



**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**PROLİN GRUBU TAŞIYAN BAZI
KALİKS[4]AREN TÜREVLERİNİN SENTEZİ
VE CANLI HÜCREDE SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Alev GÜL

YÜKSEK LİSANS

Kimya Anabilim Dalı

**Haziran-2018
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Alev GÜL tarafından hazırlanan “Prolin Grubu Taşıyan Bazı Kaliks[4]aren Türevlerinin Sentezi ve Canlı Hücrede Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması 26.06/18 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya. Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS/olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Danışman

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

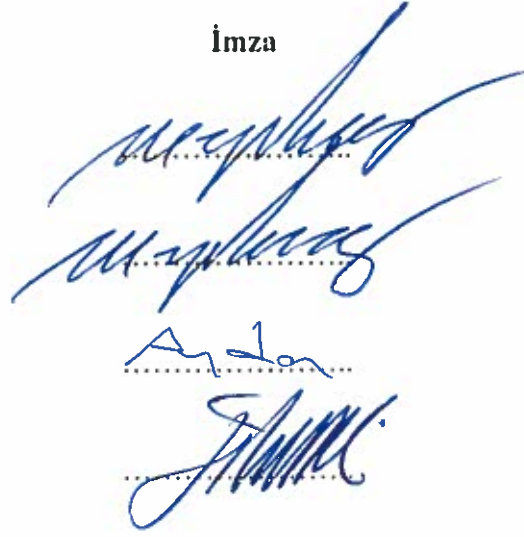
Üye

Prof. Dr. Aydan YILMAZ

Üye

Doc. Dr. Erdal KOCABAŞ

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
FBE Müdürü

Bu tez çalışması TUBITAK tarafından 116Z173 no'lu proje ve Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17201064 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Doç. Dr. Serdar Karakurt bu tez çalışmasının ikinci danışmanıdır.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.



Alev GÜL

Tarih: 26/06/2018

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

PROLİN GRUBU TAŞIYAN BAZI KALİKS[4]AREN TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE CANLI HÜCREDE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Alev GÜL

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

2018,94 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

Prof. Dr. Aydan YILMAZ

Doç. Dr. Erdal KOCABAŞ

Kaliksarenlerin supramoleküler kimyada önemli bir yeri vardır. Diğer supramoleküllere göre daha kolay sentezlenebilir ve fonksiyonlandırıldıkları için organik kimyada dikkat çeken bileşiklerdir. Kaliksarenler fenolik-O grupları üzerinden ve *ter*-bütıl grupları dealkilasyonla giderildikten sonra aromatik birimlerin *p*-konumundan fonksiyonladırılarak anyon, katyon ve organik bileşikler için reseptör olarak kullanılabilirler.

Bu çalışmada kaliks[4] arenler hem fenolik-O üzerinden hem de fenolik grupların *p*-konumundan L-prolin ile fonksiyonlandırıldı (3 ve 8 no'lu bileşikler). Sentezlenen bu bileşiklerin yapısı FT-IR, ¹H-NMR ve ¹³C-NMR ile aydınlatıldı. Daha sonra bu bileşiklerin (3 ve 8) anti-kanser özelliklerini araştırmak amacı için insan kanser hücre hatları üzerinde DLD1, A549, HEPG2 ve PC3 hücrelerinde sitotoksik etkileri Alamar Blue yöntemiyle araştırıldı. Hücre ölüm mekanizmasını incelemek amacıyla flow sitometre yöntemi ve DNA yapısı üzerindeki etkilerini incelemek için Comet Assay deney çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalar normal epitel hücresinde de yapılarak, insan kanser hücreleri arasındaki farklılıklar incelendi.

Sentezlenen 3 no'lu bileşiğin DLD1 hücre hattında sitotoksik etki gösterdiği ve diğer kanser hücrelerinde etkisiz olduğu bulundu. Ayrıca 3 no'lu bileşiğin normal epitel hücresinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı gözlemlendi. 3 no'lu bileşiğin A549 kanseri ve normal epitel hücresi olan PNT1A'da DNA hasarına neden olduğu bulundu. A549 ve PC3 hücre hatlarında 3 no'lu bileşik hücreyi erken ve geç apoptoza sürüklediği bulundu. 8 no'lu bileşiğin PC3, DLD1 ve A549 kanser hücre hatlarında sitotoksik etki gösterirken, normal prostat epitel hücresinde az da olsa bir sitotoksik etki gösterdiği bulundu. 8 no'lu bileşik HEPG2 kanser hücre hattında DNA hasarına neden olduğu bulundu. Akciğer, prostat, kolon ve normal prostat epitel hücresinde DNA hasarına neden olmadığı bulundu. Ayrıca 8 no'lu bileşiğin A549 ve DLD1 kanser hücrelerinde apoptoza neden olduğu bulundu.

Anahtar Kelimeler: Anti-kanser, Apoptoz, Kaliks[4]aren, L-prolin, , Sitotoksiste

ABSTRACT

MS THESIS

SYNTHESIS OF SOME CALIX[4]AREN DERIVATIVES BEARING L-PROLIN GROUP AND DETERMINATION OF CYTOTOXIC EFFECT IN LIVING CELLS

ALEV GÜL

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELCUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN CHEMISTRY

Advisor: Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
2018, 94 Pages

Jury
Advisor Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Prof. Dr. Aydan YILMAZ
Doç. Dr. Erdal KOCABAŞ

Calixarenes has an important role in supramolecular chemistry. Supramolecules can be synthesized more readily than others and are much more remarkable compounds in organic chemistry in order to be functionalized. After via Calixarenes' phenolic-O groups and their *tert*-butyl groups are removed by dealkylation, they can be used as a receptor for anion, cation and organic compounds by being functionalized aromatic moieties from p-position.

In this study, the calix[4]arenes are functionalized with L-proline both over phenolic-O and the p-position of the phenolic groups (**3** and **8** the compounds). The structure of these synthesized compounds was illuminated by FT-IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. Then in order to investigate the anti-cancer properties of these compounds (**3** and **8**), their cytotoxic effects on DLD1 A549, HepG2 and PC3 human cancer cell lines were searched by the Alamar Blue method. It was performed a flow cytometry method to examine the mechanisms of cell death and Comet Assay experimental studies to examine the effects on DNA structures. These studies were also performed for the normal epithelial cells and then the differences between human cancer cells were evaluated. Moreover, it was seen that compound **3** had no any cytotoxic effect on normal epithelial cell. It was found that compound **3** caused DNA damage on A549 cancer and PN1A normal epithelial cell line. It was found that compound **3** shifted A549 and PC3 cells to early and late apoptosis. While compound **8** had a cytotoxic effect on PC3, DLD1 and A549 cancer cell lines, it was seen that it had even a little cytotoxic effect on normal epithelial cell line. It was found that compound **8** caused DNA damage on HEPG2 cancer cell line. Also, it was determined that compound **8** did not caused DNA damage on lung, prostate, colon and normal epithelial cell lines. It was also found that compound **8** induced apoptosis in A549 and DLD1 cancer cell lines.

Keywords: Anti-cancer, Apoptosis, Calix[4]arene, L-proline, Cytotoxicity,

ÖNSÖZ

- Bu yüksek lisans tezinde, kendisine ne zaman danışsam bana zamanını ayırıp, faydalı olabilmek için elinden geleni yapan, bir sorun yaşadığımda çözmeye çalışan, gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm sayın danışman hocam Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.
- Çalışmamda yöntem açısından bana yardımda bulunarak yol gösteren ve zamanını benim hazırladığım tez çalışmasına ayırıp bana laboratuvarını açan, yardımını benden esirgemeyen ve bana kattığı her bilgi için Doç. Dr. Serdar KARAKURT'a teşekkür ederim.
- Teşekkürlerin az kalacağı Kimya Bölümündeki diğer hocalarımdan da bana hayatım boyunca kazandırdıkları her şey için ve beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donattıkları için hepsine teker teker teşekkürlerimi sunuyorum.
- Tez çalışmalarım sürecinde TÜBİTAK'a ve Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'ne(BAP) desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunuyorum.
- Çalışmamda desteğini ve ne zaman başım sıkışsa çekinmeden yanına gittiğim ve zamanı olmamasına rağmen benden yardımlarını esirgemeyen, çok değerli doktora öğrencisi Mehmet OĞUZ'a ve birlikte güzel vakit geçirdiğimiz her zaman bana destek olan Arş. Gör. Dr. Zeynep DENLİ'ye teşekkürü borç bilirim.
- Ve son olarak beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan sevgili babam Yaşar GÜL ve annem Dürdane GÜL'e ve ailemin diğer üyelerine sonsuz teşekkürler.

Alev GÜL
KONYA-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1.Kaliksarenler.....	1
1.1.1. Kaliksarenlerin Tarihçesi	1
1.1.2. Kaliksarenlerin Adlandırılması	3
1.1.3. Kaliksarenlerin Tek Basamaklı Sentezi	4
1.1.4. Kaliksarenlerin Konformasyonları	5
1.1.5. Kaliksarenlerin Fonksiyonlandırılması	7
1.1.6. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları.....	11
1.2.L-Prolin.....	21
1.3.Kanser	23
1.3.1. Kanser Oluşumu ve Gelişimi	24
1.3.2. Prostat Kanseri	25
1.3.3. Akciğer Kanseri	26
1.3.4. Kolon Kanseri	27
1.3.5. Karaciğer Kanseri	29
1.4.Alkali Comet Testi.....	30
1.5.Apoptoz.....	30
1.5.1. Nekroz.....	31
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	33
2.1. Kaliksarenlerin Biyokimyasal Araştırmalarda Kullanımları	33
2.1.1. Antiviral Aktivite	33
2.1.2. Antifungal Aktivite	33
2.1.3.Antibakteriyal Aktivite	34
2.1.4. Antikarsinojenik Aktiviteleri	35
2.2. Kaliksaren-Prolin Türevleri ile Yapılan Çalışmalar	38
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	41
3.1. Enstrümental Teknikler.....	41
3.2. Kimyasal Sentezler ve Karakterizasyon	41
3.2.1. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren (1).....	42
3.2.2. 5,11,17,23-(Tetra-ter-bütil)-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren'nin dealkilasyonu (Carlton-Smith ve ark.) (Gutsche ve Iqbal, 1990)	43
3.2.3. Kaliks[4]aren'in L-pirolin karboksilik asit türevinin sentezi (3) (Becker ve ark., 2008).....	44

3.2.4. 5,11,17,23-Tetra- <i>ter</i> -bütül-25,26,27,28-tetrametoksikarbonilmetoksi- kaliks[4]aren (Carlton-Smith ve ark.)(Arnaud-Neu ve Ark. 1989).	45
3.2.5. 5,11,17,23-Tetra- <i>ter</i> -bütül-25,26,27,28 tetrahidroksikarbonilmetoksi- kaliks[4]aren (Carlton-Smith ve ark.) (Arnaud-Neu ve Ark.. 1989).	46
3.2.6. 5,11,17,23-Tetra- <i>ter</i> -bütül-25,26,27,28-tetraklorokarbonilmetoksi kaliks[4]aren	47
3.2.7. 5,11,17,23-Tetra- <i>ter</i> -bütül-25,26,27,28-tetraklorokarbonilmetoksi kaliks[4]aren ile L- prolinmetilesteri bileşiğinin etkileştirilmesi (Combes ve ark.)47	
3.2.8. 7 nolu bileşiğin hidrolizi (8)	48
3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	49
3.3.1. Hücre Hatları	49
3.3.2. Hücrelerin Büyüme Ortamlarının Hazırlanması	52
3.3.3. Hücre Açma	52
3.3.4. Hücre Kapatma	52
3.3.5. Hücre Canlılığı Çalışmaları	53
3.3.6. Comet Assay	53
3.3.7. Apoptoz Çalışmaları	55
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	56
4.1. Kaliksaren Bileşiklerinin Sentezi.....	56
4.2. 3 ve 8 no'lu Bileşiklerin Sitotoksosite Çalışmaları	65
4.3. 3 ve 8 no'lu Bileşiklerin DNA Yapısı Üzerindeki Etkilerinin Aydınlatılması....	77
4.4. 3 ve 8 no'lu Bileşiklerin Flow Sitometre Çalışmaları	79
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	85

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

N	Normalite
M	Molarite
M _A	Molekül Ağırlığı
mL	Mililitre
Mmol	Milimol
-p-	Para
-o-	Orto
Ter-	Tersiyer
Eqv	Eşdeğer Gram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
°C	Santigrat Derece

Kısaltmalar

ATCC	American Type Culture Collection
DMSO	Dimetil Sülfoksit
IC ₅₀	Toplam Hücre Sayısının Yarisını İnhibe Eden İlaç/Madde Konsantrasyonu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

İlk çağlardan günümüze kadar insanoğlu bilim ve teknoloji alanında bilinmeyi keşfetme arzusu üzerine araştırmalar yapmada ve var olan araştırmaları daha çok geliştirmek için çabalamaktadırlar.

Günümüzde insan ve çevre için toksik maddelerin birçok zararının olduğu bilinmektedir. Supramoleküller bu sorunların giderilmesi için uygun fonksiyonel grupları olan makromoleküller sentezlenmiştir. Supramoleküller birinci ve ikinci kuşak bileşikler olarak bilinen taç eterler ve siklodekstrinlerin kimyası son 50 yılı aşkın çeşitli alanda kullanılmaktadır (Gutsche ve Iqbal, 1990). Kaliksarenler, supramoleküller kimya da üçüncü kuşak bileşik olarak bilinir ve çeşitli moleküllerle kompleks yapabilen hidrofobik bir boşluk olacak şekilde fenolik yapıların hidroksil gruplarına o-pozisyonundan metilen köprüleriyle birbirine bağlanmış, halkalı ve esnek yapıda olan oligomerdir.

Kaliksarenler, sensör, membran, katalizör, enantiomerlerin tanınması, katyon, anyon ve moleküllerin taşınması ve biyokimyasal çalışmalar gibi çok geniş uygulama alanlarında kullanılmaktadır.

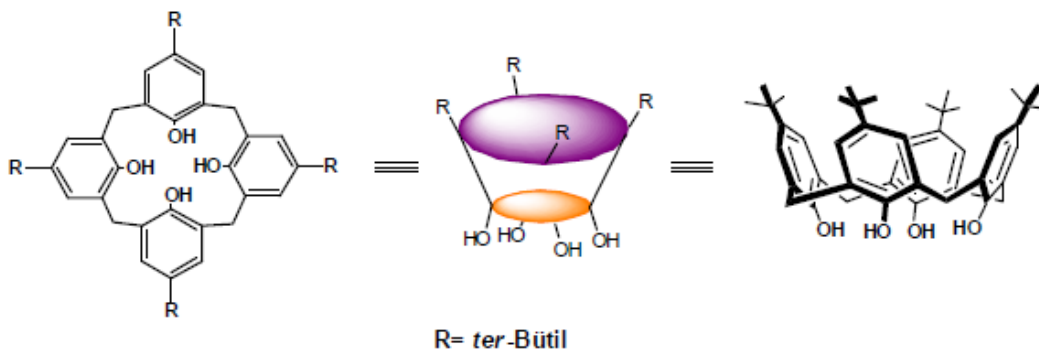
İlk defa 1978 yılında kaliks[n]arenlerin tek kap metodu ile sentezlenmesinden bu yana onların anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-viral ve anti-karsinojen özellikleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Kanser hücrelerine olan yüksek afiniteleri, düşük sistemik toksisiteleri, kolay ve hızlı bir şekilde farklı fonksiyon gruplarının yapılarına eklenebilmeleri, hidrofilik özellikte olmaları ve ilaç moleküllerini taşıyabilme özelliklerinden dolayı kaliks[n]arenler kanser teröpatik ilaçların geliştirilmesi için önemli bir aday olmaktadır.

1.1.Kaliksarenler

1.1.1. Kaliksarenlerin Tarihçesi

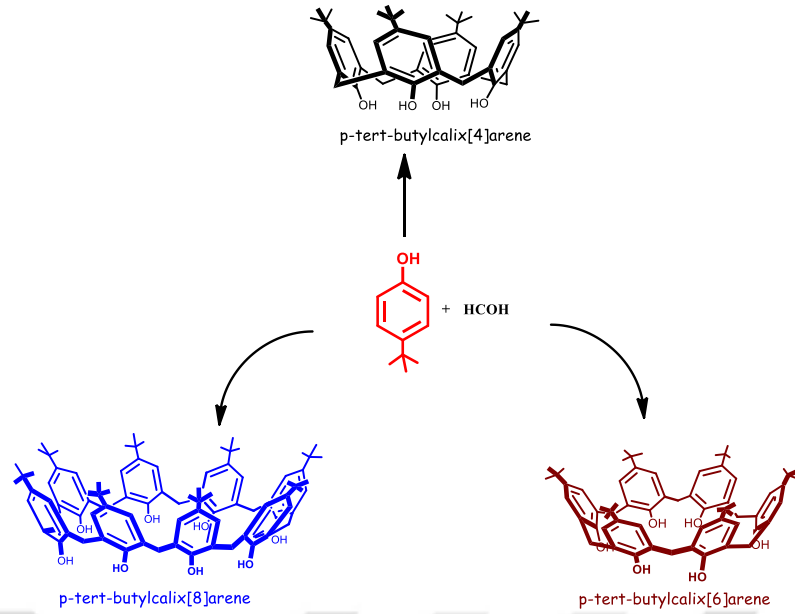
Kaliksarenler fenol-formaldehit ürünü olduğundan dolayı bunların tarihsel gelişiminden bahsetmek faydalı olacaktır. 1872 yılında Adolph von Baeyer 70 yıldır tam olarak aydınlatılamayan yapısını, fenol ile formaldehiti ilk kez tepkimeye sokarak oldukça sert, reçinemsiz ve kristallenmeyen bir madde izole etti. 1900 lı yılların başlarında enstrümental analiz tekniklerinin gelişmesi ile birlikte Leo Hendrick Baekeland, Adolph

Von Baeyer' in kullandığı fenol-formaldehit kimyasını geliştirerek bulduğu reçineyi ilk fenoplast olarak isimlendirmiş ve ticari piyasada "bakalit" adıyla pazarlanmıştır (Pilato, 2013). Ticari piyasada odak noktası olan bakalit, fenol-formaldehit kimyasının tanınmasında büyük bir rolü vardır. *p-ter*-bütil fenölü, sulu formaldehit ve sodyum hidroksit 50–55 °C da, sonra 110–120 °C da iki saat beklettikten sonra bezir yağı içinde 200 °C ye kadar birkaç saat ısıtıldığında erime noktası yaklaşık 340 °C olan bir madde elde ettiler. Zinke elde edilen bu ürünlerin *p*-alkilfenölün sadece iki orto pozisyonu ile formaldehitin reaksiyonu sonucunda oluşan lineer bir polimerin halkalaşmasıyla elde edilen siklik tetramer yapıda saf bir bileşik olduğunu savundu.



Şekil 1.1: Kaliks[4]arenlerin farklı gösterimleri

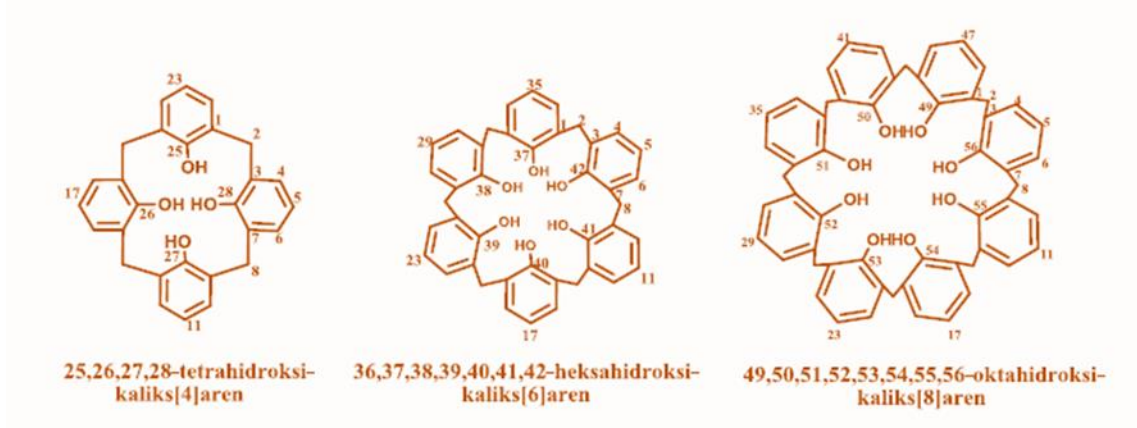
Daha sonraki yıllarda bu yapının sadece tetramer olmadığı tetramer, hekzamer, oktamere ve lineer oligomer karışımı olduğunu ispatladılar (Gutsche ve Iqbal, 1990). Daha sonra Gutsche tarafından 4, 6 ve 8 fenolikten oluşan kaliksarenlerin uygun sentetik tek basamakta sentez prosedürleri geliştirilmiştir. Gutsche 4, 6 ve 8 fenolik birimden oluşan kaliksarenlerin tetramer, hekzamer, oktamere yapılarından yüksek verimle ve ayrı ayrı saf olarak elde etmiştir.



Şekil 1.2: *p-ter*-Bütikaliks[4]aren, *p-ter*-Bütikaliks[6]aren ve *p-ter*-Bütikaliks[8]aren

1.1.2. Kaliksarenlerin Adlandırılması

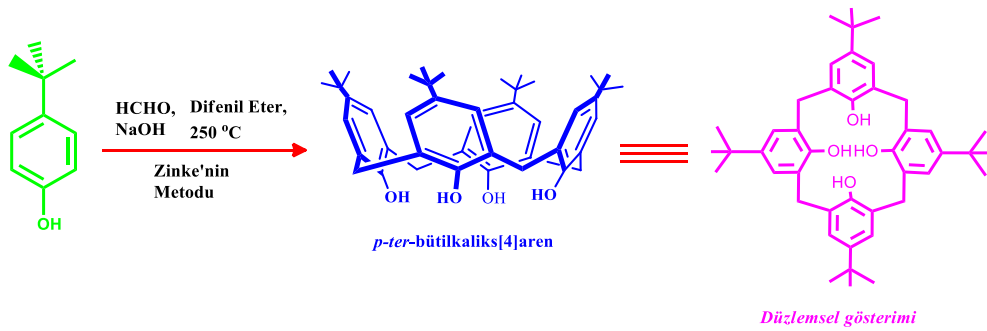
Fenol halkalarıyla metilen grupların bağlanması sonucu siklik tetramer taç şeklinde yapı meydana gelmektedir. Birçok araştırmacı kaliksarenleri farklı bir şekilde isimlendirmişlerdir. Gutsche böyle bileşiklerin IUPAC sistemine göre adlandırması zor olduğu için bileşikleri pratik bir şekilde isimlendirerek IUPAC'a kabul ettirmiştir. Yunanca da taç anlamına gelen kaliks[n]aren terimi, organik kimyada aromatik halkayı gösteren "aren" kelimesinin birleşmesi sonucu meydana gelmiştir. Kaliks[n]aren kelimesindeki [n] ifadesi fenolik grupların makrosiklik büyüklüğü göstermektedir. Kaliks[n]arenler 4, 5, 6, 7, 8,... gibi farklı sayıda fenolik birimlerden ve substitue gruplardan meydana gelebilirler. Farklı substitue fenoller için kaliksarenler isimlendirilirken fenolün substitue kısmı kaliksarenlerin önüne yazılır. Literatürde *p*-alkil fenolden oluşan dörtlü siklik tetramer yapıdaki kaliksaren, daha sistematik olarak 5,11,17,23-tetra-alkil-25,26,27,28-tetra-hidroksi kaliks[4]aren şeklinde, daha kısa ise *p*-alkilkaliks[n]arenler şeklinde adlandırılır (Gutsche ve ark., 1989).



Şekil 1.3: Kaliks[4]aren, kaliks[6]aren ve kaliks[8]arenlerin yapıları ve numaralandırılması

1.1.3. Kaliksarenlerin Tek Basamaklı Sentezi

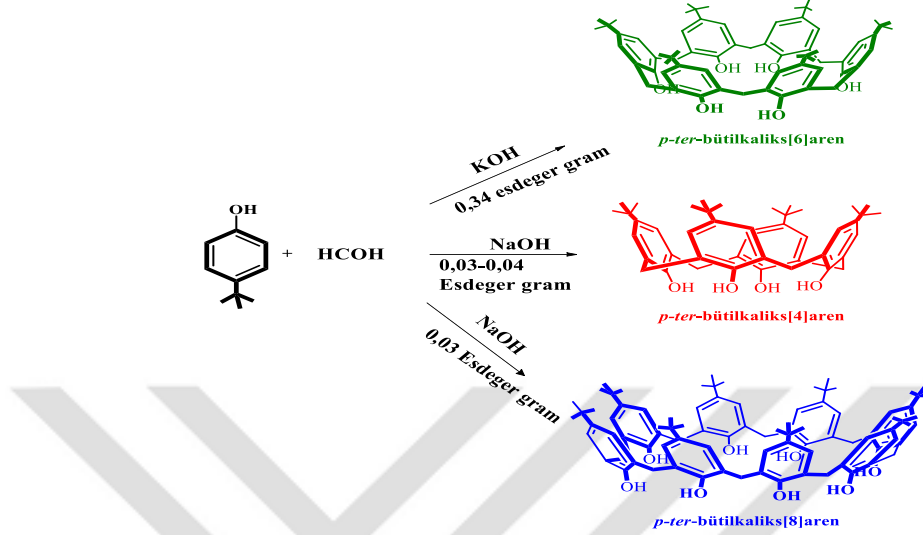
Gutsche ve ark, 1989 yılında kaliks[n]arenlerin sentezini tek basamakta gerçekleştirip, yeni bir metot olarak yayınladılar. *p-ter*-Bütilfenol, fenol ve % 37 formaldehit çözeltisine bağlı olarak 0,045 eqv. orana karşılık gelen miktarda NaOH karışımı önce 110-120 °C arasında 2 saat ısıtılır ve ön ürün oluşur. Oluşan ürün difenil eterle ksilol başlığı takılarak 2 saat geri soğutucu altında kaynatılıp reaksiyonun oda sıcaklığına gelmesi için bir süre bekletilir. Reaksiyon karışımı etil asetat ile çöktürülür ve toluen ile tekrar kristallendirilerek 342-344 °C de eriyen beyaz renkli *p-ter* bütilkaliks[4]aren sentezlenir.



Şekil 1.4: Tek basamaklı *p-ter*-Bütilkaliks[4]aren' in sentezi

p-ter-Bütilfenol, %37'lik formaldehit çözeltisi ve 0,34 eqv. KOH içeren karışım 2 saat ısıtıldığı zaman “ön ürün” oluşur. Ancak bu aşamada difenileter yerine ksilen kullanıldığında elde edilen ürünün kloroform-asetonda kristallenmesiyle %85 verimle 380-381°C erime noktasına sahip *p-ter*-bütilkaliks[6]aren oluşur.

p-ter-Bütilfenol, paraformaldehit ve 0,03 eqv. NaOH içeren karışım ksilen içerisinde 4 saat ısıtıldığında oluşan çökelek süzülür ve kloroformda tekrar kristallendirilirse %65 verimle 411-412°C erime noktasına sahip *p-ter*-bütilkaliks[8]aren elde edilir.



Şekil 1.5: *p-ter*-Bütilkaliks[4]aren, *p-ter*-bütilkaliks[6]aren ve *p-ter*-bütilkaliks[8]arenlerin yapıları

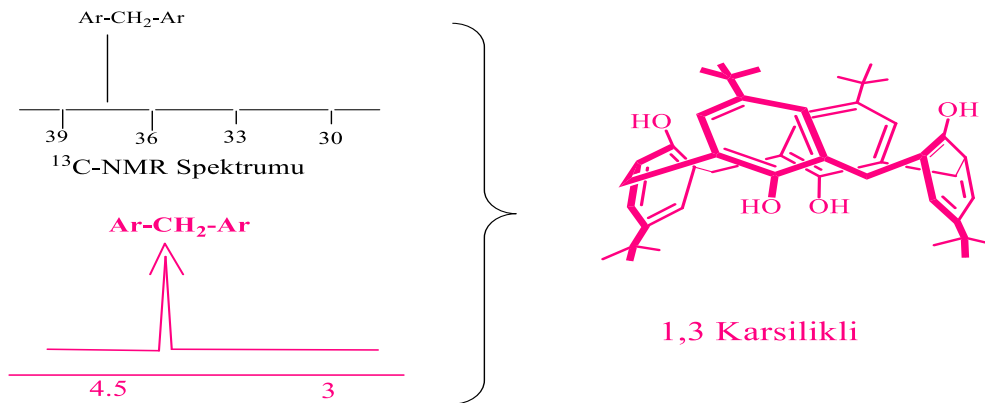
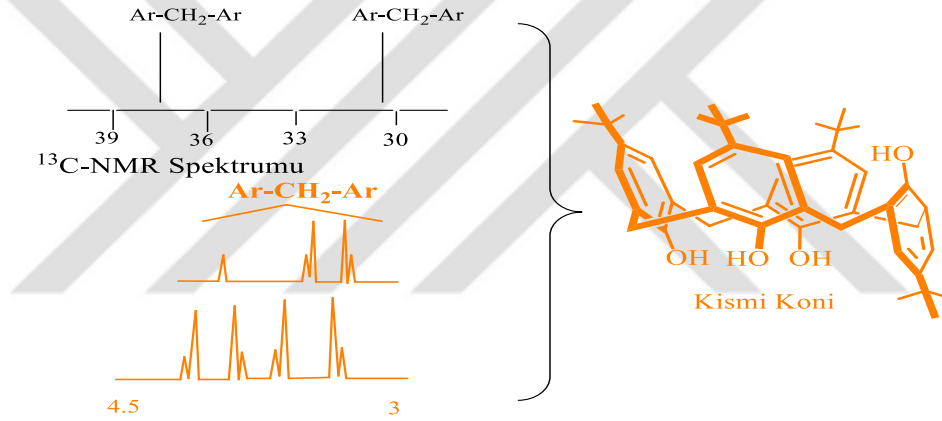
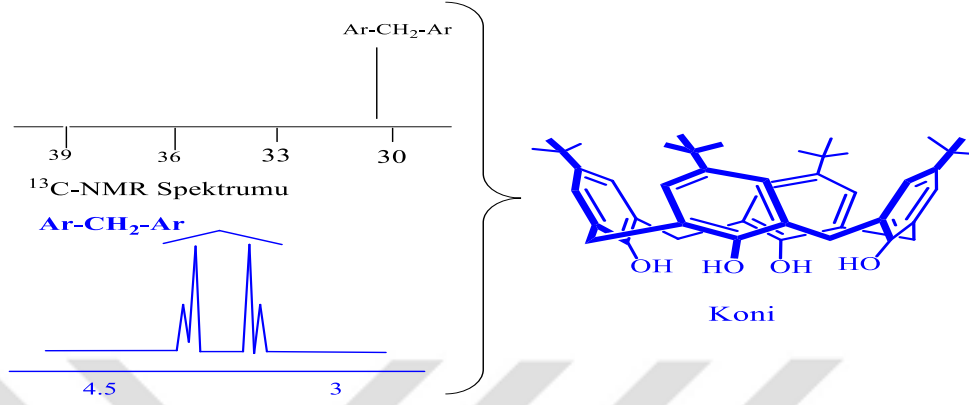
1.1.4. Kaliksarenlerin Konformasyonları

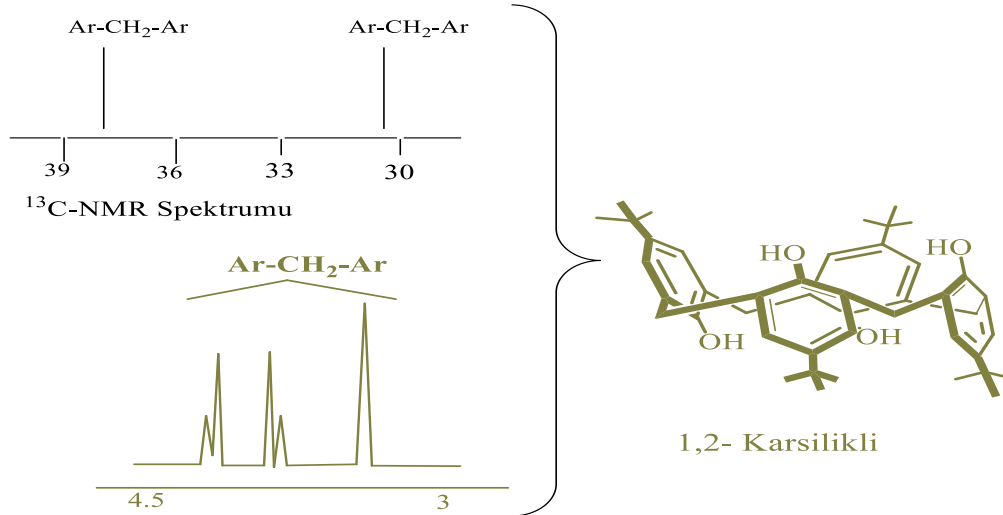
Cornforth, Zinke'nin çalışmalarından ilham alarak kaliks[4]arenlerin dört ayrı konformasyona sahip olduğunu keşfetmiştir. Bu konformasyonlar köprüdeki $-\text{CH}_2$ gruplarının aşağı (d) ya da yukarı (u) yönelimleri ile alakalıdır. Kaliks[4]arenlerdeki farklı konformasyonları Cornforth “koni” (u,u,u,u), “kısmi koni” (u,u,u,d), “1,2-karşılıklı” (u,u,d,d) ve “1,3-karşılıklı”(u,d,u,d) olarak adlandırmıştır (Gutsche ve ark., 1983). Konformasyon sayısındaki artış, halkalı yapıdaki aril gruplarının sayısındaki artıştan meydana gelir. Kaliks[4]aren bileşiklerinin hangi konformasyonda olduğu $^1\text{H-NMR}$ spektrumundaki köprü protonlara ait olan rezonans sinyallerine bakıldığında ortaya çıkar (Gutsche ve ark., 1989).

Tablo 1.1: Kaliks[4]aren’ in Ar-CH₂-Ar protonlarının ^1H NMR spektrumları

Konformasyon	Ar-CH ₂ -Ar protonları
Koni	Bir çift dublet
Kısmi Koni	İki çift dublet (1:1)veya bir çift dublet ve bir singlet (1:1)

1,2-Karşılıklı	Bir singlet ve iki dublet (1:1)
1,3-Karşılıklı	Bir singlet



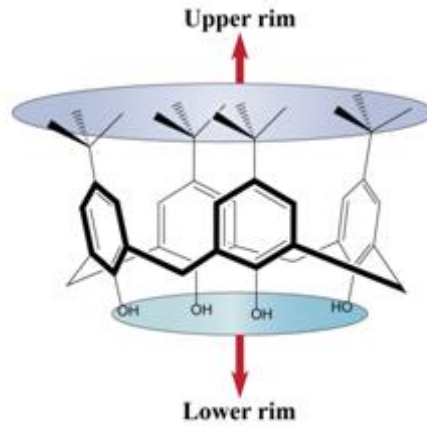


Şekil 1.6: *p-ter*-Bütilkaliks[4]aren' in konformasyonları ve NMR spektrumları

Süstitüentlerin konformasyon dönüşüm hızına bağlı olmasının yanı sıra çözücülerin etkisi baskındır. Toluene, kloroform, karbondisülfür ve brombenzen gibi polar organik çözücüler kaliksarenler ile karmaşık bileşikler oluşturarak konformasyon dönüşüm serbest enerjisini artırırlar. Bunun dışında pridin, aseton ve asetonitril gibi başka polar çözücüler kaliksarenlerdeki molekül içi hidrojen bağlarını kırarak konformasyonel dönüşümü yükseltirler (Gutsche ve ark., 1981).

1.1.5. Kaliksarenlerin Fonksiyonlandırılması

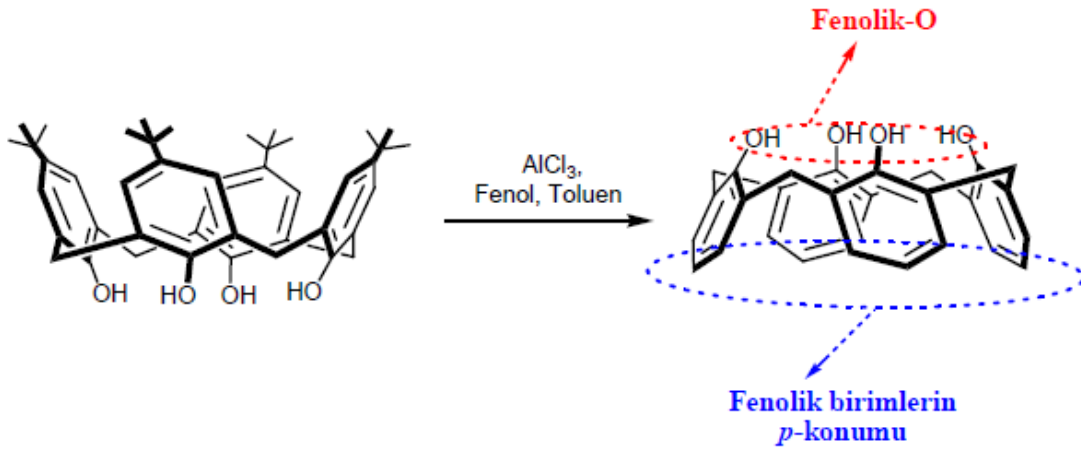
Supromoleküllerden olan kaliksarenler halkalı yapıda fenol türevli bileşiklerdir. Bundan dolayı kaliksarenler fenolik yapıdaki bileşiklerin hemen hemen tümünün vermiş olduğu tepkimeyi vermektedir. Bundan dolayı kaliksarenlerin siklodekstrin ve başka halkalı yapıdaki taç eterlere oranla sentezlerde çok fazla kullanılmasını sağlamaktadır. Bu amaçtan dolayı kaliksarenlerin yapısında bulunan fenolik halka grupları *para* konumundan ya da fenolik oksijen grupları üzerinden farklı fonksiyon gruplarla türevlendirilmektedir.



Şekil 1.7: Fenolik birimlerin *p*-konumu ve fenolik-O kısımları

1.1.5.1. Kaliksarenlerin *para* Pozisyonundan Fonksiyonlandırılması

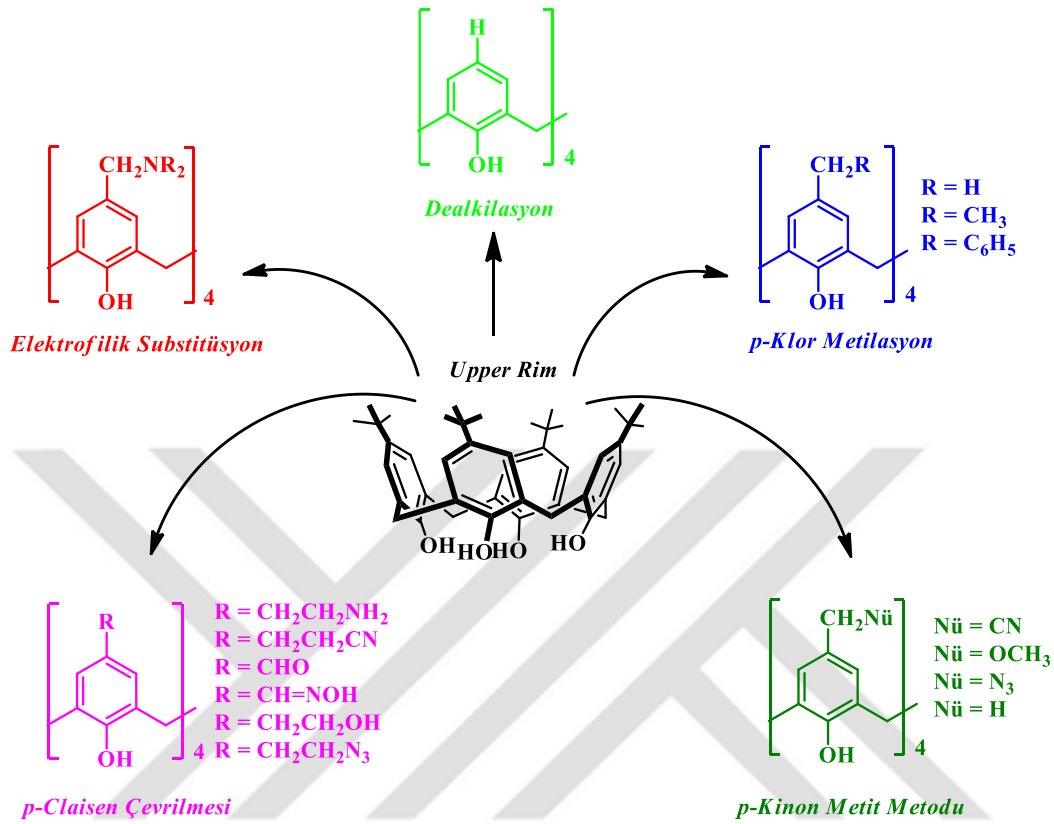
p-terbütilkaliks[n]arenler sentezlendikten sonra *para* konumundaki ter-bütil gruplarını AlCl_3 ile reaksiyona sokarak kolayca giderip (dealkilasyon) kaliks[n]arenleri sentezlemişlerdir (Gutsche ve Iqbal, 1990).



Şekil 1.8: *p*-ter-Bütilkaliks[4]arenin dealkilasyonu

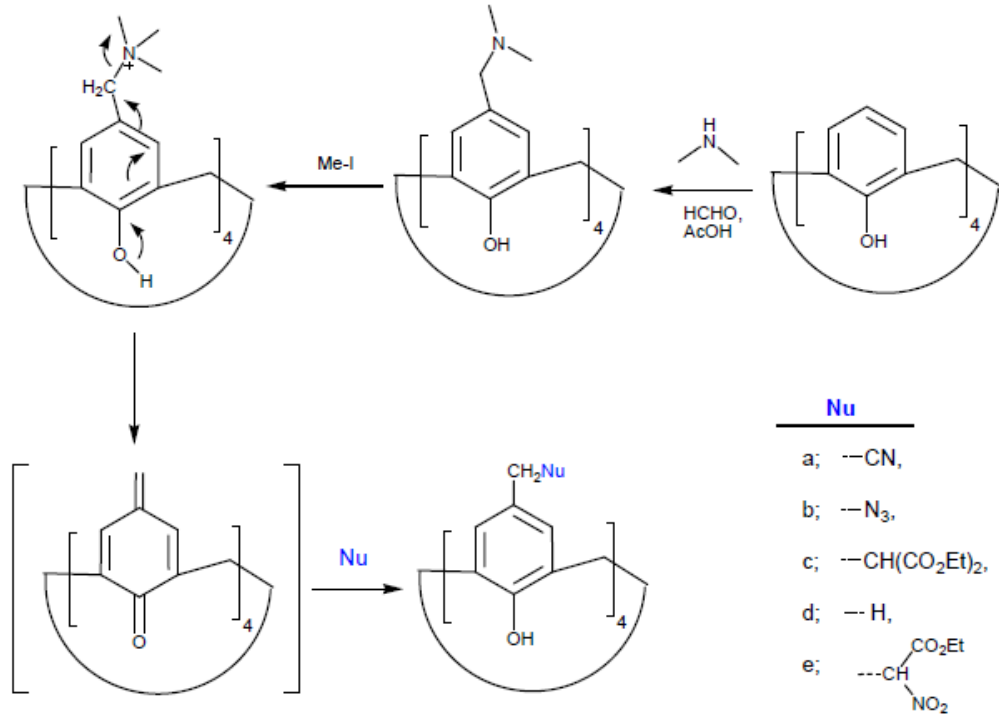
p-ter-bütil gruplarının giderilmesiyle oluşan kaliksarenler kolaylıkla *para* konumundan fonksiyonlandırılabilir. Bu işlem ilk olarak Claisen düzenleme tepkimelerinde kullanılmış ve *para* konumunda kolaylıkla türevlendirilmiştir (Gutsche ve Pagoria, 1985). Bu tepkime öncelikle fenolik kısımlar allil eter olacak şekilde fonksiyonlandırılır ve sonra dietilanilin içinde ısıtılarak allil grupları *p*-pozisyonuna gider. Bu reaksiyon 1990 larda sadece kaliks[4]aren bileşiği kullanıldığı zaman yürüyordu. Gutsche'nin 1990 yıllarındaki çalışma arkadaşı Gibbs yeni bir metot geliştirdi. Bu yönteme göre Claisen düzenleme reaksiyonları diğer kaliksarenlerde de

uygulanmaktadır (Gibbs ve Gutsche, 1993). Bu yöntem kullanılarak kaliksarenlerin bütün para konumları fonksiyonlandırılabilir.



Şekil 1.9: Kaliks[4]arenin fenolik birimlerin p-konumu üzerinden fonksiyonlandırılması

Kaliksarenlerin fenolik gruplarından p-konumu ile fonksiyonlandırılmasında kullanılan diğer bir metod p-kinonmetit metodudur (Gutsche ve Nam, 1988). Yani bu yöntemle öncelikle dealkile olmuş kaliksaren formaldehit ve dimetil ya da diallilamin ile etkileştirilerek kaliksaren türevi içeren bir Mannich bazı sentezlenir. Sonra bu Mannich bazı metil iyodür ile reaksiyona sokulup kuvaterner tuzuna dönüştürülebilir. Kuvaterner tuzunun nükleofilikler ile çok kolay tepkime verdiği bilinmektedir ve bu durumda kaliksarenlerin fenolik kısımlarının p-konumu üzerinden farklı gruplu nükleofiller bağlanabilir (Gutsche ve Nam, 1988).

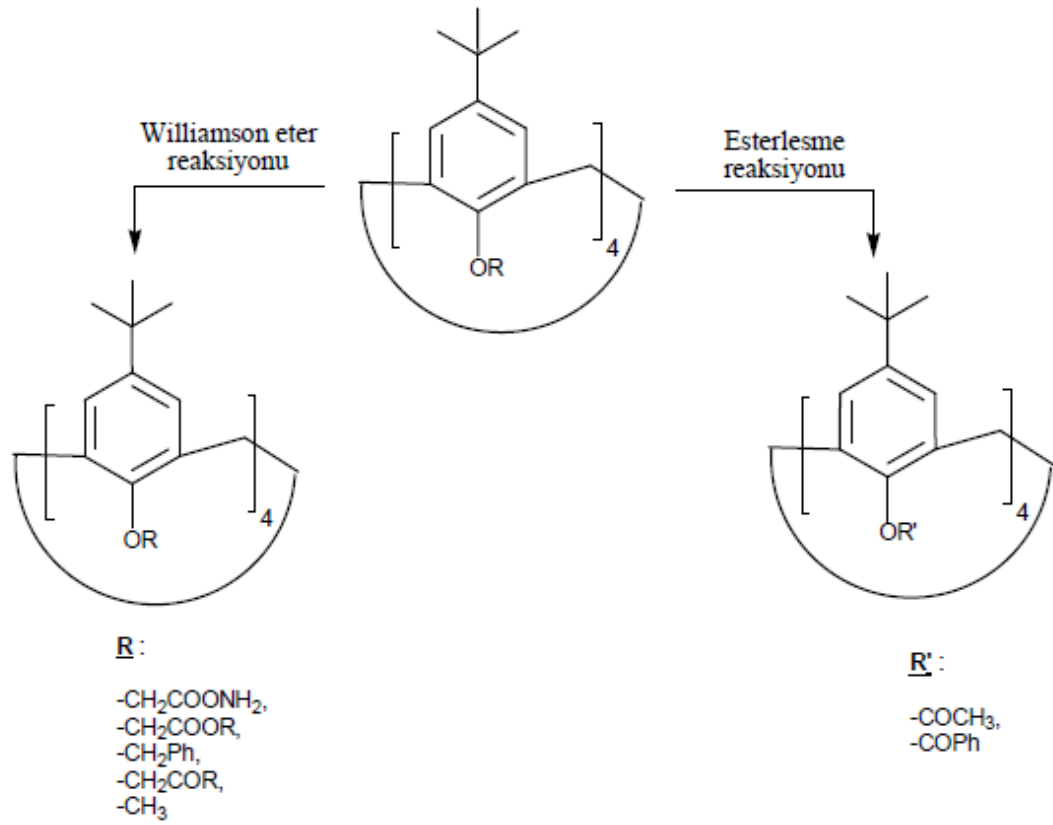


Şekil 1.10: *p*-Kinsonmetit yöntemiyle kaliksarenlerin fenolik birimlerin *p*-konumu üzerinden fonksiyonlandırılması

Kaliksarenler *p*-konumları üzerinden bromlama, iyotlama, nitrolama, sülfolama, klorsülfolama, klormetilleme, açilleme, diazolama ve formülasyon gibi süstitüsyon tepkimeleri vermektedir (Gutsche ve Lin, 1986; Shinkai ve ark., 1986; Hamada ve ark., 1990; Arduini ve ark., 1991; Verboom ve ark., 1992; Morzherin ve ark., 1993; Nagasaki ve ark., 1993; Alam ve ark., 1994; Deligoz ve Ercan, 2002).

1.1.5.2. Kaliksarenlerin Fenolik-OH Üzerinden Fonksiyonlandırılması

Kaliksarenler fenolik gruplarının *p*-konumundan fonksiyonlandırılmasının aksine fenolik-O üzerinden fonksiyonlandırılması çok kolaydır. Fenolik-O konumlarında bulunan OH grupları çeşitli gruplarla tepkimeye sokularak farklı eter ve ester türevleri sentezlenebilmektedir.



Şekil 1.11: *p-ter*-Bütilkaliks[4]arenin fenolik-O üzerinden fonksiyonlandırılması

1.1.6. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları

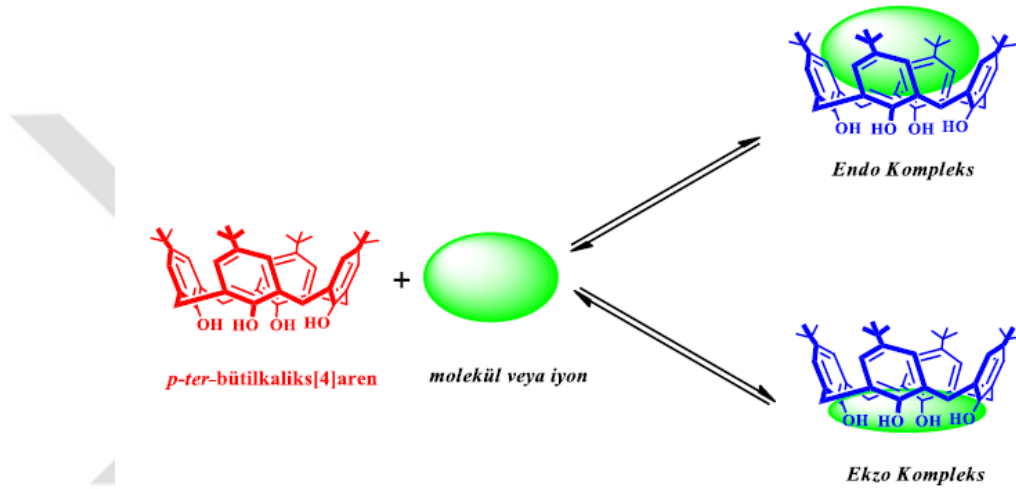
Kaliksarenler farklı uygulama alanlarında kullanılmıştır. Bunlardan bazıları;

- Molekül / İyon taşıyıcı kaliksarenlerin kullanımı
- Sensör çalışmalarında kaliksarenlerin kullanımı
- Kolon dolgu maddesi olarak kaliksarenlerin kromatografide kullanılması
- Enantiyomerlerin tanınması ve ayrılmasında kaliksarenlerin kullanılması
- Kaliksarenlerin katalizör olarak kullanılması
- Kaliksarenlerin biyokatalizör olarak kullanılması
- Kaliksarenlerin anti-kanser uygulamalarda kullanılması

Kaliksarenlerin çok geniş bir kullanım alanı vardır. Bu kullanım alanlarıyla ilgili birkaç örnek aşağıda verilmiştir.

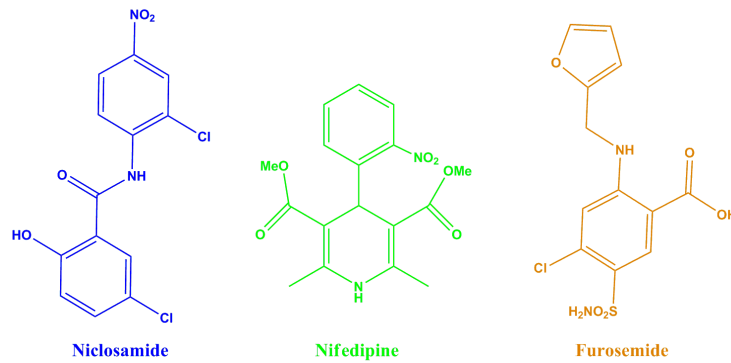
1.1.6.1. Molekül / İyon Taşıyıcı Kaliksarenlerin Kullanımı

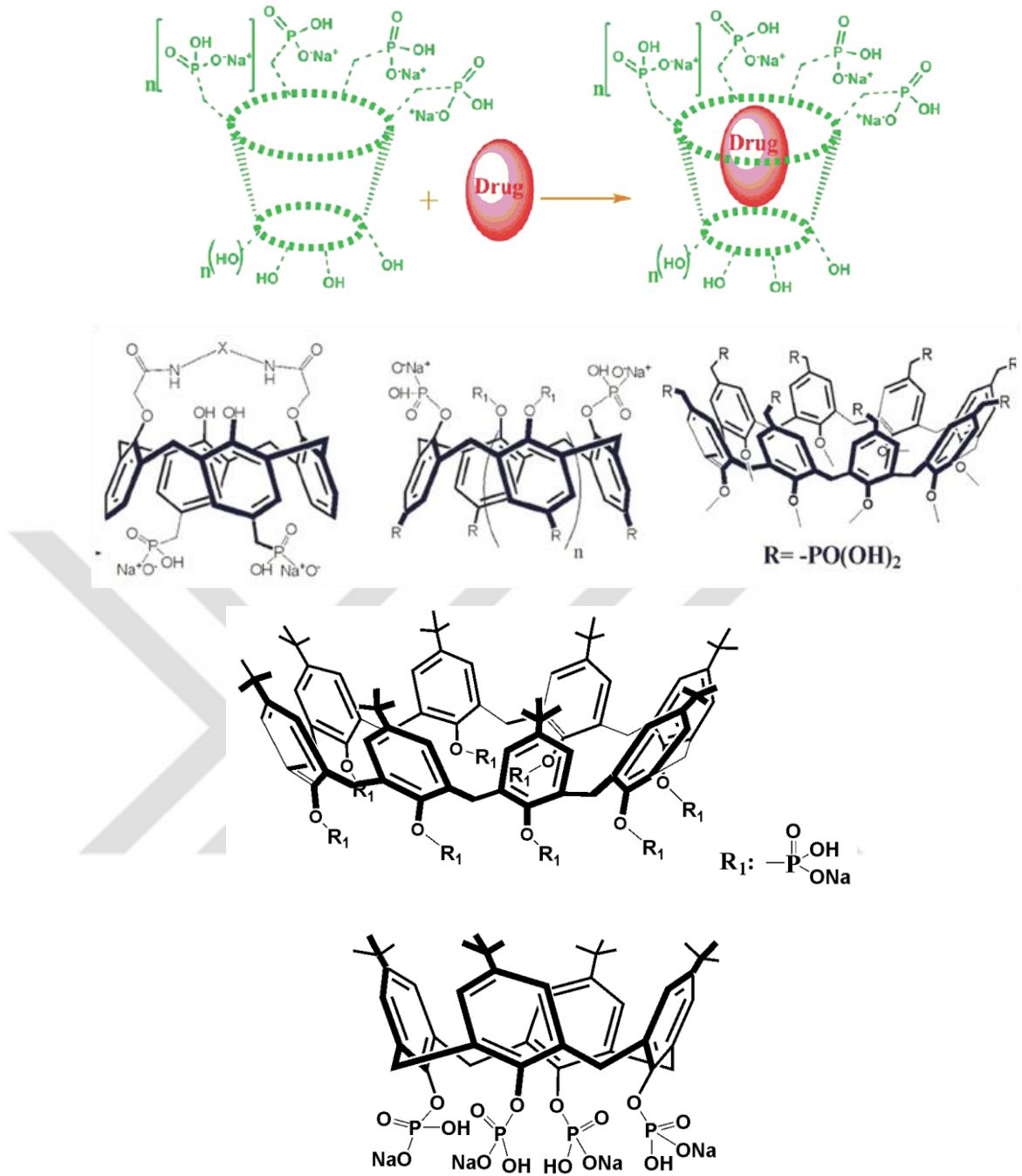
Yapısında halkalı boşluklar bulunan kaliksarenler çok çeşitli molekül ve iyon yapılarıyla kompleks yapma özelliği oluşturlar. O yüzden kaliksarenler molekül/iyon taşıyıcı olarak çok fazla kullanılmaktadır. Bu yapıların kompleksleri Şekil 1.12'de gösterilmiş olduğu gibi endo- ve ekzo- kompleksleri gibidir. Kaliksarenler kompleksleşmeden dolayı, anyon, kation ve molekül taşıyıcı gibi özelliklerle kullanılmaktadır.



Şekil 1.12: Kaliksarenlerin kompleks oluşumu

Grubumuz tarafından yapılan çalışmada niklosamit, nifedipin ve furosemit gibi sudaki çözünürlüğü çok düşük olan ilaçların sudaki çözünürlüğünü konuk-konak türü kompleks yapma kabiliyetine sahip suda çözünen fenolik O-dan ve fenolik birimlerin p-konumundan fonksiyonlu kaliks fosfonatları kullanarak arttırmayı başarmışlardır (Bayrakçı ve ark., 2009).



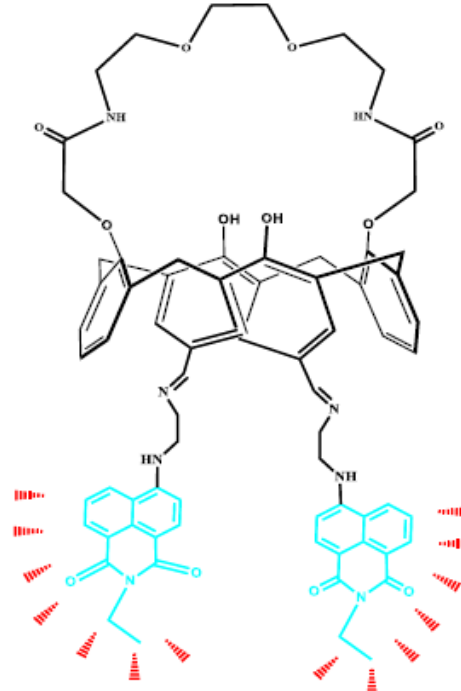


Şekil 1.13: Fosfonat grubu taşıyan kaliks[*n*]aren bileşikleri

1.1.6.2. Sensör Çalışmalarında Kaliksarenlerin Kullanımı

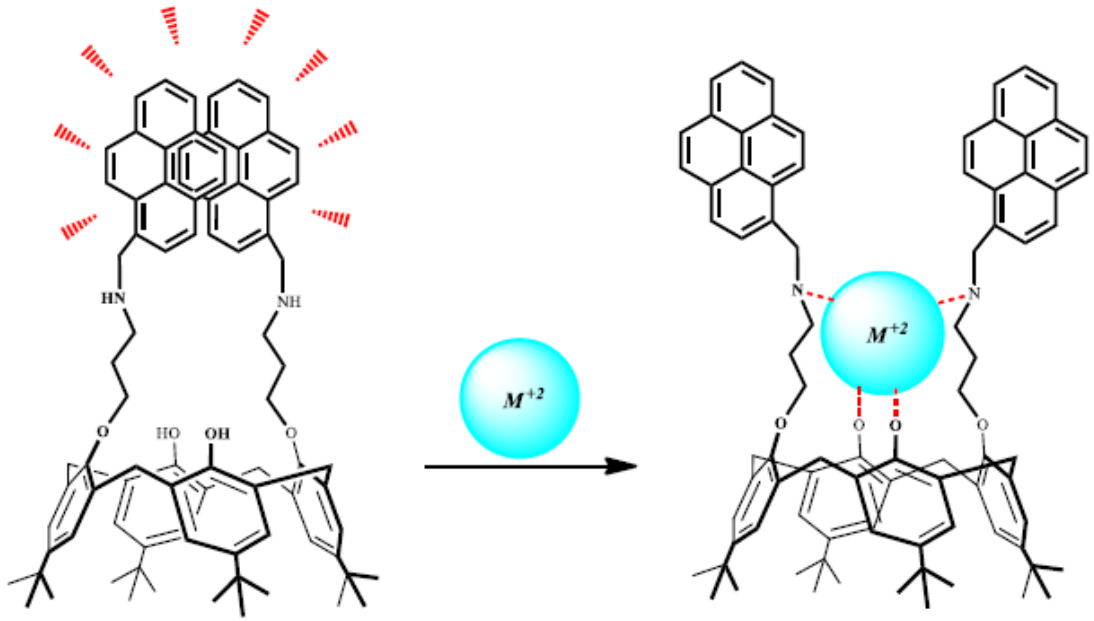
Farklı metal iyonları dizisi oluşturulduktan sonra bunların arasından Cu⁺² iyonu seçilerek çok fazla seçiciliğe sahip kaliks[4]aren naftilamit türevi bileşik sentezlenmiştir (Sahin ve Yilmaz, 2012). Sentezlenen bu bileşiğin floresans özelliğe sahip olup olmadığı UV, NMR, floresans spektroskopisi teknikleri yöntemleri kullanılarak seçilmiş farklı metal iyonları (Na⁺, Li⁺, Mg⁺², Ni⁺², Cu⁺²) ve bazı anyon grupları (F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, CH₃COO⁻

, H_2PO_4^-) arasında inceleme yapmışlardır. Alınan sonuçlara göre bileşiklerin Cu^{+2} iyonuna karşı oldukları ve yüksek seçicilik gösterdikleri gözlenmiştir.



Şekil 1.14: Naftilamit türevli kaliks[4]aren bileşiğinin Cu^{+2} iyonuna karşı duyarlılığı

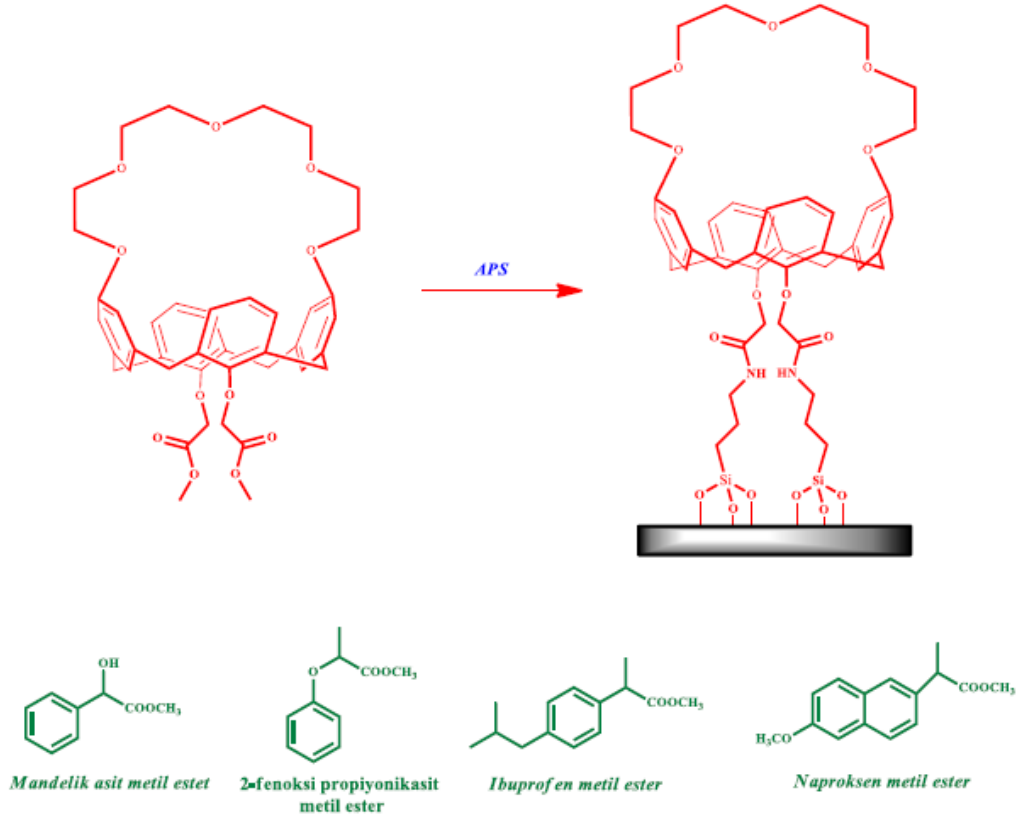
Yapılan diğer bir çalışmada 1,3 pozisyonunda bulunan fenolik-O bileşiği yapısında piren grubu bulunduran florojenik *p-ter*-bütilkaliks[4]aren bileşiği sentezlenmiştir (Sahin ve Yilmaz, 2011). Piren amin türevli kaliks[4]arenler sırayla Pb^{+2} ve Cu^{+2} iyonlarının seçimli sensörde rol oynadıklarını gözlemlemişlerdir.



Şekil 1.15: Pb^{+2} ve Cu^{+2} iyonlarına karşı sensör özellik gösteren kaliks[4]aren bileşiği

1.1.6.3. Kolon Dolgu Maddesi Olarak Kaliksarenlerin Kromatografide Kullanılması

Silika sabit fazına kaliks[4]crown-5 bileşiği bağlanarak HPLC kolon dolgu maddesi olarak kullanılmış ve kromatografide bazı aromatik aminler, fenoller ve bazı ilaç ayrılmıştır (Erdemir ve Yılmaz, 2011).

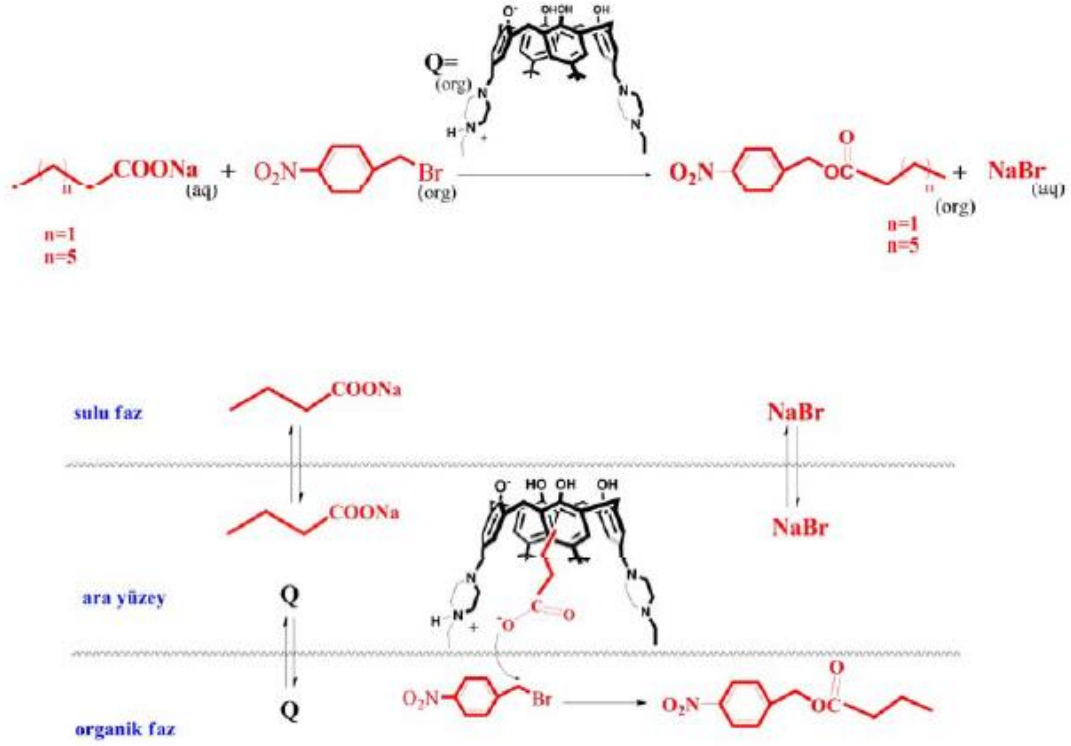


Şekil 1.16: Kaliks[4]crown-5 bileşiği ile bağlanmış silika sabit fazı ve ayırmada kullanılan bazı ilaçlar

1.1.6.4. Katalizör Olarak Kaliksarenlerin Kullanılması

1.1.6.4.1. Faz Transfer Katalizör Olarak Kullanılması

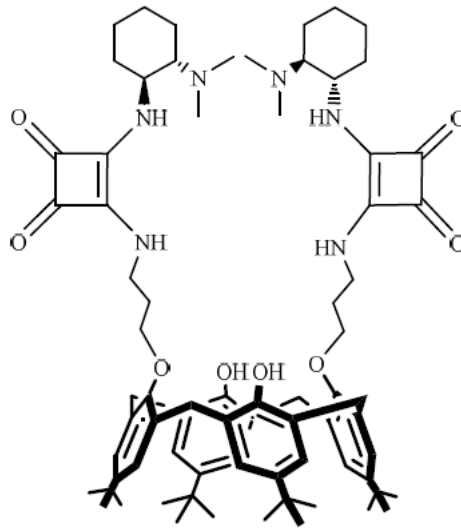
Akceylan ve Yılmaz, çalışmalarının birinde kaliks[4]aren bileşiklerinin fenol birimlerinin p-pozisyonunda alkil amin grupları ile fonksiyonlandırmış ve bu yapılar p-nitrobenzil bromür ile bazı alkali metal karboksilat arasında olan ester tepkimesinde faz transfer katalizör olarak kullanmışlardır. *N*-etilpiperazin amin türevli kaliks[4]aren bileşiği esterleşme tepkimesinde yüksek verimle katalizlediğini tespit etmişlerdir (Akceylan ve Yılmaz, 2011).



Şekil 1.17: Ester oluşum reaksiyon mekanizması

1.1.6.4.2. Kiral-akiral Katalizör Çalışmalarında Kaliksarenlerin Kullanılması

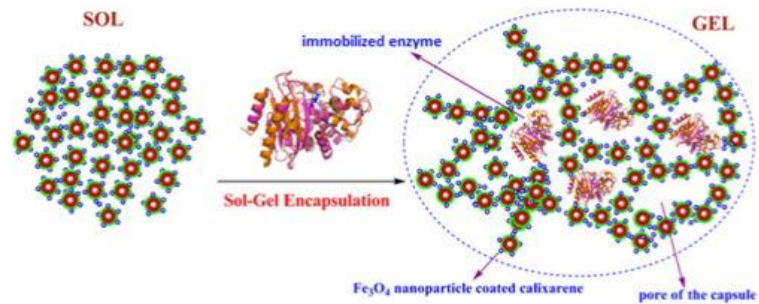
Son yıllarda yeni bir kiral organokatalizör olarak kaliks[4]aren-bis-squaramid türevini hazırlamış ve organokatalizör olarak asetilaseton ile β -nitrofenollerle Michael katılması tepkimelerinde kiral orgaokatalizör olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak sentezlenen kiral katalizörün enantiyoseçici reaksiyonlarda kiral katalizör olarak kullanılabileceği ve kaliksaren halkasının da aktif etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Vural ve ark., 2016).



Şekil 1.18: Tersiyer amin grubu taşıyan kiral kaliks[4]aren skuaramid türevi (Vural ve ark., 2016)

1.1.6.5. Kaliksarenlerin Biyokatalizör Olarak Kullanılması

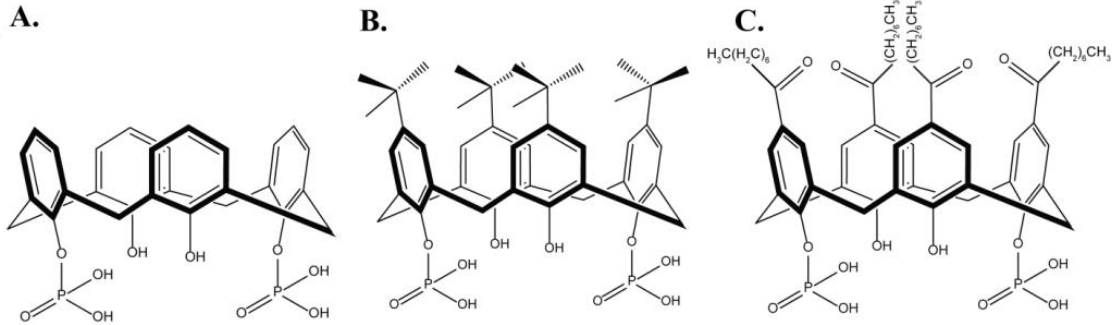
Yılmaz ve grubu demir oksit manyetik nanopartikül yüzeylerini farklı asidik gruplarla modüle etmek için fosfonik asit veya kaliks[4]aren iminodikarboksilik asit türevleri ile kaplamışlardır. *Candida rugosalipaz* lipazını sol-gel kapsülleme yoluyla modifiye etmişler ve nanoparçacıkların üzerine doğrudan immobilize etmişlerdir. Apaprosen metil ester (R/S) ve -2-fenoksipropiyonik asit metil esterinin (R/S) hidroliz reaksiyonu sonucunda katalitik aktiviteleri ve enantiyoselektifliklerini değerlendirmişlerdir. Bunun sonucunda lipazın, kaliksaren bazlı katkı maddelerinin varlığında kapsüllenmesi durumunda, lipazın aktivitesinin ve enantiyoselektifliğinin arttığını gözlemlemişlerdir. Kaliks[4]aren fosfonik asit türevi ile kapsüllenmiş lipaz, apaprosen metil ve -2-fenoksipropiyonik asit metil esterlere karşı mükemmel bir enantiyoselektivite oranına sahip olduğunu gözlemlemişlerdir (Ozyılmaz ve ark., 2016).



Şekil 1.19: Enzimlerin sol-gel kapsüllenmesi

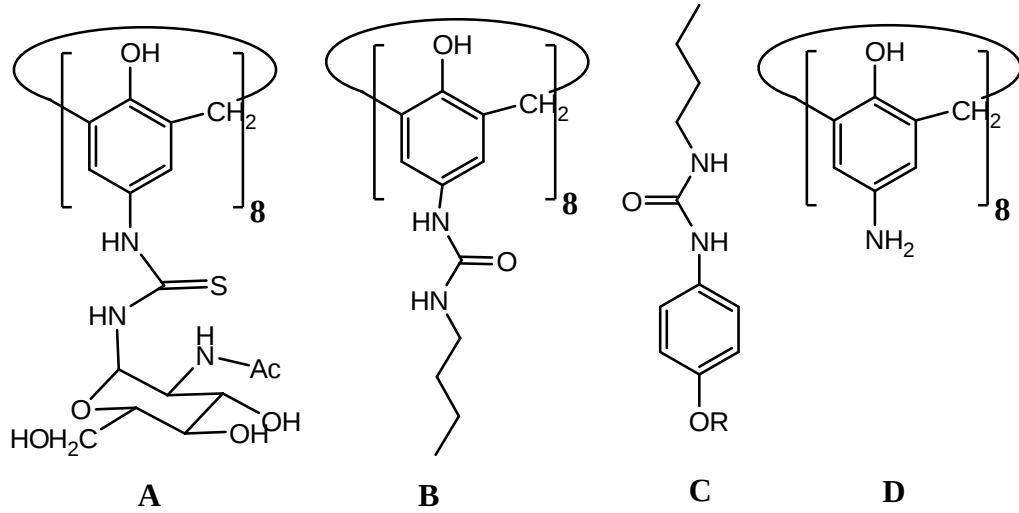
1.1.6.6. Kaliksarenlerin Anti-kanser Çalışmalarında Kullanılması

Anti-kanser çalışmalarında kaliksarenler üzerinde yoğun bir şekilde araştırmalar devam etmektedir. Günümüzde kanser Dünya çapında sonucu ölüm olan hastalıklar arasında ilk sıradadır. Dünya sağlık örgütünün verilerine göre 2015 yılında kanserden ölen kişi sayısı 8,8 milyondur. Önümüzdeki yıllarda kanserden ölen kişi sayısı %70-80 oranında artacağı belirtilmiştir (WHO, 2015). Birkaç kanser hücresi radyoterapik ve kemoteropik ilaçlara dayanıklı olduğundan dolayı kanser hücreleri ile savaşılabilecek ve bu hücelere karşı etki gösterebilecek yeni molekül ve bileşiklerin sentezlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bundan ötürü kalik[n]aren türevli bileşiklerin antikarsinojen ve ilaç taşıyıcı gibi özelliklerinin incelenmesi kanser tedavisinde kullanılmak üzere yeni bileşiklerin sentezlenmesi önemlidir. Yapılan araştırmalarda dihidrofosfonik asit türevli kaliks[4]aren (A, B, C) bileşiklerinin lösemi, melanoma ve karaciğer kanseri gibi birçok insan kanser türünde antikarsinojenik etkilerini saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu türevlerin özellikle 7,33 μM gibi düşük bir IC_{50} değeri ile insan akut lenfomablastik lökemia hücrelerine karşı etkili oldukları bulunmuştur.



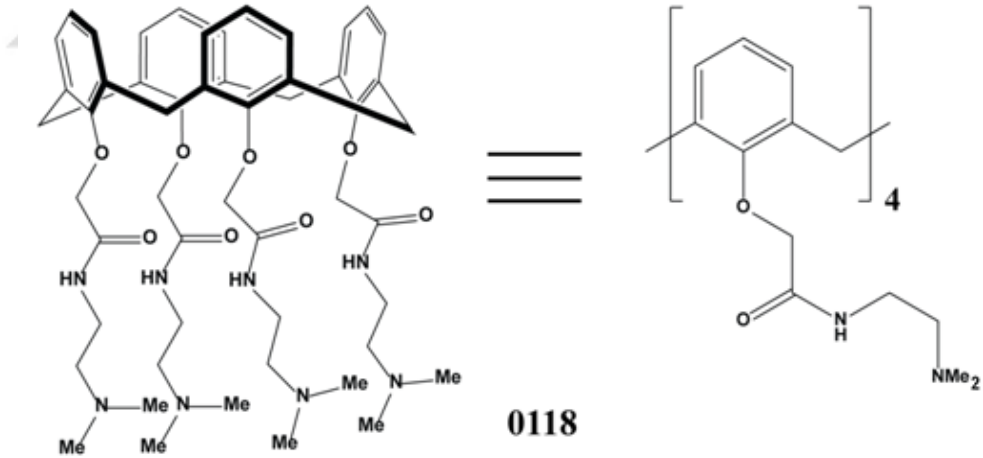
Şekil 1.20: Kaliks[4]aren dihidrofosfonik asit türevleri

Viola ve ekibi (2010) tarafından üre grubu taşıyan farklı kaliks[8]aren türevlerinin antikanser özellikleri araştırılmış ve N-asetil D-glukozamin grubu taşıyan kaliks[8]aren türevinin kanser hücrelerin metastazını ve çoğalmasını engellediğini diğer kaliks[8]aren türevlerinin etkili olmadığı gözlenmiştir. (Viola ve ark., 2010).



Şekil 1.21: Üre grubu taşıyan farklı kaliks[8]aren bileşikleri

Kaliksarenlerin antikanser özelliğine sahip türevleri literatürde araştırılmaktadır ve antikanser etki gösterdiği kanıtlanmış olan N,N-dimetilamin grupları ile türevlendirilmiş kaliksaren bileşiğinin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarının sonucunda 2014 yılında Amerikan patentli olarak yayınlamışlardır (Patent No: US 8.716.343 B2).

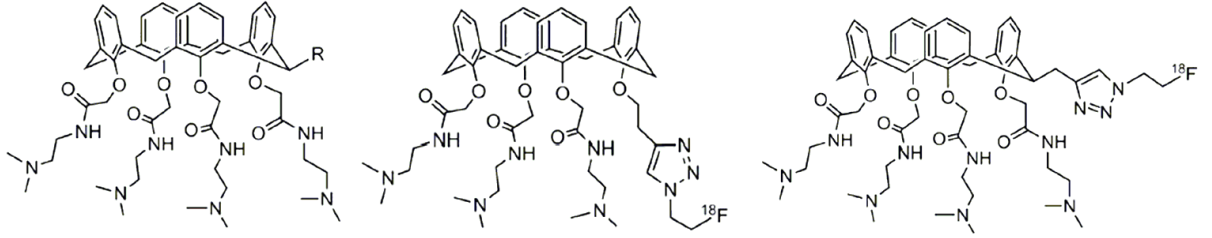


Şekil 1.22: N,N-dimetilamin grupları ile türevlendirilmiş kaliksaren bileşiği

Astorgues-Xerri ve grubu 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada N,N-dimetiletildiamin grupları ile modifiye edilmiş kaliksamenit molekülünün cis-platin, oxaliplatin, docetaxel gibi bazı sitotoksik ilaç molekülleri ile olan etkileşimlerini incelemişler ve *in vivo* çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmalardan kaliks[4]aren amit molekülünün bu ilaçlarla yaptığı kompleks yapısı sayesinde ilaç

moleküllerinin artan etkinliği sayesinde tümörlü hücrelerin büyümesini %90 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Löppchen ve ekibi 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada üç farklı tetra amit türevli kaliks[4]aren molekülü sentezlemeyi başarmışlar ve bu yapıların *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarını yapmışlardır. Tümörlü hücrelerin büyümesi ve gelişmesi üzerine inhibisyon özelliklerini bu çalışma kapsamında incelemişlerdir (Lappchen ve ark., 2015).

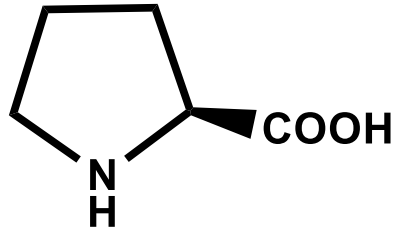


Şekil 1.23: Üç farklı tetra amit türevli kaliks[4]aren molekülü

Bir başka çalışmada kanser hücrelerinde yüksek oranda ekspresyona gerçekleşen folat reseptörlerine karşı da kaliks[4]aren türevlerinin etkili oldukları böylelikle rahim ve melanoma kanseri hücrelerinin çoğalmalarını engelledikleri gösterilmiştir (Consoli ve ark., 2015).

1.2.L-Prolin

Farmakolojik alanda önem arz eden aldol tepkimelerinin gerçekleşmesi için katalizör olarak aldolaz enzimi kullanılıyordu. Bir takım araştırma grubu bu enzimin uç kısımlarında L-prolin gruplarının var olduğunu fark etmişlerdir. List ve ark 2000 yıllarında reaksiyonda kullanılan enzimin işlevini L-prolinin gerçekleştirdiğini düşünmüşlerdir. Bu sebepten dolayı aldol reaksiyonunun yalnızca L-prolin varlığında olup olmayacağını anlamak için birkaç deneme yapmışlardır. 1972 yılında yapılmış olan L-prolin içeren moleküller içi asimetrik Hajos-Parrish-Eder-Sauer-Wiechert reaksiyonunu referans alarak, burada bulunan L-prolini molekülleri arası asimetrik aldol reaksiyonunda uygulamaya başlamışlar ve sonucunda reaksiyonun iyi sonuç verdiğini gözlemlemişlerdir. 2000 yılında başlayan bu düşünceler zamanla önem kazanmıştır ve L-prolini asimetrik organokataliz tepkimelerinde çok kullanılan bir kataliz haline getirmişlerdir.



Şekil 1.24: L-prolin molekül şekli (α -aminoasit)

Prolin sekonder amin fonksiyonallitesi olan tek doğal aminoasittir. Yapıda bulunan azot atomunun pKa değeri diğer aminoasitlerden yüksek olduğundan dolayı nükleofilik değeri de yüksektir (Sukumaran ve Hanefeld, 2005). Bundan dolayı prolin aminoasidi özellikle karbonil bileşikleri ya da Michael akseptörlerine karşı nükleofilik davranır ve iminyum iyonu veya enamin oluşabilir. Bu tepkimelerde prolinin karboksilik fonksiyonu Brönsted asidi olarak davranır ve prolinin bifonksiyonel katalizör olmasına neden olur.

L-prolinin organokatalizör olarak kullanılma nedenlerini şöyle sıralayabiliriz;

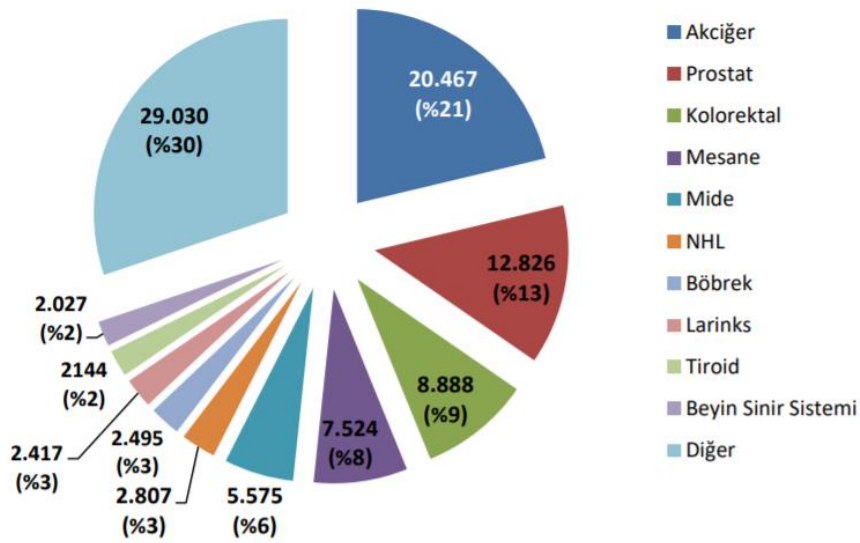
- Ucuz ve toksik değildir
- Enantiyoseçimli tepkimelerde verimli sonuçlar elde edilmesine sebep olur,
- Prolin ile meydana gelecek reaksiyonlar oda sıcaklığında gerçekleşir,
- Suda çözünür.

Kaliksarenlerin kolay sentezlenmesi ve halkalı yapıda olmasından dolayı birçok farklı uygulama alanında kullanılmıştır. Kaliksarenler, supramoleküler kimyada önemli bir yeri olan, koni şeklinde bir konformasyonda var olma potansiyelleri ve fenolik-O üzerinden ve fenolik halkaların p-konumundan kolay modifiye olmalarından dolayı, makrosiklik sepet benzeri bileşiklerdir. Özellikle, kaliks[4]aren türevleri iyon ve moleküler taşıma, konuk-konak kimyası, kataliz, iyon ve molekül seçici olmaları, kontrollü ilaç salınımı alanlarında başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Joseph ve Rao, 2011).

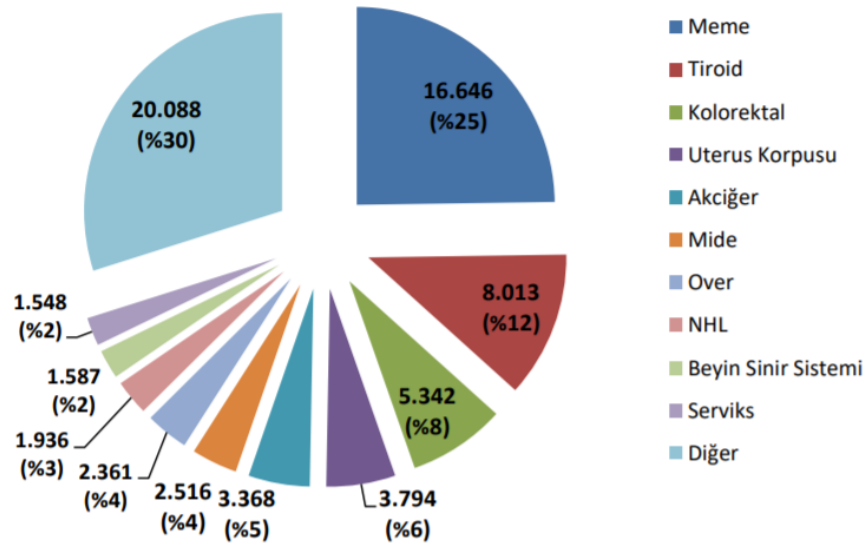
1.3.Kanser

Kanser hücre döngüsünde meydana gelen çeşitli bozulmalar sonunda hücrelerin kontrollü olarak gerçekleştirdiği hücre büyümesi, gelişmesi, çoğalması ve ölümün de olduğu bu döngünün bozulması sonucunda hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasıdır. Sağlıklı hücrelerin tümör hücrelerine dönüşmesi sürecine karsinogenez denir. Kontrolsüz bir şekilde çoğalan hücrelerin büyüyerek oluşturdukları kitleye ise tümör adı verilmektedir (Palacios ve ark., 2007). Kontrollü olarak çoğalan hücrelerde bu mekanizma onkogenler yani tümör oluşmasına neden olan genler ve tümör baskılayıcı genler olan suprasörler arasında olan dengeye bağlıdır. Meydana gelen denge onkogenler lehine bozulduğu zaman kanser oluşumuna neden olmaktadır (Testa ve ark., 2003).

Dünya genelinde kanser ölümle sonuçlanan hastalıklar arasında ilk sıradadır. Dünya sağlık örgütü 2015 verilerine göre 8,8 milyon kişi kanserden dolayı ölmüş ve kanserden kaynaklı ölümlerin gelecek 2-3 yıl süresince %70 oranında artacağını söylemiştir.



Şekil 1.25: Erkeklerde en sık görülen kanserlerin toplam sayısı ve yüzde dağılımı



Şekil 1.26: Kadınlarda en sık görülen kanserlerin toplamı ve yüzde dağılımı

1.3.1. Kanser Oluşumu ve Gelişimi

Her ne kadar bireylerin genetik özellikleri kansere yakalanma riskini artırsa da kanserlerin %80 gibi büyük bir oranı çevresel ve dış etkenlerden kaynaklanmaktadır. Dolayısı ile kanser bu etkenlerin bertaraf edilmesi sonucunda hem engellenebilir hem de bu maddeleri nötralize ya da elemine edecek başka bileşikler sayesinde tedavi edilebilir. Kalıtsal olarak oluşan kanserlerin, çevresel faktörlerden oluşan kanserlere oranla meydana gelme olasılığı daha azdır. Ultraviyole, morötesi, x-ışınları gibi fiziksel faktörler ve polisiklik, aromatik hidrokarbonlar gibi kimyasal faktörlerin yanı sıra virüsler de biyolojik olarak sağlıklı hücrelere zarar vererek hücrede değişikliğe neden olur ve kanser oluşabilir (Ward ve ark., 2004; Yang ve ark., 2004).

Kanser tedavisinde en önemli etken iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) tümörlerin farkındalığına varılabilmesidir. Benign tümörler bulundukları yerdeki çevre dokulara ya da vücudun başka bölgelerine yayılmaz ve sadece olduğu bölgede sınırlı olduğu için bu tümörlere benign tümörler denir. Çevresindeki normal dokuyu istila eden ve dolaşım veya lenfatik sistemler aracılığı ile yayılan tümörler ise malign tümörlerdir. Kanser hücresinin lenf ya da kan yoluyla vücudun diğer bölgelerine giderek gittikleri yerde anormal şekilde çoğalarak kanserin bu şekilde yayılmasına metastaz denilmektedir. Malign tümörler kanser olarak tanımlanmaktadır. Malign tümörler metastaz yapabilen

tümörlerdir (Sugarbaker ve Kemeny, 1989; Wands ve Blum, 1991; Cabibbo ve Craxi, 2009).

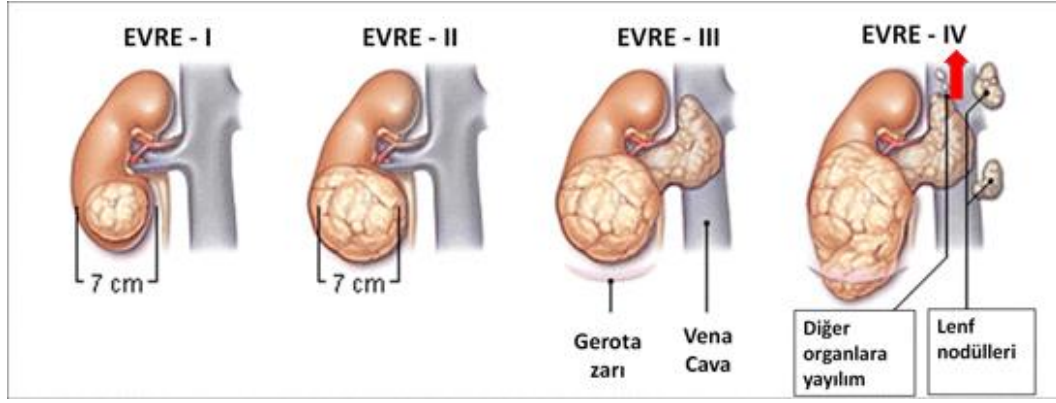
Kimyasal karsinogenler maruz kaldığı ciltlerde ve emildiği bağırsakta veya metabolizmanın fonksiyonuna göre kolon, karaciğeri böbrek gibi organlar gibi herhangi bir bölgede tümör oluşabilir. Ancak karsinogene maruz kalmak kanser oluşumuna tek başına sebep olmaz. Uygun koşullar sağlandığı takdirde karsinogenler kanser oluşumuna neden olabilir. Bu kimyasal karsinogenlere örnek aşağıda verilmiştir (Yang ve ark., 2004).

- Hidrokarbonlar, baca temizleyicileri, boya endüstrisinde kullanılan kimyasallar,
- Nikel(II), krom (VI) bileşikleri,
- Sigara dumanı ve katranındaki kimyasallar,
- Bazı hazır yiyeceklerinde bulunan katkı maddeleri,
- Piyasada bulunan çoğu ilaçta bulunan kimyasallar.

1.3.2. Prostat Kanseri

Prostatın tanımı ilk olarak Niccolo Massa tarafından 1536 yılında yapılmış ve anatomist Andreas Vesalius tarafından ilk kez 1538 yılında anatomisi resmedilmiştir (Hellerstedt ve Pienta, 2002).

Prostat kanseri ilk olarak 1817 yılında George Langstaff tarafından tıp literatürüne kazandırılmıştır (Chin ve Reiter, 2004). Hücre ölümü ve prostat bezindeki hücre proliferasyonu arasında olan dengenin bozulmasıyla, organ hacminin kötü huylu tümör şeklinde büyümesi sonucunda prostat kanseri meydana gelmektedir (Kumagai ve ark., 2007; Siegel ve ark., 2014). Endüstrileşmiş ülkelerde önemli bir sağlık problemi haline gelen prostat kanseri erkeklerde, akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alan ve en fazla kansere bağlı ölüm sebebidir (Szliszka ve ark., 2013).



Şekil 1.27: Prostat kanserinin oluşum evreleri
<https://www.prostathastaligi.gen.tr/prostat-kanseri-evreleri.html>

Prostat kanserine neden olan etmenler arasında; yaş, ırk, hormonal faktörler, diyetel faktörler, sigara ve alkol kullanımı gibi faktörler prostat kanserini tetiklemektedir.

Prostat kanseri evreleri;

Evre I: Kanser hücreleri prostatın az bir bölümüne yayılmış ve prostat beziyle sınırlıdır.

Evre II: Birinci evrenden biraz daha ilerlemiş durumdadır ama bu evrede de kanserli hücreler prostat bezi ile sınırlı haldedir.

Evre III: Evre I ve II ye göre daha ilerlemiş haldedir. Kanser hücreleri prostatı çevreleyen kapsüllere yayılmıştır. Sperma kesesini de kapsayabilir.

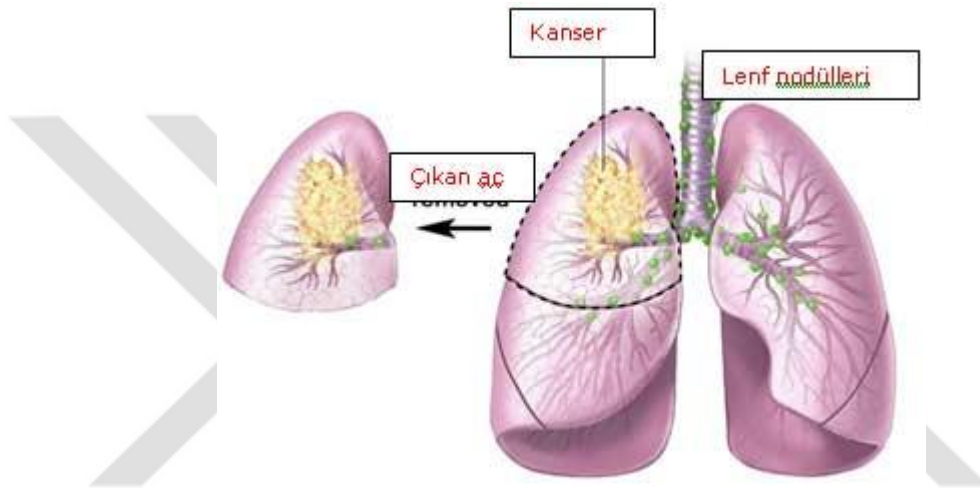
Evre IV: Kanser hücreleri lenf bezlerine, organlara ve sperma kesesinin dışında kalan kısımlara da yayılmış durumdadır. Bu evre bu hastalıkta son evredir.

1.3.3. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana grubu ayrılmaktadır.

Akciğer kanseri erkeklerde birinci, kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci sırada yer alan ve ölümle sonuçlanan kanser türüdür ve bu oran her geçen yıl artmaktadır (Alberg ve Samet, 2003). Erkeklerde görülme oranı kadınlarda görülme oranına göre daha yüksektir ve sigara içen kadınlarda da akciğer kanseri artmaktadır. Akciğer kanserine yakalanma oranı arasındaki farkın kadın ve erkeklerde sigara içme alışkanlığından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu kanser türüne yakalanmanın en büyük faktörü sigara veya sigara dumanında bulunan kimyasal karsinojenler olma olasılığı çok

yüksektir (Pauk ve ark., 2005). Kimyasal karsinojenlerin DNA üzerinde meydana getirdiği hasarlardan ötürü ve oksidatif hasarın birikimine yol açarak mutasyonların oluşmasına neden olur (Lubin ve Boice, 1997). Bunun sonucunda hücrelerin neoplastik sürece girmesine neden olur. Sigaranın tümör baskılayıcı gen olan p53 gen mutasyonlarına sebep olarak kanser oluşumuna katkı sağladığı düşünülmektedir (Denissenko ve ark., 1996). Bu kanser türünün oluşmasına sigaradan başka, radon gazı, beslenme alışkanlıkları, çevre kirliliği ve genetik faktörlerde neden olmaktadır (Ruano-Ravina ve ark., 2003).



Şekil 1.28: Akciğer kanseri (2018)

<http://www.astimalerji.com/akciger-kanserinde-tedavi/>

Akciğer kanseri evreleri;

Evre I: Kanser hücreleri akciğerin küçük bir kısmında görülür.

Evre II: Bu evrede kanser hücreleri lenf bezlerine sıçramış durumda olur.

Evre III: Kanser hücreleri akciğer zarı ya da iki akciğer arasında bulunan mediasten denilen boşluğa ve buradaki bezlere yayılmış durumdadır.

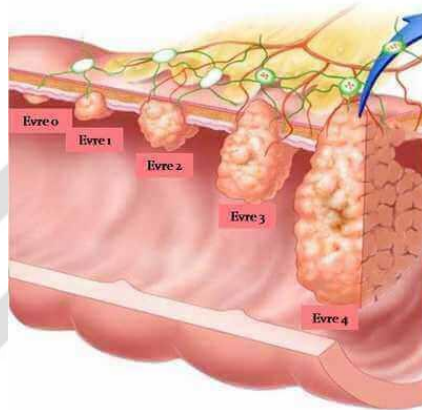
Evre IV: Kanser hücreleri akciğer bölgesinden uzak organlara böbrek üstü bezi, kemik gibi yayılmış durumdadır.

1.3.4. Kolon Kanseri

Kolon kanseri (kolorektal) gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde üçüncü sırada görülür ve bu kanser türü tüm kanser türlerinin yaklaşık %10 unu oluşturur (Lee ve ark., 2006). Kolon kanseri için her yıl yaklaşık olarak vaka sayısı 150.000'dir. Yaşam boyunca kolon kanseri gelişme riski hemen hemen %6'dır. Bu oran kadınlara göre erkeklerde daha

yüksektir. Bu kanserin gelişimi 40 yaşından sonra kadın ve erkek için yükseliş göstermektedir.

Kolon kanseri 1990 yılından bu yana gelişmekte olan ülkelerde 472.000 ölümden sorumludur ve dördüncü en sık görülen kanser türüdür. Kolon kanseri görülmesi geniş bir coğrafya ya sahiptir. Çoğunlukla Batı Avrupa Kuzey Amerika, Yeni Zelanda, Avustralya gibi ülkelerde görülür. Kolon kanseri, batılılaşma ve gelişmişlikle giderek artmaktadır. Kolon kanserinin oluşumunda genetik faktörler, ırk, diyetle ilgili faktörler, adenomlar, obezite, sigara kullanımı, radyasyon gibi faktörler etkili olmaktadır.



Şekil 1.29: Kolon kanseri evreleri (2014)

<https://www.hayatisaglik.com/hastaliklar/kolon-kanserinde-evrelendirme.html>

Kolon kanseri evreleri;

Evre I: Bu evrede kanser hücreleri kalın bağırsağın iç yüzeyinde bulunur

Evre II: Bu evrede iki grup oluşmaktadır. Birincisi kanser hücreleri lenf düğümlerine yayılmamış fakat bağırsağın dış yüzeyindedir. İkincisi bağırsağın dış yüzeyine yayılmış ve yakındaki organlara geçmiş fakat vücudun diğer organlarına sıçramamıştır.

Evre III: Evre II de gerçekleşen durumların hepsi bu evrede görülebilir. Fakat bu evrede kanser hücreleri bir boyut kazanmış ve vücudun diğer organlarına yayılmış olabilir.

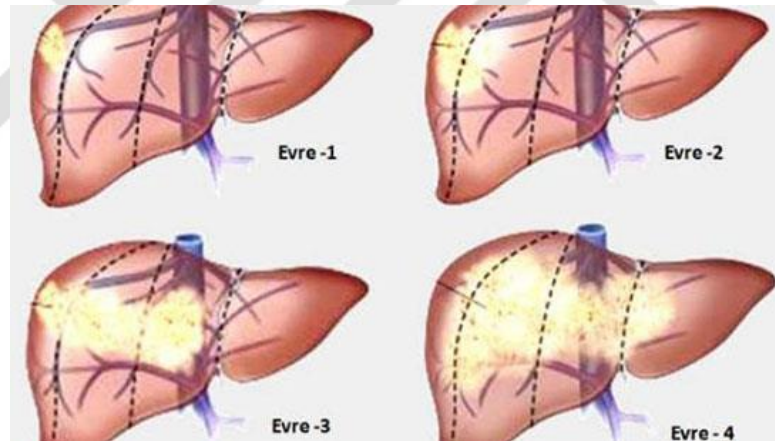
Evre IV: Bu evre diğer evreleri kapsamaktadır ve kanser hücreleri akciğer, karaciğer, lenf düğümleri gibi uzak organlara yayılmış durumdadır.

1.3.5. Karaciğer Kanseri

Karaciğer hepatosit, safra, epitelyum, vasküler, stellat hücreleri, kupffer hücreleri, endotel gibi farklı hücre gruplarından meydana gelmektedir. Bu hücre gruplarının herhangi birinde iyi ya da kötü huylu tümör oluşabilmektedir (Jemal ve ark., 2011).

Dünya’da, karaciğer kanseri en sık görülen kanserler arasında ikinci sıradadır. Karaciğer kanseri yüksek ölüme sahiptir ve kanserden dolayı ölümlerde üçüncü sırada gelmektedir (Lewandowski ve ark., 2014). Bu kanser oluştuğu zamandan itibaren karaciğer metastazı yapmaktadır. Türkiye’de Sağlık Bakanlığı 2007-2008 verilerine göre on iki ilden alınmış kanser kayıtlarında karaciğer kanseri görülme oranı diğer kanser türleri içinden %7,8 kadınlarda üçüncü, %7,5 erkeklerde dördüncü sırada yer almaktadır.

Karaciğer kanserinin oluşum nedenleri arasında, yaş, sigara, alkol, genetik faktörler, bağırsak hastalıkları, çevresel etmenler gibi faktörler sayılabilir. (Seo ve ark., 2013).



Şekil 1.30: Karaciğer kanseri evreleri

<https://www.karaciger.gen.tr/karaciger-kanseri-evreleri.html>

Karaciğer kanseri evreleri;

Evre I: Kanser hücreleri küçüktür. Yakında ve uzakta bulunan organlara sıçramamış durumdadır.

Evre II: Kanser hücreleri bu evrede lenf bezlerine ve diğer yerlere yayılmamış durumdadır. Karaciğer de kanserli hücrelerin sayısı artış göstermektedir.

Evre III: Evre I ve II de gerçekleşen olaylar bu evrede de gerçekleşir. Fakat bu evrede kanser hücreleri damarlara yayılmış ve karaciğerin üst dokusuna ve yakın bölgelere yayılmış durumdadır.

Evre IV: Bu aşamada kanserli hücreler yakın ve uzak dokulara yayılma göstermektedir.

1.4.Alkali Comet Testi

Son zamanlara gelişmekte olan “Tek Hücre Jel Elektroforezi” (SCGE) metodu DNA sarmalındaki kırıkların tespiti için kullanılan bir tekniktir. SCGE metodu “Comet Assay” veya “Mikrojel Elektroforetik Teknik” olarak da bilinmektedir (Fairbairn ve ark., 1995).

Hücrelerde bulunan DNA sarmalı kırıklarının tespit edilebilmesi Rydenberg ve Johanson tarafından yapılmıştır. Lam üzerindeki agara gömülü halde duran hücreler lizis edilerek hücreleri proteinlerden ayırmışlar ve nötralize ederek akrilin oranj ile boyama işlemi yapmışlardır. Bunun sonucunda da kırmızı flöresans yeşilin oranını hesaplamayı başarmışlardır. Tek sarmalı kırmızı, çift sarmalı yeşil flöresans gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Ancak yapılan bu teknik diğer bilim insanları tarafından fazla kullanılmamıştır (Fairbairn ve ark., 1995).

1984 yıllarında Ostling ve Johanson nörtal metodu modifiye ederek hücredeki DNA hasarının direk olarak gösterilmesinde “Mikrojel Elektroforetik Teknik” yöntemini sunmuşlardır. Ostling ve Johanson radyasyona maruz kalmış hücreleri agarozda süspanse ettikten sonra lam üzerine yaymıştır. Tuz ve deterjan ile birlikte lizis işlemi yapılmış ve elektroforez yapıldıktan sonra akridin oranj ile boyamışlar. Bunun sonucunda eğer DNA da hasar meydana gelmiş ise, DNA fragmanları ile elektrik yük kazanarak çekirdekten anot yönünde hareket ederek kuyruklu yıldız görüntüsü oluşması sonucunda bu hasar görmüş hücrelere COMET denilmektedir.

1.5.Apoptoz

Vücudumuzda bulunan hücreler bir süre yaşar ve her hücre zamanı gelince ölür. Hücrenin çoğalması ve ölümü arasında bir denge vardır. Bir hücre ölüm tipi olan apoptoz yunanca ağaçtan düşen yaprak ya da çiçekten ayrılan petal anlamına gelmektedir. Apo kelimesi ayrı, ptosis kelimesi düşmek anlamına gelmektedir. Apoptoz 1972 yılında ilk kez Avustralyalı bir patalog olan J.F.K. Kerr tarafından tanımlanmıştır (Fadeel ve Orrenius, 2005). Bu konu ile ilgili çalışmalarda genel olarak Caenorhabditis elegans nematodu kullanılmıştır. Basit yapıda ve birçok hücreli olan nematod ile çalışan, Sydney

Brenner, Robert Horvitz ve John E. Sulston isimli bilim insanları “programlanmış hücre ölümü ve organ gelişiminin genetik olarak düzenlenmesi” üzerine 2002 yılında Nobel ödülü kazanmışlardır.

Ced-3, ced-4 ve ced-9 genleri nematodlarda apoptozu kontrol eden genlerdir. Mutasyon sonucu inaktif olmuş ced-3 ve ced-4 genleri bulunduran nematodlarda apoptozun oluşmadığı ve normalde ölmesi gereken hücrelerin yaşadığı görülmüştür. Bu sebeple ced-3 ve ced-4 genlerinin ölüm genleri olduğu ve apoptozu indükledikleri aynı zamanda ced-4 geninin ise ölüme karşı koruyan bir gen olup apoptozu inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Bu genlerin insan genomundaki karşılıkları ced-3 için kaspazlar, ced-4 için Apaf-1 ve ced-9 için Bcl-2 olduğu belirtilmiştir (Hengartner ve ark., 1992; Renahan ve ark., 2001). Apoptoz mitoz gibi normal bir gelişim için gereklidir ve organizmanın tamamına karşı tehdit oluşturacak hücreleri yıkmak için gerekli olan bir mekanizmadır.

1.5.1. Nekroz

Rastgele gelişen ve genler tarafından kontrol altına alınamayan dokularda ve dokuları oluşturan hücrelerde meydana gelen, "istenmeyen" hücre ölümüdür. Siyanid, arsenik gibi toksik kimyasallar ve ağır metaller nekroza neden olmaktadır. Bu süreçte mitokondriyal ROS üretimi artar, apoptik olmayan proteazlar aktive olur, ATP üretimi azalır ve Ca^{+2} yolları açılır.

Nekroz tipleri;

- Koagülasyon nekrozu; en sık görülen nekroz türüdür ve her tür iskemik olayda gözlenir. Sitoplazma proteinleri koagülasyona uğrar ve çekirdek kaybolur. Beyin hariç diğer tüm dokularda hipoksik ölümün karakteristiğidir.
- Likefasyon nekrozu (kolliküasyon nekrozu, erime nekrozu); dokuların enzimatik sindirimi ile gerçekleşmektedir ve daha çok beyin dokusunda ve apselerde gözlenir.
- Kazeöz nekroz; tüberküloz hastalığında ortaya çıkmaktadır ve granülomların merkezinde eozinofilik heterojen hücre kitleleri birikir.
- Yağ nekrozu; makrofajlarda lipaz enzimi ve hasarlı pankreas hücreleri ile ortaya çıkan yağ asitlerinin kalsiyumla birleşmesi sonucu oluşan beyaz tebeşirimsi bölgelerle karakterizedir.

- Kanfrenöz nekroz; derin ve büyük yaralanmalarda dokuya implante olan bakterilerin etkisi sonucu oluşmaktadır.
- Fibrinoid nekroz; damarlarda ve bağ dokularında gözlenmektedir. Damar duvarındaki fibrin benzeri protein materyal birikimi izlenir.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kaliksarenlerin Biyokimyasal Araştırmalarda Kullanımları

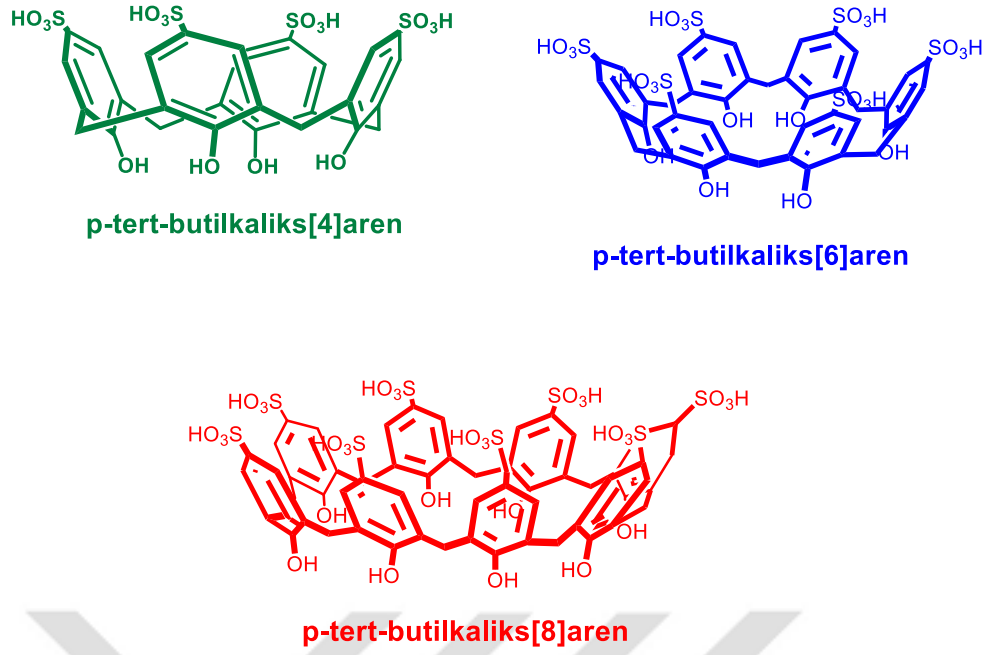
Cornforth ve ark. 1955 yılında kaliks[n]arenlerin ilk olarak doğrudan biyolojik aktivitesi olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında fenolik-O konumuna polioksietilen grupları ile fonksiyonlandırıdıkları *p*-oktilkaliks[8]areni bir anti-tüberküloz ajanı olarak aktif olduklarını göstermişlerdir. Bu mekanizma tüberküloza karşı şunda kullanılan diğer ilaçlardan farklı olduğu ve konvansiyonel kemoterapötik ajanlara karşı direnci arttırdığından bu bileşiklerin umut verici olduğunu göstermişlerdir. 40 yıl kadar uzun bir süre boyunca Hwang ve arkadaşlarının (1995) bazı kaliksaren türevlerinin anti-viral aktivitesi ile ilgili patent alana kadar kaliksarenlerin biyolojik aktiviteleri üzerinde çalışma yapılmamıştır (Perret ve Coleman, 2011).

2.1.1. Antiviral Aktivite

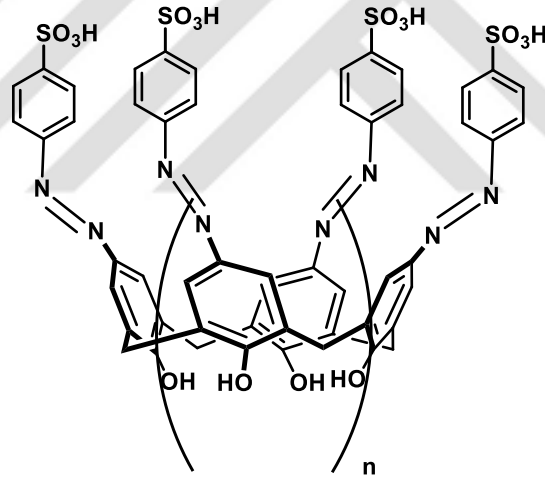
Hwang ve ark. (1995) HIV ve Herpes gibi viral hastalıkların tedavisinde p-sülfokaliks[n]arenlerin kullanılabileceğini gözlemlemişlerdir. Hwang ve ark, bir zarf virüslü hücre enfeksiyonunu inhibe etmek için o bölgeye terminal uçlarda karboksilat, fosfat, sülfat ester ve amid içeren polar gruplara sahip kaliksaren türevli bileşiklerin terapötik olarak etki edecek miktarda uygulanması üzerine bir yöntem geliştirmiş ve patent almışlardır. Burada mekanizma, moleküllerin elektrostatik etkileşimleri sonucunda zarf virüsü ile etkileşerek o bölgedeki hücreleri tanıyarak onları yok etmesi şeklinde olduğu yorumlanmıştır (Perret ve Coleman, 2011)

2.1.2. Antifungal Aktivite

Lamartine ve ark. (2002) tarafından p-sülfokaliks[n]arenler (Şekil 2.1) ve fenil diazo türevinin (Şekil 2.2), *Fartarium solani* mantarı gibi patojen olan mantarlara karşı değerlendirilmiştir ve yaklaşık olarak % 60-70 inhibisyon aralığına sahiptir. Bu bileşikler tamamen *Corynebacterium dematium* türü mantarların büyümesini de inhibe ettiği bulunmuş ve bu nedenle mantarlarla ilgili bitki hastalıklarının en aza indirgenmesi için ajan olarak kullanılması öngörülmüştür (Perret ve Coleman, 2011).



Şekil 2.1: p-sülfokaliksarenlerin yapısı



Şekil 2.2: Lamartine ve arkadaşları tarafından incelenen anyonik kaliksaren türevi (Lamartine ve ark., 2002)

2.1.3. Antibakteriyal Aktivite

Bazı kaliksaren türevleri *Corynebacterium dematium*'a karşı antibiyotik olarak test edilmiş ve test edilen diğer kaliksaren türevleri arasında p-sülfokaliksarenler ve anyonik kaliksaren türevli bileşikler (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2) en aktif ve etkisi en yüksek olarak bulunmuştur. Temel formda sülfoksit (SO_3H) gruplarına sahip olanlar, antibiyotik aktivitelerde rol oynayabilecekleri varsayılmıştır (Perret ve Coleman, 2011).

2.1.4. Antikarsinojenik Aktiviteleri

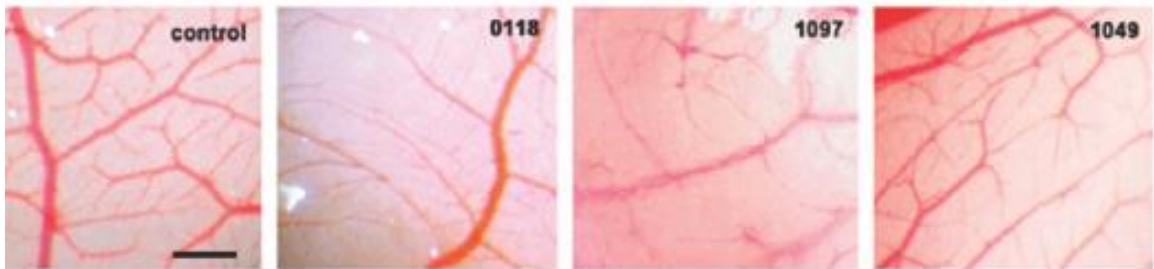
Tümör hücrelerinin hayatta kalması yeterli miktarda besin ve oksijene ve kan damarları yoluyla atığın atılmasına bağlıdır. Bu nedenle, tümör içinde yeni kan damarlarının varlığı büyümeleri için gereklidir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), PDGF reseptörü ile etkileşerek anjiyogenezde önemli bir rol oynar (Zhou ve ark., 2006). Sentezlenen kaliksaren türevleri, reseptörün fosforilasyonunu önleyerek PDGF'nin reseptörle etkileşimini keser, böylece antianjiyojenik ajan olarak işlev görür. Endotelial hücrelerin proliferasyonunda yapılan *in vitro* çalışmalarında, Dings ve ark. (2006) kaliksarenin fenolik-birimlerinin p-konumunda *ter*-bütil, izopentil, izobütil ve propil grupları ile fenolik-O konumunda *tetra*-N,N-dimetilamino etil veya guanidil gruplarına taşıyan kalikserenlerin güçlü anjiyogenez inhibitörle olduğunu anlaşılmıştır (Dings ve ark., 2006). Daha sonra, *in vivo* çalışmalar, bu bileşiklerin polikasyonik-yapıları MA-148 yumurtalık kanseri hücrelerine ve B16 fare melanoma hücrelerine karşı ileri düzeyde bir etkinlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Dings ve ark., 2013).

Kaliksaren bazlı bileşiklerin antikarsinojenik aktivitesi çeşitli araştırma grupları tarafından araştırılmıştır. Baggetto ve ark. çeşitli tümör hücreleri (MU2, MU2F, HT1080, SP6.5, 1PC227, Jurkat, MEWO, H1-60, Huh7, Hep-G2, MEWO, DLM.1) üzerinde kaliksaren türevlerinin etkisini incelemiş ve çalışmış ve bu bileşiklerin aktiviteleri standart antikarsinojenik ilaçlarıyla karşılaştırılmışlar. Bu fonksiyonelleştirilmiş kaliksaren türevlerinin, özellikle lenfoblastik lösemi ve melanoma hücre hatlarında güçlü antikarsinojenikajan olduğunu keşfetmişlerdir (Yousaf ve ark., 2015). Benzer şekilde, Nasuhi Pur ve Dilmaghani (2014), dört platin (II) merkezi ile fonksiyonel hale getirilmiş kaliks[4]aren sentezlemiş ve prospektif bir antikarsinojenik ajanı olduğunu bildirmişlerdir. Kemoterapötik bir ajan olan karboplatin ile karşılaştırıldığında yeni sentezlenen bileşik, küçük hücreli olmayan akciğer kanserine, hepatoselüler kansere ve göğüs kanserine karşı daha iyi aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (Nasuhi Pur ve Akbari Dilmaghani, 2014). Kolorimetrik sitotoksosite testleri kullanılarak, akciğer kanseri hücre hattındaki ortalama inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) 2,6 µM olarak bulundu. Bir başka çalışmada, bir fare melanoma modelinde kalikserenin glikokonjugatlarının *in vivo* etkisinin, 2 hafta içinde tümör büyümesinde önemli bir azalma içerdiği rapor edilmiştir (Hulikova ve ark., 2010).

Bugüne kadar, ABD klinik araştırmalar veritabanı, potansiyel antianjiyojenik ve antineoplastik aktiviteye sahip kaliksaren bazlı bileşik ve galektin-1 inhibitörü olan

OTX008'in sadece bir Faz I çalışmasını göstermektedir. İlaç, ilerlemiş solid tümörleri olan hastalarda çok işlevli bir karbonhidrat bağlanma proteini olan galektin-1'in downregülasyonu yoluyla işlev görür. Çalışma 2012'den beri devam etmekte olup, henüz sonuç bildirilmemiştir.

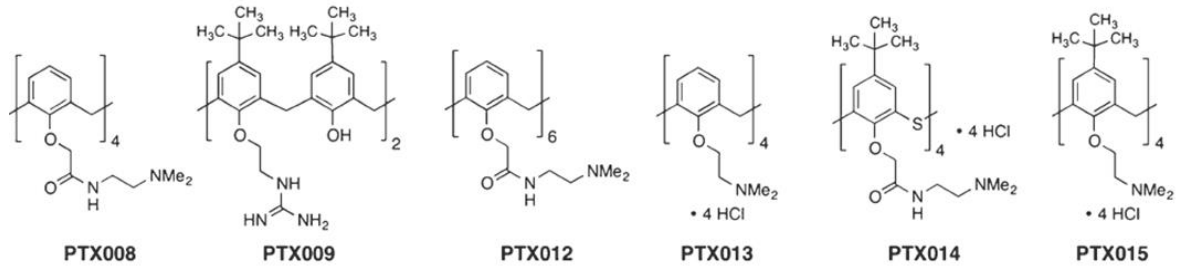
Dings ve ekibinin *in vivo* çalışmasının birinde fare modellerinde kaliks[4]aren türevli maddelerin yeni damar (angiojenezis) oluşumlarını engellediğini ve tümör büyümesini sınırlandırdığı böylelikle büyüme faktörü reseptörlerine bağlanarak insan glikoblastoma kanseri hücrelerinin gelişimini durdurduğunu gözlemlemişlerdir. Buna ilaveten insan damar endotelyal hücrelerinde (HUVEC) de N,N-dimetiletilediamin grupları ile modifiye edilmiş kaliks[4]amit ($IC_{50}=2 \mu M$) ticari olarak satılan angineksle ($IC_{50}=5 \mu M$) oranla 2,5-kat daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma grubu kaliksaren molekülünün hidrofilik ve hidrofobik kısımlarını modifiye ederek anti tümör özelliğe sahip moleküller olarak sentezlemişler ve bu kaliksaren moleküllerinin kanser hücrelerini inhibe ettiklerini göstermişler ve bu çalışmalar patentlenmiştir (Patent NO:US 8,716,343 B2). Özellikle 0118 olarak kodladıkları ve amit grupları ile sübsitüe olmuş kaliks[4]aren molekülünün tümörlü hücre üzerindeki kan damarlarının oluşumunu engellediğini ve tümörün yayılmasını inhibe ettiğini söylemişlerdir. Yaptıkları bu çalışma da damar oluşumunu engelleyen kontrol ve karşılaştırma yapısı olarak peptit ve protein yapılarından oluşmuş olan angineks molekülü kullanılmış ve bu yapı ile hem hidrofobik hem de hidrofilik bölgeler açısından mimik olarak benzerlik sergileyen kaliksaren iskeletini modifiye etmişlerdir.



Şekil 2.3: N,N-dimetilaminoetil grupları ile sübsitüe olmuş kaliks[4]aren molekülünün tümörlü hücre üzerindeki etkileri

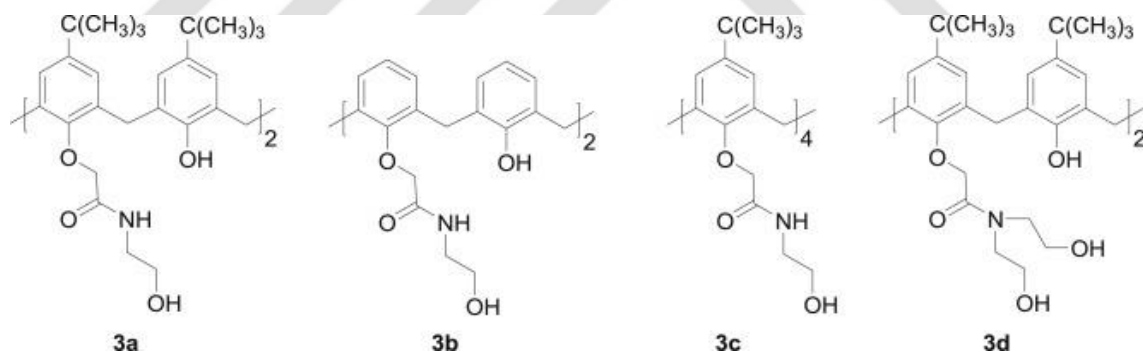
Ding ve ekibinin yaptığı başka bir çalışmada kanserli ve tümörlü hücrelere karşı sitotoksik etki gösteren polikatyonik bir kaliksaren türevi sentezlemişlerdir. Bu çalışmada kaliksaren bileşiğinin hidrofobik ve hidrofilik kısımlarını türevlendirerek anti-tümör özelliğe sahip kaliksaren bileşiği sentezlemişlerdir. PTX0013 olarak adlandırdıkları ve

tetra amin grupları ile süstitüe olmuş kaliks[4]aren bileşiğinin ilaçlara karşı dirençli olan kanserli hücrelerin büyümesini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir.



Şekil 2.4: Amin grupları ile süstitüe olmuş kaliks[4]aren bileşiği

An ve ark (2016) tarafından kaliks[4]aren polihidroksamin türevli bileşikler sentezlemiş ve çeşitli kanser hücrelerinde (A549, SKOV3, SE1990, HELA, RAJİ ve MDA-MB231) sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Bunun sonucunda **3a-3d** maddelerinin kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir (Tablo 2.1) (An ve ark., 2016).



Şekil 2.5: Kaliks[4]aren polihidroksamin türevlerinin yapısı **3a-3d** (An ve ark., 2016)

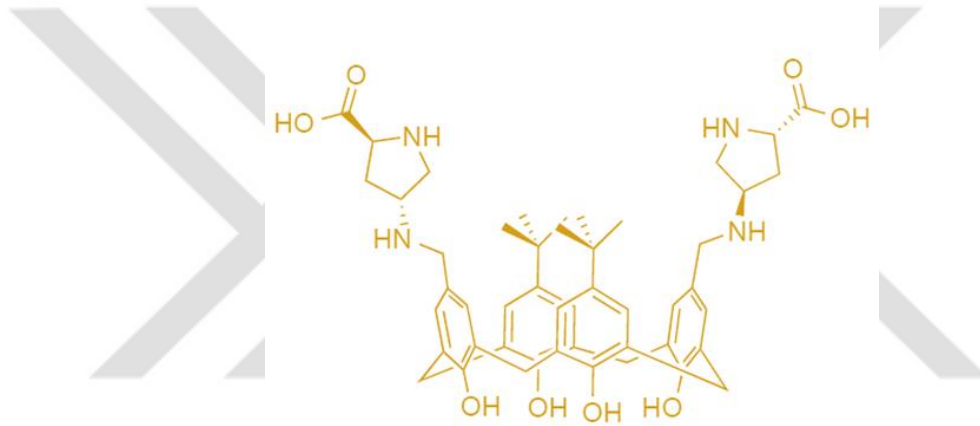
Tablo 2.1: Kanser hücrelerinde 3a-3d maddelerinin IC₅₀ Değerleri

HÜCRE	3a	3b	3c	3d
A549	4,0	-	3,7	-
SKOV3	2,8	2,3	5,1	-
SW1990	4,3	-	3,3	11,3
HELA	2,7	-	7,1	8,1

RAJİ	5,0	-	4,7	11,2
MDA-MB231	5,3	1,6	3,4	5,2

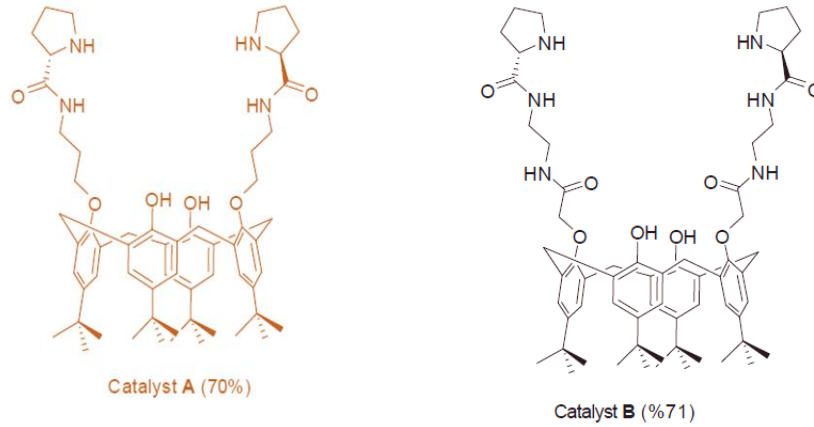
2.2. Kaliksaren-Prolin Türevleri ile Yapılan Çalışmalar

Yılmaz ve grubunun yapmış olduğu çalışmada kaliks[4]arenin para pozisyonundan L-prolin grubu bağlayarak sulu ortamda asimetric kiral aldol reaksiyonunun enantiyoseçiciliği organokatalizör olarak incelenmiş ve yüksek verimle reaksiyon ürünü elde etmişler ve % 95 diastereo, % 80 enantiyoseçicilik gözlemlemişlerdir (Uyanik ve ark., 2014).



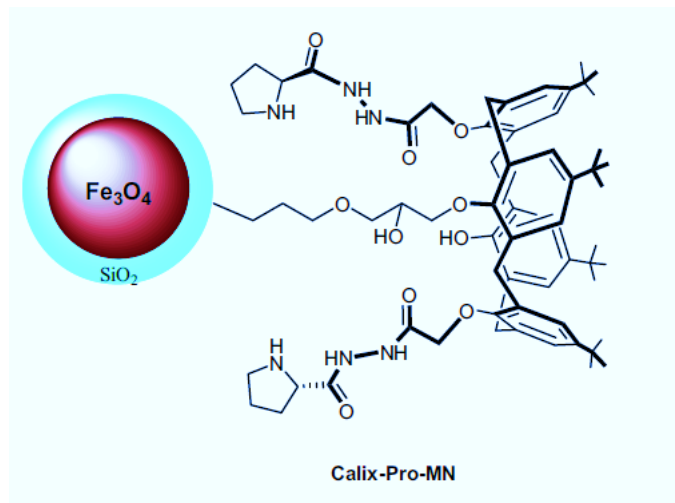
Şekil 2.6: L-prolin ile para pozisyonundan fonksiyonlandırılmış kaliksaren

Yılmaz ve grubu kaliks[4]arenin fenolik-O pozisyonundan L-prolin grubu ile birleştirerek yeni bir organokatalizör sınıfı oluşturacaklarını düşünmüşler ve bu tür bileşiklerin hidrofobik boşlukların sudaki aldol reaksiyonunu kolaylaştıracağını öngörmüşlerdir. Kaliks[4]arenin hidrofobik etkisi reaksiyonun dönüşüm ve stereo seçicilik üzerindeki rolünü ele almışlardır. Yani L-prolinden türetilen iki yeni *p-ter*-bütikaliks[4]aren bazlı kiral organokatalizör sentezlemişlerdir. Sentezlenen A ve B bileşiklerinin sulu ortamda doğrudan enantiyoseçici aldol reaksiyonlarını kataliz edebildiğini gözlemlemişlerdir. (Eymur ve ark., 2014).



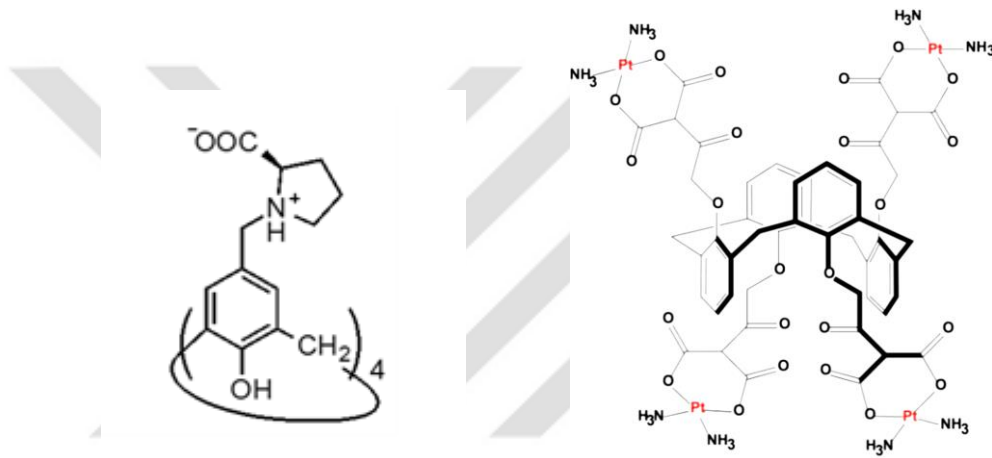
Şekil 2.7: L-prolin türevli kaliks[4]aren bileşiği (Uyanık ve ark., 2014)

Başka bir çalışmada Yılmaz ve ekibi, L-prolin türevli kaliks[4]aren bileşiğini Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllere immobilize edildikten sonra bir heterojen katalizör olarak direkt aldol tepkimelerinde kullanmışlardır. Manyetik nanopartiküllere immobilize edilen bu kiral kaliks[4]aren-prolin bileşiği suda gerçekleşen aldol reaksiyonunda yüksek verim, diastereoseçicilik ve enantiyoseçicilik göstermiştir. Kiral kaliksarenlerin manyetik nanopartiküllere immobilize edilmesi ile elde edilen bu katalizör dış manyetik alan kullanılarak üründen kolaylıkla ayrılabilmekte ve aktivite kaybına uğramadan tekrar kullanılabilir duruma geldiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar endüstriyel açıdan katalizörü oldukça önemli kıldığı bulunmuştur (Akceylan ve ark., 2015).



Şekil 2.8: L-prolin türevli kaliks[4]aren ile manyetik Fe_3O_4 'ün kompleksleşme reaksiyonu

Başka bir çalışmada ise t ropotik olarak kullanılan cisplatinlerin birçok yan etkilerinin olmasından dolayı bunlara alternatif olarak kaliks[4]aren-cisplatin türevleri kullanılmaya başlanmıştır. Kaliks[4]aren-cisplatin türevleri insan kanseri hücrelerine; MCF-7 (meme kanseri), HEPG2 (karaciğer kanseri) ve A549 (akciğer kanseri), karşı kullanıldığında cisplatine oranla çok daha etkili oldukları bulunmuştur (IC₅₀ değerleri sırasıyla; 5,7  M, 4,9  M ve 2,6  M olarak bulunmuştur). Sitotoksik etkilerinin yanı sıra kaliks[4]aren-cisplatin kanser hücrelerinden C6 glioma hücrelerinin metastazını da inhibe etmekte böylelikle tümör yayılımını engellemektedirler (Oh ve ark., 2005; Beshara ve ark., 2010).



şekil 2.9: D-Prolin ve Kaliks[4]aren-cisplatin molekül şekli

Son yıllarda yapılan bir çalışmada fenolik birimlerin *p*-konumu D-prolin grubu ile modifiye edilmiş kaliks[4]aren türevinin insan papilloma virüsüne (HPV)karşı etkili olduğu görülmüştür. HPV enfeksiyonu her yaşta görülebilmektedir ve mukozal bölgelerde kansere neden olabilmektedir. Özellikle serviks kanser vakalarının tümünde (% 99,7) HPV markerları gözlenmiştir.

Bu çalışmada, yukarıda anlatılan literatürler doğrultusunda sekonder bir amin ve aynı zamanda önemli bir aminoasit olan prolin molekülü uygun şekilde kaliksarenlere modifiye edilerek hücre içi sitotoksik etkileri, hücre ölüm mekanizması, DNA etkileşimi araştırılması amaçlanmıştır. Bunun için kaliks[4]aren hem fenolik-O konumundan hem de fenolik birimlerin *p*-konumundan L-prolin ile fonksiyonlandırılıp karakterize edildikten sonra çeşitli insan kanser hücrelerinde sitotoksik etkileri, DNA etkileşimi ve hücre ölüm mekanizması incelendi.

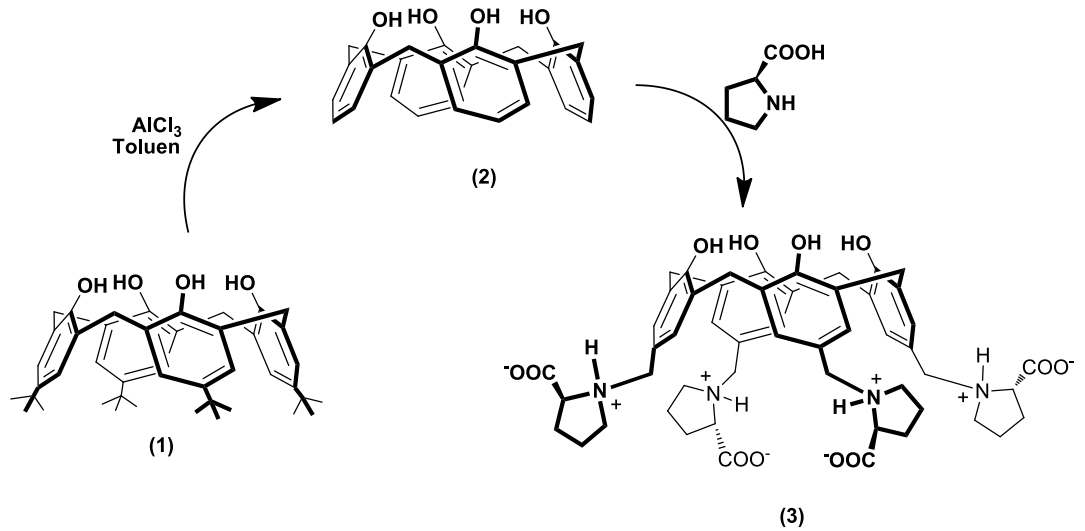
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Enstrümental Teknikler

SRS markalı cihazla erime noktası tayini yapıldı. Varian 400 MHz spektrometresi ile APT, ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, COSY spektrumları CDCl_3 içinde alındı. Kimyasal kayma değerleri NMR spektrumda ppm cinsinde belirtildi. ATR problu Perkin Elmer 1605 FT-IR spektrometresinden IR spektrumları alındı. Perkin Elmer LS55 spektrometresiyle floresans spektrumları, Shimadzu160A UV-visible ölçümleri alındı. Deneylerde kullanılmış olan kimyasal maddeler analitik saflıktadır ve Merck, Fluka, Aldrich ve Sigma firmalarından temin edilmiştir. Analitik TLC'ler silika jel tabakasıyla kaplanmış alüminyum plakalar kullanıldı. Silika jel 60 kolon kromatografisi çalışmalarında kullanıldı. Deneyde kullanılan saf su Millipore Milli-Q Plus cihazı ile saflaştırılıp kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak olan cihazlar: Laminar akımlı kabin Santrifüj (Antech) de hücre kültürü çalışmaları yapıldı. pH metre (Thermo Orion 420A+ marka cam elektrot) deney de kullanılacak çözeltilerin pH ayarında kullanıldı. Hücre canlılık testi için Spektrofotometre (Thermo multiscan-90) kullanıldı. Hücre ve doku kültürlerinin yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için CO_2 inkübatörü (Binder) kullanıldı. Deneyde kullanılacak malzemelerin sterilizasyon işlemleri için Otoklav (Nüve) kullanıldı. Canlı hücre gözlemi için Inverted Mikroskop (VWR) kullanıldı. Donmuş olan hücrelerin açılmasında, 37°C 'de besiyer ve diğer sıvılar için su banyosu (Nüve bath) kullanıldı.

3.2. Kimyasal Sentezler ve Karakterizasyon

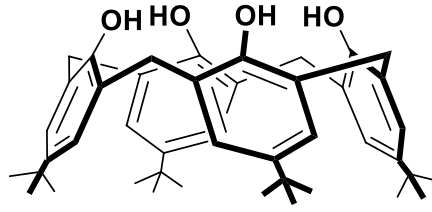
Bu çalışmada sentezlenen bileşiklerin bir kısmı literatür çalışmalarına göre bir kısmı da daha önceki metodların modifiye edilmesi sonucu sentezlenmiştir. Bunun sonucunda toplam 8 bileşik sentezlenmiştir.



Şekil 3.1: 3 nolu kaliks[4]aren türevinin sentez şeması

3.2.1. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren (1)

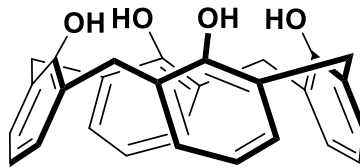
1L lik balona 100 g (0,665 mol) *p*-ter-bütilfenol, %37 lik formaldehitten 62,3 mL (0,83 mol) ve 1,2 g (0,03 mol) NaOH tartıldı. Oluşan reaksiyon karışımı yağ banyosunda 110-120 °C da sabit tutularak ksilol cihazı takılı geri soğutucu da N₂ gazı altında 1,5-2 saat ısıtıldı. Bu sırada reaksiyon karışımı viskoz bir haldeyken turuncu renge ardından katı sarı kütleye dönüşür. Katı sarı kütleye dönüştükten sonra oda sıcaklığında soğutuldu. 800-1000 mL difenil eter ile süspanse edildi ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Bir ksilol cihazı ve azot girişi takılır ve balon ısıtılarak suyun ortamdan çıkışı ve reaksiyon karışımının berraklaşması beklendi. Suyun ortamdan uzaklaşması bittikten sonra karışıma bir geri soğutucu takıldı ve 1,5-2 saat kaynatıldı. Sonra reaksiyon karışımı oda sıcaklığında soğutulmaya bırakıldı. Soğuma işleminin ardından 1L etil asetat ilave edilerek 1 saat karıştırıldı ve çökmenin tamamlanması beklendi. Meydana gelen beyaz çökelek şeklindeki sıvı süzüldü ve iki kere 100 mL etil asetat ile, bir kere 200 mL asetik asit ve son olarak su ile yıkandı. Elde edilen madde kurumaya bırakıldı. Kurutulan 66,5g (% 62) ham ürün toluen ile tekrar kristallendirildi ve 61,6 g parlak ve beyaz kristal formda E.N: 344 °C olan bir bileşik elde edilir. ¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ (ppm): 1.20 (s, 36H, But), 3.45 (d, 4H, ArCH₂Ar), 4.25 (d, 4H, ArCH₂Ar), 7.05 (s, 8H, ArH), 10.35 (s, 4H, OH).



(1)

3.2.2. 5,11,17,23-(Tetra-ter-bütil)-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren'nin dealkilasyonu (Gutsche ve Iqbal, 1990)

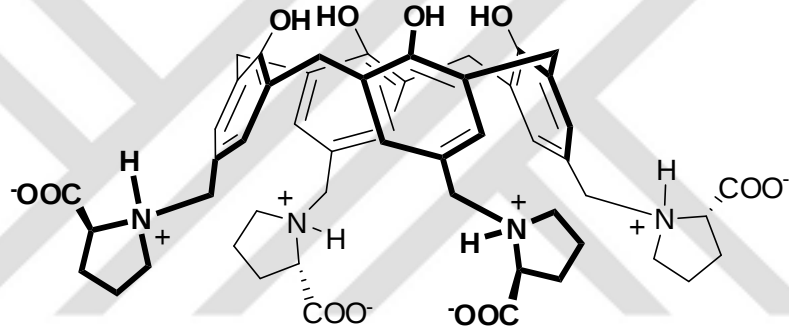
p-ter-Bütilkaliks[4]arenden 52.4 g (70,71 mmol) alınarak 675 mL kuru tolüen ile çözülür ve üzerine 32 g (340 mmol) fenol ilave edilerek çözöldü. AlCl₃ üç adıma bölünerek 76 g (570 mmol) 10 dk ara ile ilave edildi. En son eklenen AlCl₃ den sonra 4 saat boyunca N₂ atmosferinde oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu banyosunda bulunan balona 0.2 N HCl eklendi. Sulu ve organik faz ayrılır ve nötralleştirildi. Alınan organik faz MgSO₄ ile kurumaya bırakıldı. Meydana gelen sarı çözelti distillendi ve 500 mL metanol (CH₃OH) eklendi. CH₃OH eklendiği zaman çöken bej renkli madde süzölerek kurutulmaya bırakıldı. CHCl₃-CH₃OH varlığında kristallendirilir ve %78 verimle beyaz renkli kristaller meydana geldi. E.N: 313-315 °C. ¹H-NMR (400 MHz CDCl₃) δ (ppm): 4,23 (d, 4H, *J* = 13 Hz, ArCH₂Ar), 4,23 (d, 4H, *J* = 13 Hz, ArCH₂Ar), 6,67 (t, 4H, *J*=7,44 Hz, ArH), 7,45 (d, 8H *J*=7,56 Hz, ArH), 10,16 (s, 4H, OH).



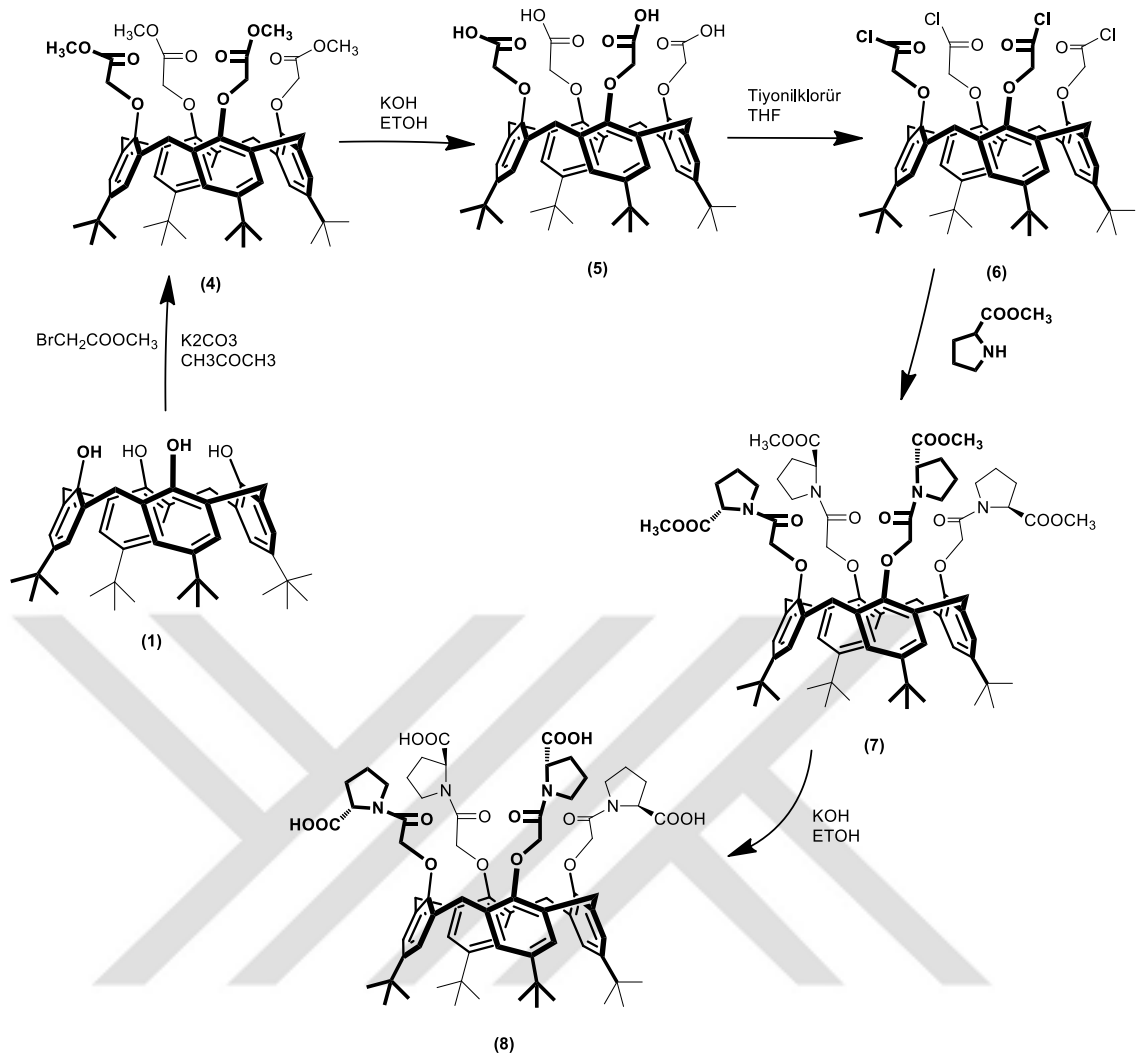
(2)

3.2.3. Kaliks[4]aren'in L-pirolin karboksilik asit türevinin sentezi (3) (Becker ve ark., 2008)

2 g (4.8 mmol), kaliks[4]aren, 45 mL tetrahidrofuran, 2.9 g (25 mmol) L-prolin ve 7 mL su ilave edilerek çözüldü. 5.6 mL asetik asit ve 2 mL formaldehit (%37) ilave edildi. 72 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. İşlem sonunda çöken madde süzüldü. Su/etanol (1:1) oranında aseton karışımından kristallendirildi ve %75 verimle ürün elde edildi. E.n. 340°C (dec.). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz D_2O): δ (ppm): 1.63-2.04 (m, 16H CHCH_2 , CH_2CH_2), 2.87-2.98 (m, 4H, CH_2N), 3.28-3.38 (m, 4H, CH_2N), 3.65(m, 4H, CHN) 3.72-3.86 (m, 4H, ArCH_2Ar), 3.98 (s, 4H, ArCH_2N), 7.07 (s, 8H, ArH). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ (ppm): 173.3, 150.8, 131.0, 129.4, 123.2, 67.4, 60.9, 57.4, 45.73, 28.7, 23.3.



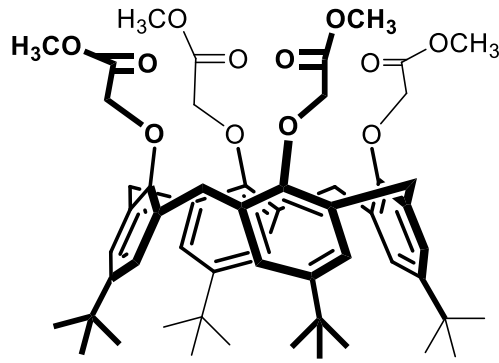
(3)



Şekil 3.2: 8 nolu kaliks[4]aren türevinin sentez şeması

3.2.4. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrametoksikarbonilmetoksi-kaliks[4]aren (Arnaud-Neu ve Ark. 1989).

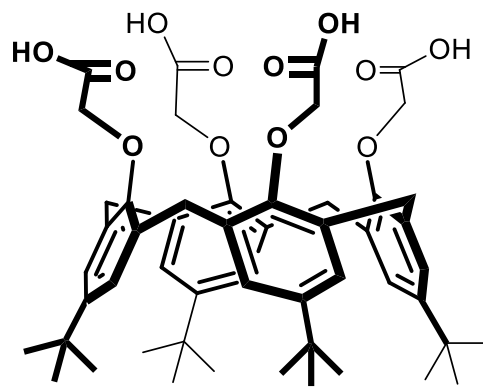
p-ter-bütilkaliks[4]arenden 5 g (7.71 mmol) ve 4.29 g (30.84 mmol) potasyum karbonattan 250 mL aseton varlığında geri soğutucuda 2 saat kaynatıldı. Metilbromasetattan 2.84 mL eklendi. Bu karışım 24 saat kaynatıldı ve karıştırıldı. 24 saatin sonunda karışım süzüldü ve soğumaya bırakıldı. Soğuyan karışım süzüldü ve destilleme işlemi yapıldı. Ve son olarak meydana gelen katı etanol varlığında kristallendirildi. Oluşan ürünün verimi % 65 olarak elde edildi. E.n. 215-217 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz CDCl_3) δ (ppm): 1.09 (s, 36H, Bu^t), 3.20 (d, 4H, $J=13.3$ Hz, ArCH_2Ar), 3.78 (s, 12H, OCH_3), 4.82 (s, 8H, OCH_2), 4.83 (d, 4H, $J=13.3$ Hz, ArCH_2Ar), 6.90 (s, 8H, ArH).



(4)

3.2.5. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28 tetrahidroksikarbonilmetoksi-kaliks[4]aren (Arnaud-Neu ve Ark.. 1989).

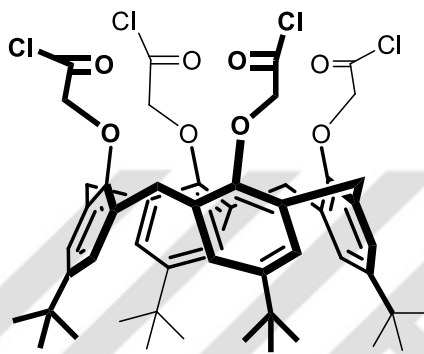
Kaliksaren'in tetra ester türevi **4** 3.9 g (4,4 mmol), 200 mL etanol içinde çözüldü. KOH'ın sulu çözeltisi üzerine ilave edildi. 8 saat boyunca kaynatıldı. Çözücü tamamen destillenene kadar kalan miktar asitli su varlığında çöktürülerek süzüldü. Süzülen madde su ile yıkanarak % 85 verimli tetra-karboksil türevli kaliksaren **5** elde edildi. Elde edilen maddenin verimi %55 'tir. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz CDCl_3) δ (ppm): 1.36 (s, 36H, But), 3.62 (yayvan, 4H, ArCH_2Ar), 3.78 (s, 12H, OCH_3), 4.87-5.13 (yayvan, 12H, (8H OCH_2 ve 4H, ArCH_2Ar)), 7.21 (s, 8H, ArH).



(5)

3.2.6. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetraklorokarbonilmetoksi kaliks[4]aren

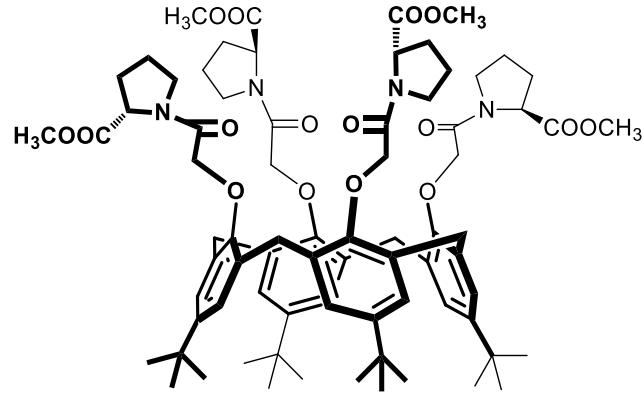
p-ter-bütilkaliks[4]arenin tetraasit türevinden 5 0,8 g (0.91 mmol) alındı ve 35 mL THF ilave edilerek çözüldü. Üstüne 4,5 mmol tiyoniklorür ilave edildi. geri soğutucu da 3 saat kaynatıldı. Çözücü vakum ortamında tamamen destillendi. Çözücü daha fazla saflaştırılmadan sonraki basamak için kullanıldı.



(6)

3.2.7. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetraklorokarbonilmetoksi kaliks[4]aren ile L- prolinmetilesteri bileşiğinin etkileştirilmesi (Combes ve ark.)

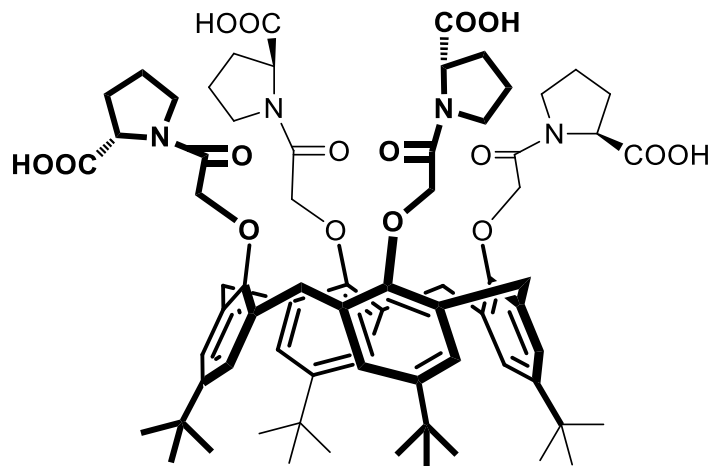
Daha önce sentezlenen kaliksarenin asitklorür bileşiği 0.95g (1 mmol) 20 ml diklormetan içerisinde çözüldükten sonra bu karışımın üzerine 10 ml diklormetanda çözülmüş 0.99 g (6 mmol) L-prolinmetilesteri ve 1 ml trietilamin içeren karışım damla damla ilave edildi ve oda sıcaklığında 28 saat karıştırıldı. Karıştırma işlemi bittikten sonra reaksiyon karışımı önce 3 defa 20 mL seyreltik asitli suyla, daha sonra pH 7 olana kadar destile suyla ekstraksiyon yapılarak yıkandı. Organik faz MgSO₄ ile kurutulup ve çözücü uçurularak sarı renkli katı elde edildi. Bileşik 7 % 70 verimle elde edildi. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 1.07 (s, 36H, But), 1.83-1.97 (m, 8H, CH₂ (prolin)), 2.13-2.22 (m, 8H, CH₂ (prolin)) 3.29 (m, 8H, CH₂(prolin)), 3.69-3.78 (m, 16H, (12H, OCH₃ ve 4H, ArCH₂Ar)), 4.48 (m, 4H, ArCH₂Ar), 4.93 (s, 4H, OCH₂), 5.08 (s, 4H, OCH₂), 5.22 (m, 4H, CH(prolin)), 6.75 (s, 8H, ArH).



(7)

3.2.8. 7 nolu bileşiğin hidrolizi (8)

1 g kaliksarenin L-prolinmetilesteri türevi (Combes ve ark.) 100 mL etanol içerisinde çözüldü. Üzerine KOH 'ın sulu çözeltisi ilave edilerek 8 saat kaynatıldı. Sonra çözücü tamamen destillendi ve kalan kısım asitli su ile çöktürüldü. Daha sonra süzüldü ve su ile yıkandı. % 80 verimle **8** nolu kaliksaren türevi elde edildi. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 1.16 (s, 36H, But), 1.96 (m, 8H, CH_2 (prolin)), 2.11 (m, 8H, CH_2 (prolin)) 3.27 (m, 8H, CH_2 (prolin)), 3.48 (m, 4H, ArCH_2Ar), 3.96 (d, 4H, $J=14.6$ Hz, ArCH_2Ar), 4.38 (s, 4H, OCH_2), 4.82 (s, 4H, OCH_2), 4.94 (m, 4H, $\text{CH}(\text{prolin})$), 7.17 (s, 8H, ArH). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO): δ (ppm) 172.7, 168.1, 152.2, 147.5, 134.7, 125.3, 4.6, 59.0, 45.6, 34.54, 31.4, 30.8, 29.0, 24.8.



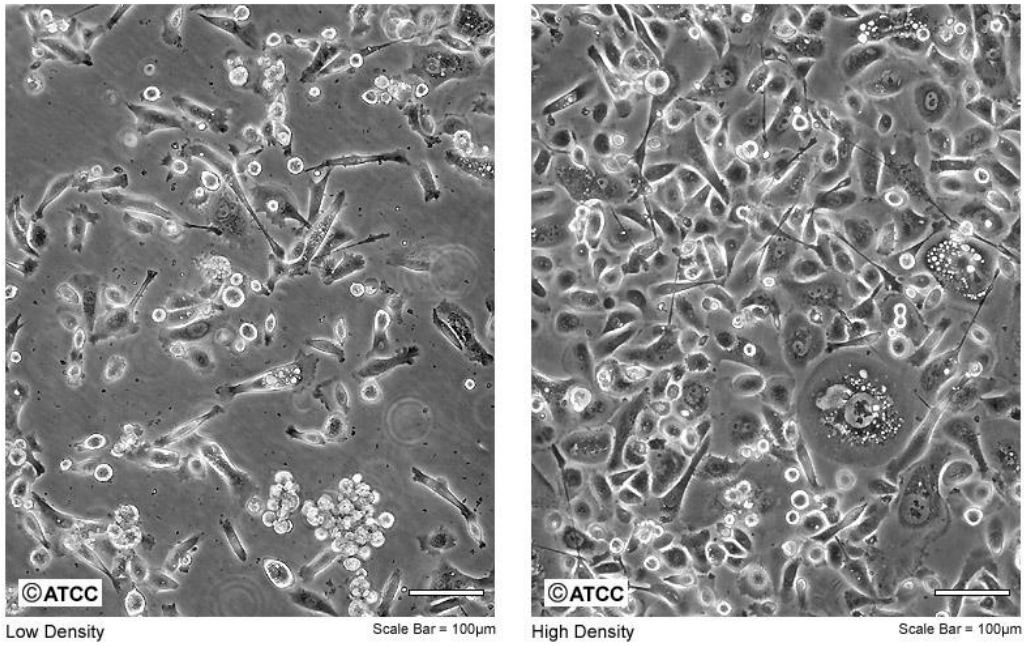
(8)

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.3.1. Hücre Hatları

Çalışmada prostat kanser hücre hattı PC-3, kolon kanseri hücre hattı DLD1, karaciğer hücre hattı HEPG2 ve akciğer kanseri hücre hattı A549 ile sağlıklı insan epitelium hücre hattı olan PNT1A kullandı. Bu hücre hatları üzerinde prolin türevli kaliks[4]arenler insan kanser hücrelerinde sitotoksik etkisi incelendi. Bu çalışmada kullanılan normal prostat epitel hücresi Sigma ve kanser hücreleri ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD) firmasından satın alındı.

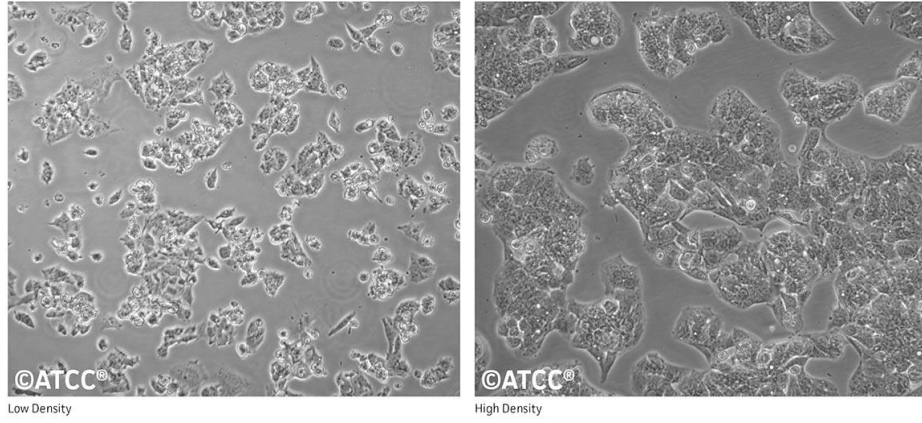
ATCC Number: **CRL-1435**
Designation: **PC-3**



Şekil 3.3: Prostat kanseri hücre hattı (PC-3)

Bu çalışmada, 62 yaşında bir erkekten ve IV. evrede olan prostatik adenokarsinomun kemik metastazı başlamış ve yapışık bir hücre hattı olan PC-3 kullanıldı (American Type Culture Collection).

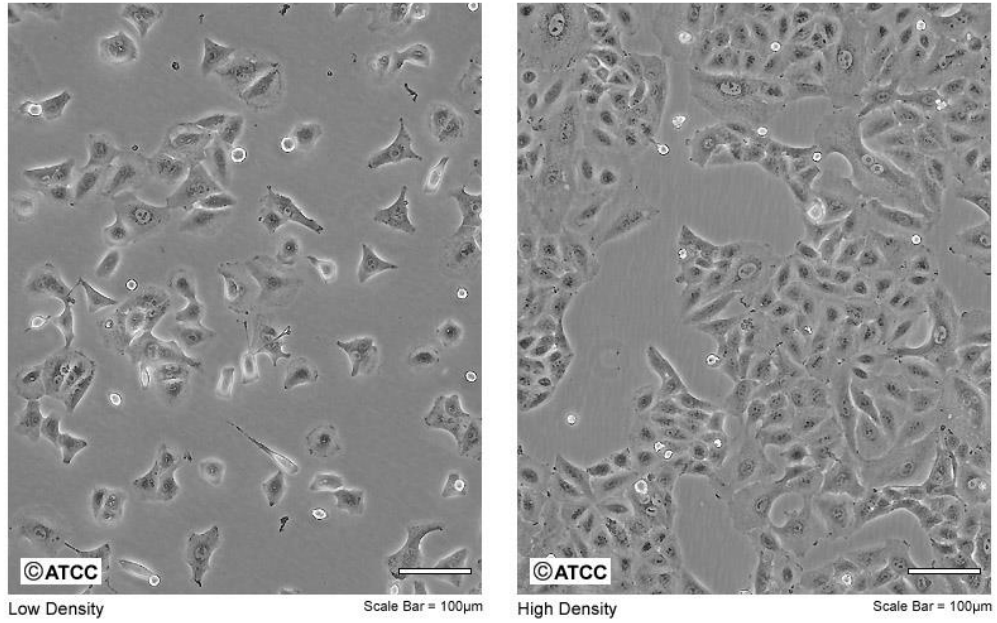
ATCC Number: **HB-8065**
Designation: **Hep G2**



Şekil 3.4: Karaciğer kanseri hücre hattı (HEPG2)

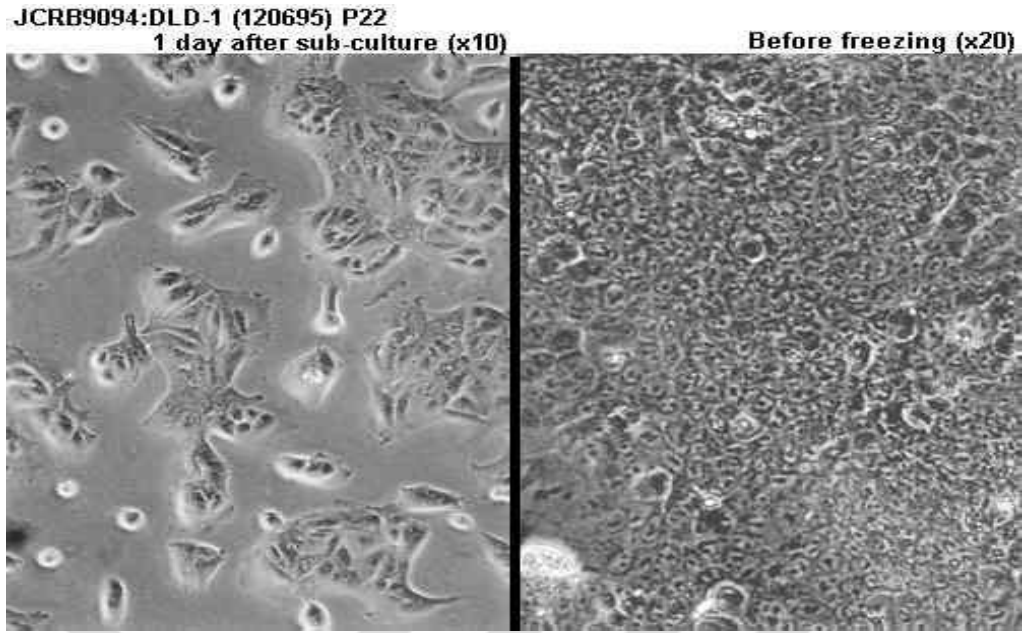
HEPG2 hücre hattı (karaciğer kanseri) 15 yaşında bir erkekten alınmış ve yapışık özellikte olan hücre hattı kullanıldı (Şekil 3.4).

ATCC Number: **CCL-185**
Designation: **A-549**



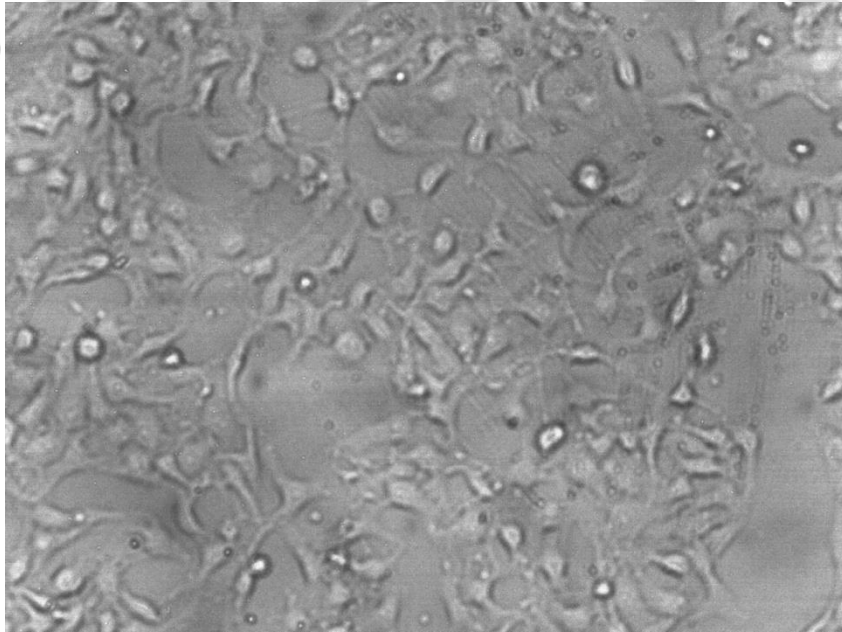
Şekil 3.5: Akciğer kanseri hücre hattı (A549)

Bu hücre akciğer kanseri hücre hattıdır (A549). Akciğer karsinomatöz dokusunda 58 yaşındaki bir erkekten alınmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.6: Kolon kanseri hücre hattı (DLD1)

Kolon kanseri hücre hattı kolorektal adenokarsinoma hücre hattından izole edilmiş ve yetişkin bir erkekten alınan yapışık epitel bir hücre hattıdır (Şekil 3.6).



Şekil 3.7: Normal prostat epitel hücre hattı (PNT1A)

İnsan normal epitel hücre hattı 35 yaşında bir erkeğin prostatından elde edilmiş ve normal yetişkin prostat epitel hücrelerinin, kusurlu bir replikasyon kaynağı olan SV40

genomu içeren bir plazmid ile transfeksiyon yoluyla ölümsüzleştirilmesi ile oluşturulmuştur (Şekil 3.7).

3.3.2. Hücrelerin Büyüme Ortamlarının Hazırlanması

Kanser hücre hatları %10 FBS (fötal sıgır serumu) ve %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren farklı büyüme ortamları içerisinde 37 °C ve %5 CO₂ ' li ortamda büyütüldü. Bu büyüme ortamları aynı zamanda kullanılacak olan kaliks[n]aren türevlerinin de seyreltilmesinde de kullanıldı. T-75 büyüme kaplarında çoğalan hücreler 10 mM fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra hücreler tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak büyüme kaplarından kaldırıldı ve 6, 12, 24, 96 kuyucuklu büyüme plakalarına aktarıldı.

3.3.3. Hücre Açma

Hücre açma işlemine başlamadan önce 37 °C lik su banyosunda hücre büyüme ortamı için gerekli olan malzemeler bekletildi ve sonra hücre kültürü kabinine alındı. -80 buzdolabından çıkardığımız hücreyi 37 °C lik su banyosunda sıvı hale gelene kadar bekletildi, Sıvı hale gelen hücre, hücre kabinine alındı ve T-75 büyüme kabı içerisine aktarıldı 37 °C ve % 5 karbondioksitli inkübatörde 24 saat bekletildi. 24 saatin sonunda hücreler ilk büyüme ortamından uzaklaştırıldı ve yerine yeni büyüme ortamı eklendi. Bu işlemlerin hepsi A-549, HEPG-2, PNT1A, DLD1 ve PC-3 için aynı şekilde yapıldı.

3.3.4. Hücre Kapatma

Hücreler %75-80 büyüme oranına ulaştığı zaman T-75 büyüme kabında bulunan besiyer çekildi. 10 µM fosfat tamponu ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra T-75 flask içine tripsin-EDTA konuldu ve hücreler kalkana kadar 37 °C ve %5 lik inkübatörde bekletildi. T-75 büyüme ortamının tabanından kalkan hücrelerin üzerine büyüme ortamı konuldu. Pipetlemenin ardından steril 15 lik falkona alındı. 400xg de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj bitince 15 lik falkon hücre kültürü kabinine alındı ve dibe çöken hücrelerin üzerindeki büyüme ortamı yavaşça aspire edildi. 1 mL yeni besiyer konuldu ve dikkatlice pipetleme yapıldıktan sonra cryo tüpe aktarıldı. Üzerine 100 µL DMSO ilave edilerek -80°C de muhafaza edildi.

Tablo 3.1. Hücre Hatları ve Besiyerler

Hücre Hattı	Besiyeri	FBS	L-Glutamin	Pen-strep
PC-3	Ham's F-12	%10	%1	%1
DLD1	RPMI 1640	%10	%1	%1
HEPG2	EMEM	%10	%1	%1
A549	DMEM	%10	%1	%1
PNT1A	RPMI-1640	%10	%1	%1

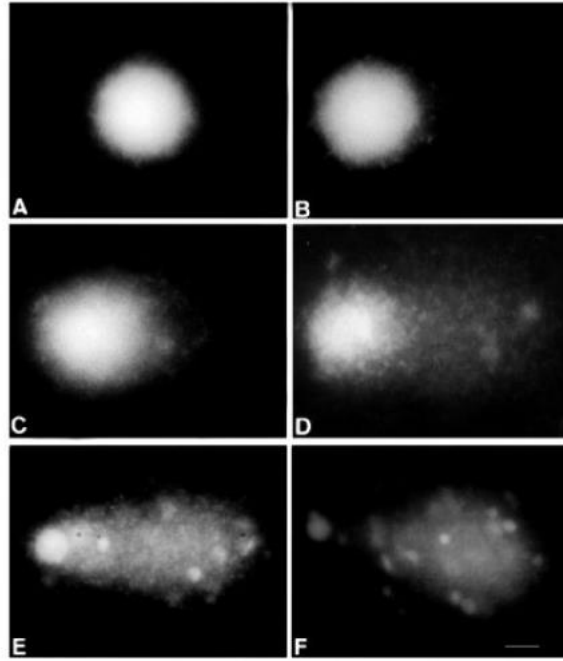
3.3.5. Hücre Canlılığı Çalışmaları

Hücre hatları uygun büyüme ortamları içerisinde büyütüldükten sonra hücre proliferasyonunu gözlemlemek amacı ile tripsin-EDTA solüsyonu yardımıyla T-75 büyüme kaplarından alındı. 96 kuyucuklu büyüme plakalarına her kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde aktarıldı. 24 saatlik bir inkübasyondan sonra hücreler 0-200 μ M aralığında prolin türevli kaliksaren grubu maddelerinin canlılığı kolorimetrik bir yöntem olan “Alamar Blue” (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) yöntemi ile tayin edildi (Hamid ve ark., 2004; Karakurt ve Adali, 2016). Ayrıca canlı ve ölü hücre oranları ise % 0.04 “Tripan Mavis” kullanılarak Biorad TC20 Otomatik hücre sayım cihazı ile belirlendi.

3.3.6. Comet Assay

Sitotoksik çalışmalardan sonra **3** ve **8** no’lu bileşik kanser hücreleri ve epitel hücrelerinde DNA da meydana gelen hasar Comet yöntemi ile tespit edildi. 15×10^4 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara hücre ekimi yapıldı. 24 saat sonunda IC_{50} değerlerinde **3** ve **8** no’lu bileşikler ile muamele edildi. 48 saat sonra hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılarak 60 μ L de 3×10^4 hücre olacak şekilde PBS ile seyreltilti. 0.1 g LMA(Low Melting Agarose) tartılarak 10 mL PBS ile çözüldü ve ısıtıcıda kaynamaması ve berrak olmasına özen göstererek hazırlandı. Hazırlanan LMA dan 160 μ L + hücre-PBS karışımından 60 μ L alındı ve karıştırıldı. Önceden hazırlanmış NMA(Normal Melting Agarose) lam üzerinde 150 μ L hücre+PBS+LMA karışımından yayılarak üzerine

uzun lamel yerleştirilir ve +4°C da 30 dk bekletildi. Preparatlar üzerindeki lameller jeli yırtmadan dikkatlice kaldırıldı ve preperatlar şale içerisindeki soğuk lizis solüsyonuna yerleştirildi. Lizis çözeltisindeki preperatlar +4°C de en az. 1, en fazla 2 saat bekletildi. Lizis işleminden geçirilen preparatlar elektroforez tankına yerleştirilir. Preperatların üzerini 3-4 mm geçecek kadar hazırlanan +4°C running buffer tanka döküldü ve 15dk bekletilerek tankın etrafına buz aküleri yerleştirildi. 15dk sonunda 25 Volt, maksimum Amperde 28 dakika boyunca elektrik akımı uygulanarak elektroforez işlemi (yürütme işlemi) gerçekleştirildi. Yürütmenin ardından lamalar 5 dk nötralizasyon tampon çözeltisinde (+4°C'de) bekletildi. Lamalar hala şalenin içindeyken soğuk distile su ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Lamalar iyice kuruyunca 5 dk soğuk EtOH'de +4°C de bekletildi. Süre sonunda lamalar karanlıkta kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlara son konsantrasyonu 2 µg/mL olacak şekilde 50 µL etidyum bromür + 1000 µL distile su karışımından 35-40 µL damlatılarak üzerine küçük lamel kapatıldı ve ZOE Floresans Cell İmagine mikroskobunda incelendi.



Şekil 3.8: Komet testi sonucu elde edilen hücrelerdeki DNA hasar tipleri A-Tip 0, B-Tip 1, C-Tip 2, D-Tip3, E-Tip 4, F-Apoptotik hücre

3.3.7. Apoptoz Çalışmaları

Hücreler % 80 büyüme potansiyeline ulaştığı zaman 6 kuyucuklu plakalara 25×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 37°C ve % 5 CO_2 'de inkübatöre bırakıldı. 24 saat sonra 6 kuyucuklu plakada bulunan hücreler IC_{50} değerlerinde **3** ve **8** no'lu bileşik ile muamele edilerek ve 48 saat boyunca inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklar PBS ile yıkandı ve hücreler tripsin-EDTA yardımıyla kaldırıldı. Hücrelerin üzerine besiyer ekleyerek 5 dk 1500 xg de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atıldı ve üzerine tekrar PBS eklenerek tekrar 5 dk 1500 xg de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak üzerine 100 μL Binding buffer ilave edildi. Binding buffer üzerine 2.5 μL Annexin V ve 2.5 μL 7-AA ilave edilerek 30 dk karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda 400 μL Binding buffer ilave edilerek Flow sitometre cihazında (BD FACS Aria III, software: FACS Diva software) okutuldu.

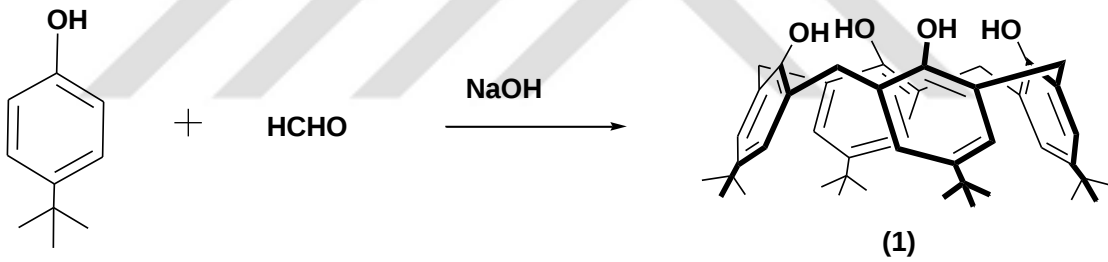
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

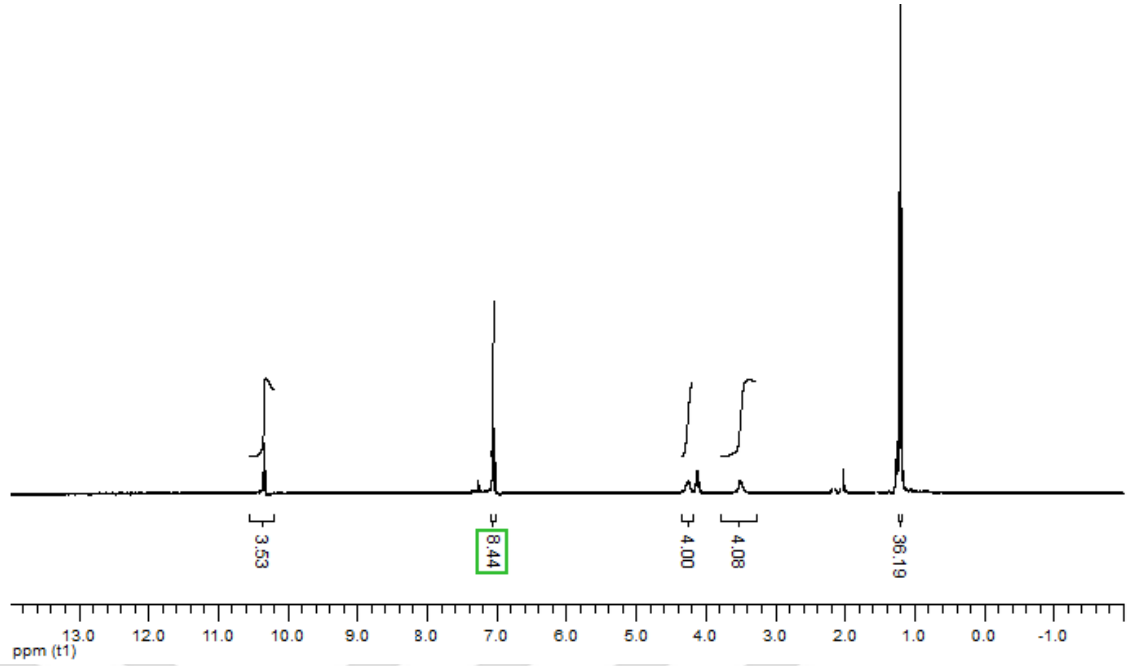
4.1. Kaliksaren Bileşiklerinin Sentezi

Halkalı yapıda makrosiklik oligomer olan kaliks[n]arenler, formaldehit ve p-sübstitüe fenolün bazik ortamda kondenzasyon reaksiyonunda sentezlenir (Gutsche ve Iqbal, 1990). Kaliksarenlerin halkalı yapıda olmasından dolayı konuk-konak kompleksleşmesi yapabilmekte ve farklı boyutlarda molekül boşluğu oluşturulabildiği için farklı alanlarda çoğu bilim insanının dikkatini çekmiştir (Yılmaz ve Sayın, 2016).

Bu çalışmada sentezlenen prolin türevli kaliks[4]arenler ile insan kanser hücre hatlarında sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirildi.

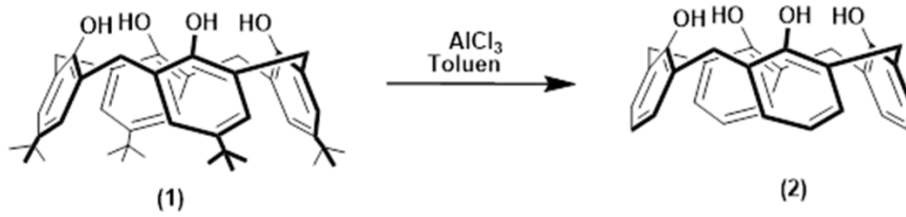
Bu çalışmanın birinci şemasında verilen 3 no'lu bileşiğin sentezi için başlangıç maddesi olan 5,11,17,23 *tetra-ter-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren* (**1**) literatüre göre sentezlendi. (Gutsche ve Iqbal, 1990). Bu bileşiğe ait ¹H-NMR spektrumu Şekil 4.1'de verilmiştir.

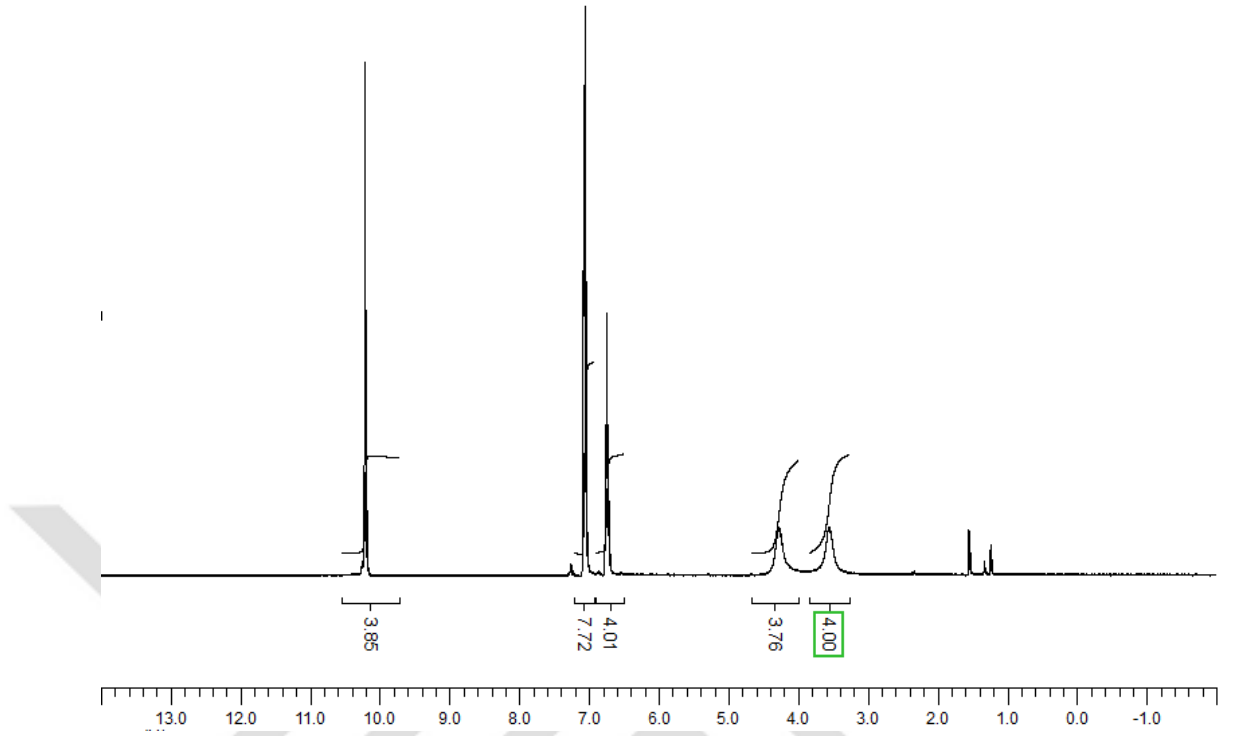




Şekil 4.1: *p*-ter-Bütilkaliks[4]arenin (1) ¹H-NMR spektrumu

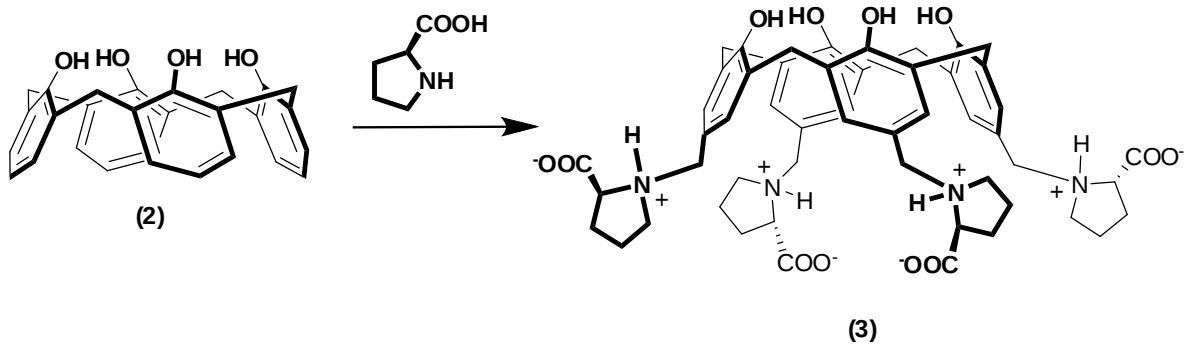
Sentezlenen *p*-ter-bütilkaliks[4]arendeki (1) *ter*-bütıl grupları literatüre göre (Gutsche ve Iqbal, 1990) uygun koşullarda toluen içerisinde susuz AlCl₃ ile etkileştirilerek uzaklaştırıldı ve 2 no'lu kaliks[4]aren bileşiği sentezlendi. 1.65 ppm deki *ter*-bütıl gruplarının uzaklaştırıldığı bu bileşiğin ¹H-NMR spektrumundan görüldü (Şekil 4.2.)

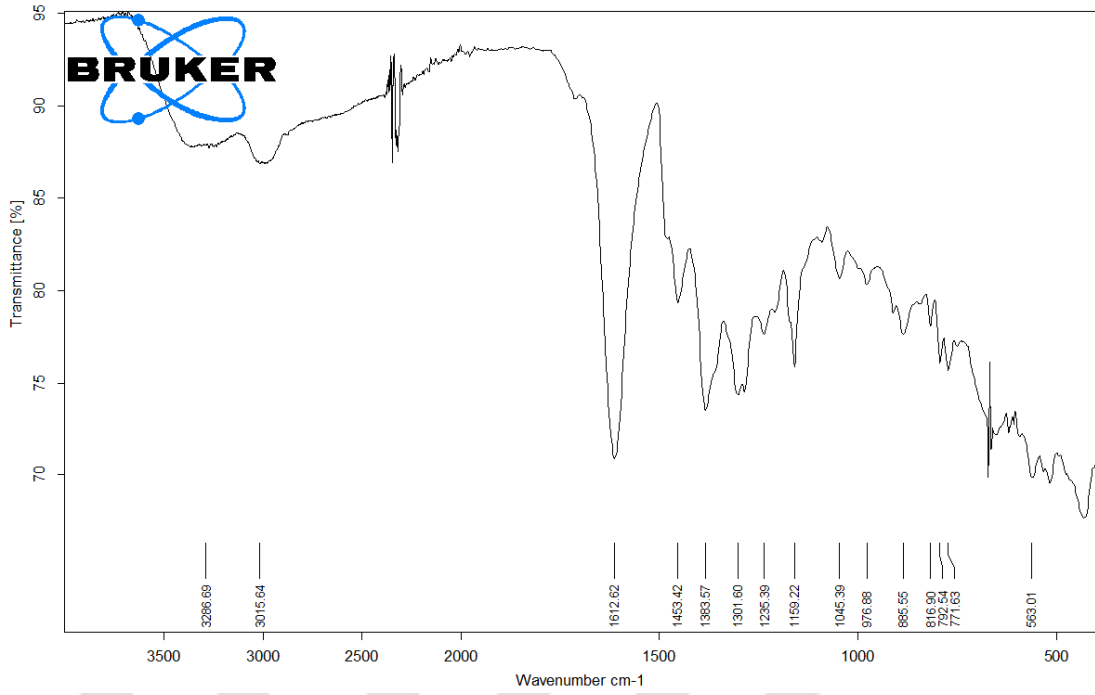




Şekil 4.2.: Kaliks[4]arenin ^1H -NMR spektrumu

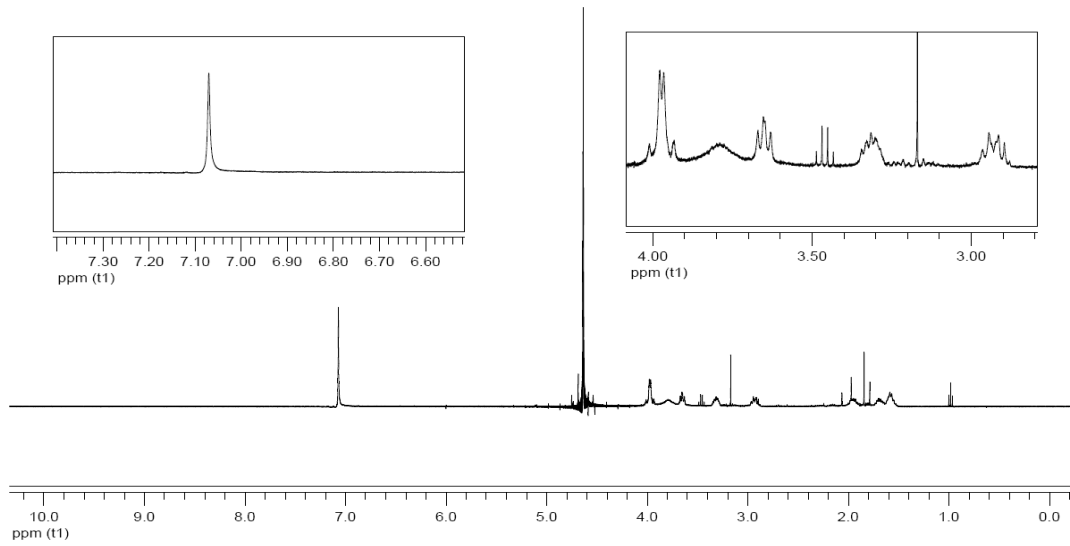
Sentezlenen 2 nolu kaliks[4]aren bileşiği literatüre göre Mannich tepkimesi koşullarında L-prolin ile etkileştirilerek %75 verimle kaliks[4]arenin L-prolin türevi (3) sentezlendi (Becker ve ark., 2008).



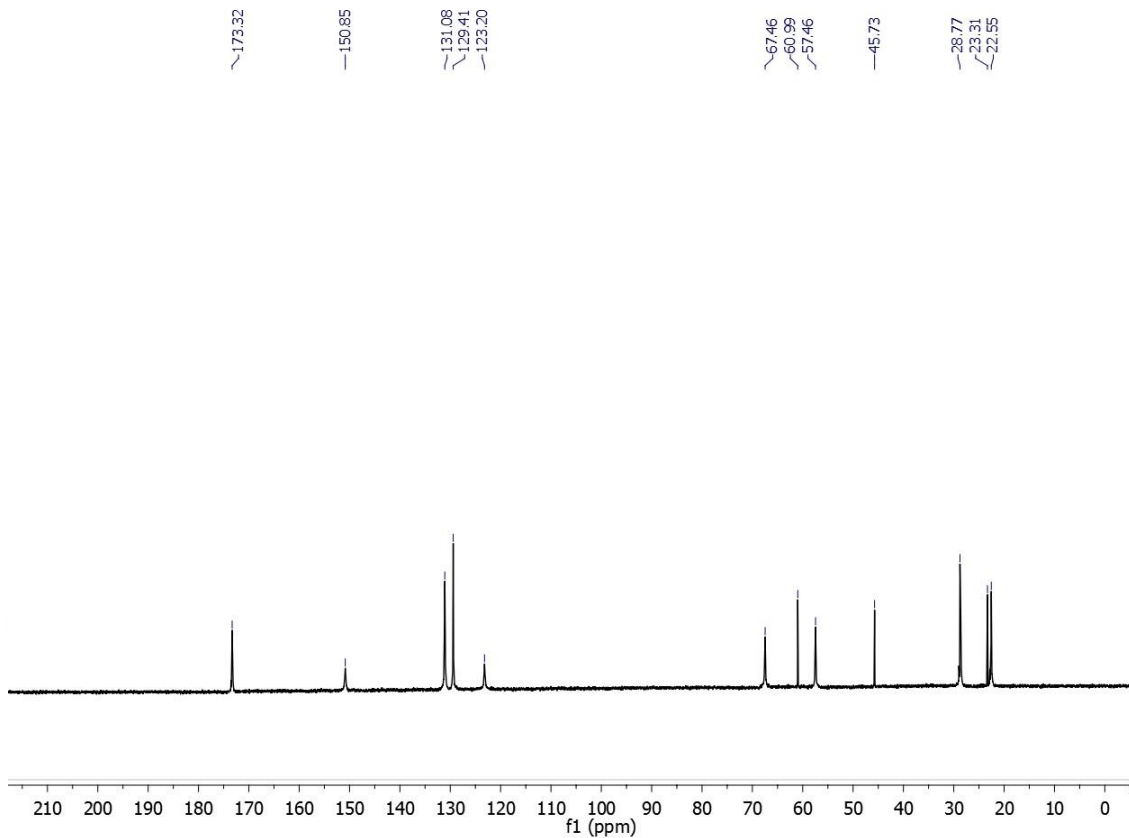


Şekil 4.3: 3 nolu bileşiğin FTIR spektrumu

FTIR spektrumuna baktığımızda karboksil karbonil grubuna ait bandın 1612 cm^{-1} de gözlenmesi karboksilik asit grubunun asetat formunda olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.4: 3 nolu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu

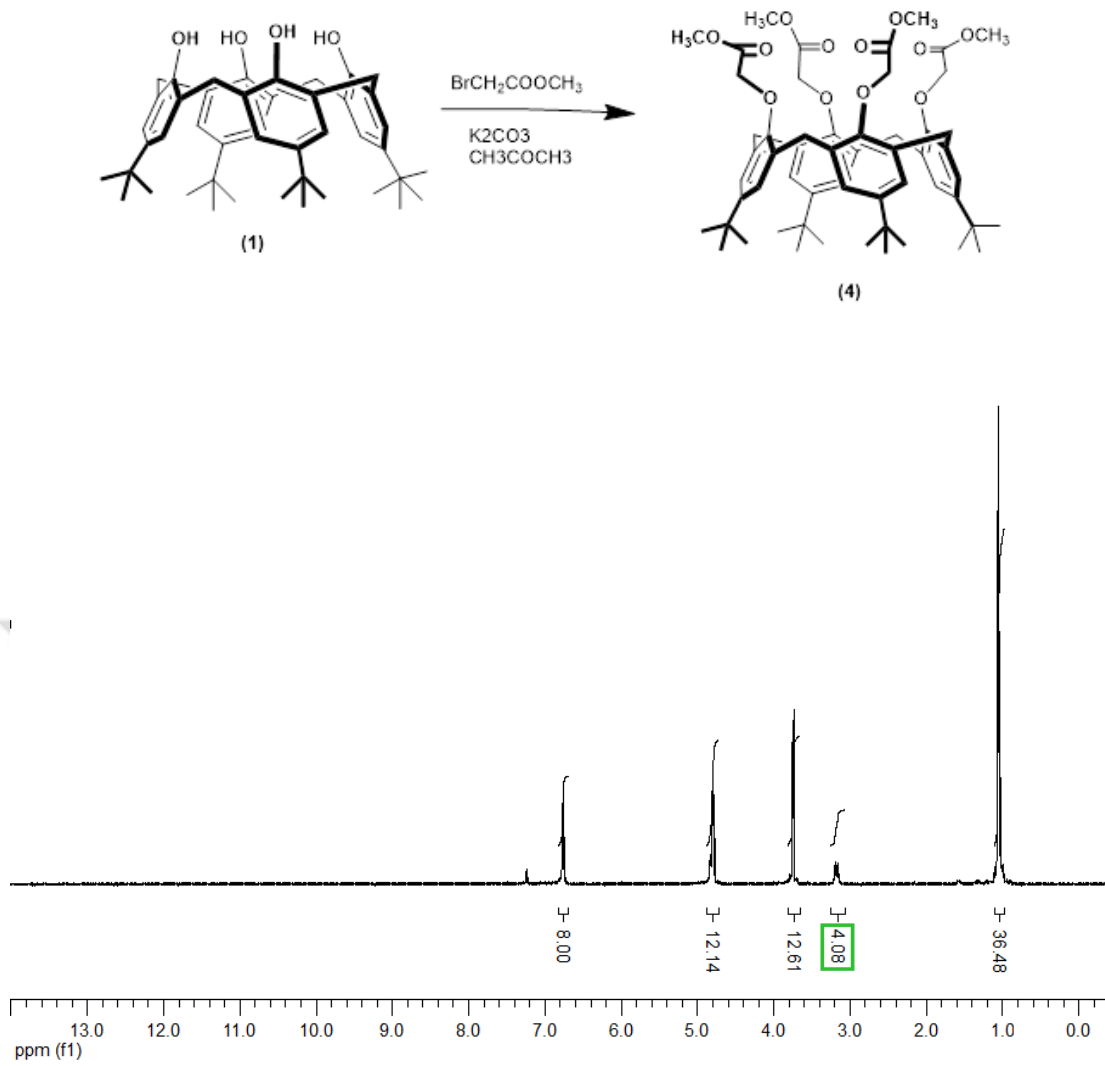


Şekil 4.5: 3 nolu bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu

Sentezlenen bu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde 1.63-2.04, 2.87-2.98, 3.28-3.38 ppm arasındaki pikler prolin halkasına ait olan sinyallerdir. 3.98 ppm deki pik prolin halkasının kaliksaren bileşiğinin p-pozisyonuna bağlanması ile oluşan $\text{Ar-CH}_2\text{N}$ grubuna aittir. Ayrıca 7.07 ppm de görülen singlet pik ise kaliksaren bileşiğine dört prolin halkasının p-pozisyonundan bağlandığının kanıtıdır (Şekil 4.5.). Bu bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu ^1H -NMR spektrumuna göre daha nettir. 173.3 ppm de C=O (COOH grubu) pikinin gözlenmesi yapıyı doğrulamaktadır (Şekil 4.6.).

Çalışmanın ikinci sentez şamasında verilen 8 nolu kaliksaren türevini sentezlemek için ilk olarak ester türevi ve sonrasında bu ester türevinin hidrolizi ile karboksilik asit türevlerine dönüştürüldü. Daha sonra da tıyonil klorür ile uygun koşullarda etkileştirilmesi ile asit klorürlerine dönüştürüldükten sonra L-prolin metilesteri ile tepkimeye sokuldular.

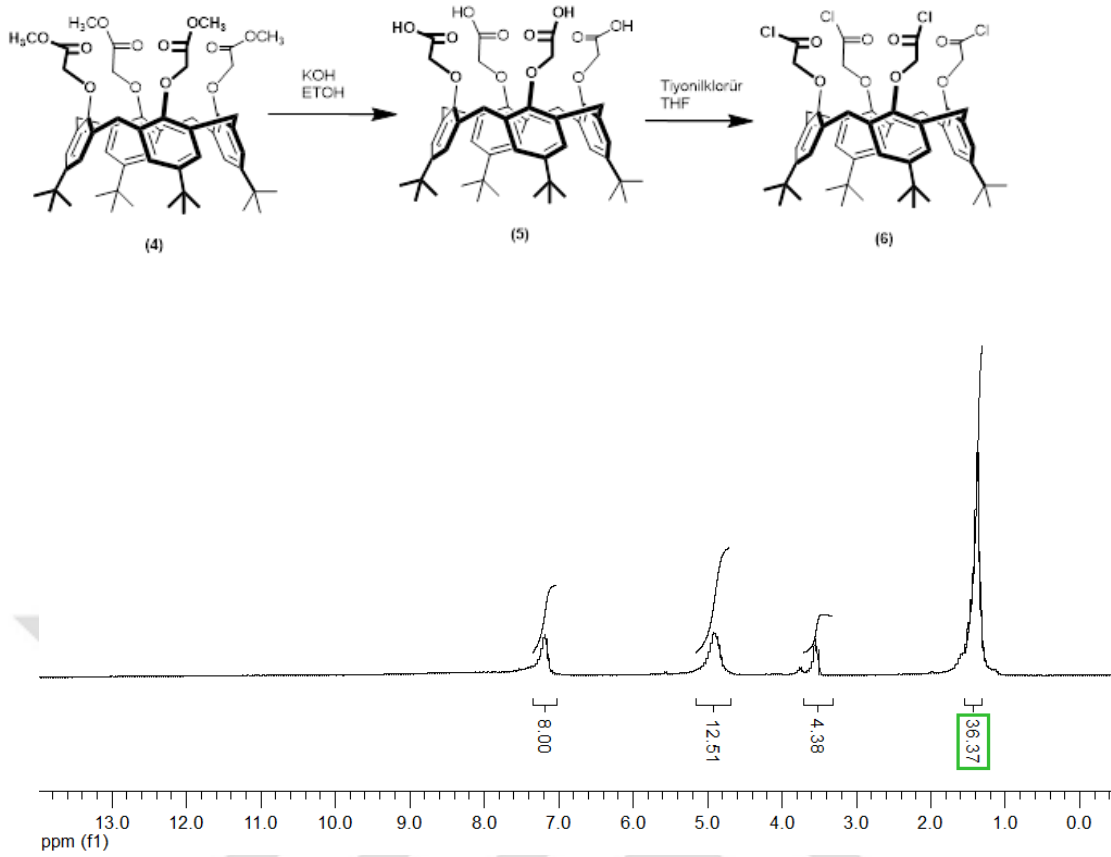
p-ter-Bütikaliks[4]aren tetra ester türevi literatüre göre sentezlendi. Bunun için *p-ter*-bütikaliks[4]aren (1) metilbromasetat ile K_2CO_3 varlığında aseton içerisinde tepkimeye sokularak hedef bileşik 7 sentezlendi.



Şekil 4.6.: 4 nolu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu

Bu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumuna (Şekil 4.6.) baktığımızda 4.82 ppm de gözlenen 8 eşdeğer protonlu $\text{O}-\text{CH}_2-$ piklerini ve 3.79 ppm deki 12 eşdeğer protonlar ester grubunu gösterir. Ayrıca 1.10 ppm deki 36 özdeş *p-ter*-bütil gruplarına ait protonlar kaliksaren bileşiğinin fenolik OH grubunun dördüne de ester grubunun bağlandığını doğrulamaktadır.

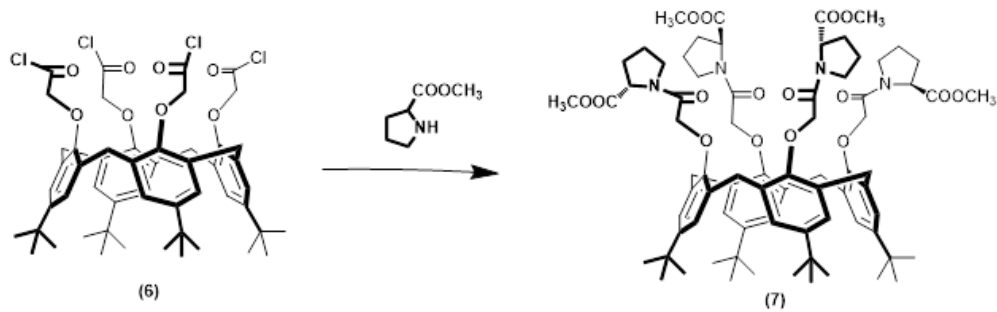
Sentezlenen 4 nolu ester bileşikler etanol içerisinde sulu KOH varlığında hidroliz edildi ve 5 nolu tetraasit türevine dönüştürüldü ve devamında bu asit türevli kaliksaren, THF içerisinde tiyoniklorür ile etkileştirilerek tetraasit klorür türevi elde edildi (Arnaud-Neu ve Schwing-Weill, 1997).

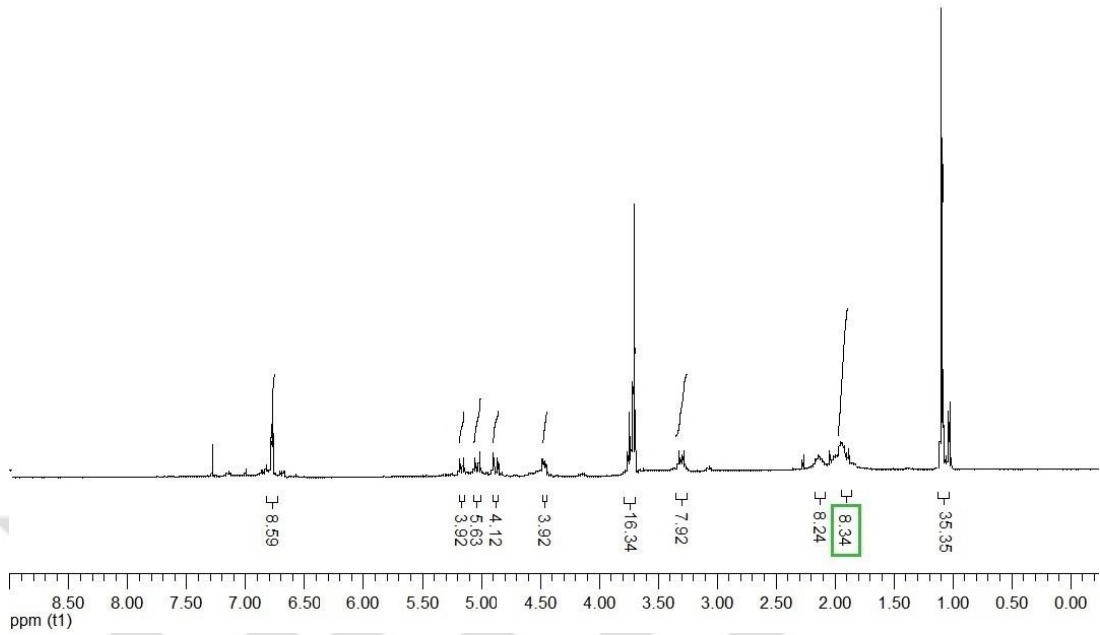


Şekil 4.7: 5 nolu bileşiğin ¹H-NMR spektrumu

5 nolu bileşiğe ait ¹H-NMR spektrumuna (Şekil 4.7.) baktığımızda reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini 3.79 ppm deki karakteristik ester grubuna ait metil protonlarının sinyallerinin kaybolması göstermektedir.

Bir sonraki basamakta sentezlenen 6 nolu tetraasit klorür türevi L-prolin metil esteri ile THF çözücü ortamında etkileştirilerek kaliksarenin 7 nolu türevine dönüştürüldü.

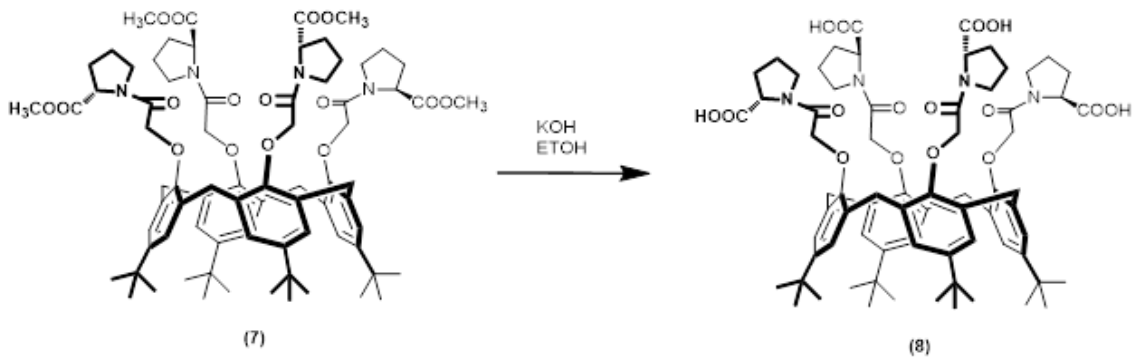


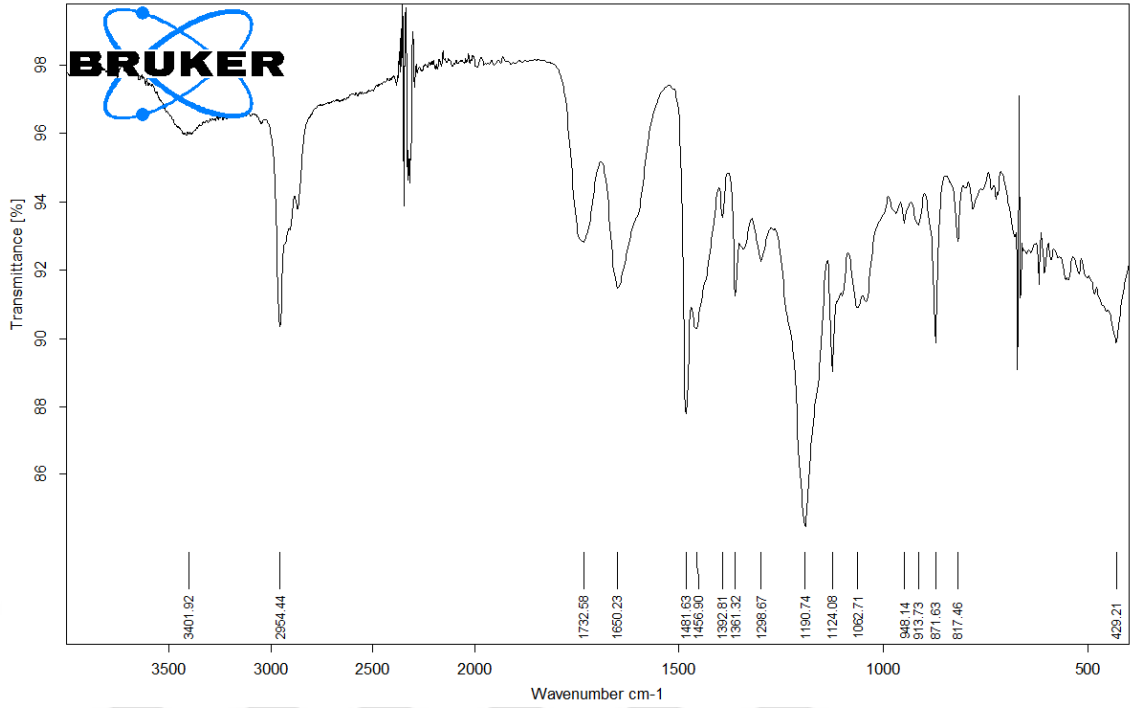


Şekil 4.8: 7 nolu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu

Bu bileşiğin ^1H -NMR spektrumuna baktığımızda 1.07 ppm de *ter*-bütil gruplarına ait 36 protonluk singlet pik, 1.83-1.97 ve 2.13-2.22 ppm de prolin grubuna ait CH_2 protonlarının sinyalleri ve 6.75 de gözlenen aromatik protonlara ait singlet bize dört prolin grubunun bağlandığını göstermektedir.

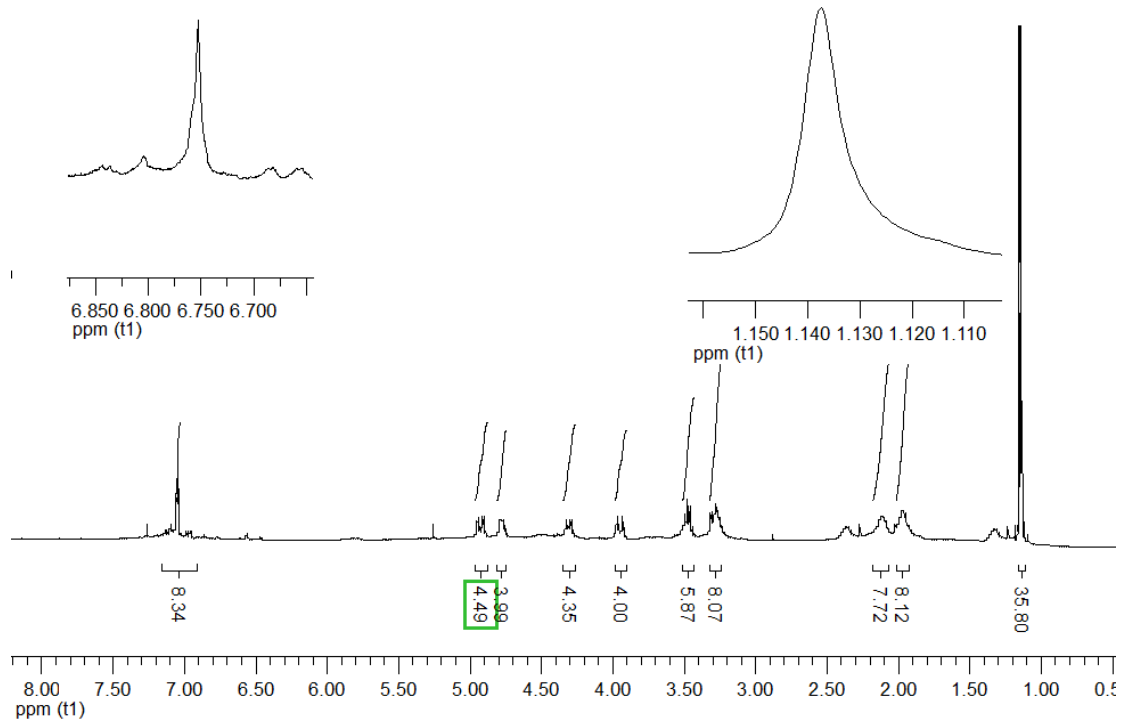
Sentezlenen 7 nolu bileşik etanol içerisinde sulu KOH varlığında hidroliz edildiğinde 8 nolu bileşiğinin oluştuğu bu bileşiğe ait ^1H -NMR spektrumunda ester grubundaki metil protonlarına ait pikin kaybolmasından anlaşıldı.



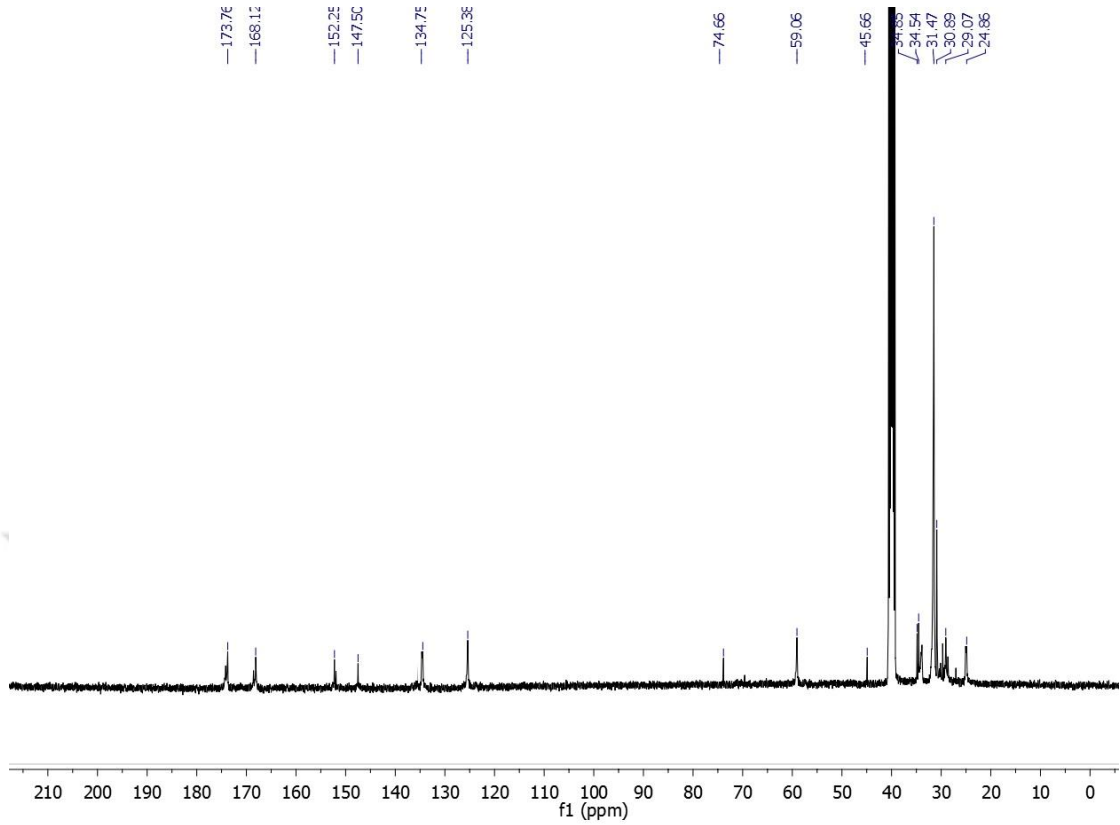


Şekil 4.9: 8 nolu bileşiğin FTIR spektrumu

8 nolu bileşiğin FTIR spektrumuna baktığımızda 1732 cm^{-1} de karbonil grubuna ait band ile yeni oluşan 1650 cm^{-1} deki karakteristik amid bandının gözlenmesi yapıyı doğrulamaktadır.



Şekil 4.10: 8 nolu bileşiğin ^1H -NMR spektrumu



Şekil 4.11: 8 nolu bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumu

Ayrıca bu bileşiğin ^{13}C -NMR spekturumuna baktığımızda 173.7 ppm de $\text{C}=\text{O}$ (COOH grubu) ve 168.1 de $\text{N}-\text{C}=\text{O}$ karbonuna ait pikler yapıyı desteklemektedir.

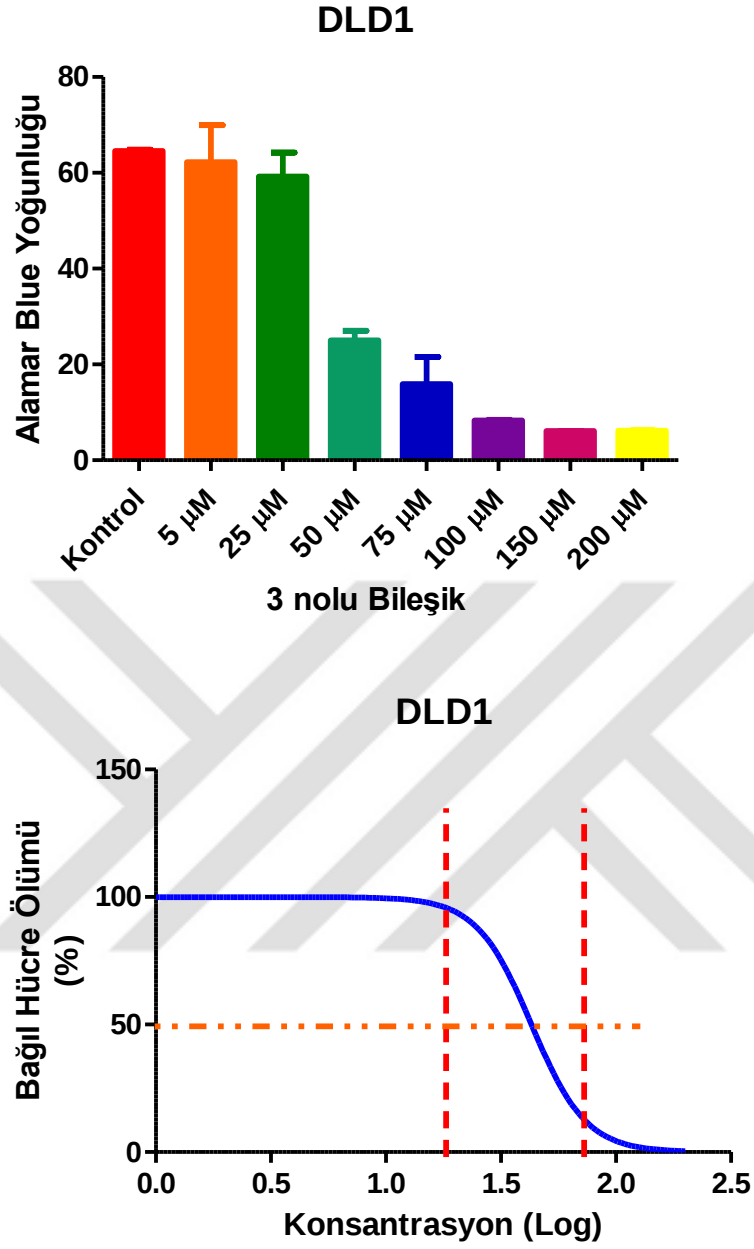
4.2. 3 ve 8 no'lu Bileşiklerin Sitotoksisite Çalışmaları

Bu çalışmada sentezlenen moleküller insan kanser hücre hatlarında sitotoksisite çalışmaları gerçekleştirildi. Çalışmanın ilk basamağında sentezlenen prolin türevli kaliks[4]arenler çeşitli insan kanser hücreleri üzerinde test edildi ve kanser hücrelerinin %50 sini öldüren konsantrasyonlarda (IC_{50}) hesaplandı. Prolin türevli kaliks[4]arenler 4 farklı insan kanser hücreleri ve insan epitel hücresi olmak üzere toplamda beş hücre hattında denendi. Bu çalışma sonucunda kaliks[4]aren bileşiklerinin seçici olarak sitotoksik etkiye sahip oldukları ve doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (Tablo 4.1).

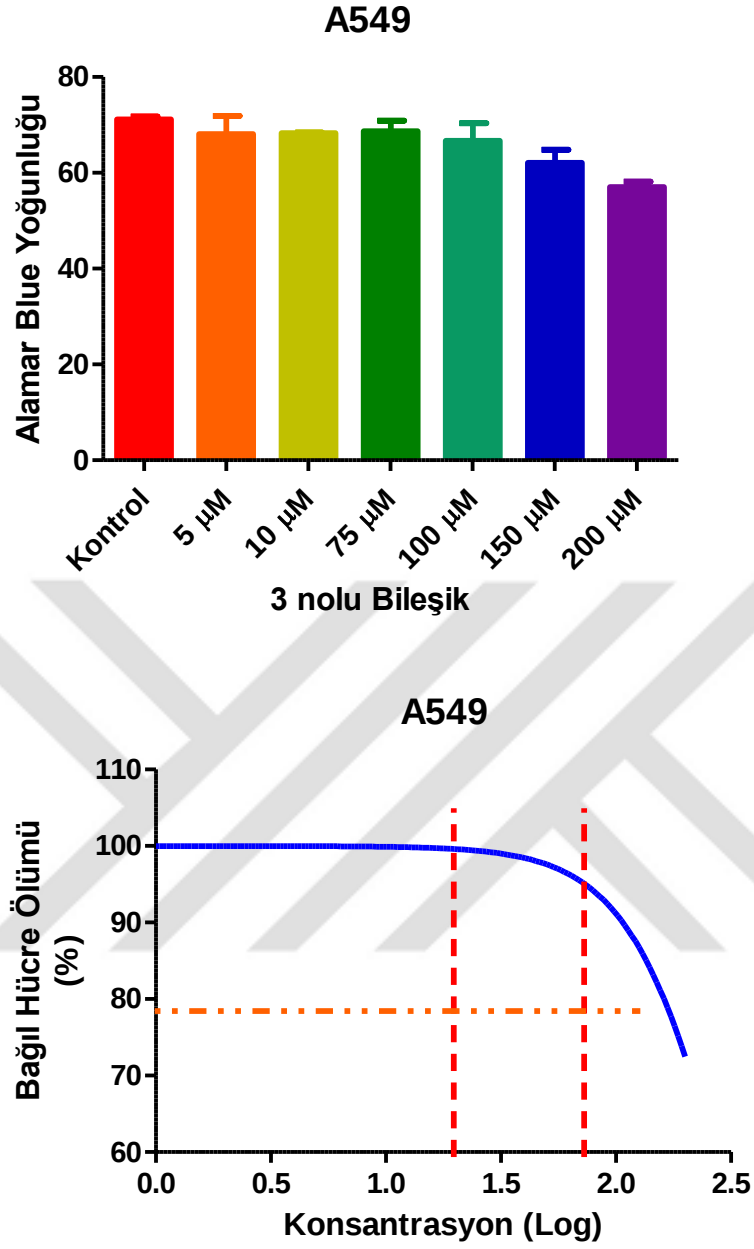
Tablo 4.1: Değişik kanser hücrelerinde anti kanser ajanların IC₅₀ (μM) değerleri

Hücre	3 nolu bileşik	8 nolu bileşik
PNT1A	>200	66,1 μM
A549	>200	49,5 μM
PC-3	94,5 μM	55,9 μM
DLD1	43,0 μM	45,2 μM
HEPG-2	147,0 μM	105,5 μM

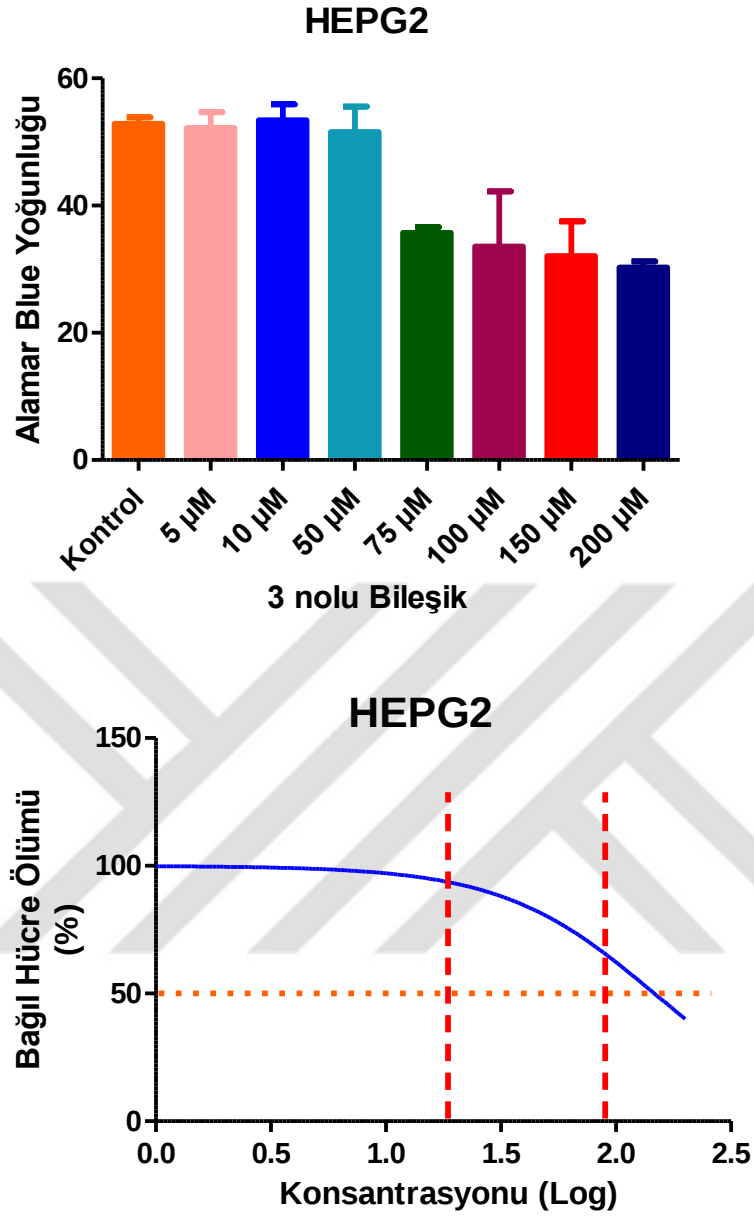
İnsan akciğer kanseri hücre hattı A-549, kolon kanseri hücre hattı DLD-1, karaciğer kanseri hücre hattı HEPG2, prostat kanseri hücre hattı PC-3 ve insan sağlıklı epitel hücre hattı PNT1A hücrelerinin optimum hücre sayısı inkübe süresi ve IC₅₀ değerlerinin hesaplanması amacıyla 96 kuyucuklu plakalara 3'lü tekrar şeklinde ekildi. Optimum hücre sayısını belirlemek amacıyla 1×10^4 hücre 96 kuyucuklu plakalara ekildi. 37 °C , % 5 CO₂ de 24 saat boyunca inkübe edildi. Hücrelerin doluluk süresini belirlemek amacıyla optimum hücre sayısında ekim yapıldı ve % 80-90 hücre doluluk oranına ulaşana kadar beklendi. Kaliks[4]aren türevlerinin A-549, DLD-1, PC-3, HEPG2 ve PNT1A hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri belirledikten sonra IC₅₀ değerini hesaplamak amacıyla hücreler 0-200 μM aralığında değişen farklı konsantrasyonlarla sentezlenen bileşiklerle etkileştirildi. 3 nolu bileşik DLD-1, A-549, HEPG2, PC-3 ve PNT1-A hücrelerinin proliferasyonunu doza bağımlı olarak etkiledi. Elde edilen sigmodial grafikler sonucunda IC₅₀ değeri hesaplandı (**Tablo 4.1**). Elde edilen veriler sonucunda 3 no'lu bileğin insan kolon kanseri hücrelerinde yüksek oranda sitotoksik etkiye sahip olduğu bulundu. Akciğer, karaciğer, prostat kanseri hücrelerinde sitotoksik etki göstermediği bulundu. Aynı zamanda normal epitel hücresi üzerinde de toksik etki göstermediği bulundu. Seçilen konsantrasyonlarda sağlıklı hücrelere zarar vermeden sadece kanserli hücrelere etki gösterdi.



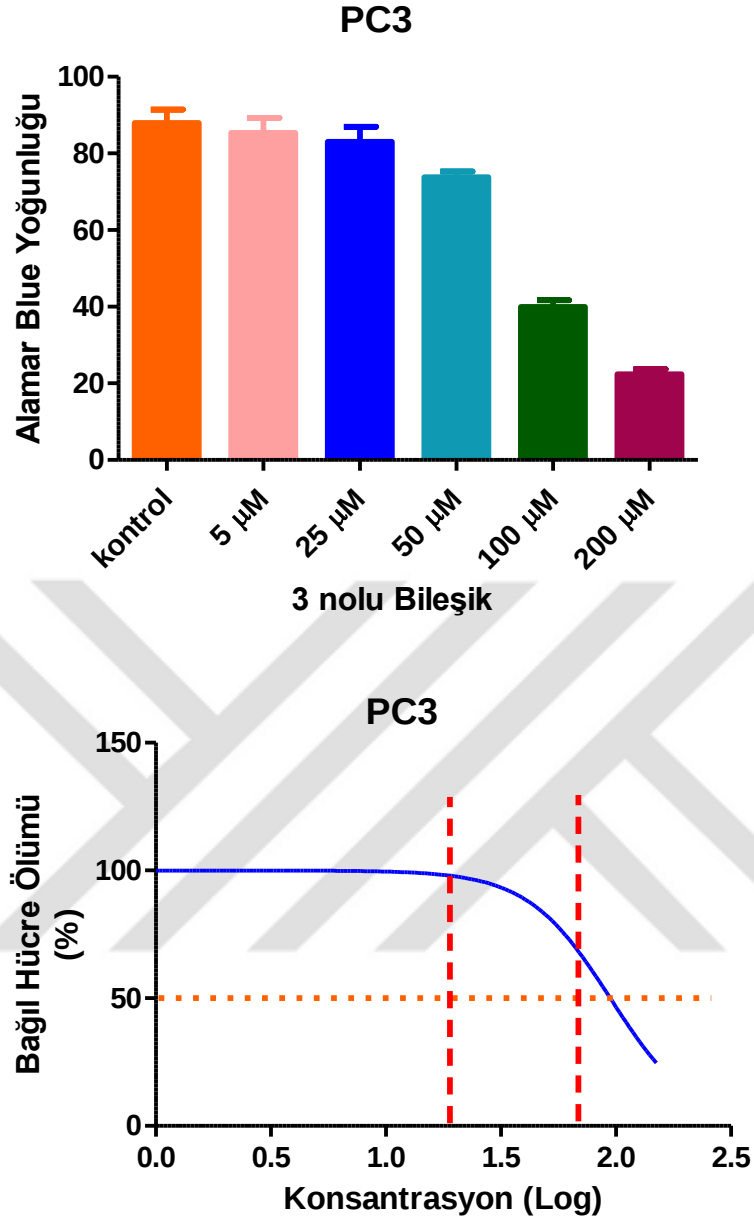
Şekil 4.12: 3 no'lu bileşiğin insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



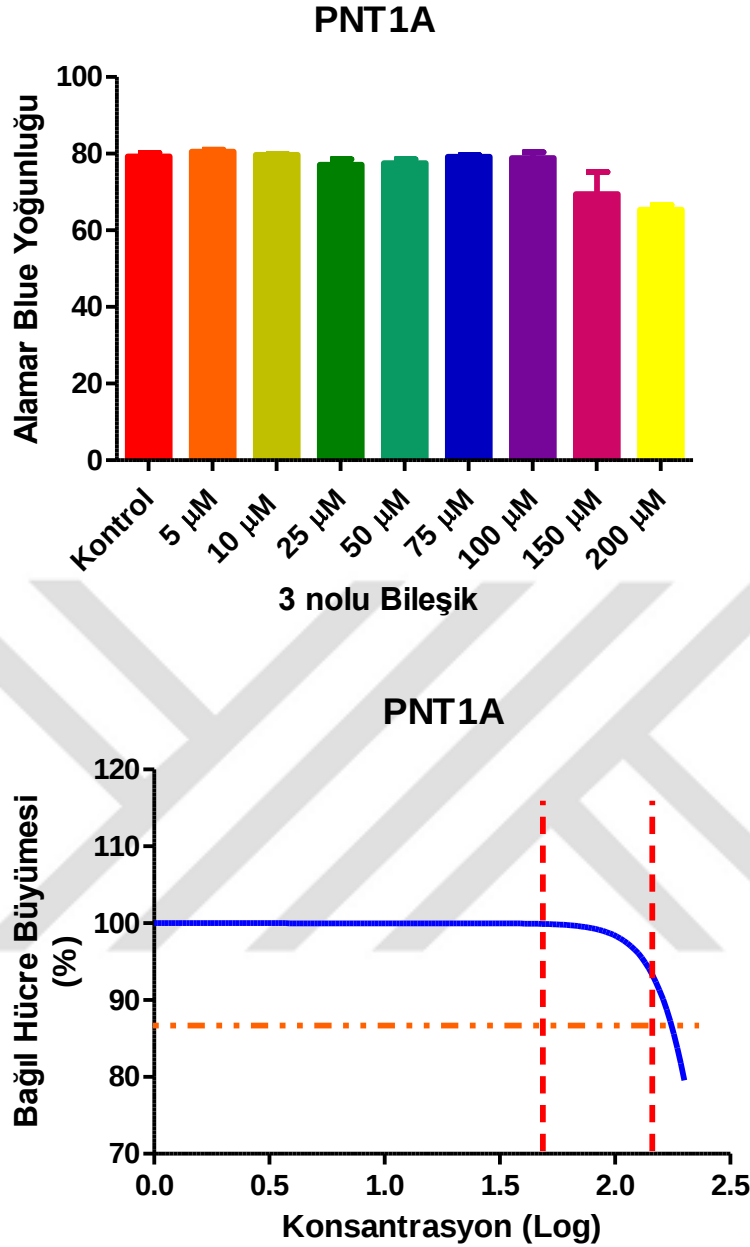
Şekil 4.13: 3 no'lu bileşiğin insan akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



Şekil 4.14: 3 no'lu bileşiğin insan karaciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri

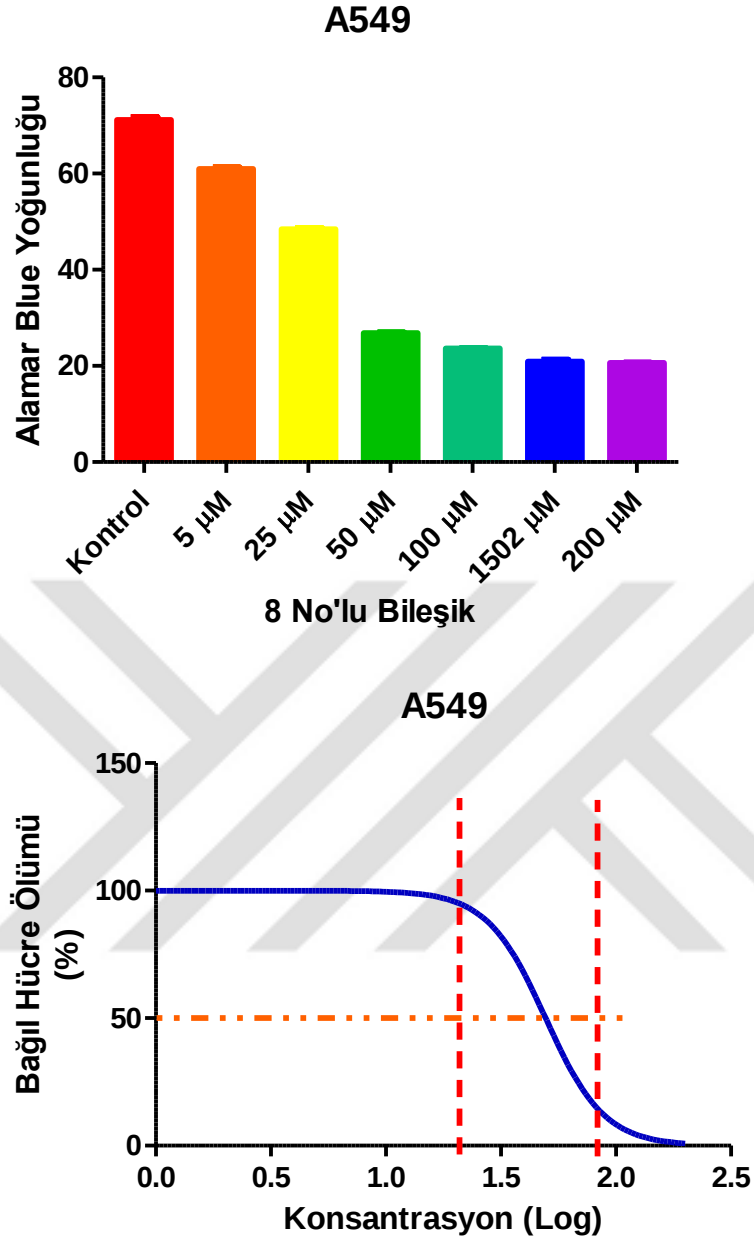


Şekil 4.15: 3 no'lu bileşiğin insan prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri

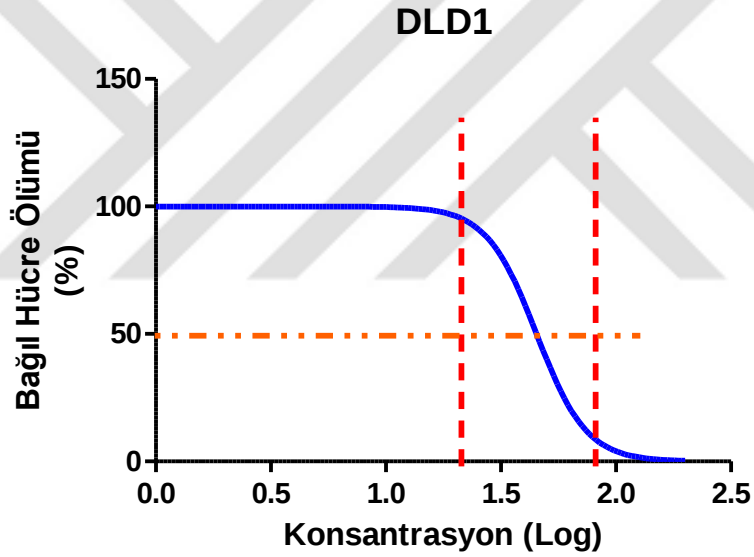
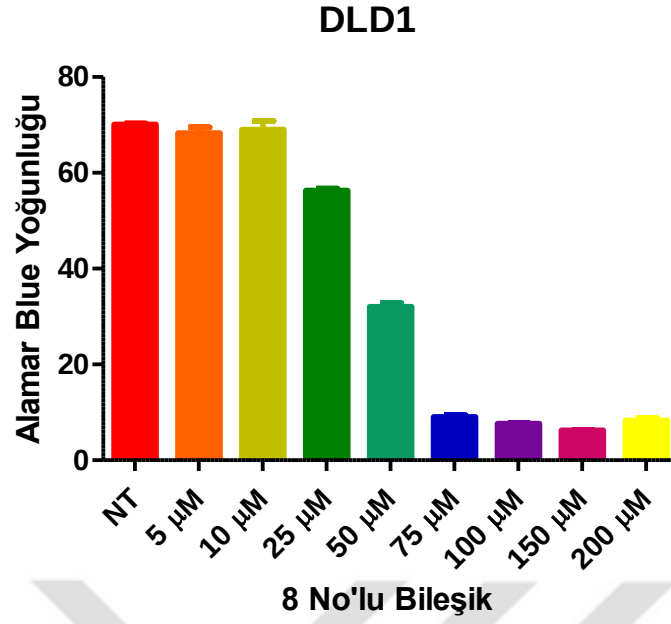


Şekil 4.16: 3 no'lu bileşiğin insan sağlıklı epitel hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri

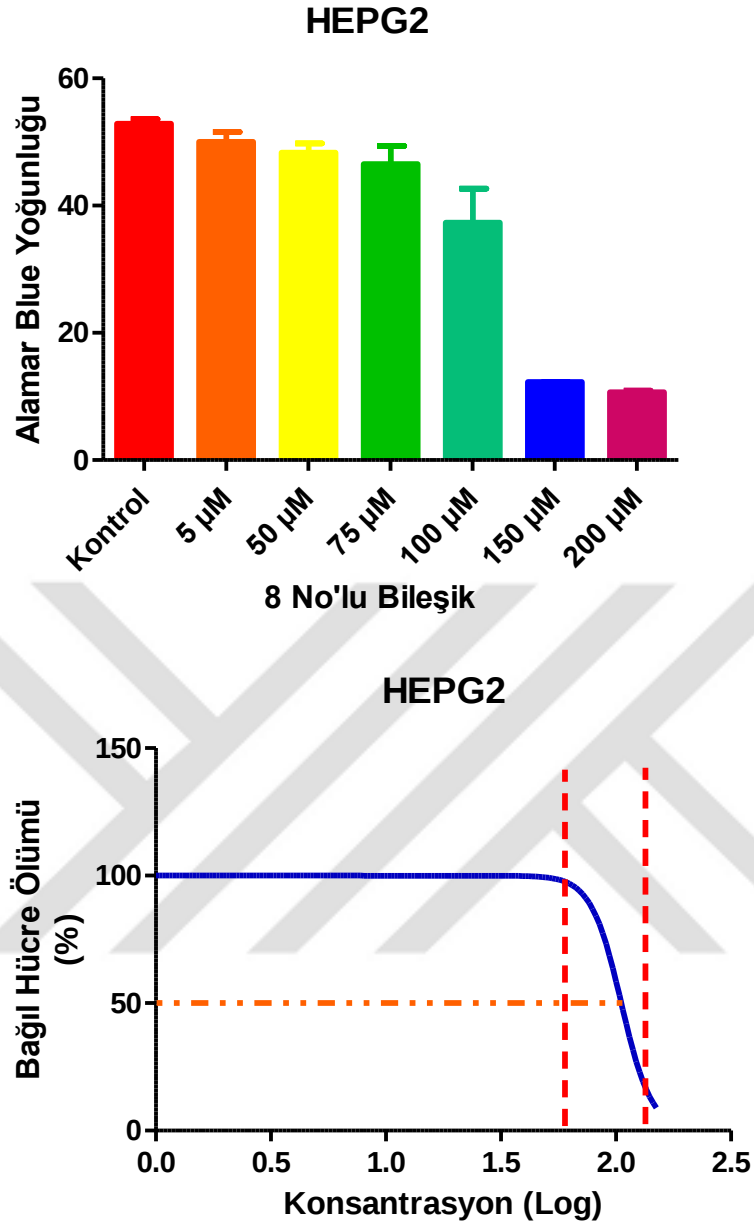
8 no'lu bileşik DLD-1, A549, HEPG2, PC-3 ve PNT1A hücrelerinin proliferasyonunu doza bağımlı olarak etkilediği bulundu. Elde edilen sigmodial grafikler sonucunda IC_{50} değeri hesaplandı (**Tablo 4.1.**). 8 no'lu bileşik insan kolon kanseri, prostat kanseri ve akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonunu yüksek oranda inhibe ettiği gözlemlendi. Karaciğer kanseri hücrelerinde çok az bir etki gösterdiği bulundu. Fakat bu bileşiğin düşük bir oran olsa da insan epitel hücrelerini de etkilediği bulundu. Tüm bunlar birlikte incelendiğinde 8 no'lu bileşiğin kanser hücreleri üzerinde toksik etkiye sahip olduğu bulundu.



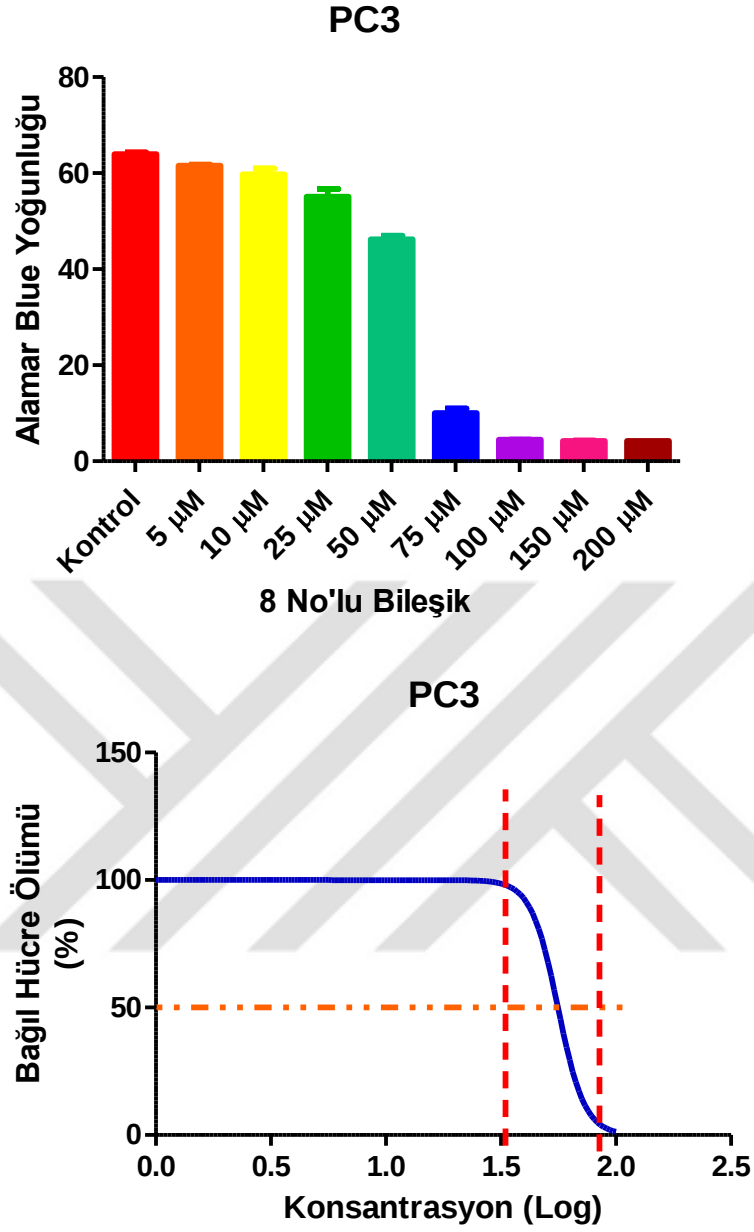
Şekil 4.17: 8 no'lu bileşiğin insan akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



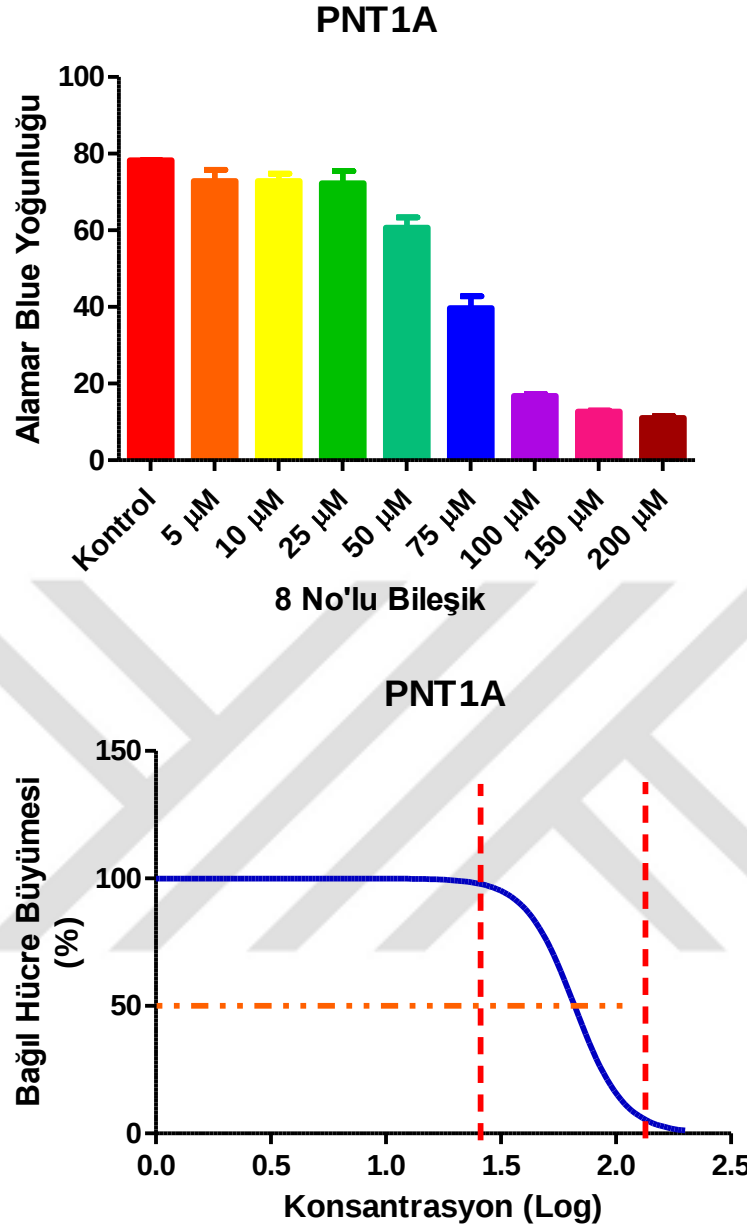
Şekil 4.18: 8 no'lu bileşiğin insan kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



Şekil 4.19: 8 no'lu bileşiğin insan karaciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



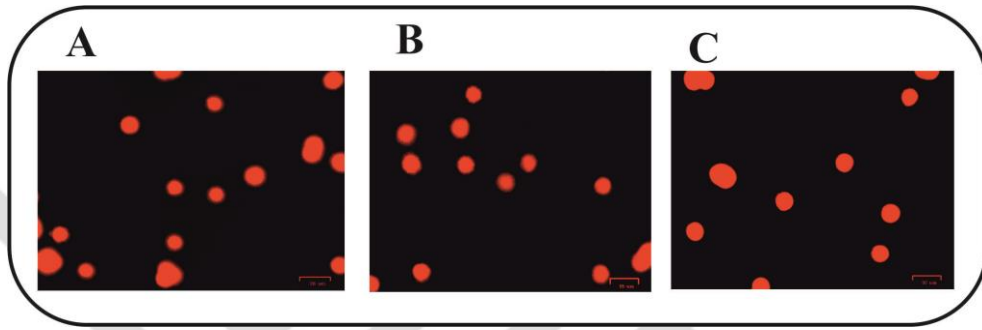
Şekil 4.20: 8 no'lu bileşiğin insan prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri



Şekil 4.21: 8 no'lu bileşiğin insan sağlıklı epitel hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkileri

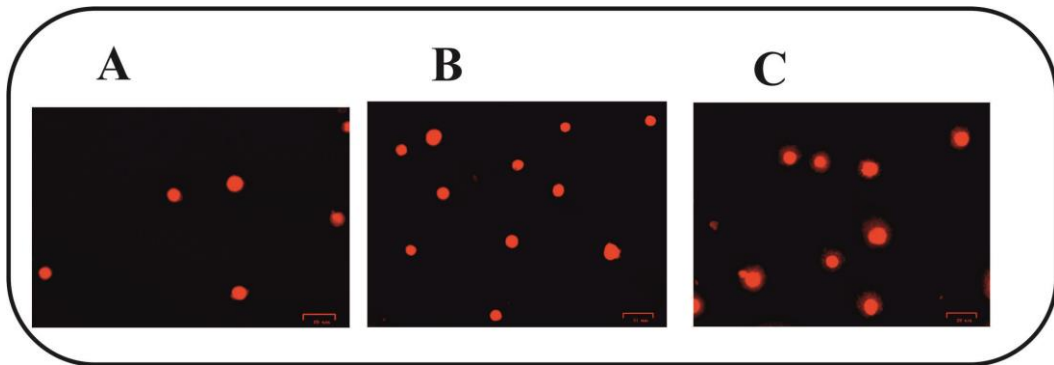
4.3. 3 ve 8 no'lu Bileşiklerin DNA Yapısı Üzerindeki Etkilerinin Aydınlatılması

Bu çalışmada 3 ve 8 no'lu bileşiğin DNA yapısı üzerine bir etkisi olup olmadığı incelendi. Çalışmalar sonucunda insan akciğer kanseri (A549), kolon kanser (DLD1), karaciğer kanseri (HEPG2), prostat kanseri (PC3) ve insan normal epitel hücresi (PNT1A) hatları 3 ve 8 no'lu bileşiklerle etkileştirilerek çalışıldı. Bunun yanında sentezlenen bileşiklerle muamele edilmeyen kontrol grubu bırakıldı.



Şekil 2.22: Kolon kanseri hücre hattı (DLD1) A) Kontrol grubu, B) 3 no'lu bileşiğin DNA kırığı üzerindeki etkisi, C) 8 no'lu bileşiğin DNA kırığı üzerindeki etkisi

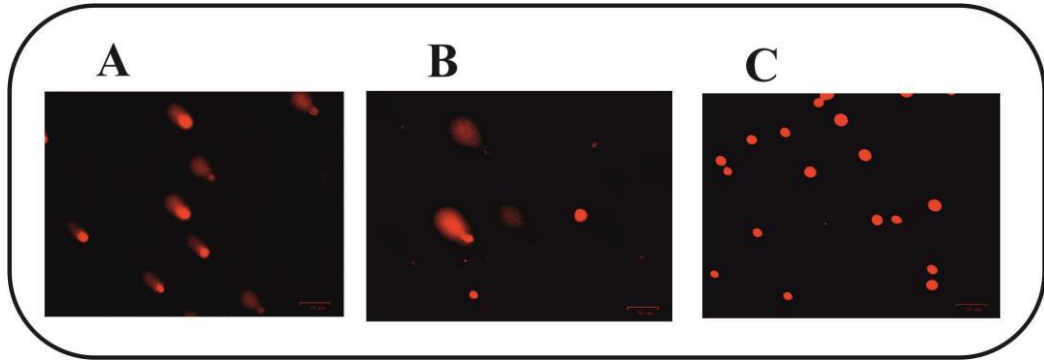
Kolon kanseri hücre hattında DNA kırığına rastlanmamıştır. 3 no'lu bileşik ve 8 no'lu bileşik kolon kanseri hücrelerinde DNA hasarına neden olmamıştır. 3 ve 8 no'lu bileşik içermeyen kontrol grubunda yani hücrenin kendisinde bir DNA hasarı oluşmamıştır.



Şekil 4.23: Karaciğer kanseri (HEPG2) hücre hattı üzerinde DNA kırığının etkisi A) Kontrol grubu B) 3 no'lu bileşik C) 8 no'lu bileşik

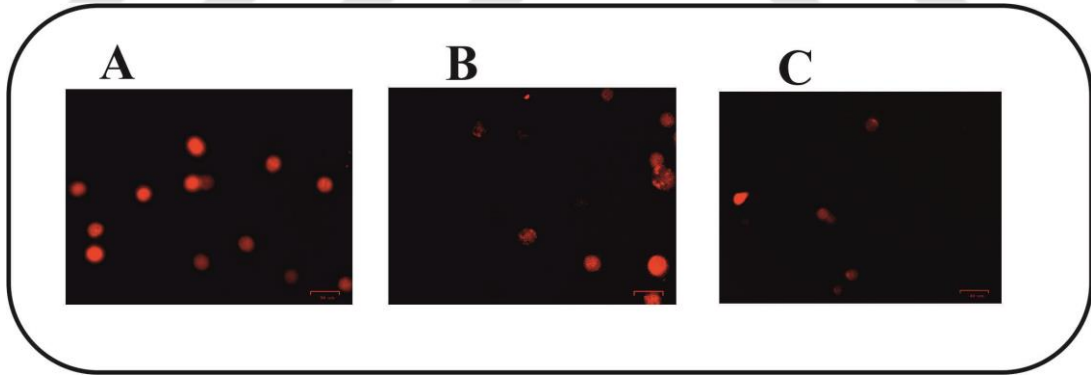
Karaciğer kanseri hücre hattında (HEPG2) 3 ve 8 no'lu ile muamele edilmemiş kontrol grubunda DNA hasarı meydana gelmemiştir. 3 no'lu bileşik ile muamele

edilmesi sonucunda da DNA kırığı oluşmamıştır. 8 no'lu bileşik ile muamele edilmiş hücrede tip 2 derecesinde bir DNA hasarı oluşmuştur.



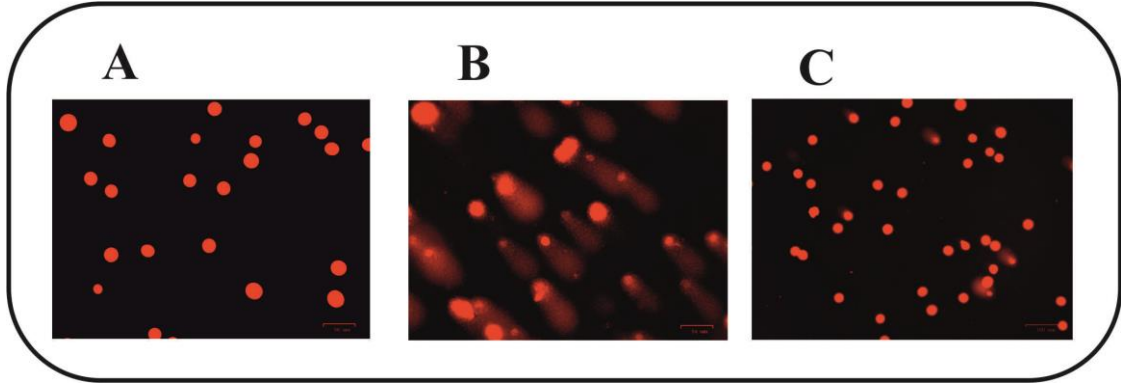
Şekil 4.24: Akciğer kanseri (A549) hücre hattında DNA kırığının etkileri A) Kontrol grubu B) 3 no'lu bileşik C) 8 no'lu bileşik

İnsan akciğer kanseri hücre hattında 3 ve 8 no'lu bileşik ile muamele görmemiş kontrol grubunda tip 3 şeklinde bir DNA hasarı görülmektedir. 3 no'lu bileşik ile muamele edilen hücrelerde tip 4 şeklinde DNA kırığı meydana gelmiştir. 8 no'lu bileşik ile muamele edilmiş hücrede ise DNA kırığı gözlenmemiştir.



Şekil 4.25: Prostat kanseri (PC3) hücre hattı A) Kontrol grubu B) 3 no'lu bileşiğin DNA kırığı üzerindeki etkileri C) 8 no'lu bileşiğin DNA kırığı üzerindeki etkileri

Prostat kanseri hücre hattının kontrol grubunda, 3 ve 8 no'lu bileşik muamele edilmiş hücrelerde DNA hasarı görülmemiştir.

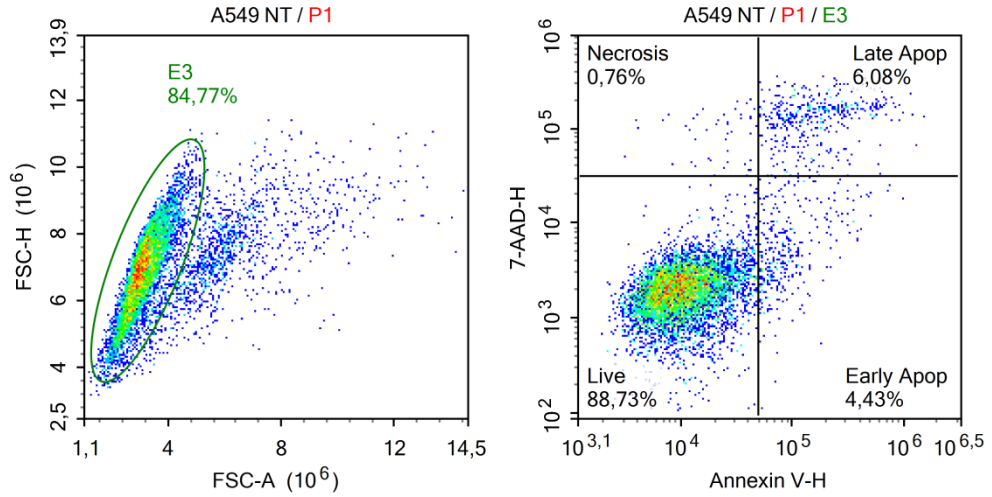


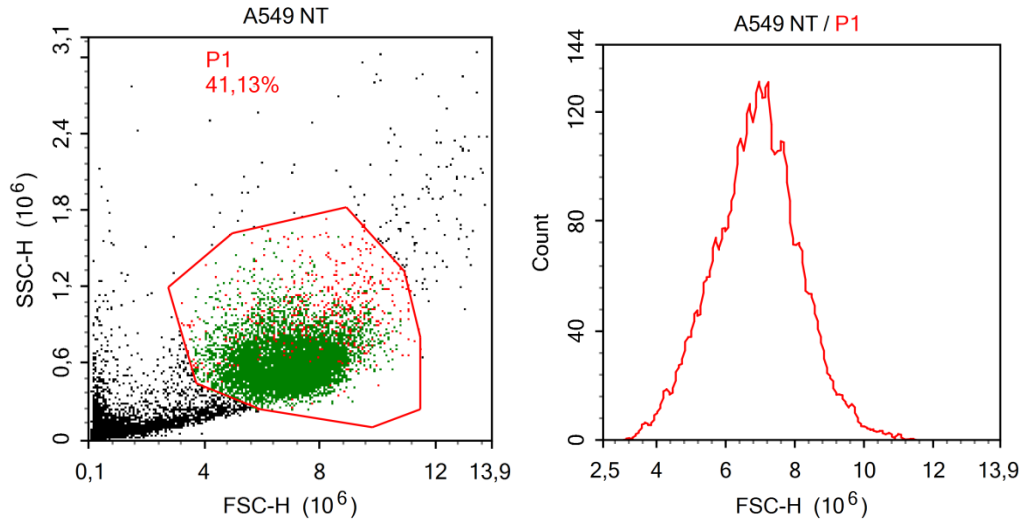
Şekil 4.26: Normal prostat epitel hücresi (PNT1A) A) Kontrol grubu B) **3** no.2lu bileşiğin DNA kırığı üzerindeki etkileri C) **8** no'lu bileşiğin etkileri

Normal epitel prostat hücre hattının kontrol grubu ve **8** no'lu bileşik ile muamele edilen hücre de DNA hasarı gözlenmemiştir. **3** no'lu bileşik ile muamele edilmiş olan hücre de tip 4 şeklinde bir hasar meydana geldiği gözlenmiştir.

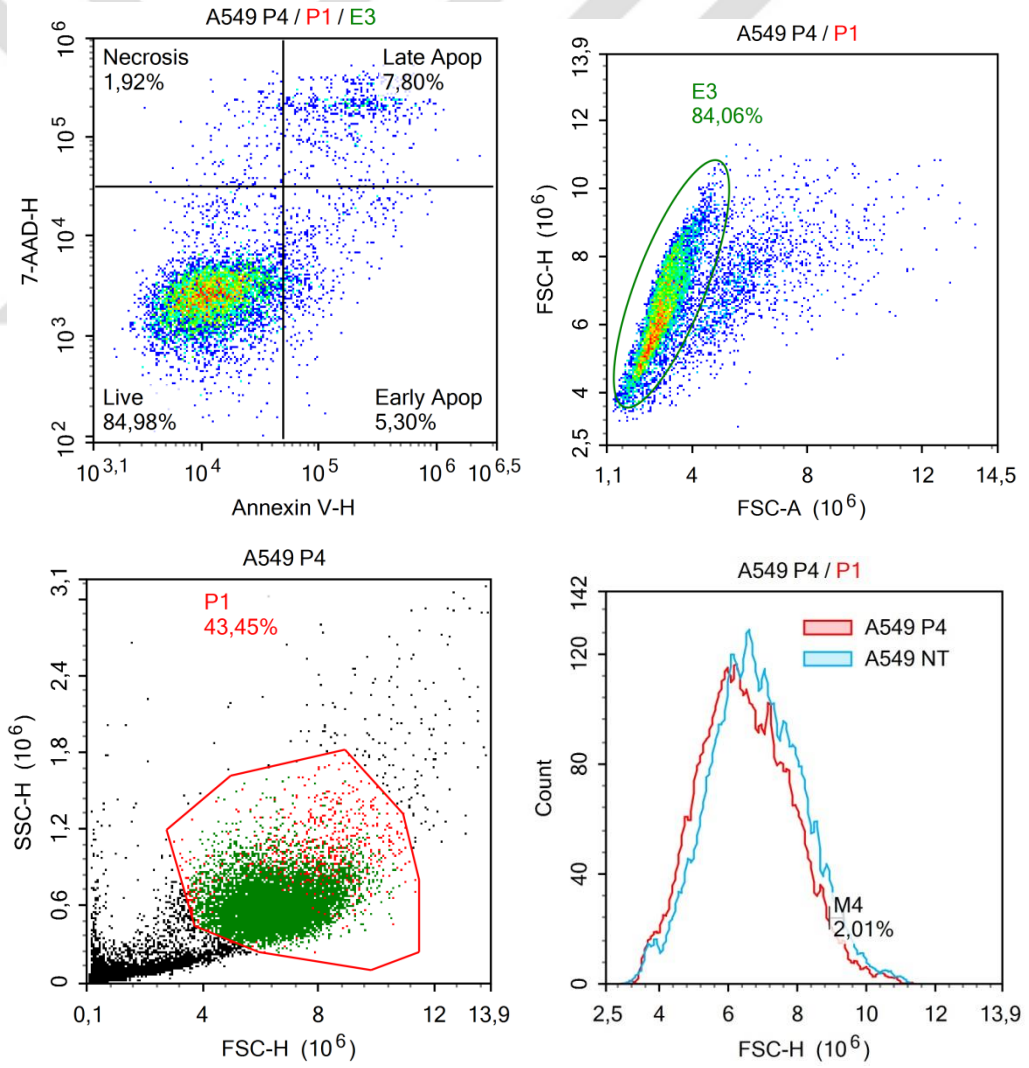
4.4. 3 ve 8 no'lu Bileşiklerin Flow Sitometre Çalışmaları

Bu çalışma da **3** ve **8** no'lu bileşik ile muamele edilen insan karaciğer, akciğer, prostat, kolon kanseri ve insan normal epitel hücreleri üzerinde apoptoz etkileri incelendi.

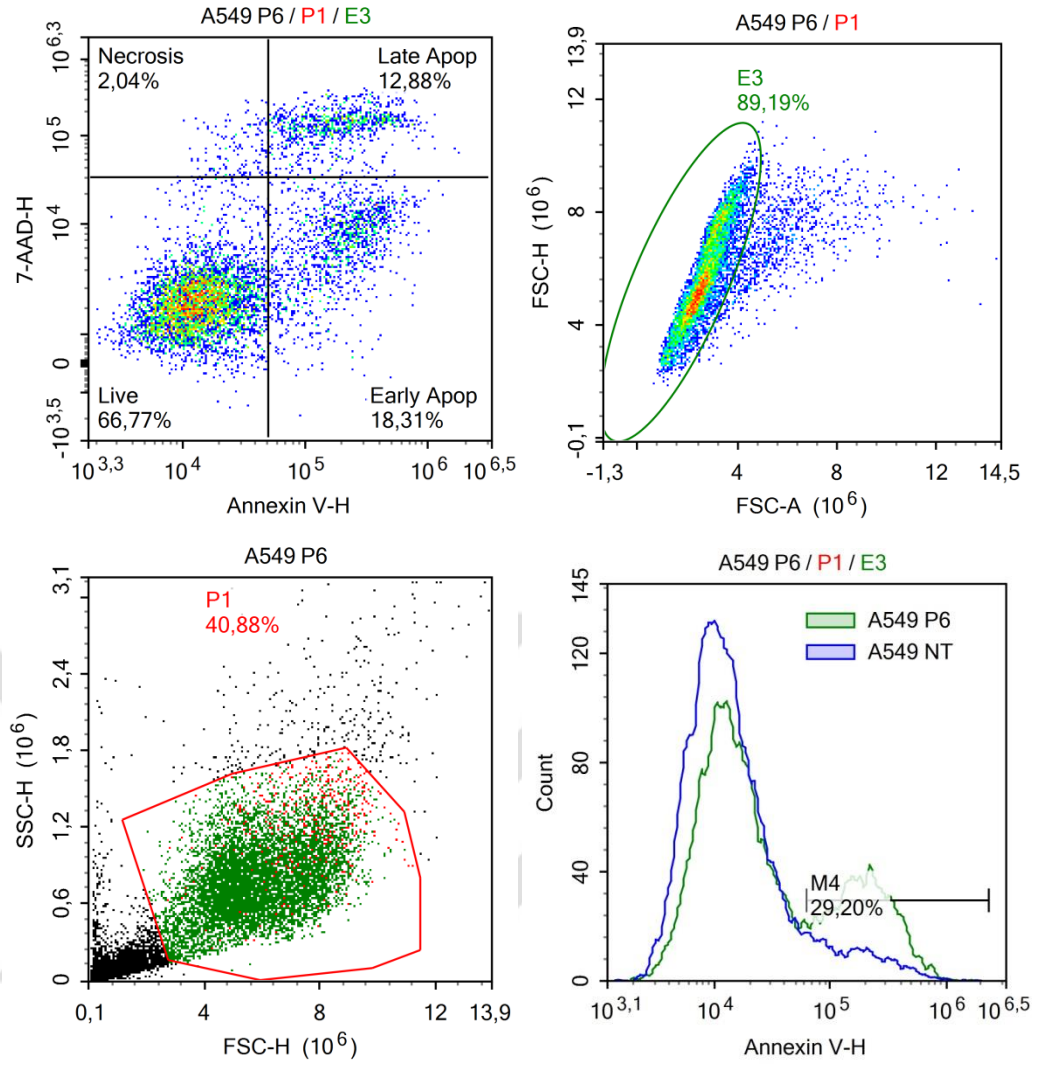




Şekil 4.27: A549 Akciğer kanseri kontrol grubu flow sonuçları

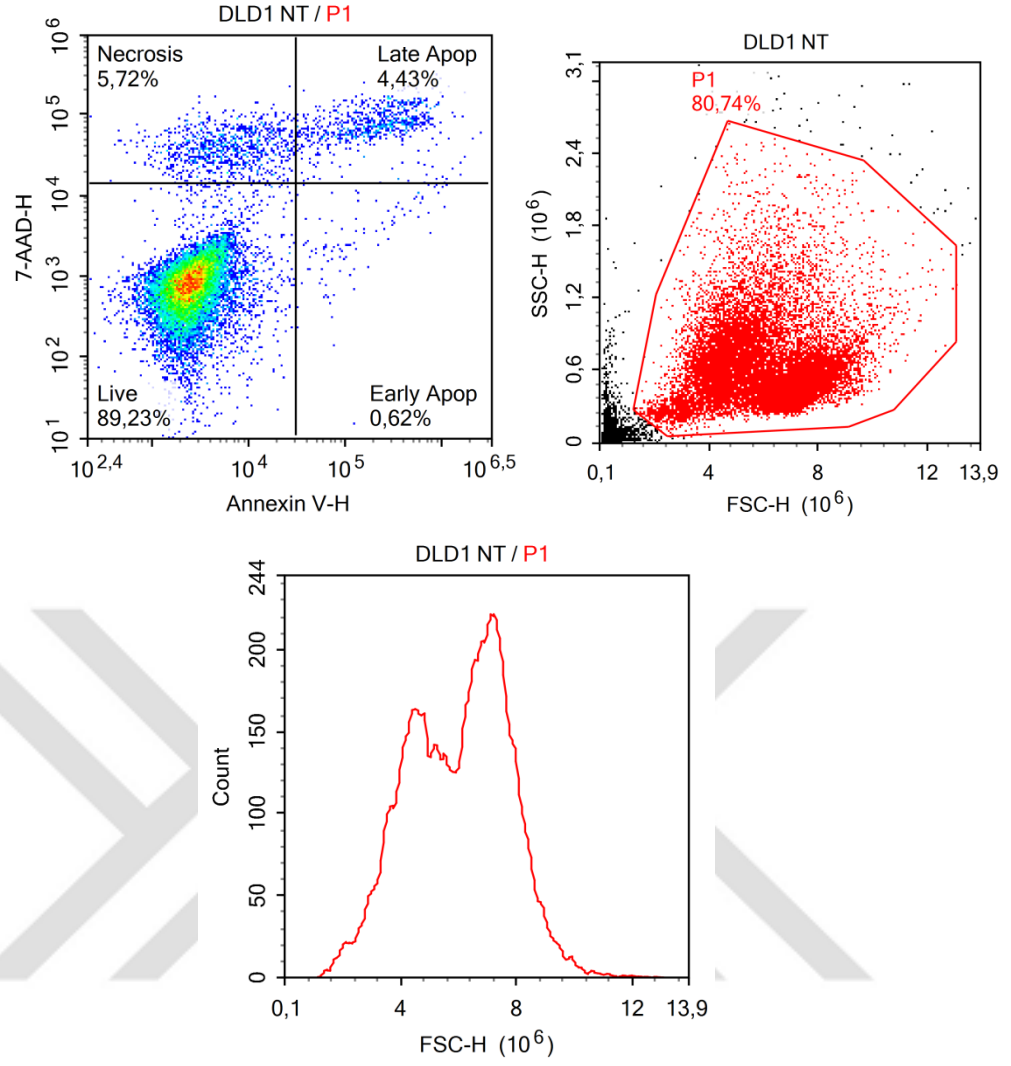


Şekil 4.28: 3 no'lu bileşiğin akciğer kanseri üzerindeki flow sonuçları

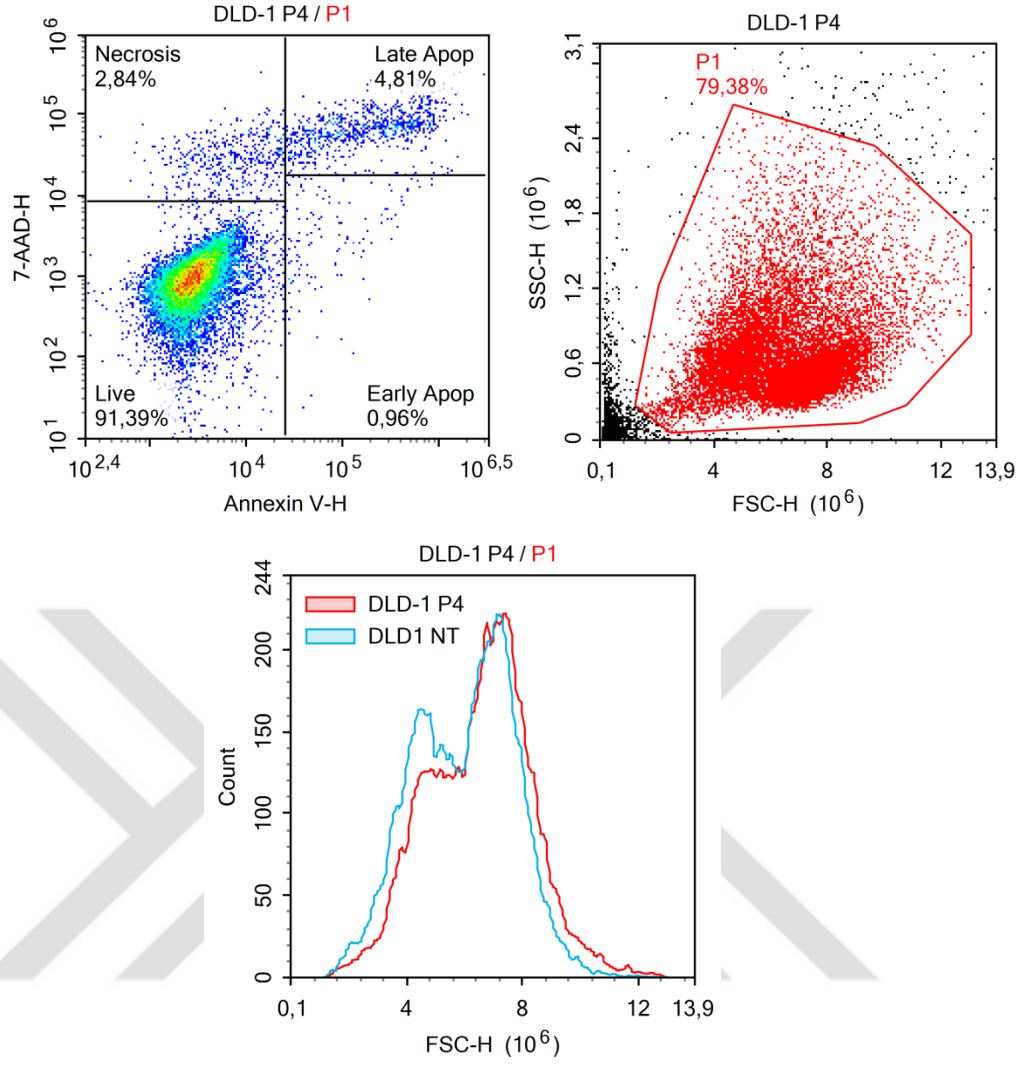


Şekil 4.29: 8 no'lu bileşiğin akciğer kanseri hücre hattında flow sonuçları

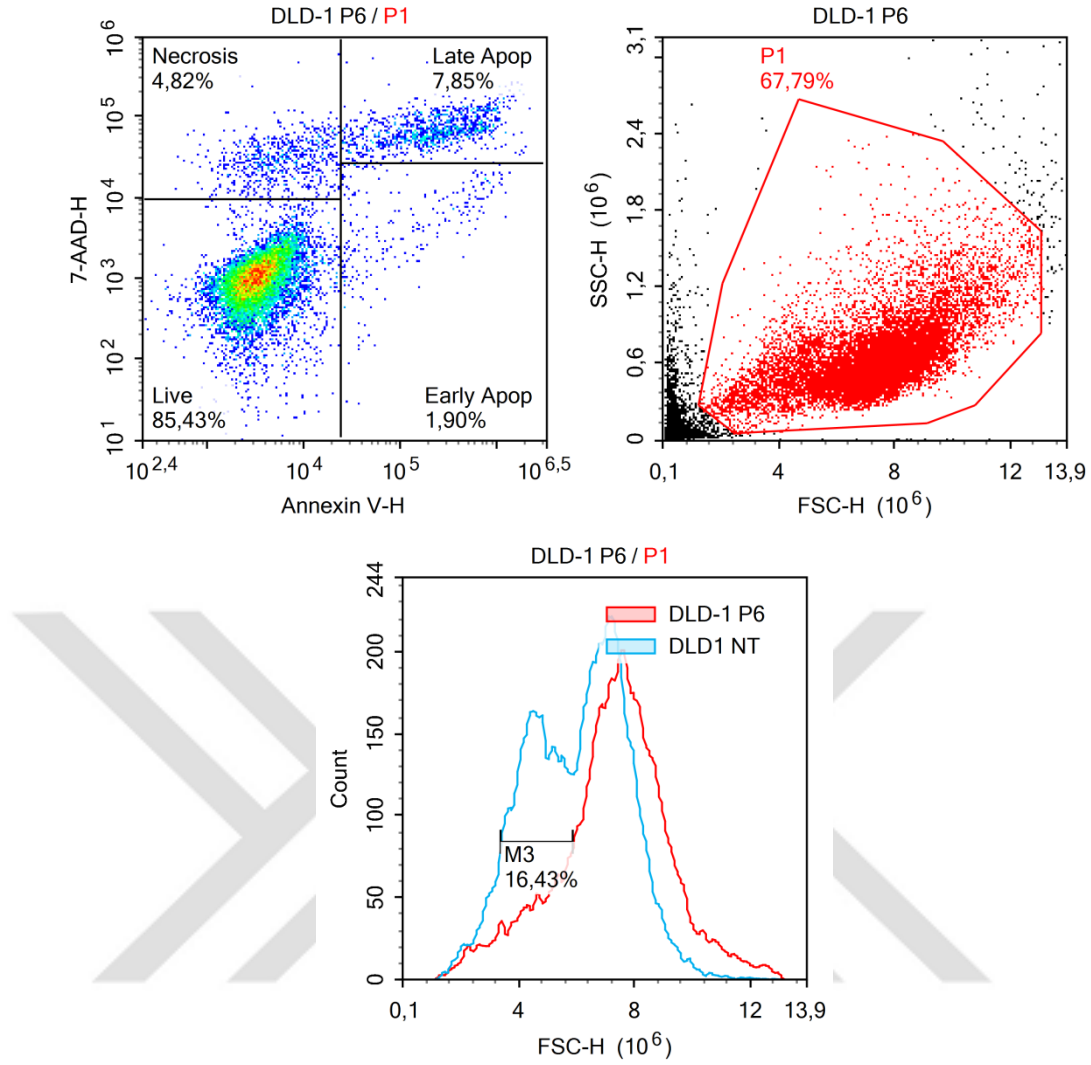
3 no'lu bileşiğin insan akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki flow sonuçlarına göre 3 no'lu bileşiğin hücre döngüsünü engelleyerek hücre çoğalmasını durdurduğu gözlemlendi. Akciğer kanseri hücre hattı A549, 3 ve 8 no'lu bileşik ile muamele edilmemiş kontrol grubu % 4,4 erken apoptoz, % 6.08 geç apoptoza uğradığı gözlemlendi. 3 no'lu bileşik ile muamele edilen hücreler %5.30 erken apoptoz, %7.8 geç apoptoz olduğu bulundu. 8 no'lu bileşikte ise %18,2 erken apoptoz, %12,9 geç apoptoza uğradığı gözlemlendi.



Şekil 4.30: DLD1 kolon kaneri hücre hattı kontrol grubu flow sonuçları



Şekil 4.31: 3 no'lu bileşiğin kolon kanseri hücre hattı üzerindeki etkilerinin flow sonucu



Şekil 4.32: 8 no'lu bileşiğin kolon kanseri hücre hattındaki flow sonuçları

3 ve 8 no'lu bileşik ile etkileştirilmiş kontrol grubu hücrelerinin % 0.6 erken apoptoz, % 4.43 geç apoptoza sürüklendiği bulundu. 3 no'lu bileşik ile etkileştirilmiş kolon kanseri hücre hattı % 0.96 erken, % 4.8 geç apoptoza neden olduğu bulundu. 8 no'lu bileşik ile etkileştirilmiş hücreler % 1.9 erken apoptoz, % 7.85 geç apoptoza neden olduğu bulundu.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada sekonder bir amin ve aynı zamanda önemli bir aminoasit olan L-prolin Mannich tepkimesi koşullarında kaliks[4]arene fenolik birimlerin p-konumundan modifiye edilerek sentezlendi.
- Kaliks[4]aren tetraester türevi sentezlendikten sonra, tetraklörür türevine dönüştürüldü daha sonra bu bileşik L-prolinmetil ester ile etkileştirildi. Sentezlenen ester bileşiğinin hidrolizi ile hedeflenen bileşik olan kaliks[4]arenin tetra prolin türevi elde edildi.
- Sentezlenen bütün bileşiklerin yapıları FTIR, ¹H NMR, ¹³C NMR ve elementel analiz teknikleri ile aydınlatıldı.
- Sentezlenen bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerinde sitotoksik etkileri, DNA yapısı üzerindeki etkileri ve hücre ölüm mekanizması (apoptoz) incelendi.
- **3** ve **8** no'lu bileşikler dört farklı kanser hücresi ve epitel hücresi dahil beş hücrede sitotoksik etkileri incelendi ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bulundu.
- **3** no'lu bileşiğin insan kolon kanseri hücresinde yüksek değerde bir sitotoksik etki gösterdiği ve insan karaciğer, akciğer, prostat kanseri hücrelerinde ve sağlıklı epitel hücresinde toksik etki göstermediği bulundu.
- **8** no'lu bileşik insan kolon, akciğer, prostat kanseri hücreleri üzerinde toksik etki gösterdiği bulundu. Karaciğer kanser hücresine ise çok az etki gösterdiği gözlemlendi. **8** no'lu bileşik aynı zamanda insan sağlıklı epitel hücresinde de toksik etki gösterdiği gözlemlendi.
- Seçilen konsantrasyon aralıklarında **3** no'lu bileşik epitel hücresinde toksik bir etki göstermezken, **8** no'lu bileşik az da olsa toksik etki gösterdiği gözlemlenmiştir.
- İnsan akciğer kanseri hücre hattında **3** no'lu bileşiğin DNA hasarına neden olduğu ve **8** no'lu bileşiğin hücreye hasar vermediği bulundu.
- İnsan kolon ve prostat kanseri hücre hatlarında **3** ve **8** no'lu bileşiğin DNA kırığına neden olmadığı bulundu
- Karaciğer kanseri hücre hattında ise **8** no'lu bileşiğin DNA hasarına neden olduğu, **3** no'lu bileşiğin hasar vermediği bulundu.

- Normal prostat epitel hücre hattında **3** no'lu bileşiğin DNA hasarına neden olduğu, **8** no'lu bileşiğin bir etki göstermediği bulundu.
- Apoptoz çalışmaları için **3** ve **8** no'lu bileşiklerle etkileştirilmiş insan akciğer, karaciğer, kolon, prostat kanseri ve insan normal epitel hücrelerinden IC₅₀ değerlerinin en düşük olanları seçildi. Bunun sonucunda akciğer ve kolon kanseri hücrelerinde flow sitometresi çalışmaları yapıldı.
- Flow sitometre çalışmaları sonucunda kolon kanseri hücre hattında **3** no'lu bileşik kontrol grubuna göre 1,5 kat erken apoptoz, 2 kat geç apoptoz ve **8** no'lu bileşik 3 kat daha erken apoptoz, 1,7 kat geç apoptoza neden olduğu gözlemlendi.
- Akciğer kanseri hücre hattında ise **3** no'lu bileşik kontrol grubuna oranla 1,2 kat erken ve geç apoptoza, **8** no'lu bileşik ise 4 kat erken apoptoz, 2 kat geç apoptoza neden olduğu bulundu.

KAYNAKLAR

- Akceylan, E. ve Yilmaz, M., 2011, Synthesis of calix[4]arene alkylamine derivatives as new phase-transfer catalysts for esterification reaction, *Tetrahedron*, 67 (34), 6240-6245.
- Akceylan, E., Uyanik, A., Eymur, S., Sahin, O. ve Yilmaz, M., 2015, Calixarene-proline functionalized iron oxide magnetite nanoparticles (Calix-Pro-MN): An efficient recyclable organocatalyst for asymmetric aldol reaction in water, *Applied Catalysis a-General*, 499, 205-212.
- Alam, I., Sharma, S. K. ve Gutsche, C. D., 1994, Calixarenes .38. The Quinonemethide Route to Monosubstituted and Tetrasubstituted Calix[4]Arenes, *Journal of Organic Chemistry*, 59 (13), 3716-3720.
- Alberg, A. J. ve Samet, J. M., 2003, Epidemiology of lung cancer, *Chest*, 123 (1), 21s-49s.
- An, L., Han, L.-L., Zheng, Y.-G., Peng, X.-N., Xue, Y.-S., Gu, X.-K., Sun, J. ve Yan, C.-G., 2016, Synthesis, X-ray crystal structure and anti-tumor activity of calix[n]arene polyhydroxyamine derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 123, 21-30.
- Arduini, A., Manfredi, G., Pochini, A., Sicuri, A. R. ve Ungaro, R., 1991, Selective Formylation of Calix[4]Arenes at the Upper Rim and Synthesis of New Cavitands, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* (14), 936-937.
- Arnaud-Neu, F. ve Schwing-Weill, M. J., 1997, Calixarenes, new selective molecular receptors, *Synthetic Metals*, 90 (3), 157-164.
- Astimalerji.com, 2014, <http://www.astimalerji.com/akciger-kanserinde-tedavi/>, [Ziyaret Tarihi: 6 Mayıs 2018].
- Bayrakçı, M., Ertul, Ş. ve Yilmaz, M., 2009, Synthesis of di-substituted calix[4]arene-based receptors for extraction of chromate and arsenate anions, *Tetrahedron*, 65 (38), 7963-7968.
- Becker, T., Goh, C. Y., Jones, F., McIldowie, M. J., Mocerino, M. ve Ogden, M. I., 2008, Proline-functionalised calix[4]arene: an anion-triggered hydrogelator, *Chemical Communications* (33), 3900-3902.
- Benignus, V. A. ve Coleman, T. G., 2010, Simulations of exercise and brain effects of acute exposure to carbon monoxide in normal and vascular-diseased persons, *Inhalation Toxicology*, 22 (5), 417-426.
- Beshara, C. S., Jones, C. E., Daze, K. D., Lilgert, B. J. ve Hof, F., 2010, A Simple Calixarene Recognizes Post-translationally Methylated Lysine, *Chembiochem*, 11 (1), 63-66.
- Cabibbo, G. ve Craxi, A., 2009, Needle track seeding following percutaneous procedures for hepatocellular carcinoma, *World J Hepatol*, 1 (1), 62-66.
- Carlton-Smith, C., Holmes, J. A., Naggie, S., Lidofsky, A., Lauer, G. M., Kim, A. Y., Chung, R. T. ve Grp, A. A. S., 2018, IFN-free therapy is associated with restoration of type I IFN response in HIV-1 patients with acute HCV infection who achieve SVR, *Journal of Viral Hepatitis*, 25 (5), 465-472.
- Chin, J. L. ve Reiter, R. E., 2004, Molecular Markers and Prostate Cancer Prognosis, *Clinical Prostate Cancer*, 3 (3), 157-164.
- Combes, J. D., Heard, I., Poizot-Martin, I., Canestri, A., Lion, A., Piroth, L., Didelot, J. M., Ferry, T., Patey, O., Marchand, L., Flejou, J. F., Clifford, G. M., Etienney, I. ve Grp, A. E. A. S., 2018, Prevalence and Risk Factors for Anal Human

- Papillomavirus Infection in Human Immunodeficiency Virus-Positive Men Who Have Sex with Men, *Journal of Infectious Diseases*, 217 (10), 1535-1543.
- Consoli, G. M. L., Granata, G., Fragassi, G., Grossi, M., Sallese, M. ve Geraci, C., 2015, Design and synthesis of a multivalent fluorescent folate-calix[4]arene conjugate: cancer cell penetration and intracellular localization, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13 (11), 3298-3307.
- Deligoz, H. ve Ercan, N., 2002, The synthesis of some new derivatives of calix[4]arene containing azo groups, *Tetrahedron*, 58 (14), 2881-2884.
- Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M. S. ve Pfeifer, G. P., 1996, Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53, *Science*, 274 (5286), 430-432.
- Dings, R. P. M., Chen, X. M., Hellebrekers, D. M. E. I., van Eijk, L. I., Zhang, Y., Hoyer, T. R., Griffioen, A. W. ve Mayo, K. H., 2006, Design of nonpeptidic topomimetics of antiangiogenic proteins with antitumor activities, *Journal of the National Cancer Institute*, 98 (13), 932-936.
- Dings, R. P. M., Levine, J. I., Brown, S. G., Astorgues-Xerri, L., MacDonald, J. R., Hoyer, T. R., Raymond, E. ve Mayo, K. H., 2013, Polycationic calixarene PTX013, a potent cytotoxic agent against tumors and drug resistant cancer, *Investigational New Drugs*, 31 (5), 1142-1150.
- Eymur, S., Akceylan, E., Sahin, O., Uyanik, A. ve Yilmaz, M., 2014, Direct enantioselective aldol reactions catalyzed by calix[4]arene-based L-proline derivatives in the water, *Tetrahedron*, 70 (30), 4471-4477.
- Fadeel, B. ve Orrenius, S., 2005, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease, *Journal of Internal Medicine*, 258 (6), 479-517.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L. ve O'Neill, K. L., 1995, The comet assay: a comprehensive review, *Mutat Res*, 339 (1), 37-59.
- Gibbs, C. G. ve Gutsche, C. D., 1993, Calixarenes .31. Synthesis and Conformation of P-Tert-Butyltetramercaptocalix[4]Arene, *Journal of the American Chemical Society*, 115 (12), 5338-5339.
- Gutsche, C. D., Dhawan, B., No, K. H. ve Muthukrishnan, R., 1981, Calixarenes .4. The Synthesis, Characterization, and Properties of the Calixarenes from Para-Tert-Butylphenol, *Journal of the American Chemical Society*, 103 (13), 3782-3792.
- Gutsche, C. D., Dhawan, B., Levine, J. A., No, K. H. ve Bauer, L. J., 1983, Calixarenes-9 - Conformational Isomers of the Ethers and Esters of Calix[4]Arenes, *Tetrahedron*, 39 (3), 409-426.
- Gutsche, C. D. ve Pagoria, P. F., 1985, Calixarenes .16. Functionalized Calixarenes - the Direct Substitution Route, *Journal of Organic Chemistry*, 50 (26), 5795-5802.
- Gutsche, C. D. ve Lin, L. G., 1986, Calixarenes .12. The Synthesis of Functionalized Calixarenes, *Tetrahedron*, 42 (6), 1633-1640.
- Gutsche, C. D. ve Nam, K. C., 1988, Calixarenes .22. Synthesis, Properties, and Metal Complexation of Aminocalixarenes, *Journal of the American Chemical Society*, 110 (18), 6153-6162.
- Gutsche, C. D., Alam, I., Iqbal, M., Mangiafico, T., Nam, K. C., Rogers, J. ve See, K. A., 1989, Topics in Calixarene Chemistry, *Journal of Inclusion Phenomena*, 7 (1), 61-72.
- Gutsche, C. D. ve Iqbal, M., 1990, Para-Tert-Butylcalix[4]Arene, *Organic Syntheses*, 68, 234-237.

- Hamada, F., Bott, S. G., Orr, G. W., Coleman, A. W., Zhang, H. M. ve Atwood, J. L., 1990, Thiocalix[4]Arenes .1. Synthesis and Structure of Ethylthiocalix[4]Arene Methyl-Ether and the Related Structure of Bromocalix[4]Arene Methyl-Ether, *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry*, 9 (3), 195-206.
- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R. ve Bullock, P., 2004, Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening, *Toxicology in Vitro*, 18 (5), 703-710.
- Hayatisaglik.com , 2016, <https://www.hayatisaglik.com/hastaliklar/kolon-kanserindeevrelendirme.html> , [Ziyaret Tarihi: 6 Mayıs 2018].
- Hellerstedt, B. A. ve Pienta, K. J., 2002, The current state of hormonal therapy for prostate cancer, *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 52 (3), 154-179.
- Hengartner, M. O., Ellis, R. E. ve Horvitz, H. R., 1992, Caenorhabditis-Elegans Gene Ced-9 Protects Cells from Programmed Cell-Death, *Nature*, 356 (6369), 494-499.
- Hulikova, K., Grobarova, V., Krivohlava, R. ve Fiserova, A., 2010, Antitumor Activity of N-Acetyl-D-glucosamine-Substituted Glycoconjugates and Combined Therapy with Keyhole Limpet Hemocyanin in B16F10 Mouse Melanoma Model, *Folia Microbiologica*, 55 (5), 528-532.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. ve Forman, D., 2011, Global Cancer Statistics, *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 61 (2), 69-90.
- Joseph, R. ve Rao, C. P., 2011, Ion and molecular recognition by lower rim 1,3-di-conjugates of calix[4]arene as receptors, *Chemical Reviews*, 111 (8), 4658-4702.
- Karakurt, S. ve Adali, O., 2016, Tannic Acid Inhibits Proliferation, Migration, Invasion of Prostate Cancer and Modulates Drug Metabolizing and Antioxidant Enzymes, *Anticancer Agents Med Chem*, 16 (6), 781-789.
- Karaciger.gen.tr , 2014, <https://www.karaciger.gen.tr/karaciger-kanseri-evreleri.html>, [Ziyaret Tarihi: 6 Mayıs 2018].
- Kumagai, J., Fujimura, T., Takahashi, S., Urano, T., Ogushi, T., Horie-Inoue, K., Ouchi, Y., Kitamura, T., Muramatsu, M., Blumberg, B. ve Inoue, S., 2007, Cytochrome P450 2B6 is a growth-inhibitory and prognostic factor for prostate cancer, *Prostate*, 67 (10), 1029-1037.
- Lamartine, R., Tsukada, M., Wilson, D. ve Shirata, A., 2002, Antimicrobial activity of calixarenes, *Comptes Rendus Chimie*, 5 (3), 163-169.
- Lappchen, T., Dings, R. P. M., Rossin, R., Simon, J. F., Visser, T. J., Bakker, M., Walhe, P., van Mourik, T., Donato, K., van Beijnum, J. R., Griffioen, A. W., Lub, J., Robillard, M. S., Mayo, K. H. ve Grull, H., 2015, Novel analogs of antitumor agent calixarene 0118: Synthesis, cytotoxicity, click labeling with 2-[F-18]fluoroethylazide, and in vivo evaluation, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89, 279-295.
- Lee, M., Sup Han, W., Kyoung Kim, O., Hee Sung, S., Sun Cho, M., Lee, S. N. ve Koo, H., 2006, Prognostic value of p16INK4a and p14ARF gene hypermethylation in human colon cancer, *Pathology - Research and Practice*, 202 (6), 415-424.
- Lewandowski, R. J., Memon, K., Mulcahy, M. F., Hickey, R., Marshall, K., Williams, M., Salzig, K., Gates, V. L., Atassi, B., Vouche, M., Atassi, R., Desai, K., Hohlastos, E., Sato, K., Habib, A., Kircher, S., Newman, S. B., Nimeiri, H., Benson, A. B. ve Salem, R., 2014, Twelve-year experience of radioembolization for colorectal hepatic metastases in 214 patients: survival by era and chemotherapy, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 41 (10), 1861-1869.

- Lubin, J. H. ve Boice, J. D., 1997, Lung cancer risk from residential radon: Meta-analysis of eight epidemiologic studies, *Journal of the National Cancer Institute*, 89 (1), 49-57.
- Morzherin, Y., Rudkevich, D. M., Verboom, W. ve Reinhoudt, D. N., 1993, Chlorosulfonylated Calix[4]Arenes - Precursors for Neutral Anion Receptors with a Selectivity for Hydrogen Sulfate, *Journal of Organic Chemistry*, 58 (26), 7602-7605.
- Nagasaki, T., Tajiri, Y. ve Shinkai, S., 1993, New Water-Soluble Calixarenes Modified with Amino-Acids at the Upper Rim, *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society*, 112 (6), 407-411.
- Nasuhi Pur, F. ve Akbari Dilmaghani, K., 2014, Calixpenams: synthesis, characterization, and biological evaluation of penicillins V and X clustered by calixarene scaffold, *Turkish Journal of Chemistry*, 38 (2), 288-296.
- Oh, S. W., Moon, J. D., Lim, H. J., Park, S. Y., Kim, T., Park, J., Han, M. H., Snyder, M. ve Choi, E. Y., 2005, Calixarene derivative as a tool for highly sensitive detection and oriented immobilization of proteins in a microarray format through noncovalent molecular interaction, *Faseb Journal*, 19 (8), 1335-+.
- Ozyilmaz, E., Bayrakci, M. ve Yilmaz, M., 2016, Improvement of catalytic activity of *Candida rugosa* lipase in the presence of calix[4]arene bearing iminodicarboxylic/phosphonic acid complexes modified iron oxide nanoparticles, *Bioorganic Chemistry*, 65, 1-8.
- Palacios, E., Racotta, I. S., Aparicio, B., Arjona, O. ve Martinez-Palacios, C. A., 2007, Lipid classes and fatty acids during embryogenesis of captive and wild silverside (*Chirostoma estor estor*) from Patzcuaro Lake, *Fish Physiology and Biochemistry*, 33 (1), 81-91.
- Pauk, N., Kubik, A., Zatloukal, P. ve Krepela, E., 2005, Lung cancer in women, *Lung Cancer*, 48 (1), 1-9.
- Prostathastaligi.gen.tr .2018, <https://www.prostathastaligi.gen.tr/prostat-kanserievreleri.html>, [Ziyaret Tarihi: 6 Mayıs 2018].
- Perret, F. ve Coleman, A. W., 2011, Biochemistry of anionic calix[n]arenes, *Chemical Communications*, 47 (26), 7303-7319.
- Pilato, L., 2013, Phenolic resins: 100 Years and still going strong, *Reactive & Functional Polymers*, 73 (2), 270-277.
- Renahan, A. G., Booth, C. ve Potten, C. S., 2001, What is apoptosis, and why is it important?, *British Medical Journal*, 322 (7301), 1536-1538.
- Ruano-Ravina, A., Figueiras, A. ve Barros-Dios, J. M., 2003, Lung cancer and related risk factors: an update of the literature, *Public Health*, 117 (3), 149-156.
- Sahin, O. ve Yilmaz, M., 2011, Synthesis and fluorescence sensing properties of novel pyrene-armed calix[4] arene derivatives, *Tetrahedron*, 67 (19), 3501-3508.
- Sahin, O. ve Yilmaz, M., 2012, Synthesis and fluorescence sensing properties of a new naphthalimide derivative of calix[4]arene, *Tetrahedron Letters*, 53 (18), 2319-2324.
- Seo, S. I., Lim, S. B., Yoon, Y. S., Kim, C. W., Yu, C. S., Kim, T. W., Kim, J. H. ve Kim, J. C., 2013, Comparison of recurrence patterns between 5 years and > 5 years after curative operations in colorectal cancer patients, *Journal of Surgical Oncology*, 108 (1), 9-13.
- Shinkai, S., Mori, S., Koreishi, H., Tsubaki, T. ve Manabe, O., 1986, Hexasulfonated Calix[6]Arene Derivatives - a New Class of Catalysts, Surfactants, and Host Molecules, *Journal of the American Chemical Society*, 108 (9), 2409-2416.

- Siegel, R., Ma, J. M., Zou, Z. H. ve Jemal, A., 2014, Cancer Statistics, 2014, *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 64 (1), 9-29.
- Sugarbaker, P. H. ve Kemeny, N., 1989, Management of metastatic cancer to the liver, *Adv Surg*, 22, 1-56.
- Sukumaran, J. ve Hanefeld, U., 2005, Enantioselective C-C bond synthesis catalysed by enzymes, *Chemical Society Reviews*, 34 (6), 530-542.
- Szliszka, E., Sokol-Letowska, A., Kucharska, A. Z., Jaworska, D., Czuba, Z. P. ve Krol, W., 2013, Ethanolic Extract of Polish Propolis: Chemical Composition and TRAIL-R2 Death Receptor Targeting Apoptotic Activity against Prostate Cancer Cells, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Testa, R., Testa, E., Giannini, E., Botta, F., Malfatti, F., Chiarbonello, B., Fumagalli, A., Polegato, S., Podesta, E., Romagnoli, P., Risso, D., Cittadini, G. ve De Caro, G., 2003, Trans-catheter arterial chemoembolisation for hepatocellular carcinoma in patients with viral cirrhosis: role of combined staging systems, Cancer Liver Italian Program (CLIP) and Model for End-stage Liver Disease (MELD), in predicting outcome after treatment, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 17 (12), 1563-1569.
- Uyanik, A., Bayrakci, M., Eymur, S. ve Yilmaz, M., 2014, Upper rim-functionalized calix[4]arene-based L-proline as organocatalyst for direct asymmetric aldol reactions in water and organic media, *Tetrahedron*, 70 (49), 9307-9313.
- Verboom, W., Durie, A., Egberink, R. J. M., Asfari, Z. ve Reinhoudt, D. N., 1992, Ipso Nitration of Para-Tert-Butylcalix[4]Arenes, *Journal of Organic Chemistry*, 57 (4), 1313-1316.
- Viola, S., Merlo, S., Consoli, G. M. L., Drago, F., Geraci, C. ve Sortino, M. A., 2010, Modulation of C6 Glioma Cell Proliferation by Ureido-Calix[8]arenes, *Pharmacology*, 86 (3), 182-188.
- Vural, U., Durmaz, M. ve Sirit, A., 2016, A novel calix[4]arene-based bifunctional squaramide organocatalyst for enantioselective Michael addition of acetylacetone to nitroolefins, *Organic Chemistry Frontiers*, 3 (6), 730-736.
- Wands, J. R. ve Blum, H. E., 1991, Primary hepatocellular carcinoma, *N Engl J Med*, 325 (10), 729-731.
- Ward, K. M., Binns, H., Chin, C., Webber, S. A., Canter, C. E. ve Pahl, E., 2004, Pediatric heart transplantation for anthracycline cardiomyopathy: Cancer recurrence is rare, *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 23 (9), 1040-1045.
- WHO, 2015, <http://www.who.int/cancer/en/> [Ziyaret Tarihi: 15 Nisan 2018].
- Yang, C. S., Chin, K. V. ve Lambert, J. D., 2004, Cancer Chemoprevention by targeting proteasomal degradation - Commentary re KA Dragnev et al, Specific chemopreventive agents trigger proteasomal degradation of G(1) cyclins: Implications for combination therapy. *Clin Cancer Res*, 2004;10:2570-7., *Clinical Cancer Research*, 10 (7), 2220-2221.
- Yilmaz, M. ve Sayin, S., 2016, Calixarenes in Organo and Biomimetic Catalysis, In: *Calixarenes and Beyond*, Eds: Springer, p. 719-742.
- Yousaf, A., Hamid, S. A., Bunnori, N. M. ve Ishola, A., 2015, Applications of calixarenes in cancer chemotherapy: facts and perspectives, *Drug Des Devel Ther*, 9, 2831-2838.
- Zhou, H. C., De-An, W., Baldini, L., Ennis, E., Jain, R., Carie, A., Sebti, S. M. ve Hamilton, A. D., 2006, Structure-activity studies on a library of potent calix[4]arene-based PDGF antagonists that inhibit PDGF-stimulated PDGFR

tyrosine phosphorylation, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4 (12), 2376-2386.

