodlu bileşiğin molekül şekli

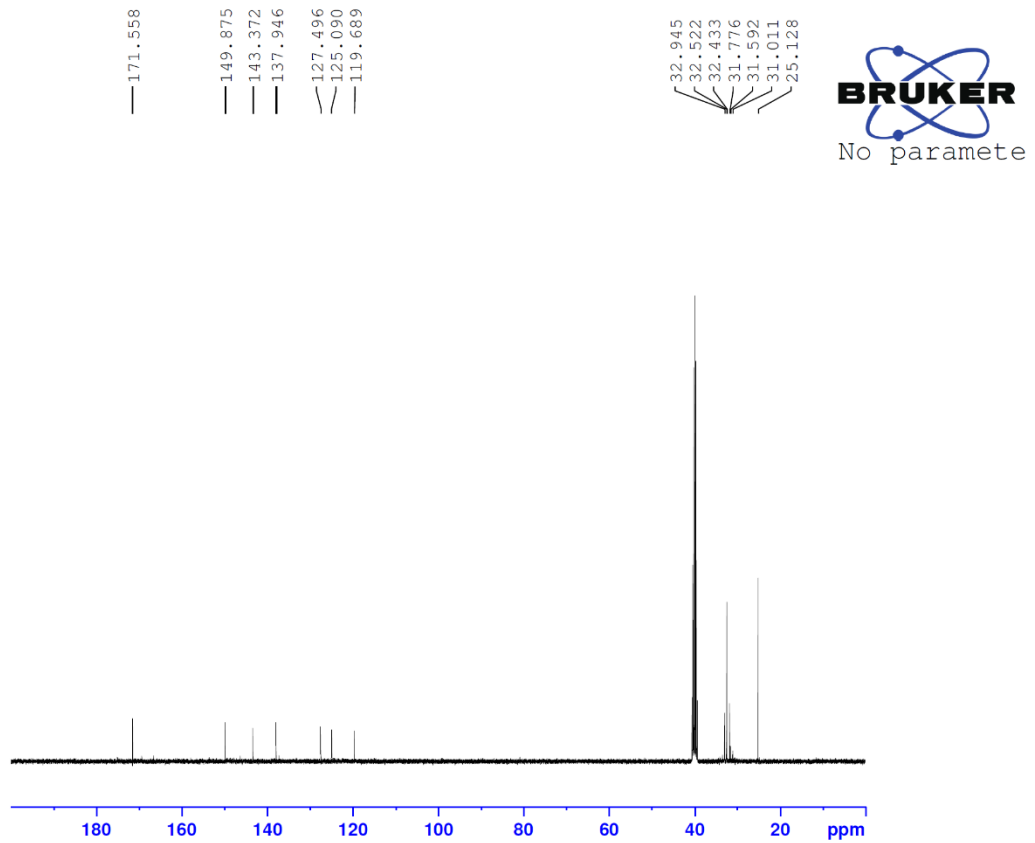
Verim: % 76. E.n. 130.8 °C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.02-1.05 (3H, m, siklopentil CH), 1.48-1.54 (5H, m, siklopentil CH, CH₂), 1.70-1.71 (3H, m, siklopentil CH), 2.08 (2H, t, J=7.44 Hz, CH₂), 7.32-7.37 (1H, m, piridin CH), 7.59-7.61 (1H, m, piridin CH), 7.83-7.87 (1H, m, piridin CH), 8.00-8.03 (1H, m, piridin CH), 8.15 (1H, s, CH=N), 9.62 (1H, s, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm): 25.13, 31.01, 31.59, 31.78, 32.43, 32.52, 32.95, 119.69 (piridin C), 125.09 (piridin C), 127.50 (piridin C), 137.95 (CH=N), 143.37 (piridin C), 149.88 (piridin C), 171.56 (C=O).

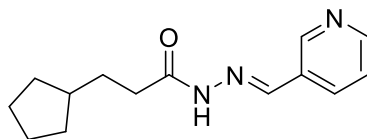


Şekil 5.23. 3g Bileşiğine ait ¹H NMR spektrumu



Şekil 5.24. 3g Bileşiğine ait ¹³C NMR spektrumu

5.1.11. 3-Siklopentil-N'-(piridin-3-ilmetilen)propanhidrazid (3h)

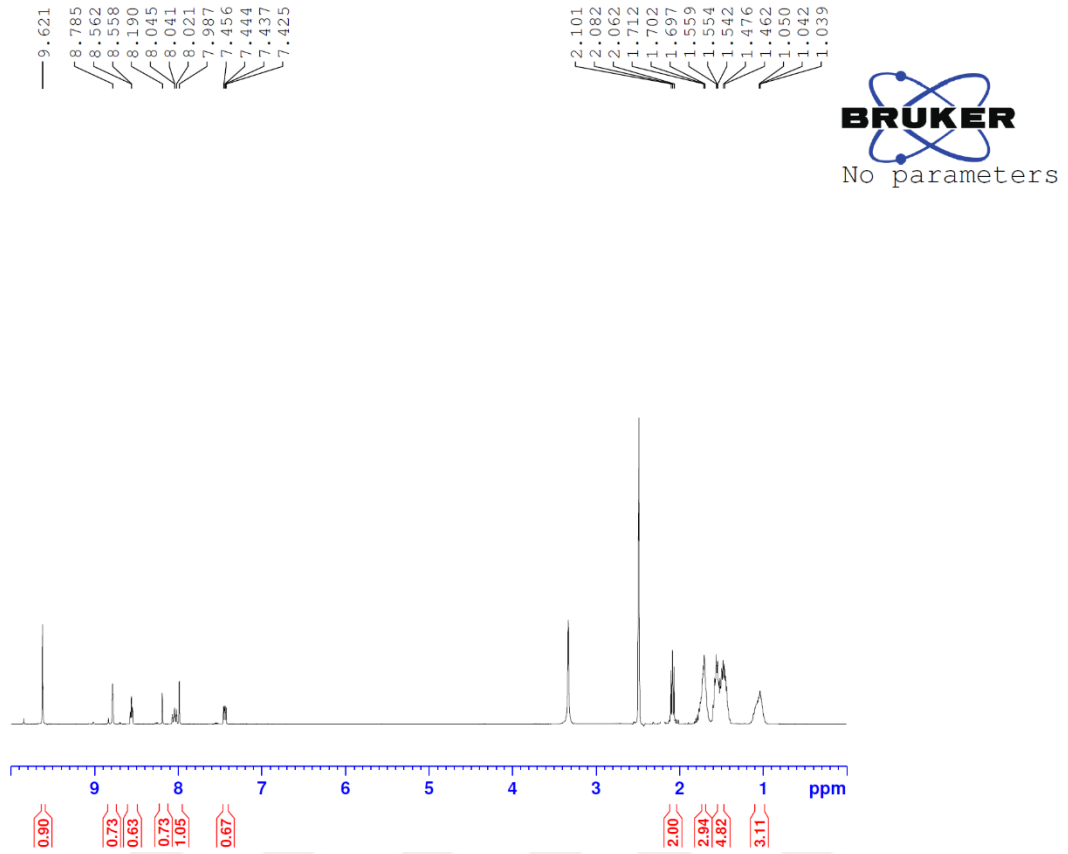


Şekil 5.25. 3h kodlu bileşiğin molekül şekli

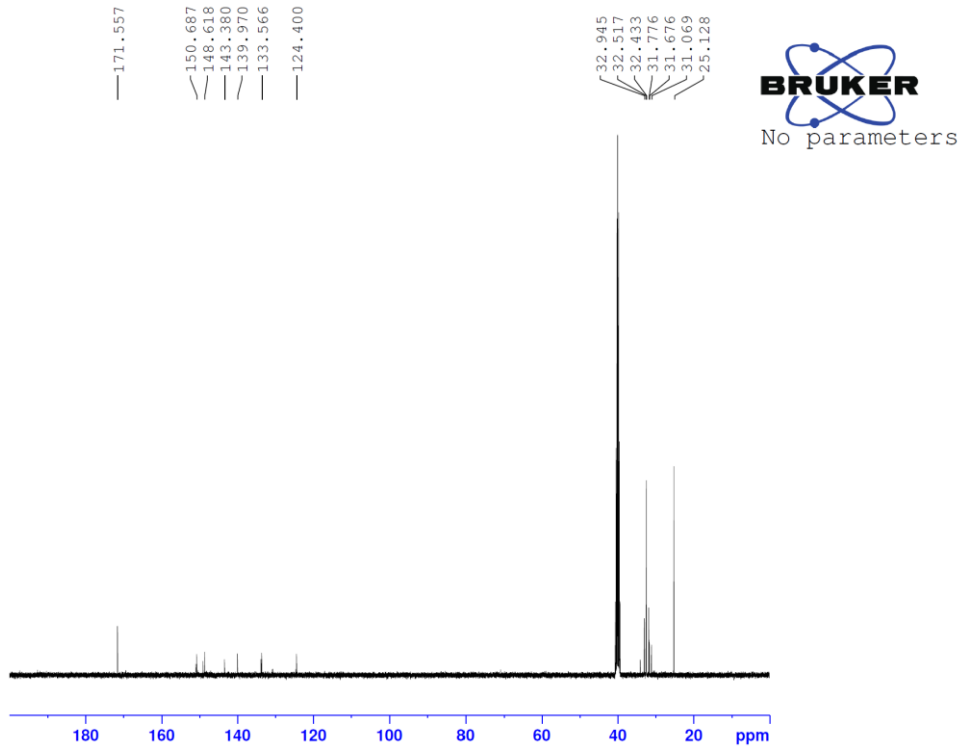
Verim: % 75. E.n. 150.5 °C.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.02-1.05 (3H, m, siklopentil CH), 1.46-1.56 (5H, m, siklopentil CH, CH_2), 1.70-1.71 (3H, m, siklopentil CH), 2.08 (2H, t, $J=7.44$ Hz, CH_2), 7.42-7.46 (1H, m, piridin CH), 7.99-8.05 (1H, m, piridin CH), 8.19 (1H, s, $\text{CH}=\text{N}$), 8.55-8.56 (1H, m, piridin CH), 8.79 (1H, s, piridin CH), 9.62 (1H, s, NH).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta(\text{ppm})$: 25.13, 31.07, 31.68, 31.78, 32.43, 32.52, 32.95, 124.40 (piridin C), 133.57 (piridin C), 139.97 ($\text{CH}=\text{N}$), 143.38 (piridin C), 148.62 (piridin C), 150.69 (piridin C), 171.56 ($\text{C}=\text{O}$).

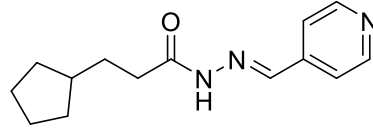


Şekil 5.26. 3h Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu



Şekil 5.27. 3h Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu

5.1.12. 3-Siklopentil-N'-(piridin-4-ilmetilen)propanhidrazid (31)

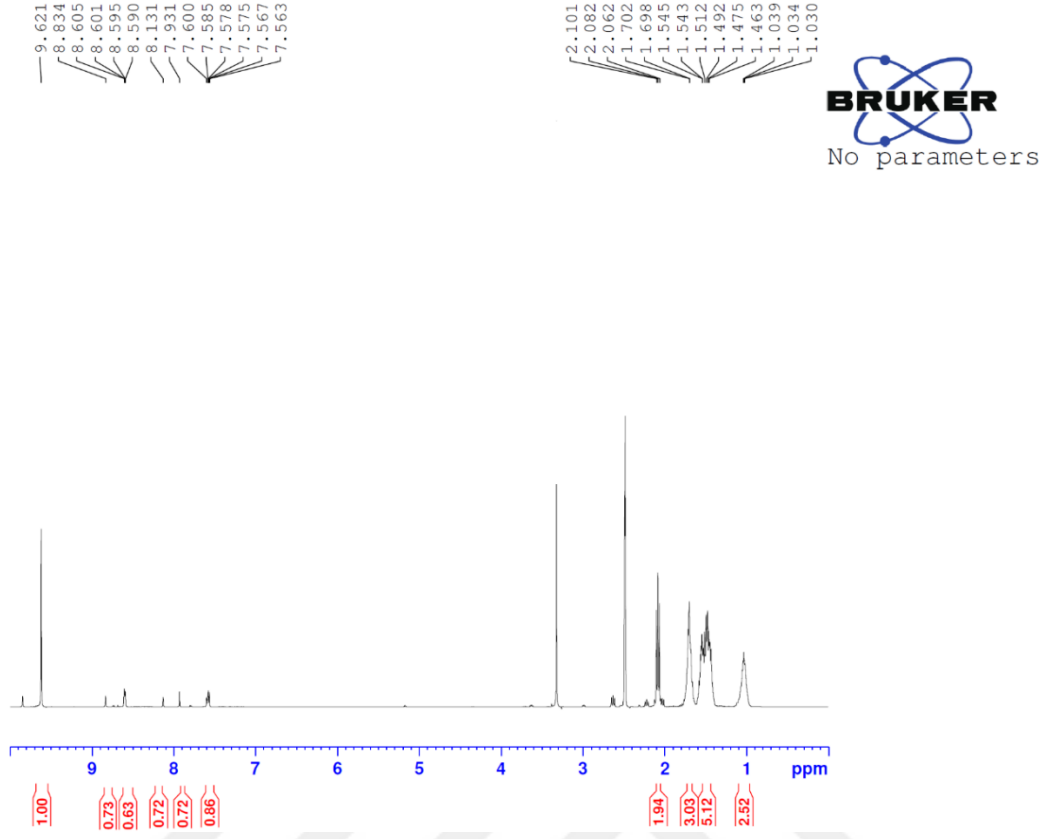


Şekil 5.28. 31 kodlu bileşiğin molekül şekli

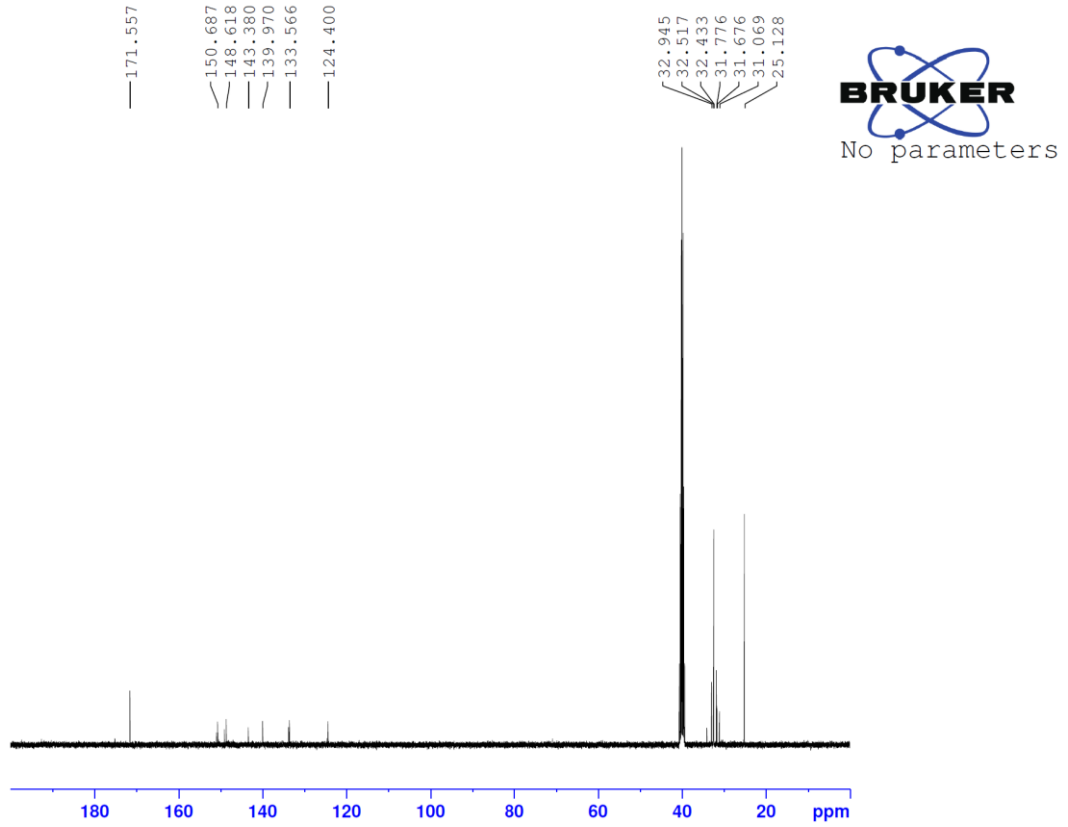
Verim: % 81. E.n. 176.6 °C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.02-1.04 (3H, m, siklopentil CH), 1.46-1.54 (5H, m, siklopentil CH, CH₂), 1.69-1.70 (3H, m, siklopentil CH), 2.08 (2H, t, J=7.44 Hz, CH₂), 7.56-7.60 (1H, m, piridin CH), 7.93 (1H, s, piridin CH), 8.13 (1H, s, CH=N), 8.59-8.61 (1H, m, piridin CH), 8.83 (1H, s, piridin CH), 9.62 (1H, s, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm): 25.13, 31.00, 31.60, 31.78, 32.43, 32.52, 32.94, 121.01 (piridin C), 21.34 (piridin C), 140.36 (CH=N), 150.69 (piridin C), 171.56 (C=O).

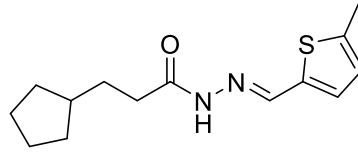


Şekil 5.29. 3i Bileşiğine ait ¹H NMR spektrumu



Şekil 5.30. 3i Bileşiğine ait ¹³C NMR spektrumu

5.1.13.3-Siklopentil-N'-(5-metiltiyofen-2-ilmetilen)propanhidrazit (3j)

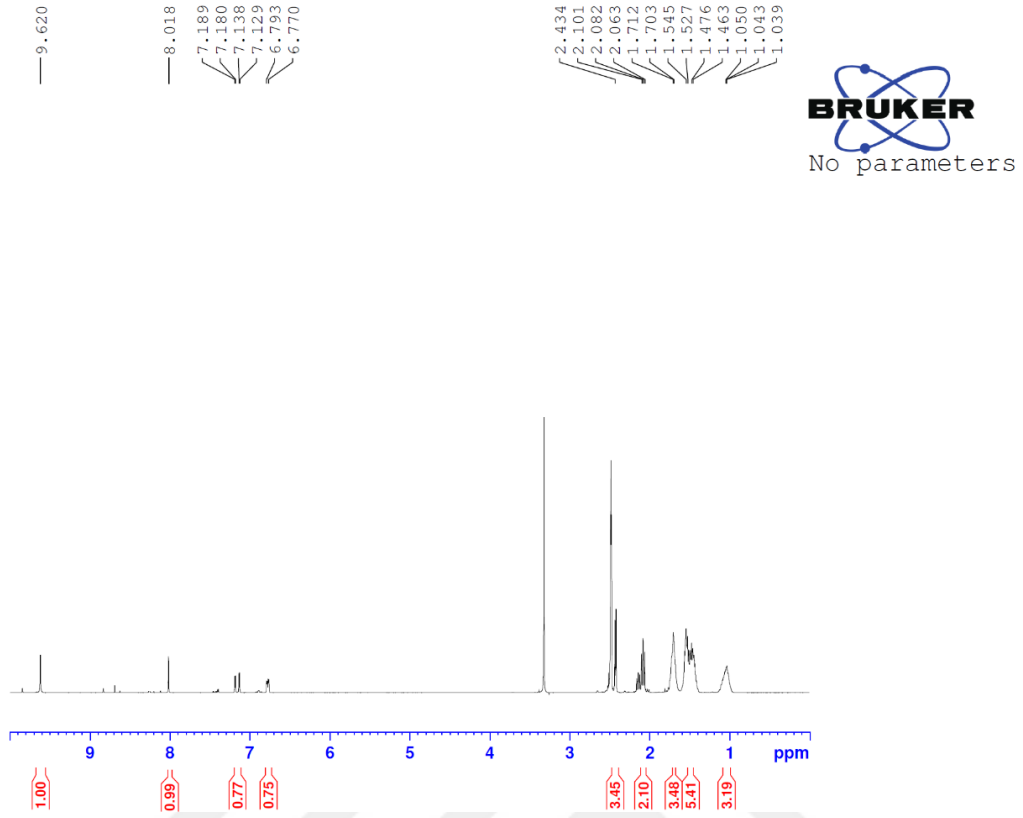


Şekil 5.31. 3j kodlu bileşiğin molekül şekli

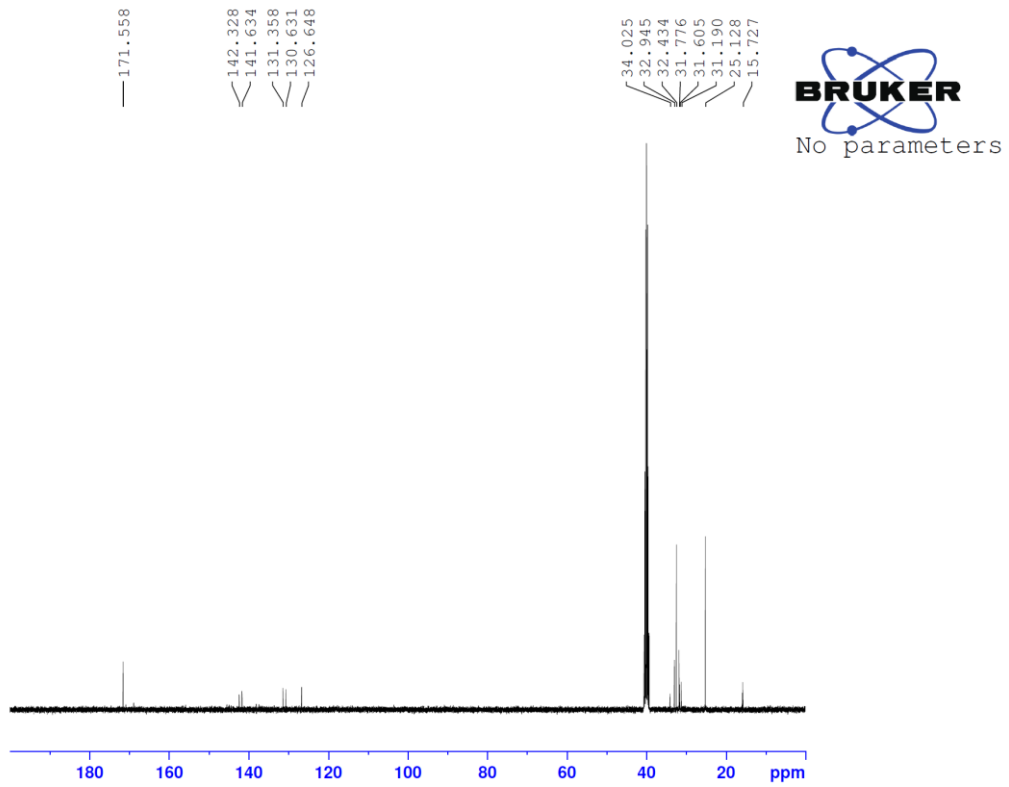
Verim: % 80. E.n. 154.2 °C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.01-1.05 (3H, m, siklopentil CH), 1.46-1.55 (5H, m, siklopentil CH, CH₂), 1.70-1.71 (3H, m, siklopentil CH), 2.08 (2H, t, J=7.44 Hz, CH₂), 2.43 (3H, s, CH₃), 6.77-6.79 (1H, m, tiyofen CH), 7.13-7.19 (1H, m, tiyofen CH), 8.02 (1H, s, CH=N), 9.62 (1H, s, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ(ppm): 15.73 (CH₃), 25.13, 31.19, 31.61, 31.78, 32.43, 32.95, 34.03, 126.65 (tiyofen C), 130.63 (tiyofen C), 131.36 (tiyofen C), 141.63 (CH=N), 142.33 (tiyofen C), 171.56 (C=O).



Şekil 5.32. 3j Bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu



Şekil 5.33. 3j Bileşiğine ait ^{13}C NMR spektrumu

5.2. Sentez Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Bu tez çalışması kapsamında, on yeni hidrazon türevi bileşik (**3°-3j**) sentezlenmiştir. Planlanan sentez şemasının ilk basamağında siklopentilpropanoik asit bileşiği sülfürik asit katalizörlüğünde metanol içerisinde geri çeviren soğutucu altında kaynatılmıştır. Bu tepkime Fischer esterleşmesi olarak tanımlanmaktadır. Reaksiyon belli bir süre sonunda dengeye ulaşmaktadır. Reaksiyonu ester yönüne kaydırmak için metanolün fazlası kullanılmıştır. Reaksiyon bitiminde etil 3-siklopentilpropanoat (**1**) bileşiği elde edilmiştir. İkinci basamakta, etil 3-siklopentilpropanoat (**1**) bileşiği hidrazin hidrat ile geri çeviren soğutucu altında kaynatılarak 3-siklopentilpropanhidrazit (**2**) bileşiği elde edilmiştir. Son basamakta ise, hidrazit türevi bileşik ile on farklı aldehit türevi etanol içerisinde reaksiyona sokularak hidrazon türevi bileşikler (**3°-3j**) elde edilmiştir.

5.3. Spektral Verilerin Değerlendirilmesi

Sentezlenen bileşiklerin yapıları ¹H NMR ve ¹³C NMR spektroskopik yöntemleri kullanılarak aydınlatılmıştır. Bileşiklerin hepsinde ortak yapı olarak siklopentan ve hidrazon yapısı yer almaktadır. Siklopentana ait protonlar 1.01-1.71 ppm aralığında gözlenmiştir. Yine bileşiklerin yapısında ortak olarak bulunan (CH=N) yapısına ait proton 7.96-8.19 ppm aralığında singlet olarak gözlenmiştir. Furan halkasına ait aromatik protonlar 6.39-7.79 ppm aralığında tespit edilmiştir. Tiyofen halkasına ait aromatik protonlar ise 6.77-8.09 ppm aralığında gözlenmiştir. Pirol halkasına ait protonlar ise 6.03-6.90 ppm aralığında gözlenmiştir. Piridin halkasına ait aromatik protonlar ise 7.32-8.61 ppm aralığında tespit edilmiştir. **3f** bileşiğinde yer alan 1-metil-pirol yapısındaki metil protonları ve **3j** bileşiğinde yer alan 5-metiltiyofen yapısındaki metil protonları sırasıyla 3.79 ve 2.43 ppm de singlet olarak gözlemlenmiştir. Hidrazon yapısında yer alan NH protonları ise 9.62 ppm de singlet olarak tespit edilmiştir.

Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerde ortak yapısal parçacıklar ¹³C-NMR spektrumlarında genel olarak beklendiği gibi pikler vermiştir. Sentezlenen bileşiklerin spektrumlarında, karbon atomlarından elektronik çevrelerine göre özdeş olanlar dikkate alınarak toplam karbon sayısı belirlenmiş ve beklenen sayıda pik gözlenmiştir. Bileşiklere ait spektrumlarda spesifik fonksiyonel gruplardan karbonil (C=O) 171.56-175.20 ppm aralığında gözlenmiş olup literatür verileri ile uyum içerisinde [65]. Sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapıları incelendiğinde, bütün bileşiklerde ortak olarak bulunan

siklopentan halkasına ait karbonlar 23.12-34.05 ppm aralığında gözlenmiştir. Yine bütün sentezlenen bileşiklerde ortak olarak bulunan CH=N karbonları 135.78-141.63 ppm aralığında pik vermiştir. **3f**, **3j** Kodlu bileşiklerde aromatik halkaya bağlı metil (-CH₃) karbonları 15.73-36.69 ppm aralığında gözlenmiştir.

5.4. Antikanser Aktivite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Sentezlenen hidrazon türevlerinin (**3a-3j**) anti-kanser aktivitesi, mide kanseri hücre dizilerine (SNU1, AGS) karşı test edilmiştir. Bileşiklerin sağlıklı hücrelerdeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla sağlıklı fare fibroblast hücre hattı (L929) kullanılmıştır. Sisplatin standart ilaç olarak kullanılmıştır. 3c Kodlu bileşiğin 54,10±1,72 ve 44,51±1,80 μM IC₅₀ değerleri ile her iki mide kanseri hücre hattına karşı referans ilaçtan daha etkili olduğu bulunmuştur. 3c Bileşiğinin sağlıklı hücrelerdeki IC₅₀ değerinin daha yüksek olması (81,48±1,70 μM) bileşiklerin kanser hücrelerine karşı daha etkili olduğunu göstermektedir. Antikanser aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, **3j** bileşiğinin yine her iki mide kanser hücre hattına karşı 75,85±0,90 ve 50,15±1,12 μM IC₅₀ değerleri ile sisplatinden daha etkili olduğu bulunmuştur. Ancak **3j** kodlu bileşiğin sağlıklı hücre hattı üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde bileşiğin sitotoksik olduğu dikkat çekmektedir.

Tablo 5.1. Bileşiklerin SNU1, AGS ve L929 hücre dizilerine ait IC₅₀ değerleri (μM)

Bileşik	SNU1	AGS	L929
3a	>100	>100	>100
3b	85,11±2,17	>100	>100
3c	54,10±1,72	44,51±1,80	81,48±1,70
3d	>100	>100	>100
3e	>100	>100	>100
3f	75,11±2,79	95,99±3,08	>100
3g	92,22±2,34	>100	>100
3h	>100	>100	>100
3i	>100	>100	97,87±3,31
3j	75,85±0,90	50,15±1,12	15,47±1,30
Sisplatin	84,80±3,31	91,85±2,24	>100

5.5. Antibakteriyel Aktivite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Sentezlenen bileşiklerin (3a-3j) *H. Pylori*'ye karşı minimum inhibitör konsantrasyonu ve minimum bakterisidal konsantrasyonu belirlenmiştir. Testin gerçekleştirilmesi için artan şekilde bileşiklerin farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Antibakteriyel tahlilin sonuçları, tüm bileşikler (3a-3j) için orta derecede tatmin edici sonuçlar göstermiştir. Özellikle iki bileşik 3c ve 3d için sırasıyla MIC değeri 4 ve 8 ve MBC değeri 8 ve 16 µg/mL ile güçlü antibakteriyel potansiyel göstermiştir. Diğer tüm bileşikler (3a, 3b, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i ve 3j), 16 µg/mL MIC değerleri ve 32 µg/mL MBC değerleri göstermiştir.

Tablo 5.2. Bileşiklerin (3a-3j) *H. pylori*'ye karşı MIC ve MBK değerleri (µg/mL)

Microorganism	<i>Helikobakter pylori</i>	
Bileşik (µg/mL)	MIC	MBC
3a	16	32
3b	16	32
3c	4	8
3d	8	16
3e	16	32
3f	16	32
3g	16	32
3h	16	32
3i	16	32
3j	16	32

5.6. Üreaz İnhibisyon Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Sentezlenen bileşiklerin (3a-3j) üreaz enzimi üzerinde inhibitor aktivitesi incelenmiştir. Standard bileşik olarak tiyoüre kullanılmıştır. **Tablo 5.3**'te görüldüğü üzere seride bulunan 3c ve 3j bileşikleri sırasıyla $9,813 \pm 0,403$ ve $11,407 \pm 0,393$ µg/mL IC_{50} değerleri ile üreaz enzimine karşı standard bileşikten ($IC_{50} = 13,428 \pm 0,587$ µg/mL) daha yüksek inhibitör aktivite göstermiştir. 3b ($IC_{50} = 19,451 \pm 0,963$ µg/mL), 3e ($IC_{50} = 18,609 \pm 2,119$ µg/mL), 3f ($IC_{50} = 18,055 \pm 0,569$ µg/mL) ve 3i ($IC_{50} = 15,807 \pm 0,988$ µg/mL) bileşiklerinin ise standard bileşik ile kıyaslanabilir düzeyde inhibitor potansiyele sahip olduğunu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, seri içerisinde kimyasal yapısında 5-nitrotiyofen halkası (3c) ve 5-metiltiyofen halkası (3j) taşıyan bileşiklerin aktivitesi diğer türevlere göre daha yüksek çıkmıştır. Kimyasal yapısında piridin halkası taşıyan türevler

içinde (3g, 3h, 3i) en yüksek aktivite ise piridin halkasının 4. konumundan sübsitüe olduğu türev (3i) bulunmuştur. Pirol halkası taşıyan türevlerin (3e ve 3f) üreaz inhibitor aktivitesinin çok benzer olduğu tespit edilmiştir. Furan halkası taşıyan türevlerin (3a, 3d) ise seri içinde en düşük aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Tablo 5.3. Bileşiklerin Üreaz İnhibisyon Aktivitesi (3a-3j)

Bileşik	IC ₅₀ ((µg/mL)
3a	68,220±1,309
3b	19,451±0,963
3c	9,813±0,403
3d	43,408±1,097
3e	18,609±2,119
3f	18,055±0,569
3g	27,607±1,366
3h	34,508±2,011
3i	15,807±0,988
3j	11,407±0,393
Tiyoüre	13,428±0,587

5.7. Moleküler Doking

Bu moleküler yerleştirme çalışması, anti-ülser terapötiklerinin geliştirilmesinde önemli bir hedef olan üreaz enzimi ile bileşiklerin inhibitör etkileşim mekanizmalarını araştırmayı amaçladı. Spesifik olarak bileşikler **3c** ve **3j**, üreazın aktif bölgesi içindeki bağlanma etkinliklerini ve etkileşim profillerini belirlemek için hesaplamalı olarak analiz edildi.

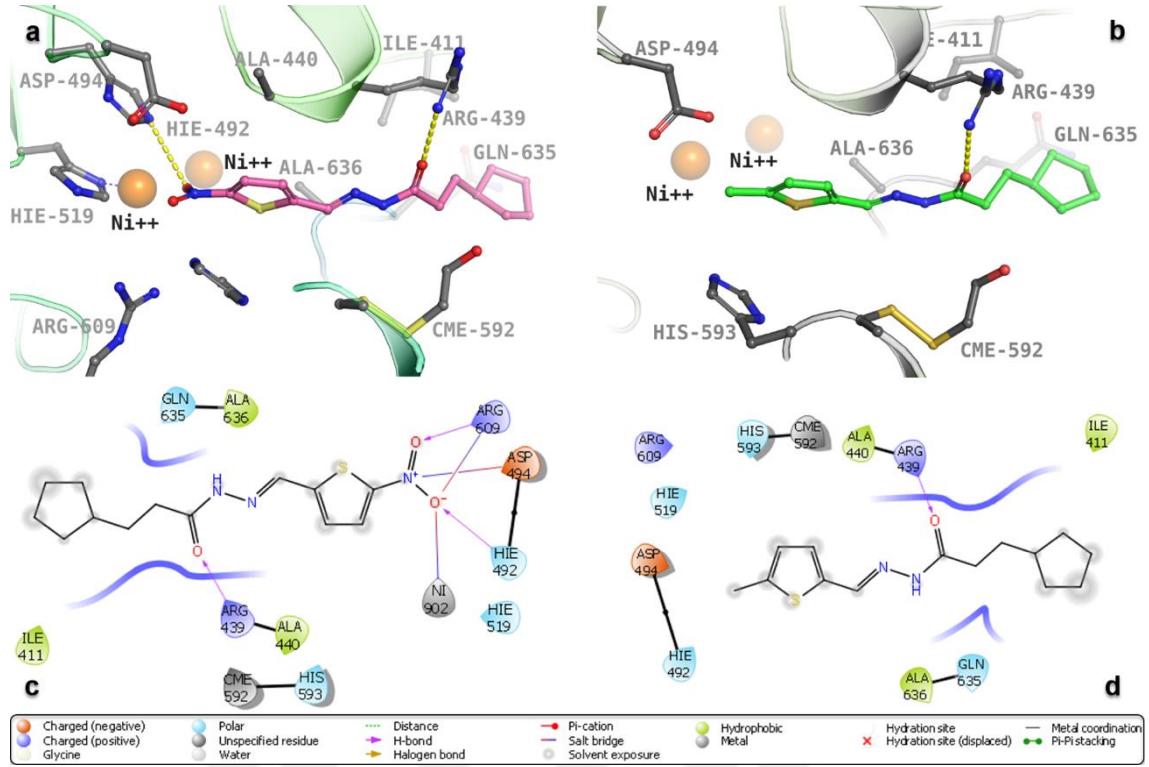
Şekil 5.34'de gösterilen kenetlenme sonuçları, 3c (a ve c) ve 3j (b ve de) bileşikleri tarafından üreaz aktif bölgesindeki kritik kalıntılarla oluşturulan ayırt edici moleküler etkileşimleri göstermektedir. Bileşik 3c, karbonil oksijeni yoluyla Arg439 kalıntısıyla bir hidrojen bağı kurar; bu, enzimin bağlanma cebi içinde önemli bir stabilize edici etkileşime işaret eder. Ligandın nitro grubu, aktif bölgenin Ni⁺⁺ iyonu ile bir tuz köprüsü oluşturur ve bu, bileşiğin inhibitör mekanizması için önemli olabilir. Ek olarak ligand, Arg609 ile iki dişli etkileşime girerek hem bir hidrojen bağı hem de bir tuz köprüsü oluşturur, bu da bağlanma stabilitesini ve afinitesini önemli ölçüde artırır.

Buna karşılık bileşik **3j**, **3c**'ye benzer şekilde yalnızca Arg439 ile hidrojen bağı korur. Bu, ligandın enzimatik boşluk içindeki başlangıç oryantasyonu için gerekli olan önemli bir etkileşimi göstermektedir. Ancak **3j**, **3c**'de gözlemlenen Arg609 ile iki dışlı etkileşime sahip değildir ve Ni^{++} iyonu ile başka herhangi bir ek etkileşime girmez. Bileşik **3c** ve **3j** arasındaki kenetlenme puanlarında gözlenen fark muhtemelen tamamlayıcı stabilize edici etkileşimlerdeki eksiklikten kaynaklanmaktadır. Bu, kenetlenme enerjisini ölçen Glide gscore'unun da doğruladığı gibi, **3c**'yi daha uygun bir bağlayıcı haline getiriyor.

Bileşik **3c**, bileşik **3j**'nin -3.78 kcal/mol'lük skoruna kıyasla -4.48 kcal/mol'lük bir gscore ile üstün bir bağlanma afinitesi sergiler. gscore, hidrojen bağları, tuz köprüleri ve hidrofobik temaslar gibi çeşitli etkileşim enerjilerinin bir birleşimidir. Daha yüksek bir gscore, daha stabil bir ligand-enzim kompleksini gösterir. **3j**'nin daha düşük gskoru, etkileşim haritasında ek hidrojen bağlarının veya tuz köprülerinin bulunmamasından kaynaklanıyor olabilir.

Yerleştirme etkileşimlerinin analizi, bağlanma afinitesinin modüle edilmesinde her kovalent olmayan etkileşimin önemini vurgulamaktadır. Bileşik **3c**, karmaşık etkileşim ağı nedeniyle bir üreaz inhibitörü için umut verici bir adaydır. Öte yandan, bileşik **3j** iyi bir bağlanma afinitesi sergiler, ancak daha olumlu etkileşimlere girebilecek ek fonksiyonel grupların eklenmesi için yapısal optimizasyon gerekli olabilir.

Özetle, moleküler yerleştirme çalışmaları, üreaz inhibitörlerinin stabilitesi ve özgülüğünün belirlenmesinde kovalent olmayan etkileşimlerin kritik rolüne ışık tutmaktadır. Etkileşim profillerinden elde edilen bilgiler, daha güçlü inhibitörlerin rasyonel tasarımı için stratejik bir temel sağlar. Yerleştirme sonuçlarından elde edilen bu tür modifikasyonlar bağlanma afinitelerini arttırabilir ve üreazı hedef alan daha etkili terapötik ajanların geliştirilmesine yol açabilir.



Şekil 5.34. Üreazın (a) Arg439, Hie492, Arg609 ile hidrojen bağlarını ve Arg609 ve Ni++ ile tuz köprüsünü gösteren bileşik **3c** ve (b) Arg439 ile bir hidrojen bağı oluşturan bileşik **3j** ile bağlanma etkileşimlerini görüntüler. Sırasıyla (c) **3c** ve (d) **3j** için 2 boyutlu etkileşim haritaları. (PDB Kimliği: 4H9M).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında başlangıç materyali olarak 3-siklopentilpropanoik asitten hareketle 10 yeni hidrazon türevi sentezlenmiştir. Başarılı sentezin ardından bileşiklerin kimyasal yapısı ^1H NMR, ^{13}C NMR spektroskopik yöntemleri kullanılarak aydınlatılmıştır. Hidrazon yapısı, anti-üreaz bileşikleri olarak umut verici aktivite sağlamaktadır. Böylece yeni sentezlenen hidrazon bileşiklerinin *H. Pylori*'ye karşı antibakteriyel aktivitesi ve farklı mide kanseri hücre hatlarına (SNU1, AGS) karşı antikanser etkileri belirlenmiştir. Bileşiklerden **3c** ve **3j** SNU1, AGS hücrelerine karşı en yüksek inhibitör aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde yine **3c** ve **3j** bileşikleri pozitif control tiyoüreye göre yüksek antiüreaz aktivitesi elde edilmiştir. Bileşiklerin *H. pilori*'ye karşı antibakteriyel etkileri değerlendirildiğinde, **3c** ve **3d** kodlu bileşiklerin seri içerisinde en yüksek etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Bileşiklerin yapı-etki ilişkisi incelendiğinde, CH_3 ve NO_2 gruplarının tiyofen halkasının 5. konumunda bulunmasının bileşiklerin antiproliferatif etkisini arttırdığını ortaya koymaktadır. Özellikle üç aktivite sonuçları göz önüne alındığında, **3c** kodlu bileşiğin her üç aktivitede ön plana çıktığı görülmektedir. **3c** bileşiğinin yapısında tiyofen halkasının 5. konumunda güçlü electron çekici grup olan nitro grubu yer almaktadır. Çalışmanın sonuçları, gelecekte yan zincirler olarak elektron çeken gruplara sahip olan hidrazon türevlerinin, mide kanseri için antikanser ajanları olarak daha ileri araştırmalar için potansiyel bir hedef alan olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Ghouri, Y.A. I. Mian, and J.H. (2017). Rowe, Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J. Carcinog.*, 16.
- [2] Popiołek, Ł., Gawrońska-Grzywacz, M., Berecka-Rycerz, A., Paruch, K., Piątkowska-Chmiel, I., Natowska-Chomicka, D., Herbet, M., Gumieniczek, A., Dudka, J., Wujec, M. (2020). New benzenesulphonohydrazide derivatives as potential antitumour agents. *Oncol. Lett.*, 20(5), 1-1.
- [3] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.*, 71(3), 209-249.
- [4] Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Pineros, A.Z., Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer.*, 144(8), 1941-1953.
- [5] Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2018). Global cancer observatory: cancer today. *Lyon, France: IARC.*, 3(20), 2019.
- [6] Plummer, M., Franceschi, S., Vignat, J., Forman, D., & de Martel, C. (2015). Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int. J. Cancer.*, 136(2), 487-490.
- [7] Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.*, 61(2), 69-90.
- [8] Hooi, J. K., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M. M., Underwood, F. E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D.Y., Wong, V.W.S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., Kaplan, G.G., Ng, S. C. (2017). Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology.*, 153(2), 420-429.
- [9] Peleteiro, B., Bastos, A., Ferro, A., & Lunet, N. (2014). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. *Dig. Dis. Sci.*, 59, 1698-1709.
- [10] Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.*, 55(2), 74-108.
- [11] Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., Falush, D., Stamer, C., Prugnolle F., van der Merwe, S.W., Yamaoka, Y., Graham, D.Y., Perez-Trallero, E., Wadstrom, T., Suerbaum, S., Achtman, M. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature.*, 445(7130), 915-918.

- [12] Marshall, B. and Warren, J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The lancet.*, 323(8390), 1311-1315.
- [13] Marshall, B.J. and Warren, J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.*, 1(8390), 1311-5.
- [14] Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Kiyomi Taniyama, M.D., Naomi Sasaki, M.D., Schlemper, M.D. (2001). Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N. Engl. J. Med.*, 345(11), 784-789.
- [15] Correa, P., (1988). A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res.*, 48(13), 3554-3560.
- [16] Peek Jr, R.M. and Crabtree, J.E. (2006). Helicobacter infection and gastric neoplasia. *J. Pathol.*, 208(2), 233-248.
- [17] Al-Salem, H. S., Arifuzzaman, M., Issa, I. S., & Rahman, A. M. (2021). Isatin-hydrazones with multiple Receptor Tyrosine Kinases (RTKs) inhibitory activity and in-silico binding mechanism. *Appl. Sci.*, 11(9), 3746.
- [18] Abdelrhman, E. M., El-Shetary, B. A., Shebl, M., & Adly, O. M. (2021). Coordinating behavior of hydrazone ligand bearing chromone moiety towards Cu (II) ions: Synthesis, spectral, density functional theory (DFT) calculations, antitumor, and docking studies. *Appl. Organomet. Chem.*, 35(5), e6183.
- [19] Guimaraes, D. G., de Assis Gonsalves, A., Rolim, L. A., Araújo, E. C., dos Anjos, S., Laysna, V., Araújo, C. R. M. (2021). Naphthoquinone-based hydrazone hybrids: Synthesis and potent activity against cancer cell lines. *Med. Chem.*, 17(9), 945-955.
- [20] Liu, B., Liu, H., Zhang, H., Di, Q., & Zhang, H. (2020). Crystal engineering of a hydrazone molecule toward high elasticity and bright luminescence. *J. Phys. Chem. Lett.*, 11(21), 9178-9183.
- [21] Lazny, R. and A. Nodzevska, (2010). N, N-dialkylhydrazones in organic synthesis. From simple N, N-dimethylhydrazones to supported chiral auxiliaries. *Chem. rev.*, 110(3), 1386-1434.
- [22] Belskaya, N.P., Dehaen, W. and Bakulev, V.A. (2010). Synthesis and properties of hydrazones bearing amide, thioamide and amidine functions. *Arkivoc.*, 2010, 275-332.
- [23] Rollas, S. and Ş. Güniz Küçükgülzel, (2007). Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules.*, 12(8), 1910-1939.
- [24] Cornelissen, J. P., Van Diemen, J. H., Groeneveld, L. R., Haasnoot, J. G., Spek, A. L., & Reedijk, J. (1992). Synthesis and properties of isostructural transition-metal (copper, nickel, cobalt, and iron) compounds with 7, 7', 8, 8'-tetracyanoquinodimethanide (1-) in an unusual monodentate coordination mode:

- crystal structure of bis (3, 5-bis (pyridin-2-yl)-4-amino-1, 2, 4-triazole) bis (7, 7', 8, 8'-tetracyanoquinodimethanido) copper (II). *Inorg. Chem.*, 31(2), 198-202.
- [25] Mandewale, M. C., Patil, U. C., Shedge, S. V., Dappadwad, U. R., & Yamgar, R. S. (2017). A review on quinoline hydrazone derivatives as a new class of potent antitubercular and anticancer agents. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.*, 6(4), 354-361.
- [26] Morgan, E., Arnold, M., Camargo, M. C., Gini, A., Kunzmann, A. T., Matsuda, T., Soerjomataram, I. (2022). The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020–40: A population-based modelling study. *EClinicalMedicine.*, 47.
- [27] Blok, P., Craanen, M. E., Johan Offerhaus, G., Dekker, W., Kuipers, E. J., Meuwissen, S. G., & Tytgat, G. N. (1999). Molecular alterations in early gastric carcinomas: No apparent correlation with *Helicobacter pylori* status. *Am. J. Clin. Pathol.*, 111(2), 241-247.
- [28] Villako, K., Kekki, M., Maaroos, H. I., Sipponen, P., Uibo, R., Tammur, R., & Tamm, A. (1991). Chronic gastritis: progression of inflammation and atrophy in a six-year endoscopic follow-up of a random sample of 142 Estonian urban subjects. *Scand. J. Gastroenterol.*, 26(sup186), 135-141.
- [29] Ernst, P.B. and Gold, B.D. (2000). The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54(1): p. 615-640.
- [30] Lee, J. Y., Gong, E. J., Chung, E. J., Park, H. W., Bae, S. E., Kim, E. H., Kim, J., Do, Y.S., Kim, T.H., Chang, H.S., Song, H.J., Choe, J., Jung, H. Y. (2017). The characteristics and prognosis of diffuse-type early gastric cancer diagnosed during health check-ups. *Gut and liver.*, 11(6), 807.
- [31] Sycuro, L. K., Pincus, Z., Gutierrez, K. D., Biboy, J., Stern, C. A., Vollmer, W., & Salama, N. R. (2010). Peptidoglycan crosslinking relaxation promotes *Helicobacter pylori*'s helical shape and stomach colonization. *Cell.*, 141(5), 822-833.
- [32] Thamphiwatana, S., Gao, W., Obonyo, M., & Zhang, L. (2014). In vivo treatment of *Helicobacter pylori* infection with liposomal linolenic acid reduces colonization and ameliorates inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 111(49), 17600-17605.
- [33] Pormohammad, A., Mohtavinejad, N., Gholizadeh, P., Dabiri, H., Salimi Chirani, A., Hashemi, A., & Nasiri, M. J. (2019). Global estimate of gastric cancer in *Helicobacter pylori*-infected population: a systematic review and meta-analysis. *J. Cell. Physiol.*, 234(2), 1208-1218.
- [34] Testoni, P. A., Masci, E., Marchi, R., Guslandi, M., Ronchi, G., & Tittobello, A. (1987). Gastric cancer in chronic atrophic gastritis: associated gastric ulcer adds no further risk. *J. Clin. Gastroenterol.*, 9(3), 295-302.

- [35] Kao, C. Y., Sheu, B. S., & Wu, J. J. (2016). *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed. J.*, 39(1), 14-23.
- [36] Lina, T. T., Alzahrani, S., Gonzalez, J., Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., & Reyes, V. E. (2014). Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. *World J. Gastroenterol.*, 20(36), 12753.
- [37] Eaton, K. A., Brooks, C., Morgan, D. R., & Krakowka, S. (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.*, 59(7), 2470-2475.
- [38] Bauerfeind, P., Garner, R., Dunn, B. E., & Mobley, H. L. (1997). Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut.*, 40(1), 25-30.
- [39] Vimbela, G. V., Ngo, S. M., Frazee, C., Yang, L., & Stout, D. A. (2017). Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int. J. Nanomedicine.*, 3941-3965.
- [40] Salvatori, S., Marafini, I., Laudisi, F., Monteleone, G., & Stolfi, C. (2023). *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Pathogenetic Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.*, 24(3), 2895.
- [41] Weeks, D. L., Eskandari, S., Scott, D. R., & Sachs, G. (2000). A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Sci.*, 287(5452), 482-485.
- [42] Cover, T. L. (1996). The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbial.*, 20(2), 241-246.
- [43] Nilsson, C., Sillén, A., Eriksson, L., Strand, M. L., Enroth, H., Normark, S., Falk, P., Engstrand, L. (2003). Correlation between *cag* pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. *Infect. Immune.*, 71(11), 6573-6581.
- [44] Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., & Tschäpe, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbial.*, 23(6), 1089-1097.
- [45] Queiroz, D. M. M., Mendes, E. N., Rocha, G. A., Moura, S. B., Resende, L. M. H., Barbosa, A. J. A., Castro, L.P., Oliveira, C.A., & Lima, G. F. (1993). Effect of *Helicobacter pylori* eradication on antral gastrin-and somatostatin-immunoreactive cell density and gastrin and somatostatin concentrations. *Scand. J. Gastroenterol.*, 28(10), 858-864.
- [46] Magalhães Queiroz, D. M., & Luzzza, F. (2006). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.*, 11, 1-5.
- [47] Marcus, E. A., & Scott, D. R. (2001). Cell lysis is responsible for the appearance of extracellular urease in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.*, 6(2), 93-99.

- [48] Mobley, H. L. (1996). The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 10(Sup1), 57-64.
- [49] Dunn, B. E., & Phadnis, S. H. (1998). Structure, function and localization of *Helicobacter pylori* urease. *Yale J. Biol. Med.*, 71(2), 63.
- [50] Fan, X., Gunasena, H., Cheng, Z., Espejo, R., Crowe, S. E., Ernst, P. B., & Reyes, V. E. (2000). *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J. Immunol.*, 165(4), 1918-1924.
- [51] Beswick, E. J., Pinchuk, I. V., Minch, K., Suarez, G., Sierra, J. C., Yamaoka, Y., & Reyes, V. E. (2006). The *Helicobacter pylori* urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF- κ B activation and interleukin-8 production. *Infect. Immune.*, 74(2), 1148-1155.
- [52] EJ, B. (2005). *Helicobacter pylori* binds to CD74 on gastric epithelial cells and stimulates interleukin-8 production. *Infect. Immun.*, 73, 2736-2743.
- [53] Valenzuela-Valderrama, M., Cerda-Opazo, P., Backert, S., González, M. F., Carrasco-Véliz, N., Jorquera-Cordero, C., Wehinger, S., Canales, J., Bravo, D., & Quest, A. F. (2019). The *Helicobacter pylori* urease virulence factor is required for the induction of hypoxia-induced factor-1 α in gastric cells. *Cancers.*, 11(6), 799.
- [54] Kitajima, Y. and Miyazaki, K. (2013). The critical impact of HIF-1 α on gastric cancer biology. *Cancers.*, 5(1), 15-26.
- [55] Goda, N., Ryan, H. E., Khadivi, B., McNulty, W., Rickert, R. C., & Johnson, R. S. (2003). Hypoxia-inducible factor 1 α is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol. Cell. Biol.*, 23(1), 359-369.
- [56] Mollazadeh, M., Azizian, H., Fakhriolaei, A., Iraj, A., Avizheh, L., Valizadeh, Y., Zomoradian, K., Elahi, F., Moazzam, H., Kazemzadeh, H., Amanlou, M., Garmciri, F., Hamidian, E., Biglar, M., Larijani, B., & Mahdavi, M. (2023). Different barbiturate derivatives linked to aryl hydrazone moieties as urease inhibitors; design, synthesis, urease inhibitory evaluations, and molecular dynamic simulations. *Med. Chem. Res.*, 32(5), 930-943.
- [57] Ahmad, S., Khan, M., Shah, M. I. A., Ali, M., Alam, A., Riaz, M., & Khan, K. M. (2022). Synthetic Transformation of 2-{2-Fluoro [1, 1'-biphenyl]-4-yl} Propanoic Acid into Hydrazide-Hydrazone Derivatives: In Vitro Urease Inhibition and In Silico Study. *ACS omega.*, 7(49), 45077-45087.
- [58] Al-Mohammadi, J. A., Taha, M., Rahim, F., Hussain, R., Farooq, R. K., Wadood, A., Nawaz M., Salahuddin, M., Khan, K.M., Uddin, N. (2022). Synthesis, in vitro evaluation, and molecular docking studies of benzofuran based hydrazone a new inhibitors of urease. *Arab. J. Chem.*, 15(8), 103954.
- [59] Baltaş, N. (2022). Synthesis of quinazolinone derivatives containing an acyl hydrazone skeleton as potent anti-urease agents enzyme kinetic studies and anti-oxidant properties. *J. Chem. Res.*, 46(3), 17475198221096568.

- [60] Shehzad, M. T., Khan, A., Islam, M., Halim, S. A., Khiat, M., Anwar, M. U., Hussain, J., Hameed, A., Pasha, A.R., Khan, F.A., Al-Harrasi, A., & Shafiq, Z. (2020). Synthesis, characterization and molecular docking of some novel hydrazonothiazolines as urease inhibitors. *Bioorg. Chem.*, 94, 103404.
- [61] Akyüz, G., Beriş, F. Ş., Kahveci, B., & Menteşe, E. (2019). Synthesis of novel 2, 3-disubstituted quinazolin-4 (3H)-one derivatives containing hydrazone skeleton as potent urease inhibitors and their antimicrobial activities. *J. Heterocyc. Chem.*, 56(11), 3065-3072.
- [62] Menteşe, E. and B.B. Sökmen, (2019). Synthesis and In Vitro Urease Inhibition of Some Novel Benzimidazole-based Hydrazones. *J. Heterocyc. Chem.*, 56(9), 2442-2448.
- [63] Khan, M., Ahad, G., Manaf, A., Naz, R., Hussain, S. R., Deebe, F., Shah, S., Khan, A., Ali, M., Zman, K., Zafar, S., Salar, U., Hameed, A., & Khan, K. M. (2019). Synthesis, in vitro urease inhibitory activity, and molecular docking studies of (perfluorophenyl) hydrazone derivatives. *Med. Chem. Res.*, 28, 873-883.
- [64] Scavenging, D.R. (2015). Synthesis of benzophenone hydrazone analogs and their DPPH radical scavenging and urease inhibitory activities. *J. Chem. Soc. Pak.*, 37(03), 479.
- [65] Uzgören Baran, A. (2013). Comparative study of microwave-assisted and conventional synthesis of ibuprofen-based acyl hydrazone derivatives. *Turk. J. Chem.*, 37 (6), 927-935.
- [66] Khalili Ghomi, M., Noori, M., Nazari Montazer, M., Zomorodian, K., Dastyafteh, N., Yazdanpanah, S., Mahdavi, M. (2023). [1, 2, 4] triazolo [3, 4-b][1, 3, 4] thiadiazole derivatives as new therapeutic candidates against urease positive microorganisms: design, synthesis, pharmacological evaluations, and in silico studies. *Sci. Rep.*, 13(1), 10136.
- [67] Mollazadeh, M., Azizian, H., Fakhrioliaei, A., Iraj, A., Avizheh, L., Valizadeh, Y., Mahdavi, M. (2023). Different barbiturate derivatives linked to aryl hydrazone moieties as urease inhibitors; design, synthesis, urease inhibitory evaluations, and molecular dynamic simulations. *Med. Chem. Res.*, 32(5), 930-943.
- [68] Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., & Banks, J. L. (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J. Med. Chem.*, 47(7), 1750-1759.