ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pirolidin Türevi Bileşiklerin Bazı Farmakolojik Etkilerinin Araştırılması: *in vitro* ve *in vivo* Çalışmalar

Senanur TAŞ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Temmuz, 2024

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

Pirolidin Türevi Bileşiklerin Bazı Farmakolojik Etkilerinin Araştırılması: *in vitro* ve *in vivo* Çalışmalar

---

Senanur TAŞ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 01/07/2024 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği / ~~Oy Çokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. H. Ali DÖNDAŞ (Danışman) ……

: Prof. Dr. Gülüzar ATLI DEMİRAY ……

: Prof. Dr. Tuğba TAŞKIN TOK ……

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2023-15939

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

İÇİNDEKİLER

ÖZ I
ABSTRACT II
TEŞEKKÜR III
ÇİZELGELER DİZİNİ IV
ŞEKİLLER DİZİNİ V
SİMGELER VE KISALTMALAR VII
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5
3. MATERYAL VE METOT 9
3.1. Materyal 9
3.1.1. Kullanılan Cihazlar 9
3.1.2. Kullanılan Malzemeler 9
3.2. Metod 9
3.2.1. Pirolidin Türevi Bileşiklerin Sentezi 10
3.2.2. Total Antioksidan Kapasite (DPPH) Yöntemi 13
3.2.3. Antimikobakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi 14
3.2.4. Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi 14
3.2.5. Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi 15
3.2.6. Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite (MTT) Testi 16
3.2.7. Farelerde *in vivo* Deneysel Çalışmalar 17
3.2.8. Farelerde *in vitro* Deneysel Çalışmalar 19
3.2.9. *İn silico* Çalışmalar 20
3.2.10. İstatistiksel Analiz 21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 23
4.1. Bulgular 23
4.1.1. Sentezlenen Yeni Pirolidin Türevi Bileşiklerin Spektral Verileri 23
4.1.2. Total Antioksidan Kapasite (DPPH) Bulguları 24
4.1.3. Antimikobakteriyel Aktivite Bulguları 25
4.1.4. Antibakteriyel Aktivite Bulguları 26
4.1.5. Antifungal Aktivite Bulguları 28
4.1.6. MTT Testi Bulguları 29
4.1.7. Farelerde *İn Vivo* Deneysel Çalışmalar 32
4.1.8. Farelerde *İn Vitro* Deneysel Çalışmalar 34
4.1.9. Moleküler Docking Çalışmaları 36
4.1.10. Absorbsiyon-Dağılım-Metabolizma-Atılım-Toksisite (ADMET) Çalışmaları 39

4.2. Tartışma 42
4.2.1. Sentezlenen Pirolidin Türevi Bileşiklerin Analizi 42
4.2.2. Total Antioksidan Kapasitenin Değerlendirilmesi 43
4.2.3. Antimikrobiyal Bulgularının Değerlendirilmesi 44
4.2.4. MTT Testi Bulgularının Değerlendirilmesi 45
4.2.5. Zorunlu Yüzme Testi Bulgularının Değerlendirilmesi 45
4.2.6. Fare COX-2 ELISA Testi Bulgularının Değerlendirilmesi 45
4.2.7. Fare SOD1 ELISA Testi Bulgularının Değerlendirilmesi 46
4.2.8. Moleküler Docking ve ADMET Bulgularının Değerlendirilmesi 47
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 49
KAYNAKLAR 51
ÖZGEÇMİŞ 63
EKLER 65

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pirolidin Türevi Bileşiklerin Bazı Farmakolojik Etkilerinin Araştırılması: *in vitro* ve *in vivo* Çalışmalar

Senanur TAŞ

Danışman: Prof. Dr. H. Ali DÖNDAŞ
İkinci Danışman: Prof. Dr. Naciye YAKTUBAY DÖNDAŞ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Tedavide kullanılan bazı ilaçlara karşı direnç geliştirmesi, bazılarının istenmeyen yan etkileri ve sınırlı biyoyararlanımları nedeni ile yeni ilaç araştırma ve geliştirme (AR-GE) çalışmaları önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasında; indol, tiyoüre, vinilsülfon farmakofor gruplarından birini veya birkaçını bulunduran bazı yeni potansiyel biyoaktif pirolidin türevi hibrit moleküller sentezlenerek farklı farmakolojik özellikleri *in vitro, in vivo* ve *in silico* çalışmalarla araştırıldı. Bunun için ilk olarak, ilgili aminoasitlerden elde edilen iminlerin, imin azometin yilür 1,3-dipolar halkalı katılma reaksiyonu ile yeni sübstitüe pirolidin ve bunların benzoilizotiyosiyonatla kondenzasyonu sonucunda aminokarbotiyol-pirolidin türevi hibrit bileşikler sentezlendi. Elde edilen moleküllerin yapıları ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HRMS, FT-IR ve X-Ray gibi analitik teknikler ile aydınlatıldı. Sentezlenen yeni moleküllerin resazurin mikrotitre yöntemi (REMA) ile antimikobakteriyel, resazurin mikroplak yöntemi ile antibakteriyel, sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile antifungal, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile antikanser, zorunlu yüzme testi ile antidepresan, 2,2′-difenil-1-pikril hidrazil hidrat (DPPH) testi ile antioksidan kapasite, süperoksit dismutaz (SOD1) enzim seviyesi ile antioksidan ve siklooksijenaz-2 (COX-2) enzim seviyesi ile antiinflamatuvar aktiviteleri ELISA testi ile araştırıldı. Elde edilen yeni pirolidin türevi hibrit moleküllerin bağlanma enerjileri COX-2 enzimine karşı *in silico* moleküler docking çalışmaları ve bazı farmakokinetik özellikleri ise absorpsiyon-dağılım-metabolizma-eliminasyon-toksisite (ADMET) çalışmaları ile araştırıldı. Yapısında divinilsülfon farmakofor grubu bulunduran yeni pirolidin türevi hibrit bileşiklerden **6a** nolu molekülün, elde edilen diğer pirolidin ve aminokarbotiyol-pirolidin hibrit moleküllerine (**6b**, **8**) kıyasla genel anlamda bazı farmakolojik etkilerinin daha iyi olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Biyoaktivite, *İn vivo/in vitro, İn silico* moleküler docking, Pirolidin türevi bileşikler.

CUKUROVA UNIVERSITY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MSc THESIS

Some Pharmacological Properties of Pyrrolidine Derived Compounds: *in vitro* and *in vivo* Studies

Senanur TAŞ

Advisor: Prof. Dr. H. Ali DÖNDAŞ
Co-Adviser: Prof. Dr. Naciye YAKTUBAY DÖNDAŞ

Department of Biotechnology

ABSTRACT

The novel drug research and development (R&D) studies are important and crucial due to the resistance to some drugs used in treatment, undesirable side effects and limited bioavailability of them in therapies. In this thesis, some novel potentially bioactive hybrid pyrrolidine derivative molecules containing one or more of indole, thiourea, vinylsulfone pharmacophore groups were synthesised and their various pharmacological properties were investigated by *in vitro, in vivo* and *in silico* studies. Thus, the novel substituted hybrid pyrrolidines compounds were prepared from imines, derived from corresponding amino acids, via imine azomethine yilide 1,3-dipolar cycloaddition reactions. The novel hybrid aminocarbothiol-pyrrolidine benzoylisothiothionate derivative were than obtained by condensation of pyrrolidine with benzoylisothiothionate.The structures of novel molecules were determined using analytical techniques such as ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, HRMS, FT-IR and X-Ray. The synthesized new molecules were then tested for their anti(myco)bacterial by using resazurin microtiter method (REMA), antibacterial using resazurin microplate method, antifungal using liquid microdilution method, anticancer activity using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test, antidepressant activity using forced swimming test, antioxidant capacity using 2,2′-diphenyl-1-picryl hydrazyl hydrazyl hydrate (DPPH) test, antioxidant activity using superoxide dismutase (SOD1) enzyme level and antiinflammatory activity using cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme level were investigated using ELISA test. The binding energies and some pharmacokinetic properties of prepared novel hybrid pyrrolidine derivatives were investigated using *in silico* molecular docking studies against COX-2 enzyme, and absorption-distribution-metabolism-elimination-toxicity (ADMET) studies. The new pyrrolidine derivative hybride molecule bearing divinylsulfone pharmacophore group **6a**, shown better pharmacological activities when comparing to other obtained pyrrolidine and aminocarbotiol-pyrrolidine (**6b, 8**) hybride molecules.

Keywords: Bioactivity, *in vivo/in vitro, in silico* molecular docking, Pyrrolidine derived compounds.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren, her aşamada rehberlik eden değerli danışmanlarım Prof. Dr. H. Ali DÖNDAŞ ve Prof. Dr. Naciye YAKTUBAY DÖNDAŞ'a hoşgörü ve emekleri için en içten duygularımla saygı ve minnetimi sunarım. Tez süresince motivasyonları ve yönlendirmeleri için her zaman minnettar olacağım. Onlarla çalışmak benim için bir gurur ve mutluluktu.

Tez çalışmamda katkıları bulunan Prof. Dr. Gülüzar ATLI DEMİRAY, Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ, Prof.Dr. Tuğba TAŞKIN TOK, Doç. Dr. Mahmut ÜLGER, Öğr. Gör. Dr. Tuncay İNCE, Dr. Samet POYRAZ ve Dr. Samet BELVEREN'e sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda her zaman yardım eden ve sürekli beni motive eden değerli ekip arkadaşlarım Abdulselam SAĞLAM, Beyza Nur ARSLAN, Zeynep KATIÇELİK, Hadice HAZNEVİ, Mehmet Ali TAMER, Bedriye ÇELİK ve Gizem YILDIRIM'a dostlukları, içtenlikleri ve sabırları için teşekkür ederim.

Bu süreçte her anımda yanımda olan, bana benden daha çok inanan, benden desteğini hiç esirgemeyen ve çalışmalarım konusunda beni teşvik eden sevgili annem Necla TAŞ'a, babam Mustafa TAŞ'a, nişanlım Hüseyin KOÇHAN'a ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından FYL-2023-15939 numaralı proje olarak desteklenmiştir. BAP birimine sağladıkları destek için teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans Eğitim Programı ve Yüksek Lisans eğitim-öğretimim boyunca verdiği destekler için Fen Bilimleri Enstitüsü'ne teşekkür ederim.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Total antioksidan kapasite analiz değerleri (DPPH) 24
Çizelge 4.2. Antimikobakteriyel aktivite bulguları 26
Çizelge 4.3. Antibakteriyel aktivite bulguları 27
Çizelge 4.4. Antifungal aktivite bulguları 28
Çizelge 4.5. Sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin COX-2 (PDB: 3LN1) enzimi ile ilgili moleküler docking çalışmaları 36
Çizelge 4.6. ADME bulguları 41
Çizelge 4.7. Toksisite bulguları 42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Pirolidin, indol, tiyoüre ve divinilsülfon farmakofor gruplarının bazı farmakolojik özellikleri 2
Şekil 2.1. Pirolidin, indol, tiyoüre veya vinilsülfon farmakofor gruplarını bulunduran ilaçlar..... 5
Şekil 2.2. Antioksidan (1, 2) ve antibakteriyel (2,3) aktiviteye sahip pirolidin türevi moleküller 6
Şekil 2.3. Antikanser aktiviteye sahip indol (4), pirolidin (5, 6, 7) ve vinilsülfon (8) türevi moleküller 7
Şekil 2.4. Antidiyabetik (9) ve antimikrobiyal (10, 11) aktiviteye sahip pirolidin türevi moleküller 8
Şekil 2.5. Potansiyel AChE inhibitörü olan (12, 13) pirolidin türevi moleküller..... 8
Şekil 3.1. Tez çalışması kapsamında yer alan çalışmanın genel gösterimi 10
Şekil 3.2. İminlerin sentez şeması 11
Şekil 3.3. Siklik pirolidinlerin sentez şeması 12
Şekil 3.4. 6a Bileşiğinin tek kristal X-ışını kırınımı yapısı 12
Şekil 3.5. Aminokarbotiyol-Pirolidin sentez şeması 13
Şekil 3.6. DPPH reaksiyonu 13
Şekil 3.7. DPPH testi aşamaları 14
Şekil 3.8. Resazurin mikrotitre yöntemi aşamaları 14
Şekil 3.9. Resazurin mikroplak yöntemi aşamaları 15
Şekil 3.10. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi aşamaları..... 16
Şekil 3.11. HCT116 (A) ve diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücre (B) hatlarının ışık mikroskobunda görüntüsü (10X) 17
Şekil 3.12. MTT testi aşamaları 17
Şekil 3.13. Farelerde deneysel çalışmaların şematik gösterimi..... 19
Şekil 3.14. ELISA testi aşamaları 20
Şekil 4.1. Total antioksidan kapasite (DPPH) bulgularının analizi..... 25
Şekil 4.2. *M. tuberculosis* H37Rv suşuna karşı siklik pirolidin türevi moleküllerin MİK değerleri 26
Şekil 4.3. Bakterilere karşı pirolidin türevi moleküllerin MİK değerleri..... 28
Şekil 4.4. Funguslara karşı pirolidin türevi moleküllerin MİK değerleri..... 29
Şekil 4.5. Yeni pirolidin türevi moleküllerin HCT116 hücre hattında canlılık üzerine etkileri.... 31
Şekil 4.6. Yeni pirolidin türevi moleküllerin diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücre hattında canlılık üzerine etkileri..... 32
Şekil 4.7. Yeni pirolidin türevi moleküllerin farelerde zorunlu yüzme testinde hareketsizlik süreleri üzerindeki etkileri 33

Şekil 4.8. Yeni pirolidin türevi moleküllerin farelerde zorunlu yüzme testinde yüzme süreleri üzerindeki etkileri 34
Şekil 4.9. Yeni pirolidin türevi moleküllerin karaciğer dokusundaki COX-2 enzim seviyeleri üzerindeki etkileri 35
Şekil 4.10. Yeni pirolidin türevi moleküllerin karaciğer dokusundaki SOD1 enzim seviyeleri üzerindeki etkileri 36
Şekil 4.11. 6a molekülünün COX-2 (PDB: 3LN1) ile 3D ve 2D konformasyonel gösterimi..... 37
Şekil 4.12. 6b molekülünün COX-2 (PDB: 3LN1) ile 3D ve 2D konformasyonel gösterimi..... 38
Şekil 4.13. 8 molekülünün COX-2 (PDB: 3LN1) ile 3D ve 2D konformasyonel gösterimi..... 38
Şekil 4.14. Referans ilacın COX-2 (PDB: 3LN1) ile 3D ve 2D konformasyonel gösterimi..... 39
Şekil 4.15. SwissADME çevrimiçi sunucusu tarafından tahmin edilen BOILED-Egg modeli 40

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADME : Absorbsiyon-Dağılım-Metabolizma-Eliminasyon
AR-GE : Araştırma ve Geliştirme
^{13}C-NMR : Karbon-13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
COSY : Homonükleer Korrelasyon Spektroskopisi
COX : Siklooksijenaz
d :Dublet
dd : Dubletin Dubleti
ddd : Dubletin Dubletinin Dubleti
dt : Dubletin Tripleti
DEPT : Distortionless Enhanced By Polarization Transfer
DMSO : Dimetilsülfoksit
DPPH : 2,2′-difenil-1-pikril hidrazil hidrat
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESI : Elektrosprey İyonizasyon
FBS : Fetal Sığır Serumu
FT-IR : Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
^{1}H-NMR : Proton-Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HRMS : Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektroskopisi
i.p. : İntraperitoneal
İTK : İnce Tabaka Kromatografisi
J : Jiromanyetik Sabiti
LD50 : %50 Lethal (Öldürücü) Doz
m : Multiplet
MİK : Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MS : Kütle Spektroskopisi
PDB : Protein Veri Bankası
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
s : Singlet
SOD : Süperoksit Dismutaz
t : Triplet

1. GİRİŞ

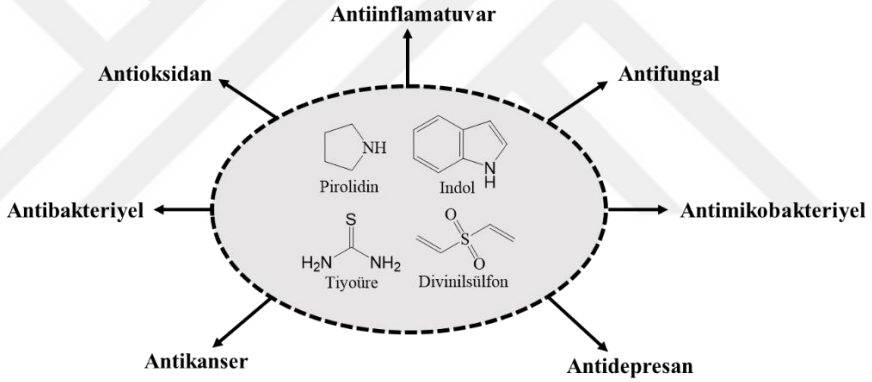
Mevcut ilaçların bazılarında istenmeyen yan etkiler veya bazı ilaçlara karşı direnç gelişmesi gibi sınırlamaların ortaya çıkması, yeni ilaç araştırma ve geliştirme (AR-GE) çalışmalarının önemini artırmaktadır (Döndaş ve ark., 2023). Yeni ilaç adayı moleküllerin geliştirilmesinde *in vitro* yöntemlerle moleküler düzeyde araştırma yapılması ve bu araştırmaların *in vivo* deneysel çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. İlaçların geliştirilmesinde, mevcut olan çok sayıda biyoaktif bileşikte olduğu gibi çoğu azot atomu içeren sentetik veya doğal kaynaklı heterosiklik yapıların hastalıkların tedavi yaklaşımlarında kullanımı giderek artmaktadır (Raimondi ve ark., 2020; Spano ve ark., 2020; Raimondi ve ark., 2019). Pirolidinler, pirolidin alkaloidleri veya pirolidin bazlı hibrit moleküller, birçok doğal üründe veya farmakolojik olarak önemli olan yapılarda bulunmaktadır. Pirolidin türevi hibrit bileşikler, farmakoterapide çeşitli roller üstlenerek biyolojik olarak aktif yeni bileşiklerin ve potansiyel ilaç adaylarının tasarlanması ve geliştirilmesinde çok yönlü bir temel oluşturduğu literatürde bilinmektedir (Döndaş ve ark., 2023).

Tetrahidropirol olarak da bilinen yapısında azot atomu içeren beş üyeli heterosiklik yapı olan pirolidin halkası doğal ya da sentetik birçok molekülün yapısında bulunmaktadır. Çok sayıda biyolojik ve farmakolojik olarak aktif molekülün yanı sıra birçok alkaloid ve biyoaktif bileşiğin ana yapısını da oluşturduğu bilinmektedir (Bhat ve Tilve, 2014; Li Petri ve ark., 2021; Liu ve ark., 2016; Islam ve ark., 2020). Arisarum vulgare'de (R)-bgugaine (antimikrobiyal) (Majik ve ark., 2008) ve Morus alba'da 1,4-dideoksi-1,4-imino-D-ribitol (antikanser) (Mizushina ve ark., 2003) mevcuttur. Pirolidin ve bazı pirolidin türevi moleküller ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan birçok ilaçta yer alan en yaygın beş üyeli azot heterosiklikleri arasında önemli bir yere sahip olup, ilaç tasarımında tercih edilen yapılar arasında yer almaktadır (Li Petri ve ark., 2021; Vitaku ve ark., 2014). Azot atomu içeren yapılardan indol ve tiyoürenin de biyolojik olarak aktif birçok moleküle dahil edilmesinin, bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerine büyük katkı sağladığı bilinmektedir (Sharma ve Singh, 2023).

İndol, beş üyeli pirol halkasıyla altı üyeli benzen halkasının α,β-pozisyonunda birleşmesiyle oluşan C_8H_7N formülüne sahip aromatik heterosiklik organik bir bileşiktir. Bununla birlikte indol halkası içeren triptofan gibi amino asitler ve bazı indol halkası bulunduran moleküller çeşitli biyolojik ve klinik uygulamaları nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Lakhdar ve ark., 2006; Sharma ve ark., 2010; Kaushik ve ark., 2013). Tiyoüre ise, ürede bulunan oksijen atomunun yerine kükürt atomunun geçmesiyle oluşan, $CS(NH_2)_2$ kimyasal formülüne sahip, tiyokarbamid olarak da bilinen iki tautomerik formu bulunan organik bir bileşiktir. Tiyoüre türevi bileşikler, geniş bir biyoaktiviteye sahip olduğu ve çok sayıda ilacın yapısında bulunduğu bilinmektedir (Khan ve ark., 2021; Mertschenk ve ark., 2000).

Yapısında sülfür bulunduran vinilsülfon grubu da son yıllarda, medisinal kimya ve ilaç AR-GE çalışmalarında önemli potansiyel bir farmakofor olarak ilgi çektiği rapor edilmiştir (Ahmadi ve Emami, 2022).

Pirolidin, indol, tiyoüre ve vinilsülfon gibi farmakofor grupları içeren doğal ürünlerin veya bu ürünlerden elde edilen çeşitli moleküllerin, bazı hastalıkların tedavisinde kullanıldığı literatürde yer almaktadır. Bu farmakofor grupların antioksidan (Zulfiqar ve ark., 2021; Yeşilkaynak ve ark., 2023; Iacopetta ve ark., 2020; Ning ve ark., 2013), antiinflamatuvar (Jan ve ark., 2020; Singh ve ark., 2022; Moneer ve ark., 2016; Ning ve ark., 2013), antimikobakteriyel (Döndaş ve ark., 2023; Döndaş ve ark., 2018; Döndaş ve ark., 2024), antifungal (Łukowska-Chojnacka ve ark., 2019; MahamadAlli Shaikh ve Debebe, 2020; Antypenko ve ark., 2019; Padmavathi ve ark., 2011), antibakteriyel (Bhat ve ark., 2022; Kaur ve ark., 2019;Naz ve ark., 2020; Padmavathi ve ark., 2011), antikanser (Tilekar ve ark., 2020; Song ve ark., 2021; Abbas ve ark., 2020; Lu ve ark., 2014) ve antidepresan (Wróbel ve ark., 2019; Pesarico ve ark., 2020; Perveen ve ark., 2012; Wesołowska ve ark., 2006) gibi aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Pirolidin, indol, tiyoüre ve divinilsülfon farmakofor gruplarının bazı farmakolojik özellikleri

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerini (ROS) yakalayarak veya peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek hücreyi oksidasyonun toksik etkilerine karşı korumaktadırlar. ROS tarafından indüklenen oksidasyon, hücre zarı parçalanması, zar proteinlerinin hasarı ve DNA mutasyonları ile sonuçlanabilmektedir (Dontha, 2016). Hücrede bir antioksidan savunma sistemi bulunmasına rağmen, lipidlere, proteinlere ve DNA'ya verilen hasarı içeren oksidatif yaralanmalar yaşam döngüsü boyunca meydana gelir ve oksidan-antioksidan dengesi oksidan lehine geliştiğinde birçok hastalık oluşabilmektedir (Maxwell, 1995). Oksidan-antioksidan dengesinde, SOD gibi spesifik enzimler ve serbest radikalleri yakalayan radikal temizleyiciler rol oynar (Vouldoukis ve ark., 2004). Süperoksit dismutazlar, süperoksit anyonlarının etkili bir şekilde dismutasyonunu katalize eden, 3 farklı izoformu (SOD1, SOD2, SOD3) bulunan bir enzim ailesidir.

Antioksidan, antiinflamatuvar etkinliğe sahip terapötiklerin birçok hastalığı tedavi edebilme potansiyellerinin olduğu bilindiği için bu etkilere sahip terapötiklere olan ilgi son zamanlarda artış göstermiştir (Tewari ve ark., 2024).

İnflamasyon; artrit, kanser gibi hastalıkların patogenezinde rol oynayan, bağışıklık sisteminin enfeksiyon veya yaralanmalar gibi zararlı uyaranlara karşı verdiği biyolojik bir yanıttır (Chen, 2010). Siklooksijenaz (COX), inflamasyonda rol oynayan enzimlerden biridir ve COX-1 ile COX-2 olmak üzere iki izoforma sahiptir. COX-1 izoformu fizyolojik olarak neredeyse tüm dokularda eksprese edilir ve koruyucu bir role sahiptir. COX-2 izoformu ise fizyolojik olarak uterus, beyin, böbrek gibi dokularda bulunmakla birlikte, inflamasyon ve kanser gibi patolojik durumlarda yüksek oranda eksprese edilir. COX-1'in inhibisyonu gastroduodenal hasara ve böbrek fonksiyon bozukluğuna yol açarken, COX-2 inhibisyonu antiinflamatuvar etkilere neden olur (Faki ve Er., 2021). İnflamasyonun neden olduğu hastalıkların tedavisinde birçok steroid ve nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların yaygın olarak kullanıldığı ve bu ilaçların önemli bir kısmının çeşitli yan etkilere sahip olduğu literatürde bilinmektedir (Kayaalp, 2012; Jaturapatporn ve ark., 2012).

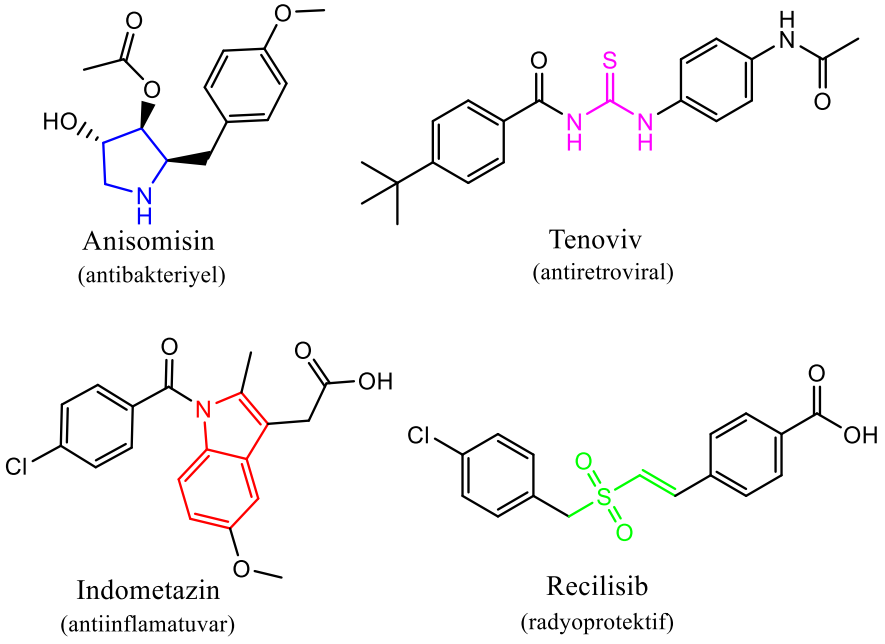
Kanser, normal büyüme ve farklılaşma mekanizmalarının hasar görmesi sonucunda kontrolü kaybetmesiyle değişime uğramış bir hücrenin sınırsız çoğalma ile karakterize olan bir hastalıktır (Brown ve ark., 2023). Dünyada en sık görülen kanser türlerinden biri olan kolon kanseri, kanserle ilişkili ölümlerin önde gelen sebeplerinden biridir. (Labianca ve ark., 2010). Kanserin yaygın tedavi yöntemleri arasında kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi işlemler yer almaktadır. Kemoterapi ve radyoterapinin kanser tedavisinde oldukça etkili yöntemler olmasına rağmen, bu yöntemlerin kullanımında ciddi yan etkiler ortaya çıkabilir. Kanser tedavisindeki diğer temel sorunlardan biri, kanser hücrelerinin tedaviye karşı giderek artan direncidir (Qi ve ark., 2010; Wang ve ark., 2012). Bu nedenle, kanseri tedavi etmek için araştırmalar devam etmektedir.

Yaygın, kronik ve tekrarlayan bir psikolojik sendrom olan depresyon, serotonin, noradrenalin ve dopamin gibi çeşitli nörotransmitterlerin işlevindeki bozukluklar bu hastalıkta rol oynar. Uykusuzluk, yorgunluk veya enerji kaybı, depresif ruh hali, ilginin azalması, değersizlik duygusu, düşünme veya konsantrasyon yeteneğinde azalma, tekrarlayan ölüm veya intihar düşünceleri gibi semptomların (Fried ve Nesse, 2015) ortadan kaldırılması amaçlanmasına rağmen, birçok hastada semptomların düzelmemesi veya düzelen semptomların uzun süreli olmaması, depresyon tedavisinde başarısızlık olarak karşımıza çıkabilir. Şu anda çeşitli antidepresan ilaçların kullanılmasına rağmen, klinik sınırlamalar ve yan etkiler göz önünde bulundurulduğunda, depresyon tedavisi için etkili ve güvenli ilaçların geliştirilmesi gerekmektedir (Trivedi ve ark., 2008; Yadav ve ark., 2024).

Bu tez projesinde; yapısında indol, tiyoüre, vinilsülfon farmakofor gruplarından birini veya birkaçını bulunduran yeni potansiyel biyoaktif pirolidin türevi hibrit bileşiklerin sentezlenerek bazı farmakolojik etkilerinin *in vivo, in vitro* ve *in silico* çalışmalarla araştırılması amaçlandı. Tez çalışmasının hipotezi, sentezlenen yeni potansiyel biyoaktif pirolidin türevi moleküllerin antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antikanser ve antidepresan gibi farmakolojik etkilere sahip olabilecekleri üzerine kuruldu. Elde edilen sonuçlar da sentezlenen moleküllerden bazılarının farmakolojik etkiler gösterdiği belirlendi.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Pirolidin türevi bileşiklerin bazıları antioksidan (Saurav ve ark., 2012; Rezai ve ark., 2018; Zulfiqar ve ark., 2021), antiinflamatuvar (Jan ve ark., 2020; Zulfiqar ve ark., 2021), antibakteriyel (Döndaş ve ark., 2023; de Cozar ve ark., 2019; Döndaş ve ark., 2018; Döndaş ve ark., 2006; Haddad ve ark., 2015; Bhat ve ark., 2022), antifungal (Döndaş ve ark., 2023; Döndaş ve ark., 2006; Haddad ve ark., 2015; Łukowska-Chojnacka ve ark., 2019), antimikobakteriyel (Döndaş ve ark., 2023; de Cozar ve ark., 2019; Döndaş ve ark., 2018; Haddad ve ark., 2015), antiviral (Moni ve ark., 2015), antikanser (Döndaş ve ark., 2018; Li ve ark., 2020; Zulfiqar ve ark., 2021; Bhat ve ark., 2023), antidiyabetik (Salve ve Jadhav, 2021) ve antidepresan (Wróbel ve ark., 2019) gibi aktivitelere sahipken, bazı türevleri ise çeşitli enzim inhibitör etkilerine sahiptir (Toumi ve ark., 2021; Tabti ve ark., 2023; Döndaş ve ark., 2023; Döndaş ve ark., 2024). Yapı iskeletinde pirolidin halkası bulunan ilaçlar arasında glikopironyum (antikolinerjik), anirasetam (antialzheimer), anisomisin (antibakteriyel) ve rolipram (antidepresan); indol halkası bulunan ilaçlar arasında indometazin (antiinflamatuvar); tiyoüre farmakofor grubunu bulunduran ilaçlar arasında tenoviv (antiretroviral); vinilsülfon farmakofor grubunu bulunduran ilaçlar arasında ise Recilisib (radyoprotektif) yer almaktadır (Şekil 2.1) (https://go.drugbank.com/categories/DBCAT000663 (Erişim tarihi: 03.06.2024)). Bununla birlikte, pirolidin halkası içeren terapötik moleküller daridorexant (insomnia), pacritinib (JAK-2 inhibitörü) ve futibatinib (FGFR-4 inhibitörü) gibi FDA tarafından onaylanan yapılarda mevcuttur (Benedetto ve ark., 2022).

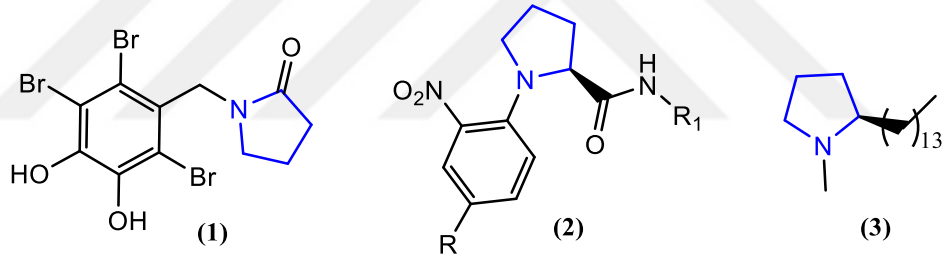


Şekil 2.1. Pirolidin, indol, tiyoüre veya vinilsülfon farmakofor gruplarını bulunduran ilaçlar

Rezai ve arkadaşları (2018) yaptıkları bir çalışmada, 1-(4, 5-dihidroksibenzil) pirolidin-2-on türevi biyolojik olarak aktif doğal bromofenol bileşikleri ve bunların farklı türevlerini sentezleyerek antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Sentezlenen bazı moleküllerin **(1)** (Şekil 2.2) radikal süpürme deneyleri çeşitli biyoanalitik antioksidan yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Bileşiklerin, trolox ve bütillenmiş hidroksianisol (BHA) gibi standart antioksidan bileşiklerle karşılaştırıldığında güçlü antioksidan aktiviteler gösterdiği rapor edilmiştir.

Odusami ve arkadaşları (2020) sentezledikleri bazı pirolidin-2-karboksiamid türevlerinin **(2)** (Şekil 2.2) antibakteriyel ve antioksidan özelliklere sahip olduğunu ve bazılarının özellikle *Staphylococcus aureus*'a karşı yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiklerini ve bu nedenle önemli antibakteriyel bileşikler olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Majik ve arkadaşları (2013) yaptıkları bir çalışmada, Arisarum vulgare bitkisinde bulunan antifungal ve antibakteriyel aktivite gösteren doğal bir pirolidin alkaloidi olan (R)-Bgugaine'ni **(3)** sentezleyerek (Şekil 2.2) akciğerlerde, böbreklerde, idrar yollarında biyofilm oluşturabilen Gram-negatif bakteri olan Pseudomonas aeruginosa bakterilerinde biyofilm oluşumu ve sürü hareketliliği üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak, pirolidin alkolidi olan Bgugaine'in biyofilm oluşumunu %83, sürü hareketliliğini %95 inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.



Şekil 2.2. Antioksidan (**1, 2**) ve antibakteriyel (**2,3**) aktiviteye sahip pirolidin türevi moleküller

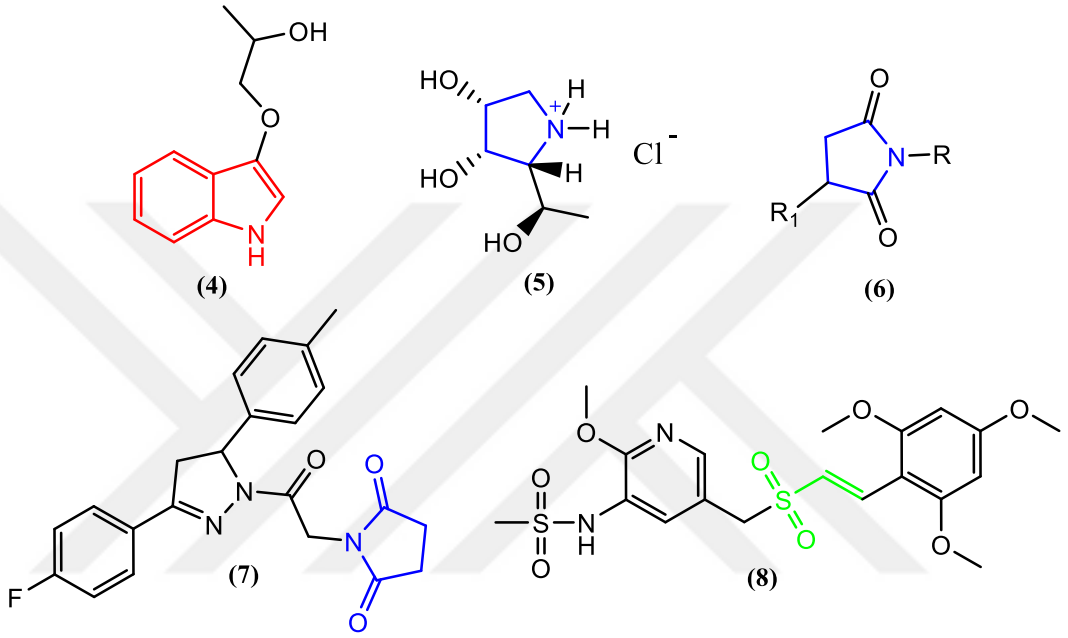
Al-Massarani ve arkadaşları (2016), Kızıldeniz Süngeri Haliclona sp. bitkisinin kimyasal içeriğini ve sitotoksik aktivitelerini araştırmışlardır. Kızıldeniz Süngeri Haliclona sp'nin etanolik ekstresinden indol alkaloidi olan 1-(1H-indol-3-yloxy) propan-2-ol **(4)**, pirolidin alkaloidi olan (2R, 3S, 4R, 5R) pirolidin-(1-hidroksietil)-3,4-diol hidroklorür **(5)** (Şekil 2.3) ve diğer çeşitli bileşikleri doğal bir kaynaktan saflaştırmayı başararak HepG-2, Daoy ve HeLa kanser hücre hatlarına karşı zayıf sitotoksik aktivite gösterdiklerini rapor etmişlerdir.

Zulfiqar ve arkadaşları (2021) sentezledikleri 4-(Pirolidin-2,5-dion-1-il)fenol türevi bileşiklerden bazılarının **(6)** (Şekil 2.3), standart COX-1 inhibitörü Ibuprofen ile karşılaştırıldığında daha yüksek antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğunu, aynı moleküllerin insan kolon kanseri hücre hattına (HT-29) karşı önemli bir inhibisyon gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Tilekar ve arkadaşları (2020) tasarlayıp elde ettikleri pirazolin-sübstitüe pirolidin-2,5-dion hibrit bileşiklerinden bazılarının **(7)** (Şekil 2.3) antikanser etkinliklerini *in vitro, in vivo* ve *in silico* olarak değerlendirmişlerdir. Sentezlenen bazı moleküllerin HT-29 ve insan meme kanseri (MCF-7)

hücre hatlarında hücre canlılığını azaltarak potansiyel antikanser bir ajan olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Lu ve arkadaşları (2014) (E)-3-((Stirilsulfonil)metil)piridin ve (E)-2-((Stirilsulfonil)methil)piridin **(8)** (Şekil 2.3) gibi yeni bileşiklerin sentezini yaparak, yapı-aktivite ilişkilerini ve meme kanseri, kolon kanseri ve ovaryum kanseri üzerinde antikanser potansiyellerini araştırmışlardır. Sentezlenen yeni kimyasal yapılarından bazılarının antikanser aktivitesi olduğunu rapor etmişlerdir.



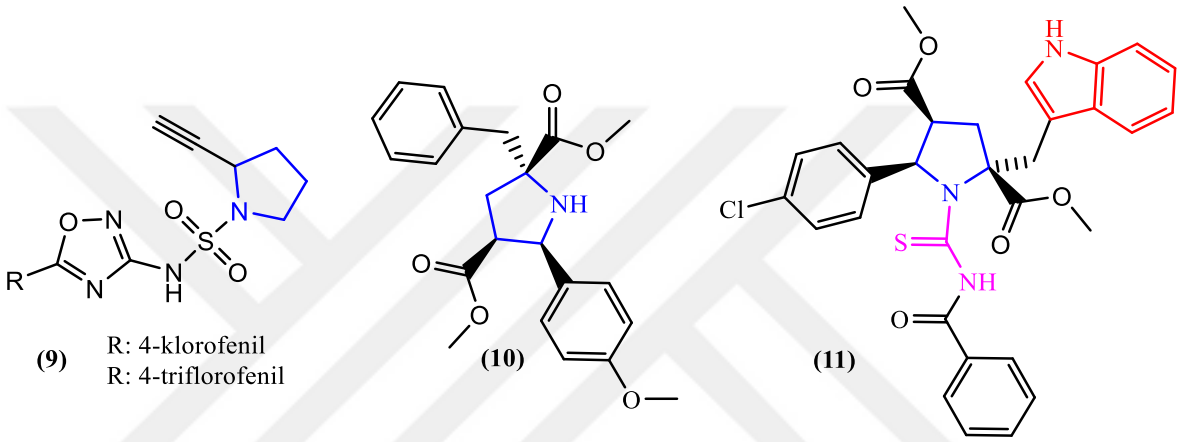
Şekil 2.3. Antikanser aktiviteye sahip indol (**4**), pirolidin (**5, 6, 7**) ve vinilsülfon (**8**) türevi moleküller

Girgis ve arkadaşları (2015a) spiro-alkaloidlerin antikanser aktivitesini araştıran moleküler modelleme çalışması yapmışlardır. Bu araştırma sonucunda, hem pirolidin hem de indol halkası içeren bazı dispiro[2*H*-indene-2,3′-pirolidin-2′,3″-[3*H*]indol]-1,2″(1″*H*, 3*H*)-dion'ların farklı kanser hücre hatlarında standart ilaç olan doksorubisine yakın veya daha güçlü antitümör aktivite sergilediğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte Girgis ve arkadaşları, yaptıkları başka bir çalışmalarında bir dizi dispiro [3H-indol-3,2′- pirolidin-3′,3″-piperidin] sentezleyerek, antikanser aktiviteleri açısından araştırmışlardır. Sentezledikleri bileşiklerden bazılarının HeLa (servikal), HepG2 (karaciğer), MCF-7 (meme) ve HCT116 (kolon) gibi insan tümör hücre hatlarına karşı antitümör aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Salve ve Jadhav (2021) sentezledikleri yeni pirolidin sülfonamid türevli bileşiklerin **(9)** (Şekil 2.4) DPP-IV inhibitörü olarak *in vitro* deneysel çalışmalarında diyabet üzerine etkilerini, yapısında pirolidin bulunan referans ilaç vildagliptin ile karşılaştırarak incelemişlerdir. Sonuç olarak, sentezlenen pirolidin sülfonamid türevli bileşiklerin kayda değer antidiyabetik aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Döndaş ve arkadaşları (2024) yeni pirolidin-benzensülfonamid türevleri sentezleyerek **(10)** (Şekil 2.4) antimikrobiyal, CA ve AChE enzim inhibisyonlarını araştırmışlardır. Sentezlenen bazı bileşiklerin referans ilaca yakın antimikobakteriyel aktivite, bazı bileşiklerin referans ilaçlara kıyasla daha az antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdiklerini, ayrıca bazı bileşiklerin de güçlü enzim inhibitör aktivite potansiyeline sahip olduklarını rapor etmişlerdir.

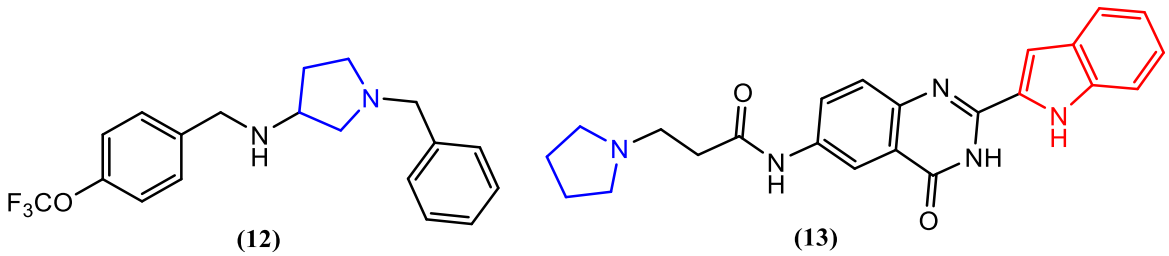
Döndaş ve arkadaşları (2017) 2-(pirolidin-1-il)tiazol türevlerini **(11)** (Şekil 2.4) kolay ve yüksek verimle sentezleyerek antibakteriyel ve antimikobakteriyel aktivitelerini araştırmışlardır. Referans olarak kullanılan izoniazid ile kıyaslandığında sentezlenen bazı bileşiklerin antimikobakteriyel aktivitelerinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.



Şekil 2.4. Antidiyabetik (**9**) ve antimikrobiyal (**10, 11**) aktiviteye sahip pirolidin türevi moleküller

Choubey ve arkadaşları (2020) Alzheimer hastalığının tedavisi için N-benzilpirolidin türevlerini **(12)** (Şekil 2.5) sentezleyerek AChE, BChE ve BACE-1 enzimleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak, bazı N-benzilpirolidin türevlerinin Alzheimer hastalığının tedavisinde potansiyel olarak yararlı olabileceğini, bu türevlerin nöroprotektif özellikleri ve anti-amiloid birikim aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalarda nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımlar sunabileceğini belirtmişlerdir.

Li ve arkadaşları (2012) 2-(2-indolil-)-4(3H)-kinazolin türevli **(13)** (Şekil 2.5) bileşikler sentezleyerek, *in vitro* ve *in silico* çalışmalarla elde ettikleri bileşiklerin önemli AChE inhibitör aktivite gösterdiklerini rapor etmişlerdir.



Şekil 2.5. Potansiyel AChE inhibitörü olan (**12, 13**) pirolidin türevi moleküller

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

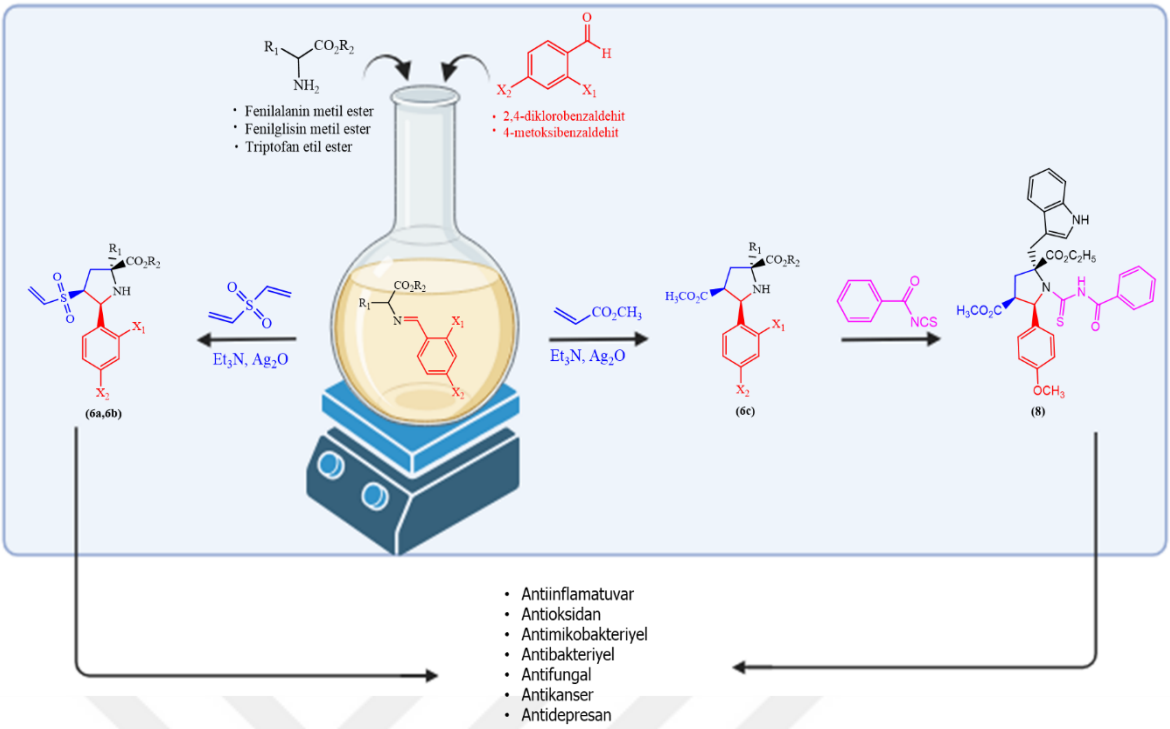
Tez çalışmasında, soğutucu sistemler (+4°C, -20°C, -80°C), hassas terazi (AXIS, 10-220mg), UV lambası (CAMAG, 24V, 12W), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (HEIDOLPH), rotary evaporatör (HEIDOLPH), vakum pompası (N816 LABOPORT), kütle spektrometresi (MS)(AGİLENT 6460), erime noktası tayini (STUART SMP30), FT-IR (PERKİNELMER ATR, Jasco FTIR 4700 IRT 5200), nükleer manyetik rezonans (NMR) (Bruker Ultrashield Plus Biospin GmbH, AVANCE III 400 MHz NaNoBay FT-NMR), UV-Visible spektrofotometre (Shimadzu UV-1800), ELISA washer (Rayto, RT-3100 Microplate Washer) ve ELISA reader (Rayto, RT-2100C Microplate Reader) cihazları kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Malzemeler

Bu çalışmada, (R)-(-)-2-fenilglisin metil ester hidroklorür (Aldrich, Kat No: 307882), trietilamin (Sigma-Aldrich, Kat. No: 471283), divinilsülfon (Merck, Kat. No: 821215), metilakrilat (Sigma, Kat. No: 8.00841), gümüş oksit (Merck, Kat. No. 119208), L-fenilalanin metil ester hidroklorür (Aldrich, Kat No: P17202), (R)-(-)-2-Fenilglisinmetil ester hidroklorür (Aldrich, Kat No: 307882), L-triptofan etil ester hidroklorür (Aldrich, Kat. No: 93690), 2,4-diklorobenzaldehit (Merck, Kat. No: 8.20433), 4-metoksibenzaldehit (Merck, Kat. No: 8.22314), benzoilizotiyosiyanat (Aldrich, Kat. No: 261653), dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck, Kat. No: M116743.1000), etanol (Merck, Kat. No: 1.00983), etil asetat (EtAc) (Merck, Kat. No:1.09623), dietil eter (Merck, Kat. No: 1.00921), n-hekzan (Merck, Kat. No: 208752), toluen (Merck, Kat. No: 1.08323), diklorometan (DCM) (Merck, Kat. No: 1.06051), aseton (Tekkim, Kat. No. 010050), amonyum klorür (Sigma-Aldrich, Kat. No: 11209), magnezyum sülfat (Merck, Kat. No: 1,06067), silika jel 60 (Merck, Kat. No: 107734), DPPH (Sigma-Aldrich, Kat. No: 1898-66-4), 50 mL falkon tüp (Kırgen), 1.5 mL ependorf tüp (Microcult), 0.1-10 µL pipet ucu, 10-100 µL pipet ucu, 100-1000 µL pipet ucu, 10-20 mL şırınga, RIPA tamponu (Elabscience), proteaz inhibitör kokteyl (Abbkine), fenilmetansulfonil florid (PMSF), sodyum ortovanadat, fare SOD ELISA kiti (BT Lab, Kat. No. E2608Mo), fare COX-2 ELISA kiti (BT Lab, Kat. No. E0605Mo) kullanıldı.

3.2. Metod

Bu tez çalışması kapsamında tasarlanan moleküllerin sentezi ile ilgili yöntemlerin genel gösterimi Şekil 3.1‘de belirtilerek sentezde kullanılan reaksiyonlar aşağıda detaylandırılmıştır.

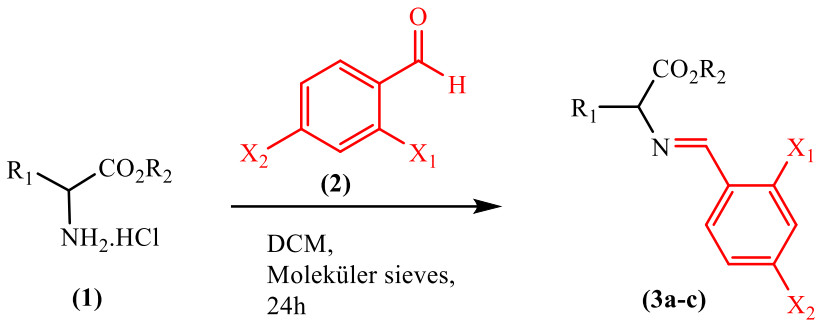


Şekil 3.1. Tez çalışması kapsamında yer alan çalışmanın genel gösterimi

3.2.1. Pirolidin Türevi Bileşiklerin Sentezi

İmin Bileşiklerinin Sentezi

Yeni sentezlenecek siklik pirolidin türevi bileşikler için gerekli iminlerin **(3a,b,c)** sentezi için, ayırma hunisine ilgili aminoasit (12,55 mmol, 2,53 gr) katıldı ve üzerine 75 mL diklorometan (DCM) ve 75 mL amonyak (NH_3) eklendi. DCM ile ekstrakte edildikten sonra birleştirilen organik fazlar magnezyum sülfat ($MgSO_4$) kullanılarak kurutuldu. Çözücü rotary evaporatörde uçurulduktan sonra serbest aminoasitin üzerine susuz DCM eklenerek çözüldü. Daha sonra çözeltiye 3 saat boyunca 300^oC'de aktifleştirilen moleküler sieveler koyuldu. Ardından aldehit (1 eq) bir miktar DCM ile çözüldükten sonra cam pipet kullanılarak reaksiyon kabına damla damla ilave edildi. Reaksiyon oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırıldıktan sonra süzülerek moleküler sievelerden arındırıldı. Çözücü rotary evaporatör yardımıyla uçurulduktan Şekil 3.2'de belirtilen iminler bir sonraki reaksiyonda kullanıldı.



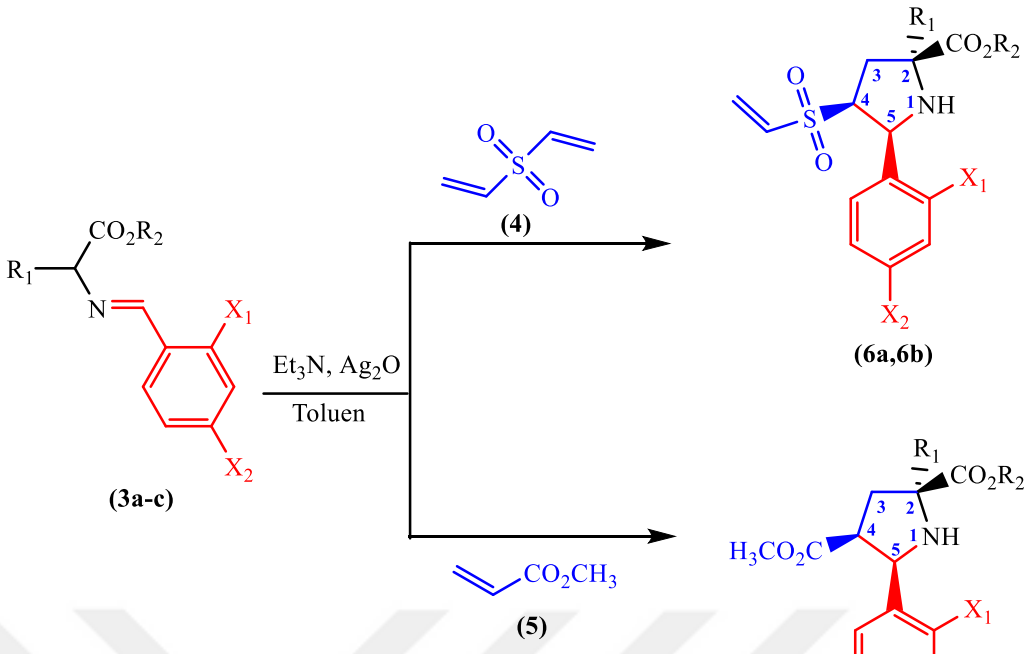
3a:	R_1: Ph	R_2: -CH_3	X_1: Cl	X_2: Cl
3b:	R_1: $PhCH_2$	R_2: -CH_3	X_1: Cl	X_2: Cl
3c:	R_1: indol	R_2: -C_2H_5	X_1: H	X_2: OCH_3

Şekil 3.2. İminlerin sentez şeması

Pirolidin Türevi Hibrit Bileşiklerin Sentezi

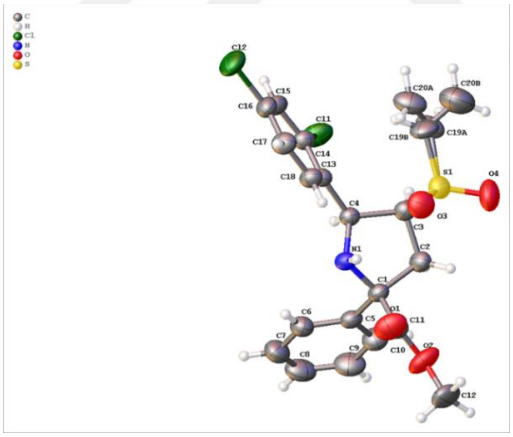
Yeni siklik pirolidin türevi hirit bileşiklerin sentezi için, toluen içinde çözünen imin (9,56 mmol, 3,08 gr) üzerine baz olarak trietilamin (Et_3N) (16,25 mmol, 1,64 gr) ve katalist olarak gümüş oksit (Ag_2O) (2,39 mmol, 0,55 gr) eklendikten sonra, toluende çözünen ilgili dipolarofil çözeltisi damla damla ilave edildi. Reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında 18 saat boyunca karıştırıldı ve reaksiyonun tamamlandığı ince tabaka kromatografisi (İTK) ile kontrol edildikten sonra çözücü vakum altında buharlaştırıldı. Reaksiyon karışımı DCM de çözülerek doygun NaCl ve NH_4Cl çözeltileri ile ekstraksiyon yapıldıktan sonra birleştirilen organik fazlar $MgSO_4$ ile kurutuldu (Döndaş ve ark., 2017, Döndaş ve ark., 2011). Elde edilen ürünler (Şekil 3.3) kolon kromatografisiyle (Etil Asetat (EtOAc)-Hegzan, 1:4) saflaştırıldı ve uygun çözücülerde kristallendirildi.

Saflaştırılan yeni moleküllerin yapıları ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, FT-IR, DEPT, ^{2}D-COSY ve MS/HRMS gibi tekniklerle aydınlatıldı. Bunlardan **6a** nolu molekülün stereokimyası X-Ray ile doğrulandı (Şekil 3.4).



6a: R_1: Ph R_2: $-CH_3$ X_1: Cl X_2: Cl
6b: R_1: $PhCH_2$ R_2: $-CH_3$ X_1: Cl X_2: Cl
6c: R_1: indol R_2: $-C_2H_5$ X_1: H X_2: OCH_3

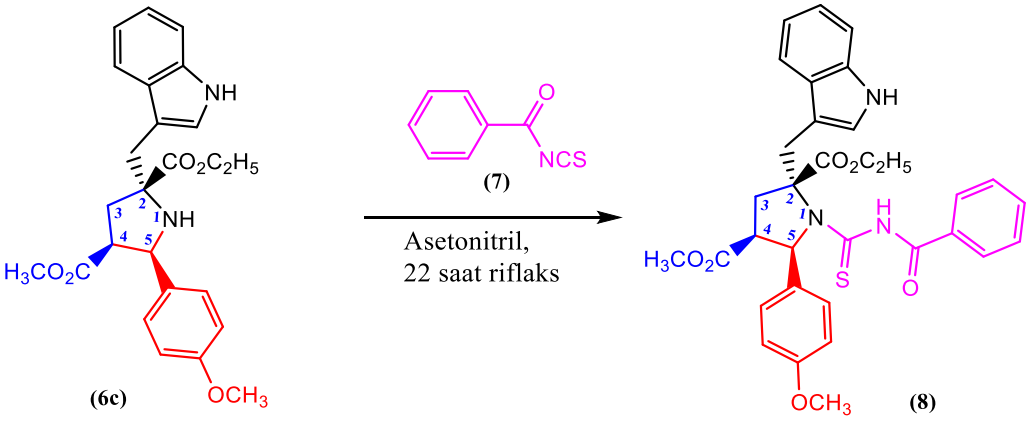
Şekil 3.3. Siklik pirolidinlerin sentez şeması



Şekil 3.4. **6a** Bileşiğinin tek kristal X-ışını kırınımı yapısı

Aminokarbotiyol-Pirolidin Bileşiğinin Sentezi

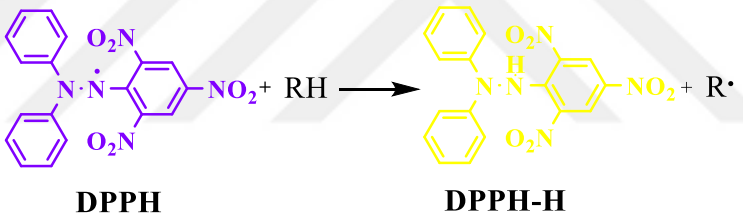
Sentezlenen bileşiklerden **6c** nolu pirolidin molekülünden çıkılarak aminokarbotiyol pirolidin türevi bileşiğin (**8**) sentezi için, asetonitril içinde bulunan benzoilizotiosiyanat çözeltisi, asetonitril içinde çözünen pirolidin **(6c)** çözeltisine damla damla ilave edilerek geri soğutucu altında 22 saat boyunca riflaks edildi (Döndaş ve ark., 2017, Döndaş ve ark., 2011). İTK ile reaksiyonun tamamlandığı belirlendikten sonra çözücü rotary evaporatörde uzaklaştırılıp kolon kromatografisiyle saflaştırılarak **8** nolu molekül elde edildi (Şekil 3.5). Bileşiğin yapısı ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, FT-IR ve MS/HRMS gibi tekniklerle aydınlatıldı.



Şekil 3.5. Aminokarbotiyol-Pirolidin sentez şeması

3.2.2. Total Antioksidan Kapasite (DPPH) Yöntemi

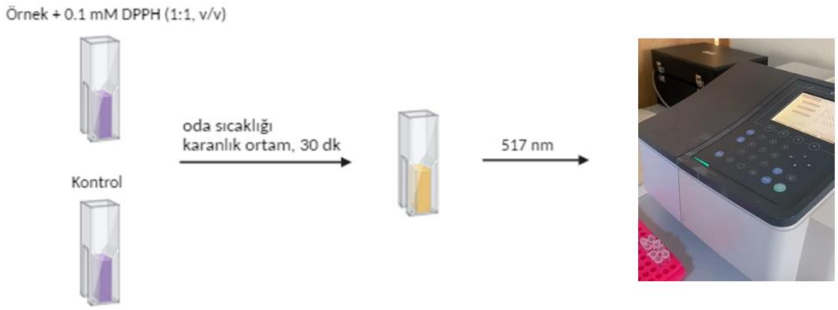
Serbest radikal temizleme yöntemi olarak da bilinen DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi kimyasal bileşiklerin, bitkisel ekstrelerin veya biyolojik kaynakların total antioksidan kapasitesini ölçmektedir. Mor renkli DPPH'de bulunan azot atomunun tek elektronu, hidrojen atomları verebilen antioksidanlar varlığında sarı renkli difenilpikrilhidrazine indirgenmektedir (Şekil 3.6) (Kedare ve Singh, 2011).



Şekil 3.6. DPPH reaksiyonu

Bu tez çalışması kapsamında, pirolidin türevi bileşiklerin **(6a, 6b, 8)** antioksidan kapasiteleri Sarıkürkçü ve ark. (2015) tarafından önerilen DPPH yöntemi ile 3 farklı konsantrasyonda (50, 100 ve 200 µg/ml) ve 3 tekrarlı (n=3) çalışıldı (Sarikurkcu ve ark., 2015) (Şekil 3.7). İçerisinde 200 µl sentezlenen yeni bileşiklerin bulunduğu ependorf tüplere 0,1 mM DPPH çözeltisi eşit hacimde (1:1, v/v) eklendi. Aynı zamanda farklı ependorflarda da kör örnekleri hazırlandı. Örnekler iyice karıştırılıp ağızları sıkıca kapatıldıktan sonra oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 30 dakika bekletildi. Daha sonra hazırlanan çözeltilerin absorbans değerleri 517 nm'de okutuldu. Total antioksidan kapasite aşağıdaki denklemden yararlanılarak hesaplandı:

Antioksidan Aktivite (%) = [(OD kontrol – OD örnek) / OD kontrol] x 100

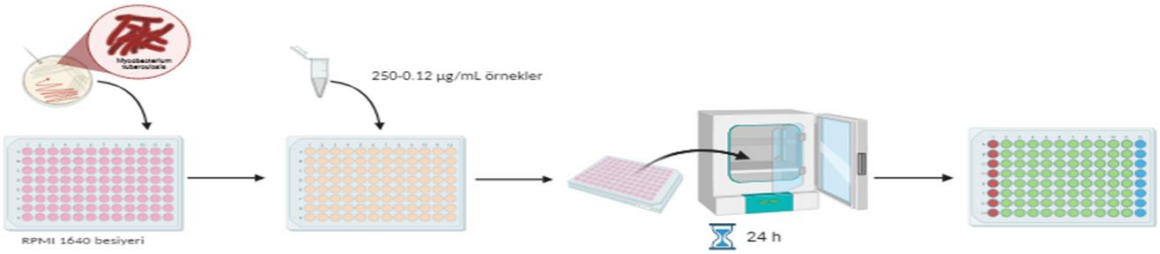


Şekil 3.7. DPPH testi aşamaları

3.2.3. Antimikobakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi

İlgili bileşiklerin antimikobakteriyel aktiviteleri, standart *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv suşuna karşı *in vitro* antimikobakteriyel etkileri ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri, resazurin mikrotitre yöntemi (REMA) kullanılarak belirlendi (Palomino ve ark., 2002; GL, 2011) (Şekil 3.8). *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv suşu, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'na ait Ulusal Tüberküloz Referans Laboratuvarı'ndan temin edildi. İzoniyazid (INH) (Sigma I3377) ve Rifampisin (RIF) (Sigma R3501) ise referans antiTB ajanları olarak kullanıldı.

İncelenen bileşiklerin antimikobakteriyel aktivitelerini değerlendirmek üzere, DMSO içinde çözünen stok çözeltiler 1000 µg/mL başlangıç konsantrasyonunda hazırlandı. Ardından, bileşiklerin 7H9-S ortamındaki seri iki katlı seyreltileri ve referans antiTB ajanları için 100 µl'lik plakalar oluşturuldu. Standart suş ilavesiyle birlikte, test edilen bileşiklerin konsantrasyon aralığı 250-0.12 µg/mL olarak ayarlandı. Her plağa, antibiyotik içermeyen bir büyüme kontrolü ve inokulumsuz sterilite kontrolü içerdi. DMSO'nun etkisi, her plağa eklenen kontroller aracılığıyla kontrol edildi.



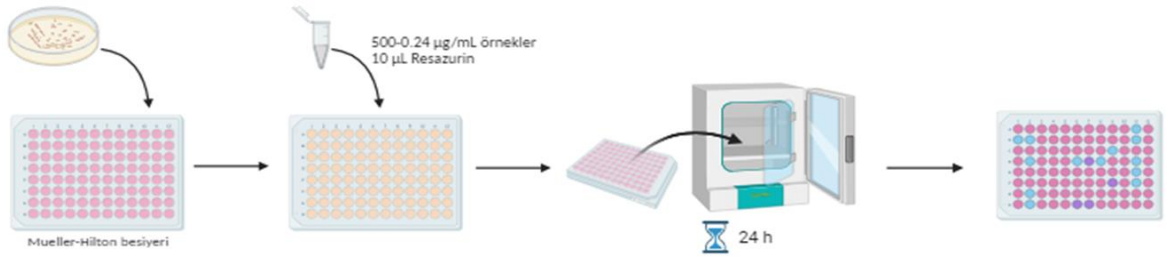
Şekil 3.8. Resazurin mikrotitre yöntemi aşamaları

3.2.4. Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi

Antibakteriyel aktivite çalışmaları resazurin mikroplak yöntemi (resazurin microtitre assay-REMA) kullanılarak (Şekil 3.9), *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitif) (ATCC 25925), *Escherichia coli* (Gram-negatif) (ATCC 25923), *Acinetobacter baumannii* (Gram-negatif) (ATCC 02026), *Bacillus subtilis* (Gram-pozitif) (ATCC 6633), *Aeromonas hydrophila* (Gram-negatif) (ATCC 95080) standart suşlarına karşı yapıldı (Gahlaut ve Chhillar, 2013). Ankara'daki Refik Saydam

Ulusal Tip Kültür Koleksiyonu Laboratuvarı'ndan temin edilen ve Farmasötik Mikrobiyoloji AD laboratuvarında -20°C'de derin dondurucuda saklanan standart bakteri suşları kullanıldı.

Bileşikler, DMSO'da çözülerek 1000 µg/mL başlangıç konsantrasyonunda stok çözeltileri hazırlandı ve membran filtreler (0,22 µm) kullanılarak bileşiklerin sterilizasyonu sağlandı. Mikroplak kuyularına Mueller-Hinton broth (Sigma 70192) besiyerinden 100 µl eklendi. İncelenen bileşiklerden hazırlanan stok çözeltilerden de mikroplağın ilk kuyularına 100 µl eklenerek, test edilecek maddelerin konsantrasyonları 500-0,24 µg/mL arasında seri dilüsyon yapıldı. Plaklara, inokulumsuz bir sterilite kontrolü ve standart ilaç içermeyen bir üreme kontrolü eklendi. Bakteri süspansiyonu, 1/20 oranında distile su ile seyreltilerek ve standart bakteri suşları kullanılarak 0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlandı. Hazırlanan süspansiyondan 10 µl kuyulara eklendi. Resazurin (Sigma R7017) çözeltisi, (%0,01 (w/v) oranında distile suyla hazırlanan) membran filtreler (0,22 µm) kullanılarak sterilize edildi. Steril resazurin çözeltisi kuyulara 10 µl eklenerek kapakları kapatılan plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Plaklardaki renk değişimi 24 saat sonunda değerlendirildi. Resazurinin maviden pembe veya renksiz hale dönmesi pozitif yani bakteriyel üreme olarak kabul edildi. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değeri resazurinin maviden pembeye veya renksiz hale dönmesini engelleyen en düşük konsantrasyon olarak belirlendi. Antibakteriyel aktivite tayin işlemleri iki kez tekrarlandı.

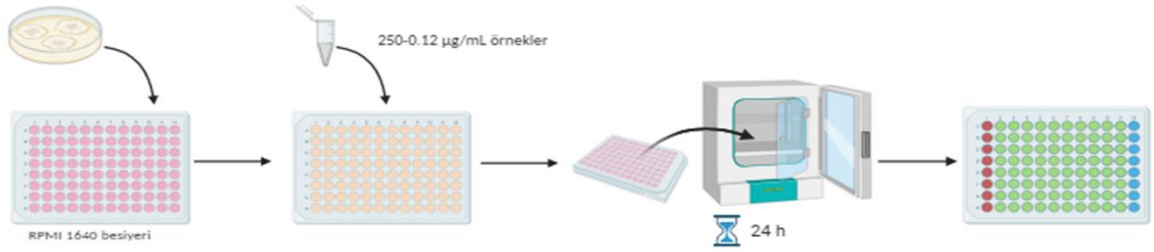


Şekil 3.9. Resazurin mikroplak yöntemi aşamaları

3.2.5. Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi

İlgili bileşiklerin antifungal aktiviteleri, *Candida albicans* (ATCC 14053), *Candida tropicalis* (ATCC 1369) ve *Candida glabrata* (ATCC 15126) standart suşlarına karşı sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle NCCLS M27-A2 (NCCLS, 2002) standart protokolü kullanılarak değerlendirildi (Şekil 3.10) (Sönmez ve ark., 2010; Güzeldemirci ve Küçükbasmacı, 2010). Referans antifungal ilaç olarak Flukonazol (Sigma, F8929) kullanıldı. Çalışmada kullanılan standart maya suşları, Ankara'da bulunan Refik Saydam Ulusal Tip Kültür Koleksiyonu Laboratuvarı'ndan temin edildi ve Farmasötik Mikrobiyoloji AD. laboratuvarında -20°C derin dondurucuda saklandı. Besiyeri olarak pH'ı 7,0 olan RPMI 1640 ve 0.165 M 3-(N-morfolino)-propansülfonik asit kullanıldı. Standart suşların çalışma süspansiyonları, RPMI 1640 besiyerinde önce 1:100 daha sonra 1:20 oranında seyreltilerek kullanıldı.

Bileşikler, DMSO içinde çözüldü ve 1000 µg/mL başlangıç konsantrasyonuna ulaşmak için stok çözeltiler hazırlandı. Bileşiklerin sterilizasyonu için 0,22 µm membran filtreler kullanıldı. 96 kuyulu mikroplaklarda, hazırlanan stok çözeltilerinin ve standart ilacın RPMI 1640 besiyeri kullanılarak iki kat seri dilüsyonu yapıldı ve son konsantrasyon değerleri 250-0,12 µg/mL aralığında elde edildi. Plaklara inokulumsuz bir sterilite kontrolü ve standart ilaç içermeyen üreme kontrolü eklendi. Her kuyuya inokulum süspansiyonundan 100 µl eklenerek plaklar, normal atmosferde 35°C'de 48 saat boyunca inkübe edildi ve sonuçlar görsel olarak değerlendirildi. MİK değeri, sentezlenen yeni bileşiklerin üremeyi inhibe ettiği en düşük konsantrasyon değeri olarak belirlendi. Bütün antifungal aktivite tayin işlemleri iki kez tekrarlandı.



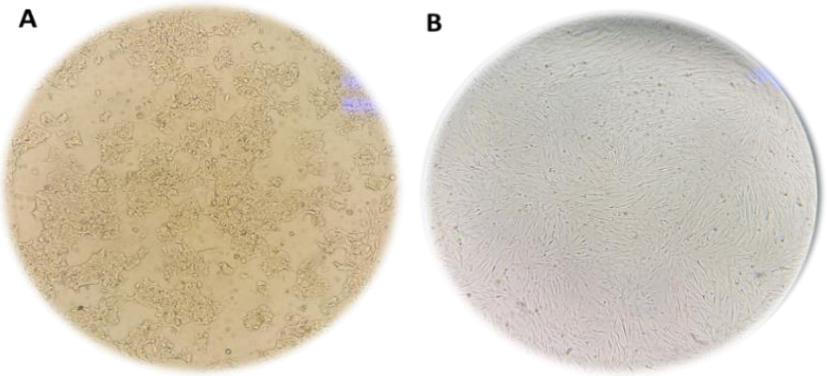
Şekil 3.10. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi aşamaları

3.2.6. Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite (MTT) Testi

MTT (3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testinde, hücrelerin mitokondrilerinde yer alan mitokondriyal dehidrogenaz enzimi, MTT'yi mavi formazan kristallerine indirger ve bu süreç mitokondrinin normal işleyişini ve hücre canlılığını belirler (Mosmann, 1983).

Hücre hatları ve kültür koşulları

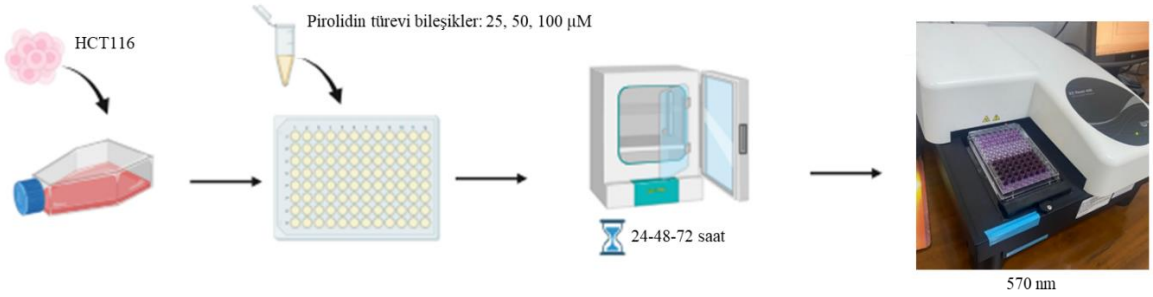
HCT116 (insan kolon kanseri hücresi) ve diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücre hatları (Şekil 3.11), Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ tarafından temin edildi. HCT116 hücreleri, %10 FBS (ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu) ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyerinde, diş pulpası mezenkimal kök hücreleri ise %15 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren MEM (Minimum Essential Medium) besiyerinde kültüre edildi. Hücreler, %5 CO_2'lik bir atmosferde 37 °C'de inkübe edildi.



Şekil 3.11. HCT116 (A) ve diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücre (B) hatlarının ışık mikroskobunda görüntüsü (10X)

MTT Testi

Hücreler üstel olarak büyüyüp yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştığında, PBS ile yıkanarak %0,25 tripsin eklenip hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Tripsinin hücre yapılarına zarar vermemesi için, tripsinin 4 katı kadar besiyeri eklendi. Hücre karışımı 15 mL falkona alınıp 2200 rpm'de 4 dakika santrifüj edilerek, süpernatant kısmı atıldı ve pelletin üzerine yeni besiyeri eklendi. Ardından thoma lamında hücre sayımı yapılarak, 10^4 hücre/kuyucukta 96 kuyulu mikroplakalara ekildi. Hücrelerin yüzeye tutunması için 24 saat inkübe edildi. Sentezlenen 3 adet yeni pirolidin türevi bileşik için hazırlanan 25, 50, 100 µM olmak üzere 3 farklı konsantrasyon kuyucuklara eklendi. Ayrıca pozitif kontrol olarak CaOCl ve pirolidin türevi bileşiklerin solvent kontrolü olarak %1 DMSO eklendi. 3 farklı mikroplaka hazırlanarak ayrı ayrı mikroplakalar 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi (Şekil 3.12). Ardından her kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu eklendikten 4 saat sonra mavi kristallerin oluşumuyla kuyucuklar boşaltıldı ve 100 µl DMSO eklendi. Mikroplakalar 20-25 dakika inkübatörde bekletildi ve mikroplaka okuyucu kullanılarak 570 nm'de okutuldu (Banoon ve Ghasemian, 2021; Celik ve ark., 2020).



Şekil 3.12. MTT testi aşamaları

3.2.7. Farelerde *in vivo* Deneysel Çalışmalar

Hayvanlar ve Deney Grupları

Deneyler 10-12 haftalık, yaklaşık 30 gram ağırlığında olan erkek Swiss albino cinsi fareler üzerinde gerçekleştirildi. Sağlıklı fareler Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama

ve Araştırma Merkezi (SABİDAM)'nden temin edildi. Tüm fareler paslanmaz çelik kafeslerde barındırılarak deney boyunca 22 ± 3°C, % 55 ± 5 bağıl nem, 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde, suya ve yeme erişimleri serbest olacak şekilde (*ad libitum*) kontrollü laboratuvar koşullarında tutuldu.

Bu tez çalışmasında farelere uygulanan yöntem ve teknikler, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından belirlenen yönergelere uygun olarak gerçekleştirilmiş olup, Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (27.03.2023).

Fareler 12 gruba ayrılmıştır ve her bir gruptaki fare sayısı 5-7 arasındadır (n=5-7). Farelere pirolidin türevi bileşikler ve kontrol grupları 10 gün boyunca *oral (gavaj)* yolla verildi. Her gün farelerin ağırlıkları kayıt altına alındı. Deneysel gruplar şu şekildedir:

1. **Grup:** Genel Kontrol Grubu
2. **Grup:** Ksilen için Solvent Kontrol Grubu (Solvent: mısır yağı)
3. **Grup:** Ksilen (0,5 mg/kg**)** Grubu (Solvent: mısır yağı)
4. **Grup:** Ksilen+Sentetik Bileşikler (**6a, 6b, 8**) için Solvent Kontrol Grubu (Solvent:%4 DMSO)
5. **Grup:** Ksilen+Düşük Doz Sentetik Bileşik **6a** (50 µM) Grubu (Solvent: %4 DMSO)
6. **Grup:** Ksilen+Yüksek Doz Sentetik Bileşik **6a** (150 µM) Grubu (Solvent: %4 DMSO)
7. **Grup:** Ksilen+Düşük Doz Sentetik Bileşik **6b** (50 µM) Grubu (Solvent: %4 DMSO)
8. **Grup: :** Ksilen+Yüksek Doz Sentetik Bileşik **6b** (150 µM) Grubu (Solvent: %4 DMSO)
9. **Grup:** Ksilen+Düşük Doz Sentetik Bileşik **8** (50 µM) Grubu (Solvent: %4 DMSO)
10. **Grup:** Ksilen+Yüksek Doz Sentetik Bileşik **8** (150 µM) Grubu (Solvent: %4 DMSO)

Farelerde Ksilen ile İnflamasyon İndüksiyonu

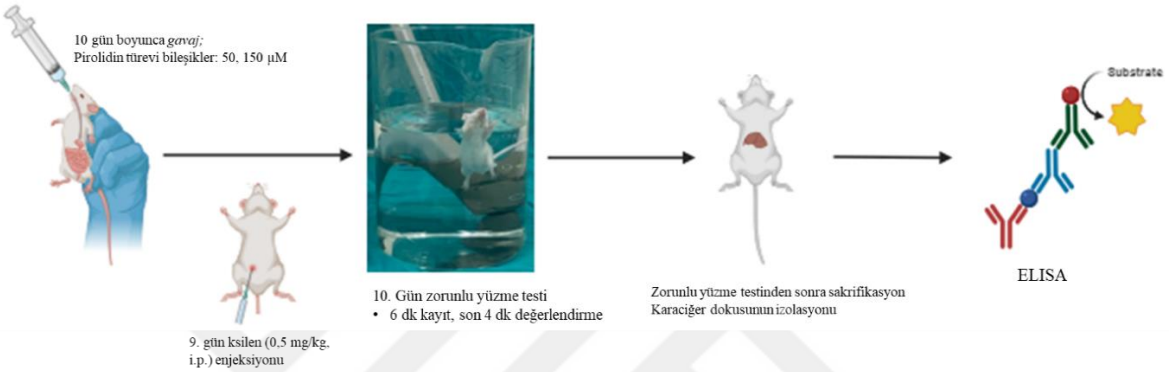
Pirolidin türevi bileşikler ve kontrol grupları 9. Günde farelere uygulandıktan 1 saat sonra mısır yağında çözülen ksilen (0,5 mg/kg) *intraperitonel* (*i.p.*) olarak farelere enjekte edildi (Morcos ve ark., 2015). 24 saat sonra bir davranış deneyi olan zorunlu yüzme testi gerçekleştirildi (Şekil 3.13).

İlgili Ajanların Antidepresan Etkilerinin Araştırılması: Zorunlu Yüzme Testi

Zorunlu yüzme testi (Forced Swimming Test; ZYT), test edilecek ajanın antidepresan etkisinin araştırılmasında kullanılan *in vivo* bir yöntemdir. Bu test, farelerin sudaki davranışlarını analiz etmeye dayanır. Depresyon durumundaki farelerin sudaki davranışlarında karakteristik farklılıklar vardır. Zorunlu yüzme testinde bu kriterler dikkate alınır. Bu test için, 30 cm yükseklikte, 20 cm çapa sahip şeffaf cam beher kullanıldı. İçerisine katılan su seviyesi alttan 15 cm olacak şekilde ilave edildi. Ayrıca su sıcaklığı 22 ± 3°C olarak ayarlandı. Tankların boyutları, yüzme testi sırasında farelerin tankın dibine ayaklarıyla veya kuyruklarıyla dokunamayacakları şekilde seçildi. Tankın

yüksekliğinin, farelerin tanktan kaçmasını önleyecek kadar yüksek olmasına dikkat edildi. 10 günde son doz verildikten 1 saat sonra fareler su dolu silindire konulup 6 dakika boyunca farelerin davranışları kayıt edildi. Bu kayıtların ilk dakikalarında fareler hareketli olduklarından ilk 2 dakika dikkate alınmayıp, son 4 dakikası dikkate alınmıştır. 6. dakikanın sonunda fareler sudan çıkarılarak kurutuldu (Şekil 3.13) (Can ve ark., 2012; Yankelevitch-Yahav ve ark., 2015).

Zorunlu yüzme testinden sonra tüm farelerden anestezi altında (%10 Sevofluran) kardiyak ponksiyon yöntemi ile kan alınarak servikal dislokasyonla ötenazi edildikten sonra abdominal insizyon yapılıp böbrek ve karaciğer dokuları izole edildi.

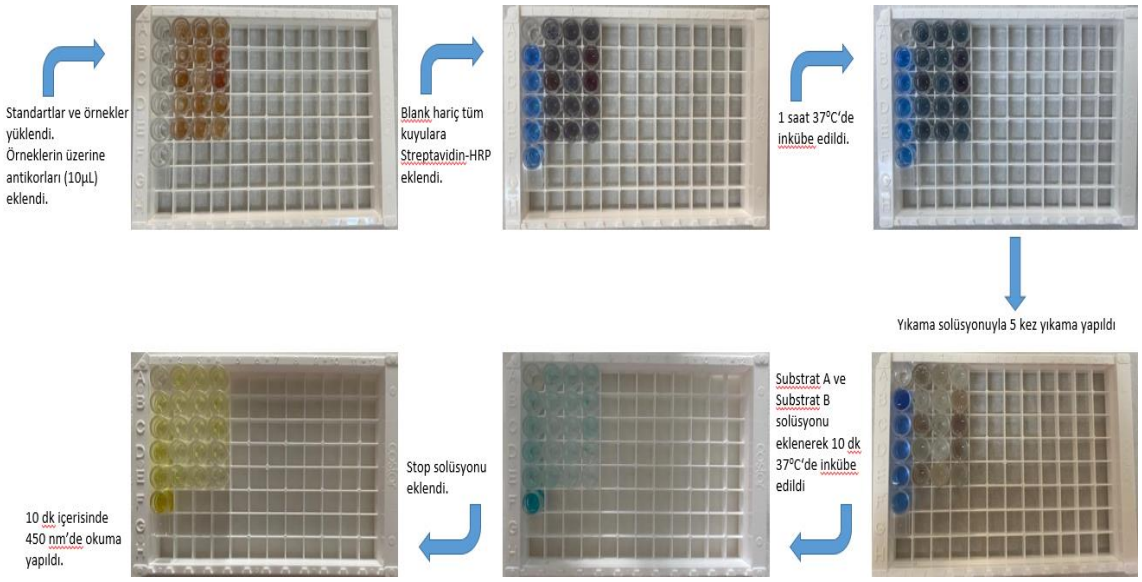


Şekil 3.13. Farelerde deneysel çalışmaların şematik gösterimi

3.2.8. Farelerde *in vitro* Deneysel Çalışmalar

İlgili Ajanların Antioksidan ve Antiinflamatuvar Etkilerinin İn Vitro Deneylerle Araştırılması: ELISA Testi

Tüm farelerden izole edilen böbrek ve karaciğer dokuları homojenize edilmiştir. Bu homojenizasyon işlemi tamamen buzlu ortamda yapıldı. Homojenize edilecek olan dokular öncelikle tartılmıştır ve bulunan ağırlıklar 3 ile çarpılarak üzerlerine eklenmesi gereken Ripa içerik miktarı hesaplandı. Ripa içeriğinin hazırlanması için; Ripa buffer tampon çözeltisi, sodyum ortovanadat, PMSF ve proteaz inhibitör kokteyl çözeltileri gereken miktarlarda alınarak homojen şekilde karıştırıldı. Her bir doku için gereken Ripa içerik miktarı, ependorflardaki dokuların üzerine aktarıldı. Dokular makas yardımıyla parçalara ayrıldıktan sonra ultrasonik homojenizatör ile homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi tamamlandıktan sonra dokular 2200 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Daha sonra ependorflardaki süpernatant kısım yeni ependorflara aktarılarak kullanılıncaya kadar -20ºC'de muhafaza edildi. İzole fare böbrek ve karaciğer dokularındaki antioksidan (süperoksiddismutaz (SOD)) ve antiinflamatuvar (siklooksijenaz (COX)) enzim seviyeleri homojenizasyon ile elde edilen süpernatantlardan ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testi kullanılmak suretiyle ölçüldü. ELISA deneysel protokolü, ilgili ELISA kitinde belirtilen talimatlara uygun şekilde yapıldı (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. ELISA testi aşamaları

3.2.9. *İn silico* Çalışmalar

İn silico yaklaşım, moleküler biyoloji ve kombinatoryal kimyadan elde edilen bilgiler doğrultusunda bileşiklerin (bitkisel kaynaklı, kimyasal vb.) vücuttaki hedef proteinlerle nasıl bir araya geleceğini tahmin etmeye yardım eden yazılım programlarından oluşmaktadır (Rao ve ark., 2011; Waghulde ve ark., 2018). Bu çalışmada da sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin COX-2 (PDB: 3LN1, 2.40 Å) enzimiyle *in silico* çalışmalar yapılarak bağlanma enerjileri ve bağlanma türleri tespit edildi.

Protein Hazırlama

Protein Veri Bankası (RCSB PDB)'ndan COX-2 (PDB: 3LN1, 2.40 Å) enziminin X-ray kristal yapısı .pdb formatında indirildi. AutoDock Tools programında su molekülleri ve heteroatomlar kaldırılarak, polar hidrojen atomları ve Kollman chargelar (yükler) eklendi. Ardından .pdbqt formatında kaydedildi (Rauf ve ark. 2015).

Ligand Hazırlama

Sentezlenen yeni pirolidin türevli bileşiklerin yapıları ChemDraw Professional 15.0 programı kullanılarak çizildi ve .sdf formatında kaydedildi. Referans ilaç (Celecoxib) ise ZINC veri bankasından .sdf formatında indirildi. OpenBabel 2.3.1 yazılımıyla enerji minimizasyonu yapılarak bileşiklerin 3D yapıları .pdb formatında kaydedildi (O'Boyle ve ark., 2011; Ambure ve ark., 2014). Ligand hazırlarken, yaygın olarak kullanılan ligand hazırlama prosedürlerinden biri olan Kumar ve ark. (2017) tarafından önerilen yöntem uygulandı. Kısaca, .pdb formatında olan ligandlara AutoDock Tools programında hidrojen atomları eklendi ve gasteiger yükleri hesaplanarak AutoDock Vina için ligand seçimi yapılıp .pdbqt formatında kaydedildi.

Moleküler Docking

.pdbqt formatında elde edilen protein ve liganların moleküler docking işlemi The Scripps Research Institute tarafından geliştirilen AutoDock Vina programı kullanılarak yapıldı (Tallei ve ark., 2020). Protein için x,y,z koordinat sisteminde 60 x 60 x 60 boyutunda aktif bölge belirlenerek (COX-2; x = 28.827, y = -23.439, z = -15.094) (Er-Rajy ve ark., 2024; Hatai ve Banerjee, 2019) not defterine .txt olarak kaydedildi. Komut sistemine gerekli komutlar yazılarak moleküler docking işlemine başlandı. Elde edilen afinite skorlarına bakılarak, en iyi bağlanma enerjisi gösteren konformasyon seçilerek Discovery Studio 2021 Client uygulamasında Protein-Ligand etkileşimlerinin 3D ve 2D görselleştirmeleri yapıldı.

Absorbsiyon-Dağılım-Metabolizma-Atılım-Toksisite (ADMET) Çalışmaları

Bir bileşiğin etkili olabilmesi amacıyla vücuttaki hedefine yeterli konsantrasyonda ulaşarak, beklenen biyolojik etkileri gerçekleştirmesi için yeterince uzun süre biyoaktif yapıda kalması gerekmektedir. Çok sayıda biyoaktif bileşik vardır, ancak canlılar üzerinde yapılan deneylerin sınırlı olmasından dolayı absorbsiyon, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite değerlendirmeleri için bilgisayar destekli modeller deneylere geçerli alternatifler oluşturmaktadır (Daina ve ark., 2017).

Sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin farmakokinetik özellikleri, ilaca benzerlikleri ve toksisitelerinin tahmini SwissADME (http://www.swissadme.ch/ (Erişim tarihi: 30.05.2024)), ADMETlab 3.0 (https://admetlab3.scbdd.com/ (Erişim tarihi: 30.05.2024)) ve ProTox 3.0 (https://tox.charite.de/protox3/ (Erişim tarihi: 30.05.2024)) gibi çevrimiçi sunucular kullanılarak tarandı.

3.2.10. İstatistiksel Analiz

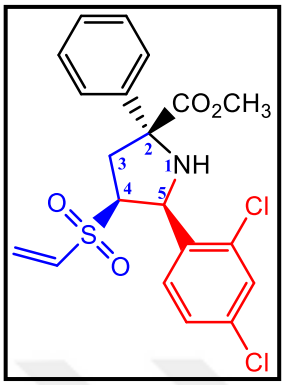
Deneysel verilerin analizi için GraphPad Prism (8.4.3) istatistiksel analiz programları [Analysis of Variance (ANOVA), Tukey *post-hoc*] kullanıldı. $P<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

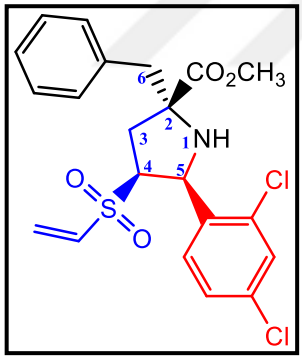
4.1.1. Sentezlenen Yeni Pirolidin Türevi Bileşiklerin Spektral Verileri

Metil-5-(2,4-diklorofenil)-2-fenil-4-(vinilsülfonil)pirolidin-2-karboksilat; (6a)



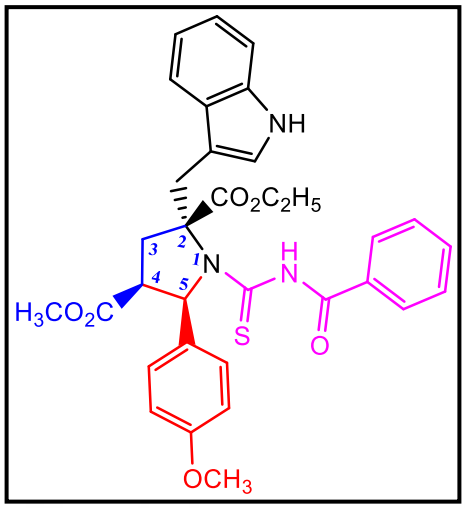
Kapalı formülü $C_{20}H_{19}Cl_2NO_4S$**,** verimi %60 olan ve beyaz renkli toz halde elde edilen **6a** numaralı bileşiğin E.N. 152-153.7 ºC'dir. **^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$):** 7.69 (m, 3H, Ar-H), 7.35 (m, 5H, Ar-H), 5.90 (m, 2H, CHC*H*), 5.72 (dd, *J*= 6.5, 3.0, 1H, C*H*-SO_2), 4.59 (dd, *J*= 5.8, 11.2, 1H, 5-H), 4.03 (ddd, *J*= 3.0, 5.8, 8.8, 1H, 4-H), 3.77 (m, 3H, OCH_3), 3.70 (dd, *J*= 3, 15.3, 1H, 3-H), 2.97 (dd, *J*= 8.8, 15.3, 1H, 3'-H). **^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$):** 173.08 (C=O), 141.71, 135.18, 134.71, 134.64, 132.41, 130.03, 129.97 (=CH_2), 128.90, 128.76 (2C), 128.04, 127.19, 126.12 (2C) , 70.07 (2C), 64.24, 60.04, 53.20, 38.86 (-CH_2). **HRMS (ESI) m/z (%):** $[M+H]^+$ hesaplanan $C_{20}H_{19}Cl_2NO_4S$: 440.0485, bulunan $C_{20}H_{19}Cl_2NO_4S$: 440.0541**. FT-IR (cm^{-1}) νmax:** 3316.5, 3060.41, 1724.24, 1592.93, 1426.38, 1304.82, 1270.11, 1128.66, 814.24, 732.23, 465.57

Metil-2-benzil-5-(2,4-diklorofenil)-4-(vinilsülfonil)pirolidin-2-karboksilat; (6b)



Kapalı formülü $C_{21}H_{21}Cl_2NO_4S$, verimi %69 olan ve beyaz renkli toz halde elde edilen **6b** numaralı bileşiğin E.N. 140.3-142.3ºC'dir. **^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$):** 7.62 (d, *J*= 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.34 (d, *J*= 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.27 (m, 4H, Ar-H), 7.21-7.15 (m, 2H, Ar-H), 5.88 (dd, *J*= 8.3, 1H, CHC*H*), 5.84 (dd, *J*= 16.5, 1.1 Hz, 1H, CHC*H*), 5.69 (dd, *J*= 8.4, 1.1 Hz, 1H, C*H*-SO_2), 4.67 (s, 1H, 5-H), 3.94 (ddd, *J*= 8.9, 6.0, 2.7 Hz, 1H, 4-H), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.22 (dd, *J*= 15.5, 2.7 Hz, 1H, 3-H), 3.15 (d, *J*= 13.4 Hz, 1H, 6-H), 3.03 (d, *J*= 13.4 Hz, 1H, 6'-H), 2.56 (dd, *J*= 15.6, 9.0 Hz, 1H, 3'-H). **^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$)**: 174 (C=O), 135.99, 135.25, 134.61, 132.67, 129.97, 128.61, 127.18, 77.09, 68.15, 63.82, 59.49, 52.49. **HRMS (ESI) m/z (%):** $[M+H]^+$ hesaplanan $C_{21}H_{21}Cl_2NO_4S$ 454.362, bulunan $C_{21}H_{21}Cl_2NO_4S$ 454.0695**. FT-IR (cm^{-1}) νmax:** 3331.43, 3067.23, 2949.59, 1731.76, 1455.99, 1307.5, 1130.08.

2-etil-4-metil-2-((1H-indol-3-il)metil)-1-(benzoilkarbamotiyoil)-5-(4-metoksifenil)pirolidin-2,4-dikarboksilat; (8)



Kapalı formülü $C_{33}H_{33}N_3O_6S$, verimi %89 olan ve sarı renkli toz halinde elde edilen **8** numaralı bileşiğin E.N. 175-177 °C'dir. **^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6):** 11.21 (s, 1H, NH), 10.47 (s, 1H, NH), 7.73–7.65 (m, 2H, Ar-H), 7.51 (t, *J*= 7.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (d, *J*= 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.38–7.26 (m, 6H, Ar-H), 7.11 (t, *J*= 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.03 (t, *J*= 7.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.78 (d, *J*= 8.5 Hz, 2H, Ar-H), 5.32 (d, *J*= 9.8 Hz, 1H, 5-H), 4.41 – 4.29 (m, 2H, CH_2CH_3), 4.19 (dt, *J*= 17.6, 7.1 Hz, 1H, 4-H), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.62 (d, *J*= 15.1 Hz, 1H, 6'-H), 3.38 (dd, *J*= 14.0, 7.0 Hz, 1H, 6-H), 2.95 (s, 3H, OCH_3), 2.74 (t, *J*= 12.8 Hz, 1H, 3-H), 2.32 (dd, *J*= 12.5, 7.0 Hz, 1H, 3'-H), 1.39 (t, *J*= 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3). **^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d6): δ =** 180.27 (C=S), 170.86 (C=O), 168.92 (C=O), 165.72 (C=O), 158.83, 135.80, 133.24, 132.06, 129.46, 128.73 (2C), 128.35 (2C), 128.23, 127.92 (2C), 125.61, 121.13, 119.02, 117.92, 113.23 (2C), 111.58, 108.11, 75.33, 67.01, 61.48, 55.09, 51.18, 46.43, 35.59, 25.37, 13.88. **HRMS (ESI)** $[M+H]^+$ hesaplanan $C_{33}H_{33}N_3O_6S$: 599.7020, bulunan: 600.2182.

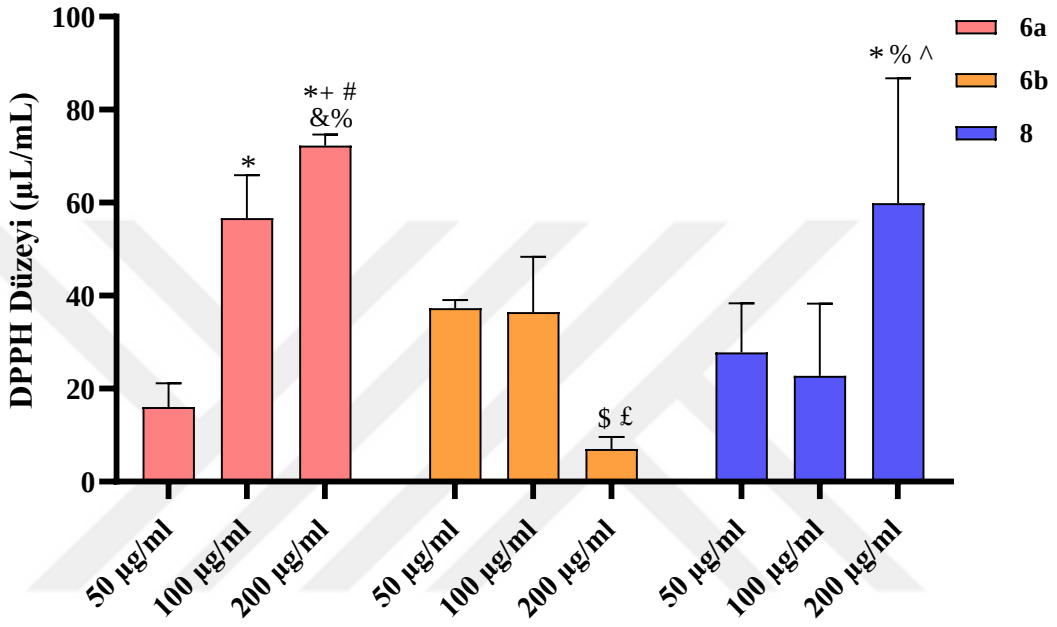
4.1.2. Total Antioksidan Kapasite (DPPH) Bulguları

Sentezlenen 3 adet yeni pirolidin türevi bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda total antioksidan kapasitesi DPPH ile analiz edildi. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi, total antioksidan kapasite tayininden elde edilen sonuçlarla pirolidin türevi bileşiklerin total antioksidan kapasitelerinin yüksek olduğu söylenebilir. Ayrıca verilerin aritmetik ortalama ± standart hata hesaplamaları Çizelge 4.1'de verildi.

Çizelge 4.1. Total antioksidan kapasite analiz değerleri (DPPH)

	DPPH düzeyi (µL/mL)
6a 50 µg/ml	16,1±2,95
6a 100 µg/ml	56,7±5,32
6a 200 µg/ml	72,3±1,36
6b 50 µg/ml	37,3±1,01
6b 100 µg/ml	36,4±6,88
6b 200 µg/ml	7,00±1,53
8 50 µg/ml	27,8±6,07
8 100 µg/ml	22,7±8,97
8 200 µg/ml	59,9±15,5

Sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin total antioksidan kapasiteleri DPPH testi ile 3 farklı konsantrasyonda (50, 100 ve 200 µg/ml) çalışılarak, **6a** bileşiğinin total antioksidan kapasitesi sırasıyla %16,1, %56,6 ve %72,3; **6b** bileşiğinin total antioksidan kapasitesi sırasıyla %37,3, %36,4 ve %7,00; **8** bileşiğinin total antioksidan kapasitesi sırasıyla %27,8, %22,7 ve %59,9 olarak tespit edildi. **6a** bileşiğinin antioksidan kapasitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde doz bağımlı arttığı gözlemlendi.



Şekil 4.1. Total antioksidan kapasite (DPPH) bulgularının analizi (*: **6a** 50 µg/ml grubuna göre istatistiksel farklılık; +: **6b** 50 µg/ml grubuna göre istatistiksel farklılık; #: **8** 50 µg/ml grubuna göre istatistiksel farklılık; $: **6a** 100 µg/ml grubuna göre istatistiksel farklılık; &: **6b** 100 µg/ml grubuna göre istatistiksel farklılık; %: **8** 100 µg/ml grubuna göre istatistiksel farklılık; £: **6a** 200 µg/ml grubuna göre istatistiksel farklılık; ^: **6b** 200 µg/ml grubuna göre istatistiksel farklılık) (P>0,05)

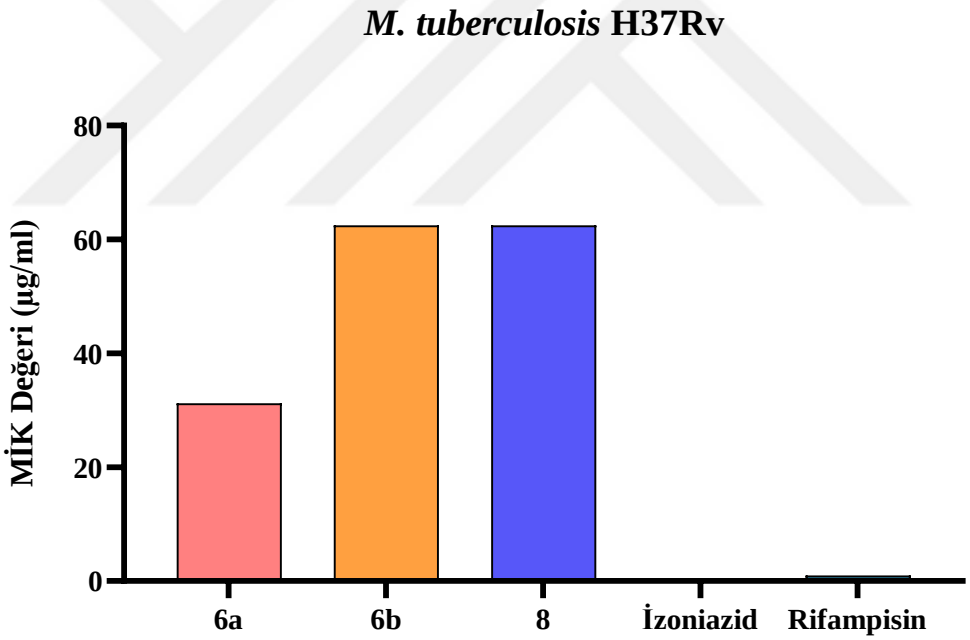
4.1.3. Antimikobakteriyel Aktivite Bulguları

Sentezlenen 3 tane yeni siklik (**6a, 6b**, **8**) pirolidin türevi bileşiklerin antimikobakteriyel aktiviteleri *M. Tuberculosis* H37Rv suşuna karşı test edildi. Antimikobakteriyel aktivite değerlendirmelerinde referans ilaçlar olarak rifampisin ve izoniazid kullanılarak elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında sentezlenen pirolidin türevi moleküllerin daha düşük antimikobakteriyel aktivite gösterdiği, bunlardan **6a**'nın **6b** ve **8** nolu moleküllere göre daha yüksek antimikobakteriyel aktivite gösterdiği belirlendi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2**.** Antimikobakteriyel aktivite bulguları

	***M. tuberculosis* H37Rv (µg/ml)**
6a	31,25
6b	62,50
8	62,50
İzoniazid	0,12
Rifampisin	0,97

M. Tuberculosis H37Rv'nin, referans ilaçlar olarak kullanılan rifampisine karşı aktivitesi 0,97 µg/ml ve izoniazide karşı aktivitesi 0,12 µg/ml olarak ölçüldü. Sentezlenen pirolidin türevi moleküllerin (**6a, 6b, 8**) *M. Tuberculosis* H37Rv'e karşı MİK değerleri; **6a** için 31,25 µg/ml, **6b** ve **8** için 62,50 µg/ml olarak gözlemlendi (Çizelge 4.3). Siklik pirolidin bileşiği olan **6a**'nın, **6b** ve **8** bileşiklerine kıyasla *M. Tuberculosis* H37Rv'ye karşı daha yüksek antimikobakteriyel aktivite gösterdiği söylenebilir (Şekil 4.2). Ayrıca pirolidin bileşiklerin, *M. Tuberculosis* H37Rv'ye karşı referans rifampisin ve izoniazid ile karşılaştırıldığında istenilen düzeyde etki göstermedikleri ifade edilebilir.



Şekil 4.2. *M. tuberculosis* H37Rv suşuna karşı siklik pirolidin türevi moleküllerin MİK değerleri

4.1.4. Antibakteriyel Aktivite Bulguları

Sentezlenen 3 tane yeni siklik (**6a, 6b**, **8**) pirolidin türevi bileşiklerin antibakteriyel aktiviteleri *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitif) (ATCC 25925), *Escherichia coli* (Gram-negatif) (ATCC 25923), *Acinetobacter baumannii* (Gram-negatif) (ATCC 02026), *Bacillus subtilis* (Gram-pozitif) (ATCC 6633) ve *Aeromonas hydrophila* (Gram-negatif) (ATCC 95080) gibi çeşitli bakteri suşlarına karşı değerlendirildi.

Antibakteriyel aktivite değerlendirmelerinde referans ilaç olarak ampisilin kullanılarak elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında pirolidin türevi bileşiklerin bazılarının potansiyel antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edildi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Antibakteriyel aktivite bulguları

	***Staphylococcus aureus* (µg/ml)**	***Escherichia coli* (µg/ml)**	***Acinetobacter baumannii* (µg/ml)**	***Bacillus subtilis* (µg/ml)**	***Aeromonas hydrophila* (µg/ml)**
6a	125	250	**125**	125	**62,50**
6b	250	250	**62,50**	250	125
8	500	125	**125**	125	125
Ampisilin	31,25	15,62	**125**	0,9	31,25

Referans ilaç olarak kullanılan ampisiline karşı *S. aureus*'un aktivitesi 31,25 µg/ml olarak ölçüldü. Sentezlenen pirolidin türevi moleküllerin (**6a, 6b, 8**) *S. aureus*'a karşı MİK değerleri; **6a** için 125 µg/ml, **6b** için 250 µg/ml ve **8** için 500 µg/ml olarak gözlemlendi (Çizelge 4.3). Divinilsülfon grubu içeren siklik pirolidin bileşiği olan **6a**'nın, **6b** ve **8** bileşiklerine kıyasla *S.aureus'*a karşı daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.3).

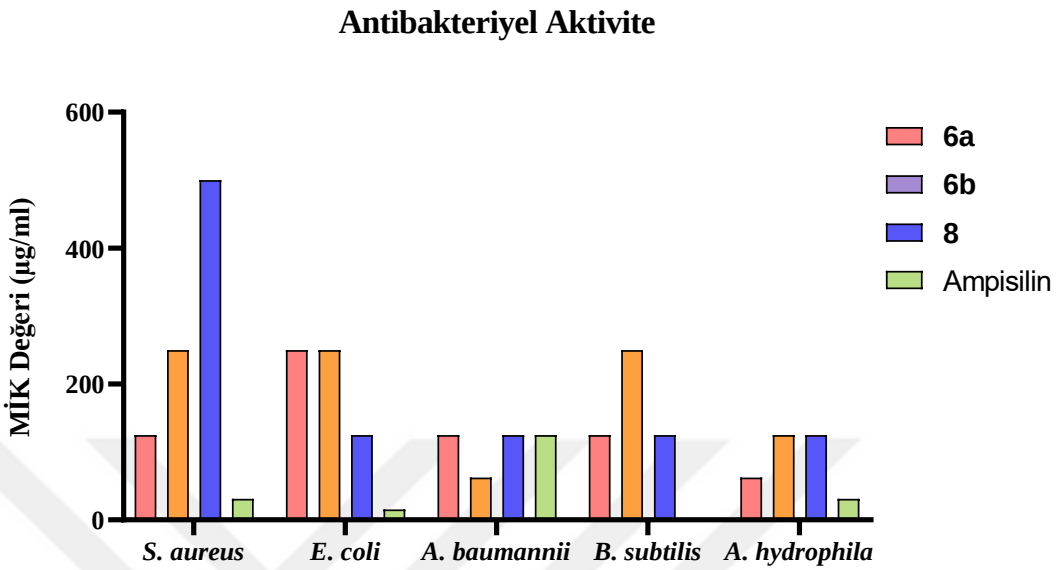
E. coli'nin, referans ilaç olarak kullanılan ampisiline karşı aktivitesi 15,62 µg/ml olarak ölçüldü. Sentezlenen pirolidin türevi moleküllerin (**6a, 6b, 8**) *E. coli'ye* karşı MİK değerleri; **6a** ve **6b** için 250 µg/ml, **8** için 125 µg/ml olarak gözlemlendi (Çizelge 4.3). Aminokarbotiyol grubunu içeren pirolidin bileşiği **8**'in, **6a** ve **6b** bileşiklerine kıyasla *E. coli*'ye karşı daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.3).

*A.baumannii'*nin, referans ilaç olarak kullanılan ampisiline karşı aktivitesi 125 µg/ml olarak ölçüldü. Sentezlenen pirolidin türevi moleküllerin (**6a, 6b, 8**) *A. baumannii'ye* karşı MİK değerleri; **6a** ve **8** için 125 µg/ml, **6b** için 62,5 µg/ml olarak gözlemlendi (Çizelge 4.3). 62,50 µg/ml MİK değeri ile divinilsülfon grubunu içeren siklik pirolidin bileşiği olan **6a**'nın, **6b** ve **8** bileşiklerinden ve aktivitesi 125 µg/ml olarak ölçülen referans ilaç ampisilinden *A.baumannii*'ye karşı daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 4.3).

B. subtilis'in, referans ilaç olarak kullanılan ampisiline karşı aktivitesi 0,9 µg/ml olarak ölçüldü. Sentezlenen pirolidin türevi moleküllerin (**6a, 6b, 8**) *B. subtilis'e* karşı MİK değerleri; **6a** ve **8** için 125 µg/ml, **6b** için 250 µg/ml olarak gözlemlendi (Çizelge 4.3). Bileşik **6a** ve **8**'in, **6b** bileşiğine kıyasla *B. subtilis*'ye karşı daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.3). Ayrıca pirolidin bileşiklerinin *B. subtilis*'e karşı referans ampisilin ile karşılaştırıldığında daha düşük antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlendi.

A. hydrophila'in, referans ilaç olarak kullanılan ampisiline karşı aktivitesi 31,25 µg/ml olarak ölçüldü. Sentezlenen pirolidin türevi moleküllerin (**6a, 6b, 8**) *A. hydrophila*'e karşı MİK değerleri; **6a** için 62,5 µg/ml, **6b** ve **8** için 125 µg/ml olarak gözlemlendi (Çizelge 4.3).

Divinilsülfon grubunu içeren siklik pirolidin bileşiği olan **6a**'nın, **6b** ve **8** bileşiklerine kıyasla *A. hydrophila*'ya karşı daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Bakterilere karşı pirolidin türevi moleküllerin MİK değerleri

4.1.5. Antifungal Aktivite Bulguları

Sentezlenen 3 adet yeni siklik (**6a, 6b**, **8**) pirolidin türevi moleküllerin *Candida albicans* (ATCC 14053), *Candida tropicalis* (ATCC 1369) ve *Candida glabrata* (ATCC 15126) gibi çeşitli fungal suşlarına karşı antifungal aktiviteleri test edildi. Flukonazol referans ilaç olarak kullanılarak, yapılan antifungal aktivite değerlendirmeleriyle karşılaştırıldığında pirolidin türevi moleküllerin flukonazole göre daha düşük, ancak potansiyel antifungal aktivite gösterdiği belirlendi (Çizelge 4.4).

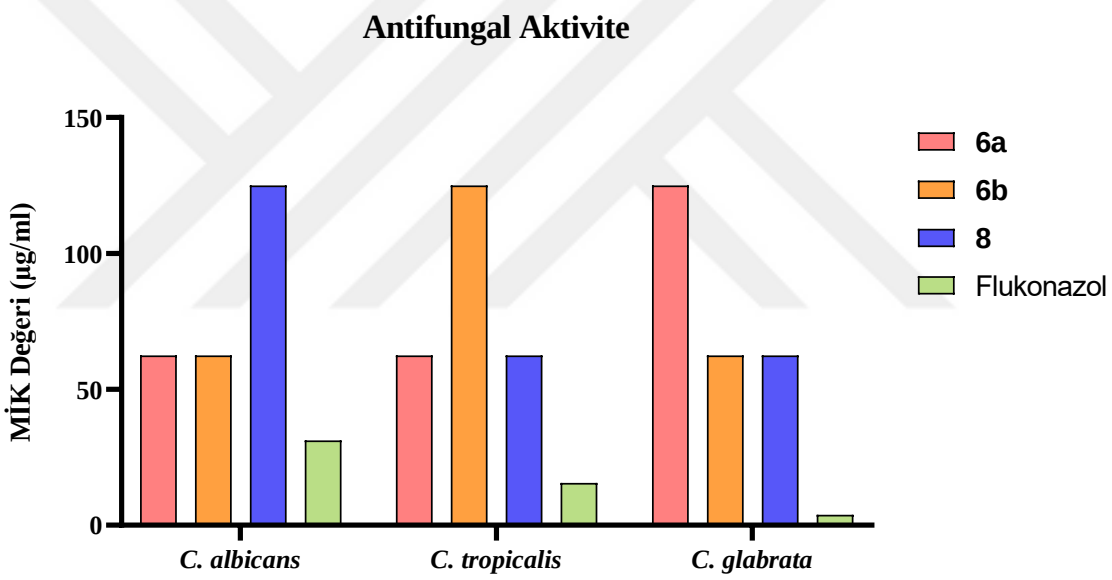
Çizelge 4.4. Antifungal aktivite bulguları

	Candida albicans **(µg/ml)**	***Candida tropicalis*** **(µg/ml)**	***Candida glabrata*** **(µg/ml)**
6a	**62,50**	62,50	125
6b	**62,50**	125	62,50
8	125	62,50	62,50
Flukonazol	31,25	15,62	3,90

*C. albicans'*ın, referans ilaç olarak kullanılan flukonazola karşı aktivitesi 31,25 µg/ml olarak ölçüldü. Sentezlenen pirolidin türevi bileşiklerin (**6a, 6b, 8**) *C. albicans*'a karşı MİK değerleri; **6a** ve **6b** için 62,5 µg/ml, **8** için 125 µg/ml olarak gözlemlendi (Çizelge 4.4). Divinilsülfon grubunu içeren siklik pirolidin bileşikleri olan **6a** ve **6b**'nin, **8** bileşiğine kıyasla *C. albicans*'a karşı daha yüksek antifungal aktivite gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.4). Pirolidin türevi bileşiklerin *Candida albicans*'a karşı flukonazol ile karşılaştırıldığında önemli seviyede bir etki göstermediği, ancak potansiyel antifungal aktivite gösterdiği ifade edilebilir.

C. tropicalis'ın, referans ilaç olarak kullanılan flukonazola karşı aktivitesi 15,62 µg/ml olarak ölçüldü. Sentezlenen pirolidin türevi bileşiklerin (**6a, 6b, 8**) *C. tropicalis*'a karşı MİK değerleri; **6a** ve **8** bileşikleri için 62,5 µg/ml, **6b** için 125 µg/ml olarak gözlemlendi (Çizelge 4.4). Bileşik **6a** ve **8**'in, **6b** bileşiğine kıyasla *C. tropicalis*'a karşı daha yüksek antifungal aktivite gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.4). Pirolidin türevi bileşiklerin *C. tropicalis*'a karşı flukonazol ile karşılaştırıldığında önemli seviyede bir etki göstermediği ifade edilebilir.

C. glabrata'nın, referans ilaç olarak kullanılan flukonazola karşı aktivitesi 3,90 µg/ml olarak ölçüldü. Sentezlenen pirolidin türevi bileşiklerin (**6a, 6b, 8**) *C. glabrata*'ya karşı MİK değerleri; **6a** için 125 µg/ml, **6b** ve **8** bileşikleri için 62,5 µg/ml olarak gözlemlendi (Çizelge 4.4). Bileşik **6b** ve **8**'in, **6a** bileşiğine kıyasla *C. glabrata*'ya karşı daha yüksek antifungal aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 4.4). Pirolidin türevi bileşiklerin *C. glabrata*'ya karşı flukonazol ile karşılaştırıldığında önemli seviyede bir etki göstermediği ifade edilebilir.



Şekil 4.4. Funguslara karşı pirolidin türevi moleküllerin MİK değerleri

4.1.6. MTT Testi Bulguları

HCT116 hücre hattına sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşikler için hazırlanan 25, 50, 100 µM olmak üzere 3 farklı konsantrasyon uygulanarak 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonun sonunda MTT yöntemi ile hücre canlılığı ve sitotoksisite üzerindeki etkileri tespit edildi. Elde edilen sonuçlarla pirolidin türevi bileşiklerin zamana bağımlı bir şekilde antiproliferatif aktivite gösterdikleri söylenebilir (Şekil 4.5).

24 saatlik uygulama yapılan hücreler kıyaslandığında genel kontrol grubuna göre; CaOCl, ve **8** 100 µM uygulanan grupların MTT aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu tespit edildi.

24 saatlik uygulama yapılan hücreler kıyaslandığında CaOCl grubuna göre; diğer bütün grupların MTT aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu gözlemlendi.

24 saat uygulanan **6a** 25, 50 ve 100 μM, **6b** 25, 50 ve 100 μM, **8** 25 ve 50 μM gruplarına göre, 48 ve 72 saat uygulanan grupların MTT aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu tespit edildi.

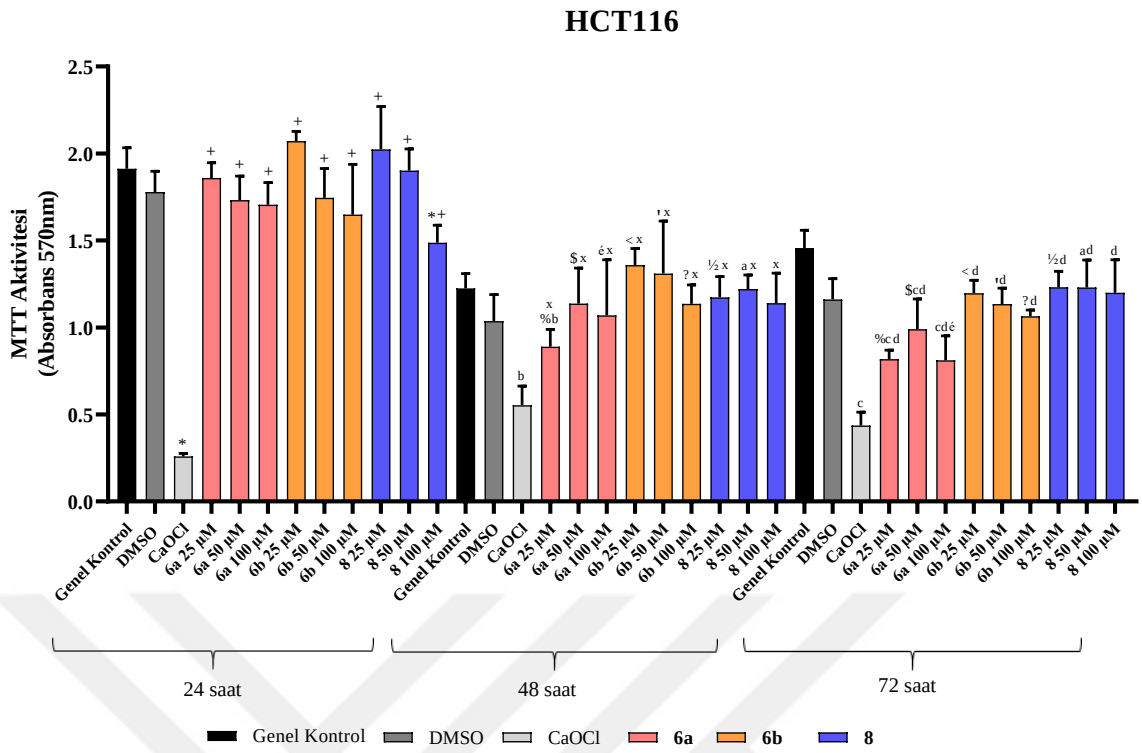
48 saatlik uygulama yapılan hücreler kıyaslandığında genel kontrol grubuna göre; CaOCl, ve **6a** 25 μM uygulanan grupların MTT aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu gözlemlendi.

48 saatlik uygulama yapılan hücreler kıyaslandığında CaOCl grubuna göre; bütün grupların MTT aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edildi.

48 saat uygulanan **6b** 25 μM grubuna göre, 72 saat uygulanan grupların MTT aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu tespit edildi.

72 saatlik uygulama yapılan hücreler kıyaslandığında genel kontrol grubuna göre; CaOCl, **6a** 25, 50 ve 100 μM uygulanan grupların MTT aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu gözlemlendi.

72 saatlik uygulama yapılan hücreler kıyaslandığında CaOCl grubuna göre; bütün grupların MTT aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edildi.

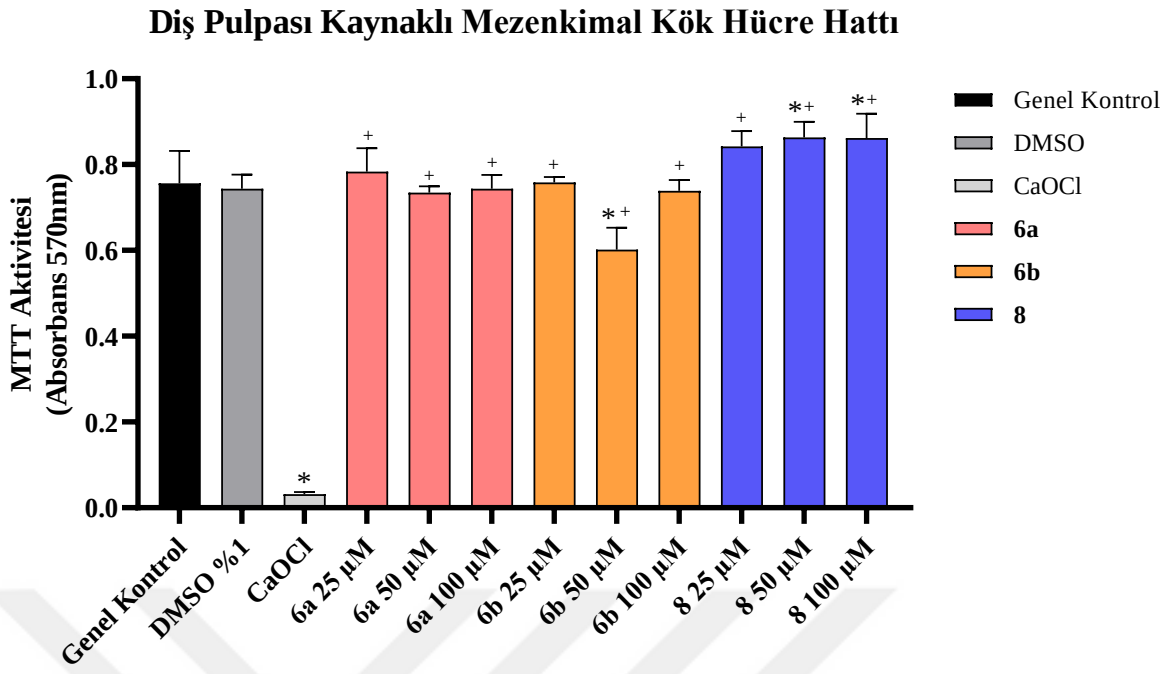


Şekil 4.5. Yeni pirolidin türevi moleküllerin HCT116 hücre hattında canlılık üzerine etkileri (CaOCl: Kalsiyum hipoklorit (%7) içeren DMEM (Pozitif Kontrol); DMSO: Dimetilsülfoksit (%1) içeren DMEM (Solvent Kontrol)) (*: Genel kontrol (24 saat) grubuna göre istatistiksel farklılık; +: CaOCl (24 saat) grubuna göre istatistiksel farklılık; %: **6a** 25 µM (24 saat) grubuna göre istatistiksel farklılık; $: **6a** 50 µM (24 saat) grubuna göre istatistiksel farklılık; é: **6a** 100 µM (24 saat) grubuna göre istatistiksel farklılık; <: **6b** 25 µM (24 saat) grubuna göre istatistiksel farklılık; ': **6b** 50 µM (24 saat) grubuna göre istatistiksel farklılık; ?: **6b** 100 µM (24 saat) grubuna göre istatistiksel farklılık; ½: **8** 25 µM (24 saat) grubuna göre istatistiksel farklılık; a: **8** 50 µM (24 saat) grubuna göre istatistiksel farklılık; b: Genel kontrol (48 saat) grubuna göre istatistiksel farklılık; x: CaOCl (48 saat) grubuna göre istatistiksel farklılık; c: Genel kontrol (72 saat) grubuna göre istatistiksel farklılık; d: CaOCl (72 saat) grubuna göre istatistiksel farklılık)(P>0,05)

Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücre hattına sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşikler için hazırlanan 25, 50, 100 µM olmak üzere 3 farklı konsantrasyon uygulanarak 24 saatlik inkübasyonun sonunda MTT yöntemi ile hücre canlılığı ve sitotoksisite üzerindeki etkileri tespit edildi. Elde edilen sonuçlarla pirolidin türevi bileşiklerin sağlıklı hücre hattında herhangi bir sitotoksisite yapmadığı gözlemlendi (Şekil 4.6).

Genel kontrol grubuna kıyasla; CaOCl ve **6b** 50 µM uygulanan grupların MTT aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu, **8** 50 µM ve **8** 100 µM uygulanan grupların ise MTT aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu tespit edildi.

CaOCl grubuna kıyasla; bütün grupların MTT aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.6. Yeni pirolidin türevi moleküllerin diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücre hattında canlılık üzerine etkileri (CaOCl: Kalsiyum hipoklorit (%7) içeren DMEM (Pozitif Kontrol); DMSO: Dimetilsülfoksit (%1) içeren DMEM (Solvent Kontrol)) (*: Genel kontrol grubuna göre istatistiksel farklılık; +: CaOCl grubuna göre istatistiksel farklılık) (P>0,05)

4.1.7. Farelerde *İn Vivo* Deneysel Çalışmalar

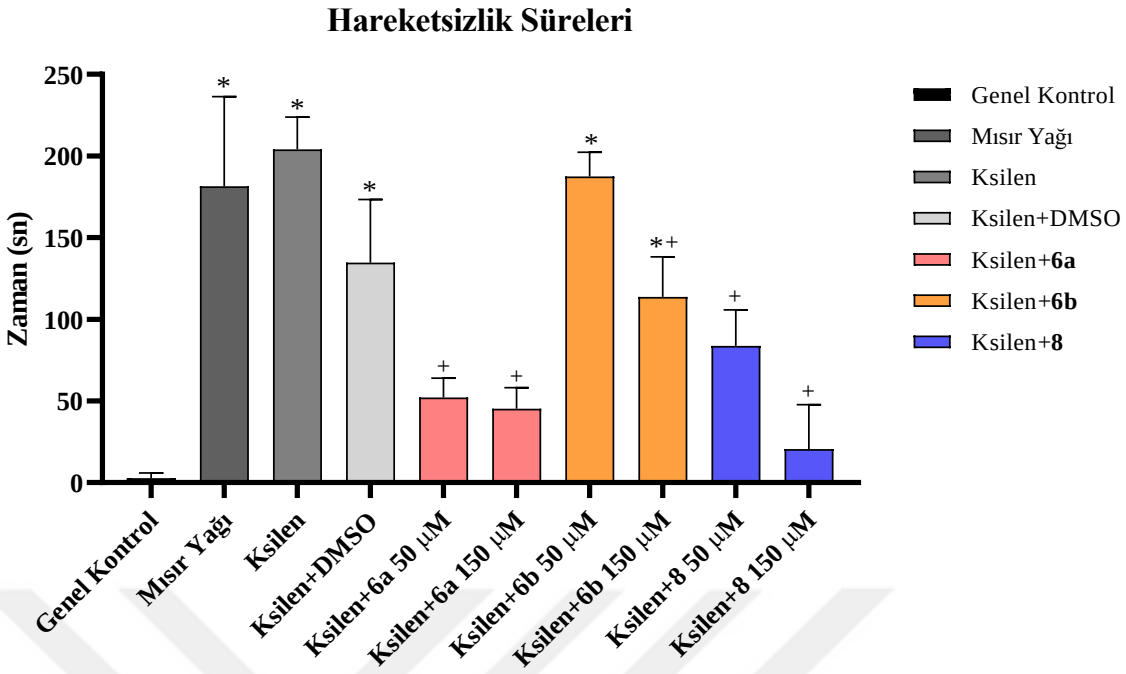
Zorunlu Yüzme Testi Bulguları

Pirolidin türevi bileşiklerin farklı dozları, ksilen ile inflamasyon indüklenen (*i.p.*) *Swiss albino* farelere gavaj yoluyla uygulanarak depresyon üzerine etkileri zorunlu yüzme testi (ZYT) ile tespit edildi.

Genel kontrol grubuyla kıyaslandığında; Mısır yağı, Ksilen, Ksilen+DMSO(%4), Ksilen+**6b** 50 µM ve Ksilen+**6b** 150 µM uygulanan grupların hareketsizlik sürelerinin istatiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi.

Ksilen grubuyla kıyaslandığında; Ksilen+**6a** 50 µM, Ksilen+**6a** 150 µM, Ksilen+**6b** 150 µM, Ksilen+**8** 50 µM ve Ksilen+**8** 150 µM uygulanan grupların hareketsizlik sürelerinin istatiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi.

Ksilen farelerin hareketsizlik süresini artırarak depresan benzeri etki gösterdi ve bileşik **6a**'nın 50-150 µM, bileşik **6b**'nin 150 µM, bileşik **8**'in 50-150 µM dozları ile tedavi edilen farelerin hareketsizlik sürelerinin azaldığı tespit edilerek, depresyon benzeri davranışı iyileştirebilecekleri söylenebilir (Şekil 4.7).

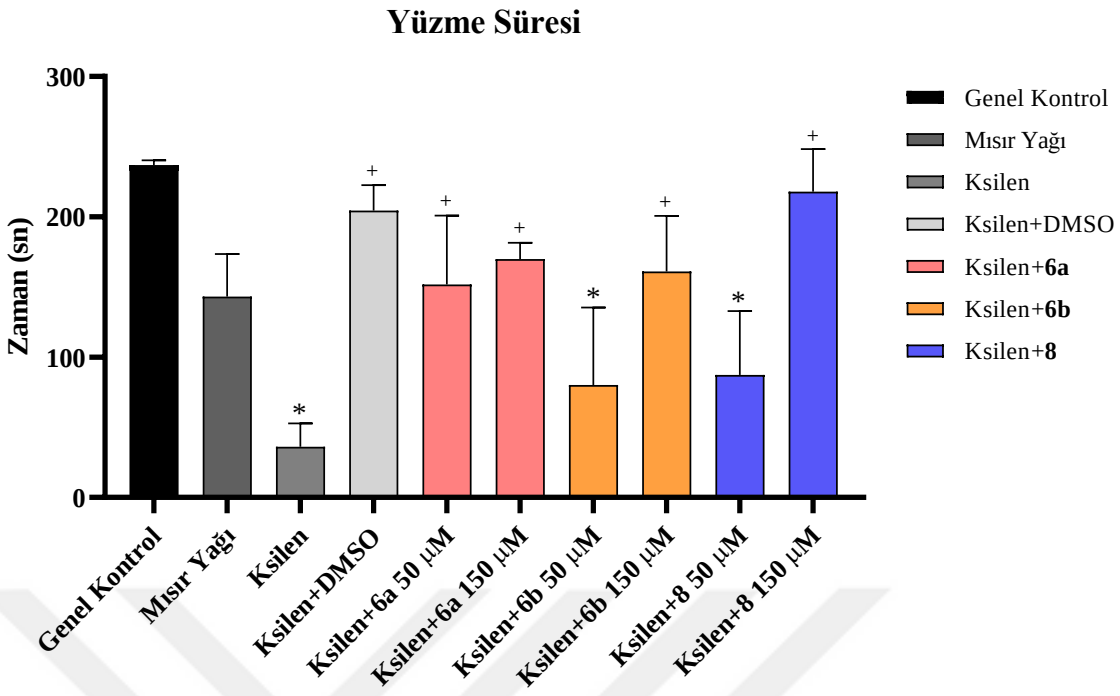


Şekil 4.7. Yeni pirolidin türevi moleküllerin farelerde zorunlu yüzme testinde hareketsizlik süreleri üzerindeki etkileri (Mısır yağı: ksilenin çözücüsü; Ksilen: inflamasyon indüksiyon ajanı; Ksilen+DMSO: inflamasyon indüksiyon ajanı+kimyasal çözücüsü (%4)) (*: Genel kontrol grubuna göre istatistiksel farklılık; +: Ksilen grubuna göre istatistiksel farklılık) (P>0,05)

Genel kontrol grubuyla kıyaslandığında; Ksilen, Ksilen+**6b** 50 µM ve Ksilen+**8** 50 µM uygulanan grupların yüzme sürelerinin istatiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi.

Ksilen grubuyla kıyaslandığında; Ksilen+DMSO(%4), Ksilen+**6a** 50 µM, Ksilen+**6a** 150 µM, Ksilen+**6b** 150 µM ve Ksilen+**8** 150 µM uygulanan grupların yüzme sürelerinin istatiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi.

Ksilen farelerin yüzme süresini azaltarak depresan benzeri etki gösterdi ve bileşik **6a**'nın 50-150 µM, bileşik **6b**'nin 150 µM, bileşik **8**'in 150 µM dozları ile tedavi edilen farelerin yüzme sürelerinin arttığı tespit edilerek, depresyon benzeri davranışı iyileştirebilecekleri söylenebilir (Şekil 4.8).



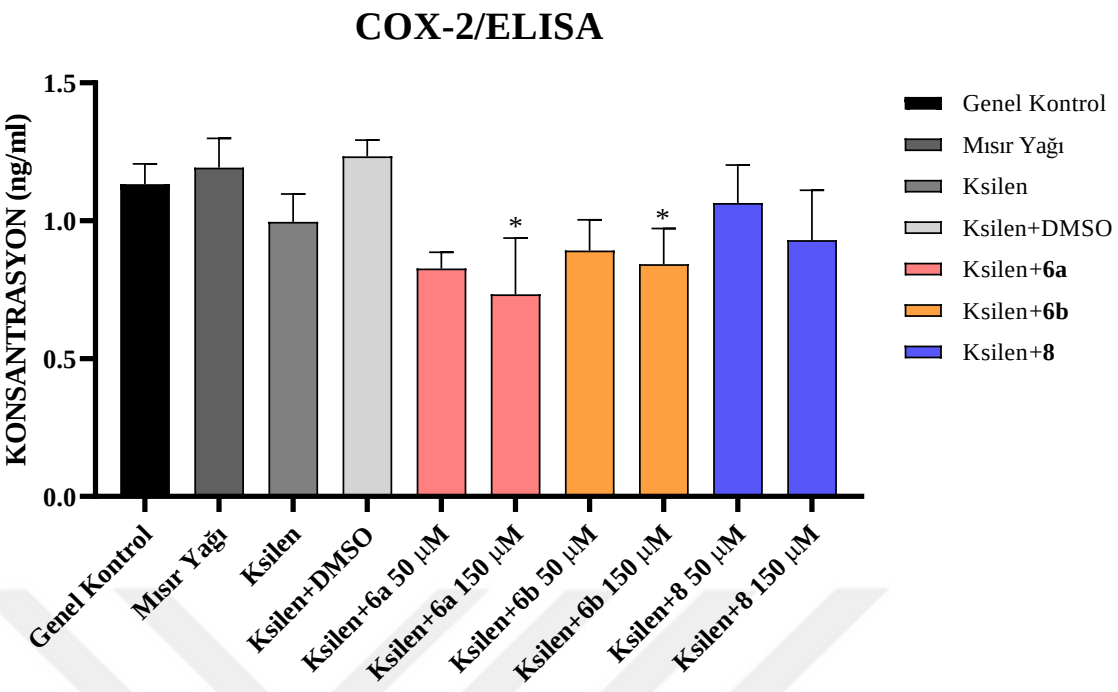
Şekil 4.8. Yeni pirolidin türevi moleküllerin farelerde zorunlu yüzme testinde yüzme süreleri üzerindeki etkileri (Mısır yağı: ksilenin çözücüsü; Ksilen: inflamasyon indüksiyon ajanı; Ksilen+DMSO: inflamasyon indüksiyon ajanı+kimyasal çözücüsü (%4)) (*: Genel kontrol grubuna göre istatistiksel farklılık; +; Ksilen grubuna göre istatistiksel farklılık) (P>0,05)

4.1.8. Farelerde *İn Vitro* Deneysel Çalışmalar

Fare COX-2 ELISA Testi Bulguları

Ksilen ile inflamasyon indüklenen *Swiss albino* farelere sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin 50 µM ve 150 µM olmak üzere farklı dozları uygulanıp karaciğer dokuları izole edildi ve COX-2 enzim seviyeleri ELISA ile tespit edildi.

Genel kontrol grubuyla kıyaslandığında; **6a** 150 µM ve **6b** 150 µM uygulanan grupların, COX-2 enzim seviyelerini istatiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı gözlemlendi (Şekil 4.9).

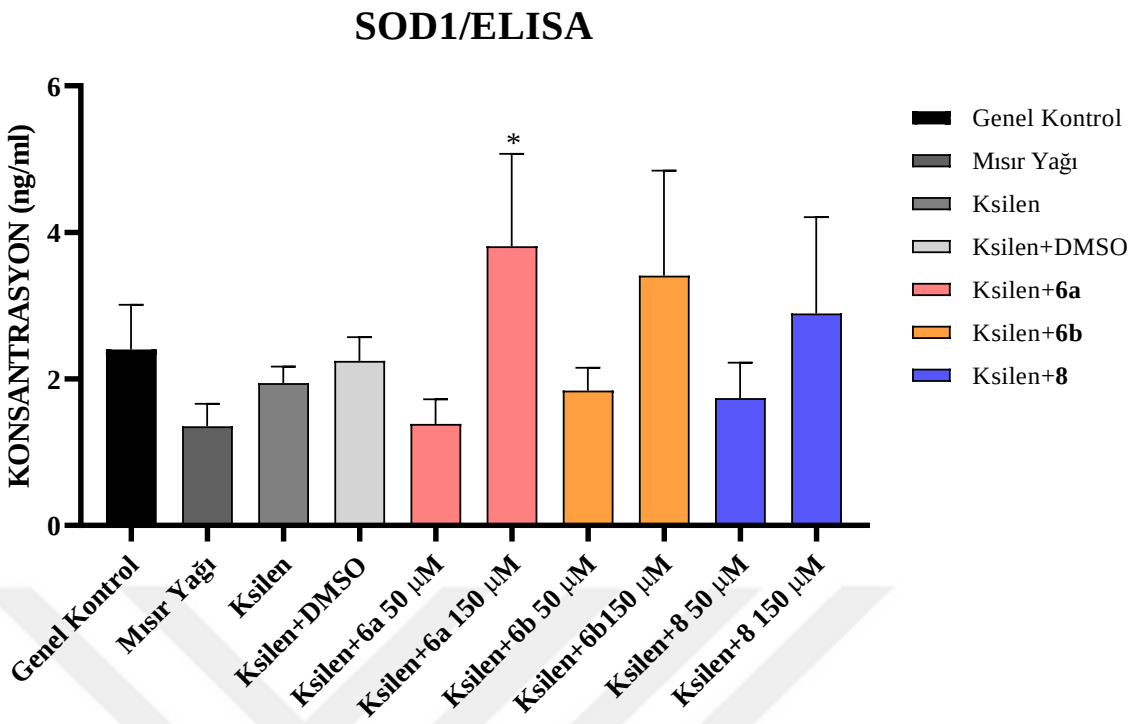


Şekil 4.9. Yeni pirolidin türevi moleküllerin karaciğer dokusundaki COX-2 enzim seviyeleri üzerindeki etkileri (Mısır yağı: ksilenin çözücüsü; Ksilen: inflamasyon indüksiyon ajanı; Ksilen+DMSO: inflamasyon indüksiyon ajanı+sentetik kimyasal bileşiklerin solventi (%4)) (*: Genel Kontrol grubuna göre istatistiksel farklılık) (P>0,05)

Fare SOD1 ELISA Testi Bulguları

Ksilen ile inflamasyon indüklenen *Swiss albino* farelere sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin 50 µM ve 150 µM olmak üzere farklı dozları uygulanıp karaciğer dokuları izole edildi ve SOD1 enzim seviyeleri ELISA ile tespit edildi.

Ksilen grubuyla kıyaslandığında; Ksilen+**6a** 150 µM uygulanan grubun SOD1 enzim seviyesini istatiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlemlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Yeni pirolidin türevi moleküllerin karaciğer dokusundaki SOD1 enzim seviyeleri üzerindeki etkileri (Mısır yağı: ksilenin çözücüsü; Ksilen: inflamasyon indüksiyon ajanı; Ksilen+DMSO: inflamasyon indüksiyon ajanı+kimyasal çözücüsü (%4)) (*: Ksilen grubuna göre istatistiksel farklılık) (P>0,05)

4.1.9. Moleküler Docking Çalışmaları

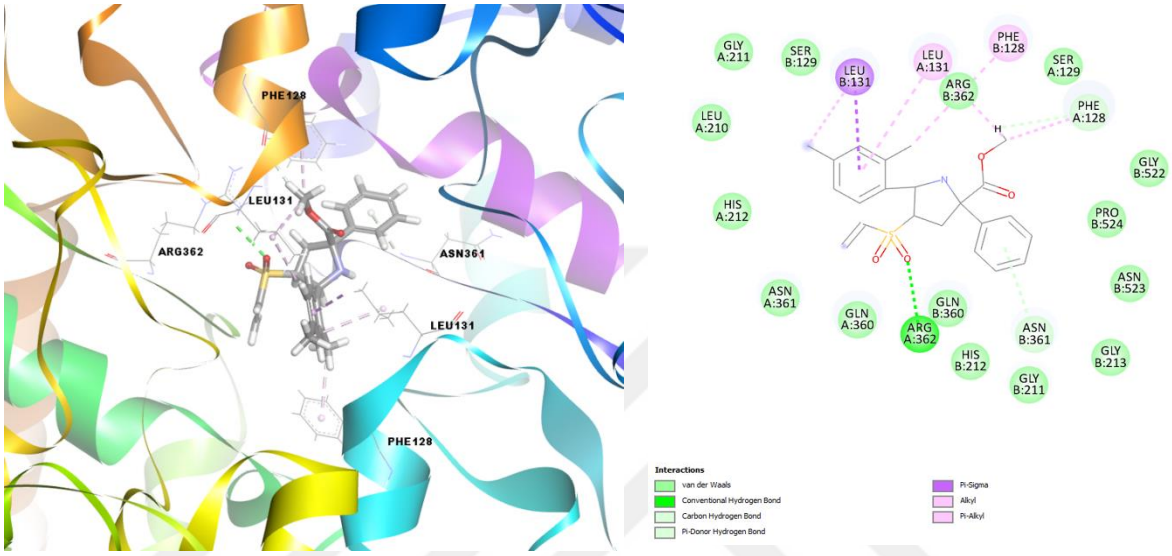
Sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin potansiyel antiinflamatuvar etkileri COX-2 (PDB: 3LN1, 2.40 Å) enzimine bağlanma afinitelerini ve ligand protein etkileşimlerini araştırmak için moleküler docking çalışmaları yapıldı.

Çizelge 4.5'de sentezlenen yeni pirolidin türevi moleküllerin COX-2 enziminin aktif bölgesindeki bağlanma serbest enerjileri (kcal/mol) ve aminoasitler ile yaptıkları moleküler bağları ve kimyasal etkileşimleri verilmiştir.

Çizelge 4.5. Sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin COX-2 (PDB: 3LN1) enzimi ile ilgili moleküler docking çalışmaları

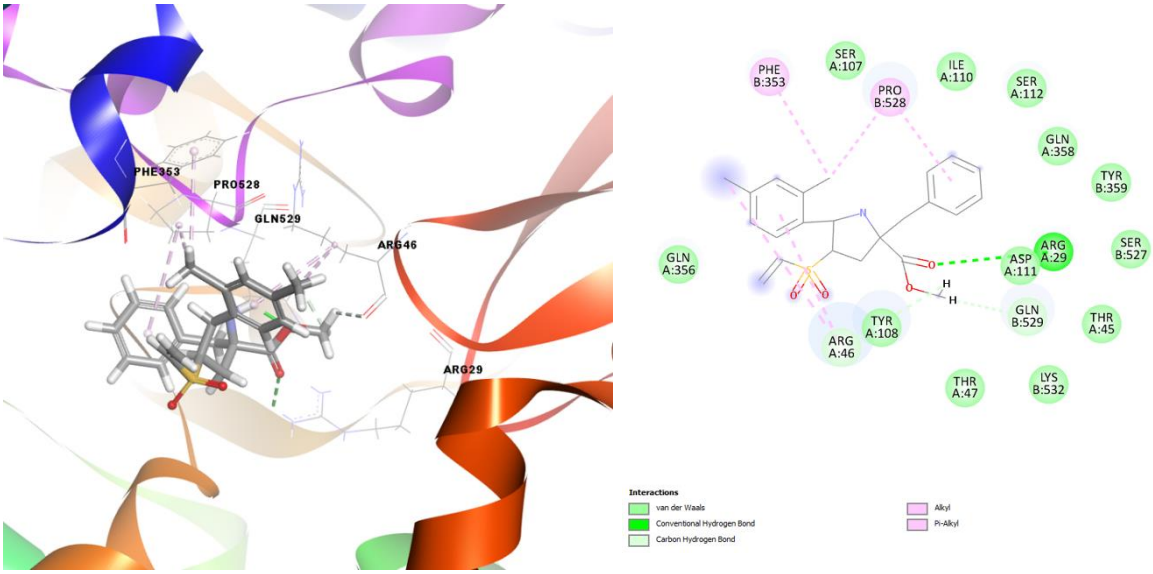
	Bağlanma serbest enerjisi (kcal/mol)	**H-bağı**	**Hidrofobik etkileşimler**	**Diğer (halojen,vb.)**
6a	-9.5	ARG362	PHE128, LEU131, ASN361	-
6b	-8.9	ARG29	ARG46, PHE353, PRO528	-
8	-10.2	ARG46	GLN355	-
Celecoxib	-11.2	ARG29, TYR116, GLN529	PRO139, ARG455	GLU31, ASP111

Şekil 4.11'de bileşik **6a**'nın COX-2 (PDB: 3LN1) enziminin aktif bölgesindeki lokalizasyonu üç boyutlu ve iki boyutlu olarak gösterilmiştir. İlk olarak bileşik **6a**'da bulunan sülfon grubu ile ARG362 aminoasitinin amin grubu arasında hidrojen bağı yaptığı tespit edildi. Daha sonra bileşik **6a**'nın $-CO_2CH_3$ grubu ile PHE128 aminoasiti arasında C-H bağı, benzen halkası ile ASN361 aminoasiti arasında π-donor etkileşimi ve 2,4-diklorobenzen halkası ile LEU131 aminoasiti arasında π-sigma ve alkil etkileşimi, PHE128 aminoaisiti arasında π-alkil etkileşimi oluşturduğu belirlendi.



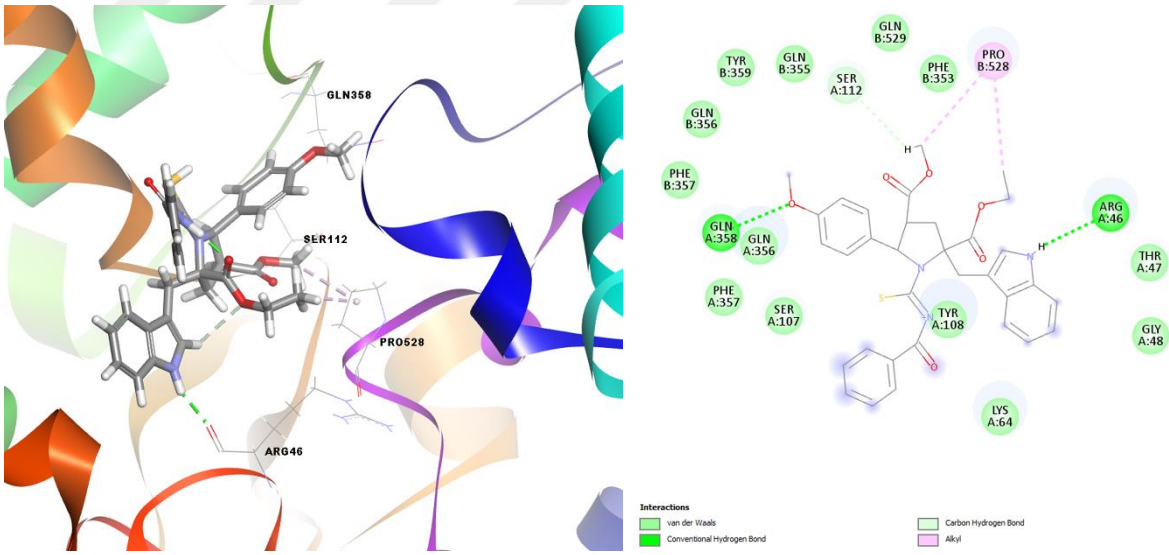
Şekil 4.11**. 6a** molekülünün COX-2 (PDB: 3LN1) ile 3D ve 2D konformasyonel gösterimi

Şekil 4.12'de bileşik **6b**'nin COX-2 (PDB: 3LN1) enziminin aktif bölgesindeki lokalizasyonu 3D ve 2D görseli verilmiştir. İlk olarak, bileşik **6b**'de bulunan $-CO_2CH_3$ grubu ile ARG29 aminoasitinin amin grubu arasında konvansiyonel hidrojen bağı yaptığı saptandı. Daha sonra bileşik **6b**'nin 2,4-diklorobenzen halkası ile ARG46 aminoasiti arasında π-alkil etkileşimi, benzen ve 2,4-diklorobenzen halkası ile PRO528 aminoasiti arasında alkil etkileşimi, 2,4-diklorobenzen halkası ile PHE353 aminoasiti arasında π-alkil etkileşimi oluşturduğu tespit edildi.



Şekil 4.12. **6b** molekülünün COX-2 (PDB: 3LN1) ile 3D ve 2D konformasyonel gösterimi

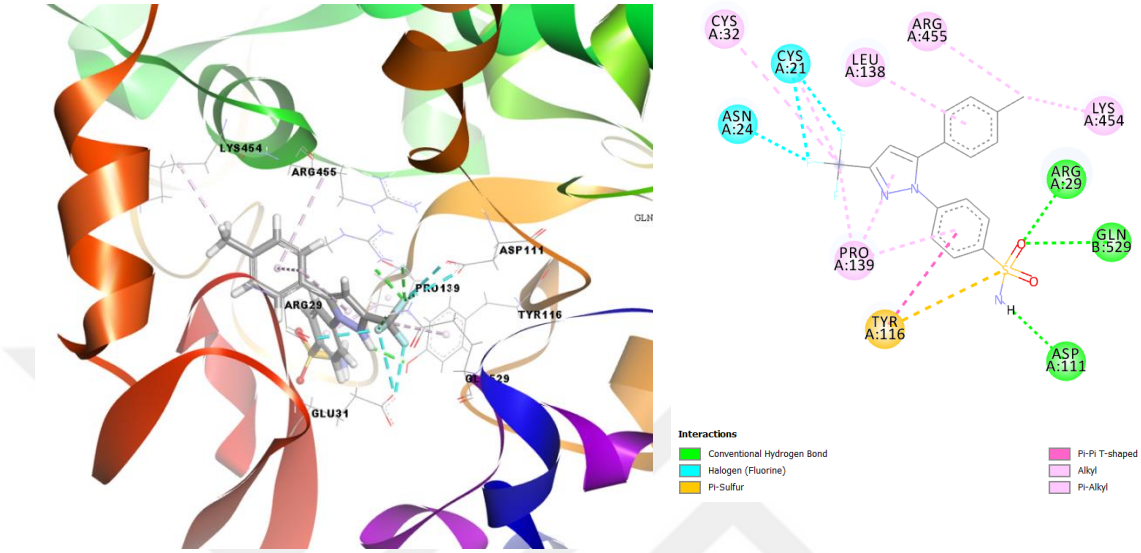
Şekil 4.13'de bileşik **8**'in COX-2 (PDB: 3LN1) enziminin aktif bölgesindeki lokalizasyonu 3D ve 2D görseli verilmiştir. İlk olarak, bileşik **8**'de bulunan indol halkası ile ARG46 aminoasitinin karboksil grubu arasında ve metoksibenzen halkası ile GLN358 aminositinin amin grubu arasında hidrojen bağı yaptığı belirlendi. Daha sonra bileşik **8**'in $-CO_2CH_3$ grubu ile SER112 aminoasiti arasında C-H bağı yaptığı tespit edildi.



Şekil 4.13**. 8** molekülünün COX-2 (PDB: 3LN1) ile 3D ve 2D konformasyonel gösterimi

Şekil 4.14'de Antiinflamatuvar ilaç olarak referans kullanılan Celecoxib'in COX-2 (PDB: 3LN1) enziminin aktif bölgesindeki lokalizasyonu 3D ve 2D görseli verilmiştir. İlk olarak, Celecoxib'de bulunan sülfonamid grubu ile ARG29 aminoasitinin amin grubu arasında (Aksöz, 2021) , ASP111 aminoasitinin karboksilik asit grubu arasında ve GLN529 aminoasitinin amin grubu arasında konvansiyonel hidrojen bağı yaptığı görüldü. Daha sonra Celecoxib'de bulunan

triflorometil grubu ile CYS21 ve ASN24 aminoasitleri arasında halojen etkileşimi ve CYS21, CYS32 ve PRO139 aminoasitleri arasında alkil etkileşimi, benzen halkaları ile PRO139 ve LEU138 aminoasiti arasında π-alkil etkileşimi, ARG455 ve LYS454 arasında alkil etkileşimi ve pirazol halkası ile PRO139 aminoasiti arasında π-alkil etkileşimi oluşturduğu gözlemlendi.



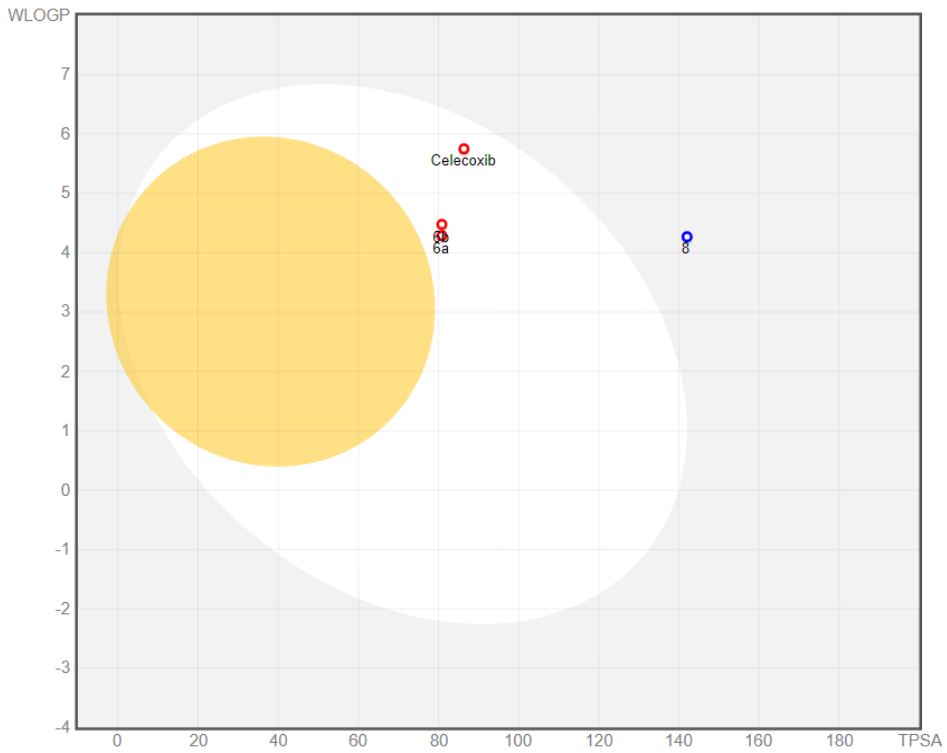
Şekil 4.14. Referans ilacın COX-2 (PDB: 3LN1) ile 3D ve 2D konformasyonel gösterimi

Yukarıda yapılan docking çalışması *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda moleküler seviyedeki açıklanamayan kısımların aydınlatılması ve tahmininde olası etkileşim yönelimlerini ve mekanizmalarını göstermektedir. Bu tez çalışmasında uygulanılan yaklaşım ve algoritmalar temelinde çeşitli hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Yeni yaklaşım ve olasılıklar temelinde bu hesaplamalar detaylandırılarak daha da iyileştirilecektir.

4.1.10. Absorbsiyon-Dağılım-Metabolizma-Atılım-Toksisite (ADMET) Çalışmaları

Sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin farmakokinetik özellikleri, ilaca benzerlikleri ve toksisitelerinin tahminini araştırmak için ADMET çalışmaları yapıldı.

X ekseninde topolojik polar yüzey alanı (TPSA) tarafından belirlenen polarite ve Y ekseninde n-oktanol/su çözücüleri (LogP O/W) arasındaki bölme katsayısının logaritması ile tanımlanan lipofiliklik arasındaki ilişkiyi inceleyen SwissADME sunucusundaki BOILED-Egg tahmin modeli kullanılarak farmakokinetik özellikler değerlendirildi (Şekil 4.15) (El fadili ve ark., 2022). Beyaz renkli yumurtada bulunan **6a**, **6b** bileşikleri ve Celecoxib referans ilacı gastrointestinal sistemden emilme olasılığı daha yüksek olan maddelerdir.



Şekil 4.15. SwissADME çevrimiçi sunucusu tarafından tahmin edilen BOILED-Egg modeli

Sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin ve referans ilaçların farmakokinetik özellikleri SwissADME ve ADMETlab çevrimiçi sunucularından taranarak Çizelge 4.6'de gösterilmiştir. Bütün bileşiklerin gastrointestinal sistemden emilimlerinin yüksek olduğu ve ADMETlab verilerine göre bileşik **8** haricindeki diğer bileşiklerin kan beyin bariyerinden geçebildikleri tespit edildi. Bir molekülün ilaç adayı olarak kabul edilebilmesi için belirli kriterlere uyması gerekmektedir. Bu kriterler arasında, lipofilite ölçüsü olarak kullanılan LogP değerinin -0,7 ile +5,0 arasında olması, moleküler ağırlığın 150-500 g/mol'ün arasında olması, akseptör hidrojen bağının 10'dan az, donor hidrojen bağının ise 5'ten az olması ve esneklik için dönebilen bağ sayısının 9'dan az olması bulunmaktadır. Ayrıca TPSA değerlerinin 20-130 $Å^2$ arasında olmalı ve suda çözünebilirliğinin göstergesi olan LogS (suda çözünürlüğün logaritması) değeri de genellikle 6'dan yüksek olmamalıdır (Daina ve ark., 2017). Bu kriterlere göre bileşik **6a**, **6b** ve Celecoxib referans ilacının belirtilen özellikleri tamamen karşıladığı, bileşik **8**'in genel anlamda bu sınırlar içerisinde olduğu görülmektedir. Bunlara ek olarak kullanılan bütün bileşiklerin SwissADME'de Lipinski'nin kurallarına uyduğu, ancak sadece bileşik **8**'in moleküler ağırlığının bu kurala uymadığı tespit edildi.

Çizelge 4.6. ADME bulguları (MW: moleküler ağırlık, nRot: dönebilen bağ sayısı, nHA: akseptör H-bağı sayısı, nHD: donor H-bağı sayısı, TPSA: toplam polar yüzey alanı, LogP: lipofiliklik, LogS: suda çözünebilirlik, HIA: insan bağırsak emilimi, KBB: kan beyin bariyeri geçirgenliği, Lipinski: MW ≤ 500, MLOGP ≤ 4,15, N ya da O ≤ 10, NH ya da OH ≤ 5 (Lipinski ve ark., 2012))

	Molekül	**Swiss ADME**	**ADMET lab**		**Molekül**	**Swiss ADME**	**ADMET lab**
MW (g/mol)	6a	440.34	439.040	**LogP**	6a	4.08	3.70
	6b	454.37	453.060		6b	4.38	3.98
	8	599.70	599.21		8	5.31	5.360
	Celecoxib	381.37	381.08		Celecoxib	3.40	3.52
nRot	6a	6	6	**LogS**	6a	-5.06	-4.30
	6b	7	7		6b	-5.26	-3.12
	8	13	13		8	-6.41	-5.87
	Celecoxib	4	4		Celecoxib	-4.57	-5.28
nHA	6a	5	5	**HIA**	6a	+	+
	6b	5	5		6b	+	+
	8	6	9		8	+	+
	Celecoxib	7	5		Celecoxib	+	+
nHD	6a	1	1	**KBB**	6a	-	+
	6b	1	1		6b	-	+
	8	2	2		8	-	-
	Celecoxib	1	2		Celecoxib	-	+
TPSA ($Å^2$)	6a	80.85 $Å^2$	72.47 $Å^2$	**Lipinski**	6a	+	+
	6b	80.85 $Å^2$	72.47 $Å^2$		6b	+	+
	8	142.05 $Å^2$	109.96 $Å^2$		8	+ (1 ihlal; MW>500)	-
	Celecoxib	86.36 $Å^2$	77.98 $Å^2$		Celecoxib	+	+

Bileşiklerin ProTox-III çevrimiçi sunucusu kullanılarak toksisite analiz verileri Çizelge 4.7'da belirtilmiştir. Toksikoloji sınıflarının III ve IV arasında değiştiği belirlendi. Molekül **6a** ve **6b** toksikoloji sınıfları IV olarak tespit edilmiş olup, referans ilaç olan Celecoxib ile aynı seviyede toksik etki gösterdiği saptandı. Toksikoloji sınıfı III olarak tespit edilen molekül **8**'in referans ilaca kıyasla daha fazla toksik etkiye sahip olduğu belirlendi. Ayrıca molekül **6a, 6b, 8**'in nefrotoksik, molekül **8**'in nörotoksik ve Celecoxib'in karsinojen olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.7. Toksisite bulguları

	6a	6b	8	Celecoxib
LD50 (mg/kg) ve Toksikoloji Sınıfı	1600 mg/kg Sınıf IV	1739 mg/kg Sınıf IV	100 mg/kg Sınıf III	1400 mg/kg Sınıf IV
Hepatotoksisite	İnaktif	İnaktif	İnaktif	İnaktif
Nörotoksisite	İnaktif	İnaktif	**Aktif**	İnaktif
Nefrotoksisite	**Aktif**	**Aktif**	**Aktif**	İnaktif
Karsinojenite	İnaktif	İnaktif	İnaktif	**Aktif**
İmmünotoksisite	İnaktif	İnaktif	İnaktif	İnaktif
Mutajenite	İnaktif	İnaktif	İnaktif	İnaktif
Sitotoksisite	İnaktif	İnaktif	İnaktif	İnaktif

4.2. Tartışma

4.2.1. Sentezlenen Pirolidin Türevi Bileşiklerin Analizi

Tez kapsamında %60-89 aralığında bir verimle sentezlenen 3 yeni bileşiğin yapısı ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ^{2}D-COSY, DEPT, HMQC, FT-IR, HRMS ve X-Ray gibi analitik tekniklerle aydınlatılarak, karakterizasyona ait spektral analiz verileri bulgular kısmında ve ilgili spektrumlar ise EK 1'de verildi.

Bileşik 6a'nın Analizi

^{1}H-NMR spektrumunda 7.69 ppm'de integrali üç proton olan multiplet pik, 7.35 ppm'de integrali beş proton olan multiplet pik yapıdaki aromatikliğe ait protonlardır. Bununla birlikte, 5.90 ppm'de integrali iki proton olan multiplet pik CHC*H* protonlarını, 5.72 ppm'de integrali bir proton olan dubletin dubleti(dd) pik C*H*-SO_2 protonuna, 4.59 ppm'de integrali bir proton olan dd pik 5-H protonuna, 4.03 ppm'de integrali bir proton olan dubletin dubletinin dubleti(ddd) pik 4-H protonuna, 3.77 ppm'de integrali üç proton olan multiplet pik –OCH_3 protonuna, 3.70 ppm'de integrali bir proton olan dd pik 3-H protonuna ve 2.97 ppm'de integrali bir proton olan dd pik 3'-H protonuna aittir. Bileşiğin ^{13}C-NMR spektrumunda; karbonile (C=O) ait pik 173.08 ppm'de görülmüştür. Bileşiğin IR spektrumunda 3316.5 cm^{-1}'deki pik N-H ve 3060.41 cm^{-1}'deki pik aromatik C-H titreşimlerine, 1724.24 cm^{-1}'deki pik C=O titreşimine ait olduğu görülmektedir. Bileşiğin HRMS analizi sonucunda 440.054 m/z değerindeki moleküler iyon pikinin, bileşiğin molekül ağırlığını doğruladığı belirlenmiştir.

Bileşik 6b'nin Analizi

^{1}H-NMR spektrumunda 7.62 ppm'de integrali bir proton olan dublet(d) pik, 7.34 ppm'de integrali bir proton olan triplet(t) pik, 7.27 ppm'de integrali beş proton olan multiplet pik ve 7.21-7.15 ppm'de integrali iki proton olan multiplet pik yapıdaki aromatikliğe ait protonlardır. Bununla birlikte, 5.88 ppm'de integrali bir proton olan dd pik CHC*H* protonuna, 5.84 ppm'de integrali bir

proton olan dd pik CHC*H* protonuna, 5.69 ppm'de integrali bir proton olan dd pik C*H*-SO_2 protonuna, 4.67 ppm'de integrali bir proton olan singlet(s) pik 5-H protonuna, 3.94 ppm'de integrali bir protona olan ddd pik 4-H protonuna, 3.74 ppm'de integrali üç proton olan singlet pik –OCH_3 protonuna, 3.22 ppm'de integrali bir proton olan dd pik 3-H protonuna, 3.15 ppm'de integrali bir proton olan dublet pik 6-H protonuna, 3.03 ppm'de integrali bir proton olan dublet pik 6'-H protonuna ve 2.56 ppm'de integrali bir proton olan dd pik 3'-H protonuna aittir. Bileşiğin ^{13}C-NMR spektrumunda; karbonile (C=O) ait pik 174 ppm'de görülmüştür. Bileşiğin IR spektrumunda 3331.43 cm^{-1}'deki pik N-H, 3067.23 cm^{-1}'deki pik aromatik C-H, 2949.59 cm^{-1}'deki pik alifatik C-H ve 1731.76 cm^{-1}'de ise C=O pikleri görülmektedir. Bileşiğin HRMS spektrumunda görülen 454.069 m/z değerindeki moleküler iyon pikinin, bileşiğin molekül ağırlığını doğruladığı belirlenmiştir.

Bileşik 8'in Analizi

^{1}H-NMR spektrumunda 11.21 ppm ve 10.47 ppm'de integrali bir proton olan singlet pik NH protonuna, 7.73-7.65 ppm'de integrali iki proton olan multiplet pik, 7.51 ppm'de integrali bir proton olan triplet pik, 7.41 ppm'de integrali bir proton olan dublet pik, 7.38-7.26 ppm'de integrali altı protona olan multiplet pik, 7.11 ppm'de integrali bir proton olan triplet pik, 7.03 ppm'de integrali bir proton olan triplet pik, 6.78 ppm'de integrali iki proton olan dublet pik yapıdaki aromatikliğe, 5.32 ppm'de integrali bir proton olan dublet pik 5-H protonuna, 4.41-4.29 ppm'de integrali iki proton olan multiplet pik CH_2CH_3 protonuna, 4.19 ppm'de integrali bir proton olan dubletin tripleti(dt) pik 4-H protonuna, 3.70 ppm'de integrali üç proton olan singlet pik –OCH_3 protonuna, 3.62 ppm'de integrali bir proton olan dublet pik 6'-H protonuna, 3.38 ppm'de integrali bir proton olan dd pik 6-H protonuna, 2.95 ppm'de integrali üç proton olan singlet pik –OCH_3 protonuna, 2.74 ppm'de integrali bir proton olan triplet pik 3-H protonuna, 2.32 ppm'de integrali bir proton olan dd pik 3'-H protonuna ve 1.39 ppm'de integrali üç proton olan triplet pik CH_2CH_3 protonuna aittir. Bileşiğin ^{13}C-NMR spektrumunda; tiyokarbonile (C=S) ait pik 180.27 ppm'de, diğer karbonillere (C=O) ait pikler ise 170.86, 168.92 ve 165.72 ppm'de görülmüştür. Bileşiğin HRMS spektrumunda gözlenen 600.2182 m/z değerindeki moleküler iyon pikinin, bileşiğin molekül ağırlığını doğruladığı belirlenmiştir.

4.2.2. Total Antioksidan Kapasitenin Değerlendirilmesi

Son yıllarda yapılan araştırmalar bazı pirolidin türevi bileşiklerin antioksidan kapasitlerini DPPH yöntemi ile araştırarak, antioksidan kapasiteye sahip olduklarını rapor etmişlerdir (Saurav ve ark., 2012).

Sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin total anitoksidan kapasiteleri DPPH yöntemi ile 50, 100 ve 200 µg/ml olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda incelendi. **6a** bileşiğinin en fazla %72,30, **6b** bileşiğinin en fazla %37,29 ve **8** bileşiğinin en fazla %59,91 total antioksidan kapasite göstererek, en yüksek total antioksidan kapasiteye **6a'**nın sahip olduğu tespit edildi. Ayrıca bileşik

6a'nın total antioksidan kapasitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde doza bağlı arttığı tespit edildi.

Son yıllarda yapılan bir çalışmada, pirolidin türevi moleküllerin total antioksidan kapasiteleri DPPH testi ile incelenmiştir. Mesci ve arkadaşları (2021), sentezledikleri pirolidin türevi moleküllerin en yüksek total antioksidan kapasitenin yaklaşık %60 olduğunu tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise, sentezlenen pirolidin türevi bileşiklerin en yüksek total antioksidan kapasitenin %72,3 olduğu belirlenmiştir.

4.2.3. Antimikrobiyal Bulgularının Değerlendirilmesi

Pirolidin türevi bileşiklerin antimikobakteriyel aktiviteleri *M. tuberculosis* H37Rv standart suşuna karşı gerçekleştirilerek, **6a** bileşiğinin, **6b** ve **8** bileşiğine göre daha iyi aktivite gösterdiği tespit edildi. **6a** ile kıyaslandığında, yapısına bir -CH_2 grubu eklenen **6b** bileşiğinin ve yapısında aminokarbotiyol grubu bulunduran **8** bileşiğinin, **6a'**dan daha az antimikobakteriyel aktivite gösterdiği belirlendi.

Pirolidin türevi bileşiklerin antibakteriyel aktiviteleri çeşitli suşlara karşı gerçekleştirilerek, standart ilaç olarak kullanılan ampisilinle karşılaştırıldı. Pirolidin türevi bileşiklerin *A. baumannii* suşuna karşı **6b** bileşiğinin ampisilinden daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği, **6a** ve **8** bileşiklerinin ise ampisilin ile benzer antibakteriyel aktiviteyi gösterdiği belirlendi. Ayrıca *A. hydrophila* suşuna karşı ise 62,50 µg/ml MİK değeri gösteren **6a**'nın, ampisiline yakın (31,25 µg/m) antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edildi.

Pirolidin türevi bileşiklerin antifungal aktiviteleri çeşitli suşlara karşı gerçekleştirilerek, standart ilaç olarak kullanılan flukonazol ile karşılaştırıldı. *C. albicans* suşuna karşı yapısında aromatik halkanın meta pozisyonlarında iki klor atomu bulunan **6a** ve **6b** bileşiklerinin flukonazola yakın antifungal aktivite gösterdikleri, buna karşı yapısında halojen bulundurmayan **8** bileşiğinin daha az antifungal aktivite gösterdiği tespit edildi.

Pirolidin türevi bileşiklerin antimikrobiyal aktivileri üzerine yapılan araştırmalarda antimikobakteriyel, antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip oldukları literatürde bilinmektedir (Döndaş ve ark., 2024; Döndaş ve ark., 2017). Döndaş ve diğerleri (2024) tarafından yapılan bir araştırmada, pirolidin-benzensülfonamid türevleri sentezlenerek bazı bileşiklerin referans ilaca benzer antimikobakteriyel aktivite gösterdiği, bazılarının ise referans ilaçlara kıyasla daha az antibakteriyel ve antifungal aktivite sergilediği rapor edilmiştir. Bu tez çalışmasında sentezlenen yeni pirolidin türevi moleküller, bahsedilen araştırmada sentezlenen pirolidin-benzensülfonamid türevi moleküller ile benzer antimikobakteriyel ve antifungal aktiviteler gösterirken, antibakteriyel aktivitelerinin ise bazı bakterilere karşı daha yüksek olduğu tespit edildi.

4.2.4. MTT Testi Bulgularının Değerlendirilmesi

Sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin kolon kanseri hücreleri (HCT116) ve diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkileri MTT testi ile doz ve zamana bağlı olarak araştırıldı. Pirolidin türevi bileşikler HCT116 hücre hattındaki hücreleri zaman bağımlı bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığı tespit edildi. Diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücre hattında ise herhangi bir sitotoksik etki yapmadıkları belirlendi.

Son zamanlarda bazı pirolidin türevi bileşiklerin antikanser aktiviteleri üzerine yapılan araştırmalarda, pirolidin türevi bileşiklerin HepG2, MCF-7, HCT116 ve MDA-MB-231 gibi hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdiğini ve en yüksek sitotoksik etkiyi de HCT116 hücre hattına karşı gösterdiğini rapor etmişlerdir (Ahmad ve ark., 2019; Islam ve ark., 2020).

Yapılan başka bir çalışmada ise, spirooksindol pirolidin bağlı indol ve imidazol heterosiklik hibritleri sentezleyerek antifungal taramalar sonrasında antifungal aktivitesi en yüksek olan bileşiği seçerek, HCT116 hücre hattına karşı antikanser potansiyelini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada, bu bileşiğin HCT116 hücre hattında herhangi bir sitotoksik etki göstermediğini rapor etmişlerdir (Bolous ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında ise sentezlenen yeni pirolidin türevi moleküllerin HCT116 hücre hattına karşı sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi.

4.2.5. Zorunlu Yüzme Testi Bulgularının Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında *swiss albino* farelere ksilen (0,5 mg/kg) uygulamasıyla inflamasyon oluşturulan farelerde sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin antidepresan aktiviteleri zorunlu yüzme testi (ZYT) ile araştırıldı. Ksilen farelerin hareketsizlik süresini artırarak depresan benzeri etki gösterdi. Ksilen uygulanan ve tedavi edilen gruplardan, bileşik **6a**'nın 50-150 μM, bileşik **6b**'nin 150 μM, bileşik **8**'in 50-150 μM dozları depresyonu ifade eden hareketsizlik sürelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltarak, antidepresan etki gösterdikleri tespit edildi.

Malawska ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, sentezledikleri 4,4-difenil-1-[(4-fenilpiperazin-1-il)metil]pirolidin-2-on bileşiğini farelere uygulayarak zorunlu yüzme testinde depresyonu ifade eden hareketsizlik sürelerinin %24,3 oranında azaldığını ve potansiyel antidepresan benzeri etki gösterdiğini rapor etmişlerdi. Bu tez çalışmasında sentezlenen **6a** ve **8** nolu pirolidin türevi moleküllerin ise, dikkate değer oranda antidepresan aktivite gösterdikleri belirlendi (Şekil 4.7).

4.2.6. Fare COX-2 ELISA Testi Bulgularının Değerlendirilmesi

Bu tez çalışması kapsamında swiss albino farelere ksilen (0,5 mg/kg) uygulamasıyla inflamasyon oluşturulan farelere farklı konsantrasyonlarda sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin oral olarak uygulanmasıyla karaciğerlerindeki antiinflamatuvar aktiviteleri tespit etmek amacıyla siklooksijenaz-2 (COX-2) enzim seviyesi ELISA testi kullanılarak tespit edildi. Ksilen uygulanan ve tedavi edilen gruplardan, bileşik **6a** ve **6b**'nin 150 μM dozları farelerin karaciğerindeki COX-2 enzim seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaltarak, antiinflamatuvar etki

gösterdikleri tespit edildi. Deneysel veriler, ilgili tedavi gruplarının doza bağımlı bir şekilde antiinflamatuvar etki oluşturduklarını göstermektedir.

Son yıllarda Jan ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, N-sübstitüe pirolidin-2,5-dion türevlerini sentezleyerek antiinflamatuvar potansiyellerini COX-1, COX-2 ve 5-lipoksijenaz (5-LOX) enzim inhibisyonları gibi farklı *in vitro* deneylerle, farelerde karregenan kaynaklı pençe ödemi gibi *in vivo* deneylerle incelemişlerdir. Elde ettikleri bazı bileşiklerin docking çalışmalarında COX-2 seçiciliği gösterdiğini ve *in vivo* çalışmalarda ödemi azaltarak antiinflamatuvar aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, pirolidin ditiyokarbamatın hepatik iskemi ve reperfüzyon üzerindeki etkileri araştırılmıştır. İskemik koşullarda, karaciğerdeki COX-2 ekspresyonunun arttığı ve pirolidin ditiyokarbamat tedavisi ile bu ekspresyon seviyesinin azaldığını tespit ederek, pirolidin ditiyokarbamatın hepatoprotektif etkilere sahip olduğunu rapor etmişlerdir (Lee ve ark., 2008).

Yukarıda bahsedilen araştırmalardan farklı olarak ksilen ile karaciğer hasarı oluşturulması sonucunda sentezlenen yeni pirolidin türevi moleküllerden bazılarının antiinflamatuvar aktivite gösterdiği tespit edildi.

4.2.7. Fare SOD1 ELISA Testi Bulgularının Değerlendirilmesi

Bu tez çalışması kapsamında, ksilen ile inflamasyon oluşturulan *swiss albino* farelere farklı konsantrasyonlarda sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin uygulanmasıyla karaciğerlerindeki SOD1 enzim seviyesi ELISA yöntemiyle araştırılarak antioksidan aktiviteleri araştırıldı. Ksilen, SOD1 enzim seviyesini azaltarak oksidan etki gösterdi. **6a** nolu bileşiğin 150 µM dozunun SOD1 enzim seviyesini istatiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırarak antioksidan aktivite gösterdiği tespit edildi. **6b** ve **8** bileşiği ile tedavi edilen gruplarda ise doza bağımlı bir şekilde SOD1 enzim seviyesini arttırarak antioksidan aktivite gösterdikleri, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.

Tez kapsamında kullanılan pirolidin türevi bileşiklerin antioksidan kapasiteye sahip olduklarını gösteren birçok literatür mevcuttur (Zulfiqar ve ark., 2021; Rezai ve ark., 2018; Saurav ve ark., 2012). Sk ve arkadaşları (2010) pirolidin türevi bileşiklerin antioksidan kapasitesi üzerine yaptıkları bir araştırmada, spiro[tetralin-1,3′-pirolidin] türevi bileşikler sentezleyerek *swiss albino* farelerde kadmiyum (Cd) kaynaklı toksisiteye karşı inhibitör aktiviteleri açısından değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak sentezlenen bileşiklerle tedavi edilen grubun GST, SOD, CAT ve GSH seviyelerinin aktivitesinin arttığını tespit ederek antioksidan aktivitesi olduğunu rapor etmişlerdir.

Tez çalışması kapsamında sentezlenen yeni pirolidin türevi moleküllerden sadece **6a**'nın, karaciğer hasarı oluşturulan farelerin SOD seviyesini arttırarak antioksidan aktivite gösterdiği tespit edildi.

4.2.8. Moleküler Docking ve ADMET Bulgularının Değerlendirilmesi

Yeni moleküllerin COX-2 enzimiyle etkileşimlerinin araştırılması için yapılan docking çalışması ile moleküler seviyedeki açıklanamayan kısımların aydınlatılması ve olası etkileşim yönelimleri, uygulanılan yaklaşım ve algoritmalar temelinde bazı hesaplamalar gerçekleştirilerek araştırıldı. Bunun için, moleküllerin COX-2 enziminin aktif bölgesindeki bağlanma serbest enerjileri ve aminoasitler ile yaptıkları moleküler bağları ve kimyasal etkileşimleri belirlendi. Molekül **6a**, **6b** ve **8**'in bağlanma enerjileri sırasıyla -9,5, -8,9 ve -10,2 kcal/mol olarak bulundu ve referans ilaçla karşılaştırıldığında bu bileşiklerin referans ilaca yakın bağlanma enerjileri gösterdiği tespit edildi. Moleküler docking çalışmaları, yeni yaklaşım ve olasılıklar temelinde daha detaylı çalışmalar yapılarak daha da iyileştirilecektir.

Ayrıca moleküler docking çalışmalarına ek olarak, sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin insan bağırsak emilimi, kan beyin bariyeri geçirgenliği gibi ADME özelliklerinin ve toksisitelerinin tahmini için SwissADME, ADMETlab 3.0 ve ProTox 3.0 çevrimiçi sunucuları kullanıldı. Bir molekülün ilaç adayı olarak kabul edilebilmesi için gerekli olan Lipinski kurallarına göre bileşik **6a** ve **6b**'nin tamamen uyduğu, bileşik **8**'in ise bu kurallardan birine (MW ≤ 500 g/mol) uymadığı tespit edildi. Ayrıca, SwissADME verilerine göre bileşik **6a**, **6b** ve **8**'in LogS değerleri, referans ilaç olan Celecoxib ile karşılaştırıldığında daha düşük bulundu; bu da suda çözünürlüklerinin daha iyi olabileceği ve dolayısıyla vücut tarafından daha fazla emilimlerinin olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda bileşik **6a**, **6b** ve **8**'in insan bağırsak emilimi (HIA) özelliğine sahip oldukları tespit edildi; bu sayede potansiyel biyoaktif bileşiklerin hedeflenen tedavi bölgesine ulaşıp düşük dozlarda daha etkili olmasını sağlar (Hou ve Wang, 2008). Bunlara ek olarak, kan beyin bariyeri geçirgenliği SwissADME ve ADMETlab verileri incelendiğinde sonuçların farklı olduğu tespit edildi. Fakat her iki çevrimiçi sunucuda da bileşik **8**'in kan beyin bariyerini geçemediği görülmüş olup, bunun nedeninin moleküler ağırlığından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşikler ve referansların ProTox-III çevrimiçi sunucusu kullanılarak yapılan toksisite analiz verilerinde molekül **6a, 6b** ve **8'**in nefrotoksik ve molekül **8'**in nörotoksik olduğu tespit edildiğinden dolayı klinik kullanımda dikkat edilmesi gerekmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında sentezlenen yeni pirolidin türevi bileşiklerin total antioksidan kapasiteleri (DPPH), antibakteriyel, antifungal, antimikobakteriyel, antikanser (MTT), antioksidan (SOD1), antiinflamatuvar (COX-2) ve antidepresan aktiviteleri *in vivo, in vitro* ve *in silico* yöntemler kullanılarak incelendi.

Pirolidin türevi bileşiklerden, molekül **6a**'nın *M. tuberculosis* H37Rv suşuna karşı dikkate değer antimikobakteriyel aktiviteye sahip olduğu söylenebilir. Antibakteriyel aktivite çalışmalarında *A. baumannii* suşuna karşı tüm bileşikler ve *A. hydrophila* suşuna karşı özellikle molekül **6a**, antifungal aktivite çalışmalarında ise özellikle *C. albicans* suşuna karşı **6a** ve **6b** moleküllerinin dikkate değer derecede aktivite gösterdikleri tespit edildi. *A. baumannii* bakteri suşuna karşı ampisilin referans ilacından daha iyi antibakteriyel aktivite gösteren **6a** bileşiği ile ilgili potansiyel ilaç adayı olabilmesinden dolayı daha detaylı çalışmaların yapılarak patent alınması dahil ilaç adayı olabilme ihtimali olduğunu düşünmekteyiz.

HCT116 hücre hattına uygulanan pirolidin türevi bileşiklerin hücrelerin canlılığını azaltma kapasitesi 24 saat sonra artış gösterdi. Pirolidin türevi bileşikler, diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücre hattındaki hücrelerin canlılığını genel anlamda etkilemediğinden dolayı tedavide kullanılabilme potansiyelinin olabileceği söylenebilir. Hücre canlılığını azaltabilme mekanizmalarının nasıl gerçekleştiğini ve bu aktivitenin diğer hücre hatlarında da bulunup bulunmadığı daha ileriki çalışmalarla araştırılacaktır.

Ksilen ile inflamasyon indüklenen *Swiss albino* farelere uygulanan sentezlenen yeni bileşikler genel anlamda depresyonu ifade eden hareketsizlik sürelerini azaltarak antidepresan aktivite gösterdi. Sentezlenen yeni moleküllerin önemli derecede antidepresan aktivitelerinin olması, bu aktivite ile ilgili daha ileriki çalışmaların yapılması önem arz etmektedir.

İnflamasyon oluşturulan farelerin karaciğerlerinde COX-2 ve SOD1 enzim seviyeleri incelenerek, sentezlenen yeni pirolidin türevi hibrit bileşiklerden **6a**'nın antiinflamatuvar ve antioksidan, **6b**'nin ise sadece antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu belirlendi. En yüksek total antioksidan kapasiteye ise molekül **6a** sahip olup, doza bağımlı olarak antioksidan kapasitesinin arttığı tespit edildi. Bu tez çalışmasında elde edilen **8** nolu molekülün antiinflamatuvar aktivitesini, ve **8** ile **6b** nolu moleküllerin antioksidan aktivitesini kullandığımız konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde gözlemleyemedik. Kullandığımız konsantrasyonlardan daha yüksek konsantrasyonlar ve/veya daha uzun uygulama süreleri ile antiinflamatuvar ve antioksidan aktivitelerinin çalışılması gerekmektedir.

Yapılan *in silico* çalışmalarda ise, sentezlenen yeni pirolidin türevi moleküllerin COX-2 enzimine bağlanma enerjileri hesaplandı. Uygulanılan algoritmalar temelinde gerçekleştirilen hesaplamalarda, yeni yaklaşım ve olasılıklar temelinde daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiği belirlendi.

Yapılan ADME çalışmalarında **6a**, **6b** ve **8** (MW ≤ 500 g/mol hariç) bileşiklerinin genel anlamda Lipinski'nin kurallarına uyduğu tespit edildi. Toksisite çalışmalarında ise moleküllerin herhangi bir hepatotoksisite göstermediği gözlemlendi. Bununla birlikte, **6a, 6b** ve **8** nolu moleküllerin nefrotoksik olduğu tespit edilerek, ileriki çalışmalarda bu bileşiklerin böbrek üzerinde yaptığı etkileri incelemenin önem arz edeceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Abbas, S. Y., Al-Harbi, R. A., ve El-Sharief, M. A. S., 2020. Synthesis and anticancer activity of thiourea derivatives bearing a benzodioxole moiety with EGFR inhibitory activity, apoptosis assay and molecular docking study. European Journal of Medicinal Chemistry, 198, 112363.

Ahmad, A., Ullah, F., Sadiq, A., Ayaz, M., Rahim, H., Rashid, U., Ahmad, S., Jan, M., S., Ullah, R., Shahat, A., ve Mahmood, H. M., 2019. Pharmacological evaluation of aldehydic-pyrrolidinedione against HCT-116, MDA-MB231, NIH/3T3, MCF-7 cancer cell lines, antioxidant and enzyme inhibition studies. Drug Design, Development and Therapy, 4185-4194.

Ahmadi, R., ve Emami, S., 2022. Recent applications of vinyl sulfone motif in drug design and discovery. European Journal of Medicinal Chemistry, 234, 114255.

Aksöz, B. E., 2021. Molecular docking studies on some 4, 5-dihydro-1H-pyrazole derivatives as cyclooxygenase inhibitors. Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University, 45(3), 565-576

Al-Jasass, F. M., ve Al-Jasser, M. S., 2012. Chemical composition and fatty acid content of some spices and herbs under Saudi Arabia conditions. The scientific world journal, 2012.

Al-Massarani, S. M., El-Gamal, A. A., Al-Said, M. S., Abdel-Kader, M. S., Ashour, A. E., Kumar, A., Abdel-Mageed, W. M., Al-Rehaily, A. J., Ghabbour, H. A., ve Fun, H. K, 2016. Studies on the red sea sponge Haliclona sp. for its chemical and cytotoxic properties. Pharmacognosy Magazine, 12(46), 114.

Ambure, P., Kar, S., ve Roy, K., 2014. Pharmacophore mapping-based virtual screening followed by molecular docking studies in search of potential acetylcholinesterase inhibitors as anti Alzheimer's agents. Biosystems, 116, 10-20.

Anonim 1: https://go.drugbank.com/categories/DBCAT000663

Anonim 2: http://www.swissadme.ch/ (Erişim tarihi: 30.05.2024)

Anonim 3: https://admetlab3.scbdd.com/ (Erişim tarihi: 30.05.2024)

Anonim 4: https://tox.charite.de/protox3/ (Erişim tarihi: 30.05.2024)

Antypenko, L., Meyer, F., Kholodniak, O., Sadykova, Z., Jirásková, T., Troianova, A., Buhaiova, V., Cao, S., Kovalenko, S., Garbe, L. A., ve Steffens, K. G., 2019. Novel acyl thiourea derivatives: Synthesis, antifungal activity, gene toxicity, drug-like and molecular docking screening. Arch Pharm (Weinheim). Feb;352(2):e1800275. doi: 10.1002/ardp.201800275. PMID: 30589110.

Banoon, S. R., ve Ghasemian, A., 2021. The characters of graphene oxide nanoparticles and doxorubicin against HCT-116 colorectal cancer cells in vitro. Journal of Gastrointestinal Cancer, 1-5.

Belveren, S., Larranaga, O., Poyraz, S., Dondas, H. A., Ülger, M., Şahin, E., Ferrándiz-Saperas, M., Sansano, J. M., Retamosa, M. G., ve de Cozar, A., 2019. From bioactive pyrrolidino [3, 4-c] pyrrolidines to more bioactive pyrrolidino [3, 4-b] pyrrolidines via ring-opening/ring-closing promoted by sodium methoxide. Synthesis, 51(07), 1565-1577.

Belveren, S., Dondas, H. A., Ülger, M., Poyraz, S., García-Mingüens, E., Ferrandiz-Saperas, M., ve Sansano, J. M., 2017. Synthesis of highly functionalized 2-(pyrrolidin-1-yl) thiazole frameworks with interesting antibacterial and antimycobacterial activity. Tetrahedron, 73(48), 6718-6727.

Benedetto Tiz, D., Bagnoli, L., Rosati, O., Marini, F., Santi, C., ve Sancineto, L., 2022. FDA-Approved Small Molecules in 2022: Clinical Uses and Their Synthesis. Pharmaceutics, 14(11), 2538.

Bhat, A. A., Singh, I., Tandon, N., ve Tandon, R., 2023. Structure activity relationship (SAR) and anticancer activity of pyrrolidine derivatives: Recent developments and future prospects (A review). European Journal of Medicinal Chemistry, 246, 114954.

Bhat, A. A., Tandon, N., ve Tandon, R., 2022. Pyrrolidine derivatives as antibacterial agents, current status and future prospects: A patent review. Pharmaceutical Patent Analyst, 11(6), 187-198.

Bhat, C., ve Tilve, S. G., 2014. Recent advances in the synthesis of naturally occurring pyrrolidines, pyrrolizidines and indolizidine alkaloids using proline as a unique chiral synthon. RSC Advances, 4(11), 5405-5452.

Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., ve Pienta, K. J., 2023. Updating the Definition of Cancer. Molecular cancer research: MCR, 21(11), 1142–1147. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411

Can, A., Dao, D. T., Arad, M., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., & Gould, T. D., 2012. The mouse forced swim test. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (59), e3638.

Chen, C., 2010. COX-2's new role in inflammation. Nature chemical biology, 6(6), 401-402.

Cheng, X. C., Wang, Q., Fang, H., ve Xu, W. F., 2008. Advances in matrix metalloproteinase inhibitors based on pyrrolidine scaffold. Current medicinal chemistry, 15(4), 374-385.

Choubey, P. K., Tripathi, A., Sharma, P., ve Shrivastava, S. K., 2020. Design, synthesis, and multitargeted profiling of N-benzylpyrrolidine derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 28(22), 115721.

Daina, A., Michielin, O., ve Zoete, V. J. D. O. S., 2017. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. Sci Rep 7: 42717.

Dontha, S., 2016. A review on antioxidant methods. Asian J. Pharm. Clin. Res, 9(2), 14-32

Döndaş, H., Nural, Y., Duran, N., ve Kilner, C., 2006. Synthesis, crystal structure and antifungal/antibacterial activity of some novel highly functionalized benzoylaminocarbothioyl pyrrolidines. Turkish Journal of Chemistry, 30(5), 573-583.

El fadili, M., Er-rajy, M., Imtara, H., Kara, M., Zarougui, S., Altwaijry, N., Al kamaly, O., Al Sfouk A., ve Elhallaoui, M., 2022. 3D-QSAR, ADME-Tox in silico prediction and molecular docking studies for modeling the analgesic activity against neuropathic pain of novel NR2B-selective NMDA receptor antagonists. Processes, 10(8), 1462.

Er-Rajy, M., Faris, A., Zarougui, S., ve Elhallaoui, M., 2024. Design of potential anti cancer agents as COX-2 inhibitors, using 3D-QSAR modeling, molecular docking, oral bioavailability proprieties, and molecular dynamics simulation. Anti Cancer Drugs, 35(2), 117-128.

Faki, Y., ve Er, A., 2021. Different chemical structures and physiological/pathological roles of cyclooxygenases. Rambam Maimonides medical journal, 12(1).

Fried, E. I., ve Nesse, R. M., 2015. Depression sum-scores don't add up: why analyzing specific depression symptoms is essential. BMC medicine, 13, 1-11.

Gahlaut, A., ve Chhillar, A. K., 2013. Evaluation of antibacterial potential of plant extracts using resazurin based microtiter dilution assay. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(2), 372-376.

Girgis, A. S., Panda, S. S., Srour, A. M., Farag, H., Ismail, N. S., Elgendy, M., Abdel-Aziz, A. K., ve Katritzky, A. R., 2015a. Rational design, synthesis and molecular modeling studies of novel anti oncological alkaloids against melanoma. Organic ve Biomolecular Chemistry, 13(23), 6619-6633.

Girgis, A. S., Panda, S. S., Farag, I. A., El-Shabiny, A. M., Moustafa, A. M., Ismail, N. S., Pillai, G. G., Panda, C. S., Hall, C. D., ve Katritzky, A. R., 2015b. Synthesis, and QSAR analysis of anti oncological active spiro-alkaloids. Organic ve Biomolecular Chemistry, 13(6), 1741-1753.

GL, W., 2011. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes. Approved Standard M24-A2, 31(5).

Güzeldemirci, N. U., ve Küçükbasmacı, Ö., 2010. Synthesis and antimicrobial activity evaluation of new 1, 2, 4-triazoles and 1, 3, 4-thiadiazoles bearing imidazo [2, 1-b] thiazole moiety. European journal of medicinal chemistry, 45(1), 63-68.

Habib-Martin, Z. A., Hammad, H. M., Afifi, F. U., Zihlif, M., Al-Ameer, H. J., Saleh, M. M., Abaza, I. F., ve Nassar, Z. D., 2017. In vitro and in vivo evaluation of the antiangiogenic activities of Trigonella foenum-graecum extracts. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7(8), 732-738.

Haddad, S., Boudriga, S., Akhaja, T. N., Raval, J. P., Porzio, F., Soldera, A., Askri, M., Knorr, M., Rousselin, Y., Kubicki, M. M., ve Rajani, D., 2015. A strategic approach to the synthesis of functionalized spirooxindole pyrrolidine derivatives: in vitro antibacterial, antifungal, antimalarial and antitubercular studies. New journal of chemistry, 39(1), 520-528.

Hatai, B., ve Banerjee, S. K., 2019. Molecular docking interaction between superoxide dismutase (receptor) and phytochemicals (ligand) from Heliotropium indicum Linn for detection of potential phytoconstituents: New drug design for releasing oxidative stress condition/inflammation of osteoarthritis patients. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 8(2), 1700-1706.

Hou, T., ve Wang, J., 2008. Structure–ADME relationship: still a long way to go?. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 4(6), 759-770.

Iacopetta, D., Catalano, A., Ceramella, J., Barbarossa, A., Carocci, A., Fazio, A., La Torre, C., Caruso, A., Ponassi, M., Rosano, C., Franchini, C., ve Sinicropi, M. S., 2020. Synthesis, anticancer and antioxidant properties of new indole and pyranoindole derivatives. Bioorganic Chemistry, 105, 104440.

Islam, M. S., Al-Majid, A. M., El-Senduny, F. F., Badria, F. A., Rahman, A. M., Barakat, A., ve Elshaier, Y. A., 2020. Synthesis, anticancer activity, and molecular modeling of new halogenated spiro [pyrrolidine-thiazolo-oxindoles] derivatives. Applied Sciences, 10(6), 2170.

Islam, M. T., ve Mubarak, M. S., 2020. Pyrrolidine alkaloids and their promises in pharmacotherapy. Advances in Traditional Medicine, 20(1), 13-22.

Jan, M. S., Ahmad, S., Hussain, F., Ahmad, A., Mahmood, F., Rashid, U., Abid, O., Ullah, F., Ayaz, M., ve Sadiq, A., 2020. Design, synthesis, in-vitro, in-vivo and in-silico studies of pyrrolidine-2, 5-dione derivatives as multitarget anti-inflammatory agents. European Journal of Medicinal Chemistry, 186, 111863.

Jaturapatporn, D., Isaac, M. G. E. K. N., McCleery, J., ve Tabet, N., 2012. Aspirin, steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. Cochrane Database of Systematic Reviews, (2), CD006378, DOI: 10.1002/14651858.CD006378.pub2

Javan, M., Ahmadiani, A., Semnanian, S., ve Kamalinejad, M., 1997. Antinociceptive effects of Trigonella foenum-graecum leaves extract. Journal of ethnopharmacology, 58(2), 125-129.

Joy, P. P., Thomas, J., Mathew, S., ve Skaria, B. P., 2001. Medicinal Plants. Tropical Horticulture Vol. 2. Naya Prokash, Calcutta, pp. 449-632

Kaur, J., Utreja, D., Jain, N., ve Sharma, S., 2019. Recent developments in the synthesis and antimicrobial activity of indole and its derivatives. Current Organic Synthesis, 16(1), 17-37.

Kaushik, N. K., Kaushik, N., Attri, P., Kumar, N., Kim, C. H., Verma, A. K., ve Choi, E. H., 2013. Biomedical importance of indoles. Molecules, 18(6), 6620-6662.

Kayaalp, S. O., 2012. Kortikosterodler. Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 2. Cilt, 13.Basım., 1119-1146, Pelikan Yayıncılık Ltd Şti. Ankara.

Kedare, S. B., ve Singh, R. P., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of food science and technology, 48, 412-422.

Khan, E., Khan, S., Gul, Z., ve Muhammad, M., 2021. Medicinal importance, coordination chemistry with selected metals (cu, Ag, au) and Chemosensing of Thiourea derivatives. A review. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 51(8), 812-834.

Khursheed, R., Rizwani, G. H., Sultana, V., Ahmed, M., ve Kamil, A., 2014. Antidepressant effect and categorization of inhibitory activity of monoamine oxidase type A and B of ethanolic extract of seeds of Trigonella Foenum-Graecum Linn. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 27.

Kumar, J., Tyagi, P., Saini, A. K., Sharma, D., ve Kumar, V., 2023. Analytical Method Development for Evaluation of Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Thiourea-Based Antivirals through nLC/MS-MS. bioRxiv, 2023-06.

Kumar, N., Goel, N., Chand Yadav, T., ve Pruthi, V., 2017. Quantum chemical, ADMET and molecular docking studies of ferulic acid amide derivatives with a novel anticancer drug target. Medicinal Chemistry Research, 26, 1822-1834.

Kumar, R., 2023. Investigation of In-Vitro Method of Antiulcer Activity. Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology, 2(1), 264-267.

Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M. A., Prochilo, T., Quadri, A., Gatta, G., de Braud, F., ve Wils, J. 2010. Colon cancer. Critical reviews in oncology/hematology, 74(2), 106-133.

Lakhdar, S., Westermaier, M., Terrier, F., Goumont, R., Boubaker, T., Ofial, A. R., ve Mayr, H., 2006. Nucleophilic reactivities of indoles. The Journal of organic chemistry, 71(24), 9088-9095.

Lee, C. H., Kim, S. H., ve Lee, S. M., 2008. Effect of pyrrolidine dithiocarbamate on hepatic vascular stress gene expression during ischemia and reperfusion. European journal of pharmacology, 595(1-3), 100-107.

Li Petri, G., Raimondi, M. V., Spanò, V., Holl, R., Barraja, P., ve Montalbano, A., 2021. Pyrrolidine in drug discovery: a versatile scaffold for novel biologically active compounds. Topics in Current Chemistry, 379, 1-46.

Li, Z., Wang, X., Lin, Y., Wang, Y., Wu, S., Xia, K., Xu, C., Ma, H., Zheng, J., Luo, L., Zhu, F., He, S., ve Zhang, X., 2020. Design, synthesis, and evaluation of pyrrolidine based CXCR4 antagonists with in vivo anti tumor metastatic activity. European Journal of Medicinal Chemistry, 205, 112537.

Li, Z., Wang, B., Hou, J. Q., Huang, S. L., Ou, T. M., Tan, J. H., An, L. K., Li, D., Gu, L. Q, ve Huang, Z. S., 2013. 2-(2-indolyl-)-4 (3 H)-quinazolines derivates as new inhibitors of AChE: design, synthesis, biological evaluation and molecular modelling. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 28(3), 583-592.

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., ve Feeney, P. J., 2012. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Advanced drug delivery reviews, 64, 4-17.

Liu, X. C., Lai, D., Liu, Q. Z., Zhou, L., Liu, Q., ve Liu, Z. L., 2016. Bioactivities of a new pyrrolidine alkaloid from the root barks of Orixa japonica. *Molecules*, *21*(12), 1665.

Lu, T., Goh, A. W., Yu, M., Adams, J., Lam, F., Teo, T., ... ve Wang, S., 2014. Discovery of (E)-3-((Styrylsulfonyl) methyl) pyridine and (E)-2-((Styrylsulfonyl) methyl) pyridine derivatives as anticancer agents: synthesis, structure–activity relationships, and biological activities. Journal of Medicinal Chemistry, 57(6), 2275-2291.

Łukowska-Chojnacka, E., Kowalkowska, A., Gizińska, M., Koronkiewicz, M., ve Staniszewska, M., 2019. Synthesis of tetrazole derivatives bearing pyrrolidine scaffold and evaluation of their antifungal activity against Candida albicans. European journal of medicinal chemistry, 164, 106-120.

MahamadAlli Shaikh, T., ve Debebe, H., 2020. Synthesis and evaluation of antimicrobial activities of novel N-substituted indole derivatives. Journal of Chemistry, 2020, 1-9.

Majik, M. S., Naik, D., Bhat, C., Tilve, S., Tilvi, S., ve D'Souza, L., 2013. Synthesis of (R)-norbgugaine and its potential as quorum sensing inhibitor against Pseudomonas aeruginosa. Bioorganic ve medicinal chemistry letters, 23(8), 2353-2356.

Majik, M. S., Parameswaran, P. S., ve Tilve, S. G., 2008. A concise synthesis of (R)-Bgugaine, a pyrrolidine alkaloid from Arisarum vulgare. Journal of Chemical Research, 2008(3), 121-122.

Malawska, K., Rak, A., Gryzło, B., Sałat, K., Michałowska, M., Żmudzka, E., Lodarski, K., Malawska, B., ve Kulig, K., 2017. Search for new potential anticonvulsants with anxiolytic and antidepressant properties among derivatives of 4, 4-diphenylpyrrolidin-2-one. Pharmacological Reports, 69(1), 105-111.

Mertschenk, B., Knott, A., ve Bauer, W., 2000. Thiourea and thiourea derivatives. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 1-15.

Morcos, N. Y., Diab, M. R., Allah, A. A., & Borgsh, I. H. I. A., 2015. Acute health effects of chloroform and xylene in mice. J Environ Sci.

Maxwell, S. R., 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. Drugs, 49(3), 345-361

Mesci, S., Gül, M., ve Yıldırım, T., 2021. Investigation of antioxidant activity and effect on cell viability of pyrrolidine compounds in MCF-7 (breast cancer) and DLD-1 (colon cancer) cell lines. International Journal Of Biology And Chemistry, 14(1), 35-47.

Mizushina, Y., Xu, X., Asano, N., Kasai, N., Kato, A., Takemura, M., Asahara, H., Linn, S., Sugawara, F., Yoshida, H. ve Sakaguchi, K., 2003. The inhibitory action of pyrrolidine alkaloid, 1, 4-dideoxy-1, 4-imino-D-ribitol, on eukaryotic DNA polymerases. Biochemical and biophysical research communications, 304(1), 78-85.

Moneer, A. A., Mohammed, K. O., ve El-Nassan, H. B., 2016. Synthesis of novel substituted thiourea and benzimidazole derivatives containing a pyrazolone ring as anti-inflammatory agents. Chemical Biology ve Drug Design, 87(5), 784-793.

Moni, L., Banfi, L., Basso, A., Carcone, L., Rasparini, M., ve Riva, R., 2015. Ugi and Passerini reactions of biocatalytically derived chiral aldehydes: application to the synthesis of bicyclic pyrrolidines and of antiviral agent telaprevir. The Journal of organic chemistry, 80(7), 3411-3428.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods, 65(1-2), 55-63.

Naz, S., Zahoor, M., Umar, M. N., Alghamdi, S., Sahibzada, M. U. K., ve UlBari, W., 2020. Synthesis, characterization, and pharmacological evaluation of thiourea derivatives. Open Chemistry, 18(1), 764-777.

NCCLS, 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Nural, Y., Döndaş, H., Grigg, R., ve Şahin, E., 2011. Polysubstituted fused ring bicyclic thiohydantoins from aminocarbo-N-thioylpyrrolidines derived from azomethine ylide 1, 3-dipolar cycloadditions. Heterocycles, 83(9).

O'Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., ve Hutchison, G. R., 2011. Open Babel: An open chemical toolbox. Journal of cheminformatics, 3, 1-14.

Odusami, J. A., Ikhile, M. I., Izunobi, J. U., Olasupo, I. A., Osunsanmi, F. O., Opoku, A. R., Fotsing, M. C. D., Asekun, O. T., Familoni, O. B., ve Ndinteh, D. T., 2020. Synthesis of substituted N-(2′-nitrophenyl) pyrrolidine-2-carboxamides towards the design of proline-rich antimicrobial peptide mimics to eliminate bacterial resistance to antibiotics. Bioorganic Chemistry, 105, 104340.

Padmavathi, V., Lakshmi, T. R., Venkatesh, B. C., ve Mahesh, K., 2011. Synthesis and antimicrobial activity of a new class of sulfone linked bisheterocycles. International Journal of Organic Chemistry, 1(03), 78.

Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., ve Portaels, F., 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial agents and chemotherapy, 46(8), 2720-2722.

Parvizpour, A., Ahmadiani, A., Javan, M., ve Kamalinejad, M., 1999. A study on the site of antinociceptive effect of Trigonella Foenum-Graecum (TFG) leaves extract in phasic and tonic models of pain. Physiology and Pharmacology, 3(2), 193-199.

Parvizpur, A., Ahmadiani, A., ve Kamalinejad, M., 2004. Spinal serotonergic system is partially involved in antinociception induced by Trigonella foenum-graecum (TFG) leaf extract. Journal of ethnopharmacology, 95(1), 13-17.

Perveen, S., Fatima, N., Khan, M. A., Dar, A., Khan, K. M., Afza, N., ve Voelter, W., 2012. Antidepressant activity of carbamates and urea derivatives. Medicinal Chemistry Research, 21, 2709-2715.

Pesarico, A. P., Birmann, P. T., Pinto, R., Padilha, N. B., Lenardão, E. J., ve Savegnago, L., 2020. Short-and long-term repeated forced swim stress induce depressive-like phenotype in mice: effectiveness of 3-[(4-chlorophenyl) selanyl]-1-methyl-1h-indole. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 14, 564187.

Poyraz, S., Döndaş, H. A., Yamali, C., Belveren, S., Demir, Y., Aydınoglu, S., Döndaş, N., Y., Tok, T., T., Taş, S., Ülger, M., ve Sansano, J. M., 2024. Design, synthesis, biological evaluation and docking analysis of pyrrolidine-benzenesulfonamides as carbonic anhydrase or acetylcholinesterase inhibitors and antimicrobial agents. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 1-18.

Poyraz, S., Döndaş, H. A., Döndaş, N. Y., ve Sansano, J. M., 2023. Recent insights about pyrrolidine core skeletons in pharmacology. Frontiers in Pharmacology, 14, 1239658.

Poyraz, S., Döndaş, H. A., Sansano, J. M., Belveren, S., Yamali, C., Ülger, M., Döndas, N. Y., Sağlık, B. N., ve Pask, C. M., 2023. N-Benzoylthiourea-pyrrolidine carboxylic acid derivatives bearing an imidazole moiety: Synthesis, characterization, crystal structure, in vitro ChEs inhibition, and antituberculosis, antibacterial, antifungal studies. Journal of Molecular Structure, 1273, 134303.

Poyraz, S., Canacankatan, N., Belveren, S., Yetkin, D., Kibar, K., Ülger, M., Sansano, J. M., Özcelik, N. D., Yılmaz, Ş. N., ve Döndaş, H. A., 2018. Study of the anti (myco) bacterial and antitumor activities of prolinate and N-amidocarbothiolprolinate derivatives based on fused tetrahydropyrrolo [3, 4-c] pyrrole-1, 3 (2 H, 3a H)-dione, bearing an indole ring. Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly, 149, 2253-2263.

Poyraz, S., Belveren, S., Ülger, M., Şahin, E., ve Döndaş, H. A., 2017. Synthesis, characterization, crystal structure, and antituberculosis activity of some novel polysubstituted aminocarbothiol/thiohydantoin-pyrrolidine derivatives. Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly, 148, 2173-2182.

Qi, F., Li, A., Inagaki, Y., Gao, J., Li, J., Kokudo, N., Li, X. K., ve Tang, W., 2010. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemoor radio-therapy for cancer. Bioscience trends, 4(6).

Raimondi, M. V., Presentato, A., Li Petri, G., Buttacavoli, M., Ribaudo, A., De Caro, V., ... ve Cancemi, P., 2020. New synthetic nitro-pyrrolomycins as promising antibacterial and anticancer agents. Antibiotics, 9(6), 292.

Raimondi, M. V., Listro, R., Cusimano, M. G., La Franca, M., Faddetta, T., Gallo, G., ... ve Barone, G., 2019. Pyrrolomycins as antimicrobial agents. Microwave-assisted organic synthesis and insights into their antimicrobial mechanism of action. Bioorganic & medicinal chemistry, 27(5), 721-728.

Rao, V. S., ve Srinivas, K., 2011. Modern drug discovery process: An in silico approach. Journal of bioinformatics and sequence analysis, 2(5), 89-94.

Rauf, M. A., Zubair, S., ve Azhar, A., 2015. Ligand docking and binding site analysis with pymol and autodock/vina. International Journal of Basic and Applied Sciences, 4(2), 168.

Rezai, M., Bayrak, C., Taslimi, P., GÜLÇİN, İ., ve Menzek, A., 2018. The first synthesis and antioxidant and anticholinergic activities of 1-(4, 5-dihydroxybenzyl) pyrrolidin-2-one derivative bromophenols including natural products. Turkish journal of chemistry, 42(3), 808-825.

Salve, M. T., ve Jadhav, S. B., 2021. Synthesis, Characterization, and Evaluation of in vitro Antidiabetic Activity of Novel Pyrrolidine Sulphonamide Derivative. International Journal of Pharmaceutical Investigation, 11(4).

Sarikurkcu, C., Zengin, G., Aktümsek, A., Ceylan, O., ve Şanda, M. A., 2015. Onopordum Anatolıcum Tohumlarının Antıoksidan Aktiviteleri. Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi, (41), 89-96.

Saurav, K., ve Kannabiran, K., 2012. Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2, 4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine Streptomyces VITSVK5 spp. Saudi journal of biological sciences, 19(1), 81-86.

Sharma, S., ve Singh, S., 2023. The Biological and Pharmacological Potentials of Indole based Heterocycles. Letters in OrganicChemistry, 20(8), 711-729.

Sharma, V., Kumar, P., ve Pathak, D., 2010. Biological importance of the indole nucleus in recent years: a comprehensive review. Journal of Heterocyclic Chemistry, 47(3), 491-502.

Singh, S., Sharma, N., ve Chandra, R., 2022. The indole nucleus as a selective COX-2 inhibitor and anti inflammatory agent (2011–2022). Organic Chemistry Frontiers, 9(13), 3624-3639.

Sk, U. H., Sharma, A. K., Ghosh, S., ve Bhattacharya, S., 2010. Synthesis and biological evaluation of novel spiro 6-methoxytetralin-1, 3′-pyrrolidine based organoselenocyanates against cadmium-induced oxidative and hepatic damage in mice. European journal of medicinal chemistry, 45(8), 3265-3273.

Song, F., Bian, Y., Liu, J., Li, Z., Zhao, L., Fang, J., Lai, J., ve Zhou, M., 2021. Indole alkaloids, synthetic dimers and hybrids with potential in vivo anticancer activity. Current Topics in Medicinal Chemistry, 21(5), 377-403.

Sönmez, M., Celebi, M., ve Berber, I., 2010. Synthesis, spectroscopic and biological studies on the new symmetric Schiff base derived from 2, 6-diformyl-4-methylphenol with N-aminopyrimidine. European journal of medicinal chemistry, 45(5), 1935-1940.

Spano, V., Rocca, R., Barreca, M., Giallombardo, D., Montalbano, A., Carbone, A., ... ve Barraja, P., 2020. Pyrrolo [2′, 3′: 3, 4] cyclohepta [1, 2-d][1, 2] oxazoles, a new class of antimitotic agents active against multiple malignant cell types. Journal of Medicinal Chemistry, 63(20), 12023-12042.

Sundberg, R. J., Pearce, B. C., ve Laurino, J. P. (1986). Pyrrolidine-2, 3-dione, 1-allylpyrrolidine-2, 3-dione and 1-ethoxypyrrolidine-2, 3-dione. Journal of heterocyclic chemistry, 23(2), 537-539.

Yilmaz, Ş., Yoldas, O., Dumani, A., Guler, G., Ilgaz, S., Akbal, E., Oksuz, H., Celik, A., Yilmaz, B., 2020. Calcium hypochlorite on mouse embryonic fibroblast cells (NIH3T3) in vitro cytotoxicity and genotoxicity: MTT and comet assay. Molecular biology reports, 47, 5377-5383.

Tabti, K., Ahmad, I., Zafar, I., Sbai, A., Maghat, H., Bouachrine, M., ve Lakhlifi, T., 2023. Profiling the structural determinants of pyrrolidine derivative as gelatinases (MMP-2 and MMP-9) inhibitors using in silico approaches. Computational Biology and Chemistry, 104, 107855.

Tallei, T. E., Tumilaar, S. G., Niode, N. J., Kepel, B. J., Idroes, R., Effendi, Y., Sakib, S., A., ve Emran, T. B., 2020. Potential of plant bioactive compounds as SARS-CoV-2 main protease (M pro) and spike (S) glycoprotein inhibitors: a molecular docking study. Scientifica, 2020.

Tewari, A., Singh, R., ve Brar, J. K., 2024. Pharmacological and Therapeutic Properties of Fenugreek (Trigonella foenum-graecum) Seed: A Review. Journal of Phytopharmacology, 13(2), 97-104.

Tilekar, K., Upadhyay, N., Meyer-Almes, F. J., Loiodice, F., Anisimova, N. Y., Spirina, T. S., Sokolova, D. V., Smirnova, G. B., Choe, J. Y., Pokrovsky, V. S., Lavecchia, A., ve S Ramaa, C., 2020. Synthesis and biological evaluation of pyrazoline and pyrrolidine-2, 5-dione hybrids as potential antitumor Agents. ChemMedChem, 15(19), 1813-1825.

Toumi, A., Boudriga, S., Hamden, K., Sobeh, M., Cheurfa, M., Askri, M., Knorr, M., Strohmann, C. ve Brieger, L., 2021. Synthesis, antidiabetic activity and molecular docking study of rhodanine-substitued spirooxindole pyrrolidine derivatives as novel α-amylase inhibitors. Bioorganic Chemistry, 106, 104507.

Trivedi, M. H., Hollander, E., Nutt, D., ve Blier, P., 2008. Clinical evidence and potential neurobiological underpinnings of unresolved symptoms of depression. Journal of Clinical Psychiatry, 69(2), 246-258.

Vitaku, E., Smith, D. T., ve Njardarson, J. T., 2014. Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among US FDA approved pharmaceuticals: miniperspective. Journal of medicinal chemistry, 57(24), 10257-10274.

Vouldoukis, I., Conti, M., Krauss, P., Kamaté, C., Blazquez, S., Tefit, M., Mazier, D., Calenda, A., ve Dugas, B., 2004. Supplementation with gliadin-combined plant superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences and protects against oxidative stress. Phytotherapy Research, 18(12), 957-962.

Waghulde, S., Kale, M. K., ve Patil, V. R., 2018. In silico docking and drug design of herbal ligands for anticancer property. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 7(6S), 84-91.

Wang, Z., Wang, N., Chen, J., ve Shen, J., 2012. Emerging glycolysis targeting and drug discovery from chinese medicine in cancer therapy. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2012.

Wesołowska, A., Nikiforuk, A., Stachowicz, K., ve Tatarczyńska, E., 2006. Effect of the selective 5-HT7 receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. Neuropharmacology, 51(3), 578-586.

Wróbel, M. Z., Chodkowski, A., Herold, F., Marciniak, M., Dawidowski, M., Siwek, A., ... ve Turło, J., 2019. Synthesis and biological evaluation of new multi-target 3-(1H-indol-3-yl) pyrrolidine-2, 5-dione derivatives with potential antidepressant effect. European Journal of Medicinal Chemistry, 183, 111736.

Yadav, K., Rani, A., ve Dua, K., 2024. Potential Herbal Remedies for Treatment of Depression: A Mini Review. The Natural Products Journal, 14(6), 1-13.

Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A., & Doron, R., 2015. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. JoVE (Journal of Visualized Experiments), (97), e52587.

Yeşilkaynak, T., Demirdöğen, R. E., Muslu, H., ve Emen, F. M., 2023. Co (II), Ni (II), and Cu (II) metal complexes based on thiourea ligand: synthesis, characterization, thermal behaviors, anticancer, and antioxidant activities. Inorganic and Nano-Metal Chemistry, 53(1), 101-111.

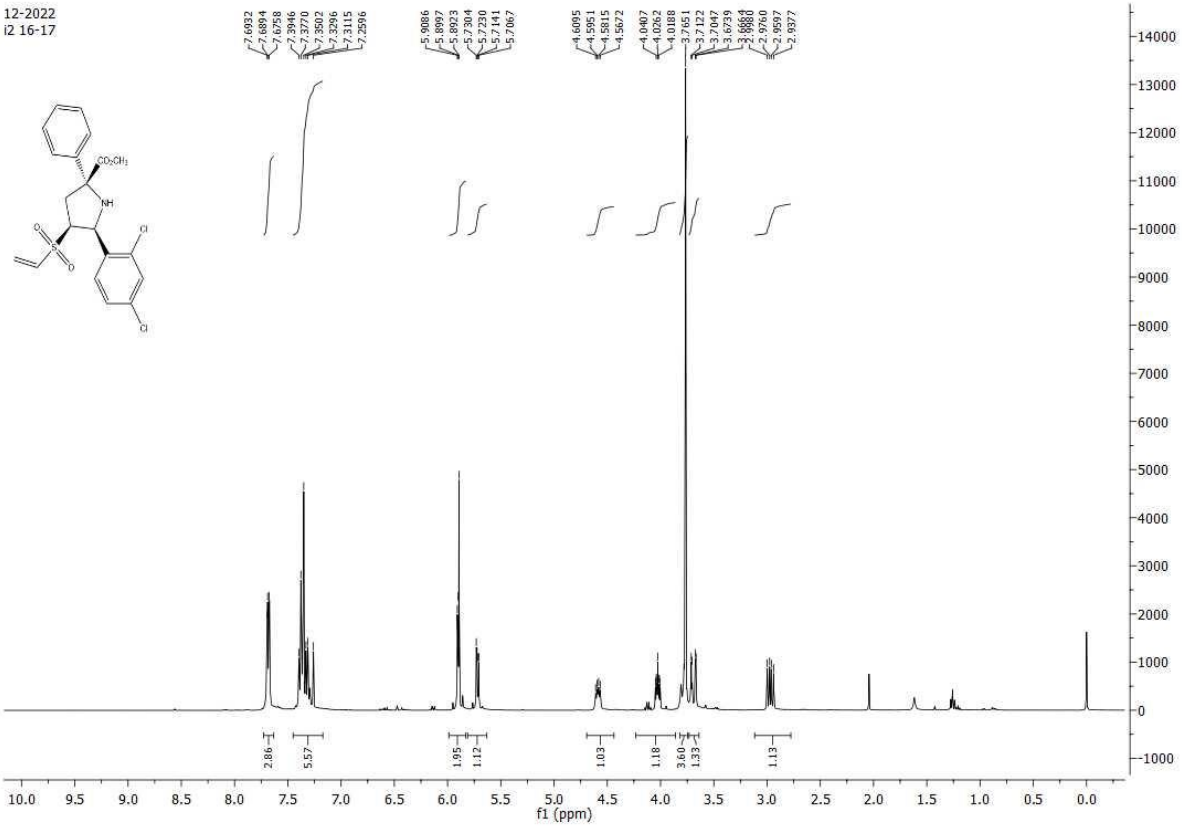
Zulfiqar, S., Haroon, M., Baig, M. W., Tariq, M., Ahmad, Z., Tahir, M. N., ve Akhtar, T., 2021. Synthesis, crystal structure, anti cancer, anti inflammatory anti oxidant and quantum chemical studies of 4-(pyrrolidine-2, 5-dione-1-yl) phenol. Journal of Molecular Structure, 1224, 129267.

ÖZGEÇMİŞ

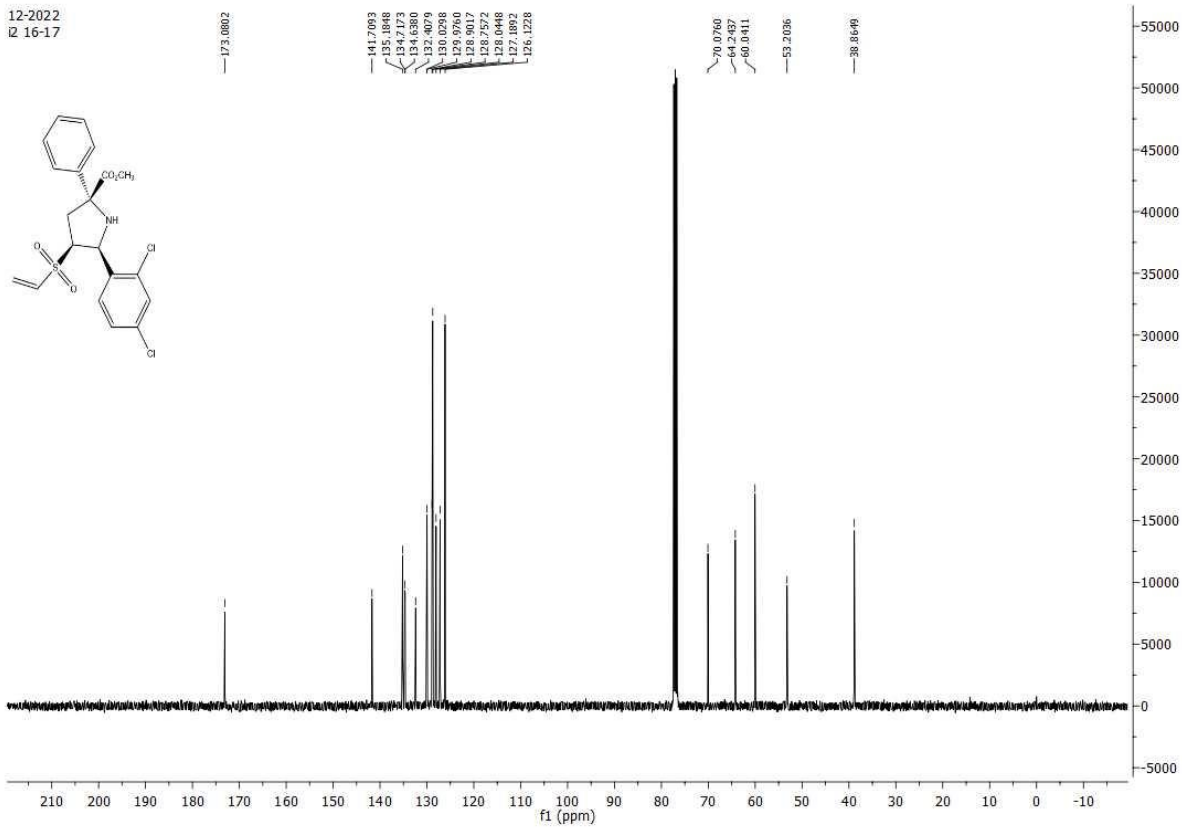
Senanur TAŞ, ilk, orta ve lise eğitimini Adana'da tamamladı. 2018 yılında Uludağ Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2021 yılında bölüm ikincisi olarak lisans eğitimini tamamladı. 2022 yılında Biyoteknoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. Araştırma alanları biyoteknoloji, organik kimya, farmasotik kimya, kimyasal sentez, fitoterapi, moleküler biyoloji vb. gibi çeşitli alanları kapsar.

EKLER

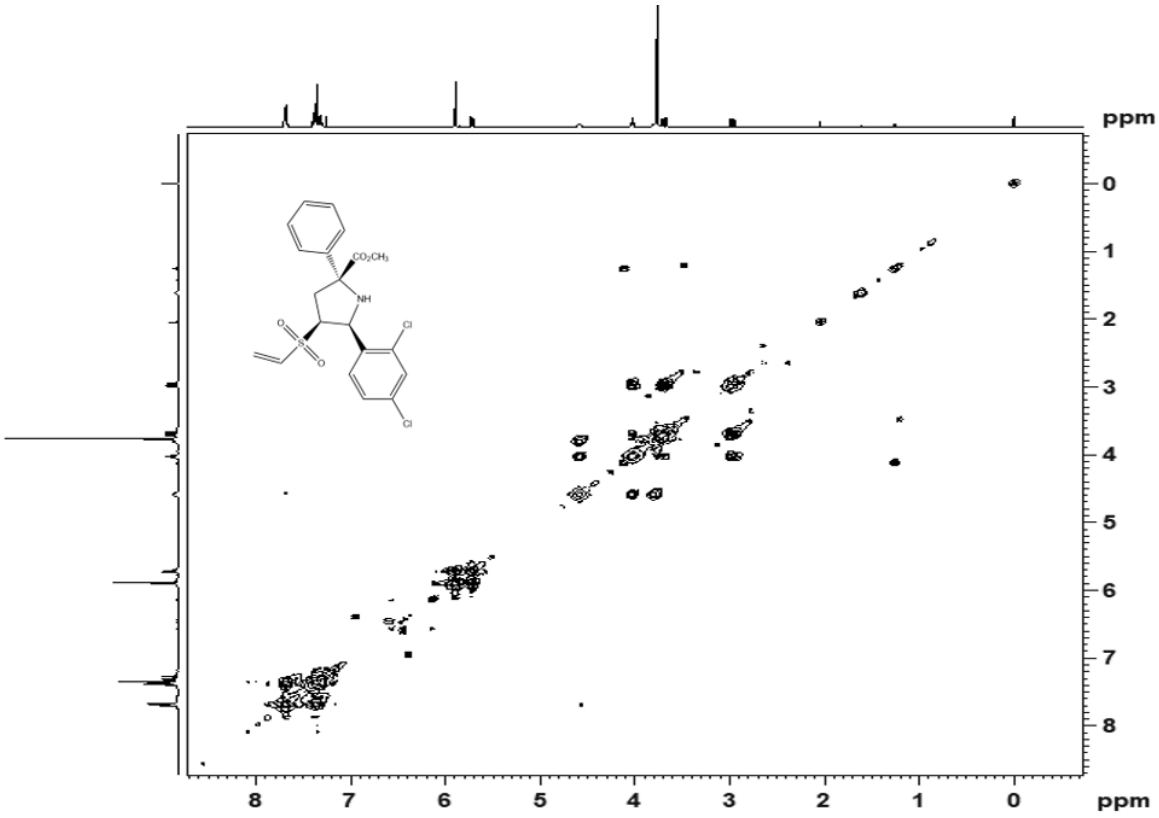
SENTEZLENEN BİLEŞİKLERİN SPEKTRUMLARI:



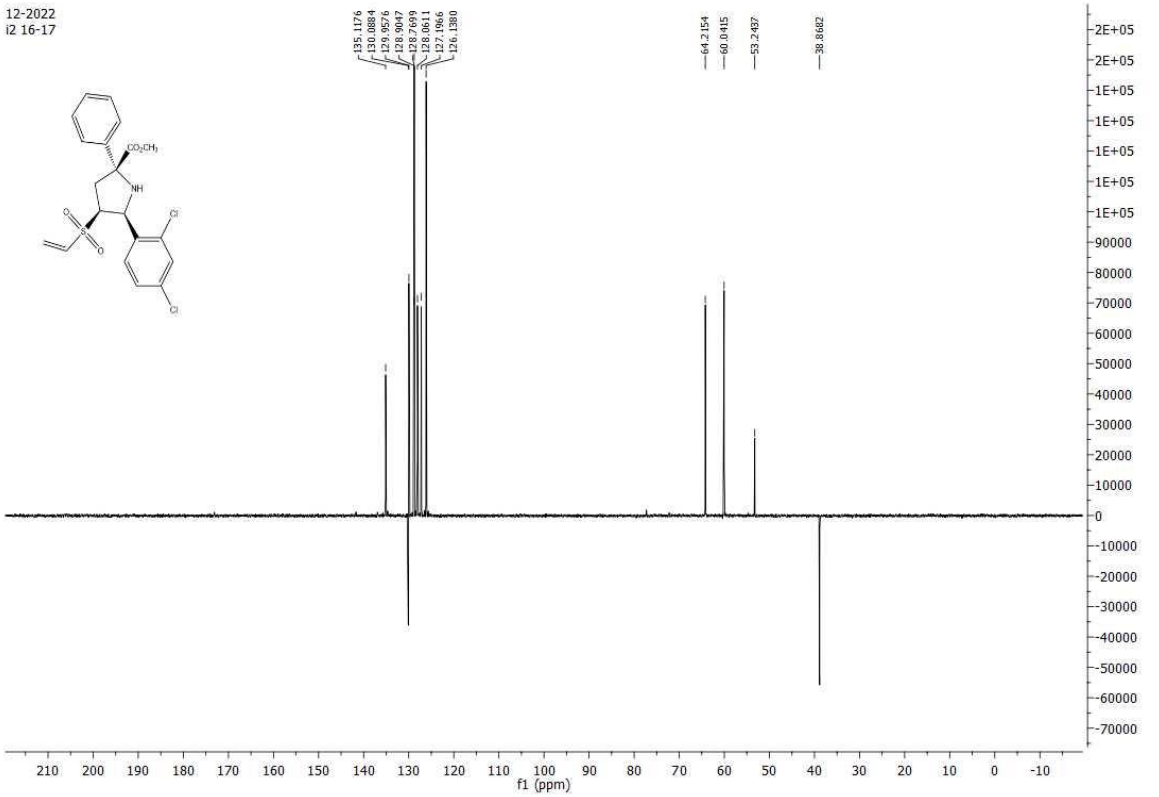
6a bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu



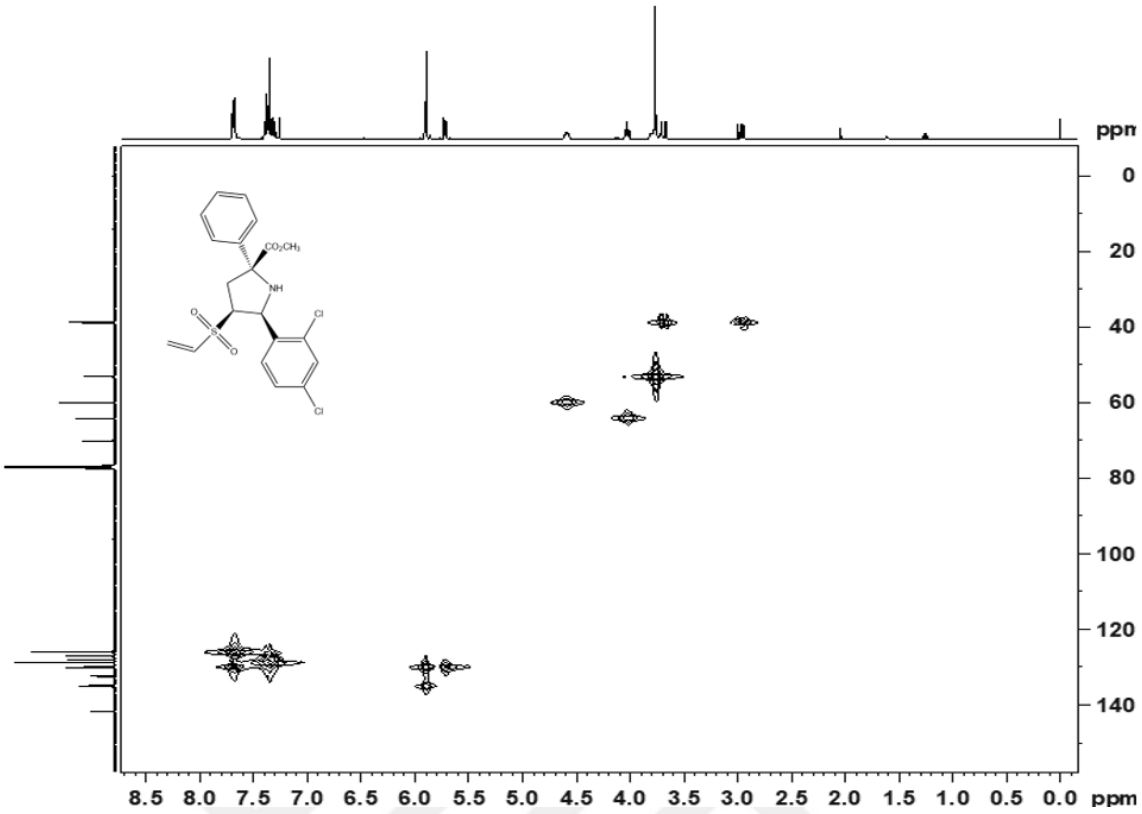
6a bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu



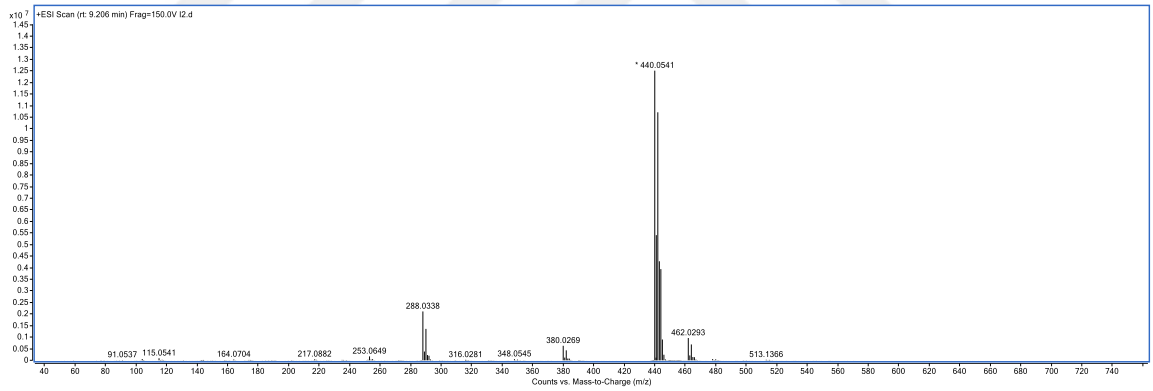
6a bileşiğinin ^{2}D-COSY spektrumu



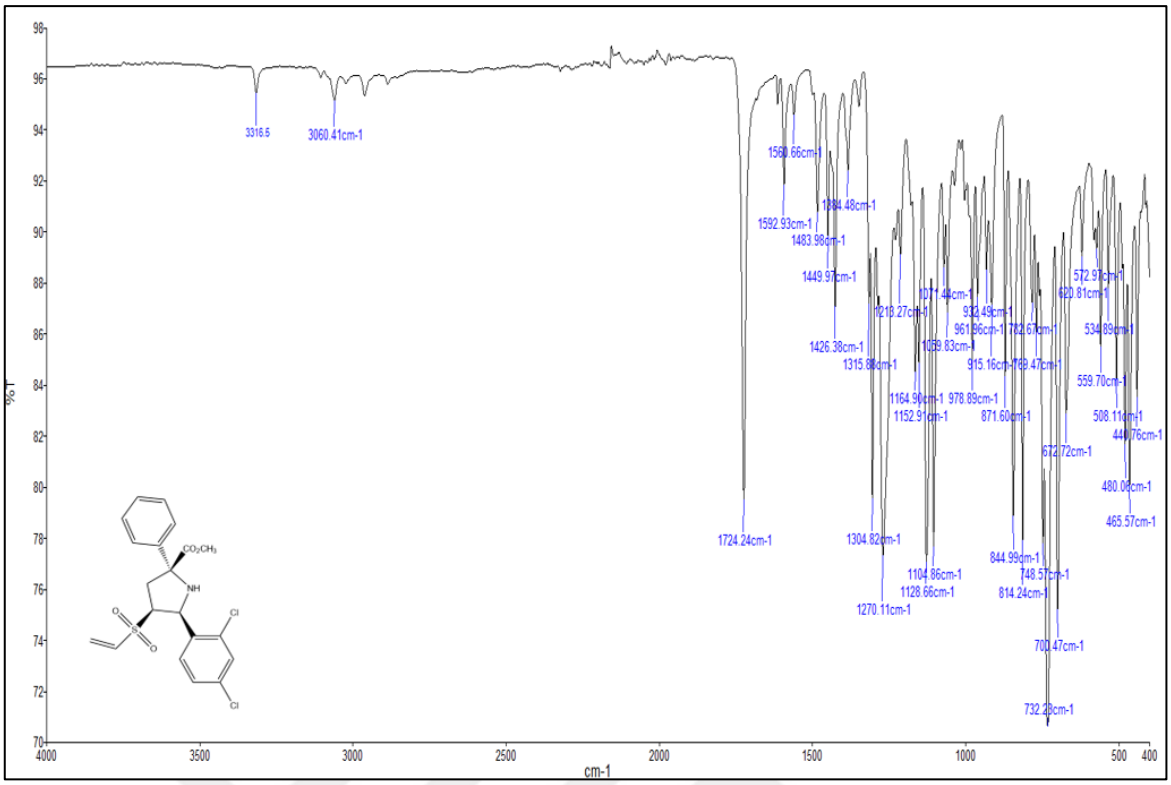
6a bileşiğinin DEPT spektrumu



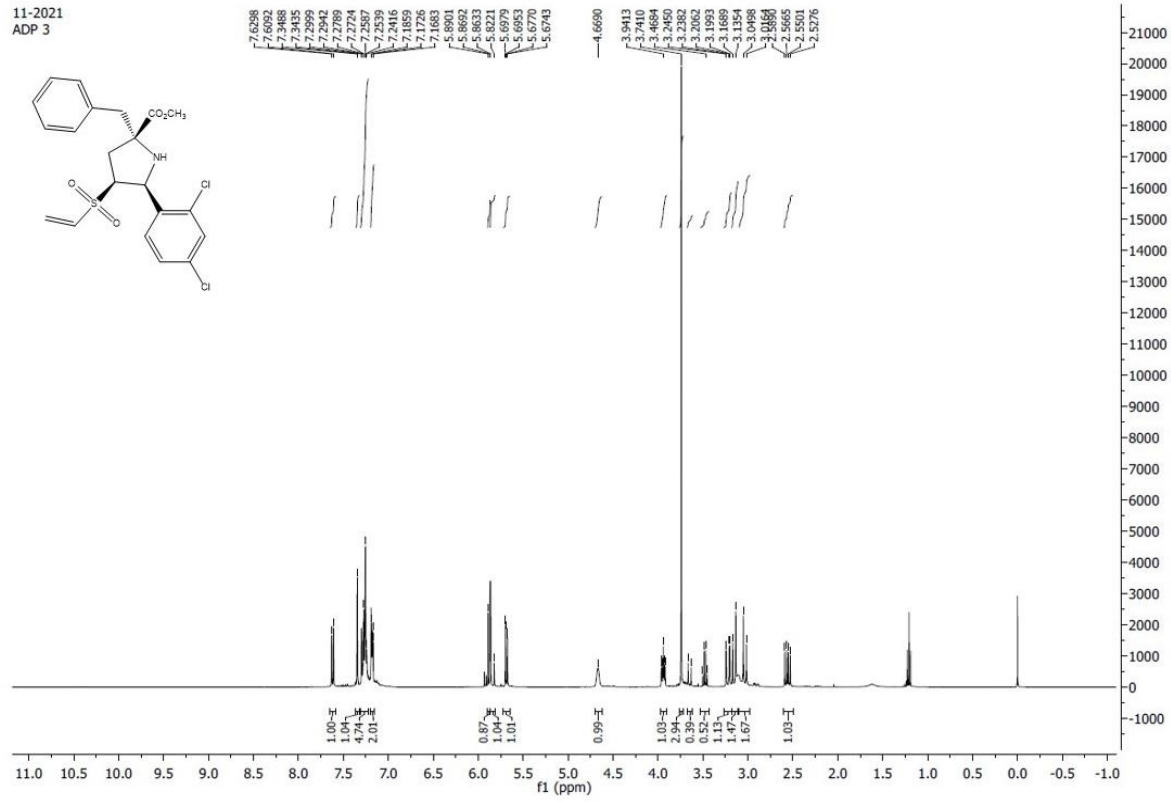
6a bileşiğinin HMQC spektrumu



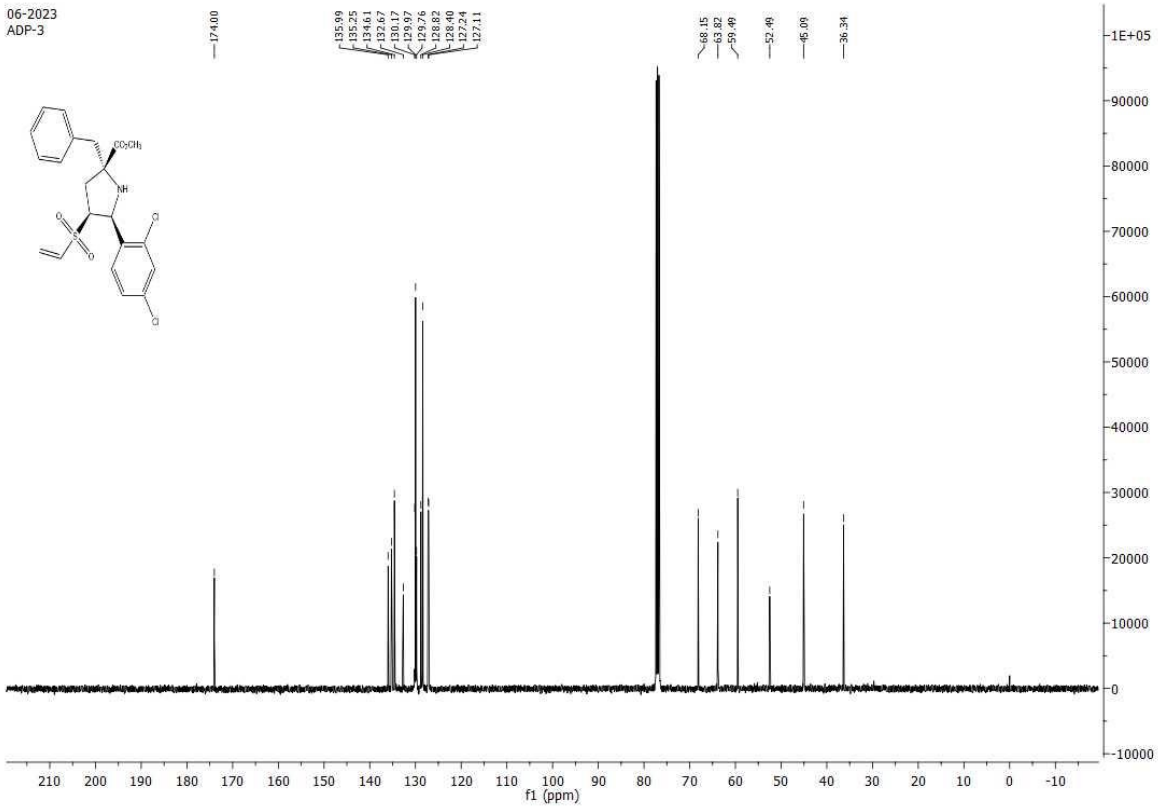
6a bileşiğinin MS spektrumu



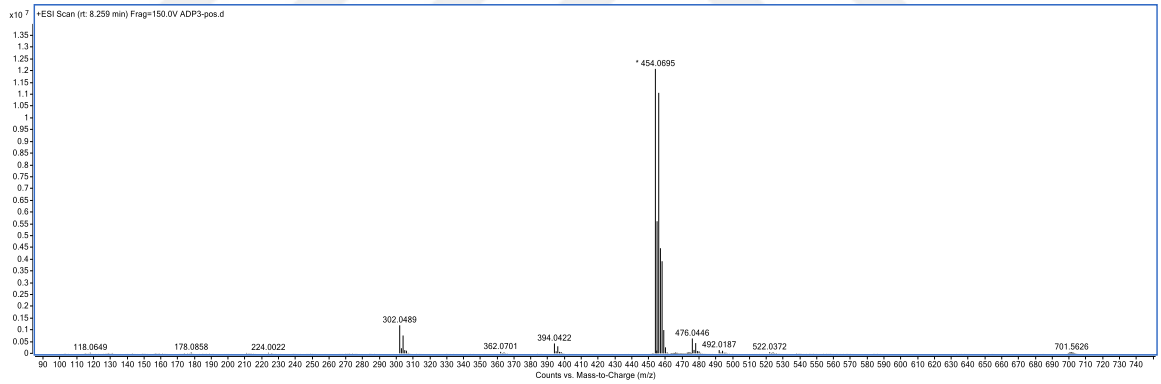
6a bileşiğinin FT-IR spektrumu



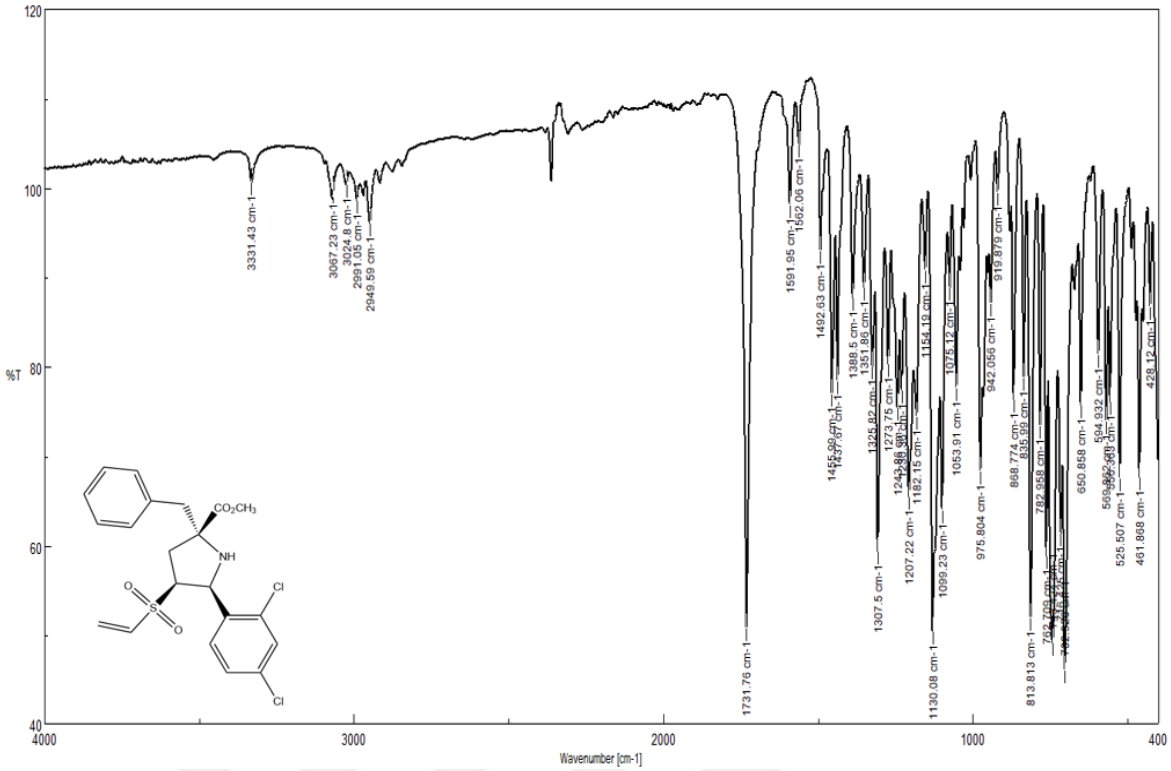
6b bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu



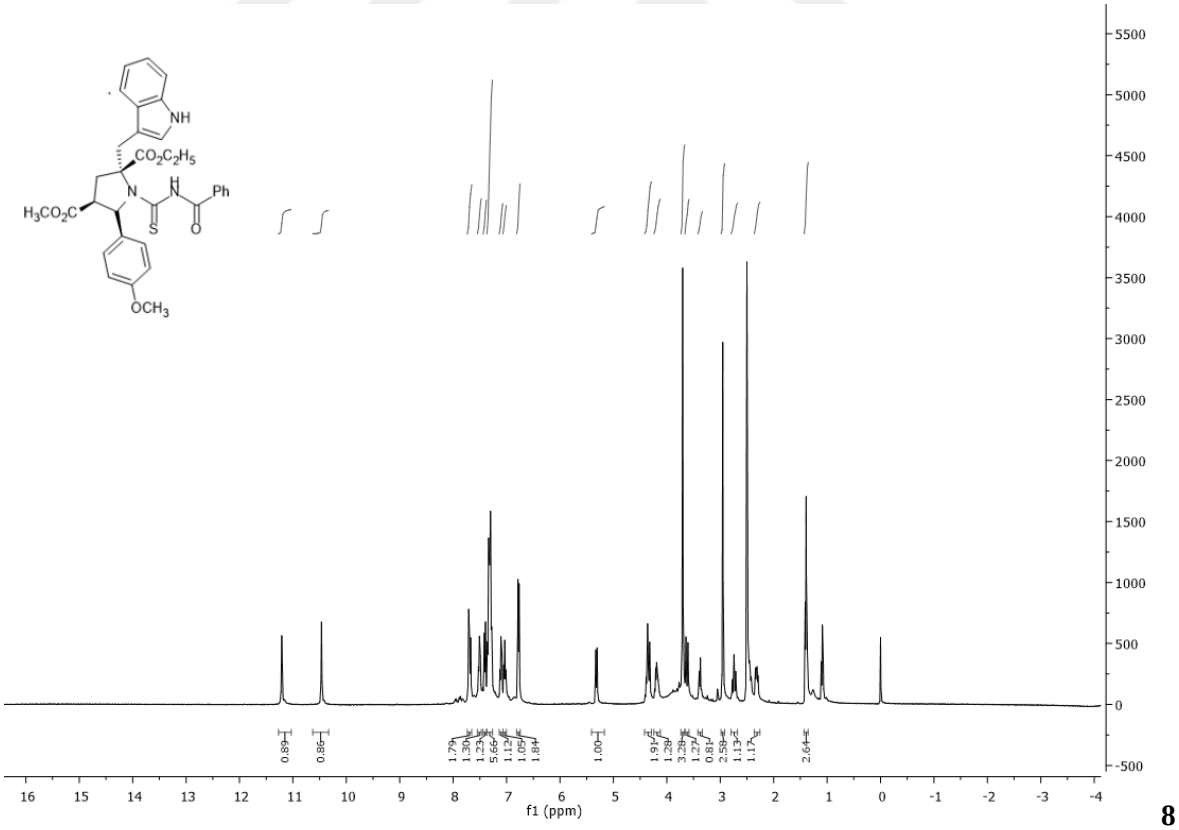
6b bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu



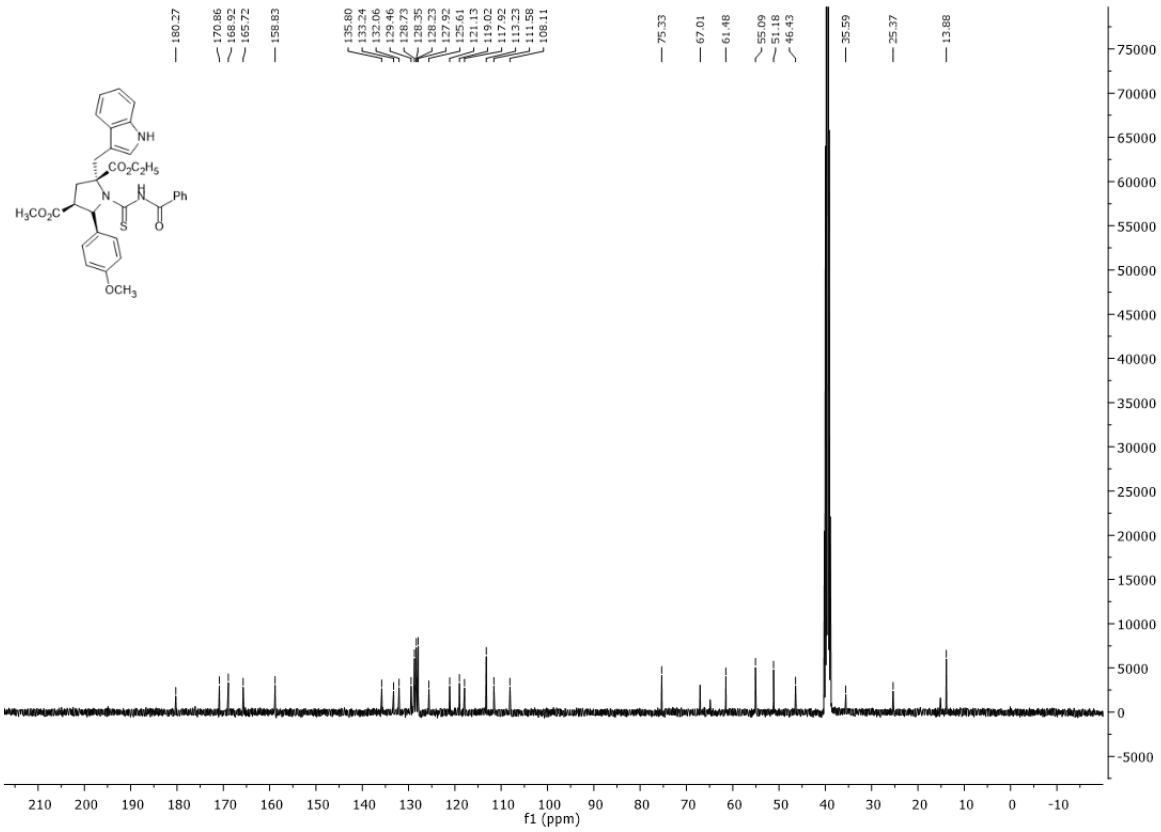
6b bileşiğinin MS spektrumu



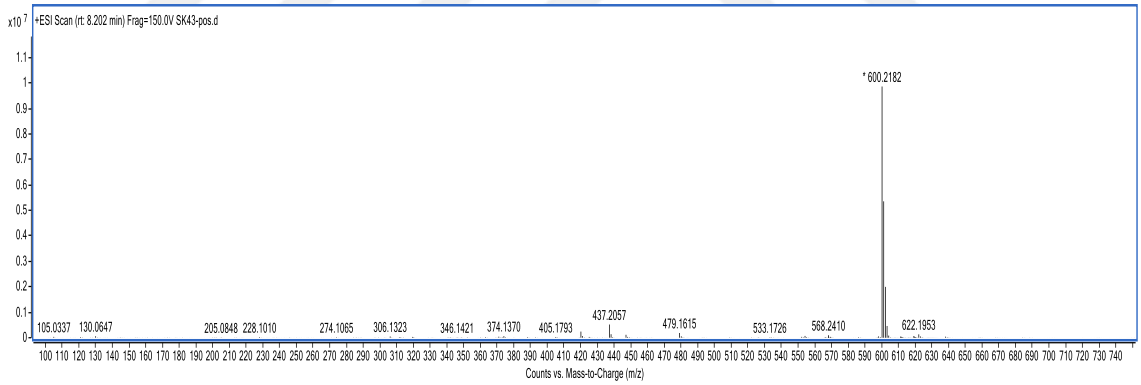
6b bileşiğinin FT-IR spektrumu



8 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu



8 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu



8 bileşiğinin MS spektrumu

6a bileşiğinin Tek Kristal X-Işını Kırınımı Verileri:

Ampirik Formül	$C_{20}H_{19}Cl_2NO_4S$
Molekül Ağırlığı	440.32
Sıcaklık/K	273.15
Kristal Sistem	monoclinic
Uzay grubu	$P2_1/c$
a/Å	15.892(6)
b/Å	10.714(5)
c/Å	12.004(6)
α/°	90
β/°	101.60(3)
γ/°	90
Hacim/Å^3	2002.2(15)
Z	4
$_{\rho calc}$g/cm3	1.461
μ/mm^{-1}	4.125
F(000)	912.0
Kristal Boyutu/mm^3	0.15 × 0.15 × 0.10
Radyasyon Işını	CuKα (λ = 1.54178)
Veri Toplama İçin 2Θ Aralığı/°	5.676 to 171.222
Indeks Aralıkları	$-20 \leq h \leq 20$, $-13 \leq k \leq 12$, $-15 \leq l \leq 15$
Toplanan Yansımalar	50560
Bağımsız Yansımalar	4357 [R_{int} = 0.0738, R_{sigma} = 0.0325]
Veriler/sınırlamalar/parameteler	4357/8/277
F^2'ye uygunluk	1.044
Son R indeksleri [I>=2σ (I)]	R_1 = 0.0455, wR_2 = 0.1055
Son R indeksleri [Bütün Veriler]	R_1 = 0.0655, wR_2 = 0.1187
En Büyük Pik/Boşluk/ e Å^{-3}	0.35/-0.37

6a bileşiğine ait atomik koordinatlar ve izotropik yer değiştirme parametreleri

Atom	**x**	**y**	**z**	**U(eq)**
Cl1	6316.9(5)	8928.5(7)	401.7(5)	60.2(2)
Cl2	4985.6(5)	11482.7(7)	3457.2(7)	65.0(2)
S1	8836.2(4)	8621.5(6)	3167.1(6)	46.34(18)
O1	8480.5(15)	5133(2)	4888.0(16)	66.4(6)
O2	9021.9(13)	3969(2)	3673.0(17)	67.2(6)
O3	8665.5(13)	8391.8(19)	4279.4(15)	57.8(5)
O4	9707.6(12)	8512(2)	3025(2)	72.3(6)
N1	7387.7(12)	6336.3(16)	3226.9(17)	35.8(4)
C1	7996.5(14)	5470(2)	2869.4(18)	35.9(5)
C2	8594.6(16)	6282(2)	2265(2)	42.5(5)
C3	8191.8(14)	7595(2)	2166.0(18)	36.3(5)
C4	7275.1(13)	7338.5(19)	2386.4(18)	32.9(4)
C5	7514.0(15)	4448(2)	2096.9(19)	38.6(5)
C6	6682.8(16)	4132(2)	2188(2)	48.7(6)
C7	6246(2)	3189(3)	1520(3)	64.4(8)
C8	6624(2)	2546(3)	767(3)	66.1(8)
C9	7455(2)	2830(3)	691(3)	64.6(8)
C10	7899.9(19)	3777(2)	1347(2)	53.0(6)
C11	8517.8(15)	4849(2)	3935(2)	41.5(5)
C12	9572(2)	3307(3)	4587(3)	71.9(9)
C13	6731.6(13)	8405.2(18)	2667.3(18)	32.9(4)
C14	6246.6(14)	9145(2)	1815.8(19)	37.3(5)
C15	5706.3(15)	10078(2)	2051(2)	43.8(5)
C16	5653.4(15)	10301(2)	3162(2)	43.2(5)
C17	6122.6(17)	9605(2)	4039(2)	46.2(6)
C18	6648.9(15)	8663(2)	3780(2)	40.5(5)
C19B	8430(15)	10143(13)	3060(20)	61(5)
C19A	8481(5)	10108(4)	2640(4)	53.7(14)
C20A	8139(3)	10875(4)	3266(4)	67.9(11)
C20B	8888(14)	10898(18)	2614(18)	102(6)

6a bileşiği için anizotropik yer değiştirme parametreleri ($Å2\times10^3$) anizotropik yerdeğiştirme parametre faktörü: $-2\pi^2[h^2a^{*2}U_{11}+2hka^*b^*U_{12}+\ldots]$.

Atom	**U_{11}**	**U_{22}**	**U_{33}**	**U_{23}**	**U_{13}**	**U_{12}**
Cl1	81.8(5)	61.4(4)	35.0(3)	4.0(3)	6.3(3)	24.2(3)
Cl2	53.3(4)	58.2(4)	86.1(5)	-7.7(3)	20.1(3)	21.0(3)
S1	39.5(3)	45.5(3)	52.1(4)	-1.8(3)	4.6(2)	-5.0(2)
O1	83.0(15)	74.3(13)	40.1(10)	7.8(9)	8.0(9)	22.4(11)
O2	63.3(12)	74.4(13)	58.3(12)	5.5(10)	-1.0(9)	37.8(11)
O3	58.3(11)	66.8(12)	43.0(10)	-4.8(9)	-2.8(8)	-3.6(9)
O4	37.0(10)	83.5(15)	96.6(17)	-11.6(12)	13.4(10)	-11.2(10)
N1	40.1(10)	31.9(9)	37.4(10)	3.3(7)	12.3(8)	5.0(7)
C1	36.5(11)	33.6(10)	38.5(11)	3.8(8)	9.9(9)	6.7(8)
C2	42.3(12)	40.6(12)	47.6(13)	2.7(10)	16.1(10)	4.2(9)
C3	37.8(11)	37.4(11)	34.4(10)	5.1(8)	9.2(9)	1.1(9)
C4	33.9(10)	31.3(10)	33.3(10)	0.9(8)	6.2(8)	1.4(8)
C5	40.5(12)	32.2(10)	41.8(12)	4.0(9)	5.0(9)	6.0(9)
C6	48.3(14)	38.6(12)	60.3(16)	2.6(11)	13.5(12)	-0.5(10)
C7	55.4(17)	44.9(14)	90(2)	0.8(14)	7.5(15)	-9.8(12)
C8	80(2)	41.1(14)	70.4(19)	-6.0(13)	-0.7(16)	-8.9(14)
C9	86(2)	45.2(14)	63.4(18)	-11.9(13)	17.3(16)	3.3(14)
C10	57.9(16)	47.7(14)	54.7(15)	-6.5(11)	14.1(12)	4.9(11)
C11	38.1(12)	39.8(11)	45.6(13)	6.5(10)	6.2(10)	2.6(9)
C12	54.5(17)	63.1(18)	86(2)	20.8(16)	-14.4(16)	15.3(14)
C13	32.7(10)	30.1(9)	35.8(10)	1.2(8)	6.6(8)	-0.5(8)
C14	38.3(11)	34.2(10)	38.0(11)	0.4(8)	4.0(9)	0.6(9)
C15	39.0(12)	38.4(11)	50.8(14)	4.2(10)	1.6(10)	5.0(9)
C16	36.0(11)	37.4(11)	57.4(14)	-1.9(10)	12.3(10)	4.3(9)
C17	53.8(14)	44.0(12)	44.5(13)	-1.4(10)	18.4(11)	5.5(10)
C18	45.2(12)	37.6(11)	39.6(12)	4.6(9)	10.2(10)	4.6(9)
C19B	67(9)	31(7)	84(16)	-6(8)	12(10)	14(6)
C19A	74(3)	43(2)	45(3)	-1.3(17)	12(2)	-15.4(19)
C20A	95(3)	42(2)	67(2)	-2.7(17)	15(2)	-7(2)
C20B	111(13)	67(10)	128(16)	23(10)	20(12)	-10(10)

6a bileşiği için bağ uzunlukları (Å)

Atom	**Atom**	**Length/Å**	**Atom**	**Atom**	**Length/Å**
Cl1	C14	1.739(2)	C3	C4	1.557(3)
Cl2	C16	1.734(2)	C4	C13	1.511(3)
S1	O3	1.436(2)	C5	C6	1.389(3)
S1	O4	1.434(2)	C5	C10	1.388(4)
S1	C3	1.791(2)	C6	C7	1.387(4)
S1	C19B	1.749(13)	C7	C8	1.368(5)
S1	C19A	1.763(5)	C8	C9	1.375(5)
O1	C11	1.197(3)	C9	C10	1.387(4)
O2	C11	1.315(3)	C13	C14	1.396(3)
O2	C12	1.444(3)	C13	C18	1.396(3)
N1	C1	1.466(3)	C14	C15	1.383(3)
N1	C4	1.459(3)	C15	C16	1.374(4)
C1	C2	1.570(3)	C16	C17	1.380(3)
C1	C5	1.536(3)	C17	C18	1.385(3)
C1	C11	1.530(3)	C19B	C20B	1.277(17)
C2	C3	1.540(3)	C19A	C20A	1.303(6)

6a bileşiği için bağ açıları (^{0})

Atom	Atom	Atom	Angle/˚	Atom	Atom	Atom	Angle/˚
O3	S1	C3	109.22(11)		C10	C5	C1	121.9(2)
O3	S1	C19B	95.2(7)		C10	C5	C6	118.4(2)
O3	S1	C19A	112.42(19)		C7	C6	C5	120.4(3)
O4	S1	O3	117.66(14)		C8	C7	C6	120.9(3)
O4	S1	C3	107.78(12)		C7	C8	C9	119.2(3)
O4	S1	C19B	114.8(7)		C8	C9	C10	120.7(3)
O4	S1	C19A	106.2(2)		C9	C10	C5	120.3(3)
C19B	S1	C3	111.8(8)		O1	C11	O2	124.1(2)
C19A	S1	C3	102.4(2)		O1	C11	C1	124.5(2)
C11	O2	C12	118.3(2)		O2	C11	C1	111.4(2)
C4	N1	C1	105.07(16)		C14	C13	C4	121.47(19)
N1	C1	C2	106.28(17)		C18	C13	C4	122.08(19)
N1	C1	C5	110.44(18)		C18	C13	C14	116.4(2)
N1	C1	C11	107.99(18)		C13	C14	Cl1	120.30(17)
C5	C1	C2	113.05(19)		C15	C14	Cl1	117.39(18)
C11	C1	C2	110.57(19)		C15	C14	C13	122.3(2)
C11	C1	C5	108.40(18)		C16	C15	C14	119.1(2)
C3	C2	C1	105.16(18)		C15	C16	Cl2	119.01(19)
C2	C3	S1	109.64(16)		C15	C16	C17	121.1(2)
C2	C3	C4	102.36(17)		C17	C16	Cl2	119.8(2)
C4	C3	S1	115.02(15)		C16	C17	C18	118.7(2)
N1	C4	C3	104.99(16)		C17	C18	C13	122.4(2)
N1	C4	C13	113.47(17)		C20B	C19B	S1	112.8(16)
C13	C4	C3	120.05(17)		C20A	C19A	S1	120.2(4)
C6	C5	C1	119.5(2)					

6a bileşiği için dönme açıları (0)

A	**B**	**C**	**D**	**Angle/°**	**A**	**B**	**C**	**D**	**Angle/°**
Cl1	C14	C15	C16	-178.08(18)	C3	C4	C13	C18	-100.5(2)
Cl2	C16	C17	C18	179.76(19)	C4	N1	C1	C2	30.5(2)
S1	C3	C4	N1	-83.72(18)	C4	N1	C1	C5	-92.5(2)
S1	C3	C4	C13	45.4(2)	C4	N1	C1	C11	149.15(18)
O3	S1	C3	C2	-77.93(18)	C4	C13	C14	Cl1	-4.8(3)
O3	S1	C3	C4	36.73(18)	C4	C13	C14	C15	176.1(2)
O3	S1	C19B	C20B	139.2(19)	C4	C13	C18	C17	-177.1(2)
O3	S1	C19A	C20A	2.6(6)	C5	C1	C2	C3	113.4(2)
O4	S1	C3	C2	50.97(19)	C5	C1	C11	O1	-126.5(3)
O4	S1	C3	C4	165.64(17)	C5	C1	C11	O2	54.3(3)
O4	S1	C19B	C20B	15(2)	C5	C6	C7	C8	0.4(4)
O4	S1	C19A	C20A	-127.4(5)	C6	C5	C10	C9	1.2(4)
N1	C1	C2	C3	-7.9(2)	C6	C7	C8	C9	1.2(5)
N1	C1	C5	C6	-25.6(3)	C7	C8	C9	C10	-1.7(5)
N1	C1	C5	C10	157.9(2)	C8	C9	C10	C5	0.5(5)
N1	C1	C11	O1	-6.8(3)	C10	C5	C6	C7	-1.6(4)
N1	C1	C11	O2	173.9(2)	C11	C1	C2	C3	-124.9(2)
N1	C4	C13	C14	-151.6(2)	C11	C1	C5	C6	92.5(2)
N1	C4	C13	C18	24.8(3)	C11	C1	C5	C10	-83.9(3)
C1	N1	C4	C3	-41.3(2)	C12	O2	C11	O1	-0.5(4)
C1	N1	C4	C13	-174.29(17)	C12	O2	C11	C1	178.8(2)
C1	C2	C3	S1	106.64(18)	C13	C14	C15	C16	1.1(3)
C1	C2	C3	C4	-15.9(2)	C14	C13	C18	C17	-0.5(3)
C1	C5	C6	C7	-178.2(2)	C14	C15	C16	Cl2	179.25(18)
C1	C5	C10	C9	177.7(2)	C14	C15	C16	C17	-0.6(4)
C2	C1	C5	C6	-144.5(2)	C15	C16	C17	C18	-0.4(4)
C2	C1	C5	C10	39.0(3)	C16	C17	C18	C13	1.0(4)
C2	C1	C11	O1	109.1(3)	C18	C13	C14	Cl1	178.62(17)
C2	C1	C11	O2	-70.2(3)	C18	C13	C14	C15	-0.5(3)
C2	C3	C4	N1	35.1(2)	C19B	S1	C3	C2	178.0(8)
C2	C3	C4	C13	164.24(19)	C19B	S1	C3	C4	-67.4(8)
C3	S1	C19B	C20B	-107.7(19)	C19A	S1	C3	C2	162.7(2)
C3	S1	C19A	C20A	119.7(5)	C19A	S1	C3	C4	-82.6(2)
C3	C4	C13	C14	83.1(3)					

6abileşiği için Hidrojen Atom Koordinatları ($Å \times 10^4$) ve Isotropik Yerdeğiştirme Parametreleri ($Å^2 \times 10^3$)

Atom	x	y	z	U(eq)
H2A	9175	6305	2714	51
H2B	8611	5948	1519	51
H3	8153	7916	1393	44
H4	6951	6971	1682	40
H6	6418	4556	2699	58
H7	5688	2990	1585	77
H8	6324	1925	312	79
H9	7721	2382	195	77
H10	8460	3963	1283	64
H12A	9998	2851	4291	108
H12B	9233	2737	4931	108
H12C	9849	3893	5147	108
H15	5383	10547	1466	53
H17	6086	9765	4789	55
H18	6958	8185	4370	49
H19B	7934	10378	3305	74
H19A	8537	10344	1914	64
H20A	8083	10640	3993	82
H20B	7953	11658	2986	82
H20C	9379	10613	2385	123
H20D	8730	11733	2517	123
H1	7635(18)	6600(20)	3890(20)	46(7)

6a bileşiği için atomik doluluk oranları

Atom	Occupancy	Atom	Occupancy	Atom	Occupancy
C19B	0.22	H19B	0.22	C19A	0.78
H19A	0.78	C20A	0.78	H20A	0.78
H20B	0.78	C20B	0.22	H20C	0.22
H20D	0.22				