

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

**YENİ SENTEZLENMİŞ BENZİMİDAZOL TÜREVLERİNİN AKCİĞER
KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNE SİTOTOKSİK / APOPTOTİK VE
ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

MUSTAFA UÇKUN

**YÜKSEKLİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

TEMMUZ 2019

Tezin Başlığı: Yeni Sentezlenmiş Benzimidazol Türevlerinin Akciğer Kanseri Hücre Hattı Üzerine Sitotoksik/Apoptotik ve Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması

Tezi Hazırlayan: Mustafa UÇKUN

Sınav Tarihi:12 Temmuz 2019

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri:

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Elif APOHAN

İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

İnönü Üniversitesi

Prof.Dr. Birgül ÖZCAN

Mustafa Kemal Üniversitesi

Prof. Dr. Halil İbrahim ADIGÜZEL

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Yeni Sentezlenmiş Benzimidazol Türevlerinin Akciğer Kanseri Hücre Hattı Üzerine Sitotoksik/Apoptotik ve Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması “ başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Mustafa Uçkun

ÖZET

Yüksek Lisans

YENİ SENTEZLENMİŞ BENZİMİDAZOL TÜREVLERİNİN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI ÜZERİNE SİTOTOKSİK / APOPTOTİK VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa Uçkun

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

62 + x sayfa

2019

Danışman: Prof. Dr. Elif APOHAN

Tüm dünyada her geçen gün artan hasta sayısı ile kanser önemli bir halk sağlığı sorunu olarak birinci sırayı almıştır. Tüm kanser çeşitleri içerisinde erkeklerde akciğer kanseri, kadınlarda ise meme kanseri başı çekmektedir. Her geçen gün daha da yaygınlaşan kanserle mücadele edebilmek için kanser hücrelerini seçen yeni kimyasal ajanların terkihi ve keşfi de önem kazanmıştır.

Bu çalışmada, sentezlenen on yeni benzimidazol türevi bileşiğin, akciğer kanser hücreleri (A549) ve sağlıklı akciğer epitel hücreleri (BEAS2B) üzerine sitotoksik aktiviteleri, MTT analiz yöntemi ve kaspaz 3 aktivitesine bakılarak incelenmiştir. Kontrol için kanser ilacı olarak kullanılan cisplatinle karşılaştırılmıştır. Ayrıca gram negatif ve gram pozitif bakteri türleri üzerine antimikrobiyal, bazı maya türleri üzerine de antifungal aktiviteleri mikrodilüsyon yöntemiyle incelenmiştir.

İncelenen bileşiklerden dört tanesi (2c, 3a, 3b ve 5) A549 hücrelerine karşı daha yüksek sitotoksik aktivite göstermiştir. Cisplatinin IC₅₀ değeri, 72. saatte A549 hücreleri için 6.75 µg/mL iken, bileşik 2c, 3a, 3b ve 5'in IC₅₀ değerleri sırasıyla 24.35, 28.49, 38.51 ve 60.70 µg/mL olarak hesaplanmıştır. BEAS2B hücreleri için bu bileşiklerin IC₅₀ değerleri A549 için IC₅₀ değerlerinden daha yüksektir. BEAS2B hücreleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla 87.63, 49.32, 57.89 ve 68.53 µg/mL iken, mevcut çalışmada cisplatinin IC₅₀ değeri 2.75 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bu dört yeni bileşik incelenen tüm mikroorganizmalara karşı yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Çalışmadaki dört bileşiğin yapılan analiz sonucuna göre Kaspaz 3 aktivitesini artırdığı görülmüştür.

Bu dört yeni bileşiğin sitotoksik aktivitesi gösterdiği tespit edilerek, gelecekte kemoterapötik potansiyele sahip yeni benzimidazol türevi bileşiklerin çalışmasına örnek olacağı değerlendirilmektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: Akciğer kanseri, Antimikrobiyal etki, Benzimidazol, Kaspaz 3 aktivitesi, Sitotoksik etki

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC/APOPTOTIC AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF NEWLY SYNTHESIZED BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES ON LUNG CANCER CELL LINE

Mustafa Uçkun

İnönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

62+ x pages

2019

Supervisor: Prof. Dr. Elif APOHAN

With the increasing number of patients all over the world, cancer has taken first place as an important public health problem. Among all types of cancer, lung cancer is the leading cause of cancer in men and breast cancer in women. To combat cancer which is becoming more common with each passing day, the composition and the discovery of new chemical agents that have chosen cancer cells have gained importance.

In this study, the cytotoxic activities of the ten novel benzimidazole derivative compounds on lung cancer cells (A549) and healthy lung epithelial cells (BEAS2B) were examined by MTT analysis method and caspase 3 activity. It was compared with cisplatin used as a cancer drug for control. Besides, antimicrobial activities on gram-negative and gram-positive bacteria and antifungal activities on some yeast species were examined by the microdilution method.

Four of the compounds examined (2c, 3a, 3b and 5) showed higher cytotoxic activity against A549 cells. The IC_{50} value of cisplatin was 6.75 $\mu\text{g/mL}$ for A549 cells in 72 hours, while IC_{50} values of compounds 2c, 3a, 3b and 5 were calculated as 24.35, 28.49, 38.51 and 60.70 $\mu\text{g/mL}$, respectively. For BEAS2B cells, the IC_{50} values of these compounds are higher than the IC_{50} values for A549. IC_{50} values for BEAS2B cells were 87.63, 49.32, 57.89 and 68.53 $\mu\text{g/mL}$, respectively, whereas the IC_{50} of cisplatin in the present study was calculated as 2.75 $\mu\text{g/mL}$. Besides, these four novel compounds have high antimicrobial activity against all examined microorganisms. Four compounds in the study showed that Caspase 3 activity was increased according to the results of the analysis.

It has been determined that these four new compounds show cytotoxic activity and will serve as an example for the study of new benzimidazole derivative compounds with chemotherapeutic potential in the future.

KEYWORDS: Antimicrobial effect, Benzimidazole, Caspase 3 activity, cytotoxic effect, Lung cancer,

TEŞEKKÜR

Katıldığım bir TÜBİTAK öğretmen eğitimi sonrası çıktığım bu yolda sona ulaşmanın mutluluğu ve gururunu yaşamaktayım. Eylül 2016 yüksek lisans mülakat sınav jürisinde görevli iken tanıştığım, ilerlemiş yaşıma rağmen benim istek ve azmimi görüp, bana inanarak, ders sürecinde ve bu çalışmanın her aşamasında yardımını, desteğini umutsuzluğa kapıldığım anlarda bile esirgemeyen, beni cesaretlendirerek önerileri ile yönlendiren tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Elif APOHAN 'a;

Yine ders sürecinde, ayrıca tüm çalışmamda bilgi ve tecrübesiyle her zaman destek olan, bu çalışmanın antimikrobiyal kısmında yardımını esirgemeyen bölümümüz Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA 'ya;

Tezin deneysel aşaması ve yazım aşamasında zorlandığım her an genç yaşına rağmen bilgisi, becerisiyle bana yardımcı olan sevgili kardeşim, bölümümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Samet UÇAR'a;

Yine tezin antimikrobiyal deneysel aşamasında zorlandığım her aşamada yardımını esirgemeyen sevgili arkadaşım, bölümümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Eray TATLICI 'ya;

Tezimi 2019/1596 no'lu proje ile destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne;

Yüksek lisans süresince ders programını bana göre düzenleyerek yardımcı olan okul müdürlerim ve müdür yardımcılara;

Bir işe başlayıp bitirme konusunda azim ve kararlılığı ile hep örnek aldığım babam merhum Zekeriya UÇKUN ve benim bu günlere gelmemde büyük emekleri olan annem Sultan UÇKUN 'a;

Sırtımı korkmadan yasladığım, en büyük desteğim, yaşıma rağmen, sen istersen başarırısın diyen, aile reisi olarak yapmam gereken ve aksattığım pek çok görevimi üstlenen, her konuda bana yardımcı olan ve tüm bu süreçte zaman zaman onları ihmal etmeme rağmen, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, hayat enerjilerim, AŞKIM, eşim Nalan, sevgili kızım Gökçen Tuğçe ve oğlum Altuğ Buğra'ya;

teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.2. Dünyada ve Türkiye’de Kanser.....	2
1.3. Akciğer Kanseri.....	5
1.4. Benzimidazol ve Türevleri	7
1.5. Hücre Yaşam Döngüsü ve Kanser.....	9
1.5.1. Hücre yaşam döngüsü	9
1.5.2. Hücre yaşam döngüsünün düzenlenmesi	11
1.5.3. Hücre döngüsü ve kanser	13
1.6. Apoptoz	15
1.6.1. Apoptoz mekanizmaları	17
1.6.1.1. Apoptozun ekstrinsik yolağı	18
1.6.1.2. Apoptozun intrinsik yolağı	18
1.7. Kaspaz-3.....	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Hücre Kültürü.....	25
3.2. Çalışmalarda Kullanılan Benzimidazol Bileşikleri	25
3.3. Optimizasyon Çalışmaları	27
3.4. MTT Analizi.....	27
3.5. Kaspaz-3 Kolorimetrik Analizi	28
3.6. Bileşiklerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	29
4. BULGULAR.....	31
4.1. Bileşiklerin A549 Hücreleri Üzerine Sistotoksik Etkisi.....	31
4.2. Bileşiklerin BEAS2B Hücreleri Üzerine Sistotoksik Etkisi.....	37
4.3. Kaspaz-3 Spesifik Aktivitesi	44

4.4. Minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) Bulguları.....	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
6. KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	62



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	DSÖ 2016 verilerine göre bazı AB ülkelerinde kanserden ölümler (%)	3
Şekil 1.2.	Erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün yaşa göre dağılımı (%)	3
Şekil 1.3.	Kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün yaşa göre dağılımı (%)	4
Şekil 1.4.	Pürin bazları ve benzimidazol	7
Şekil 1.5.	Benzimidazolün genel kimyasal formülü	8
Şekil 1.6.	Hücre döngüsü	9
Şekil 1.7.	Hücre döngüsünün büyüme faktörüyle düzenlenmesi	11
Şekil 1.8.	Hücre döngüsünü düzenleyen CDK komplekslerinin görev bölgeleri	11
Şekil 1.9.	Hücre döngüsü kontrol noktaları	13
Şekil 1.10.	Kültür kabı (a) normal hücre, (b) kanserli hücre bölünmesi	14
Şekil 1.11.	p53 geninin hücre döngüsündeki bir dizi görevi	15
Şekil 1.12.	Apoptozun iki yolağı ve apoptozda görevli temel proteinler	17
Şekil 1.13.	Perforin/granzimle indüklenen apoptoz mekanizması	19
Şekil 1.14.	Kaspaz-3'ün apoptozda keserek aktifleştirdiği hücre içi hedeflerden bazıları	20
Şekil 3.1.	1,5-disübstitüye benzimidazol (1)	25
Şekil 3.2.	1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzları (2a-c)	26
Şekil 3.3.	1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzları (3a-c)	26
Şekil 3.4.	Bis (N-koordine-benzimidazol) kobalt (II) kompleksleri (4a,4b)	26
Şekil 3.5.	Bis (N-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksi (5)	27
Şekil 4.1.	1,5-disübstitüye benzimidazol bileşiğinin (1) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	31
Şekil 4.2.	1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzunun (2a) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	32
Şekil 4.3.	1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzunun (2b) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	32
Şekil 4.4.	1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzunun (2c) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	33
Şekil 4.5.	1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (3a) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	33
Şekil 4.6.	1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (3b) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	34

Şekil 4.7.	1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (3c) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	34
Şekil 4.8.	Bis (N-koordine-benzimidazol) kobalt (II) kompleksleri (4a) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	35
Şekil 4.9.	Bis (N-koordine-benzimidazol) kobalt (II) kompleksleri (4b) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	35
Şekil 4.10.	Bis (N-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksi (5) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	36
Şekil 4.11.	Cisplatinin A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi.....	36
Şekil 4.12.	1,5-disübstitüye benzimidazol bileşiğinin (1) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	38
Şekil 4.13.	1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzunun (2a) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	38
Şekil 4.14.	1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzunun (2b) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	39
Şekil 4.15.	1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzunun (2c) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	39
Şekil 4.16.	1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (3a) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	40
Şekil 4.17.	1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (3b) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	40
Şekil 4.18.	1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (3c) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	41
Şekil 4.19.	Bis (N-koordine-benzimidazol) kobalt (II) kompleksleri (4a) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	41
Şekil 4.20.	Bis (N-koordine-benzimidazol) kobalt (II) kompleksleri (4b) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	42
Şekil 4.21.	Bis (N-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksi (5) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi	42
Şekil 4.22.	Cisplatinin BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi..	42
Şekil 4.23.	1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzu (2c) A549 hücre hattı üzerine kaspaz 3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi.....	44

Şekil 4.24.	1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzu (3a) A549 hücre hattı üzerine kaspaz 3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi.....	45
Şekil 4.25.	1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzu (3b) A549 hücre hattı üzerine kaspaz 3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi.....	45
Şekil 4.26.	Bis(N-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksi (5) A549 hücre hattı üzerine kaspaz 3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi.....	46
Şekil 4.27.	1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzu (2c) BEAS2B hücre hattı üzerine kaspaz 3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi	46
Şekil 4.28.	1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (3a) BEAS2B hücre hattı üzerine kaspaz 3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi	47
Şekil 4.29.	1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (3b) BEAS2B hücre hattı üzerine Kaspaz 3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi.....	47
Şekil 4.30.	Bis(N-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksi (5) BEAS2B hücre hattı üzerine kaspaz 3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Benzimidazol türevi bileşikler ve cisplatinin akciğer kanser hücreleri (A549) üzerine zamana bağlı IC ₅₀ değerleri (µg/mL)	37
Çizelge 4.2. Benzimidazol türevi bileşikler ve cisplatinin sağlıklı akciğer epitel hücreleri (BEAS2B) üzerine zamana bağlı IC ₅₀ değerleri (µg/mL)	43
Çizelge 4.3. Benzimidazol türevi bileşiklerin mikroorganizmalar üzerine MİK değerleri (µg/mL).....	49



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
A549	: Akciğer kanser hücresi
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu (Acquired Immun Deficiency Syndrome)
BEAS2B	: Sağlıklı akciğer epitel hücresi
CAD	: Kaspaz aracılığıyla aktiveleşen endonükleaz (caspase-activated endonuclease)
CDK	: Siklin bağımlı kinaz (cyclin dependent kinase)
CKI	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü (cyclin dependent kinase inhibitory)
CYC	: Siklin (cyclin)
DMEM	: Hücre besiyeri (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	: Dimetil sülfoksit (Dimethyl sulphoxide)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ(WHO)	: Dünya sağlık örgütünü (Whorlde healthy organisation)
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
FBS	: Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)
HSGM	: Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü
I	: İnterfaz
IC ₅₀	: Baskılayıcı konsatrasyon 50 (Inhibition concentration)
ICAD	: CAD inhibitörü (inhibitor CAD)
M	: Mitoz
MTT	: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid
p53	: Tümör süpresör gen
PBS	: Fosfat tamponlu solüsyon (Phosphate buffered saline)
S	: Sentez (DNA replikasyonu)
TNF	: Tümör nekroz faktör (Tumor necrosis factor)
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptörü (Tumor necrosis factor receptor)
TRAIL	: Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
µM	: Mikro molar
mL	: Mililitre

1. GİRİŞ

Organizmanın en küçük yaşamsal ve işlevsel birimi hücre için, değişen dış koşullara karşı sabit bir iç durumun muhafaza edilmesi, hayatta kalmak için zorunludur (King vd. 2000) ve bu durum organizmada homeostazi (iç denge) olarak tanımlanır. Çekirdek tarafından kontrol edilen hücre metabolizması, inorganik ve organik madde ihtiyacının karşılanması, atık maddelerin uzaklaştırılması ayrıca hücreler arası iletişim ve madde iletiminin gerçekleşmesi hücre büyüklüğünün belli sınırlar içerisinde kalmasına bağlıdır. Kısacası organizmanın yaşamı, yapı ve fonksiyonlarının işlevi fizyolojik gereksinimlerinin korunmasıyla mümkündür.

Hücre çoğalması ve hücre ölümü arasında mutlak bir denge olmak zorundadır. Bu denge bozulursa yani ölen hücre sayısı, bölünen veya farklılaşan hücre sayısından fazla olduğunda dejeneratif hastalıklar, tam tersi bölünen hücre sayısı, ölen hücre sayısından fazla olduğunda ise kanser veya bağışıklık sistemi hastalıkları ortaya çıkar (Karadağ, 2016). Kısacası normal şartlarda organizmada; zigotla başlayıp ölüme kadar geçen süre zarfında hücreler, doğarlar, çoğalırlar, farklılaşırlar ve yaşlanarak ölürlər (Akşit ve Bildik, 2003). Organizmada bir hücreye gereksinim kalmadığında, hücre içi sinyal iletim sistemi (haberciler) devreye girerek hücrenin yok olma sürecini başlatır. Ayrıca hücrelerin ölümü, çeşitli hastalıklar ya da kirlетici ajanlar tarafından zarar gördüğünde, bağışıklık sistemi tarafından tepkisel olarak koruyucu bir mekanizma olarak da ortaya çıkar (Özay ve Ülker, 2008).

İç veya dış faktörler genetik dejenerasyona yatkın hücrelerde malign çoğalmaya neden olabilir. Genetik yapısı bozulmuş hücreler, normal şartlarda bağışıklık sistemi tarafından tanınarak yok edilirler. Ancak bazı hücreler savunma hücrelerinden kurtularak kontrolsüz biçimde bölünür ve sayısı artarak kanserli hücrelere dönüşür. Kanser, insan vücudunun çoğu organını veya dokusunu etkileyebilen bir hastalıktır (Aktaş ve Demiray, 2018).

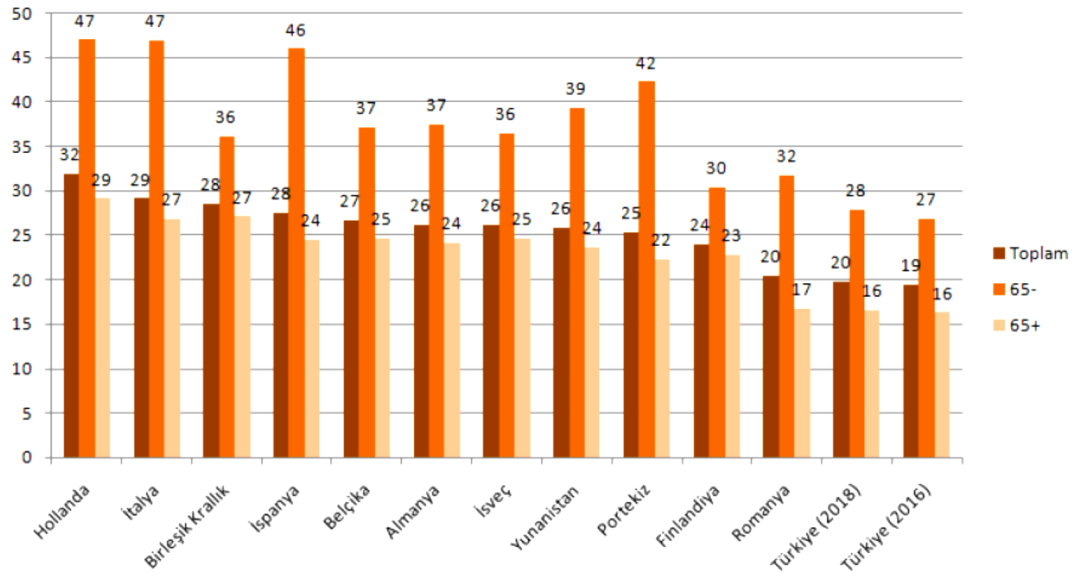
Pek çok gelişmiş ülkede ölüm nedenlerinin başında gelen kanser, yakın bir gelecekte dünyanın geri kalanında da kaynak seviyesinden bağımsız, en önemli hastalık ve ölüm sebebi olarak, hatta iskemik kalp rahatsızlığı veya diğer spesifik hastalık gruplarından dolayı gerçekleşen ölümleri de aşarak en önemli ölüm nedeni olarak karşımıza çıkacaktır (Jemal vd. 2011). Çağımızın en ölümcül hastalıklarından birisi olan kanserin her geçen gün daha yaygın olarak gözlenmesi kanser hücrelerini seçen yeni kimyasal ajanların bulunmasını önemli kılmıştır. Organizmadaki yönetici

moleküllerin yapısal birimleri nükleotidlere benzerlik gösteren heterosiklik yapıları aromatik bir bileşik olan benzimidazol türevleri geniş terapötik uygulama yelpazesine sahip maddeler olarak tıbbi kimyada önemli bir farmakofor olarak dikkat çekmektedir (Snehlata vd. 2016). Doğal birçok üründe ve ilaçta bulunan benzimidazol türevleri; iyon sistemleri, B12 vitamin çeşitleri, bazı metalloproteinler dahil pek çok biyolojik molekül için geçiş ve bağlanma molekülü olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüz modern ilaç keşfinde önemli bir farmakofor olan benzimidazol türevi bileşikler antitümör, antifungal, anti-enflamatuar, antibakteriyel, antihelmintik ve antiviral gibi çok farklı farmakolojik görev üstlenebilen çok yönlü bir bileşiktir (Apohan vd. 2017). Bu amaçla kanserli doku oluşumu ve gelişimini durdurmak için farklı hücre sinyal yolları ve apoptozu uyaran maddeler sentezleyerek yeni tedavi imkânları geliştirilmeye çalışılmaktadır (Görür, 2010).

Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hasan Küçükbay ve ekibi tarafından sentezlenen on farklı Benzimidazol türevi maddenin, akciğer kanser hücresi (A549 hücre hattı) ve akciğer epitel sağlıklı hücresi (BEAS 2B hücre hattı) üzerine farklı konsantrasyonlarda, zaman bağımlı olarak sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Ayrıca gram pozitif *Staphylococcus aureus*, gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* bakterileri üzerine bileşiklerin antibakteriyel etkisi, *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* maya mantarı üzerine antifungal etkisi araştırılmıştır.

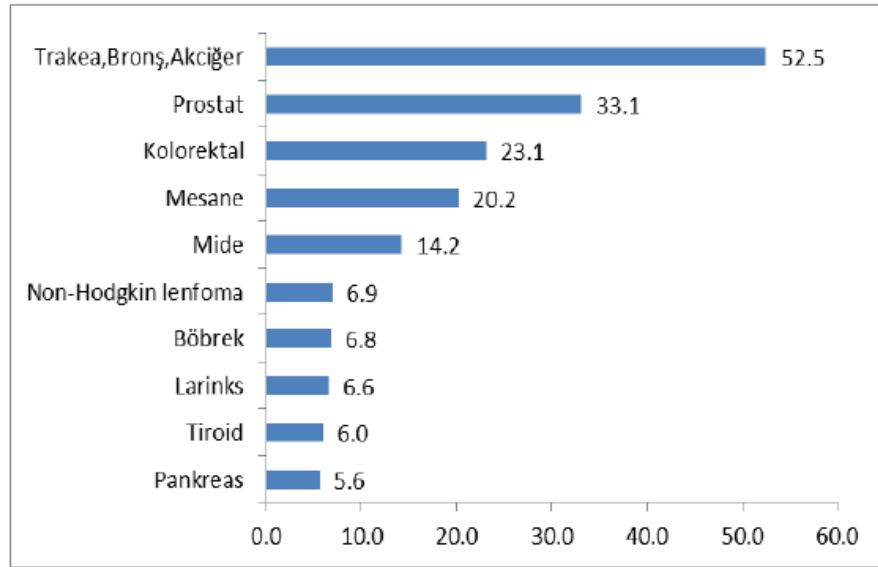
1.2. Dünyada ve Türkiye’de Kanser

Dünya genelinde kanser bir halk sağlığı sorunudur, kanserin önlenmesi ve tedavisi konusunda her geçen gün artan bilgimize rağmen, her yıl yaklaşık 14 milyon yeni vakayla insidansı artan ve buna bağlı olarak da mortalitesi yükselen bir hastalıktır. Kanser 2003 yılında gelişmiş ülkelerde ikinci sırada, gelişmekte olan ülkelere ise en önemli üç ölüm sebebinden biri iken, 2015 yılında tahmini 8,8 milyon kişinin, 2018 yılında ise tahmini 9,6 milyon kişinin ölümüne neden olmuş, güncel verilere göre ise dünya genelinde ölüm nedenleri arasında ilk sıraya yerleşmiştir. Önlenebilirliği yüksek bir hastalık olan kanserin beklenmeyen bu yükselişi tüm dünya ülkelerinde kabul edilemeyecek büyüklükte bir insani ve sosyal maliyet oluşturmaktadır (Jemal vd. 2011; WHO World Cancer Report, (2018); WHO Cancer, 2018).

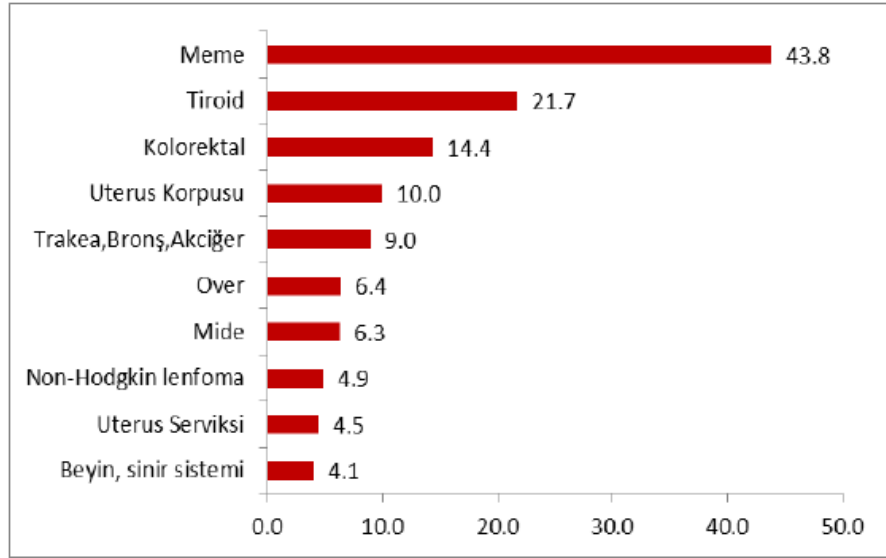


Şekil 1.1. DSÖ 2016 verilerine göre bazı AB ülkelerinde kanserden ölümler (%), (Anonymous. 6)

Sağlık Bakanlığının son verilerine göre kanser, her yıl ortalama 160.000 civarında yeni konulan teşhis ve yaklaşık 90.000 civarında ölüm nedeniyle, ülkemizde insidansı, morbiditesi ile mortalitesi hızla artan sosyal ve ekonomik açıdan yüklediği yük bakımından önemli bir halk sağlığı sorunu olarak öne çıkmaktadır (Anonymous. 5).



Şekil 1.2. Erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün yaşa göre dağılımı (%), (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2015, Anonymous. 5)



Şekil 1.3. Kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün yaşa göre dağılımı (%), (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2015, Anonymous. 5)

Bölgesel ve uluslararası bazı farklılıklar olsa da, tütün, enfeksiyonlar, sağlıksız beslenme ve ultraviyole ışınlar kanser oluşumunda temel risk faktörleri olarak öne çıkmaktadır. Özellikle tütün, gelişmiş ülkelerde en önemli risk faktörü olmayı sürdürürken, bazı gelişmekte olan Afrika ve Asya ülkelerinde enfeksiyon hastalıkları en önemli kanser sebebidir. Obezite, gelişmiş ülkeler dahil artık düşük ve orta gelirli ülkeler de bile her geçen gün önemini artırarak kanser için risk faktörleri arasında yerini almaktadır (Jemal vd. 2011, McGuire, 2016).

Tütün kanserojen bir üründür ve dünya genelinde yaklaşık 1,3 milyar insan tütün ürünü tüketmektedir. Özellikle sigara 16 kanser türünün temel sebebi ve dünya genelinde kanser kaynaklı ölümlerin yaklaşık beşte birini kapsamaktadır. Amerika’da yapılan bir araştırmaya göre 1991 ve 2003 yılları arası erkeklerde kanser kaynaklı ölüm oranlarındaki %40’a varan düşüşün, özellikle son yıllarda sigara kullanımındaki azalmaya bağlı olduğu düşünülmektedir (Jemal vd. 2011). TÜİK verilerine göre ülkemizde 15 yaş ve üstü bireylerde tütün ürünleri kullanımı 2014 yılında %27,3 iken 2016 verilerine göre bu oran %26,5’ye düşmüştür. Erkeklerde tütün ürünleri kullanımı 2014-2016 yılları arası %41,8’den %40,1’e düşerken, kadınlarda ise %13,1’den %13,3’e yükselmiştir (TÜİK ölüm nedenleri istatistikleri, 2018). Tek başına sigara dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin %20’sinden sorumludur. Sigara kullananlarda akciğer kanseri görülme sıklığı içmeyenlere oranla 15 ila 30 kat daha fazladır (Jemal vd. 2011).

Yapılan araştırmalar 2008 yılında dünya genelindeki kanser vakalarının %16,1'inin enfeksiyon hastalıkları etmenlerinden kaynaklandığını göstermiştir. Enfeksiyonların sebep olduğu kanserler (karaciğer, mide ve rahim ağız kanseri) gelişmekte olan ülkelerde daha sık görölmekteyken, gelişmiş ülkelerde prostat, meme ve kolon kanserleri daha çok öne çıkmaktadır (WHO cancer, 2018). Dolayısıyla dünya genelinde özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde enfeksiyon hastalıklarına yakalanma oranının düşürölmesi, kanser insidansında da önemli oranda azalmayı beraberinde getirecektir (Jemal vd. 2011).

Kanserin önlenbilmesi amacıyla, türe özgü moleküler yaklaşımlar, hücre sinyal yolaklarını hedefleyen yeni ilaçların keşfi, cerrahi ve tıbbi onkolojideki yeniliklerle erken tanı ve tedavideki yeni gelişmeler olağanüstü fırsatlar sunmaktadır (Jemal vd. 2011; WHO world cancer report, 2018).

1.3. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri; bronş, bronşiyol ve alveollerden köken alan epitel hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonrası ortaya çıkan, temeli mutasyona bağı bir kanser türüdür. Mutasyonun asıl hedefi büyümeyi uyararak proto-onkogenler, büyümeyi inhibe eden kanser baskılayıcı genler ve hasara uğrayan DNA'nın onarımını düzenleyen genlerdir (Aliyev, 2015;Yurdakul, 2017). Kontrolsüz çoğalan hücreler alveollerin içersini kaplayarak hava değışim yüzeyini azaltır, hastanın solunum güçlüğü çekmesine neden olur.

Akciğer kanserinin histopatolojisine bakıldığında küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olmak üzere iki türü vardır (Parkin vd. 2004). Küçük hücreli akciğer kanseri, akciğer kanserlerinin en hızlı çoğalan türüdür. Karakteristik olarak tümör hücreleri küçüktür, yoğun olarak bir arada duran, farklılaşma göstermediğı için doku içersinde diğeri hücreler ve birbirinden ayrılmalrı güç olan kanser hücrelerinden oluşur. Yapılan araştırmalar küçük hücreli akciğer kanserinin, sigara içilmesiyle yakın ilişkisi olduğunu göstermektedir (Aliyev, 2015). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, skuamoz (yassı epitel) hücreli karsinoma, adenokarsinoma ve büyük hücreli karsinoma olarak üç alt türü vardır, akciğer kanserlerinin %85'ini kapsamaktadır (Mason ve Bousey, 2000; Parkin vd. 2004).

T.C. Sağık Bakanlığı'nın 2016 Türkiye Kanser İstatistikleri Raporunda yayınlanan 2014 yılı verilerine göre tüm kanser vakaları içinde erkeklerde görölme

sıklığı en yüksek kanser türü % 52,5'le akciğer kanseridir. Ülkemizde tüm yaş ve cinsiyet grupları dikkate alındığında % 21,9 görülme sıklığı ile yine akciğer kanseri en ön sırada yerini almıştır (Gönüllü, 1995; HSGM Faaliyet raporu, 2016). 2018 TÜİK verilerine göre ölüm nedenleri arasında %38,4 ile dolaşım sistemi hastalıklarından sonra, %19,7 ile kanserden ölümler ikinci sırada yer almaktadır. Kanser sebebiyle gerçekleşen ölümler 2018 yılında toplam 81 bin 129'dur. Kanser ölümleri dikkate alındığında ise akciğer kanseri %31,1 ile ilk sıradadır (Akyüz, 2006;Yurdakul, 2017; TÜİK ölüm nedenleri istatistikleri, 2018). Dünya genelinde akciğer kanserinden her yıl yaklaşık 1 milyon kişi hayatını kaybetmektedir. Hastaların ortalama yaşam süresi hastalığın ortaya çıkmasıyla birlikte 8 aydır ve akciğer kanseri hastalarının en çok beş yıl süreyle sağ kalım oranı %15'tir (Müsellim, 2007).

Akciğer kanserinin ortaya çıkmasında başlıca etken sigara kullanımıdır. Öyle ki sigara kullanımı tek başına akciğer kanseri riskini 30 kat artırmaktadır. Sigara içme süresi, içilen sigaranın çeşidi, içilen sigara miktarı ve içilen süre kanser gelişimini doğrudan etkilemektedir. Sigara kullanmadığı halde sigara dumanına maruz kalma (pasif içicilik) tek başına kanser riskini azımsanmayacak oranda artırmaktadır. Yapılan araştırmalar; mesleki maruziyete bağlı kanser vakalarında asbest, doğada bulunan uranyumun bozunma sonucu oluşan radon gazı, hava kirliliği, kentsel yaşam gibi sebepleri akciğer kanserinin nedenleri arasında gösterilmektedir. Ayrıca kalıtsal faktörler dikkate alındığında birinci derece akrabalarında akciğer kanseri olanlarda riskin 2-3 kat arttığı değerlendirilmiştir (Akyüz, 2006; Müsellim, 2007; Yurdakul, 2017).

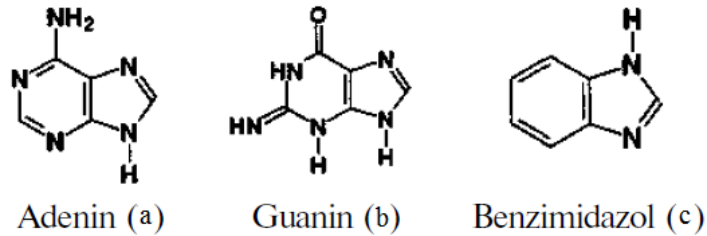
Son yıllarda yapılan araştırmalar akciğer kanserinin moleküler yapısı ve gelişimi hakkında daha fazla bilgiye sahip olmamızı sağlamıştır. Elde edilen bilgiler, tümörün boyutu, özellikleri ve yayılımına da bakılarak koruyucu tedavi olarak uygulanan kemoterapi, hormon tedavisi ve radyoterapi gibi yöntemlerle kanserin tekrarlama riskini azaltmayı hedeflerken, akıllı ilaçlarla hedefe yönelik tedavilere yönlendirmektedir (Yurdakul, 2017). Tam bu noktada araştırmacılara düşen en önemli iş, yeni arayışlara yönelerek terapötik özellikte yeni ajanlar keşfetmektir.

1.4. Benzimidazol ve Türevleri

Günümüzde kanser hastalığına bağlı ölümler, ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer almakta ve kemoterapi kanser tedavisinde en sık kullanılan tedavi yöntemi olamaya devam etmektedir. Kemoterapi; kanserin çeşidine, evresine göre tedavi etmeyi, yayılımını önlemeyi, tümörün büyümesini yavaşlatmayı ve vücudun farklı bölgelerine yayılmış kanser hücrelerini yok etmeyi amaçlayan ilaçla tedavi yöntemidir (Aslan vd. 2006).

Kanserden ölümler bu kadar çokken araştırmacılar için daha iyi, daha etkili kemoterapötik ilaç geliştirme ve hedefe yönelik tedavilerin ortaya çıkartılması çabası önem kazanmaktadır.

Bu bağlamda 1943 yılında Woolley benzimidazolün kemoterapötik potansiyelini fark ederek çeşitli biyolojik tepkimelerin gerçekleşmesinde pürinlere benzer davranabileceğini ifade etmiştir (Wolley, 1943; Bansal ve Silakari, 2012). Çünkü DNA-ilaç kompleksleri RNA polimeraz enzimini etkileyerek, mRNA sentezini durdururlar. Benzimidazol (c) yapısal olarak DNA nükleotidlerinden heterosiklik yapıları Adenin (a) ve Guanin (b) benzeri oldukları için kemoterapötik aktivitelerini bu yolla gösterebilecekleri düşünülmekte ve bu amaçla çalışılmaktadır (Spasov vd. 1999; Ören ve Yalçın, 1997; Barot vd.2013).

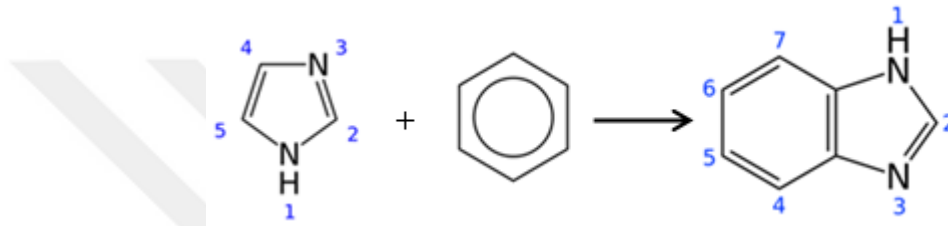


Şekil 1.4. Pürin bazları ve benzimidazol, (Walia vd. 2011; Ören ve Yalçın, 1997).

Ayrıca Brink yaptığı çalışmalarda B12 vitamini ayrışma ürünü olarak 5,6-dimetilbenzimidazolü tanımlamış (Brink ve Folkers, 1949) ve bazı B12 vitamin benzeri aktivite gösteren benzimidazol türevlerini sentezlemiştir (Sapasov vd. 1999; Walia vd. 2011; Bansal ve Silakari, 2012). Bazı yeni araştırma ve araştırmacılar için bu veriler örnek olmuş ve son yıllarda benzimidazol sınıfı organik bileşikler antiparaziter, antikonvülzan (antiepileptik), analjezik, antihistaminik, antihipertansifer, antiviral, antikanser, antifungal, anti-inflamatuvar gibi birçok özelliğinden dolayı çeşitli biyolojik çalışmalarda önemli bir heterosiklik yapı olarak

dikkat çekerek, gelişmiş ve çalışılmıştır (Apohan vd.2017; Walia vd. 2011; Keri vd. 2009; Bansal ve Silakari, 2012; Barot vd.2013; Carlsson vd. 2002).

Benzimidazol, çift halkasal yapısı, benzen ve imidazol füzyonuyla oluşmuş, aromatik yapıli heterosiklik bir bileşiktir. Benzen iyi bir çözücü ve ilaç, plastik, sentetik sakız veya boyaların kimyasal sentezinin önemli bir öncüsü olarak kimya endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İmidazol ise beyaz, renksiz, suda çözündüğünde hafif alkali bir çözelti oluşturur. Yapısında bitişik olmayan iki azot atomu içeren diazoller sınıfından bir organik bileşiktir. Ayrıca histidin aminoasidi, histamin ve büyümede etken olan biyotin gibi biyolojik pek çok molekül imidazol yapısındadır.



Şekil 1.5. Benzimidazolün genel kimyasal formülü, (Barot vd.2013).

Her geçen gün benzimidazol halkası, farmasötik moleküllerin geliştirilmesinde faydalı olabilecek yapısal bir motif olarak kullanılmakta ve yeni benzimidazol türevleri sentezlenerek *in vitro* ve *in vivo* olarak kanser tedavisi için potansiyel yeni kemoterapötikler olarak gösterilmektedir. Ayrıca farklı farmakolojik aktivitelere sahip bileşikler olarak çok yönlü özellikleriyle öne çıkmaktadır (Easmon vd. 2001; Barot vd.2013; Alamgir vd. 2007; Özdemir vd. 2017; Apohan vd. 2017).

Bazı doğal ilaçların yapısında heterosiklik halka şekliyle biyoaktif rol oynayan benzimidazol ve türevleri kanser hücrelerinin mitoz hücre bölünmesini önlediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiş, yeni ve modern ilaçların keşfedilmesinde önemli bir farmakofor olarak antikanser ajanların tasarımında büyük ilgi görmüştür (Abonia vd. 2011; Wang vd. 2018).

Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hasan KÜÇÜKBAY ve ekibi tarafından sentezlenen 10 yeni benzimidazol türevi bileşiğin sitotoksik etkisi akciğer kanseri hücre hattı (A549) ve sağlıklı akciğer epitel hücre hattı (BEAS2B) üzerinde test edilmiştir. Güçlü sitotoksik etkiye sahip bileşiklerin kaspaz 3 aktivitesi değerlendirilmiştir. Ayrıca bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesi de test edilmiştir.

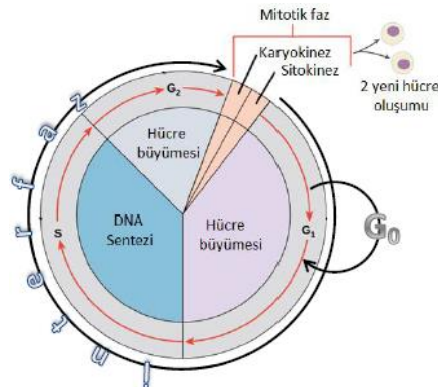
1.5. Hücre Yaşam Döngüsü ve Kanser

1.5.1. Hücre yaşam döngüsü

Tüm canlılar en küçük yaşamsal ve işlevsel birim olan tek bir hücre ya da çok sayıdaki hücrenin birleşmesinden meydana gelmiştir. Çok hücreli ve kompleks bir yapıya sahip olan insan, uzun süre tek başına hayatta kalamayan farklılaşmış çok sayıda özelleşmiş hücre gruplarından oluşur (Reece vd. 2013). Canlılığın devamı tüm biyolojik olayların hücresel bir temelde gerçekleşmesine ve hücre bölünmesine bağlıdır. Ökaryotik hücre çekirdeği, hücrede organik ve inorganik madde homeostazisi, metabolizma sonucu oluşan atık maddenin uzaklaştırılması, ayrıca hücreler arası madde iletiminin gerçekleşmesi, haberleşme ve hücre büyüklüğünün belli sınırlar içinde kalmasından sorumludur. Hücre bölünmesi hücrelerin özelliklerine, görevlerine, bulundukları yere ve yaşama süresine göre değişir (Alberts vd. 2013; Lamerton, 1974).

Hücre bölünmesinin zamanlaması ve hızı, organizmada normal bir süreçte büyüme, gelişme ve hayatta kalma gibi durumlar için kritik önem taşır. Canlıda, büyüme, gelişme ayrıca doku ve organ onarımı için hücre bölünür ve genetik olarak birbirinin aynısı iki yeni hücre oluşur (Alberts vd. 2013). Hücre döngüsü olarak tanımlanan bu süreç, bir hücre bölünmesinin başlangıcından onu takip eden diğer hücre bölünmesinin başlangıcına kadar geçen zaman aralığını kapsar (Canpolat, 2016).

Hücre bölünmesi; karakteristik olarak DNA eşlenmesi (interfaz) ve eşlenen DNA'nın iki ayrı hücreye ayrılmasıyla (mitotik faz) meydana gelen ardışık iki süreç sonucu gerçekleşir (Reece vd. 2013; Cooper ve Hausman, 2016; Vermeulen vd. 2003).



Şekil 1.6. Hücre döngüsü, (Reece vd. 2013'den düzenlenmiştir)

Hücre interfaz süresince sabit bir hızla büyürken, hacimsel olarak bir büyüme gerçekleşir, DNA interfazın belirli bir kısmında sentezlenerek eşlenir (Cooper ve Hausman, 2016). Hücre döngüsünün yaklaşık % 90'ını kapsayan interfaz evresi kendi içinde meydana gelen biyokimyasal olaylar dikkate alınarak G1, S ve G2 alt evrelerinden oluşur.

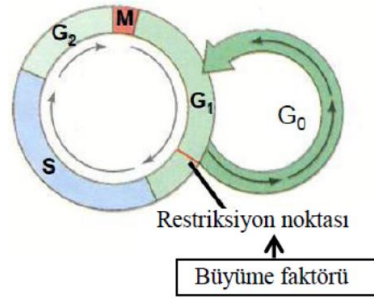
G1'de hücre büyüme süreciyle birlikte, DNA hasarları kontrol edilerek düzeltilir, ayrıca DNA replikasyonu için gerekli çeşitli proteinler ve ATP sentezlenir. S evresinde DNA zincirleri kalıp olarak kullanılarak mevcut DNA'nın tıpatıp aynısı bir kopya sentezlenir. G2 evresi yine hücre büyümesinin devam ettiği ve mitotik evre için protein sentezi ve ATP üretimin yapıldığı evredir. Döngünün yaklaşık 24 saatte sürdüğü tipik bir insan hücresinde 11 saat süren G1, 8 saat süren S, 4 saat süren G2 evresi sonrası yaklaşık 1 saat süren ve iki aşamada gerçekleşen mitotik evreyle döngü tamamlanır (Cooper ve Hausman, 2016).

Mitotik evrede interfazda eşlenen DNA'nın kromozomlara dönüştüğü, mikrotübüllerin oluşturduğu iğ iplikleri aracılığıyla kardeş kromatidlerin birbirlerinden ayrılarak hücrenin zıt kutuplarına taşınmasıyla gerçekleşen nükleus (karyokinez) bölünmesi ve hücrenin ortasından ipe doğru boğumlanarak sitoplazmanın (sitokinez) bölünmesi sonrası iki yeni hücre meydana gelmektedir (Alberts vd. 2013).

G1 evresinin sonlarına doğru hücre çoğalmasını uyaran ve ekstrasellüler büyüme faktörleri tarafından kontrol edilen restriksiyon noktası olarak tanımlanan bir hücre bölünme karar noktası bulunur. G1 evresindeki kontrol noktasının geçilmesi büyüme faktörleri ve farklılaşmayı uyarıcı hücre dışı ve içi sinyallere bağlıdır. Vücutta bulunan farklı doku tipleri için epidermal, trombosit kaynaklı, insülin benzeri gibi pek çok farklı büyüme faktörü bileşik bulunmaktadır. Eğer G1'de uygun büyüme faktörleri bulunmuyorsa hücre restriksiyon noktasında durur ve bu şekildeki hücreler G0 olarak adlandırılan, hücre büyümesi durmuş, metabolik olarak aktif ancak protein sentez hızı düşük, dinlenme durumundaki durağan evreye girebilir ve uygun ekstrasellüler sinyallerle uyarılmadıkça çoğalmadan çok uzun süre bu şekilde kalabilirler (Cooper ve Hausman, 2016). İnsan vücudunda çoğalmayan veya çoğalamayan hücrelerin büyük kısmı G0 durağan evredeki hücrelerdir (Vermeulen vd. 2003).

Kanserli hücreler bu kontrolü kaybeder ve sürekli döngü içinde kalırlar, böylece çok kez bölünerek sayısal olarak artış gösterir. Aynı zamanda hücrelerdeki

kontak inhibisyonunun devre dışı kalması çoğalan hücrelerin üst üste yığınlar oluşturarak tümör yapılarının oluşmasına neden olur.



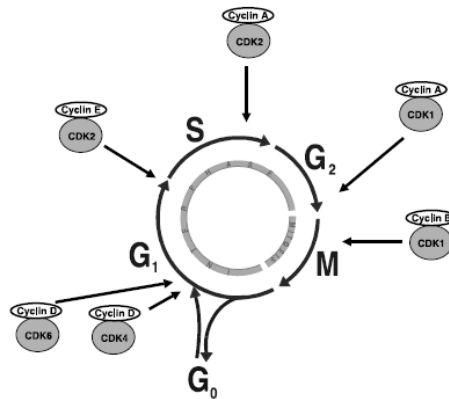
Şekil 1.7. Hücre döngüsünün büyüme faktörüyle düzenlenmesi, (Cooper ve Hausman, 2016)

1.5.2. Hücre yaşam döngüsünün düzenlenmesi

Hücre döngüsü sırasında bir evreden diğer evreye geçiş belirli bir düzen içinde, bir kontrol sistemi aracılığıyla farklı hücresel proteinler tarafından düzenlenir ve önceki bir olay tamamlanmadan sonraki olaylar gerçekleşmez (Cooper ve Hausman, 2016; Vermeulen vd. 2003).

Hücre döngüsü, kilit role sahip düzenleyici proteinler, döngünün belirli noktalarında aktive edilen bir serin–treonin protein kinaz ailesi olan siklinler (CYC), siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) tarafından kontrol düzenlenir (Vermeulen vd. 2003; Canplatt, 2016).

Yapılan deneysel çalışmalarda dokuz farklı CDK tanımlanmış ve bunların bir kısmının hücre döngüsünde G₁ (CDK4, CDK6 ve CDK2), S (CDK2), G₂ ve M (CDK1) etkin olarak görev aldığı tespit edilmiştir (Şekil 1.8.) (Alberts vd. 2013). Bu moleküllerin hücre içi konsantrasyonları ve aktivitelerindeki değişimler döngüdeki ardışık olayların hızını belirlemede önemli role sahiptir.



Şekil 1.8. Hücre döngüsünü düzenleyen CDK komplekslerinin görev bölgeleri, (Vermeulen vd. 2003)

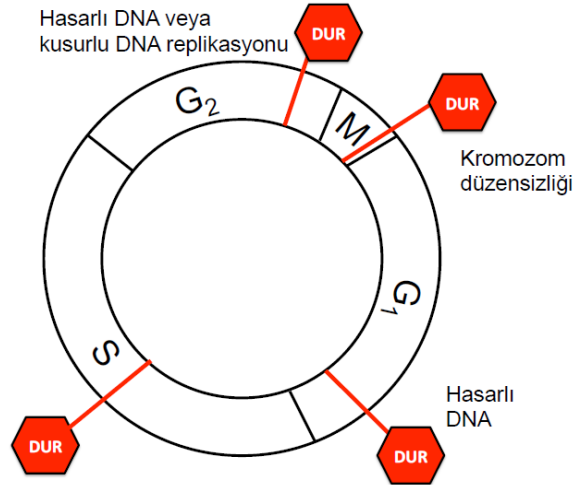
Her siklin molekülü ayrı biyokimyasal yapıda olup farklı protein guruplarının veya farklı siklinlerin fosforilasyonunu katalizlese de CDK'lar yapısal olarak temelde aynıdır, ancak hücre döngüsünün düzenlenmesinde, ne zaman ve hangi yoğunlukta bulunacakları farklılık gösterir (Murray, 2004; Cabadak, 2008). Hücre döngüsünde CDK protein seviyeleri sabit kalırken, siklin (CYC) protein seviyeleri hücre döngüsünde zaman zaman artıp azalır ve bu şekilde CDK'ların düzenli olarak aktivasyonunu sağlarlar (Vermeulen vd. 2003).

Ökaryotik hücre döngüsü evreleri arasında düzeni sağlayan G1, S, G2 ve M olarak adlandırılan dört kontrol noktası vardır. Hücre içi sentezlenen bazı kimyasal maddeler bu noktalarda “dur” ve “devam et” sinyalleri oluşturarak hücre döngüsünü düzenler. G1 kontrol noktasında hücre büyüklüğü ve DNA hasarının olup olmadığı kontrol edilir. Büyüme faktörü yetersizliği, DNA hasarı ve hücre kontak inhibisyonu gibi nedenler *p53* geninin CDK inhibitörü olan *p21*'in ekspresyonunu uyararak birçok CDK/CYC kompleksinin inhibisyonunu sağlayarak “DUR” sinyali oluşmasına ve döngünün durdurularak, hücrenin G0 durağan evreye girmesine neden olur. Her şey uygun olduğunda devam et sinyali döngüyü tekrar başlatabilir ya da DNA hasarı onarılamıyorsa, hücre apoptoz yoluyla yok edilebilir (Vermeulen vd. 2003; Murray, 2004; Cabadak, 2008).

S kontrol noktasında DNA bütünlüğü sürekli izlenerek, hasarlı DNA'nın replikasyon öncesi onarımı, replikasyon sırasında yanlış baz eşleşmeleri ya da DNA'nın bazı bölümlerinin eksik replikasyonu gibi hatalar bulunup onarılarak kalite kontrol görevi gerçekleştirilir.

G2 kontrol noktası DNA replikasyonu tamamlanmadan mitozun başlamasını engeller. Aynı zamanda mitotik evre (M fazı) işlemlerini uyarır, S evresinde tam olarak replikasyonu gerçekleşmemiş DNA'yı tanır ve gerekli durumlarda hücre döngüsünü S evresinde durduracak sinyalleri üretir. DNA replikasyonu tamamlanana kadar hücre, G2 evresinde bekletilir. DNA replikasyonu tamamlanınca G2 kontrol noktasının inhibisyonu ortadan kalkar ve hücre mitozu başlatır.

M kontrol noktası DNA bütünlüğünü koruyarak, iğ ipliklerinin kromozomun sentromer bölgesindeki kinetokorlara bağlanarak metafazdan anafaza geçişi ve kromozomların yavru hücrelere taşınmasını sağlar.

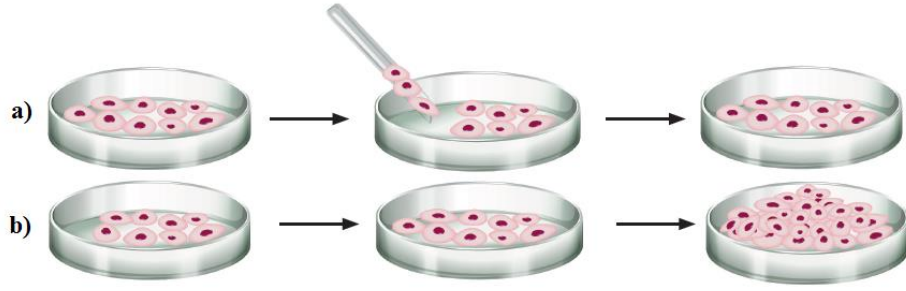


Şekil 1.9. Hücre döngüsü kontrol noktaları, (Cooper ve Hausman, 2016)

Hücre bölünmesi herhangi bir sebeple kontrolden çıkarsa kontrolsüz bölünen hücreler çoğalır ve tümör oluşumuna sebep olurlar (Canpolat, 2016). İncelenen kanserlerin yarısından fazlasında *p53* gen mutasyonunun olduğu rapor edilmiştir. Yapılan araştırmalar farklı kanser türlerinde, genellikle hücre döngüsünün G₁-S fazını kontrol eden proteinlerinin inaktif olduğu, G₂-M fazlarını kontrol eden proteinlerin de ise değişimin daha az görüldüğü rapor edilmiştir (Cabadak, 2008).

1.5.3. Hücre döngüsü ve kanser

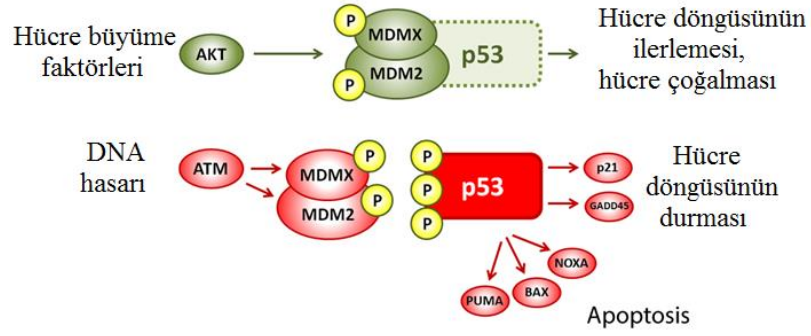
Çok hücreli organizmalarda genel ihtiyaçlar doğrultusunda hücrelerin çoğalması, farklılaşması, canlılığını devam ettirmesi veya hücre ölümü çeşitli genler tarafından kontrol edilir. Kanser oluşumuna neden olan temel etken, mutasyona uğramış hücrelerin sürekli ve kontrolsüz çoğalmasıdır (Sherr, 1996; Aktaş ve Demiray, 2018). Kanser hücreleri ile normal vücut hücrelerinin kültür ortamındaki hücre bölünme davranışları birbirinden farklılık göstermektedir. Kültür kabı içindeki sağlıklı hücreler 24 saatte bir bölünerek tek sıra hücre tabakası olarak zemini kapladığında oluşan kontak inhibisyonu sonucu bölünme durur. Kanserli hücreler ise hem sağlıklı hücrelerden daha hızlı bölünürler, hem de kültür kabında üst üste yığılarak kümelenme oluştururlar (Şekil 1.10.) (Anonymous 2, 2019; Cooper ve Hausman, 2016).



Şekil 1.10. Kültür kabı (a) normal hücre, (b) kanserli hücre bölünmesi (Aktaş ve Demiray, 2018)

Hücre döngüsü sırasında mutasyonları ve hücre transformasyonlarını azaltmak için DNA hasarı tanıma ve onarım mekanizmaları vardır. Ayrıca bağışıklık sistemi de kanserli hücreleri tanımak ve yok etmek için programlanmıştır. Tüm bu homeostatik mekanizmalardaki aksamalar kontrolsüz hücre bölünmesine yani kansere sebep olur (Ali Burak, 2009; Anonymous 2, 2009). Kanser gelişimi ve ilerlemesi genellikle hücre döngüsü düzenleyicilerinin aktivitesindeki bir dizi değişiklikle bağlantılıdır. Örneğin, hücre döngüsünü inhibe eden maddeler uygun olmayan koşullarda bölünmeyi durdururken, aynı maddelerin azda olsa aktivitesi kanseri teşvik edebilir. Benzer şekilde, hücre bölünmesini aktive eden düzenleyiciler eğer aktifse kansere yol açabilir. Çoğu durumda, aktivitedeki bu değişiklikler, hücre döngüsü düzenleyici proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Anonymous 2, 2009). Mutasyonlar sonucu DNA tamir enzimleri durur, proto-onkogenler de aktiveşerek onkogene dönüşür, sonrasında tümör baskılayıcı genler aktiveşir (Zhang, 2007).

DNA hasarı ve hücre kontak inhibisyonu gibi nedenlerle p53 geni p21 genini aktiveştirerek hücre döngüsünü durdurur. Ancak yapılan araştırmalarda tümör hücrelerinin yarısından fazlasında p53 geninin mutasyona uğradığı rapor edilmiştir (Ali Burak, 2009; Vazquez vd. 2008). *PRb* ve *p53* gibi tümör süpresör genlerinin inaktivasyonu, normal olarak hücre döngüsü ilerlemesini inhibe eden proteinlerin disfonksiyonu ile sonuçlanır (Vermeulen vd. 2003). *p53* tümör baskılayıcı gen, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü kontrol noktaları ve apoptoz gibi pek çok etkiye sahip, hücresel süreçleri düzenleyen çok fonksiyonlu bir transkripsiyon faktörüdür (Ali Burak, 2009; Anonymous 3, 2019).



Şekil 1.11. p53 geninin hücre döngüsündeki bir dizi görevi (Anonymous 1, 2019, <https://www.bethyl.com> adresinden düzenlenmiştir)

Kanser hücrelerinin bir diğer özelliği, sağlıklı vücut hücrelerinden çok daha fazla sayıda bölünebilmeleridir, bu sebeple kanser hücreleri ölümsüz hücreler olarak tanımlanabilir. Oysa kültürdeki sağlıklı vücut hücreleri, yaklaşık 40 bölünmeden sonra ölürler (Anonymous 2, 2019). Normal hücrelerden daha hızlı çoğalan kanser hücreleri fazla miktarda enerjiye ve atık maddelerin uzaklaştırılmasına ihtiyaç duyar, ayrıca farklı doku ve organlara yayılabilmesi yeni kan damarlarının oluşması ile mümkün olur. Kanser hücresinin, var olan damarlardan yeni damar uzantıları oluşturmaya anjiyogenez, kan ve lenf yoluyla diğer doku ve organlara yayılması olayına ise metastaz denir (Anonymous 4, 2019; Hartwell vd. 1994).

Kanser hücresi mikro çevresinde; kontrolsüz hücre bölünmesi, anjiyogenez, metastaz ve ilaçlara karşı direncin oluşumunu sağlayan bir ortam oluşur. Kanser hücrelerinin hızlı metabolizması daha çok karbondioksit oluşmasını sağlar. Buna bağlı olarak hipoksi (oksijen yetersizliği) ve inflamatuvar faktörlerde artış gözlenir. Hipoksi sonucu oksijen ihtiyacı artan kanser hücreleri damar oluşumunu uyaran anjiyogenik faktörler salgılar ve tümör ile damar arasındaki ekstrasellüler matriks proteinlerini parçalayan enzimler aktifleşir. Ayrıca kanser hücresindeki onkogenler de damar oluşumunu destekler (Anonymous 4, 2019; Hartwell vd. 1994).

1.6. Apoptoz

Her hücre; bölünür (proliferasyon), büyür, farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptoz) (Erdoğan ve Uzaslan, 2003). Zigotta başlayarak ölene kadar geçen süre zarfında organizmada hücre bölünmesi, farklılaşması, metabolik faaliyetler ile hücre ölümü, sürekli ve düzenli olarak gerçekleşen temel olaylardır. Yaşamın devamlılığı, organizmada yapı ve fonksiyonların fizyolojik gereksinimlerin belirlendiği sınırlar

içinde gerçekleşmesine bağlıdır. Bu sebeple hücre bölünmesi, farklılaşması ve hücre ölümü arasında kritik bir denge vardır ve bu denge bozulursa birçok hastalık ortaya çıkar.

Eğer hücre bölünmesi artıp, hücre ölümleri azalırsa kanser başta olmak üzere, birçok viral enfeksiyon, nörolojik ve otoimmünolojik çeşitli bozuklukların gelişimine sebep olur (Thompson, 1995). Bunun tam tersi hücre kaybının fazla olduğu durumlarda ise iskemi, kalp hastalıkları, nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıkması söz konusudur (Erdoğan ve Uzaslan, 2003).

İlk kez 1972’de Kerr ve arkadaşları, genetik olarak kontrol edilen hücre ölümü (apoptoz) ve programlı olmayan, tesadüfi hücre ölümü (nekroz) olarak isimlendirdikleri iki hücre ölüm mekanizması tanımlamışlardır. Ancak önemi yıllarca anlaşılamayan apoptoz, bugün embriyogenezden başlayıp yaşlanmaya kadar normal doku homeostazisi ve pek çok hastalığın biyolojik sürecinde yer alarak biyomedikal araştırmaların en sıcak alanlarından biri haline gelmiştir (Renehan vd. 2001). Apoptozun daha iyi anlaşılması, hücre ölümünü kontrol eden yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine ışık tutacaktır (Thompson, 1995).

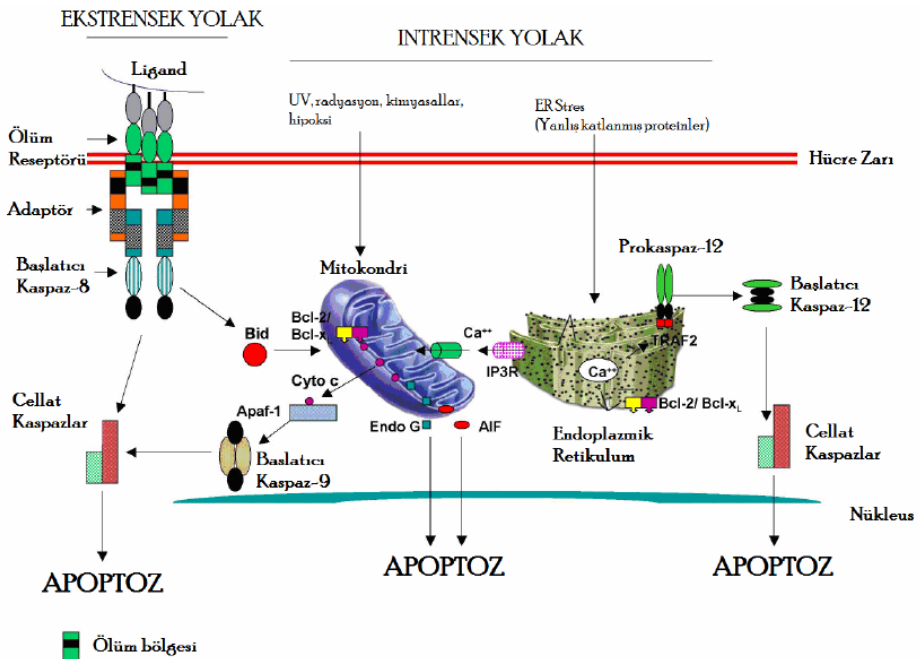
İnsan sağlığı sadece vücudun yeni hücreler üretmesi değil, aynı zamanda yaşlanan ve hasara uğrayan hücrelerin kontrollü bir şekilde yok edilmesine bağlıdır. Apoptoz mekanizması oldukça karmaşık ve kompleks olaylar bütünüdür. Apoptoz sürecinde oluşan ana morfoloji, çekirdeğin yoğunlaşması ve daha sonra hücrenin parçalara (apoptotik cisimcikler) ayrılmasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücrenin hacmi küçülerek diğer hücrelerle olan bağlantısı kopar ve hücre-çevre ile ilişkisi kesilir (Balakumaran vd. 1996), hücrede kromatin yoğunlaşır, hücre büzülmesi sonrası tomurcuklanmalar olurken fosfatidilserin molekülleri hücre zarı dış yüzeyine çıkar, bu durum fagositik hücreler için sinyal oluşturur. Transglutaminaz enziminin etkisi sonucu zardaki tomurcuklanmalarla başlayan apoptoz, hücrenin apoptotik cisimciklere ayrılmayla son bulur (Elmore, 2007). Bu apoptotik cisimcikler de komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınıp fagosite edilerek ortadan kaldırılır.

Araştırmacıları heyecanlandıran, bir hücrenin yaşamını veya ölümünü modüle edebilme kabiliyetini keşfetmek ve muazzam terapötik potansiyeli olan ajanlar üretebilmektir. Bu nedenle, tüm araştırmalar, hücre döngüsü mekanizmalarının açıklanmasına, analizine, hücre döngüsünü durdurma ve apoptozu kontrol eden sinyal yollarına odaklanmıştır. Tüm bu amaçlar apoptoz araştırmalarının baş döndürücü bir hızla ilerlemesine yol açmıştır. Kilit roldeki apoptotik proteinlerin

birçoğunun tanımlanmış olmasına rağmen, bu proteinlerin moleküler mekanizmaları açıklanmaya devam etmektedir (Zhang ve Xu, 2002). Çünkü pek çok sitotoksik ilaç ve radyoterapi uygulamaları kanser hücrelerinde apoptozu indüklerken hücrenin direnç göstermesi başarısızlıkla sonuçlanan bir tedavi demektir. Bu tedaviler ayrıca normal hücrelerde de apoptozu indükleyerek, kemik iliği, bağırsak ve oral mukoza üzerinde yan etkiler oluşturarak kullanılabilecek dozu sınırlandırabilir (Renehan vd. 2001; Görür, 2010).

1.6.1. Apoptoz mekanizmaları

DNA hasarı, oksidatif stres, radyasyon, viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, onkogenler, kemoterapötikler, gibi bazı faktörler apoptozu tetikleyen başlıca etkenlerdir (Rastogi ve Sinha, 2009). Kaspazlar; apoptozun başlatılmasından DNA fragmentasyonuna, hücre zarının tomurcuklanmasından, fosfolipid asimetrisinin bozulmasına kadar tüm apoptoz süresince görev alan ve pek çok farklı molekül tarafından hassas bir şekilde kontrol edilen apoptoz mekanizmasını kontrol eden bir grup proteindir. Sistein proteazları olan kaspazların bir kaskad oluşturacak şekilde aktifleşmeleri hem hücre içi hem de hücre dışı etkenler tarafından gerçekleştirilen iki farklı yolla tetiklenmektedir. Bunlar; ekstrinsek (ölüm reseptörü) ve intrinsek (mitokondriyal) olmak üzere başlıca iki yolak üzerinden gerçekleşir (Sartorius vd. 2001; Görür, 2010).



Şekil 1.12. Apoptozun iki yolağı ve görevli temel proteinler (Ali Burak, 2009)

1.6.1.1. Apoptozun ekstrinsik yolağı

Ekstresek (ölüm reseptörü) yolağta, hücrese apoptozun ana fizyolojik aktivatörleri, TNF (Tumor Necrosis Factor) gen reseptör ailesi üyeleri olan Fas (CD95/APO1), TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor-1) ve TRAILR1 (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand-R1), TRAIL-R2, TNF-R1 gibi ölüm ligandlarını kullanır (Erdoğan ve Uzaslan, 2003). Bu ligandların ölüm reseptörüne bağlanması sonucu kaspaz-8 aktivasyonu başlar ve diğer kaspazların indüklemesi ile hücreyi ölüme götüren süreç başlamış olur (Sortorius vd. 2001).

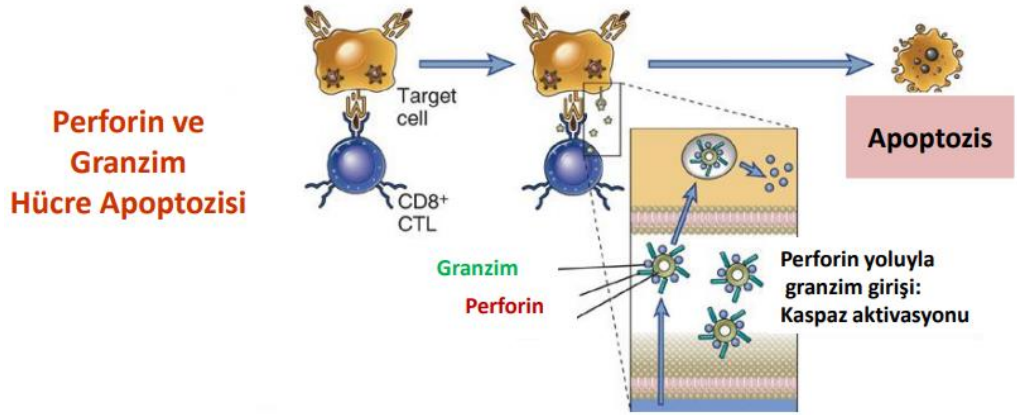
1.6.1.2. Apoptozun intrinsik yolağı

İntrinsik yolağta, mitokondri aktivasyonu apoptozun indüklenmesinde merkezi öneme sahiptir. Mitokondri, bir taraftan apoptoz için gerekli olan enerjiyi üretirken diğer taraftan sitokrom-c, endonükleaz G ve AIF gibi proapoptotik proteinlerin sitoplazmaya salınımı kaspazların aktifleşmesini sağlar. Sitokrom c sitoplazmada apoptotik proteaz aktive edici Apaf-1'e bağlanarak apoptozom adı verilen protein kompleksini meydana getirir. İntrinsik yolağ, Bcl-2 protein ailesi üyeleri tarafından kontrol edilir. Bcl-2 ailesi, birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri proapoptotik yani apoptozu indükleyici etkiye sahipken diğeri antiapoptotik yani apoptozu baskılayıcı etkiye sahiptir. Ayrıca apoptoz başlangıcı, ölüm reseptörü seviyesinde FLICE (kaspaz-8) inhibe edici proteinler (FLIP'ler) ile önlenabilir.

Apoptozun düzensizliğı; kanser, otoimmünite ve AIDS gibi hastalıklarla ilişkilidir. Bu nedenle, hücre ölümü yollarının aydınlatılması ve apoptoz modölatörlerinin tanımlanması birçok terapötik etkiye sahiptir (Sortorius vd. 2001).

Yapılan araştırmalar bu iki temel yolağın haricinde perforin/granzim A veya B'yi içeren bir başka apoptoz yolağı daha tanımlanmıştır (Tripathi vd. 2009). Perforin/granzimle indüklenen apoptoz, sitotoksik T lenfositler tarafından virüsle veya hücre içi patojenlerle enfekte olmuş hücreleri yok etmek için kullanılan ana yoldur (Trapani ve Smyth, 2002). T hücrelerinin salgıladığı perforinler enfekte olmuş hücrenin zarında delikler açarken, granzimler endositozla hücre içersine girerek kaspaz aktivasyonu ile apoptozu başlatır (Reece, 2013). Granzimlerin, katil hücre ve hedef hücre arasında oluşan immünolojik sinaps içine salınması, virüslerin, hücre içi bakterilerin ve kanserli hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılması

için önemlidir (Lieberman, 2010). Yapılan araştırma ve bulgular kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olan immünoterapinin önünü açmıştır.



Şekil 1.13. Perforin/granzimle indüklenen apoptoz mekanizması (Abbas vd. 2014).

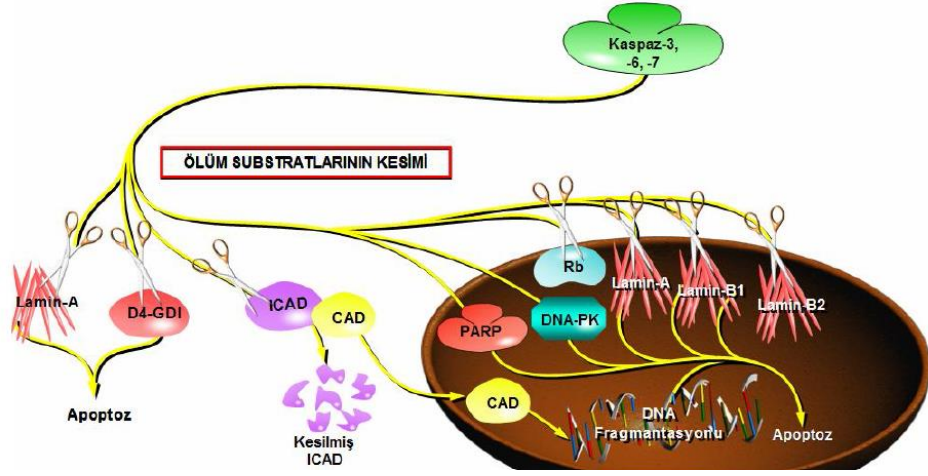
1.7. Kaspaz-3

Kaspaz-3 aktif merkezinde sistein molekülü taşıyıp aspartat rezidüsünü karboksil ucundan kesen bir moleküldür. Diğer kaspaz ailesi üyelerinden başlatıcı kaspazlar olarak adlandırılan kaspaz-8 ve kaspaz-9 tarafından aktifleştirilir ve sitoplazmada kaspaz ailesinden olmayan hedef proteinlerini spesifik bölgelerinden tanıyarak keser.

Fonksiyonu en iyi tanımlanan ve cellat kaspaz olarak isimlendirilen kaspaz-3 aktifleştikten sonra pek çok substrata bağlanarak keser (Şekil 1.14.). Bu proteolitik yıkım apoptoz sırasındaki morfolojik değişimin temelidir. Örneğin, kaspaz-3 kestiği gelsolin aktifleşerek apoptozun karakteristik morfolojik değişimi olan plazma membranında tomurcuklanmasına neden olur (Renahan vd. 2001). Kaspaz-3 aynı zamanda lamin B, nükleer/mitotik aparat proteini (NuMA) ve sitokeratinler gibi hücre iskeleti elemanlarının kesiminden de sorumludur (Renahan vd. 2001; Balakumaran vd. 1996). Bu proteinlerin temel fonksiyonunun hücrenin şeklinin korunması olduğu düşünüldüğünde, kaspaz-3 aktivitesi ile bu proteinlerin kesilmesinin apoptotik süreçteki morfolojik değişim açısından önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

Kaspaz 3 aktive olduktan sonra spesifik bir noktadan kesme yaparak doğrudan etki edebileceği gibi, başka moleküller üzerinden dolaylı olarak da etkisini gösterebilir. Örneğin; endonükleaz CAD inhibitörü olan ICAD kaspaz-3 ile kesildiğinde aktive olmakta ve kesilen parça aktif kısım olarak ortama salınmaktadır

(Elmore, 2007). Kaspaz-3'ün spesifik bölgeler üzerinden kestiği daha pek çok substrat bulunmaktadır, bunlarda bazıları şekil 1.14'te gösterilmiştir.



Şekil 1.14. Kaspaz-3'ün apoptozda keserek aktifleştirdiği hücre içi hedeflerden bazıları (Erdoğan ve Uzaslan, 2003; Thompson, 1995).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sentezlenen bir dizi yeni benzimidazol türevi bileşik standart suşlara karşı *in vitro* antimikrobiyal aktiviteleri açısından test edilmiştir. Bileşiklerin antibakteriyel etkisi gram negatif *Escherichia coli* ATCC 25922 ile *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve gram pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 bakterileri, antifungal etkisi ise *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* türü mayalar üzerine test edilmiştir. Bileşiklerin bazılarının gram pozitif bakteriler üzerine MİC değerleri 12.5-400 µg / mL arasındadır. Bileşiklerin hiçbirisi çalışılan konsantrasyonlarda gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Ayrıca test edilen bileşiklerin sekizinin *C. albicans*'a karşı MİC değeri 50-400 µg / mL arasındadır (Küçükbay vd. 2001).

Bonham, aziridin halkası bağladıkları pirrolo[1,2-a]benzimidazol türevi bileşiklerin sitotoksik etkisini insan meme kanseri hücre hatları (MCF-7 ve HCC1937) üzerine test etmişler ve çalışmanın kontrolü amacıyla normal fibroblast hücre hattını (GM00637) kullanmışlardır. Benzimidazol türevi bileşiklerin sitotoksik etkisinin normal fibroblast hücre hattına göre meme kanseri hücre hatlarında daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (Bonham, 2011).

Altı farklı benzimidazol türevi bileşiğin sentezi yapılmış ve sitotoksik aktivitesi yedi insan neoplastik hücre hattına (K562, HL60, MCF7, A549, MDA231, HT29 ve KB) karşı değerlendirmiştir. Altı nolu bileşiğin A549 hücre hattına karşı 28 µM IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. Bu bileşiğin ayrıca neoplastik olmayan HACAT hücrelerinde de seçici bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiş olup IC₅₀ değeri 22.2 µM olarak bulunmuştur. Ayrıca altı nolu bileşiğin K562 hücre hattında apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar altı nolu bileşiğin antikanser ajan olarak geliştirilip değerlendirilebileceği fikrini oluşturmuştur (Romero vd. 2011).

Dört farklı benzimidazol türevi bileşiğin hücre proliferasyonuna inhibisyon etkisini Al-Duoh ve arkadaşları araştırmıştır. MTT analizi yöntemini kullanarak kolon kanser hücre hattı (HCT-116) ve meme kanser hücre hattı (MCF-7) üzerine sitotoksik etkisini ölçmüşler. HCT-116 hücre hattında benzimidazol 2'nin IC₅₀ değeri 16.2 µg/mL, benzimidazol 1'in 28.5 µg/mL ve benzimidazol 4'ün 24.08 µg/mL olduğunu tespit etmişlerdir. MCF-7 hücre hattında ise benzimidazol 4'ün IC₅₀ değeri 8.86 µg/mL, benzimidazol 2'nin 30.29 µg/mL ve benzimidazol 1'in 31.2 µg/mL olduğu tespit etmişlerdir. Benzimidazol 3'ün her iki hücre hattında da IC₅₀ değeri 50

$\mu\text{g/mL}$ üzerinde olduğu için sitotoksik olarak kabul edilmemiştir. Sonuçlar benzimidazol türevlerinin hem kolon hem de meme kanseri hücre hatları üzerine sitotoksik olduğunu göstermiştir (Al-Douh, 2012).

Youssef vd. tarafından benzimidazol ve benzotiyazol türevi bileşikler sentezlenmiş ve karaciğer kanseri hücre hattı (HepG2) üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Ayrıca bu bileşiklerin apoptoz aktivitesi de tespit edilmiştir. Sonuçlar; sentezlenen bileşiklerin varlığında HepG2 hücre hattında hücre döngüsünün G1 fazında durduğunu, kaspaz-3 aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığını ve apoptozu indüklediğini göstermiştir (Youssef, 2012).

LH4 olarak isimlendirilen tek işlevli platin tris (benzimidazol) monokloroplatin (II) klorürün, ayrı ayrı kersetin, kapsaisin, kurkumin ve cisplatin ile kombine edilerek insan yumurtalık tümör hücreleri ($A2780^{\text{cisR}}$, $A2780^{\text{ZD0473R}}$ ve $A2780$) üzerine sitotoksik etkisi araştırılmıştır. LH4'ün $A2780$ hücre hattına oranla dirençli $A2780^{\text{cisR}}$ ve $A2780^{\text{ZD0473R}}$ hücre hatları üzerine daha aktif olduğu bulunmuştur. Ayrıca kersetin, kapsaisin, kurkumin ve cisplatin ile kombine edilen LH4'ün dirençli tümör hücrelerine karşı daha yüksek aktivite göstermesi, bileşiğin yeni platin bazlı antikanser ilaç olarak gelişme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Arzuman, 2014).

Bir dizi imidazopiridin/imidazopirimidin-benzimidazol konjugatları (11a-t) sentezlenerek bu bileşiklerin hücre proliferasyonu inhibisyon etkisi, insan servikal (Hela), akciğer (A549), prostat (DU-145) ve melanom (B-16) kanseri hücre hatları üzerine test edilmiştir. Bileşiklerden özellikle A549 hücre hattı üzerine etkili olan 11i'nin IC_{50} değeri $1.48 \mu\text{M}$ ve 11p'nin IC_{50} değeri $1.92 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Çalışmada bu bileşiklerin A549 hücre hattında G2/M evrelerinde hücre polifereasyonunu inhibe ederek, ayrıca kaspaz-3 aktivasyonu göstererek sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Kamal vd. 2014).

Chen vd. tarafından benzimidazol akrinin türevi bileşiklerin *in vitro* insan kolon kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Benzimidazol türevi bileşiklerin insan kolon kanseri hücre hatları (SW480 ve HCT 116) üzerine sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Benzimidazol türevi bileşiklerin SW480 ve HCT116 hücre hatları üzerine IC_{50} değerleri sırasıyla $6.5 \mu\text{mol/L}$ ve $3.33 \mu\text{mol/L}$ olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak yeni benzimidazol akrinin türevi bu bileşiklerin hem ekstrensek, hem de intrinsek apoptoz yollarını indükleyerek insan kolon kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Chen, 2015).

Biyoaktif yan zincirler eklenerek sentezlenen yeni benzimidazol türevi bileşiklerin *in vitro* sitotoksik etkisi hepatosellüler karsinom (HepG-2) ve meme karsinomu (MCF-7) hücre hatlarına karşı değerlendirilmiş ve sitotoksik etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Benzimidazol türevi bileşiklerin HepG-2 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı IC₅₀ değerlerini sırasıyla 12.30 µM ve 24.5 µM olarak hesaplanmıştır (El-Deen, 2016).

Küçükbaş ve arkadaşları, benzimidazolyum bromid türevi yeni bileşikler sentezleyerek karakterize etmişlerdir. Bu bileşiklerin (1'den 7'ye numaralı) *in vitro* sitotoksik aktivitelerini yumurtalık kanser hücre hattı (A2780) ve prostat kanser hücre hatları (PC-3) üzerine sitotoksik etkileri değerlendirilmiş ve 24, 48 saat sonra IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Benzimidazol türevi bileşiklerin A2780 ve PC-3 hücre hatlarına karşı sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Küçükbaş, 2016).

Akkoç vd. tarafından benzimidazolyum tuzları ve bunların piridin ile geliştirilen paladyum N-heterosiklik karben (Pd-NHC) bazlı kompleksleri sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Bu bileşiklerin sitotoksik aktivitesi insan embriyonal böbrek hücresi (HEK-293T), insan meme epitelyal adenokarsinomu (MDA-MB-231) ve insan kolon epitelyal kolorektal adenokarsinomu (DLD-1) hücre hatları üzerine test edilmiş ve benzimidazol türevi bu bileşiklerin tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Akkoc, 2017).

Benzimidazol türevi bileşiklerin insan servikal kanseri (HeLa) ve kolon kanseri (SW-620) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiş benzimidazol türevi bileşiklerin kanserli hücre hatlarının proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan benzimidazol türevi bileşiklerin hiç biri SW-620'nin proliferasyonunu inhibe etmediği, HeLa hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu durumun, bileşiklerin HeLa hücre hattına karşı spesifik etkisi olarak değerlendirilip, daha ayrıntılı çalışılması gerektiği bildirilmiştir (Arslaner, 2017).

İnsan meme kanseri (MCF-7) hücrelerinde *in vitro* sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmek istenen 27 farklı yeni benzimidazol türevi bileşik tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Yapılan çalışmalarda sentezlenen bileşiklerin sitotoksik etkileri tespit edilmiştir. Bu bileşiklerden dört aktif benzimidazol türevi bileşiğin MCF-7 hücre hattı üzerine IC₅₀ değerleri 19.93 µM, 16.06 µM, 3.98 µM ve 10.59 µM olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla benzimidazol uygulanan hücrelerin parçalandığı tespit edilmiştir (Özdemir, 2017).

Apohan vd. tarafından, 14 yeni kobalt ve çinko benzimidazol kompleksi sentezlenmiş ve akciğer kanseri (A549) ve kontrol amacıyla sağlıklı akciğer epitel hücresi (BEAS2B) üzerine sitotoksik aktiviteleri incelenmiştir. İncelenen bileşiklerden 1, 4 ve 5 nolu üç benzimidazol kompleksinin A549 hücre hattına karşı yüksek bir sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Cisplatinin IC_{50} değeri 72. saatte A549 hücreleri için 2.56 $\mu\text{g/mL}$ iken, 1, 4 ve 5 nolu bileşiklerin IC_{50} değerleri sırasıyla 1.97 $\mu\text{g/mL}$, 1.87 $\mu\text{g/mL}$ ve 1.9 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. BEAS2B hücreleri için IC_{50} değerleri sırasıyla 59.8 $\mu\text{g/mL}$, 24.5 $\mu\text{g/mL}$ ve 32.67 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. Sağlıklı hücre hattına sitotoksik etkisi, kanser hücreleri üzerine olan sitotoksik etkiden daha zayıf olduğu ifade edilmiştir (Apohan, 2017).

Bir dizi simetrik olmayan 2-morfolinoetil bağlı benzimidazol türevi bileşik ve bunların gümüş komplekslerini sentezleyen Aktaş ve arkadaşları, sentezlenen komplekslerin sitotoksik etkilerini meme kanseri (MCF-7) hücre hattına karşı test etmişlerdir. Sentezledikleri benzimidazol türevi bileşikler ve gümüş komplekslerinin MFC-7 hücre hattına karşı sitotoksik etkiye sahip ve IC_{50} değerinin 6-14 μM arasında olduğunu bildirmişlerdir (Aktaş, 2018).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

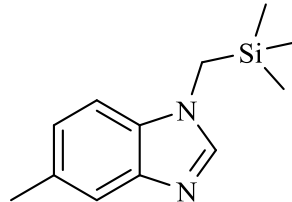
Akciğer kanseri hücreleri (A549) ve sağlıklı akciğer epitel hücreleri (BEAS 2B), tüm çalışmalarda %10 fetal sıgır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren, DMEM besiyeri ortamında, %5 CO₂ içeren nemli atmosferde, 37 °C’de inkübasyona bırakılarak çoğaltılmıştır. Flaska ekimi yapılan hücre hatlarının kontrolleri ve besiyeri değişimleri takip edilerek, konfluent olan hücre hatları uygun zaman aralıklarında pasajlanarak hücre hattı devamlılığı sağlanmıştır. Deney kurulma aşamasında konfluent duruma gelen hücreler, tripsinle muamele edilerek toplanmış ve santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmıştır. Sonra pelet üzerine 10 mL DMEM besiyeri eklenmiştir.

Hücre süspansiyonu ve tripan mavisi (1x1) muamele edilen hücreler sayım için hemositometreye alınarak mikroskop altında canlı hücre sayımı yapılmıştır.

MTT analizleri için 96 kuyucuklu platelere uygun sayıda hücre ekimi yapılmış ve aynı koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılan hücrelerin platelere yapışarak çoğalması sağlanmıştır. Hücreler platelere yapıştıktan sonra benzimidazol bileşikleriyle muamele edilmiştir (Apohan vd. 2017).

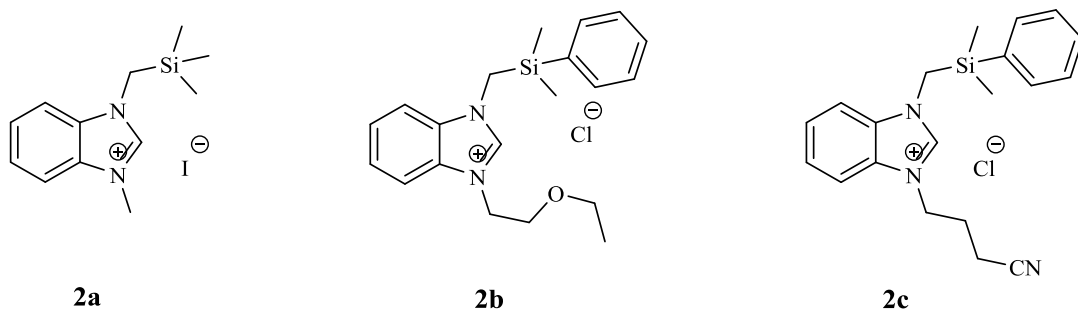
3.2. Çalışmalarda Kullanılan Benzimidazol Bileşikleri

Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Hasan KÜÇÜKBAY ve ekibi tarafından sentezlenen benzimidazol türevi bazı bileşiklerin sitotoksik ve antimikrobiyal etkisi çalışılmıştır. Bu çalışmada kullanılan benzimidazol bileşikleri şunlardır;

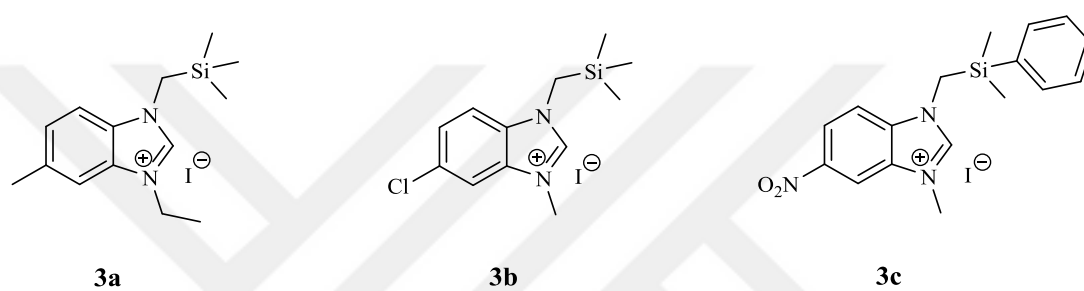


1

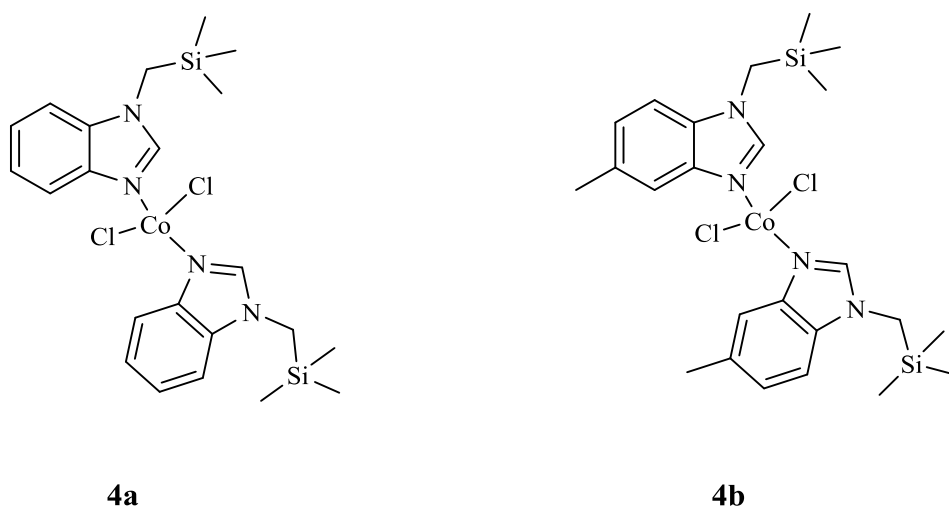
Şekil 3.1. 1,5-disubstitüye benzimidazol (1)



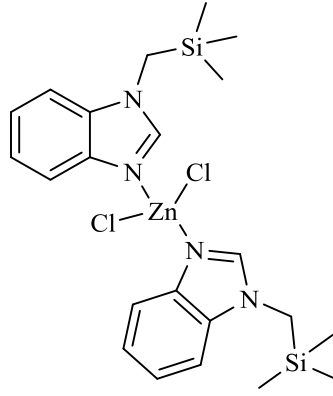
Şekil 3.2. 1,3-disüstitüye benzimidazolyum tuzları (**2a-c**)



Şekil 3.3. 1,3,5-trisüstitüye benzimidazolyum tuzları (**3a-c**)



Şekil 3.4. Bis (*N*-koordine-benzimidazol) kobalt (II) kompleksleri (**4a,4b**)



5

Şekil 3.5. Bis (N-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksi (5)

3.3. Optimizasyon Çalışmaları

Benzimidazol türevi bileşikler A549 hücreleri ve BEAS2B hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (5-100 µg/mL) uygulanmış ve bileşiklerin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Optimum maruz kalma süresinin tespitine yönelik olarak çalışmalarda kullanılan hücreler bileşiklerle farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) muamele edilmiştir. Aynı deneyler cisplatin ile de tekrarlanmıştır. A549 ve BEAS2B hücreleri; benzimidazol bileşikleri ve cisplatin ile muamele edildikten sonra MTT analizleri yapılarak optimum konsantrasyon ve zaman belirlenmiştir. MTT analizlerine göre sitotoksik aktivite gösteren bazı benzimidazol türevi bileşikler için IC₅₀ değerleri konsantrasyon aralığı dikkate alınarak kaspaz 3 analizi yapılmıştır.

3.4. MTT Analizi

Bir hücre popülasyonunun çevresel faktörlere verdiği tepki *in vitro* olarak hücre canlılığı ve proliferasyonunun ölçülmesi analiziyle mümkün olabilir. Tetrazolyum tuzları (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) veya MTT dengeli tuz çözeltilerinde sarı bir çözelti oluşturur ve pozitif yükü sayesinde hücreler tarafından içeri alınır. MTT'nin (sarı) tetrazolyum halkası, hücre içi NAD (P) H-oksidoredüktazlar tarafından mor formazan kristallerine indirgenir. Formazan kristalleri sulu çözelti içinde çözünmez, ancak DMSO'da çözünür. Çözünme işlemi

sonrası oluşan mor renkli çözelti spektrofotometrik olarak ölçülebilir (McGahon vd. 1995). MTT reaktifi, hücrenin az olduğu ortamlarda düşük renklenmeye bağlı düşük absorbans verir, çünkü ölü hücre mitokondiyal faaliyet gerçekleştiremez. ELISA okuyucu tarafından analiz edilerek, meydana gelen renk değişimine göre çoğalan hücre oranları belirlenmektedir (Mosman 1983). MTT analizi sayesinde hücre hatlarına ilk etapta uygulanacak bileşik konsantrasyonları da belirlenebilmektedir. Çünkü MTT analizi hücrelerin %50'sinin öldüğü bileşik konsantrasyonun belirlenmesini sağlamaktadır. Spektrofotometrede kolorimetrik olarak ölçülebilen renklenme, hücre sayısı ile üretilen sinyal arasında doğru ilişki hücre çoğalması oranındaki değişikliklerin doğru bir şekilde ölçülmesini sağlar (Stockert vd. 2012; Darzynkiewicz vd. 1992).

MTT analizinin bu işlevinden hareketle, A549 ve BEAS2B hücreleri için 96 kuyucuklu platelere (10.000 hücre/kuyucuk) ekimi yapılan ve manipülasyonu gerçekleştirilen hücrelere artan konsantrasyonlarda (5-100 µg/mL) benzimidazol türevi bileşikler ve cisplatin uygulanmış, 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiştir. Her kuyucuğa, aktiveleştirilmiş MTT solüsyonu 20 µl eklenmiş ve CO₂'li inkübatörde 37⁰C'de 4 saat bekletilmiştir. Hücrelerin çoğalma değerleri 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile hesaplanmıştır (Oktar, 2009; Apohan vd. 2017).

3.5. Kaspaz-3 Kolorimetrik Analizi

ICE-ailesi proteazların/ kaspazların aktivasyonu memeli hücrelerinde apoptozu başlatır. Kaspaz 3, aynı zamanda CPP-32 olarak da bilinen hücre içi sistein proteazıdır. Proenzim olarak sentezlenir ve apoptoz sırasında kaspaz kaskatının uyarılması ile aktif hale geçer. Kaspaz 3 enzimi, DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) aminoasit motifi içeren PARP (poli ADP-riboz polimeraz) ve 70 kD büyüklüğündeki U1-ribonükleoprotein gibi molekülleri parçalar (Apohan vd. 2017; Vaculova ve Zhivotovsky, 2008).

Kaspaz-3 enzim aktivitesini belirlemek için Kaspaz-3 kolorimetrik analiz kiti kullanılmıştır. Kaspaz 3 analizi için, hem A549 hem de BEAS2B hücreleri ile 6 kuyucuklu platelere her bir kuyucukta 1x10⁶ hücre olacak şekilde 2 mL besiyeri ile birlikte ekimleri yapılmıştır. MTT analizinde etkisi görülen 2c, 3a, 3b ve 5 nolu benzimidazol türevi bileşikler ve kontrol amacıyla kullanılan cisplatin farklı dozlarda 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatin sonunda hücreler toplanarak

4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bundan sonraki aşamalarda kullanılan kaspaz kiti sıcaklık değişimlerinden etkilendiğinden tüm örnekler ve uygulanacak maddeler buz dolu bir kap içerisinde bekletilerek çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Buzda bekletilerek soğutulan liziz tamponundan hücrelerin üzerine 50 µL eklenerek karıştırılmış ve buz üzerinde 10 dk bekletilmiştir. Örnekler ependorflara alınarak, 4°C’de soğutmalı santrifüjde 10.000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir ependorfa alınmış ve 96’lık platelerde ayrı ayrı kuyucuklara 50 µL süpernatant ve 50 µL 2X reaksiyon tamponu eklenmiştir. Daha sonra ışık almayan ortamda her kuyucuğa 5 µL kaspaz-3 kolorimetrik substrat (DEVD-pNA) ilave edilerek alüminyum folyoya sarılıp 2 saat süreyle 37°C’de bekletilmiştir. Sonrasında ELISA okuyucuda 405 nm’de absorbans ölçümü yapılarak, hücrelerde kontrol grubu ve ilaç uygulanmış hücrelerde 48. saate kaspaz-3 enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir (Apohan vd. 2017; Vaculova ve Zhivotovsky, 2008).

Kaspaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılacak olan diğer bir veri total protein analizidir. Bunun için toplanarak liziz edilen hücre örneklerinin her birinden 96 kuyucuklu mikropate 5 µL konularak üzerine 250 µL bradford çözeltisi eklenmiş, ışık almaması için alüminyum folyo ile sarılarak 20 dk bekletilmiş ve sonra ELISA okuyucuda 595 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır. Absorbans sonrası hesaplanan total protein içindeki kaspaz-3 enzim aktivitesi, yüzdelik (%) olarak hesaplanmıştır (Apohan vd. 2017).

3.6. Bileşiklerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çalışmalarda maddelerin antibakteriyel etkisini belirlemek için gram negatif *Escherichia coli* ATCC 25922 ile *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, gram pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 bakterileri kullanılmış ve nutrient agar besiyerinde 37°C’de 18-24 saat süreyle inkübe edilerek üretilmiştir. Antifungal etkisini test etmek için de *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* olmak üzere iki maya kullanılmış, bunlar 35 ml sabouraud dekstroz agar besiyerinde 30 °C’de 24-48 saat süreyle inkübe edilerek üretilmiştir (Apohan vd. 2017; Magaldi vd. 2004; Reller vd. 2009).

Benzimidazol türevi bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesinin saptanması için minimum inhibe edici konsantrasyon (MİC) mikrodilüsyon yöntemi uygulanarak

saptanmıştır. Bileşikler; uygulama öncesi, kullanılacak mikroorganizmalar üzerine inhibe edici etkisi bulunmayan DMSO'da çözdürülerek stok çözeltiler hazırlanmıştır. Çözeltiler 96 kuyucuklu platelere alınarak seri sulandırmaları yapılmıştır. Benzimidazol türevi bileşiklerin MİK değerleri yukarıda belirtilen bakteriler ve mayalara uygulanarak belirlenmiştir. Yukarıda belirtilen şekilde üretilen mikroorganizma örnekleri, doğrudan koloni süspansiyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Bu amaçla süspansiyon bulanıklığı 0,5 McFarland standartına eşdeğer bulanıklığa ayarlanmış ve uygun şekilde sulandırılıp standardize edildikten sonra kuyucuklara eklenmiştir. Ayrıca kontrol amacıyla benzimidazol türevi bileşik içermeyen besiyerine de hücre ekimi yapılmıştır. İnkübasyona bırakılan bakteriler 37°C'de 24 saat süreyle, mayalar ise 30°C'de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. MİK değeri mikroorganizmaların üremesini tamamen inhibe eden en düşük konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir (Apohan vd. 2017; Magaldi vd. 2004; Reller vd. 2009)

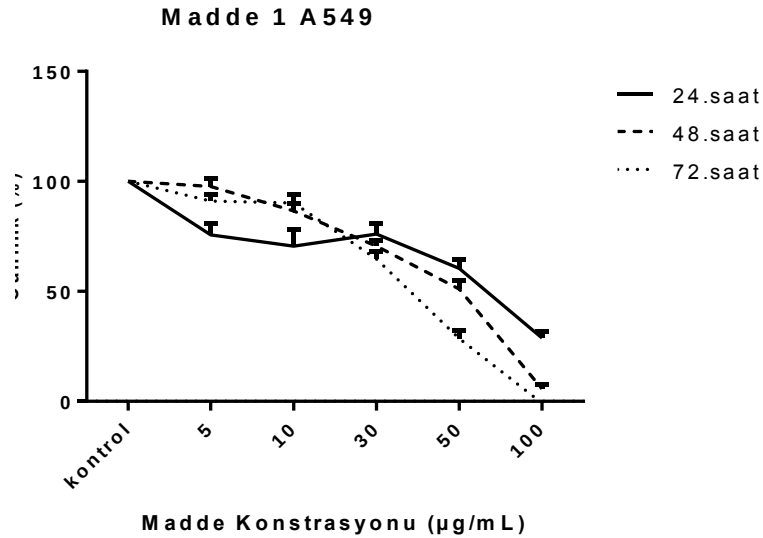
4. BULGULAR

Yapılan bu çalışmada sentezlenen on farklı benzimidazol türevi bileşiğin akciğer kanseri hücreleri (A549) ve sağlıklı akciğer epitel hücreleri (BEAS2B) üzerine sitotoksik etkisi test edilmiş, kontrol amacıyla da cisplatin kullanılmıştır. Ayrıca tüm bileşiklerin gram pozitif, gram negatif bakteriler ve mayalar üzerine antimikrobiyal etkisi test edilmiştir.

BEAS2B hücrelerine göre sitotoksik etkisi yüksek olduğu değerlendirilen ve cisplatinle karşılaştırması yapılan dört bileşik (**2c**, **3a**, **3b** ve **5**) seçilmiş, apoptotik mekanizmanın bir göstergesi olarak kaspaz-3 aktivitesine bakılmıştır. Çalışmada araştırılan tüm bileşiklerin konsantrasyon ve zaman bağımlı parametreleri ölçülmüş, gerekli hesaplamalar yapılarak grafik olarak gösterilmiştir.

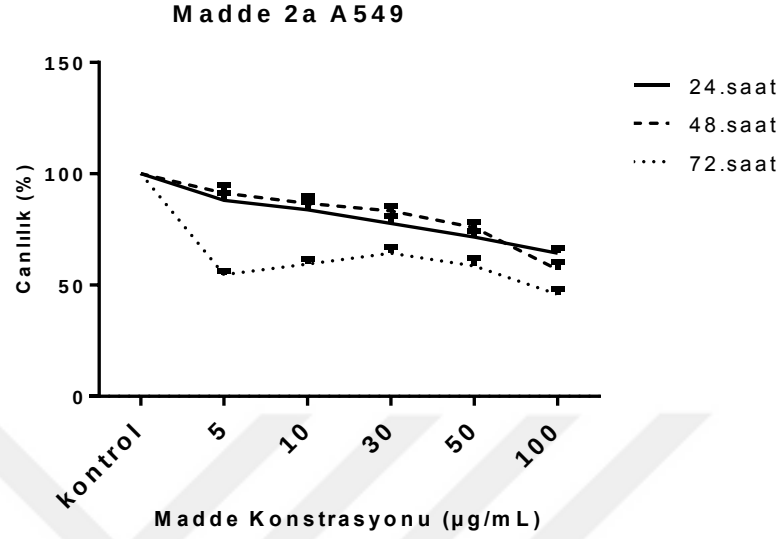
4.1. Bileşiklerin A549 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi

1,5-disüstitüye benzimidazol (**1**) bileşiğinin A549 hücreleri üzerine 24., 48. ve 72. saatlerde IC₅₀ değerleri sırasıyla 66.47 µg/mL, 51.31 µg/mL ve 38.11 µg/mL'dir (Şekil 4.1).



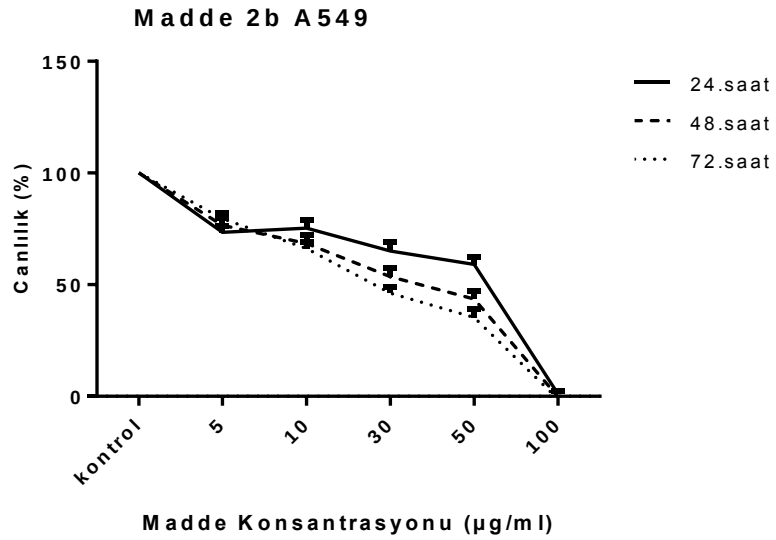
Şekil 4.1. 1,5-disüstitüye benzimidazol bileşiğinin (**1**) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

A549 hücreleri üzerine 1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzunun (**2a**) 24., 48. saatlerde IC_{50} değerleri $>100 \mu\text{g/mL}$ iken, 72. Saatte IC_{50} değerleri $83.40 \mu\text{g/mL}$ 'dir (Şekil 4.2).



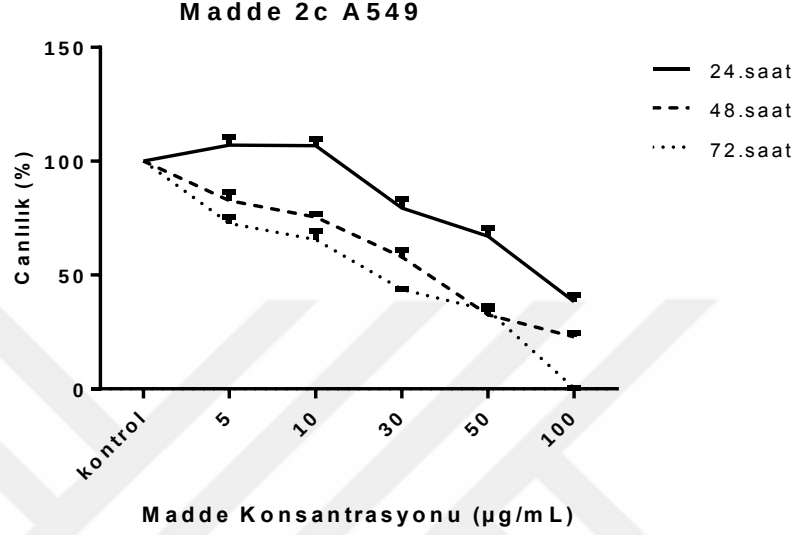
Şekil 4.2. 1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzunun (**2a**) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzunun (**2b**) A549 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin zamana bağlı grafiği Şekil 4.3'de gösterilmiştir. 24. saatte IC_{50} değeri $57.84 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmışken, 48. ve 72. saatlerde hesaplanan IC_{50} değeri ise sırasıyla $37.09 \mu\text{g/mL}$ ve $26.22 \mu\text{g/mL}$ 'dir.



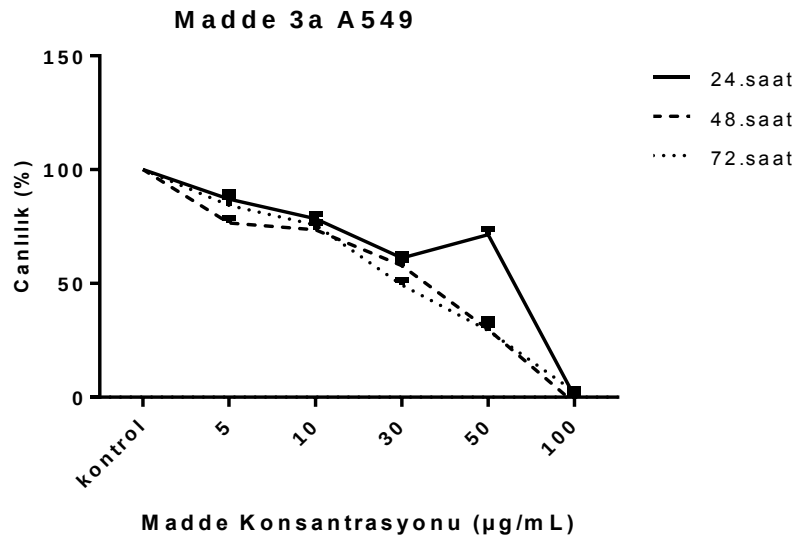
Şekil 4.3. 1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzunun (**2b**) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Şekil 4.4’de 1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzunun (2c) A549 hücreleri üzerine 24., 48. ve 72. saatlerdeki konsantrasyon bağımlı canlılık (%) değerleri grafiği görülmektedir. 24. saatte IC₅₀ değerleri 79.03 µg/mL olarak hesaplanmış, 48. ve 72. saatte ise belirgin bir azalma gözlenen IC₅₀ değerleri sırasıyla önce 37.39 µg/mL, sonrada 24.35 µg/mL ‘ye düşmüştür.



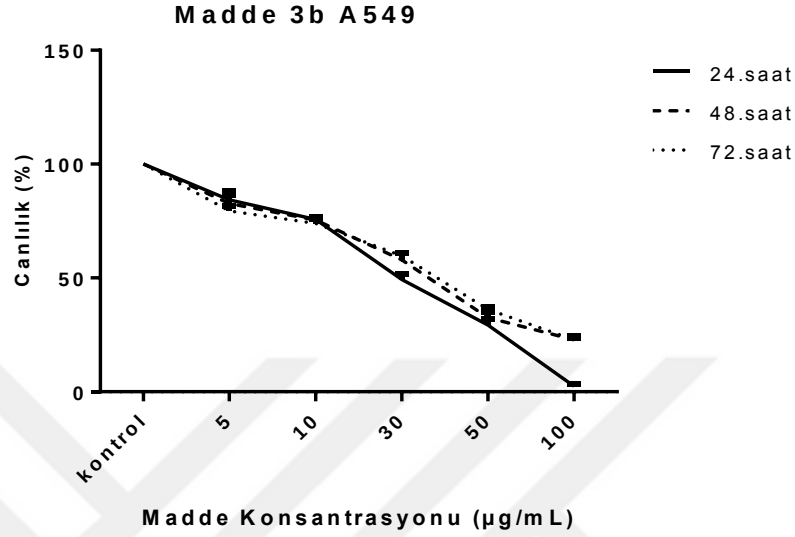
Şekil 4.4. 1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzunun (2c) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (3a) IC₅₀ değerleri 24., 48. ve 72. saatlerde sırasıyla 65.85 µg/mL, 35.49 µg/mL ve 28.49 µg/mL olarak tespit edilmiş ve Şekil 4.5’de gösterilmiştir.



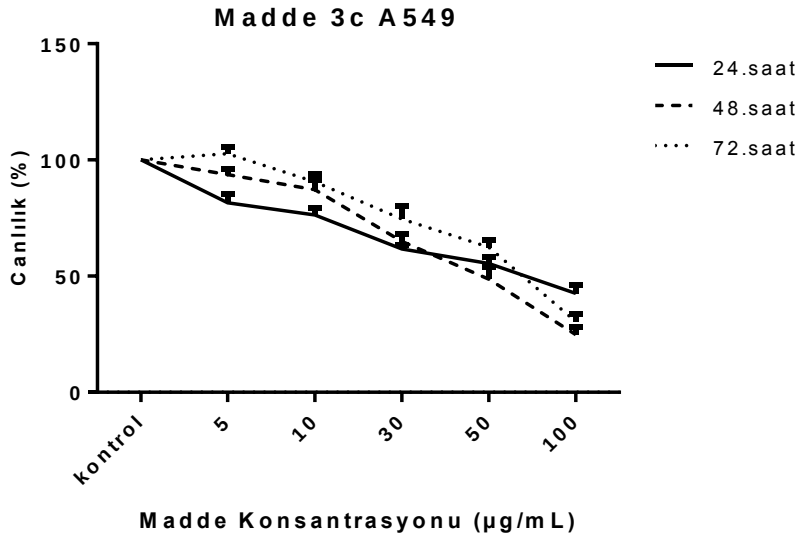
Şekil 4.5. 1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (3a) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

A549 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi araştırılan 1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (**3b**) zaman ve konsantrasyon bağımlı grafiği Şekil 4.6'da gösterilmiştir. 24. saatte 30.83 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanan IC_{50} değeri, 48. saatte 36.26 $\mu\text{g/mL}$ ve 72. saate ise 38.51 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır.



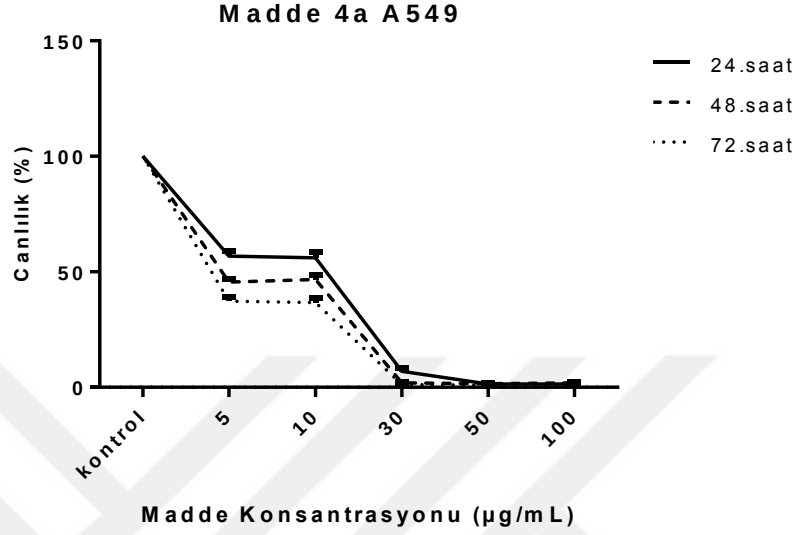
Şekil 4.6. 1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (**3b**) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (**3c**) IC_{50} değerleri 24., 48. ve 72. saatler için ayrı ayrı hesaplanmıştır, sırasıyla 80.20 $\mu\text{g/mL}$, 67.32 $\mu\text{g/mL}$ ve 56.32 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilerek Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



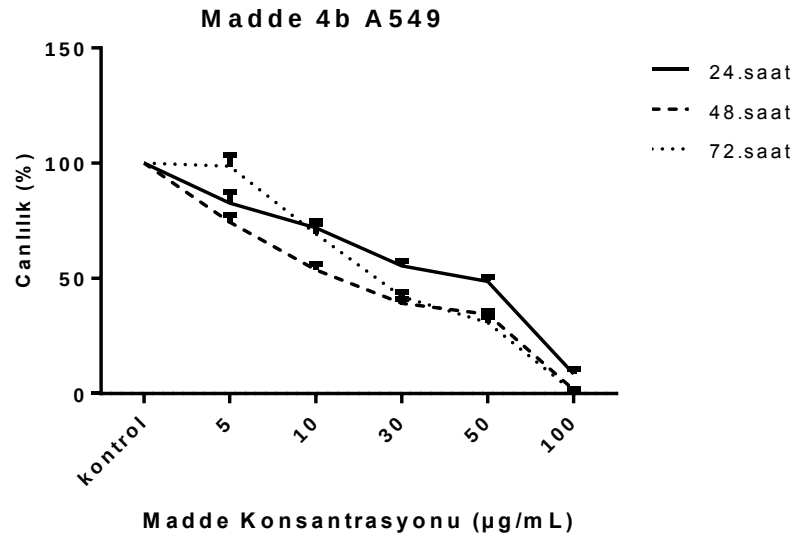
Şekil 4.7. 1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (**3c**) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Şekil 4.8’de Bis (N-koordine-benzimidazol) kobalt (II) kompleksinin (**4a**) A549 hücreleri üzerine 24., 48. ve 72. saatlerdeki canlılık (%) değerleri gösterilmiştir. 24., 48. ve 72. saatlerdeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 12.45 µg/mL, 4.58 µg/mL ve 3.98 µg/mL olarak hesaplanmıştır.



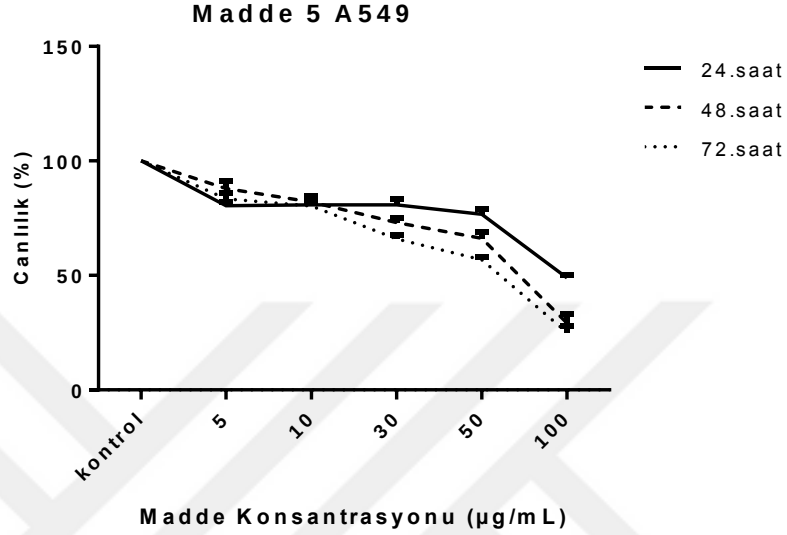
Şekil 4.8. Bis (N-koordine-benzimidazol) kobalt (II) kompleksleri (**4a**) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Bis (N-koordine-benzimidazol) kobalt (II) kompleksi (**4b**) A549 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin zamana bağlı grafiği Şekil 4.9’da gösterilmiştir. 24. saatte IC₅₀ değeri 46.00 µg/mL olarak hesaplanmışken, 48. ve 72. saatlerde hesaplanan IC₅₀ değeri ise sırasıyla 15.12 µg/mL ve 24.19 µg/mL’dir.



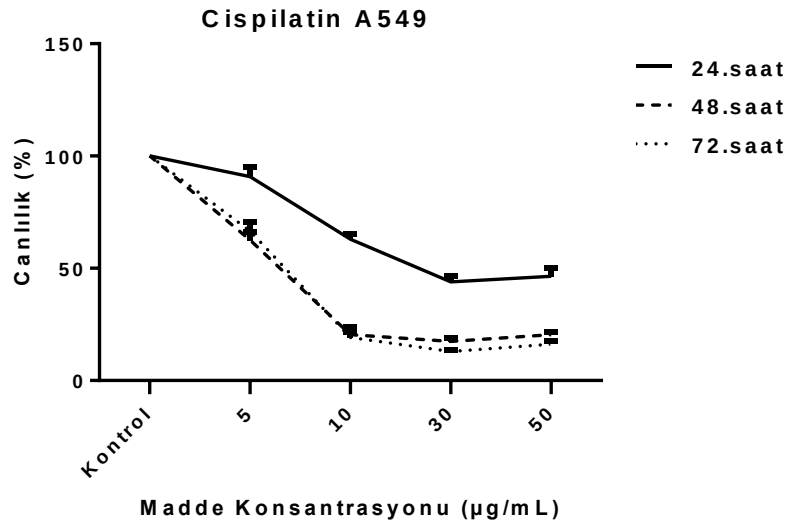
Şekil 4.9. Bis (N-koordine-benzimidazol) kobalt (II) kompleksleri (**4b**) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Bis (*N*-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksinin (5) A549 hücreleri üzerine 24. saatteki IC₅₀ değerleri 98.11 µg/mL, 48. saatteki IC₅₀ değerleri 71.85 µg/mL ve 72. saatte IC₅₀ değerleri ise 60.70 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Bis (*N*-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksi (5) A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Halen kanser tedavisinde kemoterapi ilacı olarak kullanılan cisplatin kontrol amacıyla A549 hücrelerine uygulanmış, 24., 48. ve 72. saatlerdeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 23.55 µg/mL, 6.48 µg/mL ve 6.75 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Cisplatinin A549 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Çalışmada kullanılan benzimidazol türevi bileşikler ve cisplatinin A549 hücrelerine karşı sitotoksik etkisi, 5-100 µg/mL değişen konsantrasyonlarda uygulanmış ve MTT analiz sonuçları 24., 48. ve 72. saatte alınarak IC₅₀ değerleri hesaplanarak çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

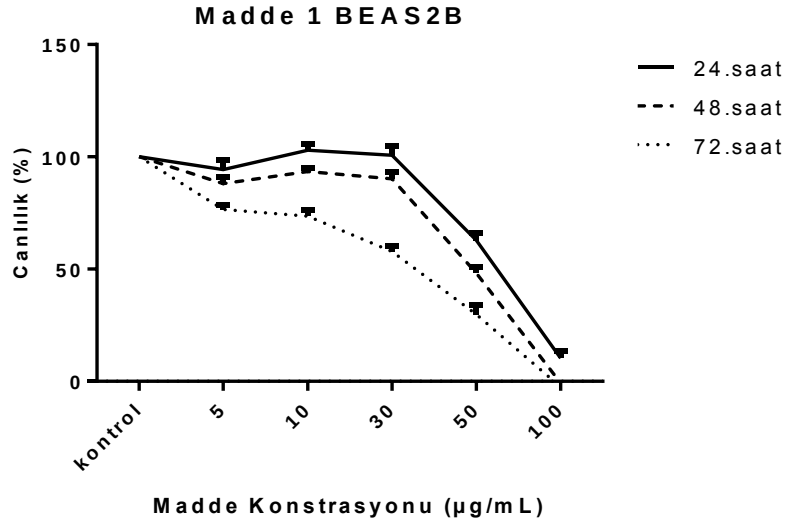
Çizelge 4.1. Benzimidazol türevi bileşikler ve cisplatinin akciğer kanser hücreleri (A549) üzerine zamana bağlı IC₅₀ değerleri (µg/mL)

Bileşik No	Zaman (saat)		
	24	48	72
1	66,47	51,31	38,11
2a	>100	>100	83,40
2b	57,84	37,09	26,22
2c	79,03	37,39	24,35
3a	65,85	35,49	28,49
3b	30,83	36,26	38,51
3c	71,00	48,46	64,35
4a	12,45	4,58	3,98
4b	46,00	15,12	24,19
5	98,11	71,85	60,70
Cisplatin	23,55	6,48	6,75

Çizelge incelendiğinde de **4a** maddesinin 24., 48. ve 72. saatlerde IC₅₀ değerleri sırasıyla 12.45 µg/mL, 4.58 µg/mL ve 3.98 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değerler **4a** maddesinin ticari ilaç cisplatininden daha yüksek bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterirken, A549 hücrelerine karşı en az sitotoksik etkiyi ise **2a** maddesinin gösterdiği görülmüştür.

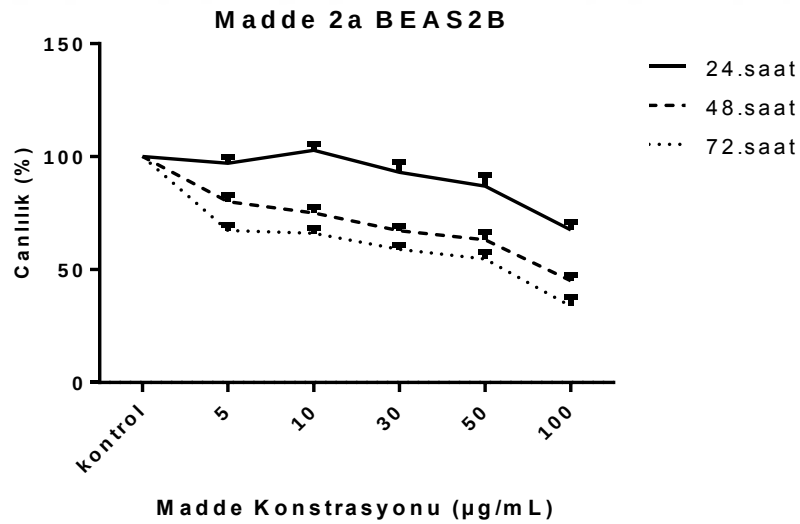
4.2. Bileşiklerin BEAS2B Hücreleri Üzerine Sistotoksik Etkisi

BEAS2B hücreleri üzerine sitotoksik etkisi araştırılan 1,5-disüstitüye benzimidazol (**1**) zaman ve konsantrasyon bağımlı grafiği Şekil 4.12’de gösterilmiştir. 24. saatte 62.33 µg/mL olarak hesaplanan IC₅₀ değeri, 48. saatte 49.14 µg/mL ve 72. saate ise 35.79 µg/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.12. 1,5-disubstitüye benzimidazol bileşiğinin (1) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

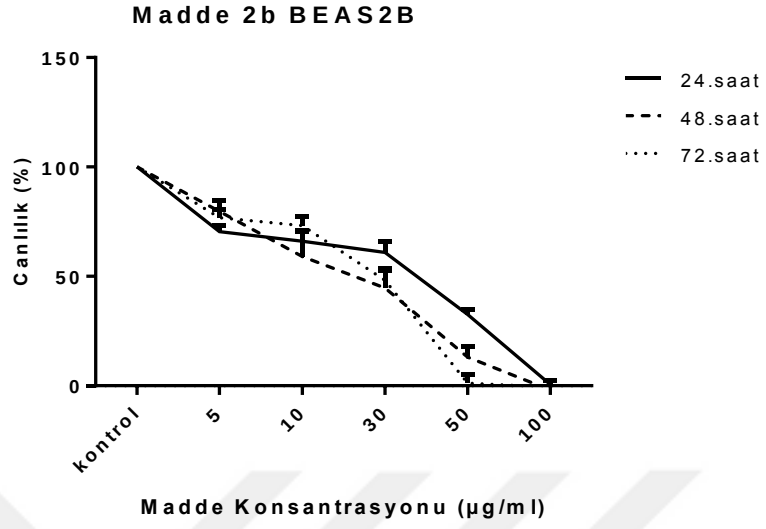
1,3-disubstitüye benzimidazolyum tuzunun (2a) BEAS2B hücreleri üzerine sitotoksik etkisi maddenin konsantrasyon artışına bağlı olarak 24., 48. ve 72. saatlerde IC₅₀ değerleri sırasıyla >100 µg/mL, 86.35 µg/mL ve 61.16 µg/mL'dir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. 1,3-disubstitüye benzimidazolyum tuzunun (2a) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

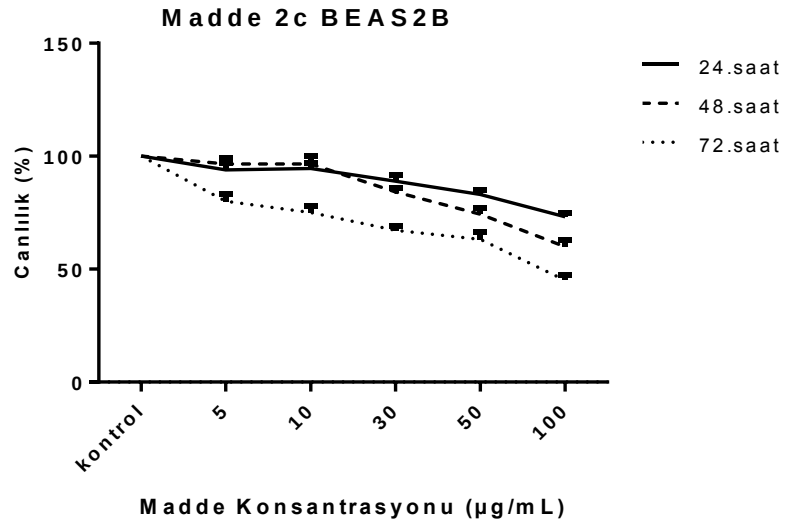
1,3-disubstitüye benzimidazolyum tuzunun (2b) BEAS2B hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin zamana bağlı grafiği Şekil 4.14'de gösterilmiştir. 24. ve 48. saatte

IC₅₀ değeri sırasıyla 37.96 µg/mL ve 22.66 µg/mL olarak hesaplanmışken, 72. saatlerde hesaplanan IC₅₀ değeri ise 28.55 µg/mL'dir.



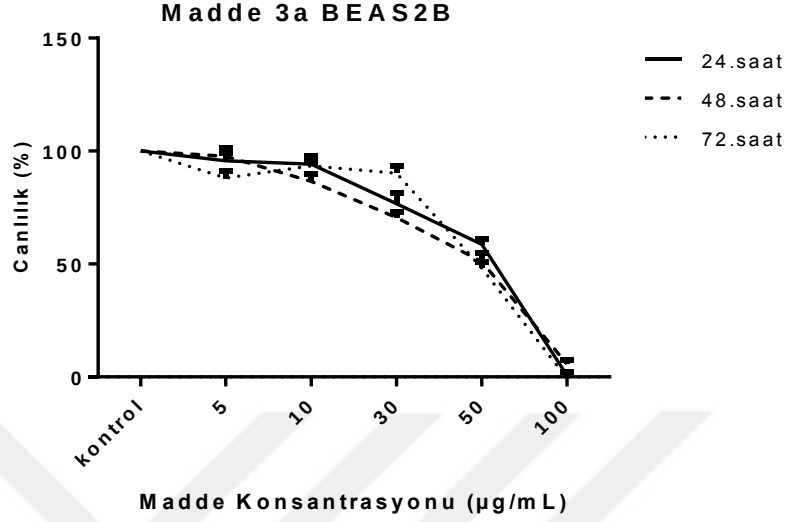
Şekil 4.14. 1,3-disübstitye benzimidazolyum tuzunun (2b) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Şekil 4.15'de 1,3-disübstitye benzimidazolyum tuzunun (2c) BEAS2B hücreleri üzerine 24., 48. ve 72. saatlerdeki konsantrasyon bağımlı canlılık (%) değerleri görülmektedir. 24. ve 48. saatte IC₅₀ değerleri >100 µg/mL daha büyük bir değer olup, 72. saatte ise 87.63 µg/mL'ye düşmüştür.



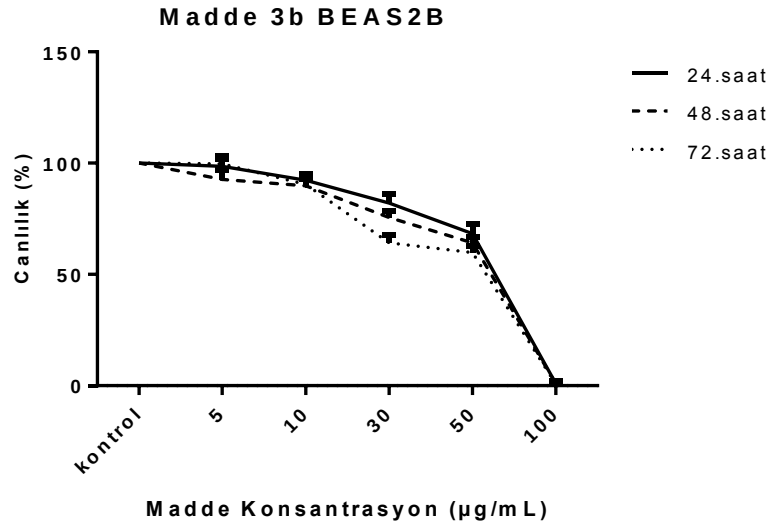
Şekil 4.15. 1,3-disübstitye benzimidazolyum tuzunun (2c) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (**3a**) BEAS2B hücreleri üzerine IC_{50} değerleri 24., 48. ve 72. saatler için belirlenmiş, sırasıyla 57.85 $\mu\text{g/mL}$, 50.62 $\mu\text{g/mL}$ ve 49.32 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanarak Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



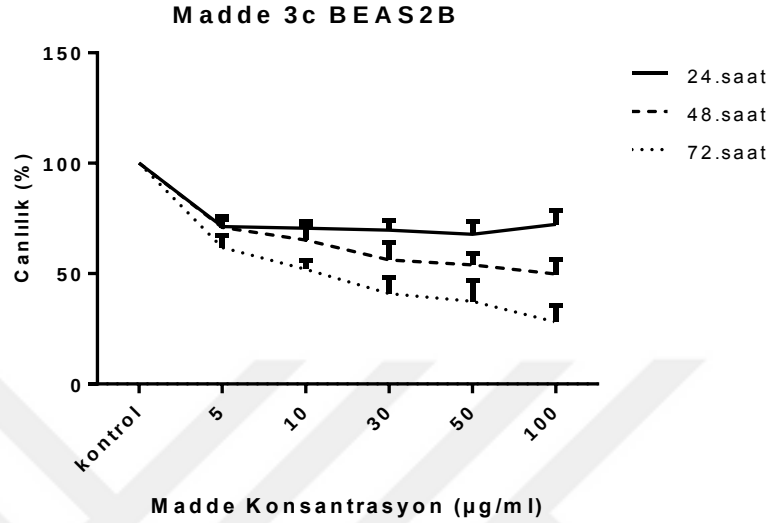
Şekil 4.16. 1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (**3a**) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

BEAS2B hücreleri üzerine sitotoksik etkisi araştırılan 1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (**3b**) zaman ve konsantrasyon bağımlı grafiği Şekil 4.17'de gösterilmiştir. 24. saatteki IC_{50} değeri 63.34 $\mu\text{g/mL}$, 48. saatteki IC_{50} değeri 61.36 $\mu\text{g/mL}$ ve 72. saatte IC_{50} değeri ise 57.89 $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır.



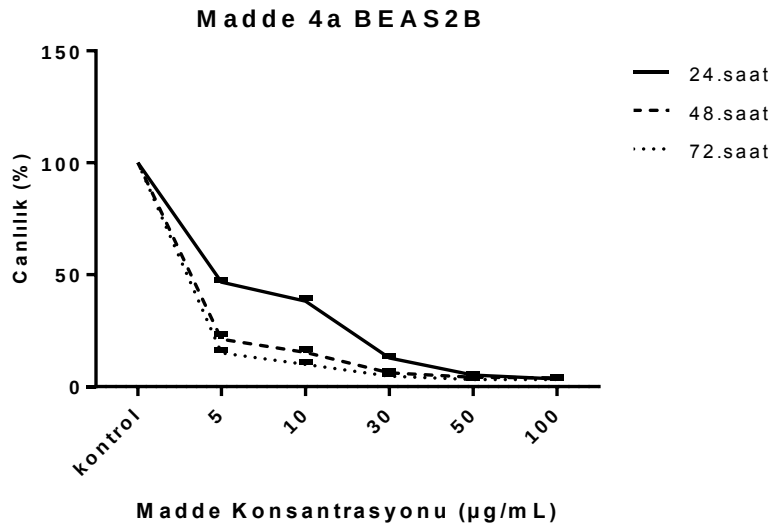
Şekil 4.17. 1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (**3b**) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (**3c**) BEAS2B hücreleri üzerine 24. saatteki IC_{50} değeri $>100 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmış, 48. saatteki IC_{50} değeri önemli bir düşüşle $98.25 \mu\text{g/mL}$ ' ye, 72. saatte ise IC_{50} değeri büyük bir azalmayla $13.56 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.18).



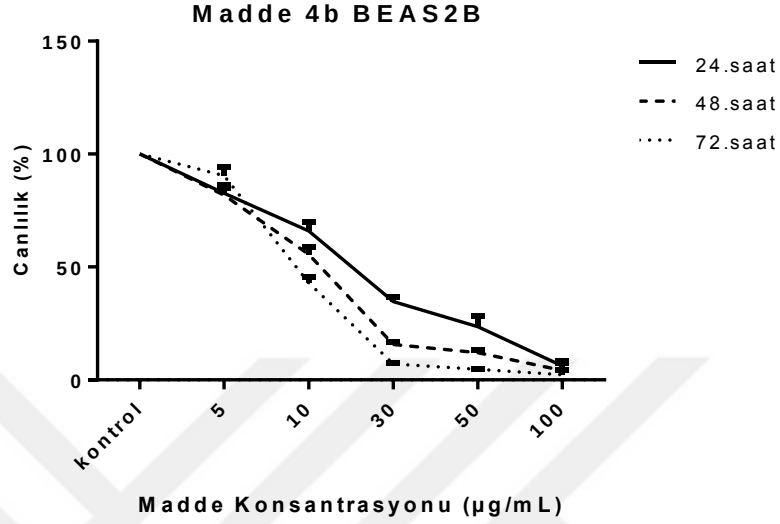
Şekil 4.18. 1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (**3c**) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Şekil 4.19'da Bis (N-koordine-benzimidazol) kobalt (II) kompleksleri (**4a**) BEAS2B hücreleri üzerine 24., 48. ve 72. saatlerdeki konsantrasyon bağımlı canlılık (%) değerleri gösterilmiştir. 24. saatte IC_{50} değerleri düşük bir değer $4.69 \mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmış, 48. ve 72. saatte ise daha da azalarak IC_{50} değerleri sırasıyla önce $3.17 \mu\text{g/mL}$, sonrada $2.94 \mu\text{g/mL}$ 'ye düşmüştür.



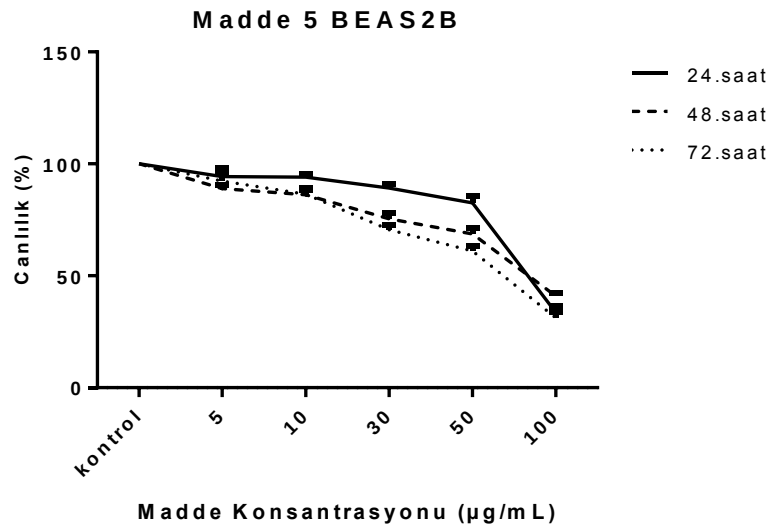
Şekil 4.19. Bis (N-koordine-benzimidazol) kobalt (II) kompleksleri (**4a**) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Bis (N-koordine-benzimidazol) kobalt (II) kompleksleri (**4b**) BEAS2B hücreleri üzerine 24. saatteki IC₅₀ değeri 20.21 µg/mL, 48. saatteki IC₅₀ değerleri 12.76 µg/mL ve 72. saatte IC₅₀ değerleri ise 9.26 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.20).



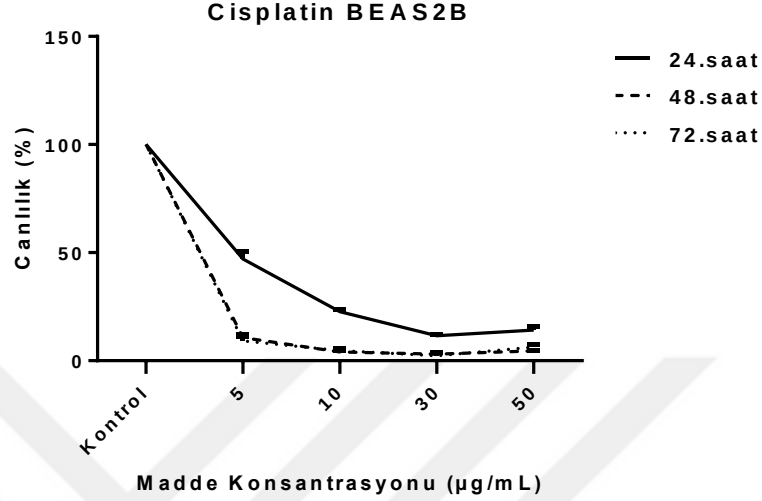
Şekil 4.20. Bis (N-koordine-benzimidazol) kobalt (II) kompleksleri (**4b**) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

BEAS2B hücreleri üzerine sitotoksik etkisi araştırılan Bis (N-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksinin (5) zaman ve konsantrasyon bağımlı grafiği Şekil 4.21’de gösterilmiştir. 24. saatte 83.18 µg/mL olarak hesaplanan IC₅₀ değeri, 48. saatte 83.69 µg/mL ve 72. saatte ise 68.53 µg/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.21. Bis (N-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksinin (5) BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Yapılan bu çalışmada kontrol grubu olarak halen kanser tedavisinde kemoterapi ilacı olarak kullanılan cisplatin kullanılmış, BEAS2B hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. 24., 48. ve 72. saatlerdeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 4.72 µg/mL, 2.79 µg/mL ve 2.75 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Cisplatinin BEAS2B hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Çalışmada kullanılan benzimidazol türevi bileşikler ve cisplatin 5-100 µg/mL değişen konsantrasyonlarda BEAS2B hücrelerine uygulanmış ve sitotoksik etki MTT analizi yöntemiyle test edilmiştir. Maddelerin ve cisplatinin 24., 48. ve 72. saatteki IC₅₀ değerleri hesaplanarak çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Benzimidazol türevi bileşikler ve cisplatinin sağlıklı akciğer epitel hücreleri (BEAS2B) üzerine zamana bağlı IC₅₀ değerleri (µg/mL)

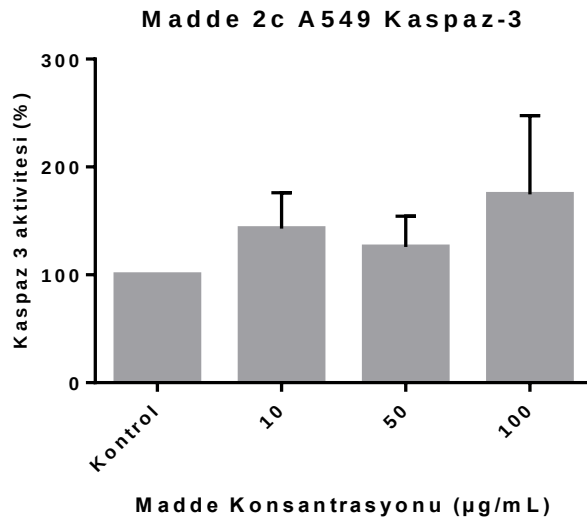
Bileşik No	Zaman (saat)		
	24	48	72
1	62,33	49,14	35,79
2a	>100	86,35	61,16
2b	37,96	22,66	28,55
2c	>100	>100	87,63
3a	74,13	53,46	43,73
3b	63,34	61,36	57,89
3c	>100	98,25	13,56
4a	4,69	3,17	2,94
4b	20,21	12,76	9,26
5	83,18	83,69	68,53
Cisplatin	4,72	2,79	2,75

Çizelge incelendiğinde **4a** maddesinin IC₅₀ değerlerinin cisplatine çok yakın olduğu görülmektedir. Aynı şekilde **4b** maddesinde sağlıklı hücelere karşı çok yüksek bir sitotoksik etkiye sahiptir. Kemoörapötik ajanlarda aranan özellik sağlıklı hücelere kanserli hücelerden daha az sitotoksik etki göstermesidir. Bu sebeple çizelge incelendiğinde BEAS2B hücelere karşı en az sitotoksik etki gösteren maddeler **2c**, **3a**, **3b** ve **5**. maddeler olduğu görülmüştür.

4.3. Kaspaz-3 Spesifik Aktivitesi

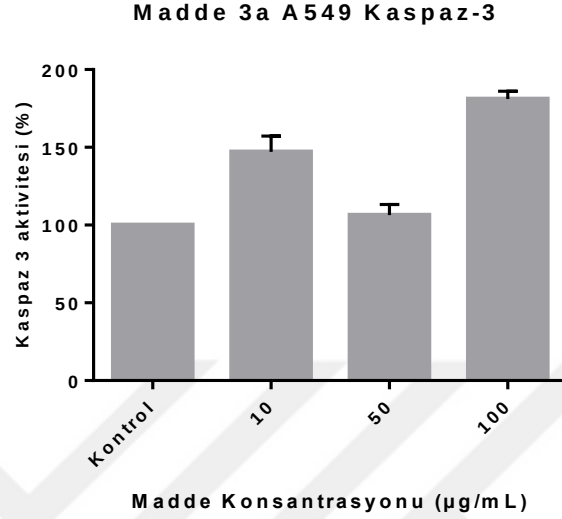
Yapılan çalışmalarda elde edilen MTT analiz bulguları incelendiğinde 1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzu (**2c**), 1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzları (**3a**) ve (**3b**) ile Bis(*N*-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksi (**5**) bileşiklerinin A549 hücre hattı üzerine BEAS2B hücre hattına göre dikkate değer bir sitotoksik etki gösterdiği değerlendirilmiş, bu sebeple bu bileşiklerdeki kaspaz-3 spesifik aktivitesi ölçülmüştür.

1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzu (**2c**) A549 hücre hattı üzerine kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre değişimi Şekil 4.23'de gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre uygulanan her üç konsantrasyonda da belirgin bir artış gösterdiği, özellikle 72. saatin sonunda kontrole göre iki kata yakın bir artış olduğu görülmüştür.



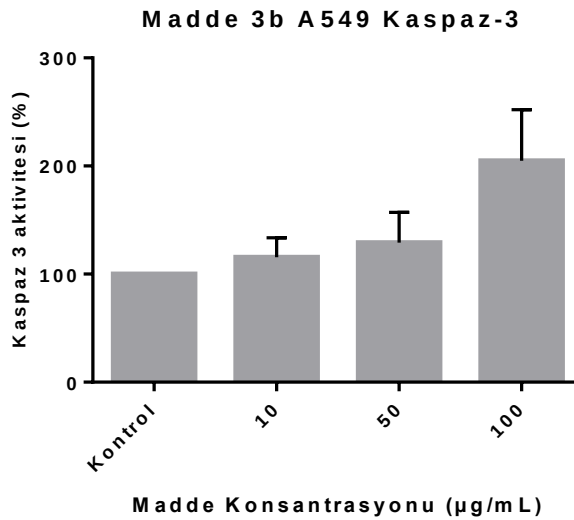
Şekil 4.23. 1,3-disübstitüye benzimidazolyum tuzu (**2c**) A549 hücre hattı üzerine kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi

A549 hücre hattı üzerine 1,3,5-trisüstitüye benzimidazolyum tuzunun (**3a**) kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre değişimi hesaplanmıştır. Kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre konsantrasyon artışına bağlı olarak artış gösterdiği, 72. saatte ise artışın en yüksek değere çıktığı görülmüştür (Şekil 4.24).



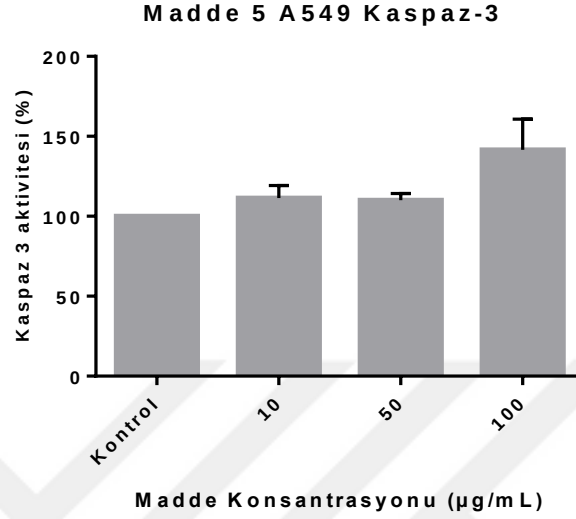
Şekil 4.24. 1,3,5-trisüstitüye benzimidazolyum tuzu (**3a**) A549 hücre hattı üzerine kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi

1,3,5-trisüstitüye benzimidazolyum tuzunun (**3b**) kaspaz-3 spesifik aktivitesinin A549 hücre hattındaki kontrole göre değişimi hesaplanmış, Şekil 4.25’de gösterilmiştir. 72. saatte artış en yüksek değere çıkmıştır.



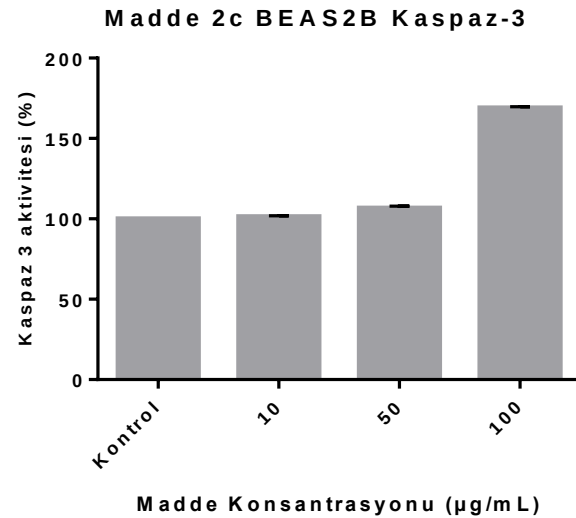
Şekil 4.25. 1,3,5-trisüstitüye benzimidazolyum tuzu (**3b**) A549 hücre hattı üzerine kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi

Bis(*N*-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksi (5) A549 hücre hattı üzerine kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre değişimi Şekil 4.26’da gösterilmiştir. Madde konsantrasyonu değişimine bağlı olarak kaspaz-3 aktivitesi kontrole göre küçükte olsa bir artış göstermiştir.



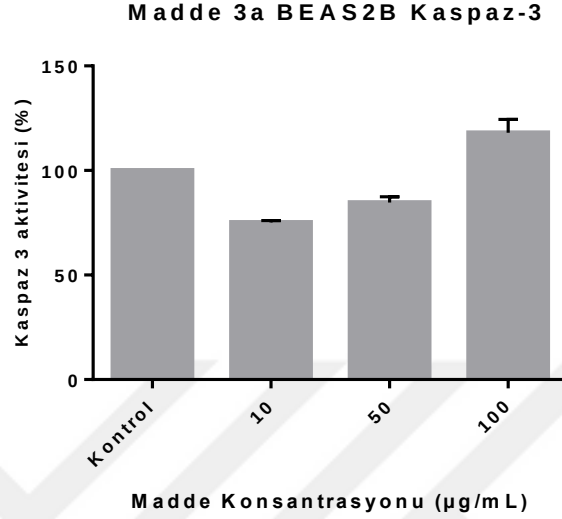
Şekil 4.26. Bis(*N*-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksi (5) A549 hücre hattı üzerine kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi

BEAS2B hücre hattı üzerine 1,3-disüstitüye benzimidazolyum tuzu (2c) kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre değişimi hesaplanmıştır. Kaspaz-3 spesifik aktivitesi kontrolle kıyaslandığında ilk iki konsantrasyon kontrol ile yaklaşık aynı olmasına rağmen, yüksek konsantrasyonda çok büyük bir artış göstermiştir (Şekil 4.27).



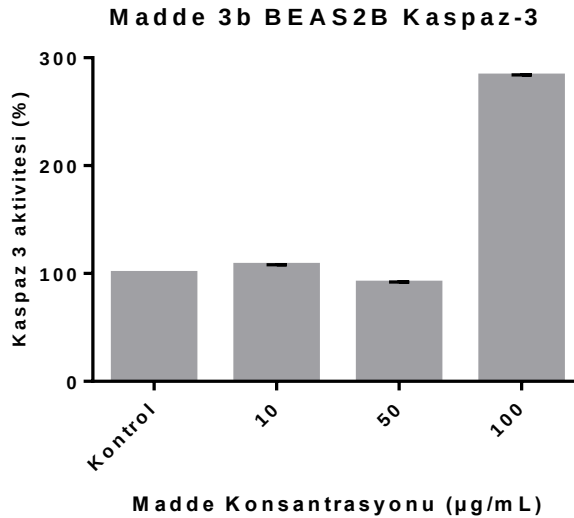
Şekil 4.27. 1,3-disüstitüye benzimidazolyum tuzu (2c) BEAS2B hücre hattı üzerine kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi

1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (3a) kaspaz-3 spesifik aktivitesinin BEAS2B hücre hattındaki konsantrasyon artışı ve kontrole göre değişimi hesaplanmış ve Şekil 4.28’de gösterilmiştir. 72. saatte kaspaz aktivitesi kotrole göre artış göstermiştir.



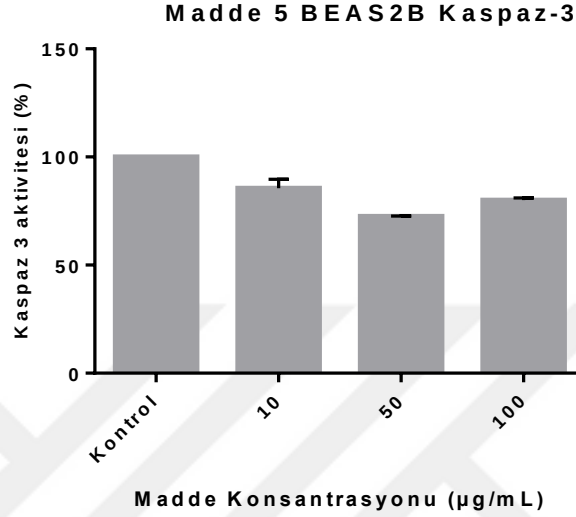
Şekil 4.28. 1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (3a) BEAS2B hücre hattı üzerine kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi

1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (3b) BEAS2B hücre hattı üzerine kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre değişimi Şekil 4.29’da gösterilmiştir. Madde konsantrasyonu değişimine bağlı olarak kaspaz-3 spesifik aktivitesi kontrole göre belirgin bir artış göstermiştir.



Şekil 4.29. 1,3,5-trisübstitüye benzimidazolyum tuzunun (3b) BEAS2B hücre hattı üzerine kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi

Bis(*N*-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksi (5) BEAS2B hücre hattı üzerine kaspaz-3 spesifik aktivitesinin konsantrasyon ve kontrole göre değişimi hesaplanmış ve Şekil 4.30'da gösterilmiştir. Kaspaz-3 spesifik aktivitesi konsantrasyona bağlı olarak artması beklenirken bir azalma söz konusudur. Bu durum farklı bir hücre ölüm yolağının aktive olduğu şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 4.30. Bis(*N*-koordine-benzimidazol) çinko (II) kompleksi (5) BEAS2B hücre hattı üzerine kaspaz-3 spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde (%) değişimi

4.4. Minimum inhibe edici konsantrasyon (MİK) Bulguları

Bu çalışmada kullanılan benzimidazol türevi bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerini test etmek için *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* türleri kullanılmıştır. Bileşiklerin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri 96 kuyucuklu plaklar kullanılarak MİK değerleri mikrodilasyon yöntemiyle saptanmış ve mikroorganizma üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyon µg/mL olarak ifade edilmiştir (Apohan vd. 2017).

Çizelge 4.3. Benzimidazol türevi bileşiklerin mikroorganizmalar üzerine MİK değerleri (µg/mL).

Madde	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
1	-	-	-	-	-
2a	1600	800	1600	400	400
2b	1600	400	400	100	100
2c	1600	800	1600	800	800
3a	800	400	400	25	25
3b	800	400	200	50	100
3c	800	400	400	25	25
4a	1600	200	100	400	400
4b	1600	800	800	400	800
5	1600	800	1600	800	800
Gentamisin	0.78	0.39	3.12	-	-
Fluconazol	-	-	-	0.39	0.39

Çalışmalarda kullanılan bileşiklerin MİK değerleri ve kullanılan referans bileşiklerin (gentamisin ve fluconazol) MİK değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde bileşiklerin mayalar için 25 ile 800 µg/mL aralığında MİK değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bileşiklerden **3b**'nin *C.albicans*'a 50 µg/mL, **3a** ve **3c** bileşiklerinin *C.albicans* ve *C.tropicalis*'e karşı 25 µg/mL MİK değeriyle en yüksek antifungal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan bileşiklerin antibakteriyel aktivitelerinin genel olarak düşük olduğu görülmektedir. Gram negatif *E.coli* için en düşük MİK değeri **3a**, **3b** ve **3c** bileşiklerinde olup 800 µg/mL'de bakteri üremesini inhibe etmiştir.

P.aeruginosa için MİK değerleri 200-800 µg/mL aralığında saptanmıştır ve **4a** bileşiği için MİK değeri en düşük değer olarak 200 µg/mL olduğu gözlenmiştir. Gram pozitif *S.aureus* için MİK değerleri 100 µg/mL ile 1600 µg/mL aralığında ölçülmüştür. Saptanan en düşük değer 100 µg/mL **4a** bileşiği ile 200 µg/mL **3b** bileşiği olduğu ve bu maddelerin *S.aureus* için en yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğu görülmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Benzimidazol türevi bileşiklerle yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, bu bileşiklerin kanser hücresi çeşidine göre, süre ve konsantrasyona bağlı olarak etkilerinin de değiştiğini göstermektedir. Yapılan bu çalışmada, son yıllarda hem ülkemizde hem de dünyada insidansı sürekli artarak, kanser türleri arasında dikkat çeken, görülme sıklığı ve ölüm oranı en yüksek olan akciğer kanseri üzerine, yeni sentezlenmiş on farklı benzimidazol türevi bileşiğin sitotoksik etkisi test edilmiştir. Benzimidazol türevi bileşiklerin sitotoksik etkisini inceleyen çalışmalarla ilgili yapılan literatür araştırmalarında çok farklı kanser hücre hatlarının kullanıldığı görülmüştür (Romero, 2011; Al-Douh, 2012; Kamal vd. 2014; Akkoc, 2017; Arzuman, 2014; Küçükbay, 2016; Apohan, 2017).

Önemli bir halk sağlığı sorunu olan kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapötik ilaçlarda aranan temel özellik, kanser hücresini öldürürken, sağlıklı hücreye ya hiç zarar vermemesi ya da en az zararı vermesidir. Bu amaçla yapılan bu çalışmada, A549 (akciğer kanser hücresi) hücre hattı ve kontrol için BEAS2B (sağlıklı akciğer epitel hücresi) hücre hattı kullanılmış, elde edilen bulguların literatüre ve bundan sonra yapılacak bu tür çalışmalara katkı sağlayacağı öngörülmüştür.

Geçmiş yıllarda uygulanan cerrahi müdahaleler kanser tedavisinde etkili olmadığı gibi farklı sonuçların ortaya çıkmasına da sebep olmuştur. Hücrenin moleküler yapısı hakkında daha fazla bilgi edinilmesi kanser tedavisinde, hücrenin programlı bir şekilde kendini yok ettiği apoptozu indükleyen iç dinamikleri çalıştıran kemoterapötik ajanların keşfine yönlendirmiştir.

Çalışmamızda önce on farklı benzimidazol türevi bileşiğin hücre canlılığı üzerine etkisini test etmek için MTT analizi yapılmıştır. MTT analizi hücre canlılığının tespitinde diğer yöntemlere göre uygulaması kolay, spektrofotometrik olarak çabuk sonuç veren ve sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (Kamal vd. 2014; Arzuman, 2014; Apohan, 2017).

MTT sonuçları değerlendirildiğinde benzimidazol türevi bileşiklerin A549 hücre hattı üzerine sitotoksik etki gösterdiği görülmektedir (Tablo 4.1). Bu bileşiklerin sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi de ayrıca değerlendirilmiştir (Tablo 4.2). Yapılan çalışma sonrası elde edilen bulgular A549 ve BEAS2B hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkinin karşılaştırılmasını ve kemoterapötik potansiyele

sahip olanların belirlenmesini sağlamıştır. Madde (1)'in 72. saatte IC_{50} değeri A549 için 38.11 $\mu\text{g/mL}$ iken, BEAS2B için 35.79 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Bunun gibi diğer bazı maddelerde de (2a, 3c, 4a, 4b) sitotoksik etkinin hem A549 hücre hattı ve hem de BEAS2B hücre hattı üzerindeki etkilerinin olduğu görülmektedir. Ancak yapılan başka çalışmalarda da sentezlenen ve etkisine bakılan tüm bileşiklerin uygulanan kanser hücre hattı üzerine sitotoksik etki göstermeyip benzer durumların olabildiği bildirilmiştir (Bonham, 2011; Romero, 2011; Küçükbaş, 2016; Özdemir, 2017). Apohan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada on dört benzimidazol türevi bileşikten üç tanesinin A549 üzerine sitotoksik etkisi tespit edilmiş ve cisplatinle karşılaştırması yapılmıştır. Diğer bileşiklerin de belirli oranlarda sitotoksik aktivite gösterdiği ancak BEAS2B ile karşılaştırıldığında kemoterapötik potansiyelinin dikkate değer olmadığı değerlendirilmiştir (Apohan vd. 2017). Benzer bulgular bazı benzimidazol türevi bileşiklerin A549 hücre hattı üzerine sitotoksik etki göstermediğini, ancak farklı kanser türleri için sitotoksik etki gösterebileceğini, bu nedenle yeni çalışmalarda bunun dikkate alınarak daha çok hücre hattı kullanılmasının yararlı olacağı değerlendirilmiştir.

Çalışmalarda elde edilen bulgular özellikle 2c, 3a, 3b ve 5. bileşiklerin kemoterapötik potansiyele sahip olabileceğini göstermiştir. 2c bileşiğinin A549 hücre canlılığı üzerine etkisi 24, 48 ve 72. saatlerde konsantrasyona bağlı olarak IC_{50} değeri 79.03 $\mu\text{g/mL}$ 'den 24.35 $\mu\text{g/mL}$ 'ye düşüş göstermiştir. Aynı bileşiğin BEAS2B hücre canlılığı üzerine etkisi ise IC_{50} değeri >100 $\mu\text{g/mL}$ 'den ancak 87.63 $\mu\text{g/mL}$ 'ye düşmüş ve bu bileşiğin kemoterapötik potansiyele sahip olabileceğini düşündürmüştür. 3a bileşiği A549 hücre canlılığı 24, 48, ve 72. saatlerde konsantrasyona bağlı olarak IC_{50} değeri 65.85 $\mu\text{g/mL}$ 'den 28.49 $\mu\text{g/mL}$ 'ye düşmüştür. Bileşiğin BEAS2B hücre hattı için sitotoksik etkisi IC_{50} değeri ise 74.13 - 43.73 $\mu\text{g/mL}$ aralığındadır. 3b bileşiğinin A549 için IC_{50} değeri 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 30.83, 36.26 ve 38.51 $\mu\text{g/mL}$ hesaplanmıştır. BEAS2B için ise IC_{50} değeri sırasıyla 63.34, 61.36 ve 57.89 $\mu\text{g/mL}$ olarak ölçülmüştür. 5 bileşik için sitotoksik etki A549 hücre hattında IC_{50} değeri 72. saatte 60.70 $\mu\text{g/mL}$ iken, BEAS2B hücreleri için 68.53 olarak belirlenmiştir. Tüm bu bulgular dört benzimidazol türevi bileşiğin kemoterapötik ajan olarak geliştirilebileceği düşüncesinden hareketle, sitotoksik etkiye sahip mekanizmanın apoptoz olup olmadığını test etmeye yönlendirmiş ve bu bileşikler için kaspaz-3 aktivitesine bakılmıştır.

Çalışmamızda apoptozun tespiti için spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Apoptoz sonrası oluşan DNA fragmentlerinin ELİSA okuyucu yardımıyla mikropalak içinde spektrofotometrik olarak ölçümü yapılmıştır. Yöntem maddelerin uygulandığı örneklerden elde edilen absorbans değerlerinin kontrolden elde edilenle orantılanması sonrası, örneklerde aktive edilen apoptozun yarı-kantitatif olarak hesaplanmasına olanak sağlamaktadır. Bu yöntem oldukça pratik ve çabuk sonuç verdiği için tercih edilmiştir. Bileşiklerin apoptoz aktivitesini kantitatif olarak görebilmek için elde edilen bulgular grafiklere dönüştürülmüştür (Şekil 4.23 - Şekil 4.30).

Çalışmada test edilen dört bileşiğin apoptozu aktive ettiği ve kaspaz 3 aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir. Ancak yeni yapılacak çalışmalarda farklı yöntemlerin de kullanılması apoptoz mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına ve yeni stratejilerin belirlenmesine önemli katkılar sunacaktır. Kullanılan bazı bileşiklerin A549 hücre hattına karşı daha az sitotoksik etki göstermesi bu bileşiklerin diğer bazı kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etki göstermeyeceği anlamına gelmemektedir. Bu sebeple yapılacak yeni çalışmalarda bileşiklerin farklı hücre hatlarında denenmesi olumlu sonuçlar ortaya çıkarabilir.

Yapılan kaspaz-3 spesifik aktivitesi ile MTT sonuçlarının birbiri ile uyumlu olduğu değerlendirilmiştir. 48 saat sonunda **2c** bileşiğinin A549 hücre hattı için kaspaz-3 aktivitesi kontrole oranla belirgin bir artış göstermekle birlikte 100 µg/mL konsantrasyonda yükselerek yaklaşık %80'lik bir artış göstermiştir (Şekil 4.23). BEAS2B hücre hattı için ilk iki konsantrasyonda kontrole hemen hemen aynı olan kaspaz-3 aktivitesi, 100 µg/mL konsantrasyonda yine yaklaşık aynı oranda artış göstermiştir (Şekil 4.27). Bu sonuçlar 48 saatte A549 hücre hattı için 10 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonda, 100 µg/mL konsantrasyonda ise her iki hücre hattında da apoptozu indüklediğini göstermiştir. Chen vd. yapmış olduğu bir çalışmada akridin türevi benzimidazol bileşiklerinin kolon kanseri hücre hatları (SW480 ve HCT 116) üzerine apoptoz yolaklarını indükleyerek insan kolon kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Chen vd. 2015).

3a maddesi BEAS2B hücre hattına 48 saatte ilk iki konsantrasyonda kontrole göre düşük kaspaz-3 aktivitesi gösterirken, son konsantrasyonda küçük bir artış göstermiştir (Şekil 4.28). **3a** bileşiği 48 saatte A549 hücre hattında ise ilk konsantrasyonda %50'ye varan bir artış ve son konsantrasyonda %70'lik bir artış göstermiştir (Şekil 4.24). Bu bulgular bileşiğin kanserli hücrede apoptozu

indüklediğinin bir göstergesidir. Yapılacak daha ayrıntılı çalışmalar bileşiğin başka apoptoz yollarını da indüklediğini gösterebilir. Literatürde benzer çalışmalar da kaspaz-8 ve 9 aktivitesine de bakılmıştır (Chen vd. 2015). Yine farklı analiz yöntemleri kullanılarak Apoptotik diğer yolların aktivitesi test edilebilmektedir (Arzuman vd. 2014). Elde edilen bulgular bu bileşiğin kemoterapötik ajan olarak dikkate değer olduğunu göstermekte ve yeni yapılacak çalışmalara temel oluşturacağı düşünülmektedir.

3b maddesi A549 hücre hattında 48 saatte konsantrasyona bağlı olarak kaspaz-3 aktivitesinde belirgin bir artış göstermiş, 100 µg/mL konsantrasyonda ise kontrole göre iki kat artmıştır (Şekil 4.25). BEAS2B için ilk iki konsantrasyonda kontrolün altında olması ve 100 µg/mL konsantrasyonda ise üç katına çıkmıştır (Şekil 4.29). Bu sonuç bileşiğin özellikle ilk iki konsantrasyonda A549 hücre hattında apoptozu indüklerken BEAS2B’de apoptozu indüklemediği ve bu nedenle kemoterapötik ajan olarak dikkate değer olduğu düşüncesi ile daha ayrıntılı çalışılmasının gerektiği değerlendirilmiştir.

A549 hücre hattı üzerine apoptozu belirlemek için kaspaz-3 aktivitesine bakılan madde 5’in 100 µg/mL olan son konsantrasyonda dikkate değer bir yükseliş gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.26). Aynı maddenin BEAS2B hücre hattında ise kaspaz-3 aktivitesi kontrole göre düşük bulunmuştur (Şekil 4.30). Bu durum MTT’de genellikle tespit edilen hücre ölümünün farklı hücre ölüm mekanizmaları (nekroz ya da otofaji gibi) tarafından gerçekleşmiş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Bir dizi kompleks biyokimyasal olayla gerçekleşen apoptoz mekanizmasının nasıl düzenlendiğinin anlaşılması hücrede dış müdahale ile apoptozun manipülasyonuna ve terapötik amaçlarla kullanımına yol açacaktır. Bu sebeple yeni kemoterapötik ajanların keşfi önem kazanmıştır. Çalışmamızda kullanılan benzimidazol türevi bileşiklerin sitotoksik etkilerinin test edilmesi sırasında elde edilen bulgular bu bileşiklerin bazılarının apoptozu indüklediğini göstermiş, yeni yapılacak çalışmalarda daha ayrıntılı testlerle spesifik değerlendirmelerin yapılabileceği düşünülmüş ve çalışmaların diğer çalışmalara temel oluşturacağı değerlendirilmiştir.

Çalışmadaki antimikrobiyal aktiviteyle ilgili olarak test edilen bileşiklerin bakterilere karşı MİK değeri 100 ile 1600 µg/mL ve mayalara karşı ise 25 ile 800 µg/mL olarak ölçülmüştür (Tablo 3). Yapılan bu çalışmada **4a** bileşiğinin gram pozitif *S.aureus* bakterisi için en düşük 100 µg/mL, gram negatif *P. aeruginosa*’ya

karşı en düşük MİK değeri 200 µg/mL ölçülmüştür. Ayrıca bu çalışmada test edilen **3a** ve **3c** bileşikleri *C.albicans* ve *C.tropicalis*'e karşı 25 µg/mL MİK değeriyle en yüksek antifungal aktiviteyi göstermiştir. Tüm bu bulgular benzimidazol türevi bazı bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstererek bundan sonra yapılacak yeni çalışmalar için temel oluşturacağı düşünülmektedir.

Literatürdeki bir çalışmada bazı bis-5-metilbenzimidazol bileşiğinin *C.albicans* ve *C.tropicalis*'e karşı antifungal aktiviteleri *in vitro* olarak denenmiş ve bileşiklerin mayalara karşı minimum inhibitör konsantrasyonun (MİK) 25 ila 800 mg/L aralığında olduğu ifade edilmiştir (Küçükbay, 2003). Sentezlenen bir dizi yeni benzimidazol türevi bileşiğin antimikrobiyal aktivitesi *in vitro* çalışmalarda test edilmiş ve gram pozitif bakterilere (*E. faecalis* ve *S. aureus*) karşı MİK değeri 50-400 µg/mL olarak ölçülmüştür. Aynı bileşiklerin gram negatif bakterilere (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) karşı herhangi bir antibakteriyel aktivitesinin olmadığı, ayrıca *C.albicans* ve *C.tropicalis*'e karşı antifungal aktivitenin ise en düşük 50 µg/mL MİK değeri ölçüldüğü rapor edilmiştir (Küçükbay, 2009). Benzimidazol türevi bileşiklerle yapılan başka bir çalışmada antibakteriyel etki orta derecede ölçülmüş, antifungal etki ise MİK değeri en düşük 100 µg/mL olarak bildirilmiştir (Apohan vd.2017). Tüm bu çalışmalar dikkate alındığında bu çalışmada bazı maddelerin antimikrobiyal etkisinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite rapor edilmezken, bu çalışmada gram negatif *P. aeruginosa*'ya karşı **4a** bileşiğinin MİK değeri 200 µg/mL olarak ölçülmüştür.

Elde edilen bulguların akciğer kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek hücre ölüm mekanizmasını çalıştırması, bileşiğin yeni bir antikanser ilaç olarak gelişme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Bu durumun gelecekte yapılacak araştırmalarda benzimidazol türevi yeni bileşiklerin sentezlenmesi ve denenmesi için temel oluşturacağı düşünülmektedir. Ayrıca çalışmada sadece A549 hücre hattına karşı sitotoksik etki değerlendirilmiştir. Eğer yeni çalışmalarda, sentezlenen bu benzimidazol türevi bileşikler farklı kanser hücre hatları üzerine denenirse A549 üzerine etkili olmayan bir bileşiğin başka hücre hattına karşı sitotoksik aktivite gösterebileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abonia, R., Cortes, E., Insuasty, B., Quiroga, J., Nogueras, M., Cobo, J. (2011) . Synthesis of novel 1,2,5-trisubstituted benzimidazoles as potential antitumour agents. *Eur J.Med.Chem.* **46** (9), 4062–4070.
- Akkoc, S., Kayser, V., Ilhan, I.O., Hibbs, D.E., Gok, Y., Williams, P.A., Hawkins, B., Lai, F. (2017). New compounds based on a benzimidazole nucleus: synthesis, characterization and cytotoxic activity against breast and colon cancer cell lines. *J. Organ Chem.* **839**, 98-107.
- Akşit, H., Bildik, A. (2003). Apoptozis, *Türkiye Klinikleri Arch Lung.* **4** (3),165-74
- Aktaş, A., Keleştemur Ü., Gök Y., Balcıoğlu S., Ateş B., Aygün M. (2018). 2-Morpholinoethyl-substituted N-heterocyclic carbene (NHC) precursors and their silver (I) NHC complexes: synthesis, crystal structure and in vitro anticancer properties. *J Iran Chem Soc.* **15**, 131–139.
- Aktaş, E., Demiray, F. (2018) *Ortaöğretim Fen Lisesi Biyoloji*. Devlet kitapları. Ankara, Türkiye, 23 p.
- Akyüz, M.F. (2006). *Evre III B 64 küçük hücre dışı akciğer kanserli hastada eş zamanlı ve ardışık kemoradyoterapinin karşılaştırmalı iki yıllık cevap oranları*. Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
- Alamgir M., Black D.S.C., Kumar N. (2007) Synthesis, Reactivity and Biological Activity of Benzimidazoles. *Top Heterocycl Chem.* **9**, 87-118.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A.D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2013). *Temel hücre biyolojisi*. Garland Science. NewYork, USA. 991 p.
- Al-Douh, M.H., Sahib, H.B., Osman, H., Abd Hamid, S., Salhimi, S. M. (2012). Anti-Proliferation Effects of Benzimidazole Derivatives on HCT-116 Colon Cancer and MCF-7 Breast Cancer Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev.* **13** (8), 4075-4079
- Ali Burak Ö.(2009). *HCT-116 Kolon kanseri hücre hattında yeşil çay etken maddesi olan (-)-epigallokatekin-3-gallat'ın apoptoz üzerine etkisinin incelenmesi*. Lüksek lisans tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.
- Aliyev, E. (2015). *Alveoler kanser hücre dizilerinde apoptoz mekanizmaları üzerine bortezomibin etkilerinin araştırılması*. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Anonymous 1. (2019). <https://www.bethyl.com/antibody/Signal+Transduction+p53+Signaling> . (on-line access on 20 Apr, 2019).

- Anonymous 2. (2019). <https://www.khanacademy.org/science/biology/cellular-molecular-biology/stem-cells-and-cancer/a/cancer> (on-line access on 16 May, 2019).
- Anonymous 3. (2019). <https://www.rndsystems.com/research-area/p53-pathway> (on-line access on 16 May, 2019).
- Anonymous 4. (2019). <https://www.drozdogan.com/anjiyogenez-yeni-damar-olusumunun-kanser-ve-tedavileri-icin-onemi-nedir/> (on-line access on 16 May, 2019).
- Anonymous 5. (2018). <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=30626> (on-line access on 26 May, 2019)
- Anonymous 6. (2019). http://www.tuik.gov.tr/basinOdasi/haberler/2019_06_20190507.pdf (on-line access on 11 Jun, 2019)
- Apohan, E., Yılmaz Ü., Yılmaz Ö., Serindağ A., Küçükbay H., Yeşilada Ö., Baran Y. (2017). Synthesis, cytotoxic and antimicrobial activities of novel cobalt and zinc complexes of benzimidazole derivatives, *J. Organ Chem.* **828**, 52 – 58.
- Arslaner, C., Karakurt, S., Koc, Z.E. (2017). Synthesis of benzimidazole Schiff base derivatives and cytotoxic effects on colon and cervix cancer cell lines. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **7** (4), 2103-2107.
- Arzuman, L., Beale, P., Chan, C., Yu, J.Q., Huq, F. (2014). Synergism from Combinations of tris(benzimidazole) monochloroplatinum (II) Chloride with Capsaicin, Quercetin, Curcumin and Cisplatin in Human Ovarian Cancer Cell Lines. *Anticancer Res.* **34** (10), 5453-5464.
- Aslan, Ö., Vural, H., Kömürcü, Ş., Özet, A. (2006). Kemoterapi alan kanser hastalarına verilen eğitimin kemoterapi semptomlarına etkisi. *C.Ü. Hemşirelik Yüksek Okulu Dergisi.* **10** (1).
- Balakumaran, A., Campbell, G. A., & Moslen, M. T. (1996). Calcium Channel Blockers Induce Thymic Apoptosis in Vivo in Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **139** (1), 122-127.
- Bansal Y., Silakari O. (2012). The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. *Bioorg. Med. Chem.* **20** (21), 6208-6236.
- Barot, K.P., Nikolova, S., Ivanov, I., Ghate, M.D. (2013). Novel research strategies of benzimidazole derivatives: A review. *Med. Chem.* **13**(10), 1421-1447.
- Bonham, S., O'Donovan, L., Carty, M.P., Aldabbagh, F. (2011). First synthesis of an aziridinyl fused pyrrolo[1,2-a]benzimidazole and toxicity evaluation towards normal and breast cancer cell lines. *Org. Biomol. Chem.* **9** (19), 6700-6706.
- Brink, N.G., Folkers, K. (1949). Vitamin B₁₂ VI 5,6-Dimethylbenzimidazole, a degradation product of vitamin B₁₂. *J.Am.Chem.Soc.*, **71**(8), 2951.

- Cabadak H. (2008). Hücre Siklusu ve Kanser. Derleme. *Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fak.Derg.* 51 – 61.
- Canpolat F.(2016), Hücre siklusu ve apoptoz. *Güncel Dermatoloji Dergisi.* **1** (1),11-17.
- Carlsson, E., Lindberg, P., Unge, S.(2002), Two of a kind. *Chem. Brit.* **5**, 42-45.
- Chen, K., Chu, B.Z., Liu, F., Li, B., Gao, C.M., Li, L.L., Sun, Q.S., Shen, Z.F., Jiang, Y.Y. (2015). New benzimidazole acridine derivative induces human colon cancer cell apoptosis in vitro via the ROS-JNK signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin.* **36** (9), 1074-1084.
- Cooper.G.M., Hausman.R.E.(2016). *Hücre: Moleküler Yaklaşım.* Çeviri:7. Baskı. İzmir Tıp Kitapevi, İzmir, Türkiye, p.651-690.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz M.A., Lassota, P., Traganos, F. (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Wiley-Liss, Inc.* **13**, 795-808.
- Easmon, J., Puerstinger, G., Roth, T., Fiebig, H-H., Jenny, M., Jaeger, W., Heinisch, G., Hofmann, J. (2001). 2-Benzoxazolyl and 2-benzimidazolyl hydrazones derived from 2- acetylpyridine: A novel class of antitumor agents. *Int. J. Cancer.* **94**, 89-96.
- El-Deen, E.M.M., Mohamed, N.A., El-Serwy, W.S., Abdelghany, T.M., Nossier, E.S. (2016). Synthesis, Molecular Docking and Cytotoxicity Evaluation of Novel 1,2-Disubstituted Benzimidazole Derivatives Against Liver and Breast Cancer Cell Lines. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* **7** (5), 1599-1615.
- Elmore S.,(2007).Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* **35** (4), 495–516.
- Erdoğan B.B., Uzaslan E.K. (2003). Apoptozis Mekanizmaları: Tümör Gelişiminde Fas-FasL Bağımlı Apoptozis. *Türkiye Klinikleri Arch Lung.* **4** (3), 165-74.
- Gönüllü, U.(1995). *Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi*, Üniversitesi Tıp Fakültesi, 15, Ankara.
- Görür A. (2010). *Hepatosellüler karsinomda apoptozis mekanizması ve bazı Benzimidazol türevlerinin hepatosellüler karsinom üzerine etkisi*, Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi, İçel.
- Hartwell, L., Wainert, T., Kadyk, L., Garvik, B. (1994). Cell Cycle Checkpoints, Genomic Integrity, and Cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **59**, 259-263.
- HSGM, Faaliyet raporu. (2016),<https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/kurumsal/plan-ve-faaliyetler/2016-faaliyet-raporu.pdf> (on-line access on 16 May,2019).

- HSGM, Kanser istatistikleri. (2018). <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/495-2014-Türkiye-kanser-istatistikleri.html> (on-line access on 12 Nov, 2018)
- Jemal,A., Bray,F., Center,M.M., Ferlay,J., Ward, E., Forman,D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* **61** (2),134.
- Kamal, A., Kumar, G.B., Nayak, V.L., Reddy, V.S., Shaik, A.B., Rajender, Reddy, M.K. (2014). Design, synthesis and biological evaluation of imidazopyridine/imidazopyrimidine-benzimidazole conjugates as potential anticancer agents. *Med. Chem. Commun.* **6**, 606.
- Karadağ, A. (2016). Otofaji: Programlı Hücre Ölümü, *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi.* **15** (2).
- Keri, R., Hosamani, K., Reddy, H.R.S., Shingalapuri, R.V. (2009).Wells-dawson heteropolyacid: an efficient recyclable catalyst for the synthesis of benzimidazoles under microwave condition. *Catal Lett.* **131** (3), 552-559.
- King, J.C., Shames, D.M., Woodhouse L.R. (2000). Zinc Homeostasis in Humans, *J Nutr.* **130** (5),1360-1366.
- Küçükbay, H., Durmaz, R., Güven, M., Günel, S. (2001). Synthesis of Some Benzimidazole Derivatives and their Antibacterial and Antifungal Activities. *Arzneim.-Forsch./ Drug Res.* **51** (5), 420-424.
- Küçükbay, H., Durmaz, R., Güven, M., Günel, S. (2009). Synthesis of some benzimidazole derivatives and their antibacterial and antifungal activities. *Asian J. Chem.* **21** (8), 6181-6189.
- Küçükbay, H., Durmaz, R., Okyucu, N., Günel, S. (2003). Antifungal activity of some bis-5-methylbenzimidazole compounds. *Folia Microbiol.* **48** (5), 679-681.
- Küçükbay, H., Mumcu, A., Tekin, S., Sandal, S. (2016). Synthesis and evaluation of novel N, N'-disubstituted benzimidazolium bromides salts as antitumor agents. *Turk J. Chem.* **40**, 393 – 401.
- Lamerton, L.F. (1974). The mitotic cycle and cell population control. *J Clin Pathol.* **3** (7), 19-25.
- Lieberman, J. (2010) Granzyme A activates another way to die. *Immunol Rev.* **235** (1), 93-104.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M.T., Olaizola, C., Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *Int J Infec Dis.* **8**, 39-45
- Mason, R.J., Bousey, H.A. (2000). Textbook of respiratory medicine. *W.B. Saunders Co* pp. 1395-1407. Philadelphia.

- McGahon, A.J., Martin, S.J., Bissonnette, R.P., Mahboubi, A., Shi, Y , Mogil, R.J., Nishioka, W.K., Yeşil, D.R. (1995). The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods Cell Biol.* 46,153-85.
- McGuire, S. (2016). *World Cancer Report. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Geneva, Switzerland.* 7 (2), 418–419.
- Mosman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
- Murray A., (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. Review. *Cell.* **116** (2), 221-234.
- Müsellim, B. (2007). Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri II. Sempozyum Dizisi No:58, 1 -113- 118.
- Oktar, N. (2009). K562 Hücre dizisinde fosfin bileşiklerinin sitotoksik etkisinin MTT ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Ozdemir, A., Uzunoglu, S., Caliskan, B., Banoglu, E., Ark, M. (2017). Anticancer activity of novel benzimidazole derivatives against MCF-7 cancer cells. *Faseb J.* **31**.
- Ören Ü., Yalçın İ.,(1997) Kemoterapötik etkili benzoksazol türevleri ve halka analogları üzerinde gerçekleştirilmiş yapı-etki ilişkileri, *A.Ü. Ecz. Fak. Derg.* **25** (2), 081-108.
- Özay, G., Ülker, E.(2008). *Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler*, *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.* (2) 73-78.
- Parkin, M., Tycznski J.E., Boffetta P., Samet J., Shields P.,Caporaso N. (2004). Pathology and genetics of tumors of the lung. *WHO Publications Center*, pp,5-12.
- Rastogi RP, Sinha RP. (2009). Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI Journal.* **8**, 155-181.
- Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V., Jackson, R.B. (2013). *Campbell Biyoloji. 9. Baskıdan Çeviri.* Palme Yayıncılık, Ankara, Türkiye, 94 p.
- Reller, L.B., Weinstein, M., Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin Infect Dis.*49 (11), 1749–1755.
- Renehan A.G., Booth C., Potten C.S.(2001).What is apoptosis, and why is it important? *BJM.* **322** (7301), 1536–8.

- Romero-Castro, Aurelio & León-Rivera, Ismael & Citlalli Avila-Rojas, Laura & Navarrete-Vázquez, Gabriel & Nieto-Rodríguez, Alejandro. (2011). Synthesis and Preliminary Evaluation of Selected 2-Aryl-5(6)-nitro-1H-benzimidazole Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Arch Pharm Res.* **34**, 181-9.
- Sarhan, A.A.O., Al-Dhfyan, A., Al-Mozaini, M.A., Adra, C.N., Aboul-Fadl T. (2010). Cell cycle disruption and apoptotic activity of 3-aminothiazolo[3,2-a]benzimidazole-2-carbonitrile and its homologues. *Eur J Med Chem.* **45** (6): 2689-94.
- Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. (2001). Molecular mechanisms of death-receptor mediated apoptosis. *Chembiochem.* **2** (1), 20-9.
- Sherr J. C.(1996). Cancer Cell Cycles. *Science.* **274** (5293), 1672-1677.
- Smaill, J.B., Fan J.Y., Denny WA,(1998). DNA minor groove targeted alkylating agents based on bis- benzimidazole carriers: synthesis, cytotoxicity and sequence-specificity of DNA alkylation. *Anticancer Drug Des.* **13**, 857-880.
- Snehlata, Y., Balasubramanian, N., Harmeet.K. (2016). Perspectives of benzimidazole derivatives as anticancer agents in the new era. *Anticancer Agents Med Chem.* **16** (11), 1403-1425.
- Spasov, A.A., Yozhitsa, N., Bugaeva, L.I., Anisimova, V.A. (1999). Benzimidazole derivatives: Spectrum of pharmacological activity and toxicological properties (A Review). *Pharm Chem J.* **33** (5), 6-17.
- Stockert, J.C., Castro, A.B., Canete, M., Horobi, R. W., Villanueva, A. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica.* **114** (8), 785-796.
- Thompson, C. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* **267** (5203),1456-1462.
- Trapani, J.A., Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* **2** (10), 735-747.
- Tripathi R, Mishra DP, Shaha C. (2009). Male germ cell development: turning on the apoptotic pathways. *J Reprod Immunol.* **83** (1-2), 31-5.
- Vaculova, A., Zhivotovsky, B. (2008). *Chapter Eight Caspases: Determination of Their Activities in Apoptotic Cells.* Methods in Enzymology. Stockholm, Sweden. **442**, 157-181.
- Vazquez, A., Bond, E.E., Levine, A.J., Bond, G.L. (2008). The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* **7** (12), 979-87.
- Vermeulen K, Bockstaele, D.R.V., Bernemanet, Z.N. (2003).The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**, 131–149.

- Walia, R., Hedaitullah, M., Naaz, S.F., Iqbal, K. Lamba, H.S.(2011). Benzimidazole derivatives-an overview. *Int. J. Res. Pharm. Chem.* **1** (3), 2231-2781.
- Wang, Z., Deng,X., Xiong, S., Xiong, R., Liu, J., Zou, L., Lei, X., Cao, X., Xie, Z., Chen, Y., Liu, Y., Zheng, X., Tang, G. (2018). Design, synthesis and biological evaluation of chrysin benzimidazole derivatives as potential anticancer agents, *Nat Prod Res.* **32** (24), 2900-2909.
- WHO, Cancer. (2018). <http://www.who.int/cancer/en/> (on-line access on 26 May, 2018).
- WHO, World Cancer Report. (2018). <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=76&codcch=16> (on-line access on 22 Nov, 2018).
- Woolley. (1943). Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. *Received for publication.*
- Youssef, A.M., Malki, A., Badr, M.H., Elbayaa, R.Y., Sultan, A.S. (2012). Synthesis and Anticancer Activity of Novel Benzimidazole and Benzothiazole Derivatives against HepG2 Liver Cancer Cells. *Med Chem.* **8** (2), 151-162.
- Yurdakul, Ö. (2017). *Resvarotrolün insan kanser hücrelerinde (H1299) antioksidan etkisinin araştırılması*. Lüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya.
- Zhang H. (2007) Review: Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *J Cell Physiol.* 567-74.
- Zhang J, Xu M.(2002). Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. *Trends Cell Biol.* **12** (2), 84- 89).

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyadı : MUSTAFA UÇKUN

Doğum Yeri ve Tarihi : DÖRTYOL – 1971

Adres : Malatya Fen Lisesi
Yakınca Mahallesi Osmangazi Sokak No 15/1
YEŞİLYURT / MALATYA

E-Posta : biyokrk@gmail.com

Lisans : Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Bölümü VAN

Mesleki Deneyim ve Ödüller : Milli Eğitim Bakanlığı – Biyoloji Öğretmeni
(24 Yıl)
İlköğretim Genel Müdürlüğü- Aylıkla
Ödüllendirme,
Malatya Valiliği – Takdir Belgesi,
Malatya Valiliği – Başarı Belgesi,
İl Milli Eğitim Müdürlüğü – Teşekkür belgesi

Yayın Listesi : Elif Apohan, Özfer Yeşilada, Samet Uçar, Eray Tatlıcı, **Mustafa Uçkun**, Sema Erdemoğlu
Nanopartiküllerin Çeşitli Kanser Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik Etkisi, International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, 26-27 April Ankara / Turkey (2018).