

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YENİ FENOTİYAZİN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN
SENTEZ, YAPI AYDINLATILMALARI, ANTİKANSER
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ VE MOLEKÜLER
MODELLEME ÇALIŞMALARI**

Mehmet Murat KIŞLA

**FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Zeynep ATEŞ-ALAGÖZ

**Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun
116Z388 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2021

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Yeni Fenotiyazin Türevi Bileşiklerin Sentez, Yapı Aydınlatılmaları, Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi ve Moleküler Modelleme Çalışmaları” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak şahsım tarafımdan yazılmıştır. Tezde yer alan bileşiklerin sentezi ve moleküler doking çalışmaları tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler ve yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Mehmet Murat KIŞLA

Tarih: 18.01.2021

İmza:

KABUL VE ONAY



İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler Ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1.Fenotiyazin Türevlerinin Farmakolojik Etkileri	5
1.2.Fenotiyazin Türevlerinin Adlandırılması	6
1.3.Fenotiyazinin Fiziksel Özellikleri	7
1.4.Fenotiyazinin Kimyasal Özellikleri	8
1.4.1.Halkada Gerçekleşen Sübstitüsyon Reaksiyonları	9
1.4.2. Amino Hidrojeninin Sübstitüsyonu	13
1.4.3. Sülfid Köprüsünün Modifikasyonu	18
1.5. Fenotiyazinlerin Genel Sentez Yöntemleri	20
1.5.1. Bernthsen yöntemi ile	20
1.5.2. Difenilaminden hareketle	21
1.5.3. Smiles rearranjmanı ile	21
1.5.4. Schiff bazlarından hareketle	23
1.5.5. Ullmann tipi sentez ile	23
1.5.6. Ester türevi aracılığıyla	24
1.5.7. 10-Fenilfenotiyazin sentezi	24
1.6. Fenotiyazinlerin Hepatosellüler Karsinoma (HCC) Tedavisindeki Apoptotik Etkileri	25
1.7. Fenotiyazinlerin Yapı-Aktivite İlişkileri	28
1.8. Asetilkolinesterazlar ile Hepatosellüler Karsinoma Arasındaki İlişki	30
2. GEREÇ VE YÖNTEM	32
2.1. Sentez Edilen Maddelerin Analitik Kontrolünde Kullanılan Yöntemler	32
2.1.1. Kromatografik Analizler	32
2.1.2. Erime Noktası Tayinleri	32
2.1.3. Spektral Analizler	32
2.2. Tasarlanan Bileşiklerin Sentezi	33
2.2.1. Sentezlenen Ara Bileşikler için Genel Sentez Yöntemi	33
2.2.2. Sübstitüe Fenotiyazin 10-Karboksamitlerin Genel Sentez Yöntemi	34

2.2.3. Aromatik Amin Kullanılarak Sentezlenen Sübstitüe Fenotiyazin 10-Karboksamitlerin Genel Sentez Yöntemi	35
2.3. Sentezlenen Bileşiklerin Biyolojik Aktivite Çalışmaları	35
2.4. Moleküler Doking Analizleri	36
3. BULGULAR	37
3.1.Sentezlenen Sübstitüe Fenotiyazin 10-Karboksamitler ve Analiz Sonuçları	37
3.1.1. 2-((4-Fluorobenzil)amino)-1-(10 <i>H</i> -fenotiyazin-10-il)etanon (6)	37
3.1.2. 2-((3,4-Diklorobenzil)amino)-1-(10 <i>H</i> -fenotiyazin-10-il)etanon (7)	40
3.1.3. 2-((3,4-Difluorobenzil)amino)-1-(10 <i>H</i> -fenotiyazin-10-il)etanon (8)	43
3.1.4. 2-(Benzilamino)-1-(2-kloro-10 <i>H</i> -fenotiyazin-10-il)etanon (9)	45
3.1.5. 2-(Benzilamino)-1-(10 <i>H</i> -fenotiyazin-10-il)etanon (10)	48
3.1.6. 2-((4-Klorobenzil)amino)-1-(10 <i>H</i> -fenotiyazin-10-il)etanon (11)	51
3.1.7. 3-(Benzilamino)-1-(10 <i>H</i> -fenotiyazin-10-il)propan-1-on (12)	54
3.1.8. 3-((4-Klorobenzil)amino)-1-(10 <i>H</i> -fenotiyazin-10-il)propan-1-on (13)	57
3.1.9. 3-((4-Fluorobenzil)amino)-1-(10 <i>H</i> -fenotiyazin-10-il)propan-1-on (14)	60
3.1.10. 3-((3,4-Difluorobenzil)amino)-1-(10 <i>H</i> -fenotiyazin-10-il)propan-1-on (15)	63
3.2. Aromatik Amin Kullanılarak Sentezlenen Sübstitüe Fenotiyazin 10-Karboksamitler ve Analiz Sonuçları	65
3.2.1. 1-(10 <i>H</i> -Fenotiyazin-10-il)-2-(fenilamino)etan-1-on (16)	65
3.2.2. 1-(10 <i>H</i> -Fenotiyazin-10-il)-2-((4-(trifluorometil)fenil)amino)etan-1-on (17)	68
3.3. Sentezlenen Bileşiklerin Biyolojik Aktivite Tayin Sonuçları	70
3.4. Moleküler Doking Analizleri	72
3.4.1. Asetilkolinesteraz Enzimi ile Doking Analizleri	72
3.4.2. Bütirikolinesteraz Enzimi ile Doking Analizleri	78
4. TARTIŞMA	79
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	82
ÖZET	84
SUMMARY	85
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ	97

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmasında antikanser etkili olabilecek fenotiyazin türevi bileşiklerin sentezlenmesi, yapılarının aydınlatılması, moleküler doking çalışmalarının yapılması ve aktivitelerinin araştırılması planlanmıştır.

Yüksek lisans tezimin hazırlanması ve çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübesiyle bana her zaman yol gösteren, sorunlarımla yakından ilgilenen, her zaman, her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zeynep ATEŞ-ALAGÖZ'e tüm içtenliğimle saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülgün AYHAN KILCIĞİL'e ve sentezlediğim bileşiklerin ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve LC-MS analizlerini yapan Sayın Prof. Dr. Ali Hakan GÖKER'e

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her konuda destek ve yardımcı olan Sayın Dr. Fikriye ZENGİN-KARADAYI'ya,

Her zaman bilgi ve deneyimleriyle yardımcı olan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma ve çalışmalarım sırasında yanımda olan araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Çeşitli hücre hatlarındaki antikanser aktivite çalışmalarını yürüten Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Sayın Doç. Dr. Özlen KONU'ya ve Dr. Murat Yaman'a,

Son olarak mezuniyetimden itibaren yüksek lisans sürecimde sevgisini ve desteğini benden esirgemeyen eşim Uzm. Ecz. Cemile ŞAHİNER KIŞLA'ya sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK Proje No: 116Z388) tarafından desteklenmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AChE	Asetilkolinesteraz
Akt	Protein kinaz B
ATD	Alfa-1-antitripsin eksikliği
ATP	Adenozin trifosfat
ATZ	Antitripsin
BuChE	Butirilkolinesteraz
CaM	Kalmodulin
CHRNA7	Kolinerjik reseptör nikotinik alfa 7
CPZ	Klorpromazin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Dopamin reseptörü
cGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EMT	Epitelyal mezenkimal geçiş
ER	Östrojen reseptörü
ESI	Elektrospray İyonizasyon
EtOH	Etil alkol
FP	Flufenazin
HCC	Hepatosellüler karsinoma
HTC	Hepatoma doku kültürü
HUW	İluprin-W
IC ₅₀	İnhibisyon konsantrasyonu
IMP	İmipramin
İTK	İnce tabaka kromatografisi
LC-MS	Sıvı kromatografisi-Kütle Spektrofotometresi
MAPK	Mitojen ile aktive edilen protein kinaz
MeOH	Metanol
MPT	Mitokondriyal permeabilite geçişi
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PHT,PTZ	Fenotiyazin
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-kinaz
SFB	Sorafenib
SMP30	Senescens belirteci protein-30
TEA	Trietilamin
TFP	Trifluoperazin
TFPZ	Trifluopromazin
THF	Tetrahidrofur
THIO,TR	Tiyoridazin
TMS	Tetrametilsilan
TRAIL	Tumor nekrozis faktör ile ilişkili apoptoz-indükleyici ligand
Wnt	Wingless-related integration site
2D	İki boyutlu

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Ticari olarak kullanılan fenotiyazin türevlerinden bazıları	6
Şekil 1.2.	Fenotiyazin halka sisteminin <i>Chemical Abstracts</i> metoduna göre numaralandırılması	7
Şekil 1.3.	Fenotiyazin halka sisteminin <i>Beilstein</i> metoduna göre numaralandırılması	7
Şekil 1.4.	Metilen mavisi boyalarının kimyasal formülü ve IUPAC adlandırmaları	8
Şekil 1.5.	Fenotiyazinden hareketle 5-fenilfenotiyazin eldesi	8
Şekil 1.6.	Fenotiyazinden hareketle 3,7-dinitrofenotiyazin-5-oksit eldesi	9
Şekil 1.7.	Fenotiyazinden hareketle klorür sübstitüsyon reaksiyonu	11
Şekil 1.8.	Fenotiyazinden fenotiyazin-1-karboksilik asit eldesi	12
Şekil 1.9.	10-Etilfenotiyazinden hareketle 10-etilfenotiyazin-4-karboksilik asit eldesi	12
Şekil 1.10.	10-Etilfenotiyazinden hareketle asetilli fenotiyazin türevlerinin eldesi	13
Şekil 1.11.	Fenotiyazinden hareketle etil-10-fenotiyazinasetat eldesi	15
Şekil 1.12.	Fenotiyazinin 2-kloro-1-dimetilaminopropan ile alkilasyonu sonucu oluşan ürünler	16
Şekil 1.13.	10-(2-Dimetilamino-1-propil)-fenotiyazinden hareketle 10-formilfenotiyazin eldesi	16
Şekil 1.14.	Fenotiyazinden Cu katalizörlüğünde karbazol eldesi	19
Şekil 1.15.	Fenotiyazin 2-karboksilik asitten <i>m</i> -karboksidifenilamin eldesi.	20
Şekil 1.16.	Difenilaminden fenotiyazin eldesi	20
Şekil 1.17.	Fenotiyazinden aminoalkil halojenürler ile 10.konumdan sübstitüsyonu.	21
Şekil 1.18.	Difenilaminden alkilfenotiyazinlerin eldesi	21
Şekil 1.19.	Difenilaminden hareketle Lewis asidi katalizörlüğünde fenotiyazin eldesi	21
Şekil 1.20.	2-Kloronitrobenzen ile 2-aminobenzentiyolden fenotiyazin eldesi	22
Şekil 1.21.	Smiles rearanjmanı ile 2-klorofenotiyazinin eldesi	22
Şekil 1.22.	Schiff bazından hareketle 2-halofenotiyazin türevlerinin eldesi	23
Şekil 1.23.	Ullmann reaksiyonu ile fenotiyazin eldesi	23

Şekil 1.24.	Ullmann reaksiyonu ile 2-klorofenotiyazin eldesi	24
Şekil 1.25.	Fenotiyazinlerden 10-sübstitüe türevlerin eldesi	24
Şekil 1.26.	2,2'-Dibromofenilsülfid ve anilin ile 10-fenilfenotiyazin eldesi	25
Şekil 1.27.	2-[4-[3-[2-(Trifluorometil)fenotiyazin-10-il]propil]piperazin-1-il]etanol	25
Şekil 1.28.	3-(2-Klorofenotiyazin-10-il)- <i>N,N</i> -dimetilpropan-1-amin	26
Şekil 1.29.	10-[3-(4-Metilpiperazin-1-il)propil]-2-(trifluorometil)fenotiyazin	27
Şekil 1.30.	10-[2-(1-Metil-2-piperidil)etil]-2-metiltiyofenotiyazin, THIO	27
Şekil 1.31.	2-Asetoksi- <i>N,N,N</i> -trimetiletanaminyum klorür	30
Şekil 1.32.	AChE aktivitesi ile tümör ilişkisi	31
Şekil 2.1.	Sentezlenen fenotiyazin türevi bileşikler için genel reaksiyon şeması.	35
Şekil 3.1.	6 no'lu bileşiğin kütle spektrumu	38
Şekil 3.2.	6 no'lu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	38
Şekil 3.3.	6 no'lu bileşiğin ¹³ C NMR spektrumu	39
Şekil 3.4.	7 no'lu bileşiğin kütle spektrumu	41
Şekil 3.5.	7 no'lu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	41
Şekil 3.6.	7 no'lu bileşiğin ¹³ C NMR spektrumu	42
Şekil 3.7.	8 no'lu bileşiğin kütle spektrumu	44
Şekil 3.8.	8 no'lu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	44
Şekil 3.9.	9 no'lu bileşiğin kütle spektrumu	46
Şekil 3.10.	9 no'lu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	46
Şekil 3.11.	9 no'lu bileşiğin ¹³ C NMR spektrumu	47
Şekil 3.12.	10 no'lu bileşiğin kütle spektrumu	49
Şekil 3.13.	10 no'lu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	49
Şekil 3.14.	10 no'lu bileşiğin ¹³ C NMR spektrumu	50
Şekil 3.15.	11 no'lu bileşiğin kütle spektrumu	52
Şekil 3.16.	11 no'lu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	52
Şekil 3.17.	11 no'lu bileşiğin ¹³ C NMR spektrumu	53
Şekil 3.18.	12 no'lu bileşiğin kütle spektrumu	55
Şekil 3.19.	12 no'lu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	55
Şekil 3.20.	12 no'lu bileşiğin ¹³ C NMR spektrumu	56

Şekil 3.21.	13 no'lu bileşiğin kütle spektrumu	58
Şekil 3.22.	13 no'lu bileşiğin ^1H NMR spektrumu	58
Şekil 3.23.	13 no'lu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu	59
Şekil 3.24.	14 no'lu bileşiğin kütle spektrumu	61
Şekil 3.25.	14 no'lu bileşiğin ^1H NMR spektrumu	61
Şekil 3.26.	14 no'lu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu	62
Şekil 3.27.	15 no'lu bileşiğin kütle spektrumu	64
Şekil 3.28.	15 no'lu bileşiğin ^1H NMR spektrumu	64
Şekil 3.29.	16 no'lu bileşiğin kütle spektrumu	66
Şekil 3.30.	16 no'lu bileşiğin ^1H NMR spektrumu	66
Şekil 3.31.	16 no'lu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu	67
Şekil 3.32.	17 no'lu bileşiğin kütle spektrumu	69
Şekil 3.33.	17 no'lu bileşiğin ^1H NMR spektrumu	69
Şekil 3.34.	Sentezlenen fenotiyazin türevlerinin hücre hatlarındaki IC_{50} değerlerinden yola çıkarak yapılan R_1 bazlı karşılaştırmalı analizi (Mean IC_{50} = 47.94 μM)	71
Şekil 3.35.	Sentezlenen fenotiyazin türevlerinin hücre hatlarındaki IC_{50} değerlerinden yola çıkarak yapılan R_2 bazlı karşılaştırmalı analizi (Mean IC_{50} = 47.94 μM)	72
Şekil 3.36.	Huprin W ile AChE'nin bağlanma pozları	73
Şekil 3.37.	Ligandlar ve Huprin W' nin bağlanma bölgesinde çakıştırılmış pozları	73
Şekil 3.38.	Huprin W – AChE etkileşim profili (Glide score: -14.76)	73

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Sentezlenen fenotiyazin türevi ara bileşiklerinin kimyasal özellikleri	34
Çizelge 3.1.	24 saatlik türev uygulamaları nihayetinde Hep3B ve SkHep1 hatlarından elde edilen IC ₅₀ değerleri (μM).	70
Çizelge 3.2.	Test edilen ligandların iki-boyutlu etkileşim diyagramları	74
Çizelge 3.3.	AChE ligandları için QikProp ile hesaplanan moleküler özellikler	77



1. GİRİŞ

Kanser (neoplazm, malign tümör), anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi olarak tanımlanan ve herhangi bir organ veya dokuda başlayabilen geniş hastalıklar grubudur. Bu kontrolsüz büyüme sonucunda, vücudun diğer kısımlarına ve/veya uzaktaki organlara yayılma gösterme karakteristiğine ise metastaz adı verilir ve kanser kaynaklı ölümlerin majör sebebidir. Bunun yanı sıra, dünyadaki ölüm nedenleri arasında kanser ikinci sırada gelmektedir. Erkeklerde akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanserleri en yaygın görülmekle birlikte kadınlarda göğüs, kolorektal, akciğer, servikal ve tiroid kanserlerinin insidansı yüksektir.

Günümüzde, mevcut ilaçlar ve kombinasyonları ile kanser kemoterapisi yetersiz kalmakta ve birçok kanser türünde tedavi sağlanamamaktadır. Gelişmiş ülke insanların da en önemli sağlık sorunlarının başında kanser gelmektedir. Tek başına cerrahi veya radyasyonla tedavi başarısı % 20 iken, kemoterapi ile tedavi başarısı % 75'lere kadar ulaşmaktadır. Ancak bu gelişmelere karşın kanser hala kardiyovasküler sisteme ait hastalıklardan sonra ikinci en büyük ölüm nedenidir (Foye, 1995). Mevcut antikanser ilaçların çoğu düşük biyoyararlanım, toksisite ve ilaç direnci gibi istenmeyen yan etkiler göstermektedir. Yoğun araştırmalara rağmen etkili, selektif ve toksisitesi az antikanser ilaçların gelişimi mümkün olamamıştır.

Kemoterapi, tümör hücrelerini seçici olarak yok etmek veya çoğalmalarını sınırlamak amacıyla düşük moleküler ağırlıklı ilaçların kullanımına yönelmiştir. Sitotoksik etki gösteren ajanların yan etkilere arasında kemik iliği supresyonu, gastrointestinal lezyonlar, saç kaybı, mide bulantısı ve klinik direnç yer almaktadır. Bahsi geçen yan etkilerin oluşmasının temel nedeni, bu ajanların selektif etki göstermemesidir (Thurston, 2007). Kemoterapinin başlangıcı 1940'lı yıllarda kullanılmaya başlanan azot hardallarına dayandırılmaktadır. Bu türevler oldukça güçlü bir antimetabolit etkiye yol açmaktadırlar. Başlangıç olarak uygulanan bu yöntemin başarısına istinaden çok sayıda antikanser ajan geliştirilebilmiştir (Shewach ve Kushta,

2009). Bu ilaçlar etki mekanizmalarına göre DNA ile etkileşen ajanlar, antimetabolitler, anti-tübülün ajanlar, moleküler hedefleyici ajanlar, hormonlar, monoklonal antikorlar ve diğer biyolojik ajanlar olarak sınıflandırılmaktadır (Thurston, 2007).

Antikanser ilaçlardan antimetabolitlerin etki mekanizması vücuttaki temel biyosentez yolları ile ilişkilidir. Pürin ve pirimidinin yapısal analogları hücresel komponentlerin yerine geçerek nükleik asit sentezini bozarlar. Bu türevlere 5-fluorourasil ve merkaptopürin örnek olarak gösterilebilir. Metotreksat gibi diğer antimetabolitler ise metabolizmanın enzimatik işlemleri üzerinde etki gösterirler. DNA ile etkileşen ajanlar antikanser ilaçların en geniş ve en önemli kısmını oluşturur. Bu türevler etkilerini çeşitli mekanizmalar aracılığıyla göstermektedir. Alkilleyici türevler (dakarbazin, prokarbazin ve temozolamid), DNA bazlarının minör veya majör kıvrımlarının alkilenmesi şeklinde etki ederler. Çapraz bağlayıcı ajanlar DNA ile bağlanarak iplikler arası veya iplik içinde çapraz bağlanmalara yol açmaktadırlar. Bu grup ilaçların platin kompleksleri (cisplatin, karboplatin, oksaliplatin) ve azot hardalları (siklofosfamid, ifosfamid) olmak üzere iki alt grubu mevcuttur. İnterkalasyon ajanları baz çiftlerini birbirine bağlayarak etki gösterirler. Bu grup bileşikler, antrasiklinler (doksorubisin, epirubisin), mitoksantron ve aktinomisin-D' yi içermektedir. Topoisomera inhibitörleri irinotekan ve etopozid, DNA topolojisindeki enzimleri inhibe ederek etkilerini gösterirler. Blomisin gibi ajanlar DNA ile etkileşerek ipliklerin ayrılmasına neden olurlar. Antitübülün ajanlar mikrotübül dinamikleri ile etkileşerek hücre bölünmesini inhibe ederler ve hücre ölümüne yol açarlar. Bu sınıftaki bileşikler taksanlar ve vinka alkaloidlerini içerir (Thurston, 2007).

Günümüzde, kanser insidansının artmasıyla sitotoksik ilaçları içeren tedavi yaygınlaşmıştır. Yaşlanan ve kansere duyarlı hale gelen nüfusun artmasıyla ve yeni tedavilerin bulunmasıyla kanser ile ilgili eczacılık hizmetlerinin önümüzdeki 10 yılda iki katına çıkacağı öngörülmektedir (Hoppe-Tichy, 2010). Geliştirilen sitotoksik tedaviler daima klasik sitotoksik ajanlar ile kombine kullanılmaktadır (Nussbaumer ve ark., 2011).

Fenotiyazin türevi bileşikler, antipsikotik ilaçlar sınıfına dahil olmakla birlikte, son zamanlarda anti-proliferatif ve sitotoksik etkileri keşfedilmiştir. Bu kapsamda yapılan çalışmalar beyin, melanoma, meme ve akciğer kanserinde yoğunlaşmış olmakla birlikte, fenotiyazin türevlerinin hepatosellüler karsinoma (HCC) üzerindeki etkinlikleri ile ilgili çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Örneğin flufenazin, tiyoridazin ve perfenazinin glioma ve nöroblastoma hücre hatlarında doza bağımlı olarak DNA fragmentasyonuna neden olduğu bulgulanmıştır (Gil-Ad ve ark., 2004). Yapılan bir diğer çalışmada, tiyoridazinin B16 melanoma hücrelerindeki apoptozisi artırdığı görülmüştür (Gil-Ad ve ark., 2006). Akciğer kanseri hücrelerinde flufenazin-N-2-kloroetan'ın TRAIL ile indüklenen apoptozu desteklediği gösterilmiştir (Hwang ve ark., 2009). Flufenazin, klorpromazin ve trifluoperazinin anti-kanser etkinlikleri, protein gen ağ analizleri ile aydınlatılmış ve bu türevlerin gen/yolak olarak MAP kinaz, Wnt ve retinoik asit sinyallerini etkiledikleri bulgulanmıştır (Qi ve Ding, 2013).

Fenotiyazin türevleri söz konusu anti-kanser etkinliklerini yukarıdaki yollara ek olarak, kolinerjik sistem aracılığıyla da gösterebilmektedir. Son yıllarda, asetilkolinin kolinerjik sinapslardaki etkisinin yanı sıra hayatta kalma, farklılaşma ve proliferasyondaki etkisi açığa çıkmıştır. Bu kolinerjik operatör ile birlikte çok sayıda proteinin tümörjenezisteki önemi son günlerde artmıştır (Tata, 2008; Catassi ve ark., 2008). Pérez-Aguilar ve ekibi tarafından yapılan çalışmanın sonucunda hepatosellüler karsinom ile ilişkili hücre hatlarında (HID, Huh-7 ve HepG2) AChE düzeyinde artışa karşılık AChE aktivitesinde azalma görülmüştür (Pérez-Aguilar ve ark., 2015). Bu bulgulardan yola çıkarak AChE'nin tümör baskılayıcı olduğu ve HCC'de prognostik marker olarak kullanılabileceği kanıtlanmıştır (Zhao ve ark., 2011).

Yukarıdaki çalışmalara ek olarak, flufenazin ve pirimidin analogunun ise ilaç direncine karşı etkili olduğu bulgulanmıştır (Cieslik-Boczula vd., 2014). Ayrıca amin ve metilamin substitüentlerinin asetilkolin ile indüklenen akımı farklı dozlarda etkiledikleri gözlenmiştir. Bu bulgular, amin ve alkilamin substitüentlerinin Ach modülasyonu üzerindeki etkisini kanıtlamaktadır (Sadek ve ark., 2012). Flufenazinin μM 'lük konsantrasyonlarda karbakol ile aktive olan potasyum akımını engellediği gösterilmiştir (Okada ve ark., 2013). Ashoor ve arkadaşları ise flufenazinin $10 \mu\text{M}$ 'lık

bir dozda CHRNA7 reseptör ligand bağlanmasını engelleyebildiğini göstermiştir (Ashoor ve ark., 2011). Darvesh ve ekibi, yeni sentezlenen fenotiyazin türevlerinin farklı nörotransmitter reseptörleri (dopamin, serotonin, histamin, muskarik) ile etkileşebileceğini gösterdiği gibi asetilkolini metabolize eden kolinesteraz aktivitesini de bloke edebildiğini göstermiştir (Darvesh ve ark., 2013). Yukarıdaki çalışmalar, fenotiyazin içeren yeni ilaç moleküllerinin tasarımı, tanımlanması ve antikanser etkilerinin çeşitli süstitüsyonlar ile artırılmasının mümkün olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında antikanser etkinlikleri olduğu ispatlanan fenotiyazin türevi bileşiklerin yeni türevlerinin tasarımı ve sentezlenmesi amaçlanmıştır. Tasarlanan bileşiklerin bazılarında, fenotiyazin halkasındaki -Cl korunmuştur. Zyt ve arkadaşlarının 2014 makalesinde (Zyt ve ark., 2014) kullanılan sentez yöntemi esas alınarak yeni bileşikler türevlendirilmiştir. Kolinerjik reseptör ve sinyallerin kanserle olan alakası bilindiğinden (Egleton ve ark., 2008) biyolojik aktivite ve moleküler doking analizlerinde rasyonel olarak AChE enzimi seçilmiştir. Darvesh ve arkadaşları ise fenotiyazinin 10-karbonil türevlerinin etkili kolinesteraz inhibitörü olduğunu göstermiştir. Fenotiyazin halkası ile aminli yapılar arasındaki uzaklıkta 1, ve 2 karbon uzaklık olacak şekilde yeni türevlerin sentezi planlanmış ve aradaki karbon uzaklığının aktiveyi ne yönde etkileyeceği de araştırılmıştır. Flufenazinde bulunan piperazin halkası yerine başka amin grubu içeren alifatik ya da flufenazin ve tiyridazin moleküllerinde var olan -F, -Cl, ve -CF₃ gruplarını içeren aromatik halkalar getirilmiştir.

Tasarlanan bileşiklerin yapı-aktivite ilişkilerini aydınlatmak amacıyla moleküler doking analizleri yürütülmüş ve farmakokinetik profillerini etkileyen fizikokimyasal özellikleri hesaplanmıştır. Elde edilen verilerin anti-IICC etkili fenotiyazinlerin AChE ile etkileşiminde rol oynayan kriterleri aydınlatacağını ve yeni türevlerin tasarlanmasında bir kilometre taşı olacağını düşünmekteyiz.

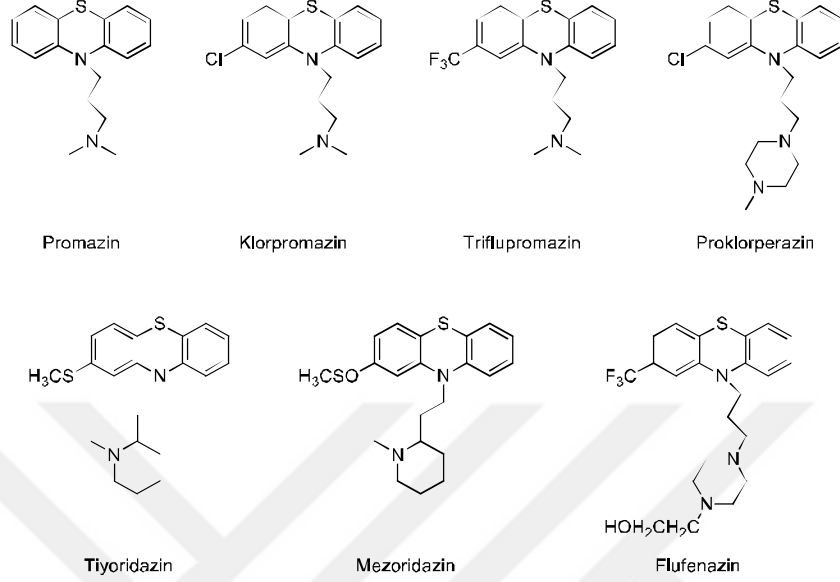
1.1. Fenotiyazin Türevlerinin Farmakolojik Etkileri

Fenotiyazin türevi bileşiklerin medisinal kimyada geniş bir kullanım alanı mevcuttur. Başlangıçta antihelmintik özellikleri nedeniyle tedaviye giren fenotiyazinlerin kimyası üstün terapötik özelliklerinden dolayı ilgi odağı olmuştur. Bu bileşiklerin trankilizan (El-Said, 1981, Kulkarni ve Fingerman, 1986), antienflamatuvar (Tilak ve ark., 1998, Zoete ve ark., 1999), antimalaryal (Dominguez ve ark., 1997, Pinto ve ark., 1979), nöroleptik (Lin ve ark., 1991, Luo ve ark., 1995), antimikrobiyal (Raval ve Dcsai, 2005, Amaral ve ark., 1992), antitüberküloz (Vivros ve Amaral, 2001; Amaral ve Kristiansen, 2000; Trivedi ve ark., 2008, Meindi ve Laske, 1989), antikanser (Mototashi ve ark., 2000; Mototashi ve ark., 1999; Kurihara ve ark., 1996), antihistaminik (Ledincer ve Mitscher, 1976, Sugimoto ve ark., 1998), diüretik (Vorontsov ve ark., 1980), sedatif (Petts ve Pleuvry, 1983), antiviral (Kanzawa ve ark., 1970), antiemetik (Williams ve Smith, 1999), antihelmentik (Upadhyay ve Sivastava, 1994), anestezik (Sharma ve ark., 1971), antiparkinson (Li ve ark., 1998), antipiretik (Heit, 1983) ve analjezik (Acs ve ark., 1995, Borbely ve Loepfe-Hinkkanen, 1979, Bansode ve ark., 2009) etkiye sahip oldukları keşfedilmiştir.

Fenotiyazinlerin kimyasına olan bu ilgi 1950'de Charpentier'in yaptığı trankilizan klorpromazin buluşu ile gerçekleşmiştir. Ardından 1963 yılında Schenker ve Herbst tarafından yürütülen (Schenker ve Herbst, 1963) bir diğer araştırmada fenotiyazinlerin farklı özellikleri irdelenmiştir. Bunun yanı sıra çok sayıda derlemede (Gordon ve ark., 1964; Gordon ve ark. 1963; Emmerson ve Miya, 1963; Vikhyasy, 1958; Kleinsorge ve Rosner, 1958; Ramage ve ark. 1960; Pearson, 1957) farklı biyoaktivitelerine değinilmiştir. Bodea ve Silberg tarafından 1968 yılında fenotiyazin halka sisteminin kimyası incelenmiştir (Bodea ve Silberg, 1968; Arya ve ark., 2013).

Bu türevler, merkezi sinir sistemi üzerinde gösterdikleri antiemetik ve sedatif etki ile iskelet kasları ve endokrin sistemi etkiler. Söz konusu sedatif etki, yan zincirin n-propilamin ile değiştirilmesi sonucunda artmıştır. Ek olarak bu bileşikler

analjeziklerin etkisini de artırmaktadır. Söz konusu türevlerden en çok bilinenleri klorpromazin, promazin, asetofenazin, perfenazin ve tiyoridazindir (Şekil 1.1).

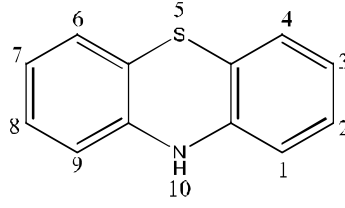


Şekil 1.1. Ticari olarak kullanılan fenotiyazin türevlerinden bazıları.

1.2. Fenotiyazin Türevlerinin Adlandırılması

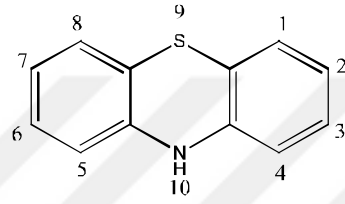
Fenotiyazin ilk defa Bernthsen tarafından sentez yönteminde kullandığı difenilamin ve sülfür dolayısıyla tiyodifenilamin olarak adlandırılmıştır (Bernthsen, 1883). Günümüzde de geçerli olan bu adlandırma daha sonra yerini daha modern bir adlandırma metodu olan fenotiyazine bırakmıştır. Alternatif adlandırmalara örnek olarak 2,3,5,6-dibenzo-1,4-tiyazin ve dibenzoparatiyazin gösterilebilir (Meyer ve Jacobsen, 1920; Patterson ve Capell, 1940).

Fenotiyazin halkası 1,4-tiyazin halkasının 2,3 ve 5,6 konumlarından bağlandığı iki benzen halkasından oluşur. Halka sisteminin adlandırılmasında yaygın olarak *Chemical Abstracts* sistemine başvurulmaktadır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Fenotiyazin halka sisteminin *Chemical Abstracts* metoduna göre numaralandırılması

Fenotiyazin halka sistemi, günümüzde yaygın olmayan **Beilstein** adlandırma metoduna göre aşağıdaki gibi numaralandırılıp adlandırılabilir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Fenotiyazin halka sisteminin *Beilstein* metoduna göre numaralandırılması

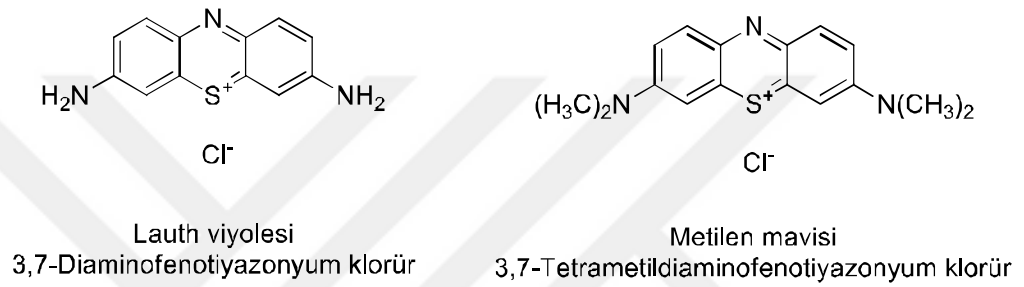
Yaygın olarak gerçekleştirilen türevlendirmelerden olan amino hidrojeninin sübstitüsyonu sonucu 10-sübstitüe, sülfür atomunu içeren sübstitüsyonlar ile ise 5-sübstitüe türevlere ulaşılabilir.

1.3. Fenotiyazinin Fiziksel Özellikleri

Saf haldeki fenotiyazin, erime noktası 180-181°C olan açık sarı renkteki katı kristaller halinde bulunmaktadır (National Formulary, 1950). Çoğu organik çözücüde çözünbilmekle birlikte alkolde zor çözünür, suda neredeyse hiç çözünmez ve nemlenmesi oldukça zordur. Bunun yanı sıra, gün ışığı ve nem varlığında kolayca oksitlenebilmektedir. Hafif acı bir tada sahiptir.

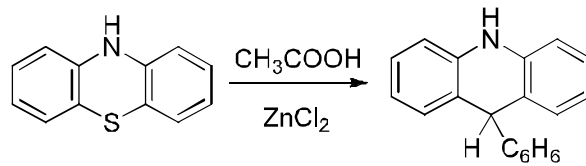
1.4. Fenotiyazinin Kimyasal Özellikleri

Fenotiyazin kimyasının babası olarak bilinen Bernthsen, metilen mavisi boyaları üzerinde yürüttüğü deneyler sırasında bu bileşiklerin kimyasal yapısında fenotiyazin halka sisteminin bulunduğunu öne sürmüştür (Bernthsen, 1883)(Şekil 1.4). Ardından difenilamin ile sülfürü 250-260°C’de reaksiyona tabi tutarak %40 verimle fenotiyazin maddesine ulaşmıştır. Sentezlediği bileşiğin metilen mavisinde bulunduğunu aşağıda anlatılan bir dizi deney ile kanıtlamıştır (Bernthsen, 1885a).



Şekil 1.4. Metilen mavisi boyalarının kimyasal formülü ve IUPAC adlandırmaları

Amino grubunun varlığını kanıtlamak adına metil, etil ve asetilli türevlerini hazırlamıştır. İki fenil halkasını bağlayan sülfid köprüsünü ise 10-metilfenotiyazini sülfona oksitleyerek tespit etmiştir. Fenotiyazinin benzoik asit ve çinko klorür varlığında fenilakridine dönüştürülmesiyle bu köprünün konumunun orto olduğu belirlenmiştir (Bernthsen, 1885) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Fenotiyazinden hareketle 5-fenilfenotiyazin eldesi

Bernthsen, fenotiyazini konsantre nitrik asitle nitrolayarak α - ve β -izomer olmak üzere iki dinitrofenotiyazin sülfoksitlere ulaşmıştır. α -izomerin redüklenmesiyle oluşan diaminofenotiyazin oksidasyon reaksiyonu ile Lauth viyolesine (tiyonin)

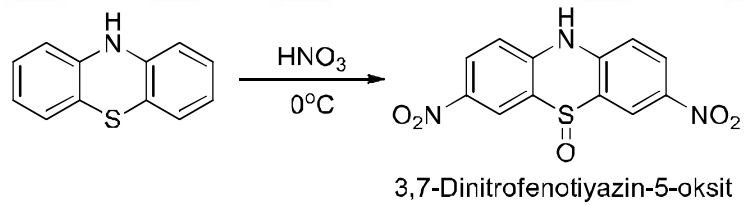
dönüşür (Bernthsen, 1885). Söz konusu yöntemler aracılığıyla tiyonin yapısının fenotiyazin içerdiği kanıtlanmıştır.

1.4.1. Halkada Gerçekleşen Sübstitüsyon Reaksiyonları

Fenotiyazin halkasının sübstitüsyonu, nitrolama, halojenasyon, merkürasyon, metalasyon ve Friedel-Crafts açılması başlıkları altında incelenmektedir.

1.4.1.1. Nitrolama Reaksiyonları

Bernthsen, fenotiyazin ile nitrik asidi 0°C'de muamele ederek iki adet dinitrofenotiyazin sülfoksit elde etmiştir (Şekil 1.6). Bunlardan α -izomerinin 3,7-dinitrofenotiyazin 5-oksit olduğu tespit edilmiş fakat β -izomer tanımlanmamıştır (Bernthsen, 1885).



Şekil 1.6. Fenotiyazinden hareketle 3,7-dinitrofenotiyazin-5-oksit eldesi

Yukarıdaki deney koşulları ılımlı hale getirildiğinde mononitrosülfoksit yapısına ulaşılmıştır (Bernthsen, 1885). Bu nitro türevinin redüksiyonu ile elde edilen aminin ferri klorür ile oksidasyonu sonucunda metilen mavisi boyalarından biri elde edilmiştir. Bu özellik 3-aminofenotiyazinlere özgü olduğundan mononitro türevi 3-nitrofenotiyazin 5-oksit olarak tanımlanmıştır.

10-metilfenotiyazinin nitrolanması sonucunda 10-metil-3-nitrofenotiyazin 5-oksit ve 10-metil-3,7-dinitrofenotiyazin 5-oksit elde edilmiştir (Kehrmann ve Zybs, 1919). Konsantre nitrik asit ile fenotiyazinin ısıtılması sonucunda tetranitrofenotiyazin

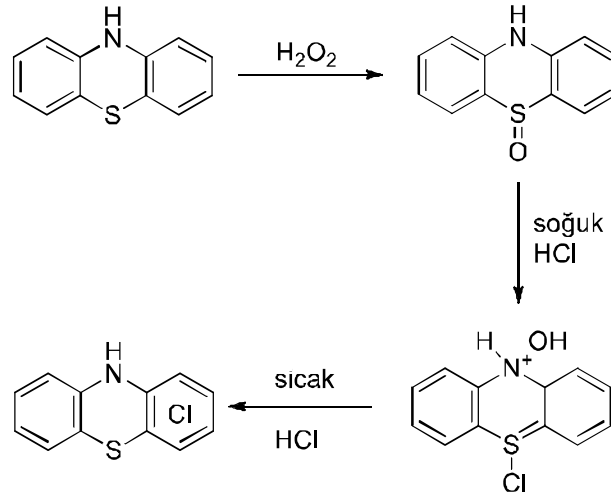
5-oksit elde edilmiştir (Barnett ve Smiles, 1910; Kehrmann ve Nossenko, 1913). Barnett ve Smiles (Barnett ve Smiles, 1910), bu bileşiği diaminotiyonine redüklemiştir (Kehrmann ve Nossenko, 1913). Ek olarak, 10-asetilfenotiyazinin nitrik asit ve asetik asit karışımı ile nitrolanması sonucunda 3,7-dinitrofenotiyazın 5-oksit elde edilmiştir (Bernthsen, 1885; Gilman ve Shirley, 1944). Gilman ve Shirley 10-etil-, 10-desil-, 10-oktadesil-, ve 10-fenilfenotiyazınları nitrolayarak 3-nitrofenotiyazın 5-oksitlere ulaşmıştır (Gilman ve Shirley, 1944). Fenotiyazinin glasiyal asetik asitteki çözeltisine sodyum nitrit eklendiğinde 3,7-dinitrofenotiyazine ulaşılmıştır (Kehrmann ve Nossenko, 1913). 4 mol sodyum nitrit ile soğuk glasiyal asetik asitte süspande haldeki 1,3-dinitro-fenotiyazın reaksiyona girdiğinde 1,3,7-trinitrofenotiyazın oluşmuştur (Kehrmann ve Ringer, 1913).

1.4.1.2. Halojenasyon Reaksiyonları

Florür fenotiyazine direkt olarak eklenememektedir ve fluorofenotiyazınların sentezi fluorodifenilaminlerin tiyasyonu ile gerçekleştirilir (Roe ve ark., 1953; Smith, 1950).

Fenotiyazinin doğrudan klorlanması sonucu düşük verim ile di- ve tetraklorofenotiyazınların yanı sıra tetraklorofenotiyazın 5-dioksit elde edilmiştir (Unger ve Hoffman, 1896). Aynı araştırmacılar azot tetraoksit varlığında HCl/eterin fenotiyazın ile reaksiyonu sonucunda mono-, di-, ve tetraklorofenotiyazınlara ulaşmıştır. Elde edilen tetraklorofenotiyazın türevinin doğrudan klorlama ile elde edilen türev ile aynı olduğu tespit edilmiştir. Dikloro türevinin ise doğrudan klorlamada elde edilen türev ile izomer olduğu görülmüştür. Monokloro türevi saflaştırılamamıştır (Unger ve Hoffman, 1896).

Klor süstitüsüyonu için ikinci metod Page ve Smiles tarafından mercek altına alınmıştır (Page ve Smiles, 1910). Bu reaksiyonun fenotiyazonyum tuzu aracılığıyla gerçekleşen basamakları Şekil 1.7.'de verilmiştir.



Şekil 1.7. Fenotiyazinden hareketle klorür süstitüsyon reaksiyonu

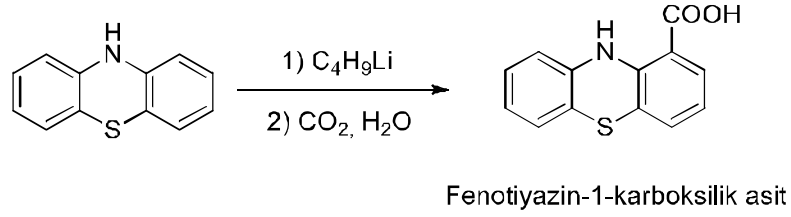
Fenotiyazinin bromür ile muamelesi sonucunda 3,7-dibromofenotiyazonyum bromür (Kehrmann, 1902) veya fenotiyazonyum bromürün hidrojen bromür tuzu elde edilmiştir (Kehrmann ve Diserens, 1915; Pümmerer ve Gassner, 1913). İyodürün ise fenotiyazine süstitüsyonu fenotiyazonyum iyodürün hidroiyodürünü vermiştir (Pümmerer ve Gassner, 1913). 10-Etil-4-lityofenotiyazinin iyodür ile reaksiyonu sonucunda iyodun lityumun yerini almasıyla 10-etil-4-iodofenotiyazin oluşmuştur. Bu reaksiyondan yola çıkarak, iyodürün metallerle yer değıştirdiğı gösterilmiştir (Gilman ve ark., 1954).

1.4.1.3. Civa ile reaksiyon

10-Metil- ve 10-etilfenotiyazinler, merkürü asetatın alkoldeki çözeltisi ile tepkime vererek 3-asetoksimerkürü- ve 3,7-diasetoksimerkürü-10-alkilfenotiyazinleri oluşturmaktadır. Asetoksimerkürü gruplarının $NaCl$ ile reaksiyonu sonucunda oluşan kloromerkürü türevlerinin potasyum iyodür ile muamelesi iyodür türevini, potasyum bromür ile reaksiyonu bromür türevini vermiş ve arsenik triklorür ile reaksiyonu sonucunda arsen triklorür türevi elde edilmiştir (Finzi, 1932; Gilman ve ark., 1954).

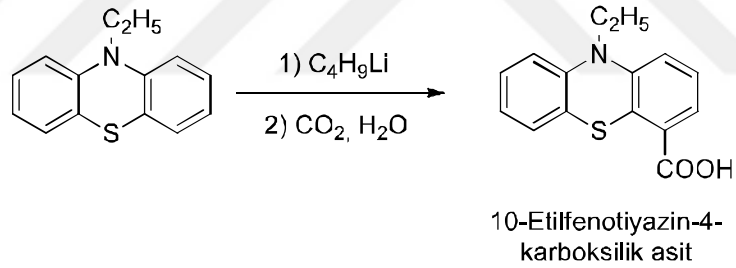
1.4.1.4. Metaller ile reaksiyonlar

Fenotiyazinin 1'nci konumundan bütillityum ile, ardından CO₂ ile reaksiyonu sonucunda %52 verimle fenotiyazin-1-karboksilik asit elde edilmiştir (Gilman ve ark., 1944a) (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Fenotiyazinden fenotiyazin-1-karboksilik asit eldesi

10-Etil- ve 10-fenilfenotiyazinlerin bu reajan ile reaksiyonu 4'ncü konumdan düşük verimle gerçekleşmiştir (Gilman ve ark., 1944b) (Şekil 1.9).

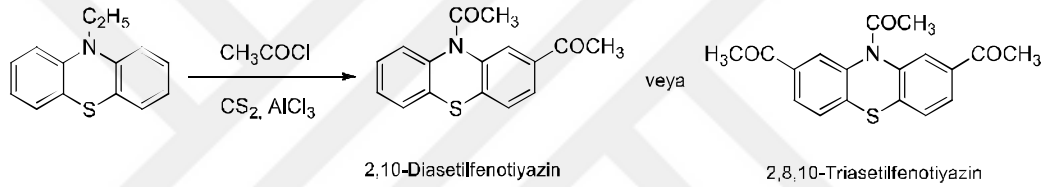


Şekil 1.9. 10-Etilfenotiyazinden hareketle 10-etilfenotiyazin-4-karboksilik asit eldesi

3-Metoksifenotiyazinin bütillityum ile reaksiyonu ve ardından gelen karbonasyon ile yine monokarboksilik asit türevi elde edilmekle birlikte, sübstütüsyonun konumu tespit edilememiştir. Sübstütü lityum atomunun halojenler ile yer değiştirmesi ile halojenasyon başlığında bahsedilen 10-etil-4-lityofenotiyazinden 10-etil-4-iyodofenotiyazin elde edilebilmektedir (Gilman ve ark., 1954).

1.4.1.5. Friedel-Crafts Açılması

Scholl ve Seer tarafından yapılan ve fenotiyazin halkasının ilk Friedel-Crafts Açılması olan araştırmada, bu halka ftalik anhidrit, AlCl_3 , ve CS_2 ile reflux altında reaksiyona tabi tutulmuştur (Scholl ve Seer, 1911). Düşük verimle fenotiyazin-3,7-diftalik asit elde edilmiştir. Bu bileşiğin siklizasyonu sonucu düzlemsel bis-kinon türevine ulaşılmıştır. Benzer şekilde, fenotiyazin halkasının asetilklorür ile açılması gerçekleştirilebilmektedir. Bu reaksiyon ile elde edilebilen 10-asetilfenotiyazinin tekrardan aynı koşullar ile muamelesi sonucunda asetilklorürün miktarına göre 2,10-diasetilfenotiyazin (Baltzly ve ark., 1946) ve 2,8,10-triasetilfenotiyazin (Michels ve Amstutz, 1950) elde edilmektedir (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. 10-Etilfenotiyazinden hareketle asetilli fenotiyazin türevlerinin eldesi

Asetik anhidrit ve $\text{AlCl}_3/\text{CS}_2$ ile gerçekleştirilen süstitüsyonda 3,7-diasetilfenotiyazin elde edilmiştir (Massie, 1946). Ek olarak, 10-asetilfenotiyazin ile β -karbomektoksipropiyonil klorürün girdiği reaksiyonla %58 verimle 2-süksinilfenotiyazin oluşmuştur (Baltzly ve ark., 1946). Friedel-Crafts reaksiyonu ile alkilasyon, fenotiyazin halkasında henüz gerçekleştirilmemiştir.

1.4.2. Amino Hidrojeninin Süstitüsyonu

10-Süstitüe fenotiyazinlerin farmakolojik üstünlüklerinin keşfedilmesi üzerine, amino hidrojeninin değiştirilmesi üzerine çalışmalara yoğunlaşmıştır. Alkilasyon re ajanları olarak alkoller, sülfatlar ve halojenürler kullanılırken, açılasyon için aril, açıl ve sülfonil halojenürler kullanılmaktadır.

1.4.2.1. Alkilasyon reaksiyonları

1.4.2.1.1. Alkollerle reaksiyon

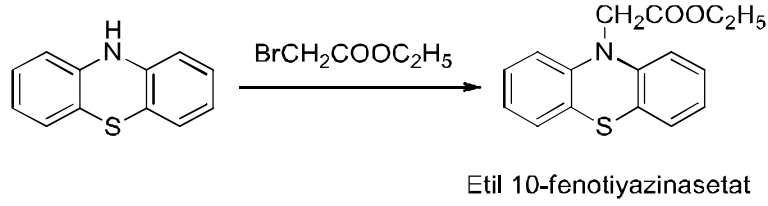
10-Metilfenotiyazin ve 10-etilfenotiyazinin sentezi fenotiyazin, ilgili alkol ve düşük miktarda susuz HCl ağzı kapalı kapta 110-115°C'de gerçekleştirilmiştir. Sonuçta %60 verimle metilli türev ve %35 verimle etilli türev elde edilmiştir. Metanol çözeltisinin metil iyodür ve fenotiyazin ile reaksiyonu sonucunda 10-metil- türevine ulaşılmaktadır. Yüksek molekül ağırlığına sahip alkoller bu reaksiyonu vermemektedir (Bernstein ve Rothstein, 1944).

1.4.2.1.2. Sülfatlarla reaksiyon

Fenotiyazinin dioksandaki çözeltisinin metil sülfat ve susuz K₂CO₃ ile 24 saat boyunca reflaksının ardından 10-metilfenotiyazin elde edilmiştir (Gilman ve Nelson, 1953). 3-Metilfenotiyazin ise dimetilsülfat/aseton içeren NaOH ile 10. konumdan metillenmiştir (Buu-Hoï ve Hoán, 1951). Fenotiyazinin dietil sülfat ile alkillenme reaksiyonu başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Gilman ve ark., 1944b).

1.4.2.1.3. Halojenürler ile reaksiyon

Reajan olarak alkil halojenür kullanıldığında katalizör olarak sodyum amidür kullanılmaktadır. Alkil bromür, fenotiyazin, Na₂CO₃, ve bakırın ksilen ortamındaki reaksiyonu ile elde edilen 10-Allil-, 10-*n*-desil, ve 10-*n*-oktadesilfenotiyazinlerin saflık yüzdesi sırasıyla 62.9 ve 20'dir. Etil-10-fenotiyazinasetatın sentezi fenotiyazin, etil bromoasetat, K₂CO₃, ve bakır karışımının ısıtılmasıyla gerçekleştirilmiştir (Cauquil ve Cassadevall, 1947) (Şekil 1.11).

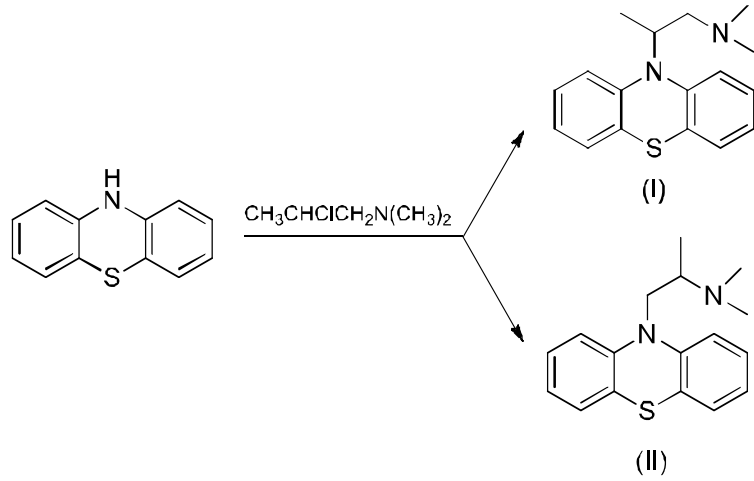


Şekil 1.11. Fenotiyazinden hareketle etil-10-fenotiyazinasetat eldesi

Benzer şekilde etil-β-bromopropiyonattan 10-fenotiyazinpropiyonat elde edilmektedir. Bu iki ester asitlerine hidrolize edildikten sonra 10-fenotiyazinasetik asidin 10-metilfenotiyazine CO₂ kaybederek dönüştüğü, propiyonik asidin ise bu koşullarda stabil olduğu görülmüştür. Aril iyodürlerin de alkillemede kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Bu amaçla fenotiyazin, aril iyodür, potasyum karbonat ve bakır bronz ile kaynama noktası yüksek ve inert bir solvanda reaksiyona tabi tutulduğunda sübstitüe 10-fenilfenotiyazinler (karbometoksi, kloro, metoksi, metil, nitro) elde edilmiştir (Gilman ve Shirley, 1944; Gilman ve ark., 1944b).

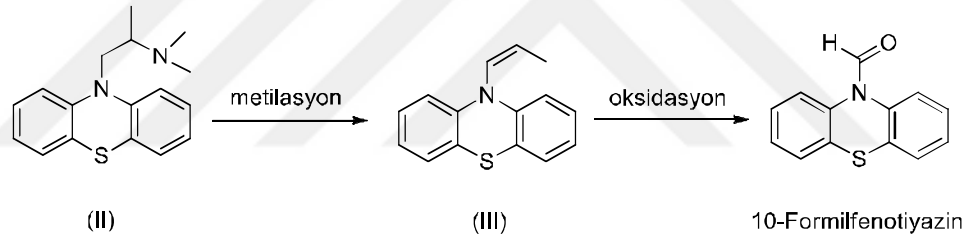
Fenotiyazinin azot atomunun NaNH₂ ile verdiği reaksiyon sonucu elde edilen sodyum tuzu ile etil bromürün muamelesi sonucunda 10-etil, benzil klorürün muamelesi sonucunda ise 10-benzilfenotiyazinlere ulaşılmıştır (Gilman ve ark., 1952). İyodobenzen ise söz konusu tuz ile ürün oluşturmamıştır (Gilman ve Nelson, 1953).

Alkilaminoalkil halojenürleri içeren alkilasyonlarda farklı rearanjmanlar görülmüş ve izomerler tespit edilmiştir. Charpentier fenotiyazini sodyum amidür varlığında 2-kloro-1-dimetilaminopropan ile alkilemiş ve majör final ürünün 10-(1-dimetilamino-2-propil)fenotiyazin (I) yerine 10-(2-dimetilamino-1-propil)-fenotiyazin (II) olduğunu bulgulamıştır (Charpentier, 1947) (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Fenotiyazinin 2-kloro-1-dimetilaminopropan ile alkilasyonu sonucu oluşan ürünler

Ardından (II) yapısının metilasyonu ile elde edilen (III) yapısı oksidasyona tabi tutulunca 10-formilfenotiyazin yapısına ulaşılmıştır (Charpentier, 1947) (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. 10-(2-Dimetilamino-1-propil)-fenotiyazinden hareketle 10-formilfenotiyazin eldesi

Fenotiyazin ve türevleri sodyum amidür varlığında propilen veya etilen oksitlerle reaksiyona girerek 10-(2-hidroksialkil)-fenotiyazinleri verirler (Dahlbom, 1951). Sodyum amidür yerinc lityum amidür kullanıldığında da 10-sübstitüç-fenotiyazinlere ulaşılabilir (Wright ve ark., 1950). Dialkilaminoalkil halojenürlerin Grignard komplekslerinin de fenotiyazini alkilleyerek 10-(dialkilaminoalkil) fenotiyazin oluşturduğu bulgulanmıştır (Berg ve Ashley, 1953).

2-(Klorometil)-imidazolin hidroklorürün fenotiyazin ile *o*-klorobenzen içeren ortamda 14 saat reflaksı sonucunda 10-(2-imidazolil-metil)fenotiyazin hidroklorür sentezlenmiştir (Miescher ve Marxer, 1950). Fenotiyazin ve 2-

trifluorometilfenotiyazin, siyanoetilasyon adındaki reaksiyon ile sırasıyla β -(1-fenotiyazil)-propiyonitril ve β -(2-trifluorometil-fenotiyazin-1-il)-propiyonitrili oluşturmuştur (Smith, 1950; Smith, 1951).

1.4.2.2. Açılasyon Reaksiyonları

Fenotiyazinin ilk açılasyon ürünü asetik anhidrit ile reflaks sonucu elde edilen 10-asetilfenotiyazin'dir (Bernthsen, 1885). Alternatif olarak süksinik anhidrit (Baltzy ve ark., 1946) ve ftalik anhidrit (Winnek ve Faith, 1949) de açılasyonda kullanılmıştır.

Piridin çözeltisi, hem anhidritler ile hem de asit klorürler ile açılasyonda tercih edilen bir katalizör olmakla birlikte, asit klorür ile açılasyon nispeten daha kolay bir şekilde gerçekleşmektedir (Hazlet ve Roderick, 1945). Benzer şekilde haloaçil halojenürler ile benzen veya toluen ortamında gerçekleştirilen reflaks ile 10-haloaçilfenotiyazinler elde edilmiştir (Dahlbom ve Ekstrand, 1951; Ekstrand, 1951). Bu ürünlerin primer ve sekonder aminler ile muamelesi sonucunda 10-aminoaçilfenotiyazinlere ulaşılmaktadır.

Eşdeğer miktarda uzun zincirli yağ asitlerinin klorürleri ve fenotiyazin ısıtıldığında 10-açilfenotiyazinlere ulaşılmaktadır (Ford, 1937). Söz konusu türevler Na_2CO_3 ve dioksan ortamında fenotiyazin ve ilgili asit klorürden de elde edilebilmektedir (Gilman ve Nelson, 1953).

Sülfonil türevinin eldesi fenotiyazinlerin benzensülfonil klorür ile piridin katalizörlüğündeki reaksiyonuyla gerçekleştirilmiştir (Hazlet ve Roderick, 1945). Aynı yöntemle ilgili klorürler kullanılarak 10-*p*-nitrobenzensülfonil-, 10-*p*-asetamidobenzensülfonil-, 10-*p*-toluen-sülfonilfenotiyazinler hazırlanmıştır (Bernstein ve Rothstein, 1944). Benzoil klorürün 3-nitrofenotiyazin-5-oksit ile reaksiyonuyla 10-benzoil-3-nitrofenotiyazin 5-oksit elde edilmiştir (Hazlet ve

Roderick, 1945). Fosgen ile fenotiyazin 10-klorokarboksifenotiyazini oluşturmuştur (Fraenkel, 1885).

1.4.3. Sülfid Köprüsünün Modifikasyonu

Fenotiyazindeki kükürt atomunu içeren reaksiyonlar;

1. Kükürt atomunun oksidasyonu sonucu sülfoksit ve sülfonların oluşumu
2. Sülfoksit veya sülfonların sülfite redüksiyonu
3. Sülfür atomunun yapıdan çıkartılmasıdır.

1.4.3.1. Sülfür Atomunun Oksidasyonu

Bu amaçla yaygın olarak KMnO_4 ve H_2O_2 kullanılmaktadır. KMnO_4 'ın sudaki sıcak çözeltisi ile 10-metilfenotiyazin ve 10-etilfenotiyazin sülfon türevlerine oksitlenmiştir (Bernthsen, 1885). Bu re ajanla 10-*p*-toluensülfonil türevi sülfoksitlere yükseltgenirken ve 10-asetil- ile 10-*p*-asetamidobenzensülfonil türevleri reaksiyon vermemiştir. KMnO_4 'ün asetik asitteki %75'lik çözeltisi, etil 10-fenotiyazin karboksilatı, sulu permanganat çözeltisi ise CHCl_3 içindeki 10-fenilfenotiyazini sülfona oksitlemiştir (Bernstein ve Rothstein, 1944; Finzi, 1932).

H_2O_2 'in etil alkol içindeki çözeltisi fenotiyazinleri sülfoksit türevlerine yükseltgemedi a seton içindeki çözeltiye kıyasla büyük bir üstünlük sağlamıştır (Gilman ve Shirley, 1944; Houston ve ark., 1949; Kehrman ve Discrens, 1915). Sıcak glasiyal asetik asit çözeltisi de H_2O_2 ile oksidasyonda tercih edilen bir çözücü olmuştur (Gilman ve ark., 1954; Gilman ve Nelson, 1953; Michels ve Amstutz, 1950; Smith, 1951). H_2O_2 , Etanol içindeki HCl 'nin eşliğinde fenotiyazini triklorofenotiyazin 5-okside dönüştürmüştür (Brady ve Smiles, 1910).

Konsantre NO_2 veya glasiyal asetik asit içindeki NO_2 hem nitrolama hem de oksidasyonu gerçekleştirerek sülfoksitleri verir (Bernthsen, 1885; Gilman ve Nelson,

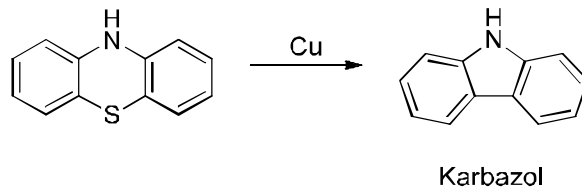
1953; Gilman ve Shirley, 1944; Kehrmann ve Zybs, 1919). CH_3COOH içerisindeki potasyum hipoklorür ve kromik anhidrit de alternatif oksidatif ajanlar olarak kullanılmış ve başarılı olunmuştur (Michels ve Amstutz, 1950).

1.4.3.2. Sülfoksit ve Sülfonların Redüksiyonu

EtOH ve H_2SO_4 , 3,7-dinitrofenotiyazin 5-oksidi 3,7-dinitrofenotiyazine dönüştürmüştür (Kehrmann ve Nossenko, 1913). SnCl_2/HCl ise 3-nitrofenotiyazin 5-oksidi ve 3,7-dinitrofenotiyazin 5-oksidi ilgili aminofenotiyazinlere redüklemiştir (99). HCl , redüktif rolüyle 5-oksit türevlerinin klorofenotiyazinlere klorlanmasında etkilidir. Bu sayede fenotiyazin 5-oksidi, 10-metilfenotiyazin 5-oksidi, 3-nitrofenotiyazin 5-oksidi, 3,7-dinitrofenotiyazin 5-oksidi, ve 10-etilfenotiyazin 5-oksidi redükledikten sonra 3. ve 7. konumlardan klorlamıştır (Gilman ve ark., 1954).

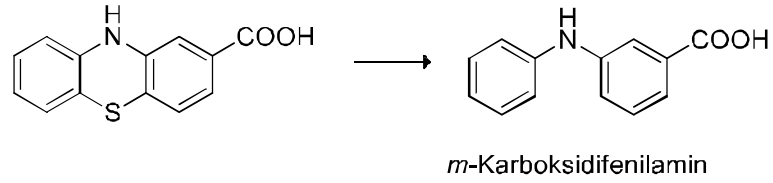
1.4.3.3. Sülfür Atomunun Eliminasyonu

Fenotiyazin türevleri, Cu ile ısıtma sonucunda ilgili karbazolleri verirler (Charpentier, 1947) (Şekil 1.14).



Şekil 1.14. Fenotiyazinden Cu katalizörlüğünde karbazol eldesi.

Raney- Ni kullanılarak sülfür yapıdan çıkartılmış, bu şekilde fenotiyazinden difenilamin ve 2-karboksifenotiyazinden *m*-karboksidifenilamin elde edilmiştir (Shah ve ark., 1948) (Şekil 1.15).



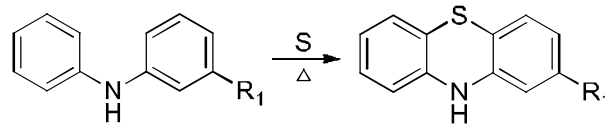
Şekil 1.15. Fenotiyazin 2-karboksilik asitten *m*-karboksidifenilamin eldesi.

Benzer şekilde hidroiyodik asidin 10-etil- ve 10-fenil-fenotiyazin-4-karboksilik asidi sırasıyla *m*-karboksidifenilamin ve *m*-karboksitriphenilamine dönüştürdüğü bulgulanmıştır. Ek olarak fenotiyazin molibden oksit ile tepkimeye girerek difenilamin, anilin, ve benzene dönüşmüştür (Orlow ve ark., 1931). Dioksan içerisinde 230°C ve yüksek basınçta, kobalt sülfür katalizöründe redüksiyon ile fenotiyazinden difenilamin ve *o*-merkaptodifenilamin elde edilmiştir (Signaigo, 1946).

1.5. Fenotiyazinlerin Genel Sentez Yöntemleri

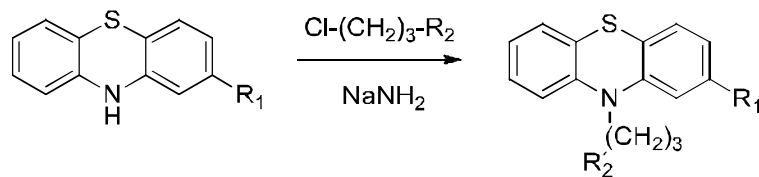
1.5.1. Bernthsen Yöntemi ile:

Fenotiyazin, bu yöntemle göre ilgili difenilaminin kükürtle susuz ortamda ısıtılması sonucu elde edilir (Şekil 1.16).



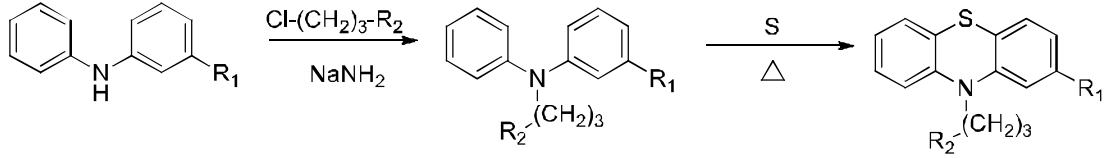
Şekil 1.16. Difenilaminden fenotiyazin eldesi.

Bu yapıya 10 numaralı konumdan süstitüsyon, sodyum amidür varlığında aminoalkil halojenürler ile gerçekleştirilir (Şekil 1.17).



Şekil 1.17. Fenotiyazinden aminoalkil halojenürler ile 10.konumdan süstitüsüonu.

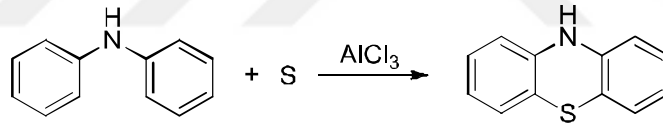
Alternatif olarak, difenilamine yan zincir süstitüsüonu yapıldıktan sonra kükürt ile halka kapanması reaksiyonu gerçekleştirilebilir (Bernthsen, 1883) (Şekil 1.18).



Şekil 1.18. Difenilaminden alkilfenotiyazınların eldesi

1.5.2. Difenilaminden hareketle:

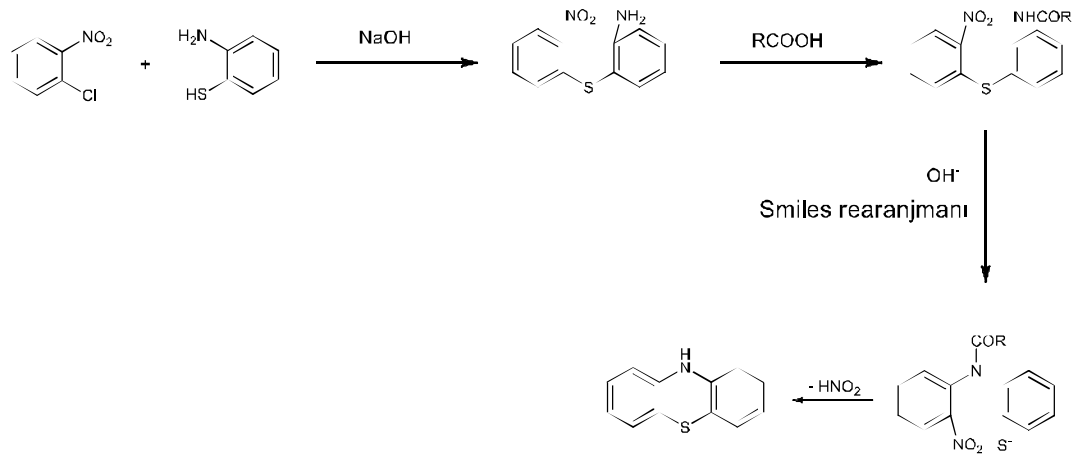
Fenotiyazin halka sistemi difenilaminin sülfür ile Lewis asidi (AlCl_3) katalizörlüğündeki reaksiyonu sonucunda elde edilir (Ram ve ark., 2019) (Şekil 1.19).



Şekil 1.19. Difenilaminden hareketle Lewis asidi katalizörlüğünde fenotiyazin eldesi

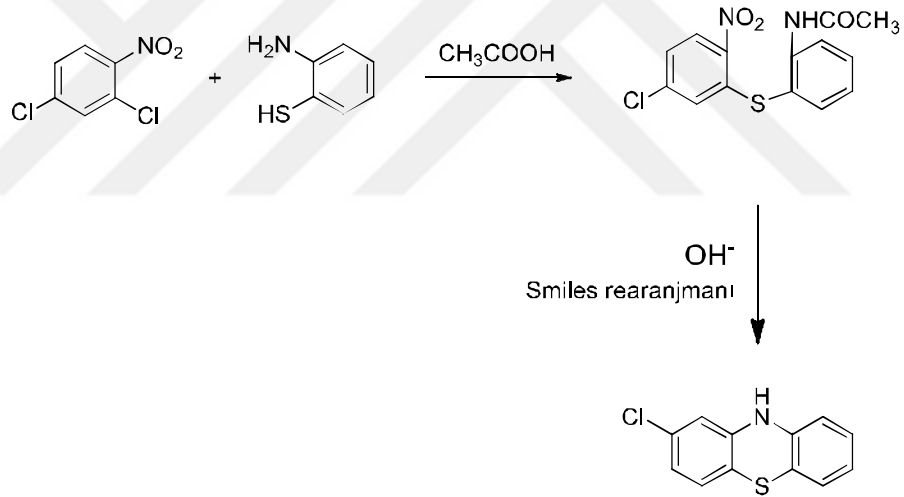
1.4.3. Smiles rearanjmanı ile:

2-Kloronitrobenzenin bazik ortamda 2-aminobenzentiylol ile reaksiyonu, ilgili 2-amino-2'-nitrodifenilsülfıt türevini verir. Ardından bu türev karboksilik asitlerle muamele edildiğinde N-asetilli türevi elde edilir. Oluşan 2-asetamido-2'-nitrodifenilsülfür türevi alkali koşullarda Smiles rearanjmanına uğrayarak fenotiyazini verir (Evans ve Smiles, 1935) (Şekil 1.20).



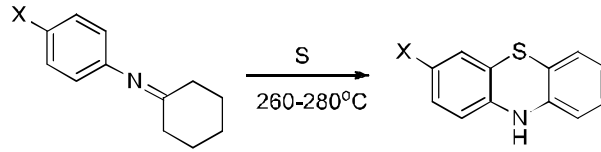
Şekil 1.20. 2-Kloronitrobenzen ile 2-aminobenzenitiyolden fenotiyazin eldesi

Sentetik strateji klorpromazinin prekürsörü olan 2-klorofenotiyazininin eldesi yöntemine de uyarlanmıştır (Şekil 1.21).



Şekil 1.21. Smiles rearranjmanı ile 2-klorofenotiyazinin eldesi

1.5.4. Schiff bazlarından hareketle:

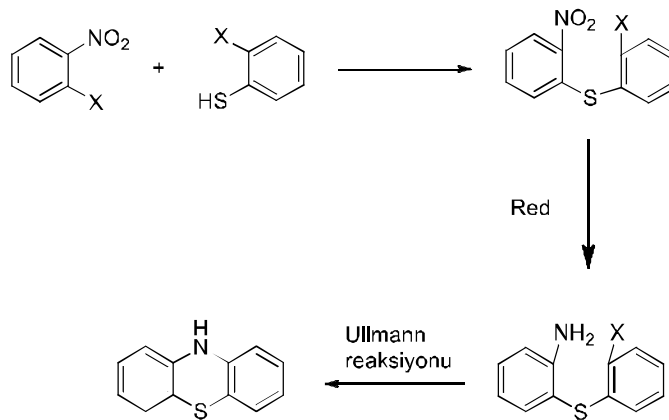


Şekil 1.22. Schiff bazından hareketle 2-halofenotiyazin türevlerinin eldesi

Alok ve ark. tarafından yürütülen bu sentez yönteminde kükürt varlığında yüksek sıcaklıkta siklizasyon reaksiyonu gerçekleşmiştir (Alok ve ark., 2012) (Şekil 1.22).

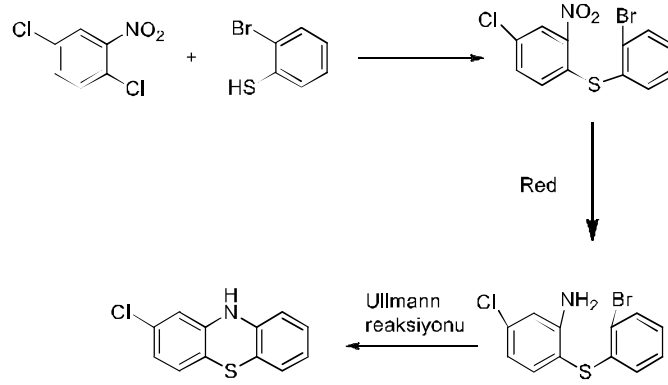
1.5.5. Ullmann tipi sentez ile:

Bu sentez yöntemine göre 2-halonitrobenzenin 2-halotiyofenol ile reaksiyona sokulması ile 2-halo-2-nitrodifenilsülfür elde edilir. Ardından redüksiyon ile 2-halo-2'-aminodifenilsülfide dönüştürülür. Sonuçta, benzin ara ürünü ile Ullmann reaksiyonu sonucunda fenotiyazin elde edilir (Nodiff ve Hausman, 1966; Bonvicino ve ark., 1962) (Şekil 1.23).



Şekil 1.23. Ullmann reaksiyonu ile fenotiyazin eldesi

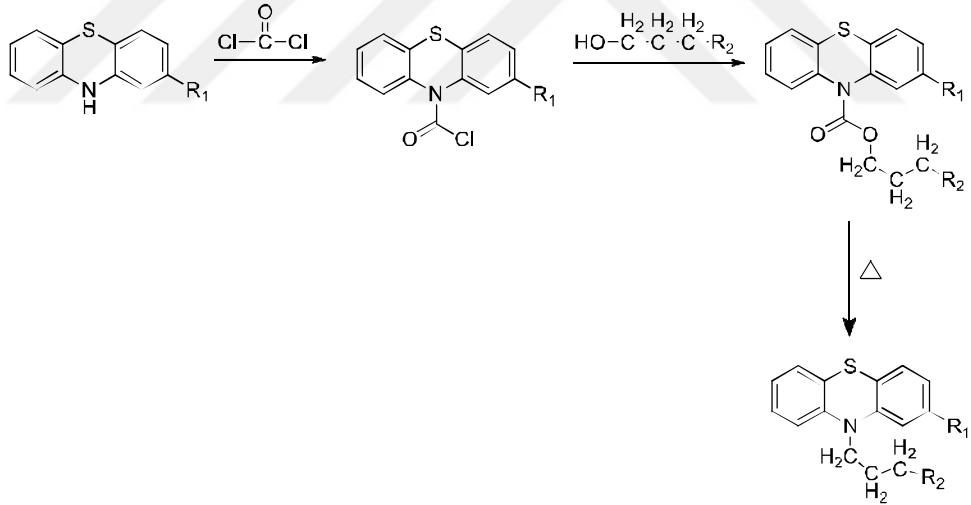
Bu prosedür ile aynı zamanda 2-klorofenotiyazinin de sentezi gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 1.24).



Şekil 1.24. Ullmann reaksiyonu ile 2-klorofenotiyazin eldesi

1.5.6. Ester türevi aracılığıyla:

Fenotiyazinlerin fosgen ve aminoalkil türevleriyle girdiği reaksiyon sonucunda 10-süstitüe türevleri elde edilir (Fraenkel, 1885) (Şekil 1.25).

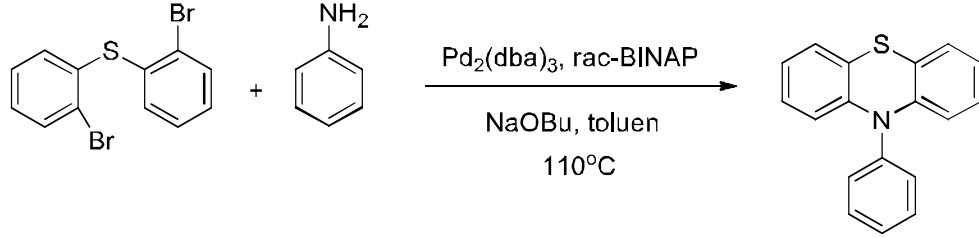


Şekil 1.25. Fenotiyazinlerden 10-süstitüe türevlerin eldesi

1.5.7. 10-Fenilfenotiyazin sentezi:

Başka bir yaklaşımda 10-fenilfenotiyazin, tek kaptaki bir işlemde 2,2'-dibromofenil sülfid ve anilin arasındaki bir paladyum katalizli tandem C-N bağı oluşturma reaksiyonu yoluyla yüksek verimle sentezlenir. Bu reaksiyon ilk aşamada

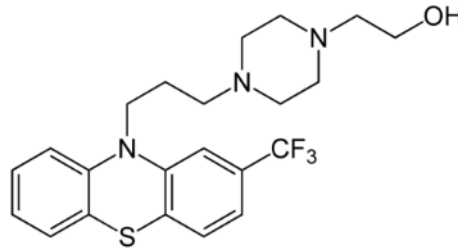
bir nükleofilik aromatik süstitüsyon ile başlar, ardından istenen ürünü elde etmek için molekül içi siklizasyon ile devam eder (Ram ve ark., 2019) (Şekil 1.26).



Şekil 1.26. 2,2'-Dibromofenilsülfid ve anilin ile 10-fenilfenotiyazin eldesi

1.6. Fenotiyazinin Hepatosellüler Karsinoma (HCC) Tedavisindeki Apoptotik Etkileri

Belli bir patoloji için onaylanmış ve kullanımda olan ilaçların başka patolojilerde etkinliklerinin aranması ‘*drug repurposing*’ olarak bilinmektedir. Antipsikotik ilaçlardan olan fenotiyazin türevleri yakın zamanda antikanser ajanlar olarak gündeme gelmiştir. Yapılan bir dizi çalışmada bu ilaç grubunun yüksek antikanser etkinliği bulgulanmıştır (Gupta, 1988; Rigas ve ark., 1981; Gupta ve ark., 1993; Rai ve ark., 1996; Andreani ve ark., 1991; Al-abdalla ve ark., 1995; Hamadi ve ark., 1998; Nyati ve ark., 1995). Söz konusu antikanser etkinliğin DNA ile oluşan kompleksten köken alıyor olabileceği bulgulanmıştır (Naqi ve ark., 1996).



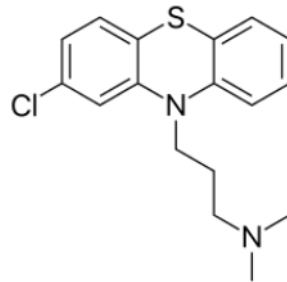
Şekil 1.27. 2-[4-[3-[2-(Trifluorometil)fenotiyazin-10-il]propil]piperazin-1-il]etanol

Şizofreni tedavisinde kullanılan flufenazinin enantat tuzunun (Şekil 1.27) hepatosellüler yan etkileri olduğu bulunmuştur (Schneider ve ark., 1981). Bu ilacın aynı zamanda, fare modelindeki hepatik fibrozda azalmaya neden olduğu

bulgulanmıştır (Li ve ark., 2014). Ek olarak lipid peroksidasyon ve katalaz aktivitesini artırdığı ve superoksit dismutaz seviyesini azalttığı görülmüştür (Corte ve ark., 2009).

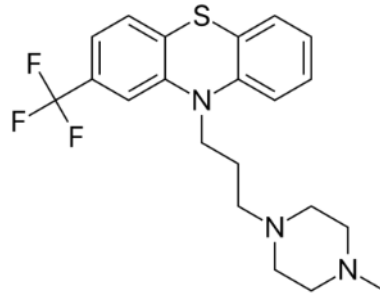
Alfa-1-antitripsin eksikliği (ATD), çocuklarda ve erişkinlerdeki karaciğer hastalığının genetik nedeni olarak bilinmektedir. Söz konusu hastalık fibrozis/sirozis ile karakterize olup, hepatosellüler karsinomaya zemin hazırlamaktadır (Perlmutter ve Silverman, 2011; Perlmutter ve ark., 2007). Vakaların büyük çoğunluğu homozigot ATZ alelini içeren ATD'nin klasik formundan kaynaklanmaktadır. Mutasyona uğramış ATZ proteini endoplazmik retikulumda ve hepatositlerde miktarca artarak hücrel bozulmalara neden olmaktadır (Maurice ve Perlmutter, 2012).

ATD Fare modelinde yapılan çalışmalara göre, ATZ ekspresyonu, *in vivo* karaciğer hücrelerindeki ER'de artışa neden olduğunda otofajinin aktive olduğu görülmüştür (Kamimoto ve ark., 2006). Bu nedenle, otofajik yolları tetikleyen ilaç moleküllerinin mutant ATZ kaynaklı hepatosellüler yükü azaltabileceği hipotezi ortaya atılmıştır. Böylece, majör proteotoksik etkisi olan hepatik fibrozis de engellenmiş olabilecektir. Flufenazinin de bu yolla fare modelinde hepatik fibrozis insidansını azalttığı görülmüştür.



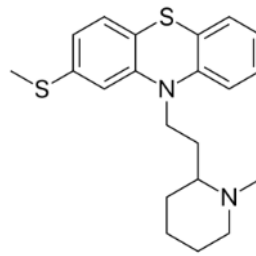
Şekil 1.28. 3-(2-Klorofenotiyazin-10-il)-N,N-dimetilpropan-1-amin

Ray ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan çalışmada klorpromazinin (Şekil 1.28) asetaminofenin hepatotoksitesini azalttığı kanıtlanmıştır (Ray ve ark., 2001).



Şekil 1.29. 10-[3-(4-Metilpiperazin-1-il)propil]-2-(trifluorometil)fenotiyazin

Sencensens belirtci protein-30 (SMP30), yaşlanma ile birlikte hepatosit ve renal tübüler epitelde üretilen bir proteindir (Fujita ve ark., 1992a; Fujita ve ark., 1992b). Bu proteinin ekspresyonunun azalmasıyla birlikte yaşlılarda karaciğer hasarı görülmektedir. Matsuyama ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, SMP30'nin antiapoptotik etkisinin, kalmmodulin (CaM) tarafından modüle edilen Akt ile ilişkisi araştırılmıştır. Sonuçta, SMP30'un Akt aktivasyonuna yol açarak HepG2 hücrelerini apoptozisten koruduğu kanıtlanmıştır. Trifluoperazin gibi CaM inhibitörlerinin PI3K-Akt yolağı aracılığıyla SMP30'un oluşturduğu anti-apoptotik etkiyi artırdığı görülmüştür (Egea ve ark., 2001; Cheng ve ark., 2003) (Şekil 1.29). Yapılan bu çalışmada CaM ve SMP30 arasındaki ilişki hala tamamen aydınlatılmamakla birlikte SMP30 aracılı Akt regülasyonunun olası mekanizması açıklanmıştır (Matsuyama ve ark., 2004).



Şekil 1.30. 10-[2-(1-Metil-2-piperidil)etil]-2-metiltiyofenotiyazin, THIO

Lu ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada, Şekil 1.30.'da kimyasal formülü verilen THIO'nun metastatik inhibisyonundaki rolü incelenmiştir. HCC hücre hatları, hayvan modelleri, dopamin reseptörü (DR) ve dopaminin HCC dokularındaki ekspresyon düzeylerine ek olarak THIO'nun bu hücre hatlarında ve fare tümör xenograftlarındaki etkisi incelenmiştir. THIO'nun hücre siklusunu G0/G1 fazında

durdurduğu bulgulanmıştır. Bu ilaç etken maddesinin apoptozisi artırmadığı, sonradan yapılan Kaspaz-3 testi ile kanıtlanmıştır. Procaspase-3 ile yarılmış Caspase-3 arasında ekspresyon düzeyi farkı görülmemiştir. Aynı zamanda THIO'nun epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ile tümör hücrelerinin göçünü engellediği görülmüştür. Ek olarak, dopamin antagonistlerinin kemoterapi etkinliğini artırıp metastazisi önlediğini savını *in vitro* olarak kanıtlamışlardır (Lu ve ark., 2015). Yakın zamanda, THIO'nun metastatik olabilecek lösemi kanseri kök hücrelerini selektif olarak hedef aldığı tespit edilmiştir (Sachlos ve ark., 2012).

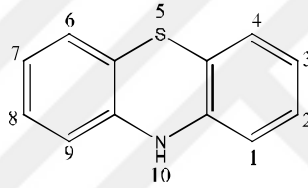
Haloperidol, flufenazin ve flupentiksölün ise nöroblastoma ve glioma hücre hatlarında doza bağımlı hücre ölümünü indüklediği görülmüştür (Behl ve ark., 1995; Silver ve ark., 1994). Bazı nöroleptik ilaçların insan nöroblastomalarında, rat C6 glioma hücreleri ve fare primer beyin dokusunda apoptotik etki gösterdiği de rapor edilmiştir (Vilner ve ark., 1995; Gil-Ad I ve ark., 2004; Gil-Ad I ve ark., 1998). Perfenazinin, SH-SY5Y hücre hattının hücre siklusunu G1 fazında durdurarak antiproliferatif etki gösterdiği belirtilmiştir (Silver ve ark., 1994). Calaf'ın araştırma grubu, fizostigmin tarafından inhibe edilen AChE' nin sıçan süt bezi epitellerindeki karsinojenizisi teşvik ettiğini bulmuştur. Ek olarak, klorpromazin ve tamoksifen içeren kombine tedavinin meme kanseri hücrelerinde sinerjistik antitumor etki sağladığı görülmüştür (Yde ve ark., 2009).

1.7. Fenotiyazinlerin Yapı-Aktivite ilişkileri

De Faria ve arkadaşları fenotiyazinlerin hepatosellüler sitotoksitelerinde rol oynayan yapı-etki ilişkilerini ele almıştır. Beş adet ticari fenotiyazin türevinin hepatoma doku kültürü (HITC) üzerinde hayatta kalma çalışmalarını yapmışlardır. Buna ek olarak mitokondriyal permeabilite geçişinin apoptozis ile ilişkisi öne sürülmüştür.

MPT (Mitochondrial permeability transition), mitokondride gerçekleşen enerji metabolizmasındaki bozukluklara dayalı nekrozis ve apoptozis ile yakından ilişkilidir. Bu yolla gerçekleşen hücre ölümleri ATP tükenmesi veya pro-apoptotik proteinlerin (sitokrom c gibi) sitozole salınmasıyla sonuçlanmaktadır. Mitokondriyal membran proteinlerinin tiyol gruplarındaki oksidasyon, MPT'nin tetiklenmesine yol açar. Kimyasal maddeler bu grubu oksitleyerek apoptozisi indükleyebilirler (de Faria ve ark., 2015).

Bu çalışma sonucunda, ticari fenotiyazin türevlerinin karaciğer hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin sıralaması TR>TFP>FP>TFPZ>CPZ>IMP≈PHT şeklinde bulgulanmıştır. Araştırmacılar, bu sıralamadan yola çıkarak olası yapı-aktivite ilişkilerini yorumlamıştır.



Şekil 1.2. Fenotiyazin halka sisteminin *Chemical Abstracts* metoduna göre numaralandırılması

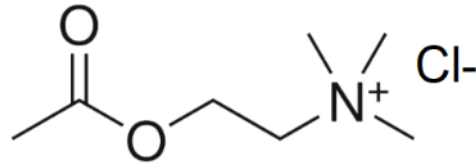
Söz konusu aktiviteyi belirleyen yapısal özellikler incelendiğinde, yan zincirin sitotoksisiteyi büyük ölçüde etkilediği ve 2. Konumdaki süstitüsyonların potansi etkilemesinin $\text{SCH}_3 > \text{CF}_3 > \text{Cl}$ şeklinde olduğu görülmüştür. 10. konumdaki süstitüentlere göre potens sıralaması ise piperidin > piperazin > alifatik şeklinde belirlenmiştir. Bu olgulara göre, hidrofobik süstitüentlerin aktiviteyi artırdığı söylenebilmektedir. Trifluoperazin'in flufenazinden daha potent çıkmasının nedeni ise yapıda var olan ek hidroksil grubundan ileri gelmektedir. Klorpromazindeki kloro ve trifluopromazindeki trifluorometil grupları aktivitede artışa neden olmuştur (de Faria ve ark., 2015).

Fenotiyazinler, fenotiyazin kısmı hidrofobik, yan zincir hidrofilik kısmı oluşturmak üzere amfifilik yapıdadır. Bu karaktere karşın, test edilen ticari fenotiyazinlerin hepsinin lipofilik karakteri baskındır. Benzer logP değerlerine sahip

olmalarına karşın, farklı sitotoksik özellikler sergilemişlerdir. Bu olgu, sitotoksitelerinde farklı moleküler parametrelerin rol oynadığını kanıtlamaktadır. Bu parametrelerden biri, membran üzerindeki uzaysal konumlanmalarıdır. Bu çalışma, fenotiyazinlerin HTC hücre kültüründeki sitotoksik etkileri için bir yapı-etki çalışmasıdır. Fenotiyazin ve yan zincir bileşiğin amfifilitesinde rol oynar. Yan zinciri piperidin türevi içeren TR (Tiyoridazin, THIO) en potent bileşik olarak tespit edilmiştir (de Faria ve ark., 2015).

1.8. Asetilkolinesterazlar ile Hepatosellüler Karsinoma Arasındaki İlişki

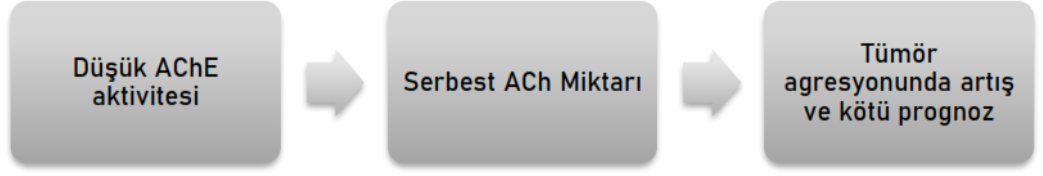
Şekil 1.31.'de kimyasal formülü verilen asetilkolinin kolinerjik sinapslardaki etkisinin yanı sıra son yıllarda hayatta kalma, farklılaşma ve proliferasyondaki etkisi açığa çıkmıştır. Bu kolinerjik operatör ile birlikte çok sayıda proteinin tümörjenizisteki önemi son günlerde artmıştır (Tata, 2008; Catassi ve ark., 2008). Hücrelerde asetilkolinesteraz (AChE) ve butirikolinesteraz (BuChE) olmak üzere iki tip kolinesteraz sentezlenmektedir. Bu iki enzim, hidrolitik görevlerinin yanı sıra vücutta çeşitli proteinler ile etkileşerek non-katalitik roller de üstlenmektedir. AChE'nin bu bağlamda etkileştiği proteinler: lamininler, kollajen IV, amiloid β -peptit, Presenilin-1, Ran-bağlayıcı protein, nöronal enolaz, protein kinaz-C olarak örneklendirilebilir.



Şekil 1.31. 2-Asetoksi-N,N,N-trimetiletanaminium klorür

Pérez-Aguilar ve ekibi tarafından yapılan çalışmanın sonucunda hepatosellüler karsinom ile ilişkili hücre hatlarında (HD, Huh-7 ve HepG2) AChE düzeyinde artışa karşılık AChE aktivitesinde azalma görülmüştür (Pérez-Aguilar ve ark., 2015). Bu bulgulardan yola çıkarak AChE'nin tümör baskılayıcı olduğu ve HCC'de prognostik

marker olarak kullanılabileceği kanıtlanmıştır (Zhao ve ark., 2011). AChE ile tümör ilerlemesi ve prognoz arasındaki ilişki şekil 1.32.’da gösterilmiştir.



şekil 1.32. AChE aktivitesi ile tümör ilişkisi

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Sentez Edilen Maddelerin Analitik Kontrolünde Kullanılan Yöntemler

2.1.1. Kromatografik Analizler

Sentez çalışmaları esnasında reaksiyonların yürüyüşünü izlemek, elde edilen ürünlerin saflık derecelerini saptamak amacı ile İnce Tabaka Kromatografisinden (İTK) yararlanılmıştır. Bu amaçla Kieselgel-60 GF254 kaplı alüminyum plaklar (Merck) kullanılmıştır. Lekelerin belirlenmesinde 254 nm dalga boyundaki UV ışığından (Camag UV Lambası) yararlanılmıştır. Kolon kromatografisi için silicagel 60 (0,040-0,060 mm; 230-400 mesh) kullanılmıştır.

2.1.2. Erime Noktası Tayinleri

Sentezlenen bileşiklerin erime noktası tayinleri, Buchi B540 cihazı kullanılarak kapiller yöntemle yapılmış ve sonuçlar düzeltilmeden verilmiştir.

2.1.3. Spektral Analizler

2.1.3.1. Kütle (MASS) Spektrumları

Kütle analizleri, Waters ZQ micromass LC-MS spektrometresinde, elektrospay iyonizasyon (ESI) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

2.1.3.2. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrumları

^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları, Varian Mercury-400 FT-NMR spektrometresinde alınmıştır. İç standart madde olarak tetrametilsilan (TMS), çözücü olarak CDCl_3 ve $\text{DMSO}-d_6$ kullanılmıştır.

2.1.3.3. Elementel Analiz

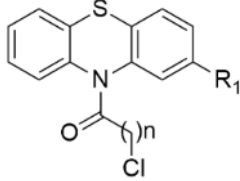
Elementel analizler, Leco CHNS 932 Elementel Analiz cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

2.2. Tasarlanan Bileşiklerin Sentezi

2.2.1. Sentezlenen Ara Bileşikler için Genel Sentez Yöntemi

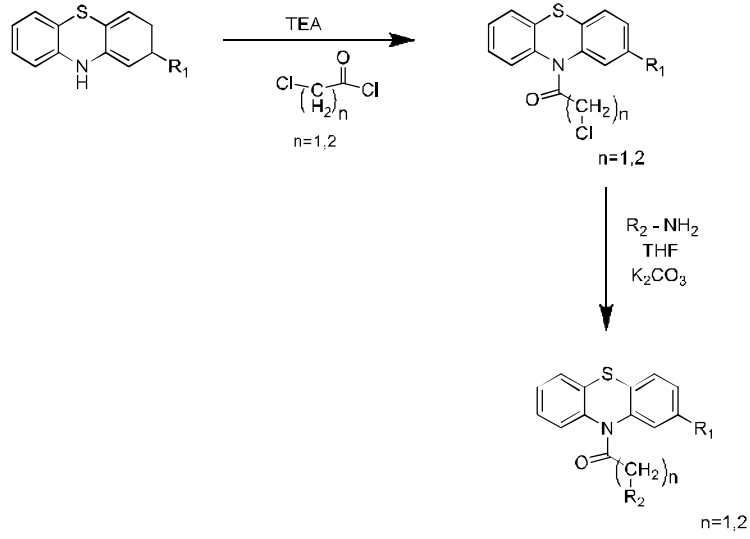
Şekil 2.1.'de görüldüğü üzere bileşiklerin sentezine ticari olarak satın alınan nonsüstitüe ve süstitüe fenotiyazin türevleri ile başlandı. Fenotiyazin türevi (0.5g, 2 mmol) ve TEA (0.22g, 2.2 mmol) 10 ml kuru THF içinde karıştırılarak çözüldü ve üzerine kloro asetil klorür ya da kloro propiyonil klorürün 5 ml THF içindeki çözeltisi damla damla ilave edilerek oda sıcaklığında 1 hafta karıştırıldı. Reaksiyon 6:1 hekzan:etil asetat solvan sistemi kullanılarak İTK yöntemi ile kontrol edildi. Reaksiyon bitiminde buzlu suya döküldü ve dieterler ile ekstraksiyon yapıldı. Eter tabakası önce 5% NaHCO_3 ve ardından distile suyla yıkandı. Eter fazı susuz Na_2SO_4 ile kurutularak solvan uçuruldu. Elde edilen ürünler kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırıldı. Sentezlenen fenotiyazin türevi ara basamakların kimyasal özelliklerini içeren tablo Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Sentezlenen fenotiyazin türevi ara bileşiklerin kimyasal özellikleri

				
	n	R ₁	MS (ESI+) m/z	Erime Noktası (°C)
1	1	-H	276	117
2	1	-Cl	311	118
3	1	-SCl ₃	321	124
4	2	-H	290	144
5	2	-Cl	325	113

2.2.2. Sübstitüe Fenotiyazin 10-Karboksamitlerin Genel Sentez Yöntemi

15 ml THF içindeki 1.2 mmol amin 600 mg K₂CO₃ ile muamele edildi. 5 ml THF içindeki 2-kloro-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)etan-1-on /2-kloro-1-(2-kloro-10*H*-fenotiyazin-10-il)etanon /3-kloro-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)propan-1-on (1 mmol) damla damla ilave edilerek, reaksiyon 6-8 saat reflux edildi. Reaksiyon İTK ile kontrol edildi, bitiminde solvan uçurulurak etilasetat ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz suyla yıkanarak ve Na₂SO₄ ile kurutuldu. Daha sonra solvan uçurularak ürün, CHCl₃ : MeOH mobil fazı kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Aşağıdaki **3.1.** ve **3.2.** numaralı bölümlerde her bir türev için kullanılan başlangıç maddeleri, ürün saflaştırma yöntemi, ürün miktarı, erime noktası ve NMR sonuçları verilmiştir. Sentezlenen türevler için genel reaksiyon şeması ise Şekil 2.1.'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Sentezlenen fenotiyazin türevi bileşikler için genel reaksiyon şeması

2.2.3. Aromatik Amin Kullanılarak Sentezlenen Sübstitüe Fenotiyazin 10-Karboksamitlerin Genel Sentez Yöntemi

2-Kloro-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)etan-1-on (5 mmol) ve trietilaminin (0.57 ml) 50 ml etanoldeki karışımına uygun arilaminler (5 mmol) ve NaI (2.5 mmol) oda sıcaklığında eklendi. Karışım 10 saat reflaks edildi ve reaksiyon bitiminde karışım süzüldü, süzöntü uçurularak etilasetatta çözülüp, suyla ekstraksiyon yapıldı. Etilasetat uçurularak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı.

2.3. Sentezlenen Bileşiklerin Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Sentezlenen fenotiyazin türevi bileşiklerin biyolojik aktivite çalışmaları Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Özlen Konu ve Dr. Murat Yaman tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, bileşikler naif IICC hatlarından en az iki tane (Hep3B, SkHep1, HepG2 ve Huh7) ve MCF-7 lüminel epitel meme kanseri tipinde taranmıştır. Ek olarak Hep3B ve SkHep1 hatlarının eGFP (enhanced Green Fluorescence Protein) ifade eden stabil klonlarında da taramalar gerçekleştirilmiştir. Hücreler, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, ve 1%

non-essential amino acid içeren DMEM/Low-Glucose besi ortamında büyütülmüş, ve genel büyütme koşulları olarak 37 °C ve 5% CO₂ şartları kullanılmıştır. eGFP hatlarının büyüme ortamlarında ayrıca genitisin (geneticin (G418) sulfate (ChemCruz, sc-29065A)) kullanılmıştır (Hep3B^{eGFP}: 500 µg/ml ve skHep1^{eGFP}: 900 µg/ml).

Sentezlenen 5 adet ara ürün ve 12 adet sonuç ürünün hücre varlığına etkileri MTT deneyleriyle test edilmiştir. 24 saatlik uygulamalar sonucunda ve 3.7 µM, 11.1 µM, 33.3 µM ve 100 µM doz skalasında öncül taramalarda hücrelerin varlığı, MTT viyabilite değerleri ile ölçülmüştür. Bunu takiben GraphPad (v6.01) programı ile, ilaçların viyabiliteye etkinlikleri doz eğrileri üzerinde grafiğe dökülmüş, ve IC₅₀ hesaplamaları yapılmıştır (Çizelge 3.1.). Programın "log(inhibitor) vs response (four variables) - Nonlinear regression" metodu, bu doğrultuda kullanılmıştır. Alternatif olarak, IC₅₀ elde edilemeyen durumlarda "log(inhibitor) vs response (four variables) - Nonlinear regression" metodundan faydalanılmıştır. %0.1 DMSO referans değeri olarak tüm uygulamalar için sabitlenirken, sorafenib (SFB) ise kontrol molekülü olarak kullanılmıştır.

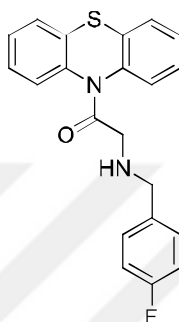
2.4. Moleküler Doking Analizleri

Proteinler, Maestro'daki Protein Preparation Wizard ile ve gridbox, Glide'ın Receptor Grid Generation modülü ile hazırlanmıştır. Ligandlar 2D builder ile çizilip, LigPrep modülüne tabi tutulmuş ve ardından Ligand Docking işlemi başlatılmıştır. Ligand interactions işlemi ile etkileşimler görüntülenmiştir. Docking aşamasında belli enerji değerinden yüksek değerle bağlananlar program tarafından elenmiştir. Yeşil ile gösterilen etkileşimler hidrofobik (Pi-Pi veya alkil olmak üzere); mor olanlar, hidrojen bağı etkileşimlerini; mavi-kırmızı, tuz köprüsünü; ve kırmızı ise pi-kasyon etkileşimlerini temsil etmektedir. Kolinesteraz inhibisyonu için AChE enzimi (pdb id: 4BDT) ve BuChE enzimi (pdb id: 4BDS) test edilmiş olup pozitif kontrol olarak Huprin W ve Takrin kullanılmıştır (Nachon ve ark., 2013).

3. BULGULAR

3.1. Sentezlenen Sübstitüe Fenotiyazin 10-Karboksamitler ve Analiz Sonuçları

3.1.1. 2-((4-Fluorobenzil)amino)-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)etanon (6)

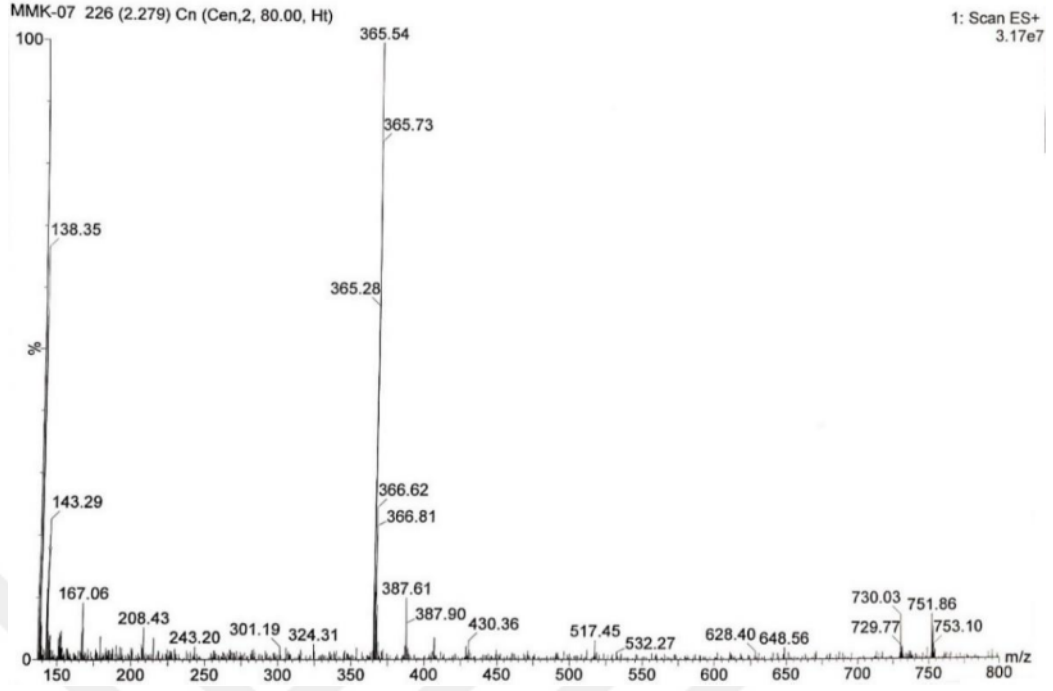


5 ml THF içindeki 4-fluorobenzilamine (0.54 mmol, 0.061 ml) K₂CO₃ (218 mg) eklendi. Üzerine 2.5 ml THF içindeki 2-kloro-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)etan-1-on (0.54 mmol, 150 mg) damla damla ilave edildi. Reaksiyon 6-8 saat reflux edildi. İTK ile reaksiyonun bitip bitmediği kontrol edildi. Reaksiyon bitiminde solvan uçurularak EtOAc ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz suyla yıkanıp Na₂SO₄ ile kurutuldu. Daha sonra solvan uçuruldu. 4:1 CHCl₃:Hekzan mobil fazı kullanılarak kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. 40% verimle 60 mg ürün elde edildi. **MS (ES⁺) m/z:** 365. Erime noktası: 88.1 °C.

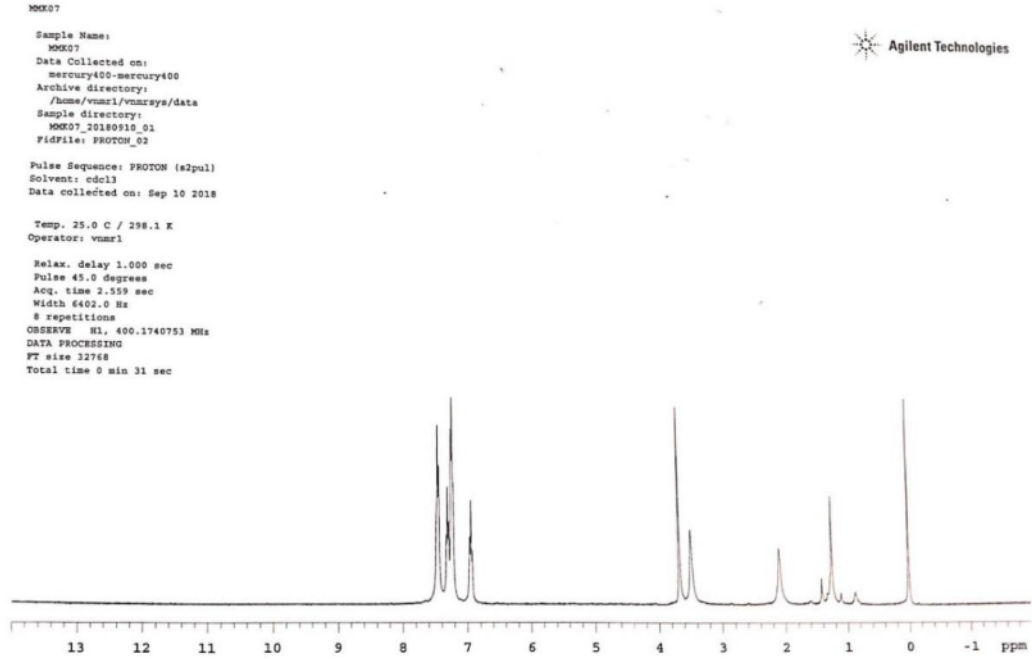
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δppm 2.09 (brd s, 1H), 3.48 (s, 2H), 3.66 (s, 2H), 6.92-6.96 (m, 2H), 7.21-7.32 (m, 6H), 7.43-7.45 (m, 4H). **¹³C NMR (CDCl₃)** δ ppm 50.29, 52.35, 115.00, 115.21, 126.89, 127.11, 128.09, 129.85, 129.93, 137.99, 160.76, 163.19.

Elementel Analiz: C₂₁H₁₇FN₂OS-0,35H₂O

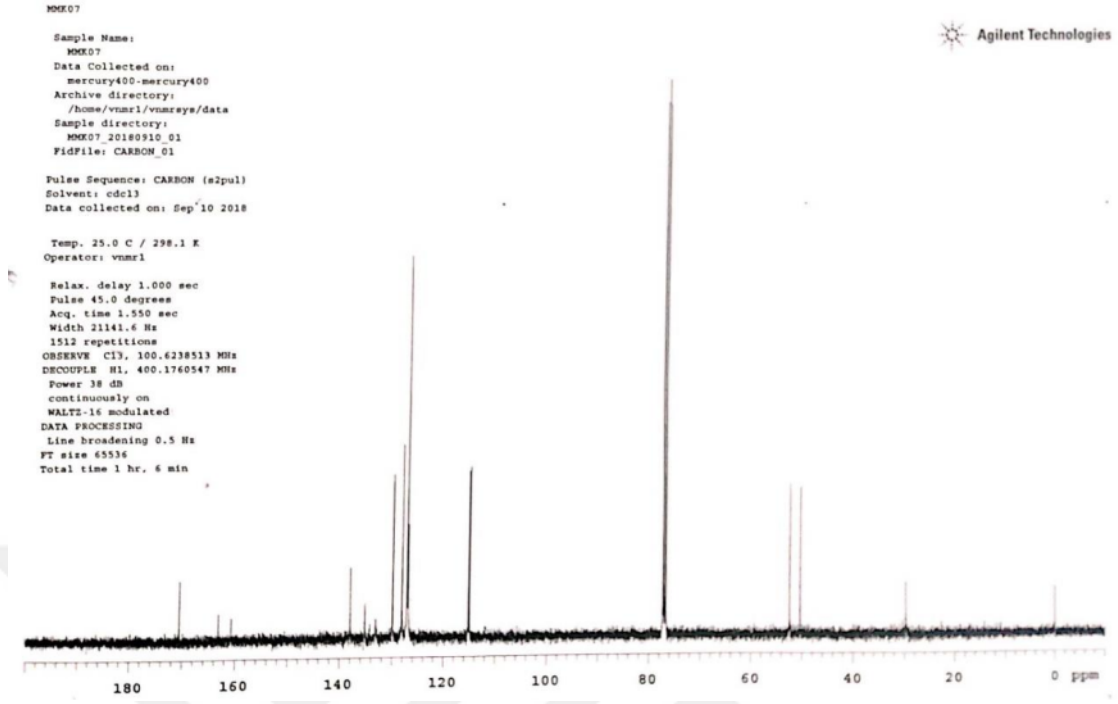
	C	H	N	S
Hesaplanan:	68.03	4.81	7.55	8.64
Bulunan:	68.34	5.34	7.17	8.10



Şekil 3.1. 6 no'lu bileşiğin kütle spektrumu

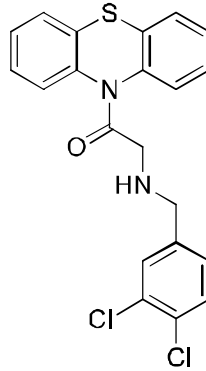


Şekil 3.2. 6 no'lu bileşiğin ¹H NMR spektrumu



Şekil 3.3. 6 no'lu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu

3.1.2. 2-((3,4-Diklorobenzil)amino-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)etanon (7)

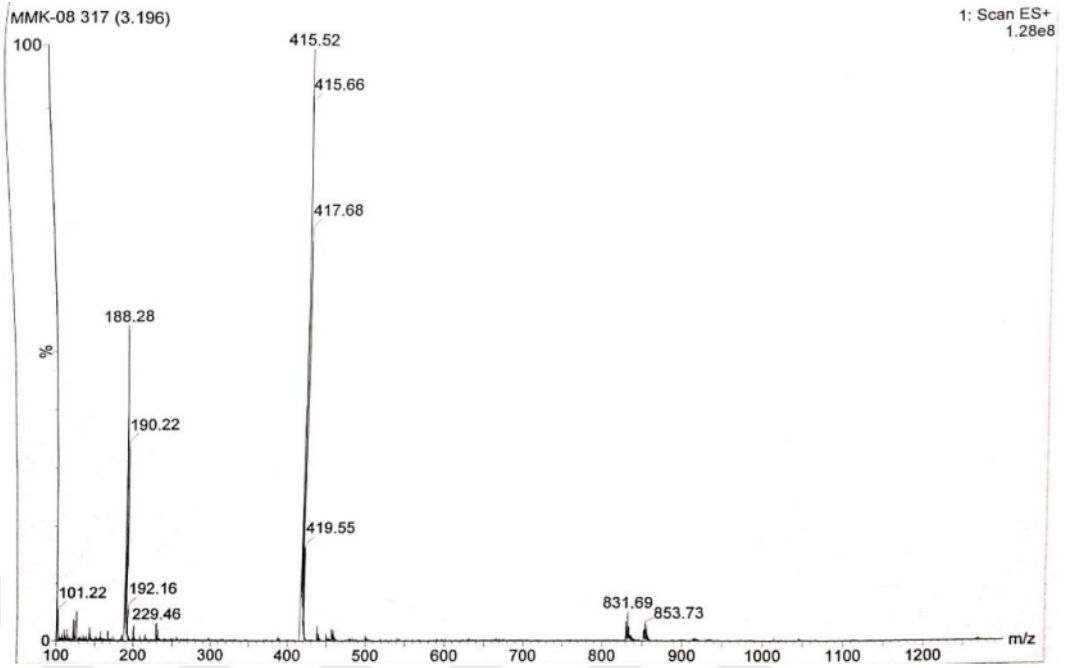


7.5 ml THF içindeki 3,4-diklorobenzilamine (0.54 mmol, 0.072 ml) K₂CO₃ (270 mg) eklendi. Üzerine 2.5 ml THF içindeki 2-kloro-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)etan-1-on (0.54 mmol, 150 mg) damla damla ilave edildi. Reaksiyon 6-8 saat reflux edildi. İTK ile reaksiyonun bitip bitmediği kontrol edildi. Reaksiyon bitiminde solvan uçurularak EtOAc ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz suyla yıkanıp Na₂SO₄ ile kurutuldu. Daha sonra solvan uçuruldu. 4:1 CHCl₃:Hekzan mobil fazı kullanılarak kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. 20% verimle 30 mg ürün elde edildi. **MS (ES+) m/z:** 415. Erime noktası: 145.6 °C.

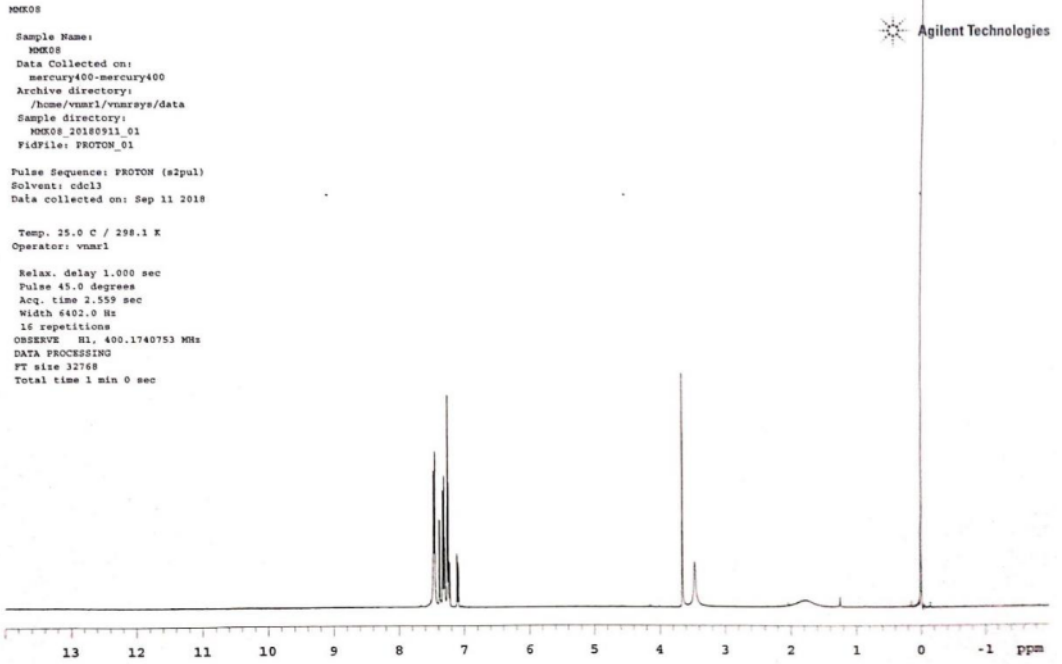
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δppm 3.46 (s, 2H), 3.65 (s, 2H), 7.10 (dd, *J*= 8.0 Hz, *J*= 2.0 Hz, 1H), 7.22-7.26 (m, 3H), 7.29-7.33 (m, 2H), 7.38 (d, *J*= 2.0 Hz, 1H), 7.45 (dd, *J*= 8.0 Hz, 4H). **¹³C NMR (DMSO)** δppm 49.58, 50.62, 127.05, 127.10, 127.20, 127.86, 128.10, 128.91, 129.70, 130.11, 130.60, 132.00, 137.85, 141.57, 169.82.

Elementel Analiz: C₂₁H₁₆Cl₂N₂OS

	C	H	N	S
Hesaplanan:	60.73	3.88	6.74	7.72
Bulunan:	60.45	3.89	6.91	7.72



Şekil 3.4. 7 no'lu bileşiğin kütle spektrumu



Şekil 3.5. 7 no'lu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

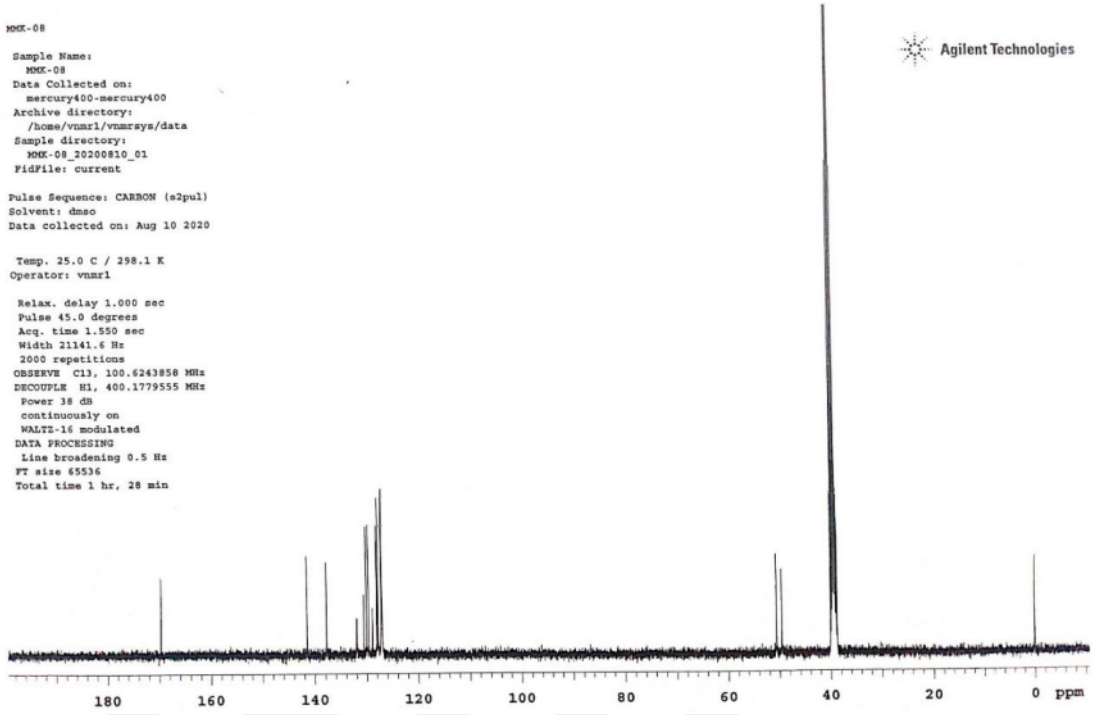
MMK-08

Sample Name:
MMK-08
Data Collected on:
Mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
MMK-08_20200810_01
FidFile: current

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsc
Data collected on: Aug 10 2020

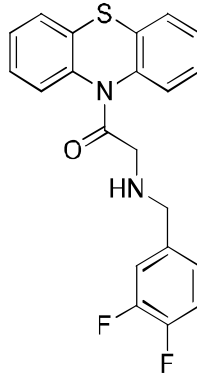
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
2000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243858 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 18 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 28 min



Şekil 3.6. 7 no'lu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu

3.1.3. 2-((3,4-Difluorobenzil)amino)-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)etanon (8)

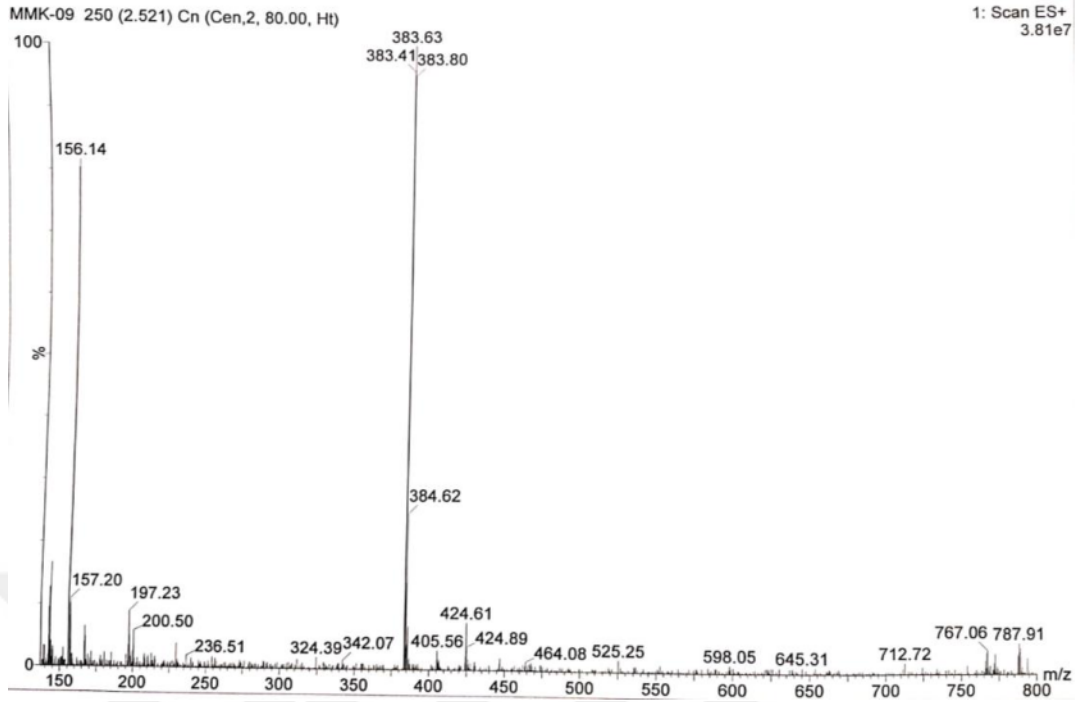


7.5 ml THF içindeki 3,4-difluorobenzilamine (0.54 mmol, 0.063 ml) K₂CO₃ (270 mg) eklendi. Üzerine 2 ml THF içindeki 2-kloro-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)etanon (0.54 mmol, 150 mg) damla damla ilave edildi. Reaksiyon 6-8 saat reflux edildi. İTK ile reaksiyonun bitip bitmediği kontrol edildi. Reaksiyon bitiminde solvan uçurularak EtOAc ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz suyla yıkanıp Na₂SO₄ ile kurutuldu. Daha sonra solvan uçuruldu. 4:1:2 Hekzan:CHCl₃:EtOAc mobil fazı kullanılarak kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. 27 % verimle 40 mg ürün elde edildi. **MS (ESI+) m/z:** 383. Erime noktası: 70.4 °C.

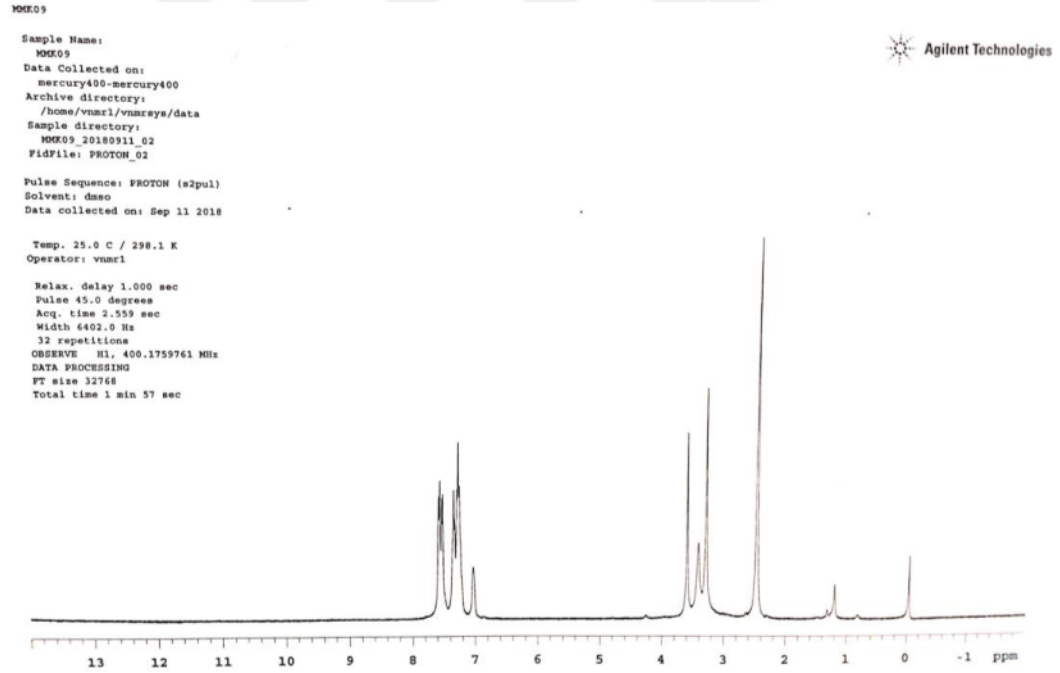
¹H NMR (400 MHz, DMSO): δppm 3.41 (s, 2H), 3.59 (s, 2H), 7.03 (s, 1H), 7.26-7.35 (m, 6H), 7.52-7.59 (m, 4H).

Elementel Analiz: C₂₁H₁₆F₂N₂OS-0,45H₂O

	C	H	N	S
Hesaplanan:	64.58	4.36	7.17	8.21
Bulunan:	64.57	4.45	7.05	7.93

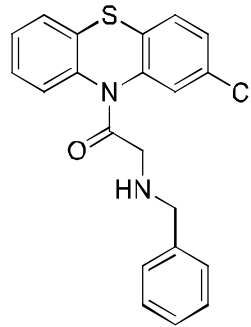


Şekil 3.7. 8 no'lu bileşiğin kütle spektrumu



Şekil 3.8. 8 no'lu bileşiğin ¹H NMR spektrumu

3.1.4. 2-(Benzilamino)-1-(2-kloro-10*H*-fenotiyazin-10-il)etanon (9)

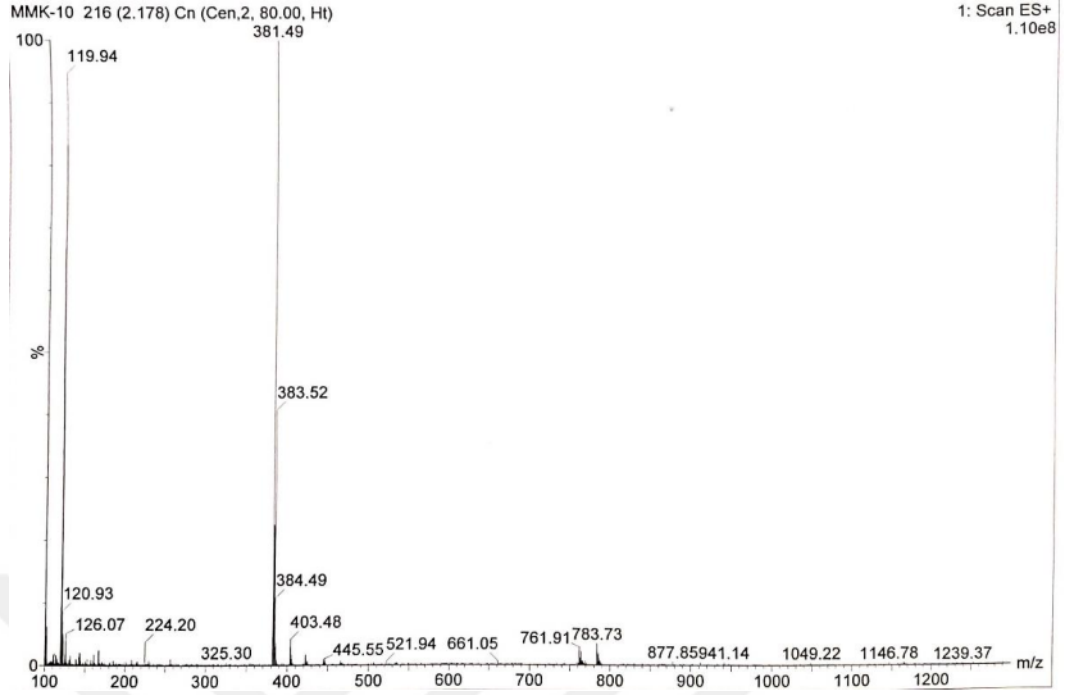


4 ml THF içindeki benzilamine (0.312 mmol, 0.034 ml) K₂CO₃ (156 mg) eklendi. Üzerine 1 ml THF içindeki 2-kloro-1-(2-kloro-10*H*-fenotiyazin-10-il)etanon (0.26 mmol, 100 mg) damla damla ilave edildi. Reaksiyon 6-8 saat reflux edildi. İTK ile reaksiyonun bitip bitmediği kontrol edildi. Reaksiyon bitiminde solvan uçurularak EtOAc ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz suyla yıkanıp Na₂SO₄ ile kurutuldu. Daha sonra solvan uçuruldu. 4:1:2 Hekzan:CHCl₃:Etil asetat mobil fazı kullanılarak kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. 43% verimle 43 mg ürün elde edildi. **MS (ESI+) m/z:** 382. Erime noktası: 115.8 °C.

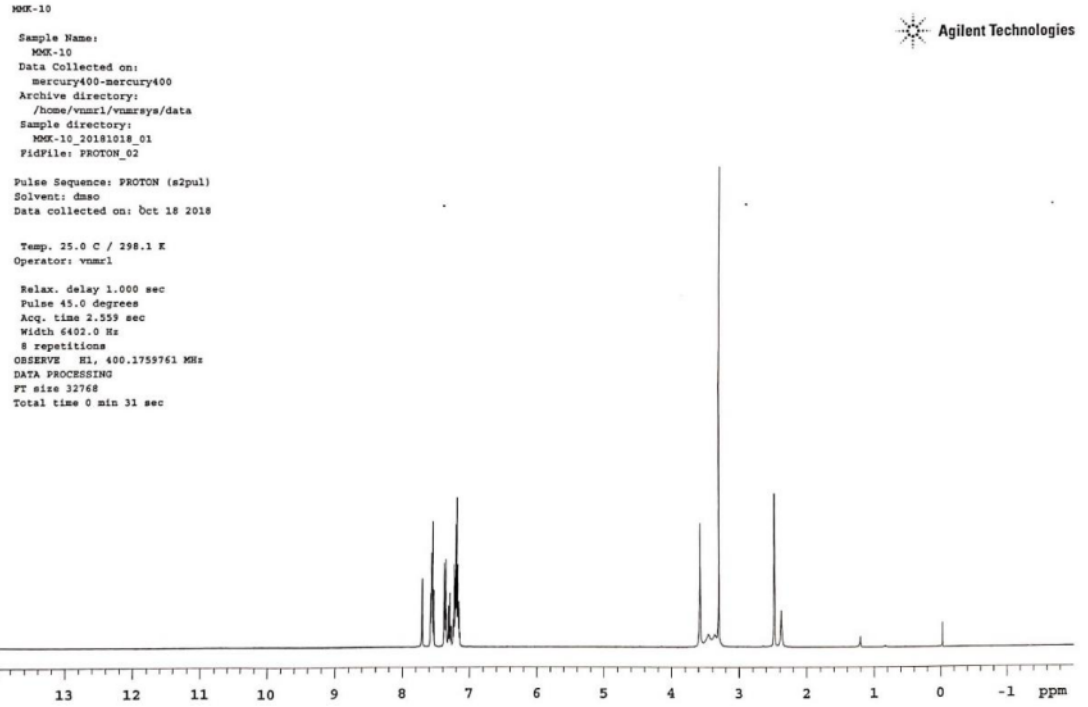
¹H NMR (400 MHz, DMSO): δppm 2.37 (brd s, 1H), 3.41 (s, 2H), 3.58 (s, 2H), 7.14-7.24 (m, 5H), 7.27-7.31 (m, 1H), 7.34-7.38 (m, 2H), 7.53-7.58 (m, 3H), 7.71 (d, J=2.0 Hz, 1H). **¹³C NMR (DMSO)** δ ppm 49.76, 52.06, 126.63, 127.01, 127.09, 127.38, 127.54, 127.97, 128.05, 128.08, 129.05, 131.17, 131.52, 131.78, 137.38, 139.17, 140.03, 169.99.

Elementel Analiz: C₂₁H₁₇ClN₂OS

	C	H	N	S
Hesaplanan:	66.22	4.50	7.35	8.42
Bulunan:	66.31	4.71	7.49	8.38



Şekil 3.9. 9 no'lu bileşiğin kütle spektrumu



Şekil 3.10. 9 no'lu bileşiğin ¹H NMR spektrumu

MOX-10

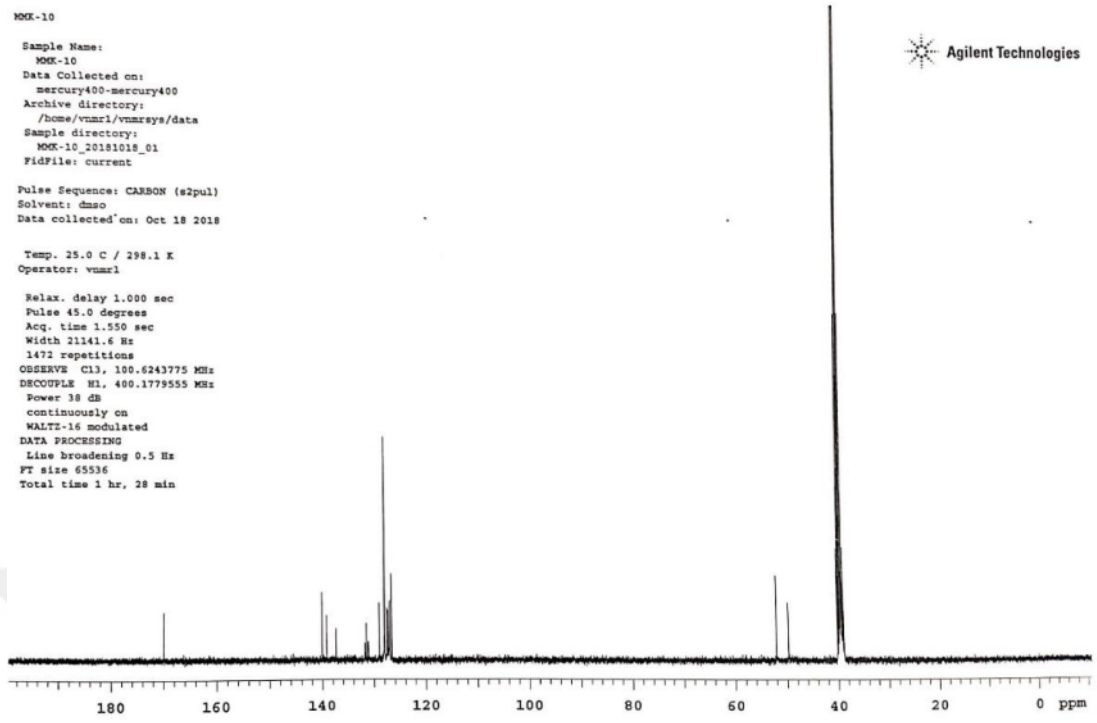
Sample Name:
MOX-10
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
MOX-10_20181018_01
FidFile: current

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Oct 18 2018

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

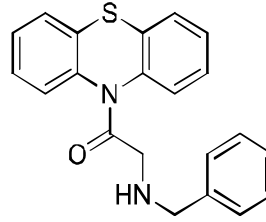
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
1472 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243775 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 28 min

Agilent Technologies



Şekil 3.11. 9 no'lu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu

3.1.5. 2-(Benzilamino)-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)etanon (10)

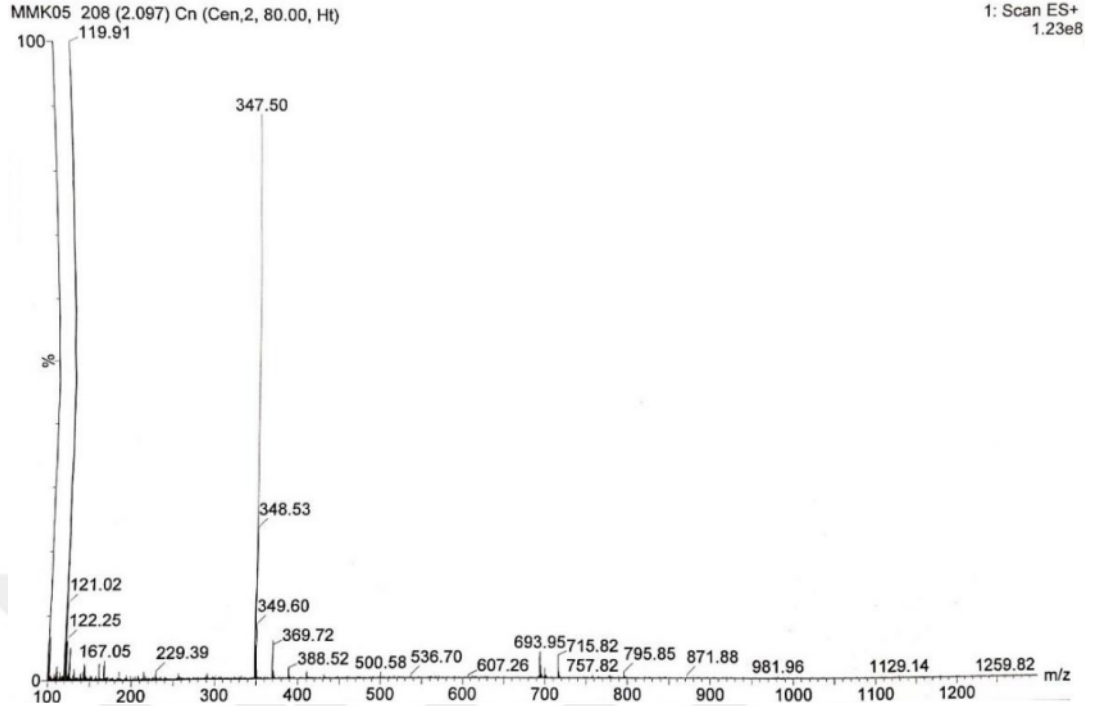


Benzilamin (0.516 mmol, 0.046 ml) ve K₂CO₃ (516 mg) 6 ml THF içinde çözüldü. Üzerine 2.5 ml THF içindeki 2-kloro-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)etanon (0.120 g, 0.43 mmol) damla damla ilave edildi. Reaksiyon 6-8 saat reflux edildi. Reaksiyon İTK ile kontrol edildi. Bitiminde solvan uçurularak EtOAc ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz suyla yıkanıp MgSO₄ ile kurutuldu. Daha sonra solvan uçuruldu. 3:1 hekzan-etilasetat mobil fazı kullanılarak kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. 41.6% verimle 50 mg ürün elde edildi. **MS (ESI+)** **m/z**: 347. Erime noktası: 113.5 °C.

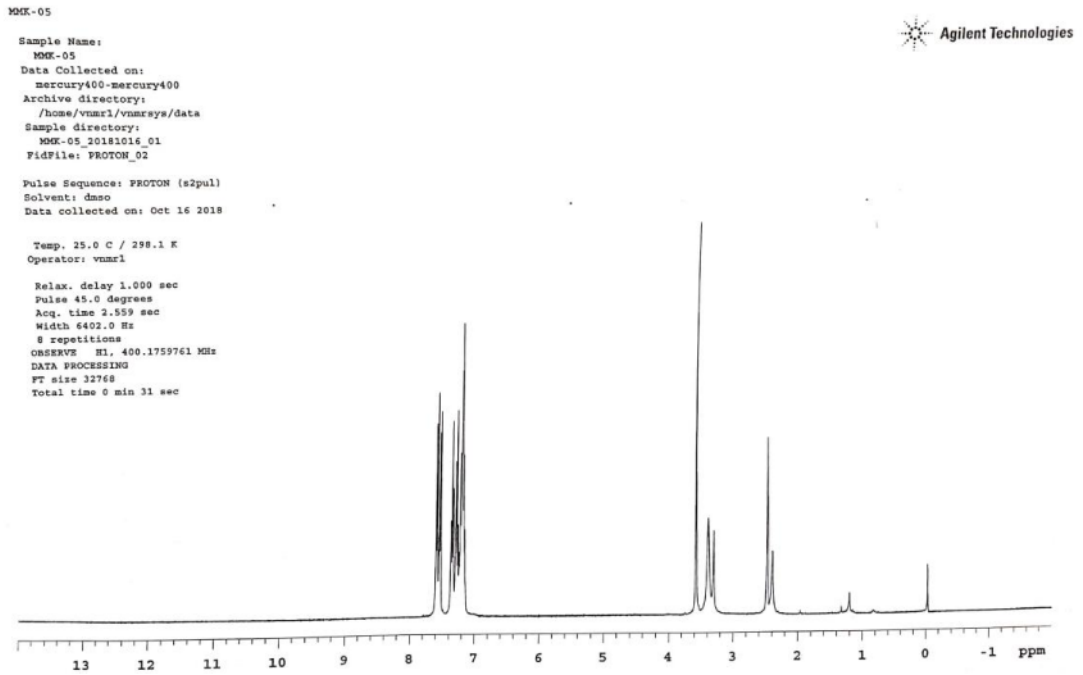
¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ ppm 2.39 (brd s, 1H), 3.39 (brd s, 2H), 3.57 (s, 2H), 7.15-7.24 (m, 5H), 7.26-7.29 (m, 2H), 7.33-7.37 (m, 2H), 7.56 (m, 4H). **¹³C NMR (DMSO)** δ ppm 49.77, 52.08, 126.61, 127.10, 127.17, 127.25, 127.92, 127.96, 128.04, 132.08, 137.92, 140.05, 170.00.

Elementel Analiz: C₂₁H₁₈N₂OS

	C	H	N	S
Hesaplanan:	72.80	5.24	8.09	9.25
Bulunan:	72.65	5.54	8.05	9.09



Şekil 3.12. 10 no'lu bileşiğin kütle spektrumu



Şekil 3.13. 10 no'lu bileşiğin ¹H NMR spektrumu

MMK-05

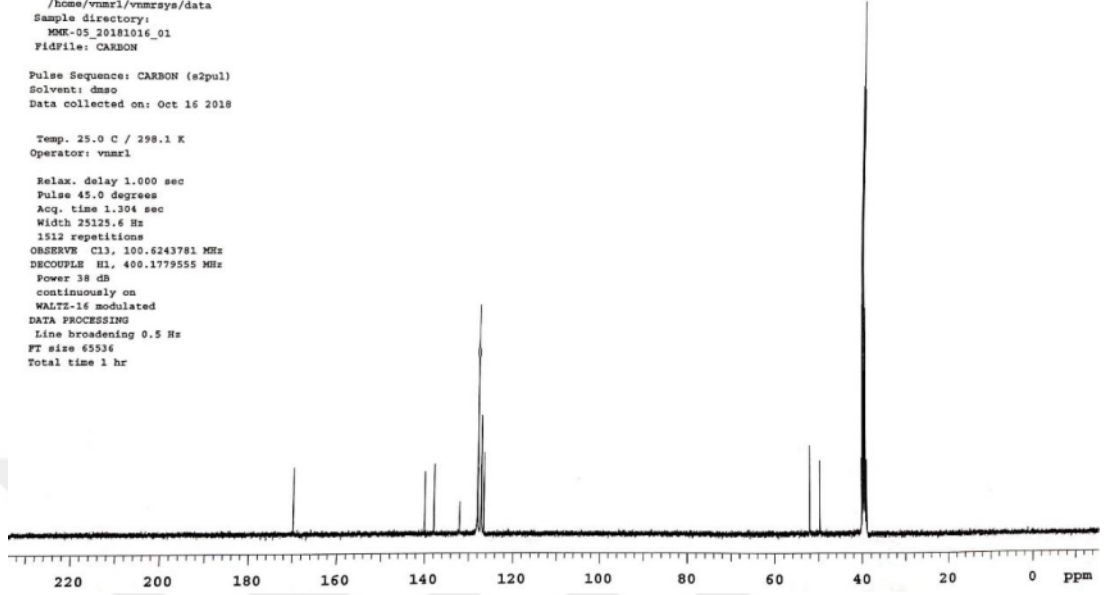


Sample Name:
MMK-05
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
MMK-05_20181016_01
FidFile: CARBON

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: dmsd
Data collected on: Oct 16 2018

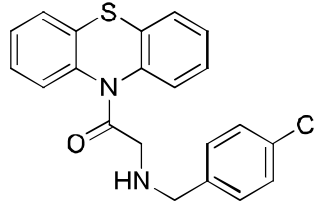
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
1512 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243781 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779555 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr



Şekil 3.14. 10 no'lu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu

3.1.6. 2-((4-Klorobenzil)amino)-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)etanon (11)

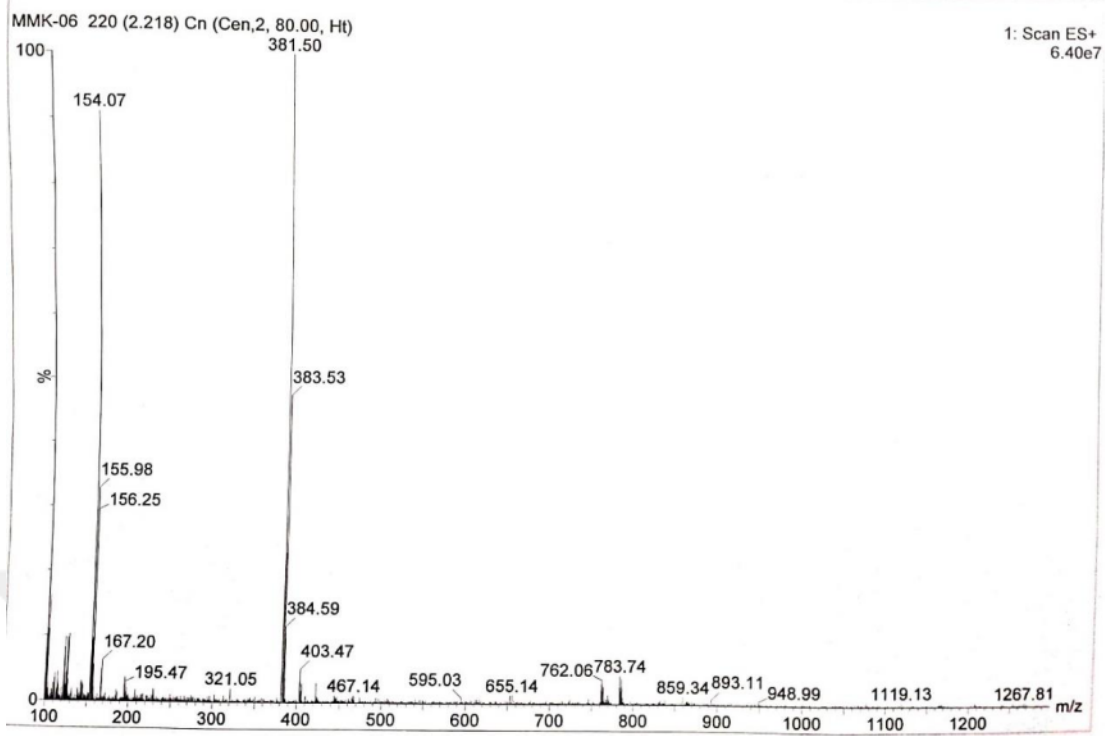


4-Klorobenzilamin (0.534 mmol, 0.065 ml) ve K₂CO₃ (270 mg) 7.5 ml THF içinde çözüldü. Üzerine 2.5 ml THF içindeki 2-kloro-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)etan-1-on (0.150 g, 0.53 mmol) damla damla ilave edildi. Reaksiyon 6-8 saat reflux edildi. Reaksiyon İTK ile kontrol edildi. Bitiminde solvan uçurularak EtOAc ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz suyla yıkanıp MgSO₄ ile kurutuldu. Daha sonra solvan uçuruldu. 8:1 kloroform-etilasetat mobil fazı kullanılarak kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. 10.6% verimle 16 mg ürün elde edildi. **MS (ESI+)** *m/z*: 381. Erime noktası:108.2 °C.

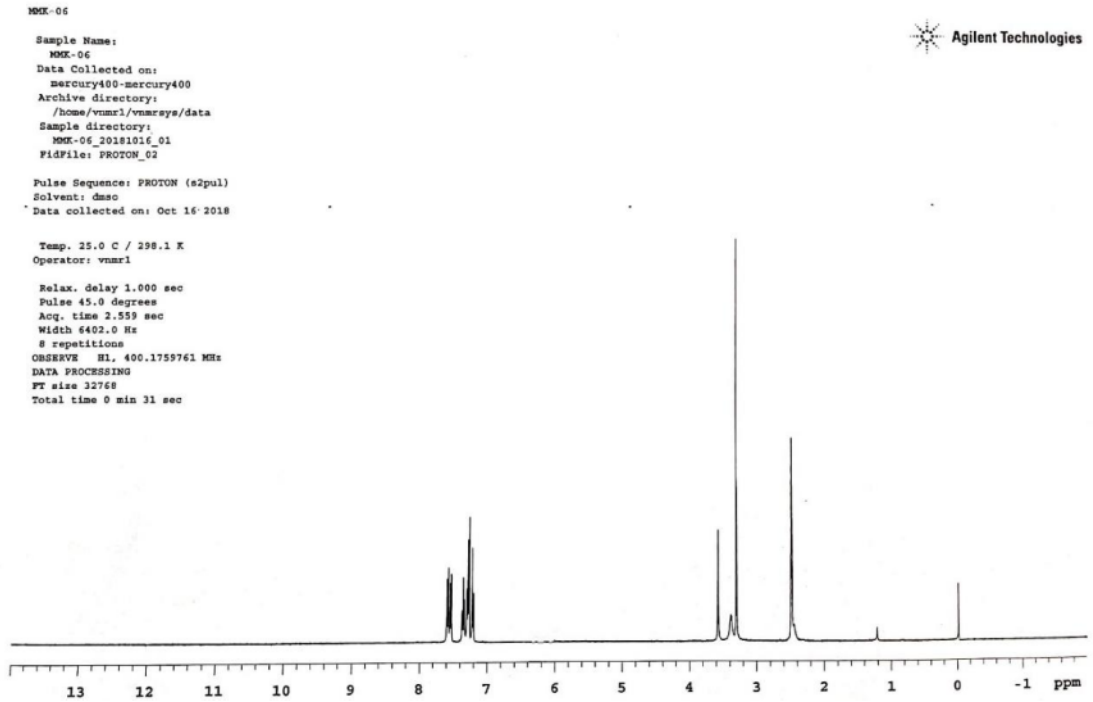
¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ ppm 3.38 (brd s, 2H), 3.57 (s, 2H), 7.21 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.28 (m, 4H), 7.37 (m, 2H), 7.56 (m, 4H). **¹³C NMR (DMSO):** δ ppm 49.74, 51.25, 127.11, 127.17, 127.27, 127.39, 127.98, 129.72, 131.08, 132.07, 137.91, 139.23, 169.95.

Elementel Analiz: C₂₁H₁₇ClN₂OS·0,2H₂O

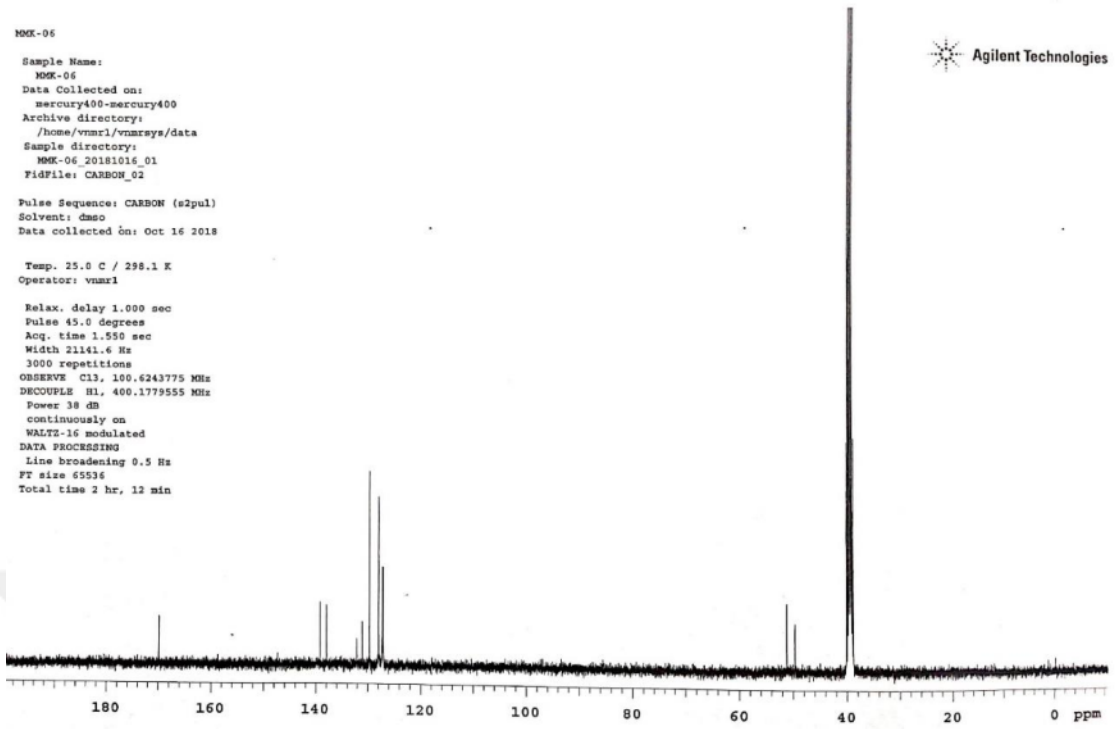
	C	H	N	S
Hesaplanan:	65.59	4.56	7.28	8.33
Bulunan:	65.53	4.64	7.38	8.31



Şekil 3.15. 11 no'lu bileşiğin kütle spektrumu

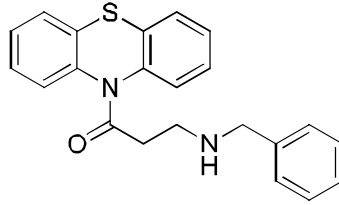


Şekil 3.16. 11 no'lu bileşiğin ¹H NMR spektrumu



Şekil 3.17. 11 no'lu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu

3.1.7. 3-(Benzilamino)-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)propan-1-on (12)

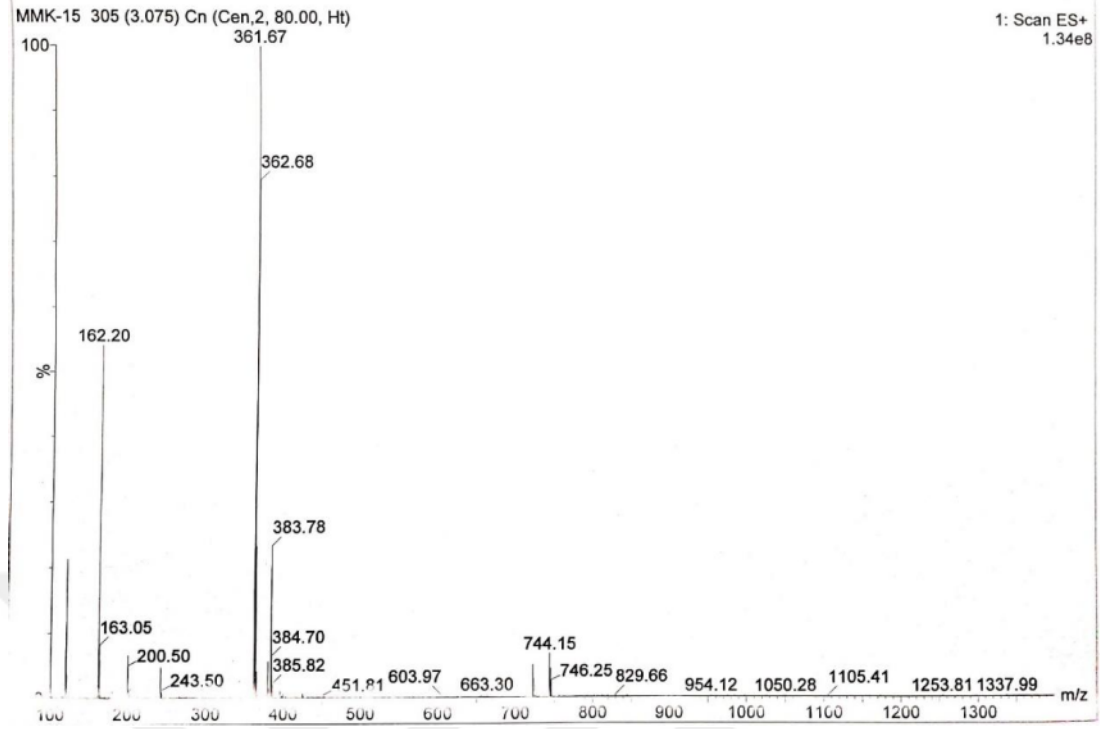


Benzilamin (1.242 mmol, 0.135 ml) ve K₂CO₃ (745.2 mg) 15 ml THF içinde çözüldü. Üzerine 5 ml THF içindeki 3-kloro-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)propan-1-on (0.300 g, 1.035 mmol) damla damla ilave edildi. Reaksiyon 6-8 saat reflux edildi. Reaksiyon İTK ile kontrol edildi. Bitiminde solvan uçurularak EtOAc ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz suyla yıkanıp MgSO₄ ile kurutuldu. Daha sonra solvan uçuruldu. 13:1 kloroform-hekzan mobil fazı kullanılarak kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. 14% verimle 42 mg ürün elde edildi. **MS (ESI⁺) m/z:** 361. Erime noktası: 81.9 °C.

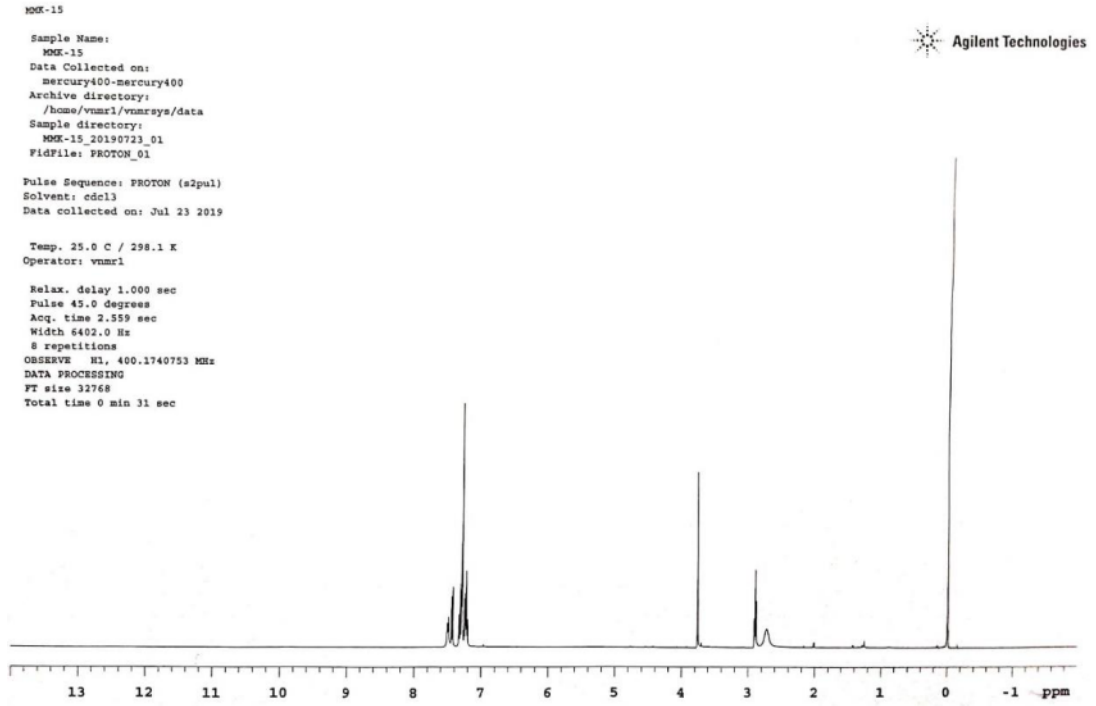
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 2.76 (brd s, 3H, CH₂+NH), 2.89 (t, 2H), 3.76 (s, 2H), 7.20-7.25 (m, 4H), 7.27-7.30 (m, 4H), 7.31-7.33 (m, 1H), 7.43 (dd, *J* = 7.6 Hz, *J* = 1.2 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 8 Hz, 2H). **¹³C NMR (CDCl₃):** δ ppm 34.49, 44.87, 53.74, 126.94, 127.01, 127.09, 127.29, 128.02, 128.23, 128.43, 138.45, 139.30, 171.33.

Elementel Analiz: C₂₂H₂₀N₂OS-0,5H₂O

	C	H	N	S
Hesaplanan:	71.51	5.72	7.58	8.67
Bulunan:	71.67	5.60	7.65	8.82



Şekil 3.18. 12 no'lu bileşiğin kütle spektrumu



Şekil 3.19. 12 no'lu bileşiğin ¹H NMR spektrumu

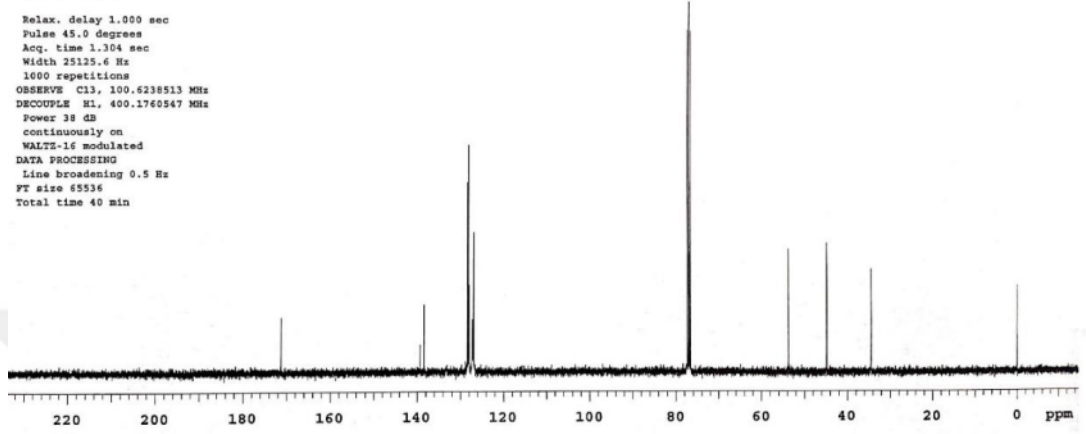
MMK-15

Sample Name:
MMK-15
Data Collected on:
Mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
MMK-15_20190723_01
FidFile: CARBON_01

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdc13
Data collected on: Jul 23 2019

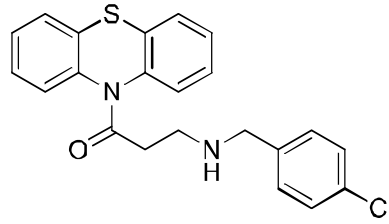
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
1000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6238513 MHz
DECOUPLE H1, 400.1760547 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 40 min



Şekil 3.20. 12 no'lu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu

3.1.8. 3-((4-Klorobenzil)amino)-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)propan-1-on (13)

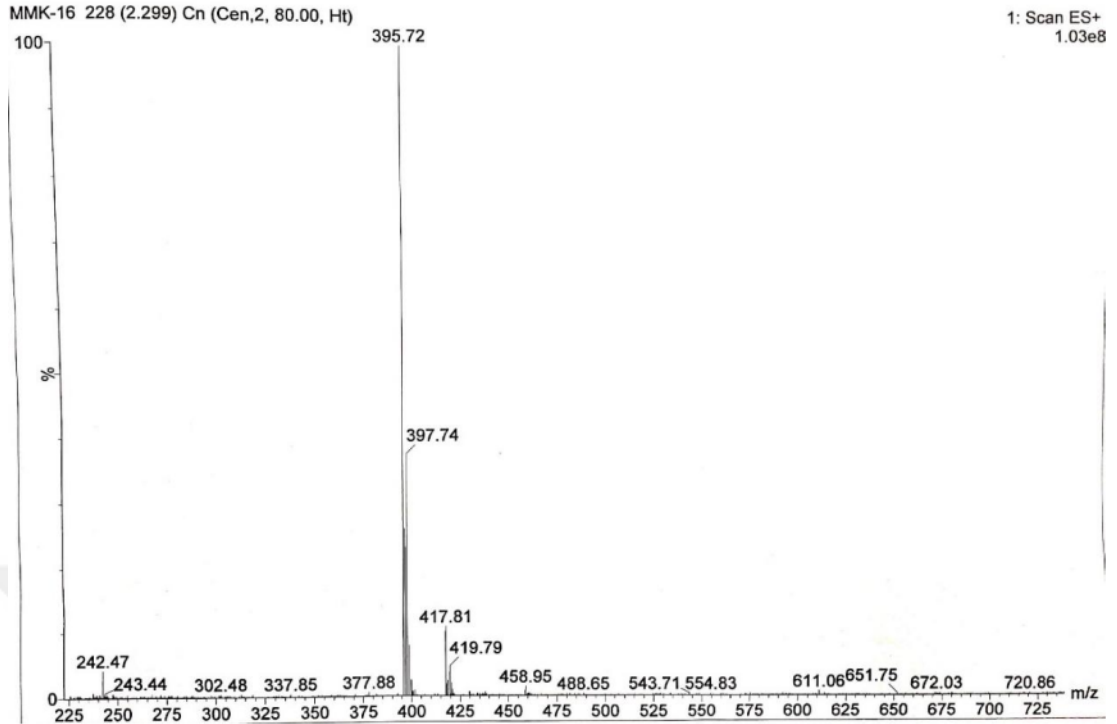


4-Klorobenzilamin (1.242 mmol, 0.151 ml) ve K₂CO₃ (745.2 mg) 15 ml THF içinde çözüldü. Üzerine 5 ml THF içindeki 3-kloro-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)propan-1-on (0.300 g, 1.035 mmol) damla damla ilave edildi. Reaksiyon 6-8 saat reflux edildi. Reaksiyon İTK ile kontrol edildi. Bitiminde solvan uçurularak EtOAc ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz suyla yıkanıp MgSO₄ ile kurutuldu. Daha sonra solvan uçuruldu. 50:1 diklorometan-metanol mobil fazı kullanılarak kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. 11.6% verimle 35 mg ürün elde edildi. **MS (ESI⁺) m/z:** 395. Erime noktası: 95.2 °C.

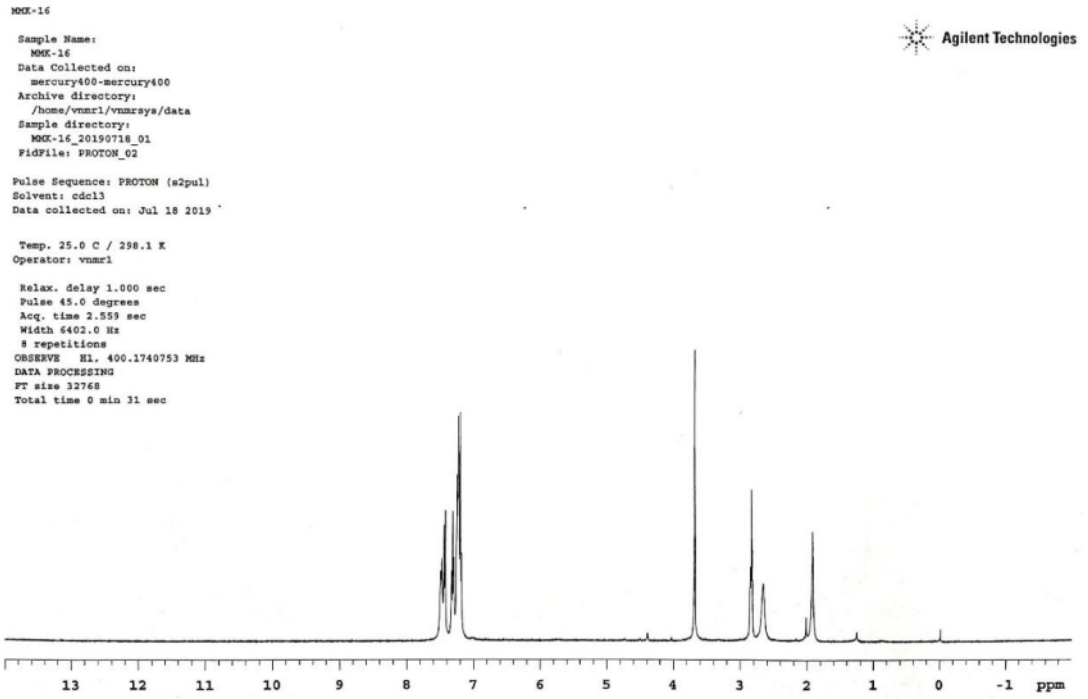
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 1.9 (brd s, 1H), 2.66 (brd s, 2H), 2.84 (t, 2H), 3.68 (s, 2H), 7.18-7.33 (m, 8H), 7.46 (m, 4H). **¹³C NMR (CDCl₃):** δ ppm 34.77, 44.84, 53.13, 126.93, 126.99, 127.26, 128.04, 128.43, 129.41, 132.52, 138.51, 138.60, 171.30.

Elementel Analiz: C₂₂H₁₉ClN₂OS-1,5 CH₂Cl₂

	C	H	N	S
Hesaplanan:	54.03	4.24	5.36	6.13
Bulunan:	54.13	4.20	5.69	6.41



Şekil 3.21. 13 no'lu bileşiğin kütle spektrumu



Şekil 3.22. 13 no'lu bileşiğin ¹H NMR spektrumu

MMK-16

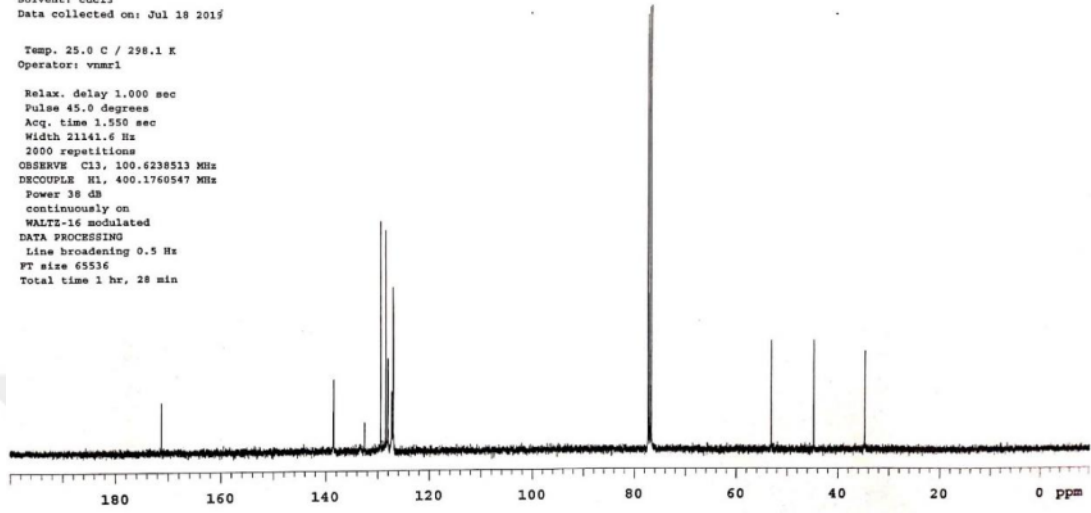
Sample Name:
MMK-16
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
MMK-16_20190718_01
FidFile: CARBON_01

Agilent Technologies

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdc13
Data collected on: Jul 18 2019

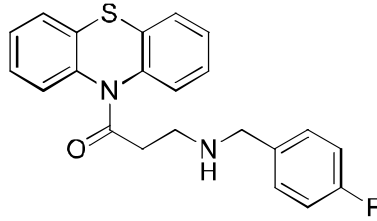
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
2000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6238513 MHz
DECOUPLE H1, 400.1760547 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 28 min



Şekil 3.23. 13 no'lu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu

3.1.9. 3-((4-Fluorobenzil)amino)-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)propan-1-on (14)

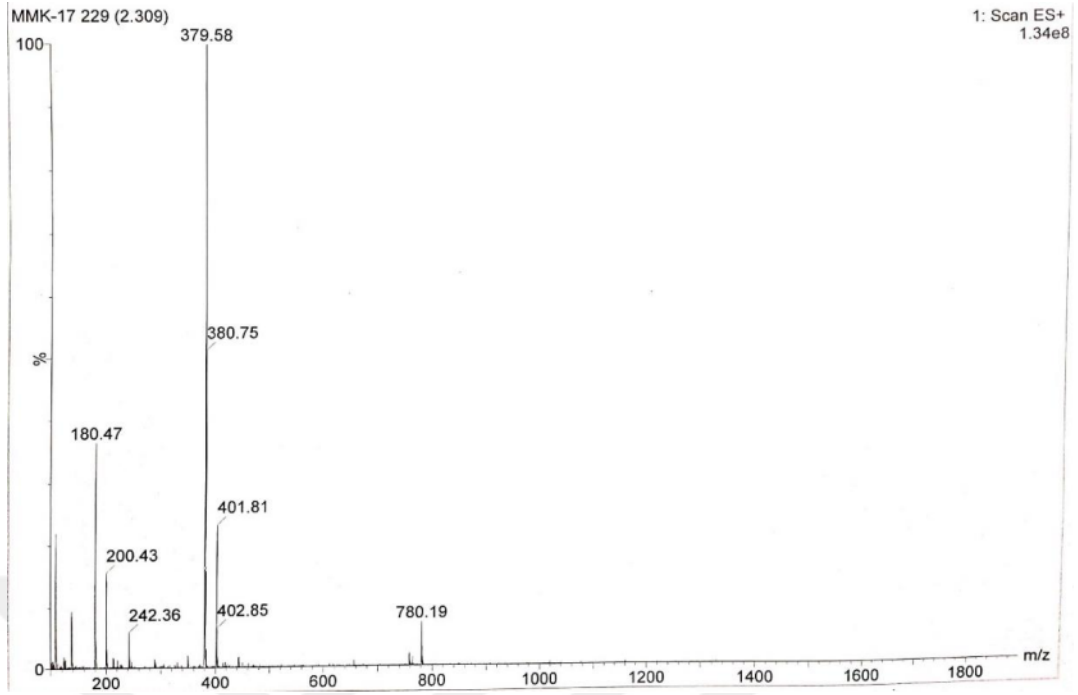


4-Fluorobenzilamin (1.242 mmol, 0.141 ml) ve K₂CO₃ (745.2 mg) 15 ml THF içinde çözüldü. Üzerine 5 ml THF içindeki 3-kloro-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)propan-1-on (0.300 g, 1.035 mmol) damla damla ilave edildi. Reaksiyon 6-8 saat reflux edildi. Reaksiyon İTK ile kontrol edildi. Bitiminde solvan uçurularak EtOAc ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz suyla yıkanıp MgSO₄ ile kurutuldu. Daha sonra solvan uçuruldu. EtOAc'da çözülerek hekzan ile kristalizasyon gerçekleştirildi. 12.3% verimle 37 mg ürün elde edildi. **MS (ESI+)** m/z: 379. Erime noktası: 87.9 °C.

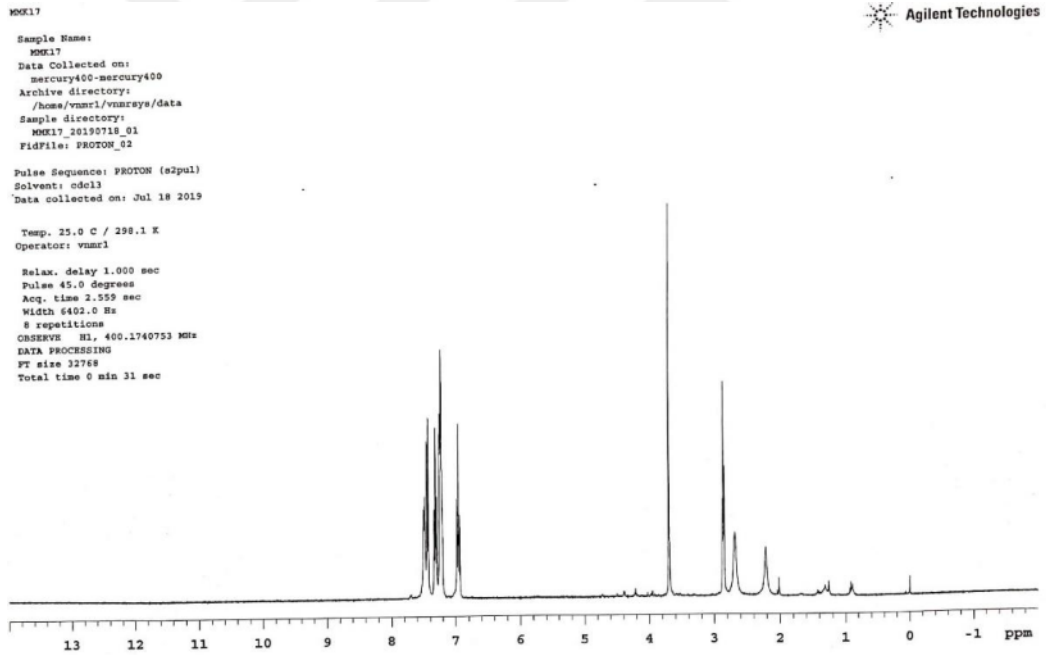
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 2.21 (brd s, 1H), 2.68 (s, 2H), 2.85 (t, 2H), 3.69 (s, 2H), 6.96 (t, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.20-7.25 (m, 4H), 7.31 (t, *J*=6.8 Hz, 2H), 7.43 (d, *J*=7.2 Hz, 2H), 7.49 (d, *J*=8 Hz, 2H). **¹³C NMR (CDCl₃):** δ ppm 34.66, 44.85, 53.08, 115.02, 115.23, 126.95, 127.00, 127.27, 128.03, 129.64, 129.72, 134.23, 135.53, 138.47, 160.69, 163.12, 171.32.

Elementel Analiz: C₂₂H₁₉FN₂OS

	C	H	N	S
Hesaplanan:	69.82	5.06	7.40	8.47
Bulunan:	69.51	5.29	7.31	8.26



Şekil 3.24. 14 no'lu bileşiğin kütle spektrumu



Şekil 3.25. 14 no'lu bileşiğin ¹H NMR spektrumu

NOG17

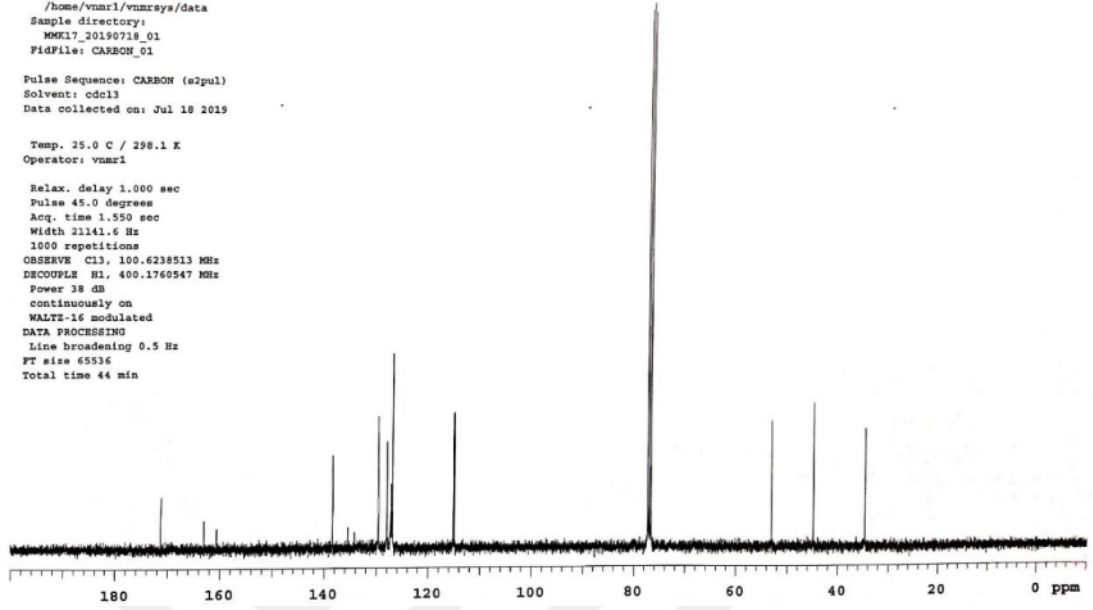
Sample Name:
NOG17
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
NOG17_20190718_01
FidFile: CARBON_01

Agilent Technologies

Pulse Sequence: CARBON (zgpg30)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Jul 18 2019

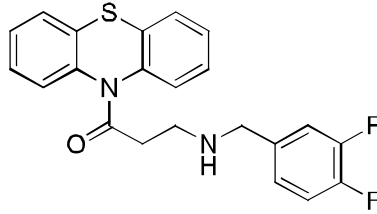
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.550 sec
Width 21141.6 Hz
1000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6238513 MHz
DECOUPLE H1, 400.1760547 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 44 min



Şekil 3.26. 14 no'lu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu

3.1.10. 3-((3,4-Difluorobenzil)amino)-1-(10H-fenotiyazin-10-il)propan-1-on (15)

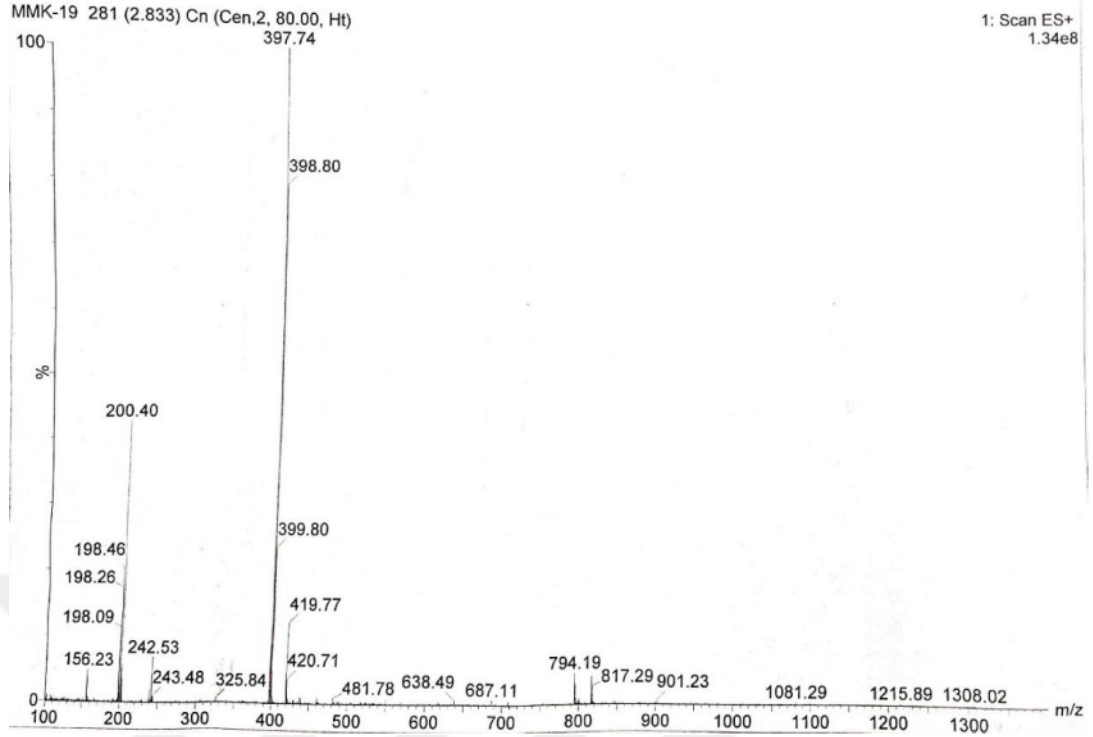


3,4-Difluorobenzilamin (1.242 mmol, 0.15 ml) ve K_2CO_3 (745.2 mg) 15 ml THF içinde çözüldü. Üzerine 5 ml THF içindeki 3-kloro-1-(10H-fenotiyazin-10-il)propan-1-on (0.300 g, 1.035 mmol) damla damla ilave edildi. Reaksiyon 6-8 saat reflux edildi. Reaksiyon İTK ile kontrol edildi. Bitiminde solvan uçurularak EtOAc ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz suyla yıkanıp $MgSO_4$ ile kurutuldu. Daha sonra solvan uçuruldu. 3:1 kloroform-hekzan solvan sistemi mobil faz olarak kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. 12% verimle 36 mg ürün elde edildi. **MS (ESI+) m/z:** 397. Erime noktası: 94.7 °C.

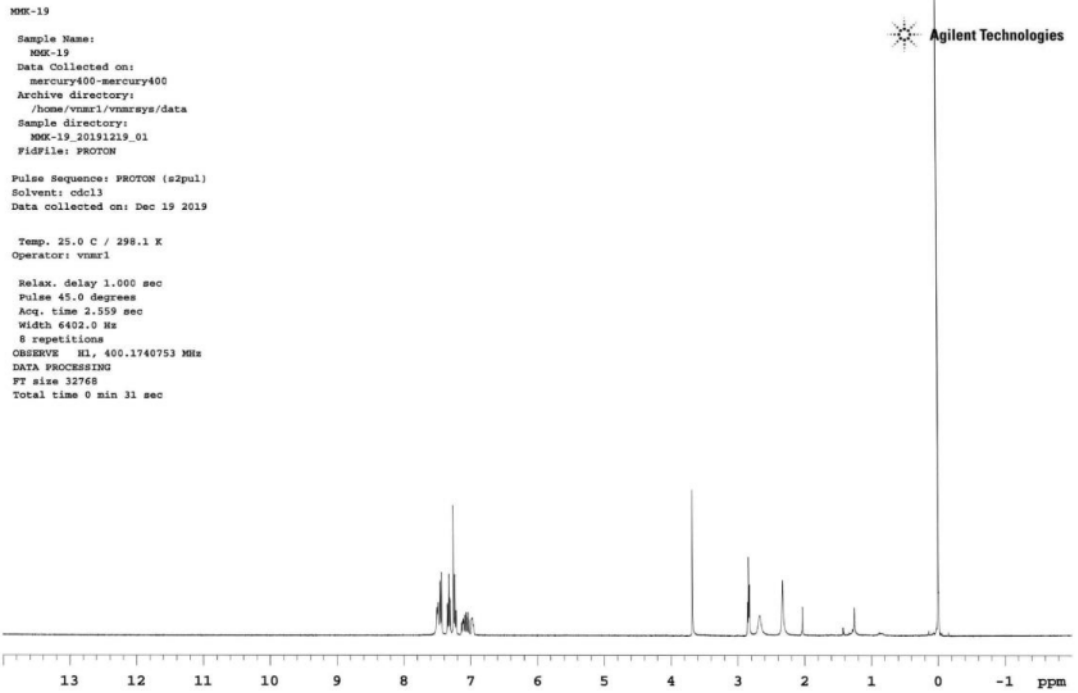
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 2.32 (s, 1H), 2.67 (brd s, 2H), 2.83 (t, 2H), 3.67 (s, 2H), 6.97 – 7.13 (m, 3H), 7.236 (t, 2H), 7.30-7.34 (m, 2H), 7.43 – 7.50 (m, 4H).

Elementel Analiz: $C_{22}H_{18}F_2N_2OS \cdot 0.3H_2O$

	C	H	N	S
Hesaplanan:	65.75	4.66	6.97	7.98
Bulunan:	65.77	4.86	6.81	7.74



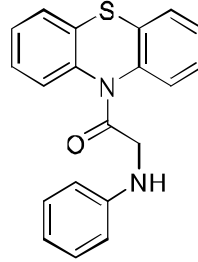
Şekil 3.27. 15 no'lu bileşiğin kütle spektrumu



Şekil 3.28. 15 no'lu bileşiğin ¹H NMR spektrumu

3.2. Aromatik Amin Kullanılarak Sentezlenen Sübstitüe Fenotiyazin 10-Karboksamitler ve Analiz Sonuçları

3.2.1. 1-(10*H*-Fenotiyazin-10-il)-2-(fenilamino)etan-1-on (16)

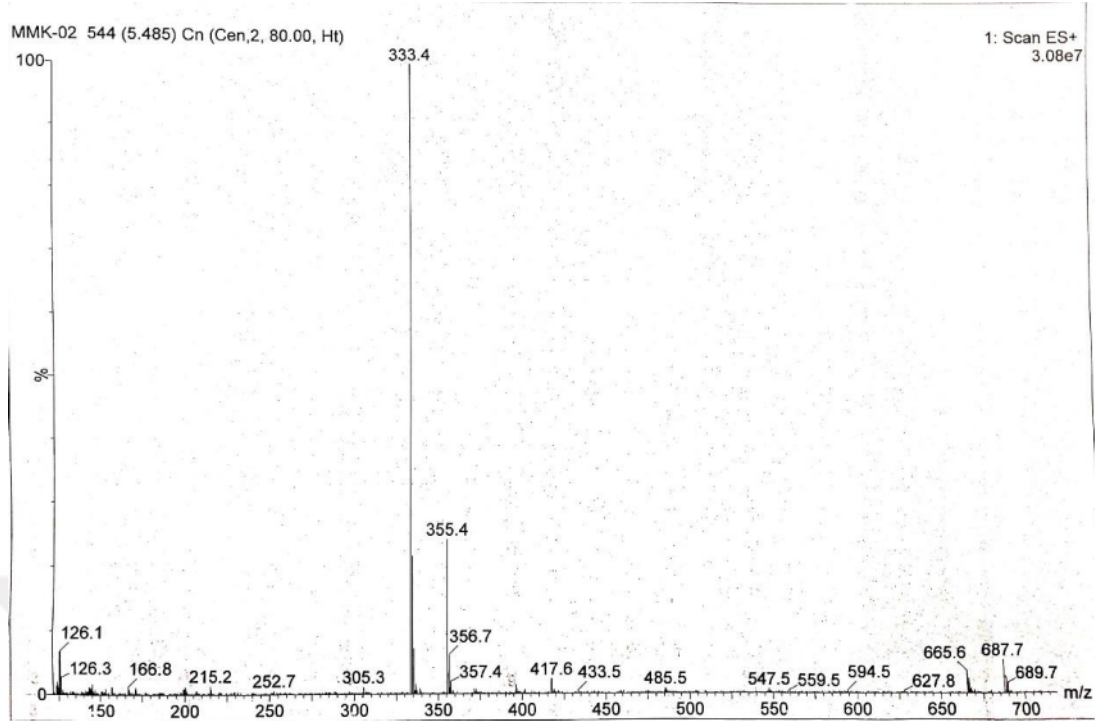


2-Kloro-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)etan-1-on (250 mg, 0.9 mmol) ve trietilaminin (0.10 ml) 50 ml etanoldeki karışımına anilin (0.9 mmol) ve NaI (134.1 mg, 0.9 mmol) oda sıcaklığında eklendi. Karışım 10 saat reflux edildi ve reaksiyon bitiminde karışım süzülerek uçuruldu. Kalan kısım etilasetatta çözülerek suyla ekstraksiyon yapıldı. EtOAc'da çözülerek hekzan ile kristalizasyon gerçekleştirildi. **MS (ESI+)** *m/z*: 333. Erime noktası: 153 °C.

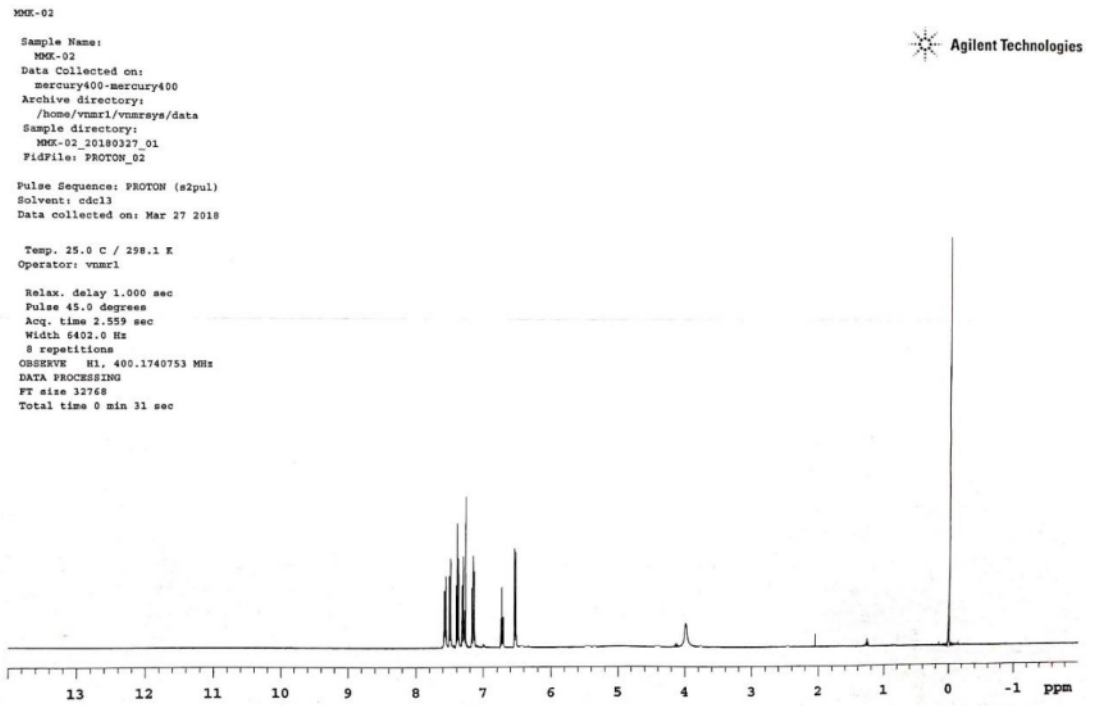
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 3.98 (s, 2H), 6.51-6.54 (m, 2H), 6.70-6.74 (m, 1H), 7.13-7.17 (m, 2H), 7.26-7.31 (m, 2H), 7.37 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H) 7.40 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H) 7.49 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.6 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H). **¹³C NMR (CDCl₃)** δ ppm 46.73, 113.30, 118.24, 126.87, 127.23, 127.41, 128.28, 129.25, 137.69, 146.82, 168.98.

Elementel Analiz: C₂₀H₁₆N₂OS

	C	H	N	S
Hesaplanan:	72.26	4.85	8.43	9.65
Bulunan:	72.15	5.05	8.45	9.60



Şekil 3.29. 16 no'lu bileşiğin kütle spektrumu



Şekil 3.30. 16 no'lu bileşiğin ¹H NMR spektrumu

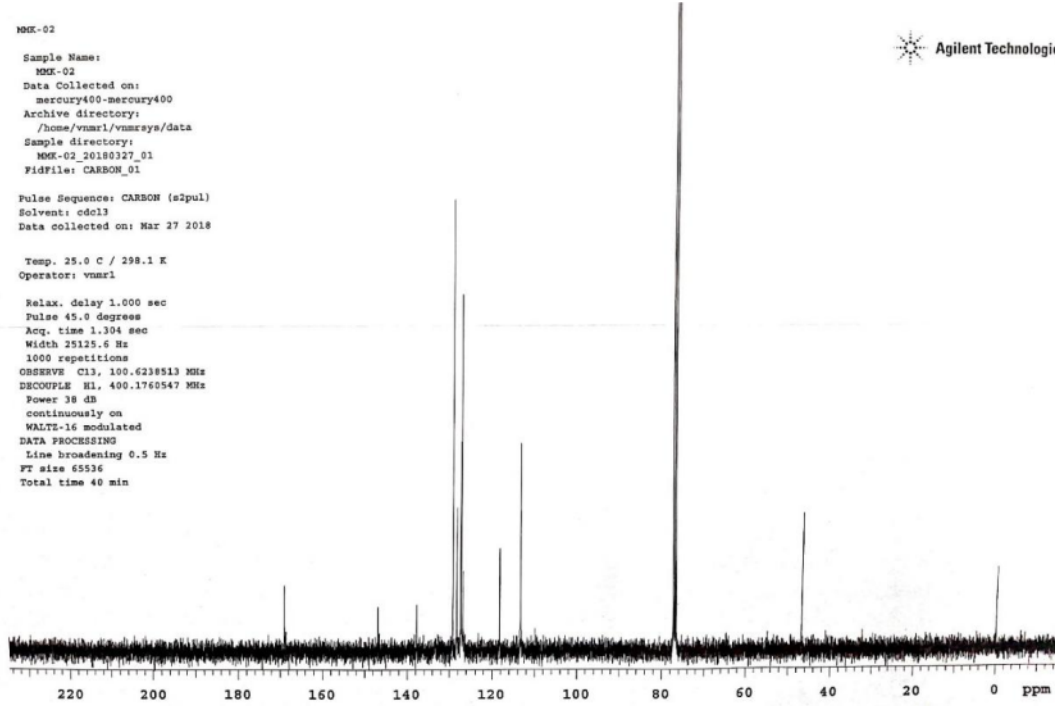
MMK-02

Sample Name:
MMK-02
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory:
MMK-02_20180327_01
FidFile: CARBON_01

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Mar 27 2018

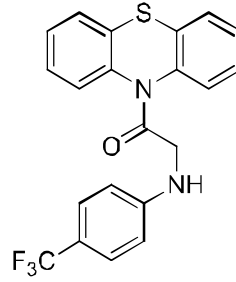
Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.304 sec
Width 25125.6 Hz
1000 repetitions
OBSERVE CH3, 100.6238513 MHz
DECOUPLE H1, 400.1760947 MHz
Power 38 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 40 min



Şekil 3.31. 16 no'lu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu

3.2.2. 1-(10*H*-Fenotiyazin-10-il)-2-((4-(trifluorometil)fenil)amino)etan-1-on (17)

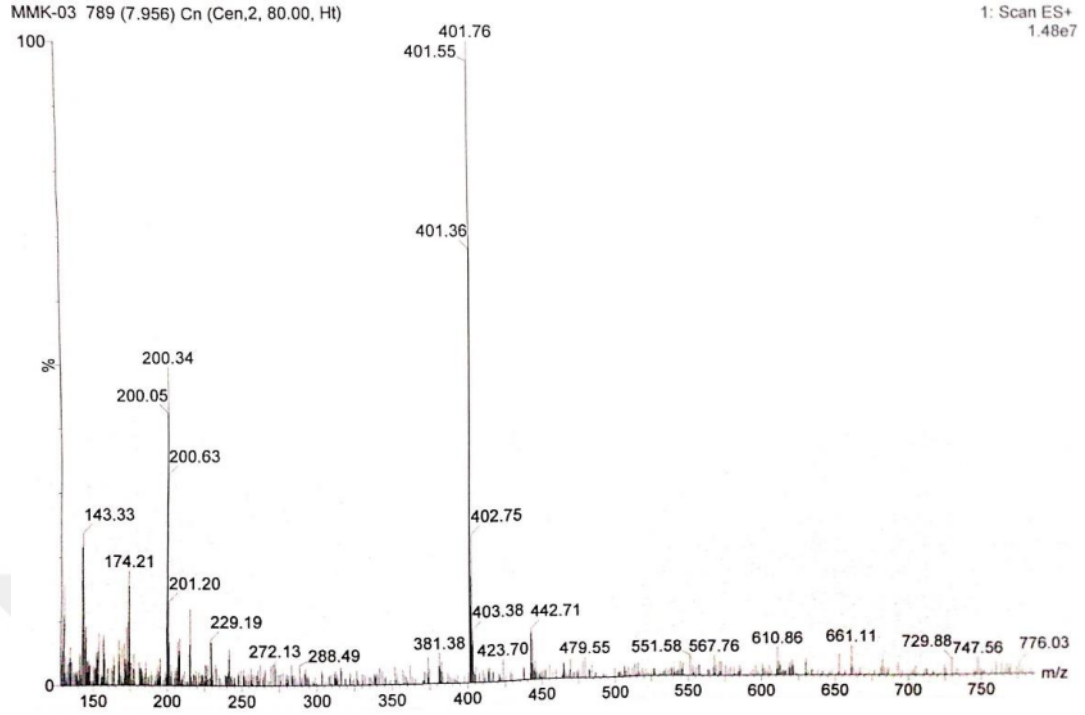


2-Kloro-1-(10*H*-fenotiyazin-10-il)etan-1-on (250 mg, 0.9 mmol) ve trietilaminin (0.10 ml) 50 ml etanoldeki karışımına p-trifluorometilanilin (0.9 mmol) ve NaI (134.1 mg, 0.9 mmol) oda sıcaklığında eklendi. Karışım 10 saat reflux edildi ve reaksiyon bitiminde karışım süzülerek uçuruldu. Kalan kısım etilasetatta çözülerek suyla ekstraksiyon yapıldı. Daha sonra solvan uçuruldu. 7:2 hekzan:etil asetat solvan sistemi mobil faz olarak kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. **MS (ESI+) m/z:** 401. Erime noktası: 189 °C.

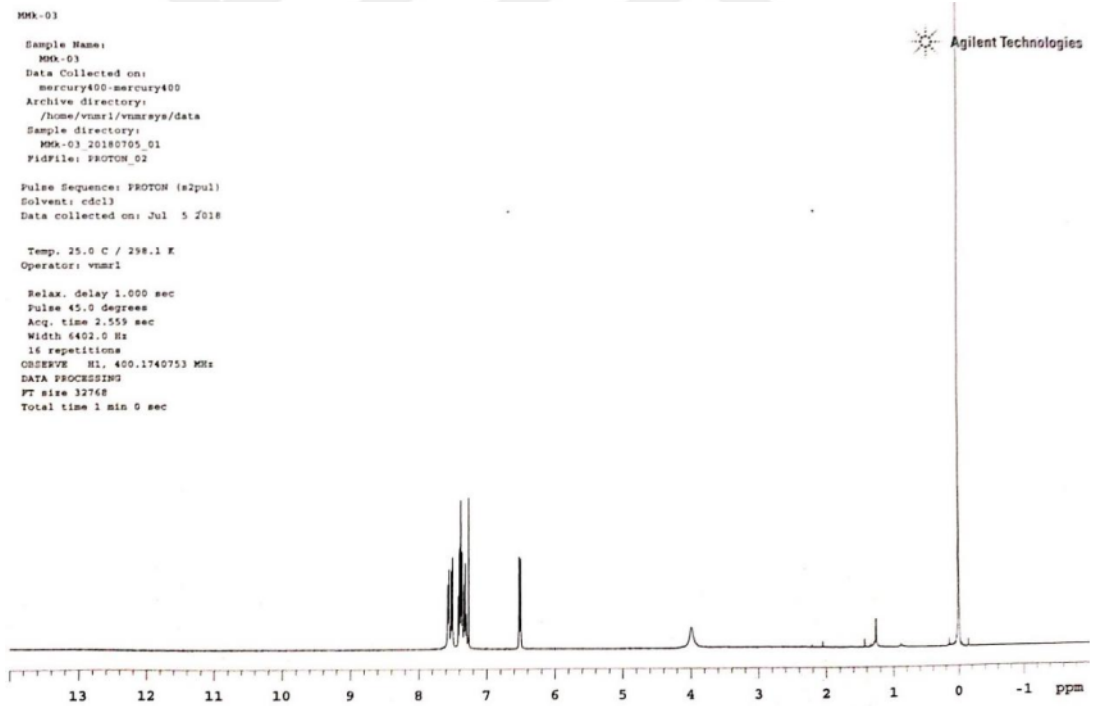
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 3.99 (s, 2H), 6.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.26-7.42 (m, 6H), 7.51 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H).

Elementel Analiz: C₂₁H₁₅F₃N₂OS-0,24H₂O

	C	H	N	S
Hesaplanan:	62.31	3.85	6.92	7.92
Bulunan:	62.31	3.98	6.84	7.85



Şekil 3.32. 17 no'lu bileşiğin kütle spektrumu



Şekil 3.33. 17 no'lu bileşiğin ¹H NMR spektrumu

3.3. Sentezlenen Bileşiklerin Biyolojik Aktivite Tayin Sonuçları*

Ön tarama sonuçları, 24 saatlik ilaç uygulamaları üzerinden alınmıştır. Bu kapsamda, Hep3B ve SkHep1 hatları taranmıştır (Çizelge 3.1.). Bunların yanı sıra naif HCC hatları HepG2 ve Huh7 ile HCC olmayan meme kanseri hattı MCF-7 hücre hatları da seçilen türevlerin hücre viyabilitesine etkileri üzerinden değerlendirilmişlerdir. Fenotiyazinden ana yapısından daha etkin türevler gözlenmiştir. Ara ürünlerden **1** ve **3** öne çıkmışlardır. Diğer ara ürün türevleri **2**, **4** ve **5**'nin fenotiyazin (**PTZ**) yapısına benzerliği değerlendirildiğinde, **1** ve **3** ileri sentez yolları için öncül bilgiler sunmaktadırlar. Özgün türevler arasındaysa **13** ve **14** öne çıkmışlardır.

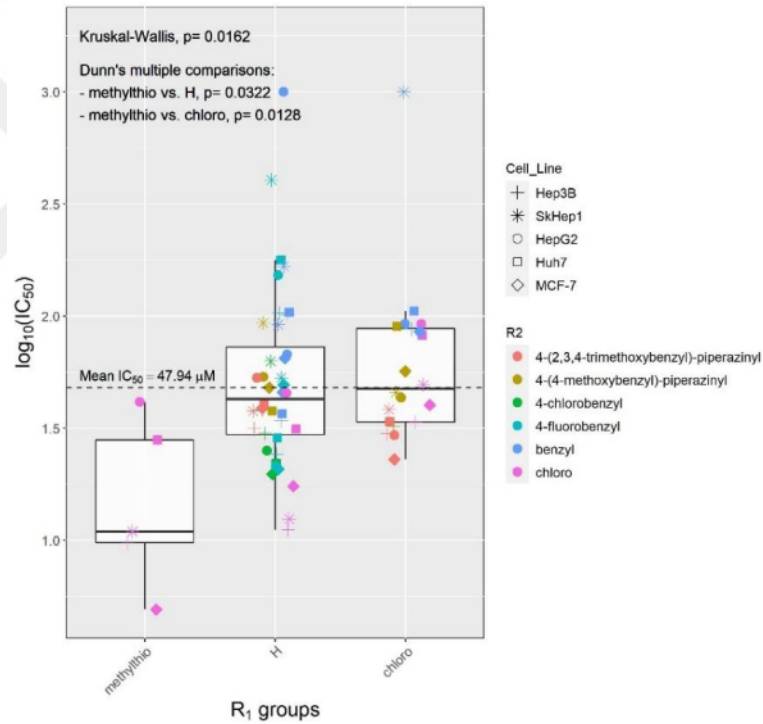
Çizelge 3.1. 24 saatlik türev uygulamaları nihayetinde Hep3B ve SkHep1 hatlarından elde edilen IC₅₀ değerleri (μM)

	Hep3B	SkHep1	HepG2	Huh7	MCF7
PTZ	61,05	44,74	71,17	138,51	ns
SFB	5,973876	0,258861	11,28758	6,643247	--
1	11,14	12,46	45,43	31,33	17,46
2	33,69	49,44	92,32	82,2	40,17
3	9,78	10,95	41,49	28,06	4,92
4	43,44	40,11	—	--	42,47
5	56,72	44,72	—	--	61,69
6	103,16	405,23	152,01	177,59	49,42
7	57,64	ns	ns	ns	--
8	80,87	ns	139,33	78,42	--
9	87,5	ns	92,41	105,17	85,14
10	101,67	166,84	ns	36,69	45,78
11	88,81	ns	95,44	101,8	--
12	34,24	91,74	67,51	104,33	64,94
13	30,01	62,9	25,17	22	19,76
14	24,25	53,15	21,48	28,58	20,83
15	23,83	71,51	—	--	39,07
16	218,84	ns	ns	107,55	--
17	61,3	141,33	99,62	166,96	--

* Biyolojik aktivite analizleri Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Doç.Dr. Özlen KONU ve Dr. Murat Yaman tarafından gerçekleştirilmiştir.

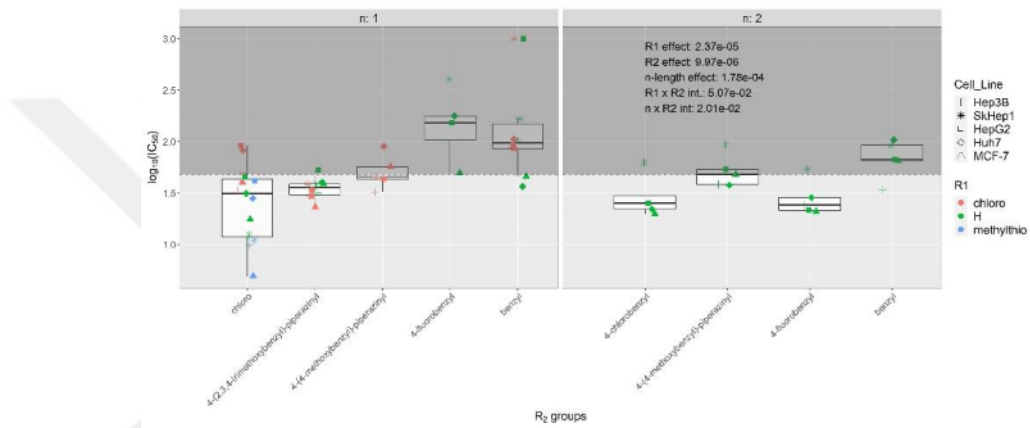
3.4. İstatistiksel Yapı-Aktivite Analizleri

Şekil 3.34.'te verilen Kruskal-Wallis non-lineer istatistiksel analizinde, 3 numaralı bileşiğin ($R_1=-SCH_3$; $R_2=-Cl$) diğer türevlere göre oldukça aktif olduğu görülebilmektedir. Fenotiyazinin ikinci konumu non-süstitüe olunca bu aktivite dramatik bir şekilde azalmakta ve bu substituent kloro olduğunda ortalama IC_{50} değerine kadar aktivite düşmektedir. Dunn'ın çoklu karşılaştırmasına göre, 2. konuma gelecek bir metiltiyo grubu nonsüstitüe ($p=0.0322$) ve kloro ($p=0.0128$) türevlerine göre hücre hatlarında daha aktif olabilmektedir. Söz konusu analizin güvenilirliği oldukça yüksektir ($p=0.0162$).



Şekil 3.34. Sentezlenen fenotiyazin türevlerinin hücre hatlarındaki IC_{50} değerlerinden yola çıkarak yapılan R_1 bazlı karşılaştırmalı analizi (Mean $IC_{50} = 47.94 \mu M$)

R_2 süstitüentleri bazında n-Way Anova testi yapıldığında ise, asetilli türevlerden ($n=1$) nonsüstitüe ara basamakların ($R_2=$ chloro) diğere türevlere göre aktif olduğu görölmektedir (Şekil 3.35.). Ek olarak, 4-fluorobenzil ve benzil içeren türevler bariz bir şekilde inaktif olarak bulunmuştur. Propiyonil ara zincirli türevlerde ($n=2$) ise 4-kloro ve 4-fluorobenzil içeren türevler rölative olarak aktif bulunmuştur. Aktivite üzerindeki substituent, n sayısı ve bunların kolektif etkisi incelendiğinde öncelikle R_1 grubunun, n zincir uzunluğunun ve $n \times R_2$ etkileşiminin aktivitede rol oynadığı söylenebilmektedir. Bu etkilerden sonra sırasıyla $R_1 \times R_2$, ve R_2 etkisi gelmektedir.

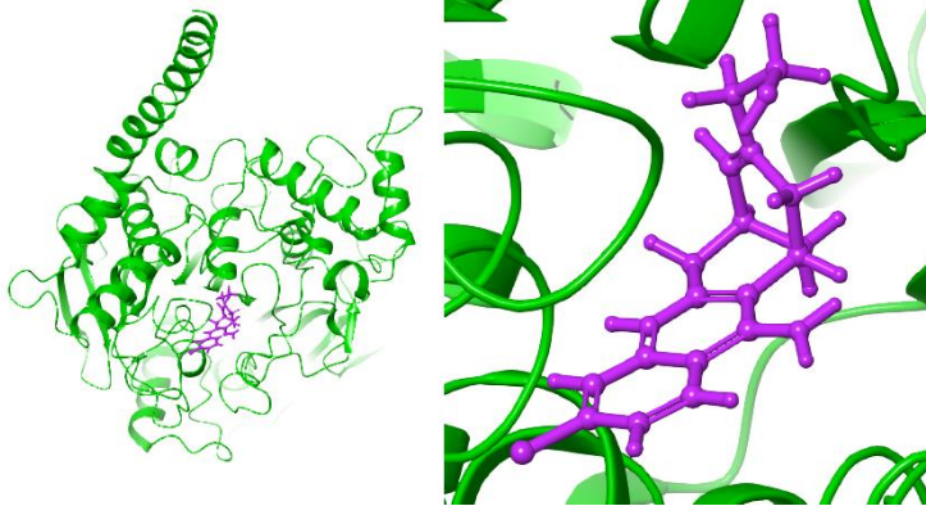


Şekil 3.35. Sentezlenen fenotiyazin türevlerinin hücre hatlarındaki IC_{50} değerlerinden yola çıkarak yapılan R_2 bazlı karşılaştırmalı analizi (Mean $IC_{50}=47.94 \mu M$)

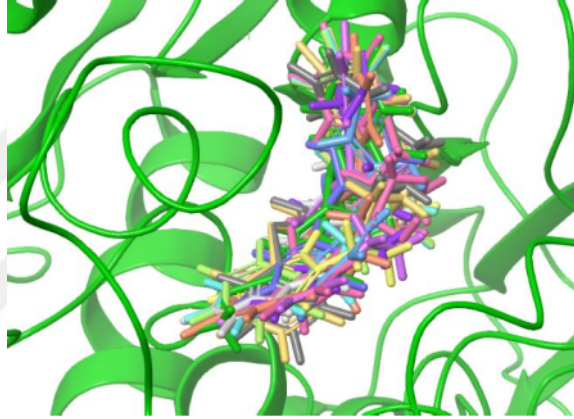
3.5. Moleküler Doking Analizleri

3.5.1. Asetilkolinesteraz Enzimi ile Doking Analizleri

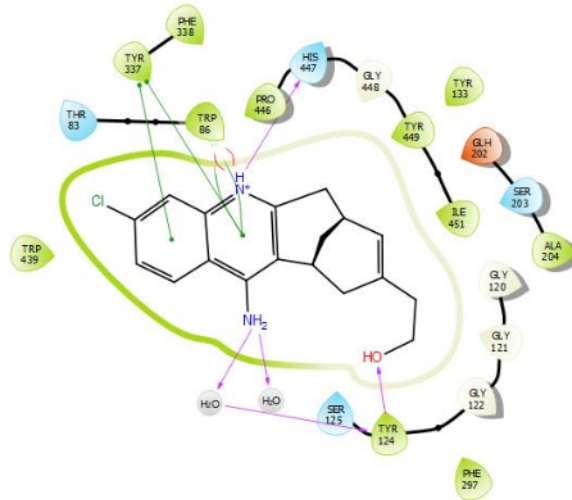
Fenotiyazin türevlerinin kolinesteraz modölatör etkilerini araştırmak amacıyla, öncelikli olarak standart bileşik Huprin W'yi içeren AChE (pdb id:4BDT) ele alındı. AChE modülasyonunun öngörülmesi için bu komplekste var olan etkileşimleri mimik eden fenotiyazin türevleri mercek altına alındı. Huprin W ile bu enzimin etkileşimleri Şekil 3.36. ve Şekil 3.38.'de, tüm ligandların bu kompleks ile karşılaştırılmış bağlanma modları Şekil 3.37.'de ve etkileşim diyagramları Çizelge 3.2.'de detaylı bir şekilde sunulmuştur.



Şekil 3.36. Huprin W ile AChE'nin bağlanma pozları

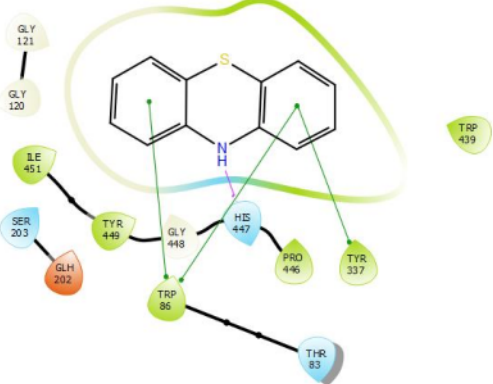
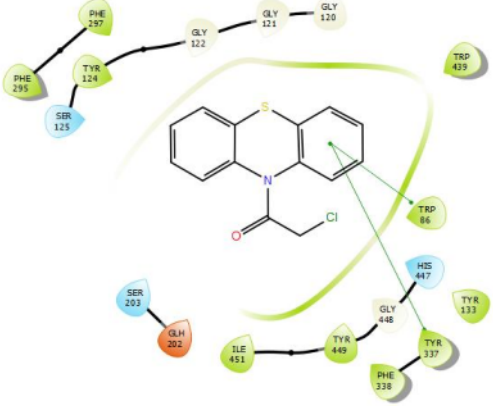
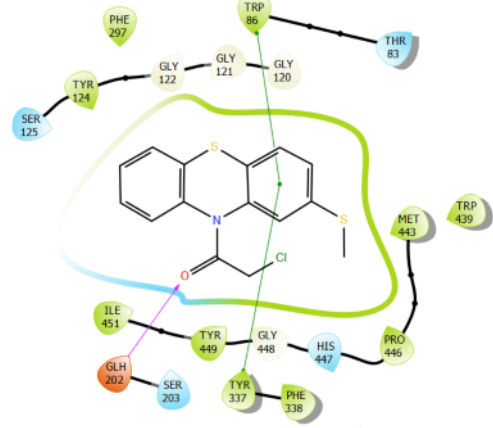
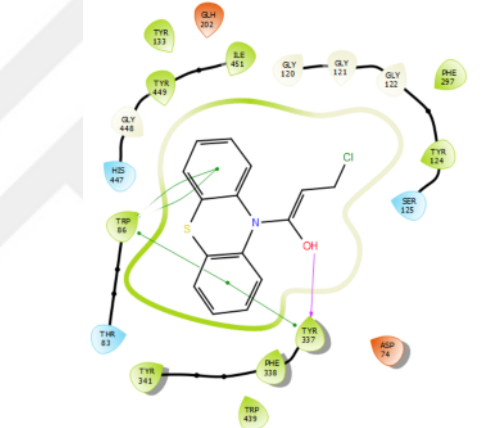
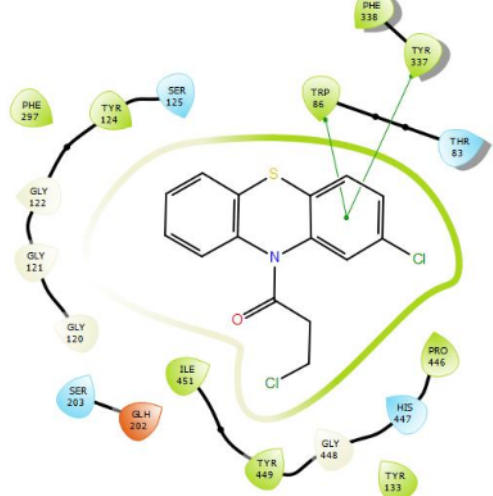
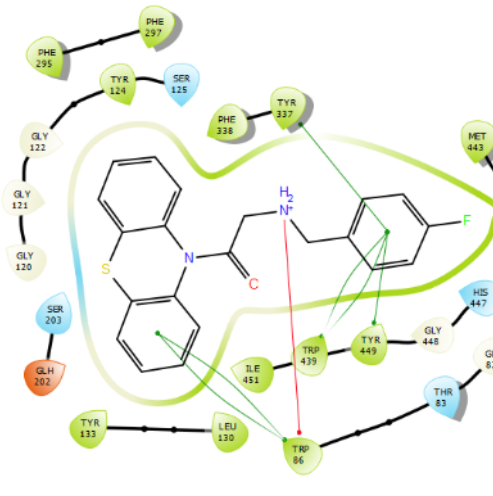


Şekil 3.37. Ligandlar ve Huprin W' nin bağlanma bölgesinde çakıştırılmış pozları

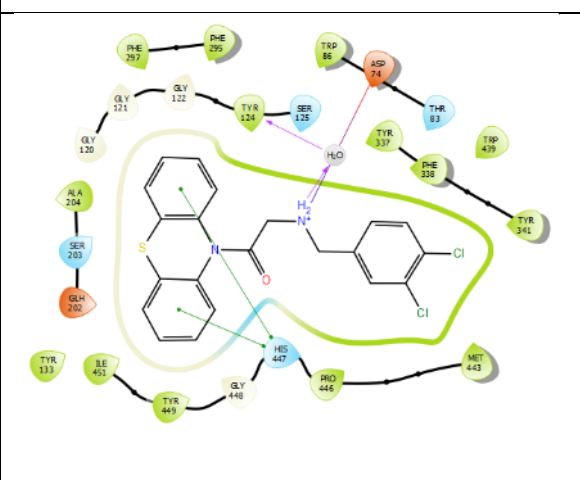


Şekil 3.38. Huprin W – AChE etkileşim profili (Glide score: -14.76)

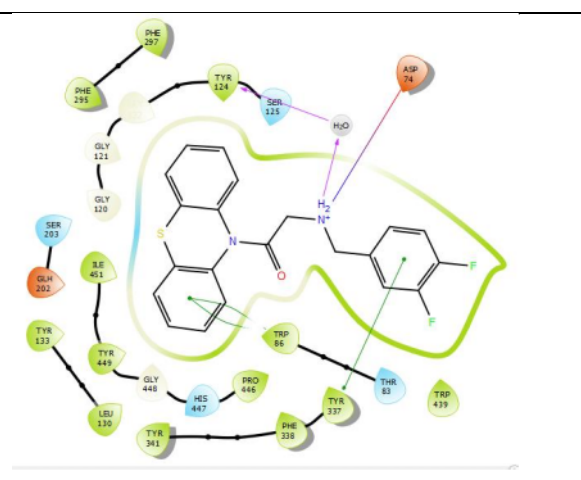
Çizelge 3.2. Test edilen ligandların iki-boyutlu etkileşim diyagramları

PTZ (Glide score: -9.773) 	1 (Glide score: -8.216) 
3 (Glide score: -8.935) 	4 (Glide score: -6.068) 
5 (Glide score: -8.555) 	6 (Glide score: -8.504) 

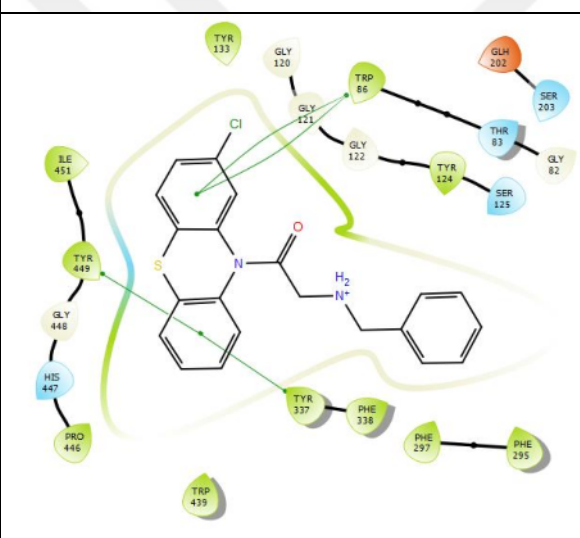
7 (Glide score: -6.059)



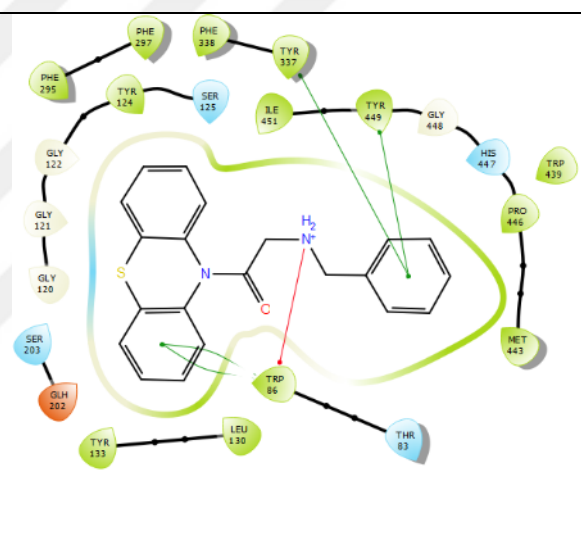
8 (Glide score: -7.681)



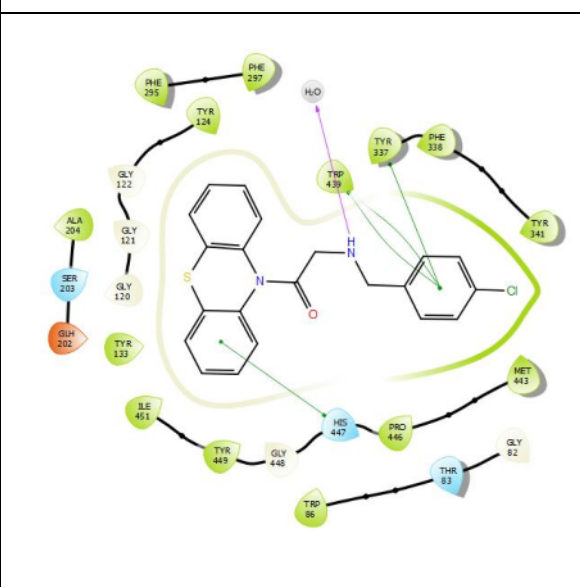
9 (Glide score: -6.579)



10 (Glide score: -8.260)



11 (Glide score: -7.851)



Huprin-W ve AChE kompleksinden elde edilen veriler ışığında, bağlanma bölgesinde Tyr337 ve Trp86 ile Pi-Pi stacked etkileşimleri tespit edilmiştir. –OH kısmı ve –NH₂ kısımları, Tyr124 ile ortamdaki su molekülleri aracılığıyla hidrojen bağı etkileşimleri oluşturabilmektedir. Buna ek olarak His447 ile halkadaki azot H bağı etkileşimi kurabilmiştir. Tyr337 ile 4.37 ve 3.52 Å, Trp86 ile 3.63 Å, Tyr124 ile 2.14 Å, His447 ile 1.78 Å uzaklıkta etkileşimler kurmuştur.

Huprin W'den elde edilen gerekli etkileşimler göz önüne alındığında, AChE modülasyonunun incelendiği fenotiyazin türevlerinde bu etkileşimlerin kısmi yahut tamamen gözlemlendiğini söylemek mümkündür. H₂O aracılığıyla Tyr124 ile kurulan H-bağı, **7**, ve **8**'te görülmekle birlikte stabilizasyonda pozitif bir etkisine rastlanılmamıştır. Afinite değerlerine göre özellikle PTZ, **3**, **5**, **6**, ve **10** en stabil kompleksleri oluşturmuşlardır. Aktif bileşik olan **3**, reseptör kavitesindeki Trp86 ve Tyr337 ile Pi-Pi etkileşimlerine ek olarak Glh202 ile hidrojen bağı etkileşimleri oluşturmuştur. Bu etkileşim verisi aktivitesini destekler nitelikte olmuştur. Nispeten daha az aktif olan bileşik **1**'in ise bileşik **3**'e göre bir hidrojen bağı etkileşimi göstermediği görülmüştür. Bu karşılaştırmadan yola çıkılarak, kavite yüzeyindeki polar bir aminoasitle gerçekleşecek olan bir hidrojen bağı etkileşiminin aktiviteyi artırdığı söylenebilmektedir. Bu hipotez, **13** ve **14** numaralı bileşiklerin reseptörle etkileşim sonucu incelendiğinde de kanıtlanabilmektedir zira bu iki ligand reseptöre bağlanamamıştır.

Çizelge 3.3. AChE ligandları için QikProp ile hesaplanan moleküler özellikler

	Moleküler ağırlık	Moleküler hacim	QPlogp	% Oral absorbsiyon
HUW	313.829	990.146	2.876	83.916
PTZ	199.270	663.265	3.568	100.000
1	275.752	804.331	3.570	100.000
2	310.197	857.505	4.186	100.000
3	321.839	937.634	4.338	100.000
4	289.779	862.599	4.987	100.000
5	324.224	921.603	4.647	100.000
6	364.436	1126.716	4.490	100.000
7	415.336	1199.044	5.237	100.000
8	382.427	1111.739	4.457	100.000
9	380.891	1162.276	4.810	100.000
10	346.446	1117.491	4.299	100.000
11	380.891	1161.551	4.793	100.000
12	360.473	1164.140	5.422	100.000
13	394.918	1207.711	5.912	100.000
14	378.463	1190.619	5.590	100.000
15	396.4542	1207.435	5.729	100.000
16	332.419	1051.181	4.604	100.000
17	400.418	1119.542	5.364	100.000

Hesaplanan QikProp Moleküler Deskriptörlerine göre, bazı ligandların reseptöre bağlanamaması moleküler hacimlerinin büyüklüğüyle açıklanabilmektedir (Çizelge 3.3). Zira bağlanabilen ligandlardan **PTZ** ve **1** düşük moleküler hacme sahiptirler. **13** ve **15** numaralı bileşikler, HUW'a göre aşırı yüksek bir log P değerine sahiptir ve Lipinski kurallarına uymamaktadır. Bu değer, bileşiğin membranlardan geçişini ve toksisiteyi etkilediğinden 3'ten yüksek olmamalıdır ve HUW bu parametreyi sağlamaktadır. Aktif bileşik **3**'ün özellikleri incelendiğinde, moleküler ağırlığın HUW'a yakın olduğu fakat moleküler hacmin yüksek olduğu görülmektedir. Moleküler hacmin büyük olması kaviteyle etkileşimi zorlaştırabilmektedir. Ayrıca, kompütasyonel log P değeri HUW'a göre oldukça yüksek bulunmuştur. İlacın bu özelliği biyoyararlanımda uygun olmayan sonuçlar doğurmakla birlikte, teknolojik olarak çözüme kavuşturulabilmektedir.

3.5.2. Bütirilkolinesteraz Enzimi ile Doking Analizleri

Bütirilkolinesteraz'ın da kolinesteraz modölatörü aktivitede incelenmesi gereken bir enzim olduğu gerçeğinden yola çıkarak, bu enzimin kompleksi ile de doking analizi gerçekleştirilmiştir (pdb id:4BDS). Söz konusu komplekste bağı ligand Takrin'dir ve fenotiyazin ligandlarının etkileşimleri bu bileşik ile karşılaştırılmıştır. BuChE ile yürütölen docking analizlerine göre, sentezlenen fenotiyazin türevi ligandların BuChE ile yeterli afiniteyi göstermediğı tespit edilmiştir.



4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında antikanser etkinlikleri olduğu ispatlanan fenotiyazin türevi yeni bileşiklerin tasarımı ve sentezi gerçekleştirilmiştir. Fenotiyazin türevi bileşiklerin sentezine 500 mg non süstitüe fenotiyazin veya 2-klorofenotiyazin ile başlandı. 2.2 mmol TEA, 10 ml kuru THF içinde karıştırıldıktan sonra ilgili açilklorürlerin 5 ml THF içindeki çözeltisi reaksiyon ortamına damla damla ilave edilerek oda sıcaklığında 1 hafta reaksiyona tabi tutuldu. Elde edilen ürünler kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırıldı. Final ürünler için, 15 ml THF içindeki 1.2 mmol amin önce 600 mg K_2CO_3 ile muamele edilerek, daha sonra 5 ml THF içindeki 1 mmol propiyonilli ve asetilli ara ürünler ile 6-8 saat reflaks edildi. Reaksiyon İTK ile kontrol edilerek, solvan uçurularak etilasetat ile ekstraksiyon yapıldı. Daha sonra solvan uçurularak ürün, $CHCl_3$: MeOH mobil fazı kullanılarak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Süstitüent olarak anilin türevlerini içeren bileşiklerin sentezi için 2-kloro-1-(10H-fenotiyazin-10-il)etan-1-on (5 mmol) ve trietilaminin (0.57 ml) 50 ml etanoldeki karışımına uygun arilaminler (5 mmol) ve NaI (2.5 mmol) oda sıcaklığında eklendi. Karışım 10 saat reflaks edildi ve reaksiyon bitiminde karışım süzüldü, süzüntü uçurularak etilasetatta çözülüp, suyla ekstraksiyon yapıldı. Etilasetat uçurularak kolon kromatografisi ile saflaştırıldı.

Sentezi yapılan bileşiklerin saflık kontrolleri, erime noktaları ve İTK incelemeleri yapıldıktan sonra, yapılarını kanıtlamak üzere spektral analizleri gerçekleştirilmiş, elementel analiz, 1H -NMR ve ^{13}C -NMR analizleri ve kütle spektrumu analizleri ile elde edilen bulguların beklenen yapıları kanıtlar nitelikte olduğu bulunmuştur.

Sentezlenen fenotiyazin türevi bileşiklerin biyolojik aktivite çalışmaları kapsamında, bileşikler naif ICC hatlarından en az iki tane (Hep3B, SkHep1, HepG2 ve Huh7) ve MCF-7 lüminel epitel meme kanseri tipinde taranmıştır. Ek olarak Hep3B ve SkHep1 hatlarının eGFP (enhanced Green Fluorescence Protein) ifade eden stabil klonlarında da taramalar gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen 5 adet ara ürün ve 12 adet sonuç

ürünün hücre varlığına etkileri MTT deneyleriyle test edilmiştir. 24 saatlik uygulamalar sonucunda ve 3.7 μM , 11.1 μM , 33.3 μM ve 100 μM doz skalasında öncül taramalarda hücrelerin varlığı, MTT viyabilite değerleri ile ölçülmüştür. Bunu takiben GraphPad (v6.01) programı ile ilaçların viyabiliteye etkinlikleri doz eğrileri üzerinde grafiğe dökülmüş, ve IC_{50} hesaplamaları yapılmıştır. Sorafenib (SFB) ise kontrol molekülü olarak kullanılmıştır.

Ara ürünlerden 2. konumda süstitüent taşımayan **1** no lu bileşik ile 2. konumda metiltiyo grubu taşıyan **3** no lu bileşik öne çıkmışlardır. Bu bileşiklerde fenotiyazin halkasının azotuna bağlı asetil klorür yapısı bulunmaktadır. 2. konumdaki yine süstitüent taşımayıp sadece fenotiyazin halkasının azotuna bağlı propil klorür yapısı olan **4** no lu bileşikte etki görülmesi bu konumda sadece 2 karbonlu bir yapının aktivite için önemli olduğunu göstermektedir. **3** no lu bileşikteki metiltiyo grubunun da aktiviteyi olumlu etkilediği görülmüş ama metiltiyo grubu içeren sonuç ürünler elde edilememiştir. Sentezlenen sonuç fenotiyazin türevleri arasındaysa **13** ve **14** no lu türevler öne çıkmışlardır. **13** ve **14**'ün MCF-7 hattında göreceli olarak etkin olması bu türevlerin meme kanseri için de öncül türev olabileceklerinin göstermektedir. Yine sentezlenen türevlerin zamana bağlı etkilerini görmek amacıyla 48 saatlik türev muameleleri de Hep3B ve SkHep1 hücre hatlarında gerçekleşmiştir. 48 saatle birlikte etkide artışa doğru bir yönelim olduğu görülmüştür. Yine sentezlenen sonuç fenotiyazin türevleri arasındaysa **13** ve **14** no lu türevler öne çıkmışlardır. Bu türevlerin ikisinde de 2. konumda süstitüent olmaması, bu konumdaki herhangi bir süstitüentın reseptörle etkileşim açısından önemli olmadığı ve aktiviteye herhangi bir katkı yapmadığı sonucunu göstermektedir. **14** no lu bileşiğin p-fluorobenzil, **13** no lu bileşiğin p-klorobenzil grubunu içermesi, para konumunda halkayı desaktive eden bir halojenin varlığının aktiviteyi olumlu etkilediğini göstermektedir.

Moleküler doking analizlerinde, sentezlenen fenotiyazin türevi bileşiklerin AChE ve BuChE enzimleri ile etkileşim profilleri incelenmiş ve süstitüentlerden doğan yapı-etki ilişkileri biyolojik aktivite ile korele bir şekilde aydınlatılmıştır. Bu çalışmalar için belirlenen reseptörler 3.10 Å rezolüsyondaki 4BDT kodlu AChE'nin Hüprin W ile kompleksi ve 2.10 Å rezolüsyonlu BuChE'nin Takrin ile kompleksidir.

HepG2, Hep3B ve Huh7 hücre hatlarında en sitotoksik bileşik olan **3** numaralı bileşimin etkileşim özellikleri ve kaviteye yerleşimi incelenmiştir. Bağlanma enerjisi - 8.935 kkal/mol olan bu bileşik, cepteki hidrofobik yüzeyle yüksek uyum göstermiş ve Tyr337 ve Trp86 gibi aminoasitlerle etkileşim göstermiştir. Ek olarak, Glh202 ile hidrojen bağı etkileşimi göstermiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sentezlenen 5 adet ara ürün ve 12 adet sonuç olmak üzere 17 adet fenotiyazin bileşiğinin antikanser aktiviteleri hepatoma hücre hattı Hep3B, hepatik adenokarsinoma hücre hattı SkHep1, hepatosellüler karsinoma hücre hatları HepG2 ve Huh7 ile meme kanseri hücre hattı MCF-7'deki IC_{50} değerleri tespit edilerek incelenmiştir.

Hep3B hücre hattındaki sitotoksikite değerleri incelendiğinde, 10. konumda asetil grubu bulunduran fenotiyazin ara basamaklarından 2. konumu non-süstitüe olan bileşik **1** ($IC_{50} = 11,14 \mu M$) ve 2.konumundaki metiltiyo bulunduran bileşik **3** ($IC_{50} = 9,78 \mu M$) referans bileşik Sorafenibe ($IC_{50} = 5,793876 \mu M$) yakın bir etkinlik göstermiştir. SkHep1 hücre hattı ele alındığında ise, standardın etkinliğiyle aradaki fark artmıştır (Bileşik **1** için $IC_{50} = 12,46 \mu M$, bileşik **3** için $IC_{50} = 10,95 \mu M$, Sorafenib için $IC_{50} = 0,258861 \mu M$). HepG2 incelendiğinde ise bileşik **1** ($IC_{50} = 45,43 \mu M$) ve bileşik **3** ($IC_{50} = 41,49 \mu M$), Sorafenib'e ($IC_{50} = 11,28758$) μM göre zayıf etkinlik göstermiştir. Sentezlenen fenotiyazin türevlerinden p-klorofenil süstitüenti taşıyan bileşik **13**'ün Hep3B'deki IC_{50} değeri $30,01 \mu M$, HepG2'deki IC_{50} değeri $25,17 \mu M$ ve Huh7'deki IC_{50} değeri $22 \mu M$ olarak bulunmuştur. Süstitüent olarak p-fluorofenil taşıyan bileşik **14**'ün ise Hep3B'deki IC_{50} değeri $24,25 \mu M$, HepG2'deki IC_{50} değeri $21,48 \mu M$ ve Huh7'deki IC_{50} değeri $28,58 \mu M$ olarak bulunmuştur. Sonuç olarak p-fluorofenil süstitüsyonu, p-klorofenil grubuna nispeten Hep3B ve HepG2 hücre hatlarındaki sitotoksik etkiyi artırmış fakat Huh7'deki söz konusu etkiyi azaltmıştır. Genel olarak iki bileşik de modifikasyon sonucu fenotiyazin ana yapısından daha yüksek aktivite sergilemiştir.

Fenotiyazin türevleriyle yapılan Dunn'ın çoklu karşılaştırma analizlerine göre fenotiyazinin iskeletinin 2. konumuna gelen metiltiyo grubunun aktivite üzerindeki etkisi kloro grubuna ve nonsüstitüe duruma göre daha fazladır (methylthio vs. H, $p=0.0322$; methylthio vs. chloro $p=0.0860$; Kruskal-Wallis, $p=0.0162$). Bileşik **13** ve

14'te bulunan 4-fluorobenzil ve 4-klorobenzil sübstitüentlerinin aktiviteyi artırdığı görülmüştür. Yapılan n-Way Anova testi'ne göre, R₁ grubunun asetil yerine propiyonil olması aktiviteyi artırmıştır. Özet olarak, fenotiyazinin 10. konumundaki ara zincirin uzunluğunun, 2.konumdaki sübstitüent ve ara zincire sübstitüe olan arilaminin tipinin (4-klorobenzil, 4-fluorobenzil), aktivite üzerinde önemli rol oynadığı görülmüştür.

Sitotoksitesi en yüksek bulunan 3 numaralı bileşik, AChE enziminin ligand bağlanma bölgesine yüksek afinite göstererek uyum sağlamış ve literatürdeki önemli etkileşimleri göstermiştir. Elde edilen sonuçlar bu bileşiğin Hep3B, SkHep1, ve HepG2 hücre hatları üzerindeki aktivitesini destekler niteliktedir.

Sentezlenen bileşiklerin etki sonuçları ve destekleyici doking çalışmaları, fenotiyazin türevlerinin gelecekte antikanser ilaçların geliştirilmesinde değerlendirilebileceği fikrini kanıtlamıştır. Aktif bulunan bileşiklerin etki mekanizmasının AChE enziminin modülasyonu ile olabileceği gösterilmiştir. Yapılacak ileri çalışmalar ile etki mekanizması daha da aydınlatılabilecek ve sentezlenen özgün fenotiyazin türevlerinin *in vivo* etkinlikleri kanıtlanabilecektir. Bu sayede antikanser ilaç etken madde geliştirme çalışmalarına katkı sağlanmış olacaktır.

ÖZET

Yeni Fenotiyazin Türevi Bileşiklerin Sentez, Yapı Aydınlatılmaları, Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi ve Moleküler Modelleme Çalışmaları

Bu çalışmada, fenotiyazin türevi bileşiklerin sentezi için non-süstitüe veya 2-klorofenotiyazin ile asetil klorür/propiyonil klorür muamele edilerek fenotiyazin 10-il açıl klorürler elde edilmiştir. Daha sonra uygun aminler ile K_2CO_3 ya da NaI varlığında reaksiyona sokularak fenotiyazin 10-karboksamitler elde edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapıları elementel analiz, 1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları ve Mass (ESI+) spektral verileriyle kanıtlanmıştır.

Elde edilen 17 bileşiğin (1-17) Hep3B, SkHep1, HepG2, Huh7 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı *in vitro* sitotoksik etkileri taranmıştır. Sonuçta, fenotiyazin türevi bileşiklerden **13** ve **14** 'c ek olarak ara ürün bileşikleri **1** ve **3** aktif olarak bulunmuştur. Yapı-etki ilişkileri incelendiğinde, fenotiyazin halkasının ikinci konumundaki metiltiyo grubunun ve sonuç ürünlerden **13** ve **14**'teki p-klorofenil ve p-fluorofenil gruplarının sitotoksik etkiyi artırdığı sonucuna ulaşılmıştır.

Sitotoksitesi en yüksek bulunan **3** numaralı bileşiğin doking analizlerindeki bağlanma modu ve etkileşimleri bu bileşiğin Hep3B, SkHep1, ve HepG2 hücre hatları üzerindeki aktivitesini destekler niteliktedir.

Sonuçta, sentezlenen 12 adet fenotiyazin türevi ve 5 adet ara basamak fenotiyazin türevlerinin arasından fenotiyazin ana yapısına göre daha yüksek antikanser aktiviteye sahip türevler bulunmuş ve bunlardan birkaçı standart Sorafenib'e yakın değerlerde aktivite sergilemiştir. Anti-HCC aktivitenin AChE modülasyonundan kaynaklanabileceği tezinin moleküler doking çalışmaları ile temellendirilmesi hedeflenmiştir. Türevlerden en aktif olan bileşik **3**'ün bu enzime yüksek afinite ve çok sayıda etkileşim göstermesi bu tezi ispatlamıştır. Bu çalışma ile antikanser ilaç keşif araştırmalarında fenotiyazin türevlerinin drug repurposing ile kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Antikanser, Doking, Fenotiyazin, Sentez, Sitotoksiste.

SUMMARY

Synthesis, Structure Elucidation, Anticancer Activity and Molecular Modelling Studies of Novel Phenothiazine Derivatives

In this study, synthesis of phenothiazine derivatives were carried out by using non-substituted or 2-chlorophenothiazine derivatives and acetyl/propionyl chlorides, to yield phenothiazine 10-yl acyl chlorides. Afterwards, the reaction of these intermediates with appropriate amines and K_2CO_3 or NaI yielded phenothiazine 10-carboxamides. The exact structures of these amides were identified using elemental analysis, 1H -NMR and ^{13}C -NMR spectrums and Mass (ESI+) spectral data.

In vitro cytotoxicities of 17 phenothiazine derivatives (**1-17**) were screened against Hep3B, SkHep1, HepG2, Huh7 and MCF-7 cell lines. Consequently, novel phenothiazine derivatives **13**, **14** and intermediates **1** and **3** were found to be active. SAR studies of these derivatives suggested that methylthio group at the 2nd carbon of phenothiazine increased the cytotoxicity. As a conclusion drawn from novel derivatives **13** and **14**, p-chlorophenyl and p-fluorophenyl groups also caused relatively high cytotoxicity values.

Binding mode and interactions of the most cytotoxic compound **3** supports the activity of this derivatives on hepatic cell lines Hep3B, SkHep1, and HepG2.

All of the synthesized 12 phenothiazine derivatives and 5 intermediates were found to be more cytotoxic than phenothiazine core and some of them exhibited close values to that of standard Sorafenib. Moreover, we aimed to evidence the thesis of Anti-HCC activity and AChE relationship with molecular docking studies. Fortunately, the high affinity and better activity profile of compound **3** proved this thesis. With this study, we emphasized the drug repurposing value of phenothiazine in anticancer drug discovery research.

Keywords: Anticancer, Cytotoxicity, Docking, Phenothiazine, Synthesis.

KAYNAKLAR

- ACS G, PALKOVITS M, BLUMBERG PM (1995). Trifluoperazine modulates [3H] resiniferatoxin binding by human and rat vanilloid (capsaicin) receptors and affects 45Ca uptake by adult rat dorsal root ganglion neurones. *J Pharmacol Exp Ther*, **274**(3): 1090-1098.
- ALOK M, DEBOBRATA S, JAYANTA D, PRANAB G (2012). A new synthesis of phenothiazines. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, **1**: 41-42.
- AL-ABDALLA MA, JAIN A, GUPTA, RR (1995). Synthesis of 7-phenoxyphenothiazines by smiles rearrangement. *Hetero Commun*, **1**(5-6): 445-450.
- AMARAL L, KRISTIANSEN JE (2000). Phenothiazines: an alternative to conventional therapy for the initial management of suspected multidrug resistant tuberculosis. A call for studies. *Int J Antimicrob Agents*, **14**: 173-176.
- AMARAL L, KRISTIANSEN J, LORIAN V (1993). Synergic effect of chlorpromazine on the activity of some antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, **30**(4): 556-558.
- ANDREANI A, RAMBALDI M, LOCATELLI A, ARESCA P, BOSSA R, GALATULAS I (1991). Potential antitumor agents XVIII (1). Synthesis and cytotoxic activity of phenothiazine derivatives. *Eur J Med Chem*, **26**(1): 113-116.
- ARYA DK, VERMA A, SINGH D, KACHHAWA JBS (2013). A review on pharmacological / biological activities of different derivatives of phenothiazines. *International Journal of Environment & Animal Conservation*, **2**: 24-31.
- ASHOOR A, LORKE D, NURULAIN SM, KURY LA, PETROIANU G, YANG KH, OZ M (2011). Effects of phenothiazine-class antipsychotics on the function of alpha7-nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol*, **673**: 25-32.
- BALTZLY R, HARFENIST M, WEBB FJ (1946). Some phenothiazine derivatives; the course of the Friedel-Crafts reaction. *J Am Chem Soc*, **68**(12): 2673-2678.
- BANSODE TN, SHIELKE JV, DONGRE VG (2009). Synthesis and antimicrobial activity of some new N-acyl substituted phenothiazines. *Eur J Med Chem*, **44**: 5094-5098.
- BARNETT EB, SMILES S (1910). The intramolecular rearrangement of diphenylamine ortho-sulphoxides, Part II. *J Chem Soc*, **97**: 186-196.
- BEHL C, RUPPRECHT R, SKUTELIA T, HOLSBOER F (1995). Haloperidol induced cell death-mechanism and protection with vitamin E 'in vitro'. *Neuroreport*, **7**: 360-364.

- BERG SC, ASHLEY JN (1953). U.S. patent 2,607,773; *Chem Abstracts* **47**: 6989.
- BERNSTEIN H, ROTHSTEIN L (1944). Phenothiazine Chemistry. I. 10-Sulfanilylphenothiazine and Other 10-Substituted Phenothiazine Derivatives. *J Am Chem Soc*, **66**: 1886-1888.
- BERNTSEN A (1885). Studien in der Methylenblaugruppe. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **230**: 73-212.
- BERNTSEN A (1883). Ueber das Methylenblau. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **16**: 2896.
- BORBELY AA, LOEPFE-HINKKANEN M (1979). Synthesis and antifungal activity of some substituted phenothiazine and related compounds. *Mod Pharmacol Toxicol*, **16**: 403-426.
- BODEA C, SILBERG I (1968). Recent advances in the chemistry of phenothiazines. *Advances in Heterocyclic Chemistry*, **9**.
- BONVICINO GE, YOGODZINSKI LH, HARDY Jr RA (1962). A new type of Smiles Rearrangement of N,N-dialkyl-N'-[2-(o-bromophenoxy)phenyl]-1,3-propanediamines to 2-[N-(3-Dialkylaminopropyl)- o-bromoanilino]phenols. *J Org Chem*, **27(12)**: 4272-4280.
- BRADY OL, SMILES S (1910). CXLIV.—The intramolecular rearrangement of diphenylamine ortho-sulphoxides. Part III. The tri- and tetra-chlorosulphoxides. *J Chem Soc*, **97**: 1559-1565.
- BUU-HOÏ NP, HOÁN NG (1951). An aldehyde of the phenothiazine series. *J Chem Soc*, 1834.
- CALAF GM, PARRA F, GARRIDO F (2007). Cell proliferation and tumor formation induced by eserine, an acetylcholinesterase inhibitor, in rat mammary gland. *Oncol Rep*, **17**: 25-33.
- CATASSI A, SERVENT D, PALEARI L, CESARIO A, RUSSO P (2008). Multiple roles of nicotine on cell proliferation and inhibition of apoptosis: implications on lung carcinogenesis. *Mutat Res*, **659**: 221-231.
- CAUQUIL G, CASSADEVALL A (1947). Préparation des acides (10-phénothiazyl)-acétique, β -(10-phénothiazyl)-propionique, et de leurs esters éthyliques. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, **225**: 578.
- CILARPENTIER P (1947). Sur la constitution d'une diméthylamino-propyl-N-phénothiazine. *Compt Rend*, **225**: 306.
- CHENG A, WANG S, YANG D, XIAO R, MATTSON MP (2003). Calmodulin mediates brain-derived neurotrophic factor cell survival signaling upstream of Akt-kinase in embryonic neocortical neurons. *J Biol Chem*, **278**: 7591-7599.
- CIESLIK-BOCZULA K, SWIATEK P, JASZCZYSZYN A, ZAWILSKA P, GASIOROWSKI K, MALINKA W, KOHLER G (2014). Phase separation in phosphatidylcholine membrane

caused by the presence of a pyrimidine analogue of fluphenazine with high anti-multidrug-resistance activity. *J Phys Chem B*, **118**: 3605-3615.

CORTE CL, FACIUNETTO R, PUNTEL R, WAGNER C, NOGUEIRA CW, SOARES FA, ROCHA JB (2009). Chronic treatment with fluphenazine alters parameters of oxidative stress in liver and kidney of rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **105**(1): 51-57.

DAHLBOM R (1951). Swedish patent 129,843; *Chem Abstracts*, **45**: 5193.

DAHLBOM R, EKSTRAND T (1951). 10-Aminoacylphenothiazines. I. Aminoacetyl and aminopropionyl derivatives. *Acta Chem Scand*, **5**: 102-114.

DARVESH S, MACDONALD IR, MARTIN E (2013). Selectivity of phenothiazine cholinesterase inhibitors for neurotransmitter, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **23**(13): 3822-3825.

DE FARIA PA, BETTANIN F, CUNHA RL, PAREDES-GAMERO EJ, HOMEM-DE-MELLO P, NANTES IL, RODRIGUES T (2015). Cytotoxicity of phenothiazine derivatives associated with mitochondrial dysfunction: a structure-activity investigation. *Toxicology*, **330**: 44-54.

DOMINGUEZ JN, LOPEZ S, CHARRIS J, IARRUSO L, LOBO G, SEMENOW A, OLSON JE, ROSENTHAL PJ (1997). Synthesis and antimalarial effects of phenothiazine inhibitors of a *Plasmodium falciparum* cysteine protease. *J Med Chem*, **40**: 2726-2733.

EGEA J, ESPINET C, SOLER RM, DOLCET X, YUSTE VJ, ENCINAS M, IGLESIAS M, ROCAMORA N, COMELLA JX (2001). Neuronal survival induced by neurotrophins requires calmodulin. *J Cell Biol*, **154**: 585-597.

EGLETON RD, BROWN KC, DASGUPTA P (2008). Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci*, **29**(3): 151-158.

EKSTRAND T (1951). Swedish patent 127,566; *Chem Abstracts*, **45**: 1886.

EL-SAID MK (1981). Synthesis of new phenothiazine derivatives as potential tranquilizers and sedatives. *Pharmazie*, **36**: 678-679.

EMMERSON JL, MIYA, TS (1963). Metabolism of phenothiazine drugs. *J Pharm Sci*, **52**: 411-419.

Farmasötik ve Medisinal Kimya (2019). Hacettepe Üniversitesi Yayınları, ISBN: 9789754914894.

FINZI C (1932). *Chem Abstracts* **26**: 4338.

FORD GM (1937). High molecular weight fatty acid derivatives (Doctoral Dissertation). Iowa State College.

- FOYE WO (1995). Cancer chemotherapeutic agents. American Chemical Society, 1-212.
- FRAENKEL N (1885). Ueber einige derivate des thiodiphenylamins. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **18**: 1843-1849.
- FUJITA T, UCHIDA K, MARUYAMA N (1992). Purification of senescence marker protein-30 (SMP30) and its androgen-independent decrease with age in the rat liver. *Biochim Biophys Acta*, **1116**: 122-128.
- FUJITA T, SHIRASAWA T, UCHIDA K, MARUYAMA N (1992). Isolation of cDNA clone encoding rat senescence marker protein-30 (SMP30) and its tissue distribution. *Biochim Biophys Acta*, **1132**: 297-305.
- GILMAN H, INGHAM RK, CHAMPAIGNE JF, DIEHL JW, RANCK RO (1954). Some derivatives of 10-alkylphenothiazines. *J Org Chem*, **19**: 560-569.
- GILMAN H, NELSON RD (1953). Oxidation of 10-acyl- and 10-alkylphenothiazines. *J Am Chem Soc*, **75**: 5422.
- GILMAN H, NELSON RD, CHAMPAIGNE JR JF (1952). Some 10-substituted phenothiazines. *J Am Chem Soc*, **74**(16): 4205-4207.
- GILMAN H, SHIRLEY DA, VAN ESS PR (1944a). The metalation of phenothiazine. *J Am Chem Soc*, **66**: 625-627.
- GILMAN H, VAN ESS PR, SHIRLEY DA (1944b). The metalation of 10-phenylphenothiazine and of 10-ethylphenothiazine. *J Am Chem Soc*, **66**: 1216.
- GILMAN H, SHIRLEY DA (1944). Some Derivatives of Phenothiazine. *J Am Chem Soc*, **66**: 888.
- GIL-AD I, SHITAI B, LEVKOVITZ Y, NORDENBERG J, TALER M, KOROV I, WEIZMAN A (2006). Phenothiazines induce apoptosis in a B16 mouse melanoma cell line and attenuate in vivo melanoma tumor growth. *Oncology Reports*, **15**: 107-12.
- GIL-AD I, SHITAI B, LEVKOVITZ Y, DAYAG M, ZELDICH E, WEIZMAN A (2004). Antiproliferative activity of phenothiazines in neuroblastoma and glioma cell-lines. Evidence for apoptotic mechanism and relevance to brain cancer therapy. *J Mol Neurosci*, **22**: 189-198.
- GIL-AD I, OFFEN D, SHITAI B, GALLILI-MOSBERG R, WEIZMAN A (1998). Haloperidol induces neurotoxicity in mouse embryo brain tissue. Evidence for oxidative damage mechanism, and implication for tardive dyskinesia. *Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases*, Fisher A, Yoshida M and Hanin I (eds). Plenum Press, NY, 163-169.
- GORDON M, CRAIG PN, ZIRKLE, CL (1964). Molecular modifications in the development of phenothiazine drugs. Molecular modification in drug design. *Adv Chem*, **45**: 140-147.

- GORDON M, COOK L, TEDESCHI, DH, TEDESCHI, RE (1963). Some structure-activity relationships in the phenothiazines. *Arzneim Forsch*, **13**: 318-320.
- GUPTA RR, SARASWAT V, GUPTA V, RAJORIA CM, GUPTA A, JAIN MJ (1993). Synthesis of 5,6- and 5,7-chloro-3-methyl-4H-1,4-benzothiazines and their conversion into sulfones. *Hetero Chem*, **30**: 803-806.
- GUPTA RR (1988). Phenothiazines and 1,4-Benzothiazines - Chemical and Biomedical Aspects. *Bioactive Molecules*, **4**.
- HAMADI MY, GUPTA R, GUPTA RR (1998). Synthesis of fluorophenothiazines by smiles rearrangement. *Hetero Commun*, **4**: 277-280.
- HAZLET SE, RODERICK EE (1945). Derivatives of phenothiazine. *J Am Chem Soc*, **67(3)**: 495-496.
- HEIT WF (1983). Hematologic effects of antipyretic analgesics. Drug-induced agranulocytosis. *Am J Med*, **14-75(5A)**: 65- 69.
- HOPPE-TICHY T (2010). Current challenges in European oncology pharmacy practice. *J Oncol Pharm Pract*, **16**: 9-18.
- HOUSTON DF, KESTER EB, DE EDS F (1949). Phenothiazine derivatives: mono-oxygenated compounds. *J Am Chem Soc*, **71(11)**: 3816-3818.
- HWANG MK, MIN YK, KIM SH (2009). Calmodulin inhibition contributes to sensitize TRAIL-induced apoptosis in human lung cancer H1299 cells. *Biochem Cell Biol*, **87(6)**: 919-26.
- KAMIMOTO T, SHOJI S, HIDVEGI T, MIZUSHIMA N, UMEBAYASHI K, PERLMUTTER DH, YOSHIMORI T (2006). Intracellular inclusions containing mutant $\alpha 1$ -antitrypsin Z are propagated in the absence of autophagic activity. *J Biol Chem*, **281**: 4467-4476.
- KANZAWA F, HOSHI A, KURETANI K (1970). Relationship between antitumor activity and chemical structure in psychotropic agents. *Gann*, **61(6)**: 529-534.
- KEIIRMANN F, ZYBS P (1919). Über aminoderivate des N-Methyl-phenazthioniums. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **52(1)**: 130-141.
- KLEINSORGE H, ROSNER K (1958). Die phenothiazine delivative in der medizin, *Klinik and Experiment*.
- KULKARNI KG, FINGERMAN M (1986). Effects of two tranquilizers, reserpine and chlorpromazine, on neurosecretory cells and the ovary of the fiddler crab, *Uca Pugilator*. *Gen Pharmacol*, **17(6)**: 671-683.
- LEDNICER D, MITSCHER LA (1976). *Organic Chemistry of Drug Synthesis*, **1**: 372-392.

- LI J, PAK SC, O'REILLY LP, BENSON JA, WANG Y, HIDVEGI T, HALE P, DIPPOLD C, EWING M, SILVERMAN GA, PERLMUTTER DH (2014). Fluphenazine reduces proteotoxicity in *C. elegans* and mammalian models of alpha-1-antitrypsin deficiency. *PLoS One*, **31;9(1)**: e87260.
- LI LJ, FAN QH, LIU CJ (1998). Antinicotinic properties of anticholinergic antiparkinson drugs. *J Pharm Pharmacol*, **50(11)**: 1299-1305.
- LIN G, MIDHA KK, HAWES EM (1991). Synthesis of the piperidinone metabolites of piperidine type phenothiazine antipsychotic drugs via ruthenium tetroxide oxidation. *J Heterocycl Chem*, **28**: 215-219.
- LU M, LI J, LUO Z, ZHANG S, XUE S, WANG K, SHI Y, ZHANG C, CHEN H, LI Z (2015). Roles of dopamine receptors and their antagonist thioridazine in hepatoma metastasis. *Oncol Targets Ther*, **8**: 1543-1552.
- LUO H, HAWES EM, MCKAY G, KORCHINSKI ED, MIDHA KK (1995). N(+)- glucuronidation of aliphatic tertiary amines in human: antidepressant versus antipsychotic drugs. *Xenobiotica*, **25(3)**: 291-301.
- L. Schrödinger, New York, NY, 2019, Schrödinger Release 2019-3: Glide.
- L. Schrödinger, New York, NY, 2019, Schrödinger Release 2019-3: LigPrep.
- L. Schrödinger, New York, NY, 2019, Schrödinger Release 2019-3: Maestro.
- L. Schrödinger, New York, NY, 2019, Schrödinger Release 2019-3: Phase.
- MAURICE N, PERLMUTTER DH (2012). Novel treatment strategies for liver disease due to a1-antitrypsin deficiency. *Clin Transl Sci*, **5**: 289-294.
- MASSIE SP (1946). *Iowa State Coll J Sci*, **21**: 74.
- MATSUYAMA S, KITAMURA T, ENOMOTO N, FUJITA T, ISHIGAMI A, HANDA S, MARUYAMA N, ZHENG D, IKEYAMA K, TAKEI Y, SATO N (2004). Senescence marker protein-30 regulates Akt activity and contributes to cell survival in Hep G2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **321(2)**: 386-390.
- MEINDI W, LASKE R, (1989). Antimycobacterial properties of phenothiazine type compounds. *Arch Pharm (Weinheim)*, **322(3)**: 133-136.
- MEYER V, JACOBSEN P (1920). *Lehrbuch der Organischen Chemie*, **2(3)**: 1490.
- MICHELS JG, AMSTUTZ ED (1950). Studies in the sulfone series. V. 2,8-Diaminophenothiazine-5-dioxide. *J Am Chem Soc*, **72**: 888.

- MIESCHER K, MARXER A (1950) U.S. patent 2,485,212. *Chem Abstracts*, **44**: 2572.
- NACHON F, CARLETTI E, RONCO C, TROVASLET M, NICOLET Y, JEAN L, RENARD PY (2013). Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochem J*, **453(3)**: 393-369.
- NAQI S, ARGYELAN G, MOLNÁR J, KAWASE M, MOTOHASHI N (1996). Antitumor activity of phenothiazine-related compounds. *Anticancer Res*, **16(4A)**: 1915-1918.
- National Formulary (1950). American Pharmaceutical Association **IX**: 81.
- NODIFF EA, HAUSMAN M (1966). A simple preparation for some hydroxyphenothiazines. *J Org Chem*, **31(2)**: 625-626.
- NUSSBAUMER S, BONNABRY P, VEUTHEY J, FLEURY-SOUVERAIN S (2011). Analysis of anti-cancer drugs: A review. *Talanta*, **85**: 2265-2289.
- NYATI MK, RAJORIA CM, GUPTA RR, DEV PK (1995). Evaluation of certain ureas and nitrosoureas of 2,3-dihydro-1,4-benzothiazines against Sarcoma-180 solid tumors *in vivo*. *Anticancer Drugs*, **6(5)**: 693-696.
- OKADA M, WATANABE S, MATADA T, ASAO Y, HAMATANI R, YAMAWAKI H, HARA Y (2013). Inhibitory effects of psychotropic drugs on the acetylcholine receptor-operated potassium current (IK.ACh) in guinea-pig atrial myocytes. *J Vet Med Sci*, **75**: 743-747.
- ORLOW NA, BURD NI, SSUKATSCHEWA WD (1931). Berginisierung einiger heterocyclischer verbindungen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **64(10)**: 2631.
- QI L, DING Y (2013). Potential antitumor mechanisms of phenothiazine drugs. *Science China Life Sciences*, **56(11)**: 1020-7.
- PAGE HJ, SMILES S (1910). *J Chem Soc*, **97**: 1115.
- PATTERSON AM, CAPELL LT (1940). The Ring Index. **84**: 252.
- PEARSON DE (1957). Heterocyclic Compounds. Elderfield, R.C. (Ed.), John Wiley and Sons, New York, **6**: 624.
- PÉREZ-AGUILAR B., VIDAL CJ, PALOMEC G, GARCÍA-DOLORES F, GUTIÉRREZ-RUIZ MC, BUCIO L, GÓMEZ-OLIVARES JL, GÓMEZ-QUITROZ, LE (2015). Acetylcholinesterase is associated with a decrease in cell proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Biochimica et biophysica acta*, **1852(7)**: 1380–1387.

- PERLMUTTER DH, SILVERMAN GA (2011). Hepatic fibrosis and carcinogenesis in α 1-antitrypsin deficiency: A prototype for chronic tissue damage in gain-of-function disorders. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**: 181–194.
- PERLMUTTER DH, BRODSKY JL, BALISTRERI WF, TRAPNELL BC (2007). Molecular pathogenesis of α 1-antitrypsin deficiency-associated liver disease: A meeting review. *Hepatology*, **45**: 1313–1323.
- PETTS HV, PLEUVRY BJ (1983). Interactions of morphine and methotrimeprazine in mouse and man with respect to analgesia, respiration and sedation. *Br J Anaesth*, **55**(5): 437-441.
- PINTO AC, DASILVA RS, HOLLINS, RA (1979). A simple synthesis of 1-phenothiazine ethanalamines: Potential antimalarials. *J Heterocycl Chem*, **16**(5): 1085-1086.
- PUMMERER R, GASSNER S (1913). Über die desmotropie o- und p-chinoider salze in der thiazinreihe. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **46**: 2310-2327.
- RAI D, GUPTA V, GUPTA RR (1996). Synthesis and spectral studies of nitrosoarene derivatives of 6-bromo and 6-chloro-2,3-dihydro-1,4-benzothiazines as possible anticancer agents. *Hetero Commun*, **2**(6): 587–592.
- RAM VJ, SETHI A, NATH M, PRATAP R (2019). The Chemistry of Heterocycles 1st Edition: Nomenclature and Chemistry of Three to Five Membered Heterocycles, Elsevier.
- RAMAGE GR, RODD EH, LONQUIST JK (1960). Chemistry of carbon compounds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, **IVc**: 1512.
- RAVAL J, DESAI KK (2005). Synthesis and antimicrobial activity of new triazolopyridinyl phenothiazines. *ARKIVOC*, **xiii**: 21–28.
- RAY SD, BALASUBRAMANIAN G, BAGCHI D, REDDY CS (2001). Ca^{2+} -calmodulin antagonist chlorpromazine and poly(ADP-ribose) polymerase modulators 4-aminobenzamide and nicotinamide influence hepatic expression of BCL-XL and P53 and protect against acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mice. *Free Radical Biology and Medicine*, **31**(3): 277–291.
- RIGAS VA, VUNAKIS HV, LEVINE L (1981). The effect of phenothiazines and their metabolites on prostaglandin production by rat basophilic leukemia cells in culture. *Prostaglandins Med*, **7**(2): 183.
- ROE A, MONTGOMERY J, HOYLE V, VARNELL WA (1953). Abstracts of papers presented at the southern and southwestern regional meeting of the American Chemical Society, New Orleans, Louisiana.
- SACHLOS E, RISUENO RM, LARONDE S, SHAPOVALOVA Z, LEE J-H, RUSSELL J, MALIG M, MCNICOL JD, FIEBIG-COMYN A, GRAHAM M, LEVADOUX-MARTIN M, LEE JB, GIACOMELLI AO, HIASSELL JA, FISCHER-RUSSELL D, TRUS MR, FOLEY R, LEBER

- B, XENOCOSTAS A, BROWN ED, COLLINS TJ, BHATIA M (2012). Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. *Cell*, **149**: 1284–1297.
- SADEK B, ASHOOR A, AL MANSOURI A, LORKE DE, NURULAIN SM, PETROIANU G, WAINWRIGHT M, OZ M (2012). N3,N7-diaminophenothiazinium derivatives as antagonists of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Pharmacol Res*, **66**: 213-218.
- SCHENKER VE, HERBST H (1963). Phenothiazine and azaphenothiazine als heilmittel. *Progress in Drug Research*, **5**: 269.
- SCHNEIDER SJ, KIRBY EJ, ITIL TM (1981). Clinical blood chemistry values and long acting phenothiazines. *Pharmacopsychitria*, **14**: 107-114.
- SCHOLL R, SEER C (1911). Über die katalytische absplattung von wasserstoff aus aromatischen kernen und den aufbau kondensierter systeme durch aluminiumchlorid. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **44**: 1233.
- SHAH KH, TILAK BD, VENKATARAMAN K (1948). Rancy nickel reductions—Part I. *Proc Indian Acad Sci*, **28(3)**: 142.
- SHARMA VN, MITTAL RL, BANERJEE SP, SHARMA HL (1971). Phenothiazines as local anesthetics. *J Med Chem*, **14**: 68-71.
- SHEWACH DS, KUHTA RD (2009). Introduction to cancer chemotherapeutics. *Chem Rev*, 2859–2861.
- SIGNAIGO FK (1946). U.S. patent 2,402,686; *Chem Abstracts* **40**: 5767.
- SILVER MA, YANG ZW, GANGULI R, NIMGAONKAR VL (1994). An inhibitory effect of psychoactive drugs on a human neuroblastoma cell line. *Biol Psychiatry*, **35**: 824-826.
- SMITH NL (1950). Synthesis of phenothiazine derivatives for use as antioxidants. *J Org Chem*, **15**: 1125-1130.
- SMITH NL (1951). Formation and oxidation of some phenothiazine derivatives. *J Org Chem*, **16**: 415-418.
- SUGIMOTO Y, TARUMI, T, ZHAO QE, FUJII Y, KAMEI C. (1998). Effects of antiallergic drugs on histamine release from rat peritoneal mast cells induced by bradykinin. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, **20(6)**: 457-462.
- S. Epik, LLC, New York, NY, 2016; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019, Schrödinger Release 2019-3; Protein Preparation Wizard, LLC, New York.

- TATA AM (2008). Muscarinic acetylcholine receptors: new potential therapeutic targets in antinociception and in cancer therapy. *Recent Pat CNS Drug Discov*, **3**: 94–103.
- THURSTON DE (2007). Chemistry and pharmacology of anticancer drugs. *Br J Cancer*, **97**(12): 1713.
- TILAK R, TYAGI R, GOEL B, SAXENA KK, SRIVASTAVA VK, KUMAR A (1998). *Indian Drugs*, **35**: 216–221.
- TIWARI D, THAKKAR SS, RAY A (2018). Structure-activity relationship in phenothiazine antipsychotic drugs: Molecular orbital calculation, *in silico* molecular docking and physico-chemical parameters. *Indian Journal of Chemistry*, **57B**: 1194–1202.
- TRIVEDI A, SIDDIQUI A, SHAH V (2008). Design, synthesis, characterization and antitubercular activity of some 2-heterocycle-substituted phenothiazines. *ARKIVOC*, **ii**: 210–217.
- UPADHYAY RK, SRIVASTAVA SD (1994). New heterocycles: synthesis and biological evaluation. *Ind J Hetero Chem*, **4**: 121–124.
- VIKHYASY, YI (1960). Uch. Zap. Inst. Formakol. Khimi., *Akad Med Nauk*, **1**: 27.
- VILNER BJ, JOHN CS, BOWEN WD (1995). Sigma-1 and sigma-2 receptors are expressed in a wide variety of human and rodent tumor cell-lines. *Cancer Res*, **15**: 408–413.
- VIVEROS M, AMARAL L (2001). Enhancement of antibiotic activity against poly-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* by phenothiazines. *Int J Antimicrob Agents*, **17**: 225–228.
- VORONTSOV VV, LERNER IM, SHCHELKUMOV EL (1980). Relationship between the chemical structure and diuretic action in a number of acyl phenothiazine derivatives. *Farmakol Toksikol*, **43**(1): 81–84.
- WILLIAMS PI, SMITH M (1999). An assessment of prochlorperazine buccal for the prevention of nausea and vomiting during intravenous patient-controlled analgesia with morphine following abdominal hysterectomy. *Eur J Anaesthesiol*, **16**(9): 638–645.
- WINNEK PS, FAITH IIE (1949). U.S. patent 2,461,460; *Chem Abstracts*, **43**: 3853.
- WRIGHT JB, LINCOLN EII, HEINZELMAN RV, HUNTER JII (1950). Histamine Antagonists. VII. Phenothiazine Derivatives. *J Am Chem Soc*, **72**: 3536–3539.
- YDE CW, CLAUSEN MP, BENNETZEN MV (2009). The antipsychotic drug chlorpromazine enhances the cytotoxic effect of tamoxifen in tamoxifen-sensitive and tamoxifen-resistant human breast cancer cells. *Anticancer Drugs*, **20**: 723–35.
- ZHAO Y, WANG X, WANG T, HU X, HUI X, YAN M, GAO Q, CHEN T, LI J, YAO M, WANG D, GU J, FAN J, HE X (2011). Acetylcholinesterase, a key prognostic predictor for hepato-

cellular carcinoma, suppresses cell growth and induces chemosensitization. *Hepatology*, **53**: 493–503.

ZOETE V, BAILLY F, MAGLIA F, ROUGEE M, BENSASSON RV (1999). Molecular orbital theory applied to the study of nonsteroidal anti-inflammatory drug efficiency. *Free Radical Biol Med*, **26(9/10)**: 1261-1268.

ZYTA J, JASZCZYSZYN A, SWIATEK P, GASIOROWSKI K, MALINKA W (2014). Synthesis, pro-apoptotic activity and 2D-QSAR studies of new analogues of fluphenazine. *Acta Pol Pharm*, **71**: 49-58.

