

**YENİ AMİNO BENZOHİDROKSAMİK ASİT
TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE ANTİKANSER
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Işıl Nihan KORKMAZ

**Doktora Tezi
Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR
Kimya Ana Bilim Dalı
2021**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

**YENİ AMİNO BENZOHİDROKSAMİK ASİT TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE
ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**
(Synthesis Of New Amino Benzohydroxamic Acid Derivatives and Investigation Of
Their Anti-Cancer Properties)

DOKTORA TEZİ

Işıl Nihan KORKMAZ

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Erzurum
Haziran, 2021

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Işıl Nihan KORKMAZ tarafından hazırlanan “Yeni Amino Benzohidroksamik Asit Türevlerinin Sentezi ve Antikanser Özelliklerinin Araştırılması” başlıklı çalışması 10/06/2021 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Kimya Ana Bilim Dalı, Kimya Bilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Harun BUDAK <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islakİmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islakİmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Murat ÇAKICI <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islakİmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Mehmet Hüseyin ALKAN <i>Dicle Üniversitesi</i>	Aslı Islakİmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Ahmet ALTAY <i>Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi</i>	Aslı Islakİmzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun
.../.../.... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Aslı Islakİmzalıdır
Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.



TEZ BENZERLİK ORANI BEYAN FORMU¹

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Işıl Nihan KORKMAZ
Öğrencinin Numarası	16041307001
Ana Bilim Dalı	Kimya
Bilim Dalı	Kimya
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	23	30
Kuramsal Temeller	6	30
Materyal ve Yöntem	12	35
Bulgular	10	20
Tartışma	0	20
Tezin Geneli	14	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Işıl Nihan KORKMAZ	Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR
17.5.2021	17.5.2021
İmza: Aslı Islakİmzalıdır	İmza: Aslı Islakİmzalıdır

¹ Bu form bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp Tez Savunması Jüri Öneri Formu'yla birlikte Ana Bilim Dalı Başkanlığı aracılığıyla ÜBYS üzerinden Enstitüye iletilmelidir.

TEŞEKKÜR

Üstün bilimsel kişiliği yanında insan olarak da örnek aldığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e doktora öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı en derin ve içten şükranlarımı sunarım.

Bilimsel çalışmalarımın her aşamasında katkıda bulunan, her sorunumla yakından ve içtenlikle ilgilenen Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN' e, Prof. Dr. Harun BUDAK' a ve Doç. Dr. Murat ÇAKICI' ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca bilgi ve birikimlerinin yanında yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZTEKİN'e, Dr. Öğr. Üyesi Ramazan KALIN'a, Dr. Öğr. Üyesi Fatma Necmiye KACI' ya ve Sayın Araş. Gör. Dr. Gökhan DERVİŞOĞLU'na minnettarım.

Örnek bir insan ve bilim insanı olarak hayatımda özel ve önemli bir yeri olan ve birlikte birçok çalışmaya imza attığımız hocam Sayın Araş. Gör. Dr.Pınar GÜLLER'e ve Dr. Öğr. Üyesi Uğur GÜLLER'e teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, hayatımın her anında yanımda olan anneme, babama, abime, eşim ve canım kızım Umay Deniz'e yürekten teşekkür ederim.

YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı ile sağladığı maddi destekten dolayı YÖK' e teşekkür ederim.

Işıl Nihan KORKMAZ

ÖZET

DOKTORA TEZİ

YENİ AMİNO BENZOHİDROKSAMİK ASİT TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Işıl Nihan KORKMAZ

Danışman: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Amaç: Bu tez çalışmasının amacı, histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri olduğu bilinen hidroksamik asitlerin yeni (4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit, 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit, 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit) türevlerini sentezlemektir. Ayrıca bu çalışmada, bu aday inhibitörlerin sağlıklı insan fibroblast hücre hattı, insan akciğer kanser (A549) hücre hattı ve insan servikal kanser (*HeLa*) hücre hattında antikanser özelliklerini incelemek ve kanser hücrelerinde aktivitelerinin arttığı bilinen tiyoredoksin redüktaz (TRXR1), glutatyon S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimleri üzerine inhibisyon etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

Yöntem: Tez kapsamında üç yeni amino hidroksamik asit türevi (4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit, 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit ve 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit) sentezlendi. Sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücrelerine etkileri incelendi. TRXR1, GST ve GR enzimlerinin aktiviteleri üzerine etkileri incelendi. Sentezlenen moleküllerin doğruluğu ¹H-NMR ve ¹³C-NMR MHz ve HRMS ile belirlendi.

Bulgular: 4-Amino-2-metoksi benzohidroksamik asit molekülünün sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücreleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla; 0,55 mM, 1,8 mM ve 2,2 mM olarak belirlendi. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit molekülünün sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücreleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla; 1,01 mM, 1,03 mM ve 0,54 mM olarak belirlendi. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit molekülünün sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücreleri için IC₅₀ değerleri sırasıyla; 2,46 mM, 0,78 mM ve 0,25 mM olarak belirlendi.

Sonuç: Karakterizasyon sonuçlarından yeni amino benzohidroksamik asit türevlerinin başarılı bir şekilde sentezlendiği anlaşılmıştır. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit molekülü sadece *HeLa* kanser hücreleri üzerine antikanser etki göstermiş olup, 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit molekülü A549 ve *HeLa* kanser hücrelerinde antikanser etki göstermiştir. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit molekülünün hem GR hemde TRXR1 aktivitelerini önemli ölçüde baskıladığı bulunmuştur. GST aktivitelerinde ise inhibitörlerimiz kanser hücrelerinde önemli ölçüde etki göstermemişlerdir.

Haziraz 2021, 119 sayfa

Anahtar Kelimeler: Hidroksamik asit; Antikanser, HDAC inhibitörleri, Enzim aktivitesi

ABSTRACT

PhD Thesis

SYNTHESIS OF NEW AMINO BENZOHYDROXAMIC ACID DERIVATIVES AND INVESTIGATION OF THEIR ANTI-CANCER PROPERTIES

Işıl NİHAN KORKMAZ

Supervisor: Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR

Purpose: The aim of this thesis is to synthesize new (4-amino-2-methoxy benzohydroxamic acid, 4-amino-3-methyl benzohydroxamic acid, 3-amino-5-methyl benzohydroxamic acid) hydroxamic acid derivatives, which are known to be histone deacetylase (HDAC) inhibitors. Besides, in this study it has been aimed to examine the anticancer properties of these candidate inhibitors on the human healthy fibroblast cell line, human lung cancer (A549) cell line, and human cervical cancer (*HeLa*) cell line. And also their inhibition effects on the activities of thioredoxin reductase (TRXR1), glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR) enzymes of which activities are increased in cancer cell have been investigated.

Method: Within the scope of the thesis, three new amino hydroxamic acid derivatives (4-amino-2-methoxy benzohydroxamic acid, 4-amino-3-methyl benzohydroxamic acid and 3-amino-5-methyl benzohydroxamic acid) were synthesized. Their effects on healthy fibroblast, A549 and *HeLa* cancer cells were investigated. The effects on the activities of TRXR1, GST and GR enzymes were investigated. The accuracy of the synthesized molecules was checked by ^1H -NMR and ^{13}C -NMR MHz and HRMS.

Findings: For healthy fibroblast, A549 and *HeLa* cancer cells, IC_{50} values of 4-Amino-2-methoxy benzohydroxamic acid molecule were determined as 0.55 mM, 1.8 mM, and 2.2 mM respectively. IC_{50} values of 4-Amino-3-methyl benzohydroxamic acid molecule for healthy were determined as 1.01 mM, 1.03 mM and 0.54 mM respectively. IC_{50} values of 3-Amino-5-methyl benzohydroxamic acid molecule were determined as 2.46 mM, 0.78 mM and 0.25 mM respectively.

Results: It was determined from the characterization results that new amino benzohydroxamic acid derivatives were successfully synthesized. 4-Amino-3-methyl benzohydroxamic acid molecule showed anticancer effect only in *HeLa* cancer cells, 3-Amino-5-methyl benzohydroxamic acid molecules showed anticancer effect in both A549 and *HeLa* cancer cells. It was found that the 3-Amino-5-methyl benzohydroxamic acid molecule were significantly suppressed the activities of GR and TRXR1 enzymes. However, these inhibitors did not have a significant effect on the activity of cancer cells GST.

June 2021, 119 pages

Keywords: Hydroxamic acid; Anticancer, HDAC inhibitors, Enzyme activity

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
GİRİŞ.....	1
Kanser	1
Akciğer Kanseri	2
Servikal kanser	2
Kanser Hücrelerinin Temel Özellikleri	3
Proliferatif büyüme sinyal oluşumunda kendi kendine yetme	4
Hücre bölünmesine sebep olan sinyallerin sürdürülmesi	4
Kanserleşmeyi destekleyen iltihaplanma (yangı=enflamasyon)	4
İnvazyonun ve metastazın aktifleşmesi	5
Büyüme baskılayıcılardan kaçış	5
Anjiyogenezin teşvik edilmesi	5
Gen yapısında mutasyonlar (hatalar)	5
Enerji metabolizmasının yeniden programlanması	6
Hücre ölümüne (apoptoz) direnç	6
Kanser ve Oksidatif Stres	12
Tiyoredoksin sistemi ve tiyoredoksin redüktaz	13
Glutatyon S-transferazlar (GST)	14
Glutatyon Redüktaz (GR)	16
Kanser Tedavi Yöntemleri	17
Hidroksamik Asitler	18
Histon Deasetilaz Enzimleri (HDAC)	21
Epigenetik Düzenlemeler	21
DNA modifikasyonları	22

Kromatin modifikasyonları	22
Histon Deasetilaz inhibitörleri	26
KAYNAK ÖZETLERİ.....	28
MATERYAL METOT	40
Tez Kapsamında Kullanılacak Cihazlar, Kimyasal Maddeler ve Kitler	40
Hidroksamik Asit Sentezi	43
Antikanser Aktivite Çalışmaları Kullanılacak Hücre Hattları	44
Akciğer kanser hücre hattı (A549)	44
Servikal kanser hücre hattı (HeLa)	45
Hücre kültürü çalışmaları.....	46
Kullanılılan DMEM - Ham's F12 besi ortamının içeriği	46
Hücrelerin dondurulması ve saklanması	46
Hücrelerin tripsinizasyon işlemi ile kaldırılması	47
Hemositometre ile hücre sayımı	47
Kanser Hücrelerine Yeni Amino Benzohidroksamik Asit Türevlerinin Uygulanması ..	48
Hücre Canlılık Testleri.....	48
WST-8 hücre proliferasyonu ve sitotoksite testi	48
Apoptotik ve Nekrotik Hücre Analizleri.....	49
Apoptotik ve nekrotik hücre miktarlarının belirlenmesi.....	49
Apoptotik ve nekrotik hücrelerin görüntülenmesi	50
Kaspaz-3 enzim aktivitesindeki değişimin saptanması belirlenmesi.....	50
Annexin-V analizi ile apoptotik hücre popülasyonunun saptanması.....	51
İstatistiksel Analizler.....	52
Sentezlenen Amino Benzohidroksamik Asit Moleküllerinin Sağlıklı Fibroblast, A549 ve Hela Kanser Hücrelerinde TRXR1, GST ve GR Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	52
Protein Ekspresyon Analizi.....	52
Total proteinin homojenatının hazırlanması	52
Tiyoredoksin Redüktaz 1 (TRXR1) Aktivite Ölçümü.....	53
Glutasyon S-Transferaz (GST) Aktivite Ölçümü.....	54
Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivite Ölçümü	56
ARAŞTIRMA BULGULARI	58
Spektrumlar	58
¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumları	58
Kütle spektrumu.....	58

Hidroksamik Asitlerin Sentezi	58
Genel prosedür	58
Sağlıklı Fibroblast, A549 ve <i>HeLa</i> Kanser Hücre Canlılığının WST-8 Testi ile Analizi	60
Kaspaz-3 Enzim Aktivitesindeki Değişimin Saptanması	66
Annexin-V Testiyle Apoptotik Hücre Popülasyonu	68
Sentezlenen Amino Benzohidroksamik Asit moleküllerinin Sağlıklı Fibroblast, A549 ve <i>HeLa</i> kanser hücrelerinde TRXR1 Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelendiği Çalışmanın Sonuçları	72
Sentezlenen Amino Benzohidroksamik Asit moleküllerinin Sağlıklı Fibroblast, A549 ve <i>HeLa</i> Kanser Hücrelerinde GST Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelendiği Çalışmanın Sonuçları	75
Sentezlenen Amino Benzohidroksamik Asit moleküllerinin Sağlıklı Fibroblast, A549 ve <i>HeLa</i> Kanser Hücrelerinde GR Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelendiği Çalışmanın Sonuçları	77
SONUÇLAR.....	79
KAYNAKLAR.....	82
EKLER	99
EK 1. 3 HİDROKSAMİK ASİT MOLEKÜLLERİNE AİT ¹ H-NMR VE ¹³ C-NMR SPEKTRUMLARI	99
ÖZGEÇMİŞ.....	103

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. TRXR1 Aktivitesinin Belirlenmesindeki Kuvvet İçeriği	54
Tablo 2. GST Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kuvvet İçeriği.....	55
Tablo 3. GR Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kuvvet İçeriği.....	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. Apoptotik yollar	9
Şekil 3. Nekrotik hücre ölümü	11
Şekil 4. Tioredoksin Sistemi (tioredoksin, tioredoksin redüktaz ve NADPH) tarafından kataliz edilen redoks reaksiyonları	13
Şekil 5. Glutasyon S-transferaz enziminin katalizlediği reaksiyon	15
Şekil 6. GR enziminin katalizlediği reaksiyon	16
Şekil 7. Hidroksamik asitlerin genel formülü	18
Şekil 8. Histon proteinleri	20
Şekil 9. Lizin artığının asetilasyonu ve deasetilasyonu	23
Şekil 10. Lizin	24
Şekil 11. Histonların asetile ve deasetile olması durumunda transkripsiyon	25
Şekil 12. HDAC inhibitörlerinin yapısı	26
Şekil 13. Hidroksamik asit sentezi genel reaksiyonu	43
Şekil 14. Hücre kültüründe kullanılacak yeni sentezlenecek amino benzohidroksamik asit bileşikleri	44
Şekil 15. İnsan akciğer kanser hücre hattı (A549) görüntüsü (10x)	44
Şekil 16. İnsan servikal kanser hücre hattı (HeLa) görüntüsü (10x)	45
Şekil 17. İnsan sağlıklı fibroblast hücre hattı görüntüsü (10x)	46
Şekil 18. WST-8 ile formazan bileşiğinin oluşumu	49
Şekil 19. Kaspaz-3 enzim aktivitesi reaksiyonu	50
Şekil 20. 4-Amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) molekülünün konsantrasyonuna bağlı sağlıklı fibroblast hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları	60
Şekil 21. 4-Amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) molekülünün konsantrasyonuna bağlı A549 kanser hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları	61
Şekil 22. 4-Amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) molekülünün konsantrasyonuna bağlı HeLa kanser hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları	61
Şekil 23. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) molekülünün konsantrasyonuna bağlı sağlıklı fibroblast hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları	62
Şekil 24. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) molekülünün konsantrasyonuna bağlı A549 kanser hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları	63

Şekil 25. 4–Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) molekülünün konsantrasyonuna bağlı <i>HeLa</i> kanser hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları.....	63
Şekil 26. 3–Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) molekülünün konsantrasyonuna bağlı sağlıklı fibroblast hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları.....	65
Şekil 27. 3–Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) molekülünün konsantrasyonuna bağlı A549 kanser hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları	65
Şekil 28. 3–Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) molekülünün konsantrasyonuna bağlı <i>HeLa</i> kanser hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları.....	66
Şekil 29. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c), 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b)’ nin sağlıklı fibroblast hücrelerinde Kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkisi	67
Şekil 30. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)’ nin A549 kanser hücrelerinde Kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	67
Şekil 31. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) ve 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)’ nin <i>HeLa</i> kanser hücrelerinde Kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	68
Şekil 32. (A) 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) ve 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)’ nin % apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonu üzerine etkisi (B)-(C) Akış sitometri görüntüleri.....	69
Şekil 33. (A) 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)’ nin % apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonu üzerine etkisi (B) Akış sitometri görüntüsü.....	70
Şekil 34. (A) 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) ve 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)’ nin % apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonu üzerine etkisi (B)-(C) Akış sitometri görüntüleri.....	71
Şekil 35. Amino benzohidroksamik asit türevlerinin TRXR1 aktivitesi üzerine etkileri	73
Şekil 36. Amino benzohidroksamik asit türevlerinin GST aktivitesi üzerine etkileri	75
Şekil 37. Amino benzohidroksamik asit türevlerinin GR aktivitesi üzerine etkileri	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A549	: İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı
AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
ANT	: Voltaj Bağımlı Anyon Kanalı
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör
Bac	: X İlişkili, Apoptoz Düzenleyici
Bad	: Bcl-2 İlişkili Hücre Ölümü Agonisti
Bax	: X İlişkili, Apoptoz Düzenleyici
Bcl-2	: B Hücreli Lenfoma
Bcl-W	: Anti-Apoptotik Bir Protein
Bid	: BH3 Etkileşen Etki Alanı Ölüm Agonisti
CAD	: Kaspaz aktive edici DNaz
CS055	: Chidamide
CTCL	: Kutanöz T Hücreli Lenfoma
DISC	: Ölüm Tetikleyici Sinyal Kompleksi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
Endo G	: Endonukleaz-G
FAS-FASL	: Hücre Yüzeyi Ölüm Reseptörü ve Ligandı
FBS	: Fetal Dana Serum
GR	: Glutasyon Redüktaz
GST	: Glutasyon S-Transferaz
HAT	: Histon Asetiltransferaz
HCV	: Hepatit C virüs
HDAC	: Histon Deasetilaz
HDACs	: Histon Deasetilaz Enzimleri
HEK293	: İnsan Embriyonik Böbrek (Hek293)
HepG2	: İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı
HL-60	: İnsan Promyelotik Lösemi
HPDE6c7	: Sağlıklı Pankreas Epitel Hücresi
HT29	: İnsan Kolon Adenokarsinoma
IAF	: İnhibitör Apoptotik Faktör

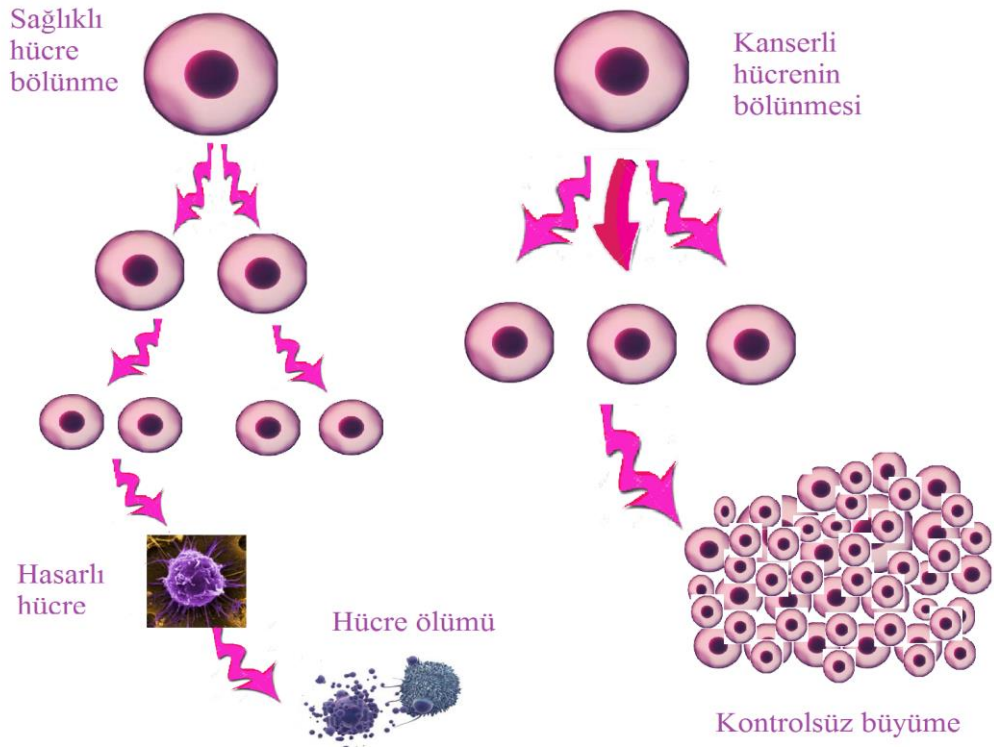
ICAD	: İnaktif Kaspaz Aktive Edici Dnaz
ILGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
LBH589	: Panobinostat
MCF-7, MDA MB-231, MDA MB-468	: Meme Kanseri Hücre Dizileri
Mcl-1	: Myeloid Lösemi Hücre Farklılaşma Proteini
MMT	: Matris Metaloproteinaz
MMT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NK	: Negatif Kontrol
Noxa	: Forbol-12-Miristat-13-Asetat İle İndüklenen Protein1
P53	: Tümör Protein 53
PANC-1, AsPC-ve Mia-PaCa-2	: Pankreas Kanseri Hücre Dizileri
PARP	: Poli ADP-Riboz Polimeraz
PARP1	: Poli [ADP-Riboz] Polimeraz 1
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PC-3	: Prostat Kanseri Hücre Hattı
PK	: Protein Kinaz
PK	: Pozitif Kontrol
PTCL	: Periferik T Hücreli Lenfoma
Puma	: Regüle Apoptoz Modülatörü
Real Time-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIP	: Reseptör Etkileşimli Protein
RIP1-RIP3	: Reseptör Etkileşimli Protein 1-3
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SAHA	: Suberoilanolid Hidroksamik Asit (Varinostat)
SAM	: S-Adenozil Metiyonin
SAM	: Ampisilin Sulbaktam
SBHA	: Suberoil Bishidroksamik Asit
SKOV-3	: İnsan Over Kanseri Hücreleri
Smac	: İkinci Mitokondri Türevli Kaspaz Aktivatörü
TNF	: Tümör Nekroz Faktör

TNF-alfa	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNFR	: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TRAIL	: Tnf İlişkili Apoptozu İndükleyen Ligand
Trx	: Tiyoredoksin
TRXR1	: Tiyoredoksin Redüktaz 1
TSA	: Trikostatin A
VDAC	: Voltaj Bağımlı Anyon Kanalı
5-FU	: 5-Fluorourasil
XTT	: 2,3-Bis-(2-Metoksi-4-Nitro-5-Sülfofenil)-2H-Tetrazolyum-5-Karboksanilit

GİRİŞ

Kanser

Kanser, vücut içindeki hücrelerin bir grubundaki değişikliklerin, tümör adı verilen bir yumru oluşumuna sebep olacak şekilde sınırsız büyümeye meyilli olduğu durumda ortaya çıkan ölümcül bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Bu tanım hematolojik kanserler haricindeki tüm kanserler için de geçerli olmaktadır (Can 2014).



Şekil 1. Sağlıklı ve kanserli hücre bölünmesinin şematik gösterimi (Dalay ve Buyru 2015).

Kanser, normal hücrelerin bölünme kalıbı davranışlarının bozulması ile kontrolsüz çoğalmaları (proliferasyon) ve diğer dokulara yayılımı (metastaz) ile karakterize edilen genetik ve epigenetik bir hastalıktır. Kanser hücrelerinde bölünme kalıbını denetleyen genler ya mutasyona uğramıştır ya da normal olmayan bir şekilde eksprese olma profili göstermektedir (Klug and Cummings 2006).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) alt birimi olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), Küresel Kanser Gözlemevi'nin bir parçası olan GLOBOCAN 2020 veritabanı aracılığıyla 2020 yılında 185 ülkede 36 belli kanser türü açısından sıklık ve hayat kaybı oranına yönelik tahminlerini çevrimiçi olarak bildirmiştir. Bu verilere göre, küresel kanser

yükünün 2020 yılında 19,3 milyon yeni hastaya ve 10,0 milyon hayat kaybına yükseldiği bildirilmiştir. Dünya üzerinde her 5 kişiden biri kansere yakalanmakta olup, her 8 erkekten 1'i ve her 11 kadından 1'i kanser sebebiyle hayatını kaybetmektedir. Türkiye'de ise 2020 yılında erkeklerde en sık görülen 5 kanser türü; akciğer, prostat, kolorektal, mesane ve mide kanseridir. Kadınlarda en yaygın görülen ilk 5 kanser çeşidi ise; meme, tiroid, kolorektal, akciğer ve rahim kanseridir. Bu tasnifte dikkat çekici bir husus ise kolorektal kanserlerin hem erkeklerde hem kadınlarda en sık görülen 3. kanser olmasıdır. (Globocan 2020 Database. <https://gco.iarc.fr/>).

Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, akciğerde kanser hücrelerinin gereksiz ve kontrolsüz çoğalmasıyla meydana gelmektedir. Kanserli doku hızla yayılır ve kan damarları ile çevre organ ve dokulara yayılır. Kanser hücreleri diğer doku ve organlara yayıldığı zaman akciğerin çalışmasını zorlaştırır ve yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürür (Romaszko 2018).

Akciğer kanseri iki grupta sınıflandırılmaktadır;

- 1) Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC)
- 2) Küçük hücreli akciğer kanseri (Byers and Rudin 2015).

NSCLC tüm akciğer kanseri türlerinin yaklaşık olarak %14'ünü kapsayan ve yaygınlığı çok yüksek bir kanser türüdür (Byers and Rudin 2015).

Bu kanser türünün başlaması ve ilerlemesi, çevresel faktörlerden etkilenen epigenetik değişikliklerin yanında nokta mutasyonları, delesyonlar, yer değiştirme ya da amplifikasyonlar da içinde olmak üzere kalıcı genetik değişiklikler kombinasyonunun birikmesinin sonucunda gerçekleşmektedir. Epigenetik farklılıklar, hücrenin çekirdeğinde yer alan bir protein ve DNA kompleksi olan replikasyon, onarım, rekombinasyon ve transkripsiyon gibi tüm DNA bağımlı işlemleri önemli derecede etkileyen kromatinin kalıtsal değişikliklerinin toplamını tanımlamaktadır (Metha *et al.* 2015).

Servikal kanser

Servikal kanser, serviks dokularında kötü huylu hücrelerin oluşturduğu, gebelik evresindeki kadınları etkileyen jinekolojik kanser türlerinden biridir. Kadınlarda görülen kanser hastalıkları arasında insidans ve ölüm oranı ile servikal kanseri dördüncü en yaygın kanserdir (Arbyn *et al.* 2020).

Servikal kanser yavaş ilerlemesi, lezyonların varlığının saptanabilmesi ve çok sayıda etkili tedavilerin sunulması nedeniyle en önlenebilir kanser çeşitlerinden birini oluşturmaktadır (Leyden *et al.* 2005).

Kanser tek bir organı etkileyebildiği gibi uzaktaki organlara yayılarak da etkisini gösterebilir. Her ne kadar bazı standartlar belirlenmiş olsa bile her kanser türüne özgü olarak farklı yaklaşımlar ve tedaviler uygulanmaktadır. Her insanın farklı bir DNA'ya sahip olması oyunun kuralını değiştiren en büyük etmen olmaktadır (Baykara 2015).

Kanser oluşumunun kökeninde deoksiribonükleik asit (DNA)'nın doğru bir şekilde eşleşmemesi yatmaktadır. DNA doğru eşleşmediğinde mutasyona uğrayarak yeni bir yapı meydana gelmesine neden olur ve bu mutasyonlar genetik, sistemsel ve çevresel etkenlerle gelişebilmektedir (Dalay ve Buyru 2015).

Kanser Hücrelerinin Temel Özellikleri

Kanser hastalık kaynaklı yaşam kayıplarının başında gelmektedir. Çevrenin ve yaşlanmanın etkisiyle hücre çoğalması ve hücrelerin birbirleriyle olan ilişkilerini kontrol eden genlerdeki hasarların birikmesi sonucunda kanserleşme meydana gelmektedir. Kanserleşme nedenlerinin farklı olmasına rağmen sonuç hepsinde ortak olmaktadır. Kontrolsüz hücre bölünmesi. Bilindiği üzere kanser tek bir hastalıktan ibaret değildir. Kanser pek çok türü bulunmaktadır. Kansere karşı en etkili tedavilerin geliştirilmesi kanserin temel özelliklerinin bilinmesine bağlı olmaktadır (Hanahan and Weinberg 2011).

Kanserin ayırt edici özellikleri, insan tümörlerinin çok aşamalı gelişimi sırasında kazanılan on temel biyolojik yeteneği içermektedir. Bunlar;

1. Proliferatif büyüme sinyal oluşumunda kendi kendine yetme
2. Büyüme inhibe eden sinyallere duyarsızlık
3. Tümörün yol açtığı immun supresyonun engellenmesi
4. Sınırsız replikatif potansiyel kazanma
5. Kanserleşmeyi destekleyen iltihaplanma (yangı=enflamasyon)
6. İnvazyon ve metastazın aktivasyonu
7. Anjiyogenez indüklenmesi
8. Gen yapısında mutasyonlar (hatalar)
9. Apoptozdan kaçma (hücre ölümüne direnç)
10. Enerji metabolizmasının yeniden programlanmasıdır (Hanahan and Weinberg 2011).

Bu kavramların yaygın olarak uygulanabilirliğinin kabul edilmesi, insan kanserini

tedavi etmek için yeni araçların geliştirilmesini giderek daha fazla etkileyecektir.

Proliferatif büyüme sinyal oluşumunda kendi kendine yetme

Normal hücreler inaktif, sessiz bir durumdan aktif, proliferatif bir duruma geçişte mitojenik büyüme sinyallerine gereksinim duymaktadır. Ancak tümör hücre proliferasyonu sadece dışarıdan gelen büyüme sinyallerine bağımlı değildir. Çünkü bu hücreler önemli derecede büyüme otonomisi kazanmaktadırlar. Tümör hücrelerinin otonomik büyüme geçişlerinin altında 3 faktör yatmaktadır: 1) Otokrin ya da parakrin şekilde görev yapan intrinsik mitojenleri üretme ve serbestleme yeteneğine sahip heterojen neoplastik hücre popülasyonu kazanımı; 2) Büyüme sinyallerini alıp bunları devam eden yolaktaki hedeflere ileten iyon kanalları ve hücre yüzey reseptörlerinin özelliklerinde ve/veya ekspresyonlarında değişme; ve 3) En sonunda gen ekspresyonunu hedefleyen intraselüler yolların deregülasyonudur (Prevarskaya *et al.* 2010).

Hücre bölünmesine sebep olan sinyallerin sürdürülmesi

Kanser hücresinin en önemli özelliği kronik bölünme ve çoğalmadır. Embriyodan yaşamın sonuna kadar geçen süre boyunca canlılarda bulunan hücrelerin sayısal dengesi çok önemli olmaktadır. Canlıda yaşamdan ölüme kadar olan bu süreçte kontrollü mitoz bölünme ile yeni hücreler meydana gelirken, hücrelerin bir kısmı ise çeşitli etkenler vasıtasıyla hücrenin ölümü ile ortadan kaldırılmakta, böylece sabit denge korunmaktadır. Biyolojik süreçlerde hücrenin döngü mekanizmalarının sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi oldukça önemlidir. Hücre döngüsünde yaşanan bir aksaklık hücrede kontrolsüz çoğalmalara veya kontrollü hücre ölümlerine neden olmaktadır (Maiuri *et al.* 2007). Literatürlerde tanımlanmış 12 farklı tipte hücre ölümü olup, bunlar beş ana tipte toplanabilmektedir: apoptoz, nekroz, otofaji, paraptoz ve otoşizis. 5 ana tip haricinde kalan hücre ölüm şekilleri ise bu başlıklardan biri altında sınıflandırılmaktadır (Bellamy *et al.* 1995; Ellis *et al.* 1991).

Kanserleşmeyi destekleyen iltihaplanma (yangı=enflamasyon)

Tümör ortamı sadece kanser hücrelerini bulundurmaz, aynı zamanda inflamasyon ilişkili bağışıklık sistemi hücrelerini de bulundurmaktadır. Bu hücreler büyüme etkenleri ve enzimlerin sayısını artırarak kanserin yeni damar oluşturmalarını ve yayılmasını destekleyen bir ortam meydana getirmektedir. Aynı zamanda reaktif oksijen radikallerinin oluşmasını sağlayarak DNA'nın hasar görmesine ve kanserleşmeye sebep olmaktadır (Hanahan and Weinberg 2011).

İnvazyonun ve metastazın aktifleşmesi

Çoğalan tümör hücrelerinin oluşturduğu doku belli bir boyuta eriştiğinde kanser hücrelerinden bazıları bu dokudan ayrılmakta (ayrılma) ve doku içinde ilerlemektedir (invazyon). Hücre bir damara rastladığında bu damarın duvarını da eriterek damar içine girmekte ve daha sonra damar içindeki kanla birlikte vücutta dolaşmaktadır. Damar içindeki yolculuğu sırasında kanser hücreleri belli organlarda damar yüzeyine tutunarak o bölgede damar duvarını tekrar eritmekte ve hedef dokuya yerleşerek çoğalmasına devam etmektedir. Primer tümör kitlesinden ayrılan kanser hücresinin damar içine girerek uzak organlara yerleşmesine metastaz denir (Kumar *et al.* 1992; Ringer and Schnipper 2001; İçli ve Akbulut 2005; Dinçol 2000; Reed 2008; Dalay 2000; Tripathy 1997; Dy and Adjei 2006; Kerbel and Ellis 2008; Song *et al.* 2008; Radinsky 2000).

Büyüme baskılayıcılardan kaçış

Kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olan büyüme baskılayıcılardan kaçınmak hücreler arası kontakt hücre büyümesini baskılayan bir süreçtir ve bu duruma kontakt inhibisyonu denir. Bölünme temelli ölümsüzlüğün sağlanması için normal hücrelerde hücre çoğalmasının önünde duran iki bariyer bulunmaktadır. Bunlar; hücrenin bölünmeyi durdurduğu ama yaşamına devam ettiği durum senesens ve hücre ölümünün gerçekleştiği kriz durumudur (Hanahan and Weinberg 2011).

Anjiyogenezin teşvik edilmesi

Kanser hücreleri, yeni ve daha uzak dokulara yayılabilme özelliğine sahiptirler ve bu özellikleri kanser hücrelerini daha da ölümcül hale getirmektedir. Tümör hücreleri kan veya lenfatik yollarla vücuda dağılabilir ve ulaştıkları yerlerde çoğalabilmektedirler; bu sürece metastaz denir. Kanserın metastatik yayılımı için damar ağı, çok önemli bir etmendir. Yeni kan damarlarının oluşması sürecine anjiyogenez adı verilir. Normal hücrelerde, yeni kan damarlarının büyümesi pro- ve anti-anjiyogenik sinyaller arasındaki dengeyle, sıkı bir şekilde kontrol edilir. Kanserın ilerlemesi yeterli niktarda oksijen sağlayabilmesi için gerekli yeni kan damarının oluşumu ile yakından ilişkilidir. Kanser hücreleri pro- ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengeyi bozmayı başararak yeni kan damarları oluşturur (Carmeliet 2005).

Gen yapısında mutasyonlar (hatalar)

DNA hasarlarının birikmesi kanserleşmenin en önemli sebebidir. Aynı zamanda DNA tamirinde görev alan enzimlerin fonksiyonlarının kaybolması gen yapısındaki bozulmaların artmasını desteklemektedir (Hanahan and Weinberg 2011).

Enerji metabolizmasının yeniden programlanması

Kanser hücreleri çok hızlı bölünme eğiliminde olduklarından dolayı fazla miktarda enerjiye ihtiyaç duymaktadırlar. Bunun için oksijen varlığına bakmadan glikozu kullanarak sürekli enerji üretmektedirler. Bu duruma “Warburg etkisi” adı verilmektedir (Hanahan and Weinberg 2011).

Hücre ölümüne (apoptoz) direnç

Hücreler, ömürlerinin sonuna geldiklerinde bir bütün olarak ölebildikleri gibi, aynı zamanda ömürleri boyunca da, canlıları meydana getiren hücrelerde düzenli bir şekilde ölümler gerçekleşmektedir (Ellis *et al.* 1991).

Apoptoz (Programlı hücre ölümü)

Apoptoz organizmada işlevini tamamlamış ya da hasara uğramış olan hücrelerin çevre hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Her hücre doğar, büyür, farklılaşır ve ölür. Tüm bu olaylar doğal bir denge halinde sürüp gitmektedir. Hücre çoğalması ve ölümüyle arasında kontrollü bir denge bulunmaktadır. Apoptoz ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda bir çok hücreli ve çok basit bir yapıya sahip bu nematod ile çalışan Sydney Brenner, Robert Horvitz ve John E. Sulston “programlanmış hücre ölümü ve organ gelişiminin genetik olarak düzenlenmesi” konusuyla 2002 yılında Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir. Nematodlarda *ced-3*, *ced-4* ve *ced-9* olarak bilinen 3 genin apoptozu kontrol altına aldığını belirtmişlerdir. Mutasyon ile inaktif olmuş *ced-3* ve *ced-4* genlerini taşıyan nematodlarda apoptozun gerçekleşmediği, normalde ölmesi gereken hücrelerin yaşamaya devam ettiği gözlemlenmiş olup, *ced-3* ve *ced-4*’ün ölüm genleri olup apoptozu indükledikleri, *ced-9*’un ise ölüme karşı koruyan gen olup apoptozu inhibe ettiği sonucuna varmışlardır (Hengartner *et al.* 1992; Andrew *et al.* 2001).

Apoptoz üç yolla oluşur.

1. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörler ile (dışsal yolak)
2. Mitokondriyel (içsel yolak)
3. Endoplazmik retikulum aracılığı ile (El-Khattouti *et al.* 2013).

Apoptoz ölüm şeklinin düzenlenmesinde tümör protein 53 (P53) geni, B hücreli lenfoma (Bcl-2) ailesi ve proteinleri, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ve kaspazlar önemli rol oynamaktadırlar. İnsanlarda apoptozun düzenlenmesi P53 geni ile başlayan ve kaspazlara kadar süren bir süreç olup, apoptozun hem içsel hemde dışsal yolunda

kaspazlar (sisteine bağımlı aspartata özgü proteazlar) anahtar rol oynamaktadırlar. Hücrede bulunan mitokondri organeli apoptotik sinyallerin iletilmesinde temel organeldir (Andersen and Kornbluth, 2013).

Kaspazlar, aktif bölgelerinde sistein aminoasiti bulunduran ve proteinleri aspartik asit rezidülerinden kesen proteazlar olarak bilinmektedir. Apoptozu başlatıcılar (kaspaz 2, 8, 9 ve 10), apoptozu yürütenler (kaspaz 3, 6 ve 7) olmaktadır. Ayrıca sitokin aktivasyonu yapanlar (kaspaz 1, 4, 5, 11, 12 ve 14) gibi farklı kaspaz türleride bulunmaktadır (Maiuri *et al.* 2007).

Apoptozun oluşumunu tetikleyen hücre içi ve hücre dışı sinyaller bulunmaktadır. Hücre içi Ca^{++} düzeyi artışı, pH azalışı, DNA hasarı, metabolik hücre siklus bozuklukları ve hipoksi hücre içi sinyaller olarak nitelendirilirken, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS–FAS ligand aracılığı ile apoptoz, TNF aracılığı ile apoptoz), büyüme ve üreme faktörlerinin yetersiz oluşu ise hücre dışı sinyaller olarak nitelendirilmektedir. Hücre içi sinyaller instrinsik apoptoz yolunu devreye sokarken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik yol ile apoptozu indüklemektedir (Danial and Korsmeyer 2004; Kroemer *et al.* 2007; Smaili *et al.* 2000).

Birçok farklı molekül tarafından hassas bir şekilde kontrol altına alınan apoptoz mekanizması kaspazların aktifleşmesini sağlayan iki farklı yolak ile tetiklenmektedir. Birincisi hücre zarında bulunan reseptörlerin çeşitli moleküller aracılığı ile uyarılmasıyla ölüm reseptörlerine ölüm ligandlarının bağlanması ile aktifleştirilen ölüm reseptörü yolu ‘ekstrinsik yolak’ diğeri ise hücre içerisindeki etmenlerin etkisiyle işleyen sinyaller sonucu aktive olan mitokondriyal yol ‘instrinsik yolaktır’ (Kroemer *et al.* 2007).

İnstrinsik Yol (İçsel yolak)

Doku hemostazisi yani yapım ve yıkımın düzen içerisinde olması apoptozis proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Apoptozis süreci boyunca hücre zarı sağlam olduğundan inflamasyon görülmemektedir. Apoptozis fonksiyonel olarak bozulan hücrelerin ortadan kaldırılması için proapoptotik veya antiapoptotik moleküllerin zıt etkileşimleri ile düzenlenen programlı hücre ölümüdür (Spierings *et al.* 2004).

B hücre lenfoma protein ailesi üyeleri hem proapoptotik hemde antiapoptotik proteinleri içerir apoptozun temel mitokondriyal yolağını düzenlemektedirler. B hücre lenfoma ailesi apoptozu inhibe eden Bcl-2, Mcl-1, Bcl W veya aktive eden bax, bac, bad, bid, noxa ve puma gibi birbirleriyle yüksek oranda yapısal homoloji gösteren proteinlerden meydana gelen bir ailedir. Bcl-2 protein ailesinin apoptozdaki işlevleri üç ana madde de toparlanmaktadır. Bu maddelerden bir grup üye mitokondri membranı üzerinde dimerleşerek

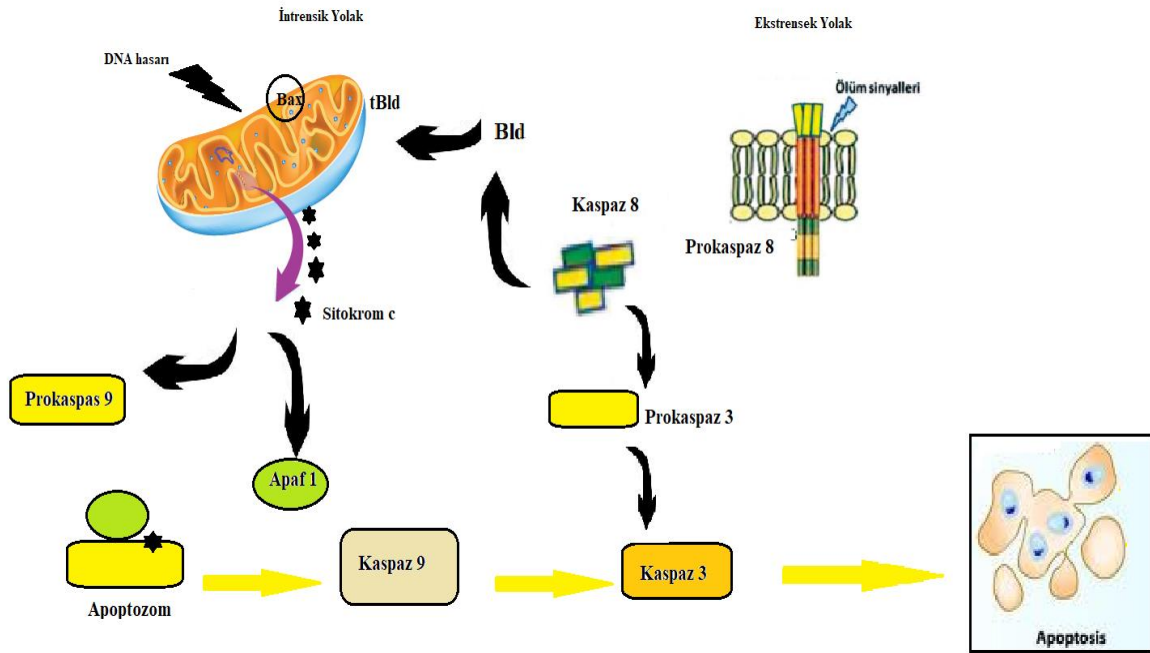
por oluşumunu sağlamakta ve böylece sitokrom c ve diğer proapoptotik ürünlerin salınmasına aracılık eder (Spierings *et al.* 2004). Bu grubun en iyi bilineni bax, bac ve bid' dir. Apoptozun içsel yolağı hücre içi hasarlar gibi olaylar tarafından uyarılır. Hücrelerde çoklu zincirlere sahip proapoptotik bax ve bac proteinleri monomer olarak bulunmaktadır. İnaktif haldeki bax ya sitoplazmada ya da zayıf bir biçimde membrana bağlı olarak bulunmaktadır. Ve bu proteinlerin hidrofobik cebi C-terminalindeki heliks ile doldurulmuş durumdadır. Ölüm sinyali alındığında bax homodimerize bir yapı kazanır ve mitokondri dış membranına girer. Mitokondride konumlanmış olan inaktif bac bu ölüm sinyallerine yanıt verirken yapısal değişim geçirerek dimerize olur ve aktive yapı kazanır. Böylece mitokondri dış membranı geçirgen bir hal alır. Bax ve bac' ın oligomerize olmasına bağlı olarak oluşan porlardan sitokrom c, smac, endonükleaz G ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımı gerçekleşir. Sitokrom c oksidatif fosforilasyon için elektron taşıyıcı, smac apoptotik faktörün inhibitörünü inhibe eder ve apoptozu hızlandırır. Apoptotik faktörün inhibitörü ortamda bulunması ise kaspaz aktivasyonunu engeller. AIF çekirdeğe transloke olurken Endo-G ise DNA' yı parçalar. Mitokondri porlardan salınan sitokrom C, apoptotik proteaz aktive eden faktör (apaf-1) ATP' nin katılmasıyla apoptozom denilen kompleks bir yapı meydana gelir (Adams *et al.* 2001; Adrain and Martin 2001; Strasser *et al.* 2000). Bu kompleks prokaspaz 9' un pro kısmını uzaklaştırarak ona farklı bir yapı kazandırır ve aktifleştirir. Aktif kaspaz 9 ise prokaspaz 3 üzerinde benzer işlevler yaparak aktif kaspaz-3 haline gelir. Aktif kaspaz 3 bir inaktif kaspaz aktive edici DNaz denilen (ICAD)' ı inaktifleştirirken, diğer yandan kaspaz aktive edici DNaz (CAD)' ı serbestleştirmektedir. Cad çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına yani DNA' nın nükleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına sebep olur. Özetle mitokondri dış zarının geçirgenliğinin artması ve bunu takip eden kaspaz akışı sayesinde hücre içerisinde içsel yani mitokondriyal apoptoz yolağı tamamlanmış olur (Adams *et al.* 2001; Smaili *et al.* 2000; Palmer *et al.* 2000).

Ekstrinsik yol (Dışsal yolak)

Hücre dışı sinyaller (büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS-FASL) aracılığı ile apoptoz, TNF aracılığı ile apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (iskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon) ile tetiklenmekte ve hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri aracılığıyla başlatılmaktadır. Ekstresek yolak, ölüm reseptör yolağı olarak da bilinmektedir ve hücre dışı bir sinyalin plazma membranında bulunan bazı reseptörler aracılığıyla apoptotik aktivasyona dönüşmesi olarak tanımlanmaktadır. TNF-alfa, FAS L ve TRAIL gibi uyanların ölüm reseptörlerine

bağlanması sonucunda tümör nekroz faktörü (TNF) ve lenfotoksi proteinlerinin ölümüne neden olduğu ortaya çıkmaktadır (Spierings *et al.* 2004)

Tümör nekroz faktörü (TNF) ailesi, reseptör proteinlerin hücre dışı bölgelerine bağlanması sonucunda etki göstermektedirler. TNF ailesinde on dokuz farklı ligand bulunmakta ve TNF ailesinin her bir üyesi TNFR ailesine ait bir veya birden fazla reseptörde, bazı reseptörlerde bir veya birden fazla liganda bağlanma özelliği göstermektedirler. Apoptozun ekstresek yolağında önemli görevi olan ölüm reseptörleri, TNF' nin bağlandığı, FASL' ın bağlandığı ve TNFR apoptoz tetikleyici ligandın bağlandığı reseptörlerdir. Ekstresek apoptotik yol tetikleyebilen ekstresek yolağın başlatılmasında önemli bir yer tutan kaspazları (kaspaz-8, kaspaz-10) bağlayarak kaspaz kaskadı oluşumuna bağlı olarak konformasyonel değişimler oluşmaktadır. Bu değişimler sonucunda ligandın ölüm reseptörlerine bağlanmasının ardından reseptör yapısı trimerik bir yapı kazanmaktadır. Trimerik yapı kazanan reseptör ölüm tetikleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşumu sağlanmaktadır. Kompleks oluşumundan kaspaz-8-10 aktifleşir ve kompleksten ayrılarak sitoplazmaya geçmektedir. Bir sonraki süreçte ise inaktif haldeki prokaspaz-8'in pro kısmı atılarak aktif kaspaz-8 haline gelmekte ve aktifleşen kaspaz-8, doğrudan prokaspaz-7'yi, aktif kaspaz-7 haline getirmesinden sonra apoptoza götürebilmektedir. Bunun yanında aktif kaspaz-7, kaspaz-3'ü aktif hale getirerek ya da intrinsik apoptoz yolağındaki Bid'i keserek kaspaz-9 aracılığıyla yine kaspaz-3 üzerinden, CAD aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna neden olarak da hücreyi apoptoza götürmektedir (Adams *et al.* 2001; Curtin and Cotter 2003).



Şekil 2. Apoptotik yollar (Golstein and Kroemer 2007).

Nekroz (Hasar yolu ile ölüm)

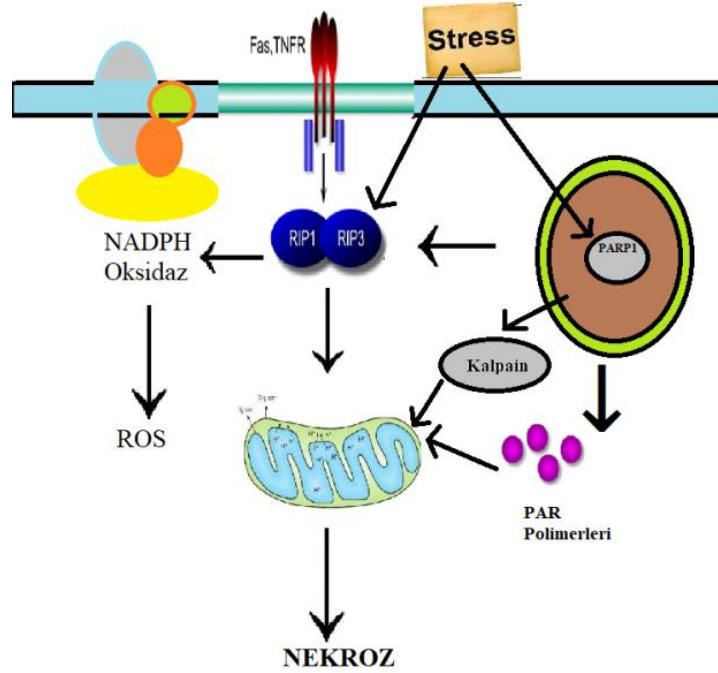
Nekroz; rastgele gelişen, stres, hipoksi, toksik maddeler ve ağır metaller nedeniyle ortaya çıkan, genler tarafından kontrol edilemeyen, düzensiz bir süreçtir. Nekroz sırasında hücrelerde şişme, kromatin parçalanması ve kümelenmesi, organel ve plazma membranlarında hasar ve liziz, membran asimetrisinde bozulma ve inflamasyon gözlenmektedir. Bunun yanında, mitokondride reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi artmakta, ATP üretimi azalmakta ve kalsiyum kanalları açılmaktadır. Nekrozun meydana gelmesindeki en yaygın neden hipoksidir (Golstein and Kroemer 2007; Nicotera *et al.* 2004).

Nekroz dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılar aracılığıyla başlayan ve ilk etapta iyon dengesinin bozulması, hücredeki NAD^+ 'ın nükleer enzim poli ADP-riboz polimeraz (PARP) tarafından indirgenmesine neden olmaktadır. Bu durumda ATP eksikliği ortaya çıkmakta, iyon yetersizliği sonucu hücre sıvı almakta, organeller şişmekte ve ozmotik basınç nedeniyle patlamaktadır. Hücre içeriği tamamen hücreler arası boşluğa salınmakta ve bunun sonucu olarak inflamasyon meydana gelmektedir (Edinger and Thompson 2004)

Nekrozun moleküler mekanizmasında bazı olaylar ile gerçekleşmektedir. Fas, TNF reseptörlerinin aktivasyonu veya hücrel stres sonucu reseptör etkileşimli proteinler (RIP1 ve RIP3) aktive olmaktadır. Aktifleşen bu proteinler mitokondriyonu ya direkt aktive eder ya da nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazın oluşturduğu reaktif oksijen türleri ile indirekt olarak etkileyip nekrozu indüklenmesine sebep olmaktadır. Nekrotik sinyal ayrıca PARP' i aktive eder ve PARP1 de kalpain aktivasyonu, RIP kinazların aktivasyonu ya da PAR polimerazlar yoluyla nekroza neden olur. PAR polimeraz ve Ca^{++} ile aktive olan kaspaz proteaz ailesi üyesi olan kalpain, AIF salınımını sağlayarak nekrotik hücreleri indükleyerek lizozomal enzim salınımına neden olan kathepsin aktivasyonuna katkıda bulunur (Palmer *et al.* 2000; Galluzi *et al.* 2006; Golstein and Kroemer 2007; Nicotera *et al.* 2004).

Bcl-2 ailesinin bir diğer proteini olan BNIP, direkt olarak mitokondriyal por oluşumunu aktive eder. Mitokondriyal porlar; mitokondriyon dış membranında voltaj bağımlı anyon kanalı (VDAC), iç membranda adenin nükleotit translokaz (ANT), matrikste peptidil prolil izomeraz siklofilin D' den meydana gelmektedir. Mitokondriyal porlar, aşırı reaktif oksijen türleri ve Ca^{++} üretiminde açılan geniş kanallardır (Franz and Kidson 1997; Baines 2010; Zong and Thompson 2006). Kalsiyum, endoplazmik retikülüne yakın olan mitokondriyon matriksine geçerek mitokondriyal porların açılmasını sağlamaktadır. RIP kinazlar da ROS üretimini elektron transport zinciri yoluyla sağlarlar. Aşırı düzeyde Ca^{++} ve reaktif oksijen türlerinin artışı porun uzun süre açık kalmasını sağlamaktadır. Bu durumda

hücre oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretmez duruma gelmekte ve nekroz ölüm gerçekleşmektedir (Baines 2010; Zong and Thompson 2006).



Şekil 3. Nekrotik hücre ölümü (Baines 2010).

Otofaji (Programlı hücre ölümü)

Hücrel adaptasyon ve yaşamın devamlılığı için önemli olmakla birlikte, açlık, radyasyon, kemoterapötik ajanlar ve stres koşulları altında, hücrenin kendini yemesi olarak tanımlanmaktadır. Hücrede otofaji mekanizmasının hasar görmesi sonucunda kanser, nörodejeneratif ve enfeksiyon hastalıkları gibi patolojik durumlar gerçekleşmektedir (Izmirli vd 2014).

Paraptoz

Hücreyi nekroza götüren, yapısal ve biyokimyasal açıdan apoptozdan farklı olarak, programlı bir hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Paraptozda insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1 (ILGF-1)'in aktivasyonunu, mitokondride ve endoplazmik retikulumda şişmeler ve hücre içinde vakuollerin oluşması görülmektedir (Hoa *et al.* 2009).

Otoşizis (Otoparçalanma)

Oksidatif stres tarafından tetiklenen yeni bir hücre ölümü formu olan otoşizis, apoptoz ve nekrozdan farklı olup sitoplazmanın kromatin ile nükleus etrafındaki dar bir çerçeveye indirgenmesi ile karakterize edilmektedir (Saikumar and Venkatachalam 2009).

Kanser ve Oksidatif Stres

En dış orbitallerinde eşleşmemiş elektrona sahip radikal, iyon veya moleküllere reaktif oksijen türleri (ROS) adı verilmektedir. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjili oldukları için ROS'u oldukça reaktif duruma getirmektedir. ROS, serbest oksijen radikalleri ve non-radikal ROS olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Yan and Sohal 1998).

Normal fizyolojik koşullarda, hücrelerde sürekli oluşan ROS ile onlarla etkileşime geçen antioksidanlar arasında bir denge bulunmaktadır (Sies and Cadenas 1985; Halliwell 2007). Serbest radikaller organizmada moleküler düzeyde birçok etkiye neden olmaktadır. ROS'da artış hücre için toksiktir ve hücrede proteinleri, lipidleri ve nükleik asitleri hasara uğratarak hücre içi sinyal yollarını bozmaktadır (Lopez *et al.* 2013).

ROS oldukça yüksek reaktiviteye sahip moleküller olup başta mitokondri olmak üzere hücre organellerinde gerçekleşen normal metabolizmanın sonucu olarak veya iskemi-reperfüzyon, yaşlanma, radyasyon, yüksek oksijen basıncı, inflamasyon ve kimyasal ajanlara maruz kalma gibi sebepler bağlı olarak üretilirler (Dokuyucu *et al.* 2014). Serbest radikallerle uyarılan oksidatif stresin başta kanser olmak üzere (Pisoschi and Pop 2015) diyabet, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar, ateroskleroz ve inflamatuvar bozukluklar gibi birçok hastalığın patogenezinin sorumlu olmaktadır (Berlett *et al.* 1997; Aydın *et al.* 2012; Şahin *et al.* 2012; Motor *et al.* 2014).

Antioksidan mekanizmalar vücut dokuları için zararlı etkilere sahip olan serbest radikallere karşı savunma sistemi geliştirmektedirler. Oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması, DNA gibi tüm temel biyolojik bileşiklerin zarar görmesini, membran lipidleri ve hücre ölümünün oluşmasına neden olmaktadır. Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden daha fazla miktarda reaktif oksijen türü ile karakterize olduğu ve reaktif oksijenli türlerin kanser fenotipinin korunmasından sorumlu olduğu kanıtlanmıştır. ROS onkogenler için uyarıcı olarak tanımlanmıştır (Tandon *et al.* 2005). ROS, hücre membran proteinlerine, lipid, lipoprotein ve DNA'ya önemli derecede zarar vermektedir (Pisoschi and Pop 2015).

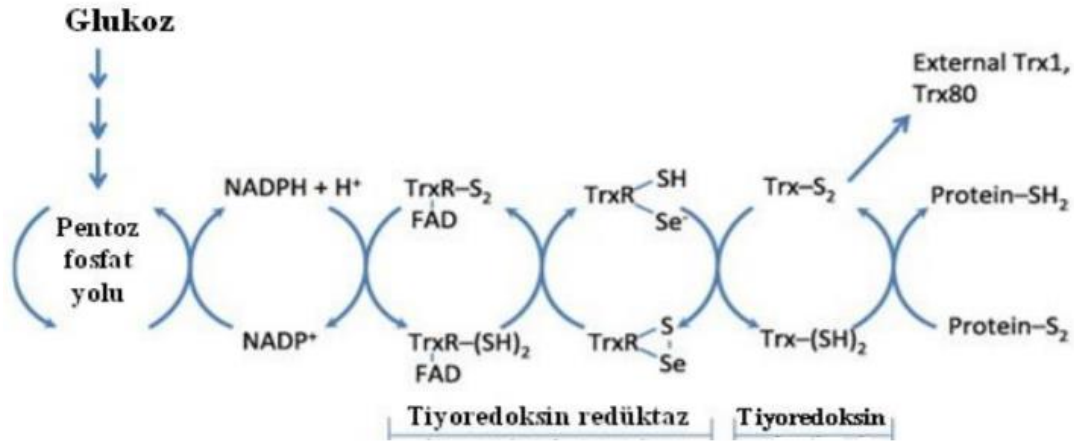
Hücrelerde ROS'un üretimine kaynak oluşturabilecek pek çok faktör ve olay sayılabilmektedir. Artan metabolik aktivite, mitokondriyal disfonksiyon, peroksisom aktivitesi, pek çok enzimin artan ve azalan aktivitesi, kanserli bir hücrede onkogen aktivitesi, reseptör sinyal artışı bunlardan bazılarıdır. (Liou and Storz 2010).

Vücut enzimatik ve enzimatik olmayan karmaşık bir antioksidan savunma sistemine sahiptir (Tandon *et al.* 2005). Ayrıca yapılan bazı kanser çalışmalarında, tümör nekroz faktörlerine ve antikanser ilaçlarına karşı enzimlerin direnç gösterici rol oynadığı ortaya

konulmuştur. Bu enzimlerin göstermiş oldukları inhibisyon kanser ilaç araştırmalarının bir parçasını oluşturmaktadır (Zhong *et al.* 1999; Deep *et al.* 2010). Tioredoksin redüktaz (TRXR1), glutatyoın S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR) bu enzimlerden bazılarıdır.

Tioredoksin sistemi ve tioredoksin redüktaz

Tioredoksin sistemi; tioredoksin redüktaz (TRXR E.C 1.6.4.5.), tioredoksin (Trx), ve NADPH'dan oluşur ve hücre büyümesine, apoptoza, antioksidan savunmaya, redoks sinyallemesi gibi pek çok önemli reaksiyonlara katılmaktadır (Nordberg 2001).



Şekil 4. Tioredoksin Sistemi (tioredoksin, tioredoksin redüktaz ve NADPH) tarafından kataliz edilen redoks reaksiyonları (Holmgren and Lu 2010).

Tioredoksin redüktaz (TRXR1, E.C 1.6.4.5), glutatyon redüktaz, lipoamid dehidrogenaz, civa iyonu redüktaz ve tripanotion disülfid redüktaz enzimlerini kapsayan piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktaz ailesine ait bir selenoenzimdir. Aynı zamanda TRXR her altbiriminde bir redoks-aktif disülfid bağı ve sıkı bağlanmış flavin adenin dinükleotit (FAD) molekülü içeren, homodimerik bir flavoenzimdir (Williams 1992; Sandalova *et al.* 2001). Bu ailenin bütün üyelerinin alt birimleri redoks aktif ditiyol/disülfid bağı içerdiği anlaşılmaktadır. Memeli TRXR1'nin bütün alt birimleri FAD bağlama bölgesi, NADPH bağlama bölgesi ve yüzey etkileşim alanı bulundurmaktadır (Sandalova *et al.* 2001).

Enzimin mitokondriyal ve sitozolik olmak üzere iki formu bulunmaktadır (Mustacich and Powis 2000). Ancak memeli TRXR1'lerinin üç değişik izoformu mevcuttur. Bunlar; sitozol/nükleustan izole edilen TRXR1, (Holmgren and Bjornstedt 1995), mitokondriden izole edilen TRXR2 ve testislerden saflaştırılan TRXR3'dür (Gasdaska *et al.* 1999). Memelilerde bulunan TRXR1'ler selenyum içeren piridin nükleotid-disülfid oksidoredüktazlardır ve Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys amino asit dizisinden oluşan redoks katalitik bölge bulundurmaktadır (Mustacich and Powis 2000).

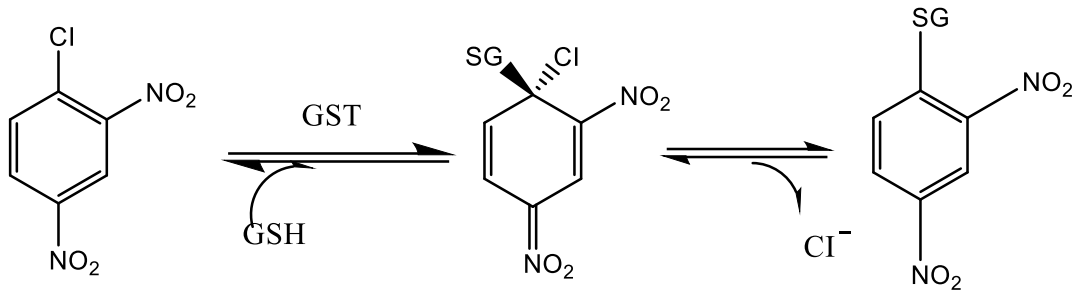
TRXR1, NADPH'yi kullanarak Trx yapısındaki aktif bölge disülfidlerinin indirgenmesini katalizlemektedir. Elektronlar NADPH'dan TRXR1'nin aktif bölgesine FAD aracılığıyla transfer edilmektedirler. Birçok fonksiyonunun yanında redükte Trx, genel protein disülfid indirgeyicisidir. TRXR1, hücre büyümesi, apoptoz, antioksidan savunma, redoks sinyalleme gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir, bu rollerinin çoğunu Trx'i redükleyerek yapmaktadır (Mustacich ve Powis 2000). Ayrıca Trx sistemin iskemik strese koruyucu etkisi bulunmaktadır ve bu etki antioksidan ve antiapoptotik fonksiyonlarıyla ilgilidir (Yost and Fridovich, 1973).

Trx ve TRXR1, büyümenin kolaylaştırılması, programlanmış hücre ölümü ve hücrenin korunması gibi hücre içi proseste rol alan redoks aktif proteinlerdir. Trx sisteminin biyolojik aktivitelerinden bir tanesi DNA sentezindeki kofaktör rolüdür. Bu açıdan TRXR1/Trx sistemi, DNA'nın sentezinde ve hücre proliferasyonunda ihtiyaç duyulan deoksiribonükleotidlerin üretiminde kritik öneme sahiptir (Tandoğan ve Ulusu 2011).

TRXR1 salınımının, muhtemelen proteinin yapısı ve fonksiyonundaki değişiklikler ile ilişkili olarak akciğer, servikal, kolorektal, pankreas ve hepatik kanser gibi insan kanser türünde arttığı görülmüştür (Tamura and Stadtman 1996; Södborg *et al.* 2000; Yoon *et al.* 2016; Cadenas *et al.* 2010; Yang *et al.* 2012). TRXR1/Trx'nin biyolojik aktiviteleri ve saldırgan tümör büyümesi ile olan bağlantısı, bu sistemin kanser tedavisi için önemli bir hedef olduğunu düşündürmektedir (Karlenius and Tonissen 2010).

Glutasyon S-transferazlar (GST)

Glutasyon S-transferazlar; GSTs (EC. 2.5.1.18), hormonlar, yağ asitleri, flavonoidler, bilirubin ve ksenobiyotiklerin de dahil olduğu, endojen ve ekzojen kaynaklı çok çeşitli hidrofobik moleküllerde elektrofilik merkezde glutasyonun sülfidril grubunu aktive etmesiyle daha kolay itrah edilebilen ve daha az zararlı bileşiklere dönüşümünü katalizleyen Faz-II detoksifikasyon enzimi olarak tanımlanmaktadır. Tiyol antioksidan enzim olan Glutasyon S-transferazlar hücreyi oksidatif zararlara karşı korumak ve ksenobiyotiklere karşı hücrenin en önemli savunma mekanizmasını oluştururlar. Hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunan bu enzim 3 ailede sınıflandırılmaktadır. Bunlar: memelilerde sitozolik GST, mitokondriyal GST, mikrozomal GST' dir (Armstrong 1997).



Şekil 5. Glutatyon S-transferaz enziminin katalizlediği reaksiyon (Armstrong1997).

Üç boyutlu katlanmaları bakımından birbirine çok benzeyen mitokondroyal ve sitozolik GST çözünebilen GST' ler olarak da isimlendirilmektedirler. Çözünebilen GST' ler çok sayıda izoenzime sahip olup farklı dokularda farklı miktarlarda bulunabilmektedirler. Ayrıca bu izoenzimlerin birbirlerinden farklı olarak izoelektrik noktaları ve aminoasit dizilimleri arasında da farklılık göstermektedirler (Mannervik *et al.* 1985).

Faz-II detoksifikasyon enzimi olan GST enzim inhibitörleri genellikle kanser tedavisinde kullanılmaktadırlar. Kanser tedavisinde sıklıkla kullanıldığı bilinen alkilleyici ajanların birçoğu'nun GST'nin substratları olduğu bilinmektedir. GST'ler antikanser ilaçların metabolizmasını artırmıştır. Sitotoksik ajanlara karşı kanser hücrelerinin direnç geliştirmesinde çeşitli mekanizmalar yer almaktadır. Bu mekanizmalar içerisinde: hücre siklusu, proliferasyon, detoksifikasyon, ilaç transportu gibi biyokimyasal mekanizmalar ve DNA replikasyonu ve tamiri gibi mekanizmalar rol oynamaktadır. Bazı bileşiklere karşı oluşan direncin ortadan kaldırılmasına yönelik tedavilerdeki yeni yaklaşımlarından bir diğeri de, tümör hücrelerinde yükselmiş seviyelerde salgılandığı bildirilen GST enziminin (özellikle GSTP) terapötik amaçla yararlanmaktır (Meister and Anderson 1983).

Tümör hücresine antikanser bileşenin katılmasıyla hücre içinde glutatyon (GSH) düzeyinde ve GST enziminin ifadesinde artış meydana gelmektedir. Enzim, hücrede bol miktarda bulunan ve tiyol içeren bir tripeptit olan GSH yardımıyla ksenobiyotiklerin protein yapısındaki çeşitli pompalar vasıtasıyla itrah edilmesini sağlamaktadır. GST aktivitesindeki artışa bağlı olarak ilacın hücre içinde daha fazla süreyle kalması bu nedenle daha zor bir hal almaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, tümör hücrelerinde GSH'nin yüksek düzeylere ulaşmasının ve GST'nin aşırı ekspresyonunun ile paralel gelişebileceği yönünde olmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan en önemli ilaç gruplarından alkilleyici bileşiklerin bu grup bileşiklere direnç geliştirmesi, ilaca kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak GST'ye karşı permeabilitenin değişmesi, hücrede GSH ve GST seviyelerinin artması ile bağlantılı olmaktadır (Meister and Anderson 1983).

Farklı kanser türleri ve dokuları üzerine yapılan çalışmalarda GST'nin farklı izoenzimlerinin katı kanser türlerinde ilaç direnci gösterdikleri belirlenmiştir. Akciğer, yumurtalık ve mide kanseri türlerinde yüksek oranda ilaç direnci ve dolayısıyla yüksek ölüm oranları sergilemektedir (Siegel *et al.* 2015). GST izozimlerinden GSTP1-1'in çok farklı insan kaynaklı tümörde (akciğer, kolon, böbrek, over, ösefagus ve mide) fazla miktarda salgılandığı bildirilmiştir (Tew 1994; Harrison *et al.* 1989; Tidefelt *et al.* 1992; Green *et al.* 1993; Gilbert *et al.* 1993; Grignon *et al.* 1994; Hamada *et al.* 1994; Yang *et al.* 2006).

GSH, yapısında bulunan tiyol (-SH) grupları okside moleküllerin zararlı etkilerine karşı hücreyi savunmaktadırlar. Glutasyon'un organizmadaki temel işlevleri olarak, hücre içindeki serbest radikallerin ve reaktif oksijen ürünlerinin zararsız hale getirilmesi, membran proteinleri ve çeşitli enzimlerin tiyol gruplarının korunması, DNA ve protein sentezi, ksenobiyotiklerin, bazı antineoplastik ilaçların ve bazı metabolik son ürünlerin konjugasyonla detoksifikasyonu, aminoasit transportu, insülin gibi bazı proteinlerin disülfür bağlarının koparılması ve böylece proteinlerin üç boyutlu yapılarının değişmesi, hücre içerisinde sistein deposu olarak bulunması ve bazı enzimlerin reaksiyonlarında rol oynaması sayılabilmektedir. Gerçekleştirdiği bu önemli görevlerden dolayı hücrede GSH'ın düşük konsantrasyonda bulunması bazı metabolik olumsuzlukları beraberinde getirmektedir (Knappen *et al.* 1999).

Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz (GR, E.C.1.8.1.7) ilk defa 1951'de tanımlanmış olup (Glutasyon: NADP⁺ oksidoredüktaz, EC 1.8.1.7; GR) düşük GSH veya yüksek molekül ağırlıklı (GSSG) disülfid substratları ile indirgenmiş piridin nükleotidleri arasında elektron transferini katalizeleyen kilit bir enzim olarak tanımlanmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu 2009; Akyol 2004).



Şekil 6. GR enziminin katalizlediği reaksiyon (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Hücre içi türlerin redoks durumlarının devam ettirilmesinde, serbest radikallerin ve reaktiflerin temizlenmesinde görev alan önemli bir enzimdir. Oksijen türleri, hücre içi sinyal iletimi ve yüksek GSH/GSSG oranını koruyarak gen düzenlemesinde etkin rol oynamaktadır. Genellikle organizmada GSH indirgenmiş formda bulunur, bununla yanı sıra hücrenin oksidatif stresine tepki olarak hızlı bir şekilde GSSG'ye oksitlenebilir. Buna rağmen, GR, NADPH ile GSSG'yi GSH'ye indirger ve GSH/GSSG'nin hücre içi oranını dengede tutmaktadır. Bu durum enzimin katalizlediği reaksiyonun en önemli hedeflerinden biridir

(Toribio 1996). GSH'nin sayısız hücresel süreçteki önemli işlevleriyle birlikte, GSH seviyeleri ve GSH/GSSG oranı, Alzheimer, AIDS, diyabet, kardiyovasküler hastalık ve kanser gibi sayısız insan hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (Candas *et al.* 1997).

Bu bilgilerin yanı sıra GR enziminden karaciğer ve kanser hastalıklarının teşhisinde, beslenmede, riboflavin yetersizliğinin ölçümünde ve bazı genetik bozuklukların belirlenmesinde klinik olarak faydalanılmaktadır (Beütler 1969).

Kanser Tedavi Yöntemleri

Şimdiye kadar bilinen 100'den fazla kanser çeşidi olmasına ve belli tipteki kanser türleri için olabildiğince standart yaklaşımlar geliştirilmesine rağmen kanser aynı zamanda kişisel bir hastalık olmaktadır. Dünya üzerindeki hiçbir insanın DNA'sı birbirine benzemediği için kişilerin benzer tedavilere farklı yanıtlar vermesi şaşırtıcı olmayan bir gerçektir. Şu ana kadar bilinen kanser çeşitleri üzerinde teknolojinin gelişmesiyle, günümüzde var olan tedavilere ek yeni tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Klasik tedavi yöntemleri olarak bilinmekte olan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlerin yanı sıra aşılar, biyolojik, hormonal, hedeflenmiş ve gen terapiler giderek artan sayıda kullanılmaya başlanmıştır (Fitzmaurice *et al.* 2015; Pavlopoulou *et al.* 2015).

Cerrahi yöntemler, kanserli dokunun çıkarılmasından ibarettir. Organ kaybı, kanserin tekrarlama riski ve tüm kanser tiplerine uygulanamaması bu yöntemlerin dezavantajlarından. Radyoterapide kanserli hücreler, spesifik frekans bandında ve spesifik şiddette radyasyon ile yakılır. Kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücrelerin de zarar görmesi, radyasyon dağılımının tüm kanser hücrelerine eşit yoğunlukta olmaması ve radyasyona maruz kalan dokuda fonksiyon kaybı oluşması bu yöntemin dezavantajlarını oluşturur. Kemoterapide ise kanserli hücrelerin toksik etkisi bulunan ilaçlar ile öldürülmesi, kanserli hücrelerin bölünmesini sağlayan mekanizmaların ortadan kaldırılması hedeflenmektedir (Nehru and Singh 2008; Wang 2009).

Kanser tedavisinde kemoterapi ilaçlarının mümkün olduğunca tümörleri hedef alması ve sağlıklı dokular üzerinde etkisinin sınırlı olması, tedavideki başarı bakımından esastır. Bu husus ayrıca hastanın yaşam süresi ve kalitesinin artması bakımından önemlilik arz eder. Günümüzde klinik tedavilerde kullanılan geleneksel tedavi yöntemlerinin dezavantajlarından dolayı, yeni kanser tedavi yöntemlerinin gelişmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Artemov *et al.* 2015).

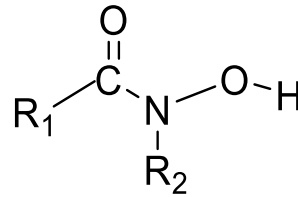
Günümüzde kanser hastalarının belli bir bölümünde kanserin tipine de bağlı olmak üzere kemoterapi ile tam tedavi veya uzun bir iyileşme dönemi (remisyon)

sağlanabilmektedir. Tek başına cerrahi veya radyasyonla tedavi başarısı % 20 iken, kemoterapi ile tedavi başarısı % 75' lere kadar çıkmaktadır (Carter and Slavik 1974).

Son yıllarda, kanser hastalarının yaşam beklentisinin dikkate değer ölçüde artması nedeniyle kanser tedavisinde büyük ilerleme kaydedilmiştir (Marks *et al.* 2009). Kanser tedavisi için bir dizi potansiyel yaklaşım önerilmiştir, ancak histon deasetilaz inhibitörleri (HDAC'ler) öne çıkanlardandır. Literatürdeki çeşitli raporlar, belirli HDAC inhibitörleri ailesi üyelerinden hidroksamik asitlerin birkaç tümörde anormal şekilde eksprese edildiğini ve kanserli hücrelerin ayırt edici özelliklerini kontrol etmede gereksiz bir işlevi olduğunu ortaya koymaktadır (Wang *et al.* 2011).

Hidroksamik Asitler

Genel olarak RCO-NH-OH formülüne sahip, bir amidi ve N-O-H bir asidi temsil ettiğinden dolayı bu bileşikler hidroksamik asitler olarak bilinmektedir. Asitlik sabitleri (pKa), 7,0-11,5 arasında olup, asitlik sabitleri yaklaşık 15 olan amitlerden daha asidik özellik göstermektedirler (Malstrom 1970; Nielsands 1974).



Şekil 7. Hidroksamik asitlerin genel formülü

Genel formülünde gösterildiği gibi karboksiamitlerde yer alan amidik azota bağlı bulunan hidrojen atomunun yerine hidroksil grubunun gelmesiyle oluşmaktadır (Malstrom 1970; Nielsands 1974). Sulu çözeltide bulunan hidroksamik asit molekülüne zayıf bir baz çözeltisi ilave edildiğinde, asidik hidrojen atomu molekülü terkeder ve ortamda bulunan metal iyonlarına koordinasyon, oluşan hidroksamat anyonundaki negatif formal yüklü oksijen atomu ve karbonil oksijeni üzerinden gerçekleşir. Böylece hidroksamik asitler iki dişli ligant özelliği göstermektedirler (Brown *et al.* 1979).

HDAC inhibitörlerinin en büyük sınıfını oluşturan en iyi demir şelatlayıcılar olarak da bilinen hidroksamik asitler; kemoterapik ilaç olarak (antibiyotik, tümör önleyici, AIDS önleyici ve kandaki demir ile ilgili rahatsızlıklarda), kolorimetrik belirteç (indikatör) olarak ve metallerin spektrofotometrik tayinlerinde kullanılmaktadırlar (McCall KA *et al.* 2000; Thiagalingam and Cheng 2000).

Hidroksamik asitlerin kullanım alanlarıyla ilgili yapılan araştırmalarda HDAC inhibitörleri olarak genellikle antikanser olarak kullanıldığı gözlemlenmektedir (Vandenbroucke *et al.* 2014; Batı 2014). Metal iyonu seçiciliği olan bu yapıların metaloproteinler (enzimler) üzerinde önemli inhibisyon özellikleri göstermektedirler (Kakkar 2013). Ayrıca üreaz ve lipaz inhibisyonu üzerine de çalışmalar mevcuttur (Yang *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2012).

Kanser hücrelerinin ayırt edici özelliklerinden hücrelerin bölünmesi, çoğalması, farklılaşması esasen genlerin kontrolü altında olduğundan kanser genlerle ilişkilidir. Genler kromozomlar üzerinde sıkıca paketlenmiş halde olup bu genlerin üzerindeki fiziksel veya kimyasal değişimler doğrudan hücrenin görevlerini değiştirebilmektedirler. Genomdaki genler üzerinde meydana gelebilecek bir hasara bağlı DNA tamir sistemleri genin asıl görevini yeniden kazandırmaya çalışsa da her zaman başarı elde edilemez. Böyle bir durumda genlerin ürünü olan proteinlerin eksik ve hatalı üretilmesi, hücresel işlevlerde bozulmaya neden olmaktadır (New *et al.* 2012).

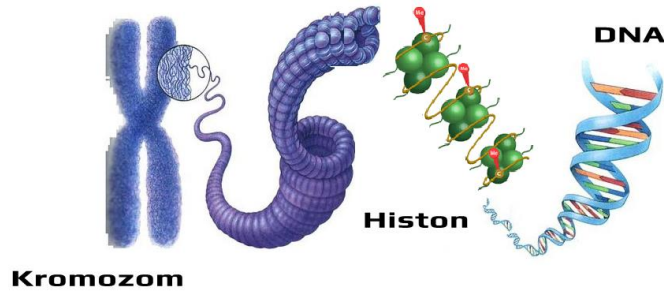
Tıp, biyoloji ve özellikle de genetik bilimi sayesinde DNA'nın yapısının iyice aydınlatılmasıyla birlikte kansere yol açan bir genin genomdaki yeri tespit edilebilmekte böylece potansiyel tedavi yöntemlerinin önü açılmaktadır. DNA ile ilgili yeni bilgiler yine de gen düzenlenmesinin altında yatan mekanizmaları ya da hastalığın buna bağlı olarak gelişim sürecini tam olarak açıklayamamaktadır. Epigenetik olgusu tam da bu noktada ortaya çıkmaktadır (Seo *et al.* 2015).

Epigenetik; genotipik değişikliklerden kaynaklanmayan gen ekspresyonundaki farklılıkları ve belli bir fenotipi meydana getiren genler ile bu gen ürünleri arasındaki bağlantıyı ve gelişim sırasında genotipin, fenotipi nasıl etkilediğini inceleyen bilim dalı olarak tanımlanmaktadır (Martın *et al.* 2007; Holliday 2006). Epigenetik değişiklikler, moleküler temeli karmaşık bir olay olup, bazı genlerin aktivasyonunun ne zaman ve ne şekilde olacağını belirler. Bu zaman zarfı içerisinde yetişkinlerde hücre yenilenmesi, gen imprintingi, X kromozom inaktivasyonu gibi olaylar gerçekleşmektedir (Meissner *et al.* 2008; Bond *et al.* 2007). Bu süreç içerisinde meydana gelen hasarlara bağlı olarak kanser, nörolojik hastalıklar ve otoimmün gibi sağlık problemlerinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Portela *et al.* 2010; Herman *et al.* 2003; Jones and Baylin 2002,2007).

Embriyodan yaşamın sonuna kadar geçen süre boyunca gen ifadesinde çeşitli değişiklikler meydana gelmektedir. Genomdaki genler, belirli zamanlarda ve belirli yerlerde ifade edilmektedir. Epigenetik değişiklikler herhangi bir geni aktive edici genetik mekanizmalara benzer şekilde, bir genin aktivasyonuna ya da susturulmasına neden

olmaktadır. Gen düzenlemesinin nasıl yürütüldüğünün anlaşılması hücrelerin nasıl farklılaştığının ya da kanserojen hale geldiğinin anlaşılmasında oldukça önemlidir. Hem hücre farklılaşmasının hem de farklı yerlerde farklı genlerin ifade edilmesinin temelinde epigenetik düzenlenmeler yatmaktadır (Yokuş 2013). Hücrelerde gen aktivasyonunu etkileyen çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin sonucunda seleksiyona uğrayacak farklı bir fenotip ortaya çıkabilir. Dolayısıyla kontrollü hücre çoğalmasından çıkmış olan bu hücre popülasyonunun sahip olduğu fenotip evrilip kansere sebep olabilir (Ponder 2001).

Gen aktivitesinin dinamik düzenleyicisi histonlardır. Ökaryotik hücrelerde genomik DNA'nın büyük bir miktarı histon proteinleriyle sıkıca paketlenmiş bir şekilde nükleus içerisinde bulunur. Histon proteinleri lizin ve arjinin aminoasitlerince zengin pozitif yüklü nükleer proteinlerdir. Pozitif yüklü olmaları, negatif yüklü DNA ile güçlü bir şekilde bağlanmalarına olanak verir. Beş tipi bulunan histon proteinleri bir araya gelerek oktamer adı verilen bir yapı oluşturur. DNA bu oktamer etrafında sarılarak nükleozom adı verilen yapıyı meydana getirirler. Nükleozomlar arasındaki ilişki ise bağlayıcı histonlar olan H1 ve diğer kromatin ilişkili proteinler tarafından sağlanarak DNA'nın daha ileri yoğun yapısı ile kromatin oluşumu gerçekleştirilir (New 2012; Inche 2006).



Şekil 8. Histon proteinleri (New 2012; Inche 2006).

DNA paketlenmesinin temel proteinleri olan histonların amino kuyrukları çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar geçirmektedir. Bu modifikasyonlar histonların elektrostatik yükünü değiştirerek histon olmayan proteinler için tanıma bölgesi oluşturmakta ve DNA replikasyonu, tamiri ve gen ifadesinin kontrolü gibi biyolojik olayları kontrol etmektedir. Histonların geçirdiği modifikasyonların epigenetik düzenlemede çok önemli bir rolü bulunmaktadır (Xu and Parmigiani 2007).

Epigenetik düzenlemelerde gerçekleşen reaksiyonların geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz gerçekleşmesi histon deasetilaz enzimler vasıtasıyla gerçekleşmektedir. HDAC'ler, histon kuyruğunu, kromatin konformasyonu, protein DNA etkileşimi ve hatta transkripsiyonu düzenleyen epigenetik regülatörlerdir (Kanwal and Gupta 2012).

Histon Deasetilaz Enzimleri (HDAC)

Üç farklı yapısal sınıfa ayrılan HDAC enzimleri çinko bağımlı (sınıf I/II) veya NAD bağımlı (sınıf III) mekanizmalarla çalışan, transkripsiyonel baskılamada kromatinin yeniden şekillendirilmesinde rol oynayan enzimler olarak tanımlanmaktadır. Sınıf I/II HDAC enzimleri, kanser ve diğer hastalıkların tedavisi için ortaya çıkan bir terapötik hedeftir (Marks *et al.* 2001).

HDAC enzimleri, katalizlenen histonların amino-terminal uçlarının tekrar pozitif yük kazanmaları histonlar ile DNA'nın etkileşimini artmasına neden olmaktadır. Genlerin transkripsiyonunu başlatan, DNA parçasının üzerindeki bağlantı kısımlar yok edilerek gen transkripsiyonunu inhibe etmektedir. HDAC substratlarının çoğu, hücre yapışması, hücre bölünmesi ve apoptozda rol alan düzenleyici proteinlerdir. (Chittur 2008; Li 2005).

Genler üzerinde meydana gelebilecek geri dönüşümlü ve geçici bir şekilde meydana gelen epigenetik mekanizmalarda (Seo *et al.* 2015) gerçekleşebilecek en basit hasar, kanser başta olmak üzere pek çok hastalıkla bağlantılı olabilmektedir (Egger *et al.* 2004; Sawan *et al.* 2008). Bu nedenle kanser hem genetik hem de epigenetik işlemlerde meydana gelen ve birçok basamaktan oluşan karmaşık bir hastalıktır (Kanwal and Gupta 2012).

Epigenetik Düzenlemeler

İnsan genomunda bulunan yaklaşık 23.000 gen bulunmakta ve bu genlerin ifade edilebilmesi kromatin yapısının gevsemesi ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanması ile gerçekleşmektedir. Gen ekspresyonunun transkripsiyonel seviyede düzenlenmesi histon modifikasyonları ile sağlanmaktadır (Klung 2002; Oak 2006).

Doğrudan ve dolaylı olarak gen ifadesini kontrol eden epigenetik mekanizmalar (Holliday 2006) ele alındığında; dolaylı olarak gen ifadesini kontrol eden mekanizmaları özellikle de nonkoding RNA'nın mRNA'yı tetikleyerek protein sentezini engellemesi gerçekleşirken doğrudan gen ifadesini kontrol eden bu mekanizmalar kromatin ve DNA düzeyindeki modifikasyonlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Holliday 2006).

DNA modifikasyonları

Deoksiribo nükleik asit (DNA), modifikasyonu gen ifadesini değiştirerek hücre fonksiyonlarını değiştiren, bir metil grubunun kovalent şekilde DNA metiltransferaz katalizinde bir sitozin-fosfat-guanin (CpG) bölgelerindeki beş numaralı karbon atomundan yapıya katılmasıyla meydana gelen, epigenetik gen ifadesindeki değişikliklerin, DNA sekansı ile bağlantı göstermeksizin ve hücre bölünmesi esnasında bir nesilden diğerine geçebilmesi olayı olarak tanımlanmaktadır (Waterland and Michels 2007; Bond and Finnegan 2007). DNA metilasyon süreci boyunca metil vericisi olarak S-Adenozil Metiyonin (SAM) görev yapar. Metilasyon DNA'nın inaktive olmasına neden olarak protein ekspresyonunu engelleyen bir sistemdir (Cummings and Klug 2002).

Kromatin modifikasyonları

Kromatin düzeyindeki modifikasyonları nonkovalent ve kovalent olmak üzere iki farklı grupta incelemektedirler (Segre and Chicca 2011). Kromatin modifikasyonlar genlerin susturulmasına neden olurlar ve bu durum geni inaktive edici bir mutasyon veya delesyon gibi genetik bir mekanizmayla eşdeğer olmaktadır (Marks *et al.* 2003).

Nonkovalent histon modifikasyonları

Histon takasları, histon katımları, kromatin onarımı, nonkoding RNA ile etkileşim, farklı ajanlarla etkileşim (virüsler, farklı protein grupları) ve uzun-mesafe kromozom etkileşimleri (hem kromozom içi, hem kromozomlar arası) nonkovalent histon modifikasyonları olarak sayılabilmektedir (Bond and Finnegan 2007).

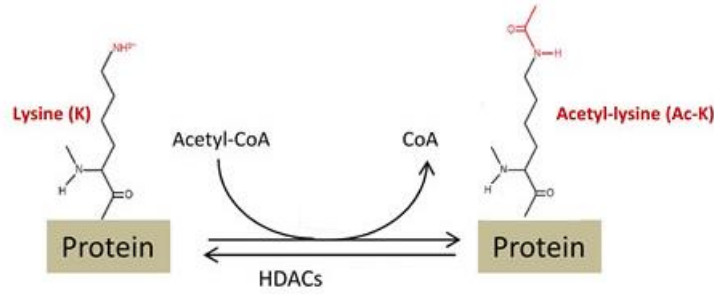
Histon modifikasyonları (Kovalent Modifikasyon)

Histon modifikasyonları histonların elektrostatik yükünü değiştirerek histon olmayan proteinler için tanıma bölgesi oluşturmakta ve DNA replikasyonu, tamiri ve gen ifadesinin kontrolü gibi biyolojik olayları kontrol etmektedir (Xu and Parmigiani 2007).

Bu modifikasyonlar, kromatin ile ilişkili histon proteinlerinin, proteinler ile de etkileşerek, genin transkripsiyon aşamasının düzenlenmesini sağlayan faktörlerdir (Segre and Chicca 2011). Nükleozom içindeki histon moleküllerinin bazik amino terminal kuyrukları nükleozomdan çıkıntılar yaparak fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon, ubikitinasyon, ADP ribosilasyonu, sumolasyonu, glikosilasyonu ve biyotilasyonunu gibi modifikasyonlar gerçekleşmektedir. Histon modifikasyonlarından en çok incelenen ve araştırılan modifikasyonlar metilasyon ve asetilasyondur. Spesifik olarak asetilasyon, histon

kuyruklarının pozitif yükünü nötralize eder ve DNA'ya afinitelerini azaltır (Marks *et al.* 2003).

Histon modifikasyonlarından asetilasyon, en çok çalışılan modifikasyon olup, histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzim aileleri tarafından düzenlenmektedir. HAT'lar asetil grubunun, asetil koenzim A'dan histonların amino kuyruklarına ve histon olmayan proteinlere transferini katalizleyen enzimlerdir (Xu and Parmigiani 2007; Segre and Chicca 2011; Bond and Finnegan 2007).



Şekil 9. Lisin artığının asetilasyonu ve deasetilasyonu (Martile *et al.* 2016).

Metilasyon, histon proteinlerinde bulunan aminoasitlere histon metiltransferaz enzimleri tarafında bir, iki veya üç adet metil grubu (tri metilasyon) eklenmesiyle gerçekleşen bir modifikasyon olarak tanımlanmaktadır. Bir genin ifade edilip edilmeyeceğini o geni açık veya kapalı konuma (switch on- switch off) getiren olay bu ve benzeri modifikasyonlardır (Martin and Zhang 2007).

Fosforilasyon, polipeptidlere bir veya birden fazla fosfat grubunun bağlanmasıyla gerçekleşen bu modifikasyondur. Fosforilasyon, protein kinazlar (PK) ve protein fosfatazlar (PP) tarafından gerçekleştirilen bir reaksiyondur (Ford *et al.* 2007).

S-nitrasilasyon, histon deasetilazlara sistein rezidüsünden nitrosil (NO) grubunun eklenmesi ile gerçekleşen modifikasyondur. Bu durum katalitik aktiviteyi etkiler ve bunun sonucu olarak kromatinden korepresörlerin ayrılamamasına neden olur (Nott *et al.* 2008).

Ubukitinasyon, Ubukitin (Ub) olarak bilinmekte olan proteinin kovalent olarak bağlanması sonucunda gerçekleşen modifikasyon olarak tanımlanmaktadır (Hershko and Ciechanover 1998).

Sumolasyon, bir isopeptide küçük ubuquitin benzeri değiştirici (SUMO) gruplarının eklenmesiyle gerçekleşen modifikasyondur (Yang *et al.* 2007).

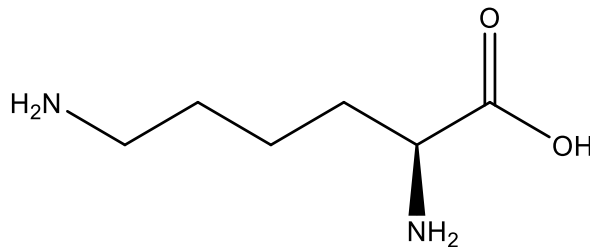
Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu

Histon asetilasyonunun düzenlenmesi iki enzim tarafından kontrol edilmektedir: Histon asetiltransferazlar (HAT) ve histon deasetilazlar (HDAC) dır (Zhang *et al.* 2003).

HAT'ler, histonlar üzerindeki ϵ - amino grup lizin (K) kalıntılarını asetile eder, böylece pozitif yükleri nötralize etmektedir, bu da negatif yüklü DNA'ya bağlanma yeteneklerini azaltır. Ek olarak H4-K16 histonunun asetilasyonu, özellikle yüksek dereceli kromatin yapılarının oluşumunu bozmaktadır. Açık bir kromatin konfigürasyonu, spesifik transkripsiyon faktörleri ve genel transkripsiyon makineleri için erişilebilirlik sağlamaktadır (Shogren-Knaak *et al.* 2006).

HDAC'ler, hücrelerin çoğalması ve ölümü ile ilgili, hücre çoğalması ve ölümü ile ilgili histonik olmayan proteinlerin onarımı ve deasetilatı gibi transkripsiyondan bağımsız olayları da etkileyebilmektedirler. Histon asetilasyonu, bir lizin tortusuna bir asetil grubu eklenmesiyle sonuçlanmaktadır. Histon asetil transferazların aksine, HDAC'ler asetil gruplarını çıkarır ve genellikle kromatin inaktivasyonuna bağlanır (Marks *et al.* 2003). HDAC'ler, asetil kısmının, çekirdek nükleozomal histonları dâhil, proteinlerin lizin kalıntılarından çıkarılmasını katalizleyen enzimdir (Finnin *et al.* 1999).

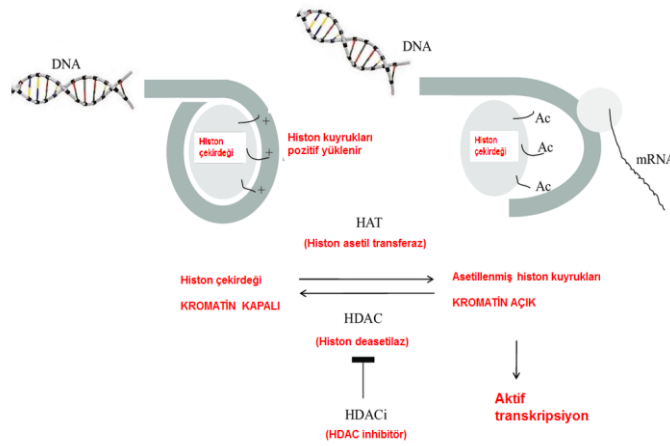
DNA'yı transkripsiyon faktörleri (DNA'ya doğrudan bağlanarak gen ifadesini düzenleyen proteinler) için daha çok ya da daha az ulaşılabilir olmakta önemlidirler. Lizin kalıntısı asetilasyonu DNA-histon etkileşimlerini zayıflatır ve DNA'yı transkripsiyon esnasında gerekli faktörler için daha ulaşılabilir yapmaktadır. Asetilasyon geri dönüşümlü bir süreç olup, asetillenmiş lizin amino asitinden asetil grubunun kopmasıyla birlikte kromatin tekrar kondense olmakta ve transkripsiyon baskılanmaktadır. Kromatinin belli bir bölgesinde histonların asetile olması, o bölgenin transkripsiyonel açıdan aktif olduğunu gösterirken, deasetile olması transkripsiyonun baskılandığını belirtmektedir (Fennell *et al.* 2008).



Şekil 10. Lizin (Fennell *et al.* 2008).

Histon asetilasyonu transkripsiyonel aktivasyon ile histon deasetilasyonu ve gen susturulması ile ilişkilidir. Histonların N terminal kuyruk kısımları arasında lizinlerden meydana gelmektedir. HAT' lar, asetil kısımlarını (CH₃CO), asetil koenzim A (asetil-

CoA)’dan histonlar arasında bulunan lizin rezidülerinin ϵ -amino grupları üzerine transfer etmektedirler. Asetilasyon ile negatif (-) yüklü asetil grubunun histon proteininin amino ucuna bağlanmasıyla, pozitif (+) yüklü lizin aminoasiti yükünün bir kısmını kaybederek nötral amid bağlarına dönüşmektedir. Bu yüzden histonlar ve DNA arasındaki elektrostatik etkileşim zayıflar ve kromatinde daha “açık” bir kromatin yapısı oluşmasını sağlar. Bu olduğunda transkripsiyon faktörlerinin genlerin promotor bölgelerine ulaşmaları kolaylaşmakta ve gen transkripsiyon gerçekleşmektedir. Bu durumun aksine, HDAC enzimleri ile katalize edilen histonların amino-terminal uçlarının tekrar pozitif yük kazanmaları, histonlar ile DNA’nın etkileşimini artmasına sebep olmaktadır. Bundan dolayı promotör üzerindeki bağlantı bölgeleri bloke edilerek gen transkripsiyonu inhibe edilmektedir (Pan and Huang 2007; Hrzenjak *et al.* 2006; Alberts *et al.* 2002).



Şekil 11. Histonların asetile ve deasetile olması durumunda transkripsiyon (Thiagalingam *et al.* 2003).

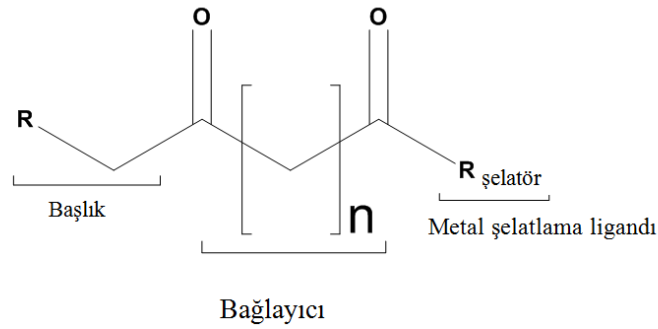
Son yıllarda HDAC’ları inhibe edebilen bileşikler HDAC inhibitörleri olarak tanımlanmıştır. HDAC’ların biyolojik fonksiyonlarının çok çeşitli olması nedeniyle, HDAC inhibitörlerinin etkileri kalıtsal hastalıklarda ve kanser türlerinde araştırılmakta, inhibitörler bu hastalıkların tedavisi için potansiyel ilaç adayları olarak görülmektedir (Thiagalingam *et al.* 2003).

HDAC inhibitörleri, düşük toksisiteleri nedeniyle kanser tedavisi için ümit verici bir tedavi oluşturmaktadır. HDAC inhibitörlerinin farklılaşma, hücre döngüsü durması ve apoptozu indüklediği ve birçok kanser hücre hattında göç, istila ve anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. Tek başına ve çeşitli antikanser ilaçlarla birlikte HDAC inhibitörleri, hematolojik hem de katı tümörlerde önemli antikanser aktivitesi gösteren klinik çalışmalarda test edilmektedir. ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından kutanöz T hücreli lenfoma (CTCL) tedavisi için kullanılan SAHA (vorinostat, Zolinza), klinik onkoloji pazarına girmek için

onaylanan ilk HDAC inhibitörü idi ve diğer maligniteler için testi devam etmektedir (Martínez *et al.* 2008).

Histon Deasetilaz inhibitörleri

HDAC inhibitörleri yapısal olarak 3 farklı kısımdan meydana gelmektedir. Fonksiyonel bölge metal bağlayıcı bölüm olup enzimin aktif bölgesine bağlanır, alifatik zincir enzim yapısındaki tüp boyunca uzanmakta, başlık bölgesi ise yüzey tanımadan sorumlu olup tüpün giriş kısmı ile etkileşime girmektedir (Grozinger *et al.* 2002; Miller *et al.* 2003; Vannini *et al.* 2004).



Şekil 12. HDAC inhibitörlerinin yapısı (Grozinger *et al.* 2002; Miller *et al.* 2003; Vannini *et al.* 2004).

Normal yaşam döngüsü boyunca, hücre çoğalmaya, farklılaşmaya ya da ölmeye karar vermesi gereken birçok fırsatla karşılaşır. Bu işlemlerin herhangi birindeki bir hasar hücrenin kontrolsüz büyümesine buna bağlı olarak kansere neden olabilir. HDAC'ler kanser gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. HDAC inhibitörü olarak tanımlanan ilk kimyasal sodyum bütirat (NaB) (Ginsburg *et al.* 1973; Altenburg *et al.* 1976; Boffa *et al.* 1978).

HDAC inhibisyonu tümör hücrelerinin apoptozise girmesine yol açtığı için, küçük molekül HDAC inhibitörleri, çoğu klinik çalışmaya girmiş yeni bir mekanizma tabanlı anti-kanser ajanı sınıfı olarak geliştirilmiştir (Khan 2011).

HDAC inhibitörleri, transkripsiyonel etkilerinin haricinde, kanser hücrelerinde hücre döngüsünün inaktif halde olan G2 kontrol noktasını aktif hale getirerek hücre bölünmesini durdurmakta ve apoptozu uyarmaktadır (Taddei *et al.* 2005; Bernhard *et al.* 1999). Kanser hücrelerinin HDAC inhibitörleri tarafından indüklenen apoptozu karşı daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (Rosato and Grant, 2005; Nebbioso *et al.* 2005). Ayrıca, HDAC inhibitörlerinin, hücre büyümesinin inhibisyonunda görev alan genlerin asetilasyonunu arttırdığı ve bu sayede kanserli hücrenin büyümesini durdurucu etkisinin olduğu düşünülmektedir. HDAC inhibitörleri, kanser hücrelerinde ölüm, apoptoz ve hücre siklusunun durmasına neden olan,

epigenetik veya epigenetik olmayan düzenlemede önemli roller oynayan nispeten yeni bir antikanser ajan sınıfıdır. Bu nedenle, HDAC'ler, kanser terapötiklerinde umut verici hedefler haline gelmiş ve hızla gelişen bir klinik araştırma alanı olan HDAC inhibitörlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır (Barneda-Zahonero 2012).

Günümüzde birçok HDAC inhibitörü tanımlanmıştır. Bunlar:

Hidroksamik Asitler: TSA, SAHA, Oksamflatin, ABHA, Skriptaid (SB-556629),

Kısa-Zincirli Yağ Asitleri: Butirat, fenilbutirat ve valproik asit,

Amidler: MS-275 (MS-27-275), MethylGene, CI-994

Epoksiketon-Taşıyan Siklik Tetrapeptidler: Trapoksinler, HC-toksin, Chlamydocin,

Epoksiketon-Taşımayan Siklik Tetrapeptidler: FR901228, CHAPs ve diğer yapılar olan Depudecin, Tubacin, Organosülfür bileşikler (Barneda-Zahonero 2012).

HDAC inhibitörlerinin *in vivo* çalışmalarda, tümör büyümesini ve metastazı önemli ölçüde azalttıkları kanıtlanmışlardır. Örneğin; kısa zincirli yağ asitlerinden bütirik asitler ve türevleri kolon, prostat, endometriyal ve servikal karsinomlar üzerinde çalışılmış, kanserli hastalarda hücre döngüsünü değiştirerek bölünmeyi durdurduğu, farklılaşma ve apoptozu uyardığı belirtilmiştir (Fennell *et al.* 2008).

KAYNAK ÖZETLERİ

Kanser büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin klonal yayılımıdır ve somatik genetik hastalıkların en sık, en yaygın ve aynı zamanda en komplike olanıdır. Çok basamaklı ve uzun süreli genotipik ve fenotipik düzeyde gerçekleşen bu süreç, uzun yıllar boyunca araştırma konusu olmuştur (Futreal *et al.* 2001).

Kanserin tedavisinde hali hazırda kullanılan birçok tedavi yönteminde kanser hücrelerini yok etmenin yanında sağlıklı hücrelerde zarar vermesi gibi istenmeyen yan etkileride vardır. Bu nedenle, seçici yeni kanser tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla kanser hücrelerine spesifik, yüksek antikanser potansiyeline sahip, güvenilir ve yan etkisi az kemoterapötik stratejilerin geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır (Sharman *et al.* 1999).

Birçok bilim insanı kansere karşı çözüm yöntemleri geliştirebilmek için çalışmalarını sürdürmektedir. Bu gibi çalışmalar arasında gündeme gelen alternatif yöntemlerden birisi de HDAC inhibitörleridir (Topal 2009).

Hem genetik hem de epigenetik değişikliklerle kanser ilerlemesi kontrol altına alınabilmektedir. Genetik değişimlerin geri dönüşümü imkansızken epigenetik değişimler geri dönüştürülebilir. Bu avantaj, önerilen epigenetik modifikasyonların terapi uygulamalarında tercih edilmesi gerektiğini göstermektedir. DNA metiltransferaz ve histon deasetilaz epigenetik terapi çalışmalarının birinci hedefi haline gelmiştir. Bazı DNA metilasyon ve HDAC inhibitörleri antikanser ilaçlar olarak Amerika'da Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmıştır (Eroğlu 2018).

Histon asetilasyonunu modifikasyona uğratan enzimlerdeki değişiklikler, bir kanser biyolojisi açısından oldukça önemlidir, çünkü histon deasetilasyon (HDAC) bazı insan kanserlerinde aşırı eksprese edilir ve onkojenik transkripsiyon faktörleri tarafından alınır. Örneğin, HDAC, mide (Song *et al.* 2005), prostat (Halkidoi *et al.* 2004) ve kolon kanserinde (Zhu *et al.* 2004) aşırı eksprese gibi görünmektedir ve anormal HDAC aktivitesi de bazı lösemi biçimlerinde (Fenrick and Hiebert 1998) ve lenfoma da oluşmaktadır (Lemerrier *et al.* 2002).

Histon asetilasyonu, lizin rezidülerinin yan zincirlerine asetil grubu transfer eden HAT'ler aracılığı ile kontrol edilir. HDAC' ler ise tam tersi şekilde, lizin rezidülerinden asetil

gruplarını koparırlar. Böylece gen ifadesi baskılanmış olmaktadır. HDAC enzimleri hedef genlerin sessizleştirilmesinde çok alt birimli transkripsiyonel korepresör kompleksinin bir bileşeni olarak görev alır (Inche 2006).

HDAC inhibitörlerinin hücre döngüsünü bloke ettiğini ve hücre tipine ve çevresel faktörlere bağlı olarak apoptoz veya farklılaşmaya neden olduğunu gösteren çok sayıda literatür vardır (McLaughlin *et al.* 2003; Kim *et al.* 2000, 2001; Finzer *et al.* 2001).

HDAC inhibitörleri'nin yapısal farklılıkları dolayısıyla bloke edici potansiyelleri birbirinden farklıdır (Mehnert *et al.* 2007). Antikanser ajanlar olarak geliştirilen bu inhibitörler, sınıf 1, 2 ve 4 HDAC enzimlerini hedeflemektedirler. Sentezlenen bu inhibitörlerin bazıları klinik denemelerde kullanılırken, diğerleri preklinik araştırma aşamasındadır (Yoon *et al.* 2016).

Bugüne kadar, dört HDAC inhibitörü olan Vorinostat, Romidepsin, Panobinostat ve Belinostat, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmıştır. Prensip olarak, bu HDAC inhibitörleri daha az ciddi yan etkileri olan klinikte hematolojik kanserler için kullanılır. Klinik çalışmalar, diğer kanser türlerini ve aynı zamanda malign olmayan hastalıkları ele almak için sürekli genişlemektedir. HDAC inhibisyonu ayrıca çeşitli inflamasyon bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklarda yararlı sonuçlara neden olmaktadır (Yoon *et al.* 2016).

Kütanoz T hücreli lenfoma tedavisinde kullanılan bir ilaç olan Vorinostat (suberoylanilide hidrokсамik asit veya SAHA), çoklu Faz I ve II klinik çalışmalarında başlangıç değerlendirmesi yapılan bir HDAC aktivitesinin nanomolar inhibitörüdür. Vorinostat, HDAC aktivitesini inhibe eden, böylece asetillenmiş histonların yanı sıra histon olmayan proteinlerin birikmesini indükleyen, kültür hücrelerinin çoğalmasını bloke olmasını sağlayan ve çeşitli hayvan modellerinde tümör büyümesini inhibe eden küçük moleküler ağırlıklı (<300) doğrusal bir hidrokсамik asit molekülüdür. Ayrıca vorinostat, geniş bir HDAC aktivitesi inhibitörüdür ve hem sınıf I hem de II enzimlerini inhibe etmektedir (Marks *et al.* 2001 ; Marks and Dokmanovic 2005).

Vorinostat, klinik gelişimde HDAC inhibitörlerinin en gelişmişidir. Vorinostat, ilerlemiş deride T hücreli lenfoma hastalarının tedavisinde klinik kullanım için Federal İlaç İdaresi tarafından onaylanan ilk HDAC inhibitörüdür (Duvic and Vu 2007; Marks and Breslow 2007). Kutanöz T hücreli lenfomalar (CTCL'ler), deride ortaya çıkan tüm lenfomaların çoğunu oluşturan, klinik olarak heterojen bir postmik lenfoma grubudur. Preklinik çalışmalarda, Vorinostat'ın, Sezary hücreleri de dahil olmak üzere çok çeşitli kanser hücre hatlarında hücre döngüsü durması ve apoptozu indükleyen asetillenmiş histonların

birikmesine neden olduğu gösterilmiştir. Vorinostat ayrıca lösemi, lenfoma ve *in vivo* katı tümör modellerinde antitümör aktivitesi göstermiştir (Zhang 2005; Duvic 2006; Butler 2002, 2007; Marchion 2004; Almenara 2002; Nimmnapallı 2003; He 2001; Sakajırı 2005; Kelly 2003; O'connor 2006; Garcia-manero 2005; Vrana 1999).

Varinostat'taki *in vitro* antitümör aktivitesi araştırıldığında, hem parenteral ve oral uygulama ile prostat kanseri (Butler *et al.* 2000) lösemi (He *et al.* 2001), meme kanseri (Cohen *et al.* 1999, 2002), glioma (Eyüpoğlu vd 2005) ve akciğer kanseri (Desai *et al.* 2003) gibi (katı tümörler ve hematolojik kanserleri) tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Tümör büyümesinin inhibisyonu, kilo alımı, histolojik çalışmalar ve otopside doku/organların brüt anatomik muayenesi ile değerlendirildiği gibi toksisitesi çok az ya da hiç olmayan Vorinostat dozlarında kendini göstermektedir (Butler *et al.* 2000). Diyetle verilen Vorinostat'ın kanserojen *N-metilnitrosoüre* ile indüklenen meme tümörlerinin gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Cohen *et al.* 1999). Vorinostat uygulaması tümör sayısını azaltmış ve var olan meme tümörlerinin büyümesini inhibe etmiştir (Cohen *et al.* 2002).

Belinostat, periferik T hücresi lenfoma (PTCL) tedavisi için FDA tarafından onaylanan üçüncü ilaçtır. Sınıf I, II ve IV HDAC' lerin inhibisyonuna sebep olan bir hidroksamat türevidir (Mottamal *et al.* 2016). 120 PTCL hastasında yapılan klinik araştırma çalışması, % 26 ORR (genel tepki oranı) göstermiştir. Belinostat şu anda CTCL (kutanöz T hücreli lenfoma), multipl miyelom, Burkitt lenfoma ve fallop tüp kanserinde olduğu gibi katı tümörlerin tedavisi için 15'ten fazla klinik denemede araştırılmaktadır (Losson *et al.* 2016).

Park ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada insan meme kanseri hücre hatlarında istila veya göç için gerekli olan spesifik HDAC inhibitörlerinin izoformlarını tanımlamışlardır. *MDA-MB-231* kanser hücreleri, *MCF-7* kanser hücrelerine kıyasla anlamlı ölçüde daha invaziv ve daha yüksek seviyelerde matris metaloproteinaz-9 (MMP-9) ifade etmiştir. *MCF-7* ve *MDA-MB-231* kanser hücreleri arasındaki HDAC inhibitörlerinin izoformlarının ekspresyonunu karşılaştırıp ve Real Time-PCR ve western blot analizleriyle *MDA-MB-231* hücrelerinde HDAC4, 6 ve 8'in daha fazla ekspresyonunu gözlemlemişlerdir. Çalışmada HDAC inhibitörü olan Apicidin, *MDA-MB-231* kanser hücrelerinde istila, göç ve MMP-9 ekspresyonunu hafiflettiği gösterilmiştir. HDAC1, 4, 6 ve 8'e karşı spesifik siRNA'ların kullanılması, *MDA-MB-231* kanser hücrelerinde HDAC1, 6 ve 8'in inhibisyonunun, ancak HDAC4' ün inhibisyonunun istila ve MMP-9 ekspresyonundan sorumlu olduğu gösterilmiştir. HDAC1, 4, 6 veya 8'i aşırı eksprese eden *MCF-7* kanser hücrelerinin invazivliğini analiz edilip ve HDAC1, 6 veya 8'in aşırı ekspresyonunun

invazyonu ve MMP-9 ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, HDAC'lerin istiladaki işlevsel rollerini *MCF-7* ve *MDA-MB-231* kanser hücrelerinde ekspresyonlarına göre inceleyip, bulgulardan, HDAC1, 6 ve 8'i meme kanseri hücrelerinin ilerlemesinde etkili olduğu belirtilmiştir. Meme kanseri metastazı için potansiyel biyo belirteçler olarak HDAC izoformları geliştirilerek, bu çalışma meme kanseri istilası için yeni tedavilerin geliştirilmesine kadar genişletilebilir (Park *et al.* 2011). Toplam RNA ve hücre lizatları, *MCF-7* ve *MDA-MB-231* kanser hücrelerinden hazırlanıp mRNA ve protein seviyeleri sırasıyla Real-Time PCR ve western blotlama ile belirlenmiştir. Daha sonra, bir HDAC inhibitörü olan Apicidin, *MDA MB231* kanser hücrelerinin istila ve göçünü inhibe edip etmediğini incelenmiştir (Park *et al.* 2011).

HDAC inhibitörü olan Apicidin, meme kanseri hücrelerinde istila ve göçü engellemektedir. Hücreler, bir invazyon denemesinden veya bir yara iyileşme denemesinden önce belirtilen konsantrasyonlarda apicidin ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca belirtilen konsantrasyonlarda Apicidin ile muamele edilmiş, *MDA MB-231* kanser hücrelerinin istila ve göçünü inhibe edip etmediğini incelenip gösterilmiştir. *MDA-MB-231* kanser hücreleri, *MCF-7* kanser hücrelerinden daha fazla istila ve göç gösterdiği görülmüştür. *MDA-MB-231* kanser hücrelerinin Apicidin tedavisi doza bağlı bir şekilde istila ve göçü inhibe ettiğini ve Apicidin'in insan meme epitel hücrelerinde MMP-2 aktivitesini MMP-9'dan daha fazla inhibe ettiği bildirilmiştir (Kim 2000). Apicidin MMP aktivitesi üzerindeki etkisini test etmek için hücrelere artan miktarda apicidin uygulanıp ve Real-Time PCR kullanarak mRNA ekspresyonu gözlemlenmiştir. Apicidin, *MDA-MB-231* kanser hücrelerinde MMP-9 ekspresyonunu inhibe ettiğini ancak MMP-2 aktivitesini inhibe etmediği belirlenmiştir (Park *et al.* 2011).

Kuwajima ve grubu tarafından yapılan bir çalışmada HDAC inhibitörleri, butirat veya Trikostatin A *Murin B16-BL6* hücreleri ile muamele edilmiştir. Yapay bazal zarın melanom hücresi istilası, Matrigel, Transwell odası deneyi ile incelenip. Trikostatin A'nın yanı sıra butirat, temel olarak hücre döngüsünü durdurarak hücre büyümesini inhibe ettiği belirtilmiştir. Butirat tedavisi, *E-kadherin* ya da *N-cadherin* mRNA'sı yukarı regüle edilmesede, hücre hücresi agregasyonunu arttırmış olduğu belirlenmiştir (Kuwajima *et al.* 2007).

Qian ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmada, preklinik prostat kanseri modellerinde HDAC inhibitörü Belinostat'ın aktivitesi incelenmiştir. *In vitro* proliferasyon deneyleri, belinostatın prostat kanseri hücre çizgilerinin ($IC_{50} < 1.0$ microM) büyümesini kuvvetle inhibe ettiğini ve bu hücrelere sitotoksik olduğu gösterilmiştir. Washout deneyleri,

Belinostat'a nispeten kısa bir süre (<12 saat) maruz kalmanın, suboptimal büyüme inhibisyonunu indüklediğini ve 48 saat boyunca 1,0 microM Belinostat'a maruz kalan hücrelerin, 48 µM Belinostat'a maruz kalan hücrelerin geri çekilme kapasitesini koruduğunu göstermiştir. Geri dönüşü olmayan bir şekilde büyümesi engellendiği gözlemlenmiştir (Qian 2007).

Vigushin ve grubu tarafından yapılan bir çalışmada meme hücre kültüründe sitostatik ve ayırt edici özelliklere sahip bir antifungal antibiyotik olan Trikostatın A (TSA), HDAC aktivitesinin güçlü ve spesifik bir inhibitörü olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada, insan meme kanseri hücre dizilerinde TSA'nın *in vitro* antiproliferatif ve HDAC inhibe edici aktivitesini değerlendirmek ve bir kanserojen kaynaklı meme kanseri modelinde *invivo* antitümör etkinliği ve toksisitesi değerlendirilmektedir. TSA'nın meme kanserine karşı güçlü ve doza bağlı antitümör aktivitesinin, *in vitro* ve *in vivo* olarak, kanser tedavisinde antikanser tedavisi için moleküler bir hedef olarak HDAC'ı kuvvetle desteklediği doğrulanmıştır (Vigushin *et al.* 2001).

HDAC inhibitörü olarak Suberoil bishidroksamik asit (SBHA), hücre büyümesi ve apoptoz gibi çeşitli hücresel etkilere sahiptir. Yapılan çalışmada, SBHA'nın A549 kanser hücrelerinin büyüme ve ölümü üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. SBHA, A549 kanser hücrelerinin büyümesini, doza bağlı bir şekilde 72 saatte yaklaşık 50 µM bir IC₅₀ ile inhibe etmiş olup, DNA akış sitometrik analizi sonuçlarından SBHA'nın hücre döngüsünün bir G2/M faz tutuklamasını indüklediği gösterilmiştir. Bu ajan ayrıca, alt G1 hücreleri ve Anneksin V-FITC boyama hücreleri tarafından kanıtlandığı gibi apoptozu indüklemiştir. SBHA kaynaklı apoptoz, mitokondriyal membran potansiyeli kaybı (MMP; ΔΨ (m)), Bcl-2 azalması, Bax artışı ve kaspaz-3 aktivasyonu eşlik etmiştir. Test edilen kaspaz inhibitörlerinin tümü ile bazı hücreleri ile SBHA kaynaklı A549 kanser hücre ölümünden önemli ölçüde kurtarılmış olduğu gözlemlenmiştir. SBHA ile muamele edilen A549 kanser hücrelerinin büyümesini IC₅₀ x 50 µM ile 72 saatte doza bağlı bir şekilde inhibe etmiştir. Beklendiği gibi, bir HDAC inhibitörü olarak SBHA'nın, A549 kanser hücrelerinde asetillenmiş H3 ve H4 seviyelerini arttırdığı gözlemlenmiştir. A549 kanser hücre büyümesinin SBHA tarafından inhibe edilmesi, hücre döngüsü sırasında bir tutuklama ile açıklanabildiği için, hücre döngüsü dağılımları SBHA ile muamele edilmiş A549 kanser hücrelerinde incelenmiştir. DNA akış sitometrik analizi, 30-70 µM SBHA'nın, 72 saatte hücre döngüsünün bir G2/M faz durdurmasını önemli ölçüde indüklediğini göstermiştir (You 2010; Ning 2008). Hem A549 kanser hücrelerinde hem de MCF-7 kanser hücrelerinde yapılan çalışmalar, SBHA tedavisinin belirgin bir apoptoz seviyesini indüklediğini göstermiştir (You 2010; Zhuang 2008).

Panobinostat (LBH589), immüno-modüle edici ajanlar ve Bortezomib'den sonra multipl miyelom tedavisi için tümör ilerlemesi ile son zamanlarda onaylanmış bir pan-HDAC inhibitörüdür. Akciğer, meme, yumurtalık kanseri ve multipl miyelom gibi katı tümörlere karşı inhibe edici aktivitesini belirlenmiştir (Ganai 2016).

Kanserin ilerlemesi ile ilgili epigenetik olayları tersine çevirme yeteneğine sahip olan Panobinostat (LBH589) (Atadja 2009) hematolojik, akciğer, meme, yumurtalık, tiroid ve prostat malignitelerinde kanser önleyici etkileri gözlemlendi (Ganai 2016). Yakın zamanda Panobinostat, immüno-modüle edici ajanlar ve bortezomib sonrasında multipl miyelomun tümör ilerlemesi ile tedavisi için onaylanmıştır (Mu 2016).

Xiong ve grubu tarafından yapılan bir çalışmada ise *in vivo* ve *in vitro* olarak sodyum butiratın B16 melanomu üzerindeki etkisini belirlenmiş olup, tedavi sonrası hücre apoptoz oranını saptamak için MTT yöntemi, tümör ile ilişkili makrofaj infiltrasyon durumu, akış sitometrisi ile tespit edilmiştir. Tümör ilişkili makrofaj sitokinlerinin ekspresyonunu saptamak için western blot ve immünohistokimyasal yöntem kullanılmıştır. Belirli bir sodyum butirat konsantrasyonu *in vivo* ve *in vitro* olarak B16 melanom büyümesini etkili bir şekilde inhibe edebilir ve bu inhibisyon tümörle ilişkili makrofaj farklılaşmasının baskılanmasına bağlıdır. Aynı zamanda, ilgili makrofaj faktörlerinin kontrole kıyasla aşağı regüle edildiğini gözlemlenmiş olup, sodyum butirat tümörle ilişkili makrofaj proliferasyonunu baskılayarak B16 melanom büyümesini etkili bir şekilde inhibe edebildiği ve ilgili pro-tümör makrofaj faktörlerinin ifadesini azaltabildiği bu da melanom epigenetik tedavisinin klinik çalışmasını desteklemeye yardımcı olabildiği belirlenmiştir (Xiong *et al.* 2015).

Shi ve grubu tarafından yapılan bir çalışmada NaB' ın A549 ve kolorektal (HCT116) kanser hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi araştırmışlardır. A549 ve HCT116 kanser hücreleri, 24 veya 48 saat boyunca farklı NaB konsantrasyonları (0-16 mM) ile tedavi edildiği, kanser hücrelerinin yaşayabilirliği, MTT deneyi kullanılarak ölçülmüş ve NaB'nin, 24 saatlik bir tedavi süresi içinde A549 ve HCT116 kanser hücrelerinin proliferasyonunu belirgin şekilde bastırdığı tespit edilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda NaB'nin A549 kanser ve HCT116 kanser hücrelerinin canlılığını inhibe edebileceğini ileri sürmüşlerdir (Shi *et al.* 2020).

Shi ve grubu tarafından HDAC inhibitörü olan suberoilanolid hidroksamik asidin (SAHA), prostat kanseri hücrelerinde SAHA'nın anti-tümör aktivitesini keşfetmek için, insan prostat kanseri hücre hatları DU145 ve PC-3 kanser hücreleri, 24 ve 48 saat boyunca artan SAHA dozları ile muamele edilmiştir. Hücre proliferasyonunu izlemek için, MTT hücre proliferasyon analizi yapılmıştır. SAHA, DU145 ve PC-3 kanser hücrelerinin hücre

proliferasyonunu doza bağımlı bir şekilde inhibe ederken, inkübasyon süresinin 48 saate uzatılması hücrelerin SAHA' ya duyarlılığını önemli ölçüde artırmadığı gözlemlenmiştir. *DU145* kanser hücrelerinin hücre canlılığı, 48 saat boyunca SAHA (4 mM) tedavisi üzerine yaklaşık %55 azaldığı ve *PC-3* kanser hücrelerinin canlılığı, 5uM SAHA varlığında yaklaşık %45'e düşürülmüştür. MTT hücre proliferasyon tahliline göre hesaplanan IC_{50} değerlerine göre, SAHA tedavisi, *DU145* ve *PC-3* kanser hücrelerinin hücre proliferasyonunun doza bağlı inhibisyonuyla sonuçlandığını bildirmişlerdir (Shi *et al.* 2017).

Wang tarafından yapılan bir çalışmada insan meme kanseri *MCF-7* ve kanserli olmayan insan böbrek (*HEK293*) kanser hücrelerinde HDAC inhibitörü sodyum butirat ve DNA çift iplikli kopma (DSB) hasarı arasındaki bağlantıyı kurmaya çalışılmıştır. NaB'nin, kanserli *MCF-7* kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek için CCK-8 analizleri yapıp, *MCF-7* kanser hücreleri 24, 48 saat boyunca 1, 2,5, 5, 10 veya 20 mM NaB varlığında kültürlenmiştir. NaB doza ve zamana bağlı bir şekilde *MCF-7* hücre canlılığını bastırmıştır. 1 veya 2.5 mM NaB tedavisi ile önemli bir etki gözlenmeyip, NaB konsantrasyonlarındaki ilave artışlar, artan proliferasyonun azalmasına neden olmuştur. Etki yüksek doz gruplarında daha belirgin olduğunu gözlemlemişlerdir (20 mM, $p < 0.001$). Bu bulgular *MCF-7* kanser hücre canlılığının NaB tarafından inhibe edildiğini göstermiştir. *MCF-7* hücre canlılığı, NaB tarafından inhibe edildiği; NaB ile tedavi edildikten 24 saat ve 48 saat sonra hücre canlılığı önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Wang 2016).

Dong ve grubu tarafından yapılan çalışma kapsamında HDAC inhibitörleri ile farklı tümör şekillerinde derin antiproliferatif aktivitelerle kanıtlanmıştır. Literatürde yer alan bilgilere göre daha önce, birçok polioksometalat HDAC' nin antitümör aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, insan prostat kanserinde polioksometalatlar arasındaki bir bileşik olan PAC-320'nin antitümör mekanizması araştırılmıştır. PAC-320'nin geniş spektrumlu bir HDAC olduğunu ve *in vitro* ve *in vivo* olarak prostat kanseri hücrelerinin büyümesini önleyebilir olduğu belirlenmiştir (Dong *et al.* 2018).

Kanser endikasyonlarında klinik olarak geliştirilmekte olan yeni bir HDAC inhibitörü ise Chidamide (CS055/HBI-8000) tir. Yapılan çalışmada bileşiğin *in vitro* ve *in vivo* antitümör özelliklerini bildirmektedir. Bu çalışmada sunulan sonuçlar, Chidamide'ın, tek bir ajan olarak veya kombinasyon terapileri halinde çeşitli tümör tiplerinin tedavisi için potansiyel uygulanabilirliğine sahip olduğuna dair kanıt sağlamaktadır (Ning *et al.* 2011).

5-Fluorourasil (5-FU), kolon, mide ve akciğer kanserlerine karşı en yaygın kullanılan ilaçlardan biridir. 2018 yılında yapılan bir çalışmada 5- fluorourasile (5-FU), kanser terapisinde ciddi bir problemdir ve kanser kemoterapisinin etkinliğini arttırmak için bunun aşılması

gerekmektedir. HDAC inhibitörlerinin kanser tedavilerinde kullanıldığı ve yakın zamanda, HDAC inhibitörlerinin çeşitli antikanser ilaçlarına karşı in vitro direncin üstesinden gelebileceği bildirilmiştir. 5-FU dirençli bir meme kanseri hücre dizisi oluşturularak HDAC inhibitörlerinin bu hücrelerdeki etkileri incelenmiştir. 5-FU, Valproik asit (VPA), Gimeracil, Oteracil ve SAHA temin edildikten sonra insan meme kanseri hücre dizisi *MDA468*, 100 U/mL penisilin ve 0,1 mg / mL ile takviye edilip, 5-FU'ya dirençli *MDA-MB-468* alt çizgilerinin oluşturulması, *MDA468* hücrelerinin, yaklaşık bir yıl boyunca artan miktarda 5-FU varlığında kültürlenmiştir. Nihai 5-FU konsantrasyonu 10 uM idi. Hücreler daha sonra sınırlayıcı seyreltme yöntemi kullanılarak klonlanmış, ebeveyn hücrelerinin aynı büyüme kabiliyetine sahip bir alt klon seçilip ve *MDA468/FU* olarak adlandırılmıştır. *MDA468 / FU* hücreleri, 10 uM 5-FU içeren kültür ortamında tutulup, sonuçlardan *MDA468* ve *MDA468/FU* hücrelerinde 5-FU'nun büyüme inhibitör etkisi ilk önce ebeveyn ve 5-FU dirençli *MDA468* hücrelerinin 5-FU'ya kadar hayatta kaldıklarını analiz edilmiştir. *MDA468/FU* hücrelerinin 5-FU'ya hücre hayatta kalma eğrisi, *MDA468* hücrelerinininkiyle karşılaştırıldığında sağa (daha yüksek konsantrasyon tarafına) kaymıştır. *MDA468* ve *MDA468/FU* hücrelerinde 5-FU IC₅₀ değerleri sırasıyla 3.88 ± 0.30 ve 92.5 ± 5.2 uM olarak bulunmuştur (Minegaki *et al.* 2018).

Minjie ve grubu tarafından yapılan bir çalışmada, yeni bir hidroksamat bazlı HDAC inhibitörü ST-3595'in potansiyel anti-pankreas kanseri aktivitesi ele alınmıştır. ST-3595'in, hem kurulan pankreas kanseri hücre dizilerine (*PANC-1*, *AsPC-1* ve *Mia-PaCa-2*) hem de hasta kaynaklı primer kanser hücrelerine karşı güçlü bir anti-proliferatif ve sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, kanserli olmayan sağlıklı pankreas epitel (*HPDE6c7*) hücrelerine genel olarak güvenli olmuştur. Pankreas kanseri hücrelerine karşı ST-3595 kaynaklı sitotoksikite, önemli apoptoz aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. ST-3595 kaynaklı pankreas kanseri hücresi apoptozunu çarpıcı şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Özet olarak, çalışmanın sonuçlarından elde edilen bulgulara göre; ST-3595 tarafından HDAC'lerin hedeflenmesinin yeni ve gelecek vaat eden bir anti-pankreas kanseri stratejisi olarak temsil edebileceğini belirtmişlerdir (Minjie *et al.* 2015).

Singh ve grubunun bir araştırmasında DNA metil transferazları, azasitidin ve desitabinin inhibitörlerinin, HDAC inhibitörleri ile birlikte kullanıldığında, miyelodisplastik sendrom, prostat, yumurtalık ve pankreas endokrin tümör hücreleri üzerinde antitümör etkileri arttırdığı belirlenmiştir (Singh *et al.* 2018).

Tümör büyümesi ve metastazına karşı etkili aktiviteleri olan yeni nesil HDAC inhibitörleri geliştirmek amacıyla, bis ikameli aromatik amidlerin bir dizi yeni hidroksamat bazlı HDAC inhibitörü tasarlanmış, sentezlenmiş ve modifiye edilmiştir. Bileşiklerin bazıları,

in vitro sınıf I ve II b HDAC'leri inhibe etmede nanomolar IC₅₀ değerlerinin yanı sıra, kanser hücresi çoğalmasını ve göçünü bloke etmede alt mikromolar dereceli aktiviteyi de göstermiştir. Bu sonuçlara göre; elde edilen yeni bir hidroksamat bazlı, bis ikameli aromatik amid HDAC inhibitörlerinin, ileride meme kanseri büyümesi ve metastazına karşı yeni potansiyel antitümör büyümesi ve metastaz ajanları olarak geliştirilebileceğini göstermişlerdir (Yang *et al.* 2014).

Yang ve grubu tarafından yapılan bir çalışmada, antikanser aktiviteleri gösterdiği için 1,2,4-oksadiazol çekirdeğe sahip yeni bir hidroksamat bazlı bis ikameli aromatik amid HDAC inhibitörleri sınıfının tasarımı ve sentezi bildirilmiştir (Kemnitzer *et al.* 2009; Cai *et al.* 2015). Yeni sentezlenen bileşiklerin pek çoğu, kusursuz derecede HDAC1 inhibe edici etkiler ve önemli anti-proliferatif aktiviteler göstermiştir (Yang *et al.* 2019). Reaksiyon mekanizmasında tiyofenin yerine 1,2,4-oksadiazol kullanıp, daha sonra bis-ikameli aromatik amidler HDAC inhibitörü içeren bir dizi 1,2,4-oksadiazol sentezlenip antitümör aktiviteleri için değerlendirmeler yapılmıştır. Yapılar kapsamlı spektroskopik analizler sonucu 1,2,4-oksadiazol çekirdeğe sahip on üç yeni hidroksamat bazlı bis ikameli aromatik amid HDAC inhibitörü elde edilmiştir. Üç bileşik, mükemmel HDAC1 inhibe edici etkiler ve belirgin anti-proliferatif aktiviteler göstermiştir. Farklı bir çalışmada pirimidiniltiyofenil fonksiyonelliğinin bu bileşiklerin antikanser aktiviteleri için gerekli olup olmadığını araştırmak için bis-ikameli aromatik amidler hidroksamat bazlı HDAC'ler içeren bir dizi feniloksadiazol tasarlanmıştır. Hedef bileşiklerin karaciğer kanseri hücresi proliferasyonu üzerindeki inhibitör etkilerinin apoptozis artırılması ile birlikte olup olmadığını belirlemek için HepG2 kanser hücrelerine, 48 saat boyunca farklı hedef bileşik konsantrasyonları ve SAHA ile inkübe edilip FITC-Annexin V/propidium iyodür (PI) boyama ve akış sitometri deneyi yapılmıştır. Reaksiyonda belirtilen 11a ve 11c bileşiğinin dozu, HepG2 kanser hücrelerinde bağımlı olarak indüklenen apoptoz ve apoptoz yüzdesi, pozitif kontrol bileşiği SAHA'ninkinden bile daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Yang *et al.* 2019).

Literatürde, hidroksamik asitlerin çoğunlukla ilaç olarak özellikle de antikanser olarak kullanımıyla ilgili çalışmalar yer almaktadır (Yang *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2012; Anzick *et al.* 1997; Almenara *et al.* 2002; Deroanne *et al.* 2002; Loudni *et al.* 2007; Fajas *et al.* 2002; Huang and Pardee 2000; Richon *et al.* 2001; Ruefli *et al.* 2002).

Gupta ve arkadaşları tarafından hidroksamik asitlerin kimyasal yapısını, sentez yollarını ve kimyasal özelliklerini bildirmişlerdir. Metal şelatlama ve hidrojen bağlanma özellikleri hidroksamik asitleri pek çok biyolojik aktiviteye sahip olabilen bir bileşik sınıfı

haline getirmeleri hakkında bilgiler sunulmaktadır. Hidroksamik asitler tarafından inhibe edilebilen tüm önemli enzimlerin kısa bir açıklaması da vurgulanmaktadır. Hidroksamik asitler tarafından inhibe edilen en önemli enzimler, matris metaloproteinazlar, TNF-a dönüştürücü enzim, anjiyotensin dönüştürücü enzim, lipooksijenaz, LTA4 hidrolaz, üreaz, peptit deformilaz, histon deasetilaz, UDP-3-O- [R-3 hidroksisristosil] -GlnA deasetilaz, prokollajen C-proteinaz, agrekanaz ve karbonik anhidraz. Bu bilgiler ışığında hidroksamik asit grubu, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, HIV, Alzheimer, sıtma, alerjik hastalıklar, tüberküloz, metal zehirlenmesi, aşırı demir yükü gibi çeşitli hastalıklara karşı ilaç geliştirmek için farmakofor olarak önemli bir görevi üstlenmekte olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, hidroksamik asit grubundan potansiyel insektisitler, antimikrobiyaller, antioksidanlar, anti-korozif ajanlar, yanroforlar ve minerallerin etkilerinin bir aracı olarak da faydalanılmıştır. Hidroksamik asitlerin aynı zamanda hipotansif etkiler ürettikleri için etkili nitrik oksit (NO) vericileri oldukları da tartışılmaktadır (Gupta 2013).

Hidroksamatlar (R-CONHOH), enzim inhibisyonu üzerine nadiren araştırılmıştır. Tüm insan izoformlarına karşı PhCONHOH'nin inhibisyonu/yapısal çalışması rapor edilmiştir. Alifatik (R = Me ve CF (3)) ve aromatik (R = Ph) hidroksamatları CAI'ler olarak karşılaştırarak, CONHOH'nin çok yönlü bir çinko bağlama grubu olduğunu kanıtlamışlardır. R kısmının doğasına bağlı olarak, CA aktif bölgesi içindeki katalitik iyon için farklı koordinasyon modları benimseyebilir. Hidroksamat, yeni karbonik anhidraz inhibitörlerinin geliştirilmesi için çok yönlü bir çinko bağlama grubunu temsil edeceği belirtilmiştir (Di Fiore *et al.* 2012).

Trx salınımı, muhtemelen protein yapı ve fonksiyonundaki değişikliklere bağlı olarak akciğer, kolorektal, servikal, hepatik ve pankreas kanseri gibi birçok insan kanser türünde artmış olarak bulunmuştur (Tamura and Stadtman 1996; Södborg *et al.* 2000; Yoo *et al.* 2006; Cadenas *et al.* 2010; Yan *et al.* 2012).

You ve Park tarafından yapılan bir çalışmada, antikanser etkileri olan bir HDAC inhibitörü olan SAHA 'nın *HeLa* kanser hücreleri üzerindeki büyümeyi inhibe edici etkilerini değerlendirmişlerdir. SAHA, *HeLa* kanser hücrelerinin büyümesini 24 saatte yaklaşık 10 uM'lik bir IC₅₀ ile inhibe ettiğinin ve kaspaz-3 aktivasyonunun eşlik ettiği apoptozu indüklediğinin belirlemişlerdir. Test edilen tüm kaspaz inhibitörleri, SAHA'nın neden olduğu *HeLa* hücre ölümünü önlerken, TNF-a, SAHA ile tedavi edilen *HeLa* hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü yoğunlaştırmıştır. Ayrıca SAHA, *HeLa* hücrelerinde TRXR1 seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir. TRXR1'in aşağı regülasyonu, SAHA ile tedavi edilen *HeLa* hücrelerinde hücre ölüm seviyelerini arttırırken, TRXR1'in aşırı ekspresyonu bu hücrelerdeki

seviyeleri zayıflatmıştır. SAHA, *HeLa* hücrelerinde TRXR1 seviyelerini düşürmüştür. TRXR1' in aşırı ekspresyonu bu hücrelerdeki seviyeleri zayıflatmış ve sonuç olarak, SAHA, TRXR1 seviyelerinden etkilenen kaspaz bağımlı apoptoz yoluyla *HeLa* kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir (You and Park 2017).

Ayrıca, Trx-1'in lenfoid hücre kültürüne eklendiğinde ya da geni bu hücrelere aktarıldığında hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir. TRXR1'in hücre ölümüne karşı hangi mekanizma ile koruma sağladığı henüz bilinmemektedir (Powis *et al.* 1998). Meme kanseri MCF-7 hücre hattında yapılan bir çalışmada ise, kolon kanseri ve murin lenfoma hücreleri gibi çeşitli hücre serilerinin insan TRXR1 ile enfekte edilmesi sonrası VEBF (vasküler endotel büyüme faktörü) sekresyonunda önemli oranda artış görülmüştür. Buna karşın, redoks inaktif mutant Trx ile enfekte edilmesinin VEBF yapımını kısmi olarak engellemiştir (Welsh *et al.* 2002). Hücre çoğalmasının uyarılmasına olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada da TRXR1'e maruz kalan lenfositler, fibroblastlar ve birçok lösemik ve solid tümör hücre serilerinin büyüme hızında artış görülmüştür. Bu çoğaltıcı etkinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte sitokin (IL-1, IL-2 ve TNF-a) üretimindeki ve büyüme faktör (temel fibroblast büyüme faktörü) aktivitesindeki artışa bağlı olabileceği bildirilmiştir (Powis and Montfort 2001).

Tonissen ve Di Trapani tarafından yapılan bir çalışmada HDAC inhibitörü SAHA'nın *HeLa* kanser hücreleri üzerindeki fizyolojik olarak uygun konsantrasyonlarda 2.5-10 μ M'lik etkilerini değerlendirmişlerdir. SAHA dozu, *HeLa* hücre çizgisinde canlılığın azalmasına bağımlı olarak neden olduğu gözlemlenmiştir. Buna uygun olarak, *HeLa* kanser hücrelerindeki TRXR1 aktivitesi SAHA ile uygulamadan sonra azaldığı tespit edilmiştir (Tonissen and Di Trapani 2009).

TRXR1/Trx'nin biyolojik aktiviteleri ve saldırgan tümör büyümesi ile olan bağlantısı, bu sistemin kanser terapisi için önemli bir hedef olduğunu düşündürür. Çeşitli Trx/TRXR1 sistem inhibitörleri tanımlanmıştır. Trx'in aşırı ifade edilmesi ya kanser hücre büyümesinin doğrudan uyarılmasını ya da kanser hücre apoptozunun inhibisyonuna yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Trx ekspresyonunun yüksek seviyesi *in vitro* ve *in vivo* olarak invaziv ve metastatik tümör aktivitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Ceccarelli *et al.* 2008).

GST'ler, ksenobiyotik detoksifikasyon, oksidatif stres ürünlerinin temizlenmesi, protein taşınması, hücre proliferasyonunun modülasyonu ve apoptoz sinyal yolunun indüksiyonu dahil olmak üzere birçok biyolojik fonksiyonda rol oynamaktadır (Laborde 2010). Dahası, GST izozimleri (Alfa, Mu ve Pi) neoplastik dokularda sıklıkla aşırı eksprese

edilir ve akciğer, yumurtalık, meme ve mide karsinomu gibi bir dizi tümör için önemli bir belirteç olarak kabul edilmiştir (Ruzza *et al.* 2009; Zhao and Wang 2006).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda meme, kolon, prostat gibi birçok agresif tümörde aşırı seviyede eksprese olan HDAC'ların inhibisyonuna dayalı tedavi yaklaşımları kanser tedavisi için dikkat çekici olmuştur. Bu amaçla spesifiklikleri ve aktiviteleri yönünden farklılık gösteren sentetik ve doğal HDAC inhibitörleri kemoterapötik stratejiler için kullanılmaktadır. Bu inhibitörler spesifik kanser hücrelerinde hücre farklılaşmasını, hücre döngüsünü durdurmayı ve hücre ölümünü, anjiyogenezin azaltılmasını ve bağışıklık sisteminin modülasyonunu üzerinde etkili olmaktadır (Sanaei and Kavoosi 2019). HDAC inhibitörü olarak kullanılan hidroksamik asit türevlerinin yüksek antikanser potansiyeline sahip olmaları nedeniyle yeni hidroksamik asit türevlerinin sentezi son zamanlarda ilgi görmektedir (Seo *et al.* 2014). Bu tez kapsamında, küçük molekül ağırlıklı yeni amino benzohidroksamik asit türevleri sentezlenmesi ve bu türevlerin aşırı HDAC aktivitesine sahip olan insan sağlıklı fibroblast, A549, HeLa kanser hücreleri üzerine antikanser etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL METOT

Tez Kapsamında Kullanılacak Cihazlar, Kimyasal Maddeler ve Kitler

CİHAZ ADI	MARKA MODEL
Azot tankı	MVE Cryogenics cryosystem 4000
Buz makinası	Hoshizaki Rs 113100
CO ₂ inkübatörü	Esco CCL-050B-8
Derin dondurucu (-20°C), (-80°C)	Arçelik 5233 NHEY A ⁺ , Nuaire NU-9668GC
Floresans Mikroskop	Olympus CK40
Akış Sitometri	Beckman Coulter B53009
Hassas terazi	Denver Instruments Summit S-203, Gecavery (UK)
Karıştırıcı (Vorteks)	Fisons whırlı-mixer
Laminer-air akış kabin	Esco Airstream® Gen 3
Magnetik karıştırıcı	IKA C-MAG HS 7 digital, Chiltan Hotplate Magmetic Stirrer HSBI
Masa santrifüjü	MSE Mistral 2000
Mikroplak karıştırıcı	IKA MS 3
Mikroplaka okuyucu	Molecular Devices-Spectra Max Plus 384
Otoklav	Hirayama HVE-50
Otomatik pipet seti (1-1000)	Eppendorf
Peristaltik pompa	Ismatec
pH metre	Schott pH-Meter CG840
Saf su cihazı	Barnstead Easy Pure UV/UF, Human Corporation -New Human Power I
Santrifüj	Hettich® ROTANTA 460R
Soğutmalı santrifüj	Heraeus Sepatech (Suprafuge 22), Hermle Z 323 K(Germany)
Spektroflorometre	CHEBIOS s.r.l. (Optimum-one/UV-VIS)

Su banyosu	Memmert WNB 14
Ters-faz ışık mikroskobu	Olympus CK40
Ultrasonik su banyosu	Bandelin RK 102 H

KİMYASAL MADDELER	FİRMA
1-Kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)	Sigma-Aldrich
Akrilamid	Sigma-Aldrich
Brom timol mavisi	Sigma-Aldrich
Coommassie brilliant blue R-250	Sigma-Aldrich
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma-Aldrich
EDTA (Etilendiamintetraasetik asit)	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
FBS (Fetal sığır serumu)	Biowest
Fenilmetilsülfonil Flüorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Fosforik Asit (H ₃ PO ₄)	Sigma-Aldrich
G-250 Coomassie Brilliant Blue	Fluka
Glisin	Sigma-Aldrich
Glutasyon (GSH)	Sigma-Aldrich
GSSG (Okside Glutasyon)	Sigma-Aldrich
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma-Aldrich
Hidroksilamin hidroklorür (HO-NH ₂)	Sigma-Aldrich
İzopropanol	Sigma-Aldrich
Monopotasyum Fosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich
L-Tirozin p-nitrofenilasetat	Sigma-Aldrich
Metanol (MeOH)	Sigma-Aldrich
Metoksi hidroksamik asit	Sigma-Aldrich
N,N'-metilen bisakrilamid	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Sodyum nitrit (NaNO ₂)	Sigma-Aldrich

Sodyuk Hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH)	Sigma-Aldrich
Penisilin/Streptomisin	Gibco
Potasyum fosfat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich
Sepharose-4B	Sigma-Aldrich
Sodyum bikarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich
Sodyum perklorat (NaClO ₄)	Sigma-Aldrich
Sodyum sülfat (Na ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich
Standart serum albümin	Sigma-Aldrich
Steril PBS (fosfat tamponlu salin)	Sigma-Aldrich
Sülfirik asit (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich
Trihidroksimetil aminometan (Tris)	Sigma-Aldrich
Tripan mavisi (%0,4)	Gibco
Tripsin-EDTA	Sigma-Aldrich

KİT ADI	FİRMA
Caspase-3 Colorimetric Assay Kit	BioVision
Propidyum iyodür (PI) içeren FITC annexin V apoptoz belirleme kiti	BioLegend
WST-8 Hücre proliferasyonu ve sitotoksosite test kiti	Boster

Bu tez çalışmasında, yeni amino benzohidroksamik asit yapısında potansiyel HDAC inhibitörleri olabilecek 3 farklı yeni 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit, 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit, 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit) türevi sentezlendi. Sentezlenen moleküllerin karakterizasyonu ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS (Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi) ile gerçekleştirildi. Karakterizasyon sonuçlarından benzohidroksamik asit türevlerinin başarılı bir şekilde sentezlendiği anlaşıldı.

Sentezlenen bu yeni amino benzohidroksamik asit moleküllerinin antikanser ve enzim inhibisyonu aktivitelerini belirlemek için çalışmalar yapıldı.

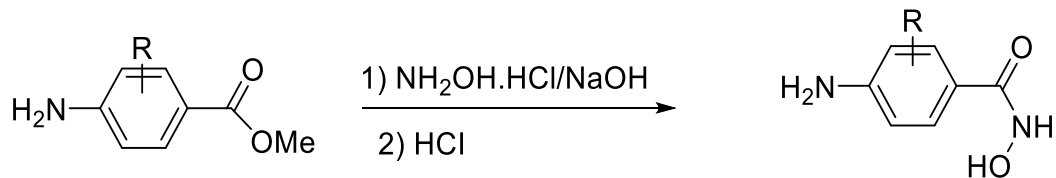
Bu aday inhibitörlerin aşırı HDAC aktivitesine sahip olan amino benzohidroksamik asit türevleri epitel kaynaklı insan sağlıklı (normal) fibroblast, A549 ve HeLa kanser hücreleri

kullanılarak antikanser potansiyel incelenmesi yapıldı. Bu türev moleküllerin kanser hücrelerinde yüksek aktivite sergiledikleri bilinen TRXR1, GST ve GR enzimleri üzerine *in vivo* inhibisyon çalışmaları gerçekleştirildi.

Hidroksamik Asit Sentezi

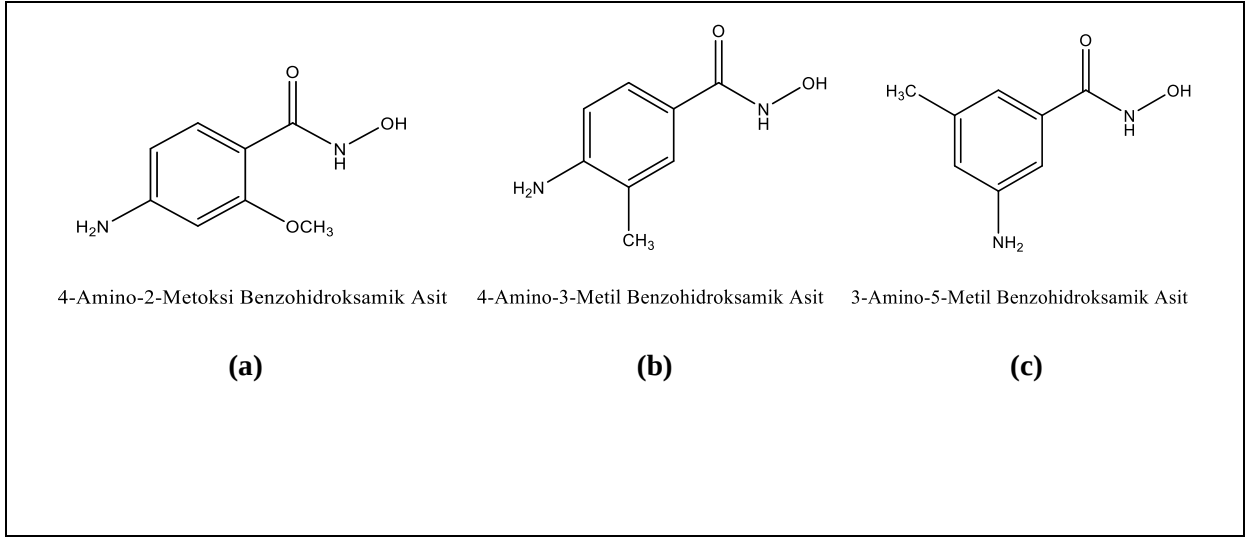
Çalışılması planlanan yeni amino benzohidroksamik asit bileşiklerin türevlerinin NH-OH formları ticari olarak bulunamadığından metil esterleri satın alınarak literatürde (Duangduan *et al.* 2015) bilinen yöntemlere göre sentezi gerçekleştirildi.

Hedeflenen amino benzohidroksamik asit türevlerinin sentezi için ilgili metil benzoat türevi metanol içerisinde çözülerek üzerine su içerisinde hazırlanan NaOH (4 ekiv.) ve hidroksilamin hidroklorür (2 ekiv.) çözeltisi yavaş yavaş ilave edildi. Oda sıcaklığında karıştırılan reaksiyon TLC ile takip edilerek reaksiyon tamamlandığında 2M HCl ile pH 5.5'e ayarlandı ve çözücü düşük basınçta uzaklaştırıldı. Elde edilen ham ürün metanolde tekrar çözülerek süzgeç kâğıdı yardımıyla katı kısım uzaklaştırıldı ve metanolde çözünmüş kısım kristallendirilerek saflaştırıldı. Elde edilen benzohidroksamik asit türevlerinin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR gibi spektroskopik yöntemlerle yapıları aydınlatıldı. NMR (400 MHz) analizleri Kimya bölümümüzde gerçekleştirildi. Moleküllerin yüksek çözünürlüklü kütle analizi ile doğruluğunun tespiti için ise Üniversitemiz bünyesinde bulunan Doğu Anadolu Araştırma Merkezi laboratuvarında bulunan Q-TOF LC/MS cihazından yararlanıldı (daytam.atauni.edu.tr/cihaz/mini-protean-tetra-cell).



Şekil 13. Hidroksamik asit sentezi genel reaksiyonu

Metoksi hidroksamik asit 25 mg alıdı 0°C civarında ve buz banyosunda 10 mL 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 mL çözelti, inhibitör çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan inhibitör 40 mL *Sefaroz-4B-L-tirozin* süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH=9,5'a çıkarılarak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı ve daha sonra 1 L saf su ve 200 mL 10 mM KH₂PO₄ (pH= 6,8) tamponuyla yıkanarak üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Whitney 1974).



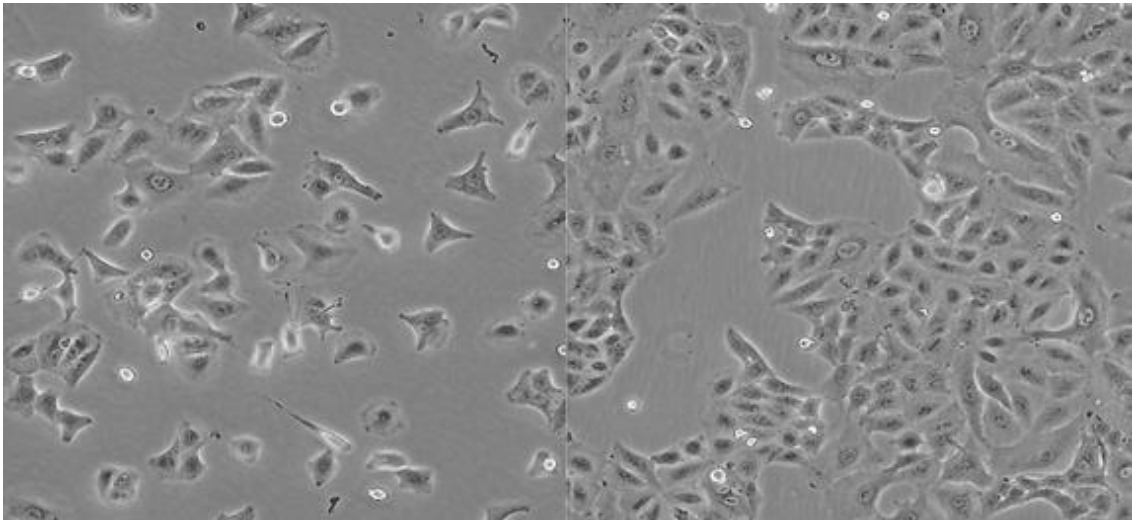
Şekil 14. Hücre kültüründe kullanılacak yeni sentezlenecek amino benzohidroksamik asit bileşikleri

Antikanser Aktivite Çalışmaları Kullanılacak Hücre Hattları

Tez kapsamında *in vitro* antikanser çalışmaları için Erzurum Teknik Üniversitesi, Yüksek Teknoloji Araştırma Merkezinde (YÜTAM) bulunan Kanseri Araştırma Laboratuvarından temin edilen epitel kaynaklı insan sağlıklı (normal) fibroblast hücre hattı, akciğer kanseri (A549) ve servikal kanseri (*HeLa*) hücreleri kullanıldı.

Akciğer kanseri hücre hattı (A549)

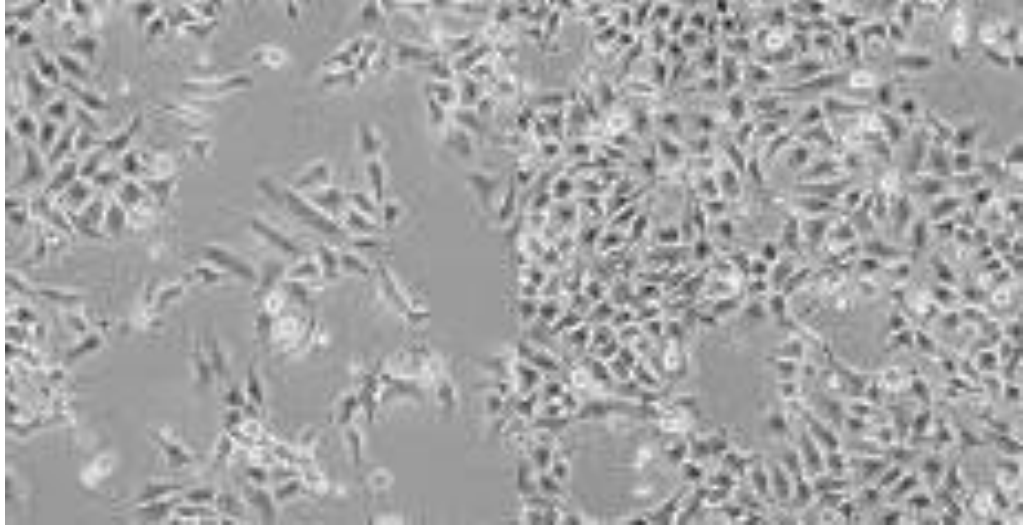
A549 kanseri hücre hattı, sürekli çalışılabilecek bir hücre hattı soyu oluşturmak için yapılan bir çalışmada 1972 yılında Giard ve arkadaşları tarafından 58 yaşındaki Orta Asya'lı bir erkeğin akciğer karsinoma dokusundan explant kültür tekniği ile izole edilmiştir (Cooper *et al.* 2016). Bu hücreler tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir (Zappa and Mousa 2016).



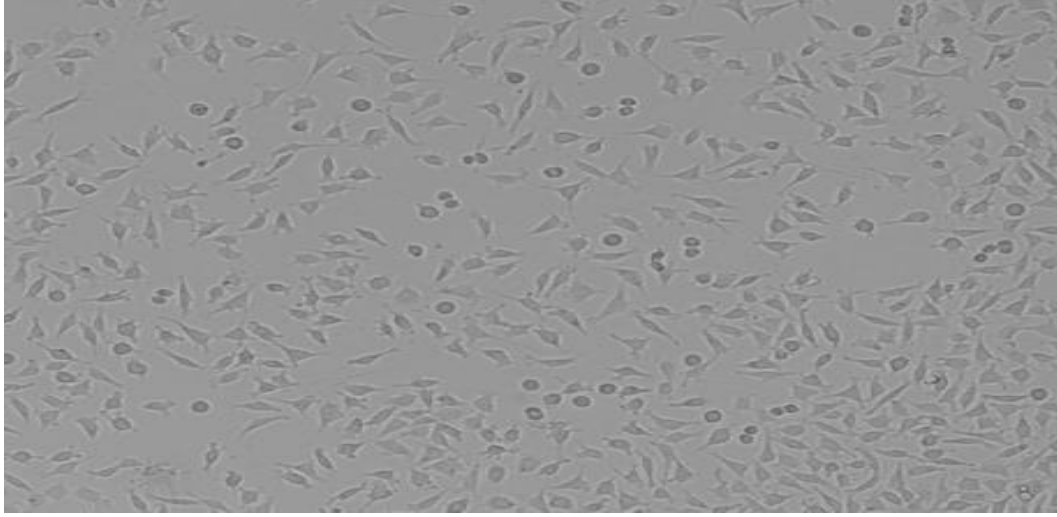
Şekil 15. İnsan akciğer kanseri hücre hattı (A549) görüntüsü (10x)

Servikal kanser hücre hattı (*HeLa*)

İzole edilen ilk insan kanseri 1951 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde servikal kanser nedeni ile takip edilen Afrika kökenli bir kanser hastasının kanser dokularının laboratuvarında kültürü yapılmıştır. Henrietta Lack adındaki bu kanser hastası kanserin metastaz yapması sonucu hayatını kaybetmiştir, ancak laboratuvarında kültürü yapılan kanser hücrelerinin adı hastanın ad ve soyadının harfleri olan “*HeLa*” adı servikal kanser hücre hattı olarak isimlendirilmiştir. Bu kanser hücrelerinin ölümsüz olması ve çok kolay üretilibilmeleri antikanserojenik çalışmalar başta olmak üzere birçok çalışmada kullanımına hız kazandırmıştır. *HeLa* kanser hücresi köken olarak epitel bir hücredir. Bu kanser hücreleri yüzeye tutunarak gelişmektedirler (Rahbari *et al.* 2009).



Şekil 16. İnsan servikal kanser hücre hattı (*HeLa*) görüntüsü (10x)



Şekil 17. İnsan sağlıklı fibroblast hücre hattı görüntüsü (10x)

Hücre kültürü çalışmaları

Epitel kaynaklı insan sağlıklı (normal) fibroblast, *A549* ve *HeLa* kanser hücreleri üzerine çalışmalarında tarif edildiği gibi DMEM-Ham's F12 (1:1) besi ortamı içinde 37 °C'de %5 CO₂ ile nemlendirilmiş inkübatörde kültüre edilerek çoğaltıldı. Hücreler her iki veya üç günde bir kontrol edildi. %70-80 konfluense ulaşan hücreler haftada en az iki kez pasajlanarak çoğaltılmıştır. Flasktaki besiyeri uzaklaştırılarak, PBS (fosfat tamponlu tuzlu su) ile üç kez yıkanmış ve % 0,1 tripsin/EDTA eklenerek 5 dk boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler flask tabanından tamamen ayrılınca, tripsini inhibe etmek amacıyla besiyeri eklenmiş ve hücreler 15 mL'lik santrifüj tüpleri içerisinde 1200 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve besiyeri ile yeni flaska süspanse edilmiştir (Zhang *et al.* 2009).

Kullanılan DMEM - Ham's F12 besi ortamının içeriği

Epitel kaynaklı insan sağlıklı (normal) fibroblast, *A549* ve *HeLa* kanser hücrelerini kültüre etmek için %10 FBS (fetal dana serumu) ve %1 penisilin-streptomisin (10.000 ünite/mL, 10 mg/mL streptomisin) ile desteklenen DMEM- Ham's F12 (1:1) besi ortamı kullanıldı.

Hücrelerin dondurulması ve saklanması

Kanser hücrelerinin stoklarının elde edilmesi için hücreler %70-80 konfluent olduktan sonra tripsin ile yüzeyden kaldırıldı. Santrifüjleme ile tripsinli medyum uzaklaştırılıp ve PBS ile yıkamadan sonra hücre pelleti %10 fetal dana serumu ve %0,5 antibiyotik ile desteklenen DMEM- Ham's F12 (1:1) besiyerinde çözdürüldü. Cryo tüplere 140 µl DMSO ve üzerine 1860 µl süspanse haldeki hücreler eklenerek -80 °C'deki soğutucuda bir gece bekletilip ve

ertesı gün Cryo tüpler -80 °C'deki soğutucudan çıkarılarak sıvı azot tankına yerleştirmek suretiyle çalışma için yeterli stoklar hazırlandı.

10X PBS pH 7.0 Çözeltisi: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ ve 2,4 g KH₂PO₄ 800 mL distile su içerisinde çözölürölerek pH'sı HCl ile 7.4'e ayarlandıktan sonra, dH₂O ile hacmi 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan PBS çözeltisi otoklavda sterilize edilerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Hücrelerin tripsinizasyon işleml ile kaldırılması

İnsan sağlıklı fibroblast, A549 ve HeLa kanser hücreleri %70-80 konfluent olduktan sonra 25 cm³'lük hücre kültür kaplarına 3 mL, 75 cm³'lük hücre kültür kaplarına ise 5 mL önceden 37°C'ye ısıtılmış tripsin ilave edilerek 1-2 dk 37°C'de inkübatörde bekletilerek hücreler yüzeyden kaldırıldı. 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjleme ile tripsinli besi ortamı uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkamadan sonra hücre pelleti DMEM-Ham's F12 (1:1) besi ortamında çözölürölerek hücrelerin tripsinizasyon işleml gerçekleştirildi.

Hemositometre ile hücre sayımı

In vitro antikanser çalışmaları için hücre kültür kaplarına ekilecek canlı sağlıklı fibroblast, A549 ve HeLa kanser hücrelerinin sayım işleml, tripan mavisi boyası kullanılarak hemositometre (thoma lamı) üzerinde gerçekleştirildi. Hücre süspansiyonundan 100 µL alınarak 2 mL'lik ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 100 µL tripan mavisi konularak homojenize edildi. Homojenize edilen süspansiyondan 10 µL alınarak hemositometrenin her iki odacığına ilave edildi. Inverted mikroskop ile canlı hücre sayısını tespit etmek maksadıyla canlı ve cansız hücreler birbirinden ayırt edilerek hücre sayımı yapıldı. Bu işlemlde tripan mavisi boya yöntemi kullanıldı. Mikroskop altında cansız hücreler boyayı absorbe ederek mavi renkte görünürken, canlı hücreler boyayı absorbe etmediklerinden dolayı parlak olarak gözlemlendi. Hücrelerin sayımı sonrasında, iki odacık ortalaması alındı ve ml başına düşen hücre sayısı şu şekilde hesaplandı;

Hesaplama (*Canlı hücre sayısı/ mL*) = *İki odacık ortalama hücre sayısı (A) x seyreltme faktörü (SF) x 10⁴*

SF = Trypan Blue ile yapılan seyreltme faktörü

10⁴ = Hemositometre boyutlarından hesaplanan faktör

Hesaplanan total hücre miktarından; WST-8 sitotoksosite testleri için 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyucuk başına 100 µL'de 1x10⁴, apoptotik ve nekrotik hücrelerin akış sitometrik sayımı için 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyucuk başına 2 mL'de 3x10⁵

canlı hücre olacak şekilde kanser hücreleri DMEM-Ham's F12 (1:1) besi ortamı ile seyreltilerek ekildi. Daha sonra ekilen hücreler 37 °C'de %5 CO₂ ile nemlendirilmiş inkübatörde 24 saat kültüre edildi.

Kanser Hücrelerine Yeni Amino Benzohidroksamik Asit Türevlerinin Uygulanması

Hücre kültür kaplarına belirlenen sayıda ekilen kanser hücrelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonunda kültür kaplarındaki besi ortamı çekilerek yerine eşit hacimde DMEM-Ham's F12 (1:1) besi ortamı ile seyreltilmiş artan (0,00975-2500 mM) konsantrasyonlarda 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a), 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b), 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) eklendi ve 37 °C'de %5 CO₂ ile nemlendirilmiş inkübatörde 24 saat daha inkübe ederek kültüre edildi.

İnkübasyon sonunda örneklerin sitotoksik aktiviteleri WST-8 testleriyle, apoptotik ve nekrotik etkileri ise akış sitometresi ile gerçekleştirildi.

Hücre Canlılık Testleri

WST-8 hücre proliferasyonu ve sitotoksikite testi

WST-8[2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H tetrazolium, monosodium salt] negatif yüklü bir bileşik olmasından dolayı hücre membranını geçememekte, ortamda bir elektron alıcı molekül varsa indirgenmekte ve suda çözülebilir bir formazan boya meydana getirmektedir. WST-8, hücrelerdeki dehidrojenaz enzimleri ile indirgenerek hücre kültürü ortamında çözünür olan turuncu renkli bir ürün (formazan) oluşturmaktadır. Hücrelerdeki dehidrojenazlar tarafından üretilen formazan boyası miktarı, canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılı olduğundan hücre proliferasyonunun direkt bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. WST- 8'in canlı hücreleri saptama hassasiyeti, diğer tetrazolyum tuzları olan MTT, XTT, MTS veya WST-1'den daha yüksektir. Bu amaçla sağlıklı fibroblast hücre hattına uygulanacak optimum kültür filtratı ve protein konsantrasyonunu belirlemek için çalışmada WST-8 hücre proliferasyon testi yapılmıştır (Kacı 2018).

Kanser hücrelerine karşı en etkili sitotoksik yeni 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a), 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b), 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)' in doz konsantrasyonlarının belirlenmesi WST-8 sitotoksikite testi kullanılarak (Volz *et al.* 2012) çalışmalarında tarif edildiği gibi değerlendirildi. WST-8 deneyi formazan oluşturmak üzere mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından tetrazolyum tuzu WST-8'in kesilmesine dayanmaktadır. 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında kanser hücrelerine artan konsantrasyonlarda 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a), 4-amino-3-metil

benzohidroksamik asit (b), 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) uygulanmasından sonra her kuyuya 10 µl WST-8 tetrazolyum tuzu ilave edildi ve hücreler 4 saate kadar 37 °C'de %5 CO₂ ile nemlendirilmiş inkübatörde inkübe edildi. Absorbans, bir mikropilaka okuyucusu kullanılarak 690 nm' de ki bir referans ile 450 nm'de ölçüldü. Uygulanan her doz için formüle göre yüzde canlılık ve sitotoksosite değerleri hesaplanarak apoptozun saptaması için uygulanacak deneylerde uygun kültür filtratı ve protein konsantrasyon aralığı belirlendi.

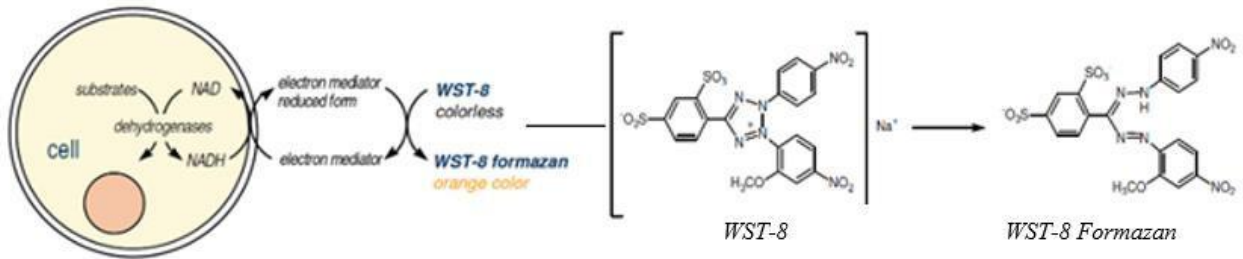
Absorbans seviyesi doğrudan canlı hücre sayıları ile ilişkilidir. Hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre yüzde değer olarak hesaplanarak ifade edildi.

$$\text{Canlı hücre oranı (\%)} = [(A_{\text{Örnek}(1-22)} - A_{\text{NK}}) / (A_{\text{PK}} - A_{\text{NK}})] * 100$$

A: Absorbans

PK: Pozitif kontrol

NK: Negatif kontrol



Şekil 18. WST-8 ile formazan bileşiğinin oluşumu (Kacı 2018).

Apoptotik ve Nekrotik Hücre Analizleri

Apoptotik ve nekrotik hücre miktarlarının belirlenmesi

Sağlıklı fibroblast, A549 ve HeLa kanser hücrelerinde apoptoz ve nekroz miktarları, ticari olarak satılan propidyum iyodür içeren Annexin V ve FITC apoptoz saptama kiti kullanılarak akış sitometrik yöntem ile kit protokolüne göre belirlendi.

Testin Prensipleri:

Bu kit, çoğu hücre tipinde bulunan ve bir membran fosfolipidi olan fosfatidilserin (PS)'in apoptozun erken safhalarında plazma membranının iç yüzeyinden hücre dış yüzeyine yaptığı translokasyon ve hücre dış yüzeyinde Fosfatidilserine yüksek afinite ile bağlanan 35,8-kDa büyüklüğündeki Annexin V proteininin oluşturduğu kompleks gözlemine dayanır. Nekrotik hücrelerin spesifik özelliklerinden biri hücre zarı bütünlüğünün kaybolmasıdır. Propidyum iyodür (PI) hücre zarı bütünlüğü kaybolmuş nekrotik hücreleri tanımlamak için kullanılır. Ayrıca, bu deney canlı hücrelerin (Annexin V-FITC negatif; PI negatif), apoptotik

hücrelerin (Annexin V-FITC pozitif; PI negatif) ve nekrotik / non-apoptotik hücrelerin (Annexin V-FITC negatif; PI-pozitif) ayırt edilmesini de mümkün kılar.

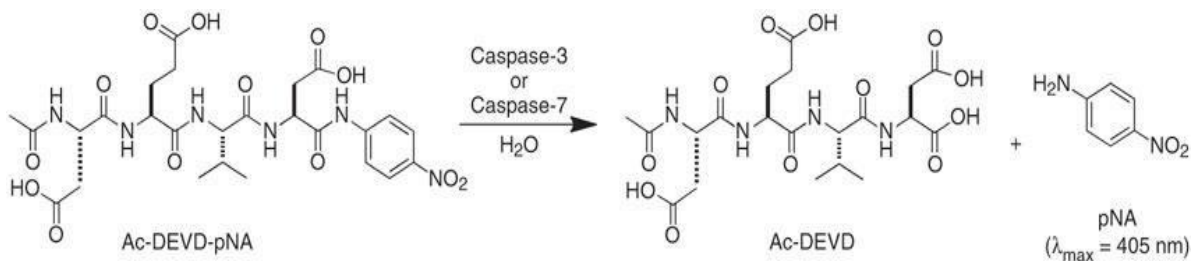
Kültüre edilen kanser hücreleri tripsinizasyon işlemiyle kaldırıldıktan sonra falkon tüplerine aktarıldı. 3×10^5 hücre /mL konsantrasyonundaki hücreler soğuk hücre boyama tamponu ile iki kez yıkandı ve daha sonra Annexin V bağlama tamponu içinde hücreler tekrar süspanse edildi. 5 mL'lik bir test tüpüne hücre süspanسیونunun 100 μ L' si aktarıldı ve sırasıyla 5 μ L FITC Annexin V, 10 μ L propidyum iyodür solüsyonu eklendi. Hücreler yavaşça vortekslenerek ve karanlıkta oda sıcaklığında (25°C) 15 dakika inkübe edildi. Her tüpe 400 μ L Annexin V bağlama tamponu eklendi. Apoptotik ve nekrotik kanser hücrelerinin yüzde miktarları 488 nm'de uyarımla bir akış sitometre cihazı ile ölçülecek ve değerler % hücre miktarı cinsinden verildi.

Apoptotik ve nekrotik hücrelerin görüntülenmesi

Apoptotik ve nekrotik kanser hücrelerinin görüntülenmesi, ticari olarak satılan PI ile FITC Annexin V Apoptoz Saptama Kiti kullanılarak floresan mikroskobu yöntemiyle kit protokolüne göre belirlendi. Bu protokole göre; apoptotik ve nekrotik hücre görüntülerinin elde edilmesi için kanser hücreleri Annexin V ile inkübe edildikten sonra hücreler yıkandı ve %2 formaldehit ile bir cam slayta sabitlendi. FITC ve rodamin çift filtre seti kullanarak bir floresans mikroskopu altında apoptotik ve nekrotik hücrelerin morfolojik yapıları incelendi.

Kaspaz-3 enzim aktivitesindeki değişimin saptanması belirlenmesi

Kaspaz-3 enzim aktivitesindeki değişiklikler apoptozun tayininde kullanılan en önemli belirteçlerden birini oluşturmaktadır. Bu yöntemde DEVD-pNA, kaspaz-3 enzimi için işaretlenmiş bir substrat olarak kullanılmakta ve enzim aktivitesi sonucu kromofor p-nitroanilid (pNA)' in 405 nm'deki absorbans değerine göre sonuçlar elde edilmektedir.



Şekil 19. Kaspaz-3 enzim aktivitesi reaksiyonu (Kacı 2018).

Apoptotik hücrelerde kaspaz-3'ün aktive olması veya aktivitesinin artması hücresel apoptozun iç yolak üzerinden tetiklendiğinin göstergesi olarak kabul edilir. Kanser

hücrelerinin kaspaz-3 aktivitelerinin *in vitro* olarak belirlenmesi Kaspaz-3/CPP32 Kolorimetrik Analiz kiti kullanılarak üretici firmanın tarifine göre yapıldı.

Buna göre;

1. 6 kuyucuklu platelere $1 \times 10^6/2$ mL /kuyu olacak şekilde ekim yapılmış ve belirlenen konsantrasyonlarda ilaç uygulaması gerçekleştirildi.
2. 24 veya 48 saat sonunda, kuyucuklardaki hücreler tripsin yardımıyla (500 µL) ile kaldırıldı ve 15 mL' lik falkonlar içerisine toplandı. Hücrelerin alındığı kuyucuklar, soğuk 1 mL PBS ile yıkandı ve alınan hücreler de önceki falkonlara eklendi.
3. 10 dk 1000 rpm' de ve 15-17°C de santrifüj edildi.
4. Süpernatant dikkatli şekilde uzaklaştırıldı.
5. Pellet üzerine 50 mL soğuk "hücre lizis tamponu" içerisinde çözüldükten sonra, steril epandorflara alınarak 10 dk buz üzerinde inkübe edildi.
6. 4 °C' de 10,000 x g'de 1 dakika santrifüjlen yapıldı.
7. Analiz için süpernatant (sitosolik ekstrakt) taze bir tüpe aktarıldı ve hızlı bir şekilde buza konuldu.
8. Süpernatant üzerine 100 µL hücre lizis tamponu eklendi.
9. Her bir örnekten 50 µL alınarak 2 tekrar olacak şekilde 96 kuyucuklu platelere aktarıldı. Reaksiyon Tamponu (10 mM DTT içeren) eklendi.
10. 5 µL 4 mM DEVD-pNA substratı (200 µM son konsantrasyon) eklenecek ve 37 °C'de 2 saat boyunca inkübe edildi.
11. Örnekler bir mikrotitre plaka okuyucusu yardımıyla 405 nm'de okutuldu.
12. Elde edilen sonuçlar kontrol seviyesi ile karşılaştırılarak CPP32 aktivitesindeki artış belirlendi.

Annexin-V analizi ile apoptotik hücre popülasyonunun saptanması

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan başka bir metod ise hücre membranı içerisinde bulunan fosfotidilserin (PS) lokasyonunun belirlenmesidir. Fosfotidilserin sağlıklı hücrelerde membranın iç kısmında bulunmakta, apoptotik hücrelerde ise ekstraselüler kısımda bulunmaktadır. Bu durumun belirlenebilmesi için çalışmada "Annexin A5-FITC Kit-Apoptosis Detection Kit" kit protokolü izlenmiştir. Kit protokolüne uygun olarak 6 kuyucuklu platelere, her kuyucukta 1×10^6 sağlıklı fibroblast hücreleri /2 mL olacak şekilde ekim yapıldı ve CVDK-8 analizi sonucu belirlenen konsantrasyonlarda (%50) kültür filtratı ve IC₅₀ değerinde protein örnekleri hücrelere uygulandı. 48 saatlik inkübasyon sonrası, hücreler toplandı ve iki kez soğuk PBS ile yıkanarak 4°C'de 500 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant

atılarak oluşan pellet soğuk “1X bağlama tamponu” içerisinde çözündürülmüş ve 100 µL hücre süspansiyonu için, buz üzerinde cam FACS tüpleri içerisine transfer edildi ve her bir örneğin üzerine 5 µL propidyum iyodür (PI) ve 1 µL annexin A5-FITC eklendi. Tüp buz üzerinde 15 dk karanlıkta inkübe edildi ve son olarak 400 µL soğuk “1X bağlama tamponu” eklenerek, sonuçlar akış sitometri cihazında analiz edildi.

İstatistiksel Analizler

Tüm ölçümler GraphPad Prism 5.01 yazılımı ile istatistiksel analizler yapıldı ve karşılaştırılabilir veri setleri değerlendirildi ve analizler, Student’s two-tailed t-test kullanılarak yapıldı. $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

($p > 0.05$ =ns (önemsiz), $p < 0.05$ = *(önemli), $p < 0.01$ =** (çok önemli), $p < 0.001$ =*** (yüksek derecede önemli))

Sentezlenen Amino Benzohidroksamik Asit Moleküllerinin Sağlıklı Fibroblast, A549 ve HeLa Kanser Hücrelerinde TRXR1, GST ve GR Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Sağlıklı fibroblast, A549 ve HeLa kanser hücreleri için kullanılan komplet besiyeri Ham's F-12K bazal medyum içerisinde %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin olacak şekilde hazırlandı. Sağlıklı fibroblast, A549 ve HeLa kanser hücreleri için komplet besiyeri DMEM bazal medyum içerisinde %10 FBS, %1 L-Glutamin ve %1 penisilin/streptomisin olacak şekilde hazırlandı. Fibroblast, A549 ve HeLa kanser hücreleri komplet medium içerisinde 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilerek çoğaltıldı. Her 2-3 günde bir, hücrelerin besiyeri değiştirildi. Hücre yoğunluğuna ve deneysel amaca bağlı olarak %70-80 konfluensiye ulaşımlarsa 6-7 günde bir hücreler tripsin-EDTA (0.25%) yardımıyla kaldırılarak pasajlandı. Hücreler dondurma besiyeri komplet besiyeri içerisinde %5’lik DMSO) içerisinde dondurularak -80°C’de saklandı. (Cheng *et al.* 2016; Cooper *et al.* 2016).

Protein Ekspresyon Analizi

Total proteinin homojenatının hazırlanması

1. Hücre kültürüne uyumlu steril petri kaplarının her birine 1×10^6 hücre olacak şekilde 10’ar mL komplet besiyeri içerisinde hazırlanan sağlıklı fibroblast, A549 ve HeLa kanser hücreleri ekildi. Yapışmaları ve %60-70 konfluensiye ulaşmaları için 37°C’de %5’lik CO₂ ayarlı inkübatörde bekletildi.
2. İnkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırıldı, petrilere 2mL Dulbecco'nun fosfat tamponlu salini (DPBS) ile yıkandı ve DPBS aspire edildi.

3. Muamele grubu olarak, taze komplet besiyeri içerisinde ve daha önce belirlenen IC_{50} konsantrasyonlarında hazırlanan 10 mL liken asitleri petri kaplarına eklendi. $37^{\circ}C$ de %5'lik CO_2 ayarlı inkübatörde zaman bağımlı olarak (48 saat) inkübe edildi. Kontrol grubuna ise sadece komplet besiyeri ilave edildi. Her bir grup 3'er tekrerrür olacak şekilde hazırlandı.
4. İnkübasyon sonrasında besiyeri aspire edildi ve soğuk DPBS tamponu ile yıkama yapıldı. Buz üzerine konulan her bir petri kabına 500 μL 1X lizis tampon eklendi. Lizis tampon olarak 5.1 mM Fenilmetilsülfonil Flüorid (PMSF) içeren Radyoimmuno çökeltme tahlil tamponu (RIPA) kullanıldı.
5. 5 dk buz üzerinde bekletildi ve kazıyıcılar yardımıyla hücreler petri kaplarından kazınarak 1,5 mL'lik ependorf tüplerde toplandı. Vorteksenerek $+4^{\circ}C$ 'de sonikatörde kısa süreli parçalama yapıldı.
6. 14.000 g'de 10 dk $+4^{\circ}C$ 'de santrifüjlendi ve süpernatant alınarak alikuatlara ayrıldı ve daha sonraki deneyler için kullanılabilecek $-80^{\circ}C$ 'de saklandı (Shankaranarayanan and Nigam 2003).

Tiyoredoksin Redüktaz 1 (TRXR1) Aktivite Ölçümü

TRXR1 aktivitesi ölçülürken 5,5'-Di tiyo-bis-(2-nitrobenzoik Asit) (DTNB) yöntemi kullanıldı, bu yöntemde tiyoredoksin redüktaz NADPH bağımlı olarak DTNB'deki disülfid bağlarının redüksiyonunu katalizlemesi esas alınmaktadır (Holmgren 1977). Deneyde 100 mM potasyum fosfat pH 7'de 10 mM EDTA, 0,2 mM NADPH, 0,2 mg/mL sığır serum albümin, %1 etanol ve 5mM DTNB karışıma eklendi. 1000 μL 'lik küvetteki karışıma enzim (1-50 μL), $25^{\circ}C$ 'de eklendi ve 412 nm'de absorpsiyon artışı belirlenerek ve spektrofotometre ile kaydedildi. Küvet spektrofotometreden çıkarılmadan her 60 saniyede bir aktivite ölçümü yapıldı. Bu işleme 3 dakika boyunca devam edildi. Daha sonra Lambert-Beer denklemi kullanılarak 1 dakikada harcanan DTNB miktarı belirlendi. Aktivite dakikada DTNB oksidasyonunun belirlenmesine dayanmaktadır. Hücre özleri küçük değişikliklerle Holmgren ve Björnstedt tarafından hazırlanan yöntemle göre hazırlandı ve toplam TRXR1 aktivitesi açısından analiz edildi (Holmgren and Bjornstedt 1995).

Aktivite Ölçüm Çözeltileri:

1. 100 mM KH_2PO_4 (pH: 7,0) /10 mM EDTA: 1,36 g KH_2PO_4 ve 0,374 g EDTA tartılarak 90 mL saf suda çözüldü, pH 7'ye ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2. 2 mM NADPH çözeltisi: NADPH dan 0,0083 g tartılarak bir miktar saf suda çözöldü, hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.
3. 0,2 mg/mL sığır serum albümin çözeltisi: 1 mg sığır serum albümin alınarak hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlandı.
4. 5 mM DTNB çözeltisi: 0,00991g DTNB tartılarak üzerine %98'lik etanolden 5 mL ilave edildi. Vortekslenerek iyice çözünmesi sağlandı.

Enzim Aktivitesinin Belirlenmesinde 412 nm'de absorbans artışı her 60 saniyede bir 3 dakika boyunca ölçölecektir. Enzimin aktivitesi aşağıda verilen formölle hesaplanacaktır.

$$\text{Enzim Aktivitesi (EÜ/mL)} = \frac{\Delta OD}{13,6} * \frac{VT}{VE} * Sf * \frac{1}{2}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (mg/mL)} = \frac{EÜ/mL}{mg/mL}$$

EÜ/ml: 1 mL'deki enzim ünitesi

ΔOD: Bir dakikadaki absorbans değışimi

14,15: Ekstriksiyon katsayısı

V_T: Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E: Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

SF: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır).

Tablo 1. TRXR1 Aktivitesinin Belirlenmesindeki Küvet İçeriğı

Çözeltiler	Numue tüpü (µL)	Kontrol tüpü (µL)
100 mM potasyum fosfat /	200,0	200,0
10 mM EDTA tamponu		
Sığır serum Albumin (0,2 mg/ml)	100,0	100,0
Enzim çözeltisi	20,0	20,0
Saf su	480,0	580, 0
NADPH (0,2 Mm)	100,0	0
DTNB (5 mM)	100,0	100,0
Toplam hacim	1000	1000

Glutatyon S-Transferaz (GST) Aktivite Ölçümü

Tümör hücrelerine anti-kanser ajanın girmesiyle birlikte hücre içinde GSH düzeyinde ve GST enziminin ifadesinde artış olmaktadır. Hücre içinde GSH en fazla bulunan tiyol grubu içeren bir tripeptiddir. Bu bileşik GST enziminin fizyolojik substratı olarak görev yapmaktadır (Meister and Anderson 1983).

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 0,1 M KH₂PO₄ (pH:6,5): 0,68 g KH₂PO₄ ve 0,014 g EDTA tartılarak 30 mL saf su içerisinde çözüldü ve pH 6,5'a ayarlandı. Son hacim destile 50 mL olacak şekilde saf su tamamlandı.
2. 20 mM GSH Çözeltisi: 0,03 g indirgenmiş glutatyon alınarak bir miktar saf suda çözüldü ve hacim destile su ile 5 mL'ye tamamlandı.
3. 25 mM CDNB Çözeltisi: 0,025 g 1-kloro 2,4 dinitrobenzen alınarak bir miktar %95'lik etanol çözeltisi içerisinde çözüldü ve hacmi etanol ile 5 mL'ye tamamlandı.

Glutatyon S-transferaz enzimi bir glutatyon molekülü ile bir aromatik elektrofilin konjugasyonunu katalizlemektedir. En çok kullanılan aromatik elektrofil 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'dir. Bu substratın kullanılmasıyla oluşan dinitrobenzen 5- glutatyon (DNB-SG) ürünü 340 nm'de maksimum absorbanans göstermektedir (Meister and Anderson 1983).

Tablo 2. GST Aktivite Ölçümünde Kullanılan Küvet İçeriği

Çözeltiler	Numune tüpü (µL)	Kontrol tüpü (µL)
0,5 M Aktivite Tamponu	200	200
25 mM CDNB	20	20
20 mM GSH	50	50
Saf su	730	710
Enzim çözeltisi	-	20
Toplam hacim	1000	1000

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD}{9,6} * \frac{V_T}{V_E} * SF$$

EÜ/ml: 1 mL'deki enzim ünitesi

ΔOD: Bir dakikadaki absorbanans değişimi

9,6: 340 nm' de 1Mm DNB-SG' nin ekstiraksiyon katsayısı

V_T: Ölçümün yapıldığı küvetin toplam hacmi

V_E: Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

SF: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnekler için kullanılır).

Glutatyon Redüktaz (GR) Aktivite Ölçümü

GR aktivitesinin belirlenmesi iki temel esasa göre belirlenmektedir. Bu esaslardan birincisi; reaksiyonda reaksiyona giren NADPH 340 nm’de maksimum absorbans vermektedir. Reaksiyon ortamına katılan glutatyon redüktaz enzimi NADPH’ın azalmasına neden olmaktadır. Bu azalma spektrofotometrik olarak 340 nm’de takip edilmektedir (Carlberg and Mannervik 1985). Yöntemin ikincisi ise aynı reaksiyonda ürün olarak ortaya çıkan GSH’nın 5,5’-ditiyobis-(2- nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyonu sonucu oluşturduğu bileşiğin 412 nm’de verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak takip edilmesidir. GR enzimi GSH’ ın zamanla artmasını sağlamakta, oluşan GSH da DTNB ile reaksiyona girerek absorbans artışına sebep olmaktadır (Smit *et al.* 1988). GR enziminin aktivite ölçüm yöntemlerinden birincisi daha spesifik olduğu için tercih edilmektedir. Yaptığımız çalışmada daha özgül yöntem olması bakımından birinci yöntemi esas aldık. Glutatyon redüktaz enzim aktivitesi FAD’li ve FAD’sız olmak üzere iki değişik ölçüm yapılmaktadır. Bazen biri bazen de her iki türlü ölçüm yapılarak karşılaştırma yapılmaktadır. Çalışmamızda FAD’sız ölçüm yapıldı (Akkemik vd 2011).

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 0,1 M KH_2PO_4 (pH:7,5): 0,68 g KH_2PO_4 tartılarak yaklaşık 40 mL saf suda çözülmesi sağlandı, Ph:7,5’ e ayarlandı ve toplam hacim 50 mL’ ye tamamlandı.
2. 20 mM GSSG Çözeltisi: 61,88 mg okside glutatyon tartılarak bir miktar saf suda çözüldü ve toplam hacim 5 mL’ ye tamamlandı.
3. 2 mM NADPH Çözeltisi: 8,3 mg NADPH alınarak bir miktar saf suda çözüldü. Saf suyla 5 mL’ye tamamlandı (Taşer ve Çiftçi 2010).

Tablo 3. GR Aktivite Ölçümünde Kullanılan Küvet İçeriği

Çözeltiler	Numue tüpü (µL)	Kontrol tüpü (µL)
50 mM Tris/HCl, 1mM EDTA	200	200
25 mM CDNB	20	20
20 mM GSSG	50	50
2 mM NADPH	50	50
Saf su	730	710
Enzim çözeltisi	-	20
Toplam hacim	1000	1000

Enzim ünitesi hesaplanırken aşağıdaki formül kullanıldı:

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD}{6,22} * \frac{VT}{VE} * SF$$

Bu formülde yer alan simgeler aşağıda açıklandı;

E $\ddot{U}$ /ml: 1 mL'deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değışimi

6,22: 1 mM NADPH'ın oluşturduğu absorbans değeri (ekstinsiyon katsayısı)

VT: Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

VE: Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

SF: Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

ARAşTIRMA BULGULARI

Spektrumlar

¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları

¹H-NMR Bruker 400 MHz spektrometre

¹H-NMR Varian 400 MHz spektrometre

¹³C-NMR Bruker 100 MHz Spektrometre

¹³C-NMR Varian 100 MHz Spektrometre

Kütle spektrumu

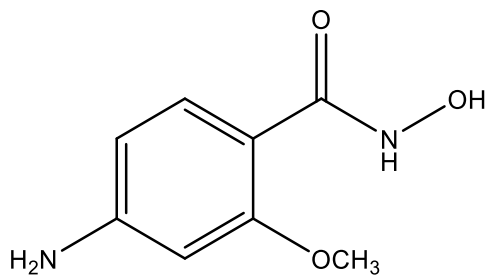
Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS

Hidroksamik Asitlerin Sentezi

Genel prosedür

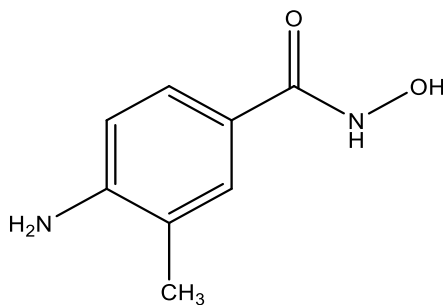
Hedeflenen benzohidroksamik asit türevlerinin sentezi için ilgili metil benzoat türevi metanol içerisinde çözülerek üzerine su içerisinde hazırlanan NaOH (4 ekiv.) ve hidroksilamin hidroklorür (2 ekiv.) çözeltisi yavaş yavaş ilave edildi. Oda sıcaklığında karıştırılan reaksiyon TLC ile takip edilerek reaksiyon tamamlandığında 2M HCl ile pH 5,5'e ayarlandı ve çözücü düşük basınçta uzaklaştırıldı. Elde edilen ham ürün metanolde tekrar çözülerek süzgeç kâğıdı yardımıyla katı kısım uzaklaştırıldı ve metanolde çözünmüş kısım kristallendirilerek saflaştırıldı. Elde edilen benzo hidroksamik asit türevlerinin ¹H-NMR, ¹³C NMR ve HRMS (Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi) gibi spektroskopik yöntemlerle yapıları aydınlatıldı. NMR (400 MHz) analizleri kimya bölümümüzden alınarak ve moleküllerin kütle analizi ile doğruluğunun tespiti için ise Üniversitemiz bünyesinde bulunan Doğu Anadolu Araştırma Merkezi laboratuvarında bulunan Q-TOF LC/MS cihazından yararlanıldı (daytam.atauni.edu.tr/cihaz/mini-protean-tetra-cell).

4-Amino-2-Metoksi Benzohidroksamik Asit (a)



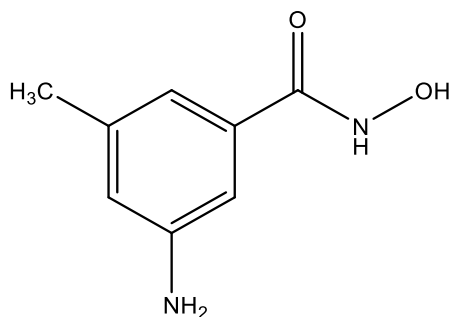
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.11 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 7.49 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.18 (s, 1H), 6.17 -6.14 (m, 2H), 5.69 (s, 2H), 3.75 (s, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 164.5, 159.1, 153.8, 132.6, 108.3, 106.7, 96.5, 55.8; Q-TOF (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$: $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ için hesaplanan: 182,0691, bulunan: 182,0702.

4-Amino-3-Metil Benzohidroksamik Asit (b)



^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.71 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.33 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 5.35 (s, 2H), 2.03 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 165.8, 150.3, 129.8, 126.5, 120.5, 120.1, 113.3, 18.1; Q-TOF (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$: $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ için hesaplanan: 166,0742, bulunan: 166,0754.

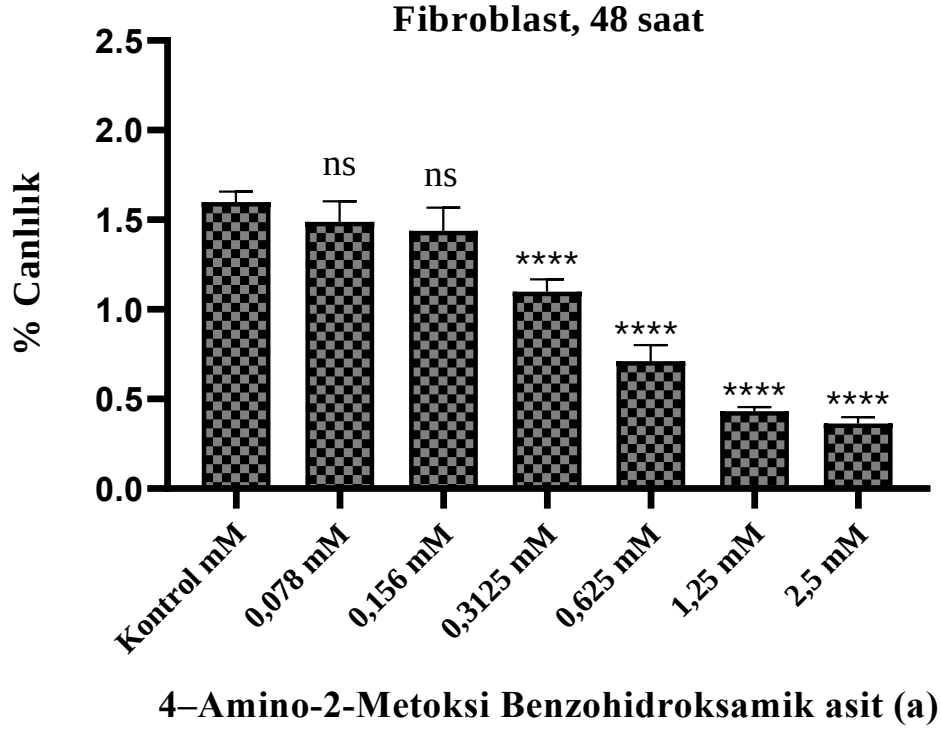
3-Amino-5-Metil Benzohidroksamik Asit (c)



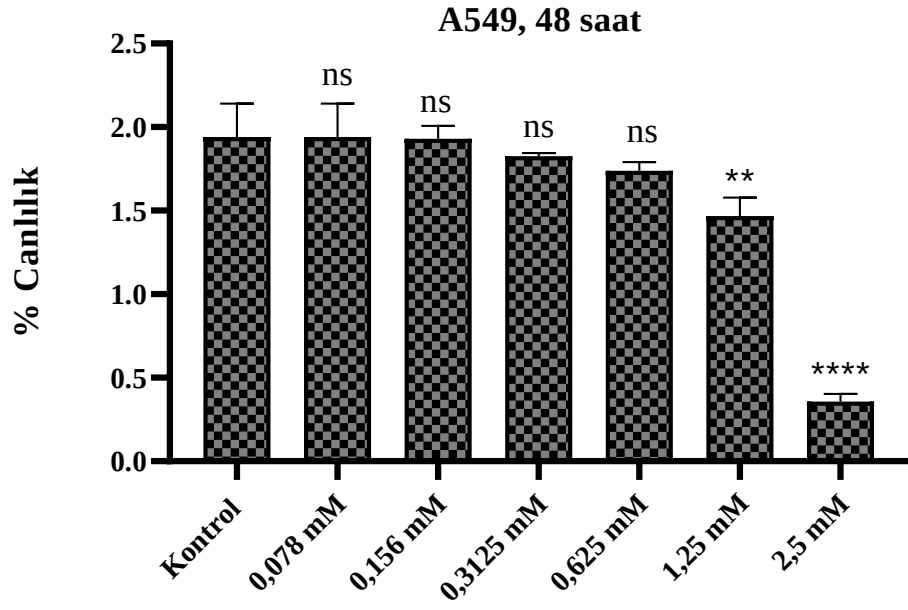
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.63 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 6.84 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.49 (dd, J = 8.0, 2.3 Hz, 1H), 6.47 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 2.10 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 167.5, 146.8, 135.7, 131.5, 122.5, 115.6, 113.7, 18.9. **Q-TOF** (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$: $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ için hesaplanan: 166,0742, bulunan: 166,0755.

Sağlıklı Fibroblast, A549 ve *HeLa* Kanser Hücre Canlılığının WST-8 Testi ile Analizi

Amino benzohidroksamik asit yapısında sentezlenen (4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a), 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b), 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)) moleküller sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücreleri üzerine antikanser potansiyel etkileri araştırıldı. WST-8 testinde 48 saatlik 2,5 mM, 1,25 mM, 0,625 mM, 0,3125 mM, 0,156 mM, 0,078 mM konsantrasyon değerleri için hücre canlılığı etkileri araştırıldı ve sonuçlar verildi. Uygulama her bir molekül için ayrı ayrı gerçekleştirildi.

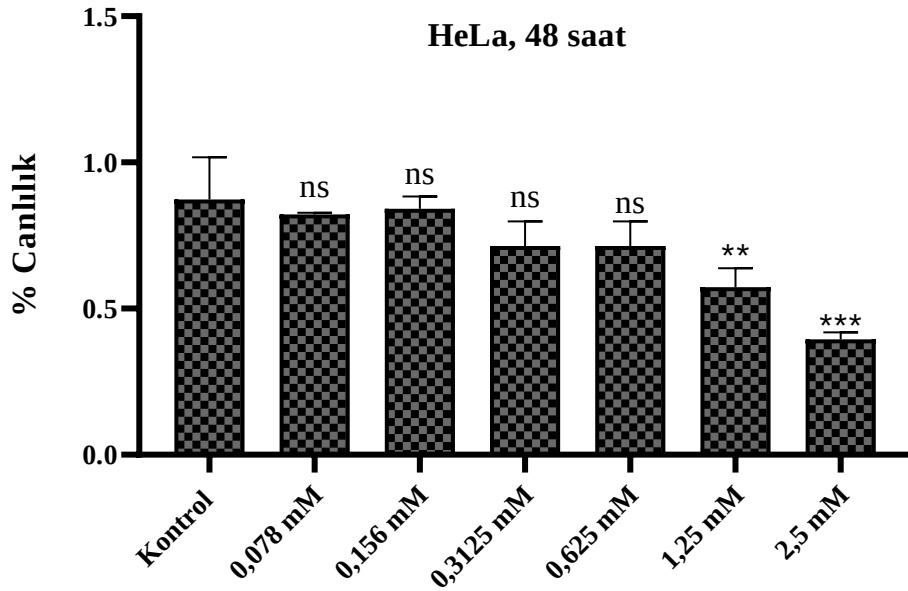


Şekil 20. 4-Amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) molekülünün konsantrasyonuna bağlı sağlıklı fibroblast hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları
($p > 0.05$ =ns (önemsiz), $p < 0,05$ =* (önemli), $p < 0,01$ =** (çok önemli), $p < 0,001$ =*** (yüksek derecede önemli))



4–Amino-2-Metoksi Benzohidroksamik asit (a)

Şekil 21. 4–Amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) molekülünün konsantrasyonuna bağlı A549 kanser hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları
($p > 0.05 = \text{ns}$ (önemsiz), $p < 0.05 = *$ (önemli), $p < 0.01 = **$ (çok önemli), $p < 0.001 = ****$ (yüksek derecede önemli))



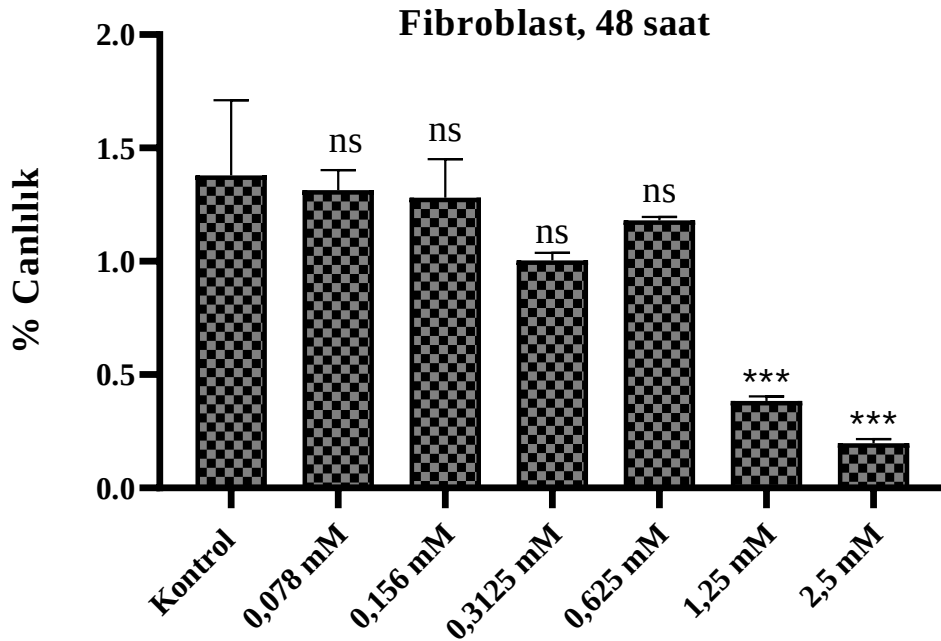
4–Amino-2-Metoksi Benzohidroksamik asit (a)

Şekil 22. 4–Amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) molekülünün konsantrasyonuna bağlı HeLa kanser hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları
($p > 0.05 = \text{ns}$ (önemsiz), $p < 0.05 = *$ (önemli), $p < 0.01 = **$ (çok önemli), $p < 0.001 = ****$ (yüksek derecede önemli))

Sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücrelerine uygulanan 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) doz konsantrasyonları arttıkça hücrelerin canlılık oranlarının doza bağımlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Sağlıklı fibroblast hücrelerine uygulanan 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) molekülünün canlılık oranları sırasıyla %100, %93,06, %89,94, %68,75, %44,52, %27,02, %22,79 olarak tespit edildi. 4-Amino-2-metoksi benzohidroksamik asit' in IC₅₀ değeri 0,55 mM doz olarak belirlendi. Bu nedenle sonraki çalışmalar IC₅₀ değerleri kullanılarak gerçekleştirildi.

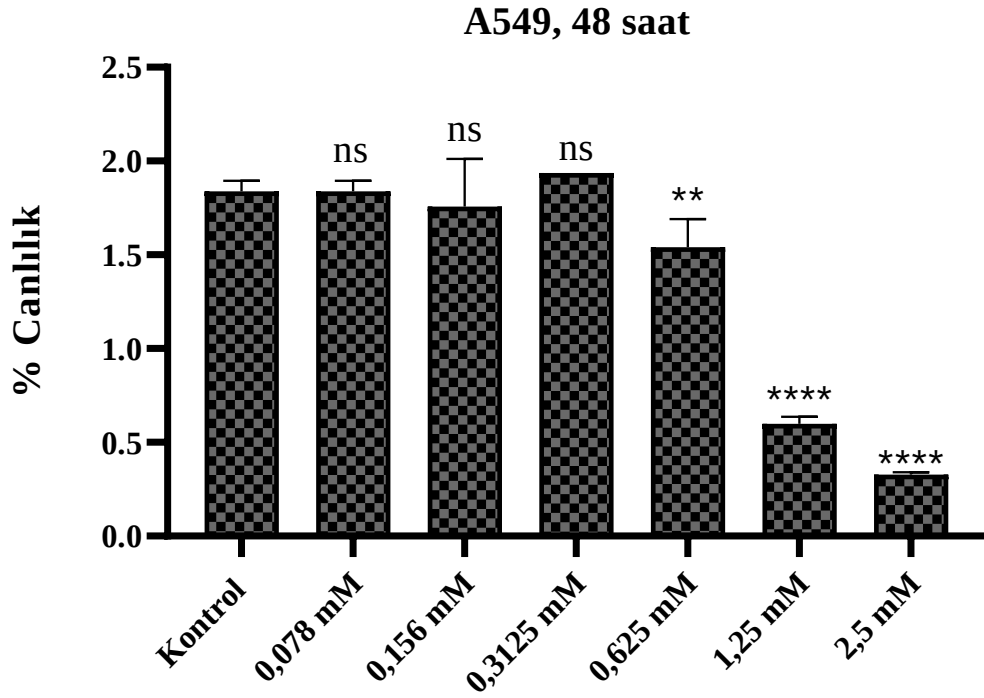
A549 kanser hücrelerine uygulanan 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) molekülünün canlılık oranları sırasıyla %100, %100, %99,45, %94,12, %89,53, %75,61, %18,36 olarak tespit edildi. 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a)' nın IC₅₀ değeri hücre ölümüne yol açan 1,8 mM olarak belirlendi.

HeLa kanser hücrelerine uygulanan 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) molekülünün canlılık oranları sırasıyla %100, %94,20, %96,33, %81,83, %81,79, %65,61, %45,27 olarak tespit edildi. 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a)' in IC₅₀ değeri hücre ölümüne yol açan 2,2 mM olarak belirlendi.



4-Amino-3-Metil Benzohidroksamik asit (b)

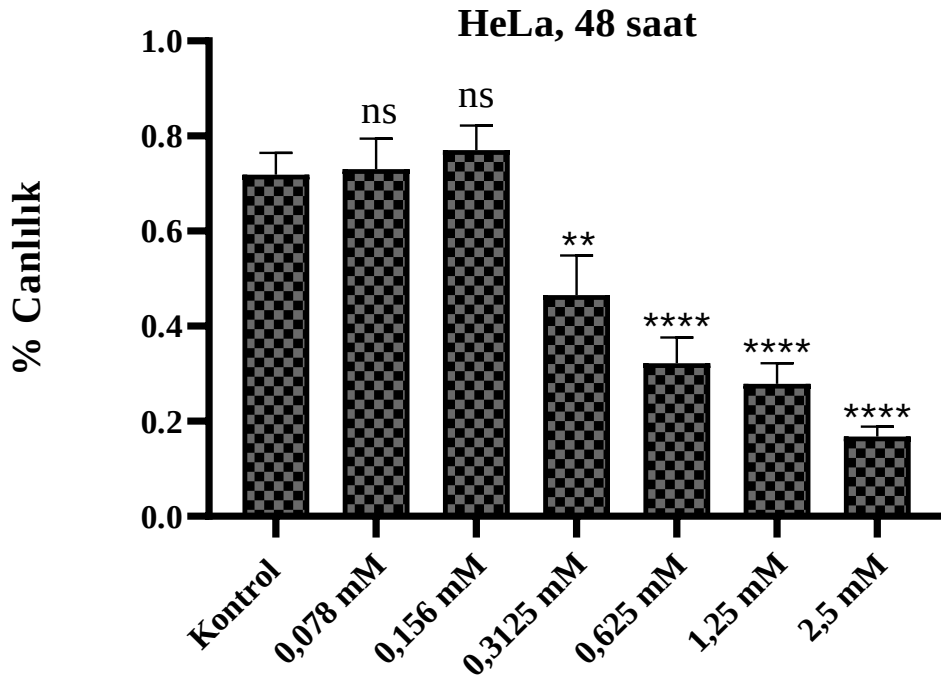
Şekil 23. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) molekülünün konsantrasyonuna bağlı sağlıklı fibroblast hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları
($p > 0.05$ =ns (önemsiz), $p < 0.05$ =*(önemli), $p < 0.01$ ** (çok önemli), $p < 0.001$ *** (yüksek derecede önemli))



4-Amino-3-Metil Benzohidroksamik asit (b)

Şekil 24. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) molekülünün konsantrasyonuna bağlı A549 kanser hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları

($p > 0.05$ =ns (önemsiz), $p < 0.05$ =* (önemli), $p < 0.01$ =** (çok önemli), $p < 0.001$ =*** (yüksek derecede önemli))



4-Amino-3-Metil Benzohidroksamik asit (b)

Şekil 25. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) molekülünün konsantrasyonuna bağlı HeLa kanser hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları

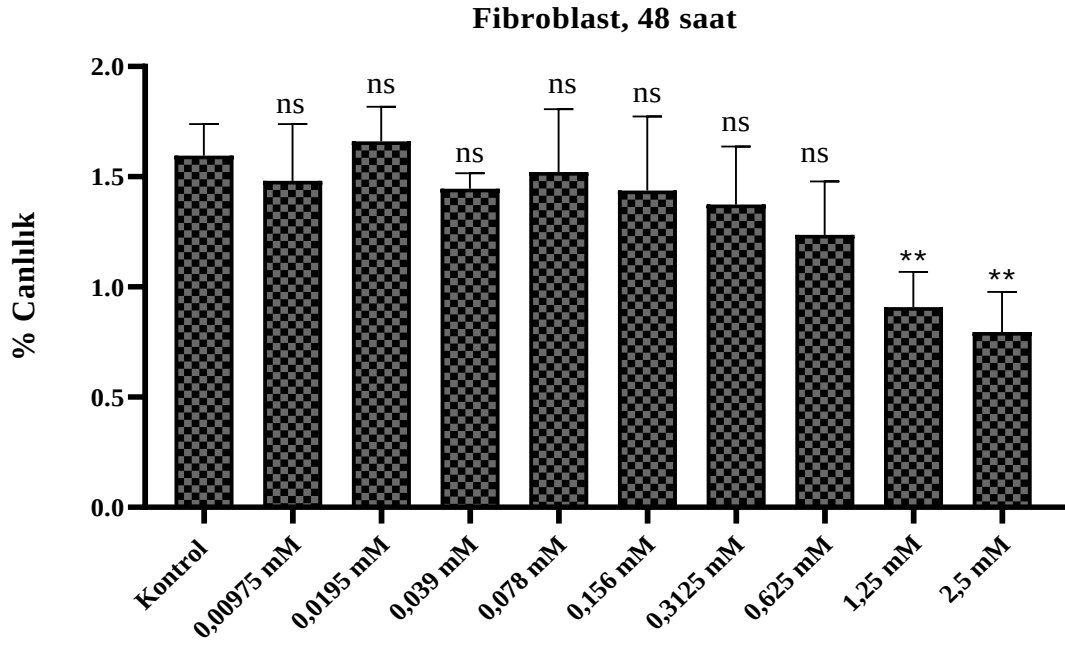
($p > 0.05$ =ns (önemsiz), $p < 0.05$ =* (önemli), $p < 0.01$ =** (çok önemli), $p < 0.001$ =*** (yüksek derecede önemli))

Sağlıklı fibroblast hücrelerine uygulanan 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) molekülünün canlılık oranları sırasıyla %100, %95,28, %92,84, %72,79, %85,60, %27,85, %14,27 olarak tespit edildi. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit' in IC₅₀ değeri 1,01 mM olarak belirlendi. Bu nedenle sonraki çalışmalar IC₅₀ değerleri kullanılarak gerçekleştirildi.

A549 kanser hücrelerine uygulanan 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) molekülünün canlılık oranları sırasıyla %100, %100, %95,63, %105,35, %83,78, %32,61, %17,89 olarak tespit edildi. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b)' in IC₅₀ değeri 1,03 mM olarak belirlendi.

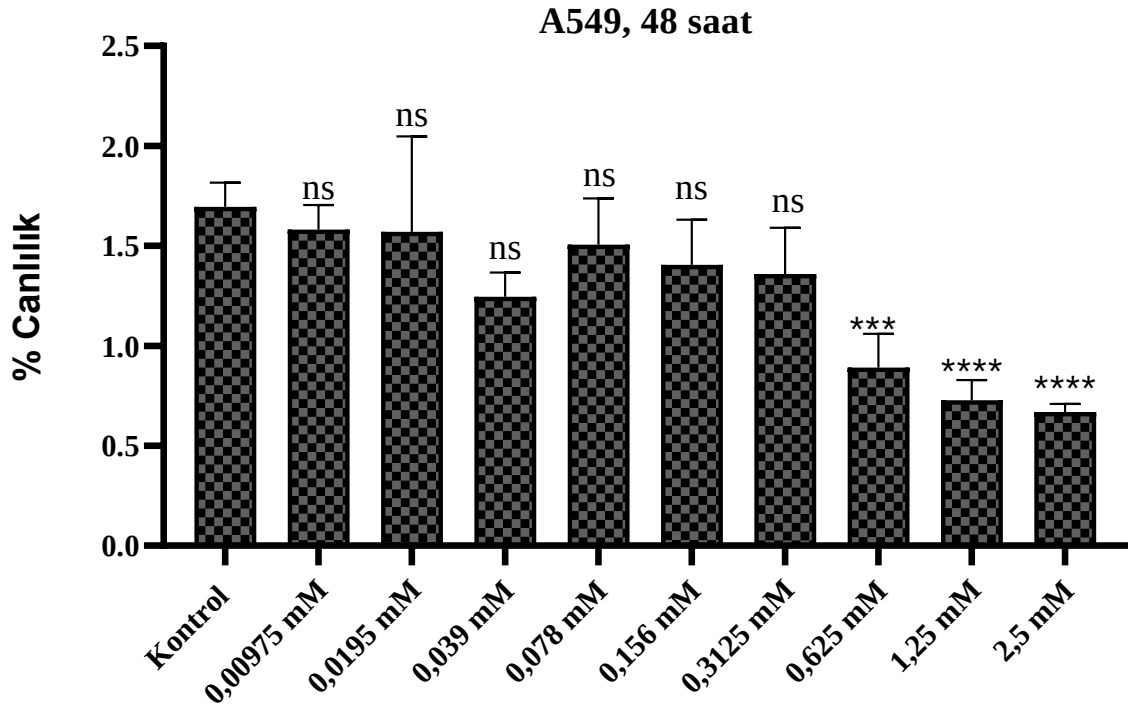
HeLa kanser hücrelerine uygulanan 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) doz konsantrasyonları arttıkça hücrelerin canlılık oranlarının doza bağımlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. *HeLa* kanser hücrelerine uygulanan 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) molekülünün canlılık oranları sırasıyla %100,% 101,26, %107,09, %64,72, %44,74, %38,80, %23,32 olarak tespit edildi. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b)' in IC₅₀ değeri 0,54 mM olarak belirlendi.

Amino benzohidroksamik asit yapısında sentezlenen 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) molekülünün sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücreleri üzerine antikanser potansiyel etkileri araştırıldı. WST-8 testinde 48 saatlik 2,5 mM, 1,25 mM, 0,625 mM, 0,3125 mM, 0,156 mM, 0,078 mM, 0,039 mM, 0,0195 mM ve 0,00975 mM konsantrasyon değerleri için hücre canlılığı etkileri araştırıldı ve sonuçlar verildi. Uygulama her bir molekül için ayrı ayrı gerçekleştirildi.



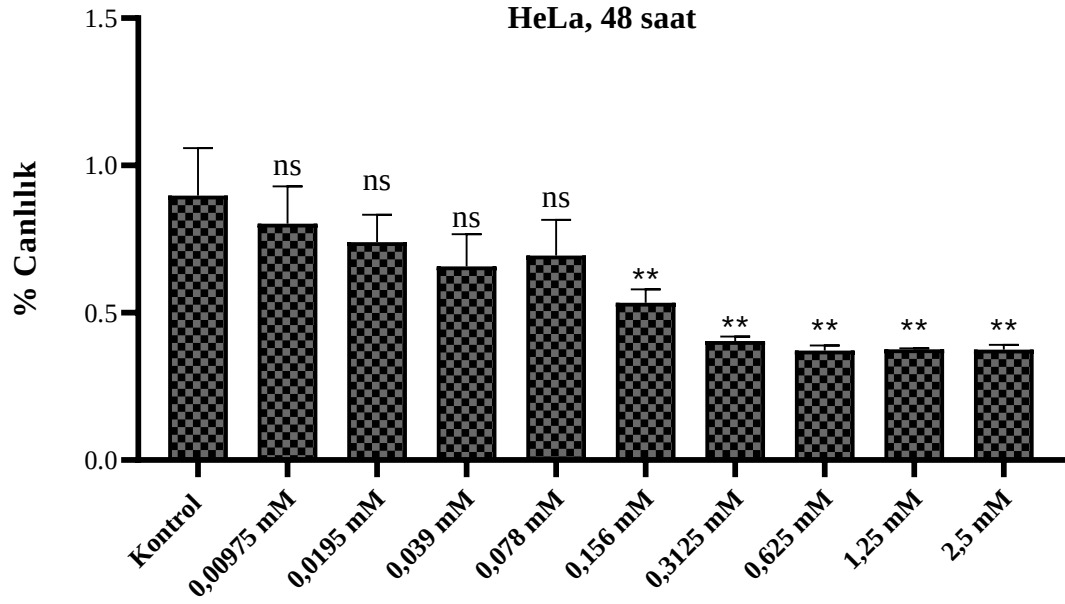
3-Amino-5-Metil Benzohidroksamik asit (c)

Şekil 26. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) molekülünün konsantrasyonuna bağlı sağlıklı fibroblast hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları
($p > 0.05 = ns$ (önemsiz), $p < 0.05 = *$ (önemli), $p < 0.01 = **$ (çok önemli), $p < 0.001 = ***$ (yüksek derecede önemli))



3-Amino-5-Metil Benzohidroksamik asit (c)

Şekil 27. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) molekülünün konsantrasyonuna bağlı A549 kanser hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları
($p > 0.05 = ns$ (önemsiz), $p < 0.05 = *$ (önemli), $p < 0.01 = **$ (çok önemli), $p < 0.001 = ***$ (yüksek derecede önemli))



3-Amino-5-Metil Benzohidroksamik asit (c)

Şekil 28. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) molekülünün konsantrasyonuna bağlı *HeLa* kanser hücre hattında 48 saatlik WST-8 sonuçları

($p > 0,05 = ns$ (önemsiz), $p < 0,05 = *$ (önemli), $p < 0,01 = **$ (çok önemli), $p < 0,001 = ***$ (yüksek derecede önemli))

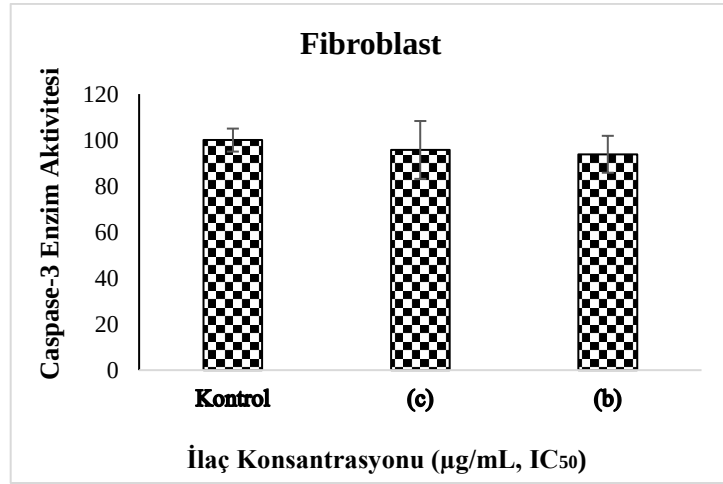
Sağlıklı fibroblast hücrelerine uygulanan 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)'nin hücre canlılık oranları sırasıyla %100, %92,80, %104,0, %90,58, %95,29, %90,08, %86,07, %77,40, %56,93, %49,80 olarak tespit edildi. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) molekülü için IC_{50} değeri 2,46 mM doz konsantrasyon değeri olarak belirlendi. Bu nedenle sonraki çalışmalar IC_{50} değerleri kullanılarak gerçekleştirildi.

A549 ve *HeLa* kanser hücrelerine uygulanan 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) doz konsantrasyonları arttıkça hücrelerin canlılık oranlarının doza bağımlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Buna göre kontrol grubu ve artan konsantrasyonlardaki 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit gruplarında A549 kanser hücre hattında hücre canlılık oranları sırasıyla %100, %93,25, %92,66, %73,47, %88,86, %82,85, %80,21, %52,51, %42,96, %39,48 olarak tespit edildi. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)'nin IC_{50} değeri 0,78 mM olarak belirlendi. *HeLa* kanser hücre hatında ise hücre canlılık oranları sırasıyla %100, %89,36, %82,48, %73,31, %77,32, %59,50, %45,01, %41,41, %41,85, %41,81 olarak tespit edildi. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)'nin IC_{50} değeri 0,25 mM olarak belirlendi.

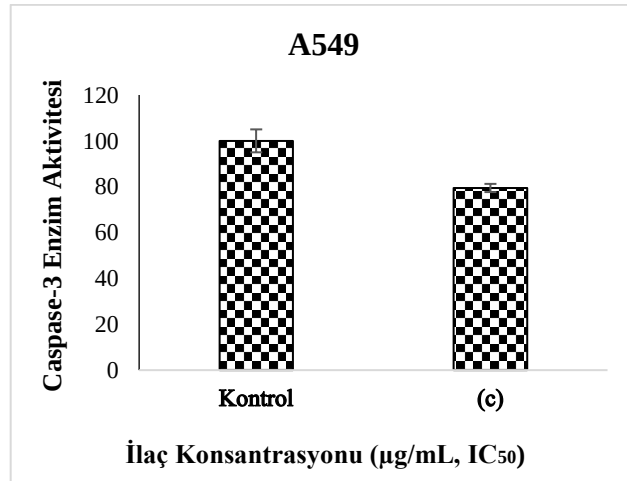
Kaspaz-3 Enzim Aktivitesindeki Değişimin Saptanması

Sentezlenen amino benzohidroksamik asit yapısındaki moleküllerin sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini değerlendirmek için, kaspaz-3 enzim aktivitesindeki değişiklikler önemli bir belirteç olarak kullanılmaktadır.

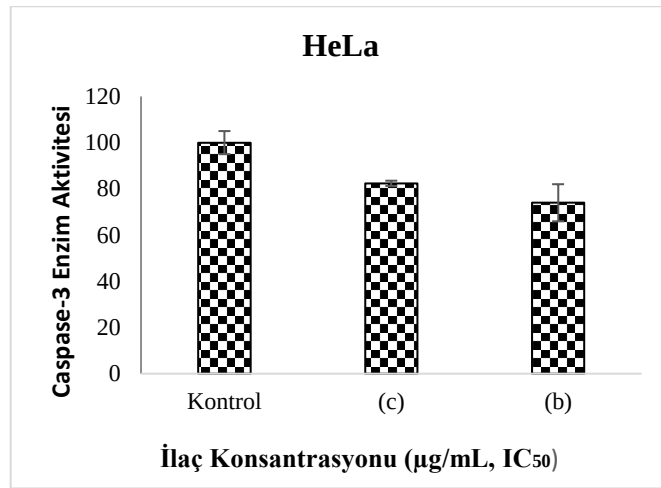
Benzohidroksamik asit türevleri sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücreleri üzerine uygulandı ve kontrol grubu olarak ise herhangi bir uygulama yapılmamış hücreler kullanılarak, 48 saat süreyle 37°C’de inkübe edildi.



Şekil 29. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c), 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b)’ nin sağlıklı fibroblast hücrelerinde Kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 30. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)’ nin A549 kanser hücrelerinde Kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 31. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) ve 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)' nin *HeLa* kanser hücrelerinde Kaspaz-3 enzim aktivitesi üzerine etkisi

3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) molekülünün sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücrelerine uygulandı ve sonuçlar kontrol grubu ile kıyaslandığında kaspaz-3 enzim aktivitesi sırasıyla % 20, %18 ve %5 oranında azaldığı tespit edildi. Tüm örnekler üç tekrar çalışıldı.

4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) molekülünün sağlıklı fibroblast ve *HeLa* kanser hücrelerine uygulandı ve sonuçlar kontrol grubu ile kıyaslandığında kaspaz-3 enzim aktivitesi sırasıyla %27 ve %6 oranında azaldığı tespit edildi. Tüm örnekler üç tekrar çalışıldı ve bu gözlemler neticesinde kaspaz-3 de gözlenen azalma hücrelerin apoptozdan ziyade nekroza yönlendirme eğilimi sergilediği tespit edildi.

Annexin-V Testiyle Apoptotik Hücre Popülasyonu

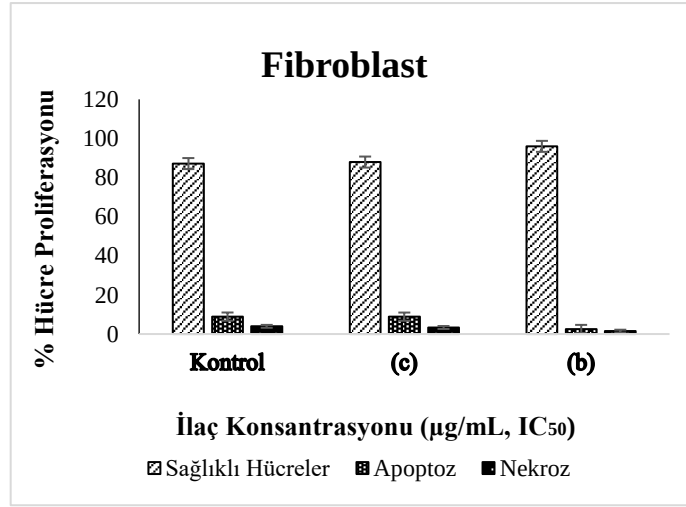
Sentezlenen amino benzohidroksamik asit yapısındaki moleküllerin sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücrelerini üzerinde hangi yolağı kullanarak ölüme götürdüğü ise Annexin-V analizi ile akış sitometri cihazı kullanılarak belirlendi. Sentezlenen bu moleküller (IC₅₀) sağlıklı fibroblast hücre hattına uygulandı, ardından apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonları belirlendi.

Bu deney için yalnızca %50'lik doz tercih edildi. Çünkü %100'lük uygulanan doz sonucunda yeterli hücre sayısına ulaşılammıştır. Kontrol grubu olarak, önceki deneylerde olduğu gibi, herhangi bir uygulama yapılmamış olan hücreler (hücre + besiyeri) kullanıldı ve tüm örnekler üç tekrar çalışıldı.

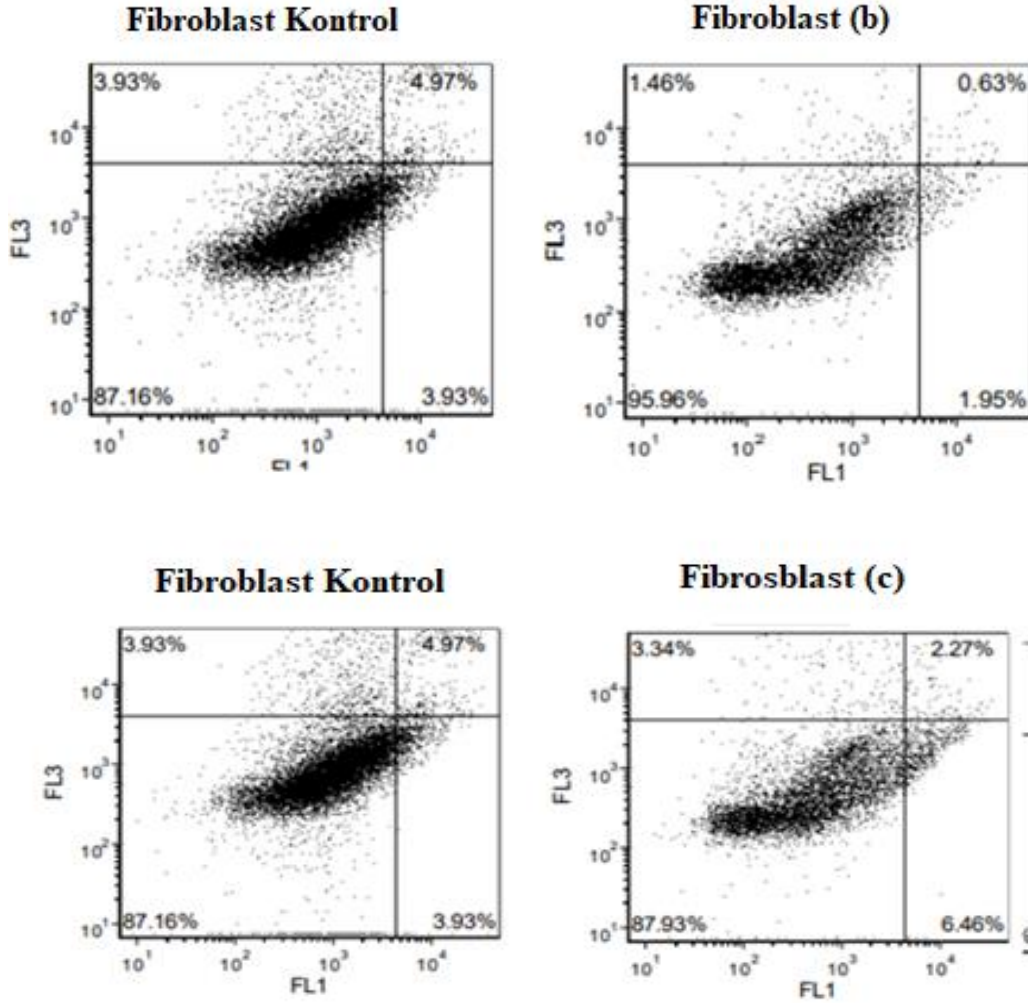
Amino benzohidroksamik asit yapısındaki moleküllerin sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücrelerine uygulanması sonucu apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarında meydana gelen değişiklikler belirlendi. Analiz sonuçlarından hücre hatlarına uygulanan

örneklerin kanser hücrelerini apoptozdan ziyade nekroza yönlendirme eğilimi sergilemekte olduğu belirlendi.

A

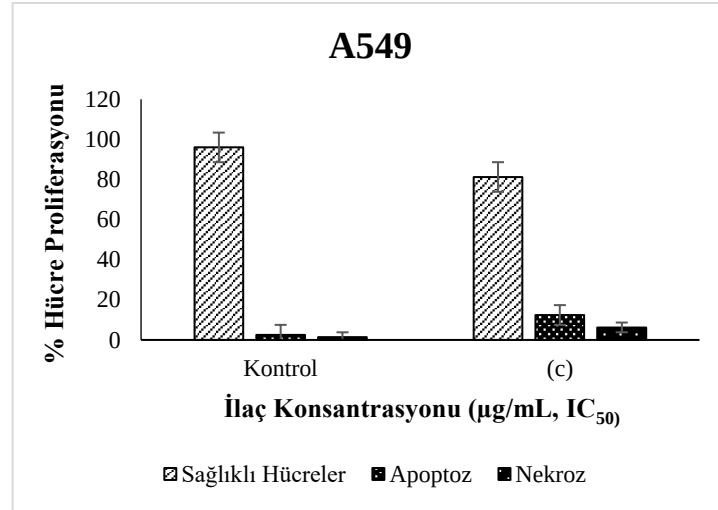
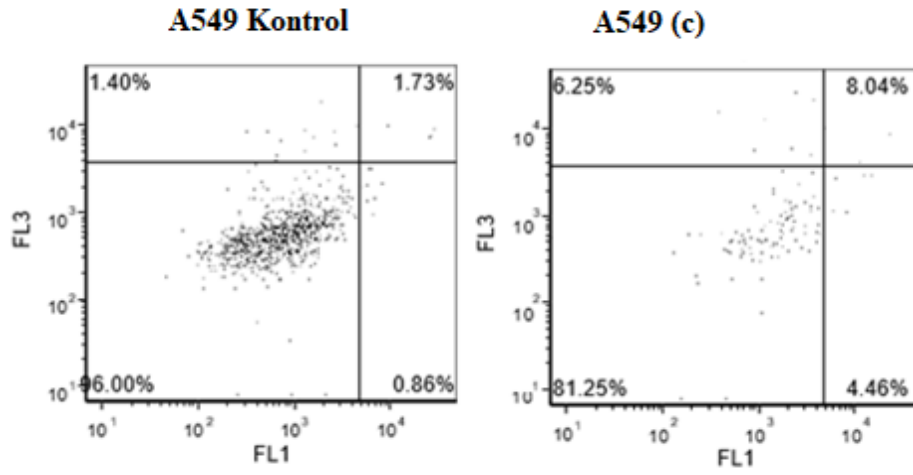


B

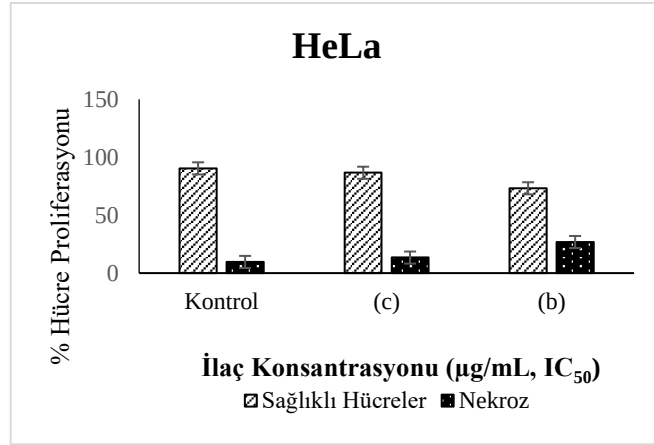
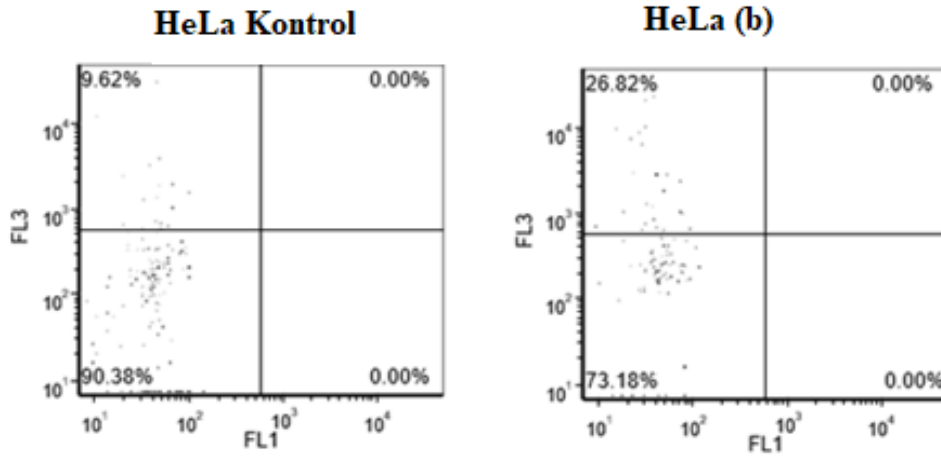
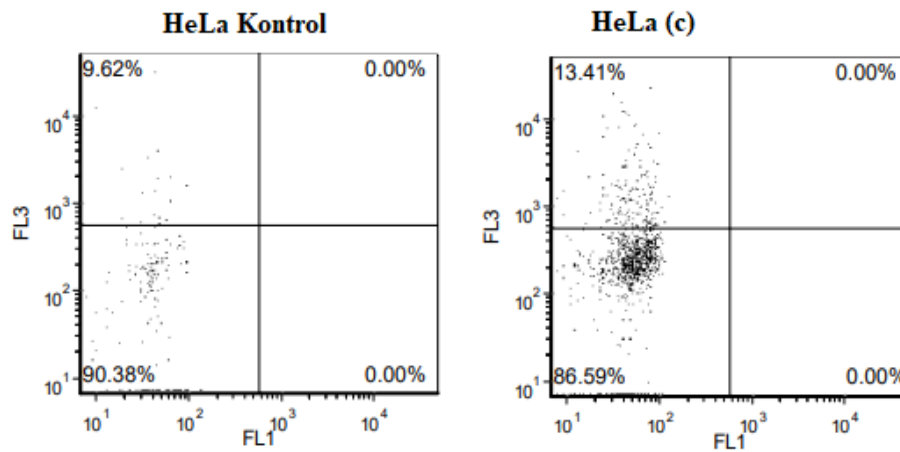


C

Şekil 32. (A) 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) ve 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)' nin % apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonu üzerine etkisi (B)-(C) Akış sitometri görüntüleri

A**B**

Şekil 33. (A) 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)' nin % apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonu üzerine etkisi (B) Akış sitometri görüntüsü

A**B****C**

Şekil 34. (A) 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) ve 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)' nin % apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonu üzerine etkisi (B)-(C) Akış sitometri görüntüleri

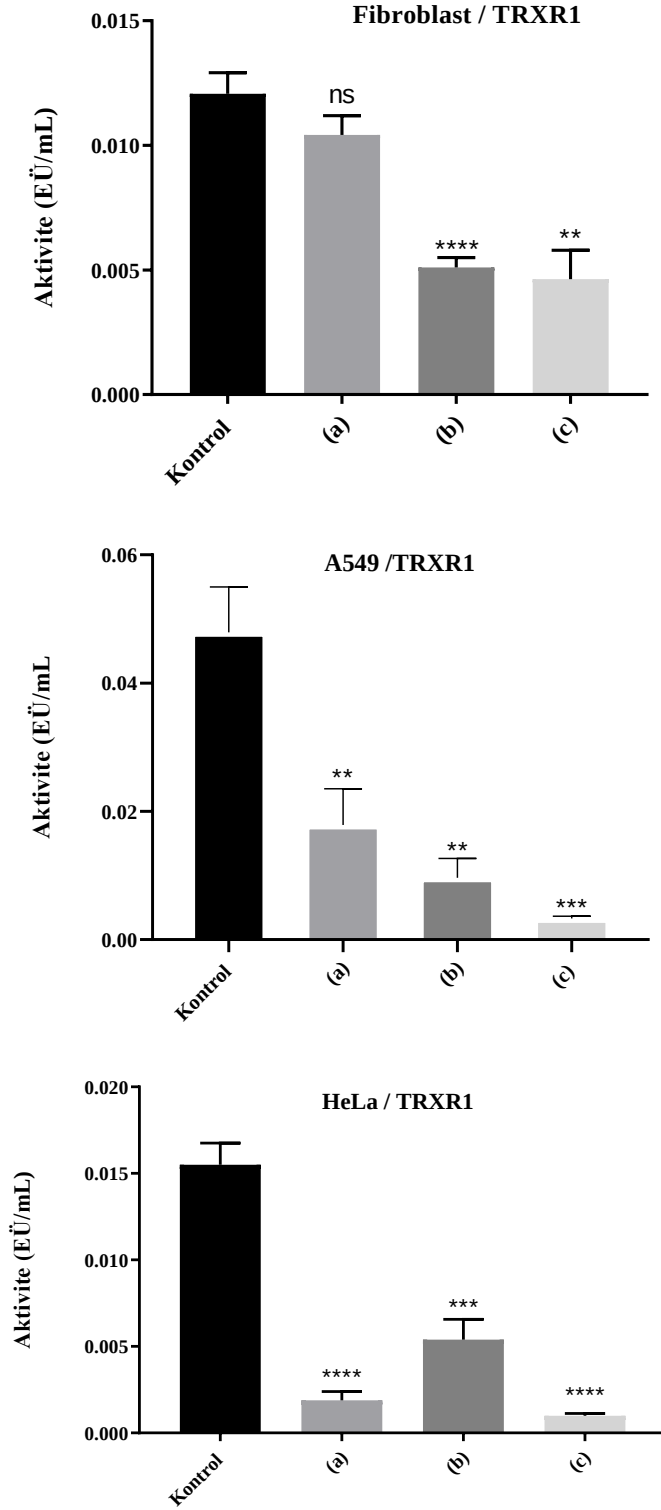
Sağlıklı fibroblast hücreleri üzerine ilk olarak uygulama yapılmadığında kontrol %87,16 iken apoptoz ve nekroz hücre popülasyonları sırasıyla %8,9 ve %3,93 olarak belirlendi. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) molekülü uygulandığında, kontrol %87,93 iken apoptoz ve nekroz hücre popülasyonları sırasıyla %8,87 ve %3,34 olarak bulundu. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) uygulandığında, kontrol %95,96 iken apoptoz ve nekroz hücre popülasyonları sırasıyla; %2,25 ve %1,46 olarak tespit edildi.

A549 kanser hücreleri üzerine ilk olarak uygulama yapılmadığında kontrol %96 iken apoptoz ve nekroz hücre popülasyonları sırasıyla; %2,59 ve %1,4 tespit edildi. Fakat A549 kanser hücreleri üzerine 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) uygulandığında ise kontrol %81,25 iken apoptoz ve nekroz hücre popülasyonları sırasıyla %12,44 ve %6,25 olarak bulundu.

HeLa kanser hücreleri üzerine ilk olarak uygulama yapılmadığında kontrol %90,38 iken nekrotik hücre popülasyonu %9,62 olarak bulundu. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) molekülünün *HeLa* kanser hücreleri üzerine uygulandığında, kontrol %86,59 iken nekrotik hücre popülasyonları %13,41 olarak bulundu. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) molekülünün *HeLa* kanser hücreleri üzerine uygulandığında, kontrol %73,18 iken nekrotik hücre popülasyonları %26,82 olarak bulundu. *HeLa* kanser hücreleri üzerine yapılan kaspaz 3 sonuçlarından 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) ve 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) moleküllerinin ağırlıklı olarak nekroz ölüm olduğundan apoptoz testi yapılmadı.

Sentezlenen Amino Benzohidroksamik Asit moleküllerinin Sağlıklı Fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücrelerinde TRXR1 Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelendiği Çalışmanın Sonuçları

4-Amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a), 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) ve 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) moleküllerinin TRXR1 aktivitesi üzerine etkilerini incelemek amacıyla hazırlanan sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücre lizatlarında enzim aktiviteleri ölçüldü. GraphPad Prism 7 programı kullanılarak sonuçların istatistik hesaplamaları t-test analizi ile değerlendirildi, sonuçlar kontrol gruplarıyla kıyaslandı ve değişiklikler anlamlandırıldı. ($p > 0.05$ =ns (önemsiz), $p < 0.05$ = *(önemli), $p < 0.01$ =**(çok önemli), $p < 0.001$ =***(yüksek derecede önemli)



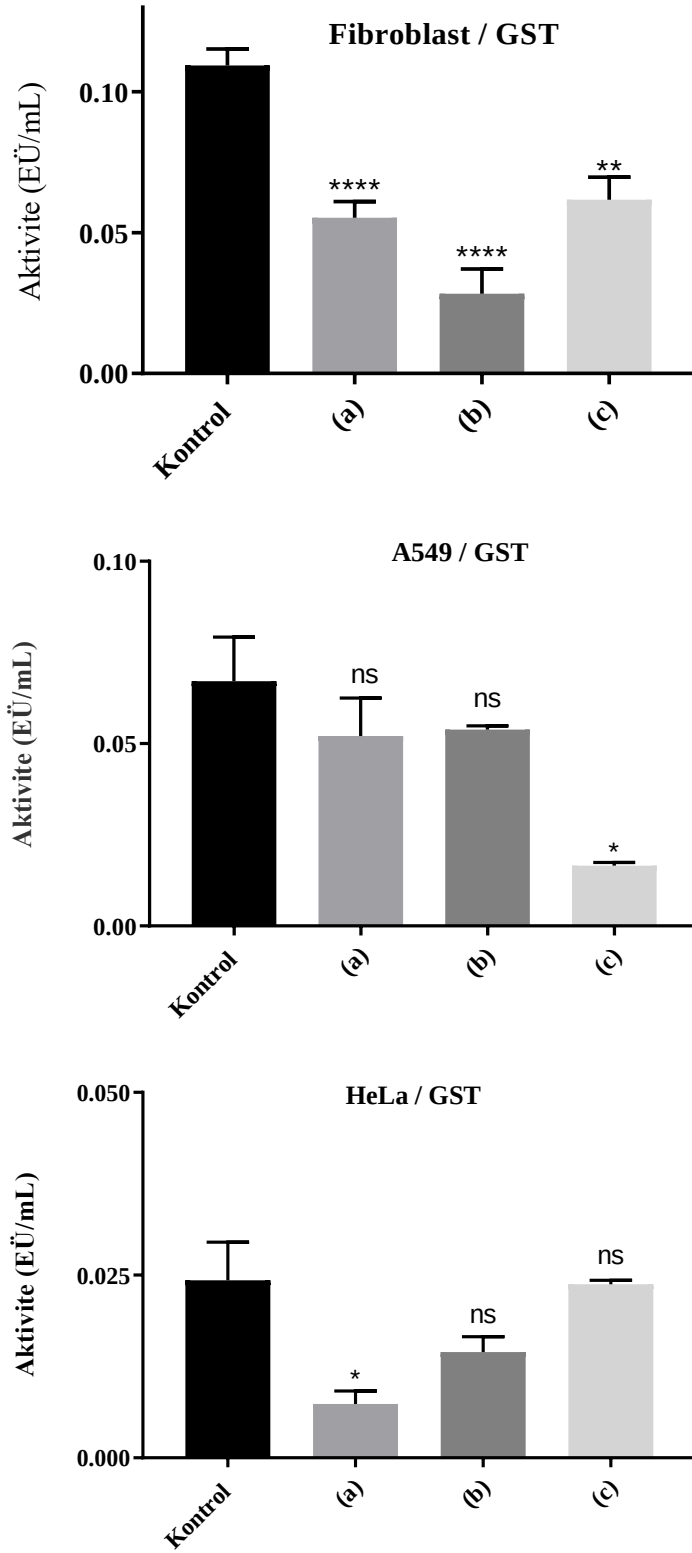
Şekil 35. Amino benzohidroksamik asit türevlerinin TRXR1 aktivitesi üzerine etkileri ($p > 0.05 = \text{ns}$ (önemsiz), $p < 0.05 = *$ (önemli), $p < 0.01 = **$ (çok önemli), $p < 0.001 = ***$ (yüksek derecede önemli)) 4-Amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a), 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b), 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)

Sağlıklı fibroblast hücresinde 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) molekülünün TRXR1 aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı görüldü. 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b)'nin enzim aktivitesini yüksek derecede önemli ölçüde ($p<0,01$) inhibe ettiği ve 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)'nin ise çok önemli ölçüde ($p<0,001$) inhibisyona neden olduğu tespit edildi.

A549 kanser hücrelerinde her üç molekülünde enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu tespit edildi. 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) ve 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b)'nin enzim aktivitesini çok önemli ölçüde ($p<0,01$) inhibe ettiği, 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)'nin ise yüksek derecede önemli ölçüde ($p<0,001$) inhibe ettiği görüldü.

HeLa kanser hücrelerinde her üç molekülün de yüksek derecede önemli ölçüde ($p<0,001$) enzimi inhibe ettiği görüldü.

Sentezlenen Amino Benzohidroksamik Asit moleküllerinin Sağlıklı Fibroblast, A549 ve HeLa Kanser Hücrelerinde GST Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelendiği Çalışmanın Sonuçları



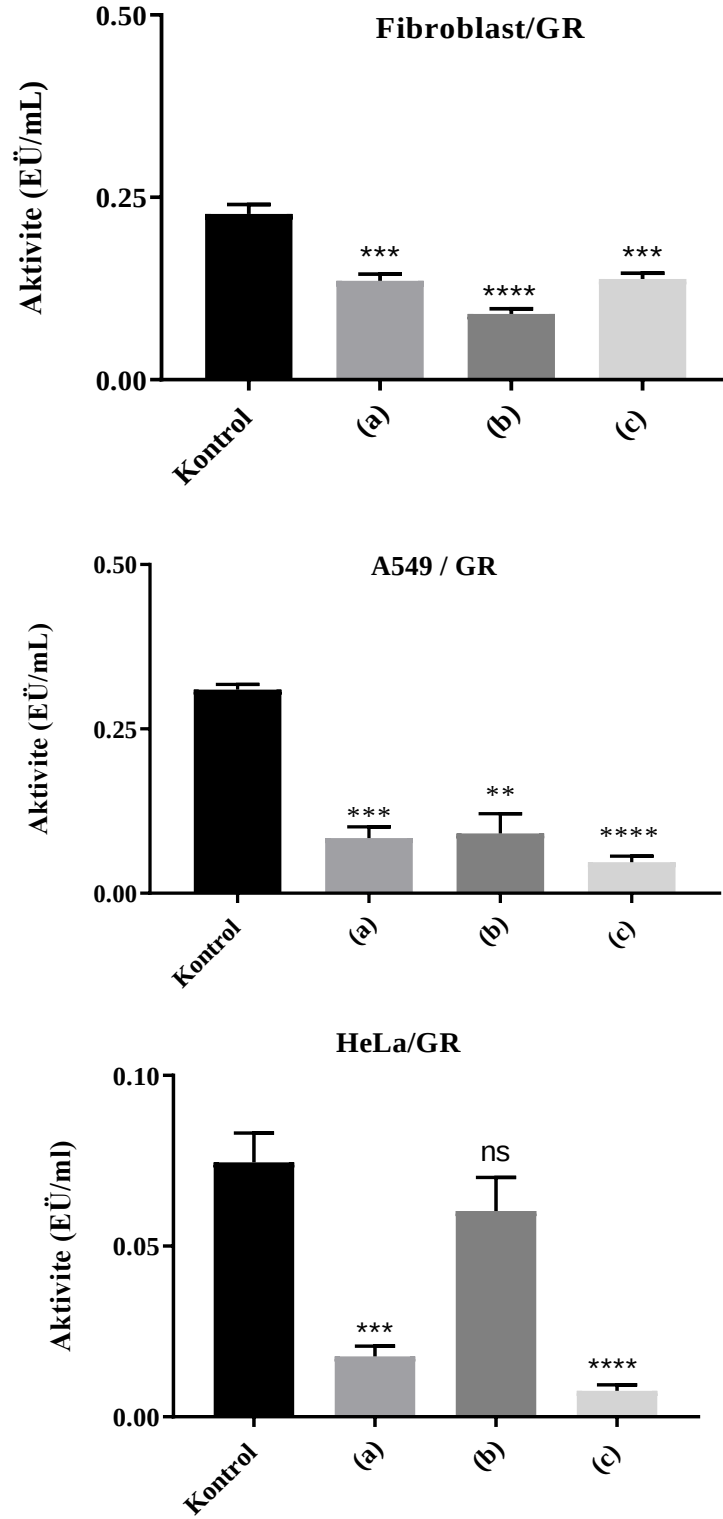
Şekil 36. Amino benzohidroksamik asit türevlerinin GST aktivitesi üzerine etkileri (p>0.05=ns (önemsiz), p<0,05= *(önemli), p<0,01=**(çok önemli), p<0,001=*** (yüksek derecede önemli) 4-Amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a), 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b), 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c))

Maddelerin detoksifikasyon reaksiyonlarında görevli olan GST aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde sağlıklı fibroblast hücrelerinde 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) ve 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b)'nin enzim aktivitesini yüksek derecede önemli ölçüde ($p<0,001$) inhibe ettiği görüldü. 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)'nin ise önemli ölçüde ($p<0,01$) inhibisyona neden olduğu tespit edildi.

A549 kanser hücrelerinde 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) ve 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b)'in enzim aktivitesini etkilemediği 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)'nin önemli ölçüde ($p<0,01$) inhibisyona neden olduğu bulundu.

HeLa kanser hücresinde de 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) ve 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)'nin GST aktivitesi üzerine etkisi olmazken 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) önemli ölçüde ($p<0,01$) inhibisyona neden olmuştur.

Sentezlenen Amino Benzohidroksamik Asit moleküllerinin Sağlıklı Fibroblast, A549 ve HeLa Kanser Hücrelerinde GR Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelendiği Çalışmanın Sonuçları



Şekil 37. Amino benzohidroksamik asit türevlerinin GR aktivitesi üzerine etkileri
($p > 0.05 = \text{ns}$ (önemsiz), $p < 0,05 = *$ (önemli), $p < 0,01 = **$ (çok önemli), $p < 0,001 = ***$ (yüksek derecede önemli))
4-Amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a), 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b), 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)

Maddelerin redükte glutatyonun geri kazanımı reaksiyonunu katalizyelen GR aktivitesi üzerine etkileri de incelendi. Sağlıklı fibroblast hücrelerinde ve A549 kanser hücrelerinde her üç molekülün de enzim aktivitesini kontörle kıyasla çok önemli ölçüde azalttığı tespit edildi.

HeLa kanser hücrelerinde 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) ve 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c)'nin yüksek derecede önemli ölçüde ($p<0,001$) inhibisyona sebep olurken, 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b)'nin ise enzim aktivitesi etkilemediği görüldü.

SONUÇLAR

Kanser tedavisi için literatür araştırmalarında HDAC inhibitörü olan hidroksamik asit türevlerinin kanserin belirleyici özelliklerinden biri olabileceği gösterilmektedir. Bu yüzden hidroksamik asit türevlerinin kanserle mücadelede çok fazla etkili olması nedeniyle bilimsel çalışmalar üzerinde en çok araştırılan konulardan biri olmuştur.

HDAC inhibitörlerinin hazırlanmasına yönelik polimer destekli reaktiflerin kullanıldığı tam otomatik çok basamaklı bir çözelti faz sentezi usulü, bu alanda tıbbi ve birleştirici kimya gruplarının çıkışını daha da hızlandırma potansiyeline sahip olabilir (Minucci 2006).

Hidroksamik asit yan zincirinin uzunluğu HDAC inhibisyonu için önemlidir. Optimal karbon zinciri uzunluğu ($n = 5$ veya 6) yapısındadır (Cai *et al.* 2010).

Bu amaçla çalışma kapsamında HDAC inhibitörü yapısında 3 farklı yeni amino hidroksamik asit molekülünün sentezi yapıldı ve karakterizasyon sonuçlarından sentezin doğruluğunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği belirlendi. Daha sonra sentezlenen bu yeni amino benzohidroksamik asit türevlerinin epitel kaynaklı insan sağlıklı fibroblast A549 ve *HeLa* kanser hücreleri üzerine en etkili oldukları sitotoksik doz konsantrasyon (IC_{50}) değerleri WST-8 sitotoksikite testi kullanılarak belirlendi. 4-Amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) molekülünün sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücreleri için IC_{50} değerleri sırasıyla; 0,55 mM, 1,8 mM ve 2,2 mM olarak belirlendi. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) molekülünün sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücreleri için IC_{50} değerleri sırasıyla; 1,01 mM, 1,03 mM ve 0,54 mM olarak belirlendi. 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) molekülünün sağlıklı fibroblast, A549 ve *HeLa* kanser hücre hatları için IC_{50} değerleri sırasıyla; 2,46 mM, 0,78 mM ve 0,25 mM olarak belirlendi.

Sitotoksik doz konsantrasyonu belirlendikten sonra kaspaz-3 çalışmaları yapıldı. Kaspaz 3 deki enzim aktivitesindeki azalma moleküllerin kanser hücrelerini apoptozdan ziyade nekroza yönlendirme eğilimi sergilediği tespit edildi. Yapılan çalışmada 4-Amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a), 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) ve 3-Amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) molekülünün hepsinde kaspaz-3 enzim aktivitesi kontrole kıyasla azaldı. Bunu komfirme etmek için Annexin V testi ile ölçüm yapıldı. Bu testin sonucunda hem apoptozdan ziyade nekroz ölüm yolağına gittiği gözlemlendi. Yapılan çalışmada

kullanılan bu bileşiklerin kontrole göre sağlıklı hücrelerde zarar vermek yerine sağlıklı hücrelerin yaşanabilirliğini arttırmıştır. Yani sadece kanserli hücelere etki ettiği gözlemlendi.

Benzer bir çalışmada bir HDAC inhibitörü olarak bilinen SAHA molekülünün *HeLa* kanser hücreleri üzerindeki büyümeyi inhibe edici etkileri değerlendirilmiştir. SAHA'ya 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz kaldıktan sonra *HeLa* kanser hücrelerinin büyümesi, sırasıyla 24, 48 ve 72 saatte ~ 10, 3 ve 1 uM'lik bir IC₅₀ ile doza ve zamana bağlı olarak azaldığı ve kaspaz bağımlı apoptoz yoluyla *HeLa* kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (You and Park 2014).

Yeni bir ikinci nesil HDAC inhibitörü olan Kuisinostatın (JNJ-26481585), NSCLC hücresi üzerinde etkili terapötik aktivitesiyle ilgili altta yatan moleküler mekanizmaları araştırılmış olup A549 kanser hücrelerinin canlılığının, 24 saatlik zaman noktasında 100 nM'nin altındaki doz konsantrasyonunun önemli ölçüde değişmediğini, Kuisinostatın, A549 kanser hücre proliferasyonunu doza ve zamana bağlı şekillerde önemli ölçüde inhibe ettiğini ve mitokondri aracılı hücre apoptozunu indüklediği belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2015).

HDAC enzimleri olarak klasik HDAC'lerin transkripsiyonu ve kromatin durumunu kontrol etmesinin yanı sıra, bu proteinlerin, farklı işlevlere sahip yüzlerce proteini deasetile etme kabiliyetleri sayesinde, pek çok hücresel işlemin düzenlenmesinde de rol oynadığı giderek daha açık hale geliyor. Proteomik ve biyoinformatik yaklaşımlarla yapılan son yüksek verimli çalışmalar, HDAC aktivitesi için önemli hedefler olarak çok sayıda metabolik enzimi tanımlamıştır (Wang *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2010).

Tiyoredoksin (Trx) sisteminin deregülasyonu kanser (Zhu *et al.* 2019), inme (Oraby and Rabie 2020) ve kardiyovasküler hastalıklar (Mahmood *et al.* 2013) gibi çeşitli hastalıklarda gözlenmiştir. TRXR1 proteininin aşırı ekspresyonu birçok katı tümörde bildirilmiştir ve bu da büyümeyi teşvik etme kapasiteleri aracılığıyla tümör gelişimine katkıda bulunabilecek TRXR1 aktivitesinde artışa yol açmaktadır (Ghareeb and Metanis 2020). TRXR1 aktivitesinin inhibisyonunun, kanser hücrelerinin hücre çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir (Zhang *et al.* 2019).

SAHA ile tedavi edilen *HeLa* kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü yoğunlaştırdığı, Trx1 seviyelerini düşürdüğü ve sonuç olarak, SAHA, TRXR1 seviyelerinden etkilendiği belirtilmiştir (You and Park 2014).

Literatür araştırmalarında, GSH metabolizmasının kanser hücrelerinde HDAC inhibitör aktivitesi için önemli bir yol olduğu gösterilmektedir. Ek olarak, HDAC inhibitör tedavisine veya GSH sentezine müdahale eden kimyasal bileşiklere bağlı olarak GSH

tükenmesi üzerine yükselen ROS seviyelerinin, kanser terapisinde hücre ölümünü artırabileceği ileri sürülmüştür (Chiaradonna *et al.* 2015). Önceki raporlarla uyumlu olarak, sonuçlarımız kanser hücrelerinde GST tükenmesi HDAC inhibitörlerinin kansere özgü sitotoksitesinin bir mekanizması olabileceğini düşündürmektedir (Ruefli *et al.* 2001; Zhu *et al.* 2014)

Sağlıklı fibroblast hücrelerinde TRXR1 aktivitesini en çok azaltan inhibitör 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) olarak bulunmuştur. Aynı inhibitör *HeLa* kanser hücrelerinde de aynı şekilde önemli ölçüde inhibitör etkisi göstermiştir. *A549* ve *HeLa* kanser hücrelerinde ise en etkili inhibisyon 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) göstermiştir.

Sağlıklı fibroblast hücrelerinde GST aktivitesini en çok azaltan inhibitörler 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) ve 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) olmuştur. 4-Amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) molekülü *HeLa* ve *A549* kanser hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. *A549* ve *HeLa* kanser hücrelerinde ise en etkili inhibisyon 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) molekülünde göstermiştir. *A549* kanser hücreleri üzerine GST aktivitesini önemli ölçüde azaltan inhibitör 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) iken, *HeLa* kanser hücrelerinde ise 4-amino-2-metoksi benzohidroksamik asit (a) olarak bulunmuştur.

Sağlıklı fibroblast hücrelerinde GR aktivitesini en çok azaltan inhibitör 4-amino-3-metil benzohidroksamik asit (b) göstermiştir. *A549* ve *HeLa* kanser hücreleri üzerinde GR aktivitesini en çok azaltan inhibitör 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit (c) olmuştur.

Sonuç olarak, terminalde aynı hidroksamik asit iskeletine sahip bir molekülün çeşitli pozisyonundaki grup değişiklikler nedeniyle meydana gelen çeşitlendirilmiş bir aktivite profili olduğu sonucuna varabiliriz. Bu nedenle, 3-amino-5-metil benzohidroksamik asit molekülü, göstermiş olduğu spesifik aktiviteden dolayı çeşitli, diğer uyumlu gruplarla ve sadece kanser tedavisi alanında değil, aynı zamanda diğer ilişkili hastalıklarda da giderek daha fazla çalışabilir.

KAYNAKLAR

- Adams, J.M., Cory, S.,2001.Life or death decions by the Bcl-2 family. Trends. Biochem Sci;26:61-6.
- Adrain, C., Martin, S.J., 2001.The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. Trends Biochem Sci; 26:390-7.
- Akkemik, E., Şentürk, M., Özgeriş, F. B., TAŞER, P., & Ciftci, M.,2011. In vitro effects of some drugs on human erythrocyte glutathione reductase. Turkish Journal of Medical Sciences, 41(2), 235-241.
- Akyol, Ö.,2004. Şizofrenide oksidatif stres. Kocatepe Tıp Dergisi. 5: 15-25.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002.Basic Genetic Mechanisms, "Molecular Biology of the Cell", 4. Baskı, GarlandScience, London-New York, s. 208-230.
- Almenara, J., Rosato, R., Grant, S.,2002. Synergistic induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells by flavopiridol and the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). Leukemia.16(7):1331-1343.
- Altenburg, B.C., Via, D.P.,Steiner, S.H.,1976. Modification of the phenotype murine sarcoma virus-transformed cells by sodium butyrate: effects on morphology and cytoskeletal elements. Exp Celi Res 102: 223-231.
- Andersen, J.L., Kornbluth, S.,2013. The tangled circuitry of metabolism and apoptosis. Molecular cell, 49(3), 399-410.
- Andrew, G.R, Catherine, B., Christopher, S.P.,2001. Education and debate, What is apoptosis, and why is it important, BMJ,322:1536-1538.
- Anzick, S. L., Kononen, J., Walker, R. L., Azorsa, D. O., Tanner, M. M., Guan, X. Y., ... & Meltzer, P. S.,1997. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. Science, 277(5328), 965-968
- Arbyn, M., *et al.* ,2020. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. The Lancet Global Health, 8(2): p. e191-e203.
- Armstrong, R.N.,1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. Chemical Research in Toxicology. 10(1): 2-18.
- Artemov, A., Aliper, A., Korzinkin, M., Lezhnina, K., Jellen, L., Zhukov N. ve ark. (2015). A method for predicting target drug efficiency in cancer based on the analysis of signaling pathway activation. Oncotarget, 6, 29347-29356.
- Atadja, P.,2009. Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges. Cancer Lett 280: 233-241.
- Aydın, M.,Selcoki, Y., Nazlı, Y., Çolak, N., Serkan Yalçın, K., Canbal, M., Eryonucu, B.,2012. Relationship between total antioxidant capacity and the severity of coronary artery disease. Journal of Clinical & Experimental Investigations/Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi, 3(1).
- Baines, C.P.,2010. Role of the mitochondrion in programmed necrosis. Front Physiol; Nov 29;1:156.

- Barneda-Zahonero, Bruna., Parra, M., 2012. Histone deacetylases and cancer Federation of European Biochemical Societies, 6(6), 579-589.
- Bati, A.C., Johnstone, R.W., 2014. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J Clin Invest*, 124: 30-9.
- Baykara, O., 2015. Horizons in Cancer Research vol.57. Current Therapies and Latest Developments in Cancer Treatment, s.105-156.
- Bellamy, C.O.C., Malcomson R.D.G, Harrison D.J and Wyllie A.H., 1995. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Seminar in Cancer Biol.* 6: 3-16.
- Berlett, B.S., Stadtman, E. R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313-20316
- Bernhard, D., Ausserlechner, M.J., Tonko, M., Löffler, M., Hartmann, B.L., Csordas, A. and Kofler, R., 1999. Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitors sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts, *FASEB J.*, 13.
- Beütler, E., 1969. Effect of flavin compound on Glutathione Reductase Activity; In vivo and in vitro studies. *J Clin Invest.* 48: 1957– 1966.
- Boffa, L.C., Vidalí, G., Mann, R.S., Allfrey, V.G., 1978. Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J Biol Chem*, 253: 3364-3366.
- Bond, D.M., Finnegan, E.J., 2007. Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. *Trends Plant Sci*, 12(5):211-216.
- Brown, D.A., McKeith, D. and Glass, W.K., 1979. Transition Metal Complexes of Mono-hydroxamic Acids, *Inorganica Chimica Acta*, 35, 5-10.
- Butler, L., Agus, B., Scher, H.I., 2007. Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses growth. *Expert Opin. Investig. Drugs* Downloaded from informahealthcare.com by University of Bath on 11/19/14 For personal use only. Duvic & Vu *Expert Opin. Investig. Drugs* 16(7) 1119 the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 60(18):5165-5170.
- Butler, L., Zhou, M.X., 2002. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99(18):11700-11705.
- Butler, L.M., Agus, D.B., Scher, H.I., Higgins, B., Rose, A., Cordon-Cardo, C., Thaler, H.T., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Richon, V.M., 2000. Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 60: 5165–5170.
- Byers, L.A., Rudin, C.M., 2015. Small cell lung cancer: where do we go from here? *Cancer.* Mar 1;121(5):664-72.
- Cadenas, C., Franckenstein, D., Schmidt, M., Gehrmann, M., Hermes, M., Geppert, B., Schormann, W., Maccoux, L.J., Schug, M., Schumann, A., Wilhelm, C., Freis, E., Ickstadt, K., Rahnenführer, J., Baumbach, J.I., Sickmann, A., Hengstler, J.G., 2010. Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12, R44-R59.
- Cai, J., Wei, H., Hong, K.H., 2015. Discovery and preliminary evaluation of 2-aminobenzamide and hydroxamate derivatives containing 1,2,4-oxadiazole moiety as potent histone deacetylase inhibitors. *Eur J Med Chem.* 96:1–13.

- Cai, X., Zhai, H. X., Wang, J., Forrester, J., Qu, H., Yin, L., ... & Qian, C.,2010. Discovery of 7-(4-(3-ethynylphenylamino)-7-methoxyquinazolin-6-yloxy)-N-hydroxyheptanamide (CUDC-101) as a potent multi-acting HDAC, EGFR, and HER2 inhibitor for the treatment of cancer. *Journal of medicinal chemistry*, 53(5), 2000-2009.
- Can, G.,2014. Onkolojik Hastalıklar ve HemGirelik Bakımı. Ğçinde: Enç N. Ğç Hastalıkları HemGireliğı. 1. Baskı, Ğstanbul, 50. Yıl Yayınları, 2014. 365-411.
- Candas, R., Sohal. S., Radyuk, S.N, Klickhko, V.I, Orr, W.C.,1997. Molecularorganization of the glutathione reductase gene in *Drosophila melanogaster*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*,339: 323-334.
- Carlberg, C.,Mannervik,B., 1985. Glutathione reductase assays. *Methods in Enzymology*, 113, 484-495. Academic Pres, Orlando, FL.
- Carmeliet, P., 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438 (15): 932-936.
- Carter, S.K., Slavik, M.,1974. "Chemotherapy of cancer", *Annu. Rev. Pharmacol*, 14, 157-179.
- Ceccarelli,J., Delfino, L., Zappia, E., Castellani, P., Borghi, M., Ferrini, S., Tosetti, F., Rubartelli, A.,2008. The redox state of the lung cancer microenvironment depends on the levels of thioredoxin expressed by tumor cells and affect tumor progression and response to prooxidants. *International Journal of Cancer*, 123, 1770- 1778.
- Chiaradonna, F., Barozzi, I., Miccolo, C., Bucci, G., Palorini, R., Fornasari, L., ... & Chiocca, S.,2015. Redox-mediated suberoylanilide hydroxamic acid sensitivity in breast cancer. *Antioxidants & redox signaling*, 23(1), 15-29.
- Chittur, S.V., Sangster-Guity, N., McCormick, P.J.,2008. Histone deacetylase inhibitors: A new mode for inhibition of cholesterol metabolism. *BMC Genomics*.9:507.
- Cohen, L.A., Marks, P.A., Rifkind, R.A., Amin, S., Desai, D., Pittman, B., Richon, VM.,2002. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), a histone deacetylase inhibitor, suppresses the growth of carcinogen-induced mammary tumors. *Anticancer Res*, 22: 1497–1504.
- Cohen, L.A.,Amin, S., Marks, PA., Rifkind, RA., Desai, D., Richon. VM.,1999. Chemoprevention of carcinogen-induced mammary tumorigenesis by the hybrid polar cytodifferentiation agent, suberanilohydroxamic acid (SAHA). *Anticancer Res*, 19: 4999–5005.
- Cooper, J. R., Abdullatif, M.B., Burnett, E.C., Kempself, K.E., Conforti, F., Tolley, H, Collins, J.E., Davies, D.E, 2016. Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and Differentiation towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype, *Plos one*,11, e0164438.
- Cummings, M.R., Klug, WS.,2002. *Genetik*, 6. baskı, Palme Yayın, Ankara, 816.
- Curtin, J.F., Cotter, T.G.,2003. Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis. *Cell Signal*;15:983-92.
- Dalay, N., 2000. *Kanser Biyolojisi*. Topuz E, Aydın A, Karadeniz AN; eds. *Klinik Onkoloji*.İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları; 48-53.
- Dalay, N.,2015. Buyru, N. *Kanser Biyolojisi*. Ğçinde: Can G. Onkoloji HemĞireliğı. 1. Baskı, Ğstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri; 7-17.
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J.,2004. Cell death: critical control points. *Cell*;116:205-219.
- Deep, D., Gao, X., Jiang, H., Janic, B., Arbab, A. S.,Rojanasakul, Y., Dulchavsky, S. A. and Gautam, S. C.,2010. *Biochem. Pharma*. 79, , 350-360.

- Deroanne, C. F., Bonjean, K., Servotte, S., Devy, L., Colige, A., Clausse, N., ... & Castronovo, V., 2002. Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene*, 21(3), 427-436
- Desai, D., Das, A., Cohen, L., EL Bayoumy, K., Amin, S., 2003. Chemopreventive efficacy of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Anticancer Res*, 23: 499–503.
- Di Fiore, A., Maresca, A., Supuran, C. T., & De Simone, G. 2012. Hydroxamate represents a versatile zinc binding group for the development of new carbonic anhydrase inhibitors. *Chemical Communications*, 48(70), 8838-8840.
- Dinçol, K., 2000. Kemoterapide Temel Prensipler. İn: Topuz E, Aydın A, Karadeniz AN; eds. *Klinik Onkoloji. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları*; 34-47.
- Dokuyucu, R., Karateke, A., Gokce, H., Kurt, R. K., Ozcan, O., Ozturk, S., Duru, M., 2014. Antioxidant effect of erdosteine and lipoic acid in ovarian ischemia–reperfusion injury. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 183, 23-27.
- Dong, Z., Yang, Y., Liu, S., Lu, J., Huang, B., Zhang, Y., 2018. HDAC inhibitor PAC-320 induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer, Vol. 9, (No. 1), pp: 512-523.
- Duvic, M., Zhang, C., 2006. Clinical and laboratory experience of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Br. J. Cancer*. 95(Suppl. 1): S13-S19.
- Duvic, M., Vu, J., 2007. Vorinostat: A new oral histone deacetylase inhibitor approved for cutaneous T-cell lymphoma. *Expert Opin Invest Drugs*, 16: 1111– 1120.
- Dy, G.K., Adjei, A.A., 2006. Principles of Chemotherapy. İn: Chang AE, Ganz PA, Hayes DF *et al.* ; eds. *Oncology*. Springer Science Business Media; 14- 40.
- Edinger, A. L., & Thompson, C. B., 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology*, 16(6), 663-669
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. ve Jones, A. P., 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429, 457-463.
- El-Khattouti, A., Selimovic, D., Haikel, Y., & Hassan, M., 2013. Crosstalk between Apoptosis and Autophagy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies in Cancer. *Journal of Cell Death*, 6.
- Ellis, R.E, Yuan, J and Horvitz, H.R. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 663-698.
- Eroğlu, O., 2018. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. *Archives Medical Review Journal*; 27(3): 346-362.
- Eyupoglu, I.Y., Hahnen, E., Buslei, R., Siebzehnruhl, F.A., Savaskan, N.E., Luders, M., Rankle, C., Wick, W., Weller, M., Fahlbusch, R., Blumcke, I., 2005. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) has potent anti-glioma properties in vitro, ex vivo and in vivo. *J Neurochem*, 93: 992–999.

- Fajas, L., Egler, V., Reiter, R., Hansen, J., Kristiansen, K., Debril, M. B., ... & Auwerx, J., 2002. The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPAR γ and adipocyte differentiation. *Developmental cell*, 3(6), 903-910.
- Fennell, B.J., Al-shatr, A.Z., Bell, A., 2008. Isotype expression, post translational modification and stage-dependent production of tubulins in erythrocytic *Plasmodium falciparum*, *elsevier*, Volume 38, Issue 5, Pages 527-539.
- Fenrick, R., Hiebert, S.W., 1998. Role of histone deacetylases in acute leukemia. *J Cell Biochem Suppl*, 30–31: 194–202.
- Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M, Rifkind, R.A., Marks, P.A, vd., 1999. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, 401(6749):188-93.
- Finzer, P., Soto, U., Zur Hausen, H., Rosl, F., 2001. Inhibitors of histone deacetylase arrest cell cycle and induce apoptosis in cervical carcinoma cells circumventing human papillomavirus oncogene expression. *Oncogene*, 20 pp. 4768-4776.
- Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M.F., Allen, C., 2015. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol*, 1(4):505-27.
- Ford, J., Ahmed, S., Allison, S., Jiang, M, Milner., 2007. J. JNK2-dependent regulation of SIRT1 protein Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, Puigserver P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J*, 26(7):1913-1923.
- Franz, T.A., Kidson, S.H., 1997. Mapping of interdigital apoptosis in the chick and duck hindlimb. *Embryology*. 93(2):85-94.
- Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., 2001. Wooster, R., Stratton, M.R. Cancer and genomics. *Nature*. 15;409(6822):850-852.
- Galluzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., *et al.*, 2006. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 16: 1093-1107.
- Ganai, SA., 2016. Panobinostat: The small molecule metalloenzyme inhibitor with marvelous anticancer activity. *Curr Top Med Chem* 16: 427-434.
- García-manero, G., Yang, H., Sanchez-gonzalez, B., 2005. Final results of a Phase I study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*. 106: 785a (Abstract).
- Gasdaska, P.Y., Berggeren, M.M., Berry M.J., Powis G., 1999. Cloning, sequencing and functional expression of a novel human thioredoxin reductase. *FEBS Lett*, 442, 105-111.
- Ghareeb, H., & Metanis, N., 2020. The Thioredoxin System: A Promising Target for Cancer Drug Development. *Chemistry—A European Journal*, 26(45), 10175-10184.
- Gilbert, L., Elwood, L. J., Merino, M., Masood, S., Barnes, R., Steinberg, S. M., ... & Moscow, J. A. 1993. A pilot study of pi-class glutathione S-transferase expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor expression and prognosis in node-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 11(1), 49-58.
- Ginsburg, E., Salomon, D., Sreevalsan, T., Freese, E., 1973. Growth Inhibition and Morphological Changes Caused by Lipophilic Acids in Mammalian Cell. *Proc Natl Acad Sci ABD* 70: 2457–2461.

- Golstein, P., Kroemer, G., 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*; 32:37-43.
- Green, J. A., Robertson, L. J., & Clark, A. H., 1993. Glutathione S-transferase expression in benign and malignant ovarian tumours. *British journal of cancer*, 68(2), 235-239.
- Grignon, D. J., Abdel-Malak, M., Mertens, W. C., Sakr, W. A., & Shepherd, R. R., 1994. Glutathione S-transferase expression in renal cell carcinoma: a new marker of differentiation. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 7(2), 186-189.
- Grozinger, C.M., Schreiber, S.L., 2002. Deacetylase Enzymes: biological functions and use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol*; 9(1):3-16.
- Gupta, S. P., & Sharma, A., 2013. The chemistry of hydroxamic acids. In *Hydroxamic Acids* (pp. 1-17). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Halkidou, K., Gaughan, L., Cook, S., Leung, H. Y., Neal, D. E., & Robson, C. N. (2004). Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *The Prostate*, 59(2), 177-189.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical society transactions*, 35(5), 1147-1150.
- Hamada, S. I., Kamada, M., Furumoto, H., Hirao, T., & Aono, T., 1994. Expression of glutathione S-transferase- π in human ovarian cancer as an indicator of resistance to chemotherapy. *Gynecologic oncology*, 52(3), 313-319.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Harrison, D. J., Kharbanda, R., Bishop, D., McLelland, L.I., & Hayes, J. D. 1989. Glutathione S-transferase isoenzymes in human renal carcinoma demonstrated by immunohistochemistry. *Carcinogenesis*, 10(7), 1257-1260.
- He, L.Z., Tolentino, T., Grayson, P., Zhong, S., Warrell, Jr. R.P., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Richon, V.M., Pandolfi, P.P., 2001. Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest*, 108: 1321–1330.
- Hengartner, M.O., Ellis, R.E., and Horvitz, H.R., 1992. *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 356: 494-499.
- Herman, J.G., Baylin, S.B., 2003. Gene Silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 349(21):2042-2054.
- Hershko, A., Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 67:425-479.
- Hoa, N., Myers, M. P., Douglass, T. G., Zhang, J. G., Delgado, C., Driggers, L., Callahan, L. L., VanDeusen, G., Pham, J. T., Bhakta, N., Ge, L., and Jadus, M. R. 2009. Molecular mechanisms of paraptosis induction: implications for a non-genetically modified tumor vaccine. *PloS One*, 4(2), 4631.
- Holliday, R., 2006. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*, 1(2):76-80.
- Holmgren, A., & Bjornstedt, M., 1995. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in enzymology*, 252, 199-208.
- Holmgren, A., Lu, J., 2010. Thioredoxin and thioredoxin reductase: Current research with special reference to human disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396, 120-124.

- Holmgren, A.,1977. Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction.
- Holmgren, A.,1995. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure*, 3(3), 239-243.
- Hrzenjak, A., Moinfar, F., Kremser, M.L., Strohmeier, B., Staber, P.B., Zatloukal, K., Denk, H.,2006. Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol Cancer Ther.* 5(9):2203-10.
- Huang, L., & Pardee, A. B., 2000. Suberoylanilide hydroxamic acid as a potential therapeutic agent for human breast cancer treatment. *Molecular medicine*, 6(10), 849-866.
- Inche, A.G and La, Thangue, N.B.,2006. Chromatin control and cancerdrug discovery: realizing the promise. *Drug Discovery Today*, 11(3-4): 97-109.
- Izmirli, M., Ecevit, H., & Göğebakan, B. 2014.Yaşamak için Otofaji. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 23(3), 411-419.
- İçli, F.,Giriş, A. H. O., 2005. İn. iliçin G, Biberoğlu K, Süleymanlar G ve ark.; eds. İç Hastalıkları. Güneş Kitapevi, 2007-2014.
- Jones, P.A., Baylin, S.B.,2007. The epigenomics of cancer. *Cell*,128(4):683-692.
- Jones, PA., Baylin, S.B.,2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*,3(6):415-428.
- Kacı, F.N.,2018. Çeşitli Bakteri İzolatlarının Kültür Filtratları ve Proteinlerinin İnsan Fibroblast Hücrelerinde Sitotoksik ve Moleküler Yanıtlarının Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Kakkar, R., 2013. Hydroxamic Acids. Springer Publishing, ISBN: 978-3-642-381119, 307 s.,21-23.
- Kanwal, R. ve Gupta, S.,2012. Epigenetic modifications in cancer. *Clinical Genetics*, 81, 303-311.
- Karlenius, T.C. ve Tonissen, K.F., 2010. Thioredoxin and cancer: A role for thioredoxine in all states of tumor oxygenation. *Cancers*, 2, 209-232.
- Keha, E., Küfrevioglu, Ö.İ., 2009. Biyokimya. Aktif Yayınevi, Erzurum. 637.
- Kelly, W., Richon, M., O'connor, O., 2003.Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clin. Cancer Res.* 9(10 Part 1):3578-3588.
- Kemnitzer, W., Kuemmerle, J., Zhang, H.Z.,2009. Discovery of 3-aryl-5-aryl-1,2,4-oxadiazoles as a new series of apoptosis inducers. 2. Identification of more aqueous soluble analogs as potential anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 19: 4410–4415.
- Kerbel, R.S.,Ellis, L.M., Angiogenesis, DeVita ,V.T., Lawrence, T.S., Rosenberg, S.A.,2008.eds.Cancer. 8 th ed. Philadelphia: Lippicott-Williams&Wi lkins; 103-116
- Khan,O., La Thangue, N.B.,2011. HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunology and Cell Biology*, 90(1), 85–94.
- Kim, M.S., Son, M.W., Kim, W.B.,2000. In Park Y and Moon A: Apicidin, an inhibitor of histone deacetylase, prevents H-ras-induced invasive phenotype. *Cancer Lett* 157: 23-30.

- Kim, J.S., Lee, S., Lee, T., Trepel, J.B., Lee, Y.W., 2001. Transcriptional activation of p21WAF1/CIP1 by Apicidin, a novel histone deacetylase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, pp. 866-871.
- Kim, Y.B., Ki, S.W., Yoshida, M., Horinouchi, S., Antibio, J., 2000. Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells, pp. 1191-1200.
- Klug, W.S., and Cummings, M.R., 2006. *Concepts of Genetics* (8th edition). Pearson Education Inc. Publishing as Prentice Hall.
- Klung, S., W., Cummings, R.M., 2002. Regulation of gene expression in eukaryotes, "Concepts of Genetics", Trans. Ed. Öner C., Palme Publishing, pp. 434-442.
- Knapen, M.F., Zusterzeel, P.L., Peters, W.H., Steegers, E.A., 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 82: 171-184.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*; 87:99-163.
- Kumar, V., Cotran, R. S., & Robbins, S. L., 1992. *Basic pathology*. WB Saunders Company.
- Kuwajima, A., Iwashita, J., Murata, J., Abe, T., 2007. The histone deacetylase inhibitor butyrate inhibits melanoma cell invasion of Matrigel. *Anticancer Res.* 27:4163–4169.
- Laborde, E., 2010. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ* 17:1373–1380.
- Lemercier, C., Brocard, M.P., Puvion-Dutilleul, F., Kao, H.Y., Albagli, O., Khochbin, S., 2002. Class II histone deacetylases are directly recruited by BCL6 transcriptional repressor. *J Biol Chem*, 277: 22045–22052.
- Leyden, W.A., *et al.*, 2005. Cervical cancer in women with comprehensive health care access: attributable factors in the screening process. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(9): p. 675-683.
- Li, X.N., Shu, Q., Su, J.M.F., Perlaky, L., Blaney, S.M., Lau, C.C., 2005. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Ther*, 4(12):1912–22.
- Liou, G.Y., Storz, P. 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* 2010; 44 (5): 479–496.
- Lopez-Alarcona, C., Denicola, A., 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta*; 763: 1e10.
- Losson, H., Schnekenburger, M., Dicato, M., Diederich, M., 2016. Natural Compound Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi): Synergy with Inflammatory Signalling Pathway Modulators and Clinical Applications in Cancer. *Molecules*, 21, 1608.
- Loudni, L., Roche, J., Potiron, V., Clarhaut, J., Bachmann, C., Gesson, J. P., & Tranoy-Opalinski, I., 2007. Design, synthesis and biological evaluation of 1, 4-benzodiazepine-2, 5-dione-based HDAC inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(17), 4819-4823.

- Mahmood, D.F.D., Abderrazak, A., El Hadri, K., *et al.*, 2013. The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 19:1266–1303.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A. and Kroemer, G. 2007. Self-Eating and Self-illing: Crosstalk between Autophagy and Apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9):741–52.
- Malstrom, B.G., 1970. *Biochemical Functions of Iron Deficiency*, Academic Press, NewYork.
- Marchion, D.C., Bıakau, E., Daud, A.I., 2004. Sequence-specific potentiation of topoisomerase II inhibitors by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid. *J. Cell Biochem.* 92(2):223-237.
- Marks, A. P., Miller, T., Richon, V., 2003. Histone deacetylases, *Curr. Opin.*
- Marks, P., Rifkind, R.A., Richon, V.M., Breslow, R., Miller, T., Kelly, W.K., 2001. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*, 1: 194–202.
- Marks, P.A., Dokmanovic, M., 2005. Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs* 14: 1497–1511.
- Marks, P.A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., 2000. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(15), 1210-1216.
- Marks, P.A., Breslow, R., 2007. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: Development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol*, 25: 84– 90.
- Martile, M., Bufalo, D., and Daniela Trisciuglio, 2016. The multifaceted role of lysine acetylation in cancer: prognostic biomarker and therapeutic target. *Oncotarget*, 7:55789-55810.
- Martin, C., Zhang, Y., 2007. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol*, 19(3):266-272.
- Martínez, O., Iglesias, Lidia, R., Llorente, Ruth, S., Martínez, G., Alberto, Z., Ana, A., 2008. Histone deacetylase inhibitors: mechanism of action and therapeutic use in cancer. Volume 10, Issue 7, pp 395–398.
- McCall, K.A., Huang, C., Fierke, C.A., 2000. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr*, 130(5S Suppl):1437S-46S.
- McLaughlin, F., Finn, P., La Thangue, N.B., 2003. The cell cycle, chromatin and cancer: mechanism based therapeutics come of age. *Drug Disc Today*, 8, pp. 793-802.
- Mehnert, J.M., Kelly, W.K., 2007. Histone deacetylase inhibitors: biology and mechanism of action. *Cancer J.* No.13(1):23-9.
- Mehta, A., Dobersch, S., Romero-Olmedo, A.J., Barreto, G., 2015, Epigenetics in lung cancer diagnosis and therapy, *Cancer and Metastasis Reviews*, 34, 2292–41.
- Meissner, A., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., 2008. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454(7205):766-770.
- Meister, A., & Anderson, M. E., 1983. Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 52(1), 711-760.
- Miller, T.A., Witter, D.J., Belvedere, S., 2003. Histone Deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 2003;46(24):5097-116.
- Minegaki, T., Suzuki, A., Mori, M., Tsuji, S., Yamamoto, S., Watanabe, Tomoyo, Tsuzuk A.i., Tsunoda, T., Yamamoto, A., Tsujimoto, M., Nishiguchi, K., 2018. Histone

- deacetylase inhibitors sensitize 5-fluorouracil-resistant MDA-MB-468 breast cancer cells to 5-fluorouraci. 6202-6208.
- Minjie, Ş., Hong, D., & Hu, Z., Wu, W., & Zhang, Y., 2015. Targeting pancreatic cancer cells by a novel hydroxamate-based histone deacetylase (HDAC) inhibitor ST-3595. *Tumor Biol.* 36:9015–9022.
- Minucci, S., Pelicci, P.G., 2006. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more). *Treatments for cancer. Nat Rev Cancer*, 6:38–51.
- Motor, S., Ozturk, S., Ozcan, O., Gurpinar, A. B., Can, Y., Yuksel, R., ... & Ozturk, O. H., 2014. Evaluation of total antioxidant status, total oxidant status and oxidative stress index in patients with alopecia areata. *International journal of clinical and experimental medicine*, 7(4), 1089
- Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T.L., G., 2015. Histone Deacetylase Inhibitors in Clinical Studies as Templates for New Anticancer Agents, 20(3): 3898–3941.
- Mustacich, D. ve Powis, G., 2000. Thioredoxin reductase. Review article. *Biochemical Journal*, 346, 1-8.
- Nebbioso, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., ... & Altucci, L., 2005. Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nature medicine*, 11(1), 77-84.
- Nehru, M.R., Singh, P.O., 2008. Nanotechnology and Cancer Treatment , *Asian J. Exp. Sci.*, Vol : 22 , No : 2 , 45 – 50.
- New, M, Olzscha, H and La Thangue, N.B., 2012. HDAC inhibitorbased therapies: can we interpret the code? *Molecular Oncology*, 6(6): 637-56.
- Nimmanapalli, R., Fumo, L., Stobaugh, C., 2003. Cotreatment with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhances imatinib-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukemia cells. *Blood*. 101(8):3236-3239.
- Nicotera, P., Bernassola, F., Melino, G., 2004. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*; 23:2757-2765.
- Nielands, J.B., 1974. *Microbial Iron Metabolism*, Academic Press, New York.
- Ning, Z. Q., Li, Z. B., Newman, M. J., Shan, S., Wang, X. H., Pan, D. S., ... & Lu, X. P., 2012. Chidamide (CS055/HBI-8000): a new histone deacetylase inhibitor of the benzamide class with antitumor activity and the ability to enhance immune cell-mediated tumor cell cytotoxicity. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 69(4), 901-909.
- Ning, L., Jaskula-Sztul, R., Kunnimalaiyaan, M., 2008. Suberoyl bishydroxamic acid activates Notch1 signaling and suppresses tumor progression in an animal model of medullary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol* 15: 2600-2605.
- Nordberg, J., Arnér, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol and Medicine*, 31: 1287-312.
- Nott, A., Watson, P.M., Robinson, J.D., Crepaldi, L., Riccio, A., 2008. S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. *Nature*, 455(7211):411-415.
- O’connor, O., Heaney, L., Schwartz, L., 2006. Clinical experience with intravenous and oral formulations of the novel histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in patients with advanced hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol.* 24(1):166-173.

- Oak, Ridge.,2006. National Laboratory, Human Genome Project Information.of Molecular Pathology Cagle, P.T., Allen, T.C. Springer, Chapter 4, 29-40
- Oraby, M.I., Rabie, R.A.,2020. Blood biomarkers for stroke: the role of thioredoxin in diagnosis and prognosis of acute ischemic stroke. *Egypt J Neurol Psychiatry Neurosurg* 56:1–8.
- Palmer, A.M., Greengrass, P.M.,Cavalla, D.,2000. The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News & Perspectives*; Vol. 13, No.6, 378-384.
- Pan, .L, Lu, .J, Huang, B.,2007. HDAC Inhibitors: A potential new category of anti-tumor agents. *Cell Mol Immunol*.4(5):337-43. 49.
- Park, S.Y., Jun, J.A., Jeong, K.J., Heo, H.J., Sohn, J.S., Lee, H.Y.,2011. Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion of breast cancer. *Oncol Rep.* 25: 1677-1681.
- Pavlopoulou, A., Spandidos, D.A., Michalopoulos, I.,2015. Human cancer databases (review). *Oncol Rep*, Jan;33(1):3-18.
- Pisoschi, A.M., Pop, A.,2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 97: 55-74
- Ponder, B. A. J.,2001. Cancer genetics. *Nature*, 411, 336-341.
- Portela, A., Esteller, M.,2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*, 28(10):1057-1068.
- Powis, G., Kirkpatrick, D.L., Angulo, M., & Baker, A.,1998. Thioredoxin redox control of cell growth and death and the effects of inhibitors. *Chemico-biological interactions*, 111, 23-34.
- Powis, G.,Montfort, W.R. 2001. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 30(1), 421-455.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., Shuba, Y.,2010. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in Molecular Medicine*;16(3):107-21.
- Qian, X., Ara, G., Mills, E., LaRochelle, W. J., Lichenstein, H. S., & Jeffers, M., 2007. Activity of the histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) in preclinical models of prostate cancer. *International Journal of Cancer*, 122(6), 1400–1410.
- Radinsky, R.,2000. Growth Factors and Receptors in Cancer Metastasis. In: Perry MC; eds. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*.Spring.
- Rahbari, R., Sheahan, T., Modes, V., Collier, P., Macfarlane, C., Badge, R. M.,2009. “A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification”, *Biotechniques*, 46 (4): 277–284.
- Reed, S.Ĭ., 2008.Cell Cycle. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA; eds. *Cancer*. 8 th Ed. Philadelphia: Lippicott-Williams&Wilkins; 79- 92
- Richon, V. M., Zhou, X., Rifkind, R. A., & Marks, P. A., 2001. Histone deacetylase inhibitors: development of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) for the treatment of cancers. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 27(1), 260-264
- Ringer, D.P., Schnipper, L.E.,2001. Principles of Cancer Biology. In: Lenhard RE, Osteen RT,Gansler T;eds. *Clinical Oncology Atlanta: American Cancer Society*; 21-35.

- Romaszko, A.M, Doboszyńska, A.,2018. Multiple primary lung cancer: A literature review. *Adv Clin Exp Med*. 2018 May;27(5):725-730.
- Rosato, R. R. and Grant, S., 2005. Histone deacetylase inhibitors: insights into mechanisms of lethality, *Expert Opin. Ther. Targets*, 9, 4, 809-824.
- Ruefli, A.A., Ausserlechner, M.J., Bernhard, D., Sutton, V.R., Tainton, K.M., Kofler, R., Smyth, M.J., and Johnstone, R.W.,2001. The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10833–10838.
- Ruzza, P., Rosato, A., Ross, C.R., Floreani, M., Quintier, L., 2009. Glutathione transferases as targets for cancer therapy. *Anti Cancer Agents Med Chem* 9:763–777.
- Saikumar, P. & Venkatachalam, M.A., 2009, *Apoptosis and Cell Death, Basic Concepts of Molecular Pathology* (pp. 29-40). Springer, Boston.
- Sakajiri, S., Kumagai, T., Kawamata, N., 2005. Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines. *Exp. Hematol.* 33(1):53-61.
- Sanaei, M., & Kavooosi, F.,2019. Histone deacetylases and histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action in various cancers. *Advanced biomedical research*, 8
- Sandalova, T., Zhond, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A., Schneider, G.,2001. Threedimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: Implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 98: 9533-9538.
- Sawan, C., Vaissiere, T., Murr, R. ve Herceg, Z.,2008. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation Research*, 642, 1-13.
- Segre, C.V., Chiocca, S.,2011. Regulating the regulators: The Post-Translational Code of Class I HDAC1 and HDAC2. *J Biomed Biotech*, doi: 10.1155/2011/690848.
- Seo, J.Y., Park, Y. J., Yi, Y. A., Hwang, J. Y., Lee, I. B., Cho, B. H., Son, H. H. ve Seo, D. G. 2015. Epigenetics: general characteristics and implications for oral health. *Restorative Dentistry ve Endodontics*, 40(1), 14-22.
- Shankaranarayanan, P., & Nigam, S.,2003. IL-4 induces apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells: evidence for the pivotal role of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid binding to activated peroxisome proliferator-activated receptor γ transcription factor. *The Journal of Immunology*, 170(2), 887-894.
- Sharman, W. M., Allen, C. M., & Van Lier, J. E.,1999. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug discovery today*, 4(11), 507-517.
- Shi, B., Xu, F. F., Xiang, C. P., Jia, R., Yan, C. H., Ma, S. Q., ... & Fan, P.,2020. Effect of sodium butyrate on ABC transporters in lung cancer A549 and colorectal cancer HCT116 cells. *Oncology letters*, 20(5), 1-1.
- Shi, X.Y., Ding, W., Li, T.Q., Zhang, Y.X., & Zhao, S.C.,2017. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), induces apoptosis in prostate cancer cell lines via the Akt/FOXO3a signaling pathway. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 23, 5793.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J. M., Pazin, M. J., Davie, J. R., & Peterson, C.L.,2006. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, 311(5762), 844-847.

- Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A.,2015. Cancer statistics, CA Cancer J Clin. 65:5–29.
- Sies, H.,Cadenas, E.,1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences, 311(1152), 617-631.
- Singh, Amit., Anupam, K.B., ID and Abhay, K., Pandey., 2018.Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy, Nutrients, 10, 731.
- Smaili, S., Hsu, Y., *et al.* 2000. Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. J. Bioener and Biomem.; 32(1):35-46. 21
- Smith, I.K., Vierheller, T.L. and Thorne, A.C., 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic acid). Analitical Biochemisty, 175, 408-413.
- Song, J., Noh, J.H., Lee, J.H., Eun, J.W., Ahn, Y.M., Kim, S.Y., Lee, S.H., Park, W.S., Yoo, N.J., Lee, J.Y., Nam, S.W.,2005. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. APMIS, 113: 264–268.
- Song, Y., Samulski, T.D.,Van Dyke, T.A.,2008.Cancer. İn: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA;eds.Cancer. 8 th ed. Philadelphia: LippicottWilliams&Wilkins; 3-12.
- Södborg, A., Sahaf, B., Rosén, A.,2000. Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: Presence in human plasma. Cancer research, 60, 2281-2289.
- Spierings, D.C, de Vries, E.G., Vellenga,E.. *et al.* ,2004. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. J Histochem Cytochem 52(6): 821-831.
- Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V.M.,2000. Apoptosis signaling. Annu Rev Biochem;69:217-45.
- Şahin, D.Y.,Elbasan, Z., Gür, M., Türkoğlu, C., Özaltun, B., Sümbül, Z., & Çaylı, M.,2012. Relationship between oxidative stress markers and cardiac syndrome X. Journal of Clinical & Experimental Investigations/Klinik ve Deneysel Arastirmalar Dergisi, 3(2)
- Taddei, A., Roche, D., Bickmore, W.A. and Almouzni, G., 2005. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromation: implications for anti-cancer therapy? EMBO Reports, 6, 6, 520–524.
- Tamura, T., Stadtman, T.C.,1996. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 93, 1006-1011.
- Tandoğan, B. ve Ulusu, N.N., 2011. Thioredoxin reductase. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 39, 87-92.
- Tandon, V.R., Sharma, S.,Mahajan, A.,Bardi, G.H., 2005. Oxidative stress: a novel strategy in cancer treatment. Jk Science, 7(1), 1-3.
- Taser,P., Çiftçi,M.,2010. Hindi Karaciğerinden Glutatyon Redüktaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Kromatografi, Erzurum.
- Tew, K. D.,1994. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. Cancer research, 54(16), 4313-4320.

- Thiagalingam, S., Cheng, H-K., Lee, J.H, Mineva, N., Thiagalingam, A. Ve Ponte, F. J.,2003. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code, *Ann.N.Y. Acad.Sci.*, 983, 84-100.
- Tidefelt, U., Elmhorn-Rosenborg, A., Paul, C., Hao, X. Y., Mannervik, B., & Eriksson, L. C., 1992. Expression of glutathione transferase π as a predictor for treatment results at different stages of acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer research*, 52(12), 3281-3285.
- Tonissen, K. F., & Di Trapani, G., 2009. Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Molecular nutrition & food research*, 53(1), 87-103
- Topal, T., Öter, Ş., Korkmaz, A.,2009. Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Derg* 2009;19(3):137-143.
- Toribio, F., Martinet-Lara, E., Pascual, P. and Lopez-Barea, J., 1996. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes, *Journal of Chromatography B*. 684, 77-97.
- Tripathy, D., Neoplasia.,1997. In: McPhee SJ,Lingappa VR,Ganong WF *et al.* ;eds. *Pathophysiology of Disease*.2nd ed.Connecticut: Appleton&Lange; 78-97.
- Vandenbroucke, R. Libert., 2014. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nature Reviews Drug Discoverey* volume13, pages904–927 (2014).
- Vannini, A., Volpari, C., Filocamo, G., Casavola, E.C., Brunetti, M., Renzoni, Prasun Chakravarty,D., Paolini, C., Francesco,R.D., Gallinari,P., Steinkühler,C.,and Marco,.D.,2004. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Elsevier*,101 (42) 15064-15069.
- Vigushin,D.M., Ali, S., Pace, P.E.,Mirsaidi ,N., Ito, K., Adcock, I., Coombes, R.C.,2000.Tric hostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clin Cancer Res* 7: 971-976.
- Volz, H.C., Laohachewin, D., Seidel, C., Lasitschka, F., Keilbach, K., Wienbrandt, A.R., Andrassy, J., Bierhaus, A., Kaya, Z., Katus, H.A., Andrassy, M.,2012. S100A8/A9 aggravates post-ischemic heart failure through activation of RAGE-dependent NF-kappaB signaling. *Basic Res Cardiol*.107(2):250.
- Vrana, J.A., Decker, R.H., Johnson, C.R., 1999. Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53. *Oncogene* 18:7016-7025.
- Wang, C., Henkes, L.M., Doughty, L.B., He, M., Wang, D., Meyer-Almes, F.J.,Cheng, Y. Q., 2011. Thailandepsins: bacterial products with potent histone deacetylase inhibitory activities and broad-spectrum antiproliferative activities. *Journal of natural products*, 74(10), 2031-2038.
- Wang, Q., Zhang, Y., Yang, C., Xiong, H., Lin, Y., Yao, J., Li, H., Xie, L., Zhao, W., Yao, Y., Ning, Z.B., Zeng, R., Xiong, Y., Guan, K.L., Zhao, S., and Zhao, G.P.,2010. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science* 327: 1004–1007.
- Wang, X., Wang, Y., Chen, Z., Shin, M.D.,2009. Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology , *Cancer Res. Treat.* , 41 (1) : 1 – 11.

- Wang, Y., Hu, P.C., Ma, Y.B., Fan, R., Gao, F.F., Zhang, J.W., Wei, L., 2016. Sodium butyrate-induced apoptosis and ultrastructural changes in MCF-7 breast cancer cells. *Ultrastruct Pathol* 40: 200-204.
- Waterland, R.A., Michels, K.B., 2007. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu Rev Nutr*, 27:363-388.
- Welsh, S.J., Bellamy, W.T., Briehl, M.M., Powis, G., 2002. The redox protein thioredoxin-1 (trx1) increases hypoxia-inducible factor 1 protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res* 62:5089-95.
- Whitney, P.L., 1974. "Affinity chromatography of carbonic anhydrase" *Analytical Biochemistry*, 57, 467-476.
- Williams, C.H.J., 1992. Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase and mercuric ion reductase - a family of flavoenzyme transhydrogenases. *Chemistry and Biochemistry of Flavor Enzymes*, 3, 121-211.
- Xiong, F., Mou, Y.Z., Xiang, X.Y., 2016. Inhibition of mouse B16 melanoma by sodium butyrate correlated to tumor associated macrophages differentiation suppression. *Int J Clin Exp Med* 8: 4170-4174.
- Xu, W.S., Parmigiani, R.B., Marks, P.A., 2007. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 26:5541-52.
- Yan, L.J., Sohal, R. S., 1998. Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(22), 12896-12901.
- Yang, M., Jones, S.S., 2014. Histone deacetylase (hdac) biomarkers in multiple myeloma. *Blood* 2013 122:1909.
- Yang, P., Ebbert, J.O., Sun, Z., & Weinshilboum, R.M., 2006. Role of the glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: a review. *Journal of Clinical Oncology*, 24(11), 1761-1769.
- Yang, X.Y., Zhou, X., and Popescu N.C., 2012. Preclinical evaluation of combined antineoplastic effect of DLC1 tumor suppressor protein and suberoylanilide hydroxamic acid on prostate cancer cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420, 325-330.
- Yang, Y., Fu, W., Chen J, Olashaw, N., Zhang, X., Nicosia, S.V., 2007. SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol*, 9(11):1253-1262.
- Yang, Z., Shen, M., Tang, M., Zhang, W., Cui, X., Zhang, Z., Pei, H., Li, Y., Hu, M., Bai, P., Chen, L., 2019. Discovery of 1,2,4-oxadiazole-Containing hydroxamic acid derivatives as histone deacetylase inhibitors potential application in cancer therapy. *Euro J Med Chem.*, Sep 15;178:116-130.
- Yokuş, B., 2013. "Epigenom ve epigenetik". *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* .5-13.
- Yoon, S., & Eom, G.H., 2016. HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases. *Chonnam Medical Journal*, 52(1), 1.
- Yost, F.J.J., Fridovich, I., 1973.. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 248: 4905-8.

- You, B.R., & Park, W.H.,2014. Suberoylanilide hydroxamic acid-induced HeLa cell death is closely correlated with oxidative stress and thioredoxin 1 levels. *International journal of oncology*, 44(5), 1745-1755.
- You, B.R., Park, W.H.,2017. Suberoylanilide hydroxamic acid induces thioredoxin1-mediated apoptosis in lung cancer cells via up-regulation of miR-129-5p. *Molecular carcinogenesis*, 56(12), 2566-2577.
- You, B.R., Park, W.H.,2010. Suberoyl bishydroxamic acid inhibits the growth of A549 lung cancer cells via caspase-dependent apoptosis. *Mol Cell Biochem* 344: 203-210, 2010.
- Zappa, C., & Mousa, S. A., 2016. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational lung cancer research*, 5(3), 288.
- Zhang, C., Richon, V., Ni, X., 2005. Selective induction of apoptosis by histone deacetylase inhibitor SAHA in cutaneous T-cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action. *J. Invest. Dermatol.* 125(5):1045-1052.
- Zhang, J., Ouyang, W., Li, J., Zhang, D. Yu., 2012.Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) inhibits EGF-induced cell transformation via reduction of cyclin D1 mRNA stability, *Toxicology and Applied Pharmacology*, ,263, 218-224.
- Zhang, J., Zhang, B., Li, X., Han, X., Liu, R., & Fang, J.,2019. Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase as potential anticancer agents: an update. *Medicinal research reviews*, 39(1), 5-39.
- Zhang, X., Jiang, S. J., Shang, B., & Jiang, H. J.,2015. Effects of histone deacetylase inhibitor trichostatin A combined with cisplatin on apoptosis of A 549 cell line. *Thoracic cancer*, 6(2), 202-208.
- Zhang, Y., Zhang, H., Yu, P., Liu, Q., Liu, K., Duan, H., ... & Zhang, G.,2009. Effects of matrine against the growth of human lung cancer and hepatoma cells as well as lung cancer cell migration. *Cytotechnology*, 59(3), 191.
- Zhang,X.,Yang,Z.,Khan,S.I.,John,R.,Horton,Hisashi.,Tamaru,Eric.,U,Selker.,Cheng,X.,,2003 . Structural Basis for the Product Specificity of Histone Lysine Methyltransferases. Volume 12, Issue 1, Pages 177-185.
- Zhao, G.S., Wang, X.B.,2006. Advance in antitumor agents targeting glutathione-S-transferase. *Curr Med Chem* 13:1461–1471.
- Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin,Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S.M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang, P., Chen, X., Lei, Q., Xiong, Y., and Guan, K.L.,2010. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 327: 1000–1004.
- Zhong, W., Yan, T.,Lim, R., Oberley, L.W.,1999. *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 1334-1345.
- Zhu, H., Tao, X., Zhou, L., *et al.* ,2019. Expression of thioredoxin 1 and peroxiredoxins in squamous cervical carcinoma and its predictive role in NACT. *BMC Cancer* 19:1–9.
- Zhu, P., Martin, E., Mengwasser, J., Schlag, P., Janssen, K.P., Gottlicher, M., 2004. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* 5: 455–463.
- Zhu, Y., Das, K., Wu, J., Lee, M.H., and Tan, P.,2014. RNH1 regulation of reactive oxygen species contributes to histone deacetylase inhibitor resistance in gastric cancer cells. *Oncogene* 33: 1527–1537.

- Zhuang, Z.G., Fei, F., Chen, Y., Jin, W., 2008. Suberoyl bis-hydroxamic acid induces p53-dependent apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* 29: 1459-1466.
- Zong, W.X., Thompson, C.B., 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*; Jan 1;20(1):1-15.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Işıl Nihan KORKMAZ
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Bandırma Şehit Mehmet Gönenc Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Ens, Kimya Anabilim Dalı (2016)
Doktora:	Atatürk Üniversitesi
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi
Tezden Üretilmiş Yayınlar	