

**N-(4-ASETİLFENİL)-2-(ARİLTİYO)ASETAMİT VE
N'-(3-HİDROKSİ-4-METOKSİBENZİLİDEN)-2-(4-TOSİLPİPERAZİN-1-İL)
ASETOHİDRAZİT TÜREVLERİNİN
PANKREAS KANSERİNDE ANTİKANSER ETKİLERİNİN
PARP İNHİBİTÖRLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Şennur GÖRGÜLÜ

Eskişehir 2019

**N-(4-ASETİLFENİL)-2-(ARİLTİYO)ASETAMİT VE
N'-(3-HİDROKSİ-4-METOKSİBENZİLİDEN)-2-(4-TOSİLPİPERAZİN-1-İL)
ASETOHİDRAZİT TÜREVLERİNİN
PANKREAS KANSERİNDE ANTİKANSER ETKİLERİNİN
PARP İNHİBİTÖRLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Şennur GÖRGÜLÜ

DOKTORA TEZİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ocak 2019

JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Şennur GÖRGÜLÜ'nün "N-(4-asetilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit ve N'-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il)asetohidrazit Türevlerinin Pankreas Kanseri Antikanser Etkilerinin Parp İnhibitörleri ile Karşılaştırılması" başlıklı tezi 14.01.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim/Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakoloji Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Üye : Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

Üye : Prof. Dr. A. Pınar ÖZTOPÇU VATAN

Üye : Doç. Dr. Emel ERGENE

Üye : Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Enstitü Müdürü



ÖZET

N-(4-ASETİLFENİL)-2-(ARİLTİYO)ASETAMİT VE N'-(3-HİDROKSİ-4-METOKSİBENZİLİDEN)-2-(4-TOSİLPİPERAZİN-1-İL) ASETOHİDRAZİT TÜREVLERİNİN PANKREAS KANSERİNDE ANTİKANSER ETKİLERİNİN PARP İNHİBİTÖRLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Şennur GÖRGÜLÜ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2019

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Pankreas kanseri, erken evrede teşhisi oldukça güç olan ve ancak pankreasın tamamına yayıldığında semptomları ortaya çıkan bir kanserdir. Bu şartlarda çok az hasta ameliyatla tedavi şansına sahip olmaktadır. Bu nedenle pankreas kanserinde yeni tedavi yöntemleri ve yeni antikanser maddelerin geliştirilmesi konusunda çalışmalar önem kazanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında, yeni nesil antikanser ilaç olarak oral poli(adenozin difosfat [ADP]-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörü olan olaparib ve rucaparib ile bazı benzer gruplara sahip, *N*-(4-asetilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit ve *N'*-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il)asetohidrazit türevlerinin sentezleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sentez maddelerinin ve standart PARP inhibitörlerinin, insan normal pankreas hücresi (hTERT-HPNE) ve insan pankreas kanser hücreleri (PANC-1 ve Capan-1) üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkieri *in vitro* yöntemlerle araştırılmış ve karşılaştırılmıştır. Sentez maddelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmek, aktif madde ve konsantrasyon tespiti yapmak için MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) yöntemi, hücre proliferasyonu üzerine etkilerinin ve IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi için de xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi kullanılmıştır. Akım sitometri cihazı kullanılarak apoptoz, kaspaz-3 aktivasyonu, mitokondriyal membran potansiyeli ölçümleri ve hücre döngüsü analizleri yapılmıştır. Hücrelerin morfolojik görüntüleri fotoğraflanmış, ELISA yöntemi ile PARP yarıklanma düzeyleri belirlenmiş ve RT-PCR ile etkili olabilecek mRNA gen ifadelerine bakılmıştır.

Sonuç olarak rucaparib en yüksek etkinliği göstermiştir. Buna paralel etki gösteren PARP inhibitörü adayı olabilecek gruplar ihtiva eden sentez maddelerinden, özellikle LHS-4 ve CS-1'in, pankreas kanser hücrelerinde önemli antikanser aktivite gösterdiği, normal hücrelerde toksik etkilerinin daha az olduğu belirlenmiştir. İlave çalışmalar ile bu maddelerin olabilecek PARP inhibitör yapı-etkinliklerinin aydınlatılması ve mevcut antikanser etkinliklerinin desteklenmesi, kanser tedavisi için yeni aktif maddelerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: Olaparib, Rucaparib, PARP inhibitörü, Pankreas kanseri, Antikanser etki.

ABSTRACT

A COMPARISON OF ANTICANCER EFFECTS N-(4-ACETYLPHENYL)-2-(ARYLTHIO)ACETAMIDE AND N'-(3-HYDROXY-4-METOXYBENZILIDENE)-2-(4-TOSYLPYPERAZINE-1-YL) ACETOHYDRAZIDE DERIVATIVES IN PANCREATIC CANCER WITH PARP INHIBITORS

Şennur GÖRGÜLÜ

Department of Pharmacology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January 2019

Supervisor: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Pancreatic cancer is a type of cancer that is very difficult to diagnose at early stages and symptoms appear only when the cancer is spread over the entire pancreas. Under these conditions, very few patients have a chance to be treated surgically. Therefore, studies on the development of new treatment methods and new anticancer agents in pancreatic cancer have gained importance.

Within the scope of this thesis, *N*-(4-acetylphenyl)-2-(arylthio)acetamide and *N'*-(3-hydroxy-4-methoxybenzilidene)-2-(4-tosylpiperazine-1-yl)acetohydrazide derivatives were synthesized which have similar groups with olaparib and rucaparib which are used oral Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors as new generation anticancer drug. The cytotoxic and apoptotic effects of the synthesized derivatives on immortalized human normal pancreatic cell (hTERT-HPNE) and human pancreatic cancer cells (PANC-1 and Capan-1) were investigated and compared by *in vitro* methods. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay was used in order to find effective derivatives and their concentration ranges for the evaluation of the synthesized derivatives on cell viability, the xCELLigence Real Time Cell Analysis System was used to determine the IC₅₀ values. Apoptosis, caspase-3 activation, mitochondrial membrane potential measurements and cell cycle analyzes were performed using the flow cytometer. Morphological images of the cells were photographed, PARP cleavage levels were determined by ELISA and mRNA gene expressions which may be effective were examined with RT-PCR array.

As a result, rucaparib showed the highest efficacy. In parallel the synthesized derivatives, LHS-4 and CS-1, that may be PARP inhibitor candidates showed significant anticancer activity on the pancreatic cancer cells, and less toxic effects in normal pancreatic cells. The elucidation of the PARP inhibitory structure-activity and supporting the existing anticancer activities of these derivatives with additional studies will allow the development of new active substances for cancer treatment.

Keywords: Olaparib, Rucaparib, PARP inhibitor, Pancreatic cancer, Anticancer effect.

ETİK İLKE ve KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Şennur GÖRGÜLÜ

TEŞEKKÜR

Pek çok akademisyenin de farklı açılardan zorluğunu çektiği, sabır ve emek isteyen bu doktora sürecinin, binbir fedakarlığın ötesinde, zorlukların üstesinden gelerek bilimsel becerilerimi keyifle geliştirebildiğim, yaşamımın ciddi anlamda şekillenmesinde rol oynayan, oldukça yorucu bir süreç olduğuna inanıyorum.

Başından beri hep birlikte çalışmayı arzuladığım, anlayışına sığındığım ve bana sabırla katlanarak tecrübeleriyle yol gösteren, doktora sürecimi tamamlamam ve daha iyisini başarabilmem için yönlendiren, bu bağlamda desteğini esirgemeyen, çok sevgili danışman hocam Prof. Dr. Miriş DİKMEN'e,

Kariyerimin gelişmesinde, sabırla başarıya ulaşmak için çıktığım bu yolda bana inanarak desteğini esirgemeyen ve değerli olduğumu hissettiren, tez çalışmalarımı yürüttüğüm ve aynı zamanda personeli olduğum Anadolu Üniversitesi, Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nin (AÜBİBAM) tüm olanaklarından faydalanmamı sağlayan, Merkez Müdürümüz Prof. Dr. Temel ÖZEK'e,

Tez çalışmamı yapabilmem için kullandığım kimyasal maddelerin sentezi ve karakterizasyonunu gerçekleştirip tezime katkı sağlayan değerli arkadaşım ve hocam Doç. Dr. Leyla YURTTAŞ'a,

PCR deneylerinde desteğini gördüğüm, her türlü tecrübeyi benimle paylaşan, sıcaklığını ve bana olan güvenini her daim hissettiğim çok sevgili hocam Doç. Dr. Emel ERGENE'ye,

Maddi manevi her türlü desteklerine defalarca kez minnettar olduğum çok kıymetli hocalarım Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ'ye, Dr. Öğr. Üyesi Volkan KILIÇ ve Doç. Dr. Gözde AYDOĞAN KILIÇ'a,

Akım sitometrisi analizlerini bana sevdiren ve bu alanda gelişmem için yüksek lisansımdan itibaren ilk adımlarımı atmamı sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK'e,

Eczacılık Fakültesi Dekanı ve Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanımız saygıdeğer hocam Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e,

Motivasyonumu yüksek tutmak için her türlü çabayı ve desteği gösteren, sevgilerini her daim hissettiğim canım arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Gülsel YURTDAS KIRIMLIOĞLU'na, Rabia ARLI'ya, Hatice TORUN'a, değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Murat Sami BERKMAN'a,

Akademik hayatıma olan katkılarından ötürü Prof. Dr. Lütü GENÇ'e,

AÜBİBAM çalışanlarına, tezimde manevi desteğini gördüğüm tüm değerli hocalarım ve arkadaşlarıma,

Hayatımın tüm aşamalarında sevgi, ilgi ve fedakarlıklarıyla bu günlere gelmemde haklarını asla ödeyemeyeceğim, hayallerime ulaşmamda hep arkamda desteklerini hissettiğim, sonsuz sevgiyle bağlı olduğum, canımdan çok sevdiğim ve tezimi ithaf ettiğim çok sevgili ailemin fertleri anneciğim Gülten GÖRGÜLÜ'ye, babacığım Ali GÖRGÜLÜ'ye, abiciğim Şükrü GÖRGÜLÜ'ye ve yengeme, zııırlıkları ve eğlendirici tavırlarıyla beni neşelendiren yeğenciklerim Sinem ve Mehmet Ali GÖRGÜLÜ'ye, stresli zamanlarımin vazgeçilmez çözümü olan minnoş kedilerim Fındık kızım ve Fıstık oğluma içten teşekkürlerimi sunarım.

Şennur GÖRGÜLÜ

Şubat 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ETİK İLKE ve KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Pankreas	2
1.1.1. Pankreas kanseri	2
1.1.2. Kemoterapinin kısıtlamaları	6
1.2. DNA Tamir Mekanizmaları.....	8
1.3. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP) İnhibitörleri	10
1.3.1. PARP ailesinin üyeleri.....	11
1.3.2. Terapötik hedef olarak PARP	14
1.3.3. PARP aktivasyonu ve nekrozu.....	14
1.3.4. PARP1 fonksiyonunu inhibe etmek için hedef olarak PARP:.....	15
1.4. PARP ve Pankreas Kanseri.....	16
1.5. Olaparib	18
1.6. Rucaparib.....	20
1.7. <i>N</i> -(4-asetilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit ve <i>N'</i> -(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il)asetohidrazit Türevleri.....	21
2. GEREÇLER	23
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler	23
2.2. Kullanılan Cihazlar	25
3. YÖNTEMLER	27
3.1. Maddelerin Sentez Yöntemleri	27

3.1.1. <i>N</i> -(4-asetilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevlerinin sentezi (Yöntem A)	27
3.1.2. <i>N'</i> -(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il)asetohidrazit türevlerinin sentezi (Yöntem B)	27
3.2. Hücre Kültürü Analizleri.....	28
3.2.1. Deneylerde kullanılan pankreatik hücreler	28
3.2.1.1. <i>Capan-1</i> hücre hattı	28
3.2.1.2. <i>PANC-1</i> hücre hattı	28
3.2.1.3. <i>hTERT-HPNE</i> hücre hattı.....	29
3.2.2. Malzeme sterilizasyonu	29
3.2.3. Hücrelerin besiyerlerinin hazırlanması	29
3.2.4. Stok aktivasyonu.....	30
3.2.5. Hücrelerin pasajlanması ve stoklanması.....	30
3.2.6. MTT Yöntemi	31
3.2.7. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile hücre empedansının ölçülmesi	32
3.2.8. Akım Sitometrisi (Flow Cytometry) analizleri.....	34
3.2.8.1. Akım Sitometrisi ile apoptoz belirleme çalışmaları	35
3.2.8.1.1. Annexin V-FITC/PI yöntemi	36
3.2.8.1.2. Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi	37
3.2.8.1.3. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin (<i>JC-1</i>) ölçülmesi	39
3.2.8.1.4. DNA analizi ile hücre döngüsünün incelenmesi	41
3.2.9. ELISA ile PARP [214/215] yarıklanma miktarının ölçülmesi	43
3.2.10. Hücre morfolojilerinin görüntülenmesi ve floresan boyama.....	46
3.2.10.1. <i>DAPI</i> ve <i>MitoTracker Red CMXros</i> ile işaretleme.....	46
3.2.10.2. Floresan görüntüleme için preparat hazırlanması	47
3.2.11. Gen ifadelerindeki değişimlerin belirlenmesi	48
3.2.11.1. RNA izolasyonu	48
3.2.11.2. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi	48
3.2.11.3. Kantitatif RT-PCR Array yöntemi	48
4. BULGULAR	50
4.1. Kimyasal Türevlerin Eldesi	50
4.1.1. <i>N</i> -(4-asetilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevlerinin eldesi.....	50

4.1.1.1. <i>N</i> -(4-asetilfenil)-2-[(1-metil-1 <i>H</i> -imidazol-2-il)tiyo]asetamit (LHS-1).....	50
4.1.1.2. <i>N</i> -(4-asetilfenil)-2-[(1-metil-1 <i>H</i> -tetrazol-5-il)tiyo]asetamit (LHS-2)	51
4.1.1.3. <i>N</i> -(4-asetilfenil)-2-[(4,5-dihidrotiyazol-2-il)tiyo]asetamit (LHS-3)	51
4.1.1.4. <i>N</i> -(4-asetilfenil)-2-[(5-metil-1,3,4-tiyadizol-2-il)tiyo]asetamit (LHS-4) ..	52
4.1.1.5. <i>N</i> -(4-asetilfenil)-2-[(4-metil-1,2,4-triazol-3-il)tiyo]asetamit (LHS-5)	52
4.1.1.6. <i>N</i> -(4-asetilfenil)-2-(benzotiyazol-2-iltiyo)asetamit (LHS-6).....	53
4.1.2. <i>N</i> '-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il)asetohidrazit türevlerinin eldesi.....	53
4.1.2.1. <i>N</i> '-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1- il)asetohidrazit (CS-1)	53
4.1.2.2. <i>N</i> '-(2,3-diklorobenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il)asetohidrazit (CS-2)	54
4.3. Hücre Kültürü Analizleri.....	55
4.3.1. MTT analiz sonuçları.....	55
4.3.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sonuçları	57
4.3.3. Akım sitometri analizleri.....	61
4.3.3.1. Annexin V-FITC/PI ile apoptoz tayini	62
4.3.3.2. Mitokondriyal membran potansiyeli ölçümü	71
4.3.3.3. Aktif kaspaz-3 apoptoz tayini.....	80
4.3.3.4. Hücre döngüsü ve DNA analizi	89
4.3.4. Morfolojik görüntü analizleri.....	98
4.3.5. ELISA ile PARP [214/215] yarıklanmasının değerlendirilmesi.....	106
4.3.6. Kantitatif RT-PCR Array yöntemi ile gen ifadesindeki etkinliğin değerlendirilmesi.....	108
5. TARTIŞMA VE YORUM	113
6. SONUÇ	132
ÖZGEÇMİŞ.....	156

TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Türkiye Sağlık İstatistikleri	3
Tablo 4.1. Capan-1 hücreleri için xCELLigence yöntemi ile hesaplanan IC ₅₀ konsantrasyonları	58
Tablo 4.2. hTERT-HPNE hücreleri için xCELLigence yöntemi ile hesaplanan IC ₅₀ konsantrasyonları	59
Tablo 4.3. PANC-1 hücreleri için xCELLigence yöntemi ile hesaplanan IC ₅₀ konsantrasyonları	60
Tablo 4.4. Capan-1 hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonrası apoptotik/nekrotik hücre oranları.....	64
Tablo 4.5. PANC-1 hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonrası apoptotik/nekrotik hücre oranları.....	67
Tablo 4.6. hTERT-HPNE hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonrası apoptotik/nekrotik hücre oranları	70
Tablo 4.7. Capan-1 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim oranları .	73
Tablo 4.8. PANC-1 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim oranları .	76
Tablo 4.9. hTERT-HPNE hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim oranları	79
Tablo 4.10. Capan-1 hücrelerinde kaspaz-3 ile apoptoz analizi değişim oranları	82
Tablo 4.11. PANC-1 hücrelerinde kaspaz-3 ile apoptoz analizi değişim oranları.....	85
Tablo 4.12. hTERT-HPNE hücrelerinde kaspaz-3 ile apoptoz analizi değişim oranları.....	88
Tablo 4.13. Capan-1 hücrelerinde hücre döngüsü analizi sonucu faz dağılımları.....	91
Tablo 4.14. PANC-1 hücrelerinde hücre döngüsü analizi sonucu faz dağılımları	94
Tablo 4.15. hTERT-HPNE hücrelerinde hücre döngüsü analizi sonucu faz dağılımları.....	97
Tablo 4.16. Standartların ölçülen absorban ve standart sapma değerleri	106
Tablo 4.17. Hücre gruplarına test maddelerinin 24 saatlik IC ₅₀ değerlerinin uygulanması sonucu hesaplanan yarıklanmış PARP [214/215] aktivite miktarları	107
Tablo 4.18. RT ² PCR Array plakasındaki genler ve tanımlamaları.....	109
Tablo 4.19. RT-PCR analiz sonuçlarına göre Capan-1 hücrelerindeki genlerin kontrol grupuna göre mRNA ekspresyon seviyeleri.....	110

Tablo 4.20. RT-PCR analiz sonuçlarına göre PANC-1 hücrelerindeki genlerin kontrol grubuna göre mRNA ekspresyon seviyeleri.....	111
Tablo 4.21. RT-PCR analiz sonuçlarına göre hTERT-HPNE hücrelerindeki genlerin kontrol grubuna göre mRNA ekspresyon seviyeleri.....	112

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Olaparibin kimyasal formülü	19
Şekil 1.2. PARP inhibitörü çalışma mekanizması.....	20
Şekil 1.3. Rucaparibin kimyasal formülü	21
Şekil 4.1. LHS-1'in molekül yapısı	50
Şekil 4.2. LHS-2'nin molekül yapısı.....	51
Şekil 4.3. LHS-3'ün molekül yapısı	51
Şekil 4.4. LHS-4'ün molekül yapısı	52
Şekil 4.5. LHS-5'in molekül yapısı.....	52
Şekil 4.6. LHS-6'nın molekül yapısı.....	53
Şekil 4.7. CS-1'in molekül yapısı	53
Şekil 4.8. CS-2'nin molekül yapısı	54
Şekil 4.9. Capan-1 hücreleri üzerinde uygulanan sentez maddeler ve PARP inhibitörleri için MTT analizi ile konsantrasyon aralığının belirlenmesi ve anlamlılıkları	56
Şekil 4.10. hTERT-HPNE hücreleri üzerinde uygulanan sentez maddeler ve PARP inhibitörleri için MTT analizi ile konsantrasyon aralığının belirlenmesi ve anlamlılıkları	56
Şekil 4.11. PANC-1 hücreleri üzerinde uygulanan sentez maddeler ve PARP inhibitörleri için MTT analizi ile konsantrasyon aralığının belirlenmesi ve anlamlılıkları	57
Şekil 4.12. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde test numunelerinin Capan-1 hücreleri üzerinde 72 saatlik normalize hücre proliferasyon grafiği.....	58
Şekil 4.13. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde test numunelerinin hTERT-HPNE hücreleri üzerinde 72 saatlik normalize hücre proliferasyon grafiği.....	59
Şekil 4.14. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde test numunelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 72 saatlik normalize hücre proliferasyon grafiği	60
Şekil 4.15. Capan-1 hücrelerinde 24. saat IC ₅₀ değerlerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz sonuçları	62
Şekil 4.16. Capan-1 hücrelerinde 48. saat IC ₅₀ değerlerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz sonuçları	63

Şekil 4.17. PANC-1 hücrelerinde 24. saat IC ₅₀ değerlerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz sonuçları.....	65
Şekil 4.18. PANC-1 hücrelerinde 48. saat IC ₅₀ değerlerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz sonuçları.....	66
Şekil 4.19. hTERT-HPNE hücrelerinde 24. saat IC ₅₀ değerlerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz ölçüm sonuçları.....	68
Şekil 4.20. hTERT-HPNE hücrelerinde 48. saat IC ₅₀ değerlerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz ölçüm sonuçları.....	69
Şekil 4.21. Capan-1 hücrelerinde 24. saat IC ₅₀ değerlerinin JC-1 boyası ile mitokondriyal membran potansiyelinin analiz sonuçları.....	71
Şekil 4.22. Capan-1 hücrelerinde 48. saat IC ₅₀ değerlerinin JC-1 boyası ile mitokondriyal membran potansiyelinin analiz sonuçları.....	72
Şekil 4.23. PANC-1 hücrelerinde 24. saat IC ₅₀ değerlerinin JC-1 boyası ile mitokondriyal membran potansiyelinin analiz sonuçları.....	74
Şekil 4.24. PANC-1 hücrelerinde 48. saat IC ₅₀ değerlerinin JC-1 boyası ile mitokondriyal membran potansiyelinin analiz sonuçları.....	75
Şekil 4.25. hTERT-HPNE hücrelerinde 24. saat IC ₅₀ değerlerinin JC-1 boyası ile mitokondriyal membran potansiyelinin analiz sonuçları.....	77
Şekil 4.26. hTERT-HPNE hücrelerinde 48. saat IC ₅₀ değerlerinin JC-1 boyası ile mitokondriyal membran potansiyelinin analiz sonuçları.....	78
Şekil 4.27. Capan-1 hücrelerinde 24. saat IC ₅₀ değerlerinin kaspaz-3 analiz sonuçları	80
Şekil 4.28. Capan-1 hücrelerinde 48. saat IC ₅₀ değerlerinin kaspaz-3 analiz sonuçları	81
Şekil 4.29. PANC-1 hücrelerinde 24. saat IC ₅₀ değerlerinin kaspaz-3 analiz sonuçları.....	83
Şekil 4.30. PANC-1 hücrelerinde 48. saat IC ₅₀ değerlerinin kaspaz-3 analiz sonuçları.....	84
Şekil 4.31. hTERT-HPNE hücrelerinde 24. saat IC ₅₀ değerlerinin kaspaz-3 analiz sonuçları.....	86
Şekil 4.32. hTERT-HPNE hücrelerinde 48. saat IC ₅₀ değerlerinin kaspaz-3 analiz sonuçları.....	87
Şekil 4.33. Capan-1 hücrelerinde 24. saat IC ₅₀ değerlerinin hücre döngüsü analiz sonuçları.....	89
Şekil 4.34. Capan-1 hücrelerinde 48. saat IC ₅₀ değerlerinin hücre döngüsü analiz sonuçları.....	90
Şekil 4.35. PANC-1 hücrelerinde 24. saat IC ₅₀ değerlerinin hücre döngüsü analiz sonuçları	92
Şekil 4.36. PANC-1 hücrelerinde 48. saat IC ₅₀ değerlerinin hücre döngüsü analiz sonuçları	93
Şekil 4.37. hTERT-HPNE hücrelerinde 24. saat IC ₅₀ değerlerinin hücre döngüsü analiz sonuçları.....	95

Şekil 4.38. hTERT-HPNE hücrelerinde 48. saat IC ₅₀ değerlerinin hücre döngüsü analiz sonuçları.....	96
Şekil 4.39. Maddelerin IC ₅₀ konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra Capan-1 hücrelerinin inverted ışık mikroskop görüntüleri	99
Şekil 4.40. Maddelerin IC ₅₀ konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra PANC-1 hücrelerinin inverted ışık mikroskop görüntüleri	100
Şekil 4.41. Maddelerin IC ₅₀ konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra hTERT-HPNE hücrelerinin inverted ışık mikroskop görüntüleri	101
Şekil 4.42. Maddelerin IC ₅₀ konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra Capan-1 hücrelerinin BioTek Cytation 5 Multimod plaka okuyucuda çekilmiş floresan görüntüleri.....	103
Şekil 4.43. Maddelerin IC ₅₀ konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra PANC-1 hücrelerinin BioTek Cytation 5 Multimod plaka okuyucuda çekilmiş floresan görüntüleri.....	104
Şekil 4.44. Maddelerin IC ₅₀ konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra hTERT-HPNE hücrelerinin BioTek Cytation 5 Multimod plaka okuyucuda çekilmiş floresan görüntüleri.....	105
Şekil 4.45. Yarıklanmış PARP [214/215] için standart eğri ve denklemi.....	106
Şekil 4.46. Maddelerin 24 saat IC ₅₀ değerlerinin PARP yarıklanması üzerine etkileri.....	108
Şekil 4.47. RT-PCR deneyinde ekspresyonu incelenen Capan-1 hücrelerindeki genlerin ekspresyon değişimlerini gösteren ısı gen haritası. Renk değişimleri; kontrole göre kırmızı artan ekspresyonu, yeşil azalan ekspresyonu, siyah ise aynı seviyedeki gen ekspresyonlarını göstermektedir.	110
Şekil 4.48. RT-PCR deneyinde ekspresyonu incelenen PANC-1 hücrelerindeki genlerin ekspresyon değişimlerini gösteren ısı gen haritası. Renk değişimleri; kontrole göre kırmızı artan ekspresyonu, yeşil azalan ekspresyonu, siyah ise aynı seviyedeki gen ekspresyonlarını göstermektedir.	111
Şekil 4.49. RT-PCR deneyinde ekspresyonu incelenen hTERT-HPNE hücrelerindeki genlerin ekspresyon değişimlerini gösteren ısı gen haritası. Renk değişimleri; kontrole göre kırmızı artan ekspresyonu, yeşil azalan ekspresyonu, siyah ise aynı seviyedeki gen ekspresyonlarını göstermektedir.	112

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
ATP	: Adenozin trifosfat
BD	: Becton Dickinson
BER	: Baz eksizyon onarımı
Capan-1	: İnsan pankreas adenokarsinom hücresi
CAT	: C-terminal katalitik
CI	: Hücre indeksi
CMXRos	: MitoTracker Red Chloromethyl-X-rosamine
CO₂	: Karbondioksit
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles's Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FBS	: Fetal sığır serumu
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
FL	: Floresan
FSC	: İleri yönlü saçılım kanalı
GAR	: Glisin-arjinin bakımından zengin
HR	: Homolog rekombinasyon
hTERT-HPNE	: İnsan normal pankreas hücresi
IC₅₀	: Hücrelerin canlılığının yarısını inhibe eden konsantrasyon
ICD-10	: Uluslararası hastalık sınıflandırması
IMDM	: Iscove's Modified Dulbecco's Medium
JC-1	: Mitokondriyal membran potansiyeli
MDR	: Çoklu ilaç direnci
MMR	: Yanlış eşleşme tamiri

MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Thiazolyl Blue
NAD+	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NER	: Nükleotit-eksizyon tamiri
NHEJ	: Homolog olmayan rekombinasyon
NO	: Nitrik oksit
Ola	: Olaparib
PANC-1	: İnsan pankreas epteliyoid karsinom hücresi
PAR	: Poli (ADP-Riboz)
PARG	: Poli (ADP-Riboz) glikohidrolaz
PARP	: Poli (ADP-riboz) polimeraz
PBS	: Fosfat tamponu
PDA	: Pankreatik duktal adenokarsinom
PE	: Fikoeritrin
PEG	: Polietilen glikol
P-gp	: P-glikoprotein
PI	: Propidyum iyodür
PS	: Fosfatidilserin
rhEGF	: İnsan rekombinant epidermal büyüme faktörü
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RUCA	: Rucaparib
S.H.	: Standart hata
S.S.	: Standart sapma
SSB	: Tek zincir kırıkları
SSC	: Yana saçılımı kanal
TANK	: Tankiraz
WGR	: Triptofan-glisin-arjinin zengini
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
xCELLigence RTCA MP	: xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi

1. GİRİŞ

Kanser, dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ve 2012'de 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yayınlanan istatistiklere göre, 2012'de 14 milyon olan kanser vakalarının 20 yıl içinde 22 milyona yükselmesi beklenmektedir [1]. Pek çok farklı tipte kanser olmasına rağmen teşhis ve tedavi sürecinde yaşanan sıkıntılar nedeniyle kanser, dolaşım sistemi hastalıkları haricinde en fazla ölüme sebep olan hastalıklar arasındadır. Dünyada kanser türleri arasında en son aşamada farkedilen, geç teşhis nedeniyle en fazla ölüme sebep olan kanserler arasında da pankreas kanseri mevcuttur ve iyileştirilme şansı ancak ameliyatla olmakla birlikte kesin iyileştirilme amacıyla ameliyata alınan hastaların oranı ise %20' dir. Kanser, patofizyolojik olarak heterojen bir hastalık olup, başlangıcından sonra hızla kontrol edilemeyen bir aşamaya ilerlemektedir [2]. Bununla birlikte, immün, fototermal, fotodinamik, gen ve hormon tedavisi de dahil olmak üzere çeşitli tedavi yöntemleri, klinik öncesi araştırmalarda kanser potansiyelini umut verici bir şekilde ortadan kaldırsa da, cerrahi, radyasyon ve kemoterapi birçok kanser için ilk tedavi seçeneği olmaya devam etmektedir [3]. Bununla birlikte, bu odaklanmış tedavi stratejileri, uzak organlara ulaşan metastatik tümörleri kontrol altına alamamaktadır. Kanser tedavisi için bir sonraki ana strateji olan konvansiyonel kemoterapi, ilaçların kanser hücrelerine hedeflenmesine yönelik olmadığı için, sağlıklı dokulara istenmeyen yan etkilere neden olmaktadır [4]. Sitotoksik ajanlar, tekrarlayan kanserlerde tüm vücut tedavisinde yaygın olarak kullanılıyor olmalarına rağmen; geleneksel anti-kanser ilaçları, suda zayıf çözünürlük, spesifik olmayan biyolojik dağılım, normal hücrelere karşı ciddi toksisite, tümörlerde veya kanserli hücrelerde yetersiz ilaç konsantrasyonları ve çoklu ilaç direnci gelişimi gibi çeşitli dezavantajlarla karşı karşıyadır [5, 6]. Bu nedenle, hedefli alternatif terapötik yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Bu nedenle her geçen yıl hedefe yönelik yeni ilaç etken maddelerinin geliştirilmesine olan ilgi giderek artmaktadır [7].

Bu çalışmada kimyasal yapısı özelliğinden dolayı Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitör aktivitesi olabileceği düşünülen sentez maddelerinden *N*-(4-asetilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevleri ve *N'*-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-

il)asetohidrazit türevlerinin pankreas kanseri üzerindeki antikanser etkisi araştırılmış ve bu etkinlik PARP inhibitörlerinden olan olaparib ve rucaparib ile karşılaştırılmıştır. Bunun için pankreas kanseri üzerinde etkinliği kanıtlanmış iki PARP inhibitörü pozitif kontrol olarak kullanılmış; insan pankreas adenokarsinom (Capan-1), insan pankreas epteliyoid karsinom (PANC-1) ve insan normal pankreas (hTERT-HPNE) hücreleri üzerindeki *in vitro* etkileri moleküler analiz yöntemleri kullanılarak incelenmiştir.

1.1. Pankreas

Pankreas midenin hemen arkasında bulunan, yaklaşık 15 cm uzunluğunda duodenum ve kolon arasında kalan ve genellikle ultrasonla teşhis için zor bir bölgede bulunmaktadır. Gıdaların sindirimi, kan şekerinin dengede tutulması başta olmak üzere pek çok önemli görevi bulunmaktadır. Pankreas kanseri pankreastaki hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasıyla başlar. [8].

Pankreasta 2 ana hücre tipi bulunmaktadır:

Egzokrin hücreler: Pankreastaki pek çok hücre ekzokrin bezler ve kanallardan oluşur. Ekzokrin bezler özellikle yağların olmak üzere gıdaların sindirilmesine yardımcı olacak şekilde bağırsaklara salınan pankreas enzimlerini üretirler. Enzimler öncelikle kanal (duct) denilen küçük tüplere salınırlar. Bu kanallar pankreas kanalına (pankreatik kanal) boşalmak için birleşerek daha büyük kanallar oluşturur. Pankreatik kanal ortak safra kanalıyla birleşerek (karaciğerden safra taşıyan kanal) ve Vater ampülündeki duodenuma (ince bağırsağın ilk kısmı) boşalır [8].

Endokrin hücreler: Endokrin hücreler pankreastaki hücrelerin çok daha küçük bir kısmını meydana getirirler. Bu hücreler adacık (Langerhans adacıkları) adı verilen küçük kümelerden oluşmaktadır. Langerhans adacıkları insülin ve glukagon (kan-şeker seviyesini kontrol etmede görevli) gibi önemli hormonları üretir ve bu hormonlar doğrudan kana salınırlar [8].

1.1.1. Pankreas kanseri

Pankreas kanseri, teşhisi oldukça güç olan ve ancak pankreasın tamamına yayıldığında ancak semptomatik veri elde edilmesine neden olan bir kanser türü olduğu için

hastaların sadece %20'si ameliyatla tedavi şansına sahiptir. Tüm evreleri düşünüldüğünde 1 ve 5 yıllık hayatta kalım oranları %29 ve %7'dir. Geç teşhiste bu oranlar %15 ve %2'ye düşmektedir. Erken teşhis edildiğinde sağ kalım oranı 5 yıl için sadece %9'dur. Pankreas kanseri tedavisi en zor olan, en ölümcül kanser türleri arasında 4. sırada yer almaktadır [9].

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Avrupa bölgesi içinde saydığı, Türkiye'deki verilerin sağlık kurumlarındaki gecikmiş düzenlemeleri nedeniyle, 2017 yılında basılmış, Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanmış ve ulaşılabilen en son Sağlık İstatistikleri 2016 Yılığında [10], Uluslararası Hastalık Sınıflandırması (ICD-10) tarafından hazırlanmış veriler, kanser bilgisi altında değil ancak neoplazm verisi olarak belirtilmiştir, ölüm oranları dolaşım sistemi hastalıklarından sonra en fazla olan hastalık grubuna girmektedir ve Tablo 1.1'de gösterilmiştir.

Tablo 1.1. *Türkiye Sağlık İstatistikleri*

ICD-10 Ana Tanı Kodları	Kod	Yıl								
		2014			2015			2016		
		Erkek	Kadın	Toplam	Erkek	Kadın	Toplam	Erkek	Kadın	Toplam
		Ana Tanı Gruplarına ve Cinsiyete Göre Ölüm Nedenlerinin Dağılımı, (%), Türkiye								
Neoplazmlar	C00-D48	24,32	15,61	20,35	23,73	15,42	19,94	23,58	15,15	19,71

Türkiye'de en sık görülen 10 kanser türü ise kolorektal, mesane, böbrek, larink, trake-akciğer ve bronş, mide, Non-Hodgkin lenfoma, beyin ve diğer sinir sistemi ile meme-uterus/prostat ve pankreas kanserleridir. Erkeklerde ve kadınlarda en sık görülen kanser türleri farklılık göstermekle birlikte pankreas kanseri en sık görülen 10 kanser türü içinde yer almaktadır. 100.000'de dünya standart nüfusu göz önüne alındığında Türkiye'de pankreas kanserinin insidansı 2010 yılında 5,7 olarak belirtilmiştir ki bu da %2,2'ye tekabül etmektedir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu verilerine göre tüm kanser türleri içindeki insidansı erkeklerde 168,7'lik dilimde 3,1'inin; kadınlarda 261,4'lük dilimde 5,7'sinin pankreas kanseri olduğu belirtilmiştir. Bu verilere göre teşhisi erken ve doğru şekilde yapılamadığı için kayıt ve tedavi altına alınabilen kayıtlı hasta sayısı düşük, kısa sürede ölüm oranı yüksek görünmektedir [10].

Pankreasın ekzokrin hücreleri ve endokrin hücreleri farklı türlerde tümörler oluştururlar. Pankreasın ekzokrin ve endokrin kanserlerini ayırt etmek çok önemlidir. Farklı risk faktörlerine ve nedenlerine, farklı belirtilere ve semptomlara sahiptirler, farklı testlerle teşhis edilirler ve farklı görünümlere sahiptirler [8]. Endokrin olmayan pankreas tümörleri iyi ve kötü huylu olmak üzere iki tiptir. Pankreasın iyi huylu endokrin olmayan tümörleri: adenoma, kistadenoma, lipoma, fibroma, hemanjioma, lenfanjioma, nöroma olarak çeşitlendirilir. Pankreasın kötü tümörleri arasında ise duktal adenokarsinoma, kistik adenokarsinoma ve diğer (sarkomalar, metastatik v.s) kötü huylu tümörler yer alır. Tümörler farklı histolojik yapılarda bulunabilir.

Pankreas kanserleri temelde şu şekildedir:

Ekzokrin pankreatik kanserler: Ekzokrin kanserler, pankreas kanserinin en yaygın türüdür. Pankreas kanseri dendiğinde genellikle ekzokrin kanserler anlaşılır ve çoğu duktal adenokarsinomlardır [11-12].

Pankreatik adenokarsinom: Ekzokrin pankreas kanserlerinin %95'i adenokarsinomdur. Bu kanserler genellikle pankreas kanalında başlar. Daha seyrek olarak pankreatik enzimleri oluşturan hücrelerden gelişirler ki bunlara asinar hücre karsinomu da denilmektedir [11-12].

Daha az yaygın ekzokrin kanser türleri: Bu kanserler arasında adenoskuamoz karsinom, skuamoz karsinom, taşlı yüzük hücreli (signet ring) karsinom, farklılaşmamış karsinom, dev hücreli farklılaşmamış karsinomlar sayılabilir [11-12].

Ampüler kanser (Vater ampül karsinom): Bu kanser safra ve pankreas kanallarının bir araya gelerek ince bağırsağın içine boşaldığı Vater ampülünde başlar. Teknik olarak pankreatik kanser değildir ancak benzer şekilde tedavi edildiği için bu kısımda ele alınmıştır. Genellikle safra kanalını tıkar ve daha fazla uzaklaşamazlar. Bu blokaj vücutta safra birikmesine ve özellikle gözlerin ve vücudun sararmasında (sarılık) neden olur. Bu nedenle teşhisi daha erken evrede olabilmektedir [11-12].

Intraduktal papiller müsinöz neoplazmlar (IPMN): İnvazif pankreas kanserinin iyileştirebilme potansiyeli olan bir öncü lezyonunu temsil ettikleri için bunları tanımak önemlidir. Karakteristik olarak pankreasın daha büyük kanallarında (duct) büyüdükleri için intraduktal olarak isimlendirilir. Tedavi edilme şansı vardır ancak tedavi edilmez ise invazif adenokarsinomaya ilerleyebilir [12].

Pankreatik intraepitelyal neoplazmlar (PaIN): Mevcut görüntüleme sistemleriyle görüntülenemeyecek kadar küçüktürler. Pankreasın erken teşhisinde önemli bir ipucu olduğu düşünüldüğü için aktif bir araştırma alanıdır. Tedavi edilmediği takdirde invazif duktal adenokarsinomlara (Pankreatik Duktal Adenokarsinom, PDA) dönüşürler ki pankreas kanseri dendiğinde ilk akla gelen kanser türü bunu ifade etmektedir [12]. Mutasyonlarla ilişkili olup, görülme sıklığı yaş ile artar ve genelde pankreasın baş kısmında bulunurlar [13].

Müsinöz kistik neoplazmlar (MCN): Genelde bir parça şeklinde ve 5-35 cm arasında değişen büyüklüklerdedir. Fibroz şekilli kalın duvarlı, musin, hemorajik sıvı veya nekrotik materyal muhteviyatlıdır, yavaş büyür ve tesadüfen farkedilir. Nadir olarak görülür ve semptomları net değildir. Kadınlarda görülme sıklığı erkeklere oranlar 20 kat fazla olup 40-50 yaşları arasında rastlanmaktadır [14].

Endokrin pankreatik kanserler: Nöroendokrin tümörler olarak veya Langerhans adacıklarından köken alan tümörler olduğundan adacık hücreli (islet cell) tümörler olarak da adlandırılırlar ve pankreas kanserlerinin %1-5'inden daha azını oluşturacak kadar seyrek görülürler. İyi veya kötü huylu tümörler olabilirler ve mikroskop altında çok benzer görünürler, bu sebeple bu hücrelerin aslında kanser olup olmadığı net anlaşılamamaktadır, anlaşılabilenler ise pankreas dışına yayıldığında görülmektedir. Nöroendokrin tümörlerin yaklaşık yarısı kana salınan ve semptomlara neden olan hormonları üretir. Bunlara “fonksiyonel tümörler” denir ve her birine tümör hücreleri tarafından yapılan hormon türünün ismi verilir (örn: Gastrinoma, insülinoma, somatostatinoma, glukagonoma vb.). Fonksiyonel olmayan nöroendokrin tümörler ise belirtilere sebep olacak kadar hormon üretmedikilerinden yayılmadan önce genellikle çok büyümüş olurlar [12, 15].

Pankreatik lenfoma: Çok nadir görülür ve pankreas kanseri için kullanılan standart tedavilerden farklı şekillerde tedavi edilirler.

Pankreas kanseri yayılımı fazla olmadığı için kanser riski düşük kişilerin hastalığa yakalanma ihtimalini tespit edebilecek bir tarama testi henüz mevcut değildir. Rutin kanser belirteçleri üzerinden tarama da maliyeti yükseltecek ve zorluk çıkaracaktır. Bu sebeple pankreas kanserinin ilişkili olduğu düşünülen bazı genler araştırılmaktadır. Ailesel pankreatit ve pankreas kanseri, Peutz-Jeghers hastalığı, ailesel tipik olmayan melanoma, kistik fibrozisi, ailesel farklı kanser sendromları [Lynch sendromu, familial adenomatöz

polipoz (FAP), kalıtsal meme ve over kanseri, BRCA1, BRCA2 ve BRCA2'nin partneri ve lokalizatörü PALB2 mutasyonu] gibi yatkınlığı olan bireylerde pankreas kanserinin oluşmasından sorumlu germline, genetik mutasyonlar nedeniyle kansere yakalanma riski daha yüksektir ve rutin taramalarla takip önerilmektedir. Pankreas kanseri ile ilişkili genlerde meydana gelen mutasyonlar kanser progresyonu ve metastaza neden olmakta, bununla birlikte hücre turnoveri, telomerazın kısalması, genomik instabilite ve epitel hücrelerinin anormal yapısal durum almaları dönüşerek pankreas kanserine sebep olmasında rol oynamaktadır [16, 18].

1.1.2. Kemoterapinin kısıtlamaları

Lokalize ve metastatik kanserlerin tedavisinde, çoğunlukla intravenöz rejimler yoluyla uygulanan kimyasal antineoplastik ilaçların kullanımına kemoterapi denir ve bu yöntem kanser tedavisinde birincil terapötik yaklaşımdır [19]. Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, kemoterapötik ilaçlar aşağıdaki sınırlamalara sahiptir:

- Neoplastik dokulara özgüllüğün olmaması kanserli olmayan hücrelerde hasarlara neden olur ve bu da mukozit, kemik iliği aktivitesinin baskılanması (immüno ve myelosüpresyon), mide bulantısı, sekonder neoplazmlar ve infertilite gibi ciddi aşırı yan etkilere yol açar. Buna ek olarak, kemoterapötiklerin yüksek dağılım hacmi, ilaç dağılımını tümörlere özgü yapmaz; böylece antineoplastik ilaçların sağlıklı dokularda anormal konsantrasyonuna neden olur [19].
- Aktif etki mekanizmasındaki seçicilik eksikliği konvansiyonel kemoterapide belirgin bir dezavantajdır. Kemoterapötik ilaçların çoğu, malin hücrelere özgü intraselüler mekanizmalar üzerinde değil, hem neoplastik hem de normal hücreler tarafından paylaşılan geçitler üzerinde etkindir. Böylece, bu ilaçlar tarafından uyarılan sitotoksik ve sitostatik mekanizmalar, kanserli olmayan sağlıklı dokuları da vurur. Bu nedenle, toksik olmayan ve daha etkili tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır [20].
- Kemoterapötik ajanlar, düşük molekül ağırlıklı ilaçlar için yüksek farmakokinetik hacim dağılımına bağlı olarak sitotoksositeye neden olur. Düşük molekül ağırlıklı kimyasallar hızla atılır. Bu nedenle, terapötik bir etki elde etmek için daha yüksek

konsantrasyona ihtiyaç duyulmaktadır ve bu da toksisiteye yol açmaktadır. Konvansiyonel kemoterapötik ilaçların terapötik indeksinin düşük olması, etkili tedavi için gereken konsantrasyonun yüksek olması demektir ve bu yüksek konsantrasyon çoğunlukla doza bağlı olarak sistemik yan etkilere yol açmaktadır [21].

- Kemoterapötik ilaçların formülasyonu, suda çözünürlüğünün zayıf olması nedeniyle zorlayıcıdır. Zayıf çözünürlük, ilaçların hazırlanmasını güçleştirir [22]. Yüksek hidrofobiklik ve zayıf çözünürlük nedeniyle, kemoterapötik uygulamalar sınırlanmaktadır. Diğer kemoterapötik ajanlar, hedef reseptöre eğilim gösteren lipofilik grupların eklenmesinden dolayı zayıf çözünürlüğe sahiptir [23, 24]. Ek olarak, çoğunlukla retiküloendotelial sistemde yüksek bozunuma duyarlılık, formülasyonun oral ilaç uygulamasına izin vermez ve intravenöz, transdermal, intraperitoneal gibi hastalara uygun olmayan uygulama rejimlerini gerektirir. Böylece, ilaç dağılım sistemleri optimize edilerek mevcut kemoterapötik ajanların veriliş yollarında modifikasyon yapılabilir [25]. Az çözünen ilaçlar intravenöz enjeksiyonla uygulandığında, çözünmeyen ilaçların bir araya toplanması nedeniyle kan damarlarında embolizmaya neden olabilir ve sıklıkla birikim yerinde yüksek ilaç konsantrasyonları sonucu lokal toksisiteye neden olabilir. [26, 27].
- Kemoterapide, doğuştan ya da edinilen kemodirenç mekanizmalarına bağlı olarak, antikanser ilaçlarının yararlığı sınırlı düzeyde olmaktadır [28]. Bir tümör dokusunun interstitiyumu yüksek hidrostatik basınca sahiptir ve bu durum, normal dokulardan farklı olarak, ilacı tümörden uzaklaştırabilen dışa doğru bir konvektif interstisyel akıma neden olur. Üstelik ilaç tümöral dokular arasına başarıyla verilmesine rağmen, kanser hücreleri çoklu-ilâç-direnci (MDR) kazanmışsa ilacın etkinliği sınırlı olabilir [29]. MDR'nin karakteristik özelliği, ilaçları hücreden uzak tutabilen plazma membran P-glikoprotein (P-gp) aşırı ekspresyonudur. P-gp kaynaklı MDR'yi önlemek için antikanser ilaçların kapsüllenmesi ve P-gp inhibitörlerinin birlikte uygulanması da dahil olmak üzere birçok strateji önerilmiştir [30]. Birçok lipofilik ilacın eflüks taşıyıcılar vasıtasıyla dışa atılımı, etki alanında yaklaşık-optimal terapötik ilaç konsantrasyonuna neden olur ve kemoterapinin başarısındaki engeller arasında yer alır [31].

- Geleneksel kemoterapide, ilacın tümöre naklinde zorluklarla karşılaşmaktadır. İlaçların fizikokimyasal özellikleri, boyut, yüzey kompozisyonu, yük dahil olmak üzere ulaşımında önemli rol oynamaktadır [32]. Bir diğer zorluk ise ilacın tümörlü kitleye dağılımını engelleyen patofizyolojik tümör heterojenitesidir. Buna ek olarak, asidik tümör mikrobiyolojisi, aside duyarlı ilaçların bozunmasına neden olur [33].

Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörleri meme ve yumurtalık kanserlerinde potansiyel kanser terapötikleri olarak çalışılmıştır. PARP inhibitörleri, PARP'in yanı sıra baz eksizyon onarımının (enzimatik fonksiyonun blokajı yoluyla) inhibisyonu dahil olmak üzere çeşitli belgelenmiş etki mekanizmalarına sahiptir 1-3. Bu mekanizmalar, DNA replikasyon çatallarının durması ve çöküşünden sonra çift iplikli kırılmaların indüksiyonuna yol açar. Homolog DNA onarımında belirgin bir defekt olduğu bilinen (ki bu nedenle çift zincirli kırıkların onarımında kusurlu olan) tümörler, PARP inhibitör tedavisine duyarlı görünmektedir. Bunlar, BRCA1 ve BRCA2'de (BRCA1/2) germline veya somatik mutasyonlarla ilişkili tümörleri içerir [34].

Bugüne kadar yapılan klinik deneyler, germline BRCA1/2 mutasyonları ile ilişkili göğüs ve over kanserlerinde PARP inhibitörleri ile sağ kalımın arttığını göstermiştir [35]. BRCA eksikliği olan pankreas kanseri hücrelerinin biyolojisi, kişiye özel ve kişiselleştirilmiş tedavi için büyük terapötik avantajlar sağlayabileceğini göstermiştir [36].

1.2. DNA Tamir Mekanizmaları

Genomik bütünlük sayısız genlere karşı içsel ve dışardan toksisitesi olan ajanlar tarafından DNA hasarı şeklinde bozulabilir. Bu saldırılardan korunmak için ise hücrelerde, çok aşamalı karmaşık bir moleküler süreç gelişmiştir. DNA onarımı hücresel işlevlerin sürdürülebilmesi için önemli bir rol oynamaktadır. DNA hasarları pek çok farklı tamir mekanizmasıyla düzeltilebilir. Bunlar direkt ve dolaylı olarak gerçekleştirilebilir. Fotoreaktivasyon, O₆-metilguanin-DNA-metiltransferaz ve basit zek zincir kırıklarının ligasyonu ile DNA direkt tamir edilebilir. Dolaylı olarak ise DNA'nın tek zincir kırıkları (SSB'ler), baz eksizyon onarımı (BER), nükleotit-eksizyon onarımı (NER) yolları ile onarılrken; DNA'nın çift zincir kırıkları (DSB'ler), homolog rekombinasyonla (HR) veya homolog olmayan rekombinasyon (NHEJ) ve yanlış eşleşme onarımı (MMR) ile sağlanır.

BER mekanizmaları, oksidasyon, alkilasyon ve deaminasyondan kaynaklanan tek-bazlı lezyonları tanır; DNA glikozilazları, AP endonükleaz, DNA polimeraz, DNA ligaz dahil olmak üzere çok sayıda enzimi içerir. NER, sarmal distorsiyonlu lezyonlarla aktive olur ve genom boyunca veya aktif olarak transkribe edilen genlerin tamirini gerçekleştirir. MMR, replikasyon hatalarını, yani eşleşmeyen nükleotitleri ve küçük ekleme/silme halkalarını (loop) çıkarır. Bu yoldaki kusurlar, kalıtsal poliposiz kolorektal kanser de dahil olmak üzere yüksek mutasyon oranına ve kansere neden olur [37-39].

DSB'ler daha tehlikelidir, çünkü tamamlayıcı zincir her zaman birebir onarım için uygun değildir ve tamir edilemeyen çift zincir kırıkları hücre ölümüne neden olmaktadır. HR yolu, kardeş kromatid iplikçığının kullanılmasıyla çift zincir kırıklarında onarımdan sorumludur. Sadece bir homolog eşlemenin, genellikle homolog kardeş kromatidinin erişilebilirliğinin olduğu, hücre döngüsünün sadece S ve G₂/M fazlarında çalışır [38]. NHEJ yolunda ise hücre döngüsünden bağımsız olarak G1 fazında aktivite sağlanarak DNA tamiri gerçekleştirilir [39].

HR'de ilk aşamada mayotik rekombinasyon 11(MRE11), DNA tamir proteini RAD50 ve nibrin (NBS1) proteinlerinden oluşan MRN kompleksi işlev görür ve hücredeki çift zincir kırıkları fark eder. Hemen sonra protein kompleksi, bu bilgiyi kontrol noktasındaki ATM (ataxia-telangiectasia mutated) kinaz olarak adlandırılan bir enzime iletir. ATM kinaz enziminin, hücrenin çift zincir kırıklarına karşı geliştirdiği reaksiyonu kontrol ettiği ve hücreye onarım fırsatı tanımak için hücre büyümesini yavaşlattığı açıklanmıştır. Tek başına PARP inhibitörleri ile tedavinin, BRCA ile mutasyona uğramış kanser hücre hatlarında apoptozu indüklediği bilirse de, MRN down regülasyonunun, BRCA mutasyonlarına sahip olmayan hücreleri PARP inhibitörleri ile tedaviye duyarlı hale getirebileceğini, tümör agresyonunu kontrol etmenin alternatif bir yolunu sunduğunu göstermektedir [38-40].

Genomik instabilite, kanser hasarı olup, DNA hasarı birikimi ve tümör mutasyonu için uygun olan genotiplerin gelişimini destekleyen müteakip mutasyonlarla sonuçlanır. Bu süreç, büyük ölçüde insan hücrelerinin güçlü DNA onarım mekanizmalarındaki anormalliklerden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, bozulmamış onarım sistemleri, canlılığı destekleyen bir genomik stabiliteyi muhafaza etmek için gereklidir. Bu şekilde, DNA hasar onarım yollarının hedeflenmesi, kanser tedavisinde çekici bir terapötik hedef haline

gelmiştir. Artan ilgi, bu temel DNA onarım yollarını destekleyen hücresel süreçlerdir. Bir hücrenin DNA hasarının onarımı için kullandığı yolun seçimi, aktif bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir [41-43].

1.3. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP) Inhibitörleri

Poli (ADP-riboz) polimerazlar (PARP), prelinik ve klinik modellerde yoğun olarak çalışılan DNA çift zincir kırıkları onarım yollarında yer alan bir protein ailesidir. PARP'lar, tek iplikçik DNA hasarının onarımı, hata eğilimli NHEJ üzerinde HR'nin teşhisi ve kromatin modifikasyonu ve transkripsiyon düzenlemesi gibi DNA onarımı dışı birkaç hücresel fonksiyon da dahil olmak üzere birçok önemli hücresel işlemde rol oynamaktadır. PARP'larla ilişkili DNA onarımında daha küçük rollere sahip PARP2 ve PARP3 ile birlikte PARP1'in en önemli rolü üstlendiği görülmektedir. On yıl önce, PARP inhibitörlerinin, normal hücreler üzerinde minimal etkilere sahip ancak HR'de kusurlu hücrelere sitotoksik etkili olduğu bulunmuş ve büyük heyecan yaratmıştır. Bu raporlardan ötürü, PARP'ın hücresel işlevdeki rolünün anlaşılması için geniş çalışmalar başlatılmış ve PARP inhibitörlerinin 2014 yılında over kanseri için olaparibin FDA onayı ile klinik pratiğe entegrasyonunda doruğa ulaşmıştır [41-44].

PARP; birkaç hedef proteinin glutamik asit kalıntıları üzerinde uzun ve dallanmış (ADP-riboz) (PAR) polimerler sentezleyecek şekilde nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD⁺) substrat olarak kullanan bir enzim ailesi olarak tanımlanır [45-46]. 1960'lı yıllarda açıklanan birçok çalışmada PARP'ın nükleer bir enzim olarak işlev gördüğü tespit edilmiştir. Negatif yüklü polimerlerin ilavesi, alıcı proteinlerin özelliklerini ve işlevlerini derinden değiştirir. Poli (ADP-ribozil)asyon, baz eksizyon onarım yolunda çift iplikli DNA kopmalarının onarımı, gen transkripsiyonu, hücre döngüsü ilerlemesi, hücre ölümü, kromatin fonksiyonları ve genetik istikrar gibi birçok hücresel sürecin düzenlenmesinde rol oynamaktadır [47-50]. Bu işlevler esas olarak PARP ailesinin en iyi karakterize edilmiş üyesi olarak görülen PARP1'e atfedilmiştir. Bununla birlikte, PARP'ları kodlayan yeni genlerin, yapılarının ve hücre altı lokalizasyonunun karakterizasyonu ile birlikte tanımlanması, telomer replikasyonu ve hücre nakil de dahil olmak üzere, hücrelerdeki poli (ADP-riboz)ilasyon için farklı roller ortaya koymuştur [51-52].

PARP inhibitörleri PARP substratının bağlanma bölgesinde NAD⁺ ile rekabet ederek PARP'ı yakalamak için tasarlanmıştır. Yapılan çalışmalarda göğüs, yumurtalık, prostat, akciğer ve pankreatik kanserlerde DNA hasarının onarımında uygulanabileceğini göstermiştir [53-55].

1.3.1. PARP ailesinin üyeleri

PARP ailesinin üyeleri olarak memeli hücrelerinde en az 18 ayrı protein tanımlanmışsa da sadece 6 tanesi PARP sentezinde görev alır ve bununla birlikte, sadece PARP1, PARP2 ve PARP3'ün DNA onarımında işlev gördüğü bilinmektedir. Memeli hücrelerinde şuana kadar PARP1, PARP2, PARP3, PARP4 (vault PARP; VPARP), PARP5 (tankiraz 1) ve PARP6 (tankiraz 2) olmak üzere altı adet PARP tespit edilmiştir [51, 52, 56-59].

PARP1: Dört ana bölgeden oluşan 116 kDa'lık bir nükleer protein olup, tüm ökaryotlarda bulunan, enzim familyasının kurucu üyesidir. Tüm PARP'ların enzim aktivitesinin çoğunluğu ile DNA hasarı olaylarında dakikalar içinde hücresel PARP'ın %90'ını üretmektedir. Üç çinko parmak motifli bir N-terminal DNA bağlanma alanı (domein), bir kaspaz-3 bölünme bölgesi içeren bir nükleer konum sinyali, bir otomodifikasyon etki alanı (protein-protein etkileşimleri, örneğin BRCA1 ile etkileşim) ve bir C-terminal katalitik alanı (proteinlerin enzimatik aktivitesinden sorumlu) mevcuttur. Bu enzim, alkilleyici ajanlar, iyonize radyasyonlar veya serbest radikallerin yol açtığı DNA hasarına tepki olarak aktive olur. Çinko parmak motifleri vasıtasıyla, PARP1, DNA tek veya çift sarmal kırılmalarına hızla bağlar, otoribozilasyona uğrar ve alıcı proteinlere ADP-riboz polimerleri ekler. Bundan sonra ribozillenmiş PARP molekülü DNA'dan salınır ve katalitik aktivitesi inaktive edilir. Polimer formasyonu oluşumundan birkaç dakika sonra, poli (ADP-riboz) molekülleri, poli (ADP-riboz) glikohidrolaz (PARG) ile hızla parçalanır, böylece PARP1'in DNA hasarına yanıt olarak otoribozilasyon yapma kabiliyetine yeniden başlamasına izin verir. Böylece PARP1, çentik sensörü gibi davranır ve hücresel proteinlerin PARP1 aracılı translasyon sonrası modifikasyonu, transkripsiyon ve DNA replikasyonunu durdurmak ve hasar bölgesinde DNA onarım sistemlerini almak için hızlı sinyaller sağlar [60-63].

PARP1, hem nekroz hem de apoptozda önemli bir rol oynamaktadır. Büyük miktarda DNA hasarı durumunda, PARP1'in aşırı aktivasyonu, yeniden NAD⁺ sentezlemeye yönelik girişimlerde adenosin trifosfat (ATP) havuzlarını tüketebilir ve bu işlem sonunda nekrozla hücre ölümüne yol açar. Muhtemelen, hücreler apoptotik uyarılara maruz bırakıldığında PARP1 kaspazlar tarafından bölünür. DNA bağlama alanında proteoliz meydana gelir ve PARP1 katalitik aktivitesini ortadan kaldırır. Bu, apoptotik prosedürün düzenli uygulanmasını sağlamak için gerekli olan enerji havuzlarının tükenmesini önleyecektir [60]. DNA bağlanması, PARP1'de, katalitik bölgenin yeniden düzenlenmesine ve enzimatik aktivitede önemli artışa izin veren konformasyonel bir değişikliğe neden olur. Aktive edildikten sonra, DNA tamir mekanizmalarının önemli üyelerini çalıştırmak için önemli olan poli (ADP-riboz) (PAR) polimer zincirleri oluşturmak için nikotinamid adenin-dinükleotit (NAD⁺) kullanır. PARP1, PAR zincirini "PARilasyon" olarak adlandırılan bir süreçte birkaç farklı proteine kovalent olarak bağlar. PARilasyon, filogenetik olarak antik bir protein modifikasyon şeklidir ve PAR için proteinlerin aviditesi, multiprotein kompleksleri için iskele işlevi görmesini sağlar [60-64].

PAR bağlanma motiflerine sahip proteinlerin listesi oldukça geniştir ve histon 1, histon 2B, DNA protein kinaz, diğer kromatin ile ilişkili alıcı proteinler ve hatta PARP1'in kendisi de dahil olmak üzere DNA replikasyonu ve hasar onarımında hayati öneme sahip proteinleri içerir. Ek olarak, PAR zincirleri üzerindeki çoklu bağlama bölgeleri, protein komplekslerinin aktif konformasyonunu stabilize etmeye yardımcı olur. Efektör proteinlere PAR bağlanması DNA hasar tespiti, kromatin yeniden modelleme ve DNA onarım komplekslerinin birleştirilmesini modüle eder. Aslında, glisin-arjinin bakımından zengin (GAR) domeinler gibi, DNA hasar tanıma için kritik olan birçok proteinin DNA bağlanma domeinleri de PAR'ı bağlar [62-65].

PARP1'in aktive edildiği bir ana mekanizma, normal hücrel metabolik aktiviteler, hücrel açlık ve sitotoksik tedaviler de dahil olmak üzere birçok mekanizma tarafından üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından tetiklenen DNA hasarıdır. PAR ve PARP, DNA tamirine, mitokondriyal aktiviteye ve metabolizmaya ve bağışıklık fonksiyonuna aracılık ederler. PARP aktivitesi ayrıca, kanser hücrelerinde upregülasyon ile strese, hücrel tepkiye aracılık eder. Ekstra polasyon ile PAR ve PARP, "kanser belirtilerinin" birkaçının bir parçası olarak düşünülebilir [63-66].

PARP2: Şimdiye kadar karakterize edilen PARP gen ailesinin üyeleri arasında PARP2, PARP1'in katalitik alanı ile en yüksek homologluğu gösterir ve PARP1^{-/-} hücrelerinde görülen DNA hasarına tepki olarak ADP-riboz polimerlerinin oluşumuna katkıda bulunur [58]. PARP2, bir C-terminal katalitik (CAT) domeini, bir merkezi triptofan-glisin-arjinin (WGR) ve bir N-terminal bölgesinden oluşur. WGR ve CAT domeinleri hasarlı DNA bölgelerine lokalizasyondan sorumludur, bu alanlar DNA hasarıyla etkileşime katkıda bulunur [67]. PARP2, PAR üretimindeki PARP1'e ve onun baz eksizyon onarımına (BER) katılımına benzer fonksiyonlara sahiptir [57, 68] Preklinik kanıtlar, PARP2 knockout ve inhibisyonunun, akciğer adenokarsinom hücrelerinden kaynaklanan tümörlerin azalmasıyla sonuçlandığını düşündürmektedir [69].

PARP2 promotorunun genomik dizilimi, bu genin ekspresyon modelinin, iki enzim için bağımsız regülasyon ve tamamlayıcı rolleri olduğunu düşündüren PARP1'in ifade modelinden farklı olduğunu gösterir. 62 kDa proteini kodlayan PARP2 geni, apoptoz, kromozom uçlarının bakımı ve bağışıklık sisteminde rol alan bir dizi gen içeren bir kromozom 14 bölgesindedir. 14 nolu kromozomun bu kısmı sıklıkla çeşitli germ hücresi tümörleri, adenokarsinom, lösemi ve lenfoma içinde translokasyonlara maruz kalmaktadır; Bununla birlikte, malign transformasyonda PARP2 işlevsel değişikliğinin rolüne dair henüz hiçbir kanıt sağlanmamıştır [59]. Ancak PARP2'deki tek nükleotid polimorfizmlerinin sitotoksik kemoterapiye yanıtı öngörebildiğine dair bazı kanıtlar da vardır [70].

PARP3: PARP3 proteini (60 kDa) karakterize edilen en küçük PARP'tır, çünkü hem DNA bağlanma alanı, hem de otomodifikasyon alanından yoksundur ve DNA kırık zincir sinyalizasyonunda yer almayan kısa PARP1'e benzeyen PARP1'in alternatif bir formudur [60, 65]. PARP3'ün hücrealtı lokalizasyonu ve aktivitesi şimdiye kadar bilinmemektedir. Ancak PAR'ın sentezine katılır ve NHEJ'yi bastırmak için PARP1 ile birlikte çalışır, ayrıca mitotik iğ bütünlüğü ve telomeraz düzenlemesinde de rol oynadığı raporlanmıştır [71].

PARP4 veya VPARP: VPARP, 193 kDa bir proteindir ve vault ribonükleoprotein kompleksinin (kubbe şeklindeki RNA) bir parçası olarak tanımlanmıştır [56]. Memeli vaultları, 13 MDa'lık bir kütleyle sahiptir ve küçük bir ribonükleik asit ve hücresel ulaşımında rol oynayan 100, 193 ve 240 kDa'lık üç proteinden oluşur. Çoklu-ilaca dirençli kanser hücre dizilerinde vault proteinlerinin up-regülasyonu tespit edilmiştir [72]. Vault kompleksi yapısında bir PARP molekülünün tanımlanması, vault konformasyonunun

düzenlenmesinde ADP-ribozilasyonundan görevli olduğunu ve dolayısıyla moleküllerin taşınmasında varsayılan bir rol olduğunu düşündürmektedir.

Tankirazlar: Tankiraz-1 (TANK-1) veya PARP5 ve son zamanlarda tanımlanan tankiraz-2 (TANK-2) veya PARP6, kromozom kararlılığı için özelleşmiş yapılar olan telomer ile ilişkili bir protein olan ADP-ribozilat TRF1 ile etkileşen PARP enzimlerini tanımlar [60]. TRF1'in ADP-ribozilasyonu, telomerazden serbest bırakılmasına neden olduğu için, TANK-1, telomer uzunluğunun pozitif bir regülatörü olarak görev yapar; hücre bölünmesi sırasında kaybedilen telomerik dizileri restore eden uzmanlaşmış bir ters transkriptaz olan telomeraza erişim sağlar [73]. TANK-2 proteininin aminoasit yapısının %85'i TANK-1 ile aynı olmasına rağmen, yakın zamanda tanımlanan bu tankirazın işlevi henüz bilinmemektedir ve işlevi TANK-1'den farklı görünmektedir. Aslında, TANK-1'in aşırı ekspresyonu insan hücrelerinde ilerleyici bir telomer uzamasına yol açarken, TANK-2 aşırı ekspresyonu nekroza giden hücre ölümüne neden olur [74].

1.3.2. Terapötik hedef olarak PARP

Bugüne kadar gelişen PARP inhibitörlerinin büyük çoğunluğu, enzimin nikotinamid bağlanma alanına bağlanır ve NAD⁺'ya göre yarışmalı inhibitörler olarak görev yapar. Spesifik ve güçlü PARP inhibitörlerinin geliştirilmesi, yakın gelecekte klinik uygulamalarının olasılığını daha gerçekçi hale getirmiştir. PARP'in inhibisyonu esasen PARP1 aktivitesini bastırma kapsamı ile etkin olarak kullanılmaktadır ve bir taraftan hücreleri belirli tip DNA hasarlarından korurken, diğer yandan büyük DNA parçalanmasına tepki olarak hücre ölümünü teşvik etmektedir. Özellikle, PARP1 inhibisyonuna dayalı bir tedavinin iki temel amacı olacaktır: (i) Kemoterapi veya radyoterapi ile indüklenen kanser hücrelerindeki genotoksik hasarı arttırmak; (ii) çok sayıda klinik tablo patogenezinde rol oynayarak hücre ölümüne yol açan aşırı PARP1 aktivasyonunu önlemek [75].

1.3.3. PARP aktivasyonu ve nekrozu

Aşırı DNA hasarı, enerji bağımlı süreçlerin şiddetli bir şekilde azalmasına ve nihayetinde oksidatif metabolizmanın bozulmasına bağlı nekroza neden olan, NAD⁺ ve ATP'nin hızla tükenmesine yol açan kitlesel PARP1 aktivasyonuna neden olur. Literatürde

bu temelde, yükselmiş PARP1 aktivasyonu ve ATP tükenmesinden kaynaklanan hücre ölümünün, hücrelerin DNA hasarını onarmasını ve anormal şekilde tamir edilmiş DNA ile hayatta kalmasını ve dolayısıyla malign transformasyon riskini önlediği varsayılarak 'PARP intihar hipotezi' önerilmiştir [74].

Bazı hastalıklar, hücresel hasarlar, verimsiz mitokondriyal metabolizma veya artmış nitrik oksit (NO) üretiminden kaynaklanan oksidatif türlerin oluşumuna neden olur. Reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan DNA hasarı, PARP1'i aktive eder ve aktivasyon belirli bir sınırı aşarsa, hücre ölümü NAD⁺/ATP tükenmesinin bir sonucu olarak ortaya çıkabilir [74].

1.3.4. PARP1 fonksiyonunu inhibe etmek için hedef olarak PARG:

Yakın zamanda, kitlesel bir PARP1 aktivasyonundan ötürü hücre ölümünü önlemek üzere önerilmiş olan bir başka yaklaşım, PARG inhibisyonuna dayanmaktadır. Bu enzim bir ekzo- ve endoglikozidaz olarak işlev görür ve poli (ADPriboz)'un kısa yarılanma ömründen (yaklaşık 1 dakika) sorumludur [50, 75]. PARG inhibisyonu ADP-riboz polimerlerinin devrini yavaşlatır ve böylece NAD tükenmesini sınırlar. Üstelik PARP1, PARilasyonla güçlü bir şekilde inhibe edildiğinden, PARG inhibisyonu PARP1'i inaktif durumda tutacaktır ve bu da polipeptitlerin enzimden uzaklaştırılmasını engelleyecektir. Nitekim son çalışmalar, PARG inhibitörü gallotannin'in oksidatif ve eksitotoksik nöronal hücre ölümünü önlediğini göstermiştir. Bu nedenle, PARG inhibitörlerinin, serebral iskemi ve oksidatif hücre hasarı ile karakterize edilen diğer hastalıklarda hücre ölümünü önlemeye yönelik yeni bir terapötik yöntem sunabileceği öne sürülmüştür [76, 77].

PARP1 inhibisyonu, DNA hasarını tetikleyen antitümör ajanlar tarafından indüklenen hücre ölümünü arttırdığından, PARP1 inhibitörleri ile sistemik tedavi, normal hücrelerdeki DNA onarımını bozabilir ve bu nedenle onları kemoterapi veya radyoterapinin toksik etkilerine daha duyarlı hale getirebilir. Bu nedenle, PARP1 inhibitörleri, kemo veya radyosensitize edici ajanlar olarak kullanıldığında, neoplastik hastalığın bölgesel tedavisinde öncelikle tercih edilecektir [77].

1.4. PARP ve Pankreas Kanseri

Pankreas kanserinde pankreatik tümör oranlarının %90'dan fazlasını içeren en kötü prognoza sahip solid tümör, özellikle pankreatik duktal adenokarsinomdur (PDA). PDA şu anda gelişmiş ülkelerde kanserle ilişkili ölümlerin dördüncü önde gelen nedenidir ve PDA hastalarında son 40 yılda önemli ölçüde iyileşme görülmemesi nedeniyle 2020'ye kadar kansere bağlı ölümün ikinci sırasında olacağı tahmin edilmektedir [78]. Bu nedenle, etkili tedavilere acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Farklı tümörlerin tedavisinde PARP inhibisyonunun başarısı göz önüne alındığında, PDA'da da terapötik stratejiler araştırmak için çeşitli klinik çalışmalar yapılmıştır. Umut verici olmakla birlikte, bağımsız grupların yaptığı çalışmalarda BRCA1 ve BRCA2 eksikliği bulunan hücre hatlarının PARP inhibitörlerine karşı hassasiyet gösterdiği ve ilk kez PARP inhibitörlerinin DNA onarım mekanizmalarının bozukluğunda kanser hücrelerinde tek terapötik ajan olarak potansiyel kullanımını desteklediğini göstermiş ve bu araştırmalar klinik çalışmaları teşvik etmiştir. PARP ve özellikle PARP1, tümörlerde sıklıkla aşırı eksprese edilir, burada artan enzimatik aktivitesi, kanser hücrelerini DNA hasarına ve genetik hareketliliğe karşı koruyabilir [79]. Bu proteinlerin kansere dahil olması, yüksek PARP düzeylerinin farklı tümör tiplerinde zayıf prognozla ilişkili olması gerçeği ile öne çıkar [79, 80]. PARP aktivitesinin inhibisyonu, ya DNA'ya zarar verici ajanlarla kombinasyon halinde ya da sentetik öldürücü elde etmek için BRCA1/2 gibi DNA onarım yollarında spesifik mutasyonları barındıran tümörlerde tek bir tedavi olarak ümit vaat eden bir kanser terapisi olarak ortaya çıkmıştır [81]. Bununla birlikte, PARP1 ekspresyonu ve PDA'da tümör prognozu ve/veya progresyonu ile korelasyon hala net değildir. Bir yandan ve diğer tümörlerin aksine, yüksek nükleer PARP1 ekspresyon seviyeleri, PDA hastalarında daha uzun sağkalım ile koreledir [82]. Öte yandan, insanlardan ve farelerden alınan normal, preneoplastik ve tümör örneklerini kullanan son çalışmalar, PARP1 ekspresyonunun asiner (normal ve kanserli) hücrelerle sınırlı olduğunu, duktal hücrelerde saptanamayacağı hipotezini desteklemektedir [83]. Gerçekte, beklendiği gibi, bir PARP1 genetik delesyonu altında pankreatik kanser geliştirilen transgenik farelerde önemli bir sağkalım olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, duktal kanser hücrelerinde PARP1 ekspresyonunun, radyasyon veya kemoterapi tedavilerinden sonra PDA hastalarında up-regüle edilip edilemeyeceğini araştırmak için

daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bilgi, PARP inhibitörlerinin DNA'ya zarar veren ajanlar ile kombine bir tedavide kullanılıp kullanılmayacağını anlamak açısından önemlidir. Son çalışmalar, PARP inhibitörlerinin birkaç insan pankreatik hücre dizisinde radyoterapiye ve/veya kemoterapiye karşı duyarlılığı arttırabildiğini ve hayvan modellerini kullanan bazı *in vivo* çalışmaların aynı doğrultuda sonuçlar gösterdiğini göstermiştir [83-86]. Bununla birlikte, bu sonuçların kliniğe aktarılmasından önce, daha ileri klinik veriler ve insan numunelerinden elde edilen bilgiler gereklidir. Dikkat çekici bir şekilde, radyasyon veya DNA metile edici ajanların sitotoksik etkilerini arttırmak için PARP inhibitörlerinin varsayımsal kullanımının ötesinde, son zamanlardaki klinik deneyler, BRCA1 veya BRCA2 genlerindeki mutasyonlara sahip PDA hastalarının, PARP'ı inhibe eden monoterapiden yararlanabileceğini göstermiştir [87-89]. Bir Faz 1b çalışmasında, cisplatin kemoterapisi ve bir PARP1 inhibitörü ile BRCA mutasyonları olan PDA hastalarının %56'sı için sonuç başarıyla, yabancı tip BRCA tümörü olan hastalarda hiçbir yanıt gözlenmemiştir [90]. Aynı şekilde gemsitabine dirençli bir PDA hastasının DNA'ya zarar veren ajanlara cevap veren klinik sonuçları mevcuttur. Bu hastadan alınan kanser hücrelerinin global genomik sekanslama çalışmalarının PalB2 proteinini kodlayan genin biallelik inaktivasyonunu ortaya çıkardığı, DNA'nın çift zincir hasarının onarımında kritik olan BRCA1 ve BRCA2 etkileşimlerini bozacağı bulunmuştur. PALB2 geninin de etkisizleştirilmesinin pankreas kanserinde DNA hasarına yanıtın bir belirleyicisi ve kanser tedavisini kişiselleştirmek için iyi bir hedef olduğu düşünülmüştür [91]. Bu veriler, BRCA yolağından elde edilen DNA onarım genlerinin inaktivasyonunun, tümörlerin DNA'ya zarar veren ajanlara ve PARP inhibitörlerine karşı duyarlı olduğunu doğrulamaktadır. Ancak, BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonlar, ailesel PDA'daki en yaygın mutasyonlardır ve PARP inhibitörlerinin umut verici bir tedavi olarak kullanılmasını desteklemektedir [92]. Ancak, ailesel PDA, pankreas kanseri vakalarının %10'undan azından sorumludur ve çoğu PDA vakası bilinen kalıtsal yatkınlık olmaksızın sporadiktir [93]. Bununla birlikte, genomik çağda, PARP inhibisyonundan yararlanabilecek BRCA veya PALB2 gibi mutasyonları barındıran PDA hastalarını tanımlamak için tarama programları geliştirilmeye değerdir [94, 95]. Ayrıca, diğer tümörlerden elde edilen son veriler, BRCA eksikliğinin yanı sıra, diğer DNA hasar onarım yollarındaki kusurların, hücreleri PARP inhibisyonuna son derece duyarlı hale getirdiğini belirlemiştir [96-98]. Dikkat çekici bir şekilde, Waddell ve

arkadaşları yakın zamanda 100 PDA'lık tam genom dizileme ve kopya sayısı değişim analizleri gerçekleştirmiş ve sadece BRCA genlerini değil, aynı zamanda PALB2 ve FANCM ve XRCC4/6 gibi diğer Fanconi anemi genlerini içeren DNA hasar onarım eksikliğinin mutasyonal bir verisini de belirlemiştir [96].

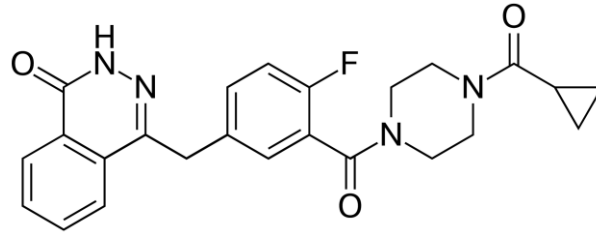
On yıl içinde BRCA mutasyonuna uğramış kanser hücrelerinde letalite görülmesinden bu yana, beş PARP inhibitörü geç evre klinik gelişimine ulaşmıştır. Bunlar Veliparib, Niraparib, Talazoparib, ilk onay alan geniş yayımlı oral PARP inhibitörü ünvanını taşıyan olaparib ve ilk klinik denemenin yapıldığı rucaparibdir.

1.5. Olaparib

Olaparib, {4-[(3-[4-(cyclopropylcarbonyl)piperazine-1-carbonyl]-4-fluorophenyl)methyl]-2H-phthalazin-1-one; KU-0059436; AZD2281; Lynparza; moleküler ağırlık: 434,46 g/mol; $C_{24}H_{23}FN_4O_3$ }, platin temelli kemoterapiye karşılık olarak, meme, yumurtalık (follop tüpleri veya peritoneal), prostat kanserlerinden yüksek derecede sorumlu olan BRCA1 ve BRCA2 genlerinin birinde veya ikisinde birden kalıtsal mutasyonla oluşmuş (germline ve/veya somatik) tümörlere negatif veya durdurucu yönde etkinlik gösteren bir oral PARP inhibitörüdür [99]. Germline BRCA eksikliği olan yumurtalık kanserinin tedavisinde FDA onayı alan ilk PARP inhibitörüdür.

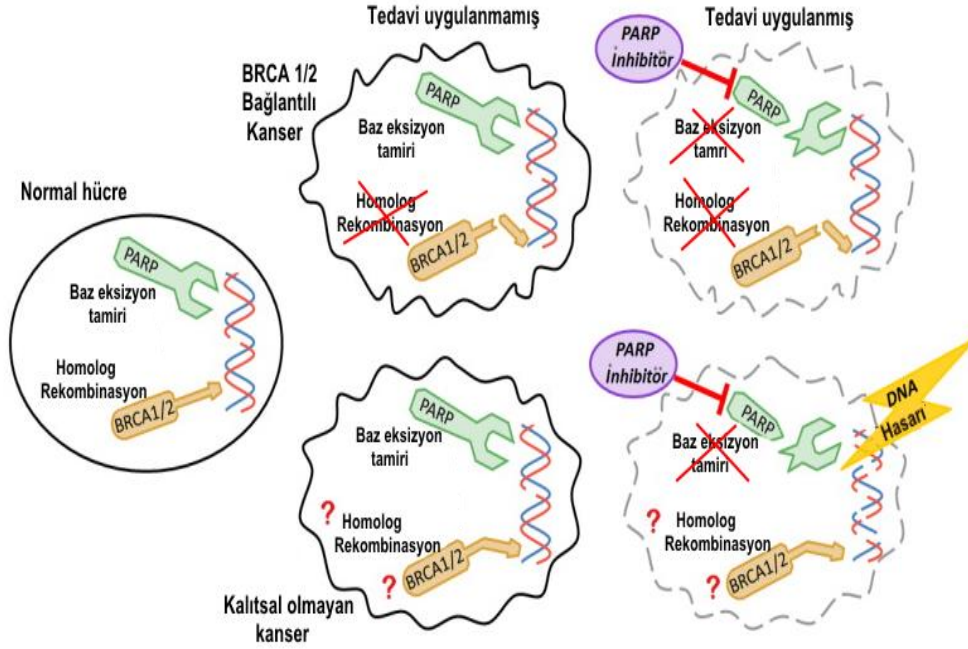
Hastalarda 8 haftadan sonra olmamak şartıyla platin içeren kemoterapötiklere ilave olarak tedaviye olaparib ile devam edilmesi durumunda yüksek etkinlik görülmüştür.

Olaparib (Şekil 1.1), hücre bölünmesi sırasında hücrelerdeki hasar görmüş DNA'yı (hem normal hem de kanser hücrelerinde) onarmaya yardım eden insan poli (ADP riboz) polimeraz (PARP) enzimlerinin etkisini bloke eder. Normal hücrelerde, BRCA1 ve BRCA2 proteinlerini gerektiren DNA'nın onarımı için alternatif bir mekanizma vardır. Bu alternatif mekanizma, BRCA1 veya BRCA2 genlerinde mutasyon bulunan kanser hücrelerinde düzgün çalışmaz. Bu nedenle, PARP proteinleri bloke edildiğinde, kanser hücrelerindeki hasar görmüş DNA'lar onarılamaz ve sonuç olarak kanser hücreleri ölür [100].



Şekil 1.1. Olaparibin kimyasal formülü [99]

Bu enzim, baz-eksizyon onarımı ile, tek sarmallı DNA kırılmalarını birleştirmeye yardımcı olur, eğer kırılmalar onarılamazsa, replikasyon çatalıyla karşılaştığında çift sarmal kırılırlar. Çift iplikli kopmalar genellikle BRCA1 ve BRCA2'nin önemli rol oynadığı homolog rekombinasyon (HR) ile onarılırlar [100, 101]. BRCA1 veya BRCA2'deki zararlı mutasyonların taşıyıcıları, onları kansere yatkın hale getirir. PARP inhibe edildiğinde, BRCA1/2 eksikliği olan hücreler artık çift sarmallı DNA kırıklarını etkin bir şekilde onaramazlar ve DNA lezyonları, kromatid kırıkları ve nihai apoptoz birikimine neden olurlar. Böylece, BRCA1/2 mutasyonları olan tümör hücreleri potansiyel olarak PARP inhibitörlerine duyarlı hale gelmiş olur. Baz-eksizyon onarımını inhibe etmenin yanı sıra, PARP inhibitörlerinin, tek sarmallı DNA kırılmalarında PARP'ı yakalamak suretiyle daha fazla sitotoksik aktivite sergilediği de bildirmiştir [102]. PARP inhibitörlerinin mekanizması, çoğu kemoterapi ile ilişkili toksisiteyi önlerken seçici bir şekilde kanser hücrelerini öldürme imkanı sunar. PARP inhibitörü olaparibin erken faz I çalışmasında BRCA mutasyonları taşıyıcılarında antitümör aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [103]. O zamandan beri olaparib, BRCA mutant meme ve yumurtalık kanserlerine karşı ya klinik yanıtlar ya da farmakodinamik biyobelirteçler yoluyla klinik etkinlik göstermiştir [104-112]. Ayrıca akciğer, rahim, pankreas, mezotelyoma, böbrek ve prostat kanseri gibi daha az yaygın BRCA ile ilişkili kanserlerde de etkinlik göstermiştir. Olaparib ayrıca kamptotesin ve radyasyona karşı tümör duyarlılığını arttırmak için kullanılmıştır. Birkaç klinik çalışma göstermiştir ki, olaparib, monoterapötik ajan tedavisi olarak veya dakarbazin, topotekan, bevacizumab veya sisplatin ve gemsitabin gibi ilaçlarla kombine halde, plazmada farmakokinetik analizler için kantitatif olarak ölçülmüştür [103, 112-115]. Şekil 1.2'de PARP inhibitörlerine ait çalışma mekanizması gösterilmiştir.



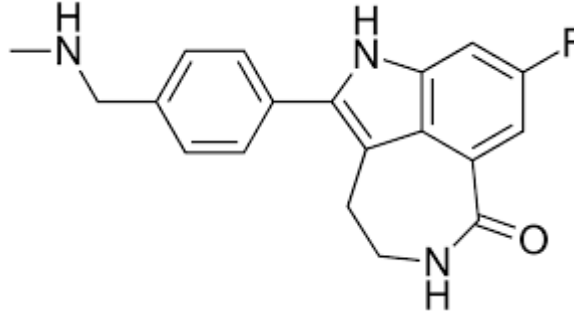
Şekil 1.2. PARP inhibitörü çalışma mekanizması [111]

Olaparibin mutajenik bir potansiyel göstermediği, ancak *in vitro* memeli hücrelerinde kromozom yapısını değiştirebildiği gözlemlenmiştir (klastojenik). Sıçanlara oral yoldan verildiğinde, olaparibin kemik iliğinde mikronükleusu indüklediği gözlemlenmiştir. Bu klastojenite, olaparibin bilinen farmakolojisi ile tutarlıdır ve insanda genotoksisite potansiyeline işaret etmektedir [116].

1.6. Rucaparib

Rucaparib {AG-14699, PF01367338, $C_{19}H_{18}FN_3O$, 8-Fluoro-2-(4-methylaminomethyl-phenyl)-1,3,4,5-tetrahydro-azepino[5,4,3-cd]indol-6-one phosphate, RUBRACA}, DNA tek iplikçik hasarını baz eksizyon-onarım yolu (BER) ile engelleyen bir PARP inhibitörüdür. Moleküler ağırlığı 421,36 g/mol ve PARP1 Ki 1,4 nM'dır. Diğer birçok PARP'ın aksine kendi yapısına yerleştirilmiş bir indol kromoforuna sahiptir. Bu kromofor, peptitleri ve proteinleri incelemek için kullanılan doğal bir amino asid olan triptofan ile benzerdir. Rucaparib (Şekil 1.3), BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu aracılığıyla ve BRCA mutasyonuna uğramamış HR tamirinde (DNA onarım genlerindeki defektler) defektif olan tümör hücrelerinde selektif sitotoksisteyi uyarır. Klinik denemelere giren ilk PARP inhibitörüdür. PARP-DNA komplekslerinin tutuklanmasını değerlendirmeyi amaçlayan çalışmalardan

elde edilen veriler de dahil olmak üzere, FDA onaylı Olaparibe benzer şekilde BRCA mutasyonlarına uğramış kanser tedavisindeki klinik çalışmalarda rucaparibin de antikanser etkisi olduğu gözlemlenmiştir [117, 119].



Şekil 1.3. Rucaparibin kimyasal formülü [120]

Yeni ilaç uygulamaları içinde değerlendirilen *in vitro* farmakoloji çalışma raporlarından elde edilen veriler, rucaparib kaynaklı hücre ölümünün apoptotik belirteçlerin upregülasyonu, PAR oluşumunun azalması (PARP inhibisyonunun farmakodinamik bir belirteci) ve artmış DNA hasarı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Doza bağlı anti-tümör aktivitesinin, plazma ve tümördeki rucaparib seviyeleri ve tümör örneklerinde azalmış PAR seviyeleri ile paralel olduğu gözlemlenmiştir [121].

1.7. *N*-(4-asetilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit ve *N'*-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il)asetohidrazit Türevleri

Amid, hidrazon gibi antikanser etkinliği olduğu gözlenen farmakofor grupları taşıyan, farklı gruplarda moleküller içeren yeni nesil sentezler yapılmakta ve özellikleri araştırılmaktadır. Piperazin halka, amid yapısı ve hidrazon yapısı ile ilgili yeni bileşiklerin potansiyel antikanser özellikler gösterdiği yapılan pek çok farklı çalışmadan elde edilmiştir. Ancak bu sentezlenen türevlerin *in vitro* olarak moleküler temelleri hücreler üzerinde farklılık göstermektedir ve daha yeni yeni pek çok ilgi alanı ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada sentezlenen *N*-(4-asetilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevleri ve *N'*-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il)asetohidrazit türevlerinin anti kanser etkinliklerinin varlığı gösterilmiş, bu etkinliğin PARP ile ilişkisi araştırılmıştır.

PARP inhibitörleri ile benzerlik [122-124] gösteren amid grubu içeren *N*-(4-Asetilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevleri şeklinde sentezlenen 6 farklı maddenin içeriğiyle

benzer grupların daha önce yapılmış anti kanser etkinlikleri araştırıldığında, imidazol [125, 126], tetrazol [127, 128], tiyazol [129, 130], tiyadizol [131, 132] ve triazol [133, 134] bağlı grupların farklı kanser hücre tipleri üzerinde etkileri denenmiş ve antikanser özellikleri olduğu gözlenmiştir.

PARP inhibitörleri ile halkasal yapıda benzerlik gösteren *Hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il)asetohidrazit* türevleri şeklinde sentezlenen 2 farklı maddenin içeriğiyle, benzer piperazin halkasının anti kanser etkinlikleri değerlendirildiğinde kanserli hücrelerin proliferasyonunu inhibe edici etkinlikleri olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca PARP inhibitörlerine ait hidrazit gruplarının benzerliği dikkat çekmiş ve bu yapıların nitrik oksit salınımını artırarak PARP inhibisyonu sağladığı belirtilmiştir [120, 135, 136].

2. GEREÇLER

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

- 10, 200, 1000, 5000 μ L'lik mikropipet uçları (Axygen, İngiltere),
- 15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya),
- 25 ve 75 cm²'lik hücre kültür flaskları (T25 ve T75 Flasklar; Greiner bio-one, Amerika)
- 2 mL'lik Ependorf tüp (Greiner bio-one, Amerika),
- 5 ve 10 mL'lik steril enjektör (Hayat, Türkiye),
- 5-10 ve 25 mL'lik tek kullanımlık serolojik pipet (Costar, Sigma-Aldrich, Almanya),
- 6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası (TPP, İsviçre),
- Lamel (Isolab, Almanya),
- Filtre (Sartorius stedim, Almanya);
- Karyotüp (2 mL) (Greiner bio-one, Amerika),
- Parafilm (Pechiney, Fransa),
- pH indükatör kağıdı (Macherey- Nagel, Almanya)
- Cedex smart Slide (Roche, İsviçre),
- xCELLigence E-plate 96 (Roche, İsviçre)
- hTERT-HPNE hücre hattı (ATCC, Amerika)
- Capan-1 hücre hattı (ATCC, Amerika)
- PANC-1 hücre hattı (ATCC, Amerika)
- MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide %98, Alfa Aesar, Almanya)
- Fosfat tamponu (PBS, Sigma-Aldrich, Almanya)
- Dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, Almanya),
- Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma-Aldrich, Almanya),
- Olaparib (CAYMAN Chemical, Amerika)
- Penisilin-streptomisin Solüsyonu (10.000 U/mL Penicillin / 10 mg/mL Streptomycin, PAN, Almanya)
- İnsan epidermal büyüme fakötrü (rhEGF, Promega, Amerika)

- Puromisin (Wisent Bio Products, Kanada)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich, Almanya);
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, Almanya);
- M3 Base Medium (Incell Corporation, Amerika)
- Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Sigma-Aldrich, Almanya);
- Sodyum pirüvat (Biochrom AG, Almanya),
- Tripan mavisi (Biological Industries, İsrail)
- Tripsin-EDTA Solüsyonu (Biochrom, Almanya),
- Cedex, Akıllı lam, (Roche Innovatis, İsviçre)
- MitoTracker Red CMX-ROS (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Amerika)
- DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride; Thermo Fisher Scientific, Amerika)
- Canlı Hücre Görüntüleme Solüsyonu (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Amerika)
- Annexin V-FITC/PI Apoptoz Tayin Kiti 1 (BD Biosciences, Amerika)
- PE Active Caspase-3 Tayin Kiti (BD Biosciences, Amerika)
- Cycle Test Plus DNA Analiz Kiti (BD Biosciences, Amerika)
- MitoScreen (JC-1) Membran Potansiyeli Tayin Kit (BD Biosciences, Amerika)
- Cleaved PARP [214/215] ELISA Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Amerika)
- 4'-Aminoasetofenon (Sigma-Aldrich)
- Aseton (Merck, Almanya)
- 2-Merkapto-1-metilimidazol (Merck, Almanya)
- 5-Merkapto-1-metiltetrazol (Sigma-Aldrich, Almanya)
- 3-Merkapto-4-metil-1,2,4-triazol(Sigma-Aldrich, Almanya)
- 2-Merkapto-2-tiyazolin (Sigma-Aldrich, Almanya)
- 2-Merkaptobenzotiyazol (Sigma-Aldrich, Almanya)
- 2,3-Diklorobenzaldehit (Merck)
- Etanol (Merck, Almanya)
- Etilasetat (Sigma-Aldrich, Almanya)

- 3-Hidroksi-4-metoksibenzaldehit (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Kloroasetilklorür (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Kloroform (Merck, Almanya)
- *p*-Toluensülfonil klorür (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Hidrazin hidrat (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Etil piperazinoasetat (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Metanol (Merck, Almanya)
- Potasyum karbonat (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Petrol eteri (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Sodyum bikarbonat (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Trietilamin (Sigma-Aldrich, Almanya)

2.2. Kullanılan Cihazlar

- CEDEX XS Analiz Sistemi (Roche Innovatis AG, İsviçre)
- Inverted mikroskop (Olympus, Japonya),
- Mulltimod Mikroplaka Okuyucu HTX Synergy AFL (ELISA Reader, BioTek, Amerika)
- Mulltimod Mikroplaka Okuyucu Görüntüleme Sistemi (Cytation 5, BioTek, Amerika)
- xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi MP İstasyonu (ACEA, Biosciences Inc. Amerika)
- Akış sitometri cihazı (BD, FACS Aria I Cell Sorter, Amerika)
- Stratagene Mx3005P RT PCR Isıl Döngü Cihazı (Agilent Technologies, Amerika)
- Laminar Flow kabin (Mars Scanlaf, Labogene ApS, Danimarka),
- HeraSafe KS Moleküler Biyoloji Laminar Kabin (Thermo, Kanada)
- Masaüstü soğutmalı santrifüj (Hettich Lab Teknoloji, Almanya),
- Derin dondurucu buzdolabı (Nuaire, Amerika)
- Steril CO₂ inkübatörü (Binder, Almanya)
- Sterilizatör (Heraeus, Almanya)
- Su banyosu (Nüve, Türkiye)

- Sıvı azot tankı (Taylor Wharton, Amerika)
- Hassas terazi (Mettler Toledo, Amerika),
- Otoklav (Eryiğit A.Ş. Türkiye),
- Orbital çalkalayıcı (Heidolph, Almanya)
- Şarjlı pipetör (Starlab, Almanya),
- Farklı hacimlerde otomatik mikropipetler (Thermo, FinnPet, Kanada),
- Vorteks (Heidolph, Almanya)
- Distile Su Cihazı (Sartorius Stedim, Almanya)
- Ultrasonik Su Banyosu (BD, ProbeTecET, Amerika)
- Mr. Frosty (Nalgene, Amerika)
- Erime Derecesi Cihazı: MP90 digital melting point apparatus (Mettler Toledo, Columbus, Amerika)
- ^1H -NMR: Bruker 300 MHz FT-NMR Spektrometre (Bruker Bioscience, Billerica, MA, Amerika)
- ^{13}C -NMR: Bruker 75 MHz FT-NMR Spektrometre (Bruker Bioscience, Billerica, MA, Amerika)
- Kütle Spektrometresi (MS): Shimadzu LCMS-IT-TOF system (Shimadzu, Tokyo, Japan).

3. YÖNTEMLER

3.1. Maddelerin Sentez Yöntemleri

3.1.1. *N*-(4-asetilfenil)-2-(arilüyo)asetamit türevlerinin sentezi (Yöntem A)

4'-Aminoasetofenon (0,05 mol) ve trietilamin (0,06 mol) tetrahidrofuran (THF) içerisinde çözüldü, tetrahidrofuran içerisinde seyreltilmiş kloroasetil klorür (0,06 mol) 0-5°C'de damla damla bu karışıma ilave edildi. Reaksiyon bitimi ince tabaka kromatografisi ile kontrol edildi. Çözücüsü uçurulan ham ürün suyla yıkanarak alındı, kuruduktan sonra etanolden kristallendirildi. Elde edilen 2-kloro *N*-(4-asetilfenil)asetamit (0,005 mol) uygun 2-merkaptoaril türevleriyle (0,005 mol) potasyum karbonat varlığında aseton içerisinde 6 saat karıştırıldı. Reaksiyonun bitiminde çözücüsü uçurulan madde suyla yıkandı, daha sonra etanolden kristallendirildi.

3.1.2. *N'*-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il)asetohidrazit türevlerinin sentezi (Yöntem B)

Etil piperazinoasetat (0,05 mol) ve trietilamin (0,06 mol) THF içerisine alınır, THF ile seyreltilmiş olan *p*-toluensülfonil klorür (0,06 mol) 0-5°C'de damla damla karışıma eklenir. Reaksiyon bittikten sonra çözücü uçurulur, suyla yıkanır, kristallendirilir. Daha sonra elde edilen etil 4-(4-toluilsülfonil) piperazinoasetat (0,04 mol) etanol içerisinde çözülür, hidrazin hidrat (0,08 mol) ile kaynatılır. Bir gece buzdolabında bekletilir, çöken ürün süzülüp alınır. Bu hidrazinlenmiş ara ürün ona eşdeğer oranda benzaldehit türevleriyle etanolde reaksiyona sokulur, reaksiyon bitiminde soğukta bekletilir, çöken ürün süzülerek alınır.

Elde edilen bileşiklerin erime derecesi belirlenmiş, yapıları da ¹H-NMR, ¹³C-NMR ile spektroskopik teknikler kullanılarak aydınlatılmıştır.

3.2. Hücre Kültürü Analizleri

3.2.1. Deneylerde kullanılan pankreatik hücreler

Tez kapsamında çalışılan 3 farklı hücre: insan sağlıklı pankreas hücresi (hTERT-HPNE) ve insan pankreas kanser hücreleri (PANC-1 ve Capan-1) üzerinde, sentez maddeleri ile PARP inhibitörlerinin (olaparib ve rucaparib) antikanser etkileri araştırılmış ve sonuçlar kontrol grubu (%0,1'lik DMSO kontrol grubu) ile karşılaştırılmıştır.

3.2.1.1. *Capan-1 hücre hattı*

Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection: ATCC) hücre bankasından HTB-49 koduyla temin edilmiş olan Capan-1 hücreleri, 40 yaşında Kafkasya kökenli bir erkeğin karaciğere metastaz yapan pankreas hücrelerinden izole edilmiştir. Epitelyal morfoloji gösteren adenokarsinom hücreleri (kanseroz pankreatik kanal hücreleri), kültür ortamında adhere olarak çoğalmaktadır. Pankreas kanalı uyumlu adenokarsinoma oluşturur. BRCA2 allelinde tek baz çifti delesyona sahiptir. Ek olarak K-RAS'da (G12V) bir onkojenik ve TP53'te inaktive edici mutasyonlara sahiptir [137].

Kültür besiyeri olarak Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) kullanılmaktadır. 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek, bu hücre tipine özgü hücrelerin ürettiği gastrik tip yoğun müsin kirliliği de giderilmiştir. Stok solüsyon ise kültür ortamına %5 DMSO ilavesi ile hazırlanmıştır.

3.2.1.2. *PANC-1 hücre hattı*

ATCC hücre bankasından CRL-1469 koduyla temin edilmiş olan PANC-1 hücreleri, 56 yaşında Kafkasya kökenli bir erkeğin pankreas kanalından izole edilmiştir. Epitelyal morfoloji gösteren epitelioid karsinom hücreleri (pankreatik kanal hücreleri), kültür ortamında adhere olarak çoğalmaktadır. K-RAS (G12V) onkojenik mutasyonuna ve TP53 inaktivasyon mutasyonuna sahiptir[138].

Kültür besiyeri olarak Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM) kullanılmaktadır. 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek yenilenmiştir. Stoklama solüsyonu ise kültür ortamına %5 DMSO ilavesi ile hazırlanmıştır.

3.2.1.3. *hTERT-HPNE hücre hattı*

ATCC hücre bankasından CRL-4023 koduyla temin edilmiş olan hTERT-HPNE hücreleri, 52 yaşında bir erkeğin pankreas kanalından, asinar-duktal metaplazi sırasında oluşan hücrelerden izole edilmiştir. Epitelyal benzeri morfoloji gösteren normal ölümsüzleştirilmiş hücreler (pankreatik kanal hücreleri), kültür ortamında adhere olarak çoğalmaktadır [139].

hTERT-HPNE hücre hattı, insan pankreatik kanalından geliştirilmiş olup, telomeraz ters transkriptaz (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) genini içeren bir retroviral ekspresyon vektörünün (pBABEpuro) transdüksiyonu ile oluşturulmuştur. Enfekte olmuş hücreler telomeraz için pozitif hale gelmiş, telomer kromozom kısalmasını engelleyerek yaşlanma durdurulmuştur, 150 bölünmenin ardından bile bu hücrelerin hala proliferde olduğu gözlemlenmiştir [140].

Kültür besiyeri olarak Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM) ve Base Medium kullanılmaktadır. 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek yenilenmiştir. Stoklama solüsyonu ise %95 fetal sığır serumu (FBS) ve %5 DMSO ilavesi ile hazırlanmıştır.

3.2.2. Malzeme sterilizasyonu

Deneylerde tek kullanımlık steril malzemeler kullanılmış, bunların haricinde kontaminasyonun engellenmesi için kapak kısımları alüminyum folyo ile sarılmış halde, cam ve metal malzemelerin sterilizasyonu için kuru hava sterilizatöründe 180°C'de 2 saat, sıvı solüsyonlar ve pipet uçları için 121°C, 1,5 atmosfer basıncında otoklavda 20 dakika arındırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Otoklavlanamayacak sıvılar için 0,22 mikron por çaplı tek kullanımlık filtreler kullanılmıştır.

3.2.3. Hücrelerin besiyerlerinin hazırlanması

hTERT-HPNE hücreleri için Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), karışım besiyeri olarak modifiye edilmiş ve karışımı oluşturan maddeler şu şekilde oranlanmıştır: Glukozsuz DMEM (%75), 2 mM L-glutamin, 1,5 g/L sodyum bikarbonat, M3 Base medium (%25). Besiyerinin tamamlanması için 10 ng/mL insan rekombinant

epidermal büyüme faktörü (rhEGF), 5,5 mM D-glukoz (1 g/L), 750 ng/mL puromisin, fetal bovin serum (FBS, %5) içerisinde nazıkçe karıştırılarak besiyerine ilave edilmiştir.

PANC-1 hücreleri için %90 DMEM, %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin antibiyotik içeren besiyeri hazırlanmıştır.

Capan-1 hücreleri için %80 IMDM, %20 FBS, %1 penisilin-streptomisin antibiyotik içeren besiyeri hazırlanmıştır.

3.2.4. Stok aktivasyonu

Önceden stoklanan hücreler derin dondurucu (-86°C) veya sıvı azot tankından (-196°C) çıkartılarak en kısa sürede, 37°C’de erimesi sağlandıktan sonra besiyeri içine alınmış, 1200 rpm’de 10 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra hücrelerin sayıları kontrol edilmiştir. Ardından hücre sayısına göre üreyebilmeleri için T25 flasklarda kültüre edilmişlerdir.

3.2.5. Hücrelerin pasajlanması ve stoklanması

Hücrelerin uygun yoğunluğa ulaşmaya kadar düzenli aralıklarla aseptik koşullarda, besiyerleri değiştirilerek flasklarda gelişimi (flask tabanına yapışarak çoğalması) sağlanmıştır. Hücrelerin azami olarak %80/flask doluluk oranına ulaşması durumunda pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Pasajlama: Hücrelerin kullandıkları besiyeri flasklardan uzaklaştırıldıktan sonra hücre flaskı steril Ca^{2+} - Mg^{2+} içermeyen fosfat tamponu (PBS) ile birkaç kez yıkanmış ve flask boyutuna uygun olacak şekilde %0,25 (w/v) Trypsin / 0,53 mM Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) solüsyonu ile 3-5 dk 37°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda Trypsin-EDTA solüsyonunu nötrlemek üzere kalkan hücreler üzerine uygun besiyeri ilave edilerek ortam seyreltilmiş ve santrifüj tüpüne alınmıştır. 1200 rpm’de 5 dk santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılmış, yeni besiyeri içinde hücreler süspanse edilmiş ve uygun miktarda flasklara bölünmüştür.

Stoklama: Pasajlama işleminden sonra hücreler uygun yoğunluk oranında sayılarak 2 mL’lik stok tüplerine uygun dondurma besiyerleri içinde aktarılmışlardır. Stok tüpleri Mr.

Frosty dondurucusu kullanılarak 1 gece -86°C de bekletilmiş ve daha sonra sıvı azot buhar fazında stoğa kaldırılmıştır.

Hücre Sayımı: Hücrelerin canlılıkları ve sayımları otomatik hücre sayım cihazında CEDEX XS Software 1.0.3 programı kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için santrifüj işlemi sonrasında hücre pelleti 1 mL besiyeri içinde homojen olarak seyreltildikten sonra 10 µL tripan mavisi solüsyonu ile 10 µL hücre süspansiyonu 10 sn homojen bir şekilde karıştırılmış sonrasında CEDEX lamına bu karışımdan 10 µL aktarılmıştır. Cihaz protokollerine göre sayım işlemi gerçekleştirildikten sonra, seyreltme oranları göz önüne alınarak hesaplamalar yapılmış ve hücreler buna göre ekilerek deneysel yöntemler gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. MTT Yöntemi

İlk kez Mosmann tarafından 1983 yılında hücre proliferasyonu yöntemi olarak bulunmuş, aynı yıllarda kanser hücre hatlarında kemoterapötik ilaçların etkisini araştırmak amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Proliferasyon ve sitotoksiteyi kantitatif olarak ölçen yöntemde, canlı ve apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl Blue] solüsyonda bulunan tetrazolium halkası, hücrelerdeki dehidrojenaz enzimlerince reaksiyona girip, sadece metabolik hücreler tarafından indirgenip parçalanarak suda çözünmeyen formazan kristallerinin oluşmasına neden olur. Reaksiyon sonucu oluşan rengin yoğunluğu mitokondriyal aktiviteyle doğrudan ilişkilidir. MTT boyasının sarı rengi, bu aktivite gözlemlendiğinde çözücü ilavesi ile mora dönüşmektedir. Çözücü ilavesi sonrasında formazan kristallerinin yoğunluğuna göre oluşan renk skalasına bağlı ölçüm yapılmaktadır. Ölü hücrelerin varlığında formazan kristali oluşmamaktadır [141].

Yöntemin uygulanışı: Hücreler, düz tabanlı, 96 kuyucuklu, steril, kapaklı, tek kullanımlık mikrolakalara, 200 µL uygun besiyeri içerisinde kuyu başına 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Plakaya ekildikten sonra hücreler 24 saat inkübasyona bırakılarak plaka tabanına yapışmaları sağlanmıştır. 24 saatin sonunda 100 µL besiyeri çekilerek yerine 100 µL içerisinde hazırlanan farklı konsantrasyonda maddeler ilave edilmiştir (Hücrelere uygulanacak konsantrasyonlar, 1:1 seyreltme faktörü göz önüne alınarak, 2 kat yoğun

hazırlanıp uygulanmıştır). Madde uygulamasını takiben 24 saat inkübasyon süresinden sonra her bir kuyuya ışıktan korunarak 20 µL stok MTT çözeltisinden (5 mg/mL PBS içinde çözülüp uygulama öncesi filtrelenen MTT solüsyonu) ilave edilerek 3 saat inkübasyona devam edilmiştir. Daha sonra hücrelerin besiyerleri tamamen çekilerek formazan kristallerinin çözünebilmesi için 100 µL DMSO ilave edilmiş, 15 dk karanlıkta çalkalandıktan sonra mikropłaka okuyucuda 540-570 nm dalga boyu ve 650 nm referans dalga boyunda oluşan renk değişimlerinin optik yoğunlukları (absorbansları) okutulmuştur.

Veriler Microsoft Office Excel'de hesaplanarak oluşturulmuştur. Bunun için öncelikle kör kuyusu değeri optik okumalardan çıkartılmıştır. Optik yoğunlukların ortalamaları ve % canlılık değeri Excel formül hesaplarından yapılmış ve sonuçlar ele alınmıştır. Kontrol grubunun canlılığı %100 kabul edilerek diğer tüm canlılık değeri bunun üzerinden hesaplanmıştır.

24 saatlik analizler sonucunda, numunelere ait konsantrasyon aralıkları belirlenmiştir.

Deneylerde 3 farklı kontrol grubu kullanılmıştır. Besiyeri güvenilirliği ve kör okuması için de kontrol grupları kullanılmış ancak deneylerde kontrol olarak çözücü kontrol grubu [%90 uygun besiyeri +%10 FBS + %1-2 Pen-Strep (%0,1 DMSO içeren besiyeri) + Hücre] üzerinden hesaplamalar gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel analizler Graphpad Prism 7 yazılım programında hesaplanmıştır. Analizlerde hücre kontrol grubunun canlılığı %100 kabul edilmiş ve bu değeri üzerinden diğer konsantrasyon kuyucuklarının % canlılık verileri hesaplanmıştır (seriler n=8 tekrarlı çalışılmıştır). Ortalama $\pm$ standart sapma (St.S.) değeri olarak veriler, bağımsız gruplar tek faktör için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve anlamlı değeri için izleme testi (post-hoc), Tukey t test ile hesaplanmıştır.

Ortalama aralarındaki farka göre şu şekillerde anlamlandırılmıştır ($p<0,05$ * anlamlı, $p<0,01$ ** önemli derecede anlamlı, $p<0,001$ *** çok önemli derecede anlamlı, $p>0,05$ anlamlı değil).

3.2.7. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile hücre empedansının ölçülmesi

xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (Real Time Cell Analyzer MP, ACEA Biosciences Inc.; xCELLigence RTCA MP cihazı), elektriksel impedans teknolojisi

ile her bir kuyucuk içindeki iyonik konsantrasyon ve hücrelerin elektronik plaka tabanındaki elektrodlarla etkileşimine dayanarak ölçüm yapan bir hücre bazlı gerçek zamanlı analiz özelliğine sahip mikroelettronik biyosensör sistemidir. Hücre canlılığı, hücre sayısı, hücre morfolojisi ve yapışma derecesinin tümü elektrod empedansını etkiler. Hücre proliferasyonunu ve morfoloji değişimini, işaretçi kullanmadan saptama, fizyolojik temas gerektirmeksizin gerçek zamanlı izleme ile otomatik ölçümler yapabilme, yüksek duyarlılık ve doğrulukta görüntüleme için kullanılan bir sistemdir. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi, elektriksel empedans ölçerek hücre sayısını dolaylı olarak tespit eder ve günlerce, istenilen aralıklarla bu ölçümü devam ettirerek gerçek zamanlı veriler oluşturur. Geleneksel hücre tabanlı testlerin zaman ve iş gücü yoğunluğunu ortadan kaldırarak büyük ölçüde verimlilik sağlamaktadır. Sistemin merkezi, özel üretilmiş 96 kuyucuklu plakaların (E-plaka 96) alt kısmında entegre edilmiş mikroelettronik hücre sensörü dizisidir. Bu sensör; elektrodlarının elektronik empedansının ölçülmesi, elektrodlar üzerindeki değişikliklerin saptanması ve izlenmesini sağlar. Birimsiz olarak ifade edilen hücre indeksi (cell index; CI); hücre durumunu gösteren elektrik empedansındaki göreceli değişikliğin ölçülmesi için kullanılır. Hücre indeksinin artışı ve azalışına bağlı olarak sistemin elde ettiği veriler, cihazın yazılımı ile otomatik olarak değerlendirilir. Hücreler elektronik plakaya ekildikten sonra literatürde hücre indeksi olarak geçen birimsiz ifadenin uygun düzeye gelmesi için inkübasyona bırakılmıştır. Hücre indeksi her hücrede farklı şekilde ve sürede artıp azalabilir [140, 141].

Yöntemin uygulanışı: Önce çalışmalarda kullanılacak olan E-plakalara 100 µL uygun besiyeri eklenmiş ve ortam ısısı ile eşitlenmesi için önce oda ısısında 5 dk bekletilmiş ve sonra cihazda kör okuması gerçekleştirilmiştir. Okuma sonunda plaka cihazdan çıkartılmış, üzerine E-plaka tabanına temas etmeden 100 µL besiyeri içerisinde hücreler (kuyu başına 1×10^4 hücre) ilave edilmiştir. Uygun CI değerine ulaşan hücrelere, test maddeleri 100 µL besiyeri içerisinde hesaplanarak uygulanmıştır (Hücrelere uygulanacak konsantrasyonlar, 1:1 seyreltme faktörü göz önüne alınarak, 2 kat yoğun hazırlanmıştır). Madde verilisini takiben saat başı veri alacak şekilde sistem ayarlanarak gerçek zamanlı analiz yapılmıştır. MTT yöntemi ile belirlenmiş olan konsantrasyon aralığının gerçek zamanlı etkisini görüntüleyebilmek için aynı konsantrasyonlar bu sistemde de kullanılmıştır.

Deneylerde 3 farklı kontrol grubu kullanılmıştır. Besiyeri güvenilirliği ve kör okuması için kullanılan kontrol gruplarının yanında hesaplamalar için esas baz alınan kontrol grubu çözücü kontrol grubudur [%90 uygun besiyeri +%10 FBS + %1-2 Pen-Strep (%0,1 DMSO içeren besiyeri) + Hücre] ve hesaplamalar bu kontrol grubu üzerinden gerçekleştirilmiştir.

xCELLigence RTCA MP cihazı ile elde edilen hücre indeks değerlerine göre; hücrelerinin proliferasyon eğrileri, RTCA Software 1.2.1.1002 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu yöntem ile formülasyonların ve etken maddenin hücrelerin canlılığının yarısını inhibe eden konsantrasyonları (IC₅₀) hesaplanmıştır

3.2.8. Akım Sitometrisi (Flow Cytometry) analizleri

1934 yılında Andrew Moldoven'ın “akım boyunca kan hücrelerinin sayımı” tekniğini geliştirmesi ile başlayan ve günümüzde hücrelerin tek tek karakterizasyonu aşamalarına kadar gelmiş bir analiz sistemidir. Yöntemin prensibi, çeşitli hücrelerin bir süspansiyon içerisinde enjeksiyon kanalı ile alındıktan sonra akış kanalı boyunca tek tek geçerken hücre granülaritesi ve büyüklüğüne göre sınıflandırılması esasına dayanmaktadır. Günümüzde pek çok araştırmada kullanılan cihaz özellikle immünofenotiplendirme, hücre proliferasyonu ve ölümünün incelenmesi, DNA analizi, RNA ve protein analizi, membran geçirgelik ve potansiyellerinin ölçülmesi, hücre ayrımı, hücre içi iyon değişimlerinin ve ilaç alımının gösterilmesi, apoptotik yolların incelenmesi, mikroorganizma ve kanser tiplendirmesi gibi amaçlarda kullanılmaktadır [142].

Hücrelerin bir akış sıvısı içerisinde tek tek geçerken üzerlerine gönderilen lazer kaynağından alarak yaydığı veya yaymadığı sinyalleri farklı dedektörler toplayarak veri şekline dönüştürür. Hücrelerin içinden geçen lazer ışınlarının yayılımı bu dedektörler ile toplanır. Hücrelerin büyüklüklerini ve yüzey alanıyla ilgili bilgileri ileri yönlü saçılım (Forward Scattered Channel, FSC) kanal dedektörleri; granülarite veya iç yapısı hakkındaki bilgileri yana saçılımlı kanal (Side Scattered Channel, SSC) dedektörleri; floresan işaretlenmiş olan ışık saçılımlarını da floresan (FL) dedektörleri toplayarak sistem üzerinde veri haline getirilmesini sağlar. Bu dedektörler sayesinde hücre süspansiyonu içinden alınarak tek tek bir akış sistemine göre verileri elde edilen hücre popülasyonu arasından

bilgi edinmek istenen hücre grupları bir çerçeve ile belirlenir. Bu grupların seçilmesi işlemine kapılama (gating) adı verilir ve hesaplamalar bu kapılar aracılığıyla % hücre popülasyonu üzerinden cihaz tarafından otomatik hesaplanır [142].

3.2.8.1. Akım Sitometrisi ile apoptoz belirleme çalışmaları

Apoptoz, embriyonik gelişim sırasında ve aynı zamanda doku homeostazının devam ettirilmesi sırasında ortaya çıkan normal fizyolojik bir süreçtir. Apoptotik program, plazma zarı asimetrisi ve bağlanması kaybı, sitoplazmanın ve çekirdeğin yoğunlaşması ve DNA'nın internükleozomal bölünmesi gibi bazı morfolojik özelliklerle karakterizedir. Plazma zarının kaybedilmesi en erken özelliklerden biridir. Apoptoz, hücrelerin hacimsel olarak küçülmesiyle başlar büzülmesiyle devam ederek çekirdekte kromatin yoğunlaşması gözlenir. Sitoplazma membranındaki balonlaşmalar ve apoptoz cisimciklerinin oluşması sonrasında bu apoptotik cisimler fagositozdan sorumlu hücreler tarafından tanınır ve sindirilir. Membran ve sitoplazmik organellerdeki bütünlük apoptoz olayında son ana kadar bozulmayabilir ve normalde bu süreci inflamasyon izlemez, bu sebeple farklı şekillerde ortaya çıkan hücresel değişiklikleri akım sitometrisi cihazı farklı yöntemlerle ölçebilir [143].

Apoptoz tayininde akım sitometrisi yöntemleri şunlardır:

- 1) Hücre büyüklüğü ve granülaritesindeki değişiklikler (ışık saçılım analizi)
- 2) Plazma membran değişikliği sonrasındaki geçirgenlik farkları (propidyum iyodür ile boyama)
- 3) Hücre yüzeyindeki değişiklikler (Annexin V-FITC ile boyama)
- 4) Mitokondri ve lizozomal değişiklikler (mitokondriyal membran potansiyeli ölçümü, lizozom proton pompası)
- 5) DNA fragmentasyonu (TUNEL yöntemi ve DNA analizi)
- 6) Kaspaz aktivasyonları
- 7) Hücre içi iyon değişikliği (Kalsiyum ölçümü) [143]

3.2.8.1.1. *Annexin V-FITC/PI yöntemi*

Apoptotik hücrelerde, fosfolipid zar fosfatidilserini (PS), plazma membranının iç kısmından dış kısmına doğru translokasyon yapar ve böylece PS'yi hücre dışındaki çevreye maruz bırakır. Annexin V, PS için yüksek afiniteye sahip ve transloke olmuş PS'ye sahip hücrelere bağlanan 35-36 kDa kalsiyuma bağımlı bir fosfolipid bağlayıcı proteindir. Annexin V, FITC de dâhil olmak üzere florokromlara konjuge edilebilir. Bu format, PS için yüksek afinitesini korur ve bu nedenle, apoptoz uygulanan hücrelerin akış sitometrik analizi için hassas bir prob olarak görev yapar. PS'nin dışa vurumu apoptozun erken aşamalarında cereyan ettiğinden Annexin V-FITC boyaması, DNA fragmentasyonu gibi nükleer değişikliklere dayalı testlerden daha erken bir aşamada apoptozu tanımlayabilir. Annexin V-FITC boyaması, apoptotik veya nekrotik süreçlerden kaynaklanan son hücre ölüm aşamalarına eşlik eden membran bütünlüğünün kaybolmasından önce gelir. Bu nedenle erken apoptotik sürecin takibi için önemli bir belirteç olarak kullanılabilir. Propidyum iyodür (PI) membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücrelerin içine girip, DNA ya da çift sarmallı RNA'ya bağlanarak kırmızı floresan veren bir boyadır. Hücre zarında translokasyon meydana gelmemiş ve membranda herhangi bir bozulma yok ise hücreler PI açısından geçirgen değildir, ölü ve hasar görmüş hücrelerde ise membran bütünlüğünün bozulması nedeniyle PI iç kısma geçebileceği için son aşama apoptoz veya ölüm evresindeki hücreler görüntülenmiş olur [144].

Bu testte, herhangi bir floresan işaretleme olmayan hücreler (FITC⁻/PI⁻) Q3 kadranda; FITC ile boyanmış ancak PI ile boyanmamış yani apoptotik veya erken apoptotik hücreler (FITC⁺/PI⁻) Q4 kadrantıyla; her iki boya ile boyanmış yani geç apoptotik veya nekrotik hücreler (FITC⁺/PI⁺) Q2 kadrantıyla; FITC ile boyanmayıp PI ile boyanmış yani nekrotik ve ölü hücreler (FITC⁻/PI⁺) Q1 kadrantıyla gösterilmiştir [144, 145]. Bu çalışmada IC₅₀ değerlerinin hücreler üzerindeki etkileri BD FACS Aria I Cell Sorter akım sitometrisi cihazında ölçülmüştür.

xCELLigence ile hücreler üzerinde gerçek zamanlı analizi yapılan maddelerin ve PARP inhibitörlerinin (olaparib ve rucaparib) IC₅₀ konsantrasyonlarının hücreler üzerindeki

apoptoz tayini BD Pharmingen'in apoptoz kitindeki (BD Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I) prosedüre göre yapılmıştır.

Cihaz okumalarının düzgün gerçekleştiğini gözlemleyebilmek ve herhangi bir saçılım olmadığını göstermek için negatif kontrol grubu (hücreli, boyasız) ve maddelerin hücresiz besiyerleri cihazda analiz edilmiş ve deney sonuçlarını değiştirebilecek herhangi bir etki veya sapma gözlenmemiştir. xCELLigence ile bulunan IC₅₀ değerlerinin hücreler üzerinde erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları değerlendirilmiştir.

Yöntemin uygulanışı: Uygun yoğunluğa gelen hücreler flasklardan kaldırılmış ve sayımları yapılmıştır. Sayım işleminden sonra düz tabanlı, 6 kuyucuklu plakalara plaka başına 1×10^6 hücre olacak şekilde ekilmiş ve plaka tabanına yapışabilmeleri için hücreler 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün maddelerin IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilmiştir. Uygun inkübasyon periyodundan sonra (24 ve 48 saat) hücreler pasajlama işlemindeki gibi kaldırılmış ve santrifüjlenmiştir. 2 kez soğuk PBS ile yıkanan hücreler 100 μ L 1X bağlanma tamponu içerisinde 1×10^5 hücre olacak şekilde akım sitometrisinde kullanılacak olan 5 mL'lik tüplere aktarılmış homojen şekilde seyreltilerek süspanse edilmiştir. Tüplere 5 μ L Annexin V-FITC ve 5 μ L PI boyaları ilave edilip nazikçe karıştırıldıktan sonra ışıktan korunarak 15 dk karanlıkta oda ısısında inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda her bir tüpe 400 μ L 1X bağlanma tamponu ilave edilerek 1 saat içinde cihazda okutulmuştur.

3.2.8.1.2. Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi

Sistein proteazlarının kaspaz ailesi, apoptoz ve inflamasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Kaspaz-3, apoptozun erken aşamalarında aktive edilen ve kaspaz ailesinin diğer üyeleri gibi aktive olan anahtar bir proteaz olup, apoptoza uğramış hücrelerde kendi kendine proteoliz ve/veya diğer bir proteazla bölünme yoluyla işlenmiş aktif olmayan bir ön enzim olarak sentezlenir. İşlenmiş kaspaz formları, aktif bir enzim oluşturmak üzere ilişkili olan büyük (17-22 kDa) ve küçük (10-12 kDa) alt birimleri içerir. Aktif kaspaz-3, apoptoza giden hücreler için bir işaretleyici olup, 32 kDa olan bir proenzimden türetilmiş 17 ve 12 kDa altbirimlerinin bir heterodimerinden oluşur. Aktif kaspaz-3, diğer kaspazların

yanısıra, çekirdekte (örneğin PARP) ve stoplazmada (örneğin D4-GDI ve Bcl-2) ilgili diğer hedefleri proteolitik olarak parçalamakta ve aktive etmektedir [146].

Kaspaz substratlarının kullanıldığı yöntemlerde peptid substratlar kullanılır ve bunlar renksizdir. Kaspaz indüklendiğinde renkli hale geçerek floresan ışıklı ürünler oluşturur. En çok bilinen kaspaz ölüm substratı PARP'tır ve DNA hasarına cevap olarak aktif hale gelerek DNA tamirinde yer alır. Erken apoptoz sırasında özellikle kaspaz-3 tarafından kesilir ve kesim ürünlerini tanıyan ürünlerle işaretleme ve ölçümleri yapılır [147].

xCELLigence ile hücreler üzerinde gerçek zamanlı analizi yapılan maddelerin ve PARP inhibitörlerinin (olaparib ve rucaparib) IC₅₀ konsantrasyonlarının hücreler üzerindeki apoptotik etkisi BD Pharmingen'in PE Aktif Kaspaz-3 apoptoz kitindeki prosedüre göre yapılmıştır.

Cihaz okumalarının düzgün gerçekleştiğini gözlemleyebilmek ve herhangi bir saçılım olmadığını göstermek için negatif kontrol grubu (hücreli, boyasız) ve maddelerin hücresiz besiyerleri cihazda analiz edilmiş ve deney sonuçlarını değiştirebilecek herhangi bir etki veya sapma gözlenmemiştir.

Yöntemin uygulanışı: Uygun yoğunluğa gelen hücreler flasklardan kaldırılmış ve sayımları yapılmıştır. Sayım işleminden sonra düz tabanlı, 6 kuyucuklu plakalara, plaka başına 1x10⁶ hücre olacak şekilde ekilmiş ve plaka tabanına yapışabilmeleri için hücreler 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün maddelerin IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilmiştir. Uygun inkübasyon periyodundan sonra (24 ve 48 saat) hücreler pasajlama işlemindeki gibi kaldırılmış ve santrifüjlenmiştir. Hücreler 2 kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra 500 µL 1X BD Cytotfix/Cytoperm solüsyonunda her tüp için 1x10⁶ hücre olacak şekilde süspanse edilmiş ve 20 dk buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra BD Cytotfix/Cytoperm (fiksasyon ve geçirgenlik için) solüsyonu uzaklaştırılmış, pellet üzerine 500 µL 1X BD Perm/Wash yıkama tamponu ilave edilerek süspanse edilmiş oda ısısında 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra PE tavşan anti-aktif kaspaz-3 antikoru eklenerek 30 dk oda ısısında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından 1 mL 1X BD Perm/Wash yıkama tamponu ile her tüp yıkanmış ve son olarak 500 µL 1X BD Perm/Wash içerisinde süspanse edilen hücreler cihazda okunmuştur.

3.2.8.1.3. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin (JC-1) ölçülmesi

Son zamanlarda, apoptoz sırasında mitokondriyal membran potansiyelini ($\Delta\psi$) incelemek üzere tasarlanan deneylere odaklanılmıştır. Mitokondriyal solunum zincirindeki oksidasyon reaksiyonları sırasında salınan enerji mitokondriyal membran boyunca negatif bir elektrokimyasal gradyan olarak depolanır ve $\Delta\psi$ polarize olarak ifade edilir. $\Delta\psi$ 'nin çökmesi depolarize olmuş $\Delta\psi$ ile sonuçlanır ve genellikle (her zaman değil) erken apoptoz sırasında meydana geldiği gözlemlenir. Örneğin, $\Delta\psi$ 'nin çökmesinin birçok çalışmada apoptoz sırasında olduğu bildirilmiş ve mitokondrinin depolarizasyonunun apoptoz sırasında gerçekleşen ilk olaylardan biri olduğuna ve hatta sitokrom c salımı için olmazsa olmaz bir koşul olduğuna dair bir genelleme mevcuttur. Bununla birlikte $\Delta\psi$ 'nin çökmesi her zaman apoptoz sırasında olmayabilir, dolayısıyla $\Delta\psi$ 'nin depolarizasyonu apoptozla bağlantılı olsa da tüm sistemlerde bu geçerli olmayabilir. Bu, hücrelerin apoptoz sürecini farklı mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirdiğinin bir göstergesidir. Apoptoza ek olarak, nekroz (depolarizasyon) ve hücre döngüsü durması (hiperpolarizasyon) sırasında da $\Delta\psi$ 'de değişiklikler olduğu bilinmektedir [148].

Mitokondri membrane potansiyelinin düşmesi erken apoptoz sırasında meydana gelir ve geçirgenlik değişimi olarak da bilinen bu olay en iyi akım sitometrisi ile belirlenebilir. Akım sitometrisi tüm hücrelerdeki $\Delta\psi$ analizinde tercih edilen bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Membran geçirgen lipofilik katyonik florokromlar $\Delta\psi$ problemleri olarak kullanılır; hücrelere penetre olur ve floresanı $\Delta\psi$ 'yı yansıtmaktadır. JC-1 (5,5', 6,6'-tetrakloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolkarbosiyanin iodyid), $\Delta\psi$ 'nin durumunu değerlendirmek için kullanılan lipofilik bir florokromdur. JC-1, $\Delta\psi$ 'ye duyarlı olduğu bulunmuş olan katyonik boyanın ilk J-agregat formunu temsil eder. JC-1'in floresan emisyon spektrumu, $\Delta\psi$ 'nin durumuna göre belirlenen JC-1 konsantrasyonuna bağlıdır. JC-1 agregat veya monomer şeklinde, her biri farklı emisyon spektrumuna sahip iki farklı durumda ortaya çıkar. JC-1, düşük boya konsantrasyonlarında monomer olarak bulunurken, daha yüksek konsantrasyonlarda agregatlar oluşturmaktadır. JC-1'in agregat ve monomer şeklindeki her iki formu da, akış sitometrelerde FL-1 (yeşil) kanalında ölçülen spektrumun en sonunda yeşil floresan şeklinde görünürler. Canlı hücreler JC-1 ile inkübe edildiğinde, JC-1, hücrelerin plazma membranına monomerler olarak nüfuz eder. JC-1'in mitokondriye

alınması $\Delta\psi$ tarafından yönlendirilir. Normal, sağlıklı mitokondrinin $\Delta\psi$ 'si polarizedir ve JC-1 böyle mitokondriler tarafından hızla alınır. Bu alım, JC-1'in konsantrasyon gradyanını arttırır ve mitokondride JC-1 agregatlarının (J-agregatları olarak bilinir) oluşumuna yol açar. J-agregatları, çoğu akış sitometresinde FL-2 (kırmızı) kanalında ölçülen daha yüksek seviyelerde kırmızı floresan emisyonu ile sonuçlanan kırmızı bir spektral kayma göstermektedir [149].

Apoptoz sıklıkla $\Delta\psi$ 'nin depolarizasyonu ile ilişkilidir ve FL-2 kanalında JC-1 floresanında azalma bulunan hücrelerin sayısının artmasına neden olur. Yani, apoptotik popülasyon sıklıkla negatif kontrol popülasyonundan daha düşük bir kırmızı floresans sinyal yoğunluğunu (FL-2 eksenini) sunar. Bazı apoptotik sistemlerde FL-1'de ölçülen yeşil floresans düzeyindeki değişiklikler de gözlenmiştir. Bu değişikliklerin membran polarizasyonu veya apoptoz düzeyindeki değişikliklerle nasıl ilişkili olduğu tam olarak açık değildir [150].

JC-1, 488-490 nm dalga boyunda uyarıldığında, monomerik formun 527 nm'de; J-agregatlarının 590 nm dalga boyunda yayılma yaptığı gözlemlenmiştir [150].

Deneylerde kullanılan BD MitoScreen Kiti, akış sitometrisinde kullanım için optimize edilmiş JC-1 ve 10X deney tamponu içerir. JC-1 genellikle bir argon iyon lazerin 488 nm hattı kullanılarak uyarılır. JC-1 monomerler 527 nm'de maksimum ışımaya yayar ve 590 nm'de birikir. Mevcut literatürde, FL-1 ve FL-2 kanallarının ölçümü için akış sitometrelerini ayarlamak için çeşitli yollar kullanılmıştır [150].

xCELLigence ile hücreler üzerinde gerçek zamanlı analizi yapılan maddelerin ve PARP inhibitörlerinin (olaparib ve rucaparib) IC₅₀ konsantrasyonlarının hücreler üzerindeki apoptoz tayini BD MitoScreen Mitokondriyal Membran Potansiyeli Tayini kit prosedüre göre yapılmıştır.

Cihaz okumalarının düzgün gerçekleştiğini gözlemleyebilmek ve herhangi bir saçılım olmadığını göstermek için negatif kontrol grubu (hücreli, boyasız) ve maddelerin hücresiz besiyerleri cihazda analiz edilmiş ve deney sonuçlarını değiştirebilecek herhangi bir etki veya sapma gözlenmemiştir.

Yöntemin uygulanışı: Uygun yoğunluğa gelen hücreler flasklardan kaldırılmış ve sayımları yapılmıştır. Sayım işleminden sonra düz tabanlı, 6 kuyucuklu plakalara plaka başına 1×10^6 hücre olacak şekilde ekilmiş ve plaka tabanına yapışabilmeleri için hücreler 1

gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün maddelerin IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilmiştir. Uygun inkübasyon periyodundan sonra (24 ve 48 saat) hücreler pasajlama işlemindeki gibi kaldırılmış ve santrifüjlenmiştir. Çalışmadan önce 10X deney tamponu (assay buffer) distile su ile 1:10 seyreltilmiş (1X) ve 37°C'ye gelmesi beklenmiştir. JC-1 stok solüsyonu vial başına oda ısısında 125 µL DMSO içinde çözündürülmüştür. JC-1 çalışma solüsyonu vial başına 1:100 olacak şekilde 1X deney tamponu (12,375 µL) ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Her bir numune tüpü içinde 1x10⁶ hücre olacak şekilde 500 µL JC-1 çalışma solüsyonu kullanılmıştır. Hücre pelletleri santrifüj işleminden sonra 500 µL JC-1 çalışma solüsyonu içine alınmış 10-15 dk 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücreler 2 kez yıkanmıştır. İlk yıkama işleminde 2 mL 1X deney tamponu kullanılarak santrifüjlenmiş, ikinci yıkama işleminde 1 mL 1X deney tamponu kullanılarak santrifüjlenmiş ve en son olarak 500 µL 1X deney tamponu içine alınmasıyla cihazda okuma işlemine geçilmiştir.

3.2.8.1.4. DNA analizi ile hücre döngüsünün incelenmesi

Tek ve çok hücreli organizmaların büyüme, gelişme ve çoğalmaları hücre bölünmesiyle sağlanır. Hücreler içeriklerini iki katına çıkarmak suretiyle ikiye bölünerek çoğalır. Bu süreç “hücre döngüsü” olarak adlandırılır. Döngü, çoğalmak için uyarılan hücrelerde gerçekleşirken birtakım geçici biyokimyasal aktivite ve morfolojik değişiklik gözlenir.

DNA histogramında:

G₀: Hücrenin dinlenme fazı, senkronize şekilde büyümenin olmadığı durumlarda DNA replikasyonuna hazır olmayan hücrelerin G₁ fazı öncesindeki dinlenme evresidir.

G₁: Hücre içeriğinin kromozomlar dahil iki katına çıktığı faz (DNA sentezi için gerekli hücre komponentlerinin sentezlenmesi).

G₀/G₁: Hücrenin büyüme sinyallerini ya da mitojenleri kontrol edip hataları onardığı dönem olarak geçmektedir.

S: DNA sentezi (DNA'nın replikasyonu).

G₁/S: Apoptoza giden kanser hücrelerinin yakalandığı kontrol noktası.

G₂: Kromozomların dublikasyonu ve mitoz hazırlık.

M: Mitoz ve hücre bölünmesi (kromozomların ayrılması).

G₂/M: Hücrenin kromozom anomalilerini ya da mutasyonları kontrol edip hataları onardığı dönem olarak gözlenmektedir.

Hücre döngüsü ve ploidisinin değerlendirilmesi:

Tez çalışmasında maddelerin etkilerinin hücre döngüsünün 3 ana fazında (G₀/G₁, S ve G₂/M) dağılımlarının incelenmesi için BD Cycletest™ Plus DNA kiti kullanılmıştır. Kit, hücre çekirdeğinin taze veya donmuş katı doku örneklerinden veya hücre süspansiyonlarından artıklarının izole edilmesi ve boyanması için bir dizi reaktif sağlar. Kademeli olarak işaretlenmiş normal ve tümör hücrelerinin akış sitometrik analizinde, anormal DNA'nın köken aldığı hatları tanımlamak ve bu dizinlerin DNA indeksini (DI) ve hücre döngüsü faz dağılımlarını araştırmak amacıyla bu kit kullanılmaktadır. Katı doku örneklerinin veya hücre süspansiyonlarının artıklarının DNA'larının boyanması için tek çekirdekli tekdüze süspansiyonlar hazırlanır. Metod, hücre membran lipitlerini noniyonik bir deterjanla çözmeyi, hücre iskeletini ve nükleer proteinleri tripsin ile ortadan kaldırarak, bir enzim ile hücrel RNA'yı sindirmeyi ve nükleer kromatini sperminle stabilize etmeyi içerir [151, 152]. Propidyum iyodür boyası stokiyometrik olarak temiz, izole edilmiş çekirdeğe bağlanır, daha sonra elektronik olarak ikiye ayırma kapasitesi olan bir akış sitometrisi cihazında ölçülür [153, 154]. Bu boyaların stokiyometrik özelliğinin avantajı hücrede bulunan DNA miktarına orantılı olmalarıdır. Bu şekilde S fazındaki hücreler, G₁'deki hücrelerden daha fazla DNA'ya sahip olacaktır. Onlar orantılı olarak daha fazla boya alacak ve DNA içeriğini ikiye katlayana kadar daha parlak bir şekilde ışıldayacaklar. G₂'deki hücreler, G₁'deki hücrelerin yaklaşık iki katı kadar daha parlak olacaktır. PI ile işaretlenmiş çekirdekler 580 nm ve 650 nm arasındaki dalga boylarında floresan ışığı yayar. Dedektörlerde toplanan verilerle oluşturulmuş floresan histogramları sayesinde, anormal DNA'nın köken aldığı hattın (DNA anöploidi) varlığı tespit edilmiş olur [155].

DI, çalışılan hücre popülasyonunun G₀/G₁ fazında bulunan bağıl hücre DNA içeriğinin tepe değerinin (veya ortalamasının), diploidi içeren normal kontrol hücre popülasyonunun G₀/G₁ fazında bulunan DNA içeriğinin tepe değerine (veya ortalamasına) bölünmesi suretiyle elde edilir.

DNA analizinin değerlendirilebilir olması için göz önünde bulundurulması gereken en önemli parametre varyasyon katsayısıdır (CV değeri, Coefficient of Variation). Pratikte CV değeri değerlendirilirken histogram grafiklerinde gözlenen G₀/G₁ pikinin ince ve uzun

olması beklenmektedir. CV değeri; G₀/G₁ pikinin ortalama yükseklik genişliğinin pik kanal sayısının 2,35 katına bölünmesiyle elde edilen değerin 100 katı şeklinde hesaplanmaktadır.

Yöntemin uygulanışı: Uygun yoğunluğa gelen hücreler flasklardan kaldırılmış ve sayımları yapılmıştır. Sayım işleminden sonra düz tabanlı, 6 kuyucuklu plakalara plaka başına 1×10^6 hücre olacak şekilde ekilmiş ve plaka tabanına yapışabilmeleri için hücreler 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün maddelerin IC₅₀ konsantrasyonlarıyla muamele edilmiştir. Uygun inkübasyon periyodundan sonra (24 ve 48 saat) hücreler pasajlama işlemindeki gibi kaldırılmış ve santrifüjlenmiştir. 1 mL tampon solüsyonu içinde nazikçe vortekslenerek süspanse edilen hücreler uygun tüplere alınarak 3 kez tampon ile yıkama işlemine tabii tutulmuştur. DNA ploidisi ölçümü için boyama prosedürü 5×10^5 hücre üzerinden gerçekleştirilmiştir. Kit içeriğindeki prosedüre göre karanlıkta A, B (20°-25°C) ve C (2°-8°C) solüsyonları deneyden önce uygun ortam koşullarına getirilerek hazırlanmıştır. Pellet üzerindeki tampon son damlasına kadar uzaklaştırıldıktan sonra; 250 µL A solüsyonu her tüpe ilave edilmiş 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üzerine 200 µL B solüsyonu ilave edilmiş ve 10 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra son olarak 200 µL C solüsyonu ilave edilmiş 10 dk buz üzerinde son inkübasyonu müteakip hücreler analiz için okumaya hazır hale getirilmiştir.

3.2.9. ELISA ile PARP [214/215] yarıklanma miktarının ölçülmesi

PARP kaspaz bölünmesi ile inaktive edilir. DNA hasarının geniş olduğu sistemlerde normal inaktivasyonun meydana geldiğine inanılmaktadır. Bu gibi durumlarda, hasarın onarılmasında uygulanabilir olandan daha fazla enerji harcanır, böylece enerji, programlanmış hücre ölümü yoluyla dokudaki diğer hücreler için geri alınır. Degradasyonun yanı sıra, PARP1'in tersine çevrilebilir downregülasyon mekanizmaları hakkında, PARP1 tarafından yönlendirilen ve YY1 transkripsiyon faktörü tarafından modüle edilen bir "otoregülatör döngü" arasında yeni kanıtlar vardır [156].

Kaspaz ile *in vitro* bölünme kaspaz ailesi üyeleri boyunca gerçekleşirken, ön veriler kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin *in vivo* yarıklanmadan sorumlu olduğunu göstermektedir. Bölünme, PARP'ı 24 kDa ve 85 kDa segmentine ayıran aspartik asit 214 (Asp214) ve glisin 215 (Gly215)'te meydana gelir. Daha küçük bir kısım DNA bağlanması için gerekli çinko

parmak motifini içerir. 89 kDa fragmanı, oto-modifikasyon domeinini ve katalitik domeini içerir. PARP inaktivasyonu yoluyla PARP katalitik domein aktivasyonunun varsayılan mekanizması DNA-bağlanma domeini ve oto-modifikasyon domeinin ayrılmasına dayanır. DNA-bağlanma bölgesi, yarıklanmış olan ya da olmayan proteinin geri kalanından bağımsız olarak çalışabilmektedir. Bununla birlikte, oto-modifikasyon domeini olmadan ayrıştırma gerçekleşmez. Bu şekilde, DNA bağlanma domeini hasarlı bir bölgeye yapışacaktır ve artık katalitik domeine sahip olmadığından onarımı etkileyemeyecektir. DNA-bağlanma domeini, diğer, yarıklanmamış PARP'ın hasarlı bölgeye erişmesini ve onarımları başlatmasını önler [156].

Özetle PARP1'in Asp214 ve Gly215 arasındaki bölünmesi, iki çinko-parmak DNA-bağlama motifinin, oto-modifikasyon ve katalitik domeinlerden ayrılmasıyla sonuçlanır, böylece enzimin DNA hasarı bölgelerine alınmasını önler. PARP1 bölünmesi apoptozun bir işareti olarak kabul edilmesine rağmen, hücre ölümünün düzenlenmesindeki işlevi tam olarak bilinmemektedir [156]. Bu tez çalışmasında Asp214 ve Gly215 arasındaki PARP yarıklanmasını göstermek için, temin edilen Cleaved PARP [214/215] ELISA kiti kullanılmıştır. Kit spesifik olarak insan yarıklanmış PARP p85 fragmentini tanımlamaktadır. Tüm PARP proteininin veya geriye kalan p25 fragmentini tanımlamamaktadır.

Yöntemin uygulanışı: Tüm reagentler kullanmadan önce oda ısısına getirilerek hazırlanmış ve çökmüş tuz kalmamasına özen gösterilmiştir. 25X tampon solüsyonu 1X yıkama solüsyonu için seyreltilmiştir.

Uygun yoğunluğa gelen hücreler flasklardan kaldırılmış ve sayımları yapılmıştır. Sayım işleminden sonra düz tabanlı, 6 kuyucuklu plakalara plaka başına 1×10^6 hücre olacak şekilde ekilmiş ve plaka tabanına yapışabilmeleri için hücreler 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün maddelerin IC_{50} konsantrasyonlarıyla muamele edilmiştir. Uygun inkübasyon periyodundan sonra hücreler pasajlama işlemindeki gibi kaldırılmış (kaldırma işlemleri sırasında kazıyıcı kullanılmış, Tripsin-EDTA ile muamele edilmemiştir) ve santrifüjlenmiştir. Hücreler 2 kez soğuk PBS ile yıkanmıştır. Hücre pelleti hücre ekstraksiyon tamponu ile buz üzerinde 30 dakika lizis edilmiş ve ardından 10 dakika vortekslenmiş, 13000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatant mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Örnek konsantrasyonlarının standart eğri aralığında

olması için numuneler hücre ekstraksiyon tamponu ile dilüe edilmiştir. Plakaya yerleştirilmeden önce SDS konsantrasyonunun %0,01'den az olması gerekmektedir. Standart dilüent tampon ile numuneler >10 ng/mL olacak şekilde dilüe edilmiştir.

In vitro olarak kaspaz-3 yarıklanmasıyla elde edilen PARP rekombinant proteininden elde edilen standart, standart dilüsyon tamponu ile 10 ng/mL'ye sulandırılmış ve 1 saat içinde 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 ve 0 ng/mL olacak şekilde standart yarıklanmış PARP [214/215] konsantrasyonları hazırlanmıştır.

Kullanmadan 15 dakika önce 1X Anti-tavşan IgG HRP solüsyonu hazırlanmıştır.

Uygulama aşağıdaki basamaklara göre gerçekleştirilmiştir:

- 1) Antijenin bağlanması ve dedektörün ilavesi:
 - a. 50 µL standartlar, kontrol ve örnekler kuyulara ilave edilmiştir. Kromojen için boş kuyu bırakılmıştır.
 - b. 50 µL yarıklanmış PARP [214/215] tayin antikor solüsyonu, kromojenin olacağı boş kuyu haricinde her kuyuya ilave edilmiştir.
 - c. Plaka kaplanmış ve 3 saat oda ısısında orbital çalkalayıcıda 400-600 rpm'de çalkalanmaya bırakılmıştır.
 - d. Daha sonra solüsyon kuyulardan tamamen aspire edilmiş ve kuyular 4 kez 1X yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
- 2) IgG HRP ilavesi:
 - a. 100 µL Anti-tavşan IgG HRP solüsyonu, kromojen körleri haricindeki tüm kuyulara ilave edilmiştir.
 - b. Plaka kaplanarak 30 dk oda ısısında inkübe edilmiştir.
 - c. Kuyulardan solüsyon tamamen aspire edilmiş ve kuyular 4 kez 1X yıkama tamponu ile yıkanmıştır.
- 3) Stabilize kromojenin ilavesi:
 - a. 100 µL stabilize kromojen her kuyuya ilave edilmiştir. Bu sırada substrat solüsyonu mavi renge dönüşmeye başlar.
 - b. Oda ısısında karanlıkta 30 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir.
- 4) Durdurucu (stop) solüsyon ilavesi:

- a. Her kuyuya 100 µL stop solüsyon ilave edilir. Nazıkçe plaka yanlarından vurularak kuyulardaki mavi rengin sarıya dönmesi sağlanmıştır.

5) Plakanın okunması:

- a. Plaka 2 saat içerisinde ELISA cihazında 450 nm absorbansta plaka kuyuları okutulmuştur. Cihazdan alınan veriler, istatistiksel değerlendirme için kullanılmıştır.

İstatistiksel değerlendirmeler Graphpad Prism 7 yazılım programında hesaplanmıştır (seriler n=3 tekrarlı çalışılmıştır). Ortalama $\pm$ standart sapma (St.S.) değerleri olarak veriler, bağımsız gruplar tek faktör için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve anlamlı değerler için izleme testi (post-hoc), Tukey t test ile hesaplanmıştır ($p<0,05^*$ anlamlı, $p<0,01^{**}$ önemli derecede anlamlı, $p<0,001^{***}$ çok önemli derecede anlamlı, $p>0,05$ anlamlı değil).

3.2.10. Hücre morfolojilerinin görüntülenmesi ve floresan boyama

Maddelerle 24 saat inkübasyon sonrasında morfolojik değişikliklerin gözlemlenebilmesi için boynamamış hücreler inverted tip trinoküler ışık mikroskopunda 10X objektif kullanılarak (Olympus, CKX41SF) ve floresan işaretli hücreler multtimod mikroparka okuyucu görüntüleme sisteminde (Cytation 5, BioTek) 20X objektif kullanılarak fotoğraflanmıştır.

3.2.10.1. DAPI ve MitoTracker Red CMXros ile işaretleme

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol); çift sarmallı DNA'nın küçük oluşuna seçici olarak bağlanarak, bağlanmamış haldekinden yaklaşık 20 kat daha parlak bir şekilde mavi floresan ışığa yapan bir probdur. DNA'ya karşı seçiciliği ve yüksek hücre geçirgenliği, sitoplazmadan az miktarda arka plan kirliliğine sebep olacak şekilde çekirdeklerin net ve parlak görüntülenebilmesini sağlar. DNA içeriğini hücre bazında belirlenmesini gerektiren yüksek içerikli tarama yöntemlerinin önemli bir bileşenidir. Floresan boyanın uyarımı 358 nm (eksitasyon), ve floresanın Emilimi 461 nm (emisyon) dalga boylarında görüntülenmektedir [157].

MitoTracker Red Chloromethyl-X-rosamine (CMXRos); mitokondriyi belirlemek için hücreler, plazma membranı boyunca pasif olarak difüze olan ve aktif mitokondrilerde biriken MitoTracker problemleri ile inkübe edilir. Tetrametilrosamin ve rodamin 123 gibi mitokondri için geleneksel flüoresan boyayla işaretlenmiş mitokondriler zar potansiyelinde bir kayıp yaşamadan kolayca yıkanabilirler. Mitokondriye girmeden önce ışıma yapmadıkları halde, mitokondride okside olarak tutunan ve floresan ışıma yapan boyalar geliştirilmiştir. Deneylerde kullanılan mitokondri takip boyasında rozamin kullanılmıştır. Floresan boyanın uyarımı 579 nm (eksitasyon), ve floresanın Emilimi 599 nm (emiyon) dalga boylarında görüntülenmektedir [158].

3.2.10.2. Floresan görüntüleme için preparat hazırlanması

Sterilizasyon işlemi yapılmış olan lameller, 6 kuyulu düz tabanlı mikropalakalara yerleştirildikten sonra üzerlerine steril, deiyonize su içerisinde hazırlanmış 400 µL %0,1'lik jelatin solüsyonu ilave edilmiş ve 10 dk bekletilmiştir. Ardından solüsyon çekilerek 15 dk kuruması beklenmiştir.

Her bir lamel üzerine lamelin dışına taşmadan yapışmaları için 5×10^3 hücre ekilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon peridyodundan sonra test maddelerinin IC₅₀ konsantrasyonları uygun besiyeri içerisinde hazırlanarak hücreler üzerine uygulanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrasında hücreler 4 kez PBS ile yıkanmıştır. mitokondriyi boyayabilmek için stok boya solüsyonlarından MitoTracker Red CMXRos ile 20 dk; çekirdeği boyayabilmek için DAPI ile 5 dk hücreler muamele edilmiş ve karanlıkta hücrelere girmesi sağlanmıştır. Ardından 3 kez PBS ile yıkanan hücreler, canlı görüntüleme solüsyonu içerisine alınmıştır. Hücreler, BioTek Cytation 5 Multimod Mikropalaka Okuyucu ve Görüntüleme Sisteminde 20X objektif kullanılarak fotoğraflanmıştır.

3.2.11. Gen ifadelerindeki değişimlerin belirlenmesi

3.2.11.1. RNA izolasyonu

mRNA ekspresyon çalışmalarında yalnızca etkinliğinin en yüksek olduğu ve her gruptan bir adet olacak şekilde sentez maddeleri (LHS-4, CS-1) ile pozitif kontrol grubu olarak da rucaparib seçilmiştir. Hücrelerin mRNA ekspresyon düzeyleri aşağıda belirtilen aşamalara göre gerçekleştirilmiştir.

Maddelerin IC₅₀ konsantrasyonları ile hücreler 24 saat kültür koşullarında inkübasyona bırakılmış, ardından hücreler 1X tripsin-EDTA solüsyonuyla flask yüzeyinden kaldırılmış ve Cedex[®] (Roche) otomatik hücre sayım cihazı kullanılarak, 1X Tripan mavisi boyası varlığında canlı hücre sayısı belirlenmiştir. 1x10⁶ hücre içeren her bir numuneden RNeasy[®] Plus Mini kit (Qiagen Katalog No: 74134 ve 74136) ile ve kitin önerdiği protokole uygun olarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.11.2. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi

Nanodrop[®] ile saflığı, kalitesi ve miktar tayini yapılmış olan her bir RNA örneğinden 1 g iolacak şekilde reverse transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bunun için RT² HT First Strand Kit (Qiagen Katalog No: 330411) kullanılmış ve işlem adımları kitin önerdiği protokole göre uygulanmıştır

3.2.11.3. Kantitatif RT-PCR Array yöntemi

Capan-1, PANC-1 ve hTERT-HPNE hücre hatlarında, LHS-4, CS-1, rucaparib ve çözücü besiyeri kontrol gruplarının hücre ölüm mekanizmalarında rolü olan bazı genlerin ifadeleri üzerine etkileri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) Array yöntemiyle, MxPro software ile Stratagene[®] Mx3005P model ısıl döngü cihazı (Agilent Technologies) kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla; programlanmış hücre ölümünün farklı mekanizmalarında rolü olduğu bilinen, seçilmiş 10 adet gene ait primerlerle tasarlatılıp (Custom Human RT² Profiler PCR Array: CAPH13125A) hazırlanmış özel 96 kuyulu plakalarda deneyler gerçekleştirilmiştir. Her bir plakada 10 gene ait primerler bulunmaktadır. Housekeeping gen olarak; Gliseraldehit 3-fosfat

dehidrojenaz (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase, GAPDH) ve aktin beta (ACTB) kullanılmış ve plakada revers transkriptaz kontrolüne (RTC) de yer verilmiştir.

Deneyle, nükleazdan arındırılmış bir çalışma kabininde gerçekleştirilmiş ve saf su, pipetler, tüpler, pipet uçları ve rezervuarlar gibi kullanılan bütün sarf malzemeler nükleaz içermeyen özellikte seçilmiştir. Bu amaçla, 102 µL cDNA, 1350 µL “RT² qPCR SYBR Green Master Mix (Referans boya Rox)” ve 1250 µL nükleaz içermeyen su, yine nükleaz içermeyen bir yatay rezervuarda karıştırılmıştır. Ardından, bu karışım her bir kuyuya 35 µL olacak şekilde otomatik pipet ile paylaştırılmıştır (her bir kuyu için ayrı nükleaz içermeyen pipet ucu kullanılmasına dikkat edilmiştir). Bütün kuyular zımba kapak ile kapattıktan sonra, kuyularda hava kabarcığı kalmadığından emin olunmuş ve plaka 800 rpm’de 2 dk santrifüj edilmiştir. Hazırlanan plaka, PCR cihazına yerleştirilmiş ve aşağıdaki termal profilde yaklaşık 2 saat süresince amplifikasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Termal profil: 1.segment; 1 döngü, 95°C’de 10 dk; 2. segment; 95°C’de 15 sn ve 60°C’de 1 dk 40 döngü; 3.segment; 1 döngü, 95°C’de 1 dk., 55°C’de 30 sn ve 95°C’de 30 sn olarak uygulanmıştır.

Analiz: Sonuçlar, delta delta Ct metoduyla, web-tabanlı veri analiz programı kullanılarak [159] analiz edilmiştir. Normalizasyon için kullanılan housekeeping gen; GAPDH’dır. Sonuçlar, negatif kontrole göre 2 kat fark (2x fold downregulation/upregulasyon, genlerdeki değişiklik katsayısı) oluşmasına göre değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda, genlerdeki değişiklik katsayı değerlerine göre elde edilmiş grafikler veri olarak sunulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Kimyasal Türevlerin Eldesi

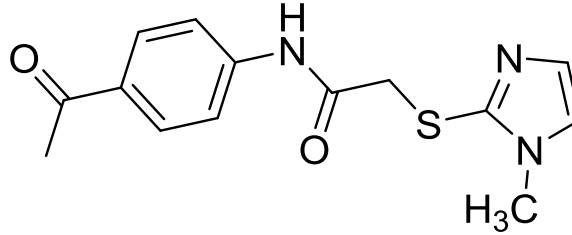
Bu çalışmada altı adet *N*-(4-asetilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit ve iki adet *N'*-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il)asetohidrazit türevinin sentezi gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. *N*-(4-asetilfenil)-2-(ariltiyo)asetamit türevlerinin eldesi

Altı türev yöntem A'ya göre elde edilmiştir.

4.1.1.1. *N*-(4-asetilfenil)-2-[(1-metil-1*H*-imidazol-2-il)tiyo]asetamit (LHS-1)

Sentezlenen türeve dair yapı Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. LHS-1'in molekül yapısı.

Verim: %77. **Erime Derecesi:** 175°C.

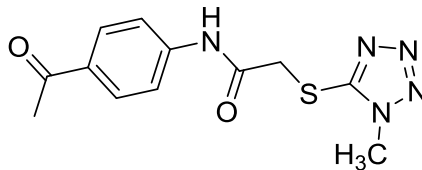
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 2.52 (s, 3H, CH₃), 3.60 (s, 3H, CH₃), 3.91 (s, 2H, CH₂), 6.97 (d, J=1.20 Hz, H, Ar-H), 7.25 (d, J=1.20 Hz, H, Ar-H), 7.68 (d, J=8.81 Hz, 2H, Ar-H), 7.93 (d, J=8.75 Hz, 2H, Ar-H), 10.71 (s, H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 26.88 (CH₃), 33.44 (CH₃), 38.88 (CH₂), 118.78, 124.03, 129.01, 129.99, 132.36, 139.96, 143.63, 167.63 (C=O), 196.93 (C=O).

C₁₄H₁₅N₃O₂S hesaplanan: (%) C 58.11, H 5.23, N 14.52; **bulunan:** (%) C 58.13, H 5.24, N 14.54.

4.1.1.2. *N*-(4-asetilfenil)-2-[(1-metil-1*H*-tetrazol-5-il)tiyo]asetamit (LHS-2)

Sentezlenen türeve dair yapı Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. LHS-2’nin molekül yapısı.

Verim: %75. **Erimе Derecesi:** 220°C.

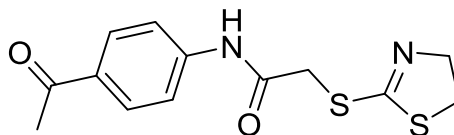
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 2.53 (s, 3H, CH₃), 3.99 (s, 3H, CH₃), 4.33 (s, 2H, CH₂), 7.69 (d, J=8.77 Hz, 2H, Ar-H), 7.94 (d, J=8.72 Hz, 2H, Ar-H), 10.70 (s, H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 26.90 (CH₃), 34.16 (CH₃), 38.19 (CH₂), 118.91, 130.02, 132.54, 143.35, 153.78, 166.08 (C=O), 196.96 (C=O).

C₁₂H₁₃N₅O₂S hesaplanan: (%) C 49.47, H 4.50, N 24.04; **bulunan:** (%) C 49.46, H 4.51, N 24.07.

4.1.1.3. *N*-(4-asetilfenil)-2-[(4,5-dihidrotiyazol-2-il)tiyo]asetamit (LHS-3)

Sentezlenen türeve dair yapı Şekil 4.3’te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. LHS-3’ün molekül yapısı.

Verim: %74. **Erimе Derecesi:** 164°C.

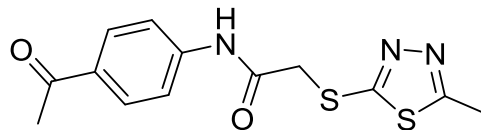
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 2.52 (CH₃), 3.74 (t, J=7.99 Hz, 2H, CH₂), 4.13(t, J=8.00 Hz, 4H, CH₂ ve tiyazolidin CH₂), 7.75 (d, J=8.79 Hz, 2H, Ar-H), 7.93 (d, J=8.73 Hz, 2H, Ar-H), 10.56 (s, H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 26.89 (CH₃), 36.08 (CH₂), 37.48 (CH₂), 64.36 (CH₂), 118.82, 132.38, 143.55, 163.27, 166.58 (C=O), 196.95 (C=O).

C₁₃H₁₄N₂O₂S₂ hesaplanan: (%) C 53.04, H 4.79, N 9.52; **bulunan:** (%) C 53.03, H 4.80, N 9.54.

4.1.1.4. *N*-(4-asetilfenil)-2-[(5-metil-1,3,4-tiyadizol-2-il)tiyo]asetamit (LHS-4)

Sentezlenen türeve dair yapı Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. LHS-4'ün molekül yapısı.

Verim: %72. **Erime Derecesi:** 174°C.

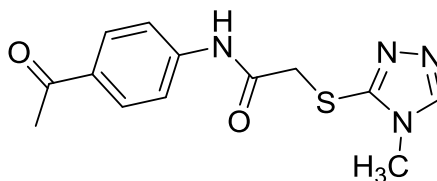
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 2.53 (CH₃), 2.67 (CH₃), 4.31 (CH₂), 7.71 (d, J=8.83 Hz, 2H, Ar-H), 7.94 (d, J=8.77 Hz, 2H, Ar-H), 10.69 (s, H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 15.64 (CH₃), 26.89 (CH₃), 38.61 (CH₂), 118.89, 130.02, 132.49, 143.46, 164.67, 166.33 (C=O), 196.95 (C=O).

C₁₃H₁₃N₃O₂S₂ hesaplanan: (%) C 50.80, H 4.26, N 13.67; **bulunan:** (%) C 50.82, H 4.25, N 13.68.

4.1.1.5. *N*-(4-asetilfenil)-2-[(4-metil-1,2,4-triazol-3-il)tiyo]asetamit (LHS-5)

Sentezlenen türeve dair yapı Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. LHS-5'in molekül yapısı.

Verim: %76. **Erime Derecesi:** 247°C.

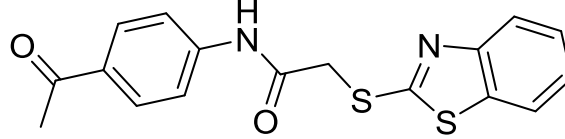
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 2.52 (s, 3H, CH₃), 3.60 (s, 3H, CH₃), 4.10 (s, 2H, CH₂), 7.68 (d, J=8.79 Hz, 2H, Ar-H), 7.93 (d, J=8.73 Hz, 2H, Ar-H), 8.55 (s, H, Ar-H), 10.62 (s, H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 26.88 (CH₃), 31.29 (CH₃), 38.20 (CH₂), 118.86, 130.00, 132.45, 143.49, 146.72, 149.10, 166.89 (C=O), 196.95 (C=O).

C₁₃H₁₄N₄O₂S hesaplanan: (%) C 53.78, H 4.86, N 19.30; **bulunan:** (%) C 53.76, H 4.85, N 19.29.

4.1.1.6. *N*-(4-asetilfenil)-2-(benzotiyazol-2-iltiyo)asetamit (LHS-6)

Sentezlenen türeve dair yapı Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. LHS-6’nın molekül yapısı

Verim: %74. **Erime Derecesi:** 127°C.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 2.73 (s, 3H, CH₃), 4.45 (s, 2H, CH₂), 7.33-7.39 (m, H, Ar-H), 7.43-7.49 (m, H, Ar-H), 7.74 (d, J=8.83 Hz, 2H, Ar-H), 7.82 (d, J=7.54 Hz, H, Ar-H), 7.95 (d, J=8.78 Hz, 2H, Ar-H), 8.02 (d, J=7.99 Hz, H, Ar-H), 10.77 (s, H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 26.89 (CH₃), 38.27 (CH₂), 118.64, 118.92, 121.55, 122.36, 125.03, 126.88, 130.02, 132.50, 135.26, 143.50, 152.96, 166.34 (C=O), 196.95 (C=O).

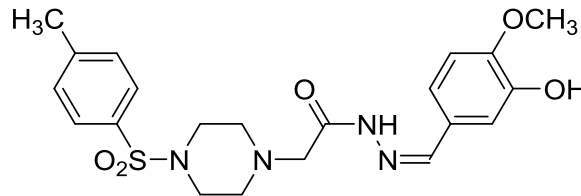
C₁₄H₁₅N₃O₂S hesaplanan: (%) C 59.63, H 4.12, N 8.18; **bulunan:** (%) C 59.61, H 4.13, N 8.17.

4.1.2. *N*’-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il)asetohidrazit türevlerinin eldesi

İki türev yöntem B’ye göre elde edilmiştir.

4.1.2.1. *N*’-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il)asetohidrazit (CS-1)

Sentezlenen türeve dair yapı Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. CS-1’in molekül yapısı

Verim: %69. **Erime Derecesi:** 167°C.

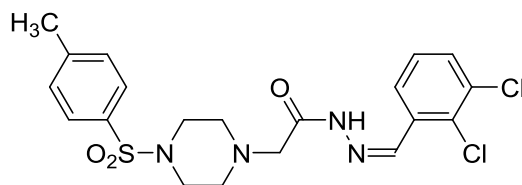
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.53 (s, 2H, piperazin CH₂), 2.64 (s, 2H, piperazin CH₂), 2.85 (s, 2H, piperazin CH₂), 2.92 (s, 2H, piperazin CH₂), 3.06 ve 3.51 (2s, 2H, CH₂CO), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 4.35 (s, 2H, COCH₂), 6.91-6.99 (m, 2H, Ar-H), 7.13 ve 7.18 (2s, 1H, Ar-H), 7.46 (d, J=7.44 Hz, 2H, Ar-H), 7.62 (d, J=7.92 Hz, 2H, Ar-H), 7.77 ve 8.10 (2s, 1H, CH=N), 9.23 ve 9.26 (2s, 1H, OH), 10.88 ve 11.11 (2s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 19.02, 21.49, 46.12, 46.49, 51.92, 52.24, 56.00, 56.49, 57.09, 60.46, 112.25, 112.33, 112.70, 120.36, 120.59, 127.42, 127.53, 128.13, 130.25, 130.33, 131.97, 132.39, 143.65, 144.15, 147.26, 147.85, 149.97, 150.14, 165.51, 170.69.

C₂₁H₂₆N₄O₅S hesaplanan: (%) C 56.49, H 5.87, N 12.55; **bulunan:** (%) C 56.56, H 5.91, N 12.59.

4.1.2.2. *N'*-(2,3-diklorobenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il)asetohidrazit (CS-2)

Sentezlenen türeve dair yapı Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. CS-2'nin molekül yapısı

Verim: %66. **Erime Derecesi:** 196°C.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.55 (s, 2H, piperazine CH₂), 2.65 (s, 2H, piperazin CH₂), 2.85 (s, 2H, piperazin CH₂), 2.93 (s, 2H, piperazin CH₂), 3.12 ve 3.57 (2s, 2H, CH₂CO), 4.35 (s, 2H, COCH₂), 7.39-7.51 (m, 3H, Ar-H), 7.61-7.70 (m, 3H, Ar-H), 7.88 (dt, J=8.40, 2.91 Hz, 1H, Ar-H), 8.32 ve 8.69 (2s, 1H, CH=N), 11.45 ve 11.56 (2s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 21.49, 46.11, 46.48, 51.86, 52.23, 57.02, 60.51, 125.76, 125.91, 128.15, 128.91, 130.26, 130.34, 131.73, 131.94, 132.00, 132.35, 132.75, 134.28, 134.53, 139.14, 143.30, 144.19, 166.32, 171.30.

C₂₀H₂₂Cl₂N₄O₃S hesaplanan: (%) C 51.18, H 4.72, N 11.94; **bulunan:** (%) C 51.25, H 4.84, N 11.88.

4.3. Hücre Kültürü Analizleri

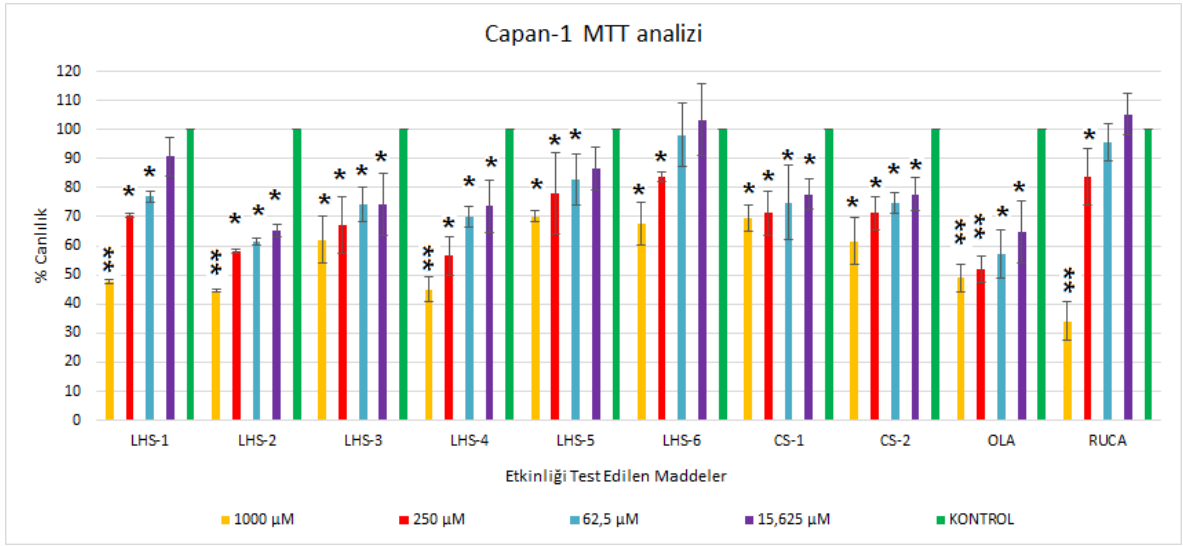
4.3.1. MTT analiz sonuçları

Sentezlenen test maddelerinin ve standart PARP inhibitörlerinin farklı konsantrasyonları hazırlanıp seyreltme yapılarak hücrelere verilmiştir. Sentezlenen tüm test maddeleri ve standart PARP inhibitörleri için en yüksek konsantrasyondan düşüğe doğru seyreltmeleri şu şekilde yapılmış ve 4 farklı dilüsyon (n=5) ile hücrelere uygulanmıştır: 1000; 250; 62,5; 15,63 μ M. Besiyeri kontrol (kör) kuyularının ölçümleri tüm kuyulardan çıkartılarak hesaplamalar çözücü kontrol grubu üzerinden değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

Hücre içeren tüm kuyulardan hücre içermeyen kör kuyusunun mikropalakadaki okuma değerlerinin çıkarılması ile absorbans verileri elde edilmiştir. Hesaplamalar için bu değerler % canlılık değerlerine dönüştürülmüştür. Ortalaması alınan çözücü kontrol grubunun canlılığı %100 kabul edilmiş ve diğer veriler buna göre hesaplanarak grafiklerde % canlılık değerleri sunulmuştur.

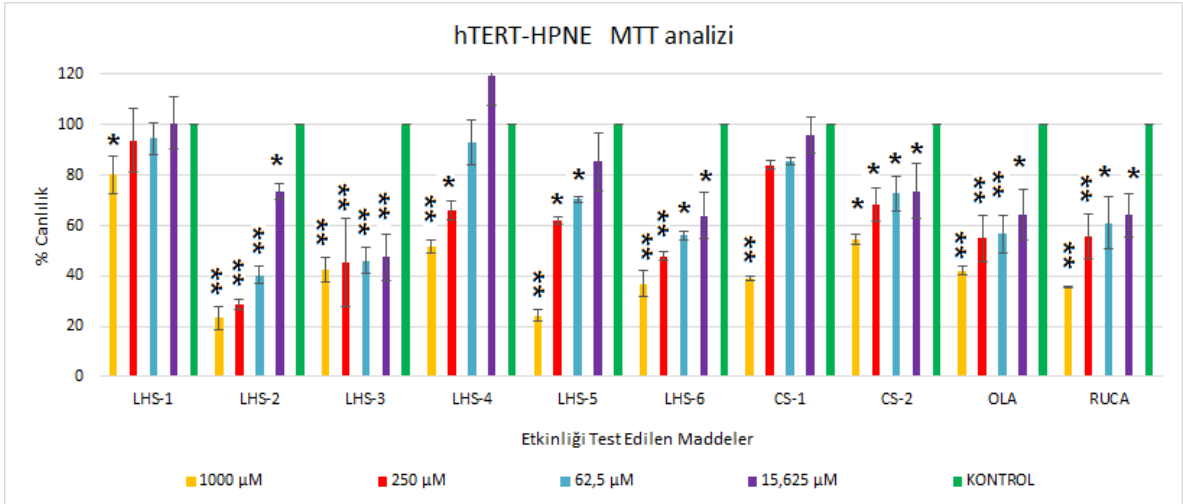
MTT yönteminde elde edilen verilere göre sentezlenen maddeler ve standart PARP inhibitörlerinin hücre proliferasyonuna olan etkileri xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde kullanılacak konsantrasyon aralığının belirlenmesi ve sitotoksosite taraması için ön veri niteliğindedir. Bu veriler baz alınarak xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi analizleri gerçekleştirilmiştir.

Capan-1 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan test maddelerinin MTT analizleri sonucunda elde edilen 24 saatlik % canlılık ve anlamlılıkları Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



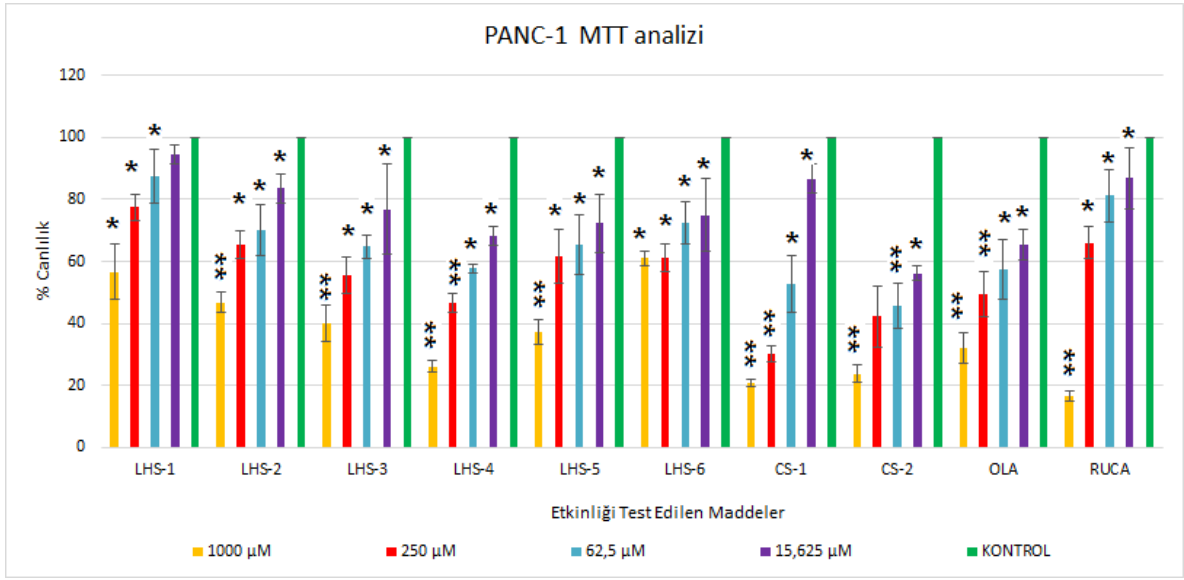
Şekil 4.9. Capan-1 hücreleri üzerinde uygulanan sentez maddeler ve PARP inhibitörleri için MTT analizi ile konsantrasyon aralığının belirlenmesi ve anlamlılıkları ($p < 0,05$ * anlamlı, $p < 0,01$ ** önemli derecede anlamlı, $p > 0,05$ anlamlı değil)

hTERT-HPNE hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan test maddelerinin MTT analizleri sonucunda elde edilen 24 saatlik % canlılık değerleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. hTERT-HPNE hücreleri üzerinde uygulanan sentez maddeler ve PARP inhibitörleri için MTT analizi ile konsantrasyon aralığının belirlenmesi ve anlamlılıkları ($p < 0,05$ * anlamlı, $p < 0,01$ ** önemli derecede anlamlı, $p > 0,05$ anlamlı değil)

PANC-1 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan test maddelerinin MTT analizleri sonucunda elde edilen 24 saatlik % canlılık değerleri Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. PANC-1 hücreleri üzerinde uygulanan sentez maddeleri ve PARP inhibitörleri için MTT analizi ile konsantrasyon aralığının belirlenmesi ve anlamlılıkları ($p < 0,05$ * anlamlı, $p < 0,01$ ** önemli derecede anlamlı, $p > 0,05$ anlamlı değil)

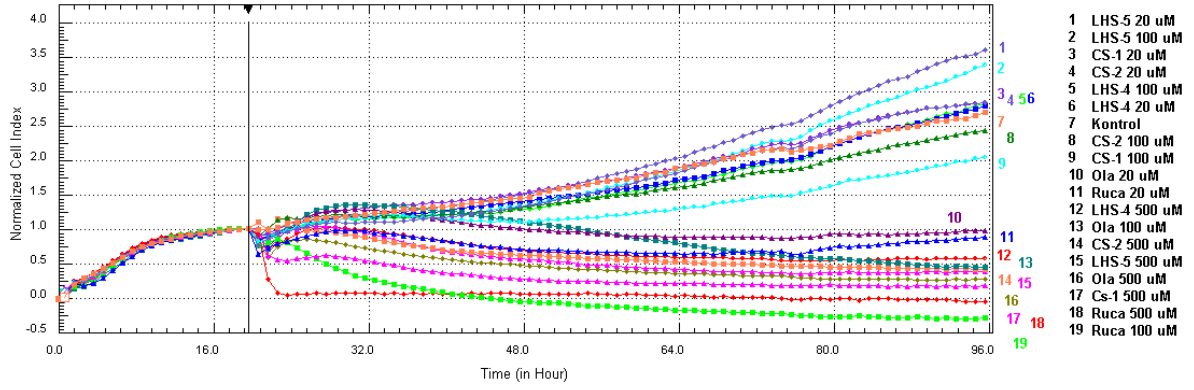
4.3.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sonuçları

MTT yöntemi hücre canlılıkları ve etkin konsantrasyon aralığına göre seçilen sentez maddeleri için xCELLigence RTCA MP Sistemi ile çalışmalar eş zamanlı olarak 3 farklı konsantrasyon üzerinden (500, 100, 20 µM) tekrar edilmiştir (n=5). Veriler saat başı alınmış ve maddelerin hücre proliferasyonlarına olan etkileri belirlenmiştir.

MTT sonuçlarına göre öncelikli olarak LHS-4, LHS-5, CS-1 ve CS-2 için xCELLigence analizinin yapılması planlanmıştır.

Capan-1 hücrelerine ait proliferasyon grafikleri, sistem üzerinde eş zamanlı olarak saat başı ölçülen hücre indeks (cell index: CI) değerinden elde edilmiştir. Hücreler için önceden bilinen logaritmik eğri durumuna göre numuneler hücreye hücre indeks değeri ~0,5 iken 19. saatte (Normalizasyon zamanı: 19:42, maddelerin hücrelere verildiği andan itibaren sıfırlanma noktası) uygulanmıştır.

Capan-1 hücreleri için 72 saatlik normalize hücre proliferasyon eğrileri Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. *xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde test numunelerinin Capan-1 hücreleri üzerinde 72 saatlik normalize hücre proliferasyon grafiği (n=5)*

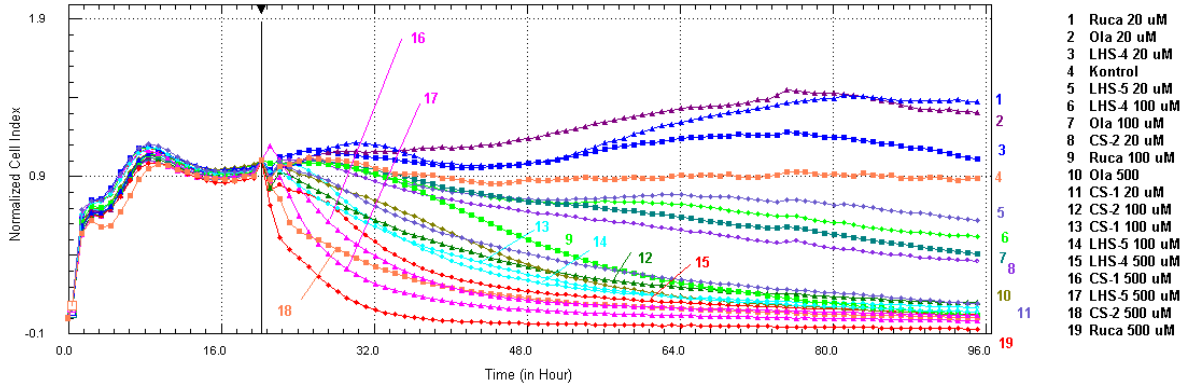
Sentez maddelerinin hücrelere uygulanmasının ardından 24, 48 ve 72 saatlik normalize IC₅₀ konsantrasyonları hesaplanmış ve Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. *Capan-1 hücreleri için xCELLigence yöntemi ile hesaplanan IC₅₀ konsantrasyonları (µM)*

Test Maddeleri	24 saat	48 saat	72 saat
LHS-4	268,69	161,97	337,91
LHS-5	264,77	307,72	192,8
CS-1	298,62	294,83	170,91
CS-2	232,17	164,09	149,07
Olaparib	451,04	120,84	87,90
Rucaparib	23,75	23,03	20,77

hTERT-HPNE hücrelerine ait proliferasyon grafikleri, sistem üzerinde eş zamanlı olarak saat başı ölçülen hücre indeks (cell index: CI) değerinden elde edilmiştir. Hücreler için önceden bilinen logaritmik eğri durumuna göre numuneler hücreye hücre indeks değeri ~1 iken 20. saatte (Normalizasyon zamanı: 20:17, maddelerin hücrelere verildiği andan itibaren sıfırlanma noktası) uygulanmıştır.

hTERT-HPNE hücreleri için 72 saatlik normalize hücre proliferasyon eğrileri Şekil 4.13’te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. *xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde test numunelerinin hTERT-HPNE hücreleri üzerinde 72 saatlik normalize hücre proliferasyon grafiği (n=5)*

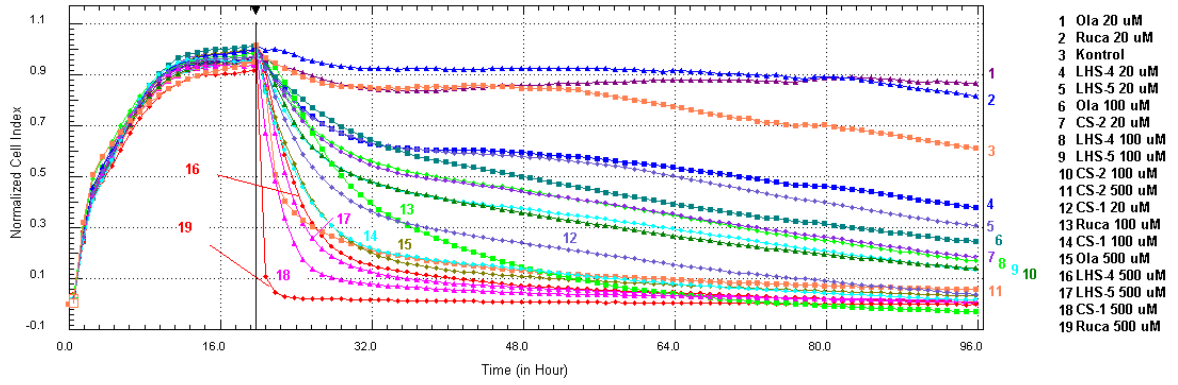
Test numunelerinin hücrelere uygulanmasının ardından 24, 48 ve 72 saatlik normalize IC₅₀ konsantrasyonları hesaplanmış ve Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. *hTERT-HPNE hücreleri için xCELLigence yöntemi ile hesaplanan IC₅₀ konsantrasyonları (µM)*

Test Maddeleri	24 saat	48 saat	72 saat
LHS-4	112,86	129,97	96,74
LHS-5	85,09	32,90	49,48
CS-1	104,31	86,95	85,12
CS-2	42,67	87,19	87,57
Olaparib	109,46	87,98	88,25
Rucaparib	182,31	46,26	29,10

PANC-1 hücrelerine ait proliferasyon grafikleri, sistem üzerinde eş zamanlı olarak saat başı ölçülen hücre indeks (cell index: CI) değerinden elde edilmiştir. Hücreler için önceden bilinen logaritmik eğri durumuna göre numuneler hücreye hücre indeks değeri ~1 iken 19. saatte (Normalizasyon zamanı: 19:53, maddelerin hücrelere verildiği andan itibaren sıfırlanma noktası) uygulanmıştır.

PANC-1 hücreleri için 72 saatlik normalize hücre proliferasyon eğrileri Şekil 4.14’te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. *xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde test numunelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde 72 saatlik normalize hücre proliferasyon grafiği (n=5)*

Test numunelerinin hücrelere uygulanmasının ardından 24, 48 ve 72 saatlik normalize IC₅₀ konsantrasyonları hesaplanmış ve Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. *PANC-1 hücreleri için xCELLigence yöntemi ile hesaplanan IC₅₀ konsantrasyonları (µM)*

Test Maddeleri	24 saat	48 saat	72 saat
LHS-4	112,83	150,67	88,88
LHS-5	140,81	109,81	87,93
CS-1	82,39	84,95	71,41
CS-2	117,48	111,62	117,22
Olaparib	134,18	32,61	82,15
Rucaparib	71,67	74,65	23,94

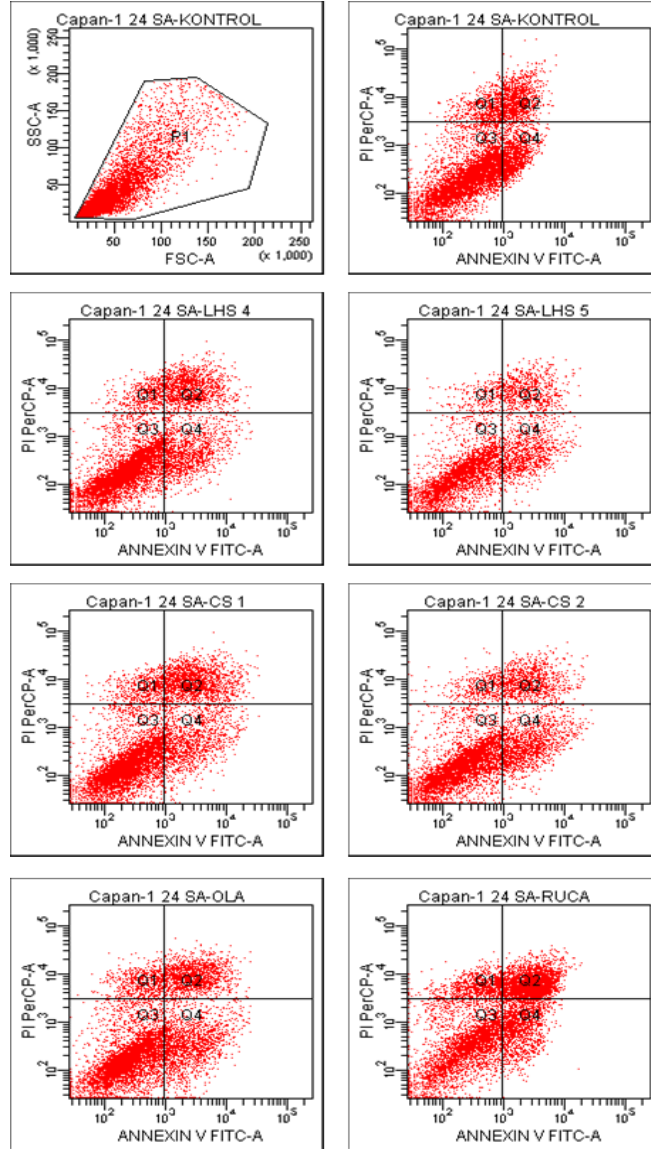
4.3.3. Akım sitometri analizleri

Sentez maddelerinin moleküler farmakolojik yöntemlerle araştırılması amacıyla akış sitometrisinde apoptotik hücre değerlendirme ve görüntüleme analizleri yapılmıştır.

Bunun için Annexin V-FITC/PI, kaspaz-3 ve mitokondriyal membran potansiyeli (JC-1) ve DNA analizi yöntemlerinde xCELLigence RTCA MP sisteminden elde edilen ve Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te gösterilmiş olan 24 ve 48 saat IC₅₀ değerlerinin hücreler üzerindeki etkileri akış sitometrisinde analiz edilmiştir.

4.3.3.1. Annexin V-FITC/PI ile apoptoz tayini

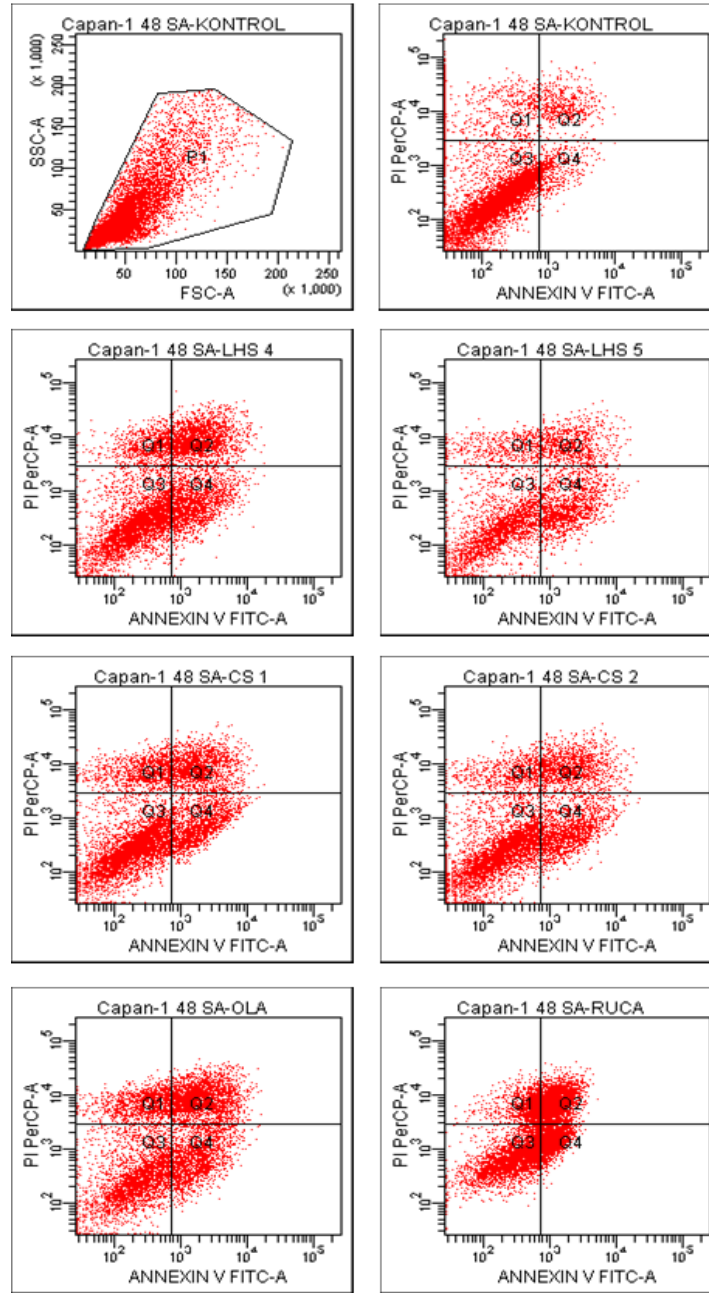
Capan-1 hücreleri için 24 saatlik IC₅₀ değerlerine göre BD Annexin V-FITC/PI Apoptoz Kit 1 kullanılarak elde edilen apoptoz analiz sonuçları Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.15. Capan-1 hücrelerinde 24. saat IC₅₀ değerlerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz sonuçları

Capan-1 hücrelerinde 24 saat için LHS-4 IC₅₀: 268,69 µM; LHS-5 IC₅₀: 264,77 µM; CS-1 IC₅₀: 298,62 µM; CS-2 IC₅₀: 264,77 µM; olaparib IC₅₀: 451,04 µM; rucaparib IC₅₀: 23,75 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

Capan-1 hücreleri için 48 saatlik IC₅₀ değerlerine göre BD Annexin V-FITC/PI Apoptoz Kit 1 kullanılarak elde edilen apoptoz analiz sonuçları Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.16. Capan-1 hücrelerinde 48. saat IC₅₀ değerlerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz sonuçları

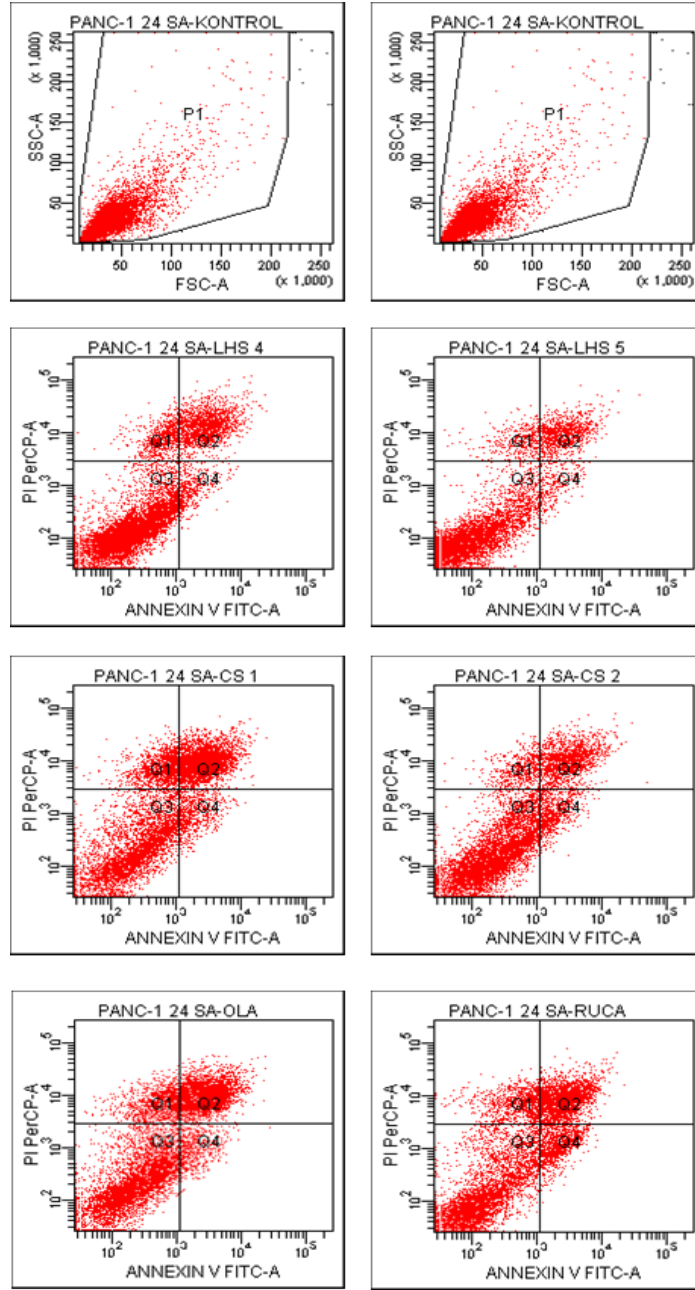
Capan-1 hücrelerinde 48 saat için LHS-4 IC₅₀: 161,97 µM; LHS-5 IC₅₀: 307,72 µM; CS-1 IC₅₀: 294,83 µM; CS-2 IC₅₀: 164,09 µM; olaparib IC₅₀: 120,84 µM; rucaparib IC₅₀: 23,03 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

Kapılama işlemi hücre granülaritesi ve büyüklüğüne göre hücre popülasyonu içinden seçilmiştir (P1) ve floresan detektörlerden elde edilen nokta alan grafiklerinde kadranslara (Q1, Q2, Q3, Q4) ayrılarak veriler elde edilmiştir. Annexin V-FITC/PI ile apoptotik-nekrotik hücre analizi sonucuna göre % hücre değerleri şeklinde Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. *Capan-1 hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonrası apoptotik/nekrotik hücre oranları (% değerler)*

24 saat				
Test Maddeleri	Q3 (Canlı Hücre)	Q4 (Erken Apoptotik Hücre)	Q2 (Geç Apoptotik Hücre)	Q1 (Nekrotik Hücre)
Kontrol (%0,1 DMSO)	66,0	14,1	12,4	7,5
LHS-4	64,1	14,8	15,1	6,0
LHS-5	66,1	16,9	12,0	4,9
CS-1	58,3	14,9	20,2	6,5
CS-2	62,7	19,2	12,7	5,4
Olaparib	55,1	20,7	16,8	7,4
Rucaparib	40,1	18,0	31,9	10,0
48 saat				
Kontrol (%0,1 DMSO)	74,2	4,8	5,7	15,3
LHS-4	48,2	19,6	22,0	10,3
LHS-5	47,8	26,5	15,0	10,7
CS-1	50,8	18,9	17,7	12,5
CS-2	52,6	20,6	17,1	9,7
Olaparib	36,6	20,3	28,2	15,0
Rucaparib	38,7	19,2	28,6	13,5

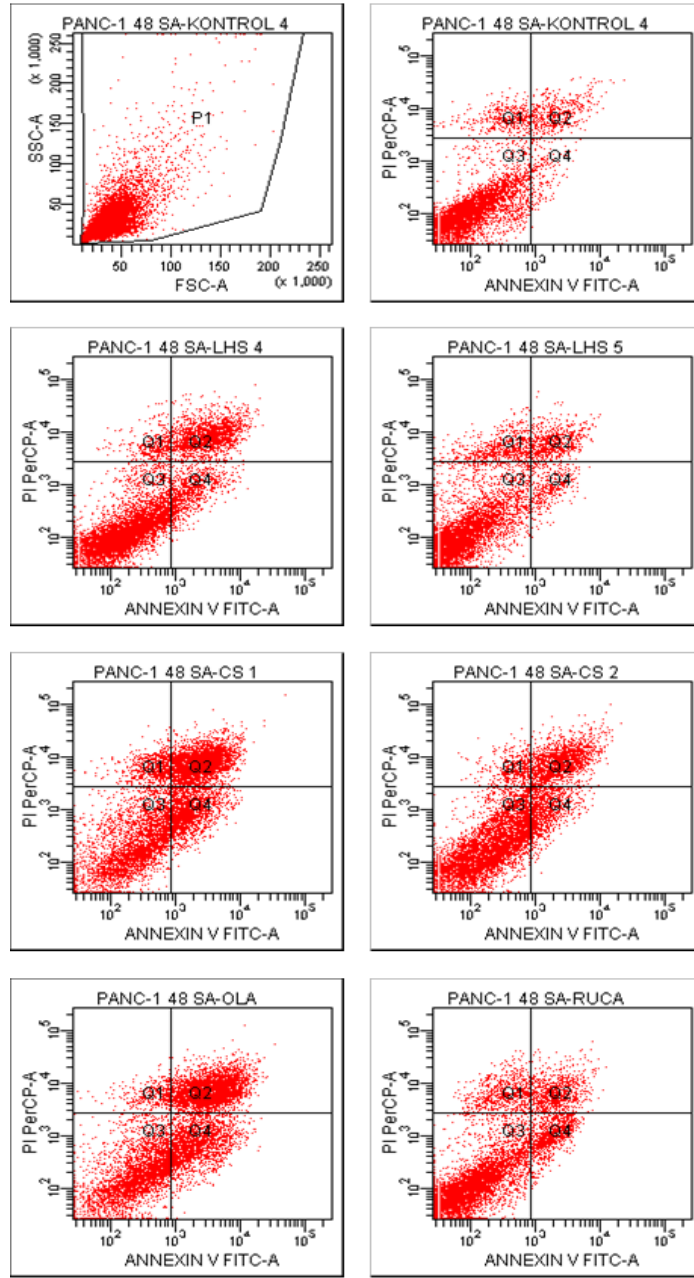
PANC-1 hücreleri için 24 saatlik IC₅₀ değerlerine göre BD Annexin V-FITC/PI Apoptoz Kit 1 kullanılarak elde edilen apoptoz analiz sonuçları Şekil 4.17’de verilmiştir.



Şekil 4.17. PANC-1 hücrelerinde 24. saat IC₅₀ değerlerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz sonuçları

PANC-1 hücrelerinde 24 saat için LHS-4 IC₅₀: 112,83 µM; LHS-5 IC₅₀: 140,81 µM; CS-1 IC₅₀: 82,39 µM; CS-2 IC₅₀: 117,48 µM; olaparib IC₅₀: 134,18 µM; rucaparib IC₅₀: 71,67 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

PANC-1 hücreleri için 48 saatlik IC₅₀ değerlerine göre BD Annexin V-FITC/PI Apoptoz Kit 1 kullanılarak elde edilen apoptoz analiz sonuçları Şekil 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.18. PANC-1 hücrelerinde 48. saat IC₅₀ değerlerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz sonuçları

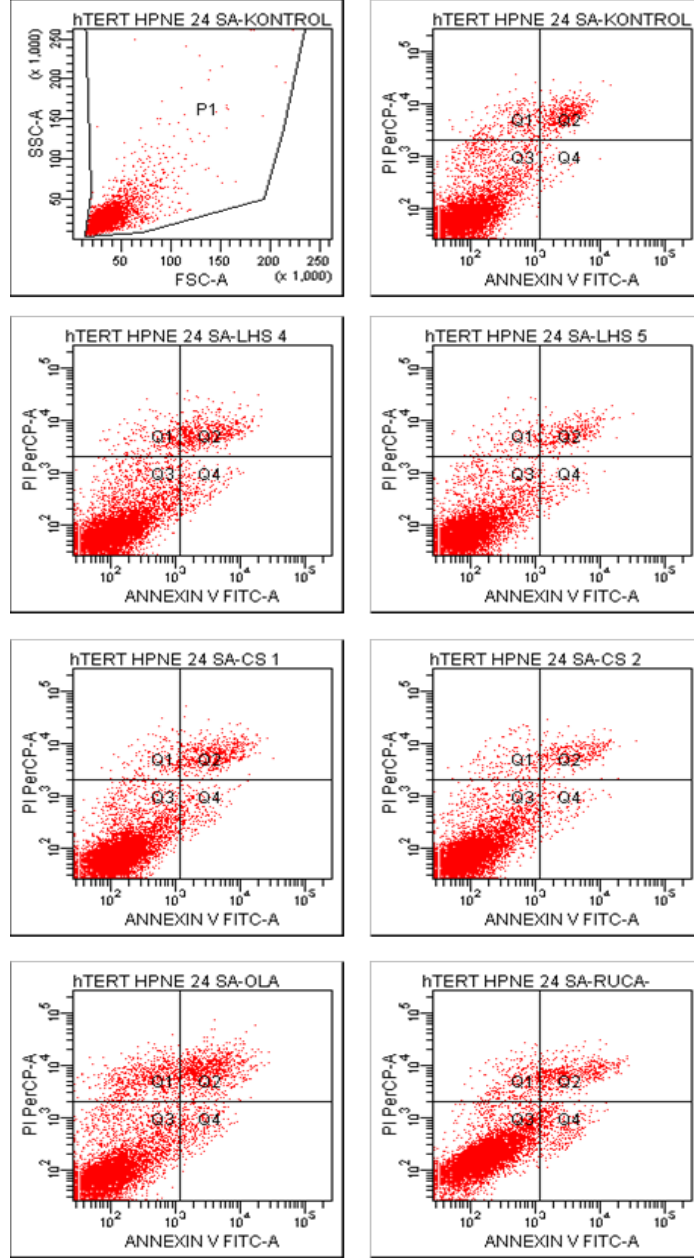
PANC-1 hücrelerinde 48 saat için LHS-4 IC₅₀: 150,67 µM; LHS-5 IC₅₀: 109,81 µM; CS-1 IC₅₀: 84,95 µM; CS-2 IC₅₀: 111,62 µM; olaparib IC₅₀: 32,61 µM; rucaparib IC₅₀: 74,65 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

Kapılama işlemi hücre granülaritesi ve büyüklüğüne göre hücre popülasyonu içinden seçilmiştir (P1) ve floresan detektörlerden elde edilen nokta alan grafiklerinde kadranslara (Q1, Q2, Q3, Q4) ayrılarak veriler elde edilmiştir. Annexin V-FITC/PI ile apoptotik-nekrotik hücre analizi sonucuna göre % hücre değerleri şeklinde Tablo 4.5’te verilmiştir.

Tablo 4.5. *PANC-1 hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonrası apoptotik/nekrotik hücre oranları (% değerler)*

Test Maddeleri	24 saat			
	Q3 (Canlı Hücre)	Q4 (Erken Apoptotik Hücre)	Q2 (Geç Apoptotik Hücre)	Q1 (Nekrotik Hücre)
Kontrol (%0,1 DMSO)	85,0	3,0	7,5	4,5
LHS-4	71,2	4,7	17,2	6,9
LHS-5	79,2	4,1	6,8	5,1
CS-1	44,0	13,8	16,9	13,1
CS-2	68,9	8,2	16,8	6,1
Olaparib	48,7	5,6	33,6	12,1
Rucaparib	55,6	10,6	9,2	10,1
Test Maddeleri	48 saat			
	Q3 (Canlı Hücre)	Q4 (Erken Apoptotik Hücre)	Q2 (Geç Apoptotik Hücre)	Q1 (Nekrotik Hücre)
Kontrol (%0,1 DMSO)	85,4	2,4	6,3	5,9
LHS-4	67,3	9,5	19,1	4,2
LHS-5	82,1	3,5	12,1	7,0
CS-1	38,6	6,8	36,1	7,7
CS-2	66,7	10,6	17,9	4,7
Olaparib	37,1	21,4	37,7	3,9
Rucaparib	72,6	11,1	23,2	7,6

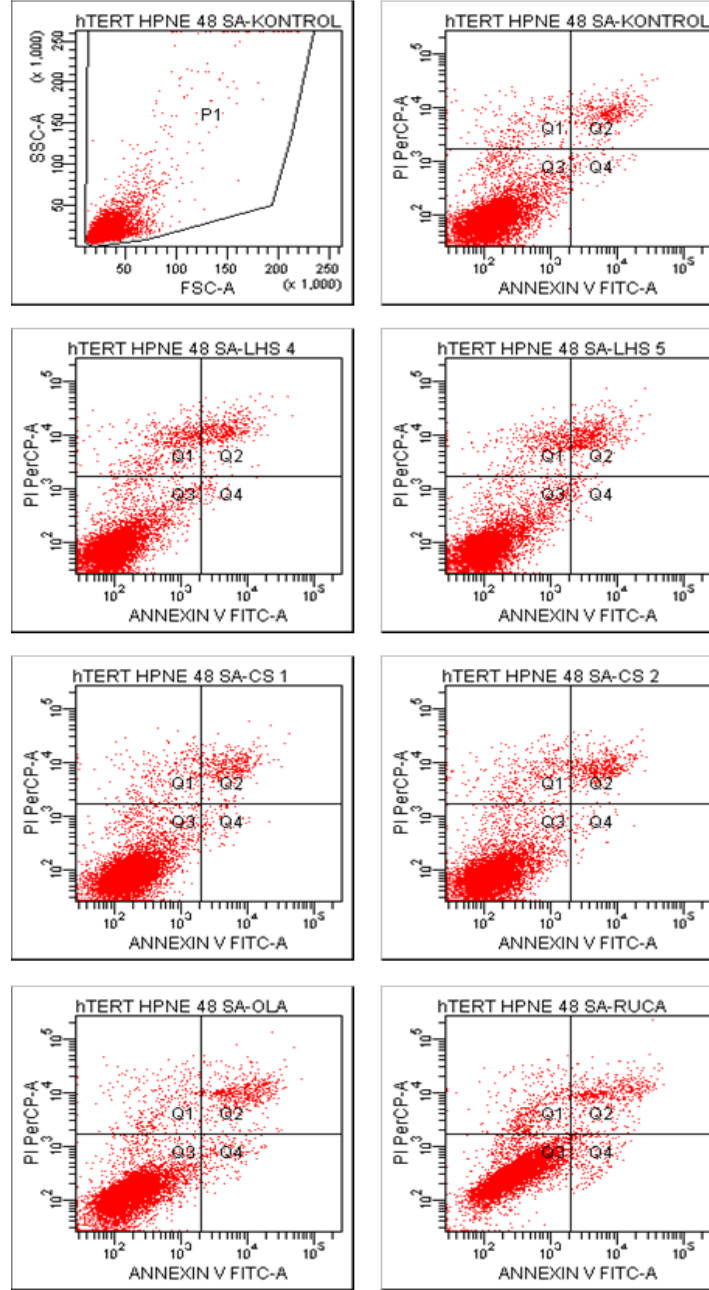
hTERT-HPNE hücreleri için 24 saatlik IC_{50} değerlerine göre BD Annexin V-FITC/PI Apoptoz Kit 1 kullanılarak elde edilen apoptoz analiz sonuçları Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. hTERT-HPNE hücrelerinde 24. saat IC_{50} değerlerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz ölçüm sonuçları

hTERT-HPNE hücrelerinde 24 saat için LHS-4 IC_{50} : 116,6 μ M; LHS-5 IC_{50} : 151,65 μ M; CS-1 IC_{50} : 464,3 μ M; CS-2 IC_{50} : 114,74 μ M; olaparib IC_{50} : 56,057 μ M; rucaparib IC_{50} : 166,23 μ M konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

hTERT-HPNE hücreleri için 48 saatlik IC_{50} değerlerine göre BD Annexin V-FITC/PI Apoptoz Kit 1 kullanılarak elde edilen apoptoz analiz sonuçları Şekil 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4.20. hTERT-HPNE hücrelerinde 48. saat IC_{50} değerlerinin Annexin V-FITC/PI ile apoptotik/nekrotik hücre analiz ölçüm sonuçları

hTERT-HPNE hücrelerinde 48 saat için LHS-4 IC_{50} : 263,15 μ M; LHS-5 IC_{50} : 137,68 μ M; CS-1 IC_{50} : 434,66 μ M; CS-2 IC_{50} : 426,16 μ M; olaparib IC_{50} : 41,89 μ M; rucaparib IC_{50} : 122,49 μ M konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

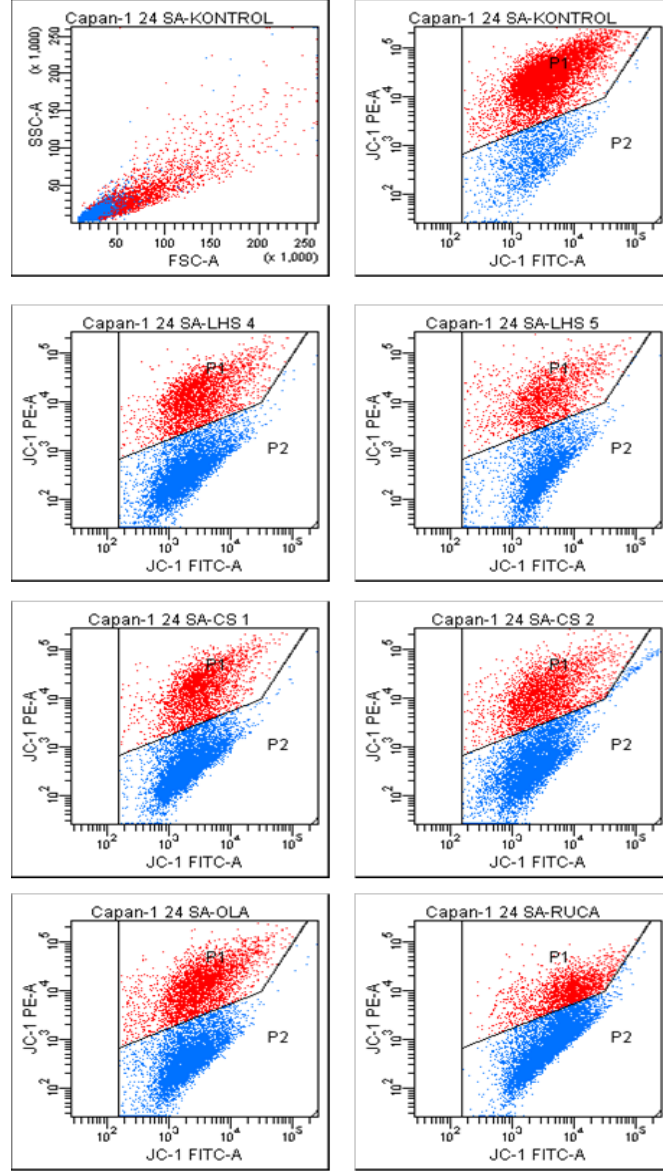
Kapılama işlemi hücre granülaritesi ve büyüklüğüne göre hücre popülasyonu içinden seçilmiştir (P1) ve floresan detektörlerden elde edilen nokta alan grafiklerinde kadranslara (Q1, Q2, Q3, Q4) ayrılarak veriler elde edilmiştir. Annexin V-FITC/PI ile apoptotik-nekrotik hücre analizi sonucuna göre % hücre değerleri şeklinde Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6. *hTERT-HPNE hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonrası apoptotik/nekrotik hücre oranları (% değerler)*

Test Maddeleri	24 saat			
	Q3 (Canlı Hücre)	Q4 (Erken Apoptotik Hücre)	Q2 (Geç Apoptotik Hücre)	Q1 (Nekrotik Hücre)
Kontrol (%0,1 DMSO)	91,7	0,5	5,0	2,8
LHS-4	89,5	2,0	5,9	2,6
LHS-5	93,9	1,1	3,5	1,5
CS-1	90,2	2,0	5,9	1,8
CS-2	93,2	1,4	3,6	1,8
Olaparib	78,3	3,2	10,4	8,1
Rucaparib	87,3	3,5	5,9	3,4
Test Maddeleri	48 saat			
	Q3 (Canlı Hücre)	Q4 (Erken Apoptotik Hücre)	Q2 (Geç Apoptotik Hücre)	Q1 (Nekrotik Hücre)
Kontrol (%0,1 DMSO)	92,5	0,7	4,4	2,4
LHS-4	88,2	0,5	4,8	6,4
LHS-5	87,9	0,7	6,5	4,9
CS-1	91,4	0,9	4,4	3,3
CS-2	89,6	0,5	5,5	4,4
Olaparib	88,4	1,9	6,2	3,5
Rucaparib	87,1	2,1	5,9	4,9

4.3.3.2. Mitokondriyal membran potansiyeli ölçümü

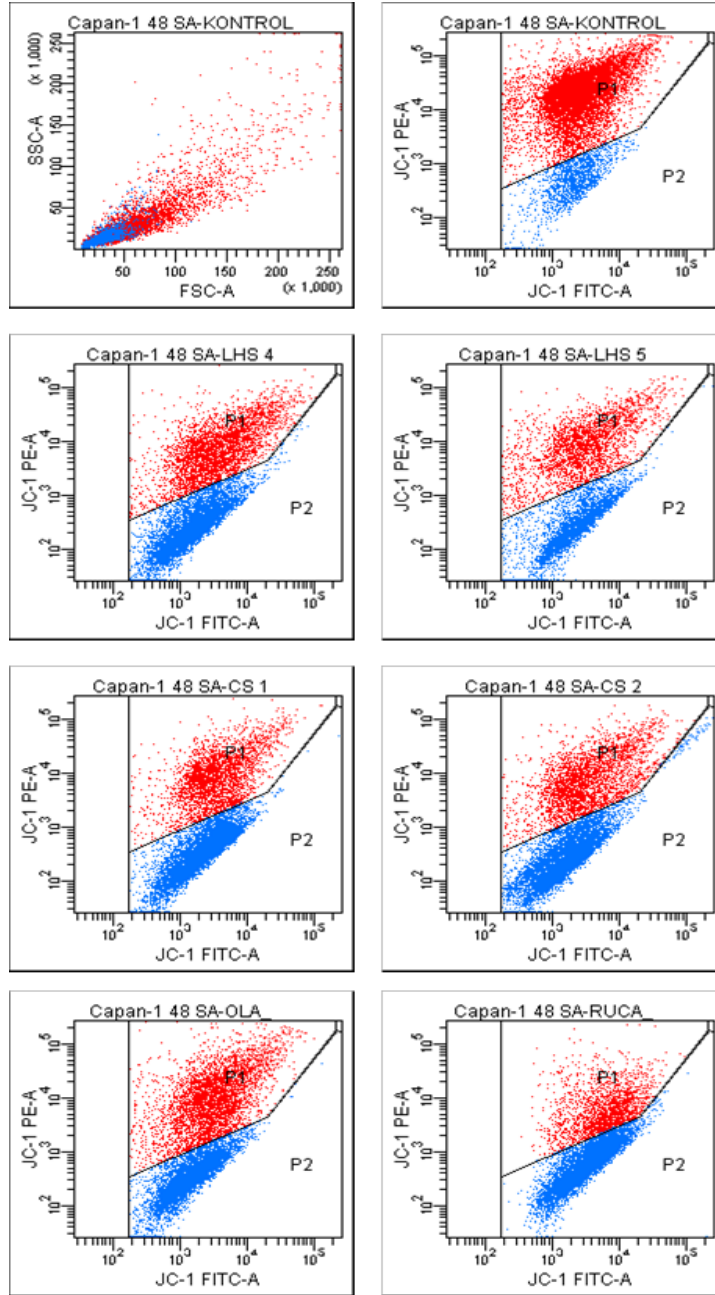
Capan-1 hücreleri için 24 saatlik IC₅₀ değerlerine göre mitokondriyal membran potansiyeli analiz sonuçları Şekil 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.21. Capan-1 hücrelerinde 24. saat IC₅₀ değerlerinin JC-1 boyası ile mitokondriyal membran potansiyelinin analiz sonuçları

Capan-1 hücrelerinde 24 saat için LHS-4 IC₅₀: 268,69 μ M; LHS-5 IC₅₀: 264,77 μ M; CS-1 IC₅₀: 298,62 μ M; CS-2 IC₅₀: 264,77 μ M; olaparib IC₅₀: 451,04 μ M; rucaparib IC₅₀: 23,75 μ M konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

Capan-1 hücreleri için 48 saatlik IC₅₀ değerlerine göre mitokondriyal membran potansiyeli analiz sonuçları Şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.22. Capan-1 hücrelerinde 48. saat IC₅₀ değerlerinin JC-1 boyası ile mitokondriyal membran potansiyelinin analiz sonuçları

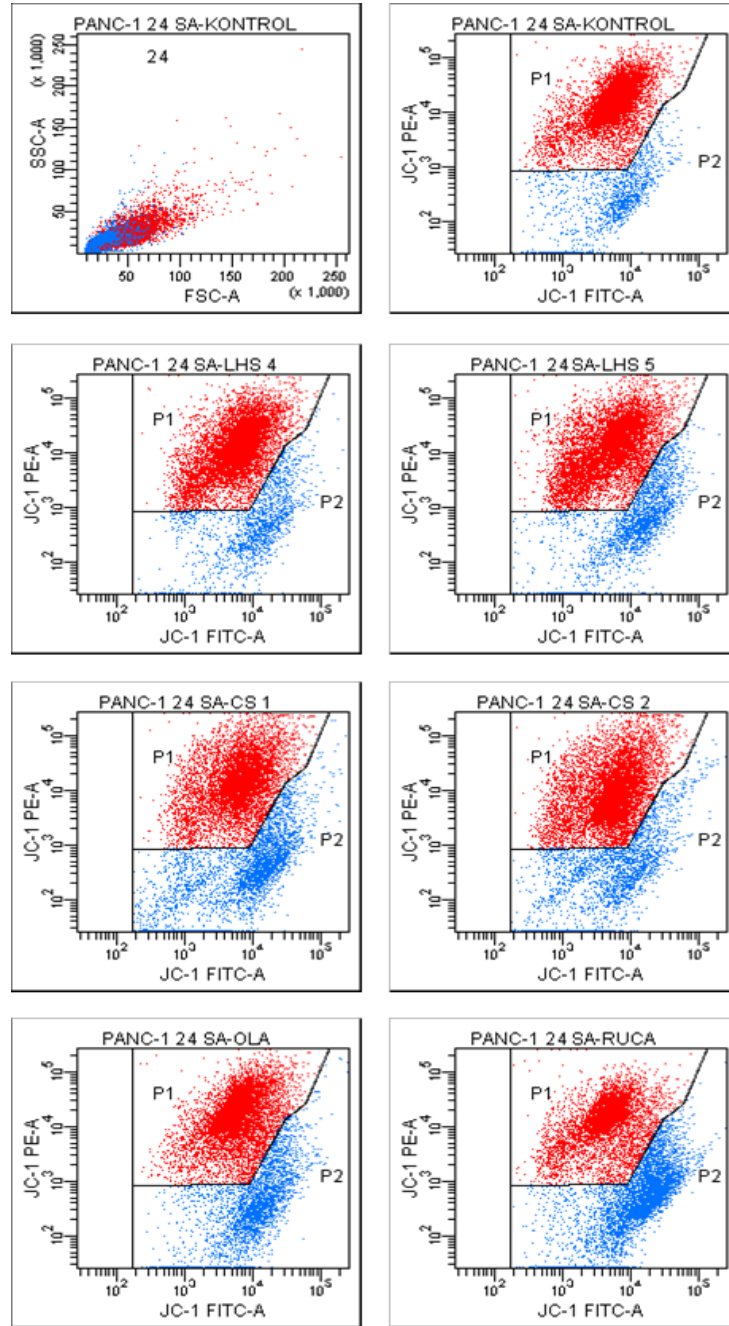
Capan-1 hücrelerinde 48 saat için LHS-4 IC₅₀: 161,97 µM; LHS-5 IC₅₀: 307,72 µM; CS-1 IC₅₀: 294,83 µM; CS-2 IC₅₀: 164,09 µM; olaparib IC₅₀: 120,84 µM; rucaparib IC₅₀: 23,03 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

Kapılama işlemi hücre granülaritesi ve büyüklüğüne göre hücre popülasyonu içinden seçilmiştir ve floresan detektörlerden elde edilen nokta alan grafiklerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimler 2 ayrı popülasyondaki (uyarılmamış: P1, uyarılmış: P2) % hücre değerleri şeklinde gösterilmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. *Capan-1 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim oranları (% değerler; mitokondriyal membran potansiyeli P1: uyarılmamış, P2: uyarılmış)*

24 saat		
Test Maddeleri	P1 (-)	P2 (+)
Kontrol (%0,1 DMSO)	81,1	18,6
LHS-4	31,2	67,6
LHS-5	19,6	43,5
CS-1	28,7	71,3
CS-2	32,0	67,6
Olaparib	37,4	62,3
Rucaparib	21,6	79,1
48 saat		
Kontrol (%0,1 DMSO)	84,1	14,5
LHS-4	35,9	59,4
LHS-5	25,8	33,9
CS-1	30,5	68,7
CS-2	30,8	66,4
Olaparib	41,5	57,0
Rucaparib	20,8	79,6

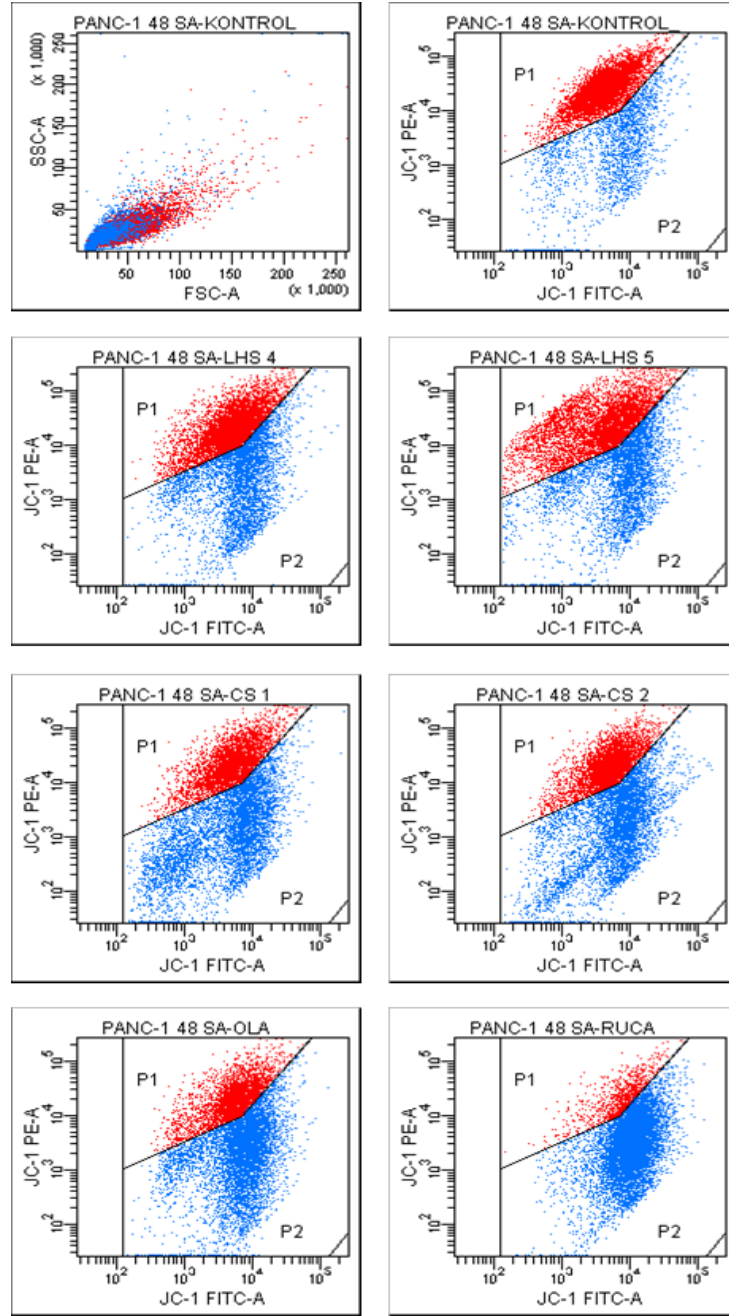
PANC-1 hücreleri için 24 saatlik IC₅₀ değerlerine göre mitokondriyal membran potansiyeli analiz sonuçları Şekil 4.23'te verilmiştir.



Şekil 4.23. PANC-1 hücrelerinde 24. saat IC₅₀ değerlerinin JC-1 boyası ile mitokondriyal membran potansiyelinin analiz sonuçları

PANC-1 hücrelerinde 24 saat için LHS-4 IC₅₀: 112,83 µM; LHS-5 IC₅₀: 140,81 µM; CS-1 IC₅₀: 82,39 µM; CS-2 IC₅₀: 117,48 µM; olaparib IC₅₀: 134,18 µM; rucaparib IC₅₀: 71,67 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

PANC-1 hücreleri için 48 saatlik IC₅₀ değerlerine göre mitokondriyal membran potansiyeli analiz sonuçları Şekil 4.24'te verilmiştir.



Şekil 4.24. PANC-1 hücrelerinde 48. saat IC₅₀ değerlerinin JC-1 boyası ile mitokondriyal membran potansiyelinin analiz sonuçları

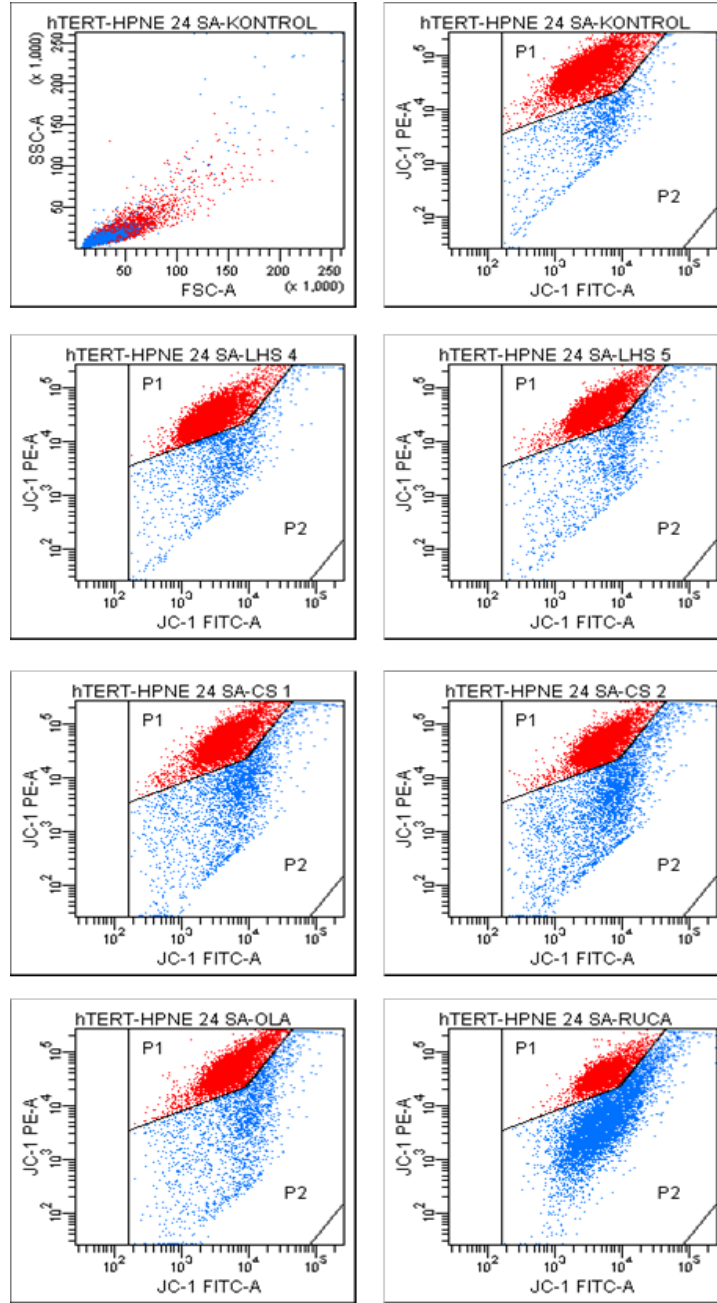
PANC-1 hücrelerinde 48 saat için LHS-4 IC₅₀: 150,67 μ M; LHS-5 IC₅₀: 109,81 μ M; CS-1 IC₅₀: 84,95 μ M; CS-2 IC₅₀: 111,62 μ M; olaparib IC₅₀: 32,61 μ M; rucaparib IC₅₀: 74,65 μ M konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

Kapılama işlemi hücre granülaritesi ve büyüklüğüne göre hücre popülasyonu içinden seçilmiştir ve floresan detektörlerden elde edilen nokta alan grafiklerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimler 2 ayrı popülasyondaki (uyarılmamış: P1, uyarılmış: P2) % hücre değerleri şeklinde gösterilmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. *PANC-1 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim oranları (% değerler; mitokondriyal membran potansiyeli P1: uyarılmamış, P2: uyarılmış)*

24 saat		
Test Maddeleri	P1 (-)	P2 (+)
Kontrol (%0,1 DMSO)	87,4	12,7
LHS-4	84,2	15,9
LHS-5	75,7	22,5
CS-1	67,8	32,4
CS-2	76,4	23,6
Olaparib	72,4	28,0
Rucaparib	55,1	45,0
48 saat		
Kontrol (%0,1 DMSO)	79,8	20,4
LHS-4	56,8	43,8
LHS-5	51,4	42,2
CS-1	40,2	60,2
CS-2	44,3	56,1
Olaparib	33,4	67,0
Rucaparib	47,5	52,5

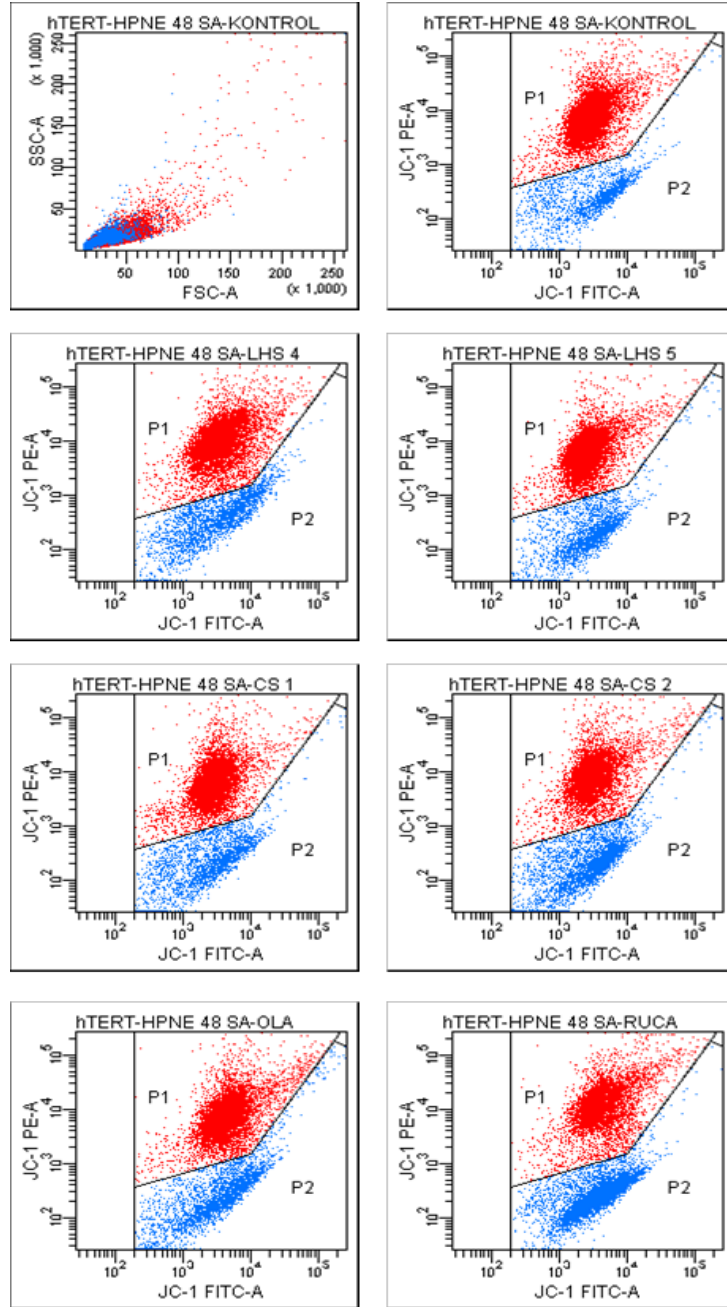
hTERT-HPNE hücreleri için 24 saatlik IC₅₀ değerlerine göre mitokondriyal membran potansiyeli analiz sonuçları Şekil 4.25'te verilmiştir.



Şekil 4.25. hTERT-HPNE hücrelerinde 24. saat IC₅₀ değerlerinin JC-1 boyası ile mitokondriyal membran potansiyelinin analiz sonuçları

hTERT-HPNE hücrelerinde 24 saat için LHS-4 IC₅₀: 116,6 µM; LHS-5 IC₅₀: 151,65 µM; CS-1 IC₅₀: 464,3 µM; CS-2 IC₅₀: 114,74 µM; olaparib IC₅₀: 56,057 µM; rucaparib IC₅₀: 166,23 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

hTERT-HPNE hücreleri için 48 saatlik IC₅₀ değerlerine göre mitokondriyal membran potansiyeli analiz sonuçları Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.26. hTERT-HPNE hücrelerinde 48. saat IC₅₀ değerlerinin JC-1 boyası ile mitokondriyal membran potansiyelinin analiz sonuçları

hTERT-HPNE hücrelerinde 48 saat için LHS-4 IC₅₀: 263,15 µM; LHS-5 IC₅₀: 137,68 µM; CS-1 IC₅₀: 434,66 µM; CS-2 IC₅₀: 426,16 µM; olaparib IC₅₀: 41,89 µM; rucaparib IC₅₀: 122,49 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

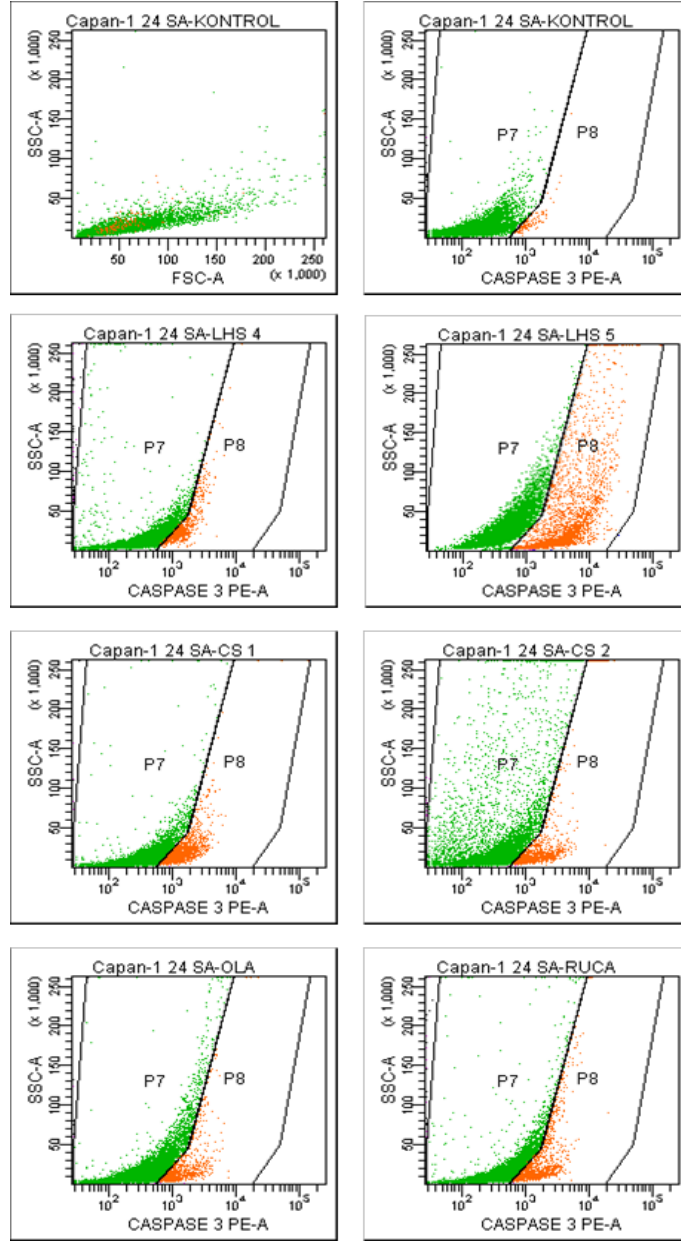
Kapılama işlemi hücre granülaritesi ve büyüklüğüne göre hücre popülasyonu içinden seçilmiştir ve floresan detektörlerden elde edilen nokta alan grafiklerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişimler 2 ayrı popülasyondaki (uyarılmamış: P1, uyarılmış: P2) % hücre değerleri şeklinde gösterilmiştir (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. *hTERT-HPNE hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim oranları (% değerler; mitokondriyal membran potansiyeli P1: uyarılmamış, P2: uyarılmış)*

24 saat		
Test Maddeleri	P1 (-)	P2 (+)
Kontrol (%0,1 DMSO)	87,9	12,1
LHS-4	84,7	15,4
LHS-5	86,0	14,3
CS-1	73,9	26,2
CS-2	65,9	34,6
Olaparib	78,0	22,6
Rucaparib	30,7	70,0
48 saat		
Kontrol (%0,1 DMSO)	83,9	15,7
LHS-4	75,8	24,0
LHS-5	78,6	21,0
CS-1	75,6	23,4
CS-2	68,3	31,0
Olaparib	70,2	29,1
Rucaparib	48,3	51,6

4.3.3.3. Aktif kaspaz-3 apoptoz tayini

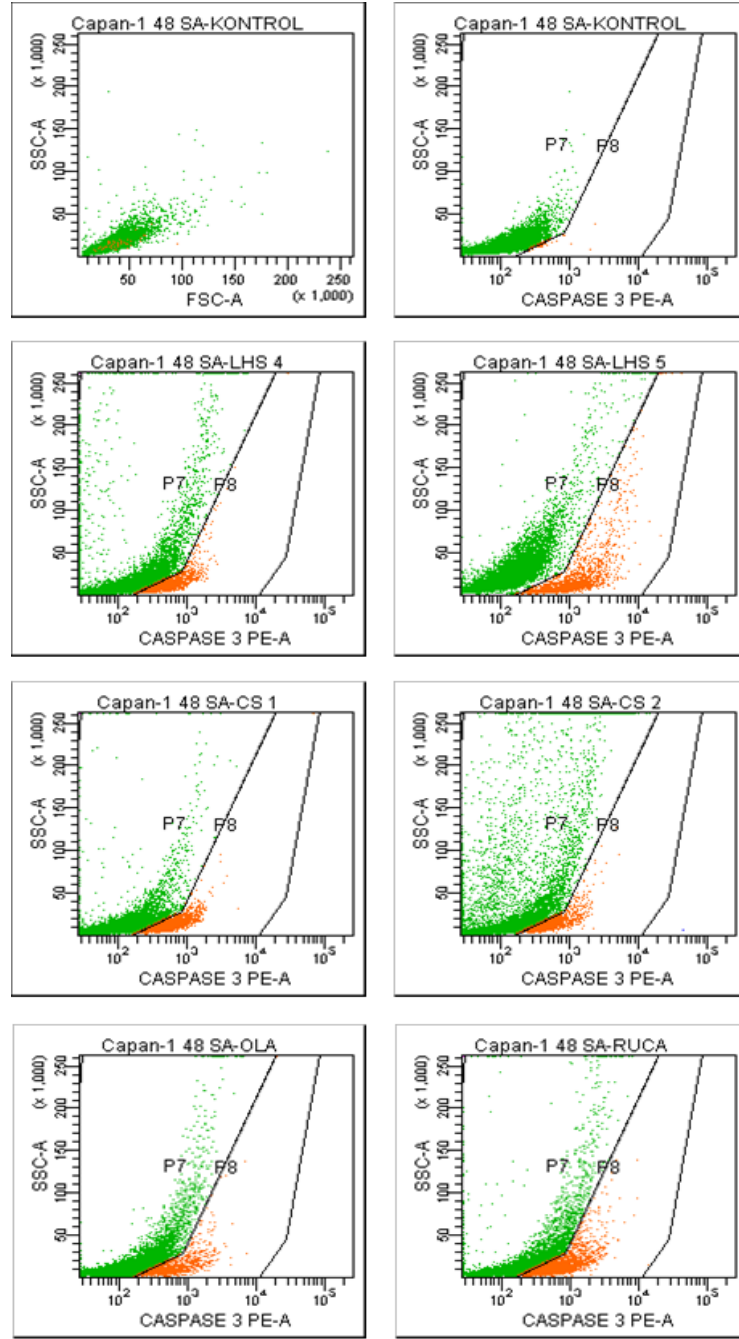
Capan-1 hücreleri için 24 saatlik IC₅₀ değerlerinin kaspaz-3 ile apoptoz analizi sonuçları Şekil 4.27’de verilmiştir.



Şekil 4.27. Capan-1 hücrelerinde 24. saat IC₅₀ değerlerinin kaspaz-3 analiz sonuçları

Capan-1 hücrelerinde 24 saat için LHS-4 IC₅₀: 268,69 µM; LHS-5 IC₅₀: 264,77 µM; CS-1 IC₅₀: 298,62 µM; CS-2 IC₅₀: 264,77 µM; olaparib IC₅₀: 451,04 µM; rucaparib IC₅₀: 23,75 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

Capan-1 hücreleri için 48 saatlik IC₅₀ değerlerinin kaspaz-3 ile apoptoz analizi Şekil 4.28’de verilmiştir.



Şekil 4.28. Capan-1 hücrelerinde 48. saat IC₅₀ değerlerinin kaspaz-3 analiz sonuçları

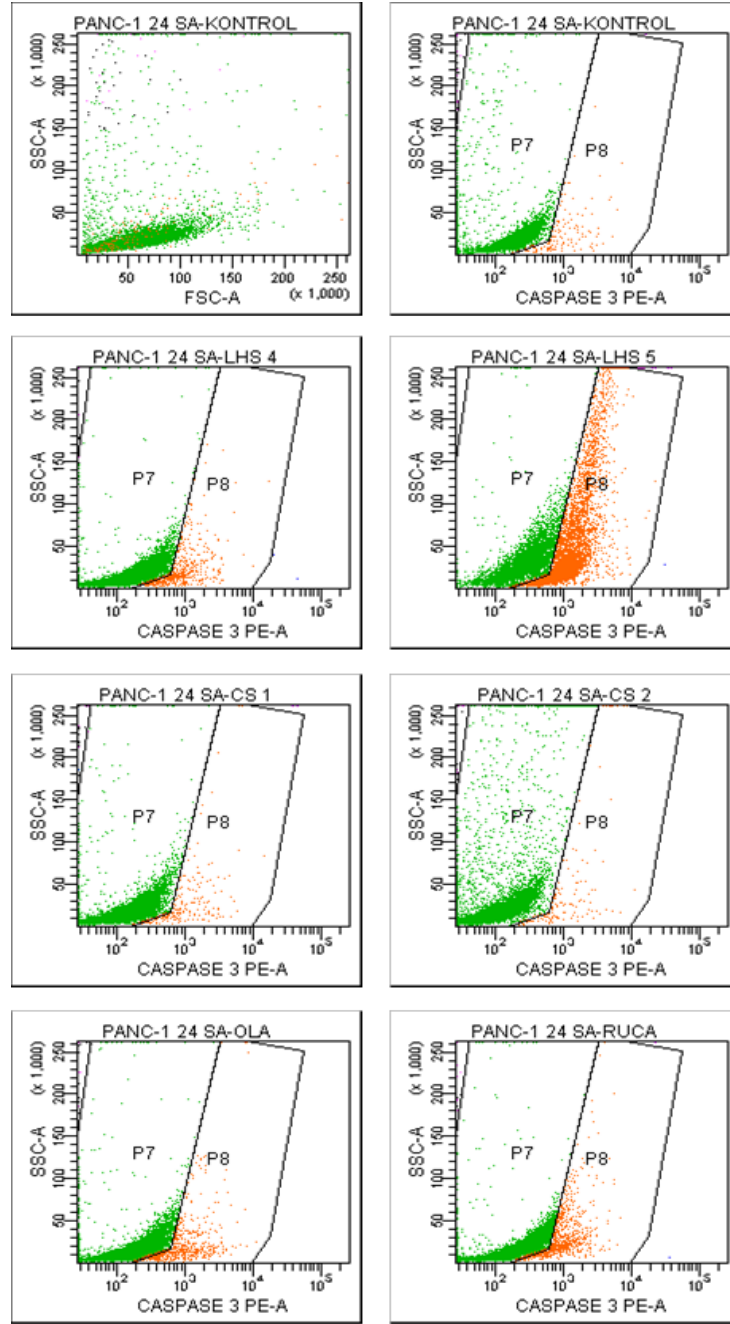
Capan-1 hücrelerinde 48 saat için LHS-4 IC₅₀: 161,97 µM; LHS-5 IC₅₀: 307,72 µM; CS-1 IC₅₀: 294,83 µM; CS-2 IC₅₀: 164,09 µM; olaparib IC₅₀: 120,84 µM; rucaparib IC₅₀: 23,03 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

Kapılama işlemi hücre granülaritesi ve büyüklüğüne göre hücre popülasyonu içinden seçilmiştir ve floresan detektörlerden elde edilen nokta alan grafiklerinde 2 ayrı popülasyondaki (kaspaz-3 inaktif: P7, aktif: P8) artış % hücre değerleri şeklinde gösterilmiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. *Capan-1 hücrelerinde kaspaz-3 ile apoptoz analizi değişim oranları (% değerler; kaspaz-3 P7: inaktif, P8: aktif)*

24 saat		
Test Maddeleri	P7 (-)	P8 (+)
Kontrol (%0,1 DMSO)	95,6	1,3
LHS-4	88,5	8,6
LHS-5	72,5	27,0
CS-1	80,1	18,5
CS-2	86,2	9,9
Olaparib	90,3	8,0
Rucaparib	86,4	11,6
48 saat		
Kontrol (%0,1 DMSO)	99,5	0,5
LHS-4	87,3	12,6
LHS-5	81,0	19,0
CS-1	80,0	20,0
CS-2	88,0	12,0
Olaparib	86,7	13,4
Rucaparib	75,2	25,0

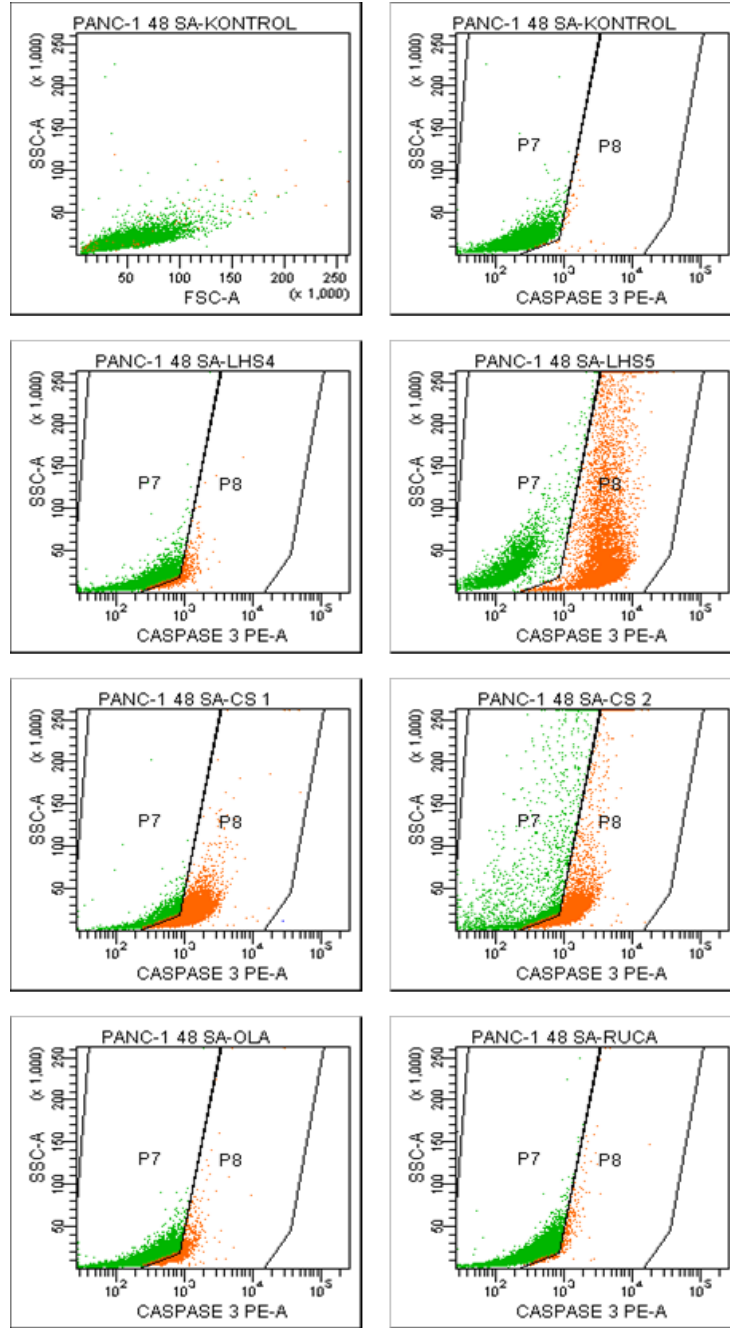
PANC-1 hücreleri için 24 saatlik IC₅₀ değerlerinin kaspaz-3 ile apoptoz analizi sonuçları Şekil 4.29’da verilmiştir.



Şekil 4.29. PANC-1 hücrelerinde 24. saat IC₅₀ değerlerinin kaspaz-3 analiz sonuçları

PANC-1 hücrelerinde 24 saat için LHS-4 IC₅₀: 112,83 µM; LHS-5 IC₅₀: 140,81 µM; CS-1 IC₅₀: 82,39 µM; CS-2 IC₅₀: 117,48 µM; olaparib IC₅₀: 134,18 µM; rucaparib IC₅₀: 71,67 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

PANC-1 hücreleri için 48 saatlik IC₅₀ değerlerinin kaspaz-3 ile apoptoz analizi sonuçları Şekil 4.30'da verilmiştir.



Şekil 4.30. PANC-1 hücrelerinde 48. saat IC₅₀ değerlerinin kaspaz-3 analiz sonuçları

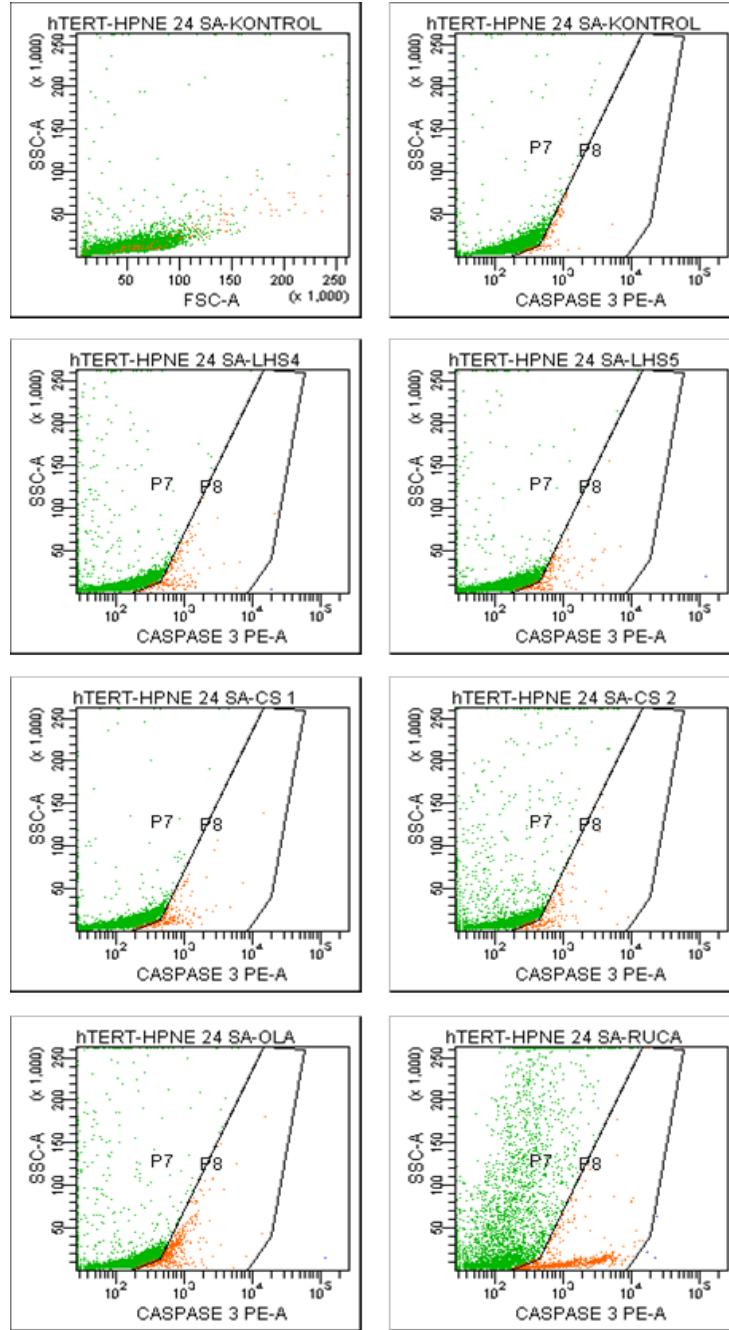
PANC-1 hücrelerinde 48 saat için LHS-4 IC₅₀: 150,67 µM; LHS-5 IC₅₀: 109,81 µM; CS-1 IC₅₀: 84,95 µM; CS-2 IC₅₀: 111,62 µM; olaparib IC₅₀: 32,61 µM; rucaparib IC₅₀: 74,65 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

Kapılama işlemi hücre granülaritesi ve büyüklüğüne göre hücre popülasyonu içinden seçilmiştir ve floresan detektörlerden elde edilen nokta alan grafiklerinde 2 ayrı popülasyondaki (kaspaz-3 inaktif: P7, aktif: P8) artış % hücre değerleri şeklinde gösterilmiştir (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. *PANC-1 hücrelerinde kaspaz-3 ile apoptoz analizi değişim oranları (% değerler; kaspaz-3 P7: inaktif, P8: aktif)*

24 saat		
Test Maddeleri	P7 (-)	P8 (+)
Kontrol (%0,1 DMSO)	98,3	1,4
LHS-4	95,3	5,1
LHS-5	47,2	53,8
CS-1	97,8	2,2
CS-2	98,6	1,5
Olaparib	94,6	5,9
Rucaparib	92,5	8,3
48 saat		
Kontrol (%0,1 DMSO)	99,5	0,6
LHS-4	84,9	16,6
LHS-5	36,4	63,8
CS-1	22,1	78,8
CS-2	28,4	73,1
Olaparib	76,0	26,0
Rucaparib	96,7	3,8

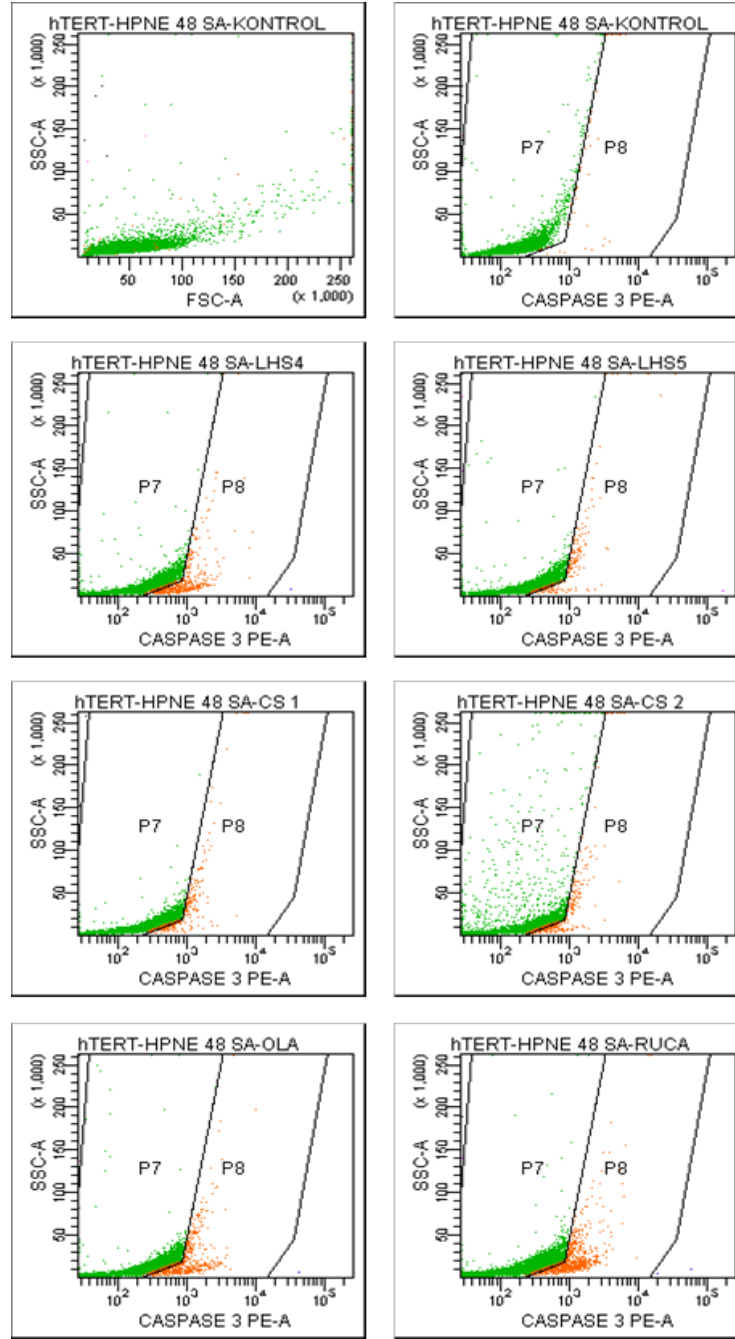
hTERT-HPNE hücreleri için 24 saatlik IC₅₀ değerlerinin kaspaz-3 ile apoptoz analizi sonuçları Şekil 4.31’de verilmiştir.



Şekil 4.31. hTERT-HPNE hücrelerinde 24. saat IC₅₀ değerlerinin kaspaz-3 analiz sonuçları

hTERT-HPNE hücrelerinde 24 saat için LHS-4 IC₅₀: 116,6 µM; LHS-5 IC₅₀: 151,65 µM; CS-1 IC₅₀: 464,3 µM; CS-2 IC₅₀: 114,74 µM; olaparib IC₅₀: 56,057 µM; rucaparib IC₅₀: 166,23 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

hTERT-HPNE hücreleri için 48 saatlik IC₅₀ değerlerinin kaspaz-3 ile apoptoz analizi sonuçları Şekil 4.32’de verilmiştir.



Şekil 4.32. hTERT-HPNE hücrelerinde 48. saat IC₅₀ değerlerinin kaspaz-3 analiz sonuçları

hTERT-HPNE hücrelerinde 48 saat için LHS-4 IC₅₀: 263,15 µM; LHS-5 IC₅₀: 137,68 µM; CS-1 IC₅₀: 434,66 µM; CS-2 IC₅₀: 426,16 µM; olaparib IC₅₀: 41,89 µM; rucaparib IC₅₀: 122,49 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

Kapılama işlemi hücre granülaritesi ve büyüklüğüne göre hücre popülasyonu içinden seçilmiştir ve floresan detektörlerden elde edilen nokta alan grafiklerinde 2 ayrı popülasyondaki (kaspaz-3 inaktif: P7, aktif: P8) artış % hücre değerleri şeklinde gösterilmiştir (Tablo 4.12).

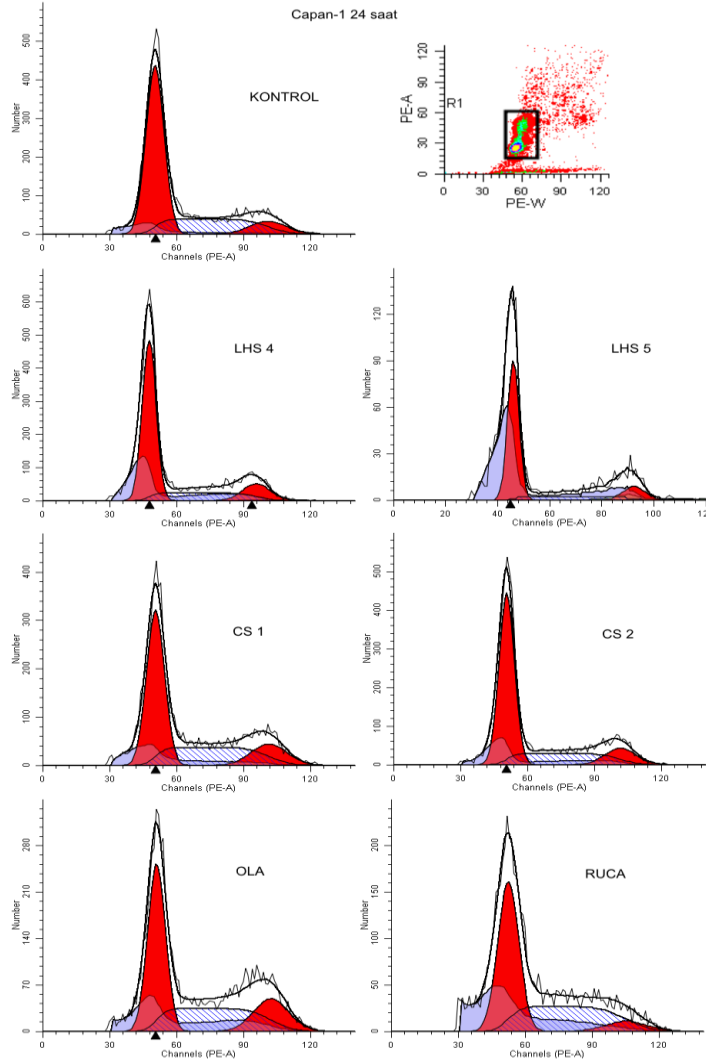
Tablo 4.12. *hTERT-HPNE hücrelerinde kaspaz-3 ile apoptoz analizi değişim oranları (% değerler; kaspaz-3 P7: inaktif, P8: aktif)*

24 saat		
Test Maddeleri	P7 (-)	P8 (+)
Kontrol (%0,1 DMSO)	98,8	1,4
LHS-4	98,2	1,9
LHS-5	97,9	2,2
CS-1	97,6	2,5
CS-2	98,0	2,1
Olaparib	94,2	6,4
Rucaparib	77,2	22,9
48 saat		
Kontrol (%0,1 DMSO)	99,5	0,5
LHS-4	93,7	7,3
LHS-5	96,8	4,3
CS-1	95,3	6,4
CS-2	93,1	9,4
Olaparib	91,8	9,9
Rucaparib	91,8	9,1

4.3.3.4. Hücre döngüsü ve DNA analizi

Sentez maddelerinin hücrelerle 2 günlük inkübasyon sonrasında etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla hücre döngüsünün 3 fazında (G_0/G_1 , S ve G_2/M) dağılımları akım sitometri cihazı kullanılarak incelenmiştir.

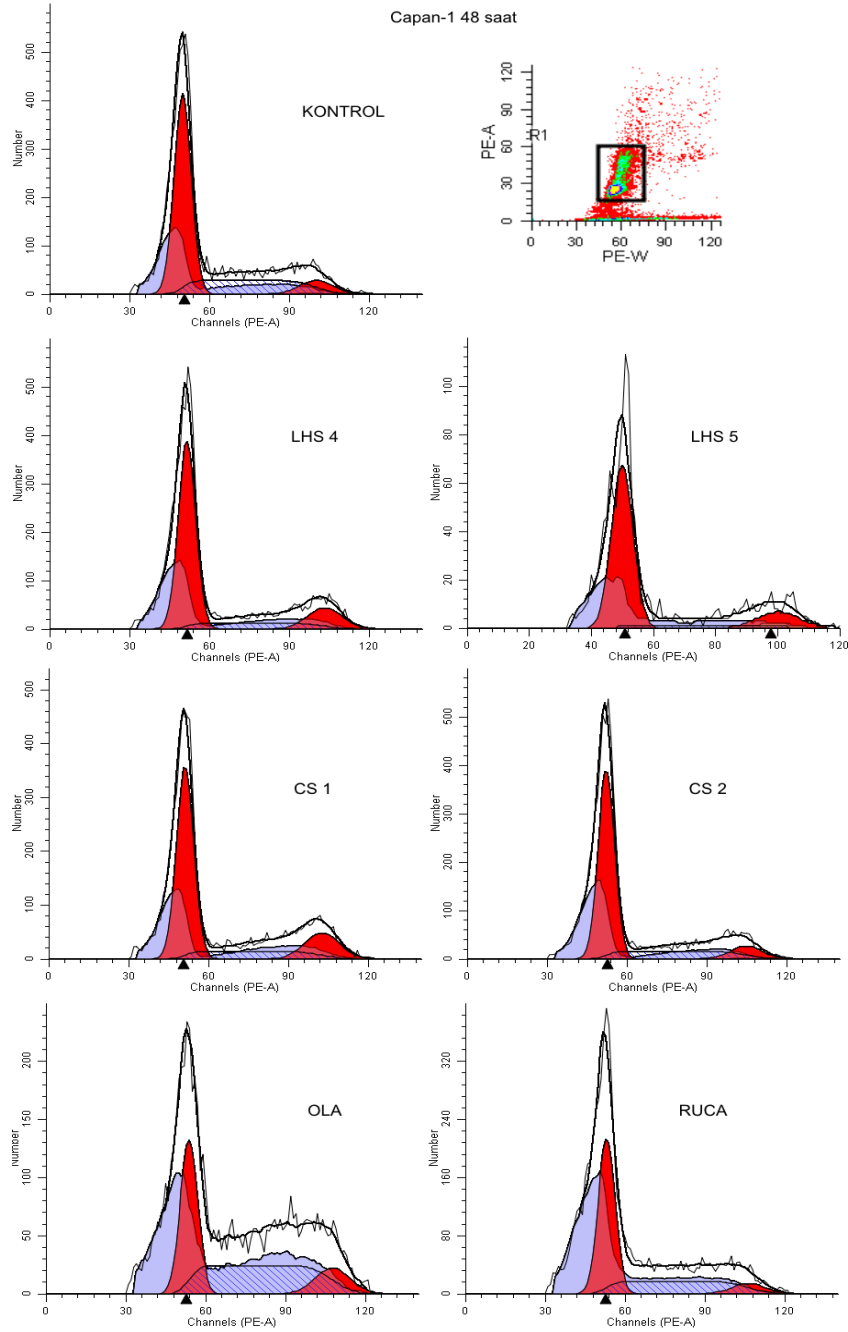
Capan-1 hücreleri üzerinde sentez maddelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonrasında IC_{50} değerleri için analiz sonuçları Şekil 4.33'te gösterilmiştir.



Şekil 4.33. Capan-1 hücrelerinde 24. saat IC_{50} değerlerinin hücre döngüsü analiz sonuçları

Capan-1 hücrelerinde 24 saat için LHS-4 IC_{50} : 268,69 μM ; LHS-5 IC_{50} : 264,77 μM ; CS-1 IC_{50} : 298,62 μM ; CS-2 IC_{50} : 264,77 μM ; olaparib IC_{50} : 451,04 μM ; rucaparib IC_{50} : 23,75 μM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

Capan-1 hücreleri üzerinde sentez maddelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonrasında IC₅₀ değerleri için analiz sonuçları Şekil 4.34'te gösterilmiştir.



Şekil 4.34. Capan-1 hücrelerinde 48. saat IC₅₀ değerlerinin hücre döngüsü analiz sonuçları

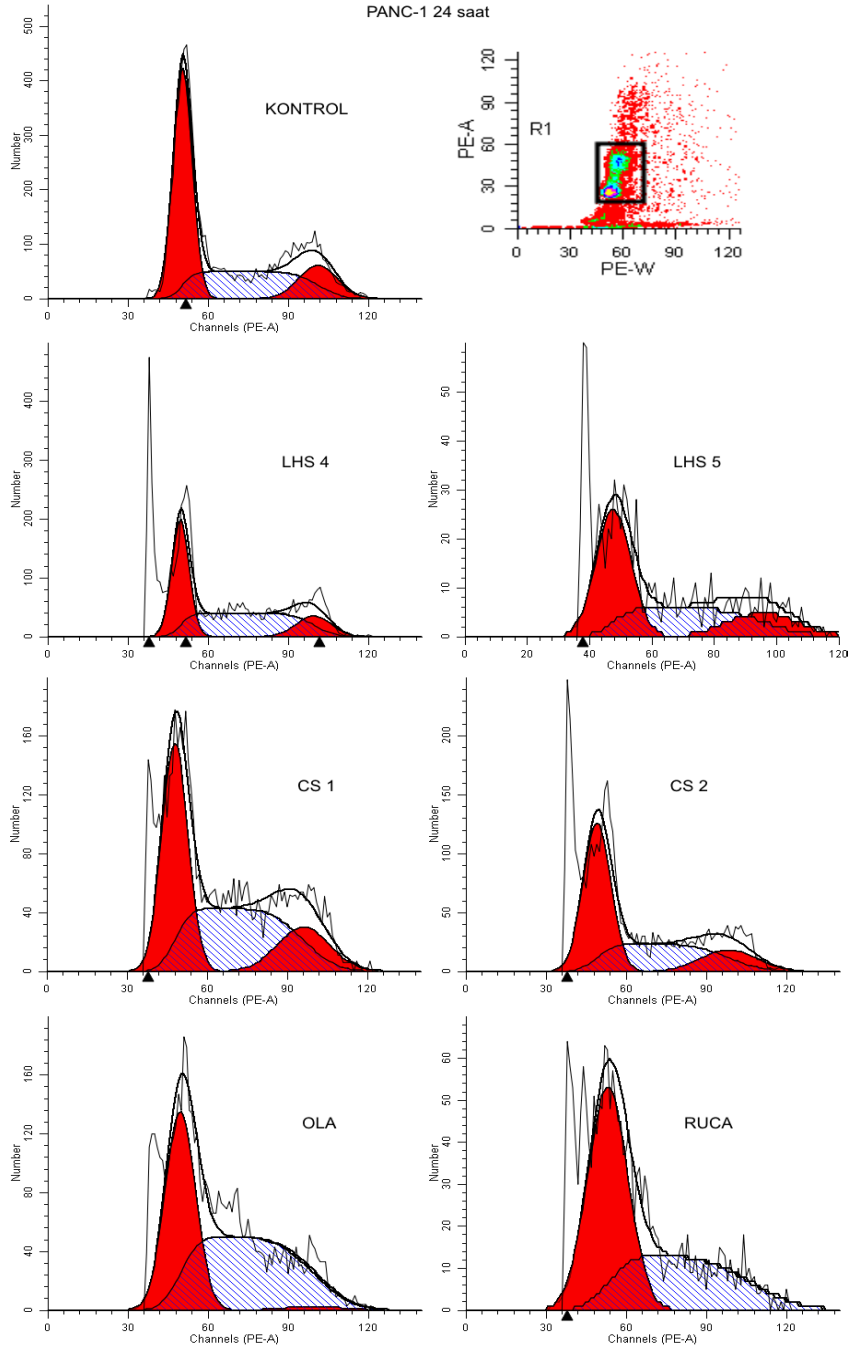
Capan-1 hücrelerinde 48 saat için LHS-4 IC₅₀: 161,97 μ M; LHS-5 IC₅₀: 307,72 μ M; CS-1 IC₅₀: 294,83 μ M; CS-2 IC₅₀: 164,09 μ M; olaparib IC₅₀: 120,84 μ M; rucaparib IC₅₀: 23,03 μ M konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

Kapılama işlemi granülaritesi ve büyüklüğüne göre hücre popülasyonu içinden agregatları almayacak şekilde diploid olan hücrelerin analizini içerecek şekilde kontrole göre yapılmış, floresan detektörlerden elde edilen nokta alan grafiklerinde G₀/G₁, S ve G₂/M fazlarına göre pikler elde edilmiş, % değerler Tablo 4.13'te gösterilmiştir.

Tablo 4.13. *Capan-1 hücrelerinde hücre döngüsü analizi sonucu faz dağılımları (% değerler)*

24 saat			
Test Maddeleri	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S
Kontrol (%0,1 DMSO)	62,60	9,37	28,03
LHS-4	66,19	13,91	16,89
LHS-5	72,51	13,90	13,59
CS-1	53,76	14,62	31,63
CS-2	63,53	12,15	24,32
Olaparib	47,72	18,32	33,96
Rucaparib	53,21	7,06	39,73
48 saat			
Kontrol (%0,1 DMSO)	64,92	10,43	24,65
LHS-4	70,07	15,68	14,25
LHS-5	75,59	14,76	9,65
CS-1	66,06	17,78	16,15
CS-2	70,82	9,48	19,69
Olaparib	37,22	11,50	51,28
Rucaparib	51,76	9,97	38,27

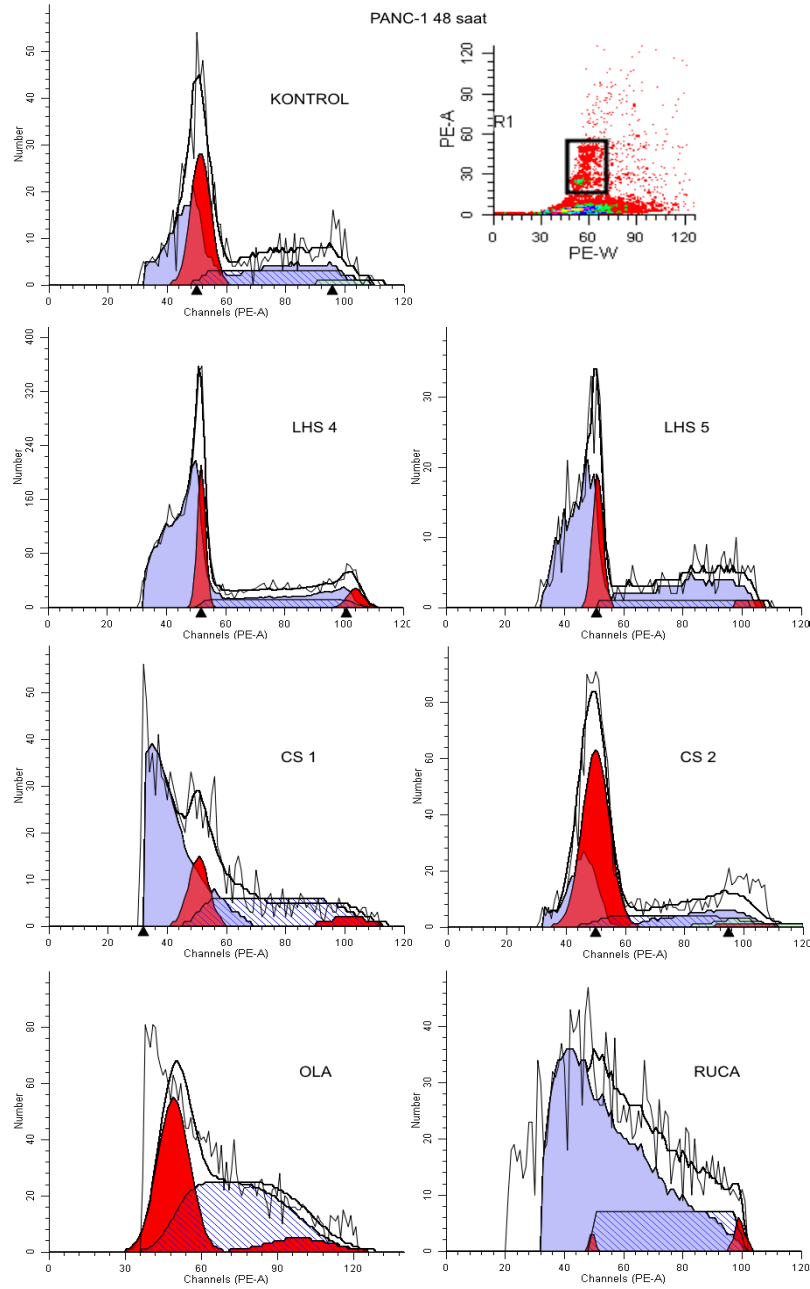
PANC-1 hücreleri üzerinde sentez maddelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonrasında IC_{50} değerleri için analiz sonuçları Şekil 4.35'te gösterilmiştir.



Şekil 4.35. PANC-1 hücrelerinde 24. saat IC_{50} değerlerinin hücre döngüsü analiz sonuçları

PANC-1 hücrelerinde 24 saat için LHS-4 IC_{50} : 112,83 μ M; LHS-5 IC_{50} : 140,81 μ M; CS-1 IC_{50} : 82,39 μ M; CS-2 IC_{50} : 117,48 μ M; olaparib IC_{50} : 134,18 μ M; rucaparib IC_{50} : 71,67 μ M konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

PANC-1 hücreleri üzerinde sentez maddelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonrasında IC₅₀ değerleri için analiz sonuçları Şekil 4.36’da gösterilmiştir.



Şekil 4.36. PANC-1 hücrelerinde 48. saat IC₅₀ değerlerinin hücre döngüsü analiz sonuçları

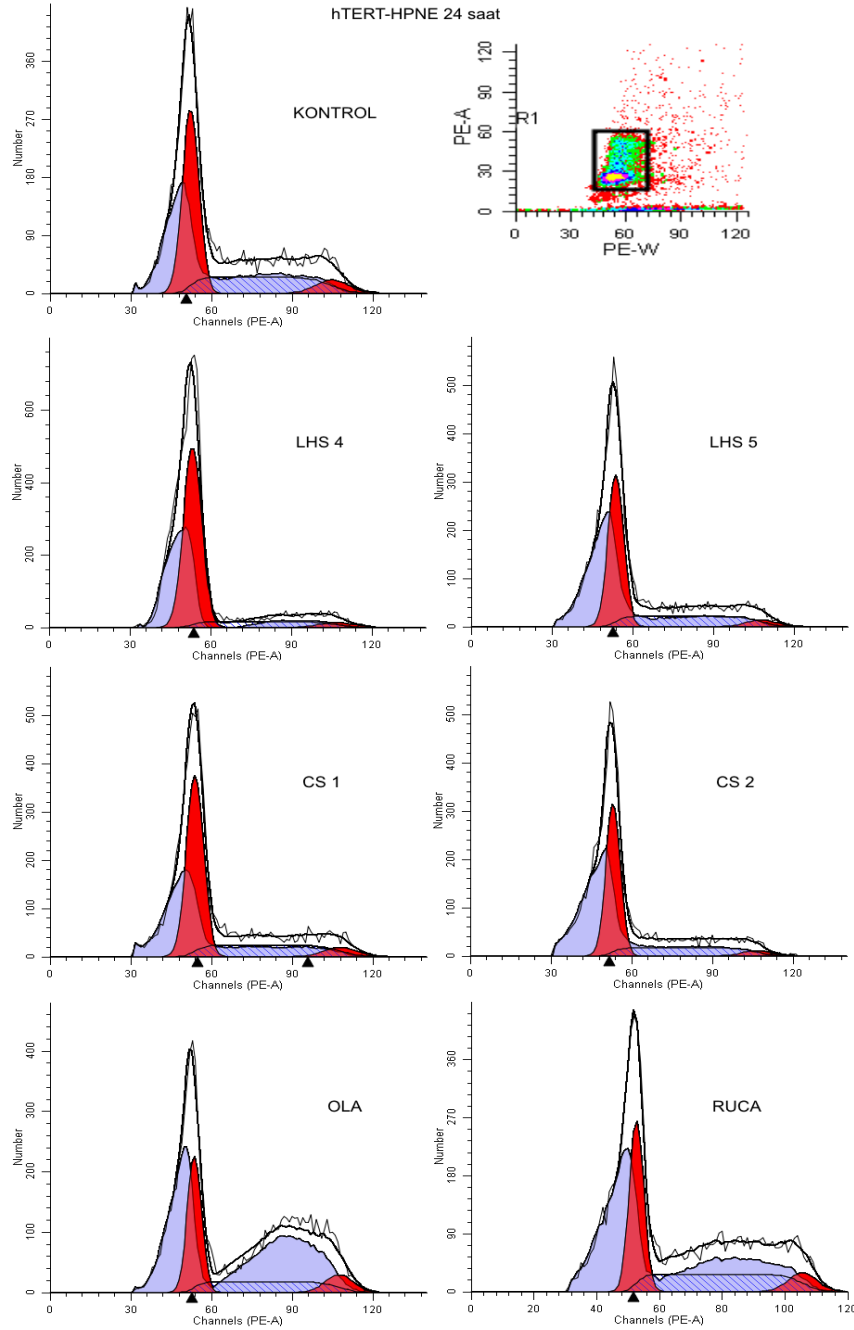
PANC-1 hücrelerinde 48 saat için LHS-4 IC₅₀: 150,67 μ M; LHS-5 IC₅₀: 109,81 μ M; CS-1 IC₅₀: 84,95 μ M; CS-2 IC₅₀: 111,62 μ M; olaparib IC₅₀: 32,61 μ M; rucaparib IC₅₀: 74,65 μ M konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

Kapılama işlemi granülaritesi ve büyüklüğüne göre hücre popülasyonu içinden agregatları almayacak şekilde diploid olan hücrelerin analizini içerecek şekilde kontrole göre yapılmış, floresan detektörlerden elde edilen nokta alan grafiklerinde G₀/G₁, S ve G₂/M fazlarına göre pikler elde edilmiş, % değerler Tablo 4.14’te gösterilmiştir.

Tablo 4.14. *PANC-1 hücrelerinde hücre döngüsü analizi sonucu faz dağılımları (% değerler)*

24 saat			
Test Maddeleri	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S
Kontrol (%0,1 DMSO)	51,22	14,71	34,07
LHS-4	38,74	13,52	47,74
LHS-5	45,85	16,99	37,16
CS-1	40,31	15,56	44,13
CS-2	50,19	14,53	35,28
Olaparib	42,65	1,39	55,96
Rucaparib	58,02	0,97	41,01
48 saat			
Kontrol (%0,1 DMSO)	58,04	0,13	41,83
LHS-4	46,62	12,03	41,35
LHS-5	56,01	8,14	35,85
CS-1	26,01	7,08	66,91
CS-2	75,56	2,23	22,21
Olaparib	2,77	14,48	82,74
Rucaparib	2,72	8,81	88,47

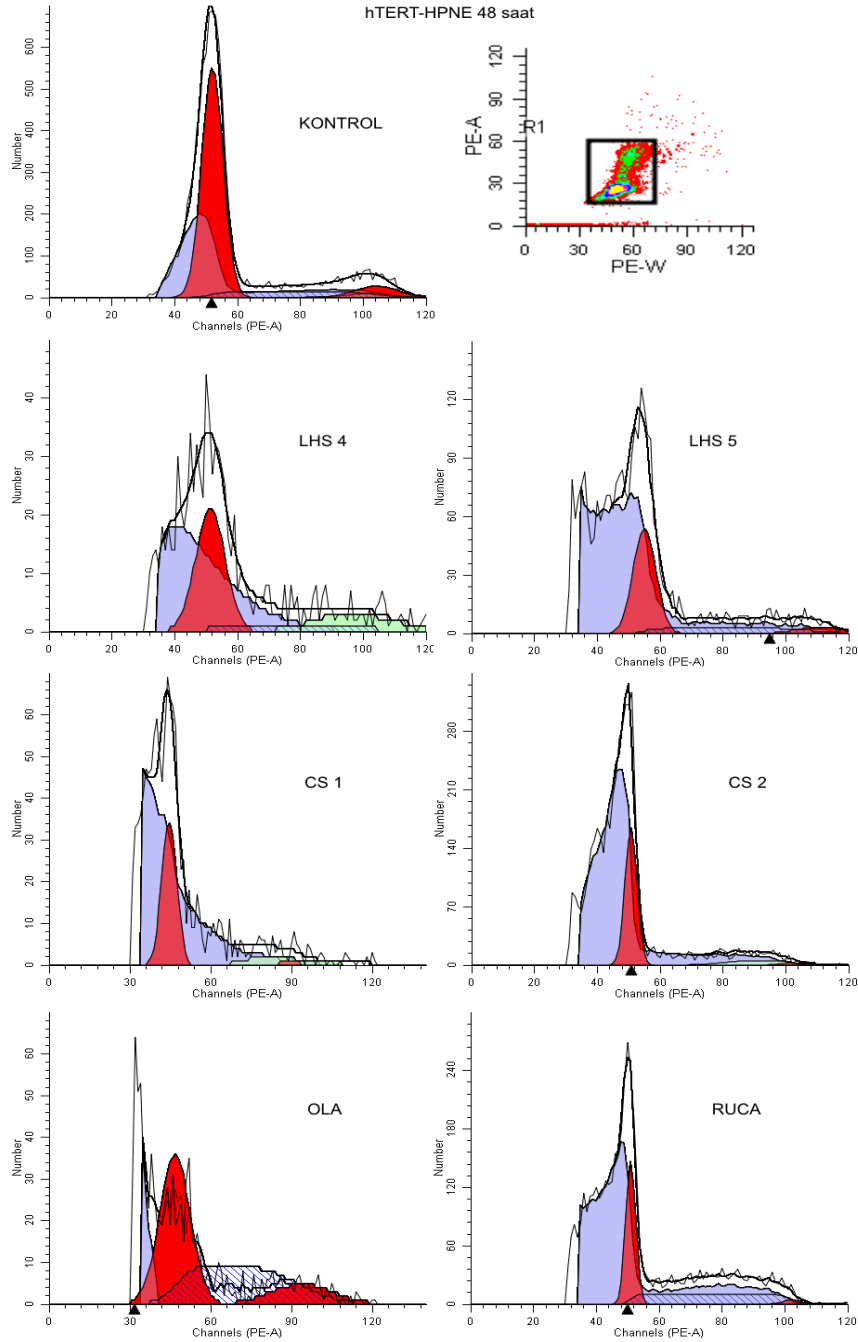
hTERT-HPNE hücreleri üzerinde sentez maddelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonrasında IC₅₀ değerleri için analiz sonuçları Şekil 4.37’de gösterilmiştir.



Şekil 4.37. hTERT-HPNE hücrelerinde 24. saat IC₅₀ değerlerinin hücre döngüsü analiz sonuçları

hTERT-HPNE hücrelerinde 24 saat için LHS-4 IC₅₀: 116,6 µM; LHS-5 IC₅₀: 151,65 µM; CS-1 IC₅₀: 464,3 µM; CS-2 IC₅₀: 114,74 µM; olaparib IC₅₀: 56,057 µM; rucaparib IC₅₀: 166,23 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

hTERT-HPNE hücreleri üzerinde sentez maddelerinin 48 saatlik inkübasyonu sonrasında IC₅₀ değerleri için analiz sonuçları Şekil 4.38’de gösterilmiştir.



Şekil 4.38. hTERT-HPNE hücrelerinde 48. saat IC₅₀ değerlerinin hücre döngüsü analiz sonuçları

hTERT-HPNE hücrelerinde 48 saat için LHS-4 IC₅₀: 263,15 µM; LHS-5 IC₅₀: 137,68 µM; CS-1 IC₅₀: 434,66 µM; CS-2 IC₅₀: 426,16 µM; olaparib IC₅₀: 41,89 µM; rucaparib IC₅₀: 122,49 µM konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

Kapılama işlemi granülaritesi ve büyüklüğüne göre hücre popülasyonu içinden agregatları almayacak şekilde diploid olan hücrelerin analizini içerecek şekilde kontrole göre yapılmış, floresan detektörlerden elde edilen nokta alan grafiklerinde G₀/G₁, S ve G₂/M fazlarına göre pikler elde edilmiş, % değerler Tablo 4.15’te gösterilmiştir.

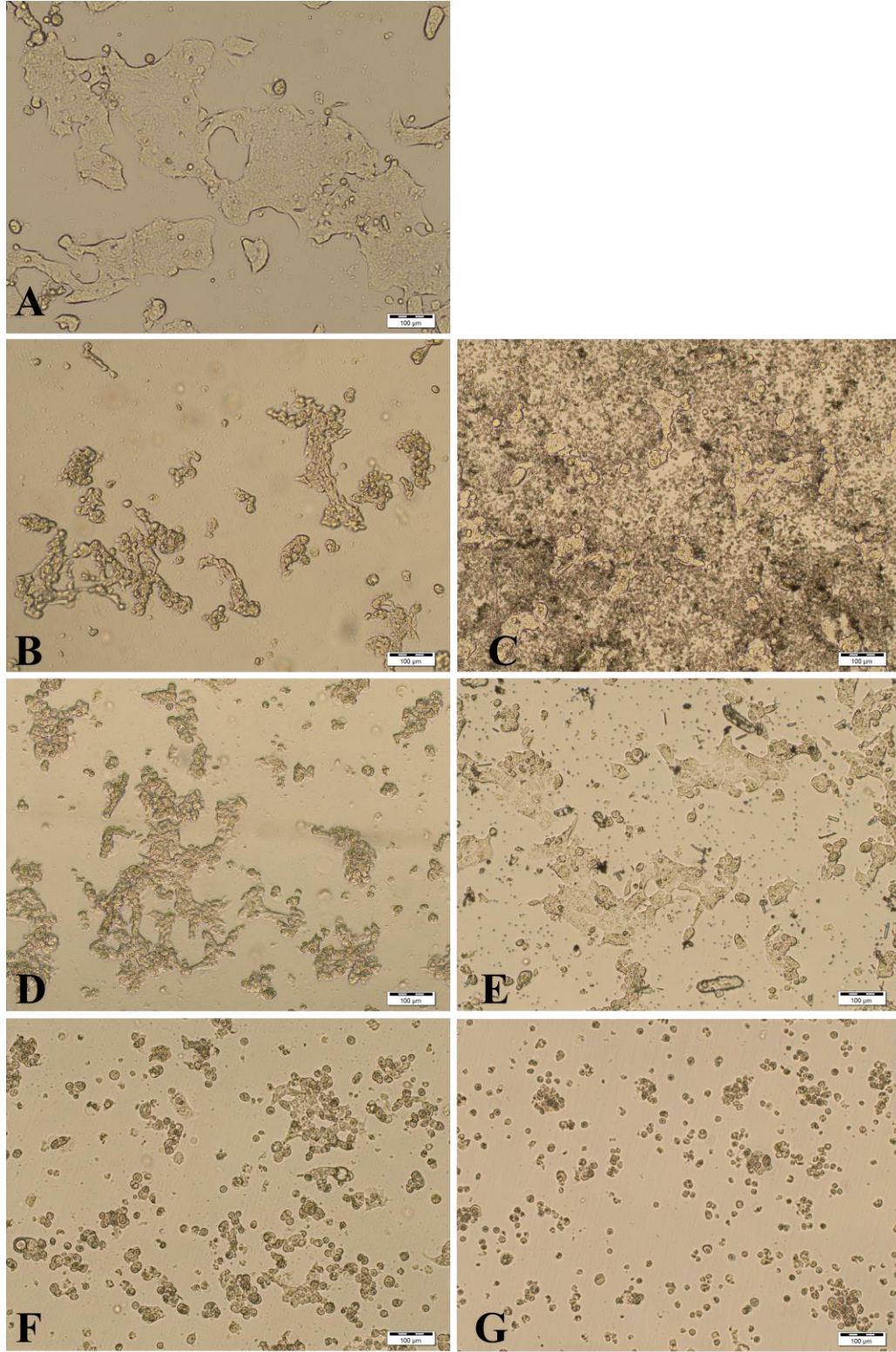
Tablo 4.15. *hTERT-HPNE hücrelerinde hücre döngüsü analizi sonucu faz dağılımları (% değerler)*

24 saat			
Test Maddeleri	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S
Kontrol (%0,1 DMSO)	57,85	8,28	33,87
LHS-4	79,32	4,23	16,45
LHS-5	62,38	5,44	32,18
CS-1	65,58	6,51	27,91
CS-2	66,68	4,60	28,72
Olaparib	53,14	13,85	33,01
Rucaparib	46,49	10,20	43,31
48 saat			
Kontrol (%0,1 DMSO)	79,68	7,77	12,54
LHS-4	80,28	0,91	18,81
LHS-5	71,01	7,88	21,11
CS-1	93,74	3,37	2,89
CS-2	95,99	3,01	1,0
Olaparib	46,75	12,86	40,38
Rucaparib	51,94	2,64	45,41

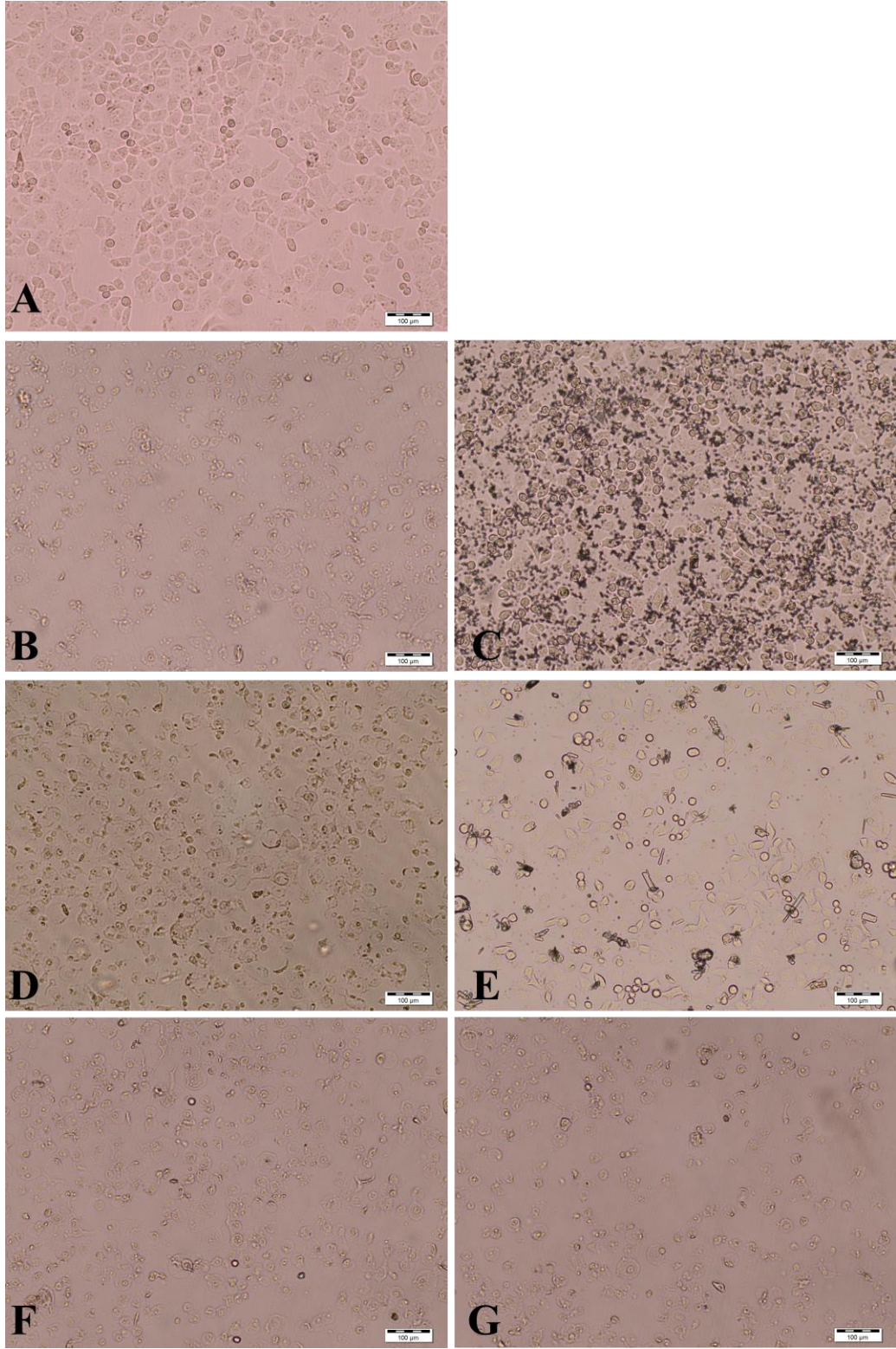
4.3.4. Morfolojik görüntü analizleri

Sentez maddelerinin (LHS-4, LHS-5, CS-1, CS-2) ve PARP inhibitörlerinin (olaparib ve rucaparib) IC₅₀ değerlerinin uygulanmasının ardından hücrelerin 24 saatlik inkübasyon sonrası durumları ve herhangi bir muamele yapılmamış hücre kontrol grubu (%0,1 DMSO içeren) ile kıyaslaması inverted ışık mikroskopunda görüntülenerek yapılmıştır.

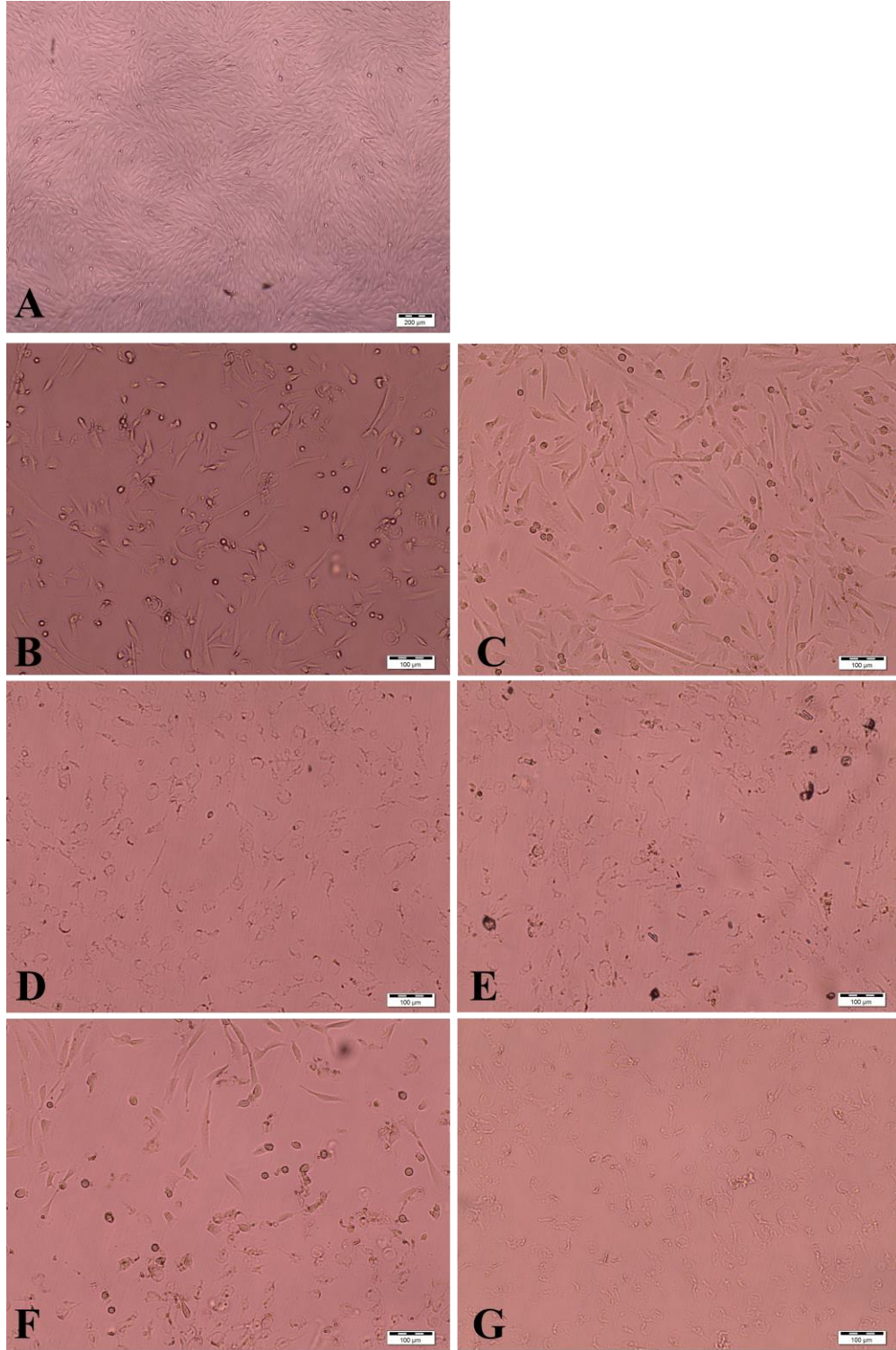
10X objektifle fotoğrafları çekilen Capan-1 hücreleri Şekil 4.39'da; PANC-1 hücreleri Şekil 4.40'ta ve hTERT-HPNE hücreleri Şekil 4.41'de gösterilmiştir.



Şekil 4.39. Maddelerin IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra Capan-1 hücrelerinin inverted ışık mikroskop görüntüleri (A: Kontrol; B: LHS-4 IC_{50} : 268,69 μM ; C: LHS-5 IC_{50} : 264,77 μM ; D: CS-1 IC_{50} : 298,62 μM ; E: CS-2 IC_{50} : 264,77 μM ; F: Olaparib IC_{50} : 451,04 μM ; G: Rucaparib IC_{50} : 23,75 μM ; mikroskop büyütmesi 10X)



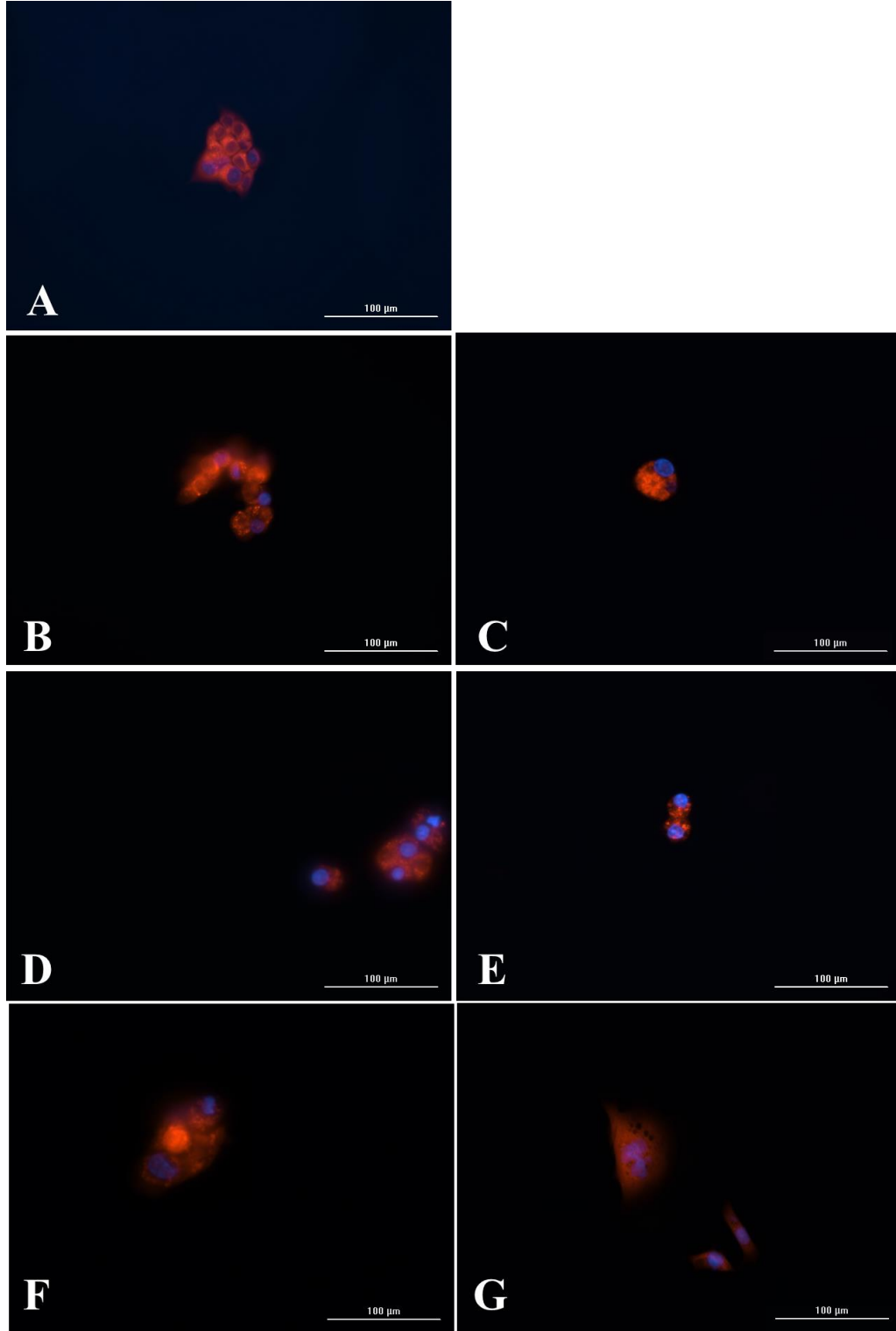
Şekil 4.40. Maddelerin IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra PANC-1 hücrelerinin inverted ışık mikroskop görüntüleri (A: Kontrol; B: LHS-4 IC_{50} : 112,83 μM ; C: LHS-5 IC_{50} : 140,81 μM ; D: CS-1 IC_{50} : 82,39 μM ; E: CS-2 IC_{50} : 117,48 μM ; F: Olaparib IC_{50} : 134,18 μM ; G: Rucaparib IC_{50} : 71,67 μM ; mikroskop büyütmesi 10X)



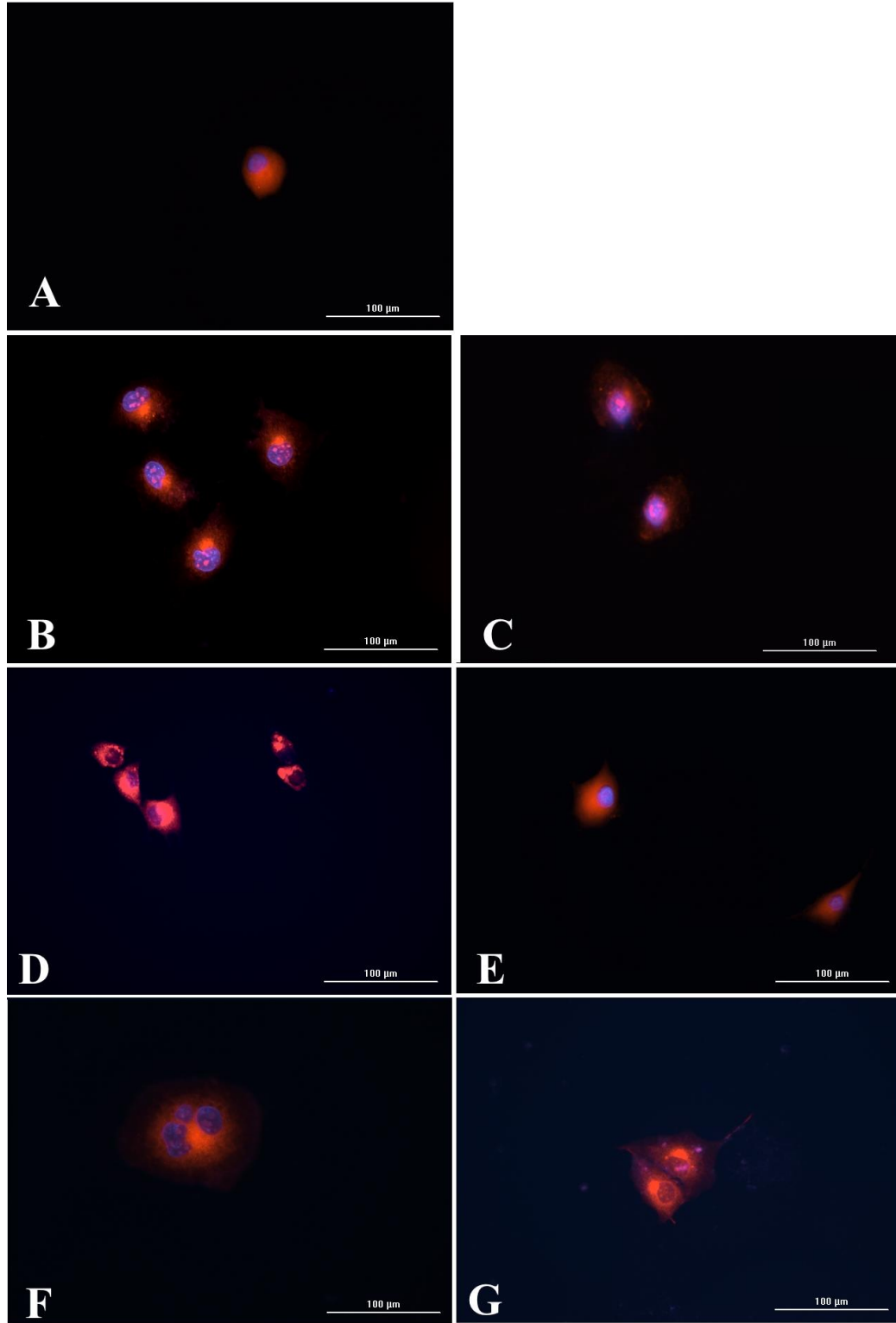
Şekil 4.41. Maddelerin IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra hTERT-HPNE hücrelerinin inverted ışık mikroskop görüntüleri (A:Kontrol; B: LHS-4 IC_{50} : 116,6 μM ; C: LHS-5 IC_{50} : 151,65 μM ; D: CS-1 IC_{50} : 464,3 μM ; E: CS-2 IC_{50} : 114,74 μM ; F: Olaparib IC_{50} : 56,057 μM ; G: Rucaparib IC_{50} : 166,23 μM ; mikroskop büyütmesi 10X)

LHS-4, LHS-5, CS-1, CS-2, olaparib ve rucaparibin IC_{50} değerlerinin uygulanmasından sonra hücrelerin 24 saatlik inkübasyon sonrası görüntüleri ve herhangi bir muamele yapılmamış hücre kontrol grubu (%0,1 DMSO içeren) ile kıyaslaması floresan boyama yapılarak görüntülenmiştir. Canlı hücre görüntüleme solüsyonu içerisinde olduğu için herhangi bir fiksasyon işlemi uygulanmamış, dolayısıyla en kısa zamanda görüntü alınması amaçlanmıştır.

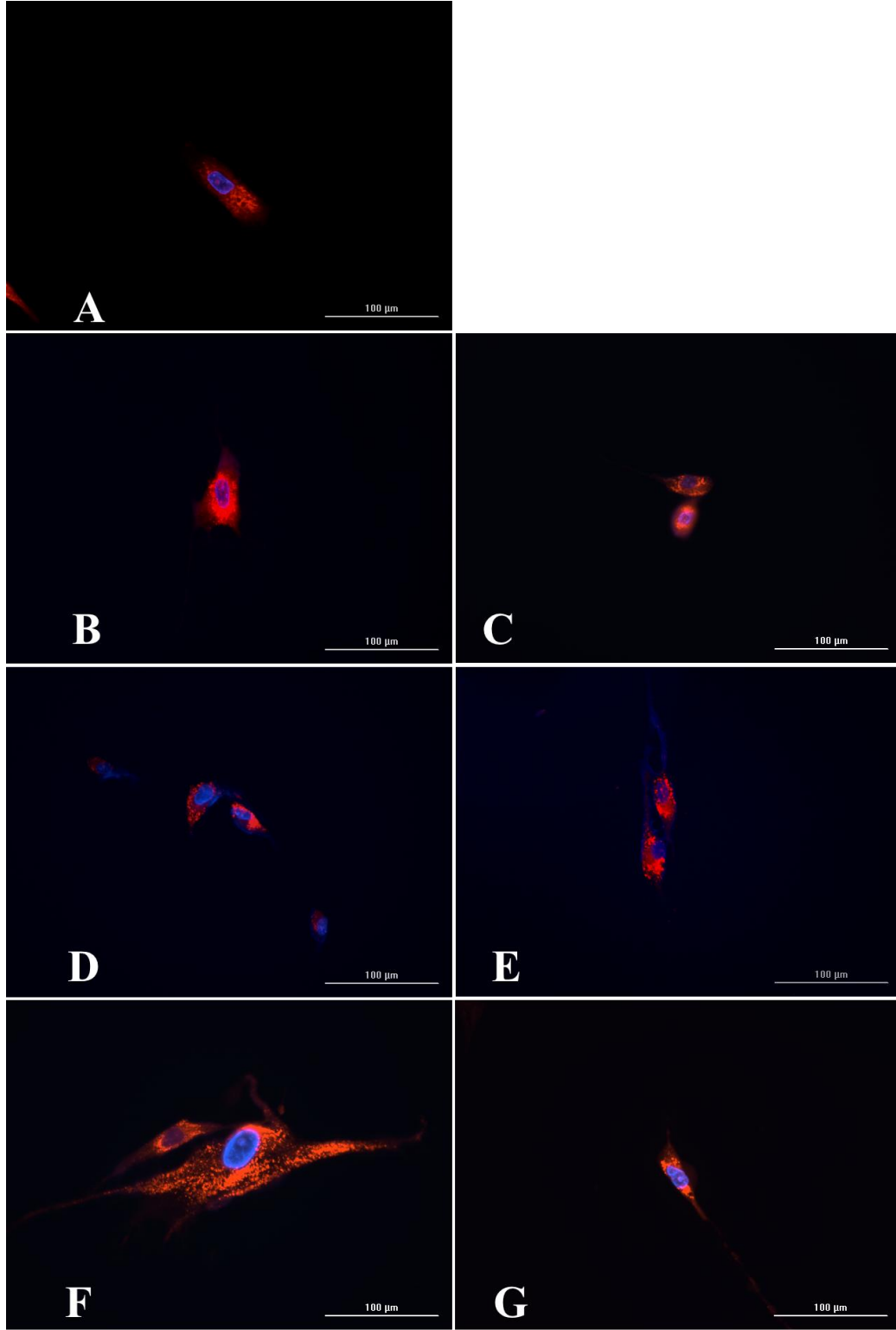
Mitokondri işaretçisi olarak kırmızı renkte görünen MitoTracker Red CMXRos; çekirdek materyali işaretçisi olarak mavi renkte görünen DAPI floresan boyalarıyla 20X büyütmede BioTek Cytation 5 Multimod plaka okuyucuda görüntüleri çekilmiş olup, Capan-1 hücreleri Şekil 4.42’de, PANC-1 hücreleri Şekil 4.43’te ve hTERT-HPNE hücreleri de Şekil 4.44’te gösterilmiştir.



Şekil 4.42. Maddelerin IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra Capan-1 hücrelerinin BioTek Cytation 5 Multimod plaka okuyucuda çekilmiş floresan görüntüleri. MitoTracker Red CMXRos (kırmızı); DAPI (mavi) (A: Kontrol; B: LHS-4 IC_{50} : 268,69 μM ; C: LHS-5 IC_{50} : 264,77 μM ; D: CS-1 IC_{50} : 298,62 μM ; E: CS-2 IC_{50} : 264,77 μM ; F: Olaparib IC_{50} : 451,04 μM ; G: Rucaparib IC_{50} : 23,75 μM ; mikroskop büyütmesi 20X)



Şekil 4.43. Maddelerin IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra PANC-1 hücrelerinin BioTek Cytation 5 Multimod plaka okuyucuda çekilmiş floresan görüntüleri. MitoTracker Red CMXRos (kırmızı); DAPI (mavi) (A: Kontrol; B: LHS-4 IC_{50} : 112,83 μM ; C: LHS-5 IC_{50} : 140,81 μM ; D: CS-1 IC_{50} : 82,39 μM ; E: CS-2 IC_{50} : 117,48 μM ; F: Olaparib IC_{50} : 134,18 μM ; G: Rucaparib IC_{50} : 71,67 μM ; mikroskop büyütmesi 20X)



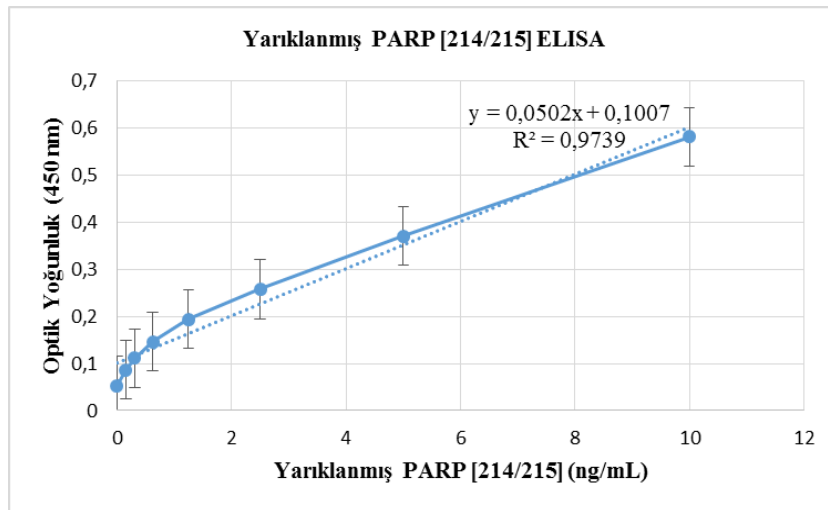
Şekil 4.44. Maddelerin IC_{50} konsantrasyonlarının uygulanmasından 24 saat sonra hTERT-HPNE hücrelerinin BioTek Cytation 5 Multimod plaka okuyucuda çekilmiş floresan görüntüleri MitoTracker Red CMXRos (kırmızı); DAPI (mavi) (A: Kontrol; B: LHS-4 IC_{50} : 116,6 μM ; C: LHS-5 IC_{50} : 151,65 μM ; D: CS-1 IC_{50} : 464,3 μM ; E: CS-2 IC_{50} : 114,74 μM ; F: Olaparib IC_{50} : 56,057 μM ; G: Rucaparib IC_{50} : 166,23 μM ; mikroskop büyütmesi 20X)

4.3.5. ELISA ile PARP [214/215] yarıklanmasının değerlendirilmesi

LHS-4, LHS-5, CS-1, CS-2, olaparib ve rucaparibin IC₅₀ değerleri ile hücrelerin 24 saatlik inkübasyonu sonrasında PARP yarıklanma düzeyleri Cleaved PARP [214/215] ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür. Kontrol grubuna %0,1 DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır. Yarıklanmış PARP [214/215] ölçümü için 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156 ve 0 ng/mL olarak hazırlanan standartlar konsantrasyonlar kullanılarak standart eğri elde edilmiştir. Tüm deneyler üçer tekrarlı çalışılmıştır. Standart eğri denklemi için hazırlanan yarıklanmış PARP [214/215] miktarları ve ELISA okumasından elde edilen optik yoğunlukları Tablo 4.16’da verilmiş, standart eğri denklemi Şekil 4.45’te sunulmuştur.

Tablo 4.16. Standartların ölçülen absorbans ve standart sapma değerleri (n=3)

Standart Yarıklanmış PARP [214/215] (ng/mL)	Optik Yoğunluk (450 nm)	Standart Sapma
10	0,581	0,007
5	0,371	0,009
2,5	0,258	0,005
1,25	0,194	0,010
0,625	0,147	0,010
0,3125	0,112	0,010
0,15625	0,087	0,005
0	0,053	0,025

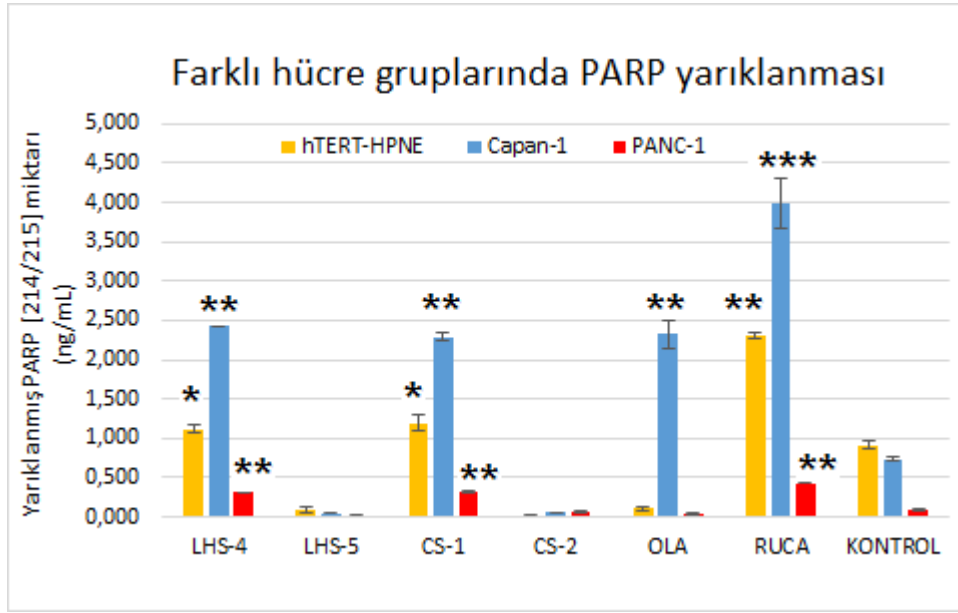


Şekil 4.45. Yarıklanmış PARP [214/215] için standart eğri ve denklemi

Kit standartları ile çizilen eğri denklemi üzerinden LHS-4, LHS-5, CS-1, CS-2, olaparib ve rucaparibin 3 farklı hücre grubu üzerinden hesaplanan PARP yarıklanması absorbans sonuçları Tablo 4.17’de verilmiş, kontrole göre sonuçlar Şekil 4.46’da kıyaslanmıştır.

Tablo 4.17. *Hücre gruplarına test maddelerinin 24 saatlik IC₅₀ değerlerinin uygulanması sonucu hesaplanan yarıklanmış PARP [214/215] aktivite miktarları*

Test Maddeleri	Standart Yarıklanmış PARP [214/215] miktarı (ng/mL)	Standart Sapma
hTERT-HPNE hücreleri		
LHS-4	1,122	0,060
LHS-5	0,086	0,031
CS-1	1,195	0,094
CS-2	0,026	0,008
Olaparib	0,106	0,027
Rucaparib	2,310	0,036
Kontrol (%0,1 DMSO)	0,916	0,046
Capan-1 hücreleri		
LHS-4	2,423	0,005
LHS-5	0,046	0,006
CS-1	2,284	0,050
CS-2	0,052	0,003
Olaparib	2,323	0,177
Rucaparib	3,983	0,318
Kontrol (%0,1 DMSO)	0,730	0,024
PANC-1 hücreleri		
LHS-4	0,311	0,007
LHS-5	0,013	0,009
CS-1	0,325	0,014
CS-2	0,059	0,007
Olaparib	0,039	0,005
Rucaparib	0,431	0,007
Kontrol (%0,1 DMSO)	0,092	0,009



Şekil 4.46. Maddelerin 24 saat IC_{50} değerlerinin PARP yarıklanması üzerine etkileri ($n=3$) ($p<0,05$ * anlamlı, $p<0,01$ ** önemli derecede anlamlı, $p>0,05$ anlamlı değil)

PARP yarıklanmasının ölçülebilmesi amacıyla 24 saatlik inkübasyon için kullanılan konsantrasyonlar: Capan-1 hücreleri için LHS-4 IC_{50} : 268,69 μM ; LHS-5 IC_{50} : 264,77 μM ; CS-1 IC_{50} : 298,62 μM ; CS-2 IC_{50} : 264,77 μM ; olaparib IC_{50} : 451,04 μM ; rucaparib IC_{50} : 23,75 μM ; PANC-1 hücreleri için LHS-4 IC_{50} : 112,83 μM ; LHS-5 IC_{50} : 140,81 μM ; CS-1 IC_{50} : 82,39 μM ; CS-2 IC_{50} : 117,48 μM ; olaparib IC_{50} : 134,18 μM ; rucaparib IC_{50} : 71,67 μM ; hTERT-HPNE hücreleri için LHS-4 IC_{50} : 116,6 μM ; LHS-5 IC_{50} : 151,65 μM ; CS-1 IC_{50} : 464,3 μM ; CS-2 IC_{50} : 114,74 μM ; olaparib IC_{50} : 56,057 μM ; rucaparib IC_{50} : 166,23 μM .

4.3.6. Kantitatif RT-PCR Array yöntemi ile gen ifadesindeki etkinliğin değerlendirilmesi

Hücrelerin kontrolleri ve sentez maddelerinin IC_{50} değerleri ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, RNA miktarları nanodrop cihazında ölçülmüş, tüm RNA örneklerinin saflık oranları (260/230 nm; 260/280 nm) ölçülmüştür. Daha sonra RNA'lar cDNA sentezi için kullanılmıştır.

İnsan apoptoz RT² profiler PCR array ile programlanmış hücre ölümüyle alakalı 9 gen profilinin ortaya konduğu deney sonuçları, TNF bağlantılı ligand-reseptör-faktörleri, kaspazları, ölüm domeinlerini, DNA hasar yolakları ve PARP ailesi ile ilgili genlerde meydana gelen anlatım profillerini araştırmak için kullanılmıştır.

RT-PCR arrayde kullanılan genlere ait gen bankası kodları ve tanımlamaları aşağıdaki Tablo 4.18’de gösterilmiştir.

Tablo 4.18. *RT² PCR Array plakasındaki genler ve tanımlamaları*

Gen Sembolü	Tanımlama
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
PARP2	Poly (ADP-ribose) polymerase 2
PARP3	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 3
CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
TNF	Tumor necrosis factor
TP53	Tumor protein p53
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
RTC	Reverse transcriptase control

House keeping gen olarak GAPDH geni kullanılmış ve RT-PCR sonunda reverse transkripsiyon kontrolü gen ifadesi gerçekleşmiştir. GAPDH daha sonra normalizasyon için analizlerde kullanılmıştır. Veriler, delta delta Ct metoduyla, web-tabanlı veri analiz programı kullanılarak analiz edilmiştir [159]. Sonuçlar, negatif kontrole göre 2 kat fark (2x fold change, genlerdeki değişiklik katsayısı) oluşmasına göre değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda, genlerdeki değişiklik katsayı değerlerine göre elde edilmiş grafikler veri olarak sunulmuştur. 2 kat ve üzerinde değişim gösterenler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Ekspresyon profilinde mRNA ifadelerindeki kat regülasyon seviyeleri 2 kat ve üzeri artış olanlar şeklinde upregüle (+) olarak değerlendirilmiş ve kırmızı renkle gösterilmiş; 2 kat ve üzeri azalmalar ise downregüle (-) olarak değerlendirilerek mavi renk ile gösterilmiştir. 2 kattan daha az değişim gösteren gen ekspresyonları ise siyah renkle görülmektedir.

İnsan pankreas hücrelerindeki belirli genlerin ifade seviyeleri kontrol gruplarıyla karşılaştırılmış değişimler clustergram olarak ifade edilen ısı gen haritası üzerinde gösterilmiştir. Korelasyon katsayısındaki benzerliklerin ifadesi için kullanılan bu haritada gruplar arasındaki gen ifadesi değişimleri benzerlik önemine göre kırmızıya ve yeşile doğru değişen renk skalası olarak gösterilmiştir. Renk skalasının en solu yeşil renkle en düşük

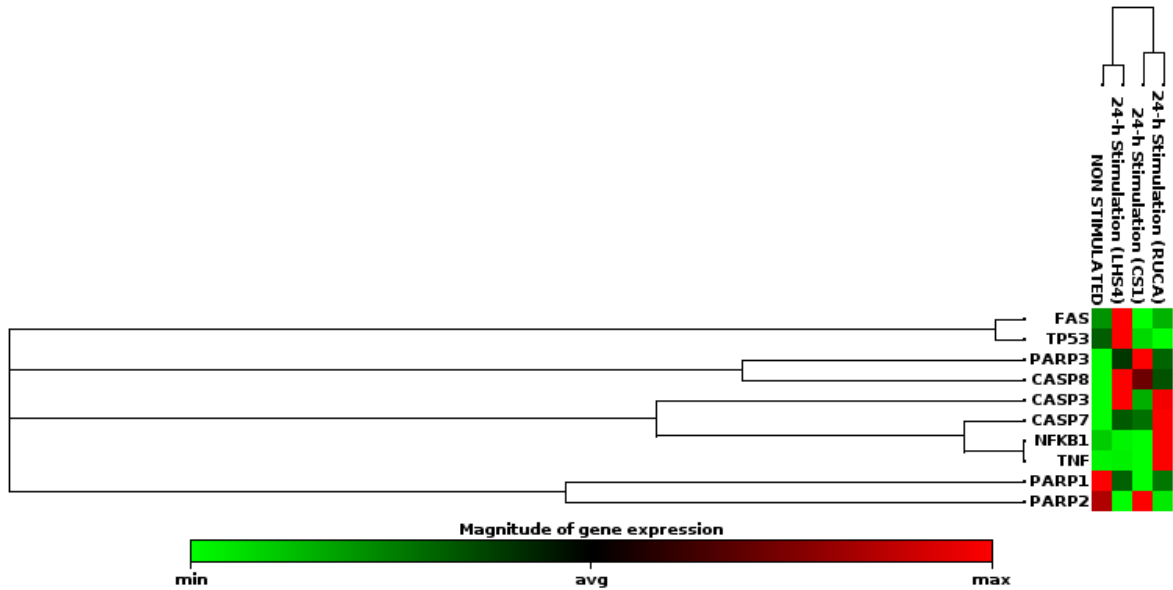
değere karşılık gelirken, en sağdaki kırmızı renk en yüksek değere karşılık gelmektedir. Siyah renk ise ortalama değer olduğunu göstermektedir.

Capan-1 hücrelerine ait kontrol grubuna göre kıyaslanan gen ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi Tablo 4.19’da, ısı gen haritası ise Şekil 4.47’de verilmiştir.

Tablo 4.19. RT-PCR analiz sonuçlarına göre Capan-1 hücrelerindeki genlerin kontrol grubuna göre mRNA ekspresyon seviyeleri (IC_{50} değerleri ile 24 saatlik inkübasyon)

Gen Sembolü	Gen ifade düzeyleri		
	LHS-4 (268,69 μ M)	CS-1 (298,62 μ M)	Rucaparib (23,75 μ M)
PARP1	-2,17	-4,53	-2,35
PARP2	-2,56	-1,06	-2,52
PARP3	2,95	5,98	2,51
CASP3	2,18	1,18	2,15
CASP7	2,22	2,06	4,78
CASP8	4,63	3,58	2,23
TNF	-1,52	-13,00	15,54
FAS	-4,63	-36,50	-1,42
TP53	-1,57	-1,92	-1,52
NFKB1	-5,16	-13,00	1,92

(-): Downregüle, (+): Upregüle,,:



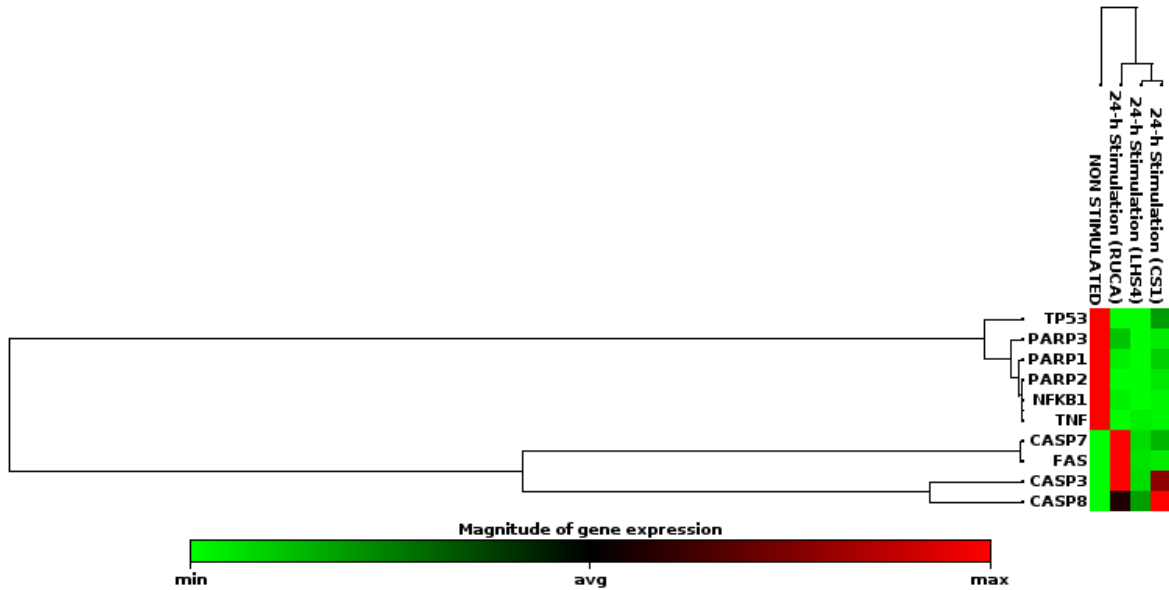
Şekil 4.47. RT-PCR deneyinde ekspresyonu incelenen Capan-1 hücrelerindeki genlerin ekspresyon değişimlerini gösteren ısı gen (clustergram) haritası. Renk değişimleri; kontrole göre kırmızı artan ekspresyonu, yeşil azalan ekspresyonu, siyah ise aynı seviyedeki gen ekspresyonlarını göstermektedir.

PANC-1 hücrelerine ait kontrol grubuna göre kıyaslanan gen ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi Tablo 4.20’de, ısı gen haritası ise Şekil 4.48’de verilmiştir.

Tablo 4.20. RT-PCR analiz sonuçlarına göre PANC-1 hücrelerindeki genlerin kontrol grubuna göre mRNA ekspresyon seviyeleri (IC_{50} değerleri ile 24 saatlik inkübasyon)

Gen Sembolü	Gen ifade düzeyleri		
	LHS-4 (112,83 μ M)	CS-1 (82,39 μ M)	Rucaparib (71,67 μ M)
PARP1	-128,00	-10,08	-32,00
PARP2	-128,00	-20,16	-128,00
PARP3	-64,00	-20,16	-8,00
CASP3	2,00	12,70	16,00
CASP7	2,00	3,17	16,00
CASP8	2,00	6,35	4,00
TNF	-32,00	-40,32	-128,00
FAS	4,00	3,17	16,00
TP53	-4,00	-2,52	-4,00
NFKB1	-128,00	-40,32	-32,00

(-): Downregüle, (+): Upregüle,



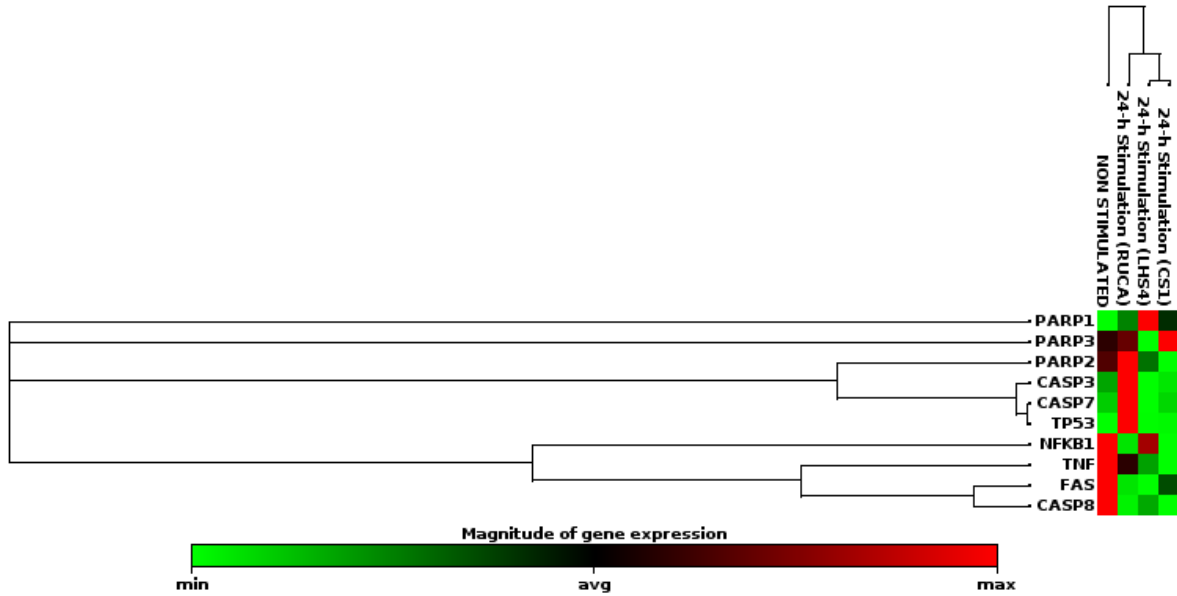
Şekil 4.48. RT-PCR deneyinde ekspresyonu incelenen PANC-1 hücrelerindeki genlerin ekspresyon değişimlerini gösteren ısı gen (clustergram) haritası. Renk değişimleri; kontrole göre kırmızı artan ekspresyonu, yeşil azalan ekspresyonu, siyah ise aynı seviyedeki gen ekspresyonlarını göstermektedir.

hTERT-HPNE hücrelerine ait kontrol grubuna göre kıyaslanan gen ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi Tablo 4.21’de, ısı gen haritası ise Şekil 4.49’da verilmiştir.

Tablo 4.21. RT-PCR analiz sonuçlarına göre hTERT-HPNE hücrelerindeki genlerin kontrol grubuna göre mRNA ekspresyon seviyeleri (IC₅₀ değerleri ile 24 saatlik inkübasyon)

Gen Sembolü	Gen ifade düzeyleri		
	LHS-4 (116,6 µM)	CS-1 (464,3 µM)	Rucaparib (166,23 µM)
PARP1	6,73	3,36	2,38
PARP2	-1,27	-1,57	1,19
PARP3	-1,19	-152,22	-215,27
CASP3	-4,76	-2,38	4,76
CASP7	-9,51	-1,19	9,51
CASP8	-4,76	-19,03	-13,45
TNF	-4,76	-30,70	-1,68
FAS	-9,51	-2,38	-6,73
TP53	2,28	26,91	2452,44
NFKB1	-1,19	-9,51	-6,73

(-): Downregüle, (+): Upregüle.



Şekil 4.49. RT-PCR deneyinde ekspresyonu incelenen hTERT-HPNE hücrelerindeki genlerin ekspresyon değişimlerini gösteren ısı gen (clustergram) haritası. Renk değişimleri; kontrole göre kırmızı artan ekspresyonu, yeşil azalan ekspresyonu, siyah ise aynı seviyedeki gen ekspresyonlarını göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE YORUM

Annexin V-FITC/PI Apoptoz kiti ile yapılan akım sitometrisi sonuçlarına göre % olarak elde edilen seçili popülasyon üzerinden belirli sayıda hücrenin apoptotik-nekrotik hücre indeks değerleri incelendiğinde Capan-1 hücrelerinin Tablo 4.4'te verilen total apoptotik hücre oranlarıyla (**geç apoptotik ve erken apoptotik hücre toplamı**) analiz sonuçlarında inkübasyon zamanının artışına bağlı olarak sentez maddelerinin ve PARP inhibitörlerinin (olaparib ve rucaparib) apoptotik ve nekrotik hücre oranlarının giderek artış gösterdiği görülmüştür. Olaparib ve rucaparib 2 gün içinde en aktif apoptotik etkinliği göstermiştir. Olaparibin total apoptotik hücre değerleri 24 saat için %37,5 ve 48 saat için %48,5; rucaparibinki ise 24 saat için %49,9 ve 48 saat için %47,8 olarak bulunmuştur. Ancak sentez gruplarına göre, artan inkübasyon süresiyle birlikte geç apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarının arttığı görülmüştür. Sentez maddelerinin apoptotik nekrotik indeksleri incelendiğinde; LHS-4 24 saat için total apoptotik hücre değerleri %29,9; 48 saat için %41,6 olarak; LHS-5'in ise 24 saat için %28,9; 48 saat için %41,5 olarak bulunmuştur. CS-1'in 24 saat için total apoptotik hücre değerleri %35,1; 48 saat için %36,6 olarak;. CS-2'nin ise 24 saat için %35,5; 48 saat için %37,1 olarak bulunmuştur. Capan-1 hücrelerinde ilaç etkinliklerinde diğer pankreas kanseri hücrelerine göre daha fazla etkinlik artışı olduğu rapor edilmiştir [160], ayrıca BRCA2 mutasyonu olan Capan-1 hücrelerinin PARP inhibitörlerine olan hassasiyeti bilinmekle birlikte, homolog rekombinasyon tamirinde PARP inhibitörlerinin etkinliğini arttığı, bu durumda hücrelerin hayatta kalamayıp ölüme sürüklendiği gözlemlenmiştir [161, 162]. Üretilen sentez malzemelerinin etkinliğinin rucaparibe olan benzerliği hücrelerin hassasiyetinin arttığının bir göstergesi apoptozdaki artışla birlikte gösterilmiştir. Olaparib ve rucaparibin elde ettiğimiz verilere paralel olarak Capan-1 hücrelerindeki etkinliği radyoterapi ile veya çeşitli kombinasyonlarla artmış benzer türevdeki PARP inhibitörlerinin de aynı hücre tipleri için benzer etki mekanizmaları üzerinden hücreyi ölüme sürüklediği gözlemlenmiştir. Bu mekanizma DNA kırıklarındaki artış ile mitoz ve apoptozdaki artış üzerinden analiz edilmiştir [163, 164].

Annexin V-FITC/PI Apoptoz kiti ile yapılan akım sitometrisi sonuçlarına göre % olarak elde edilen seçili popülasyon üzerinde sentez maddelerinin, PARP inhibitörlerinin (olaparib ve rucaparib) PANC-1 hücrelerinde apoptotik-nekrotik hücre indeks değerlerinin

inkübasyon zamanı artışına bağlı olarak arttığı belirlenmiştir (Tablo 4.5). Özellikle geç apoptoz değerlerinin erken apoptoz değerlerine oranla daha fazla olduğu görülmüştür. Olaparibin total apoptotik hücre değerleri 24 saat için %39,2; 48 saat için %59,1 olarak; rucaparibinki ise 24 saat için %19,8; 48 saat için %34,5 olarak bulunmuştur. Sentez maddelerinden LHS-4 total apoptotik hücre değerleri 24 saat için %21,9; 48 saat için %28,6 olarak ve LHS-5 24 saat için %10,9; 48 saat için %15,6 olarak bulunmuştur. CS-1 total apoptotik hücre değerleri %30,7; 48 saat için %42,9 olarak; CS-2 24 saat için %25; 48 saat için %28,5 olarak bulunmuştur. PANC-1 hücrelerinde Capan-1 hücreleriyle kıyaslandığında inkübasyon periyoduna göre maddelerde anlamlı değişkenlik gözlemlenmemiştir. Bu da daha önce yapılan çalışmalardan PANC-1 hücrelerinde Capan-1 hücrelerine kıyaslandığında inkübasyon periyoduna göre maddelerin apoptotik etkilerinde önemli farklılık görülmemiştir. Yapılan çalışmalarda PANC-1 hücrelerinin antikanser ilaçlara karşı daha fazla direnç gösterme özelliğine sahip olduğu açıklanmıştır [160]. BRCA1/2 eksikliği olan hücreler, DNA çift sarmal kırıklarını onarmak için etkili bir homolog rekombinasyon gerçekleştiremezler [165]. PARP-1'in inhibisyonu da, bu kopmalara cevap verebilecek diğer aktif DNA onarım yollarını ortadan kaldırır ve çoklu DNA onarım yollarını inhibe ederek potansiyel olarak daha fazla kırık oluşumuna neden olurlar. PANC-1 hücrelerinde yapılan klinik öncesi çalışmalarda, olaparibin hücrelerin terapötik maddelere duyarlılaştırılmasındaki etkinliği açıklanmış ve Capan-1 hücrelerindeki hassasiyete karşın apoptoz dışı diğer ölüm mekanizmalarıyla hücrelerin etkilendiğini belirtmiştir. Bu da olaparibin apoptoz sonuçlarımızdaki nekrotik ölümdaki artışa neden oluşunu açıklayabilir [90, 161, 166, 167].

Annexin V-FITC/PI Apoptoz kiti ile yapılan akım sitometrisi sonuçlarına göre % olarak elde edilen seçili popülasyon üzerinden belirli sayıda hücrenin apoptotik-nekrotik hücre indeks değerleri incelendiğinde hTERT-HPNE hücrelerinde sentez maddelerinin ve PARP inhibitörlerinin apoptotik sonuçlarını (Tablo 4.6) değerlendirdiğimizde de inkübasyon zamanının artışına paralel olarak geç apoptoz değerlerinin yükseldiği ancak, hücre canlılıklarının fazla etkilenmediği gözlemlenmiştir. Buna göre 2 gün içinde hTERT-HPNE hücrelerinde en az % hücre canlılık oranı olaparib 24 saat için hücre canlılığı %78,3; 48 saat için %88,4 ve rucaparib 24 saat için hücre canlılığı %87,3; 48 saat için %87,1 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç da bize kontrol PARP inhibitörlerine kıyasla, sentez

maddelerinin normal hücreleri daha az hasara uğrattığını, kanserli hücreler üzerinde etkinliklerinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Ölümsüzleştirilmiş HPNE hücreleri, doku kültüründe bir tek tabaka halinde büyür. Ancak çok katmanlı hTERT-HPNE hücrelerinin örnekleri de odak oluşumu şeklinde gözlenmektedir. Ancak bu hücrelerde neoplastik fenotipten sorumlu olan genlerin neler olduğu bilinmemekle birlikte bazı transpozonların geçici aktivasyonu ile indüklendiğinde, HPNE genomunda kanserle ilişkili genlerin bozulması ve/veya aktivasyonu meydana gelmektedir. Pankreas *in vitro* epitel modelleri, bazı onkogenlerin veya tümör baskılayıcı genlerin bilinen bir kombinasyonunu kullanan kanser hücreleri ile kıyaslandığında, hTERT-HPNE hücrelerinin kontrol grubu olarak kullanılmasının uygun olduğunu göstermiştir [160, 168].

Mitokondriyal membran potansiyeli analizi akım sitometrisi sonuçlarına göre, Capan-1 hücrelerinde Tablo 4.7’de verilen analiz sonuçlarında kontrol grubunun herhangi bir boya ile boyanmamış hücre indeksinin tüm gruplardan yüksek olduğu ve mitokondriyal membran potansiyelinde artış göstermediği bulunmuştur. 2 günlük analizler incelendiğinde olaparibin (mitokondriyal membran potansiyelindeki artış 24 saat için %78,3; 48 saat için %88,4) en yüksek etkinliğe sahip olduğu gözlemlenmiş ancak sentez maddelerinin 2 güne dağılımı incelendiğinde etkinliklerinin anlamlı bir fark yaratmadığı ve aktivitelerinin olaparib ve rucaparibin etkinliklerine benzer şekilde olduğu gözlemlenmiştir.

Mitokondriyal membran potansiyeli analizi akım sitometrisi sonuçlarına göre, PANC-1 hücrelerinde Tablo 4.8’de verilen analiz sonuçlarında kontrol grubunun herhangi bir boya ile boyanmamış hücre indeksinin tüm gruplardan yüksek olduğu ve mitokondriyal membran potansiyelinde artış göstermediği bulunmuştur. 2 günlük analizler incelendiğinde rucaparibin (mitokondriyal membran potansiyelindeki artış 24 saat için %55,1; 48 saat için %47,5) en yüksek etkinliğe sahip olduğu ancak sentez maddelerinin 2 güne dağılımı incelendiğinde anlamlı bir fark yaratmadığı ve aktivitelerinin olaparib ve rucaparibin etkinliklerine benzer şekilde olduğu gözlemlenmiştir.

Mitokondriyal membran potansiyeli analizi akım sitometrisi sonuçlarına göre, hTERT-HPNE hücrelerinde Tablo 4.9’da verilen analiz sonuçlarında kontrol grubunun herhangi bir boya ile boyanmamış hücre indeksinin tüm gruplardan yüksek olduğu ve mitokondriyal membran potansiyelinde artış göstermediği bulunmuştur. 2 günlük analizler incelendiğinde yine rucaparibin (mitokondriyal membran potansiyelindeki artış 24 saat için

%30,7; 48 saat için %48,3) en yüksek etkinliğe sahip olduğu ancak sentez maddelerinin 2 güne dağılımı incelendiğinde anlamlı bir fark yaratmadığı ve rucaparib kadar etkinlik göstermediği, yani sentez maddelerinin kanser hücrelerindeki etkinlikleri göz önüne alındığında apoptotik-nekrotik hücre ölçüm analizlerindeki verileri destekler nitelikte sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir.

Oksidatif stres, henüz tanımlanmamış yollar aracılığıyla mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini ve hücre ölümünü başlatan DNA kırılmalarını ve PARP-1 aktivasyonunu indükler. Oksidatif stres veya alkilleyici ajanların neden olduğu PARP aktivasyonunda, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması, mitokondriyal geçirgenlik artışı, hatta hücre ölümü oluşabilir. Ancak PARP aktivasyonu yoluyla MAP kinaz fosfataz-1 (MKP-1) ekspresyonundan sorumlu olan aktive edici transkripsiyon faktörünün (ATF-4) MAP kinazları düzenlemesi nedeniyle bu yola bağımlı gelişen hücre ölümünde PARP inhibisyonu neticesinde mitokondriyal membran potansiyelinde bir değişiklik gözlemlenmediği bildirilmiştir [169, 170, 171]

Kaspaz-3 aktivitesi analizi akım sitometrisi sonuçlarına göre Capan-1 hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonuna yönelik hücre değerlerinin inkübasyon zamanına göre etkileri Tablo 4.10'da verilmiştir. Analiz sonuçlarında kontrol grubunun herhangi bir boya ile boyanmamış hücre indeksinin tüm gruplardan yüksek olduğu ve kaspaz-3 aktivitesinde artış olmadığı gözlemlenmiştir. 2 günlük analizler incelendiğinde CS-1'in kaspaz-3 aktivasyonunda analiz değerlerinin 24 saat için %18,5; 48 saat için %20 olarak bulunduğu ve en yüksek etkinliğe sahip olduğu, apoptotik nekrotik hücre analizlerindeki benzer (erken ve geç apoptoz değerleri toplamı 24 saat için %35,1; 48 saat için %36,6) sonuçların varlığıyla dikkati çekmiştir. Diğer sentez maddelerinin ise 2 güne dağılımı incelendiğinde anlamlı bir fark yaratmadığı ve tüm grupların birbirine benzer kaspaz-3 aktivasyonu gösterdiği gözlemlenmiştir.

Kaspaz-3 aktivitesi analizi akım sitometrisi sonuçlarına göre PANC-1 hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonuna yönelik hücre değerlerinin inkübasyon zamanına göre etkileri Tablo 4.11'de verilmiştir. Analiz sonuçlarında kontrol grubunun herhangi bir boya ile boyanmamış hücre indeksinin tüm gruplardan yüksek olduğu gözlemlenmiştir. 2 günlük analizler incelendiğinde ilk gün için kaspaz-3 aktivasyonu sadece LHS-5'te (24 saat için %53,8; 48 saat için %63,8) gözlenirken, 2. gün için aktivasyon rucaparib dışındaki tüm

gruplarda gözlenmiştir. Bu durumda grupların kaspaz-3 aktiviteleri şu şekilde bulunmuştur: LHS-4 24 saat için aktivasyon %5,1; 48 saat için %16,69; CS-1 24 saat için aktivasyon %2,2; 48 saat için %78,8; CS-2 24 saat için aktivasyon %1,5; 48 saat için %73,1; olaparib 24 saat için aktivasyon %5,9; 48 saat için %26,0; rucaparib 24 saat için aktivasyon %8,3; 48 saat için %3,8 olarak bulunmuştur.

Kaspaz-3 aktivitesi analizi akım sitometrisi sonuçlarına göre hTERT-HPNE hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonuna yönelik hücre indeks değerlerinin inkübasyon zamanına göre etkileri Tablo 4.12’de verilmiştir. Analiz sonuçlarında kontrol grubunun herhangi bir boya ile boyanmamış hücre indeksinin tüm gruplardan yüksek olduğu gözlemlenmiştir. 2 günlük analizler incelendiğinde rucaparibin etkinliğinin kaspaz-3 aktivasyonunda 24 saat için %22,9 ve 48 saat için %9,1 ile en yüksek etkinliğe sahip olduğu, diğer grupların tamamının 2 güne dağılımı incelendiğinde anlamlı bir fark yaratmadığı ve tüm grupların birbirine benzer etkinlik gösterdiği, diğer akım sitometri analizleri de düşünüldüğünde normal hücreler üzerinde sentez maddelerinin olaparib ve rucaparib kadar toksik etkili olmadığı gözlemlenmiştir.

Apoptoz sırasında PARP inhibisyonu ile birlikte PARP yarıklanmasının gösterildiği deneylerle kıyaslandığında, kaspaz-3 aktivasyonu ve PARP yarıklanmasının artışı pek çok pankreatik kanser hücresinde benzer etkiler ortaya koymuştur. Kaspaz-3 aktivasyonu genel bağlamda gözlenirken PARP yarıklanması daha spesifik şekilde hassas ölçülebilir durumdadır ve kaspaz-3 ile görünmeyen yarıklanma daha kolay gözlemlenebilir. PARP yarıklanması ile ortaya çıkan fragmanların sonucunda çeşitli ölüm mekanizmaları devreye girmektedir. Herhangi bir hücre ölümü modelinde PARP yarıklanmasını karakterize etmenin üç avantajı vardır: (i) PARP'ın 89-kDa luk fragmanının tespiti, kaspaz-3 benzeri aktivasyonunu gösterir ve bu durum çok sayıda hücre ölümü modelinde kanıtlanmıştır. (ii) Diğer tespit yöntemleriyle karşılaştırıldığında, PARP yarıklanması, apoptozun çok hassas bir tahlilidir, farklı modellerde çok erken meydana gelen hücre ölümünü algılar ve hücrelerin küçük bir popülasyonunda bile meydana gelen apoptozu saptar. (iii) Granzim B'nin neden olduğu apoptoz sırasında ve nekroz sırasında görülen tamamen farklı fragmentasyon paternleri, bu hücre ölümü modelleri sırasında meydana gelen biyokimyasal olayların anlaşılmasına yol açabilir. Bu nedenle, PARP yarıklanmasının apoptozdaki rolü ve karakterizasyonu hücre ölümü sürecini anlamada yardımcı olabilir. Bu çeşitli apoptoz

modellerinde PARP bölünmesinin 89-kDa fragmanının tespiti, apoptozu belirlemede önemli parametrelerden biri olarak kabul görmüştür. Apoptoz sırasında parçalanan farklı moleküller arasında PARP'ın bozunmayı hedefleyen ilk protein grubu olduğu gösterilmiştir [118, 172-175]. Bizim sonuçlarımız da 2 farklı tip pankreatik kanser hücresi üzerinde denenen sentez maddeleri için aktivasyon sağlandığını göstermiştir

Hücre siklusu analiz sonuçlarımıza göre, olaparib ve rucaparibin Capan-1 hücrelerinde (Tablo 4.13) S fazında etkili olduğu görülmektedir. Olaparib için S fazı hücre % oranları; 24. saatte %33,96; 48. saatte %51,28 iken, rucaparib için S fazı oranları 24. saatte %39,73 ve 48 saatte %38,27 olarak analiz edilmiştir. Bölünmeye girecek hücrelerde DNA polimeraz veya nükleotid sentezinde gerekli olan bazı enzimlerin genlerindeki aktivasyonlar nedeniyle bu genlerin ürünleri G₁/S sınırında artmaya başlar, ardından S fazında hücre DNA'sı hızlıca replike olur. Bu süreçte çeşitli dış faktörler nedeniyle DNA iplikçikleri hasara uğrayabilir. G₂ fazında, bir önceki S fazında replike olmuş DNA ve kromatin proteinleri kondanse olurken, kardeş kromatidler şeklinde birleştirilirler. Herhangi bir tamir sürecinden kaçan kusurlu DNA veya replikasyonunu tamamlayamamış DNA bu süreçte kontrol edilir. DNA hasarı olan bir hücrede G₂ fazında tutukluluk hali ve S fazından hücrenin çıkışı yavaşlar ve G₁'de hücre döngüsü durdurulur. Yanlış baz eşleşmeleri ve eksik replikasyonlar nedeniyle G₂ fazına geçişler azalır. Hücre siklusanalizleri incelendiğinde, S fazı yüksekken olaparib G₂/M fazı 24 saat için %18,32; 48 saat için %11,50 olup rucaparib G₂/M fazı 24 saat için %7,06; 48 saat için %9,97 olarak bulunmuştur. Yani G₂/M oldukça düşük görünmektedir. Bunlara paralel benzer etki olarak CS-1 sentez maddesinde belirgin değişiklikler gözlenmiş (S fazı 24 saat için %31,63; 48 saat için %16,15 ve G₂/M fazı 24 saat için %14,62; 48 saat için %17,78) diğer sentez numuneleri arasında günlere bağlı olarak belirgin bir değişiklik izlenmemiştir. Farklı pankreas kanser hücrelerinde olaparibin önce S fazında, sonra G₂/M fazında hücreleri tutuklama yetkinliğinin arttığı, hücre çekirdeğinin pankreatik intraepitelyal neoplazi lezyonlarında DNA hasarına bağlı değişimlerin arttığını göstermiştir [163].

PANC-1 hücrelerinin Tablo 4.14'te verilen analiz sonuçlarına bakıldığında S fazının en yoğun olduğu maddeler Capan-1 hücrelerinde olduğu gibi olaparib ve rucaparib etken maddeleridir. Olaparib S fazı 24 saat için %55,96; 48 saat için %82,74 iken rucaparib S fazı 24 saat için %41,01; 48 saat için %88,47 olarak bulunmuştur. 2 günlük analizler

incelendiğinde S fazı yüksekken oluparib G₂/M fazı 24 saat için %1,39; 48 saat için %14,48 olup rucaparib G₂/M fazı 24 saat için %0,97; 48 saat için %8,81 olarak bulunmuştur. Yani G₂/M oldukça düşük görünmektedir. Bunlara paralel benzer etki olarak Capan-1 hücrelerindeki CS-1'e ilave olarak LHS-4'te de belirgin değişiklikler gözlenmiş, genel olarak hücre döngüsü analizlerinde Capan-1 hücrelerine göre PANC-1 hücrelerinde daha fazla tutuklanma söz konusu olduğu ortaya çıkmıştır. Bu durumda CS-1 S fazı 24 saat için %44,13; 48 saat için %66,91 ve G₂/M fazı 24 saat için %15,56; 48 saat için %7,08 olarak; LHS-4 S fazı 24 saat için %47,74; 48 saat için %41,35 ve G₂/M fazı 24 saat için %13,52; 48 saat için %12,03 olarak bulunmuştur.

hTERT-HPNE hücrelerinin Tablo 4.15'te verilen analiz sonuçlarına bakıldığında S fazının en yoğun olduğu maddeler Capan-1 ve PANC-1 hücrelerinde olduğu gibi oluparib ve rucaparib etken maddeleridir. Oluparib S fazı 24 saat için %33,01; 48 saat için %40,38 iken rucaparib S fazı 24 saat için %43,31; 48 saat için %45,41 olarak bulunmuştur. 2 günlük analizler incelendiğinde S fazı yüksekken oluparib G₂/M fazı 24 saat için %13,85; 48 saat için %12,86 olup rucaparib G₂/M fazı 24 saat için %10,20; 48 saat için %2,64 olarak bulunmuş, inkübasyon süresine bağlı anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak normal hücre grubundan beklenildiği üzere diğer test maddelerinin G₀/G₁ evresindeki indeksleri daha yüksek olup (%60 üzerinde) diğer akım sitometri analizlerinden elde edilen verilerin tutarlılığı hücre döngüsü analizlerinde de sağlanmış, test maddelerinin normal hücrelerdense kanserli hücrelerde yüksek etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Farklı hücre tipleri üzerinde oluparibin etkinliği incelendiğinde S fazındaki hücrelerinazaldığı ve homoloji yönlendirmeli DNA hasar tamirinde ciddi artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir, bu da PARP enzim aktivitesini önleme gücünden bağımsız iş gördüğünü ortaya koymakla birlikte, G₂ fazında yığılmaya sebep olduğu açıklanmıştır. PARP'in p53 işlevi üzerindeki etkileri, PARP'in kimyasal veya transdominant inhibisyonuna cevap olarak hücre döngüsünün G₂ fazında iyi bilinen hücre yığılmasını açıklayabilir. G₂ tutuklanmasında daha az oranda olmasına rağmen, p53'ün G₁ tutuklanmasının ana etkileyicisi olarak anahtar rol oynadığını ve PARP aktivitesinin yokluğunda, bazı lezyonların DNA replikasyonundan önce tespit edilmeden kalabildiğini ve bunların S fazı sırasında ve hücre döngüsünün G₂ fazında sonradan bir tutuklama ile daha fazla hasara yol açtığı gösterilmiştir. PARilasyon tarafından p53 ile indüklenen hücre

siklusunun uyarılması, lezyonların onarılması için gerekli zamanı sağlayabilir ve genomik bütünlüğün korunmasına katkıda bulunabilir. Bu sebeple p53'ün apoptotik uyarının bir alt grubuna yanıt olarak apoptozun uyarılmasında kritik bir faktör olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Rucaparib ile kombine ilaç uygulamalarında ve radyasyon maruziyetlerinde hücrel sitotoksitenin artması, G₂/M fazında hücre birikimini ağır şekilde indükleyerek, mitozun bozulmasına ve nihayetinde apoptoz ve otofajiye neden olmuştur. Bu durum farklı hücre tiplerinde gösterilmiş, bu hücreler arasından Capan-1 hücrelerinin en hassas, PANC-1 hücrelerinin ise en dirençli yanıtı verdiği belirtilmiştir. Ayrıca olaparibin yaygın olarak S fazında tutuklama yaptığı gözlemlenmiştir [176-179].

Akım sitometrisi analizlerinin ortaya koyduğu veriler neticesinde hücreler ters-faz ışık mikroskobu ile görüntülenmiş ve hücrelerdeki morfolojik değişimler akım sitometri sonuçlarımızı desteklemiştir. Hücrelerin kontrol gruplarında morfolojik olarak bütünlüğünü koruduğu görülürken, kontrole kıyasla farklı test maddelerinde farklı morfolojik değişimler görülmüştür. Bu sebeple hücreler floresan boyalarla boyanarak görüntülenmiştir.

Sentez maddeleri uygulanmış Capan-1 hücreleri büzüşerek hacim olarak ufalmış, çekirdekler kenara itilmiş ve kontrol hücrelerine göre çekirdek daha belirgin hale gelmiştir. LHS-4 ve LHS-5 uygulanan hücrelerde mitokondrilerin belirgin bir bölgede yoğunlaştığı gözlemlenirken, CS-1 ve CS-2 uygulanan hücrelerde hücrelerin stoplazmasında boğumlanmalar söz konusudur. Olaparib uygulanmış hücrelerde hücrelerin şiştiği gözlemlenirken, rucaparib uygulanan hücrelerde apoptotik cisimciklerin oluştuğu, kofulların gözlemlendiği ve hücrenin uzantılar yapmaya başlayan bir morfolojik eğilim gösterdiği gözlemlenmiştir. Her iki madde için de apoptotik hücre grupları, parçalı görünen çekirdekçik yerleşimi söz konusudur.

Sentez maddeleri uygulanmış PANC-1 hücreleri de, Capan-1 hücreleri gibi büzüşerek hacim olarak ufalmış ve kontrol hücrelerine göre çekirdekleri daha belirgin hale gelmiştir. Ancak LHS-4 ve LHS-5 uygulanan hücrelerin stoplazmalarının belirginleştiği, mitokondrilerin çekirdeğe yakın bir odaklanma gösterdiği ve hatta çekirdekte mikrosatelit yapılaşmasının olduğu düşünülmüştür. CS-1 maddesinde ise mitokondrilerin çekirdek etrafında bir yapılanma gösterdiği, stoplazmik dağılımın hacim olarak azaldığı gözlemlenmiştir. CS-2 maddesinde kontrole göre belirgin bir fark gözlenmemekle birlikte hücrelerin uzantılar yapmaya başladığı gözlemlenmiştir. Yine Capan-1 hücrelerinde olduğu

gibi olaparıb uygulanmış hücrelerde hücre boyutunun b    mediği, tam tersi Şiştiği g    lenirken  ok fazla  ekirdek ik olduğu g    lenmiŐtir. Rucaparib uygulanan h    lerde apoptotik cisimciklere benzer yapıların olduğu d    n  m  , par alı  ekirdek materyalinin h     stoplazmasına dağılmaya başladığı ve yine h    nin uzunlamasına uzantılar yapıcı bir morfolojik eğilimi g    rdiği bulunmuştur.

Sentez maddeleri uygulanmış hTERT-HPNE h    leri i in g    nt  lerden elde edilen en belirgin farklılık mitokondrilerin belirli bir odakta toplanması olmuştur. Bununla birlikte tıpkı diğer h    lerde olduğu gibi olaparıb h    de ŐiŐmeye; rucaparibin de h     morfolojisinde uzamaya neden olduğu g    lm  Őtur.

Daha  nce yapılan  alıŐmalarda rucaparib ve olaparıb ile ilgili maruziyet sonrasında h    nin  ekirdeğinde meydana gelen fosforilasyona bağlı ışıma artışı ve organellerde odaklanma ile belirgin k    leŐmenin g    lenmiŐ olması PARP inhibit  rlerinin etkinliğine dair sonu ları dođurmuŐtur. H    lerde apoptozun yanı sıra otofajik vakuoler yapılaŐmalar da s     konusu olup, rucaparib uygulaması sonrasında  ok h    rel    ekirdek yapılaŐması g    lenmiŐ, mikron  kleus formasyonunda anomaliler ile n  kleer tomurcuklanma olduğu g    lenmiŐtir [160, 179-182]. Bu sonu lar da bizim sonu larımızı desteklemektedir.

Sentez maddelerinin PARP yarıklanması  zerine etkilerinin araŐtırıldıđı ELISA kit analiz sonu larına g    , en y    k yarıklanmış PARP [214/215] d    yi rucaparibde g    lenmiŐ olup, hTERT-HPNE h    leri i in 2,310 ng/mL; Capan-1 h    leri i in 3,983 ng/mL; PANC-1 h    leri i in 0,431 ng/mL olarak belirlenmiştir. Sentez maddelerinden ise LHS-4 ve CS-1 de rucaparibe yakın PARP yarıklanma miktarı g    stermiŐtir. LHS-4 i in PARP yarıklanma miktarları hTERT-HPNE h    lerinde 1,122 ng/mL; Capan-1 h    lerinde 2,423 ng/mL; PANC-1 h    lerinde 0,311 ng/mL olarak; CS-1 i in de PARP yarıklanma miktarları hTERT-HPNE h    lerinde 1,195 ng/mL; Capan-1 h    lerinde 2,284 ng/mL; PANC-1 h    lerinde 0,325 ng/mL olarak bulunmuştur.

Akım sitometri ve PARP aktivitesi sonu larına g     ilave olarak rucaparib, LSH-4 ve CS-1 IC₅₀ konsantrasyonu uygulanan h    lerde 24 saatlik ink  basyon sonunda RT-PCR array  alıŐması ile bazı ilgili genlerin mRNA ekspresyonundaki değişiklikler araştırılmıştır.  zellikle bu genler arasında PARP1, PARP2 ve PARP3 ve kaspazlardaki değişiklikler incelenmiştir.

RT-PCR array analizleri sonucunda mRNA gen ekspresyonlarında kontrole göre upregüle olan genler:

Capan-1 hücreleri için LHS-4 açısından değerlendirildiğinde, PARP3, CASP3, CASP7, CASP8; CS-1 açısından değerlendirildiğinde PARP3, CASP7, CASP8 ve kontrole göre 2 kat olmadığı için anlamlı bulunmasa da CASP3; rucaparib açısından değerlendirildiğinde PARP3, CASP3, CASP7, CASP8 ve TNF ile birlikte kontrole göre 2 kat olmadığı için anlamlı bulunmasa da NFKB1 olarak belirlenmiştir.

PANC-1 hücreleri için LHS-4, CS-1 ve rucaparib açısından değerlendirildiğinde CASP3, CASP7, CASP8 ve FAS olarak bulunmuştur.

hTERT-HPNE hücreleri için LHS-4 ve CS-1 açısından değerlendirildiğinde PARP1 ve TP53; rucaparib açısından değerlendirildiğinde PARP1 ve TP53'e ilave olarak CASP3 ve CASP7 ile kontrole göre 2 kat olmadığı için anlamlı bulunmasa da PARP2 olarak belirlenmiştir.

RT-PCR array analizleri sonucunda mRNA gen ekspresyonlarında kontrole göre downregüle olan genler:

Capan-1 hücreleri için LHS-4 açısından değerlendirildiğinde, PARP1, PARP2, FAS ve NFKB1 ile kontrole göre 2 kat olmadığı için anlamlı bulunmasa da TNF ve TP53; CS-1 açısından değerlendirildiğinde PARP1, PARP2, TNF, FAS, NFKB1 ve kontrole göre 2 kat olmadığı için anlamlı bulunmasa da PARP2 ile TP53; rucaparib açısından değerlendirildiğinde yalnızca PARP1 ve PARP ile kontrole göre 2 kat olmadığı için anlamlı bulunmasa da FAS ve TP53 olarak belirlenmiştir.

PANC-1 hücreleri için LHS-4, CS-1 ve rucaparib açısından değerlendirildiğinde hepsinde aynı gen gruplarının (CASP3, CASP7, CASP8 ve FAS) downregüle olduğu belirlenmiştir.

hTERT-HPNE hücreleri için LHS-4, CS-1 ve rucaparib açısından değerlendirildiğinde hepsinde aynı olan PARP1 ve TP53 ile rucaparib için ilave olarak CASP3, CASP7 ve kontrole göre 2 kat olmadığı için anlamlı bulunmasa da PARP2 şeklinde belirlenmiştir.

PARP1, Poli (ADP-riboz) polimeraz 1 geni, poli (ADP-ribozil)asyonla çeşitli nükleer proteinleri modifiye eden bir kromatin ilişkili enzim olan poli (ADP-ribozil) transferazı kodlar. Bu modifikasyon DNA'ya bağımlı olarak farklılaşma, proliferasyon, tümör

transformasyonu gibi çeşitli önemli hücrel süreçlerin düzenlenmesinde ve ayrıca DNA hasarından hücrenin geri kazanılmasında rol oynayan moleküler olayların düzenlenmesinde yer alır [183].

İçinde bulunduğu pek çok biyolojik süreç mevcuttur ve bunlar; bazıları apoptotik süreç, baz-eksizyon onarımı, insülin uyarısına hücrel yanıt, kromozom organizasyonu, DNA hasar cevabı, DNA hasarının tespiti, DNA onarımı, DNA ligasyonu, DNA metabolik süreci, homolog rekombinasyon aracılı çift iplik kırığının tamiri, global genom nükleotid-eksizyon onarımı, çekirdekte protein konumunun korunması, mitokondriyal DNA metabolik süreci ve DNA onarımı, protein poli (ADP-ribozil)asyon ve DNA metilasyonunun düzenlenmesidir. Lokal ileri meme kanseri, metastatik meme kanseri, fallop tüpü kanseri, yumurtalık kanseri, BRCA germ hattı mutasyonu pozitif periton kanseri gibi bazı hastalıklarda ekspresyonu gözlenmektedir [183, 184].

PARP2, poli (ADP-riboz) polimeraz 2 geni bir katalitik domein içeren ve bir poli (ADP-ribosil)asyon reaksiyonunu katalize edebilen poli (ADP-ribozil) transferaz benzeri 2 proteinini kodlar. Bu protein, poli (ADP-ribozil) transferaz ile homolog olan bir katalitik alana sahiptir, ancak poli (ADP-ribozil) transferazın C-terminali katalitik alanını aktive eden bir N-terminali DNA bağlama bölgesinden yoksundur. Bu proteinin N-terminal bölgesi içindeki bazik artıklar, potansiyel DNA bağlama özelliklerini taşıyabilir ve proteinin nükleer ve/veya nükleolar hedeflenmesinde rol oynayabilir [185].

Görev aldığı biyolojik süreçler; baz-eksizyon onarımı, DNA onarımın, DNA ligasyonu, apoptotik sinyal yolu, peptidil-serin ADP-ribozilasyon, protein ADP-ribozilasyonu [185].

Lokal ileri meme kanseri, metastatik meme kanseri, yumurtalık kanseri, fallop tüpü kanseri, BRCA germline mutasyonu pozitif epitelyal over kanseri gibi bazı hastalıklarda ekspresyonu görülmektedir [186].

PARP3, poli (ADP-riboz) polimeraz 3 geni tarafından kodlanan protein PARP ailesine aittir. Bu enzimler, DNA onarımı, apoptozun düzenlenmesi ve genomik stabilitenin korunması için gerekli olan poli-ADP-ribozilasyon ile nükleer proteinleri modifiye eder. Bu gen, hücre döngüsü başından sonuna kadar tercihen kardeş sentriyol boyunca lokalize olan poli (ADP-ribozil) transferazı 3'ü kodlar [187].

DNA onarımı, DNA ligasyonu, çift iplikli kırılma onarımı, DNA ligasyonunun pozitif regülasyonu, protein ADP-ribozilasyonu, mitotik iğ organizasyonunun düzenlenmesi, telomer uzaması gibi süreçlerde görev alır. Biyolojik olarak olaparıb ve rucaparıb tarafından düzenlendiği gözlenmiştir. PARP1 ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Hücredeki bakım ve organizasyonda rol oynamaktadır. BRCA germline mutasyonu pozitif epitelyal over kanseri, BRCA germ hattı mutasyonu pozitif periton kanseri, fallop tüpü kanseri, yumurtalık kanseri, endometrioid yumurtalık kanserinde eksprese olduğu görülmektedir [188].

PARP4, poli (ADP-riboz) polimeraz 4 geni, bir poli (ADP-ribosil)asyon reaksiyonunu katalize edebilen poli (ADP-ribozil) transferaz benzeri 1 proteinini kodlar. Bu protein de PARP2'deki gibi, poli (ADP-ribozil) transferazınki ile homolog olan bir katalitik alana sahiptir, ancak poli (ADP-ribozil) transferazın C-terminali katalitik alanını aktive eden bir N-terminali DNA bağlama bölgesinden yoksundur. Bu protein doğrudan DNA'yı bağlayamadığından, transferaz aktivitesi, geniş karboksil terminalinin aracılık ettiği protein-protein etkileşimi gibi diğer faktörler tarafından aktive edilebilir. Hücre ölümü, hücre protein modifikasyonu, DNA onarımı, inflamatuvar cevap, protein ADP-ribozilasyon, telomeraz aktivitesinin düzenlenmesi, DNA hasarı uyarısına cevap, ilaca cevap, telomer uzaması gibi biyolojik süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir [189].

CASP3, kaspaz-3 geni; sistein-aspartik asit proteazı (kaspaz) ailesinin bir üyesi olan bir proteini şifreler. Kaspazların ardışık aktivasyonu, hücre apoptozunun yürütme evresinde merkezi bir rol oynar. Kaspazlar, aktif enzimi oluşturmak üzere dimerize olan büyük ve küçük iki alt-birim üretmek için korunmuş aspartik artıklarda proteolitik işlemde geçirilen aktif olmayan proenzimler olarak bulunurlar. Bu protein kaspaz-6, 7 ve 9'u ayırır ve aktive eder ve proteinin kendisi kaspaz-8, 9 ve 10 tarafından işlenir. Bu, nöronal ölüm ile ilişkili olan amiloid-beta 4A prekürsör proteininin parçalanmasında rol oynayan baskın kaspazdır. Alzheimer hastalığı. Bu genin alternatif eklenmesi, aynı proteini kodlayan iki transkript varyantı ile sonuçlanır [190].

Biyolojik olarak sistein tipi endopeptidaz aktivasyonu, apoptotik DNA fragmentasyonu ve sinyal yolu, B hücresi homeostazı, organik siklik bileşiklere hücresel cevap, eritrosit farklılaşması, hücre içi sinyal iletimi, öğrenme veya hafıza, apoptotik sürecin negatif-pozitif düzenlenmesi, hücre döngüsünün düzenlenmesi, nöron farklılaşması,

protein işleme, proteoliz, DNA hasarı uyarısına ve ilaca cevap, glikoz uyarısına cevap, hiperplazi, tümör nekroz faktörüne yanıt, UV'ye cevap, yara iyileşmesi süreçlerinde rol oynar [191].

CASP7, kaspaz-7 geni, kaspaz ailesinin bir üyesini kodlar. Kaspazların ardışık aktivasyonu, hücre apoptozunun yürütme evresinde merkezi bir rol oynar. Kaspazlar, aktif enzimi oluşturmak üzere dimerize olan büyük ve küçük iki alt-birimi üretmek için korunmuş aspartik artıklarda proteolitik işleminden geçirilen inaktif proenzimler olarak bulunurlar. Kodlanan proteinin prekürsörü kaspaz-3 ve 10 tarafından yarılr, hücre ölüm uyarınları üzerinde aktive edilir ve apoptozu indükler [192].

Hücrel olarak apoptoz, hücre ölümünün aktivasyonu ve ekspresyonunda rol oynar. Biyolojik olarak yaşlanma, apoptotik süreç, otofajik hücre ölümü, sitoplazmik taşıma, protein işleme, proteoliz süreçlerinden sorumlu olduğu bilinmektedir [192].

CASP8, kaspaz-8 geni; kaspaz ailesinin bir üyesini kodlar. Bu protein Fas ve çeşitli apoptotik uyarınlarn neden olduğu programlanmış hücre ölümüne dahil olur. Bu proteinin N-terminal FADD benzeri ölüm efektör alanı, Fas etkileşimli FADD proteini ile etkileşime girebileceğini düşündürmektedir. Bu protein, Huntington hastalarının hastalıktan etkilenen beyin bölgesinin çözünmez fraksiyonunda tespit edilmiştir, ancak normal kontrollerden değil nörodejeneratif hastalıklarda rol oynayanlarda mevcut olduğu gözlemlenmiştir [193].

Hücrede apoptoz, moleküler bölünme ve çoğalmada rol oynar; epitelyal kanser türlerinde, Huntington hastalığında, hiperplazide ekspresyonu mevcuttur. Biyolojik olarak sistein tipi endopeptidaz aktivitesinin aktivasyonu, anjiyojenez, apoptotik süreç, hücre yüzeyi reseptör sinyal yolu, mekanik uyarınlara hücrel cevap, I-kappaB kinaz / NF-kappaB'nin negatif regülasyonu, proteoliz, tümör nekroz faktörüne yanıt süreçlerinde etkinliğı gösterilmiştir [194].

CASP9, kaspaz-9 geni; kaspaz ailesinin bir üyesini kodlar. Bu protein, apoptozom ve sitokrom c ile apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1'den oluşan bir protein kompleksi aracılığıyla otoproteolitik işlem ve aktivasyona uğrayabilir; bu olayın kaspaz aktivasyon kaskadının en erken adımlarından biri olduğu; bu proteinin apoptozda merkezi bir rol oynadığı ve tümör baskılayıcı olduğu düşünülmektedir [195].

Hücrede apoptoz, hayatta kalma ve moleküler bölünmede rol oynar. Yaşlanma, DNA hasar cevabı, trombosit oluşumu, apoptotik sürecin düzenlenmesi, proteoliz, DNA hasar

uyaranına cevabın düzenlenmesi, böbrek filtrasyonu gibi farklı biyolojik süreçlerde işlevi olduğu bilinmektedir [195].

TNF, tümör nekroz faktör geni, tümör nekroz faktörü (TNF) süper familyasına ait çok fonksiyonlu bir proinflamatuvar sitokini kodlamaktadır. Bu sitokin esas olarak makrofajlar tarafından salgılanır. Bu sitokin, hücre çoğalması, farklılaşması, apoptoz, lipid metabolizması ve pıhtılaşma dahil olmak üzere geniş bir biyolojik süreç yelpazesinin düzenlenmesinde yer alır. Otoimmün hastalıklar, insülin direnci ve kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda rol oynar. Farelerde nakavt çalışmaları da bu sitokinin nöro-koruyucu işlevini göstermiştir [196].

Romatoid artrit, neoplazmlar, obezite gibi hastalıklarda ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Hücresel olarak akut inflamatuvar cevap, apoptotik süreç, kalsiyum aracılı sinyal, hücre aktivasyonu-çoğalması-ekstravazasyon, sirkadiyen ritim, kortikal aktin hücre iskelet organizasyonu, ölüm indükleyen sinyal kompleksi, savunma cevabı, DNA hasar cevabı, endotel hücre apoptotik süreci, hücre dışı matris organizasyonu, bağışıklık cevabı, JNK kaskadı, MAPK kaskadı, mitotik hücre döngüsünün negatif düzenlenmesi, transkripsiyonun negatif regülasyonu, sitokin regülasyonu gibi süreçlerde rol oynamaktadır [197].

FAS, Fas hücre yüzey ölüm reseptörü (TNF reseptörü süper ailesi üyesi 6) geni, tarafından kodlanan protein, TNF-reseptör süper ailesinin bir üyesidir. Bu reseptör bir ölüm domeini içerir. Programlı hücre ölümünün fizyolojik düzenlenmesinde merkezi bir rol oynadığı ve çeşitli malignitelerin ve bağışıklık sistemi hastalıklarının patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu reseptörün ligandı ile etkileşimi, Fas ilişkili ölüm domain proteini (FADD), kaspaz-8 ve kaspaz-10'u içeren ölüm indükleyen bir sinyalleme kompleksinin oluşumuna izin verir. Kompleks içindeki kaspazların otoproteolitik işlemi, aşağı yönlü kaspaz kaskadını tetikler ve apoptoza yol açar [198].

Yaşlanma, ölüm domeini reseptörleri aracılığıyla apoptozun indüklenmesi, B hücrelerinin aracılık ettiği bağışıklık, amino asit açlıklarına ve sitokin uyarısına hücresel yanıt, hidrostatik basınca hücresel tepki, interlökin-1'e ve tümör nekroz faktörüne hücresel yanıt, gebelikte maternal süreç, yumurtalık folikülü atrezisi, yumurtlama döngüsü, protein homooligomerizasyon regülasyonu, protein fosforilasyonunun düzenlenmesi, östrojen uyarısına cevap, glukokortikoid uyarısına cevap, büyüme faktörü uyarısına cevap,

spermatogenez, dalak gelişimi, tümör nekroz faktörü aracılı sinyal yolu gibi pek çok biyolojik süreçte görev alır [199].

TP53, tümör protein p53 geni, transkripsiyonel aktivasyon, DNA bağlanması ve oligomerizasyon domeinlerini içeren bir tümör süpresör proteinini kodlar. Kodlanan protein, hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemek için çeşitli hücresel streslere cevap verir, böylece hücre döngüsü, apoptoz, otofaji, yaşlanma, farklılaşma, DNA onarımı gibi süreçlerde görev alır. Bu gendeki mutasyonlar, Li-Fraumeni sendromu gibi kalıtsal kanserler dahil olmak üzere çeşitli insan kanserleriyle ilişkilidir [200].

P53 proteini, vücudun tamamı boyunca, DNA'ya doğrudan bağlandığı hücrelerin çekirdeğinde bulunur. Hücredeki DNA, güneş ışığından gelen zehirli kimyasallar, radyasyon veya ultraviyole (UV) ışınlar gibi maddelerle hasar gördüğünde, bu proteinin DNA'nın tamir edilip edilmeyeceğini veya hasarlı hücrenin kendini imha edip etmeyeceğini belirlemede kritik bir rol oynar. DNA tamir edilebilirse, p53 hasarı gidermek için diğer genleri aktive eder. DNA tamir edilemiyorsa, bu protein hücrenin bölünmesini engeller ve apoptoza geçmesini söyler. Mutasyona uğramış veya hasar görmüş DNA'nın bölünmesini engelleyen hücreleri durdurarak, p53, tümörlerin gelişmesini önlemeye yardımcı olur. p53 hücre bölünmesini düzenlemek ve tümör oluşumunu önlemek için gerekli olduğundan, "genomun koruyucusu" lakabını almıştır [201].

NFkB1, Nükleer Faktör Kappa B alt ünitesi 1 geni, bir 50 kD protein üretmek için 26S proteazom tarafından kotranslasyonel işleme tabi tutulabilen bir 105 kD proteini kodlar. 105 kD proteini, Rel proteinine özgü bir transkripsiyon inhibitörüdür ve 50 kD proteini, NF-kappa-B (NFkB) protein kompleksinin bir DNA bağlama alt birimidir. NFkB, sitokinler, oksidan içermeyen radikaller, ultraviyole ışınlama ve bakteriyel veya viral ürünler gibi çeşitli hücre içi ve hücre dışı uyarılarla aktive edilen bir transkripsiyon düzenleyicidir. Aktifleştirilmiş NFkB, çekirdeğe translokasyon yapar ve çok çeşitli biyolojik fonksiyonlarda yer alan genlerin ekspresyonunu uyarır. NFkB'nin uygun olmayan aktivasyonu, birtakım enflamatuvar hastalıklar ile ilişkilendirilirken, NFkB'nin kalıcı inhibisyonu, uygun olmayan immün hücre gelişimi veya gecikmiş hücre büyümesine yol açar [202].

Apoptoz, proliferasyon gibi hücresel olaylarda rol oynar. Multiple miyelom, bakteriyel enfeksiyon, büyüme bozukluğu, osteopetroz, kötüleşen multiple miyelomda

ekspresyonu görülmektedir. Biyolojik olarak apoptotik süreç, amino asit açlıklarına hücrel yanıt, karbonhidrat uyarına hücrel cevap, sitokin uyarına hücrel yanıt, interlekin-1'e ve interlekin-6'ya hücrel yanıt, doğuştan gelen bağışıklık yanıtı, lenf düğümü gelişimi, kök hücre çoğalmasının negatif regülasyonu, Toll sinyal yolu, RNA polimeraz II promotöründen transkripsiyon gibi pek çok biyolojik süreçte etkilidir [203].

GAPDH, Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz geni; gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz protein ailesinin bir üyesini kodlar. Bu genin ürünü, inorganik fosfat ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) varlığında gliseraldehid-3-fosfatın geri dönüşümlü oksidatif fosforilasyonunun karbonhidrat metabolizmasında önemli bir enerji kazandıran adımını katalize eder. Kodlanan proteinin ek olarak, çekirdekte urasil DNA glikozilaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. İnsan genomunda bu lokusa benzer birçok psödogen bulunur [204]. Bu çalışmada housekeeping gen olarak normalizasyonda kullanılmıştır.

Çalışmamızda ayrıca, revers transkripsiyon kontrolü (RTC) kullanılmıştır. Herhangi bir memeli veya bakteriyel sekansa homolog olmayan bir poli-A kuyruğuna sahip bir yapay mRNA, RT² First Strand cDNA sentez kitinin primer tamponuna önceden yüklenir ve numunelerdeki mesajlarla birlikte ters transkribe edilir. Bu diziyi tespit eden RTC, ters transkripsiyon veriminin tüm örnekler için benzer olup olmadığını belirler; Yani, tüm örneklerden elde edilen verilerin karşılaştırma için kullanılıp kullanılmayacağını belirlemeye yardımcı olur. RNA kalitesi en çok ters transkripsiyon verimini etkiler [205].

Tüm bu genlerdeki artış ve azalışlar, diğer deney sonuçlarımız ile paralellik göstermektedir.

Tümör hücre hattının biyolojik ve patolojik özellikleri ile tanımlamaları yapılırken donör hastanın klinik seyri ve türev bölgesi ile ilgili bilgiler önem arz eder. Pankreas hücrelerinin klinik geçmişi irdelendiğinde *in vitro* ve *in vivo* büyüme özellikleri, yapışma (adhezyon), yayılma (anjiyojenik özellik), göç (migrasyon) gibi fenotipik özellikleri, tümör oluşturma (tümörojenisite) yetkinlikleri en yaygın olarak bilinen 4 gen (KRAS, p53, p16, SMAD4) üzerinden değerlendirilmiş ve genotipik durumları ile antikanser tedaviye verdikleri yanıtlar literatürde ortaya konulmuştur [206]. Hücrelerin tepkileri farklı PARP inhibitörleri ve tez kapsamında üretilen sentez maddelerine göre farklılık göstermektedir. Özellikle BRCA negatif kanser hücreleri ile oluşan kanserlerin tedavisinde (meme, prostat,

yumurtalık kanserleri ve pankreatik kanser) PARP1 inhibisyonu DNA çift zincir kırıklarında sentetik ölüme neden olarak ön plana çıkmaktadır. Olaparibin yalnız ve kombine kullanıldığı tedavi yaklaşımlarında BRCA mutasyonu olan hücrelerde PARP inhibitörlerinin apoptoz seviyelerini arttırdığı, herhangi bir ilaç direnci göstermemiş BRCA mutasyonuna sahip olmayan hücrelerde de tedavi yaklaşımlarında hücreleri tedavi sürecinde hassaslaştırdığı bulunmuş, rucaparibin etkinliğinin olaparibin etkinliğine oranla daha fazla olduğu aynı konsantrasyonlarda denendiğinde hücrelerin üzerinde toksisitelerinde belirgin artış sergilediği bildirilmiştir [207]. Capan-1 hücrelerinin yapışma özelliği incelendiğinde kollajene duyarlı olduğu ve daha fazla yayılma sağlayabildiği gösterilmiştir. Haricinde PANC-1 hücrelerinden daha az tutunma özelliği olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple morfolojik olarak incelendiğinde hassas hücrelerin boyama prosedürlerinde adhezyonunun düşük olduğu belirtilmiş, analiz sonuçlarında gözlemlenen adhezyon sorunlarından kaynaklı tutarsızlıklar olabileceği belirtilmiştir. Capan-1 hücrelerinde de PANC-1 hücrelerinde de siklooksijenaz 2 (COX2) ekspresyonu varlığı ve anjiyojenik özelliklerini etkilediği, bu doğrultuda NFKB üzerinden aktivasyonun sağlandığı gözlemlenmiş, ancak Capan-1 hücrelerinde ekspresyon seviyelerinin PANC-1 hücrelerine göre daha düşük olduğu, deneysel koşullara bağlı olarak kolaylıkla ekspresyon seviyelerinin değişebildiği, miktar tayinleri ile doğrulanan çalışmalarla gösterilmiştir [208-210]. Genomik açıdan mutasyonlar değerlendirildiğinde KRAS mutasyonları, pankreas kanserinde neredeyse tüm primer tümörlerde meydana gelir ve çok yaygındır, hastalığın ilerlemesinde erken dönemde gözlenebilir. Capan-1 ve PANC-1 hücreleri KRAS aktivasyonuna sahip kanser hücreleri olmakla birlikte, hTERT-HPNE hücrelerinin de KRAS mutasyonuna sahip olduğu, ancak normal hücre açısından değerlendirilerek analizlerde kullanılabildiği literatürde belirtilmiştir [208]. RAS ailesi üyeleri (H-, K- ve N-RAS), inaktif GDP'ye bağlı durumdan aktif bir GTP'ye bağlı duruma geçerek sinyalleri hücre yüzey reseptörlerinden ileten guanin nükleotit bağlayıcı proteinlerdir. Bu proteindeki mutasyonlardan bazıları (12, 13, 61) RAS'ın GTPaz aktivitesini inhibe eder ve bu süreç GTP'ye bağlı durumda yapısal olarak aktive olan onkojenik RAS proteinine yol açar ve bu mutasyonların çoklu sinyal yollarını indüklediği, siklin bağımlı kinaz yollarında mRNA stabilizasyonu ve regulasyonuna sebep olduğu belirtilmiştir [210]. Genel olarak kanser hücreleri ele alındığında TP53 yaygın olarak gözlemlenmektedir. Ancak Capan-1 ve

PANC-1 hücrelerinde TP53 inaktive edici mutasyonlar bulunmaktadır. TP53 ve CDKN2A/p16, hücre döngüsünün G1/S kontrol noktasında ve DNA hasarından sonra genom bütünlüğünün korunmasında önemli roller oynar. Yüksek CDKN2A/p16 ve TP53 kaybı sıklığı, pankreas kanserinin ilerlemesinde G1/S hücre döngüsü kontrol noktasının kaybının önemini vurgulamaktadır ve invazif kanserlere neden olmaktadır. Tümör oluşturma potansiyeli olarak incelendiğinde PANC-1 hücrelerinin genetik mutasyonlar nedeniyle Capan-1 hücrelerinden daha dirençli olduğu ancak Capan-1 hücrelerinin daha agresif tümör oluşumuna sebep olduğu bildirilmiştir [206, 211-212].

Bu sonuçlar, farklı sitotoksosite seviyelerinden elde edilmiş benzer şekilde tamamlayıcı çalışmalar ile teyit edilmiştir, ancak tüm inhibitörler, aynı büyüklük derecesinde PARP katalitik aktivitesini hedeflemezler. Sitotoksitedeki farklılıklar, PARP inhibitörlerinin farklı hedef dışı etkileri ile açıklanamaz, çünkü olaparib, rucaparib gibi inhibitörlerin 17 insan PARP aile üyesinden sadece bir kaçına aynı seçicilik profilini gösterdiği, PARP1-4'e spesifik bağlanmaların yoğunluklu olarak gerçekleştiği gösterilmiştir. Ancak, bu bağlanmalar aynı mekanizmalar üzerinden olmamakla beraber, farklı PARPların aktivitelerinin birbirine paralel olmayacak şekilde değiştiğini de göstermiştir. Bu da PARP'ın farklı mekanizmalar üzerinden etkinliği olduğunu kanıtlar niteliktedir [213-215]. PARP tuzağı, PARP inhibitörlerinin, PARP proteinlerinin konformasyonel esnekliğini ve dinamiklerini bütünüyle bozma kabiliyetini açıklayan bir süreçtir, böylece, DNA lezyonlarının etkisinde kalmamış PARP birikmesine neden olan tek iplikli kopma onarım ara maddesine olan afinitesini artırır. Olaparib ve rucaparibin katalitik olarak aktivite gösterdiği, bilinen diğer bazı PARP inhibitörlerine göre (niraparib, veliparib) nispeten daha fazla bir PARP tuzaklama aktivitesi ile inhibisyon gerçekleştirdiği belirtilmiştir [216]. PARP1 üzerinden farklı ölüm mekanizmalarının varlığı kanıtlanmış ancak hangi mekanizma üzerinden hücre ölüm meydana getirdiğine dair spesifik çalışmalar yapılmaktadır. Apoptoz, nekroz, otofaji ve hatta yalnızca PARP1 üzerinden gerçekleşen partanatoz da bu ölüm mekanizmalarından biridir ve PAR sentezi üzerinden açıklanmaya çalışılmaktadır [217].

Apoptoza, dışsal (ölüm reseptörü) yol ve içsel (mitokondriyal) yol olmak üzere iki farklı yol aracılık eder ve her iki yolda da hücre ölüm molekülleri olan kaspazlar görev almaktadır. Mitokondriyal dış membran geçirgenliği ile kaspaz aktivasyonu ve apoptoz

gerçekleşir. İçsel yolda kaspaz-9 gibi başlatıcı kaspazlar, apoptotik süreci daha da ilerleten, efektör kaspazlar olan kaspaz-3 ve -7'yi parçalayan, düzenleyen ve aktive eden protein platformları oluşturur. Kaspaz-9 işleminin üst akışında mitokondriyal dış membran geçirgenliği adı verilen ve sıkı düzenlenmiş bir işlem, bir hücrenin apoptoz geçirip geçirmediğini belirler. Apoptozun dışsal yolağında ise, Fas veya TNF-alfa gibi ölüm reseptörü ligandları görev almaktadır. Bu ölüm uyarıcıları FAS ile ilişkili ölüm alanı proteini ve TNF reseptörü ile ilişkili ölüm alanı proteini ile kaspaz-8'i aktive eder. Aktive edilmiş kaspaz-8 daha sonra kaspaz-3 ve -7'nin yanı sıra farklı proteinleri de parçalamakta ve böylece her iki yolu birleştirerek içsel yolu aktive eder [218].

Olaparibin kaspaz aktivasyonunda PARP-1'in PANC-1 hücreleri üzerinde down regüle olarak kaspaz-3 aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca çeşitli PARP inhibitörlerinin (olaparib ve rucaparib de dahil), BRCA1 eksikliği olan hücrelerde doza bağlı bir G2/M durdurmasına neden olduğu bilinmekle birlikte bu tutuklamanın 53BP1/BRCA1 çift eksik varyantında kısmen engellendiği gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, 53BP1 kaybının da olaparib ile tetiklenen apoptozu azalttığı gözlemlenmiştir. Akım sitometri sonuçlarına uygun olarak, apoptotik efektör enzimler kaspaz-3 ve -7'nin olaparib ile indüklenen aktivasyonu, 53BP1 eksikliği olan hücrelerde 53BP1 yetkin hücrelere kıyasla çok daha zayıf olduğu, mRNA gen ekspresyon seviyelerinin körele olmamasıyla gözlemlenmiştir. Bu veriler ayrıca 53BP1'in BRCA1 eksikliği olan hücrelerin PARP inhibitör duyarlılığına katkıda bulundukları sonucunu da desteklemektedir [219-220].

6. SONUÇ

Bu çalışmada, PARP inhibitörlerine benzer gruplar içerecek şekilde sentezlenen maddelerimizin, *in vitro* hücre kültürü ortamında pankreas kanserinde sitotoksik ve apoptotik etkinliği araştırılmış, sonuçları PARP inhibitörü standart maddeler ile karşılaştırılmış ve antikanser etkinlikleri belirlenmiştir. Daha önce farklı sentez molekülleri ile çalışmalar yapılmasına karşılık, bu tez kapsamında PARP inhibitörlerine benzer bazı gruplar içerecek şekilde sentezlenen maddelerin farklı genotipe sahip pankreas kanser ve normal pankreas hücreleri üzerinde, bugün klinikte kullanılmakta olan olaparib ve rucaparib PARP inhibitörleri ile karşılaştırılmalı olarak çalışılması, bu çalışmanın özgünlüğünü göstermekte ve sonuçlarımızın pankreas kanserinin gelecekteki tedavisine ışık tutacağını göstermektedir. Meme kanserinde etkinliği kanıtlanıp ilaç olarak kullanılan, ancak pankreas kanseri tedavisinde etkinliği yeni yeni gündeme gelen rucaparib ve olaparib standart maddeleri de, bu tez kapsamında sentez maddeleri ile farklı pankreas kanseri hücrelerinde apoptotik aktivite yönünde belirli inkübasyonlarda karşılaştırılmıştır. Etkinliği en yüksek olan rucaparib etken maddesi ile buna paralel etki gösteren PARP inhibitörü adayı olabilecek sentez maddelerimizden LHS-4 ve CS-1'in, pankreas kanser hücrelerinde önemli antikanser aktivite gösterdiği, normal hücrelerde kanserli hücelere kıyasla daha az toksik etkili olduğu belirlenmiştir. Henüz tam olarak aydınlatılabilmiş bir mekanizma olmamakla birlikte PARP yarıklanması ile birlikte sentez maddelerinin muhtemel PARP inhibitörü etkilerinin olabileceğini apoptoz, PARP yarıklanması ve gen ekspresyon analizleriyle desteklenmeye çalışılmış ve özellikle LHS-4 ve CS-1'in önemli antikanser etkileri olduğunu belirlenmiştir. Sonuç olarak, daha ileri çalışmalarla PARP inhibisyonunun daha spesifik belirlenmesi, olası PARP inhibitör yapı-etkinliklerinin aydınlatılması ve mevcut antikanser etkinliklerinin ilave moleküler çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği kanaatindeyiz.

KAYNAKÇA

- [1] Saha, R.N., Vasanthakumar, S., Bende, G., Snehalatha, M. (2010). Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy. *Mol. Membr. Biol.* 27(7), 215-231.
- [2] Sultana, S., Khan, M.R., Kumar, M., Kumar, S., Ali, M. (2013). Nanoparticles-mediated drug delivery approaches for cancer targeting: a review. *J. Drug Target.*, 21 (2), 107-125.
- [3] Ochekepe, N., Olorunfemi, P. Ngwuluka, N. (2009). Nanotechnology and Drug Delivery Part 1: Background and Applications. *Trop. J. Pharm. Res.*, 8, 265-274.
- [4] Webster, T.J. (2007). IJN's second year is now a part of nanomedicine history. *Int. J. Nanomedicine.*, 2 (1), 1-2.
- [5] Abiodun-Solanke, I., Ajayi, D. Arigbede, A. (2014). Nanotechnology and its application in dentistry. *Ann. Med. Health Sci. Res.*, 4 (3), 171-177.
- [6] Zdrojewicz, Z., Waracki, M., Bugaj, B., Pypno, D. Cabała, K. (2015). Medical applications of nanotechnology. *Postepy Hig P. Med Dosw.*, 69, 1196.
- [7] Kumari, P., Ghosh, B. Biswas, S. (2016). Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *J. Drug Target.*, 24 (3), 179-191.
- [8] Vincent A., Herman J., Schulick R., Hruban R.H., Goggins M. (2011). Pancreatic cancer. *Lancet.*, 378 (9791), 607-620.
- [9] Amerikan Kanser Derneği Ulusal Kanser Bilgilendirme Merkezi (Erişim tarihi: 10.02.2019)
<http://www.cancer.org/cancer/pancreaticcancer/detailedguide/pancreatic-cancer-what-is-pancreatic-cancer>
- [10] T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2016, ISBN: 978-975-590-661-4, 2017.
- [11] John Hopkins Üniversitesi Pankreas Kanseri Blog (Erişim tarihi: 10.02.2019)
<http://pathology.jhu.edu/pancreas/BasicTypes2.php?area=ba>
- [12] John Hopkins Üniversitesi Pankreas Kanseri Blog (Erişim tarihi: 10.02.2019)
<http://pathology.jhu.edu/pancreas/BasicTypes1.php?area=ba>
- [13] Şahin F., Taşpınar M., Sunguroğlu, A. (2007). Pankreatik Kanserin Moleküler Patogenezi, *Türkiye Klinikleri J Med Sci.*, 27,560-566.

- [14] Gnoni A., Licchetta A., Scarpa A., Azzariti A., Brunetti A.E., Simone G., Nardulli P., Santini D., Aieta M., Delcuratolo S., Silvertes N. (2013). Carcinogenesis of pancreatic adenocarcinoma: precursor lesions. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(10), 19731-62.
- [15] American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. *Atlanta: Amerikan Kanser Derneği*; 2016 (Erişim tarihi: 10.02.2019)
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>
- [16] Perek, S. (2002). Pankreas Kanseri, İ.Ü. Cerrahpaşa Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, *Hepato-Bilier Sistem ve Pankreas Hastalıkları Sempozyum Dizisi.*, 28, 215-230.
- [17] Lee, M.X. ve Saif, M.W. (2009). Screening for early pancreatic ductal adenocarcinoma: An urgent call! *J.O.P.*, Mar 9;10(2), 104-8.
- [18] Göral, V. (2014). Pankreas Kanseri: Patogenez ve Tanı, *Güncel Gastroenteroloji.*, 18/4, 407-414.
- [19] Giordano, K.F. ve Jatoi, A. (2005). The cancer anorexia/weight loss syndrome: therapeutic challenges. *Curr. Oncol. Rep.*, 7, 271-276.
- [20] Šimůnek, T., Štěrbá, M., Popelová, O., Adamcová, M., Hrdina, R., Geršl, V. (2009). Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports*, 61(1), 154-171.
- [21] Torchilin, V.P. (2000). Drug targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 11, 81-91.
- [22] Gao, Y., Li, Z., Xie, X., Wang, C., You, J., Mo, F., Jia, L. (2015). Dendrimeric anticancer prodrugs for targeted delivery of ursolic acid to folate receptor-expressing cancer cells: synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 70, 55-63.
- [23] Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. (2012). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Del. Rev.*, 64, 4-17.
- [24] Lipinski, C.A. (2000). Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.*, 44(1), 235-249.
- [25] Langer, R. (1998). Drug delivery and targeting. *Nature*, 392(6679), 5-10.

- [26] Kim, J.H., Kim, Y.S., Kim, S., Park, J.H., Kim, K., Choi, K., Chung, H., Jeong, S.Y., Park, R.W., Kwon, I.C. (2006). Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles as carriers for paclitaxel. *J. Control. Release*, 111(1), 228-234.
- [27] Torchilin, V.P. (2002). PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Adv. Drug Del. Rev.*, 54(2), 235-252.
- [28] Szakács, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C., Gottesman, M.M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5(3), 219-234.
- [29] Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54(5), 631-651.
- [30] Krishna, R. ve Mayer, L.D. (2000). Multi drug resistance (MDR) in cancer: mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 11(4), 265-283.
- [31] Serpe, L. (2006). Conventional chemotherapeutic drug nanoparticles for cancer treatment. *Nanotechnologies for the Life Sciences*, 6, 1-39.
- [32] Park, J.H., Lee, S., Kim, J.H., Park, K., Kim, K., Kwon, I.C. (2008). Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Prog. Polym. Sci.*, 33(1), 113-137.
- [33] Kumari, C.S.S.R (2006). Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery, *Weinheim, Germany, Wiley-VCH.*, 2-40.
- [34] Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Kinzler, K.W. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science.*, 321:1801-6.
- [35] Hahn, S.A., Greenhalf, B., Ellis, I., Sina-Frey, M., Rieder, H., Korte, B., Detlef, K.B. (2003). BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 95, 214-21.
- [36] Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D. (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase, *Nature.*, 434. 913-917.
- [37] Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature*. 411. 366-374.

- [38] Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D'Errico, M., Simonelli, V., Dogliotti, E. (2003). The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility, *Biochimie.*, 85. 1053-1071.
- [39] Stracker, T.H., Petrini, J.H. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1290-103.
- [40] Polo, S.E. ve Jackson, S.P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications, *Genes Dev.*, 25. 409-433.
- [41] Davis, A.J. ve Chen, D.J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining, *Transl. Cancer Res.*, 2. 130-143
- [42] O'Connor, M.J. (2015) Targeting the DNA damage response in cancer, *Mol. Cell* 60., 547-560.
- [43] Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy, *Nature.*, 434. 917-921.
- [44] US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Lynparza approval letter, December 19, 2014. (Erişim tarihi: 10.02.2019) <http://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm427598.htm>.
- [45] Smith, S. (2001). The world according to PARP. *Trends in Biochem. Sci.* 26(3), 174-179.
- [46] Herceg, Z. ve Wang, Z.Q. (2011). Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat. Res.*, 477, 97-110.
- [47] Ziegler, M. ve Oei, S.L. (2001). A cellular survival switch: poly(ADPribose)ylation stimulates DNA repair and silences transcription. *Bioassays.*, 23, 543-8.
- [48] Pieper, A.A, Verma, A., Zhang, J., Snyder, S.H. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol. Sci.*, 20, 171-81.
- [49] Shall, S., de Murcia, G. (2000). Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat. Res.*, 460, 1-15.
- [50] D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., Poirier, G.G. (1999). Poly(ADPribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.*, 342, 249-68.
- [51] Smith, S., Giriat, I., Schmitt, A., de Lange, T. (1999). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science.*, 282, 1484-7.

- [52] Kickhoefer, V.A., Siva, A.C., Kedersha, N.L., Inman, E.M., Ruland, C., Streuli, M., Rome, L.H. (1999). The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Cell Biol.*, 146, 917-28.
- [53] Clark, C.C., Weitzel, J.N., O'Connor, T.R. (2012). Enhancement of synthetic lethality via combinations of ABT-888, a PARP inhibitor, and carboplatin in vitro and in vivo using BRCA1 and BRCA2 isogenic models. *Mol Cancer Ther.*, 11, 1948-5820.
- [54] Lee, J.M., Ledermann, J.A., Kohn, E.C. (2014). PARP Inhibitors for BRCA1/2 mutation-associated and BRCA-like malignancies. *Ann Oncol.*, 25, 32-4021.
- [55] Greer, J.B. ve Whitcomb, D.C. (2007). Role of BRCA1 and BRCA2 mutations in pancreatic cancer. *Gut.*, 56, 601-5
- [56] Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M., Althaus, F.R. (2000). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol. Chem.*, 275, 40974-80.
- [57] Ame, J.C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Hoger, T., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G. (1999). PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADPribose) polymerase. *J. Biol. Chem.*, 274, 17860-8.
- [58] Ame, J.C., Schreiber, V., Fraulob, V., Dolle, P., de Murcia, G., Niedergang, C.P. (2001). A bidirectional promoter connects the poly(ADPribose) polymerase 2 (PARP-2) gene to the gene for RNase P RNA structure and expression of the mouse PARP-2 gene. *J. Biol. Chem.*, 276, 11092-9.
- [59] Johansson, M. (1999). A human poly(ADP-ribose) polymerase gene family (ADPRTL): cDNA cloning of two novel poly(ADPribose) polymerase homologues. *Genomics.*, 57, 442-5.
- [60] Jacobson, M.K. ve Jacobson, E.L. (1999). Discovering new ADP-ribose polymer cycles: protecting the genome and more. *Trends Biochem. Sci.*, 24, 415-7.
- [61] Kaminker, P.G., Kim, S.H., Taylor, R.D., Zebarjadian, Y., Funk, W.D., Morin, G.B., Yaswen, P., Campisi, J. (2001). TANK2, a new TRF1- associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J. Biol. Chem.*, 276, 35891-9.

- [62] Langelier, M.F., Servent, K.M., Rogers, E.E., Pascal, J.M. (2008). A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation, *J. Biol. Chem.*, 283, 4105-4114.
- [63] Langelier, M.F., Planck, J.L., Roy, S., Pascal, J.M. (2012). Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP1, *Science.*, 336, 728-732.
- [64] Hassler, M. ve Ladurner, A.G. (2012). Towards a structural understanding of PARP1 activation and related signaling ADP-ribosyl-transferases, *Curr. Opin. Struct.Biol.*, 22, 721-729.
- [65] Mendoza-Alvarez, H. ve Alvarez-Gonzalez, R. (1993). Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular, *J. Biol.Chem.*, 268, 22575-22580.
- [66] Weaver, A.N. ve Yang, E.S. (2013). Beyond DNA repair: additional functions of PARP-1 in cancer, *Front. Oncol.*, 3, 290.
- [67] Riccio, A.A., Cingolani, G., Pascal, J.M. (2016). PARP-2 domain requirements for DNA damage-dependent activation and localization to sites of DNA damage. *Nucleic Acids Res.*, 44 (4), 1691-1702.
- [68] Schreiber, V., Ame, J.C., Dolle, P. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1, *J. Biol. Chem.*, 277, 23028-23036.
- [69] Mateu-Jiménez, M., Cucarull-Martínez, B., Yelamos, J., Barreiro, E. (2016). Reduced tumor burden through increased oxidative stress in lung adenocarcinoma cells of PARP-1 and PARP-2 knockout mice, *Biochimie.*, 121, 278-286.
- [70] Seibold, P., Schmezer, P., Behrens, S. (2015). A polymorphism in the base excision repair gene PARP2 is associated with differential prognosis by chemotherapy among postmenopausal breast cancer patients, *BMC Cancer.*, 16 (15), 978.
- [71] Boehler, C., Gauthier, L.R., Mortusewicz, O. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 2783-2788,

- [72] Schroeijers, A.B. (2000). The Mr 193,000 vault protein is upregulated in multidrug-resistant cancer cell lines. *Cancer Res.*, 60, 1104-10.
- [73] Kaminker, P.G., Kim, S.H., Taylor, R.D., Zebajarian, Y., Funk, W.D., Morin, G.B., Yaswen, P., Campisi, J. (2001). TANK2, a new TRF1- associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J. Biol. Chem.*, 276, 35891-9.
- [74] Berger, N.A. (1985). Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat. Res.*, 101, 4-15.
- [75] Brochu, G., Duchaine, C., Thibeault, L., Lagueux, J., Shah, G.M., Poirier, G.G. (1994). Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1219, 342-50.
- [76] Ying, W. ve Swanson, R.A. (2000). The poly(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor galloytannin blocks oxidative astrocyte death. *Neuroreport.*, 11, 1385-8.
- [77] Ying, W., Sevigny, M.B., Chen, Y., Swanson, R.A. (2001). Poly(ADP-ribose) glycohydrolase mediates oxidative and excitotoxic neuronal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98, 12227-32.
- [78] Rodriguez, M.I., Peralta-Leal, A., O'Valle, F., Rodriguez-Vargas, J.M., Gonzalez-Flores, A., Majuelos-Melguizo, J., Lopez, L., Serrano, S., de Herreros, A.G., Rodriguez-Manzanique, J.C., Fernandez, R., DelMoral, R.G., de Almodovar, J.M., Oliver, F.J. (2013). PARP-1 regulates metastatic melanoma through modulation of vimentin-induced malignant transformation. *PLoS Genet.*, 9-1003531.
- [79] Yelamos, J., Farres, J., Llacuna, L., Ampurdanes, C., Martin-Caballero, J. (2011). PARP-1 and PARP-2: new players in tumour development. *Am. J. Cancer Res.*, 1, 328-346
- [80] Rojo, F., Garcia-Parra, J., Zazo, S., Tusquets, I., Ferrer-Lozano, J., Menendez, S., Eroles, P., Chamizo, C., Servitja, S., Ramirez-Merino, N., Lobo, F., Bellosillo, B., Corominas, J.M., Yelamos, J., Serrano, S., Lluch, A., Rovira, A., Albanell, J. (2012). Nuclear PARP-1 protein over expression is associated with poor overall survival in early breast cancer. *Ann. Oncol.*, 23, 1156-116423.

- [81] Ashworth, A. (2008). A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP)ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. *J. Clin. Oncol.*, 26, 3785-379024.
- [82] Klauschen, F., von Winterfeld, M., Stenzinger, A., Sinn, B.V., Budczies, J., Kamphues, C., Bahra, M., Wittschieber, D., Weichert, W., Striefler, J., Riess, H., Dietel, M., Denkert, C. (2012). High nuclear poly-(ADPribose)-polymerase expression is prognostic of improved survival in pancreatic cancer. *Histopathology.*, 61, 409-41625.
- [83] Martinez-Bosch, N., Iglesias, M., Munne-Collado, J., Martinez-Caceres, C., Moreno, M., Guerra, C., Yelamos, J., Navarro, P. (2014). Parp-1 genetic ablation in Ela-myc mice unveils novel roles for Parp-1 in pancreatic cancer. *J. Pathol.*, 234, 214-22726.
- [84] Lowery, M.A., Vanoli, F., Yu, K.H., Jasin, M., O'Reilly, E.M., Moynahan, M.E. (2012). Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase-1(PARP-1) to increase radiosensitivity of human pancreatic cancer (PAC) cell lines proficient in homology-directed repair (HDR). *J. Clin. Oncol.*, 30 (Suppl 4), abstract 20427.
- [85] De Soto, J.A. ve Mullins, R. (2011). The use of PARP inhibitors as single agents and as chemosensitizers in sporadic pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.*, 29, 1354228.
- [86] Karnak, D., Engelke, C.G., Parsels, L.A., Kausar, T., Wei, D., Robertson, J.R., Marsh, K.B., Davis, M.A., Zhao, L., Maybaum, J., Lawrence, T.S., Morgan, M.A. (2014). Combined inhibition of Wee1 and PARP1/2 for radiosensitization in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.*, 20, 5085-509629.
- [87] Lowery, M.A., Lee, A., Tobias, E., Sung, P., Bhanot, U., Shakya, R., Ludwig, T., O'Reilly, E.M., Jasin, M., Moynahan, M.E. (2014). Evaluation of PARP inhibition as a platinum sparing strategy in Brca2-deficient pancreatic tumors. *J. Clin. Oncol.*, 32, 1523730.
- [88] Fogelman, D.R., Wolff, R.A., Kopetz, S., Javle, M., Bradley, C., Mok, I., Cabanillas, F., Abbruzzese, J.L. (2011). Evidence for the efficacy of Iniparib, a PARP-1 inhibitor, in BRCA2-associated pancreatic cancer. *Anticancer Res.*, 31, 1417-142031.

- [89] Leung, K. ve Saif, M.W. (2013). BRCA-associated pancreatic cancer: the evolving management. *J.O.P.*, 14, 149-15132.
- [90] Kaufman, B., Shapira-Frommer, R., Schmutzler, R.K., Audeh, M.W., Friedlander, M., Balmana, J., Mitchell, G., Fried, G., Stemmer, S.M., Hubert, A., Rosengarten, O., Steiner, M., Loman, N., Bowen, K., Fielding, A., Domchek, S.M. (2015). Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J. Clin. Oncol.*, 33, 244-250.
- [91] O'Reilly, E.M., Lowery, M.A., Segal, M.F., Smith, S.C., Moore, M.J., Kindler, H.L., Golan, T., Segal, A., Salo-Mullen, E.E., Hollywood, E., Epstein, A.S., Capanu, M., Moynahan, M.E., Fusco, A., Stadler, Z.K., GianDo, R.K., Chen, A.P., Yu, K.H., Tang, L.H., Kelsen, D.P. (2014). Phase IB trial of cisplatin (C), gemcitabine (G), and veliparib (V) in patients with known or potential BRCA or PALB2-mutated pancreas adenocarcinoma (PC). *J. Clin. Oncol.*, 32, Abstr 402334.
- [92] Villarroel, M.C., Rajeshkumar, N.V., Garrido-Laguna, I., De JesusAcosta, A., Jones, S., Maitra, A., Hruban, R.H., Eshleman, J.R., Klein, A., Laheru, D., Donehower, R., Hidalgo, M. (2011). Personalizing cancer treatment in the age of global genomic analyses: PALB2 gene mutations and the response to DNA damaging agents in pancreatic cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 10, 3-835.
- [93] Bhalla, A. ve Saif, M.W. (2014). PARP-inhibitors in BRCA-associated pancreatic cancer. *J.O.P.*, 15, 340-34336.
- [94] Holter, S., Borgida, A., Dodd, A., Grant, R., Semotiuk, K., Hedley, D., Dhani, N., Narod, S., Akbari, M., Moore, M., Gallinger, S. (2015). Germline BRCA mutations in a large clinic-based cohort of patients with pancreatic adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 33, 3124-312937.
- [95] Zhen, D.B, Rabe, K.G., Gallinger, S., Syngal, S., Schwartz, A.G., Goggins, M.G., Hruban, R.H., Cote, M.L., McWilliams, R.R., Roberts, N.J., Cannon-Albright, L.A., Li, D., Moyes, K., Wenstrup, R.J., Hartman, A.R., Seminara, D., Klein, A.P., Petersen, G.M. (2015). BRCA1, BRCA2, PALB2, and CDKN2A mutations in familial pancreatic cancer: a PACGENE study. *Genet. Med.*, 17, 569-57738.

- [96] Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.M., Chang, D.K., Kassahn, K.S., Bailey, P., Quinn, M.C. ve diğerleri (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature.*, 518, 495-50139.
- [97] Mendes-Pereira, A.M., Martin, S.A., Brough, R., McCarthy, A., Taylor, J.R., Kim, J.S., Waldman, T., Lord, C.J., Ashworth, A. (2009). Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol. Med.*, 1, 315-32240.
- [98] Weston, V.J., Oldreive, C.E., Skowronska, A., Oscier, D.G., Pratt, G., Dyer, M.J., Smith, G., Powell, J.E., Rudzki, Z., Kearns, P., Moss, P.A., Taylor, A.M., Stankovic, T. (2010). The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo. *Blood.*, 116, 4578-4587
- [99] Roth, J., Peer, C.J., Mannargudi, B., Swaisland, H., Lee, J.M., Kohn, E.C., Figg, W.D. (2014). A Sensitive and Robust Ultra HPLC Assay with Tandem Mass Spectrometric Detection for the Quantitation of the PARP Inhibitor Olaparib (AZD2281) in Human Plasma for Pharmacokinetic Application. *Chromatography.*, 1(2), 82-95.
- [100] Dantzer, F., de La Rubia, G., Menissier-de Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G., Schreiber, V. (2000). Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry.*, 39, 7559-7569.
- [101] Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., ve diğerleri (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.*, 434, 917-921.
- [102] Murai, J., Huang, S.Y., Das, B.B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J.H., Ji, J., Takeda, S., Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res.*, 75, 5588-5599.
- [103] Fong, P.C., Boss, D.S., Yap, T.A., Tutt, A., Wu, P., Mergui-Roelvink, M., Mortimer, P., Swaisland, H., Lau, A., O'Connor, M.J. ve diğerleri (2009). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N. Engl. J. Med.*, 361, 123-134.
- [104] Bundred, N., Gardovskis, J., Jaskiewicz, J., Eglitis, J., Paramonov, V., McCormack, P., Swaisland, H., Cavallin, M., Parry, T., Carmichael, J. ve

- diğerleri (2013). Evaluation of the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the PARP inhibitor olaparib: A Phase I multicentre trial in patients scheduled for elective breast cancer surgery. *Investig. New Drugs.*, 31, 949-958.
- [105] Gelmon, K.A., Tischkowitz, M., Mackay, H., Swenerton, K., Robidoux, A., Tonkin, K., Hirte, H., Huntsman, D., Clemons, M., Gilks, B., ve diğerleri (2011). Olaparib in patients with recurrent high-grade serous or poorly differentiated ovarian carcinoma or triple-negative breast cancer: A phase 2, multicentre, open-label, non-randomised study. *Lancet Oncol.* 12, 852-861.
- [106] Tutt, A., Robson, M., Garber, J.E., Domchek, S.M., Audeh, M.W., Weitzel, J.N., Friedlander, M., Arun, B., Loman, N., Schmutzler, R.K., ve diğerleri (2010). Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: A proof-of-concept trial. *Lancet.*, 376, 235-244.
- [107] Chen, Y., Zhang, L., Hao, Q. (2013). Olaparib: A promising PARP inhibitor in ovarian cancer therapy. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 288, 367-374.
- [108] Kaye, S.B., Lubinski, J., Matulonis, U., Ang, J.E., Gourley, C., Karlan, B.Y., Amnon, A., Bell-McGuinn, K.M., Chen, L.M., Friedlander, M., ve diğerleri (2012). Phase II, open-label, randomized, multicenter study comparing the efficacy and safety of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, and pegylated liposomal doxorubicin in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.*, 30, 372-379.
- [109] Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., Scott, C., Meier, W., Shapira-Frommer, R., Safra, T., ve diğerleri (2012). Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.*, 366, 1382-1392.
- [110] Liu, J.F., Tolane, S.M., Birrer, M., Fleming, G.F., Buss, M.K., Dahlberg, S.E., Lee, H., Whalen, C., Tyburski, K., Winer, E., ve diğerleri (2013). A Phase 1 trial of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib (AZD2281) in combination with the anti-angiogenic cediranib (AZD2171) in recurrent epithelial ovarian or triple-negative breast cancer. *Eur. J. Cancer.*, 49, 2972-2978.

- [111] Ellisen L.W. (2011). PARP Inhibitors in Cancer Therapy: Promise, Progress, and Puzzles. *Cancer Cell.*, 19, 165-167.
- [112] Yamamoto, N., Nokihara, H., Yamada, Y., Goto, Y., Tanioka, M., Shibata, T., Yamada, K., Asahina, H., Kawata, T., Shi, X., ve diğerleri (2012). A Phase I, dose-finding and pharmacokinetic study of olaparib (AZD2281) in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Sci.*, 103, 504-509.
- [113] Khan, O.A., Gore, M., Lorigan, P., Stone, J., Greystoke, A., Burke, W., Carmichael, J., Watson, A.J., McGown, G., Thorncroft, M., ve diğerleri (2011). A phase I study of the safety and tolerability of olaparib (AZD2281, KU0059436) and dacarbazine in patients with advanced solid tumours. *Br. J. Cancer.*, 104, 750-755.
- [114] Samol, J., Ranson, M., Scott, E., Macpherson, E., Carmichael, J., Thomas, A., Cassidy, J. (2012). Safety and tolerability of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, olaparib (AZD2281) in combination with topotecan for the treatment of patients with advanced solid tumors: A phase I study. *Investig. New Drugs.*, 30, 1493-1500.
- [115] Dean, E., Middleton, M.R., Pwint, T., Swaisland, H., Carmichael, J., Goodege-Kunwar, P., Ranson, M. (2012). Phase I study to assess the safety and tolerability of olaparib in combination with bevacizumab in patients with advanced solid tumours. *Br. J. Cancer.*, 106, 468-474.
- [116] Avrupa İlaç Kurumu: 21/12/2016 tarihli Lynparza ürün içeriği. Lynparza-EMA/H/C/003726 -II/00008/G (Erişim tarihi: 10.02.2019)
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003726/WC500180151.pdf
- [117] Plummer R, Jones C, Middleton M, Wilson R, Evans J, Olsen A, Curtin N, Boddy A, McHugh P, Newell D, Harris A, Johnson P, Steinfeldt H, Dewji R, Wang D, Robson L, Calvert, H. (2008). Phase I study of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, 1, 14(23), 7917-23.

- [118] Murai, J., Huang, S.Y., Renaud, A., Zhang, Y., Ji, J., Takeda, S., Morris, J., Teicher, B., Doroshow, J.H., Pommier, T. (2014). Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Mol. Cancer Ther.*, 13(2), 433-43.
- [119] Dal Molin, G.Z., Omatsu, K., Sood, A.K., Coleman, R.L. (2018). Rucaparib in ovarian cancer: an update on safety, efficacy and place in therapy. *Ther. Adv. Med. Oncol.*, 10, 1758835918778483.
- [120] Carney, B., Kossatz, S., Lok, B.H., Schneeberger, V., Gangangari, K.K., Pillarsetty, N.V.K., Reiner, T. (2018). Target engagement imaging of PARP inhibitors in small-cell lung cancer. *Nat. Comm.*, 9, 176.
- [121] İlaç Geliştirme ve Araştırma Merkezi, Multi-disiplin Derlemesi, NDA/BLA Multi-disciplinary Review and Evaluation NDA 209115 Rubraca (rucaparib), Application No: 209115Orig1s000 (Erişim tarihi 10.02.2019)
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2016/209115Orig1s000MultiDisciplineR.pdf
- [122] Mohd, I.A, Chad, J., Andrew, C. (2018) PARP Inhibitors: A Breakthrough in Cancer Chemotherapy. *Mod. Appro. Drug Des.*, 2(1). MADD.000526.
- [123] Ekblad, T., Camaioni, E., Schuler, H., Macchiarulo, A. (2013). PARP inhibitors: polypharmacology versus selective inhibition. *FEBS Journal.*, 280, 3563-3575.
- [124] Ekblad, T., Lindgren, A.E., Andersson, C.D., Caraballo, R., Thorsell, A.G., Karlberg, T., Elofsson, M. (2015). Towards small molecule inhibitors of mono-ADP-ribosyltransferases. *Eur. J. Med. Chem.*, 95, 546-551.
- [125] Alkahtani, H.M., Abbas, A.Y., Wang, S. (2012). Synthesis and biological evaluation of benzo [d] imidazole derivatives as potential anti-cancer agents. *Bioor. Med. Chem. letters*, 22(3), 1317-1321.
- [126] Liu, Y., Chen, T., Liu, J., Wong, Y.S. (2013). Identification of fluorescent ruthenium complexes containing imidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers by living cell real-time imaging. *Med. Chem. Comm.*, 4(5), 865-869.
- [127] Para, K.S., Stankovic, C.J., Visnick, M. (2006). *U.S. Patent No. 7,074,814*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- [128] Köhler, S.C., ve Wiese, M. (2015). HM30181 derivatives as novel potent and selective inhibitors of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *J. Med. Chem.*, 58(9), 3910-3921.
- [129] Park, J.H., El-Gamal, M.I., Lee, Y.S., Oh, C.H. (2011). New imidazo [2, 1-b] thiazole derivatives: Synthesis, in vitro anticancer evaluation, and in silico studies. *Eur. J. Med. Chem.*, 46(12), 5769-5777.
- [130] Park, J.H. ve Oh, C.H. (2010). Synthesis of new 6-(4-fluorophenyl)-5-(2-substituted pyrimidin-4-yl) imidazo [2, 1-b] thiazole derivatives and their antiproliferative activity against melanoma cell line. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 31(10), 2854-2860.
- [131] Rzeski, W., Matysiak, J., Kandefer-Szerszeń, M. (2007). Anticancer, neuroprotective activities and computational studies of 2-amino-1, 3, 4-thiadiazole based compound. *Bioor. Med. Chem.*, 15(9), 3201-3207.
- [132] Yang, X.H., Wen, Q., Zhao, T.T., Sun, J., Li, X., Xing, M., Zhu, H.L. (2012). Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of cinnamic acyl 1, 3, 4-thiadiazole amide derivatives as novel antitubulin agents. *Bioor. Med. Chem.*, 20(3), 1181-1187.
- [133] Wang, B., Chu, D., Feng, Y., Shen, Y., Aoyagi-Scharber, M., Post, L.E. (2016). Discovery and Characterization of (8S,9R)-5-Fluoro-8-(4-fluorophenyl)-9-(1-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)-2,7,8,9-tetrahydro-3H-pyrido[4,3,2-de]phthalazin-3-one (BMN 673, Talazoparib), a Novel, Highly Potent, and Orally Efficacious Poly(ADP-ribose) Polymerase-1/2 Inhibitor, as an Anticancer Agent. *J. Med. Chem.*, 59(1), 335-57.
- [134] Ahmed, F.F., El-Hafeez, A.A.A., Abbas, S.H., Abdelhamid, D., Abdel-Aziz, M. (2018). New 1, 2, 4-triazole-Chalcone hybrids induce Caspase-3 dependent apoptosis in A549 human lung adenocarcinoma cells. *Eur. J. Med. Chem.*, 151, 705-722.
- [135] Johannes, J.W., Almeida, L., Daly, K., Ferguson, A.D., Grosskurth, S.E., Guan, H., Larsen, N.A. (2015). Discovery of AZ0108, an orally bioavailable phthalazinone PARP inhibitor that blocks centrosome clustering. *Bioor. Med. Chem. letters.*, 25(24), 5743-5747.

- [136] Sampson, J.J., Donkor, I.O., Huang, T.L., Adunyah S.E. (2011). Novel piperazine induces apoptosis in U937 cells. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, 2(1), 78-88
- [137] Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC) Web sayfası (Erişim tarihi: 10.02.2019) https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-79.aspx?geo_country=tr
- [138] Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC) Web sayfası (Erişim tarihi: 10.02.2019) https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1469.aspx?geo_country=tr#generalinformation
- [139] Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC) Web sayfası (Erişim tarihi: 10.02.2019) https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-4023.aspx?geo_country=tr
- [140] Lee, K.M., Nguyen, C., Ulrich, A.B., Pour, P.M., Ouellette, M.M. (2003). Immortalization with telomerase of the Nestin-positive cells of the human pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 301(4), 1038-44.
- [141] Okur, N., Özdemir, D., Görgülü-Kahyaoğlu, Ş., Şenyiğit, Z.A., Aşıkoğlu, M., Genç, L., Karasulu, Y. (2015). Assessment of Aprotinin Loaded Microemulsion Formulations for Parenteral Drug Delivery: Preparation, Characterization, *In Vitro* Release And Cytotoxicity Studies. *Curr.t Drug Deliv.*, 12(6), 668-79.
- [142] Shapiro, H.M. *Practical Flow Cytometry*. 4.: John Willey & Sons, Inc., 2003. Pp. 556-565. ISBN: 978-0-471-41125-3 Hoboken N.J. (Eds.)
- [143] Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C. (2000). Flow vytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol Methods.*, 243, 167-90.
- [144] van England, M., Nieland, L.J.W., Ramaekers, F.C.F., Shutte, B. Reutelingsperger, C.P.M. (1998). Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.*, 31, 1-9.
- [145] Vermes, I. Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods.*, 184(1), 39-51.
- [146] Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell.*, 9, 459-70.

- [147] Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. Poirier, G.G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 53 (17), 3976-85.
- [148] Galluzzi, L., Zamzami, N., de La Motte Rouge, T., Lemaire, C., Brenner, C., Kroemer, G. (2007). Methods for the assesment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. *Apoptosis.*, 12, 803-13.
- [149] Cossarizza, A. ve Salvoli, S. (2001). Analysis of mitochondria during cell death. *Methods Cell Biol.*, 63, 467-86.
- [150] BD Pharmingen MitoScreen (JC-1) Kit içeriği (Erişim tarihi: 10.02.2019)
http://www.bdbiosciences.com/ds/ab/others/551302_Book_Website.pdf
- [151] Vindelov, L.L., Christensen, I.J., Nissen, N.I. (1983). A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry.*, 3, 323-327.
- [152] Vindelov, L.L., Christensen, I.J., Jensen, G., Nissen, N.I. (1983). Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample-storage, staining, and internal standardization. *Cytometry.*, 3, 332-339.
- [153] Humason, G.L. (1979). Staining hematologic elements and related tissues. In: Bartlett A.C, ed. *Animal Tissue Techniques*. San Francisco: W.H. Freeman & Company; 229-230.
- [154] Martens, A.C., van den Engh, G.J., Hagenbeek, A. (1981). The fluorescence intensity of propidium iodide bound to DNA depends on the concentration of sodium chloride. *Cytometry.*, 2, 24-25.
- [155] Hiddemann, W., Schumann, J., Andreef, M., (1984). Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry.*, 5, 445-446.
- [156] Los, M., Mozoluk, M., Ferrari, D., Stepczynska, A., Stroh, C., Renz, A., Schulze-Osthoff, K. (2002). Activation and Caspase-mediated Inhibition of PARP: A Molecular Switch between Fibroblast Necrosis and Apoptosis in Death Receptor Signaling. *Mol. Biol. Cell.*, 13(3), 978-988.
- [157] Thermo Fisher Scientific DAPI boyası ürün içeriği (Erişim tarihi: 10.02.2019)
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp01306.pdf>

- [158] Thermo Fisher Scientific MitoTracker Red CMXRos boyası ürün içeriği (Erişim tarihi: 10.02.2019)
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07510.pdf>
- [159] QIAGEN PCR Array Analiz Veri Hesaplama Sayfası: (Erişim tarihi: 10.02.2019)
<https://dataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>
- [160] Porcelli, L., Quatralo, A.E., Mantuano, P., Leo, M.G., Silvestris, N., Rolland, J.F., Carioglia, E., Lioce, M., Paradiso, A., Azzariti, A. (2013). Optimize radiochemotherapy in pancreatic cancer: PARP inhibitors a new therapeutic opportunity, *Mol. Oncol.*, 7, 308-322.
- [161] Drew, Y., Mulligan, E.A, Vong, W.T., Thomas, H.D., Kahn, S., Kyle, S., Mukhopadhyay, A., Los, G., Hostomsky, Z., Plummer, E.R., Edmondson, R.J., Curtin N.J. (2011). Therapeutic Potential of Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor AG014699 in Human Cancers With Mutated or Methylated BRCA1 or BRCA2, *JNCI: J. Natl. Cancer Inst.*, 103, 4, 334-346.
- [162] Vormoor, B., Schlosser, Y.T., Blair, H., Sharma, A., Wilkinson, S., Newell, D.R., Curtin, N. (2017). Sensitizing Ewing sarcoma to chemo- and radiotherapy by inhibition of the DNA-repair enzymes DNA protein kinase (DNA-PK) and poly-ADP-ribose polymerase (PARP) 1/2. *Oncotarget.*, 8, 69, 113418-113430.
- [163] Yang, S.H., Kuo, T.C., Wu, H., Guo, J.C., Hsu, C., Hsu, C.H., Tien, Y.W., Yeh, K. H., Cheng, A.L., Kuo, S.H. (2016). Perspectives on the combination of radiotherapy and targeted therapy with DNA repair inhibitors in the treatment of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.*, 22(32), 7275-88.
- [164] Calvert, H., Azzariti, A. (2011). The clinical development of inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Ann. Oncol.*, 22, 53-59.
- [165] Powell, S.N. ve Kachnic, L.A. (2003). Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. *Oncogene.*, 22, 5784-91.
- [166] Sharbeen, G., McCarroll, J., Goldstein, D., Phillips, P.A. (2015). Exploiting Base Excision Repair to Improve Therapeutic Approaches for Pancreatic Cancer. *Frontiers in Nutrition.*, 2, 1-10.

- [167] Chen, S., Wang, G., Niu, X., Zhao, J., Tan, W., Wang, H. (2014). Combination of AZD2281 (olaparib) and GX15-070 (obatoclox) results in synergistic antitumor activities in preclinical models of pancreatic cancer. *Cancer Lett.*, 348, 20-8.
- [168] Feldmann, G., Rauenzahn, S., Maitra, A. (2009). In vitro models of pancreatic cancer for translational oncology research. *Expert Opin. Drug Discov.*, 4(4), 429-443.
- [169] Mathieu, J., Flexor, M., Lanotte, M., Besancon, F. (2008). A PARP-1/JNK1 cascade participates in the synergistic apoptotic effect of TNFalpha and all-trans retinoic acid in APL cells. *Oncogene.*, 27 (24), 3361-3370.
- [170] Xu, Y., Huang, S., Liu, Z.G., Han, J. (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation. *J. Biol. Chem.*, 281 (13), 8788-8795.
- [171] Hocsak, E., Szabo, V., Kalman, N., Antus, C., Cseh, A., Sumegi, K., Eros, K., Hegedus, Z., Gallyas, F., Sumegi, B., Racz, B. (2017). PARP inhibition protects mitochondria and reduces ROS production via PARP-1-ATF4-MKP-1-MAPK retrograde pathway. *Free Radic. Biol. Med.*, 108, 770-784.
- [172] Boulares, A. H., Yakovlev, A.G., Ivanova, V., Stoica, B.A., Wang, G., Iyer, S., Smulson, M. (1999). Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J. Biol. Chem.*, 274(33), 22932-22940.
- [173] Duriez, P., Shah, G.M. (1997). Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem. Cell Biol.*, 75(4), 337-349.
- [174] Casiano, C.A., Martin, S.J., Green, D.R., and Tan, E.M. (1996). Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)- mediated T cell apoptosis. *J. Exp. Med.*, 184, 765-770.
- [175] Greenberg, A.H. (1996). Granzyme B-induced apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 406, 219-228.
- [176] Augustin, A., Spenlehauer, C., Dumond, H., Ménissier-de Murcia, J., Piel, M., Schmit, A.C., de Murcia, G. (2003). PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J. Cell Sci.*, 116(8), 1551-1562.

- [177] Masutani, M., Nozaki, T., Wakabayashi, K., Sugimura, T. (1995). Role of poly (ADP-ribose) polymerase in cell-cycle checkpoint mechanisms following γ -irradiation. *Biochimie.*, 77(6), 462-465.
- [178] Jelinic, P., Levine, D.A. (2014). New insights into PARP inhibitors' effect on cell cycle and homology-directed DNA damage repair. *Molecular cancer therapeutics.*, 13, 1645-54.
- [179] D'amours, D., Desnoyers, S., D'silva, I., Poirier, G.G. (1999). Poly (ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochemical Journal.*, 342(2), 249-268.
- [180] Sailem, H.Z., Cooper, S., Bakal, C. (2016). Visualizing quantitative microscopy data: history and challenges. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 51(2), 96-101.
- [181] Altmeyer, M., Toledo, L., Gudjonsson, T., Grofte, M., Rask, M.B., Lukas, C., Akimov, V., Blagoev, B., Bartek, J., Lukas, J. (2013). The chromatin scaffold protein SAFB1 renders chromatin permissive for DNA damage signaling. *Mol. Cell.*, 52(2), 206-220.
- [182] Beneke, S., Meyer, K., Holtz, A., Huttner, K., Burkle, A. (2012). Chromatin composition is changed by poly(ADP-ribosyl)ation during chromatin immunoprecipitation. *PLoS One*, 7(3), e32914.,
- [183] Penning, T.D., Zhu, G.D., Gandhi, V.B., Gong, J., Liu, X., Shi, Y., Bontcheva-Diaz, V. (2008). Discovery of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 2-[(R)-2-methylpyrrolidin-2-yl]-1 H-benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) for the treatment of cancer. *J. Med. Chem.*, 52(2), 514-523.
- [184] Hassa, P.O., Covic, M., Hasan, S., Imhof, R. ve Hottiger, M.O. (2001). The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF- κ B coactivator function. *J. Biol. Chem.*, 276(49), 45588-97.
- [185] Troiani, S., Lupi, R., Perego, R., Re Depaolini, S., Thieffine, S., Bosotti, R., ve Rusconi, L. (2011). Identification of candidate substrates for poly (ADP-ribose) polymerase-2 (PARP2) in the absence of DNA damage using high-density protein microarrays. *The FEBS J.*, 278(19), 3676-3687.

- [186] Schreiber, V., Amé, J.C., Dollé, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., ve de Murcia, G. (2002). PARP-2 is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J. Biol. Chem.*, 277(25), 23028-36.
- [187] Loseva, O., Jemth, A.S., Bryant, H.E., Schüler, H., Lehtiö, L., Karlberg, T. ve Helleday, T. (2012). PARP-3 is a mono-ADP-ribosylase that activates PARP-1 in the absence of DNA. *J. Biol. Chem.*, 287(41), 34494-34494.
- [188] Boehler, C., Gauthier, L.R., Mortusewicz, O., Biard, D.S., Saliou, J.M., Bresson, A. ve Dantzer, F. (2011). Poly (ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108(7), 2783-2788.
- [189] Kickhoefer, V.A., Siva, A.C., Kedersha, N.L., Inman, E.M., Ruland, C., Streuli, M. ve Rome, L.H. (1999). The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly (ADP-ribose) polymerase. *J. Cell Bio.*, 146(5), 917-928.
- [190] Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev Biochem.*, 68(1), 383-424.
- [191] Devarajan, E., Sahin, A.A., Chen, J.S., Krishnamurthy, R.R., Aggarwal, N., Brun, A.M., Tora, A.D. (2002). Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*, 21(57), 8843.
- [192] Walsh, J.G., Cullen, S.P., Sheridan, C., Lüthi, A.U., Gerner, C., Martin, S.J. (2008). Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105(35), 12815-12819.
- [193] Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Ashkenazi, A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J. Biol. Chem.*, 276(49), 46639-46
- [194] Hoffmann, J.C., Pappa, A., Krammer, P.H., Lavrik, I.N. (2009). A new C-terminal cleavage product of procaspase-8, p30, defines an alternative pathway of procaspase-8 activation. *Mol. Cell. Biol.*, 29(16), 4431-4440.
- [195] Martin, M.C., Allan, L.A., Mancini, E.J., Clarke, P.R. (2008). The docking interaction of caspase-9 with ERK2 provides a mechanism for the selective

- inhibitory phosphorylation of caspase-9 at threonine 125. *J. Biol. Chem.*, 283(7), 3854-3865.
- [196] Zer, C., Sachs, G., Shin, J.M. (2007). Identification of genomic targets downstream of p38 mitogen-activated protein kinase pathway mediating tumor necrosis factor- α signaling. *Physiol. Genomics.*, 31(2), 343-351.
- [197] Banno, T., Gazel, A., Blumenberg, M. (2004). Effects of TNF α in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J. Biol. Chem.*, 279(31), 32633-42.
- [198] Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3), 355-365.
- [199] Tejedor, J.R., Papasaïkas, P., Valcárcel, J. (2015). Genome-wide identification of Fas/CD95 alternative splicing regulators reveals links with iron homeostasis. *Mol. Cell*, 57(1), 23-38.
- [200] Nicholls, C.D., McLure, K.G., Shields, M.A., Lee, P.W. (2002). Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers implications on the dominant negative effect. *J. Biol. Chem.*, 277(15), 12937-12945.
- [201] Cancer Genome Atlas Research Network. (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474(7353), 609.
- [202] Collins, P.E., Grassia, G., Colleran, A., Kiely, P.A., Ialenti, A., Maffia, P., Carmody, R.J. (2015). Mapping the interaction of B cell leukemia 3 (BCL-3) and nuclear factor κ B (NF- κ B) p50 identifies a BCL-3-mimetic anti-inflammatory peptide. *J. Biol. Chem.*, 290(25), 15687-15696.
- [203] Hinata, K., Gervin, A.M., Zhang, Y.J., Khavari, P.A. (2003). Divergent gene regulation and growth effects by NF- κ B in epithelial and mesenchymal cells of human skin. *Oncogene*, 22(13), 1955.
- [204] Hara, M.R., Agrawal, N., Kim, S.F., Cascio, M.B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Ferris, C.D. (2005). S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.*, 7(7), 665.
- [205] Arikawa, E., Quellhorst, G., Han, Y., Pan, H., Yang, J. (2011). RT2 Profiler PCR Arrays: Pathway-focused gene expression profiling with qRT-PCR. *SA Biosciences: Technical Article*, 1-11.

- [206] Deer, E.L., González-Hernández, J., Coursen, J.D., Shea, J.E., Ngatia, J., Scaife, C. L., Mulvihill, S.J. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas.*, 39(4), 425-435.
- [207] Bourton, E.C., Ahorner, P.A., Plowman, P.N., Zahir, S.A., Al-Ali, H., Parris, C.N. (2017). The PARP-1 inhibitor Olaparib suppresses BRCA1 protein levels, increases apoptosis and causes radiation hypersensitivity in BRCA1^{+/-} lymphoblastoid cells. *J. Cancer.*, 8(19), 4048-4056.
- [208] Greco, E., Bass, D., Fogar, P. (2005). Pancreatic cancer cells invasiveness is mainly affected by interleukin-1beta not by transforming growth factor-beta1. *Int. J. Biol Markers.*, 20, 235-241.
- [209] Matsuo, Y., Sawai, H., Funahashi, H., (2004). Enhanced angiogenesis due to inflammatory cytokines from pancreatic cancer cell lines and relation to metastatic potential. *Pancreas.*, 28, 344-352.
- [210] Delesque, N., Buscail, L., Esteve, J.P., (1997). sst2 somatostatin receptor expression reverses tumorigenicity of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, 57, 956-962.
- [211] El-Rayes, B.F, Ali, S., Sarkar, F.H. (2004). Cyclooxygenase-2-dependent and independent effects of celecoxib in pancreatic cancer cell lines. *Mol. Cancer Ther.*, 3, 1421-1426.
- [212] Mohiuddin, M., Chendil, D., Dey, S. (2002). Influence of p53 status on radiation and 5-flourouracil synergy in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.*, 22, 825-830.
- [213] Murai, J., Huang, S.N., Das, B.B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J.H. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res.*, 72(21), 5588-99.
- [214] Zaremba, T., Curtin, N.J. (2007). PARP inhibitor development for systemic cancer targeting. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 7(5), 515-23.
- [215] Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M.J., Kaufmann, S.H., Poirier G.G. (2010). PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer. Nature Publishing Group*, 10(4), 293-301.
- [216] Shen, Y., Aoyagi-Scharber, M., Wang, B. (2015). Trapping Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 353(3), 446-57.

- [217] Weaver, A.N., ve Yang, E.S. (2013). Beyond DNA repair: additional functions of PARP-1 in cancer. *Front. Oncol.*, 3, 290.
- [218] Fuchs, Y. ve Steller, H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol. Nature Publishing Group*, 16(6), 329-44.
- [219] Yuan, B., Ye, N., Song, S.S., Wang, Y.T., Song, Z., Chen, H.D., (2017). Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibition and anticancer activity of simmiparib, a new inhibitor undergoing clinical trials. *Cancer Lett.*, 386, 47-56.
- [220] Yang, Z.M., Liao, X.M., Chen, Y., Shen, Y.Y., Yang, X.Y., Su, Y., He, J.X. (2017). Combining 53BP1 with BRCA1 as a biomarker to predict the sensitivity of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Acta Pharm. Sin.*, 38(7), 1038.