



YENİ SENTEZLENMİŞ BAZI KİNOLİN BİLEŞİKLERİNİN
ANTİPROLİFERATİF VE SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN
İN VİTRO OLARAK BELİRLENMESİ

Önem YÜCE ŞAHİN

Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Şaban TEKİN

Mayıs-2016
Her hakkı saklıdır

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

YENİ SENTEZLENMİŞ BAZI KİNOLİN BİLEŞİKLERİNİN
ANTİPROLİFERATİF VE SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN *İN VİTRO*
OLARAK BELİRLENMESİ

ÖNEM YÜCE ŞAHİN

TOKAT

2016

Her hakkı saklıdır.



Bu tez çalışması;

Gaziosman Paşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2012-51 nolu proje ve kısmen de TÜBİTAK 112T394 nolu projeye desteklenmiştir.

Önem YÜCE ŞAHİN tarafından hazırlanan “Yeni sentezlenmiş bazı kinolin bileşiklerinin antiproliferatif ve sitotoksik aktivitelerinin *in vitro* olarak belirlenmesi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 13.05.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOLOJİ ANABİLİM DALI’nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman :

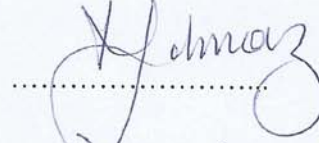
Prof. Dr. Şaban TEKİN



Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Necmettin YILMAZ



Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye:

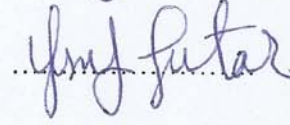
Prof. Dr. İsa GÖKÇE



Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye:

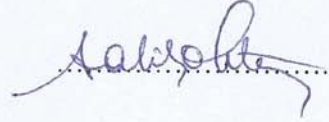
Prof. Dr. Yusuf TUTAR



Cumhuriyet Üniversitesi

Üye:

Yrd. Doç. Dr. Salih ÖKTEN



Kırıkkale Üniversitesi

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mehmet Ali SAKIN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

29.06/2016

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Önem YÜCE ŞAHİN

13-05-2016

ÖZET

DOKTORA TEZİ

YENİ SENTEZLENMİŞ BAZI KİNOLİN BİLEŞİKLERİNİN ANTİPROLİFERATİF VE SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN İN VİTRO OLARAK BELİRLENMESİ

ÖNEM YÜCE ŞAHİN

GAZİOSMAN PAŞA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI : PROF. DR. ŞABAN TEKİN)

Kinolin türevleri son yıllarda farmakolojik özellikleri bakımından dikkat çeken moleküller arasında yer almaktadır. Bu çalışmada yeni sentezlenmiş 20 kinolin türevi bileşiğin C6 (sıçan beyin tümörü), HeLa (insan serviks karsinom) ve HT29 (insan kolon karsinom) hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri hücre proliferasyon ve Laktat dehidrogenaz (LDH) sitotoksikite testleriyle araştırılmıştır. Kontrol kanser ilacı 5 fluorourasilden (5-FU) daha etkin antiproliferatif ve sitotoksik aktiviteye sahip bazı kinolin bileşiklerinin etki mekanizmaları hücre migrasyon, Topoizomeraz I inhibisyon, DNA degradasyon ve TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling) testleriyle incelenmiştir. Çalışma sonucunda SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin yüksek antiproliferatif, düşük sitotoksikite ve hücre migrasyonunu durdurucu aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Topoizomeraz I inhibisyon test sonuçları, bu bileşiklerin Topoizomeraz I aktivitesini bloke ettiklerini gösterirken; TUNEL ve DNA bantlaşma testleri bileşiklerin apoptozu uyardıklarını göstermiştir. Bu sonuçlar test edilen yeni kinolin bileşiklerinin antikanser ilaç potansiyeline sahip aday moleküller olabileceğini göstermiştir. Fakat, bunların antikanser ilaç potansiyellerinin tam olarak ortaya konması ileri *invitro* ve *invivo* çalışmaların yapılmasını gerektirmektedir.

2016, 87 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kinolin türevleri, Antikanser aktivite, Sitotoksikite, Apoptoz, Migrasyon

ABSTRACT

DOCTORATE THESIS

DETERMINATION OF IN VITRO ANTIPROLIFERATIVE AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF SOME NEWLY SYNTHESIZED QUINOLINES DERIVATIVES

ÖNEM YÜCE ŞAHİN

GAZIOSMANPASA UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOLOGY

(SUPERVISOR : PROF. DR. ŞABAN TEKİN)

In recent years, quinoline derivatives are remarkable molecules with their pharmacological properties. In this study, antiproliferative and cytotoxic activities of newly synthesized quinoline molecules were tested by cell proliferation and LDH cytotoxic activity assay against C6 (Rat brain tumor cells), HeLa (Human cervix carcinoma) and HT29 (Human colon carcinoma) cell lines. Quinoline derivatives which have exhibited more antiproliferative and cytotoxic activities than control cancer drug 5-fluorouracil (5-FU) were examined further by cell migration, topoisomerase I inhibition, DNA degradation and TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) tests. Results showed that; quinoline derivatives coded SO13 and SO18 exhibited high antiproliferative and low cytotoxic activities and inhibits cell migration. In addition, these molecules inhibited topoisomerase I activity; TUNEL and DNA laddering assays showed that these compounds induced apoptosis. These results revealed that these newly synthesised quinoline derivatives may have potentials as anticancer drugs candidates. However, further *invitro* and *invivo* experiments need to be performed to confirm their anticancer drug potential.

2016, 87 pages

Key words: Quinoline derivatives, Anticancer activity, Cytotoxicity, Apoptosis, Cell migration

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof.Dr. Şaban TEKİN'e, kinolin moleküllerinin sentezlerini yapan sayın Prof. Dr. Osman ÇAKMAK ve Yrd. Doç. Dr. Salih ÖKTEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca deneyimlerinden faydalandığım değerli arkadaşım Doç.Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU'na, değerli meslektaşım Dr. Ali AYDIN'a, Arş. Gör. İlyas CAN'a, tez yazım aşamasında teknik bilgisini esirgemeyen Biyokimya uzmanı sayın Dr. Ali YILDIRIM'a, sahip olduğum en değerli arkadaşım ve manevi kardeşim, aynı zamanda sevgili meslektaşım Dr.Meryem DUMANLI'ya verdikleri destekten dolayı minnettarım.

Öğrenim hayatım boyunca her anımda yanımda olan kıymetli annem ve babam Sevil-Necip YÜCE'ye, kardeşim Önder YÜCE'ye ve değerli aile büyüklerim Mübeccel-Yaşar SARAÇOĞLU'na, kıymetli eşim Yrd. Doç. Dr. Mustafa ŞAHİN'e sonsuz sevgilerimi sunarım.

Bu çalışma hayatta en değerli varlığım, biricik kızım Ömür ŞAHİN'e armağanımdır.

Önem YÜCE ŞAHİN

13 Mayıs 2016

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xii
1 GİRİŞ.....	1
2 KAYNAK ÖZETİ.....	2
2.1 Kanser.....	2
2.2 Kanser Hücrelerinin Temel Özellikleri.....	3
2.2.1 Büyüme faktörü üretiminde kendi kendine yeterlik.....	3
2.2.2 Tümör Baskılayıcı Gen Mutasyonları.....	4
2.2.3 Apoptoza Direnç.....	4
2.2.4 Sınırsız Replikasyon Potansiyeli.....	5
2.2.5 Tümör Anjiyogenezi.....	5
2.2.6 Doku İnvazyonu ve Metastaz.....	6
2.3 Apoptoz.....	6
2.3.1 Apoptozun Sınıflandırılması.....	7
2.3.2 Apoptozun Genetiği.....	8
2.3.3 Süper Kıvrımlı DNA.....	10
2.4 DNA Topoizomerazlar.....	11
2.4.1 DNA Topoizomerazların yapıları, fonksiyonları ve sınıflandırılmaları.....	11
2.4.2 Topoizomeraz İnhibitörleri.....	13
2.5 Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaçlar.....	14
2.5.1 Alkilleyici ajanlar.....	15
2.5.2 Antimetabolitler.....	16
2.6 Kinolin Türevleri ve Antikanser İlaç Potansiyelleri.....	19
2.6.1 Antikanser İlaç Potansiyeline Sahip Kinolin Türevleri.....	23
3 MATERYAL ve YÖNTEM.....	28

Sayfa

3.1	Çalışmada Kullanılan Kinolin Türevleri ve Sentez Mekanizmaları	28
3.1.1	Cihazlar.....	30
3.1.2	Kullanılan Kimyasallar.....	31
3.1.3	Kullanılan sarf malzemeler.....	32
3.2	Çalışmada Kullanılan Kinolin Moleküllerinin Sentez Mekanizmaları	33
3.3	Hücre Kültürü	34
3.4	Hücre Proliferasyon Testi.....	35
3.4.1	BrdU Hücre Proliferasyon ELIZA kiti çalışma solüsyonları	35
3.4.2	BrdU hücre proliferasyon ELIZA kiti prosedürü	36
3.5	Kinolin Türevi Bileşiklerin IC ₅₀ Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	37
3.6	Laktat Dehidrogenaz (LDH) Sitotoksosite Testi.....	38
3.6.1	LDH Sitotoksosite Testi çalışma solüsyonları	38
3.6.2	LDH Sitotoksosite kiti çalışma prosedürü.....	38
3.7	DNA Degredasyon/Bantlaşma Testi (DNA laddering assay)	39
3.7.1	DNA Degredasyon/Bantlaşma Testi çalışma solüsyonları.....	39
3.8	Hücre migrasyon testi.....	42
3.9	TUNEL Testi	42
3.9.1	TUNEL testi çalışma solüsyonlarının hazırlanması	42
3.9.2	TUNEL Testi Prosedürü	43
3.10	Topoizomeraz I inhibisyon testi	43
3.10.1	Topoizomeraz I inhibisyon testi çalışma solüsyonları	44
3.11	Topoizomeraz I inhibisyon test prosedürü	44
3.12	Total RNA izolasyonu ve örneklerden cDNA sentezi	44
3.12.1	Total RNA İzolasyonu solüsyonlarının hazırlanması.....	44
3.12.2	Total RNA izolasyonu prosedürü	45
3.12.3	cDNA sentezi.....	46
3.12.4	cDNA sentezinde kullanılan solüsyonlar	46
3.12.5	cDNA sentez prosedürü.....	47
3.13	Real-Time Ready Gen Ekspresyon Paneli	47
3.13.1	Real-Time Ready Gen Ekspresyon Paneli Prosedürü	47

Sayfa

3.14	İstatistik Yöntem	48
4	BULGULAR	49
4.1	BrdU Hücre Proliferasyon ELIZA Testi Sonuçları	49
4.1.1	SO1 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitesi	49
4.1.2	SO2 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	50
4.1.3	SO3 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	51
4.1.4	SO4 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	52
4.1.5	SO5 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi.....	53
4.1.6	SO6 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	54
4.1.7	SO7 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	55
4.1.8	SO8 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	56
4.1.9	SO9 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	57
4.1.10	SO10 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	58
4.1.11	SO11 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	59
4.1.12	SO12 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	60
4.1.13	SO13 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	61
4.1.14	SO14 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	62

4.1.15 SO15 bileşğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	63
4.1.16 SO16 bileşğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	64
4.1.17 SO17 bileşğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	65
4.1.18 SO18 bileşğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	66
4.1.19 SO18 bileşğinin C6(A), HeLa(B) ve HT29(C) hücre hatlarında 0,5 µg/ml – 10 µg/ml dozları arasında antiproliferatif aktiviteleri	67
4.1.20 SO19 bileşğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	68
4.1.21 SO20 (3-Br-6,8-DiPhQ) bileşğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi	69
4.2 Yeni Sentezlenmiş Bazı Kinolin Bileşiklerinin Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	70
4.2.1 SO7, SO8; SO9, SO10, SO13, SO18 kodlu bileşiklerin C6 hücre hattı üzerinde sitotoksik aktivite testi sonuçları	70
4.2.2 SO8; SO9, SO13, SO18 kodlu bileşiklerin HeLa hücre hattı üzerinde sitotoksik aktivite testi sonuçları	71
4.2.3 SO6, SO9, SO10, SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin HT29 hücre hattı üzerinde sitotoksik aktivite testi sonuçları	72
4.3 SO13 ve SO18 Kodlu Bileşiklerin HeLa Hücrelerinin Migrasyonuna Etkileri ..	72
4.4 DNA Degredasyon / Bantlaşma Testi Sonuçları	73
4.4.1 SO7, SO8, SO9, SO10, SO13 ve SO18 bileşiklerinin C6 hücre hattı üzerinde DNA bantlaşma aktivitesi.....	74
4.4.2 SO8, SO9, SO13 ve SO18 bileşiklerinin HeLa hücre hattı üzerinde DNA bantlaşma aktivitesi	75
4.4.3 SO6, SO9, SO10, SO13 ve SO18 bileşiklerinin HT29 hücre hattı üzerinde DNA bantlaşma aktivitesi.....	76

Sayfa

4.5	SO13 ve SO18 Kodlu Bileşiklerin Topoizomerez I Fonksiyonunu Baskılayıcı Aktiviteleri.....	77
4.6	SO13 ve SO18 Bileşiklerinin HT29 Hücre Hattında Bazı Genlerin Ekspresyonuna Olan Etkileri.....	78
4.7	TUNEL Testi Sonuçları.....	79
5	TARTIŞMA ve SONUÇ	82
6	KAYNAKLAR.....	88
7	ÖZGEÇMİŞ.....	95



SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simge	Açıklama
IC ₅₀	Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan madde konsantrasyonu
P	Önemlilik derecesi
SD	Standart sapma
SEM	Standart hata
Kısaltmalar	Açıklamalar
5-FU	5-Fluorourasil
C6	Glioma (sıçan) kanser hattı
Cdna	Komplemeter DNA
Cp	Real-time PCR eşik değeri
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium, high glucose
DMSO	Dimetilsulfoksit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfatlar
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Etilen daimin tetraasetik asit
ELIZA	Enzime linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
HeLa	Servikal kanser hücre hattı
HT29	Kolon kanser hücre hattı
LDH	Laktat dehidrogenaz

NFKB	Nuclear factor NF-kappa
PBS	Phosphate buffered saline
Pen-Strep	Penisilin streptomisin
RT-PCR	Real-time PCR
SOCS-2	Supresor of cytokine signalling
TdT	Termal deoksinükleotidil transferaz
TUNEL	Termal deoksinucleotidyl transferase mediated UTP nick end labeling



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Bcl-2 ve p53 genlerinin apoptozdaki rolü	9
Şekil 2.2. DNA'nın relaks ve süper kıvrımlı yapısı.....	11
Şekil 2.3. Kinolinlerin temel yapısı	19
Şekil 4.1. SO1 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi	49
Şekil 4.2. SO2 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi	50
Şekil 4.3. SO3 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi	51
Şekil 4.4. SO4 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi	52
Şekil 4.5. SO5 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi	53
Şekil 4.6. SO6 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi	54
Şekil 4.7. SO7 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi	55
Şekil 4.8. SO8 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi	56
Şekil 4.9. SO9 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi	57
Şekil 4.10. SO10 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi.....	58
Şekil 4.11. SO11 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi.....	59

Şekil 4.12. SO12 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi.....	60
Şekil 4.13. SO13 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi.....	61
Şekil 4.14. SO14 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi.....	62
Şekil 4.15. SO15 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi.....	63
Şekil 4.16. SO16 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi.....	64
Şekil 4.17. SO17 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi.....	65
Şekil 4.18. SO18 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi.....	66
Şekil 4.19. SO18 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin 0,5µg/ml-10µg/ml dozlarında hücre proliferasyon testi belirlenmesi.....	67
Şekil 4.20. SO19 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi.....	68
Şekil 4.21. SO20 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi.....	69
Şekil 4.22. C6 hücre hattı üzerinde SO7, SO8; SO9, SO10 SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin sitotoksik aktivitelerini gösteren grafik	70
Şekil 4.23. HeLa hücre hattı üzerinde SO13, SO9 ve SO8 kodlu bileşiklerin sitotoksik aktivitelerini gösteren grafik	71
Şekil 4.24. HT29 hücre hattı üzerinde SO13, SO10, SO9 ve SO6 kodlu bileşiklerin sitotoksik aktivitelerini gösteren grafik	72
Şekil 4.25 Yeni sentezlenen SO13 ve SO18 kodlu kinolin bileşiklerinin HeLa hücrelerinin migrasyonuna etkisi.	73
Şekil 4.26. SO7, SO8, SO9, SO10 bileşiklerinin DNA degradasyon aktivitesi.	74

Sayfa

Şekil 4.27. SO13 ve SO18 bileşiklerinin DNA degradasyon aktivitesi.....	74
Şekil 4.28. SO8, SO9, SO13 bileşiklerinin DNA degradasyon aktivitesi.	75
Şekil 4.29. SO13 ve SO18 bileşiklerinin DNA degradasyon aktivitesi.....	75
Şekil 4.30. SO6, SO9, SO10 bileşiklerinin DNA degradasyon aktivitesi.	76
Şekil 4.31. SO13 ve SO18 bileşiklerinin DNA degradasyon aktivitesi.....	76
Şekil 4.32. SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin Topoizomeraz I aktivitesi üzerine etkisi	77
Şekil 4.33. SO13 ve SO18'in dağılım plot grafikleri	78
Şekil 4.34. SO18 kodlu bileşiğin HT29 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerinin TUNEL testi ile belirlenmesi.....	79
Şekil 4.35. SO13 kodlu bileşiğin HT29 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerinin TUNEL testi ile belirlenmesi.....	80
Şekil 5.1. SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin gen regülasyonu üzerine etkilerini gösteren hipotetik model	86

ÇİZELGELER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Biyolojik aktiviteye sahip bazı kinolin türevleri	22
Çizelge 3.1. Sentezlenen kinolin türevi moleküller	28
Çizelge 3.2. Kinolin moleküllerinin IC ₅₀ değer tablosu.....	37



1 GİRİŞ

Kanser günümüzde insan sağlığını etkileyen ve ölümlle sonuçlanan en önemli hastalıklar arasında yer almaktadır. Kanser tedavisi amacıyla etkili ilaç geliştirme çabaları II. Dünya savaşıdan önce başlamıştır. Mikroorganizmalara karşı antibiyotik kullanımındaki başarı, araştırmacıları ve ilaç şirketlerini antikanser ilaçlar üzerinde çalışmaya teşvik etmiştir. İlerleyen zamanlarda birçok kanser araştırma merkezinin kurulması ve buralarda birçok antikanser ilaçların geliştirilmesine rağmen heterojenik bir hastalık olan kansere kesin bir çare bulunamamıştır. Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılacak etkin ve yan etkisi az olan antikanser ilaçların geliştirilmesine yönelik araştırmalar günümüzde de halen devam etmektedir. Bu alanda yapılan antikanser ilaç araştırmaları sağlık alanında yapılan araştırma çalışmalarının başında gelmektedir (S. E. A Murat Tuncer, 2008; A Murat Tuncer, 2008). Günümüzde kliniklerde kullanılan mevcut antikanser ilaçlar doğrudan veya bitki kökenli bileşiklerden esinlenilerek kimyasal sentezle ya da biyoteknolojik yöntemlerle bakteri, maya veya memeli hücreleri kullanılarak üretilmektedir.

Son yıllarda biyoteknolojik kanser ilaçlarının üretimi ve kullanımı oldukça yaygın hale gelmiştir. Yapılan araştırmalarda kanser kemoterapisi uygulanan hastalarda kullanılan antikanser ilaçlara karşı direnç oluştuğu belirlenmiştir. Kemoterapi; kanserli hastaların yaklaşık % 80'inde başarı sağlarken, ancak % 20'lik bölümde ilaca karşı gelişen direnç mekanizmaları ya da ciddi yan etkileri nedeniyle etkisiz kalmaktadır (Lowitz, B.B, Casciato, 2011). Bu çalışmada yeni sentezlenen TriBrQ (SO1), bis(SCH₃) (SO2), Br-CNQ (SO3), diCNTHQ (SO4), BrTHQ (SO5), DiMeOQ (SO6), BrQ (SO7), DiBrTHQ (SO8), metoksikinolin türevi (SO9), DiBrQ (SO10), DiCNQ (SO11), kinolin dikarbaldehit (SO12), fenilkinolin türevi (SO13), metoksibromokinolin (SO14), izokinolon türevi (SO15), bromometoksikinolin türevi (SO16), diPhQ (SO17), hidroksibromokinolin türevi (SO18), DiPhTHQ (SO19), bromofenilkinolin türevi (SO20) kodlu kinolin bileşiklerinin çeşitli kanser hücre hatları üzerinde antikanser ve sitotoksik aktiviteleri belirlenerek antikanser ilaç potansiyelleri araştırılmıştır.

2 KAYNAK ÖZETİ

2.1 Kanser

Son yıllarda üzerinde en çok araştırma yapılan hastalıklardan biri olan kanser; çeşitli etkilerle belirli genlerde oluşan mutasyonlar sonucu gen ifadesinin miktarında veya zamanlamasında meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkan hücresel seviyedeki genetik bir bozukluktur. Kanserli hücreler, genel olarak kontrolsüz bir şekilde bölünerek kendine özgü damar yapısı olan tümör dokusunu oluştururlar ve bazen dolaşım sistemine geçerek oluştukları bölgelerden, başka bir bölgeye göç ederek (metastaz) bu bölgelerde ikincil tümörleri oluştururlar (Tuncer, 2008; Tuncer, 2008; Lodish ve ark., 2011).

Kanser; epitelium hücrelerinden (karsinomlar), mezankimal hücrelerden (sarkomlar) ve hematopoetik hücrelerden (lösemi) gelişmektedir (Sherman ve ark., 1990). Çalışmalar bir taraftan kanserin moleküler biyolojisi üzerinde yoğunlaşırken, diğer taraftan da cerrahi ve radyoterapi gibi uygulamaların yanı sıra yeni nesil kemoterapotik ilaçlarla yapılan tedavi etkili olmaya ve gün geçtikçe bu konudaki araştırmalar hız kazanmaya başlamıştır (Tuncer, 2008). Kansere ilgili genler, iki temel alt gruba ayrılmaktadır: onkogenler ve tümör süpresör genler. Onkogenler, çoğunlukla proto-onkogen adı verilen normal hücresel genlerin mutant (aktif olan) alelleri olmakla birlikte telomerazları kodlayan veya apoptozu bloke eden genler de olabilmektedir. Onkogenler genellikle fonksiyon kazandıran mutasyon özelliğine sahip olup, proliferasyonu stimüle etme, tümörün damarlanmasını artırma ve apoptozu engelleme gibi mekanizmalarla malign transformasyonu gerçekleştirmektedir. Tümör süpresör genler ise hücre büyümesini regüle ederek tümör gelişimini engelleyen genlerdir. Tümör süpresör genlerdeki mutasyonlar veya bunlar tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyon kaybı, defektif apoptozu ve kontrolsüz hücre büyümesine neden olmaktadır. Mutasyonlar hücre bölünmesi sırasında devamlı olarak meydana gelmektedir ve onkogenler ile tümör süpresör genler diğer genlere oranla daha fazla mutasyona uğramaya meyilli değildir. Kanserdeki mutasyonları diğer mutasyonlardan farklı yapan, bu mutasyonların hücrede güçlü proliferasyona ve uzun hücresel yaşam için pozitif seleksiyona yol açmasıdır. Sonuç olarak kanser hücresi fenotipik olarak kontrolsüz ve aşırı proliferasyon özelliğine

sahip olup, yaşamı tehdit eden bir hastalık gelişimine yol açmaktadır (Sherman, 1990; Kumar ve Cotran, 2003).

2.2 Kanser Hücrelerinin Temel Özellikleri

2.2.1 Büyüme faktörü üretiminde kendi kendine yeterlik

Büyüme sinyallerinde otonomi Normal hücrelerin bölünebilmesi için dışarıdan büyüme faktörü sinyalini alması gerekir, kanser hücreleri normal büyüme faktörü sinyaline bağımlı değildir, mutasyonlar düzenli olmayan büyümeye sebep olmaktadır (Nelson ve Cox, 2005; Nalbantoğlu, 2006).

Büyüme sinyalleri engelleyicileri Normal hücreler engelleyici sinyallere homeostasi sağlamak için cevap verirler (vücuttaki hücrelerin çoğu aktif olarak bölünmez), kanser hücreleri büyümeyi engelleyen sinyallere cevap vermez, mutasyonlar engelleyici yolları etkilemektedir. Çok hücreli organizmayı oluşturan her bir hücre komşu (parakrin) veya uzaktaki (endokrin) bir hücreden kaynaklanan sinyallerle denetlenmektedir. Denetim işlevinde aynı zamanda dokuların alt yapısını oluşturan bağ dokusu da önemli rol oynamaktadır. Normal hücrelerden farklı olarak kanser hücreleri çevrelerindeki bağ dokusunun (ekstraselüler matriks) makromolekülleri ile temaslarını sağlayan integrin adı verilen membran yüzeyi reseptörlerini farklı eksprese ederek hareket kabiliyetlerini arttırmaktadırlar. Hücreler arası büyüme ve çoğalma sinyallerinde büyüme faktörü olarak adlandırılan çoğunluğu polipeptid yapısında moleküller görevlidir. Normal hücreler bölünmeden ve büyümeden dururlar (G_0 fazı). Fakat kanser hücreleri dışarıdan büyüme faktörü uyarısı olmadan hücre siklusuna girebilir ve büyümelerini sürdürebilirler. Kanser hücrelerinin bu özelliği kazanmalarında önemli mekanizmalar rol oynamaktadır (Lodish, 2011).

Büyüme faktörü üretiminde değişiklikler Normal biyolojik işleyişte büyüme faktörleri dokulardaki farklı kökenli hücreler tarafından üretilmektedir (heterotipik sinyalizasyon). Göç yolu ile gelen enflamasyon hücreleri ve fibroblastlar bu mekanizmada aktif yer almaktadır. Kanser hücrelerinin kendi büyüme faktörlerini normal gereksinimin üzerinde üretilip sonra da bu uyarılara kulak vererek büyüme ve proliferasyonlarına bazı glioblastoma ve sarkomların aşırı miktarda Platelet-derived growth factor (PDGF) ve

Transforming growth factor-alfa (TGF α) üretmeleri örnektir (Lodish ve ark.2003; Lodish ve ark., 2011) .

Hücre yüzeyi büyüme faktörü reseptörlerinde değişiklikler Hücre membranında yer alan ve çoğu sitoplazmik bölünmede tirozin kinaz aktivitesine sahip (RTK) büyüme faktörü reseptörleri birçok kanser türünde değişikliklere uğramaktadır (Alberts ve ark., 2008).

Hücre içi sinyal ileti zincirleri proteinlerinde değişiklikler Hücre membranından algılanan sinyallerin sitoplazma boyunca hücre nükleusuna iletilmesini sağlayan sinyal transdüksiyon zincirinde yer alan proteinlerin mutasyonları kanser hücrelerinin en erken saptanan özellikler olarak sayılabilir (Alberts ve ark., 2008).

2.2.2 Tümör Baskılayıcı Gen Mutasyonları

Büyüme ve çoğalmayı teşvik eden sinyallerin yanı sıra hücreler bu fonksiyonları durdurucu sinyaller de alırlar. Bu sinyaller hücre proliferasyonunu G0 istirahat fazına sokarak ve hücrelerin proliferatif niteliklerinin tümüyle kaybına neden olarak sadece özel işlevleri gerçekleştirecek farklılaşmaya yönlendirerek engellemektir (Elmore, 2007).

2.2.3 Apoptoza Direnç

Programlanmış hücre ölümüne karşı gelişen edinsel direnç hemen hemen tüm kanser hücrelerinin ortak özelliğidir. Mitokondriden salınan sitokrom-C sonucu aktive olan proteolitik kaspaz enzimlerinin etkisiyle hücre membranının geçirgenliğinin değişmesi, sitoplazmanın hücre dışına akması, kromozomların parçalanması sonucu apoptoza uğrayan hücreler için hiçbir enflamatuar reaksiyon olmadan mononükleer hücreler tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılmaktadır. Sensör mekanizmaları iki temel gruba ayırır. IGF-1R gibi sağkalım reseptörleri ekstraselüler sağkalım sinyallerini algılarken, FAS reseptörü ve TNF-R1 ölüm sinyallerini hücre içine iletir (Miller ve ark., 2009). DNA hasarı, hipoksi gibi intraselüler olumsuzluklar da p53 tümör baskılayıcı proteini tarafından saptanmaktadır. Bcl-2 protein ailesi adı verilen bir dizi proteinlerin ekspresyonu p53 proteini tarafından düzenlenmektedir. p53 proteini hücre hasara yanıt olarak Bax proteininin ekspresyonunu artırarak apoptozu indüklerken, artmış Bcl-2 proteini düzeyleri apoptoza karşı önemli bir direnci desteklemektedir. Birçok malign

tümörde artmış Bcl-2 düzeyleri apoptoza karşı direncin önemli bir mekanizmasını oluşturmaktadır. p53 proteininin etkisini ortadan kaldıran p53 mutasyonları hemen tüm kanserlerin yarısından fazlasında gözlenmektedir (Guo ve ark., 2007).

2.2.4 Sınırsız Replikasyon Potansiyeli

Memeli hücreleri belirli sayıda bir mitotik bölünmenin ötesinde bölünemezler. Bunun nedeni kromozomların sonunda telomer olarak adlandırılan altı baz çiftinden oluşan ve ardı sıra bir kaç bin kere tekrarlayan birimlerin varlığıdır. Her mitotik bölünme sonucu 50-100 baz çiftinden oluşan bir DNA bölümü kayıba uğrar ve kromozomlar her bölünmeyle kısalmaktadır. Bu kısalmanın nedeni DNA polimeraz enziminin kromozomların 3'ucunu tamamiyle sentezleyememesidir. Birçok kanser hücresi bu kısıtlamayı bu birimlerin sentezini gerçekleştiren telomeraz enzimini sürekli eksprese ederek aşır sınırsız bölünebilme yeteneğine kavuşmaktadır. Telomeraz ekspresyonu kanser çeşitlerinin %90'ından fazlasında gözlenmektedir (Bastien ve ark., 2002).

2.2.5 Tümör Anjiyogenezi

Normal hücrelerin oksijen sağlayabilmesi için kan damarlarına gerek vardır, fakat olgun bir insanda dolaşım sabittir. Kanser hücreleri anjiyogenezi uyarır, çünkü tümör sağkalımı ve yayılması için yeni kan damarlarının oluşması gerekmektedir. Bir tümör kitlesi belli bir çapın ötesinde büyüebilmek ve besin-oksijen gereksinimini karşılayabilmek için mutlaka damarlaşmaya gerek duymaktadır. Damar endotel proliferasyonu doku hasarı ve yaralanmış dokuların rejenere olması esnasında aktive olan Hypoxia-inducible factor (HIF) proteininin etkisiyle oluşan bir dizi reaksiyon güçlü anjiogenik faktörlerin salınımına yol açmaktadır. Vascular endothelial growth factor (VEGF) bu araçların en önemlilerindendir. Damar endotel yüzeylerinde bulunan reseptörlerine bağlanarak tirozin kinaz aktivitesi ile endotelial proliferasyonu ve damar geçirgenliğini aktive eder. VEGF etkisini ortadan kaldıran terapötik girişimler birçok kanserin standart tedavisi olarak klinikte yaygın kullanıma sahiptir. Çoğu kanser hücresinin büyüme ve metastatik potansiyele erişmesinde çevre stromal hücrelerden damar ağı oluşturabilme yeteneği kazanması (angiogenic switch) önemli rol oynamaktadır (Ghorab ve ark., 2011; El-Gohary, 2013).

2.2.6 Doku İnvazyonu ve Metastaz

Belli bir büyüklüğe erişen tümör kitleleri çevrelerindeki stromayı aşırıp uzak dokulara yayılmayı gerçekleştirecek öncü hücreleri oluşturmaktadır (invazyon ve metastaz). İnvazyon ve metastaz gelişiminde kanser hücrelerini komşu oldukları stroma ve bağ dokusuna bağlayan hücre-hücre ve hücre-stroma bağlantıları önemlidir. İnvazyonun gerçekleşmesinde ise ekstraselüler proteaz ekspresyonları da rol oynamaktadır. Bu enzimler aracılığıyla ekstraselüler matriks ve bağ dokusu eritilerek kanser hücrelerinin stromada ilerlemesi gerçekleşmektedir (Hanahan, 2000; Kumar ve Cotran, 2003; Yanardağ, 2008). Normal hücreler vücuttaki yerlerini korurlar ve genellikle göç etmezler, kanser hücreleri ise vücudun diğer bölgelerine göç ederler. Mutasyonlar invazyon ile ilgili enzimlerin aktivitesini, hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler adezyon moleküllerinin ekspresyonunu değiştirirler (Lowitz ve Casciato, 2000; Pucci, 2000; Lumachi, 2002). Tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilir ya da tahrip edebilmektedirler. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Kanser bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilmektedir (Tuncer, 2008; Tuncer, 2008).

2.3 Apoptoz

Apoptoz terimi ilk olarak 1972 de J.F.K.Kerr tarafından (Kerr ve ark., 1972) nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade etmektedir. Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla gerçekleşen bir hücre ölüm şekli olup hücrenin intiharı olarak tanımlanabilmektedir. Diğer bir tanımla apoptoz programlı hücre ölümüdür. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücresel lezyonların ya da genetik faktörlerle aktive edilen hücresel intihar programının apoptoza neden olduğu söylenebilir (Searle ve ark., 1982). Gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüne apoptoz denir. Vücuttaki her hücre belli bir süre yaşar ve zamanı gelince ölür. Apoptoz olarak adlandırılan bu önceden programlanmış hücre ölümüyle

hücre çoğalması (mitoz) arasında kontrollü bir denge vardır. Bu dengenin bozulması çok sayıdaki önemli hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Apoptozda hücreler su kaybederek küçülürler, büzülürler, şekilleri bozulur ve komşu hücrelerle bağlantılarını kaybederler. Sitoplazma yoğunlaşır ve organeller birbirine yaklaşır (Ulukaya, 2001; Vermeulen, 2003). Organeller genel olarak sağlamdır ve hücre membranı apoptozun geç evrelerine dek bütünlüğünü korumaktadır. En önemli değişiklikler çekirdekte izlenir. Kromatin (hücre bölünmesi sırasında yoğunlaşarak kromozomları oluşturan nükleik asit-protein kompleksi), çekirdek zarına yakın bölgede yoğunlaşarak hilal şeklinde çekirdek zarının iç yüzeyine yerleşmektedir. Çekirdek de büzülür, yoğunlaşır ve bazen zarla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Apoptoz süreci ilerledikçe, sitoplazmik çıkıntılar ve tomurcuklanmalar oluşur. Hücre daha sonra, sıkıca paketlenmiş organelleri, sitoplazma ve çekirdek parçalarını içeren “apoptotik cisimcik”lere parçalanır. Bu parçalar komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edilerek dokudan uzaklaştırılır. Böylece herhangi bir doku reaksiyonunun ortaya çıkması engellenmektedir (Evan ve Littlewood, 1998; Pucci, 2000; Guzmán ve ark., 2009).

Çok hücreli organizmalarda genetik oluşumlu hücre hasarının bloke edilmesi ya da hücrenin tamamen yok edilmesi apoptoz vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Böylece hasarın yayılması ve tümör oluşumu gibi zararlı olasılıklar engellenmiş olur. Apoptoz olayının oluşmasından daha önce hücresel replikasyon işlemi durur (DNA onarımı) eğer bu esnada DNA tamiri gerçekleşemezse apoptozla sonuçlanan olaylar serisi başlar. Bu sırada apoptozun başlayıp başlamaması hasarın boyutuna, hücrenin tipine ve hücrenin üretkenlik potansiyeli olan tümör geliştirme riskine bağlıdır. Apoptoz aynı zamanda farklılaşmış dokuların olgunlaşmasında da esastır. Çünkü apoptoz vücudun bütünündeki hücre sayısının sabit tutulmasını ve immün sistem faaliyetlerinin gerçekleşmesini sağlamaktadır (Evan ve Littlewood, 1998).

2.3.1 Apoptozun Sınıflandırılması

Apoptozun sınıflandırılması lizozomun fonksiyonuna göre yapılır.

Tip-1 Hücre ölümü (Heterofaji)

Bu çeşit hücre ölümünde hücrenin kendi lizozomlarının belirgin bir rolü yoktur. Hücrenin parçalanması diğer hücrelerin lizozomları vasıtasıyla olmaktadır. Hücre ölümünün bu şekli hemen hemen bütün özelleşmiş hücrelerde gözlenir. Bazı araştırmacılar bu çeşit hücre ölümünü yapısal hücre ölümü olarak tanımlamışlardır.

Tip-2 Hücre ölümü (Otofaji)

Bu tip hücre ölümünde, hücrenin sindirimi büyük ölçüde hücrenin kendi lizozomlarıyla olur. Ölen hücreler etraflarındaki sağlam hücrelerin endositozuna maruz kalmaktadır.

Tip-3 Hücre ölümü

Bu tipte hücre içi organellerin şişmesini takiben sitoplazmik alanların hücre dışı boşluklarla birleşmesi olayı gerçekleşmektedir. Hücre ve hücrenel yapılar küçültülerek tahrip edilir ve organeller elektron mikroskopuyla bile görülemeyecek kadar küçülmektedir. Aynı şekilde hücre zarı parçalanır.

Sitoplazmik tip parçalanma

Bu tip hücre ölümünde çekirdekte ve zar içeriğinde parçalanmadan ziyade karyoliz, ödem ya da diffüz dejenerasyon görülür (Pommier, 2004).

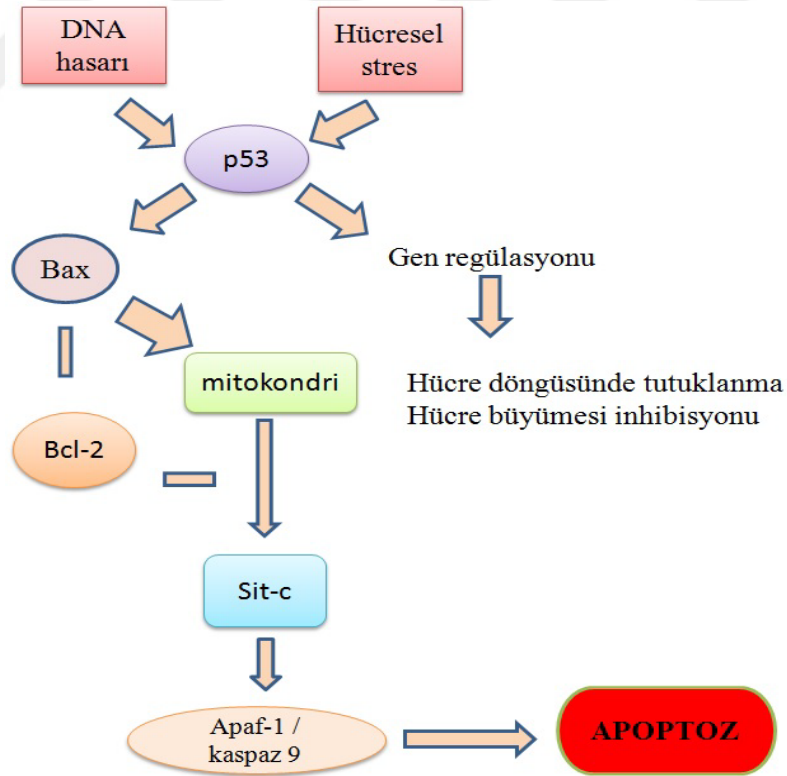
2.3.2 Apoptozun Genetiği

Apoptoz olayının gerçekleşmesi esnasında gözlenen genetik olaylar hem en toksik ilaçların hücre ölümünü bu yolla gerçekleştirdiği açık olduğundan, hem de bu işlemde tümör süpresör genleri ile onkoproteinlerin birlikte iş görmesi açısından önemlidir. Düzeltilemez DNA hasarının meydana gelmesi sonucu apoptoz kaçınılmazdır. Apoptozun indüklenmesinde iki ana yol vardır: Ekstrinsik-ölüm reseptör yolağı ve intrinsik- mitokondriyal yolak (Ki-Hwan Eum, 2011). Ekstrinsik yolak; plazma membran ölüm reseptörü Fas ve onun ekstraselüler ligandı Fas-L'nin bağlanmasıyla tetiklenir. Fas-L, ölüm kompleksi oluşturmak için Fas'la bir araya gelir. Fas-FasL bileşiği ölüm domaini içeren proteini harekete geçirerek ve prokaspaz-8'i de bir araya getirerek ölüm-indükleyici sinyal kompleksini oluşturur. Sonuç olarak protein

kompleksi prokaspaz-3'ü tetikleyen prokaspaz-8'i indükleyerek apoptotik sürecin başlamasına neden olur. İntrinsik yolak da mitokondriyal pro-enzimler aracılığıyla apoptoza teşvik eder. Her iki durumda da eğer bir hücre ekstraselüler ya da intraselüler sinyal almışsa sonradan sitozole geçen internal sitokrom-c'ye karşı dış mitokondriyal membranın geçirgenliği artar. Sitokrom-c, apoptozom oluşumu için Apaf-1 ve prokaspaz-9'u toplar. Bu da kaspaz-3 sinyal kaskadının toplanması ve apoptozla son bulur (Ouyang ve ark., 2012). Her hücresel işlemde olduğu gibi apoptozun genetiğinde de belli aşamalar görülür(Altunkaynak, 2008):

- 1- Ölüme karar verme
- 2- Hücre ölümünü gerçekleştirme
- 3- Parçalanma
- 4- Fagositoz

Bcl-2 ve p53 genlerinin rolü



Şekil 2.1. Bcl-2 ve p53 genlerinin apoptozdaki rolü

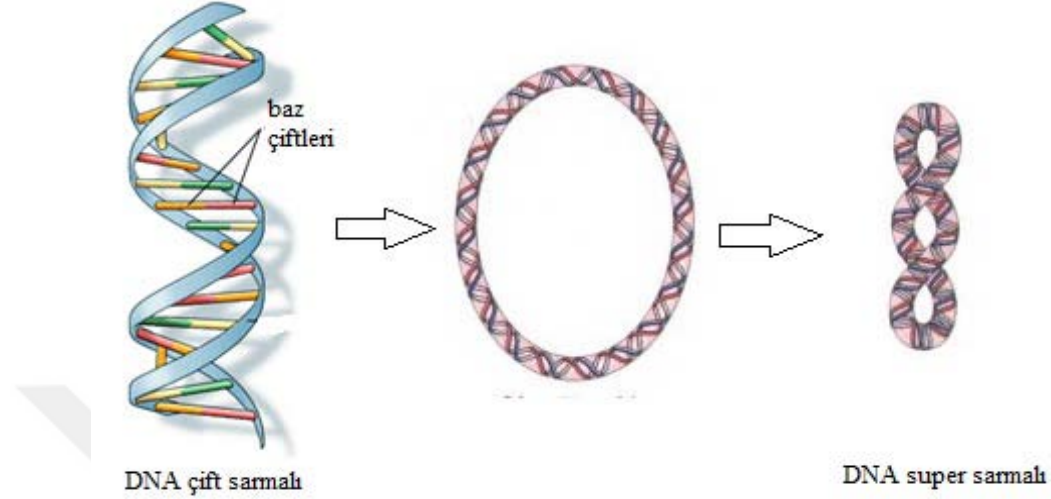
Bcl-2 ailesi antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan ve apoptozu düzenlemede en önemli role sahip olan onkoprotein grubudur. Bcl-2 ve Bcl-XL apoptozu engelleme fonksiyonunu ya kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da kaspaz akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-C gibi apoptogenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirmektedir (Vyas ve ark., 2014). Bax ya da Bak gibi proapoptotik üyeler kaspaz serbestleşmesini uyarır ve mitokondri zarının geçiş porlarının açıklığını değiştirerek sitokrom-C'yi serbestleştirir. Dolayısıyla kaspaz aktivasyonuna yol açar (Vyas, 2014; Wang ve ark., 2014). Bir hücrenin apoptoza eğilimli oluşu Bcl-2 ailesi genlerinin etkisine bağlıdır. Böylece apoptoz inhibe edilir. Oysa aşırı Bax apoptozu aktive etmektedir (Thomas ve ark., 2004).

p53; apoptozu uyarıcı bir proteindir. Birçok anti-tümör ilaç, hedef olarak hücre DNA'sını seçer ve p53 seviyesini artırır. Bu aktivasyon ya hasarın tamirine ya da apoptoza yol açar. Aynı zamanda kromozom-17'nin kısa kolundaki bir genin (17p53) üretimi ile ilgilidir. Bu genin mutasyonu p53 salgılanmasına büyük ölçüde katkıda bulunmaktadır. Bu katkı hasarı onarabilmekte veya apoptozu uyarabilmektedir. Bu ihtimallerin ikisi de Bax, p53, p21 ve farklı birkaç gene bağlıdır. Sadece p53 geninin mutasyonundan kaynaklanan birkaç tür tümör belirlendiğinden ve bu mutasyon tüm tümör türlerinde de gerçekleşen en yaygın mutasyon olduğundan önemlidir. p53, genomun içeriğini sürdürerek görev yapmaktadır. Hücrenin belli noktalarında malign tip p53 bulunması, DNA tamir mekanizmasının doğru hasarı tamir etmesinde kontrolör olarak rol oynar. Mutant p53 geni taşıyan hücreler, artık genom içeriğini garanti edemez. Çünkü artık hücre döngüsünün durma sinyallerini alamazlar. Sonuç olarak hücre genomu stabil değildir ve bütün hücreler potansiyel olarak tümör oluşturabilmektedir. Ek olarak p53 ile aynı işlevi gören p63 ve p73 genleri de tespit edilmiştir. Yani Bcl-2 hücrede aşırı miktardaysa ve p53 de mutasyona uğrarsa apoptoz gerçekleşemez (Weller, 1998; Dong ve ark., 2009).

2.3.3 Süper Kıvrımlı DNA

Elektron mikroskobu ile virüs ve bakteri DNA'larının halkasal olduğu gösterilmiş, bazılarının tipik dönüşler yaptığı gözlenmiştir. Bu yapıya "süper sarmal yapı" ya da DNA'nın *tersiyer yapısı* denmektedir. Doğadaki DNA moleküllerinin çoğu halkasaldır,

yani serbest 5' ve 3' uçları yoktur. Bazı viral ve ökaryotik kromozomlar ise doğrusal moleküllerdir.



Şekil 2.2. DNA'nın relaks ve süper kıvrımlı yapısı

Birçok hücrel DNA süper kıvrımlıdır. Süper kıvrılma relaks veya B formundaki DNA'da olması gereken toplam heliksin dönüş sayısının azalması sonucunda DNA'nın kendi eksenini etrafında dönüş yaparak süper kıvrımlı şekle dönüşmesidir (Şekil 2.1). Süper kıvrılmış DNA yapısının sürdürülebilmesi için DNA'nın ya kapalı çembersel yapıda ya da proteinlerle sarılmış olması gerekmektedir (Nelson ve Cox, 2005).

2.4 DNA Topoizomerazlar

2.4.1 DNA Topoizomerazların yapıları, fonksiyonları ve sınıflandırılmaları

Topoizomerazlar, hücre içerisinde DNA'nın topolojik özelliklerinden sorumlu enzimlerdir. Süper kıvrımlı DNA'lar ve Topoizomerazlar ökaryotlarda da bulunmaktadır. Ökaryotlarda ise, kromozomlar genellikle halkasal yapıda olmamalarına karşın histonlar ve diğer proteinlerle ilişkisi süper kıvrımları meydana getirir ve bunların Topoizomerazlar tarafından relaks hale getirilmesi gerekmektedir. Bütün hücrelerde tam olarak replike edilmiş kromozomların, hücre bölünmesinden önce DNA Topoizomerazlar tarafından çözülmüş olması zorunludur (Champoux, 2001). 1971 yılında, ilk kez Wang tarafından *E. coli* DNA Topoizomeraz I enzimi keşfedilmiştir. Bu enzim, DNA'nın tek iplikçisinde DNAaz aktivitesi ile kırık oluşturarak herhangi bir

enerji gerektirmeden negatif süper kıvrımlı DNA'nın relaks forma dönüşümünü katalizlemektedir. *E. coli* DNA Topoizomeraz I aynı zamanda yine herhangi bir enerjiye gereksinim duymadan DNA ligaz aktivitesi ile geçici olarak kırılmış fosfodiester bağları arasında yüksek enerjili kovalent bağ oluşturmaktadır.

I. Tip Topoizomerazlar; DNA'nın tek zincirinde geçici olarak bir kırık oluşturup daha sonra uçlardan birini kırılmayan zincir etrafında çevirirler ve kırılan uçları tekrar ligaz aktivitesi ile birleştirerek süper kıvrımlı DNA'yı relaks hale getirirler. Bu işlem için herhangi bir enerjiye gereksinim yoktur. DNA'daki süper kıvrımların kaldırılması enerji açısından uygun bir tepkimedir. Enzim DNA'ya bağlanır ve bir zinciri keser. Kesilmiş DNA zinciri, kesilmemiş DNA zincirinin alt kısmından geçer ve kırılmış olan iplik tekrar kapatılır. Bu işlem sonunda (-) süper kıvrım sayısında bir tane eksilme olur. Bu işlemde sorumlu enzim ailesi I. Tip Topoizomerazlar olarak adlandırılır. *E. coli* Topoizomeraz I enzimi, (-) süper kıvrımlı DNA'yı relaks haldeki DNA'ya dönüştürürken, ökaryotik Topoizomeraz I enzimleri hem (-) hem de (+) süper kıvrımlı DNA'yı relaks forma dönüştürebilirler. Tip I DNA Topoizomerazlar, süpersarmallaşmayı değiştirmekten başka çentikli dsDNA veya ssDNA halkalarının düğümlerini de çözebilmektedirler (Bailly, 2003; Lodish ve ark., 2011).

II. Tip Topoizomerazlar; DNA'nın her iki zincirini birden kesip yeniden birleştirerek DNA'nın topolojisini değiştirirler. Bu işlem için ATP hidrolizi gereklidir. Ökaryotik DNA Topoizomeraz II enzimi ise, ATP hidrolizini gerektiren bir reaksiyonla hem pozitif hem de negatif süper kıvrımlı DNA'nın relaks forma dönüşümünü katalizlemektedir. Ökaryotlarda histonların bağlanması, süperkıvrılma potansiyelini arttırabileceği için ökaryotik Topoizomeraz II'nin DNA'yı tekrar süper kıvrımlı forma döndürme aktivitesi bulunmamaktadır. Ökaryotik hücrelerdeki II. tip enzimler hem (+) hem de (-) süpersarmal yapıyı relaks hale getirebilirler. II. tip Topoizomerazlar her iki DNA zincirini de kesebildikleri için, bu işlem sonunda (-) süper kıvrım sayısında iki tane eksilme olmaktadır (Bailly, 2003).

Topoizomeraz Enzimlerinin inhibisyon Mekanizmaları

Topoizomeraz aktivitesini inhibe eden mekanizmalar oldukça farklıdır ve iki sınıfa ayrılmaktadır. Birincisi; Topoizomeraz zehirleri, ikincisi; katalitik inhibitörlerdir.

Topoizomeraz zehirleri, DNA-Topoizomeraz enzim kompleksini stabilize eder ve DNA'da oluşan kırığın tekrar birleşmesini bloke ederler. Bu bileşikler, hücrelerde tek ya da çift zincir kırıklarını taşıyan DNA segmentlerinin birikmesine sebep olur ve buna bağlı olarak hücrede mutajenik olaylar ya da hücre ölümü (apoptoz) meydana gelir. Topoizomerazların katalitik inhibitörleri ise; ya DNA'ya bağlanarak ya da Topoizomerazlara bağlanarak DNA'nın enzime bağlanmasını önlerler. Ayrıca, Topoizomeraz II enziminin katalitik döngüsü sırasında ATP'nin bağlanması veya serbest bırakılmasını engelleyen maddeler de bu sınıf inhibitörlere örnek olarak verilebilir (Syrovets ve ark., 2000; Bromberg, 2003).

Topoizomeraz I ve II enzimleri, klinikte kullanılan kemoterapotik ajanların moleküler hedefleridir. DNA Topoizomerazlar, çekirdek enzimleri olup DNA'nın süper kıvrımlı yapısını çözerek onun replikasyonuna izin vermektedir. Bunu yapmak için DNA'ya kovalent olarak bağlanarak bir ara ürün olarak geçici Topoizomeraz-DNA kesim kompleksini oluşturmaktadır. Enzim sonradan ya tek zincir (Topoizomeraz I durumunda) ya da çift zincir (Topoizomeraz II durumunda) kırıkları oluşturmakta ve kırıklardan DNA sarmalı geçerek daha sonra da kırıkları tekrar birleştirmektedir. Birbiri ardına gelen bu döngüler çift sarmalın Topolojik yapısını yeterli bir şekilde değiştirerek DNA replikasyonu ve transkripsiyonuna izin vermektedir. Birçok antitümör ajan, bu geçici Topoizomeraz-DNA kesim komplekslerini stabilize ederek Topoizomerazların kırılan DNA zincirlerini yeniden birleştirme aktivitesini yok eder ve böylece DNA molekülü sürekli kesilir. Bu topoizomeraz inhibitörleri aracılığıyla oluşan tek ve çift zincir kırıklarının birikmesi veya DNA'nın relaks hale gelememesi sonucunda hücre ölmeye başlar (Pommier, 2004).

2.4.2 Topoizomeraz İnhibitörleri

Topoizomeraz inhibitörleri arasında tedavide kullanılan kamptotesin, daktinomisin, antrasiklin, TAS-103 ve etoposid sayılabilir. Kanser terapisinde kamptotesin alkaloidi türevi olan topotekan ve irinotekan Topoizomeraz I inhibitörleri olarak kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin işleyiş mekanizması Topo I bağlı kompleksinin stabilizasyonundan sorumlu enzimin religasyon fonksiyonunun inhibisyonuna dayanır. Kamptotesin varlığında enzim-DNA kompleksi bozulur ve bölünmekte olan hücrelerde DNA çift sarmal yapısı bozulur (Tomicic ve Kaina, 2013).

Aktinomisin, streptomices türü mantarlar suşlarından izole edilen bir bileşiktir. DNA interkalatörüdür ve minor oluğa bağlanır (Goftar ve ark. 2014). Etoposid, Amerikan mayıs elmasından izole edilen bir toksindir ve DNA topoizomeraz II hedefli bir antikanser ajandır.

Etoposid'in DNA- TopoII kompleksinin arasına girebilmesi için bazı enzimlerin özel aminoasitleri gereklidir. Yapılan çalışmalar etoposid'in kromatin ve histon proteinlerine (özellikle H1) yüksek afinitesi olduğunu göstermiştir. Bu sebeple kromatin etoposid için hedeftir.

TAS-103 çift yönlü topoI ve TopoII inhibitörü olan kinolin türevli bir moleküldür ve metastatik akciğer kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser türleri üzerinde etkilidir.(Montecucco ve ark., 2015). Katalitik inhibitörler ise topoizomeraz (I ve II)-DNA kesim komplekslerinin oluşumundan önceki basamakta topoizomerazların katalitik aktivitesini inhibe etmektedir (Chen ve Liu, 1994; Desai ve ark., 2003). Topoizomeraz I Hedefli Kemoterapi Topo I hedefli ilaçların oluşturduğu DNA hasarının, hücrenin ölümü üzerinde izlediği yolun işleyiş mekanizması daha tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen apoptoz yolu kullanılarak yapıldığı düşünülmektedir. Bu yol için, p53 tümör süpresör geninin olması gerektiği düşünülmekte ve p53 proteini antikanser ilaçla indüklenen DNA hasarını apoptotik yol aracılığı ile hücre ölümüne yönlendirmektedir. p53 geninde mutasyon taşıyan kanserli hastaların da Topo I hedefli kemoterapiye dirençli duruma geldiği bilinmektedir. Topo I'e karşı yürütülen ilaç tedavisinde hücre ölümünün p53'den bağımsız başka mekanizmalar tarafından da olabileceği belirtilmektedir (Chen ve Liu, 1994).

2.5 Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Antikanser ilaç kaynakları arasında bitkiler, deniz canlıları ve mikroorganizmalar bulunur. Antikanser aktivite denemelerinde bitkilerin kullanımı çok eski tarihlere dayanır. Bitkilerden elde edilen diterpen içeren anti-enflamatuar maddelerin kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisinin araştırılmasına devam edilmektedir. Bitkilerden elde edilen bileşenler çeşitli klinik anti-kanser ajanların geliştirilmesinde önemli rol oynarlar. Yapılan araştırmalarda çok sayıda antikanser aktivitesi olan doğal

veya sentetik molekül bulunmuştur (Vyas ve ark., 2014). Fakat bunlardan sadece bazıları günümüzde kanser kemoterapisinde kullanılmaktadır.

Antikanser aktivitesi olan birçok doğal ve sentetik molekül kanser hücreleri yanında normal hücrelere sitotoksik olmaları veya diğer tehlikeli yan etkileri nedeniyle kullanılamamaktadır (Vukanovic ve ark., 1993). Bu nedenle antikanser potansiyeli olan ilaçların hem kanser hücreleri üzerinde etkili hem de yan etkilerinin çok az olması gerekmektedir. Dolayısıyla hem etkili hem de yan etksi az olan antikanser ilaçların geliştirilmesi kanser tedavisi açısından önem arz etmektedir.

Kanserle mücadelede en yaygın kullanılan tedavi yöntemleri arasında kemoterapi gelmekte ve bu amaçla çeşitli kanser ilaçları üretilmektedir. Antikanser aktivite gösteren ilaç türleri Topoizomeraz inhibitörleri, antifolatlar, alkilleyici ajanlar ve platinum analogları, hormonal ajanlar gibi gruplara ayrılmaktadır. Tanımlanan antitümör ajanların, hızlı büyüyen tümörlere karşı etkiliyken; yavaş büyüyen tümörlere karşı (Glioma, plague-benzeri miyofibroblastik tümör ve parosteal osteolisarkoma gibi) daha az etkili olduğu bildirilmiştir. Yavaş büyüyen tümörlerin büyüme ve bölünmeleri, kemik iliği ve gastrointestinal epitelyum gibi hızlı proliferen olan normal insan dokularından daha yavaş olmaktadır. Bu nedenle bu dokular uygulanan ilacın toksik etkileri nedeniyle zarar görmektedirler. Bu nedenle kullanılan ilaçlar normal dokulara zarar vermeden seçici ve spesifik olarak etki göstermelidir. Tümör tiplerinde nüfuz edebilme, boyut vb. anlamında farklılıklar olduğu kadar büyüme hızı açısından da fark olması ilaçlara olan duyarlılıkta büyük farklar oluşturmaktadır. Buna dayanarak yetişkinlerde genellikle akciğer, göğüs ve kolon solid tümörlerin kemoterapiye zayıf cevap verdiği söylenebilmektedir (Shimizu ve ark., 2002).

2.5.1 Alkilleyici ajanlar

Alkilleyici ajanlar, en eski ve en çok kullanılan ön ilaçlardır ve hücre siklusunun G1 ve S fazlarına daha fazla etkili olmaktadır. Negatif yüklü olan DNA'nın nükleofilik gruplarına ya tek noktadan ya da çift noktadan bağlanırlar. Bunun sonucu oluşan karbonyum, iki DNA zincirindeki guaninler arasında çapraz bağlanma oluşturarak DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunu bozmaktadır. Örneğin doksorubisin gibi ilaçlar hidrojen bağları ile nonkovalent kompleksler oluşturmaktadır. Bu nonkovalent

kompleksler DNA sarmalının dizili baz çiftleri arasında interkalasyon yoluyla ya da major veya minor oluğa bağlanmayla meydana gelmektedir (Ghorab ve ark., 2010). B DNA’da major oluğun minor oluktan daha derin ve geniş olması, moleküllerle etkileşiminde daha açık bir pozisyon oluşturmaktadır. Her bir oluk için baz çifti düzenlenmesi spesifiktir ve her biri farklı hidrojen bağı verici ve alıcıları içermektedir. İlaç ve protein gibi moleküller bu bölgelere bağlanmaktadır. Farklı DNA bazları ve bu bazların dizileri arasında ilaç molekülleri seçici bir şekilde ayrılabilirler. Tipik bir oluk bağlanıcı ilaç, kendini hidrojen bağları ve Van Der Waals etkileşimleri arasında tutmaktadır. AT baz çiftleri arasında minor oluk, bu ilaçlar için uygun bağlanma bölgesi olmaktadır. Örneğin bazılarının DNA zincirini hidrate eden su molekülleri ile yer değiştirerek minor oluğa bağlandıkları bilinmektedir. DNA replikasyon ve transkripsiyonunun etkin inhibitörleri olarak tercihen CG sekansında olmak üzere pürin pirimidin basamağında interkalasyon gözlenmektedir (Faidallah ve Rostom, 2013; Wang ve ark., 2014).

2.5.2 Antimetabolitler

DNA, RNA, proteinler ve diğer temel hücre bileşenlerinin sentez ve değişik basamaklarında substrat ya da koenzim olarak kullanılan doğal metabolitlerin analoglarıdır. Örneğin DNA ve RNA sentezinde bozukluklar ve hücrenin S fazını inhibe edici etkileri belirlenmiştir (Nalbantoğlu, 2006; Aydın, 2014).

Son yıllarda kanser terapisinde ilgi çeken yollardan biri de monoklonal antikor kullanımıdır. Antikor-ilaç konjugelerinin solid tümör ve lenfomada opsiyonel uygulamaları vardır ve immunomodülatör antikorlar klinikte başarı kazanmıştır. Terapotik antikorlar geliştirilmesinde kanserin serolojisinin, protein mühendisliği tekniklerinin ve immun sistem-kanser hücreleri ilişkisinin anlaşılması gerekmektedir. Kanser hücrelerinin hücre yüzey antijenleri normal dokularla karşılaştırıldığında ya over ekspresyona, mutasyona ya da seçici ekspresyona uğramıştır. Kanser hücrelerinin yüzey antijenik yapısındaki değişimlere ek olarak, tümör stromal ve vaskular hücreleri alışılmadık dışında antijen üreterek normal hücrelerden ayrılırlar (Andrew M. Scott1, Jedd D. Wolchok, 2012).

Nanopartiküller ilaç taşıyıcıları olarak tanımlanmıştır çünkü organik/inorganik materyaller kullanılmasıyla çeşitli formülasyonları vardır, hedef bölgelere karşı etkili ulaşmaları vardır ki bu da yüksek terapotik etki demektir. İnternal ve eksternal uyarıcılarla etkin ilaç iletimini kontrol ederler. Bu özelliklerinden dolayı terapotik etkileri geliştirilebilir ve istenmeyen etkileri azaltılabilir. Eksternal uyarıcı yoluyla kimyasal ya da fiziksel değişimler yapabilen uyarıcı-sorumlu nanomateriyaller aktive edilebilir. Bu nano parçacıklar kullanılarak teşhis, kişiselleştirilmiş terapi ve hastalığın eş zamanlı görüntülenmesi gibi yerine getirilebilir. 1970'lerde polialkilsiyanoakrilat parçacıkların antikanser ilaçlara bağlanmasıyla terapi yoluna gidilmiştir. İlaç taşıyıcı olarak kullanılan yaygın nano yapılar: Polimerik miseller, katanlı veziküller, cross-link nano jeller, katı yağ nanopartikülleridir (Lim et al., 2013).

Bitkiler, kemoterapi etkinliğinin artırılmasında ya da ilaca bağlı toksisitenin azaltılmasında etkili olabilen adjuvan antikanser bileşikleri olabilirler. Ginseng gibi bitkisel ilaçlar kemoterapotik ajanlarla sinerjistik etki göstererek hücre döngüsü tespitinde, apoptotik gözlemlerin geliştirilmesinde görev alabilirler. Yapılan çalışmalarda kolorektal kanserlerinde kullanılan 5-FU ile birlikte yapılan ginseng uygulamasında doza bağlı olarak hücre büyümesinin, yalnız 5-FU uygulamasına oranla daha fazla inhibe edildiği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2012).

Kanser tedavisinde kullanılan bileşiklerden biri de pirimidin antimetaboliti olan 5-floururasildir (5-FU). 5-FU, timidilat sentaz (TS) inhibisyonu için sitotoksik aktivite gösterir. 5-FU aktif metabolite döndükten sonra deoksi üridilik asitin timidilik asite metilasyonunu inhibe eder. Böylece DNA'nın bir nükleoziti olan timidin eksikliği oluşur. Aynı zamanda 5-FU, nükleik asit zincirine kendisi de katılarak RNA oluşumunu inhibe eder. 5-FU; ribozil ve deoksiribozil nükleotit metabolitlerine çevrilir. Aktif olan bu metabolitler, timidilat sentetaz enzimi ve onun kofaktörüyle kovalent bağ kurarak kompleks oluşturur. Bunun sonucu DNA sentezi durur. 5-FU'den organizmada oluşan fluorouridilat RNA yapısına katılır. RNA'nın fonksiyonları ve protein sentezi durur (Saif ve ark., 2010).

Kolorektal kanser hastalarında; 5-FU'e karşı direnç ölümlerle yakından ilgilidir. Metastatik kolorektal kanserinde 5-FU'e karşı dirençle ilgili timidilat sentetaz (TYMS) enzimi üzerine yapılan araştırmalarda 5-FU'e maruz kalan hasta ve 5-FU kullanmamış

hasta grupları karşılaştırıldığında 5-FU'e maruz bırakılan hastalarda DNA replikasyonu, 5-FU'e maruz bırakılmayan hastalara oranla yüksek bulunmuştur (Watson ve ark., 2010).

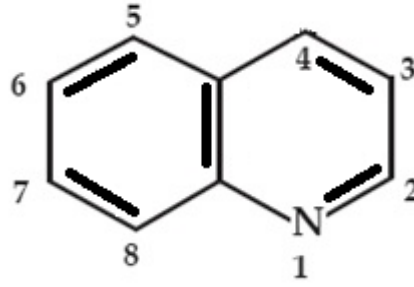
5-FU ayrıca, özefagus kanserine karşı yaygın olarak kullanılan bir kemoterapik ajandır. Yapılan çalışmalarda, interferonların (IFN) bu kansere karşı hastalarda sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Kanser hücrelerinin büyümesinin 5-FU ile birlikte IFN- β , α ile suprese edildiği kanıtlanmıştır. Bu bulgular 5-FU'in IFN yollarını stimüle ettiğini ve IFN tip I reseptörlerinin up-regülasyonunu sağladığını göstermiştir. 5-FU ve IFN kombinasyonlarının ileride özefagus kanserinde etkili olabileceği düşünülmektedir (Matsumura ve ark., 2004). Tümör hücrelerinde (MCF-7) 5-FU tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilen genler de çalışılmıştır. 5-FU ile indüklenen MAT-8, Thymosin- β -10 ve şaperonin-10 aktivasyonu p53 geninin inaktivasyonu ile sağlanır. Bununla birlikte bu genlerde birden fazla p53 bağlama bölgesi de bulunmaktadır ki bu da bu genlerin 5-FU ile indüklenen ekspresyonunda p53'ün önemli bir regülatör rolü olduğunu gösterir (Maxwell ve ark., 2003; Matsumura ve ark., 2004; Kochetkov ve ark., 2005).

Kanser tedavisinde kemoterapi ilacı olarak kullanılan bileşiklerden birisi de cis-platin'dir. Cis-platin, DNA'ya bağlanır ve tübülün sentezini stimüle eder. Sonuçta mikrotübül yapımı artar, bunun yanında daha önce sentezi tamamlanmış mikrotübüllere bağlanır ve onları stabilize eder. Bütün bu etkilerle beraber tübülün ve mikrotübül oranı bozularak tübülün polimerizasyonu engellenir ve antineoplastik etki oluşur (Faivre ve ark., 2003; Suzuki ve ark., 2009). Kanser tedavisi için geliştirilen bileşiklerden birçoğu yan etkileri nedeniyle kullanılamamaktadır veya halen kullanılmakta olanlar da tüm kanser tiplerine karşı etki göstermemektedir. Dolayısıyla günümüzde de hala kanser tedavisi için yeni moleküllerin sentezlenmesi için çalışmalar devam etmektedir.

Paclitaxel; hücre bölünmesi için gerekli olan dinamikleri bozarak hücre ölümüyle sonuçlanan tübülün polimerizasyonunu teşvik eden ajandır. Epitelial ovaryum kanseri, kolon ve akciğer kanserlerine karşı neoplastik aktivitesi vardır (Brannon-Peppas, 2004).

2.6 Kinolin Türevleri ve Antikanser İlaç Potansiyelleri

Kinolin molekülü benzen ve pridin halkarından meydana gelen heterosiklik bir moleküldür. Kinolin kömür katranından ve Cinchonamine alkaloidinin yüksek sıcaklıkla parçalanmasından da izole edilen bir alkaloiddir. Kinolinler; reçine ve terpenler için çözücüdürler ve boya üretiminde de kullanılırlar. Toprakla temas ettiklerinde hızlı biçimde yer altı suyuna geçebilmektedirler.



Şekil 2.3. Kinolinlerin temel yapısı

Kinolinler klinik kullanıma 1962 yılında nalidiksit asit formunda girmiştir. Nalidiksit asit, malarya tedavisinde kullanılan klorokinin sentezi ve saflaştırılması sırasında keşfedilmiş, bakterisid etkili bir antibiyotiktir. İdrarda yüksek konsantrasyona ulaşması nedeniyle sadece üriner sistem enfeksiyonlarında kullanılmaya başlanmıştır (Nazik and Öngen, 2010).

Kinolin türevi bileşikler değişik biyolojik aktiviteleri nedeni ile ilaç yapımında çok geniş bir kullanım alanına sahiptir (Zhang ve ark., 2014). Kinolin ve tetrahidrokinolin türevlerinin, kemoterapik aktivite (Keller, 1984), sıtma önleyici (Craig ve Pearson, 1971), antitümör (Lee ve ark., 2013), bakteri öldürücü (Amit ve ark., 2013), glukagon ve kanabinoid reseptörü (Fujita ve ark., 2009); pirazo[3,4-b]kinolin türevlerinin antiparazit, antibakteriyel, enzimatik inhibitör (Portilla ve ark., 2007); 8-hidroksikinolin türevlerinin antifungal (Meléndez Gómez ve ark., 2008) ve herbisidal (Podeszwa ve ark., 2007), antiinflamatuar, analjezik ve antihelmintik (Kalluraya ve Sreenivasa, 1998); stirilkinolin türevlerinin HIV inhibitörü ve bazı enilamin türevlerinin anti-kanser olarak (Portilla ve ark., 2007) aktivite gösterdikleri literatürde rapor edilmiştir. Bu heterosiklik aromatikler, mutajen ve kanserojen özellikleri ile de araştırmacıların

ilgisini çekmiş ve hayvanlardaki enzim sistemleri üzerindeki etkileri yoğun incelemelere konu olmuştur (Behforouz ve ark., 2007; Dong ve ark., 2009).

Kinolin grubu bileşikler tabiatta genelde alkoloid yapısında bulunurlar. Cusparine, galipine, galipoine gibi kinolin grubu taşıyan birçok alkoloid angustore kabuğundan izole edilmişlerdir. Çeşitli Cinchona türlerinin kabuklarında Cinchona alkoloidleri de kinolin yapılarında doğal ürünlerdir. Cinchonine yan zincir dört pozisyonunda kinolin çekirdeğine sahiptir. Cinchona kabuğu sıtma tedavisinde yüzyıllar boyunca kullanılmıştır. Bitki kabuğu aktif bileşen olarak kinin ihtiva eder. Yapı ve aktivite ilişkisi üzerine geliştirilen hipotezler potansiyel anti-sıtma ajanı olarak birçok kinolin türevinin sentezlenmesine yol açmıştır (Lavoie ve ark., 1984).

Antikanser potansiyeli olan sentetik moleküllerden biri de kinolinlerdir. Kinolin ve izokinolin türevlerinin kemoterapik aktiviteleri uzun zamandır bilinmektedir. Kinolin türevleri bakteri öldürücü, antitümör, anti-sıtma, ve pıhtılaşma sağlayıcı geniş etki alanına sahiptirler. Nupercaine güçlü bir lokal anestetiktir; vioform ise gastrointestinal enfeksiyonların tedavisinde kullanılır.

Kamptotesinler Topoizomerazi aktivitesini bloke eden kinolin türevi antikanser ilaçlardır. *Camptotheca* familyasındaki bitkilerden elde edilir. DNA çift zinciri içinde guanin-sitozin baz çiftleri arasına enine yerleşim gösterirler ve DNA'ya interkale olarak DNA sentezini ve mRNA sentezini engellerler (Pan ve ark., 2010; Rodríguez-Berna ve ark., 2014). Chinosol adı ile bilinen 8-hidroksi kinolin hem antiseptik olarak hem de analitik kimyada oksin adı altında reaktif olarak kullanılır. Önemli bir kinolin türevi olan Atophan veya Cincophen romatizma ilacı olarak kullanılan 2-fenil-kinolin-4-karboksilli asittir. Bu heterosiklik aromatikler, mutajen ve kanserojen özellikleri ile de araştırmacıların ilgisini çekmiş ve hayvanlardaki enzim sistemleri üzerindeki etkileri yoğun incelemelere konu olmuştur (Lavoie ve ark., 1984).

Bromlu kinolin türevleri farklı moleküllerin sentezinde aracı ve anahtar konumundadırlar. Çünkü bromo kinolinler, kinolin grubu moleküllerden farklı türevlerin elde edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bağlı brom atomları sayesinde organik yapılar, aracı ve anahtar konuma yükselir. Bromlama ile çok fonksiyonlu hale gelen kinolinler çeşitli bileşiklerle (kenetlenme reaktifleri, grignard reaktifleri v.b.)

reaksiyon verebilmektedir. Brom, bulunduğu yapılarda hem metal halojen değişimi ile elektrofilik yer değiştirmelerle, hem de n¼kleofilik yer değişimi ile farklı t¼revlerin sentezine yol açmaktadır (¼kten, 2009). Bu yolla siyan, keton, aldehit, alkil, ester, eter, asit, amin ve diğer t¼revler bromlu t¼revlerden kolayca sentezlenebilmektedir (Bacon ve Hill, 1964; ¼kten, 2009; ¼kten ve ark., 2013).

¼zokinolin t¼revleri de tıp alanındaki uygulamaları ile dikkat çekmektedir. ¼rneęin dimetilizokin anestetik, 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin'den t¼retilen kinapril, kinaprilat gibi t¼revler anti-hipertansiyon ajanı, 2,2-Hekzadekametilenizokinolinoyumdiklor¼r ise antiseptik ve anti-mantar ajanı olarak kullanılmaktadır. ¼zokinolinin azotunun alkillenmesiyle hazırlanan t¼rev bileşik ise enfeksiyonlara karşı kullanılır. Kinolinin ¼nemli t¼revleri ve kullanım alanları izelge 1'de ¼zetlenmiřtir. Birçok farmakolojik aktif ve doğal bileşiklerin yapısında bulunan kinolinin sentezi ¼zerine farklı y¼ntemler geliştirilmiştir. Kinolin t¼revlerinin biyolojik aktiviteleri (Sankaran ve ark., 2010; Chen ve ark., 2013) ve kemoterapik aktiviteleri (¼kten ve ark., 2013) olduğu ve geniş bir alanda kullanıldıkları bilinmektedir. Tıbbi kimyanın iskelesi durumunda olan kinolin t¼revlerinin antimalaryal (Madrid v ark., 2005), antifungal ve antibakteriyel (Chen ve ark., 2001), antikanser (¼kten ve ark., 2013) etkileri vardır. Ayrıca kinolinler birçok ticari boyar maddenin yapısında da yer alırlar ki kinolin sarısı bunlardan birisidir. (Lavoie ve ark., 1984).

Çizelge 2.1. Biyolojik aktiviteye sahip bazı kinolin türevleri

Bileşik Adı	Kullanıldığı Yer
Klorokin	Sıtma ilacı olarak kullanılmaktadır (Ursing ve ark., 2014).
Plazmokin	Plazmokin sıtma tedavisinde kullanılan sentetik bir maddedir. Doğada olmayıp laboratuvar şartlarında sentezlenir. Plazmokin cinsiyeti olan sıtma parazitlerini inhibe eder (Ursing ve ark., 2014).
8-hidroksi kinolin	Tıpta antiseptik olarak kullanılmaktadır, ayrıca analitik kimyada oksin adı verilen reaktiftir (Kumar ve ark., 2014).
Yatren	Yaraların dezenfektaninde etkilidir (Mathada, 2014).
Atopan (2-fenilkinolin-4 karboksilik asit)	Romatizma ilacıdır. Ayrıca gut tedavisinde kullanılır (Mathada, 2014).
Papaverin	Kas gevşetici olarak bilinir (Mathada, 2014).
Kamptotesin	Antikanserojen olarak kullanılır (Rodríguez-Berna ve ark., 2014).
Levoflaksosin	İkinci ve üçüncü kuşak antibiyotikler olarak kullanılmaktadır (Weber ve ark., 2009).

2.6.1 Antikanser İlaç Potansiyeline Sahip Kinolin Türevleri

Kinolinlerin bakterisidal etkilerinin ortaya çıkmasında DNA sentezinin inhibisyonu temel olmakla birlikte farklı mekanizmaların da hücre ölümünde rol oynadığı sanılmaktadır (Nazik and Öngen, 2010).

Kanserin, hücre homeostazisinde bozulmalara, ekstraselüler sinyallerin iletilmesinde aksaklıklara, hücreler arası iletişimin gerçekleştiği boşluklarda bazı sinyal iletim bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir. Kanser hücrelerinin GJIC (gap junctional intercellular communication) boyunca iletişim kurabilmeleri büyüme aktiviteleriyle negatif orantılıdır. Yapılan bir çalışmada; 6-metoksi-8-[(2-furanmetil) amino]-4-metil-5-(3-trifluorometilfeniloksi) (PQ7) olarak adlandırılan substituye kinolin türevlerinin GJIC proteinine yüksek oranda bağlanma gösterdiği saptanmıştır. PQ7 ile muamele edilen hücrelerde kaspaz 3 oranında da artış gözlenmiştir ki bu da apoptoz üzerine muhtemel bir ilişki kurar (Perchellet ve ark., 2010).

Göğüs kanseri hücreleri üzerinde iki tetrahidrokinolin türevi olan ve DM8, DM12 olarak adlandırılan cis-2,4-diaril-3-metil-1,2,3,4-tetrahidrokinolinin sitotoksik aktivitesi incelenmiştir. Bu bileşenlerin Gemcitabine (nükleozit analogu) ve Paclitaxel gibi antikanser ilaçlarla kombinasyonunun sinerjistik ve antagonistik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar; DM8 ve DM12 bileşenlerinin insan göğüs adenokarsinom hücre hatlarında hücre büyümesinin inhibe edildiğini göstermiştir (Muñoz ve ark., 2011).

Linomide (N-fenilmetil-1,2-dihidro-4-hidroksil-1 -metil-2-oksokinolin-3-karboksamid) olarak tanımlanan bileşiğin prostat kanserli fareler üzerinde denenmesiyle, linomide uygulanmayan deney hayvanlarında bulunan tümör büyüklüğü arasında antianjiogenik özelliğinden dolayı; tümör üzerinden kan akışının %40 oranında azaldığı görülmüştür. Tümör oluşumunun saptanmadığı organlarda ise kan akışında bir değişiklik olmaması linomide adlı bileşiğin seçici olarak anjiogenezisi inhibe ettiği ve yerleşik kan damarlarında herhangi bir azalmaya neden olmadığı belirlenmiştir (Perchellet ve ark., 2010).

4-aminoprimito [40; 50:4,5] tieno (2,3-b) kinolin adı verilen iki kinolin bileşiğinin antitümör etkileri de çalışılmıştır. Bu bileşiklerin DNA molekülünün uzunluğuna bağlı

olarak moleküle karşı yüksek afinitesi sonucu G+C'ce zengin olan bölgeden DNA molekülüne interkale olduğu düşünülmektedir. Bu moleküllerin doza bağlı olarak lösemi ve melanoma hücrelerine karşı gösterdikleri sitotoksik aktivitelerinin ve inhibisyon oranlarının benzer olduğu belirlenmiştir (Sing ve ark., 2007).

Kinolinlerin etki mekanizmaları üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda ise; antitümör aktivitenin değerlendirilmesinde; çeşitli kinolin türevlerinin kanser hücrelerinin büyümesini serbest radikallerin etkisi gibi superoksit dismutaz vb.nin etkisini artırarak sağladığı belirlenmiştir. Cisplatin gibi antikanser ilaçlarıyla karşılaştırıldığında protein ve nükleik asit seviyelerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Woynarowski, 2002; Rashad ve ark., 2010).

IGF-IR (İnsulin-like growth factor), hücre proliferasyonunda kritik arabuluculuk yapan büyüme faktörü tirozin kinazıdır (Güneş, 1999). Bu nedenle IGF-IR inhibitörlerinin tümör büyümesini engellediğine ve yeni kanser tedavileri sağladığına inanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada izokinolindion serisinin bileşenlerinin IGF-IF'ü inhibe ettiği rapor edilmiştir (Miller ve ark., 2009).

Sulfonamid taşıyan bileşiklerin birçok biyolojik aktiviteleri vardır ve *in-vitro/in-vivo* ortamlarda antitümör aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2014) Bazı kinolin ve primido kinolin türevlerinin sulfonamid içerdiği belirlenmiştir. Bu bileşiklerin *in-vitro* ortamda antikanserojen aktivitelerinin, doksorubisin isimli referans ilaçtan daha etkili olduğu bulunmuştur (Ghorab ve ark., 2010).

2-tiookso grubu ve 2-(3,4dimetoksifenil) kısmının varlığının bazı kinolin bileşiklerinde antitümör aktiviteyi artırdığı belirlenmiştir (El-Gohary, 2013). Bir kinolin türevi olan TAS-103 çift yönlü Topo I ve II inhibitörü olarak rapor edilmiştir (Tseng ve ark., 2008).

Yapılan araştırmalarda 2-fenilkinolin-4-1 türevlerinin potansiyel antikanser aktivitesi olduğu düşünülmüştür. Fakat yüksek toksisiteye sahip olmaları ve hidrofilik özellikte olmaları bu bileşiklerin ileri çalışmaları için sınır oluşturmuştur. Bunun üzerine molekül iskeletine hidroksi grubu eklenerek suda çözünübilirliği arttırıldığında antikanser aktivite özelliği gösteren yeni bileşikler elde edilmiştir (Cheng ve ark., 2013).

Yeni sentezlenen primido [4,5-b] kinolin, [1,2,3] triazino [4,5-b kinolin] ve [1,2,4] triazol[2',3':3,4]primido [6,5-b] kinolin analoglarının bazılarının böbrek kanser hücre hatları üzerinde seçici aktivite gösterirken bir kısmının da göğüs kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir. Bileşiklerden 5-(3,4-dimetoksifenil)-[1,2,3]triazino[4,5-b]kinolin ve 5-(3,4dimetoksifenil)primido[4,5-b]kinolin içeren bileşiklerin antikanser aktivite yönünden en aktif bileşikler olduğu belirlenirken 2-[3,4-dimetoksifenil] grubunun varlığının da antitümör aktiviteyi artırdığı belirtilmiştir (El-Gohary, 2013; Wang ve ark., 2014).

cis-2,4-diaril-3-metil-1,2,3,4-tetrahidrokinolinin sitotoksik aktivitesi incelenmiştir. Bu bileşenlerin Gemcitabine ve Paclitaxel ile kombine edildiğinde meme kanseri hücre hatlarında hücre büyümesinin inhibe edildiğini göstermiştir (Muñoz ve ark., 2011).

Bir seri 2-aminodihidrokinolin analogu da sentezlenmiş ve metastatik meme adenokarsinoma hücre hattı üzerinde antikanser aktivitesi incelenmiştir. Hücrelerin G2/M kontrol noktasında tutuklu kaldığı belirlenmiştir (Lee et al., 2013).

Indolo [2,3-b] kinolin türevleri DNA'ya interkale olan Ellipticine ve Olivacine gibi antikanser ilaçlarının analogudur. Prido [4,3-b]karbazol *in-vitro* ortamda DNA-Topoizomeraz I ayrılmaz kompleksini stabilize eder (Godlewska ve ark., 2013).

Kinolin türevlerinin DNA'ya interkale olarak DNA hasarından sorumlu olduğu bu sürecin de mitotik progresi önlediği bilinmektedir. Benzimidazo[1,2-b]izokinolinler'in Elliciptin'le benzer Topoizomeraz II inhibisyon özelliği gösterdiği ve *in-vitro* ortamda yüksek oranda aktif olduğu ve G1 fazında hücreleri indirgediği saptanmıştır (Hranjec ve ark., 2007)

Çeşitli tetrahidroprimidokinolinlerin yapı olarak DNA boyunca hidrojen bağları ve Van der Waals kuvvetleri uygulayarak baz çiftleri arasına girerek DNA interkalatörü olarak tanımlanabileceği belirlenmiştir (Woynarowski, 2002). Bu mekanizma, DNA sentezi ve transkripsiyonda interferans oluşumuyla ikili sarmal yapının topolojisinde değişimlere neden olur. Bazı tetrahidrokinolin ve trisiklik tetrahidroprimido[4,5-b] kinolinlerin yapı olarak bazı DNA interkalatörleriyle benzediği belirlenmiştir (Faidallah ve Rostom, 2013).

Ökaryotik hücrelerde hücre iskeletinin esansiyel bileşeni mikrotübül ağıdır. Phodofilotoksin (PPT) kinolin türevi bir bileşiktir ve proteinlerin kolşisinle bağlandığı bölgede tubulin oluşumunu inhibe eder. Bu durumun da bazı çalışmalarda eksen oluşumunun durdurulmasıyla birlikte hücrenin metafazın G2/M fazında tutuklu kalmasını sağladığı görülmüştür (Chen ve ark., 2013).

Chalchonelar doğada oluşan ya da sentetik olarak üretilen antibakteriyel, antifungal, antitüberküler, antienflamatuar, antimalarial ve antitümör aktivitesi olan ketonlardır. Chalchonelar üzerinden sentezlenen kinolin türevlerinin *in vitro* antikanser aktiviteleri incelenerek moleküllerin antikanser özellik gösterdikleri bildirilmiştir (Abonia ve ark., 2012).

Taxol ve docetaxel ovaryum, metastatik meme, melanoma gibi kanser türleri üzerinde geniş uygulama alanlarına sahiptir. Bir seri yeni kinolin-Docetaxel analoglarının çeşitli hücre hatlarına karşı antikanser aktivitesi incelenmiştir. Yeni analogların Docetaxel'den daha iyi sitotoksisite gösterdiği tanımlanmıştır (Chen ve ark., 2014).

Cryptolepis sanguinolenta adlı bitkinin köklerinden izole edilen indolokinolinlerin DNA interkale ajanı olduğu ve yüksek seviyede sitotoksisiteyle Topoizomeraz II inhibisyonu sağladığı belirlenmiştir (Lu ve ark., 2013).

Meflokin ve arenaldehitten elde edilen 4-[3-(aril) heksahidro [1,3] okzolo[3,4-a]pridin-1-yl]-2,8-bis(triflorometil) adlı kinolin türevinin çeşitli hücre hatları üzerinde antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Bileşiklerden nitro ve halo grupları içeren bileşiklerin inaktif olduğu diğerlerinin ise yeni antitümör ajan dizaynında kullanılabileceği görülmüştür (Rodrigues ve ark., 2014).

Primidokinolin türevlerinden sentezlenen çeşitli bileşiklerin antitümör aktivitesi incelenmiştir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda kontrol bileşik olarak kullanılan cisplatin ve sentezlenen bileşiklerin uygulanması sonucu antikanser aktivite gösterdiği bulunmuş ve deney hayvanlarının yaşam sürelerinde %29-66 arasında artış belirlenmiştir (Abbas ve ark., 2011).

Primidin kimyası ve primidin eldelerinin biyolojik olarak antibakteriyel ve antikanser aktivite gösterdikleri kanıtlarının artışına bağlı olarak (Alqasoumi ve ark., 2009)

araştırmalarda primido[4,5-b] kinolin türevlerinin de antikanser aktivitesi referans ilaç Doxorubicin kullanılarak incelenmiştir. Test edilen kinolin türevlerinin sitotoksik etkilerinin 4-bromobenzen-sulfonamid içeren moleküllerde referans ilaçla karşılaştırıldığında artış gösterdiği belirlenirken bir kısmında aynı etki gözlenmemiştir (Alqasoumi ve ark., 2010).

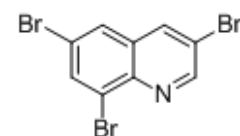
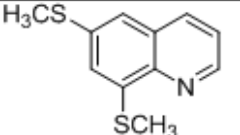
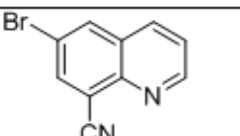
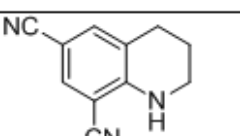
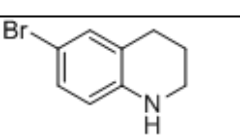
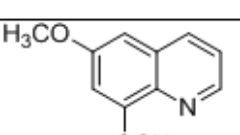
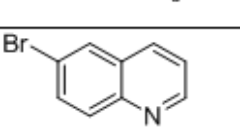
Antikanser aktivite gösterdikleri bilinen kinolin ve cinnamic asitin kombinasyonuyla oluşturulan bileşiklerin antikanser aktiviteleri de incelenmiştir. Elde edilen bileşiklerin birbirleriyle karşılaştırmaları sonucu; alkil zincirlerinin artışıyla aktivitede artış gözlenirken, MCF-7 hücrelerine karşı ters etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca kinolin moleküllerinde klorin sübstityelerinin ayrılmasının antiproliferatif aktiviteyi artırdığı da belirlenmiştir (Bianca ve ark., 2013).

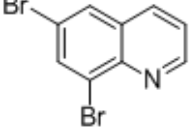
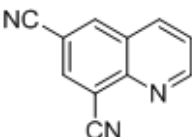
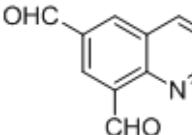
Kinolin 3-sulfonamid'in kanser hücrelerinde LDHA'yı inhibe ettiği ve laktat üretimini azalttığı belirlenmiştir. Göğüs kanseri hücrelerinde hipoksi durumunda kinolin-3-sulfonamid'le düşük LDHB ekspresyonunun LDH inhibisyonuna duyarlı olduğu belirlenmiştir. Kinolin-3-sulfonamid'in çeşitli hücre hatlarında glukoz alımını azalttığı ve mitokondriyel oksijen tüketimini artırarak hücrelerin hayatta kalmasını inhibe ettiği görülmüştür (Billiard ve ark., 2013).

3 MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Çalışmada Kullanılan Kinolin Türevleri ve Sentez Mekanizmalarını

Çizelge 3.1. Sentezlenen kinolin türevi moleküller

Kod	Molekül Formülü	Molekül Adı
SO1		TriBrQ
SO2		bis(SCH ₃)Q
SO3		BrCNQ
SO4		diCNTHQ
SO5		BrTHQ
SO6		DiMeOQ
SO7		BrQ
SO8		DiBrTHQ

SO9		Metoksi kinolin türevi
SO10		DiBrQ
SO11		DiCNQ
SO12		Kinolindikarbaldehit
SO13		Fenilkinolin türevi
SO14		metoksibromokinolin
SO15		İzokinolon türevi
SO16		Bromometoksikinolin türevi
SO17		diPhQ
SO18		Hidroksibromokinolin türevi

SO19		DiPhTHQ
SO20		Bromofenil kinolin

3.1.1 Cihazlar

Buz makinası.....	Scotsman AF80
Derin dondurucu (-20).....	Vestel GTP 455A
Derin Dondurucu (-80).....	New Brunswick Scientific U-410
Elektroforez sistemi.....	Scie-Plas HU10
ELIZA plate yıkama.....	Cenix Exaro
Etüv.....	Memmert INB 500
Faz-kontrast mikroskop.....	Leica DMIL
Güç kaynağı.....	Consort EV 265
Hassas terazi.....	Denver Instrument TB224A
Isıticılı manyetik karıştırıcı.....	IKA RH Basic 2
Işık mikroskobu.....	Olympus CX21
İnkübatör.....	Nuair AutoFlow NU-4750
Jel görüntüleme cihazı.....	UVP Biospectrum500
Karıştırıcı inkübatör.....	Heidolph Unimax 1010
Kuru blok termostat.....	BioTDB 100
Laminar kabin.....	Esco Sınıf II TipA2
Mikrodalga fırın.....	Arçelik MD 554
Mikroplate Okuma.....	Rayto RT-2100C
Otoklav.....	Hirayama HMC HV-1101
PCR.....	PeQlab Advanced Primus 96
pH metre.....	Hanna HI 2211
Realtime PCR.....	Roche Light Cycler 480
Saf su.....	Labconco WaterPro PS

Saf su.....	MES MP minipure
Santrifüj.....	Hettich EBA21
Santrifüj.....	Hettich Mikro200 R
Sıvı azot tankı.....	locator 4 Thermolyne Dewars
Soğutucu(+4).....	Uğur USS 440 DKTL
Sonikatör.....	Sonics Vibracell VCX 130
Spektrofotometre.....	Eppendorf Biophotometer UV/VIS
Spektrofotometre.....	Varian Carry 50
Terazi.....	Acculab VIC 212
Thoma Lami.....	Tiefe Depth
Ultra saf su.....	Millipore Direct-Q3 UV
Vakum pompası.....	Divac 2.2L
Vorteks özellikli santrifüj.....	ExiSpin BioNeer
Vorteks tüp çalkalayıcı.....	IKA Genius 3

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

5-Fluorouracil (5-FU).....	Sigma
Absolüt alkol.....	Merck
Agaroz.....	Lonza
Asetik asit.....	Merck
Brdu ELIZA Kit	Roche
cDNA Synthesis Kit for RT-PCR(AMW).....	Roche
Cytotoxicity Detection Kit(LDH).....	Roche
DMSO.....	Sigma
DNA marker.....	Thermo Scientific
DNazI.....	Roche
DPBS.....	Sigma
Dream Taq.....	Thermo Scientific
Entellan.....	Merck
Etidyum Bromür.....	Sigma
Fetal Bovine Serum.....	Sigma
H ₂ O ₂	Merck

HCL.....	Carlo Erba
High Pure RNA Tissue Kit.....	Roche
Hücre kültür media.....	Sigma
<i>In Situ</i> Cell Detection Kit, POD.....	Roche
Loading Dye.....	Fermentes
Metanol.....	Merck
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O.....	Amresco
NaHCO ₃	Merck
Paraformaldehit.....	Merck
Penicillin-Streptomycin.....	Sigma
ProteinazK.....	Fermentas
Realtime Ready Custom Panel 96.....	Roche
Realtime Ready DNA Probes Master.....	Roche
RNaz A.....	PEQ Lab
SDS.....	Amresco
Sodyum Sitrat.....	Merck
Steril DMSO.....	Sigma
Topoisomerase I assay Kit.....	TopoGen
Tripan Blue.....	Fluka
Tripsin-EDTA.....	Sigma
Tris.....	Roche
TritonX-100.....	Amresco
Tween-20.....	Amresco
β-merkaptotanol.....	Amresco

3.1.3 Kullanılan sarf malzemeler

Cam şişe (250ml, 500ml, 1 L).....	Isolab
Çok kanallı pipet (1-200 µl).....	Brand, Eppendorf
Dispenser.....	Eppendorf
Eppendorf tüp (2ml).....	Isolab
Filtre (0,22mikron).....	Stericup
Hücre kültür plate (96 ve 6 kuyulu).....	Corning costar

Kazıyıcı.....	Corning costar
Otomatik pipet (100-1000 µl).....	Brand, Eppendorf
Parafilm.....	Pechiney
Pastör pipeti.....	LP Italiana
PCR tüpü.....	Axygen
Pipet tabancası.....	Brand eppendorf
Pipet ucu (100-1000 µl).....	Corning costar
Pipet ucu (1-200 µl).....	Corning costar
Pipet ucu (2-10 µl).....	Corning costar
Pipet (100-1000 µl).....	Axygen
Pipet (1-200 µl).....	Axygen
Pipet (2-10 µl).....	Axygen
Plastik pipet (10 ml).....	Corning star
Plastik pipet (25 ml).....	Corning costar
Poli-lizinli cam.....	Thermo Scientific, Menzel Gläser
Silikon kültür insert.....	Ibidi
Şırınga filtre.....	Sartorius sedim
T150 Flask.....	Corning costar
T25 Flask.....	Corning costar
T75 Flask.....	Corning costar
Vidalı kapaklı santrifüj tüpü (15 ml).....	Corning costar
Vidalı kapaklı santrifüj tüpü (50 ml).....	Corning costar

3.2 Çalışmada Kullanılan Kinolin Moleküllerinin Sentez Mekanizmaları

Kinolin grubu bileşiklerin ilginç biyolojik özellikleri bu tür bileşikler üzerine olan ilgiyi artırmış ve araştırmacıları sürekli olarak farklı sentez yöntemleri geliştirmeye yöneltmiştir. Kinolin türevi sentezinde kinolinin bromlu türevleri önemlidir. Çünkü, brom atomu diğer bir çok grupta yer değiştirmeye imkan vermekte ve böylece bağlı olduğu grubu türev sentezinde anahtar konuma yükseltmektedir. Bromlu türevler, nükleofilik ve elektrofilik yer değiştirmeler kadar kenetlenme reaksiyonlarına da izin vermektedir. Bromo kinolinler, kinolin grubu moleküllerden farklı türevlerin eldesinde önemli rol oynamaktadır. Bağlı brom atomları sayesinde organik yapılar, aracı ve

anahtar konuma yükselir. Bromlama ile çok fonksiyonlu hale gelen kinolinler çeşitli bileşiklerle (kenetlenme reaktifleri, grignard reaktifleri v.s) reaksiyon verebilmektedir. Brom, bulunduğu yapılarda hem metal halojen değişimi ile elektrofilik yer değiştirmelerle, hem de nükleofilik yer değişimi ile farklı türevlerin sentezine yol açmaktadır. Bu yolla siyan, keton, aldehit, alkil, ester, eter, asit ve diğer türevler bromlu türevlerden kolayca sentezlenebilir. Kinolin ve izokinolin molekülünde brom takılabileceği yedi konum vardır. Bu sebeple çok sayıda monobrom, dibrom, tribromokinolin ve izokinolin izomerleri vardır ve bu izomerler için az sayıda uygun sentez yöntemleri bilinmektedir. Kinolinin bromlu türevleri farmakolojik aktivite gösteren birçok bileşiğin başlangıç maddesi olarak tıp kimyasında kullanılmaktadır (Sahin ve ark., 2008).

3.3 Hücre Kültürü

Bu çalışmada kanser hücre hatları olarak HeLa, C6 ve HT-29 kanser hücre hatları kullanıldı. Tüm hücre hazırlama işlemleri laminar kabinde steril ortamda gerçekleştirildi. Hücreler % 10 FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma, Germany) ve % 2 PenStrep (Penisilin-Streptomisin, Sigma, Germany) solüsyonu içeren katkılı DMEM besiyeri içeren steril T75'lik hücre kültür flasklarında 37°C de % 5 CO₂ ortamında 4-5 gün inkübe edildi. Hücreler konfluent hale geldiğinde, flasklardaki besiyeri 10 ml Tripsin-EDTA solüsyonu ile değiştirilerek, 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında flask hafifçe çalkalanarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı, oluşan hücre süspansiyonu 50 ml steril falkon tüplere aktarıldı. Hücreler üzerine 10 ml taze besiyeri (DMEM) eklenerek Tripsin nötralize edildi ve hücreler 1500 x g de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısım aspire edildikten sonra hücre pelleti 2 ml taze besiyeri eklenerek steril pastör pipetle süspansiyon haline getirildi. Hücre sayımı için hücre süspansiyonundan alınan 10 µl hücre 10 µl tripan mavisi solüsyonu ile karıştırıldı, bu karışımın 10 µl si Thoma lamına pipetlenerek hücreler mikroskop altında sayıldı ve hücre konsantrasyonu belirlendi. Sayım işleminden sonra yeni bir steril 15 ml lik Falkon tüp içinde çalışılacak hücre stok süspansiyonu (20-30 000 hücre/100 µl) hazırlandı. 100 µl hücre süspansiyonundan 96'lık hücre kültür plaklarına pipetlendi. Plakalardaki hücreler kontrol ve değişik konsantrasyonlardaki test maddelerinin eklenmesinden sonra

37 °C de 24 saat inkübe edilerek test maddelerinin kanser hücre proliferasyonuna olan etkisi BrdU cell ELIZA yöntemiyle test edildi.

3.4 Hücre Proliferasyon Testi

Çalışmada test edilecek bileşiklerin antiproliferatif aktivitesinin ve IC₅₀ konsantrasyonunun belirlenmesi için hücresel DNA miktarının tespitini sağlayan Hücre proliferasyon ELIZA kiti (BrdU Cell Proliferation ELIZA Roche, USA) kullanıldı. Hücrelere BrdU eklendiğinde, BrdU bölünmekte olan hücrelerin DNA yapısına katılır. Süspanse ve yapışkan (adherent) hücrelerin DNA yapısındaki BrdU miktarı ELIZA yöntemiyle belirlenerek hücre proliferasyonu kantitatif olarak ölçülür.

3.4.1 BrdU Hücre Proliferasyon ELIZA kiti çalışma solüsyonları

BrdU Labeling Reagent:

Falkon tüpü içerisine 100 µl BrdU koyularak besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı.

Anti-BrdU-POD solüsyonu:

Liyofilize halde gelen Anti-BrdU-POD içeren şişeye 1.1 mL ddH₂O eklenerek sulandırıldı. Ayrı bir falkon tüpüne bu karışımdan 100 µl alınarak üzeri besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı ve +4°C'de saklandı.

Yıkama Solüsyonu:

Kit içerisinde hazır halde gelen washing bufferdan 50 mL alınarak cam bir şişeye koyuldu ve üzeri 500 mL'ye tamamlanarak +4°C'de saklandı.

Durdurma Solüsyonu:

Bir cam şişeye 1M H₂SO₄ hazırlanarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose) Çözeltisinin Hazırlanması:

1000 ml'lik bir behere deiyonize su (700- 800 ml) koyuldu. Beher icine manyetik bar atılarak manyetik karıştırıcıya alındı. Üzerine DMEM (1L için bir şişe) boşaltıldı.

Oluşan karışım üzerine NaHCO₃ (2.2 g) ilave edilerek pH metre ile HCl çözeltisi kullanılarak pH 7.2 ayarlandı. Toplam hacim 1L'ye tamamlandı. Bu çözelti steril kabine alınarak 0.22 µ'luk steril filtrelerden vakum altında steril şişelere süzülerek + 4°C'de saklandı.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose) Katkılı Çözeltisinin Hazırlanması:

Steril kabin içerisinde 500 ml'lik steril şişede bulunan DMEM çözeltisinden başka bir şişeye 60 ml alınarak eksilen hacim 50 ml Fetal Bovine Serum (FBS), 10 ml Penstrep ilavesiyle tekrar 500ml'ye tamamlandı. Elde edilen çözelti + 4 °C de saklandı.

3.4.2 BrdU hücre proliferasyon ELIZA kiti prosedürü

Hazırlanan hücre stoğundan 100 µl hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu steril hücre kültür plakalarının (COSTAR, Corning, USA) ilgili kuyucuklara triplike olacak şekilde pipetlendi. Hücre kontrolü için Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri, negatif kontrol için çözücü madde dimetilsülfoksit (DMSO), pozitif kontrol için antikanser bileşik 5-FU (Sigma) test maddesi ile aynı konsantrasyonlarda hücreler üzerine eklendi. Kuyucuklardaki son hacim 200 µl olacak şekilde DMEM ile tamamlandı ve 37 °C, % 5 CO₂ ortamı sağlayan inkübatörde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra BrdU kiti prosedürüne göre hücreler üzerine göre BrdU işaretleme solüsyonundan 10 µL/kuyu olacak şekilde eklendi ve hücreler 37°C'de 4 saat yeniden inkübe edildi. Platelardaki medyum aspire edilerek işaretleme solüsyonunu ortamdan uzaklaştırıldı, filtre kağıdına blotlanarak sıvı kalıntısı alındı, plate üzerine 200 µL/kuyu olacak şekilde FixDenat solüsyonu eklenerek ve 15 ila 25°C'de 30 dakika inkübe edildi. FixDenat hücreleri sabitleyerek DNA'yı denatüre etmektedir, böylece anti-BrdU-POD antikoru DNA'ya girerek BrdU'ya rahatça ulaşabilmektedir. İnkübasyondan sonra FixDenat solüsyonu aspirasyonla uzaklaştırıldı. Hücreler üzerine Anti-BrdU-POD çalışma solüsyonu 100 µL/kuyu olacak şekilde eklenerek 22°C'de yaklaşık 90 dakika inkübe edildi. Daha sonra platerler blotlanarak antikor konjugesi uzaklaştırıldı ve kuyular 200 ila 300 µL/kuyu olacak şekilde yıkama solüsyonuyla üç kez yıkandı. Sonra yıkama solüsyonu dökülerek ve blotlamayla uzaklaştırıldı ve 100 µL/kuyu olacak şekilde substrat solüsyonu eklendi. Renk oluşuncaya kadar 22°C'de 30 dakika inkübe

edildi. Son olarak her bir kuyucuğa μL 1 M sülfürik asit (durdurma solüsyonu) eklendi ve yaklaşık 1 dakika boyunca mikropate inkübe edildi. Daha sonra ELIZA okuyucusu (Rayto, China) kullanarak plakalardaki hücrelerin proliferasyon miktarı hücre kültür medyumununun 450-650 nm'deki absorbansı ölçülerek belirlendi. Sonuçlar % hücre inhibisyonu olarak rapor edilerek, çözücü ile muamele edilmiş hücrelerin optik densitesi % 100 olarak kabul edildi.

3.5 Kinolin Türevi Bileşiklerin IC₅₀ Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Moleküllerin IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi için BrdU Cell ELIZA testi uygulandı. Test sonuçlarına göre elde edilen değerler XLfit (IDBS) programı kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplandı. Elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kinolin moleküllerinin IC₅₀ değer tablosu

	C6	HeLa	HT29
SO6	NA	NA	31,19
SO7	24.36 $\mu\text{g/mL}$	NA	NA
SO8	24.11 $\mu\text{g/mL}$	12.70 $\mu\text{g/mL}$	NA
SO9	29.923 $\mu\text{g/mL}$	NA	30.98 $\mu\text{g/mL}$
SO10	NA	NA	19.26 $\mu\text{g/mL}$
SO13	16.02 $\mu\text{g/mL}$	22.50 $\mu\text{g/mL}$	15.29 $\mu\text{g/mL}$
SO18	5.60 $\mu\text{g/ml}$	9.60 $\mu\text{g/mL}$	5.45 $\mu\text{g/mL}$
5-FU	31.27 $\mu\text{g/mL}$	33.60 $\mu\text{g/mL}$	32.90 $\mu\text{g/mL}$

NA; Kullanılan dozların hiçbiri %50 oranında inhibisyona neden olmamıştır.

3.6 Laktat Dehidrogenaz (LDH) Sitotoksisite Testi

Test edilen maddeye bağılı olarak inkübasyon süresinde ölen hücre miktarındaki artış, kültür süpernatantında LDH artışıyla sonuçlanır. Hücre hasarı sonucu ortama salınan sitoplazmik enzimlerin ölçümü bu deneylerin temelini oluşturur. Laktat dehidrogenaz sitoplazmik bir enzim olup, çoğu hücrede bulunur ve stabildir (Billiard ve ark., 2013). Bu amaçla LDH hücre sitotoksisite kiti (Roche, USA) üreticinin prosedürüne göre kullanıldı.

3.6.1 LDH Sitotoksisite Testi çalışma solüsyonları

Reaksiyon Karışımı:

11.25mL boya solüsyonuna 250 µl katalist eklenerek hazırlandı.

%2 TritonX-100 solüsyonu:

2 mL TritonX-100 alınarak üzeri 100 mL'ye tamamlandı.

1N HCl durdurma solüsyonu:

% 37'lik d:1.19 olan stoktan 82.81mL alınarak üzeri 1000mL'ye tamamlandı.

3.6.2 LDH Sitotoksisite kiti çalışma prosedürü

Sitotoksisite testi için tüm hücre hazırlama işlemleri laminar kabinde steril ortamda gerçekleştirildi. Hücreler % 10 FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma, Germany) ve % 2 PenStrep (Penisilin-Streptomisin, Sigma, Germany) solüsyonu içeren katkılı DMEM besiyeri içeren steril T75'lik hücre kültür flasklarında 37°C de % 5 CO₂ ortamında 4-5 gün inkübe edildi. Hücreler konfluent hale geldiğinde, flasklardaki besiyeri 10 ml Tripsin-EDTA solüsyonu ile değiştirilerek, 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında flask hafifçe çalkalanarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı, oluşan hücre süspansiyonu 50 ml steril falkon tüplere aktarıldı. Hücreler üzerine 10 ml taze besiyeri (DMEM) eklenerek Tripsin nötralize edildi ve hücreler 1500 x g de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısım aspire edildikten sonra hücre pelleti 2 ml taze besiyeri eklenerek steril pastör pipetle süspansiyon haline getirildi. Hücre sayımı için hücre

süspansiyonundan alınan 10 µl hücre ve 10 µl tripan mavisi solüsyonu ile karıştırıldı, bu karışımın 10 µl'si Thoma lamına pipetlenerek hücreler mikroskop altında sayıldı ve hücre konsantrasyonu belirlendi. Sayım işleminden sonra yeni bir steril 15 ml lik Falcon tüp içinde çalışılacak hücre stok süspansiyonu (5000 hücre/100 µl) hazırlandı. 100 µl hücre süspansiyonundan 96'lık hücre kültür plaklarına pipetlendi ve test maddelerinin IC₅₀ konsantrasyonlarıyla inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücre içermeyen kültür süpernatanı toplanarak bu süpernatandan 100'er µL başka bir mikropalakaya transfer edildi ve kit içinde bulunan reaksiyon karışımı 1000/kuyu olacak şekilde her süpernatana eklenerek yarım saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sırasında süpernatana geçen LDH eşleşmiş enzimatik reaksiyonla formazan oluşturmak için tetrazolyum tuzu INT'nin indirgenmesiyle süpernatana geçen LDH bu basamakta formazan oluşum miktarı ile doğru ilişkilidir. Sonuç olarak ELIZA plaka okuyucu ile kuyucuklardaki formazan boya miktarı yaklaşık 500 nm'de absorbands ölçülerek belirlendi. Sonuçlar % sitotoksosite olarak rapor edilerek, çözücü ile muamele edilmiş hücrelerin optik densitesi % 100 olarak kabul edildi.

3.7 DNA Degredasyon/Bantlaşma Testi (DNA laddering assay)

Apoptozun özelliklerinden biri DNA'nın internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180–200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsünün ortaya çıkmasına neden olur. DNA'yı parçalayan bir Ca/Mg-bağımlı endonükleaz olup apoptoz sürecinin sonlarına doğru çeşitli ölüm uyarıları nedeniyle aktifleşir. Sentezlenen kinolin bileşiklerinin antikanser etki mekanizmasının apoptoz aracılığıyla olup olmadığını test etmek amacıyla DNA degradasyon testi kullanıldı (Wang et al., 2007).

3.7.1 DNA Degredasyon/Bantlaşma Testi çalışma solüsyonları

Fosfat Sitrat Tamponu :

Na₂HPO₄ x 7H₂O 10.72 gram tartılarak üzeri distile suyla 200 ml'ye tamamlandı (solüsyon I).

Sitrik asit:

0.19 gram tartılarak üzeri distile suyla 10 ml'ye tamamlandı (solüsyon II).

Sitrat-fosfat tamponu:

Solüsyon I'den 192 ml, solüsyon II'den 8 ml alındı ve steril cam bir şişede karıştırılarak pH:7.8'de kullanıldı.

Tween 20:

0.25 mL Tween 20, 100 mL distile su içinde çözüldü.

% 70 alkol:

700 mL absöüt etil alkol alındı ve üzeri 1000 mL'ye tamamlandı.

EDTA solüsyonu (0.5 M):

18.6 g EDTA 80 mL distile suda çözüldü ve karıştırıldı. 1 M NaOH ile pH 8'e ayarlanarak üzeri 100 mL'ye tamamlandı.

TBE-buffer:

5.4 g tris ve 2.8 g borik asit 800 mL distile suda çözümlenerek üzerine 0.5 M EDTA solüsyonundan 2 mL eklendi. pH 8'e ayarlanarak üzeri 1 L'ye tamamlandı.

Etidyum bromid:

10 mg etidyum bromid 1 mL distile suda çözüldü.

DPBS Tampon Çözeltisinin Hazırlanması:

1000 ml'lik bir behere deiyonize su (700-800 ml) koyuldu. Beher içine manyetik bar atılarak manyetik karıştırıcıya alındı ve üzerine DPBS (1L için bir şişe) boşaltıldı. Herhangi bir ısıtma işlemi yapılmaksızın çözünmesi sağlandı. 1 N HCl veya 1N NaOH kullanılarak pH 7.2 ye ayarlandı ve toplam hacim 1lt'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti steril kabine alınarak 0.22µ'luk steril filtrelerden vakum altında steril şişelere süzöldü ve + 4 °C de saklandı.

50 X TAE tamponu:

242 gr Tris Base, 18.6 gr EDTA tartıldı ve 1lt behere koyuldu. 900 ml deiyonize su ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcıda çözülmeye bırakıldı. pH metrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra pH 8 olana kadar yaklaşık 60 ml glasial asetik asid eklendi. pH 8 olduktan sonra hacmini deiyonize su ile 1 ml tamamlandı. Ağzı iyice kapatılan tampon +4 °C kaldırıldı.

Eski flaskın içeriği dökülerek, üzerine 4 mL Tripsin+EDTA koyulup, kapağı sıkıca kapatıldı. Flask elle iyice çalkalanarak, tam çözünme olması için biraz beklendi. Sonra 10 mL DMEM eski flaslara eklendi, iyice çalkalanarak boş falcon tüplerine boşaltıldı. 6000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Falcon süpernatanı dökülüp, üzerine pastör pipetiyle 4 mL DMEM koyuldu, yine pastör pipetiyle pompalayarak süspanse edildi. Bu hücre solüsyonundan bir eppendorf tüpüne 20 µL alınıp ve üzerine 20 µL tripan blue koyularak pipetlemeyle karıştırıldı, bu karışımdan Thoma lamına 20 µL aktarılıp mikroskopta hücre sayımı yapıldı. Sayım sonunda 750.000 hücre bir T-25'lik flaska 6 mL besiyeri içinde koyuldu. Bir gecelik inkübasyondan sonra T25 flask'e IC₅₀ değerinden madde ve pozitif kontrol olarak 5-FU eklenip 24 saat daha inkübe edildi.

Maddeyle inkübasyonun ardından T25 içindeki besiyeri dökülmeden kazıyıcı ile iyice kazınarak hücreler yüzeyden çıkarıldı ve bir falkon tüpüne aktarıldı. 1 mL soğuk DPBS ile flask tekrar iyice kazındı ve bir pipet ile aynı falkona aktarıldı. Örnekler 6000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant döküldü. Örneklerin üzerine 1 ml DPBS eklenerek falkonun çeperine yapışan hücrelerin pipetleme ile dibe toplanması sağlandı ve santrifüj edilerek süpernatant döküldü. Örneklerin üzerine 200 µL DPBS pipetlendi ve pipetleme ile hücreler iyice sulandırıldı. Sonra üzerine 5 mL % 70'lik alkol eklenerek 24-72 saat -20°C'de tespit edildi.

Tespit sonrasında örnekler santrifüj edilip alkol döküldü, falkon tüpünün çeperine yapışan hücreler bir miktar alkol ile (100 µL kadar) pipetleme yapılarak tekrar dibe toplanması sağlandı ve tekrar santrifüj edildi. Kalan alkol pipet yardımıyla alındı ve örnekler alkolün tamamen uçması için bir shaker içinde 37°C'de 2-3 saat bekletildi.

Örnekler iyice kurutulduktan sonra üzerlerine 50 µL fosfat-sitrat tamponu eklenerek pipetleme ile hücreler bu tampon içinde iyice çözünmesi sağlandı. 37°C'de 30 dk inkübe edilen örnekler sürenin sonunda santrifüjlenerek üstte kalan 40 µL süpernatant alındı ve bir eppendorfa aktarıldı. Bu süpernatant düşük molekül ağırlıklı DNA içermektedir. Eppendorfa aktarılan 40 µL örneğin üzerine 5 µL Rnaz A ve 5 µL Tween20 eklenerek 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Sürenin sonunda örneklerin üzerine 5 µL proteinaz K eklenerek 37°C'de 30 dk daha inkübe edildi.

İşlem sonunda örneklerin üzerine 5 µL loading buffer eklenerek % 1.5'luk agaroz jelle hepsi yüklenerek elektroforez jelde yürütme sağlandı.

3.8 Hücre migrasyon testi

Test maddesi varlığında hücrelerin proliferasyon yeteneklerini ölçmeyi hedefleyen işlemdir. Bu deney için iki bölmesi arasında 500 µm mesafe bulunan µ-dish (iki bölmeli silikon kuyucuk) kullanıldı. Silikon bölmelerin her birine 35 000 hücre/70 µl olacak şekilde hücre pipetlendi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitiminde silikon kuyular pens yardımıyla kaldırıldı ve eski besiyeri 2 ml taze besiyeriyle değiştirildi. Test maddeleri IC₅₀ değerinde koyuldu ve fotoğraflanma işlemine başlandı. µ-dish'te bulunan 500 µm alan kontrol olarak kullanıldı ve bu alan göç eden hücrelerle dolana kadar fotoğraflanma işlemine devam edildi.

3.9 TUNEL Testi

Bu test sitostatik ilaç ya da radyasyondan kaynaklanan primer DNA kırıkları ve nekrozun apoptozdan ayrılmasını sağlar. Çünkü bu test apoptoz sırasında oluşan DNA kırıklarına karşı hassastır. Ancak bazı apoptotik hücrelerde DNA kırıkları oluşmadığından veya tamamlanmadığından yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. Aynı zamanda nekrozun son aşamasında oluşan yoğun DNA kırıkları da yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir (Zagariya, 2012).

3.9.1 TUNEL testi çalışma solüsyonlarının hazırlanması

Permeabilizasyon solüsyonu:

% 0.1'lik sodyum sitrat içine % 0.1'lik TritonX-100 taze olarak hazırlandı.

Blok solüsyonu:

%3'lük H₂O₂ metanol içinde hazırlandı.

Fiksasyon solüsyonu:

PBS içinde %4'lük paraformaldehit pH 7.4 ve taze hazırlandı.

3.9.2 TUNEL Testi Prosedürü

Lizimli lam üzerinde bulunan silikon kuyuların her birine 70 000 hücre/140 µl hücreler koyuldu ve üzerlerine DMSO ile çözülmüş maddeler IC₅₀ değerinde eklendi. Hücreler maddelerle birlikte 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından silikon kuyu kaldırılarak DPBS ile yıkandı ve oda sıcaklığında bir saat süre ile fiksasyon solüsyonunda bekletildi. DPBS ile 3 defa 5 dk süre ile durularak blok solüsyonunda 10 dk süre ile bekletildi. DPBS ile 3 defa 5 dk süre ile durulandı ve buz üzerinde permeabilizasyon solüsyonu içinde 2 dk bekletildi. DPBS ile her seferinde 5 dk olmak üzere durulandı ve pozitif kontrol olarak işaretlemeyen önce DNA zincir kırıklarının meydana gelmesi için DNaz I rekombinant ile hücreler 10 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. TUNEL reaksiyon karışımının hazırlanması için ise; iki negatif kontrol için 100 µl label solüsyonu alınarak negatif kontrole eklendi ve label solüsyonda kalan 450 µl enzim solüsyonuna aktararak karıştırıldı. Elde edilen 500 µl'lik TUNEL reaksiyon karışımından her bir örneğe 50 µl eklendikten sonra nem kabında 37°C'de bir saat bekletildi. DPBS ile her seferinde 5'er dk olmak üzere üç kere durulama yapıldı. Örnek üzerine entellan damlatılarak lamel kapatıldı ve floresan mikroskop altında analiz edilerek karanlık ortamda saklandı (eksitasyon dalgaboyu 450-500 nm, deteksiyon aralığı 515-565 nm).

3.10 Topoizomeraz I inhibisyon testi

Topoizomerazlar, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda DNA replikasyonu, transkripsiyonu, rekombinasyon, kromozom yoğunlaşması ve ayrılması gibi işlemlerde mutlak gerekli olan enzimlerdir. Topoizomerazlar hücrelerdeki bu hayati önemlerinin dışında antimikrobiyal ve antikanser ilaçlar için primer sitotoksik olmaları bakımından da çok önemlidir. Son yıllardaki farmakolojik çalışmalar, genellikle DNA küçük

oluşundaki özgül dizilere bağlanarak antitümör aktivite gösteren ilaçların, DNA Topoizomeraz enzimlerini inhibe ederek de etkili olduğunu göstermiştir. Hücre çoğalmasında gerekli olan Topoizomeraz enzimlerinin bu ilaçlar tarafından inhibisyonu, kontrolsüz ve hızlı bir şekilde bölünen kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurabileceği düşünülmektedir (Guo ve ark., 2007; Alberts ve ark., 2008).

3.10.1 Topoizomeraz I inhibisyon testi çalışma solüsyonları

Reaksiyon karışımı:

16 µl H₂O₂, 2 µl 10x TGS buffer, 1 µl pHOT1 DNA ve 2 ünite rekombinant Topo I enzim karıştırıldı.

Boya karışımı:

6 µl etidyum bromür 200 µl saf suyla karıştırıldı.

3.11 Topoizomeraz I inhibisyon test prosedürü

Reaksiyon karışımı eppendorf tüplere pipetlendikten sonra örnekler ısıtıcı blok üzerinde 37°C'de 30 dk inkübe edilirken, enzim karışımına en son eklendi. 30 dk sonunda eppendorfların her birine 5x stop buffer'dan 4'er µl koyuldu. % 1'lik agaroz jelle yüklemeye yapıldıktan sonra örnekler jelin % 80'inde yürüdüklerinde elektroforez işlemi sonlandırıldı. Jel etidyum bromürle 30 dk boyunca çalkalayıcıya bırakıldı. Jelin üzerindeki fazla boyadan arındırılması amacıyla jel saf su içerisinde 15 dk boyunca çalkalanarak görüntülendi.

3.12 Total RNA izolasyonu ve örneklerden cDNA sentezi

Doku ya da hücrelerin lizis solüsyonu ile parçalanıp, fenol yardımıyla total RNA'nın ekstrakte edilmesi prensibine dayanan protokol, ilk kez Chomczynski ve Sacchi tarafından 1987'de tanımlanmıştır (Chomczynski, 1987).

3.12.1 Total RNA İzolasyonu solüsyonlarının hazırlanması

Lysis/binding buffer, 25 ml (4.5 M guanidin-HCl, pH 6.6; 25°C'de) 100 mM sodyum fosfat + β merkapttoetanol

DNase I, recombinant, lyophilizate, 10 kU DNase I, 550 µl elution buffer eklendi.

DNase inkübasyon tamponu; 10 ml (pH 7.0'da 25°C'de 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 nM MnCl₂)

Wash buffer I, 33 ml; 20 ml absolut etanol eklendi.

Wash buffer II, 10 ml; 40 ml absolut etanol eklendi.

Elution buffer; 30 ml, PCR grade su

Absolüt etanol

Solüsyon I; 0.1 M NaOH + 1mM EDTA

Solüsyon II; % 0.5'lik SDS

3.12.2 Total RNA izolasyonu prosedürü

Flask içinde kültüre edilen hücrelerin eski besiyeri dökülerek, üzerine 4 mL Tripsin+EDTA koyulup, kapağı sıkıca kapatıldı ve flask elle iyice çalkalanarak, tam çözünme olması için biraz beklendi. Sonra 10 mL DMEM eski flaslara eklendi, iyice çalkalandı, boş falcon tüplerine dökülerek, 6000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Falcon süpernatanı dökülerek üzerine pastör pipetiyle 4 mL DMEM koyuldu. Yine pastör pipetiyle pompalayarak süspanse edildi. Bu hücre solüsyonundan bir eppendorf tüpüne alınıp stereo mikroskopla hücre sayımı yapıldı. Sayım sonunda 750 000 hücre bir T-25'lik flaska 6 mL besiyeri içinde koyuldu. Bir gecelik inkübasyondan sonra T-25'e IC₅₀ değerinden madde eklenerek 24 saat daha inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından T-25 içindeki besiyeri dökülmeden kazıyıcı ile iyice kazınarak hücreler yüzeyden çıkarıldı ve falcon tüpüne aktarıldı. Eski flask üzerine 1 mL soğuk DPBS eklenerek flask tekrar iyice kazındı ve bir pipet ile aynı falkona aktarıldı. Örnekler 6000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant döküldü. Örneklerin üzerine 1 ml DPBS eklenerek falcon tüpü çeperine yapışan hücreler pipetleme ile dibe toplandı ve aynı şekilde santrifüj edildi. Örneklerin üzerine 200 µL DPBS koyuldu ve pipetleme ile hücreler iyice sulandırıldıktan sonra bir eppendorfa aktarılarak üzerine 400 µL lysis/binding buffer eklendi ve 3-4 dk oda ısısında inkübe edildi.

Mikrosantrifüjün son hızında lizat 2 dk santrifüj yapılarak sonraki basamaklarda kullanılmak üzere süpernatant alındı ve üzerine 200 µL absolut etanol eklenerek

karıştırıldı. Etanol eklenen süpernatantın tamamı, toplama tüpü eklenen filtreye aktarıldı.

Filtreli toplama tüpleri son hızda 30 sn santrifüj edildi. Filtreli tüp çıkarılarak, toplama tüpünün içeriği boşaltılıp, filtreli tüp eski toplama tüpüne koyuldu.

Nükleaz içermeyen 1.5 mL'lik bir eppendorf tüpünde 90 µL DNaz inkübasyon buffer ve 10 µL DNaz I karışımı hazırlandı. Bu karışım filtreli tüpe pipetlenerek oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.

Filtreli tüpe 500 µL wash buffer I eklenerek 8000xg'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünün içeriği boşaltılarak üzerine yeniden filtreli tüp koyuldu.

Filtreli tüpe 500 µL wash buffer II eklendi ve 8000xg'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünün içeriği boşaltıldıktan sonra üzerine yeniden filtreli tüp koyuldu. Filtreli tüpe 300 µL wash buffer II eklenerek son hızda 2 dakika santrifüj edildi. Filtreli tüp nükleaz içermeyen 1.5 mL'lik eppendorflara aktarıldı.

Filtreli tüpe 100 µl elution buffer eklendikten sonra 8000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen eppendorf tüpü -80°C'a kaldırıldı.

3.12.3 cDNA sentezi

cDNA tek veya çift sarmallı olabilir, mRNA kalıbından revers transkriptaz enzimi kullanılarak komplementer DNA sentezlenir. Bu süreç tek zincirli cDNA sentezi olarak bilinir (Krug ve Berger, 1987). 1st strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) kiti üretici firmanın prosedürüne göre uygulandı.

3.12.4 cDNA sentezinde kullanılan solüsyonlar

Master karışım ve RNA örneği 20 µl, 10x'lik reaksiyon tamponundan 2 µl alınarak, 4 µl MgCl₂, 2 µl deoksiniükleotit karışımından, 2 µl Random primer p(dN)₆, 1 µl RNaz inhibitörü, 0.8 µl AMV reverse transkriptaz, 2.2 µl PCR grade su ve RNA örneğinden 5 µl alınarak karıştırıldı.

3.12.5 cDNA sentez prosedürü

Buz içindeki PCR tüplerinin her birine; 5 µl RNA koyulup üzerine hazırlanan master miksten 15 µl pipetlendi. Üzeri PCR grade su ile 13 µL'ye tamamlandı.

Termal cyler cihazında 25°C'de 10 dk ve sonra 42°C'de 62 dk inkübe edildi. İlk inkübasyonda RNA kalıbına primerlerin bağlanmasıyla beraber (annealing), ikinci inkübasyonda cDNA senteziyle sonuçlanacak reverse transkript işlemi gerçekleştirildi. 42°C'de inkübasyonu takiben AMV reverse transkriptaz 99°C'de 5 dk içinde denatüre edildi ve 4°C'de 5 dk bekletildi. Örneklerden elde edilen RNA'dan sentezlenen cDNA sentezinin doğruluğunu kontrol etmek için PCR işlemi yapıldı. Bu işlem için bir PCR tüpüne 2 µl primer, 25 µl Dream Taq ve 18 µl PCR grade su üzerine 5 µl cDNA örneği eklendi, son hacim 50 µl'ye tamamlanarak thermal cyler cihazına yüklendi ve ardından PCR ürünleri elektroforez jele yüklendi.

3.13 Real-Time Ready Gen Ekspresyon Paneli

Yeni sentezlenen kinolin türevi bileşiklerin antikanser etki mekanizmasının anlaşılması için hücre döngüsü ve apoptozda rol oynayan çeşitli genlerin ekspresyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlı uygulandı. Bu amaçla hücre döngüsü ve apoptozla alakalı genlere spesifik primer-probe içeren RealTime Ready Gen Ekspresyon Paneli (Roche, USA) kullanıldı. Çalışmada test maddelerinin antikanser aktivitelerinin temelinde yatan moleküler mekanizmayı belirlemek amacıyla, bu maddelerle muamele edilerek HT29 kanser hücre hatlarında hücre döngüsü ve apoptozla alakalı bazı genlerin ekspresyon profili tespit edildi.

3.13.1 Real-Time Ready Gen Ekspresyon Paneli Prosedürü

Her bir kuyu başına 10 µl Lightcycler 480 probe master, 5 µl PCR grade su ve 5 µl cDNA örneği kullanıldı ve 96'lik gen ekspresyon paneline göre miktar ayarlanması yapıldı. Negatif kontrolün ilk kuyusuna probe master, PCR grade su ve cDNA; ikinci kuyuya ise probe master, PCR grade su ve transkribe olmamış RNA örneği eklendi. Panelin folyosu kaldırılıp kuyucuklara hazırlanan karışımdan pipetlenerek panelin üzeri kapatıldı ve hafif santrifüleme işleminden sonra Lightcycler 480 cihazına yüklendi.

Örnek sonuçları cihazın verdiği eşik değerine göre çeşitli yazılımlar yardımıyla değerlendirildi.

3.14 İstatistik Yöntem

BrdU ELIZA testi uygulanırken her bir test için her doz kendi içerisinde de üç tekrarlı olmak üzere farklı zamanlarda ve üçerli tekrarlar gerçekleştirildi. BrdU ELIZA ve LDH test sonuçları Excel programı kullanılarak elde edilen absorbans değerlerinin girilmesiyle % inhibisyon ve % sitotoksosite sonuçları verilen formüllere göre elde edildi:

$$\% \text{ inhibisyon} = [1 - (\text{A test maddesi} / \text{A çözücü kontrol})] \times 100$$

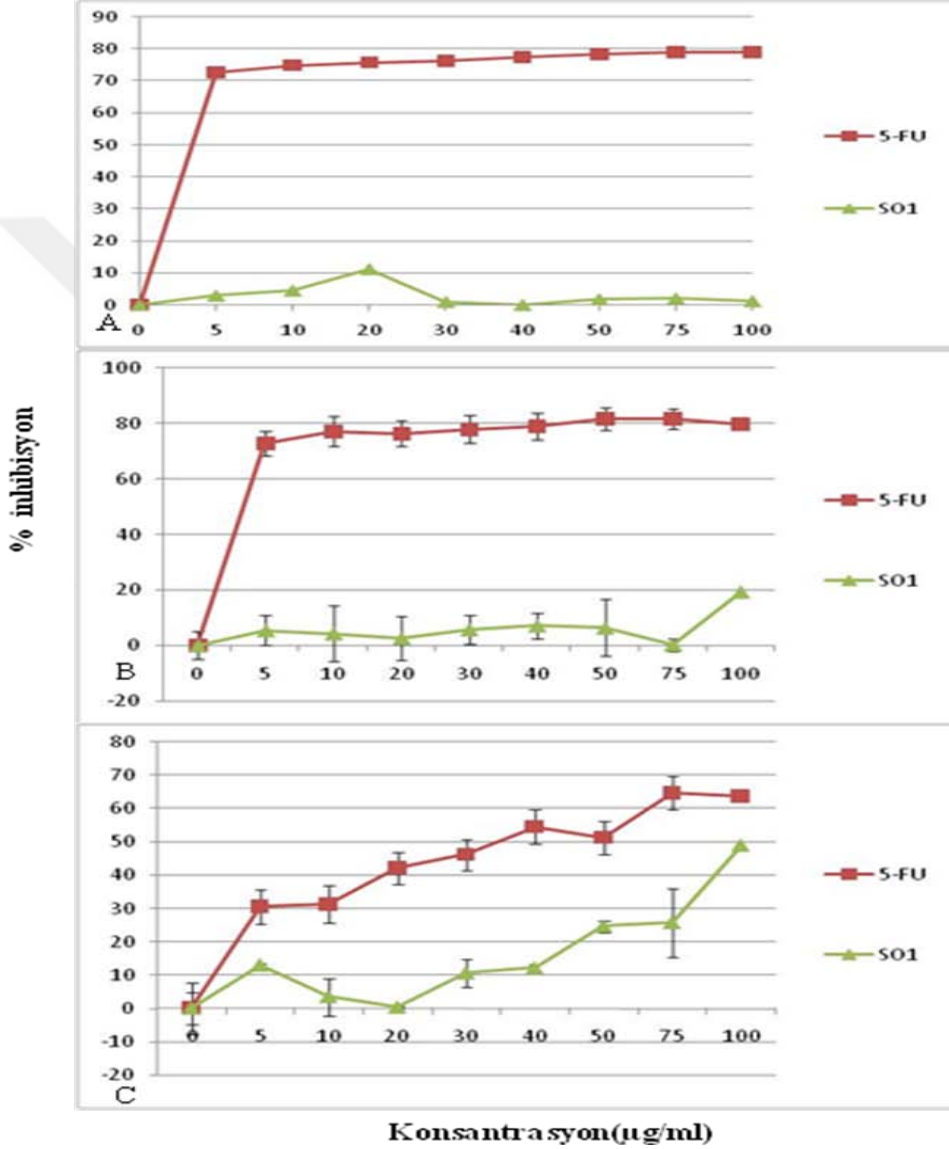
$$\% \text{ sitotoksosite} = [(\text{A test maddesi} - \text{düşük kontrol} / \text{yüksek kontrol} - \text{düşük kontrol})] \times 100$$

Ayrıca ortalamanın standart sapması (\pm SEM) ve serbestlik derecesi (\pm SD) değerleri de Excel programıyla bulundu. IC₅₀ değerleri % 95 güven aralığında XLfit (IDBS) programıyla belirlendi. Değerlerin varyans analizi ise SPSS (Statistic Program for Social and Science) programıyla one-way ANOVA testi uygulamasıyla hesaplandı. Varyans analizinde gruplar arasında oluşan farkın hangi gruptan kaynaklandığı ise *post-hoc* Tukey testiyle hesaplandı. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4 BULGULAR

4.1 BrdU Hücre Proliferasyon ELIZA Testi Sonuçları

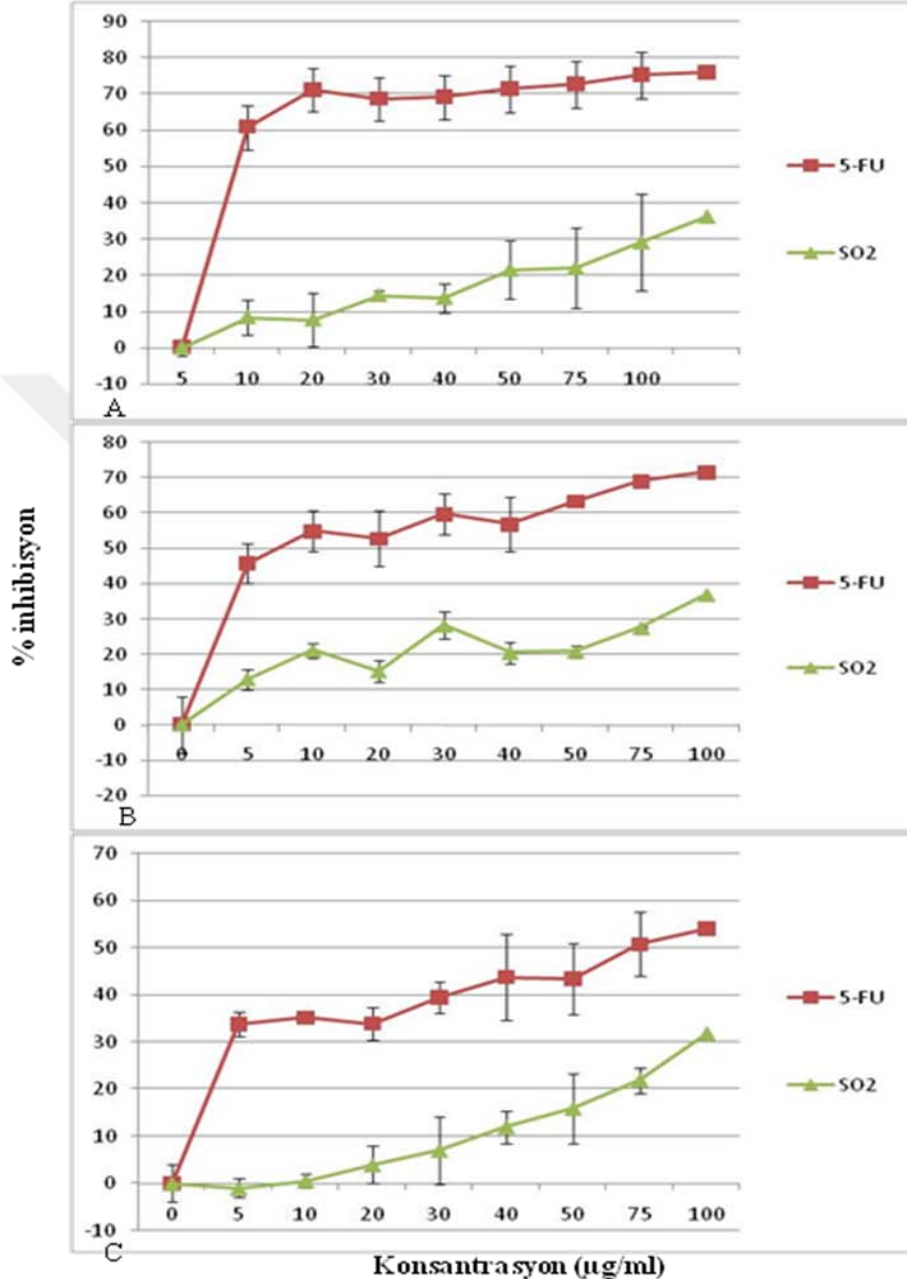
4.1.1 SO1 bileşiğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.1. SO1 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi (p<0,05)

Şekil 4.1’de elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO1 kodlu bileşik her üç hücre hattı üzerinde de % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU’ün üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

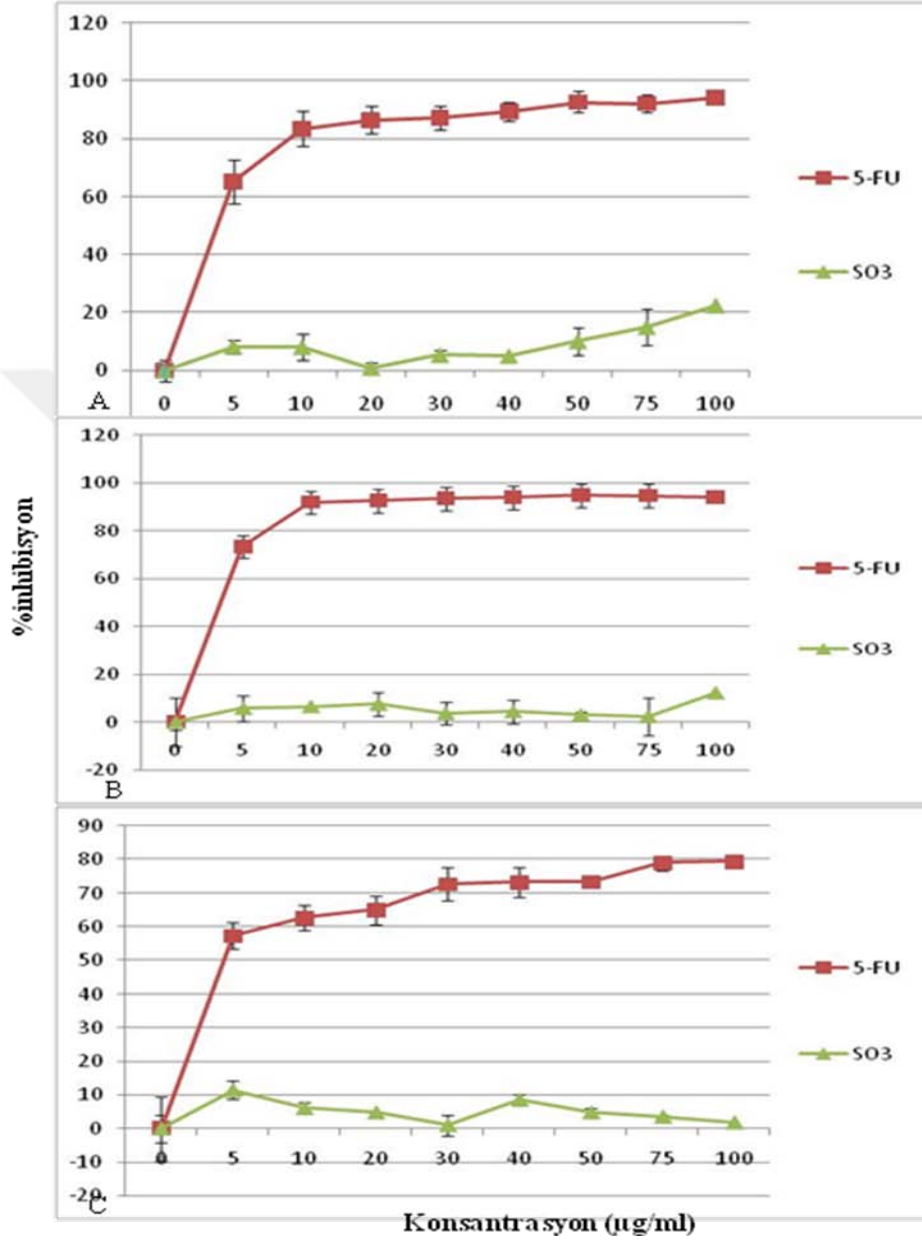
4.1.2 SO₂ bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.2. SO₂ ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi (p<0,05)

Şekil 4.2’de elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO₂ kodlu bileşik her üç hücre hattı üzerinde de % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU’ün üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

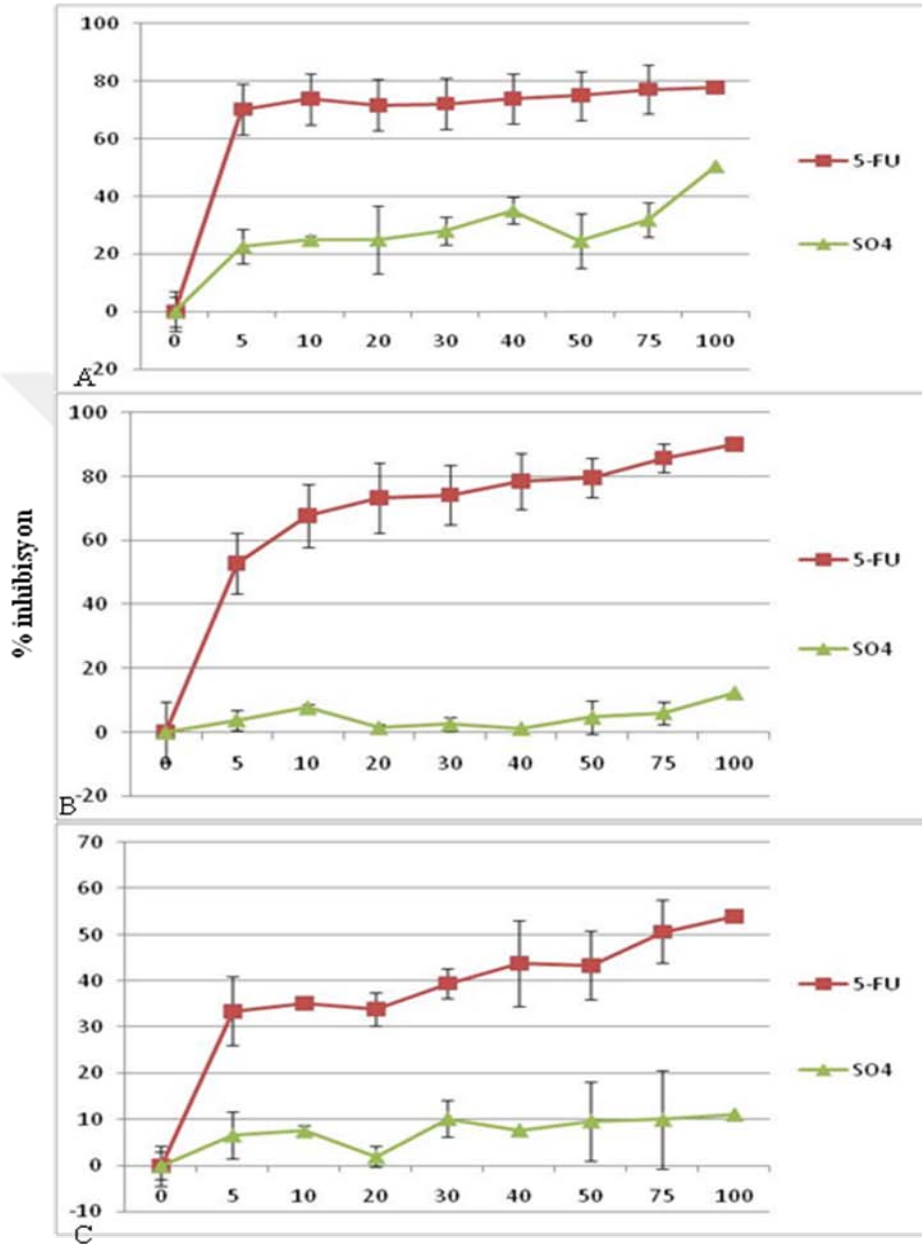
4.1.3 SO₃ bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.3. SO₃ ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi (p<0,05)

Şekil 4.3’de elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO₃ kodlu bileşik her üç hücre hattı üzerinde de % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU’ün üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

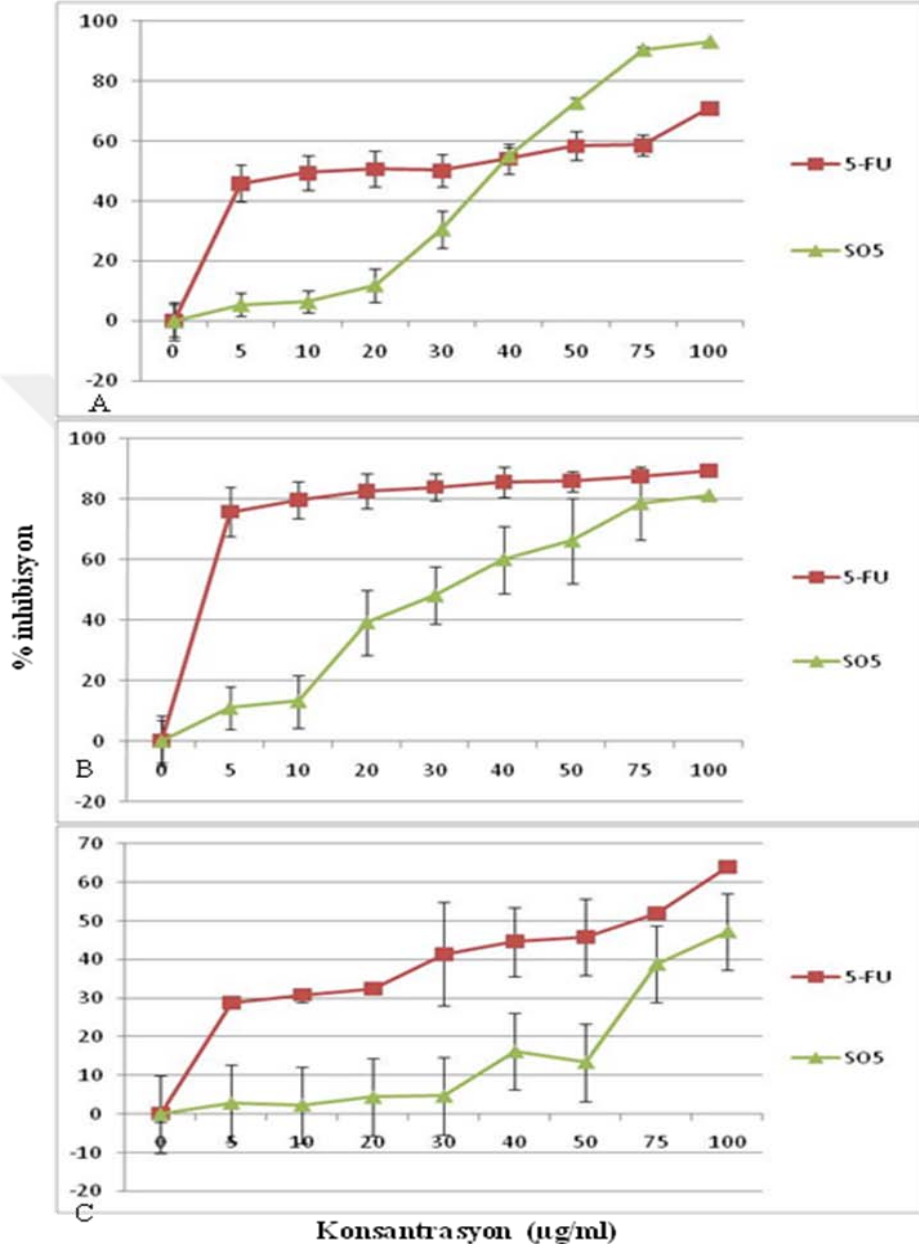
4.1.4 SO4 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.4. SO4 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.4.'de elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO3 kodlu bileşik her üç hücre hattı üzerinde de % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU'ın üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

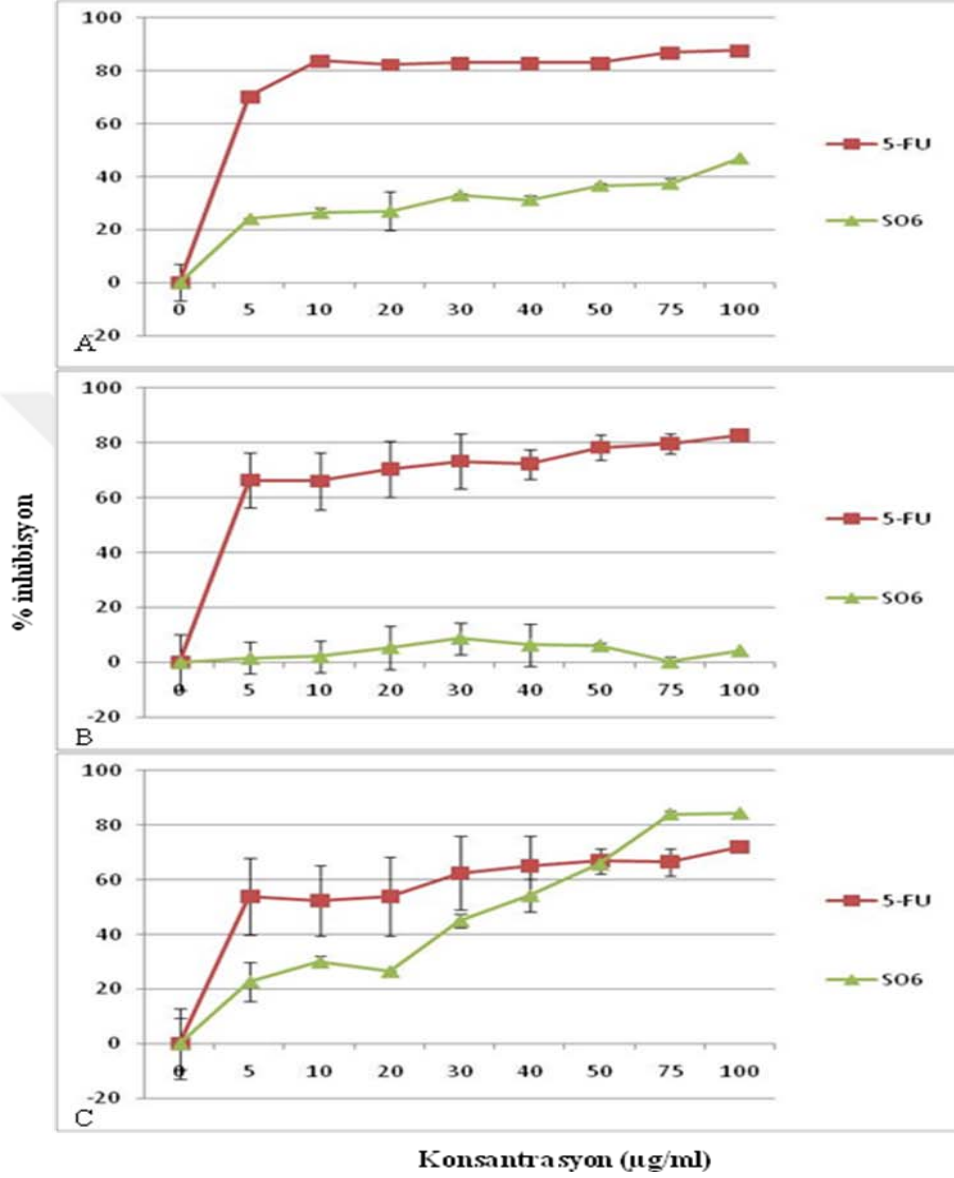
4.1.5 SO5 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.5. SO5 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.5.'de elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO5 kodlu bileşik C6 hücre hattı üzerinde 50µg/ml'de referans ilaç 5-FU'in üzerinde inhibisyon gösterirken, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU'in üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

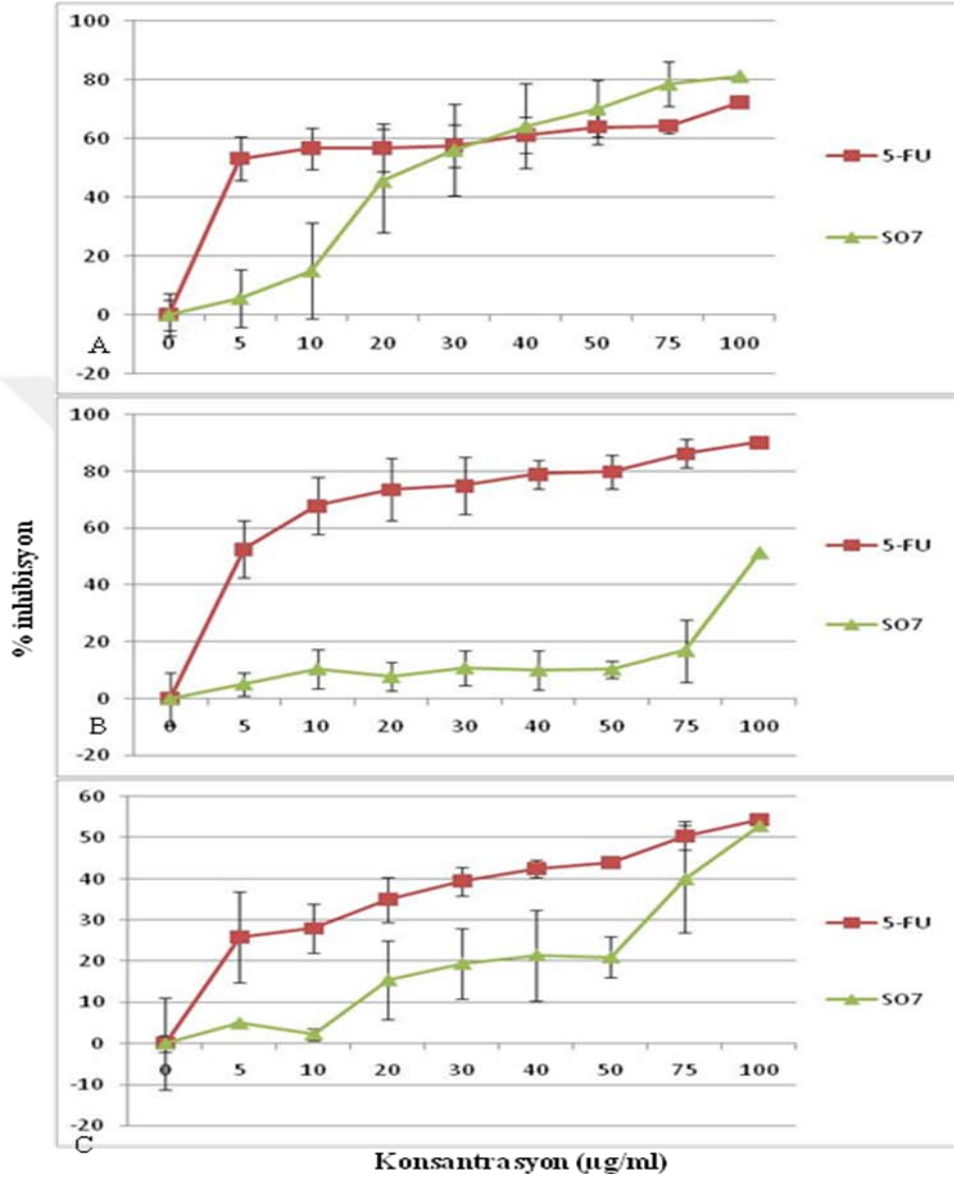
4.1.6 SO6 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.6. SO6 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.6.'da elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO6 kodlu bileşik HT29 hücre hattı üzerinde $50 \mu\text{g/ml}$ 'de referans ilaç 5-FU'ün üzerinde inhibisyon gösterirken, C6 ve HeLa hücre hatları üzerinde % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU'ün üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

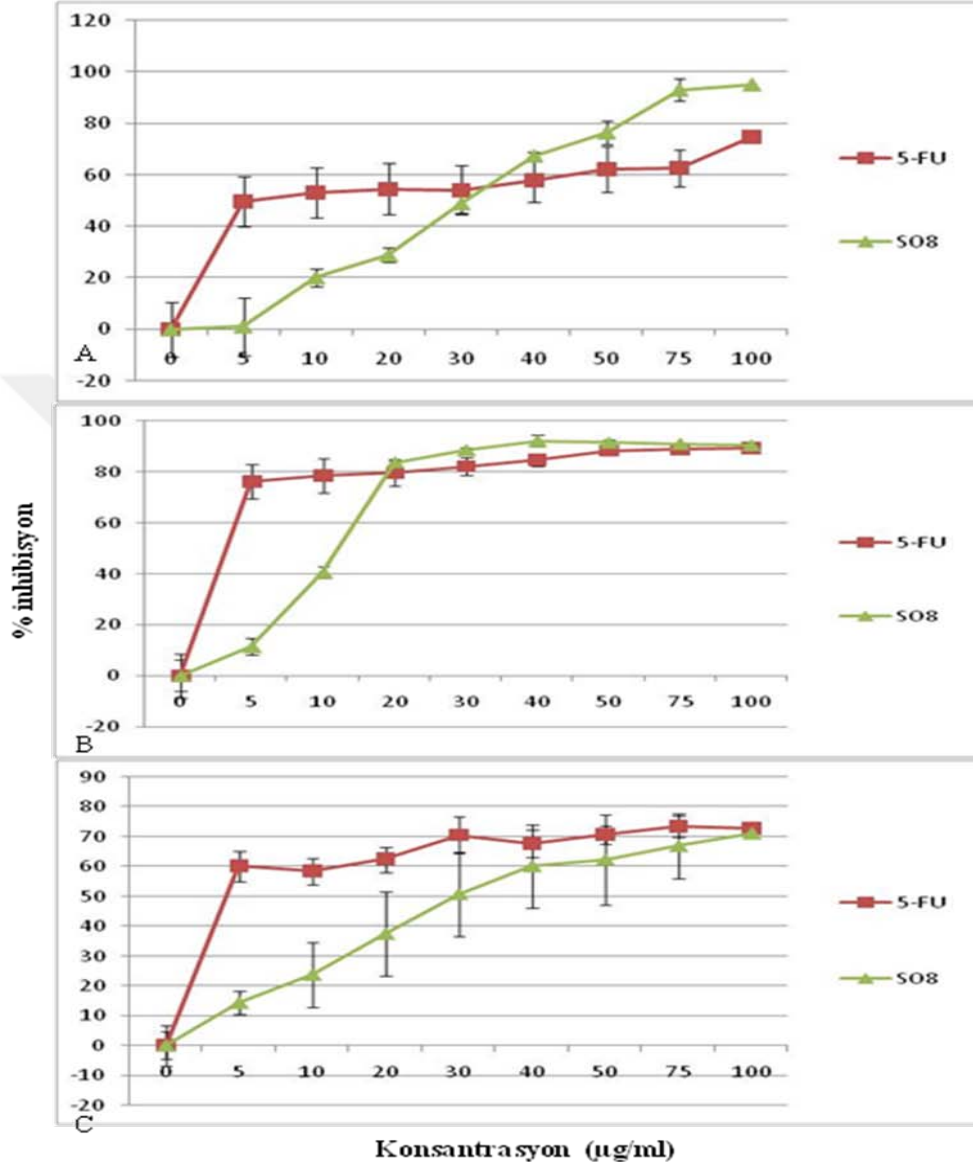
4.1.7 SO7 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.7. SO7 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.7.'de elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO7 kodlu bileşik HT29 hücre hattı üzerinde $30\mu\text{g/ml}$ 'de referans ilaç 5-FU'in üzerinde inhibisyon gösterirken, C6 ve HeLa hücre hatları üzerinde % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU'in üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

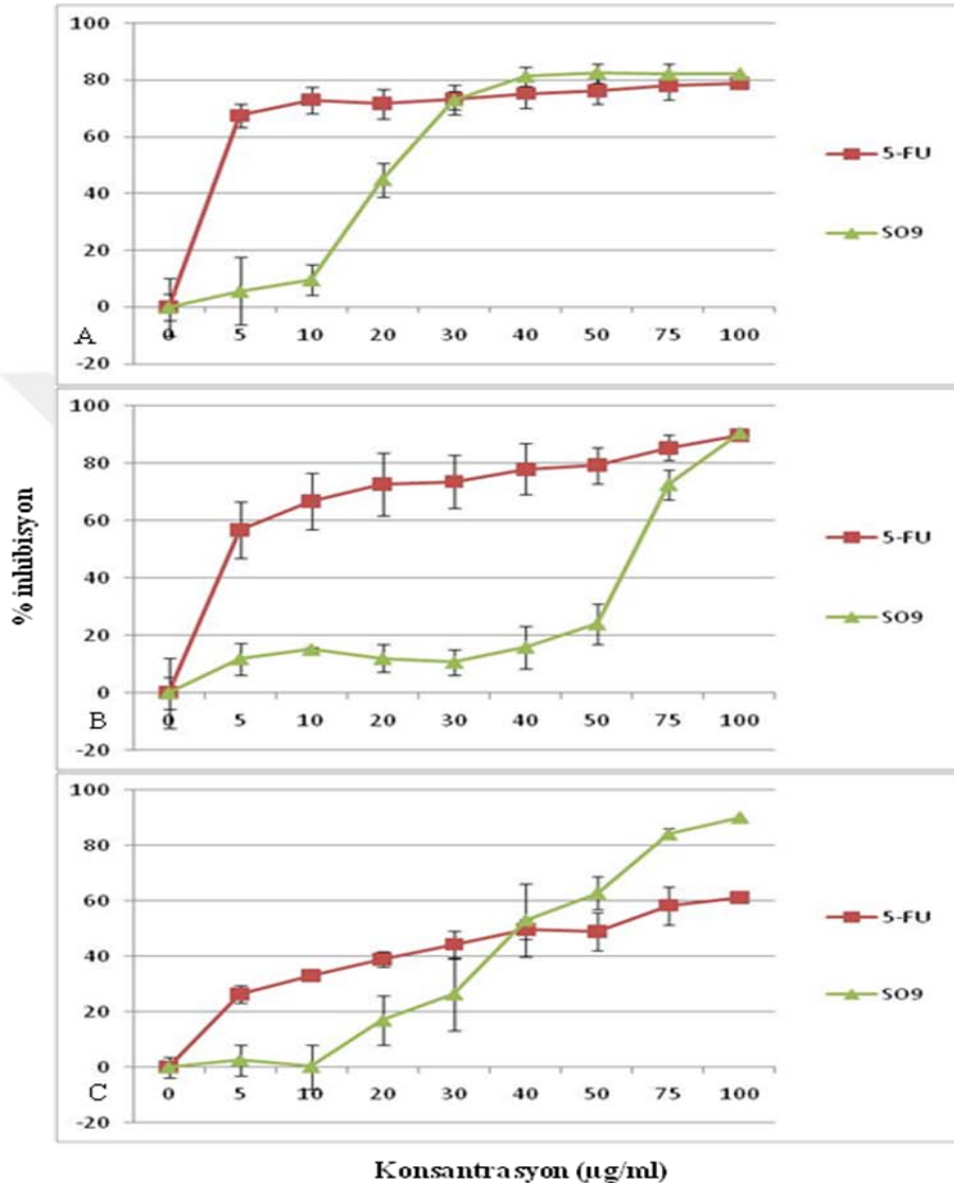
4.1.8 SO8 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.8. SO8 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.8.'de elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO8 kodlu bileşik C6 ve HeLa hücre hattı üzerinde 30µg/ml ve 20µg/ml'de referans ilaç 5-FU'in üzerinde inhibisyon gösterirken, HT29 hücre hattı üzerinde % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU'in üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

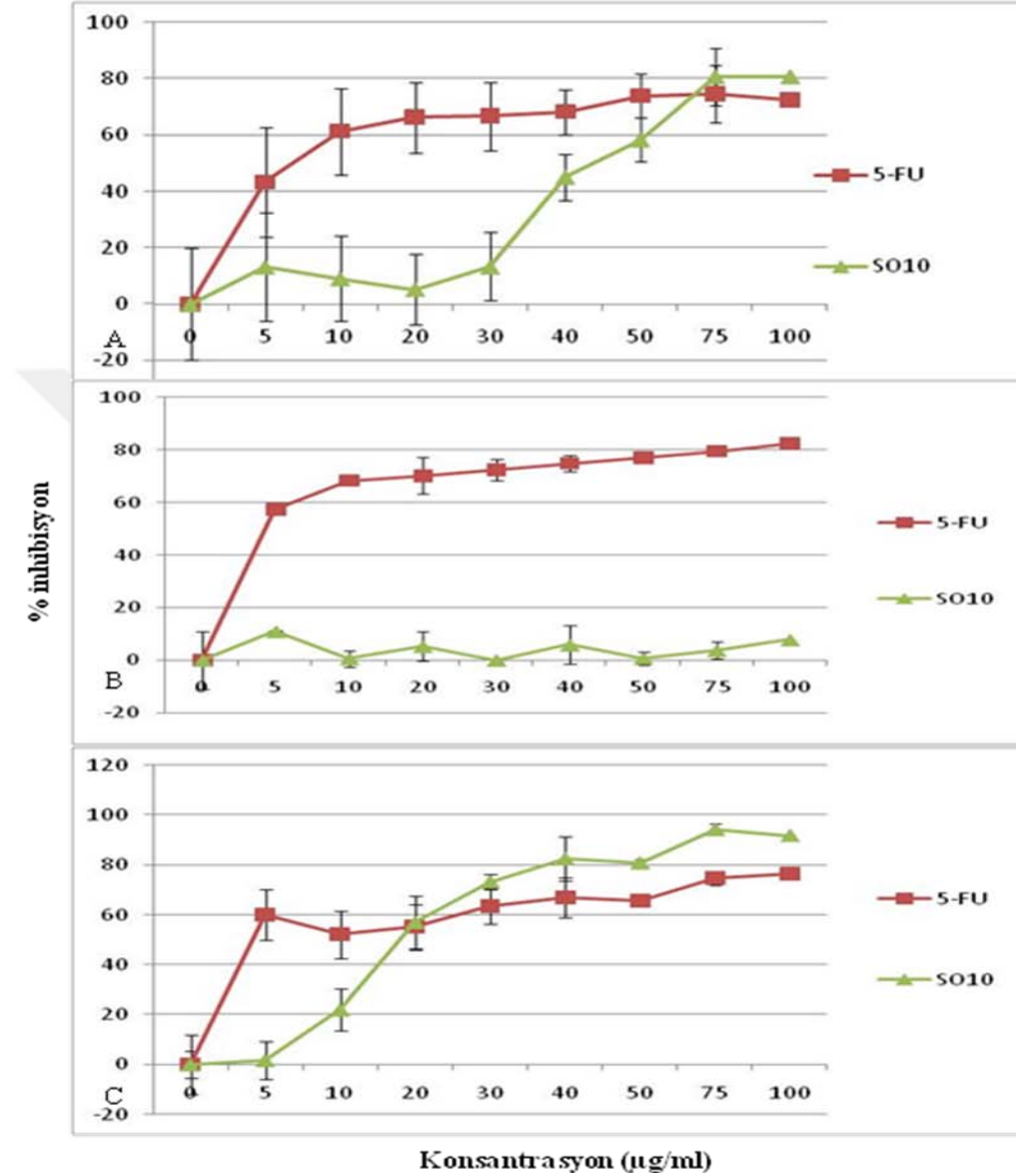
4.1.9 SO9 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.9. SO9 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.9.'da elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO9 kodlu bileşik C6 ve HT29 hücre hatları üzerinde $30\mu\text{g/ml}$ ve $40\mu\text{g/ml}$ 'de referans ilaç 5-FU'in üzerinde inhibisyon gösterirken, HT29 hücre hattı üzerinde % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU'in üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

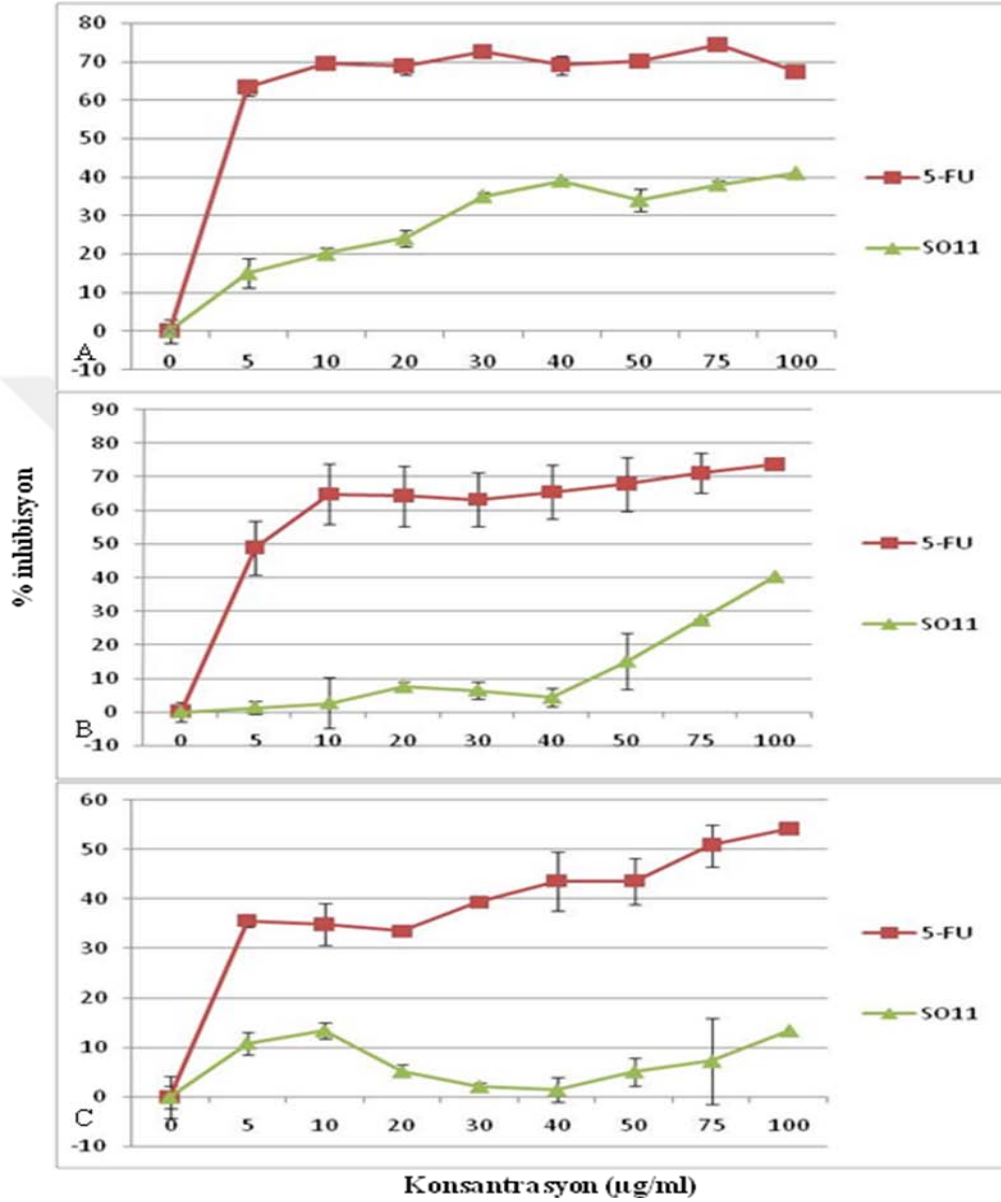
4.1.10 SO10 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.10. SO10 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.10.'da elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO10 kodlu bileşik C6 ve HT29 hücre hatları üzerinde $75\mu\text{g/ml}$ ve $20\mu\text{g/ml}$ 'de referans ilaç 5-FU'in üzerinde inhibisyon gösterirken, HeLa hücre hattı üzerinde % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU'in üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

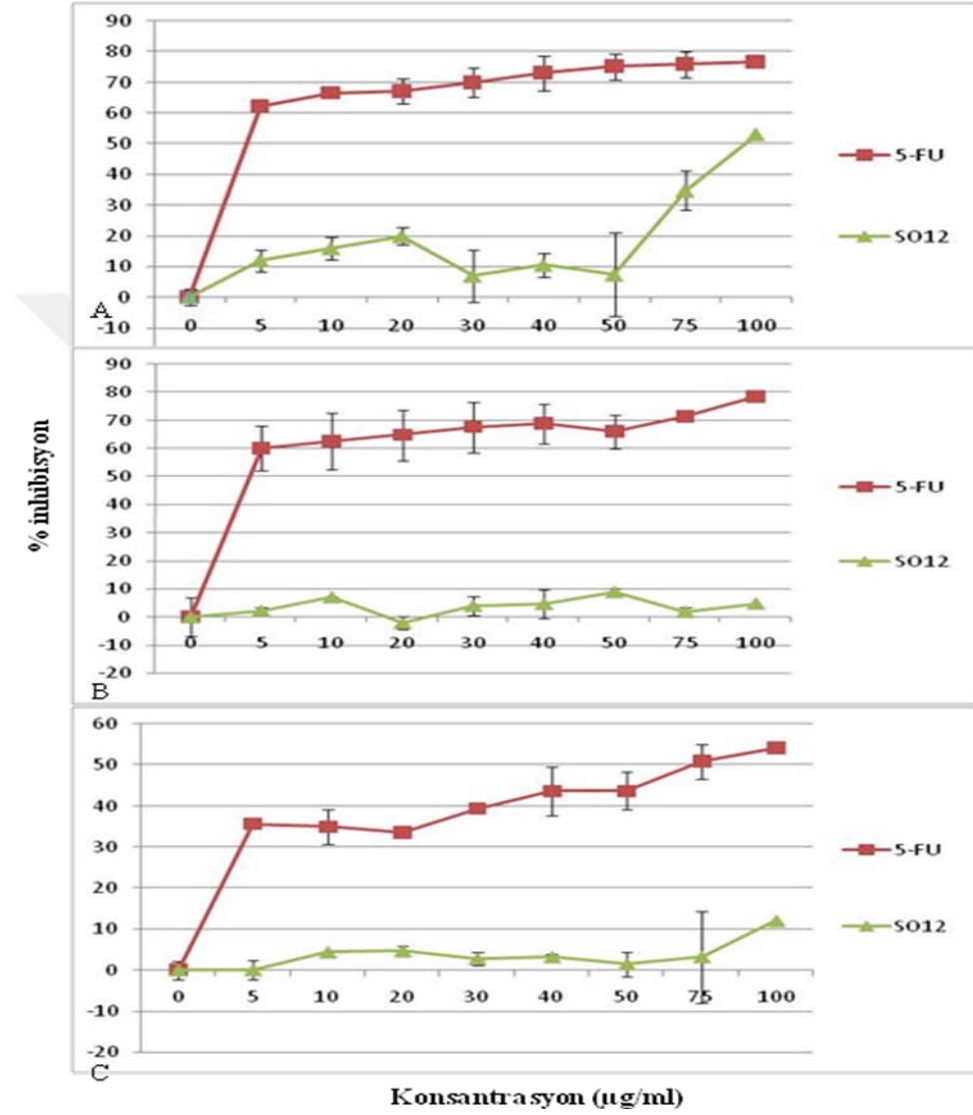
4.1.11 SO11 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.11. SO11 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.11.'de elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO11 kodlu bileşik her üç hücre hattı üzerinde de % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU'in üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

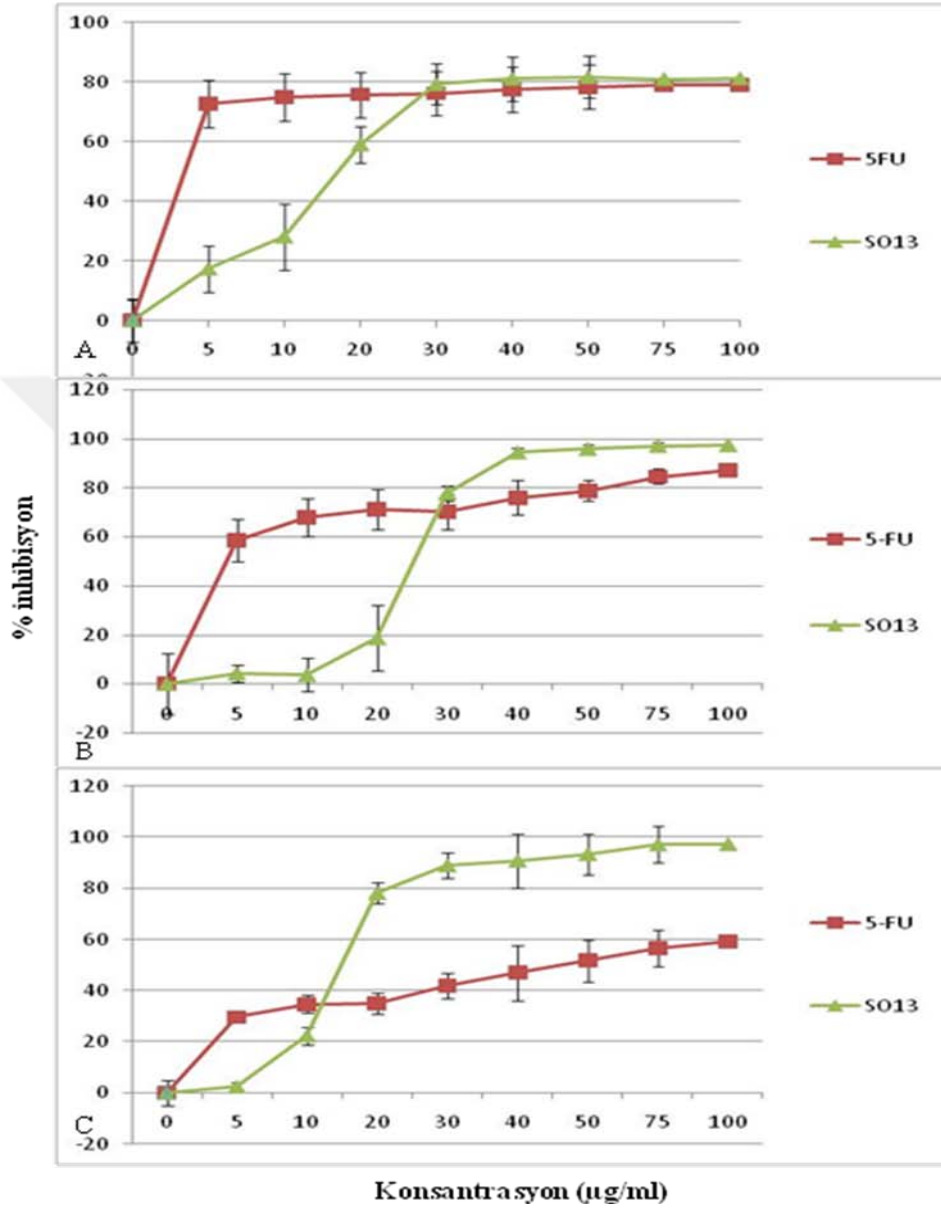
4.1.12 SO12 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.12. SO12 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.12’de elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO12 kodlu bileşik her üç hücre hattı üzerinde de % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU’ün üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

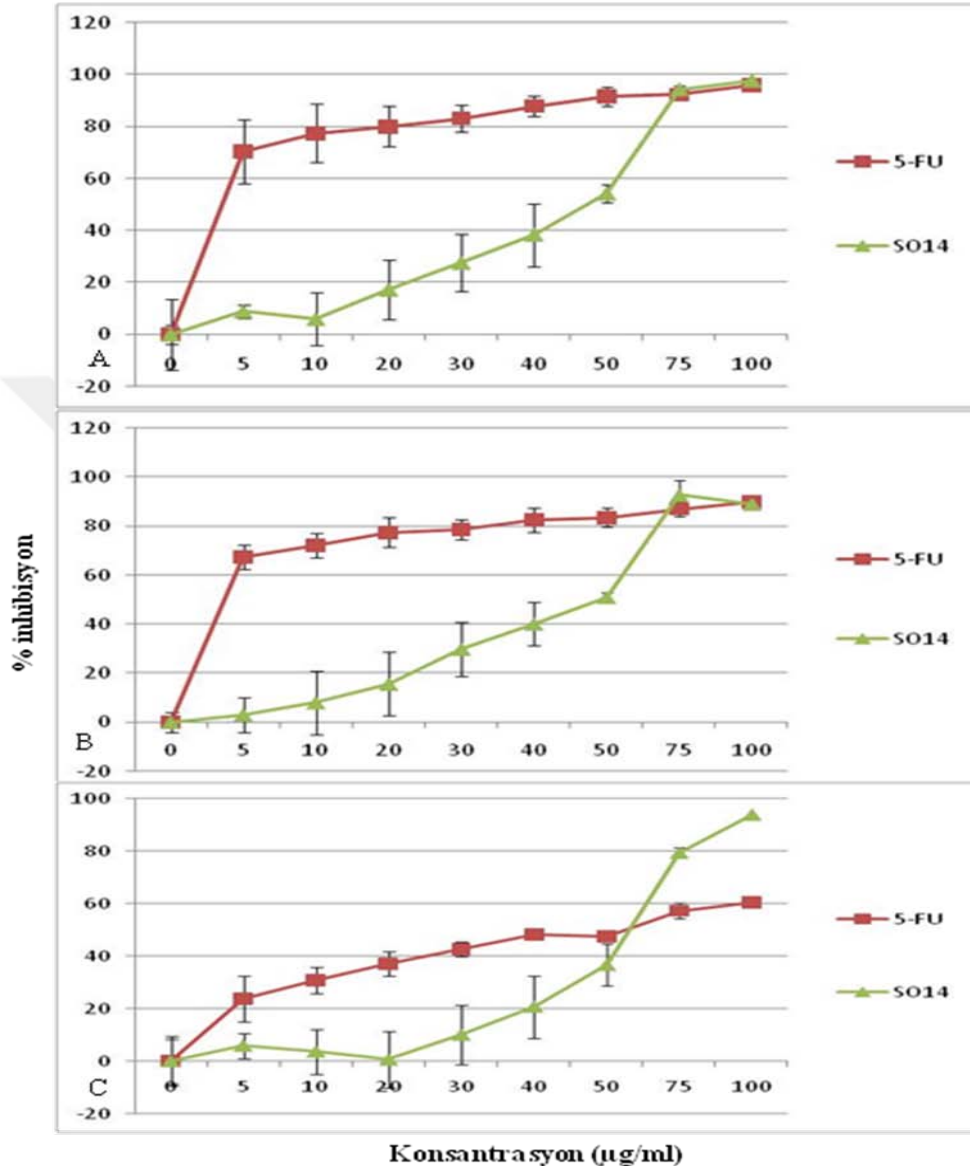
4.1.13 SO13 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.13. SO13 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.13'te elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO13 kodlu bileşik her üç hücre hattı üzerinde 30µg/ml ve 10µg/ml'de referans ilaç 5-FU'in üzerinde inhibisyon göstermiştir.

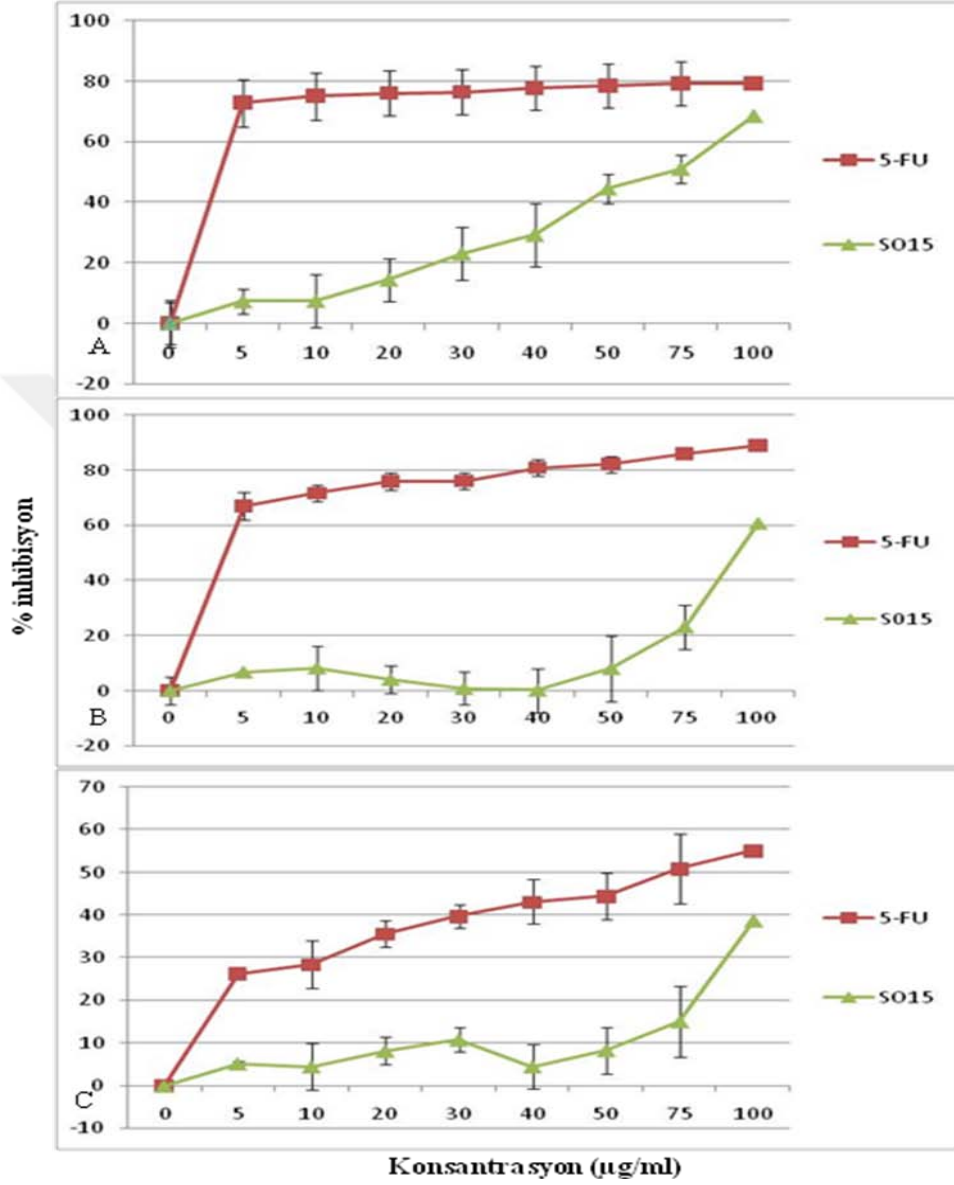
4.1.14 SO14 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.14. SO14 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.14'te elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO14 kodlu bileşik HT29 hücre hattı üzerinde 50µg/ml'de referans ilaç 5-FU'in üzerinde inhibisyon gösterirken, C6 ve HeLa hücre hattı üzerinde % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU'in üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

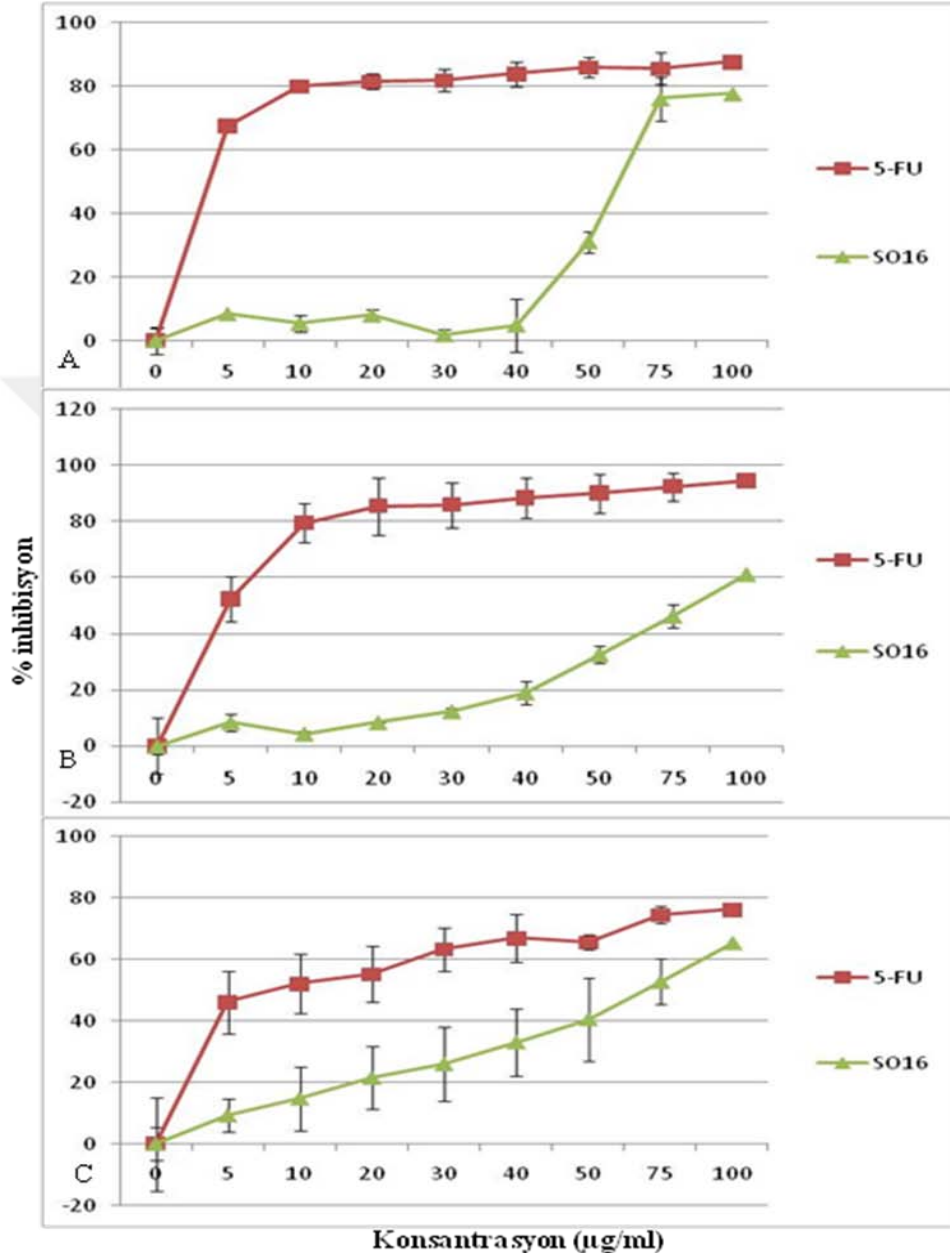
4.1.15 SO15 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.15. SO15 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.15'te elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO15 kodlu bileşik her üç hücre hattı üzerinde de % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU'ın üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

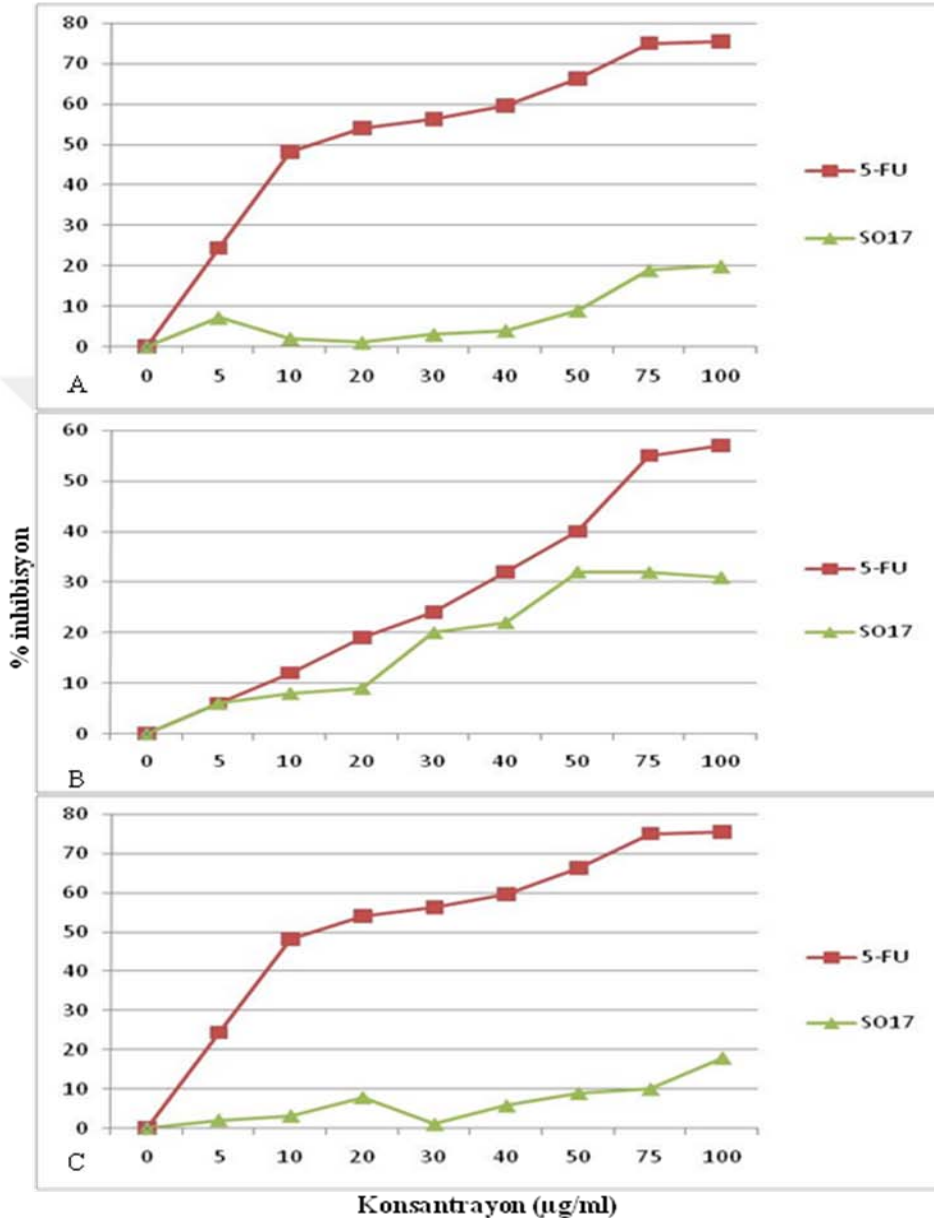
4.1.16 SO16 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.16. SO16 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.16'de elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO16 kodlu bileşik her üç hücre hattı üzerinde de % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU'ün üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

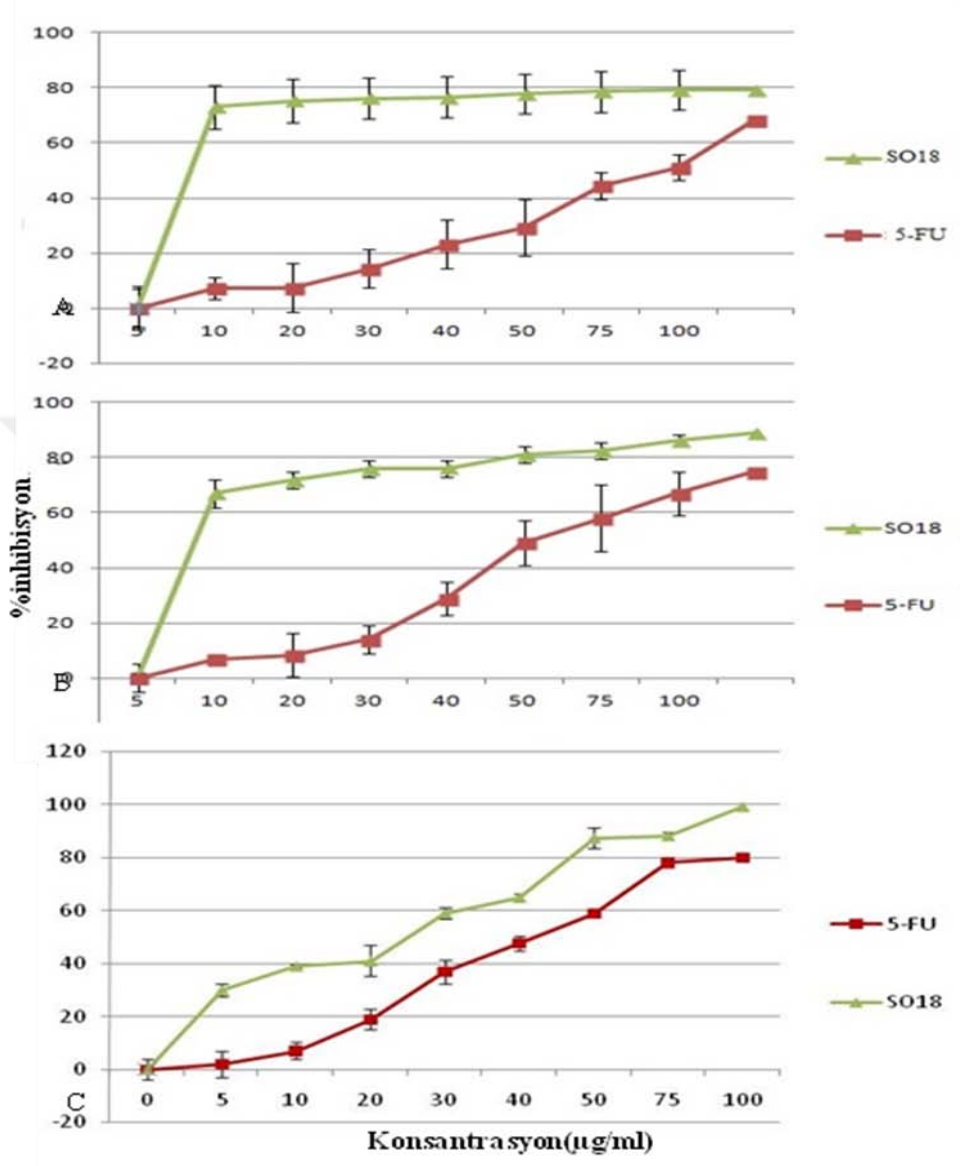
4.1.17 SO17 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.17. SO17 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.17’de elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO17 kodlu bileşik her üç hücre hattı üzerinde de % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU’ın üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

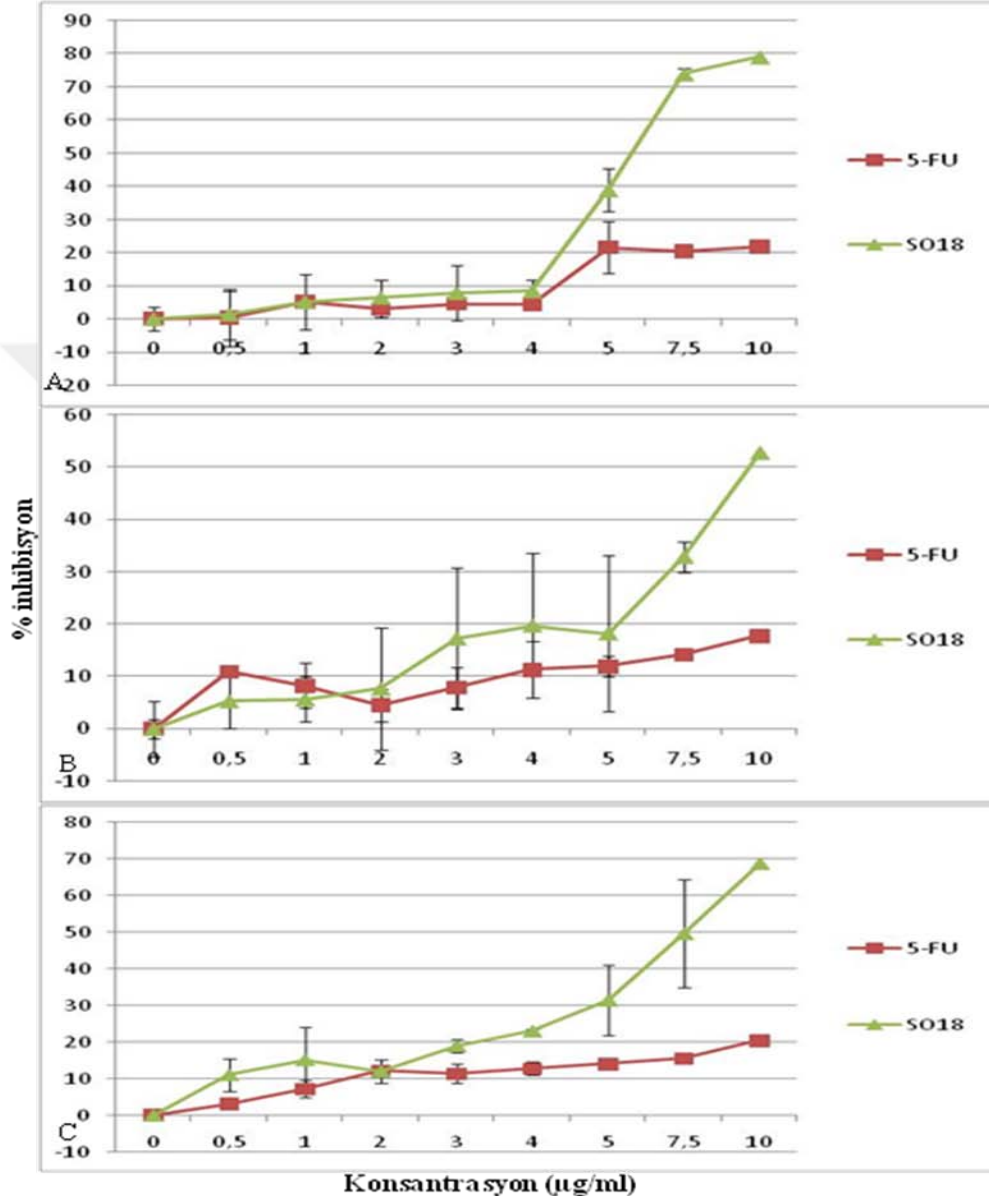
4.1.18 SO18 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.18. SO18 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.18’de elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO18 kodlu bileşik her üç hücre hattı üzerinde de 5µg/ml’nin altında değerlerde referans ilaç 5-FU’den daha yüksek inhibisyon göstermiştir.

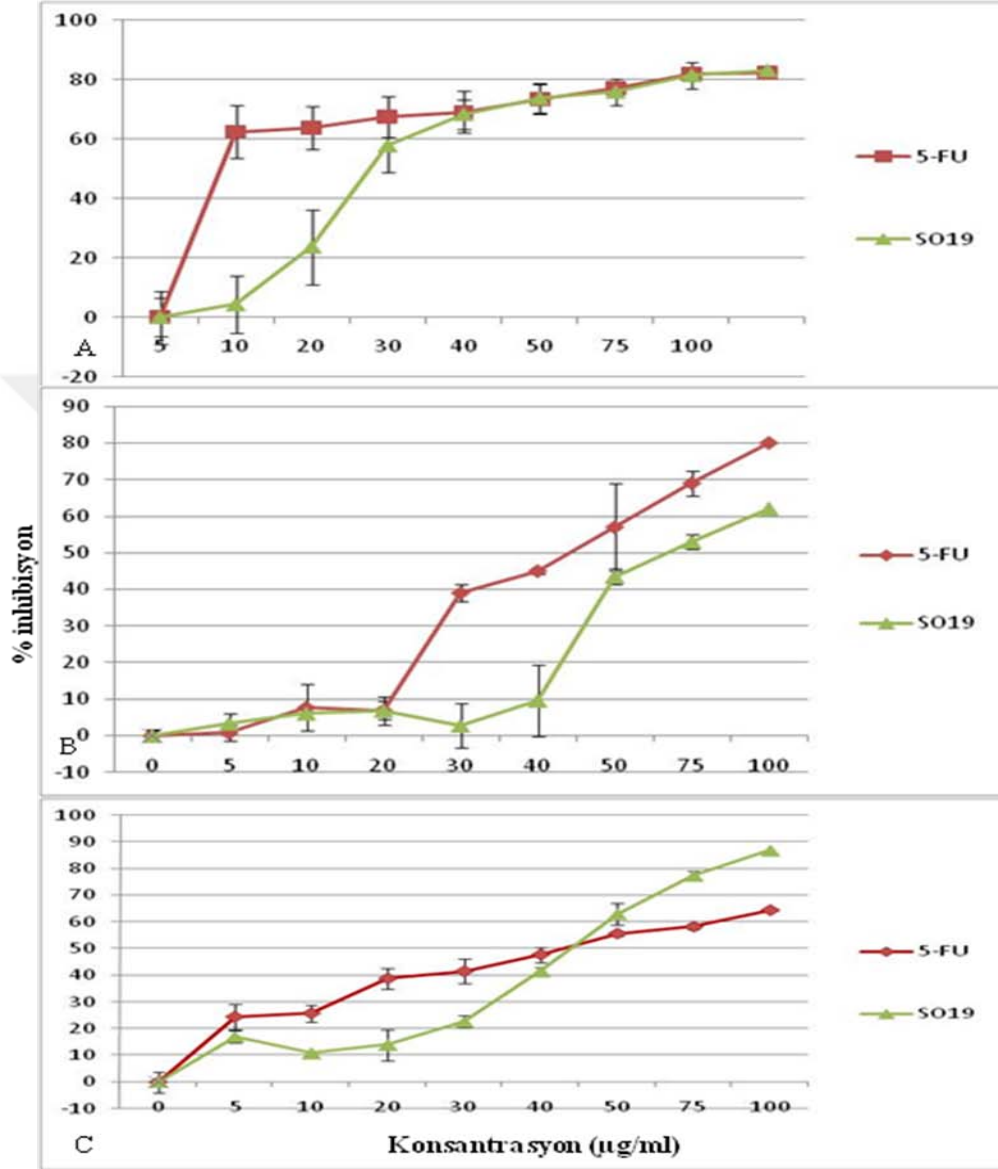
4.1.19 SO18 bileşiminin C6(A), HeLa(B) ve HT29(C) hücre hatlarında 0,5 µg/ml – 10 µg/ml dozları arasında antiproliferatif aktiviteleri



Şekil 4.19. SO18 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin 0,5µg/ml-10µg/ml dozlarında hücre proliferasyon testi belirlenmesi (p<0,05)

Şekil 4.19’da elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre yapılan 0,5µg/ml-10µg/ml doz testi çalışmalarında SO18 kodlu bileşik her üç hücre hattı üzerinde de ortalama 2µg/ml’de referans ilaç 5-FU’den daha yüksek inhibisyon göstermiştir.

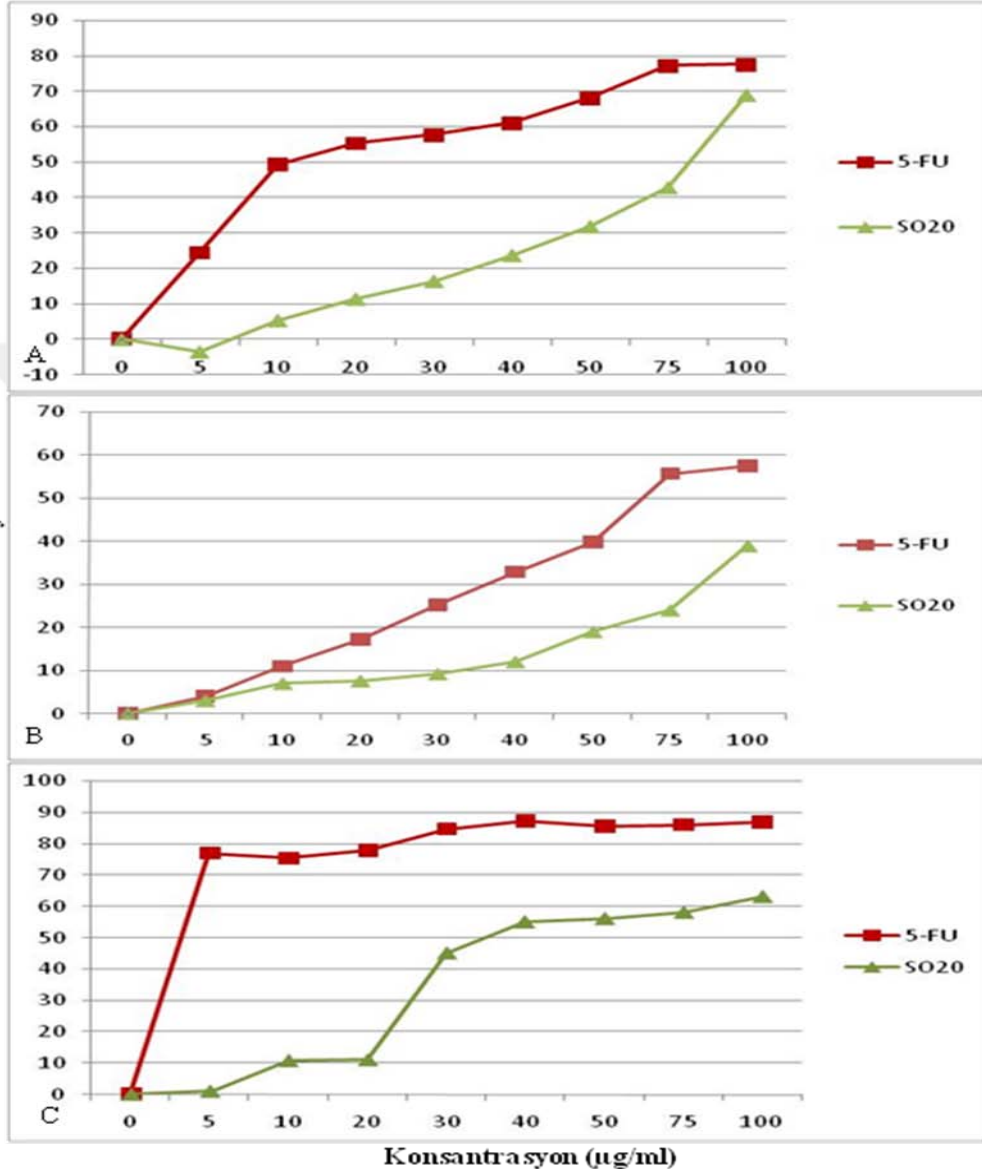
4.1.20 SO19 bileşiminin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.20. SO19 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.20’de elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO19 kodlu bileşik HT29 hücre hattı üzerinde 50µg/ml’de referans ilaç 5-FU’ün üzerinde inhibisyon gösterirken, C6 ve HeLa hücre hattı üzerinde % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU’in üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

4.1.21 **SO20** (3-Br-6,8-DiPhQ) bileşğinin C6, HeLa ve HT29 hücre hatları üzerinde antiproliferatif aktivitesi



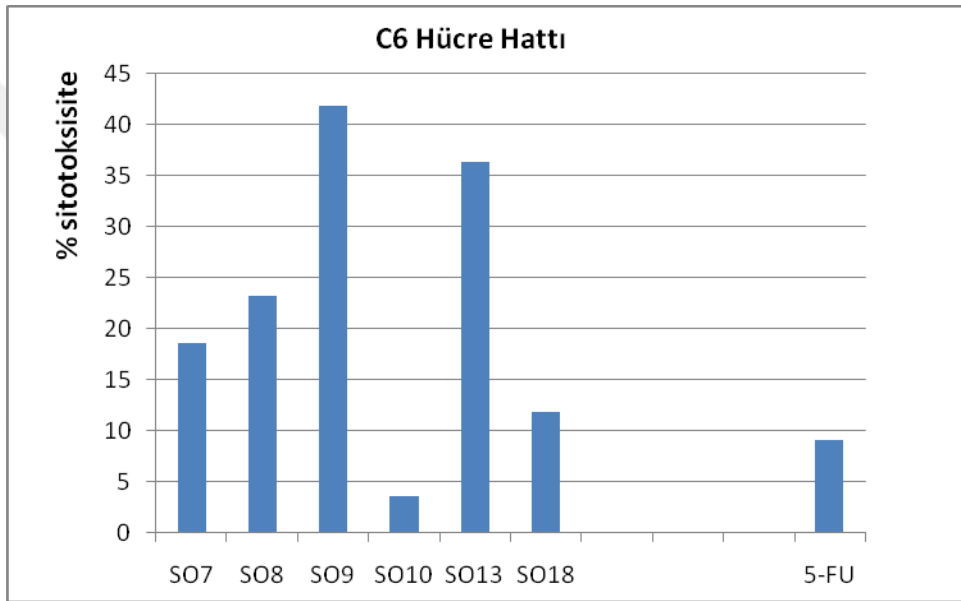
Şekil 4.21. SO20 ve 5-FU (pozitif kontrol) bileşiklerin C6 (A), HeLa (B) ve HT29 (C) hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivitelerinin hücre proliferasyon testi belirlenmesi ($p < 0,05$)

Şekil 4.21’de elde edilen hücre proliferasyon testi sonuçlarına göre SO20 kodlu bileşik her üç hücre hattı üzerinde de % inhibisyon değeri referans ilaç 5-FU’ın üzerinde bir etki göstermemiş ve hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir.

4.2 Yeni Sentezlenmiş Bazı Kinolin Bileşiklerinin Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çalışmada yeni sentezlenen kinolin türevi bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri LDH sitotoksisite test kiti kullanılarak belirlendi.

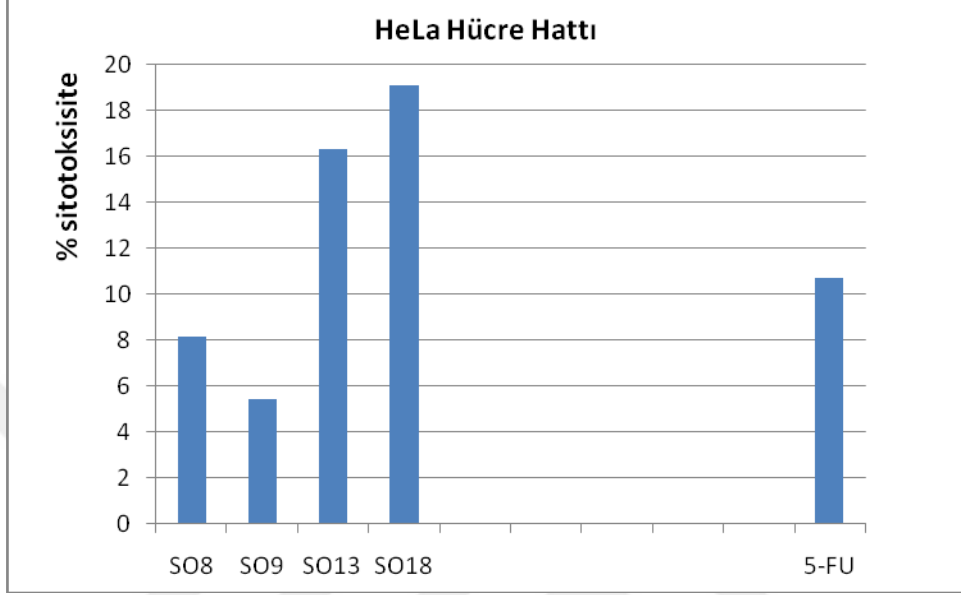
4.2.1 SO7, SO8; SO9, SO10, SO13, SO18 kodlu bileşiklerin C6 hücre hattı üzerinde sitotoksik aktivite testi sonuçları



Şekil 4.22. C6 hücre hattı üzerinde SO7, SO8; SO9, SO10 SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin sitotoksik aktivitelerini gösteren grafik

Şekil 4.22’de elde edilen sitotoksik aktivite sonuçlarına göre SO10 kodlu bileşik referans ilaç 5-FU’den daha az sitotoksik aktivite gösterirken, antiproliferatif aktivitesi en yüksek bileşik olan SO18 referans ilaçla yakın sitotoksisite göstermiştir. Diğer bileşiklerin ise referans bileşikten daha sitotoksik olduğu saptandı.

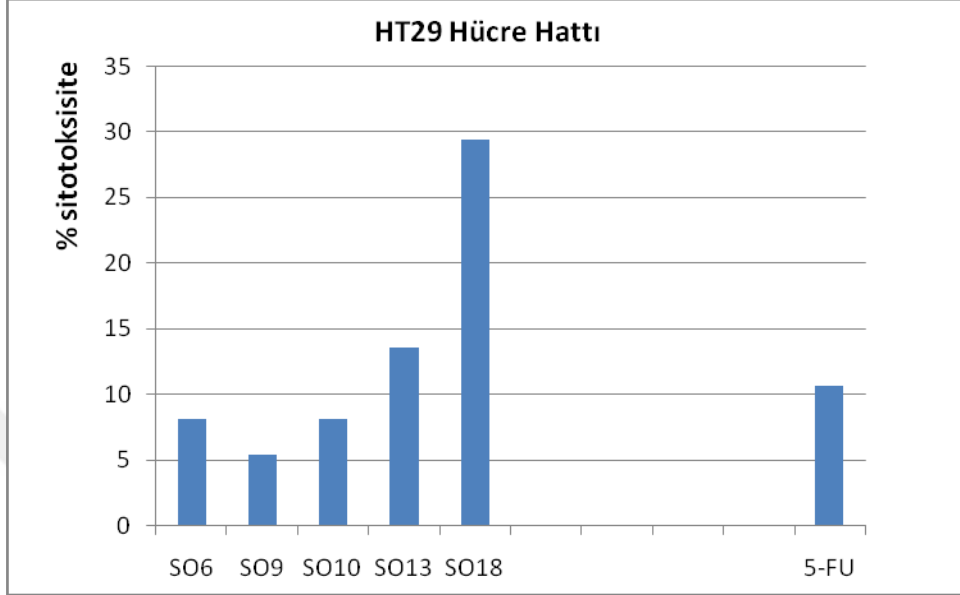
4.2.2 SO8; SO9, SO13, SO18 kodlu bileşiklerin HeLa hücre hattı üzerinde sitotoksik aktivite testi sonuçları



Şekil 4.23. HeLa hücre hattı üzerinde SO13, SO9 ve SO8 kodlu bileşiklerin sitotoksik aktivitelerini gösteren grafik

Şekil 4.23’de elde edilen sitotoksik aktivite sonuçlarına göre SO8 ve SO9 kodlu bileşikler referans ilaç 5-FU’den daha az sitotoksik aktivite gösterirken, diğer bileşiklerin ise referans bileşikten daha sitotoksik olduğu belirlendi.

4.2.3 SO6, SO9, SO10, SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin HT29 hücre hattı üzerinde sitotoksik aktivite testi sonuçları

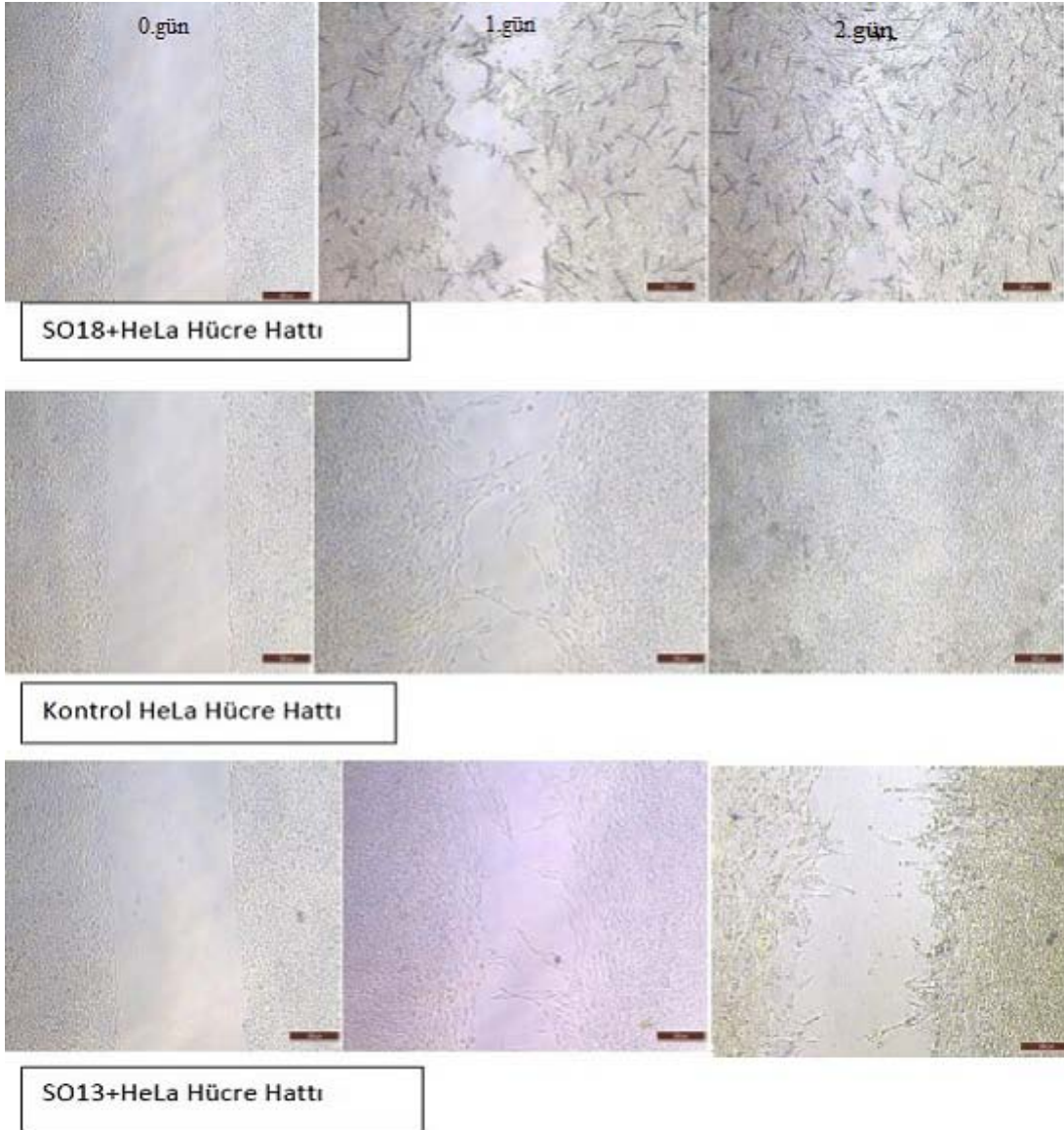


Şekil 4.24. HT29 hücre hattı üzerinde SO13, SO10, SO9 ve SO6 kodlu bileşiklerin sitotoksik aktivite gösteren grafik

Şekil 4.24’de elde edilen sitotoksik aktivite sonuçlarına göre antiproliferatif aktivitesi en yüksek bileşik olan SO18 referans ilaçtan daha sitotoksik bulunurken, diğer bileşiklerin ise referans bileşikten daha az sitotoksik olduğu gözlemlendi.

4.3 SO13 ve SO18 Kodlu Bileşiklerin HeLa Hücrelerinin Migrasyonuna Etkileri

SO13 ve SO18 kodlu kinolin bileşiklerinin HeLa hücrelerinin migrasyonuna etkisi migrasyon testiyle araştırıldı. Deney sonucu SO13 ve SO18 bileşiklerinin HeLa hücrelerinin migrasyonunu engellediğini gösterdi (Şekil 4.33).



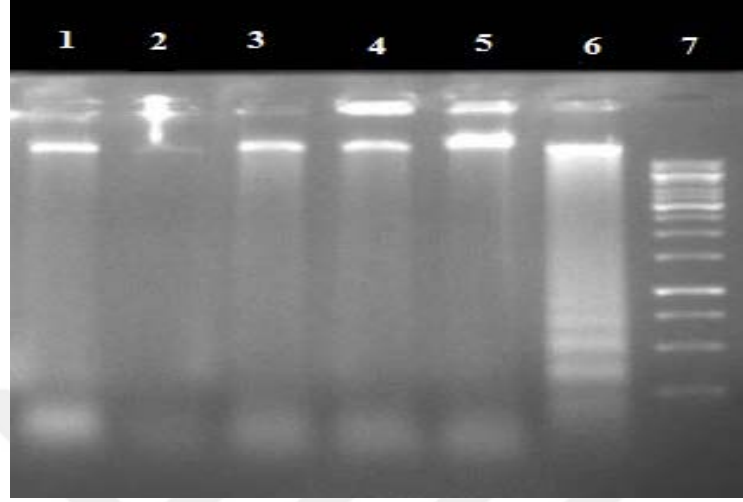
Şekil 4.25 Yeni sentezlenen SO13 ve SO18 kodlu kinolin bileşiklerinin HeLa hücrelerinin migrasyonuna etkisi. Aralarında 500 μ M boşluk bulunan HeLa hücreleri kinolin bileşikleriyle muamele edildikten 0, 24 ve 48. saatten sonra hücrelerin 500 μ M'lik boşluğa doğru migrasyonları fotoğraflandı

Hücre migrasyon testi sonuçlarına göre SO13 ve SO18 kodlu moleküllerin kontrol hücre hattıyla karşılaştırıldığında hücre migrasyonunu durdurdukları tespit edildi.

4.4 DNA Degredasyon / Bantlaşma Testi Sonuçları

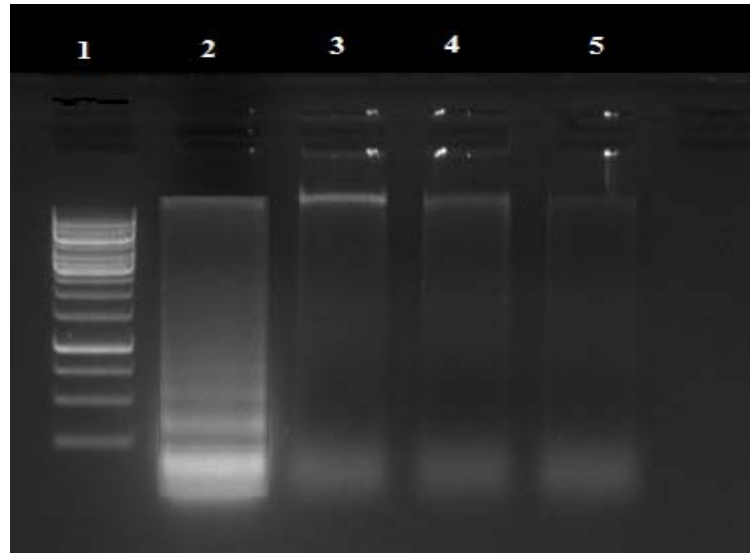
Bileşiklerin apoptozu uyarıcı potansiyellerinin varlığını belirlemek üzere DNA degredasyon (DNA bantlaşma) testi kullanıldı. Bu amaçla yeni kinolin türevleri ve kontrol bileşik 5-FU ile muamele edilen C6, HT29 ve HeLa hücrelerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra agaroz jel elektroforezi koşturularak DNA bantlaşması tespit edildi.

4.4.1 SO7, SO8, SO9, SO10, SO13 ve SO18 bileşiklerinin C6 hücre hattı üzerinde DNA bantlaşma aktivitesi



Şekil 4.26. SO7, SO8, SO9, SO10 bileşiklerinin DNA degradasyon aktivitesi. Kinolin türevleriyle muamele edilen C6 hücrelerinden izole edilen DNA, agaroz jel elektroforezinde koşturuldu

1-C6+SO8; 2-C6+SO9; 3-C6+SO10; 4-C6+SO7; 5-C6 Kontrol; 6-C6 (+) kontrol; 7-Marker. İnkübasyon süresi 24 saattir

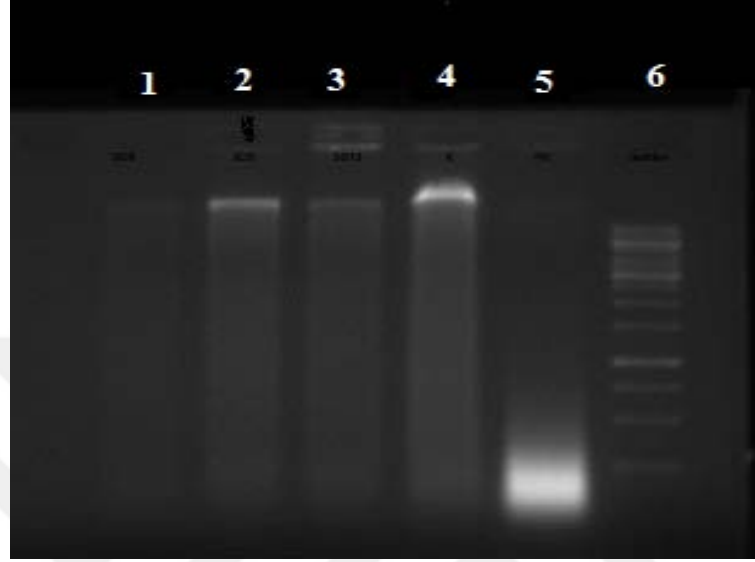


Şekil 4.27. SO13 ve SO18 bileşiklerinin DNA degradasyon aktivitesi. Kinolin türevleriyle muamele edilen C6 hücrelerinden izole edilen DNA, agaroz jel elektroforezinde koşturuldu

1-Marker; 2-C6 (+) kontrol; 3-C6 kontrol; 4-C6+SO18; 5-C6+SO13 İnkübasyon süresi 24 saattir

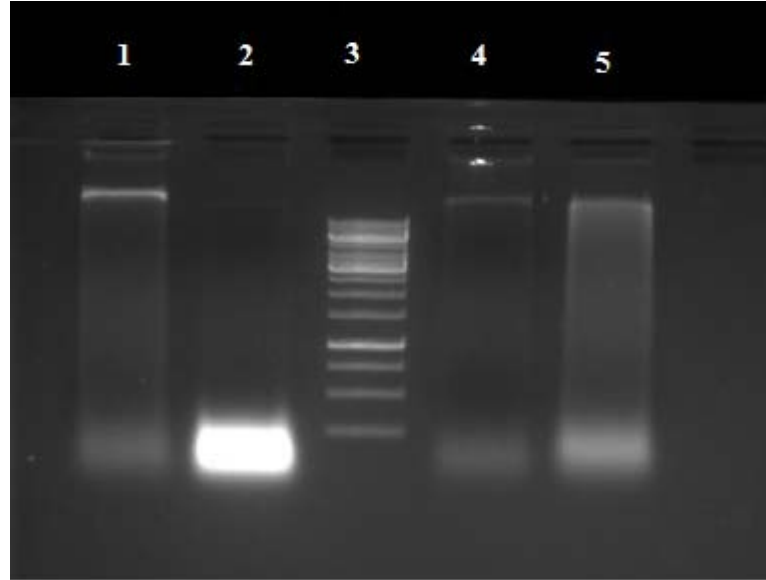
Şekil 4.26 ve 4.27’de elde edilen jel görüntülerinde sentezlenen kinolin türevlerinin C6 hücre hattı üzerinde DNA degradasyona neden olmadığı belirlendi.

4.4.2 SO8, SO9, SO13 ve SO18 bileşiklerinin HeLa hücre hattı üzerinde DNA bantlaşma aktivitesi



Şekil 4.28. SO8, SO9, SO13 bileşiklerinin DNA degradasyon aktivitesi. Kinolin türevleriyle muamele edilen HeLa hücrelerinden izole edilen DNA, agaroz jel elektroforezinde koşturuldu

1-HeLa+SO8; 2-HeLa+SO9; 3-HeLa+SO13; 4-HeLa kontrol; 5-HeLa (+) kontrol; 6-Marker. İnkübasyon süresi 24 saattir

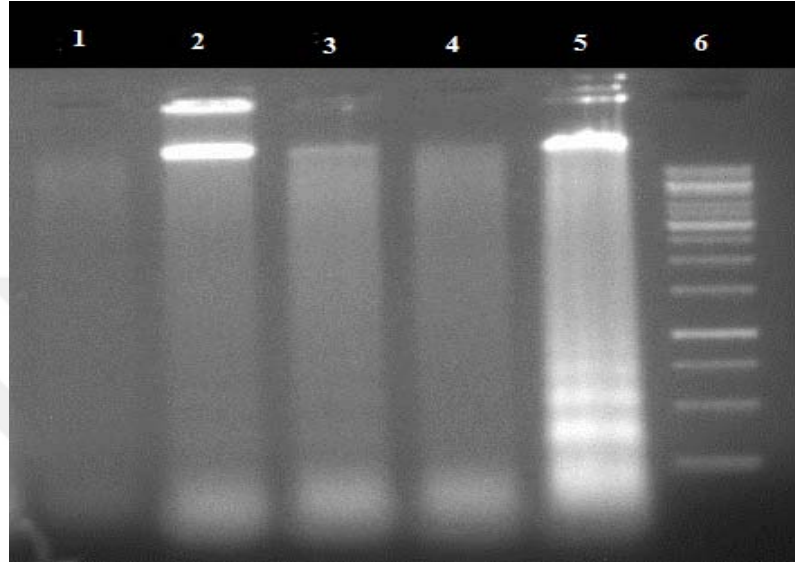


Şekil 4.29. SO13 ve SO18 bileşiklerinin DNA degradasyon aktivitesi. Kinolin türevleriyle muamele edilen HeLa hücrelerinden izole edilen DNA, agaroz jel elektroforezinde koşturuldu

1-HeLa kontrol; 2-HeLa+(+)kontrol; 3-Marker; 4-HeLa+SO18; 5-HeLa+SO13. İnkübasyon süresi 24 saattir

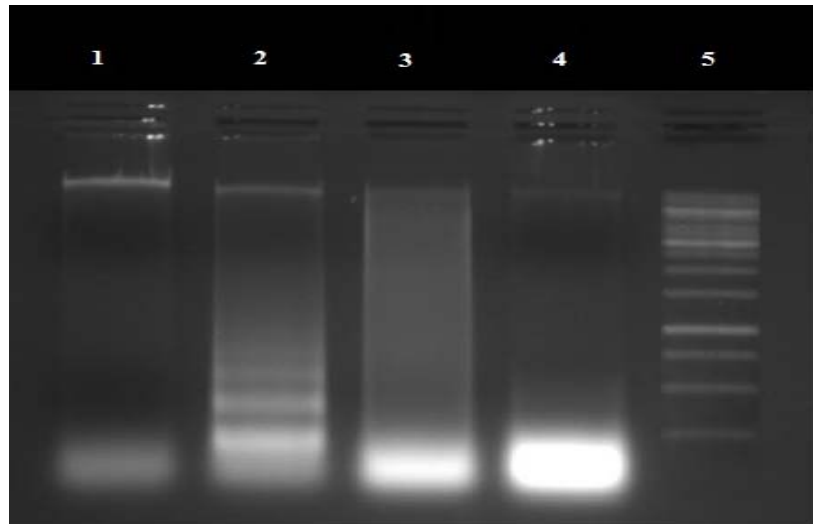
Şekil 4.28 ve 4.29’da elde edilen jel görüntülerinde sentezlenen kinolin türevlerinin HeLa hücre hattı üzerinde DNA degradasyona neden olmadığı belirlendi.

4.4.3 SO6, SO9, SO10, SO13 ve SO18 bileşiklerinin HT29 hücre hattı üzerinde DNA bantlaşma aktivitesi



Şekil 4.30. SO6, SO9, SO10 bileşiklerinin DNA degradasyon aktivitesi. Kinolin türevleriyle muamele edilen HT29 hücrelerinden izole edilen DNA, agaroz jel elektroforezinde koşuruldu

1-HT29+SO6; 2-HT29+SO9; 3-HT29+SO10; 4-HT29 kontrol; 5-HT29 (+) kontrol; 6-Marker. İnkübasyon süresi 24 saattir



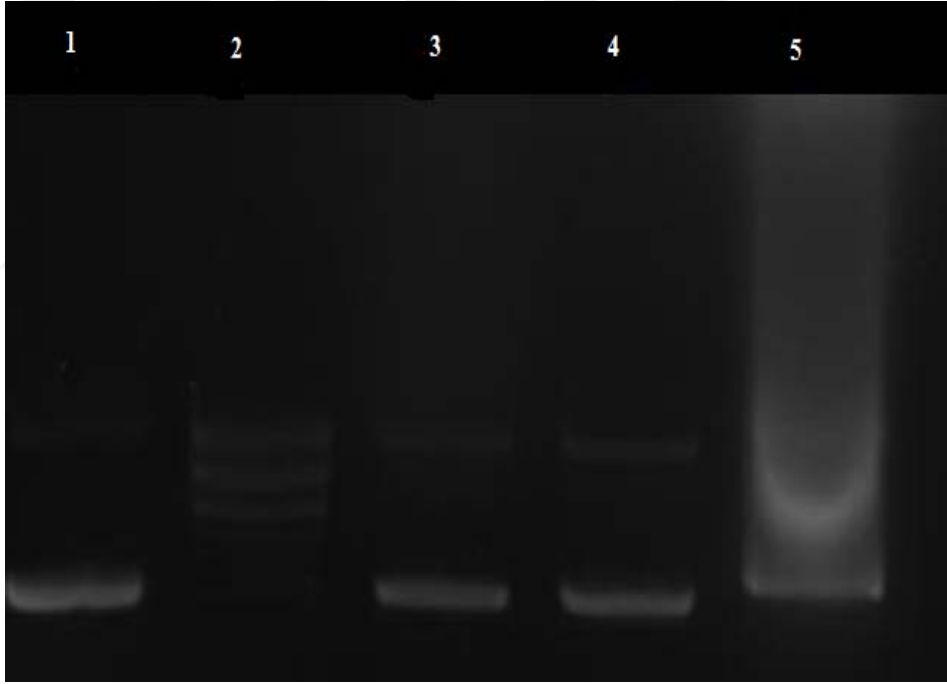
Şekil 4.31. SO13 ve SO18 bileşiklerinin DNA degradasyon aktivitesi. Kinolin türevleriyle muamele edilen HT29 hücrelerinden izole edilen DNA, agaroz jel elektroforezinde koşuruldu

1-HT29 kontrol; 2-HT29 (+) kontrol; 3-Marker; 4-HT29+SO18; 5-HT29+SO13. İnkübasyon süresi 24 saattir

Sonuç olarak Şekil 4.30 ve 4.31’de elde edilen jel görüntülerinde SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin HT29 hücre hattı üzerinde apoptozun bir göstergesi olan DNA bantlaşmasına neden olduğu görüldü.

4.5 SO13 ve SO18 Kodlu Bileşiklerin Topoizomeraz I Fonksiyonunu Baskılayıcı Aktiviteleri

SO13 ve SO18 kodlu kinolin bileşiklerinin Topoizomeraz I fonksiyonunu baskılayıcı özellikleri Topoizomeraz I inhibisyon deneyiyle belirlendi. Deney sonucu SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin Topoizomeraz I fonksiyonunu baskıladıklarını gösterdi (Şekil 4.32).

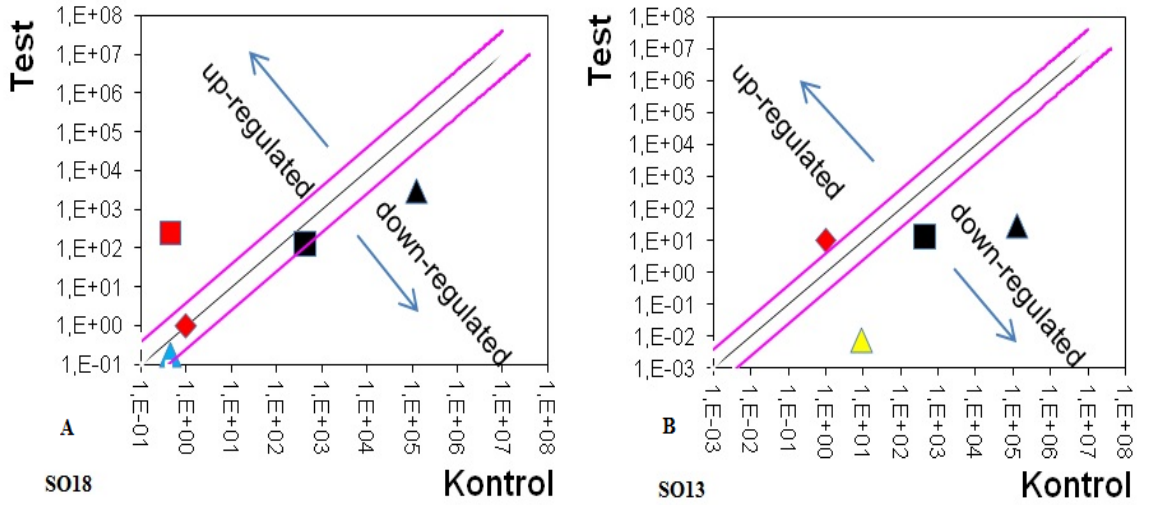


Şekil 4.32. SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin Topoizomeraz I aktivitesi üzerine etkisi

1-supersarmal Marker DNA, 2- Negatif Kontrol (pHOT1 DNA+ Topo I), 3-Pozitif kontrol (pHOT1 DNA + Kamptotesin); 4- SO13+pHOT1 DNA+Topo I, 5- SO18+PHO

4.6 SO13 ve SO18 Bileşiklerinin HT29 Hücre Hattında Bazı Genlerin Ekspresyonuna Olan Etkileri

SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin BAX, BCL2, HRK, NFKB1 ve SOCS genlerinin ekspresyonlarına olan etkileri real-time ready gen ekspresyon paneli kullanılarak test edildi (Şekil 4.33).



◆	ACTB	■	BAX	▲	BCL2
▲	HRK	■	NFKB1	▲	SOCS2

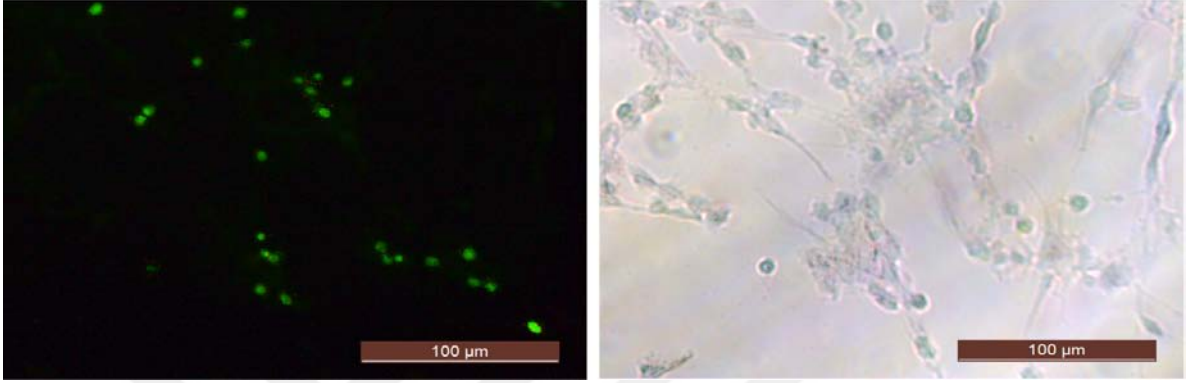
Şekil 4.33. SO13 ve SO18'in dağılım plot grafikleri

Siyah çizgi ($2^{-\Delta Ct}$) değerinin 1'e göre değişim miktarını, pembe çizgi gen ifadenme eşliğindeki değişim miktarını göstermektedir. Testler log fazında eksponansiyel büyüme gösteren HT29 hücre hatları kullanılarak yapılmış olup inkübasyon süresi 24 saattir. Test maddeleri IC₅₀ değerinde kullanıldı. ACTB, Housekeeping genidir

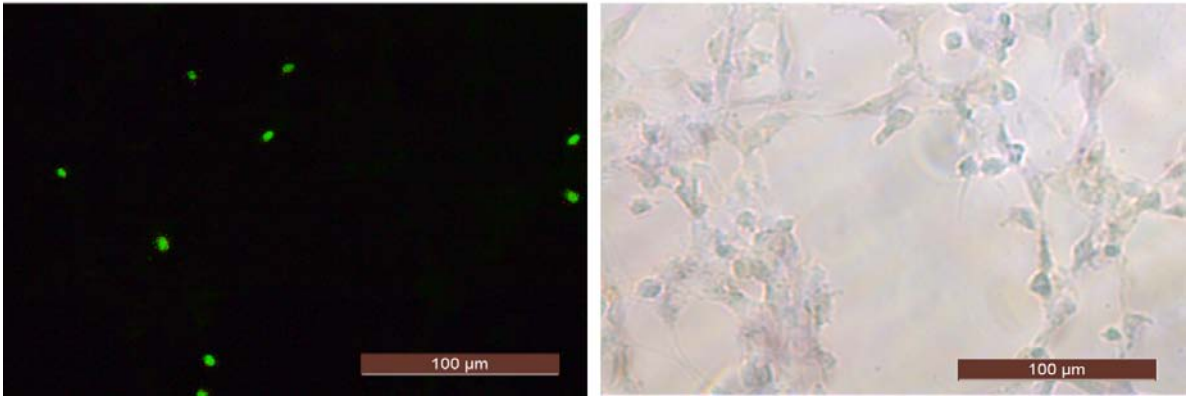
Şekil 4.33.A'da gösterilen gen ifadenme analiz sonuçlarına göre SO18 kodlu molekül BAX geninde up-regülasyonuna neden olmuşken Bcl-2 geninde down-regülasyona neden olduğu görüldü. Diğer genlerde önemli bir değişim gözlenmedi. Bu sonuçlar göre SO18 kodlu bileşiğin apoptotik yolağı aktive eden BAX genini artırdığı, apoptotik yolağı inhibe eden Bcl-2 genini azalttığı belirlendi. Şekil 4.33.B'de gösterilen gen

ifadelenme analiz sonuçlarına göre SO13 kodlu molekül Bcl-2, SOCS-2 ve NFKB1 genlerinin down-regülasyonuna neden olarak hücrenin apoptoza girmesine neden olan yolların aktivasyonuna neden olduğu tahmin edilmektedir.

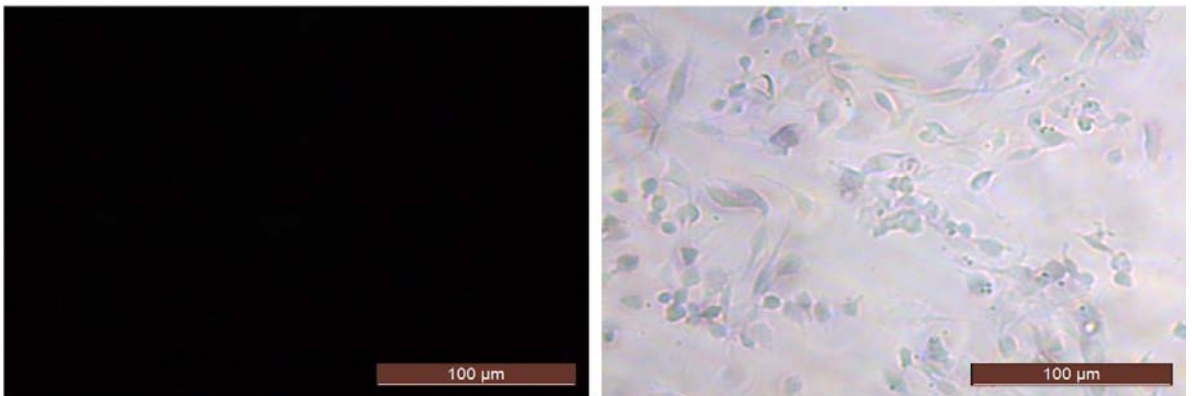
4.7 TUNEL Testi Sonuçları



SO18

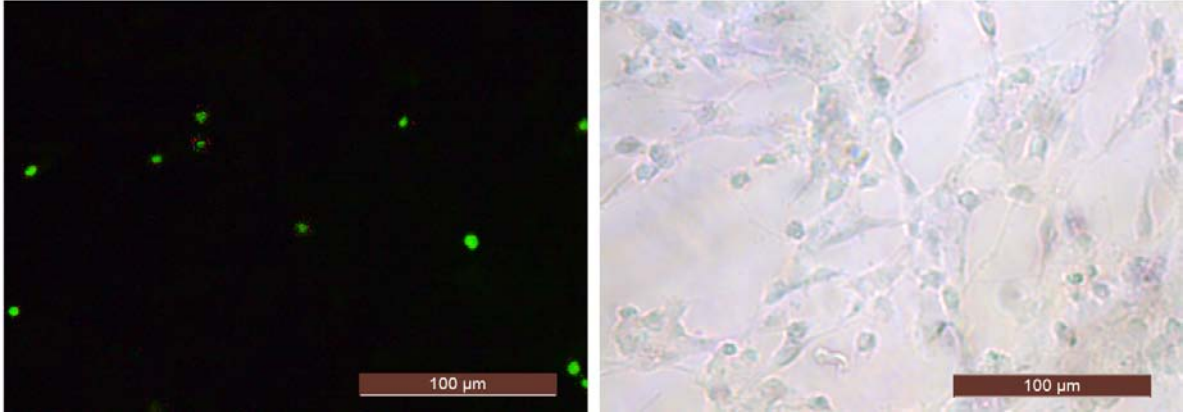


Pozitif kontrol

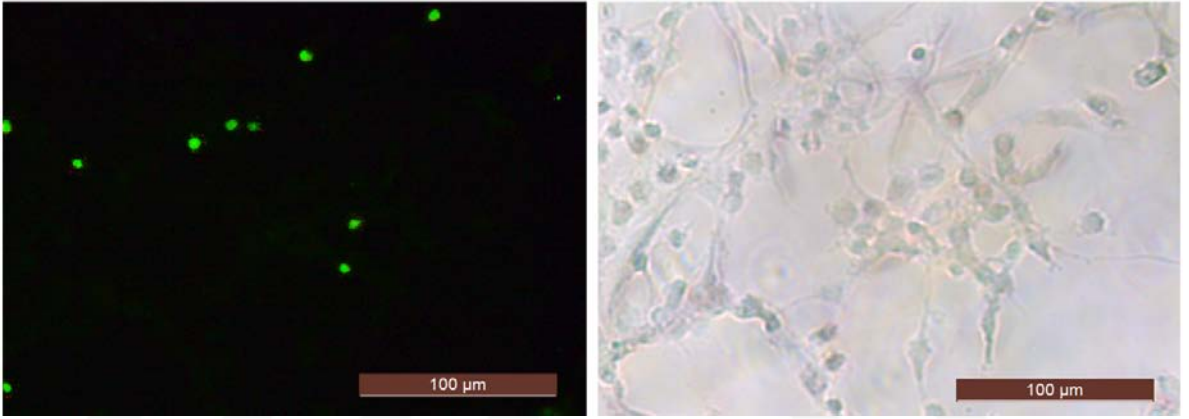


Negatif kontrol

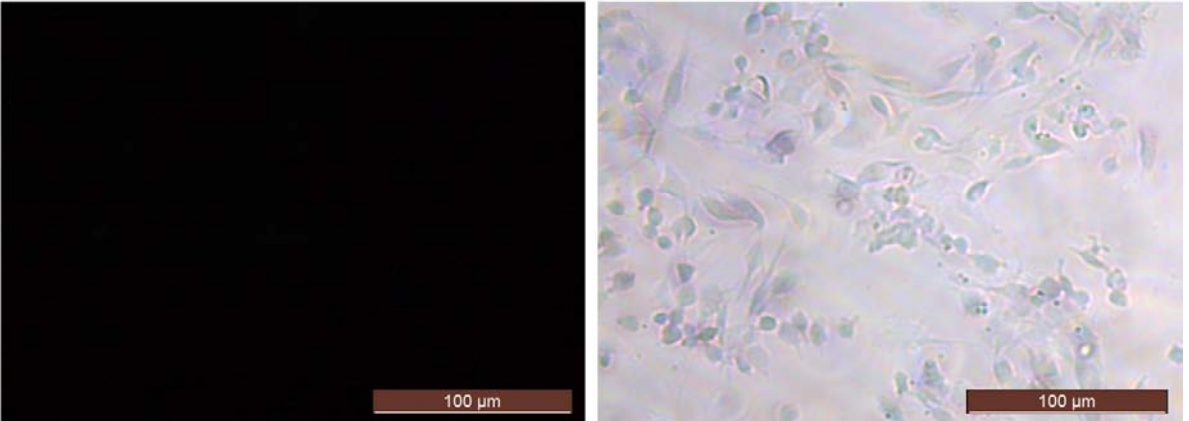
Şekil 4.34. SO18 kodlu bileşiğin HT29 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerinin TUNEL testi ile belirlenmesi



SO13



Pozitif kontrol



Negatif kontrol

Şekil 4.35. SO13 kodlu bileşiğin HT29 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerinin TUNEL testi ile belirlenmesi

TUNEL testleri log fazında eksponansiyel büyüme gösteren HT29 hücre hatları kullanılarak yapıldı, inkübasyon süresi 24 saat olarak belirlendi. Test maddeleri IC_{50} değerinde kullanıldı. Sol tarafta yer alan çekimler flüoresan mikroskoba, sağ taraftaki çekimler faz-kontrast mikroskoba aittir

Test maddeleri ile IC₅₀ konsantrasyonunda 24 saat muamele edilen HT29 hücre hattında apoptotik hücre ölümü karakteristiği olan DNA kırıklarını gösteren TUNEL sonuçları Şekil 4.34 ve Şekil 4.35’de gösterildi.



5 TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada **SO1, SO2, SO3, SO4, SO5, SO6, SO7, SO8, SO9, SO10, SO11, SO12, SO13, SO14, SO15, SO16, SO17, SO18, SO19** ve **SO20** olarak kodlanan yeni sentezlenmiş kinolin türevlerinin antikanser aktiviteleri *in vitro* deneylerle çalışılmıştır.

Antiproliferatif aktivite belirlenirken uygulanan BrdU ELIZA testinde SO1, SO2, SO3, SO4, SO11, SO12, SO14, SO15, SO16, SO17, SO19 ve SO20 kodlu moleküllerin kullanılan üç hücre hattında da (C6, HeLa, HT29) hücre proliferasyonunu inhibe edici özellik göstermediği gözlenmiştir.

SO5, SO6, SO7, SO8, SO9 ve SO10 kodlu bileşikler farklı hücre hatları üzerinde farklı IC₅₀ değerlerinde antiproliferatif aktivite göstermiştir. Bu durum maddelerin hücre seçici özellikle aktivite gösterdiklerini düşündürmektedir.

Yapılarında fenil ve metoksi grupları bulunan SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin ise her üç hücre hattında da birbirinden farklı IC₅₀ değerlerinde antiproliferatif özellik gösterdiği belirlenmesi literatürle uyumlu veriler elde edildiğini göstermektedir. Ayrıca SO18 kodlu bileşiğin BrdU ELIZA test sonuçlarına bakılarak bütün moleküllere uygulanan doz değerlerinin altında konsantrasyonlar hazırlanmış ve bu molekülün her üç hücre hattı üzerinde de IC₅₀ değerlerinin 5.6 µg/ml ile 9.6 µg/ml arasında değişerek referans ilacın çok altında IC₅₀ değerleriyle inhibisyon sağladığı görülmüştür.

Çeşitli çalışmalarda yapısında fenil ve metoksi grubu barındıran bazı kinolin moleküllerin antiproliferatif özellikleri çeşitli ovaryum, böbrek, prostat ve akciğer kanserleri üzerinde test edilmiş ve bazılarının böbrek kanser hücre hatları üzerinde seçici aktivite gösterirken bir kısmının da göğüs kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Wang ve ark., 2014).

Yapılan bir çalışmada moleküllerden 5-(3,4-dimetoksifenil)-[1,2,3]triazino[4,5-b]kinolin ve 5-(3,4dimetoksifenil)primido[4,5-b]kinolin adlı bileşiklerin antikanser aktivite yönünden en aktif bileşikler olduğu belirlenirken 2-[3,4-dimetoksifenil] grubunun varlığının da antitümör aktiviteyi artırdığı belirtilmiştir (El-Gohary, 2013).

Antikanser aktivite çalışmalarında kullanılan moleküllerin yüksek antiproliferatif özelliğin yanında düşük sitotoksik aktivite göstermeleri de beklenmektedir. C6 hücre hattı üzerinde SO10 kodlu molekülün, HeLa hücre hattı üzerinde SO8 ve SO9 kodlu molekülün ve HT29 hücre hattında ise SO6, SO9, SO10 ve SO13 kodlu moleküllerin 5-FU'dan düşük sitotoksosite gösterdikleri görülmüştür.

Yapılan bir çalışmada 6,7-metilendioksi-4 substitüefenilkinolin-2(1H)-1 türevlerinin antikanser ajan olarak promyelositik lösemi ve akciğer kanseri hücrelerinin G2/M fazında tutuklu kalmasını sağladığı ve kanser hücrelerine karşı selektif sitotoksosite gösterdiği belirlenmiştir. Bu amaçla moleküllere eklenen fenil grubuyla elde edilen kinolin türevlerinin meme adenokarsinom, ovaryum karsinoma, lösemi, hepatoma, renal karsinoma hücre hatları üzerinde antikanser aktivite gösterdiği ve apoptozu indüklediği görülmüştür (Chen ve ark., 2013) Belirlenen IC₅₀ değerlerinde hücre spesifik antiproliferatif aktivite gösteren SO6, SO9, SO13, SO14 ve SO18 kodlu bileşiklerin yapısında bulunan fenil ve metoksi gruplarının antikanser aktivite göstermeleri ve sitotoksosite değerleri literatürle uyumlu veriler elde edildiğini düşündürmektedir.

SO13 ve SO18 kodlu bileşikler HeLa hücre hattı üzerinde migrasyon hızını azaltıcı etkiye sahip olduğu söylenebilir. Kontrol hücre hattıyla aynı süre içerisinde inkübasyona bırakılan kinolin molekülü içeren hücre hattında bir süre sonra hücre büyümesi durmuştur. Fakat süre sonunda kontrol hücre hattındaki hücreler migrasyona uğrayarak lam üzerinde boşluğu doldurmuştur. Metastaz tümör hücrelerinin kaynaklandıkları primer dokudan ayrılarak farklı bir dokuya göç etmeleri ve bu yeni dokuda sekonder tümör olarak büyümeleridir. Tümör anjiogenezi hızlı büyüme için gerekli olan besin ve enerjiyi sağlamanın yanı sıra tümör hücresinin dolaşım sistemi ile temasını da arttırmaktadır. Metastaz gelişiminde diğer bir önemli faktör hücreler arası iletişimin kaybıdır. Adhezyon özelliğini kaybetmiş olan metastatik tipte tümör hücreleri yayılırlar (Lowitz ve Casciato, 2000; Altunkaynak, 2008). Bu sebeple kullanılan SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin hücre hatları üzerinde büyümeyi durdurma etkisi moleküllerin antimetastatik etkisi olabileceğini fikrini kuveetlendirmektedir.

Kromatin kondensasyonu, nukleik asit fragmentasyonu apoptozun karakteristik özelliklerindedir. SO7, SO8, SO9, SO10, SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin HeLa ve C6 hücre hatları üzerinde DNA bantlaşmasına yol açmadığı belirlenmiştir. Bu sonuç

moleküllerin göstermiş olduğu antiproliferatif aktiviteden apoptoz mekanizmasının sorumlu olmadığı düşüncesini destekler niteliktedir.

DNA degradasyon testi sonuçlarına göre SO13 ve SO18 kodlu bileşikler HT29 hücre hattı üzerinde bantlaşmaya neden olmuştur ve bu bantlaşma tek bant şeklinde görülmüştür. Bu sonuç moleküllerin antiproliferatif aktivite göstermesine apoptotik mekanizmaların yol açtığı fikrini doğurmaktadır. Bunu kanıtlamak için hücresel düzeyde *in situ* olarak yapılan TUNEL testine göre bu moleküller TUNEL pozitif olarak bulunmuştur. Bu sayede test edilen moleküllerin apoptozu uyardığı *in vivo* olarak gösterilmiştir.

Hücre çoğalmasında gerekli olan Topoizomeraz enzimlerinin inhibisyonunun; kontrolsüz ve hızlı bir şekilde bölünen kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurabileceği düşünülmektedir (Guo ve ark., 2007; Alberts ve ark., 2008). Giderek artan çeşitlilikteki Topoizomeraz inhibitörleri, antitümör aktiviteye sahip ilaçların tasarımı için yeni bir kaynak oluşturmaktadır (Jamal, 2006).

Topo I hedefli ilaçların oluşturduğu DNA hasarının, hücrenin ölümü üzerinde apoptoz yolu kullanılarak yapıldığı düşünülmektedir. Bu yol için, p53 tümör süpresör geninin olması gerektiği düşünülmekte ve p53 proteini antikanser ilaçla indüklenen DNA hasarını apoptotik yol aracılığı ile hücre ölümüne yönlendirmektedir. p53 geninde mutasyon taşıyan kanserli hastaların da Topo I hedefli kemoterapiye dirençli duruma geldiği bilinmektedir. Topo I'e karşı yürütülen ilaç tedavisinde hücre ölümünün p53'den bağımsız başka mekanizmalar tarafından da olabileceği belirtilmektedir (Zhang ve ark., 2009).

Kinolin türevlerinin DNA'ya interkale olarak DNA hasarından sorumlu olduğu bu sürecin de mitotik progresi önlediği bilinmektedir (Hranjec ve ark., 2007). İndeno [2,1-c] kinolin türevi TAS-103'ün çift yönlü Topo I ve II inhibitör ajan olduğu belirlenmiş ve sahip olduğu düşünülen bu aktivite servikal karsinoma, prostat kanseri, hepatoseluler karsinoma, mide adenokarsinoma, meme kanseri hücre hatları üzerinde test edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin pozitif kontrol kamptotesinle karşılaştırıldığında daha aktif olduğu, bir kısmının belirtilen hücre hatlarının bir kısmı üzerinde çift yönlü Topo I ve Topo II inhibitörü olabileceği belirtilmiştir (Thomas ve ark., 2004).

DNA'ya bağlanabilen ajanların Topoizomeraz II inhibitörü oldukları bilinmektedir. Bunun yanında topotekan ve irinotekan gibi DNA'ya interkale olmayan ajanların da Topoizomeraz I inhibitörü oldukları da bilinmektedir. Seçici Topo I inhibisyonu ilaç dirençliliği gelişiminde öncülük eden Topo II seviyesinde artışa neden olmaktadır. Çoklu ilaç direncine sahip kanser hücrelerinin üstesinden gelebilmek için çift yönlü Topo I ve II inhibitörlerinin araştırılması gerekmektedir.

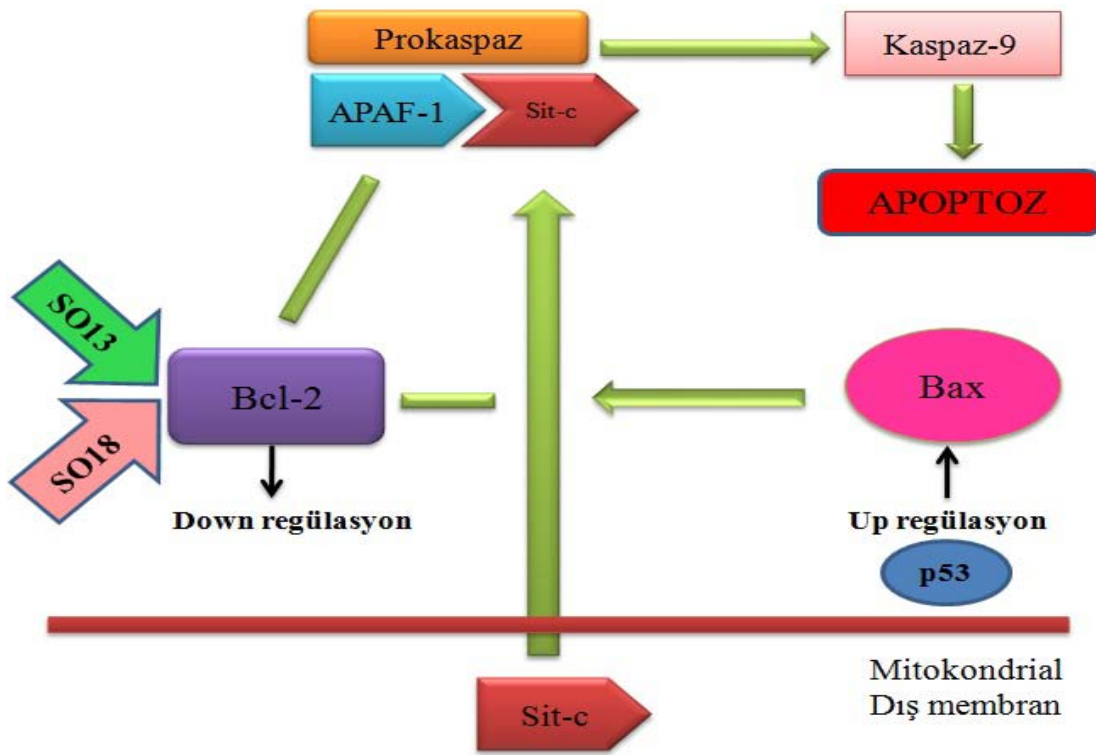
Bu çalışmalar ışığında **SO13** ve **SO18** kodlu bileşiklerin Topoizomeraz I fonksiyonunun baskılaması nedeniyle bu bileşiklerin (özellikle SO13'ün) yeni Topoizomeraz inhibitör adayı moleküller olduğu düşünülmektedir. Bileşiklerin replikasyonu baskılayıcı aktiviteleri nedeniyle; antiproliferatif aktivitelerinin temelinde DNA replikasyonunun sınırlandırılması veya durdurulması olduğu sanılmaktadır. Ayrıca bu bileşiklerin Topoizomeraz I baskılayıcı aktivitede olması, antibakteriyel aktiviteye de sahip olabilecekleri ihtimalini göstermektedir. Aynı zamanda literatürde kinolin moleküllerinin Topoizomeraz I enzim inhibisyonu gerçekleştirdiğine dair bir veri ilk defa bu çalışmada elde edilmiştir. **SO13** ve **SO18** kodlu bileşiklerin literatürde belirtildiği gibi çift yönlü Topoizomeraz I ve II inhibitörü olup olmadığının ise araştırılması gerekmektedir.

SO13 ve SO18 kodlu kinolin moleküllerinin apoptoz ve hücre döngüsüyle ilgili olan bazı genlerin ifadenme analizi yapılmıştır. Bcl-2 ailesi antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan ve apoptozu düzenlemede en önemli role sahip olan onkoprotein grubudur. Bcl-2 ve Bcl-XL apoptozu engelleme fonksiyonunu ya kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da kaspaz akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-C gibi apoptogenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir (Petros et al., 2004).

Bax ya da Bak gibi proapoptotik üyeler heterodimerizasyon yoluyla kaspaz serbestleşmesini uyarır ve mitokondri zarının geçiş porlarının açıklığını değiştirerek sitokrom-C'yi serbestleştirir. Dolayısıyla kaspaz aktivasyonuna yol açar. Bir hücrenin apoptoza eğilimli oluşu heterodimer ya da homodimer formundaki Bcl-2 ailesi genlerinin etkisine bağlıdır. Bcl-2 salgılanması sonucu Bcl-2 homodimerleri şekillenir. Bcl-2 üyesi proteinlerin aktiviteleri hücrede ayrıca transkripsiyonel düzeyde kontrol, fosforilasyon, translokasyon, dimerizasyon ve proteolitik yıkımdır. Kanser hücrelerinde

Bcl-2 protein düzeyinin arttığı belirlenmiştir (Nagata, 1997; Lawen, 2003; Petros ve ark., 2004).

Sağlıklı hücreler toksisiteden korunmak için Bcl-2 proteinlerini inaktif formda tutarlar. Bcl-2 ekspresyon düzeyi düşüktür. Bcl-2 hücrenin hayatta kalmasını teşvik ederken; Bax, Bcl'nin negatif regülatörü olarak rol oynar. Bax direk ya da dolaylı yoldan ölüm sinyali yayarken; Bcl-2, Bax'ın baskın inhibitörü olarak rol oynar. Böylece apoptoz inhibe edilir (Klug, 2002; Dilsiz, 2004; Lodish ve ark., 2011; Nussbaum, 2012).



Şekil 5.1. SO13 ve SO18 kodlu bileşiklerin gen regülasyonu üzerine etkilerini gösteren hipotetik model

Gen ifadeleme analiz sonuçlarına göre SO13 ve SO18 kodlu moleküllerin her ikisinin de apoptozu indüklemeye mekanizmalarının Bcl-2 ekspresyonunda down regülasyona neden olmaları sonucu gerçekleşebileceği fikrini düşündürmektedir. P53 proteini hücre hasara yanıt olarak Bax proteininin ekspresyonunu artırarak apoptozu indüklediği bilinmektedir (Guo ve ark., 2007). SO18 kodlu molekülün Bax ekspresyonunda up regülasyon gerçekleştirmesi bu molekülün etki mekanizmasında p53 etkisinin varlığını düşündürmektedir.

Supressor of cytotokine signalling (SOCS-2) SOCS-2 geni tarafından üretilen bir proteindir ve sitokin sinyalizasyonunu negatif yönde regüle eder. SOCS-2 down regülasyonuna bağılı olarak apoptoz ve hücre döngüsü dağılımı araştırılmıştır. Kontrol hücrelerle karşılaştırıldığında SOCS-2 gen susturulması sonucu apoptotik hücre miktarında artış gözlenmiştir. Ayrıca yüksek SOCS-2 ekspresyonuna sahip hastalarda kötü huylu tümör oluşumu gözlenmiştir. Prostat kanseri üzerinde yapılan çalışmalarda SOCS-2'nin down regülasyonuna bağılı olarak hücre siklusunda tutulma meydana geldiği ve hücre çoğalmasının azaldığı belirlenmiştir (Hoefler ve ark., 2014; Letellier ve ark., 2014; Sasi ve ark., 2014). SO13 kodlu molekülün gen ifadeleme analizinde SOCS-2 down regülasyonunun görülmesi literatürle uyumlu veriler elde edildiğini göstermektedir

Nuclear factor NF-kappa B (NFkB)'nin; hücrelerin DNA hasarına bağılı olarak apoptoza gitmelerini engellediği bulunmuştur. Antiapoptotik hücresel proteinlerin ekspresyonunun artışına yanıt olarak artan NFkB ekspresyonunun apoptozu engellediği belirlenmiştir. Flavanoidler gibi bazı fenolik bileşiklerin kalp-damar rahatsızlıkları ve bazı kanser türlerinde NFkB ekspresyonunun azalmasına bağılı olarak apoptozu indüklediği literatürde yer almaktadır (Davis ve arkl., 1999; Yamamoto ve Gaynor, 2001; Ruland, 2011).

SO13 ve SO18 kodlu moleküllerin NFkB ekspresyonunda azalmaya neden olduklarının bulunması SO18 ve fenil grubu içeren SO13 kodlu moleküllerin de benzer mekanizmalarla gen ifadenme analizinde down regülasyona neden olduklarını düşündürmektedir.

6 KAYNAKLAR

- A Murat Tuncer, 2008. significance of cancer in our country, the burden of disease and cancer control policies. In: Cancer Control in Turkey.
- A Murat Tuncer, S.E., 2008. Cancer incidence in turkey. In: Cancer Control in Turkey. pp. 17–75.
- Abbas, H.-A.S., Hafez, H.N., El-Gazzar, A.-R.B.A., 2011. Synthesis, in vitro antimicrobial and in vivo antitumor evaluation of novel pyrimidoquinolines and its nucleoside derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 21–30.
- Abonia, R., Insuasty, D., Castillo, J., Insuasty, B., Quiroga, J., Nogueras, M., Cobo, J., 2012. Synthesis of novel quinoline-2-one based chalcones of potential anti-tumor activity. *Eur. J. Med. Chem.* 57, 29–40.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2008. *Molecular Biology of the Cell*, 5th Editio. ed.
- Alessandra Montecucco, Francesca Zanetta, G.B., 2015. Molecular Mechanisms of Etoposide. *Excli J.* 95–108.
- Alexander M. Zagariya, 2012. A novel method for detection of apoptosis. *Exp. Cell Res.* 861–866.
- Alqasoumi, S.I., Al-Taweel, A.M., Alafeefy, A.M., Noaman, E., Ghorab, M.M., 2010. Novel quinolines and pyrimido[4,5-b]quinolines bearing biologically active sulfonamide moiety as a new class of antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 738–44.
- Amit, M., Yen, T.-C., Liao, C.-T., Chaturvedi, P., Agarwal, J.P., Kowalski, L.P., Ebrahimi, A., Clark, J.R., Kreppel, M., Zöllner, J., Fridman, E., Bolzoni, V.A., Shah, J.P., Binenbaum, Y., Patel, S.G., Gil, Z., 2013. Improvement in survival of patients with oral cavity squamous cell carcinoma: An international collaborative study. *Cancer* 119, 4242–8.
- Andrew M. Scott¹, Jedd D. Wolchok^{2,3,4, 5} & Lloyd J. Old, 2012. Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 12 278–287.
- Aydın, A., 2014. [Ag(CN)₂] ve [Au(CN)₂] içeren yeni kooordinasyon polimerlerinin antikanser aktivitelerinin ve etki mekanizmalarının belirlenmesi. Gaziosman Paşa Üniversitesi.
- Bacon, R.G.R., Hill, H.A.O., 1964. Metal ions and complexes in organic reactions. Part I. Substitution reactions between aryl halides and cuprous salts in organic solvents. *J. Chem. Soc.* 1097.
- Bailly, C., 2003. Homocamptothecins: potent topoisomerase I inhibitors and promising anticancer drugs. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 45, 91–108.
- Bastien D. Gomperts, Ijsbrand M. Kramer, P.E.R.T., 2002. *Signal Transduction*.
- Behforouz, M., Cai, W., Mohammadi, F., Stocksdale, M.G., Gu, Z., Ahmadian, M., Baty, D.E., Etling, M.R., Al-Anzi, C.H., Swiftney, T.M., Tanzer, L.R., Merriman, R.L., Behforouz, N.C., 2007. Synthesis and evaluation of antitumor activity of novel N-acyllavendamycin analogues and quinoline-5,8-diones. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 495–510.
- Berrin Zuhale Altunkaynak, E.Ö., 2008. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz nedir? *Tıp Araştırmaları Derg.* 93–104.
- Bianca C. Pérez a., Iva Fernandes a., Nuno Mateus a, Cátia Teixeira a, b, P.G., 2013. Recycling antimalarial leads for cancer: Antiproliferative properties of N-cinnamoyl chloroquine analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6769–6772.

- Billiard, J., Dennison, J.B., Briand, J., Annan, R.S., Chai, D., Colón, M., Dodson, C.S., Gilbert, S.A., Greshock, J., Jing, J., Lu, H., McSurdy-Freed, J.E., Orband-Miller, L.A., Mills, G.B., Quinn, C.J., Schneck, J.L., Scott, G.F., Shaw, A.N., Waitt, G.M., Wooster, R.F., Duffy, K.J., 2013. Quinoline 3-sulfonamides inhibit lactate dehydrogenase A and reverse aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Metab.* 1, 19.
- Brannon-Peppas, B.J., 2004. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 56(11):1649–59.
- C.D.Sherman, K.C.Calman, S. Eckhardt, I. Elsebai, D. Firat, D.K. Hossfeld, J.P. Paunier, B.S. (Ed.), 1990. *Klinik Onkoloji*, 4th ed.
- Champoux, J.J., 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 369–413.
- Chen, A.Y., Liu, L.F., 1994. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34, 191–218.
- Chen, M., Chen, H., Ma, J., Liu, X., Zhang, S., 2014. Synthesis and anticancer activity of novel quinoline-docetaxel analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 2867–70.
- Chen, Y.-F., Lin, Y.-C., Huang, P.-K., Chan, H.-C., Kuo, S.-C., Lee, K.-H., Huang, L.-J., 2013. Design and synthesis of 6,7-methylenedioxy-4-substituted phenylquinolin-2(1H)-one derivatives as novel anticancer agents that induce apoptosis with cell cycle arrest at G2/M phase. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 5064–75.
- Chen, Y.L., Fang, K.C., Sheu, J.Y., Hsu, S.L., Tzeng, C.C., 2001. Synthesis and antibacterial evaluation of certain quinolone derivatives. *J. Med. Chem.* 44, 2374–7.
- Cheng, Y.-Y., Liu, C.-Y., Tsai, M.-T., Lin, H.-Y., Yang, J.-S., Wu, T.-S., Kuo, S.-C., Huang, L.-J., Lee, K.-H., 2013. Design, synthesis, and mechanism of action of 2-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)-6-pyrrolidinylquinolin-4-one as a potent anticancer lead. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 5223–7.
- Chomczynski P, S.N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* Apr;162(1).
- Chong-Zhi Wang, Tyler Calway, and C.-S.Y., 2012. Herbal Medicines as Adjuvants for Cancer Therapeutics. *Am. J. Chin. Med.* 40 657.
- Craig, J.C., Pearson, D.E., 1971. Potential antimalarials. 7. Tribromomethylquinolines and positive halogen compounds. *J. Med. Chem.* 14, 1221–2.
- David L. Nelson, M.M.C., n.d. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd editio. ed.
- Davis, J.N., Kucuk, O., Sarkar, F.H., 1999. Genistein inhibits NF-kappa B activation in prostate cancer cells. *Nutr. Cancer* 35, 167–74.
- Desai, S.D., Zhang, H., Rodriguez-Bauman, A., Yang, J.-M., Wu, X., Gounder, M.K., Rubin, E.H., Liu, L.F., 2003. Transcription-Dependent Degradation of Topoisomerase I-DNA Covalent Complexes. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2341–2350.
- Dong, M.E.I., Chen, S., Kita, K., Ichimura, Y., Guo, W., Lu, S.A., Sugaya, S., Hiwasa, T., Takiguchi, M., Mori, N., 2009. Anti-proliferative and apoptosis-inducible activity of Sarcodonin G from *Sarcodon scabrosus* in HeLa cells 201–207.
- El-Gohary, N.S., 2013. Synthesis and in vitro antitumor activity of new quinoline, pyrimido[4,5-b]quinoline, [1,2,3]triazino[4,5-b]quinoline, and [1,2,4]triazolo[2',3':3,4]pyrimido[6,5-b]quinoline analogs. *Med. Chem. Res.* 22, 5236–5247.

- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- Evan, G., Littlewood, T., 1998. A Matter of Life and Cell Death. *Science* (80-.). 281, 1317–1322.
- Faidallah, H.M., Rostom, S.A.F., 2013. Synthesis, in vitro antitumor evaluation and DNA-binding study of novel tetrahydroquinolines and some derived tricyclic and tetracyclic ring systems. *Eur. J. Med. Chem.* 63, 133–43.
- Fengfei Wang,* Lilin Wang, C.B., Ewa Sicinska, §.S.M.G., Harvey Mamon, M.H.K., Raffaella Zamponi,‡ Massimo Loda, §., ELIZAbeth Maher, S.O., Charles S. Fuchs,‡ Jin Li,* Carlos Hader, A., Makrigiorgos*, G.M., 2007. DNA Degradation Test Predicts Success in WholeGenome Amplification from Diverse Clinical Samples. *J. Mol. Diagnostics*, Vol. 9.
- Fujita, A., Kameda, Y., Goya, T., 2009. Clinicopathology of stromal invasion in lung adenocarcinoma. *Pathol. Int.* 59, 1–6.
- Ghorab, M.M., Ragab, F.A., Heiba, H.I., Arafa, R.K., El-Hossary, E.M., 2010. In vitro anticancer screening and radiosensitizing evaluation of some new quinolines and pyrimido[4,5-b]quinolines bearing a sulfonamide moiety. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 3677–84.
- Ghorab, M.M., Ragab, F.A., Heiba, H.I., Ghorab, W.M., 2011. Design and synthesis of some novel quinoline derivatives as anticancer and radiosensitizing agents targeting VEGFR tyrosine kinase. *J. Heterocycl. Chem.* 48, 1269–1279.
- Godlewska, Joanna; Badowska-Roslonek, Katarzyna; Ramza, Jan; Kaczmarek, Łukasz; Peczyńska-Czoch, Wanda; Opolski, A., 2013. New saccharide derivatives of indolo[2,3-b]quinoline as cytotoxic compounds and topoisomerase II inhibitors. *Radiol. Oncol. Issues* 24 Artic. 412 Volume No.
- Guo, L., Liu, X., Nishikawa, K., Plunkett, W., 2007. Inhibition of topoisomerase II α and G2 cell cycle arrest by NK314, a novel benzo[c]phenanthridine currently in clinical trials. *Mol. Cancer Ther.* 6, 1501–8.
- Guzmán, E.A., Johnson, J.D., Carrier, M.K., Meyer, C.I., Pitts, T.P., Gunasekera, S.P., Wright, A.E., 2009. Selective cytotoxic activity of the marine-derived batzelline compounds against pancreatic cancer cell lines. *Anticancer. Drugs* 20, 149–55.
- Güneş, H., 1999. Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri. *Tr.J. of Biology* 23, 283–292.
- Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, P.M., 2011. *Moleküler Hücre Biyolojisi*, 6th ed.
- Hoefler, J., Kern, J., Ofer, P., Eder, I.E., Schäfer, G., Dietrich, D., Kristiansen, G., Geley, S., Rainer, J., Gunsilius, E., Klocker, H., Culig, Z., Pühr, M., 2014. SOCS2 correlates with malignancy and exerts growth-promoting effects in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 21, 175–87.
- Hranjec, M., Kralj, M., Piantanida, I., Sedić, M., Suman, L., Pavelić, K., Karminski-Zamola, G., 2007. Novel cyano- and amidino-substituted derivatives of styryl-2-benzimidazoles and benzimidazo[1,2-a]quinolines. Synthesis, photochemical synthesis, DNA binding, and antitumor evaluation, part 3. *J. Med. Chem.* 50, 5696–711.
- J. F. R. Kerr*, A.H.W. and A.R.C., 1972. APOPTOSIS: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetic. *Br. J. Cancer* 26, 239.

- Jamal, A., 2006. American Cancer Society Inc., Surveillance Research. *CA Cancer J Clin* 56: 108–130.
- Kalluraya, B., Sreenivasa, S., 1998. Synthesis and pharmacological properties of some quinoline derivatives. *Farmaco* 53, 399–404.
- Keller, U., 1984. Acyl pentapeptide lactone synthesis in actinomycin-producing streptomycetes by feeding with structural analogs of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid. *J. Biol. Chem.* 259, 8226–31.
- Kenneth D. Bromberg, N.O., 2003. Mechanism of action of topoisomerase II targeted anticancer drugs.
- Ki-Hwan Eum, M.L., 2011. Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras-transformed fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.* 348, 61–68.
- Kochetkov, D. V, Il'inskaia, G. V, Komarov, P.G., Strom, E., Agapova, L.S., Ivanov, A. V, Budanov, A. V, Frolova, E.I., Chumakov, P.M., n.d. [Transcriptional inhibition of human papilloma virus in cervical carcinoma cells reactivates functions of the tumor suppressor p53]. *Mol. Biol. (Mosk).* 41, 515–23.
- Krug, M.S., Berger, S.L., 1987. First-strand cDNA synthesis primed with oligo(dT). *Methods Enzymol.* 152, 316–25.
- Kumar, H., Chattopadhyay, A., Prasath, R., Devaraji, V., Joshi, R., Bhavana, P., Saini, P., Ghosh, S.K., 2014. Design, Synthesis, Physicochemical Studies, Solvation, and DNA Damage of Quinoline-Appended Chalcone Derivative: Comprehensive Spectroscopic Approach toward Drug Discovery. *J. Phys. Chem. B.*
- Kumar, Cotran, R., 2003. *Robbins Temel Patoloji*, 7th ed.
- LaVoie, E.J., Shigematsu, A., Adams, E.A., Rigotty, J., Hoffmann, D., 1984. Tumor-initiating activity of quinoline and methylated quinolines on the skin of SENCAR mice. *Cancer Lett.* 22, 269–73.
- Lawen, A., 2003. Apoptosis-an introduction. *Bioessays* 25, 888–96.
- Lee, E., Han, S., Jin, G.H., Lee, H.J., Kim, W.-Y., Ryu, J.-H., Jeon, R., 2013. Synthesis and anticancer activity of aminodihydroquinoline analogs: identification of novel proapoptotic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 3976–8.
- Letellier, E., Schmitz, M., Baig, K., Beaume, N., Schwartz, C., Frasilho, S., Antunes, L., Marcon, N., Nazarov, P. V, Vallar, L., Even, J., Haan, S., 2014. Identification of SOCS2 and SOCS6 as biomarkers in human colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 111, 726–35.
- Lim, E.-K., Jang, E., Lee, K., Haam, S., Huh, Y.-M., 2013. Delivery of Cancer Therapeutics Using Nanotechnology. *Pharmaceutics* 5, 294–317.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., A. Kaiser, C., Krieger, M., P. Scott, M., Zipursky, L., Darnell, J., 2003. *Molecular Cell Biology*, 5th ed.
- LOWITZ, B.B, CASCIATO, D., n.d. Kanser biyolojisi ve onkogenler. In: *Medical Oncology & Principles of Cancer Biology*.
- Lu, W.-J., Świtalska, M., Wang, L., Yonezawa, M., El-Sayed, I.E.-T., Wietrzyk, J., Inokuchi, T., 2013. In vitro antiproliferative activity of 11-aminoalkylamino-substituted 5H-indolo[2,3-b]quinolines; improving activity of neocryptolepines by installation of ester substituent. *Med. Chem. Res.* 22, 4492–4504.
- Madrid, P.B., Sherrill, J., Liou, A.P., Weisman, J.L., Derisi, J.L., Guy, R.K., 2005. Synthesis of ring-substituted 4-aminoquinolines and evaluation of their antimalarial activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 1015–8.

- Masoud Karimi Goftar, Nasrollah Moradi Kor, Z.M.K., 2014. DNA intercalators and using them as anticancer drugs. *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.* 2, 811–822.
- Mathada, N.G.Y. and M.B.H., 2014. Synthesis, Characterization, Antimicrobial, DNA Cleavage, and In Vitro Cytotoxic Studies of Some Metal Complexes of Schiff Base Ligand Derived from Thiazole and Quinoline Moiety. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2014.
- Matsumura, Y., Yashiro, M., Ohira, M., Tabuchi, H., Hirakawa, K., n.d. 5-Fluorouracil up-regulates interferon pathway gene expression in esophageal cancer cells. *Anticancer Res.* 25, 3271–8.
- Maxwell, P.J., Longley, D.B., Latif, T., Boyer, J., Allen, W., Lynch, M., McDermott, U., Harkin, D.P., Allegra, C.J., Johnston, P.G., 2003. Identification of 5-fluorouracil-inducible target genes using cDNA microarray profiling. *Cancer Res.* 63, 4602–6.
- Meléndez Gómez, C.M., Kouznetsov, V. V, Sortino, M.A., Alvarez, S.L., Zacchino, S.A., 2008. In vitro antifungal activity of polyfunctionalized 2-(hetero)arylquinolines prepared through imino Diels-Alder reactions. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 7908–20.
- Miller, L.M., Mayer, S.C., Berger, D.M., Boschelli, D.H., Boschelli, F., Di, L., Du, X., Dutia, M., Floyd, M.B., Johnson, M., Kenny, C.H., Krishnamurthy, G., Moy, F., Petusky, S., Tkach, D., Torres, N., Wu, B., Xu, W., 2009. Lead identification to generate 3-cyanoquinoline inhibitors of insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) for potential use in cancer treatment. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 62–6.
- Muñoz, A., Sojo, F., Arenas, D.R.M., Kouznetsov, V. V, Arvelo, F., 2011. Cytotoxic effects of new trans-2,4-diaryl-r-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines and their interaction with antitumoral drugs gemcitabine and paclitaxel on cellular lines of human breast cancer. *Chem. Biol. Interact.* 189, 215–21.
- Nalbantoğlu, S., 2006. Bazı Alkana Türlerinin DNA Topoizomeraz I İnhibisyonunun Araştırılması. Ege Üniversitesi.
- Nazik, H., Öngen, B., 2010. Türkiye’de plazmit aracılı kinolon direnci Kimyasal yapı 24, 46–54.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.-T., Zhou, T.-T., Liu, B., Bao, J.-K., 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 45, 487–498.
- Ökten, S., 2009. Yeni Bir Yaklaşımla Bromokinolinlerin Seçici Sentezi ve Yeni Kinolin Türevlerinin Eldesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi.
- Ökten, S., Çakmak, O., Erenler, R., Yüce, Ö., TEKİN, Ş., 2013. Simple and convenient preparation of novel 6,8-disubstituted quinoline derivatives and their promising anticancer activities. *Turkish J. Chem.* 37, 896–908.
- Pan, L., Chai, H., Kinghorn, A.D., 2010. The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochem. Lett.* 3, 1–8.
- Perchellet, E.M., Crow, K.R., Gakhar, G., Nguyen, T.A., Shi, A., Hua, D.H., Perchellet, J.-P.H., 2010. Bioactivity and molecular targets of novel substituted quinolines in murine and human tumor cell lines in vitro. *Int. J. Oncol.* 36, 673–88.
- Petros, A.M., Olejniczak, E.T., Fesik, S.W., 2004. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 83–94.
- Podeszwa, B., Niedbala, H., Polanski, J., Musiol, R., Tabak, D., Finster, J., Serafin, K., Milczarek, M., Wietrzyk, J., Boryczka, S., Mol, W., Jampilek, J., Dohnal, J., Kalinowski, D.S., Richardson, D.R., 2007. Investigating the antiproliferative

- activity of quinoline-5,8-diones and styrylquinolinecarboxylic acids on tumor cell lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 6138–41.
- Pommier, Y., 2004. Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I with camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints. *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents* 4, 429–34.
- Portilla, J., Quiroga, J., Cobo, J., Low, J.N., Glidewell, C., 2007. 8-tert-Butyl-7-(4-chlorophenyl)-10-phenyl-5,6-dihydro-10H-benzo[h]pyrazolo[3,4-b]quinoline. *Acta Crystallogr. C* 63, o582–4.
- Rashad, A.E., El-Sayed, W.A., Mohamed, A.M., Ali, M.M., 2010. Synthesis of new quinoline derivatives as inhibitors of human tumor cells growth. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 343, 440–8.
- Rodrigues, F.A.R., Bomfim, I. da S., Cavalcanti, B.C., Pessoa, C., Goncalves, R.S.B., Wardell, J.L., Wardell, S.M.S. V, de Souza, M.V.N., 2014. Mefloquine-oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. *Chem. Biol. Drug Des.* 83, 126–31.
- Rodríguez-Berna, G., Mangas-Sanjuán, V., Gonzalez-Alvarez, M., Gonzalez-Alvarez, I., García-Giménez, J.L., Díaz Cabañas, M.J., Bermejo, M., Corma, A., 2014. A promising camptothecin derivative: Semisynthesis, antitumor activity and intestinal permeability. *Eur. J. Med. Chem.* 83C, 366–373.
- Sahin, A., Cakmak, O., Demirtas, I., Okten, S., Tutar, A., 2008. Efficient and selective synthesis of quinoline derivatives. *Tetrahedron* 64, 10068–10074.
- Saif, M.W., Makrilia, N., Syrigos, K., 2010. CoFactor: Folate Requirement for Optimization of 5-Fluoracil Activity in Anticancer Chemotherapy. *J. Oncol.* 2010, 934359.
- Saleh I Alqasoumi, Moustafa M Ghorab, Zeinab H Ismail, Soad M Abdel-Gawad, Mohamed S A El-Gaby, H.M.A., Medicinal, 2009. Novel antitumor acetamide, pyrrole, pyrrolopyrimidine, thiocyanate, hydrazone, pyrazole, isothiocyanate and thiophene derivatives containing a biologically active pyrazole moiety. *Arzneimittelforschung* 59(12), 666–71.
- Sasi, W., Sharma, A.K., Mokbel, K., 2014. The role of suppressors of cytokine signalling in human neoplasms. *Mol. Biol. Int.* 2014, 630797.
- Searle, J., Kerr, J.F., Bishop, C.J., 1982. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.* 17 Pt 2, 229–59.
- Shimizu, K., Takada, M., Asai, T., Kuromi, K., Baba, K., Oku, N., 2002. Cancer chemotherapy by liposomal 6-[12-(dimethylamino)ethyl]aminol-3-hydroxy-7H-indeno[2,1-clquinolin-7-one dihydrochloride (TAS-103), a novel anti-cancer agent. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1385–7.
- Suzuki, M., Endo, M., Shinohara, F., Echigo, S., Rikiishi, H., 2009. Enhancement of cisplatin cytotoxicity by SAHA involves endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64, 1115–22.
- Thomas, C.J., Rahier, N.J., Hecht, S.M., 2004. Camptothecin: current perspectives. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 1585–604.
- Tomicic, M.T., Kaina, B., 2013. Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1835, 11–27.

- Tseng, C.-H., Chen, Y.-L., Lu, P.-J., Yang, C.-N., Tzeng, C.-C., 2008. Synthesis and antiproliferative evaluation of certain indeno[1,2-c]quinoline derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 3153–62.
- Ulukaya, E., n.d. Akciğer Kanseri. In: Prof.Dr.Kayhan Engin, P.D.N.Ö. (Ed.), *Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar*.
- Ursing, J., Rombo, L., Rodrigues, A., Aaby, P., Kofoed, P.-E., 2014. Malaria Transmission in Bissau, Guinea-Bissau between 1995 and 2012: Malaria Resurgence Did Not Negatively Affect Mortality. *PLoS One* 9, e101167.
- Vukanovic, J., Passaniti, A., Hirata, T., Traystman, R.J., Hartley-Asp, B., Isaacs, J.T., 1993. Antiangiogenic effects of the quinoline-3-carboxamide linomide. *Cancer Res.* 53, 1833–7.
- Vyas, V.K., Variya, B., Ghate, M.D., 2014. Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel substituted quinoline-2-carboxamide derivatives as human dihydroorotate dehydrogenase (hDHODH) inhibitors and anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* 82C, 385–393.
- Wang, N., Świtalska, M., Wu, M.-Y., Imai, K., Ngoc, T.A., Pang, C.-Q., Wang, L., Wietrzyk, J., Inokuchi, T., 2014. Synthesis and in vitro cytotoxic effect of 6-amino-substituted 11H- and 11Me-indolo[3,2-c]quinolines. *Eur. J. Med. Chem.* 78, 314–23.
- Watson, R.G., Muhale, F., Thorne, L.B., Yu, J., O'Neil, B.H., Hoskins, J.M., Meyers, M.O., Deal, A.M., Ibrahim, J.G., Hudson, M.L., Walko, C.M., McLeod, H.L., Auman, J.T., 2010. Amplification of thymidylate synthetase in metastatic colorectal cancer patients pretreated with 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Eur. J. Cancer* 46, 3358–64.
- Weber, S.A., Ostermann, A., Pohl, C., 2009. [Fulminant, life-threatening influenza A/H1N1 virus infection]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 134, 2447–50.
- Weller, M., 1998. Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53. *Cell Tissue Res.* 292, 435–45.
- Woynarowski, J.M., 2002. Targeting critical regions in genomic DNA with AT-specific anticancer drugs. *Biochim. Biophys. Acta* 1587, 300–8.
- Yamamoto, Y., Gaynor, R.B., 2001. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* 107, 135–42.
- Zhang, W., Li, Z., Zhou, M., Wu, F., Hou, X., Luo, H., Liu, H., Han, X., Yan, G., Ding, Z., Li, R., 2014. Synthesis and biological evaluation of 4-(1,2,3-triazol-1-yl)coumarin derivatives as potential antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 799–807.
- Zhang, Y., Huang, Y.-J., Xiang, H.-M., Wang, P.-Y., Hu, D.-Y., Xue, W., Song, B.-A., Yang, S., 2014. Synthesis and anticancer activities of 4-(4-substituted piperazin)-5,6,7-trialkoxy quinazoline derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 78, 23–34.
- Zhang, Z., Qian, W., Zhang, J., 2009. Positive selection for elevated gene expression noise in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 5, 299.

7 ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Önem YÜCE ŞAHİN

Doğum Tarihi: 04.07.1981

Öğrenim Durumu: Doktora

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji Bölümü	Akdeniz Üniv.-Biyoloji Bölümü	2000-2004
Y. Lisans	Biyoloji Bölümü	GOP Üniv.-Biyoloji Bölümü	2005-2008
Doktora/S.Yeterlik/ Tıpta Uzmanlık	Biyoloji Bölümü	GOP Üniv.-Biyoloji Bölümü	2008-

Yüksek Lisans Tez Başlığı:

Tokat Merkez ve İlçelerinde İnsan ve Sığırlarda Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKA) Prevalansının ELIZA Yöntemiyle Belirlenmesi

Danışman: Prof. Dr. Şaban TEKİN

Doktora Tezi Başlığı:

Yeni sentezlenmiş bazı kinolin türevlerinin antiproliferatif ve sitotoksik aktivilerinin *in vitro* olarak belirlenmesi

Danışman: Prof. Dr. Şaban TEKİN

Görevler :

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Araş. Gör.	GOP Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü	2007-2014
Uzm. Biyolog	Sinop Halk Sağlığı Laboratuvarı	2014-