

HeLa ve Beas-2B Hücre Hatlarına Karşı Benzimidazolyum Tuzlarının İn Vitro Sitotoksik Aktivite Çalışmaları

In Vitro Cytotoxic Activity Studies of Benzimidazolium Salts against HeLa and Beas-2B Cell Lines

Senem AKKOÇ*

Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta

• Geliş tarihi / Received: 31.08.2019

• Düzeltilerek geliş tarihi / Received in revised form: 02.03.2020

• Kabul tarihi / Accepted: 07.03.2020

Öz

1H-benzo[d]imidazol çekirdeği içeren altı farklı heterosiklik bileşik (S1-S6) iki basamakta hazırlandı ve yapıları farklı spektroskopik yöntemler kullanılarak karakterize edildi. Sentezlenen heterosiklik bileşikler insan serviks adenokarsinom (HeLa) ve insan sağlıklı akciğer (Beas-2B) hücre hatlarına karşı test edildi. Pozitif kontrol ilaç olarak cisplatin aynı şartlar altında serviks hücre hattına karşı denendi. Bileşik S4'ün HeLa hücre hattına karşı yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği (IC50: $3.72 \pm 0.14 \mu\text{M}$) bulundu. Çalışmanın son basamağında, ilaç adayları ile etkileştirilen hücrelerin renkli görüntüleri konfokal mikroskobu kullanılarak alındı.

Anahtar kelimeler: Benzimidazol, Heterosiklik Bileşik, Konfokal, Sitotoksik Aktivite.

Abstract

Six different heterocyclic compounds containing 1H-benzo[d]imidazole nuclei (S1-S6) were prepared in two steps and their structures were characterized using different spectroscopic methods. The synthesized heterocyclic compounds were tested against human cervix adenocarcinoma (HeLa) and human healthy lung (Beas-2B) cell lines. Cisplatin as a positive control drug was tested against the cervix cell line under the same conditions. Compound S4 was found to exhibit high cytotoxic activity against HeLa cell line (IC50: $3.72 \pm 0.14 \mu\text{M}$). In the last step of the study, color images of the cells interacted with the drug candidates were taken using confocal microscope.

Keywords: Benzimidazole, Heterocyclic Compound, Confocal, Cytotoxic Activity.

* Senem AKKOÇ; senemakkoc@sdu.edu.tr, senemakkoc44@gmail.com, Tel: +90 246 211 03 38, orcid.org/0000-0002-1260-9425

1. Giriş

İnsanların yaşam kalitesini etkileyen ve ölümlerin başta gelen nedenleri arasında yer alan kanser, her yıl dünyada milyonlarca insanın hayatını kaybetmesine neden olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün araştırmasına göre, dünyada her beş erkekten biri ve her altı kadından biri kansere yakalanmakta ve sekiz erkekten biri ve on bir kadından biri de kanser nedeni ile yaşamını yitirmektedir (World Health Organization, 2018).

Günümüzde organik bileşikler ve doğal ürünleri içeren birçok kemoterapi ilacı bulunmaktadır. Kemoterapi tedavisinde özellikle cisplatin (Rosenberg vd., 1969), karboplatin (Busschots vd., 2015), oksaliplatin (To vd., 2016) ve satraplatin (Wheate vd., 2010) gibi farklı platin bazlı ilaçlar kullanılmaktadır. Yumurtalık, testis, göğüs kanseri ve melanoma gibi tümörlerin farklı tiplerinin tedavileri metal bazlı antikanser ajanlar arasında önemli bir yere sahip olan bu platinyum temelli aktif ilaçlar kullanılarak yapılmaktadır. Öte yandan, platin içeren bu ilaçların sadece belli tümörlerin tedavisinde kullanılabilmesi ve miyelosupresyon (kemik iliği aktivitesinde azalma), ototoksitesite (iştah kaybı), nörotoksitesite (sinir sistemi hasarı) ve nefrotoksitesite (böbrek fonksiyonlarının azalması ve hasar) gibi birçok yan etkisinin olması (Yang vd., 2019) ve kemoterapötik kanser ajanlarına karşı ilaç direncinin artarak büyümesi ciddi bir tıbbi problem yaratmaktadır. Bu nedenle, kanser tedavisi için yeni, etkin ve güvenli kemoterapötik ilaç adaylarının geliştirilmesine büyük bir ihtiyaç vardır.

Benzimidazol halkası, farklı terapötik alanlarda kullanılan birçok önemli ilacın (antihistaminikler, antihelmintikler, proton pompa inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör antagonisti) elde edildiği bir tür ayrıcalıklı iskelet yapısına sahiptir (Bansal ve Silakari, 2012). Benzimidazol temelli heterosiklik bileşiklerin antibakteriyal (Gök vd., 2013; Gök vd., 2015), antiviral (Tonelli vd., 2014; Cheng vd., 2005), antiparazit (Rojas-Aguirre vd., 2012; Farahat vd., 2018), antikanser (Aslan vd., 2020; Akkoç, 2019a; Akkoç, 2019b; Akkoç vd., 2019; Akkoç vd., 2017; Akkoç vd., 2016), antienflamatuar (Sharma vd., 2017), antioksidan (Abdelgawad vd., 2019), antiaglikasyon (Taha vd., 2018), antidiyabetik (Shingalapur vd., 2010) ve glukozidaz inhibitörleri (Özil vd., 2018) gibi farklı biyolojik aktivite özelliklerinden dolayı kimyada oldukça önemli bir yeri vardır. Benzimidazol çekirdeği üzerindeki çeşitli süstituentler ile bu geniş biyolojik aktivite yelpazesi sağlanabilmektedir.

Ticari olarak satılan ve benzimidazol çekirdeği içeren çok sayıda ilaç örneği vardır. Örneğin; Bendamustin, kronik lenfositik lösemi, multipl miyelom ve Hodgkin olmayan lenfoma tedavisinde kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. Karbendazim, yaygın olarak kullanılan, geniş spektrumlu bir benzimidazol fungusit ve bir benomil metabolitidir. Fenbendazole, gastrointestinal parazitlere karşı kullanılan antelmintik bir ilaçtır. Kandesartan, yüksek tansiyon ve konjestif kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan bir anjiyotensin reseptör blokeridir. Telmisartan, hipertansiyon, kalp yetmezliği ve diyabetik böbrek hastalığını tedavi etmek için kullanılan bir ilaçtır. Maribavir, hematopoetik kök hücre / kemik iliği nakil hastalarında insan sitomegalo virüs hastalığının önlenmesi ve tedavisi için kullanılan bir antiviral ilaçtır.

Benzimidazol türevlerinin bu kadar geniş biyolojik aktivite özelliklerinden dolayı bu çalışmada, ilk olarak benzimidazolden yola çıkarak farklı N-alkilbenzimidazol türevleri sentezlendi. İkinci basamakta, sentezlenen N-alkilbenzimidazol türevleri ile farklı aril halojenürler etkileştirilerek benzimidazolyum tuzları hazırlandı ve yapıları spektroskopik yöntemler ile aydınlatıldı. Son olarak, bu bileşiklerin normal ve kanserli hücre hatlarındaki sitotoksik aktiviteleri test edilerek birbiri ile karşılaştırıldı. İlaç adayları ile muamele edilen hücrelerin renkli görüntüleri konfokal mikroskobu ile alınarak hücrelerin canlılık oranları tespit edildi.

2. Gereç ve Yöntem

2.1. Kullanılan Reaktif ve Çözgenler

Gerekli reaktiflerin bazıları yapılan çalışmada sentezlenirken bazıları da ticari olarak satın alındı. 3-Metilbenzil bromür, 4-metilbenzil bromür, 2-(bromometil) benzonitril, 4-vinilbenzil klorür, 9-(klorometil)antrasen, N-(4-bromobütil)fütalimit, N-(2-kloroetil)piperidin hidroklorür, N,N-dimetilformamit (DMF), potasyum hidroksit (KOH), etil alkol ve dietil eter gibi reaktif ve çözgenler analitik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya), Sigma-Aldrich (Interlab A.S., ABD), Alfa-Aesar (Massachusetts, ABD) veya Scharlau (Barselona, İspanya) firmalarından satın alındı.

Serviks kanser hücre hattı (HeLa) ile insan sağlıklı akciğer hücre hattı (Beas-2B) ATCC'den satın alındı. DMEM, FBS, glutamax, PBS ve trypsin-EDTA Gibco firmasından satın alındı. Cis-diaminplatinyum (II) diklorür ve 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum

bromür (MTT) Sigma-Aldrich firmasından tedarik edildi. Hoechst 33258, pentahidrat (bis-benzimid) ve propidyum iyodür (PI) boya ları ThermoFisher Scientific firmasından satın alındı. Doku kültürü flaskları ve 96 kuyucuklu plakalar Jet Biofil firmasından satın alındı.

2.2. Benzimidazolyum Tuzlarının Sentezi

S1-S3, S5, S6 bileşikleri (Akkoç vd., 2019) ile S4 (Akkoç, 2019a) bileşiği literatüre göre hazırlandı. Benzimidazol (1 mmol) ve potasyum hidroksit (1 mmol) etil alkol (40 mL) içerisinde çözüldü. Tepkime karışımı bir saat oda sıcaklığında

karıştırıldıktan sonra reaksiyon ortamına aril/alkil halojenür (1 mmol) yavaş yavaş ilave edildi ve 6 saat refluks edildi. Daha sonra reaksiyon karışımı oda sıcaklığına soğutularak oluşan potasyum klorür tuzu süzülerek ortamdan uzaklaştırıldı. Başlangıç maddesi kristallendirilerek saflaştırıldı. Elde edilen N-aril/alkil benzimidazol (1 mmol) ile aril halojenür (1 mmol) DMF de çözüldü ve tepkimenin gerçekleşmesi için reaksiyon 24 saat 80 °C'de karıştırılarak devam ettirildi. Tepkime tamamlandıktan sonra ortamdaki DMF vakum uygulanarak uzaklaştırıldı. Kristallendirilerek saflaştırılan bileşiklerin spektroskopik karakterizasyon sonuçları aşağıdaki gibidir.

1-[4-(1,3-Dioksoizindolin-2-il)butil]-3-(4-metilbenzil)benzimidazolyum bromür, S1

Verim: %33, e.n.: 263-266 °C, renk: beyaz. IR: 1544.9, 1737.7 cm⁻¹. ¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃), δ: 1.88, 2.16-2.40, 2.89, 5.83, 6.01, 7.14-7.86, 11.56. ¹³C NMR (100.13 MHz, CDCl₃), δ: 21.19, 21.20, 21.25, 34.56, 51.52, 51.55, 113.81, 127.08, 128.29, 129.50, 130.07, 131.25, 131.41, 131.97, 132.18, 134.19, 139.32, 142.77, 167.70.

1-(2-Siyanobenzil)-3-[4-(1,3-dioksoizindolin-2-il)butil]benzimidazolyum bromür, S2

Verim: %58, e.n.: 186-189 °C, renk: beyaz. IR: 1562.9, 1704.4, 2943.9 cm⁻¹. ¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃), δ: 1.89, 2.16, 3.80, 4.78, 6.17, 7.31-8.18, 11.56. ¹³C NMR (100.13 MHz, CDCl₃), δ: 25.57, 26.63, 36.62, 47.22, 48.92, 112.03, 113.18, 113.59, 117.26, 123.36, 123.38, 127.27, 127.56, 127.72, 130.09, 131.04, 131.29, 131.91, 133.34, 134.11, 134.15, 134.59, 135.77, 143.44, 168.43.

1-[4-(1,3-Dioksoizindolin-2-il)butil]-3-(4-vinilbenzil)benzimidazolyum bromür, S3

Verim: %60, e.n.: 110-112 °C, renk: krem. IR: 1557.6, 1699.3, 2931.3, 3069.8 cm⁻¹. ¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃), δ: 1.87, 2.13, 3.78, 4.75, 5.28, 5.75, 5.88, 6.66, 7.38-7.83, 11.55. ¹³C NMR (100.13 MHz, CDCl₃), δ: 25.57, 26.62, 36.69, 46.93, 51.27, 113.13, 113.86, 115.24, 123.36, 127.10, 127.23, 128.66, 131.13, 131.44, 132.89, 131.93, 134.14, 135.82, 138.48, 142.99, 168.43.

1-(3-Metilbenzil)-3-(2-(piperidin-1-il)etil)benzimidazolyum klorür, S4

Verim: %85, e.n.: 154-155 °C, renk: kahve rengi. IR: 1558.4 cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ: 1.17-1.67, 2.34, 2.67, 3.48, 4.91, 5.78, 7.15-7.96, 11.40. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ: 15.28, 21.35, 23.50, 25.29, 44.30, 51.62, 56.10, 113.48, 113.77, 125.21, 127.02, 127.08, 128.76, 129.25, 130.06, 131.00, 131.62, 132.62, 139.36, 143.97.

1-[4-(1,3-Dioksoizindolin-2-il)butil]-3-(3-metilbenzil)benzimidazolyum bromür, S5

Verim: %78, e.n.: 219-221 °C, renk: beyaz. IR: 1557.7, 1699.5, 2955.1 cm⁻¹. ¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃), δ: 1.90, 2.14, 2.34, 3.79, 4.77, 5.82, 7.15-7.83, 11.54. ¹³C NMR (100.13 MHz, CDCl₃), δ: 21.36, 25.59, 26.65, 36.69, 46.95, 51.60, 113.12, 113.85, 123.36, 125.35, 127.22, 128.93, 129.26, 130.10, 131.22, 131.46, 131.91, 132.41, 134.13, 139.39, 143.01, 168.43.

1-(Antrasen-10-ilmetil)-3-(2-siyanobenzil)benzimidazolyum klorür, S6

Verim: %35, e.n.: 227-228 °C, renk: sarı. IR: 1553.9, 2216.5, 2940.2, 3133.9 cm⁻¹. ¹H NMR (400.13 MHz, DMSO-d₆, 298 K), δ: 5.86, 6.79, 7.07-8.92, 9.17. ¹³C NMR (100.13 MHz, DMSO-d₆, 298 K), δ: 48.67, 56.47, 110.67, 114.17, 115.06, 117.17, 122.19, 123.94, 126.13, 127.49, 127.81, 127.97, 128.33, 129.62, 129.90, 131.01, 131.50, 131.61, 131.89, 132.32, 134.07, 134.25, 137.97, 142.93.

2.3. Sentezlenen Bileşiklerin İn Vitro Sitotoksik Aktivite Çalışmaları

İn vitro sitotoksik aktivite çalışmaları literatüre göre yapıldı (Akkoç, 2019a; Akkoç, 2019b;

Akkoç vd., 2019; Akkoç vd., 2017; Akkoç vd., 2016). İnsan serviks kanser hücre hattı (HeLa) ve insan normal (kansersiz olmayan) akciğer hücre hattı (Beas-2B) %10 FBS-%90 DMEM ortamında kültür edildi. Hücreler, steril 96 kuyucuklu

plakalara 1×10^3 hücre/kuyucuk yoğunluğunda ekildi. Plakalar 37°C ve %5 CO_2 içeren nemli bir ortamda 24 saat inkübe edildi. Hücreler $0.5 \mu\text{M}$ ile $200 \mu\text{M}$ (0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ve 200) aralığında değişen ilaç adaylarının (**S1-S6**) dokuz farklı konsantrasyonuna 72 saat için maruz bırakıldı. Benzimidazolyum tuzlarının stok çözeltileri PBS de hazırlandı. Pozitif kontrol olarak metal bazlı antikanser ajan olan cisplatin kullanıldı. 72 saatlik süre tamamlandıktan sonra kuyucuklardaki DMEM vakum ile uzaklaştırıldı ve hazırlanan MTT stok çözeltisi ($50 \mu\text{L}$, 5 mg/mL) her bir kuyucuğa ilave edildi. Plakalar 4 saat süre ile bir inkübatör içerisinde tekrar inkübe edildi. Daha sonra, kuyucuklardaki ortam bir pipetör aracılığı ile dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve oluşan formazonu çözmek için $200 \mu\text{L}$ DMSO her bir kuyucuğa ilave edildi. 96 kuyucuklu plaka 30 dakika boyunca bir plaka karıştırıcı üzerinde karıştırıldıktan sonra standart ELISA mikro plaka okuyucu (Biorad 6800) ile 595 nm de plakaların absorbans ölçümleri yapıldı. IC_{50} değerleri GraphPad Prism programı ile hesaplandı. Tüm bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri üç farklı data point ve üç bağımsız çalışma ile tekrarlandı. Elde edilen sonuçların ortalaması alınarak standart sapma değerleri hesaplandı (Tablo 2 ve 3).

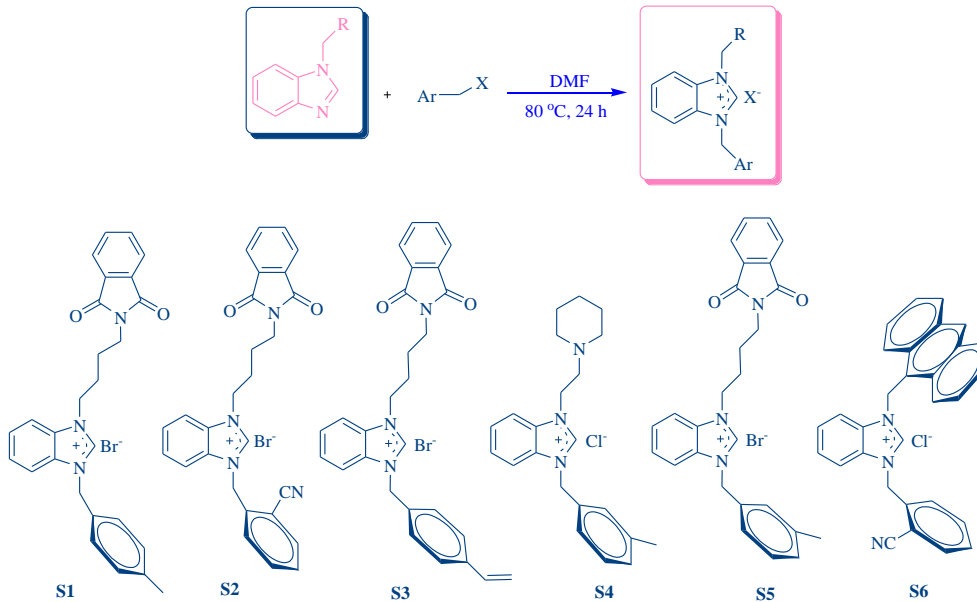
2.4. Konfokal Mikroskop Metodu

Kanserli (HeLa) ve sağlıklı insan hücreleri (Beas-2B) 12 kuyucuklu cam plakaların her bir kuyucuğuna 1 mL ve 5×10^4 yoğunlukta ekildi. Hücreler 37°C ve %5 CO_2 içeren bir inkübatörde 24 saat için inkübe edildi. 24 saat sonra, negatif kontrol dışında her bir kuyucuğa final konsantrasyon $20 \mu\text{M}$ olacak şekilde ilaç adayları ve cisplatin konuldu. Cam plaka bir inkübatörde 24 saat için tekrar inkübe edildi. Belirlenen süre tamamlandıktan sonra hücre ortamındaki besiyeri vakum ile uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuk iki kez PBS ile dikkatli bir şekilde yıkandı. Her bir kuyucuğa 1 mL taze besiyeri konuldu ve içerisine hücreleri boyamak için $1 \mu\text{g/mL}$ Hoechst ve $1 \mu\text{g/mL}$ propidyum iyodür ilave edilerek yavaşça karıştırıldı. Cam plaka 30 dakika için tekrar inkübe edildi. Son olarak, hücrelerin renkli görüntüleri konfokal mikroskobu ile fotoğraflandı.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Sentezlenen Benzimidazolyum Tuzlarının Karakterizasyonu

Literatüre göre hazırlanan bileşiklerin (**S1-S6**) açık yapıları Şekil 1'de verildi (Akkoç, 2019a; Akkoç vd., 2019).



Şekil 1. Sentezlenen benzimidazolyum tuzlarının açık yapısı.

^1H NMR spektrumunda, aşağı alanda sırasıyla 11.56, 11.56, 11.55, 11.40, 11.54 ve 9.17 ppm 'de singlet olarak elde edilen NCHN pikleri, N-alkil/aryl benzimidazollerden benzimidazolyum tuzlarının (**S1-S6**) başarılı bir şekilde sentezlendiğini desteklemektedir. ^{13}C NMR

spektrumunda **S1-S6** için NCHN karbon pikleri sırasıyla 142.77, 143.44, 142.99, 143.97, 143.01 ve 142.93 ppm 'de elde edildi (Akkoç, 2019a; Akkoç vd., 2019). Benzimidazol halkasında bulunan $\text{N}=\text{C}$ gerilme bantlarının varlığı da (1544.9 , 1562.9 , 1557.6 , 1558.4 , 1557.7 , 1553.9

cm⁻¹) tasarlanan bileşiklerin yapılarını doğrulamaktadır.

3.2. Sentezlenen Bileşiklerin Sitotoksik Aktivite Çalışmaları

Önceki çalışmalarımızda **S1-S6** bileşiklerinin *in vitro* sitotoksik aktiviteleri insan meme kanser hücre hattı (MDA-MB-231), insan kolon kanser hücre hattı (DLD-1) ve insan embriyonik böbrek hücre hattına (HEK-293T) karşı test edildi (Akkoç, 2019a; Akkoç vd., 2019). Elde edilen sonuçlar Tablo 1'de verildi.

Yapılan taramalarda **S2** bileşiğinin hem kanserli hem de sağlıklı hücreler üzerine bir toksik etkisinin olmadığı yani inaktif olduğu görüldü. Öte yandan, **S6** bileşiğinin kanserli meme hücre hattına karşı yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu ve kanserli kolon hücrelerine karşı da diğer ilaç adaylarına kıyasla daha yüksek antiproliferatif etki gösterdiği bulundu (Akkoç vd., 2019). Bu nedenle, bu çalışmada hem ilgili bileşiklerin serviks hücre hattına karşı sitotoksik etkileri hem de yüksek etkiye sahip olan **S6** bileşiğinin Beas-2B hücre hattına karşı seçiciliğinin olup olmadığı araştırıldı.

Tablo 1. Benzimidazolyum tuzlarının insan hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite sonuçları.

Bileşik	MDA-MB-231	DLD-1	HEK-293T
S1	37.43 ± 4.38	100.31 ± 2.74	T.E.*
S2	> 200	> 200	> 100
S3	105.95 ± 4.84	59.37 ± 3.61	T.E.*
S4	> 100	T.E.*	28.63
S5	53.35 ± 2.05	74.45 ± 3.59	48.48 ± 4.25
S6	1.26 ± 0.85	10.98 ± 2.33	16.22 ± 4.20

T.E.* : Test edilmedi

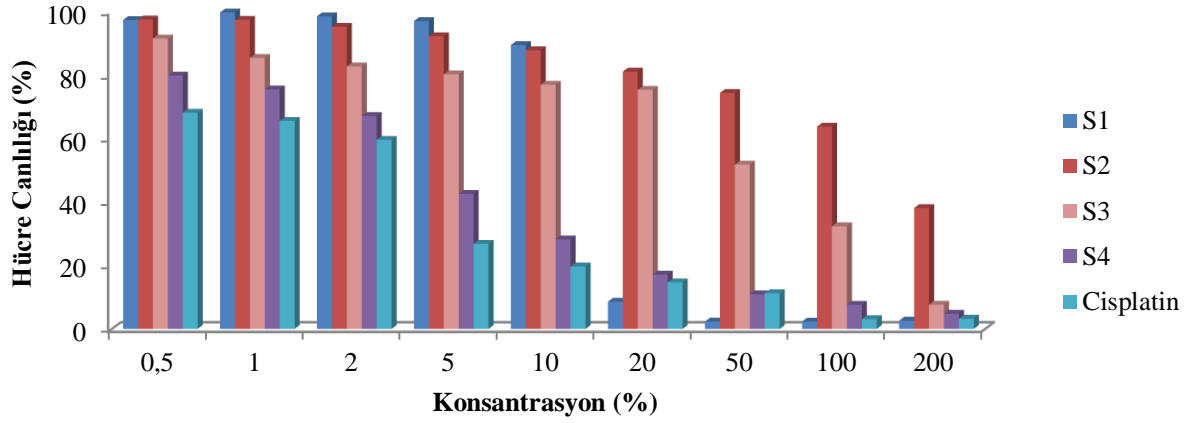
Sentezlenen bileşiklerin antiproliferatif aktiviteleri HeLa ve Beas-2B hücre hatlarına karşı 72 saat için test edildi. Bu bileşiklerin 0.5 µM ile 200 µM arasında değişen dokuz farklı konsantrasyonu sitotoksik aktiviteyi belirlemede kullanıldı. IC₅₀ değerleri üç bağımsız deney sonucunun ortalaması alınarak hesaplandı ve sonuçlar aşağıdaki tablolarda verildi (Tablo 2 ve 3).

Tablo 2. Sentezlenen bileşiklerin HeLa hücre hattına karşı *in vitro* sitotoksik aktivite sonuçları.

Bileşik	IC ₅₀ (µM)
	HeLa
S1	14.57 ± 2.01
S2	137.50 ± 5.33
S3	42.34 ± 4.83
S4	3.72 ± 0.14
Cisplatin	2.12 ± 0.02

Test edilen bileşiklerin dördü de (**S1-S4**) HeLa hücre hattına karşı sitotoksik aktivite gösterdi. N-etilpiperidin ve 3-metilbenzil grubu içeren benzimidazolyum tuzu **S4** serviks kanserli hücre hattına karşı 3.72 ± 0.14 µM IC₅₀ değeri ile diğer bileşiklere kıyasla en yüksek sitotoksik aktiviteyi sergiledi. Sentezlenen bu ilaç adayının IC₅₀ değeri, referans olarak kullanılan cisplatinin aynı hücre hattına karşı göstermiş olduğu değer ile (IC₅₀: 2.12 ± 0.02 µM) birbirine çok yakın olduğu bulundu.

N-metilbenzonitril ve N-bütilfitalimit gruplarını içeren **S2** kodlu bileşik 137.50 ± 5.33 µM IC₅₀ değeri ile HeLa hücreleri üzerinde diğer bileşiklere kıyasla daha az antiproliferatif aktiviteye sahiptir. 4-Metilbenzil grubu içeren **S1** bileşiği (14.57 ± 2.01 µM) HeLa hücre hattına karşı 4-vinilbenzil grubu içeren **S3** (42.34 ± 4.83 µM) kodlu bileşikten daha etkin olmuştur. HeLa hücrelerinin **S1-S4** bileşikleriyle etkileştirildikten 72 h sonraki canlılık oranları Şekil 2'de verildi.



Şekil 2. Konsantrasyona bağlı olarak değişen HeLa hücrelerinin canlılık oranları.

Şekil 2'de görüldüğü gibi, sentezlenen S2 kodlu bileşik 0.5 µM ve 100 µM arasındaki konsantrasyonlarda serviks hücrelerine karşı gözle görülebilir bir sitotoksik aktivite göstermedi. Öte yandan, S1, S3, S4 bileşikleriyle cisplatinin sitotoksik etkisi doza bağlı olarak değişti ve yüksek konsantrasyonlarda düşük hücre canlılık oranları gözlemlendi. Ayrıca, S4'ün kanser hücrelerinin canlılık oranları üzerindeki etkisinin klinik ilaç olarak kullanılan cisplatin ile neredeyse eşdeğer olduğu Şekil 2 de görülmektedir. En düşük hücre canlılık oranı bileşiklerin (S1-S4 ve cisplatin) 200 µM konsantrasyonunda görüldü.

S4-S6 bileşiklerinin Beas-2B hücre hattı üzerindeki sitotoksik etki sonuçları Tablo 3'de verildi. N-etilpiperidin ve 3-metilbenzil grubu içeren S4 bileşiği, serviks kanserli hücre hattına karşı 3.72 ± 0.14 µM IC_{50} değerini gösterirken sağlıklı Beas-2B hücreleri üzerine 24 saat için 59.40 µM olarak etki ettiği bulunmuştur.

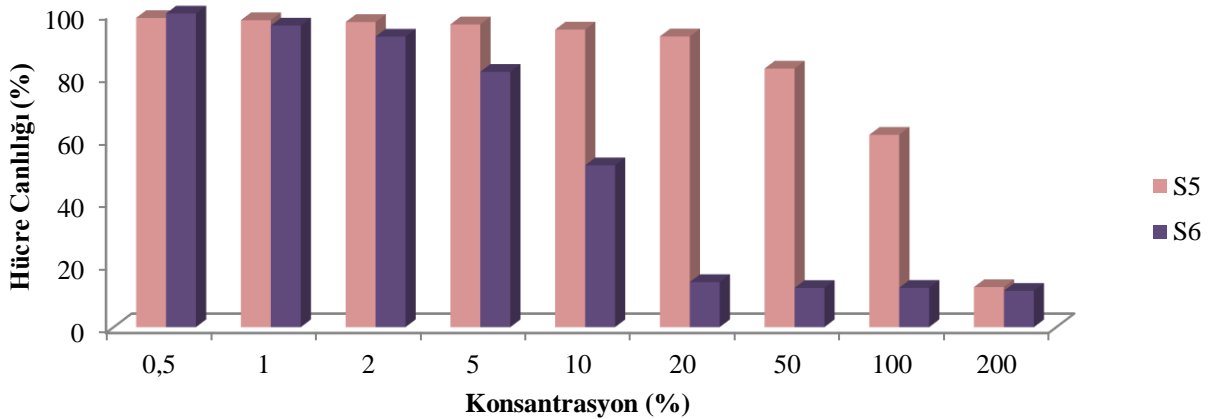
3-Metilbenzil ve N-bütülfitalimit gruplarını içeren S5 ile N-metilantrasen ve N-metilbenzonitril

gruplarını içeren S6 bileşiklerinin Beas-2B hücre hattı üzerindeki etkileri araştırıldı. Test edilen bu bileşiklerin (S5 ve S6) sağlıklı hücre hatlarında bir seçiciliğinin olmadığı ve sırası ile 120.26 ± 5.72 µM, 10.76 ± 1.44 µM IC_{50} değerlerini gösterdikleri bulundu.

Tablo 3. Beas-2B hücre hattına karşı test edilen bileşiklerin *in vitro* sitotoksik aktivite sonuçları.

Bileşik	IC_{50} (µM)
	Beas-2B
S4	59.40
S5	120.26 ± 5.72
S6	10.76 ± 1.44

Beas-2B hücre canlılık oranlarının, test edilen ilaç adaylarının konsantrasyonlarının azalması ile arttığı Şekil 3'de görülmektedir. S5 bileşiği 100 µM'a kadar toksik etki çok göstermezken, konsantrasyon 200 µM'a çıkarıldığında sağlıklı hücre sayısının yaklaşık %12 oranına kadar düştüğü görülmektedir.



Şekil 3. Beas-2B hücrelerinin canlılık oranları.

S6 bileşiği 1 μM da %4 oranında hücreleri öldürürken, konsantrasyon 10 μM 'a çıktığında hücrelerin bu ilaç adayından etkilenme oranları da %49'a çıkmaktadır. Konsantrasyon 20 μM 'a çıkarıldığında ise hücrelerin bundan etkilenmelerinin çok keskin bir şekilde arttığı ve hücre ölüm oranının %86'ya yükseldiği görülmektedir. Fakat, 20 μM 'dan daha yüksek konsantrasyonlara (50, 100, 200 μM gibi) çıkıldığında, hücrelerin bu konsantrasyon değişiminden etkilenmediği ve canlılık oranlarının 20, 50, 100 ve 200 μM için sırasıyla %14.37, %12.50, %12.53, %11.57 olduğu bulundu.

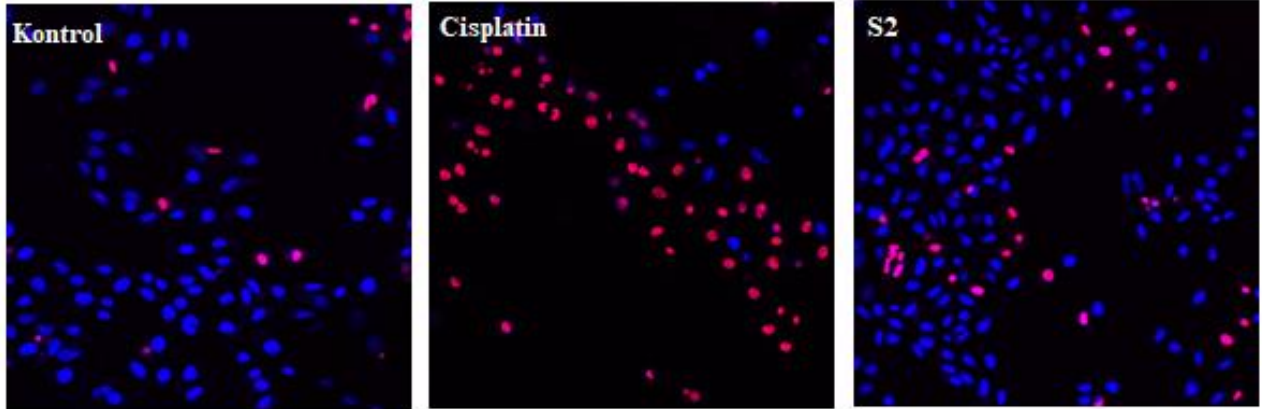
3.2. Konfokal Mikroskop Görüntüleri

HeLa ve Beas-2B hücrelerinin görüntüleri Olympus FV1000 Konfokal mikroskobu kullanılarak alındı. Kırmızı renkte gösterilen ölü hücrelerin ve mavi renkte gösterilen canlı hücrelerin tanımlanmasında Hoechst (mavi) ve PI (kırmızı) floresan boyaları kullanıldı. HeLa

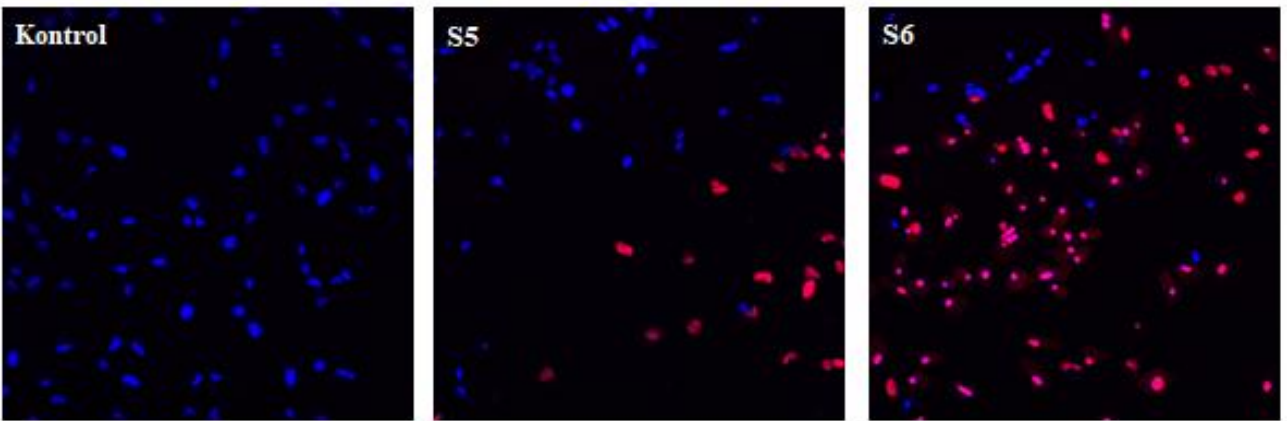
hücreleri cisplatin ve **S2** bileşiğine 24 saat için maruz bırakıldı (Şekil 4).

Negatif kontrol grupta hücreler canlılıklarını devam ettirirken, pozitif kontrol grupta (cisplatin uygulanan) hücrelerin büyük oranının öldüğü Şekil 4'de verilen fotoğraflarda görülmektedir. Konfokal görüntüleri, cisplatin ve **S2** bileşiğinin HeLa üzerindeki MTT sonuçlarını doğrulamaktadır.

Negatif kontrolün konfokal görüntülerinde hücrelerin canlılıklarını tamamen korudukları Şekil 5'de verilen ilk resimde görülmektedir. Fakat, **S5** ve **S6** bileşikleriyle muamele edilen hücrelerin canlılık oranlarının negatif kontrole kıyasla çok düştüğü ve **S6** bileşiğinin **S5** bileşiğinden daha toksik etkiye sahip olduğu alınan fotoğraflarda görülmektedir. Sonuç olarak, MTT sonuçları ile konfokal görüntülerinden elde edilen sonuçlar birbirini desteklemektedir.



Şekil 4. HeLa hücrelerinin cisplatin ve **S2** uygulandıktan 24 saat sonraki konfokal görüntüleri.



Şekil 5. Beas-2B hücrelerinin ilaç adayları uygulandıktan 24 saat sonraki konfokal görüntüleri.

4. Sonuçlar

Çalışma kapsamında öncelikle farklı N-alkilbenzimidazol türevleri hazırlandı. Bu türevlerden yararlanarak altı benzimidazolium tuzu sentezlendi. Sentezlenen bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri HeLa ve Beas-2B hücre hatlarına karşı test edildi. Bu bileşiklerden özellikle **S4** bileşiğinin $3.72 \pm 0.14 \mu\text{M}$ IC₅₀ değeri ile antikanser ilaç adayı olma yönünde önemli bir potansiyele sahip olduğu belirlendi.

Kaynaklar

- Abdelgawad, M.A., Bakr, R.B., Ahmad, W., Al-Sanea, M.M. ve Elshemy, H.A.H., 2019. New Pyrimidine-Benzoxazole/Benzimidazole Hybrids: Synthesis, Antioxidant, Cytotoxic Activity, In Vitro Cyclooxygenase and Phospholipase A2-V Inhibition. *Bioorganic Chemistry*, 92, 103218.
- Akkoç, S., 2019a. Derivatives of 1-(2-(Piperidin-1-yl)ethyl)-1H-benzo[d]imidazole: Synthesis, Characterization, Determining of Electronic Properties and Cytotoxicity Studies. *ChemistrySelect*, 4, 4938-4943.
- Akkoç, S., 2019b. Antiproliferative Activities of 2-Hydroxyethyl Substituted Benzimidazolium Salts and Their Palladium Complexes Against Human Cancerous Cell Lines. *Synthetic Communications*, 49, 2903-2914.
- Akkoç, S., Kayser, V. ve İlhan, İ.Ö., 2019. Synthesis and In Vitro Anticancer Evaluation of Some Benzimidazolium Salts. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 56, 2934-2944.
- Akkoç, S., Kayser, V., İlhan, İ.Ö., Hibbs, D.E., Gök, Y., Williams, P.A., Hawkins, B. ve Lai, F., 2017. New Compounds Based on a Benzimidazole Nucleus: Synthesis, Characterization and Cytotoxic Activity Against Breast and Colon Cancer Cell Lines. *Journal of Organometallic Chemistry*, 839, 98-107.
- Akkoç, S., Özer İlhan, İ., Gök, Y., Upadhyay, P.J. ve Kayser, V., 2016. In Vitro Cytotoxic Activities of New Silver and PEPPSI Palladium N-heterocyclic Carbene Complexes Derived from Benzimidazolium Salts. *Inorganica Chimica Acta*, 449, 75-81.
- Aslan, H.G., Akkoç, S. ve Kökbudak, Z., 2020. Anticancer Activities of Various New Metal Complexes Prepared from a Schiff Base on A549 Cell Line. *Inorganic Chemistry Communications*, 111, 107645.
- Bansal, Y. ve Silakari, O., 2012. The Therapeutic Journey of Benzimidazoles: A Review. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 20, 6208-6236.
- Busschots, S., O'Toole, S., O'Leary, J.J. ve Stordal, B., 2015. Carboplatin and Taxol Resistance Develops More Rapidly in Functional BRCA1 Compared to Dysfunctional BRCA1 Ovarian Cancer Cells. *Experimental Cell Research*, 336, 1-14.
- Cheng, J., Xie, J. ve Luo, X., 2005. Synthesis and Antiviral Activity Against Cocksackie Virus B3 of Some Novel Benzimidazole Derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15, 267-269.
- Farahat, A.A., Ismail, M.A., Kumar, A., Wenzler, T., Brun, R., Paul, A., Wilson, W.D. ve Boykin, D.W., 2018. Indole and Benzimidazole Bichalcophenes: Synthesis, DNA Binding and Antiparasitic Activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 1590-1596.
- Gök, Y., Akkoç, S., Çelikal, Ö.Ö., Özdemir, İ. ve Günel, S., 2019. In Vitro Antimicrobial Studies of Naphthalen-1-ylmethyl Substituted Silver N-heterocyclic Carbene Complexes. *Arabian Journal of Chemistry*, 12, 2513-2518.
- Gök, Y., Akkoç, S., Çelikal, Ö.Ö., Özdemir, İ., Günel, S. ve Sayin, E., 2013. N-Functionalized Benzimidazol-2-ylidene Silver Complexes: Synthesis, Characterization and Antimicrobial Studies. *Turkish Journal of Chemistry*, 37 (6) 1007-1013.
- Özil, M., Parlak, C. ve Baltaş, N., 2018. A Simple and Efficient Synthesis of Benzimidazoles Containing Piperazine or Morpholine Skeleton at C-6 Position as Glucosidase Inhibitors with Antioxidant Activity. *Bioorganic Chemistry*, 76, 468-477.
- Rojas-Aguirre, Y., Castillo, I., Hernández, D.J., Noguera-Torres, B., Márquez-Navarro, A., Villalobos, J.C., Sánchez-Bartéz, F., Sánchez-Torres, L., Gracia-Mora, I., Castillo, R. ve Hernández-Luis, F., 2012. Diversity in the Supramolecular Interactions of 5,6-Dichloro-2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole with Modified Cyclodextrins: Implications for Physicochemical Properties and Antiparasitic Activity. *Carbohydrate Polymers*, 87, 471-479.
- Rosenberg, B., Vancamp, L., Trosko, J.E. ve Mansour, V.H. 1969. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature*, 222, 385-386.
- Sharma, R., Bali, A. ve Chaudhari, B.B., 2017. Synthesis of Methanesulphonamido-Benzimidazole Derivatives as Gastro-sparing Antiinflammatory Agents with Antioxidant

- Effect. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27, 3007-3013.
- Shingalapur, R.V., Hosamani, K.M., Keri, R.S. ve Hugar, M.H., 2010. Derivatives of Benzimidazole Pharmacophore: Synthesis, Anticonvulsant, Antidiabetic and DNA Cleavage Studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 1753-1759.
- Taha, M., Mosaddik, A., Rahim, F., Ali, S., Ibrahim, M. ve Almandil, N.B., 2018. Synthesis, Antiglycation and Antioxidant Potentials of Benzimidazole Derivatives. *Journal of King Saud University - Science*, 32, 191-194.
- To, K.K.W., Poon, D.C., Wei, Y., Wang, F., Lin, G. ve Fu, L.W., 2016. Data Showing the Circumvention of Oxaliplatin Resistance by Vatalanib in Colon Cancer. *Data in Brief*, 7, 437-444.
- Tonelli, M., Novelli, F., Tasso, B., Vazzana, I., Sparatore, A., Boido, V., Sparatore, F., La Colla, P., Sanna, G., Giliberti, G., Busonera, B., Farci, P., Ibba, C. ve Loddo, R., 2014. Antiviral Activity of Benzimidazole Derivatives. III. Novel Anti-CVB-5, Anti-RSV and Anti-Sb-1 Agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 22, 4893-4909.
- Wheate, N.J., Walker, S., Craig, G.E. ve Oun, R., 2010. The Status of Platinum Anticancer Drugs in the Clinic and in Clinical Trials. *Dalton Transactions*, 39, 8113-8127.
- World Health Organization, 2018. Cancer, <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. 07 Kasım 2019.
- Yang, Y., Guo, L., Ge, X., Shi, S., Gong, Y., Xu, Z., Zheng, X. ve Liu, Z., 2019. Structure-Activity Relationships for Highly Potent Half-Sandwich Organoiridium (III) Anticancer Complexes with C^N-Chelated Ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 191, 1-7.