

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞAL KAYNAKLI PEPTİTLERİN SENTETİK
YAKLAŞIMLA ÜRETİMİ VE KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI
İNCELENMESİ

Çağla İÇLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Danışman

Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA

Eş Danışman

Prof. Dr. Serap ACAR

Temmuz, 2025

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL KAYNAKLI PEPTİTLERİN SENTETİK
YAKLAŞIMLA ÜRETİMİ VE KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI
İNCELENMESİ**

Çağla İçli tarafından hazırlanan tez çalışması 21.07.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Programı **YÜKSEK LİSANS** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Serap ACAR
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Salih TUNCAY, Üye
Üsküdar Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “Doğal Kaynaklı Peptitlerin Sentetik Yaklaşımla Üretimi ve Kansere Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırmalı İncelenmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Çağla İÇLİ



Bu çalışma, TÜBİTAK BİDEB 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ve Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün FYL-2024-6053 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



*Aileme, dostlarıma ve
eşime*

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimi tamamlamak üzere olduğumda hep aklımda olan yüksek lisans eğitimimiyle ilgili bana fikir veren, yol gösteren, her daim yanımda olduğunu hissettiğim, bir sorum veya kaygım olduğunda beni sabırla dinleyen ve bilgi birikimiyle her zaman bana ışık tutan sevgili hocam Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA'ya,

Yüksek lisans eğitimime başlamadan önce kendisiyle tanıştığım ve tanıştığım andan itibaren bilgisine hayran olduğum, her sıkıntılı anımda bana yardımcı olup sorunlarımı en hızlı şekilde çözen, tez sürecimi daha kolay hale getiren ve karamsarlığa her düştüğümde beni ürettiği çözümlerle o karamsarlıktan çıkaran sevgili hocam Prof. Dr. Serap ACAR'a

Hücre çalışmaları için laboratuvarını açan ve bize destek olan sevgili Doç Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a, hiçbir ricamı geri çevirmeyip her sorumda bana yardımcı olan sevgili Dr. Öğr. Gör. Pelin Pelit ARAYICI'ya,

Peptitler üzerinde hedeflediğim çalışmamı gerçekleştirmemde maddi olarak beni 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a ve tez çalışmamda gerekli maddi desteği sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'ne,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan, her sorumda sıkılmadan bana cevap veren ve peptitleri daha iyi anlamamı sağlayan sevgili arkadaşım Koray KAHRAMAN'a,

Herkes bilir ki yüksek lisans eğitimine başlarken büyük bir bilim açlığıyla başlanır ve yolda bazı şeylerin ne kadar zor gerçekleştiği anlaşılır. İşte bu yolculukta çok fazla düştüğüm, pes etme noktasına geldiğim, üzüldüğüm, umutsuzluk hissettiğim yeri geldi heyecanlandığım, sabırsızlıkla ertesi günü beklediğim çok fazla zaman oldu. Bu süreçte her daim yanımda olan, beni her zaman destekleyen, yapabileceğime benden çok inanan sevgili annem Canan KÜTÜK'e, biricik kardeşim Nehir İÇLİ'ye, dostum Ayşe KAN'a ve tabi ki canım eşim Batuhan DEMİR'e

Tezimi tamamlamamda bana destek olan, anlamadığımda bana bıkmadan tekrar tekrar anlatan sevgili arkadaşım Kaan EREN'e,

Hücre çalışmalarında bana destek olan sevgili arkadaşım Zişan TOPRAK'a

Bu süreçte tanıştığım güzel arkadaşlığı, samimiyeti ve tecrübesiyle bana destek olan Seçil KAYA'ya,

Yüksek lisans eğitimimin başlamasıyla dahil olduğum ve çok güzel arkadaşlıklar edindiğim ve her zaman güzel vakit geçirdiğim Günkara Research Group ve Derman'S Lab ekiplerindeki arkadaşlarıma çok çok teşekkür ederim.

Çağla İÇLİ



İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı.....	2
1.3 Hipotez.....	2
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kanser	4
2.1.1 Kanser Nedir?	4
2.1.2 Kanser İstatistikleri	5
2.1.3 Geleneksel ve Yeni Kanser Tedavi Yaklaşımları	6
2.2 Antioksidan Aktivite	8
2.2.1 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	8
2.2.2 Antioksidan Moleküller	9
2.2.3 Reaktif Oksijen Türleri - Reaktif Azot Türleri ve Antioksidatif Savunma Sistemleri	10
2.2.4 Doğal Kaynaklı Antioksidanlar	11
2.2.5 Antioksidan Aktivite Yöntemleri	11
2.3 Biyoaktif Peptitler.....	13
2.3.1 Amino Asit Nedir?	13
2.3.2 Peptitler	16
2.3.3 Terapötik Biyoaktif Peptitler	16
2.4 Kimyasal Peptit Sentezi Yöntemleri.....	19
2.4.1 Katı Faz Peptit Sentezi (SPPS)	20
2.4.2 SPPS'de Kullanılan α -Amino Koruyucu Grupları	21
2.4.3 SPPS'de Kullanılan Reçineler	23
2.4.4 SPPS'de Kullanılan Bağlayıcılar	23

2.4.5	Cleavage Kokteyl Seçimi	25
2.4.6	Analiz ve Karakterizasyon	27
3	MATERYAL METOD	28
3.1	Tez Çalışmasında Kullanılmış Olan Cihazlar	28
3.2	Tez Çalışmasında Kullanılmış Olan Kimyasal Listesi	28
3.3	Tez Çalışmasında Kullanılmış Olan Çözeltiler	30
3.3.1	DMEM High Glucose Besiyeri Çözeltisinin Hazırlanması	30
3.3.2	MTT Çözeltisinin Hazırlanması	30
3.4	Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Sentezlenmesi	30
3.4.1	Sentezlenen Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Katı Fazdan Ayrılması	31
3.5	Sentezlenen Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması	33
3.5.1	Sentezlenen Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Karakterizasyonu	33
3.5.2	Sentezlenen Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Saflaştırılması	33
3.6	Sentezlenen Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Antioksidan Aktivitelerinin Değerlendirilmesi	33
3.7	Sentezlenen Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Kanser Hücre Hattı Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırmalı İncelenmesi.....	34
3.7.1	Hücre Kültürü Çalışmaları	34
3.7.2	Sitotoksisite Analizi ile Antikanser Aktivite Saptanması	34
4	SONUÇ	34
4.1	Sentezlenen Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin LC-MS Analizi	36
4.2	Sentezlenen Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Prep-HPLC ile Saflaştırılması	42
4.3	Saflaştırılmış Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin LC Analizi	44
4.4	Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi	47
4.4.1	DPPH Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Çalışması	47
4.5	Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Antikanser Aktivitesinin Belirlenmesi	49
4.4.1	Sitotoksisite Analizi ile Antikanser Aktivite Saptanması	49
4.6	Sonuçlar ve Öneriler	51
	KAYNAKÇA	54
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	63

SİMGE LİSTESİ

Da	Dalton
dk	Dakika
g	Gram
μ l	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AA	Antioksidan Aktivite
AcOH	Asetik Asit
ACN	Asetonitril
Boc	<i>Ter</i> -bütoksi karbonil
CAT	Katalaz
DCM	Diklorometan
DIEA	N,N-Diisopropiletilamin
DMF	N,N-Dimetilformamid
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidraliz
DTT	Ditiotreitol
DVB	Divinilbenzen
EDT	1,2-Etanditiol
ESR	Elektron Spin Rezonans
ET	Elektron Transfer
FA	Formik Asit
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
Fmoc	9-Fluorenilmetilokdi Karbonil
GST	Glutasyon Transferaz
GTPx	Glutasyon Peroksidaz
HBTU	O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilutonyum hekzaflorofosfat
HCTU	O-(6-Klorobenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronyum hekzaflorofosfat
HF	Hidrojen Florür
HOBt	1-Hidroksibenzotriazol
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
NMP	N-metil-2-pirrolidon
PBF	2,2,4,6,7-Pentametil-dihidronezofuran-5-sülfonil

PEG	Polietilen Glikol
PRX	Peroksiredoksin
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RSC	Reaktif Kükürt Türleri
SET	Tek Elektron Transferi
SOD	Süperoksit Dismutaz
SPPS	Katı Faz Peptit Sentezi
tBu	Tert-Butil
TFA	Trifloroasetik Asit
TFE	Tetrafloro Etilen
TIS	Triisopropilsilan
Trt	Tritil
TRX	Tiyoredoksin
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Kanser hücresinin metastaz süreci	4
Şekil 2.2	ROS, RNS ve RSC Üretimini Gösteren Şema	9
Şekil 2.3	Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan biyoaktif peptit elde etme yöntemleri ve fonksiyonel özelliklerini özetleyen şema	18
Şekil 2.4	Yaygın kullanılan koruyucu gruplar (Fmoc ve Boc).....	22
Şekil 2.5	Boc ve Fmoc stratejilerine ait şemalar	22
Şekil 2.6	C-terminal peptit amitleri için kullanılan Fmoc bazlı reçineler	24
Şekil 2.7	C-terminal peptit asitleri için kullanılan Fmoc bazlı reçineler.....	24
Şekil 2.8	C-terminal peptit asitleri için kullanılan Boc bazlı reçineler	25
Şekil 2.9	C-terminal Peptit Amitleri için Kullanılan Boc Bazlı Reçineler.....	25
Şekil 3.1	Doğal kaynaklı L/IVPK sentetik peptitlerin sentez döngüsü	32
Şekil 4.1	LVPK ham peptidine ait MALDI-TOF-MS spektrumu.....	37
Şekil 4.2	LVPK ham peptidine ait LC kromatogramı	39
Şekil 4.3	IVPK ham peptidine ait MALDI-TOF-MS spektrumu.....	40
Şekil 4.4	IVPK ham peptidine ait LC kromatogramı	41
Şekil 4.5	LVPK ham peptidine ait preparatif HPLC kromatogramı (210 nm).....	43
Şekil 4.6	IVPK ham peptidine ait preparatif HPLC kromatogramı (210 nm).....	44
Şekil 4.7	Saf LVPK peptidine ait LC kromatogramı.....	45
Şekil 4.8	Saf IVPK peptidine ait LC kromatogramı.....	46
Şekil 4.9	24 saat için LVPK ve IVPK peptitlerinin MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığına etkisi	50
Şekil 4.10	72 saat için LVPK ve IVPK peptitlerinin MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığına etkisi	50

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Meme kanseri için değiştirilebilen ve değiştirilemeyen risk faktörleri ..	5
Tablo 2.2 20 Temel amino asit.....	14
Tablo 2.3 Cleavage kokteylleri ve özellikleri	26
Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılmış olan kimyasal listesi	28
Tablo 4.1 Teorik ve deneysel m/z değerlerinin karşılaştırılması	37
Tablo 4.2 LC-ESI-MS analizi için kullanılan gradient elüsyon programı	38
Tablo 4.3 LVPK ham peptidinin LC kromatogramından elde edilen kantitatif veriler	39
Tablo 4.4 Teorik ve deneysel m/z değerlerinin karşılaştırılması	40
Tablo 4.5 IVPK peptidinin LC kromatogramından elde edilen kantitatif veriler ..	42
Tablo 4.6 Saf LVPK peptidinin LC kromatogramından elde edilen kantitatif veriler	45
Tablo 4.7 Saf IVPK Peptidinin LC kromatogramından elde edilen kantitatif veriler	46
Tablo 4.8 LVPK peptidinin konsantrasyona göre gösterdiği % antioksidan aktivite değerleri	48
Tablo 4.9 IVPK peptidinin konsantrasyona göre gösterdiği % antioksidan aktivite değerleri.....	48
Tablo 4.10 LVPK ve IVPK peptitlerinin MCF-7 hücre hattındaki IC50 değerleri	51

Doğal Kaynaklı Peptitlerin Sentetik Yaklaşım İle Üretimi ve Kanser Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırmalı İncelenmesi

Çağla İÇLİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA

Eş-Danışman: Prof. Dr. Serap ACAR

Kanser tedavisi geçmişten günümüze süre gelmekte ve her geçen gün potansiyel tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Bu çözüm yaklaşımlarından biri ise peptitlerdir. Peptitler, kanser teşhis ve tedavilerinin geliştirilmesinde potansiyel biyomoleküller olarak birçok çalışmaya konu olmaktadır. Peptitlerin kanser teşhis ve tedavisi için kullanımında birçok yol bulunmaktadır; doğal peptitlerin taklit edilmesi, sinyal iletimini geliştirmek veya engellemek, terapötikleri özellikle kanser hücrelerine hedeflemek veya bu peptitleri hücre bariyerlerini aşmak için kullanmak bunlardan bazılarıdır. Bu noktada antioksidan-antikanser peptitlerle ilgili özellikle doğal kaynaktan izole edilerek üretilen biyoaktif peptitler üzerine sıklıkla çalışılmaktadır. Bu tez çalışmasında ise yüksek protein yoğunluğuna sahip

siyah soya fasulyesinden izole edilen ve antikanser, antioksidan özellikleri literatürde belirtilmiş olan Leu/Ile-Val-Pro-Lys dizilerinin katı faz peptit sentezi yolu ile (Leu-Val-Pro-Lys ve Ile-Val-Pro-Lys) sentezlenmesi ve ardından üretilen iki peptidin antioksidan özelliğinin ve kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliğinin karşılaştırılması hedeflenmektedir. Kimyasal sentez ile üretilen Leu-Val-Pro-Lys ve Ile-Val-Pro-Lys peptitlerinin LC/MS ile karakterizasyonu yapıldıktan sonra RP-HPLC cihazından saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Ardından bu iki peptitin DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi, MTT testi ile de MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri karşılaştırılarak araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyoaktif peptit, katı faz peptit sentezi, antioksidan-antikanser peptit

ABSTRACT

Production Of Natural Source Peptides With A Synthetic Approach And Comparative Research Of Their Effects On Cancer Cells

Çağla İÇLİ

Department of Biotechnology

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Ömer Tahir GÜNKARA

Co-supervisor: Prof. Dr. Serap ACAR

Cancer treatment has been going on from past to present and potential treatment methods are being developed every day. One of these solution strategies is peptides. Peptides are the potential biomolecules in the development of cancer diagnostics and treatments and are the subject of many studies. There are many ways to use peptides for cancer diagnosis and treatment; mimicking natural peptides, improving, or blocking signal transduction, targeting therapeutics specifically to cancer cells or using these peptides to overcome cell barriers are some of them. At this point, antioxidant-anticancer peptides, especially bioactive peptides isolated from natural sources, are frequently studied. In this thesis, it is aimed to synthesise the Leu/Ile-Val-Pro-Lys sequence (Leu-Val-Pro-Lys and Ile-Val-Pro-Lys) isolated from black soybeans with high protein density and whose anticancer and antioxidant properties have been reported in the literature by solid phase peptide

synthesis and then to compare the antioxidant properties and cytotoxic activity of the two peptides on cancer cells. The Leu-Val-Pro-Lys and Ile-Val-Pro-Lys peptides produced by chemical synthesis were characterized by LC/MS and purified by RP-HPLC. Then, the antioxidant activity of these two peptides by DPPH method and their cytotoxic activity on breast cancer cells by MTT assay were investigated by comparison.

Keywords: Bioactive peptide, solid phase peptide synthesis, antioxidant-anticancer peptide.



1.1 Literatür Özeti

Kanser tedavisi geçmişten günümüze süre gelmekte ve her geçen gün potansiyel tedavi yöntemleri geliştirilerek hastalığın tedavisine dair çözümler aranmaktadır. Günümüzde halen birçok kanser hastası bulunmakta ve yeni kanser vakaları teşhis edilmektedir. Bu süreçte geleneksel tedavi yöntemleri sıklıkla kullanılmakta olsa da yeni tedavi yöntemleri de tercih edilmeye başlanmıştır. Bu çözüm yaklaşımlarından biri ise peptitlerdir. Peptitler, kanser teşhis ve tedavilerinin geliştirilmesinde potansiyel biyomoleküller olarak birçok çalışmaya konu olmaktadır.

Peptitlerin kanser tedavilerinde kullanılması için birçok yol bulunmaktadır; doğal peptitlerin taklit edilmesi, sinyal iletimini geliştirmek veya engellemek, terapötikleri özellikle kanser hücrelerine hedeflemek veya bu peptitleri hücre bariyerlerini aşmak için kullanmak bunlardan bazılarıdır. Peptitlerin elde edilmesi için birçok yöntem literatürde bulunmaktadır. Kimyasal sentez yolu ile üretilen peptitlerde ise üretilen peptitte uygun modifikasyonlar gerçekleştirilerek etkinlikleri arttırılabilmektedir. Peptitlerin antikanser özelliğinin dışında yapılabilecek modifikasyonlarla özelliklerini geliştirmek veya daha etkili özellik gösteren peptitlerin kullanımı terapötik özelliklerini arttırmaktadır. Vücutta serbest radikal oluşumu kanserin meydana gelmesine neden olduğundan antioksidan aktivitesinin var olduğu peptitler daha etkili sonuçlar gösterebilir ve dolaylı olarak kanser riskinin azaltılmasına yardımcı olabilmektedir. Peptitlerin kanser tedavilerinde kullanılmasının nedeni ise geleneksel kemoterapi ilaçlarına göre ilaç dirençlerinin daha az olmasıdır. Bu noktada antikanser peptitlerle ilgili özellikle doğal kaynaktan izole edilerek üretilen peptitler üzerine sıklıkla çalışılmaktadır.

Yüksek protein yoğunluğuna sahip siyah soya fasulyesinden izole edilerek elde edilmiş olan ve antikanser ve antioksidan peptit olduğu belirtilmiş Leu/Ile-Val-Pro-Lys dizisinin doğal kaynaktan enzimatik yol ile izole edilmiştir. Çalışma kapsamında izolatin yüksek antioksidan etkinlik gösterdiği ve insan karaciğer kanseri, insan meme kanseri ve rahim ağzı kanserinde etkili sonuçlar gösterdiği ortaya konulmuştur. Böylelikle literature gıda kaynaklı peptitlerin etkili antikanser ve antioksidan özellik gösterdiği sunulmuştur.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez kapsamında; siyah soya fasülyesinden elde edilen antikanser ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu literatürde belirtilen Leu/Ile-Val-Pro-Lys peptit dizilerinin aktivite gösteren peptit dizisinin saptanması için katı faz peptit sentez yöntemi ile Leu-Val-Pro-Lys ve Ile-Val-Pro-Lys peptit dizilerinin sentezlenmesi ve ardından aktivite gösteren peptit dizisinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Böylece literatürde antikanser ve antioksidan peptit özelliği gösteren Leu/Ile-Val-Pro-Lys peptit dizilerinin belirsizliği ortadan kalkacak ve birçok kanser hücrelerinde etki gösteren peptit dizisi aydınlatılacaktır. Bu sayede kanser tedavisinde yapılan literatür çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

Tez kapsamında belirtilmiş amaca ulaşmak için;

1. Leu-Val-Pro-Lys ve Ile-Val-Pro-Lys tetrapeptit dizilerinin katı faz peptit sentezi ile sentezlenmesi, karakterize edilmesi ve saflaştırılması,
2. Sentezlenen tetrapeptitlerin DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılması,
3. Katı faz peptit sentezi ile sentetik olarak üretilmiş Leu-Val-Pro-Lys ve Ile-Val-Pro-Lys peptitlerin dizilerinin meme kanseri hücreleri (MCF-7) üzerindeki sitotoksik etkilerinin MTT yöntemi ile karşılaştırılması gerçekleştirilecektir.

1.3 Hipotez

Tez çalışmasında, siyah soya fasulyesinden izole edilen Leu/Ile-Val-Pro-Lys tetrapeptit dizisinin, kimyasal sentez yoluyla elde edilen varyantları olan Leu-Val-Pro-Lys(LVPK) ve Ile-Val-Pro-Lys(IVPK) peptitlerinin, antioksidan ve antikanser

aktiviteler göstermesi hipotes edilmektedir. Bu kapsamda ise katı faz peptit sentez yöntemi ile üretilen LVPK ve IVPK peptitlerinin DPPH yöntemi ile değerlendirildiğinde antioksidan özellik göstereceği, MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılarak MTT testi ile sitotoksik etki oluşturacağı ve bu iki diziden birinin diğerine göre daha güçlü antioksidan ve antikanser göstereceği yapılan çalışmalar ile ilgili dizinin tespit edilebileceği hipotezi ile bu tez çalışması gerçekleştirilmiştir.

Bu doğrultuda, sentezlenen iki peptidin biyolojik aktivitelerinin karşılaştırılması ile literatürdeki belirsizliğin giderilerek hangi peptit dizisinin daha etkili olduğu ve biyoaktif peptitlerin potansiyelinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

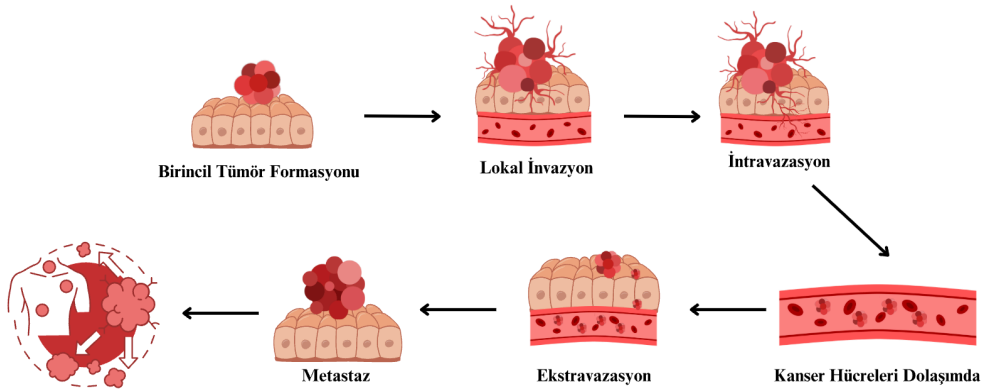


2.1 Kanser

2.1.1 Kanser Nedir?

Kanser, vücutta bulunan hücrelerin anormal bir şekilde kontrolsüz büyümesi, çevrelerindeki dokuyu istila etmesi ve metastaz yaparak yayılmasına neden olan küresel ve bulaşıcı olmayan bir hastalıktır [1], [2], [3]. Metastaz, kanser hücrelerinin anatomik olarak uzak organlara yayılmasına ve daha sonra yabancı doku mikro ortamlarına adaptasyonunu çok adımlı bir hücre biyolojik sürecinin son ürünlerini temsil etmektedir [4].

Hücre dışı matriksteki ve canlı dokunun hücresel mimarisindeki moleküler ve yapısal değişikliklerle meydana gelir [5]. Metastatik süreçte, birincil tümör büyür ve metabolik süreçlerini etkili bir şekilde gerçekleştirebilmek için bir kan kaynağı geliştirir. Bu sürece anjiyogenez denir [6]. Oluşan yeni kan damarları hücrelerin tümörden ayrılıp dolaşım kan sistemine girmesini sağlamaktadır. Bu işlem ise intravazasyon olarak adlandırılmaktadır [7].



Şekil 2.1 Kanser hücresinin metastaz süreci [6], [7]

Hastalığın sürecini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar; genetik mutasyonlar, tümörün mikroçevresi ile etkileşim ve bağışıklık sistemidir [1]. Kanser, kaynaklandığı doku türü, histolojik özellikleri ve moleküler profiliyle birlikte çeşitli kriterlere göre sınıflandırılabilir. Örneğin meme kanseri, moleküler alt tip içerisinde çeşitli klinik seyirler göstermektedir. Luminal Tip, HER2 (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2) tipi ve bazal benzeri tipler gibi gen ifadesi profil analizlerine göre çeşitli alt tiplere ayrılmaktadır [8], [9].

Meme kanseri, meme dokusunda meydana gelen sık görülen bir kanser türüdür. Dünya genelinde kadınlarda sıkça görüldüğü ve nadir de olsa erkekleri de etkileyebileceği araştırmalarda yer almaktadır. Meme kanserinin gelişimini etkileyen risk faktörleri; çevresel, genetik ve epigenetiktir [10]

Meme kanseri için değiştirilebilen ve değiştirilemeyen risk faktörleri bulunmaktadır.

Tablo 2.1 Meme kanseri için değiştirilebilen ve değiştirilemeyen risk faktörleri [11]

Değiştirilebilen Risk Faktörler	<ul style="list-style-type: none">• Obezite• Fiziksel Hareketsizlik• Alkol ve Sigara Kullanımı• Kansorejenlere Maruz Kalma
Değiştirilemeyen Risk Faktörler	<ul style="list-style-type: none">• Kadın Cinsiyeti• Yaşlılık• Meme Dokusunun Yoğunluğu• Ailede Meme ve Yumurtalık Kanseri Geçmişi• Yüksek Penetrasyonlu genler; BRCA1 ve BRAC2

2.1.2 Kanser İstatistikleri

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'na (IARC) göre her yıl 20 milyondan fazla yeni kanser vakası beklenmektedir [12]. Dünyada en sık rastlanan ölüm nedenlerinden biri olan kanser, 2020 yılında yapılan araştırmalara göre 19,3 milyon

yeni vakada görülürken neredeyse 10 milyondan fazla insanın ölümüne de sebebiyet vermiştir [13], [14] Küresel Kanser İstatistik Kurumu 2022 yılı için yaptığı çalışmada dünya genelinde yaklaşık 20 milyon kişiye kanser tanısı konulacağı ve neredeyse 10 milyon kişinin kanserden dolayı hayatını kaybedeceğini belirtmektedir [15]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Kanser ölümlerinin %70'inin düşük ve orta gelirli ülkelerde gerçekleştiğini, yaşlanma ve diğer nedenlere bağlı ölüm oranlarının düşmesi sonucunda bu ülkelerdeki ölüm oranının artmaya devam edeceğini ön görmektedir [16]. Küresel Kanser İstatistiklerine göre dünya çapında en sık tanı konulan kanser türleri; akciğer, meme ve kolorektaldir. Ek olarak meme kanseri son yıllarda en çok teşhis edilen kanser türüdür [17]. Küresel istatistikler, 2020 yılında 2,2 milyon yeni akciğer kanseri vakası tespit etmiştir. Bu veri tespit edilen tüm kanser vakaların %11,4'üne ve bu nedenden kaynaklanan tüm ölümlerin %18'ine karşılık gelmektedir [18]. İnvaziv (metastatik) meme kanseri kadınlarda en sık görülen karsinomdur ve kadın kanserlerinin %22'sini oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu kanser türünün daha fazla görüldüğü bölgeler Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya iken Japonya, Sahraaltı Afrika'nın daha az gelişmiş bölgeleri, Güney ve Doğu Asya'da daha az görülmektedir [19].

2.1.3 Geleneksel ve Yeni Kanser Tedavi Yaklaşımları

Kanser tedavisi, hastalıkla birden çok alternatif mekanizma vasıtasıyla mücadele etmeyi hedefleyen çeşitli yöntemleri içerir. Yaygın olarak kullanılan geleneksel tedaviler; cerrahi müdahale, radyasyon, kemoterapidir [20]. Kanser tedavisini belirlerken kanser evresinin yanı sıra tümörün anatomik yerleşimi, semptomları, seyri gibi klinik farklılıklar tedavi belirlemede önemli bir rol oynamaktadır [21]. Geleneksel kemoterapide kullanılan kemoterapötikler, hücre bölünmesinde görev alan proteinleri hedef almakta ve DNA'ya doğrudan etki ederek hücre ölümünü başlatmaktadır [22]. Kemoterapi, birçok hastayı iyileştirmek için uygulanmıştır ve uygulanmaya devam etmektedir ancak düşük seçicilik, kısa yaşam süresi ve ilaç direnci gibi çeşitli zorluklar tedavi sürecinde sıklıkla karşılaşılan çeşitli zorluklardandır [23]. Kemoterapide kanser tedavisinin terapötik etkinliğinin arttırmak ve direnç gelişimini azaltmak için birçok ilaç kombinasyonu da denenmektedir fakat kombinasyon kemoterapiler tedavinin tamamlanmasını

sınırlayan daha fazla yan ve toksik etkiye sebebiyet verebilmektedir [24]. Tedavi sürecinde kanser hastalarının yaklaşık %90'ını kemoterapi direnci göstermektedir [25]. Kanser tedavisi için en uygun olanı kanserli ve sağlıklı dokular arasında ayırım yapabilen tedavidir [26]. Günümüzde, tedaviler kanseri hedeflemeye ve hastalara göre kişiselleştirmeye yönelik değişikliklerle hızla ilerlemektedir. İmmunoterapi, vücudun kanser hücrelerine karşı bağışıklık gösterdiği etkiyi arttırmak için kanser aşılıları, adaptif hücre terapisi, sitokinler ve monoklonal antikörleri kullanan umut verici birçok yol ortaya çıkarmıştır [27]. Hedefli terapi ise sağlıklı hücre ve dokulara verilen hasarı en aza indirmeyi amaçlarken kanser hücrelerinin spesifik özelliklerini kullanarak onlara ulaşmayı amaçlamaktadır [28].

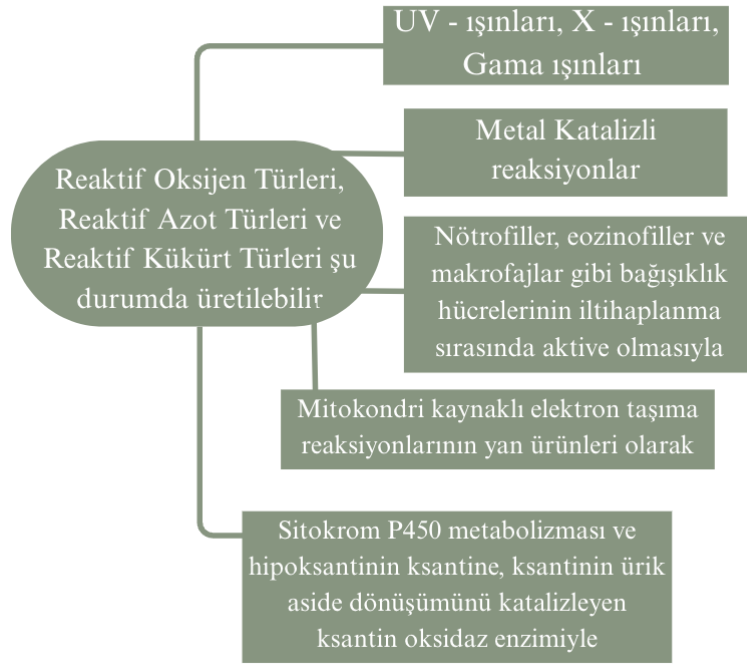
Tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunan proteinler, sağlıklı dokuyu oluşturan hücrelerdeki proteinlerle benzerlik gösterebilmektedir. Bu durum kötü huylu hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından ayırt edilmesini zorlaştırmaktadır [29]. Peptitlerin spesifik hedefleme kapasiteleri ve çeşitli terapötik etkileri sayesinde kanser tedavisinde umut verici olarak ortaya çıkmıştır. Peptitler; ilaç, hedeflenmiş ajan, sitotoksik ilaç taşıyıcı, hormon ve aşı gibi kanser tedavisinde farklı yaklaşımlarda kullanılabilir [30]. Peptitler, normal hücreleri etkilemeden doğrudan kanser hücrelerini hedefleyerek kanser hücrelerinin çoğalmasına engel olmuş ve bu sayede hem terapötik bir seçim hem de hedeflenmiş bir terapi seçeneği ortaya çıkararak geleneksel kemoterapiye alternatif bir yöntem oluşturmuştur [31], [32]. Doğal ürünler, çoklu hedefleme etkinliği, toksisite olmaması ve ilaç direnci olmaması nedeniyle antitümör ilaçları geliştirmek ve keşfetmek için değerli bir kaynaktır. Ayrıca, doğal olarak biyoaktif ürünlerin kanserleri önleme ve tedavi etme yetenekleri olduğu kanıtlanmıştır [33]. Biyoaktif peptitler, spesifik amino asit konfigürasyonuna sahip olan ve sağlık ve/veya vücut işleyişi üzerinde istenen, olumlu etkilere sahip olan protein parçalarıdır. Genellikle işlevselliklerine göre antimikrobiyal, antidiyabetik, antihipertansif, immünomodülatör, antikanser ve antioksidatif olarak sınıflandırılırlar [34]

2.2 Antioksidan Aktivite

2.2.1 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikal, bağımsız olarak var olabilen, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip kimyasal bir türdür. Bu türler, radikal olmayan moleküllere oranla daha az karalıdır. Kararsız oldukları için rastgele moleküllerle reaksiyona girme eğilimi göstermektedirler. Vücutta bulunan moleküllerin çoğu ise radikal değildir. Radikal, kararsız olduğu için başka bir moleküle elektron vererek ya da elektron alarak reaksiyona girdiği molekülü radikale dönüştürmektedir. Bu şekilde radikal oluşturma döngüsü devam etmektedir [35], [36]. Oksijeninin normal kullanımı sırasında vücutta sürekli olarak serbest radikaller üretilmektedir. Enerji üretilmesi için hücreler tarafından oksijen kullanılır ve bu biyokimyasal reaksiyon sonucunda mitokondriler tarafından serbest radikaller oluşturulmaktadır. Oluşturulan yan ürünler redoks süreçlerinden kaynaklanan reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RNS) ile reaktif kükürt türleridir (RSC) [37], [38], [39].

ROS grubu lipid peroksidasyon ürünlerini ve protein karbonil türlerini içermektedirken RNS grubu nitrik oksit ve peroksinitritleri içermektedir. Nitrik oksit, DNA hasarı, iltihaplanma, kanser hücresi büyümesi ve apoptotik işlev bozukluğunda önemli bir rol oynamaktadır. RSC ise radikaller ile hareket ederek biyomoleküllere zarar vermektedir. Dolaylı olarak DNA'daki genlere verilen kapsamlı hasar, etkisiz proteinler üreten genlerle sonuçlanabilmektedir [39].



Şekil 2.2 ROS, RNS ve RSC üretimini gösteren şema [40], [41], [42]

Vücutta meydana gelen serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasındaki denge olumsuz olduğunda ortaya oksidatif hasar çıkmaktadır ve oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır [40]. Oksidatif stres sonucu serbest radikaller, protein, lipit ve nükleik asitler gibi moleküllerle etkileşime girerek vücutta hücre homeostazında bozulmaya neden olabilmekte ve bunların sonucunda kanser gibi ölümcül hastalıkların gelişimine katkıda bulunmaktadır [43], [44].

2.2.2 Antioksidan Moleküller

Antioksidan, hedef moleküldeki oksidatif hasarı geciktiren, engelleyen veya ortadan kaldıran bir madde olarak tanımlanmaktadır [45]. Antioksidan olarak belirtilen madde, vücut tarafından zahmetsizce emilmeli, serbest radikal türlerinin oluşumunu engellemeli, redoks metallerini şelatlamalıdır. [46] Normal fizyolojik koşullarda insan hücrelerinin, dokularının ve organların sağlığı antioksidasyon – oksidasyon dengesiyle korunmaktadır. Oksidasyon, besin metabolizmasını ve detoksifikasyon gibi normal fizyolojik süreçlerde yer almaktayken antioksidanlar, dokulardaki ve organlardaki oksidatif hasarı önlemek için gereklidir [47].

Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan olarak sınıflandırılabilir. Enzimatik antioksidanlar, reaktif oksijen türlerini enzimatik reaksiyon ile temizlemektedirler [48]. Bunlar;

- Süperoksit Dismutaz (SOD)
- Katalaz (CAT)
- Glutasyon peroksidaz (GTPx)
- Tiyoredoksin (TRX)
- Peroksiredoksin (PRX)
- Glutasyon Transferaz (GST)
- Enzimatik olmayan Antioksidanlar, vitaminler (C ve E vitaminleri), β -karoten, ürik asit ve tiyol (sülfidril) grubu içeren bir tripeptit olan GSH gibi düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir ve aşağıda listelenmiştir [48].
- Retinol
- Askorbik Asit
- α -Tokoferol
- β -Karoten
- Glutasyon

2.2.3 Reaktif Oksijen – Reaktif Azot Türleri ve Antioksidatif Savunma Sistemleri

ROS'lar ve RNS'ler, vücuttaki biyomoleküllere zarar verilmesinde ve hücrelerde oksidatif stresin oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Birincil ve İkincil reaktif oksijen azot türleri (RONS) olarak sınıflandırılabilir. Birincil RONS türleri;

- Süperkoksit Anyon Radikali ($O_2^{\bullet-}$)
- Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
- Azot Monoksit (NO^{\bullet})

Bu türler İkincil RONS türlerine göre daha az toksiktir. Süperoksit Dismutaz (SOD), katalaz ve azot monoksit sentazlar gibi antioksidatif enzimler ile kontrol altına alınabilmektedir. Belirtilen enzimler sayesinde hücrede RONS düzeyi düşürülmekte ve sitotoksik etkileri azaltılmaktadır.

İkincil RONS türleri;

- Hidroksil Radikali ($\bullet\text{OH}$)
- Peroksinitrit (ONOO^-)
- Hipokloröz Asit (HOCl)

Bu türler, birincil RONS'ye göre daha reaktif ve toksik bileşiklerdir. Bu türler antioksidatif enzimlerle etkin bir şekilde kontrol altına alınamamaktadır. Dolayısıyla ikincil türlerin daha zararlı etkilerin oluşmasına sebebiyet vermektedir. Bunlar birincil RONS'nin diğer reaktif türlerle etkileşimi sonucunda oluşmaktadır [49], [50].

2.2.4 Doğal Kaynaklı Antioksidanlar

Günümüzde sentetik yol ile üretilen antioksidanların zararlarının etkisi ortaya çıkmaya başlamıştır. Alternatif ve koruyucu tıp ise doğal kaynaklı doğal antioksidanlar üzerine ilgi artmıştır [51]. Doğal antioksidanların başlıca kaynakları, bitkilerin farklı bölümlerinde yer alan bitki fenollerini olarak tanımlanabilir. Bu fenolik maddeler, meyve, sebze, tohum, fındık, yaprak, kök ve kabuk gibi bitkilerin pek çok kısmında mevcuttur. Bitkiler, normal yaşam döngülerinde flavonoid, uçucu yağ, alkaloid, lignan, terpen, terpenoid, tokoferol, fenolik asit, peptit ve çok işlevli organik asit gibi bir dizi ikincil bileşen üretmektedir. Bu durum, onları önemli doğal antioksidan kaynakları haline getirmektedir [52].

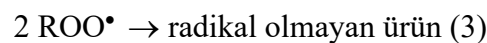
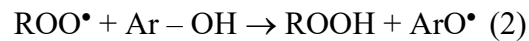
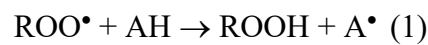
Biyolojik olarak antioksidan peptitler, endojen veya ekzojen olarak 2 gruba ayrılabilir. Endojen antioksidan peptitler, hücrelerde doğal olarak bulunmaktadır. Glutasyon, karnosin ve siklo(His-Pro) bunlara örnektir. Ekzojen antioksidan peptitler, antioksidan potansiyeline sahip gıdalar gibi dış veya çevresel kaynaklardan karşılanmaktadır [53]

Alanin (Ala), izolösin (Ile), lösin (Leu), prolin (Pro), fenilalanin (Phe), tirozin (Tyr) ve triptofan (Trp) gibi hidrofobik amino asitlerin peptit dizisinde bulunması antioksidan aktivite üzerinde daha büyük bir etkiye sahip olabileceği gözlemlenmiştir [54].

2.2.5 Antioksidan Aktivite Yöntemleri

Antioksidan aktivite; antioksidanların serbest radikaller ile etkileşime girerek oksidatif zincir reaksiyonlarını sonlandırması ve hücrel bileşenlerin oksidayonunu önlemesiyle gerçekleşmektedir [55]. Yapılan birçok araştırmada gıdalardan elde edilen maddelerin toplam antioksidan aktivitesini saptanabilmesi için geliştirilen birçok yöntem bulunmaktadır. Maddelerin antioksidan aktivitesini belirlenmesine yönelik yöntemler 2 ana gruba ayrılabilir [56]:

- Tek Elektron Transferi (SET); elektron transferini içeren bu analizlerde antioksidan tepkimesi uygun bulunan bir redoks potansiyeli probu ile taklit edilir. Tepkimede, antioksidan peroksil radikalleri ile reaksiyona girmeyip floresan veya renkli bir prob yani oksitleyici madde ile reaksiyona girmektedir. Spektrofotometrik Elektron Transfer (ET) tabanlı analizlerde antioksidanın indirgendiği durumda renk değişikliğini gösteren bir oksidanın indirgenmesindeki kapasitesini ölçmektedir. Reaksiyondaki renk değişikliğinin derecesi ise numunedeki antioksidan konsantrasyonu ile ilgilidir[57].
 - ABTS Analizi
 - DPPH Analizi
 - Demir Oksidasyonu-Ksilenol Turuncusu (FOX) Analizi
 - Ferrik Tiyosiyanat (FTC) Analizi
 - Ferrik İndirgeyici/Antioksidan Güç (FRAP) Analizi
 - Potasyum Ferrisiyanür İndirgeyici Güç (PFRAP) Analizi
 - Bakır İndirgeyici Antioksidan Güç (CUPRAC)
- Hidrojen Atom Transferi (HAT); antioksidan bileşiğinin H atomu vermesiyle reaktif oksijen türleri temizleme yeteneğini ölçer. HAT reaksiyon mekanizması, antioksidanların H atomunun daha kararlı serbest radikaller vermek üzere ROO• 'ya aktarılmasını içermektedir. Bir fenolün (Ar – OH) H atomunun bir ROO• radikaline aktarıldığı reaksiyon aşağıda gösterilmektedir[57], [58].



2.2.5.1 Kararlı Serbest Radikallere (DPPH•, ABTS•+) Karşı Temizleme (Scavenging) Aktivitesi

Antioksidan kapasitesinin belirlenmesine sıklıkla kullanılan 2 kararlı ve renkli serbest radikal türü DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidraliz) ve ABTS•⁺ (2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikal katyonudur [59]. Bu iki testin sıklıkla kullanılmasının sebebi, antioksidan ile radikal arasındaki doğrudan reaksiyonu içermesi ve enzim inhibisyonu veya birden fazla radikalın varlığı gibi etkenlerin süreci karmaşıklaştırılmamasıdır [60]. DPPH testindeki prensip, test edilen numunede bulunmakta olan antioksidanlar tarafından kararlı serbest radikal DPPH'in indirgenmesinin ölçülmesi şeklinde özetlenmektedir. DPPH çözeltisinin başlangıçta koyu mor olan rengi bir antioksidan ile reaksiyona girdiğinde, radikal nötralize oldukça daha açık bir renge dönüşmektedir. 517 nm dalga boyunda spektrofotometri kullanılarak kantitatif olarak analiz edilir ve DPPH radikalının inhibisyon yüzdesinin hesaplanmasına olanak tanımaktadır [61], [62].

2.3 Biyoaktif Peptitler

2.3.1 Amino Asit Nedir?

Amino asitler, amino grubu (-NH₂) ve karboksil grubu (-COOH) içeren organik bileşiklerdir, proteinlerin ve enzimlerin temel yapı taşıdır [63]. Tüm standart amino asitler için α - karbon dört farklı gruba bağlıdır; karboksil grubu, amino grubu, hidrojen ve yan zincir R grubudur. Glisinin α - karbonunun R grubunda H atomu bulunduğu kiral merkezi yoktur. Diğer amino asitlerin ise α - karbonunda 4 farklı grup bulunduğu ve ayna görüntüleri çakışmadığı için kiral karbon atomuna sahiptirler [64].

Amino asitler, vücut için hayati önem taşımaktadır. Sitokromlar, hormonlar, melanin, nörotransmitterlar, nükleotidler/ nükleik asitler ve diğer kritik azot bazlı bileşiklerin omurgasını oluşturmaktadır. Amino asitler, proteinlerin yapı taşları olarak ara ürünler gibi önemli rollerine ek olarak organizmaların büyümesi ve sürdürülmesi için çok önemli olan kilit metabolik yolların ve süreçlerin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır [65], [66].

Her amino asidin kendine özgü bir yan zinciri bulunmaktadır. Yan zincirler amino asitlerin kimyasal özelliklerini belirlemektedir [67].

Proteinlerde bulunan 20 standart amino asitlerin tümü hücre fizyolojisi ve fonksiyonu için gereklidir. Bu 20 amino asit kendi içinde 2 gruba ayrılmaktadır [65], [68].

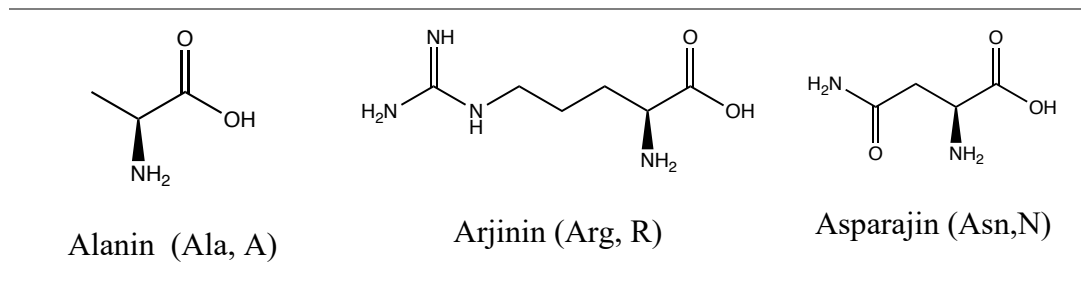
- Esansiyel Amino Asitler, vücutta doğal olarak üretilmeyen ve dışarıdan diyet ile alınması gereken amino asitler olarak tanınlanmaktadır. Bunlar; histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan ve valindir [68].
- Esansiyel Olmayan Amino Asitler, vücutta doğal olarak sentezlenir. Bunlar; alanin, aspartat, asparagin, arginin, sistein, glutamat, glutamin, glisin, prolin, serin ve tirozindir [69].

Amino asitler, yan zincirlerine göre de gruplandırılmaktadır.

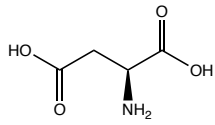
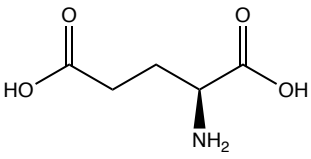
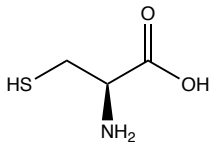
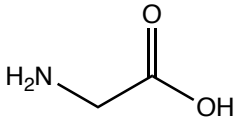
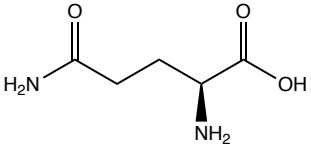
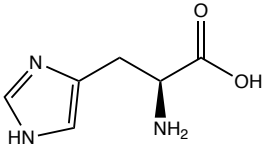
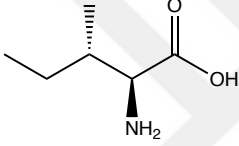
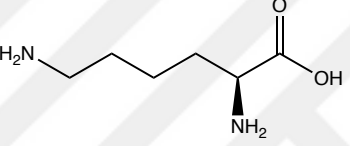
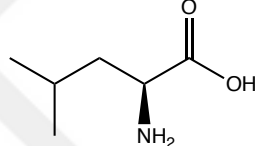
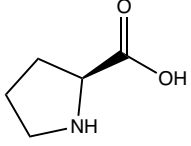
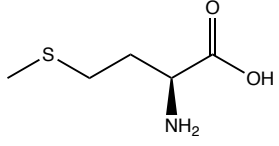
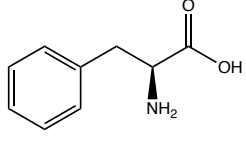
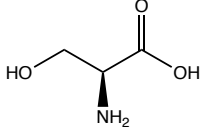
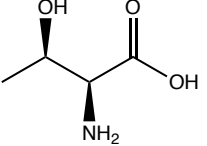
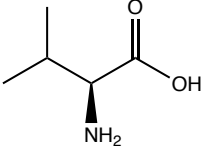
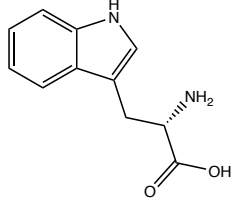
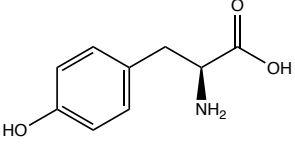
- Hidrofobik özellik gösteren aminoasitler; Metiyonin, izolösin, lösin, valin, fenilalanin, triptofan, tirozin, histidin, lizin, treonin, alanin, glisin, sistein.
- Polar amino asitler, treonin, sistein, serin, aspartik asit, asparajin, tirozin, triptofan, histidin, lizin, arjinin, glutamik asit, glutamin.
- Pozitif amino asitler; histidin, lizin, arjinin. Yüklü amino asitler; aspartik asit, glutamik asit, histidin, lizin, arjinin.
- Alifatik amino asitler, izolösin, lösin, valin.
- Aromatik amino asitler; fenilalanin, triptofan, tirozin, histidin [70].

20 temel amino asit tablo'da gösterilmiştir.

Tablo 2.2 20 Temel amino asit



Tablo 2.2 20 Temel amino asit (devam)[70]

 <p>Aspartik Asit (Asp, D)</p>	 <p>Glutamik Asit (Glu, E)</p>	 <p>Sistein (Cys, C)</p>
 <p>Glutamin (Gln, Q)</p>	 <p>Glisin (Gly, G)</p>	 <p>Histidin (His, H)</p>
 <p>İzolösin (Ile, I)</p>	 <p>Lisin (Lys, K)</p>	 <p>Lösin (Leu, L)</p>
 <p>Prolin (Pro, P)</p>	 <p>Metiyonin (Met, M)</p>	 <p>Fenilalanin (Phe, F)</p>
 <p>Serin (Ser, S)</p>	 <p>Treonin (Thr, T)</p>	 <p>Valin (Val, V)</p>
 <p>Triptofan (Trp, W)</p>	 <p>Tirozin (Tyr, Y)</p>	

2.3.2 Peptitler

Peptit, bir amino asidin karboksil grubu ile diğerk bir amino asidin amino grubu arasında oluşan amid bağı ile meydana gelen bileşiklerdir [71]. Peptitler, genellikle yüksek derecede ikincil yapı gösterirken üçüncül yapı göstermekten yoksun olup 50 amino asitten veya 5000 Da moleküler ağırlıktan daha az polipeptit zincirleri olarak da tanımlanmaktadır [72]. Peptitler amino asit sayılarına göre sınıflandırılırlar. 10 amino asitten oluşan moleküller oligopeptit olarak adlandırılırken 10-50 amino asit içeren moleküller peptit olarak adlandırılmaktadır. 50'den fazla amino asit içeren moleküller ise protein olarak adlandırılmaktadır [73]. Peptitler, moleküler olarak küçük moleküller ve proteinler arasında konumlanmış olmasına rağmen biyokimyasal ve terapötik olarak her ikisinden de farklı olan farmasötik bileşik sınıfını temsil eder [74]. Peptitlerin yapılarını ve özelliklerini belirlemek için amino asit analizi, peptit dizilemesi ve kütle spektrometresi kullanılarak karakterize edilebilir [75]. Peptitlerin yapısal özellikleri işlevselliğini ve biyoaktifliğini belirlemektedir. Peptit yapısı; molekül ağırlığı, net yük, amino asit dizisi, hidrofobiklik ve hidrofiliklik gibi özellikleri kapsamaktadır[76]. Hidrofilik ve hidrofobik özellikler peptitlerin biyolojik bağlantılarını ve etkileşimlerinde önemli rol oynamaktadır [24]

Peptit üretiminde molekül boyutu üretim şeklini belirlemektedir. Büyük peptitler ve proteinlerin sentezi için rekombinant DNA teknolojisi kullanılırken 5 – 80 amino asit kalıntısı içeren peptitlerin üretiminde kimyasal sentez uygulanabilmektedir [77].

Sentetik peptitler, terapötik ajanlar olarak ve kanserin tanı ve tedavisi, antibiyotik ilaç geliştirme, epitop haritalama, antikor üretimi ve aşı tasarımı gibi çeşitli çalışma alanlarında büyük öneme sahiptir. Biyolojik olarak aktif peptitlerin kimyasal sentezi yapı-aktivite ilişkilerinin incelenmesi için olanak sağlayabilir ve modifikasyonlar ile gelişmiş özellik ve niteliklere sahip peptit sentezine olanak sağlayabilmektedir [78].

2.3.3 Terapötik Biyoaktif Peptitler

Terapötik biyoaktif peptitler (BP), belirli vücut fonksiyonları üzerinde tanı ve tedavi edici etkiler gösteren ve insan sağlığı üzerinde düzenleyici ve koruyucu rol

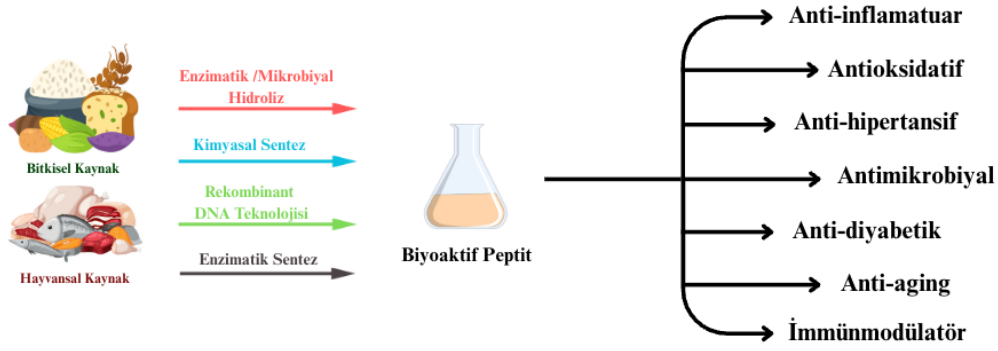
oynayabilen özel protein parçacıkları olarak tanımlanabilmektedir. “Biopep” adı verilen bir veri tabanında 1500’den fazla biyoaktif peptit bulunmaktadır ve her biri birbirinden farklıdır. Biyoinformatiğin hızlı gelişimi sonrası birçok veri tabanı oluşturulmuştur. Biopep dışında PIR, GeneBank ve Swiss-Prot gibi büyük protein ve gen dizisi veri tabanları da bulunmaktadır [79], [80], [81] . Peptit biyoaktivitesi, proteinden serbest kaldıktan sonra amino asit bileşimi ve dizilimi, hidrofobikliği ve molekül ağırlığına bağlıdır. 2 ile 20 amino asitten oluşan, molekül ağırlığı 3 kDa’dan düşük ve prolin, valin, triptofan ve fenilalanin gibi hidrofobik amino asit içeren peptitlerin güçlü antioksidan özellik gösterdiği çalışmalarda bulunmuştur [82]. Biyoaktif peptitler, gıda kaynaklı oldukları için küçük ve oldukça aktifler ve suda yüksek çözünürlüğe ve yüksek kullanıma sahiplerdir [83]. Antioksidan etkinlik, amino asitlerin dizilimi ve peptit kalıntılarına bağlıdır [84]. Biyoaktif peptitlerin elde edilmesinde çeşitli hayvansal ve bitkisel kaynaklar kullanılmaktadır [82].

Terapötik peptitler, 3 kaynaktan türetilmektedir;

- 1) Bitkiler, hayvanlar veya insanlar tarafından doğal olarak üretilen, genellikle doğal peptit hormonlarından ya da büyük protein fragmanlarından türetilen doğal ya da biyoaktif peptitler
- 2) Rekombinant veya genetik kütüphanelerden izole edilen peptit dizileri
- 3) Kimyasal kütüphanelerden keşfedilen sentetik peptitler [72].

20. Yüzyılın başlarında hayvan organlarından hormonal olarak aktif doğal peptitlerin izolasyonu ile peptitlerin terapötik kullanımı başlamıştır. Günümüze kadar doğal olarak oluşan biyolojik peptitlerin sentez yolları incelenmiş ve geliştirilmiştir [85].

Bitkisel ve hayvan kaynaklarından biyoaktif peptit elde etme yöntemleri ve fonksiyonel özelliklerini özetleyen şema Şekil 2.3’te sunulmuştur.



Şekil 2.3 Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan biyoaktif peptit elde etme yöntemleri ve fonksiyonel özelliklerini özetleyen şema [34], [86], [87]

Biyoaktif peptitler, hücresel seviyede antioksidan etki gösterdiği; lipid peroksidasyonu, hücre içi ROS seviyeleri ve apoptoz gibi oksidatif stres biyobelirteçlerini azalttığı, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi çeşitli antioksidan enzimlerin aktivitesini artırdığı yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir [88].

Peptitlerin radikal süpürme kapasitesi, farklı analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirilebilmektedir. Genellikle ABTS⁺• (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)) ve DPPH• (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) gibi sentetik radikaller kullanılarak gerçekleştirilen kolorimetrik testler tercih edilmektedir. Ek olarak radikallerin doğrudan gözlemlenmesine olanak sağlayan elektron spin rezonans (ESR) mikroskopisinden de yararlanılmaktadır [84]

Literatürde birçok biyoaktif peptit araştırması yer almaktadır. Bunlardan mısır gluteni unu, mısırın bir yan ürünü olarak yaklaşık %60 protein içermektedir. Bu protein önemli miktarda hidrofobik amino asit içermekte ve antioksidan aktivite göstermektedir [83] Siyah soya fasülyesinde biyolojik aktif bir peptit elde etmek için hidroliz yöntemiyle elde edilen tetrapeptit fraksiyonu antioksidan ve antikanser aktivite testleri için kullanılmış ve çalışmalar sonucunda antioksidan ve antikanser aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir [89].

Siyah soya fasülyesinden elde edilmiş olan tetrapeptit fraksiyonunun sekansı Leu/Ile-Val-Pro-Lys şeklindedir. Yapılan çalışmada elde edilen hidrolizatın insan karaciğeri kanser (HepG2), meme kanseri (MCF-7) ve Rahim ağzı kanseri (Hela) hücrelerine karşı antioksidan ve antikanser aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir [89].

Terapötik peptitler; diyabetik, osteoporotik, onkolojik, gastroenterolojik, kardiyovasküler, immünosupresyon, akromegali, enürezis, antiviral, antibakteriyel ve antifungal endikasyonların tedavisine önemli oranda katkıda bulunmaktadır [90].

Peptit bazlı ilaçlar veya antikanser özellik gösteren peptitler birçok araştırmadan elde edilmiş ve terapötik özelliği sayesinde çoğu hastalıkta kullanılmıştır. Günümüzde kanser hastalığının artmasıyla biyoaktif peptitlere yönelim hızla artmıştır. Gıda kaynaklı peptitler ulaşımın kolaylığı yeni biyoaktif peptit geliştirmeye olanak sağlamıştır. Günümüze kadar 80'den fazla peptit ilacı FDA (Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmış olup pazara girmiş veya klinik öncesi ve klinik çalışma aşamasındadır [91]. Gıda kaynağında elde edilen biyoaktif peptitler için enzimatik hidroliz yöntemi kullanılmakta ve enzim kullanıldığında ötürü maliyet konusunda dezavantajdır. Enzimler yüksek maliyetlere sahiptirler. Enzim – substrat oranı, hidroliz süresi, pH ve sıcaklık gibi diğer faktörler ise peptitlerdeki hidrolizat, uzunluk, molekül ağırlığı ve amino asit bileşimi gibi parametreleri etkileyebileceğinden elde edilecek peptitin biyoaktivitesi etkilenebilmektedir [92]. Sentetik yol ile üretimde ise üretim maliyeti enzimatik hidroliz yönteminden daha azdır ve istenilen modifikasyonlar gerçekleştirilene peptidin terapötik özelliği artırılabilir [93], [94].

2.4 Kimyasal Peptit Sentezi Yöntemleri

Peptitler, birçok tıbbi ve farmasötik araştırmalarda önemli bir rol oynadığı için poliamid yapıların sentezi organik kimyanın odak noktalarından biridir [95]. Kimyasal olarak peptit sentezi için birçok yöntem bulunmaktadır. Katı faz peptit sentezi (SPPS), çözelti fazı sentezi (SPS), kimyasal ligasyonu, doğal kimyasal ligasyon ve ifade edilmiş protein ligasyonu peptit sentez yöntemlerindedir. Peptit sentezinde kullanılan ve uygulanabilirliği daha kolay olan 2 önemli yöntem ise katı faz peptit sentezi (SPPS) ve çözelti fazı sentezidir (SPS) [93], [95], [96]. İlk başarılı peptit sentezi 1903 yılında Emil Fischer tarafından iki amino asidin birleştirilmesi sonucu gerçekleştirilmiştir. Bu yıllarda koruyucu bir amino grubu olmadığından daha uzun peptitlerin sentezi mümkün olmamaktadır. Bergmann ve Zervas tarafından benzil klorokarbona (Z-klorür) geliştirilmesi ve Andreson ve çalışma

arkadaşlarının tetraetil pirofosfit gibi yeni eşleştirici reaktifleri tanıtması peptit sentezinde bir dönüm noktası olmuştur [95].

2.4.1 Katı Faz Peptit Sentez (SPPS)

Geçmişten günümüze kadar peptitlerin kimyasal sentez yöntemleri gelişmektedir ve en sık kullanılan yöntemlerden biri katı faz peptit sentez (SPPS) yöntemidir. Katı faz peptit sentezinin sıklıkla kullanılmasının sebebi çözeltili faz peptit sentezinin uygulanabilirliğinin oldukça karışık ve zahmetli olmasından kaynaklanmaktadır. Çözeltili faz peptit sentezindeki bu zorluklara çözüm olarak R.B. Merrifield tarafından katı faz peptit sentezi önerilmiş ve bu sayede 1984 yılında Nobel ödülü almıştır. Merrifield tarafından önerilen bu yöntem sayesinde birçok akademik araştırmada peptit sentezi için tercih edilen yöntem SPPS olmuştur [95], [97], [98].

Yöntemin stratejisi, C-terminal koruyucu grup polimerik bir taşıyıcı görevi görmektedir ve çözünmeyen bir yüzey (katı destek) üzerinde gerçekleştirilir [99]. SPPS yöntemi sayesinde birçok kimyasal modifikasyon içeren özel peptitler elde edilebilmektedir [97], [98]. Bu yöntem daha çok 50 amino asitten az peptit sekansları için tercih edilirken aynı zamanda her türlü peptit dizisinin sentezini mümkün kılmaktadır [98].

SPPS'nin ilkesi, katı bir desteğe (reçine) tutturulmuş amino asitler kullanılarak, genellikle peptidin C-terminal ucundan N-terminal ucuna doğru bağlanma (coupling), deproteksiyon ve yıkama adımlarıyla amino asitlerin birleştirilmesidir. Yan zincir reaksiyonlarını engellemek için amino asidin N terminal ucuna koruyucu grup eklenmektedir. Bu koruyucu grup istenmeyen reaksiyonları engelleyecek şekilde N-terminal ucuna bağlı olmasına rağmen yeni amino asit ekleneceği sırasında uzaklaştırılabilmektedir [98], [100], [101], [102].

SPPS'de kullanılan reçine, mm ölçeğinde küçük küre şeklindedir ve yüzeyleri sentezde zincir oluşumunu ve kürelerin birbirine yapışmasını önleyecek şekilde organik bağlayıcı gruplar ile işlevselleştirilmiştir [103].

Genel olarak katı bir desteğe bağlı olan amino asit ile sentez başlatılır ancak amino asit bağlı olmayan reçinelerde bulunmaktadır. Bu durumda başlangıçta ekstra bir sentez adımı yer alır. Amino asit ile bağlı olan katı destekte N α -koruyucu grubu da bulunmaktadır. Koruyucu grubun kaldırılması için bir solvent hazırlanır ve bu solvent ile amino asit bağlı reçine yıkanır. Sonraki N α -koruyucu grubuna sahip

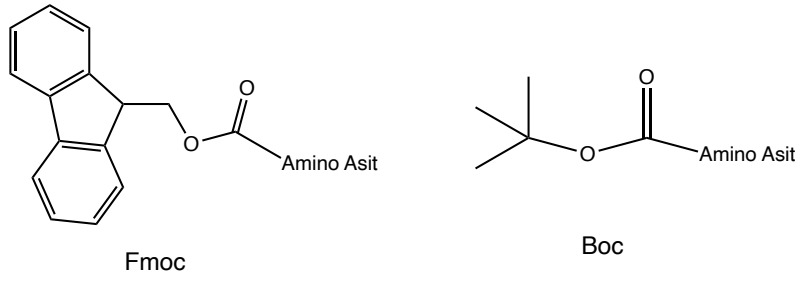
amino asidin bağlanması için önceden aktive edilmiş bir formda ya da doğrudan bir aktifleştirici varlığında önceki amino asit bağlı reçine yapısına bağlanır. Sonraki N α -koruyucu grubuna sahip amino asidi bağlamak için sentez adımları tekrar edilir. En son bağlanan N α -koruyucu grubuna sahip amino asitten sonra deproteksiyon aşaması gerçekleştirilir. Peptitin kimyasal olarak serbest bir asit ya da amid formunda elde edilebilmesi için reçineden ayrılması gerekir. Bu aşamaya cleavage yani ayrılma denir. Bu ayrıma reaktif aynı zamanda N α -koruyucu gruplarının uzaklaştırma koşullarına dayanıklı olan amino asit yan zincirlerinin koruyucu gruplarını da ortadan kaldırır [96], [102].

SPPS yöntemi sayesinde:

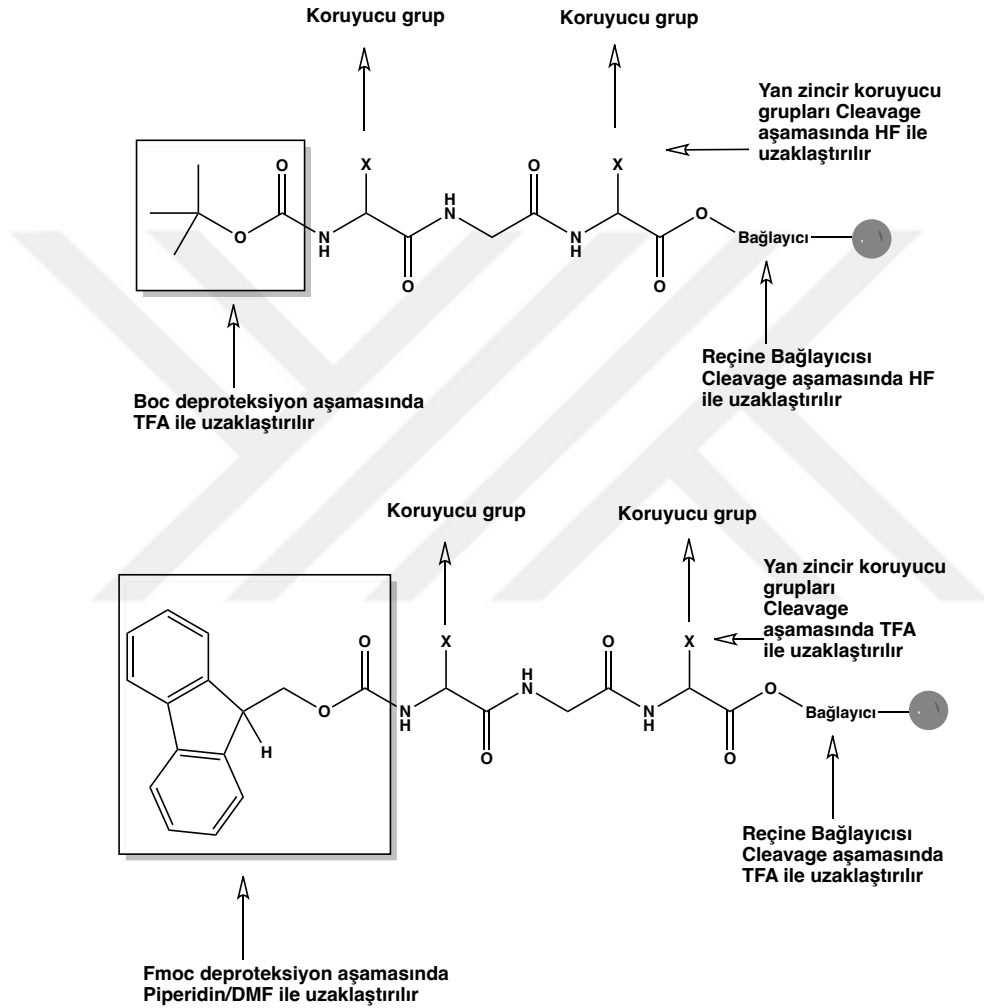
- Amino asitlerin birbirine bağlanması (coupling) daha hızlı ve verimle gerçekleştirilebilmekte
- Amino asit türevleri fazla miktarda kullanılmasına olanak sağlanmakta
- Reaksiyon sonrası açığa çıkan reaktifleri daha kolay işlemlerle yıkayıp uzaklaştırmaya olanak sağlamaktadır [95].

2.4.2 SPPS’de Kullanılan α -Amino Koruyucu Grupları

Yaygın olarak kullanılan 2 farklı α -amino koruyucu grupları bulunmaktadır. Tertiyer-bütüloksikarbonil (Boc) grubu veya 9-Flurenilmetiloksikarbonil (Fmoc) grubu kullanılır. Boc koruyucu grubu asit ile uzaklaştırılabilirken Fmoc koruyucu grubu baz ile uzaklaştırılabilmektedir. Boc grubu genellikle trifloroasetik asit (TFA) ile uzaklaştırılır ve serbest amino ucu tertiyer bir amin ile nötralize edilir. Peptidin reçineden ayrılması için hidrojen florür (HF) kullanılır. HF tehlikeli bir kimyasal olduğu için Boc koruma grubu pek tercih edilmemektedir. Fmoc koruma grubunda ise piperidin ile N,N-dimetilformamid (DMF) veya N-Metil-2-pirrolidon (NMP) içinde gerçekleştirilmektedir. Fmoc koruyucu grubunun kullanıldığı sentezde diziyi peptitten ayırmak ve amino asitte bulunan koruyucu gruplarının uzaklaştırılabilmesi için TFA kullanılmaktadır [96], [98], [100], [101], [102], [104], [105]. Boc ve Fmoc Stratejilerine ait şema Şekil 2.5’de gösterilmektedir.



Şekil 2.4 Yaygın kullanılan koruyucu gruplar (Fmoc ve Boc)



Yan zincir koruyucu grupları sentezin etkili gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Amino asitlerin yaz zincirinde de koruyucu grupların bulunmasının amacı sentez sırasında oluşabilecek olası safsızlıkları engellemek ve istenilen peptit dizisini oluşturmaktır [78], [95], [105].

Tert-butil(tBu), asit ile uzaklaştırılmakta ve genellikle Ser, Thr, Tyr, Glu ve Asp amino asitlerin yan gruplarını korumak için kullanılmaktadır. Tritil(Trt), Cys, Asn,

Gln ve His için kullanılan bir koruyucu gruptur. 2,2,4,6,7-pentametil-dihidronezofuran-5-sülfonil (Pbf), Arg için yaygın olarak kullanılan koruyucu gruptur. Boc, Lys ve Trp amino asitlerinde sıklıkla kullanılan koruyucu grubudur [78].

2.4.3 SPPS’de Kullanılan Reçineler

SPPS’de sentezin başarısını arttıran en önemli etkenlerden biri uygun katı destek yani reçinenin seçilmesidir. Katı desteğin performansı şişme özelliği, erişebilirliği ve çözücülüğü, reaktifler ve sentezlenen bileşik ile uyumluluğu ile ilişkilidir [106].

SPPS’de kullanılan reçineleri 3 farklı gruba ayrılabilir. Bunlar;

- Polistiren bazlı reçineler,
- Polietilen glikol (PEG) aşılınmış polistiren reçineler
- Polistiren içermeyen PEG reçineler

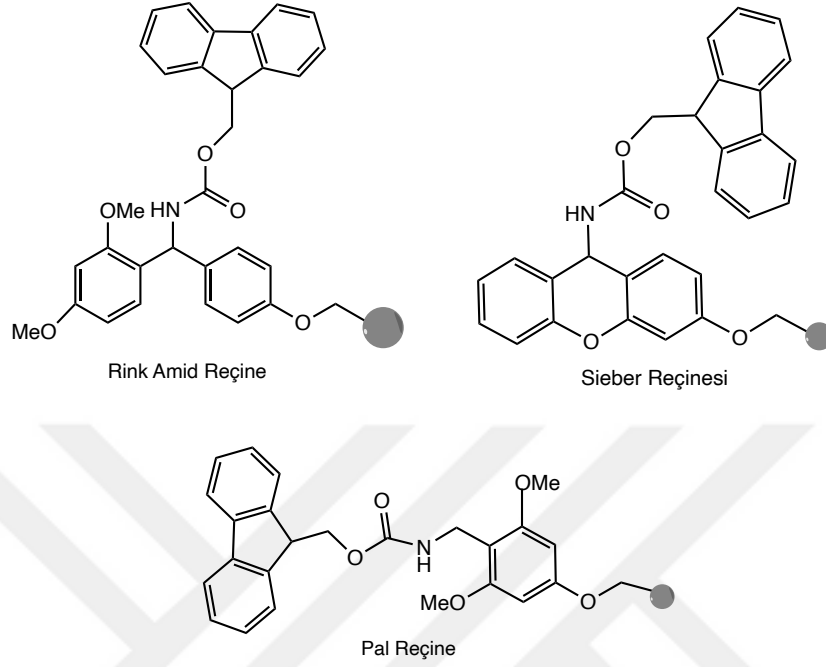
Klasik polistiren reçine %1 oranında divinilbenzen (DVB) ile çapraz bağlanmakta ve diklorometan içinde iyi şişmektedir fakat dimetilformamid (DMF) içinde iyi şişmemektedir. Su içinde ise hiçbir şişme özelliği göstermemektedir. Bu reçineler, uzun peptitlerin Fmoc SPPS yöntemi için uygun değildir [78], [107]. Fmoc SPPS’de yaygın olarak kullanılan reçine, TentaGel reçinesidir. Bu reçineler, düşük oranda çapraz bağlanmış polistiren matrisinin üzerine ağırlıkça yaklaşık olarak %50 ve %70 oranında PEG’in aşılacağı kopolimerlerden meydana gelmektedir. Su dahil birçok ilgili çözücüde şişebilmektedir [78], [81], [108].

2.4.4 SPPS’de Kullanılan Bağlayıcılar

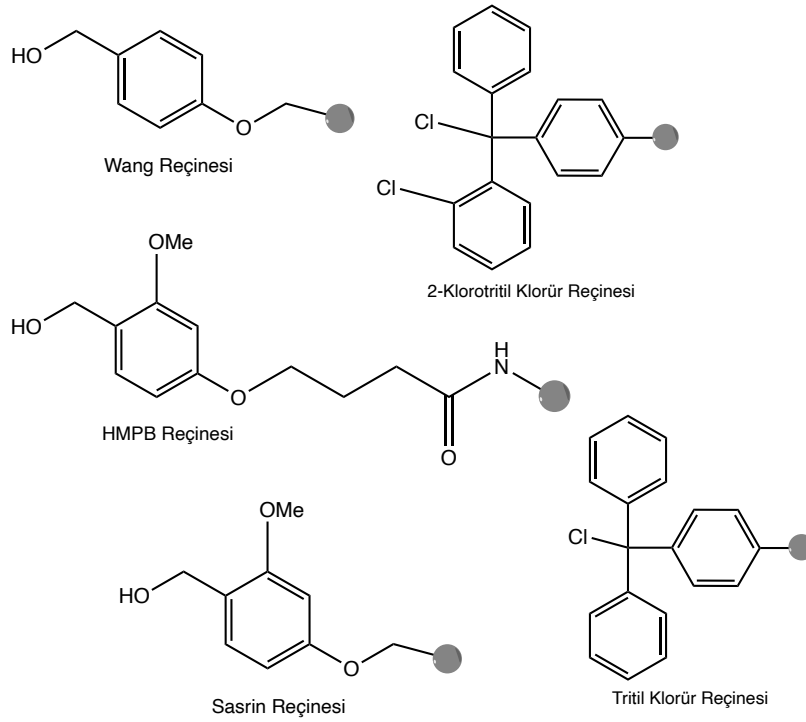
Literatürde çeşitli bağlayıcılar mevcuttur ve çoğu triflorasetik asit (TFA) ile muamele edildiğinde bir peptidi, peptit asidi ya da peptit amidi olarak serbet bırakmaktadır. En çok kullanılan peptit asit bağlayıcısı Wang bağlayıcısı iken en çok kullanılan peptit amit bağlayıcısı Rink bağlayıcısıdır. Uygulama sırasında genellikle reçineler bağlayıcıların isimleriyle tanımlanmaktadır. Wang bağlayıcısı ile fonksiyonlandırılmış olan polistiren reçine “Wang Reçinesi” olarak adlandırılır [78], [107].

SPPS’de kullanılan katı destekler koruyucu gruplara göre değişim göstermektedir. Fmoc ve Boc bazlı koruyucu gruplar, peptit amid ve peptit asit sentezlerine göre

gruplandırılmıştır. [109]. Fmoc bazlı SPPS reçineleri C-Terminal Peptit amitlerine ve C-terminal peptir asitlerine göre iki ye ayrılmaktadır. Şekil 2.6 ve Şekil 2.7’de sunulmuştur.



Şekil 2.6: C-Terminal peptit amitleri için kullanılan Fmoc bazlı reçineler [78], [106], [109]

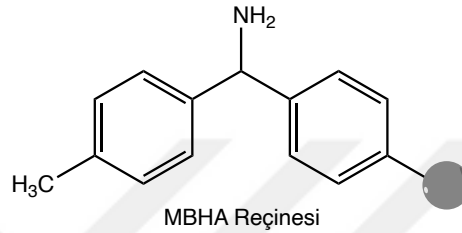


Şekil 2.7: C-Terminal peptit asitleri için kullanılan Fmoc bazlı reçineler [78], [106], [109]

Boc bazlı SPPS reçineleri C-Terminal Peptit amitlerine ve C-terminal peptit asitlerine göre iki ye ayrılmaktadır. Şekil 2.8 ve Şekil 2.9’da sunulmuştur.



Şekil 2.8 C-terminal peptit asitleri için kullanılan Boc bazlı reçineler [104]



Şekil 2.9 C-terminal peptit amitleri için kullanılan Boc bazlı reçineler [104]

Sentez sürecinde peptit zinciri, katı destek yüzeyine kovalent olarak bağlı kalır ve sentezlenen peptit, sıvı fazdaki reaktifler ve yan ürünlerden kolayca ayrılabilir. Bu durum sentezin otomasyona uygun olmasına olanak sağlarken aynı zamanda yüksek verimlilik ve temiz reaksiyon gibi önemli avantajlar sunmaktadır [103].

2.4.5 Cleavage Kokteyl Seçimi

Kokteyl seçimi, SPPS ile sentezlenen peptidin reçineden ayrılması ve amino asitlerde bulunan yan zincir koruyucu grupların uzaklaştırılması için önem arz etmektedir. Seçimi yaparken dikkat edilmesi gereken en noktalar;

- bağlayıcının yapısı
- koruyucu grupların türü
- korunmamış yan zincirlerin reaktif özellikleridir [110].

Yaygın olarak kullanılan cleavage kokteylleri ve özellikleri Tablo 2.3’de verilmiştir.

Tablo 2.3 Cleavage kokteylleri ve özellikleri [78], [81], [95], [111], [112]

Kokteyl Adı	Bileşimi (v/v)	Özelliği
Reagent B'	TFA/H ₂ O/TIS (95:2.5:2.5)	Genel olarak çoğu peptit için uygundur.
Reagent K	TFA/tiyoanizol/ H ₂ O/fenol/EDT (1,2- etanditiyol) (82.5:5:5:5:2.5)	Peptit sekansında bulunan disülfid köprülerini koruyarak peptide birbirinden ayırır.
Reagent L	TFA/TIS/DTT (ditiotreitol)/H ₂ O (88:2:5:5)	Cys içeren peptitlerde kullanılması önerilmektedir.
Reagent R	TFA/tiyoanizol/EDT/anizol (90:5:3:2)	Amin asitlerin yan koruyucu zincirinde bulunan sülfürlü koruyucu grubun uzaklaştırılmasında etkili bir kokteyldir.
Reagent B	TFA/fenol/H ₂ O/TIS (88:5:5:2)	H bağlarına karşı kararlı koruyucu grupların uzaklaştırılmasında etkilidir.
Asit Duyarlı Peptitler	AcOH (Asetik asit)/TFE (tetrafloroetilen)/DCM (20:20:60)	Koruyucu gruplar korunarak çözme; tam korumalı peptitler için uygundur.

2.4.6 Analiz ve Karakterizasyon

Peptit sentezinin en son aşaması sentezlenen peptidin analizi ve karakterizasyonudur. Sentezlenen peptidin doğruluğu ve saflığını tespit etmek için analitik yöntemlerle karakterizasyon gerçekleştirilmektedir. LC-MS (Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometrisi) analizi gerçekleştirilir. Burada amaç, sentezlenen peptitlerin molekül ağırlıklarının ve yapısal bütünlüklerinin doğrulanmasıdır. Peptitlerin Saflaştırılması için analitik ters faz HPLC (RP-HPLC) kullanılmaktadır. Böylece peptide saflaştırılması gerçekleştirilir. LC-MS analizi dışında sentezlenen peptidin kütleli doğrulamasının gerçekleştirilmesi için MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) [78], [95]

3

MATERYAL METOD

3.1 Tez Çalışmasında Kullanılmış Olan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılmış olan cihazlar aşağıda sıralanmıştır.

- Hassas Terazı – Shimadzu
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı
- Vorteks – Velp Scientifica
- Ultrasonik Su Banyosu – Bandelin Sonorex
- Santrifüj Cihazı – Beckman Coulter Allegra X-30 R
- Liyafilizatör – Telstar Cryodos
- Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)
- Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry (LC-ESI-MS)
- Preparatif HPLC - SPD-M20A, FRC-10A, LC-8A, CBM-20A, Shimadzu
- UV Spektrofotometre – UV-1800, Shimadzu UV Spektrofotometre

3.2 Tez Çalışmasında Kullanılmış Olan Kimyasal Listesi

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılmış olan kimyasal listesi

Kimyasal İsimleri	Şirket Bilgisi	Katalog No
Diklorometan (DCM)	Merck	106049
Dimetilformamid (DMF)	Supelco	103034
Piperidin	Merck	822299

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılmış olan kimyasal listesi (devamı)

N-Metil-2-pirrolidon (NMP)	Sigma-Aldrich	443778
Etanol	Sigma-Aldrich	34870
N,N- Diisopropilethilamine (DIEA)	Sigma-Aldrich	D125806
N-Hidroksibenzotriazol (HOBt)	Sigma-Aldrich	157260
O-(6-Klorobenzotriazol- 1-il)-N,N,N',N'- tetrametiluronyum hekzaflorofosfat (HCTU)	Sigma-Aldrich	851012
Asetonitril (ACN)	Sigma-Aldrich	34851
Formik Asit (FA)	Sigma-Aldrich	27001
Trifluoroasetikasit (TFA)	Sigma-Aldrich	808260
Triizopropilsilan (TIS)	Sigma-Aldrich	233781
Fmoc- Lys(Boc)-Wang Reçinesi	Sigma-Aldrich	856013
Fmoc- Val-OH	Sigma-Aldrich	852021
Fmoc-Leu-OH	Sigma-Aldrich	852011
Fmoc-Ile-OH	Sigma-Aldrich	852010

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılmış olan kimyasal listesi (devamı)

Fmoc-Pro-OH	Sigma-Aldrich	852017
-------------	---------------	--------

3.3 Tez Çalışmasında Kullanılmış Olan Çözeltiler

3.3.1 DMEM High Glucose Besiyeri Çözeltisinin Hazırlanması

Besiyeri çözeltisinin hazırlanması için 500 mL DMEM High Glucose besiyerine 5 mL penisilin streptomisin eklenerek %1'lik penisilin streptomisin içeren besiyeri stoğu hazırlanmıştır. Hazırlanan DMEM High Glucose besiyeri stoğu +4°C'de kullanıma hazır ve steril bir şekilde muhafaza edilmiştir. Deneylede kullanılmak üzere 50 mL FBS eklenmiş ve son durumda %10 FBS içerecek şekilde besiyeri stoğu hazırlanmıştır.

3.3.2 MTT Çözeltisinin Hazırlanması

MTT çözeltisinin hazırlanması için MTT tuzu (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür) konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde steril PBS çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 0.22µm por boyutuna sahip membran filtreden geçirilerek süzölmüştür. Deneysel kısımda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.4 Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Sentezlenmesi

Tez çalışmasında siyah soya fasulyesinin enzimatik hidroliz yöntemi ile elde edilmiş olan ve kütle spektrometresi ile peptit sekansı belirlenen antikanser ve antioksidan peptit olduğu düşünülen L/IVPK (Leu/Ile-Val-Pro-Lys) peptitleri, katı faz peptit sentezi yöntemiyle peptit kolonunda 0.1 mmol ölçekte olacak şekilde sentezlenmiş ve amino asitler 0.2 M, aktivatör ve aktivatör baz çözeltileri 0.5 M olarak hesaplanmıştır. Sentez sonunda peptitleri katı destekten ayırmak için TFA, TIS ve su içeren cleavage kokteyli kullanılmıştır. Her iki peptit için detaylı sentez aşamaları Şekil 3.1 'de gösterilmektedir.

Senteze başlamak için kuru olan Fmoc-Lys(Boc)-Wang reçinesi (100-200 mesh, yükleme: 0.4 - 0.6mmol/g) 167 mg tartılarak falkonda 15 mL Dimetilformamit (DMF) içinde bir gece çalkalamaya bırakılmıştır. Bu sayede şişen reçinenin

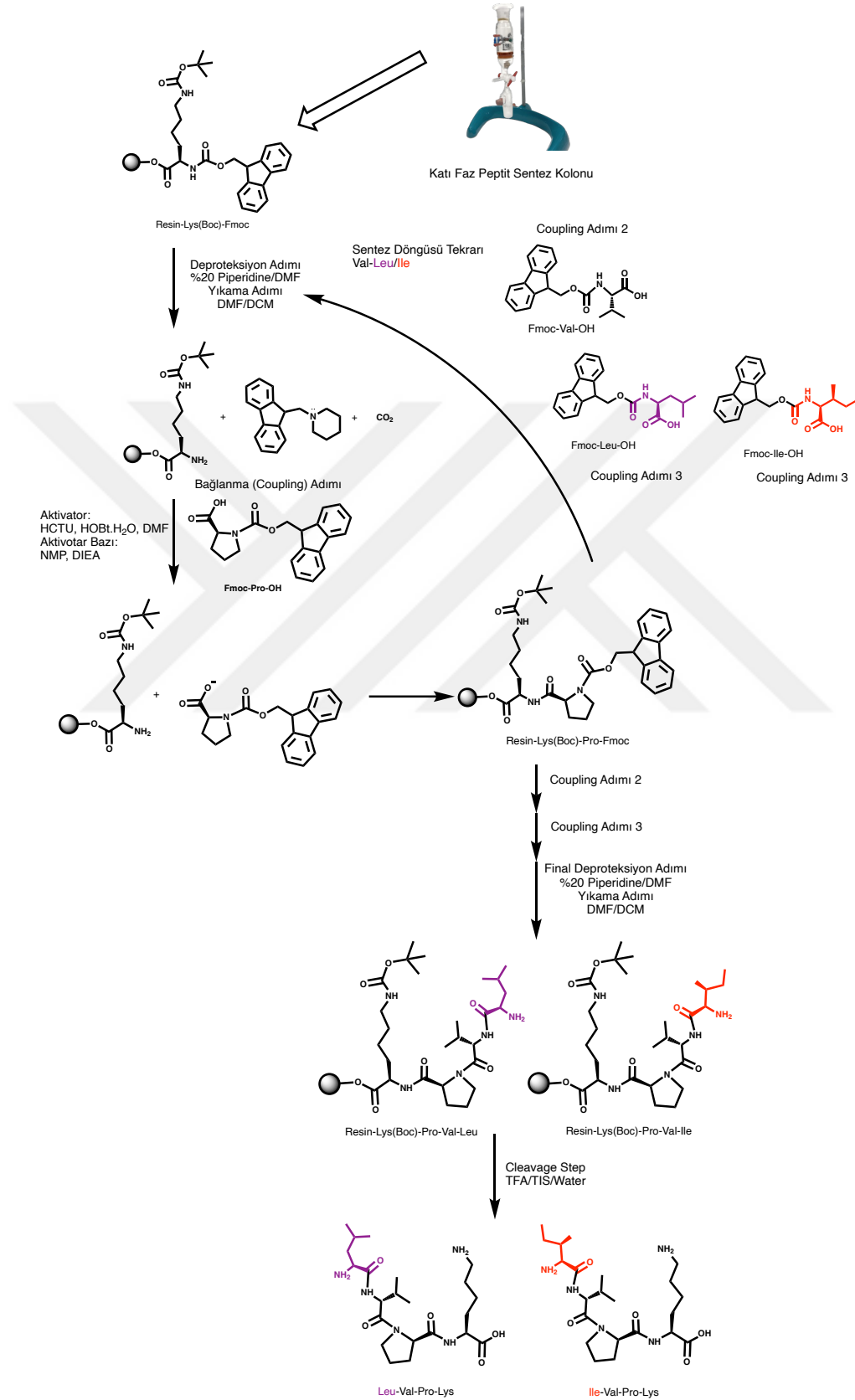
üzerinde bulunan aktif uçların açığa çıkması sağlanmıştır. Falkonda bir gece boyunca şişen reçine peptit kolonuna aktarılmıştır.

İlk amino asidin, Lys amino asidine bağlanabilmesi için reçinede bulunan Fmoc grubu koruması, DMF içerisinde hazırlanan %20 (v/v) piperidin çözeltisi kullanılarak uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu sayede ilk amino asidin reçineye bağlanması için gerekli adım gerçekleştirilmiştir. Deproteksiyon adı verilen bu işlem 30 dakikalık reaksiyon ve 2 defa tekrarlanmıştır. Reaksiyon sonrasında solüsyon vakum yardımıyla süzdürülmüştür. Ortamda Fmoc kalıntısı kalmaması için reçine 3 defa DMF ve DCM ile yıkanmış ve aynı şekilde vakumla süzölmüştür. Amino asitlerinin bağlanması için N-terminal korumalı amino asidin amino asidin karboksilik asit grubunun aktive edilmesi gerekmektedir. Bu adım için kullanılan aktivatörler (HCTU ve HOBt.H₂O), DMF içinde çözülmüş ve DMF içinde çözülmüş olan ve peptit kolonuna aktarılmış olan amino asit ile peptit kolonunda bir araya getirilmiştir. Aktivatör bazı (NMP/DIEA karışımı)'da peptit kolonuna aktarılmış ve peptit bağının oluşumu sağlanmıştır. Prolin amino asidin kalıntılarının reçinede bulunan Lizin amino asit kalıntlarına bağlanma işlemi 1 saat 30 dakika boyunca çalkalayıcı karıştırıcıda gerçekleştirilmiştir. Bağlanma işlemi sonrası solüsyon vakum yardımıyla süzölmüştür ve kalan amino asit kalıntılarının uzaklaştırılması için 3 defa DMF ve DCM ile yıkanmıştır. Bu işlem son amino asit kalıntısının bağlanmasına kadar devam etmiştir.

3.4.1 Sentezlenen Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Katı Fazdan Ayrılması

Sentezlenen L/IVPK peptitlerin katı fazdan yani reçineden ve yan zincir koruma gruplarından ayrılması için oda sıcaklığında TFA/TIS/su (95:2.5:2.5, v/v/v) kırma kokteyli hazırlanmış ve hazırlanan kokteyl ile kırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan kokteyl, reçinenin üzerine dökülerek 3 saat 15 dakika boyunca çalkalayıcı karıştırıcıda inkübe edilmiştir. İşlem süresi dolduktan sonra çözelti ve reçine vakum altında por Gooch kroze kullanılarak süzölmüştür. Süzme işlemi sonrasında süzöntüde kalan peptit, rotary evaporatör cihazında vakum altında 40°C sıcaklıkta, kırma kokteyli uzaklaştırılarak elde edilmiştir. Peptitlerin elde edilmesi için soğuk dietil eter armudiye eklenmiştir. Armudinin çeperinde belirginleşen peptitler, armudinin çeperinden bir spatül yardımıyla kazanmıştır. Oluşan karışım falkonlara alınarak santrifüje konulmuştur. Dietil eter ile 3 kez yıkanan peptit karışımı için santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Santrifüj işleminden sonra kalan sıvı

uzaklaştırılmış ve cam fırında kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen kurutulmuş ham peptitler karakterizasyon ve saflaştırma için -20°C ' de saklanmıştır.



Şekil 3.1 Doğal kaynaklı L/IVPK sentetik peptitlerin sentez döngüsü

3.5 Sentezlenen Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması

3.5.1 Sentezlenen Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Karakterizasyonu

Kurutulmuş ham peptitlerin karakterizasyon ve saflaştırma işlemlerinin gerçekleştirilmesi için 25°C oda sıcaklığında Sunniest C18 (5µm/4.6x250mm) kolonu kullanılarak, Shimadzu LCMS-2010EV, HPLC-MS (ESI iyonlaştırıcı) cihazında uygun koşullarda analiz gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen peptitlerin Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) cihazı kullanılarak kütle doğrulaması yapılmıştır. Mobil fazlar için su (%0.1 formik Asit (FA)) ve asetonitril (%0.085 FA) kullanılmıştır. Metot için 0.4 mL/dak akış hızı belirlenmiş olup, UV dedektöründe 210 - 254 nm ve ESI (+) iyonlaştırma yöntemi seçilmiştir.

3.5.2 Sentezlenen Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Saflaştırılması

LC-MS cihazında analizi yapılan ve kütle doğrulamasında alınan sonuçlara göre peptit dizileri için belirlenen saflaştırma methodu ile saflaştırma işlemi, preparatif HPLC yöntemiyle pikler toplanarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma; HPLC (RP-HPLC, SPD-M20A, FRC-10A, LC-8A, CBM-20A, Shimadzu, Tokyo, Japonya) cihazında UV-PDA dedektörü ve Shimpack PRC-ODS HPLC (20 mm x 25 cm) kolonuyla ters faz kromatografiyle gerçekleştirilmiştir. Mobil faz akış hızı 0.7 mL/dak ve UV dedektöründe dalga boyu 210-254 nm olarak belirlenmiştir. Mobil fazlar için su (%0.1 FA) ve asetonitril (%0.085 FA) kullanılmıştır.

3.6 Sentezlenen Doğal Kaynaklı Peptitlerin Antioksidan Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Sentezlenen doğal kaynaklı sentetik peptitlerin antioksidan aktvitesinin değerlendirilmesi için kolorometrik bir yöntem olan DPPH yöntemi kullanılmıştır [113]. DPPH çözeltisi, 0.5 mg DPPH'in hassas terazide tartılmasından sonra 12.68 mL etanol içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. LVPK ve IVPK peptitlerinden 1'er mg hassas terazide tartılarak 10 mL etanol içinde çözülmüştür. Böylelikle her iki peptit için 0.1mg/ml konsantrasyonda stok çözelti DPPH yönteminde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Konsantrasyon 0.0025-0.1 mg/mL aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.7 Sentezlenen Doğal Kaynaklı Peptitlerin Kanser Hücre Hattı Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırmalı İncelenmesi

3.7.1 Hücre Kültürü Çalışmaları

Doğal kaynaklı sentetik peptitlerin antikanser aktivitesinin belirlenmesi için MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 hücre hatlarının deneye hazır hale gelmesi için, daha önceden hazırlanmış olan DMEM High Glucose (4.5g/L) besiyeri çözeltisinde %95 nem, %5 CO₂ ve 37°C koşullarındaki inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Uygun hücre yoğunluğuna ulaştığında hücreler pasajlanmıştır. Hücre pasajlamada ilk olarak fosfat tampon çözeltisi (PBS) kullanılarak flasttaki hücreler yıkayıp ardından tripsin-EDTA (0.25%) kullanılarak enzimatik olarak hücreler kaldırılmıştır. Hücre süspansiyonu yaklaşık 1200 rpm'de 5 dakika 25°C koşullarında santrifüjlenmiş, süpernatant uzaklaştırılarak pelletin üzerine 1 mL taze besiyeri eklenmiştir. Akabinde tripan mavisi kullanılarak Thoma lamında hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. MCF-7 hücrelerindeki sitotoksik aktivitenin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilecek MTT testi için hücre ekimi adımında 96 kuyucuklu plaka kullanılmış olup her bir kuyunun yoğunluğu 1x10⁵ hücre/mL olacak şekilde ekim yapılmıştır ve hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.7.2 Sitotoksisite Analizi

Doğal kaynaklı sentetik LVPK ve IVPK peptitlerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki hücre canlılığına etkisi için MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür) in vitro sitotoksisite testi gerçekleştirilmiştir. Daha önce 96 kuyucuklu plakalara ekimi gerçekleştirilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmış olan plakalardaki hücreler invert mikroskop kullanılarak morfolojik olarak incelenmiştir. DMEM High Glucose (4.5 g/L) besiyeri çözeltisi aspire edilerek kuyucuklardan uzaklaştırılmış olup farklı konsantrasyonlarda peptit içeren besiyeri ile değiştirilmiştir. Örnekler, LVPK ve IVPK peptitleri 80, 100, 150, 200, 300 ve 400 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanmıştır.

Hücre deneylerinde kullanılmak üzere örnekler ilk önce 1 saat UV'de sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Örnekler için MTT testi 24 ve 72 saat için ayrı ayrı

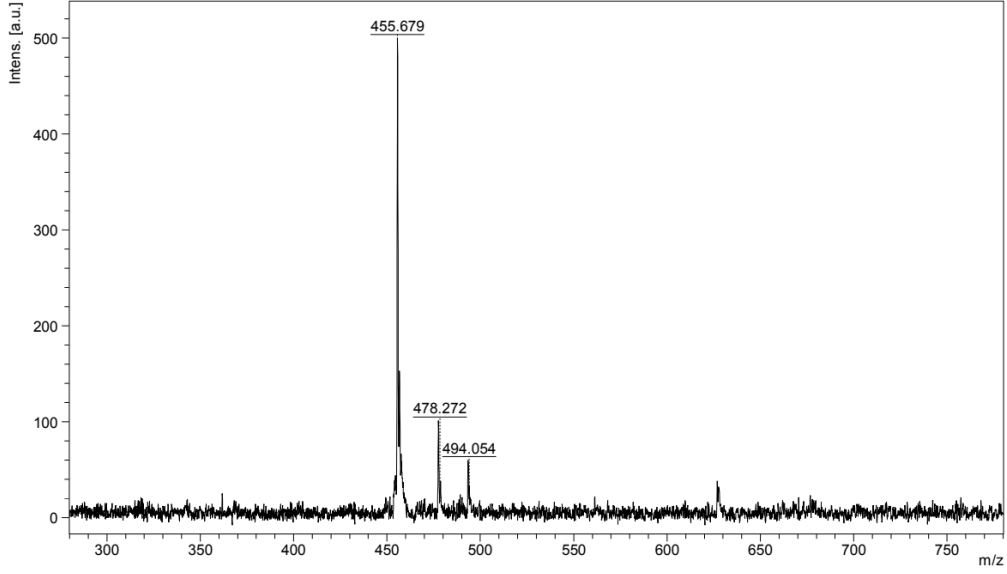
gerçekleştirilmiştir. Örnek uygulandıktan bir gün sonra plakadaki her kuyucuğa hazırlanmış olan MTT çözeltisi (10mg/mL) 10µL eklenmiştir. Aynı işlem 72. Saat içinde tekrarlanmıştır. Plakalar, 37°C’de 4 saat inkübe edilmeye bırakılmıştır. Kolorometrik bir test olan MTT’de metabolik olarak aktif olan hücreler sarı renkli MTT tuzunu mor renkli formazan kristaline indirgemesi beklenmektedir. Formazan kristali suda çözünmediğinden, kristallerin çözülmesi için her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklenmiş ve 30 dakika karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Elisa okuyucu (Thermo Scientific Multiskan FC) cihazında 30 dk sonunda 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Örneğin uygulanmadığı sadece besiyeri içeren kontrol grubunda hücre canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. Eşitlik 3.1’de verilen denklem kullanılarak örneklerin bulunduğu kuyucuklardaki hücre canlılığı % olarak hesaplanmıştır.

$$Hücre\ Canlılığı\ \% = \frac{Örnek\ Absorbansı}{Kontrol\ Absorbansı} \times 100 \quad (3.1)$$

4.1 Sentezlenen Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin LC-MS

Analizi

Katı faz peptit sentez yöntemiyle sentezlenen LVPK (Leu-Val-Pro-Lys) ve IVPK (Ile-Val-Pro-Lys) peptit dizileri uygun koşullarda reçineden ayrılmıştır. Sentez sonrası LVPK peptidi için ham ürün miktarı yaklaşık olarak 62 mg, IVPK peptidi için ham ürün miktarı yaklaşık 60 mg olarak tespit edilmiştir. Peptitlerin karakterizasyonu ve yapısal doğrulaması amacıyla Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz için 1'er mg peptit hassas terazide tartılıp ependorf tüplerine aktarılmış ve üzerlerine 1'er mL ultra saf su eklenerek çözülmüştür. 1 mg/mL konsantrasyonundaki peptit çözeltileri 0,22 µm por boyutlu selüloz asetat filtreden geçirilerek viallere süzölmüştür. Süzölen 1mg/mL'lik çözeltiler MALDI-TOF-MS analizinde kullanılmıştır. Şekil 4.1'de LVPK ham peptidine ait MS spekturumu sunulmaktadır.



Şekil 4.1 LVPK ham peptidine ait MALDI-TOF-MS spektrumu

LVPK peptidinin teorik olarak molekül ağırlığı 455.56 g/mol olarak hesaplanmıştır. LVPK peptidinin molekül ağırlığına göre beklenen iyonlara ait teorik m/z değerleri Tablo 4.1’de sunulmuştur.

Tablo 4.1 Teorik ve deneysel m/z değerlerinin karşılaştırılması

İyon Adı	Teorik m/z Değeri	Deneysel m/z Değeri
[M+H] ⁺	456.567	455.679
[M+Na] ⁺	478.549	478.272
[M+K] ⁺	494.523	494.054

MALDI-TOF MS analizi sonucunda elde edilen deneysel m/z değerleri ile teorik olarak hesaplanan iyon türleri karşılaştırıldığında, sentezlenen LVPK peptidinin yapısal doğruluğunu destekleyen güçlü bir uyum gözlemlenmiştir. Spektrumda en yüksek yoğunluklu pik, teorik olarak 456.567 m/z değerine sahip olan [M+H]⁺ iyonuna karşılık gelen 455.679 m/z olarak tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, 478.272 m/z ve 494.054 m/z değerlerinde gözlenen pikler, sırasıyla [M+Na]⁺ ve

[M+K]⁺ iyonları ile uyumludur. Bu sonuçlar, peptidin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.

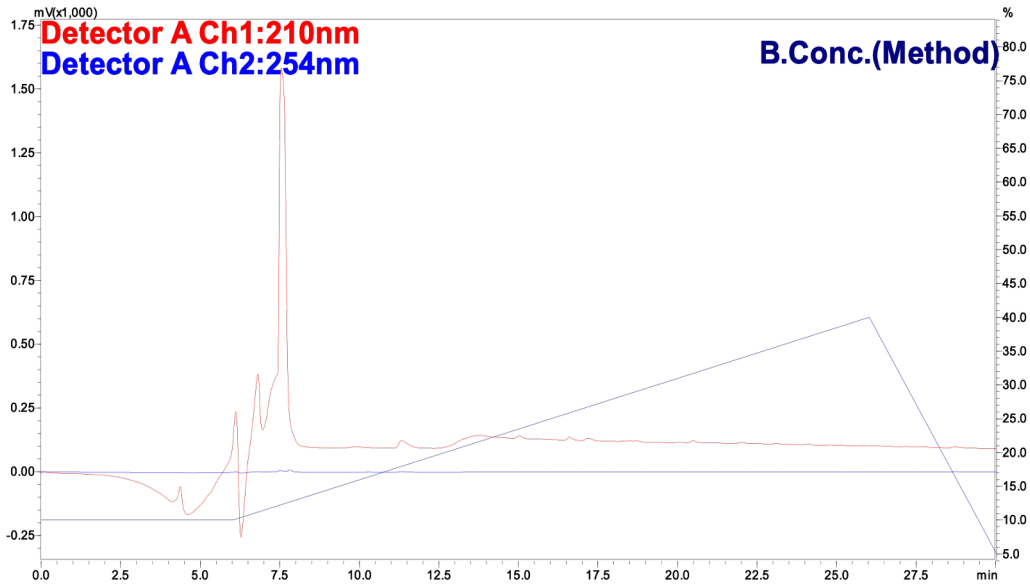
Sentezlenen LVPK ham peptidine ait saflık profili, Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry (LC-ESI-MS) analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda, kromatogramda elde edilen piklerin alan yüzdelere göre peptidin yaklaşık %80 saflıkta olduğu belirlenmiştir.

Analiz sürecinde kullanılan gradient elüsyon programı Tablo 4.2’de verilmiştir. LC-ESI-MS sisteminde kullanılan mobil fazlar: Eluent A: su (%0.085 formik asit, v/v) ve Eluent B: asetonitril (%0.085 formik asit, v/v) olup elüsyon programı, hedef peptidin etkin ayrılması ve tespit edilmesi amacıyla optimize edilmiştir.

Tablo 4.2 LC-ESI-MS analizi için kullanılan gradient elüsyon programı

Zaman (dk)	Eluent B (%ACN+FA)
0.01	10
6.00	10
26.00	40
30.00	5
30.01	-

Elde edilen LC kromatogramı Şekil 4.2’de sunulmuştur. Kromatogramda, 7.538 dakikada gözlenen ana pik %73.67 oranla en yüksek alan yüzdesine sahiptir ve hedef LVPK peptidini temsil etmektedir. Diğer pikler ise muhtemel sentez yan ürünleri veya koruyucu grupların parçalanma ürünlerini işaret etmektedir.

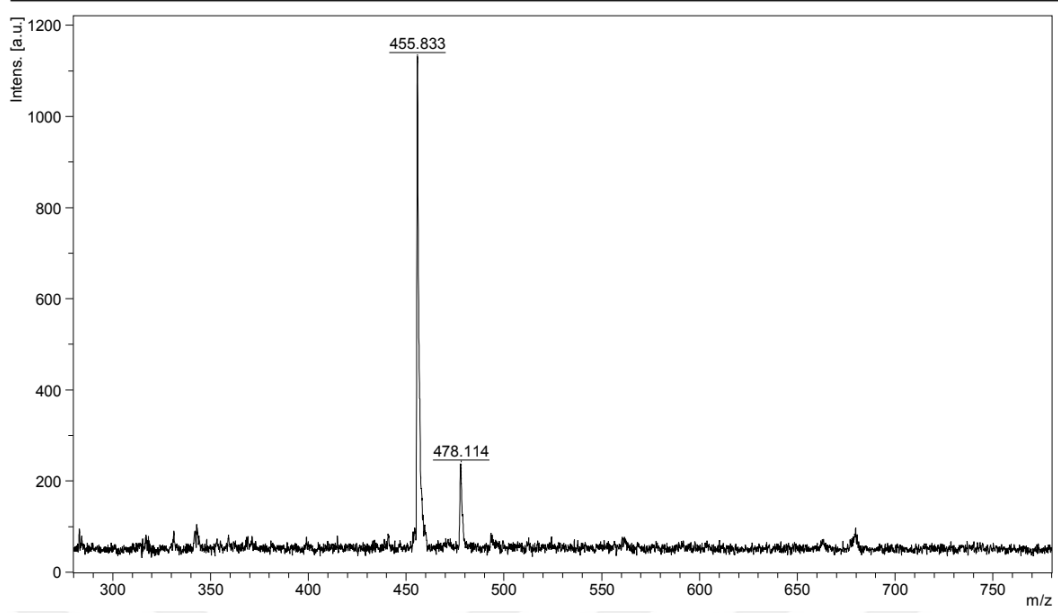


Şekil 4.2 LVPK ham peptidine ait LC kromatogramı

Tablo 4.3 LVPK ham peptidinin LC kromatogramından elde edilen kantitatif veriler

Pik No	Ahkonma Zamanı (dk)	Alan	Yükseklik	Alan (%)
1	4.371	692771	82755	2.24
2	6.114	2094100	236489	6.65
3	6.808	3693810	265333	11.7
4	7.538	24406857	1448269	73.67
5	11.325	565111	28875	1.7
6	13.747	1336575	22289	4.04
Toplam				100.000

Katı faz peptit sentez yöntemi kullanılarak sentezlenen IVPK ham peptidinin MALDI-TOF-MS analizine ait MS spektrumu Şekil 4.3'te sunulmuştur.



Şekil 4.3 IVPK ham peptidine ait MALDI-TOF-MS spektrumu

IVPK peptidinin teorik molekül ağırlığı 455.56 g/mol olarak hesaplanmıştır. MS analizinde gözlenmesi gereken iyonlara ait teorik m/z değerleri Tablo 4.4'te özetlenmiştir.

Tablo 4.4 Teorik ve deneysel m/z değerlerinin karşılaştırılması

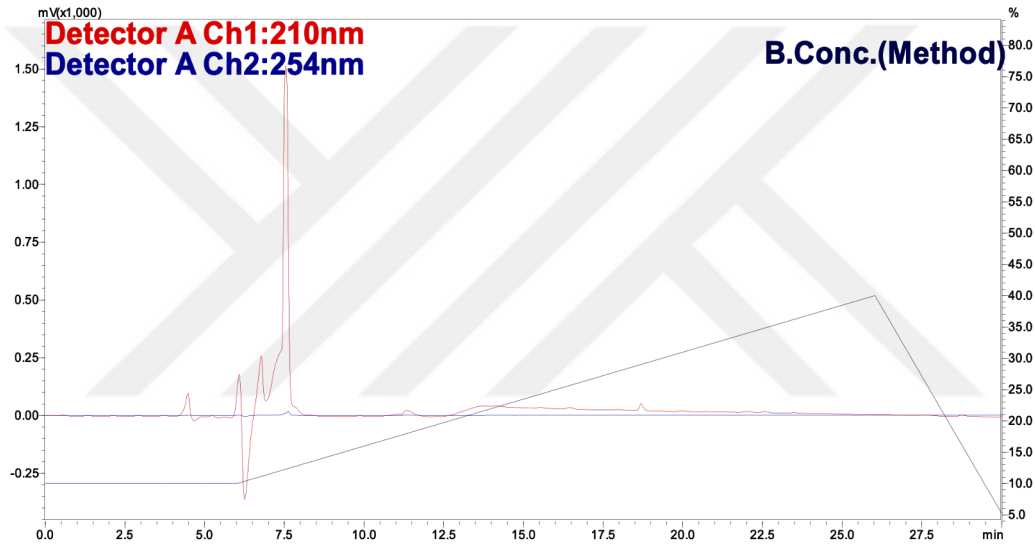
İyon Adı	Teorik m/z Değeri	Deneysel m/z Değeri
$[M+H]^+$	456.567	455.833
$[M+Na]^+$	478.549	478.114

IVPK peptidinin teorik molekül ağırlığı 455.56 g/mol olarak hesaplanmıştır. MALDI-TOF MS analizi sonucunda elde edilen m/z değerleri, teorik olarak öngörülen iyon türleriyle karşılaştırılmış ve peptidin yapısal bütünlüğünü doğrulayan sonuçlar elde edilmiştir. $[M+H]^+$ ve $[M+Na]^+$ gözlemlenen başlıca iyonlardır. Teorik ve deneysel m/z değerleri Tablo 4.4'te sunulmaktadır.

MALDI-TOF MS analizi sonucunda elde edilen deneysel m/z değerleri ile teorik olarak hesaplanan iyon türleri karşılaştırıldığında, sentezlenen IVPK peptidinin yapısal doğruluğunu destekleyen yüksek uyum gözlemlenmiştir. Spektrumda en

yüksek yoğunluklu pik, teorik olarak 456.567 m/z değerine sahip olan [M+H]⁺ iyonuna karşılık gelen 455.833 m/z olarak tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, 478.114 m/z değerinde gözlenen diğer bir pik, teorik değeri 478.549 m/z olan [M+Na]⁺ iyonu ile uyumludur. Bu sonuçlar, peptidin başarılı bir şekilde sentezlendiğini ve hedef molekül ağırlığında ürün elde edildiğini göstermektedir.

Ham IVPK peptidinin saflık analizi, LC-ESI-MS yöntemiyle gerçekleştirilmiş olup, elde edilen kromatogram Şekil 4.4'te sunulmaktadır. Kromatografik profilde gözlenen major pik, hedef peptidin varlığını doğrularken; düşük yoğunluklu minör pikler sentez yan ürünleri veya kısmen korunmuş ara ürünler ile ilişkilendirilmektedir.



Şekil 4.4 IVPK ham peptidine ait LC kromatogramı

Elde edilen kromatogram üzerinden yapılan pik alanı hesaplamalarına göre peptidin saflığı yaklaşık olarak %69.8 olarak belirlenmiştir. Saflık oranı, major pike karşılık gelen alıkonma zamanındaki sinyalin toplam sinyale oranı esas alınarak hesaplanmıştır. Analiz sırasında kullanılan gradient elüsyon protokolü ise Tablo 4.5'te sunulmaktadır.

Tablo 4.5 IVPK ham peptidinin LC kromatogramından elde edilen kantitatif veriler

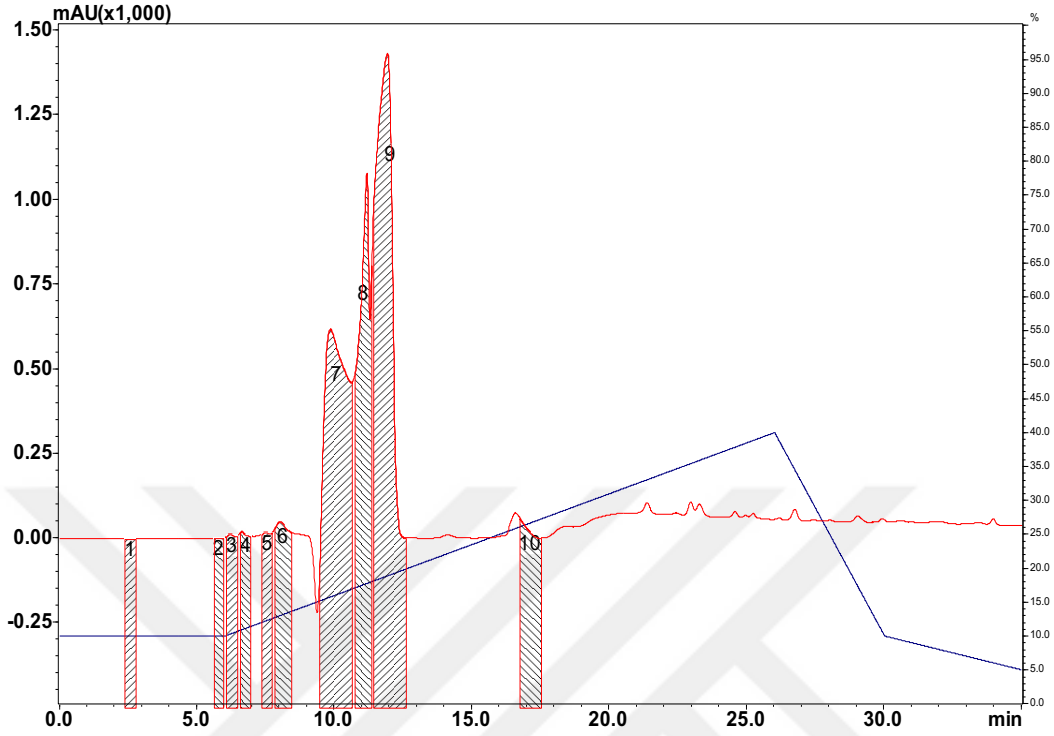
Pik No	Alıkonma Zamanı (dk)	Alan	Yükseklik	Alan (%)
1	4.471	1054722	108817	4.4
2	6.079	2934059	300654	12.2
3	6.770	2277217	217667	9.5
3	7.539	16778362	1447202	69.8
4	11.337	214250	16324	0.9
5	14.139	762452	8843	3.2
6	18.668	266748	30705	1.2
Toplam				100.000

4.2 Sentezlenen Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Prep-HPLC ile Saflaştırılması

LVPK peptidinin saflığını artırmak ve yan ürünlerden arındırmak amacıyla preparatif HPLC yöntemi uygulanmıştır. Saflaştırma işleminde, daha önce LC-ESI-MS analizinde kullanılan gradyan elüsyon protokolü temel alınmıştır (Bkz. Tablo 4.2).

Preparatif HPLC analizi sonucunda elde edilen kromatogramlar Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de sunulmuştur. Bu kromatogramlarda, hedef peptit fraksiyonlarının ayrıştığı bölgeler belirgin şekilde gözlenmektedir. Pikler arası net ayırım, safsızlıkların etkin

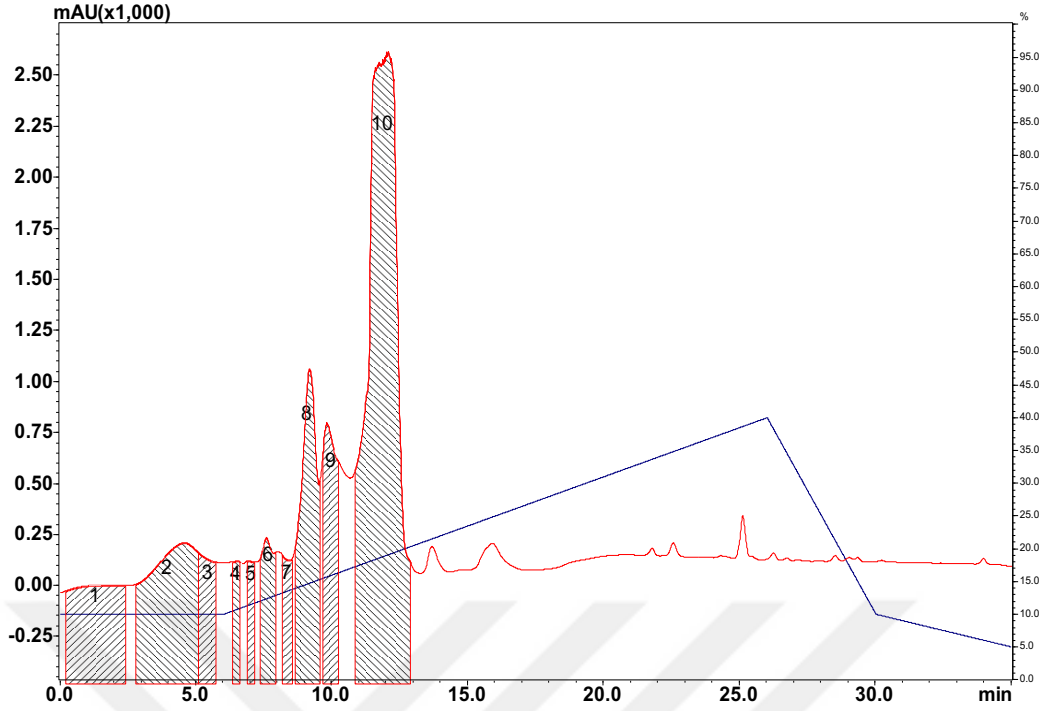
şekilde uzaklaştırılmasına olanak sağlamıştır. Fraksiyon toplama işlemi, hedef peptide karşılık gelen major pik bölgesi dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.5 LVPK ham peptidine ait preparatif HPLC kromatogramı (210 nm)

Preparatif HPLC analizinde gözlenen major pike karşılık gelen 9 numaralı fraksiyon, 12. dakikada elüe olmuş ve bu fraksiyon hedef saf peptid bölgesi olarak değerlendirilmiştir. İlgili fraksiyonlar toplanarak organik faz rotary evaporasyon ile uzaklaştırılmış ve ardından örnek liyofilizasyon ile kurutulmuştur. Bu işlem sonucunda yaklaşık 10 mg saf peptit elde edilmiştir.

IVPK ham peptidinin saflaştırılması amacıyla gerçekleştirilen Preparatif HPLC uygulamasında, daha önce LC-ESI-MS analizinde optimize edilen gradient elüsyon protokolü kullanılmıştır (Bkz. Tablo 4.2). Saflaştırma işlemine ait kromatografik veri, Şekil 4.6'da sunulmaktadır.



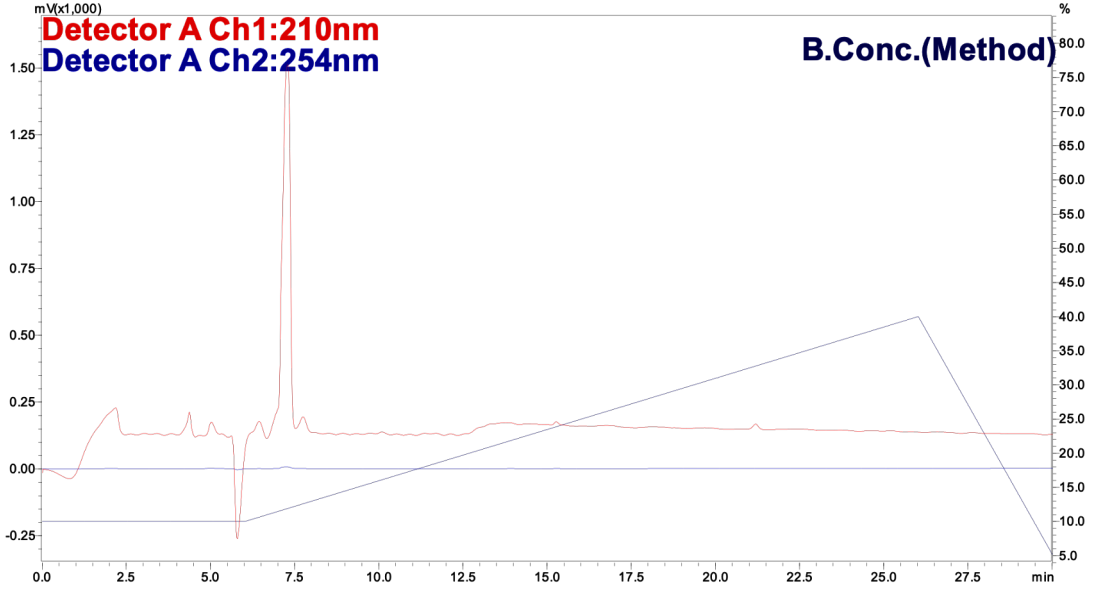
Şekil 4.6 IVPK ham peptidine ait preparatif HPLC kromatogramı (210 nm)

Preparatif HPLC analizinde IVPK peptidine ait major pik, 11–13. dakika aralığında elüe olmuştur. Bu zaman diliminde gözlenen ve aynı pike karşılık geldiği belirlenen 10 numaralı fraksiyon toplanarak, organik fazı buharlaştırılmış ve elde edilen ürün liyofilizasyon yöntemi ile kurutulmuştur. Saflaştırma işlemi sonucunda yaklaşık 20 mg saf peptit elde edilmiştir.

4.3 Saflaştırılmış Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin LC

Analizi

Saflaştırılmış LVPK peptidine ait doğrulayıcı analiz, LC-ESI-MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen LC kromatogram Şekil 4.7’de sunulmaktadır. Kromatogramda hedef peptide karşılık gelen tek bir dominant pik gözlenmiş olup, bu durum ürünün yüksek saflıkta elde edildiğini doğrulamaktadır. Önceki kromatogramlara kıyasla yan ürünlere ait piklerin belirgin şekilde azaldığı veya tamamen kaybolduğu görülmektedir.



Şekil 4.7 Saf LVPK peptidine ait LC kromatogramı

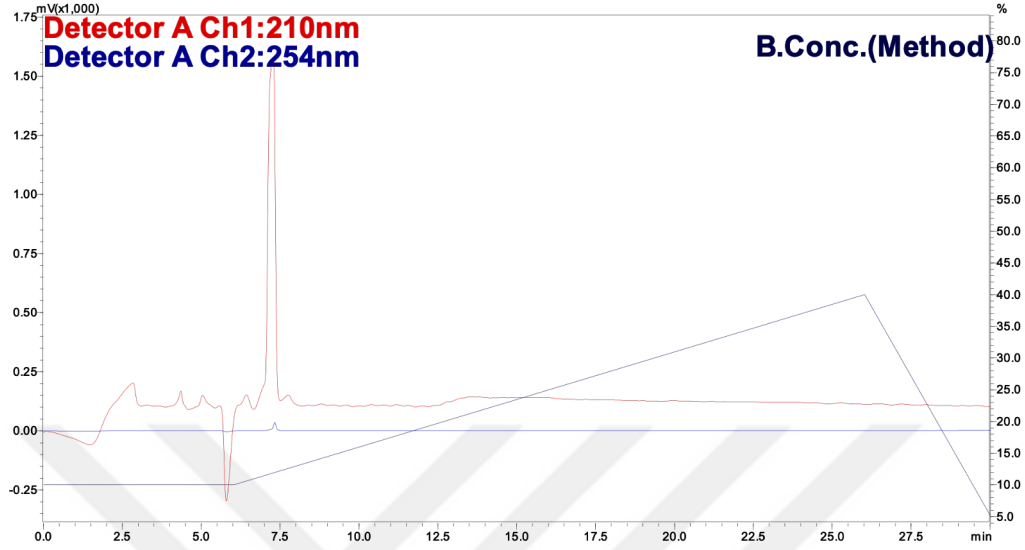
Tablo 4.6 Saf LVPK peptidinin LC kromatogramından elde edilen kantitatif veriler

Pik No	Altkonma Zamamı (dk)	Alan	Yükseklik	Alan (%)
1	2.178	2058773	85419	7.86
2	4.371	397083	64659	1.5
3	5.024	429091	43427	1.63
4	6.440	567999	46839	2.17
5	7.284	22294855	1372717	85.18
6	7.746	423397	40733	1.6
Toplam				100.000

Kromatogramda, 7. dakikada gözlenen ana pik %85 oranla en yüksek alan yüzdesine sahiptir ve hedef saf LVPK peptidini temsil etmektedir.

IVPK saf peptidin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen LC-ESI-MS analizi sonucunda elde edilen kromatografik veri Şekil 4.8'de sunulmuştur. Her iki

kromatogramda da hedef peptide karşılık gelen major pik, tek ve belirgin olarak gözlemlenmiş olup, bu durum ürünün yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir. Yan ürünlere ait minör pikler gözlenmemiş ya da ihmal edilebilir düzeydedir.



Şekil 4.8 Saf IVPK peptidine ait LC kromatogramı

Tablo 4.7 Saf IVPK peptidinin LC kromatogramından elde edilen kantitatif veriler

Pik No	Ahkonma Zamanı (dk)	Alan	Yükseklik	Alan (%)
1	2.828	2045769	88949	7.67
2	4.348	506415	60438	1.9
3	5.040	359778	39698	1.34
4	6.424	603112	50113	2.26
5	7.272	22895481	1445041	85.9
6	7.751	242037	22493	0.9
Toplam				100.000

Kromatogramda, 7. dakikada gözlenen ana pik yaklaşık %85.9 oranla en yüksek alan yüzdesine sahiptir ve hedef saf IVPK peptidini temsil etmektedir.

4.4 Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

4.4.1 DPPH Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Çalışması

0.1mM hazırlanmış olan DPPH çözeltisi ve 0.1 mg/mL peptit çözeltilerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda (0.0025 - 0.1 mg/mL) çözeltiler hazırlanmış olup V-1800, Shimadzu UV Spektrofotometre cihazında 517 nm’de ölçümler alınmıştır. İlk olarak baseline alınmış daha sonra kullanılan cihazın prensibi gereği etanol içeren küvet cihazda bırakılmış ve hazırlanmış olan DPPH çözeltisi yaklaşık 0.7 mL olacak şekilde blank alınmak üzere küvete eklenmiştir. Blank için 517 nm’de alınan absorbans değeri 0.726 ve 0.702 olarak ölçülmüştür.

Peptit çözeltilerinin konsantrasyonları 0.0025, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 ve 0.1 mg/mL olacak şekilde etanol ile seyreltilerek hazırlanmış ve her konsantrasyon değeri için DPPH çözeltisi eklenerek karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra UV-1800, Shimadzu UV Spektrofotometre cihazında 517 nm’de ölçüm alınmıştır. LVPK ve IVPK peptitlerine ait % antioksidan aktivitelerini (AA) gösteren değerler Tablo 4.8 ve Tablo 4.9’da sunulmuştur.

% Antioksidan aktivitesinin hesaplanması için eşitlik (4.1) ile hesaplama yapılmıştır.

$$\%AA = \frac{\text{Blank Abs değeri} - \text{Peptitin Abs değeri}}{\text{Blank Abs değeri}} \times 100 \quad (4.1)$$

Tablo 4.8 LVPK peptidinin konsantrasyona göre gösterdiği % antioksidan aktivite değerleri

Konsantrasyon (mg/mL)	ABS	Antioksidan Aktivite (%)
0.0025	0.331	%52.78
0.005	0.386	%44.93
0.01	0.239	%65.9
0.02	0.243	%66.52
0.04	0.220	%69.69
0.06	0.230	%68.31
0.08	0.222	%69.42
0.1	0.178	%75.48

Tablo 4.9 IVPK peptidinin konsantrasyona göre gösterdiği % antioksidan aktivite değerleri

Konsantrasyon (mg/mL)	ABS	Antioksidan Aktivite (%)
0.0025	0.328	%53.21
0.005	0.284	%59.48
0.01	0.242	%65.47
0.02	0.224	%69.14
0.04	0.236	%67.49

Tablo 4.9 IVPK peptidinin konsantrasyona göre gösterdiği % antioksidan aktivite değerleri (devamı)

0.06	0.250	%65.56
0.08	0.263	%63.77
0.1	0.258	%64.46

İki peptit için % antioksidan aktivite karşılaştırıldığında en yüksek konsantrasyon olan 0.1 mg/mL’de LVPK peptidi %75.48 aktivite gösterirken, IVPK peptidi %64.46 aktivite göstermektedir.

4.5 Doğal Kaynaklı Sentetik Peptitlerin Antikanser Aktivitesinin Belirlenmesi

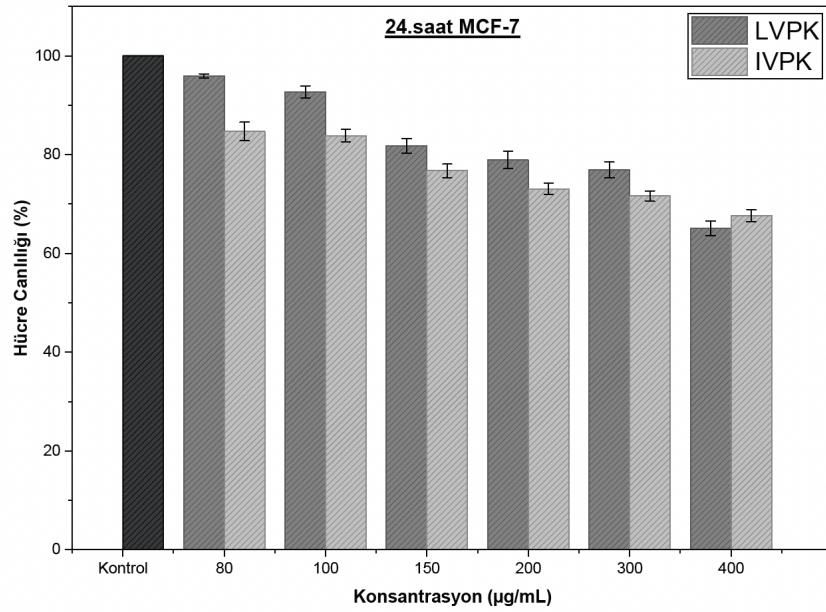
Doğal kaynaklı sentetik peptitlerin daha önceki literatür çalışmalarında antikanser özelliğinin olduğu belirtilmiş olup hangi peptit dizisinin antikanser özelliğinin daha yüksek olduğu literatürde belirsiz kalmıştır. Dizilerin sitotoksik aktivitesinin karşılaştırılması için MCF-7 hücre hattı üzerinde dizilerin sitotoksik etkisinin incelenmesi MTT testi ile gerçekleştirilmiştir. LVPK ve IVPK peptitleri, MCF-7 meme kanseri hücreleri %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM High Glucose (4.5 g/L) besiyerinde ortam sıcaklığı 37 °C olacak şekilde %95 nem ve %5 CO₂’de inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyon tamamlandıktan sonra hücrelerin yoğunluğu ve morfolojisi mikroskop altında incelenmiştir.

4.5.1 Sitotoksisite Analizi ile Antikanser Aktivite Saptanması

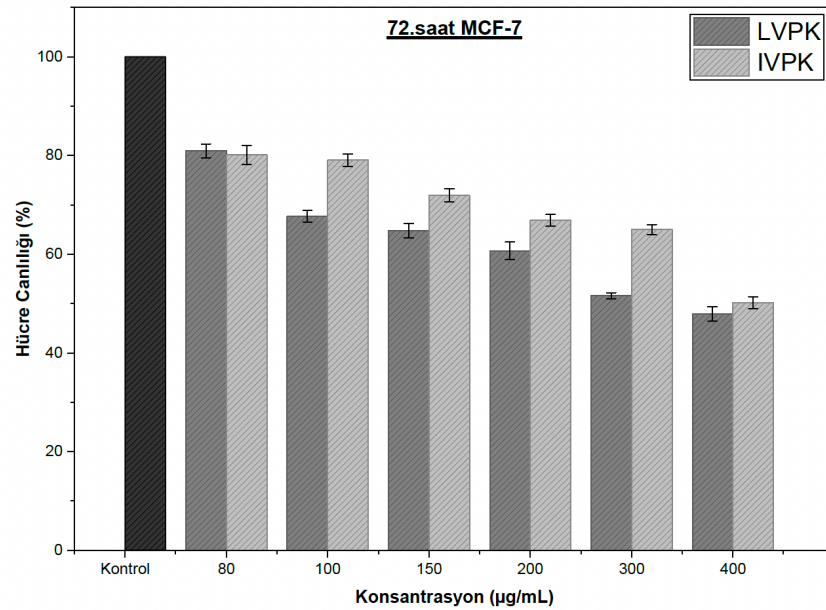
LVPK ve IVPK peptitlerin sitotoksisite analizi MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılarak MTT testi ile gerçekleştirilmiştir. MTT tuzu, suda çözündüğünde sarı renk verirken canlı hücreler tarafından hücre içine alınır. Mitokondride bulunan süksinat dehidrojenaz enzimi MTT tuzunu indirgeyerek formazan kristali meydana gelmesini sağlar. Bu indirgenme reaksiyonu yalnızca metabolik olarak aktif hücrelerde meydana gelir ve reaksiyonun gerçekleşme düzeyi hücrelerin canlılık

durumunu yansıtır. Oluşan formazan kristal miktarı, örnekteki canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan örneklerin; MTT testiyle MCF-7 hücre hattı üzerinde 24. ve 72. saatlerdeki hücre canlılığına olan etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar sırasıyla şekil 4.9 ve şekil 4.10’da sunulmuştur.



Şekil 4.9 24 saat için LVPK ve IVPK peptitlerinin MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığına etkisi



Şekil 4.10 72 saat için LVPK ve IVPK peptitlerinin MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığına etkisi

IC₅₀ (Inhibitory Concentration 50), bir maddenin test edilen biyolojik sistemde hedeflediği aktivitenin %50'sini inhibe ettiği konsantrasyonu ifade etmektedir. LVPK ve IVPK peptitlerine ait IC₅₀ değerleri tablo 4.10'da sunulmuştur.

Tablo 4.10 LVPK ve IVPK peptitlerinin MCF-7 hücre hattındaki IC₅₀ değerleri

Süre	Peptit	IC ₅₀ değeri (µg/mL)
24 saat	IVPK	>400
72 saat	IVPK	≈ 401.05
24 saat	LVPK	>400
72 saat	LVPK	≈ 343.2

24 saat ve 72 saat sonuçlarını incelediğimizde IVPK peptidinin ancak yüksek konsantrasyonlarda iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. 24 saat sonuçlarında hücre canlılığını %33 oranında azalttığını gözlemlerken 72 saat sonuçlarında hücre canlılığı ancak %50 oranında azalmıştır. LVPK peptidinde 24 saat sonuçlarında hücre canlılığının artan peptit konsantrasyonu ile birlikte azaldığı ve 72 saat sonuçlarında ise hücre canlılığını yaklaşık %53 oranında azalttığı gözlemlenmiştir.

4.6 Sonuçlar ve Öneriler

Tez kapsamında siyah soya fasulyesinden doğal olarak elde edildiği literatürde bildirilen Leu/Ile-Val-Pro-Lys (L/IVPK) tetrapeptit dizilerinin, katı faz peptit sentez (SPPS) yöntemi ile sentetik olarak üretimi, karakterizasyonu, saflaştırılması ve antioksidan ile antikanser aktivitelerinin karşılaştırılmalı incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

LVPK ve IVPK peptitleri sentezlenmiş ve LC-MS ve MALDI-TOF-MS analizleri ile moleküllerin doğrulukları saptanmıştır. RP-HPLC ile her iki peptit saflaştırılarak yüksek saflıkta elde edilmiştir.

Antioksidan aktivite etkinliğinin belirlenmesi için DPPH radikal süpürme yöntemi ile değerlendirilmiş olup her iki peptidin farklı konsantrasyonlardaki antioksidan aktivitesi gösterilmiştir. LVPK peptidi, %75,48 oranında gösterdiği inhibisyon oranıyla IVPK peptidine göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Sonuç olarak amino asit dizilimindeki farklılıkların antioksidan etkinlik üzerinde belirleyici bir etkisi olduğu ve hangi peptidin daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tez kapsamında ortaya konmuştur.

MCF-7 hücre hattı üzerindeki antikanser aktivite değerlendirilmesinde MTT sitotoksisite analizine göre, LVPK peptidinde 24 saatlik inkübasyonda hücre canlılığını %35 oranında azaltırken, 72 saatlik inkübasyonda bu oran %53 olarak gözlemlenmiştir. IVPK peptidinde ise 24 saatte yaklaşık %33'lik bir hücre canlılığı azalması görülmüş olup 72 saatte ancak en yüksek konsantrasyon değerinde hücre canlılığını %50 oranında azaltmıştır. Sonuç olarak LVPK peptidinin daha etkili bir sitotoksik etki gösterdiği ortaya konulmuştur.

Elde edilen veriler doğrultusunda LVPK peptidinin hem antioksidan hem de antikanser etkilerinin IVPK peptidine kıyasla daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Dizilimdeki Lösin (Leu) ve İzolösin (Ile) gibi yapıda benzer olan amino asitlerin biyolojik etkide farklılık gösterebildiği ve peptit biyolojik aktivitesi üzerinde kritik rol oynayabileceği gösterilmektedir. Antioksidan etkinlik, serbest radikal temizleme kapasitesi ile doğrudan ilişkili olmaktadır. LVPK peptidinin hücre ortamındaki oksidatif stres koşullarında daha etkili bir savunma gösterebileceği potansiyelini ortaya koymuştur. LVPK peptidinin MCF-7 hücre hattında göstermiş olduğu sitotoksik etki belirgin olarak meme kanseri tedavisinde IVPK peptidine göre daha yüksek potansiyelli bir molekül olduğunu göstermiştir.

LVPK peptidinin MCF-7 hücre hattında göstermiş olduğu sitotoksik etkiyi farklı kanser hücre hatlarında gözlemleyerek diğer kanser türleri açısından da sitotoksisitesi aktivitesinin değerlendirilmeli ve böylece kanser tedavisi açısından daha geniş bir perspektif ortaya konulması önemlidir. Ek olarak sağlıklı hücre hatlarındaki çalışmalar peptidin seçiciliğini ve toksisite profilini ortaya koymak açısından önemlidir. Tezde elde edilen in vitro çalışmalar doğrultusunda hayvan modellerinde değerlendirilmesi peptidin biyoyararlanımı, farmakokinetiği ve toksikolojik etkileri bakımında daha net veriler sağlayacaktır.

LVPK peptidinin terapötik etkinliğinin artırılmasını sağlamak için çeşitli modifikasyonlar denenebilir. PEGilasyon (polietilen glikol eklenmesi) peptidinin dolaşım süresini uzatmakta proteolitik enzimler tarafından yıkımını azaltmakta ve bağışıklık sistemi tarafından yıkımını engellemektedir. Bu şekilde peptidinin biyolojik stabilitesi artırılabilir. Lipozomal enkapsülasyon yöntemi denenerek peptidinin lipozom içine entegre edilmesi sonucu fiziksel koruma sağlanabilir. Bu sayede hedefli taşımaya da imkan sağlanmış olur. Lipozomlar tümör hücrelerinde pasif hedefleme gerçekleştirebilir. Yüzeyleri belirli ligandlarla fonksiyonlandırıldığında aktif hedeflemede mümkün hale gelebilir. Bu uygulamalar sayesinde LVPK peptidinin biyoyararlanımı ve hücre hedeflere yönelik ulaşımını artırarak daha etkili ve güvenli bir antikanser ajan olarak değerlendirilmesine olanak sağlayabilir.

Siyah soya fasülyesi gibi yüksek protein yoğunluğuna sahip gıda kaynaklarından izole edilen biyoaktif peptitler, antioksidan ve antikanser özelliklerin yanı sıra fonksiyonel gıda bileşeni ve takviye edici gıda olarak değerlendirilebilir. Bu şekilde düzenli tüketim hücrelerdeki oksidatif stresin azalmasına ve bağışıklık sisteminin desteklenmesi yoluyla kanser oluşumu riskini düşürmeye yardımcı olabilir. Biyoaktif peptitlerin fonksiyonel gıda formülasyonlarına entegre edilmesi, hem koruyucu sağlık uygulamalarına katkı sağlayacaktır hemde kanser gibi hastalıkların önlenmesinde yenilikçi ürün geliştirilmesine zemin hazırlayacaktır.

Tez kapsamında elde edilen bulgular sonucunda, doğal kaynaklı sentetik peptitlerin özellikle LVPK peptidinin kanser tedavisine destek amaçlı kullanılacak terapötik bir ajan potansiyeline sahip olabileceği değerlendirilmiştir. LVPK peptidi hem antioksidan hem de antikanser aktiviteler açısından IVPK peptidine göre daha düşük konsantrasyonlarda yüksek etkinlik göstermiştir. Gıda kaynaklı olması, toksisitesinin düşük olması bu tür peptitlerin takviye edici gıda özelliğinin yanı sıra profilaktik yani önleyici amaçlarla da kullanılabilmesini göstermektedir.

- [1] A. M. Varghese and M. F. Berger, “Advancing clinical oncology through genome biology and technology,” *Genome Biol*, vol. 15, no. 8, Aug. 2014, doi: 10.1186/s13059-014-0427-x.
- [2] A. S. Choudhari, P. C. Mandave, M. Deshpande, P. Ranjekar, and O. Prakash, “Phytochemicals in cancer treatment: From preclinical studies to clinical practice,” *Front Pharmacol*, vol. 10, Jan. 2020, doi: 10.3389/fphar.2019.01614.
- [3] W. G. Jiang et al., “Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives,” *Semin Cancer Biol*, vol. 35, pp. S244–S275, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.semcancer.2015.03.008.
- [4] S. Valastyan and R. A. Weinberg, “Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms,” *Cell*, vol. 147, no. 2, pp. 275–292, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.09.024.
- [5] M. Plodinec et al., “The nanomechanical signature of breast cancer,” *Nat Nanotechnol*, vol. 7, no. 11, pp. 757–765, Oct. 2012, doi: 10.1038/nnano.2012.167.
- [6] A. F. Chambers, G. N. Naumov, H. J. Varghese, K. V. Nadkarni, I. C. Macdonald, and A. C. Groom, “Critical steps in hematogenous metastasis: an overview,” *Surg Oncol Clin N Am*, vol. 10, no. 2, pp. 243–255, Apr. 2001.
- [7] A. F. Chambers, A. C. Groom, and I. C. MacDonald, “Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites,” *Nat Rev Cancer*, vol. 2, no. 8, pp. 563–572, Aug. 2002, doi: 10.1038/nrc865.
- [8] C. A. Hudis and L. Gianni, “Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need,” *Oncologist*, vol. 16, no. S1, pp. 1–11, Jan. 2011, doi: 10.1634/theoncologist.2011-s1-01.
- [9] H. S. Kim et al., “Analysis of the potent prognostic factors in luminal-type breast cancer,” *J Breast Cancer*, vol. 15, no. 4, pp. 401–406, Dec. 2012, doi: 10.4048/jbc.2012.15.4.401.
- [10] I. W. Y. Cheuk, V. Y. Shin, and A. Kwong, “Detection of methylated circulating DNA as noninvasive biomarkers for breast cancer diagnosis,” *J Breast Cancer*, vol. 20, no. 1, pp. 12–19, Mar. 2017, doi: 10.4048/jbc.2017.20.1.12.
- [11] C. Thakur, Y. Qiu, A. Pawar, and F. Chen, “Epigenetic regulation of breast cancer metastasis,” *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 43, no. 2, pp. 597–619, Jun. 2024, doi: 10.1007/s10555-023-10146-7.

- [12] J. Ferlay et al., “Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012,” *Int J Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359–E386, Mar. 2015, doi: 10.1002/ijc.29210.
- [13] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA Cancer J Clin*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, Nov. 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [14] F. Zahedipour, K. Jamialahmadi, P. Zamani, and M. Reza Jaafari, “Improving the efficacy of peptide vaccines in cancer immunotherapy,” *Int Immunopharmacol*, vol. 123, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.intimp.2023.110721.
- [15] H. O. Al-Shamsi and K. M. Musallam, “Not only a Western world issue: Cancer incidence in younger individuals in the United Arab Emirates,” *CA Cancer J Clin*, vol. 74, no. 3, pp. 227–228, May 2024, doi: 10.3322/caac.21839.
- [16] N. Lunt, “The global challenge of cancer governance,” *World Med Health Policy*, vol. 15, no. 4, pp. 672–681, Dec. 2023, doi: 10.1002/wmh3.577.
- [17] H. Sung et al., “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [18] K. Y. N. de Lima, M. de Camargo Cancela, and D. L. B. De Souza, “Spatial assessment of advanced-stage diagnosis and lung cancer mortality in Brazil,” *PLoS One*, vol. 17, no. 3, Mar. 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0265321.
- [19] D. Carmen Zaha, E. Lazăr, and C. Lăzureanu, “Clinicopathologic features and five years survival analysis in molecular subtypes of breast cancer,” *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, vol. 51, no. 1, pp. 85–89, 2010.
- [20] B. Mansoori, A. Mohammadi, S. Davudian, S. Shirjang, and B. Baradaran, “The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review,” *Adv Pharm Bull*, vol. 7, no. 3, pp. 339–348, 2017, doi: 10.15171/apb.2017.041.
- [21] S. Canbay Durmaz, D. Özbağ, and A. Dirican, “Investigation of clinical and pathological findings due to anatomical localisation in patients with colorectal cancer,” *Int J Clin Pract*, vol. 75, no. 10, Oct. 2021, doi: 10.1111/ijcp.14658.
- [22] W. Di Yu, G. Sun, J. Li, J. Xu, and X. Wang, “Mechanisms and therapeutic potentials of cancer immunotherapy in combination with radiotherapy and/or chemotherapy,” *Cancer Lett*, vol. 452, pp. 66–70, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.canlet.2019.02.048.
- [23] B. J. Kim and B. Xu, “Enzyme-Instructed Self-Assembly for Cancer Therapy and Imaging,” *Bioconjug Chem*, vol. 31, no. 3, pp. 492–500, Mar. 2020, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00025.
- [24] Z. Wang et al., “Bioengineered Dual-Targeting Protein Nanocage for Stereoscopic Loading of Synergistic Hydrophilic/Hydrophobic Drugs to Enhance Anticancer Efficacy,” *Adv Funct Mater*, vol. 31, no. 29, Jul. 2021, doi: 10.1002/adfm.202102004.
- [25] M. Azari, F. Bahreini, V. N. Uversky, and N. Rezaei, “Current therapeutic approaches and promising perspectives of using bioengineered peptides in fighting chemoresistance in triple-negative breast cancer,” *Biochem Pharmacol*, vol. 210, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.bcp.2023.115459.

- [26] J. F. Murphy, "Trends in cancer Immunotherapy," *Clin Med Insights Oncol*, vol. 4, no. 4, p. 4, 2010.
- [27] C. Durmaz and B. Erdag, "View of Overview of current approaches in cancer immunotherapy and personalized opportunities for future aspect," *Genetics & Applications*, vol. 6, no. 2, Dec. 2022, doi: 10.31383/ga.vol6iss2ga01.
- [28] Y. T. Lee, Y. J. Tan, and C. E. Oon, "A Review of the Use of Targeted Therapy for Cancer Treatment," *Clin Cancer Investig J*, vol. 12, no. 6, pp. 33–37, Mar. 2024, doi: 10.51847/thpfmsiacr.
- [29] M. C. Branco, D. M. Sigano, and J. P. Schneider, "Materials from peptide assembly: Towards the treatment of cancer and transmittable disease," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 15, no. 3, pp. 427–434, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.cbpa.2011.03.021.
- [30] N. Akentieva, "RHAMM-target peptides inhibit invasion of breast cancer cells," *Eurobiotech J*, vol. 1, no. 2, pp. 138–148, May 2017, doi: 10.24190/issn2564-615x/2017/02.05.
- [31] M. M. Gomari et al., "Rational peptide design for targeting cancer cell invasion," *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, vol. 92, no. 1, pp. 76–95, Jan. 2024, doi: 10.1002/prot.26580.
- [32] H. Sung et al., "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [33] Q. Z. Li et al., "Recent advances of bioactive proteins/polypeptides in the treatment of breast cancer," *Food Sci Biotechnol*, vol. 32, no. 3, pp. 265–282, Mar. 2023, doi: 10.1007/s10068-022-01233-6.
- [34] P. Sharma, H. Kaur, B. A. Kehinde, N. Chhikara, D. Sharma, and A. Panghal, "Food-Derived Anticancer Peptides: A Review," *Int J Pept Res Ther*, vol. 27, no. 1, pp. 55–70, Mar. 2021, doi: 10.1007/s10989-020-10063-1.
- [35] S. Dontha, "A Review on Antioxidant Methods," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 9, pp. 14–32, Oct. 2016, doi: 10.22159/ajpcr.2016.v9s2.13092.
- [36] B. Halliwell, "Antioxidants and Human Disease: A General Introduction," *Nutr Rev*, vol. 55, no. 1, pp. S44–S49, 1997, doi: 10.1111/j.1753-4887.1997.tb06100.x.
- [37] V. Sivanandham, "Free radicals in health and diseases — A mini review," *Pharmacologyonline*, vol. 1, pp. 1062–1077, 2011.
- [38] A. K. Tiwari, "Antioxidants: New-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders," *Curr Sci*, vol. 86, no. 8, pp. 1092–1102, Apr. 2004.
- [39] M. C. Christodoulou et al., "Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals," *Antioxidants*, vol. 11, no. 11, Nov. 2022, doi: 10.3390/antiox11112213.
- [40] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra, "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health," *Pharmacogn Rev*, vol. 4, no. 8, pp. 118–126, Jul. 2010, doi: 10.4103/0973-7847.70902.

- [41] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes, and J. Telser, "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence," *Mol Cell Biochem*, vol. 266, pp. 37–56, 2004.
- [42] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer," *Chem Biol Interact*, vol. 160, no. 1, pp. 1–40, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- [43] J. M. Mccord, "The evolution of free radicals and oxidative stress," *Am J Med*, vol. 108, pp. 652–659, 2000.
- [44] J. M. Lorenzo et al., "Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review," *Trends Food Sci Technol*, vol. 79, pp. 136–147, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.tifs.2018.07.003.
- [45] A. S. Veskoukis, A. M. Tsatsakis, and D. Kouretas, "Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration," *Cell Stress Chaperones*, vol. 17, no. 1, pp. 11–21, Jan. 2012, doi: 10.1007/s12192-011-0293-3.
- [46] B. Poljsak, D. Šuput, and I. Milisav, "Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2013, no. 1, 2013, doi: 10.1155/2013/956792.
- [47] Y. L. Xiong, *Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals*. Wiley-Blackwell, 2010. doi: 10.1002/9780813811048.
- [48] E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, and O. Kalayci, "Oxidative stress and antioxidant defense," *World Allergy Organization Journal*, vol. 5, no. 1, pp. 9–19, Jan. 2012, doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- [49] A. Weidinger and A. V. Kozlov, "Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: Oxidative stress versus signal transduction," *Biomolecules*, vol. 5, no. 2, pp. 472–484, Apr. 2015, doi: 10.3390/biom5020472.
- [50] R. Apak, "Current Issues in Antioxidant Measurement," *J Agric Food Chem*, vol. 67, no. 33, pp. 9187–9202, Jun. 2019, doi: 10.1021/acs.jafc.9b03657.
- [51] Y. Alan, "Arum elongatum Steven ekstraktlarının fenolik madde miktarı ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi," *BEU Journal of Science*, vol. 7, no. 2, pp. 370–379, 2018.
- [52] F. Shahidi and P. Ambigaipalan, "Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review," *J Funct Foods*, vol. 18, pp. 820–897, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.jff.2015.06.018.
- [53] F. C. Wong, J. Xiao, S. Wang, K. Y. Ee, and T. T. Chai, "Advances on the antioxidant peptides from edible plant sources," *Trends Food Sci Technol*, vol. 99, pp. 44–57, May 2020, doi: 10.1016/j.tifs.2020.02.012.
- [54] C. Kalita et al., "Recent trends in antioxidative peptides derived from soybean and other soy-based products: A comprehensive review," *Process Biochemistry*, vol. 136, pp. 311–323, Jan. 2024, doi: 10.1016/j.procbio.2023.11.027.
- [55] Q. Yang, X. Cai, A. Yan, Y. Tian, M. Du, and S. Wang, "A specific antioxidant peptide: Its properties in controlling oxidation and possible action mechanism," *Food Chem*, vol. 327, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126984.

- [56] İ. Gulcin, “Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview,” *Arch Toxicol*, vol. 94, no. 3, pp. 651–715, Mar. 2020, doi: 10.1007/s00204-020-02689-3.
- [57] F. Xiao, T. Xu, B. Lu, and R. Liu, “Guidelines for antioxidant assays for food components,” *Food Front*, vol. 1, no. 1, pp. 60–69, Mar. 2020, doi: 10.1002/fft2.10.
- [58] R. Apak, M. Özyürek, K. Güçlü, and E. Çapanoğlu, “Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays,” *J Agric Food Chem*, vol. 64, no. 5, pp. 1028–1045, Feb. 2016, doi: 10.1021/acs.jafc.5b04743.
- [59] C. López-Alarcón and A. Denicola, “Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays,” *Anal Chim Acta*, vol. 763, pp. 1–10, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.aca.2012.11.051.
- [60] Z. Cheng, J. Moore, and L. Yu, “High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay,” *J Agric Food Chem*, vol. 54, no. 20, pp. 7429–7436, Oct. 2006, doi: 10.1021/jf0611668.
- [61] A. Elias, S. Abd. Mutalib, W. A. W. Mustapha, S. Shahimi, N. Mohamed, and R. A. M. Repin, “Antioxidant content of Tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv MT1) treated by different type of Pesticide, Fertilizer and growth medium in Compost,” *Int J Chemtech Res*, vol. 11, no. 5, pp. 387–393, 2018, doi: 10.20902/ijctr.2018.110543.
- [62] M. I. Arsul, N. Syamsi, N. Putri, N. A. A. Nur, M. Mukhriani, and N. Hamzah, “Total phenolic, flavonoid, and antioxidant capacity of bajakah (*Spatholobus littoralis* Hassk),” *Current Research on Biosciences and Biotechnology*, vol. 4, no. 1, pp. 242–245, Aug. 2022, doi: 10.5614/crbb.2022.4.1/VRJ3X4LF.
- [63] G. Wu, “Dietary requirements of synthesizable amino acids by animals: A paradigm shift in protein nutrition,” *J Anim Sci Biotechnol*, vol. 5, no. 1, 2014, doi: 10.1186/2049-1891-5-34.
- [64] G. Genchi, “An overview on d-amino acids,” *Amino Acids*, vol. 49, no. 9, pp. 1521–1533, Sep. 2017, doi: 10.1007/s00726-017-2459-5.
- [65] E. Aliu, S. Kanungo, and G. L. Arnold, “Amino acid disorders,” *Ann Transl Med*, vol. 6, no. 24, Dec. 2018, doi: 10.21037/atm.2018.12.12.
- [66] M. D’Este, M. Alvarado-Morales, and I. Angelidaki, “Amino acids production focusing on fermentation technologies – A review,” *Biotechnol Adv*, vol. 36, no. 1, pp. 14–25, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.09.001.
- [67] B. Kelly and E. L. Pearce, “Amino assets: How amino acids support immunity,” *Cell Metab*, vol. 32, no. 2, pp. 154–175, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.cmet.2020.06.010.
- [68] M. A. Gruca and D. L. Dufour, “Essential amino acid,” in *The International Encyclopedia of Biological Anthropology*, Wiley, 2018, pp. 1–2. doi: 10.1002/9781118584538.ieba0162.
- [69] G. Wu, “Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition,” *Amino Acids*, vol. 37, no. 1, pp. 1–17, May 2009, doi: 10.1007/s00726-009-0269-0.

- [70] A. Then, K. Mácha, B. Ibrahim, and S. Schuster, “A novel method for achieving an optimal classification of the proteinogenic amino acids,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-72174-5.
- [71] N. Landi, A. Clemente, P. V. Pedone, S. Ragucci, and A. Di Maro, “An Updated review of Bioactive Peptides from Mushrooms in a well-defined molecular weight range,” *Toxins (Basel)*, vol. 14, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.3390/toxins14020084.
- [72] P. M. Watt, “Screening for peptide drugs from the natural repertoire of biodiverse protein folds,” *Nat Biotechnol*, vol. 24, no. 2, pp. 177–183, Feb. 2006, doi: 10.1038/nbt1190.
- [73] S. Sachdeva, “Peptides as ‘Drugs’: The journey so far,” *Int J Pept Res Ther*, vol. 23, no. 1, pp. 49–60, Mar. 2017, doi: 10.1007/s10989-016-9534-8.
- [74] J. L. Lau and M. K. Dunn, “Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions,” *Bioorg Med Chem*, vol. 26, no. 10, pp. 2700–2707, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.bmc.2017.06.052.
- [75] A. Brockmann et al., “Quantitative peptidomics reveal brain peptide signatures of behavior,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, vol. 106, no. 7, pp. 2383–2388, 2009, doi: 10.1073/pnas.0813021106.
- [76] C. Acquah, E. Di Stefano, and C. C. Udenigwe, “Role of hydrophobicity in food peptide functionality and bioactivity,” *Journal of Food Bioactives*, vol. 4, pp. 88–98, Dec. 2018, doi: 10.31665/jfb.2018.4164.
- [77] F. Guzmán, S. Barberis, and A. Illanes, “Peptide synthesis: Chemical or enzymatic,” *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 2, pp. 279–314, Apr. 2007, doi: 10.2225/vol10-issue2-fulltext-13.
- [78] P. R. Hansen and A. Oddo, “Fmoc solid-phase peptide synthesis,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1348, Humana Press Inc., 2015, pp. 33–50. doi: 10.1007/978-1-4939-2999-3_5.
- [79] A. Sanchez and A. Vazquez, “Bioactive peptides: A review,” *Food Quality and Safety*, vol. 1, no. 4, pp. 29–46, 2017, doi: 10.1093/fqs/fyx006.
- [80] F. Shahidi and Y. Zhong, “Bioactive Peptides,” *J AOAC Int*, vol. 91, no. 4, 2008, doi: 10.1093/jaoac/91.4.914.
- [81] M. Góngora-Benítez, J. Tulla-Puche, and F. Albericio, “Handles for Fmoc solid-phase synthesis of protected peptides,” *ACS Comb Sci*, vol. 15, no. 5, pp. 217–228, May 2013, doi: 10.1021/co300153c.
- [82] S. A. Tadesse and S. A. Emire, “Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market,” *Heliyon*, vol. 6, no. 8, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04765.
- [83] C. Zhou et al., “Antioxidant peptides from corn gluten meal: Orthogonal design evaluation,” *Food Chem*, vol. 187, pp. 270–278, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.04.092.
- [84] Yoshinori. Mine, Eunice. Li-Chan, and Bo. Jiang, *Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals*. Wiley-Blackwell, 2010.

- [85] H. Acar, J. M. Ting, S. Srivastava, J. L. LaBelle, and M. V. Tirrell, "Molecular engineering solutions for therapeutic peptide delivery," *Chemical Society Review*, vol. 46, no. 21, pp. 6553–6569, Nov. 2017, doi: 10.1039/c7cs00536a.
- [86] C. Kartal, B. Bakar, B. Kaplan Türköz, and S. Ötleş, "Gıda kaynaklı protein ve biyoaktif peptit eldesi, saflaştırılması ve karakterizasyonunda kullanılan güncel yöntemler ve biyoinformatik yaklaşımlar," *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, vol. 12, no. 2, pp. 395–407, Jan. 2023, doi: 10.28948/ngumuh.1177148.
- [87] E. Gençdağ, A. Görgüç, and F. M. Yılmaz, "Recovery of bioactive peptides from food wastes and their bioavailability properties," *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, vol. 8, no. 4, pp. 855–863, Apr. 2020, doi: 10.24925/turjaf.v8i4.855-863.2989.
- [88] J. E. Aguilar-Toalá and A. M. Liceaga, "Cellular antioxidant effect of bioactive peptides and molecular mechanisms underlying beyond chemical properties," *Int J Food Sci Technol*, vol. 56, no. 5, pp. 2193–2204, May 2021, doi: 10.1111/ijfs.14855.
- [89] Z. Chen et al., "Bioactive peptide with antioxidant and anticancer activities from black soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] byproduct: isolation, identification and molecular docking study," *European Food Research and Technology*, vol. 245, no. 3, pp. 677–689, Mar. 2019, doi: 10.1007/s00217-018-3190-5.
- [90] C. L. Stevenson, "Advances in peptide pharmaceuticals," *Curr Pharm Biotechnol*, vol. 10, no. 1, pp. 122–137, 2009, doi: 0.2174/138920109787048634.
- [91] M. Bidram and M. R. Ganjalikhany, "Bioactive peptides from food science to pharmaceutical industries: Their mechanism of action, potential role in cancer treatment and available resources," *Heliyon*, vol. 10, no. 23, Dec. 2024, doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e40563.
- [92] D. E. Cruz-Casas, C. N. Aguilar, J. A. Ascacio-Valdés, R. Rodríguez-Herrera, M. L. Chávez-González, and A. C. Flores-Gallegos, "Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides," *Food Chemistry: Molecular Sciences*, vol. 3, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.fochms.2021.100047.
- [93] S. Chandrudu, P. Simerska, and I. Toth, "Chemical methods for peptide and protein production," *Molecules*, vol. 18, no. 4, pp. 4373–4388, Apr. 2013, doi: 10.3390/molecules18044373.
- [94] M. Erak, K. Bellmann-Sickert, S. Els-Heindl, and A. G. Beck-Sickinger, "Peptide chemistry toolbox – Transforming natural peptides into peptide therapeutics," *Bioorg Med Chem*, vol. 26, no. 10, pp. 2759–2765, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.bmc.2018.01.012.
- [95] I. Coin, M. Beyermann, and M. Bienert, "Solid-phase peptide synthesis: From standard procedures to the synthesis of difficult sequences," *Nat Protoc*, vol. 2, no. 12, pp. 3247–3256, Dec. 2007, doi: 10.1038/nprot.2007.454.
- [96] M. Cudic and G. B. Fields, *Solid-Phase peptide synthesis*, 2nd ed. *Molecular Biomethods Handbook*, 2008. doi: 10.1007/978-1-60327-375-6_32.

- [97] M. Waliczek and P. Stefanowicz, "Shining a light on peptide and protein synthesis: Light-Emitting-Diode-driven desulfurization of cysteine to alanine with rose bengal," *Org Lett*, vol. 27, pp. 1159–1163, 2025, doi: 10.1021/acs.orglett.4c04671.
- [98] V. Martin et al., "Harnessing polarity and viscosity to identify green binary solvent mixtures as viable alternatives to DMF in solid-phase peptide synthesis," *Green Chemistry*, vol. 23, no. 9, pp. 3295–3311, May 2021, doi: 10.1039/d1gc00603g.
- [99] F. Albericio, "Orthogonal protecting groups for N-Amino and C-Terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis," *Biopolymers*, vol. 55, pp. 123–139, 2000.
- [100] R. B. Merrifield, "Solid phase peptide synthesis I. Synthesis of a tetrapeptide," *Contribution from the Rockefeller Institute*, vol. 85, 1963.
- [101] K. G. Varnava and V. Sarojini, "Making Solid-Phase Peptide Synthesis Greener: A Review of the Literature," *Chem Asian J*, vol. 14, no. 8, pp. 1088–1097, Apr. 2019, doi: 10.1002/asia.201801807.
- [102] B. Merrifield, "Solid phase synthesis on a solid matrix," vol. 232, pp. 341–347, Apr. 1986.
- [103] C. Petrou and Y. Sarigiannis, "Peptide synthesis: Methods, trends, and challenges," in *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, 2017, pp. 1–21. doi: 10.1016/B978-0-08-100736-5.00001-6.
- [104] D. M. M. Jaradat, "Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation," *Amino Acids*, vol. 50, no. 1, pp. 39–68, Jan. 2018, doi: 10.1007/s00726-017-2516-0.
- [105] A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, and F. Albericio, "Amino acid-protecting groups," *Chem Rev*, vol. 109, no. 6, pp. 2455–2504, Jun. 2009, doi: 10.1021/cr800323s.
- [106] H. J. Cho, T. K. Lee, J. W. Kim, S. M. Lee, and Y. S. Lee, "Controllable core-shell-type resin for solid-phase peptide synthesis," *Journal of Organic Chemistry*, vol. 77, no. 20, pp. 9156–9162, Oct. 2012, doi: 10.1021/jo301716d.
- [107] F. Guillier, D. Orain, and M. Bradley, "Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry," *Chemical Review*, vol. 100, pp. 2091–2157, 2000, doi: 10.1021/cr980040.
- [108] F. García-Martín et al., "ChemMatrix, a poly (ethylene glycol)-based support for the solid-phase synthesis of complex peptides," *J Comb Chem*, vol. 8, no. 2, pp. 213–220, Mar. 2006, doi: 10.1021/cc0600019.
- [109] W. Hou, X. Zhang, and C. F. Liu, "Progress in Chemical Synthesis of Peptides and Proteins," *Transactions of Tianjin University*, vol. 23, no. 5, pp. 401–419, Sep. 2017, doi: 10.1007/s12209-017-0068-8.
- [110] G. B. Fields, Z. Tian, and G. Barany, *Principles and practice of solid-phase peptide synthesis*. W.H. Freeman and Company New York, 1992.

- [111] K. M. Harris, S. Flemer, and R. J. Hondal, "Studies on deprotection of cysteine and selenocysteine side-chain protecting groups," *Journal of Peptide Science*, vol. 13, no. 2, pp. 81–93, Feb. 2007, doi: 10.1002/psc.795.
- [112] L. A. Carpino, "Peptide Chemistry," *Proc. Jpn. Symp. Pept. Chem*, vol. 115, no. 2, p. 30, 1993.
- [113] S. Kaya and S. Derman, "Design and analysis of an improved single-phase quasi-z-source inverter," *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences – Sigma Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 2021, doi: 10.14744/sigma.2021.00044.



TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Ç. İçli, Ö.T.,Günkara, S,Derman, “Production of Natural Source Peptides with A Synthetic Approach and Comparative Research”, presented at the 4th Anatolian Conference on Organic Chemistry, 2024, poster

Projeler

1. Prof. Dr. Ömer Tahir Günkara, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tez Projesi, Yüksek Lisans, FYL-2024-6053, “Doğal Kaynaklı Peptitlerin Sentetik Yaklaşımla Üretimi ve Kanser Hücreleri Üzerindeki Etkilerin Karşılaştırmalı İncelenmesi”, Tez Öğrencisi, 26.01.2024-26.10.2025.