

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YENİ SENTEZLENEN ANTİTİROZİNAZ AKTİVİTEYE SAHİP
KOJİK ASİT TÜREVLERİNİN A375 MALİN MELANOMA
HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİSİTE VE HÜCRE ÖLÜMÜ
ÜZERİNE ETKİSİNİN AYDINLATILMASI**

Rıdvan FELEKOĞLU

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2021**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YENİ SENTEZLENEN ANTİTİROZİNAZ AKTİVİTEYE SAHİP
KOJİK ASİT TÜREVLERİNİN A375 MALİN MELANOMA
HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİSİTE VE HÜCRE ÖLÜMÜ
ÜZERİNE ETKİSİNİN AYDINLATILMASI**

Rıdvan FELEKOĞLU

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ayşe ERCAN**

**ANKARA
2021**

ONAY SAYFASI**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ****SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****YENİ SENTEZLENEN ANTİTİROZİN AZ AKTİVİTEYE SAHİP KOJİK ASİT TÜREVLERİNİN
A375 MALİN MELANOMA HÜCRE HATTINDA SİTOTOKSİSİTE VE HÜCRE ÖLÜMÜ
ÜZERİNE ETKİSİNİN AYDINLATILMASI****Öğrenci: Rıdvan Felekoğlu****Danışman: Doç. Dr. Ayşe Ercan**

Bu tez çalışması 25.03.2021 tarihinde jürimiz tarafından "Biyokimya Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Gülberk Uçar*
(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Doç. Dr. Ayşe Ercan*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Yeşim Özkan*
(Gazi Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

31 Mart 2021

Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

25/03/2021

Rıdvan FELEKOĞLU

i

ⁱ"**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**"

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulgular içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Ayşe Ercan danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Rıdvan Felekoğlu

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince bilgisinden ve tecrübelerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerlerini örnek aldığım, birlikte çalışmaktan onur ve gurur duyduğum, hoşgörüsü ve desteği ile her zaman yanımda olan ve arkamda duran Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı üyesi saygıdeğer tez danışmanım Doç. Dr. Ayşe ERCAN'a,

Tez çalışmalarım esnasında, her aşamada desteğini hissetmiş olduğum, bilgisini ve deneyimlerini benimle paylaşan Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı üyesi değerli hocam Arş. Gör. Selin ÖNCÜL'e,

Bu zorlu ve stresli dönemimde beni her daim destekleyen Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve çalışanlarına,

Her zaman ve her şartta her daim yanımda olan, beni her konuda destekleyen ve güçlü kalmamı sağlayan sevgili annem Fatma FELEKOĞLU'na,

Sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Felekoğlu, R., Yeni Sentezlenen Antitirozinaz Aktiviteye Sahip Kojik Asit Türevlerinin A375 Malin Melanoma Hücre Hattında Sitotoksosite ve Hücre Ölümü Üzerine Etkisinin Aydınlatılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2021. Bu tez çalışması kapsamında, tirozinaz inhibitörü olan kojik asit türevi bileşikler incelenmiştir. A375 insan malign melanoma hücrelerine karşı sitotoksik özelliği en kuvvetli bileşiğin malign melanoma hücrelerini hangi mekanizmalarla ölüme götürdüğü ve hücre içerisinde hangi moleküler ölüm yollarını tetiklediği araştırılmıştır. Sitotoksosite için yapılan SRB deneyi sonucunda IC₅₀ değeri 9,81 µM olarak ölçülen Bileşik-15'in canlı hücreleri etkili bir biçimde ölüme götürdüğü gözlemlenmiştir. Bileşik-15'in tirozinaz inhibisyonu etkinliği için B16F10 hücrelerinin sitozölü ve kontrol olarak kojik asit kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir ve çıkan sonuçlarda kojik asitle yarışabileceği gözlemlenmiştir. Kojik asite ait IC₅₀ değeri 59,20 µM iken Bileşik-15'in IC₅₀ değeri 76,69 µM'dır. Ardından, apoptoz deneyi yapılmıştır, deney sonucunda Bileşik-15'in hücreleri apoptozun son aşamasına kadar götürdüğü gözlemlenmiştir. Bileşik-15'in A375 hücrelerinde hangi apoptotik genleri etkilediğini tespit etmek için hücrelerden RNA saflaştırılmış, ardından cDNA oluşturulmuştur. Apoptotik p53 ve Bax, anti-apoptotik Bcl-2 ve ayrıca Jnk, Mdm2 ve Mdr1 gen düzeyleri incelenmiştir. Bcl-2'nin kontrole kıyasla 0,5 kat azalması ve Bax'ın kontrole kıyasla 2,4 kat artması ile Bileşik-15'in hücreleri 24 saatte apoptoza götürdüğü gözlemlenmiştir. p53'ün aktivitesini erkenden gösterdiği Mdm2'nin oranın p53'e göre 3 kat yüksek olması hücrelerde yükselmiş olan p53 seviyesinin kontrol altına alınmış olabileceğini desteklemiştir. Mdr-1 geni için ilk 24 saatte gördüğümüz tepkinin yüksek olduğu görülmüştür. Jnk geni için herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bileşik-15'in melanoma hücrelerinde tetiklediği ölüm yolağı akış sitometrisi ile belirlenmiş ve çalışmadan elde edilen sonuçlara göre geç apoptoz oranının %58.8 olması A375 hücrelerinin programlı bir şekilde ölüme gittiği söylenebilir. A375 hücrelerinde yapılan western blot analizi ile β-Aktin, P53 ve Mdr1 proteinleri için yapılan analizlerin sonucunda bulguların gen ekspresiyon sonuçları ile tutarlı olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kojik asit, p53, apoptoz, gen ekspresyonu, sitotoksosite

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje No: 18107

ABSTRACT

Felekoglu, R., The Effect of Kojic Acid Derivatives with New Synthesized Antityrosinase Activity on Cytotoxicity and Cell Death in the A375 Malign Melanoma Cell Line, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Biochemistry Department of Master Thesis, Ankara 2021. In this thesis study, kojic acid derivative compounds which are tyrosinase inhibitors were investigated. The mechanisms that lead to death and molecular death pathways in the cells caused by which compound with the strongest cytotoxic properties against A375 human malignant melanoma cells have been examined. As a result of the SRB test conducted for cytotoxicity, it was observed that Compound-15, whose IC₅₀ value was measured as 9.81 μ M, effectively killed living cells. The enzymatic inhibition of Compound-15 was determined spectrophotometrically using the cytosol of B16F10 mice cells and kojic acid as a control. According to spectrophotometry results, it was demonstrated that Compound-15 could compete with kojic acid. Furthermore, the IC₅₀ values of kojic acid and Compound-15 were obtained as 59.20 μ M and 76.79 μ M respectively. The apoptosis test was carried out and as stated in test results, Compound-15 took the cells to the last stage of apoptosis. Then, to determine which apoptotic genes in A375 cells affected by Compound-15, RNA was purified from cells, and cDNA was synthesized. Apoptotic p53 and Bax, anti-apoptotic Bcl-2 as well as Jnk, Mdm2 and Mdr1 gene levels were examined. Bcl-2 levels decreased 0.5 times and Bax levels increased 2.4 times compared to control. Thus, it has been observed that Compound-15 leads cells to apoptosis in 24 hours. The ratio of Mdm2 in which p53 showed early activity, increased 3 times compared to p53, supports the idea that increased p53 level in cells may have been taken under control. The results obtained in the first 24 hours for the Mdr-1 gene were high. No significant change was observed in the Jnk gene compared to the control. The death pathway triggered by Compound-15 in melanoma cells was determined by flow cytometry and according to the results, it can be said that the late apoptosis rate of 58.8% leads A375 cells to more effective programmed death. As a result of the western blot and β -Actin, p53 and Mdr1 protein analysis performed on A375 cells, it was concluded that the findings were consistent with the gene expression results.

Key words : Kojic acid, p53, apoptosis, gene expression, cytotoxicity

This thesis was supported by Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit.
Project Number: 18107

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.2. Deri Kanseri	5
2.3. Malign Melanom	7
2.3.1. Malign Melanom Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri	8
2.3.2. Melanomadaki Genetik Faktörler	11
2.4 Apoptoz	12
2.4.1. Apoptozda Görülen Morfolojik Değişiklikler	17
2.5. MAPK Sinyal İletim Yolağı ve BRAF Mutasyonu	18
2.6. Melanomda tedavi	19
2.6.1. Vemurafenib	20
2.6.2. Dabrafenib	21
2.6.3. Trametinib	21
2.6.4. Dakarbazin	22
2.7. Tirozinaz Enzimi	22
2.7.1. Tirozinaz İnhibisyonları	25
2.7.2. Kojik Asit	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1. Gereç	32
3.1.1. Hücreler	32
3.1.2. Kitler ve Kimyasal Maddeler	32
3.1.3. Cihazlar	34
3.2. Yöntem	35

3.2.1. Hücre Kültürü	35
3.2.2. B16F10 Hücrelerinden Tirozinaz Elde Edilmesi	36
3.2.3. B16F10 Hücreleri ile Enzim Aktivitesi Ölçümü	37
3.2.4. Sülfürodamin B (SRB) Deneyi	37
3.2.5. Apoptoz Deneyi	38
3.2.6. Hücrelerden RNA Saflaştırılması	39
3.2.7. RNA'dan cDNA Sentezi	40
3.2.8. RT-PCR ile Gen İfadesi Analizi	41
3.2.9. Agaroz Jel Elektroforezi	43
3.2.10. Akış Sitometri ile Apoptoz ve Canlılık Tayini	44
3.2.11. Western Blot Uygulaması	45
4. BULGULAR	49
4.1. SRB Deneyi Sonuçları	49
4.2. B16F10 Hücreleri ile Enzim Aktivitesi Ölçümü	63
4.3. Apoptoz Deneyi Sonuçları	64
4.4. Saflaştırılan RNA Örneklerinin Saflık Düzeyi ve Miktarı	66
4.5. A375 Hücrelerinden Elde Edilen Total RNA Örneklerinin Agaroz Jel Görüntüleri	66
4.6. cDNA Örneklerine Ait Derişim	67
4.7. A375 Hücresinde P53, MDM2, BAX, BCL-2, MDR-1 ve JNK Genlerinin Ekspresyon Düzeyi Bulguları	68
4.8. Akış Sitometri ile Apoptoz ve Canlılık Tayini	71
4.9. Protein Miktar Tayini Bulguları	75
4.10. Western Blot Bulguları	77
5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	87
7. KAYNAKLAR	88
8. EKLER	
EK 1. Orjinallik Ekran Çıktısı	
EK 2. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
BAD	: BCL-2 ile ilişkili ölüm promotörü
BAK	: BCL-2 homolog antagonist öldürücü
BAX	: BCL-2 ile ilişkili X proteini
BID	: BH3 ile etkileşen bölge ölüm agonisti
BIK	: BCL-2 ile etkileşen öldürücü
Cdk	: Siklin bağımlı kinaz
Ct	: Eşik döngüsü
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGTA	: Egtazik asit
EtBr	: Etidyum bromür
Fas-L	: Fas ligandı
FDA	: Amerikan gıda ve ilaç dairesi
FBS	: Fetal Bovine Serum
HCl	: Hidroklorik asit
IC₅₀	: İnhibitör konsantrasyonu
JNK	: c-Jun N-Terminal kinaz
kDa	: Kilodalton
L-DOPA	: L-3,4-dihidroksifenilalanin
MAPK	: Mutajen ile aktive edilen protein kinaz
MDR1	: Çoklu İlaç Direnci Geni
NaCl	: Sodyum Klorür
NCI	: Amerikan ulusal kanser enstitüsü
NF- κB	: Çekirdek faktörü κB
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PMSF	: Fenilmetilsülfonilflorit
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR	: Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
ROS	: Reaktif oksijen türleri

SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SRB	: Sülförodamin B
TE	: Tris-EDTA
TCA	: Trikloroasetik asit
TFA	: Trifloroasetik asit
THF	: Tetrahidrofuran
T_m	: Erime sıcaklığı
TMS	: Tetrametilsilan
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNFR1	: Tip 1 TNF reseptörü
TRAIL	: TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand
TRP-1	: Tirozinaz İlişkili Protein-1
TRP-2	: Tirozinaz İlişkili Protein-2
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kanserın temel özellikleri.	4
2.2. Epidermis hücrelerde görülen kanserler	6
2.3. Malign Melanoma için risk faktörleri.	9
2.4. UVA ve UVB ışınlarının insan derisi üzerindeki etkisi	10
2.5. Melanoma Sinyal Ağı: Melanomanın oluşmasında ve gelişmesinde görev alan 3 ana mekanizmanın gösterilmektedir.	12
2.6. Apoptozis ve kanser	13
2.7. Apoptoz mekanizması	15
2.8. Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması.	16
2.9. Apoptozda oluşan morfolojik değişiklikler	18
2.10. Vemurafenib çalışma mekanizması	21
2.11. Dabrafenib ve Trametinib inhibitörlerinin çalışma mekanizması	22
2.12. Melanositler, melanozomlar ve deri içerisinde konumları.	23
2.13. Melanin pigmentinin biyosentetik yolağı	24
2.14. Kojik asitin kimyasal yapısı.	26
2.15. Melanin biyosentezinde KA'nın tirozinaz inhibitör mekanizması.	27
2.16. Tiroznaz inhibisyonu aktivitesi.	28
3.1. Işık mikroskobu altında gözlemlenen A375 hücreleri.	35
3.2. Işık mikroskobu altında gözlemlenen B16F10 hücreleri.	35
4.1. A375 hücrelerinde Bileşik-2 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiğı	49
4.2. A375 hücrelerinde Bileşik-3 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiğı	50
4.3. A375 hücrelerinde Bileşik-4 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiğı	51
4.4. A375 hücrelerinde Bileşik-5 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiğı	52
4.5. A375 hücrelerinde Bileşik-9 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiğı	53
4.6. A375 hücrelerinde Bileşik-10 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiğı	54
4.7. A375 hücrelerinde Bileşik-11 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiğı	55
4.8. A375 hücrelerinde Bileşik-13 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiğı	56
4.9. A375 hücrelerinde Bileşik-14 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiğı	57
4.10. A375 hücrelerinde Bileşik-17 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiğı	58
4.11. A375 hücrelerinde Bileşik-18 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiğı	59
4.12. A375 hücrelerinde Bileşik-19 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiğı	60

4.13.	A375 hücrelerinde Bileşik-15 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiği ($R^2 : 0,9443$)	61
4.14.	A375 hücrelerinde Bileşik-15 etkileşiminin mikroskop görüntüleri	62
4.15.	Kojik asitin B16F10 hücrelerindeki tirozinaz üzerine inhibitör etkisi	63
4.16.	Bileşik-15'in B16F10 hücrelerindeki tirozinaz üzerine inhibitör etkisi	63
4.17.	24 saat süresince Bileşik-15'in IC_{50} değerine maruz bırakılan A375 hücrelerinin kazpaz 3/7 yüzdeleri	64
4.18.	24 saat süresince Bileşik-15'in IC_{50} değerine maruz bırakılan A375 hücrelerinin sitotoksite yüzdeleri	65
4.19.	24 saat süresince Bileşik-15'in IC_{50} değerine maruz bırakılan A375 hücrelerinin canlılık yüzdeleri	65
4.20.	Saflaştırılan total RNA örneklerinin jel fotoğrafı.	67
4.21.	24 saat süresince Bileşik-15'e maruz bırakılmış A 375 hücrelerinde P53 ve Mdm2 ekspresyon düzeylerinde saptanan değişiklikler	68
4.22.	24 saat süresince Bileşik-15'e maruz bırakılmış A375 hücrelerinde Bax ve Bcl-2 ekspresyon düzeylerinde saptanan değişiklikler	69
4.23.	24 saat süresince Bileşik-15'e maruz bırakılmış A 375 hücrelerinde Jnk ve Mdr-1 ekspresyon düzeylerinde saptanan değişiklikler	69
4.24.	24 saat süresince Bileşik-15'e maruz bırakılmış A 375 hücrelerinde TP53, Mdm2, Bax, Bcl-2, Jnk ve Mdr-1 genlerinin ekspresyon düzeylerinde saptanan değişiklikler	70
4.25.	RT-PCR işlemi sırasında genlerin gösterdiği piklerin grafiği	71
4.26.	Akış sitometri analizinde A375 hücrelerine 24 saat süresince kontrol uygulanmasından sonra Annexin V ve PI boyalarla boyanma şekline göre değerlendirilmesi.(Q1:Erken Apoptoz, Q2:Geç Apoptoz, Q3:Nekroz, Q4:Canlılık)	72
4.27.	Akış sitometri analizinde A375 hücrelerine 24 saat süresince Bileşik-15'in uygulanmasından sonra Annexin V ve PI boyalarla boyanma şekline göre değerlendirilmesi.	72
4.28.	A375 hücrelerine 24 saat süresince Bileşik-15'in uygulanması ile uygulanan deney ve kontrol gruplarındaki A375 hücrelerinin % hücre değerlerinin gösterimi	73
4.29.	BCA deneyi sonucu elde edilen standart değerlerinin standart eğri grafiği ve denklemi.	76
4.30.	Bileşik-15 uygulaması sonucunda elde edilen Mdr1 ve p53 genlerinin western blot analiz sonuçları.	77
5.1.	Bileşik-15'in fiziksel ve kimyasal yapısı	79
5.2.	Apoptoz mekanizması ve efektör kaspazları	81
5.3.	Mdm2'nin p53'ü düzenlemesi	84

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Tahmini yeni kanser vakaları ve cinsiyete göre ölümlerde önde gelen on kanser türü	5
2.2. Tez kapsamında kullanılan Kojik asit ve türevleri	30
3.1. Kimyasal maddeler ve Kitler	33
3.2. cDNA için hazırlanan 1. karışım	40
3.3. cDNA için hazırlanan 2. karışım	41
3.4. RT-PCR reaksiyonu için kullanılmış olan ileri ve geri primer dizilerine ait erime sıcaklıkları ve %Guanin-Sitozin verileri.	42
3.5. RT-PCR deneyi için oluşturulan reaksiyon çözeltisi	42
3.6. RT-PCR döngü koşulları	43
3.7. Protein izolasyon için hazırlanan RİPA Çözeltisi	46
4.1. Bileşik-2'nin A375 hücrelerindeki % canlılık değeri	49
4.2. Bileşik-3'ün A375 hücrelerindeki % canlılık değeri	50
4.3. Bileşik-4'ün A375 hücrelerindeki % canlılık değeri	51
4.4. Bileşik-5'in A375 hücrelerindeki % canlılık değeri	52
4.5. Bileşik-9'un A375 hücrelerindeki % canlılık değeri	53
4.6. Bileşik-10'nun A375 hücrelerindeki % canlılık değeri	54
4.7. Bileşik-11'in A375 hücrelerindeki % canlılık değeri	55
4.8. Bileşik-13'ün A375 hücrelerindeki % canlılık değeri	56
4.9. Bileşik-14'ün A375 hücrelerindeki % canlılık değeri	57
4.10. Bileşik 17'in A375 hücrelerindeki % canlılık değeri	58
4.11. Bileşik-18'in A375 hücrelerindeki % canlılık değeri	59
4.12. Bileşik-19'un A375 hücrelerindeki % canlılık değeri	60
4.13. Bileşik-15'in A375 hücrelerindeki % canlılık değeri	61
4.14. 24 saat süresince Bileşik-15'e maruz bırakılan A375 hücrelerinin total RNA örneklerine ait 260/280 nM dalga boyu.	66
4.15. cDNA örneklerinin miktarı.	67
4.16. 24 saat boyunca Bileşik-15'e maruz bırakılmış A375 hücrelerinin Bileşik-15 uygulanmamış kontrol grubuna kıyasla elde edilen gen ekspresyon düzeylerine ait ortalama ve standart sapma değerleri.	70
4.17. A375 hücrelerine 24 saat süresince Bileşik-15'in uygulanması ile uygulanan deney ve kontrol gruplarındaki A375 hücrelerinin % hücre değerlerinin grafiği	74

- 4.18.** 2000 µg/mL içerecek şekilde artan derişimlerde 8 adet protein standartına ait 562 nm’de ölçülen absorbans değerleri. 75
- 4.19.** 48 saat boyunca Bileşik-15’e maruz bırakılan A375 hücrelerinin BCA deneyi ile ölçülen total protein düzeyleri. 76

1. GİRİŞ

Deride pigmentasyon yapan hücrelerin malign tümörü olan melanoma, dünyada görülme sıklığı hızla artan ve yüksek mortalite oranına sahip bir kanser türüdür ve diğer kanser türlerine göre daha az sıklıkta görülmesine rağmen yüksek ölüm oranı melanomayı önemli kılmaktadır. Genetik sebeplerin yanı sıra en büyük etmenin ultraviyole ışınları olduğu düşünülmekte ve güneş ışığına maruziyetin fazla olduğu bölgelerde daha sık görülmektedir. Melanın cilt renginden sorumlu olan pigmenttir ve ultraviyole hasarına karşı cilt korunmasında rol oynamaktadır. Melaninin aşırı birikimi sonucunda melazma, çiller, ve yaşlılık lekeleri gibi çok sayıda cilt problemleri ile karşılaşılabilir (1).

Bu agresif kanser türü, V600E adlı bir nokta mutasyon ile metastatik özellik kazanmaktadır. BRAF geninin 600 numaralı kodonunda Valin'in Glutamat'a dönüşümü ile karakteristik özellik kazanan bu nokta mutasyon birçok metastatik kanser türünde de mevcuttur. Vemurafenib, özellikle bu mutasyonu hedef alan FDA onaylı bir ilaçtır. Ancak gösterdiği yüksek toksisite oranı ve V600E mutasyonunu taşımayan melanoma türlerinde tümör ilerlemesini arttırmaktadır.

Tirozinaz, melanin pigmentinin biyosentezinde katalizör olarak görev alan ve fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonunu sağlayan bir enzimdir. Melaninin görevlerinden biride, canlılarda ultraviyole ışınlarına karşı koruyuculuk sağlamaktır. Melanın pigmentin aşırı üretilmesi ve birikmesi hiperpigmentasyon, melazma, postinflamatuar pigmentasyon ve patolojik durumlarda melanomaya yol açmaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda tıp, gıda endüstrisi ve kozmetikte melanin üretimini engelleyen veya azaltabilen tirozinaz inhibitörleri için yoğun bir ilgi oluşmaktadır. Günümüzde doğal veya sentetik kaynaklı birçok tirozinaz inhibitörü bulunmuştur. Tirozinaz inhibitörlerinin geneli, yapısal olarak tirozin veya L-DOPA'ya benzeyen kateşol veya fenol türevleridir. Ancak kojik asitin de dahil olduğu bu türevlerin yağdaki çözünürlükleri sınırlıdır ve stabiliteyi dayanıksızdır. Kojik asit, etkili ve tersinir yarışmalı olarak insan melanosit tirozinazını inhibe eder ve böylece melanin oluşumunu önler. Hücrel melanin oluşumunda kojik asit önemli bir rol oynar ve bakır şelatörlerinin antikanser özelliğe sahip oldukları bilgisi literatürde bulunmaktadır. Kojik asitin tirozinaz ile bakır şelasyonu yapması ve bu özelliği

barındıran yeni antiproliferatif ajanların geliştirilmesi için oldukça güçlü bir örnek olarak görülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi ve proje araştırmacısı Prof. Dr. Mutlu Aytemir'in sentezlemiş olduğu kojik asit türevi bileşikler incelenmiştir. A375 insan malign melanoma hücrelerine karşı sitotoksik özelliği en kuvvetli bileşiğin malign melanoma hücrelerini hangi mekanizmalarla ölüme götürdüğü ve hücre içerisinde hangi moleküler ölüm yollarını tetiklediği araştırılmıştır. Bu amaçla, bu yüksek lisans tez çalışmasında, sentezlenen bileşiklerin A375 insan malig

n melanoma hücrelerinin canlılığı nasıl etkilediği araştırılmıştır. Sitotoksik etkisi en yüksek olan bileşik seçilerek lüminometrik bir yaklaşımla hücre canlılığı, hücre sitotoksitesisi, efektör kaspaz 3/7 aktivasyonları açısından etkinlikleri tayin edilmiştir. Aynı bileşiğin melanoma hücrelerinde tetiklediği ölüm yolağı akış sitometrisi ile belirlenmiştir. Bu amaçla A375 hücrelerinin RNA'sı izole edilerek ölüm mekanizmalarında rol alan genlerin (p53, Bax, Bcl-2, Jnk, Mdm2, Mdr1) ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Gen ekspresyon verilerini takiben apoptotik p53 ve mdr1 proteinlerinin ekspresyon düzeyi western blotlama ile ölçülmüştür. Son olarak bileşiğin tirozinaz enzim inhibisyonu B16F10 hücrelerinin sitozölü ve kontrol olarak Kojik asit kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Bütün bu aşamaların sonucunda bu tez çalışmasının nihai amacı: sentezlenen bileşiğin yarattığı sitotoksiteden kaynaklanan hücre ölümünün kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesi, ölüm mekanizmalarını belirleyen genlerin düzeylerinin kantitatif olarak incelenmesidir. Böylece seçilimli olarak kanser hücre hattında etkili ama sağlıklı hücreye zarar vermeyen bir bileşiğin etkisi enzimatik, sitotoksik, gen ve protein ekspresyonu temelli olarak gösterilmiş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

En genel tanımıyla kanser, DNA hasarı oluşması sonucu hücrelerin düzensiz bir şekilde bölünerek kontrolsüz büyümesi ve yayılmasıdır. Kanserde hücreler her zamanki sınırları dışında büyüme gösterir, çevresinde bulunan normal hücreleri istila eder ve diğer organlara da yayılır. Kansere hücreleri, birçok etkenden dolayı değişim geçirerek kontrolsüz bir şekilde büyüme ve bölünme (hücre proliferasyonu) yeteneği kazanırlar ve bunlarla birlikte olduğu yerden vücudun başka bir bölümüne yayılım (metastaz) gösterme özelliğini kazanırlar. Buldukları yerde kitle oluşturup çoğalan ve vücudun diğer bölümlerine yerleşme eğilimi göstermeyen tümörlere benign tümör denirken ortaya çıktığı yerden diğer dokulara yayılanlara ise malign tümör denilmektedir. Malign tümörler, primer lokalizasyonlarının dışına taşarak vücudun başka bölgelerini ele geçirerek metastaz yaparlar ve ölümcül hale gelirler. Kansere hücreleri metastaz yaparken kan, lenf ya da vücut boşluklarını kullanarak diğer organlara sızar, normal hücrelerden gelen sinyallere cevap vermez, birbirlerine yapışmaz ve apoptoz sürecine girmezler. Kansere ölümlerinin en önemli sebebi metastazdır. Kansere meydana geldiği hücrelerin tipine göre değerlendirilerek dört ana başlık altında incelenir. Bu başlıklar; bağ dokusu hücrelerinde görülen sarkoma, epitel doku hücrelerinde görülen karsinoma, hematopoietik hücrelerde ve lenf damarlarında görülen lenfoma ve hematopoietik hücrelerde görülen lösemidir. Bir dokuda kansere oluşumu ve metastazın gelişiminin 10 temel özelliği vardır (Şekil 2.1) (2).

Normal hücrelerde bölünme sayısı sınırlıdır ama bu durum kansere hücrelerinde sınırsız olarak karşımıza çıkmaktadır. İmmortalite olarak bilinen bu mekanizmada kromozom uçları olan telomerler bulunur. Normal hücrelerin farklılaşması durumunda telomeraz enzimi de gittikçe azalır ve bununla beraber telomerler de kısalmaya başlar. Bu sebepten dolayı farklılaşmış bir hücre siklusu G0 fazında durur (senesans) ve sonunda çoğalma yeteneğini kaybeder. Kansere hücrelerinde ise telomeraz enzimi etkinliğini kaybetmez yani telomerlerin uzunluğu değişmez ve hücreler sınırsız çoğalma yeteneği kazanır. DNA tamir mekanizmasında saptanan eksiklikler genetik kararsızlığa neden olur. Bu durumlara bağlı olarak kansere hücrelerinin proliferasyon kontrol mekanizmalarına cevap vermesi azalır. Diğer doku ve organlarda yaşama yeteneği

elde eden klonlar oluştururlar ve metaztaz yapmaya başlarlar. Normal hücreler buldukları kültür ortamında yüzeye yapışamama durumunda bölünemezler. Normal hücreler üzerinde büyüdükleri yüzeyi tek tabaka şeklinde (monolayer) doldurduklarında besiyerleri bölünmeleri için gerekli tüm faktörleri (büyüme faktörleri ve besinler) içerse bile bölünemezler. Kültür ortamında ise kanser hücreleri büyüme faktörlerinden ve besinlerden bağımsız bir şekilde proliferasyonuna devam eder. Kanser hücrelerinin yapısında genellikle hücreler arası matriks bileşenlerini sindirecek proteazlar bulunur, bu durumun ardından normal dokular işgale uğrar. Yeni kan damarlarının oluşumu için kanser hücrelerinde büyüme faktörleri bulunmaktadır ve tümör belli bir boyuta ulaştığı zaman kendisini beslemek için yeni kan damarları (anjyogenez) oluşturulur (3).







Şekil 2.1. Kanserinin temel özellikleri (4).

Kanserin oluşması sürecinde genetik faktörlerin dışında çevresel faktörlerin de etkisi vardır. Kanser oluşumunu tetikleyici güneş ışığı, ısı, radyasyon, kronik irritasyon, alkol, endüstriyel maddeler, beslenme şekli, stres, sigara, virüs, immun yetmezlik, hareketsiz bir yaşam tarzı, yüksek tansiyon gibi bir çok faktör vardır (5).

Kanser insidans hızı ve profili az gelişmiş ve gelişmiş ülkelerde birbirinden oldukça farklıdır. Gelişmiş ülkeler bazında erkeklerde akciğer ve prostat kanserleri çoğunlukla görülürken, kadınlarda ise kolorektal ve meme kanserleri daha sık görülür, az gelişmiş ülkelerde bu durum erkeklerde akciğer, karaciğer ve mide kanserleri, kadınlarda ise serviks ve meme kanserleri olarak görülmektedir. Türkiye’de bu durum

erkeklerde mesane, akciğer ve mide kanserleri olarak görülür, kadınlarda ise kolorektal ve meme kanserlerinin daha sık görüldüğü tespit edilmiştir. Kanser hücreleri kaynak aldıkları organ-doku tiplerine göre çeşitlendirilir.100 civarında kanser çeşidi olsa da çok sık görülen birkaç tür kanser vardır (tablo 2.1). 2020 yılında Dünya sağlık örgütünden elde edilen verilere göre insidansı yüksek ve ölümcül olan kanserler meme, akciğer, prostat, kolorektal ve deri kanserleridir (6).

Tablo 2.1. Tahmini yeni kanser vakaları ve cinsiyete göre ölümlerde önde gelen on kanser türü (7)

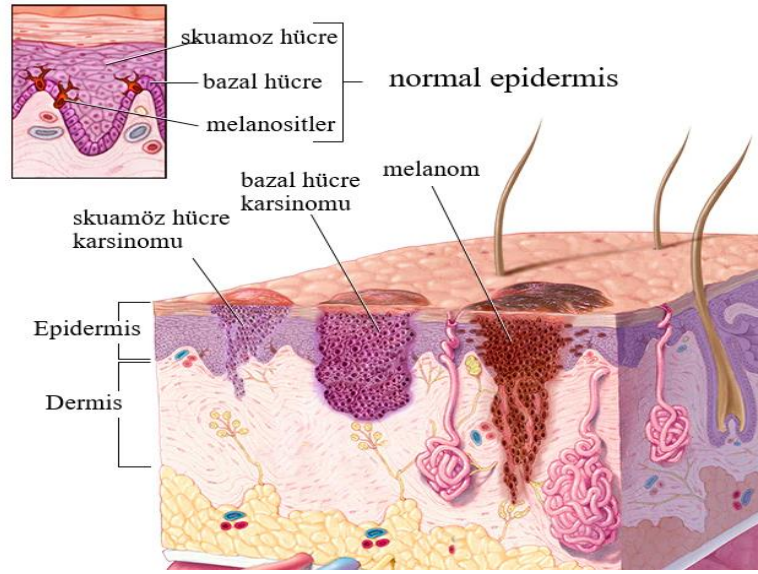
Tahmini Yeni Vakalar			Erkekler Kadınlar		Tahmini Ölümler		
Prostat	191,930	21%			Göğüs	276,480	30%
Akciğer	116,300	13%			Akciğer	112,520	12%
Kolon ve Rektum	78,300	9%			Kolon ve Rektum	69,650	8%
Mesane	62,100	7%			Rahim	65,620	7%
Deri Melanomu	60,190	7%			Tiroid	40,170	4%
Böbrek	45,520	5%			Deri Melanomu	40,160	4%
Hodgkin olmayan lenfoma	42,380	5%			Hodkink olmayan lenfoma	34,860	4%
Gırtlak	38,380	4%			Böbrek	28,230	3%
Lösemi	35,470	4%			Pankreas	27,200	3%
Pankreas	30,400	3%			Lösemi	25,060	3%
Tüm Siteler	893,660	100%	Tüm siteler	912,930	100%		
Akciğer	72,500	23%			Akciğer	63,220	22%
Prostat	33,330	10%			Göğüs	42,170	15%
Kolon ve Rektum	28,630	9%			Kolon ve Rektum	24,570	9%
Pankreas	24,640	8%			Pankreas	22,410	8%
Karaciğer ve Safra kanalı	20,020	6%			Yumurtalık	13,940	5%
Lösemi	13,420	4%			Rahim	12,590	4%
Özofagus	13,100	4%			Karaciğer ve Safra kanalı	10,140	4%
Mesane	13,050	4%			Lösemi	9,680	3%
Deri Melanomu	11,460	4%			Deri Melanomu	8,480	3%
Beyin ve Sinir Sistemi	10,190	3%			Beyin ve Sinir Sistemi	7,830	3%
Tüm Siteler	321,160	100%	Tüm Siteler	285,360	100%		

2.2. Deri Kanseri

Deri, fiziksel koruyucu bariyer olarak sıklıkla ultraviyole ışınlarına, karsinojenlere ve serbest radikallere maruz kalan vücudun bir organıdır. Diyetle vücuda giren mikroorganizmalar ve ilaçlar toksik etkilerini deri üzerinde gösterebilirler. Deri kanserleri, beyaz tenlilerde fazla görülen ve ozon tabakasının incelmesinden ötürü artan radyoaktif ışınların etkisiyle insidansı sürekli artan

malignitelerdir. Deri kanserleri, epidermiste apoptoz mekanizmasının çok az olması veya hücrelerin proliferasyon olmasından dolayı diğer kanser türlerinden ayırt edilmektedir (8).

Deri kanserleri; melanoma, bazal hücre karsinomu ve skuamöz hücre karsinomu olmak üzere üç başlıkta toplanır (Şekil 2.2). Bazal hücreli ve skuamöz hücre karsinomu, deri kanserleri arasında en yaygın olan kanser türleridir. Melanom deri kanseri ise skuamöz hücre ve bazal hücreli deri kanserlerine oranla daha az görünür ancak çok daha ciddi sonuçlara sebep olurlar (9).



Şekil 2.2. Epidermis hücrelerinde görülen kanserler (10)

Bazal hücreli karsinom, kıl folikülünün dış kök bölgesinden veya epiderminin bazal hücrelerinden bir öncül lezyon olmaksızın geliştiği bilinen, yavaş büyüyen, tedavi edilmediği zaman doku hasarı ve lokal invazyon oluşturan, nadiren metastaz yapan bir deri kanseri türüdür. Deri kanserlerinin % 80'ini oluşturur ve beyaz tenli popülasyonda en çok rastlanan kanser türüdür. Tümör, epiderminin bazal tabakasında ve bazal tabakanın eklerinden kaynaklanmaktadır. Bazal hücreli karsinom insidansının dünya çapında her yıl yaklaşık olarak %10 oranında arttığı bilinmektedir (11).

Bazal hücreli karsinom gelişiminin daha iyi anlaşılması hedgehog ileti yolağının keşfedilmesiyle başlamıştır. Bu yolak embriyonik büyüme sırasında kas-iskelet, sinir, hematopoetik sistem ve deride görev almaktadır. Hedgehog ileti yolağı derideki kök hücrelerin sağkalımı ve kıl foliküllerinin gelişimini de kontrol etmektedir. Embriyonik gelişme döneminde büyük bir öneme sahip olan bu yollar erişkin dönemde

oldukça azalmaktadır. Eğer erişkin dönemde bu yolak tekrar aktifleşirse tümörögenез ile sonuçlanmaktadır. Bazal hücre karsinomu ile ilişkili en önemli risk faktörlerinden biri de ultraviyole maruziyettir. Ultraviyoleye maruz kalınan yaş, ultraviyole miktarı ve süresi ile birlikte spesifik polimorfik genler arasındaki etkileşim bazal hücreli karsinom yatkınlığını belirleyen en önemli faktörlerden birisidir (12).

Skvamöz hücreli karsinom mukozal ve derideki epitelyal keratinositlerden meydana gelen bir deri kanseri türüdür. Skuamoz hücreli karsinom hızlı büyüme, lokal invazyon ve metastaz yapabilme özellikleri barındırır ve en sık görülen ikinci malignitedir. Melanom dışı deri kanserlerinde, Bazal hücre karsinomunun oranı % 80 iken Skuamoz hücreli karsinom oranı ise % 20'sini kapsamaktadır (13).

Genetik ve sonradan kazanılmış faktörler Skuamoz hücreli karsinom için eğilim yaratabilir. Ama yaşam boyu maruz kalınan ultraviyole B ışını miktarı Skuamoz hücreli karsinomda en önemli faktördür. Aralıklı olarak maruz kalından ultraviyole daha çok Malign melanom ve Bazal hücreli karsinom riskini artırır. Ultraviyole ışınlarından, özellikle ultraviyole (güneş spektrumunda 280-320 nm) B (UVB) ışını derideki Skuamoz hücreli karsinom'larının en önemli etken faktörü olduğu kanıtlanmıştır. Tüm bunların dışında genetik etkenlerin de rol aldığı bilinmektedir (14).

2.3. Malign Melanom

Malign melanom (MM) melanosit hücrelerinden köken alarak primer şekilde ciltte oluşum gösteren bir deri kanseri türüdür. Melanosit hücreleri derinin epidermis kısmında yer alırlar ve epidermis hücrelerinin %10'luk kısmını oluşturmalarının yanı sıra cilt rengini oluşturan melanin pigmentlerini üretirler (15). Malign melanom, cilt, göz ve saça rengini veren melanositlerin malignant dönüşümü ile kontrolsüz çoğalmasına takiben oluşan ve çoklu ilaç direncinin eşlik ettiği agresif kanser türlerinden biridir. Malign melanomalar çoğunlukla epidermiste ortaya çıkmaktadır ve bunlar invaziv (dermise doğru ilerleyen) veya *in-situ* (tamamen epidermise gömülü) olabilirler. Melanom erken evresinde sadece epidermiste görülürken, ilerleyen evrelerde yüzeysel papillar dermise kadar uzanabilen mikroinvazyonlar ve daha sonraki evrelerde ise dermisen derinlerine kadar invazyon ile metastazlar görülmesi kaçınılmazdır (16).

Malign Melanom patogenezi oldukça komplekstir ve tam olarak anlaşılması oldukça güçtür. Tüm bunlarla birlikte genetik değişimlerin birikimi, çevresel faktörlerle olan etkileşimler, onkogenlerin aktivasyonları, tümör supresör genlerin inaktivasyonları ve mekanizması bozulmuş deoksiribonükleik asit (DNA) onarımları malign melanoma patogenezlerinde önemli rol oynamaktadırlar (17).

Malign Melanom eğer tedavi edilmezse metastaz durumuna geçerek ölüme sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte, Malign Melanoma için erken aşamada tanı mümkün olursa ve tanıdan hemen sonra tedaviye başlanırsa olguların yaşamını sürdürmesi sağlanabilir. Bu aşamada Malign Melanoma oluşumunda rol alan risk faktörleri bilinirse ve risk durumundaki kişiler için gerekli tedaviler sağlanırsa hasta sayısı ve ölümlerin azaltılması açısından büyük önem taşır.

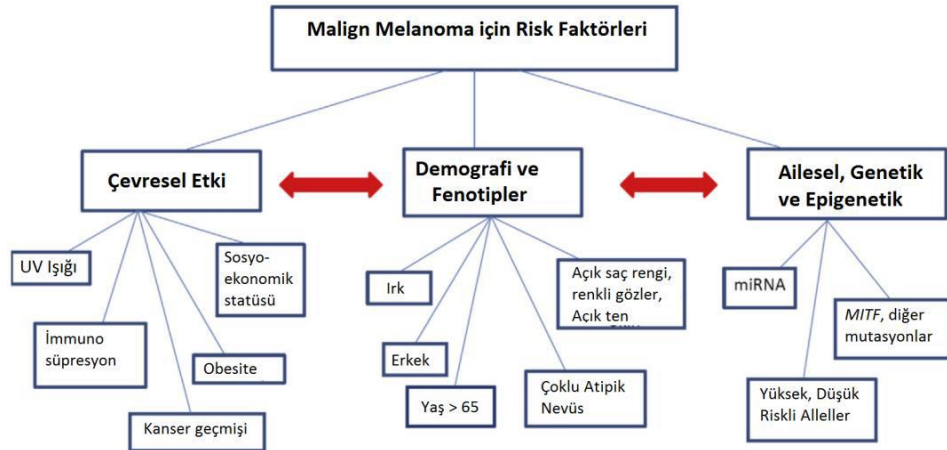
2.3.1. Malign Melanom Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Tüm deri kanserleri arasında malign melanoma kanseri en ölümcül olanı olarak bilinmektedir. Melanom deri kanserleri arasında %3'ten az bir orana sahip olmasına rağmen deri kanserine ilişkin ölümlerin yaklaşık olarak %75'inden sorumludur (18). Melanom insidansı diğer kanser formları ile kıyaslandığında, çok hızlı bir ivme gösterdiği (son 30 yıl içerisinde %237 kadar) bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre yılda 132.000 yeni malign melanom vakası oluşmaktadır. En çok vaka Avustralya'da gözlenmektedir. Avustralya'daki insidans oranı 40/100.000 kişi iken, bu oran Kuzey Avrupa ülkelerinde ise 5/100.000 kişidir. Genel olarak tüm Avrupa'daki melanom insidansı ise 12/100.000 kişidir. Yaşam süresi boyunca melanom gelişme riski her yerde farklıdır, Avustralya'da bu risk %4 iken, Amerika ve Avrupa'daki ülkelerde ise bu risk %0,5 ile %1 arasında değişmektedir (19). Türkiye'nin de içinde bulunduğu Avrupa ülkelerindeki malign melanoma insidansının hesaplandığı GLOBOCAN araştırmasında, Türkiye'deki deri malign melanoma görülme aralığı 100.000 kişide 2.1 olarak bildirilmiştir (20).

Diğer deri kanserleri, melanomdan yaklaşık olarak 20 kat daha sık görülebilmektedir. En sık görülen deri kanseri bazal hücreli karsinom, ikinci olarak görülen tür ise skuamöz hücreli karsinomdur. Bazal hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinomdan'dan yaklaşık olarak 4 kat daha sık görülebilmektedir (21).

Melanomun görülme olasılığı yaşla birlikte artan bir durumken genç yaşlarda ise (20-45 yaş arası) en üst noktaya ulaşır (22). SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results)'in 2014-2016 yılları arasında yaptığı çalışmanın sonuçlarında erişkinlerde, yaşam süresi boyunca malign melanoma gelişme riski yaklaşık %2.3 olarak tespit edilmiştir (23). Ultraviyole ışıklardan kaynaklanan maruziyetin artışı ve solaryum kullanımı nedeniyle genç kadınlarda malign melanom insidansında artış olduğu da bildirilmiştir.

Malign melanomanın ortaya çıkması ile büyüme evresinde rol oynayan başlıca 3 ana risk faktörü vardır. Bunlar; çevresel olarak oluşan risk faktörleri, genetik olarak oluşan risk faktörleri ve gen-çevre etkileşimi ortaya çıkan fenotipik risk faktörleridir (Şekil 2.3.) (24). Çevresel ve genetik faktörler, DNA tamir mekanizmalarını bozabilen genetik mutasyonların birikmesine neden olur. Bu bozunmalar melanosit proliferasyonunun oluşması, tümör invazyonu gerçekleşmesi, kan damarı oluşumları ve metastazların görülmesidir (25).

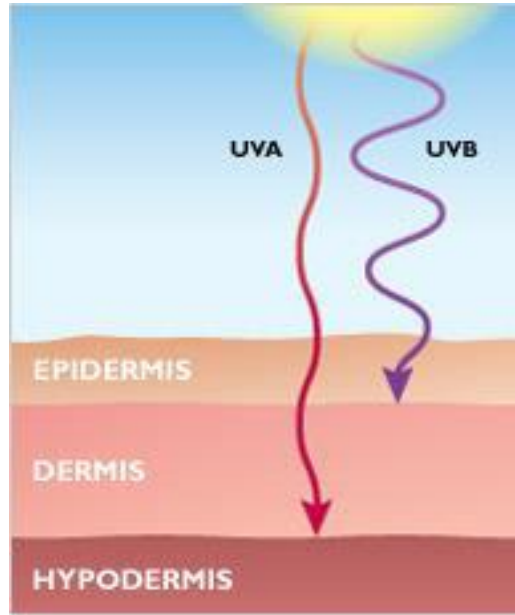


Şekil 2.3. Malign Melanoma için risk faktörleri (26).

Güneş yanığı, ışığa bağlı yaşlanma (fotoaging), bağışıklık sistemi sorunları, DNA hasarı ve deri kanserleri gibi potansiyel zararlı etkenler göz önüne alındığında, UV ışınlarından kaçınmak son derece önemlidir. Malign melanom oluşumu ve gelişiminde görülen son derece önemli olan çevresel risk faktörü ultraviyole radyasyonlarıdır. Aralıklı yada yoğun ultraviyole maruziyeti malign melanom oluşumu ve gelişimi için en önemli etkenlerden birisidir (27).

Yeryüzüne ulaşan güneş ışığı iki tür zararlı ışıktan oluşur, bunlar uzun dalga ultraviyole A (UVA, 320-380 nm) ve kısa dalga olan ultraviyole B (UVB, 280-320 nm)

olarak bilinirler. Derimiz için, UVA ışınları derinin en kalın tabakasına kadar yani dermise etki edebilirken UVB ışınları ise sadece epidermise kadar etki edebilir (Şekil 2.4.). Ultraviyole ışığın sebep olduğu deri hasarları genellikle fotosensitize işlemler tarafından oluşturulan serbest (singlet) oksijenler, süperoksit anyonlar ve hidrojen peroksitler gibi ROS (reaktif oksijen türleri) tarafından kaynaklandığı bilinmektedir (28). UV radyasyonu tarafından meydana gelen ROS, sadece deride doğrudan oksidatif hasara neden olmaz, bunun yanında hücre içindeki "serbest" demirde de ani artışlara neden olur. Serbest demirdeki ani artışlar ROS'un protein, lipid ve DNA'daki oksidatif reaksiyonlarda bir katalizör gibi davranış göstererek zararlı etkisini arttırdığını gösterir. Serbest demir, redoks döngüsüne hücre indirgeyici ajanların varlığında katılarak spesifik biyolojik hasarlar meydana getiren ilave ROS'un oluşmasına sebep olur. Bu sebeplerden dolayı demir katalizli oksidatif hasar önlenemeyecek durumlar oluşturmaktadır. Işınlanmaya maruz kalındıktan sonraki ilk birkaç saat boyunca demir hücre oksidatif hasarını şiddetlendirici kritik bir etki süresine sahiptir (29).



Şekil 2.4. UVA ve UVB ışınlarının insan derisi üzerindeki etkisi (28)

Ultraviyole maruziyeti çok kısa süreli olsa bile ROS'un hücre içerisinde mevcut olduğunu unutmamak gerekir. Hücrelerde mevcut olan ROS ilave fotosensitize olmamış mekanizmalar tarafından üretilmektedir. Bu durumun sebebi, NADPH oksidaz gibi enzimatik sistemlerin süperoksit radikaller üreten aktivasyonunun

olmasıdır. Hücredeki fazla ROS üretimi, iltihap oluşturuucu maddelerin sentezini sağlayan sinyal iletim süreçlerini başlatır. Ayrıca ferritin sentezini de kapsayacak şekilde strese adaptif cevap oluşturan yeni gen ürünlerinin oluşumunu sağlar (28).

2.3.2. Melanomadaki Genetik Faktörler

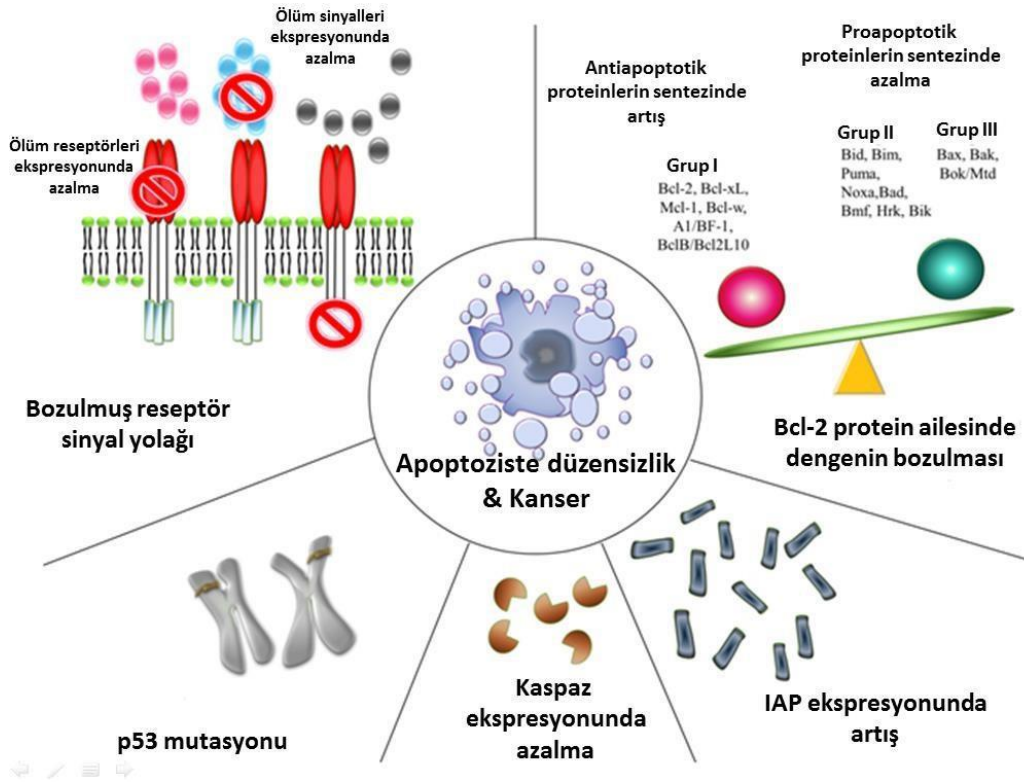
Malign melanoma, hücre sikluslarındaki proto-onkogenlere yeni özellikler kazandıran mutasyonlar ve tümör baskılayıcı genlerindeki fonksiyonların kaybıyla sonuçlanan mutasyonlardan oluşmaktadır (25, 27). Bir çok kanser tipinde yaygın olduğu gibi malign melanoma kanserinde de protoonkogenlerin mutasyonlar sonucu onkogenlere dönüşmesine ek olarak, tümör baskılayıcı genler çalışmaktadır. Melanomagenezdeki onkogenlerden olan BRAF, NRAS, KIT aktif duruma geçerken, tümör baskılayıcı genlerden CDKN2A, p53 ve PTEN ise inaktiv duruma geçmektedirler (30).

Hücre büyümesi ve bölünmesi için negatif bir düzenleyici olan CDKN2A genindeki sporadik ve germline olarak görelen mutasyonlar ile hücre döngüsündeki pozitif düzenleyicilerin aktivasyonu sonucu melanoma oluşumu görülmektedir. CDKN2A geni hücre döngüsünü yavaşlatabilen ve apoptozis mekanizmasında görev alan p14ARF ve p16INK4a proteinlerini kodlar. P16INK4a ise CDK4/6 yapısına bağlanarak bu yapıyı inhibe etmektedir (31). Bunun sonucunda tümör baskılayıcı proteinlerden olan RM-1 (retinablastoma), CDK4/6 tarafından fosforile edilemediği için P16INK4a proteininde görülen fonksiyon kayıplarına ek olarak hücre büyümesi ve bölünmesi döngüsünde hasarlar ortaya çıkar ve bu hasarlar tümör gelişimini hızlandırır (31).

P14ARF, MDM2 proteinine bağlandığı zaman MDM2 proteinini parçalayarak p53'ün dengelenmesini sağlar. Yani p14ARF proteini MDM2'yi aktivasyon durumuna geçirerek p53 proteinin negatif olarak düzenlenmesini sağlar. P16INK4A proteini ve p14ARF proteininin inaktivasyonları sonucu p53 proteini de inaktive olur ve bu durum melanoma oluşum ve gelişiminde çok önemli bir basamak olarak görülmektedir (32).

c-KIT reseptör tirozin kinaz, melanogenez oluşum sürecinde MAPK sinyal yolağını aktifleştirerek hücre çoğalmasında rol almaktadır. MAPK sinyal yolağı RAF, RAS, ERK, MEK proteinlerinin çeşitli fonksiyonlara sahip olduğu, hücre büyümesi ve hücre çoğalmasından sorumlu olan bir sinyal yolağıdır (25, 27). Malign melanom

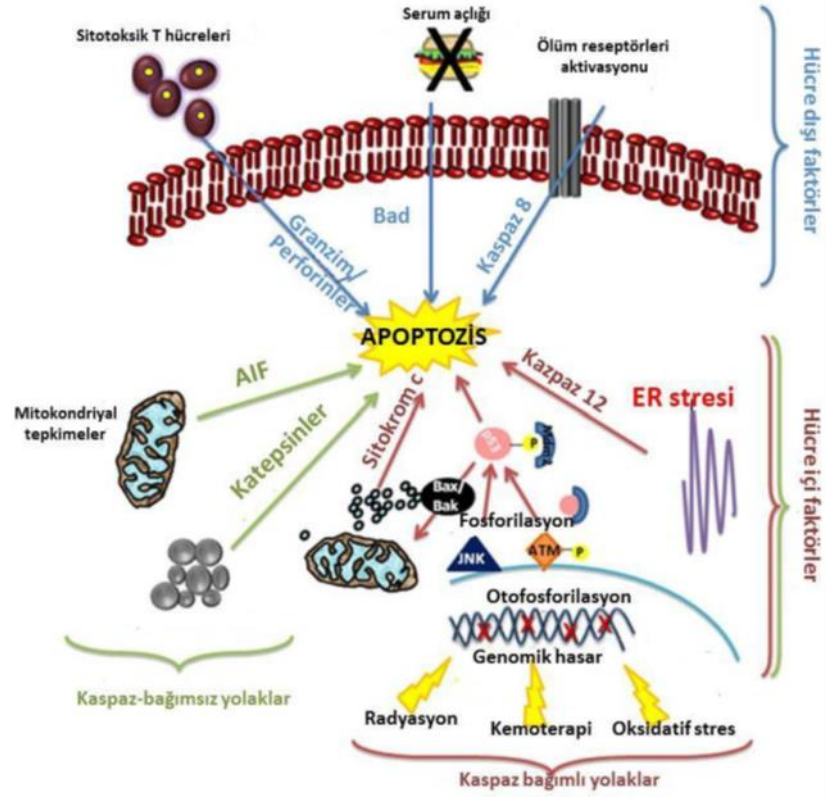
sebepler sonucunda hücre dengesini kaybedip apoptoza gider. Bu olayların kontrol edilememesi sonucunda hücre içinde oluşan düzensizlik, olası genetik bozulmalar ve hatta kanser oluşumunun görülmesi ile sonuçlandığı için apoptoz bu tarz hücreleri yok ederek organizmanın genel korunumunu sağlar (Şekil 2.6.) (35).



Şekil 2.6. Apoptozis ve kanser (36)

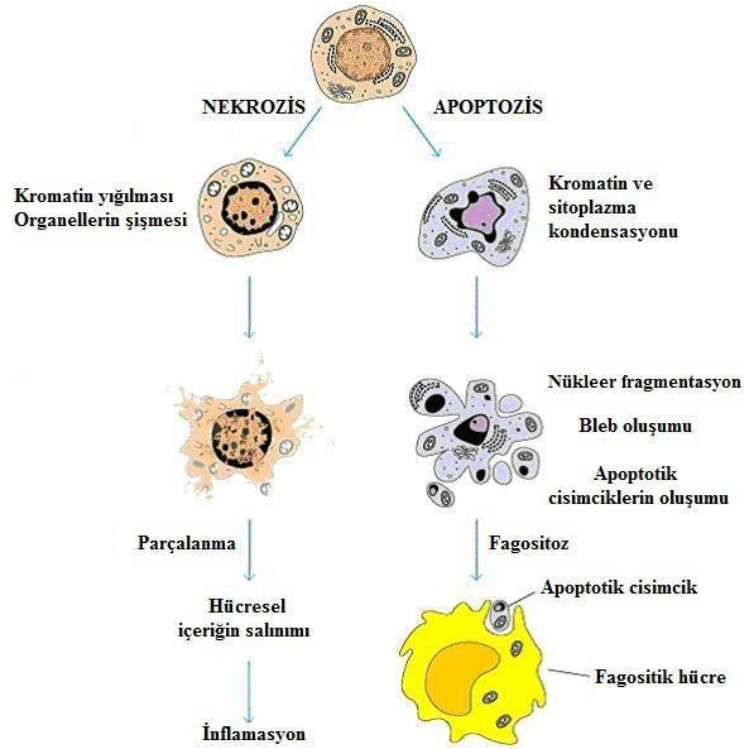
Apoptoz mekanizmasının çalışma aşamaları; ilk olarak apoptozun başlatılması, daha sonra hücre içi kaspazlarında (proteazlar) aktivasyonun oluşması, hücrede çeşitli biyokimyasal değişikliklerin meydana gelmesi ve son adım olan fagositoz ile birlikte dört aşamadan meydana gelir. Hücre tarafından harekete geçirilen genetik mekanizma hücrenin apoptoza gitmesini sağlar. Bu süreçte apoptoz için hücre içi veya hücre dışı oluşan sinyallerden sonra hücrede morfolojik ve biyokimyasal değişimler meydana gelir. Hücre içi kaspazların aktivasyonu, hücre içi ve hücre dışı oluşan sinyallerin yardımıyla sağlanır (Şekil 2.7.). Meydana gelen uyarılarla sonucunda hücre, yapışık olduğu zeminden ve etrafındaki hücrelerden ayrılarak küçülmeye başlar. Küçülen hücreler kondanse olur, hücre iskeleti parçalanır, çekirdek zarının bir bölümü erir ve çekirdeğin DNA'sı parçalarına ayrılır. DNA fragmantasyonu ve hemen ardından kromatin kondensasyonu ile süreç devam eder. Süreç devam ettikçe membran ile

çevrili olan veziküller görülür ve bu veziküller, fagositler ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilir. Bir saniye içinde bir milyon kadar hücremiz apoptoz mekanizması tarafından vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Mitoz ile bu hücrelerin yerine yeni hücreler yapılmaktadır. Mitoz (yapım) ile apoptoz (yıkım) arasında kontrollü bir denge durumu vardır. Homeostazi çok hücreli canlılarda, mitoz ve apoptoz arasındaki denge ile sağlanır. Bu denge durumunun apoptoz lehine ya da aleyhine gitmesi sonucunda birçok hastalık oluşur. Mekanizmada ortaya çıkan bir aksaklık apoptozun inhibisyonuyla sonuçlanıp neoplastik hücrelerin kontrolsüz bir şekilde artmasına ve tümör hücrelerinin de bağışıklık sisteminden kaçmasına neden olabilmektedir. Apoptozun aktifleştiği durumlarda ise hepatit C enfeksiyonu, AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insülin bağımlı diyabet, ateroskleroz, miyokard enfarktüsü, gibi hastalıklar görülebilir. Tüm bu sebeplerden dolayı bu denge vücudumuz için büyük önem taşımaktadır (37). Ayrıca radyoterapi ve kemoterapinin apoptozu tetikleyerek etkilediği bilinmektedir, apoptozu yönetmeyen kanser hücrelerinde terapiye yanıt alınmayabilir. Bu nedenle apoptoz mekanizmasına karşı kanser hücrelerinin oluşturduğu direnç büyük bir problem oluşturmaktadır. Tüm bu bilgilerin ışığında hücrelerin hangi yollarla veya sebeplerle hücre ölümüne karşı direnç kazandığı ve apoptoz yolağında oluşan bozulmaların kansere nasıl sebebiyet verdiğini anlamak çok önemli bir noktadır. Apoptoz mekanizmasının yeterince aydınlatılması mevcut tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir (38).



Şekil 2.7. Apoptoz mekanizması (39)

Apoptoz dışında bilinen bir başka hücre ölüm yolu da nekrozdur (Şekil 2.8.) . Nekroz mekanizmasında ise hücre zarı veya hücre içindeki metabolik süreçlerin hasar görmesi durumunda zarın geçirgenliği ve işlevi bozulur. Bunun sonucunda hücre şişmeye başlar, daha sonra hücre membranı patlar ve hücrenin içinde bulunan maddeler dışarıya doğru dağılır. Böylece inflamasyon uyarılır. Nekroz mekanizmasına uğrayan hücreler, biyolojik bir kaza sonucunda ölümle sonuçlanan patolojik bir yola girerler (40).



Şekil 2.8. Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması (41).

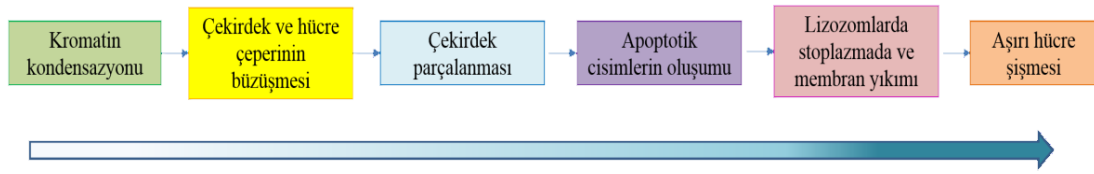
Bir hücrenin nekroza ya da apoptoza gideceği gelen sinyalin tipine veya seviyesine bağlıdır. Radyasyon, sıcaklık, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi uyarılar düşük dozda apoptoza, yüksek dozda ise nekroza sebep olabilmektedir. Apoptoz kanser ile bağlantılı olup, kaspazlar olarak bilinen bir grup sistein proteazın aktivasyonuna ve enerjiye gereksinim duyan bir süreçtir. Hücrede proapoptotik proteinlerin, antiapoptotik proteinlere göre oranı daha yüksek düzeyde ise hücre apoptoza yatkındır. Bunun tam tersi durumunda antiapoptotik proteinlerin oranı daha fazla ise hücre apoptoza daha az yatkındır. Proapoptotik üyeler; BAK, BAX, BAD, BİD, BOK/MTD, BİM, NOXA, HRK, PUMA, p53 olarak sıralanabilir. Antiapoptotik üyeler ise BCL-W, BCL-XL, BCL-2, BCL-B/BCL-2L10, A1/BF-1 ve MCL-1, olarak sıralanabilir. Hücrenin apoptoza gitme durumu, hücre içi BCL-2/BAX oranının seviyesine göre değerlendirilir. Hücrede BAX oranının yüksek olduğu durumlarda apoptoza gidilir. Eğer hücrede BCL-2 oranı daha fazla ise apoptoza gidilmez. Aşırı miktarda BCL-2 ifadesinin, melanoma hücrelerinde TRAIL'in indüklediği apoptozu inhibe ettiği, tümör malignite derecesinde artışa sebep olduğu anlaşılmıştır (35).

p53 proapoptotik bir proteindir. DNA koruyucusu ve tümör baskılayıcısı olarak görev yapar (40). Kaspaz 3, 7, 8 ve 9 enzimlerinin aktivasyonunu sağlayarak apoptoz

mekanizmasını uyarır. Böylece malignant oluşumu durdurulur. DNA veya hücre hasar gördüğü zaman p53, DNA’da belli genlerin aktivasyonuna (Apaf-1, Fas, BAX), belli genlerinde baskılanmasına (BCL-XL, BCL-2) sebep olarak apoptoz mekanizmasını etkiler (40). Kanserde en sık rastlanan genlerden biri olan p53 (%50-55) mutant genidir. Normal hücrelerde DNA hasarı meydana geldiği zaman bununla birlikte p53 seviyeside artar. Artan p53 seviyesiyle, hücre siklusu bölünmesinin kontrol noktalarından biri olan G1’i durdurarak DNA tamiri için hücreye ekstra zaman kazandırır. Bu sürede hasarın tamir edilmemesi durumunda bile hücre apoptoza gidebilir (42). Ancak hasarlı hücrelerde p53 proteini mutasyona geçirirse, hücre bölünmesinde G1 fazında duraklama olmaz, tamir için yeterli süre de sağlanmadığı için G1 fazından sonra oluşan S fazında hata oranı iki katına çıkar. Apoptozun belirlenmesinde belli başlı yöntemler kullanılmaktadır; agaroz jel elektroforezi, giemsa boyama, hematoksilen-eozin boyama, elektron mikroskopi, faz kontrast mikroskopi, TUNEL yöntemi, floresan mikroskopi, kaspaz 3-7 yöntemi, ELIZA yöntemi, flow sitometri ve western blotting olarak sayılabilir (43).

2.4.1. Apoptozda Görülen Morfolojik Değişiklikler

Apoptoz başlatıcı sinyal yolları aktif olduğu sürece hücre içindeki kalsiyum hücre dışına gönderilir ve hücredeki ATP’nin tamamı kullanılır. Hücre zarı patlamadan hücre küçülmeye doğru gider. Çekirdek zarına doğru kromatinler ilerlemeye başlar. Sırasıyla, yüzeydeki organellerin kaybı, sitoplazmik baloncukların görülmesi ve apoptotik cisimlerin oluşmasıdır. Hücreler apoptozun başlaması ile ilk olarak komşu hücrelerle olan temaslarını kaybederler ve ardından yuvarlaklaşır. Hücreden hücreye bu durumlar farklılık gösterebilir. Fakat çoğunlukla çekirdek büzülür ve düzensizleşir. Kromatinler yoğunlaştıktan sonra parçalar halinde toplanmaya başlarlar. K^+ , Na^+ , Cl^- pompalarında ve iyon kanallarında aktivasyon sistemi durur. Bunun sonucunda hücre içi ve hücre dışı arasındaki sıvı hareketi gerçekleşmez, hücreler tutunma bölgelerinden apoptozun başlamasından hemen sonra ayrılır ve büzülmeğe başlarlar. Apoptozda görülen morfolojik değişiklikler (Şekil 2.9.)’da belirtilmiştir (44).



Şekil 2.9. Apoptozda oluşan morfolojik değişiklikler (44)

2.5. MAPK Sinyal İletim Yolağı ve BRAF Mutasyonu

MAP kinaz (mitogen-activated protein kinases) ailesi serin, treonin ve tirozine özgü bir sinyal yolağıdır. Tüm hücrelerde bulunur ve bilgilerin hücre zarından çekirdeğe kadar aktarılmasında rol alır. Ayrıca MAPK sinyal yolağı RAF, RAS, ERK, MEK proteinlerinin fonksiyonel olarak çalıştığı, embriyogenezis, yaşama, poliferasyon, farklılaşma ve apoptozis olaylarının düzenlenmesinde görev alır (25, 27, 45). Tümörlerde sıkça görülen RAF, RAS ailesi mutasyonları sebebiyle MAPK sinyal yolağı aktiftir. İnsan tümörlerinin yaklaşık olarak %30'unda MAPK sinyal yolunun yoğun aktivasyonu görülüp melanomda ise bu oran yaklaşık olarak %90'dır. RAS ve RAF'ta görülen mutasyonlar bu yoğun aktivasyonun sorumlusu olarak bilinmektedir (45). RAS ve RAF protoonkogen olarak bilinirler. Dinlenme durumundaki hücrelerde RAS proteinleri inaktif durumda bulunurlar. Hücrelere sinyal gönderilmesi ile aktif duruma geçen bu proteinler sinyali hızlıca başlatırlar. Aktivasyon durumuna geçen RAS proteinleri, RAF kinazlara bağlanırken yüksek bir afinite gösterirler ve RAF kinazların hücre membranında yerleşmesini sağlarlar. Bu aktivasyonların ardından sırasıyla MEK ve ERK'in aktifleşmesi meydana gelir ve oluşan sinyal çekirdeğe iletilir. RAF kinaz'ın inhibitörleri birçok farklı kanser ve melanomda kullanılmaktadır (46). RAS kinaz üyesi olduğu bilinen BRAF mutasyonlarının keşfedilmesi melanom çalışmalarında ilerleme ve yeni tedavilerin bulunmasında çok önemli katkılar sağlamıştır (25, 27).

BRAF geninin kodladığı bir serin/treonin kinaz proteini olan BRAF, MAPK/ERK sinyal gönderim yolağında görev alan Raf kinaz ailesine üyedir. Hücre bölünmesi ve hücre farklılaşması olaylarında görev alır. BRAF geninde ortaya çıkan mutasyonlar melanomun da içinde bulunduğu çoğu kanser türünde önemli roller oynamaktadır. BRAF geninde en çok görülen mutasyonlar nokta mutasyonlarıdır (47). Yapılan kanser çalışmalarında melanom hücrelerinin yaklaşık %60'ında aktif

durumda BRAF mutasyonu saptanmıştır (48). Normal olarak BRAF geni hücre büyüme sinyallerinin cevaplanmasında diğer RAF kinaz üyeleri ile homo-heterodimerizasyon durumunda bulunmaktadır. Fakat aktive edici bir mutasyon ile birlikte, BRAF sürekli kendi kendine yetebilen aktif monomer durumuna dönüşür. Tüm bu süreçlerin sonucunda ortaya çıkan kontrolsüz hücre çoğalması, tümör oluşumu ile büyümesi ve gelişmesinde rol oynamaktadır. BRAF'ın aktivasyon gösterdiği mutasyonların %90'ında glutamik asidin valin yerine geçerek V600E mutasyonu göstermesi ve bu mutasyonun tüm melanom vakalarının yaklaşık olarak %60'ını oluşturduğu bilinmektedir (48, 49). Melanom metastazlarındaki aktif BRAF varlığı, bu mutasyonun sürekli olarak hücre büyümesini stimüle ettiğini göstermektedir. Tüm bunların sonucunda, melanoma hastalarında gözlenen bu yüksek BRAF^{V600E} oranı, anti-melanom tedavileri için potansiyel hedef olarak görülebilir (50).

2.6. Melanomda tedavi

Kanserdeki tedavi yöntemleri hastaya bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bu değişkenlikler hastanın cinsiyetine, yaşına, etnik kökenine, sosyoekonomik durumuna, aile geçmişi, herhangi bir mutasyonun gözlenip gözlenmediği, daha önce kanser geçmişi olup olmadığına, bir otoimmün hastalığının bulunup bulunmadığına, kanserin evresine ve kanserin köken aldığı dokuya göre belirlenir. Bazı durumlarda ilk olarak tümörün küçülmesi için ameliyat öncesinde kemoterapi uygulanmaktadır ve daha sonra kullanılmak istenen yöntem ise cerrahi müdahale ile kanser kitlesinin vücuttan uzaklaştırılmaya çalışılması işlemidir. Daha sonra ise kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerine başvurulur, immunoterapi ve hedeflenmiş tedavi (hasta odaklı tedavi, hastada gözlenen mutasyon ve diğer durumlara göre o hastaya özgü tedavi yöntemleri belirlenebilir) yöntemleri de destek tedavi olarak uygulanabilmektedir (51).

Kanser hastalığında yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisi kemoterapidir. Kemoterapi kanserin ilaç ve kimyasal maddeler ile tedavi edilmesi sürecidir. Kemoterapi, hücrelerin biyokimyasal süreçleri hedef alınarak hücrelerin proliferasyonunu engellemek, normal hücrelere zarar vermeden önce anormal hücreleri etkisiz hale getirmek, metastaz olasılığını düşürmek ve tümör gelişimini durdurmak için kullanılır. Kemoterapide kullanılan ilaçlar DNA alkilleyici ajanlar, topoizomeraaz inhibitörleri, mitotik inhibitörler, anti-tümör antibiyotikler ve kortikosteroidlerdir (52).

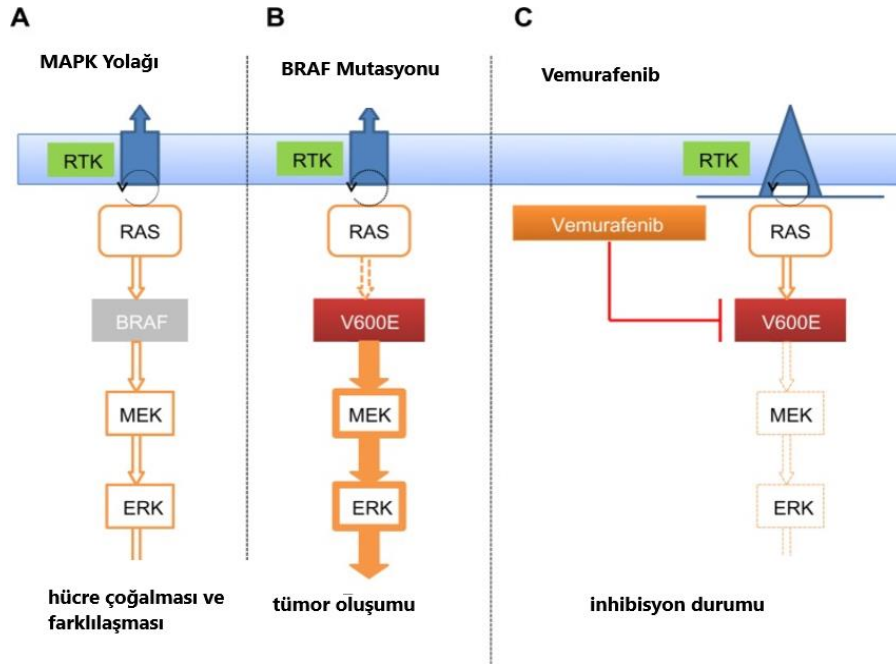
BRAF mutasyonu için kullanılan BRAF inhibitörleri pozitif hastalarda metastatik melanoma tedavisi için çok önemli gelişmeler sağlamıştır. BRAF mutasyonunun tedavisinde kullanılan bu inhibitörler daha sonra BRAF-MEK mutasyonları için de ikili ajan kombinasyonları olarak kullanılmaya başlanmıştır.

BRAF mutasyonu inhibitörleri olan Vemurafenib ve Dabrafenib malign melanom olgularında antitümoral etkinlik göstermiş olup ve FDA tarafından kullanım onayları alınan ilaçlardır. MEK inhibitörleri olan Trametinib ve Cobimetinib ise 2013 yılında tek ajan inhibitörleri olarak FDA tarafından onay almışlardır (49). Vemurofenib ve Dabrafenib tedavileri Dakarbazin tedavisiyle kıyaslandığında malign melanom olgularında önemli ölçüde kanser progresyonunu durdurduğu, hastaların genel sağkalımını artırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca BRAF inhibitörleri MEK inhibitörleri ile kombine edildikleri aktivasyonlarda MAP kinaz sinyal yolağında inhibisyonu desteklediği ve genel sağkalımı önemli bir derecede artırdıkları gözlemlenmiştir. BRAF-MEK inhibitörleri arasındaki kombinasyon dabrafenib-trametinib ve vemurofenib-cobimetinib şeklinde yapıp melanom tedavisinde geçerli standart bir tedaviye dönüşmüştür (53).

Melanom tedavisinde BRAF ve MAPK inhibitörlerinin gösterdiği umut verici gelişmelere rağmen, MAPK yolağındaki aktivasyonlara bağlı olarak oluştuğu düşünülen bir takım mekanizmalar sonucunda bu ilaç ve ilaç kombinasyonlarına karşı direnç gelişebilmektedir (54).

2.6.1. Vemurafenib

Vemurafenib BRAF mutant kinazlara karşı güçlü bir inhibitördür. Mutant form BRAF'ın inhibisyonunu sağlayarak etki gösterdiği için, Vemurafenib melanomdaki BRAF mutasyonları için önemli ölçüde özgüllük sağlamaktadır. İlk defa kanser tedavisi alacak olan 675 hastada, Vemurafenib ve Dakarbazin'in etkinliği karşılaştırılmış ve çalışmanın sonuçlarına bakıldığında Vemurafenib'in, toplam sağkalım ve toplamda en iyi cevap süresi açısından Dakarbazin'e göre oldukça üstün sonuçlara sahip olduğu gözlemlenmiştir (49, 55). Yapılan klinik çalışmaların sonucunda, Vemurafenib'in oldukça etkili ve hastalar tarafından iyi bir şekilde tolere edilebildiği gösterildiği için 2011 yılında FDA tarafından, BRAF^{V600} mutasyonlu melanom hastalarında kullanım onayı verilen bir ilaç olmuştur (55).



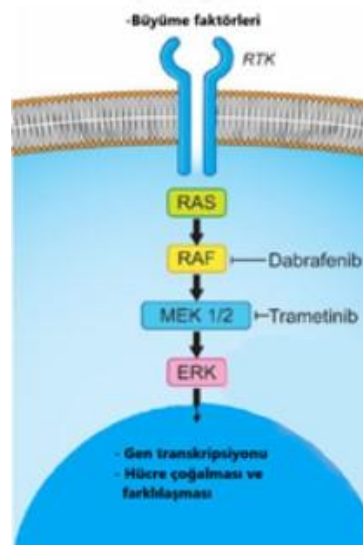
Şekil 2.10. Vemurafenib çalışma mekanizması

2.6.2. Dabrafenib

Dabrafenib, Vemurafenib'in etki mekanizmasına benzer aktivasyonu olan bir ilaçtır. BRAF^{V600E} mutasyonuna sahip 250 melanoma hastası üzerinde yapılan bir çalışmada, Dabrafenib ile Dakarbazin ilaçlarının etkinlikleri karşılaştırılmıştır ve elde edilen verilere göre Dabrafenib'in daha güvenli ve etkili olduğu anlaşılmıştır. Aynı zamanda sağkalım açısından değerlendirildiğinde Dakarbazin'den daha üstün olduğu anlaşılmıştır (54).

2.6.3. Trametinib

Trametinib, BRAF^{V600E} mutasyonuna sahip ileri evre melanom hastalarında anlamlı sonuçlar gösteren bir MEK inhibitörüdür. Etki mekanizması Vemurafenib ve Dabrafenib'den farklılık gösteren bir ilaçtır. Trametinib'in etki mekanizması, MEK ekstraselüler sinyal-düzenleyici kinazlarda oluşturulacak inhibisyon ile BRAF'ın baskılanması esas alınmıştır (55). Trametinib'in tek ajan hedefli olarak kullanıldığı tedavilerde ve Vemurafenib ile kombinasyon şeklinde kullanıldığı tedavilerde etkinliği gözlemlenmiştir (56).



Şekil 2.11. Dabrafenib ve Trametinib inhibitörlerinin çalışma mekanizması

2.6.4. Dakarbazin

Dakarbazin melanoma tedavisinde öncelikli olarak kullanılan kemoterapi ilacı olarak bilinir. Dakarbazin için tıbbi kullanım onayı 1975 yılından bu yana Amerika Birleşik Devletleri'nde alınmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün ilaç listesinde bulunan bir ilaçtır (57).

Dakarbazinin etki mekanizması iki şekilde çalışmaktadır; birinci etki mekanizması DNA replikasyonunu baskılama iken ikincisi alkilleyici ajan olarak normal DNA yapıları ile reaksiyona girip zincir kırıklarına neden olmaktadır (58). Ayrıca p53 genini aktive ederek melanoma hücre ölümlerini arttırmaktadır. Melanoma tedavilerinde ilaç ajanı olarak Dakarbazin'in kullanıldığı tedavilerde yaklaşık olarak %24 oranında küçülme görülmüştür (58).

2.7. Tirozinaz Enzimi

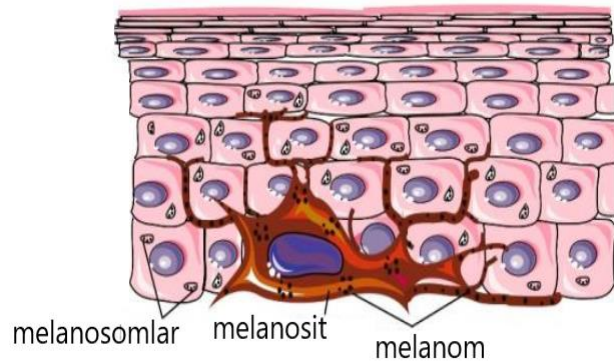
Melanin pigmenti çeşitli biyolojik çalışma fonksiyonlara sahiptir. Bunlar arasında en çok bilinenler, antitümör, antioksidan ve antiviral aktiviteleridir. Sahip olduğu radyasyon koruyucu özellikler nedeniyle çok kuvvetli bir UV filtresi görevi göstermektedir (59).

Melaninlerin bir çok türü oldukça geniş aralıklarda elektromanyetik dalgalar ile benzersiz bir etkileşime girme kapasitelerine sahiptirler. Bu sebepten dolayı enerji

toplayıcı ve koruyucu bir pigment olarak kendini göstermektedir. Radyoaktif olmadığı bilinen fotonların dağılımını sağlarken ve bunun sonucunda da serbest radikallerin temizlenmesinde etkilidir. Metaller ile çok güçlü bir şekilde şelatlama yapabilir. Bu işlemin sonucunda da hücreler kendilerini toksik metal iyonlarının etkisinden korurlar (60).

Melanin pigmenti özellikle kozmetik uygulamalarında sıklıkla kullanılır. Deri kusurlarının giderilmesinde, cilt tonunun eşitlenmesinde ve özellikle saç beyazlamasının sürecinin durdurulmaya çalışılması işlemlerinde melanin ve melanin öncülleri çeşitli formülasyonlarda kullanılmaktadır (61). Yüksek antioksidan kapasitesi sebebiyle de oksidatif stresten koruyan bir biyomakromolekül olmasından dolayı farmasötik alanı için önemli bir biyopolimerdir.

Melanositler, melanoblast olarak bilinen pigmentsiz, renksiz ve embriyonik nöronal krest hücrelerinin evrilmesinden oluşurlar (62). Melanositler derideki keratinosit tabakasının içerisinde gömülü olarak bulunurlar (Şekil 2.12.) (61).

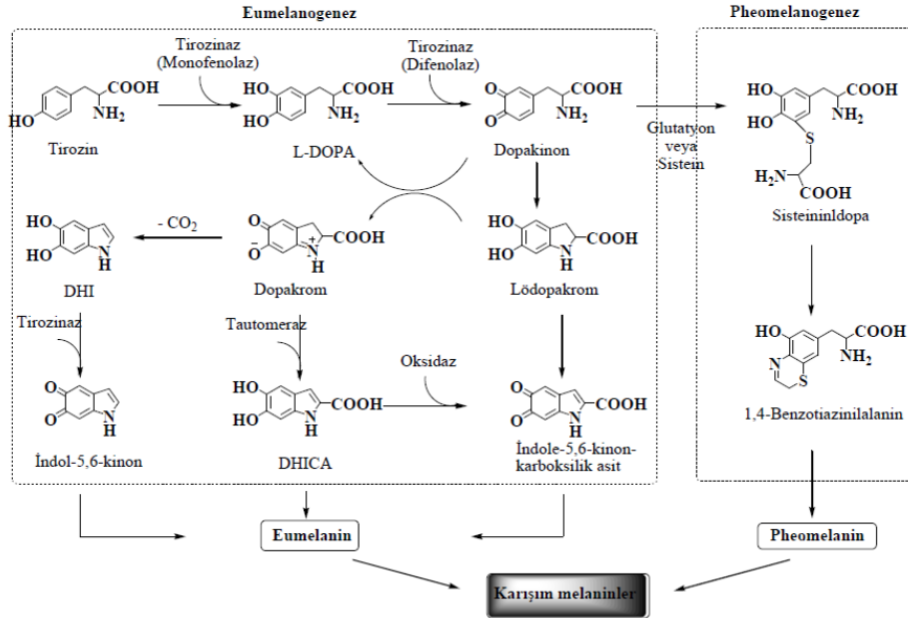


Şekil 2.12. Melanositler, melanozomlar ve deri içerisinde konumları (61).

Melanin üretilmesi süreci olarak adlandırılan melanogenez; melanositlerde oluşan enzimatik ve kimyasal reaksiyon süreçlerinden oluşmaktadır. Bu süreçte ise bir çok farklı hücre sinyalizasyon yolağı düzenleyici olarak katılmaktadır. Melanin üretiminde temel olan üç önemli yapıtaşı; tirozinaz enzimi, dopakrom tatomeraz ve tirozin-ilişkili protein-1 olarak adlandırılan enzimleridir (63). Ancak bunların arasında; tirozinaz enzimi melanin üretiminde kilit bir noktadadır. Ayrıca tüm sürecin hız kısıtlayıcı basamağında tirozinaz enzimidir.

L-tirozin amino asidinin Dopakinon'a veya L-DOPA'ya oksidasyonu ile melanin sentezi başlamaktadır. Bu dönüşüm aşaması çok kritiktir ve bu aşamada

meydana gelen her hangi aksamada, melanin üretim sürecinde de aksamaya ve inhibisyona sebep olmaktadır (64).



Şekil 2.13. Melanin pigmentinin biyosentetik yolağı (65)

Polifenol oksidaz (PPO) sınıfına ait enzimlerden olan tirozinaz enzimi, bitkiler, hayvanlar, funguslar ve diğer mikroorganizmalarda bulunmaktadır. Günümüze kadar en iyi şekilde tanımlanmış ve yapısı ayırt edilmiş polifenol oksidaz enzimleri arasındaki tirozinaz enzimi ilk sırada kendine yer bulmaktadır. Tirozinaz enziminin aktif bölgesinde bulunan iki tane bakır atomu reaksiyonlarda önemli bir role sahiptir (66). Tirozinaz enzimi çift yönlü olarak reaksiyonu katalizler; monofenolaz aktivitesindeki mono-fenollerin o-hidroksilasyonunu ve difenolaz aktivitesindeki o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonunu sağlamaktadır (67).

Tirozinaz hemen hemen tüm canlı yapılarda bulunan ve organizmanın türünü esas olarak farklı fizyolojik görevler üstlenen bir enzimdir. Tirozinaz enzimi omurgalı canlılar ve funguslarda melanin pigmentinin üretilmesinden sorumludur. Bitkilerdeki yaralanma ve doku hasarlarında ise fenolik bileşiklerin enzimatik olarak kararmasından dolayı kahverengileşmeye sebep olmaktadır (68). Melanin üretiminin bitkilerde bir tür stres adaptasyonu sağladığı bilinmektedir. Bu adaptasyonun aynı zamanda bitkisel bağışıklık sisteminin bir yanıtı olduğu bilinmektedir.

Tirozinaza bağlı olarak gıdalarda normal rengi dışında kararmalar oluşabilir. Bu durumun nedeni tirozinaz aktivitesidir. Bu tür durumlar tüketiciler ve üreticiler

tarafından istenmemektedir. Gıda sektörünün maruz kaldığı en önemli sorunlardan bir tanesi de tercih edilmeyen bu tür gıdalardır. Böyle bir durum için çözüm olarak tirozinaz inhibitörleri kullanılmaktadır (69).

2.7.1. Tirozinaz İnhibisyonları

Tirozinaz enziminin kontrol altına alınmaya çalışılması bir çok alanda ihtiyaç duyulan bir arayıştır. Bu arayışın başlıca nedenleri tarımsal ürünlerinin uzun süre saklanma ihtiyacı, zirai böceklerle mücadele, özellikle kozmetik alanlarında deri beyazlatıcı ürün ve estetik amaçlı kullanılabilir formülasyonların geliştirilmesi gibi arayışlar diğer alanlara göre daha fazla olmaktadır (70).

Tirozinaz ile melanogenez inhibitörleri arasında önemli farklar bulunmaktadır. Bir molekülün tirozinaz inhibitörü olarak kabul edilmesi için DOPA ya da Tirozin varlığında dopakrom oluşumunun inhibisyonunun sağlanması gerekmektedir (71).

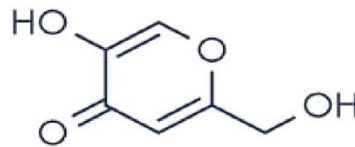
Mantar tirozinaz enzimi (*Agaricus bisporus*) olarak bilinen ve izole edilen bu enzim çalışmalarda en çok kullanılan enzim türüdür. Ancak memeli tirozinaz enzimi ile mantar tirozinaz enzimi arasındaki işlevsel ve yapısal farklılıklar sebebiyle kozmetik ve özellikle de farmasötik alanda kullanılmak istenen maddelerin aktivite çalışmalarında aldatici sonuçlar da görülebilmektedir (72). Memeli tirozinaz enzimi glikoprotein yapıdadır ve pek çok hücre içi sinyal yolağı ile sürekli bir iletişim halindedir. Fakat mantar tirozinaz enzimi ise sitozol içerisinde serbest bir halde bulunmaktadır. Bu sebeplerden dolayı bilinen bu yapısal farklılıklar doğrultusunda mutlaka memeli hücre kültürlerinin laboratuvar çalışmalarında tirozinaz enzim aktivitesi ve sitotoksikite deneylerinin yapılması yeni etkili moleküllerin bulunmasında en güvenli yöntemlerden birisi olarak görülmektedir (73).

Inhibisyon mekanizmasının yanı sıra inhibisyon gücü olarak bilinen ve enzim aktivitesinin yaklaşık olarak yarısını inhibe etmekte kullanılacak madde konsantrasyonu (IC_{50}) da inhibisyon için önemli bir değerdir. Bu değerler doğrultusunda kendini kanıtlamış olan kojik asit, arbutin ve hidrokinon gibi moleküller değerli referanslar olarak kullanılmaktadır. (71).

2.7.2. Kojik Asit

Kojik asit endüstrideki ticari uygulamalar sebebiyle son derece ilgi çekmekte ve kozmetik, kimya, gıda endüstrilerinde sık kullanılmaktadır. Ayrıca tıp ve tarım gibi çeşitli alanlarda çok önemli uygulamaları bulunmaktadır. Günümüzde Kojik asit, kozmetikte çok önemli bir yere sahiptir, en önemli uygulanma alanı ise UV radyasyonuna karşı cilt bakım ürünlerinde yer almasıdır. Bunun yanı sıra cilt beyazlatıcı kremler sabunlar, cilt koruyucu özellikli losyonlar ve diş bakım ürünlerinde ultraviyole ışınlar karşı koruyucu göreve sahiptir. Kojik asit, cilt pigmentasyonun ana enzimi olan tirozinaz oluşumunu inhibe eder. Böylece melanin oluşumunu sınırlayarak insan cildindeki hiperpigmentasyonu baskılama görevini yerine getirir (74). Elma, patates, pirinç ve bir çok kabuklu çeşidi ile farklı sebze ve meyvelerde polifenol oksidaz için inhibe edici bir aktiviteye sahiptir. Temelde enzimatik nedenlerle oluşan kararma için kullanılan oksijene etki ederek o-kinonları difenollere indirger ve melanin pigmenti oluşmasını engeller (75). Ayrıca Kojik asit'in ağrı kesici ve antiinflamatuvar ilaç olarak tıp alanında kullanılabilirliği öngörülmektedir.

Kojik asitin kimyasal yöntemler ile yapılan sentezinde canlı hücrelerde serbest radikal üretimi görülmektedir. Böyle bir riskten kaçınmak adına Kojik asit üretimi için alternatif yöntemler seçilmektedir. Yapılan bu yöntemler güvenli ve toksik olmayan mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen Kojik asit üretimine odaklanmıştır. *Aspergillus* türlerinin yaptığı aerobik fermentasyon sonucu üretilen Kojik asit, çoğu endüstride kullanılan en iyi tekniklerin başında gelmektedir. Kojik asit üretimi için kullanılan *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Mucor* gibi 5'e yakın farklı mantar türü vardır (76).

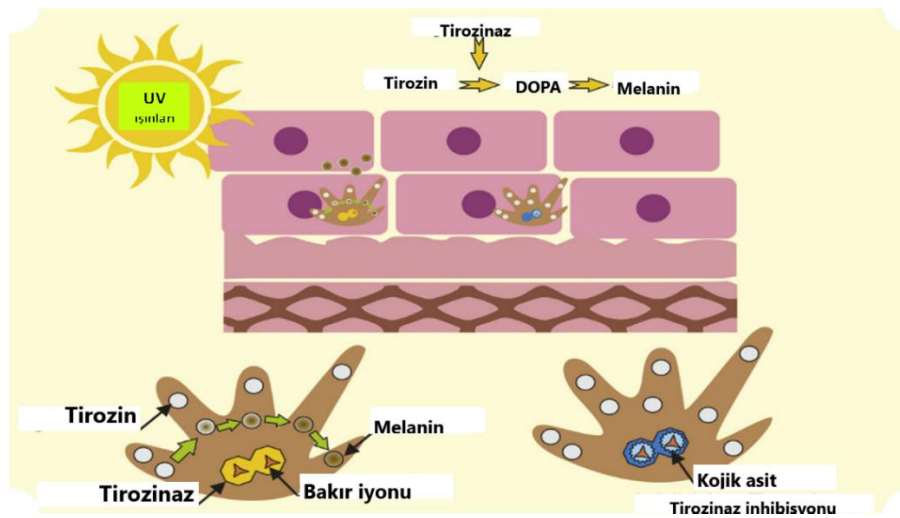


Şekil 2.14. Kojik asitin kimyasal yapısı (77).

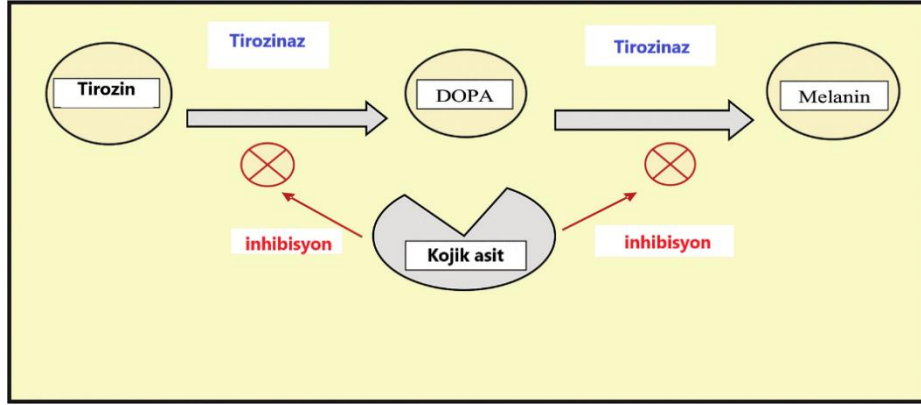
Ultraviyole ışıktan etkilenen insan cildi güneş yanığı, oksidatif stres ve cilt kanseri gibi önemli cilt hastalıklarına sebep olabilir ve bu şekilde oluşan hastalıklar UV ışığına maruz kalma miktarı ve yoğunluğuyla ilişkilidir. Kojik asit, hiperpigmentasyon etkisini tirozinaz inhibitör olarak sınırlama işlevine sahiptir ve

bununla birlikte bir UV koruyucu olarak kullanılabilir. Önemli bir cilt açıcı olarak bilinen hidrokinonun (HQ) yan etkileri yüzünden Kojik asit kozmetik alanında daha tercih edilebilir bir konuma yükselmektedir (77). Bunun yanı sıra Kojik asit yüksek dozlarda irite edici ve toksik olabilmektedir. Bu yüzden yan etkileri en aza indirip etkinliğini arttırmak için Kojik asit türevleri sentezlenilmektedir.

Kojik asit yapısı sebebiyle geniş biyolojik aktivitelere sahiptir. Bu nedenle tıbbi kimya araştırmalarında mükemmel bir yere sahiptir. Melanositler epiderminin alt katmanında bulunur ve melanin üretiminden sorumludurlar. Epidermal keratinositler içerisinde bulunan melanositler özgül dendritik hücrelerin bulunduğu kategoride sınıflandırılır ve melanozom olarak isimlendirilen bir organelde melanin üretiminde ana rol alırlar ve bu şekilde çevre keratinositlere yayılırlar. Melanositlerin her biri dendritik hücrelerin farklı derecelerinde melanozomlarla temas ederek birçok keratinositte dağılır. Karmaşık polimerler olan melaninler, tirozin ve diğer ara maddelerden üretilir. Çok kademeli bir oksidasyon sürecinden sonra siyah-kahverengi varyasyon olan eumelanin ve sarı-kırmızı varyasyon olan feomelanine dönüşürler (78). Tirozinaz, aktif bölgesinde bakır iyonlarına sahiptir. Cilt ultraviyole ışınlarla maruz bırakıldığında bakır iyonları tirozinazın daha aktif forma geçmesini sağlarlar. Kojik asit; tirozinazı yavaş, etkili ve tersinir yarışmalı olarak enzimin aktif merkezindeki bakır iyonuyla şelasyon sonucu inhibe ederek melanin oluşumunu önlemektedir. Kojik asitin gerçekleştirdiği inhibisyon ile tirozinaz aktiviteleri önlenebilir (Şekil 2.15 ve 2.16) (79).



Şekil 2.15. Melanin biyosentezinde KA'nın tirozinaz inhibitör mekanizması (80).



Şekil 2.16. Tiroznaz inhibisyonu aktivitesi (80).

Melanin sentezinden sorumlu olan genlerinin transkripsiyonel inhibisyonunu sağlayan hücre içi sinyal aktivasyonunu veya inhibisyonunu düzenleyen ve bunların dışında tirozinaz inhibisyonuna sahip olan çok az bileşik vardır. Cilt rengini açan birçok bileşiğin, tirozinaz enzim aktivasyonunu inhibe ederek melanin sentezini önemli ölçüde azalttığı bilinmektedir. Ayrıca bu bileşikler melanositlerde düşük toksisite etkisi göstermektedir. Bu cilt rengini açan bileşiklerden birkaçının, hücre içi sinyal yollarında düzenleyici aktiviteye sahip olduğu ve melanosit hücre ölümünde de belli bir ölçüde artışa neden olduğu bilinmektedir (81).

Melanomda melanositlerin farklılaşması ve proliferasyonu çoğunlukla epiderminin bazal hücre katmanında gelişir. Melanositlerin bu değişimi diğer organlara geçebilir (metastaz) ve o organların fonksiyonlarında bozulmalara sebebiyet verebilir. Melanom sürecindeki moleküler ve hücrel mekanizmaların daha iyi anlaşılması için, in vitro incelemelerde insan melanom hücrelerinin deri modelleri yaygın şekilde kullanılmaktadır. Hücre ölümünü düzenleyen anti-apoptotik mekanizmalar bu şekilde aydınlatılabilir. Tüm bu sebeplerden dolayı, tümör hücresi ölümüne neden olan sinyal iletim yollarının detaylı bilgisi, ilaç direncine karşı daha etkili ve melanom tedavisini daha ileriye taşımak için yeni hedef moleküller bulunabilir. Protein ve gen ekspresyonunda meydana gelen modifikasyonların dışında da enzimatik değişikliklerde melanomlarda melanogenezi tetikleyebilir. Melanogenez sentezindeki düzenleyicilerin kontrolü hormonlar, sitokinler, büyüme faktörleri ve nörotransmitterler tarafından aktivasyonu sağlanan reseptör aracılı yollardır. Kojik asitin etkisinin araştırılmasında A375 insan melanom hücrelerinde gen ve protein ekspresyon mekanizmasının incelenmesi ve kanser tedavisi üzerindeki etkisinin

araştırılması büyük önem taşımaktadır (82). Bu tez çalışmasında da Kojik asit türevi olan bileşiklerin in vitro deneyleri için A375 insan melanom hücreleri kullanılmıştır.

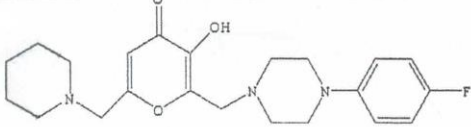
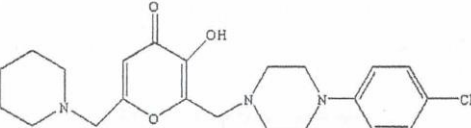
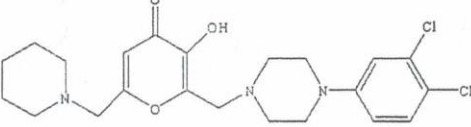
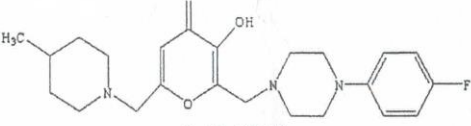
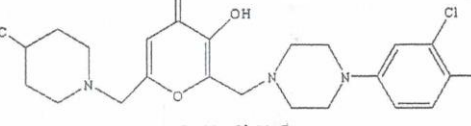
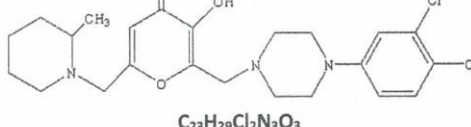
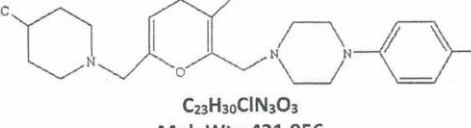
Kojik asit türevi olan bileşikler çeşitli biyolojik aktivite göstermektedirler. Kojik asitin kendisi ve türevleri antiviral, antimikrobiyal, antidiyabetik, antikanser, antitümör (83), anti-parazitik ve böcek öldürücü faaliyetler olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler göstermeleri sebebiyle giderek daha da önemli hale gelmiştir. Ayrıca Kojik asit ve türevleri antioksidan olarakta kullanılmaktadır, tirozinaz inhibitörlerinin aktiviteleri sebebiyle ilaç ve kozmetik ürünlerdeki antiinflamatuvar, anti-proliferatif, radyasyon koruyucu ve cilt aydınlatma ajanları en bilinenleridir (84).

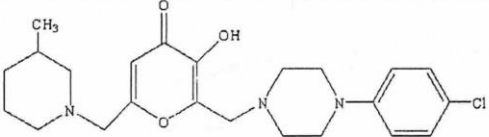
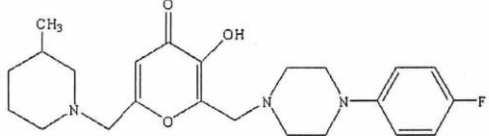
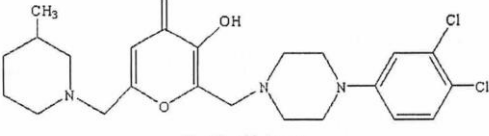
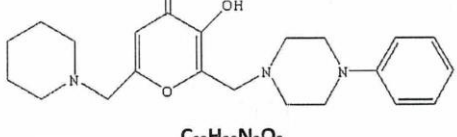
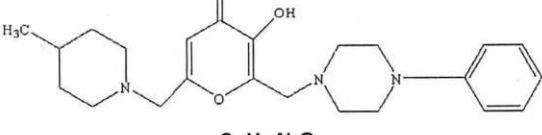
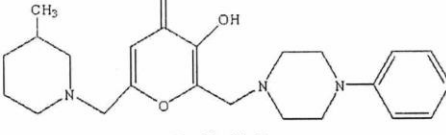
A375 insan melanoma hücreleri kanser tedavisinde kullanılarak Kojik asit ve türevlerinin genotoksitesisi incelenmiştir. Kojik asit ve türevlerinin konsantrasyonunun artmasıyla A375 hücrelerindeki büyümenin de direkt olarak inhibisyona uğradığı görülmüştür (85). Yapılan bir çok çalışmada A375 melanoma hücre hattında Kojik asit ve türevlerinin antikanserojen etkisini öğrenmek için Kojik asit ve türevlerinin uygulandığı A375 melanoma hücre hattında bazı proteinlerin kanser aşamalarında önemli roller oynadığı, bu nedenle malign melanomanın tanı ve tedavisinde belirleyici bir basamak olarak kullanılabilirliği fark edilmiştir (83).

Bu tez çalışması kapsamında, üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi ve proje araştırmacısı Prof. Dr. Mutlu Aytemir'in sentezlemiş olduğu kojik asit türevi bileşikler incelenmiştir. A375 insan malign melanoma hücrelerine karşı sitotoksik özelliği en kuvvetli bileşiğin malign melanoma hücrelerini hangi mekanizmalarla ölüme götürdüğü ve hücre içerisinde hangi moleküler ölüm yollarını tetiklediği araştırılmıştır. Bu amaçla, bu yüksek lisans tez çalışmasında, sentezlenen bileşiklerin A375 insan malign melanoma hücrelerinin canlılığı nasıl etkilediği araştırılmıştır. Sitotoksik etkisi en yüksek olan bileşik seçilerek lüminometrik bir yaklaşımla hücre canlılığı, hücre sitotoksitesisi, efektör kaspaz 3/7 aktivasyonları açısından etkinlikleri tayin edilmiştir. Aynı bileşiğin melanoma hücrelerinde tetiklediği ölüm yolağı akış sitometrisi ile belirlenmiştir. Bu amaçla A375 hücrelerinin RNA'sı izole edilerek ölüm mekanizmalarında rol alan genlerin (p53, Bax, Bcl-2, Jnk, Mdm2, Mdr1) ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Gen ekspresyon verilerini takiben apoptotik p53 proteininin ekspresyon düzeyi western

blotlama ile ölçülmüştür. Son olarak bileşiğin enzimatik tirozinaz inhibisyonu için B16F10 hücrelerinin sitozölü kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Tablo 2.2. Tez kapsamında kullanılan Kojik asit ve türevleri

A2	 <p style="text-align: center;">$C_{22}H_{28}FN_3O_3$ Mol. Wt.: 401,474</p>
A3	 <p style="text-align: center;">$C_{22}H_{28}ClN_3O_3$ Mol. Wt.: 417,929</p>
A4	 <p style="text-align: center;">$C_{22}H_{27}Cl_2N_3O_3$ Mol. Wt.: 452,374</p>
A5	 <p style="text-align: center;">$C_{23}H_{30}FN_3O_3$ Mol. Wt.: 415,501</p>
A9	 <p style="text-align: center;">$C_{23}H_{29}Cl_2N_3O_3$ Mol. Wt.: 466,401</p>
A10	 <p style="text-align: center;">$C_{23}H_{29}Cl_2N_3O_3$ Mol. Wt.: 466,401</p>
A11	 <p style="text-align: center;">$C_{23}H_{30}ClN_3O_3$ Mol. Wt.: 431,956</p>

A13	 <p style="text-align: center;">C₂₃H₃₀ClN₃O₃ Mol. Wt.: 431,956</p>
A14	 <p style="text-align: center;">C₂₃H₃₀FN₃O₃ Mol. Wt.: 415,501</p>
A15	 <p style="text-align: center;">C₂₃H₂₉Cl₂N₃O₃ Mol. Wt.: 466,401</p>
A17	 <p style="text-align: center;">C₂₂H₂₉N₃O₃ Mol. Wt.: 383,484</p>
A18	 <p style="text-align: center;">C₂₃H₃₁N₃O₃ Mol. Wt.: 397,511</p>
A19	 <p style="text-align: center;">C₂₃H₃₁N₃O₃ Mol. Wt.: 397,511</p>

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hücreler

A375 İnsan Malign Melanoma ve B16F10 Fare Melanoma hücreleri, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC) isimli firmadan temin edilmiştir.

3.1.2. Kitler ve Kimyasal Maddeler

Tez kapsamında kullanılan kimyasal maddeler ve kitler tablo 3.1’de listelenmiştir.

Tablo 3.1. Kimyasal maddeler ve Kitler

Kitler ve Kimyasal Maddeler	Firma
DMEM Yüksek Glikozlu (hücre kültürü)	Biological Industries, İsrail
Fetal Sığır Serum FBS (hücre kültürü)	Biological Industries, İsrail
ApotoxGlo Triplex Assay Kiti (sitotoksosite)	Promega, USA LOT: 0000300702
NucleoSpin® RNA izolasyon kiti (gen ekspresyonu)	Macherey-Nagel, Almanya LOT: 1706/004
GScript First-Strand Synthesis Kit (gen ekspresyonu)	Gene Direx, USA LOT: MB10860135
GoTaq® qPCR Master Mix (gen ekspresyonu)	Promega, USA LOT: 0000300603
Bcl-2 primer antikor (Western Blotting)	Bio Legend, USA LOT: B177370
Mdr1 primer antikor (Western Blotting)	Chemicon International, Almanya LOT: 0605029843
P53 primer antikor (Western Blotting)	Chemicon International, Almanya LOT: 22120968
Tyripsine EDTA %0,25 Bio.İnd (hücre kültürü)	Biological Industries, İsrail
Penisilin/Streptomisin (hücre kültürü)	Biological Industries, İsrail
L-glutamin (hücre kültürü)	Biological Industries, İsrail
Sulforhodamine B (sitotoksosite)	Santa Cruz Biotechnology, ABD LOT: DO714
DMSO (hücre kültürü)	Merck, Almanya LOT: 67-68-5
Precision Plus Protein Marker (western blotting)	BIO RAD, ABD LOT: 161-0374
(L-DOPA) (sitotoksosite)	Sigma-Aldrich, Almanya LOT: MKBQ8894V
Power® SYBR Green Master Mix	ThermoFisher, ABD LOT: 4367659
FITC Annexin V (Flow sitometri)	BioLegend, Japonya LOT: 640945
2X Laemmli Sample Buffer (western blotting)	BIO RAD, ABD LOT: 161-0737
2-Mercaptoethanol (western blotting)	Merck , ALMANYA LOT: TBF4973V
Nu PAGE jel membran (western blotting)	ThermoFisher, ABD LOT: 19021170-0745
Western Bright™ Sirius (western blotting)	Advansta, ABD LOT: 160229-95
Western Bright™ Peroxide (western blotting)	Advansta, ABD LOT: 160229-94
Protease Inhibitor Cocktail (western blotting)	ThermoFisher, ABD LOT: 58715
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Reaction (western blotting)	ThermoScientific, ABD LOT: RG131971
BCA Assay Standart (western blotting)	Santa Cruz Tec., ABD LOT: F1014
BCA Assay Reagent A (western blotting)	Santa Cruz Tec., ABD LOT: F1014
BCA Assay Reagent B (western blotting)	Santa Cruz Tec., ABD LOT: F1014

3.1.3. Cihazlar

A375 ve B16F10 hücrelerinin çoğalması için kullanılan inkübatör 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içermektedir (Panasonic MCO-18 AC-PE, Japonya). Hücrelerin gözlemlenmesi için NIKON Eclipse TS100 (ABD) marka ışık mikroskobu kullanılmıştır. Hücre kültürü santrifüj işlemlerinde Hettich Rotina 35R D78532 (Almanya) adlı santrifüj cihazı kullanılmıştır. RNA izolasyonu gibi yüksek devirli işlemler için Hettich Universal 32R D78532 (Almanya) adlı santrifüj cihazı kullanılmıştır. Hücreler ve RNA örnekleri, yeniden kullanılmak üzere -86°C'lik derin dondurucu (Panasonic MDF-U5386S-PE, Japonya)'da muhafaza edilmiştir.

SRB deneylerinde floresans ışığa ölçülmesi için FLUOstar® Omega adlı cihaz (BMG LabTech, Almanya) kullanılmıştır.

RNA örnekleri için kullanılan jel elektroforez tankı Invitrogen (Amerika Birleşik Devletleri) markadır. ZOOM Dual Power Supply (Amerika Birleşik Devletleri) adlı güç kaynağı kullanılmıştır. RNA örneklerinin UV altında görüntülenmesi için ise Gel Logic 200 Imaging System adlı cihaz ve KODAK MI SE adlı programdan yararlanılmıştır.

RNA saflaştırılması ve cDNA için gerekli istenilen sıcaklık periyotları, 96 kuyucuklu termal döngü cihazı (Applied Biosystems Veriti, ABD) tarafından yapılmıştır. Gen ekspresyon tayini ve analizi içinse Applied Biosystems ViiA™ 7 (ABD) markalı RT-PCR sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

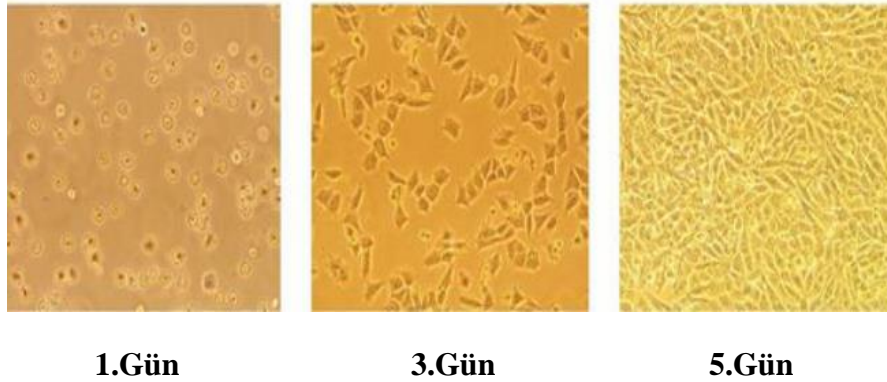
Flow sitometri deneyi için, Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'na ait Flow sitometri (BD FACSCanto™ II Flow Cytometer, BD Biosciences, ABD) ile gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar BD FACS Diva Software yazılımı ile analiz edilmiştir.

Protein örneklerinin jel elektroforezinde yürütülmesi için Invitrogen Novex Mini-Cell (Amerika Birleşik Devletleri) marka dikey jel elektroforez tankı ve ZOOM Dual Power Supply (Amerika Birleşik Devletleri) adlı güç kaynağından yararlanılmıştır. Jel transferi için iBlot™ (INVITROGEN, USA) cihazından yararlanılmıştır. Protein örneklerinin Trans UV altında görüntülenmesi için BIO RAD Universal Hood II adlı cihaz ve BioRad Image Lab™ Software adlı bilgisayar programı kullanılmıştır. Protein örnekleri için miktar tayini FLUOstar® Omega adlı (BMG LabTech, Almanya) cihaz ile yapılmıştır.

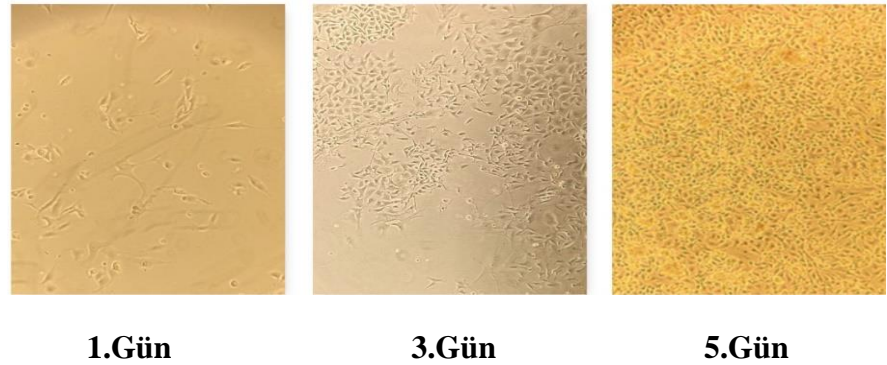
3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmalarda kullanılan A375 ve B16F10 hücre hatları için, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin ve %10 FBS içeren DMEM besin ortamı kullanılmıştır. Bu hücre hatları T75 hücre kültür flasksı içinde 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatörde büyümeye bırakılmıştır. Hücrelerde gözlenen morfolojik özellikler ve büyüme durumları ışık mikroskobu yardımıyla gözlemlenmiştir (Şekil 3.1.) ve (Şekil 3.2.).



Şekil 3.1. Işık mikroskobu altında gözlemlenen A375 hücreleri (10X).



Şekil 3.2. Işık mikroskobu altında gözlemlenen B16F10 hücreleri (10X).

Hücre Serilerinin Kültüre Edilmesi

Çalışmalarda kullanılan hücreler için kullanılacak olan; %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin ve %10 FBS içeren içeren DMEM besi yeri su banyosunda 37 °C'ye getirilir ve daha sonra T75 kültür kapları için 13 mL besiyeri aktarılır. -80 °C

'deki saklanan hücreler 37 °C'deki su banyosunda hızlıca eritilip T75 kültür kaplarına aktarılır ve hücreler 37°C'de, % 5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilir.

Hücre Serilerinin Pasajlanması

Hücreler kültür kabında yaklaşık % 80 ile % 90 doluluğa ulaştığında hücre kültüründeki kullanılmış eski besi vakumla çekilmiştir. Daha sonra hücrelerin bulunduğu yüzeye 1X % 0,25 tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek hücreler kalkıncaya kadar (yaklaşık 3 dakika) 37°C inkübatörde bekletilmiş ve yapışan hücreler mikroskopta kontrol edilerek flastan kaldırılmıştır. Tripsinin aktivasyonunu durdurmak için hücreler hemen besiyeri ilave edilmiştir. Toplanan hücreler 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılır ve 250xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında hücreler 1mL besiyeri içinde süspanse edilmiş ve flastlara bölünmüştür.

Hücre Serilerinin Stoklanması

Yeterli miktarda hücre yoğunluğuna ulaşan hücre soyları, 1X tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılmıştır. Kültür kabına eklenen tripsin-EDTA, hücreler kalkıncaya kadar (yaklaşık 3 dakika) 37°C inkübatörde bekletilmiş ve bu süre içerisinde hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskopta kontrol edilmiştir. Tripsinin hücrelere zarar vermesini engellemek için hücreler kalktıktan sonra hemen besi ortamı ilave edilmiş ve homojenize bir hal alması için karıştırılmış daha sonrada 250xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında besiyeri yardımıyla hücre süspansiyonu hazırlanmış. Süspanse hücrelerin canlılık oranları belirlenmiştir. Her bir kryotüp için 1000 µL hücre kültür içeriği konulmuş ve her bir kryotüpe %10 oranında 100 µL DMSO çözeltisi ilave edilmiş ve bu işlemden sonra üzerlerine tarih yazılarak kryotüpler -20°C'ye kaldırılmıştır. 3-4 saat sonra kryotüpler, -86°C derin dondurucuya yerleştirilerek stoklama işlemi tamamlanmıştır.

3.2.2. B16F10 Hücrelerinden Tirozinaz Elde Edilmesi

Bu deney için, öncelikle B16F10 hücreleri steril T75 flaska ekilmiştir. Hücrelerin kuyucuklardaki doluluk oranı %90'a ulaştığı zaman, hücreler tripsinize edilerek toplanmıştır. 250xg'de 5 dakika santrifüjleyip süpernatanı dökülmüş ve pelletin üzerine 1 mL soğuk PBS eklenmiş tekrardan 250xg'de 10 dakika

santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tekrardan pelletin üzerine 1 mL lizis tamponu % 0,1 Triton X-100 eklenmiş ve 3 kere homojenize edilmiştir. Elde edilen karışım 1,5 mL ependorf tüpüne aktarılmış ve 12000xg'de 10 dakika ve 4°C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant yeni bir ependorf tüpe aktarılmış ve pellet atılmıştır. Deneyin tüm aşamalarında hücre buzun içinde tutulmuştur.

3.2.3. B16F10 Hücreleri ile Enzim Aktivitesi Ölçümü

Bu çalışmada kullanılan enzim B16F10 hücrelerinden elde edilmiştir. Bileşik-15'in tirozinaz enzimi üzerindeki etkisini belirlemek için 96 kuyucuklu plakanın içerisine 100 µL (pH 6,8) 50 mM fosfat tamponu, 25 µL enzim, 15 µL inhibitör, 15 µL 3 mM L-DOPA konulmuştur. Kontrol grupları için Bileşik-15 ve Kojik asit yerine aynı hacimde DMSO eklenmiştir. İlk aşamada enzim ve inhibitör eklenmiş ve 37°C'de 20 dakika süre ile preinkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonraki aşamada ise L-DOPA eklenmiştir. Plaka 37°C'de 10 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Plaka 475 nm'de BioTek PowerWave HT Elisa Plaka Okuyucuda absorbans değerleri ölçülmüştür. Örnek ve kontrol çözeltileri için n=3 olarak alınmıştır. Maddelerin % inhibisyonları kontrol çözeltilisine kıyaslanarak formüle edilmiştir.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(A-B)/A] \times 100$$

Formülde A; DMSO, B ise örneklerin absorbansını göstermektedir. Veriler GraphPad Prism 5.03 kullanılarak çizilmiş, standart sapmaları ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

3.2.4. Sülförödamın B (SRB) Deneyi

SRB deneyi, hücre canlılığının ölçülmesi için *in vitro* olarak kullanılan yöntemlerden biridir (86). Aminoksanten bir boya olan SRB, yapısındaki sülfonik gruplar sayesinde proteinlerin bazik amino asit kalıntılarına bağlanmaktadır. Boyanmış hücrelerdeki ölçülen boya miktarı hücre kütlesi ile orantılı olarak kabul edilir (87).

A375 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara, kuyucuk başına 5×10^3 hücre olacak şekilde eklenmiştir. Hücrelerin kuyucuklardaki doluluk oranı %90'a ulaştığında, kojik asit türevleri uygulanmıştır. Hücreler 48 saat boyunca inkübatörde bekletildikten sonra deney başlatılmıştır.

İlk adımda hücreler, %10 (w/v)'luk Trikloroasetik asit (TCA) ile 1 saat boyunca 4°C'de inkübasyona bırakılarak plakaya fikse edilmiştir. Daha sonra dH₂O ile yıkanan hücrelerden TCA'nın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Plaka kurutulmuş ve hemen ardından kuyucuklara %0,06 (w/v) SRB çözeltisi eklenmiştir. Plaka 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem sonucunda boya hücrel proteinlere bağlanmıştır. İnkübasyonun ardından, plaka %1 (v/v) asetik asit ile yıkanmış ve bağlanmamış boyalar ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Plaka tekrar kurutulmuş. Plakadaki her bir kuyucuğa 200 µL 10 mM Tris bazı (pH 10,5) eklenmiş ve homojen olması için 10 dakika boyunca çalkalayıcıda çalkalanılmıştır. Son aşamada ise her bir kuyucuk için 510 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Hiç bileşik eklenmemiş kuyucuklardaki hücre canlılığı %100 kabul edilmiştir. Her bir bileşik için IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu deney n=3 olacak şekilde yapılmıştır.

3.2.5. Apoptoz Deneyi

A375 hücre hattı 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 100 µL besiyeri içinde 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilip hücrelerin tutunması için 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. A375 hücreleri % 1 (w/v) P/S, % 10 FBS ve % 1 1 X L-Glu karışımı içeren DMEM besi ortamında çoğaltılmıştır. 48 saatlik inkübasyondan sonra, hücreler kuyucuklarda yaklaşık % 80 doluluğa ulaşmış ve hücreler FBS içermeyen besi ortamında inkübatörde inkübe edilmiştir. Sitotoksisite deneylerinin sonucunda kullanılması karar verilen Bileşik-15 maddesinin IC₅₀ konsantrasyonu n=3 olacak şekilde kuyucuklara eklenip 24 saat boyunca IC₅₀ dozu etkileştirilmiştir. 24 saatlik sürenin sonunda seçili kuyucuklardaki hücrelere değişiklikler ApoTox-Glo Triplex Assay Kiti kullanılmış hücre canlılık yüzdesi, sitotoksisite yüzdesi ve kaspaz 3/7 oranları belirlenmiştir. Bu deneyin sonucunda elde edilecek bulgular ilaç ve sentezlenen bileşiğin artan dozlarında yüzde canlılık seviyesinin miktarını ve efektör kaspaz aktivasyonu üzerinden apoptotik hücre ölümünü kesin bir şekilde gösterecektir.

İlk aşama için hücre canlılığı ve sitotoksisitesinin reaktifleri olan, GF-AFC ve bis-AAF-R110 substratları 37°C'de çözündürülmüştür. 2 mL hacme sahip olan test tamponuna her bir örnek için her bir substrattan 2 µL eklenmiş ve pipetleme yöntemi ile homojenize edilmiştir. Daha sonraki aşamada belirlenen her bir kuyucuk için homojenize edilmiş reaktiften 20 µL eklenilmiş ve 37°C'de 30 dakika boyunca

inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda plaka FLUOstar® Omega floresanslı plaka okuyucuda okunmuştur. Aşağıdaki iki dalga boyu setinde floresan ölçümü yapılmıştır:

- 400 Ex/ 505 Em (Canlılık)
- 485 Ex/ 520 Em (Sitotoksisite)

Kazpaz 3/7 aktivitesinin ölçümü için belirlenen kuyucuklara 100 µL Caspase-Glo® 3/7 reaktifi eklenmiş ve pipetleme yöntemi ile iyice karıştırılmıştır. Daha sonra 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda plaka FLUOstar® Omega floresanslı plaka okuyucuda lüminansı okunmuştur.

3.2.6. Hücrelerden RNA Saflaştırılması

Öncelikle A375 hücreleri 6 kuyucuklu plakaların içerisine her bir kuyucukta 100,000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Bu hücreler % 1 (w/v) P/S, % 10 FBS ve % 1 X L-Glu karışımı içeren DMEM besi ortamında çoğaltılmıştır. Hücreler kuyucuklarda yaklaşık % 80 doluluğa ulaştığında artan dozlarda ilaç uygulaması yapılmış ve hücreler FBS içermeyen besi ortamında inkübatörde inkübe edilmiştir. 24 saatlik sürenin sonunda total RNA, NucleoSpin RNA II izolasyon kiti (Macharey Nagel) kullanılarak, üretici firmanın belirlediği kullanma talimatına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

İlk adım olarak hücreler tripsin ile toplanıp 250 × g'de 5 dakika süresince santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet kısmına 3,5 µL β-merkaptoetanol eklenmiştir. Hemen ardından hücre lize edici RA1 tamponundan 350 µL eklenmiş ve homojen hale getirilmiştir. Daha sonra filtreli toplama tüpüne alınan lizat hemen ardından 1 dakika süresince 4°C'de 11000 × g'de santrifüj edilmiştir. Tekrardan lizata 350 µL hacim içerisinde %70'lik alkol eklenmiştir. Tekrardan örnekler yeni bir filtreye sahip olan toplama tüplerine alınmış ve 30 saniye süresince 4°C'de 11000 × g'de santrifüj edilmiştir. Bu aşamada örnekler filtre kısmında tutunduğu için yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiş ve üzerine 350 µL MBD (Membrane Desalting Buffer) eklenmiş ve 1 dakika süresince 4°C'de 11000 × g'de santrifüj edilmiştir. Örnekler seyreltilmiş olan stok DNaz'dan 95 µL eklenmiş daha sonra da 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda örnekler 200 µL ikinci tampon olan RAW2 eklenmiş ve 30 saniye süresince 4°C'de 11000 × g'de santrifüj edilmiştir.

Daha sonra örneklerin bulunduğu filtrelili tüp yeni toplama tüpüne alındıktan sonra örnekler 600 µL hacimdeki 3. tampon olan RA3 uygulanmış ve 30 saniye süresince 4°C’de 11000 × g’de santrifüj edilmiştir. Örneklerin içinde bulunduğu filtrelili tüpler tekrardan yeni toplama tüplerine alınmış ve tekrardan üçüncü tampon olan RA3’ten bu sefer 250 µL eklenmiş ve yeniden 2 dakika süresince 4°C’de 11000 × g’de santrifüj edilerek filtrelili tüpler yeni toplama tüplerine taşınmıştır. Son olarak örnekler 60 µL RNaz içermeyen dH₂O eklenmiş ve 1 dakika süresince 4°C’de 11000 × g’de santrifüj edilmiştir. Elde edilmiş olan RNA’nın 2 µl’si RNA saflık ve konsantrasyon ölçümü için kullanıldı. Kalan kısım ise cDNA sentezi yapılmak üzere -80 °C’lik derin dondurucuya kaldırılmıştır.

RNA kalitesi ile miktarının belirlenebilmesi için nanospektrofotometre cihazı kullanılmıştır. İzole edilmiş olan RNA örneklerindeki A260/A280 oranlarının 1,8-2 civarı olmasına dikkat edilmiştir.

3.2.7. RNA’dan cDNA Sentezi

cDNA sentezi için GScript First-Strand Synthesis Kit kullanıldı. DNA sentezi için, protokole göre aşağıdaki adımlar takip edildi. GScript First Strand Kit çözüldükten sonra 10-15 saniye santrifüj edildi. Aşağıdaki tabloya göre RNA örneklerinden her biri için karışım hazırlandı. Karışım dikkatli şekilde santrifüj edildi (**Tablo 3.1.**).

Tablo 3.2. cDNA için hazırlanan 1. karışım

Madde	Hacim (µl)
RNA solusyonu	1 µg/µl
Oligo(dT) ₂₀	1 µl
dNTP karışımı	1 µl
dH ₂ O	13 µl’ye kadar
Toplam	13 µl

Elde edilen karışım 65°C’de 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra hemen buz içerisinde 1 dakika bekletildi. 13 µL karışım içeren her tüpe 4 µL 2. adım karışımı eklendi. Pipet ile alt-üst edilerek dikkatlice karıştırıldı. 2. adım karışımı aşağıdaki tabloya göre hazırlandı (**Tablo 3.2.**).

Tablo 3.3. cDNA için hazırlanan 2. karışım

Madde	Hacim(μl)
5X 1st strand buffer	4 μ l
DTT (0.1 M)	1 μ l
GScript RTase	1 μ l
Toplam	6 μl

Hazırlanan tüpler PCR cihazına yerleştirilerek amplifikasyon basamakları 1. basamak 50°C - 60 dk, 2. basamak 70°C - 15 dk ve 3. Basamak ise 4°C- ∞ dk soğuma olarak ayarlanmıştır. Bu aşamalar için 96 kuyucuklu termal döngü cihazı kullanılmıştır. cDNA örnekleri - 20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.8. RT-PCR ile Gen İfadesi Analizi

A375 hücresinden saflaştırılan total RNA’lardan belli işlemler sonucu elde edilmiş olan cDNA örnekleri, çoklu ilaç direnci genlerinin ekspresyon düzeyleri ve belirli apoptotik yolların araştırılmasında kullanılmıştır. Bu sebeple TP53, Mdm2, Bax ve Bcl-2 genleri apoptotik yolların incelenmesinde kullanılmıştır. Mdr-1 geni ise çoklu ilaç direncinin incelenmesi için seçilmiştir. Gapdh ise referans gen olarak seçilmiştir. Gapdh’ın ekspresyon düzeyi ile seçilmiş olan genlerinki normalize edilmiştir.

İfadelenmede ölçülecek olan her bir gen tasarımı için, Biyoteknoloji Bilgisi için Ulusal Merkez (National Center for Biotechnology Information, NCBI) veri tabanı kullanılmıştır. Kullanılmış olan primer dizileri için erime sıcaklığı (melting temperature, Tm) ve guanin-sitozin yüzdesi (**Tablo 3.3.**)’de verilmiştir.

Tablo 3.4. RT-PCR reaksiyonu için kullanılmış olan ileri ve geri primer dizilerine ait erime sıcaklıkları ve %Guanin-Sitozin verileri.

Primer	Primer Dizisi (5' → 3')	Erime Sıcaklığı (T _m , °C)	Guanin Sitozin Yüzdesi (%GC)
TP53 ileri	CACCATGAGCGCTGCCTCAGATAGC	67,60	60
TP53 geri	ACAGGCACAAACACGCACCTCAAA	65,97	50
Mdm2 ileri	AGGTCACTCCGATGAAAGGT	58,35	50
Mdm2 geri	GTTGTCTAGTACCATTAACC	50,61	40
Bax ileri	TTTCATCCAGGATCGAGCAG	57,39	50
Bax geri	AAAGTAGAAAAGGGCGACAA	55,19	40
Bcl-2 ileri	GTGTGTGGAGAGCGTCAACCGG	65,78	63,64
Bcl-2 geri	TCAAACAGAGGCCCGCATGCTGG	65,90	59,09
Mdr-1 ileri	TTCAACTATCCCACCCGACCGGAC	66,03	58,33
Mdr-1 geri	ATGCTGCAGTCAAACAGGATGGGC	66,01	54,17
Gapdh ileri	GTCGTATTGGGCGCCTGGTCAC	65,93	63,64
Gapdh geri	GCCAGCATCGCCCACTTGATT	66,00	59,09
Jnk ileri	TCAAGAAGCTAAGCCGACCA	60,55	50
Jnk geri	AAACTCGTTCCTGCAGTCCT	61,62	55

RT-PCR için “Power® SYBR Green Master Mix” kiti kullanıldı. 0.2 mL’lik tüplere her bir primer için mastermiks karışımları ayrı hazırlanmıştır ve bu çalışmada 6 primer kullanılmıştır. Primer sayısı kadar (6) mastermix hazırlandı. Toplam örnek sayısı 6 olduğu için “6x” şeklinde her bir mastermiks miktarı aşağıdaki tabloya göre hesaplandı (**Tablo 3.4.**)

Tablo 3.5. RT-PCR deneyi için oluşturulan reaksiyon çözeltisi

Materyal	Final
SYBR Green Karışımı (2X)	12.5 µL
İleri Primer (10 µM)	1 µM
Geri Primer (10 µM)	1 µM
cDNA	100 ng
dH ₂ O	Değişken
Toplam	25 µL

Oluşturulan reaksiyon çözeltisi, RT-PCR deneyi için cihaza uyumlu 96 kuyucuklu plakaya yüklenmiştir. Aşağıdaki şartlara göre PCR döngü programı uygulanılarak çalıştırılmıştır (**Tablo 3.5.**).

Tablo 3.6. RT-PCR döngü koşulları

Sıcaklık	Zaman	Döngü
95°C	10 dakika	1
95°C	15 saniye	40
60°C	1 dakika	40

Elde sonuçlar daha sonra genlerin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için ve ilgili genlerin eşik döngüsü (treshold cycle, Ct) değerlerinden referans Gapdh geninin Ct değeri çıkartılarak Δ Ct hesaplanmıştır. Ekspresyon düzeylerindeki değişimler kat cinsinden $\Delta\Delta$ Ct verileri kullanılarak elde edilmiştir. Bu deneyde n=3 tekrar yapılmıştır.

3.2.9. Agaroz Jel Elektroforezi

1 X Tris Asetik Asit EDTA (40 mM Tris, 20 mM Asetik Asit, 1 mM EDTA , pH 8) tamponu için % 2,5 agaroz jel hazırlandı. Hazırlanan solüsyon mikrodalgada ısıtılmıştır. Hazırlanan solüsyona denatüre etmesi için % 1 çamaşır suyu eklenmiş ve homojenize edilmiştir. Solüsyona son derişim 2,5 μ L 10 mg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklenmiştir. Daha sonra jel elektroforez kasetine dökülmüştür. Jel kalıp haline geldikten sonra içerisinde 1 X TAE tamponu bulunduran elektroforez tankındaki özel bölmeye yerleştirilmiştir ve -86°C'de saklanan RNA örnekleri alınmıştır. Her bir kuyucuğa dH₂O ile seyreltilmiş örneklerin her birinden 8 μ L ve nükleik asit boyası olarak bilinen Track It Cyan/Orange boyasından 2 μ L kullanılmıştır. Örnekler jele yüklenip 30 dakika boyunca 100 V'da yürütülmüştür. Jel KODAK jel görüntüleme cihazına yüklenmiştir. UV ışığı altında fotoğrafı çekilen jel hemen ardından görüntü kaydedilmiştir.

Görüntülerde RNA 2 bant şeklinde görülmüştür. Bu şekilde de RNA'nın degrade olmadığı anlaşılmıştır.

3.2.10. Akış Sitometri ile Apoptoz ve Canlılık Tayini

Apoptoz olayına giren hücrelerde plazma membranındaki fosfolipid dengesi kaybolmaktadır. Plazma membranında bulunan fosfatidilserin iç membrandan dış membrana çıkmaktadır. Bu olay hücrelerdeki membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptozun erken aşamalarında görülmektedir. Ölmekte olan hücrelerin tespitinde ise fosfatidilserinlerin ortaya çıkması güçlü bir işaret olarak kabul edilmektedir. Annexin V, kalsiyum varlığında fosfatidilserine kararlı bir şekilde bağlanır. Floresan (FITC) işaretli Annexin V ile apoptoza giden hücrelerin sayısı akış sitometri ile tespit edilebilir. Ölü hücrelerin plazma membranından geçen Propidyum iyodür (PI) boyası ise kromozomal DNA'ya bağlanabilme özelliği taşıdığından geç apoptotik ve ölü hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Non-vital boya olan Propidyum iyodür (kırmızı floresan) ve Annexin V (yeşil floresan) ile aynı zamanda hücreler boyanır. Canlı hücreler (FITC-PI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine izin vermektedir (43).

A375 hücrelerindeki apoptotik aktivitenin tespiti BD FACSCanto™ II Flow Cytometer cihazı kullanılarak yapılmıştır. 6 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına $3,0 \times 10^5$ olacak şekilde hücre ekimi yapıldıktan sonra 48 saat süreyle hücreler besi ortamı içinde iyice homojenize edildikten sonra 37°C 'de, % 5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından ortamdan besiyerleri uzaklaştırılmış, hücrelere FBS içermeyen besi ortamı eklenmiş ve kuyucuklara $n=3$ olacak şekilde Bileşik-15 maddesi ekilmiş ve $n=3$ olacak şekilde de kontrol grubu bırakılmıştır. 24 saatlik 37°C ve % 5 CO_2 ortam koşullarındaki inkübasyonundan sonra kuyucuklardaki hücreler besiyerleri ile birlikte deney tüplerine alınmıştır. Tabanda kalan hücreler için kuyucuklar 2 mL PBS ile yıkanmış sonra kuyucuklardaki PBS aynı deney tüplerine aktarılmıştır. Ardından her kuyuya 100 μL tripsin/EDTA enzim çözeltisi ile 5 dakika süreyle 37°C 'de inkübe edilmiştir. Tabandaki yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine taze besiyeri eklenerek ve pipetaj yapılmıştır. Kuyucuklardaki hücre+tripsin+besiyeri içeren tüm karışımlar aynı deney tüplerine aktarılmıştır. Hücreler $2000 \times g$ 'de 5 dakika santrafüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 100 μL bağlama solusyonu nazıkçe karıştırılarak resüspanse edilmiştir. Ardından 100 μL hücre süspansiyonunun üzerine 5 μL Annexin V FITC ve 1 μL Propidyum iyodür

eklenmiş ve nazikçe karıştırılmıştır. Hücreler karanlıkta 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler hemen flow sitometre cihazında (BD FACSCanto™ II Flow Cytometer) ölçüm yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar BD FACS Diva Software yazılımı ile analiz edilmiştir.

3.2.11. Western Blot Uygulaması

Western Blot uygulaması, içerisinde çok sayıda protein olan bir örneğin içerisinden istenilen tek bir proteini özgün olarak saptamaya yarayan yöntemdir. Bu uygulama sonunda ilgilenilen bir proteinin örnekte belirlendikten sonra yarı kantitatif bir şekilde farklı gruplar arasındaki miktarı hesaplanabilir. Protokol ve kullanılan boyalar değişiklik gösterebilir, bu yöntem sayesinde membran üzerindeki 5 ng miktarındaki proteinler bile tespit edilebilir.

Western blot işlemi sırasıyla,

- 1 proteinin membrana aktarılma işlemi
- 2 bloklama işlemi
- 3 birincil antikor uygulanması işlemi
- 4 ikincil antikor uygulanması işlemi
- 5 görüntüleme işlemi

işlemlerinden olmak üzere temel olarak beş basamaktan meydana gelir. Western blot işlemine başlamadan önce, örnekte karışım halinde bulunan proteinler genellikle belli oranda bir ön ayırma tabii tutulmaktadır. Bu işlem sayesinde elde edilen parametreler aranan proteinin tespitinde kullanılır.

Hücre Kültürü Hazırlama Aşaması

Öncelikle A375 hücreleri 6 kuyucuklu plakaların içerisine her bir kuyucukta 10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Bu hücreler % 1 (w/v) P/S, % 10 FBS ve % 1 X L-Glu karışımı içeren DMEM besi ortamında çoğaltılmıştır. Hücreler kuyucuklarda yaklaşık % 80 doluluğa ulaştığında IC₅₀ dozunda Bileşik-15 uygulaması yapılmış ve hücreler FBS içermeyen besi ortamında inkübatörde inkübe edilmiştir. 48 saatlik sürenin sonunda A 375 hücreleri tripsin-EDTA ile muamele edilmiş ve ardından 5 dakika boyunca 500xg'de santrifüjlenmiştir. Hücre pelleti PBS ile süspanse edilerek hücreler yıkanmıştır. Daha sonra pellet 2 mL'lik bir mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış

ve yüksek hızda 2-3 dakika vortekslenmiş, pellet toplanmıştır. Daha sonra pelletler 500 µL RİPA çözeltisi (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, % 1 Triton x 100, % 0,1 SDS, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH 8) içerisinde çözülmüştür. RİPA çözeltisi içeriği **Tablo.3.6.**'da gösterilmiştir. Mikrosantrifüjlerdeki örnekler homojenizatör kullanılarak 20 tekrar olmak üzere homojenize edilmiştir. Örnekler 5 dakika süre ile buzda bekletilmiş ve 4°C'de 15 dakika 14000xg'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemin hemen ardından süpernatant önceden soğutulmuş bir tüplere aktarılmıştır ve bu tüpler tekrar kullanılmak üzere -86°C'ye kaldırılmıştır.

Tablo 3.7. Protein izolasyon için hazırlanan RİPA Çözeltisi

10 mM Tris pH 8	100 mL
1 mM EDTA	37,2 mg
0,5 mM EGTA	19 mg
% 1 Triton x 100	1 mL
% 0,1 SDS	1mL
150 mM NaCl	820 mg
1 mM PMSF (proteaz inhibitörü deney başlamadan hemen önce en son ekleniliyor)	1,74 mg

Protein Miktar Tayini

Bir önceki adımda hazırlanan proteinler miktarlarına uygun olarak normalize edilmek için BCA deneyine tabi tutulmuştur. Bu deney amino asit kalıntılarının Cu^{+2} 'ı Cu^{+1} 'a indirgemesi temeline dayanmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda, proteinlerde bulunan peptid bağlarında da bu reaksiyon görülmektedir. Bu nedenle her bir Cu^{+1} iyonu BCA çözeltisi ile mor renkli bir kompleks oluşturmaktadır.

İlk aşama olarak öncelikle 2000 µg/mL'e kadar artan derişimler için 8 adet standart çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra 96 kuyucuklu bir plakada belirlenmiş kuyucuklara iki tekrarlı şekilde 25 µL eklenmiştir. Örnekler için ise kuyucuklara her bir örnekten de 25 µL eklenmiştir. Tekrardan standart çözelti ve örneklerin olduğu kuyucuklara 1:50 oranında bakır sülfat ve bikinkoninik asit solüsyonlarından oluşan çözeltiden 200 µL eklenmiştir. 96 kuyucuklu plaka 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun hemen ardından 562 nm dalga boyunda absorbans değerleri

ölçülmüştür. Standart kuyucuklarından ölçülen absorbans değerleri yardımıyla standart eğri grafiği ve denklemi hesaplanmıştır. Hesaplanan bu denklem sayesinde de örneklerdeki protein miktarı bulunmuştur.

Western Blot Aşaması

Western Blot uygulamasına geçmeden elimizdeki proteinler 10 µg olacak şekilde hepsi eşitlendi. Daha sonra elde ettiğimiz proteinlerin primer yapısını istediğimiz için proteinler 96 kuyucuklu termal döngü cihazında işleme tabi tutulmuştur. Proteinlerin tetramer ve sekonder yapılarını istemediğimiz için 2X Laemmli Sample Buffer ve 2-Mercaptoethanol solüsyonları ile muamele edilmiştir ve hemen ardından termal döngü cihazında 95 °C'de 5 dakika süre ile denatüre edilmiştir.

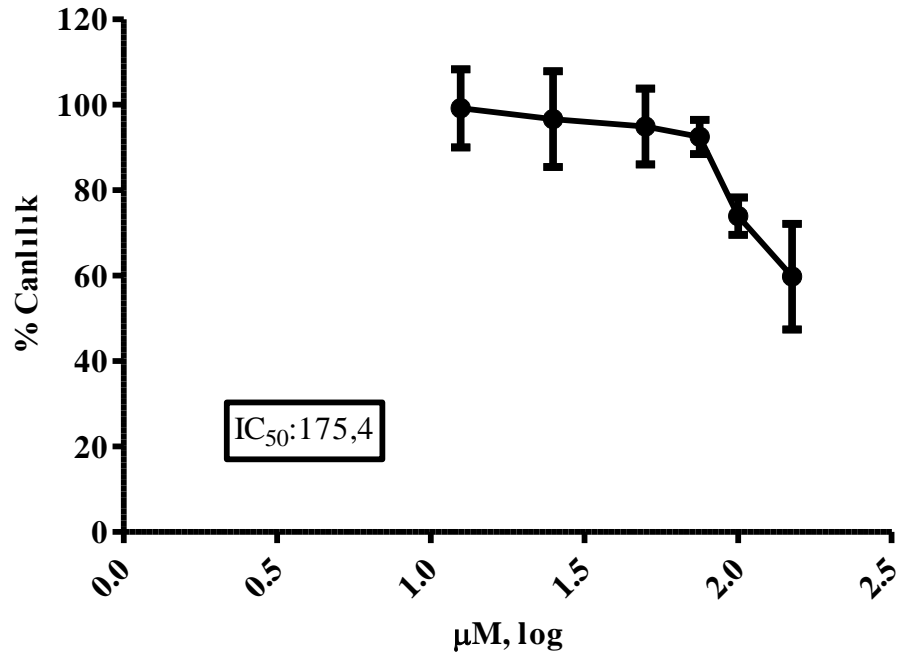
Jel yürütme tankına 1X MOPS tamponu eklendi ve ardından hazır olarak alınan jel tankın içine yerleştirilmiştir. Plakanın ilk kuyucuğuna Precision Plus Protein Dual Color Standarts işaretleyicisi 15µL olacak şekilde eklendi. Örnekler de işaretleyiciden sonraki kuyucuklara 15 µL olacak şekilde sırayla eklenilmiştir. Örneklerin hepsi jel tankına yüklenildikten sonra örnekler Dual Power Zoom cihazı ile 100 V'da 150 dakika boyunca yukarıdan aşağıya doğru yürütülmüştür. Daha sonra aradaki sürede tamponlar hazırlandı. 10X 1-Tween tamponu kullanılmıştır. Yıkama yapmak için dH₂O içerisine 1/10 oranında 10X TBS ve 1/2000 oranında Tween 20 eklenmiştir. Antikor muamelesi için ise 50'lik falkon tüpüne %5 süt tozu içerisine 1X TBS 1-Tween eklenmiştir. Belirlenen yürütme süresi bittikten sonra jel kalıpları çıkarılmıştır. Kalıbın üç kenarı kırılarak açılmıştır, jel düzgün bir şekilde ve jel parçalanmamasına dikkat edilerek çıkartılmıştır. iBlot™ transfer makinesine kullanma kılavuzunda belirtilen şekilde kurutma kağıdı konulmuştur, iyice ıslanması için transfer buffer dökülmüştür ve üzerinde hiçbir şekilde kabarcık kalmamasına dikkat edilmiştir. Kuru kalmamasına izin verilmeyen PVD membran, kurutma kağıdının üstüne yerleştirilmiştir. Jel, membran ise bunların üzerine gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Daha sonra 7 dakika süre ile işleme tabi tutulmuştur. Ortamdaki ıslaklık elektrik geçirgenliğini arttırarak üstten alta ilerleyecek şekilde, yani jelden membrana doğru protein transferini gerçekleştirir. Sürenin sonunda makineden kurutma kağıtları arasındaki membran, jelden ayrılarak çıkarılır. Blokaj yapılır, membran %5 süt tozu içinde 1X TBS 1-Tween içerisinde oda sıcaklığında 1 saat çalkalanarak

gerçekleştirilmiştir. Daha sonra membran, birincil antikor çözeltisi 10 mL %5 süt tozu içinde 1X TBS 1- Tween solüsyonu içerisinde 1/1000 gelecek şekilde karıştırılmış ve gece boyu 4 °C çalkalanılmıştır. Sürenin sonunda primer antikor çözeltisi tekrardan kullanılmak için saklama tüpüne alınmış ve membran yıkamaya alınmıştır. Yıkama işlemi için 10 mL yıkama solüsyonu olan TBST (TBS+ %0.1 Tween-20) eklenerek 3 kez 10 dakika boyunca çalkalayıcıda bekletilerek yıkama yapılmıştır. Yıkamaların sonunda ikincil antikor çözeltisi için 10 mL %5 süt tozu içinde 1X TBS 1-Tween içerisinde 1/1000 oranında ikincil antikor eklenilmiştir. Tekrardan 1 saat boyunca çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Sürenin sonunda ikincil antikor çözeltisi yeniden kullanılmak üzere ayrılmış ve membran yıkamaya alınmıştır. Üstüne 10 mL yıkama solüsyonu olan TBST (TBS+ %0.1 Tween-20) eklenerek 3 kez 10 dakika çalkalayıcıda bekletilerek yıkama yapılmıştır. Membran bir plastik şeffaf dosya yaprağının üzerine konulmuştur. Kurumamasına dikkat edilmiştir. Daha sonra Western Bright™ Peroxide ve Western Bright™ Sirius ajanları 1/1 oranında 2 mL olacak şekilde karıştırılmış ve steril bir pipetle tüm membran yüzeyine uygulanmıştır ve reaksiyon için 5 dakika beklenilmiştir. Bu ajanlar, ikincil antikor için aynı konjüge grubu taşımak zorundadır bu şekilde de ikincil antikora bağlanarak ışığa yaparlar. Daha sonra membran şeffaf plastik ile birlikte okuma yapacak olan BIO RAD Universal Hood II cihazına yerleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. SRB Deneyi Sonuçları

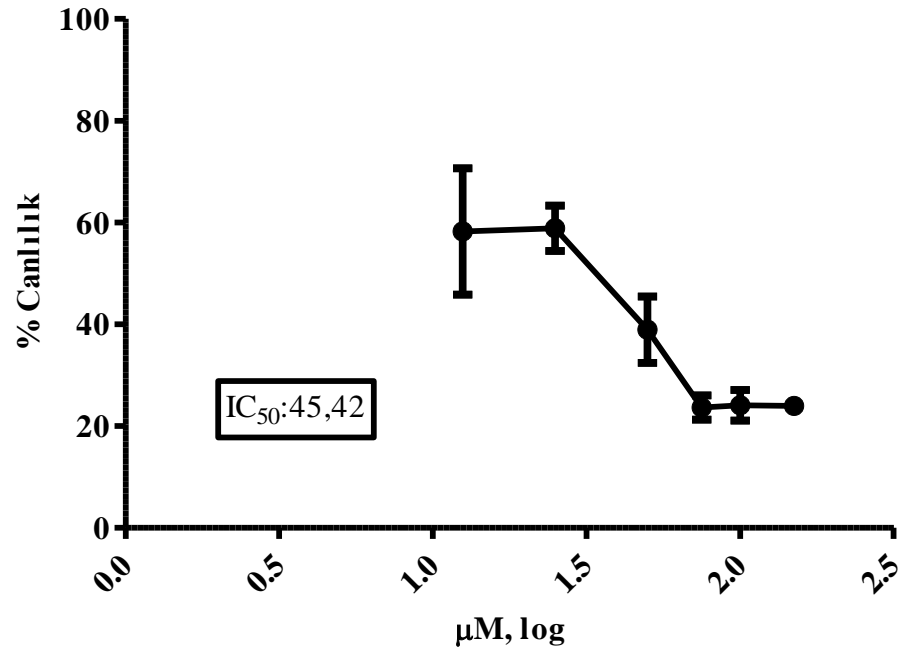
A375 hücrelerinin maruz bırakıldığı kojik asit türevleri sonucunda yapılan SRB deneyi sonuçları aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 4.1. A375 hücrelerinde Bileşik-2 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiği (n=4)

Tablo 4.1. Bileşik-2'nin A375 hücrelerindeki % canlılık değeri

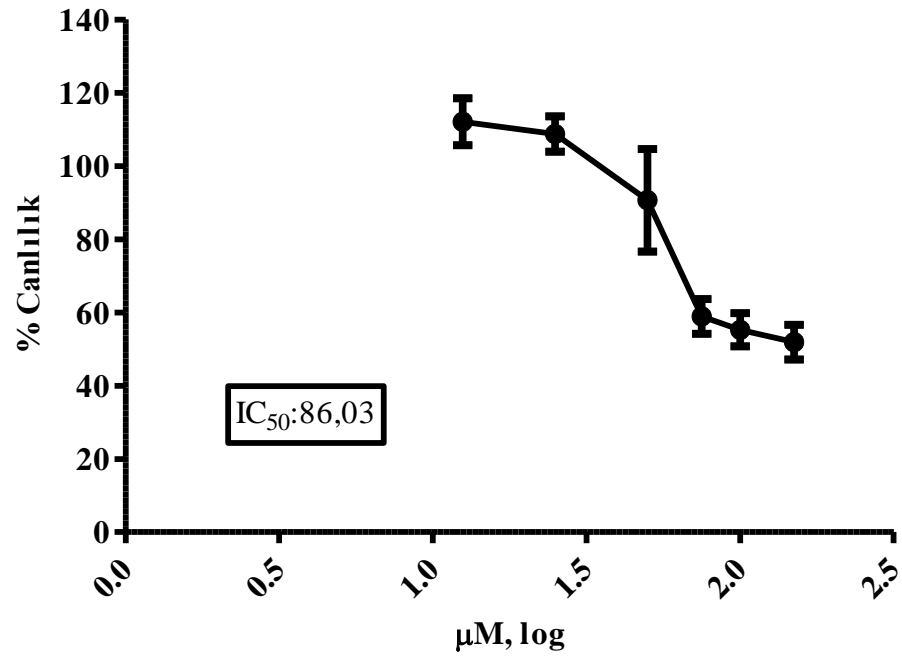
Konsantrasyon µM	Yüzde	Canlılık	%	ORT	SD
150	71,00	69,90	48,10	59,775	12,362
100	69,20	74,30	79,60	73,950	4,327
75	88,30	92,90	96,30	105,50	4,015
50	81,80	87,40	92,60	104,70	8,876
25	86,00	92,60	95,70	112,30	11,190
12,5	91,10	94,40	99,30	111,90	9,128



Şekil 4.2. A375 hücrelerinde Bileşik-3 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiği (n=4)

Tablo 4.2. Bileşik-3'ün A375 hücrelerindeki % canlılık değeri

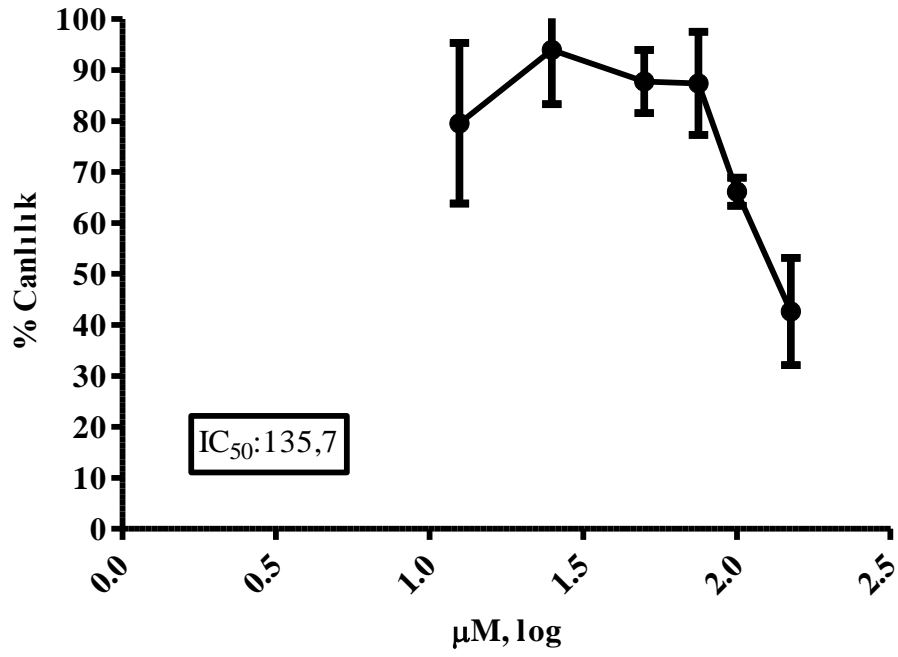
Konsantrasyon μM	Yüzde	Canlılık	%	ORT	SD	
150	23,73	23,01	24,28	24,82	23,960	0,774
100	28,26	21,20	23,01	23,91	24,095	2,996
75	21,01	22,28	25,36	25,91	23,640	2,371
50	29,17	42,39	42,03	42,21	38,950	6,521
25	53,80	57,07	60,51	64,13	58,877	4,446
12,5	57,25	71,01	41,67	63,04	58,242	12,405



Şekil 4.3. A375 hücrelerinde Bileşik-4 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiği (n=4)

Tablo 4.3. Bileşik-4'ün A375 hücrelerindeki % canlılık değeri

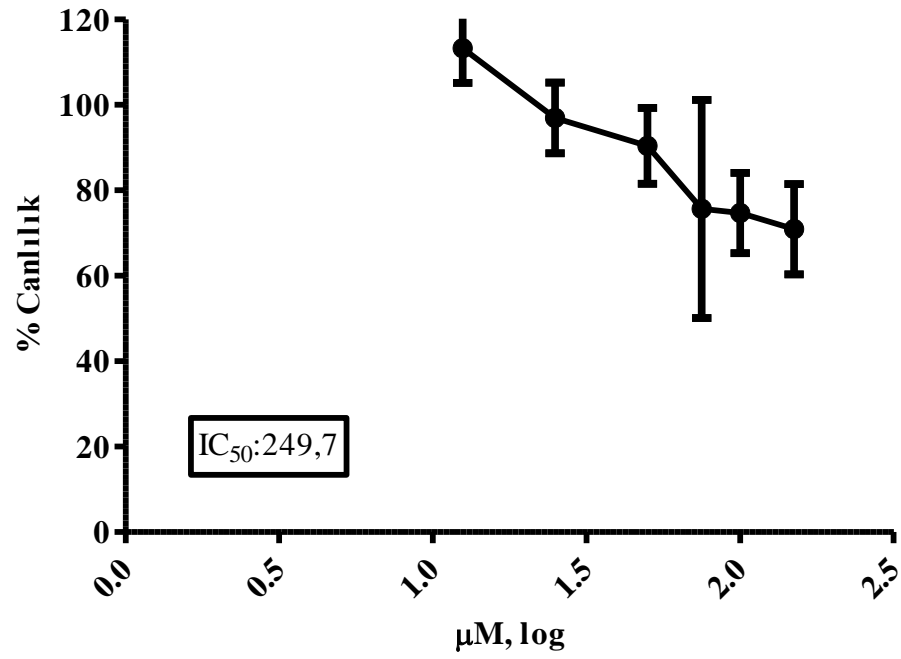
Konsantrasyon μM	Yüzde	Canlılık	%	ORT	SD	
150	56,58	42,45	56,70	62,90	51,910	8,192
100	43,16	46,29	58,76	60,72	55,256	7,826
75	45,17	66,33	60,60	63,49	58,897	9,445
50	92,58	102,16	51,32	116,46	90,630	27,983
25	101,39	120,72	100,62	112,21	108,735	9,583
12,5	96,54	127,64	113,63	110,38	112,047	12,765



Şekil 4.4. A375 hücrelerinde Bileşik-5 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiği (n=4)

Tablo 4.4. Bileşik-5'in A375 hücrelerindeki % canlılık değeri

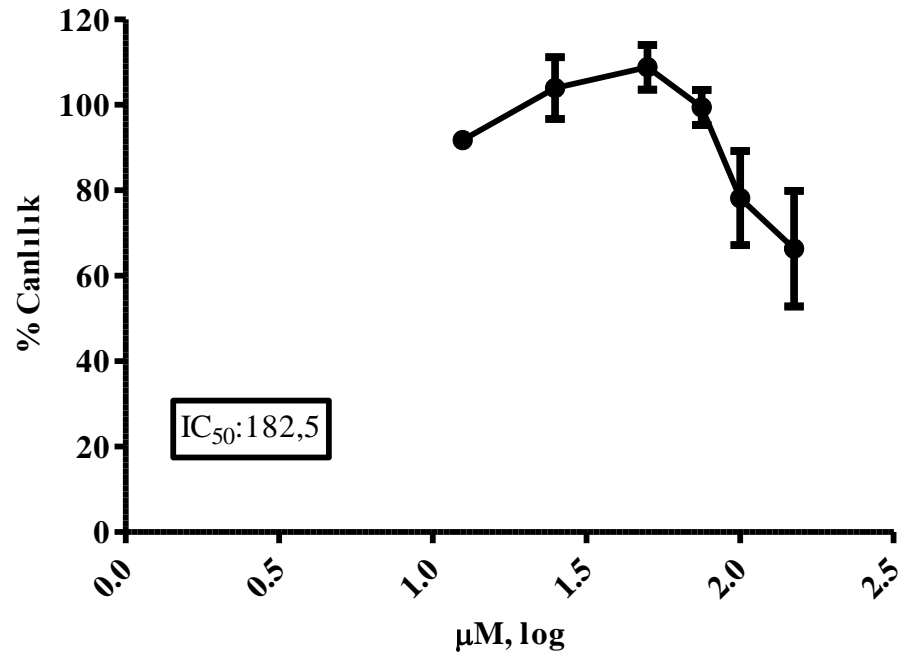
Konsantrasyon μM	Yüzde	Canlılık	%	ORT	SD
150	56,10	45,90	35,40	42,650	10,540
100	67,80	67,40	67,30	66,125	2,758
75	99,90	87,60	87,00	87,400	10,128
50	91,60	93,50	86,10	87,725	6,202
25	106,10	99,60	86,60	93,975	10,656
12,5	95,90	89,60	70,10	79,550	15,757



Şekil 4.5. A375 hücrelerinde Bileşik-9 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiği (n=4)

Tablo 4.5. Bileşik-9'un A375 hücrelerindeki % canlılık değeri

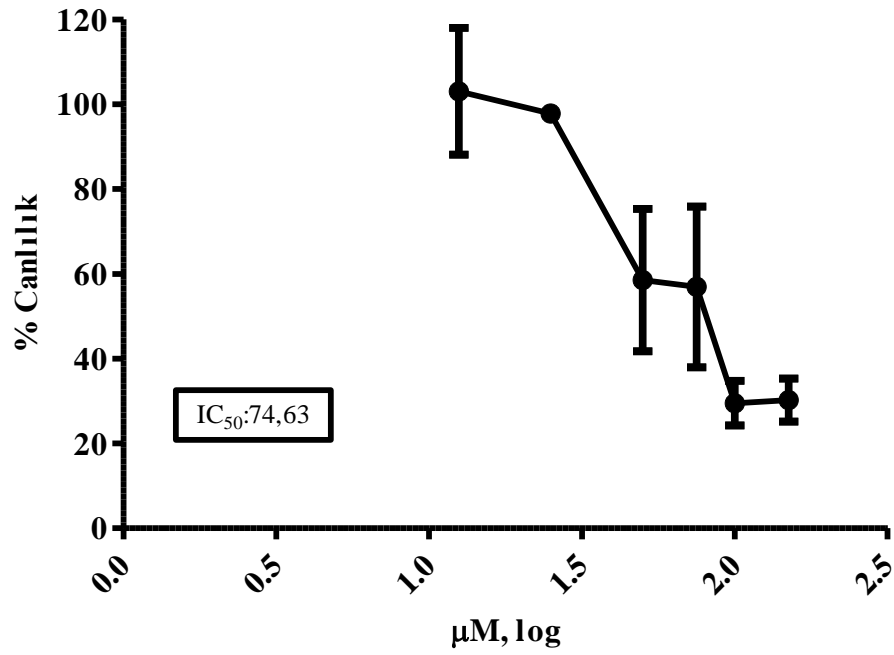
Konsantrasyon μM	Yüzde	Canlılık	%	ORT	SD	
150	62,49	86,31	66,10	68,76	70,915	10,580
100	76,62	74,61	62,43	85,19	74,712	9,385
75	61,54	105,11	60,30	42,80	75,650	25,520
50	101,15	90,04	79,40	91,04	90,407	8,890
25	92,05	108,54	97,07	90,10	96,940	8,271
12,5	115,52	123,80	106,12	107,66	113,275	8,135



Şekil 4.6. A375 hücrelerinde Bileşik-10 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiği (n=4)

Tablo 4.6. Bileşik-10'nun A375 hücrelerindeki % canlılık değeri

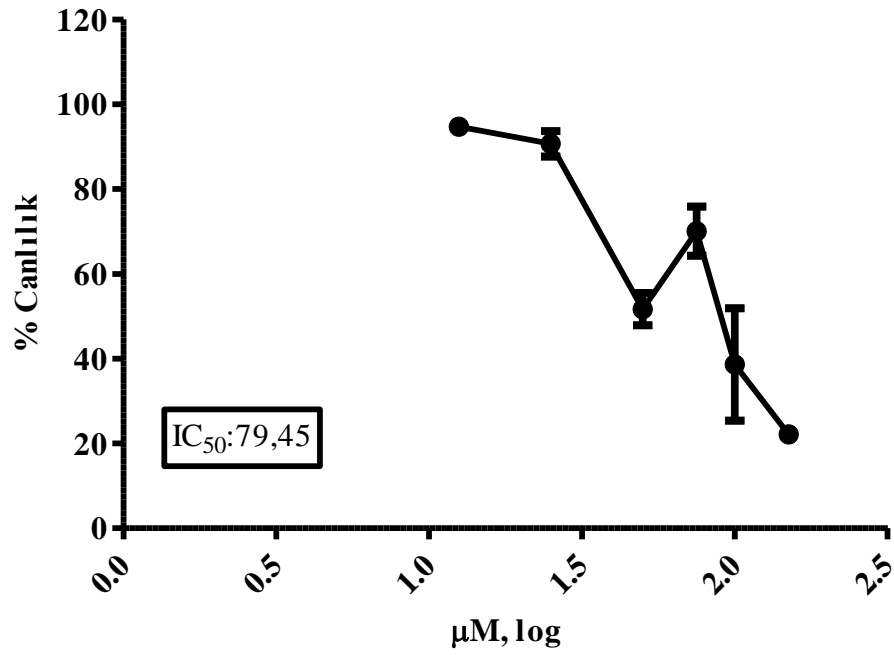
Konsantrasyon μM	Yüzde	Canlılık	%	ORT	SD	
150	75,20	80,60	54,50	55,10	66,350	13,519
100	74,80	81,90	91,00	65,00	78,175	11,004
75	99,90	104,30	99,20	94,30	99,425	4,095
50	135,50	112,50	130,20	105,10	108,800	5,232
25	108,00	112,00	98,40	97,30	103,925	7,216
12,5	92,00	91,50	47,90	15,10	91,750	0,353



Şekil 4.7. A375 hücrelerinde Bileşik-11 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiği (n=4)

Tablo 4.7. Bileşik-11'in A375 hücrelerindeki % canlılık değeri

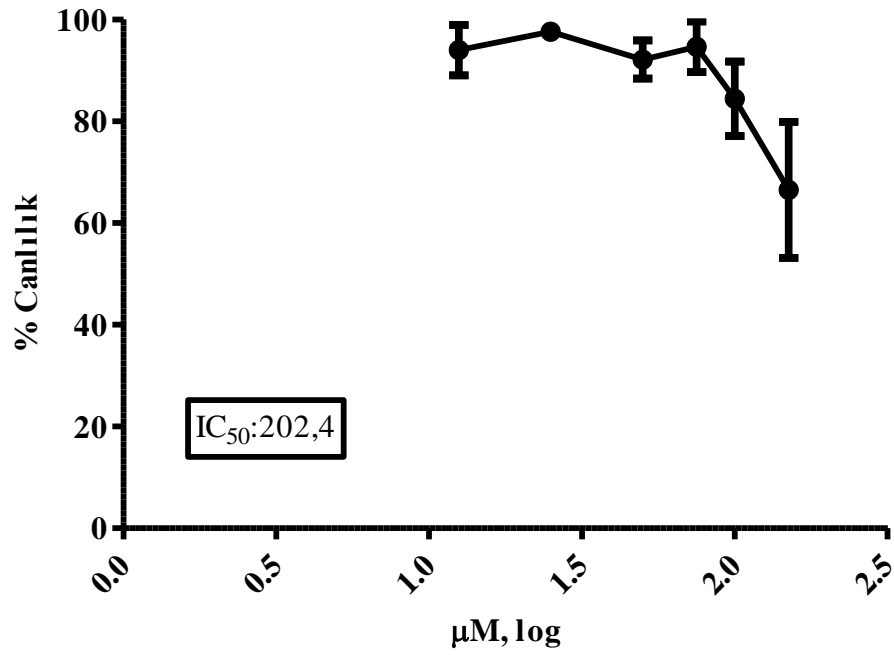
Konsantrasyon μM	Yüzde	Canlılık	%	ORT	SD
150	25,80	32,60	36,30	30,250	5,083
100	29,40	32,20	34,20	29,500	5,249
75	43,50	70,30	81,30	56,900	18,950
50	76,50	55,90	43,20	58,533	16,805
25	117,20	99,40	97,00	97,800	1,385
12,5	113,60	92,50	53,80	103,050	14,910



Şekil 4.8. A375 hücrelerinde Bileşik-13 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiği (n=4)

Tablo 4.8. Bileşik-13'ün A375 hücrelerindeki % canlılık değeri

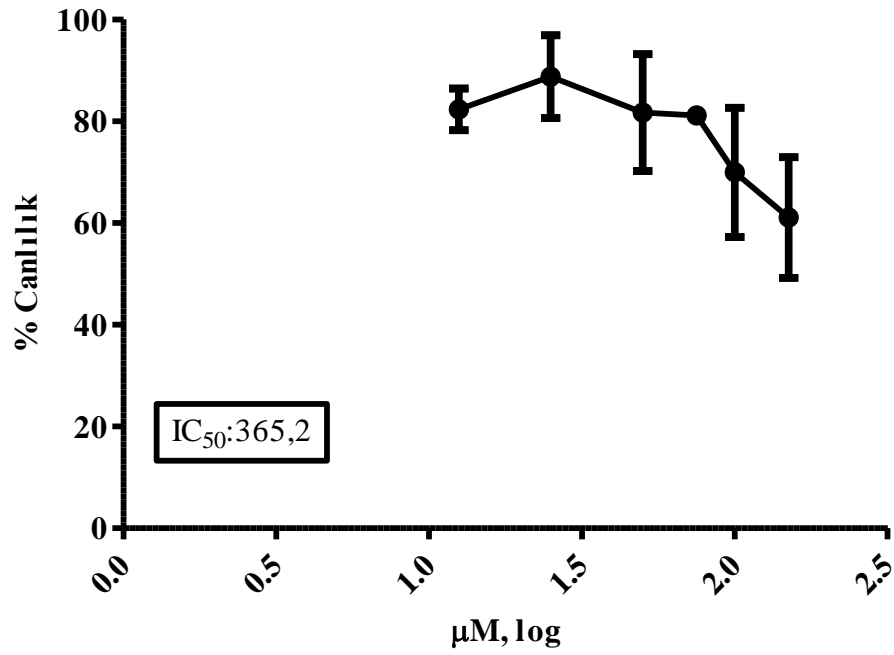
Konsantrasyon μM	Yüzde	Canlılık	%	ORT	SD	
150	23,30	20,90	23,00	21,40	22,150	1,178
100	51,10	30,30	48,70	24,40	38,625	13,276
75	74,50	72,60	71,50	61,60	70,050	5,768
50	52,20	47,20	56,40	50,90	51,675	3,795
25	89,50	87,30	94,40	91,40	90,650	3,009
12,5	93,90	92,80	94,90	97,10	94,675	1,830



Şekil 4.9. A375 hücrelerinde Bileşik-14 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiği (n=4)

Tablo 4.9. Bileşik-14'ün A375 hücrelerindeki % canlılık değeri

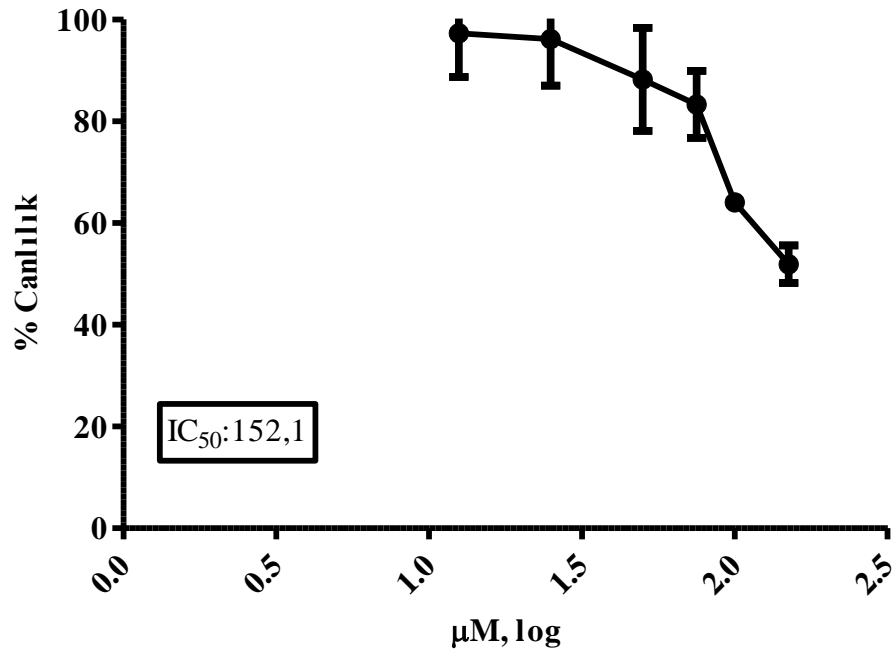
Konsantrasyon μM	Yüzde	Canlılık %	ORT	SD		
150	70,40	58,10	83,60	53,90	66,500	13,378
100	76,30	80,70	92,80	87,70	84,375	7,320
75	94,40	96,30	99,80	87,90	94,600	4,995
50	90,10	87,90	96,10	94,30	92,100	3,762
25	104,40	96,70	105,50	98,40	97,550	1,202
12,5	88,90	94,20	73,20	98,80	93,966	4,954



Şekil 4.10. A375 hücrelerinde Bileşik-17 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiği (n=4)

Tablo 4.10. Bileşik 17'in A375 hücrelerindeki % canlılık değeri

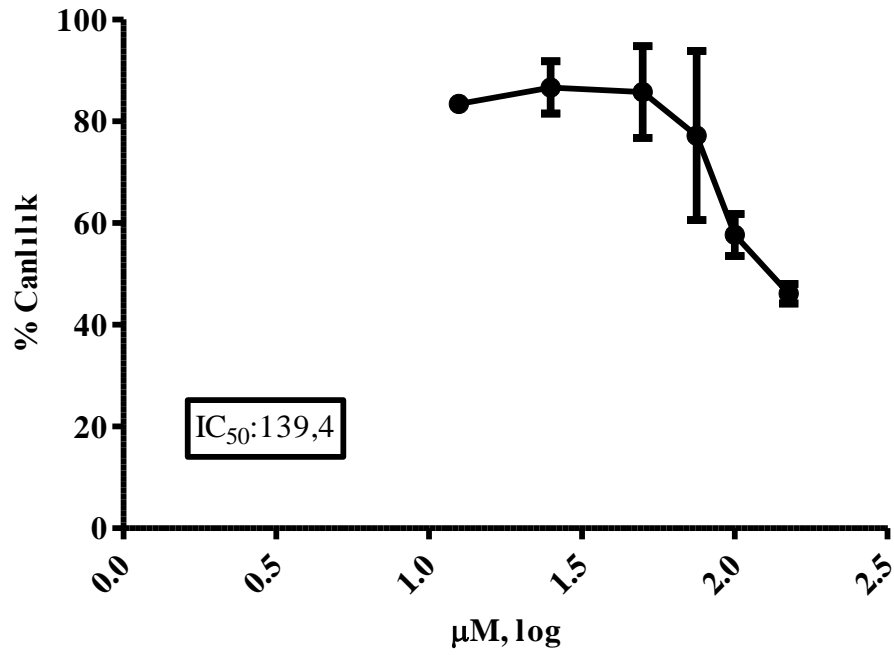
Konsantrasyon μM	Yüzde	Canlılık	%	ORT	SD	
150	46,20	61,40	61,50	75,20	61,075	11,847
100	57,40	71,30	64,00	87,00	69,925	12,720
75	79,80	82,40	104,90	104,20	81,100	1,838
50	75,90	68,30	91,20	91,30	81,675	11,483
25	83,00	95,60	94,50	97,60	88,750	8,131
12,5	79,60	87,00	73,80	80,30	82,300	4,085



Şekil 4.11. A375 hücrelerinde Bileşik-18 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiği (n=4)

Tablo 4.11. Bileşik-18'in A375 hücrelerindeki % canlılık değeri

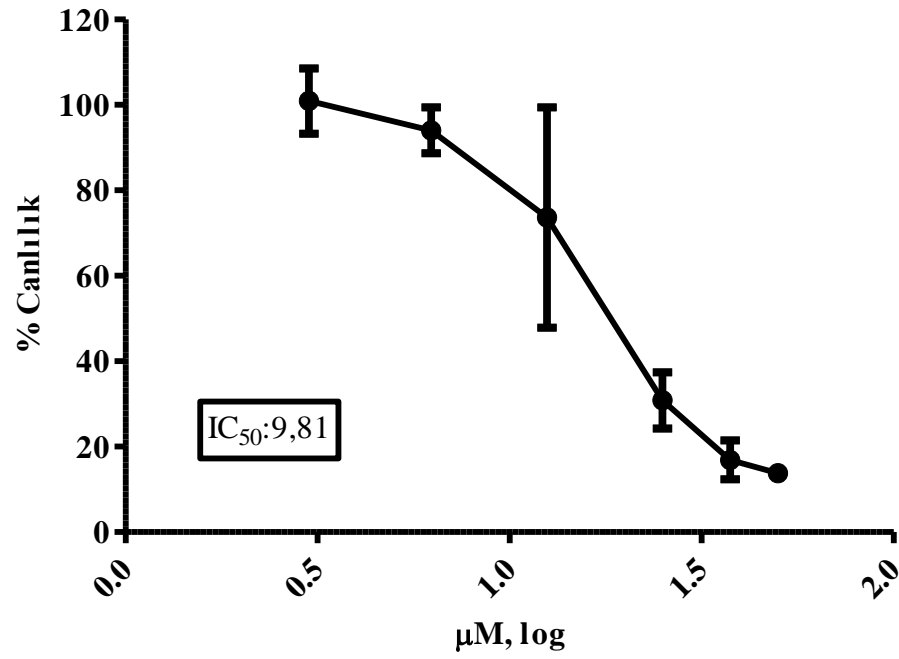
Konsantrasyon μM	Yüzde	Canlılık	%	ORT	SD	
150	55,90	54,10	48,50	49,00	51,875	3,688
100	64,60	62,10	64,70	64,70	64,024	1,284
75	111,70	89,40	84,10	76,30	83,266	6,589
50	102,20	89,00	80,90	80,70	88,200	10,102
25	108,40	97,80	90,30	88,10	96,150	9,161
12,5	107,70	99,30	87,30	94,70	97,250	8,542



Şekil 4.12. A375 hücrelerinde Bileşik-19 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiği (n=4)

Tablo 4.12. Bileşik-19'un A375 hücrelerindeki % canlılık değeri

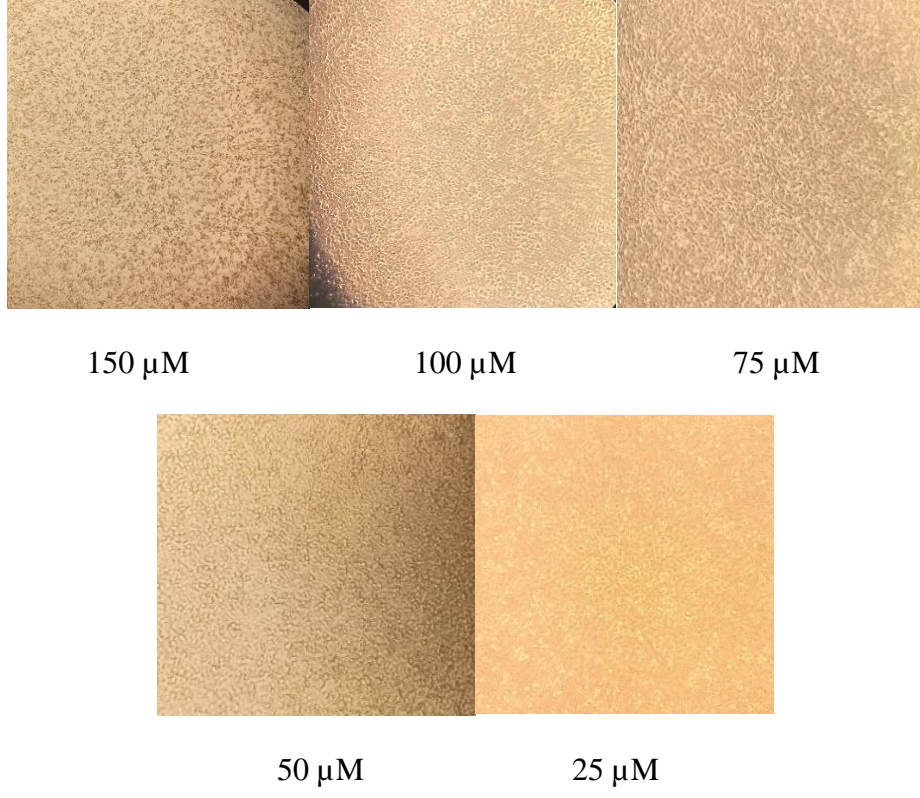
Konsantrasyon μM	Yüzde	Canlılık %	ORT	SD		
150	47,70	44,20	47,80	44,70	46,100	1,916
100	59,50	59,20	60,40	51,50	57,650	4,131
75	88,90	111,00	93,00	65,40	77,150	16,617
50	92,50	102,90	89,20	75,50	85,733	9,014
25	87,70	92,30	86,60	79,90	86,625	5,118
12,5	83,30	83,50	61,90	55,00	83,400	0,141



Şekil 4.13. A375 hücrelerinde Bileşik-15 etkileşimi sonucu oluşan % canlılık grafiği ($R^2: 0,9443$) (n=4)

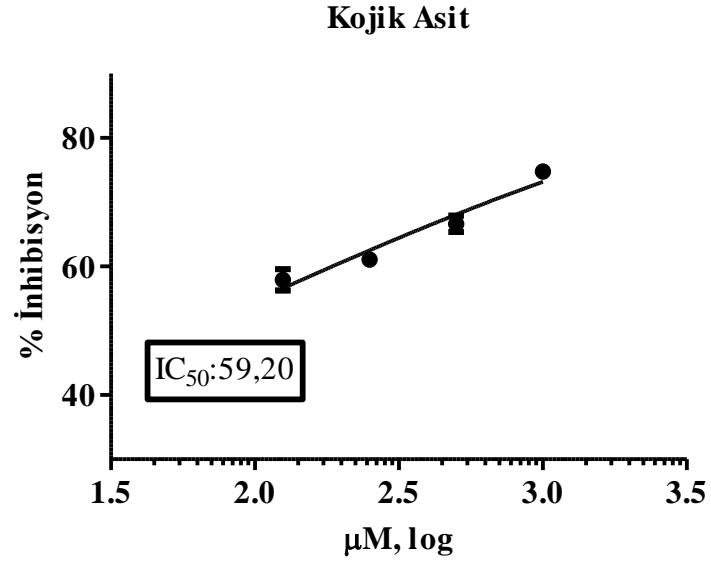
Tablo 4.13. Bileşik-15'in A375 hücrelerindeki % canlılık değeri

Konsantrasyon µM	Yüzde	Canlılık	%	ORT	SD
150	29,83	33,05	31,48	28,456	3,895
100	28,18	28,78	27,58	27,280	1,865
75	33,43	51,86	23,23	28,71	5,104
50	19,86	45,57	17,99	23,38	15,690
25	53,14	43,32	44,74	49,372	6,328
12,5	92,04	86,64	86,94	92,150	7,633

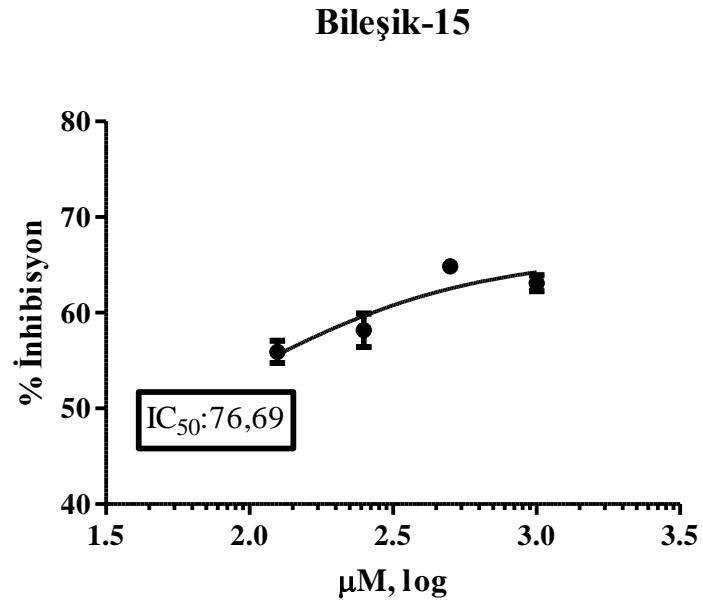


Şekil 4.14. A375 hücrelerinde Bileşik-15 etkileşiminin mikroskop görüntüleri (10X)

4.2. B16F10 Hücreleri ile Enzim Aktivitesi Ölçümü



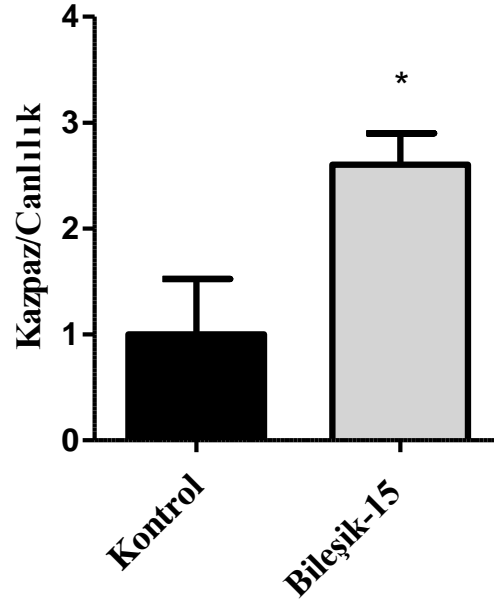
Şekil 4.15. Kojik asitin B16F10 hücrelerindeki tirozinaz üzerine inhibitör etkisi (n=3)



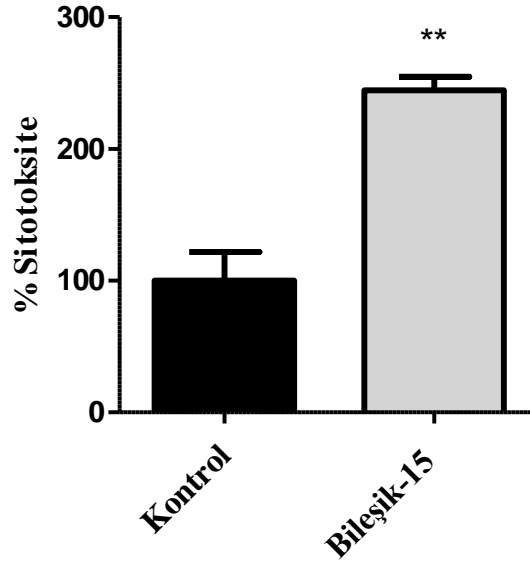
Şekil 4.16. Bileşik-15'in B16F10 hücrelerindeki tirozinaz üzerine inhibitör etkisi (n=3)

4.3.Apoptoz Deneyi Sonuçları

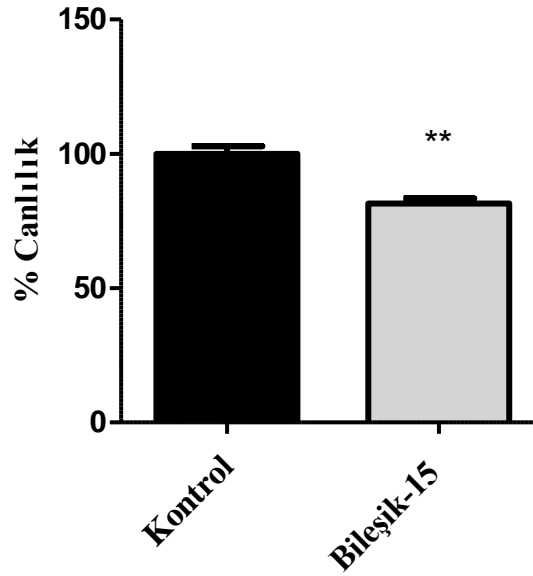
Bileşik-15'in, A375 hücrelerinde efektör kaspaz mekanizması ile apoptoza yönelme süreci apoptoz deneyi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda hücre hattı için kaspaz 3/7, sitotoksik ve canlı hücrelerin yüzde değerleri **Şekil 4.17.**, **4.18.** ve **4.19.**'de sunulmuştur.



Şekil 4.17. 24 saat süresince Bileşik-15'in IC₅₀ değerine maruz bırakılan A375 hücrelerinin kaspaz 3/7 yüzdeleri (n≥3; *p<0,05)



Şekil 4.18. 24 saat süresince Bileşik-15'in IC_{50} değerine maruz bırakılan A375 hücrelerinin sitotoksité yüzdeleri ($n \geq 3$; ** $p < 0,01$)



Şekil 4.19. 24 saat süresince Bileşik-15'in IC_{50} değerine maruz bırakılan A375 hücrelerinin canlılık yüzdeleri ($n \geq 3$; ** $p < 0,01$)

4.4. Saflaştırılan RNA Örneklerinin Saflık Düzeyi ve Miktarı

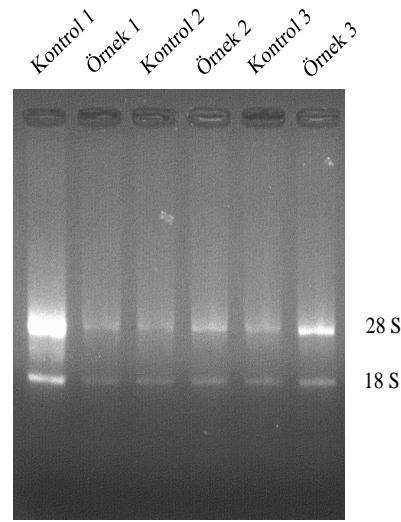
Bileşik-15'e maruz bırakılan A375 hücrelerinin total RNA'ları izole edilmiştir. Elde edilen bu RNA'lar 1/10 oranında seyreltilmiş ardından saflık ve miktar tayinleri yapılmıştır **Tablo 4.14.**

Tablo 4.14. 24 saat süresince Bileşik-15'e maruz bırakılan A375 hücrelerinin total RNA örneklerine ait 260/280 nM dalga boyu (n=3).

A375	Saflık(A260/A280)	Miktar (ng/μL)
Kontrol 1	2,9	35,14
Kontrol 2	1,94	161,71
Kontrol 3	1,94	214,09
Bileşik-15 1	1,92	126,55
Bileşik-15 2	1,85	64,22
Bileşik-15 3	2,17	77,46

4.5. A375 Hücrelerinden Elde Edilen Total RNA Örneklerinin Agaroz Jel Görüntüleri

A375 hücrelerinden saflaştırılan RNA örneklerinin görüntüsü elde edilmiştir. Fotoğrafta 18S rRNA ve 28S rRNA bantları gözlemlenmiştir. Bu bantların gözlemlenmesi total RNA'nın hücrelerden başarılı bir şekilde saflaştırıldığını göstermektedir **Şekil 4.20.**



Şekil 4.20. Saflaştırılan total RNA örneklerinin jel fotoğrafı.

4.6. cDNA Örneklerine Ait Derişim

Bileşik-15'e maruz bırakılmış olan A375 hücrelerinden saflaştırılmış olan RNA örnekleri kalıp görevinde kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. A375 hücreleri için cDNA'lerin miktarları **Tablo 4.15.**'te gösterilmiştir.

Tablo 4.15. cDNA örneklerinin miktarı (n=3).

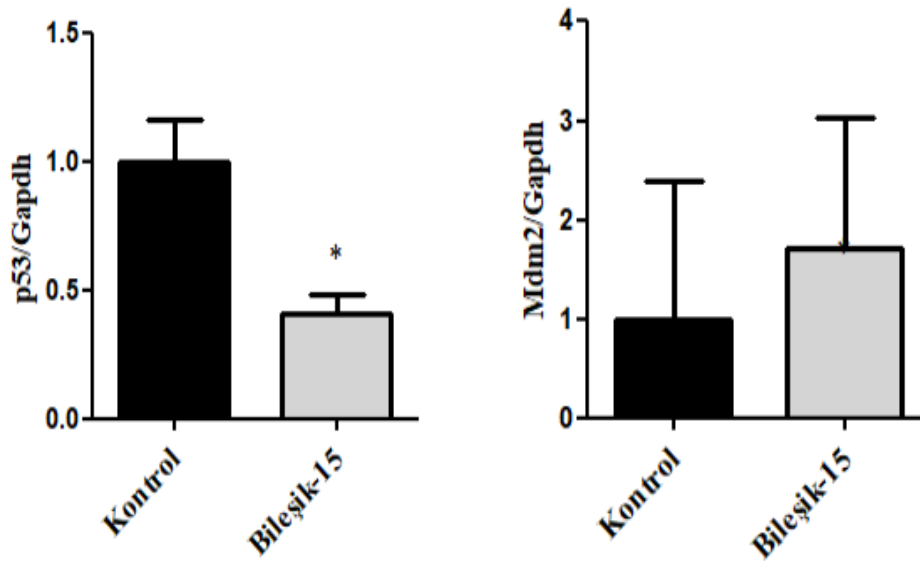
A375	Safılık(A260/A280)	Miktar (ng/µL)
Kontrol 1	1,74	620,13
Kontrol 2	1,77	639,71
Kontrol 3	1,75	571,99
Bileşik-15 1	1,73	477,44
Bileşik-15 2	1,74	484,52
Bileşik-15 3	1,76	468,71

4.7. A375 Hücresinde P53, MDM2, BAX, BCL-2, MDR-1 ve JNK Genlerinin Ekspresyon Düzeyi Bulguları

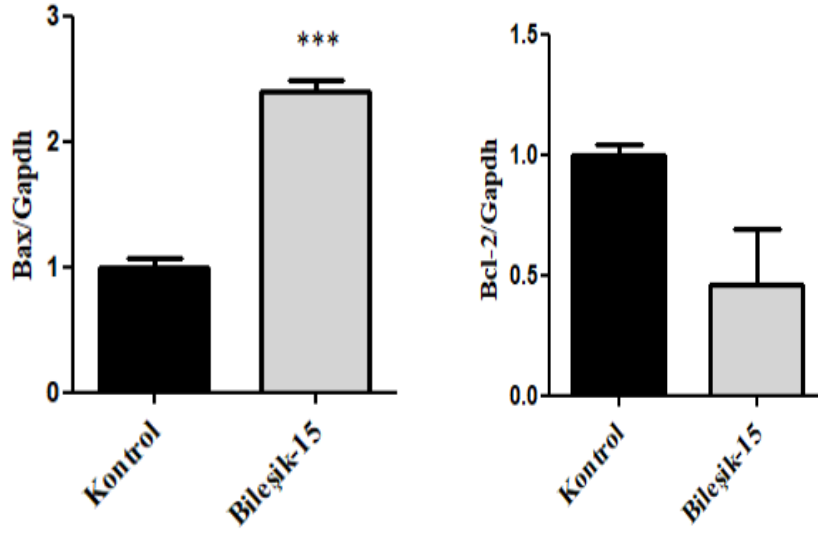
Bileşik-15 uygulaması yapılmamış ve Bileşik-15 uygulaması yapılmış olan A375 hücresinde P53, Mdm2, Bax, Bcl-2, Jnk ve Mdr-1 genleri için RT-PCR işlemi ile ekspresyon düzeylerinin belirlenmiştir ve Gapdh ise kontrol gen olarak seçilmiştir.

Deneyde tekrarlar n=3 olacak şekilde yapılmıştır. Sonuçların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar ve GraphPad grafik programı yardımıyla gen ekspresyon grafikleri çizilmiştir.

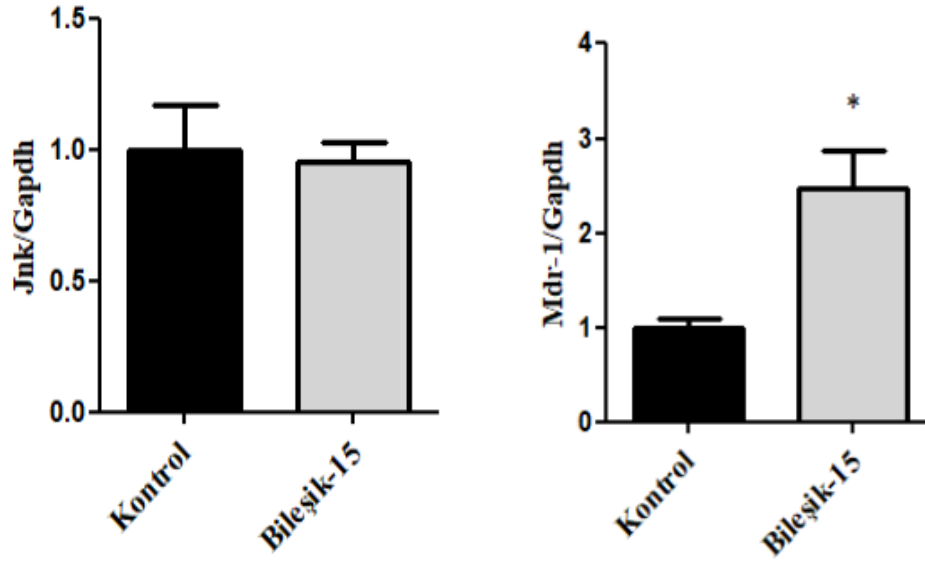
24 saat boyunca Bileşik-15'e maruz bırakılmış A375 hücrelerinin Bileşik-15 uygulanmamış kontrol grubuna kıyasla elde edilen gen ekspresyon düzeylerine ait ortalama ve standart sapma değerleri **Tablo 4.16.**'de bildirilmiştir. Bu genlerin ekspresyon düzeylerine ait grafikler ise **Şekil 4.24.**'de bir arada sunulmuştur.



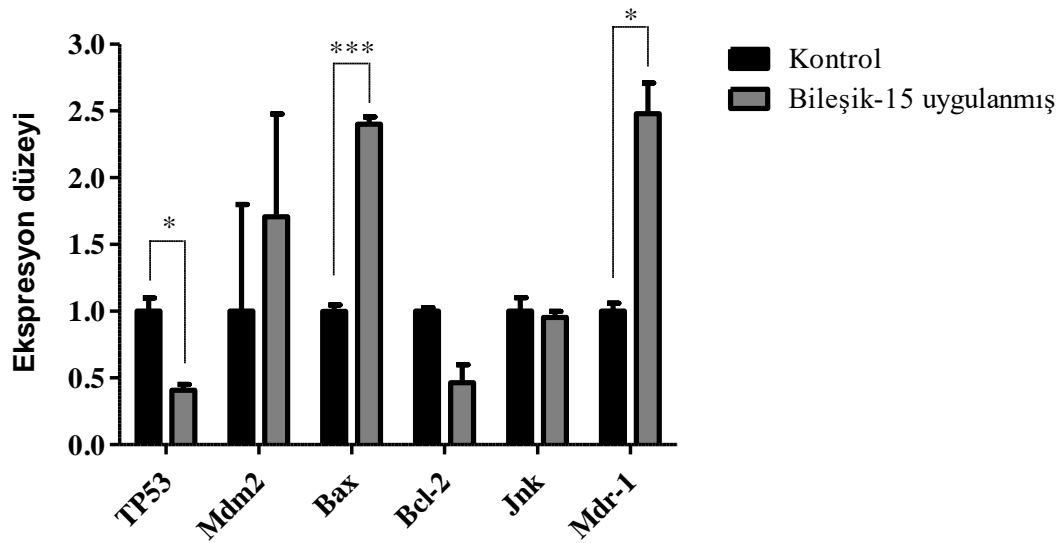
Şekil 4.21. 24 saat süresince Bileşik-15'e maruz bırakılmış A 375 hücrelerinde P53 ve Mdm2 ekspresyon düzeylerinde saptanan değişiklikler (n≥3; *p<0,05)



Şekil 4.22. 24 saat süresince Bileşik-15'e maruz bırakılmış A375 hücrelerinde Bax ve Bcl-2 ekspresyon düzeylerinde saptanan değişiklikler ($n \geq 3$; *** $p < 0,001$.)



Şekil 4.23. 24 saat süresince Bileşik-15'e maruz bırakılmış A 375 hücrelerinde Jnk ve Mdr-1 ekspresyon düzeylerinde saptanan değişiklikler ($n \geq 3$; * $p < 0,05$)



Şekil 4.24. 24 saat süresince Bileşik-15'e maruz bırakılmış A 375 hücrelerinde TP53, Mdm2, Bax, Bcl-2, Jnk ve Mdr-1 genlerinin ekspresyon düzeylerinde saptanan değişiklikler ($n \geq 3$; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$)

Tablo 4.16. 24 saat boyunca Bileşik-15'e maruz bırakılmış A375 hücrelerinin Bileşik-15 uygulanmamış kontrol grubuna kıyasla elde edilen gen ekspresyon düzeylerine ait ortalama ve standart sapma değerleri ($n \geq 3$).

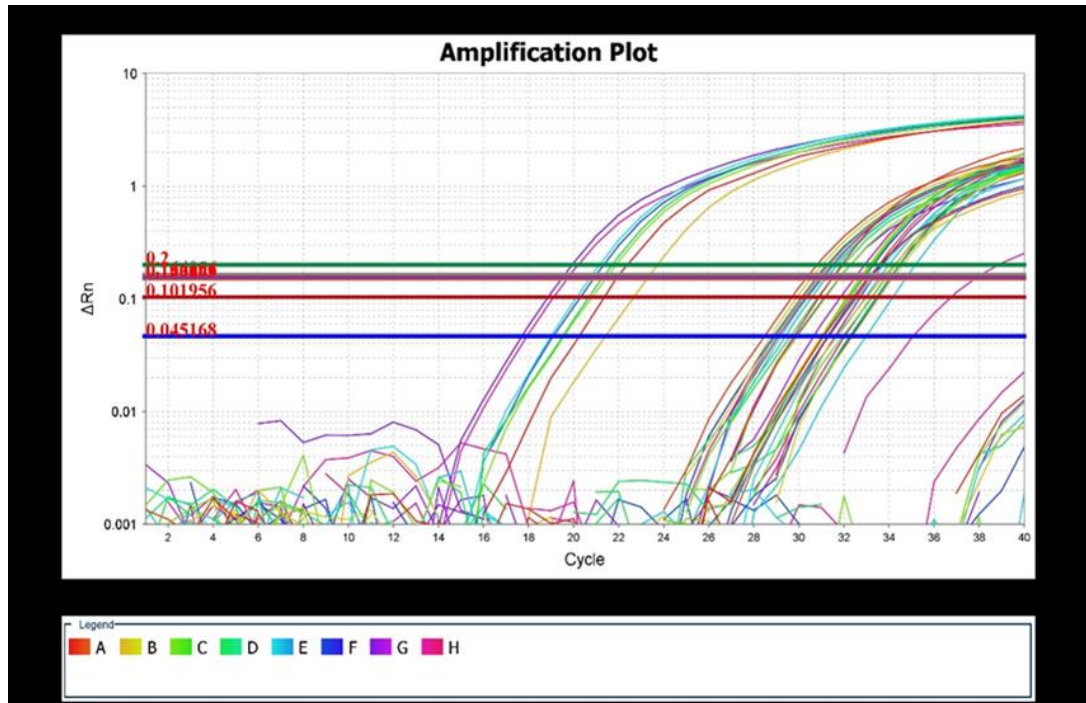
Gen		A375	
		Kontrol	Bileşik-15
TP53	Ort.	1,000	0,170
	Std. S.	0,408	0,077
Mdm2	Ort.	1,000	1,383
	Std. S.	1,708	1,330
Bax	Ort.	1,000	0,080
	Std. S.	2,401	0,092
Bcl-2	Ort.	1,000	0,048
	Std. S.	0,464	0,233
Mdr-1	Ort.	1,000	0,102
	Std. S.	2,480	0,398
Jnk	Ort.	1,000	0,177
	Std. S.	0,954	0,078

Elde edilen sonuçlara göre, A375 hücrelerinde Bileşik-15 uygulamasına yanıt olarak tümör baskılayıcı gen olan p53'ün ekspresyonunda kontrole anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Mdm2 geni p53'ün hücrel inhibitörü olarak bilinir ve bu genin ekspresyon profili, p53'ten daha yüksek biçimde elde edilmiştir.

Bax ve hücrel inhibitörü olan Bcl-2'ye ait ifadenme düzeyleri A375 hücreleri için bakıldığında, Bax'da kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Bax/Bcl-2 oranı apoptotik bir belirteç olarak görüldüğü için bu oran hesaplanmıştır. Bu değer 2,4 kat olarak hesaplanmış ve kontrole kıyasla yükseldiği sonucu elde edilmiştir.

İlaç direnci geni olarak bilinen Mdr-1'in ekspresyonu, A375 hücrelerinde Bileşik-15 verildiği hücrelerde kontrole kıyasla büyük bir artış gözlemlenmiştir ve bu artış istatistiksel açıdan anlamlıdır.

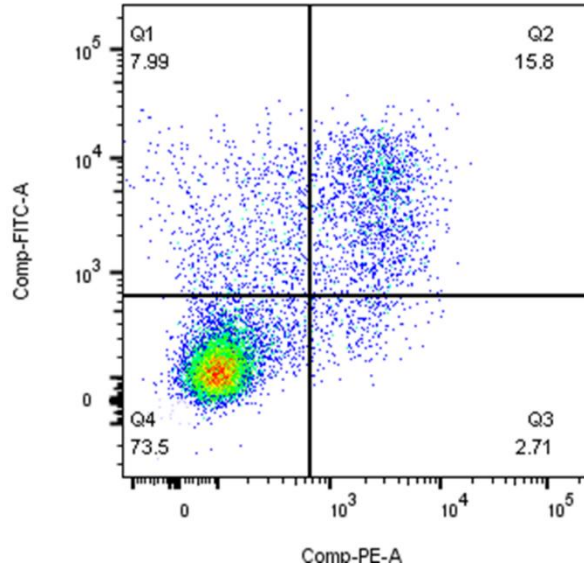
Jnk'nın ekspresyonu, A375 hücrelerinde Bileşik-15 ve kontrolde anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir.



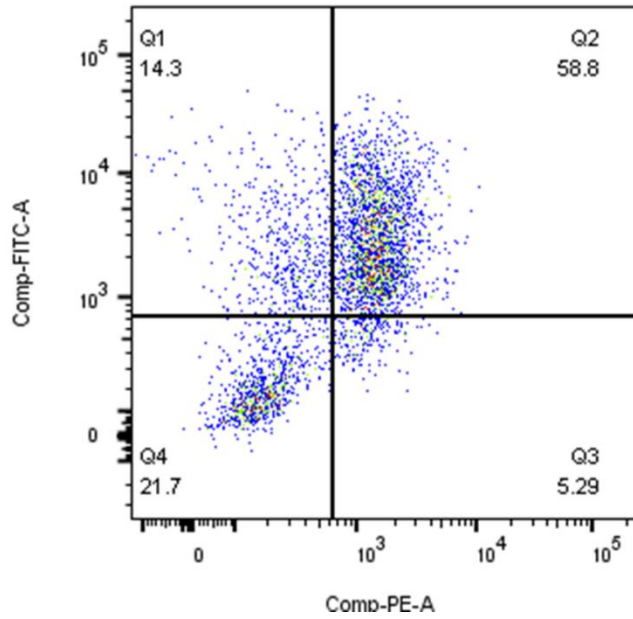
Şekil 4.25. RT-PCR işlemi sırasında genlerin gösterdiği piklerin grafiği

4.8. Akış Sitometri ile Apoptoz ve Canlılık Tayini

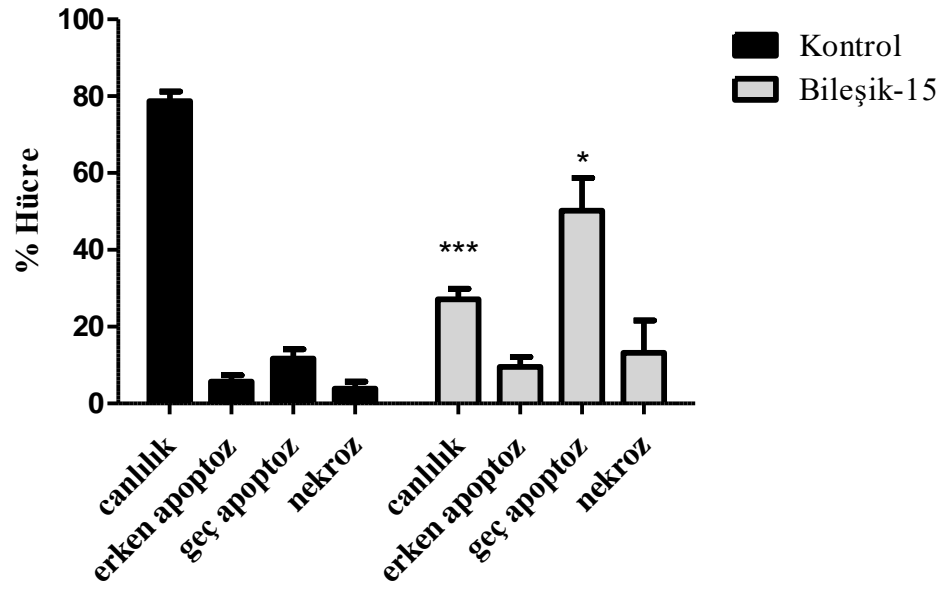
Hücrelerde oluşan apoptozun belirlenmesinde kullanılan Annexin V/PI boyama yöntemi flow sitometri analizi ile değerlendirildi. Bu yöntemde hücreler Annexin V-FITC ve PI boya ile boyanma durumlarına göre; canlı (Annexin V - / PI -), erken apoptotik (Annexin V + / PI -), geç apoptotik (Annexin V + / PI +) ve nekrotik (Annexin V - / PI +) olarak değerlendirildi Şekil 4.26. ve Şekil 4.27.



Şekil 4.26. Akış sitometri analizinde A375 hücrelerine 24 saat süresince kontrol uygulanmasından sonra Annexin V ve PI boyalarla boyanma şekline göre değerlendirilmesi.(Q1:Erken Apoptoz, Q2:Geç Apoptoz, Q3:Nekroz, Q4:Canlılık)



Şekil 4.27. Akış sitometri analizinde A375 hücrelerine 24 saat süresince Bileşik-15'in uygulanmasından sonra Annexin V ve PI boyalarla boyanma şekline göre değerlendirilmesi.(Q1:Erken Apoptoz, Q2:Geç Apoptoz, Q3:Nekroz, Q4:Canlılık)



Şekil 4.28. A375 hücrelerine 24 saat süresince Bileşik-15'in uygulanması ile uygulanan deney ve kontrol gruplarındaki A375 hücrelerinin % hücre değerlerinin gösterimi (n≥3; *p<0,05, ***p<0,001)

Tablo 4.17. A375 hücrelerine 24 saat süresince Bileşik-15'in uygulanması ile uygulanan deney ve kontrol gruplarındaki A375 hücrelerinin % hücre değerlerinin grafiği

%	Kontrol				Bileşik-15			
	annexin V+ PI- (early apoptotic)	annexinV+ PI+ (late apoptotic)	PI+ annexin V- (necrotic)	annexin V- PI- (viable)	annexin V+ PI- (early apoptotic)	annexinV+ PI+ (late apoptotic)	PI+ annexin V- (necrotic)	annexin V- PI- (viable)
n=1	8,44	13,3	0,54	77,7	14,3	58,8	5,29	21,7
n=2	2,57	7,0	7,0	83,4	8,75	58,6	4,2	28,5
n=3	6,0	14,9	4,0	75	5,6	33,2	30,1	31,1
Ort.	5,670	11,733	3,846	78,700	9,550	50,200	13,196	27,100
SD	2,948	4,176	3,232	4,288	4,404	14,722	14,648	4,853

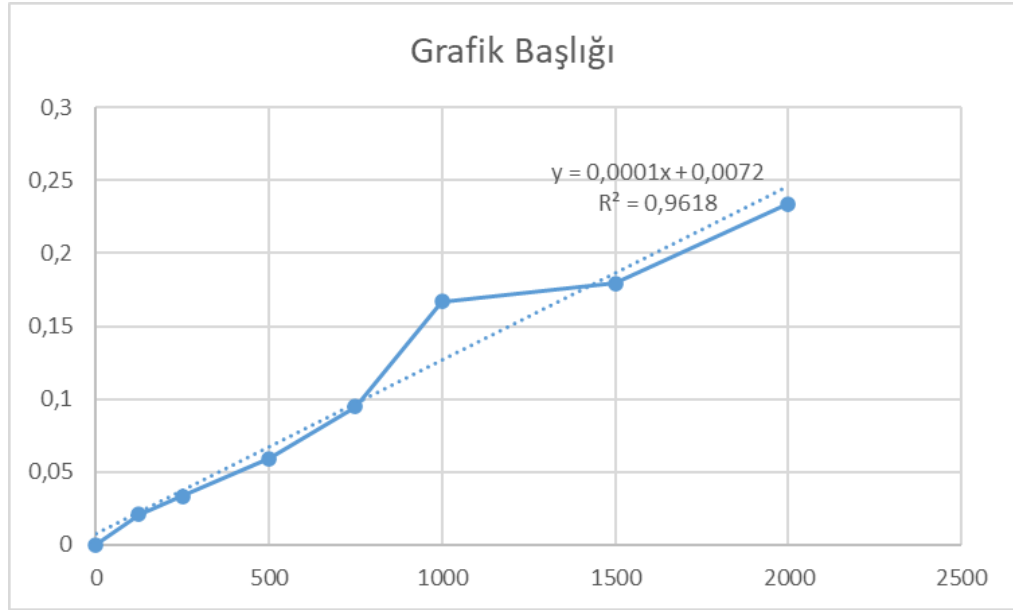
4.9. Protein Miktar Tayini Bulguları

A375 hücrelerindeki total protein düzeyinin belirlenmesi protein miktar tayini deneyinin yapılmasına karar verilmiştir.

Belirli derişimlerde protein bulunduran standartların BCA deneyi sonunda 562 nm dalga boyundaki absorbens değerleri ölçülmüştür. Elde edilen bu verilerin standart eğri grafiği çizilmiştir. Deney sonucunda elde edilen örneklerin standart absorbensları **Tablo.4.18.**'de verilirken; standart eğri grafiği ve denklemi ise **Şekil.4.29.**'da gösterilmiştir.

Tablo 4.18. 2000 µg/mL içecek şekilde artan derişimlerde 8 adet protein standartına ait 562 nm'de ölçülen absorbens değerleri (n=2).

µg/mL	Absorbans	(562 nm)	Ort.	Ort. - Kör
0	0,326	0,34	0,333	0,000
125	0,272	0,285	0,278	0,021
250	0,306	0,226	0,266	0,033
500	0,192	0,196	0,194	0,059
750	0,167	0,149	0,158	0,095
1000	0,123	0,142	0,1325	0,167
1500	0,118	0,122	0,120	0,179
2000	0,099	0,099	0,099	0,234



Şekil 4.29. BCA deneyi sonucu elde edilen standart değerlerinin standart eğri grafiği ve denklemi (n=2).

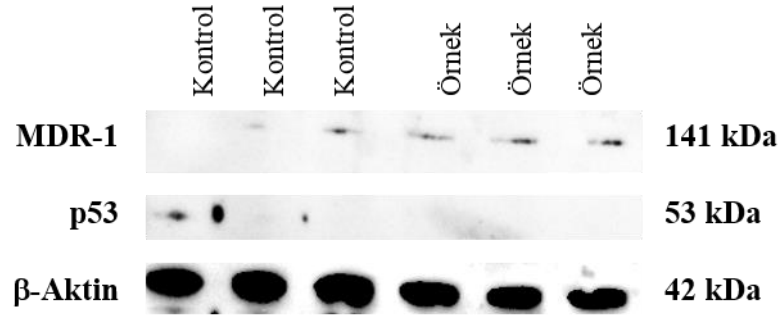
A375 hücrelerinin 48 saat boyunca Bileşik-15'e maruz bırakılmalarının ardından western blot deneyine göre normalize edilmesine ait hesaplamalar aşağıda **Tablo.4.19.**'de gösterilmiştir.

Tablo 4.19. 48 saat boyunca Bileşik-15'e maruz bırakılan A375 hücrelerinin BCA deneyi ile ölçülen total protein düzeyleri (n=2).

(nM)	Absorbans	(562)	Ort.	Değişim (µg/mL)
Kontrol 1	1,095	1,056	1,075	9693
Kontrol 2	1,052	1,066	1,059	9528
Kontrol 3	1,070	1,055	1,062	9563
Bileşik-15 1	0,807	0,860	0,833	7273
Bileşik-15 2	0,852	0,885	0,868	7623
Bileşik-15 3	0,864	0,907	0,885	7793

4.10. Western Blot Bulguları

A375 hücrelerinde yapılan western blot analizi sonucunda β -Actin, P53 ve Mdr1 proteinlerinin çeşitli düzeylerde eksprese edildiği gözlemlenmiştir. Yapılan bu western blot analizi sonucunda da bu proteinlerin belirli düzeylerde Bileşik-15 ve kontrol gruplarında eksprese olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.30. Bileşik-15 uygulaması sonucunda elde edilen Mdr1 ve p53 genlerinin western blot analiz sonuçları.

5. TARTIŞMA

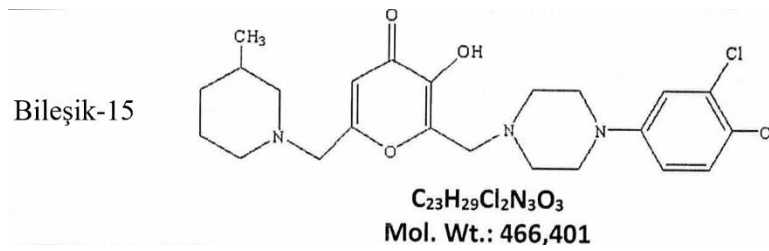
Melanoma dünyada mortalitesi en yüksek olan kanser türlerinden biridir. Bu agresif kanser türü, V600E adı verilen bir imza mutasyon ile beraber metastatik özellik kazanmaktadır. B-Raf genine ait 600 numaralı kodonunda Valin'in Glutamat'a dönüşümü ile karakterize olan bu nokta mutasyon birçok metastatik kanser türünde mevcuttur. Vemurafenib, özellikle bu mutasyonu hedef alan FDA onaylı bir ilaçtır. Ancak toksisitesi çok yüksektir ve V600E mutasyonunu taşımayan melanoma türlerinde tümör progresyonunu arttırmaktadır. Bu sebeple toksisitesi düşük, A375 insan malign melanoma hücrelerinde seçici olarak etkili türevlerin eldesi önemli bir eksiklik arz etmektedir. Ekibimiz tarafından gerçekleştirilen daha önceki bir çalışmada, antimelanoma etki gösteren Mannich bazları sentezlenmiş ve tirozinaz inhibisyonu etkinlikleri gösterilmiş, çalışmanın sonuçları yayınlanmıştır. Bileşiklerin hücre canlılığı üzerine etkileri, A375 insan melanoma, HGF-1 gingival ve MRC-5 hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri spektrofotometrik olarak Sülförödamın B testiyle belirlenmiştir ve yayınlanmıştır (65). Sonuçlar ile de 13.12.2017 tarihinde Türk Patent Enstitüsüne "Kojik Asit Türevi Bileşiklerin Antikanser ve Antitirozinaz Aktiviteleri" başlıklı buluşla (TR2017/20155) başvurulmuş ve kabul edilmiştir.

Bu çalışmada, üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalında öğretim üyesi ve proje araştırmacısı Prof. Dr. Mutlu Aytemir ve ekibinin sentezlemiş ve karakterizasyonu yapılmış olan Mannich Bazı türevi bileşikler kullanılmıştır. Bileşiklerin kimyasal yapısı **Tablo 2.2**'de gösterilmiştir.

Ekibimiz tarafından yıllardır yürütülmekte olan çalışmada piperidin halkasına sahip bileşiklerin diğer yapılara sahip bileşiklere kıyasla daha yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bunun sebebinin ise piperidin halkasının parçalanması sonucu alkil gruplarına dönüşmesi olduğu düşünülmektedir, zira bilindiği üzere alkil grupları çoğunlukla DNA bazlarına bağlanmak suretiyle replikasyonu sekteye uğratar ve hücre bölünmesini engellemektedir. Yapıda görülen bu değişim ve daha önceki çalışmada elde edilen sonuçlar yapılması planlanan çalışmanın hipotezinin ortaya konulmasına neden olmuştur.

Bu bilgiler doğrultusunda yapılmış olan bu tez çalışmasında **Tablo2.2.**'de sunulan bileşiklerin içerisinde A375 insan malign melanoma hücrelerine karşı sitotoksik özelliği en kuvvetli bileşiğin malign melanoma hücrelerini hangi

mekanizmalarla ölüme götürdüğü ve hücre içerisinde hangi moleküler ölüm yollarını tetiklediği araştırılmıştır. Bu amaçla, bu yüksek lisans tez çalışmasında, sentezlenen bileşiklerin A375 insan malign melanoma hücrelerinin canlılığı nasıl etkilediği araştırılmıştır. Sitotoksik etkisi en yüksek olan Bileşik-15 (**Şekil.6.1.**) için lüminometrik bir yaklaşımla hücre canlılığı, hücre sitotoksitesisi, efektör kaspaz 3/7 aktivasyonları açısından etkinlikleri tayin edilmiştir. Bileşik-15'in melanoma hücrelerinde tetiklediği ölüm yolağı akış sitometrisi ile belirlenmiştir. Bu amaçla A375 hücrelerinin RNA'sı izole edilmiş ölüm mekanizmalarında rol alan genlerin (p53, Bax, Bcl-2, Jnk, Mdm2, Mdr1) ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Gen ekspresyon verilerini takiben apoptotik p53 ve mdr1 proteinlerinin ekspresyon düzeyi western blotlama ile ölçülmüştür. Son olarak bileşiğin enzimatik inhibisyonu B16F10 farelerinin sitozölü ve kontrol olarak mantar tirozinazı kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.1. Bileşik-15'in fiziksel ve kimyasal yapısı

Tablo 2.2.'de gösterilen bileşiklerin sitotoksitesileri, ATCC'den temin edilen A375 insan melanoma hücre hattı SRB deneyi ile incelenmiştir. Hücresel proteinlerin içeriğini kolorimetrik olarak belirleyerek ölçen SRB deneyi, diğer bilinen sitotoksite deneylerinden farklı bir şekilde elektrokimyasal potansiyel üzerinden ölçüm yapmamaktadır. SRB'nin ölçüm prensibi canlı hücrelerdeki protein içeriği üzerinden yapılmaktadır. SRB deneyinden alınan sonuçların canlılık ile doğrusal, geniş ölçekli ve tekrarlanabilir ilaç taramaları için oldukça uygundur. 2008 yılından bu yana SRB, Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından sitotoksite ölçüm yöntemi olarak kabul edilmiştir.

Bileşikler 150, 100, 75, 50, 25 ve 12,5 μ M'lık azalan konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Bileşik 2-5, 9-11, 13-15 ve 17-19'un A375 hücrelerine karşı gösterdiği IC₅₀ değerleri μ M olarak **Tablo.2.2**'deki sırasıyla 175,4; 45,42; 86,3; 135,7; 249,7; 182,5; 74,63; 79,45; 202,4; 9,81; 365,2;152,1 ve 139,4 μ M olup; bu bileşiklerin daha

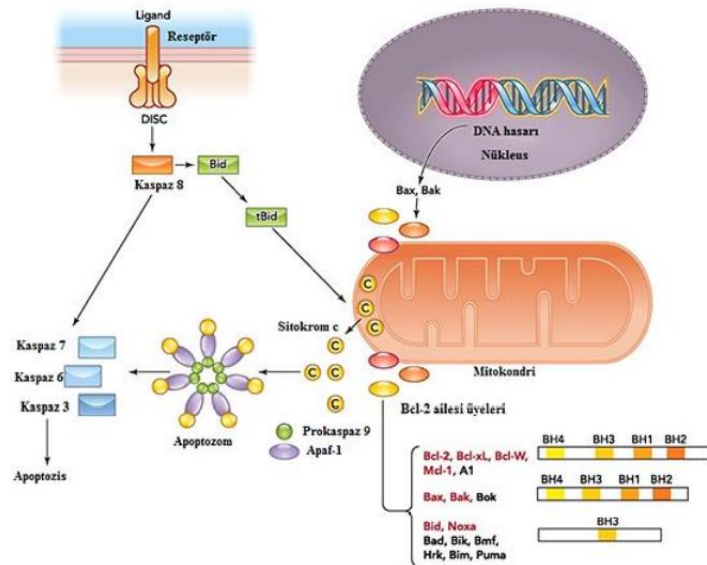
önce yapılan çalışmalardaki referanslara göre (Vemuranfenib; IC_{50} : 4,58 μ M, Dakarbazin; IC_{50} : 69,57 μ M, Kojik Asit; IC_{50} :98,77 μ M) daha düşük dozlarda A375 insan melanoma hücre hattına sitotoksik olduğu görülmüştür. Bu bileşikler içinde bulunan Bileşik-15, sitotoksisite açısından en etkili bileşik olmuştur ve en düşük IC_{50} değerine sahiptir **Şekil 4.13.** IC_{50} değeri 9,81 μ M olan Bileşik-15'in Dakarbazin ve Kojik asite göre daha az sitotoksik olduğu saptanırken, Vemurafenib ile yarışabileceği gözlenmemiştir (65). Deneylerde 13 bileşik kullanılmıştır. Kullanılan tüm bileşikler için A375 hücre hattında canlılık düzeylerinde doza bağımlı bir azalma gözlemlenmiştir. Bu azalma istatistiksel olarak da ve mikroskop altında da gözlemlenmiştir. Ayrıca en etkili bileşik seçilen Bileşik-15'in diğer bileşiklerden daha etkili olması konformasyonel yapısındaki metil grubunun pozisyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Tirozinaz enzim inhibisyonu incelenmesi için B16F10 fare kaynaklı hücre hattı kullanılmıştır. B16F10 hücrelerinin bu aşamada kullanılmasının nedeni ise bu hücre hattının yüksek melanosit aktivitesi göstermesidir. Standart bileşik olarak Kojik asit kullanılmıştır. İnhibisyon oranları nonlineer regresyon yöntemi ile istatistiksel olarak hesaplanmıştır. Çizim programı olan GraphPad Prism 5.03 ile çizilmiş, IC_{50} ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. **Şekil.4.15.** ve **Şekil.4.16.**'da etkin tirozinaz inhibisyonu Bileşik-15 ile Kojik asitin L-DOPA'ya karşı 62,50, 125, 250, 500 ve 1000 μ M doz aralıklarındaki 492 nm'deki absorbans değerleri verilmiştir. Bu değerler sonucunda her bir doza karşılık gelen % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Bileşik-15 ve Kojik asitin B16F10 tirozinaz enzim inhibisyonu IC_{50} değerleri. **Şekil.4.15.** ve **Şekil.4.16.**'da ayrı ayrı verilmiştir.

Kojik asite ait IC_{50} değeri 59,20 μ M **Şekil.4.15.** iken en yüksek inhibisyonu gösteren Bileşik-15'in IC_{50} değeri 76,69 μ M'dır. **Şekil.4.16.** Bileşik-15'in gösterdiği IC_{50} değeri Kojik asit ile karşılaştırılınca aralarında yüksek bir IC_{50} değeri gözlemlenmemiştir. Bunun sonucunda Bileşik-15'in B16F10 tirozinaz inhibisyonu için Kojik asitle yarışabileceği gözlemlenmiştir.

Tezin üçüncü basamağında apoptoz deneyi yapılmıştır, yöntem kısmında anlatıldığı şekilde hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve belirlenen kuyucuklara Bileşik-15'in IC_{50} dozunda ilaç uygulaması yapılmıştır. Apoptozda hayati bir öneme sahip olan kaspazlar, sistein-aspartik-proteazlar olarak bilinirler. Apoptozun

başlatılma ve uygulanma sürecinde kaspaz ailesi üyeleri çok önemli roller almaktadırlar. Bu kaspaz ailesi iki grupta incelenir; bir sinyal sonucunda ilk olarak devreye giren başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9 ve 10) ve apoptoz son aşaması olan yıkım sürecinden görev alan efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6 ve 7) **Şekil.5.2.** Bilinen birçok kanser tedavisi, kansere yakalanmış hücreyi apoptoza götürebilmek için bu kaspazları direkt ya da dolaylı olarak etkiler (88). Efektör kaspazlardan olan kaspaz 3, 6 ve 7 aktive edildiği zaman; endonükleaz aktivasyonu, DNA fragmantasyonu, nükleer proteinlerin imha edilmesi, fagositik hücreler için ligand ekspresyonunun oluşması ve son olarak apoptotik cisimlerin gözlemlenmesi olarak gerçekleşir (89). Bileşik-15 ile muamele edilmiş olan A375 hücrelerinde, apoptoz yüzdesinin arttığı ve kaspaz 3/7 aktivitesinin kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bileşik-15'in sitotksisite yönünden kontrol grubuna göre 2.5 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır. Hücrelerdeki canlılık oranı incelendiğinde ise kontrol grubundaki hücrelerin Bileşik-15 uygulanmış hücrelerden daha yüksek oranda anlamlı bir canlılık yüzdesi göstermektedir. Böylelikle Bileşik-15'in IC₅₀ değerine maruz bırakılan canlı hücrelerin yüzdesini etkili bir biçimde azalttığı ve bu etkinin belirgin olduğu kanıtlanmıştır. Tüm bu bilgilerin ışığında efektör kaspazlar apoptotik cisimciklerin son aşaması olarak görüldüğü için Bileşik-15'in hücreleri apoptozun son aşamasına götürdüğüne işaret etmektedir.



Şekil 5.2. Apoptoz mekanizması ve efektör kaspazları (90)

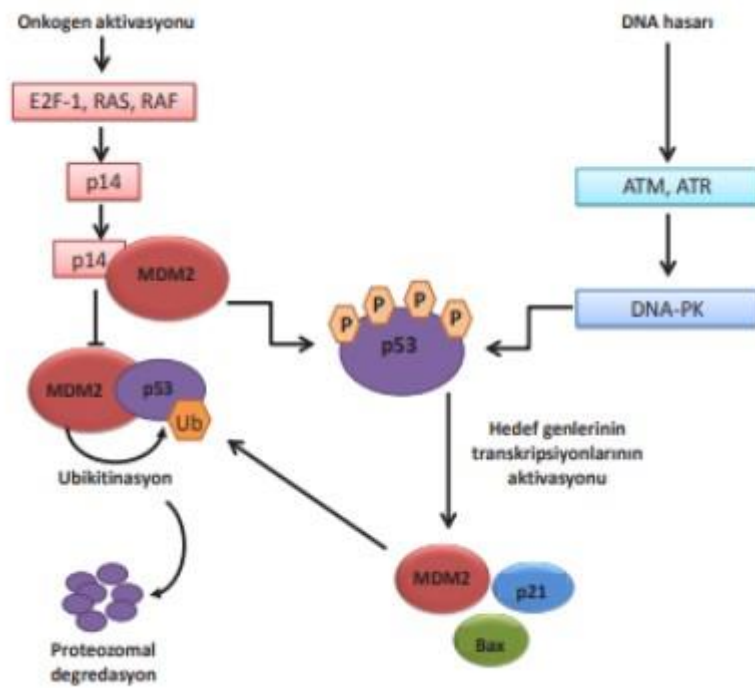
Akış sitometrisi, tek bir hücre bazında canlılığı, apoptozu nekrozu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır(91, 92). Ölü hücrelerin plazma membranından geçen Propidyum iyodür (PI) boyası ise kromozomal DNA'ya bağlanabilme özelliği taşıdığından geç apoptotik ve ölü hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanılmaktadır (43). Geç apoptozda ise nekroza benzer fizyolojik mekanizmalar görülmesine rağmen nekrozdaki farklı olarak hücre ölümünü kontrollü bir şekilde sağlar. Geç apoptoz nekrozdaki farklı olarak çevredeki sağlıklı hücrelere zarar verme eğiliminde bulunmaz. Geç apoptotik ve nekrotik hücreler genellikle bağışıklık sisteminin aktivatörleri olarak kabul edilirler, dahası, hem erken hem de geç apoptotik hücrelerin sinyalleşme üzerindeki etkileri, nekrotik hücrelere göre daha fazla baskın olmuştur (93-95). Bu nedenlerden dolayı çalışmada elde edilen geç apoptoz oranının yüksek olması A375 hücrelerini daha etkili bir programlı ölüme götürdüğü yani DNA'ya bağlanarak etkin bir şekilde çalıştığı söylenebilir. Erken ve geç apoptoz doz bağımlı değişkenlik gösterebilir. Ayrıca bu çalışmanın sonuçları kazpaz 3/7 deneyi ile anlamlı ve olumlu sonuçlar gösterdiği söylenebilir.

Tezin bu basamağında, Bileşik-15'in A375 hücrelerinde hangi apoptotik genleri etkilediğini tespit etmek için hücrelerden RNA saflaştırılmış, ardından cDNA oluşturulmuştur. Bu cDNA'lar RT-PCR yöntemi ile gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Apoptoz yolağında aktif genlerden biri olan p53 geni ve bu genin hücresel inhibitörü olan Mdm2, Bcl-2 ailesinin ilk üyesi olan ve anti-apoptotik özellik gösteren Bcl-2, yine Bcl-2 ailesinden olan ve pro-apoptotik özellik gösteren Bax, çoklu ilaç direnci geni olan Mdr1 ve Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK'ler) ailesinden olan Jnk genlerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Bu düzeyler hücrelerde ekspresyon düzeyi her koşulda aynı kalan Gapdh geni ile kıyaslandırılmıştır. Bu genlerin gösterdiği ilişki **Şekil 5.2.** ve **Şekil 5.3.**'te gösterilmiştir. Gen ekspresyon düzeylerinin incelenmesi sonucu elde edilen verilerde gözlenen doza bağlı değişiklikler Student's t test ile analiz edilmiştir. Bu analizlerin istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadıkları incelenilmiştir. GraphPad isimli yazılım programı ile bu testin değerlendirilmesi yapılmıştır. Oluşturulan cDNA'lar gen ekspresyonlarının belirlenmesi amacıyla RT-PCR işlemine tabi tutulmuştur. Düzeyleri belirlenmek istenen genler sırasıyla apoptotik p53 ve Bax, anti-apoptotik Bcl-2 ve ayrıca Jnk, Mdm2 ve Mdr1 genleri incelenmiştir.

Bcl-2 ailesi üyeleri hem proapoptotik hem de antiapoptotik fonksiyonlar gösterirler ve intrinsik apoptotik mekanizmada önemli roller oynarlar. İntrinsik mitokondriyal apoptotik program için Bcl-2 ailesi üyeleri merkezi düzenleyici proteinlerdir. Bu protein ailesinin etkileşimleri sayesinde hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceği belirlenir (96, 97). Proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoz eğilimi gösterir. Ancak antiapoptotik proteinlerin fazla olması durumunda ise hücre apoptoza daha az eğilim gösterir (98). Proapoptotik üyeler BAX, BAD, BİD, BAK, BCLXS, BİM, NOXA ve PUMA'dır. Sitozolde yer alan bu proteinler, Apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve Sitokrom-c'yi artırarak apoptozu indüklerler. Bu proteinlerin zıttı olan antiapoptotikler ise Bcl-xL, Bcl-2 ve Mcl-1'dir. Antiapoptotik proteinler ise çekirdek zarı, mitokondrinin dış membranında ve endoplazmik retikulumda bulunurlar. Hücrelerde por oluşumunda görev alarak iyon transportunu düzenlemektedirler. Özellikle hücre içindeki Ca^{++} oranını kontrol altında tutarlar. Kaspazların öncü formlarıyla birlikte devreye girdiklerinde ise AIF ve Sitokrom-c salınımını bloke edip apoptozu inhibe ederler (96, 97, 99, 100). Bcl-2/Bax oranı hematolojik malignitelerde prognostik faktör işareti olarak kullanılmaktadır (101). Yapılan birçok çalışmada, yüksek Bcl-2/Bax oranına sahip kanserli hastalarda uygulanan radyoterapiye verdikleri yanıtın oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalar, radyoterapi direncini tahmin etmek için, potansiyel bir moleküler belirteç olarak Bcl-2/Bax oranına bakılmasına yönlendirmektedir (102). Bcl-2'nin kontrole kıyasla azalması ve Bax'ın kontrole kıyasla 2,4 kat artması Bileşik-15'in hücreleri 24 saatte apoptoza götürdüğü gözlemlenmiştir ve Bileşik-15'in intrinsik apoptotik mekanizmada etkili olduğu gözlemlenmiştir.

p53 proteini DNA'ya bağlanabildiği yer olan hücre çekirdeğinde bulunmaktadır. p53 proteini DNA hasarı sırasında bu hasarı değerlendirir ve ileri yanıt düzenlemektedir. DNA'nın aldığı hasar düzeltilebilecek bir durumdaysa p53, hücre döngüsünü G1/S fazında durdurarak DNA onarıcı genleri devreye sokarak hasarın onarılmasını sağlar. Daha sonrasında ise hücre döngüsünü durdurduğu yerden devam ettirir. Eğer DNA'da meydana gelen bu hasar onarılamayacak derecede ise p53, hücrenin bölünmesini engeller ve hücreyi apoptoz mekanizmasına sokar. p53 proteini hücrede DNA'yı bağlayarak p21 proteinini uyarır. p21 proteini ise doğrudan sikline bağımlı kinaz 2 (CDK2) ile kompleks oluşturur ve hücre bölünemez **Şekil 5.3.** p53

geninde herhangi bir mutasyon olursa bu protein DNA'ya uygun bir şekilde bağlanamaz ve bu durum p21 üretiminde aksaklık yaratacağı için hücrenin çoğalmasını durduracak sinyal oluşmaz. Bu durumun sonucunda ise hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya devam ederler (89, 96, 103, 104). p53 proteininin aktivasyonu; UV, kimyasal ajanlar ve oksidatif stres gibi DNA hasarına yol açan faktörler sayesinde olur. Yapılan deneyde p53'ün aktivitesini erkenden gösterdiği düşünülmüştür ve bu çıkarıma ise Bax'ın aktivitesinin yüksek olması sebebiyle varılmıştır.



Şekil 5.3. Mdm2'nin p53'ü düzenlemesi (105)

Mdm2, p53'ün tanımlanan ilk transkripsiyonel hedeflerinden biridir. Mdm2, yapısında bulunan p53 bağlama bölgesi ile p53'ün N-terminal transaktivasyon bölgesine bağlanır ve bu bağlanma p53'ün aktif transkripsiyon yeteneğinin baskılanmasına sebep olur (106). Ayrıca Mdm2, p53'ün C-terminal düzenleme bölgesinde ubikuitinlenerek p53'ün proteazom aracılı parçalanmasını sağlar. p53-Mdm2 ilişkisi inhibe edildiğinde ise transkripsiyonel olarak aktif p53 birikimine yol açar. Mdm2'nin p53 üzerindeki denetimi p53'ün normal bir hücrede düşük seviyede tutulmasında görevli olduğunu göstermektedir (107). p53'ün proteini çekirdeğe giriş için gerekli olan çekirdek translokasyon dizisine sahiptir ancak çekirdek çıkış

dizisinden yoksundur. p53'ün çekirdekte aktivite gösterdiği bilinirken, sitoplazmada yıkıldığı görülmüştür. Bu sebeple çekirdekte biriken p53'ün sitoplazmaya taşınarak yıkıma uğratılması gerekmektedir. Bu aşamada taşıma işlemi için Mdm2 devreye girer. Çekirdeğe giriş ve çıkış dizisine sahip olan Mdm2, çekirdeğe girerek p53'e bağlanır ve p53'ün çekirdekten sitoplazmaya taşınmasını sağladıktan sonra ubiquitin aracılı proteazom yolu ile parçalanmasına aracılık eder. Hücredeki p53 seviyesi, sürekli olarak bazal bir düzeyde tutulması gerekir, bu durum hücre döngüsünün kontrolü için son derece önemlidir. p53, kendi transkripsiyonel aktivasyonunu tetikleyerek hücredeki p53 seviyesini artırır, diğer taraftan da parçalanmasına sebep olan Mdm2'nin transkripsiyonel aktivasyonunu tetiklemektedir. Sonuç olarak, hücredeki p53 seviyesinin sıkı kontrolü, yine kendisi tarafından yönetilen pozitif ve negatif geri bildirim (feedback) mekanizmaları ile gerçekleşmektedir (108-110). Tüm bu bilgiler ışığında yapılan çalışmada Mdm2'nin oranının p53'e göre yüksek olması hücrelerde yükselmiş olan p53 seviyesinin kontrol altına alınmış olabileceğini desteklemektedir.

İlaç direnci ilk defa fare lösemik hücrelerinde 4-amino-N10-metil-pteroyilglutamik asite karşı direnç oluştuğunun deneysel olarak anlaşılmasıyla 1950 yılında anlaşılmıştır. İlaç yada ajan ile tedavi edilen hücreler fonksiyonel ve yapısal olarak birbiriyle ilişkisi olmayan diğer ilaç ve ajanların sitotoksik etkilerine karşı direnç ortaya koyması olarak bilinen çoklu ilaç direnci genellikle Mdr1 ilişkilendirilir. Mdr1 geni ekspresyonunda, Mdr1 geninin ürünü olan P-glikoprotein ile ilişkilendirilir. 170 kD'luk bir glikoprotein olan P-glikoprotein varlığı bir çok hücre hattının ilaç direnç derecesi ile birliktelik gösterdiği anlaşılmıştır (111-114).

P-glikoprotein saflaştırılması 1979 yılında yapılmıştır (115). 1982 yılında ise dirençli hücre hatlarından alınan DNA'nın dirençli olmayan hücrelere aktarılması sonucunda proteinin ekspresyonu ile uyumlu şekilde dirençli olmayan hücrelerde de direnç geliştirdiği gösterilmiş ve bununla birlikte P-glikoprotein hücrelerdeki ilaç direnci rolü somut bir kanıtla ortaya konulmuştur. 1985'te ise P-glikoproteininin kodlayıcısı olan Mdr-1 geni klonlanmıştır (116). Bir çok kanser türünde ilaçlara karşı geliştirilen çoklu ilaç direnci, bir çok kemoterapinin başarısızlıkla sonuçlanmasına sebep olmuştur (117, 118). Bu bilgiler doğrultusunda Mdr-1 geni için ilk 24 saatte gördüğümüz tepkinin yüksek olduğu görülmüştür. Bileşik-15 kimyasal bir ajan veya

her hangi bir kemoterapik ajan ile birlikte hücreye verilebilirse Mdr-1'in etkisini değiştirebileceği beklenilebilir. Daha az Mdr-1 aktivitesi görülmesi için de Bileşik-15 daha düşük dozlarda hücrelere uygulanabilir. Buna ek olarak Bileşik-15'in 48 ve 72 saatlik uygulamalarıyla Mdr1 oranında değişiklik görülebileceği düşünülmektedir.

MAPK ailesinden olan Jnk geni; reseptör olmayan serin-treonin kinazlara ait bir alt üyedir. Jnk; apoptoz, proliferasyon ve farklılaşma gibi hücrel olaylarını düzenlemekte rol oynar. Bunların yanı sıra hormonlar, oksidatif stres, ozmotik stres ve hücrel tepkilerde bulunan sinyal iletim yollarına da aracılık eder (119). Jnk genlerinin 10 farklı izoformu vardır. Jnk1 ve Jnk2 formları neredeyse tüm hücrelerde ifade edilir, Jnk3 ise beyin, kalp, pankreas ve testis gibi belirli organların hücrelerinde ifade edilmektedir. Jnk'nın kısa süreli aktivasyonu proliferasyonu tetiklerken, Jnk'ya ait uzun süreli aktivasyon ise apoptozu tetiklemektedir (120). Oksidatif stres ile oluşan Jnk aktivasyonunda, Sitokrom-c mitokondriden sitoplazmaya bırakılır ve bu durumda kaspaz aktivasyonu ile sonlandığı bilinmektedir (121). Bu bilgiler doğrultusunda Jnk geninde kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlemlenilmemiştir. Bu sebeple apoptoz mekanizmamız Jnk yolağı üzerinden etki etmemektedir yada Jnk ilaç uygulamasından sonra erken evrede aktivasyon gösterip yeniden bazal seviyesine dönmüştür. Bu çıkarımları desteklemek için ise ileri ve detaylı deneylere ihtiyaç duyulmaktadır.

Tezin son aşaması olarak yapılan western blot deneyinde elde edilen sonuçlar gen ekspresyonu deneyi sonuçları ile tutarlıdır. **Şekil 4.30.**'daki bulgular doğrultusunda A375 hücrelerinin Bileşik-15 ile 48 saatlik inkübasyon sonrasında Mdr1 protein düzeyinde kontrol grubuna kıyasla artış gözlemlenmiştir. Buna zıt olarak Bileşik-15 uygulaması P53 düzeyinin baskılanmasına sebep olmuştur. Bu durum Mdm2 gen ekspresyon düzeyinin artışı ile açıklanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İleride yapılacak olan çalışmalarda daha fazla hücre hattı ile deneyler yapıp kıyaslanma yapılabilir. Diğer melanoma hücre hatları üzerinde de denenebilir. Diğer melanoma tedavisinde klinikte kullanılan kemoterapi yada immünoterapi ajanlarıyla birlikte uygulanarak sinerjik etkisi araştırılabilir. Bileşik-15'in sitotoksik etkisini DNA'ya interkale olarak mı yoksa farklı bir mekanizma üzerinden gösterdiği incelenebilir bu amaçla moleküler docking çalışmaları yapılabilir. Bileşik-15'in intrinsik apoptotik yolağı aktive ettiğinin daha ileri düzeyde kanıtlanması amacıyla kaspaz 8 ve kaspaz 9'un yanı sıra farklı belirleyici proteinlerin düzeyleri ölçülebilir. Bileşik-15'in hücre döngüsünü hangi fazda durdurduğu araştırılabilir. Son olarak Bileşik-15'in farklı formülasyonları ve bu formülasyonların *in-vivo* sistemlerdeki potansiyel anti-tümör aktivitesi gözlemlenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Briganti S, Camera E, Picardo M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Research*. 2003;16(2):101-10.
2. Topal T, Öter S, Korkmaz A. Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi*. 2009;19(3).
3. Pietras K, Östman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Experimental cell research*. 2010;316(8):1324-31.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011;144(5):646-74.
5. Erman Y, Özçelik AÖ. Erkek ve kadınların diyet-kanser ilişkisi hakkında bilgi ve inanışlar. Ankara: Ankara Üniversitesi Ev Ekonomisi Yüksekokulu.
6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2020;70(1):7-30.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(1):7-30.
8. Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P, Agostinis P, Declercq W. Cell death in the skin. *Apoptosis*. 2009;14(4):549-69.
9. Cummins DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A, editors. *Cutaneous malignant melanoma*. Mayo clinic proceedings; 2006: Elsevier.
10. cancer.org 1.800.227.2345 About Basal and Squamous Cell Skin Cancer.
11. Rogers HW, Weinstock MA, Harris AR, Hinckley MR, Feldman SR, Fleischer AB, et al. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006. *Archives of dermatology*. 2010;146(3):283-7.
12. Özdemir F. Melanom tanısı. *TÜRKDERM-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi*. 2007;41(Supp: 2):6-14.
13. Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(13):975-83.
14. Zanetti R, Rosso S, Martinez C, Nieto A, Miranda A, Mercier M, et al. Comparison of risk patterns in carcinoma and melanoma of the skin in men: a multi-centre case–case–control study. *British journal of cancer*. 2006;94(5):743-51.
15. Gurtner GC, Neligan PC. *Plastic surgery: principles*: Elsevier Health Sciences; 2012.
16. Göl İ, Erkin Ö. Knowledge and practices of primary care providers on skin cancer and skin self-examination. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*. 2018;52.
17. <Melanom_Yol_Haritasi_II.pdf>.

18. Kyrgidis A. Melanoma epidemiology. *Cutaneous Melanoma*: Elsevier; 2017. p. 1-9.
19. Aşılamları RG. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Mayıs; 2016.
20. Globocan W. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. *Int Agency Res Cancer*. 2012.
21. Tl D, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol*. 2002;146(Suppl 61):1-6.
22. Bakar Ö, Vardareli E, Sahin S, Yüksel S, Aksoy T. PET-BT incelenmesi yapılan melanom hastalarının retrospektif analizi/Retrospective analysis of melanoma patients who had undergone PET-CT examination. *Turkderm*. 2013;47(4):214.
23. Bassukas ID, Tsilidis KK, Spyridonos P. Advanced keratinocyte skin cancer is a tumor with considerable disease burden and aggressiveness. *Archives of Dermatological Research*. 2020:1-3.
24. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In vivo*. 2014;28(6):1005-11.
25. Turaçlı İD. Malign Melanom Oluşum ve İlerleme Sürecinde Gözlenen Bazı Moleküler Değişimler. *Turk Dermatoloji Dergisi*. 2017;11(4).
26. Azoury SC, Lange JR. Epidemiology, risk factors, prevention, and early detection of melanoma. *Surgical Clinics*. 2014;94(5):945-62.
27. Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. 2014.
28. Pygmalion M-J, Ruiz L, Popovic E, Gizard J, Portes P, Marat X, et al. Skin cell protection against UVA by Sideroxyl, a new antioxidant complementary to sunscreens. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010;49(11):1629-37.
29. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press, USA; 2015.
30. Fountain J, Bale S, Housman D, Dracopoli N. Genetics of melanoma. *Cancer surveys*. 1990;9(4):645-71.
31. Jonsson A, Tuominen R, Grafström E, Hansson J, Egyhazi S. High frequency of p16INK4A promoter methylation in NRAS-mutated cutaneous melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*. 2010;130(12):2809-17.
32. Houben R, Hesbacher S, Schmid CP, Kauczok CS, Flohr U, Haferkamp S, et al. High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays. *PloS one*. 2011;6(7):e22096.
33. Abildgaard C, Guldberg P. Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma. *Trends in molecular medicine*. 2015;21(3):164-71.
34. Hocker TL, Singh MK, Tsao H. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128(11):2575-95.

35. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2011;20(3):145-58.
36. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2011;30(1):87.
37. Öztürk F. Apoptoz. 2002.
38. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic pathology. 2007;35(4):495-516.
39. Ulukaya E, Acilan C, Yılmaz Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology? Cell biochemistry and function. 2011;29(6):468-80.
40. Solakoğlu Z. Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. Klinik Gelişim. 2009;22(3):20-5.
41. Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. Cell Death & Differentiation. 2012;19(1):87-95.
42. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser. 2008.
43. Güleş Ö, Ülker E. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2008;19(2):73-8.
44. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. Journal of Surgical research. 2007;139(1):143-56.
45. Peyssonnaud C, Eychène A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. Biology of the Cell. 2001;93(1-2):53-62.
46. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. Journal of Clinical Oncology. 2011;29(10):1239-46.
47. Niezgod A, Niezgod P, Czajkowski R. Novel approaches to treatment of advanced melanoma: a review on targeted therapy and immunotherapy. BioMed research international. 2015;2015.
48. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. New England Journal of Medicine. 2010;363(9):809-19.
49. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. New England Journal of Medicine. 2011;364(26):2507-16.
50. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. Cancer research. 2002;62(23):6997-7000.
51. Abdollahi A, Folkman J. Evading tumor evasion: current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. Drug Resistance Updates. 2010;13(1-2):16-28.
52. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. Experimental cell research. 2000;256(1):42-9.

53. Gavric AU, Ocvirk J, Mekjavic PJ. Ocular changes in metastatic melanoma patients treated with MEK inhibitor cobimetinib and BRAF inhibitor vemurafenib. *Radiology and oncology*. 2018;52(2):213-9.
54. O'Day SJ, Hamid O, Urba WJ. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) A novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2007;110(12):2614-27.
55. Liu Y, Sheikh MS. Melanoma: molecular pathogenesis and therapeutic management. *Molecular and cellular pharmacology*. 2014;6(3):228.
56. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *New England Journal of Medicine*. 2012;367(18):1694-703.
57. Organization WH. WHO model list of essential medicines: 17th list, March 2011. 2011.
58. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(26):2517-26.
59. Swalwell H, Latimer J, Haywood RM, Birch-Machin MA. Investigating the role of melanin in UVA/UVB-and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012;52(3):626-34.
60. Chen KG, Valencia JC, Gillet JP, Hearing VJ, Gottesman MM. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. *Pigment cell & melanoma research*. 2009;22(6):740-9.
61. D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(7):1144.
62. Ali SA, Choudhary RK, Naaz I, Ali AS. *Journal of Pigmentary Disorders*. 2015.
63. Lee S-H, Kang S-M, Sok CH, Hong JT, Oh J-Y, Jeon Y-J. Cellular activities and docking studies of eckol isolated from *Ecklonia cava* (Laminariales, Phaeophyceae) as potential tyrosinase inhibitor. *Algae*. 2015;30(2):163.
64. Tseng T-S, Tsai K-C, Chen W-C, Wang Y-T, Lee Y-C, Lu C-K, et al. Discovery of potent cysteine-containing dipeptide inhibitors against tyrosinase: a comprehensive investigation of 20× 20 dipeptides in inhibiting dopachrome formation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015;63(27):6181-8.
65. Karakaya G. Kojik Asit Türevi Mannich Bazlarının Sentezi ve İnsan Melanoma Hücrelerine Etkisi ile Antitirozinaz Aktivitelerinin Araştırılması. 2017.
66. Chen M-J, Liu J, Sheu J, Lin C, Chuang C. Study on skin care properties of milk kefir whey. *Asian-australasian journal of animal sciences*. 2006;19(6):905-8.
67. Pongkai P, Saisavoey T, Sangtanoo P, Sangvanich P, Karnchanatat A. Effects of protein hydrolysate from chicken feather meal on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *Food science and biotechnology*. 2017;26(5):1199-208.

68. Gao C-Z, Dong W, Cui Z-W, Yuan Q, Hu X-M, Wu Q-M, et al. Synthesis, preliminarily biological evaluation and molecular docking study of new Olaparib analogues as multifunctional PARP-1 and cholinesterase inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2019;34(1):150-62.
69. Mann T, Gerwat W, Batzer J, Eggers K, Scherner C, Wenck H, et al. Inhibition of Human Tyrosinase Requires Molecular Motifs Distinctively Different from Mushroom Tyrosinase. *J Invest Dermatol*. 2018;138(7):1601-8.
70. Pillaiyar T, Manickam M, Jung S-H. Downregulation of melanogenesis: drug discovery and therapeutic options. *Drug Discovery Today*. 2017;22(2):282-98.
71. Chang TS. Review an update review of tyrosinase inhibitors *Intern. J Molecul Sci*. 2009;10:2440-75.
72. Bagherzadeh K, Shirgahi Talari F, Sharifi A, Ganjali MR, Saboury AA, Amanlou M. A new insight into mushroom tyrosinase inhibitors: docking, pharmacophore-based virtual screening, and molecular modeling studies. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2015;33(3):487-501.
73. Chang T-S. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. *Materials*. 2012;5(9):1661-85.
74. Noh J-M, Kwak S-Y, Seo H-S, Seo J-H, Kim B-G, Lee Y-S. Kojic acid–amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2009;19(19):5586-9.
75. Mohamad R, Mohamed MS, Suhaili N, Salleh MM, Ariff AB. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 2010;5(2):24-37.
76. Abd El-Aziz BA. Improvement of kojic acid production by a mutant strain of *Aspergillus flavus*. *J Nat Sci Res*. 2013;3(4):31-41.
77. Saeedi M, Eslamifar M, Khezri K. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. *Biomed Pharmacother*. 2019;110:582-93.
78. Schallreuter KU. Advances in melanocyte basic science research. *Dermatologic clinics*. 2007;25(3):283-91.
79. Saghale L, Pourfarzam M, Fassihi A, Sartippour B. Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid. *Research in pharmaceutical sciences*. 2013;8(4):233.
80. Saeedi M, Eslamifar M, Khezri K. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;110:582-93.
81. Martinson K, Stueven N, Monte A, Huang C-c. A novel stilbene-like compound that reduces melanin through inhibiting melanocyte differentiation and proliferation without inhibiting tyrosinase. *Cosmetics*. 2018;5(3):45.
82. Hsieh J-F, Chen S-T, Cheng S-L. Molecular profiling of A375 human malignant melanoma cells treated with kojic acid and arbutin: INTECH Open Access Publisher; 2011.

83. Nawarak J, Huang-Liu R, Kao S-H, Liao H-H, Sinchaikul S, Chen S-T, et al. Proteomics analysis of kojic acid treated A375 human malignant melanoma cells. *Journal of Proteome Research*. 2008;7(9):3737-46.
84. Moslemi D. Radioprotective effects of kojic acid against mortality induced by gamma irradiation in mice. *Saudi Med J*. 2009;30(4):490-3.
85. Cheng S-L, Liu RH, Sheu J-N, Chen S-T, Sinchaikul S, Tsay GJ. Toxicogenomics of kojic acid on gene expression profiling of a375 human malignant melanoma cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2006;29(4):655-69.
86. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1990;82(13):1107-12.
87. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*. 2006;1(3):1112-6.
88. Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2020;1867(6):118688.
89. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*. 2019;43(6):582-92.
90. Sendoel A, Hengartner MO. Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology*. 2014;29(3):168-76.
91. Xu W, Berger SP, Trouw LA, de Boer HC, Schlagwein N, Mutsaers C, et al. Properdin binds to late apoptotic and necrotic cells independently of C3b and regulates alternative pathway complement activation. *The Journal of Immunology*. 2008;180(11):7613-21.
92. Nauta AJ, Raaschou-Jensen N, Roos A, Daha MR, Madsen HO, Borrias-Essers MC, et al. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *European journal of immunology*. 2003;33(10):2853-63.
93. Hart SP, Alexander KM, MacCall SM, Dransfield I. C-reactive protein does not opsonize early apoptotic human neutrophils, but binds only membrane-permeable late apoptotic cells and has no effect on their phagocytosis by macrophages. *Journal of Inflammation*. 2005;2(1):1-8.
94. Ren Y, Stuart L, Lindberg FP, Rosenkranz AR, Chen Y, Mayadas TN, et al. Nonphlogistic clearance of late apoptotic neutrophils by macrophages: efficient phagocytosis independent of $\beta 2$ integrins. *The Journal of Immunology*. 2001;166(7):4743-50.
95. Fu M, Fan P-s, Li W, Li C-x, Xing Y, An J-g, et al. Identification of poly-reactive natural IgM antibody that recognizes late apoptotic cells and promotes phagocytosis of the cells. *Apoptosis*. 2007;12(2):355-62.
96. Pfeffer CM, Singh AT. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(2):448.
97. Du Toit A. Balance through a bivalent regulator. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013;14(9):546-7.

98. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in biochemical sciences*. 2001;26(1):61-6.
99. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(8):594-604.
100. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2004;52(6):821-31.
101. Duo J, Ying G-G, Wang G-W, Zhang L. Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. *Molecular medicine reports*. 2012;5(6):1453-6.
102. Mackey TJ, Borkowski A, Amin P, Jacobs SC, Kyprianou N. bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. *Urology*. 1998;52(6):1085-90.
103. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke E, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death & differentiation*. 2009;16(1):3-11.
104. Adamkov M. Logical complexity of Bcl-2 family proteins function in the intrinsic apoptosis. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*. 2019;147(1-2):99-104.
105. Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nature Reviews Cancer*. 2001;1(1):68-76.
106. Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *The EMBO journal*. 1993;12(2):461-8.
107. Böttger A, Böttger V, Sparks A, Liu W-L, Howard SF, Lane DP. Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo. *Current Biology*. 1997;7(11):860-9.
108. Roth J, Dobbstein M, Freedman DA, Shenk T, Levine AJ. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *The EMBO journal*. 1998;17(2):554-64.
109. Freedman D, Wu L, Levine A. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 1999;55(1):96-107.
110. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liégeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. 1998;92(6):713-23.
111. Raguz S, Randle RA, Sharpe ER, Foekens JA, Sieuwerts AM, Meijer-van Gelder ME, et al. Production of P-glycoprotein from the MDR1 upstream promoter is insufficient to affect the response to first-line chemotherapy in advanced breast cancer. *International journal of cancer*. 2008;122(5):1058-67.
112. De Vera AA, Gupta P, Lei Z, Liao D, Narayanan S, Teng Q, et al. Immunoncology agent IPI-549 is a modulator of P-glycoprotein (P-gp, MDR1, ABCB1)-mediated multidrug resistance (MDR) in cancer: In vitro and in vivo. *Cancer letters*. 2019;442:91-103.

113. Zhu H, Wu H, Liu X, Evans BR, Medina DJ, Liu C-G, et al. Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells. *Biochemical pharmacology*. 2008;76(5):582-8.
114. Colone M, Calcabrini A, Toccaceli L, Bozzuto G, Stringaro A, Gentile M, et al. The multidrug transporter P-glycoprotein: a mediator of melanoma invasion? *Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128(4):957-71.
115. Riordan JR. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. 1979.
116. Debenham P, Kartner N, Siminovitch L, Riordan J, Ling V. DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression. *Molecular and cellular biology*. 1982;2(8):881-9.
117. Tanaka K, Kiguchi K, Mikami M, Aoki D, Iwamori M. Involvement of the MDR1 gene and glycolipids in anticancer drug-resistance of human ovarian carcinoma-derived cells. *Human cell*. 2019;32(4):447-52.
118. Fernandes LR, Stern ACB, de Cássia Cavaglieri R, Nogueira FCS, Domont G, Palmisano G, et al. 7-Ketocholesterol overcomes drug resistance in chronic myeloid leukemia cell lines beyond MDR1 mechanism. *Journal of proteomics*. 2017;151:12-23.
119. Shi J, Jiang Q, Ding X, Xu W, Wang DW, Chen M. The ER stress-mediated mitochondrial apoptotic pathway and MAPKs modulate tachypacing-induced apoptosis in HL-1 atrial myocytes. *PloS one*. 2015;10(2):e0117567.
120. Elbadawy M, Usui T, Yamawaki H, Sasaki K. Novel functions of death-associated protein kinases through mitogen-activated protein kinase-related signals. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(10):3031.
121. Grynberg K, Ma FY, Nikolic-Paterson DJ. The JNK signaling pathway in renal fibrosis. *Frontiers in physiology*. 2017;8:829.

8. EKLER

EK 1. Orjinallik Ekran Çıktısı

YENİ SENTEZLENEN ANTİTİROZİN AZ AKTİVİTEYE SAHİP
KOJİK ASİT TÜREVLERİNİN A375 MALİN MELANOMA HÜCRE
HATTINDA SİTOTOKSİSİTE VE HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNE
ETKİSİNİN AYDINLATILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%8	%7	%1	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%5
2	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	%1
3	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
4	www.norbil.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to Mersin Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
8	libratez.cu.edu.tr	

EK 2. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Rıdvan Felekoğlu
Ödev başlığı: YENİ SENTEZLENEN ANTİTİROZİN..
Gönderi Başlığı: YENİ SENTEZLENEN ANTİTİROZİN..
Dosya adı: R_dvan_Feleko_lu_tez.docx
Dosya boyutu: 9.82M
Sayfa sayısı: 91
Kelime sayısı: 15,141
Karakter sayısı: 103,812
Gönderim Tarihi: 30-Mar-2021 03:26PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1546314144

