

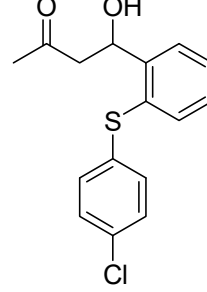
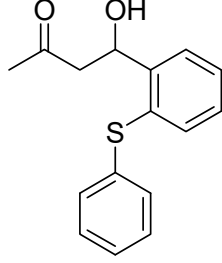
ÖZET

ANTİKANSER AKTİVİTEYE SAHİP ÖZGÜN β -HİDROKSİ KETON TÜREVİ BİLEŞİKLER

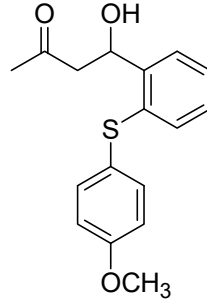
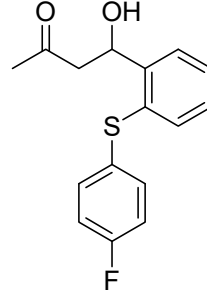
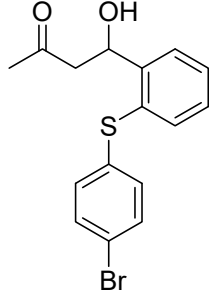
- 5 Buluş, yeni β -hidroksi keton türevi bileşikler, onların sentez yöntemi ve kanser hastalığının tedavisinde ilaç olarak kullanımı ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. β -hidroksi keton türevi bileşik olup özelliği; bileşiğin aşağıdaki gruptan seçilmesidir.



5



10

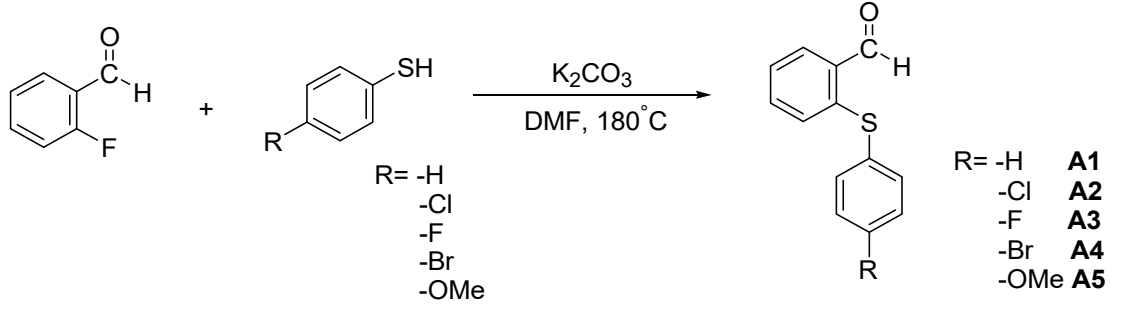
2. Farmasötik bileşim olup özelliği; İstem 1'e uygun bileşiği içermesidir.
3. Kanser hastalığının tedavisinde ilaç olarak kullanım için İstem 2'ye uygun farmasötik bileşim.

15

4. β -hidroksi keton türevi İstem 1'e uygun bileşiğin sentez yöntemi olup özelliği;

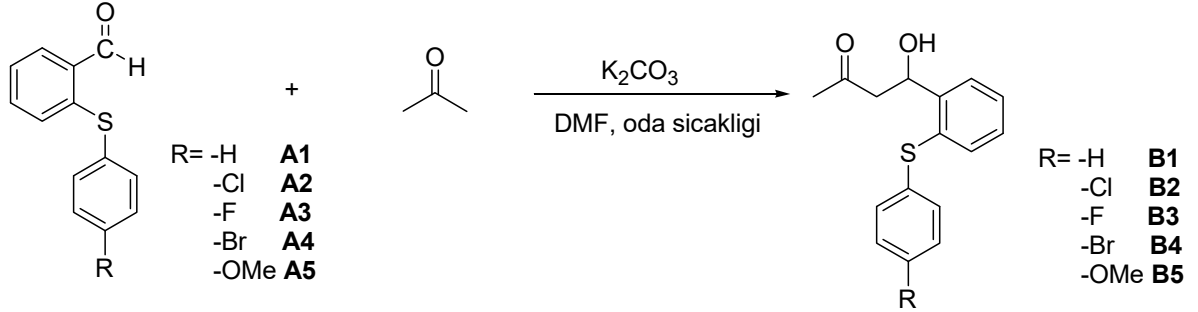
- Süstitüe tiyofenol türevleri ile 2-florobenzaldehitin K_2CO_3 katalizörlüğünde dimetilformamid içinde reflüks edilmesi,

5



- Elde edilen süstitüe aldehytler ve aseton arasında K_2CO_3 baz katalizörü ve dimetilformamid çözücüsü varlığında aldol kondenzasyon reaksiyonunun gerçekleşmesi

10



İşlem adımlarını içermesidir.

15

TARİFNAME

ANTİKANSER AKTİVİTEYE SAHİP ÖZGÜN β -HİDROKSİ KETON TÜREVİ BİLEŞİKLER

5 Buluşun İlgili Olduğu Teknik Alan

Buluş, yeni β -hidroksi keton türevi bileşikler, onların sentez yöntemi ve kanser hastalığının tedavisinde ilaç olarak kullanımı ile ilgilidir.

Buluşla İlgili Tekniğin Bilinen Durumu (Önceki Teknik)

- 10 Kanser, vücudun herhangi organ ya da dokusundaki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve büyümesi sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Kanser hücreleri genellikle sağlıklı hücrelerden farklı şekillenir, düzgün çalışmazlar ve vücudun birçok bölgesine yayılabilirler. Tümörler, anormal doku büyümesi, kontrolsüz bir şekilde büyüeyebilen ve bölünebilen hücre kümeleridir. Dünya Sağlık Örgütü-Uluslararası Kanser Araştırma Ajansının (IARC) yayınladığı araştırmaya göre dünyada her 5 kişiden biri yaşamı boyunca kansere yakalanmaktadır. Her 8 erkekte 1'i ve her 11 kadından 1'i kanser nedeniyle yaşamını kaybetmektedir. Dünya çapında, kanser teşhisi konduktan sonraki 5 yıl içinde hayatta olan toplam kanser hastası sayısının (5-yıllık prevalans) 50,6 milyon olduğu tahmin edilmektedir. 2040 yılında dünya genelinde yaklaşık 28.4 milyon yeni kanser vakası olacağı öngörülmektedir, bu sayı 2020 yılındaki yaklaşık 19.3 milyon vakanın sayısında %47'lik bir artışa karşılık gelmektedir.

Hücrel tedaviler de dahil olmak üzere hassas tıp ve yeni yöntemler, hastaların yaşam sürelerini uzatmak ve yaşam kalitesini artırmak için aralıksız denenmektedir. Onkoloji, geliştirilmekte olan tahmini 1700 klinik ilaç aday (tüm hastalıklar için yapılan klinik araştırmaların yaklaşık üçte biri) ile en büyük 10 ilaç şirketinin odağındadır.

- 25 Tüm dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir ve kadınların en önemli sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır. Hastalığın görülme sıklığının dramatik bir şekilde artıyor olması sorunun diğer yüzünü göstermektedir. Meme kanseri tedavisinde sık kullanılan bir ilaç olan doksorubisin ya da hidroksidaunorubisin, β -hidroksi keton grubu içeren antrasiklin türevi bir antibiyotiktir. Kemoterapötik ajan olarak tedavide başarı oranları yüksek olmasına rağmen, doksorubisin kullanımında tedavi sırasında ilaca karşı direnç gelişme ve kanserli olmayan hücreleri de öldürme gibi ciddi yan etkiler gözlemlenmiştir. Bu nedenle kansere karşı

daha etkin yeni ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

β -hidroksi keton bir ketonun β -karbonuna bağlı bir hidroksi grubuna sahip moleküldür. Yüksek biyolojik aktiviteleri sebebiyle diollerin, amino alkollerin, laktonların ve poliketidlerin sentezinde sıklıkla değerli yapı taşları olarak bulunan önemli bir bileşik sınıfını oluşturur. Bu önemli β -hidroksi keton motifini hedef alan yeni sentetik yöntemler geliştirilmiştir. Aldol reaksiyonu, β -hidroksi ketonlara yol açmada en etkili yöntemlerden biridir ancak bu yöntem genellikle α , β - doymamış ketonların (susuz ürünler) oluşumuna neden olmaktadır.

Buluşun Kısa Açıklaması ve Amaçları

- 10 Buluş ile yüksek verimli (%80-95) yeni bir β -hidroksi keton türevi bileşikler (**B1-B5**) sentezlenmiştir. Daha sonra belirli kanser hücre dizileri ile biyolojik aktivite süreçleri araştırıldı. Bu bileşikler arasında, bileşik **B4**'ün, MCF7 ve U87 kanser hücre hatlarına karşı en güçlü antikanser aktivite gösterdiği belirlendi. Çünkü en düşük ve biyolojik olarak en aktif IC₅₀ değeri, bileşik **B4**'de U87'ye karşı elde edildi. Ayrıntılı biyolojik aktivite bileşiği **B4**'ü hücresel
- 15 düzeyde saptamak için bazı apoptotik testler kullanıldı.

Buluşun öncelikli amacı, kanser hastalığına karşı etkili ilaç adayı olarak kullanılabilecek β -hidroksi keton türevi yeni bileşiklerin sentezlenmesidir.

- Buluşun amacı, sentezlenen β -hidroksi keton türevi bileşiklerin meme (MCF-7) ve beyin (U87) kanser hücrelerine karşı) aktivitelerinin incelenmesi ve kanser ilacı olarak kullanılan doksorubisin ile karşılaştırılmasıdır.
- 20

Buluşun bir diğer amacı, sentezlenen orijinal bileşikler arasında en yüksek antikanser etkiye sahip olan orijinal moleküllerin belirlenmesi ve anti-proliferatif etkilerine karşı duyarlılığının tespit edilmesidir.

- Buluşa konu olan β -hidroksi ketonları elde etmek için yeni bir aldol kondenzasyon metodu geliştirilmiştir. Bu amaçla, katalizör, çözücü, sıcaklık ve reaksiyon süreleri geniş bir yelpazede araştırılmış ve en iyi verimlerin elde edildiği yan ürünlerin oluşmadığı bir yöntem geliştirilmiştir. Çoğu aldol reaksiyonunda oluşan 1,3-hidroksi ketondan 1 mol su çıkışıyla α , β -doymamış ketonlar istemsiz bir şekilde oluşmaktadır. Su çıkışı nedeniyle aldol reaksiyonlarına genelde aldol kondenzasyonu denilmesinin nedeni de budur. Bu durum eğer istenen ürün β -hidroksi keton ise sorun yaratmaktadır ve istenmeyen doymamış türevine dönüşmektedir. Oysa buluş ile geliştirilen yöntemle çok az veya hiç yan ürün oluşmadan β -hidroksi keton bileşikleri
- 25
- 30

elde edilebilmektedir.

- 5 Ayrıca geliştirilen yöntemin en önemli avantajı, bilinen yöntemlerle kıyaslandığında, çok ucuz reaktiflerin kullanıldığı, oda koşullarında reaksiyon veren, özel koşullar (azot atmosferi, yüksek sıcaklık, basınç, vakum veya pahalı reaktifler) gerektirmeyen yeşil kimyaya ve enerji verimliliğine katkı sağlayan bir yöntem olmasıdır. İlaveten literatürdeki çoğu antikanser ajan sentez çalışmalarının aksine tek adımda elde edilebilen ve C-C bağının oluşmasını sağlayan aldol reaksiyonu ile moleküller sentezlenmiştir.

Buluşu Açıklayan Şekillerin Tanımları

- 10 Bu buluş bileşiklerinin antikanser etkinliği gösteren şekiller aşağıda gösterilmektedir.

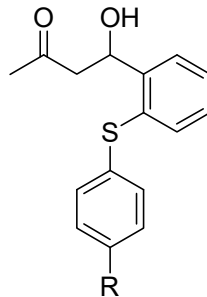
Şekil 1: B4 bileşiğinin U87 glioblastom kanser hücrelerine karşı hücrelerin %50 sini öldüren ve bilinen antikanser ilaçlar kadar etki ettiğini gösteren konsantrasyon grafiği (hücreler 48 saat boyunca B4 bileşiğinin değişik uygun dozlarıyla muamele edilmiş ve sitotoksite analizi sonucu yüzde konsantrasyon grafiği elde edilmiştir).

- 15 **Şekil 2:** B4 bileşiği için DNA merdiveni (ladder) (solda) ve annexin V apoptotik marker deneyleri (sağda) . M, 100 bp marker; lane 1, apoptotic U937 hücreleri (pozitif kontrol); lane 2, negatif kontrol; lane 3, B2; lane 4, B3; lane 5, 3j; lane 6, B5 and lane 7, B4. R. Q1; E,erken apoptoz, Q2; geç apoptoz, Q3; canlı hücreler ve Q4; nekrotik hücreler.

- 20 **Şekil 3:** B4 bileşiği ile muamele sonrası kontrol hücrelerine kıyasla ciddi oranda artış gösteren VDAC protein ifadesi western blot deneyi.

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Mevcut buluş Formül (I)'e sahip olan bileşik veya bunların farmasötik açıdan kabul edilebilir tuzu ve/veya solvatu olup,

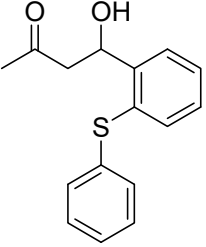
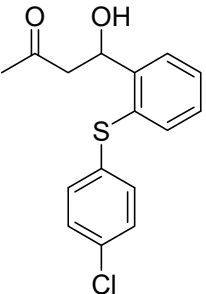
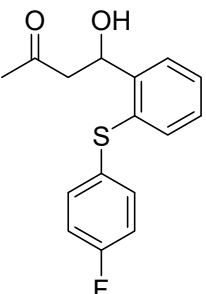
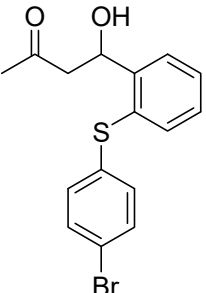
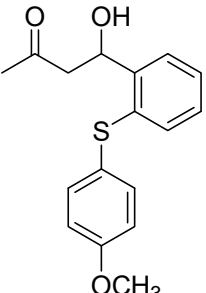


Formül I

R: H,Cl, F,Br veya OMe olabilmektedir.

Buluş bileşiklerin yapısal formülleri aşağıda Tablo 1’de gösterilmektedir:

Tablo 1: Buluş bileşiklerin yapısal formülleri ve adlandırılması

B1		4-Hidroksi-4-(2-fenilsülfanil-fenil)-bütan-2-on
B2		4-[2-(4-Kloro-fenilsülfanil)-fenil]-4-hidroksi-butan-2-on
B3		4-[2-(4-Floro-fenilsülfanil)-fenil]-4-hidroksi-butan-2-on
B4		4-[2-(4-Bromo-fenilsülfanil)-fenil]-4-hidroksi-butan-2-on
B5		4-Hidroksi-4-[2-(4-metoksi-fenilsülfanil)-fenil]-bütan-2-on

Buluş ile **B1-B5** β -hidroksi keton türevi bileşikler sentezlenmiş ve yapıları IR, ^1H ve ^{13}C NMR, kütle spektrometrisi ve elementel analiz yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Bileşiklerin FTIR spektrumuna genel olarak bakıldığında 3422 ile 3535 cm^{-1} arasında tipik OH grubu bandı ve 1693 ile 1707 cm^{-1} arasında C = O grubu bandı gözlenmiştir. Bu fonksiyonel grupların karakteristik bantlarının varlığı keto alkol yapısının oluştuğunun kanıtıdır. Bileşiklerin ^1H NMR spektrumları incelendiğinde; karbonil grubuna bitişik $-\text{CH}_3$ grubuna ait hidrojenler, $\delta = 2.00$ ppm civarında tekli ve $-\text{CH}_2$ grubuna ait hidrojenler bir ikilinin ikilisi olarak gözlemlendi. Aromatik gruplara ait hidrojenler genellikle $\delta = 7.67\text{--}6.78$ ppm aralığında ikili ve çoklu pikler olarak görülür. Bu piklerin varlığı keto alkol oluşumunu kanıtlar.

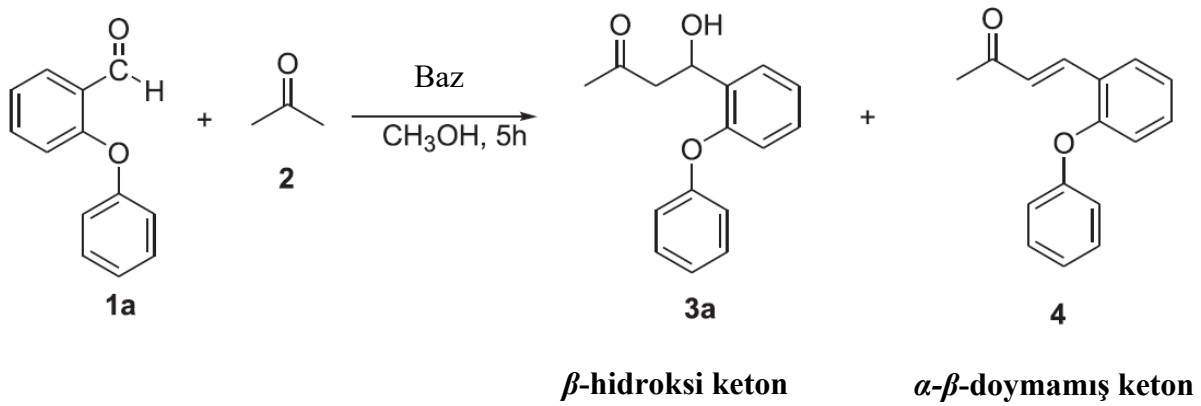
^{13}C NMR spektrumları incelendiğinde $-\text{CH}_3$ grubuna ait karbonların 30.0 ppm civarında, $-\text{CH}_2$ grubuna ait karbonların 50.0 ppm civarında ve $-\text{CH}$ grubuna ait karbonların 64.0 ppm değerlerinde olduğu görülmektedir. Aromatik karbonlar 115.0–154.0 ppm aralığında ve karbonil karbon 209.0–209.4 ppm aralığındadır. Tüm bu piklerin varlığı yapıların doğruluğunu desteklemektedir. Bileşiklerin LC-MS spektrumları incelendiğinde moleküler piklerin yanı sıra yapılarından ek H_2O sinyallerinin çıktığı gözlemlendi.

β -hidroksi ketonların sentezi için aseton ve 2-arenoksibenzaldehit veya 2-tiyoeterbenzaldehit türevlerinin varlığında bir aldol kondenzasyon reaksiyonu uygulanmıştır. Başlangıç materyali olarak kullanılan aldehitler, çeşitli sübstitüe edilmiş fenol veya tiofenol türevlerinden ve 2-floro benzaldehitten Ullmann birleştirme reaksiyonu prosedürüne göre sentezlendi [1, 2]. Bu tür aldehitlerle aldol kondenzasyon reaksiyonu teknikte bilinmemektedir. Klasik aldol reaksiyon prosedürlerini uygulandığında sadece alken oluşumu gözlemlenmektedir. Bunun nedeni yüksek konjugasyon nedeniyle α - β -doymamış ketonların daha kararlı olmasından dolayı dehidrasyon sonucunda α - β -doymamış ketonlara dönüşmesidir. Buluş β -hidroksi ketonların sentez yönteminde β -hidroksi keton verimini artırmak için α - β -doymamış keton oluşumunu en aza indirecek optimum reaksiyon koşulları belirlendi ve çok az veya hiç yan ürün oluşmadan β -hidroksi keton türevi bileşikler elde edildi. En yüksek verimde β -hidroksi keton türevi bileşiklerin sentezi için katalizör, sıcaklık, çözücü ve reaksiyon süresi parametreleri denenmiş ve en yüksek verimin elde edildiği metod tespit edilmiştir. Katalizör ve reaksiyon sıcaklığı denemelerinde KOH, NaOH, Na_2CO_3 ve K_2CO_3 baz katalizörleri varlığında reaksiyon oda sıcaklığında ve 0 °C de gerçekleştirilmiş ve bu değişkenlerin verim üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen verimler incelendiğinde bazik katalizör olarak KOH ve NaOH kullanımında alken

oluşumunun yüksek oranda olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek verim ise K₂CO₃ ile oda sıcaklığında elde edilmiştir. Sonraki adımda ise çeşitli çözücüler (aseton, etanol, kloroform, diklormetan, asetonitril, su, dimetilsülfoksit, toluen, tetrahidrofuran ve dimetilformamid (DMF)) ve reaksiyon süresi parametreleri incelenmiştir. En yüksek verim dimetilformamid ile 10 saatlik bir reaksiyon süresinde elde edilmiştir. Tespit edilen optimum şartlarda aseton ve aldehytler arasında gerçekleşen aldol kondenzasyon reaksiyonu ile buluşu oluşturan 5 adet özgün β-hidroksi keton bileşiği yüksek verimle (% 87-95) verimle elde edilmiştir (**B1-B5**).

Bunun için ilk olarak, aseton ve 2-fenoksi-benzaldehit kullanarak aldol reaksiyonunu incelendi. Katalizör, sıcaklık, çözücü ve reaksiyon süresi gibi reaksiyon koşulları parametreleri değerlendirildi.

Şema 1: Aseton ve 2-fenoksi-benzaldehit kullanarak KOH, NaOH, Na₂CO₃ ve K₂CO₃ baz katalizör varlığında gerçekleşen aldol reaksiyonunun şematik gösterimi



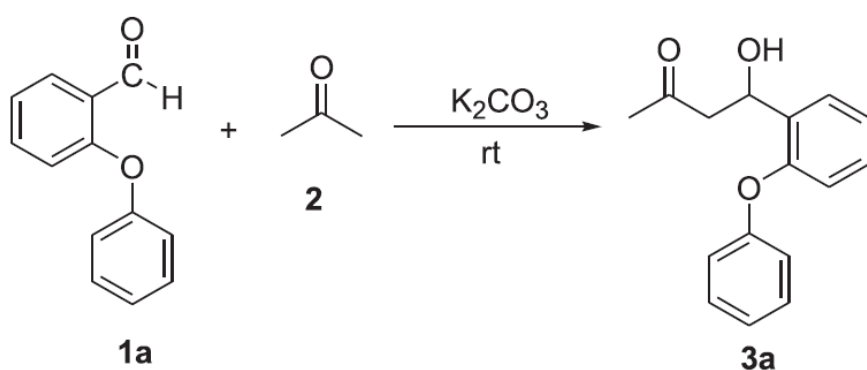
Katalizör kullanımı ve reaksiyon sıcaklığı parametresi değişkenlerinin reaksiyon verimi üzerindeki etkisinin görülmesi amacı ile bu reaksiyon baz katalizör olarak KOH, NaOH, Na₂CO₃ ve K₂CO₃ varlığında oda sıcaklığında ve 0 °C'de gerçekleştirildi ve bu değişkenlerin etkileri reaksiyon verimi üzerinde incelendi (Tablo 2). Oda sıcaklığında baz katalizör olarak K₂CO₃ kullandığında β-hidroksi keton veriminin en yüksek ve α-β-doymamış keton veriminin en düşük olduğu belirlendi (Tablo 2).

Tablo 2 : Kataliz ve reaksiyon sıcaklığının etkisi

	Baz Katalizör	Sıcaklık	Verim (%) (3a) ^a	Verim (%) (4) ^a
1	KOH	Rt	8	90
2	KOH	0	22	70
3	NaOH	Rt	40	50
4	NaOH	0	58	25
5	Na ₂ CO ₃	Rt	66	15
6	Na ₂ CO ₃	0	62	20
7	K₂CO₃	Rt	78	10
8	K ₂ CO ₃	0	75	10

^aİzole verim

- 5 **Şema 2:** Aseton ve 2-fenoksi-benzaldehit kullanarak K₂CO₃ baz katalizör varlığında oda sıcaklığında gerçekleşen aldol reaksiyonunun şematik gösterimi



- 10 Daha sonra farklı çözücülerin ürün verimine etkisi incelendi. Dimetil formamid dışında kullanılan diğer çözücülerle orta düzeyde verimler elde edildi. Taranan çözücüler arasında, 10 saatlik bir reaksiyon süresinde dimetil formamidin en iyi çözücü olduğu bulundu (Tablo 3).

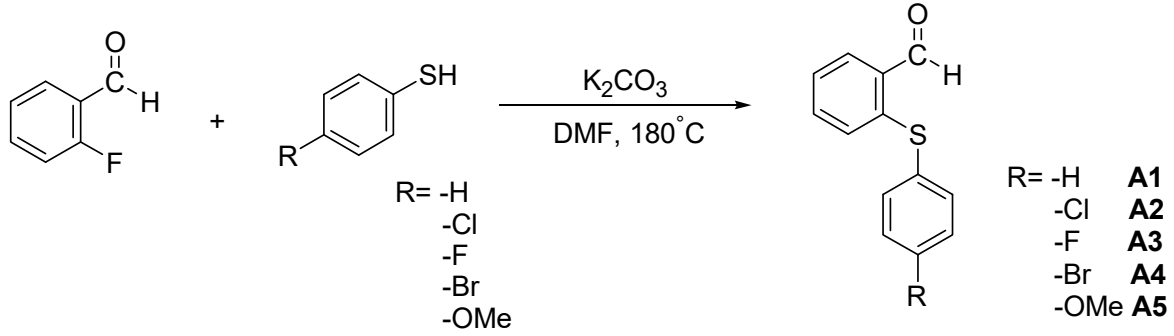
Tablo 3: Çözücü ve reaksiyon süresi etkisi

	Çözücü	Zaman (s)	Verim (%) ^a	
1	Aseton	5	60	
2	Etanol	10	67	
3	Kloroform	2	53	
4	Diklorometan	2	45	
5	Asetonitril	5	48	
6	Su	10	45	
7	Dimetilsulfoksit	2	66	
8	Toluen	2	10	
9	Tetrahidrofuran	2	26	
10	Dimetilformamit	5	82	
11	Dimetilformamit	10	92	
12	Methanol	10	82	

Bu buluşta aldol kondenzasyon reaksiyonu uygulanarak yüksek antikanser aktiviteye sahip özgün β -hidroksi keton bileşikleri sentezlenmiştir. Bu amaçla birinci basamakta 2-florobenzaldehit ve tiyofenol türevlerinden çıkılarak literatürde bilinen Ullmann Kapling reaksiyonuna göre 5 adet 2-tiyoeterbenzaldehit türevi bileşik [A1, A2, A3, A4 ve A5] sentezlenmiştir (Şema 3). Şema 3 ‘den görüldüğü gibi, öncelikle başlangıç maddesi olarak seçilen 2-tiyoeterbenzaldehit türevi bileşiklerin sentezi için Ullmann Kapling reaksiyonundan yararlanılmıştır. Süstitüe tiyofenol türevleri ile 2-florobenzaldehitin K_2CO_3 katalizörlüğünde dimetilformamid içinde 3 saat reflüks edilmesi sonucu 5 adet 2-tiyoeterbenzaldehit türevi başlangıç bileşiği [A1, A2, A3, A4 ve A5] elde edilmiştir. İkinci basamakta ise elde edilen bu aldehitler ile aseton arasında gerçekleşen aldol kondenzasyon reaksiyonu sonucu sırasıyla 4-hidroksi-4-(2-fenilsülfanil-fenil)-butan-2-on [B1], 4-[2-(4-kloro- fenilsülfanil)-fenil]-4-hidroksi-butan-2-on [B2], 4-[2-(4-floro-fenilsülfanil)-fenil]-4-hidroksi-butan-2-on [B3], 4-[2-

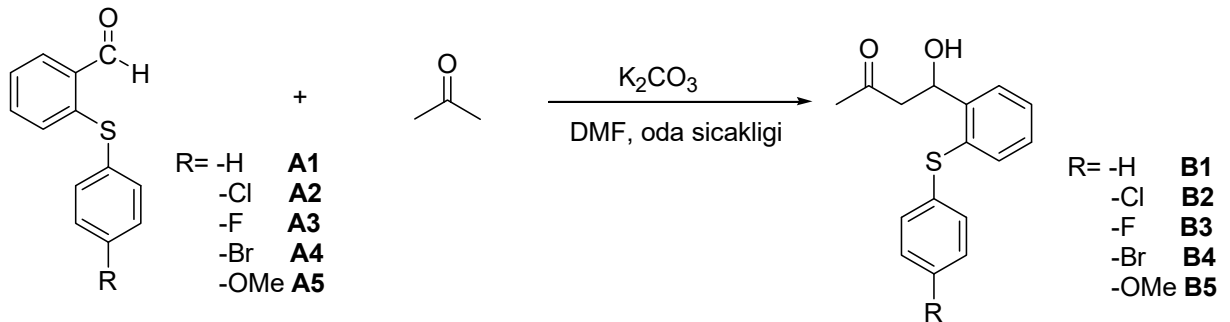
(4-bromo-fenilsülfanil)-fenil]-4-hidroksi-butan-2-on [B4], ve 4-hidroksi-4-[2-(4-metoksi-fenilsülfanil)-fenil]-butan-2-on [B5] molekülleri sentezlenmiştir (Şema 4). Bu tür aldehitler ile aldol kondenzasyon reaksiyonu teknikte bilinmemektedir.

5 **Şema 3:** A1, A2, A3, A4 ve A5 başlangıç bileşiklerinin sentezi

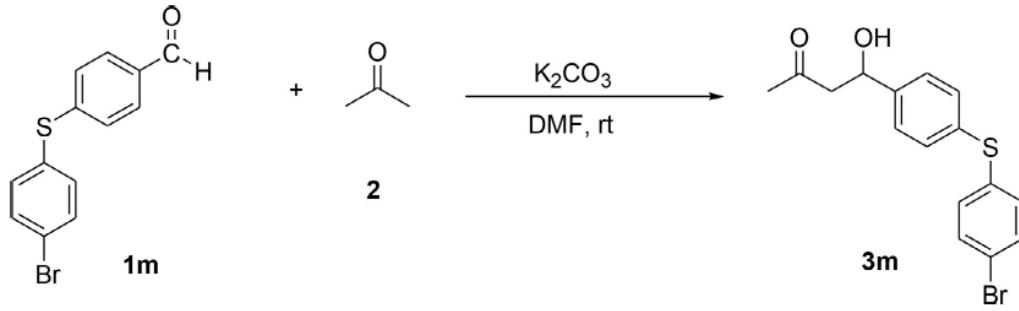


İkinci basamakta ise elde edilen bu sübstitüe aldehitler ve aseton arasında gerçekleşen aldol kondenzasyon reaksiyonundan β -hidroksi keton bileşikleri [B1, B2, B3, B4 ve B5] sentezlenmiştir (Şema 4).

15 **Şema 4:** Tiyoeter türevi β -hidroksi ketonların (B1, B2, B3, B4 ve B5) sentezi için genel reaksiyon şeması.



Örnek: B4 bileşiğinin sentez yöntemi



- Sonrasında sentezlenen tüm bileşikler, MCF-7 ve U87 hücrelerine karşı antikanser aktivite açısından incelenmiştir. MCF-7 hücreleri için **B1**, **B2**, **B3** ve **B4** bileşiklerinin sırasıyla minimum IC_{50} değerleri 375,6; 349,1; 355,1 ve 145 μM olarak bulunmuştur. **B5** bileşiği için belirtilen doz aralığında kanser hücrelerinin en az %50 sini öldüren konsantrasyon bu molekülde tespit edilmemiştir. Ek olarak U87 hücreleri için **B2**, **B3**, **B4** ve **B5** bileşiklerin sırasıyla minimum IC_{50} değerleri 3,6; 7,4; 6,6 ve 3,1 μM olarak tespit edilmiştir. **B1** bileşiği için belirtilen doz aralığında kanser hücrelerinin en az %50 sini öldüren konsantrasyon bu molekülde tespit edilmemiştir. Bileşik **B4** 'ün her iki kanser hücresinde de en güçlü bileşik olduğu ve IC_{50} dozu, MCF-7 hücreleri için 145 μM ve U87 hücreleri için 6.6 μM olarak belirlendi (Şekil 1). **B4** bileşiğinin şekil 1'de gösterildiği şekilde uygun konsantrasyon dozu belirlendikten sonra bu doz kullanılarak apoptotik DNA ladder (solda) ve annexin V deneyleri (sağda) (Şekil 2) ile apoptotik hücre ölümünün başladığı tespit edilmiştir. Kontrol hücreleri ile kıyaslandığında **B4** hücrelerinde artış gösteren geç apoptoz hücre sayısı %0.94'ten %2.34 miktarında artış göstererek yaklaşık 2 kat olarak yükseldiği tespit edilmiştir. DNA merdiveni ve Annexin V apoptotik marker testleri ile **B4** bileşiğinin, U87 hücrelerinde apoptozun başlamasına neden olduğu gösterildi (Şekil 2).
- VDAC (Voltage Dependent Anion Channels) protein ekspresyonu, U87 glioblastoma beyin kanseri hücreleri, bileşik **B4** uygulandıktan sonra çarpıcı biçimde arttı (Şekil 3). VDAC proteinin kanser hücrelerinde ifade seviyesi değişen önemli bir protein olup ilaç direncinin tersinir edildiği durumlarda kanal kapaklarının açılmasıyla birlikte aktif olduğu literatürde bilinmektedir [3] . Ek olarak, bu bileşiklerin moleküler modellemesi Akut Miyeloid Lösemi (AML), meme kanseri ve glioblastoma (GBM) tedavisi için FLT3 reseptörü, Östrojen reseptörü ve PARP2 reseptöründe çalışılmıştır. Bağlayıcı motifleri ve ilaca benzer özellikleri araştırıldı ve sonuçlara göre bileşik **B4**'ün ilaca direnç profilini tersine çevirebilecek potansiyel bir ilaç aday profiline sahip olduğu belirlendi.

REFERANSLAR

[1] T. Yildiz, H.B. Küçük, An organocatalytic method for the synthesis of some novel xanthene derivatives by the intramolecular Friedel-Crafts reaction, RSC Adv. 7 (2017) 16644–16649, doi: 10.1039/c6ra27094h .

5 [2] T. Yildiz, Synthesis of new thioxanthenes by organocatalytic intramolecular Friedel–Crafts reaction, Synth.

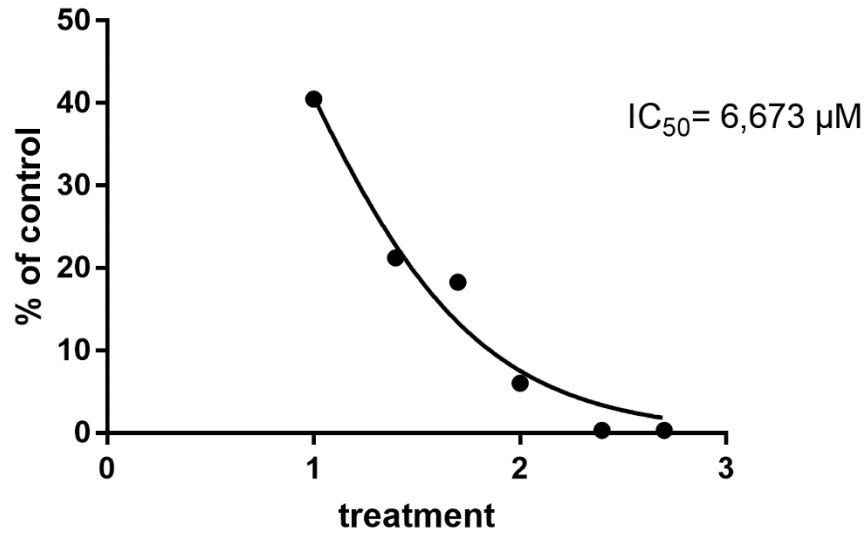
[3] H. Huang, X. Hu, C.O. Eno, G. Zhao, C. Li, C. White, An Interaction between Bcl-xL and the Voltage-dependent Anion Channel (VDAC) Promotes Mitochondrial Ca²⁺ Uptake, J. Biol. Chem. 288 (2013) 19870. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.448290>.

10

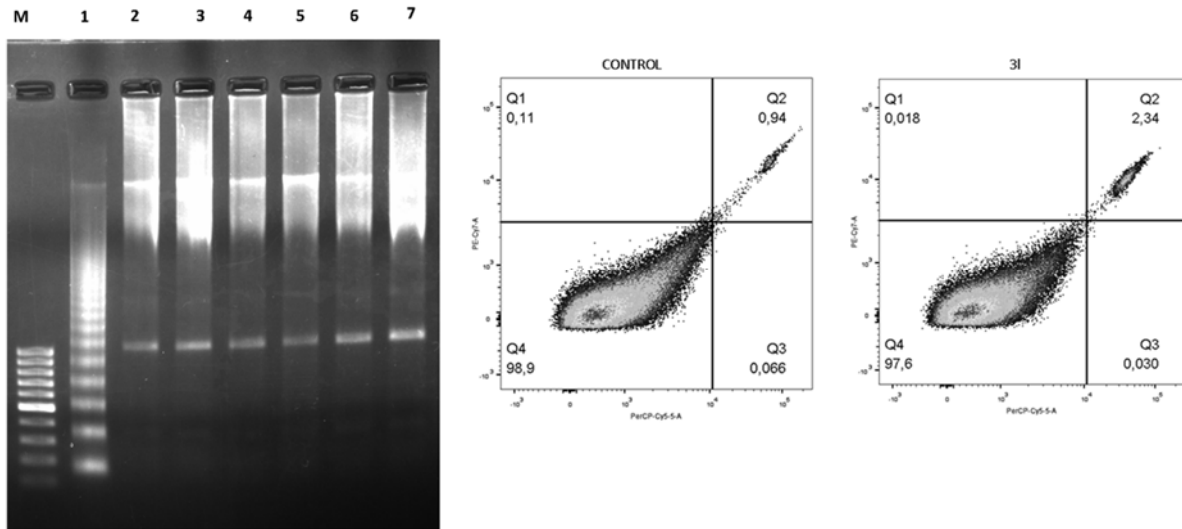
15

20

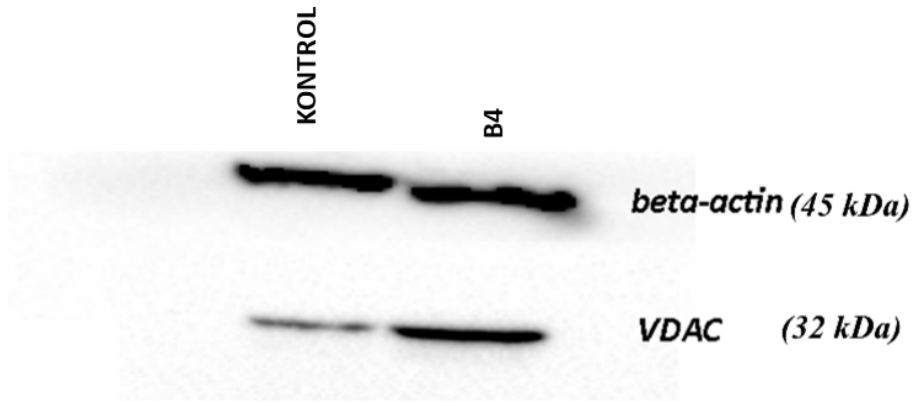
25



Şekil 1



Şekil 2



Şekil 3