



T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SÜLFONAMİD TÜREVİ BİLEŞİKLERİN İNSAN KOLOREKTAL KANSER
HÜCRE HATLARINDA SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BERNA KOCAMAN

OCAK

BERNA KOCAMAN	BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI	OCAK 2022
----------------------	------------------------------------	------------------

**SÜLFONAMİD TÜREVİ BİLEŞİKLERİN İNSAN KOLOREKTAL KANSER
HÜCRE HATLARINDA SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Berna KOCAMAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman

Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2022

Berna Kocaman tarafından hazırlanan “Sülfonamid Türevi Bileşiklerin İnsan Kolorektal Kanser Hücre Hatlarında Sitotoksik Ve Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Başkan: Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN

Genetik Anabilim Dalı, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Doç. Dr. Arif AYAR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 28.01.2022

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Ümit YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Berna KOCAMAN

28/01/2022

SÜLFONAMİD TÜREVİ BİLEŞİKLERİN İNSAN KOLOREKTAL KANSER HÜCRE HATLARINDA SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Berna KOCAMAN

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2022

ÖZET

Kolon ve rektum kanserleri dünya çapında en yaygın üçüncü tip kanserdir ve kolon kanseri rektum kanserinden daha sık görülmektedir. HDAC aktivatörleri en iyi antikanser ajanlar olarak karakterize edilir, çok çeşitli fizyolojik ve patolojik sistemlerde önemli araçlar olduğu bilinmektedir. Özellikle kanser tedavi yöntemlerinde sağlıklı hücrelerde düşük yan etkisi olan kanser hücrelerinde yüksek sitotoksik aktivite gösteren, histon deasetilaz inhibitör (HDACi) özelliğine sahip ve hücreleri apoptoza sürükleyen bileşiklerin keşfi önemlidir. Bu çalışmada; histon deasetilaz aktivite özelliği olan sülfonamid türevi bileşiklerin HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma), DLD-1 (insan kolon adenokarsinoma) ve CCD-18Co (normal kolon epiteli) hücre hatlarında biyolojik aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu hücre hatlarında, bileşiklerin sitotoksik dozu ve IC₅₀ değeri MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) yöntemiyle tespit edildi. Apoptotik hücre ölümü ve ilişkili sinyal yollarında önemli rol oynayan proteinler olan Bcl-2, Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 mRNA düzeyleri qRT-PCR yöntemiyle, P38/MAPK ve ERK1 protein analizleri Western blot yöntemiyle, HDAC aktivite özelliği HDAC aktivite analiz kiti kullanılarak ölçüldü. Bu bileşiklerin HT-29 ve DLD-1 hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilerek IC₅₀ değerleri 1-31 µM arasında hesaplandı. Apoptotik hücre ölümüne ait Bax geninde anlamlı bir artış; Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 genlerinin ifadelerinde anlamlı bir azalış gösterdiği belirlendi. Bileşiklerin apoptozla ilişkili yollarında yer alan p38/MAPK protein ifadesinde anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi. Bileşiklerin HT-29 hücre hattında HDAC aktivite özelliği gösterdiği bulundu. Sülfonamid türevi bileşiklerin potansiyel ilaç geliştirme çalışmalarında, antikanser aktivitelerinin ve apoptoza yola açan etkilerinin olabileceği düşünülmektedir.

Sayfa Adedi. : 131
Anahtar Kelimeler : Sülfonamid, HDACi, Kolon kanseri, p38/MAPK, Kaspaz
Danışman : Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

DETERMINATION OF CYTOTOXIC AND APOPTOTIC EFFECTS OF
SULFONAMIDE DERIVATIVE COMPOUNDS ON HUMAN COLORECTAL CANCER
CELL LINES

(M. Sc. Thesis)

Berna KOCAMAN

AMASYA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2022

ABSTRACT

Colon and rectal cancers are the third most common type of cancer worldwide, and colon cancer is more common than rectal cancer. HDAC activators are best characterized as anticancer agents and are known to be important tools in a wide variety of physiological and pathological systems. Especially in cancer treatment methods, the discovery of compounds that have low side effects in healthy cells, and high cytotoxic activity in cancer cells is important. In this study; The aim of this study was to investigate the biological activities of sulfonamide-derived compounds with histone deacetylase activity in HT-29 (human colorectal adenocarcinoma), DLD-1 (human colon adenocarcinoma) and CCD-18Co (normal colon epithelium) cell lines. In these cell lines, the cytotoxic dose and IC₅₀ value of the compounds were determined by the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) method. Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 mRNA levels, which are proteins that play an important role in apoptotic cell death and related signaling pathways, were analyzed by qRT-PCR method, P38/MAPK and ERK1 protein analyzes by Western blot method, HDAC activity feature HDAC activity was measured using an analysis kit. It was determined that these compounds have cytotoxic effects in HT-29 and DLD-1 cells, and their IC₅₀ values were calculated between 1-31 μ M. A significant increase in the Bax gene of apoptotic cell death; It was determined that Bcl-2, Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 genes showed a significant decrease in their expressions. It was determined that the compounds showed a significant increase in p38/MAPK protein expression, which is involved in apoptosis-related pathways. The compounds were found to show HDAC activity in the HT-29 cell line. It is thought that sulfonamide derivative compounds may have anticancer activities and apoptosis-inducing effects in potential drug development studies.

Page Number : 131
KeyWords : Sulfonamide, HDACi, Colon cancer, p38/MAPK, Caspase
Supervisor : Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince her zaman bana destek olan, bilgi ve tecrübelerini paylaşarak çalışmamı özenli bir şekilde yönlendiren tez danışmanım Prof. Dr. Tuba YILDIRIM'a, lisansüstü eğitimim süresince çalışmalarımın her aşamasında laboratuvar bilgilerini paylaşan ve öğrenmemi sağlayan Doç Dr. Arif AYAR'a, Öğr. Gör. Dr. Seda MESCI'ye, Dr. Öğrt. Üyesi Ece AVULOĞLU YILMAZ'a, Öğr. Gör. Ersin DEMİR'e, Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarının tüm akademik ve idari personeline, çalışmam boyunca beni yalnız bırakmayan, her aşamada yanımda olan arkadaşım Aybüke Afra KESKİNER'e, bilgilerini benimle paylaşarak çalışmama katkıda bulunan Dr. Yakup ŞAFAK'a, hayatımın her anına güzellikleri dokunan annem Hava KOCAMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması FMB-BAP 20-0456 Proje No' ları ile Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
RESİMLER DİZİNİ.....	xvi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Kolon/rektum kanseri.....	3
2.2.1. Genetik faktörler	6
2.2.2. Kolon/rektum kanseri biyolojisi	6
2.2.3. Biyolojik belirteçler	7
2.2.4. Evreleme	7
2.3. Kanser ve apoptoz.....	8
2.3.1. Apoptozda morfolojik değişiklikler	8
2.3.2. Apoptozda biyokimyasal değişiklikler	9
2.3.3. Apoptoz mekanizmaları	10
2.3.3.1. Dışsal ölüm reseptörü yolu	10
2.3.3.2. İç mitokondriyal yol.....	11
2.3.3.3. Ortak yol	11

	Sayfa
2.3.3.4. İç endoplazmik retikulum yolu	12
2.4. Apoptoz ve karsinogenez	12
2.4.1. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin bozulmuş dengesi	12
2.4.1.1. BCL-2 protein ailesi	13
2.5. Azaltılmış kaspaz aktivitesi	14
2.6. Histon deasetilazlar (HDAC)	15
2.6.1. Sınıf I Histon Deasetilazlar	18
2.6.2. Sınıf II Histon Deasetilazlar	20
2.6.2.1. Sınıf IIa HDAC'lar	20
2.6.2.2. Sınıf IIb histon deasetilazlar	24
2.6.2.3. Sınıf III histon deasetilazlar – sirtuinler	25
2.6.2.4. Sınıf IV histon deasetilazlar	27
2.7. Histon deasetilaz (HDAC) ve kanser	27
2.7.1. Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi)	28
2.7.1.1. Kısa zincirli yağ asitleri	28
2.7.1.2. Hidroksamik asitler	28
2.7.1.3. Siklik peptidler	29
2.7.1.4. Sentetik benzamidler	29
2.8. Sülfonamidler	30
3. MATERYAL VE METOD	34
3.1. Materyal	34
3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar	34
3.1.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal malzemeler	35
3.1.3. Moleküler analizlerde kullanılan malzemeler	36

	Sayfa
3.1.4. Hücre kültürü ve moleküler çalışmalarda kullanılan çözeltiler	36
3.2. Yöntem.....	38
3.2.1. Test bileşikler.....	38
3.2.1.1 Bileşiklerin Sentezi	39
3.2.1.2. Saflaştırma ve yapısal karakterizasyon çalışmaları	39
3.2.1.3. Karakterizasyon ve spektroskopik veriler	40
3.2.2. Hücre kültürü	44
3.2.2.1. Hücrelerin açılması	46
3.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması.....	47
3.2.2.3. Hücrelerin dondurulması	48
3.2.3. MTT Analizi	49
3.2.3.1. MTT yöntemi	49
3.2.3.2. Hücrelerin sayımı.....	49
3.2.3.3. Hücre ekimi.....	50
3.2.3.4. Test bileşiklerinin hazırlanması	52
3.2.3.5. Bileşiklerin uygulanması	52
3.2.3.6. MTT boyasının hazırlanması ve pleytlere ekimi	52
3.2.4. Total RNA izolasyonu	55
3.2.5. cDNA (Komplementer zincir) sentezi	57
3.2.6. Gerçek zamanlı PZR (qRT-PCR)	58
3.2.7. Protein izolasyonu.....	60
3.2.7.1. Protein miktar tayini	60
3.2.8. Western Blot analizi.....	61
3.2.9. HDAC aktivite analizi.....	63

	Sayfa
4. BULGULAR.....	64
4.1. Sülfonamid türevi bileşiklerin sentezi, saflaştırılması ve karakterizasyonu..	64
4.2. MTT analizi	65
4.3. MTT verilerinin istatistik analizi	87
4.4. Moleküler analizler	91
4.4.1. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri	91
4.4.2. Western Blot analizi.....	100
4.4.3. HDAC aktivite analiz sonuçları	101
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	103
KAYNAKLAR	112
ÖZGEÇMİŞ.....	131

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Apoptoz ve nekrozun karşılaştırılması	9
Çizelge 2.2. Apoptozu regüle eden genler	13
Çizelge 3.1. Kimyasal malzemeler	35
Çizelge 3.2. Moleküler malzemeler ve kitler	36
Çizelge 3.3. Primer dizileri	59
Çizelge 3.4. Amplifikasyon Programları	59
Çizelge 3.5. BCA protein test kiti standart konsantrasyonları	61
Çizelge 4.1. Bileşik-1'in CCD-18Co hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	66
Çizelge 4.2. Bileşik-2'nin CCD-18Co hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	67
Çizelge 4.3. Bileşik-3'ün CCD-18Co hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	68
Çizelge 4.4. Bileşik-3'ün CCD-18Co hücre hattında MTT analizi	69
Çizelge 4.5. Bileşik-5'in CCD-18Co hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	70
Çizelge 4.6. Bileşik-1'in DLD-1 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	71
Çizelge 4.7. Bileşik-2'nin DLD-1 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	72
Çizelge 4.8. Bileşik 3'ün DLD-1 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	74
Çizelge 4.9. Bileşik-4'ün DLD-1 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	75
Çizelge 4.10. Bileşik-5'in DLD-1 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	76
Çizelge 4.11. Bileşik-1'in HT-29 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	78
Çizelge 4.12. Bileşik-2'nin HT-29 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	79
Çizelge 4.13. Bileşik-3'ün HT-29 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	80
Çizelge 4.14. Bileşik-4'ün HT-29 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	81
Çizelge 4.15. Bileşik-5'in HT-29 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	83
Çizelge 4.16. HT-29, DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında bileşiklerin verileri	88

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.17. HT-29 hücre hattından izole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu..	91
Çizelge 4.18.DLD-1 hücre hattından izole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu...	92



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kolon kanseri oluşumu	5
Şekil 2.2. Dünyada kadınlara ve erkelere ait 2020 yılı kanser istatistikleri.....	5
Şekil 2.3. Kolon kanseri evrelemesi	8
Şekil 2.4. Sülfonamidlerin genel yapısı	30
Şekil 2.5. Prontosilin yapısı	31
Şekil 2.6. Sülfonamid türevi Schiff bazının genel yapısı (R: Alkil, Ar: Aril).....	32
Şekil 3.1. Bileşik-1 (Sülfametoksipiridazin).....	38
Şekil 3.2. Kullanılan aldehit yapıları	39
Şekil 3.3. Sülfonamid ilaç temelli Schiff bazlarının sentezi	39
Şekil 3.4. Bileşik-2 (4-((4-(tert-Bütıl)benziliden)amino)-N-(6-metoksipiridazin-3-il)benzensulfonamid (C ₂₂ H ₂₄ N ₄ O ₃ S)).....	40
Şekil 3.5. Bileşik-3 (N-(6-metoksipiridazin-3-il)-4-((2-nitrobenzyliden)amino)benzensulfonamid, (C ₁₈ H ₁₅ N ₅ O ₅ S))	41
Şekil 3.6. Bileşik-4 (N-(6-Metoksipiridazin-3-il)-4-((tiyazol-2 ilmetilenamino)benzensulfonamid (C ₁₅ H ₁₃ N ₅ O ₃ S ₂)).....	42
Şekil 3.7. Bileşik-5 (4-((Benzo[d]tiyazol-2-ilmetilen)amino)-N-(6-metoksipiridazin-3-il)benzensulfonamid (C ₁₉ H ₁₅ N ₅ O ₃ S ₂)).....	43
Şekil 3.8. Hücrelerin pasajlanması (BioRender).....	47
Şekil 3.9. Hücrelerin dondurulma aşamaları (BioRender).....	48
Şekil 3.10. Hücre sayımı ve görüntüsü (BioRender)	50
Şekil 3.11. Total RNA izolasyon aşamaları (BioRender).....	56
Şekil 3.12. Western Blot analiz aşamaları (BioRender)	62
Şekil 4.1. Bileşik-1'in CCD-18Co hücre hattında MTT analizi	66
Şekil 4.2. Bileşik-2'nin CCD-18Co hücre hattında MTT analizi	67
Şekil 4.3. Bileşik-3'ün CCD-18Co hücre hattında MTT analizi	68

Şekil	Sayfa
Şekil 4.4. Bileşik-4'ün CCD-18Co hücre hattında MTT analizi	69
Şekil 4.5. Bileşik-5'in CCD-18Co hücre hattında MTT analizi	70
Şekil 4.6. Bileşik-1'in DLD-1 hücre hattında MTT analizi.....	71
Şekil 4.7. Bileşik-2'nin DLD-1 hücre hattında MTT analizi.....	73
Şekil 4.8. Bileşik-3'ün DLD-1 hücre hattında MTT analizi.....	74
Şekil 4.9. Bileşik 4'ün DLD-1 hücre hattında MTT analizi	75
Şekil 4.10. Bileşik-5'in DLD-1 hücre hattında MTT analizi.....	76
Şekil 4.11. DLD-1 hücre hattında bileşiklerin IC50 değerlerinin karşılaştırılması	77
Şekil 4.12. Bileşik-1'in HT-29 hücre hattında MTT analizi.....	78
Şekil 4.13. Bileşik-2'nin HT-29 hücre hattında MTT analizi.....	79
Şekil 4.14. Bileşik-3'ün HT-29 hücre hattında MTT analizi.....	80
Şekil 4.15. Bileşik-4'ün HT-29 hücre hattında MTT analizi.....	82
Şekil 4.16. Bileşik-5'in HT-29 hücre hattında MTT analizi.....	83
Şekil 4.17. HT-29 hücre hattında bileşiklerin IC50 değerlerinin karşılaştırılması	84
Şekil 4.18. DLD-1 ve HT-29 hücre hatlarında IC50 değerlerinin karşılaştırılması.....	84
Şekil 4.19. Bileşik-1'in hücre hatlarında % canlılık değerlerinin karşılaştırılması	85
Şekil 4.20. Bileşik-2'nin hücre hatlarında % canlılık değerlerinin karşılaştırılması	85
Şekil 4.21. Bileşik-3'ün hücre hatlarında % canlılık değerlerinin karşılaştırılması	86
Şekil 4.22. Bileşik-4'ün hücre hatlarında % canlılık değerlerinin karşılaştırılması	86
Şekil 4.23. Bileşik-5'in hücre hatlarında % canlılık değerlerinin karşılaştırılması	87
Şekil 4.24. DLD-1 hücre hattında bileşiklerin hücre canlılığının istatistik analizi.....	89
Şekil 4.25. HT-29 hücre hattında bileşiklerin hücre canlılığının istatistik analizi.....	89
Şekil 4.26. HT-29 hücre hattında bileşiklerin hücre canlılığının istatistik analizi.....	90
Şekil 4.27. DLD-1, CCD-18Co ve HT-29 hücre hatlarında bileşiklerin hücre canlılığının istatistiksel analizi.....	90

Şekil	Sayfa
Şekil 4.28. Bileşiklerin DLD-1 hücre hattında apoptotik sinyal yollarının mRNA ekspresyonları	94
Şekil 4.29. Bileşiklerin HT-29 hücre hattında apoptotik sinyal yollarının mRNA ekspresyonları	97
Şekil 4.30. HT-29 hücre hattında gen bölgelerine ait erime eğrisi analizi	99
Şekil 4.31. DLD-1 hücre hattında gen bölgelerine ait erime eğrisi analizi.....	100
Şekil 4.32. HT-29 hücre hattında Western Blot analiz sonuçları	100
Şekil 4.33. DLD-1 hücre hattında Western Blot analiz sonuçları.....	101
Şekil 4.34. DLD-1 ve HT-29 HDAC aktivite analiz sonuçları.....	102

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. a) DLD-1 (İnsan kolon adenokarsinoma) b) HT-29 (İnsan kolorektal adenokarsinoma) c) CCD-18Co (Normal kolon epiteli).....	45
Resim 3.2. Dondurulmuş hücreler	46
Resim 3.3. Hücrelerin pleytlere ekimi	51
Resim 3.4. HT-29 kanser hücresinin pleyt/kuyucuk içerisindeki görüntüsü	51
Resim 3.5. Bileşiklerin pleytlere ekimi.....	52
Resim 3.6. Reaksiyonu durdurmak için DMSO eklenmesi	53
Resim 3.7. Reaksiyon sonrası pleytlerin görüntüsü.....	54
Resim 3.8. Pleytin mikropate spektrofotometrede ölçülmesi	55
Resim 3.9. 96'lık mikro pleyt	58
Resim 3.10. Hücre hatlarında protein miktar tayini.....	61
Resim 4.1. Nanodrop cihazı ile RNA konsantrasyonu ölçümü	91

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, yanda açıklamaları verilmek üzere aşağıda listelenmiştir.

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
g	Gram
IU	İnternational Unit
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm ³	Milimetreküp
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı

Kısaltmalar	Açıklama
DLD-1	İnsan Kolon Adenokarsinom
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
HT-29	İnsan Kolorektal Adenokarsinom
IC ₅₀	%50 İnhibitör Konsantrasyonu
p53	Tümör Protein 53

PBS	Phosphate Buffer Saline
pH	Power of Hydrogen
FAP	Ailesel Adenosis Polipozis
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
WCRF	Dünya Kanseri Araştırma Fonu
AICR	Amerikan Kanseri Araştırma Enstitüsü
NSAID	Steroid Olmayan Antiinflatuar İlaçlar
CEA	Karsinoembriyonik Antigen
TRADD	TNF Reseptörü ile İlişkili Ölüm Alanı
FADD	Fas ile İlişkili Ölüm Alanı
DISC	Ölümü İndükleyen Sinyal Kompleksi

1. GİRİŞ

Vücudun herhangi bir doku veya organında kontrolsüz hücre çoğalması ile başlayan ve hızla yayılan kanser, daha ileri evrelerde dokulara metastaz yapma özelliği olan, gelişim süreci belirsiz ve multifaktöryel olan bir hastalık grubudur. Günümüze kadar 200'den fazla kanser türü tanımlanmıştır ve vücudun birçok hücresinde kanserin gelişebildiği gözlemlenmiştir. Kanser, meydana geldiği dokuya göre isimlendirilir. En sık görülen ve ölüme yol açan kanser türleri arasında; akciğer, mide, karaciğer, kolon/rektum ve meme kanserleri bulunmaktadır. Vücudumuzda yaklaşık 1,5 metre uzunluğunda olan kalın bağırsağın iç yüzeyinde oluşan kanserlere kolorektal kanseri adı verilmektedir. Kolorektal kanseri dünya çapında en yaygın görülen üçüncü kanser türüdür. Kolon/rektum kanserleri, kolon epitel hücrelerinin tabanında bulunan bir kök hücre popülasyonundan kendilerini beş günde bir yenileyen organın lümenini kaplayan kolonik epitel hücrelerinden kaynaklanır. Kolon kanserleri, birkaç yıl içinde genişleyen çok aşamalı kolon neoplazisi sürecinin bir sonucudur. Görülme sıklığının artması nedeniyle kanser, önemli bir halk sağlığı sorunu olarak ele alınmaktadır.

Uygulanan konvansiyonel kemoterapi bir seferde bir ilaçla, bir seferde birkaç ilaçla veya radyasyon tedavisi, cerrahi ve ardından birkaç kemoterapi döngüsü gibi diğer kanser tedavileriyle birlikte verilir. Son yıllarda özellikle kanser erken tanısı ile kanser tedavisinde kaydedilen gelişmeler, hastaların sağkalım oranlarını arttırmıştır fakat ilaçların büyük çoğunluğu seçici olmadığı için geleneksel kanser kemoterapisinin yetersiz olduğu bilinmektedir. Sitotoksik aktivite gösteren, kanser hücrelerini hedefleyen, ilaca direncini baskılayan yeni antikanser adayları bileşik veya molekül sentezlenmesi birçok kanser tedavileri için önem arz etmektedir. Ancak bu bileşiklerin birçoğu yan etki gösterdiği için yeni bileşiklerin keşfi ve geliştirilmesi bilim insanları için günümüzde ön plandadır.

Histon asetilasyonu, gen ekspresyonunun önemli bir belirleyicisidir. Histon deasetilazlar (HDAC'ler), asetil grubunu histonlardan enzimatik olarak ayıran, gen ekspresyonunun kritik düzenleyicileridir. Histon deasetilaz inhibitörleri, daha geniş olarak "kromatin değiştirici maddeler" kategorisine ait olan yeni bir antikanser ilaç sınıfıdır. HDAC'ların kansere katkısının aşırı ekspresyon dışındaki mekanizmalara da bağlı olduğu ve inaktive edici mutasyonlar gösterebildiği bilinmektedir. HDACi'ler epigenetik profili ve gen ekspresyonunu değiştirerek, sitotoksisiteyle sonuçlanan hücrelerin aşağı akış yollarında çok sayıda etki meydana getirir.

Sulfonamid bileşikleri, sülfü ilaçları olarak bilinen birkaç ilaç sınıfının temelini oluşturur. İçerisinde sulfonamid yapısı ($-\text{SO}_2\text{NH}_2$) bulunan moleküle sulfonamid denir. Bu bileşikler, tarım alanlarındaki farklı biyolojik süreçleri ve farmasötik tasarımı nedeniyle önemli yapılardır ve her geçen gün daha fazla ilgi görmektedir. Çok sayıda yapısal olarak yeni sulfonamid türevlerinin, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda önemli antitümör aktivite sergilediği rapor edilmiştir.

Bu tez çalışmasında; HT-29, DLD-1 ve CCD-18Co insan hücre hatlarında sulfonamid türevi bileşiklerin sitotoksik ve apoptotik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle bileşiklerin sitotoksik dozu ve IC_{50} değeri MTT yöntemi ile tespit edildi. Hücre hatlarında, apoptotik hücre ölümünde önemli rol oynayan genlerin (*Bcl*, *Bax*, *Kaspaz-3*, *Kaspaz-8* ve *Kaspaz-9*) mRNA düzeyleri qRT-PCR yöntemiyle ölçüldü. Protein çalışmaları (p38/MAPK ve ERK1) ise Western Blot yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu bileşiklerin HDAC aktivite özelliği HDAC aktivite analiz kiti kullanılarak belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

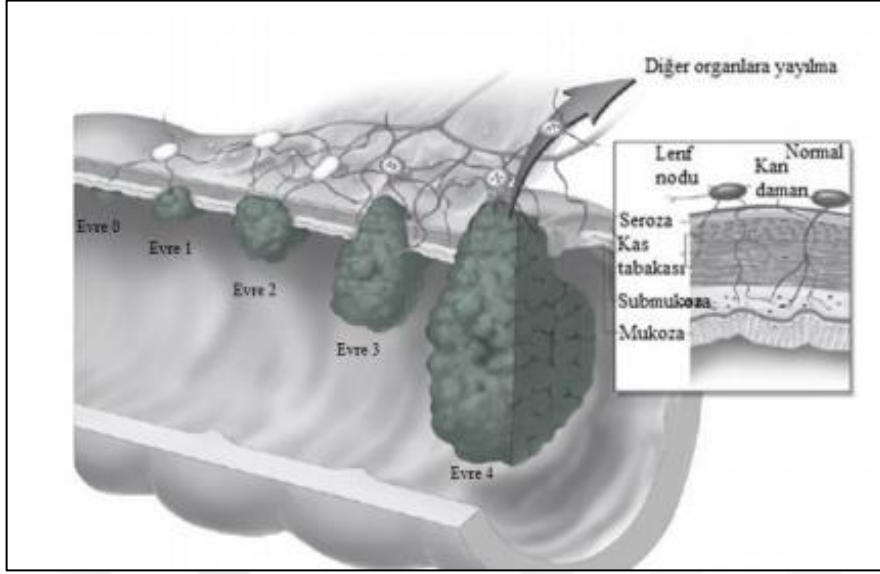
Kanser, vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalıktır. Trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunun her yerinde başlayabilir. Normalde insan hücreleri, vücudun ihtiyaç duyduğu yeni hücreler oluşturmak için büyür ve çoğalır. Hücreler yaşlandıklarında veya hasar gördüklerinde ölürlere ve yerlerini yeni hücreler alır. Bazen bu düzenli süreç bozulur, anormal veya hasarlı hücreler büyümeleri gerekirken çoğalır. Bu hücreler, doku toplulukları olan tümörler oluşturabilir. Tümörler kanserli olabilir veya kanserli olmayabilir. Kanserli tümörler yakındaki dokulara yayılır ve vücuttaki uzak yerlere seyahat ederek yeni tümörler (metastaz) oluşturur. Kanserli tümörler malign tümörler olarak da adlandırılabilir. Normal hücre işlevi ve doku homeostazi, proliferasyon ve apoptoz arasındaki bir denge ile korunur (American Cancer Society, 2015). Kanserler, malign hücre klonlarının bu dengeden kaçtığı ve kompensatuar apoptoz olmaksızın uygunsuz bir şekilde çoğaldığı hastalıklardır (American Cancer Society, 2018).

Kanser, dünya çapında kardiyovasküler hastalıkların ardından ikinci ölüm nedeni olarak bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO; World Health Organization) 2020 verilerinden elde edilen bilgilere göre; 2040 yılının sonuna kadar tahminen 30 milyon insanın kanser hastalığına yakalanacağı ve çoğu insanın kanserden hayatını kaybedeceği rapor edilmiştir. 2020 verilerine göre; kadınlarda % 9,5'luk oranla kolon kanseri ikinci sırada, erkeklerde ise % 10,9'luk oranla üçüncü sırada yer almaktadır (WHO, 2020) (Şekil 2.2).

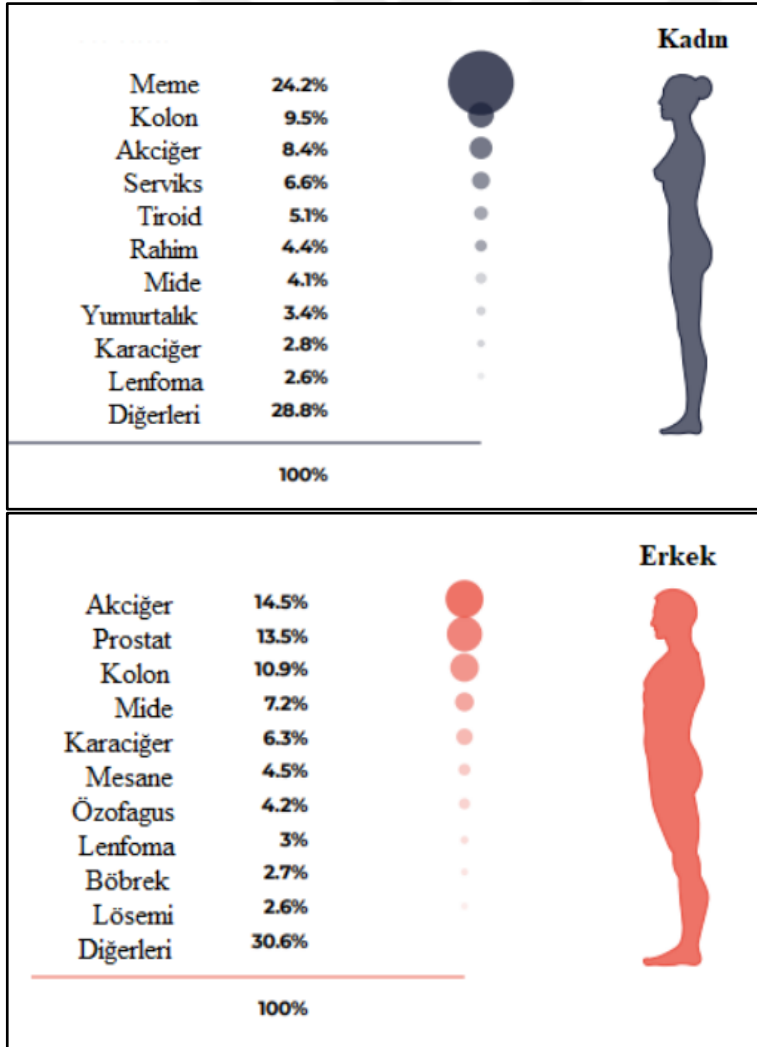
2.2. Kolon/rektum kanseri

Kolon ve rektum kanserleri dünya çapında en yaygın üçüncü tiptir (Parkin ve diğerleri, 2002; Ferlay ve diğerleri, 2004). Kolon kanseri rektum kanserinden daha sık görülür. Sanayileşmiş ülkelerde, kolon vakalarının rektum vakalarına oranı 2:1 veya daha fazladır ve kadınlarda daha çok görülmektedir. Sanayileşmemiş ülkelerde oranlar genellikle benzerdir. Avrupa'da her yıl yaklaşık 250 000 yeni kolon vakası teşhis edilmekte ve tüm malignitelerin yaklaşık %9'unu oluşturmaktadır. Sanayileşme ve kentleşme ile birlikte bu kanserlerin oranları artmaktadır. Kolon kanseri önceleri yüksek gelirli ülkelerde çok daha yaygındı, fakat günümüzde orta ve düşük gelirli ülkelerde de yaygınlığı giderek artmaktadır. Literatüre göre,

Afrika'da ve Asya'nın çoğunda kolon kanseri nadiren görülmektedir. İnsidans Batı ve Kuzey Avrupa'da, Güney ve Doğu Avrupa'dan biraz daha yüksektir. Diğer yüksek riskli alanlar arasında Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya bulunmaktadır. Orta ve Güney Amerika, Asya ve Afrika düşük riskli bölgelerdir. Kolon kanseri en sık sporadik olarak ortaya çıkar ve vakaların sadece %5'inde kalıtsaldır (Kwak ve Chung, 2007). Kolorektal kanser etiyolojisinde bugüne kadar tanımlanmış en önemli ekzojen faktör kesinlikle diyetdir. Son zamanlarda, Dünya Kanser Araştırma Fonu (WCRF) ve Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsü (AICR) diyet, fiziksel aktivite ve kanserin önlenmesi ile ilgili bilimsel literatüre ilişkin kapsamlı raporlarında, kolorektal kanserin çoğunlukla uygun diyetler ve ilişkili faktörlerle önlenabilir olduğu sonucuna varmıştır. Fiziksel aktivitenin kolorektal kansere karşı koruduğuna dair kanıtlar ikna edicidir, ancak kanıtlar rektum kanserinden ziyade kolon için daha güçlüdür. Kolon kanseri nedenleri arasında; kırmızı et, işlenmiş et, önemli miktarda (günde yaklaşık 30 gramdan fazla etanol) alkollü içecekler, vücut şişmanlığı ve karın yağlanması vardır. Ayrıca, demir içeren besinler, peynir, hayvansal yağ içeren ve şeker içeren gıdalar bu kanserin nedenleridir. Kolon kanserinin diyet dışı risk faktörleri arasında tütün kullanımı, birkaç kolorektal hastalık, genetik yatkınlık ve metabolik sendrom gibi bazı durumlar yer alır (Steward ve Kleihus, 2003). Sigara içmek, genellikle kolorektal kanser için öncü lezyonlar olarak kabul edilen büyük kolorektal adenomlarla pozitif olarak ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle tütün bileşenlerine maruz kalma, kolorektal karsinogenez için başlatıcı bir faktör olabilir (Giovannucci, 2001). ABD'de her beş kolorektal kanserden birinin potansiyel olarak tütün kullanımına bağlı olduğu bildirilmiştir.



Şekil 2.1. Kolon kanseri oluşumu (Çelik, 2015)



Şekil 2.2. Dünyada kadınlara ve erkelere ait 2020 yılı kanser istatistikleri (WHO, 2020)

Kolorektal adenomların ve kanserin önlenmesi veya geriletilmesinde nonsteroid antiinflatuar ilaçların etkisini belirlemek için sistematik bir inceleme yapılmıştır. Aspirinin sporadik adenomatöz poliplerin tekrarını önemli ölçüde azalttığına dair üç randomize çalışmadan elde edilen sonuçlar bulunmaktadır. Ailesel adenomatöz polipozda, kolorektal poliplerin ortadan kaldırılmasını veya önlenmesini değil, gerilemesini destekleyen kısa süreli çalışmalardan elde edilen kanıtlar vardır (Asano ve McLeod, 2004). İltihaplı bağırsak hastalığı (Crohn hastalığı ve ülseratif kolit) kolon kanseri riskini artırır. Yakın tarihli bir meta-analiz, Crohn hastalığından etkilenen kişilerde kolon kanseri gelişme riskinin arttığını bildirmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda ülseratif kolit ile kolorektal kanser arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur.

2.2.1. Genetik faktörler

Kolon kanserine karşı genetik yatkınlık, polipozis veya polipoz olmayan sendromlara bağlanmıştır. Ana polipoz sendromu, fap (adenomatöz polipozis koli (APC) olarak da adlandırılır) geninin mutasyonu veya kaybıyla ilişkili bilinen adenomatöz polipozdur (FAP). Kalıtsal nonpolipoz kolorektal kanser (sıklıkla HNPCC olarak adlandırılır) sendromu, altı DNA uyumsuzluğu onarım genindeki germ hattı mutasyonları ile ilişkilidir. Fin Kanser Kayıt Defteri'nde, 70 yaşına kadar HNPCC gen taşıyıcılarında kolorektal kanser insidansı belirlenmiştir. 70 yaşına gelindiğinde kümülatif kolorektal kanser insidansı %82'dir (Markowitz ve Bertagnolli, 2009).

2.2.2. Kolon/rektum kanseri biyolojisi

Kolorektal kanserin gelişimi, ardışık gen kaybını içeren çok aşamalı bir süreçtir. Moleküler biyoloji tekniklerindeki hızlı gelişmeler, birçok süreçten sorumlu olduğu düşünülen genetik değişikliklerin karakterizasyonuna olanak sağlamıştır. FAP (Ailesel Adenosis Polipozis) geninin lokusu keşfedildiğinde, genetik bağlantıyı kullanan daha kesin çalışmalar mümkün olmuştur. RFLP (Restriction fragment length polymorphism) analizi ve FAP'li 13 hasta ailesinden alınan DNA'nın in situ hibridizasyonu kullanılarak, FAP geninin konumunun 5q21-q22'de bir işarete yakın olduğu bulunmuştur. Kolorektal kanser, çok aşamalı karsinogenez sürecinin anlaşılması için faydalı bir model oluşturur. Çok sayıda polimorfik DNA markörünün bulunması, kolon kanserinde somatik heterozigotluk kaybıyla ilişkili diğer mutasyonların lokalizasyonu için bir araç sağlamaktadır. Diğer tümör baskılayıcı genlerin, bir tümör oluşumundan daha aşağı akış yönünde kolorektal onkogeneze rol

oynayabileceğini düşündürmektedir. DNA hibridizasyon analizi kullanılarak K-Ras'ta sık mutasyonlar bulunmuştur. Kromozon 18'in bir bölgesinin delesyonu, karsinomlarda ve ileri adenomlar ile nadiren erken adenomlarda görülmüştür. Bu gen kolon kanserinde (DCC) silinmiş olarak adlandırılmıştır ve protein ürününün birincil yapısı nöral hücre yapışma molekülüne (N-CAM) homologdur (Aarnio ve diğerleri, 1999).

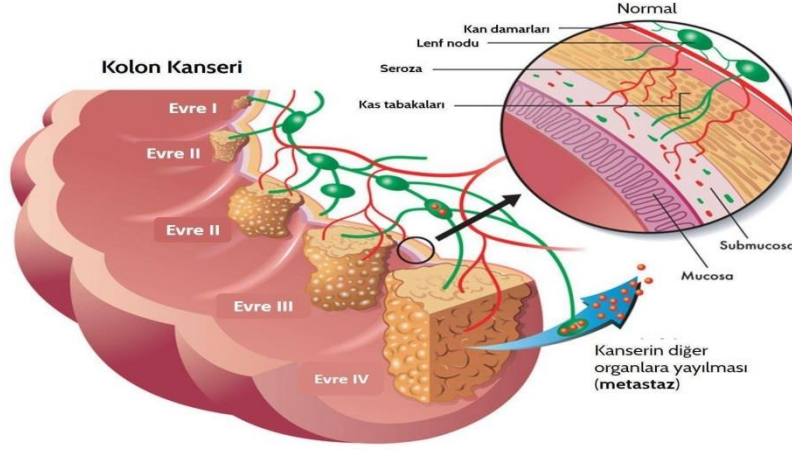
2.2.3. Biyolojik belirteçler

Kolorektal kanserin erken teşhis ve tedavisine olanak sağlayacak serolojik belirteçlerin araştırılması için büyük çaba harcanmıştır. Çeşitli proteinler, glikoproteinler, hücrel ve humoral maddeler, potansiyel tümör belirteçleri olarak incelenmiştir, ancak hiçbirinin kolorektal kansere özgü olmadığı bulunmuştur (Bresalier ve diğerleri, 1989). En yaygın olarak çalışılan tümör belirteçlerinden CEA (carcinoembryonic antigen) kalın bağırsak kanserli hastaların preoperatif evrelemesinde ve postoperatif takibinde faydalı olabilir ancak asemptomatik hastalarda tanı için düşük bir prediktif değere sahiptir (Fletcher, 1986). Testin nispeten düşük duyarlılığı ve özgüllüğünden dolayı büyük asemptomatik hastaları taramak için uygun değildir. Testin nispeten düşük duyarlılığı ve özgüllüğü olması nedeniyle asemptomatik hastaları taramak için uygun değildir. Normalin üst sınırı olarak 2,5 mg/ml kullanıldığında Dukes A ve B lezyonları için duyarlılık %36, Dukes C için %74 ve Dukes D hastalığı için %83'tür. CA19-9 gibi birkaç yeni karbonhidrat antijeni incelenmektedir ve bunlar kolondaki preneoplastik-erken neoplastik lezyonlar için özgüllük açısından bir miktar umut vaat etmektedir, tarama için etkinlikleri ise henüz belirlenmemiştir (Bresalier ve diğerleri, 1989).

2.2.4. Evreleme

TNM ve Dukes evrelemesi olmak üzere iki çeşit evreleme kullanılmaktadır. TNM, klinik ve patolojik bir sınıflandırma içeren ikili bir sistemdir. Farklı inceleme yöntemlerine dayandıkları ve farklı amaçlara hizmet ettikleri için ikisi arasında ayırım yapmak zorunludur. Klinik sınıflandırma olan cTNM'dir, patolojik olan pTNM'dir. TNM bir örnek olmadan kullanıldığında, klinik sınıflandırmayı ifade eder. Genel olarak cTNM tedavi seçiminin, pTNM ise prognostik değerlendirmenin temelidir. Dukes (Astler Collier) Evrelemesi; A: Tümör mukozada sınırlıdır. B1: Müskülaris propriaya kadardır (Tümör bağırsak duvarının kas tabakasını tutmuş fakat lenf bezlerine yayılmamıştır). B2: Müskülaris propriaya invazidir (Tümör bağırsak duvarını aşmış fakat lenf bezlerine yayılmamıştır). C1: Tümör

bağırsak duvarını aşmamıştır fakat lenf bezlerine yayılmıştır. C2: Tümör bağırsak duvarını aşmış ve lenf bezlerine yayılmıştır. D: Uzak organ metastazı oluşmuştur.



Şekil 2.3. Kolon kanseri evrelemesi

2.3. Kanser ve apoptoz

“Apoptoz” terimi, Yunanca “dökülme” anlamına gelen “απο” ve “πτωσις” kelimelerinden türetilmiştir ve sonbaharda ağaçlardan yaprakların dökülmesini ifade eder. Nekrozun aksine, bir hücrenin belirli uyarılarına aldıktan sonra aktif olarak ölüme doğru bir seyir izlediği durumu tanımlamak için kullanılır (Kerr ve Harmon, 1991). Apoptoz, 1970'lerde Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlandığından beri, biyolojik araştırmalarda en çok araştırılan süreçlerden biri olmaya devam etmektedir (Kerr, Wyllie ve Currie, 1972). Oldukça seçici bir süreç olan apoptoz, hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda önemlidir.

2.3.1. Apoptozda morfolojik değişiklikler

Hem çekirdeği hem de sitoplazmayı ilgilendiren apoptotik hücre ölümünün morfolojik değişiklikleri, hücre tipleri ve türleri arasında oldukça benzerdir (Hacker, 2000; Saraste ve Pulkki, 2000). Genellikle hücre ölümünün başlamasından hücrenin parçalanmaya kadar birkaç saat gerekir. Ancak geçen süre hücre tipine, uyarıya ve apoptotik yola bağlıdır (Saraste ve Pulkki, 2000). Çekirdekteki apoptozun morfolojik özellikleri, hücrenin yuvarlanması, hücrenin haciminde azalma (piknoz) ve psödopodların geri çekilmesinin eşlik ettiği kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanmadır (Kroemer ve diğerleri, 2005). Kromatin yoğunlaşması, nükleer membranın çevresinde başlar ve hilal veya halka benzeri

bir yapı oluşturur. Kromatin, karyoreksis olarak tanımlanan sağlam zarı olan bir hücre içinde parçalanana kadar daha da yoğunlaşır, plazma zarı ise işlem boyunca sağlamdır (Manjo ve Joris, 1995). Apoptozun sonraki aşamasında morfolojik özelliklerden bazıları; zar kabarmasını, sitoplazmik organellerin ultrastrüktürel modifikasyonunu ve zar bütünlüğünün kaybını içerir (Kroemer ve diğerleri, 2005). Genellikle fagositik hücreler, apoptotik cisimcikler oluşmadan önce apoptotik hücreleri yutar. Apoptotik hücre kalıntıları, yapay bir hücre kültürü ortamında olduğu gibi fagositte edilmezse nekroza benzer bir bozulmaya uğrarlar ve bu duruma sekonder nekroz denir (Saraste ve Pulkki, 2000).

Çizelge 2.1. Apoptoz ve nekrozun karşılaştırılması

	Nekroz	Apoptoz
Hücre Boyutu	Büyüme (Şişme)	Küçülme (Büzüşme)
Nükleus	Piknozis→Karyoreksis→Karyolizis	Kromatin kondansasyonu ve fragmantasyonu
Hücre Membranı	Parçalanmış	Sağlam
İnflamasyon	Sıklıkla var	Yok
Hücre İçeriği	Enzimatik sindirim	Sağlam

2.3.2. Apoptozda biyokimyasal değişiklikler

Genel olarak, apoptozda üç ana tip biyokimyasal değişiklik gözlemlenebilir: 1) kaspazların aktivasyonu, 2) DNA ve protein yıkımı, 3) membran değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından tanınmasıdır (Kumar ve diğerleri, 2010). Apoptozun başlarında, hücre zarının dış katmanlarında, iç katmanlardan “dışarı çevrilmiş” olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Bu, ölü hücrelerin makrofajlar tarafından erken tanınmasına izin vererek proinflamatuvar hücresel bileşenlerin salınımı olmaksızın fagositozla sonuçlanır (Hengartner, 2000). Bu süreci, DNA'nın 50-300 kilobazlık büyük parçalara karakteristik olarak parçalanması takip eder (Vaux ve Silke, 2003). Daha sonra, DNA'nın endonükleazlar tarafından 180-200 baz çiftinin üzerinde oligonükleozomlara internükleozomal bölünmesi görülür (McCarthy ve Evan, 1998). Apoptozun spesifik bir özelliği, kaspazlar olarak adlandırılan sistein proteaz ailesine ait bir grup enzimin aktivasyonudur. "Kaspaz"ın "c"si, bir sistein proteazını belirtirken "aspaz", enzimin aspartik asit kalıntılarından sonra parçalanma özelliğine karşılık

gelir (Kumar ve diğ erleri, 2010). Aktive edilmiş kaspazlar birçok hayati hücresel proteini ve nükleer yapı iskelesi ile hücre iskeletini parçalar. Ayrıca nükleer DNA'yı daha da bozan DNAazı aktive ederler (Lavrik ve Golks, 2005). Biyokimyasal değişiklikler apoptozdaki bazı morfolojik değişiklikleri kısmen a ıklaısa da, apoptoz oligonükleozomal DNA olmadan da oluşabileceğinden, DNA fragmentasyonu veya kaspaz aktivasyonunun biyokimyasal analizlerinin apoptozu tanımlamak için kullanılmaması gerektiğini belirtmek önemlidir (Galluzi ve diğ erleri, 2007).

2.3.3. Apoptoz mekanizmaları

Apoptozun mekanizmalarını anlamak çok önemlidir ve düzensiz apoptozun bir sonucu olarak ortaya çıkan durumların patogenezinin anlaşılmasına yardımcı olur. Bu da belirli apoptotik genleri veya yolları hedefleyen ilaçların geliştirilmesine yardımcı olabilir. Kaspazlar, hem başlatıcı hem de uygulayıcı oldukları için apoptoz mekanizmasının merkezinde yer alır. Kaspazların aktive edilebileceği üç yol vardır. Yaygın olarak tanımlanan iki başlatma yolu, apoptozun içsel (veya mitokondriyal) ve dışsal (veya ölüm reseptörü) yollarıdır. Her iki yol da nihayetinde ortak bir yola veya apoptozun yürütme aşamasına yol açar. Daha az bilinen üçüncü bir başlangıç yolu, içsel endoplazmik retikulum yoludur (O'Brien ve Kirby, 2008).

2.3.3.1. Dışsal  l m reseptörü yolu

Bu yol, ölüm ligandlarının bir ölüm reseptörüne bağlanmasıyla başlar. Birkaç  l m reseptörü tanımlanmış olmasına rağmen, en iyi bilinen ölüm resept r leri tip-1 TNF reseptörü (TNFR1) ve Fas (CD95) adı verilen ilgili bir proteindir ve bunların ligandları sırasıyla TNF ve Fas ligandı (FasL) olarak adlandırılır (Hengartner, 2000). Bu  l m resept r leri, TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) gibi adaptör proteinlerin yanı sıra Kaspaz-8 gibi sistein proteazlarını kapsayan bir hücre içi ölüm alanına sahiptir (Schneider ve Tschopp, 2000). Ölüm ligandının ölüm reseptörüne bağlanması, adaptör protein için bir bağlanma bölgesinin oluşumuyla sonuçlanır ve tüm ligand-reseptör-adaptör protein kompleksi, ölümü indükleyen sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinir (O'Brien ve Kirby, 2008). DISC daha sonra pro-kaspaz-8'in birleşmesini ve aktivasyonunu başlatır. Enzimin aktive edilmiş formu olan Kaspaz-8, apoptozu yürütücü kaspazları parçalayarak başlatan bir kaspazdır (Karp, 2008).

2.3.3.2. İç mitokondriyal yol

Bu intrinsik yol hücre içinde başlatılır. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, aşırı yüksek sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonları ve şiddetli oksidatif stres gibi iç uyaranlar, içsel mitokondriyal yolun başlatılmasının bazı tetikleyicileridir (Karp, 2008). Uyaranlardan bağımsız olarak, bu yol, artan mitokondriyal geçirgenliğin ve sitoplazmaya sitokrom-c gibi proapoptotik moleküllerin salınımının sonucudur (Danial ve Korsmeyer, 2004). Bu yol, foliküler Hodgkin olmayan lenfomada 18.- 14. kromozom translokasyonunun kromozomal kırılma noktasında orijinal olarak gözlenen *Bcl-2* geninden adını alan BCL-2 ailesine ait bir protein grubu tarafından düzenlenir (Tsujimoto ve diğerleri, 1984). Proapoptotik proteinler (örn. BAX, BAK, BAD, BCL-XS, BİD, BİK, BİM ve HRK) ve anti-apoptotik proteinler (örn. BCL-2, BCL-XL, BCL-W, BFL-1 VE MCL-1) olmak üzere BCL-2 proteinlerinin iki ana grubu vardır. Antiapoptotik proteinler sitokrom-c'nin mitokondriyal salınımını bloke ederek apoptozu düzenlerken, proapoptotik proteinler bu salınımı teşvikleyerek etki eder. Apoptozun başlayıp başlamayacağını belirleyen etken mutlak miktar değil, pro- ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengedir. Mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitoplazmaya salınan diğer apoptotik faktörler arasında; apoptoz indükleyici faktör (AIF), ikinci mitokondri türevli kaspaz aktivatörü (Smac), Düşük pI'li doğrudan IAP bağlayıcı protein (DIABLO) ve Omi/yüksek sıcaklık gereksinimi proteini bulunur (Kroemer, Galluzzi ve Brenner, 2007). Sitokrom c'nin sitoplazmik salınımı; sitokrom-c, Apaf-1 ve Kaspaz-9'dan oluşan apoptozom olarak bilinen bir kompleksin oluşumu yoluyla Kaspaz-3'ü aktive eder (Kroemer, Galluzzi ve Brenner, 2007). Öte yandan, Smac/DIABLO veya Omi/HtrA2, apoptoz proteinlerinin (IAP'ler) inhibitörüne bağlanarak kaspaz aktivasyonunu destekler, bu da daha sonra IAP'lerin Kaspaz-3 veya 9 ile etkileşiminde bozulmaya yol açar (Kroemer, Galluzzi ve Brenner, 2007; LaCasse ve diğerleri, 2008)

2.3.3.3. Ortak yol

Apoptozun yürütme aşaması, bir dizi kaspazın aktivasyonunu içerir. İç yol için yukarı akış kaspazı Kaspaz-9, dış yolun ise Kaspaz-8'dir. İçsel ve dışsal yollar Kaspaz-3'te birleşir. Kaspaz-3 daha sonra nükleer apoptozdan sorumlu kaspazla aktive olan deoksiribonükleazın inhibitörünü parçalar (Ghobrial, Witzig ve Adjei, 2005). Ayrıca aşağı akışlı kaspazlar; protein kinazların, hücre iskeleti proteinlerinin, DNA onarım proteinlerinin ve endonükleaz ailesinin inhibitör alt birimlerinin bölünmesini indükler. Ayrıca apoptozdaki tipik morfolojik

değişikliklere birlikte katkıda bulunan hücre iskeleti, hücre döngüsü ve sinyal yolları üzerinde de etkileri vardır (Ghobrial, Witzig ve Adjei, 2005).

2.3.3.4. İç endoplazmik retikulum yolu

Bu içsel endoplazmik retikulum (ER) yolu, üçüncü bir yoldur ve daha az bilinir. Kaspaz 12'ye bağımlı ve mitokondriden bağımsız olduğu düşünülmektedir (Szegezdi ve Fitzgerald, 2003). ER, hipoksi, serbest radikaller veya glikoz açlığı gibi hücresel stresler tarafından yaralandığında, hücrede proteinlerin açılması ve protein sentezinin azalması gerçekleşir ve TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2 (TRAF2) olarak bilinen bir adaptör protein prokaspaz-12'den ayrılır.

2.4. Apoptoz ve karsinogenez

Kanser, normal bir hücrenin kötü huylu bir hücreye dönüştüğü bir dizi genetik değişikliğin sonucu olarak görülebilirken, hücre ölümünün ortadan kaldırılması, bir hücrede bu kötü huylu dönüşüme neden olan temel değişikliklerden biridir. 1970'lerin başlarında, Kerr ve arkadaşları apoptozu potansiyel olarak malign hücrelerin, hiperplazinin ve tümör ilerlemesinin ortadan kaldırılmasıyla ilişkilendirmiştir. Bu nedenle, azaltılmış apoptoz veya direnç, karsinogenezde hayati bir rol oynar (Hanahan ve Weinberg, 2000) Malign bir hücrenin apoptoz veya apoptoz direncinde azalma elde etmesinin birçok yolu vardır. Genel olarak, apoptozdan kaçınmanın meydana geldiği mekanizmalar;

- 1) Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin bozulmuş dengesi,
- 2) Azalmış kaspaz fonksiyonu,
- 3) Bozulmuş ölüm reseptörü sinyalidir.

2.4.1. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin bozulmuş dengesi

Birçok proteinin hücrede pro- veya anti-apoptotik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Hücre ölümünün düzenlenmesinde bu pro- ve anti-apoptotik proteinlerin mutlak miktarı değil oranı önemli bir rol oynar. Ayrıca, belirli genlerin (dolayısıyla ortaya çıkan düzenleyici proteinlerin) aşırı veya düşük ekspresyonunun, kanser hücrelerinde apoptozu azaltarak karsinogeneze katkıda bulunduğu bulunmuştur (Cacan ve diğerleri, 2015).

Çizelge 2.2. Apoptozu regüle eden genler

Apoptozu Artıranlar	Apoptozu Azaltanlar
<i>p53</i>	<i>Bcl-2</i>
<i>Bax</i>	<i>Bcl-x</i>
<i>Bak ve Puma (Bbc3)</i>	<i>Mcl-1</i>

2.4.1.1. BCL-2 protein ailesi

BCL-2 protein ailesi, özellikle intrinsik yol aracılığıyla apoptozun düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynayan proapoptotik ve anti-apoptotik proteinlerden oluşur. Geri dönüşü olmayan hücrel hasarın yapısında bulunurlar ve esas olarak mitokondri düzeyinde hareket ederler. BCL-2, bu ailenin 20 yılı aşkın bir süre önce tanımlanan ilk proteinidir. *Bcl-2* geni tarafından kodlanan, insan B hücreli lenfomalarda bulunan bir dizi proteinin t(14; 18) kromozomal translokasyonuna sahip ikinci üyesi olan B hücreli lenfoma-2'den adını alır (Tsujimoto ve diğerleri, 1984). Tüm BCL-2 üyeleri, dış mitokondriyal zar üzerinde bulunur. İyon kanalı şeklinde veya gözeneklerin oluşturulması yoluyla membran geçirgenliğinden sorumlu olan dimerlerdir (Minn ve diğerleri, 1997). Fonksiyonlarına ve BCL-2 homoloji (BH) alanlarına göre BCL-2 ailesi üyeleri ayrıca üç gruba ayrılır (Dewson ve Kluc, 2010). İlk grup, dört BH bölgesinin tümünü içeren anti-apoptotik proteinlerdir ve hücreyi apoptotik uyarılardan korurlar. Bazı örnekler BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W, A1/BFL-1 ve BCL-B/BCL2L10'dur. İkinci grup sadece BH-3 proteinlerinden oluşur, diğer üyelere kıyasla BH-3 alanı ile sınırlı oldukları için bu şekilde adlandırılır. Bu gruptaki örnekler arasında BİD, BİM, PUMA, NOXA, BAD, BMF, HRK ve BİK sayılabilir. DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu ve endoplazmik retikulum stresi gibi hücrel stres zamanlarında, apoptozun başlatıcıları olan BH3 proteinlerinin aktiviteleri nedeniyle proapoptotiktirler. Üçüncü grubun üyeleri, dört BH alanının tümünü içerir ve ayrıca proapoptotiktir. Bazı örnekler BAX, BAK ve BOK/MTD'yi içerir (Dewson ve Kluc, 2010). BCL-2 ailesinin anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyelerinin dengesinde bozulma olduğunda, etkilenen hücrelerde düzensiz apoptoz ile sonuçlanır. Bu durum, bir veya daha fazla anti-apoptotik proteinin aşırı ekspresyonundan veya her ikisinin bir kombinasyonundan kaynaklanabilir. Örneğin, Raffo ve arkadaşları, *Bcl-2*'nin aşırı ekspresyonunun prostat kanseri hücrelerini apoptozdan koruduğunu göstermiştir (Raffo ve diğerleri, 1995), Fulda ve arkadaşları ise *Bcl-2* aşırı

ekspresyonunun nöroblastoma, glioblastoma ve meme karsinomu hücrelerinde TRAIL ile indüklenen apoptozun inhibisyonuna yol açtığını bildirmiştir (Fulda, Meyer ve Debatin, 2000). *Bcl-xL*'nin aşırı ekspresyonunun, tümör hücrelerinde çoklu ilaca dirençli fenotip sağladığı ve onların apoptoza uğramasını önlediği de ifade edilmiştir (Minn ve diğerleri, 1995). Mikrosatellit instabilitesi olan kolorektal kanserlerde ise *bax* genindeki mutasyonlar çok yaygındır. Miquel ve arkadaşları, *Bax(G)8* çerçeve kayması mutasyonlarından kaynaklanan bozulmuş apoptozun, kolorektal kanser hücrelerinin antikanser tedavi direncine katkıda bulunabileceğini göstermişlerdir (Miquel ve diğerleri, 2005) Kronik lenfositik lösemi (KLL) durumunda, malign hücreler, yüksek seviyelerde anti-apoptotik BCL-2 ve *in vivo* BAX gibi düşük pro-apoptotik protein seviyeleri ile anti-apoptotik bir fenotipe sahiptir. KLL'deki lökoemogenez, *in vivo* artan proliferasyon dışında azalmış apoptozdan kaynaklanmaktadır (Goolsby, Paniagua, Tallman ve Gartenhaus, 2005).

2.5. Azaltılmış kaspaz aktivitesi

Kaspazlar genel olarak iki gruba ayrılabilir: 1) Kaspaz-1 ile ilgili olanlar (örn. kaspaz-1, -4, -5, -13 ve -14), esas olarak enflamatuar süreçler sırasında sitokin işlemede yer alırlar, apoptozda merkezi bir rol oynayanlardır (örn. Kaspaz-2, -3, -6, -7, -8, -9 ve -10). İkinci grup ayrıca, apoptotik yolun başlatılmasından birincil olarak sorumlu olan başlatıcı kaspazlar (örn. Kaspaz-2, -8, -9 ve -10) ve 2) ve efektör kaspazlar (Kaspaz-3, -6) olarak sınıflandırılabilir. Kaspazlar, apoptozun başlatılması ve yürütülmesinde önemli oyuncularından biri olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, düşük kaspaz düzeylerinin veya kaspaz işlevindeki bozulmanın apoptoz ve karsinogeneizde azalmaya yol açabileceği düşünülmektedir.

Bir çalışmada, Kaspaz-9'un aşağı regülasyonu, evre II kolorektal kanserli hastalarda sık görülen bir olay olarak bulunmuştur ve kötü klinik sonuçla koreledir (Shen ve diğerleri, 2010). Başka bir çalışmada Devarajan ve arkadaşları; göğüs, yumurtalık ve servikal tümörlerden temin edilen RNA örneklerinde Kaspaz-3 mRNA seviyelerinin (meme ve servikal) saptanamaz ya da (yumurtalık) önemli ölçüde azaldığını gözlemlemiştir. Kaspaz-3 eksikliği olan meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin antikanser ilaca veya diğer apoptoz uyaranlarına yanıt olarak apoptoza uğrama duyarlılığını, Kaspaz-3 ekspresyonunu geri yükleyerek artırılabilirliğini ve Kaspaz-3 ekspresyonu kaybının olduğunu bulmuşlardır (Devarajan ve diğerleri, 2002). Bazı durumlarda, birden fazla kaspaz aşağı regüle edilerek

tümör hücresi büyümesine ve gelişimine katkıda bulunur. Bir cDNA dizisi diferansiyel ekspresyon çalışmasında Fong ve arkadaşları; Kaspaz-8 ile -10'un aşağı regülasyonunu gözlemlemiş ve bunun koryokarsinom patogenezinin katkıda bulunabileceğini öne sürmüşlerdir (Fong ve diğerleri, 2006).

2.6. Histon deasetilazlar (HDAC)

DNA ve proteinin üst düzey yapısı olan kromatin, gen transkripsiyonu için bir bariyer oluşturur. Temel kromatin birimi, her bir histon H2A, H2B, H3 ve H4'ün iki kopyasını içeren bir histon çekirdeği etrafına sarılmış 147 bp DNA içeren nükleozomdur. Bu çekirdek, nükleozomlar arasında ve nükleozomun kendi içinde etkileşim kurmak için önemlidir (Khorasanizadeh, 2004). Kromatin, DNA'da ve nükleozomlardan çıkıntı yapan histon kuyruklarında meydana gelen epigenetik modifikasyonlara bağlı olarak farklı yapısal konformasyonlar benimseyebilir. Belirli genlerin kromatin durumundaki değişiklikler, bunların bastırılmasına veya aktivasyonuna yol açabilir. Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve sumoilasyon dahil olmak üzere birkaç histon posttranslasyonel modifikasyon tanımlanmıştır (Bannister ve Kouzarides, 2011). Histon posttranslasyonel modifikasyonları gen ekspresyonunu düzenlemek için ek proteinler tarafından okunan ve tanınan sözde "histon kodunu" oluşturur (Strahl ve Allis, 2000).

Histon asetilasyonu, gen ekspresyonunun önemli bir belirleyicisidir. Asetilasyon genellikle yüksek transkripsiyonla ilişkilendirilirken, deasetillenmiş histonlar sıklıkla gen baskılaması ile ilişkilendirilir. Histon deasetilazlar (HDAC'lar), asetil grubunu histonlardan enzimatik olarak ayıran, gen ekspresyonunun kritik düzenleyicileridir. HDAC'lar için asil-lizin "silgileri" olarak daha geniş bir rol oynamaktadır (Olsen, 2012; Tan ve diğerleri, 2011). HDAC'ların histon olmayan proteinler üzerindeki aktivitesi de HDAC fonksiyonunun önemli bir yönüdür (Spange, Wagner, Heinzl ve Kramer, 2009). Bununla birlikte, çok sayıda histon olmayan HDAC substratı tanımlanmış olsa da, histon olmayan protein deasetilasyonunun moleküler ve biyolojik sonuçları, bu hedeflerin çoğunluğu için henüz aydınlatılmamıştır. Şimdiye kadar 11 HDAC içeren üç klasik HDAC sınıfı (I, II ve IV) tanımlanmıştır ve maya proteinlerine homolojilerine, hücre altı konumlarına ve enzimatik aktivitelerine göre sınıflandırılmıştır.

Sınıf III HDAC'lar veya sirtuinler, NAD'ye bağımlı katalitik bölgelere ve klasik HDAC'larla bazı örtüşen işlevlere sahiptir. Yaklaşık elli yıl önce Vincent Allfrey ve meslektaşları; histonlar üzerindeki lizin kalıntılarının ϵ -amino grubunun asetilasyonunun gen ifadesinde rol oynayabileceğini gösteren histonların lizin asetilasyonunu keşfettiler (Allfrey ve diğerleri, 1964; Gershey ve diğerleri, 1968). Asetilasyon, histon lizin kalıntılarının pozitif yükünü nötralize eder, kromatin yapısını gevşetir ve transkripsiyon makinesine daha fazla erişilebilirlik sağlar (Haberland ve diğerleri, 2009). Protein asetilasyonu, histonlardan asetil gruplarının çıkarılması, kromatin yoğunlaşmasını ve gen transkripsiyonel baskılamayı indüklemesinin aksine (Haberland ve diğerleri, 2009) genellikle gen aktivasyonu ile ilişkilidir. Lizin asetilasyonunun, transkripsiyon faktörleri ve sitoplazmik proteinler gibi önemli sayıda histon dışı proteinlerde de meydana geldiği, gen transkripsiyonunu ve diğer hücresel süreçleri etkilediği iyi bilinmektedir (Peng ve Seto, 2011). Lizin asetilasyonu, iki tip enzimin, histon asetilazların (HAT'ler) ve histon deasetilazların (HDAC'lar) antagonistik eylemleri tarafından kontrol edilen geri dönüşümlü bir modifikasyondur (Bannister ve Kouzarides, 2011). HAT'ler, asetil gruplarının asetil CoA'dan lizin kalıntısının ϵ -amino grubuna transferini katalize eder.

HDAC inhibisyonunun biyolojik sonucu, bileşiğin HDAC spesifitesine ve hücre sinyalleme yollarının içsel çalışmasına bağlıdır. HDAC'ların etki mekanizmaları ve klinik etkililiklerine yönelik araştırmalar aktif kalarak ileri çalışmalar gerektirmektedir. HDAC'lar, çok çeşitli fizyolojik ve patolojik sistemlerde önemli transkripsiyonel ortak bastırıcılar olarak ortaya çıkmıştır. Bugüne kadar, 18 insan HDAC tanımlanmış ve maya proteinleri ile homologilerine göre dört sınıfa ayrılmıştır. Sınıf I HDAC'lar (HDAC1, 2, 3 ve 8) maya transkripsiyon regülatörü RPD3 ile yüksek homoloji paylaşır, sınıf II HDAC'lar HDA1 (HDAC4, 5, 6, 7, 9 ve 10), sınıf III HDAC'lar ile yakından ilişkilidir, sirtuinler olarak da adlandırılırlar. Sir2 (SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7) ile homologdur ve sınıf IV HDAC (HDAC11), sınıf I ve II enzimlerle homologdur. Sınıf II HDAC'lar ayrıca sınıf IIa (HDAC4, 5, 7, 9) ve sınıf IIb (HDAC6 ve 10) formlarına (Haberland ve diğerleri, 2009; Parra ve Verdin, 2010) ayrılmıştır. Sınıf I, II ve VI HDAC'lar ayrıca "klasik" HDAC'lar olarak adlandırılır ve Zn^{2+} bağımlı enzimlerdir, oysa sirtuinler kofaktör olarak NAD^+ gerektirir.

Sınıf I HDAC'lar tüm dokularda her yerde eksprese edilir. Çoğunlukla hücrenin çekirdek bölümünde lokalizedirler ve histon lizin kalıntıları üzerinde güçlü bir katalitik etki gösterirler. HDAC1 ve HDAC2 oldukça benzerdir ve proliferasyon, hücre döngüsü ve

apoptoz gibi birçok hücresel süreçte rol oynar (Segre ve Chiocca, 2011). Tüm organizmada, gelişim ve fizyolojide kritik bir role sahip oldukları görülmektedir (Reichert ve diğerleri, 2012). HDAC3, hücre döngüsü süreçlerinde ve DNA hasar tepkisinde rol oynar (Reichert ve diğerleri, 2012). HDAC8 ağırlıklı olarak sitozolde bulunur ve düz kas farklılaşması gösteren hücrelerde eksprese edilir (Waltregny ve diğerleri, 2005). Sınıf I HDAC'ların protein yapısı, kısa amino ve karboksi terminal uzantıları ile çevrili yüksek oranda korunmuş deasetilaz alanı ile karakterize edilir (Yang ve Seto, 2008). Sınıf I HDAC'lar, bastırmaya aracılık etmek için genleri hedeflemek üzere görevlendirilen, çoklu protein komplekslerinin bir parçası olarak bulunur. HDAC1 ve HDAC2, Sin3, Mi-2 / NurD ve CoREST komplekslerinin katalitik alt birimleridir, oysa HDAC3 esas olarak N-CoR / SMRT kompleksi tarafından görevlendirilir. HDAC8 şimdiye kadar herhangi bir protein kompleksinin bir üyesi olarak tarif edilmemiştir (Yang ve Seto, 2008). Sınıf I HDAC'lardan farklı olarak, sınıf IIa HDAC'ler dokuya özgü bir şekilde ifade edilir, farklılaşma ve geliştirmede yer alır. Transkripsiyonel baskılama işlevlerini iskelet, kalp ve düz kas, kemik, bağışıklık sistemi, vasküler sistem ve beyinde uygularlar. Sınıf IIa HDAC'ların bir özelliği, korunmuş deasetilaz alanıyla birlikte, dokuya özgü transkripsiyon faktörleri ve eş baskılayıcılarla etkileşimlerine aracılık eden uzun bir düzenleyici N-terminal alanına sahip olmalarıdır (Parra ve Verdin, 2010; Yang ve Seto, 2008). Amino terminal alanı, fosforilasyona tabi tutulan yüksek oranda korunmuş serin kalıntıları içerir. Sınıf IIa HDAC'ların sinyale bağlı fosforilasyonu; çekirdek veya sitoplazmada lokalize olup olmadıklarını ve bu nedenle nükleer bölmede transkripsiyonel eş baskılayıcılar olarak hareket etme yeteneklerini belirleyen kritik bir olaydır (Parra ve Verdin, 2010; Yang ve Seto, 2008). Sınıf IIa HDAC'ların yüksek oranda korunmuş histon deasetilaz alanına sahip olmalarına rağmen, spesifik katalitik aktiviteleri belirsizdir. Sınıf IIa HDAC'lar, baskılayıcı kompleks SMRT / N-CoR'nin bir parçası olarak bulunmuştur (Fischle ve diğerleri, 2002; Huang ve diğerleri, 2000). HDAC6 ve HDAC10, sınıf IIb alt ailesinin iki üyesidir. HDAC6 esas olarak sitoplazmada bulunur, burada ana hedefi α -tubulin'dir, iki deasetilaz alanı ve bir karboksi-terminal çinko parmağı içerir (Hubbert ve diğerleri, 2002; Yang ve Seto, 2008). HDAC10, çekirdek ve sitoplazmada bulunur, ikinci bir deasetilaz alanı içerir ve spesifik substratları bilinmemektedir. (Hubbert ve diğerleri, 2002; Yang ve Seto, 2008).

Sirtuinler geniş çapta ifade edilir ve diğerleri arasında oksidatif stresin düzenlenmesi, DNA onarımı, metabolizmanın düzenlenmesi ve yaşlanma gibi geniş bir biyolojik işlev yelpazesine sahiptir (Bosch-Presegue ve Vaquero, 2011; Saunders ve Verdin, 2007). Sirtuinler farklı hücresel bölmelerde lokalizedir: SIRT1, SIRT6 ve SIRT7 çekirdekte, SIRT2

sitozolde bulunur. SIRT3, 4 ve 5 esas olarak mitokondriyumda bulunur (Bosch-Presegue ve Vaquero, 2011; Saunders ve Verdin , 2007). HDAC11 şu anda Sınıf IV HDAC alt ailesinin tek üyesidir. HDAC11, hem sınıf I hem de sınıf II HDAC'lar tarafından paylaşılan katalitik çekirdek bölgelerindeki korunmuş kalıntıları içerir (Gao ve diğerleri, 2002). HDAC11 ifadesi; böbrek, beyin, testis, kalp ve iskelet kasında zenginleştirilmiştir, ancak işlevi çok az çalışılmıştır. Oligodendrosit gelişimi ve bağışıklık sistemi tepkisi ile ilişkilendirilmiştir (Liu ve diğerleri, 2009; Villagra ve diğerleri, 2009).

2.6.1. Sınıf I Histon Deasetilazlar

HDAC'ların Sınıf I alt ailesinin tüm üyeleri, birçok kanserde düzensizdir. Hasta kanser örneklerini analiz eden çeşitli çalışmalarda, mide, meme, pankreas, hepatosellüler, akciğer, over ve prostat karsinomlarında HDAC1'in aşırı ekspresyonu bulunmuştur ve vakaların çoğunda HDAC1 up-regülasyonu kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Choi ve diğerleri, 2001; Cacan ve diğerleri, 2013). Diğer çalışmalar, böbrek hücre kanseri, kolorektal ve mide kanserinde ve ayrıca klasik Hodgkin lenfomada HDAC1, HDAC2 ve HDAC3'ün yüksek ekspresyonunu bildirmiştir (Adams ve diğerleri, 2010; Fritzsche ve diğerleri, 2008; Weichert ve diğerleri, 2008; Cacan, Greer ve Benson, 2015). Göğüs tümörlerini analiz eden farklı bir çalışmada; HDAC1 ve HDAC3 ekspresyonu, bağımsız bir prognostik belirteç olarak HDAC1'e işaret eden östrojen ve progesteron reseptör ekspresyonu ile ilişkilidir (Krusche ve diğerleri, 2005). 44 malign ve borderline mezenkimal tümör kategorisini temsil eden bir doku mikrodizisinde, HDAC2, HDAC1'e kıyasla yüksek oranda ifade edilir, bu da HDAC2'nin hastalığın patogeneze daha fazla katkıda bulunduğunu gösterir (Pacheco ve Nielsen, 2012). HDAC2 ayrıca akciğer kanseri dokularında da anormal bir şekilde eksprese edilir (Jung ve diğerleri, 2012). Birlikte ele alındığında bu çalışmalar, zayıf prognozla ilişkili bir kanser markörü olarak sınıf I HDAC'lerin, özellikle HDAC1'in aşırı ifadesine işaret etmektedir. Sınıf I alt ailesinin diğer üyelerinin aksine, HDAC8 ekspresyonu kanser tipine özgü görünmektedir. Çocukluk nöroblastomunda yüksek düzeyde HDAC8 ekspresyonu bildirilmiştir (Oehme ve diğerleri, 2009). Bu hastalarda HDAC8 ekspresyonu, ileri evre hastalık, kötü prognoz ve hayatta kalma ile ilişkilidir.

HDAC'lerin mutasyonları da gözlemlenmiştir. Mikrosatellit dengesizliği olan insan epitel kanserlerinde HDAC2 geninin somatik mutasyonları tanımlanmıştır (Ropero ve diğerleri, 2006). HDAC2 protein ekspresyonunun kaybı ile ilişkili mikrosatellit istikrarsızlığı ile

araştırılan önemli sayıda kanserde bir HDAC2 mutasyonu tespit edilmiştir. Bu mutasyonun, HDAC inhibitörlerinin anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkilerine direnç kazandırdığı fonksiyonel analizlerde gösterilmektedir (Ropero ve diğerleri, 2006).

HeLa hücrelerinde, HDAC1 ve HDAC3'ün siRNA aracılı susturma etkisi hücre proliferasyonunun inhibisyonuna neden olurken, HDAC4 ve HDAC7'nin ise hücre sayıları üzerinde hiçbir etkisi yoktur (Glaser ve diğerleri, 2003). HDAC1 susturma, ayrıca hücre döngüsü durması, hücre büyümesi inhibisyonu, osteosarkom ve meme kanseri hücrelerinde apoptozun indüksiyonu ile sonuçlanır (Senese ve diğerleri, 2007). Yapılan başka çalışmalarda, HDAC1'in over kanserinde siRNA ile susturulması sonucunda apoptozda görev alan FAS ya da immünojenik yanıtın artmasını sağlayan OX-40L ve 4-1BBL gibi genlerin ekspresyonlarını arttırdığı gözlemlenmiştir (Cacan, 2016; Cacan, 2017). Kolon kanseri hücrelerinde HDAC1 ve HDAC2 susturma, hücre büyümesini baskılar (Weichert ve diğerleri, 2008). HDAC1 aşırı ekspresyonu, proliferasyonda bir artışa ve prostat kanseri hücrelerinde farklılaşmamış bir fenotipe yol açar (Halkidou ve diğerleri, 2004). Nöroblastoma hücrelerinde HDAC1 susturma etkisi, ürokinaz plazminojen aktivatörünün (uPA) ekspresyonunu indükleyerek hücrelerin *in vitro* invazif kapasitesinde bir artışa neden olur (Pulukuri ve diğerleri, 2007). Hem HDAC1 hem de HDAC2'nin devreden çıkarılması, ancak HDAC3, HDAC6 ve HDAC8'in, TRAIL ile indüklenen apoptoz için kronik lenfositik lösemi (CLL) hücrelerini hassaslaştırır (Inoue ve diğerleri, 2006). Göğüs kanseri hücre hatlarında, HDAC1, HDAC6 veya HDAC8'in aşırı ekspresyonu hücre istilasını ve MMP9'u artırır (Park ve diğerleri, 2011). HDAC1 ayrıca insan karaciğer kanseri hücre dizilerinin bir alt kümesinde yukarı regüle edilir. İnaktivasyonu, tümör hücresi büyümesinin gerilemesine, otofajik hücre ölümünün indüksiyonuna, p21 ve p27 gen ekspresyonunun artmasına neden olur (Xie ve diğerleri, 2012). Akciğer kanserinde, HDAC1'in miR-449a'nın hedefi olduğu bulunmuştur. MiR-449a'nın aşağı regülasyonu, HDAC1'in yukarı regülasyonu ile ilişkilidir (Jeon ve diğerleri, 2012). HDAC1 ve HDAC2'nin servikal kanser hücrelerinde farmakolojik ilaçlarla veya siRNA tarafından susturulması, farklılaşmış bir fenotipe ve p21Cip1 / WAF1 indüksiyonu ile ilişkili apoptozda artışa neden olur (Ali ve diğerleri, 2013). Göğüs kanseri hücrelerinde, HDAC2 susturma, hücre proliferasyonunda azalma ve hücre yaşlanmanın indüksiyonu ile ilişkili olan p53'ün DNA bağlanma aktivitesini artırır (Harms ve Chen, 2007). İnsan akciğer kanseri hücre hatlarında, HDAC2 inaktivasyonu, p53 ve Bax aktivasyonu yoluyla apoptozun indüksiyonu ile sonuçlanır. A549 akciğer kanseri hücrelerinde HDAC2'nin sürekli baskılanması, hücrelerin *in vitro* ve *in vivo* tümörojenik

özelliklerini zayıflatır (Jung ve diğerleri, 2012). Akut promiyelositik lösemi hücrelerinde HDAC3, transkripsiyonu baskılamak için N-CoR baskılayıcı kompleksinin bir bileşeni olan PML-RARa tarafından görevlendirilir. Bu hücrelerde HDAC3'ün yok edilmesi, retinoik aside bağımlı genlerin ekspresyonunu başlatır (Atsumi ve diğerleri, 2006). AML-1-ETO füzyon proteini, lösemik hücrelerin transkripsiyonunu bastırmak için ETO yoluyla HDAC1, HDAC2 ve HDAC3'ü kullanır (Amann ve diğerleri, 2001). HDAC8 susturma; akciğer, kolon ve rahim ağzı kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyonunun inhibisyonuna yol açar (Vannini ve diğerleri, 2004). HDAC8'e özgü inhibitör PCI-34051; T hücrelerinden türetilen lenfoma ve lösemik hücrelerde seçici olarak apoptozu indükler, ancak solid kanser hücre hatlarında etkili değildir (Balasubramanian ve diğerleri, 2008). Çocukluk nöroblastoma hücrelerinde HDAC8'in devreden çıkarılması; proliferasyonun inhibisyonu, azalmış klonojenik büyüme, hücre döngüsü durması ve farklılaşması ile sonuçlanır (Oehme ve diğerleri, 2009).

2.6.2. Sınıf II Histon Deasetilazlar

2.6.2.1. Sınıf IIa HDAC'lar

Klasik olarak HDAC'ların kanserdeki rolüne ilişkin çalışmalar, sınıf I HDAC alt aile üyelerinin potansiyel katkılarına odaklanmıştır. Ancak, son yıllarda sınıf IIa HDAC'lar çeşitli kanser türleriyle ilişkilendirilmeye başlanmıştır. Sınıf I HDAC'ların aksine, sınıf IIa alt ailesinin bazı üyelerinin kanserde ikili bir rol oynadığı görülmektedir.

HDAC9 ve SIRT5 ile birlikte HDAC4'ün Waldenstrom makroglobulinemili hastalarda aşırı eksprese edildiği bulunmuştur (Sun ve diğerleri, 2011). HDAC4 ekspresyonu; böbrek, mesane ve kolorektal kansere kıyasla meme kanseri örneklerinde de yukarı regüle edilir (Özdağ ve diğerleri, 2006). Birkaç çalışma, HDAC4 disfonksiyonunun ve aşağı regülasyonunun kanser gelişimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Genom çapında bir yaklaşımda, melanom hücre hatlarında HDAC4 homozigot delesyonu gözlenmiştir (Stark ve Hayward, 2007). HDAC4 mutasyonları aynı zamanda meme kanserinde de bulunmuştur (Sjoberg ve diğerleri, 2006).

HDAC5 ve HDAC9, medulloblastoma risk sınıflandırması için değerli belirteçler gibi görünmektedir. Her iki HDAC'da, yüksek riskli medulloblastoma hastalarında aşırı ifade

edilir, bu durum ekspresyonları ile hayatta kalma arasında açık bir ilişki olduğunu gösterir (Milde ve diğerleri, 2010). Medulloblastoma hücrelerinde HDAC5 ve HDAC9'un siRNA'sı tarafından susturulması, hücre ölümünü teşvik etmek için yeterlidir (Milde ve diğerleri, 2010), ancak bu kanser türünün moleküler mekanizması henüz belirlenmemiştir. HDAC5 ayrıca HDAC3 ile birlikte hepatosellüler karsinomda (HCC) anormal şekilde eksprese edilir, baskılanmanın artması ise HCC'deki kopya sayısı ile ilişkilidir (Lachenmayer ve diğerleri, 2012). HDAC inhibitörü panobinostat ile tedavinin, HCC'nin prelinik modellerinde oldukça etkili olduğu bulunmuş ve bu durum HDAC'ların HCC ilerlemesindeki önemini doğrulamaktadır (Lachenmayer ve diğerleri, 2012).

Pankreas kanseri hastalarında yüksek seviyelerde sitoplazmik HDAC7 bildirilmiştir (Ouaissi ve diğerleri, 2008; Weichert, 2009). Benzer şekilde, akut lenfoblastik lösemili (ALL) çocuklarda yüksek seviyelerde HDAC7 ve HDAC9 ekspresyonu kötü prognozla ilişkilidir (Moreno ve diğerleri, 2010). Skov ve arkadaşları; HDAC7'nin miyeloproliferatif neoplazilerde önemli ölçüde aşağı regüle edildiğini bildirmişlerdir (Skov ve diğerleri, 2012). HDAC9'un aşırı ifadesi rahim ağzı kanserinde bildirilmiştir (Choi ve diğerleri, 2007). Benzer şekilde, HDAC9'un yukarı regüle ifadesi, medulloblastoma hastalarında (Milde ve diğerleri, 2010) ve çocuklukta akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastalarında (Moreno ve diğerleri, 2010) kötü sağkalım ile ilişkilidir. Bu histon deasetilazın aşırı ifade edilen seviyeleri, Waldenstrom'un makroglobulinemi hastalarında (Sun ve diğerleri, 2011) ve klasik Philadelphia-negatif kronik miyeloproliferatif neoplazm hastalarında (Skov ve diğerleri, 2012) meydana gelmektedir. Ayrıca, HDAC9 düşük dereceli astrositom ve normal beyne göre glioblastomda aşağı regüle edilmektedir (Lucio-Eterovic ve diğerleri, 2008).

Hücre hatlarını kullanan çeşitli çalışmalar, sınıf IIa HDAC ekspresyonu ve kanser arasında bir bağlantı kurmaktadır. Bu çalışmalar, hücresel olaylara bağlı olarak, sınıf IIa HDAC'ların pro-proliferatif faktörler veya tümör baskılayıcılar olarak hareket edebildiğini göstermektedir. Örneğin HDAC4, sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü p21WAF / Cip1'in (Mottet ve diğerleri, 2009) ekspresyonunu pozitif veya negatif olarak düzenleyebilir. Kolonik kriptlerin proliferatif bölgesinde HDAC4, transkripsiyon faktörü SP1 ile etkileşime girerek p21WAF1 / Cip1'in baskılanmasına ve hücre proliferasyonunun artmasına yol açar (Mottet ve diğerleri, 2009; Wilson ve diğerleri, 2008). Bunun tersine DNA hasarından sonra HDAC4, p21 ekspresyonunu indüklemek, DNA onarımını teşvik etmek ve hücre proliferasyonunu baskılamak için p53 tarafından görevlendirilir (Mottet ve diğerleri, 2009).

Platin tedavisine dirençli yumurtalık kanseri hücrelerinde, HDAC4 aşırı ifade edilir ve transkripsiyon faktörü STAT1'i deasetile ederek kanser hücresinin hayatta kalmasına yardımcı olur (Stronach ve diğerleri, 2011). HDAC4 aktivitesi yumurtalık açık hücreli karsinomda (CCC) da önemlidir. Hipoksik koşullar altında, HIF2a / Sp1 / HDAC4'ten oluşan kompleksin etkisi, CCC'lerin ön pıhtılaşma aktivitesinin kaybına yol açar (Koizume ve diğerleri, 2012). HDAC4'ün prostat kanseri hücrelerinin HIF-1'i stabilize ederek hipoksik koşulların üstesinden gelmesine yardımcı olduğu da gösterilmiştir. HDAC4'ün HIF-1'e bağlanması, glikoliz ve hipoksik koşullarda sitotoksik stresi düzenleyen bir kompleks oluşturur (Geng ve diğerleri, 2011). Kanser hücrelerinde, HDAC4'ün miRNA'ların hedefi olduğu gösterilmiştir. Hepatoselüler karsinomda (HCC), miR-1 ve miR-22'lerin olmaması nedeniyle HDAC4 seviyeleri yükselir (Datta ve diğerleri, 2008; Zhang ve diğerleri, 2010). Buna göre HCC hücrelerinde HDAC4 aşağı regülasyonu, büyüme oranlarını düşürür (Zhang ve diğerleri, 2010). miR-1 disfonksiyonu ve HDAC4 yukarı regülasyonu, akciğer kanseri hücrelerinde de bulunmuştur (Nasser ve diğerleri, 2008). Osteosarkom ve kolon kanseri hücrelerinde, HDAC4'ü hedefleyen miR-140 eksikliği kemo direnç ile ilişkilidir. Bu bağlamda apoptoz, miR-140'a yeniden tanıtıldığında p53 / HDAC4 / p21 yolu tarafından indüklenir (Song ve diğerleri, 2009). HDAC inhibitörleri, çekirdeğe girişini engellediği için HDAC4 nükleer lokalizasyonu kanserde önemlidir (Kong ve diğerleri, 2011). Bir çalışmada; onkojenik Ras'ın, ERK1 / 2 yolağının aktivasyonu yoluyla HDAC4'ün nükleer birikimi destekleyebileceği bildirildi (Zhou ve diğerleri, 2000). Ancak bunun Ras aracılı dönüşüme nasıl katkıda bulunabileceği bilinmemektedir. Ayrıca HDAC4'ün aşağı regülasyonu ile kanser gelişimi kondrosarkom hücrelerinde meydana gelmektedir. Bu hücreler normal kondrositlerden daha düşük HDAC4 seviyelerine sahiptir. HDAC4 kaybı, kondrosarkomların anjiyojenik kapasiteleri ile yakından ilişkili olan VEGF ekspresyon seviyesinde bir artışa neden olur (Sun ve diğerleri, 2009). HDAC4 baskılamasının kanser gelişimini kolaylaştırabildiği bir başka mekanizma, prostat kanseri hücrelerinde çalışılmıştır. Burada androjen reseptörünün (AR) transkripsiyonel aktivitesini, deasetilasyon dışında geliştirilmiş sumoilasyon yoluyla bastırır. Endojen HDAC4, endojen AR'nin sumoilasyonunu pozitif olarak düzenler, prostata özgü antijen ekspresyonunun ve hücre büyümesinin indüksiyonunu baskılar. HDAC4 prostat kanseri hücrelerinde azaldığında, AR baskılanmaz, bu nedenle hücre büyümesi ve proliferasyonu androjenler tarafından indüklenir (Yang ve diğerleri, 2011).

Ishikawa ve meslektaşları; pankreas kanserinde kötü prognoz belirteci olan oksisterol bağlayıcı protein 5'in HDAC5 ekspresyonunu kontrol ettiğini bulmuşlardır (Ishikawa ve diğerleri, 2010). Pankreas kanserinde HDAC5'in moleküler mekanizması, PTEN ekspresyonunu düzenleme kapasitesine dayanmaktadır. Çeşitli çalışmalar, kanser hücresi büyümesi ve çoğalmasında HDAC5 için spesifik bir işlevi olduğunu ortaya koymuştur. Aşırı ekspresyon çalışmalarından elde edilen ilk veriler, HDAC5'in çeşitli kanser hücre dizilerinde hücre proliferasyonunun negatif bir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir (Huang ve diğerleri, 2002). Meme kanseri hücrelerinde HDAC5, TBX3 ile bağlantılı olarak p14 baskılamasını düzenler ve hücre proliferasyonunu indükler (Yarosh ve diğerleri, 2008). HDAC5 ayrıca mide kanserinin yayılması ve metastatik özellikleriyle de ilişkilendirilmiştir. Son zamanlarda Peixoto ve meslektaşları; HDAC5'in kanser hücresi büyümesine katıldığı başka bir mekanizma olduğunu bildirdi. HDAC5'in kanser hücrelerinde replikasyon çatalı ilerlemesi, kanser hücrelerinde perisentrik heterokromatinin yapısını sürdürmesi ve birleştirmesi için gerekli olduğunu gösterdi (Peixoto ve diğerleri, 2012).

Meme kanseri hücrelerinde HDAC7; bir hücre döngüsü inhibitörü ve tümör baskılayıcı gen olan Reprimo'nun baskılanmasında ERa ile işbirliği yaparak hücre büyümesine katkıda bulunur (Malik ve diğerleri, 2010). Meme kanseri hücrelerinde siRNA aracılı HDAC7 susturulduktan sonra, 17-b-estradiol (E2) aracılı Reprimo baskısı bloke edilerek apoptozu indükler (Malik ve diğerleri, 2010). Bu bağlamda Khurana ve meslektaşları, meme kanseri hücrelerinin çoğalmasının düzenlenmesinde rol oynayan HDAC7 ile ilişkili ek faktörler belirlediler. HDAC7'nin aynı zamanda ACTN4 ile ilişkili olduğunu, ERa transkripsiyonel aktiviteyi güçlendirdiğini ve karşılığında kanser hücresi çoğalmasını teşvik ettiğini bildirdiler (Khurana ve diğerleri, 2010). İlginç bir şekilde HDAC7 ekspresyonunun, kanser ve normal hücre hatlarının HDACi tedavisi ile spesifik olarak aşağı regüle edildiği bulunmuştur (Dokmanovic ve diğerleri, 2007; Duong ve diğerleri, 2008). Wen ve meslektaşları; kanser hücresi kemorezistansında yer alan HIF-1'e bağımlı mekanizmayı ele aldılar ve siklin D1'in ekspresyonunu baskılayan bir HDAC7 / HIF-1 kompleksi belirlediler. Kemoresistansa HIF-1 katılımının HDAC7 / HIF-1 kompleksi tarafından siklin D1'in bastırılmasına bağlı olabileceği sonucuna vardılar (Wen ve diğerleri, 2010). Buna göre HDACi ve geleneksel kemoterapötikler ile birlikte tedavi, bu hücrelerdeki ilaca dirençli fenotipin üstesinden gelmek için yeterlidir. Kültürlenmiş ve birincil kutanöz T-hücresi lenfoma (CTCL) hücrelerinde, pan-HDACi panobinostat ile tedavi, HDAC7 ekspresyonunu azaltır böylece hedef gen Nur77'yi indükler ve sonuçta apoptozu teşvik eder (Chen ve

diğerleri, 2009). Ek olarak, anti-apoptotik proteinler olan BCL-2, BCL-xL ve BCL-B'nin küçük bir molekül inhibitörü olan panobinostat ve ABT-737'nin kombine tedavisi, HDACi duyarlı ve apoptoz üzerinde sinerjistik bir etkiye sahiptir (Chen ve diğerleri, 2009). Akut miyeloid lösemi (AML) hücrelerinin HDACi ile tedavisi, HDAC9'un aşırı ekspresyonunu teşvik eder (Bradbury ve diğerleri, 2005). Yuan ve meslektaşları; ATCD / TRIM29'u (ataksi telanjiektazi grubu D-tamamlayıcı) HDAC9'un bir substratı olarak buldular (Yuan ve diğerleri, 2010). ATDC'nin HDAC9 ile deasetilasyonu, ATDC'nin p53'e bağlanma yeteneğini değiştirerek p53 ile düzenlenen genlerin ekspresyonunu etkiler ve ATDC'nin hücre proliferasyonunu teşvik edici aktivitesinin tersine dönmesine neden olur (Yuan ve diğerleri, 2010). Bu koşullar altında HDAC9, glioblastomlarda HDACi tedavisi ve HDAC9 aşağı regülasyonunun etkisi ile bir tümör baskılayıcı görevi görür.

2.6.2.2. Sınıf IIb histon deasetilazlar

Yüksek seviyelerde HDAC6 ekspresyonu, tümörjenez ile ilişkilendirilmiştir (Lee ve diğerleri, 2008; Sakuma ve diğerleri, 2006). Oral skuamöz hücreli karsinomda, normal oral skuamöz dokuya göre karsinomlarda önemli ölçüde daha yüksek HDAC6 ekspresyonu bulunmuştur ve ileri evre kanserlerde erken evreye göre HDAC6 ekspresyonu artmıştır (Sakuma ve diğerleri, 2006). Bunun tersine meme kanserinde HDAC6 ekspresyonu daha iyi sağkalımla ilişkilendirilmiştir. Yüksek HDAC6 mRNA seviyeleri, düşük seviyeli olanlara göre endokrin tedavisine daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Bu nedenle HDAC6, endokrin tedavisine yanıt verme ve ayrıca meme kanserinin ilerlemesi için prognostik bir gösterge olarak hizmet edebilir (Zhang ve diğerleri, 2004). Ancak meme kanseri dokularını analiz eden başka bir çalışmada; HDAC6 protein ekspresyonuna dayalı olarak önemli prognostik farklılıklar ortaya koymamıştır (Saji ve diğerleri, 2005). HDAC6, Hsp90 şaperonunu deasetile ederek steroid reseptör aracılı transkripsiyonel aktivasyonun inhibisyonuna yol açar. Bu mekanizmanın prostat kanseri hücrelerinin (Gao ve Alumkal, 2010) ve göğüs kök hücrelerinin (Hsieh ve diğerleri, 2012) büyümesini etkilediği bildirilmiştir. Diğer çalışmalar, HDAC6'nın vasküler epitel hücrelerinin polarizasyonunu ve göçünü düzenleyerek anjiyogenezi teşvik ettiğini bildirmiştir (Kaluza ve diğerleri, 2011; Li ve diğerleri, 2011).

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) hücrelerinde, HDAC6'ya özgü bir inhibitör olan tubasin, *in vitro* ve *in vivo* kemoterapinin etkilerini artıran bir anti-proliferatif etkiye sahiptir (Aldana-Masangkay ve diğerleri, 2011). HDAC6 inhibitörü ACY-1225 ile multipl miyelom

hücrelerinin tedavisinden sonra apoptozun indüksiyonuna benzer bir mekanizma açıklanmıştır (Santo ve diğerleri, 2012). Xu ve meslektaşları, HDAC1 ve HDAC6'nın, HDACi tedavisinden sonra pediatrik akut miyeloid lösemide sitarabin kaynaklı apoptoz için kritik önemi olduğunu gösterdi (Xu ve diğerleri, 2011). Bu nedenle, HDAC6'nın spesifik HDACi'lerle hedeflenmesi, tek başına veya diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde kanser hücrelerini tedavi etmesi için düşünülmelidir. Nöroblastoma hücrelerinde, HDACi tedavisinden sonra HDAC6 / HSP90 kompleksinin bozulması, p53'e bağlı apoptotik bir yolun aktivasyonuna ve Myc destabilizasyonuna yol açar (Regan ve diğerleri, 2011). Pan-HDACi'ler ile yapılan diğer çalışmalar, hücre ölümünü indüklemeye yardımcı olan HDAC6-HSP90 kompleksi tarafından düzenlenen çeşitli mekanizmalara ışık tutmuştur. Li ve arkadaşları, tümör hücreleri SAHA ile tedavi edildikten sonra p53 ve mutasyona uğramış p53'ün bu kompleksin hedefleri olduğunu gösterdi (Li ve diğerleri, 2011a, b). Ek olarak As₂O₃, HDAC6 aktivitesini inhibe ederek anti-miyelom etkileri oluşturur (Qu ve diğerleri, 2012). Hücre içi makrofaj göçü inhibe edici faktör (MIF) de bu tümörle aktive olan HDAC6 / HSP90 kompleksinin bir hedefidir. MIF, tümör hücresinin hayatta kalmasını teşvik eder ve bu proteinin yüksek seviyeleri, tümör saldırganlığı ve kötü prognoz ile ilişkilidir (Schulz ve diğerleri, 2012).

HDAC10'un kanserde potansiyel bir rolü olduğu bildirilen çok az çalışma vardır. Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu (NSCLC) örneklerinde, sınıf II HDAC'ların ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir ve bu durum akciğer kanseri hastalarında kötü prognoz ile ilişkilidir (Osada ve diğerleri, 2004). Daha yakın zamanlarda, HDAC10'un mide kanserinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini düzenlemede önemli olduğu gösterildi. HDAC10'un inhibisyonu, ROS'un birikmesine neden olarak içsel apoptotik yolu tetiklemektedir (Lee ve diğerleri, 2010). HDAC10 ekspresyonu, kronik lenfositik lösemili (CLL) hastalarda daha güçlüdür, ancak çoğu HDAC ailesi enziminin seviyeleri bu patolojide yükselir, bu da pan-HDACi'nün CLL tedavisi için alt tipe özgü HDACi'den daha iyi sonuçlar verebileceğini gösterir (Wang ve diğerleri, 2011).

2.6.2.3. Sınıf III histon deasetilazlar – sirtuinler

Son yıllarda artan kanıtlar sirtuinleri kanserle ilişkilendirmektedir. Bununla birlikte, diğer HDAC'larda olduğu gibi, sirtuinlerin kanserde hem pro-onkogenik hem de tümör baskılayıcı rol oynadığı görülmektedir. Klasik HDAC'lara benzer şekilde, birçok kanser türünde birkaç

sirtuinin anormal ifadesi bulunmaktadır. Örneğin, SIRT1 akut miyeloid lösemide (AML), prostat kanserinde ve melanom dışı cilt kanserinde yukarı regüle edilirken (Bradbury ve diğerleri, 2005; Hida ve diğerleri, 2007; Huffman ve diğerleri, 2007; Stunkel ve diğerleri, 2007), kolon tümörlerinde aşağı regüle edilmiştir (Özdağ ve diğerleri, 2006). SIRT3 ve SIRT7 meme kanserinde yukarı regüle edilir (Ashraf ve diğerleri, 2006). SIRT2, gliomalarda ve mide karsinomunda aşağı regüle edilir (Hiratsuka ve diğerleri, 2003; Inoue ve diğerleri, 2007a, b). SIRT2'nin katalitik bölgede enzimatik aktivitesini ortadan kaldıran bir mutasyon melanomlarda görülmüştür (Lennerz ve diğerleri, 2005). Çalışmalar; SIRT2'nin bir tümör baskılayıcı görevi gördüğünü, kaybının mitotik kontrol noktasını tehlikeye atarak genomik dengesizliğe ve tümörijenize katkıda bulunduğunu göstermektedir (Dryden ve diğerleri, 2003; Hiratsuka ve diğerleri, 2003; Inoue ve diğerleri, 2007). SIRT3'ün farklı meme kanseri türlerinde yukarı ve aşağı regüle edildiği bulunmuştur (Ashraf ve diğerleri, 2006; Kim ve diğerleri, 2010). Kanserde SIRT5 ve SIRT6'nın değişen ekspresyonu şimdiye kadar rapor edilmemiştir. Farklı kanser hücre hatlarında eksojen SIRT1 ekspresyonu, P-glikoprotein ekspresyonunu indükler ve kanser hücrelerini kemoterapi ilacı doksorubisine dirençli hale getirir, buna karşılık SIRT1'in siRNA tarafından yıkımı ilaca dirençli fenotipi kısmen tersine çevirir (Chu ve diğerleri, 2005). SIRT2'nin bir tümör baskılayıcı görevi olduğu düşünülmektedir, eksikliği ise mitotik kontrol noktasını tehlikeye atarak genomik dengesizliğe ve tümörijenize katkıda bulunur (Dryden ve diğerleri, 2003; Inoue ve diğerleri, 2007a, b). SIRT3, bir tümör baskılayıcı veya destekleyici olarak hareket edebilir. Fibrosarkom hücrelerinde, hücre ölümüne karşı koruma SIRT3 ekspresyonuna bağlıdır (Yang ve diğerleri, 2007). SIRT3 aşırı ekspresyonu, mesane kanseri hücrelerinde p53 ile indüklenen hücre büyümesinin engellenmesini sağlamaktadır (Li ve diğerleri, 2010). İnsan kolon karsinomu ve osteosarkom hücrelerinde SIRT3; ROS, HIF-1a ve hedef genlerinin seviyelerini baskılar. Kolon karsinom hücrelerinde, SIRT3 susturma etkisi, bir ksenograft modelinde tümörögenezi indükler (Bell ve diğerleri, 2011). Çok yakın zamanda SIRT7'nin, transkripsiyonel baskılamaya aracılık ve kanser hücresi fenotiplerini stabilize eden, promotor ile ilişkili ve oldukça seçici bir H3K18Ac deasetilaz olduğu bildirilmiştir. SIRT7 tükenmesi, farelerde insan kanser hücresi ksenograftlarının tümör oluşumunu azaltır (Barber ve diğerleri, 2012).

2.6.2.4. Sınıf IV histon deasetilazlar

HDAC11'in kanserde potansiyel rolünü bildiren çok az çalışma vardır. HDAC11'in Hodgkin lenfomada (HL) rol oynadığı bulunmuştur. HDAC11 ekspresyonunu seçici olarak inhibe eden siRNA'lar, HL hücre hatlarında apoptozu indükleyerek süpernatantlarında tümör nekroz-a (TNF-a) ve IL-17 üretimini artırmıştır (Buglio ve diğerleri, 2011). HDAC11'in anormal ekspresyonu, diğer hematopoietik hücre malignitelerinde bildirilmiştir. Örneğin, Philadelphia-negatif kronik miyeloproliferatif neoplazmalar (CMPN'ler) yüksek seviyelerde HDAC11 açığa çıkarır. HDACi'lerle tedavi, CMPN hastalarında görülen splenomegali ve diğer metabolik semptomları azaltır. Bununla birlikte, bu hastalardaki HDACi'lerin etkilerinin anti-inflamatuar ve immüno-modüle edici kapasitelerinden yada anti-proliferatif ve pro-apoptotik potansiyellerinden kaynaklandığı henüz belirlenmemiştir (Skov ve diğerleri, 2012).

2.7. Histon deasetilaz (HDAC) ve kanser

Çeşitli HDAC'ların mutasyonu veya anormal ekspresyonu sıklıkla insan hastalıklarında özellikle kanserde gözlemlenmiş ve bu durum onları birçok insan kanseri için önemli terapötik hedefler haline getirmiştir (Kumari ve diğerleri, 2013). Bu nedenle, histon asetilasyonunun küresel modeli kanserde düzensizdir. Esteller ve meslektaşları; kanser hücrelerinin lizin 16'da histon H4 asetilasyon kaybına uğradıklarını bildirmişlerdir, bu da HDAC aktivitesinin tümör fenotipini oluşturmada kritik olduğunu göstermektedir (Fraga ve diğerleri, 2005). Klasik HDAC'ların fazlaca temsil edildiği patolojik durumlarda, histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi) ümit verici kanser terapötik ajanları olarak ortaya çıkmıştır. Bugüne kadar Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kanser (kutanöz T hücreli lenfoma) tedavisi için vorinostat (SAHA, Zolinza) ve romodepsin (FK228, Istodax) HDACi onaylanmıştır, diğerleri klinik denemelerden geçmektedir (Khan ve La Thangue, 2012). Ancak, çoğu HDACi enzim özgülüğünün olmaması nedeniyle dezavantajlıdır ve çok çeşitli yan etkilere neden olabilir. Ayrıca, HDAC'ların kansere katkısının aşırı ekspresyon dışındaki mekanizmalara da bağlı olduğu ve inaktive edici mutasyonlar gösterebildiği bilinmektedir.

2.7.1. Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi)

Histon deasetilaz inhibitörleri, daha geniş olarak "kromatin değiştirici maddeler" kategorisine ait olan yeni bir antikanser ilaç sınıfıdır. HDACi'ler epigenetik profili ve gen ekspresyonunu değiştirerek, sitotoksositeyle sonuçlanan hücrelerin aşağı akış yollarında çok sayıda etki meydana getirir. Yapı, biyolojik aktivite ve özgüllük açısından değişen çeşitli bileşikler grubudur. Genel olarak, HDACi'ler bir çinko bağlayıcı alan, bir sınırlama grubu ve ikisini birbirine bağlayan bir düz zincirli bağlayıcı içerir (Marks ve Xu, 2009). Kısa zincirli yağ asitleri, hidroksamik asitler, siklik peptidler ve sentetik benzamidler olmak üzere dört sınıfa ayrılabilirler.

2.7.1.1. Kısa zincirli yağ asitleri

Kısa zincirli yağ asitleri arasında, sınıf I ve IIA HDAC'leri seçici olarak inhibe eden Sodyum bütirat, Fenilbütirat ve Valproik asit (VPA) bulunur. HDAC'ı inhibe etmek için milimoların altında veya milimolar düzeyde konsantrasyon gerektirirler. Sodyum bütirat ve fenilbutirat, akut miyeloid lösemi (AML) ve miyelodisplastik sendromda (MDS) araştırılmış ve sınırlı aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. VPA, antiepileptik bir ilaç olarak kullanılmıştır ve yönetilebilir bir yan etki profiline sahiptir. Başka çalışmalarda, VPA, all - trans retinoik asit ile azasitidin ve desitabin gibi demetile edici ajanlarla kombinasyon halinde AML veya yüksek riskli MDS hastalarında araştırılmıştır. Çalışmalarda, değişken hematolojik iyileşme ve güvenli kombinasyon bildirilmiştir (Marks ve Xu, 2009).

2.7.1.2. Hidroksamik asitler

Genel olarak hidroksamatlar, tüm HDAC sınıflarını etkileyen spesifik olmayan HDAC inhibisyon aktivitesi göstermektedir. Vorinostat, HDAC Ila dışında düşük nanomolar aralıktaki tüm çinkoya bağımlı HDAC'leri inhibe eder. Refrakter kutanöz T hücreli lenfoma (CTCL) için, 2006 yılında Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ilk HDACi'dür. FDA onayı, CTCL'li hastalarda % 30 yanıt oranıyla faz II klinik çalışmaya dayanmaktadır (Olsen ve diğerleri, 2007; Duvic ve diğerleri, 2007). Vorinostat, daha önce kullanılan tedavilere benzer yanıt oranları ve diğer ajanlara kıyasla daha yüksek bir rahatlamaya neden olmuştur. Vorinostat hem hematolojik hem de katı tümörlerde en kapsamlı olarak çalışılan HDACi'lerden biridir.

2.7.1.3. Siklik peptidler

Depsipeptid olarak da bilinen Romidepsin, Sınıf I ve II HDAC enzimlerini inhibe eden bisiklik bir peptiddir. İki sistemik tedavide veya sonrasında ilerleyici, kalıcı veya tekrarlayan hastalarda KTHL'nin Kutanöz belirtileri için FDA onayı alan ikinci HDACi'dür (2009). FDA onayı, 167 hastanın tedavi edildiği (Kim ve diğerleri, 2008; Piekarz ve diğerleri, 2009) ve ORR'nin % 34 ve % 35'inin gözlendiği iki tek kollu, çok merkezli çalışmaya dayanmaktadır. Yanıt süresi 14.9 ve 13.7 ay şeklinde oldukça uzundur. Faz I denemesinde; romidepsin, bortezomib ve deksametazon kombinasyonunun, nükseden veya dirençli multipl miyelomlu hastalarda kalıcı yanıtlar ortaya çıkardığı gösterilmiştir. Romidepsin, katı tümörlerde minimal aktivite göstermiştir. Metastatik, kastrasyona dirençli prostat kanseri olan 35 hastadan oluşan faz II çalışması, Romidepsin'in minimal klinik aktivitesini ortaya çıkarmıştır.

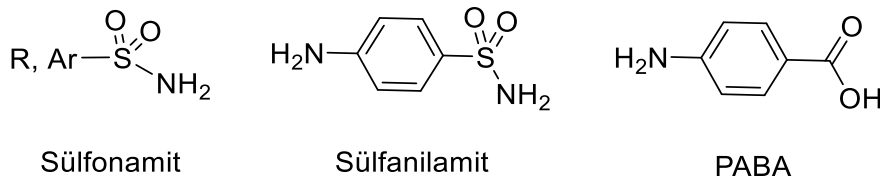
2.7.1.4. Sentetik benzamidler

Benzamidler, mosetinostat ve entinostatı içerir. Her iki bileşik de sınıfa özgü HDACi'dir ve seçici olarak HDAC I'i inhibe eder. Mocetinostat, oral sınıfa özgü bir HDACi'dir ve seçici olarak HDAC Sınıf I'i inhibe eder. Nükseden klasik Hodgkin lenfomalı hastalarda faz II denemesinde umut verici klinik aktivite göstermiştir. Nükseden-Refrakter MDS - AML hastalarında yapılan faz II çalışmasında, 5 Azasitidin ile kombinasyon halinde Mocetinostat MDS'de % 61 ve AML'de % 32'lik bir ORR göstermiştir. En yüksek riskli MDS hastalarının yaklaşık üçte ikisi, tam olmayan ilik iyileşmesi (Cri) ile tam remisyon şeklinde en iyi yanıt elde edilmiştir. Entinostat, HDAC sınıf I'i inhibe eden sınıfa özgü başka bir HDACi'dür. Entinostat ve 5-Azasitidin kombinasyonu, miyeloid maligniteli hastalarda değerlendirilmiştir. En az dört kür tedavi alan 30 hasta arasında 7 hastada CR, 4 hastada PR ve 7 hastada hematolojik iyileşme görülmüştür. Entinostat, östrojen reseptörü pozitif (ER +) meme kanserinde hormonal tedavilere direnci hedefler. Nonsteroidal aromataz inhibitörü üzerinde ilerleyen (ER +) meme kanseri olan menopoz sonrası kadınlarda yapılan randomize plasebo kontrollü faz II çalışmada, Entinostat ve Eksemestan ile tedavi medyan PFS'yi 4,3 aya, Exemestane ve Plasebo ile 2,3 aya yükseltmiştir.

Kanser tedavilerinin başarısı, normal dokunun hayatta kalmasına izin verirken tümör hücresi ölümünün hangi ölçüde olduğuna bağlıdır. Güncel kanser tedavilerinin çoğu, DNA sentezi veya hücre bölünmesinin temel mekanizmasına müdahale eder. Geliştirilmekte olan daha yeni nesil kanser ilaçları, ya tümör ilerlemesinden sorumlu spesifik büyümeyi düzenleyen lezyonları hedeflemek ya da tümör hücrelerinde apoptozu baskılayan lezyonları inhibe etmek için tasarlanmıştır (Makin, 2002; Brown ve Wouters, 2001; Schmitt ve Lowe, 2001). Kanser kemoterapisindeki zorluklar, hücre döngüsündeki kusurlar ve tümör hücrelerinde apoptoz gelişimi ilaç direncine neden olabilir (Johnstone ve diğerleri, 2002; Shah ve Schwartz, 2001). İlaça bağlı apoptoz katkıda bulunan moleküler olayları anlamak, kanser genetiği ile ilaç duyarlılığı arasındaki ilişkiyi tanımlamaya yardımcı olacaktır, anti-tümör ilaç tasarımı ve tedavisine daha rasyonel bir çözüm sunacaktır. Kanserlerde apoptoz indüksiyonunda hücre döngüsü düzenleyici moleküllerin rolü üzerine yapılan araştırmalar, kanser hücrelerinin biyolojisini daha iyi anlamamızı sağlayacaktır (Johnstone ve diğerleri, 2002).

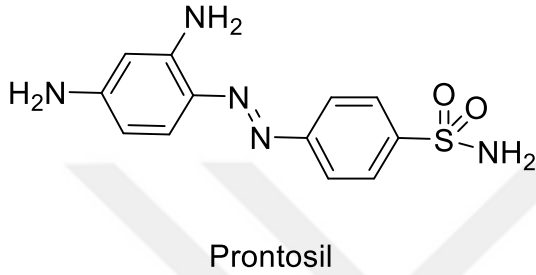
2.8. Sülfonamidler

Sülfa ilaçlar diğer adıyla ‘sülfonamidler’ (Şekil 2.4.) ilk mikrobiyal inhibitörlerden biridir. Bu bileşikler II. Dünya Savaşı sırasında binlerce yaralı askeri enfeksiyonlardan korumuş ve hayata tutunmalarını sağlamıştır. Sülfa ilaçların ana yapısı sülfanilamid olup sentezi asetanilitle başlar. Sülfanilamid PABA (p-aminobenzoik asit)’e yapısal olarak benzer (Şekil 2.4.). Bu benzerlik biyolojik etkinliğini sağlamaktadır. Çünkü organizmada PABA’nın bağlandığı enzim bölgesine, PABA yerine bağlanır. PABA bakteriyel gelişim için gerekli olan folik asitin sentezinde kullanılır. PABA yerine enzim bölgesine yerleşen sülfanilamid bakteriyel gelişim için gereken folik asit sentezini inhibe eder. Böylece hastalığa sebebiyet veren bakterilerin gelişip, çoğalmasını engeller.



Şekil 2.4. Sülfonamidlerin genel yapısı (R: Alkil, Ar: Aril), Sülfanilamid ve PABA’nın yapısı

Sülfa ilaçların keşfi bir tesadüf sonucu olmuştur. Bakterilerin boyanması işleminde kullanılan boyar bir madde olan prontosilin (Şekil 2.5.) antibakteriyel olarak davrandığı anlaşılmıştır. Fakat bakterileri yok eden yapının prontosil değil ortamda prontosilin parçalanmasıyla oluşan sülfanilamid olduğu anlaşılmıştır. Bu buluş sülfanilamid türevi pek çok molekülün hazırlanması ve biyolojik etkinliğinin araştırılmasını sağlamıştır. Böylece sülfanilamidler ilk antibiyotikler olarak tarihteki yerini almıştır (Hart, 1995).

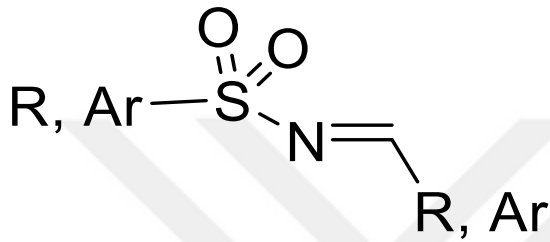


Şekil 2.5. Prontosilin yapısı

Bir sülfonamid iskeleti ($\text{RSO}_2\text{-NH}_2$), sülfonil (SO_2) grubuna bağlı serbest bir amino ucundan (NH_2) oluşur. Sülfonamidlerin neredeyse 70-80 yıllık bir geçmişi vardır. Sülfonamidler, bakteri ve mantarların yol açtığı çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır (Hussain, 2016). Sülfonamidler, ağızdan iyi emilmeleri ve idrarla atılmaları nedeniyle biyolojik olarak önemli bir bileşik grubudur (Deng, 2018). Ancak uzun süreli kullanıldığında karaciğer, böbrek, deri, akciğer, kalp ve kanda sülfonamidlerin metabolizasyonu ile oluşan ürünlere karşı gelişen aşırı duyarlılık sorunu gözlenmiştir (Mondal, 2018, Mondal, 2017). Bu yan etkiler, dünya çapında yeni nesil ilaçların araştırılmasına yol açmıştır. Yapılan çalışmalar neticesinde yeni geliştirilen sülfonamidlerin daha az toksisiteye, artan reaktiviteye ve uygun maliyetlere sahip moleküller olmasına özen gösterilmiştir (Deng, 2018). Bu yan etkileri aşım sülfonamidleri işlevsel hale getirmenin basit yollarından biri, sülfonamid amino grubunun, aldehitler, ketonlar veya karboksilli asitler gibi karbonil içeren türlerle reaksiyonu sonucu oluşturduğu azometin içerikli kondenzasyon ürünlerinin güçlü sinerjisinden faydalanmaktır (Hussain, 2016).

Schiff bazları, yapısal olarak karbon-azot çift bağı (C=N) ile temsil edilen imin veya azometin fonksiyonel grubuna sahip bileşiklerdir. (Şekil 2.6.). Primer aminlerin karbonil bileşikleriyle kondenzasyonu sonucu elde edilirler. İlk olarak Hugo Schiff tarafından rapor

edilmişlerdir. Schiff bazları, yaygın olarak kullanılan bir organik bileşik sınıfıdır. Analitik kimya, biyokimya ve anorganik kimya dahil olmak üzere çeşitli alanlarda farklı uygulamalara sahiptir. Azometin azot atomu, hücre bileşenlerinin aktif merkezleriyle hidrojen bağı oluşturabilir ya da normal hücre süreçlerine dahil olabilir. Biyolojik aktif özelliklerinin yanı sıra katalizörler, organik sentezde ara yapılar ve korozyon inhibitörleri olarak da kullanılırlar. Çalışmalar, Schiff baz metal komplekslerinin serbest organik bileşiklerden daha fazla biyolojik aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır (Kajal, 2013).



Şekil 2.6. Sülfonamid türevi Schiff bazının genel yapısı (R: Alkil, Ar: Aril)

Schiff bazları ayrıcalıklı bileşikler olarak değerlendirilirler (Bharti, 2010). Azometin grubunun geniş çaplı aktivitesi ve oluşum kolaylığı nedeniyle günlük yaşamda oldukça kullanışlıdır. Özellikle asimetrik Schiff bazları, çok yönlü sterik ve elektronik özellikleri (Menati, 2010) sayesinde birçok reaksiyonda katalizör (Latif, 2007) olarak çalışırken, optoelektronik uygulamalar (Kuo, 2008) için de umut verici malzemelerdir. Endüstriyel açıdan polimer stabilizatörleri olarak çeşitli boya ve pigmentlerin sentezi (Safoura, 2014) ve β -laktamların sentezinde (Fekri, 2013) rol alırken; koordinasyon kimyasında şelatlama maddesi (Souza, 1985) olarak da kullanılırlar. Bunlara ek olarak farklı özellikteki öncü biyoaktif yapıların tasarımında ve geliştirilmesinde çok yönlü bir farmakofor özelliği göstermişlerdir. Biyolojik önemi göz önüne alındığında Schiff bazları antibakteriyel (Chohan, 2004), antifungal (Rajendran, 2002), antiviral (Girgaonkar, 2012), anti-inflamatuar (Jayakumarswamy, 2011), antikonvülsan (Sridhar, 2002), antitümör (Ren, 2002), anti-HIV (Abdulghani, 2011), ateş düşürücü özellikler (Venkateshwarlu, 2012) göstermişlerdir. Schiff bazı bileşiklerinin faydalı özellikleri, azometin bağı ile de sınırlı değildir. Sübstitüe aromatik bileşikler ve heteroatomlu halkalar gibi çok sayıda bileşik iskelesi tarafından yapısal olarak güçlendirilmişlerdir. Ayrıca azot, oksijen gibi elektronca zengin türlerin varlığına ek olarak, kükürtün de yer aldığı uygulamaların Schiff bazların biyopotansiyelini büyük ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (Yıldırım ve diğerleri, Amasya Üniversitesi/BAP, FMB BAP. 20-

0456 no'lu Araştırma Projesi Sonuç Raporu, 2022). Örneğin -orto ve -para pozisyonlarında -OH grubu olan salisilaldehit türevlerinden türetilen Schiff bazları, enol-imin ve keto-enamin arasındaki tautomerizasyonla uyarılmış duruma geçen $O-H\cdots N$ ve $O\cdots H-N$ tipi hidrojen bağlarının varlığından dolayı ilgi çekicidir (Fonkui, 2018). Schiff bazları arasında en çok çalışılan Schiff bazları, benzersiz yapısal temsilleri ve güçlü biyolojik aktiviteleri nedeniyle sülfonamidden türetilenlerdir (Khan, 2018).

Bu bilgiler doğrultusunda; çalışmamızda HT-29 ve DLD-1 kanser hücre hatlarında bir anti-kanser ajan olabileceği düşünülen sülfonamid türevi beş bileşiğin etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar

- Santrifüj (Hettich, ALMANYA)
- Vorteks (IKA, ALMANYA)
- Laminar akışlı kabin (Thermo Scientific, ABD)
- Karbondioksit İnkübatör (Mettler, ALMANYA)
- Sıvı azot tankı (Thermo Scientific, ABD)
- Işık mikroskobu (Olympus, JAPONYA)
- Invert mikroskop (Leica, ALMANYA)
- Mikroplaka okuyucu (Thermo Scientific, ABD)
- -80 °C Buzdolabı (Thermo Scientific, ABD)
- Buzdolabı (- 20 °C , + 4 °C) Arçelik, TÜRKİYE)
- Hassas terazi (Shimadzu, JAPONYA)
- Thoma lamı (Isolab, ALMANYA)
- Pipetör (Thermo Scientific, ABD)
- Mikro pipetler (Thermo Scientific, ABD)
- µDrop plate (Thermo Scientific, ABD)
- PZR cihazı (Thermo Scientific ABD)
- Kuru blok DB-4D (Techne, ABD)

- Kemilüminesans görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat, FRANSA)
- PikoReal 96 RealTime PZR cihazı (Thermo Scientific, ABD)
- Elektroforez güç kaynağı (Thermo Scientific, ABD)
- Shaker (IKA, ALMANYA)
- Hızlı blotlama cihazı (Bio Rad, ABD)
- Otoklav (Hirayama, JAPONYA)

3.1.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal malzemeler

Hücre kültürü çalışmamızda kullanılan kimyasal malzemeler ve kullanım amaçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kimyasal malzemeler

Kimyasal adı	Marka	Kullanım Amacı
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Medium)	Sigma	Hücre üretiminde
McCOY's 5A Medium	Capricorn Scientific	Hücre üretiminde
Penisilin/streptomisin	Gibco	Hücre üretiminde
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco	Hücre üretiminde
Sodyum Bikarbonat	Sigma	Hücre üretiminde
Sodyum Pürivat	Gibco	Hücre üretiminde
DMSO(Dimethyl sulfoxide)	Honeywell	MTT çalışmasında
Trypan Blue	Sigma	Hücre sayımında
Trypsin-EDTA	Sigma	Hücre pasajlamada
MTT Boyası	Sigma	MTT çalışmasında
PBS (Phosphate Buffer Saline)	Sigma	Hücrelerin yıkanması
Etanol	Sigma	Sterilizasyon işlemlerinde

3.1.3. Moleküler analizlerde kullanılan malzemeler

Çizelge 3.2. .Moleküler malzemeler ve kitler

Malzeme adı	Marka
RNA izolasyon kiti (K0731)	Thermo Scientific
cDNA sentez kiti (K1622),	Thermo Scientific
HDAC activity kolorimetrik assay kit	BioVision
Maxima SYBR green qRT-PCR master mix 2X (K0221)	Thermo Scientific
β -Aktin, P38/MAPK (primer antibody)	İnvitrogen
ERK1 (primer antibody)	RD
<i>Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, Kaspaz-8, Kaspaz-9</i>	Oligomer
Luminol/Enhancer	Thermo Scientific
BCA protein assay kit (23225)	Thermo Scientific
96'lık mikroyet	Thermo Scientific

3.1.4. Hücre kültürü ve moleküler çalışmalarda kullanılan çözeltiler

RPMI 1640 Medium (1X)

DLD-1 hücre hattı için RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır. Besiyerinin içeriğinde 4500mg/L glukoz, L-glutamin ve sodyum bikarbonat vardır. Besiyerinin pH'ı uygun seviyeye ayarlandıktan sonra 0,20 μ m enjektör filtre kullanılarak filtreleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hazırlanan besiyeri +4⁰ C'de muhafaza edilmiştir. Kullanılan malzemeler; 1 X RPMI (223 mL), %10 FBS (25 mL), Sodyum pürivat (2,5 mL), Penisilin/streptomisin'dir (2,5 mL).

McCoy's 5A Medium (1X)

HT-29 hücre hattı için McCoy's 5A medium kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan 250 mL 1X McCoy's 5A besiyeri tablodaki miktarlarda hazırlanmıştır ardından +4⁰ C'de muhafaza edilmiştir. Kullanılan malzemeler; 1X McCoy's 5A (223 mL), %10 FBS (25 mL), Penisilin/streptomisin'dir (2,5 mL).

EMEM Medium (1X)

CCD-18Co hücre hattı için EMEM medium kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan 250 mL 1X EMEM besiyeri tablodaki miktarlarda hazırlanmıştır ardından +4⁰ C’de muhafaza edilmiştir. Kullanılan malzemeler; EMEM (223 mL), %10 FBS (25 mL), Penisilin/streptomisin (2,5 mL) ve sodyum pirüvattır (2,5 mL).

PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X

800 mL distile su (dH₂O) içerisinde; sodyum klorür (NaCl), disodyum fosfat (Na₂HPO₄), potasyum klorür (KCl), monopotasyum fosfat (KH₂PO₄) ile karıştırılarak çözelti hazırlanmıştır. Çözeltinin pH’ı 7,4’e ayarlandıktan sonra hacim distile su ile 1 L’ye tamamlanmıştır. Daha sonra 121°C’de 15 dakika otoklav yapılmıştır.

1,5 M Tris-HCL Tamponu (1X)

Western blot çalışmasında kullanılacak olan tampon için 18,17 gram Trisma-base tartılıp, 100 mL distile su içerisinde çözölmüştür. Daha sonra pH değeri 8,8’e ayarlanmıştır.

0,5 M Tris-HCL Tamponu (1X)

Western blot çalışmasında kullanılacak olan tampon için 6,06 gram Trisma-base tartılıp, 100 mL distile su içerisinde çözölmüştür. Daha sonra pH değeri 6,8’e ayarlanmıştır.

Amonyum Persülfat (%10’luk)

0,1 gram amonyum persülfat (APS) tartılıp 1 mL distile su içerisinde çözölmüştür.

1 X Running Buffer

3 gram Tris ve 14,4 gram glisin tartılıp, 1 L distile su içerisinde çözölmüştür. pH 8,3’e ayarlandıktan sonra 1 gram SDS tartılıp karışımın üzerine eklenmiştir.

Transfer Buffer

15 gram glisin ve 3,03 gram Tris tartıldıktan sonra üzerine 200 mL metanol eklendikten sonra distile su ile 1 L’ye tamamlanır.

10 X TBS

1 L için; 24 gram Tris, 80 gram NaCl 300 mL su ile çözölmüştür. Daha sonra karışımın pH’ı 7,6 olarak ayarlandıktan sonra 1 L’ye tamamlanmıştır.

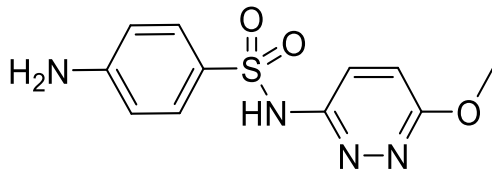
1 X TBS

10 X TBS'den 1 L alındıktan sonra üzerine 500 µL Tween-20 eklenerek elde edilir.

3.2. Yöntem

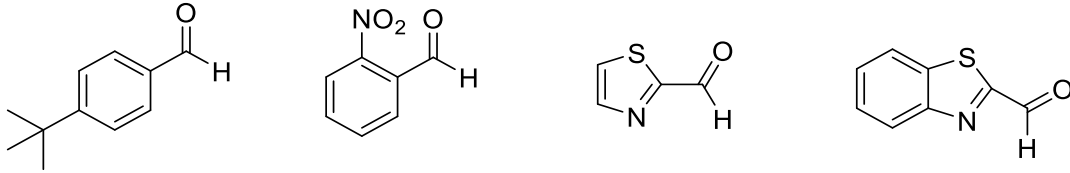
3.2.1. Test bileşikler

Bu tez çalışması "Kolon Kanseri Hücrelerinde Sulfonamid Türevi Bileşiklerin Apoptoz Mekanizmasına Etkileri" isimli Amasya Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, FMB-BAP 20-0456 numaralı araştırma projesinden üretilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan bileşikler; Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Emine Bağdatlı ve Doç. Dr. Aliye Gediz Ertürk tarafından sentezlenmiştir. Çalışmanın ilk aşaması yeni sülfonamid türevi Schiff bazı moleküllerin sentezi, saflaştırılması ve yapısal karakterizasyondur. Sülfonamid türevi sülfanilamidlerin sentezinde sülfametoksipiridazin bileşiği ve dört farklı aldehit kullanılmıştır. Sentezlenen moleküllerin yapılarının tam tespitinde FTIR, NMR (^1H ve ^{13}C / APT), LCMS / TOF ve UV-Vis. yöntemleri kullanılmıştır.



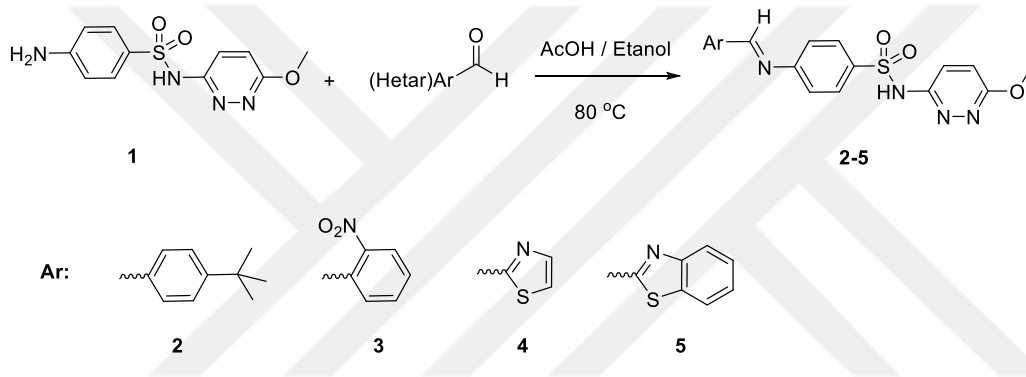
Şekil 3.1. Bileşik-1 (Sülfametoksipiridazin)

Schiff bazlarının sentezi için hem yenilik, hem de biyoaktivite sağlayabilecek aldehitlerle çalışılmıştır. Bu aldehitlerin yapısı aşağıda görülmektedir (Şekil 3.2.). Aldehitler belirlenirken yapının biyoaktivite üzerine etkisini araştırabilmek için hem aromatik hem de heterosiklik aromatik halka taşıyan aldehitler seçilmiştir. Aromatik aldehitler seçilirken halkaya elektron sağlayan ve halkadan elektron çeken gruplara sahip aldehitler belirlenmiştir. Heteroatomlu aromatik grup taşıyan aldehitler mono- ve bisiklik heterosiklik aldehitler olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu ideal reaksiyon koşulları belirlenmiştir. Reaksiyonlar etanol içerisinde 1 mol sülfonamid bileşiğine karşılık 1,2 ekivalent oranda aldehit kullanılarak, asetik asit katalizörlüğünde, geri yoğunlaştırma koşullarında sağlanmıştır. Reaksiyon süreleri 5 ile 17 saat aralığında değişmektedir.



Şekil 3.2. Kullanılan aldehit yapıları

3.2.1.1 Bileşiklerin Sentezi



Şekil 3.3. Sülfü ilaç temelli Schiff bazlarının sentezi

3.2.1.2. Saflaştırma ve yapısal karakterizasyon çalışmaları

Reaksiyonlarda başlangıç maddelerinin durumu ve ürün oluşumu TLC (İnce Tabaka Kromatografisi) ile takip edildi. Uygun reaksiyon sürelerinde sonlandırılan reaksiyon karışımlarının çözücüsü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Katı ham ürün katalizör asetik asitten kurtarmak üzere suyla yıkandı ve kurutuldu.

Bileşik-2 soğuk metanol (3x10 ml) ve soğuk asetonitril ile (3x10 ml) ard arda yıkanıp, asetonitril ve THF (Tetra hidrofuran) karışımından üç kez kristallendirildi.

Bileşik-3 dioksanda çözülerek 2:1 Etil asetat : Hekzan kolon kromatografisine uygulandı. Önemli ölçüde saflaştırılan madde ardından 2:1 Etil asetat : Hekzanda (%1,5 N(Et)₃ içeren) preparatif tabaka kromatografisiyle tamamen saflaştırıldı.

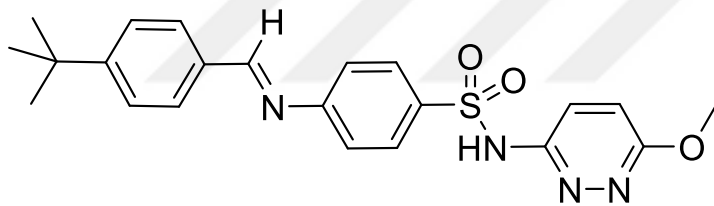
Bileşik-4 tüm başlangıç maddeleri tamamen tükenmiş tek bir madde olarak sentezlendi. Ham katı soğuk etil asetat ve dietileterle iki kez yıkandı. Ardından kloroformda preperatif tabaka kromatografisi uygulandı.

Bileşik-5 soğuk metanol (3x10 mL) ve soğuk asetonitril ile (3x10 mL) ard arda yıkanıp, metanolden üç kez kristallendirildi.

Yapısal karakterizasyon için ilk aşamada TLC, Erime Noktası tayini ve FTIR (Fouirer Transform Infrared Spektrofotometre) spektroskopisi yöntemleri uygulandı. Sentezlenen tüm yeni moleküllerin yapılarının tam tespitinde spektroskopik metotlardan FTIR, NMR (Nükleer Manyetik Rezonans), (^1H ve ^{13}C / APT), LC-MS / TOF ve UV-Vis. yöntemleri kullanıldı (Yıldırım ve diğerleri, Amasya Üniversitesi/BAP, FMB BAP. 20-0456 no'lu Araştırma Projesi Sonuç Raporu, 2022).

3.2.1.3. Karakterizasyon ve spektroskopik veriler

Bileşik-2



Şekil 3.4. Bileşik-2 (4-((4-(tert-Bütil)benziliden)amino)-N-(6-metoksipiridazin-3-il)benzensulfonamid (C₂₂H₂₄N₄O₃S)

Molekül Ağırlığı: 424.1569 g/mol

Fiziksel Hal: Beyaz katı madde

Erime Noktası: 209-210°C

Saflaştırma: Soğuk metanol (3x10 mL) ve soğuk asetonitril ile (3x10 mL) ard arda yıkanıp, asetonitril ve THF karışımından üç kez kristallendirildi.

R_f Değeri: 0.63 (2:1 Etil asetat/Hekzan)

Verim: %35

FTIR (ATR, cm⁻¹): ν 3217 (-NH gerilmesi, w), 3132-3008 (Aromatik -CH gerilmesi, w), 2962 ve 2870 (Alifatik -CH gerilmesi, w), 1635 (C=N gerilmesi, m), 1573 ve 1465 (Aromatik C=C gerilmesi, m), 1388 (-SO₂ asimetrik gerilmesi, s), 1296 (C-N gerilmesi, s),

1134 (-SO₂ simetrik gerilmesi, s), 1087 (C-O-C simetrik gerilmesi, s), 1002 (1,4-disubstitüe aromatik halka düzlem içi CH eğilmesi, m), 817 ve 725 (1,4-disubstitüe aromatik halka düzlem dışı C-H eğilmesi, s).

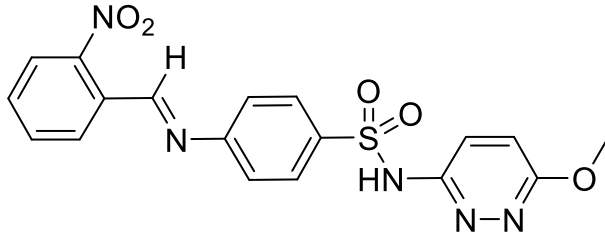
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm): 1.32 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 3.84 (s, 3H, -OCH₃), 6.56 (d, *J*: 8.7 Hz, 1H, Ar. =CH), 7.34 (d, *J*: 8.4 Hz, 2H, Ar. =CH), 7.47 (d, *J*: 8.6 Hz, 1H, Ar. =CH), 7.57 (d, *J*: 8.4 Hz, 2H, Ar. =CH), 7.64 (s, 1H, NH), 7.85 (d, *J*: 7.9 Hz, 2H, Ar. =CH), 7.88 (d, *J*: 8.6 Hz, 2H, Ar. =CH), 8.58 (s, 1H, N=CH).

¹³C NMR/APT (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm): 31.24 (-C(CH₃)₃), 35.54 (-C(CH₃)₃), 54.80 (-OCH₃), 121.82 (Ar. =CH), 126.24 (Ar. =CH), 126.47 (Ar. =CH), 128.44 (Ar. =CH), 129.38 (Ar. =CH), 129.92 (Ar. =CH), 134.38 (Ar. -C), 140.80 (Ar. -C), 145.22 (Ar. -C), 150.20 (Ar. -C), 153.06 (Ar. -C), 155.56 (Ar. -C), 158.36 (N=CH).

LC/MS-TOF: C₂₂H₂₄N₄O₃S (M+H)⁺ için Hesaplanan = 425.1642, Bulunan (M+H)⁺ = 425.1614.

UV-Vis (THF, c: 2.36x10⁻⁴ mol L⁻¹): λ_{max} (ε, L/mol.cm) 204 (7131), 242 (11 766), 315 (15 610).

Bileşik-3



Şekil 3. 5. Bileşik-3 (N-(6-metoksipiridazin-3-il)-4-((2-nitrobenzyliden)amino) benzensulfonamid, (C₁₈H₁₅N₅O₅S))

Molekül Ağırlığı: 413.0794 g/mol

Fiziksel Hal: Krem rengi katı madde

Erime Noktası: 193 – 195°C

Saflaştırma: 2:1 Etil asetat : Hekzan kolon kromatografisi ardından 2:1 Etil asetat : Hekzanda (%1.5 N(Et)₃ içeren) preparatif tabaka kromatografisi

R_f Değeri : 0.6 (2:1 Etil asetat/Hekzan)

Verim: %60

FTIR (ATR): ν = 3340 (N-H gerilimi, w); 3178, 3055 (aromatik =C-H gerilimleri, w) ; 2954, 2870 (alifatik C-H gerilmeleri, w); 1643 (C=N gerilimi, w); 1597, 1527 (Aromatik C=C gerilimleri, m); 1404 (SO₂ asimetrik gerilmesi, m); 1134 (SO₂ simetrik gerilmesi, s); 1080 (C-O gerilmesi, s); 933 (orto disubstitüe aromatik halka düzlem dışı C-H eğilimi, m-s); 833 (1,4-disubstitüe aromatik halka düzlem dışı C-H eğilimi, m) cm⁻¹.

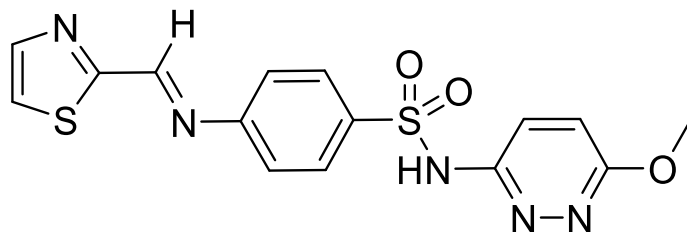
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm): 3.84 (s, 3H, -OCH₃); 5.94 (s, 1H NH); 6.56 (d, 1H, Ar. =CH, J : 8.7 Hz); 7.37-7.48 (m, 3H Ar. =CH); 7.79-7.92 (m, 5H, Ar. =CH); 8.13-8.18 (m, 1H, Ar =CH), 8.88 (s, 1H, N=CH).

¹³C NMR/APT (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm): 54.36 (-OCH₃); 112.53 (Ar. =CH); 112.64 (Ar. -C); 121.48 (Ar. -C); 124.30 (Ar. =CH); 124.61 (Ar. =CH); 129.72 (Ar. -C); 129.39 (Ar. -C); 129.73 (Ar. =CH); 129.87 (Ar. =CH); 130.56 (Ar. -C); 133.90 (Ar. =CH); 149.33 (Ar. -C); 132.04 (Ar. -C); 152.63 (Ar. -C); 159.19 (N=CH); 166.12 (Ar. -C).

LC/MS-TOF: C₁₈H₁₅N₅O₅S (M + H)⁺ için hesaplanan = 414.0867, bulunan = 414.0855.

UV-Vis. (THF, c = 2.42.10⁻⁴ mol/L): $\lambda_{\max}$.(ϵ , L/mol.cm)= 204 (3962.80); 242 (14285.12); 268 (5830.57); 279 (6855.37); 289 (6954.54)

Bileşik-4



Şekil 3.6. Bileşik-4

Molekül Ağırlığı: 375.0460 g/mol

Fiziksel Hal: Krem rengi katı madde

Erime Noktası: 215 – 216°C

Saflaştırma: Ham katı soğuk etil asetat ve dietileterle iki kez yıkandı. Ardından kloroformda preparatif tabaka kromatografisi uygulandı.

R_f Değeri : 0.68 (2:1 Etil asetat/Hekzan)

Verim: %65

FTIR (ATR): ν = 3055, 3024 (Aromatik =C-H gerilimleri, s) ; 2946 (alifatik C-H eğilimi, s); 1625 (C=N gerilimi, w); 1573 (C=C gerilimi, s); 1404 (SO₂ asimetrik gerilimi, m); 1157 (SO₂ simetrik gerilimi, s); 740, 694 (monosubstitüe aromatik halka düzlem dışı C-H eğilimleri, m); 840 (1,4-disubstitüe aromatik halka düzlem dışı C-H eğilimi, m) cm⁻¹.

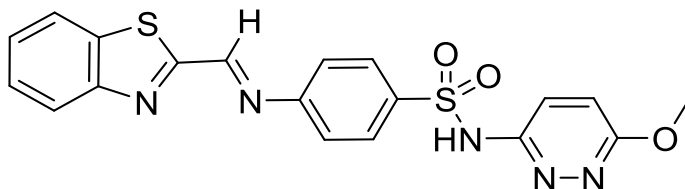
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ (ppm): 3.84 (s, 3H, -OCH₃); 5.94 (s, 1H -NH); 6.56 (d, 1H, Ar. =CH, *J*: 9.5 Hz); 7.40-7.51 (m, 3H Ar. =CH); 7.89 (d, 2H, Ar. =CH, *J*: 8.3 Hz); 8.10 (dd, 12H, Ar =CH, *J*: 34.1, 2.7 Hz), 8.83 (s, 1H, N=CH).

¹³C NMR/APT (100 MHz, DMSO-*d*6): δ (ppm): 54.35 (-OCH₃); 112.54 (Ar. =CH); 121.89 (Ar. =CH); 127.70 (Ar. =CH); 128.09 (Ar. =CH); 145.14 (Ar. =CH); 146 (Ar. =CH); 151.85 (Ar. -C); 152.16 (Ar. -C); 152.24 (Ar. -C); 152.64 (Ar. -C); 155.67 (N=CH); 166.11 (Ar. -C).

LC/MS-TOF: C₁₅H₁₃N₅O₃S₂ (M + H)⁺ için hesaplanan = 376.0538, bulunan = 376.0594.

UV-Vis. (THF, c = 2.66.10⁻⁴ mol/L): λ_{max} .(ε, L/mol.cm) = 200 (9428.57); 260 (11281.95); 312 (11548.87).

Bileşik-5



Şekil 3.7. Bileşik-5 (4-((Benzo[d]tiyazol-2-ilmetilen)amino)-N-(6-metoksipiridazin-3-il)benzensulfonamid (C₁₉H₁₅N₅O₃S₂))

Molekül Ağırlığı: 425.4810 g/mol

Fiziksel Hal: Uçuk sarı renkli katı madde

Erime Noktası: 227-230°C

Saflaştırma: Soğuk metanol (3x10 mL) ve soğuk asetonitril ile (3x10 mL) ard arda yıkayıp, metanolden üç kez kristallendirildi.

R_f Değeri: 0.52 (2:1 Etil asetat/Hekzan)

Verim: %59

IR (ATR, cm⁻¹): ν 3232 (-NH gerilmesi, m), 3078-3032 (Aromatik -CH gerilmesi, m), 2931 ve 2862 (Alifatik -CH gerilmesi, w), 1643 (C=N gerilmesi, w), 1589 ve 1460 (Aromatik

C=C gerilmesi, m), 1396 (-SO₂ asimetrik gerilmesi, s), 1296 (C-N gerilmesi, s), 1134 (-SO₂ simetrik gerilmesi, s), 1087 (C-O simetrik gerilmesi, s), 1010 (1,4-disübstitüe aromatik halka düzlem içi C-H eğilmesi, m), 817 ve 732 (1,4-disübstitüe aromatik halka düzlem dışı C-H eğilmesi, s).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm): 3.84 (s, 3H, OCH₃), 6.17 (d, *J*: 8.1 Hz, 1H, Ar. =CH), 6.93 (d, *J*: 8.8 Hz, 1H, Ar. =CH), 7.43 (s, 1H, -NH), 7.57 (d, *J*: 8.4 Hz, 2H, Ar. =CH), 7.62 (ddd, *J*: 8.9, 7.1, 1.3 Hz, 2H, Ar. =CH), 7.92 (d, *J*: 8.2 Hz, 2H, Ar. =CH), 8.18 (d, *J*: 8.7 Hz, 1H, Ar. =CH), 8.22 (d, *J*: 7.2 Hz, 1H, Ar. =CH), 8.98 (s, 1H, N=CH).

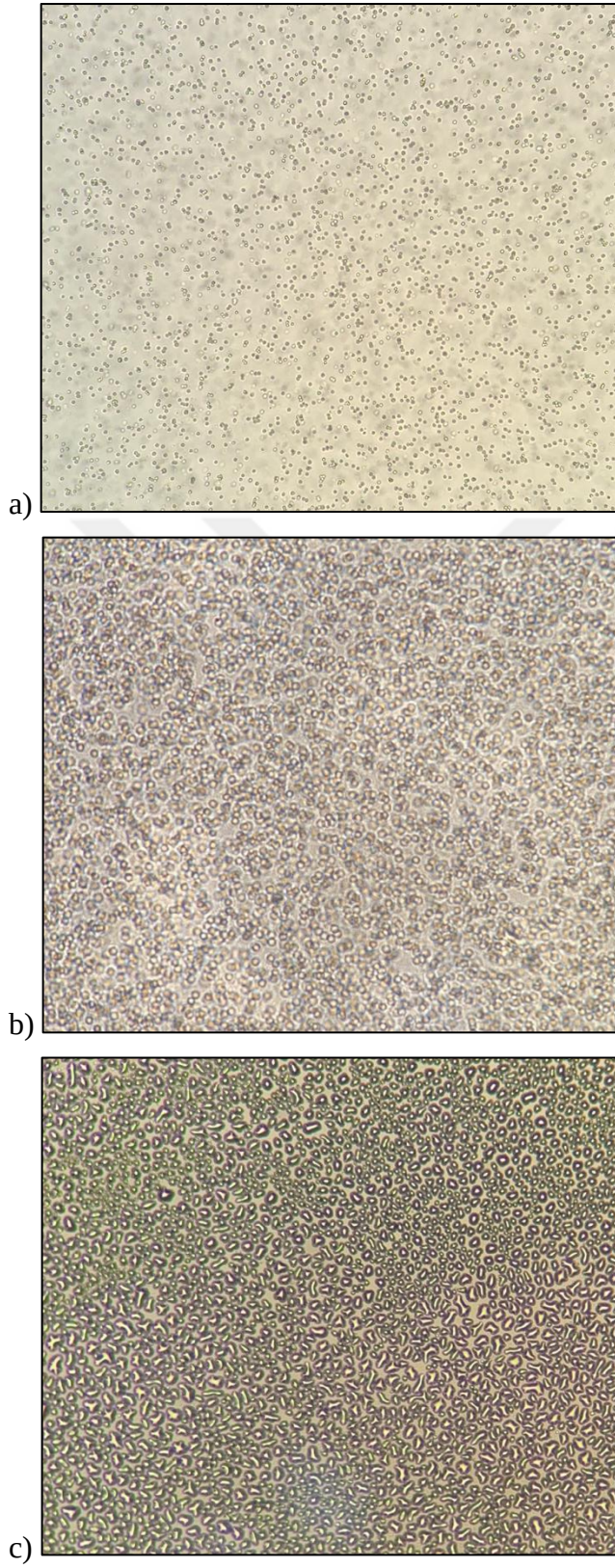
APT-¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm): 55.04 (-OCH₃), 122.59 (Ar. =CH), 123.34 (Ar. =CH), 123.94 (Ar. =CH), 124.64 (Ar. =CH), 125.82 (Ar. =CHx2), 127.54 (Ar. =CH), 127.95 (Ar. =CH), 135.24 (Ar. -C), 138.31 (Ar. -C), 145.29 (Ar. -C), 152.20 (Ar. -C), 153.86 (Ar. -C), 155.81 (Ar. -C), 159.97 (N=C-S), 167.03 (N=CH).

LC/MS-TOF: C₁₉H₁₅N₅O₃S₂ (M+H)⁺ için hesaplanan = 426.0689, bulunan = 426.0673.

UV-Vis (THF, 2.35x10⁻⁴ mol L⁻¹): λ_{max} (ε, L/mol.cm) 200 (8165), 253 (10 761), 293 (12 063), 353 (974).

3.2.2. Hücre kültürü

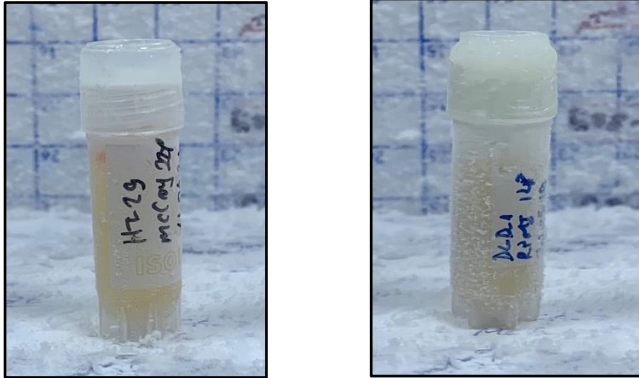
Bu tez çalışmasında, Şap Enstitüsü'nden satın alınan HT-29 (kolorektal kanseri) (97042201), Gebze Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından ATCC (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu)'den satın alınan DLD-1(kolon kanseri) (ATCC® CCL221TM) ve CCD-18Co (normal kolon epiteli) (ATCC® CRL-1459TM) hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücre hatları; %10 FBS (fetal bovine serum), %1 penisilin-streptomisin içeren besiyerleri ve 25 cm² flasklar kullanılarak, % 96 nem, %5 CO₂ ve 37°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. Hücrelerin üretimi istenilen yoğunluğa geldiğinde 25 cm² lik flasktan alınıp 75 cm²lik flaska pasajlanmıştır. Bu işlemde 25'lik flasktaki hücreler ilk olarak PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra 1X Tripsin-EDTA kullanılarak yüzeye yapışan hücreler kaldırılmıştır. Flaskın içine Tripsin-EDTA miktarının iki katı besiyeri eklenip, hücreler 15 ml falkona alınıp 16 000 rpm (repeat per million)'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan supernatant atılıp pelet bir miktar besiyerinde çözüldükten sonra hücreler 75'lik flaska ekilmiştir. Bu işlemler sonrasında hücreler Leica (Leica/DM IL LED) invert mikroskop kullanılarak gözlenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.



Resim 3.1. a) DLD-1 (İnsan kolon adenokarsinoma) b) HT-29 (İnsan kolorektal adenokarsinoma) c) CCD-18Co (Normal kolon epiteli)

3.2.2.1. Hücrelerin açılması

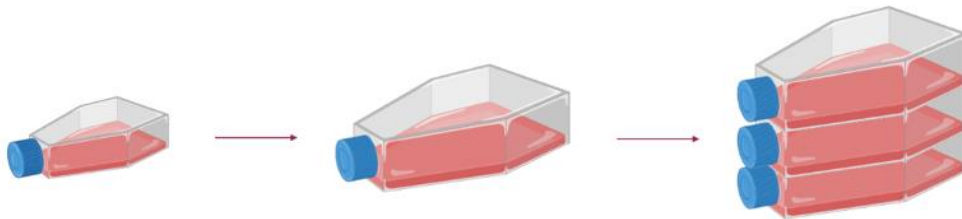
- -80°C'den veya sıvı azot tankından (-196°C) alınan hücreler öncelikle -20°C'de belirli bir süre bekletildikten sonra hücreler oda sıcaklığında bırakılarak çözündürüldü.
- 25 cm² 'lik flask içerisine bir miktar besiyeri eklendi ve flaskın üzerine hangi besiyeri kullanıldığı, hücrenin ismi, tarihi ve kaçınıcı pasaj olduğu yazıldı.
- Oda sıcaklığında çözünen hücreler, içerisinde 3 mL besiyeri bulunan 15 ml falkon tüp içerisine alındı ve 16 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı.
- Supernatant pipet yardımı ile uzaklaştırılarak dip kısımda bulunan pelet üzerine 1 mL besiyeri eklendikten sonra pipetaj yapılarak pelet çözündü. Önceden hazırlanmış flask içerisine hücre ekimi gerçekleştirildi.
- Hücrelerin kontrolü invert mikroskop ile yapıldı. Hücreler monolayer olduklarından yüzeye yapışmaları için 24 saat etüvde bekletildikten sonra hücreler kontrol edildi. Hücreler %80 doygunluğa ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi.



Resim 3.2. Dondurulmuş hücreler

3.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması

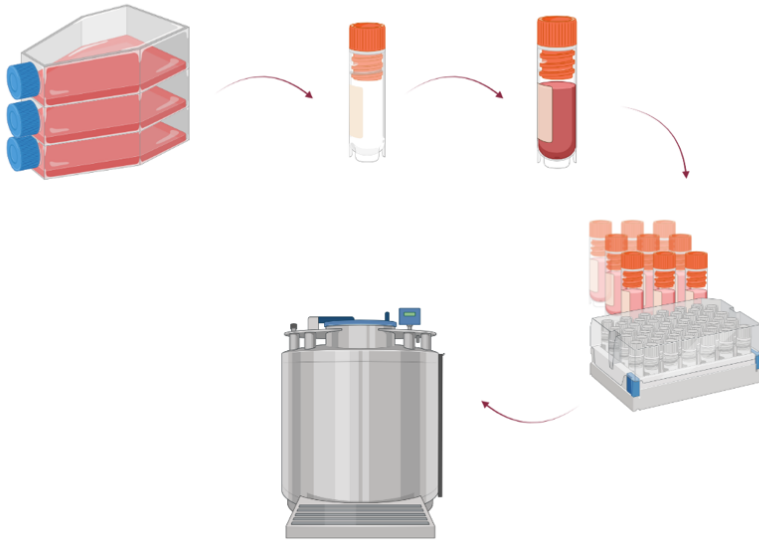
- Hücreler %80 doygunluğa ulaştıktan sonra flasklara 1 mL PBS eklenerek hücelere yıkama işlemi yapıldı.
- Yıkama işleminin ardından hücreleri yüzeyden kaldırmak için flaskların içerisine 2'şer mL tripsin-EDTA eklendi.
- Tripsin-EDTA eklenmiş flasklar 5-7 dakika arasında etüvde bekletildi ve yüzeye yapışmış hücrelerin çabuk bir şekilde flask yüzeyinden kaldırılması sağlandı.
- Tripsin-EDTA miktarının iki katı kadar besiyeri eklenerek reaksiyon durduruldu.
- Flasktaki hücre, Tripsin-EDTA ve besiyerli karışım temiz bir 15 ml falkon tüpe alındı. Daha sonra 16 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak dip kısımda oluşan pelet üzerine belli miktar besiyeri eklenerek pelet çözündü.
- Daha önceden hazırlanmış, üzerine hücre ismi, tarih, pasaj numarası ve besiyeri bilgisi yazılmış flasklara hücre ekimi gerçekleştirildi.
- Hazırlanan flasklar %97 nemli ortamda, 37°C'de ve %5 CO₂' li etüvde bekletildi.
- Hücre ekiminden hemen ve bir gün sonra hücreler, invert mikroskop kullanılarak gözlemlendi. Yüzeye yapışmayan yani ölü olan hücreler besiyeri değiştirilerek ortamdan uzaklaştırıldı.
- Deneyler için uygun hücre miktarına ulaşana kadar pasaj işlemine devam edildi.



Şekil 3.8. Hücrelerin pasajlanması (BioRender)

3.2.2.3. Hücrelerin dondurulması

- Hücreler PBS ile iyice yıkandı.
- Flaska 2 mL tripsin-EDTA eklendi ve etüvde 5 -7 dakika arasında bekletildi.
- Tripsin-EDTA miktarının 2 katı kadar besiyeri eklendi ve flask içindeki besiyeri-hücre karışımı falkon tüpüne alındı. Bu karışım 16 000 rpm' de 10 dakika kadar santrifüj edildi ve üst kısımda kalan süpernatant atıldı.
- Her 1,8 ml cryotüpe 1425 μ L besiyeri-hücre karışımı, 50 μ L FBS ve 75 μ L DMSO (yavaş bir şekilde) eklendi. İşlemin bu aşamasında buz üzerinde çalışıldı.
- Cryotüpler öncelikle bir süre kadar -20°C 'de bekletildi daha sonra -20°C 'den alınarak -80°C 'ye bırakıldı.
- Ardından cryotüpler -80°C veya -196°C 'de olan sıvı azot tankına konuldu.



Şekil 3.9. Hücrelerin dondurulma aşamaları (BioRender)

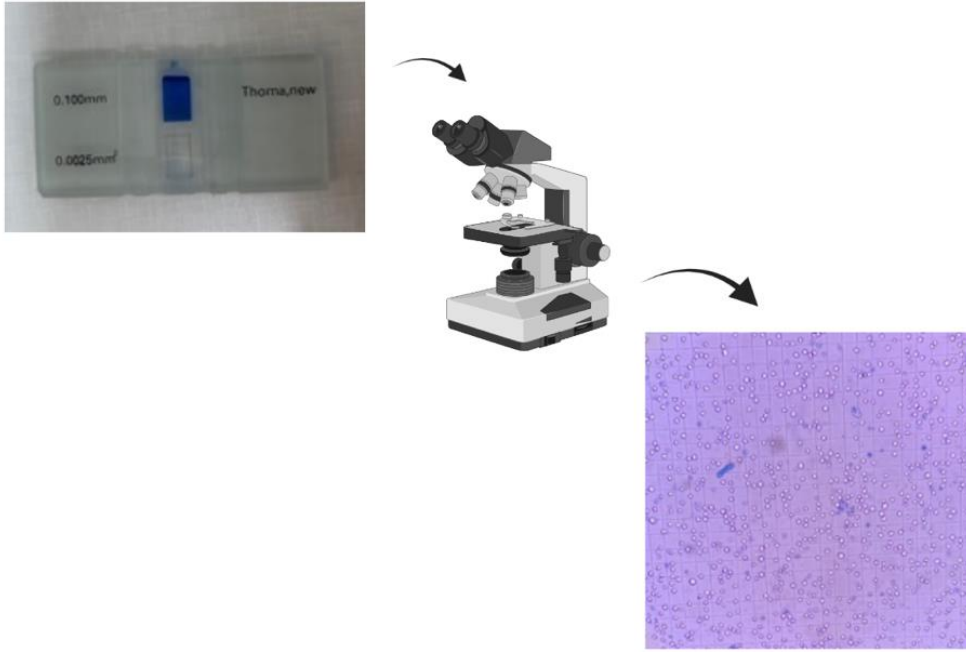
3.2.3. MTT Analizi

3.2.3.1. MTT yöntemi

MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür) yöntemi, mitokondriyal aktiviteyi belirleyen canlı hücreler tarafından kristal haline dönüştürülmesi temeline dayanmaktadır. Canlı hücreler tarafından substratın kromojenik ürüne dönüştürülmesine bağlı olan canlılık deneyleri arasında, MTT yöntemi çok yönlü ve geçerli analizlerden biridir. MTT yöntemi, suda çözünür sarı renkteki boyar maddenin mitokondriyal redüktazın etkisiyle çözünmeyen mor bir formazan kristaline dönüştürülmesini kapsamaktadır. Formazan daha sonra çözündürülür ve konsantrasyon 570 nm'de optik yoğunluk ile belirlenir. MTT boyası üretici firmanın önerilerine göre kullanılarak bileşiklerin sitotoksik aktivite çalışması DLD-1, HT-29 ve CCD18-Co hücre hatları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin mitokondrilerinde tetrazolyum tuzunun azalması sonucunda bir renk değişikliği meydana gelir. Gerekli optimizasyon çalışmaları sonucunda MTT testinde kullanılacak hücre sayısı, 96 kuyuluk plakada kuyu başına 1×10^4 olarak belirlenmiştir.

3.2.3.2. Hücrelerin sayımı

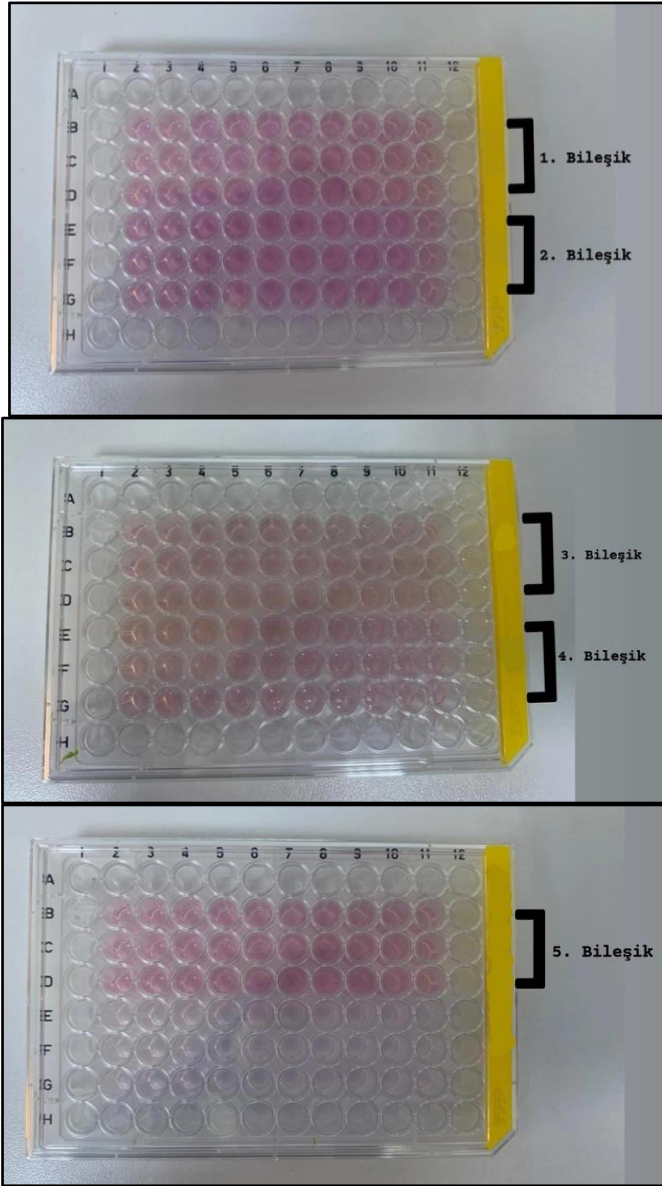
- Pasajlama sırasında falkon tüpe alınan hücreler 16 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısımda kalan supernatant atıldı.
- Alt kısımda kalan pelet üzerine 1000 μ L besiyeri eklenerek pelet çözündü ve pipetaj yapıldı.
- 1000 μ L besiyeri-hücre karışımından 10 μ L alınarak 0.2 mL'lik tüpe eklendi ve üzerine 10 μ L trypane blue boyası ilave edildikten sonra uygun şekilde pipetaj yapıldı.
- Karışımdan 10 μ L alındı, thoma lamı ve lamel arasına dikkatlice yayıldı.
- Thoma lamında bulunan 16 karedeki hücreler ışık mikroskobu kullanılarak sayıldı.
- Sayılan hücreler toplandı ve elde edilen sonuç $A \times 2 \times 10^4$ formülüne dayanarak 2×10^4 ile çapıldı ve hücre sayısı belirlendi.



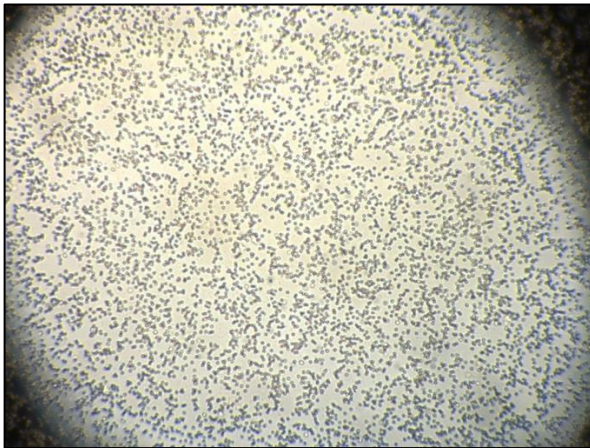
Şekil 3.10. Hücre sayımı ve görüntüsü (BioRender)

3.2.3.3. Hücre ekimi

96 kuyucuklu pleytlere her kuyucuğa 1×10^4 hücre gelecek şekilde hücreler ekildi. Her kuyucuğa 100 μL besiyeri+hücre karışımı olacak şekilde hesaplandı. Pleytler, ekim işleminden sonra hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat CO_2 etüvde inkübasyona bırakıldı.



Resim 3.3. Hücrelerin pleytlere ekimi



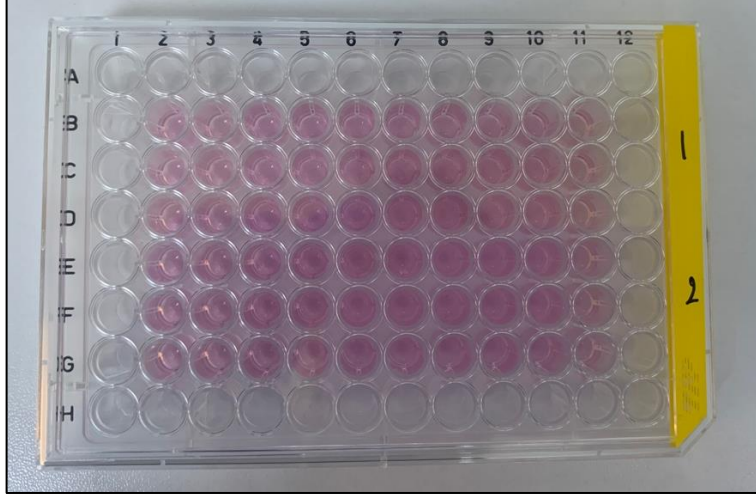
Resim 3.4. HT-29 kanser hücresinin pleyt/kuyucuk içerisindeki görüntüsü

3.2.3.4. Test bileşiklerinin hazırlanması

Bileşiklerin moleküler ağırlıklarına göre gerekli hesaplamalar yapılmıştır ve bu hesaplamalar doğrultusunda, bileşikler DMSO'da çözülerek her bileşikten 100 mM hazırlanmıştır. Bileşiklerden seri dilüsyon yapılarak hücrelere farklı dozlarda ekilmiştir ve bu işlem sırasında tüm dozlarda DMSO oranı %1'in altındadır.

3.2.3.5. Bileşiklerin uygulanması

Çalışmada kullanılan sülfonamid türevi bileşiklerin her biri molekül ağırlığına göre hesaplanarak DMSO içinde çözüldü ve her birinden 100 μ M stok hazırlandı. Daha sonra 100 μ M stok konsantrasyonundan seri dilüsyon yapılarak 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 ve 1,56 μ M'lık konsantrasyonlar hazırlandı. Hazırlanan bileşiklerin konsantrasyonları uygun miktarda besiyeri ile 96'lık pleytlere ekilmiştir. Bu aşama üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak Mitomisin-C, negatif (çözücü) kontrol olarak 1/1000 DMSO kullanılmıştır. Bileşik eklenmiş pleyt 24 saat boyunca etüvde bekletildi.

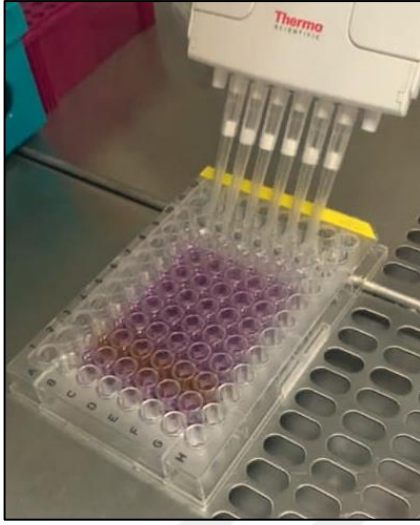


Resim 3.5. Bileşiklerin pleytlere ekimi

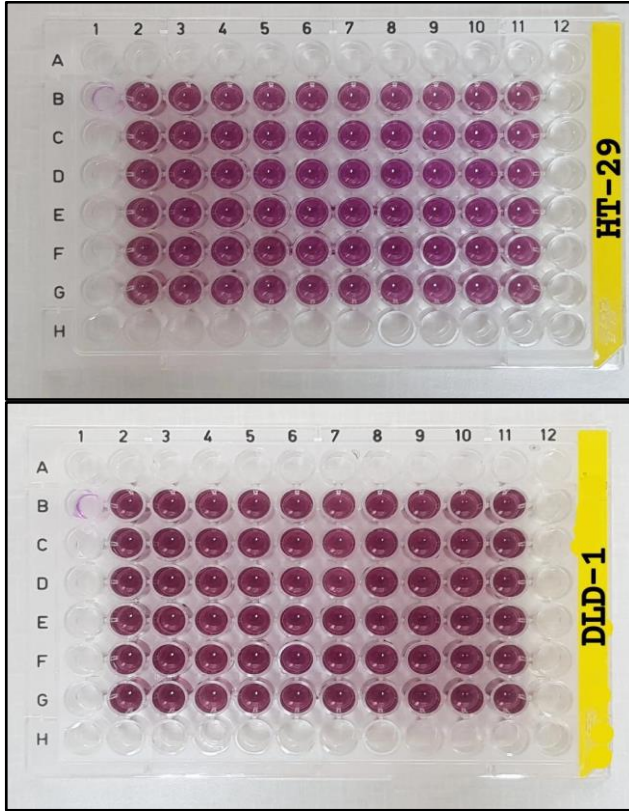
3.2.3.6. MTT boyasının hazırlanması ve pleytlere ekimi

MTT boyası ışığa duyarlı olduğu için deneyin bu aşamasında karanlık ortamda çalışıldı. 3 pleyt için 0.020 g MTT boyası tartıldı ve 4 mL PBS'de çözülerek vortekslendikten sonra 16 mL besiyeri eklenip tekrar vortekslenerek iyice çözünmesi sağlandı. Hazırlanan karışım

kuyu başına 100 μ L düşecek şekilde pleytlere ekildi. Boya ışığa karşı hassas olduğundan pleytler bu aşamada alüminyum folyo ile kaplandı. Pleytler 2 ila 4 saat arasında etüvde bekletildi. 2 ila 4 saat sonunda pleyt içindeki karışım döküldü ve her kuyucuğa 100 μ L düşecek şekilde DMSO eklendi. Daha sonra pleyt yine karanlıkta 10 dakika daha bekletildikten sonra spektrofotometrede 570 nm absorbans değerinde okutuldu. İkinci ve üçüncü deney tekrarları farklı günlerde yapıldı.



Resim 3.6. Reaksiyonu durdurmak için DMSO eklenmesi



Resim 3.7. Reaksiyon sonrası pleytlerin görüntüsü

10 dakika inkübasyondan sonra, spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific/Multiskan) ile 570 nanometre absorbans değerinde ölçümler yapıldı. Microsoft Excel programı ile uygulanan doz ve yüzde canlılık eğrisi belirlendi. %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri hesaplandı ($Sitotoksite = \frac{Test\ absorbans\ değeri}{kontrol\ absorbans\ değeri\ ortalaması} \times 100$). Hesaplanan değerlere göre uygun grafikler çizildi. Deneyler beş bileşik için üçer kez tekrarlanmıştır. Elde edilen verilere göre, bileşiklerin hücre hatları üzerine sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir, veriler negatif kontrol ve pozitif kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.



Resim 3.8. Pleytin mikropate spektrofotometrede ölçülmesi

3.2.4. Total RNA izolasyonu

İlk olarak DLD-1 ve HT-29 hücre hatları 24 saat boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler 6’lı plakalara kuyu başı 2×10^6 hücre olacak şekilde ekilmiştir. MTT sonucuna göre bileşiklerin sitotoksik dozları HT-29 hücre hattında Bileşik-1 için 12,5 μ M, Bileşik-2 için 6,25 μ M, Bileşik-3 için 25 μ M, Bileşik-4 için 25 μ M ve Bileşik-5 için 100 μ M, DLD-1 hücre hattında ise Bileşik-1 için 12,5 μ M, Bileşik-2 için 12,5 μ M, Bileşik-3 için 12,5 μ M, Bileşik-4 için 25 μ M ve Bileşik-5 için 100 μ M olarak belirlenmiştir. Belirlenen dozlarda bileşikler hücrelere uygulanmıştır ve 24 saatin sonunda hücreler 1X PBS ile yıkanmıştır. 1X tripsin ile kaldırılan hücreler 16 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılıp pelet alınmıştır. Geri kalan aşamalar kitte önerilen protokole göre yapılmıştır.

Kit protokolüne göre;

- Her bir ml Lizis Buffer için 20 μ L β -merkaptoetanol olacak şekilde hazırlanmış Lizis Buffer β -merkaptoetanol karışımı 600’er μ L olacak şekilde tüplere eklenmiştir ve homojen görünüm oluşana kadar vortekslenmiştir.
- Tüplere 360 μ L %100 etanol eklenip pipetaj yapılmıştır.
- Bu tüplerden 700’er μ L alınıp RNA saflaştırma kolonundan (Thermo Fisher Scientific / Gene JET) geçirilmiştir. 12 000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası kolonun altında kalan sıvı uzaklaştırılmış tüplerdeki kalan karışımlar da kolondan geçirilip yeniden santrifüj edilmiştir. Daha sonra kolonlar yeni toplama tüplerine alınmıştır.

- Yıkama tamponu 1'den 700'er μL alınarak kolonlardan geçirilmiştir. 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek altta kalan sıvı atılmıştır.
- Yıkama tamponu 2'den 600'er μL alınarak kolonlardan geçirilmiş ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek santrifüj sonrası altta kalan sıvı atılmıştır.
- Yıkama tamponu 2'den 250'şer μL alınarak kolonlardan geçirilmiş ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek santrifüj sonrası altta kalan sıvı atılıp kolonlar 1,5 mL'lik steril yeni tüplere alınmıştır.
- En son işlem olarak 50 μL nükleaz içermeyen su eklenip 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüplerde toplanan sıvılar daha sonra qRT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.



Şekil 3.11. Total RNA izolasyon aşamaları (BioRender)

İzole edilen RNA'ların saflığı ve konsantrasyonu nanodrop (Thermo Fischer Scientific/Multiskan) cihazı ile ölçülmüştür. Örnekler 280 ve 260 nanometrede okutulmuştur. Konsantrasyonlar ($\mu\text{g} / \mu\text{L}$) = $[\text{OD (optik yoğunluk)} 260 \times \text{Sulandırma Oranı} \times 40 (\mu\text{g} / \mu\text{L})]$ formülü yardımı ile hesaplanmıştır. A260 / A280 oranı yaklaşık olarak 2 olan örnekler ile çalışmaya devam edilmiştir.

3.2.5. cDNA (Komplementer zincir) sentezi

Total RNA'ların komplementer zincirleri elde edildikten sonra “Thermo Fisher Scientific; cDNA sentez kiti (K1622)” kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Sentez için döngü; 1. aşama için 65°C'de 5 dakika, 2. aşama için 42°C'de 1 saat ve son olarak 3. aşama için 70°C'de 5 dakikadır. 5 bileşik ve kontrol için sentezlenen cDNA'lar, bir sonraki aşama olan qPCR için -20 C'de muhafaza edilmiştir.

cDNA protokolüne göre;

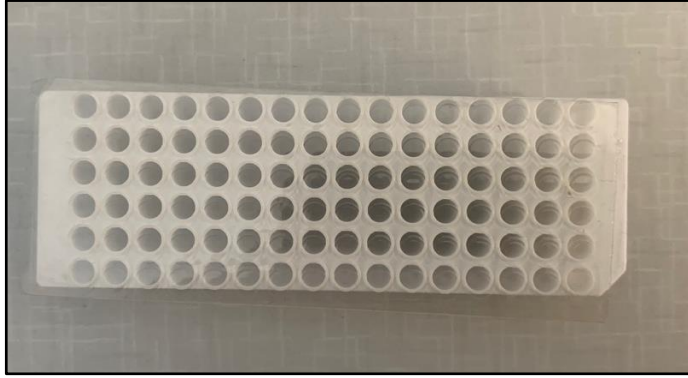
- Örneklerin total RNA miktarı 100 ng olacak şekilde hesaplandıktan sonra uygun miktarlarda kullanılmıştır
- Her bir tüpe 1'er μL oligo (dT) 18 primerlerinden eklendikten sonra nükleaz içermeyen su ile hacim 12 μL 'ye tamamlanmış ve 3-5 saniye arasında santrifüj yapılmıştır.
- 4 μL 5X Reaksiyon tamponundan, 2 μL dNTP (10 mM) karışımından, 1 μL RiboLock Rnase Inhibitörden ve 2 μL RevertAid enziminden tüplere eklenmiştir.
- Total hacim 20 μL olacak şekilde tüpler vortekslenmiştir.
- PCR cihazında karışım 42°C'de 1 saat bekletilmiştir. 1 saat sonunda, enzimi inhibe etmek için 70°C'de 5 dakika daha bekletilmiştir. Elde edilen cDNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu çalışmalarında *Bax*, *Bcl-2*, *Kaspaz-3*, *Kaspaz-8*, *Kaspaz-9* ve *β -Aktin* genlerine ait bağlanma sıcaklıklarının belirlenebilmesi için optimizasyon çalışmaları

yapılmıştır. Bu sebepten dolayı total hacim 20 μ L olacak şekilde örneklerden karışım hazırlanmış ve her bir gen için denemeler gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Gerçek zamanlı PZR (qRT-PCR)

NCBI veri tabanı kullanılarak genlerin dizileri belirlenmiştir. Tablo 3.4.'te genlerin gerçek zamanlı PZR (qRT-PCR) için gerekli olan primer dizileri NCBI primer blast programı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) yardımıyla belirlenmiştir. qRT-PCR çalışmasında; Syber Green Master Mix (2x, 5 μ L), Forward primer (10 mM, 1 μ L), Reverse primer (10 mM, 1 μ L), cDNA (2 μ L), Nükleaz içermeyen H₂O (1 μ L) kullanılmıştır.



Resim 3.9. 96'lık mikro pleyt

Malzemeler hazırlandıktan sonra PikoReal 96 (Thermo Fisher Scientific) cihazı kullanılarak ve amplifikasyon program uygulanarak mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir (Tablo 3.5.). Tüm bileşiklerden elde edilen cDNA örnekleri iki tekrarlı olarak çalışılmıştır. Gerçek zamanlı PZR ile erime eğrisi (melt curve) analizi yapılarak primerlerin özgünlüğü belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Primer dizileri

Genler	Primer Dizileri 5'-3'
<i>β-Aktin</i> F	TGACGTGGACATCCGCAAAG
<i>β-Aktin</i> R	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG
<i>Bax</i> F	TCATGGGCTGGACATTGGAC
<i>Bax</i> R	GAGACAGGGACATCAGTCGC
<i>Bcl-2</i> F	ATCTGGGCCACAAGTGAAGTC
<i>Bcl-2</i> R	TTCGACGTTTTGCCTGAAGAC
<i>Kaspaz-3</i> F	GCGGTTGTAGAAGAGTTTCGT
<i>Kaspaz-3</i> R	TTATTAACGAAAACCAGAGCGCC
<i>Kaspaz-8</i> F	CTGCTGGGGATGGCCACTGTG
<i>Kaspaz-8</i> R	TCGCCTCGAGGACATCGCTCTC
<i>Kaspaz-9</i> F	AGGCCCCATATGATCGAGGA
<i>Kaspaz-9</i> R	TCGAACAACCTTGCTGCTTGC

Çizelge 3.4. Amplifikasyon Programları

Başlangıç denatürasyonu	95°C	10 dakika
Denatürasyon	95°C	15 saniye
Bağlanma sıcaklığı	<i>β-Aktin</i> için 51°C <i>Bax</i> için 59°C <i>Bcl-2</i> için 59°C <i>Kaspaz-3</i> için 59°C <i>Kaspaz-8</i> için 59°C <i>Kaspaz-9</i> için 59°C	30 saniye } 40 döngü
Uzama	72°C	30 saniye
Final uzama	72°C	10 dakika

Gerçek zamanlı PZR analizinde Ct (cycle threshold) değeri, floresan sinyal miktarının belirlenebilmesi için gereken eşik değeri geçen döngü sayısının tespit edilmesi açısından önemlidir. Cycle threshold değeri küçük olduğunda gen ifadesi erken döngüde başlamaktadır ve gen ifadesinin belirlenmesi için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerinin hesaplanması gerekmektedir. Referans gen için ΔCT değeri belirlenmiştir. Daha sonra $\Delta CT = Ct(\text{hedef gen}) - Ct(\text{referans gen})$ Her primer grubu için $\Delta\Delta CT$ değeri hesaplanmıştır. $\Delta\Delta CT = \Delta Ct(\text{hedef gen}) - \Delta Ct$

(referans gen) Genlerin ifadelerinin upregüle veya downregüle olup olmadığı $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin hesaplanmasıyla bulunmuştur.

3.2.7. Protein izolasyonu

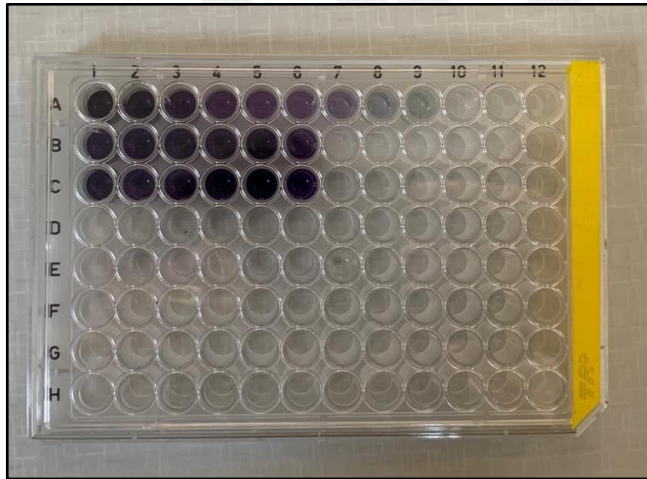
DLD-1 ve HT-29 hücreleri 24 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra 75’lik flasklara 6×10^6 hücre sayısı hesaplanarak ekilmiştir. MTT sonuçlarına göre; DLD-1 hücresinde sitotoksik doz 1. bileşikte 12,5 µM, 2. bileşikte 12,5 µM, 3. bileşikte 12,5 µM, 4. bileşikte 25 µM, 5. bileşikte 100 µM olarak belirlenen bileşikler hücelere uygulanmıştır. HT-29 hücresinde sitotoksik doz 1. bileşikte 12,5 µM, 2. bileşikte 6,25 µM, 3. bileşikte 25 µM, 4. bileşikte 25 µM ve 5. bileşikte 100 µM olarak belirlenen bileşikler hücelere uygulanmıştır. 24. saatin sonunda hücreler 1X PBS ile yıkandı ve 1X Tripsin EDTA ile kaldırılarak 15 mL’lik santrifüj tüpler içerisine alınan hücreler 16 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve supernatant atıldı. Tüp içerisindeki pelletlere 500 µL RIPA tamponu (Thermo Fisher Scientific, 9806) eklenerek pipetaj yapıldı ve tüpler buz üzerine alınarak 5 dakika bekletildi. Steril mikrosantrifüj tüp içerisine alınan örnekler 14 000 x g de 10 dakika santrifüj edildi ve örneklerle ait süpernatantlar steril mikrosantrifüj tüp içerisine alındı ve izole edilen proteinler -20 °C’de muhafaza edildi.

3.2.7.1. Protein miktar tayini

“Thermo Fisher Scientific BCA Protein Assay” ile protein konsantrasyonları belirlenmiştir (Tablo 3.6.). BCA’nın Reagent A ve B olmak üzere iki solüsyonu vardır. Bu solüsyonlar 50:1 oranında karıştırıldı ve 200’er µL alınarak 96 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına eklendi. Konsantrasyonları bilinen protein standartlarından ve elde edilen protein lizatlarından iki tekrarlı olacak şekilde her kuyuya 10’ar µL eklendi. BCA kimyasalı ile iyice karışmasına dikkat edildi. Kuyucuklara RIPA tamponu blank olarak eklendi. Daha sonra oluşan ürünün ışıktan etkilenmemesi için 96 kuyucuklu plaka alüminyum folyo ile sarılarak tepkimenin oluşması için 37°C’de 45 dakika inkübe edildi. 96 kuyucuklu plaka oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometre ile 562 nm’de absorbans değerleri ölçüldü. Standartların absorbans değeri ile standart grafik çizilmiştir. Daha sonra doğrusal grafiğin formülü kullanılarak, R2 değeri hesaplanmıştır. Absorbans değerleri ile protein lizatlarının konsantrasyonları µg / mL cinsinden 100 ng olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. BCA protein test kiti standart konsantrasyonları

Tüpler	Dilüsyon hacmi (mL)	BSA'nın kaynağı ve hacmi (mL)	Final BSA konsantrasyonu (µg/mL)
A	0	Stoktan 300	2
B	125	Stoktan 375	1,5
C	325	Stoktan 325	1
D	175	B dilüsyon tüpünden 175	0,75
E	325	C dilüsyon tüpünden 325	0,50
F	325	E dilüsyon tüpünden 325	0,25
G	325	F dilüsyon tüpünden 325	0,125
H	400	G dilüsyon tüpünden 100	0,025
I	400	0	0 (Blank)



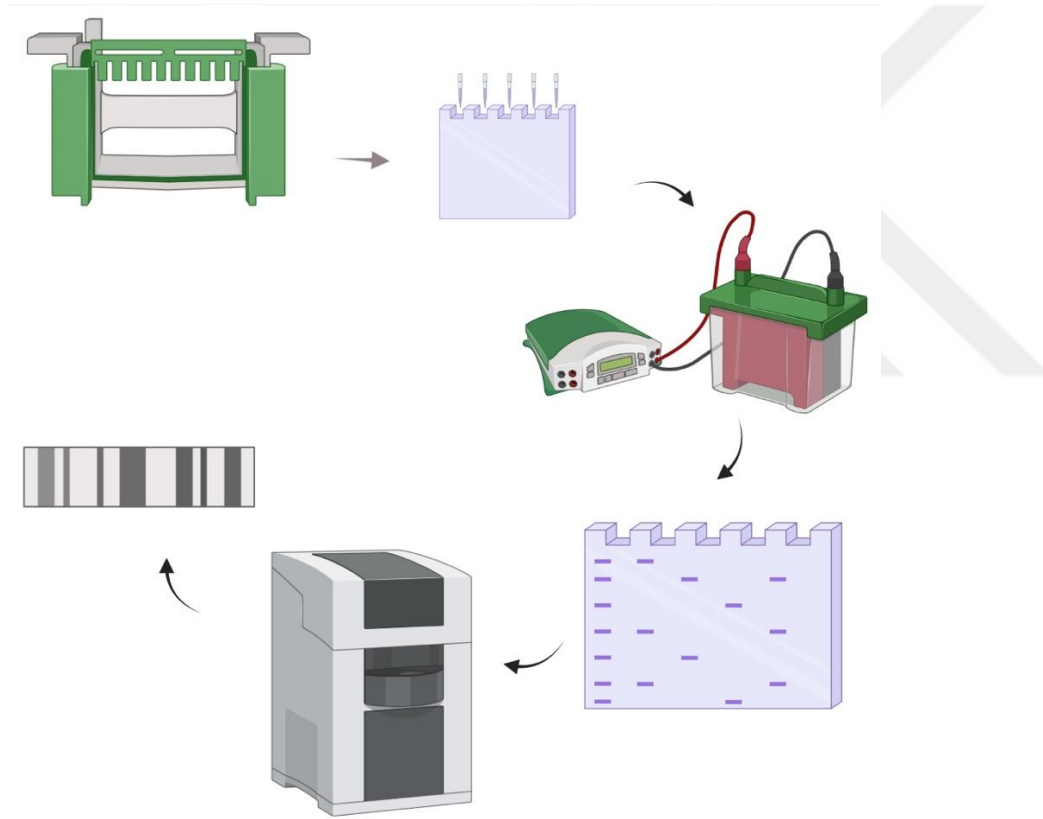
Resim 3.10. Hücre hatlarında protein miktar tayini

3.2.8. Western Blot analizi

Gerekli olan tamponlar hazırlandıktan sonra ayırma jeli (%10) ve yükleme jeli (%4) aşağıdaki tabloya göre yapılmıştır. %10'luk ayırma jeli; distile su (6,6 mL), akrilamid (%40) (5,4 mL), Tris tamponu (pH 8,8, 4 mL), APS (100 µL) ve TEMED (50 µL) kullanılarak yapılmıştır. %4'lük yükleme jeli ise; distile su (5,9 mL), akrilamid (%40, 1,6 mL), Tris tamponu (pH 6,8, 2,5 mL), APS (40 µL) ve TEMED (14 µL) kullanılarak oluşturulmuştur.

Jeller uygun şekilde yapıldıktan sonra dikey elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tanka işaretli yere kadar 1X yürütme tamponu eklendikten sonra jellerdeki taraklar çıkarılmıştır. Protein içeren örnekler, örnek yükleme tamponu (200 μ L %50 Gliserol, 100 μ L 1 M Tris, 100 μ L %10 SDS, 50 μ L %0,1 Bromfenol ve 50 μ L DTT) ile (30:30 μ) oranında karıştırılmıştır. 5 dakika boyunca 95°C kuru blok ısıtıcıda bekletilmiştir. Daha sonra proteinler, her kuyuya 40 μ L olacak şekilde yüklenmiştir.

Yükleme işlemi bittikten sonra 3,5 saat 120 V akım uygulanarak protein bantları yürütülmüştür. Yürütme işlemi bittikten sonra jeldeki proteinler, Bio-Rad Transblot Turbo Transfer sistemi kullanılarak membrana aktarılmıştır.



Şekil 3.12. Western Blot analiz aşamaları (BioRender)

Membranın kenarına çeltik atılmıştır. 10 dakika boyunca 30 μ L TBST ile yıkanmıştır. Daha sonra 1 saat boyunca blocking-buffer (50 ml TBST+2.5 gr süt tozu) ile muamele edilmiştir. Bir saat sonunda TBST ile 3 kez, 10'ar dakika yıkanmıştır. Üçüncü yıkamadan sonra farklı membranlara antikor-buffer (20 mL 1 X TBST, 0,2 gram süt tozu, 20 μ L P38/MAPK, ERK1 (RD, anti -h/mPhospho-ERK1) ve anti- β -aktin antibody eklenerek 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tekrar 3 kez, 10'ar dakika TBST ile yıkama yapılmıştır.

Üçüncü yıkamadan sonra (20 ml 1 X TBST, 0,2 gram süt tozu, 4 µL sekonder antibody (Invitrogen, Gt anti-Ms IgG (H+L) secondary antibody) koyularak 1 saat bekletilmiştir. Bir saat sonunda 5 kez, 10'ar dakika 1 X TBST ile yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemi 1 X TBST ile yapıp çözelti döküldükten sonra 1 ml A (Peroxide buffer) ve 1 ml B (Luminol/Enhancer) (Thermo) karıştırılıp, tüm membrana dağılacak şekilde konulmuştur. 5-10 dakika beklendikten sonra kemilüminesans cihazında görüntüleme yapılmıştır.

3.2.9. HDAC aktivite analizi

Yukarıda belirtilen protein izolasyon protokolüne göre bileşiklerin MTT analizi ile belirlenen dozları kullanılarak, hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Proteinler elde edildikten sonra BioVision HDAC Activity Colorimetric Assay Kit protokolüne uygun şekilde çalışılmıştır. Tüm bileşikler için üçer tekrar yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak 10 µL HeLa nükleer ekstrakt kullanılmıştır. Trikostatin A ve bileşik uygulanmamış hücreden elde edilen protein negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

BioVision HDAC Activity Colorimetric Assay Kit protokolüne göre;

- 96'lı pleyte her bir bileşik için 85 µL protein eklendi.
- Bileşiklerin üzerine 10 µL HDAC assay buffer eklendi.
- 5 µL HDAC substrat eklenerek pipetaj yapıldı.
- 37°C'de 1 saat bekletildi.
- 1 saatin sonunda her kuyuya 10 µL Lizin developer eklenerek pipetaj yapıldı.
- 37°C'de 30 dakika bekletildi.
- 30 dakika sonunda 400-405 nm'de ölçüm yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Sülfonamid türevi bileşiklerin sentezi, saflaştırılması ve karakterizasyonu

Bu çalışmada kolorektal kanser hücrelerinde sülfonamid türevi bileşiklerin *in-vitro* anti-kanser aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmanın ilk aşaması; potansiyel anti-kanser aktivite göstermesi beklenen sülfonamid türevi bileşiklerin (Bileşik 2-5) sentez, saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarını içermektedir. Sülfonamidler, antibakteriyel, antikarbonik anhidraz, diüretik, hipoglisemik ve antitiroid aktiviteye sahip çeşitli farmakolojik ajan türleri ile önemli bir ilaç sınıfını oluşturur. Çok sayıda sülfonamid türevlerinin *in-vitro* ve *in-vivo* antitümör aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Moleküller bir aromatik/heterosiklik veya amino asit sülfonamid kimyasal iskelete sahip olup, antitümör etkileri çeşitli mekanizmalarla açıklanmaktadır. Bunlar; karbonik anhidraz inhibisyonu, G1 fazında hücre döngüsü bozulması, mikrotübül düzeneğinin bozulması, fonksiyonel baskılanma, aktivatör NF-Y ve anjiyogenez (matriks metalloproteinaz (MMP)) inhibisyonudur (Scozzafava, 2003).

Bileşik-1'den (sülfametoksipiridazin) çeşitli aldehitlerle kondenzasyon reaksiyonuyla sentezlenen yeni sülfonamid türevi Schiff bazı bileşiklerin (Bileşik 2-5) yapıları FT-IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR/APT, UV-Vis. Ve LC/MS-TOF spektroskopik yöntemleriyle belirlenmiştir. Tüm bileşikler moleküler formüllerine göre hesaplanan $[\text{M} + \text{H}]^+$ iyon piklerini yüksek bir uyumla LC/MS-TOF kütle spektrumlarında vermektedir: Bileşiklerin $[\text{M} + \text{H}]^+$ iyon pikleri m/z 425,1642; 414,0867; 376,0538 ve 426.0689 olarak hesaplanmış ve kütle spektrumlarında ise m/z 425,1614; 414,0855; 376,0594 ve 426,0673 değerleri gözlenmiştir (Bileşik 2-5 için sırasıyla). ATR ile çekilen FTIR verileri incelendiğinde, sülfametoksipiridazinin (Bileşik-1) amino ($-\text{NH}_2$) grubuna ait 3479 ve 3387 cm^{-1} dalga sayılarında gelen çift dişli şiddetli pikin ürünlerin spektrumunda kaybolduğu ve yerine 3217; 3340; - ve 3232 cm^{-1} 'de tek dişli $-\text{NH}$ gerilmesine ait piklerin ortaya çıktığı gözlenmiştir (Bileşik 2-5, sırasıyla). Burada Bileşik-3 için $-\text{NH}$ gerilme bandı gözlenmemekte olmasına rağmen bileşiğin diğer spektroskopik verileri $-\text{NH}$ grubunun varlığını açıkça ortaya koymaktadır. Ayrıca başlangıç maddesi aldehitlere ait aldehit hidrojeni $\text{HC}=\text{O}$ ve aldehit karboniline ait $\text{C}=\text{O}$ gerilme pikleri ürünlerin oluşumu sonucu kaybolarak yerine 1635; 1643; 1625 ve 1643 cm^{-1} dalga sayılarında azometin ($\text{HC}=\text{N}$) grubuna ait gerilmeler olarak gözlenmişlerdir (Bileşik 2-5, sırasıyla) (Salehi, 2019). Bileşiklerin ^1H NMR sinyallerine göre, 8.58; 8.88; 8.83 ve 8.98 ppm'de gelen bir protonluk singlet pikler $\text{N}=\text{CH}$ azometin grubuna; 7,64; 5,94; 5,94 ve 7,43 ppm'de gelen bir protonluk singlet pikler ise sülfonil

grubuna bağı (SO₂-NH) NH yapısına ait kimyasal kayma değerleridir (Bileşik 2-5, sırasıyla). Bileşiklerin ¹H NMR spektrumlarında gözlemlenen bu iki pik bileşiklerin oluşumuna dair güçlü kanıtlardır (Hamad, 2020). Tüm bileşiklerde 3.84 ppm'de gelen üç protonluk tekli pik ise sülfonamid iskeletinin taşıdığı metoksi (OCH₃) protonlarına aittir. 6.17-8.22 ppm aralığında gelen sinyaller ise ürünlerde yer alan farklı çevreye sahip aromatik halka protonlarının kimyasal kaymalarıdır. Bileşiklerin ¹³C NMR-APT spektrumlarındaki belirleyici piklerden biri azometin (-N=C-) grubuna ait kuaterner C sinylidir (Hamad, 2021). Bu pikler bileşik 2-5 için sırasıyla 158.36; 159.19; 155.67 ve 167.03 ppm'de gözlenmiştir. Ürünlerdeki sülfametoksipiridazin sülf ilacından gelen metoksi grubu metil (CH₃) karbonu Bileşik 2-5 için sırasıyla 54.80; 54.36; 54.35 ve 55.04 ppm kimyasal kayma değerlerinde gözlenmiştir. 112.53-166.12 ppm bölgesindeki sinyaller farklı kimyasal çevreye sahip aromatik halkaların metilen C'larına (=CH) atfedilmiştir. Bileşiklerin sahip olduğu konjuge moleküler yapı bizi UV-Vis. çalışmalarını yapmaya yönlendirmiştir. Yeni moleküllerin UV-Vis spektrumlarına bakıldığında başlıca 200-204; 242-260 ve 312-353 nm dalga boylarına karşılık gelen aralıkta maksimum absorpsiyon (λ_{max}) verdikleri gözlenmiştir. Bu λ_{max} değerleri moleküllerin yapılarıyla uyumludur. 200-204 ve 242-260 nm arası görülen bantlar aromatik kromoforun $\pi - \pi^*$ geçişinden kaynaklanan E1 ve B bantlarına (sırasıyla) karşılık gelmektedir. 312-353 nm arası gözlenen bantlar ise moleküllerdeki ortaklanmamış elektron çifti (n elektronları) içeren heteroatomların n - π^* geçişlerinden kaynaklanmaktadır (Erdik, 1998; Yıldırım ve diğerleri, Amasya Üniversitesi/BAP, FMB BAP. 20-0456 no'lu Araştırma Projesi Sonuç Raporu, 2022).

4.2. MTT analizi

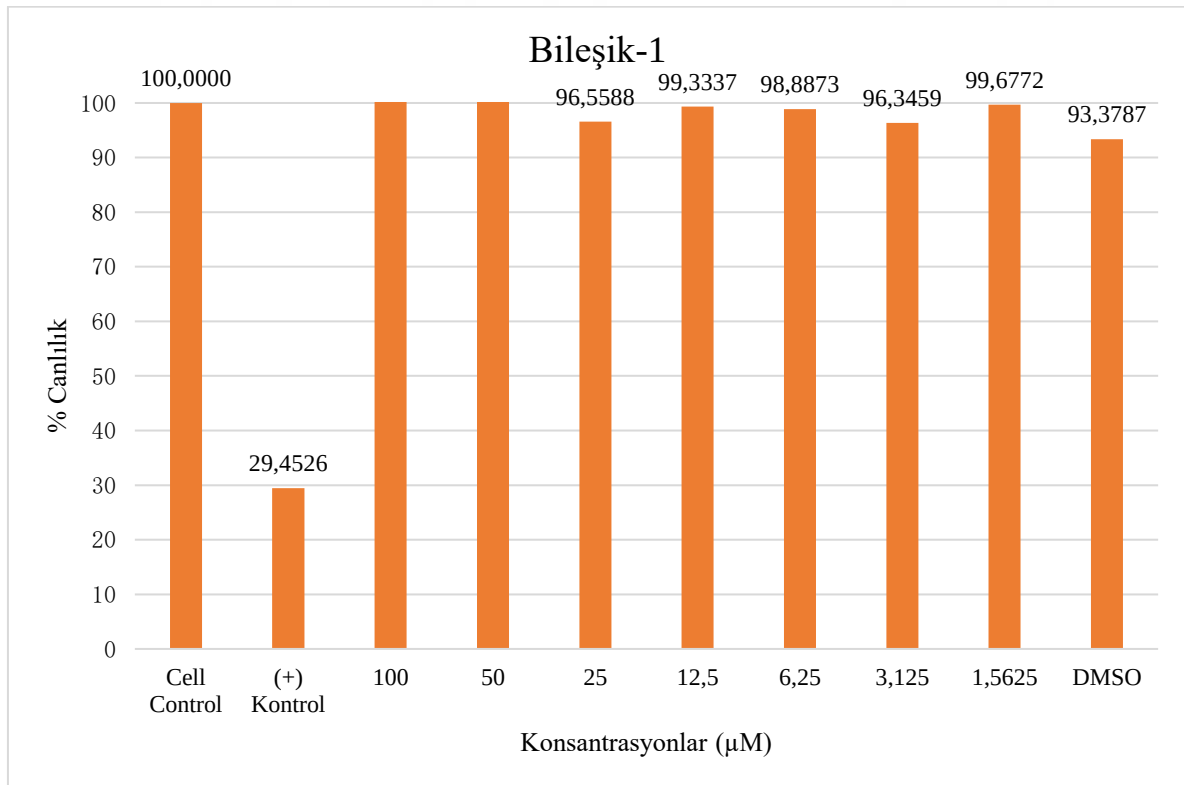
CCD-18Co, DLD-1 ve HT-29 hücre hatları üzerine en etkin dozu belirleyebilmek amacıyla bileşik-1, bileşik-2, bileşik-3, bileşik-4 ve bileşik-5 DMSO içinde çözülerek 100 μ M ana stok hazırlandı. CCD-18Co, DLD-1 ve HT-29 hücre hatlarında, her bileşiğin sitotoksik dozu spektrofotometrik olarak ölçme metoduna dayanan MTT yöntemiyle belirlendi. Microsoft Excel programı ile uygulanan doz miktarları ile % hücre canlılık eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon değeri (IC₅₀) sütun grafiği ile hesaplandı. Anti-kanser bileşiği olan mitomycin-C (100 mg/ml) pozitif kontrol olarak, DMSO (1/1000) negatif (çözücü) kontrol olarak kullanıldı.

Bileşik-1 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

CCD-18Co hücre hattında: Bileşik-1'in hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu bileşiğin (+) kontrol olarak kullanılan anti kanserojen mitomycin-C'ye oranla daha az sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1) (Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. Bileşik-1'in CCD-18Co hücre hattında MTT absorbans ölçümleri

Hücre Kontrol	1,4559	100,000
(+) Kontrol	0,4288	29,4526
100 μ M	1,4697	100,9479
50 μ M	1,4622	100,4373
25 μ M	1,4058	96,56333
12,5 μ M	1,4462	99,33373
6,25 μ M	1,4397	98,89184
3,125 μ M	1,4027	96,34582
1,5625 μ M	1,4512	99,67946
DMSO	1,3595	93,3808



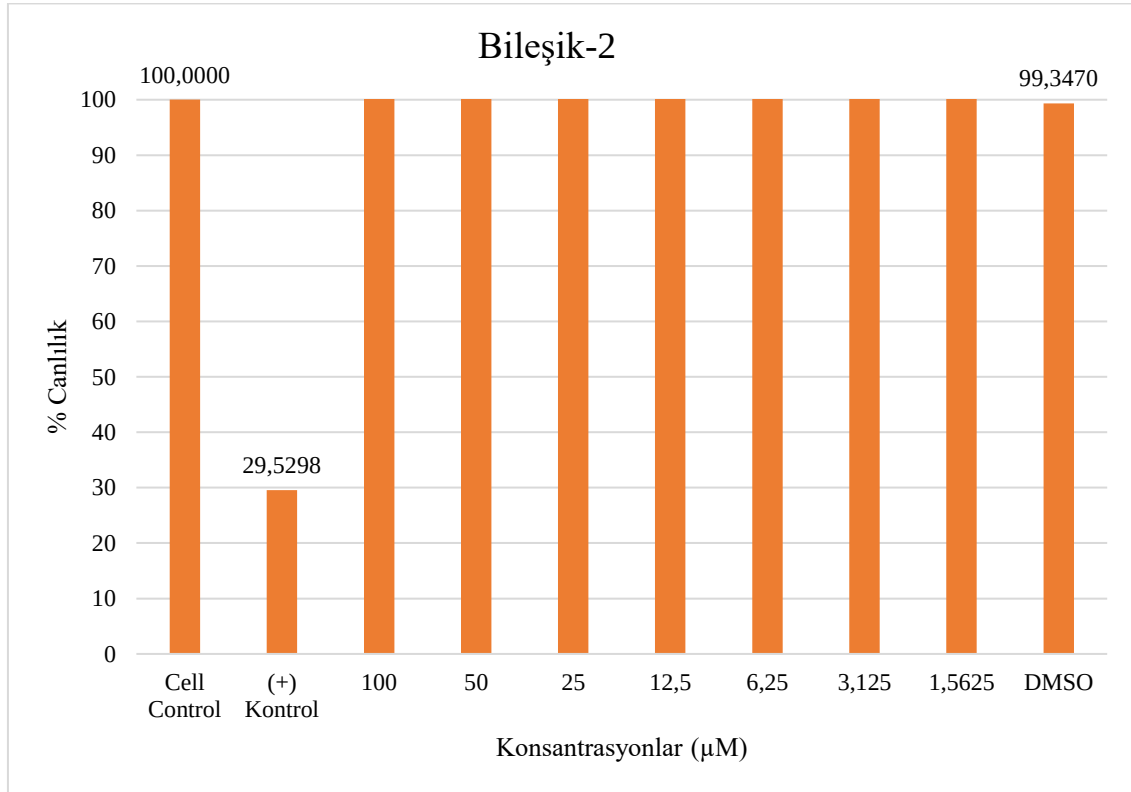
Şekil 4.1. Bileşik-1'in CCD-18Co hücre hattında MTT analizi

Bileşik-2 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

CCD-18Co hücre hattında; Bileşik-2'nin hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu bileşiğin (+) kontrol olarak kullanılan anti kanserojen mitomycin-C'ye oranla daha az sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.2) (Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. Bileşik-2'nin CCD-18Co hücre hattında MTT absorbans ölçümleri

Hücre Kontrol	1,4548	100,0000
(+) Kontrol	0,4296	29,5298
100 μ M	1,4858	102,1262
50 μ M	1,4588	100,2727
25 μ M	1,4968	102,8869
12,5 μ M	1,4587	100,2658
6,25 μ M	1,4712	101,125
3,125 μ M	1,4855	102,1056
1,5625 μ M	1,5004	103,1298
DMSO	1,4453	99,34471



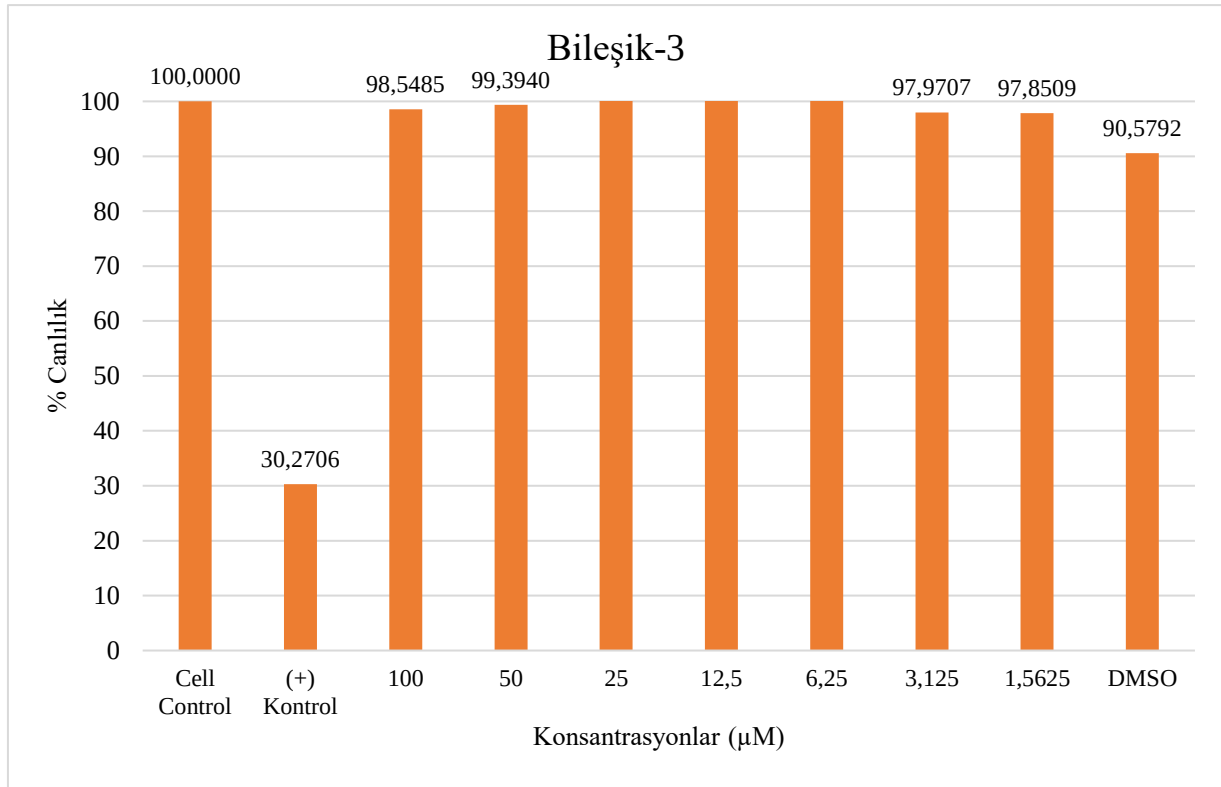
Şekil 4.2. Bileşik-2'nin CCD-18Co hücre hattında MTT analizi

Bileşik-3 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

CCD-18Co hücre hattında; Bileşik-3'ün hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu bileşiğin (+) kontrol olarak kullanılan anti kanserojen mitomycin-C'ye oranla daha az sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3) (Şekil 4.3).

Çizelge 4.3. Bileşik-3'ün CCD-18Co hücre hattında MTT absorbands ölçümleri

Hücre Kontrol	1,4192	100
(+) Kontrol	0,4296	30,2706
100 μ M	1,3986	98,55079
50 μ M	1,4106	99,39401
25 μ M	1,4829	104,4932
12,5 μ M	1,4214	100,155
6,25 μ M	1,4402	101,4844
3,125 μ M	1,3904	97,97064
1,5625 μ M	1,3887	97,85555
DMSO	1,2855	90,57898



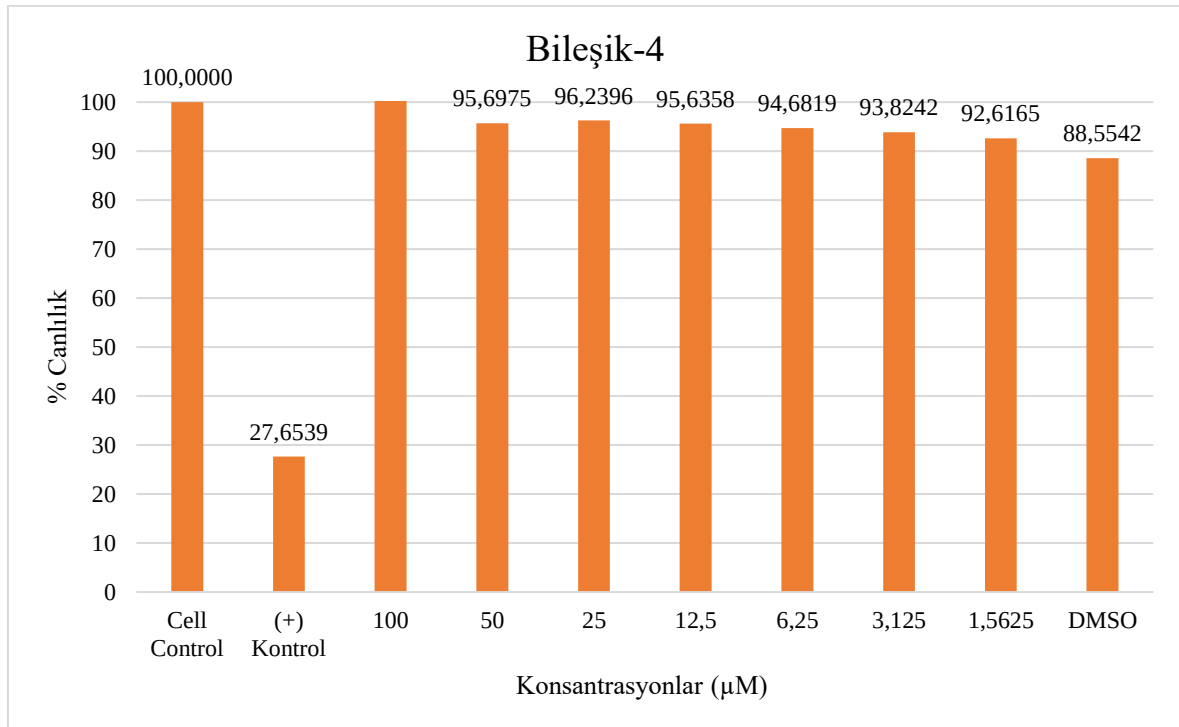
Şekil 4.3. Bileşik-3'ün CCD-18Co hücre hattında MTT analizi

Bileşik-4 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

CCD-18Co hücre hattında; Bileşik-4'ün hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu bileşiğin (+) kontrol olarak kullanılan anti kanserojen mitomycin-C'ye oranla daha az sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.4) (Şekil 4.4).

Çizelge 4.4. Bileşik-3'ün CCD-18Co hücre hattında MTT analizi

Hücre Kontrol	1,4573	100
(+) Kontrol	0,4030	27,6539
100 µM	1,4937	102,4977
50 µM	1,3946	95,69533
25 µM	1,4025	96,23971
12,5 µM	1,3937	95,63586
6,25 µM	1,3798	94,67749
3,125 µM	1,3673	93,82434
1,5625 µM	1,3497	92,61665
DMSO	1,2905	88,55444



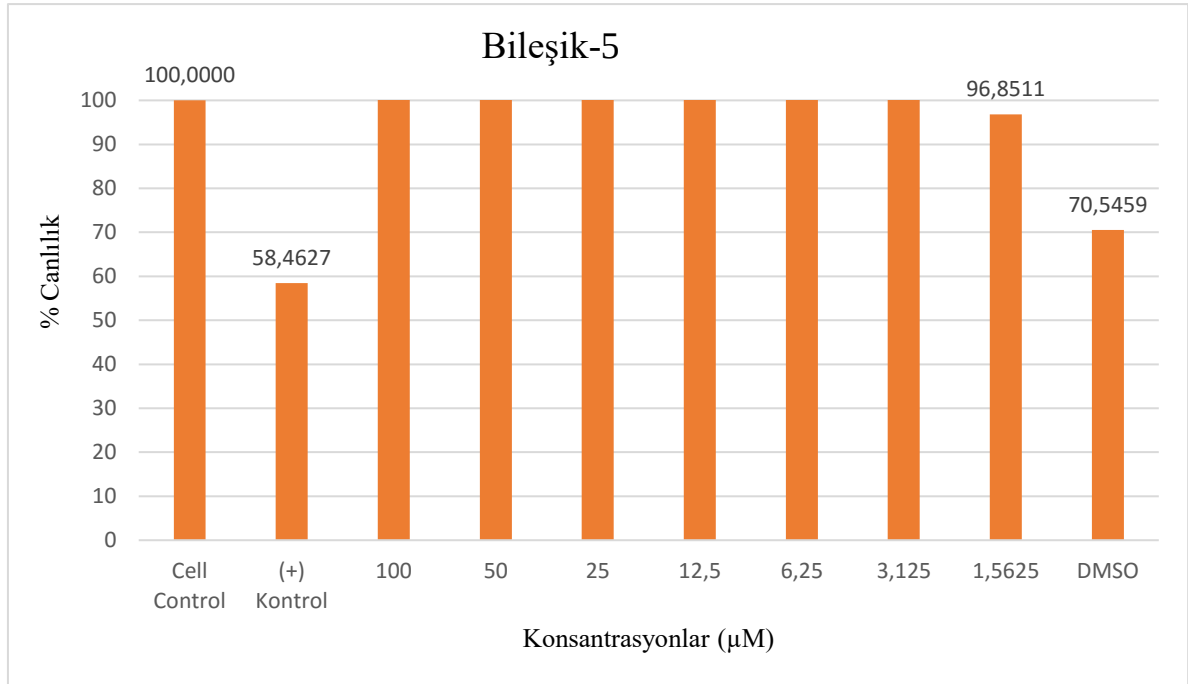
Şekil 4.4. Bileşik-4'ün CCD-18Co hücre hattında MTT analizi

Bileşik-5 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

CCD-18Co hücre hattında; Bileşik-5'in hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu bileşiğin (+) kontrol olarak kullanılan anti kanserojen mitomycin-C'ye oranla daha az sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.5) (Şekil 4.5).

Çizelge 4.5. Bileşik-5'in CCD-18Co hücre hattında MTT absorbans ölçümleri

Hücre Kontrol	1,3465	100
(+) Kontrol	0,7872	58,4627
100 μ M	1,3862	102,9484
50 μ M	1,4553	108,0802
25 μ M	1,3847	102,8370
12,5 μ M	1,3785	102,3765
6,25 μ M	1,3839	102,7776
3,125 μ M	1,3952	103,6168
1,5625 μ M	1,3041	96,8511
DMSO	0,9499	70,5459



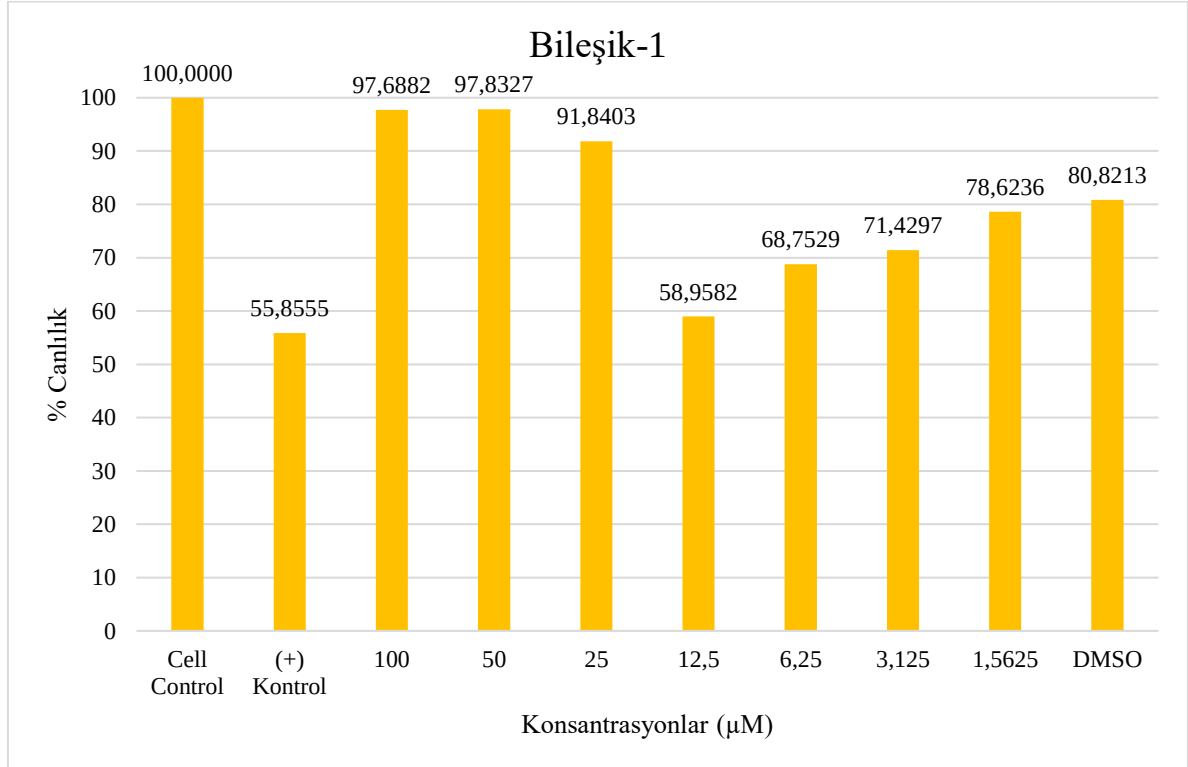
Şekil 4.5. Bileşik-5'in CCD-18Co hücre hattında MTT analizi

Bileşik-1 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

DLD-1 hücre hattında; Bileşik-1'in hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 12,5 μ M konsantrasyonda göstermiştir. DLD-1 kanser hücre hattında Bileşik-1'in % canlılık aktiviteleri 97 ve 58 arasında belirlenmiştir (Tablo 4.6) (Şekil 4.6).

Çizelge 4.6. Bileşik-1'in DLD-1 hücre hattında MTT absorbands ölçümleri

Hücre Kontrol	1,3150	100,0000
(+) Kontrol	0,7345	55,8555
100 μ M	1,2846	97,6882
50 μ M	1,2865	97,8327
25 μ M	1,2077	91,8403
12,5 μ M	0,7753	58,9582
6,25 μ M	0,9041	68,7529
3,125 μ M	0,9393	71,4297
1,5625 μ M	1,0339	78,6236
DMSO	1,0628	80,8213



Şekil 4.6. Bileşik-1'in DLD-1 hücre hattında MTT analizi

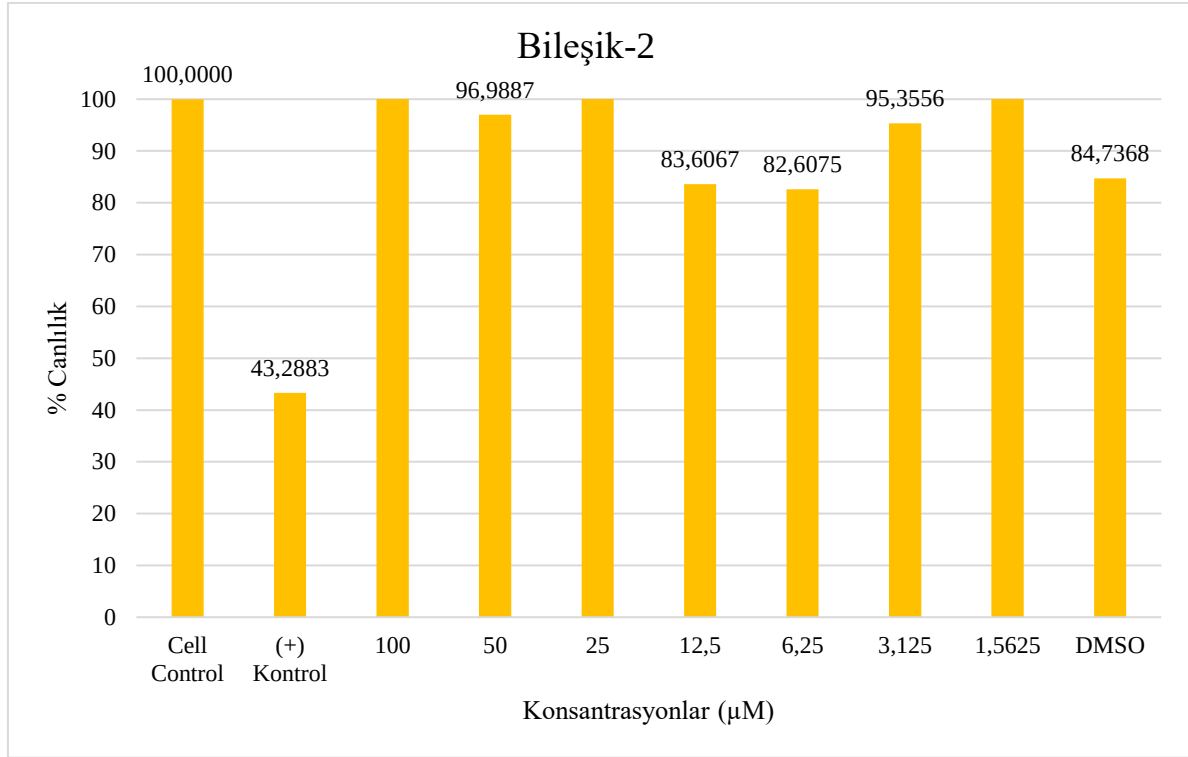
MTT yöntemi ile bileşik-1'in hücre yoğunluğu üzerindeki etkisi spektrofotometre ile okutuldu. Microsoft Excel programı ile uygulanan doz miktarları ve % canlılık eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon değeri (IC_{50}) sütun grafiği ile hesaplandı ve logaritmik eğimi çizildi. Logaritmik eğim çizgisinden %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri Bileşik-1 için 24 μM olarak belirlendi.

Bileşik-2 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

DLD-1 hücre hattında; Bileşik-2'nin hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 6,25 μM konsantrasyonunda göstermiştir. DLD-1 kanser hücre hattında Bileşik-2'nin % canlılık aktiviteleri 104 ve 82 arasında belirlenmiştir (Tablo 4.7) (Şekil 4.7).

Çizelge 4.7. Bileşik-2'nin DLD-1 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri

Hücre Kontrol	1,4512	100,0000
(+) Kontrol	0,6282	43,2883
100 μM	1,5114	104,1483
50 μM	1,4075	96,9887
25 μM	1,5782	108,7514
12,5 μM	1,2133	83,6067
6,25 μM	1,1988	82,6075
3,125 μM	1,3838	95,3556
1,5625 μM	1,5255	105,1199
DMSO	1,2297	84,7368



Şekil 4.7. Bileşik-2'nin DLD-1 hücre hattında MTT analizi

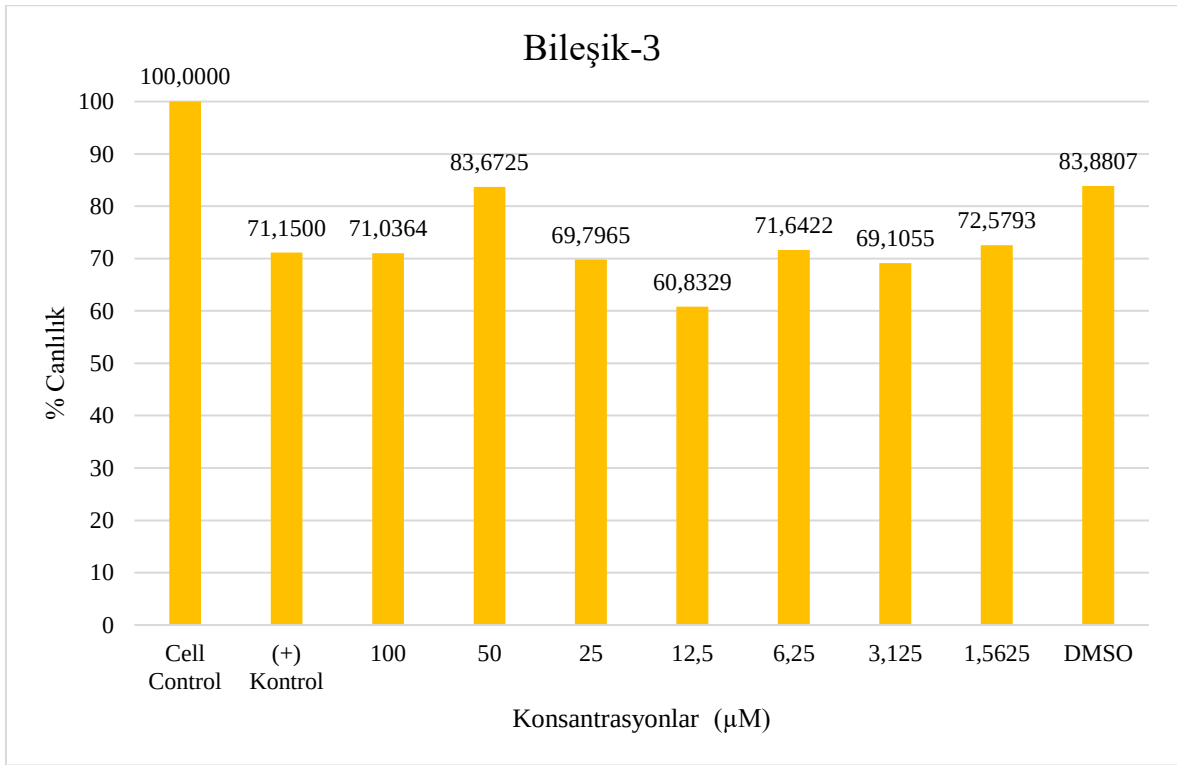
Logaritmik eğim çizgisinden %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri Bileşik-2 için 31 µM olarak belirlendi.

Bileşik-3 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

DLD-1 hücre hattında; Bileşik-3'ün hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 12,5 µM konsantrasyonunda göstermiştir. DLD-1 kanser hücre hattında bileşik-3'ün % canlılık aktiviteleri 83 ve 60 arasında belirlenmiştir (Tablo 4.8) (Şekil 4.8).

Çizelge 4.8. Bileşik 3'ün DLD-1 hücre hattında MTT absorbands ölçümleri

Hücre Kontrol	1,0565	100,0000
(+) Kontrol	0,7517	71,1500
100 μ M	0,7505	71,0364
50 μ M	0,8840	83,6725
25 μ M	0,7374	69,7965
12,5 μ M	0,6427	60,8329
6,25 μ M	0,7569	71,6422
3,125 μ M	0,7301	69,1055
1,5625 μ M	0,7668	72,5793
DMSO	0,8862	83,8807



Şekil 4.8. Bileşik-3'ün DLD-1 hücre hattında MTT analizi

Logaritmik eğim çizgisinden %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri Bileşik-3 için 5 μ M olarak belirlendi.

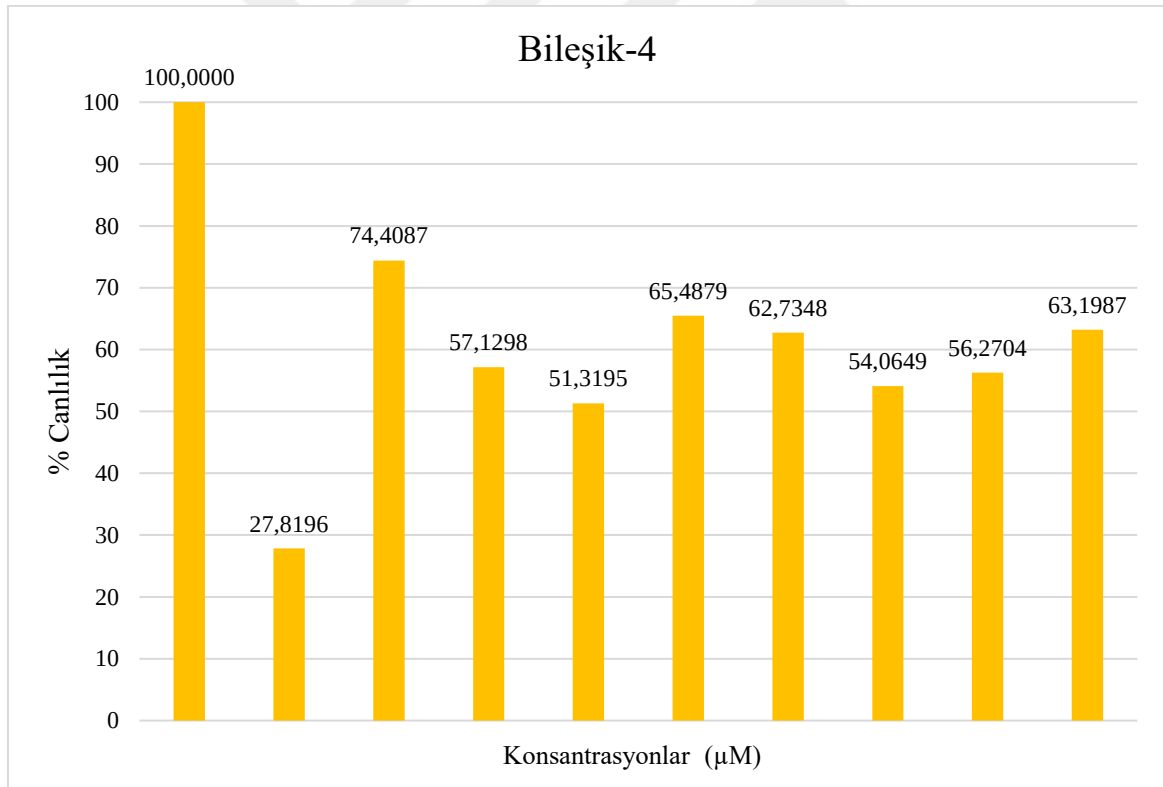
Bileşik-4 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

DLD-1 hücre hattında; Bileşik-4'ün hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 25 μ M konsantrasyonunda göstermiştir. DLD-1 kanser hücre

hattında Bileşik-4'ün % canlılık aktiviteleri 74 ve 51 arasında belirlenmiştir (Tablo 4.9) (Şekil 4.9).

Çizelge 4.9. Bileşik-4'ün DLD-1 hücre hattında MTT absorbands ölçümleri

Hücre Kontrol	1,3149	100,0000
(+) Kontrol	0,3658	27,8196
100 μ M	0,9784	74,4087
50 μ M	0,7512	57,1298
25 μ M	0,6748	51,3195
12,5 μ M	0,8611	65,4879
6,25 μ M	0,8249	62,7348
3,125 μ M	0,7109	54,0649
1,5625 μ M	0,7399	56,2704
DMSO	0,8310	63,1987



Şekil 4.9. Bileşik 4'ün DLD-1 hücre hattında MTT analizi

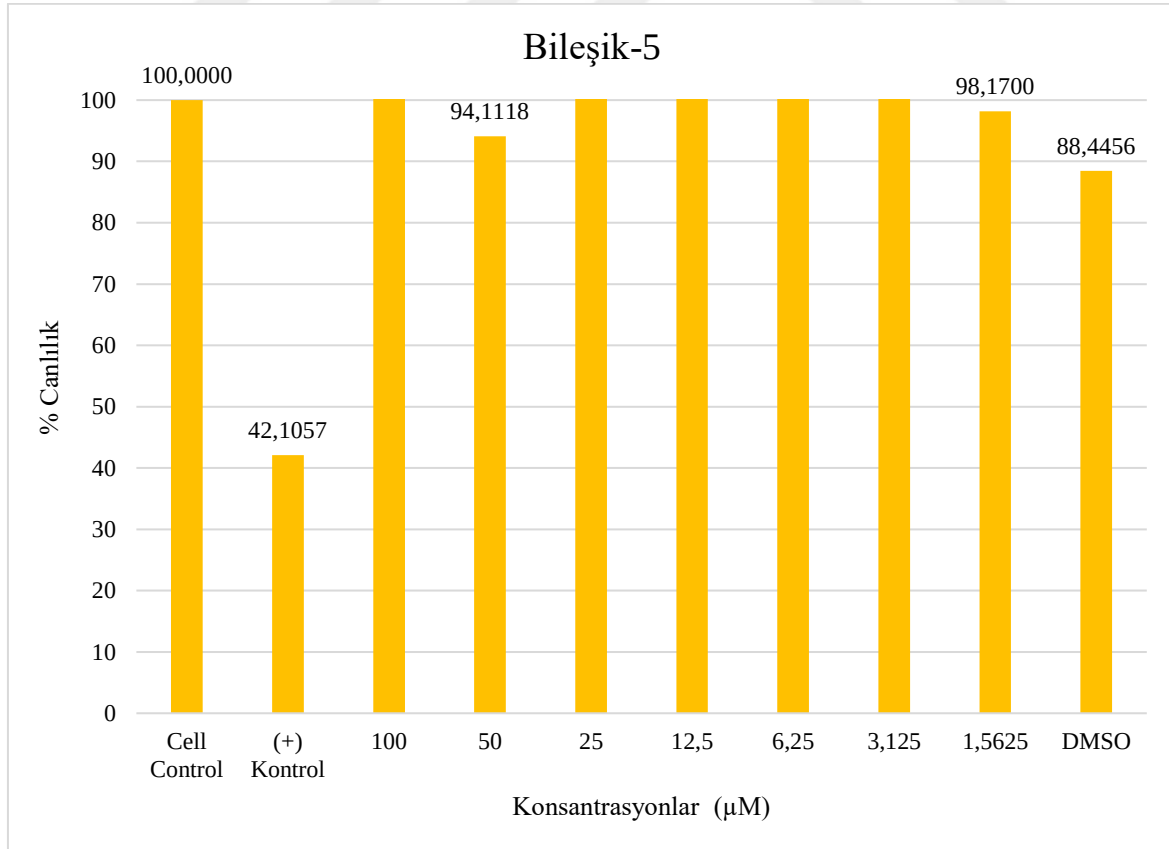
Logaritmik eğim çizgisinden %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri Bileşik-4 için 1 μ M olarak belirlendi.

Bileşik-5 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

DLD-1 hücre hattında; Bileşik-5'in hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır (Tablo 4.10) (Şekil 4.10).

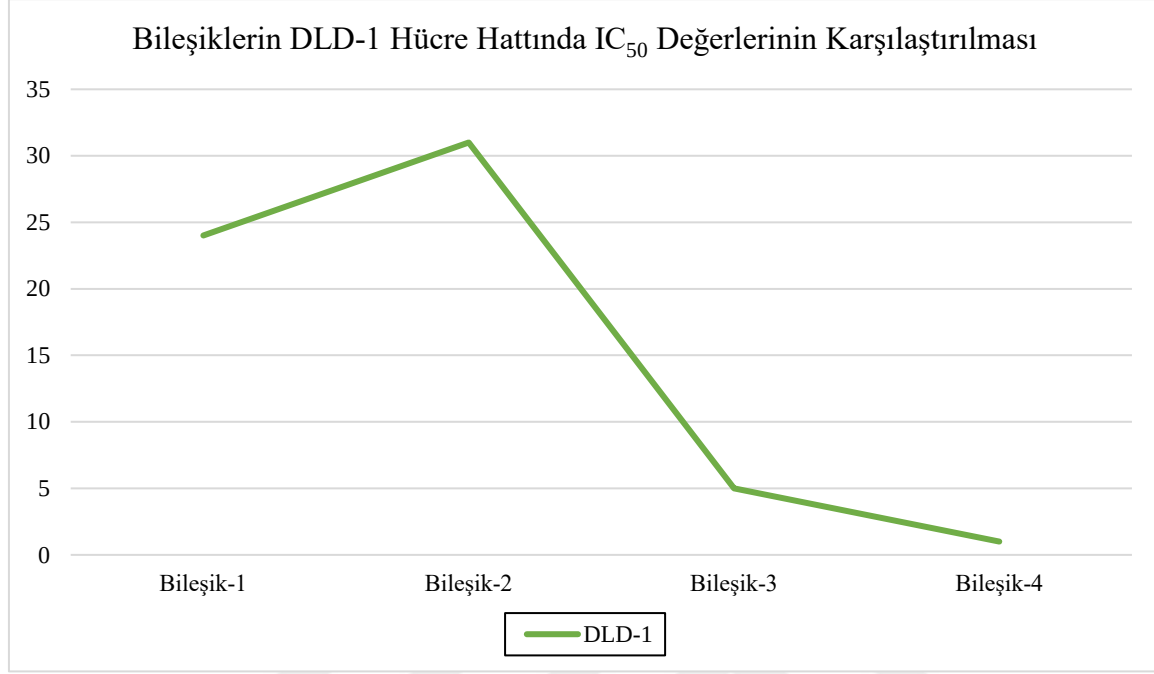
Çizelge 4.10. Bileşik-5'in DLD-1 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri

Hücre Kontrol	1,3060	100,0000
(+) Kontrol	0,5499	42,1057
100 μ M	1,3523	103,5452
50 μ M	1,2291	94,1118
25 μ M	1,3420	102,7565
12,5 μ M	1,3375	102,4119
6,25 μ M	1,3148	100,6738
3,125 μ M	1,3666	104,6401
1,5625 μ M	1,2821	98,1700
DMSO	1,1551	88,4456



Şekil 4.10. Bileşik-5'in DLD-1 hücre hattında MTT analizi

Logaritmik eğim çizgisinden %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri Bileşik-5 için belirlenememiştir.



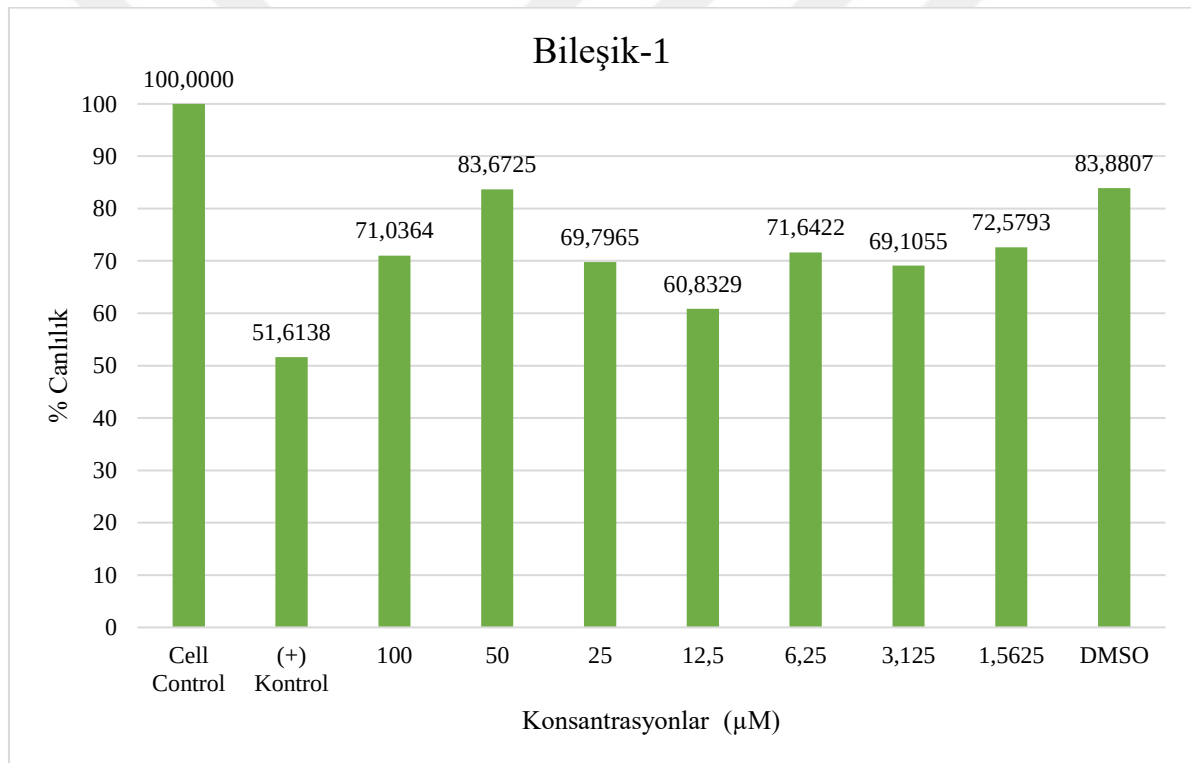
Şekil 4.11. DLD-1 hücre hattında bileşiklerin IC_{50} değerlerinin karşılaştırılması

Bileşik-1 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

HT-29 hücre hattında; Bileşik-1'in hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 12,5 μ M konsantrasyonunda göstermiştir. HT-29 kanser hücre hattında bileşik-1'in % canlılık aktiviteleri 83 ve 60 arasında belirlenmiştir (Tablo 4.11) (Şekil 4.11).

Çizelge 4.11. Bileşik-1'in HT-29 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri

Hücre Kontrol	1,0565	100,0000
(+) Kontrol	0,5453	51,6138
100 μ M	0,7505	71,0364
50 μ M	0,8840	83,6725
25 μ M	0,7374	69,7965
12,5 μ M	0,6427	60,8329
6,25 μ M	0,7569	71,6422
3,125 μ M	0,7301	69,1055
1,5625 μ M	0,7668	72,5793
DMSO	0,8862	83,8807



Şekil 4.12. Bileşik-1'in HT-29 hücre hattında MTT analizi

Logaritmik eğim çizgisinden %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri Bileşik-1 için 5 μ M olarak belirlendi.

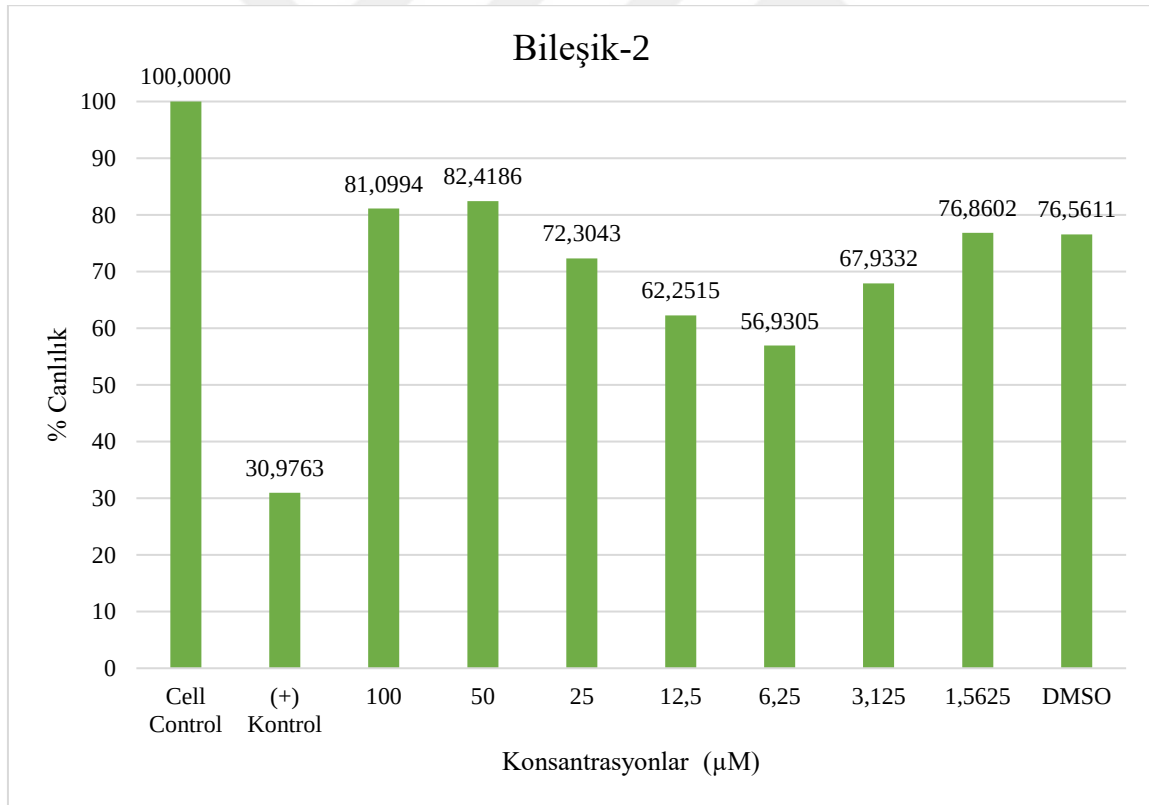
Bileşik-2 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

HT-29 hücre hattında; Bileşik-2'nin hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 6,25 μ M konsantrasyonunda göstermiştir. HT-29 kanser

hücre hattında bileşik-2'nin % canlılık aktiviteleri 82 ve 56 arasında belirlenmiştir (Tablo 4.12) (Şekil 4.12).

Çizelge 4.12. Bileşik-2'nin HT-29 hücre hattında MTT absorbands ölçümleri

Hücre Kontrol	1,1370	100,0000
(+) Kontrol	0,3522	30,9763
100 μ M	0,9221	81,0994
50 μ M	0,9371	82,4186
25 μ M	0,8221	72,3043
12,5 μ M	0,7078	62,2515
6,25 μ M	0,6473	56,9305
3,125 μ M	0,7724	67,9332
1,5625 μ M	0,8739	76,8602
DMSO	0,8705	76,5611



Şekil 4.13. Bileşik-2'nin HT-29 hücre hattında MTT analizi

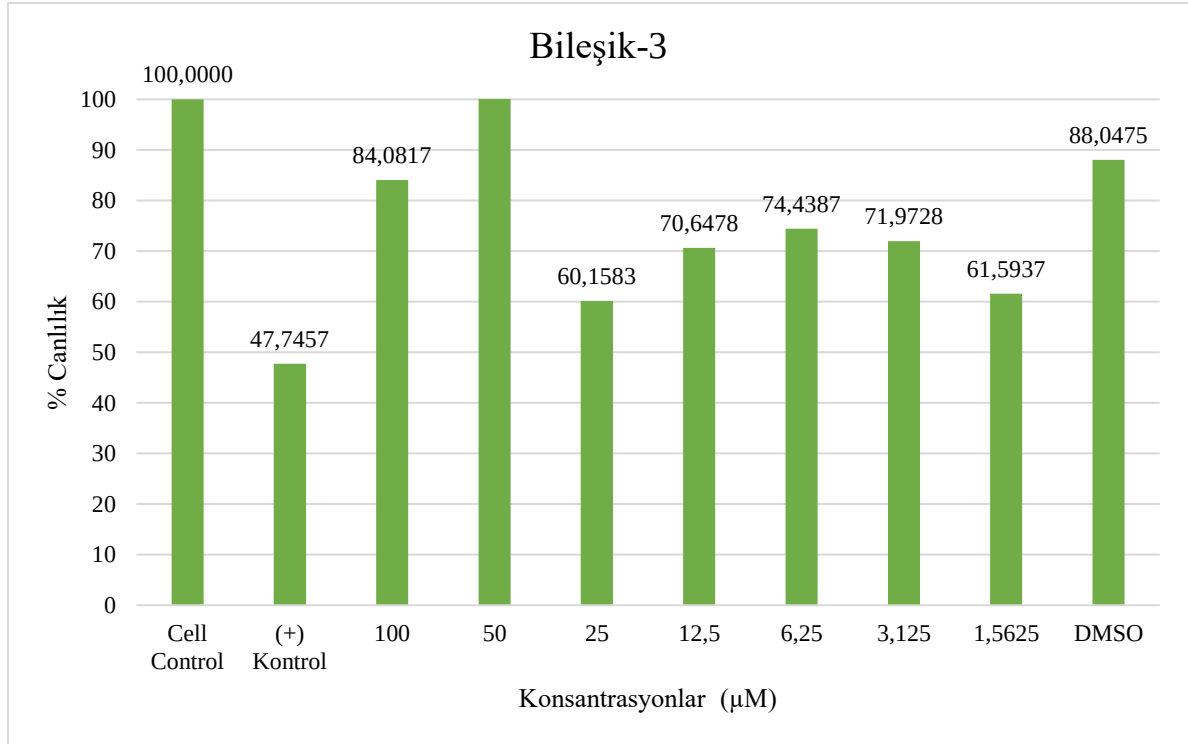
Logaritmik eğim çizgisinden %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri Bileşik-2 için 23 μ M olarak belirlendi.

Bileşik-3 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

HT-29 hücre hattında: Bileşik-3'ün hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 25 μM konsantrasyonunda göstermiştir. HT-29 kanser hücre hattında bileşik-3'ün % canlılık aktiviteleri 100 ve 60 arasında belirlenmiştir (Tablo 4.13) (Şekil 4.13).

Çizelge 4.13. Bileşik-3'ün HT-29 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri

Hücre Kontrol	1,0868	100,0000
(+) Kontrol	0,5189	47,7457
100 μM	0,9138	84,0817
50 μM	1,0902	100,3128
25 μM	0,6538	60,1583
12,5 μM	0,7678	70,6478
6,25 μM	0,8090	74,4387
3,125 μM	0,7822	71,9728
1,5625 μM	0,6694	61,5937
DMSO	0,9569	88,0475



Şekil 4.14. Bileşik-3'ün HT-29 hücre hattında MTT analizi

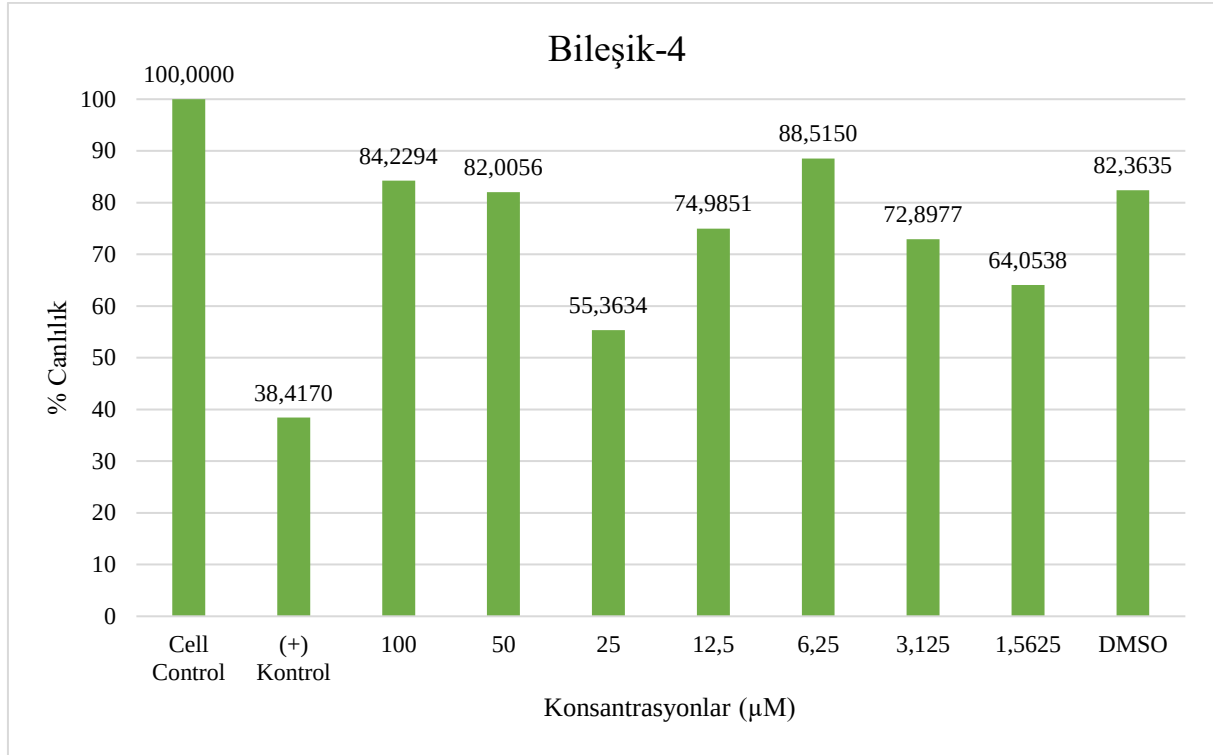
Logaritmik eğim çizgisinden %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri Bileşik-3 için 9 μM olarak belirlendi.

Bileşik-4 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

HT-29 hücre hattında; Bileşik-4'ün hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 25 μM konsantrasyonunda göstermiştir. HT-29 kanser hücre hattında bileşik-4'ün % canlılık aktiviteleri 88 ve 55 arasında belirlenmiştir (Tablo 4.14) (Şekil 4.14).

Çizelge 4.14. Bileşik-4'ün HT-29 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri

Hücre Kontrol	1,1737	100,0000
(+) Kontrol	0,4509	38,4170
100 μM	0,9886	84,2294
50 μM	0,9625	82,0056
25 μM	0,6498	55,3634
12,5 μM	0,8801	74,9851
6,25 μM	1,0389	88,5150
3,125 μM	0,8556	72,8977
1,5625 μM	0,8518	64,0538
DMSO	0,9667	82,3635



Şekil 4.15. Bileşik-4'ün HT-29 hücre hattında MTT analizi

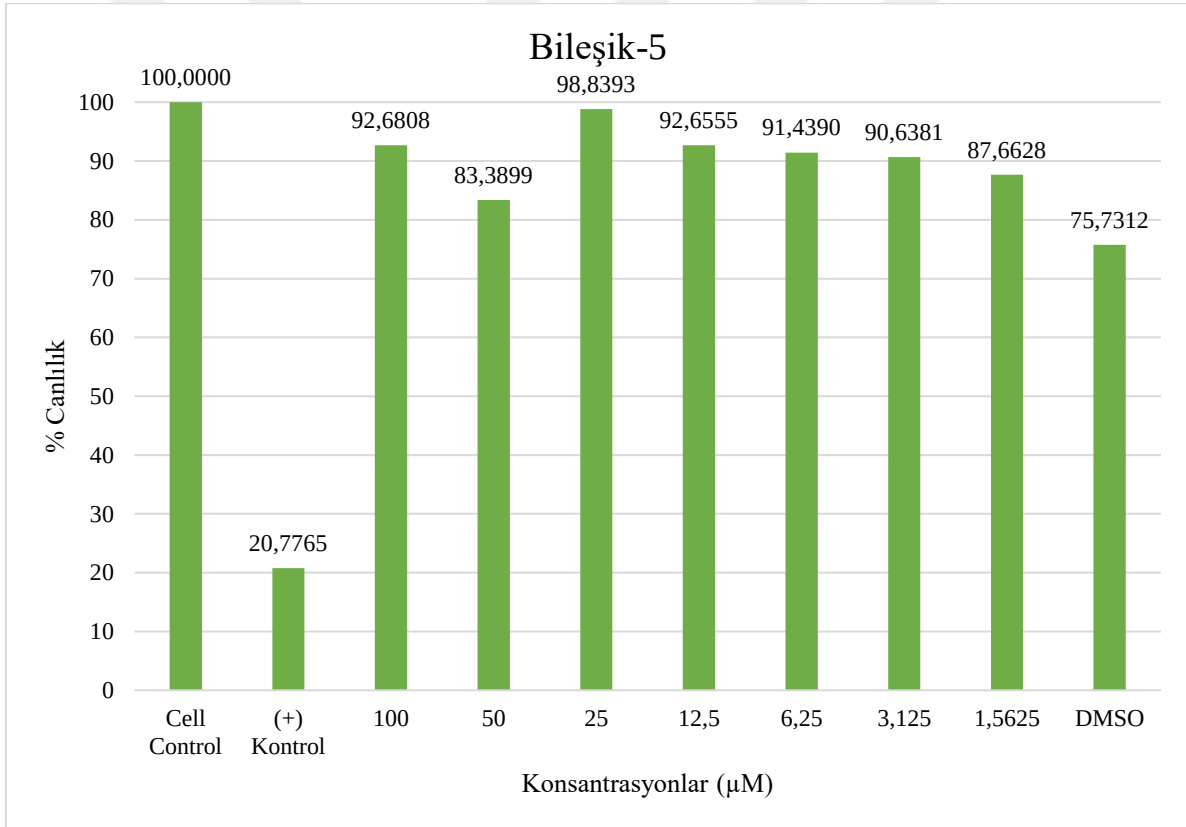
Logaritmik eğim çizgisinden %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri Bileşik-4 için 17,75 μM olarak belirlendi.

Bileşik-5 için etkin sitotoksik dozunun belirlenmesi

HT-29 hücre hattında: Bileşik-5'in hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır (Tablo 4.15) (Şekil 4.15).

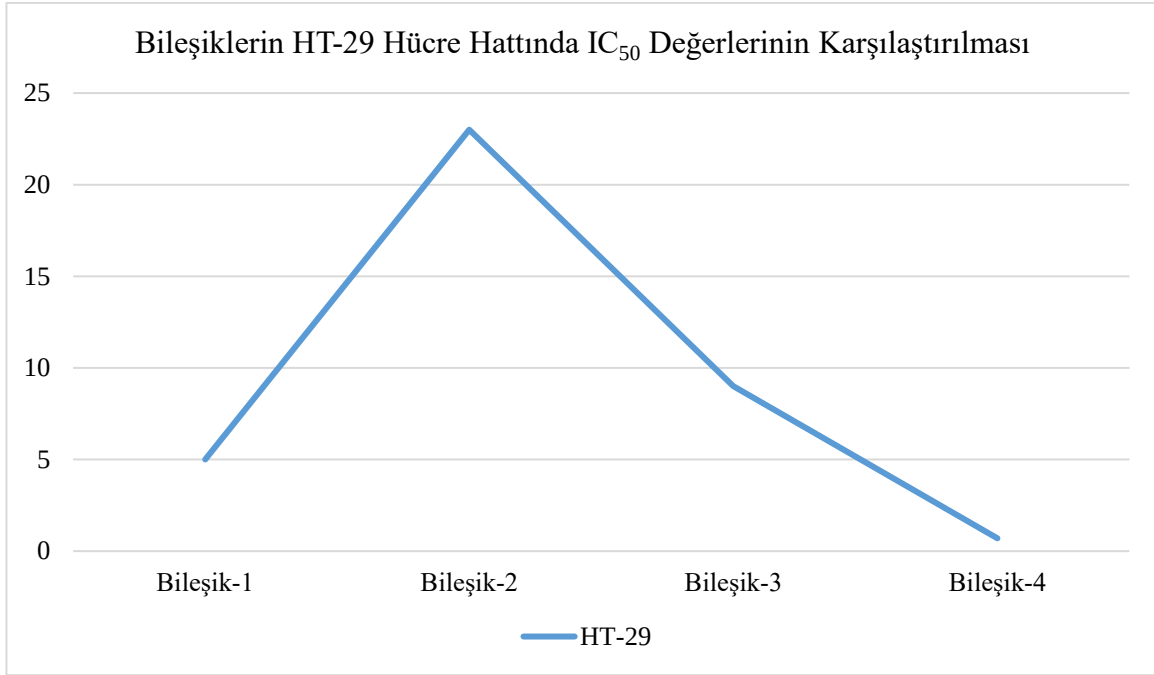
Çizelge 4.15. Bileşik-5'in HT-29 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri

Hücre Kontrol	1,9729	100,0000
(+) Kontrol	0,4099	20,7765
100 μ M	1,8285	92,6808
50 μ M	1,6452	83,3899
25 μ M	1,9500	98,8393
12,5 μ M	1,8280	92,6555
6,25 μ M	1,8040	91,4390
3,125 μ M	1,7882	90,6381
1,5625 μ M	1,7295	87,6628
DMSO	1,4941	75,7312

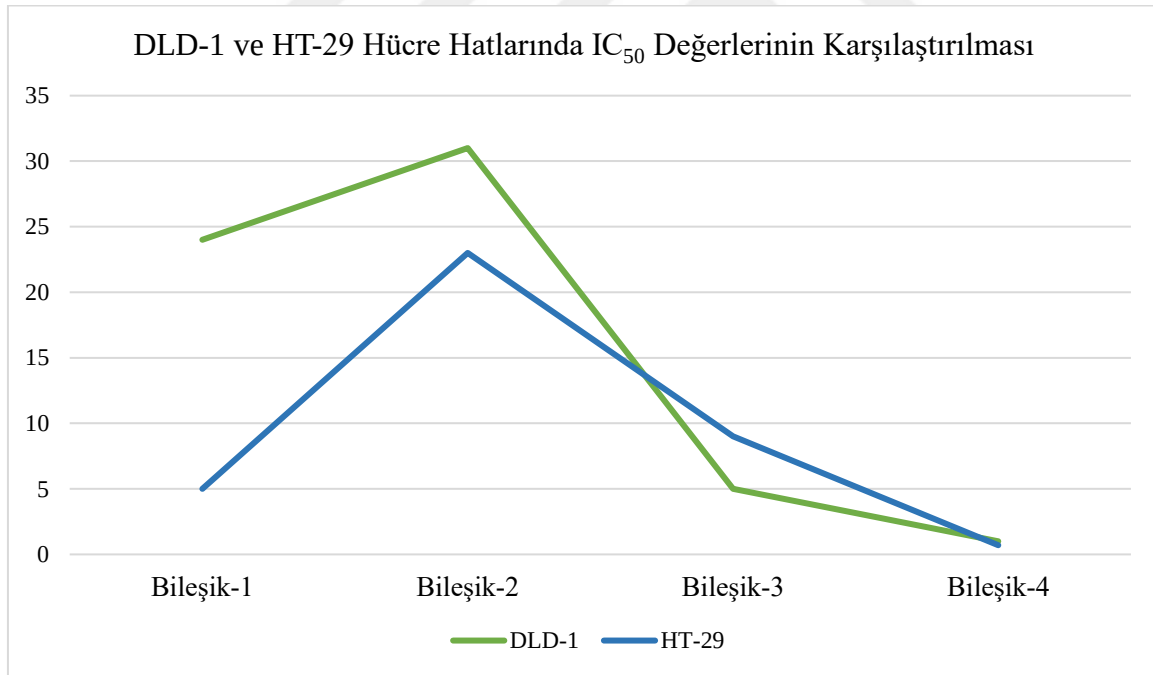


Şekil 4.16. Bileşik-5'in HT-29 hücre hattında MTT analizi

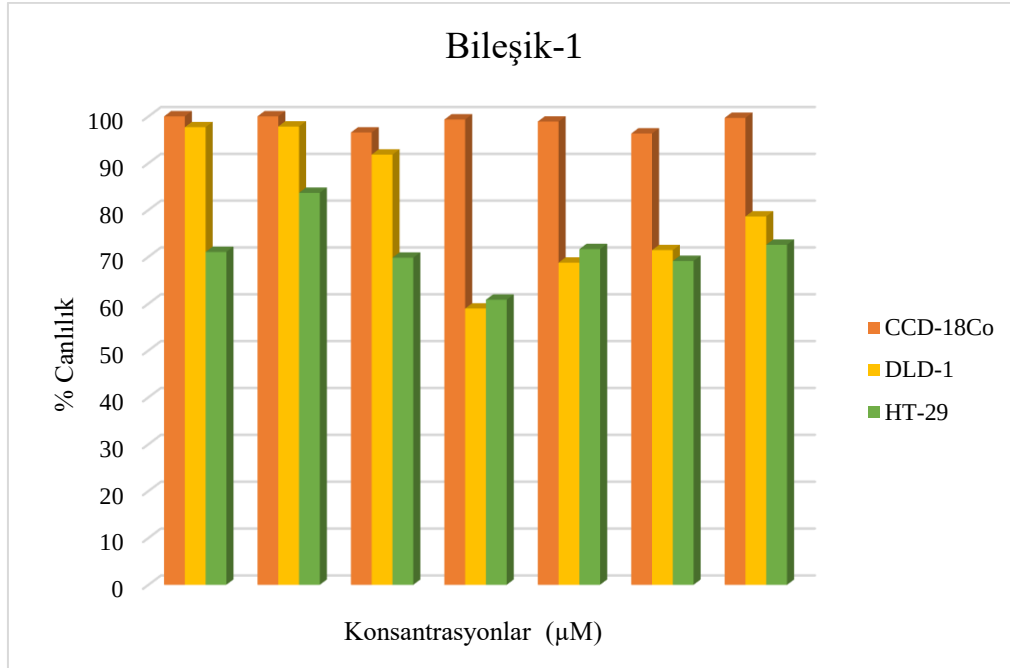
Logaritmik eğim çizgisinden %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri Bileşik-5 için belirlenememiştir.



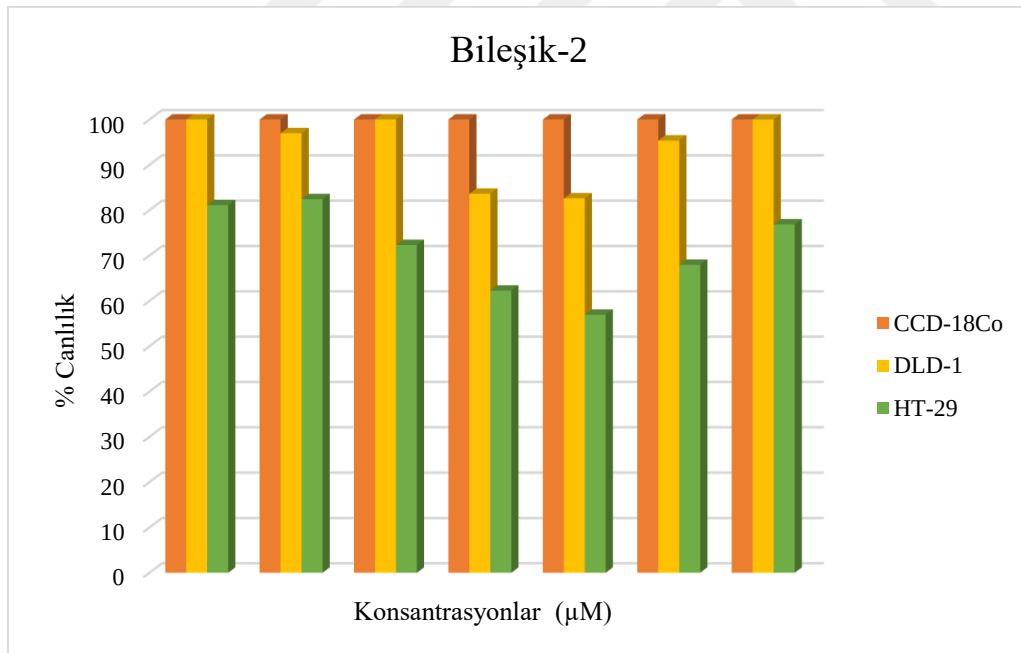
Şekil 4.17. HT-29 hücre hattında bileşiklerin IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması



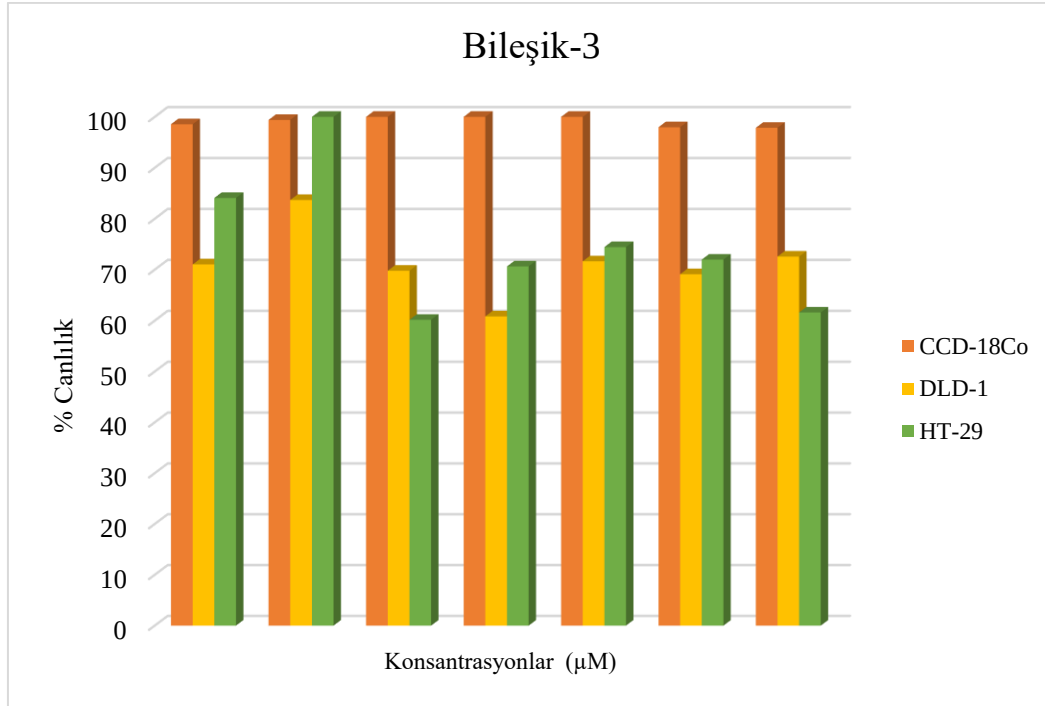
Şekil 4.18. DLD-1 ve HT-29 hücre hatlarında IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması



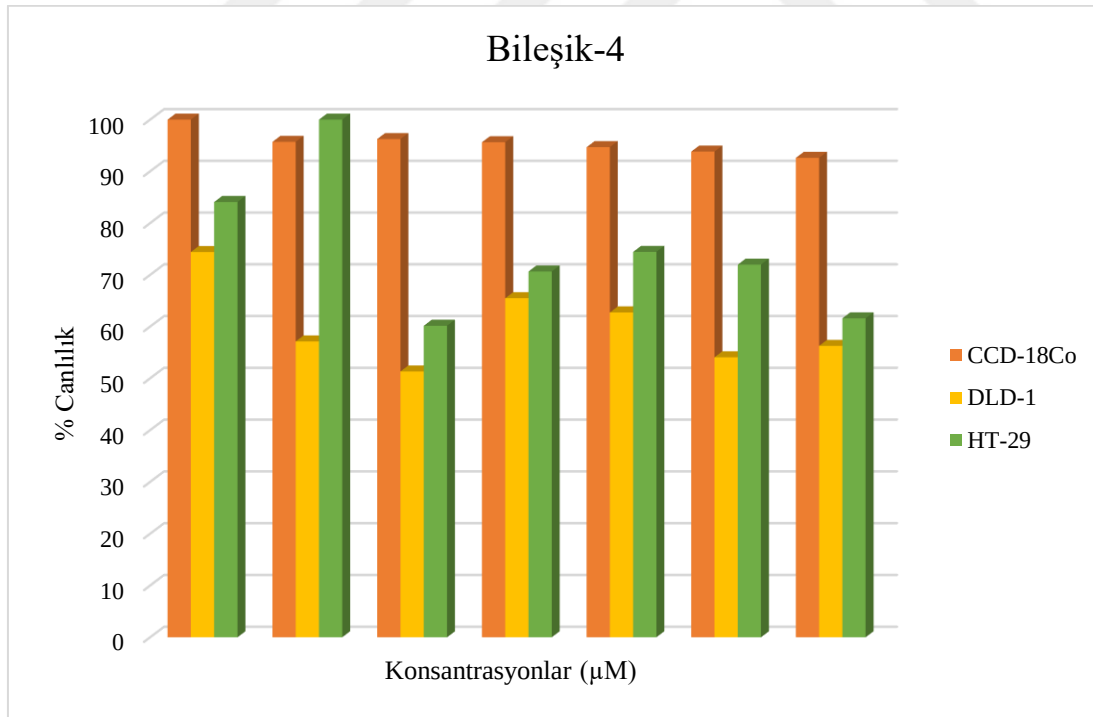
Şekil 4.19. Bileşik-1'in hücre hatlarında % canlılık değerlerinin karşılaştırılması (Konsantrasyonlar sırasıyla 100-50-25-12,5-6,25-3,125-1,56 μM)



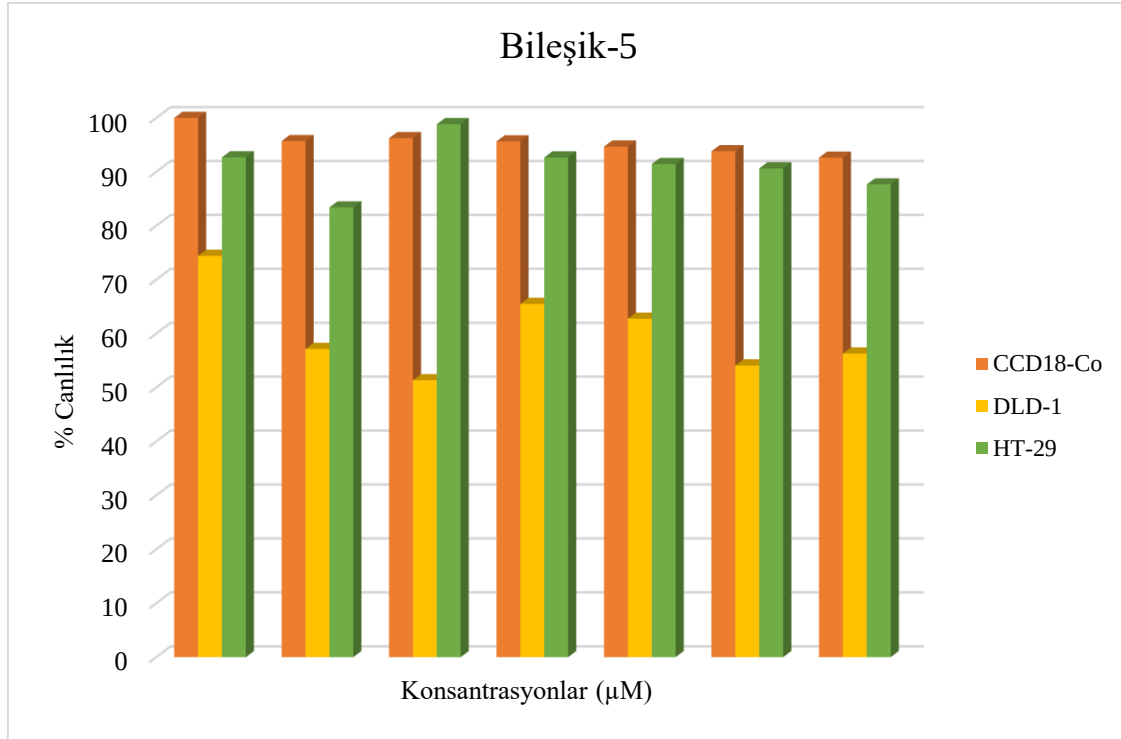
Şekil 4.20. Bileşik-2'nin hücre hatlarında % canlılık değerlerinin karşılaştırılması (Konsantrasyonlar sırasıyla 100-50-25-12,5-6,25-3,125-1,56 μM)



Şekil 4.21. Bileşik-3'ün hücre hatlarında % canlılık değerlerinin karşılaştırılması (Konsantrasyonlar sırasıyla 100-50-25-12,5-6,25-3,125-1,56 μM)



Şekil 4.22. Bileşik-4'ün hücre hatlarında % canlılık değerlerinin karşılaştırılması (Konsantrasyonlar sırasıyla 100-50-25-12,5-6,25-3,125-1,56 μM)



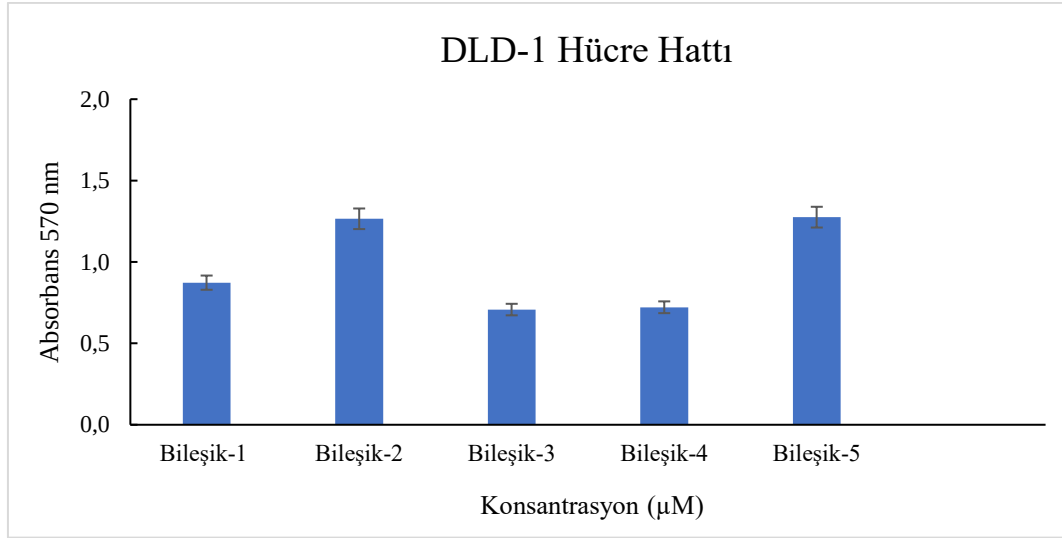
Şekil 4.23. Bileşik-5'in hücre hatlarında % canlılık değerlerinin karşılaştırılması (Konsantrasyonlar sırasıyla 100-50-25-12,5-6,25-3,125-1,56 µM)

4.3. MTT verilerinin istatistik analizi

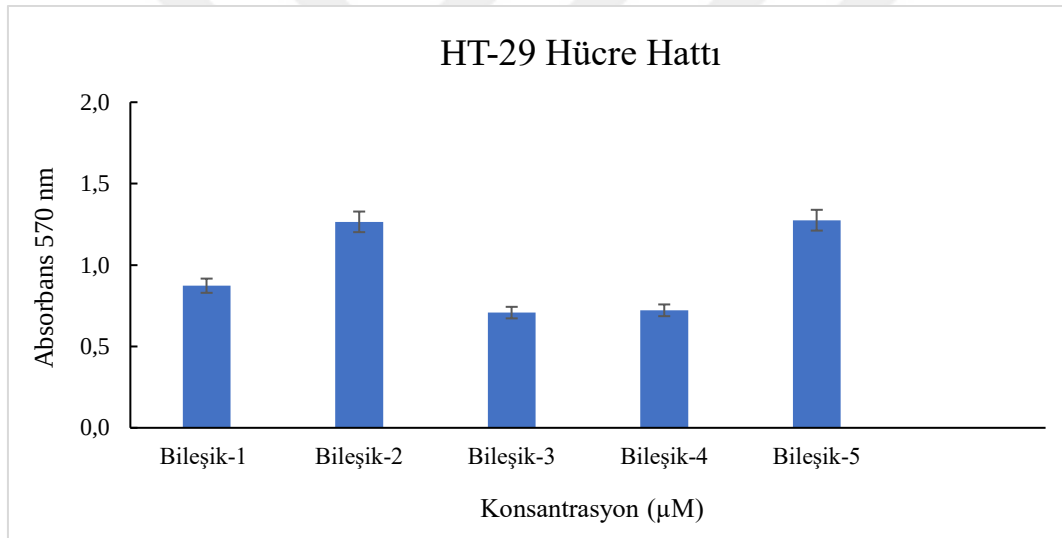
Veri setleri arasındaki farklılıkların değerleri DLD-1, HT-29 ve CCD-18Co hücre hatlarında MTT testinin en etkili dozları (üçlü tekrar) seçilerek (25-12,5-6,25 µM) ANOVA testi ile analiz edilmiştir ve sonuçlar hücre hatları için $ID_{50} \pm SE$ (ortalamanın standart hatası) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde; DLD-1, HT-29 ve CCD-18Co hücre hatları ile bileşiklerin hücre canlılığı konsantrasyonlarının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,005$).

Çizelge 4.16. HT-29, DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında bileşiklerin verileri

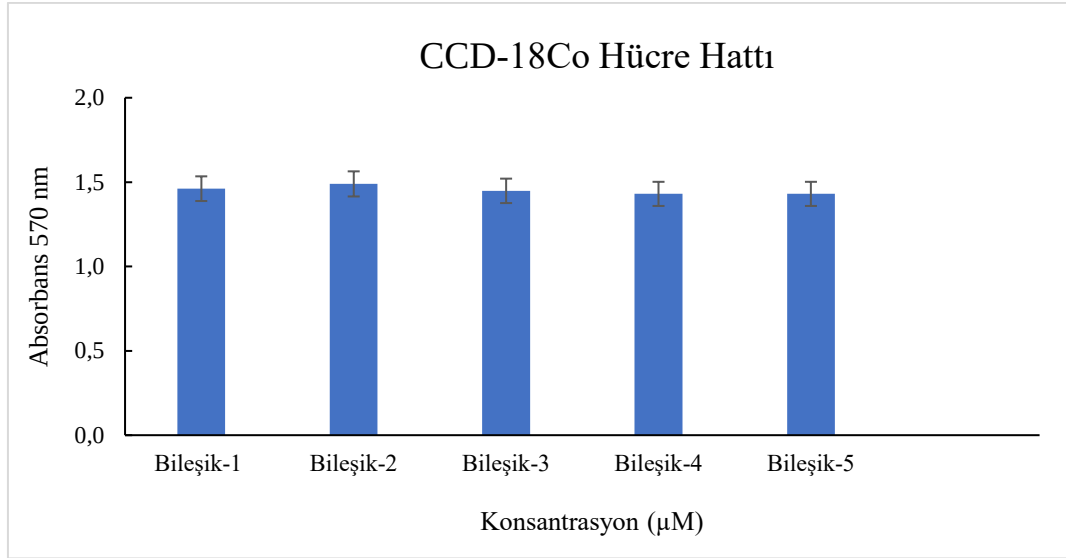
Hücre Hatları	Konsantrasyon (µM)	Bileşikler ID50 (µM) ± SE				
		B-1	B-2	B-3	B-4	B-5
HT-29	25	0,7374±0,3218	0,9321±0,4419		0,6538±0,0997	
		0,6498±0,3373	1,9500±0,1144			
	12,5	0,6427±0,2622	0,8221±0,4228		0,7678±0,2241	
		0,8801±0,2643	1,8280±0,1391			
	6,25	0,7569±0,3198	0,7078±0,4554		0,8090±0,1384	
		1,0389±0,2366	1,8040±0,1750			
DLD-1	25	1,2077±0,3011	1,5782±0,1231		0,7374±0,2716	
		0,6748±0,1926	1,3420±0,0664			
	12,5	0,7753±0,1824	1,2133±0,0887		0,6420±0,3049	
		0,8611±0,0475	1,3375±0,0150			
	6,25	0,9041±0,2152	1,1988±0,1451		0,7569±0,1633	
		0,8249±0,0808	1,3148±0,0298			
CCD-18Co	25	1,4858±0,0150	1,4968± 0,0315		1,4829±0,0344	
		1,4025±0,0069	1,3847±0,0448			
	12,5	1,4462±0,0298	1,4587±0,0479		1,4214±0,0197	
		1,3932±0,0506	1,3785±0,0178			
	6,25	1,4397± 0,0653	1,4712±0,0624	1,4402±0,0431	1,3298±	
		0,0304	1,3839±0,0159			



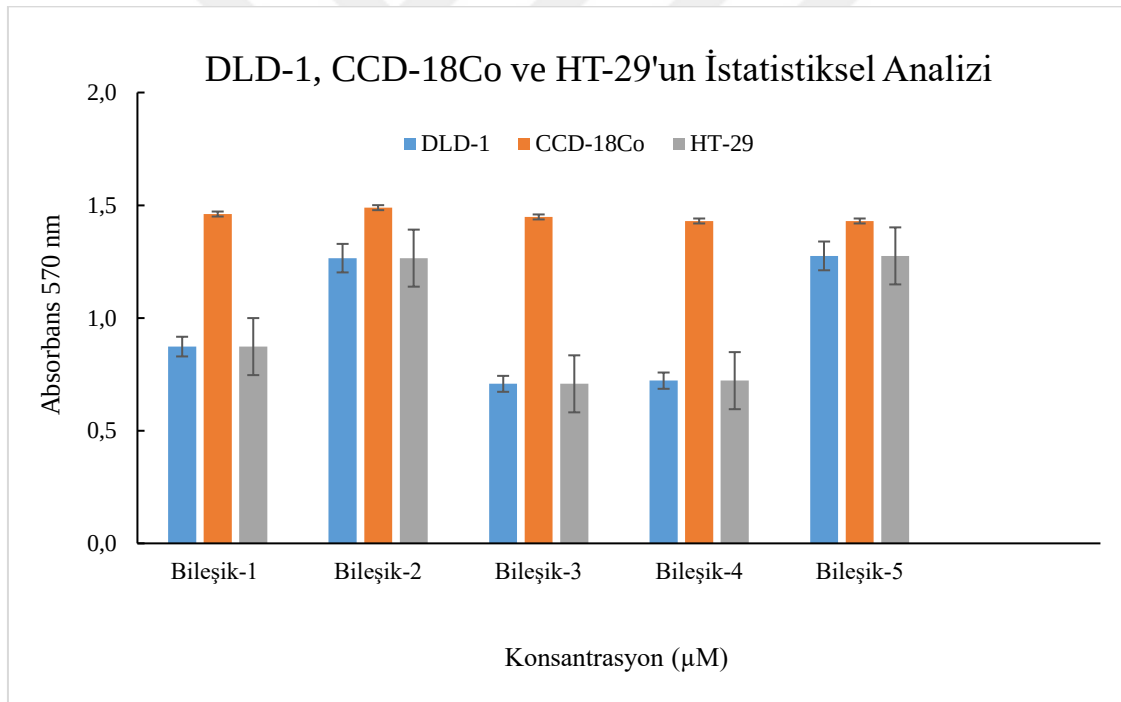
Şekil 4.24. DLD-1 hücre hattında bileşiklerin hücre canlılığının istatistik analizi



Şekil 4.25. HT-29 hücre hattında bileşiklerin hücre canlılığının istatistik analizi



Şekil 4.26. HT-29 hücre hattında bileşiklerin hücre canlılığının istatistik analizi



Şekil 4.27. DLD-1, CCD-18Co ve HT-29 hücre hatlarında bileşiklerin hücre canlılığının istatistiksel analizi

4.4. Moleküler analizler

4.4.1. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri

MTT analiz sonucundaki veriler dikkate alındığında DLD-1 hücre hattında Bileşik-1, Bileşik-2 ve Bileşik-3 için 12,5 µM, Bileşik-4 için 25 µM ve Bileşik-5 için 100 µM olarak; HT-29 hücre hattında Bileşik-1 için 12,5 µM, Bileşik-2 için 6,25 µM, Bileşik-3 ve Bileşik-4 için 25 µM ve Bileşik-5 için 100 µM olarak konsantrasyonları uygulanarak qRT-PCR analizleri çalışılmıştır. DLD-1 ve HT-29 kanser hücre hatlarından izole edilen RNA'ların saflığı ve konsantrasyonu nanodrop cihazı ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Nanodrop ile uygun konsantrasyonlarda (ng/µL) sulandırılan RNA örnekleri 260 ve 280 nm'de ölçülmüştür. RNA konsantrasyonu (µg/mL) = [OD (Optik yoğunluk) 260 x sulandırma oranı x 40 (µg/mL)] formülü aracılığıyla hesaplanmıştır. İzole edilen tek zincirli total RNA'lar 100 ng olacak şekilde hesaplanarak oligo d(T) primeri ve revers transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüştür.



Resim 4.1. Nanodrop cihazı ile RNA konsantrasyonu ölçümü

Çizelge 4.17. HT-29 hücre hattından izole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu

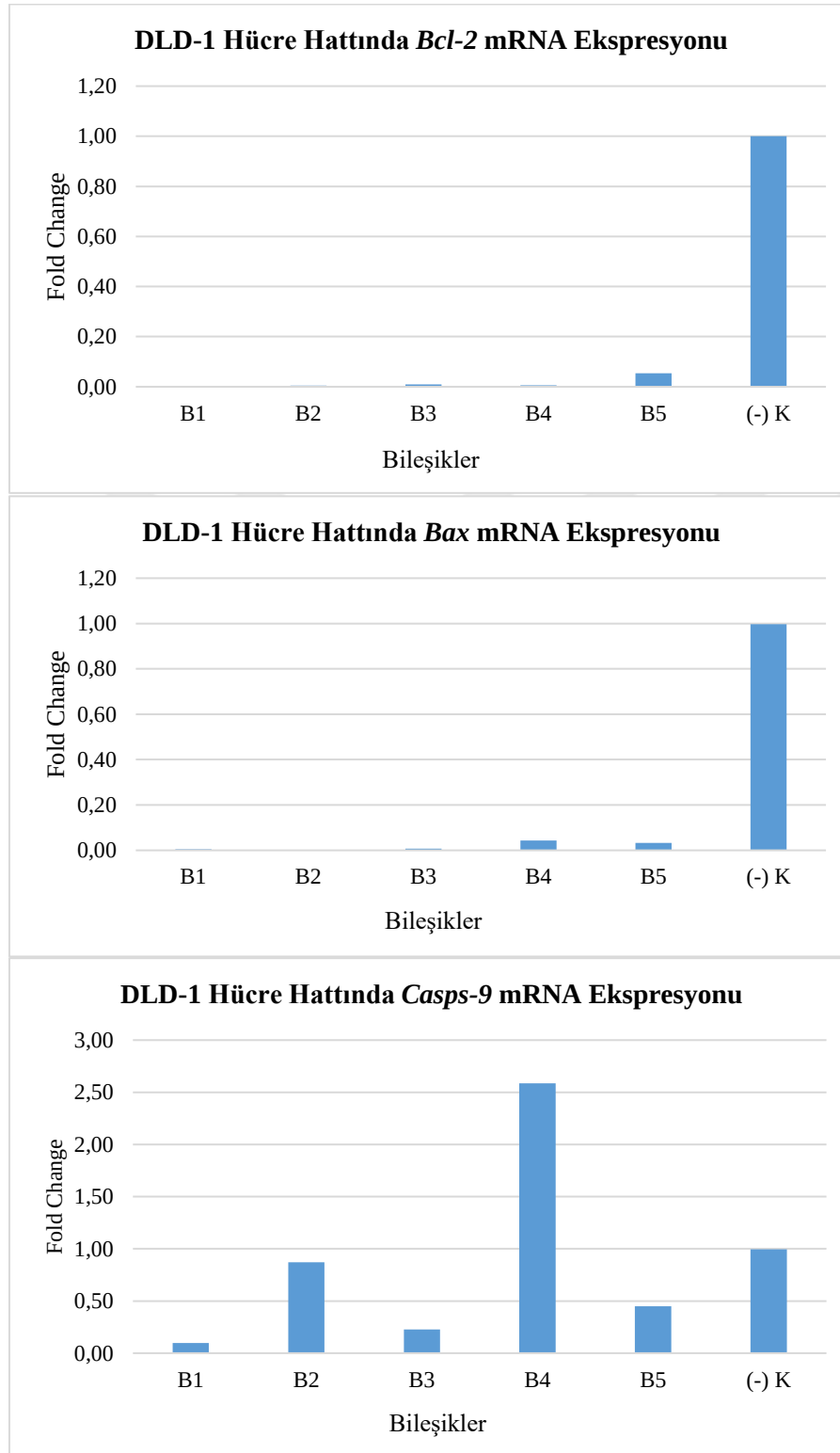
Bileşikler	ng/µL	260/280
Bileşik-1	1954	1,986
Bileşik-2	1525	1,993
Bileşik-3	1945	1,991
Bileşik-4	2146	1,984
Bileşik-5	1804	1,978
Negatif kontrol	2112	1,986

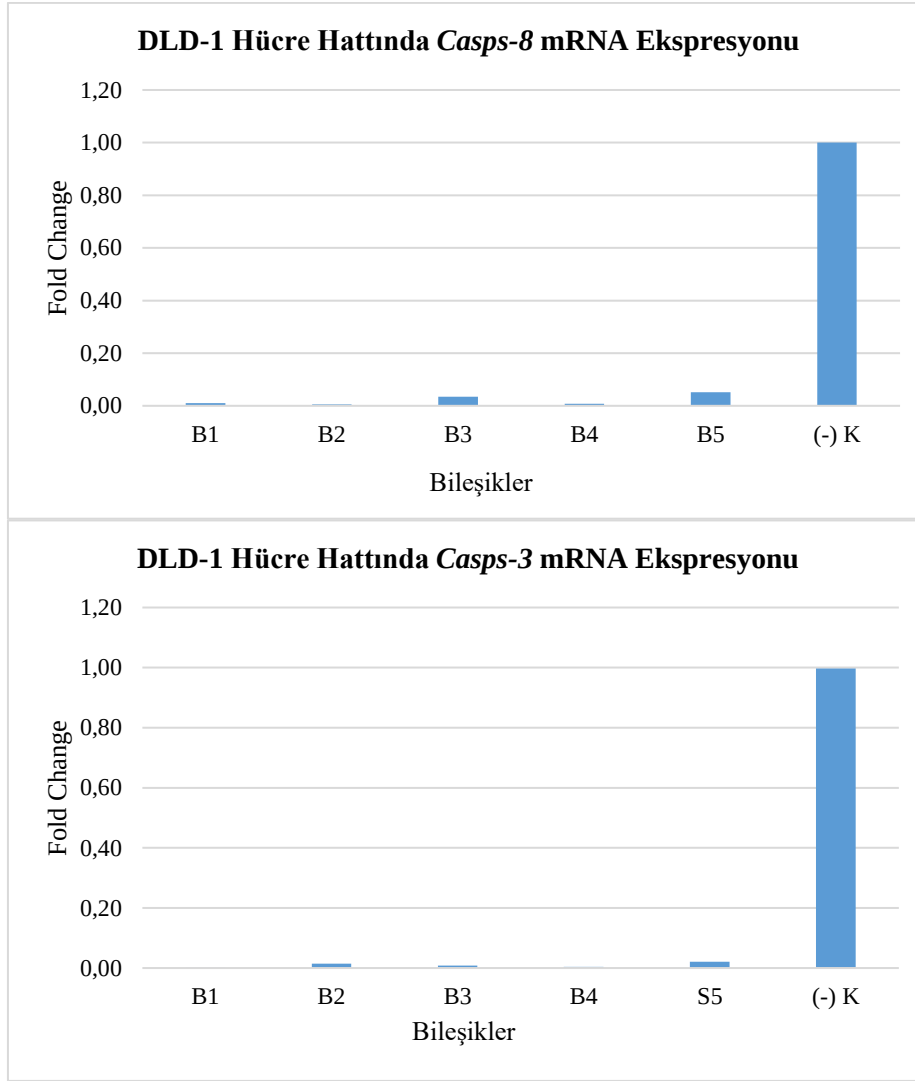
Çizelge 4.18. DLD-1 hücre hattından izole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu

Bileşikler	ng/ μ L	260/280
Bileşik-1	2269	1,828
Bileşik-2	2086	1,844
Bileşik-3	2125	1,841
Bileşik-4	1863	1,855
Bileşik-5	2003	1,854
Negatif kontrol	2458	1,816

Tek zincirli total RNA'lar elde edildikten sonra 100 ng olacak şekilde hesaplanmıştır. Kitteki enzimler kullanılarak tek zincirli total RNA'lardan cDNA'lar elde edilmiştir. DLD-1 ve HT-29 kanser hücre hatlarında, sülfonamid türevi bileşiklerin apoptotik sinyal yollarında önemli rol oynayan genlerin; *Bax*, *Bcl-2*, *Kaspaz-3*, *Kaspaz-8* ve *Kaspaz-9* mRNA ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. Beş bileşiğe ait mRNA gen ifadesindeki kat (fold) artışı ve azalışı Microsoft Excel programı kullanılarak elde edilmiştir.

DLD-1 hücre hattında apoptotik sinyal yolak genlerinin qRT-PZR sonuçları





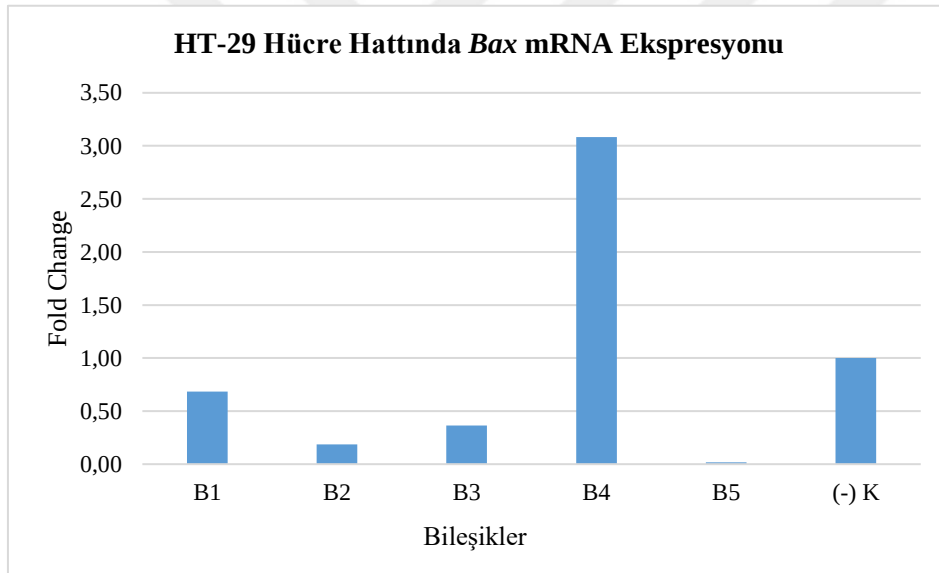
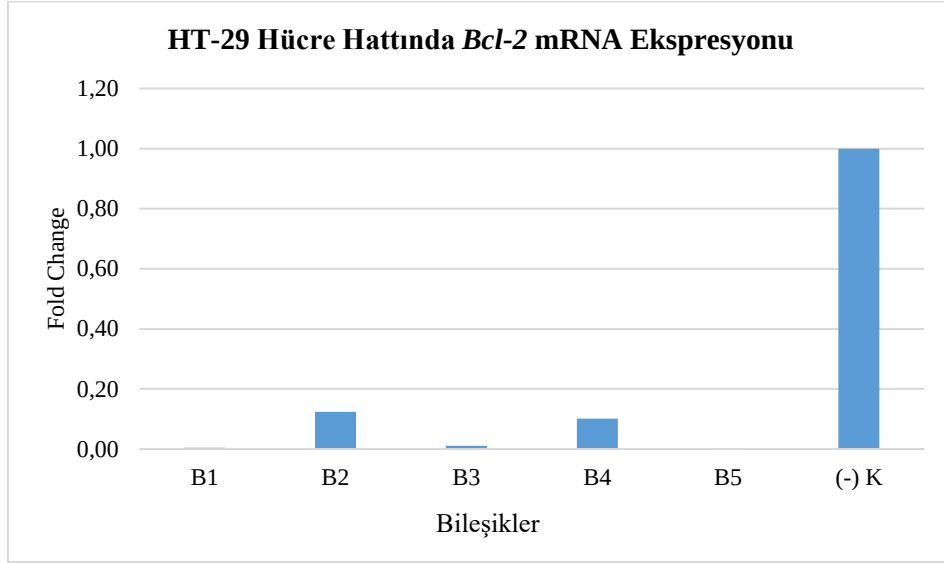
Şekil 4.28. Bileşiklerin DLD-1 hücre hattında apoptotik sinyal yollarının mRNA ekspresyonları

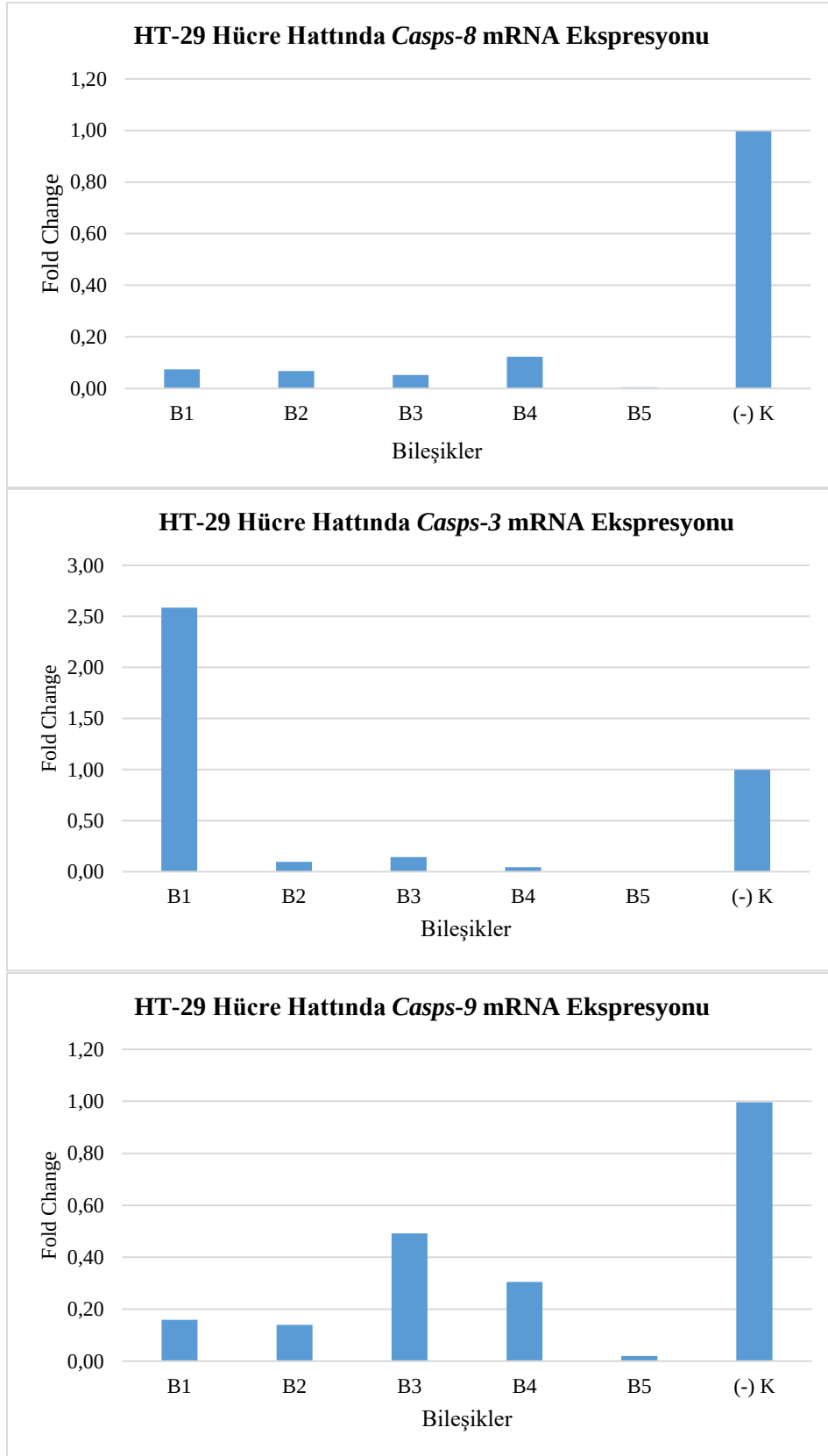
- Bileşik-1'in uygulandığı DLD-1 hücrelerinde; *Bax* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Bcl-2* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-3* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-8* gen ifadesinin 1 kat azaldığı ve *Kaspaz-9* gen ifadesinin 0,9 kat azaldığı tespit edilmiştir.
- Bileşik-2'nin uygulandığı DLD-1 hücrelerinde; *Bax* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Bcl-2* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-3* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-8* gen ifadesinin 1 kat azaldığı ve *Kaspaz-9* gen ifadesinin 0,2 kat azaldığı tespit edilmiştir.

- Bileşik-3'ün uygulandığı DLD-1 hücresinde; *Bax* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Bcl-2* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-3* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-8* gen ifadesinin 1 kat azaldığı ve *Kaspaz-9* gen ifadesinin 0,8 kat azaldığı tespit edilmiştir.
- Bileşik-4'ün uygulandığı DLD-1 hücresinde; *Bax* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Bcl-2* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-3* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-8* gen ifadesinin 1 kat azaldığı ve *Kaspaz-9* gen ifadesinin 2,5 kat arttığı tespit edilmiştir.
- Bileşik-5'in uygulandığı DLD-1 hücresinde; *Bax* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Bcl-2* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-3* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-8* gen ifadesinin 1 kat azaldığı ve *Kaspaz-9* gen ifadesinin 0,5 kat azaldığı tespit edilmiştir.

Bileşik-1, Bileşik-2, Bileşik-3, Bileşik-4 ve Bileşik-5 DLD-1 hücrelerinde apoptotik sinyal yollarında rol oynayan *Bax*, *Bcl-2*, *Kaspaz-3* ve *Kaspaz-8* gen ifadesini 1 kat azalttığı, *Kaspaz-9* gen ifadesinde ise sadece Bileşik-4'ün 2,5 kat arttırdığı tespit edilmiştir.

HT-29 hücre hattında apoptotik sinyal yolak genlerinin qRT-PZR sonuçları





Şekil 4.29. Bileşiklerin HT-29 hücre hattında apoptotik sinyal yollarının mRNA ekspresyonları

Bileşik-1'in uygulandığı HT-29 hücresinde; *Bax* gen ifadesinin 0,3 kat azaldığı, *Bcl-2* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-3* gen ifadesinin 2,5 kat arttığı, *Kaspaz-8* gen ifadesinin 1 kat azaldığı ve *Kaspaz-9* gen ifadesinin 0,9 kat azaldığı tespit edilmiştir.

Bileşik-2'nin uygulandığı HT-29 hücresinde; *Bax* gen ifadesinin 0,8 kat azaldığı, *Bcl-2* gen ifadesinin 0,9 kat azaldığı, *Kaspaz-3* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-8* gen ifadesinin 1 kat azaldığı ve *Kaspaz-9* gen ifadesinin 0,9 kat azaldığı tespit edilmiştir.

Bileşik-3'ün uygulandığı HT-29 hücresinde; *Bax* gen ifadesinin 0,7 kat azaldığı, *Bcl-2* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-3* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-8* gen ifadesinin 1 kat azaldığı ve *Kaspaz-9* gen ifadesinin 0,5 kat azaldığı tespit edilmiştir.

Bileşik-4'ün uygulandığı HT-29 hücresinde; *Bax* gen ifadesinin 3 kat arttığı, *Bcl-2* gen ifadesinin 0,9 kat azaldığı, *Kaspaz-3* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-8* gen ifadesinin 1 kat azaldığı ve *Kaspaz-9* gen ifadesinin 0,7 kat azaldığı tespit edilmiştir.

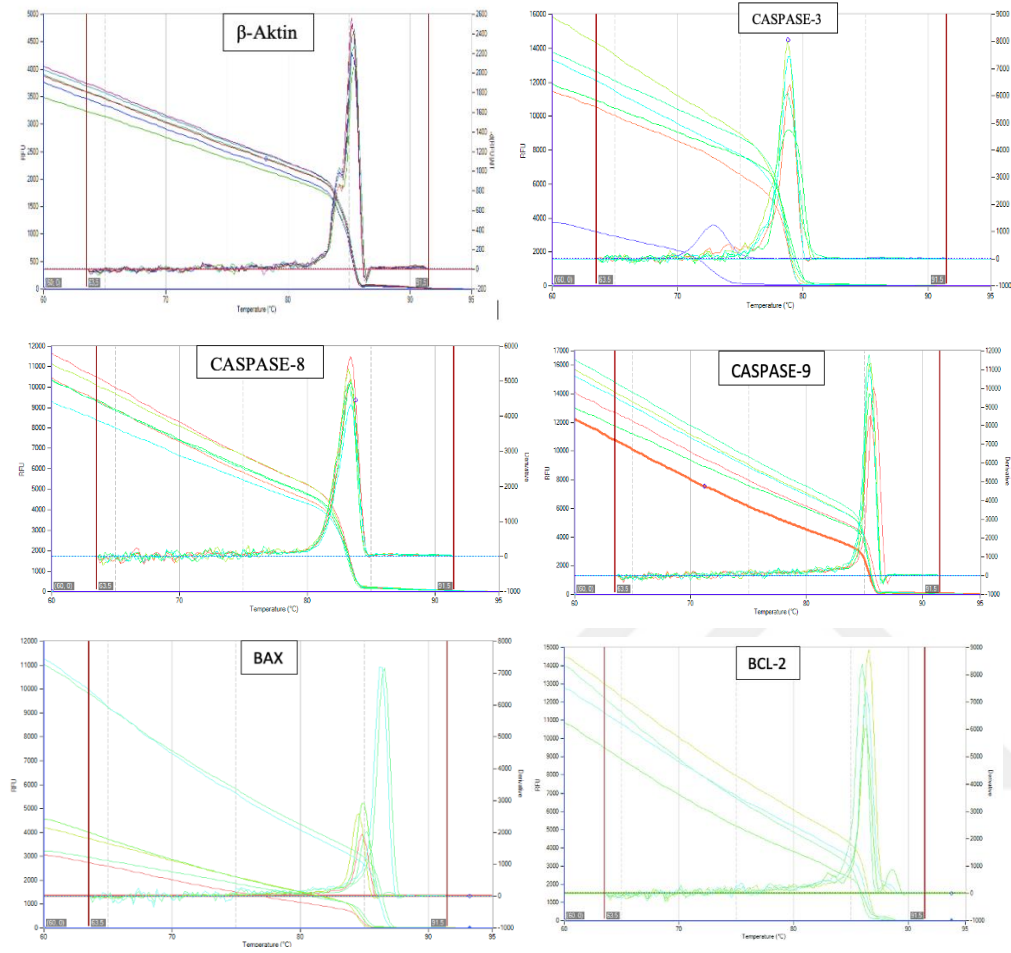
Bileşik-5'in uygulandığı HT-29 hücresinde; *Bax* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Bcl-2* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-3* gen ifadesinin 1 kat azaldığı, *Kaspaz-8* gen ifadesinin 1 kat azaldığı ve *Kaspaz-9* gen ifadesinin 1 kat azaldığı tespit edilmiştir.

HT-29 hücre hattında *Bax* gen ifadesinde bileşik-4'te 3 kat artış olmakla birlikte, diğer bileşiklerde azalış görülürken *Bcl-2* gen ifadesinde tüm bileşiklerde anlamlı bir azalış görülmektedir. *Kaspaz-3* gen ifadesinde sadece bileşik-1'de 2,5 kat artış görülürken, diğer bileşiklerde 1 kat azalış görülmüştür. *Kaspaz-8* gen ifadesinde tüm bileşiklerde 1 kat azalış tespit edilmiştir. *Kaspaz-9* gen ifadesinde bileşik-1 ve bileşik-2 0,9 kat, bileşik-3 0,5 kat, bileşik-4 0,7 kat ve bileşik-5 1 kat azalış göstermiştir. Elde edilen verilere göre tüm sonuçlar birbiriyle uyumludur.

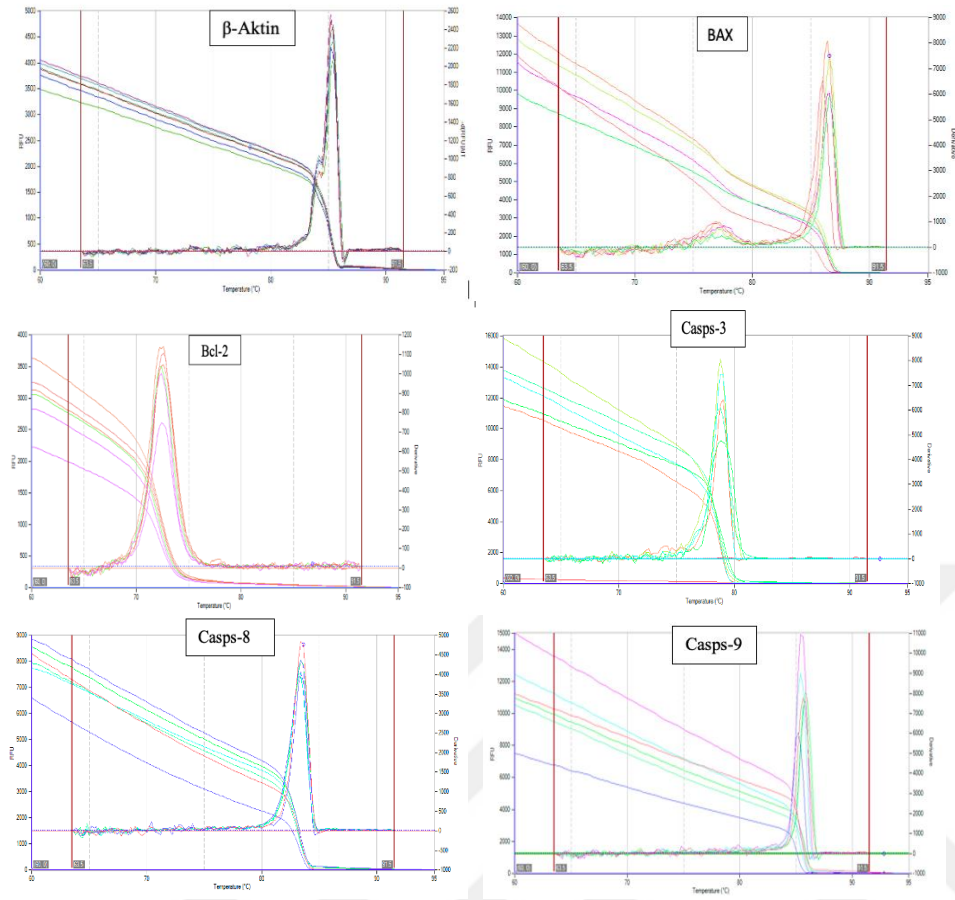
DLD-1 ve HT-29 hücre hattında apoptotik sinyal yolak genlerinin qRT-PZR sonuçları karşılaştırıldığında;

Bax gen ifadesinde HT-29 hücre hattında bileşik-4'te artış görülürken, DLD-1 hücre hattında tüm bileşiklerde azalış görülmüştür. *Bcl-2* gen ifadesinde her iki hücre hattında da 1 kat azalış görülmektedir. DLD-1 hücresi, HT-29 hücre hattına göre *Kaspaz-3* ve *Kaspaz-8* gen ifadelerini daha çok azaltmıştır. *Kaspaz-9* gen ifadesi HT-29 hücre hattında tüm bileşiklerde azalış gösterirken, DLD-1 hücre hattında bileşik-4'te 2,5 kat artış göstermiştir. Tüm gen

ifadelerinde HT-29 hücre hattı, DLD-1 hücre hattındaki sonuçlara göre daha anlamlı bir sonuç vermiştir.

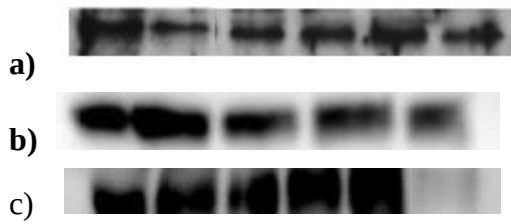


Şekil 4.30. HT-29 hücre hattında gen bölgelerine ait erime eğrisi analizi

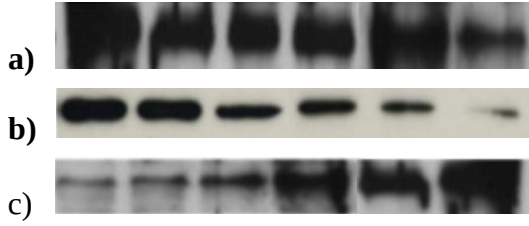


Şekil 4.31. DLD-1 hücre hattında gen bölgelerine ait erime eğrisi analizi

4.4.2. Western Blot analizi



Şekil 4.32. HT-29 hücre hattında Western Blot analiz sonuçları a) β -Aktin (43 kDa) b) p38/MAPK (50 kDa) c) ERK1 (44 kDa) (Sırasıyla, Bileşik-1, Bileşik-2, Bileşik-3, Bileşik-4, Bileşik-5 ve Kontrol grubu)

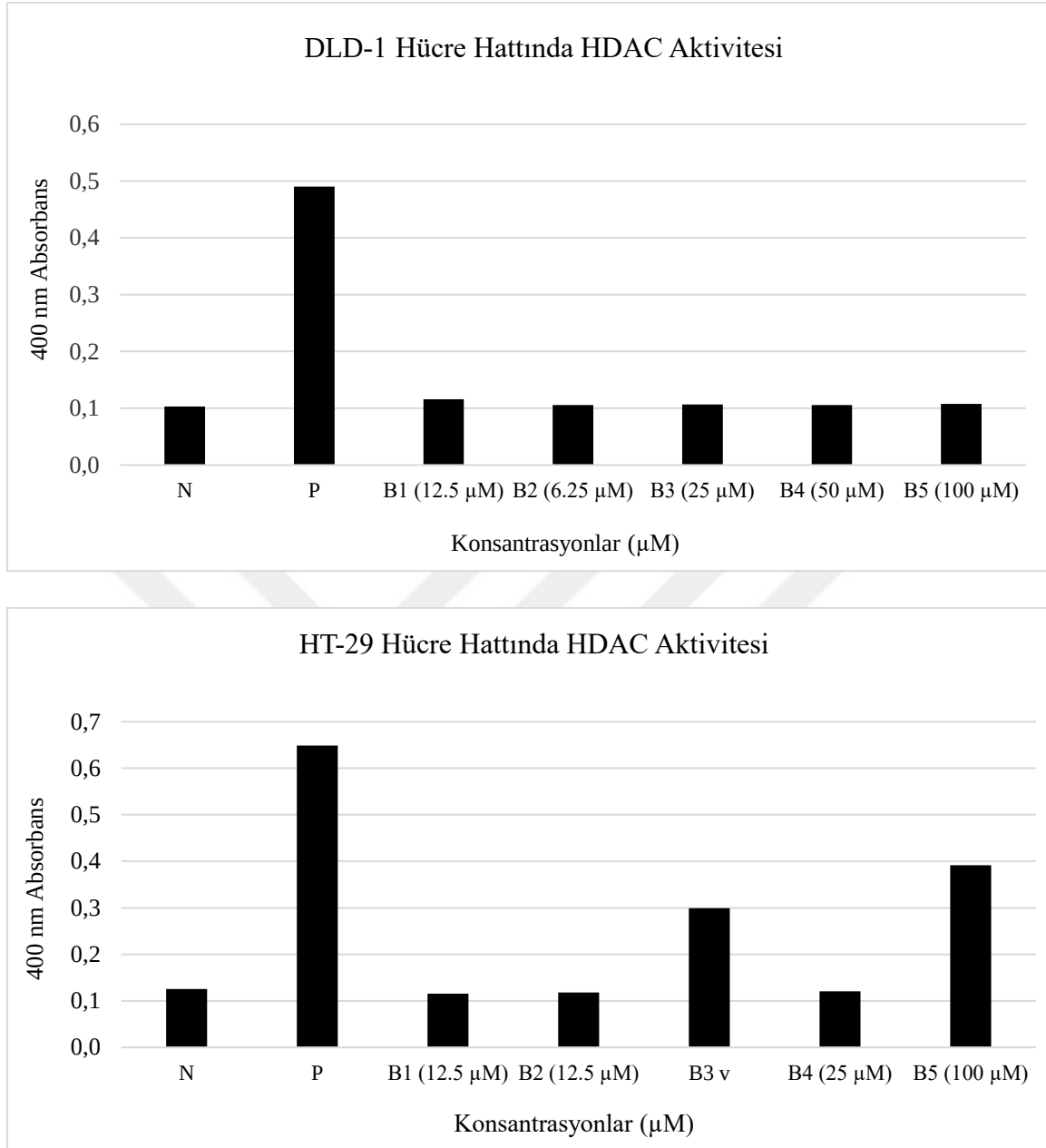


Şekil 4.33. DLD-1 hücre hattında Western Blot analiz sonuçları a) β -Aktin (43 kDa) b) p38/MAPK (50 kDa) c) ERK1 (44 kDa) (Sırasıyla, Bileşik-1, Bileşik-2, Bileşik-3, Bileşik-4, Bileşik-5 ve Kontrol grubu)

Western Blot analizi, sülfonamid türevi bileşikler ile muamele edilen HT-29 ve DLD-1 hücre hatlarında p38/MAPK ve ERK1 proteinlerinin (100 ng) ifadesindeki değişimin gözlemlenmesi amaçlanarak yapılmıştır. Housekeeping olarak kullanılan β -aktinin hem farklı konsantrasyonlarda bileşiklerin uygulandığı hücrelerde hem de kontrol hücresinde ifade edildiği görülmüştür. Kontrol grubu, seçilen artan dozlarda (6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M ve 100 μ M) bileşiklerin uygulandığı hücreler ile karşılaştırıldığında HT-29 hücre hatında p38/MAPK protein ifadesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Ancak DLD-1 hücre hattında ise anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. HT-29 ve DLD-1 hücre hatlarında ERK-1 protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır.

4.4.3. HDAC aktivite analiz sonuçları

Evrensel HDAC aktivitesi, kolorimetrik HDAC aktivite analiz kiti kullanılarak tespit edilmiştir. HDAC aktivite analiz sonuçları negatif kontrol ile karşılaştırıldığında; DLD-1 hücre hattında bileşiklerin (B1-5) HDAC aktivitesi görülmezken, HT-29 hücre hattında Bileşik-3 ve Bileşik-5'in HDAC aktivite artışı gösterdiği bulunmuştur.



Şekil 4.34. DLD-1 ve HT-29 HDAC aktivite analiz sonuçları

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Deneysel çalışmamızın amacı; dünya genelinde en sık karşılaşılan kanser tipi olan kolorektal kanserine karşı antikanser potansiyelinin yüksek olabileceğini düşündüğümüz sülfonamid türevi bileşiklerin etkilerini araştırmaktır. Hücre kültürü, deney hayvanlarının kullanıldığı yöntemlere göre etik kurul zorunluluğu olmayan ayrıca kullanılan maddenin etkisinin kısa zamanda ve direkt olarak test edilmesini sağladığı için dünya çapında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu *in vitro* çalışmada HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma) ve DLD-1 (insan kolon adenokarsinoma) kanser hücre hatları üzerine sülfonamid türevi bileşiklerin; MTT yöntemiyle sitotoksik etkileri, Real-time PCR yöntemi ile apoptotik hücre ölümü, Western Blot yöntemi ile protein analizleri ve HDAC aktivite analizleri gerçekleştirildi.

Çalışmada kullanılan bileşiklerin çeşitli kanser türleri ile ilgili çalışmalara ait literatür bilgileri aşağıda kapsamlı olarak verilmiştir.

Literatür araştırmasında birçok sülfonamid türevi bileşikler ile çalışmaların mevcut olduğu görülmüştür. Bu bileşikler ile birçok kanser hücresinde antikanser aktivite (sitotoksikite, gen ekspresyonu ve apoptotik sinyal yolları) çalışmaları yapılmıştır. sülfonamid türevi bileşiklerin kanser hücreleri üzerine etkisi kapsamında yapılan çalışmalar, araştırmacılar tarafından uzun yıllardır ön planda tutulmaktadır.

G. Hu ve arkadaşları tarafından; yeni bir dizi florokinolon C-3 heterosiklik (IV), yani s-triazol Schiff 27(a-k) ve ofloksasinin mannich baz türevleri sentezlenmiş ve bir murin lösemi hücre hattına (L1210) karşı *in vitro* antitümör aktivitesi değerlendirilmiştir. Bir insan lökositoma hücre hattı (HL60) ve bir Çin hamsteri yumurtalık hücre hattı (CHO) üzerine MTT analizi yapılmış ve sonuçlardan serbest fenol grubu içeren bazı bileşiklerin diğer test bileşiklerinden daha güçlü aktivite sergilediği sonucuna varılmıştır (G. Hu ve diğerleri, 2012).

2021 yılında histon deasetilaz inhibitörü kullanılarak yapılan bir çalışmada, MCF-7, DU154 ve VERO hücre hatlarıyla MTT deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu deney sonucunda, çoğu HDACi bileşiklerin MCF-7 hücre hattı proliferasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiği ve sağlıklı hücre olarak kullanılan VERO hücrelerine zarar vermediği gözlemlenmiştir ve bu

durum deneyde kullanılan bileşiklerin güvenli kullanımı olduğunu göstermektedir (Zhao ve diğerleri, 2021).

Ghorab ve arkadaşları, sulfonamid bileşiklerin insan rahim ağzı kanseri (HeLa), insan hepatoselüler karsinoma (HepG2), insan medulloblastomu (Daoy) ve insan kolon kanseri (HT-29) hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteleri MTT analizi kullanılarak değerlendirilmiş ve en aktif bileşikler için IC_{50} değerinin yanı sıra tüm bileşikler için büyüme inhibisyon yüzdeleri belirlenmiştir. HeLa, HepG2 ve Daoy hücrelerinde %50'nin üzerinde, ancak HT-29 hücreleri için %50'nin altında büyüme inhibisyonu gösterdiği saptanmıştır (Ghorab ve diğerleri, 2016).

2014'te Cumaoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sulfonamid türevi bileşiklerinin etkisini test etmek için MTT analizi kullanılmıştır. 24 saat boyunca bileşiklerle muamele edilen MCF-7, HEPG2 ve Colo-205 hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığını belirlemişlerdir (Cumaoğlu ve diğerleri, 2014).

Yeni sentezlenmiş pirol türevleri ile ilgili Bavadi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; MTT analizi kullanılarak MCF-7, MOLT-4 ve HL-60 dahil olmak üzere üç insan kanser hücre hattına karşı antikanser aktivite olarak biyolojik özellikler açısından taranmıştır. Hedef bileşiklerin (25, 50, 100 ve 200 mM) farklı konsantrasyonları hücrelerle tedavi edilmek üzere seçilmiş ve referans ilaç olarak cisplatin kullanılmıştır. Test edilen pirol bileşiklerinin sonuçları, test edilen kanser hücre hatlarına karşı geniş bir hücre büyümesini inhibe edici aktivite yelpazesi sergilediği gözlemlenmiştir. Bileşikler arasında, sülfonamid kısmında morfolin halkasına sahip bileşik-1a, MCF-7, MOLT-4 ve HL-60 için sırasıyla 39.0, 25.5 ve 30.6 mM IC_{50} değerleri ile test edilmiş hücre hatlarına karşı iyi inhibitör aktivite sergilediği bulunmuştur. Morfolin halkasının (Bileşik-1a'da) sülfonamid parçasında fenil halkasıyla (Bileşik-1b) değiştirilmesi, inhibitör aktivite kaybına yol açtığı görülmüştür. Bileşik-1c'de klorun sülfonamide eklenmesi daha iyi inhibitör aktivite sağladığı bulunmuştur. Buna karşılık, pirol halkasının 4-pozisyonunda 1,3-dimetil barbitürik asit grubunun (Bileşik-1c) barbitürik asit grubuyla (Bileşik-1d) değiştirilmesi, inhibitör aktiviteyi etkilememiştir. Bileşik-1f'nin IC_{50} değerinin bileşik-1e ile karşılaştırılması, kloro grubunun sülfonamid 4-fenil halkasına eklenmesinin sitotoksik etkiyi iyileştirebileceğini gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, sülfonamid parçasında ve pirol halkasının 4-pozisyonunda morfolin ve kumarin gruplarına sahip olan bileşik-1h, bileşik-1g ile karşılaştırıldığında hedef hücre hatlarında

inhibe edici aktivite sergilediği gözlemlenmiştir. Bu çalışma morfolin halkasının sülfonamid parçasına eklenmesinin daha iyi antikanser aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Bavadi ve diğerleri, 2017).

2011’de Mirian ve arkadaşlarının, HeLa ve MCF-7 hücre hattında test edilmiş sülfonamidler 100-1000 mM konsantrasyon aralığında sitotoksik etki göstermiş ve hücre canlılığını %50 düşürdüğü görülmüştür. 10-1000 mM konsantrasyon aralığında test edilen sülfonamid türevli bileşiklerin sitotoksik olduğu saptanmıştır ve IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Bu sonuçlarla uyumlu olarak, diğer araştırmacılar, sülfonamidlerin ve siklooksijenaz inhibe edici bileşiklerin hepatosellüler karsinom, serviks ve akciğer kanserine karşı önemli sitotoksik etki göstermediğini, ancak meme, kolorektal ve mesane kanserlerinden gelen hücrelere karşı çok daha etkili olduklarını göstermiştir (Mirian ve diğerleri, 2011).

Bonakdar ve arkadaşları, üç kalkon sülfonil klorürlerin reaksiyonundan sonra antikanser aktivite göstermesi beklenen test bileşiklerinin, Tamoxifen'den daha az antikanser aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Sonuç olarak, kalkon sülfonil klorürlerin farklı aromatik süstitüe aminlerle K_2CO_3 varlığında solventsiz koşullarda oda sıcaklığında reaksiyonu ile bir dizi yeni kalkon sülfonamid türevi sentezlemişler ve yeni sentezlenen tüm bileşiklerin MCF-7'ye karşı antikanser aktivite etkisini test etmişlerdir ve elde edilen sonuçlara göre bileşik 4'ün en güçlü antikanser aktivite sergilediğini saptamışlardır (Bonakdar ve diğerleri, 2017).

İndol sülfonamidler ile ilgili 2006 yılında yapılan çalışmada bileşik 1-5'in insan rahim ağzı kanseri (HeLa) hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri farklı konsantrasyonlarda (0,1 ila 20 μM) değerlendirilmiştir. Tüm indol sülfonamid bileşiklerin, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Proliferasyonun yarı maksimum inhibisyonu (IC_{50}) 6 ila 17 μM arasında değiştiği analiz edilmiştir (Mohan ve diğerleri, 2006).

Çalışmamızda kullandığımız DLD-1 ve HT-29 hücre hatlarında sülfonamid türevi bileşiklerin (Bileşik 1,2,3,4) sitotoksik etki gösterdiği ve hücre canlılığını %50 düşürdüğü ilk kez saptanmıştır. Bu bileşikler kanser hücre hatlarında etkili bir inhibisyon gösterirken, sağlıklı hücre olarak kullandığımız CCD-18Co hücre hattına etki etmemiştir. HT-29 hücre hattı için bileşiklerin sitotoksik etkisi farklılık göstermiştir. Bileşik-5 haricinde diğer bileşiklerimiz HT-29 hücre hattında %50'nin altında büyüme inhibisyonu göstermiştir.

2018 yılında yeni quinazoline türevi sülfonamid bileşikler (3D) ile yapılan çalışmada, bu bileşiklerin p53 ve BAX gibi proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu indüklediği bulunmuştur. Bununla birlikte, insan kolorektal adenokarsinomu (HT-29) ve metastatik kolorektal hücrelerinde (CRC) *Bcl-2* ve *Bcl-xL* ekspresyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Bu nedenle, *Bax* ekspresyonunun indüklenmesi, *Bcl-2* ve *Bcl-xL* ekspresyonunun inhibisyonu, yeni quinazoline türevi sülfonamid bileşikler ile indüklenen apoptoz için bir temel sağlamıştır. *Bax* aktivasyonunda indüksiyon, VDAC kanalının açılmasına ve böylece sitokrom-c'nin salınmasına yol açtığı görülmüştür. Mitokondriden sitozole sitokrom-c salınımının arttırdığı bulunmuştur ve bunun sonucunda kaspazlar aktive olmuştur. Ayrıca çalışmanın bulgularında ROS'a bağlı apoptozun indüklenmesi, yeni quinazoline türevi sülfonamid bileşiklerin potansiyel bir antikanser ajanı olduğunu öngörmüşlerdir (Obeed ve diğerleri, 2018).

Sülfonamid karbonik anhidraz inhibitörleri ile yapılan çalışmada; bileşik verildikten sonra apoptotik yolda yer alan ekspresyon genlerinde (*Kaspaz 3, 8, 9, 12* ve *Bax*) artış ve *Bcl-2*'de azalma olması apoptotik mekanizmaların ve hem iç hem de dış apoptotik yolların tetiklendiğini göstermiştir. Ayrıca bileşiklerin neden olduğu artan NRF-2 gen ekspresyonu, ROS seviyeleri ile koreledir ve HeLa hücrelerinde artan ROS yoluyla anti-kanser aktivitelerine sahiptir (Koyuncu ve diğerleri, 2019).

2015'te proapoptotik gen ifadelerinde önemli bir artış ile ilişkili bileşiklerle 12 ve 24 saatlik tedaviye yanıt olarak hücre canlılığında azalma görülmüştür. *Kaspaz-3* mRNA ekspresyonu, üç farklı tipte kanser hücre hattında test edilen bileşiklerle 12 saatlik tedaviyi takiben arttığı gözlemlenmiştir. Özellikle MCF-7 hücrelerinde kaspazda artan mRNA seviyeleri, test edilen tüm bileşiklerle 24 saatlik tedaviden sonra ölçülmüştür. 12 saat boyunca bileşik 1 ve bileşik 2 MCF-7 ve HEPG2 hücre dizilerinde *Kaspaz-9* mRNA ekspresyonlarını aktive ederek apoptozu indükleyebileceği görülmüştür. Bunlara ek olarak, bileşik 1 ve bileşik 2 ile 24 saatlik tedavileri takiben MCF-7 hücre hattında *Kaspaz-9* mRNA ifadesinin arttığı görülmüştür. Kanser hücrelerinde apoptoz sinyal aktivasyonunun bulunmasına dayanarak, proapoptotik gen ekspresyonunun aktivasyonunda MAPK yolunun aktivasyonu tespit edilmiştir. ERK fosforilasyonu, test edilen tüm bileşiklerle 12 saatlik tedaviden sonra Colo-205 hücre hattında belirgin bir şekilde gösterilmiştir (Cumaoglu ve diğerleri, 2015).

Tülüce ve arkadaşları, HT-29 insan kolorektal hücre hattını, apoptotik, canlı ve ölü hücrelerin durumunu göstermek için 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda sülfonamid türevi bileşik (H-4i) ile muamele etmişlerdir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, apoptoz değerinin H-4i ile orantılı olarak arttığı analiz edilmiştir. Sonuçlar negatif kontrole göre kıyaslandığında, hücreler H-4i ile muamele edildiğinde bir dizi apoptotik etki gözlenmiştir (Tülüce ve diğerleri, 2018).

Cumaoğlu ve arkadaşları, kanser hücrelerinde apoptoz sinyal aktivasyonunun bulunmasına dayanarak, proapoptotik gen ekspresyonunun aktivasyonunda hangi sinyal yolunun yer aldığı ile ilgili çalışmalarında MAPK yolunun aktivasyonunu tespit etmişlerdir. ERK'nin fosforilasyonu, test edilen tüm bileşiklerle 12 saatlik tedaviden sonra Colo-205 hücre hattında belirgin bir şekilde analiz edilmiştir. Test edilen tüm bileşiklerle 12 saatlik tedaviden sonra Colo-205 hücre hattında *Kaspaz-3* aracılı apoptozun aktivasyonu, ERK fosforilasyonunun aktivasyonu ile düzenlenebileceği saptanmıştır. p38 MAPK'nın aktivasyonu, test edilen tüm bileşiklerle 12 saatlik muamelenin ardından HEPG2 ve Colo-205 hücre hatlarında ölçülmüştür. Test edilen tüm sülfonamid türevi bileşiklerde, farklı kanser hücre dizilerinde antiproliferatif etkilere sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Sülfonamid bileşikler, proapoptotik genlerin mRNA ekspresyonunu indükleyebilir (*Kaspaz-3*, *Kaspaz-8* ve *Kaspaz-9*) ve çeşitli malignitelerin tedavisi için kanser önleyici maddeler olarak orta düzeyde etkinlik gösterebileceği düşünülmektedir (Cumaoğlu ve diğerleri, 2014).

2022 yılında yapılan bir çalışmada, sülfonamid türevi bileşiklerin çeşitli dozları ve MCF-7 hücre hattı kullanılarak Bax ve Bcl-2 aktivitesi ölçülmüştür. Bax için; bileşik 4d (1.7, 2, 2.4 kat) ve bileşik 4f'nin (1.2, 1.4 ve 1.6 kat) artış gösterdiğini bulmuşlardır. Bcl-2 ekspresyonu için, bileşik 4d'nin 0.88, 0.68 0.49 kat, bileşik 4f'nin 0.92, 0.68 ve 0.62 kat aşağı regüle edildiği bulunmuştur. Sonuçlar hem bileşik 4d hem de bileşik 4f'nin kaspaz 7'nin ekspresyonunda bileşik uygulanmamış MCF-7 hücrelerine göre (1.13-, 1.35- ve 1.58 kat) önemli bir artışa neden olduğunu ortaya koymuştur (Alqahtani ve diğerleri, 2022).

Yaptığımız tez çalışmasında apoptoz ile ilişkili, *Bax*, *Bcl-2*, *Kaspaz-3*, *Kaspaz-8* ve *Kaspaz-9* genlerin ifadeleri ilk kez analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar β -Aktin ile karşılaştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler değerlendirildiğinde; DLD-1 ve HT-29 hücre hatlarında, genel olarak bileşiklerin apoptozu indüklediği, hücre tamir mekanizmalarını engelleyici özellikleri olabileceği belirlendi. *Bax* gen ifadesinde HT-29 hücre hattında

bileşik-4'te artış görülürken, DLD-1 hücre hattında tüm bileşiklerde azalış görülmüştür. *Bcl-2* gen ifadesinde her iki hücre hattında da 1 kat azalış görülmektedir. DLD-1 hücresi, HT-29 hücre hattına göre *Kaspaz-3* ve *Kaspaz-8* gen ifadelerini daha çok azaltmıştır. *Kaspaz-9* gen ifadesi HT-29 hücre hattında tüm bileşiklerde azalış gösterirken, DLD-1 hücre hattında bileşik-4'te 2,5 kat artış göstermiştir. Tüm gen ifadelerinde HT-29 hücre hattı, DLD-1 hücre hattındaki sonuçlara göre daha anlamlı bir sonuç göstermiştir.

G1/S geçişi sırasında hücre döngüsü ilerlemesindeki E7070 aracılı bozuklukların mekanizmasını aydınlatmak için Fukuoka ve arkadaşları, Western blot ile E7070'in pRb'nin fosforilasyon durumu, A549 ve A549/ER hücrelerindeki ekspresyon seviyesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. E7070'in p21 ve p53 ekspresyonlarının seviyelerini de etkileyip etkilemediğini belirlemek için, Western blot analizi ile A549 ve A549/ER hücrelerinde E7070'in p21 ve p53 protein seviyeleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. 5 veya 20 ug/ml'de E7070'e 72 saat maruz kaldıktan sonra, p21 ve p53 proteinlerinin seviyeleri, A549 hücrelerinde E7070 tedavisi ile yukarı regüle edilmiş ancak A549/ER hücrelerinde bir sonuç bulamamışlardır. Bu bulgular, hiperfosforile pRb E7070 tedavisindeki nispi azalmaya, p21 ve p53 ekspresyonlarının indüklenmesi yoluyla aracılık edilebileceğini göstermektedir (Fukuoka ve diğerleri, 2001).

Mohan ve arkadaşlarının indol sülfonamidler ile yaptığı Western Blot analizinde apoptotik yolun dahil olduğu öne sürülerek *Bcl-2* fosforilasyonunda bir artış görülmüştür. BCL-2 ailesinin bazı üyeleri (*Bax* ve *Bad*) apoptozu teşvik ederken, diğerleri (*Bcl-2* ve *Bcl-xl*) hücrenin hayatta kalmasını teşvik ederek apoptotik düzenlemede kilit bir rol oynadığı analiz edilmiştir. BCL-2 ailesi üyeleri arasındaki rekabetçi dimerizasyon, nükleer parçalanmaya ve hücre ölümüne yol açan kaspazların aktivasyonunu düzenlemiştir, örneğin; *Bcl-2* ve *Bax*'ın heterodimerizasyonu, *Bakx* aracılı apoptozu önleyerek *Bcl-2* işlevini fosforilasyon yoluyla düzenlendiği bulunmuştur (Mohan ve diğerleri, 2006).

2021 yılında yapılan çalışmada, hipoksi altında betulin sülfonamid bileşiklerle tedaviden sonra meme kanseri hücre hatları HS578T, MDA-MB-231 ve MCF-7'de HIF-1 α , CA IX ve CA XII protein seviyelerini araştırmak için Western blot analizi gerçekleştirilmiş ve her üç hücre hattında da HIF-1 α 'nın protein seviyelerinde değişiklik görülmemiştir. 24 saatlik süreden sonra betulin sülfonamidlerin CA IX ve CA XII protein seviyelerinin, hücre hattına bağlı olarak farklı şekilde etkilendiği gözlemlenmiştir (Güttler ve diğerleri, 2021).

Yaptığımız çalışmada Western Blot analizi kullanılarak, sülfonamid türevi bileşikler ile muamele edilen HT-29 ve DLD-1 hücre hatlarında p38/MAPK ve ERK1 proteinlerinin ifadesi ilk kez belirlenmiştir. Housekeeping olarak kullanılan β -aktinin farklı konsantrasyonlarda bileşiklerin uygulandığı hücrelerde ve kontrol hücresinde ifade edildiği görülmüştür. Kontrol grubu, farklı dozlarda bileşiklerin uygulandığı hücreler ile karşılaştırıldığında sadece HT-29 hücre hatında p38/MAPK protein ifadesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$).

2016'da MDA-MB-231 hücrelerinde histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi) ile yapılan çalışmada, HDACi'lerin hücre döngüsünü ve mitokondriyal ilişkili apoptoz yoluyla *in vitro* proliferasyonu önemli ölçüde baskılayabildiği gösterilmiştir. (Wang ve diğerleri, 2016).

2019 yılında yapılan bir çalışmada hem farmakolojik hem de genetik yöntemler kullanarak, Sınıf I HDAC 1 ve 2'nin inhibisyonunun, MEK veya BCL-2 inhibisyonu ile birlikte apoptozu indüklemek için yeterli olduğu belirlenmiştir. Spesifik HDAC1+2 inhibisyonunun lenfoid hücre dizilerinde apoptozu teşvik ettiği ve HDAC inhibitörleri ile indüklenen apoptozun HDAC sınıf I inhibisyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir (Ramakrishnan ve diğerleri, 2019).

Manna ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; yüksek E2 seviyeleri ile birlikte StAR proteininin yüksek ekspresyonu ile sağkalımını etkileyen ER + meme kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir mekanizma olduğu belirtilmiştir. Buna göre StAR'ın mitokondriye anormal kolesterol iletimi, androjen öncülerinin yeterli miktarı ve dolayısıyla meme tümörjenezini teşvik etmede E2 ile sonuçlanması mümkündür. Bu nedenle StAR'ın meme kanserinde prognostik değeri olduğu düşünülmektedir. StAR ekspresyonunu baskılayan bir dizi HDAC inhibitörü, MCF7 hücrelerinde E2 sentezini de azaltarak, StAR'ın hormona duyarlı meme kanserinin önlenmesinde ve tedavisinde terapötik olarak hedeflenebileceğini belirtmişlerdir (Manna, Ahmad, Vartak, Molehin ve Pruitt, 2019).

Tra ve diğerlerinin 2017 yılında yaptıkları çalışmada MCF-7 hücre hattı kullanılarak *Viburnum sambucinum* yapraklarından elde edilen iki triterpenoid hupehenol D ve 12 β -hidroksi-3,15-diokso-20,21,22-23,24,25,26,27-oktanordammanran ilk kez 3D sitotoksik ve HDAC inhibitör aktiviteleri değerlendirilmiştir. Kullandıkları bileşikler yüksek sitotoksik

aktivite gösterirken, HDAC inhibitör aktivitesinin önemsiz olduğunu bildirmişlerdir (Tra ve diğerleri, 2017).

Yaptığımız çalışmada DLD-1 ve HT-29 hücre hatlarında sülfonamid türevi bileşiklerin HDAC aktivite özellikleri, HDAC Aktivite Analiz Kiti ile ilk kez belirlendi. Bileşik-3 ve Bileşik-5'in sadece HT-29 hücre hattında HDAC aktivite artışı gösterdiği bulundu.

Histon deasetilazların inhibisyonunun, çeşitli hücre tiplerinde ölüm reseptörü ve mitokondriyal apoptotik sinyal yollarının aktivasyonu ile hedef genlerin transkripsiyonu modüle ettiği ve kanser hücrelerinde apoptozu veya farklılaşmayı indüklediği gösterilmiştir.

HDAC enzimleri önemli hücresel olayları etkilediğinden potansiyel ilaçların hedefleridir ve bu enzimleri inhibe edebilen çeşitli bileşikler sentezlenmiştir. HDAC inhibitörleri denilen bu bileşikler enzimlerin aktif bölgelerine bağlanarak histonlar asetile olduğunda gen ekspresyonları değişmektedir.

Histon deasetilasyon inhibitörlerinin kanser tedavisi için kullanımı günümüzde önem kazanmaktadır. Kanser hücrelerindeki epigenetik değişiklikler tümör gelişimi ile ilgili neredeyse tüm yolları ilgilendirdiği için, hücre döngüsünün kontrolü, apoptoz, hücre iletişimi, tümör hücre istilası, metastaz ve anjiyogenez ile ilgili hatalı gen ekspresyon düzenlenmesinde epigenetik ilaçların etkili olabileceği bilinmektedir.

Sülfonamidler, diğerleri arasında antibakteriyel, antikarbonik anhidraz, diüretik, hipoglisemik, antitiroid, antiproteaz ve antiviral tipte bir dizi biyolojik aktiviteye sahip çeşitli farmakolojik ajan türleri ile önemli bir ilaç sınıfını oluşturur. Çok sayıda yapısal olarak yeni sülfonamid türevlerinin, farklı proteazlara (metallo-, serin, sisteinler, memeli veya viral kaynaklı aspartik proteazlar) karşı inhibitör aktivite gösterdiği ve bu nedenle önemli ölçüde antitümör, antienflamatuar ve antiviral etkisi olduğu rapor edilmiştir. Aromatik/heterosiklik sülfonamidler ortak bir kimyasal motife sahip olmalarına rağmen, biyolojik etkilerinin çeşitli mekanizmaları vardır, bunlardan bazıları günümüzde tam olarak aydınlatılamamıştır.

Kullandığımız bileşiklerin, dıştan ve içten gelen uyarımları tetiklediği yolla hücreleri ölümüne sürüklediği tespit edilmiştir. Dışsal yolda hücrenin yüzey kısmında yer alan TNF α ve TNFR1 gibi ölüm reseptörlerine ligand bağlanması ile Kaspaz-8 aktivasyonu gerçekleştiğinde

Kaspaz-8 Kaspaz3'ü aktive ederek hücre apoptozuna neden olmaktadır. İçsel yolda ise mitokondriden sitokrom C salınarak Kaspaz-9 aktive olur, Kaspaz-9 Kaspaz 3'ü aktive ederek hücre apoptoza sürüklenir.

Sonuç olarak sülfonamid türevi bileşiklerin, HT-29 ve DLD-1 hücreleri için anti-kanser araştırmalarında hücre büyümesini ve çoğalmasını önleme potansiyeli gösterdiği, apoptoz ve ilişkili yollarla kanser hücrelerini ölüme sürüklediği, HDAC aktivite özelliği olduğu gözlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda kullandığımız bu bileşiklerin, temel hücresel süreçler üzerinde etkiye sahip olduğu ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere gelecek çalışmalara fayda sağlayacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Aarnio M, Sankila R. and Pukkala E, et al. (1999). Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *International Journal of Cancer*, 81, 214–8.
- Abdulghani, A.J. and Abbas, N.M. (2011). Synthesis characterization and biological activity study of new schiff and Mannich bases and some metal complexes derived from Isatin and dithiooxamide. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 706-712.
- Adams, H., Fritzsche, F.R., Dirnhofer, S., Kristiansen, G. And Tzankov, A. (2010). Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in classical Hodgkin's lymphoma. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14, 577e584.
- Al-Obeed, O., Vaali-Mohammed, M. A., Eldehna, W. M., Al-Khayal, K., Mahmood, A., Abdel-Aziz, H. A. and Ahmad, R. (2018). Novel quinazoline-based sulfonamide derivative (3D) induces apoptosis in colorectal cancer by inhibiting JAK2–STAT3 pathway. *OncoTargets and therapy*, 11, 3313.
- Aldana-Masangkay, G.I., Rodriguez-Gonzalez, A., Lin, T., Ikeda, A.K., Hsieh, Y.T., Kim, Y.M., Lomenick, B., Okemoto, K., Landaw, E.M., Wang, D., Mazitschek, R., Bradner, J.E. and Sakamoto, K.M. (2011). Tubacin suppresses proliferation and induces apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia and Lymphoma* 52, 1544e1555.
- Ali, M. W., Cacan, E., Liu, Y., Pierce, J. Y., Creasman, W. T., Murph, M. M., Govindarajan, R., Eblen, S. T., Greer, S. F., & Hooks, S. B. (2013). Transcriptional suppression, DNA methylation, and histone deacetylation of the regulator of G-protein signaling 10 (RGS10) gene in ovarian cancer cells. *PloS one*, 8(3), e60185.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R. and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of Rna synthesis. *Proceedings of the National Academy of Science*, U S A 51, 786e794.
- Alqahtani, A. S., Ghorab, M. M., Nasr, F. A., Ahmed, M. Z., Al-Mishari, A. A. and Attia, S. M. (2022). The Antiproliferative and Apoptotic Effects of a Novel Quinazoline Carrying Substituted-Sulfonamides: In Vitro and Molecular Docking Study. *Molecules*, 27(3), 981.
- Amann, J.M., Nip, J., Strom, D.K., Lutterbach, B., Harada, H., Lenny, N., Downing, J.R., Meyers, S. and Hiebert, S.W. (2001). ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 6470e6483.
- American Cancer Society. Basic cancer facts. (2015). <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics.html> Son Erişim tarihi: 05.10.2021
- American Cancer Society. What causes cancer? (2018). <https://www.cancer.org/cancer/cancercauses.html>. Son Erişim Tarihi: 05.10.2021

- Asano TK, McLeod RS. (2004). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and aspirin for the prevention of colorectal adenomas and cancer: a systematic review. *Diseases of the Colon and Rectum*, 47, 665–73.
- Ashraf, N., Zino, S., Macintyre, A., Kingsmore, D., Payne, A.P., George, W.D. and Shiels, P.G. (2006). Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer. *British Journal of Cancer*, 95, 1056e1061.
- Atsumi, A., Tomita, A., Kiyoi, H. and Naoe, T. (2006). Histone deacetylase 3 (HDAC3) is recruited to target promoters by PML- RAR α as a component of the N-CoR co-repressor complex to repress transcription in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 345, 1471e1480.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21, 381e395.
- Barber, M.F., Michishita-Kioi, E., Xi, Y., Tasselli, L., Kioi, M., Moqtaderi, Z., Tennen, R.I., Paredes, S., Young, N.L., Chen, K., Struhl, K., Garcia, B.A., Gozani, O., Li, W. and Chua, K.F. (2012). SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature*, 487, 114e118.
- Barber, M.F., Michishita-Kioi, E., Xi, Y., Tasselli, L., Kioi, M., Moqtaderi, Z., Tennen, R.I., Paredes, S., Young, N.L., Chen, K., Struhl, K., Garcia, B.A., Gozani, O., Li, W. and Chua, K.F. (2012). SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature*, 487, 114e118.
- Bavadi, M., Niknam, K. and Shahraki, O. (2017). Novel pyrrole derivatives bearing sulfonamide groups: Synthesis in vitro cytotoxicity evaluation, molecular docking and DFT study. *Journal of Molecular Structure*, 1146, 242-253.
- Bell, E.L., Emerling, B.M., Ricoult, S.J. and Guarente, L. (2011). SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1 α and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. *Oncogene*, 30, 2986e2996.
- Bharti, S.K., Nath, G., Tilak, R. And Singh, S.K. (2010). Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring. *European Journal of Medical Chemistry*, 45, 651–660.
- <https://biorender.com> Erişim Tarihi: 11.11.2021
- Bonakdar, A. P. S., Vafaei, F., Farokhpour, M., Esfahani, M. H. N. and Massah, A. R. (2017). Synthesis and anticancer activity assay of novel chalcone-sulfonamide derivatives. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 16(2), 565.
- Bosch-Presegue, L. and Vaquero, A. (2011). The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer*, 2, 648e662.
- Bradbury, C.A., Khanim, F.L., Hayden, R., Bunce, C.M., White, D.A., Drayson, M.T., Craddock, C. and Turner, B.M. (2005). Histone deacetylases in acute myeloid

leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia*, 19, 1751e1759.

- Bresalier RA, Boland CR, Itzkowitz SH. and Kim YS. (1989). Basic gastrointestinal oncology. In: Kern Jr F, Blum AL, editors. *The gastroenterology annual*, 2, 271–319.
- Buglio, D., Khaskhely, N.M., Voo, K.S., Martinez-Valdez, H., Liu, Y.J. and Younes, A. (2011). HDAC11 plays an essential role in regulating OX40 ligand expression in Hodgkin lymphoma. *Blood*, 117, 2910e2917.
- Chen, J., Fiskus, W., Eaton, K., Fernandez, P., Wang, Y., Rao, R., Lee, P., Joshi, R., Yang, Y., Kolhe, R., Balusu, R., Chappa, P., Natarajan, K., Jillella, A., Atadja, P. and Bhalla, K.N. (2009). Cotreatment with BCL-2 antagonist sensitizes cutaneous T-cell lymphoma to lethal action of HDAC7-Nur77-based mechanism. *Blood*, 113, 4038e4048.
- Cacan, E., Spring, A. M., Kumari, A., Greer, S. F., & Garnett-Benson, C. (2015). Combination Treatment with Sublethal Ionizing Radiation and the Proteasome Inhibitor, Bortezomib, Enhances Death-Receptor Mediated Apoptosis and Anti-Tumor Immune Attack. *International journal of molecular sciences*, 16(12), 30405–30421.
- Cacan, E., Ali, M. W., Boyd, N. H., Hooks, S. B., & Greer, S. F. (2014). Inhibition of HDAC1 and DNMT1 modulate RGS10 expression and decrease ovarian cancer chemoresistance. *PloS one*, 9(1), e87455.
- Cacan, E., Greer, S. F., & Garnett-Benson, C. (2015). Radiation-induced modulation of immunogenic genes in tumor cells is regulated by both histone deacetylases and DNA methyltransferases. *International journal of oncology*, 47(6), 2264–2275.
- Cacan E. (2016). Histone Deacetylase-1-mediated Suppression of FAS in Chemoresistant Ovarian Cancer Cells. *Anticancer research*, 36(6), 2819–2826.
- Cacan E. (2017). Epigenetic-mediated immune suppression of positive co-stimulatory molecules in chemoresistant ovarian cancer cells. *Cell biology international*, 41(3), 328–339.
- Chohan, Z.H. (2004). Synthesis and biological properties of Cu(II) complexes with 1,1'-disubstituted ferrocenes. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry*, 34(5), 833-846.
- Choi, J.H., Kwon, H.J., Yoon, B.I., Kim, J.H., Han, S.U., Joo, H.J. and Kim, D.Y. (2001). Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Japanese Journal of Cancer Research*, 92, 1300e1304.
- Choi, J.H., Song, Y.S., Yoon, J.S., Song, K.W. and Lee, Y.Y. (2010). Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with tumor cell proliferation and metastasis in gastric cancer. *Apmis*, 118, 196e202.

- Choi, Y.W., Bae, S.M., Kim, Y.W., Lee, H.N., Kim, Y.W., Park, T.C., Ro, D.Y., Shin, J.C., Shin, S.J., Seo, J.S. and Ahn, W.S. (2007). Gene expression profiles in squamous cell cervical carcinoma using array-based comparative genomic hybridization analysis. *International Journal of Gynecological Cancer*, 17, 687e696.
- Chu, F., Chou, P.M., Zheng, X., Mirkin, B.L. and Rebbaa, A. (2005). Control of multidrug resistance gene *mdr1* and cancer resistance to chemotherapy by the longevity gene *sirt1*. *Cancer Research*, 65, 10183e10187.
- Cumaoglu, A., Dayan, S., Agkaya, A. O., Ozkul, Z. and Ozpozan, N. K. (2015). Synthesis and pro-apoptotic effects of new sulfonamide derivatives via activating p38/ERK phosphorylation in cancer cells. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 30(3), 413-419.
- Danial NN. and Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- Datta, J., Kutay, H., Nasser, M.W., Nuovo, G.J., Wang, B., Majumder, S., Liu, C.G., Volinia, S., Croce, C.M., Schmittgen, T.D., Ghoshal, K. and Jacob, S.T. (2008). Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Research*, 68, 5049e5058.
- Dayan, S. Synthesis and pro-apoptotic effects of new sulfonamide derivatives via activating p38/ERK phosphorylation in cancer cells.
- Deng, Y., Li, B. and Zhang, T. (2018). Bacteria that make a meal of sulfonamide antibiotics: Blind spots and emerging opportunities. *Environmental Science & Technology*, 52, 3854–68.
- Devarajan E, Sahin AA., Chen JS., Krishnamurthy RR., Aggarwal N., Brun AM., Sapino A., Zhang F., Sharma D., Yang XH., Tora AD. and Mehta K (2002). Downregulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*, 21(57), 8843-8851.
- Dewson G. and Kluc RM. (2010). Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton*, 2, 9-22.
- Dokmanovic, M., Perez, G., Xu, W., Ngo, L., Clarke, C., Parmigiani, R.B. and Marks, P.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors selectively suppress expression of HDAC7. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 2525e2534.
- Dryden, S.C., Nahhas, F.A., Nowak, J.E., Goustin, A.S. and Tainsky, M.A. (2003). Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Molecular Cell Biology*, 23, 3173e3185.
- Duong, V., Bret, C., Altucci, L., Mai, A., Duraffourd, C., Loubersac, J., Harmand, P.O., Bonnet, S., Valente, S., Maudelonde, T., Cavailles, V. and Boulle, N. (2008). Specific activity of class II histone deacetylases in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Research*, 6, 1908e1919.

- Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P and Kelly C, *et al.* (2007). Phase 2 trial of oral vorinostat suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA for refractory cutaneous T-cell lymphoma CTCL. *Blood*, 109:31-9.
- Erdik, E., Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, 2. Baskı, Gazi Kitapevi, Ankara, 1998.
- Fekri, M.H., Darvishpour, M., Khanmohammadi, H. and Rashidipour, M. (2013). Synthesis and biological activity of a new Schiff base ligand Pyridazine based. *Journal of Chemical Health Risks*, 3, 63-68.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. (2004)GLOBOCAN 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. *International Agency for Research on Cancer CancerBase* No. 5, version 2.0. Lyon: IARC.
- Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M.J., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Voelter, W. and Verdin, E. (2002). Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Molecular Cell*, 9, 45e57.
- Fletcher RH. (1986). Carcinoembryonic antigen. *Annals of Internal Medicine*, 104, 66–73.
- Fong PC., Xue WC., Ngan HYS., Chiu PM., Chan KYK., Tsao GSW. and Cheung ANY (2006) Caspase activity is downregulated in choriocarcinoma: a cDNA array differential expression study. *Journal of Clinical Pathology*, 59(2), 179-183.
- Fonkui, T.Y., Ikhile, M.I., Ndinteh, D.T. and Njobeh, P.B. (2018). Microbial activity of some heterocyclic Schiff bases and metal complexes: A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 17 (12), 2507-2518.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N.G., Perez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J.A., Cano, A., Calasanz, M.J., Colomer, D., Piris, M.A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T. and Esteller, M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*, 37, 391e400.
- Fritzsche, F.R., Weichert, W., Roske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Stephan, C., Jung, K., Scholman, K., Denkert, C., Dietel, M. and Kristiansen, G. (2008). Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in renal cell cancer. *BMC Cancer*, 8, 381.
- Fukuoka, K., Usuda, J., Iwamoto, Y., Fukumoto, H., Nakamura, T., Yoneda, T., ... & Nishio, K. (2001). Mechanisms of action of the novel sulfonamide anticancer agent E7070 on cell cycle progression in human non-small cell lung cancer cells. *Investigational new drugs*, 19(3), 219-227.
- Fulda S., Meyer E. and Debatin KM. (2000). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene*, 21, 2283-2294.

- G. Hu, G. Wang and N. Duan et al. (2012). Design, synthesis and antitumor activities of fluoroquinolone C-3 heterocycles(IV): s-triazole Schiff-Mannich bases derived from ofloxacin. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(3) 312–317.
- Galluzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*, 14, 1237-1266.
- Gao, L. and Alumkal, J. (2010). Epigenetic regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer. *Epigenetics*, 5, 100e104.
- Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F. and Atadja, P. (2002). Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 25748e25755.
- Geng, H., Harvey, C.T., Pittsenbarger, J., Liu, Q., Beer, T.M., Xue, C. and Qian, D.Z. (2011). HDAC4 protein regulates HIF1alpha protein lysine acetylation and cancer cell response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 38095e38102.
- Ghobrial IM., Witzig TE. and Adjei AA (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55, 178-194.
- Ghorab, M. M., Alsaid, M. S., Nissan, Y. M., Ashour, A. E., Al-Mishari, A. A., Kumar, A., and Ahmed, S. F. (2016). Novel sulfonamide derivatives carrying a biologically active 3, 4-dimethoxyphenyl moiety as VEGFR-2 inhibitors. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 64(12), 1747-1754.
- Ghorab, M. M., Ragab, F. A., Heiba, H. I., Arafa, R. K. and El-Hossary, E. M. (2010). In vitro anticancer screening and radiosensitizing evaluation of some new quinolines and pyrimido [4, 5-b] quinolines bearing a sulfonamide moiety. *European journal of medicinal chemistry*, 45(9), 3677-3684.
- Giovannucci E. (2001). An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 10, 725–31.
- Girgaonkar, M.V and. Shirodkar, S.G. (2012). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some new Schiff's bases derived. *Journal of Chemical Pharmaceutical Research*, 4(1), 260-264.
- Glaser, K.B., Li, J., Staver, M.J., Wei, R.Q., Albert, D.H. and Davidsen, S.K. (2003). Role of class I and class II histone deacetylases in carcinoma cells using siRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 310, 529e536.
- Güttler, A., Eiselt, Y., Funtan, A., Thiel, A., Petrenko, M., Keßler, J. and Bache, M. (2021). Betulin Sulfonamides as Carbonic Anhydrase Inhibitors and Anticancer Agents in Breast Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8808.

- Güvenir Çelik, E. (2015). SW480 ve DLD-1 Kolon Kanseri Hücre Hatlarında Epibrassinolide ile Tetiklenen Apoptozun Moleküler Hedeflerinin Araştırılması. Yüksek Lisans, İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Haberland, M., Montgomery, R.L. and Olson, E.N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Review Genetics*, 10, 32e42.
- Hacker G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Research*, 301, 5-17.
- Halkidou, K., Gaughan, L., Cook, S., Leung, H.Y., Neal, D.E. and Robson, C.N. (2004). Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*, 59, 177e189.
- Hamad, A. Chen, Y. Khan, M.A., Jamshidi, S., Saeed, N., Clifford, M., Hind, C., Sutton, J.M. and Rahman, K.M. (2021). Schiff bases of sulphonamides as a new class of antifungal agent against multidrug-resistant *Candida auris*. *MicrobiologyOpen*, 10, e1218.
- Hamad, A., Khan, M.A., Rahman, K.M., Ahmad, I. Ul-Haq, Z., Khan, S. and Shafi, Z. (2020). Development of sulfonamide-based Schiff bases targeting urease inhibition: Synthesis, characterization, inhibitory activity assessment, molecular docking and ADME studies. *Bioorganic Chemistry*, 102, 104057.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Harms, K.L. and Chen, X. (2007). Histone deacetylase 2 modulates p53 transcriptional activities through regulation of p53-DNA binding activity. *Cancer Research*, 67, 3145e3152.
- Hengartner MO. (2000). Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*, 104, 325-328.
- Hida, Y., Kubo, Y., Murao, K. and Arase, S. (2007). Strong expression of a longevity-related protein, SIRT1, in Bowen's disease. *Archives of Dermatological Research*, 299, 103e106.
- Hiratsuka, M., Inoue, T., Toda, T., Kimura, N., Shirayoshi, Y., Kamitani, H., Watanabe, T., Ohama, E., Tahimic, C.G., Kurimasa, A. and Oshimura, M. (2003). Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309, 558e566.
- Hsieh, T.H., Tsai, C.F., Hsu, C.Y., Kuo, P.L., Lee, J.N., Chai, C.Y., Hou, M.F., Chang, C.C., Ko, Y.C., Tsai, E.M. (2012). Phthalates stimulate the epithelial to mesenchymal transition through an HDAC6-dependent mechanism in human breast epithelial stem cells. *Toxicological Sciences*, 128, 365e376.
- Huang, E.Y., Zhang, J., Miska, E.A., Guenther, M.G., Kouzarides, T. and Lazar, M.A. (2000). Nuclear receptor corepressors partner with.

- Huang, Y., Tan, M., Gosink, M., Wang, K.K. and Sun, Y. (2002). Histone deacetylase 5 is not a p53 target gene, but its overexpression inhibits tumor cell growth and induces apoptosis. *Cancer Research*, 62, 2913e2922.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F. and Yao, T.P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 417, 455e458.
- Huffman, D.M., Grizzle, W.E., Bamman, M.M., Kim, J.S., Eltoum, I.A., Elgavish, A. and Nagy, T.R. (2007). SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer Research*, 67, 6612e6618.
- Hussain, Z., Fadhil, Z., Adil, H., Khalaf, M., Abdullah, B. And Yousi, E. (2016). Research Journal of Pharmaceutical. *Biological and Chemical Sciences*, 7(3), 1500-1510.
- Inoue, T., Hiratsuka, M., Osaki, M., Oshimura, M., 2007a. The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. *Cell Cycle*, 6, 1011e1018.
- Inoue, T., Hiratsuka, M., Osaki, M., Yamada, H., Kishimoto, I., Yamaguchi, S., Nakano, S., Katoh, M., Ito, H. and Oshimura, M. (2007). SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. *Oncogene*, 26, 945e957.
- Ishikawa, S., Nagai, Y., Masuda, T., Koga, Y., Nakamura, T., Imamura, Y., Takamori, H., Hirota, M., Funakoshi, A., Fukushima, M. and Baba, H. (2010). The role of oxysterol binding protein-related protein 5 in pancreatic cancer. *Cancer Sciences*, 101, 898e905.
- Jayakumarswamy, B.H.M., Rahaman, F., Revankar, V.K. and Vasantakumar, P.K. (2011). Synthesis, characterization, anti-microbial and anti-inflammatory activity, studies of novel schiff base 3,3'-(1,2-phenylene bis [nitrilo (E) methylydine]) diquinolin-2-ol and its metal(II) complexes. *International Journal of PharmTech Research*, 3, 1864-1873.
- Jeon, H.S., Lee, S.Y., Lee, E.J., Yun, S.C., Cha, E.J., Choi, E., Na, M.J., Park, J.Y., Kang, J. and Son, J.W. (2012). Combining microRNA-449a/ b with a HDAC inhibitor has a synergistic effect on growth arrest in lung cancer. *Lung Cancer*, 76, 171e176.
- Jung, K.H., Noh, J.H., Kim, J.K., Eun, J.W., Bae, H.J., Xie, H.J., Chang, Y.G., Kim, M.G., Park, H., Lee, J.Y. and Nam, S.W. (2012). HDAC2 overexpression confers oncogenic potential to human lung cancer cells by deregulating expression of apoptosis and cell cycle proteins. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113, 2167e2177.
- Kajal, A., Bala, S., Kamboj, S., Sharma, N. and Saini, V. (2013). Schiff Bases: A Versatile Pharmacophore. *Journal of Catalysts*.
- Kaluza, D., Kroll, J., Gesierich, S., Yao, T.P., Boon, R.A., Hergenreider, E., Tjwa, M., Rossig, L., Seto, E., Augustin, H.G., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. and Urbich, C. (2011). Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin. *Embo Journal*, 30, 4142e4156.

- Karp G: Cell and molecular biology: Concepts and experiments. 5 edition. John New Jersey: Wiley and Sons; 2008, 653-657.
- Karp G: Cell and molecular biology: Concepts and experiments. 5 edition. John New Jersey: Wiley and Sons; 2008, 653-657.
- Kerr J.F. and Harmon B.V. (1991). Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In Apoptosis: the molecular basis of cell death. Volume 3. Edited by: Tomei LD, Cope FO. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 5-29.
- Kerr JFR, Wyllie AH and Currie (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.
- Khan, M.N., Khan, A.M., Ullah, H., Hussain, S. and Khattak, A.K. (2018). Synthesis and antibacterial activity of the sulfonamide based schiff base and its transition metal (II) complexes. *Pakistan Journal of Pharmacetical Sciences*, 31, 1, 103-111.
- Khan, O. And La Thangue, N.B. (2012). HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunology and Cell Biology*, 90, 85e94.
- Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, 116, 259e272.
- Khurana, S., Chakraborty, S., Cheng, X., Su, Y.T. and Kao, H.Y. (2010). The actin-binding protein, actinin alpha 4 (ACTN4), is a nuclear receptor coactivator that promotes proliferation of MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 1850e1859.
- Kim Y, Whittaker S, Demierre MF, Rook AH, Lerner A. and Duvic M. *et al.* (2008). Clinically significant responses achieved with romidepsin in treatment-refractory cutaneous T-cell lymphoma: Final results from a phase 2B, international, multicenter, registration study. *Blood*, 112: 263.
- Kim, H.S., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K.S., Aykin- Burns, N., Pennington, J.D., van der Meer, R., Nguyen, P., Savage, J., Owens, K.M., Vassilopoulos, A., Ozden, O., Park, S.H., Singh, K.K., Abdulkadir, S.A., Spitz, D.R., Deng, C.X. and Gius, D. (2010). SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell*, 17, 41e52.
- Koizume, S., Ito, S., Miyagi, E., Hirahara, F., Nakamura, Y., Sakuma, Y., Osaka, H., Takano, Y., Ruf, W. and Miyagi, Y. (2012). HIF2alpha-Sp1 interaction mediates a deacetylation- dependent FVII-gene activation under hypoxic conditions in ovarian cancer cells. *Nucleic Acids Research*, 40, 5389e5401.
- Kong, Y., Jung, M., Wang, K., Grindrod, S., Velena, A., Lee, S.A., Dakshanamurthy, S., Yang, Y., Miessau, M., Zheng, C., Dritschilo, A. and Brown, M.L. (2011). Histone deacetylase cytoplasmic trapping by a novel fluorescent HDAC inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics* 10, 1591e1599.

- Koyuncu, I., Gonel, A., Durgun, M., Kocyigit, A., Yuksekdağ, O. and Supuran, C. T. (2019). Assessment of the antiproliferative and apoptotic roles of sulfonamide carbonic anhydrase IX inhibitors in HeLa cancer cell line. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 34(1), 75-86.
- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S. and Melino G (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1463-1467.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilisation in cell death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99-163.
- Krusche, C.A., Wulfig, P., Kersting, C., Vloet, A., Bocker, W., Kiesel, L., Beier, H.M. and Alfer, J. (2005). Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 90, 15e23.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N and Aster JC. (2010). Robins and Cotran: pathologic basis of disease. 8 edition. Philadelphia: Saunders Elsevier, 25-32.
- Kumari, A., Cacan, E., Greer, S. F., & Garnett-Benson, C. (2013). Turning T cells on: epigenetically enhanced expression of effector T-cell costimulatory molecules on irradiated human tumor cells. *Journal for immunotherapy of cancer*, 1, 17.
- Kuo, K.L., Huang, C.C. and Lin, Y.C. (2008). Synthesis and photophysical properties of multinuclear zinc-salophen complexes: enhancement of fluorescence by fluorene termini. *Dalton Transactions*, 3889–3898.
- Kwak EL. and Chung DC. (2007). Hereditary colorectal cancer syndromes: an overview. *Clinical Colorectal Cancer*, 6, 340–4.
- LaCasse EC., Mahoney DJ., Cheung HH., Plenchette S., Baird S. and Korneluk RG. (2008). IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*, 27(48), 6252-6275.
- Lachenmayer, A., Toffanin, S., Cabellos, L., Alsinet, C., Hoshida, Y., Villanueva, A., Minguez, B., Tsai, H.W., Ward, S.C., Thung, S., Friedman, S.L. and Llovet, J.M., (2012). Combination therapy for hepatocellular carcinoma: additive preclinical efficacy of the HDAC inhibitor panobinostat with sorafenib. *Journal of Hepatology*, 56, 1343e1350.
- Latif, S.A.A., Hassib, H.B. and Issa, Y.M. (2007). Studies on some salicylaldehyde Schiff base derivatives and their complexes with Cr(III), Mn(II), Fe(III), Ni(II) and Cu(II). *Spectrochimica Acta Part A*, 67, 950–957.
- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 2665-2672.

- Lee, Y.S., Lim, K.H., Guo, X., Kawaguchi, Y., Gao, Y., Barrientos, T., Ordentlich, P., Wang, X.F., Counter, C.M. and Yao, T.P. (2008). The cytoplasmic deacetylase HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis. *Cancer Research*, 68, 7561e7569.
- Lennerz, V., Fatho, M., Gentilini, C., Frye, R.A., Lifke, A., Ferel, D., Wolfel, C., Huber, C. and Wolfel, T. (2005). The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A* 102, 16013e16018.
- Li, D., Marchenko, N.D. and Moll, U.M., (2011). SAHA shows preferential cytotoxicity in mutant p53 cancer cells by destabilizing mutant p53 through inhibition of the HDAC6- Hsp90 chaperone axis. *Cell Death Differentiation*, 18, 1904e1913.
- Li, D., Xie, S., Ren, Y., Huo, L., Gao, J., Cui, D., Liu, M. and Zhou, J., (2011). Microtubule-associated deacetylase HDAC6 promotes angiogenesis by regulating cell migration in an EB1-dependent manner. *Protein Cell*, 2, 150e160.
- Li, S., Banck, M., Mujtaba, S., Zhou, M.M., Sugrue, M.M. and Walsh, M.J. (2010). p53-induced growth arrest is regulated by the mitochondrial SirT3 deacetylase. *PLoS One*, 5, e10486.
- Liu, H., Hu, Q., D'Ercole, A.J. and Ye, P. (2009). Histone deacetylase 11 regulates oligodendrocyte-specific gene expression and cell development in OL-1 oligodendroglia cells. *Glia*, 57, 1e12.
- Lucio-Eterovic, A.K., Cortez, M.A., Valera, E.T., Motta, F.J., Queiroz, R.G., Machado, H.R., Carlotti Jr., C.G., Neder, L., Scrideli, C.A. and Tone, L.G. (2008). Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas. *BMC Cancer*, 8, 243.
- Malik, S., Jiang, S., Garee, J.P., Verdin, E., Lee, A.V., O'Malley, B.W., Zhang, M., Belaguli, N.S. and Oesterreich, S. (2010). Histone deacetylase 7 and FoxA1 in estrogen-mediated repression of RPRM. *Molecular Cell Biology*, 30, 399e412.
- Manjo G. and Joris I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*, 146, 3-15.
- Manna, P. R., Ahmed, A. U., Vartak, D., Molehin, D., and Pruitt, K. (2019). Overexpression of the steroidogenic acute regulatory protein in breast cancer: Regulation by histone deacetylase inhibition. *Biochemical and biophysical research communications*, 509(2), 476-482.
- Markowitz, S. D. and Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular basis of colorectal cancer. *New England journal of medicine*, 361(25), 2449-2460.
- Marks PA and Xu WS. (2009). Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107:600-8.

- McCarthy NJ, Evan GI. (1998). Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Current Topics in Developmental Biology*, 36, 259-278.
- Menati, S., Azadbakht, R., Kakanejadi, A., Bruno, G. and Rudbari, H. (2010). In: Proceedings of the 14th Int. Electron. Conf. Synth. Org. Chem., 1–30 November 2010, Sciforum Electronic Conferences Series, a046, pp. 1–9.
- Milde, T., Oehme, I., Korshunov, A., Kopp-Schneider, A., Remke, M., Northcott, P., Deubzer, H.E., Lodrini, M., Taylor, M.D., von Deimling, A., Pfister, S. and Witt, O. (2010). HDAC5 and HDAC9 in medulloblastoma: novel markers for risk stratification and role in tumor cell growth. *Clinical Cancer Research*, 16, 3240e3252.
- Minn AJ, Vélez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, 385(6614), 353-357.
- Minn AJ., Rudin CM., Boise LH. and Thompson CB (1995). Expression of Bcl-XL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood*, 86, 1903-1910.
- Miquel C., Borrini F., Grandjouan S., Aupérin A., Viguier J., Velasco V., Duvillard P., Praz F. and Sabourin JC. (2005). Role of bax mutations in apoptosis in colorectal cancers with microsatellite instability. *American Journal of Clinical Pathology*, 23(4), 562-570.
- Mirian, M., Zarghi, A., Sadeghi, S., Tabaraki, P., Tavallae, M., Dadrass, O. and Sadeghi-Aliabadi, H. (2011). Synthesis and cytotoxic evaluation of some novel sulfonamidederivatives against a few human cancer cells. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 10(4), 741.
- Mohan, R., Banerjee, M., Ray, A., Manna, T., Wilson, L., Owa, T. and Panda, D. (2006). Antimitotic sulfonamides inhibit microtubule assembly dynamics and cancer cell proliferation. *Biochemistry*, 45(17), 5440-5449.
- Mondal, S., Mandal, S.M., Mondal, T.K. and Sinha, C. (2017). Spectroscopic characterization, antimicrobial activity, DFT computation and docking studies of sulfonamide Schiff bases. *Journal of Molecular Structure*, 1127, 557-567.
- Mondal, S., Mondal, T.K., Rajesh Y., Mandal M. and Sinha, C. (2018). Copper(II)-sulfonamide Schiff base complexes: Structure, biological activity and theoretical interpretation. *Polyhedron*, 151, 344–354.
- Moreno, D.A., Scrideli, C.A., Cortez, M.A., de Paula Queiroz, R., Valera, E.T., da Silva Silveira, V., Yunes, J.A., Brandalise, S.R. and Tone, L.G. (2010). Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 150, 665e673.
- Mottet, D., Pirotte, S., Lamour, V., Hagedorn, M., Javerzat, S., Bikfalvi, A., Bellahcene, A., Verdin, E. and Castronovo, V. (2009). HDAC4 represses p21(WAF1/Cip1)

expression in human cancer cells through a Sp1-dependent, p53-independent mechanism. *Oncogene*, 28, 243e256.

- Nasser, M.W., Datta, J., Nuovo, G., Kutay, H., Motiwala, T., Majumder, S., Wang, B., Suster, S., Jacob, S.T. and Ghoshal, K. (2008). Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 33394e33405.
- O'Brien MA. And Kirby R. (2008). Apoptosis: a review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(6), 572-585.
- Oehme, I., Deubzer, H.E., Wegener, D., Pickert, D., Linke, J.P., Hero, B., Kopp-Schneider, A., Westermann, F., Ulrich, S.M., von Deimling, A., Fischer, M. and Witt, O., (2009). Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clinical Cancer Research* 15, 91e99.
- Olsen CA. (2012). Expansion of the lysine acylation landscape. *Angewandte Chemical International Edition England*. 51(16), 3755–3756.
- Olsen EA, Kim YH, Kuzel TM, Pacheco TR, Foss FM. and Parker S, *et al.* (2007). Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 25:3109-15.
- Osada, H., Tatematsu, Y., Saito, H., Yatabe, Y., Mitsudomi, T. and Takahashi, T. (2004). Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients. *International Journal of Cancer*, 112, 26e32.
- Ouaissi, M., Sielezneff, I., Silvestre, R., Sastre, B., Bernard, J.P., Lafontaine, J.S., Payan, M.J., Dahan, L., Pirro, N., Seitz, J.F., Mas, E., Lombardo, D. and Ouaissi, A., (2008). High histone deacetylase 7 (HDAC7) expression is significantly associated with adenocarcinomas of the pancreas. *Annals of Surgical Oncology*, 15, 2318e2328.
- Ozdag, H., Teschendorff, A.E., Ahmed, A.A., Hyland, S.J., Blenkiron, C., Bobrow, L., Veerakumarasivam, A., Burt, G., Subkhankulova, T., Arends, M.J., Collins, V.P., Bowtell, D., Kouzarides, T., Brenton, J.D. and Caldas, C. (2006). Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. *BMC Genomics*, 7, 90.
- Pacheco, M. and Nielsen, T.O. (2012). Histone deacetylase 1 and 2 in mesenchymal tumors. *Modern Pathology*, 25, 222e230.
- Park, S.Y., Jun, J.A., Jeong, K.J., Heo, H.J., Sohn, J.S., Lee, H.Y., Park, C.G. and Kang, J. (2011). Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer. *Oncology Reports*, 25, 1677e1681.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L. and Thomas DB. (2002). Cancer incidence in five continents. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Vol. VIII. *International Agency for Research on Cancer*, 155.

- Parra, M. and Verdin, E. (2010). Regulatory signal transduction pathways for class IIa histone deacetylases. *Current Opinion in Pharmacology*, 10, 454e460.
- Peixoto, P., Castronovo, V., Matheus, N., Polese, C., Peulen, O., Gonzalez, A., Boxus, M., Verdin, E., Thiry, M., Dequiedt, F. and Mottet, D. (2012). HDAC5 is required for maintenance of pericentric heterochromatin, and controls cell-cycle progression and survival of human cancer cells. *Cell Death and Differentiation*, 19, 1239e1252.
- Peng, L. and Seto, E. (2011). Deacetylation of nonhistone proteins by HDACs and the implications in cancer. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 206, 39e56.
- Piekarz R, Wright J, Frye R, Allen SL, Prince M. and Smith S, *et al.* (2009). Final results of a phase 2 NCI multicenter study of romidepsin in patients with relapsed peripheral T-cell lymphoma (PTCL). *ASH Annual Meeting Abstract*, 114:1657.
- Pulukuri, S.M., Gorantla, B. and Rao, J.S. (2007). Inhibition of histone deacetylase activity promotes invasion of human cancer cells through activation of urokinase plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 35594e35603.
- Qu, X., Du, J., Zhang, C., Fu, W., Xi, H., Zou, J. and Hou, J. (2012). Arsenic trioxide exerts antimyeloma effects by inhibiting activity in the cytoplasmic substrates of histone deacetylase 6. *PLoS One*, 7, e32215.
- Raffo AJ., Perlman H., Chen MW., Day ML., Streitman JS. and Buttyan R. (1995). Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Research*, 55, 4438.
- Rajendran, S.P. and Karvembu, R. (2002). Synthesis and antifungal activities of Schiff bases derived from 3-amino-2H-pyrano[2,3]-quinolin-2 ones, *Indian Journal of Chemistry*, 41B, 222-224.
- Ramakrishnan, V. G., Miller, K. C., Macon, E. P., Kimlinger, T. K., Haug, J., Kumar, S., & Kumar, S. K. (2019). Histone deacetylase inhibition in combination with MEK or BCL-2 inhibition in multiple myeloma. *Haematologica*, 104(10), 2061.
- Regan, P.L., Jacobs, J., Wang, G., Torres, J., Edo, R., Friedmann, J. and Tang, X.X., (2011). Hsp90 inhibition increases p53 expression and destabilizes MYCN and MYC in neuroblastoma. *International Journal of Oncology*, 38, 105e112.
- Reichert, N., Choukrallah, M.A. and Matthias, P. (2012). Multiple roles of class I HDACs in proliferation, differentiation, and development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 2173e2187.
- Ren, S., Wang, R., Komatsu, K., Bonaz-Krause, P., Zyrianov, Y., McKenna, C.E., Csipke, C., Tokes, Z.A. and Lien, E.J. (2002). Synthesis, biological evaluation and quantitative Structure-Activity relationship analysis of new schiff bases of hydroxysemicarbazide as potential antitumor agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 410-419.

- Ropero, S., Fraga, M.F., Ballestar, E., Hamelin, R., Yamamoto, H., Boix-Chornet, M., Caballero, R., Alaminos, M., Setien, F., Paz, M.F., Herranz, M., Palacios, J., Arango, D., Orntoft, T.F., Aaltonen, L.A., Schwartz Jr., S. And Esteller, M. (2006). A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. *Nature Genetics*. 38, 566e569.
- Safoura, F. (2014). Novel synthesis of Schiff bases bearing glucosamine moiety. *Research Journal of Chemical Sciences*, 4(2), 25-28.
- Saji, S., Kawakami, M., Hayashi, S., Yoshida, N., Hirose, M., Horiguchi, S., Itoh, A., Funata, N., Schreiber, S.L., Yoshida, M. and Toi, M. (2005). Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene*, 24, 4531e4539.
- Sakuma, T., Uzawa, K., Onda, T., Shiiba, M., Yokoe, H., Shibahara, T. and Tanzawa, H. (2006). Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology*, 29, 117e124.
- Salehi, M., Kubicki, M., Galini, M., Jafari, M. and Malekshah, R.E. (2019). Synthesis, characterization and crystal structures of two novel sulfa drug Schiff base ligands derived sulfonamide and molecular docking study. *Journal of Molecular Structure*, 1180, 595-602.
- Santo, L., Hideshima, T., Kung, A.L., Tseng, J.C., Tamang, D., Yang, M., Jarpe, M., van Duzer, J.H., Mazitschek, R., Ogier, W.C., Cirstea, D., Rodig, S., Eda, H., Scullen, T., Canavese, M., Bradner, J., Anderson, K.C., Jones, S.S. and Raje, N. (2012). Preclinical activity, pharmacodynamic, and pharmacokinetic properties of a selective HDAC6 inhibitor, ACY-1215, in combination with bortezomib in multiple myeloma. *Blood*, 119, 2579e2589.
- Saraste A, Pulkki K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45, 528-537.
- Saunders, L.R. and Verdin, E. (2007). Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*, 26, 5489e5504.
- Schneider P. and Tschopp J. (2000). Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 74, 281-286.
- Schulz, R., Marchenko, N.D., Holembowski, L., Fingerle-Rowson, G., Pesic, M., Zender, L., Dobbstein, M. and Moll, U.M. (2012). Inhibiting the HSP90 chaperone destabilizes macrophage migration inhibitory factor and thereby inhibits breast tumor progression. *Journal of Experimental Medicine*, 209, 275e289.
- Scozzafava A., Owa T., Mastrolorenzo A. and Supuran CT. (2003). Anticancer and antiviral sulfonamides. *Current Medicinal Chemistry*, 10(11), 925-53.
- Segre, C.V. and Chiocca, S. (2011). Regulating the regulators: the post- translational code of class I HDAC1 and HDAC2. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 690848.

- Senese, S., Zaragoza, K., Minardi, S., Muradore, I., Ronzoni, S., Passafaro, A., Bernard, L., Draetta, G.F., Alcalay, M., Seiser, C. And Chiocca, S. (2007). Role for histone deacetylase 1 in human tumor cell proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 4784e4795.
- Shen XG., Wang C., Li Y., Wang L., Zhou B., Xu B., Jiang X., Zhou ZG. and Sun XF (2010). Downregulation of caspase-9 is a frequent event in patients with stage II colorectal cancer and correlates with poor clinical outcome. *Colorectal Diseases*, 12(12), 1213-1218.
- Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J., Barber, T.D., Mandelker, D., Leary, R.J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S.D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J.K., Gazdar, A.F., Hartigan, J., Wu, L., Liu, C., Parmigiani, G., Park, B.H., Bachman, K.E., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. and Velculescu, V.E., 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, 314, 268e274.
- Skov, V., Larsen, T.S., Thomassen, M., Riley, C.H., Jensen, M.K., Bjerrum, O.W., Kruse, T.A. and Hasselbalch, H.C. (2012). Increased gene expression of histone deacetylases in patients with Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Leukemia and Lymphoma*, 53, 123e129.
- Song, B., Wang, Y., Xi, Y., Kudo, K., Bruheim, S., Botchkina, G.I., Gavin, E., Wan, Y., Formentini, A., Kornmann, M., Fodstad, O. and Ju, J. (2009). Mechanism of chemoresistance mediated by miR- 140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene*, 28, 4065e4074.
- Souza, P., Garcia-Vazquez, J.A. and Masaguer, J.R. (1985). Synthesis and characterization of copper (ii) and nickel(ii) complexes of the Schiff base derived from 2-(2-aminophenyl) benzimidazole and salicylaldehyde. *Transition Metal Chemistry*, 10, 410-412.
- Spange S, Wagner T, Heinzl T. and Krämer OH. (2009). Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(1), 185–198.
- Sridhar, S.K., Pandeya, S.N., Stables, J.P. and Ramesh, A. (2002). Anticonvulsant activity of hydrazones, Schiff and Mannich bases of isatin derivatives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16: 129-132.
- Stark, M. and Hayward, N. (2007). Genome-wide loss of heterozygosity and copy number analysis in melanoma using high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Research* 67, 2632e2642.
- Stewart BW. And Kleihus P, editors. (2003). World cancer report. Lyon: IARC Press.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41e45.

- Stunkel, W., Peh, B.K., Tan, Y.C., Nayagam, V.M., Wang, X., Salto- Tellez, M., Ni, B., Entzeroth, M. and Wood, J. (2007). Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnology Journal*, 2, 1360e1368.
- Sun, J.Y., Xu, L., Tseng, H., Ciccarelli, B., Fulciniti, M., Hunter, Z.R., Maghsoudi, K., Hatjiharissi, E., Zhou, Y., Yang, G., Zhu, B., Liu, X., Gong, P., Ioakimidis, L., Sheehy, P., Patterson, C.J., Munshi, N.C., O'Connor, O.A. and Treon, S.P. (2011). Histone deacetylase inhibitors demonstrate significant preclinical activity as single agents, and in combination with bortezomib in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 11, 152e156.
- Szegezdi E., Fitzgerald U., Samali (2003). Caspase-12 and ER stress mediated apoptosis: the story so far. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1010, 186-194.
- Tan MJ, et al. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*, 146(6), 1015–1027.
- Tra, N. T., Ha, N. T. T., Cham, B. T., Nga, N. T., Huong, D. T. M., & Van Cuong, P. (2017). 3D cytotoxic and histon deacetylase (HDAC) inhibitory activities of triterpenoids isolated from leaves of *Viburnum sambucinum*. *Vietnam Journal of Chemistry*, 55(6), 724-724.)
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC. and Croce CM (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14; 18) chromosome translocation. *Science*, 226, 1097-1099.
- Tülüce, Y., Ahmed, B. A., Koyuncu, İ. and Durgun, M. (2018). The cytotoxic, apoptotic and oxidative effects of carbonic anhydrase IX inhibitor on colorectal cancer cells. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 50(2), 107-116.
- Vannini, A., Volpari, C., Filocamo, G., Casavola, E.C., Brunetti, M., Renzoni, D., Chakravarty, P., Paolini, C., De Francesco, R., Gallinari, P., Steinkuhler, C. and Di Marco, S. (2004). Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proceedings of National Academy of Sciences U S A* 101, 15064e15069.
- Vaux D, Silke J. (2003). Mammalian mitochondrial IAP-binding proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 203, 449-504.
- Venkateshwarlu, E., Venkateshwarrao, J., Umasankar, K. and Gheeraj, G. (2012). Study of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of novel isatin derivatives. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5, 187-190.
- Villagra, A., Cheng, F., Wang, H.W., Suarez, I., Glozak, M., Maurin, M., Nguyen, D., Wright, K.L., Atadja, P.W., Bhalla, K., Pinilla-Ibarz, J., Seto, E. and Sotomayor, E.M. (2009). The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nature Immunology*, 10, 92e100.
- Waltregny, D., Glenisson, W., Tran, S.L., North, B.J., Verdin, E., Colige, A. and Castronovo V. (2005). Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle

- alpha-actin and is essential for smooth muscle cell contractility. *Faseb Journal*, 19, 966e968.
- Wang, J.C., Kafeel, M.I., Avezbakiyev, B., Chen, C., Sun, Y., Rathnasabapathy, C., Kalavar, M., He, Z., Burton, J. and Lichter, S., (2011). Histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology*, 81, 325e329.
- Wang, Z. T., Chen, Z. J., Jiang, G. M., Wu, Y. M., Liu, T., Yi, Y. M., ... & Wang, H. S. (2016). Histone deacetylase inhibitors suppress mutant p53 transcription via HDAC8/YY1 signals in triple negative breast cancer cells. *Cellular signalling*, 28(5), 506-515.
- Weichert, W., Roske, A., Niesporek, S., Noske, A., Buckendahl, A.C., Dietel, M., Gekeler, V., Boehm, M., Beckers, T. and Denkert, C. (2008). Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*, 14, 1669e1677.
- Wen, W., Ding, J., Sun, W., Wu, K., Ning, B., Gong, W., He, G., Huang, S., Ding, X., Yin, P., Chen, L., Liu, Q., Xie, W. and Wang, H. (2010). Suppression of cyclin D1 by hypoxia-inducible factor-1 via direct mechanism inhibits the proliferation and 5-fluorouracil-induced apoptosis of A549 cells. *Cancer research*, 70(5).
- World Health Organization. (2020). WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. *World Health Organization*. pp 160.
- Xu, X., Xie, C., Edwards, H., Zhou, H., Buck, S.A. and Ge, Y. (2011). Inhibition of histone deacetylases 1 and 6 enhances cytarabine-induced apoptosis in pediatric acute myeloid leukemia cells. *PLoS One*, 6, e17138.
- Yang, H., Yang, T., Baur, J.A., Perez, E., Matsui, T., Carmona, J.J., Lamming, D.W., Souza-Pinto, N.C., Bohr, V.A., Rosenzweig, A., de Cabo, R., Sauve, A.A. and Sinclair, D.A. (2007). Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival. *Cell*, 130, 1095e1107.
- Yang, X.J. and Seto, E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nature Reviews Molecular Cell. Biology*, 9, 206e218.
- Yang, Y., Tse, A.K., Li, P., Ma, Q., Xiang, S., Nicosia, S.V., Seto, E., Zhang, X. and Bai, W. (2011). Inhibition of androgen receptor activity by histone deacetylase 4 through receptor SUMOylation. *Oncogene*, 30, 2207e2218.
- Yarosh, W., Barrientos, T., Esmailpour, T., Lin, L., Carpenter, P.M., Osann, K., Anton-Culver, H. and Huang, T. (2008). TBX3 is overexpressed in breast cancer and represses p14 ARF by interacting with histone deacetylases. *Cancer Research*, 68, 693e699.
- Yıldırım ve diğerleri, Amasya Üniversitesi/BAP, FMB BAP. 20-0456 no'lu Araştırma Projesi Sonuç Raporu, 2022.

- Yuan, Z., Peng, L., Radhakrishnan, R. and Seto, E. (2010). Histone deacetylase 9 (HDAC9) regulates the functions of the ATDC (TRIM29) protein. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 39329e39338.
- Zhang, J., Yang, Y., Yang, T., Liu, Y., Li, A., Fu, S., Wu, M., Pan, Z. and Zhou, W. (2010). MicroRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell proliferation and tumourigenicity. *British Journal of Cancer*, 103, 1215e1220.
- Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Omoto, Y., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hayashi, S. and Iwase, H. (2004). HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 10, 6962e6968.
- Zhao, C., Tang, C., Li, C., Ning, W., Hu, Z., Xin, L. and Huang, J. (2021). Novel hybrid conjugates with dual estrogen receptor α degradation and histone deacetylase inhibitory activities for breast cancer therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 40, 116185.
- Zhou, X., Richon, V.M., Wang, A.H., Yang, X.J., Rifkind, R.A. and Marks, P.A. (2000). Histone deacetylase 4 associates with extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, and its cellular localization is regulated by oncogenic Ras. *Proceedings of National Academy Sciences. U S A* 97, 14329e14333.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Berna KOCAMAN

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
-----------------	--------------	----------------

Lisans	: Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2019
--------	------------------------------------	------

Yüksek Lisans	: Amasya Üniversitesi	2022
---------------	-----------------------	------

Yabancı Dili

İngilizce (C2)

Fransızca (B2)