**T.C.**
**DİCLE ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# BİS-AZOT HARDALI İÇEREN POTANSİYEL ANTİKANSER HİBRİT MOLEKÜLLERİN DİZAYNI, SENTEZİ VE DNA'YA BAĞLANMA İLGİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Hayrettin DİNÇ**

**DOKTORA TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DİYARBAKIR**
**KASIM 2017**

**T.C.**
**DİCLE ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# BİS-AZOT HARDALI İÇEREN POTANSİYEL ANTİKANSER HİBRİT MOLEKÜLLERİN DİZAYNI, SENTEZİ VE DNA'YA BAĞLANMA İLGİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Hayrettin DİNÇ**

**DOKTORA TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DİYARBAKIR**
**KASIM 2017**

T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Hayrettin DİNÇ tarafından yapılan"Bis-Azot Hardalı İçeren Potansiyel AntikanserHibrit Moleküllerin Dizaynı, Sentezi ve DNA'ya Bağlanma İlgilerinin Araştırılması" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından KİMYAAnabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

ÜnvanıAdı Soyadı

Başkan:Prof. Dr. M. Çetin AYTEKİN

Üye: Prof. Dr. Göksel KIZIL

Üye: Doç. Dr. Veysel TOLAN

Üye :Doç. Dr. Tarık ARAL

Üye :Yrd. Doç. Dr. Selami ERCAN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 27/11/2017

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../201..

Doç.Dr. Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

( MÜHÜR )

# TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans ve Doktora eğitimim boyunca danışmanlığımı yapan, düzgün ve son derece kaliteli bilimsel kimliği ve kişiliği ile gerek ders aşamasında gerekse tez çalışmalarım sırasında sınırsız desteği ile her türlü bilgi birikiminden yararlandığım ve hayat boyu kullanacağım bilimsel tecrübeler edindiğim değerli hocam Prof. Dr. Murat KIZIL'a sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Çetin AYTEKİN'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında güler yüzü ve pozitif enerjisi ile desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Göksel KIZIL'a teşekkürlerimi sunarım.

Biyoorganik kimya çalışma grubunda bulunan arkadaşlarım Dr. Bircan ÇEKEN, Dr. Sevil EMEN, Dr. Sevcan ALTAŞ, Nesrin İNCEÖREN ve Feryal AKAY'ya yardım ve desteklerini esirgemedikleri için teşekkür ederim.

2016-2017 yılı arasında Missouri (Columbia, Missouri, amerika) üniversitesindeki çalışmalarımı eksiksiz yapmamda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Kent S. GATES'e sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca onun araştırma grubunda bulunan tüm arkadaşlara özellikle deneysel çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen Maryam Imani Nejad'a sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Tez çalışmam sırasında her türlü destekte bulanan değerli dostum Süleyman ÖZAKIN, Bülent BALİ ve Murat AZİZOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ev arkadaşım değerli dostum Ekrem KUM'a desteklerinden dolayı ona teşekkür ederim.

Bu çalışmaya laboratuvar imkânı sağlayıp Biyoorganik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nın kurulmasında yardımcı olan Fen Fakültesi Dekanlığı'na teşekkür ederim.

Tez savunma sınavı jürisinde bulunan Doç. Dr. Veysel TOLAN, Doç. Dr. Tarık ARAL ve Yrd. Doç. Dr. Selami ERCAN hocalarıma katkılarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

2015 Yılı 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı 1. Dönem başvurumu kabul eden ve bana bir yıl boyunca Amerika'da tez çalışmalarımı yapma şansı verdiği için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı DÜBAP'a teşekkür ederim.

Hayatımın her evresinde bana duydukları güven ve sonsuz desteklerini esirgemeyen çok değerli aileme ve dostlarıma teşekkür ederim.

Ve yine hayatı boyunca beni güzel yerlerde hayal eden değeri tarifsiz merhum ANNEMİ rahmetle anıp bu çalışmayı ona ve tüm yitirdiklerime adıyorum.

# İÇİNDEKİLER


| | | Sayfa |
|---|---|---|
| **TEŞEKKÜR** | | I |
| **İÇİNDEKİLER** | | II |
| **ÖZET** | | V |
| **ABSTRACT** | | VI |
| **ÇİZELGE LİSTESİ** | | VIII |
| **ŞEKİL LİSTESİ** | | IX |
| **EK LİSTESİ** | | XI |
| **KISALTMA VE SİMGELER** | | XII |
| **1.** | **GİRİŞ** | 1 |
| 1.1. | Kanser | 1 |
| 1.2. | Kemoterapi Tarihi | 2 |
| 1.3. | DNA Hasarının Önemi | 5 |
| 1.4. | Küçük Moleküller ve DNA ile Etkileşimleri | 5 |
| 1.5. | Kovalent Olmayan Etkileşim | 6 |
| 1.5.1. | İnterkalasyon | 6 |
| 1.5.2. | Oluklara Bağlanma | 8 |
| 1.5.3. | Elektrostatik Etkileşim | 9 |
| 1.6. | Kovalent Etkileşim | 10 |
| 1.6.1. | Alkilasyon | 10 |
| 1.6.2. | Bazı Radikallerin DNA ile Etkileşimi | 11 |
| 1.7. | Hardal Gazı | 13 |
| 1.8. | Azot Hardalının DNA'ya Bağlanma Mekanizması | 16 |
| 1.9. | Antitümör Antibiyotikler | 18 |
| 1.9.1. | Bleomisin | 18 |

| | | |
|---|---|---|
| 1.9.1.1. | FeII(BLM) Kompleksinin DNA Kesim Mekanizması…….. | 21 |
| 1.9.2. | Enediyen Antibiyotikler……. | 21 |
| 1.9.2.1. | Neokarzinostatin……. | 22 |
| 1.9.2.2. | Esperamicin ve Calicheamicin ……. | 23 |
| 1.9.2.3. | Dynemicin A……. | 25 |
| 1.9.3. | Enediyen Antibiyotiklerin DNA'yı Kesme Mekanizmaları……... | 25 |
| 1.9.4. | Leinamycin Antibiyotiği……. | 27 |
| 1.9.5. | Antibiyotiklerin DNA Kesimindeki Spesifikliği…… | 28 |
| 1.10. | Maxam-Gilbert Metodu…..……. | 28 |
| 1.11. | Tezin Amacı, Önemi ve Hedefleri……. | 29 |
| **2.** | **KAYNAK ÖZETLERİ**……. | 31 |
| **3.** | **MATERYAL VE METOT**…….. | 45 |
| 3.1. | Kullanılan Kimyasal Maddeler…….. | 45 |
| 3.2. | Kullanılan Aletler……... | 46 |
| 3.3. | Sentez Çalışmaları…….. | 46 |
| 3.3.1. | Bis-(4-(4-(bis(2-kloroetil)amino)fenil)bütanoat)-1,2-etandiil (HDL) Sentez Şeması……. | 46 |
| 3.3.2. | Bis-(4-(4-(bis-(2-kloroetil)amino)benzoat)-1,2-etandiil (HDS) Sentez Şeması……. | 47 |
| 3.4. | Plazmit DNA Kesim Çalışmaları……... | 48 |
| 3.4.1. | Agaroz Jel Elektroforezi Yöntemi ile DNA Kesim Çalışmaları…… | 49 |
| 3.5. | NBP (4-(*p*-nitrobenzil)piridin) ile Kimyasal Aktivite Çalışmaları……. | 50 |
| 3.6. | Mono-alkilasyon ve Çapraz Bağlanma Çalışmaları……... | 50 |
| **4.** | **ARAŞTIRMA BULGULARI**…….. | 53 |
| 4.1 | Sentez Çalışmaları…….. | 53 |
| 4.1.1. | 4-(bis(2-hidroksietil)amino)benzoat **(61)** Sentezi……..…… | 53 |
| 4.1.2. | 4-(bis(2-kloroetil)amino)benzoik asit **(62)** Sentezi……. | 53 |
| 4.1.3. | HDL (Bis(4-(4-(bis(2-kloroetil)amino)fenil)bütanoat)-1,2-etandiil) Sentezi…. | 54 |

4.1.4. HDS (Bis-(4-(4-(bis-(2-kloroetil)amino)benzoat)-1,2-etandiil) Sentezi…… 55

4.2. Plazmit DNA Kesim Çalışmaları…….. 56

4.2.1. HDL ve Klorambusil molekülünün DNA Kesim Koşulları ve Kesim Etkileri.. 57

4.3. NBP ile Kimyasal Aktivite Çalışmaları……. 59

4.4. Çapraz Bağlanma ve Mono-alkilasyon Çalışmaları……... 61

4.4.1. Maxam-Gilbert Yöntemi ile DNA'yı Alkilleme Kapasitesi…….. 61

4.4.2. Çapraz Bağlanma Aktivitesi……... 64

**5. TARTIŞMA VE SONUÇ**…… 67

**6. KAYNAKLAR**…….. 75

EKLER……. 85

ÖZGEÇMİŞ……..... 91

# ÖZET

BİS-AZOT HARDALI İÇEREN POTANSİYEL ANTİKANSER HİBRİT MOLEKÜLLERİN DİZAYNI, SENTEZİ VE DNA'YA BAĞLANMA İLGİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Hayrettin DİNÇ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2017

Günümüzde de kanser tedavisinde kullanılan azot hardalları, 1940'lı yıllarda malignan hastalıkların tedavisinde kullanıldığı rapor edilen en eski sentetik alkilleyici ajanlardır. Azot hardalları, I. Dünya savaşında kimyasal silah olarak kullanılan sülfür hardalının kimyasal modifikasyonu ile sentezlenmiştir. Azot hardalları DNA'yı guaninin N-7 pozisyonu üzerinden alkilleyen ve molekül içi/molekül dışı çapraz bağlanmalar yapan bifonksiyonel alkilleyici ajanlardır.

Azot hardalları, Hodking hastalığı, multipl miyelom, kolon kanseri, prostat kanseri ve meme kanseri gibi kanser hastalıklarının tedavilerinde önemli rol oynarlar. Mekloroetamin, Klorambusil, Melfalan gibi azot hardalları güçlü reaktif bileşiklerdir. Buna karşın azot hardalları kemoterapide genellikle başka bir ilaç ile birlikte kullanılır. Bu durum yeni ilaç keşfi yapan bilim insanların ilgisini çekmektedir. Azot hardallarının kanserli hücreler üzerindeki etkinliğini arttırmak için çalışmalar yapılmaktadır. Bunun yanı sıra bir takım bilim insanı da mevcut ilaçların etki mekanizmasını çalışmaktadırlar. Hedef ile ilacın etkileşme modunun bilinmesi daha etkili ilaç keşfi için önemlidir.

Bu tezde klinik olarak kullanılan azot hardallarının etkinliğini arttırmak ve etki mekanizması aydınlatmak için bir dizi çalışmalar yapıldı. Bu amaçla normal azot hardallardan farklı olarak iki başlı azot hardalı (Klorambusil) içeren HDL (tetra-alkilasyon kapasitesine sahip) molekülünün dizaynı ve sentezi yapıldı. Sonra HDL molekülün aktivitesi ve etki mekanizması araştırıldı. Plazmit DNA kesim çalışmaları, NBP (4-(*p*-nitrobenzil)piridin) ile kimyasal aktivite çalışmaları ve sentetik oligonükleoptit üzerindeki mono-alkilasyon ve/veya çapraz bağlanma çalışmaları yapıldı.

Bu deneyler sonucunda HDL molekülünün, plazmit DNA üzerinde kesim aktivitesine sahip olduğu, kimyasal aktivite çalışmalarında Klorambusil'den çok daha reaktif olduğu ve çapraz bağlanma çalışmalarında çoklu çapraz bağlanmalar yaptığı tespit edildi. Maxam-Gilbert yöntemi ile yapılan mono-alkilasyon çalışmalarında ise HDL molekülünün guanini alkillediği rapor edildi. Elde edilen veriler bis-azot hardalının (HDL) mono-azot hardalından kimyasal olarak daha reaktif olduğu ve bundan dolayı kemoterapik ajan olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Antikanser, DNA, Maxam-Gilbert, Alkilasyon, Azot Hardalları

## ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARECTERISETION OF POTENTIAL ANTI-CANCER BIS-NITROGEN MUSTARDS, AND DETERMINATION OF THEIR DNA BINGING ACTIVITY

Ph.D. THESIS

Hayrattin DİNÇ

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2017

Nitrogen mustards are the oldest synthetic alkylating agents that was reported to use in cancer treatment in 1940s that are still being used. They were synthesised by the modification of sulfur mustard which was used as a gas-weapon during World War I. They are bifunctional alkylating agents that alkylate to DNA on guanine site (N-7) and make cross-link between intra-strand and inter-strand.

They have great role for the treatment of hodgkin's disease multiple myeloma, colon cancer, prostate cancer and breast cancer. Nitrogen mustards as Mechloretamine, Chlorambucil, Melphalan are very reactive compunds. Notwithstanding, they are usually use with another co-drug on chemothrapy. This situation catches scientist's interest who search new agent. They are studying to increase effective of nitrogen mustards on cancer cells. Besides that most of scientist too are researching for mechanism of action of current agents. Knowledge of mode of action between target and agent is important to discovery of more effective agent.

In this thesis, a number of studies were conducted in order to increase effectiveness and to elucidating the mechanism of action of novel clinically nitrogen mustards. For this purpose, the HDL (with tetra-alkylation capacity) molecule containing two-headed nitrogen mustard (Chlorambucil) unlike normal nitrogen mustards were designed and synthesised. Then activity and the mechanism of action of HDL were investigated. Plasmid DNA cleavage studies, chemical activity with NBP (4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine) and mono-alkylation and/or cross-link on synthetic oligonucleotide was investigated.

As a result of these experiments, it was observed the HDL molecule was found to have plasmid DNA cleavage activity, and also were found to be much more reactive than chlorambucil in their chemical activity studies and cross-linked in cross-linking studies. In the mono-alkylation studies performed with the Maxam-Gilbert method. The guanine was found to

be alkylated with the HDL molecule. The obtained data indicate that bis-nitrogen mustard (HDL) is chemically more reactive than mono-nitrogen mustard. Therefore, it has been found to have potency to be used as a chemotherapeutic agent

**Key Words:** Anticancer, DNA, Maxam-Gilbert, Alkylation, Nitrogen Mustards

# ÇİZELGE LİSTESİ


| Tablo | | Sayfa |
|---|---|---|
| **1.1.** | Ewin Smith papirüsü el yazısı | 1 |
| **1.2.** | 1918 yılında hardal gazından etkilenen bir hastanın görüntüsü | 14 |
| **4.1.** | Deneyde kullanılan maddelerin total hacmi ve final konsantrasyonları | 56 |
| **4.2.** | HDL ve Klorambusil moleküllerinin DNA kesim koşulları ve etkileri (DNA (33 ng/mL), NaP (Sodyum Fosfat Tamponu) (50 mM), plazmit başına kırıklar (S)) | 59 |

# ŞEKİL LİSTESİ


| Şekil | | Sayfa |
|---|---|---|
| **1.1.** | Mekloroetaminin kimyasal yapısı | 2 |
| **1.2.** | Vinblastin ve Vinkristin yapısı | 3 |
| **1.3.** | Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların kronolojisi | 4 |
| **1.4.** | Aktinomisin D antibiyotiğinin yapısı | 6 |
| **1.5.** | Ligandın DNA ile interkalasyonu | 7 |
| **1.6.** | Bazı interkalatör türleri | 8 |
| **1.7.** | Ligandın oluklara bağlanması | 9 |
| **1.8.** | İyonun DNA dış yüzeyi ile elektrostatik etkileşimi | 9 |
| **1.9.** | DNA bazlarında ve şeker fosfat iskeletinde nükleofilik kısımlar | 10 |
| **1.10.** | Elektrofillerin DNA kesim mekanizması | 11 |
| **1.11.** | Bazı radikal türlerinin deoksiribozdan hidrojen koparma reaksiyon mekanizması | 12 |
| **1.12.** | Bazı önemli alkilleyici ajan türleri | 13 |
| **1.13.** | Hardal gazının yapısı | 14 |
| **1.14.** | Kemoterapide kullanılan ilaçların yapısı | 16 |
| **1.15.** | A) Azot hardalının çapraz bağlanması, B) Azot hardalının alkilasyon mekanizması | 17 |
| **1.16.** | Bleomisin türevleri ve etkin bölgeleri | 19 |
| **1.17.** | BLM' nin demir ve kobalt metali ile kompleksleri | 19 |
| **1.18.** | BLM'nin DNA kesim modellemesi | 20 |
| **1.19.** | FeII(BLM) kompleksinin DNA'yı kesme mekanizması | 21 |
| **1.20.** | Neokarzinostatin'in yapısı | 22 |
| **1.21.** | Neokarzinostatin'in tiyol ile aktivasyonu | 23 |
| **1.22.** | Esperamicin ve Calicheamicin antibiyotiklerinin yapıları | 24 |

| | | |
|---|---|---|
| **1.23.** | Dynemicin A antibiyotiğinin yapısı | 25 |
| **1.24.** | Antibiyotiklerin DNA'yı kesme mekanizmaları | 26 |
| **1.25.** | Leinamycin antibiyotiğinin moleküler yapısı | 27 |
| **1.26.** | Leinamycin antibiyotiğinin DNA'yı alkilleme mekanizması | 27 |
| **1.27.** | Maxam-Gilbert yöntemi ve akrilamid jel elektroforez şeması | 29 |
| **3.1.** | HDL molekülünün sentez şeması; a) Okzalil klorür, oda sıcaklığı, 30 dk., b) Etilen glikol, piridin, $CH_2Cl_2$, oda sıcaklığı, 8 saat | 46 |
| **3.2.** | HDS molekülünün sentez şeması a) etilen oksit, % 25 sulu asetik asit, oda sıcaklığı, 24 saat; b) (1) $SOCl_2$, benzen, refluks, 3 saat, (2) HCl (konsantre), refluks, 3 saat, c) Okzalil klorür, oda sıcaklığı, 30 dk., d) etilen glikol, piridin, $CH_2Cl_2$, oda sıcaklığı, 8 saat | 47 |
| **3.3.** | Plazmit DNA formları ve yatay agaroz jel elektroforezi | 49 |
| **3.4.** | Bir elektrofilin NBP ile reaksiyonu | 50 |
| **3.5.** | HDL molekülünün uzunluğu ve buna göre dizyn edilen oligonükleotitler | 51 |
| **4.1.** | DNA kesim çalışması sonucu oluşan plazmit başına kırıkları (S) | 58 |
| **4.2.** | HDL ve klorambusil molekülünün NBP ile alkilasyon mekanizması | 60 |
| **4.3.** | HDL ve Klorambusil (CHL) molekülünün NBP ile oluşturdukları moleküllerin (65 ve 66) absorbans grafiği | 60 |
| **4.4.** | HDL molekülünün Maxam-Gilbert yöntemi ile DNA dubleks A'yı alkillme kapasitesi jel fotoğrafı | 62 |
| **4.5.** | HDL molekülünün Maxam-Gilbert yöntemi ile DNA dubleks B'yi alkillme kapasitesi jel fotoğrafı | 63 |
| **4.6.** | Klorambusil ve HDL molekülünün DNA dubleks A'ya çapraz bağlanma jel fotoğrafı | 64 |
| **4.7.** | Klorambusil ve HDL molekülünün DNA dubleks B'ye çapraz bağlanma jel fotoğrafı | 65 |
| **5.1.** | Azot hardallarının Olası alkilasyon yolakları | 68 |
| **5.2.** | DMEDA ile abazik **(5)** molekülün reaksiyonu sonucu DNA şeker-fosfat iskeletinin tamamıyla kırılma mekanizması | 70 |
| **5.3.** | HDL molekülünün DNA üzerindeki etkisinin agaroz jeldeki gösterimi | 71 |
| **5.4.** | Mekloroataminin mono ve bis alkilasyonu sonucu oluşan abazik bölge mekanizması | 73 |
| **5.5.** | Abazik bölge ile adeninin (dA) çapraz bağlanma mekanizması | 74 |

# EK LİSTESİ


| Ek | | Sayfa |
|---|---|---|
| **1.** | 4-(bis(2-hidroksietil)amino)benzoat'ın **(61)** $^{1}$H-NMR Spekturumu | 85 |
| **2.** | 4-(bis(2-hidroksietil)amino)benzoat'ın **(61)** $^{13}$C-NMR Spekturumu | 86 |
| **3.** | 4-(bis(2-kloroetil)amino)benzoik asit'in **(62)** $^{1}$H-NMR Spekturumu | 87 |
| **4.** | 4-(bis(2-kloroetil)amino)benzoik asit'in **(62)** $^{13}$C-NMR Spekturumu | 88 |
| **5.** | HDL (Bis(4-(4-(bis(2-kloroetil)amino)fenil)bütanoat)-1,2-etandiil) in $^{1}$H-NMR Spekturumu | 89 |
| **6.** | HDL (Bis(4-(4-(bis(2-kloroetil)amino)fenil)bütanoat)-1,2-etandiil) in$^{13}$C-NMR Spekturumu | 90 |
| **7.** | HDL (Bis(4-(4-(bis(2-kloroetil)amino)fenil)bütanoat)-1,2-etandiil) in HDMS Spekturumu | 91 |

## KISALTMA VE SİMGELER

**BLM** : Bleomycin antibiyotiği

**DMF** : N,N-Dimetil formamid

**DMSO** : Dimetil sülfoksit

**DNA** : Deoksiribonükleik asit

**RNA** : Ribonükleik asit

**ESR** : Elektron spin rezonans

**HPLC** : Yüksek basınçlı sıvı kromotografisi

**MTT** : Microculture tetrazolium salt

**NADPH** : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

**NMR** : Nükleer manyetik rezonans

**UV-visible** : Ultraviyole-görünür spektrofotometre

**MÖ** : Milattan Önce

**$S_N1$** : Nükleoflik yerdeğiştirme reaksiyonu (I)

**$S_N2$** : Nükleoflik yerdeğiştirme reaksiyonu (II)

***O*** : *Orto*

***M*** : *meta*

***P*** : *para*

**NBP** : 4-(*p*-nitrobenzil)piridin

**HDMS** : Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi

**HDL** : Bis-(4-(4-(bis(2-chloroethyl)amino)phenyl)butanoat)-1,2-ethanediyl

**HDS** : (Bis-(4-(4-(bis-(2-kloroetil)amino)benzoat)-1,2-etandiil

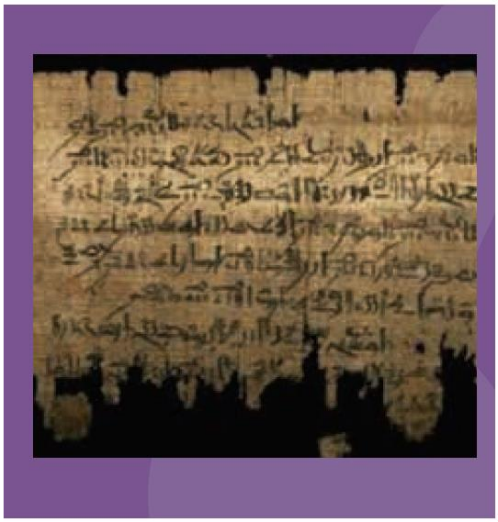
**BLM** : Bleomisin

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Kanser

Tarih öncesi zamanlardan beri insanları etkileyen kanser, artan yaşlı nüfus ile uyumlu olarak ve son yarım yüzyılda tüketim ve çevresel ürünlerdeki karsonojen maddelerin varlığında, genel nüfusun sağlığını tehdit eden tedavisi güç bir hastalıktır.

Kayda değer en eski kanser belirtileri, tarih öncesinden kalan insan kemiği ve dinazor fosillerinde rastlanılmaktadır. Kayıt altına alınan ilk kanser vakaları (sekiz meme kanseri vakası) ise MÖ 16. yy da ya da daha öncesinde, Ewin Smith papirüsü olarak adlandırılan mısır papirüs el yazılarında görülmektedir (Çizelge 1.1.) (Faguet 2014).



**Çizelge 1.1.** Ewin Smith papirüsü el yazısı

Bu el yazmalarında kanser tedavisine yönelik yaklaşımlar bulunmaktadır. Bunlar; ameliyat ile tedavi, farmakolojik tedavi ve büyü ile yapılan tedavilerdir. Diğer el yazmalarında ise gerçek tümör tedavisinin olmadığı da yazılmaktadır (Faguet 2014), (Gronning 2015).

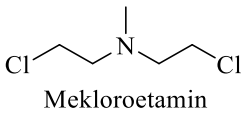
Daha sonraları Yunanlı doktor Hipokrat (MÖ 460-370) deri, meme, mide, sörviks ve rektum olmak üzere çeşitli kanser vakalarına dair birçok detaylı tanımlamalar yapmıştır. Dr. Hipokrat aynı zamanda kanserin erken evresi ve diğereri için yaklaşımlarda bulunmuş ve erken kanser evresi için ‘‘dağlama’’ ve çeşitli krem

tedavileri uygulamıştır. Bunun yanı sıra ‘‘Kanser’’ terimi ilk defa Dr. Hipokrat tarafından dile getirilmiştir. Buradan anlaşılan kanser hastalığının aslında yeni bir hastalık olmadığı tarih öncesinden beri süre gelen belirli zamanlarda çeşitli tanımlamalar ve tedaviler önerildiği bir hastalıktır (Faguet 2014), (Gronning 2015).

Dünya sağlık örgütünün tanımlamasına göre kanser: Lokal olarak bir dokuda meydana gelen kontrolsüz hücre büyümesi ve daha sonra başka doku/organlara dağılan çoklu hastalık türüdür. Kanserin yayılımı durdurulamadığı zaman ölümle sonuçlanması kaçınılmaz olur. Kanser oluşumuna neden olan birçok faktör vardır. Bu etkenleri çevresel ve içsel olmak üzere iki gruba ayırabiliriz. Çevresel faktörler; tütün mamüller, alkol, enfeksiyon ve sağlıksız beslenme, içsel faktörleri de hormonal, kalıtsal gibi etkenlerdir (Gronning 2015).

### 1.2. Kemoterapi Tarihi

Kemoterapi, orijinal olarak her ne kadar kanser tedavisi amaçlanmasa da ilk defa 20. yüzyılın başlarında geliştirilmiştir. II. Dünya savaşı sırasında, hardal gazına maruz kalan insanların beyaz kan hücreleri sayısındaki azalma tespitiyle beraber kanser tedavisi olarak keşfedilmiştir. Bu bulgular araştırmacılara bu gazın hücre bölünmesini durdurup durdurmadığı fikrine öncülük etmiştir. İlk çalışmaları 1940 yılında tamamlanan ve 1946 yılında da yayınlanan çalışmada Alfred Gilman ve Louis Goodman, azot hardalının (Şekil 1.1.) kanser tedavisinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Goodman ve ark. 1946), (DeVita ve Chu 2008).

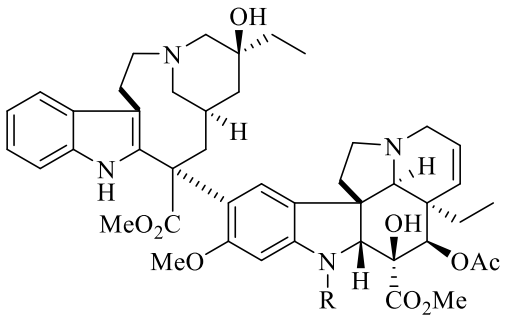


Mekloroetamin

**Şekil 1.1.** Mekloroetaminin yapısı

II. Dünya savaşından sonra diğer terapötik yaklaşımlar geliştirildi. Harvard Tıp Fakültesinde çalışan bir patalog, Sidney Faber ve arkadaşları, folat analoğu olan Metotreksat’ı geliştirmişlerdir. Bu ilaç folik asitin antagonisti olarak davranıp folatın sentezinden sorumlu enzimleri (metiyonin sentaz gibi) inhibe ederek etki gösterir (DeVita ve Chu 2008).

1950 li yıllarda bitki alkoloidlerden (*Vinca rosea*) izole edilen ekstraktların kan kanseri hastaları üzerinde yararlı olduğu tespit edilmiştir. Sonra 1960 larda vinca alkoloidleri olarak adlandırılan ekstraktlar antikanser ajan (Vinblastin ve Vinkristin) (Şekil 1.2.) olarak kullanılmaya başlanılmıştır (DeVita ve Chu 2008).

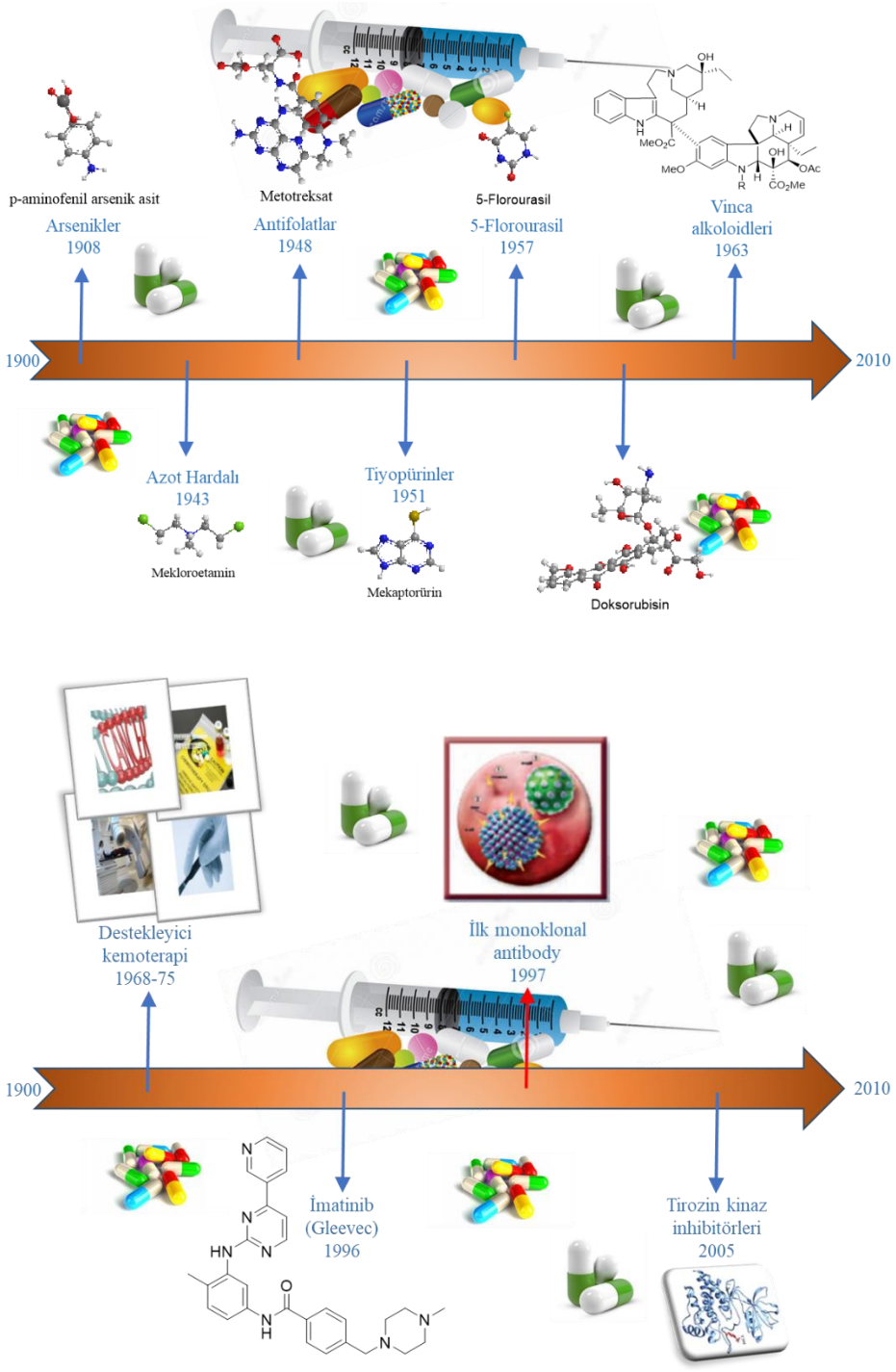



R= $CH_3$: (+)-Vinblastin
R= CHO: (+)-Vinkristin

**Şekil 1.2.** Vinblastin ve Vinkristinin yapısı

Daha sonra takip eden yıllarda kemoterapi ajanı sentezi, doğal ürünlerden izolasyonu ve bunların taklidi çalışmaları günümüze kadar devam etmiştir. Bununla birlikte birçok yaklaşım ve mekanizma üzerinde yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Kanser tedavisinde birçok ilaç denenmiştir ve kronolojisi aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 1.3.) (DeVita ve Chu 2008).

Kanser tedavisinde hücre içinde ve hücre dışında birçok yol ve yolak hedef alınmaktadır. Araştırmacılar hücre duvarındaki reseptörler, hücre içindeki proteinler ve DNA üzerinde etkili ilaçlar üzerinde yoğun çalışmalar yürütmektedirler. Özellikle DNA üzerinde etkili olabilecek küçük moleküllerin sentezi ve mekanizması büyük önem teşkil etmektedir.



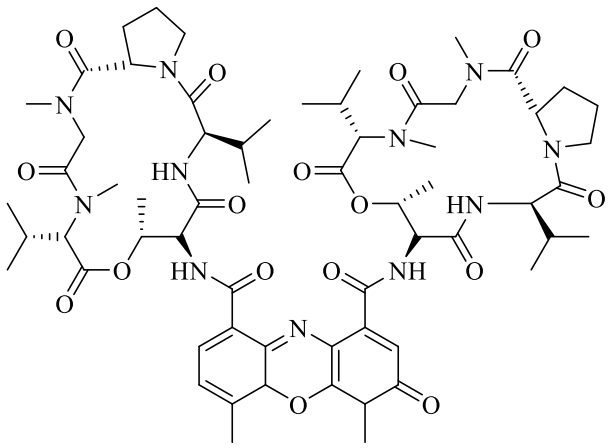

**Şekil 1.3.** Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların kronolojisi

### 1.3. DNA Hasarının Önemi

Hücresel işlemleri tasarlayan ve düzenleyen çift sarmal deoksiribonükleik asit (DNA) içindeki heterosiklik bazların dizisi genetik kodu oluşturur (Watson ve Crick 1953), (Alberts ve ark. 2002). Hücresel DNA transkripsiyonu sırasında genlerin doğru okunması fonksiyonel proteinler için gereklidir (Alberts ve ark. 2002). Buna ek olarak, genetik kodun birebir kopyasını içeren dişi hücrelerin meydana gelmesi için DNA'nın hatasız replikasyonu gereklidir (Alberts 2002, 2003). Bu söylemle beraber, apoptotik veya nekrotik mekanizma ile hücre ölümüne veya hücre büyümesinin inhibisyonuna, DNA'nın kimyasal modifikasyonunun öncülük etmesi şaşırtıcı değildir (Zhou ve Elledge 2000), (Norbury 2001), (Rouse ve Jackson 2002), (Green 2005). Bazı hücresel sistemler DNA hasarını tamir eder (Lindahl ve ark. 1972), (Hoeijmakers 2001), (Scharer 2003), (Friedberg 2003). Bu aşamada genetik koddaki hatalı bir okuma, DNA'nın hatalı eşleşmesine neden olur (Hemminki 1993), (O'Neill 2000), (Luch 2005). Bu sebeplerden dolayı biyoteknoloji, toksikoloji, karsiyogenez, ve medisinal kimya gibi alanlarda DNA hasarı çalışmaları temelde ve pratikte büyük önem taşır.

### 1.4. Küçük Moleküller ve DNA ile Etkileşimleri

1953 yılında Watson ve Crick, genetik materyal olduğu bilinen DNA'nın yapısal olarak çift sarmal heliks olduğunu (Watson ve Crick 1953) belirttikten sonra DNA'nın yapısal özellikleri ve bu özelliklerin replikasyonda ve transkripsiyonda ne tür bir rol üstlendiği merak konusu olmuştur. Özellikle kanser gibi genetik orijinli hastalıkların tanısı ve tedavisi için büyük önem kazanmıştır. Bilim insanları 40 yılı aşkın bir süredir antikanser ilaç dizaynında küçük moleküllerin nükleik asitlerle etkileşme modu üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır. Rauen ve Reich 1960'lı yıllarda actinomcyin D antibiyotiğinin (Şekil 1.4.) DNA baz çifleri arasında interkalasyon yaptığını göstererek hücresel metabolizmanın bozulması için DNA'yı güçlü bir hedef haline getirmişlerdir (Kersten ve ark.1960), (Reich 1964).



**Şekil 1.4.** Aktinomisin D antibiyotiğinin yapısı

Küçük moleküller DNA ile kovalent ve kovalent olmayan iki farklı modifikasyon mekanizması ile etkileşirler. Kovalent modifikasyon; küçük moleküllerin elektrofil kısımları ile DNA'nın nükleofil kısımlarının etkileşme reaksiyonu veya küçük moleküllerdeki radikallerin DNA ile etkileşme reaksiyonu olmak üzere iki farklı mekanizma üzerinden yürüyebilir. Kovalent olmayan etkileşim mekanizması ise küçük organik moleküllerin ve iyonların DNA ile interkalasyon, DNA oluklarına bağlanma ve DNA ile elektrostatik etkileşim olmak üzere üç temel mekanizma üzerinden gerçekleşir.

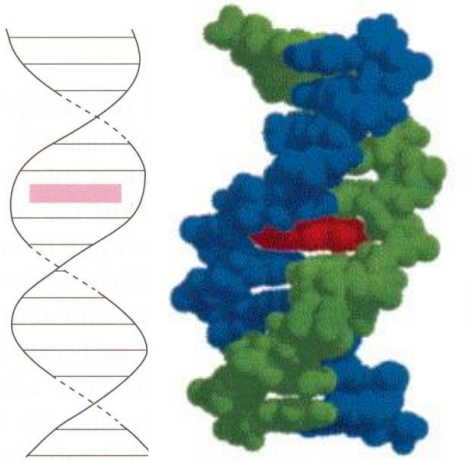
### 1.5. Kovalent Olmayan Etkileşim

Kovalent olmayan etkileşim interkalasyon, oluklara bağlanma ve elektrostatik etkileşim olmak üzere üç ana bölümden oluşmaktadır.

#### 1.5.1. İnterkalasyon

1961 yılında Lerman, klasik interkalasyon modeli için yeni ufuklar açan çalışmalar yapmıştır. Lerman, DNA çözeltisine proflavin **(2)** akridin **(3),** ve akridin orange **(4)** gibi rijit ve aromatik ligantları (Şekil 1.6.) (2, 3, 4) ilave ettiğinde DNA çözeltisinin çökme katsayısında azalma, viskozitesinde ise artma olduğunu gözlemlemiştir. Bu gözlemler sonucunda akridinlerin DNA sarmalında yapısal karışıklık meydana getirdiğini ve bunun interkalasyon mekanizması ile olduğunu önermiştir (Şekil 1.5.) (Lerman 1961). Bununla birlikte, Lerman, akridinlerin düzlemsel yapısının DNA sarmalına dik ve baz çiftlerine paralel bir şekilde etkileşim yaptığı diklorizm ve polarizlenmiş flouresans çalışmalarıyla göstermiştir (Lerman 1963). Daha

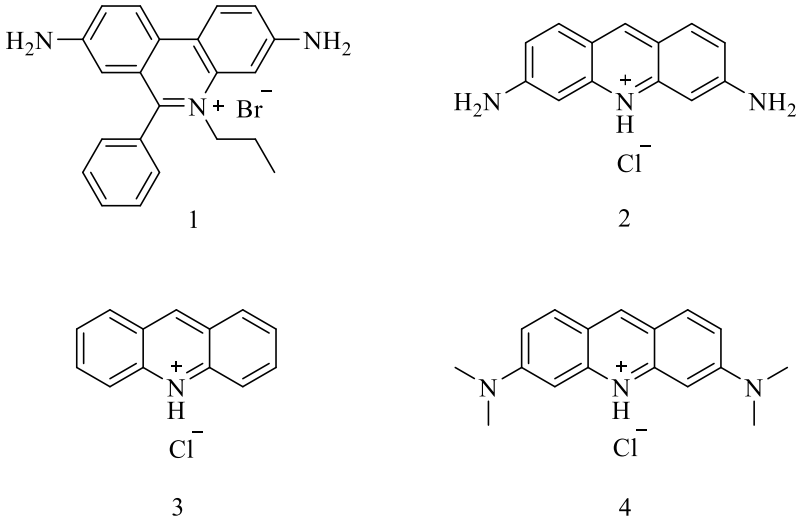
sonra, Neville ve Davies interkalasyon mekanizması ile proflavin-DNA ve akridin orange-DNA komplekslerinin X-ray motiflerini belirtmişlerdir (Neville ve Davies 1966).



**Şekil 1.5.** Ligandın DNA ile interkalasyonu

İnterkalasyonda kromofor madde DNA baz çiftleri arasına girerek çift sarmalda yaklaşık 3.4 Å'luk bölgesel açılmalar oluşturur. Bilindiği gibi normal bir DNA'nın B-formunda her 360º'lik dönüş 10 baz çiftinine denk gelir. İnterkalasyon bölgesinde bu dönüşte bir azalma meydana gelir. Bununla birlikte baz çiftleri arasındaki açılma açısı DNA-ligant kompleksinin geometrisine bağlı olarak değişiklik gösterir. Örneğin etidyum bromürün **(1)** fenantradiniyum halkasının baz çiftleri arasına girmesiyle bir baz çiftinin 36º olan açısı 10º düşer, dolayısıyla aralanma açısı 26º olurken, sırasıyla akridin orange ve proflavinin neden olduğu aralanma açısı 17º ve 11º'dir (Wilson 1996). Çift sarmalın açılmasıyla sonuçlanan bu etkileşimde fosfat grupları arasındaki mesafe artar bölgesel yük yoğunluğu azalır, bu da fosfat gruplarına yakın olan sodyum iyonu gibi zıt yüklerin ayrılmasını kolaylaştırır. Daha sonra hidrofobik etkileşime uygun nonpolar aromatik halka içeren interkalatör, kendisi gibi hidrofobik baz çiftleri arasına gömülür (Boresch ve Karplus 1995). Üstelik katyonik interkalatörler, Manning ve Record tarafından tanımlanan polielektrot teorisi ile ortama fazladan zıt yük salınımı yapar (Manning 1978), (Record 1978). Yeni oluşan kompleks; hidrofobik, van der Walls, π-π etkileşimi, hidrojen bağı ve kolombik itmenin azalmasıyla kararlı hale gelir (Boresch 1995). Üstelik interkalatörlerin sahip oldukları sübstitüentler DNA küçük oluklarında van der Walls etkileşimi ve A-T baz çifti ile hidrojen bağı yaparak, (Aktinomisin D gibi

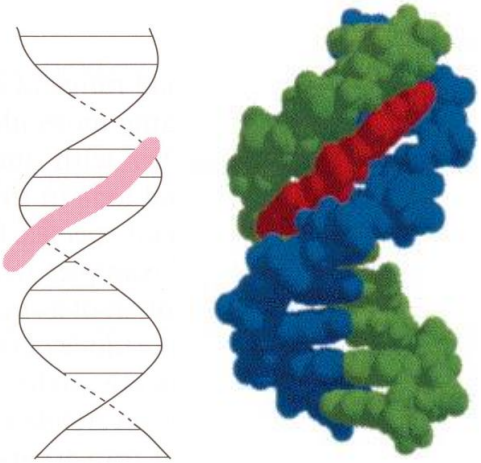
Şekil 1.4.) bağlanmada selektivite gösterebilirler. Etidyum bromür ve proflavin bilinen ilk interkatörlerdir (Wang 1992), (Krugh 1994).




**Şekil 1.6.** Bazı interkalatör türleri

### 1.5.2. Oluklara Bağlanma

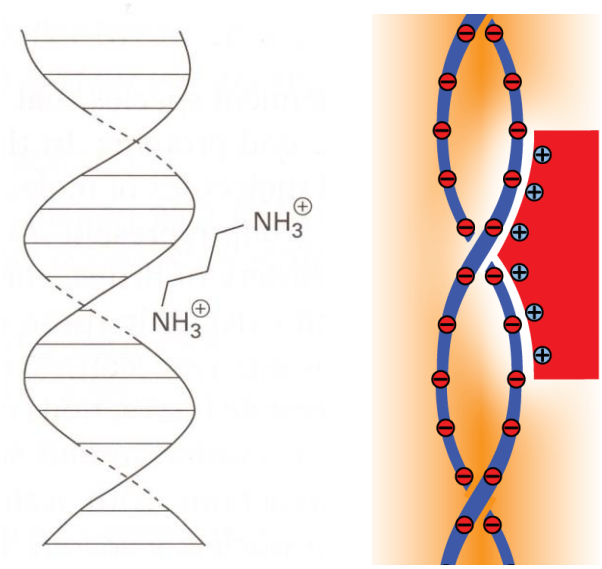
İnterkalatörlerin aksine ligand kayda değer bir sterik engelle karşılaşmadan ve DNA yapısını bozmadan bir hilal şeklini alarak oluklardaki bükülmelere spesifik olarak bağlanır (Şekil 1.7.). Poliamid yapısında bulunan bu ligand oluk duvarı ile van der Waals ve komşu baz çiftleriyle de hidrojen bağı olmak üzere kovalent olmayan etkileşim içerisindedir (Chaires 1997). Bu etkileşimin diğer özelliği de, bir çok baz çiftlerini kapsayacak şekilde nükleik asitlerle oldukça yüksek selektivite sağlanabilinir olmasıdır (Wilson 1996). Netropsin antibiyotiği DNA oluğunda A-T bölgesine spesifik olarak bağlanan ilk ajandır (Wartell ve ark. 1974).



**Şekil 1.7.** Ligandın oluklara bağlanması

### 1.5.3. Elektrostatik Etkileşim

Elektrostatik etkileşim DNA dış yüzeyi boyunca gerçekleşen genellikle spesifik olmayan bir etkileşim şeklidir (Şekil 1.8.). DNA bel kemiğinde bulunan negatif yüklerle bir çok iyon ve küçük molekül ile etkileşirler (Silverman ve Holladay 2014).



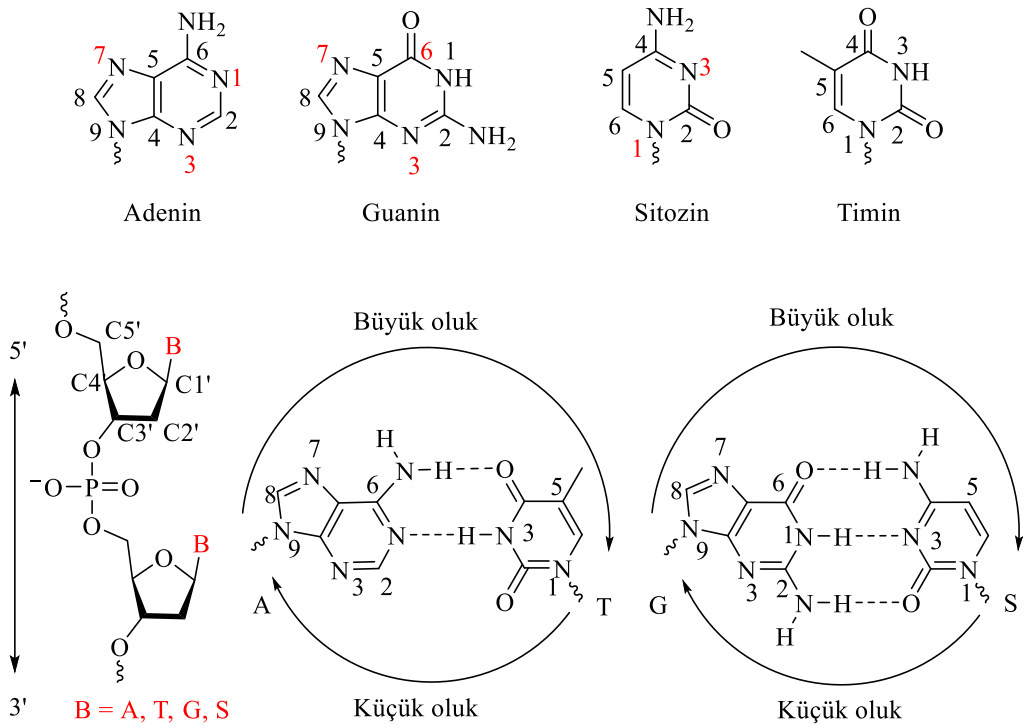

**Şekil 1.8.** İyonun DNA dış yüzeyi ile elektrostatik etkileşimi

### 1.6. Kovalent Etkileşim

Kovalent etkileşim; alkilasyon ve radikalik olamak üzere iki farklı modifikasyon mekanizması ile etkileşir.

#### 1.6.1. Alkilasyon

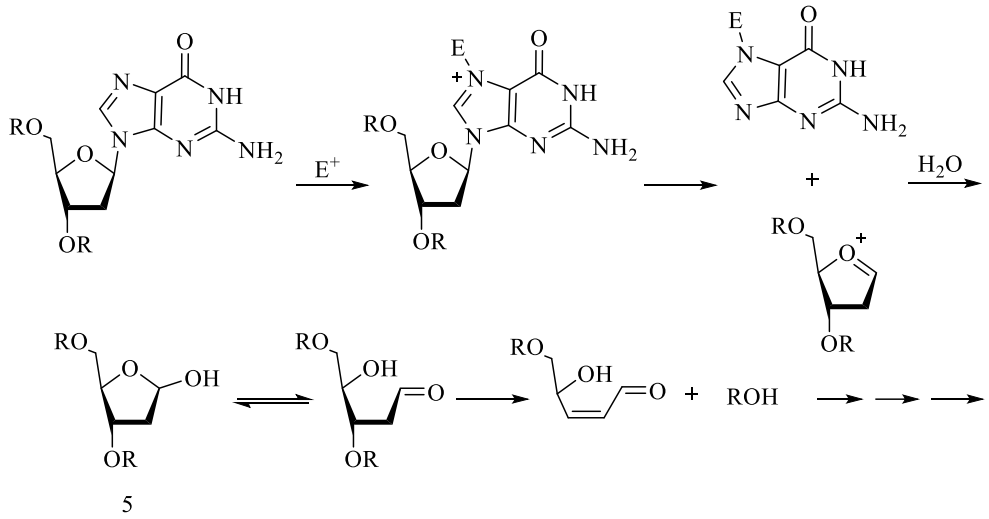
Elektrofiller DNA yapısındaki farklı nükleofilik kısımlarla reaksiyona girebilir. Her ne kadar aktivite elekrofillerin kimyasal yapılarına bağlı olsa da elektrofiller genellikle DNA'nın belli nükleofilik kısımlarına karşı seçicilik gösterirler (Brookes ve ark. 1961), (Lawley ve Brookes 1963), (Singer 1976). Elektrofilik doğal ürünler ile guaninin N-7, adeninin N-3 ve N-7 kısımlarının yanı sıra ekzosiklik N-2 amino grubu ile adeninin N-7 ve guaninin N-3 kısımları en çok modifikasyona uğrayan kısımlardır (Şekil 1.9.) (Brookes ve ark 1961), (Pullman ve ark. 1981), (Lawley ve Brookes 1963).




**Şekil 1.9.** DNA bazlarında ve şeker fosfat iskeletinde nükleofilik kısımlar

Pürin kalıntılarının N-7 ya da N-3 pozisyonunda meydana gelen elektrofilik modifikasyon sonucu glikozidik bağ zayıflar (Lawley ve Brookes 1963), (Mattes ve ark. 1980). Bunun sonunda abazik bölge **(5)** oluşur ve nötral şartlarda bu bölgeler

hidrolizlenerek DNA kesimi gerçekleşir (Şekil 1.10.) (Bennett ve ark. 1993), (Lindahl ve ark. 1972). Abazik bölge alkali şartlarda hızlı bir şekilde zincir kırıklarına neden olur (Maxam 1980), (Mattes ve ark. 1980), (Sugiyama 1994). Elektrofilik türlerin DNA bazlarındaki ekzosiklik azotları ve karbonil oksijenleriyle veya DNA iskeleti üzerinde bulunan fosfat oksijenleriyle reaksiyonu genellikle kararlı ürünler oluştururlar ve bu ürünler ortalama pH koşullarında kendiliğinden DNA zincirinde kırığa neden olmazlar (Wong ve ark. 1994), (Singer ve ark. 1978).



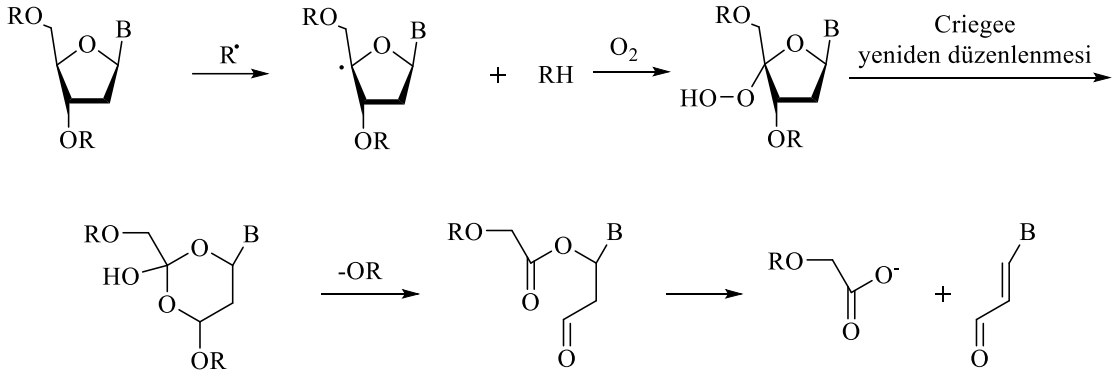

**Şekil 1.10.** Elektrofillerin DNA kesim mekanizması

Bu tür mekanizma ile yürüyen küçük moleküller alkil ajanları olarak bilinirler ve bunların sebep olduğu reaksiyona da alkilasyon denir. Bu reaksiyonlar $S_N1$ ve $S_N2$ mekanizması üzerinden yürür ve bu tür ajanların en reaktif oldukları kısım Adenin ve Guaninin N-7 ve N-3 kısımlarıdır (Lawley 1963; 1996), (Beranek 1990). DNA'nın olası alkilasyon çeşitlerinin olması, çoğu alkilasyon ajanlarının mutajenik ve/veya karsiyojenik olmaları, genellikle DNA sentezini bloke etmeleri, diğer biyomoleküllerle reaksiyona girebilmesi (yan etki) ve hem mono-fonksiyonel hem de bis-fonksiyonel (çapraz bağlanmalar) ajan olabilme gibi özellikleri vardır.

### 1.6.2. Bazı Radikallerin DNA ile Etkileşimi

Birçok radikal türü DNA ile değişik pozisyonlarda reaksiyona girebilir. Yoğun araştırmaların konusu olan DNA hasarının önemli bir mekanizması, radikaller tarafından DNA iskeletinde bulunan deoksiriboz şekerden bir hidrojen koparılmasıdır.

(Breen 1995), (Sonntag ve ark. 1981). Deoksiriboz şekerden bir hidrojen atomu koparılarak kesimle sonuçlanan reaksiyonun bütün basamakları tamamıyla bilinmektedir (Şekil 1.11.) (Sonntag ve ark. 1981), (Pratviel ve ark. 1995). Radikaller, şeker-fosfat iskeleti dışında, DNA bazlarıyla da reaksiyona girebilirler (Zady ve Wong 1980), (Barvian ve Greenberg 1995). Bu tür reaksiyonlar deoksiriboz iskeletinde kesime neden olmazken DNA'da modifikasyona neden olurlar. Böyle modifikasyonlar biyolojik öneme sahiptirler. Radikaller veya öncü radikaller DNA'ya spesifik olarak bağlanmadığı zaman, DNA kesimi küçük dizilerle veya baz spesifikliği ile meydana gelir (Tullius ve ark.1987). Bunun aksine alkilleyici ajanlarla DNA kesimi bir veya daha fazla DNA bazı için selektivite gösterir. DNA hasarı; oksijen merkezli (süper oksit radikali, hidroksi radikali vb.) (Breen 1993; 1995), (Sonntag ve ark. 1981), karbon merkezli (aril radikali) (Zady ve Wong 1980), (Nicolaou 1991), azot merkezli radikaller ve hidrojen radikali (Sonntag ve ark. 1981) ile gerçekleşir.

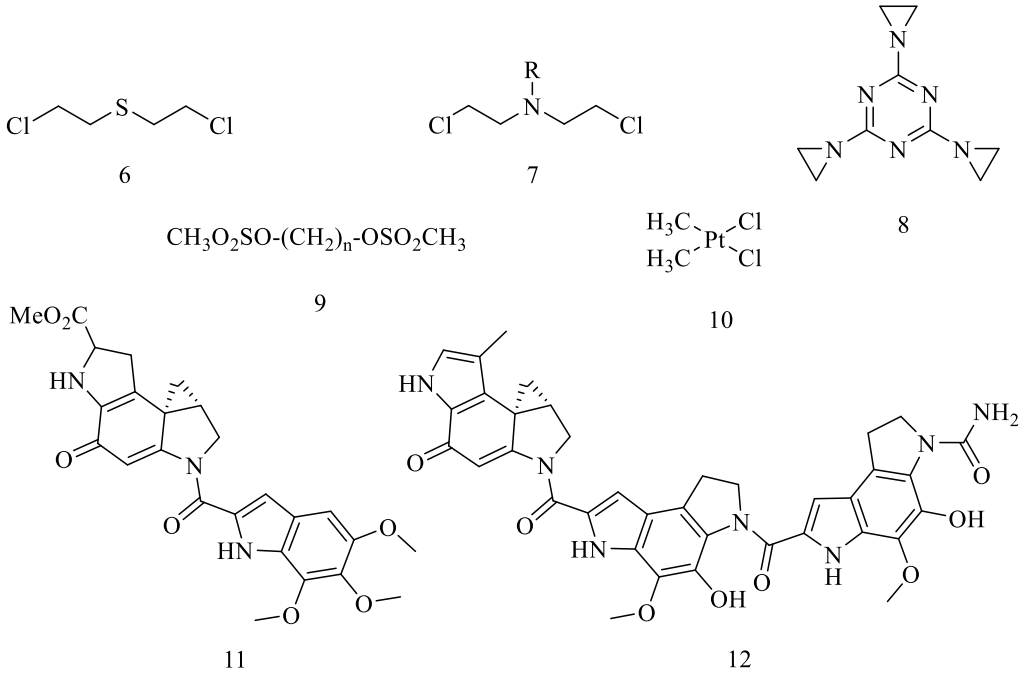



**Şekil 1.11.** Bazı radikal türlerinin deoksiribozdan hidrojen koparma reaksiyon mekanizması

Deoksiribozdan hidrojen koparma reaksiyonun kolaylığı tamamıyla C-H bağının kuvvetine bağlıdır (Miaskiewicz ve Osman 1994). Deoksiribozun 1', 2', 3' ve 4' pozisyonlarından koparılan hidrojenlerin hesaplanan entalpileri, 1', 4' ve 3' pozisyonlarındaki C-H bağının kuvvetiyle doğru orantılıdır. Bu durumda karbon merkezli radikaller bir komşu oksijen ile kararlı olurlar (Miaskiewicz ve Osman 1994). 2' pozisyonundaki C-H bağının enerjisi diğer C-H bağının enerjilerine göre kısmen de olsa daha yüksektir. Bütün pozisyonlardaki C-H bağ enerjileri 87.3 ile 91.2 kcal/mol arasındadır (Miaskiewicz ve Osman 1994). Bu hesaplama tetrahidrofurandaki α-hidrojeni için deneysel olarak hesaplanan (92 kcal/mol) bağ enerjisi ile kıyaslanmıştır

(Golden ve Benson 1969). Pratikte oldukça reaktif olan hidroksi radikali (HO•), DNA iskeletinin her pozisyonundan hidrojen atomu koparabilir ancak reaksiyon esnasında her pozisyondaki C-H bağının kuvvetine nazaran o pozisyondaki sterik engel önemlidir (Balasubramanian ve ark. 1998). DNA'daki deoksiriboz hidrojenlerin sterik engeli; H5'>H4'>>H3'>>>>>H2'>>>>>H1' şeklinde sıralanabilir (Balasubramanian ve ark. 1998).

Kanser terapisinde kullanılan en önemli alkilleyici ajanlar; I. ve II. Dünya Savaşı sırasında kullanılan sinir gazı olarak da bilinen sülfür hardallarından **(6)** esinlenerek sentezlenen azot hardalları **(7)**, etileniminler **(8)**, metanosülfonik asit esterleri **(9)**, platin komplekleri **(10)**, siklopropan halkasına sahip Duokarmasin **(11)**, (+)-CC-1065 **(12)** antibiyotikleri ve bunların analoglarıdır (Şekil 1.12.).



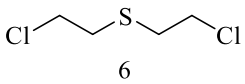

**Şekil 1.12.** Bazı önemli alkilleyici ajan türleri

Bu alkilleyici ajanlardan hardal gazları klinik olarak ençok kullanılan ilaçların başında gelir.

### 1.7. Hardal Gazı

Yaklaşık yüz yıl önce I. Dünya savaşı, bütün dünyanın değişmesine neden oldu. Yaklaşık 17 milyon insanın öldüğü ya da yaralandığı bu savaş aynı zamanda ‘‘Büyük Savaş veya Kimyagerlerin Savaşı’’ olarak da bilinir. O dönemde gelişen kimya

endüstrisi ile birlikte sayısız kimyasal silah denemesi yapılmıştır. Bunlardan bir tanesi de hardal gazıdır (Şekil 1.13.) (Hazell 2014).




6

**Şekil 1.13.** Hardal gazının yapısı

İlk kez Belçika'nın Ypres kasabasında Alman birlikleri tarafından kullanılan hardal gazı, parıldayan bir bulut kütlesi gibi olup keskin biber kokusuyla 24 saat sonra başlayan önlenemez kaşıntı, oluşan kabarcıklar ve dehşet verici yaralar meydana getirdiği belirtilmiştir (Çizelge 1.2.). Hardal gazının ilk kullanımından sonuna kadar yaklaşık 10,000 ölü ve beraberinde birçok yaralı kişi kayıt altına alınmıştır. Hardal gazı birçok kimyasal silah gibi Karlsruhe Üniversitesinden profesör Fritz Haber tarafından geliştirilmiştir (Hazell 2014).



**Çizelge 1.2.** 1918 yılında hardal gazından etkilenen bir hastanın görüntüsü

Hardal gazı sadece I. Dünya savaşında kullanılmadı II. Dünya savaşında ve Irak'ın Halepçe kasabasında da kimyasal silah olarak kullanılmış ve birçok ölümle sonuçlanmıştır. Hardal gazı kimyasal silah haricinde tıpta kanser ilacı olarak da kullanılmıştır. II. Dünya savaşı sırasında, Yale üniversitesinde Louis Goodman ve Alfred Gilman hardal gazından etkilenen askerlerin ayrıntılı tıbbi taramasını yaparken askerlerin beyaz kan kürelerindeki dramatik azalışı fark ettiler. Bu bulgu doktorlarda yeni bir fikrin öncüsü olmuştur. Doktorların ''Eğer hardal gazı normal beyaz kan

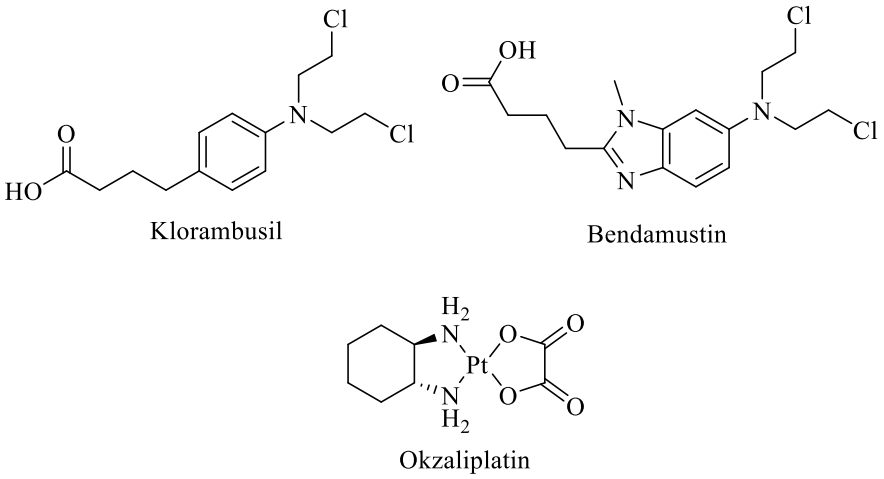
hücrelerini öldürüyorsa neden kanserli hücrelerini öldürmesin'' (Haddow ve ark. 1948), (Hazell 2014) düşüncesiyle kemotrapideki kullanımı düşünülmüştür.

Başarılı hayvan deneylerinden sonra Dr. Goodman ve Gilman bir gönüllü kanser hastası üzerinde denemelerini yapmışlarıdır. Gönüllü kişi ileri kanser hastası olduğu için yutkunamıyor, uyuyamıyor hatta kendi kollarını bile dirsekten bükemiyordu tümörlerden dolayı. 27 Ağustos 1942 yılında, doktorlar gönüllü kişiye ilk doz ilacı vermişlerdir ve bu ilacı Sentetik Lenfosidal Kimyasal olarak adlandırdılar. Gerçekte bu kimyasalın azot hardalı olduğunu denemelerin başarılı olmasından sonra belirtmişlerdir (Şekil 1.1.).

Gönüllü aldığı birkaç tedaviden sonra az da olsa iyileşme göstermiş, yutkunmaya başlamış, uyuyabilmiş, rahatça beslenebilmiş ve ağrıları azalmıştır.

Doktorlar bu başarılı çalışmayı 1946 yılında yayınlamışlardır. Bu olay tıp tarihinde anıtsal bir zaman olarak bilinir ve kemoterapi olarak bilinen kanser tedavisinin başlangıcıdır.

Azot hardalı II. Dünya savaşından sonra Birleşik Krallıktan proffesör Alexander Haddow'un dikkatini çekmiştir. Kendisi de kanserli hücrelerin büyümesini engelleyen molekül sentezi üzerine çalışmaktaydı. Dr. Haddow 1948 yılında yayınladığı ilk çalışmasında, esasen kanserli hücreleri öldürmek için çok az miktarda azot hardalına ihtiyaç olduğunu belirtmiştir. Belki de en önemlisi Dr. Haddow azot hardalının nasıl daha az toksik ama daha fazla potent yapılacağını göstermiştir (Haddow ve ark.1948). Çalışma adeta bir ''Lego'' oyunu gibiydi. Dr. Haddow, alifatik azot hardalının yanında birçok aromatik azot hardalı modellemesi yapmıştır. Bunun sonucunda da aromatik azot hardallarının alifatiğe göre daha az dozda daha fazla etki gösterdiğini yaptığı rat deneylerinde gözlemlemiştir. Bu bilgiler dahilinde halen kemoterapi kullanılan Klorambusil, Bendamustin platinli moleküller gibi kanser ilaçları sentezlenmiştir (Şekil 1.14.) (Haddow ve ark. 1948), (Hazell 2014).

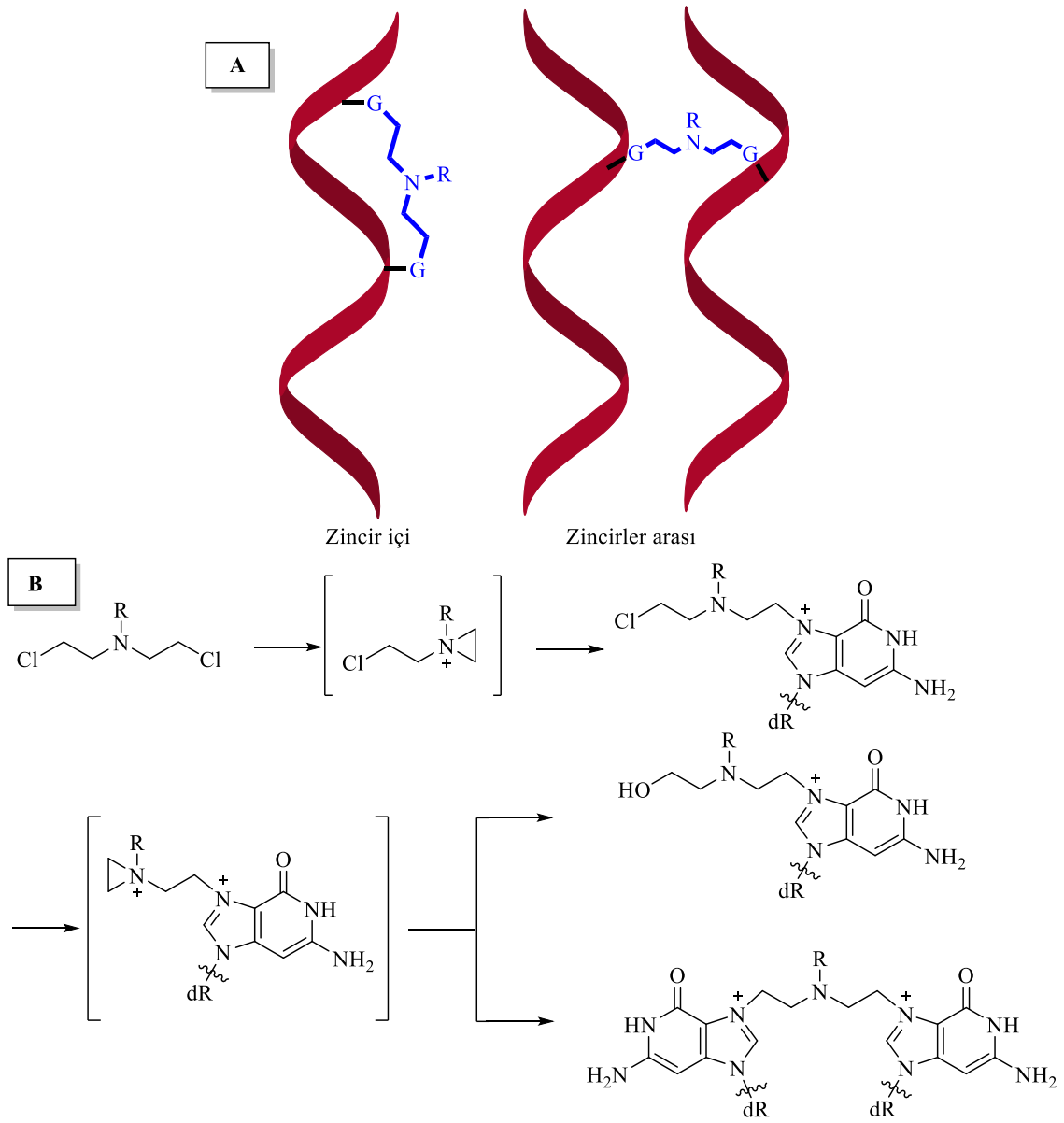



**Şekil 1.14.** Kemoterapide kullanılan ilaçların yapısı

Daha sonraki yapılan çalışmalarda bilim insanları azot hardalının DNA'ya bağlandığı ve DNA hasarına neden olduğu belirtilmiştir.

### 1.8. Azot Hardalının DNA'ya Bağlanma Mekanizması

Azot hardalı molekül içi yeniden düzenleme ile azidirinyum iyonun oluşturup DNA bazları üzerindeki nükleofilitesi yüksek kısımları alkilleyerek tek zincirde ve çift zincirde çapraz bağlanmalar meydana getirir (Şekil 1.15.) (Bhattachharyya ve Mehdi 2004), (Loeber ve ark. 2009).




**Şekil 1.15. A)** Azot hardalının çapraz bağlanması, **B)** Azot hardalının alkilasyon mekanizması

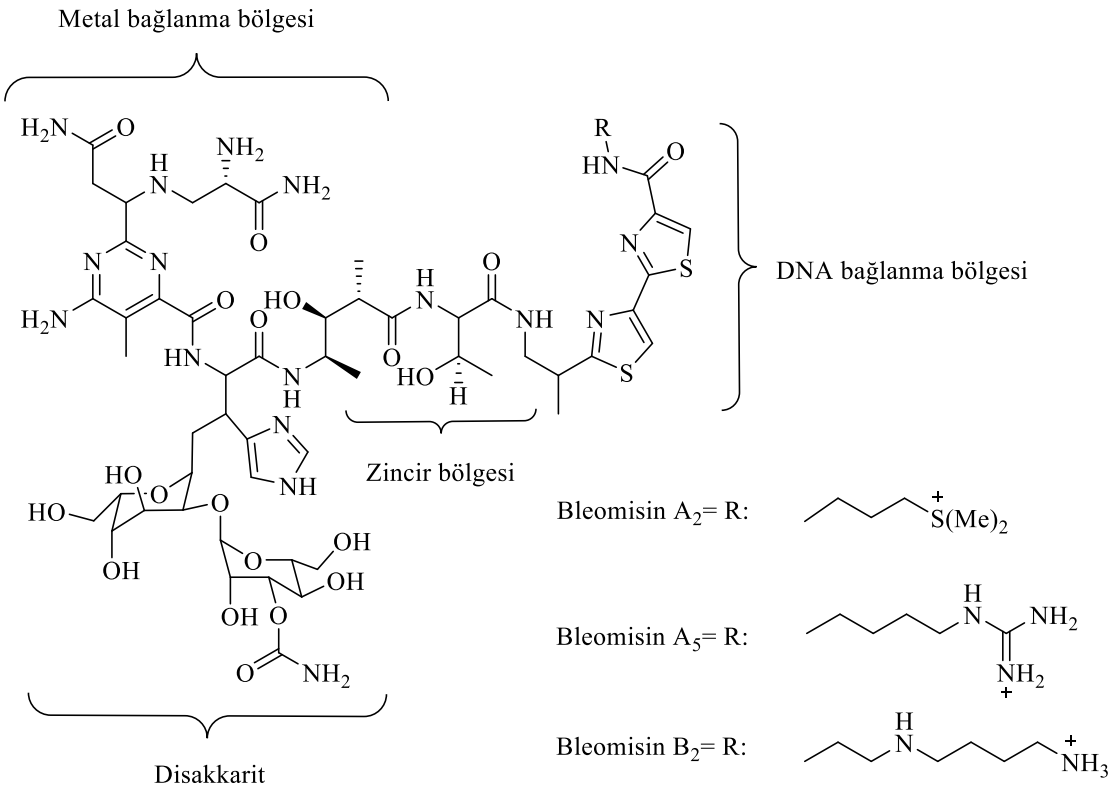
DNA'yı etkileyen sentetik ilaçlar haricinde birçok doğal ürün ve onların mimikleri vardır. Doğadan elde edilen sekonder metabolit olarak adlandırdığımız antitümör antibiyotikler DNA üzerinde yukarıda belirtildiği gibi kovalent ve kovalent olmayan etkileşimler yaparak etkili olurlar.

### 1.9. Antitümör Antibiyotikler

#### 1.9.1. Bleomisin

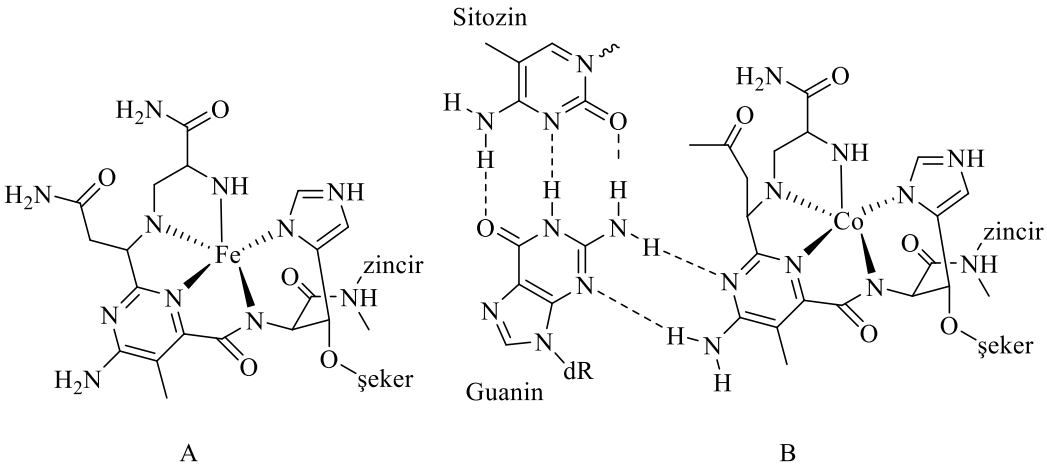
DNA oksidasyonu için en etkili doğal bileşiklerden bir tanesi de antitümör Bleomisin (BLM) (Şekil 1.16.) antibiyotiğidir. Umezawa ve arkadaşları 1966 yılında BLM'yi *Streptomyces Verticillus* bakterisinden bakır ile kompleks şeklinde izole etmişlerdir. Bu antibiyotik özellikle Hodgkin, non-Hodgkin lenfoma, kötü huylu baş ve boyun kanserleri tedavisinde kullanılır (Chen ve Stubbe 2004), (Umezawa 1978), (Galm ve ark. 2005). Düşük oksidasyon bölgesindeki bir metal iyonu [Fe (II) veya Cu (I) gibi] ve moleküler oksijen ($O_2$) varlığında DNA sarmalında hem tek hem de çift zincir kırıklarına neden olur. Geniş çaplı araştırmalara rağmen Bleomycinin hücre içerisinde aktivite gösterdiği formu tam olarak bilinmemektedir. Buna karşın, en yüksek aktiviteyi *in vitro* ortamda demir gibi bir metal kofaktör ile gösterdiği belirtilmiştir (Sausville ve ark. 1978). *In vivo* çalışmalar (terapötik etki ve konsantrasyonlarda), Fe(BLM) kompleksinin toksisitesinin, Cu(BLM), Zn(BLM) ve serbest haldeki Bleomycinin toksisitesinden daha az olmasına rağmen, antitümör aktiviteleri aynıdır (Boger ve Cai 1999).

Bleomisin; metal bağlama, zincir, DNA bağlanma ve karbohidrat bölgesi olmak üzere dört ana bölgeden oluşur (Şekil 1.16.) (Hecht 1986, 2000), (Stubbe ve ark.1996), (Boger ve Cai 1999), (Chen ve Stubbe 2004).



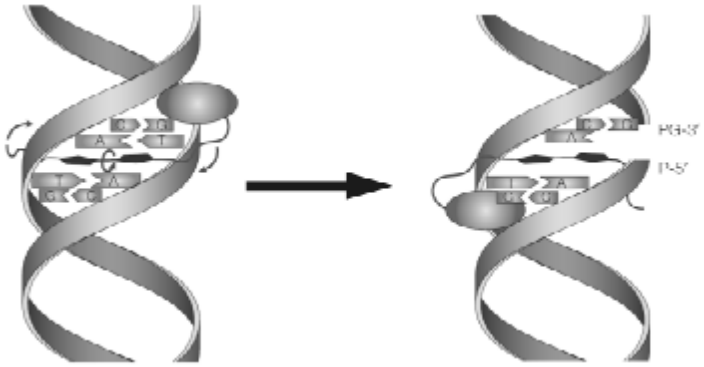

**Şekil 1.16.** Bleomisin türevleri ve etkin bölgeleri

Fe(BLM) kompleksinin kristal yapısı tam olarak bilinmemektedir. Bleomisinin metal bağlama bölgesi metal iyonunu, imidazol amin, deprotonlanmış amid, pirimidin azotu, sekonder amin ve β-aminoalaninin pirimer amini yardımıyla bağlar (Şekil 1.17a).




**Şekil 1.17.** BLM'nin demir ve kobalt metali ile kompleksleri

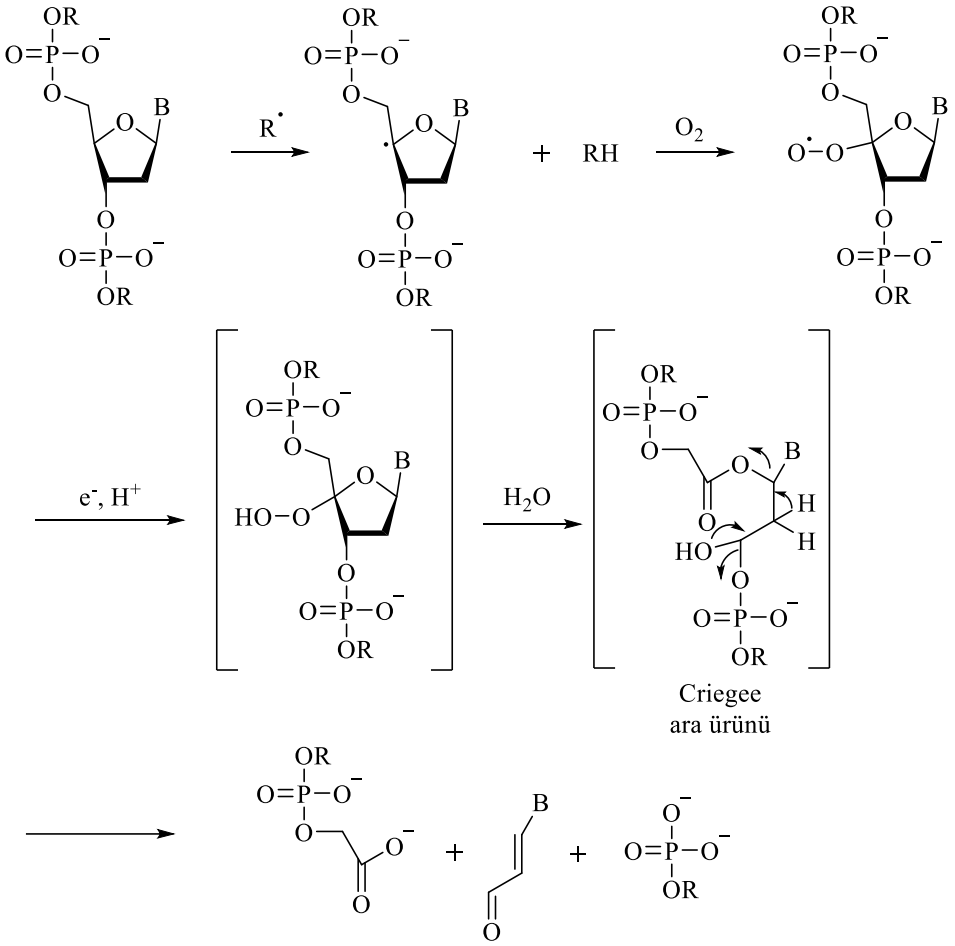
Bleomisin metal kompleksi, Guanin ile pirimidindeki azot ve amin grubu üzerinden etkileşir (Şekil 1.17a.). Co(BLM) kompleksinin NMR çalışmaları, bu azotlar ile Guanin arasında direkt bir etkileşim olduğunu ve bu etkileşim sırasında Guanin ve Sitozin arasındaki Watson-Crick hidrojen bağlarında herhangi bir değişiklik olmadığını göstermiştir (Şekil 1.17b) (Wu ve ark. 1996). Pirimidin üzerindeki amino grubu, dimetilamino grubu ile yer değiştirdiğinde kesim süreci tamamıyla dururken, amino grubu ayrıldığında daha az kesimin söz konusu olduğu gözlemlenmiştir (Boger ve Cai 1999). Tek zincirdeki kesimde bleomycinin selektivitesi 1978'de rapor edilmiş (D'Andrea 1978) ve DNA sarmalındaki 3' pozisyonundaki Guaninden kesim yaptığı belirtilmiştir. Bleomisin'in DNA'ya olan ilgisi bistiyazol ünitesinin interkalasyon ve küçük oluklara bağlanmasından kaynaklanır (Wu ve ark. 1994), (Povirk 1979). Zincir bağlama bölgesinin de çift sarmal kesimdeki etkisi önemlidir. Öyle ki bu zincir bölgesindeki en ufak bir değişiklik kesim kapasitesini dramatik bir şekilde azaltır (Hecht 1986, Stubbe 1996), (Boger ve Cai 1999) Rishel 2003). Stubbe ve arkadaşları, bistiyazol ünitesi ve zincir ünitesi ile 3' pozisyonundan tek zinciri kestikten sonra halka çevrilme mekanizması ile 180$^{o}$ dönerek diğer zincire geçip 3' pozisyonunda kestiğini göstermişlerdir (Şekil 1.18.) (Wu ve ark. 1994, 1996a,b,), (Chen 2004, 2005). Bleomisin'in karbohidrat bölgesindeki α-L-glikoz ve α-D-mannoz ise bleomsinin bazı kanser hücrelerinde birikmesinden sorumlu olabilirler fakat DNA kesiminde rol almazlar.



**Şekil 1.18.** BLM'nin DNA kesim modellemesi

### 1.9.1.1. $Fe^{II}$(BLM) Kompleksinin DNA Kesim Mekanizması

$Fe^{II}$(BLM) kompleksi aerobik ortamda moleküler oksijen yardımıyla deoksiriboz şekerin C4' pozisyonundaki hidrojeni koparark kesimi 3' pozisyonunda yapar (Şekil 1.19.).




**Şekil 1.19.** $Fe^{II}$(BLM) kompleksinin DNA'yı kesme mekanizması

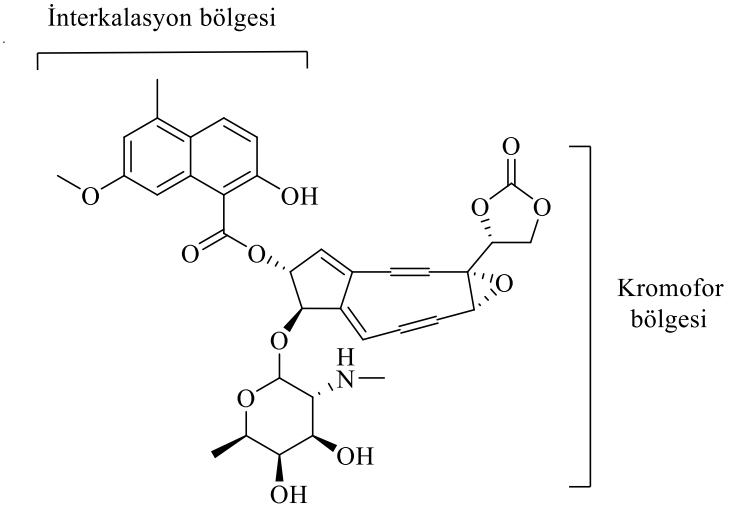
### 1.9.2. Enediyen Antibiyotikler

1965 yılında izole edilen neokarzinostatin (Ishida ve ark.1965) dışındaki Esperamicin (Konishi ve ark. 1985), Calicheamicin (Lee ve ark. 1987), ve Dynemicin A gibi enediyen antibiyotikler (Konishi ve ark. 1989) 1980'lerin sonlarına doğru çeşitli mikroorganizmalardan izole edilmişlerdir. Yaygın yapısal özelliği bir makrosiklik halkada en az bir çift bağ ve iki üçlü bağ bulundurmasıdır. Bu özelliğinden dolayı enediyen antitümör antibiyotikleri olarak anılırlar. Bu tür bileşiklerin tamamı DNA ile

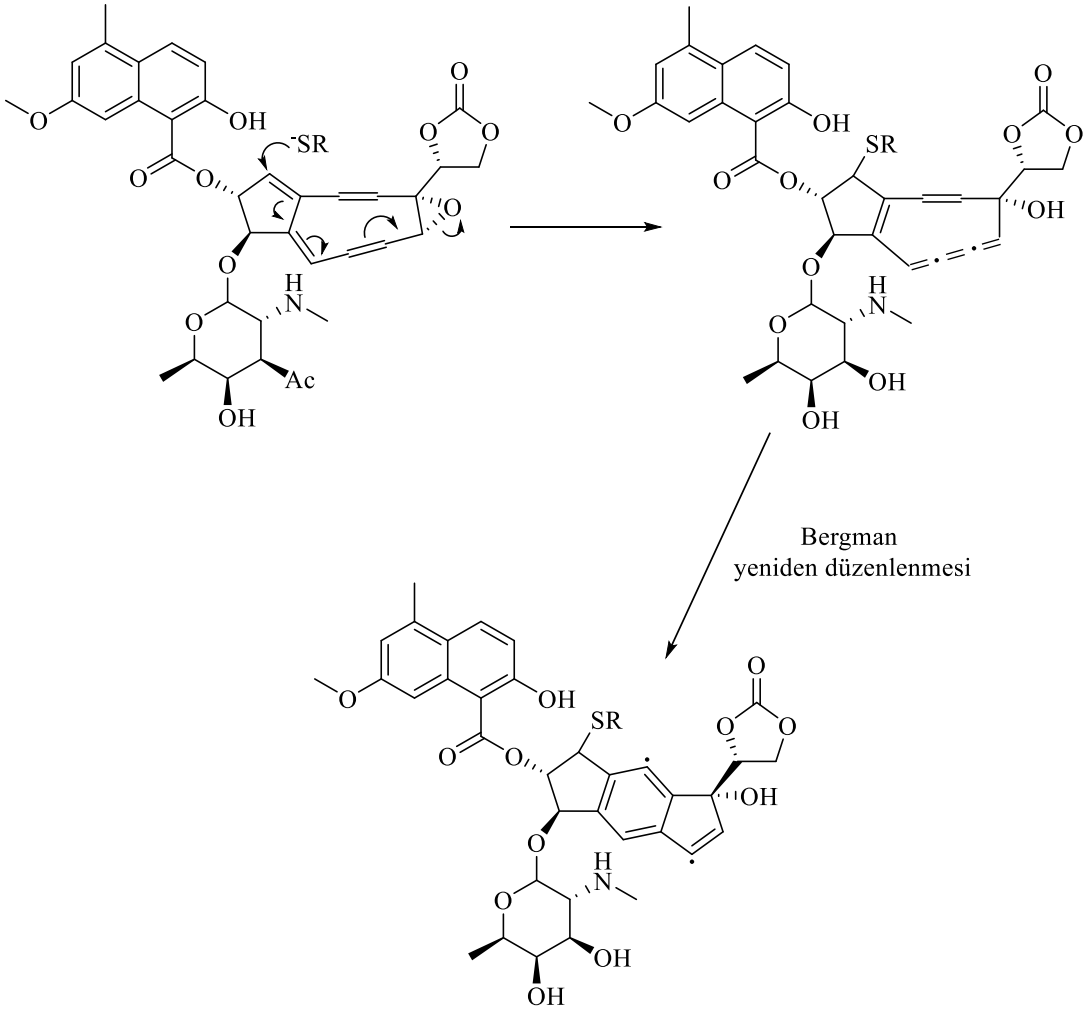
iki farklı şekilde etkşileşirler. Antibiyotiklerin bir kısmı DNA küçük oluklarında interkalasyon yaparken diğer bir kısmı ise tiyol ya da NADPH gruplarıyla aktive edilerek DNA zincirini kesen radikalleri oluştururlar.

### 1.9.2.1. Neokarzinostatin

1965 yılında *Sterptomyces carzinostaticus'*tan izole edilmiştir (Ishida ve ark.1965) Zinostatin olarak da bilinen Neokarzinostatin, en eski enediyen antibiyotiğidir (Şekil 1.20.) (Myers 1987). Naftoat ester bölgesi DNA'da interkalasyon yaparken epoksibisiklo[7.3.0]dodekadiendin bölgesi ise DNA küçük oluklarında kromofor olarak davranır. Tiyol tarafından aktive edilerek Bergman yeniden düzenlenmesiyle diradikal oluşturur (şekil 1.21.) (Lockhart ve ark. 1981), (Myers ve ark. 1994). Oksijen varlığında deoksiribozun C4' ve C5' pozisyonundaki hidrojenleri koparak iki farklı mekanizma ile DNA kesimi gerçekleştirir (Şekil 1.24.).



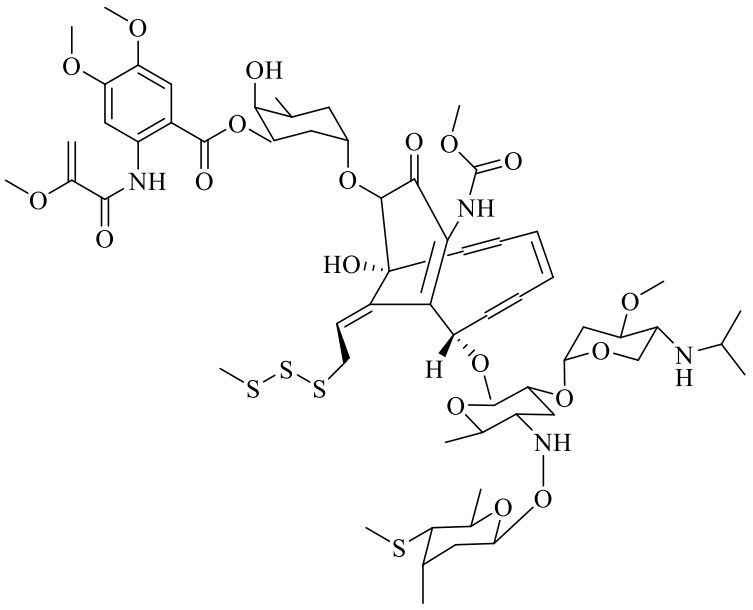

**Şekil 1.20.** Neokarzinostatin'in yapısı



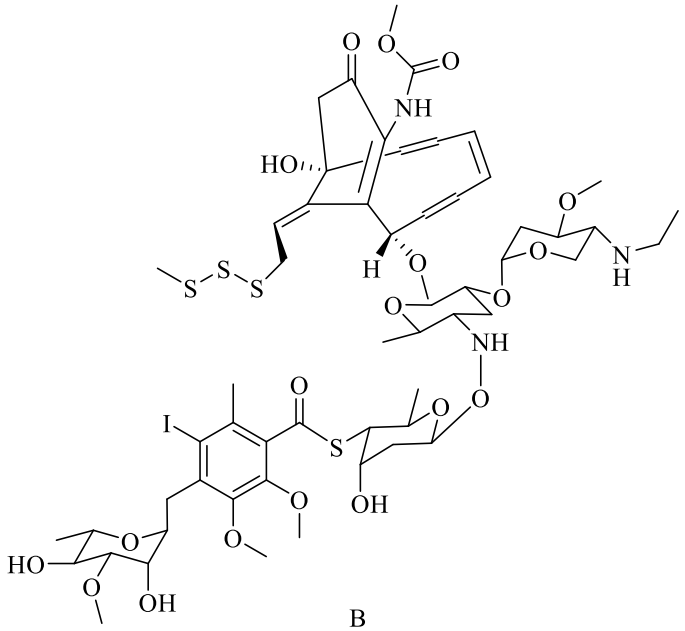

**Şekil 1.21.** Neokarzinostatin'in tiyol ile aktivasyonu

### 1.9.2.2. Esperamicin ve Calicheamicin

Esperamicin (Şekil 1.22a.) ve Calicheamicin (Şekil 1.22b.) antitümör antibiyotikleridirler. 1987 yılında Esperamicin speramisin *Actinomadura verrucosospora*, Calicheamicin ise *Micromonospora echinospora* ssp. calichensis toprak örneklerinden izole edilmişlerdir (Lee ve ark. 1987), (Golik ve ark 1987), (Pryor 1988). Neokarzinostatin gibi diradikal oluşturarak DNA kesimine sebep olurlar.



A

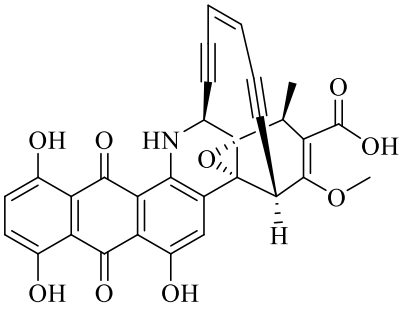


B

**Şekil 1.22.** Esperamicin ve Calicheamicin antibiyotiklerinin yapıları

### 1.9.2.3. Dynemicin A

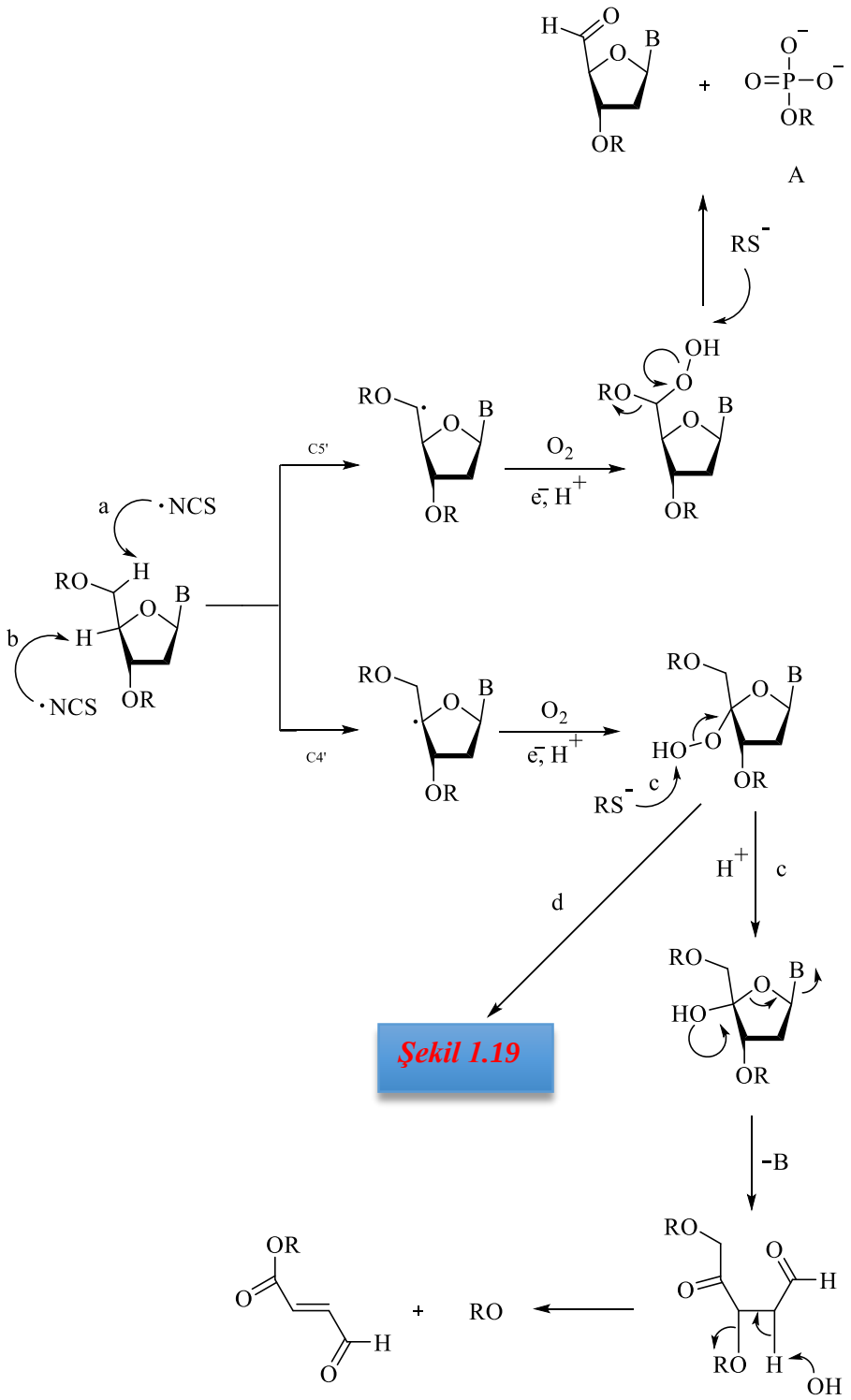
1989 yılında *Micromonospora chersina* bakterisinden izole edilen Dynemicin A antibiyotiği (Şekil 1.23.) hem enediyen hem de antrasiklin antitümör özellikli bir yapıdadır (Konishi ve ark. 1989). Yapısındaki antraquinonun DNA küçük oluklarındaki baz çiftleri arasına girerek interkalasyona sebep olduğu tahmin edilmektedir. Daha sonra NADPH ve tiyol yardımıyla Neokarzinostatin (Şekil 1.21.) ve diğer antibiyotikler gibi diradikal oluşturarak DNA deosiriboz şekerinden hidrojen atomu koparark DNA kesimine neden olur.




**Şekil 1.23.** Dynemicin A antibiyotiğinin yapısı

### 1.9.3. Enediyen Antibiyotiklerin DNA'yı Kesme Mekanizmaları

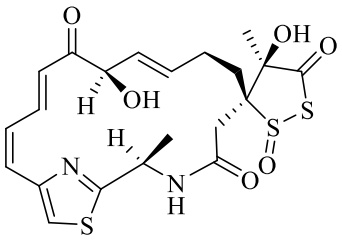
Yüksek reaktiviteye sahip enediyen antibiyotikleri oksijen varlığında deoksiribozun C4' ve C5' pozisyonlarından birer hidrojen koparark DNA küçük oluklarında kesimlere neden olurlar. Bu iki farklı yolla gerçekleşen kesim daha çok C5' pozisyonu üzerinden gerçekleşir (%80) (Şekil 1.24.) (Silverman ve Holladay 2014).



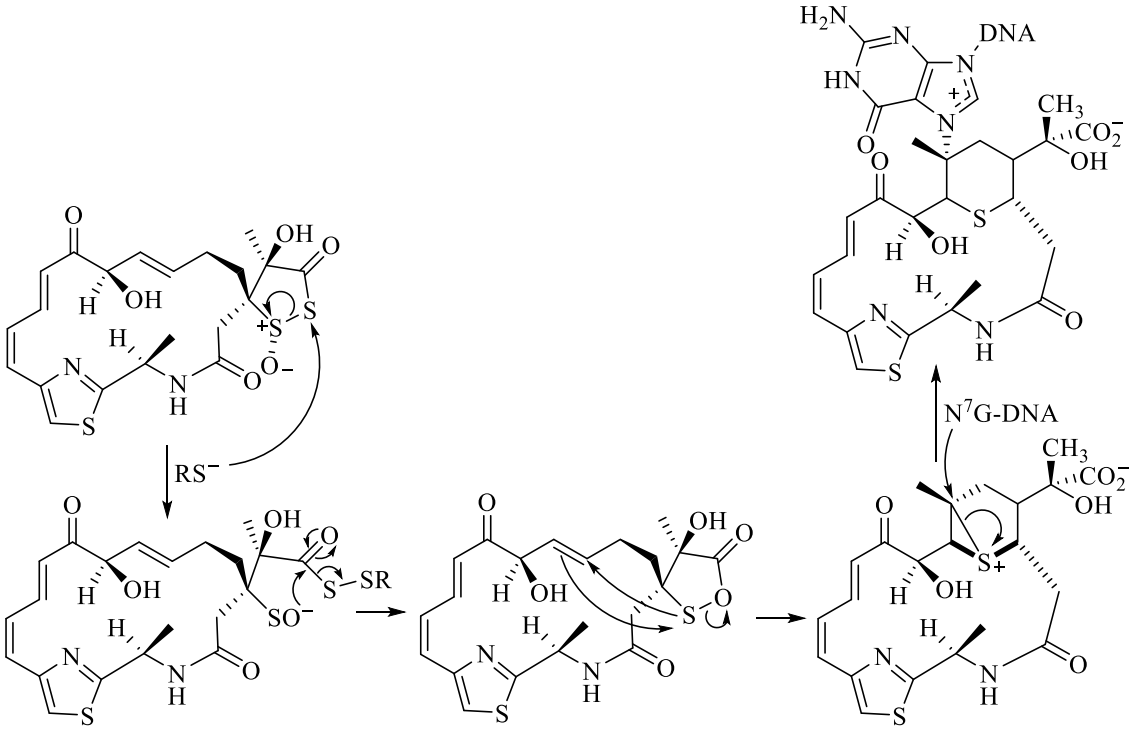

**Şekil 1.24.** Antibiyotiklerin DNA'yı kesme mekanizmaları

### 1.9.4. Leinamycin Antibiyotiği

Leinamycin antibiyotiği japon bilim insanları tarafından *Streptomyces atroolivaceus* bakterisinin bir suşundan izole dilen güçlü bir antitümör ajandır (Şekil 1.25.) (Hara ve ark. 1990). Bu antibiyotiğin sitotoksik aktivitesi tiyollerin reaksiyonuyla başlar ve DNA'yı guaninin N-7 pozisyonunda alkilleme ile sonlanır (Şekil 1.26.) ve bu da DNA kesimine neden olur (Hara ve ark. 1990), (Gates 2000).



**Şekil 1.25.** Leinamycin antibiyotiğinin yapısı



**Şekil 1.26.** Leinamycin antibiyotiğinin DNA'yı alkilleme mekanizması

### 1.9.5. Antibiyotiklerin DNA Kesimindeki Spesifikliği

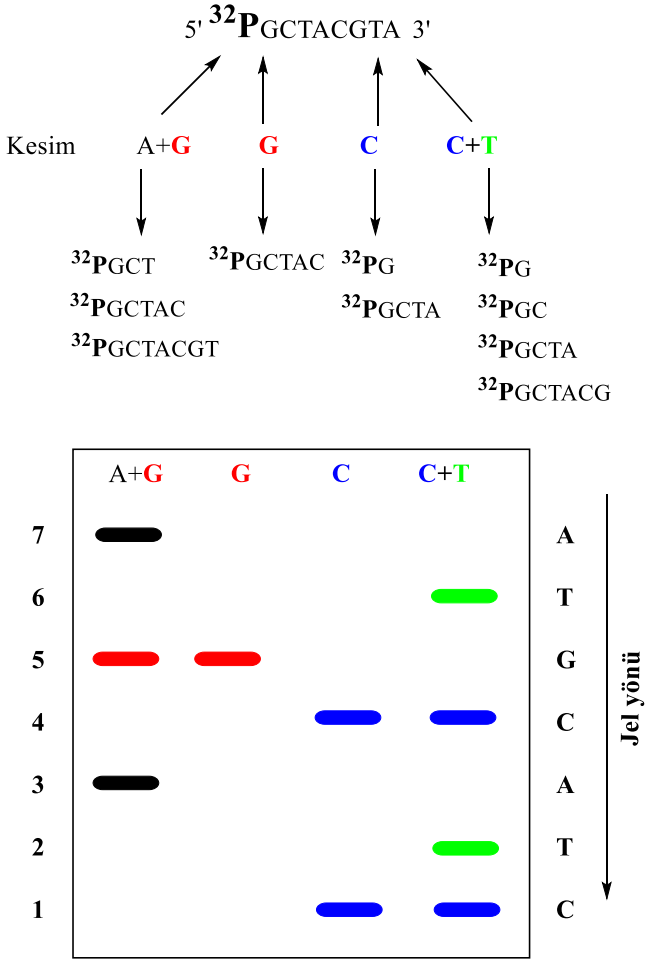
Esperamicin için öncelikli kesim bölgesi Timin (T>C>A>G), Calicheamicin için Sitozin, (C>>T>A=G) Neokarzinostatin için Timin (T>A>C>G) ve Bleomisin için Sitozin (C>T>A>G) bazı iken Dynemicin A için Guanin bazıdır.

Araştırmacılar, DNA üzerinde etkili moleküllerin etkinliğinin yanı sıra bu tür moleküllerin hangi mekanizma ile ya da hangi modda DNA ile etkileştiğini araştırırlar. Bununla da yetinmeyip etkileşimin DNA'nın hangi bölgesinde (büyük ve küçük oluk) meydana geldiği ve baz spesifikliğinin olup olmadığı merak konusu olmuştur. Mekanizmayı aydınlatmak için birçok kimyasal ve biyolojik yöntemler mevcuttur (Maxam-Gilbert ve Sanger metotları gibi).

### 1.10. Maxam-Gilbert Metodu

DNA dizilemesi, DNA molekülündeki bazlarının sırasının belirlenmesidir. DNA dizileme tıp, biyoloji, biyokimya, biyoteknoloji ve özellikle kanser araştırmalarında önmeli bir yere sahiptir. Günümüzde birçok DNA dizileme metodu vardır. Bunlardan bir tanesi de Maxam-Gilbert DNA dizilemesidir. 1976-1977 yılları arasında Allan Maxam ve Walter Gilbert tarafından geliştirilen bir DNA dizileme metodudur. $^{32}P$ ile etiketlenen bu metot, bir terminal DNA molekülünün adenin, sitozin, guanin ve timin bazlarından bir kimyasal ajan ile spesifik olarak kırılmasıdır (şekil 1.27.) (Maxam ve Gilbert 1977), (Heather ve Chain 2016). DNA'ya atak yapan ajan ilkin baza bağlanır daha sonra bazı şekerinden ayırarak DNA hasarına neden olur. Bazını kaybenden şeker (abazik) DNA iskeletinde zayıf bir nokta haline dönüşür ve rahatlıkla kırılmalara neden olur. Bir alkali ya da amin katalizli β-eliminasyon reaksiyonları serileriyle şekeri 3' ve 5' ünden tamamıyla parçalar (Şekil 1.10.).

Radyoaktif gama 32 fosfor kullanılarak etiketlenen DNA nükleotiti, kimyasal reaksiyona maruz kaldığında dört farklı reaksiyon söz konusudur. Genel olarak, pürin bazları (A+G) için formik asit, sadece guanin için dimetil sülfat, pirimidin bazları (C+T) için hidrazin ve sadece sitozin için de hidrazin reaksiyonuna ek olarak sodyum klorür tuzu kullanılır (Şekil 1.27.) (Maxam ve Gilbert 1977), (Heather ve Chain 2016).




**Şekil 1.27.** Maxam-Gilbert yöntemi ve akrilamid jel elektroforez şeması

### 1.11. Tezin Amacı, Önemi ve Hedefleri

Bu tez kapsamında sentezlenen moleküller DNA üzerinde etkili küçük moleküllerdir. DNA'yı alkilasyon mekanizmasıyla hasara uğratan azot hardalı bazlı antikanser ilaçlar klinik olarak sıkça kullanılmaktadır. Ancak bu tür ilaçların tek başlarına etkileri az olduğu için daha çok tamamlayıcı ilaçlarla beraber kemoterapide kullanılmaktadır. Bu amaçla klinik olarak kullanılan ancak etkisi az Klorambusil **(13)** ilacının etkinliğini arttırmak için iki başlı azot hardalı içeren moleküller tasarlayıp sentezlendi.

**Amaç;**

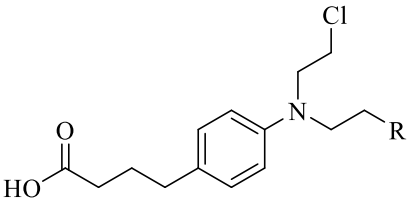
1) Bis-azot hardalı içeren potansiyel antikanser moleküller sentezlendi ve yapıları aydınlatıldı.
2) Sentezlenen moleküllerin *in vitro* Plazmid DNA kesim etkisi incelendi.
3) Sentezlenen moleküllerin kimyasal bağlanma aktiviteleri araştırıldı.
4) Sentezlenen moleküllerin DNA dubleksi üzerine etkisi araştırıldı.
5) Sentezlenen moleküllerin DNA'yı alkilleme mekanizması aydınlatıldı.
6) Literatürde mevcut olan ilaçlardan daha etkili kemoterapötik ajan tasarımına olanak sağlandı.

**Hedefler:**

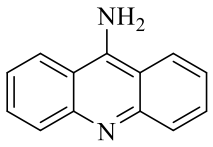
1) Tasarlanan moleküllerin sentezlerini gerçekleştirilerek, yapıları $^{1}H$ ve $^{13}C$ NMR ve HDMS analiz çalışmaları ile aydınlatıldı.
2) Sentezlenen moleküllerin DNA kesim etkisinin mevcut azot hardal moleküllerinden daha etkili ve spesifik olması hedeflendi.
3) Sentezlenen moleküllerin DNA bağlanma ilgilerinin güçlü olması hedeflendi
4) Bu moleküllerin dizayn edilmesindeki amaç sadece biyolojik etkinliği artırmak değil; bununla birlikte DNA'yı alkilleme mekanizması ve bölgesinin aydınlatılmasıdır. Tamamlanan bu tez, literatüre katkı sağlayarak yeni iki başlı antikanser ilaçların tasarlanmasında ve mekanizmasının açıklanmasında etkili olacaktır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

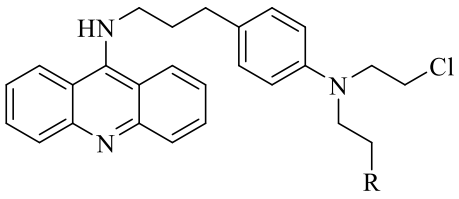
Ferguson ve arkadaşları, 9-aminoacridine ile anilik hardal molekülünün birleştirilmesiyle mono ve bis-fonksiyonel hibrit moleküller **(15-18)** sentezlemişler. Sentezlenen hibrit moleküllerin sitotoksisitesini fare yumurtalığından alınan AS52 hücreleri üzerinde çalışmıştır. Elde edilen veriler mono ve bis-fonksiyonel **(15-18)** moleküllerin, klorambusil antikanser ilacından ve 9-aminoakridin molekülünden çok daha iyi aktivite gösterdiği ve sentezlenen hibrit moleküllerden uzun zincirli moleküllerin kısa zincirli moleküllere oranla daha aktif oldukları rapor edilmiştir (Ferguson ve ark. 2000).



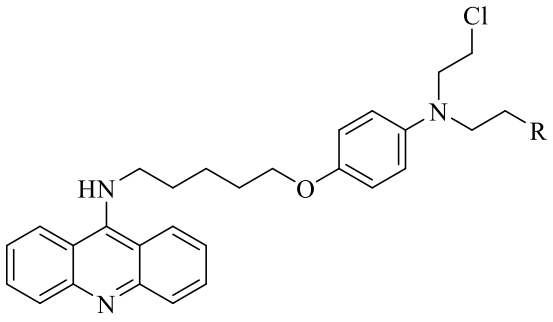

13. R= Cl (klorambusil)
14. R= H




9-aminoakridin

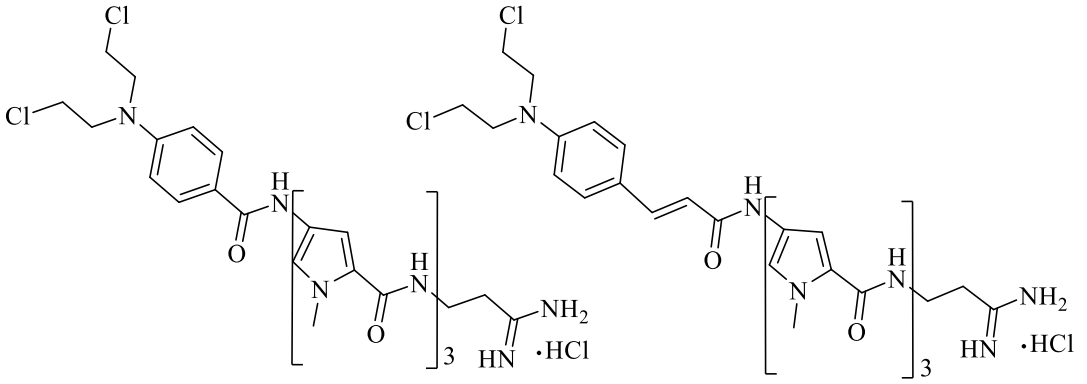



15. R= Cl
16. R= H




17. R= Cl
18. R= H

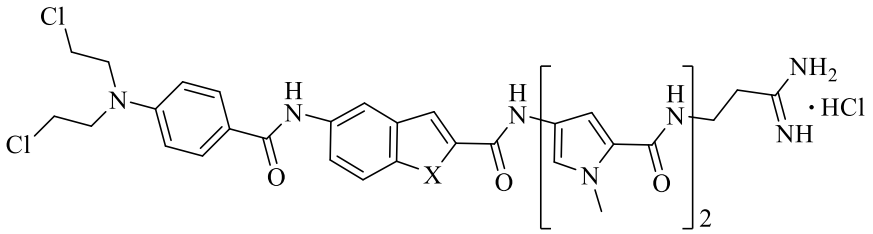
Baraldi ve arkadaşları, tallimustin antikanser ilacının izoesterlerini **(19-26)** sentezlemiş ve kan kanseri hücresi üzerinde antitümör aktivitelerini araştırmışlar. Elde edilen verilerden sentezlenen moleküllerin DNA sarmalında spesifik olarak A-T zengin bölgelerinde, tallimustin kadar aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Baraldi ve ark. 2002).



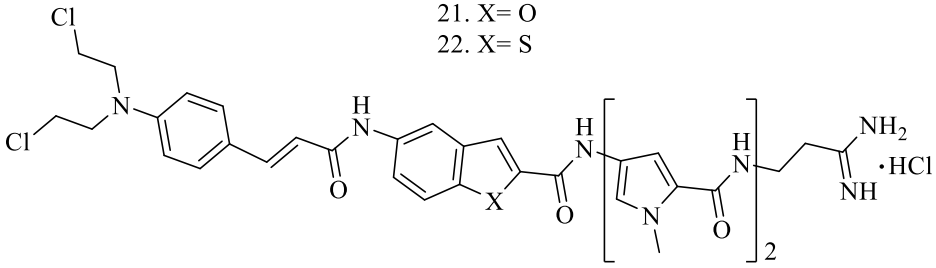
Tallimustin



PNU-157911



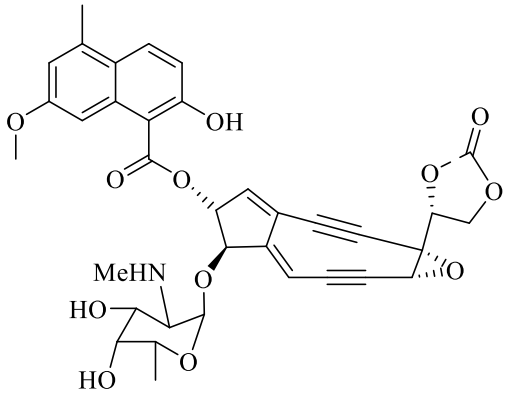
19. X= NH
20. X= N-Me
21. X= O
22. X= S



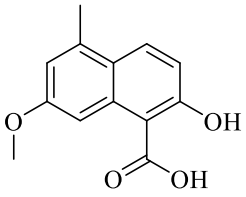
23. X= NH
24. X= N-Me
25. X= O
26. X= S

Naftoat kısmına azot hardalları olan melfalan ve Klorambusil molekülleri ile birleştirip, oluşan yeni moleküllerin biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır **(29-30)**. Yapılan çalışmalarda, sentezlenen moleküllerin, Guanin N-7 pozisyonundan DNA'yı alkilleme aktivitesinin, melfalan-naftoat hibrit molekülü varlığında, daha fazla olduğu ve hidroliz derecesinin azaldığı, fakat klorambusil sentezinde herhangi bir değişikliğin olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca bileşiklerin *in vitro* olarak kanserli hücre hattında K562'ye karşı sitotoksik aktiviteleri MTT testi kullanılarak çalışılmıştır. Bileşiklerin DNA'da hasar oluşturma kapasitelerinin, hücre büyümesini inhibe etme kabiliyetleri ile doğru orantılı olduğu, klorambusil-naftoat hibrit bileşiğinin etkisinin düşük olduğu ve

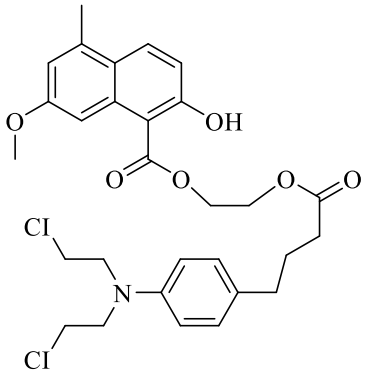
melfalan-naftoat hibrit bileşiğinin ise etkisinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Urbaniak ve ark. 2004).



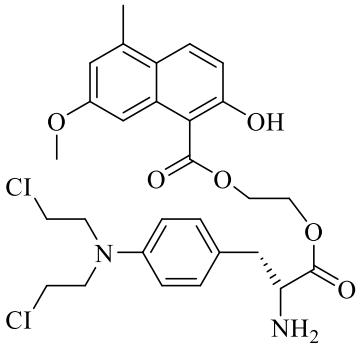
27. Neokarzinostatin (apo-NCS)



28. Naftoat

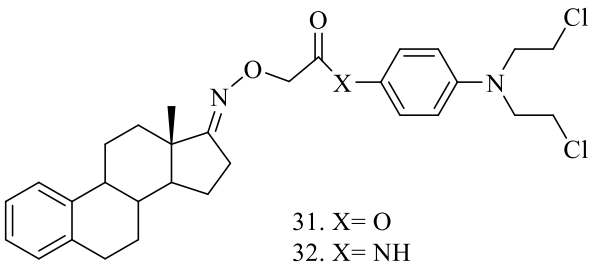


29. Klorambusil-Naftoat



30. Melfelan-Naftoat

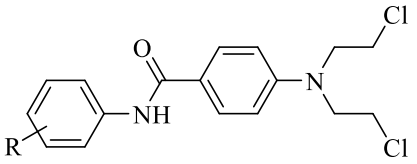
Zhang ve arkadaşları, steroid-azot hardalı konjugasyonu ile iki farklı molekül **(31-32)** sentezlemişler. Sentezlenen moleküller ile kolon kanseri ve akciğer kanseri hücreleri üzerinde yapılan MTT testinde 31 molekülünün daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Zhang ve ark. 2009).



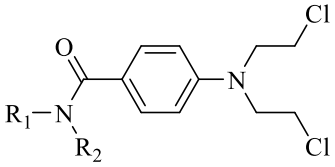
31. X= O
32. X= NH

Zheng ve arkadaşları, bir dizi molekül **(33a-t)** sentezleyip hem antikanser aktivitelerine hem de yapı-aktivite ilişkilerini araştırmışlar. Meme kanseri hücresi

üzerinde yapılan MTT deneyinde bütün moleküllerin inhibisyon etkisine sahip oldukları, **33b** ve **33t** moleküllerin pozitif kontrol olarak kullanılan erlotinip antikanser ajanı kadar inhibisyon aktivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir (Zheng ve ark. 2010).

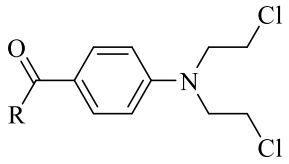


33 a-j

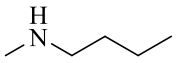


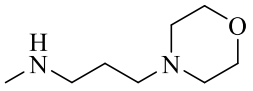
33 k-m

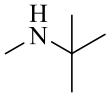
a. R= *p*-$CH_3$
b. R= *p*-$CH_3O$
c. R= *p*-$CH(CH_3)_2$
d. R= *o*-F
e. R= *o*-Cl
f. R= *o*-Br
g. R= *p*-F
h. R= *p*-Cl
i. R= *p*-Br
j. R= *p*-$NO_2$
k. $R_1$= *n*-propyl, $R_2$= *n*-propyl
l. $R_1$= *n*-butyl, $R_2$= *n*-butyl
m. $R_1$= $C_6H_5$, $R_2$= $CH_3$

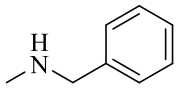


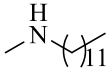
33 n-t

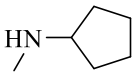
n. R= 

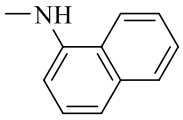
r. R= 

o. R= 

s. R= 

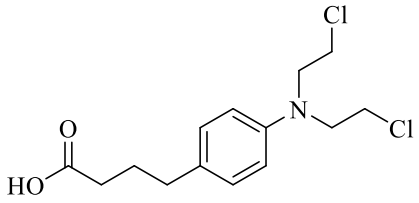
p. R= 

q. R= 

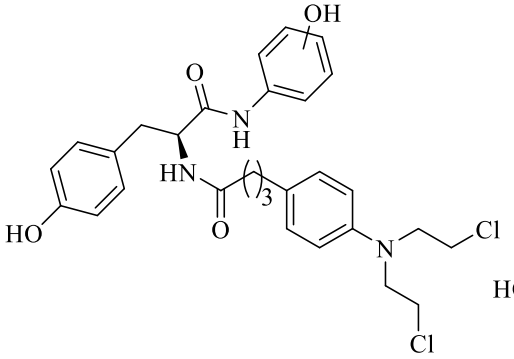
t. R= 

Descoteaux ve arkadaşları, L-*p*-tirozin ile *o, m* ve *p*-hidroksianilini birleştirerek üç farkı tirosinamid molekülü elde etmişler. Daha sonra bu molekülleri klorambusil ve farklı zincir boylarındaki klorambusil türevleri (**5** ve **10** karbonlu) ile etkileştirerek hibrit moleküller sentezlemişler. Sentezlenen hibrit moleküllerin *in vitro* olarak sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Meme, yumurtalık ve rahim ağzı kanser hücreleri üzerinden yapılan MTT deneyinde **34** ve **35** *o, m* ve *p*-hidroksianilin (**5** karbonlu) hibrit

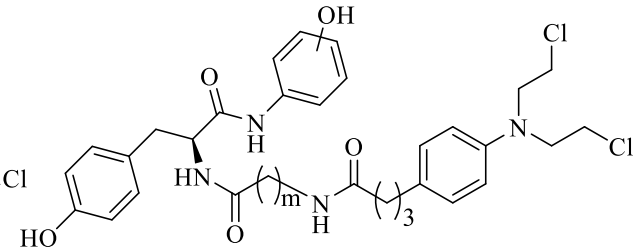
moleküllerinin klorambusilden daha aktif, **34** ve **35** *o, m* ve *p*-hidroksianilin hibrit moleküllerinin ise daha az aktif olduğu rapor edilmiştir. Bunun nedeninin ise alkil zincirinin uzunluğu olabileceğini belirtilmiştir (Descoteaux ve ark. 2012).



13. Klorambusil



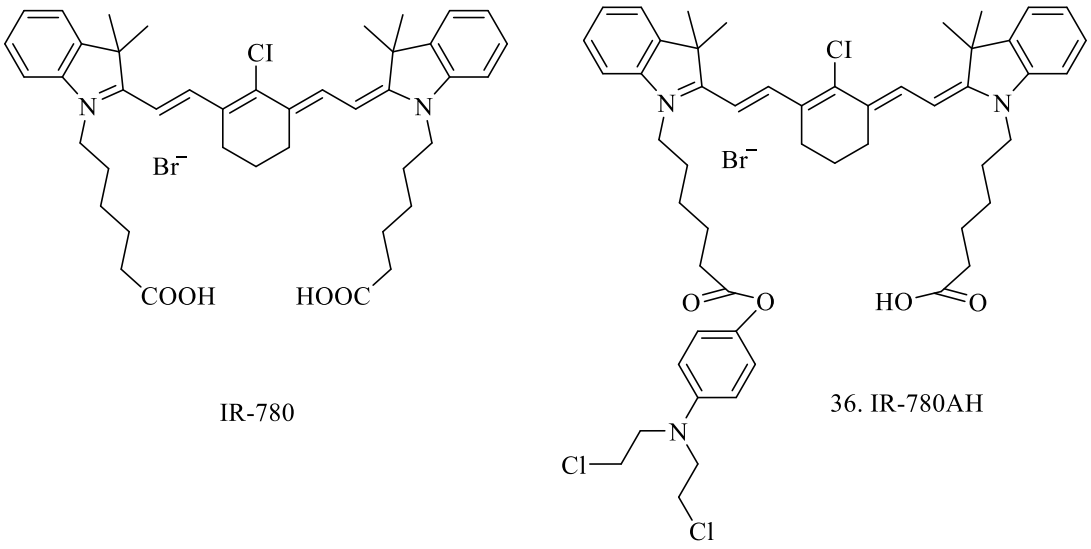
34. *o, m, p*-hidroksianilin



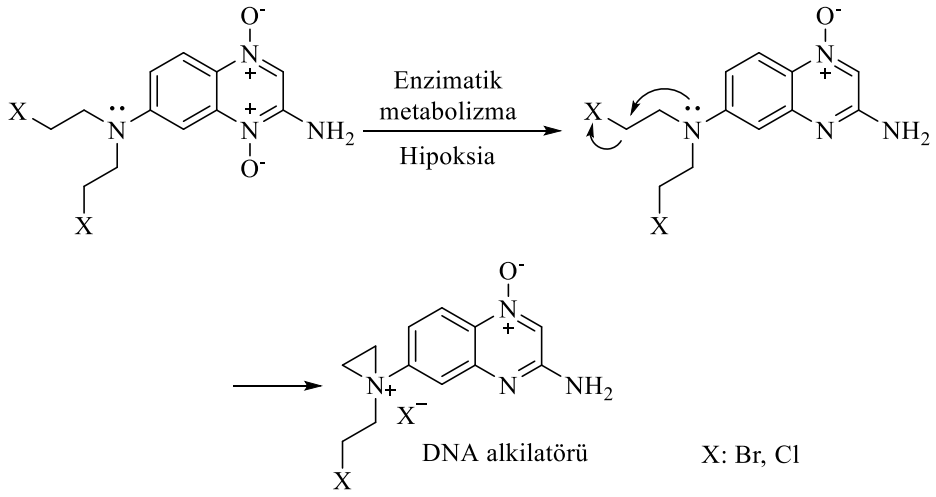
35. *o, m, p*-hidroksianilin

m= 5 veya 10

Zhang ve arkadaşları, daha önce sentezledikleri floresans özellikli heptamin boyası (IR-780) ile aromatik azot hardal molekülünü birleştirerek hibrit molekül (IR-780AH) sentezlemişler. Sentezlenen ilacın, selektif olarak tümörlü hücrelere taşınması araştırılmıştır. İlaç, bir dizi görüntüleme tekniği ile tümörlü ve tümörsüz hücreler üzerindeki aktivitesi ve hücredeki yoğunluğu incelenmiştir. Elde edilen veriler hibrit molekülün tümörlü hücrelerde daha çok biriktiği belirtilmiştir. Yazarlar bu hibrit molekünün tümörlü hücrelerin radyolojik olarak görüntülenmesi ve ilaçların hedefe taşınması için model antikanser ilaç olabileceğini rapor etmişler (Zhang ve ark. 2014).

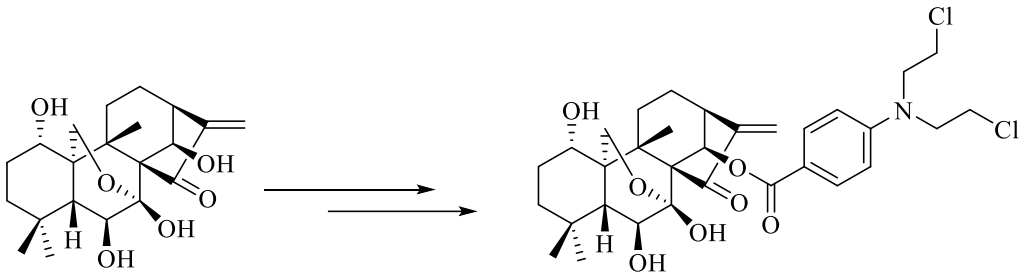



Johnson ve arkadaşları (2014), heterosiklik yapılı tripazamin molekülünün vücutta oksijence fakir (hipoksia) solid tümörlerde enzimatik deoksijenasyona uğrayarak mono N-oksit metabolitini oluşturduğu bilgisinden esinlenerek, birçok kanser tedavisinde kullanılan azot hardalı bazlı ilaçların vücuttaki kararlılığını ve seçiciliğini (olası makromoleküllerde alkilasyon yapmaması) arttırmak için tripazamin analogları içeren hibrit azot hardalı moleküllerini sentezlemişler. Bu amaçla sentezlenen moleküllerin seçici olarak oksijence fakir hücrelerde alkilasyon yaptıkları rapor edilmiştir (Johnson ve ark 2014).



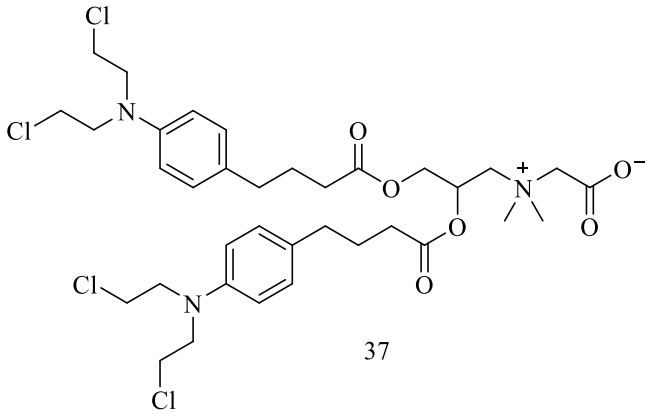

Xu ve arkadaşaları (2014), doğal ürün olan Oridonin türevlerinden azot hardalı içeren bir dizi molekül sentezlemişler. İnsan kanser hücreleri üzerinde (K562, MCF-7, Bel-7402, and MGC-803) yapılan sitotoksisite çalışmalarında hibrit moleküllerin

oridonin molekülünden yaklaşık 21 kat daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Xu ve ark. 2014).



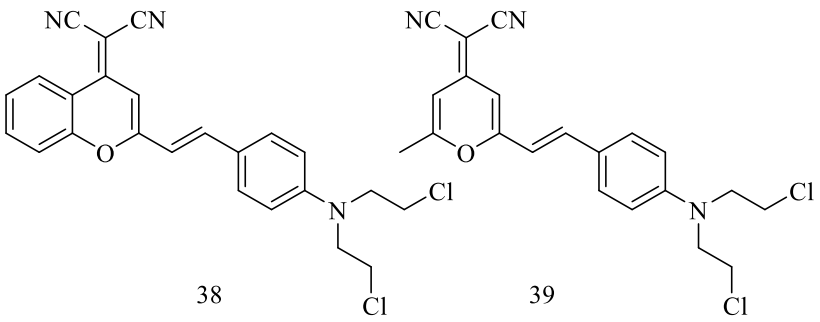
Oridonin Hibrit molekül

Fang ve arkadaşları tarafından betaine konjuge iki başlı azot hardalı sentezlenmiştir. Bu molekülün kanserli hücrelere karşı sitotoksisitesi klorambusil molekülüne kıyasla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Fang ve ark. 2015).



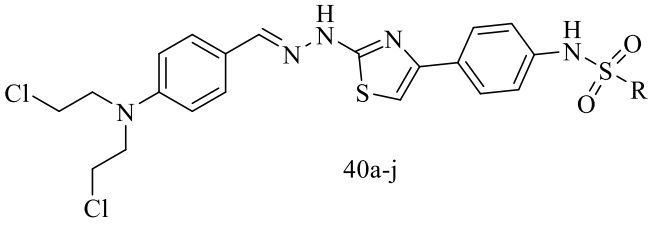
37

Başka bir çalışmada sentezlenen mitokondri hedefli azot hardallarının (**38** ve **39**) tümörlü hücrelerdeki floresans özellikleri akış sitometrisi yöntemi ile araştırılmış ve her iki molekülün de spesifik olarak mitokondride floresans özellikte olduğu ayrıca iyi antitümör aktiviteye de sahip oldukları rapor edilmiştir (Chen ve ark. 2016).

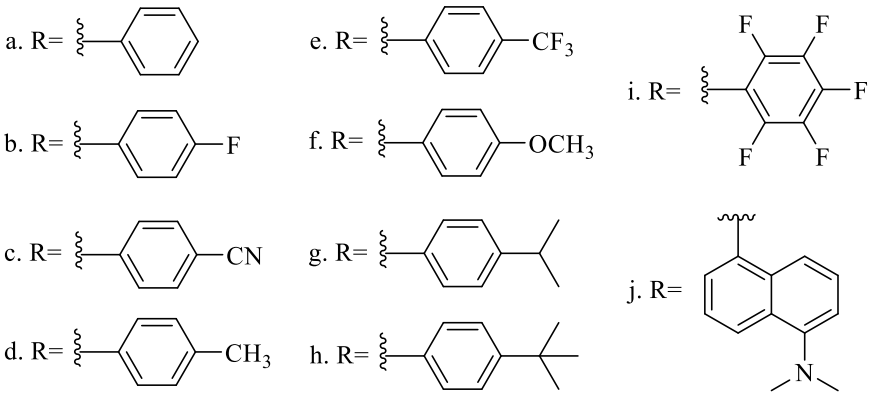


38 39

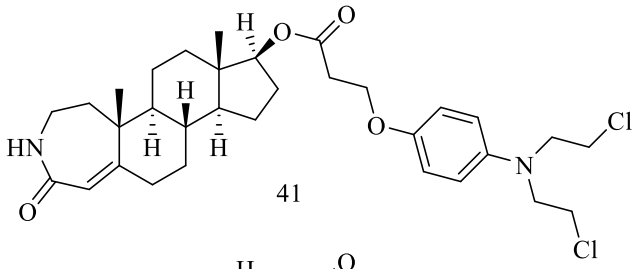
Laczkowski ve arkadaşları tarafından sentezlenen tiazol bazlı azot hardalların (40a-j) kanserli hücre hatları (MV4-11, A549, MCF-7 ve HCT116) ve normal fare fibroblastı (BALB/3T3) üzerinde sitokosisite etkileri araştırılmıştır. **40b**, **40c**, **40e**, **40f** ve **40i** moleküllerinin özellikle kan kanseri hücre hatları (MV4-11) üzerinde yüksek aktiviteye ve **40c** ile **40f** moleküllerinin normal fare fibroblastına (BALB/3T3) karşı sitotoksisitesi kanserli hücrelerden 20 kat daha az olduğu rapor edilmiştir (Laczkowski ve ark. 2016).



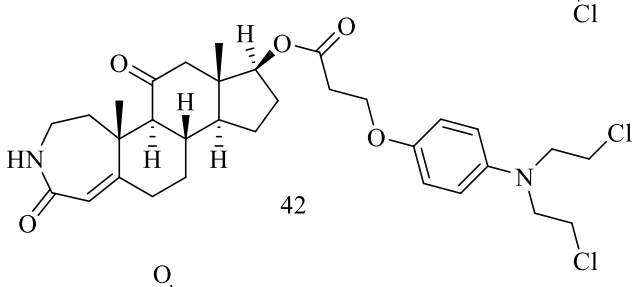
40a-j



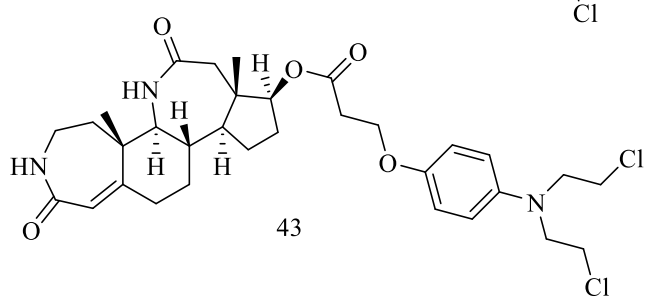

Başka bir çalışmada Trafalis ve arkadaşları tarafından tasarlanan ve sentezlenen hibrid azosteroidial azot hardallarının (**41**, **42**, **43** ve **44**) *in vivo* ve *in vitro* testlerle antikanser aktiviteleri araştırılmıştır. Kan kanseri hücre hatları üzerinde yapılan deneylerde moleküllerin daha düşük toksisitesi ve yüksek antikanser aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (Trafalis ve ark. 2016).



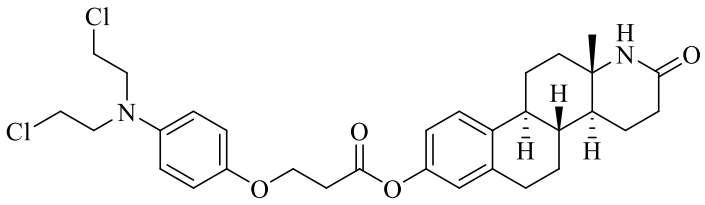
41



42

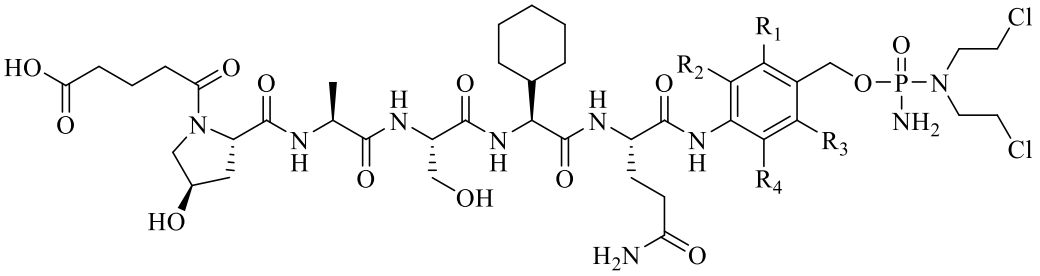


43



44

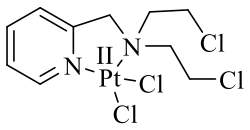
Wu ve Hu (2016), bir dizi Glutaril-Hyp-Ala-Ser-Chg-Gln-4-aminobenzil fosforamide konjuge azot hardalları **(45a-e)** sentezlenmiş ve prostat kanseri hücreleri üzerinde antikanser etkileri yanı sıra yapı-aktivite çalışmaları yapılmıştır. Bütün moleküllerin prostat kanserine karşı etkili olduğu ve yapıda bulunan flor atomunun pozisyonunun kararlılık açısından önemli olduğu rapor edilmiştir. **45b** molekülünün öncü molekül olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir (Wu ve Hu 2016).



45a-e

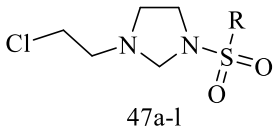
a. $R_1$, $R_2$, $R_3$, $R_4$= H
b. $R_1$= F, $R_2$, $R_3$, $R_4$= H
c. $R_2$,= F, $R_1$, $R_3$, $R_4$= H
d. $R_1$, $R_3$= F, $R_2$, $R_4$= H
e. $R_4$= F, $R_1$, $R_2$, $R_3$= H

Karmakar ve arkadaşları cis-dikloroplatin(II) kompleksi ile azot hardalı molekülünü içeren bileşik **(46)** sentezlemişler. Yapılan kararlılık ve anti kanser testler sonucunda hem azot hardalının varlığı hem de platn kompleksinin varlığı molekülde glutatyona karşı kararlılık sağladığını ve bu nedenle anti kanser etkisnin cis-platin kompleksinden daha iyi olduğu rapor edilmiştir (Karmakar ve ark. 2016).

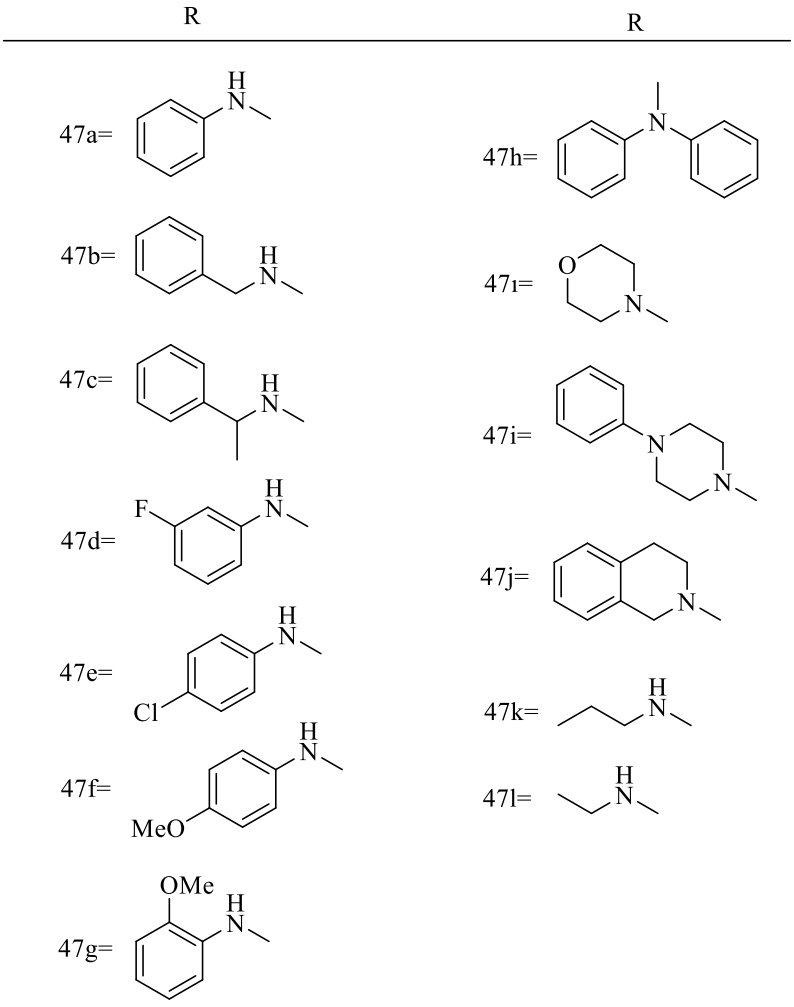


46

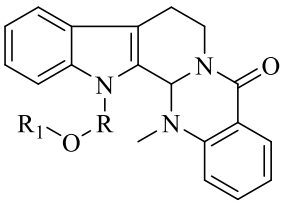
Cheloufi ve arkadaşları, azot hardalı kullanarak sülfosikloürea türevlerini **(47a-l)** sentezlemişler. Dört farklı kanser hücre hatları (Jurkat, K562, U266, and A431) üzerinde yapılan sitotoksisite çalışmaları sonucunda sentezlenen moleküllerin antikanser aktiviteye sahip oldukları ancak Klorambusil ile karşılaştırıldığında daha az aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir (Cheloufi ve ark. 2016).



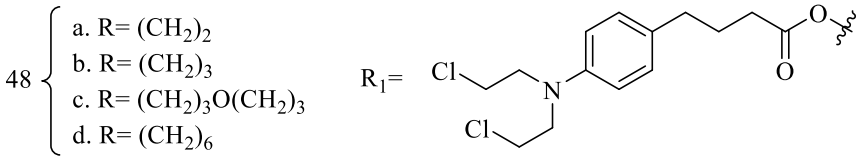
47a-l

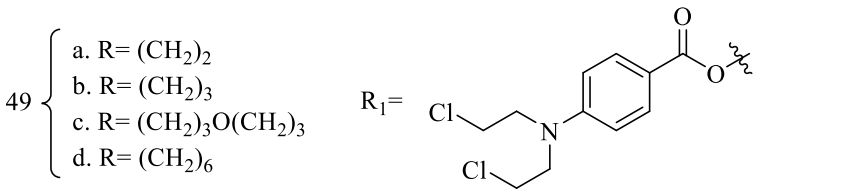


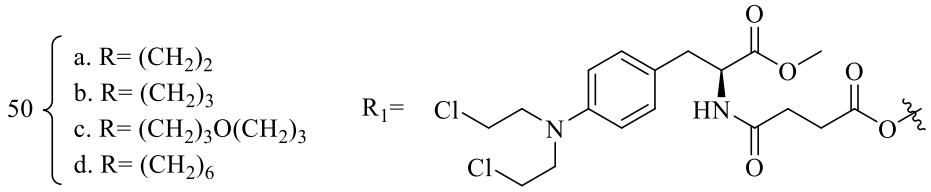

Hu ve çalışma arkadaşları tarafında tasarlanan ve sentezlenen azot hardallarına konjuge evodiamin molekülleri (**48a-d**, **49a-d** ve **50a-d**) dört farklı kanser hücre hatları (PC-3, HepG2, THP-1 ve HL-60) ve normal sağlıklı hücre (PBMC) üzerinde sitotoksisite yetenekleri test edilmiş ve tüm moleküllerin antikanser aktviteye sahip oldukları rapor edilmiştir. Bu moleküller içinde **48c** molekülü çok güçlü antikanser etki gösterdiği için kanserli hücre hattı (HL-60) üzerindeki etkinin mekanizması çalışması yapılmıştır. Çalışma sonunda $G_2$ fazında mitokondri yolağında hücrede apoptize neden olduğu tespit edilmiştir (Hu ve ark. 2017).



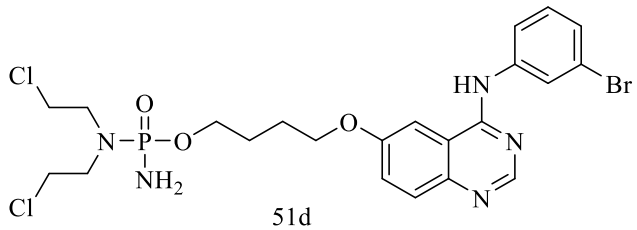
48a-d, 49a-d, 50a-d



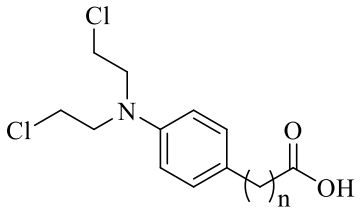

Lin ve arkadaşları EGFR/HER2 reseptörleri inhibitörlerinin ana yapısını (kinozolin) içeren birçok fosforamid azot hardalları **(51a-r)** sentezlemiştir. Bunlardan **51d** molekülü EGFR/HER2 ye karşı en yüksek inhibisyon aktivitesine sahip olduğu ayrıca MDA-MB-468 ve H522 hücre hatları üzerinde de yüksek aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Lin ve ark. 2017).



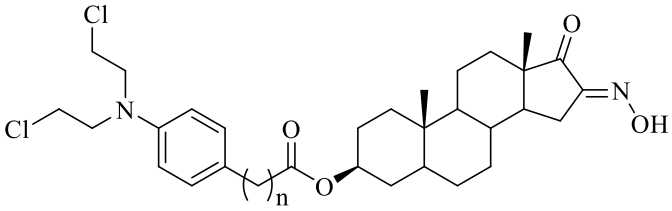
51d

Acharya ve Bansal sentezledikleri streoid türevi azot hardallarını bir dizi test ile kimyasal ve biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. 4-(*p*-nitrobenzil)piridin (NBP) ile yapılan kimyasal alkilasyon aktivite deneyi ile 0.4 mM konsantrasyonda kullanılan hardalların ölçülen absorbans değerlerine bakılarak belirlenen alkilasyon aktivitesinin

tek başlarına kullanıldığından daha aktif olduğu rapor edilmiştir (Acharya ve Bansal 2017).

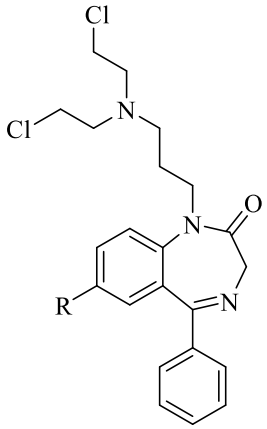


52. n= 0
53. n= 1



54. n= 0
55. n= 1

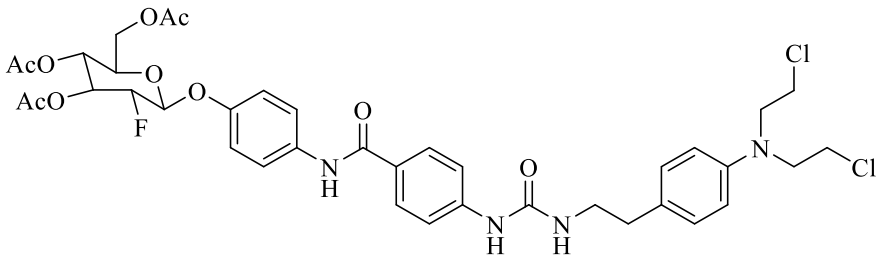
Singh ve arkadaşları benzodiazapene konjuge azot hardalları (**56** ve **57**) sentezlemişler. Moleküllerin merkezi sinir sistemi tümörlerine karşı etkili olabileceği ön görülerek *in vivo* ve *in vitro* birçok test yapılmıştır. NBP ile deneyde benzodiazapene konjuge hardalların Klorambusilden daha fazla alkilasyon aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Singh ve ark. 2017).



56. R= Cl
57. R= $NO_2$

El Hilali ve arkadaşları Klorambusil'e konjuge florodeoksiglukoz içeren bir dizi molekül sentezlemişler. Sentezlenen moleküller beş farklı kanser hücre hattı üzerinde

antikanser aktiviteleri test edilmiş ve en iyi aktiviteyi bileşik **58**'in gösterdiği rapor edilmiştitr (El Hilali ve ark. 2017).




58

Yukarıda özetleri verilen daha önceki çalışmaları incelediğimizde 1950'den bu yana azot hardalları günümüze kadar birçok çalışmanın konusu olmuş ve halen araştırmacılar bu molekülün türevlerini, etkinliğini ve spesifikliğini arttırma adına çalışmaya devam etmektedirler. Ancak yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda sentezlenen molekülün etki mekanizmasına dair çalışmalar yoktur. Bu tezde literatürdeki bu eksikliği giderme adına sentezlenen molekülün aktivitesi ve etki mekanizmasının aydınlatma çalışmaları yapıldı.

## 3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Missouri Üniversitesi, Kimya Bölümü (Columbia Missouri, Amerika) Laboratuvarlarında yapılmıştır.

### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

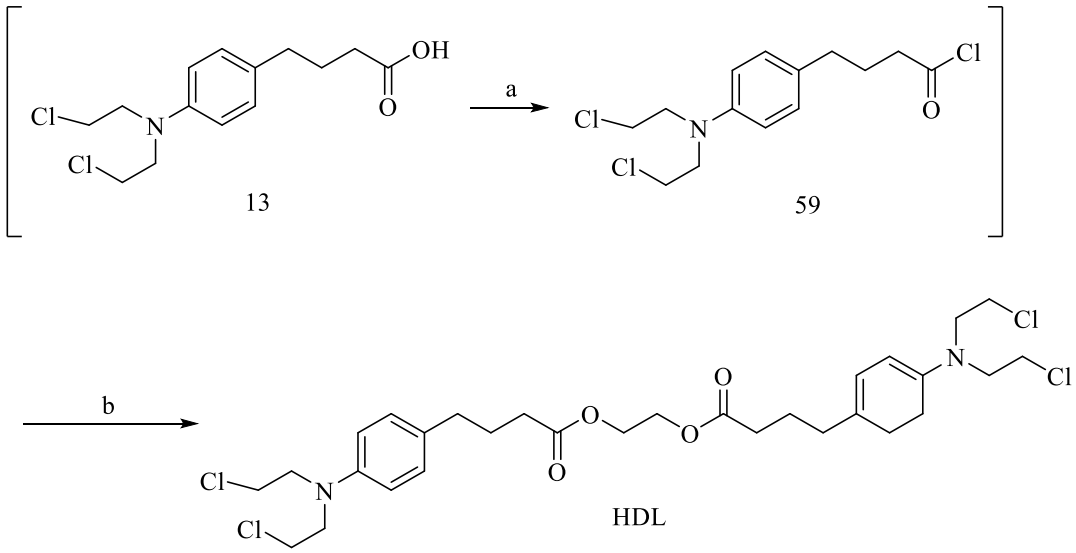
Klorombusil (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), 4-aminobenzoat (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), asetik asit (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), etilen oksit (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), amonyum hidroksit (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), etil asetat (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), magnezyum sülfat (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), benzen (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), tiyonil klorür (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), hidroklorik asit (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), formamid (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), dimetilsülfoksit (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), sodyum bikarbonat (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), hekzan (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), okzalil klorür (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), diklorometan (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), etilen glikol (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), piridin (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), N,N′-dimetiyletilendiamin (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), tris asetat (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), etilendiamin asetik asit (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), 4-(*p*-nitrobenzil)piridin, etanol (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), etidyum bromür (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), potastum hidroksit (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), agaroz (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), oligonükleotitler (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). Urasil DNA glikolaz (UDG) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), T4 DNA polinükleotit kinaz (T4 PNK) (New England Biolabs Ipswich, MA, USA), [$\gamma$-$^{32}$P]-ATP (6000 Ci/mmol) (PerkinElmer), C-18 Sep-Pak kartuş (Waters, Milford, MA, USA), BS Poly prep kolon (BioRad, Hercules, CA, USA), HEPES tamponu (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), sodyum fosfat (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA), Akrilamid/bis-akrilamid 19:1 (40% Solüsyon/Elektroforez) (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ve Kloroform-$D_1$ (Merck), kullanılmıştır.

### 3.2. Kullanılan Aletler

$^{1}$H NMR (Bruker 500 ve 600 MHz), $^{13}$C NMR (Bruker 500 ve 600 MHz), yatay agaroz jel elektroforezi ve güç kaynağı (BioRad, Hercules, CA, USA), Cary 100 UV-VIS Spectrometer, Moleküler görüntüleme (BioRad, Quantity One programı, 4.6.5. versiyonu, Hercules, CA, USA), jel görüntüleme cihazı (BioRad, Quantity One programı, 4.6.5. versiyonu, Hercules, CA, USA), Sterilizatör (Heraus), -20 Derin Dondurucu (Sanyo), Santrifüj (Universal 320 R, Hettich), pH metre (Mettler-toledo), Çeker Ocak, Evaporatör (RE 100B, Bibby Strilin Ltd.), terazi (Mettler Toledo) su banyosu, SpeedVac liyoflizatör, Sterilizatör (Heraus) kullanılmıştır.

### 3.3. Sentez Çalışmaları

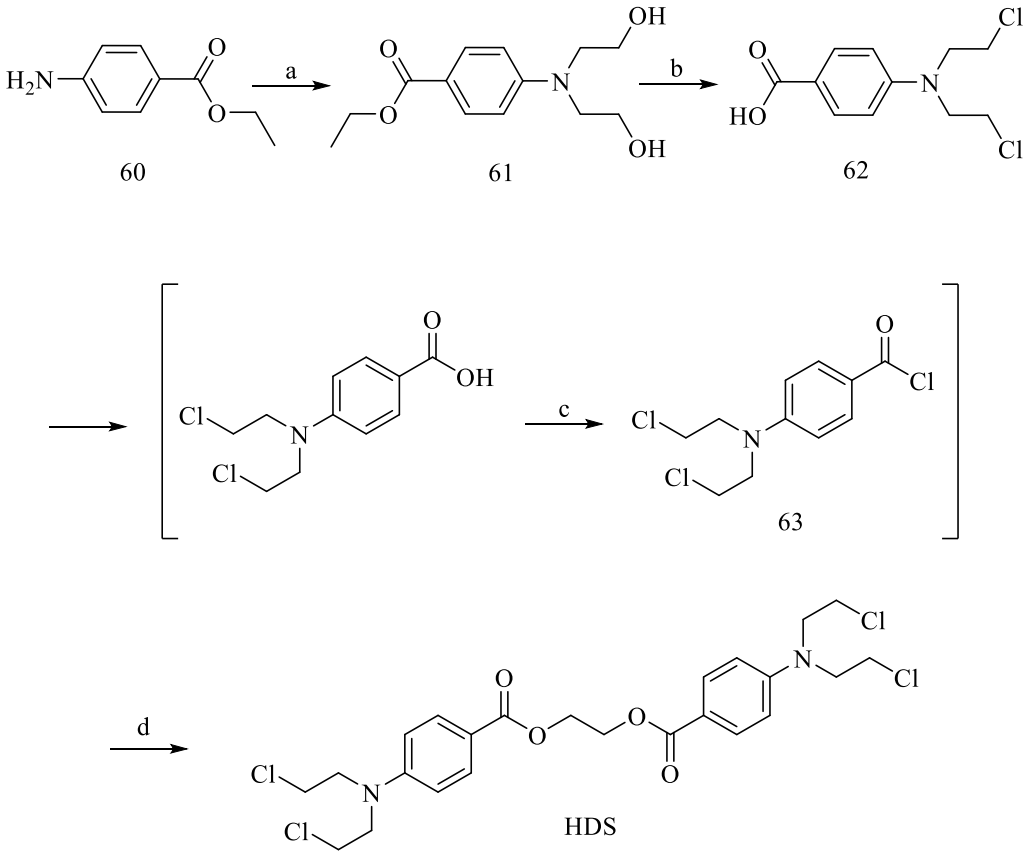
#### 3.3.1. Bis-(4-(4-(bis(2-kloroetil)amino)fenil)bütanoat)-1,2-etandiil (HDL) Sentez Şeması




**Şekil 3.1.** HDL molekülünün sentez şeması; a) Okzalil klorür, oda sıcaklığı, 30 dk., b) Etilen glikol, piridin,$CH_2Cl_2$, oda sıcaklığı, 8 saat

Klorambusil molekülünün nükleofilik ataklara daha açık hale gelmesi için okzalil klorür varlığında asit klorüre **(59)** dönüştürüldü. Daha sonra saflaştırma işlemi yapılmadan reaksiyonun yüzde yüz gerçekleşmiş olduğu kabul edilerek reaksiyona devam edildi. Sonra birkaç kez susuz diklorometan ile yıkanan asit klorürün etilen glikol ile esterleşme reaksiyonu sonucu HDL molekülü sentezlendi.

### 3.3.2. Bis-(4-(4-(bis-(2-kloroetil)amino)benzoat)-1,2-etandiil (HDS) Sentez Şeması




**Şekil 3.2.** HDS molekülünün sentez şeması a) etilen oksit, %25 sulu asetik asit, oda sıcaklığı, 24 saat; b) (1) $SOCl_2$, benzen, refluks, 3 saat, (2) HCl (konsantre), refluks, 3 saat, c) Okzalil klorür, oda sıcaklığı, 30 dk, d) etilen glikol, piridin, $CH_2Cl_2$, oda sıcaklığı, 8 saat

4-amino benzoat **(60)** molekülü ile etilen oksit ile reaksiyonu sonucu 4-(bis-(2-hidroksietil)amino)benzoat **(61)** sentezlendi. Sonra **61** molekülü önce tiyonil klorür ile etkileştirerek 4-(bis-(2-klororetil)amino)benzoat sentezlendi, sonra saflaştırma işlemi yapılmadan derişik hidroklorik asit ile ester asite dönüştürülerek 4-(bis-(2-klororetil)amino)benzoik asit **(62)** sentezlendi. Sentezlenen azot hardalı **(62)** molekülü nükleofilik ataklara daha açık hale gelmesi için okzalil klorür varlığında asit klorüre **(63)** dönüştürüldü. Sonra hiç saflaştırma yapmadan reaksiyonun yüzde yüz gerçekleşmiş olduğu kabul edilerek reaksiyona devam edildi. Birkaç kez kuru diklorometan ile yıkanan asit klorürün etilen glikol ile esterleşme reaksiyonu sonucu HDS molekülü sentezlendi.

Ancak sentezlenen HDS molekülünün çok kararsız olmasından dolayı çok çabuk bozundu. Saflaştırma işleminden hemen sonra aniden renk değiştirmesi ve alınan NMR örneklerinin uyuşmaması gibi nedenlerden dolayı daha sonra yapılacak biyolojik ve kimyasal aktivite çalışmalarında kullanılamadı.

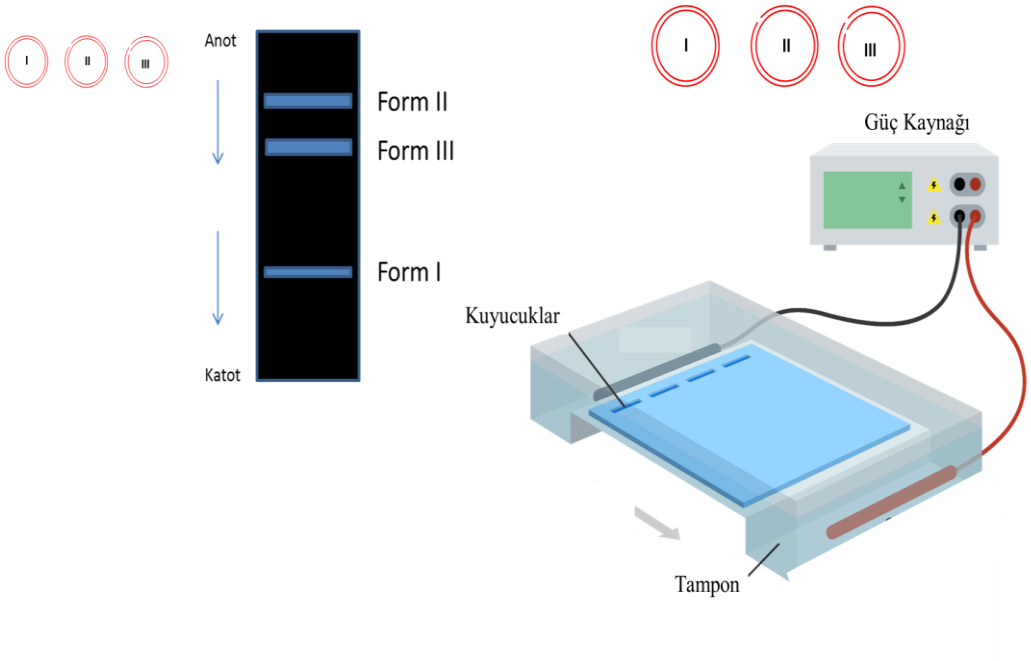
### 3.4. Plazmit DNA Kesim Çalışmaları

Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin ayrımı, tanımlanması ve saflaştırılması için kullanılan bir yöntemdir. Bu yüzden agaroz jel elektroforezi, çeşitli nedenlerle saflaştırılan DNA'nın tanımlanabilmesi, büyüklüğünün belirlenebilmesi ve özellikle yapısında yapılan değişikliklerle hangi formda olduğunu tespit etmek için iyi bir tekniktir.

Jel elektroforezi, makromolekülleri büyüklük, elektrik yükü ve diğer fiziksel özellikler temelinde ayıran bir yöntemdir. Elektroforez terimi yüklü partiküllerin elektrik akımı etkisi altında hareketini açıklamaktadır.

Birçok önemli biyolojik makromolekül (amino asitler, peptitler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler) iyonlaşabilen gruplara sahiptir ve pH'ya bağlı olarak çözeltide katyon (+) ya da anyon (-) biçiminde, elektrik yükü taşıyan türler olarak bulunurlar. Net yükün özelliğine bağlı olarak yüklü partiküller katoda veya anoda doğru hareket ederler. Elektrik alanının uygulandığı jel nötral pH'da ise DNA'nın negatif yüklü fosfat grupları anottan katoda doğru hareket eder (Şekil 3.3.).

Sentezlenen molekülün plazmit DNA üzerine aktivitesi agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Bu sistemle; DNA'nın supercoiled formunun (form I, kırık yok), open circular form (form II, DNA zincirinde sadece bir kırık var) ve linear form'a (form III, DNA zincirinde birden fazla kırık var) dönüşümü incelendi. Form I, yük yoğunluğu fazla, hacmi de düşük olduğu için jelde en hızlı hareket eden formdur. Form II'nin yoğunluğu daha az olduğu için daha yavaş hareket eder. Form III ise Form I ve Form II' nin arasında bir hıza sahiptir (Şekil 3.3.).




**Şekil 3.3.** Plazmit DNA formları ve yatay agaroz jel elektroforezi

### 3.4.1. Agaroz Jel Elektroforezi Yöntemi ile DNA Kesim Çalışmaları

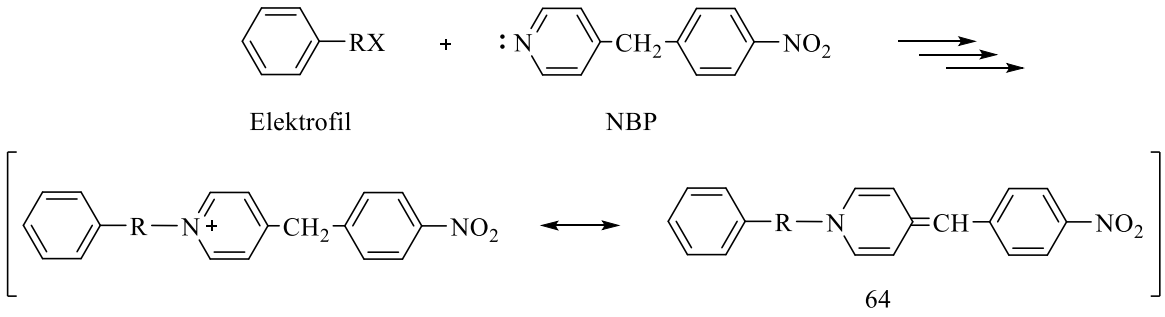
Agaroz (2.7 g) 300 mL Tris asetat tamponuna (40 mM tris asetat, 1 mM EDTA, pH 8.2) ilave edildi ve mikrodalga fırında kaynatıldı. 60 $^{o}$C'ye karıştırılarak soğutuldu. Sonra jel üç eşit tanka dökülerek soğumaya bırakıldı. Soğuyan jelin üstü jelatinle kaplanarak +4 $^{o}$C de bir gece bekletilip kullanıma hazır hale geldi.

Bir gece önceden hazırlanan jel dikkatli bir şekilde yerleştirilerek numuneler kuyucukları taşmayacak şekilde yüklendi. Yükleme işleminden sonra 300 mA ve 80 Volt koşullarında 3 saat boyunca yürütme işlemi devam ettirildi. Sonra jeller daha önce hazırlanmış etidyum bromür (500 mL saf su ve 50 µL etidyum bromür) banyosunda 20 dk bekletildi. Son olarak 15 dk saf su içinde bekletilip Bio-Rad, jel görüntüleme cihazında, Quantity One programı kullanılarak jellerin resimleri çekilip gerekli hesaplar (Hesaplamalar form I ve form II deki bant yoğunluğuna bakılarak yapıldı. Plazmit başına zincir kırıklarını S= -ln fI eşitliği kullanılarak hesaplandı. Burada sırasıyla S Plazmit başına zincir karıklarını, fI sağlam kalan form I miktarını göstermektedir) yapıldı.

### 3.5. NBP (4-(*p*-nitrobenzil)piridin) ile Kimyasal Aktivite Çalışmaları

Bir molekülün kimyasal alkilasyon aktivitesini belirleme yöntemlerinden bir tanesi de nükleofilitesi DNA bazlarına (N-7 guanin) benzer değerde olan 4-(*p*-nitrobenzil)piridin ile reaksiyonu sonucu oluşan maddelerin absorbans değerlerinin belirlenmesidir.

Burada ısı ve bazik bir ortamında NBP molekülünün nükleofilik atağı sonucu oluşan rezonans yapılardan mor renkli kromoforun **(64)** absorbans değeri alkilasyon olup olmadığı veya var olan absorbansın standart molekülle kıyaslanması yapılır (Şekil 3.4.).

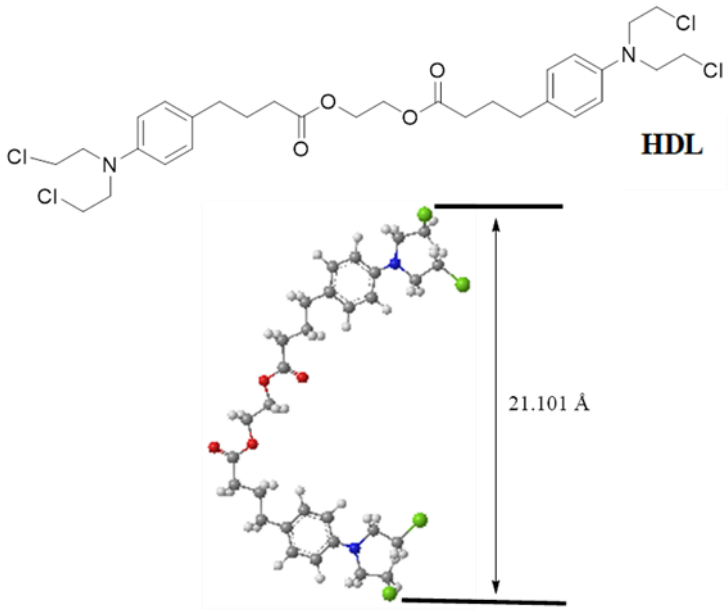



**Şekil 3.4.** Bir elektrofilin NBP ile reaksiyonu

Farklı konsantrasyonlardaki numuneler tüplere ilave edilerek 1 mL etanolde çözünür. Sonra her bir tüpe 1 mL %5 lik NBP (4-(*p*-nitrobenzil)piridin) (etanol içinde) ve 0.05 M asetat (pH 4.2) tamponu ilave edildilip 80 ºC de 30 dk su banyosunda inkübe edilir. Bu süre sonunda 0.1 N KOH ilave edilip vorteks ile karıştırıl ve oluşan mor renkli numunelerin absorbans (585 nm) ölçümü yapılır.

### 3.6. Mono-alkilasyon ve Çapraz Bağlanma Çalışmaları

Çapraz bağlanma ve Maxam-Gilbert yöntemi ile mono-alkilasyon çalışmları için öncelikle molekülün kararlı haldeki uzunluğu ölçülerek en uygun oligonükleotit dizayn edildi. Bunun yanı sıra dizayn edilen oligonükleotitde sadece bir bazı değiştirerek mutant oligonükleotit de dizayn edildi (Şekil 3.5.).




**A** 5′-TAA TAT ATA ATT AAG GGC CCT GAC TTA AAT TCT
3′-ATT ATA TAT TAA TTC CCG GGA CTG AAT TTA AGA

**B** 5′-TAA TAT ATA ATT AAG GGC CCT GAC TTA AAT TCT
3′-ATT ATA TAT TAA TTC CCT GGA CTG AAT TTA AGA

**Şekil 3.5.** HDL molekülünün uzunluğu ve buna göre dizayn edilen oligonükleotitler

Tek zincir halde gelen 2'-deoksinükleotit standart prosedür takip edilerek γ-$^{32}$P ile 5' den işaretleme işlemi yapılıp ve komplomenteri ile çift sarmal haline getirildi.

Çapraz bağlanma işlemi için sentezlenen molekül (HDL) veya standart molekül (final konsantrasyon 10 mM, DMSO içinde) HEPES (50 mM pH 7 ve 100 mM NaCl) tamponunda 37 ºC sıcaklıkta 47 saat inkübe edildi. Sonra DNA reaksiyon ortamından ayırmak için etanolde çöktürüldü ve formamid ile tekrardan süspanse hale getirildi. Üzerine yükleme tamponu eklendikten sonra %20 lik denature poliakrilamid jel elektroforezi ile 1600 Volt da 5 saat boyunca yürütüldü. Daha sonra her kuyucuktaki radyo işaretlenmiş DNA miktarı Phosphorimager ile analiz edildi.

Mono-alkilasyon için de ilaç (HDL) veya standart molekül (final konsantrasyon 10 mM, DMSO içinde) HEPES (50 mM pH 7 ve 100 mM NaCl) tamponunda ve 37 ºC sıcaklıkta 72 saat boyunca inkübe edildi (final hacim 20 µL). Sonra DNA'yı reaksiyon ortamından ayırmak için etanolde çöktürüldü ve tekrardan 1 M piperidin (50 µL) ile çözündü 90 ºC sıcaklıkta 25 dakika inkübe edildi (Maxam-Gilbert yöntemi). Sonra

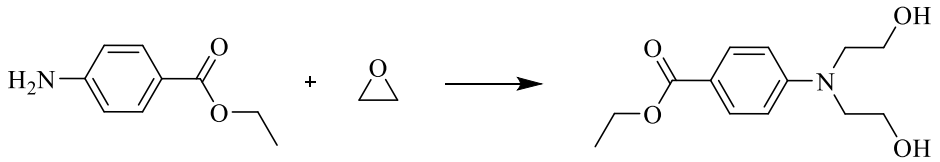
çözelti kuru buzda dondurularak 40 dakika boyunca SpeedVac cihazında liyofilize edildi. Bu süre sonunda liyofilizat 20 μL suda çözünerek tekrardan uçuruldu. Kuruyan DNA fregmentleri formamid ile tekrardan süspanse hale getirildi. Üzerine yükleme tamponu eklendikten sonra %20 lik denature poliakrilamid jel elektroforezi ile 1600 Volt da 4 saat boyunca yürütüldü. Daha sonra her kuyucuktaki radyo işaretli DNA miktarı Phosphorimager ile analiz edildi.

# 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

## 4.1 Sentez Çalışmaları

### 4.1.1. 4-(bis(2-hidroksietil)amino)benzoat (61) Sentezi

Cam balona 4-aminobenzoat **(60)** (1.0 eq., 20 mg, 0.12 mmol) alındı ve üzerine asetik asit (1 mL) ilave edildip çözündü. Sonra buz banyosuna alınarak üzerine şırınga ile etilen oksit (10.7 eq., 64 μL, 1.28 mmol) damla damla ilave edilip oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyon sonunda amonyum hidroksit ilave edilerek ortam bazik hale getirildi. Sonra etil asetat (3x20 mL) ile ekstrakte edildi. Organik faz toplandı. Kurutmak için bir miktar $MgSO_4$ kullanıldı sonrasında da filtre edilip çözücü uçuruldu. Saflaştırma işlemi için %100 etil asetat ile flash kolon kromotografisi işlemi yapıldı ve beyaz kristalimsi katı madde **(61)** (23 mg, %83) elde edildi (Zheng ve ark. 2010). e.n. 96-97 $^oC$ $^1$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 1.37 (t, 3H, *J* = 7.0, $OCH_2CH_3$); 3.53 [s, 2H, $N(CH_2CH_2OH)_2$]; 3.66 [t, 4H, *J* = 5.0, $N(CH_2CH_2OH)_2$]; 3.89 [t, 4H, *J* = 5.0, $N(CH_2CH_2OH)_2$]; 4.3 (q, 2H, *J* = 7.0, $OCH_2CH_3$); 6.4 (d, 2H, *J* = 9.0, Ph); 7.9 (d, 2H, *J* = 9.5, Ph); $^{13}$C-NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 166.96, 151.33, 131.48, 118.35, 111.39, 60.76, 60.39, 55.19, 14.57.

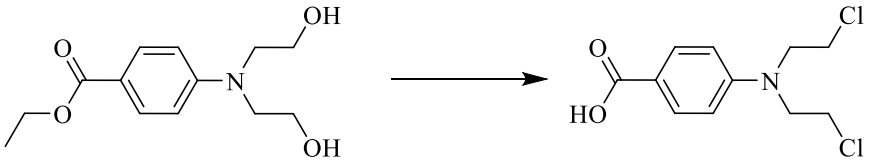



60 61

### 4.1.2. 4-(bis(2-kloroetil)amino)benzoik Asit (62) Sentezi

4-(bis(2-hidroksietil)amino)benzoat **(61)** (1.0 eq., 50 mg, 0.2 mmol) molekülü benzen (3 mL) içerisinde çözündü ve üzerine (5.1 eq., 73 μL, 1.02 mmol) $SOCl_2$ ilave edildi ve 3 saat boyunca refluks yapıldı. Daha sonra çözücü uçurulup elde edilen maddenin üzerine konsantre HCl (2 mL) ilave edilip 4 saat daha refluks edildi. Bu süre sonunda reaksiyon sonlandırılıp soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra bir gece boyunca buzdolabında bekletildi. Sonra $NaHCO_3$ ile bazikleştirilip etil asetat (3x20 mL) ile ekstrakte edildi. Organik faz toplandı. Kurutmak için bir miktar $MgSO_4$ kullanıldıktan sonra filtre edilip çözücü uçuruldu. Saflaştırma işlemi için etil asetat/hekzan (1:1) ile flash kolon kromotografisi yapıldı. Beyaz katı madde **(62)** (57

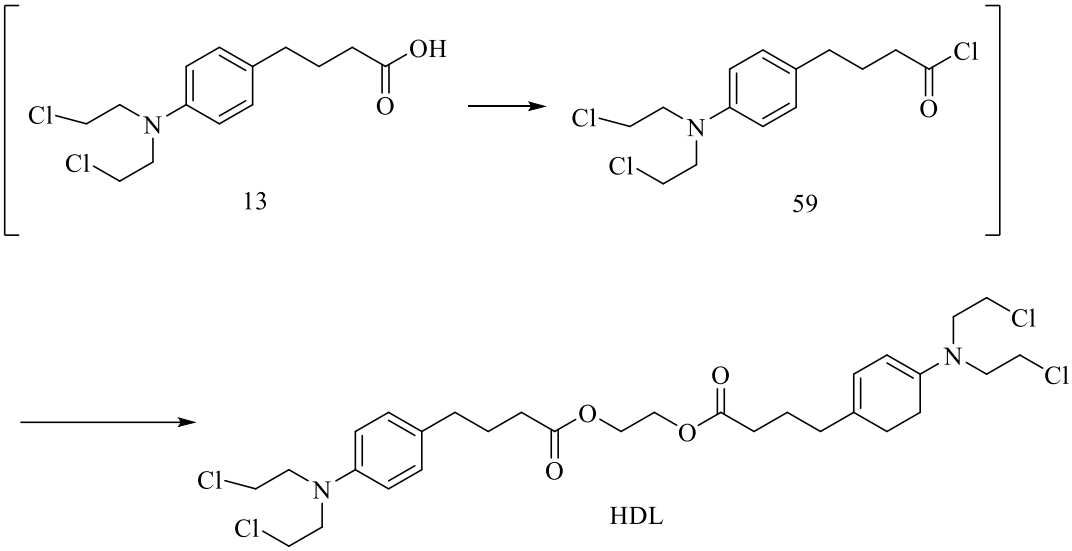
mg, %66.4) elde edildi (Zheng ve ark. 2010). e.n. 172-173 $^{o}$C $^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 3.7 [t, 4H, *J* = 7.0, $N(CH_2CH_2Cl)_2$]; 3.8 [t, 4H, *J* = 7.0, $N(CH_2CH_2Cl)_2$]; 6.7 (d, 2H, *J* = 9.0, Ph); 8.0 (d, 2H, *J* = 9.0, Ph); 11.3 (s, 1H, COOH), $^{13}$C-NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 171.30, 150.49, 132.74, 118.03, 111.08, 77.47, 77.22, 76.97, 53.51, 40.27.




58 59

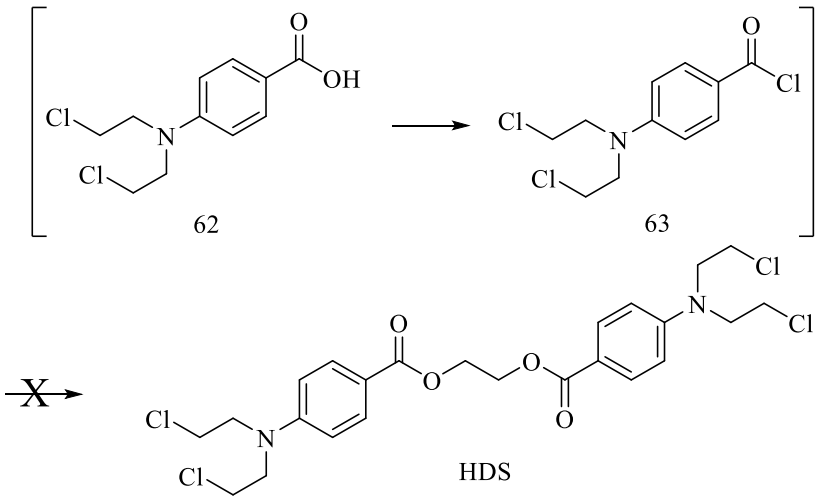
### 4.1.3. HDL (Bis(4-(4-(bis(2-kloroetil)amino)fenil)bütanoat)-1,2-etandiil) Sentezi

Klorambusil **(13)** (2.2 eq., 100 mg, 0.33 mmol) molekülü okzalil klorür içerisinde (2 mL) çözündü ve 30 dk boyunca oda sıcaklığında argon gazı altında karıştırıldı. Sonra reaksiyon sonlandırılıp argon gazı yardımıyla kurutulup susuz $CH_2Cl_2$ (2 mL) ile yıkanıp tekrardan argon gazı yardımıyla çözücü uçuruldu. Daha sonra asit klorür ara ürünü **(59)** susuz $CH_2Cl_2$ (2 mL) de çözündü, üzerine etilen glikol (1.0 eq., 8.4 μL, 0.15 mmol) ve piridin (20.0 eq., 562 μL, 6.6 mmol) ilave edildi oda sıcaklığında 8 saat boyunca karıştırıldı. Sonra karışım ayırma hunisine transfer edilip üzerine etil eter (15 mL) ilave edildi ve destile su (5x10 mL) ile yıkanıp organik faz toplanıp $MgSO_4$ ile kurutuldu. Saflaştırma işlemi için etil asetat/hekzan (1:2) ile flash kolon kromotografisi işlemi yapıldı. Yağımsı beyaz HDL molekülü (15 mg, %14,5) elde edildi (Bastein ve ark. 2013). HDMS (635.2 m/z) $^{1}$H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 1.91 [q, 4H, *J* = 7.5, $CH_2CH_2CH_2$]; 2.33 [t, 4H, *J* = 7.5, $CH_2CH_2CH_2$]; 2.54 [t, 4H, *J* = 7.5, $CH_2CH_2CH_2$]; 3.59 [q, 8H, *J* = 6.5, $N(CH_2CH_2Cl)_2$]; 3.61 [q, 8H, *J* = 6.5, $N(CH_2CH_2Cl)_2$]; 4.26 [s, 4H, $OCH_2CH_2O$], 6.61 (d, 4H, *J* = 8.5, Ph); 7.06 (d, 4H, *J* = 9.0, Ph), $^{13}$C-NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 173. 36, 144.40, 130.58, 129.75, 112.26, 62.12, 53.67, 40.56, 33.97, 33.47, 26.71.




### 4.1.4. HDS (Bis-(4-(4-(bis-(2-kloroetil)amino)benzoat)-1,2-etandiil) Sentezi

4-(bis(2-kloroetil)amino)benzoik asit **(62)** (2.2 eq., 100 mg, 0.33 mmol) molekülü okzalil klorür içerisinde (2 mL) çözündü ve 30 dk boyunca oda sıcaklığında argon gazı altında karıştırıldı. Bundan sonra reaksiyon sonlandırılıp argon gazı yardımıyla kurutuldu. Sonra susuz $CH_2Cl_2$ (2 mL) ile yıkanıp tekrardan argon gazı yardımıyla çözücü uçuruldu. Daha sonra asit klorür ara ürünü **(63)** susuz $CH_2Cl_2$ (2 mL) de çözündü, üzerine etilen glikol (1.0 eq., 8.4 µL, 0.15 mmol) ve piridin (20.0 eq., 562 µL, 6.6 mmol) ilave edildi oda sıcaklığında 8 saat boyunca karıştırıldı. Sonra karışım ayırma hunisine transfer edilip üzerine etil eter (15 mL) ilave edildi ve destile su (5x10 mL) ile yıkanıp organik faz toplanıp $MgSO_4$ ile kurutuldu. Saflaştırma işlemi için etil asetat/hekzan (1:2) ile flash kolon kromotografisi işlemi yapıldı. Yağımsı beyaz HDS molekülü elde edildi (Bastein ve ark. 2013). Ancak HDS molekülün kararsızlığından (saflaştırma işleminden hemen sonra aniden renk değiştirmesi ve alınan NMR örneklerinin uyuşmaması) dolayı madde eldesi ve karakterizasyonu yapılamadı.




### 4.2. Plazmit DNA Kesim Çalışmaları

Sentezlenen HDL molekülünün plazmit DNA kesim çalışmaları için agaroz jel elektroforezi deneyi yapıldı. Standart olarak klorambusil kullanıldı. DMEDA (N,N-Dimetiletilendiamin) varlığında ve yokluğunda yapılan deneyde Klorambusil (100, 250, 500 ve 1000 μM final konsantrasyon) ve HDL molekülünün (50, 125, 250 ve 500 μM final konsantrasyon) artan konsantrasyonları, plazmit DNA (30 ng/mL), NaP tamponu (50 mM, pH 7), DMEDA (100 mM), ve saf su kullanıldı. Toplam hacim de 30 μL olacak şekilde ayarlandı (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Deneyde kullanılan maddelerin total hacmi ve final konsantrasyonları

| | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** | **12** | **13** | **14** | **15** | **16** | **17** | **18** | **19** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DNA | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 33 ng/mL |
| NaP | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 50 mM |
| DMSO | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Klorambusil | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 μM |
| Klorambusil | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 250 μM |
| Klorambusil | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 500 μM |
| Klorambusil | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 mM |
| HDL | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 50 μM |
| HDL | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 125 μM |
| HDL | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 250 μM |
| HDL | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 500 μM |
| DMEDA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 100 mM |
| $H_2O$ | 29 | 26 | 24 | 24 | 24 | 24 | 24 | 22 | 22 | 22 | 22 | 24 | 24 | 24 | 24 | 22 | 22 | 22 | 22 | |
| Total Hacim | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 mL |

Tüm bileşenler ilave edildikten sonra ependorfların kapakları iyice kapatılıp 24 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Sonra 8-11 ve 16-19

kuyucuklarına DMEDA ilave edilerek iki saat boyunca 37ºC de bekletildi. Daha sonra 4 μL yükleme tamponu ilave edilerek numuneler aynı anda 3 farklı jele yüklendi. Yükleme işleminden sonra 300 mA ve 80 volt koşullarında 3 saat boyunca yürütme işlemi devam ettirildi. Jeller daha önce hazırlanmış etidyum bromür (500 mL saf su ve 50 μL etidyum bromür) banyosunda 20 dk bekletildi. Son olarak 15 dk saf su içinde bekletilip Bio-Rad, jel görüntüleme cihazında, Quantity One programı kullanılarak jellerin resimleri çekilip gerekli hesaplar yapıldı. Hesaplamalar form I ve form II deki bant yoğunluğuna bakılarak yapıldı. Plazmit başına zincir kırıklarını S= -ln fI eşitliği kullanılarak hesaplandı. Burada sırasıyla S Plazmit başına zincir karıklarını, fI sağlam kalan form I miktarını göstermektedir (Zang ve ark. 2001).

### 4.2.1. HDL ve Klorambusil Molekülünün DNA Kesim Koşulları ve Kesim Etkileri

Birinci kuyucuk sadece pGL-2 Basic plazmit DNA (33 ng/mL) ve su içerir. Bu kuyucuk standart olarak kabul edildi.

İkinci kuyucuk pGL-2 Basic plazmit DNA (33 ng/mL), tampon ve su içerir. Bu kuyucuk tamponun DNA üzerindeki etkisi araştırıldı.

Üçüncü kuyucuk pGL-2 Basic plazmit DNA (33 ng/mL), çözücü (DMSO) ve su içerir. Burada da çözücünün DNA üzerindeki etkisi araştırıldı.

Dört, beş, altı ve yedinci kuyucuklarda pGL-2 Basic plazmit DNA (33 ng/mL), tampon, artan klorambusil konsantrasyonları (100, 250, 500 ve 1000 μM) ve su içerir. Bu kuyucuklarda klorambusil molekülünün artan konsantrasyonlarında DNA üzerindeki etkisi araştırıldı.

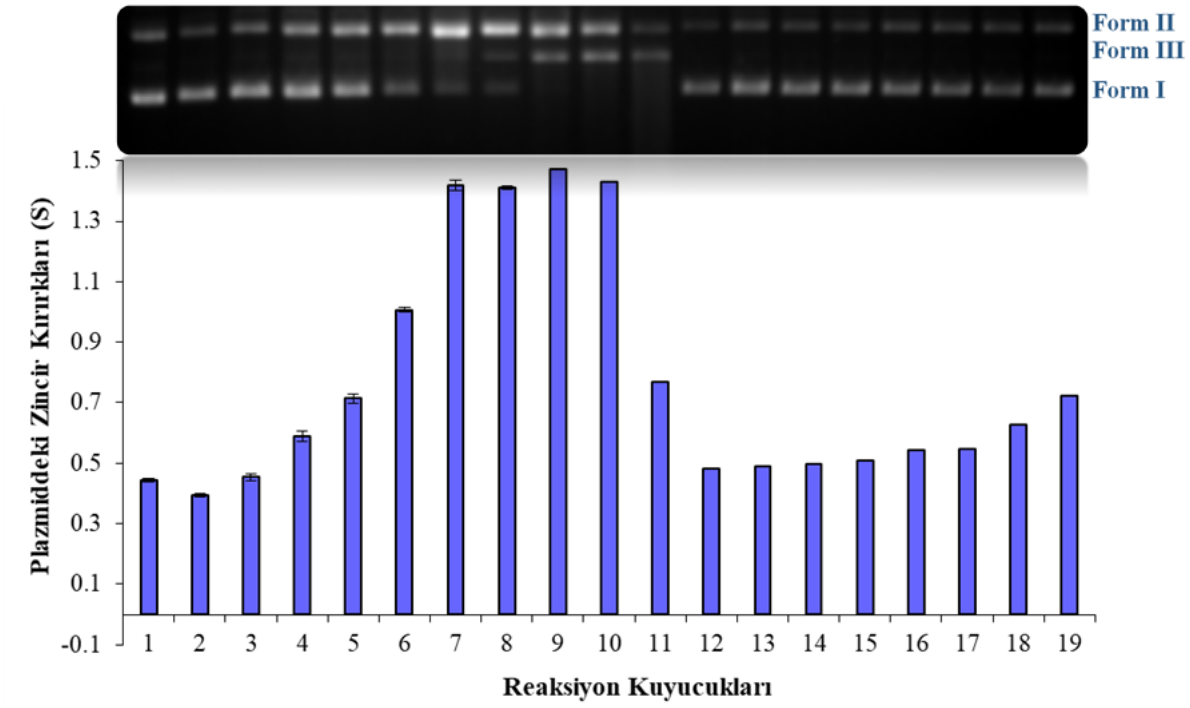
Sekiz, dokuz, on ve on birinci kuyucuklarda pGL-2 Basic plazmit DNA (33 ng/mL), tampon, DMEDA (100 mM), artan klorambusil konsantrasyonları (100, 250, 500 ve 1000 μM) ve su içerir. Bu kuyucuklarda DMEDA varlığında klorambusil molekülünün artan konsantrasyonlarında DNA üzerindeki etkisi araştırıldı.

On iki, on üç, on dört ve on beşinci kuyucuklarda pGL-2 Basic plazmit DNA (33 ng/mL), tampon, artan HDL molekülünün konsantrasyonları (50, 125, 250 ve 500 μM)

ve su içerir. Bu kuyucuklarda HDL molekülünün artan konsantrasyonlarında DNA üzerindeki etkisi araştırıldı.

On altı, on yedi, on sekiz ve on dokuzuncu kuyucuklarda pGL-2 Basic plazmit DNA (33 ng/mL), tampon, DMEDA (100 mM), artan HDL molekülünün konsantrasyonları ve su içerir. Bu kuyucuklarda DMEDA varlığında HDL molekülünün artan konsantrasyonlarında DNA üzerindeki etkisi araştırıldı.

Yapılan bu deney sonucunda test edilen üç jelin aritmetik ortalaması alınıp plazmit başına kırıkları (S) hesaplandı (Şekil 4.1.) ve (Çizelge 4.2.).




**Şekil 4.1.** DNA kesim çalışması sonucu oluşan plazmit başına kırıkları (S)

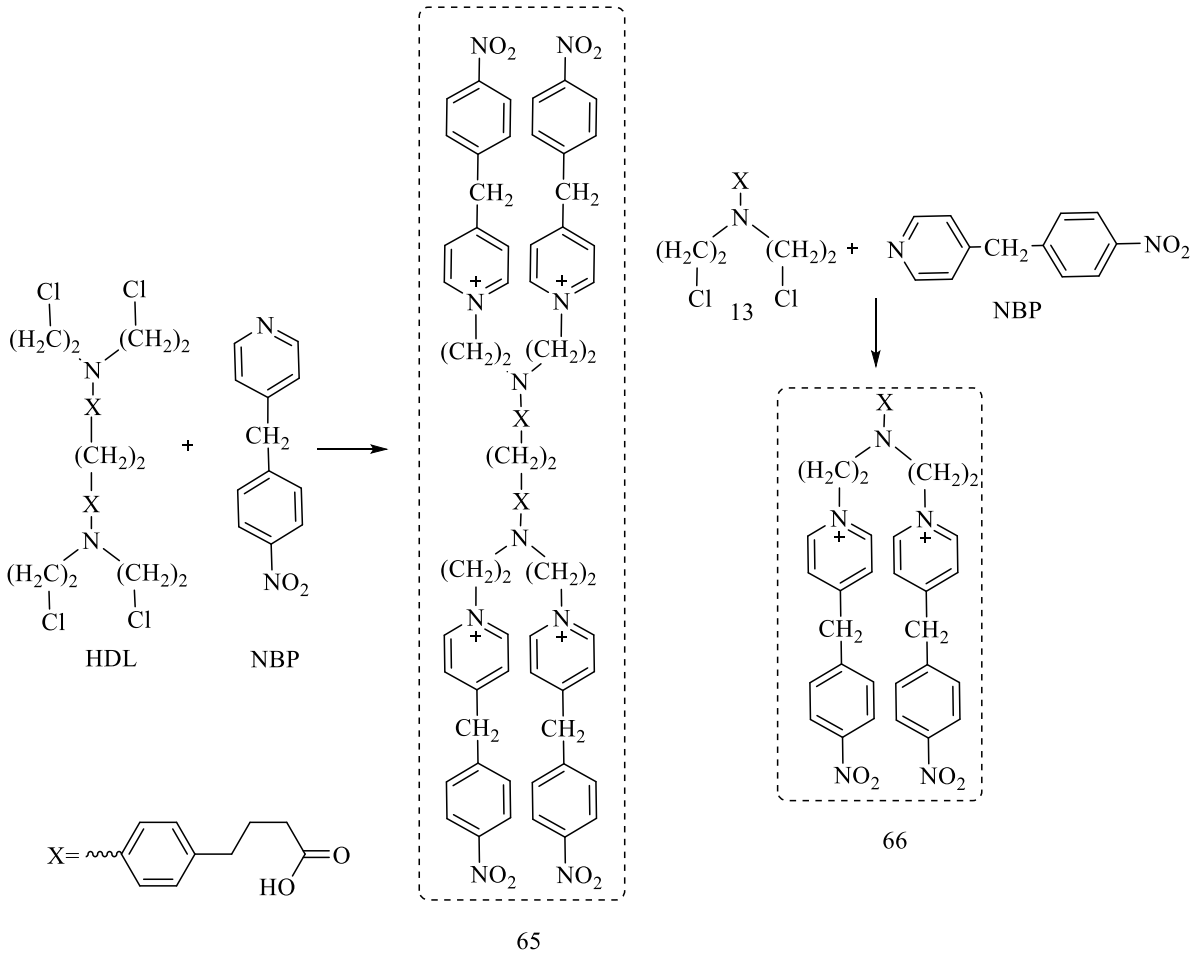
Çizelge 4.2. HDL ve klorambusil moleküllerinin DNA kesim koşulları ve etkileri (DNA (33 ng/mL), NaP (Sodyum Fosfat Tamponu) (50 mM), plazmit başına kırıklar (S))

| **Kuyucuk No** | **Kuyucuk İçeriği** | **S** |
|---|---|---|
| 1 | DNA | 0.44±0.005 |
| 2 | DNA+NaP | 0.39±0.005 |
| 3 | DNA+NaP+DMSO | 0.45±0.011 |
| 4 | DNA+NaP+Klorambusil (100 μM) | 0.59±0.017 |
| 5 | DNA+NaP+Klorambusil (250 μM) | 0.71±0.014 |
| 6 | DNA+NaP+Klorambusil (500 μM) | 1.00±0.050 |
| 7 | DNA+NaP+Klorambusil (1000 μM) | 1.41±0.003 |
| 8 | DNA+NaP+Klorambusil (100 μM)+DMEDA (100 mM) | 1.47±0.012 |
| 9 | DNA+NaP+Klorambusil (250 μM)+DMEDA (100 mM) | 1.43±0.004 |
| 10 | DNA+NaP+Klorambusil (500 μM)+DMEDA (100 mM) | 0.77±0.017 |
| 11 | DNA+NaP+Klorambusil (1000 μM)+DMEDA (100 mM) | 0.48±0.006 |
| 12 | DNA+NaP+HDL (100 μM) | 0.49±0.006 |
| 13 | DNA+NaP+HDL (100 μM) | 0.49±0.005 |
| 14 | DNA+NaP+HDL (100 μM) | 0.50±0.005 |
| 15 | DNA+NaP+HDL (100 μM) | 0.51±0.010 |
| 16 | DNA+NaP+HDL (100 μM)+DMEDA (100 mM) | 0.55±0.010 |
| 17 | DNA+NaP+HDL (100 μM)+DMEDA (100 mM) | 0.54±0.005 |
| 18 | DNA+NaP+HDL (100 μM)+DMEDA (100 mM) | 0.62±0.005 |
| 19 | DNA+NaP+HDL (100 μM)+DMEDA (100 mM) | 0.72±0.017 |

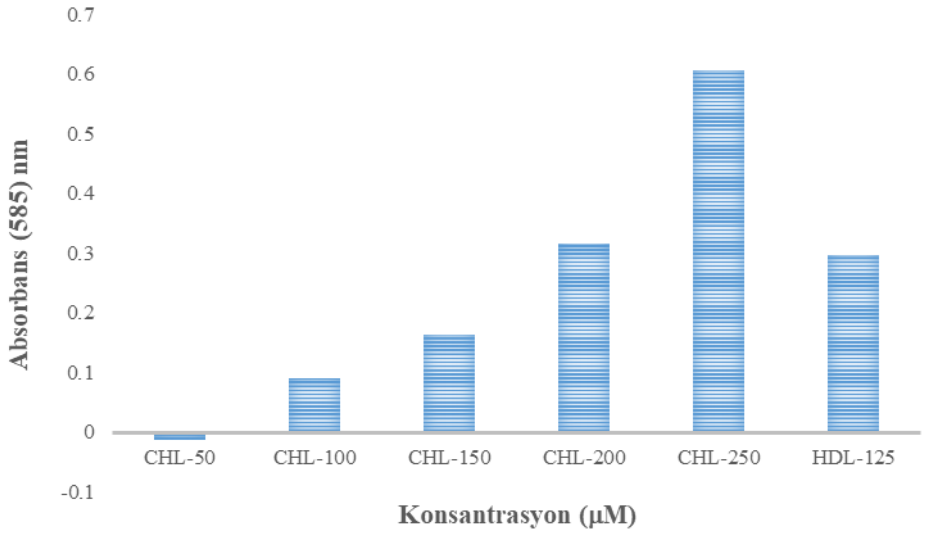
### 4.3. NBP ile Kimyasal Aktivite Çalışmaları

HDL molekülünün kimyasal aktivitesi NBP ile test edildi. Klorambusil ile HDL molekülünün, NBP ile reaksiyonu sonucu oluşturacakları yeni moleküllerin (**65** ve **66**) ölçülen absorbans değerlerinin kıyaslanması ile aktivite belirlendi (Bardos ve ark. 1965).

Bu testte klorambusil molekülünün artan konsantrasyonları (50, 100, 150, 200 ve 250 μM) ile HDL (125 μM) NBP ile reaksiyonları sonucu oluşan moleküllerin (**65** ve **66**) mekanizması (Şekil 4.2.) ve absorbans (Şekil 4.3.) değerleri hesaplandı (Bardos ve ark. 1965).




**Şekil 4.2.** HDL ve Klorambusil molekülünün NBP ile alkilasyon mekanizması



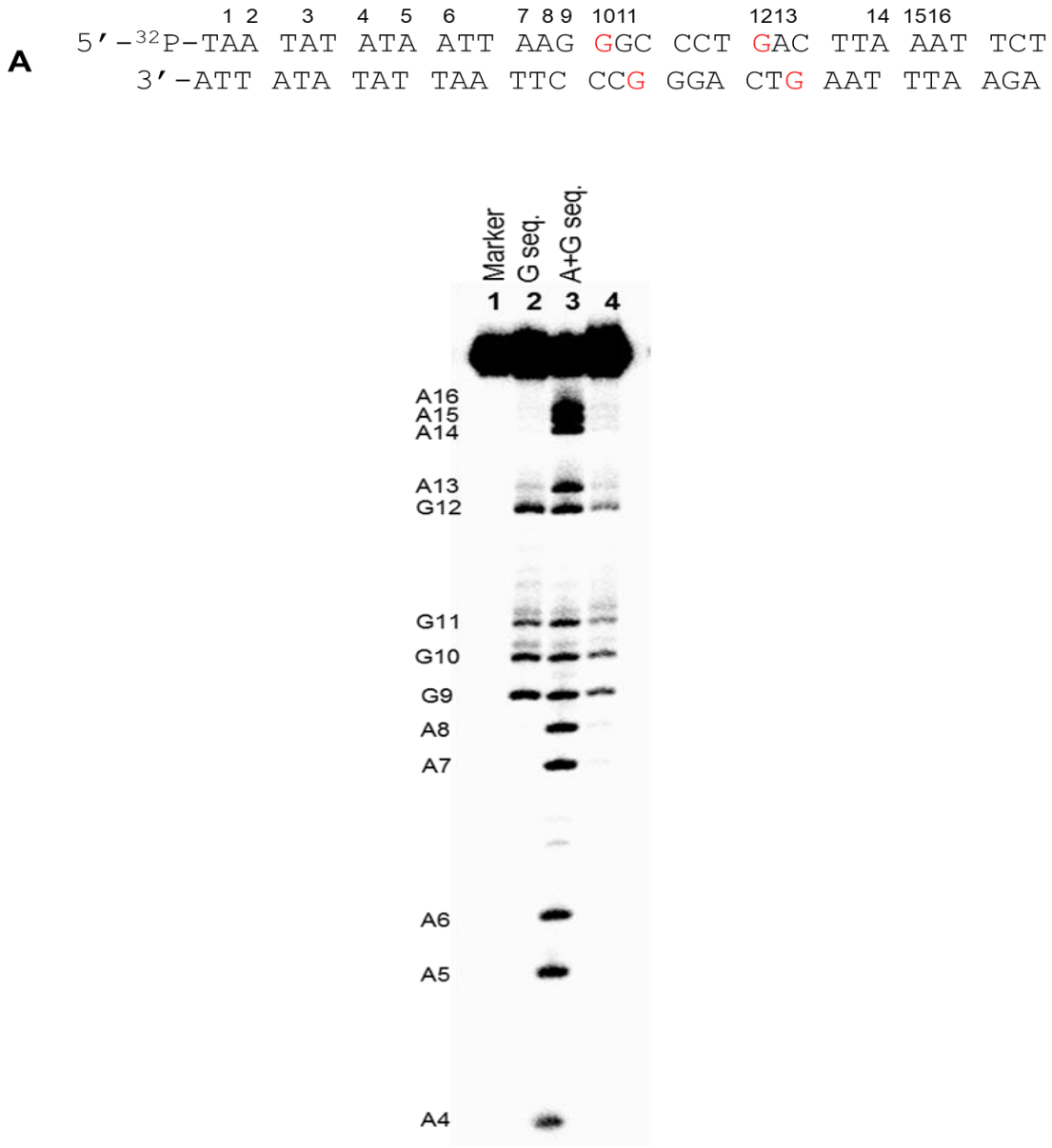

**Şekil 4.3.** HDL ve Klorambusil (CHL) molekülünün NBP ile oluşturdukları moleküllerin (**65** ve **66**) absorbans grafiği

### 4.4. Çapraz Bağlanma ve Mono-alkilasyon Çalışmaları

Tasarlanan oligonükleotitle (33 bp) klorambusil ve HDL molekülünün çapraz bağlanma ve Maxam-Gilbert yöntemi ile mono-alkilasyon çalışmaları yapıldı (Millard ve ark. 1990).

#### 4.4.1. Maxam-Gilbert Yöntemi ile DNA'yı Alkilleme Kapasitesi

HDL mokekülünün DNA dubleks A guanin kısımlarındaki alkilasyon. $^{32}$P-işaretli oligonukleotit dubleks A, HDL molekülü ile HEPES tamponu içinde (50 mM, pH 7, 100 mM NaCl ve DMSO %10 v/v) 37 °C 72 saat inkube edildi ve %20 poliakrilamide jele yüklendi. Jelde yürütülen işaretli DNA phosphorimager ile analiz edildi. Kuyucuk 1 de sadece dubleks A., Kuyucuk 2 de Maxam-Gilbert'in G-reaksiyonu, Kuyucuk 3, Maxam-Gilbert'in A+G reaksiyonu ve Kuyucuk 4 de ise HDL molekülünün (1 mM) Maxam-Gilbert metodu ile işaretli dubleks A ile reaksiyonu koşulları var. Üzerine yükleme tamponu eklendikten sonra %20 lik denature poliakrilamid jel elektroforezi ile 1600 volt da 4 saat boyunca yürütüldü. Daha sonra her kuyucuktaki radyo işaretlenmiş DNA miktarı Phosphorimager ile analiz edildi (Millard ve ark. 2004).

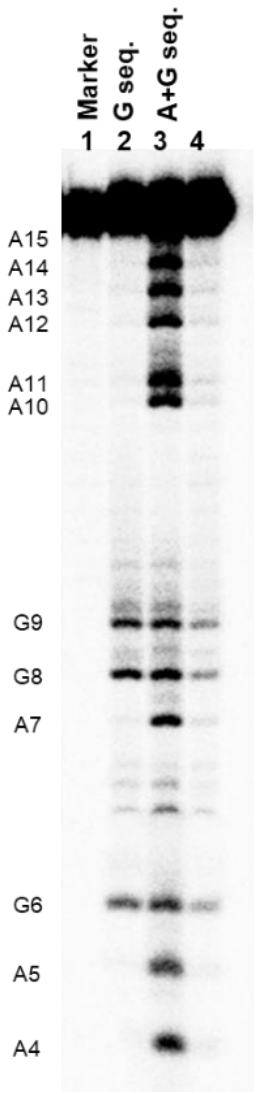



**Şekil 4.4.** HDL molekülünün Maxam-Gilbert yöntemi ile DNA dubleks A'yı alkillme kapasitesi jel Fotoğrafı

HDL mokekülünün DNA dubleks B (mutant) guanin kısımlarındaki alkilasyon. $^{32}$P-işaretli oligonukleotit dubleks B, HDL molekülü ile HEPES tamponu içinde (50 mM, pH 7, 100 mM NaCl ve DMSO %10 v/v) 37 °C 72 saat inkube edildi ve %20 poliakrilamid jele yüklendi. Jelde yürütülen işaretli DNA phosphorimager ile analiz edildi. Kuyucuk 1 de sadece dubleks B., Kuyucuk 2 de Maxam-Gilbert'in G-reaksiyonu, Kuyucuk 3 de Maxam-Gilbert'in A+G reaksiyonu ve Kuyucuk 4 de ise HDL molekülünün (1 mM) Maxam-Gilbert metodu ile işaretli dubleks B ile reaksiyonu koşulları var. Üzerine yükleme tamponu eklendikten sonra %20 lik denature

poliakrilamid jel elektroforezi ile 1600 volt da 4 saat boyunca yürütüldü. Daha sonra her kuyucuktaki radyo işaretlenmiş DNA miktarı Phosphorimager ile analiz edildi (Millard ve ark. 2004).

5′-TAA TAT ATA ATT AAG GGC CCT GAC TTA AAT TCT
3′-ATT ATA TAT TAA TTC CCT GGA CTG AAT TTA AGA-$^{32}$P-5′ **B**



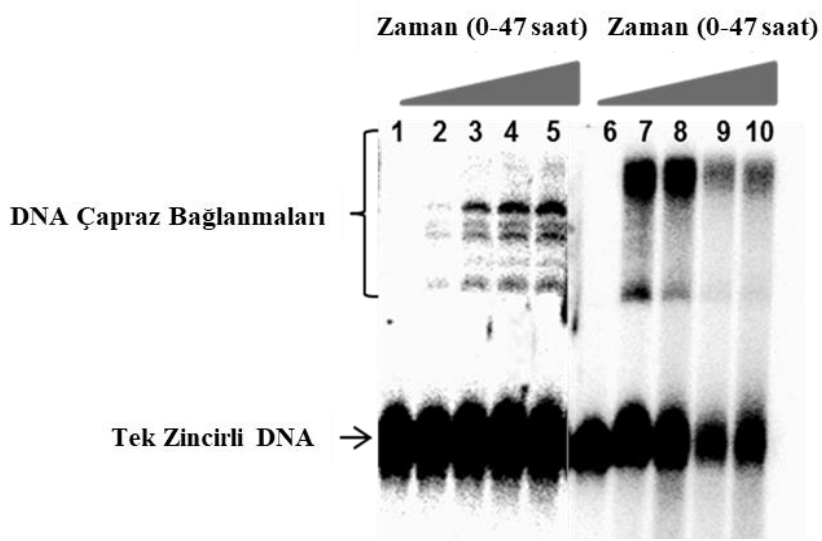

**Şekil 4.5.** HDL molekülünün Maxam-Gilbert yöntemi ile DNA dubleks B'yi alkillme kapasitesi jel fotoğrafı

### 4.4.2. Çapraz Bağlanma Aktivitesi

HDL ve klorambusil molekülünün zamana bağlı dubleks A üzerine çapraz bağlanması. $^{32}$P- ile işaretlenmiş 2'-deoksioligonükleotid HEPES tamponu (50 mM, pH 7, 100 mM NaCl ve %10 DMSO) ve 10 mM HDL (kuyucuk 1-5) veya Klorambusil (kuyucuk 6-10) ile 37 °C, 0, 6, 21, 32 ve 47 saat aralığında inkübe edildi. Üzerine yükleme tamponu eklendikten sonra %20 lik denature poliakrilamid jel elektroforezi ile 1600 volt da 5 saat boyunca yürütüldü. Daha sonra her kuyucuktaki radyo işaretlenmiş DNA miktarı Phosphorimager ile analiz edildi (Millard ve ark. 2004).

A

```
          1 2   3   4  5  6    7 8 9 1011       1213     14 1516
5'-32P-TAA TAT ATA ATT AAG GGC CCT GAC TTA AAT TCT
   3'-ATT ATA TAT TAA TTC CCG GGA CTG AAT TTA AGA
```

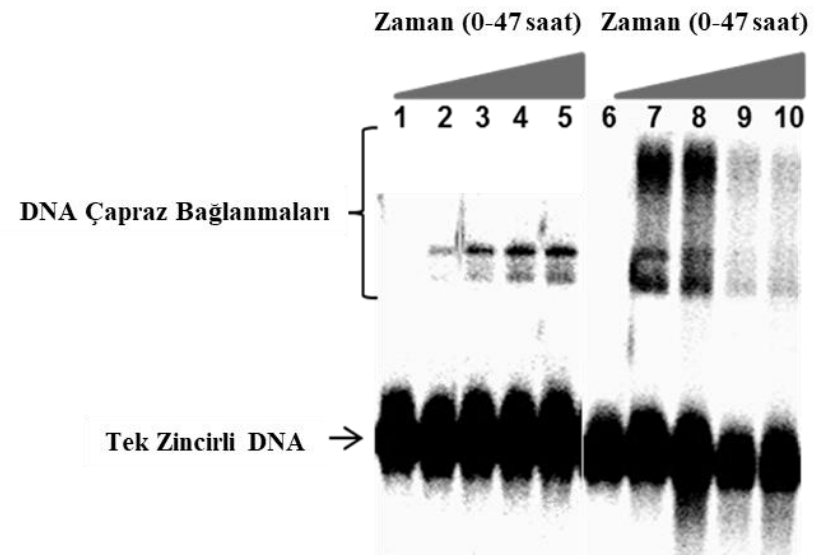



**Şekil 4.6.** Klorambusil ve HDL molekülünün DNA dubleks A'ya çapraz bağlanma jel fotoğrafı

HDl ve Klorambusil molekülünün zamana bağlı dubleks B üzerine çapraz bağlanması. $^{32}$P- ile işaretlenmiş 2'-deoksioligonükleotid HEPES tamponu (50 mM, pH 7, 100 mM NaCl ve 10% DMSO) ve 10 mM HDL(kuyucuk 1-5) veya klorambusil (kuyucuk 6-10) ile 37 °C, 0, 6, 21, 32 ve 47 saat aralığında inkübe edildi. Üzerine yükleme tamponu eklendikten sonra %20 lik denature poliakrilamid jel elektroforezi ile 1600 volt da 5 saat boyunca yürütüldü. Daha sonra her kuyucuktaki radyo işaretlenmiş DNA miktarı Phosphorimager ile analiz edildi (Millard ve ark. 2004).

**B**

5′-TAA TAT ATA ATT AAG GGC CCT GAC TTA AAT TCT
3′-ATT ATA TAT TAA TTC CCT GGA CTG AAT TTA AGA-$^{32}$P-5′



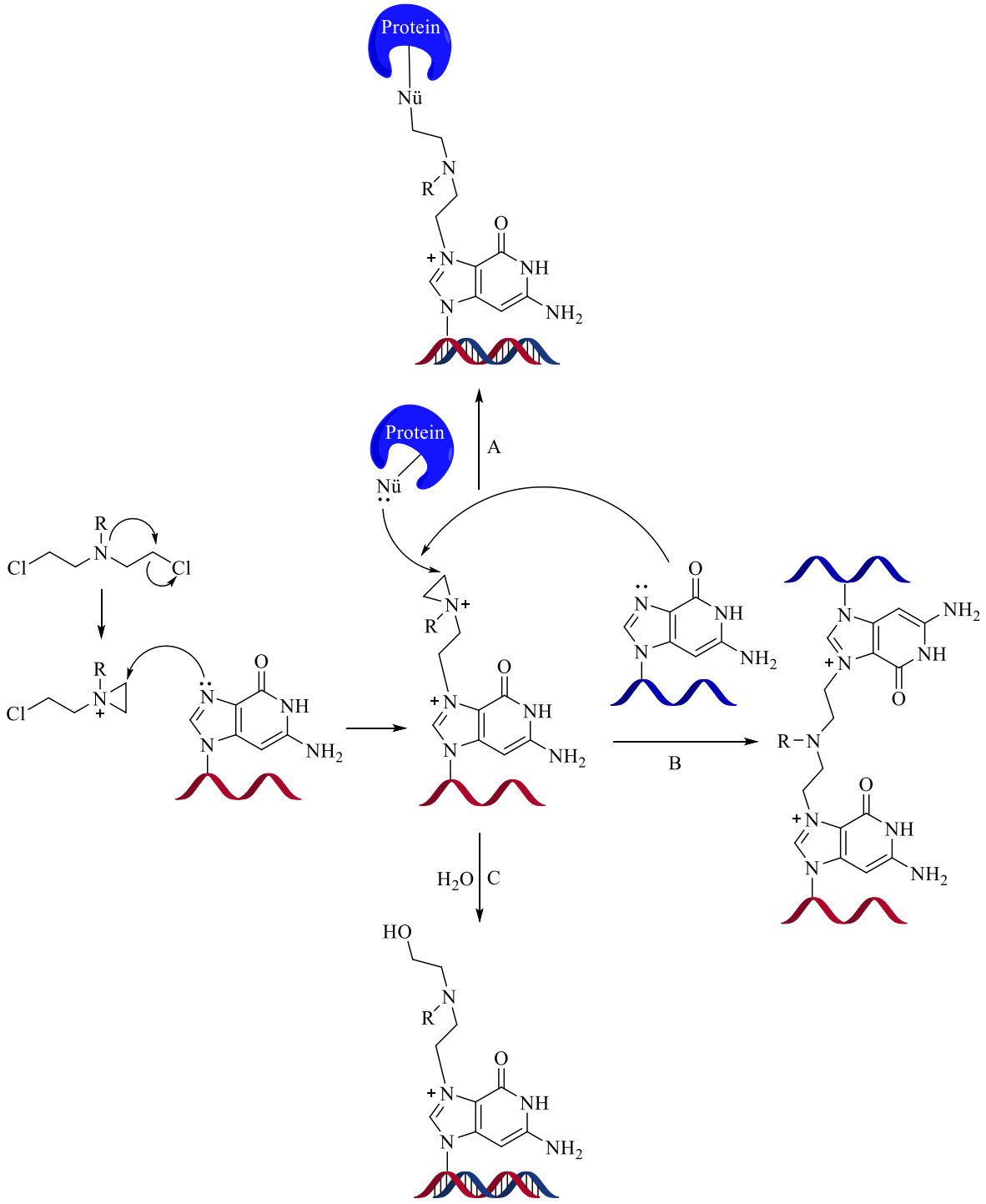

**Şekil 4.7.** Klorambusil ve HDL molekülünün DNA dubleks B'ye çapraz bağlanma jel fotoğrafı

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bis-(2-kloroetil)-amin veya azot hardalları çeşitli kanser vakalarının tedavisinde kullanılan bi-fonksiyonel alkilasyon ajanlarıdır (Chabner ve ark. 2005). Azot hardallarının bi-fonksiyonel özelliği DNA formasyonunda molekül içi/molekül dışı (B yolağı) ve protein-DNA (A yolağı) çapraz bağlanmalar yapmasına olanak sağlar ya da sadece DNA'yı bir guanin üzerinden alkilleyerek mono-alkillasiyon (C yolağı) neden olur (şekil 5.1.) (Tretyakova ve ark. 2015). Yapılan çalışmalar azot hardallarının DNA üzerindeki çapraz bağlanmaları her ne kadar %1-5 arasındaki düşük bir değerde olsa da DNA replikasyonu ve transkripsiyonu gibi temel prosesleri bloke ederek sitotoksik etki yaratır (Schearer 2005), (Noll ve ark. 2006). Ayrıca apoptozisi hızlandırarak hızlıca bölünen kanserli hücrelere karşı spesifik sitotoksik etki gösterirler (Deans ve West 2011).

Azot hardalları DNA zincirindeki iki bazıyla reaksiyonu sonucu DNA'da molekül dışı çapraz bağlanma olarak adlandırılan bir kovalent bağ oluşturur. Heliksin açılmasına ve şeker fosfat iskeletinde kırıklara neden olan bu durum, hücre için gerekli prosesleri bloke ederek aktivite gösterirler. Ancak bu tür kemoterapötik ajanlar kullanımları sırasında DNA tamir mekanizmalarının devreye girmesiyle ilaca karşı gösterdikleri kimyasal-direnç ilacın istenilen etki göstermesini engeller. Bu problemi çözmek için onkologlar bu ilaçları tek başlarına değil de yardımcı ilaçla kullanmalarını önerirler.

Bu çalışmada klinik olarak kullanılan Klorambusil **(13)** molekülünün düşük aktitivitesini arttırma ve alkilasyon mekenizmasını açıklama çalışmaları yapıldı.




**Şekil 5.1.** Azot hardallarının olası alkilasyon yolakları

**Sentez Çalışmaları**

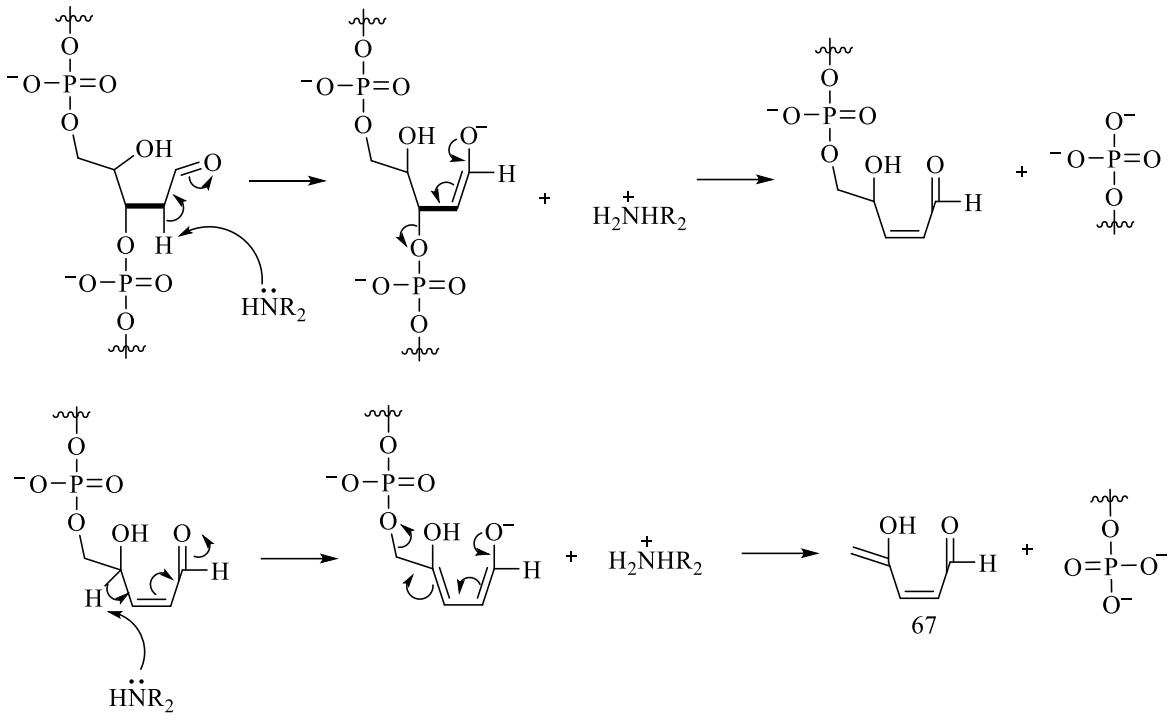
Asetik asit ortamında, 4-aminobenzoat **(60)** ın amino grubunun etilen oksit ile SN2 reaksiyonu sonucunda molekül **61** sentezlendi. Bir sonraki basamakta tiyonil klorür ile bileşik **61** deki amino alkollerin klor ile yer değiştirme reaksiyonu gerçekleştirildi. Sonra konsantre hidroklrorik asit ile moleküldeki ester karboksilik asite dönüştürülüp bileşik **62** elde edildi. Sentezlenen **61** ve **62** bileşiklerin verimleri literatürile karşılatırıldığında **61** (%83, lit. 84) bileşiğinin literatür ile hemen hemen aynı olduğu, **62** (%66.4, lit. 45) bileşiğinin verimi ise literatürden çok daha iyi olduğu rapor edildi (Zheng ve ark. 2010).

HDS molekülü, sentezlenen azot hardalı türevi **(62)** bileşik ile etilen glikolün birleştilimesi ile sentezlendi. Bu basamakta öncelikle bileşik **62** deki karboksilik asitin okzalil klorür ile asit klorüre **(63)** dönüştürüldü ve saflaştırma işlemi yapılmadan etilen glikol ile birleştirme reaksiyonu gerçekleştirildi. Ancak HDS molekülünün elde edilmesi çok çabuk bozunması ile mümkün olamamıştır.

Klorambusil **(13)** molekülü ile etilen glikolün birleştirilmesi ile iki başlı azot hardalı (HDL) sentezlendi. HDL molekülü, klorambusilin önce okzalil klorür ile asit klorüre **(59)** dönüştürüldü sonra etilen glikol ile esterleşme reaksiyonuyla sentezlendi. Sentezi yapılan HDL molekülü litretürde çok sık çalışılmamış iki başlı azot hardalı türevidir.

**Plazmit DNA Kesim Aktivitesi**

HDL molekülünün DNA üzerindeki kesim aktivitesini pGL-2 Basic plazmit DNA kullanılarak DMEDA varlığında/yokluğunda yapıldı. Standart olarak da kemoterapide kullanımı olan Klorambusil **(13)** kullanıldı. Ayrıca DNA kırıklarının daha görünür hale gelmesi için N,N'-dimetiletilenediamin (DMEDA) kullanıldı. DMEDA kimyasal veya UV ile DNA'da meydana getirdiği abazik bölgenin **(5)** aldehit rezonans formundan başlayarak şekerin **(67)** hem 5' hem de 3' yönündeki fosfatları koparak DNA sarmalında kırıklara neden olur (Şekil 5.3.) (McHugh ve Knowland 1995).



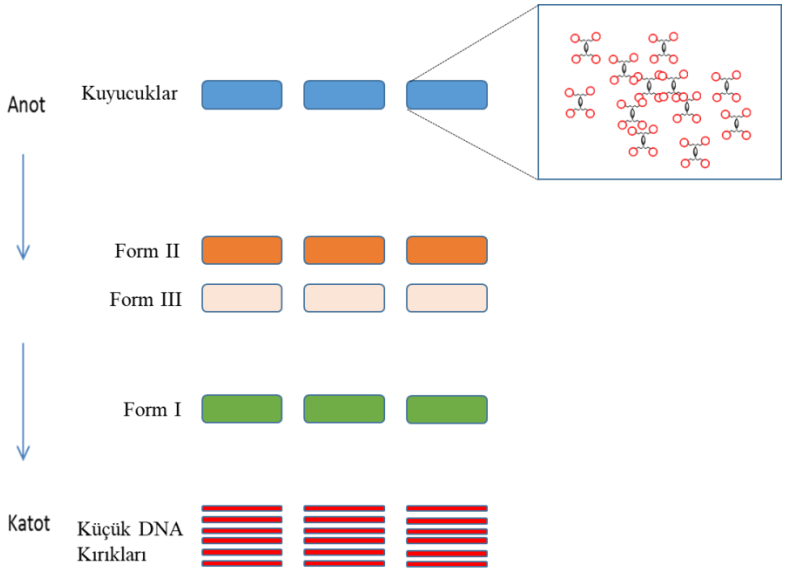

**Şekil 5.2.** DMEDA ile abazik **(5)** molekülün reaksiyonu sonucu DNA şeker-fosfat iskeletinin tamamıyla kırılma mekanizması

Birinci kuyucukda sadece DNA var ve plazmit başına düşen kırık sayısı en az olan kuyucuktur bu da standart kuyucuk olup diğer kuyucukların bununla kıyaslanması yapıldı. 2. ve 3. kucucuklardaki kırık sayısı beklenildiği gibi standart ile hemen hemen aynı değerde olduğu rapor edildi. Bu sonuç kullanılan tamponun ve çözücünün tek başlarına DNA üzerinde bir etkisi olmadığını göstermektedir.

4-7 kuyucuklarda klorambusilin artan konsantrasyonuyla DNA kesim etkisi araştırıldı. Konsantrasyon arttıkça DNA üzerindeki etkinin arttığı gözlemlendi. 8-11 kuyucuklarda ise DMEDA artan klorambusil konsantrasyonuyla DNA üzerindeki etkisi araştırıldı ve DMEDA varlığında klorambusildeki konsantrasyon artışından bağımsız olarak DNA'daki kırıkların dramatik şekilde arttığı gözlemlendi. Klorambusilin DNA üzerindeki etkisi daha önceki yapılan çalışmalarla bir paralellik içerisinde olduğu gözlemlendi (Zuravka ve ark. 2015).

HDL molekülünün artan konsontrasyonlarda DNA kesim aktivitesinin DMEDA varlığında ve yokluğunda (sırasıyla 12-15 ve 16-19 kuyucuklar) standart molekül

klorambusil ile karşılaştırıldığında beklenenin aksine daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1.) (Çizelge 4.2.). Bu sonuç HDL molekülünün klorambusilden daha düşük DNA kesim aktivitesine sahip olduğunu gösterse de aslında böyle olmadığı düşünülmektedir. Buna göre HDL molekülü beklenilen aktiviteyi ya dört farklı yerden alkilasyon yapabilme kapasitesine sahip HDL molekülünün plazmit DNA ile oluşturduğu tetramer yapı sonucu jelde takılı kaldığı ya da çok yüksek aktivitesi ile DNA'yı çok küçük parçalara böldüğü ve bunun sonucunda sürüklenmeler olduğu düşünülmektedir (Şekil 5.3.).




**Şekil 5.3.** HDL molekülünün DNA üzerindeki etkisinin agaroz jeldeki gösterimi

### NBP ile Kimyasal Aktivite Çalışmaları

HDL molekülünün kimyasal aktivitesi, nükleofilik kapasitesi guanin N-7 pozisyonu ile benzer olan NBP molekülü ile test edildi (Şekil 4.2.) (Bardos ve ark. 1965). Guaninin N-7 pozisyonunda alkilasyon yaptığı bilinen klorambusilin artan konsantrasyonuyla NBP ile reaksiyonu sonucu oluşan molekülün (**62**) ölçülen absorbans değeri literatür rapor edilen değerlerle örtüşmektedir (Şekil 4.3.) (Acharya ve ark. 2017).

HDL ile NBP molekülünün reaksiyonu sonucu oluşan molekülün **(65)** ölçülen absorbans değeri molekül **66** ile kıyaslandığında 125 µM HDL molekülünün yaklaşık olarak 200 µM klorambusil molekülü ile aynı absorbans değerine sahip olduğu rapor

edildi. Bu sonuç antikanser ilaç tasarımcılarının ‘‘düşük doz-yüksek etki’’ amacına uygun olduğunu göstermiştir.

**Maxam-Gilbert Yöntemi ile DNA’yı Alkilleme Kapasitesi**

Azot hardalları DNA’yı guaninin N-7 pozisyonunda alkillerler (Şekil 5.1.) (Brooks ve lawley 1961). Üstelik difonksiyonel hardallar DNA’da diguaninil türevlerini oluşturarak çapraz bağlanmalar meydana getirirler. DNA zincirinde GG arasında 5’-GNC/3’-CNG (guanin-sitozin, N; G, C, A ve T) dizilerinde çapraz bağlanmalar meydana gelir (Şekil 5.1.) ( Ojwang ve ark. 1989), (Millard ve ark. 2006).

Maxam-Gilbert metoduyla HDL molekülünün alkilasyon bölgesini tespit etmek için sentetik olarak sentezlenen 33 bp bir oligonükleotit ve onun bir mutantı kullanıldı (sadece bir guanin yerine timin). Pozitif kontrol olarak da G ve A+G alkilasyonlar oluşturuldu.

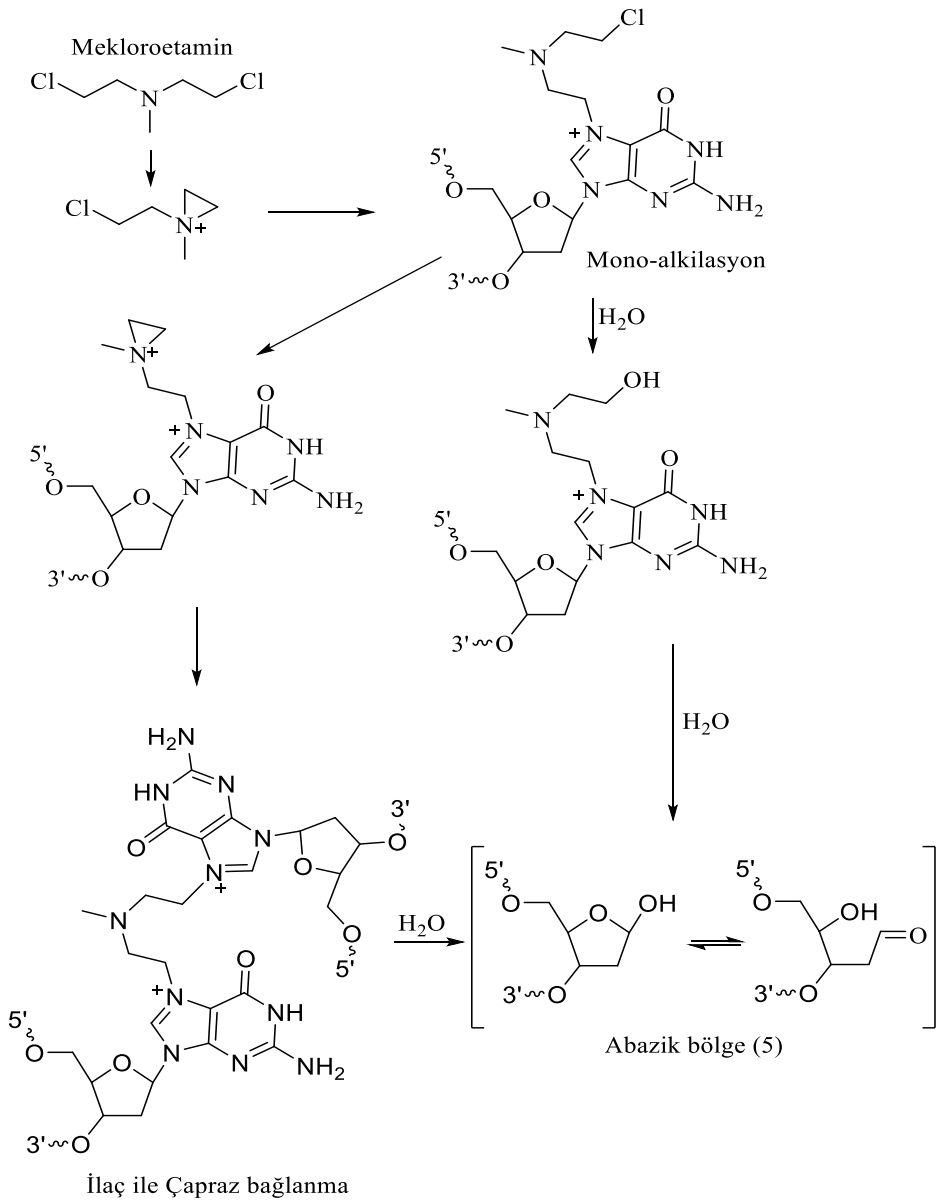
5’ ucundan $^{32}P$ ile işaretlenen DNA dubleksi üzerine spesifik olarak G ve A+G alkilasyonlar meydana getirildi (G9, G10, G11 ve G12). HDL molekülü beklenildiği gibi sadece guanin bölgesinde alkilasyon yaptığı gözlemlendi (Şekil 4.4.). Ayrıca 3’ ucundan $^{32}P$ ile işaretlenen mutant DNA dubleksinde de görüldüğü gibi sadece G6, G8 ve G9 bölgelerinde (Şekil 4.5.) alkilasyon yaptığı rapor edildi.

**Çapraz Bağlanma Çalışmaları**

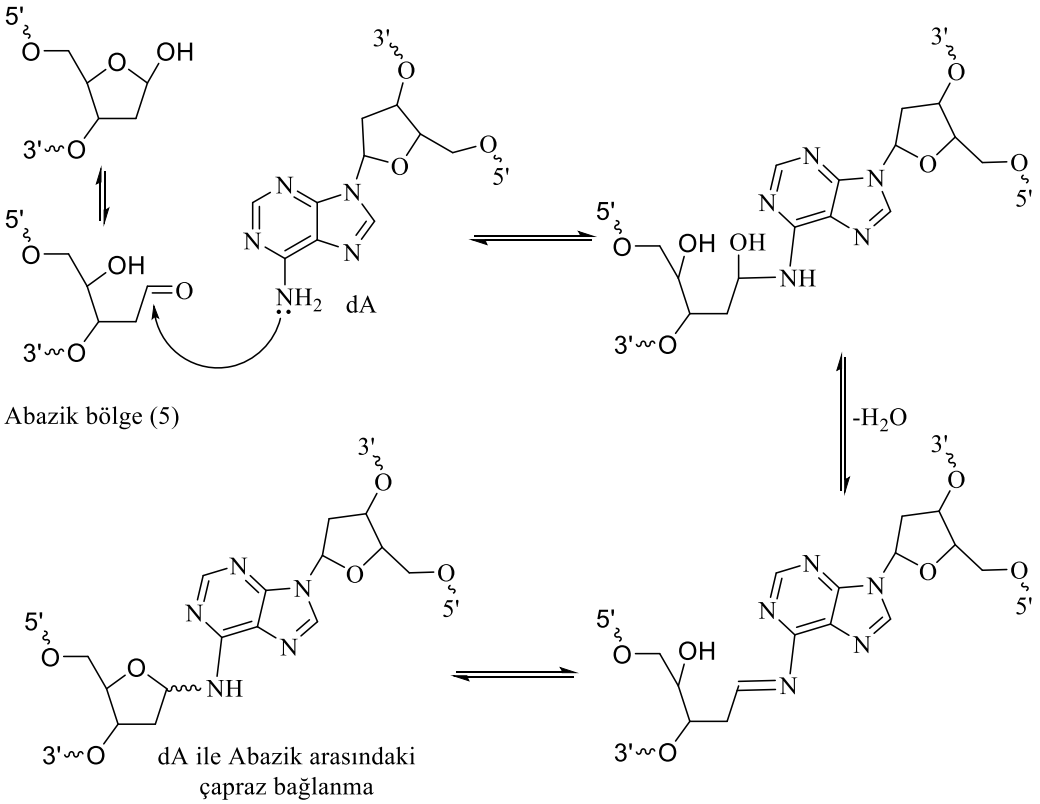
HDL molekülünün çapraz bağlanma aktivitesi zamana karşı test edildi ve klorambusil ile kıyaslanmalar yapıldı. 5’ ucundan $^{32}P$ ile işaretlenen DNA dubleksi ile yapılan çalışmalarda klorambusil molekülün zaman ilerledikçe çapraz bağlanma aktivitesinin azaldığı rapor edildi (Şekil 4.6.). HDL molekülü ise klorambusilin aksine zaman ilerledikçe artan çapraz bağlanma aktivitesine sahip olduğu tespit edildi. Ayrıca beklenildiği gibi HDL molekülü çoklu çapraz bağlanmalar meydana getirdiği rapor edildi (Şekil 4.6.).

Ayrıca 3’ ucundan $^{32}P$ ile işaretlenen mutant DNA dubleksi ile yapılan çapraz bağlanmalar bir guaninin olmaması dolayısıyla çoklu çapraz bağlanmalar meydana getirmeyip (Şekil 4.7.) klasik azot hardalı gibi davrandığını göstermektedir.

Bunun yanı sıra kemoterapötik ilaç olarak kullanılan Mekloroatamin ile yapılan mekanizma çalışmlarında azot hardalının gunaninin N-7 pozisyonundaki mono ve bis-alkilasyonu sonucu oluşan abazik bölgelerin (Şekil 5.4.) ortamda bulunan adenin (dA) ile daha önce görülmeyen çağraz bağlanma meydana getirdiği (Şekil 5.5.) Nejad ve çalışma arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (Nejad ve ark. 2016). Burada Mekloroatamin molekülünün DNA ile ilk etapta G-G arasında çapraz bağlanmalar meydana getirdiği ve zaman ilerledikçe farklı bir formasyonda çapraz bağlanmalar meydana getirdiği bunun da abazik bölge ile adenin arasındaki çapraz bağlanma olduğunu rapor etmişler (Şekil 5.5.).




**Şekil 5.4.** Mekloroataminin mono ve bis alkilasyonu sonucu oluşan abazik bölge mekanizması




**Şekil 5.5.** Abazik bölge ile adeninin (dA) çapraz bağlanma mekanizması

Yukarıdaki çalışmalar doğrultusnda HDL molekülün zaman ilerledikçe G-G arasındaki çapraz bağlanmaların yanı sıra kısmen de olsa yeni çapraz bağlanmalar yaptığı düşünülmektedir (Şekil 5.5.). Bu bağlanmaların da abazik bölge ile adenin arasındaki çapraz bağlanma olabileceği göstermektedir (Nejad ve ark. 2016).

Sonuç olarak tasarlanıp sentezlenen HDL molekülün alkilasyon kapasitesinin olduğu ve klasik azot hardalı modeli olan klorambusil ile kıyaslandığında daha reaktif olduğu rapor edildi. Çalışmanın başında belirlenen hedeflere uygun sonuçlar elde edilelen bu tezde bir sonraki çalışma olarak *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların yapılması planlanmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

Acharya, P.C., Bansal, R., 2017. Synthesis of Androstene Oxime-Nitrogen Mustard Bioconjugates as Potent Antineoplastic Agents. ***Steroids***, 123, 73-83.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th ed., ***Garland Science***, New York, USA.

Balasubramanian, B., Pogozelski, W. K., Tullius, T. D. 1998. DNA Strand Breaking by the Hydroxyl Radical ıs Governed by the Accessible Surface Areas of the Hydrogen Atoms of the DNA Backbone. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, 95, 9738-9743.

Baraldi, P.G., Romeo, R., Pavani, M.G., Nunez, M.D.C., Binghamb, J.P., Hartleyb, J.A. 2002. Benzoyl and Cinnamoyl Nitrogen Mustard Derivatives of Benzoheterocyclic Analogues of the Tallimustine: Synthesis and Antitumour Activity. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry***, 10, 1611-1618.

Bardos, T.J., Datta-Gupt, N., Hebborn, P., Triggle, D.J. 1965. A Study of Comparative Chemical and Biological Activities of Alkylating Agents. ***Conparative Activities Of Alkylating Agents***, 8, 167-174.

Barvian, M.R., Greenberg, M.M.1995. Independent Generation of 5,6-Dihydrothymid-5-yl in Single-Stranded Polythmidylate. $O_2$ Is Necessary for Strand Scission, ***Journal of the American Chemical Society***, 117, 8291–8292.

Bastien, D., Hanna R., Leblanc, V., Asselin, E., Berube, G. 2013. Synthesis and Preliminary In Vitro Biological Evaluation of 7a-Testosterone-chlorambucil Hybrid Designed for the Treatment of Prostate Cancer. ***European Journal of Medicinal Chemistry***, 64, 442-447.

Bennett, R.A.O., Swerdlow, P.S., Povirk, L.F. 1993. Spontaneous Cleavage of Bleomycin-induced Abasic Sites in Chromatin and Their Mutagenicity in Mammalian Shuttle Vectors. ***Biochemistry***, 32, 3188-3195.

Beranek, D.T. 1990. Distribution of Methyl and Ethyl Adducts Following Alkylation with Monofunctional Alkylating Agents. ***Mutation Resesrch***, 231, 11-30.

Bhattacharyya, P.K., Mehdi, C. 2005. Theoritical Study on the Mechanism of Alkylation at N-7 Guanine by Few Nitrogen Mustards. ***Indian Journal of Chemistry***, 44, 1319-1323.

Boger, D.L., Cai, H.1999. Bleomycin: Synthetic and Mechanistic Studies. ***Angewandte Chemie International Edition***, 38, 448-476.

Boresch, S., Karplus, M. 1995. The Meaning of Component Analysis: Decomposition of the Free Energy in Terms of Specific ***Interactions. Journal of Molecular Biology***, 254, 801-807.

Breen, A.P., Murphy, J.A. 1993. Modelling Radical-Initiated DNA Cleavage by Vinyl Epoxides. ***Journal of the Chemical Society, Chemical Communications***, 16, 191-192.

Breen, A.P., Murphy, J.A. 1995. Reactions of Oxyl Radicals with DNA. ***Free Radical Biology & Medicine***, 18, 1033-1077.

Brookes, P., Lawley, P. D. 1961. The Reaction of Mono- and Di-Functional Alkylating Agents with Nucleic Acids***. Biochemistry Journal,*** 80, 496-503.

Chabner, B.A., Amrein, P.C., Druker, B.J., Michaelson, M.D., Mistsiades, C.S., Goss, P.E. 2005. DNA Repair Enzymes: Cell, Molecular, and Chemical Biology. ***Elsevier,*** New York, USA.

Chaires, J.B. 1997. Energetics of Drug-DNA Interactions. ***Biopolymers***, 44, 201-215.

Cheloufi, H., Belhani, B., Ouk, T.S., Zerrouki, R., Aouf, N.E., Berredjem,·M. 2016. Synthesis and Antitumor Evaluation of Novel Sulfonylcycloureas Derived from Nitrogen Mustard. ***Molecular Diversity,*** 20, 399-405.

Chen, J., Stubbe, J. 2004. Bleomycins: New Methods Will Allow Reinvestigation of Old Issues. ***Current Opinion in Chemical Biology***, 8, 175-181.

Chen, X., Chen, H., Lu, C., Yang, C., Yu, X., Li, K., Xie,Y. 2016. Novel Mitochondria-targeted, Nitrogen Mustard-based DNA Alkylation Agents with Near Infrared Fluorescence Emission. ***Talanta,*** 161, 888-893.

Deans, A.J., West, S. C. 2011. DNA Interstrand Crosslink Repair and Cancer. ***Nature Reviews Cancer***, 11, 467-480.

Descoteaux, C., Brasseur, K., Leblanc, V., Parent, S., Asselin, E., Berube, G. 2012. Design of Novel Tyrosine-Nitrogen Mustard Hybrid Molecules Active Against Uterine, Ovarian and Breast Cancer Cell Lines. ***Streoids,*** 77, 403-412.

DeVita, V.T., Chu, E. 2008. A History of Cancer Chemotherapy**.** ***Cancer Research***, 68, 8643-8653.

El Hilali, M., Reux, B., Debiton, E., Leal, F., Galmier, M.J., Vivier, M., Chezal, J.M., Miot-Noirault, E., Coudert, P., Weber, V. 2017. Linker Structure-activity Relationships in Fluorodeoxyglucose Chlorambucil Conjugates for Tumor-Targeted Chemotherapy. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry,*** 25, 5692-5708.

Faguet, G.B. 2015. A Brief History of Cancer: Age-Old Milestones Underlying Our Current Knowledge Database. ***International Journal of Cancer***, 136, 2022-2036.

Fang, S., Niu, Y., Zhang, W., Zhang, Y., Yu L., Zhang, Y., Li, X. 2015. Liposome-like Nanocapsules of Dual Drug-tailed Betaine for Cancer Therapy. ***International Journal of Pharmaceutics***, 493, 460-465.

Ferguson, L.R., Turner, P.M., Denny, W. A. 2000. The Mutagenic Spectrum of Acridine-Linked Aniline Nitrogen Mustards in AS52 Cells:Implications of DNA Targeting with High Selectivity for Adenine or Guanine Bases. ***Mutation Research***, 469, 115-126.

Friedberg, E. C. 2003. DNA Damage and Repair. ***Nature,*** 421, 436-440.

Galm, U., Hager, M.H., Van Lanen, S.G., Ju, J., Thorson, J.S., Shen, B. 2005. Antitumor Antibiotics: Bleomycin, Enediynes, and Mitomycin. ***Chemical Reviews***, 105, 739-758.

Gates, K.S. 2000. Mechanisms of DNA Damageb by Leinamycin. ***Chemical Research Toxicology***, 13, 953-956.

Golden, D. M., Benson, S. W. 1969. Free-Radical and Molecule Thermochemistry from Studies of Gas-Phase Iodine-Atom Reactions. ***Chemical Reviews***, 69, 125-134.

Golik, J., Clardy, J., Dubay, g., Groenewold, G., Kawaguchi, H., Konishi, N., Krishnan, B., Ohkuma, H., Saitoh, K-I., Doyle, T. W. 1987. Esperamicins, A Novel Class of Potent Antitumor Antibiotics. 3. Structures of Esperamicins A1, A2, and A1b, ***Journal of the American Chemical Society***, 109, 3462.

Goodman, L.S., Wintrobe, M.M., Dameshek, W., Goodman, M.J., Gilman, M.A., Mclennan, M.T. 1946. Nitrogen Mustard Therapy. ***The JAMA Network***, 132, 126-132.

Green, D. R. 2005. Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead. ***Cell***, 121, 671-674.

Gronning, T. 2001. History of Cancer, Graham, A.C., (ed.) The SAGE Encyclopedia of Cancer and Society. Thousand, 549-553, Oaks, CA, USA.Haddow, A., Kon, G., Ross, W. 1948. Effects Upon Tumours of Various Haloalkylarylamines. ***Nature,*** 162, 824-825.

Hara, M.,Takahashi, I., Yoshıda, M., Kawamoto, I., Morimoto, M., Nakano, H. 1990. A Novel Antitumor Antibiotics Produced by A Streptomyces sp. ***Journal of Antibiotics***, 42, 333-335.

Hazell, S. 2014. Mustard Gas–from the Great War to Frontline Chemotherapy, http://scienceblog. cancerresearchuk.org/2014/08/27/mustard-gas-from-the-great-war-to-frontline-chemotherapy, 27-08-2014.

Heather, J.M., Chain, B. 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. ***Genomics,*** 107, 1-8.

Hecht, S.M. 1986. The Chemistry of Activated Bleomycin. ***Accounts of Chemical Research***, 19, 383-391.

Hecht, S.M. 2000. Bleomycin: New Perspectives on the Mechanism of Action. ***Journal of Natural Products,*** 63, 158-168.

Hemminki, K. 1993. DNA Adducts and Mutations in Occupational and Environmental Biomonitoring. ***Carcinogenesis***, 14, 2007-2027.

Hoeijmakers, J.H.J. 2001. Genome Maintenance Mechanisms for Preventing Cancer. ***Nature***, 411, 366-374.

Hu, X., Wang, Y., Xue, J., Han, T., Jiao, R., Li, Z., Liu, W., Xu, F., Hua, H., Li, D. 2017. Design and Synthesis of Novel Nitrogen Mustard-Evodiamine Hybrids with Selective Antiproliferative Activity. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,*** 22, 4989-4993.

Ishida, N., Miyazaki., K., Kumagai, K., Rikimaru; M. 1965. Neocarzinostatin, An Antitumor Antibiotic of High Molecular Weight; Isolation, Physicochemical Properties and Biological Activities. ***Journal of Antibiotics***, 18, 68-76.

Johnson, K.M., Parsons, Z.D., Barnes, C.L. ve Gates K.S. 2014. Toward Hypoxia-Selective DNA-Alkylating Agents Built by Grafting Nitrogen Mustards onto the Bioreductively Activated, Hypoxia- Selective DNA-Oxidizing Agent 3-Amino-1,2,4-benzotriazine 1,4-Dioxide (Tirapazamine). ***The Journal of Organic Chemistry,*** 79(16), 7520-7531.

Karmakar, S., Purkait, K., Chatterjee, S., Mukherjee, A. 2016. Anticancer Activity of a Cis-Dichloridoplatinum(II) Complex of a Chelating Nitrogen Mustard: Insight Into Unusual Guanine Binding Mode and Low Deactivation by Glutathione. ***Dalton Transactions,*** 45, 3599-3615.

Kersten, H., Kersten, W., Rauen, H.M. 1960. Action of Nucleic Acids on the Inhibition of Growth by Actinomycin of Neurospora crassa. ***Nature,*** 187, 60-61.

Konishi, M., Ohkuma, H., Saitoh; K., Kawaguchi, H., Golik, J., Dubay, G., Gronewold, G., Krishnan, B., Doyle; T. W. 1985. Esperamicins, A Novel Class of Potent Antitumor Antibiotics. I. Physico-Chemical Data and Partial Structure, ***Journal of Antibiotics***, 38, 1605-1609.

Konishi, M., Ohkuma, H., Matsumoyo, K., Tsuno, T., Kamei; H., Miyaki; T., Oki, T., Kawaguchi, H., Van Duyne, G. D., Clardy, J. 1989. Dynemicin A, A Novel Antibiotic with the Anthraquinone and 1,5-diyn-3-ene Subunit, ***Journal of Antibiotics***, 42, 1449-1452.

Krugh, T.R. 1994. Drug-DNA Interactions. ***Current Opinion Structure Biology,*** 4, 351-364.

Laczkowski, K., Switalska, M., Baranowska- Laczkowski, A., Plech, T., Paneth, A., Misiura, K., Wietrzyk, J., Czaplinska, B., Mrozek-Wilczkiewicz, A., Malarz, K., Musioł, R., Grela, I. 2016. Thiazole-Based Nitrogen Mustards: Design, Synthesis, Spectroscopic Studies, DFT Calculation, Molecular Docking, and Antiproliferative Activity Against Selected Human Cancer Cell Lines. ***Journal of Molecular Structure***, 1119, 139-150.

Lawley, P. D., Brookes, P. 1963. Further Studies on the Alkylation of Nucleic Acids and Their Constituent Nucleotides. ***Biochemistry Journal***, 89, 127-138.

Lee, M. D., Dunne, T. S., Siegel, M. M., Chang, C. C., Morton, G, O., Borders, D. B. 1987. Calichemicins, a Novel Family of Antitumor Antibiotics. 1. Chemistry and Partial Structure of Calichemicin. ***Journal of the American Chemical Society***, 109, 3464.

Lerman, L.S. 1961. Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridines. ***Journal of Molecular Biology,*** 3, 18-30.

Lerman, L.S. 1963. The Structure of the DNA-Acridine Complex, ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, 49, 94-102.

Loeber, R.L., Michaelson-Richie, E.D., Codreanu, S.G., Liebler, D.C., Campbell, C.R., Tretyakova, N.Y. 2009. Proteomic Analysis of DNA-protein Cross-linking by Antitumor Nitrogen Mustards. **Chemical Research Toxicology**, 22, 1151-1162.

Lin, S., Li, Y., Zheng, Y., Luo, L., Sun, Q., Ge, Z., Cheng, T., Li, R. 2017. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Quinazoline -phosphoramidate Mustard Conjugates as Anticancer Drugs. ***European Journal of Medicinal Chemistry,*** 127, 442-458.

Lindahl, T., Andersson, A. 1972. Rate of Chain Breakage At Apurinic Sites in Double-Stranded Deoxyribonucleic Acid. ***Biochemistry,*** 11, 3618-3623.

Ling, X., Zhong, W., Q., Ni, K. 2008. Spectroscopic studies on the interaction of pazufloxacin with calf thymus DNA. Journal of Photochemistry and Photobiology B: ***Biology,*** 98, 172-176.

Lockhart, T.P., Comita, P.B., Bergman, R.G., 1981. Kinetic Evidence for the Formation of Discrete 1,4-Dehydrobenzene Intermediates. Trapping by Inter- and Intramolecular Hydrogen Atom Transfer and Observation of High-Temperature CIDNP. ***Journal of the American Chemical Society***, 103, 4082.

Luch, A. 2005. Nature and Nurture - Lessons from Chemical Carcinogenesis. ***Nature Review Cancer,*** 5, 113-125.

Manning, G.S. 1978. The Molecular Theory of Polyelectrolyte Solutions with Applications to the Electrostatic Properties of Polynucleotides**.** ***Quarterly Reviews of Biophysics***, 11, 179-246.

Mattes, W.B., Hartley, J,A., Kohn. K,W. 1980. Mechanism of DNA Strand Breakage by Piperidine at Maxam, A. M., Gilbert, W., Sequencing End Labelled DNA With Base-Specific Chemical Cleavages. ***Methods in Enzymology***, 65, 499-560.

Maxam, A.M., Gilbert, W.1977. A new method for sequencing DNA. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, 74 (2): 560–564.

McHugh, P.J., Knowland, J. 1995. Novel Reagents for Chemical Cleavage at Abasic Sites and UV Photoproducts in DNA. ***Nucleic Acids Research***, 23, 1664-1670.

Miaskiewicz, K., Osman, R. 1994. Theoretical Study on the Deoxyribose Radicals Formed by Hydrogen Abstraction. ***Journal of the American Chemical Society,*** 116, 232-238.

Millard, J.T., Katz, J.L., Goda, J., Frederick, E.D., Pierce, S.E. Speed, T.J., Thamattoor, D.M. 2004. DNA Interstrand Cross-Linking by a Mycotoxic Diepoxide. ***Biochimie,*** 86, 419-423.

Millard, J.T., Hanly, T.C., Murphy, K., Tretyakova, N. 2006. The 5'-GNC Site for DNA Interstrand Cross-Linking is Conserved for Diepoxybutane Stereoisomers. ***Chemical Research Toxicology,*** 9, 16-19.

Myers, A. G. 1987. Proposed structure of the Neocarzinostatin Chromophore-Methyl Thioglycolate Adduct; A Mechanism for the Nucleophilic Activation of Neocarzinostatin. ***Tetrahedron Letters,*** 28, 4493-4496.

Myers, A.G., Cohen,S.B., Kwon, B.M. 1994. DNA Cleavage by Neocarzinostatin Chromophore. Establishing the Intermediacy of Chromophore-Derived Cumulene and Biradical Species and Their Role in Sequence-Specific Cleavage. ***Journal of the American Chemical Society,*** 116, 1670-1682.

Nejad, I. M., Johnson, K.M., Price, N.E., Gates, K.S. 2016. A New Cross-Link for an Old Cross-Linking Drug: The Nitrogen Mustard Anticancer Agent Mechlorethamine Generates Cross-Links Derived from Abasic Sites in Addition to the Expected Drug-Bridged Cross-Links. ***Biochemistry,*** 55, 7033-7041.

Neville, D.M.Jr.,Davies, D.R. 1966. The Interaction of Acridine Dyes with DNA: An X-ray Diffraction and Optical Investigation. ***Journal of Molecular Biology***, 17, 57-74.

Noll, D.M., Mason, T.M., Miller, P.S. 2006. Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA. ***Chemical Reviews,*** 106, 277-301.

Norbury, C. J., Hickson, I. D. 2001. Cellular Responses to DNA Damage. ***Annual Review of Pharmacology and Toxicology,*** 41, 367-401.

O'Neill, J. P. 2000. DNA Damage, DNA Repair, Cell Proliferation, and DNA Replication: How Do Gene Mutations Result**.** ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,*** 97, 11137-11139.

Ojwang, J.O., Gruenberg, D.A., Loechler, E.L. 1989. Synthcsis of a Duplex Oligonucleotide Containing a Nitrogen Mustard Interstrand DNA-DNA Cross-link. ***Cancer Research,*** 49, 529-537.

Pryor, W. 1988. Why Is the Hydroxyl Radical the Only Radical that Commonly Adds to DNA? Hypothesis: It Has A Rare Combination of High Electrophilicity, High Thermochemical Reactivity, and A Mode of Production that Can Occur Near DNA. ***Free Radical Biology and Medicine,*** 4, 219-223.

Pullman, A., Pullman, B. 1981. Molecular Electrostatic Potential of The Nucleic Acids. ***Quarterly Reviews of Biophysics,*** 14, 289-380.

Record, M.T., Anderson, C.F., Lohman, T.M. 1978. Thermodyn1amic Analysis of Ion Effects on the Binding and Conformational Equilibria of Proteins and Nucleic Acids: the Roles of Ion Association or Release, Screening, and Ion Effects on Water Activity. ***Quarterly Reviews of Biophysics,*** 11, 103-178.

Reich, E. 1964. Actinomycin: Correlation of Structure and Function of Its Complexes with Purines and DNA. ***Science,*** 143, 684-689.

Rouse, J., Jackson, S. P. 2002. Interfaces Between the Detection, Signaling, and Repair of DNA Damage. ***Science***, 297, 547-551.

Sausville, E.A., Peisach, J., Horwitz, S.B. 1978. Effect of Chelating Agents and Metal Ions on the Degradation of DNA by Bleomycin. ***Biochemistry,*** 17, 2740-2746.

Scharer, O. D. 2003. Chemistry and Biology of DNA Repair. ***Angewandte Chemie International Edition.*** 42, 2946-2974.

Schearer, O.D. 2005. DNA Interstrand Crosslinks: Natural and Drug-Induced DNA Adducts that Induce Unique Cellular Responses. ***Chembiochem,*** 6, 27-32.

Silverman, R.B., Holladay, M.W. 2014. The Organic Chemistry of Drug Disign and Drug Action, ***Elseveir,*** 517, San Diego, CA., USA.

Singer, B. 1976. All Oxygens in Nucleic Acids React with Carcinogenic Ethylating Agents. ***Nature,*** 264, 333-339.

Singer, B., Kroeger, M., Carrano, M. 1978. O2- and O4-Alkyl pyrimidine Nucleosides: Stability of the Glycosyl Bond and of the Alkyl Group As A Function of pH. ***Biochemistry,*** 17, 1246-1250.

Singh, R.K., Prasad, D.N., Bhardwaj, T.R. 2017. Design, Synthesis and In Vitro Cytotoxicity Study of Benzodiazepine-Mustard Conjugates as Potential Brain Anticancer Agents. ***Journal of Saudi Chemical Society,*** 21, 86-93.

Sonntag, C.V., Hagen, U., Schon-Bopp, A., Schulte-Frohlinde, D. 1981. Radiation-induced Strand Breaks in DNA: Chemical and Enzymatic Analysis of End Groups and Mechanistic Aspects. ***International Journal of Radiation Biology,*** 9. 109-142.

Stubbe, J., Kozarich, J.W., Wu, W., Vanderwall, D.E. 1996. Bleomycins: A Structural Model for Specificity, Binding, and Double Strand Cleavage. ***Chemical Research,*** 29, 322-330.

Sugiyama, H., Fujiwara, T., Ura, A., Tashiro, T., Yamamoto, K., Kawanishi, S., Saito, I. 1994. Chemistry of Thermal Degradation of Abasic Sites in DNA. Mechanistic Investigation on Thermal DNA Strand Cleavage of Alkylated DNA. ***Chemical Research Toxicology,*** 7, 673-683.

Trafalis, D., Geromichalou, E., Dalezis, P., Nikoleousakos, N., Sarli, V. 2016. Synthesis and Evaluation of New Steroidal Lactam Conjugates with Aniline Mustards as Potential Antileukemic Therapeutics. ***Steroids,*** 115,1-8.

Tretyakova, N.Y. Groehler, A., Ji, S. 2015. DNA-Protein Cross-links: Formation, Structural Identities, and Biological Outcomes. ***Chemical Research,*** 48, 1631-1644.

Tullius, T.D., Dombroski, B.A., Churchill, M.E.A., Kam, L. 1987. Hydroxyl Radical Footprinting: A High-Resolution Method for Mapping Protein-DNA Contacts. ***Methods of Enzymology,*** 155, 537-538.

Umezawa, H. 1966. Maeda, K., Takeuchi, T., Okami, Y., New Antibiotics, Beomycin A and B. ***The Journal of Antibiotics,*** 19, 200-209.

Umezawa, H. 1978. Bleomycin; Current Status and New Developments. ***Academic Press***, New York, USA.

Urbaniak, M.D., Bingham, J.P., Hartley, J.A., Woolfson, D.N., Caddick, S. 2004. Design and Synthesis of a Nitrogen Mustard Derivative Stabilized by Apo-neocarzinostatin. ***Journal of Medicinal Chemistry,*** 47, 4710-4715.

Wang, A.H.J. 1992. Intercalative Drug Binding to DNA. ***Current Opinion Structure Biology***, 2, 361-368.

Wartell, R.M., Larson, J.E., Wells, R.D. 1974. Netropsin:A Specific Probe for A-T Regions of Duplex Deoxyribonucleic Acid. ***The Journal of Biological Chemistry,*** 249, 6719-6731.

Watson, J.D., Crick, F.H.C. 1953. A structure for Deoxyriboze Nucleic Acid. ***Nature,*** 171, 737-738.

Wilson, W. D. 1996. In Nucleic Acids in Chemistry and Biology. ***Oxford University Press***, New York, 331-370. USA.

Wong, C.W., Li, B. F.L. 1994. A Method for Locating O6-Methylguanine Residues in DNA. ***Nucleic Acids Research,*** 22, 882-883.

Wu, W., Vanderwall, D.E., Stubbe, J., Kozarich, J.W., Turner, C.J. 1994. Interaction of Co-Bleomycin A2 (green) with d(CCAGGCCTGG)2: Evidence for Intercalation Using 2D NMR. ***Journal of the American Chemical Society,*** 116, 10843-10844,

Wu, W., Vanderwall, D.E., Lui, S.M., Tang, X.J., Turner, C.J., Kozarich, J.W., Stubbe, J. 1996. Solution Structure of Co·Bleomycin A2 Green Complexed with d(CCAGGCCTGG. ***Journal of the American Chemical Society,*** 118, 1268-1280.

Wu, W., Vanderwall, D.E., Turner, C.J., Kozarich, J.W., Stubbe, J. 1996. Solution Structure of Co·Bleomycin A2 Green Complexed with d(CCAGGCCTGG). ***Journal of the American Chemical Society,*** 118, 1281-1294.

Wu, X., Hu, L. 2016. Design and Synthesis of Peptide Conjugates of Phosphoramide Mustard as Prodrugs Activated by Prostate-Specific Antigen. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry,*** 24, 2697-2706.

Xu, S., Pei, L., Wang, C., Zhang, Y.K., Li, D., Yao,H., Wu, X., Chen, Z.S., Sun, Y., Xu, J., 2014. Novel Hybrids of Natural Oridonin-Bearing Nitrogen Mustards as Potential Anticancer Drug Candidates. ***Medicinal Chmistry Letters,*** 28, 797-802.

Zady, M.F., Wong, J.L. 1980. Unusual Competition Between Nitrogen and Carbon Methylation of Nucleosides by Methyl Radical in Various Aqueous Media. ***The Journal of Organic Chemistry,*** 45, 2373-2377.

Zang, H., Breydo, L., Mitra, K., Dannaldson, J., Gates, K.S. 2001. DNA Alkylation by Leinamycin Can Be Triggered by Cyanide and Phosphines. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters***, 11, 1511-1515.

Zhang, H.B., Xue, J.J., Zhao, X.L., Liu, D.G., Li, Y. 2009. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Steroid-Linked Nitrogen Mustards. ***Chinese Chemical Letters***, 20, 680-683.

Zhang, E., Luo, S., Tan, X., Shi, C. 2014. Mechanistic Study of IR-780 Dye as a Potential Tumor Targeting and Drug Delivery Agent. ***Biomaterials,*** 35, 771-778.

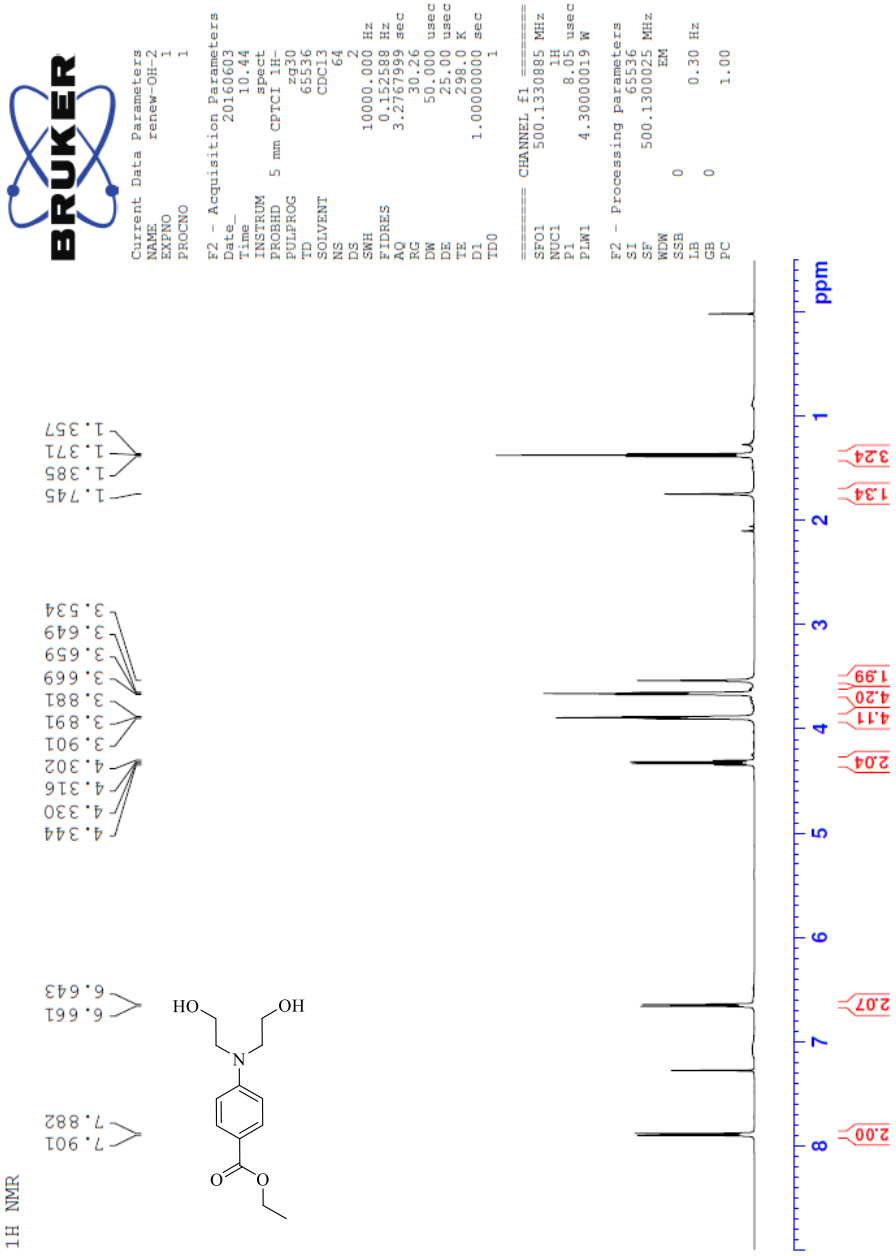
Zheng, Q.Z., Zhang, F., Cheng, K., Yang, Y., Chen, Y., Qian, Y., Zhang, H.J., Li, H.Q., Zhou, C.F., An, S.Q., Jiao, Q.C., Zhu, H.L. 2010. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking Studies of Amide-Coupled Benzoic Nitrogen Mustard Derivatives as Potential Antitumor Agents. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry***, 18, 880-886.

Zhou, B.B.S., Elledge, S.J. 2000. The DNA Damage Response: Putting Checkpoints in Perspective. ***Nature***, 408, 433-438.

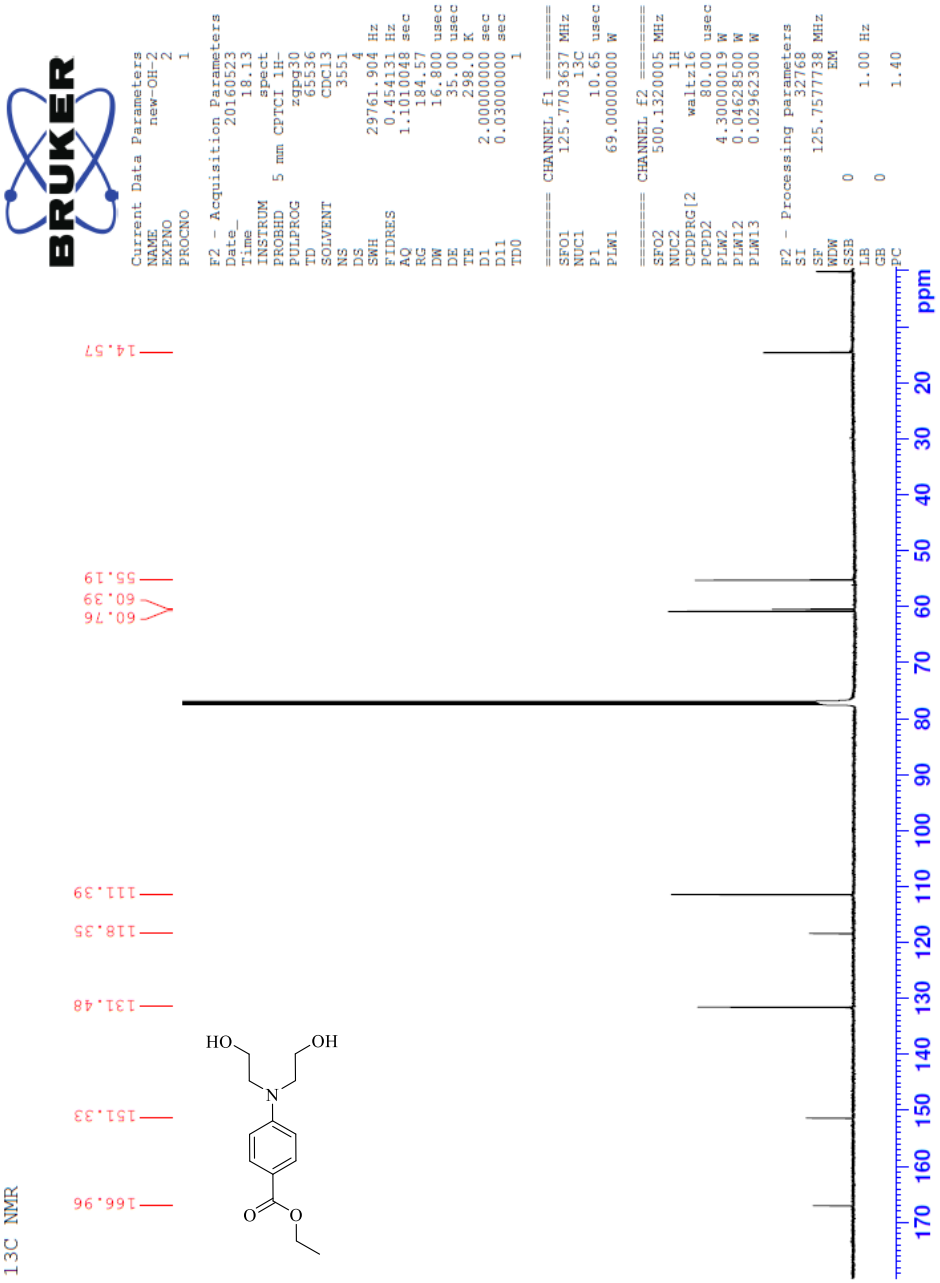
Zuravka, I., Roesmann, R., Sosic, A., Göttlich, R., Gatto, B. 2015. Bis-3-chloropiperidines Containing Bridging Lysine Linkers: Influence of Side Chain Structure on DNA Alkylating Activity. ***Bioorganic & Medicinal Chemistry***, 23, 1241-1250.

**EKLER**

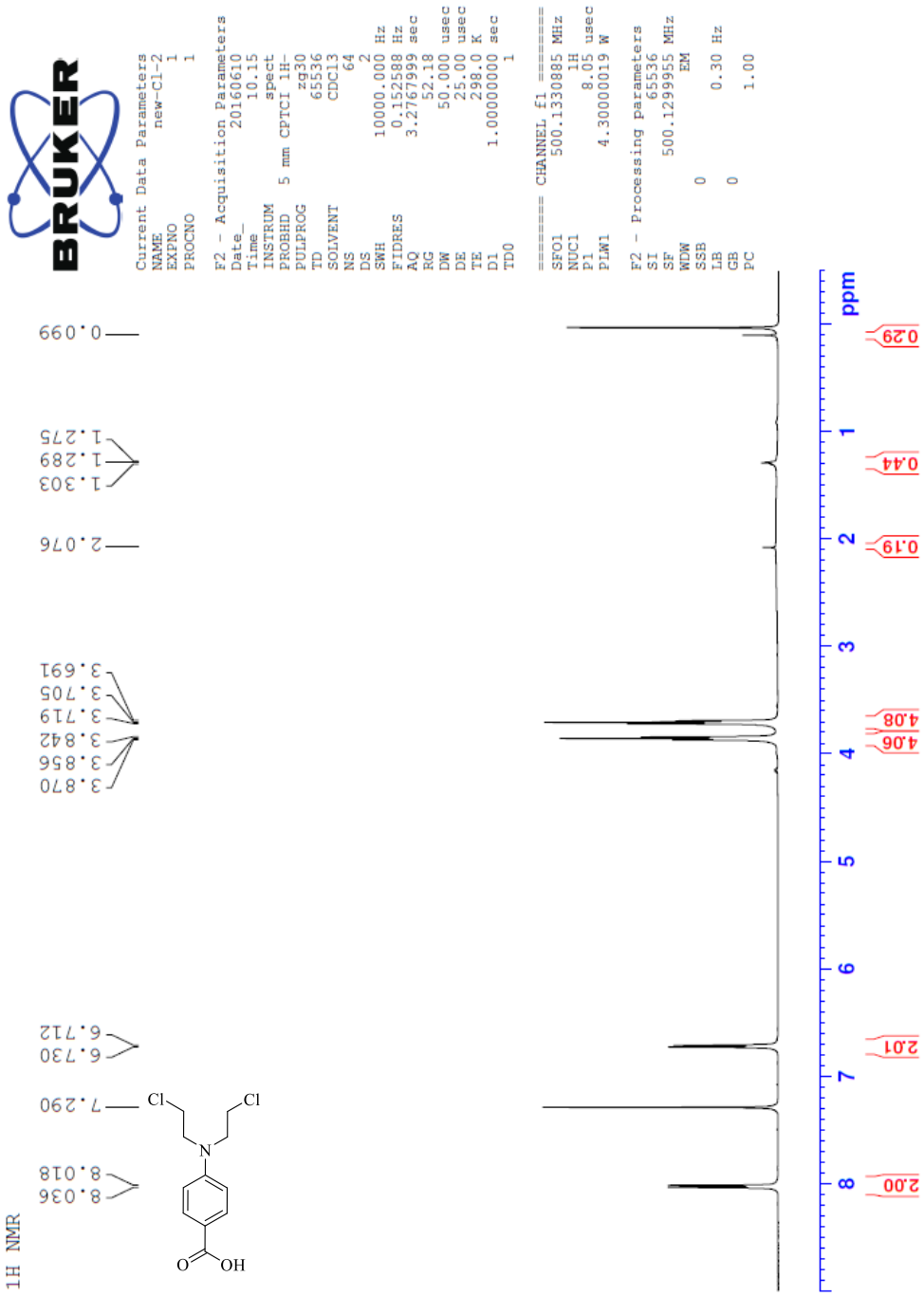
**EK-1. 4-(bis(2-hidroksietil)amino)benzoat'ın (61) $^{1}$H-NMR Spekturumu**



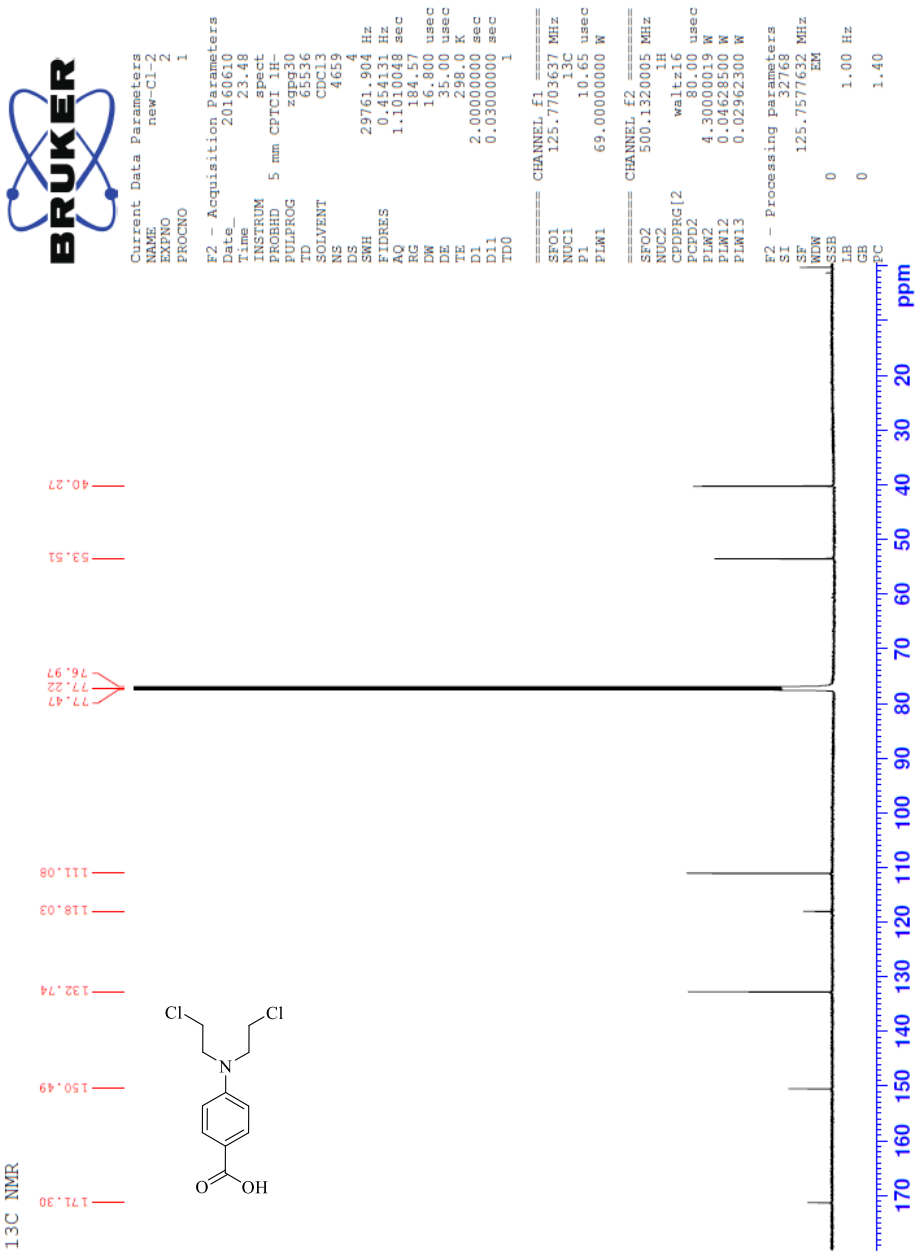
**EK-2. 4-(bis(2-hidroksietil)amino)benzoat'ın (61) $^{13}$C-NMR Spekturumu**



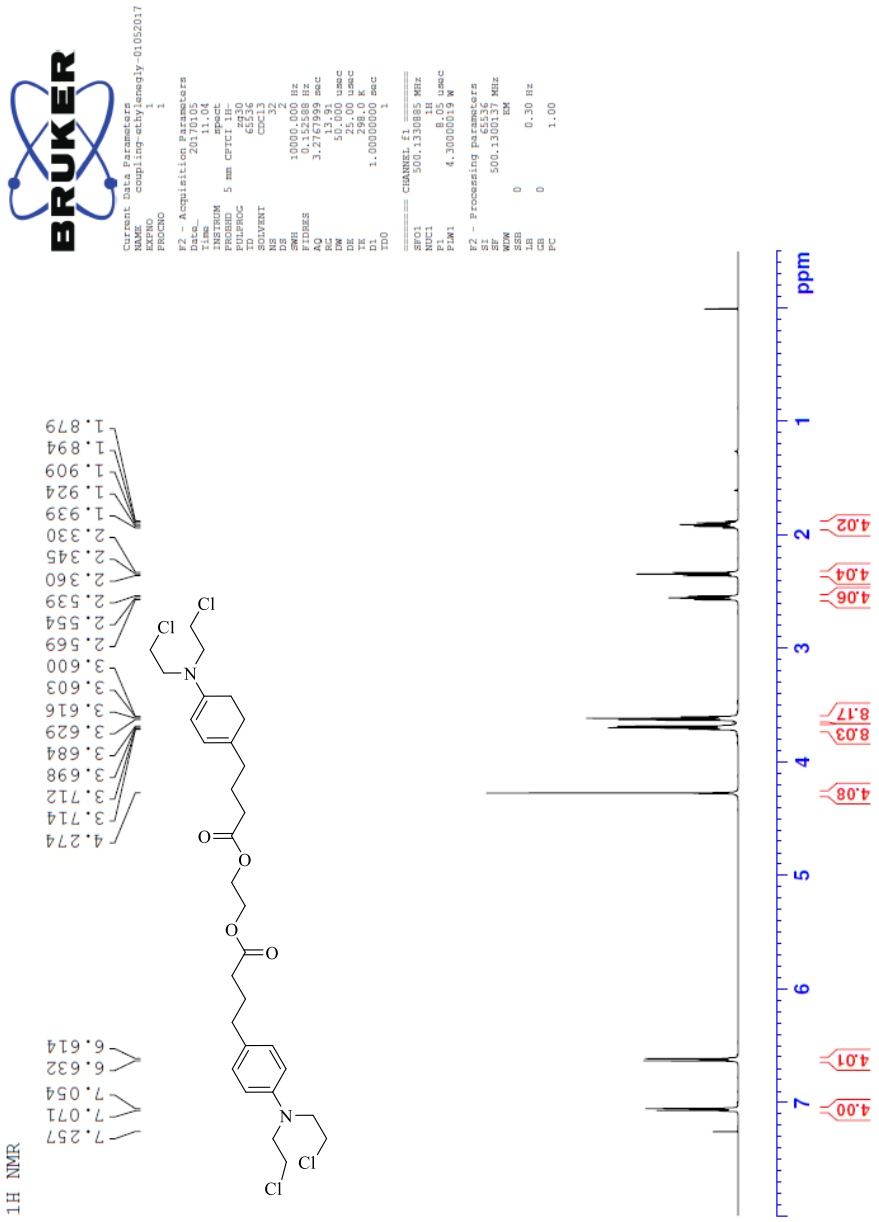
**EK-3. 4-(bis(2-kloroetil)amino)benzoik asit'in (62) $^{1}$H-NMR Spekturumu**



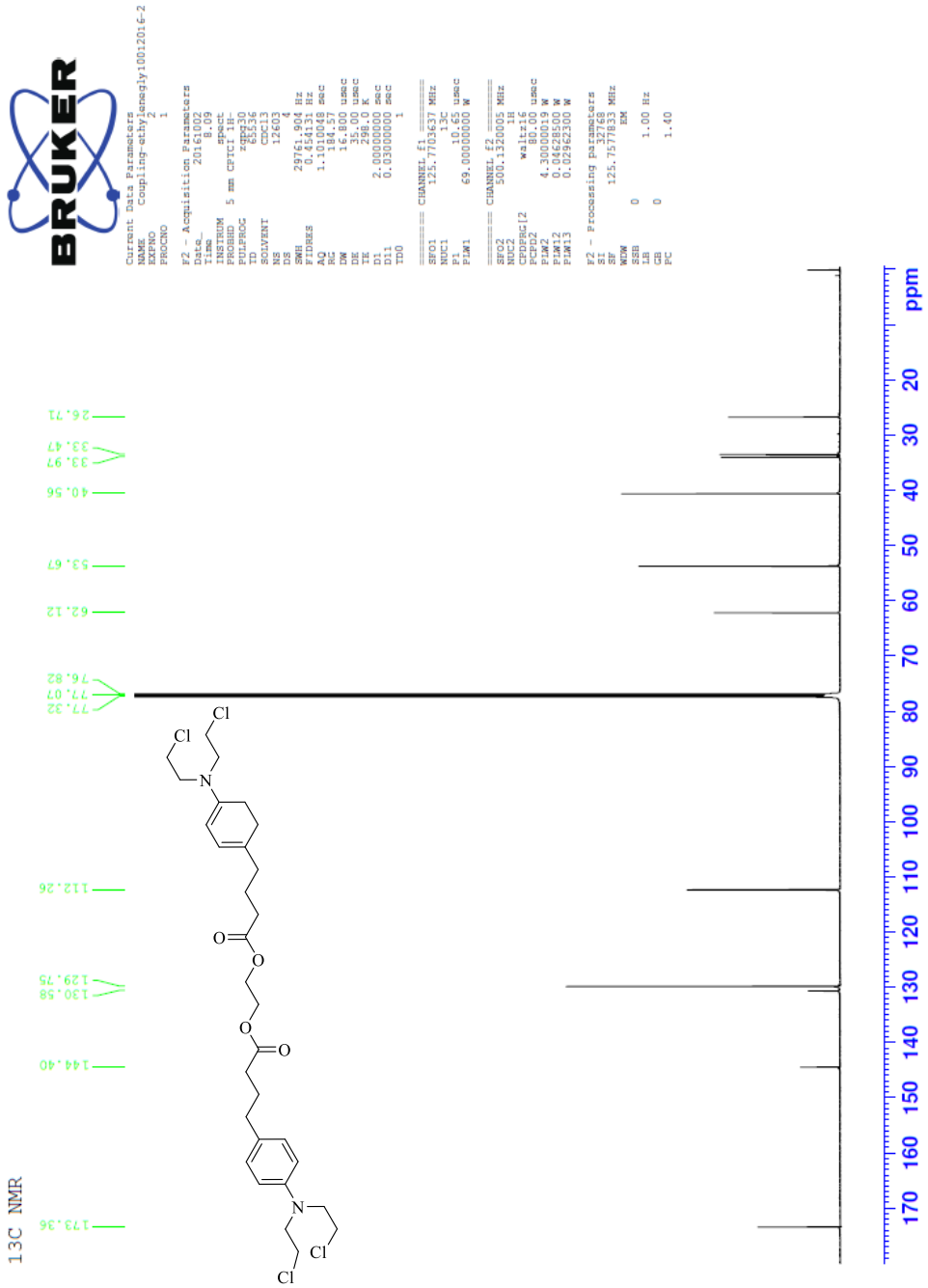
**EK-4. 4-(bis(2-kloroetil)amino)benzoik asit'in (22) $^{13}$C-NMR Spekturumu**



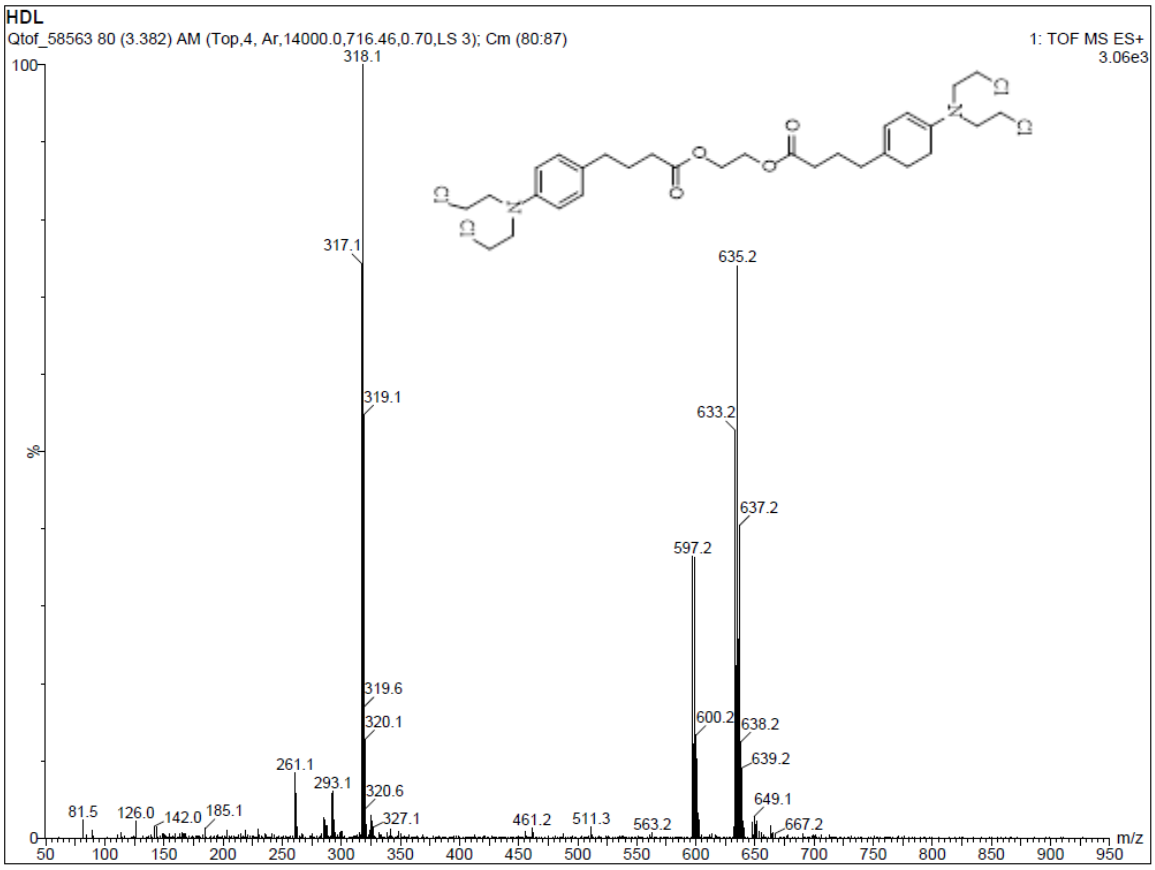
**EK-5. HDL (Bis(4-(4-(bis(2-kloroetil)amino)fenil)bütanoat)-1,2-etandiil) in $^{1}$H-NMR Spekturumu**



**EK-6. HDL (Bis(4-(4-(bis(2-kloroetil)amino)fenil)bütanoat)-1,2-etandiil) in $^{13}C$ NMRSpekturumu**



**EK-7. HDL (Bis(4-(4-(bis(2-kloroetil)amino)fenil)bütanoat)-1,2-etandiil) in HDMS Spekturumu**



# ÖZGEÇMİŞ

**Kişisel Bilgiler**

**Adı Soyadı** : Hayrettin DİNÇ

**Doğum Tarihi** : 05.10.1986

**Uyruğu** : T.C.

**Doğum Yeri** : Tutak/AĞRI

**Medeni Hali** : Bekar

**Adres** : Mestanzade Mah 44 sok No 12 Seyhan/ADANA

**GSM** : (0544) 4486991

**E-Mail** : dinchayrettin@gmail.com

**Öğrenim Durumu:**

| Derece | Bölüm/Program | Üniversite | Yıl |
|---|---|---|---|
| Lisans | Kimya | Dicle Üniversitesi | 2005-2010 |
| Y. Lisans | Kimya | Dicle Üniversitesi | 2011-2013 |
| Doktora | Kimya | Dicle Üniversitesi | 2013-2017 |

**Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:** Bis-Akridin Ligantlarının Sentezi, Yapısal Karakterizasyonu, Antimikrobiyal Aktiviteleri ve DNA ile Etkileşimlerinin İncelenmesi. **Tez Danışmanı:** Prof. Dr. Murat KIZIL

**Doktora Tezi Başlığı ve Danışmanı:** Bis-Azot Hardalı İçeren Potansiyel Antikanser Hibrit Moleküllerin Dizaynı, Sentezi ve DNA'ya Bağlanma İlgilerinin Araştırılması **Tez Danışmanı:** Prof. Dr. Göksel KIZIL

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORATEZ ÇALIŞMASI İNTİHAL RAPORU FORMU

| ÖĞRENCİ BİLGİLERİ | |
|---|---|
| ADI VE SOYADI | Hayrettin DİNÇ |
| ÖĞRENCİ NO | 13803508 |
| EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI | 20017-2018 |
| YARIYIL | ☒ Güz☐Bahar |
| ANABİLİM DALI | Kimya |
| PROGRAM | DOKTORA |
| TEZ KONUSU | Bis-Azot Hardalı İçeren Potansiyel Antikanser Hibrit Moleküllerin Dizaynı, Sentezi ve DNA`ya Bağlanma İlgilerinin Araştırılması |
| **İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ** | |
| RAPOR TÜRÜ | Tez Savunma SınavıSonrası |
| SAYFA SAYISI | 108 |
| BENZERLİK ORANI | %21 |
| RAPORLAMA TARİHİ | 29/11/ 2017 |

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam **108** sayfalık kısmına ilişkin, **29/11/ 2017** tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %21 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

☐ Kabul/Onay sayfaları hariç,
☐ Kaynakça hariç
☐ Alıntılar hariç/dâhil
☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve bu Uygulama Esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

(İmza)
**Hayrettin DİNÇ**

| (İmza) | (İmza) |
|---|---|
| 27.../11.../20.17 | 29.../11.../ 20.17 |
| Prof. Dr. Göksel KIZIL<br>**Tez Danışmanı** | Prof. Dr. Ömer YAVUZ<br>**Kimya Anabilim Dalı Başkanı** |