

Synthesize of 5-Bromo and 5,7-Dibromo Azanaphthalene Derivatives and Their Antiprolifretive Activities on Several Cancer Cell Lines

*¹Salih ÖKTEN^a, ²Osman Çakmak, ³Tuğba Kul Köprülü and ⁴Şaban Tekin

*¹Department of Primary Education, Division of Science Education, Faculty of Education, Kırıkkale University, 71450, Yahşihan, Kırıkkale, TURKEY

²Department of Chemistry, Faculty of Art and Science, Yıldız Technical University, 34210, Davutpaşa, İstanbul, TURKEY

³Department of Biology, Faculty of Art and Science, Gaziosmanpasa University, 60240, Tokat, TURKEY

⁴Institution of Gene Engineering and Biotechnology, Tübitak MAM, 41470, Gebze, Kocaeli, TURKEY

Abstract

A series of substitute azanaphthalene were treated with molecular bromine under various conditions. Some of 5-bromo and 5,7-dibromo azanaphthalene derivatives (**3-6**) were obtained. Then, the synthesized bromo azanaphthalene were evaluated for their anticancer effects in vitro on C6 (rat brain tumor) and HT29 (human colon carcinoma) cells lines by using SRB cell proliferation assay. **3** and **4** showed high antiproliferative impact on cancer cell lines according to 5-FU (control) whereas **5** and **6** did not inhibit proliferation of C6 and HT29 cell lines. In contrast to 5-florouracil (5-FU), bromo oxines derivatives (**3** and **4**) significantly inhibited proliferation of C6 and HT29 cell lines. According to LDH assay, cytotoxicities of compounds **3** and **4** were high on C6 cell lines. A result of the present study indicates that mono and dibromo hydroxy azanaphthalene (**3** and **4**) may have promising anticancer potential with unknown mechanism of action.

Key words: Azanaphthalene, hydroxy azanaphthalene, methoxy azanaphthalene, bromination, anticancer.

Özet

Bir takım azanaftalinler çeşitli reaksiyon şartlarında moleküler bromla muamele edildi. 5-bromo ve 5,7-dibromo azanaftalin türevleri (**3-6**) elde edildi. Sentezlenen aromo azanaftalin türevlerinin C6 (sıçan beyin kanseri hücresi) ve HT29 (insan kolon kanseri hücresi) ne karşı anti kanser etkilerini SRB hücre proliferasyon yöntemi ile belirlendi. **3** ve **4**, kontrol amaçlı kullanılan 5-FU'a göre kanser hücrelerinde yüksek inhibisyon etki gösterirken, **5** ve **6** kanser hücrelerini (C6 and HT29) inhibe edemediği belirlenmiştir. LDH deneyine göre, **3** ve **4**'ün sitotoksitesininin C6 hücre hatlarında yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, mono ve dibromo hidroksi azanaftalin (**3** ve **4**) etkili antikanser potansiyeli bilinmeyen bir mekanizmaya sahip olduğunu göstermiştir.

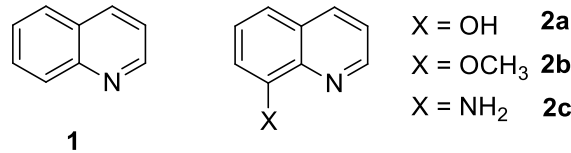
Anahtar kelimeler: Azanaftalin, hidroksi azanaftalin, metoksi azanaftalin, bromlama, antikanser.

1. Giriş

Kanser gelişmiş ve gelişmekte olan devletlerde ölüme yol açan ikinci ana sebeplerden birisi olmaya devam etmektedir [1]. Kemoterapi kanseri tedavisinde kullanılan en etkin yol olmakla birlikte klinik kullanım nisbeten yüksek toksitite ve yan etkilerden dolayı sınırlanmaktadır. Çünkü üretilen ilaçlar yeterli seçicilik ve spesifiklik göstermemesi ile kanserli olmayan hücreler de parçalanmaktadır [2]. Bu durumda, başta yapılması gereken potansiyel ters etkileri azaltılmış ve daha etkili yeni anti kanser ilaçların geliştirilmesidir.

Antikanser ilaç araştırmaları gibi, sağlık alanında yapılan araştırma çalışmalarının başında gelmekte ve bu alanda yapılan harcamalar milyar dolarlarla ifade edilmektedir. Hasta sayısının artması ve kanser hastalıklarının çeşitlenmesi ilaç şirketleri için yüksek kar anlamına geldiğinden, bu alanda kullanılacak aday ilaçların maddi değeri çok yüksektir. Anti kanser, antibiyotik ilaçların çeşitlerinin çok olması kadar, etkili ve aynı zamanda yan etkilerinin asgari düzeyde olması istenir. Bu nedenle, yüksek farmakolojik özellikler sunmalarına rağmen, birçok doğal ve sentetik aday ilacın deneme aşaması sonrasında kullanımı mümkün olmamıştır.

İlaç tasarımı, kinolin olarak da bilinen azanaftalin ve türevleri N-heterosiklik bileşiklerin en önemli sınıfıdır. Azanaftalin ve azanaftalin iskeletine sahip bileşikler, biyoaktivite uygulamalarında ve sentetik strateji geliştirmek için ilgi çekici hedef moleküller olarak görülmektedir. Aromatik bileşiklerin bu sınıfı antibakteriyelden antikansere kadar çok geniş bir alanda biyolojik aktivite göstermektedir [3]. Azanaftalin ve türevlerinin farmakoloji alanında vazgeçilmez rolleri sebebiyle, özellikle 8-süstitüe azanaftalin türevlerinin eldesi için bir çok sentez yöntemleri geliştirilmiştir.



Şekil 1. Azanaftalin ve 8-Süstitüe Azanaftalin türevlerinin molekül yapısı

Bromo azanaftalinler (yada bromo kinolinler) kinolin çekirdeğine çeşitli süstitüentleri bağlamak için önemli bir araç haline gelmiştir [3e,4]. Literatürde 5,7-dibromoazanaftalin (5,7-dibromokinolin, 5,7-DiBrQ, **4**) temelli iskelet yapısına sahip birçok biyoaktif bileşik rapor edilmiştir [5].

Bu çalışma 8-OH, -MeO ve -NH₂ (**2a-2c**) azanaftalinlerin bromlanması karmaşık bir işlem olduğunu göstermektedir. Uzun yıllardır 8-hidroksikinolinin (**2a**) bromlanması üzerine çalışan bilim adamları 5-bromo (**3**) ve 5,7-dibromo (**4**) izomer karışımını elde etmişlerdir. Ayrıca, 5-bromo-8-hidroksikinolin verimini arttırmak ve reaksiyon şartlarını optimize etmek için birçok çalışma bulunmaktadır. 8-Hidroksiazanaftalin (8-OHQ, **2a**) bileşiğinin moleküler brom ile 5,7-dibromo-8-hidroksikinolini (**4**) veren reaksiyonlar, çeşitli çözücü şartlarında denenmiştir. Etanol [6], H₂O [7], seyreltik H₂SO₄ ve HCl [8] bunlardan bazılarıdır. Moleküler brom dışında NBS ile

de reaksiyonlar yapılmıştır [9] Son yıllarda, sulu $\text{CaBr}_2\text{-Br}_2$ sistemi kullanılarak, endüstriyel ölçekte çevre dostu ve geri dönüşümlü bromlama ajanı ile çalışmalar bulunmaktadır [10].

8-metoksikinolin'in (8-OMeQ, **2b**) çeşitli çözücülerde (H_2SO_4 ; asetik asit, glasiyal; kloroform) moleküler brom ve NBS ile halojenlenmesi üzerine çalışarak, 8-kinolinol **2a** bromlanması ile karşılaştırmışlardır. **2b**'nin NBS ve %93'lük H_2SO_4 ile oda sıcaklığında brominasyonu gerçekleştirilmiştir. 2 eq NBS varlığında, 5-bromo-8-metoksikinolin **6** (%10) ve 5,7-dibromo-8-metoksikinolin **7** (%30) elde edilmiştir. 3 eşdeğer NBS ile ise ana ürün olarak %57 verimle 5,7-dibromo **7** ürünü oluşmuştur. Diğer taraftan 8-aminokinolinin bromlama reaksiyonu için bromlama ajanı $[\text{BBIm}]\text{Br}_3$ kullanılmış ve 5,7-dibromür **7** ürününün sentezi gerçekleştirilmiştir [11].

8-aminoazanaftalin **2c**, 2 eş değer mol Br_2 ile muamele edildiğinde kuantitatif bir verimle 5,7-dibromür **5** elde edilmiştir. **2c** asetonitril çözücüsünde NBS ile 5-bromo-8-aminoazanaftalin sentezlenmiştir [12].

Bu çalışmada, bazı bromo 8-sübtitüte azanaftalinler hazırlanarak, bunların biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Bromlanmış 8-hidroksikinolin türevleri HT29 ve C6 hücre hatlarının proliferasyonuna karşı yüksek inhibisyon göstermektedirler. **3** ve **4** literatürde bilinen moleküller olmasına karşın antiproliferatif aktivitelerinin ortaya çıkarılması ilk defa bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir. **3** ve **4**'ün anti kanser potansiyellerinin ortaya çıkarılması gelecekte kanser tedavisi üzerine yapılacak araştırmalara katkıda bulunabilir.

2. Materyal ve Yöntem

İnce tabaka kromatografisi, Merck silica F_{254} 0.255-mm tabakalarla yürütülerek, spotlar 254 nm'de UV fluorescence altında görüntülendi. Erime noktaları Thomas-Hoover capillary erime noktası cihazı yardımıyla belirlendi. Çözücüler düşük basınç altında uzaklaştırıldı. NMR spektrumları Bruker 400 MHz cihazı kullanılarak kaydedildi. IR spektrumları JASCO 430 FT/IR cihazı yardımıyla kaydedildi. Hücre proliferasyon SRB (colorimetric) kitleri kullanılarak belirlenmiştir Antikanser ilacı, 5-flourourasil (5-FU) Sigma firmasında satın alınmıştır.

2.1. 8-Hidroksikinolinin (2a) Bromlanması

8-OHQ (**2a**) (1 g, 6.889 mmol) CH_3CN (20 mL) içinde çözüldü ve çözelti tuz – buz karışımı ile 0°C ye soğutuldu. HBr çıkışını tutmak için reaksiyon balonuna NaOH ve CaCl_2 bulunduran kurutma tüpü takıldı. Bu çözeltiye Br_2 (2.202 g, 13.778 mmol, 1,5 eq) şırınga ile 10 dakika içerisinde ilave edildi. Br_2 ilavesi sırasında çökelek oluştu. Reaksiyon muhteviyatı 2 saat kadar karıştırıldıktan sonra reaksiyon muhtevası, (%5'lik) Na_2CO_3 (4×25 mL) ile ekstrakte edildi. Organik faz Na_2SO_4 üzerinden kurutuldu ve vakumda uzaklaştırıldı. Bakiye ürün silika jelden süzülde. Tartıldı (2.87 g). Mono ve dibrom ürün karışımından (**3** ve **4**) ibaret maddeden bir miktarı (1.8 g) üzerine 10 mL asetonil ilave edildi. Dibromür **4** asetonitrilde çözünürken, monobromür **3** çözünmedi. Çözünen sıvı kısım kristallenmeye tabi tutuldu. Dibromür **3**

kristallendirilerek saflaştırıldı (çubuk şeklinde kristaller %37 izole verim, 0.77 g). Kloroform, Metilen klorür ya da etilasetat'ta çözünmeyen monobromür ise aseton ve metanol karışımında bir gece boyunca bekletildi. Yavaş bir çözünme gözlemlendi. Monobromürün gece boyunca tamamen çözüldüğü görüldü. Ürün **3** tekrar kristallendirildi (%51 izole verim, 0.78 g).

7-bromo-8-hidroksikinolin (**3**): Erime noktası: 138-139°C. ¹H NMR (400 MHz, CDC1₃): δ 8.83 (dd, $J_{23}= 4$ Hz, $J_{24}= 1.2$ Hz, 1H, H₂), 8.51 (dd, $J_{42}= 1.2$ Hz, $J_{43}= 8.4$ Hz, 1H, H₄), 7.73 (d, $J_{65}= 8.4$ Hz, 1H, H₆), 7.59 (dd, $J_{32}= 4$ Hz, $J_{34}= 8.4$ Hz, 1H, H₃), 7.10 (d, $J_{56}= 8.4$ Hz, 1H, H₅), 3.3 (s, 1H, -OH).

5,7-Dibromo-8-hidroksikinolin (**4**): Erime noktası: 195-197°C. ¹H NMR (400 MHz, CDC1₃): δ 8.81 (dd, $J_{23}= 4$ Hz, $J_{24}= 1.2$ Hz, 1H, H₂), 8.44 (dd, $J_{42}= 1.2$ Hz, $J_{43}= 8.4$ Hz, 1H, H₄), 7.88 (s, 1H, H₅), 7.57 (dd, $J_{32}= 4$ Hz, $J_{34}= 8.4$ Hz, 1H, H₃), 3.3 (s, 1H, -OH). ¹³C NMR (100 MHz, CDC1₃): δ 149.7, 149.2, 138.6, 136.2, 133.8, 126.7, 123.0, 110.0, 103.8. IR (cm⁻¹): 3066, 2921, 1581, 1563, 1490, 1457, 1396, 1365, 1332, 1270, 1201, 1133, 933, 871, 806, 784, 723, 649.

2.2. 5,7-Dibromokinolin-8-amin (**5**) Sentezi

8-aminokinolin (**2c**) (100 mg, 0,70 mmol) CH₂Cl₂ (20 mL) ile çözüldü. Reaksiyon çözeltisinin üzerine Br₂ (0.222 g, 1.42mmol, 2.1 eq) damlalıklarla 30 dakika içerisinde ilave edildi. Br₂ ilavesi ile çökelek oluşumu gözlenmedi. Reaksiyon balonu aliminyum folyo ile sarılarak, manyetik karıştırıcıyla karıştırıldı. 17 saat sonra karışım (%5' lik) NaHCO₃ (3 x 25 mL) ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz Na₂SO₄ (5 g) ile kurutulularak süzüldü. Organik çözücü vakumda uzaklaştırıldı. Ürün Hekzan/EtOAc (5:1) üzerinde kristallendirildi. 208 mg (%99 verim) 5,7-dibromokinolin-8-amin (**5**) elde edildi. Erime noktası: 118-120°C. ¹H NMR (400 MHz, CDC1₃): δ 8.77(dd, $J_{23}= 4.0$ Hz, $J_{24}= 1.2$ Hz, 1H, H₂), 8.40 (dd, $J_{42}= 1.2$ Hz, $J_{43}= 8.4$ Hz 1H, H₄), 7.80 (s,1H, H₆), 7.51 (dd, $J_{32}= 4.4$ Hz, $J_{34}= 8.4$ Hz 1H,H₃) 5.48 (bs, 2H, NH₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDC1₃): δ 148.4 , 142.1, 138.4 , 135.7 , 133.2, 126.7, 122.5, 106.9, 103.2.

2.3. 8-Metoksikinolinin (**2b**) Bromlanması

8-metoksikinolin (**2b**) (382.4 mg, 2,4 mmol) diklormetanda (15 mL) çözüldükten sonra, şırınga ile çözeltiye brom (768 mg, 4.8 mmol) eklendi. Çözelti, oda sıcaklığında ve gün ışığı ortamında 5 gün süre ile manyetik olarak karıştırıldı. İnce tabaka kontrolü bir gün sonra hala ortamda başlangıç maddesinin varlığını gösterdi. Beş gün sonra reaksiyon sonlandırıldı ve sodyum bikarbonat (% 5'lik 100 ml) ile ekstrakte edildi. Daha sonra sodyum sülfat üzerinde kurutuldu. 5-bromo-8-metoksikinolin (**5**) tek ürün (535 mg, %92) halinde elde edildi. E. N.: 79-81°C. ¹H NMR (400 MHz, CDC1₃): δ 8.91 (dd, $J_{23}= 4$ Hz, $J_{24}= 1.2$ Hz, 1H, H₂), 8.43 (dd, $J_{43}= 8.4$ Hz, $J_{42}= 1.6$ Hz, 1H, H₄), 7.66 (d, $J_{67}= 8.4$ Hz, 1H, H₆), 6.87 (d, $J_{76}= 8.4$ Hz, 1H, H₇), 7.49 (dd, $J_{32}= 4$ Hz, $J_{34}= 8.4$ Hz, 1H, H₃), 4.04 (s, OCH₃). ¹³C NMR(100 MHz, CDC1₃): δ 152.2, 149.7, 140.8, 135.5, 130.0, 128.1, 122.8, 111.8, 108.1, 56.2 (-OCH₃). IR (cm⁻¹): 2915, 2848, 1600, 1588, 1500, 1460, 1352, 1300.

2.4. Sulforhodamine B (SRB) Testi

Bu çalışmada test maddelerinin antiproliferatif aktivitelerini belirlemek amacıyla ön test olarak “hücre total proteinlerinin” tespitine dayanan SRB testi kullanılmıştır. Hücrede sentezlenen total protein miktarı toplam hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Hücreler kontrol ve test maddeleriyle 24 saat inkübe edildikten sonra kuyucuklara 50 µL CCl₃COOH eklenerek 4 C de 90 dk inkübe edilir. Sonra kuyucuklar 3 kez 300 µL dd H₂O ile yıkanıp kurutulur. Hücreler 100 µL SRB boyası ile 25 C de 30 dk muamele edildikten sonra 300 µL CH₃COOH ile 3 kez yıkanarak kurutulur. Tüm kuyucuklara 200 µL 10 mM Tris Base çözeltisi eklendikten sonra 25°C 30 dk inkübe edilir ve bir mikropilaya okuyucuda 492 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri kaydedilir.

2.5. LDH Sitotoksite Testi

ELİZA testlerinde önemli düzeyde antiproliferatif (antikanser) aktivite gösteren moleküllerin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri Laktat dehidrogenaz (LDH) belirlenmektedir. Test edilen maddeye bağlı olarak inkübasyon süresinde ölen hücre miktarındaki artış, kültür süpernatantında LDH artışıyla sonuçlanmaktadır. Hücre hasarı sonucu ortama salınan sitoplazmik enzimlerin ölçümü bu deneylerin temelini oluşturur. Laktat dehidrogenaz sitoplazmik bir enzim olup, çoğu hücrede bulunur ve stabildir. Bu LDH testi, Roche hücre sitotoksikite kiti kullanılarak, kitin prosedürüne göre uygulanmıştır. Madde uygulamasına bağlı olarak test sonucunda kanser hücrelerinde yüksek oranda LDH çıkışı gerçekleşmesi maddenin sitotoksik olduğunu ifade ederken, düşük LDH değeri maddenin sitostatik özelliğe sahip olduğunu ifade etmektedir.

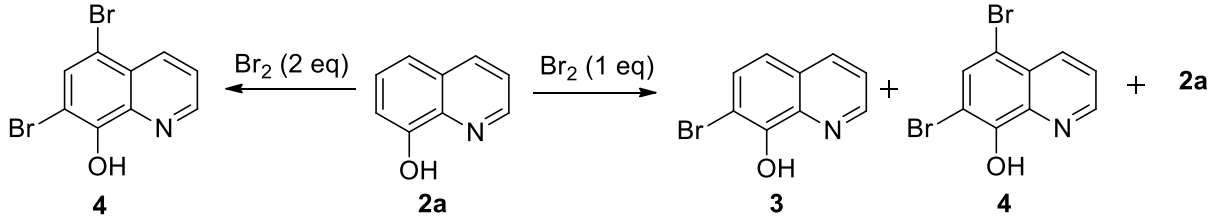
Özet olarak, sitotoksikite testi için kültürdeki hücreler (BrdU yönteminde hazırlandığı gibi) bir mikropilaya (96 kuyucuklu hücre kültür plakası) pipetlenir ve test maddelerinin IC₅₀ konsantrasyonlarıyla inkübe edilir. İnkübasyon sonrası hücre içermeyen kültür süpernatantı toplanır. Bu süpernatanttan 100 µL başka bir mikropilaya transfer edilir ve kit içinde bulunan reaksiyon karışımı 100 µL/kuyu olacak şekilde her süpernatanta eklenir ve yarım saat daha inkübe edilir. İnkübasyon sırasında süpernatanta geçen LDH eşleşmiş enzimatik reaksiyonla formazan oluşturmak için tetrazolyum tuzu INT^yi indirgeyecektir. Böylece süpernatanta geçen LDH bu basamakta formazan oluşum miktarı ile doğru ilişkilidir. Sonuç olarak ELISA plaka okuyucu ile kuyucuklardaki formazan boya miktarı yaklaşık 630 nm’de absorpsiyon ölçülerek belirlenir. Sonuçlar % sitotoksikite olarak rapor edilmekte olup, çözücü ile muamele edilmiş hücrelerin optik densitesi %100 olarak kabul edilecektir. Buna göre % sitotoksikite [(Experiment Result – Background Control) – Low Control / [(High Control – Low Control)] × 100 formülüne göre hesaplanacaktır. Etkili çıkan maddeler en az bir kanser hücre hattı kullanılarak test edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Bileşiklerin Sentezi ve Yapı Analizleri

Kinolinol (2a) asetonitril çözücü ortamında 2 eşdeğer mol Br₂ ile reaksiyonu tam bir dönüşümle

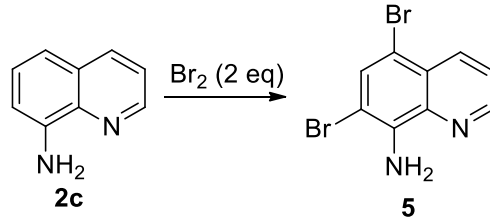
dibromür **4** bileşiğini verdi. 7-bromkinolin (**3**) ile 5,7-dibromkinolinin oluşumu yarışmalı bir reaksiyon olduğundan, 1 eq brom ile reaksiyonda 7-brom-8-hidroksikinolin (**3**) yanında dibromür **4** gözlenmekte ve başlangıç bileşiği ortamda kalmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. 8-Hidroksikinolinin (**2a**) moleküler bromla reaksiyonu

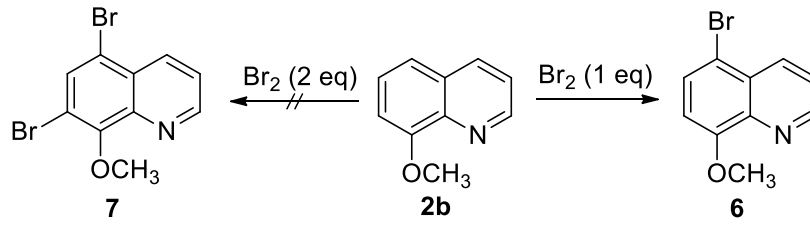
2 eq brom ile **2a** bileşiği kolayca elde edilse de monobromür **3** bileşiğinin tek ürün halinde eldesi mümkün olmamaktadır. Ancak, çözünme farkına dayanarak karışımdan monobromür (**3**) bileşiği, dibromür (**4**) ürününden kolayca ayrılmaktadır. Başlangıç maddesinin tamamen reaksiyona girdiği brom miktarı 1.5 eşdeğer mol olarak belirlendi. Bu şartlarda 8-OHQ (**2a**) 1.5 eq brom ile reaksiyonunda monobromür (**3**) ile dibromür (**4**) 58:42 oranında karışım oluşturmaktadır.

8-NH₂Q (**2c**) bileşiği 2 ekivalent bromla reaksiyona sokuldu. Kantitatif bir verimle **5** bileşiği elde edildi (Şekil 3). Kinolin-8-amin (**2c**) literatürlerde NBS ile bromlama yapıldığına dair kayıtlar yer almaktadır [13]. Ayrıca AcOH içinde moleküler bromla reaksiyon yapıldığı bildirilmektedir [14]. Ancak bu literatürlerde verimler ve bazı reaksiyon ayrıntıları hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.



Şekil 3. 8-Aminokinolin'in (**2c**) bromlanması

8-Metoksiazanaftalin **2b** türevi farklı eş değer mollerde bromlanma reaksiyonları incelendi. **2b**'nin 1 eşdeğer moleküler bromla muamelesinden **6** elde edildi. 8-MeOQ **2b** bileşiği regioselektif olarak C5 konumunda bromlandığı gözlemlendi. Dibromür **7** elde etmek için bromlama reaksiyonu 2 eş değer Br₂ ile reaksiyon tekrarlandı fakat reaksiyon sonunda monobromür **6** elde edildiği gözlemlendi (Şekil 4).



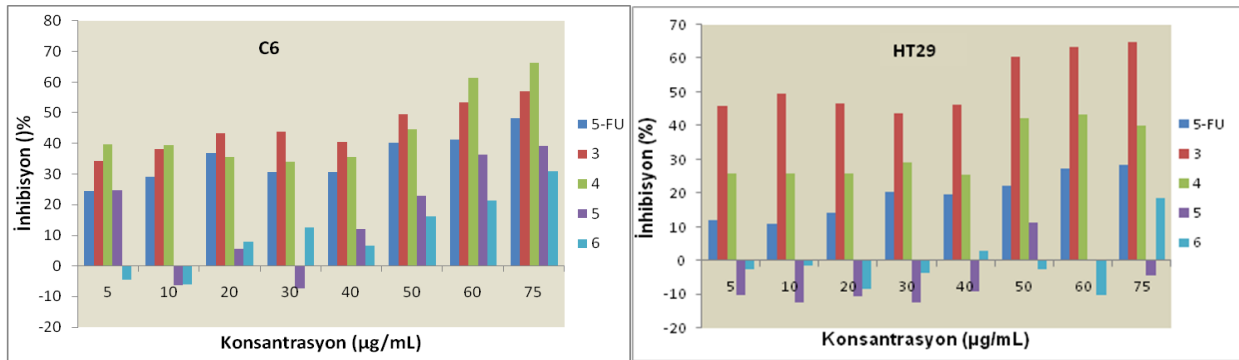
Şekil 4. 8-Metoksikinolin'in (2b) bromlanması

Monometoksit **6** bileşiğinde karakteristik H2 protonunun rezonans sinyali (δ 8.91) dubletin dubletidir. Molekülün benzen halkasındaki protonların birer AB sistemi vermesi ($J_{67} = 8.4$ Hz) moleküllerin C-5 konumlarında bromlandığını göstermektedir. 8-MeO-5-BrQ'nin (**6**) proton ve karbon NMR değerleri literatür ile uyum sağlamaktadır [15].

Bu çalışmalarda karşılaşılan diğer bir bulgu, **4** soft çözücülerde kolaylıkla çözünürken mono bromür **3** çözünmemesidir. 8-OHQ (**2a**) 1 eq brom ile etkileştirilmesi sonucu oluşan her iki ürün (**3** ve **4**) karışımdan çözünme farkı ile başarılı bir şekilde ayrılmaktadır.

3.2. Antikanser Aktivite Çalışmaları

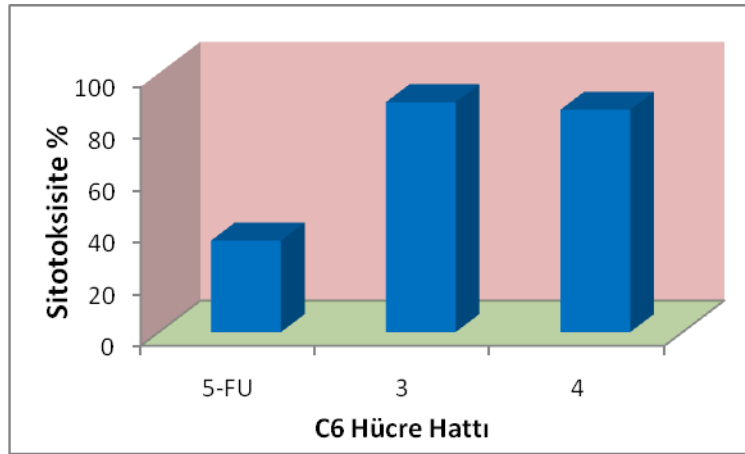
3.2.1. Antiproliferatif aktivite



Şekil 5. **3**, **4**, **5**, **6** moleküllerinin ve pozitif kontrolün (5FU) HT-29 ve C6 hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktiviteleri. Hücre proliferasyonu SRB (Sulforhodamine B) kiti kullanılarak ölçülmüştür. İnhibisyon oranları 3 bağımsız deneyin triplicate tekrarı ile belirlenmiştir ($p < 0.05$).

3, **4**, **5** ve **6** moleküllerinin HT-29 ve C6 hücre hatlarına karşı antiproliferatif etkileri SRB hücre proliferasyon kiti kullanılarak belirlendi. Sonuçlara göre **3** ve **4** molekülleri 5 µg/mL ve daha yüksek konsantrasyonlarda kontrol bileşiği 5-FU'ya göre C6 ($p < 0.05$) ve HT-29 ($p < 0.05$) hücre hatlarının çoğalmasını durdurmuştur. Fakat **5** ve **6** 5-FU'ya göre C6 ($p < 0.05$) ve HT-29 ($p < 0.05$) hücre hatlarının çoğalmasını inhibe edememiştir (Şekil 5).

3.2.2. Sitotoksik aktivite



Şekil 6. C6 hücre hattında **3** ve **4** Sitotoksik aktivitesi. Logaritmik olarak çoğalan hücrelere karşı LDH sitotoksiste kiti kullanılarak **3** ve **4**'ün IC₅₀ konsantrasyonlarında sitotoksitesini belirlendi. **3** ve **4**'ün sitotoksitesini belirgin bir şekilde ($p < 0.05$) 5-FU'dan yüksektir. Sitotoksiste oranları **3** bağımsız deneyin triplike tekrarı ile belirlenmiştir ($p < 0.05$).

3, **4** ve 5-FU'nin sitotoksiste yüzdeleri %35-%90 aralığındadır. **3** ve **4** C6 hücre hatlarında %88 sitotoksiste göstermiştir. Bu sonuçlara göre C6 hücre hatlarında her iki bileşimin (**3** ve **4**) sitostatik potansiyelinden ziyade sitotoksik potansiyele sahip olduğunu diyebiliriz (Şekil 6).

4. Sonuçlar

Bromo sübstitüe azanaftalin türevleri çeşitli biyolojik aktiviteler göstermekle birlikte çeşitli endüstriyel bileşiklerin, organokimyasalların ve farmakolojik bileşiklerin sentezi için anahtar ve aracı moleküllerdir. 8-sübstitüe (-OH, OMe and NH₂) azanaftalinlerin çeşitli farmakolojik özellikleri bulunması ve bu türevlerin brominasyonu üzerine bir çok çalışma yapılmasına rağmen, hala araştırmacılar için popülaritesini korumaktadır.

Bazı substitute kinolin bileşiklerinin bazı kanser hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri rapor edilmişti [16]. **3**, **4**, **5**, **6**'nin C6, and HT29 hücre hatlarına karşı antiproliferatif ve sitotoksik aktiviteleri ilk defa bu çalışma ile ortaya konulmuştur **3** ve **4** bileşikleri, C6 ve HT29 hücre hatlarına yüksek konsantrasyonlarda (5–75 µg/mL) 5-FU'a nazaran daha yüksek antiproliferatif aktivite göstermiştir (Şekil 5).

Sonuç olarak, bu güncel çalışma **3** ve **4**'ün C6 (sıçan beyin tümörü) ve HT29 (insan kolon tümörü) hücre hatlarında hücre proliferasyonunu durdurması vasıtasıyla potansiyel antikanser bileşikler olduklarını göstermiştir. Fakat **3** ve **4**'ün anti kanser potansiyellerini ve etki mekanizmalarını ortaya çıkarmak için daha fazla *in vitro* and *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Bu çalışmanın yapılabilmesi için maddi destekte bulunan TÜBİTAK (Proje no: 112T394) ve bu sempozyuma katılmam için maddi destekte bulunan Kırıkkale Üniversitesi BAP komisyonuna (Proje no: 2013/01 ve 2012/122) teşekkür ederiz.

References

- [1] (a) Zhang JY. Apoptosis-based anticancer drugs. *Nat Rev Drug Disc* 2002; 1:101-102. (b) Buolamwini JK. Novel anticancer drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3:500-509.
- [2] Borowski E, Bontemps-Gracz MM, Piwkowska A. Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochim Pol* 2005; 52:609-627.
- [3] (a) Sim SK, Lown JW. Studies related to antitumor antibiotics. Part VII. Synthesis of streptonigrin analogues and their single strand scission of DNA. *Can J Chem* 1976; 54:2563. (b) Porter TH, Bowman CM, Folkers K. Coenzyme Q. 153. Antimetabolites of coenzyme Q 16. New alkylmercaptoquinones having antimalarial curative activity. *J Med Chem* 1973; 16:115. (c) Take Y, Oogose K, Kubo T, Inouye Y. Comparative Study on Biological Activities of Heterocyclic Quinones and Streptonigrin. *J Antibiot* 1987; 40:679. (d) Lazo JS, Aslan DC, Southwick EC, Cooley KA, Ducruet AP, Joo B, Vogt A, Wipf P. Discovery and Biological Evaluation of a New Family of Potent Inhibitors of the Dual Specificity Protein Phosphatase Cdc25. *J Med Chem* 2001; 44:4042. (e) Ökten S, Çakmak O, Erenler R, Tekin Ş, Yüce Ö. Simple and convenient preparation of novel 6,8-disubstituted quinoline derivatives and their promising anticancer activities. *Turk J Chem* 2013; 37:896-908.
- [4] Sahin A, Cakmak O, Demirtas I, Ökten S, Tutar A. Efficient and selective synthesis of quinoline derivatives. *Tetrahedron* 2008; 64:10068-10074.
- [5] Mphahlele MJ, Lesenyeho LG. Halogenated quinolines as substrates for the palladium-catalyzed-cross-coupling reactions to afford substituted quinolines. *J Heterocycl Chem* 2013; 50:1-16.
- [6] Skraup H. Eine neue Bildungsweise des Phenanthrolins. *Monatsh* 1882; 3:531.
- [7] Berg R, Kurstenmacher H, *Anorg Z.* 5,7-Dibrom-o(8)-Oxychinolin, ein neues spezifisches Reagens auf Kupfer, Eisen und Titan in der quantitativen Analyse. *Allg Chem* 1932; 204:215.
- [8] Matsumura K. Friedel and Crafts Reaction with 8-Hydroxyquinoline. *J Amer Chem Soc* 1935; 57: 24.
- [9] Boger DL, Duff SR, Panek JS, Yasuda M. Inverse electron demand Diels-Alder reactions of heterocyclic azadienes. Studies on the total synthesis of lavendamycin: investigative studies on the preparation of the CDE .beta.-carboline ring system and AB quinoline-5,8-quinone ring system. *J Org Chem* 1985; 50:5782.
- [10] Kumar L, Mahajan T, Agarwal DD. An instant and facile bromination of industrially-important aromatic compounds in water using recyclable CaBr₂-Br₂ system. *Green Chem* 2011; 13:2187.
- [11] Borikar SP, Daniel T, Paul V. Mild, efficient, and regioselective monobromination of arylamines and phenols using [BBIm]Br₃ as a new reagent. *Synt Comm* 2010; 40:647.

- [12] Barnham KJ, Gautier, ECL, Huggins, PJ, Parsons, JG. Substituted quinoline derivatives as antiamyloidogenic agents and their preparation, pharmaceutical compositions and using he treatment of neurological and cell proliferation diseases. 2008 WO2008074068 A1.
- [13] Bagheri M, Azizi N, Saidi MR. An intriguing effect of lithium perchlorate dispersed on silica gel in the bromination of aromatic compounds by N-bromosuccinimide, *Can J Chem* 2005; 83: 146-149.
- [14] da Silva LE, Joussef AC, Pacheco LK, da Silva DG, Steindel M, Rebelo RA, Schmidt B. Synthesis and in vitro evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of N-quinolin-8-yl-arylsulfonamides. *Bioorg Med Chem* 2008; 16:7079.
- [15] Trecourt F, Mallet M, Mongin F, Queguiner G. Synthesis of substituted 8-methoxyquinolines by regioselective bromine-lithium exchange of 5,7-dihalo-8-methoxyquinolines and 7-bromo-8-methoxyquinoline. *Synthesis* 1995; 9:1159-1162.
- [16] (a) Solomon, VR, Hu C, Lee H. Design and synthesis of anti-breast cancer agents from 4-piperazinylquinoline: A hybrid pharmacophore approach. *Bioorg Med Chem* 2010; 18:1563–1572. (b) Boschelli DH, Wang DY, Ye F, Wu B, Zhang N, Dutia M, Powell DW, Wissner A, Arndt K, Weber JM, Boschelli F. Synthesis and Src Kinase Inhibitory Activity of a Series of 4-Phenylamino-3-quinolinecarbonitriles. *J Med Chem* 2001; 44: 822-833.