

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**AMİNOASİT TEMELLİ AMİTLERİN SENTEZLENMESİ VE
BU BİLEŞİKLERİN HELA SERVİKS KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNDE ANTİKANSER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**ÖMER ERDOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd.Doç.Dr. Yusuf KURTULMUŞ**

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Birimi tarafından 14043 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Ömer ERDOĞAN tarafından hazırlanan “**Aminoasit temelli amitlerin sentezlenmesi ve bu bileşiklerin HeLa serviks kanser hücreleri üzerinde antikanser etkilerinin incelenmesi**” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora/Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/01/2018

Ünvan	Adı Soyadı	Kurum	İmza
Yrd.Doç.Dr.	Yusuf KURTULMUŞ	Adnan Menderes Üniversitesi
Prof.Dr.	Aslıhan BÜYÜKÖZTÜRK KARUL	Adnan Menderes Üniversitesi
Prof.Dr.	Hülya AYBEK	Pamukkale Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimi ve deneyimiyle bana yol gösteren, uygun bir çalışma ortamı oluşturmak için gerekli bilimsel donanımı sağlayan tez danışmanım Yrd.Doç.Dr.Yusuf KURTULMUŞ'a, tezimin her aşamasında bilgileriyle beni yönlendiren ve her türlü imkanı sunan Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr.Aslıhan KARUL'a, hücre kültürü çalışmalarında gerekli bilgi ve donanımı sağlayan Prof.Dr.Çiğdem YENİSEY'e, araştırmalarım esnasında bana destek olan, bilgisini her zaman büyük bir özveri ile paylaşan Yrd.Doç.Dr. Mustafa YILMAZ'a, akademik hayata adım atmamı sağlayan, sentez ve karakterizasyon çalışmalarında her türlü yardımını esirgemeyen Prof.Dr. Giray TOPAL'a, bilgilerini ve değerli vakitlerini benimle paylaşan tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Adnan Menderes Üniversitesi Tıbbi Biyokimya ailesine ve ayrıca bugünlere gelmemde maddi ve manevi olarak her türlü desteği ile emeklerini asla ödeyemeyeceğim annem, babam, kızkardeşim ve eşime teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
KABUL ONAY.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.2. Serviks Anatomisi.....	7
2.3. Serviks Kanseri.....	8
2.3.1. Serviks Kanseri Epidemiyolojisi.....	8
2.3.2. Serviks Kanseri Etyolojisi ve Risk Faktörleri.....	9
2.3.3. Serviks Kanseri Evrelendirmesi.....	10
2.4. HeLa Serviks Kanser Hücreleri.....	12
2.5. Poli(ADP-Riboz) Polimeraz.....	13
2.5.1. Poli(ADP-Riboz) Polimeraz-I.....	13
2.6. Vasküler Endotelyal Growth Faktör.....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	17
3.2. Kullanılan Malzemeler.....	17
3.3. Kullanılan Cihazlar.....	17
3.4. Sentez Çalışmaları.....	18
3.4.1. 2,6-bis(4-nitrobenzamido) hekzanoik asit Sentezi.....	18

3.4.2.	N-p-Nitrobenzoil-L-tirozin Sentezi.....	19
3.4.3.	N-p-Nitrobenzoil-L-histidin Sentezi.....	20
3.4.4.	N-p-Nitrobenzoil-L-valin Sentezi.....	21
3.4.5.	N-p-Nitrobenzoil-L-prolin Sentezi.....	22
3.5	Hücre Kültürü Çalışmaları.....	23
3.5.1.	Hücrelerin Sayılması.....	23
3.5.2.	Sentezlenen Amit Dozlarının Hazırlanması.....	23
3.5.3	WST-I Sitotoksisite Testi.....	23
3.5.4.	Apoptoz İlişkili PARP Testi.....	24
3.5.5	Anjiyogenez İlişkili VEGF Testi.....	26
3.6.	İstatistiksel Analizler.....	28
4.	BULGULAR.....	29
4.1.	Amitlere Ait FT-IR Spektrumları.....	29
4.1.1.	2,6-bis(4-nitrobenzamido) hekzanoik asid'e Ait FT-IR Spektrumu...	29
4.1.2.	N-p-Nitrobenzoil-L-tirozin'e Ait FT-IR Spektrumu.....	29
4.1.3.	N-p-Nitrobenzoil-L-histidin'e Ait FT-IR Spektrumu.....	30
4.1.4.	N-p-Nitrobenzoil-L-valin'e Ait FT-IR Spektrumu.....	30
4.1.5.	N-p-Nitrobenzoil-L-prolin'e Ait FT-IR Spektrumu.....	31
4.2.	Amit Konsantrasyonlarının Hücre Canlılığına Etkisi.....	31
4.3.	Sentezlenen Amitlerin Apoptoza Etkisi.....	34
4.4.	Sentezlenen Amitlerin Anjiyogenez Etkisi.....	36
5.	TARTIŞMA.....	38
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
	Kaynaklar.....	44
	Ekler.....	50
	Özgeçmiş.....	51

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Asp	: Asparagin
ATP	: Adenozintrifosfat
B1	: 2,6-bis(4-nitrobenzamido) hekzanoik asit
B2	: N-p-Nitrobenzoil-L-tirozin
B3	: N-p-Nitrobenzoil-L-histidin
B4	: N-p-Nitrobenzoil-L-valin
B5	: N-p-Nitrobenzoil-L-prolin
CIN	: Servikal intraepitelyal neoplazi
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükelik asit
DPBS	: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
FBS	: Fetal Bovine Serum
FIGO	: Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
Gly	: Glisin
HCl	: Hidroklorik Asit
HPV	: Human papillomavirüs
HSV	: Herpes simplex virüs
NAD	: Nikotinamid dinükleotid
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NP	: Nörofilin
PARP	: poli(ADP-Riboz) polimeraz
PIGF	: Plasental büyüme faktörü
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
VEGF	: Vasküler Endotelyal Growth Faktör
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Growth Faktör Reseptörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WST-I	: 4-[3-(4-İyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyo]-1,3-benzen disülfonat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Servikte tümör gelişimi.....	3
Şekil 2.2.	Kanserin belirteçleri.....	5
Şekil 2.3.	Serviks anatomisi.....	7
Şekil 2.4.	Serviks insidansı.....	9
Şekil 2.5.	İnsan PARP-I proteininin fonksiyonel bölgeleri.....	13
Şekil 2.6.	DNA hasar seviyesine bağlı olarak PARP-I'in üstlendiği metabolik olaylar.....	14
Şekil 2.7.	PARP-I yarıklanma mekanizması.....	15
Şekil 2.8.	VEGF ailesinin ligand ve reseptörleri.....	16
Şekil 3.1.	2,6-bis(4-nitrobenzamido) hekzanoik asidin yapısı.....	18
Şekil 3.2.	N-p-nitrobenzoil-L-tirozin'in yapısı.....	19
Şekil 3.3.	N-p-nitrobenzoil-L-histidin'in yapısı.....	20
Şekil 3.4.	N-p-nitrobenzoil-L-valin'in yapısı.....	21
Şekil 3.5.	N-p-nitrobenzoil-L-prolin'in yapısı.....	22
Şekil 4.1.	2,6-bis(4-nitrobenzamido) hekzanoik aside ait FTIR spektrumu.....	29
Şekil 4.2.	N-p-nitrobenzoil-L-tirozin'e ait FT-IR spektrumu.....	29
Şekil 4.3.	N-p-nitrobenzoil-L-histidin'e ait FT-IR spektrumu.....	30
Şekil 4.4.	N-p-nitrobenzoil-L-valin'e ait FT-IR spektrumu.....	30
Şekil 4.5.	N-p-nitrobenzoil-L-prolin'e ait FT-IR spektrumu.....	31
Şekil 4.6.	24 saat inkübasyon sonunda % canlı hücrelerin amit dozlarına göre düzeylerinin sütun grafiği ile gösterilmesi.....	33
Şekil 4.7.	48 saat inkübasyon sonunda % canlı hücrelerin amit dozlarına göre düzeylerinin sütun grafiği ile gösterilmesi.....	33
Şekil 4.8.	72 saat inkübasyon sonunda % canlı hücrelerin amit dozlarına göre düzeylerinin sütun grafiği ile gösterilmesi.....	34
Şekil 4.9.	PARP-I'e standart grafiği.....	34
Şekil 4.10.	PARP'e proteinin amit dozlarına göre düzeylerinin sütun grafiği ile gösterilmesi.....	35

Şekil 4.11.	VEGF'ye ait standart grafiği.....	36
Şekil 4.12.	VEGF proteinin amit dozlarına göre düzeylerinin sütun grafiği ile gösterilmesi.....	37
Şekil 5.1.	Zhou ve arkadaşları tarafından sentezlenen pirazin amit türevlerinin yapısı.....	38
Şekil 5.2.	Mali ve arkadaşları tarafından sentezlenen spirooksindazol türevlerinin yapısı.....	39
Şekil 5.3.	Zhang ve Zhu tarafından izole edilen Nobilaside-D'nin yapısı.....	39
Şekil 5.4.	İnceler ve arkadaşları tarafından sentezlenen 1-fenil-3-(tiyofen-3-il)-1H-pirazol-4-karboksilik asidin amit ve ester türevlerinin yapısı	40
Şekil 5.5.	Singh ve arkadaşları tarafından sentezlenen Cu(II) komplekslerinin yapısı.....	40

RESİMLER DİZİNİ

Resim 2.1.	HeLa Serviks Kanser Hücreleri.....	12
-------------------	------------------------------------	----

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Kemoterapötikler ve özellikleri.....	6
Tablo 2.2.	Serviks kanseri etyolojisi ve risk faktörleri.....	10
Tablo 4.1.	İnkübasyon süresi ve konsantrasyona bağlı olarak % canlı hücre değerleri.....	32
Tablo 4.2.	24 saat inkübasyon sonunda amit konsantrasyonuna bağlı PARP-I miktarları.....	35
Tablo 4.3.	24 saat inkübasyon sonunda amit konsantrasyonuna bağlı VEGF miktarları.....	37

ÖZET

AMİNOASİT TEMELLİ AMİTLERİN SENTEZLENMESİ VE BU BİLEŞİKLERİN HELA SERVİKS KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDE ANTİKANSER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Erdoğan Ö. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp) Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2018.

Bu çalışmada lizin, fenilalanin, histidin, valin ve prolin aminoasitlerinin p-nitrobenzoil klorür ile tepkimesiyle amit türevi bileşikler elde edildi. Bu bileşiklerin yapısı FT-IR ile aydınlatıldı. Sentezlenen bu bileşiklerin sitotoksik, apoptotik ve anjiyojenik etkileri HeLa serviks kanser hücre dizisi üzerinde in vitro ortamda çalışıldı. Sentezlenen bileşiklerin 25, 50, 100 ve 200 µM'lık dozlarının HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri WST-I yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi. B1, B2 ve B5 bileşikleri HeLa hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterirken, B3 ve B4 bileşiklerinin proliferasyonu indüklediği bulundu. HeLa hücreleri üzerinde sentezlenen bileşiklerin apoptotik etkisini belirlemek için, kaspasların yıkım ürünü olan ve ölüm molekülü olarak adlandırılan Poli(ADP-Riboz) Polimeraz(PARP) molekülü miktarı elisa yöntemi ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Anjiyojenik etkiyi belirlemek için de vasküler endotelyal growth faktör(VEGF) miktarı elisa yöntemi ile belirlendi.

Anahtar Kelimeler: HeLa, Antikanser, Amitler, PARP, VEGF.

ABSTRACT

THE SYNTHESIS OF AMINOACID BASED AMIDES AND EVALUATION OF ANTICANCER EFFECT ON HELA CERVICAL CANCER CELLS THIS COMPOUNDS

**Erdogan O. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences , Biochemistry
Department, Thesis of Biochemistry, Aydin, 2018.**

In this study, lysine, phenylalanine, histidine, valine and proline amino acids were reacted with p-nitrobenzoyl chloride to give amide derivative compounds. The structure of these compounds was elucidated by FT-IR. The cytotoxic, apoptotic and angiogenic effects of these synthesized compounds were studied in vitro on the HeLa cervical cancer cell line. The cytotoxic activities of 25, 50, 100 and 200 μ M doses of the synthesized compounds on HeLa cells were determined spectrophotometrically using the WST-I method. B1, B2 and B5 showed cytotoxic effect on HeLa cells whereas B3 and B4 compounds induced proliferation. To determine the apoptotic effect of the compounds on HeLa cells, the amount of poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) molecule, which is the degradation product of caspases and termed the death molecule, was measured spectrophotometrically by ELISA method. The amount of vascular endothelial growth factor (VEGF) was also measured by elisa method to determine the angiogenic effect.

Key words: HeLa, Anticancer, Amides, PARP, VEGF.

1. GİRİŞ

Kanser en önemli sağlık sorunlarından birisidir ve ülkemizde sebebi bilinen ölümler arasında kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ikinci sıradadır. Kanser gelişimine neden olan etmenler arasında sigara dumanı ve katranında bulunan kimyasal ve karsinojenik ajanlar, radyasyon ve güneş ışığından gelen zararlı ultraviyole ışınlar, ağır metaller ve fiziksel inaktivite bulunmaktadır. Bu zararlı etmenlere ek olarak; vitamin, mineral ve antioksidan bakımından zengin gıdaların yetersiz tüketilmesi ile hücrelerin zararlı moleküllere ve serbest radikallere karşı koruyucu, detoksifiye edici sistemlerinin ve savunma mekanizmalarının zayıflaması da hücre hasarının artmasına yol açmakta ve böylece kanser gelişimi tetiklenmektedir (Doll ve ark, 2010; Tarançı, 2014).

Serviks kanseri, dünya genelinde her yıl 528.000 yeni teşhis ile kadınlarda en yaygın görülen 4. kanser türüdür. Aynı zamanda kadın kanserlerinin %8'ini oluşturmaktadır. Serviks kanserinde en önemli risk faktörü human papilloma virüs (HPV) tür. Bununla birlikte pek çok çevresel faktör ve bireylerin sahip olduğu kalıtsal faktörler de serviks kanseri gelişiminde rol oynamaktadır. Serviks kanseri öncül lezyonlarının bazı bireylerde gerilemesi, bazı bireylerde ise kanser gelişimine sebep olması çevresel faktörlerin etkinliğinin yanı sıra genetik yatkınlığın da serviks kanserindeki önemini göstermektedir (Globocan, 2012; Kıran, 2009; Au, 2004).

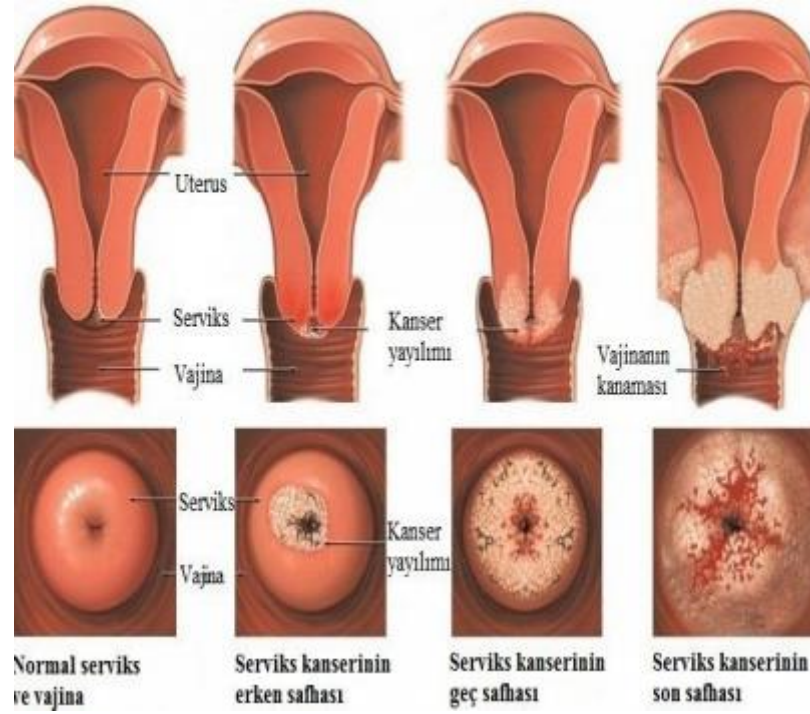
Önlenebilir ve tedavi edilebilir bir hastalık olan kanserin teşhisi ve tedavisi büyük önem arz etmektedir. Kemoterapötikler ile kanser hücrelerini yok etmek veya bu hücrelerin büyümesini kontrol altına almak en önemli tedavi yaklaşımıdır. Kanserle mücadelede kullanılan ana strateji olan kemoterapi, tek başına kullanılabilmesi gibi cerrahi ve radyoterapi yaklaşımlarıyla beraber de kullanılabilir. Klinikte, farklı antikanser ilaçlar tek başına veya kombine olarak hastalara verilirken, yeni ilaçların keşfi için de çalışmalar devam etmektedir. Kemoterapötik ajanlar amit, ester, nitril, hidroksil, amino, nitro v.b fonksiyonel grupları ihtiva eden bileşiklerdir. Birçok amit türevi bileşiğin prostat karsinomlu hücreler üzerinde toksik, apoptotik ve antianjiyogenez etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Jung ve ark, 2009; Pradidphol ve ark, 2012; Kaçar, 2016).

Bu tez çalışmasında, aminoasitlerden yola çıkılarak amit türevi bileşikler sentezlenecektir. Bu bileşiklerin doza ve zamana bağlı olarak HeLa serviks kanser hücreleri üzerinde sitotoksik, apoptotik ve anjiyogenejik etkileri incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser kelimesi, iyileşmeyen bir şişliği tanımlamak için “karkinos” kelimesini kullanan Hipokrat’tan köken almaktadır. Kanser, temel olarak hücrelerin birtakım moleküler olaylar sonucu normal fonksiyonlarının değişime uğrayarak kontrolsüz çoğalmaya başlaması ve köken aldığı dokuya komşu ya da uzak dokulara yayılmaları (metastaz) ile karakterize edilen bir hastalıktır (Mcphie ve ark, 2003; Sudhakar, 2009). Kanserli hücrelerde büyümeyi ve bölünmeyi kontrol eden sistemler çevresel veya genetik faktörlerin etkisi sonucu işlevselliğini kısmen veya tamamen yitirirler. Herhangi bir dokuda oluşan tümör orijininin uzak bölgelerde proliferasyon olmuyor ise benign (iyi huylu), proliferasyon oluyor ise de malign (kötü huylu) olarak adlandırılır (Hanahan ve Weinberg, 2000).



Şekil 2.1: Servikte Tümör Gelişimi (Tarañç1, 2014)

Kanser oluştuğu hücrelerin tipine bağlı olarak, karsinoma (epitel hücrelerinden kaynaklanan), sarkoma (bağ doku hücrelerinden kaynaklanan), lösemi (hematopoyetik hücrelerden kaynaklanan) ve lenfoma (hematopoyetik hücrelerden kaynaklanan ve lenf

damarlarında oluşan) olmak üzere dört ana başlık altında incelenir. Kanseri dokunun oluşumu ve metastaz özelliği kazanması için altı adet belirteç tespit edilmiş ve bu belirteçler hastalığın oluşumu ve gelişiminde kademeli olarak gözlemlenmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Bunlar:

a) Büyüme sinyal otonomisi: Normal hücreler bölünebilmek için büyüme faktörlerinin dışında bir sinyale ihtiyaç duyarlar, kanser hücreleri ise büyüme faktör sinyalinden bağımsız olarak bölünürler. Çünkü büyüme faktör yolağında oluşan mutasyon kontrolsüz büyümeye sebep olur.

b) Büyüme inhibitör sinyallerinden kaçınma: Normal hücreler homeostaziyi devam ettirmek için inhibitör sinyallerine yanıt verirler; kanser hücreleri, oluşan mutasyonlar nedeniyle inhibitör sinyallerine yanıt vermez.

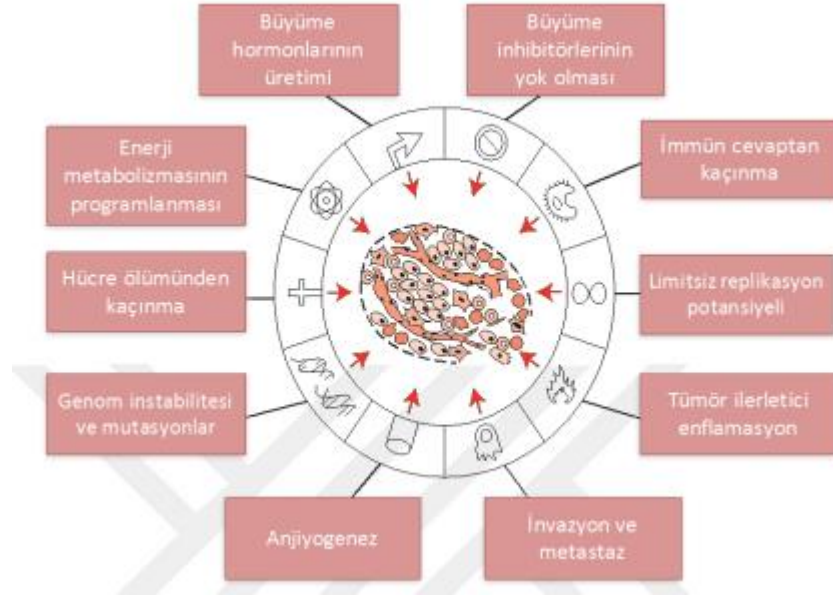
c) Apoptotik hücre ölümlerinden kaçınma: Normal hücreler apoptoz mekanizması tarafından uzaklaştırılır, kanser hücreleri ise apoptotik sinyale cevap vermezler.

d) Sınırsız replikasyon potansiyeli: Normal hücreler yaşlandıktan sonra, hücrenin sınırlı sayıda iki katına çıkmasını belirleyen sayma düzeneğine sahiptirler. Bu hücresel sayac her DNA replikasyonu sırasında meydana gelen kromozom uçlarının kısalmasını belirler (telomerler). Kanseri hücrelerinde telomeraz uzunluğu korunur. Telomer regülasyonunun değişmesi sınırsız replikasyon potansiyeline neden olur.

e) Anjiyogenez (yeni kan damarlarının oluşumu): Normal hücreler besin ve oksijen desteği için kan damarlarına bağlıdır, fakat uygun bir insanda dolaşım sabittir. Kanseri hücreleri ise anjiyogenez uyarır, yeni kan damarlarının gelişmesi tümör yaşamı ve büyümesi için gereklidir. Anjiyogenik değişimin aktive edilebilmesi anjiyogenik uyarıcılar ve inhibitörler arasındaki dengenin değiştirilmesi ile sağlanabilir.

f) İnvazyon ve metastaz: Normal hücreler vücut içerisinde yerlerini korurlar ve genellikle göç etmezler. Ancak vücudun diğer kısımlarına hareket eden kanseri hücreleri, kanseri ölümlerinin en büyük nedenidir. Mutasyonlar, invazyona neden olan enzimlerin aktivitesini, hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler adhezyonu sağlayan molekülleri değiştirir.

Kanseri en önemli belirteçleri şekil 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.2: Kanser Belirteçleri (Kaçar, 2016).

Kanserde kullanılan tedavi yöntemleri arasında radyoterapi, kemoterapi, hormon yardımlı immünoterapi ve cerrahi operasyonlar yer almaktadır. Bunların içerisinde en yaygın olarak kullanılanı kemoterapidir. Kemoterapötik ajanların kanser hücreleri üzerinde sitotoksik, apoptotik ve antianjiyogenezik etki göstermesi hedeflenerek, kanserin durdurulması ve yayılmasının önlenmesi amaçlanır. Bu tedavi yaklaşımının önündeki en büyük engel, kemoterapötik bileşiklere karşı kanser hücreleri tarafından direnç oluşturulmasıdır. İlaç direnci, kanser hücrelerinin ilaç hasarına karşı hızlı bir adaptasyon süreci yaşaması sonucu meydana gelir. Çoğu kemoterapötik ajanın sağlıklı hücre ve dokular üzerinde toksik etki göstermesi ve kanserleşmiş dokuların zamanla ilaca direnç göstermesi nedeniyle, yeni kemoterapötik ajanlar üzerine araştırmalar yoğun olarak devam etmektedir (Mor ve ark, 2008; Wang ve ark, 2012). Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerle ilgili detaylı bilgi tablo 2.1’de verilmiştir (Stavrovskaya, 2000).

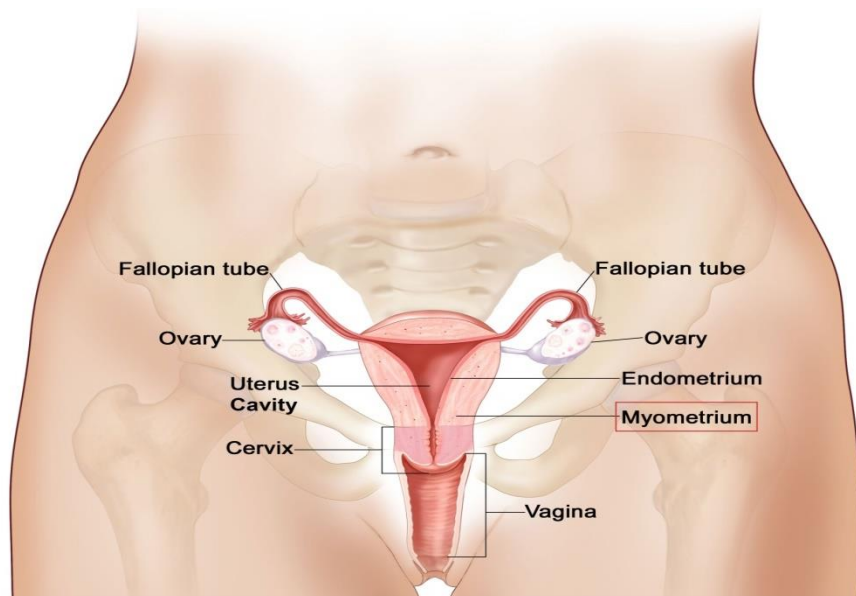
Tablo 2.1. Kemoterapötikler ve Özellikleri

Antikanser ilaç grubu	Etki mekanizması	Etkili olduğu kanser türleri	Örnek ilaç
Alkilleyiciler	DNA'da hasar oluşturur ve replikasyonu engeller.	Lösemi, lenfoma, sarkoma, akciğer, meme, ovaryum kanserleri	Cisplatin
Antimetabolitler	Nükleik asitlerin yapıtaşları yerine girerek oluşumlarını engeller.	Lösemi, meme, ovaryum, barsak kanserleri	5-Florourasil
Anti-tümör antibiyotikler	Enfeksiyonlarda kullanılan antibiyotikler gibi değildir. DNA interkalasyonu yaparak replikasyonu engeller.	Karsinomalar, meme, ovaryum, tiroid, testis kanserleri	Bleomycin
Topoizomeraz inhibitörleri	DNA replikasyonunda görev alan topoizomeraz ezimini inhibe eder.	Ovaryum, gastrointestinal ve diğer pek çok kanser türü	Etoposide
Mitotik inhibitörler	Mitoz (M) için gerekli enzimleri inhibe ederek, hücreleri M fazında durdurur.	Meme, akciğer, miyeloma, lenfoma ve lösemi	Paclitaxel
Kortikosteroidler	Kanser tedavisinde semptomları giderici olarak kullanılır.	Kanser ilaçları kullanılan tüm kanserler	Dexamethasone
Diğer kemoterapötik ilaçlar	Örneğin, proteozom inhibitörü	Miyeloma	Bortezomib

2.2. Serviks Anatomisi

Kadın üreme organları pelvik kavitede yerleşmiş iç üreme organları ile perinede yerleşmiş dış üreme organlarından oluşur. İç üreme organları uterus, overler, tuba uterinalar ve vajinadan oluşur. Uterus dört kısımda incelenir. Fundus, korpus, istmus ve serviksidir (Taşkın, 2005).

Serviks, uterusun 1/3 alt kısmına verilen isimdir. Uzunluğu yaklaşık 2-4 cm, çapı 2,5-3,5 cm'dir. Şekli ve büyüklüğü kadının yaşına ve hormonal durumuna göre değişiklik gösterir. Serviksin alt kısmı vajina içine sokulmuş durumdadır ve portio vaginalis cervicis ismini alır. Bu bölümün üzerinde kalan serviks kısmına ise portio supravaginalis cervicis adı verilir. Portio supravaginalis cervicis ön tarafta mesane ile komşudur ve aralarında parametrium denen bağ dokusu yer alır. Portio vaginalis cervicis'in vagina tarafından görünen deliğine ostium uteri adı verilir ve yukarı doğru canalis cervicis uteri ile devam eder. Bu kanalda yer alan plikalara plica palmatae denir. Portio vaginalis cervicis ile vagina duvarı arasında çepeçevre oluşan çıkmaza fornix vaginae adı verilir. Bunun yan taraflarına pars lateralis, ön kısmına pars anterior, arka kısmına ise pars posterior denir (Philip ve William, 2003; Karaoğlu, 2012).



Şekil 2.3: Serviks Anatomisi (<http://www.profdrhasanserdaroglu.com>)

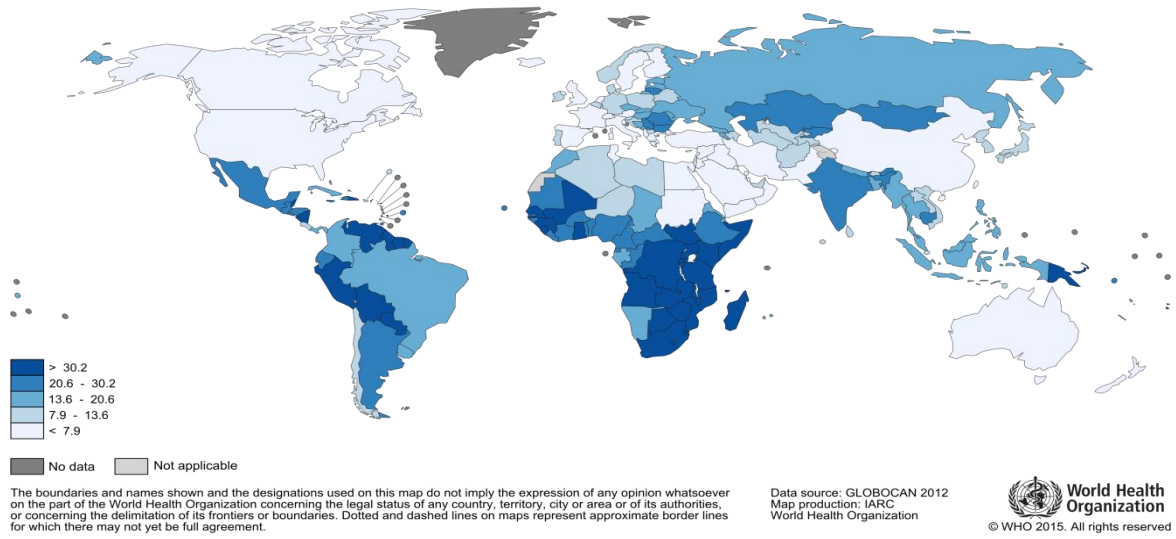
2.3. Serviks Kanseri

Sadece 2012 yılında, 528.000 yeni vaka ile serviks kanseri kadınlar arasında en yaygın 4. kanser türüdür. Her gün yaklaşık 740 kadın serviks kanserinden yaşamını yitirmekte ve bu veriler serviks kanserini kansere bağlı ölümler arasında 2. sıraya yükseltmektedir (Bailey ve ark, 2016; Small ve ark, 2017). Serviks kanseri görülme yaşı genel olarak 20-80 yaş gibi geniş bir yelpazeye yayılır. En sık 50-59 yaşları arasında görülmektedir. Ülkemiz koşullarında invaziv serviks kanserlerinin %65'i 40-60 yaş grubunda görülmektedir. Erken serviks kanserinin olası ilk semptomu, sıklıkla hasta tarafından farkına varılmayan ince, su gibi, kanla bulaşık vaginal akıntıdır. Klasik semptomu, en sık rastlanan belirti olmamasına rağmen ara ara olan, ağrısız metroraji veya postkoital lekelenmelerdir. Geç semptomlar veya daha fazla ilerlemiş hastalık belirtileri, sekonder olarak ureterler, pelvik duvar veya siyatik sinirlerin tutulumuna bağlı yana veya bacağına vuran ağrı gelişmesidir. Hastaların çoğu, dizüri, hematüri, rektal kanama veya konstipasyondan şikayetçidir. İnvaziv serviks kanseri sıklıkla, servikal epitelde metaplastik olayların anormal gelişimi ile başlayan, servikal intraepitelial neoplazi (CIN I, II, III) ve mikroinvaziv kanser ile devam eden bir sürecin sonunda oluşan hastalıktır. Serviks kanseri uzun bir preinvaziv hastalık evresinden sonra geliştiği için erken tanı ve tedavinin önemli olduğu kanserlerden birisidir. Serviks kanserinin önceden tespit edilebilmesi için tarama testi olarak Papanicolaou (Pap smear) testi kullanılmaktadır. Serviks kolay ulaşılabilir bir organ olduğu 3 ve pap smear testi ile serviks kanserleri erken evrede yakalanabildiği için, bu evrede yapılacak uygun tedavi ile hastaların yaşam şansı artmaktadır. (Han ve ark, 2005; Kıran, 2009).

2.3.1. Serviks Kanserinin Epidemiyolojisi

Serviks kanseri kadınlar arasında görülen en yaygın dördüncü kanser türü olup, kadınlarda görülen kanserlerin %12'sini oluşturmaktadır. Yılda yaklaşık 528.000 yeni serviks kanseri olgusu bildirilmekte ve bu olguya bağlı ölümlerin % 85'i düşük ve orta gelirli ülkelerde görülmektedir (Randall ve Ghebre, 2016). Düşük ve orta gelirli ülkelerde serviks kanserinin görülme sıklığının yüksek olması, preinvaziv lezyonların kansere dönüşmeden saptanabilmesi ve tedavi edilebilmesi için gereken etkili tarama programlarının bulunmamasından kaynaklanmaktadır (Chuang ve ark, 2016). Dünya kanser istatistikleri (GLOBOCAN) 2012 verilerine göre (Şekil

2.4.) serviks kanseri insidansı 30/100.000'den büyük olanlar yüksek riskli bölgeler içinde Doğu Afrika (42.7/100.000), Malenezya (33.3/100.000), Güney Afrika (31.5/100.000) ve Orta Afrika (30.6/100.000) yer almaktadır. Serviks kanser insidansı 7.9/100.000'den küçük olan Batı Asya ve Ortadoğu ülkeleri de dahil diğer bazı ülkeler düşük riskli bölgeler grubunu oluşturmaktadır. Ülkemizin serviks kanser insidansı 4.5/100.000'dir. Gelişmiş ülkelerde ölüm oranının son yıllarda giderek azalması erken tanı ve tedavinin etkili şekilde uygulanmasına bağlanmaktadır (Globocan, 2012).



Şekil 2.4: Serviks kanseri insidansı

2.3.2. Serviks Kanseri Etyolojisi ve Risk Faktörleri

Günümüzde serviks kanserinin etyolojik nedenleri kesin olarak bilinmemekle birlikte, bazı önemli risk faktörleri tanımlanmaktadır (Tablo 2.2.). Epidemiyolojik çalışmalar serviks kanseri gelişiminde en büyük risk faktörünün human papillomavirüs (HPV) olduğunu göstermektedir ve neredeyse bütün serviks karsinomlu vakalarda HPV gözlemlenmektedir (Walboomers ve ark, 1999). HPV sağlıklı kadınlarda da görülmesine rağmen nadiren serviks kanserine yol açmaktadır. Çünkü, günümüze kadar tespit edilen HPV tiplerinden birçoğu düşük risk grubunu oluşturmaktadır. HPV tip 6, 11, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 ve 81 düşük risk grubunu temsil etmektedir. Yüksek risk grubu üyeleri olan HPV tip 16, 18, 31, 33, 35 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 63, 73 ve 82 serviks ve diğer genital kanserlere yol açmaktadır (Maas ve ark, 2017; Kessler, 2017). Ayrıca immunosupresif ve oral kontraseptif kullanımı, chlamydia

ve HSV-2 enfeksiyonu, sigara bağımlılığı, meyve ve sebze bakımından yetersiz diyet, üç veya daha fazla hamilelik, birden fazla partnerle seks, obezite gibi pek çok faktör ve bireylerin sahip oldukları genotipler de serviks kanserinin gelişiminde rol oynamaktadır. Serviks kanseri öncül lezyonlarının bazı bireylerde gerilemesi, bazı bireylerde ise kanser gelişimine sebep olması, çevresel faktörlerin etkinliğinin yanı sıra genetik duyarlılığın da serviks kanserinde önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Tablo 2.2. Serviks kanseri Etyolojisi ve Risk Faktörleri

HPV Enfeksiyonu
İleri Yaş
İrk
Fazla sayıda seksüel partner
Oral kontraseptif kullanımı
İmmunosüpresif ilaçlar
Sebze ve meyve bakımından fakir diyet
3 veya daha fazla hamilelik
Chlamydia enfeksiyonu
HSV-2 enfeksiyonu
Sigara Bağımlılığı
Obezite

2.3.3. Serviks Kanseri Evrelendirmesi

Günümüzde serviks kanseri evrelemesinde Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyon (FIGO)'nun evreleme sistemi kullanılmaktadır. FIGO evreleme sistemi, tümör büyüklüğü ve hastalığın pelvisteki yayılımını esas alan bir sistemdir. Kanserin büyüklüğü ve yaygınlığı klinik olarak birçok inceleme ile değerlendirilerek, hastalık evreleri I'den IV'e kadar kategorilere ayrılmaktadır. Evre I; servikste sınırlı büyümeyi temsil ederken, evre IV; kanserin metastaz ile uzak organlara yayılımını belirtir (Sankaranarayanan ve ark, 2005).

Evre 0: İn situ karsinom, intraepitelyal karsinom

Evre I: Karsinom kesin olarak servikse sınırlıdır.

Evre IA: Kanser invazyonu sadece mikroskopik olarak belirlenebilir. Ölçülen stromal invazyonun maksimum derinliği 5 mm, genişliği 7 mm'yi geçmemelidir.

Evre IA1: Stromal invazyon derinliği 3 mm'den küçüktür ve tümör 7 mm'den geniş değildir.

Evre IA2: Stromal invazyon derinliği 3–5 mm arasındadır ve tümör 7 mm'den geniş değildir.

Evre IB: Servikse sınırlı klinik lezyonlar veya evre IA'dan büyük preklinik lezyonlar

Evre IB1: 4 cm'den küçük klinik lezyonlar

Evre IB2: 4 cm'den büyük klinik lezyonlar

Evre II: Alt 1/3'ü haricinde vajen tutulumu veya pelvis yan duvarları haricinde parametrium infiltrasyonu

Evre IIA: Belirgin parametrium infiltrasyonu yok. Vajenin üst 2/3'üne kadar tutulum vardır.

Evre IIB: Belirgin parametrium infiltrasyonu vardır. Ancak pelvis yan duvarına ulaşmamıştır.

Evre III: Vajen alt 1/3'ünün tutulumu veya pelvis yan duvarlarına infiltrasyon; başka sebeplere bağlı olmayan tüm hidronefroz ve/veya nonfonksiyone böbrek vakaları

Evre IIIA: Pelvis yan duvarlarına ulaşmamıştır, fakat vajen alt 1/3'ü infiltridir.

Evre IIIB: Tümör pelvis duvarına ulaşmış veya hidronefroz veya nonfonksiyone böbrek vardır.

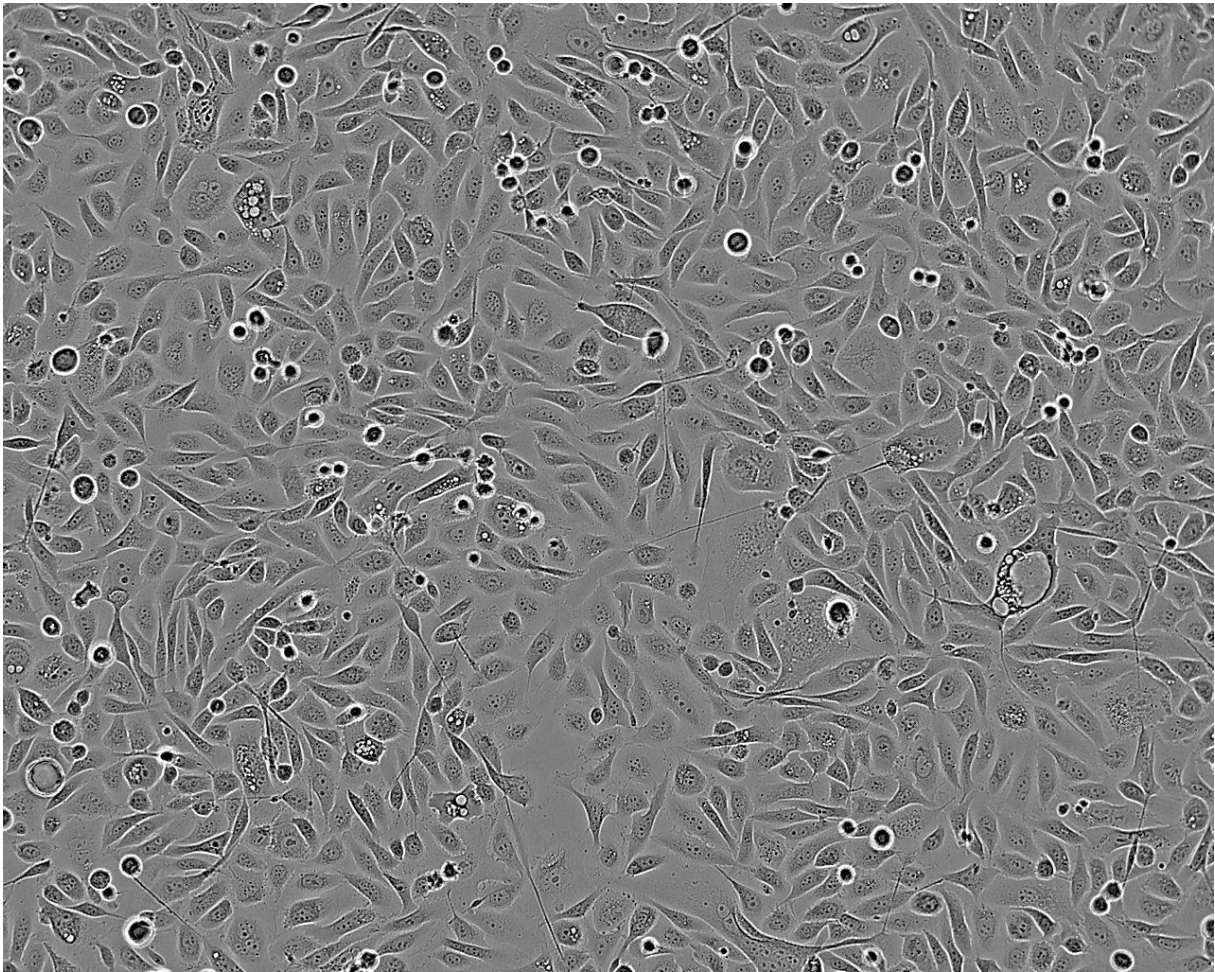
Evre IV: Tümör gerçek pelvisi aşmış veya klinik olarak mesane ve/veya rektum mukozası tutulum vardır.

Evre IVA: Tümörün komşu pelvik organlara yayılımı

Evre IVB: Uzak organlara yayılım (Disaia ve ark, 2003).

2.4. HeLa Serviks Kanser Hücreleri

Serviks kanser hücreleri, 1952 yılında Scherer tarafından afrika kökenli Amerikalı bir kanser hastasının serviks dokusundan izole edilmiştir. Henrietta Lack adındaki bu kanser hastası kanserin metastaz yapması sonucu hayatını kaybetmiştir, ancak laboratuvarında kültürü yapılan serviks kanser hücrelerine hastanın ad ve soyadının ilk iki harflerinden esinlenerek “HeLa” ismi verilmiştir. HeLa hücrelerinin ölümsüz olması ve çok kolay üretilibilmeleri antikanserojenik çalışmalar başta olmak üzere birçok çalışmada kullanımına hız kazandırmıştır. Ayrıca HeLa hücreleri doğal olarak düşük süperoksit dismutaz aktivitesine sahip oldukları için hücresel oksidatif stresin etkilerini incelemek için de uygun bir modeldir. İnsan serviks kanser hücre hattı olan HeLa hücresi köken olarak epitel bir hücredir. Bu kanser hücreleri yüzeye tutunarak gelişmektedirler (Horakova ve ark, 2001; Florea ve ark, 2005; Tarançı, 2014).



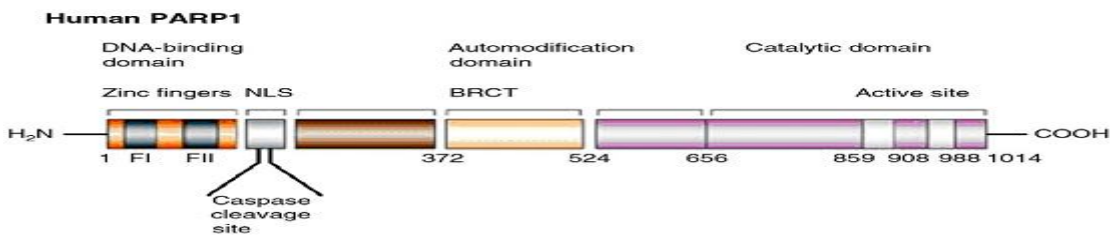
Resim 2.1. HeLa Serviks Kanser Hücreleri

2.5. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz

Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP) 1963 yılında Chambon ve çalışma grubu tarafından keşfedilmiş, hücre sinyali enzimleri ailesinin bir üyesidir. Ökaryotlarda bulunan bu enzimler DNA bağlanma proteinlerinin poli (ADP-ribozillenme)sini sağlayarak sitotoksik ajanlar, iyonize radyasyon ve oksidatif stres sonucu oluşmuş DNA zincir kırıklarını onarırlar (Bai ve ark, 2001; Burkle, 2001; Smulson ve ark, 2000). Ayrıca PARP' lar DNA hasarı ve genomik integritenin sürdürülmesi (Shell ve De Murcia, 2000), transkripsiyonel seviyede çeşitli proteinlerin ekspresyonlarının düzenlenmesi (Kim ve ark, 2004), nekroz ve apoptoz üzerinden hücre ölümü (Schreiber ve ark, 2006; Virag and Szabo, 2002), hücre replikasyonunun düzenlenmesi (Saxena ve ark, 2002) ve telomeraz aktivitesinin düzenlenmesi (Samper ve ark, 2001) gibi multi hücrel süreçlerden sorumludurlar. PARP enzim ailesi 18 üyeden oluşmasına rağmen en bol bulunan izoformu PARP-I' dir.

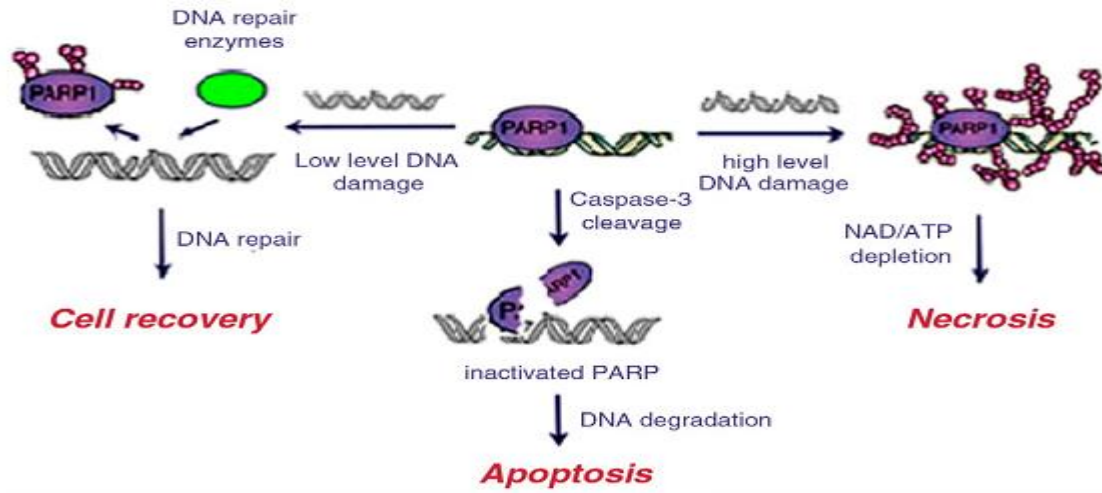
2.5.1. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz-I

Poli (ADP-Riboz) transferaz veya Poli (ADP-Riboz) sentetaz olarak da bilinen PARP-I (E.C 2.4.2.30), PARP protein ailesinin en bol bulunan ve üzerinde en çok çalışma yapılan üyesidir. 116 kDa molekül ağırlığına ve 1014 tane aminoasit kalıntısına sahip olan PARP-I, çift çinko atomu içeren bir N-terminal DNA bağlanma bölgesi, bir çekirdek lokalizasyon sinyali bölgesi, bir merkezi otomodifikasyon bölgesi ve bir de NAD⁺ dan ADP-riboz yapılarını protein akseptörüne transfer eden C-terminal katalitik bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2.5). PARP-I'in DNA bağlanma bölgesi tek yada çift zincir kırıklı bölgelere iki çinko atomu sayesinde yüksek afinite ile bağlanır. Bu çinko atomlarından biri çift zincir kırıklarına karşı PARP-I'i aktive ederken, diğeri tek zincir kırıklarına karşı aktivasyonu gerçekleştirir (Meyer-Ficca ve ark, 2005; Nguewa ve ark, 2005; Schreiber ve ark, 2006).



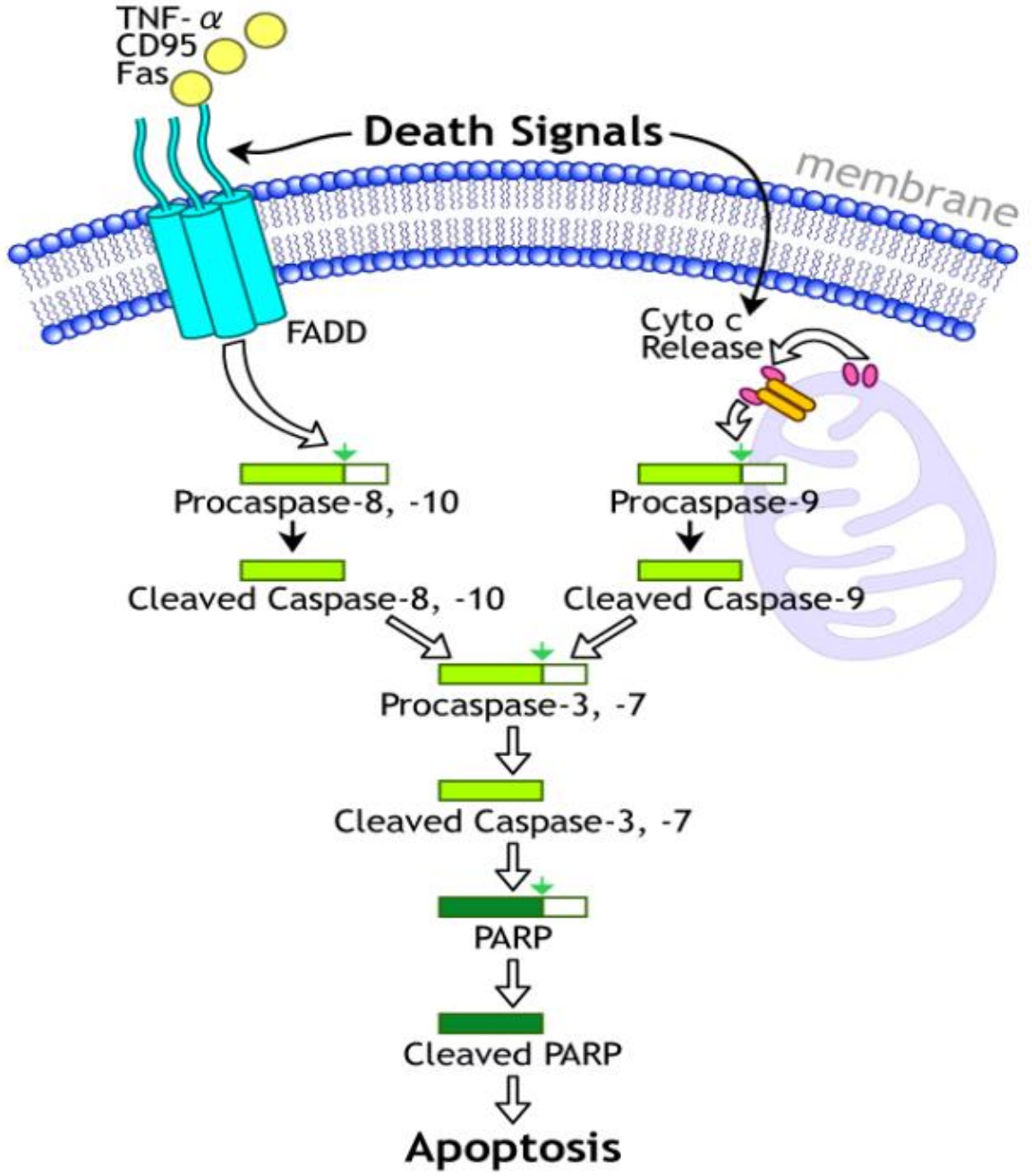
Şekil 2.5: İnsan PARP-I proteinin fonksiyonel bölgeleri (Sodhi ve ark, 2010)

DNA'daki hasar miktarına göre PARP-I farklı metabolik işlevler üstlenmektedir. Eğer DNA'daki hasar çok yüksek ise PARP-I, ATP/NAD tüketiminden dolayı hücreyi nekroza götürür. Eğer DNA'daki hasar az miktarda ise diğer DNA onarım enzimleriyle birlikte PARP-I DNA onarımında görev alarak hücrenin yaşamasını sağlar. Kaspaz ailesinden apoptozda çok kritik rol üstlenen ve PARP-I'ın yarıklanmasının ana sorumlusu olan kaspaz 3 (Boulares ve ark, 1999) aktifleşmiş ise PARP-I yarıklanması gerçekleştirilerek, hücre apoptoza gitmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: DNA hasar seviyesine bağlı olarak PARP'ın üstlendiği metabolik olaylar (Sodhi ve ark, 2010).

Apoptoz sürecinde, kaspaz-3 ve kaspaz-7 PARP-I'in Asp214 ve Gly215 aminoasitleri arasındaki bağı kırarak çekirdek lokalizasyon bölgesi ile DNA bağlanma bölgesinin birbirinden ayırır (Şekil 2.7.). Böylelikle, PARP-I inaktive olarak DNA hasarını onarması için ATP tüketmesi engellenir ve apoptozun ATP bağımlı basamakları için gerekli enerji sağlanmış olur (D'Amours ve ark, 2001; Kim ve ark, 2005; Virág ve ark, 2002).



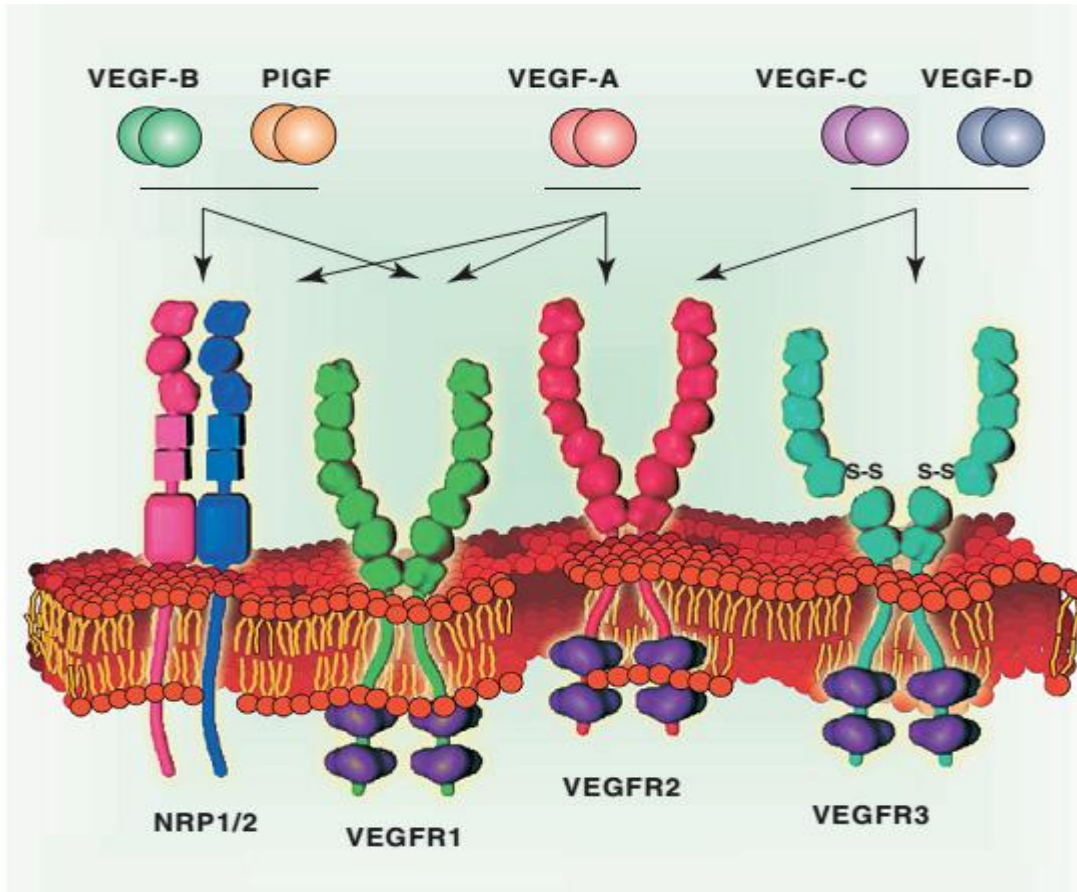
Şekil 2.7: PARP-I yarıklanma Mekanizması

Antikanser çalışmalarında bilim insanları PARP-I inhibitörlerinin bulunmasına da yönelmektedir. PARP inhibitörleri araştırılırken PARP-I'in katalitik bölgesine bağlanan NAD⁺ ile yarışmalı moleküller aranır (Tok ve Koçyiğit, 2015).

2.6. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

1983 yılında Senger ve çalışma ekibi tarafından literatüre kazandırılan VEGF, anjiyogenez ve damar geçirgenliğini etkileyen temel bir glikoproteindir (Senger D.R. ve ark, 1983). VEGF ailesi 6 farklı homolog faktörden oluşmaktadır. Bunlar: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasental büyüme faktörü (PlGF)'dir. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-D, VEGF-E ve PlGF kan damarlarının büyümesinde etkili iken, VEGF-C temel olarak lenf damarlarının gelişmesini etkilemektedir. Ayrıca VEGF-A, VEGF-B ve VEGF-C sinir hücrelerini doğrudan etkilemektedir (Raab ve Plate, 2007).

VEGF reseptörleri tirozin kinaz bağımlı ve tirozin kinaz bağımsız reseptörler olmak üzere ikiye ayrılırlar. VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 tirozin kinaz bağımlı reseptörlerdir. Nörofilin-1 (NP-1) ve nörofilin-2 (NP-2) tirozin kinaz bağımsız reseptörlerdir. VEGF üyeleri bu reseptörlere farklı bağlanma eğilimi gösterirler (Takahashi ve Shibuya, 2005).



Şekil 2.8: VEGF ailesinin ligand ve reseptörleri (Xuri ve ark, 2012).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

4-Nitrobenzoil klorür (Sigma-aldrich), L-Tirozin (Sigma-aldrich), L-Histidin (Sigma-aldrich), L-Lisin (Sigma-aldrich), L-Valin (Sigma-aldrich), L-Prolin (Sigma-aldrich), Sodyum Hidroksit (Sigma-aldrich), Hidroklorik Asit (Sigma-aldrich), Etanol (Sigma-aldrich), RPMI- 1640 besiyeri with HEPES with L-glutamin (Capricorn), penisilin-streptomisin (İnvitrogen), Fetal bovine serum (İnvitrogen), Trypsin-EDTA (İnvitrogen), DPBS (İnvitrogen), Dimetil sülfoksit (Sigma), WST-1 (Roche), Human PARP elisa kit (Fine Test), Human VEGF elisa kit (Fine Test).

3.2. Kullanılan Malzemeler

Yarı otomatik mikropipetler (10µL, 200µL, 1000µL) (ISOLAB), 8 kanallı otomatik pipet (Pipetman), Şarjlı pipet (Dragon Lab) Steril Pipet (5mL-10mL'lik) (Costar), filtre (0,22 µm) (Millipore), steril mikropipet ucu (10, 200, 1000 µL) (Eppendorf), Falcon Tüp (15mL, 50mL'lik) (Orange Scientific), Steril eppendorf (Axygen Quality), Hücre kültür flaskı (25 cm²-75cm²) (Orange Scientific), 96 kuyucuklu hücre plağı (Costar), 24 kuyucuklu hücre plağı (Costar).

3.3. Kullanılan Cihazlar

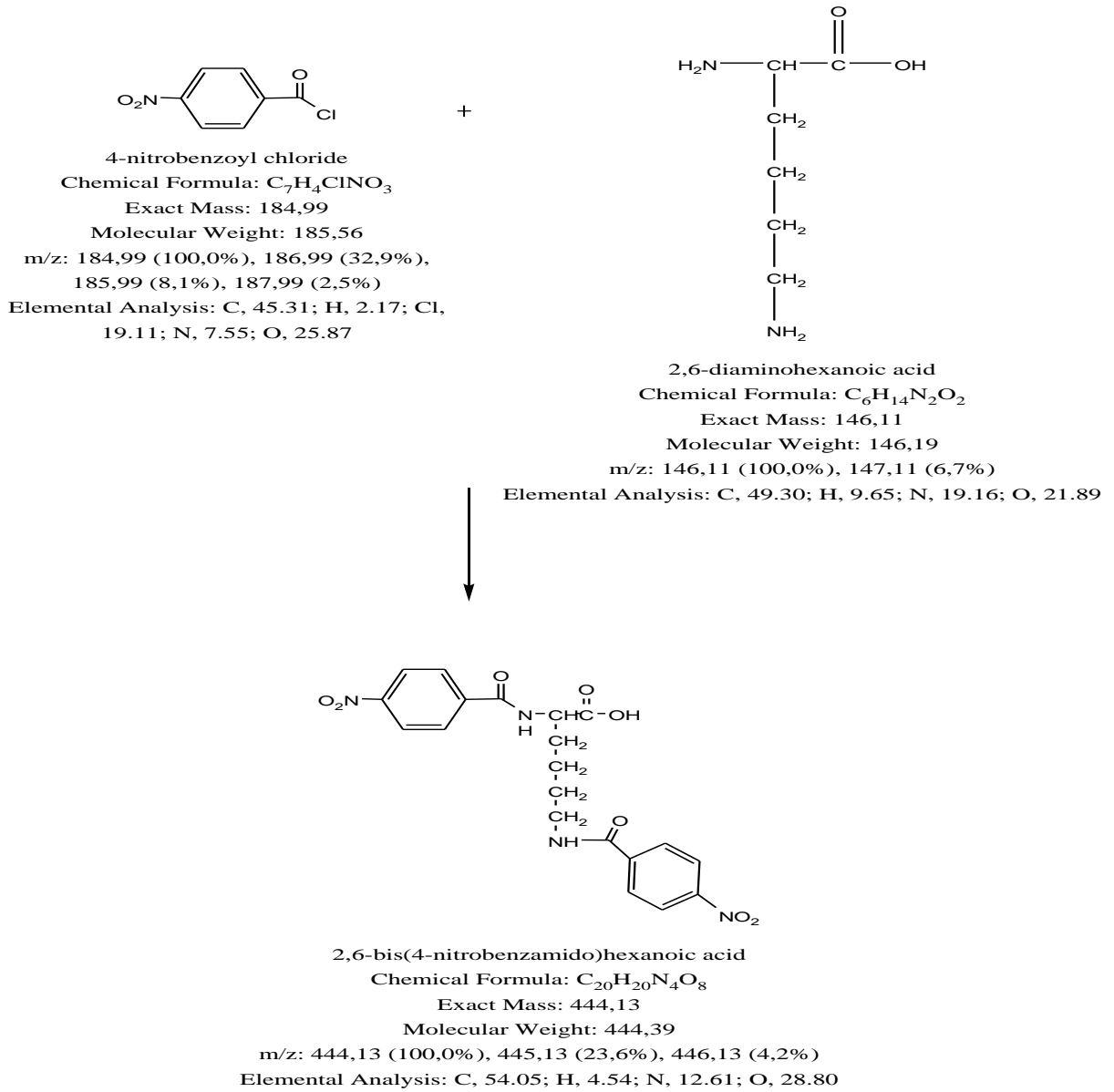
1. Biyogüvenlik kabini (Heraeus HS12)
2. CO₂ İnkübatörü (Nuair NU5500)
3. İnverted Mikroskop (Olympus CK40)
4. UV-Visible Multiskan Spektrofotometre (Diagnostik Automation)
5. Soğutmalı Santrifüj (15 ml falkon için) (Hettich D78532)
6. Soğutmalı Santrifüj (eppendorf için) (Eppendorf 5415R)
7. Mikroplate Shaker (ısıtmalı), (Eksper HT)
8. EVE™ Otomatik Hücre Sayım Cihazı (NanoEnTek)
9. -80 Dondurucu (Nüve NF 190)
10. FT-IR (Perkin Elmer Precisely Spectrum One)

11. Erime noktası tayin cihazı (Barnstead Electrothermal 9100)

12. pH Metre (Hanna Instrument HI 221)

3.4. Sentez Çalışmaları

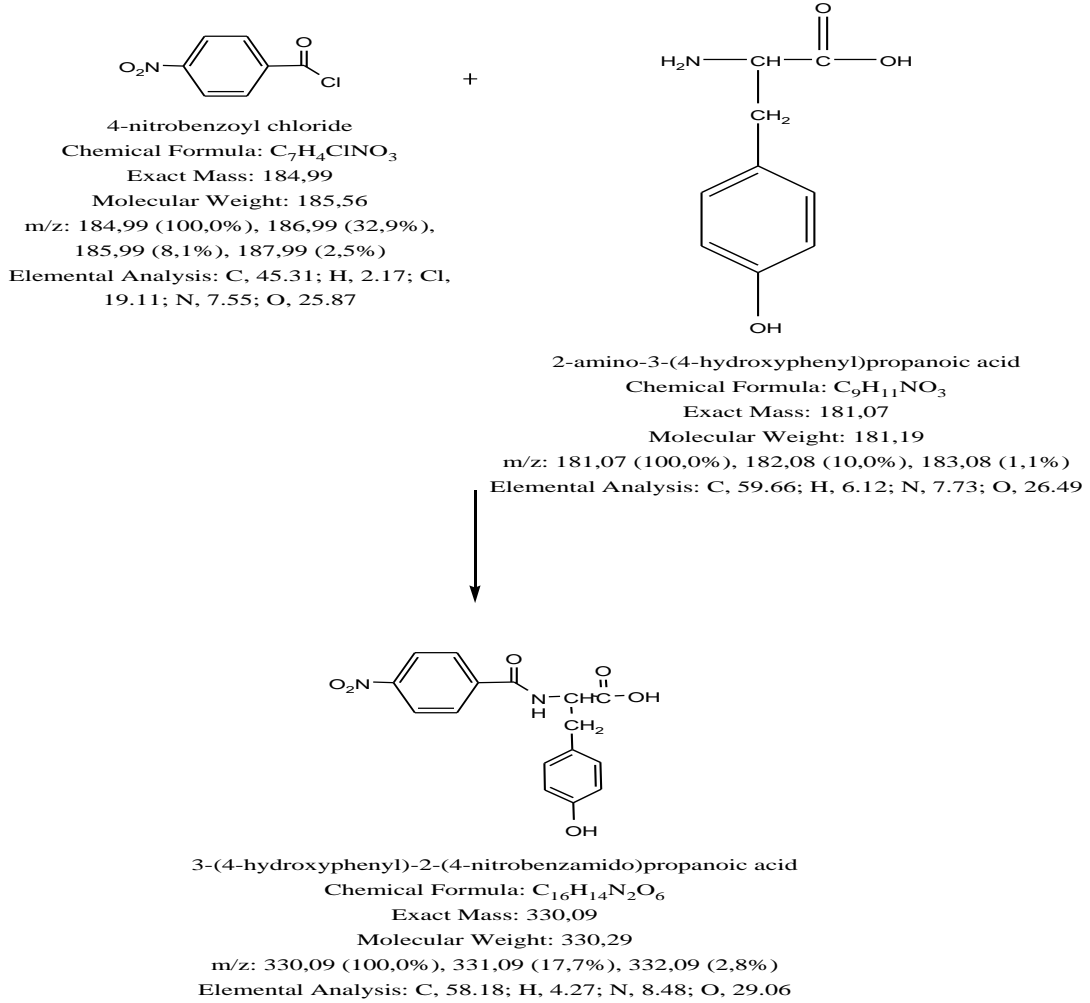
3.4.1. 2,6-bis(4-nitrobenzamido) hekzanoik asit Sentezi (B1)



Şekil 3.1. 2,6-bis(4-nitrobenzamido) hekzanoik asidin yapısı

0,73g(5 mmol) L-lisin ve 1,5 g sodyum asetat 100mL'lik bir beher içerisinde 10 mL 1N NaOH' da çözüldü ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu çözeltinin üzerine, 0,93g(5 mmol) p-nitrobenzoilchlorür ilave edildi ve 15 dk boyunca karıştırıldıktan sonra süzüldü. Süzülen çözeltiliye 3N HCl çökelek gözlemlenmeyene dek damla damla ilave edildi. Bu işlemle birlikte oluşan beyaz katı dibe çöktü. Oluşan bu çökelek vakum pompasında süzüldü. Elde edilen beyaz renkli katı madde etanolde kristallendirildi. (E.N: 188-190 °C dekompoz, verim: 0,39g %27)

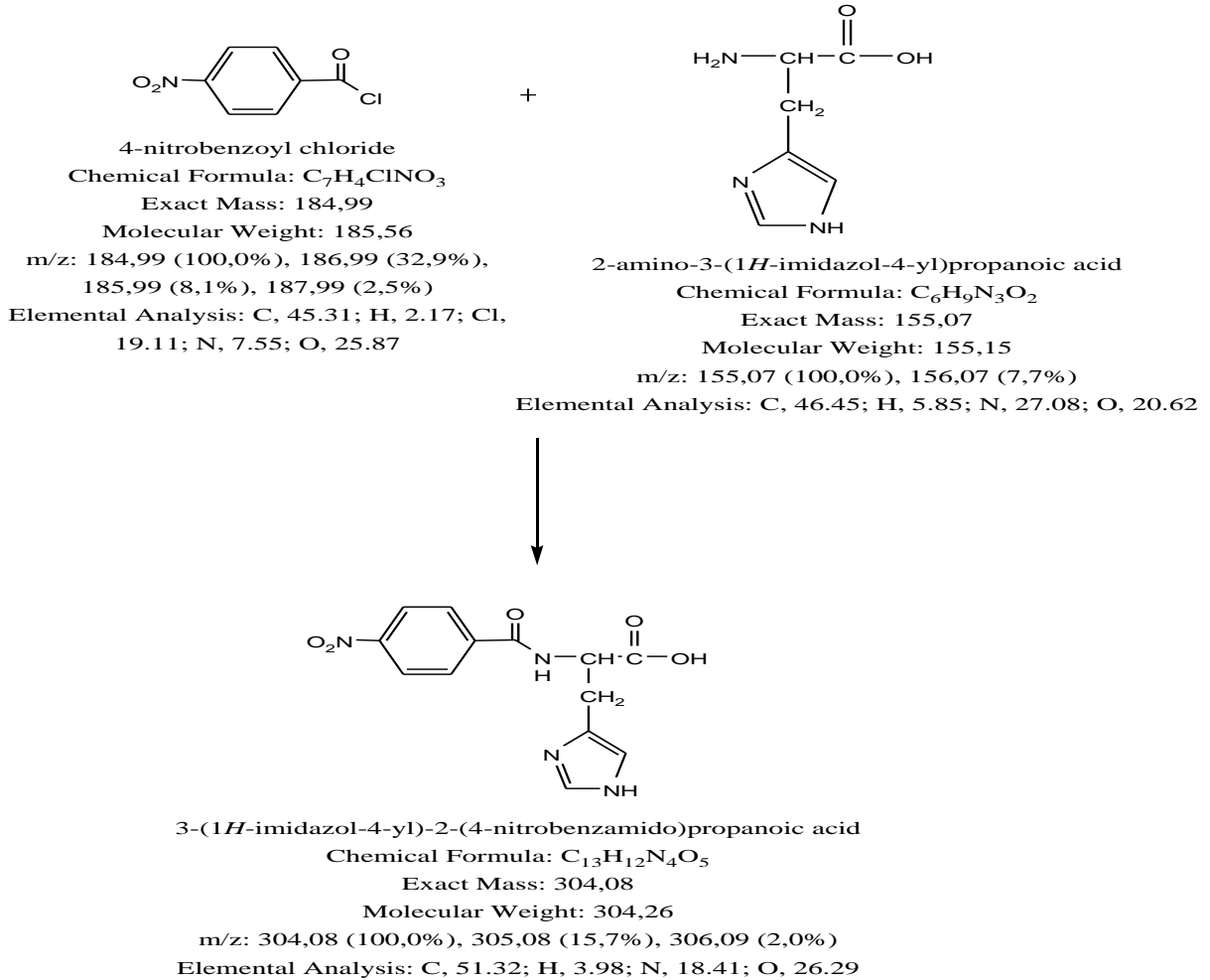
3.4.2. N-p-Nitrobenzoil-L-tirozin Sentezi (B2)



Şekil 3.2. N-p-nitrobenzoil-L-tirozin yapısı

0,91g(5 mmol) L-Tirozin ve 1,5 g sodyum asetat 100mL'lik bir beher içerisinde 10 mL 1N NaOH' da çözüldü ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu çözeltinin üzerine, 0,93g(5 mmol) p-nitrobenzoilchlorür ilave edildi ve 15 dk boyunca karıştırıldıktan sonra süzüldü. Süzülen çözeltiliye 3N HCl çökelek gözlemlenmeyene dek damla damla ilave edildi. Bu işlemle birlikte oluşan beyaz katı dibe çöktü. Oluşan bu çökelek vakum pompasında süzüldü. Elde edilen beyaz renkli katı madde etanolde kristallendirildi. (E.N:232, verim: 0,9g %55)

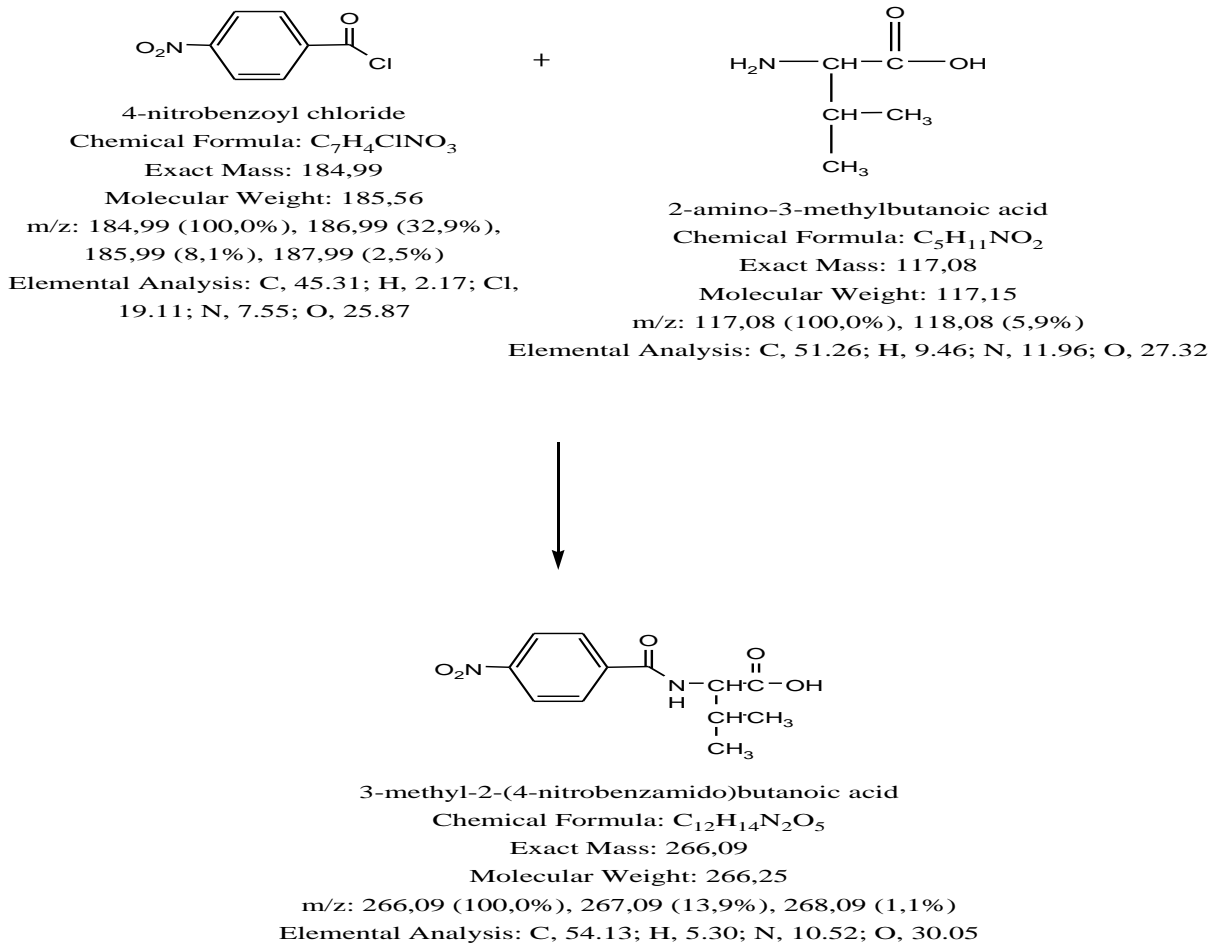
3.4.3. N-p-Nitrobenzoil-L-histidin Sentezi (B3)



Şekil 3.3. N-p-nitrobenzoil-L-histidin yapısı

0,775g (5 mmol) L-histidin ve 1,5 g sodyum asetat 100mL'lik bir beher içerisinde 10 mL 1N NaOH' da çözüldü ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu çözeltinin üzerine, 0,93g (5 mmol) p-nitrobenzoilklorür ilave edildi ve 15 dk boyunca karıştırıldıktan sonra süzüldü. Süzülen çözeltiliye 3N HCl çökelek gözlemlenmeyene dek damla damla ilave edildi. Bu işlemle birlikte oluşan beyaz katı dibe çöktü. Oluşan bu çökelek vakum pompasında süzüldü. Elde edilen beyaz renkli katı madde etanolde kristallendirildi. (E.N:236-238 decompoze, verim: 0,39g %27)

3.4.4. N-p-Nitrobenzoil-L-valin Sentezi (B4)

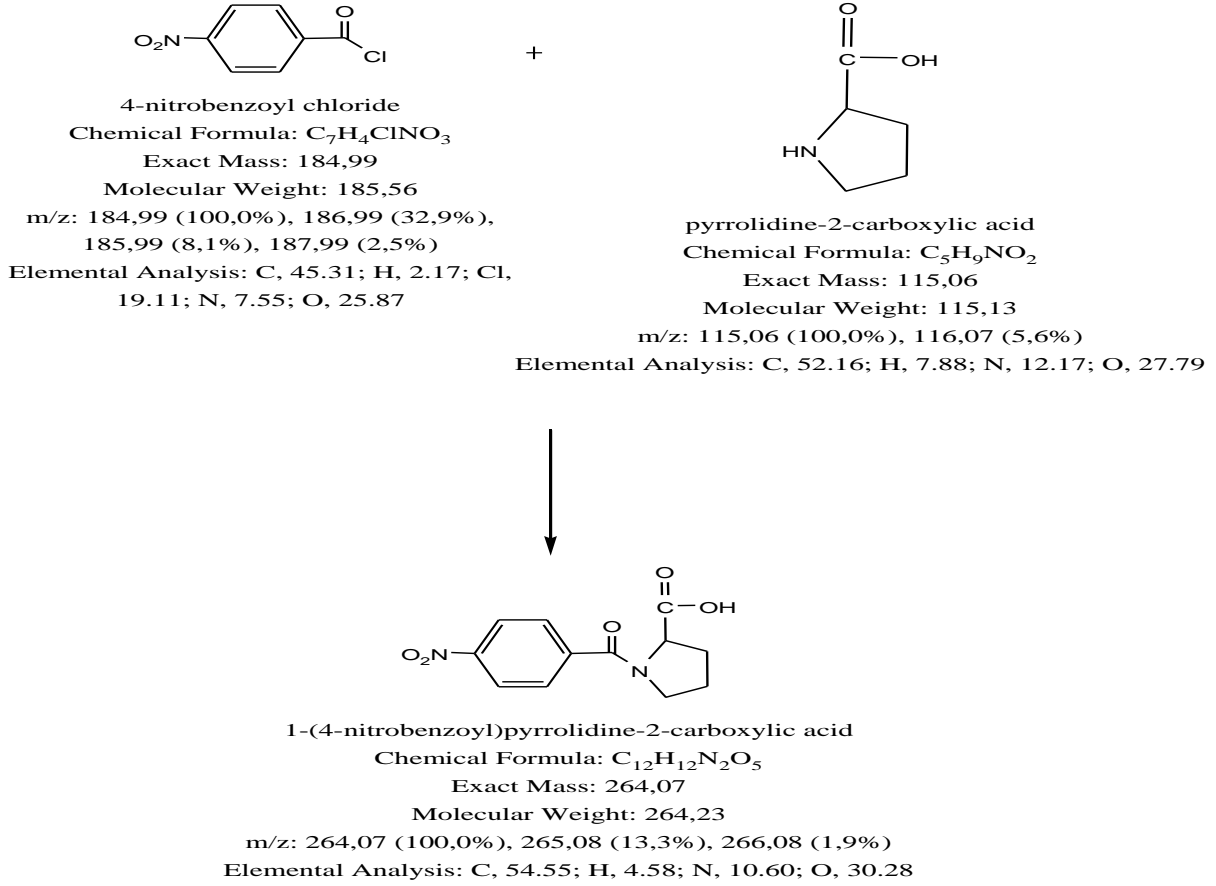


Şekil 3.4. N-p-nitrobenzoil-L-valin yapısı

0,585g(5 mmol) L-Valin ve 1,5 g sodyum asetat 100mL'lik bir beher içerisinde 10 mL 1N NaOH' da çözüldü ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu çözeltinin üzerine, 0,93g (5 mmol) p-nitrobenzoilklorür ilave edildi ve 15 dk boyunca karıştırıldıktan sonra süzüldü. Süzülen çözeltiliye 3N HCl çökelek gözlemlenmeyene dek damla damla ilave

edildi. Bu işlemle birlikte oluşan beyaz katı dibe çöktü. Oluşan bu çökelek vakum pompasında süzüldü. Elde edilen beyaz renkli katı madde etanolde kristallendirildi. (E.N: 131 °C, verim: 0,68g %51)

3.4.5. N-p-Nitrobenzoil-L-prolin Sentezi (B5)



Şekil 3.5. N-p-nitrobenzoil-L-prolin yapısı

0,57g(5 mmol) L-prolin ve 1,5 g sodyum asetat 100mL'lik bir beher içerisinde 10 mL 1N NaOH' da çözüldü ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu çözeltinin üzerine, 0,93g(5 mmol) p-nitrobenzoilchlorür ilave edildi ve 15 dk boyunca karıştırıldıktan sonra süzüldü. Süzülen çözeltiliye 3N HCl çökelek gözlemlenmeyene dek damla damla ilave edildi. Bu işlemle birlikte oluşan beyaz katı dibe çöktü. Oluşan bu çökelek vakum pompasında süzüldü. Elde edilen beyaz renkli katı madde etanolde kristallendirildi. (E.N:146-148 °C verim: 0,6g %45)

3.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

Aminoasitlerden yola çıkılarak sentezlenen bileşiklerin kanser hücrelerinde sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla, çalışmamızda HeLa serviks kanser hücreleri kullanılmıştır. Stoktan çıkarılan HeLa hücreleri %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren L-glutamin ve HEPES'li RPMI-1640 besiyerinde, 25 cm² lik flasklarda, %5 CO₂ ve 37 °C ortam koşullarında büyütülmüştür. Hücreler flaskları %80-90 oranında doldurduklarında yeni 25 cm² ve 75 cm² lik flasklara pasajlanarak deneylerde kullanılmak üzere stoklar çoğaltılmıştır.

3.5.1 Hücrelerin Sayılması

HeLa hücreleri flaskları %80-90 oranında doldurduklarında besiyeri dökülerek hücreler 2 kez 3 mL DPBS ile yıkanmıştır. Flaskın ebatına ve hücre yoğunluğuna bağlı olarak flaskın içerisine 500-750 µL 1X tripsin/EDTA ilave edilmiştir. Flask bir-iki dakika CO₂ inkübatöründe bekletilerek yüzeye yapışmış hücrelerin kalkması sağlanmıştır. Tripsinin toksik etkisini nötralize etmek için kalkan hücrelerin üzerine eklenen tripsin miktarının beş katı kadar medium ilave edilmiştir. Flask içeriği 15 mL'lik falcon tüpüne aktararak 1100 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet kısmına besiyeri eklenmiştir. HeLa hücreleri tripan mavisi ile boyanarak, hücre sayım cihazında sayılmıştır.

3.5.2. Sentezlenen Amit Dozlarının Hazırlanması

Katı halde elde edilen amitlerin DMSO içerisinde 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlanmıştır. Stok çözeltiliden, besiyeri ile gerekli seyreltmeler yapılarak hücrelere uygulanmak üzere 25, 50, 100, 200 µM'lık dozlar elde edilmiştir. En yüksek amit konsantrasyonunda DMSO oranı %0,1 olduğundan, kontrol grubuna içerisinde %0,1 DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır.

3.5.3 WST-I Sitotoksosite Testi

HeLa hücreleri %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren L-glutamin ve HEPES'li RPMI-1640 besiyerinde, 25 cm² lik flasklarda, %5 CO₂ ve 37 °C ortam koşullarında büyütülmüştür. Hücreler flaskı istenilen oranda kaplayınca sayımı yapılarak, her bir

kuyucukta 20.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara 100 µL besiyeri ortamında eklenmiştir. Hücrelerin yapışmaları için inkübatörde 24 saat inkübasyona maruz bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda eski besiyeri dökülerek kuyucuklara 100 µL amit konsantrasyonları (25, 50, 100, 200 µM) uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hücrelere ise 100 µL %0,1 DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır. Plakalar 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda her bir kuyucuktaki hücreler üzerine 10 µL WST-I reaktifi ilave edilerek, hücreler 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plakalar spektrofotometrede 420 nm dalga boyunda okunmuştur. Deneyler birbirinden bağımsız 3 tekrar şeklinde çalışılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri hücre canlılığı ile direkt ilişkilendirilmiştir.

3.5.4. Apoptoz ilişkili PARP Testi

PARP 116 kDa molekül ağırlığına sahip bir çekirdek enzimidir. DNA hasarının belirlenmesi, DNA onarımı ve apoptoz reaksiyonları gibi birçok hücre içi moleküler olayda görev almaktadır. PARP kaspazın belirlenen ilk substratıdır. Apoptoz sürecinde kaspaz 3 ve kaspaz 7, Asp214 ve Gly215 aminoasitleri arasındaki bağı kırarak PARP proteinini 85 kDa ve 25 kDa ağırlığındaki iki fragmente yarırlar. Böylelikle PARP inaktive olarak, hücrenin apoptoza girmesi sağlanır.

Bu çalışmada PARP-I miktarı ELİZA yöntemi ile ölçülecektir. PARP-I eliza kiti 96 kuyucuklu plaka içermektedir ve bu kuyucukların her biri PARP-I antikoru ile kaplanmıştır. Biotin ile konjuge edilmiş PARP-I antikoru dedeksiyon antikoru olarak kullanılmaktadır. Plakaya ilk olarak standartlar, numuneler ve biotin ile konjuge edilen dedeksiyon antikoru ilave edilir ve inkübasyondan sonra plaka yıkanır. Yıkamadan sonra HRP-Streptavidin eklenerek, dedeksiyon antikoru tutunur. HRP enzimatik reaksiyonunu gözlemlemek için renk oluşturucu madde olarak TMB ortama ilave edilir. Son olarak, TMB eklendikten sonra oluşan mavi rengi sarıya döndürmek için asidik stop solüsyonu kuyucuklara eklenir. Oluşan bu sarı rengin optik dansitesi 450 nm'de mikrolaka okuyucuda okunur ve elde edilen standart grafikten PARP-I miktarı hesaplanır (Fine Test PARP-I Elisa Kit, 2017).

PARP-I miktarını ölçmek için, 24 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 40.000 hücre olacak şekilde HeLa hücreleri ekildi. Hücrelerin yapışması için plaka 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyeri atılarak hücreler 24 saat boyunca amit konsantrasyonları ile inkübe edildi ve HeLa hücreleri tripsin ile kaldırılarak hücreler ependorf tüplere alındı. Hücreler üç kez soğuk DPBS ile yıkandı. Her bir ependorfa 200 µL lizis tamponu ilave edildi

ve 30 dakika buz içerisinde bekletildi. Bu süre içerisinde 10 dakika aralıklarla ependorf tüpler vorteksenerek PARP-I proteini hücrelerden ekstrakte edildi. 30 dakika ekstraksiyondan sonra, ependorf tüpler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, hücre lizatı ayrı ependorflara alındı ve Elisa ölçümlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi.

Eliza protokolü aşağıdaki gibi uygulandı.

1. Standart ve numuneler eklenmeden önce plaka 2 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.
2. Kitin manuelinde belirtilen standart konsantrasyonları hazırlandı. 40 ng/mL stok standart çözeltisinden 300 µl alındı ve 300 µl standart dilüenti ile seyreltildi. Bu çözeltiden de 300 µl alınıp ve üzerine ve 300 µl standart dilüent eklenerek seri dilüsyonlar ile konsantrasyonları (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 ve 20 ng/mL) olacak şekilde 6 standart hazırlandı.
3. Hazırlanan standartlar ve hücre lizatından plakadaki her bir kuyucuğa 100 µl ilave edildi. Kör kuyucuğuna 100 µl standart dilüenti eklendi.
4. Plakanın üzeri koruyucu membran ile kapatılarak, 37 °C ve 200 rpm'de 90 dakika inkübe edildi.
5. Koruyucu membran çıkarılarak plaka içeriği döküldü.
6. Biotin antikoru, antikor dilüenti ile 1:100 oranında dilüe edildi. Bu karışımdan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi.
7. Plakanın üzeri koruyucu membran ile kapatılarak, 37 °C ve 200 rpm'de 60 dakika inkübe edildi.
8. Yıkama solüsyonu distile su ile 1:25 oranında dilüe edilerek hazırlandı. Bu solüsyon ile plaka 3 defa manuel olarak yıkandı.
9. HRP-Streptavidin, HRP-Streptavidin dilüenti ile 1:100 oranında dilüe edildi. Bu karışımdan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi.
10. Plakanın üzeri koruyucu membran ile kapatılarak, 37 °C ve 200 rpm'de 30 dakika inkübe edildi.
11. Koruyucu membran kaldırılarak plaka içeriği döküldü. Plaka 5 defa yıkama solüsyonu ile manuel olarak yıkandı.
12. Her bir kuyucuğa 90 µl TMB substratı ilave edildi.
13. Plakanın üzeri koruyucu membran ile kapatılarak 37 °C ve 200 rpm'de 15 dakika inkübe edildi. Bu esnada mavi renk oluştu.
14. Plakanın üzerindeki koruyucu membran kaldırıldı. Oluşan mavi rengi, sarıya dönüştürmek için her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi.
15. Optik dansite mikropilaka okuyucu da 450 nm' de ölçüldü.

16. Standartların konsantrasyonlarına karşılık okunan OD değerlerine bağlı olarak standart grafiği çizildi. 4-parametre denklemi bulundu ve bu denklemden yola çıkılarak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.5.5. Anjiyogenez ilişkili VEGF Testi

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), endotel hücrelerinin sayıca artmalarını ve yeni oluşan damarda yaşamlarını sürdürmelerini sağlamaktadır. Ayrıca matriks metalloproteinazlar gibi matriks parçalayıcı enzimlerin artışını sağlayarak anjiyogenezi indüklemektedir. Bu olayın tümör hücrelerinin büyümesi ve gelişmesinde de etkili olduğu bilinmektedir. Kanser tedavisindeki temel yaklaşımlardan biri de anjiyogenez inhibitörlerinin geliştirilmesidir (Durak ve ark., 2005; Yaramış 2011).

VEGF eliza kiti 96 kuyucuklu plaka içermektedir ve bu kuyucukların her biri VEGF antikoru ile kaplanmışdır. Biotin ile konjuge edilmiş VEGF antikoru dedeksiyon antikoru olarak kullanılmaktadır. Plakaya ilk olarak standartlar, numuneler ve biotin ile konjuge edilen dedeksiyon antikoru ilave edilir ve inkübasyondan sonra plaka yıkanır. Yıkamadan sonra HRP-Streptavidin eklenerek, dedeksiyon antikoru tutunur. HRP enzimatik reaksiyonunu gözlemek için renk oluşturucu madde olarak TMB ortama ilave edilir. Son olarak, TMB eklendikten sonra oluşan mavi rengi sarıya döndürmek için asidik stop solüsyonu kuyucuklara eklenir. Oluşan bu sarı rengin optik dansitesi 450 nm'de mikropilaka okuyucu' da okunur ve elde edilen standart grafikten VEGF miktarı hesaplanır (Fine Test VEGF Elisa Kit, 2017).

VEGF miktarını ölçmek için, 24 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 40.000 hücre olacak şekilde HeLa hücreleri ekildi. Hücrelerin yapışması için plaka 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyeri atılarak hücreler 24 saat boyunca amit konsantrasyonları ile inkübe edildi ve HeLa hücreleri tripsin ile kaldırılarak hücreler ependorf tüplere alındı. Hücreler üç kez soğuk DPBS ile yıkandı. Her bir ependorfa 200 µL lizis tamponu ilave edildi ve 30 dakika buz içerisinde bekletildi. Bu süre içerisinde 10 dakika aralıklarla ependorf tüpler vorteksenerek VEGF proteini hücrelerden ekstrakte edildi. 30 dakika ekstraksiyondan sonra, ependorf tüpler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek, hücre lizatı ayrı ependorflara alındı ve Eliza ölçümlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi.

Eliza protokolü aşağıdaki gibi uygulandı.

1. Standart ve numuneler eklenmeden önce plaka 2 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.

2. Kitin manuelinde belirtilen standart konsantrasyonları hazırlandı. 200 pg/mL stok standart çözeltisinden 300 µl alındı ve 300 µl standart diluenti ile seyreltildi. Bu çözeltiden de 300 µl alınıp ve üzerine ve 300 µl standart diluent eklenerek seri dilusyonlar ile konsantrasyonları (31.25, 62.5, 125, 250, 500 ve 1000 pg/mL) olacak şekilde 6 standart hazırlandı.
3. Hazırlanan standartlar ve hücre lizatından plakadaki her bir kuyucuğa 100 µl ilave edildi. Kör kuyucuğuna 100 µl standart diluenti eklendi.
4. Plakanın üzeri koruyucu membran ile kapatılarak, 37 °C ve 200 rpm'de 90 dakika inkübe edildi.
5. Koruyucu membran çıkarılarak plaka içeriği döküldü.
6. Biotin antikoru, antikor dilüenti ile 1:100 oranında dilüe edildi. Bu karışımdan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi.
7. Plakanın üzeri koruyucu membran ile kapatılarak, 37 °C ve 200 rpm'de 60 dakika inkübe edildi.
8. Yıkama solüsyonu distile su ile 1:25 oranında dilüe edilerek hazırlandı. Bu solüsyon ile plaka 3 defa manuel olarak yıkandı.
9. HRP-Streptavidin, HRP-Streptavidin dilüenti ile 1:100 oranında dilüe edildi. Bu karışımdan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi.
10. Plakanın üzeri koruyucu membran ile kapatılarak, 37 °C ve 200 rpm'de 30 dakika inkübe edildi.
11. Koruyucu membran kaldırılarak plaka içeriği döküldü. Plaka 5 defa yıkama solüsyonu ile manuel olarak yıkandı.
12. Her bir kuyucuğa 90 µl TMB substratı ilave edildi.
13. Plakanın üzeri koruyucu membran ile kapatılarak 37 °C ve 200 rpm'de 15 dakika inkübe edildi. Bu esnada mavi renk oluştu.
14. Plakanın üzerindeki koruyucu membran kaldırıldı. Oluşan mavi rengi, sarıya dönüştürmek için her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi.
15. Optik dansite mikropłaka okuyucu da 450 nm' de ölçüldü.
16. Standartların konsantrasyonlarına karşılık okunan OD değerlerine bağlı olarak standart grafiği çizildi. 4-parametre denklemi bulundu ve bu denklemden yola çıkılarak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.6. İstatistiksel Analizler

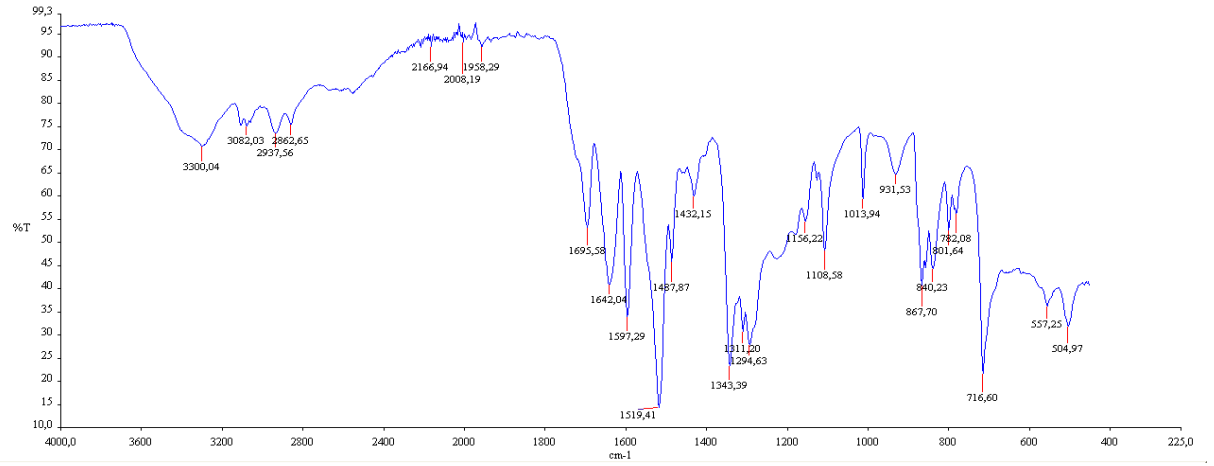
Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS (for Windows Release 11.5 Standart Version Copyright © Spss Inc. 1989-2001) hazır paket programı kullanılarak yapıldı. Grupların amit dozlarına bağı pozitif veya negatif korelasyon gösterip göstermediğini çift yönlü korelasyon testi kullanılarak tespit edildi ($p<0,05$).

HeLa hücrelerine sentezlenen amitlerin farklı dozları uygulanarak elde edilen sitotoksisite, PARP-I ve VEGF verilerinin normal dağılıma uygunluğu belirlendi. Tek yönlü ANOVA ve post-hoc olarak Tukey testi kullanılarak verilerin istatistiksel analizi yapıldı. Tüm çalışmalar %95 güven aralığı baz alınarak gerçekleştirildi ($p<0,05$).

4. BULGULAR

4.1. Amitlere Ait FT-IR Spektrumları

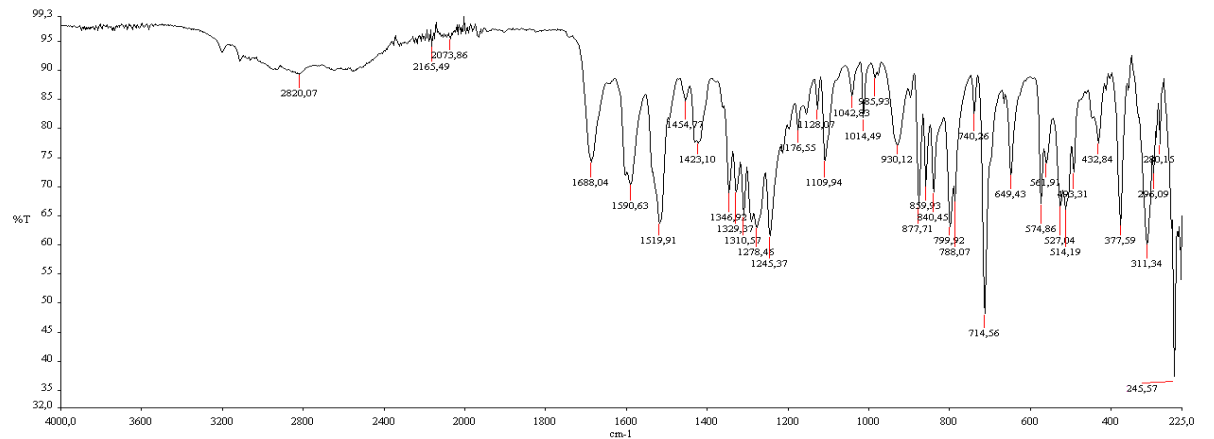
4.1.1. 2,6-bis(4-nitrobenzamido) hekzanoik asit'e ait FT-IR spektrumu



Şekil 4.1. 2,6-bis(4-nitrobenzamido) hekzanoik aside ait FTIR spektrumu

IR= 2937,2862(CH), 1695,1642,1597(C=O), 1519 (C-C), 1343 (C-N), 1311 (C-O)

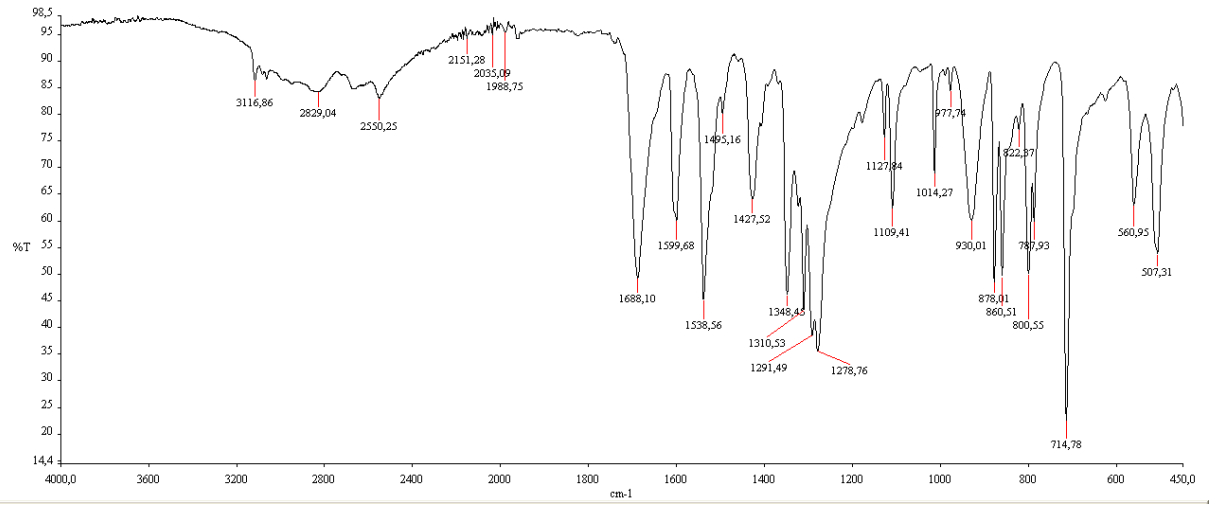
4.1.2. N-p-Nitrobenzoil-L-tirozin'e ait FT-IR spektrumu



Şekil 4.2. N-p-Nitrobenzoil-L-tirozin'e ait FT-IR spektrumu

IR= 2937,2820(CH), 1688,1590(C=O), 1519 (C-C), 1346 (C-N), 1245 (C-O)

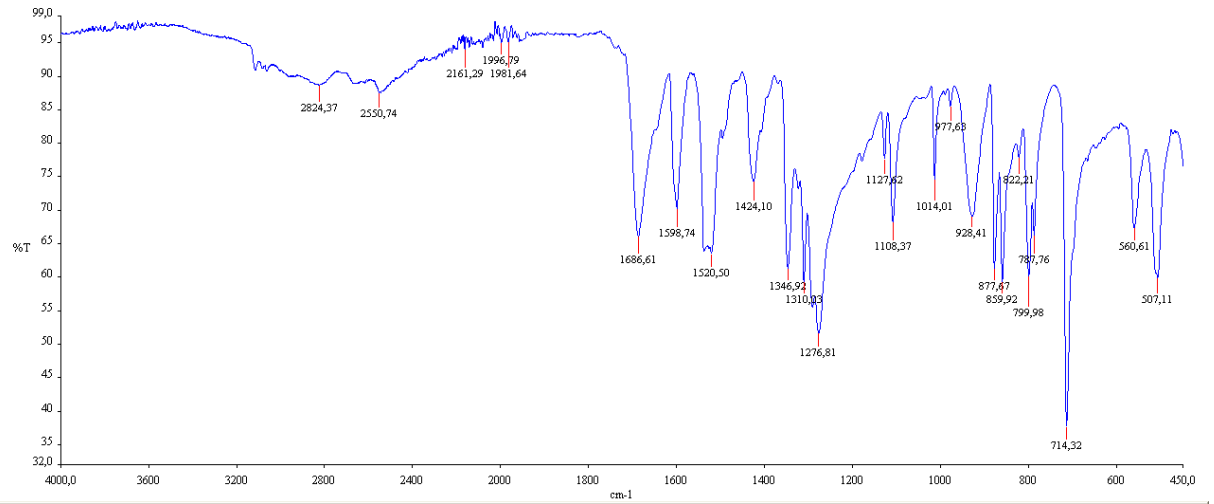
4.1.3. N-p-Nitrobenzoil-L-histidin'e ait FT-IR spektrumu



Şekil 4.3. N-p-Nitrobenzoil-L-histidin'e ait FT-IR spektrumu

IR= 3116(NH), 2829,2550(CH), 1688,1599(C=O), 1538 (C-C), 1348 (C-N), 1291 (C-O)

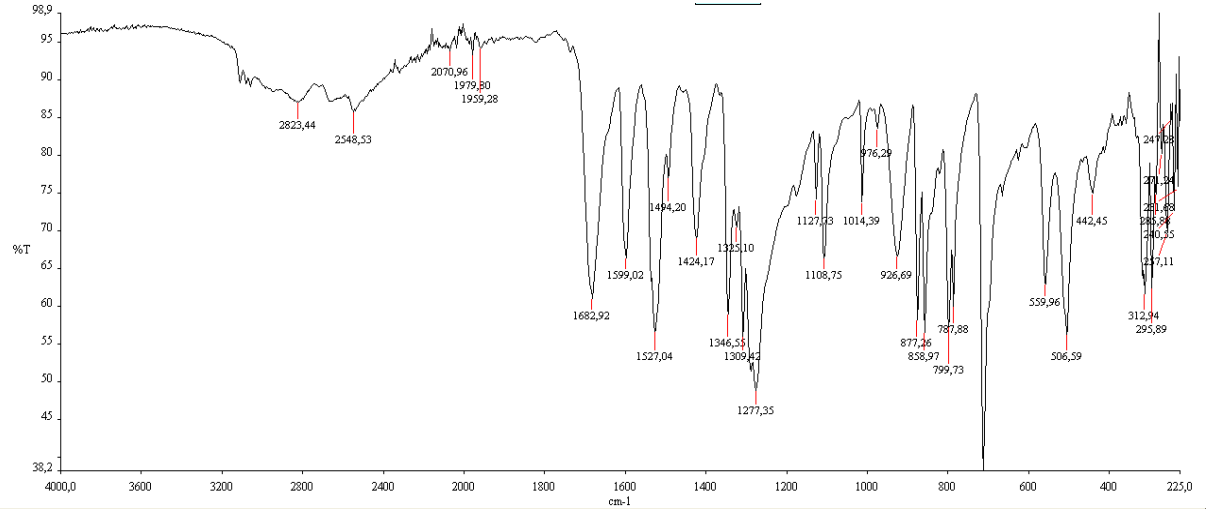
4.1.4. N-p-Nitrobenzoil-L-valin'e ait FT-IR spektrumu



Şekil 4.4. N-p-Nitrobenzoil-L-valin'e ait FT-IR spektrumu

IR= 2824,2550(CH), 1686,1598(C=O), 1520 (C-C), 1310 (C-N), 1276 (C-O)

4.1.5. N-p-Nitrobenzoil-L-prolin'e ait FT-IR spektrumu



Şekil 4.5. N-p-Nitrobenzoil-L-prolin'e ait FT-IR spektrumu

IR= 3082(NH), 2823(CH), 1682,1599(C=O), 1527 (C-C), 1346 (C-N), 1309 (C-O)

4.2. Amit Konsantrasyonlarının Hücre Canlılığına Etkisi

Sentezlenen amitlerin HeLa hücrelerinde zamana ve konsantrasyona bağlı olarak önemli sitotoksik ve proliferatif etkileri belirlenmiştir. WST-I hücre canlılık testi sonucunda Tablo 4.1'de görüldüğü gibi konsantrasyon ve inkübasyon zamanına bağlı olarak % hücre canlılık değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler gözlemlenmiştir ($p < 0.05^*$).

24 saatlik inkübasyon sonunda 25, 50, 100 ve 200 μM amit konsantrasyonlarında % hücre canlılık değerleri kontrol grubuna göre B-1 bileşiği için sırasıyla 82.55*, 77.25*, 85.92* ve 98.51; B-2 bileşiği için sırasıyla 86.52*, 89.54*, 107.09* ve 109.16*; B-3 bileşiği için sırasıyla 82.51*, 112.36*, 125.23* ve 126.18*; B-4 bileşiği için sırasıyla 97.13*, 114.39*, 119.69* ve 122.29*; B-5 bileşiği için sırasıyla 98.81, 92.44*, 88.59* ve 83.70* olarak hesaplanmıştır. B1'in 200 μM ve B5'in 25 μM 'lık dozu hariç diğer tüm dozlarda elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

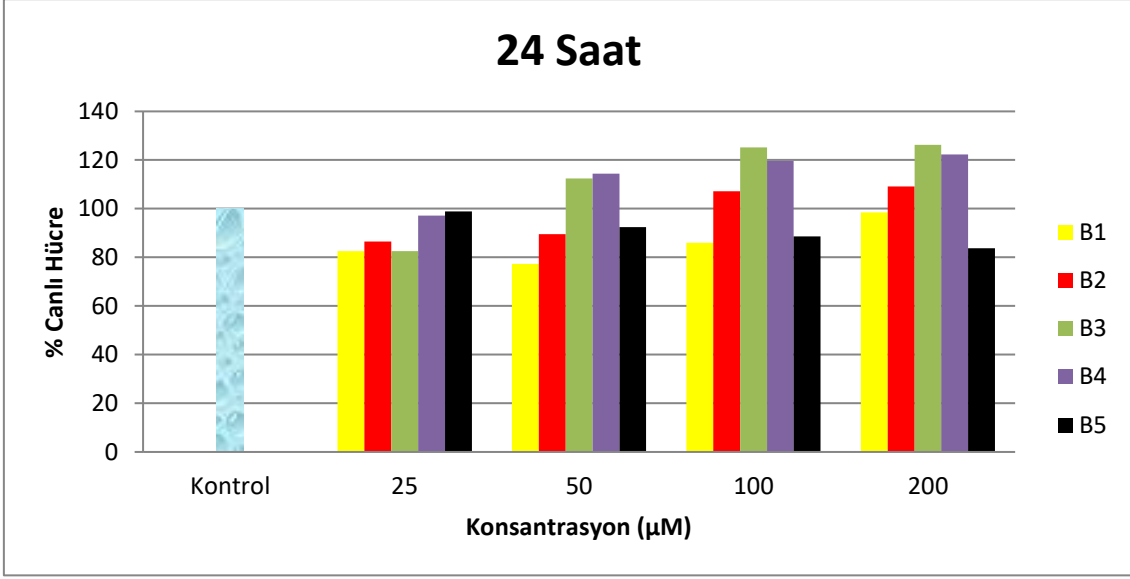
48 saatlik inkübasyon sonunda 25, 50, 100 ve 200 μM amit konsantrasyonlarında % hücre canlılık değerleri kontrol grubuna göre B-1 bileşiği için sırasıyla 93.21*, 81.76*, 94.21* ve 111.58*; B-2 bileşiği için sırasıyla 89.45*, 90.36*, 96.37* ve 103.72*; B-3 bileşiği için sırasıyla 97.23*, 117.98*, 124.46* ve 131.37*; B-4 bileşiği için sırasıyla 100.26, 114.09*, 119.71* ve 124.46*; B-5 bileşiği için sırasıyla 97.66, 91.62*, 85.74* ve 79.26* olarak

hesaplanmıştır. B4 ve B5'in 25 µM'lık dozu hariç diğer tüm dozlarda elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05).

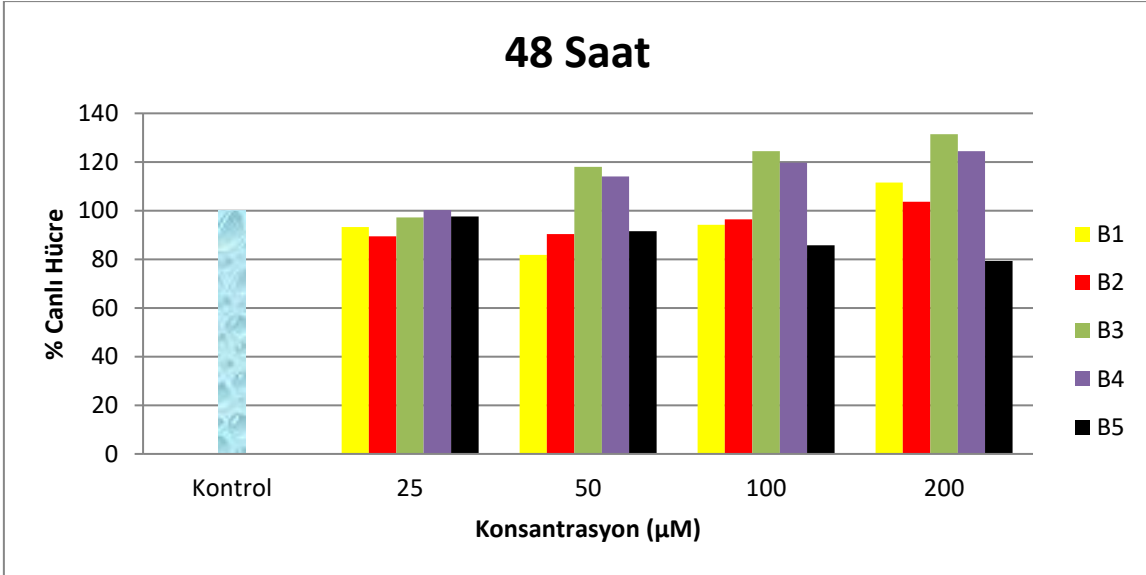
72 saatlik inkübasyon sonunda 25, 50, 100 ve 200 µM amit konsantrasyonlarında % hücre canlılık değerleri kontrol grubuna göre B-1 bileşiği için sırasıyla 82.14*, 80.16*, 104.36*ve 122.5*; B-2 bileşiği için sırasıyla 89.09*, 99.60, 105.08* ve 113.49*; B-3 bileşiği için sırasıyla 105.59*, 110.32*, 119.64* ve 121.43*; B-4 bileşiği için sırasıyla 77.77*, 89.21*, 93.65* ve 119.05*; B-5 bileşiği için sırasıyla 97.82, 91.43*, 78.17* ve 69.46* olarak hesaplanmıştır. B2'nin 50 µM ve B5'in 25 µM'lık dozları hariç diğer tüm dozlarda elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05).

Tablo 4.1. İnkübasyon süresi ve konsantrasyona bağlı % canlı hücre değerleri.

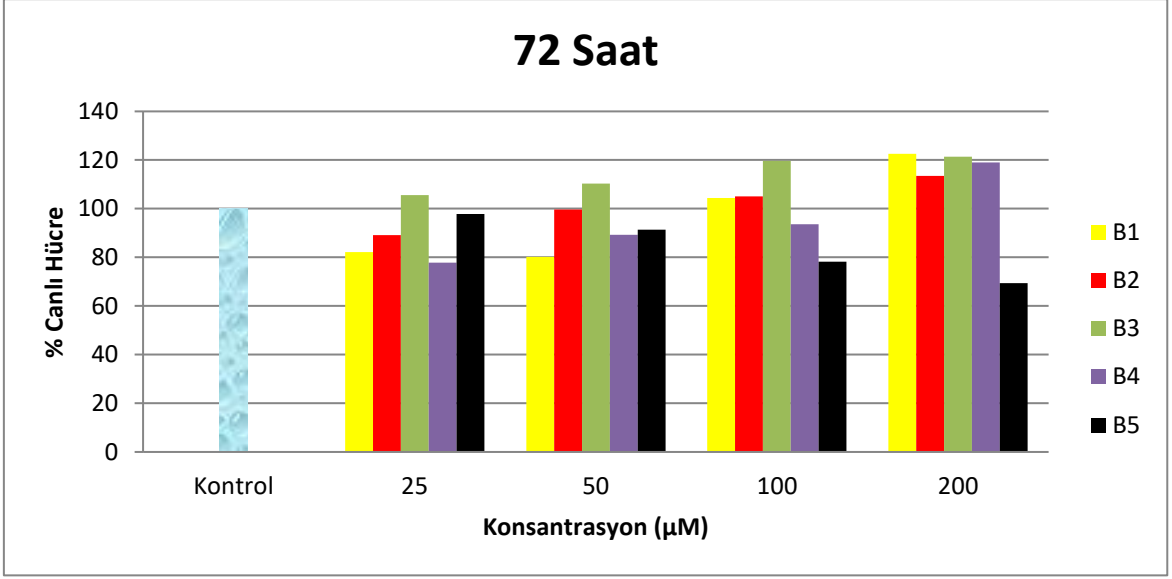
		Bileşik Kodu				
İnkübasyon Süresi	Konsantrasyon (µM)	<i>B-1</i>	<i>B-2</i>	<i>B-3</i>	<i>B-4</i>	<i>B-5</i>
24 SAAT	25	82.55*	86.52*	82.51*	97.13*	98.81
	50	77.25*	89.54*	112.36*	114.39*	92.44*
	100	85.91*	107.10*	125.23*	119.69*	88.58*
	200	98.51	109.16*	126.18*	122.29*	83.70*
48 SAAT	25	93.21*	89.45*	97.24*	100.25	97.66
	50	81.76*	90.36*	117.98*	114.08*	91.61*
	100	94.21*	96.36*	124.46*	119.71*	85.74*
	200	111.58*	103.72*	131.37*	124.45*	79.25*
72 SAAT	25	82.14*	89.08*	105.59*	77.77*	97.82
	50	80.15*	99.60	110.32*	89.20*	91.43*
	100	104.36*	105.08*	119.64*	93.65*	78.17*
	200	122.5*	113.49*	121.43*	119.04*	69.46*



Şekil 4.6. 24 saat inkübasyon sonunda % canlı hücrelerin amit dozlarına göre düzeylerinin sütun grafiği ile gösterilmesi



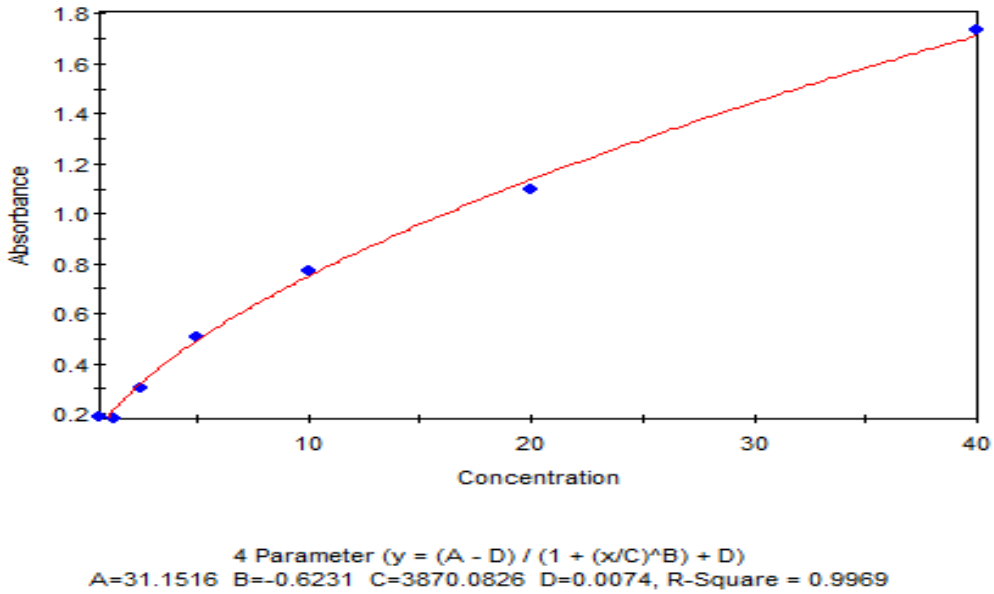
Şekil 4.7. 48 saat inkübasyon sonunda % canlı hücrelerin amit dozlarına göre düzeylerinin sütun grafiği ile gösterilmesi



Şekil 4.8. 72 saat inkübasyon sonunda % canlı hücrelerin amit dozlarına göre düzeylerinin sütun grafiği ile gösterilmesi

4.3. Sentezlenen Amitlerin Apoptoza Etkisi

Sentezlenen amitlerin HeLa hücreleri üzerinde apoptotik etkisini belirlemek amacıyla PARP-I miktarı eliza yöntemiyle ölçülmüştür. Kit protokolü uygulandıktan sonra PARP-I standartlarından faydalanarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Kalibrasyon grafiği yardımıyla, amit konsantrasyonları uygulanan HeLa hücre lizatlarının absorbanslarına karşılık gelen PARP-I miktarları hesaplanmıştır.

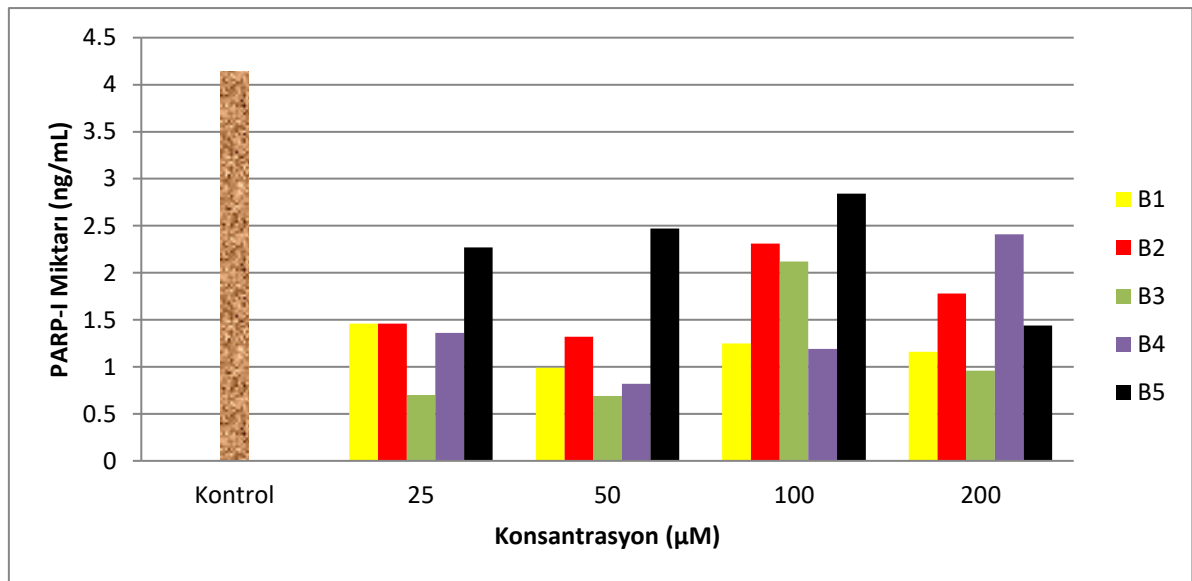


Şekil 4.9. PARP-I'e ait standart grafiği

24 saatlik inkübasyon sonunda 25, 50, 100 ve 200 μM amit konsantrasyonlarında PARP-I miktarı(ng) B-1 bileşiği için sırasıyla 1.46*, 0.99*, 1.25* ve 1.16*; B-2 bileşiği için sırasıyla 1.46*, 1.32*, 2.31* ve 1.78*; B-3 bileşiği için sırasıyla 0.70*, 0.69*, 2.12* ve 0.96* B-4 bileşiği için sırasıyla 1.36*, 0.82*, 1.19* ve 2.41*; B-5 bileşiği için sırasıyla 2.27*, 2.47*, 2.84* ve 1.44* olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubunun PARP-I miktarı ise 4.14 ng ölçülmüştür. Tüm dozlarda elde edilen veriler kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 4.2. 24 saatlik inkübasyon sonunda amit konsantrasyonuna bağlı PARP-I miktarları (ng)

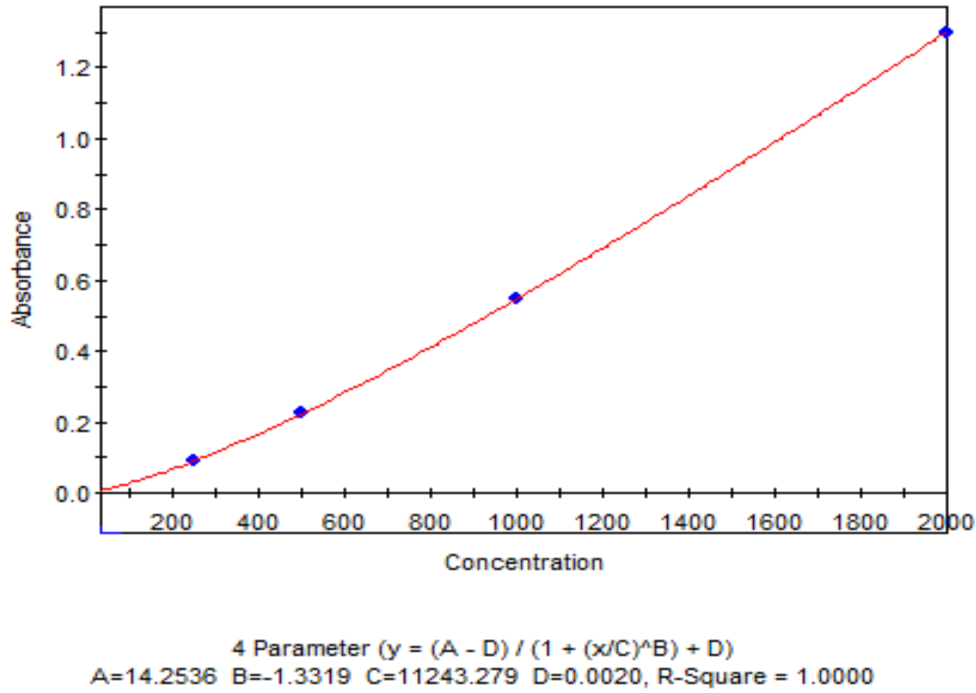
Kontrol= 4.14 ng		Bileşik Kodu				
		B-1	B-2	B-3	B-4	B-5
Konsantrasyon (μM)	25	1,46*	1,46*	0,70*	1,36*	2,27*
	50	0,99*	1,32*	0,69*	0,82*	2,47*
	100	1,25*	2,31*	2,12*	1,19*	2,84*
	200	1,16*	1,78*	0,96*	2,41*	1,44*



Şekil 4.10. PARP-1 proteininin amit dozlarına göre düzeylerinin sütun grafiği ile gösterilmesi

4.4. Sentezlenen Amitlerin Anjiyogeneze Etkisi

Sentezlenen amitlerin HeLa hücreleri üzerinde anjiyogenejik etkisini belirlemek amacıyla VEGF miktarı eliza yöntemiyle ölçülmüştür. Kit protokolü uygulandıktan sonra VEGF standartlarından faydalanarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Kalibrasyon grafiği yardımıyla, amit konsantrasyonları uygulanan HeLa hücre lizatlarının absorbanslarına karşılık gelen VEGF miktarları hesaplanmıştır.

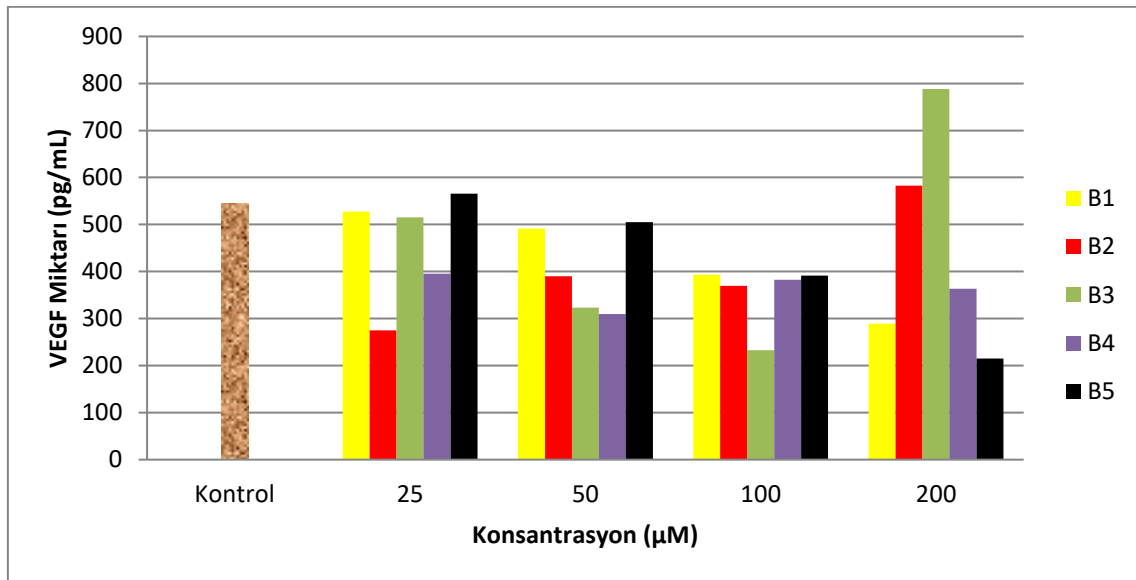


Şekil 4.11. VEGF'ye ait standart grafiği

24 saatlik inkübasyon sonunda 25, 50, 100 ve 200 μ M amit konsantrasyonlarında VEGF miktarı(pg) B-1 bileşiği için sırasıyla 527.27, 491.39*, 393.42* ve 289.36*; B-2 bileşiği için sırasıyla 275.07*, 389.73*, 369.23* ve 582,28*; B-3 bileşiği için sırasıyla 515.39*, 323.21*, 232.84* ve 788.44*; B-4 bileşiği için sırasıyla 395.27*, 309.41*, 382.31* ve 363.57*; B-5 bileşiği için sırasıyla 565.77, 505.14*, 391.58* ve 215.27* olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubunun VEGF miktarı ise 543,75 pg ölçülmüştür. B1 ve B5'in 25 μ M'lık dozları hariç diğer tüm dozlarda elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 4.3. 24 saatlik inkübasyon sonunda amit konsantrasyonuna bağlı VEGF miktarları (pg)

Kontrol= 543.75 pg		Bileşik Kodu				
		B-1	B-2	B-3	B-4	B-5
Konsantrasyon (μ M)	25	527,27	275,07*	515,39*	395,27*	565,77
	50	491,39*	389,73*	323,21*	309,41*	505,14*
	100	393,42*	369,23*	232,84*	382,31*	391,58*
	200	289,36*	582,28*	788,44*	363,57*	215,27*

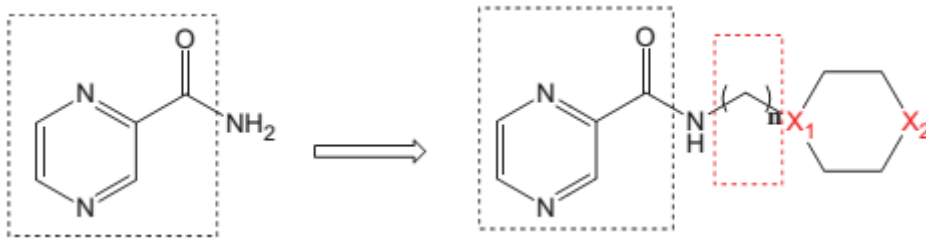


Şekil 4.12. VEGF proteininin amit dozlarına göre düzeylerinin sütun grafiği ile gösterilmesi

5. TARTIŞMA

Kanser, genlerdeki bir dizi mutasyonlar sonucu hücrelerin normal işlevlerini yitirerek aşırı çoğalmaya başlamasıyla karakterize edilen bir hastalıktır. Normal fizyolojik durumlarda proto-onkogenler hücre bölünmesi ve büyümesinden sorumludur, ancak mutasyon sırasında bu genler onkogenlere dönüşerek hücrenin varlığı için tehlikeli bir durum teşkil ederler. Ayrıca, tümör baskılayıcı genlerin eksikliği kontrolsüz hücre büyümesini tetikler ve kanser oluşumu başlar. (Aizawa ve ark, 2016; Hassanpour ve Dehghani, 2017). Kemoterapi, yani kimyasal ajanlar ile kanser hücrelerini yok etmek veya bu hücrelerin büyümesini kontrol altına almak en önemli tedavi yaklaşımıdır. Kemoterapötik ajanlar amit, ester, nitril, hidroksil, amino, nitro v.b fonksiyonel grupları ihtiva eden bileşiklerdir. Birçok amit fonksiyonel grubu içeren bileşiğin karsinomlu hücreler üzerinde toksik, apoptotik ve antianjiyogenejik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Kanser tedavisinde güncel olarak kullanılan indomethacin ve doxorubicin gibi kemoterapötikler kanser hastalarının yaşam sürelerini uzatmaktadır. Ancak bu bileşikler istenmeyen yan etki, saflaştırma zorluğu, sentez kompleksliği ve multi ilaç direnci gibi çeşitli problemlere de sahiptir. Bu problemlerin üstesinden gelmek için yeni kemoterapötiklerin geliştirilmesi acil bir ihtiyaçtır (Ackerstaff ve ark, 2007; Tacar ve ark, 2013).

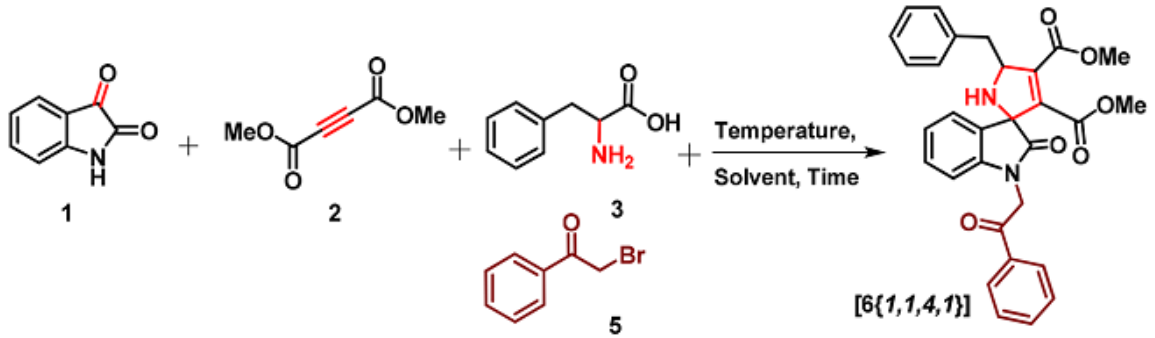
Zhou ve ark. (2017) öncül madde olarak pirazin karboksilik asidi kullanarak açilasyon, amidasyon ve alkilasyon tepkimeleri yardımıyla 11 yeni pirazin amid türevi sentezlemiştir (Şekil 5.1). Bu bileşiklerin biyoaktivitelerini bakteriyostatik deneyler ile ölçmüşlerdir. Sentezledikleri bileşiklerde %99.6'ya varan antibakteriyel aktivite rapor etmişlerdir.



Şekil 5.1 Zhou ve arkadaşları tarafından sentezlenen pirazin amid türevlerinin yapısı

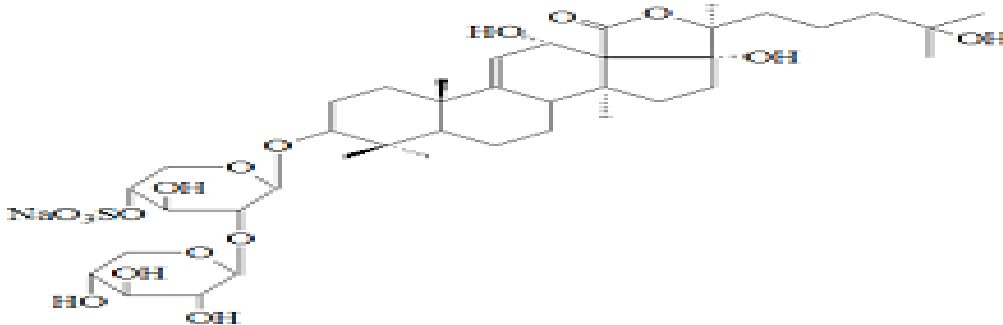
Mali ve ark. (2017) aminoasit, izatin, but-2-ynedioat ve fenil açil bromür arasındaki multi bileşenli tepkime yardımıyla 28 tane yeni spirooksindol türevlerini sentezlemiştir

(Şekil 5.2). Bu bileşiklerin MCF-7, A-549 ve HeLa hücreleri üzerinde ılımlı sitotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir.



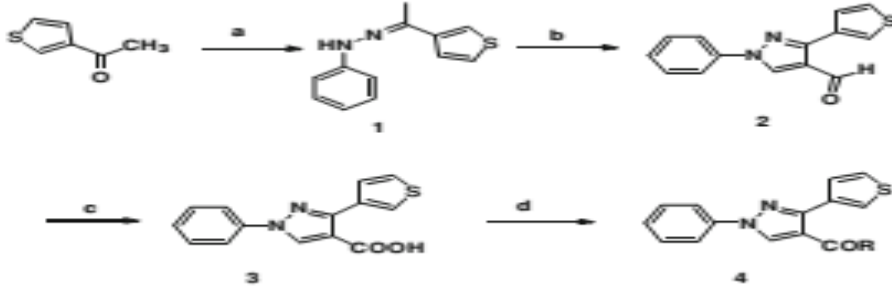
Şekil 5.2 Mali ve arkadaşları tarafından sentezlenen spirooksindazol türevlerinin yapısı

Zhang ve Zhu (2015) deniz hıyarından izole ettikleri yeni bileşiği nobilaside D olarak kimliklendirmişlerdir. Bu bileşiğin yapısını iki boyutlu NMR ve ESI-MS ile aydınlatmışlardır (Şekil 5.3). Antikanser çalışmalarında K562, U937, A549, MCF-7, HepG2 ve HeLa hücrelerini kullanmışlardır. Nobilaside D'nin K562 ve MCF-7 hücreleri üzerinde çok iyi sitotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir.



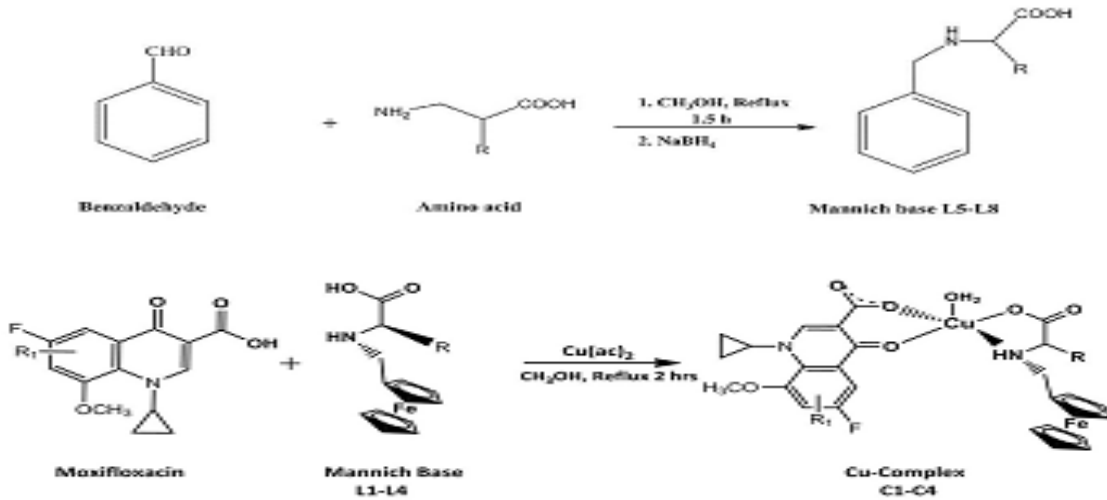
Şekil 5.3 Zhang ve Zhu tarafından izole edilen Nobilaside-D'nin yapısı

İnceler ve ark. (2013) 1-fenil-3-(tiyofen-3-il)-1H-pirazol-4-karboksilik asidin amit ve ester türevlerini sentezleyerek bu bileşiklerin MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, Raji ve HL60 hücreleri üzerinde antikanser etkilerini incelemiştir. Sentezledikleri bileşiklerden bazılarının HL60 ve Raji hücreleri üzerinde yüksek inhibitör etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.



Şekil 5.4 İnceler ve arkadaşları tarafından sentezlenen 1-fenil-3-(tiyofen-3-il)-1H-pirazol-4-karboksilik asidin amit ve ester türevlerinin yapısı

Singh ve ark. (2017) iki basamaklı bir tepkime üzerinden aminoasit türevli Cu(II) kompleksleri sentezleyerek bu bileşiklerin A549 tümör hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkisini incelemiştir (Şekil 5.5). Cu(II) türevli bileşiklerin liganda göre %50-85 arasında daha toksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca bu bileşiklerin A549 hücrelerine 12 saat muamelesi ile erken apoptozun başladığı da sunulmuştur.



Şekil 5.5 Singh ve arkadaşları tarafından sentezlenen Cu(II) komplekslerinin yapısı

Bu tez çalışmasında lizin, fenilalanin, histidin, valin ve prolin aminoasitlerinin p-nitrobenzoil klorür ile tepkimesinden amit türevi bileşikler elde edilmiştir. Bu bileşiklerin yapısı FT-IR ile aydınlatılmıştır. Antikanser çalışmalarında HeLa serviks kanser hücreleri kullanılmıştır. Hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca 25, 50, 100 ve 200 μ M amit konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve sitotoksik aktivite WST-I yöntemiyle ölçülmüştür.

B1 bileşiği için en yüksek sitotoksik aktivite, %77.25 canlı hücre oranı ile 24 saat inkübasyon ve 50 µM konsantrasyonda ölçülmüştür. Tüm inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) 25 ve 50 µM'lık dozlar sitotoksik etki gösterirken 100 ve 200 µM'lık dozlar proliferasyonu indüklemiştir.

B2 bileşiği için en yüksek sitotoksik aktivite, %86.52 canlı hücre oranı ile 24 saat inkübasyon ve 25 µM konsantrasyonda ölçülmüştür.

Sentezlenen bileşikler arasında proliferasyonu en çok indükleyen bileşik B3'tür. 48 saat inkübasyon ve 200 µM konsantrasyonda % canlı hücre oranı 131.37'ye yükselmiştir.

B4 bileşiği B3 bileşiğine göre HeLa hücreleri üzerinde daha ılımlı proliferatif etki göstermiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyonda proliferatif etki daha baskınken 72 saatlik inkübasyonda sitotoksikite daha baskındır. En yüksek proliferatif etki, %124.45 canlı hücre oranı ile 48 saat inkübasyon ve 200 µM konsantrasyonda ve en yüksek sitotoksik aktivite %77.77 canlı hücre oranı ile 72 saat inkübasyon ve 25 µM konsantrasyonda ölçülmüştür.

Sentezlenen bileşikler içinde en yüksek sitotoksik aktivite B5 bileşiğinde ölçülmüştür. Tüm inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) artan doz konsantrasyonuna bağlı olarak canlı hücre sayısında düşüş gözlemlenmiştir. En yüksek sitotoksik aktivite, %69.42 canlı hücre oranı ile 72 saat inkübasyon ve 200 µM konsantrasyonda elde edilmiştir.

PARP-1 hücre ölümünün düzenlenmesinde apoptozis ile nekrozis arasında anahtar bir rol oynar. PARP-1'in aşırı çalışması apoptotik süreç için gerekli olan NAD⁺ ve ATP stoklarını azaltır. PARP-1'in inhibisyonu apoptozis aracılığıyla hücre ölümüne neden olur (Beauchamp ve ark., 2009). PARP inhibitörleri araştırılırken PARP-1'in katalitik bölgesine bağlanan NAD⁺ ile yarışmalı moleküller aranır. Yapılan bir çalışmada etkili bileşik sentezleyebilmek için bileşiklerin üç temel yapısal özellik taşıması gerektiği bulunmuştur. Bunlar: (i) Aromatik halka; (ii) İstenen antikonformasyona bağlı en az bir tane NH grubu ile birlikte karboksamid yapısı; (iii) PARP-1'in otomodifikasyon bölgesinde bulunan derin cebin içine doğru uzanan bir yan zincir (Giangini ve ark, 2014; Tok ve Kaymakçıoğlu, 2015). Sentezlediđimiz bileşiklerin yapısı PARP inhibitörlerinin sahip olması gereken kimyasal özelliklerle benzerlik göstermektedir. Sentezlediđimiz bileşiklerin tamamında aromatik halka ve amid grubu mevcuttur. Ayrıca lizin aminoasidi ile sentezlenen B-1 bileşiğinde uzun bir yan zincir bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında sentezlenen bileşiklerin HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini belirlemek için PARP-I miktarları eliza yöntemiyle ölçülmüştür. WST-I sitotoksikite testi bulgularıyla PARP-I bulgularının genellikle uyum gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca,

sentezlenen bütün bileşiklerin bütün dozlarında PARP-I miktarları kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir.

B1 bileşiği için en yüksek PARP-I inhibisyonu, sitotoksisite testinde olduğu gibi 50 μM 'lık dozda ölçülmüştür (0,99 ng/).

B2 bileşiği için en yüksek PARP-I inhibisyonu, 50 μM 'lık dozda ölçülmüştür (1,32 ng).

B3 bileşiği için en yüksek PARP-I inhibisyonu, 50 μM 'lık dozda ölçülmüştür (0,69 ng).

B4 bileşiği için en yüksek PARP-I inhibisyonu, 50 μM 'lık dozda ölçülmüştür (0,82 ng).

B5 bileşiği için en yüksek PARP-I inhibisyonu, 200 μM 'lık dozda ölçülmüştür (1,44 ng).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), endotel hücrelerine özgü bir büyüme faktörüdür. Bu büyüme faktörü temel olarak yeni damar oluşumunda rol oynarken, aynı zamanda endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve differensiasyonunda da görev alır. Kanser tedavisinde, tümörün gelişimini ve yayılmasını engellemek için kullanılan tedavi yaklaşımlarından biri de anti-VEGF ajanların geliştirilmesidir. Bu amaçla ranibizumab ve bevacizumab gibi antikor kökenli ajanların yanısıra taurolidin gibi kimyasal kökenli ajanlar mevcut tedavilerde kullanılmaktadır (Erol, 2007).

Bu tez çalışmasında sentezlenen bileşiklerin HeLa hücreleri üzerindeki anjiyojenik etkilerini belirlemek için VEGF miktarları eliza yöntemiyle ölçülmüştür. WST-I sitotoksisite testi bulgularıyla VEGF bulgularının genellikle uyum gösterdiği bulunmuştur.

B1 bileşiğinin tüm dozları VEGF miktarını kontrol grubuna göre azaltmıştır. En yüksek VEGF inhibisyonu 200 μM 'lık dozda ölçülmüştür (289,36 pg).

B2 bileşiğinin 25, 50 ve 100 μM dozlarında VEGF miktarı kontrol grubuna göre azalırken, 200 μM 'lık dozda artmıştır.

B3 bileşiğinin de B2 bileşiği gibi 25, 50 ve 100 μM dozlarında VEGF miktarı kontrol grubuna göre azalırken, 200 μM 'lık dozda artmıştır. Tüm bileşikler içerisinde en yüksek VEGF aktivasyonu da B3 bileşiğinin 200 μM 'lık dozunda ölçülmüştür (788,44 pg).

B4 bileşiğinin tüm dozları VEGF miktarını kontrol grubuna göre azaltmıştır. En yüksek VEGF inhibisyonu 50 μM 'lık dozda ölçülmüştür (309,41 pg).

B5 bileşiğinin tüm dozları VEGF miktarını kontrol grubuna göre azaltmıştır. Tüm bileşikler içerisinde en yüksek VEGF inhibisyonu B5 bileşiğinin 200 μM 'lık dozunda ölçülmüştür (215,27 pg).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Serviks kanseri de dahil olmak üzere diğer kanser türleri için kullanılan güncel kemoterapötiklerin istenmeyen yan etkilere sahip oluşu ve metabolizmanın zamanla ilaç direnci geliştirmesi gibi nedenlerle, bilim insanları yeni kemoterapötikler geliştirmeye yoğunlaşmaktadırlar. Kemoterapötiklerle yapılmak istenen temel tedavi yaklaşımı apoptozu indükleyerek hücreyi programlı ölüme götürmek ve vaskülariteyi baskılayarak metastazı engellemektir. Günümüzde bu tedavi yaklaşımına paralel olarak birçok çalışma rapor edilmiştir (Karaoğlu, 2012; Kumar ve Tiko, 2018; Gagic ve ark, 2016).

Bu tez çalışmasında; lizin, tirozin, histidin, valin ve prolin aminoasitlerinin p-nitrobenzoil klorür ile tepkimesinden amit türevi bileşikler sentezlenmiştir. Bileşiklerin yapıları FT-IR ile aydınlatılmıştır. Bu amitlerin 25, 50, 100 ve 200 μM 'lık dozlarının sitotoksik, apoptotik ve anjiyogenejik etkileri HeLa serviks kanser hücreleri üzerinde araştırılmıştır. Sentezlenen bileşikler arasında B1, B2 ve B5 bileşiğinin HeLa hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu; B3 ve B4 bileşiklerinin ise proliferatif etki gösterdiği bulunmuştur. B1 ve B2 bileşiklerinin günümüzde kullanılan güncel kemoterapötiklere kıyasla sitotoksik etkisi daha ılımlıdır. Bu bileşiklerin metal atomlarıyla sentezlenecek yeni organometalik türevlerinin daha iyi aktivite göstereceği umulmaktadır. B3 ve B4 bileşikleri göstermiş oldukları proliferatif etki nedeniyle rat çalışmalarında tümör oluşturmak veya oluşan tümörü geliştirmek için tek başlarına veya güncel kullanılan ilaçlara takviye olarak kullanılabilirler. Sentezlenen bütün bileşiklerin, apoptoz yolağının bir molekülü olan PARP-I miktarını kontrol grubuna azalttığı bulunmuştur. Ayrıca anjiyogenez belirteci olan VEGF miktarı ise B1 ve B5'in 25 μM , B2'nin 200 μM 'lık dozunda kontrol grubuna göre artış gösterirken tüm bileşiklerin diğer dozlarında düşüş göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Ackerstaff E., Gimi B., Artemov D., Bhujwala Z.M.** Antiinflammatory agent bindomethacin reduces invasion and alters metabolism in a human breast cancer cell line. *Neoplasia*. 2007, 9, 222–235.
- Aizawa K., Liu C., Tang S., Veeramachaneni S., Hu K.Q., Smith D.E., Wang X.D.** Tobaccocarcinogen induces both lung cancer and non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinomas in ferrets which can be attenuated by lycopene supplementation. *Int. J. Cancer*. 2016, 139, 1171-1181.
- Au W.W.** Life style, environmental and genetic susceptibility to cervical cancer. *Toxicology*. 2004, 198, 117–120.
- Bai P, Bakondi E, Szabo E.E, Gergely P, Szabo C, Virag L.** Partial protection by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors from nitroxyl-induced cytotoxicity in thymocytes. *Free Radical Biology Medicine* 2001, 31, 1616–1623.
- Bailey H.H., Chuang L.T., DuPont N.C., Eng C., Foxhall L.E., Merrill J.K., Wollins D.S., Blanke C.D.** American society of clinical oncology statement: human papillomavirus vaccination for cancer prevention. *J. Clin. Oncol.* 2016, 34, 1803–1812.
- Beauchamp M.C., Knafo A., Yasmeen A., Carboni J.M., Gottardis M.M., Pollak M.N., Gotlieb W.H.** BMS-536924 sensitizes human epithelial ovarian cancer cells to the PARP inhibitor 3-aminobenzamide. *Gynecol Oncol.* 2009, 115, 193-198.
- Bouchard V.J, Rouleau M, Poirier G.G.** PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp. Hematol.* 2003, 31, 446–454.
- Boulares A.H, Yakovlev A.G, Ivanova V, Stoica B.A, Wang G, Iyer S, Smulson M.** Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) 66 Cleavage in Apoptosis, *The Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274, 33, 22932–22940.
- Burkle A.** Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays* 2001, 23, 795–806.
- Chambon P, Weille J.D, Mandel P.** Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochemical Biophys. Res. Commun.* 1963, 11, 39–43.
- Chuang L.T., Feldman S., Nakisige C., Temin S., Berek J.S.** Management and Care of Women With Invasive Cervical Cancer: ASCO Resource-Stratified Clinical Practice Guideline, *Journal of Clinical Oncology*. 2016, 34(27), 3354-3355.

D'Amours D, Sallmann F.R, Dixit V.M, Poirier G.G. Gain-of-function of poly (ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases, implications for apoptosis. *J. Cell Sci.* 2001, 114, 3771–3778.

Hassanpour S.H., Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practise.* 2017, 4, 127-129.

Disaia P.J., Creasman W.T. *Clinical Gynecologic Oncology (Klinik Jinekoloji Onkoloji).* Ayhan A (Çeviri editörü). 6. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2003. 53–111.

Doll R., Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of The National Cancer Institute.* 1981, 66 (6): 1191-1308.

Durak D., Cingi A., Manukyan M., Kaya H., Özdemir A., Yeğen C. Kolu-rektal kanserlerde vasküler endolial büyüme faktörü (VEBF) ekspresyonunun prognoz üzerine etkisi. *Marmara Medical Journal.* 2005, 18(2): 53-58.

Erol N. Vasküler endotelial büyüme faktörü ve Anti-VEGF ajanlar. *Ret-Vit.* 2007, 15, 35-40.

Florea A., Dopp E., Büsselberg D. Elevated Ca^{2+} transients induced by trimethyltin chloride in HeLa cells: types and levels of response. *Cell Calcium.* 2005, 37, 251-258.

Gagic Z., Ivkovic B., Rajic T.S., Vucicevic J., Nikolic K., Agbaba D. Synthesis of the vitamin E amino acid esters with an enhanced anticancer activity and in silico screening for new antineoplastic drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2016, 88, 59-69.

Giannini G, Battistuzzi G, Vesci L, Milazzo FM, Paolis FD, Barbarino M, Guglielmi MB, Carollo V, Gallo G, Artali R, Dallavalle S. Novel PARP-1 inhibitors based on a 2-propanoyl-3H-quinazolin-4-one scaffold. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014, 24, 462-466.

Han A.C, Merzouk M., Belch R.Z. Update on cervical cancer. *Cancer Ther.* 2005, 3, 243–248.

Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000, 100 (1): 57-70.

Hoeben A, Landuyt B, Highley M.S, Wildiers H, Oosterom A.T.V, Bruijin E.A.D. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological Reviews* 2004, 56(4) 549-580.

Horakova K., Sovcikova A., Seemannova Z., Syrova D., Busanyova K., Drobna Z., Ferencik M. Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 30 (6), 650-664.

Human PARP-I Elisa Kit, Katalog No:EH3951, Wuhan Fine Biological Technology Company Ltd. 2017, Wuhan, China. (www.fn-test.com)

Human VEGF Elisa Kit, Katalog No:EH1089, Wuhan Fine Biological Technology Company Ltd. 2017, Wuhan, China. (www.fn-test.com)

Jung M., Park N., Moon H.I., Lee Y. Synthesis and anticancer activity of novel amide derivatives of non-acetal deoxoartemisinin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2009, 19, 6303-6306.

Kaçar Ö. Çeşitli kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkili paladyum türevlerinin moleküler etki mekanizmalarının aydınlatılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2016, 156.

Karaoğlu I. HeLa hücre hattında EF-24'ün, Taksol'ün oluşturduğu apoptotik ve anti-proliferatif cevabı üzerine etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2012, 96.

Kessler T.A. Cervical cancer: prevention and early detection. *Seminars in Oncology Nursing*, 2017, 33,(2), 172-183.

Kıran B. Serviks Kanserinde Glutasyon-S-Transferaz M1, Glutasyon-S-Transferaz T1, Glutasyon-S-Transferaz P1 Ve Toll Like Reseptör-9 Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Bursa, 2009, 52.

Kim M.Y, Mauro S, Gervy N, Lis J.T, Kraus W.L. NAD⁺ dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* 2004, 119, 803–814.

Kim M.Y, Zhang T, Kraus W.L. Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: PAR-laying NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev.* 2005, 19, 1951–1967.

Kumar R., Tikku A.B. Galangin induces cell death by modulating the expression of glyoxalase-1 and Nrf-2 in HeLa cells. *Chemico-Biological Interactions*

Maas N., Robinia K.A. Gynecologic cancers. In: Schuiling KD, Kikis FE, eds. *Women's Gynecologic Health*. 3rd ed. Burlington, MA: Jones and Bartlett Learning; 2017, 662-667.

Mali P.R., Shirsat P.K., Khomane N., Nayak L., Nanubolu J.B., Meshram H.M. 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions for the Synthesis of Novel Oxindole Derivatives and Their Cytotoxic Properties. *Combinational Science*. 2017, 19, 633-639

Mcphie, D. L., Coopersmith, R., Peralta, A. H., Chen, Y., Ivins, K. J., Manly, S. P., Kozlowski, M. R., Neve, K. A., Neve, R. L. DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *The Journal of Neuroscience*. 2003, 23 (17), 6914–6927.

Meyer-Ficca M.L, Meyer R.G, Jacobson E.L, Jacobson M.K. Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2005, 37, 920–926.

Mor G., Montagna M.K. ve Alvero, A.B. Modulation of apoptosis to reverse chemoresistance, *Methods in Molecular Biology*, 2008, 414, 1–12.

- Nguewa P.A, Fuertes M.A, Cepeda V, Alonso C, Quevedo C, Soto M.** Poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor 3-aminobenzamide enhances apoptosis induction by platinum complexes in cisplatin-resistant tumor cells. *Med. Chem.* 2006, 21, 47–53.
- Pradidphol N., Kongkathip N., Sittikul P., Boonyalai N.** First synthesis and anticancer activity of novel naphthoquinone amides. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2012, 49, 253-270.
- Raab S, Plate K.H.** Different networks, common growth factors: shared growth factors and receptors of the vascular and nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007, 113, 607–626.
- Randall T.C, Ghebre R.** Challenges in Prevention and Care Delivery for women with Cervical Cancer in Sub-Saharan Africa. *Frontiers in Oncology.* 2016, 6, 1-7.
- Samper E, Goytisolo F.A, Menissier de Murcia J, Gonzalez-Suarez E, Cigudosa J.C.** Normal telomere length and chromosomal end capping in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice and primary cells despite increased chromosomal instability. *J. Cell Biol.* 2001, 154, 49-60.
- Sankaranarayanan R., Ramani S., Wesley R.A.** Practical Manual on Visual Screening for Cervical Neoplasia (Servikal Neoplazilerde Gözle Tarama Pratik El Kitabı). Özgül N (Çeviri editörü). 1. baskı. Ankara: Ankara Form Matbaacılık. 2005, 9–14.
- Saxena A, Saffery R, Wong L.H, Kalitsis P, Choo K.H.** Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 26921–26926.
- Schreiber V, Danter F, Ame J.C, de Murcia G.** Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006, 7, 517–528.
- Senger D.R, Galli S.J, Dvorak A.M, Perruzzi C.A, Harvey V.S, Dvorak H.F.** Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983, 219, 983–985.
- Singh R., Devi P.R., Jana S.S., Devkar R.V., Chakraborty D.** Aminoacid-derivatized Cu(II) complexes: Synthesis, DNA interactions and in vitro cytotoxicity. *Journal of Organometallic Chemistry.* 2017, 849, 157-159.
- Small W., Bacon M., Bajaj A., Chuang L.T., Fisher B.J., Harkenrider M.M., Jhingran A., Kitchener H.C., Mileskin L.R., Viswanathan A.N., Gaffney D.K.** Cervical cancer: a global health crisis. *Cancer.* 2017, 123, 2404 –2412.
- Smulson M.E, Simbulan-Rosenthal C.M, Boulares A.H, Yakovlev A, Stoica B, Iyer S.** Roles of poly(ADP-ribosyl)ation and PARP in apoptosis, DNA repair, genomic stability and functions of P53 and E2F-1. *Adv. Enzyme. Regul.* 2000, 40, 183–215.

- Sodhi R.K, Singh M, Singh N, Jaggi A.S.** Protective effects of caspase-9 and poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors on ischemia–reperfusion-induced myocardial injury. *Arch. Pharm. Res.* 2009, 32, 1037–1043.
- Stavrovskaya A.A.** Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry(Moscow)*. 2000, 65(1), 95-106.
- Sudhakar A.** History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science and Therapy*. 2009, 1 (2), 1-4.
- Tacar O., Sriamornsak P., Dass C.R.** Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharm. Pharmacol.* 2013, 65, 157 –170.
- Takahashi H, Shibuya M.** The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci.* 2005, 109, 227–24.
- Tarañçı Ö.** Bazı Bitki Ekstraktlarının Kanser Hücrelerinde Antioksidan, Antikanserojenik ve Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2014, 138.
- Taşkın L.** Doğum ve Kadın Sağlığı Hemşireliği, 7. Baskı, Sistem Matbaacılık, s:607-615.
- Tok F, Koçyiğit K.B.** Kanser Tedavisinde Yeni Bir Yaklaşım: Poli (ADP-Riboz) Polimeraz-1 İnhibitörleri. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2015, 1(1), 41-52.
- Xuri L, Anil K, Fan Z, Chunsik L, Zhongshu T.** Complicated life, complicated VEGF-B. *Trends in Molecular Medicine*. 2012, 18(2), 119-127.
- Virag L, Szabo C.** The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 2002, 54, 375– 429.
- Walboomers J.M., Jacobs M.V., Manos M.M. et al.** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999, 189, 12-19.
- Wang A.Z., Langer R. ve Farokhzad O.C.** Nanoparticle delivery of cancer drugs, *Annual Review of Medicine*. 2012, 63(1), 185–198.
- WEB_1. (2012). Globocon’s web site. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. (04.12.2017).
- WEB_2 (2015). Hasan Serdaroglu’ web site. <http://www.profdrhasanserdaroglu.com/> (04.12.2017).
- Yaramış A.** İnsan Meme Kanseri MCF7 Hücre Dizisinde Fumagillinin Antikanserojenik Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir 2011, 77.

Zhang J.J., Zhu K.Q. A novel antitumor compound nobiliside D isolated from sea cucumber (*Holothuria nobilis* Selenka). *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017, 14, 1653-1658.

Zhou S., Yang S., Huang G. Design, synthesis and biological activity of pyrazinamide derivatives for anti-*Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2017, 32(1), 1183-1186.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Erdoğan Ömer
Uyruk : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum yeri ve tarihi : Gaziantep
Telefon : 05412706027
E-mail : omer.erdogan@adu.edu.tr
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Xxx	
Y. Lisans	Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D	25/06/2014
Lisans	Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Kimya Eğitimi A.B.D	24/07/2012

BURSLAR ve ÖDÜLLER:
xxxx

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2014-2015	Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya A.D.	Araş. Gör.
2015-....	Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D.	Araş. Gör.

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Erdoğan Ö., Topal G. Chiral stationary phases used for enantiomeric resolution. Middle East Journal of Science. 2016; 1(1):29-36.

Erdoğan Ö., Topal G., Çakmak R., Sünkür M., Canpolat M. The preparation of a new protein based HPLC column packing material and enantiomeric resolution of some pharmaceutical related compounds via this column. Middle East Journal of Science. 2016;

2. PROJELER

Süperparamanyetik Fe₃O₄ Nanopartiküllerine *Candida rugosa* Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu ve Rasemik İbuprofen Metil Esterinin Enantioselektif Hidrolizi, Tübitak 102 Projesi, 2014, Bursiyer.

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Sönmez Arslan, Hasan Saygılı, **Ömer Erdoğan**, Mehmet Çolak, Giray Topal. "Preliminary application of novel synthesized chiral hydroxy amides as catalyst in asymmetric reduction of acetophenone". International conference chimia 2014. "New Trends In Applied Chemistry". 23-24 May, Constanta, Romania, 2014.

Ahmet Çelik, Hasan Dağlı, **Ömer Erdoğan**, Edibe Sarıççek, Metin Kılıç. "Relation between serum lipo (a), plasma fibrinogen, red cell distribution width and mean platelet volume in healthy adult men". (P 224). 41 st FEBS Congress. 4-7 September. Aydın, Turkey, 2016.

Ömer Erdoğan, Giray Topal, Reşit ÇAKMAK, Murat SÜNKÜR, Mutlu Canpolat. "Chiral stationary phases for enantiomeric resolution". International Engineering, Science and Education Conference, 1-3 December, Diyarbakır, Turkey, 2016.

Ömer Erdoğan, Giray Topal, Reşit ÇAKMAK, Murat SÜNKÜR, Mutlu Canpolat. "The preparation of a new protein based HPLC column packing material and enantiomeric resolution of some pharmaceutical related compounds via this column " International Engineering, Science and Education Conference, 1-3 December, Diyarbakır, Turkey, 2016.

Salih Paşa, **Ömer Erdoğan**, Çiğdem Yenisey. " Synthesis and anticancer application of boronic structured schiff base ligand" International Congress on Fundamental and Applied Sciences 2017 (ICFAS2017), 21-25 August, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, 2017.

Salih Paşa, **Ömer Erdoğan**, Burçin İrem Abas, Murat Bingül. " 3-((2,6-Dimethoxyphenylimino)methyl) phenyl boronic acid: synthesis and prostate cancer examination" International Congress on Fundamental and Applied Sciences 2017 (ICFAS2017), 21-25 August, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, 2017.

Ömer Erdoğan, Yusuf Kurtulmuş, Burçin İrem Abas, Çiğdem Yenisey. "Amit türevi yeni bileşiklerin PC-3 prostat kanser hücre hatları üzerine antikanser etkileri" Uluslararası Katılımlı 28. Ulusal Biyokimya Kongresi, 19-23 Eylül, Erzurum, Türkiye, 2017.

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Ömer Erdoğan, Giray Topal, Reşit ÇAKMAK, Murat SÜNKÜR, Mutlu Canpolat. "Protein Temelli Yeni Bir HPLC Kolon Dolgu Maddesinin Hazırlanması ve Bazı İlaç İlişkili Rasemik Bileşiklerin Bu Kolon Üzerinden Enantiyomerik Rezolüsyonu". 16. Kromatografi Kongresi, 31 Ağustos- 2 Eylül, Malatya, 2016.

Reşit Çakmak, Ercan Çınar, Giray Topal, Selami Ercan, **Ömer Erdoğan**. "Rasemik Mandelik Asit Bütil Ester'in Enantiyoselektif Hidroliz Çalışmaları". 16. Kromatografi Kongresi, 31 Ağustos- 2 Eylül, Malatya, 2016.

Mutlu Canpolat, Giray Topal, Reşit Çakmak, **Ömer Erdoğan**. "HPLC Kolon Dolgu Maddesi Olarak Yeni Kiral Akrilamid Türevlerinin Hazırlanması". III. Ulusal Organik Kimya Kongresi. 5-8 Eylül, Trabzon, 2016.