

**METİLTİYAZOL TÜREVLERİNİN
ANTİKANSER VE ANTİİNFLAMATUVAR
AKTİVİTELERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Dilek ERDAŞ

Eskişehir 2019

**METİLTİYAZOL TÜREVLERİNİN ANTİKANSER VE ANTIİNFLAMATUVAR
AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dilek ERDAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Halide Edip TEMEL

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kasım 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Dilek ERDAŞ'ın "Metiltiyazol Türevlerinin Antikanser ve Antiinflamatuvar Aktivitelerinin Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 21/11/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Halide EDİP TEMEL	
Üye	: Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ	
Üye	: Doç. Dr. Emel ERGENE	

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Enstitü Müdürü



ÖZET

METİLTİYAZOL TÜREVLERİNİN ANTİKANSER VE ANTIİNFLAMATUVAR AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dilek ERDAŞ

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kasım 2019

Danışman: Doç. Dr. Halide EDİP TEMEL

İnflamatuvar yanıtlar; malign dönüşüm, invazyon ve metastaz olmak üzere kanser gelişiminin farklı aşamalarında belirleyici rol oynamaktadır. Günümüzde tercih edilen antiinflamatuvar ve antikanser etkili ilaçların yüksek toksisite, düşük etkinlik ve ilaç direnci nedeniyle kullanımını oldukça kısıtlıdır. Bu nedenle daha az toksik ve etkisi yüksek yeni mekanizmalara sahip antiinflamatuvar ve antikanser ilaç tasarlama çalışmaları önem kazanmıştır. Tiyazol türevi bileşikler, kanser tedavisinde kullanılan biyolojik olarak aktif önemli bileşiklerin yapısında bulunmasından dolayı yeni ilaç tasarımında oldukça önemlidir.

Bu tez kapsamında, yeni sentezlenen 4-Metiltiyazol türevi bileşiklerin, siklooksijenaz (COX) ve lipoksijenaz (LOX) enzimleri üzerinde inhibitör etki potansiyelleri araştırılmıştır. Ayrıca sentezlenen bu bileşiklerin A549, C6 ve NIH/3T3 hücre dizileri üzerinde sitotoksite değerleri MTT metodu ile belirlenerek bileşiklerin antikanser aktiviteleri A549 ve C6 hücre dizilerinde değerlendirilmiştir. Anneksin V-FITC yöntemi ile ölçülen erken/geç apoptotik ve nekrotik hücre oranı, akım sitometrisi tarafından ölçülen mitokondriyal membran bütünlüğü ve kaspaz-3 aktivasyon düzeyleri değerlendirildiğinde BHD3 kodlu bileşiğin hem C6 hem de A549 hücre dizisi üzerinde pozitif kontrol sisplatine kıyasla etkinliğinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda BHD3'ün COX-1, COX-2 ve LOX enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular, BHD3 kodlu bileşiğin antiinflamatuvar ve antikanser etki potansiyeli taşıdığını göstermekte olup tiyazol türevi bileşikleri temel alan ilaç geliştirme çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: 4-Metiltiyazol türevleri, Antiinflamatuvar, Antikanser,

Lipoksijenaz, Siklooksijenaz.

ABSTRACT

THE EVALUATION OF ANTICANCER AND ANTIINFLAMMATORY EFFECTS OF METHYLTHIAZOLE DERIVATIVES

Dilek ERDAŞ

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, November 2019

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Halide EDİP TEMEL

Inflammatory responses play a decisive role in different stages of cancer development including malignant transformation, invasion and metastasis. Today, the preferred anti-inflammatory and anticancer drugs are very limited due to their high toxicity, low efficacy and drug resistance. Therefore, anti-inflammatory and anticancer drug design studies with less toxic and highly effective mechanisms have gained importance. Thiazole-derived compounds are very important in the design of new drugs because they are present in the structure of important biologically active compounds used in the treatment of cancer.

In this thesis, the inhibitory effect potential of newly synthesized 4-Methylthiazole derivative compounds on cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX) enzymes were investigated. Furthermore, cytotoxicity values of these synthesized compounds on A549, C6 and NIH/3T3 cell lines were determined by MTT method and anticancer activities of the compounds were evaluated in A549 and C6 cell lines. When the early/late apoptotic and necrotic cell ratio measured by annexin V-FITC method, mitochondrial membrane integrity and caspase-3 activation levels measured by flow cytometry were evaluated, activation of BHD3-coded compound on both C6 and A549 cell line was observed to be higher than positive control cisplatin. BHD3 has also been shown to inhibit COX-1, COX-2 and LOX enzyme activity. The findings obtained from our study show that BHD3 coded compounds have the potential of antiinflammatory and anticancer effects and will contribute to drug development studies based on thiazole derivative compounds.

Keywords: 4-Methylthiazole derivatives, Antiinflammation, Anticancer, Lipoxygenase, Cyclooxygenase.

TEŞEKKÜR

Tez alıőmalarıma yn veren ve olanak sağlayan danışman hocam Do. Dr. Halide EDİP TEMEL'e, hücre kültürü deneysel alıőmalarımızı gerekleőtirmemizi mmkn kılan hocam Do. Dr. Glően AKALIN İFTİ'ye, test bileşiklerinin sentezini sağlayan hocam Do. Dr. Leyla YURTTAŞ'a, tez projesi yoluyla maddi destek sağlayan Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araőtırma Programı'na, ve sevgili aileme teőekkürlerimi sunarım.

21/11/2019

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” ile 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.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	3
1.1.1. İnflamasyon ve mekanizması.....	3
1.1.2. Siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzimleri.....	6
1.1.3. Kronik inflamasyon ve kanser ilişkisi.....	10
1.1.4. Apoptoz.....	13
1.1.5. Kanser tedavisi.....	19
2. YÖNTEM.....	22
2.1. 4-Metiltiyazol Türevlerinin Genel Sentez Yöntemi.....	22
2.2. Enzim İnhibitör Aktivite Çalışmaları.....	25
2.2.1. Siklooksijenaz (COX) enzimi inhibitör aktivitetesti.....	25
2.2.2. Lipoksijenaz (LOX) enzimi inhibitor aktivitetesti.....	25
2.3. Biyolojik Etki Çalışmaları	26
2.3.1. Antikanser etki çalışmaları	26
2.3.3. Apoptotik etki çalışmaları.....	27
3. BULGULAR.....	30
3.1. Enzim İnhibitör Aktiviteleri.....	30
3.1.1. Siklooksijenaz-1 (COX-1) enzimi inhibitör aktivitesi.....	30

3.1.1. Siklooksijenaz-1 (COX-1) enzimi inhibitör aktivitesi.....	30
3.1.2. Siklooksijenaz-2 (COX-2) enzim inhibisyon aktivitesi	30
3.1.3. Lipoksijenaz (LOX) enzim inhibisyon aktivitesi.....	31
3.2. Sitotoksosite (MTT) Testleri.....	31
3.3. Erken/Geç Apoptotik ve Nekrotik Etki Testleri.....	32
3.3.1. Pozitif kontrol sisplatin, BHD1 ve BHD3 bileşiklerinin A549 hücre dizisi üzerine erken/geç apoptotik ve nekrotik etkileri.....	33
3.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli Aktivitesi.....	34
3.4.1. Pozitif kontrol sisplatin, BHD1, BHD2, BHD3 ve BHD6 bileşiklerinin A549 ve C6 hücre dizisi üzerinde mitokondriyal membran potansiyeli aktivitesi	34
3.5. Kaspaz-3 Aktivitesi.....	36
3.5.1. Pozitif kontrol sisplatin, BHD1, BHD2, BHD3 ve BHD6 bileşiklerinin A549 ve C6 hücre dizisi üzerinde kaspaz-3 aktivitesi.....	36
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
KAYNAKÇA.....	44
ÖZGEÇMİŞ	

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Sentezlenen bileşikler	23
Tablo 2.2. Sentezlenen bileşiklerin analizleri	24
Tablo 3.1. Sentezlenen bileşiklerin COX-1 aktivitesi üzerindeki inhibisyon değerleri.	30
Tablo 3.2. Sentezlenen bileşiklerin COX-2 aktivitesi üzerindeki inhibisyon değerleri.	30
Tablo 3.3. Sentezlenen bileşiklerin LOX aktivitesi üzerindeki inhibisyon değerleri	31
Tablo 3.4. MTT analizi sonucu 24 saat sonundaki IC ₅₀ değerleri.....	35
Tablo 3.5. Anneksin V-FITC ve PI boyaması sonucu A549 hücrelerinde % canlılık..	32
Tablo 3.6. Anneksin V-FITC ve PI boyaması sonucu C6 hücrelerinde % canlılık.	32
Tablo 3.7. JC-1 boyaması sonucu A549 hücrelerinde % canlılık.	34
Tablo 3.8. JC-1 boyaması sonucu C6 hücrelerinde % canlılık.	35
Tablo 3.9. Kaspaz-3 aktivitesi için A549 hücrelerinin 24 saat sonunda işaretlenmesi..	36
Tablo 3.10. Kaspaz-3 aktivitesi için C6 hücrelerinin 24 saat sonunda işaretlenmesi.	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Araşidonik asit metabolizması	4
Şekil 1.2. COX-1 varyantları	7
Şekil 1.3. COX-1 ve COX-2'nin aktif ve bağlanma bölgelerinin karşılaştırılması	8
Şekil 1.5. Apoptotik dış ve iç mitokondriyal yolda etkili mekanizmalar	14
Şekil 1.6. Apoptotik sinyal mekanizmaları	16
Şekil 1.7. Proapoptotik ve antiapoptotik proteinler	18
Şekil 3.1. Erken/geç apoptotik ve nekrotik etki için A549 hücrelerinin 24 saat sonunda Anneksin V-FITC ve PI (propidyum iyodid) boyaması.	32
Şekil 3.2. Mitokondriyal membran potansiyeli aktivitesi için A549 hücrelerinin 24 saat sonunda JC-1 boyaması	38
Şekil 3.3. Mitokondriyal membran potansiyeli aktivitesi için C6 hücrelerinin 24 saat sonunda JC-1 boyaması.	40
Şekil 3.4. Kaspaz-3 aktivitesi için A549 hücrelerinin 24 saat sonunda işaretlenmesi...41	
Şekil 3.5. Kaspaz-3 aktivitesi için C6 hücrelerinin 24 saat sonunda işaretlenmesi.....42	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-HPETE	: 5-Hidroksieikosatetraenoik asit
A549	: Adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücreleri
AA	: Araşidonik asit
ASC	: Antijen uyarıcı hücreler
AP	: Aktivatör protein
APAF-1	: Apoptoz aktive edici faktör
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
Bax	: Bcl-2 bağlantılı protein
Bcl-2	: B-Hücre lenfoma 2
BHD	: 4-Metiltiyazol türevlerine verilen kod
C6	: Sağlıklı sıçan glioma hücre hattı
CAD	: Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz
COX	: Siklooksijenaz enzimi
COXİBs	: COX enzim inhibitörleri
DR5	: Ölüm reseptörü 5
DISC	: Ölüm uyarıcı sinyal kompleksi
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü
ELİSA	: Enzime bağlı immünosorbent analiz
ER	: Endoplazmik retikulum
FADD	: Fas-İlgili ölüm domain proteini
FBS	: Fetal sığır serum
FITC	: Floresanizosiyanat
GI	: Gastrointestinal
HEPG2	: İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı
PAF	: Trombosit aktive edici factor
PAMP	: Patojenle ilişkili moleküler kalıplar
PBS	: Fosfat buffer solüsyon

PG	: Prostaglandin
PKA	: Protein kinaz A
PKB	: Protein kinaz B
PKC	: Protein kinaz C
PLA ₂	: Fosfolipaz enzimi A ₂
PRR	: Patojen tanıma reseptörü
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
LOX	: Lipoksijenaz enzimi
LPA	: Lizofofatidik asit
Smac	: Mitokondriyel ikincil kaspaz aktivatörü
MTT	: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)
NIH/3T3	: Sağlıklı fare embriyonik fibroblast hücre hattı
NDGA	: Nordihidroguayaretik asit
NF- κ B	: Nükleer faktör κ B
NLRs	: Nod benzeri reseptörler
NSAID	: Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
MCF-7	: İnsan meme kanseri hücre hattı
MIF	: Makrofaj göçü inhibe edici faktör
ICAD	: İnaktif kaspaz aktive edici Dnaz
IFN	: İnterferonlar
IL	: İnterlökin
ISGF3	: IFN ile uyarılan gen faktörü 3
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör alfa
TLRs	: Toll benzeri reseptörler
TXA ₂	: Tromboksan A ₂

1. GİRİŞ

19. yüzyılda patolog Rudolf Virchow, katı malignitelerdeki iltihaplı sızıntıları tespit ederek bir hipotez geliştirmiştir. İnflamasyon ile kanser arasındaki fonksiyonel ilişkinin ilk önerisi olan bu hipotez; tümörle ilişkili inflamasyonun tümör yapılarında önemli bir özellik olarak tanımlanmasını sağlamıştır (Grivennikov vd., 2010).

Yaralanma ile ilişkili doku hasarının onarım sürecinde, doku hasarı tamir edilirken hücre çoğalmasının arttığı, immün sistemin sinyal molekülleri tarafından patojen ajanların uzaklaştırıldığı ve hasar onarımı tamamlandıktan sonra proliferasyon ve iltihapların azaldığı ancak buna rağmen, olası bir tekrar patojene karşı DNA hasarını önlemek amacıyla hücrelerin büyüme faktörleriyle zengin bu mikro ortamda çoğalmalarını devam ettirdiği yani tümörlerin iyileşmeyen yaralar gibi davrandığı yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir (Fernandes vd., 2015). İnflamasyon durumunda aktifleşen doğal bağışıklık ile tümör gelişimi arasında fonksiyonel bir ilişki olduğuna dair bulgular günümüzde de genel olarak kabul görmektedir. Bununla birlikte, bu ilişkiye aracı olan moleküler ve hücresel mekanizmaların bazıları tam olarak çözümlenememiştir. Bu nedenle tümörle ilişkili inflamasyonla tetiklenen bu immünosüpresif mekanizmalara son zamanlarda oldukça odaklanılmıştır (Korniluk vd., 2017).

İnflamasyonun kronikleşmesini ve sonrasında gerçekleşen neoplazmik süreci baskılayarak hücreleri programlı hücre ölümüne (apoptoz) düşük yan etki ile sürüklemek kanser tedavisi için günümüzde kullanılan ve ileride kullanılması planlanan kemoterapik ajanların ilk hedeflerinden biri olarak görülmektedir. Apoptoz, çeşitli uyaranlarla tetiklenebilen hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması, zar taşması ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi morfolojik değişikliklerle karakterize edilen programlı hücre ölümüdür. Apoptotik yolak nükleofilik sistein kalıtı içeren ve apoptozun başlaması ve devamı için önemli rol oynayan proteolitik enzimleri (kaspazlar) aktive etmektedir. Bu enzimler, hücresel organellerin hızlıca bozulmasını tetikleyerek apoptoz sürecinin kontrollü işlenmesini sağlamaktadır (Hale vd., 1996). Apoptotik yolda anahtar hücresel proteinlerin spesifik ayrılmasını katalize eden, ölüm proteazlarını aktive eden ve apoptotik yolda önemli görevi olan kaspaz 3 aktivasyonunun aydınlatılması güncel çalışmaların da ilgi odaklarından biri olmuştur (Ichim vd., 2016).

Apoptozun erken aşamalarda özellikle morfolojik değişikliklerden önce saptanması programlanmış hücre ölüm yollarını anlamak için kritik öneme sahiptir. Ayrıca yakın zamanlarda yapılan bir çok çalışmada geç apoptoz ve bu süreçte DNA ile ilişkili değişikliklerin belirlenmesi konusuna da odaklanılmıştır (Matt vd., 2016).

Antiinflamatuvar ve antikanser ilaç geliştirmek amacı ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, tiyazol türevi bileşiklerin güçlü antiinflamatuvar ve antikanser etki potansiyeline sahip olduğu görülmüştür (Verma vd., 2008). Tiyazoller, heterosiklik yapıda bileşikler olup sırasıyla 1. ve 3. konumunda kükürt ve azot içermektedirler. Tiamin (vitamin B1), nizatidin (antiülser), penisilin (antibiyotik), fanetizol, meloksikam (antiinflamatuvar ajanlar), ritonavir (anti-HIV), bleomisin (antineoplastik) gibi günümüzde tedavide kullanılmakta olan moleküllerin yapısında tiyazol halkasının varlığı bu tiyazol türevi bileşikleri farmakolojik olarak önemli bileşikler haline getirmiştir (Arora vd., 2016). Sentezlenen bazı tiyazol türevlerinin; interlökin-2 (IL-2), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör (TNF) dahil olmak üzere, hücre çoğalması, farklılaşması, iletişimi ve iltihaplı tepkilerin başlatılmasında önemli mediatörler üreten T hücre aktivasyonunu büyük ölçüde kontrol ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca inflamasyonda önemli görevi olan aktivatör protein 1 (AP-1) ve nükleer faktör beta (NF- κ) üzerinde seçici inhibitör etki gösterdiği in vivo çalışmalarla açığa çıkarılmıştır (Giri ve Thaker,2009).

Dokulardaki prostaglandin seviyesinin anormal değişimi ile aktive olan siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz (LOX) enzimlerinin, yara oluşumu ve inflamasyon sürecinde hasar görmüş hücreleri tümör oluşumu sürecine sürüklediği bilinmektedir (Dannhardt ve Laufer, 2000). Bu bağlamda bu tez çalışması kapsamında, yeni sentezlenen 4-Metiltiyazol türevi bileşiklerinin A549 (insan akciğer karsinoma hücre hattı), C6 (kanserli sıçan glioma hücre hattı) ve NIH/3T3 (sağlıklı fare embriyonik fibroblast hücre hattı) hücre dizileri üzerindeki antikanser etki potansiyellerinin araştırılması ve ayrıca sentezlenen bileşiklerin COX ve LOX enzimleri üzerindeki inhibitör etkilerinin ölçümüyle de antiinflamatuvar potansiyellerinin açığa çıkarılması amaçlanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen bulguların kanser tedavisinde ilaç geliştirme çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. İnflamasyon ve mekanizması

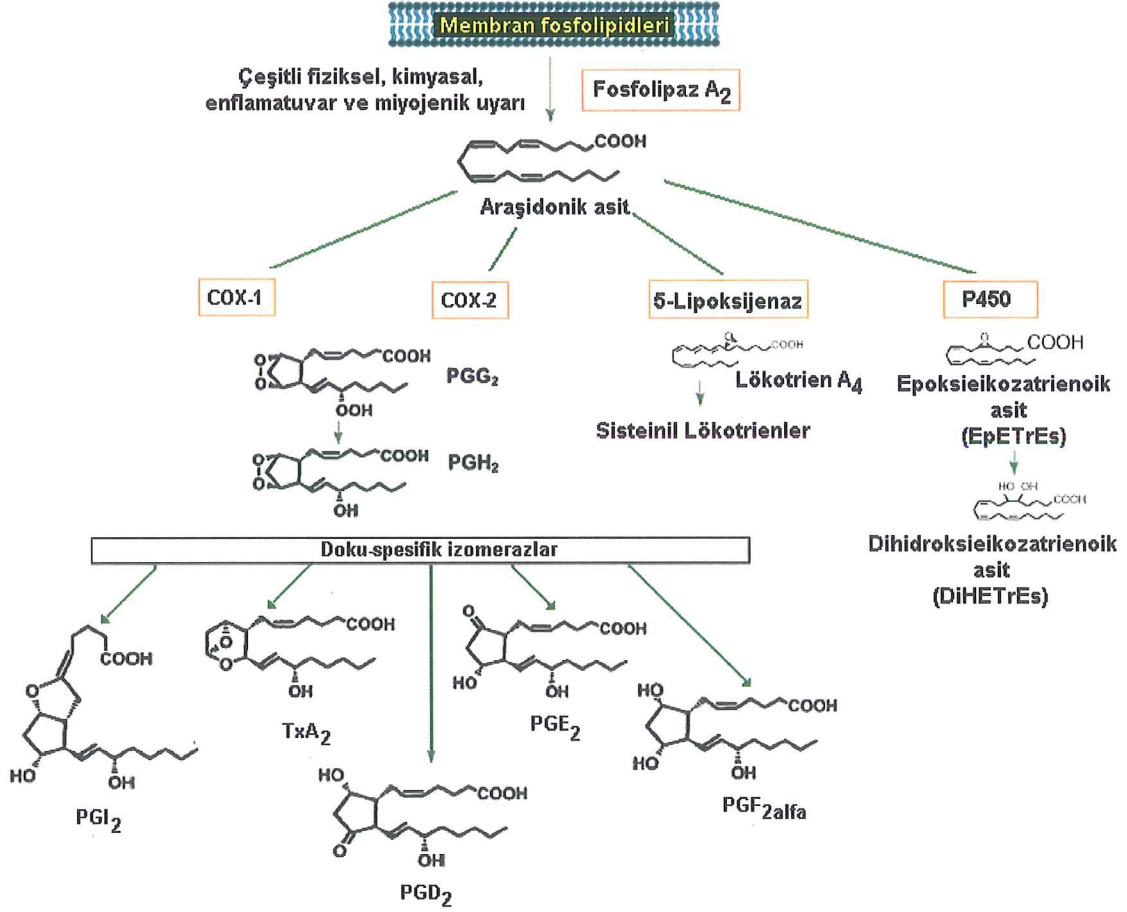
Lipidler dokularda triaçilgliserol, fosfolipidler, spingolipidler ve steroidler gibi formlarda bulunmaktadır. Fosfolipidler, metabolizmadaki metabolik tüm faaliyetlerin problemsiz sürdürülebilmesini sağlayan hücre organellerindeki hücre zarlarının temel yapıtaşdır. Fosfolipidler; yapısında araşidonik asit gibi çok zincirli doymamış yağ asitlerinin de bulunduğu yağ asitlerinden, hidrofilik özellik kazandıran fosfat içerikli bir baş ve iki açil yan zincirli kuyruk yapısında oluşturulur. Hücre zarı fosfolipidlerdeki yağ asitlerinin hidrofilik ve hidrofobik yan zincirlerinin yerleşimleri hücre zarının bütünlüğü ve akışkanlığı için önemlidir (Murphy ve Vance, 1999).

Histamin ve sitokin gibi inflamatuvar uyarılar durumunda aktifleşen fosfolipaz enzimi A₂ (PLA₂) hücre zarı fosfolipidlerini katalizleyerek araşidonik asit gibi serbest yağ asitlerini ve lizofosfolipidleri zar yapısından serbestleştirir. Serbest yağ asitleri, eikosanoidler olarak bilinen prostaglandin (PG), tromboksan (TXA) ve lökotrien (LT) metabolitlerinin prokürsörüdür. Bu metabolitlerin çok yüksek konsantrasyonda olması sitotoksik etki oluşturarak hücre içi sinyal yollarında kritik görevleri olan bir çok enzimin aktivasyonunda kritik değişiklikler yapabilmektedir. Lizofosfolipidler hücre zarının akışkanlığını ve geçirgenliğini değiştirebilen trombosit aktive edici faktör (PAF) ve lizofofatidik asit (LPA) gibi biyoaktif metabolitlere dönüşebilir (Dowhan ve Bogdanow, 2002).

Fizyolojik ve fizyopatolojik yapılarda iyon kanallarını değiştirerek hücre büyümesi, çoğalması ve yaşaması ile ilişkili sinyallerin iletiminden sorumlu protein kinaz A (PKA), protein kinaz B (PKB), protein kinaz C (PKC) gibi enzimler ve NaK-ATPaz gibi diğer bir çok enzimin aktifleşmesine yol açan araşidonik asitin, hücre içinde ikincil haberci (sinyal) görevi yapan bu eikosanoidlere (prostaglandinler, tromboksanlar, lökotrienler ve lipoksinler gibi) metabolize olduğu bilinmektedir (Sciulli vd., 2005).

Araşidonik asit hücre zarında depolanan, kas hasarına ve buna bağlı sinyallere verilen tepkilerden sorumlu olan, doğal olarak diyetle bol miktarda linoleik asitin alınmasıyla oluşan bir omega-6 esansiyel yağ asitidir. Hücre zarı yapısındaki fosfolipidlerde esterleşmiş durumda bulunan ve inflamasyon durumunda PLA₂ enzimi tarafından hücre zarı fosfolipidi yapısından ayrılıp metabolize edildiğinde inflamasyonu yöneten bir çok kimyasal mediatöre dönüştürülen araşidonik asitin, bu metabolize

edilme sürecini ise siklooksijenaz (COX) ve lipoksijenaz (LOX) enzimlerinin yönettiği bilinmektedir (Turini ve DuBois, 2002).



Şekil 1.1. Araşidonik asit metabolizması (FitzGerald, 2007)

Hücre zarı fosfolipidlerinin fosfolipaz enzimi aktivasyonu ile katalizlenmesi sonucu serbestleşen araşidonik asit gibi çok zincirli doymamış yağ asitleri COX ve LOX enzimlerinin katalizlediği iki farklı yolağa sürüklenir (Şekil 1.1). Her iki enzimin de farklı yollar üzerinden, inflamasyon sinyal kontrolünde kritik öneme sahip çeşitli mediatörlerin oluşmasına sebep olduğu bilinmektedir (Turini ve DuBois, 2002).

Siklooksijenaz enzimleri tarafından katalizlenen siklooksijenaz yolağında meydana gelen mediatörlerden biri olan prostaglandin (PG) mediatörlerinin inflamasyon sürecindeki rolünün oldukça kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir. Damar duvar yapısını oluşturan endotel hücrelerindeki prostasiklin sentaz enzimi ile üretilen prostaglandin 2 (PG₂) mediatörünün, damar genişlemesi olarak ifade edilen vazodilatasyona sebep olup kan pıhtılaşma sürecinin önemli bir basamağı olan

trombosit agregasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (Sciulli vd., 2005). Yoğunlukla mast hücreleri tarafından üretilen prostaglandin D₂ (PGD₂) ve prostaglandin E₂ (PGE₂) mediatörlerinin ise damar genişlemesine sebep olup damar geçirgenliğini arttırarak ödem oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir. PGE₂ metabolitinin ayrıca ağrı eşiğini düşürerek ağrı hissine ve başka mediatörlerle etkileşerek ateşin yükselmesine sebep olduğu da bilinmektedir. Trombositlerde tromboksan sentaz enzimi aracılığıyla sentezlenen, damarların daralması olarak tabir edilen vazokonstriksiyona sebep olan tromboksan A₂ (TXA₂) mediatörünün ise trombosit pıhtılaşmasına yol açtığı bilinmektedir (Osiri ve Moreland, 1999).

Endoplazmik Retikulum (ER) hücre organelinin zarına bağlı olarak bulunan prostaglandin endoperoksit sentaz enziminin araşidonik asitten PGH₂ sentezlenmesini katalizlemesiyle prostaglandinler ve tromboksanların oluşumunun başlatıldığı bilinmektedir. Araşidonik asitten PGH₂ sentezinin; siklooksijenaz-1 (COX-1) siklooksijenaz-2 (COX-2) olmak üzere iki tip izoenzimin katalitik etkisiyle dolayısıyla iki farklı basamakta gerçekleştiği bilinmektedir. COX-2 enziminin katalizlediği reaksiyonda oluşan PGG₂'in yapısındaki hidroperoksil grubu, peroksidaz enzimi ve indirgeyici ajan olarak kullanılan glutatyon etkisiyle, hidroksil grubuna indirgenerek PGH₂ oluşturulur. PGH₂'den ise sentaz enzimleri etkisiyle PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ (prostasiklin) ve TXA₂'nin sentezi gerçekleşir (Ryn vd., 2000).

PGE₂ mediatörünün inflamasyon ile doğrudan ilişkili bir mediatör olduğu bilinmektedir. COX-2 enziminin aktivasyonu sonucu prostaglandin yoğunluğunun artmasıyla üretimi artan PGE₂ mediatörünün çok yoğun konsantrasyonda biriktiği bölgede kızarıklık, şişlik ve ödeme sebep olarak sinir sistemi hücreleri üzerinde ağrı ve ateş gibi sinyallere yol açtığı bilinmektedir (Charlier ve Michaux, 2003).

Lipoksijenaz enziminin aktivasyonu ile oluşan mediatörlerden biri olan lökotrien B₄ (LTB₄) mediatörünün bir akyuvar hücre çeşidi olan nötrofillerde ve bazı makrofajlarda üretildiği ve nötrofiller üzerine güçlü bir kemotaktik etkisi olduğu bilinmektedir. Öncelikle mast hücrelerinde üretilen lökotrien C₄ (LTC₄), lökotrien D₄ (LTD₄) ve lökotrien E₄ (LTE₄) mediatörlerinin ise solunum yollarının daralmasına ve damar geçirgenliğinde artışa neden olduğu bilinmektedir. Bu mediatörlerin aktivasyonu ile açığa çıkan metabolitler yardımıyla dokuya giren lökositler tarafından üretilen lipoksin A₄ ve lipoksin B₄ mediatörleri ise nötrofillerin kemotaksisini ve endotele yapışmasını inhibe eden, bu bakımdan lökotrienlerin antagonisti olarak tanımlanan

önemli antiinflamatuvar mediatörlerden biridir (Leval vd., 2002).

İnflamasyon durumunda PLA₂ enziminin aktivasyonu ile hücre zarı fosfolipidlerdeki yıkımın artışı, hücrelerde hasarı arttırarak bu süreci kronik inflamasyona ve tümör oluşumuna sürükleyebilmektedir. Hücre zarını koruyan bu fosfolipidlerin yıkılmasıyla serbestleşen yağ asitlerinin ve lizofosfolipidlerin hücre zarındaki sinyal mediatörleri tarafından yüksek konsantrasyonda algılanması, hücre zarı üzerindeki bu reseptörlere sitotoksik etki oluşturarak oksidatif fosforilasyonun bozulmasına ve iyon kanallarının değiştirilmesi sonucu membran geçirgenliğinin artmasına sebep olmaktadır. Serbest yağ asitlerinin birikmesiyle araşidonik asit kaskadının kontrolsüz başlatılması sonucu yüksek konsantrasyonda biriken serbest radikaller ve reaktif oksijen türevleri gibi metabolitlerin hücre zarı proteinlerine oksidatif hasar verdiği ileri seviyede ise kronik inflamasyon ve tümör oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir (Turini ve DuBois, 2002).

Bu bağlamda inflamasyon sürecinde kritik öneme sahip COX ve LOX enzim aktivasyonunun tedavi edici nitelikteki ajanlarla azaltılması ile inflamasyonun tümör oluşumuna yönlendirilen yollarının inhibe edilebilmesi, dolayısıyla doku hasarlarını en erken seviyede iyileştirilebilmeyi sağlayabilecek antiinflamatuvar ajan geliştirme çalışmaları, günümüzde odaklanılan önemli konulardan biri olmaktadır.

1.1.2. Siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzimleri

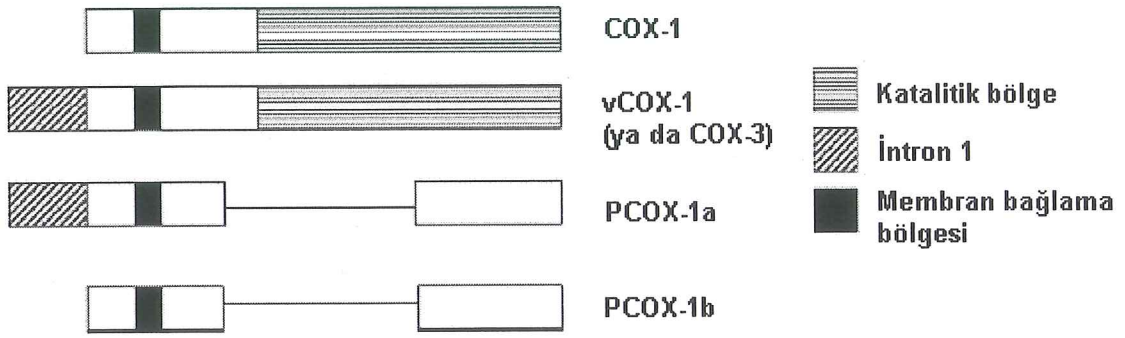
1.1.2.1. Siklooksijenaz (COX)

COX enzimi sentezinin hücrede büyüme faktörleri, tümör indükleyicileri, IL-1, LPS (lipopolisakaritler), TNF- α gibi mediatörlerle indüklenebilir olduğu yapılan çalışmalarda açığa çıkarılmıştır (Dannhardt ve Laufer, 2000). COX enziminin COX-1 ve COX-2 olmak üzere iki farklı izoform halinde bulunduğu, farklı iki gen tarafından türetildiği ve araşidonik asit substratını kullanma açısından birbirinden farklı olduğu yapılan çalışmalarla açığa çıkarılmıştır (Turini vd., 2002). NF- κ B, AP-2, NF-IL-6 gibi çoklu 5' transkripsiyon mediatörlerinin COX-2'de mevcutken, COX-1'de olmaması yapılan çalışmalarla açığa çıkarılan enzim farklılıklarından biri olmuştur (Vane ve EE, 2003).

COX-2 sentezinin hücrelerde birçok hücre tipinde IL-1, IL-17, TNF- α gibi sitokinler ve epitelyal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörleri mediatörleriyle

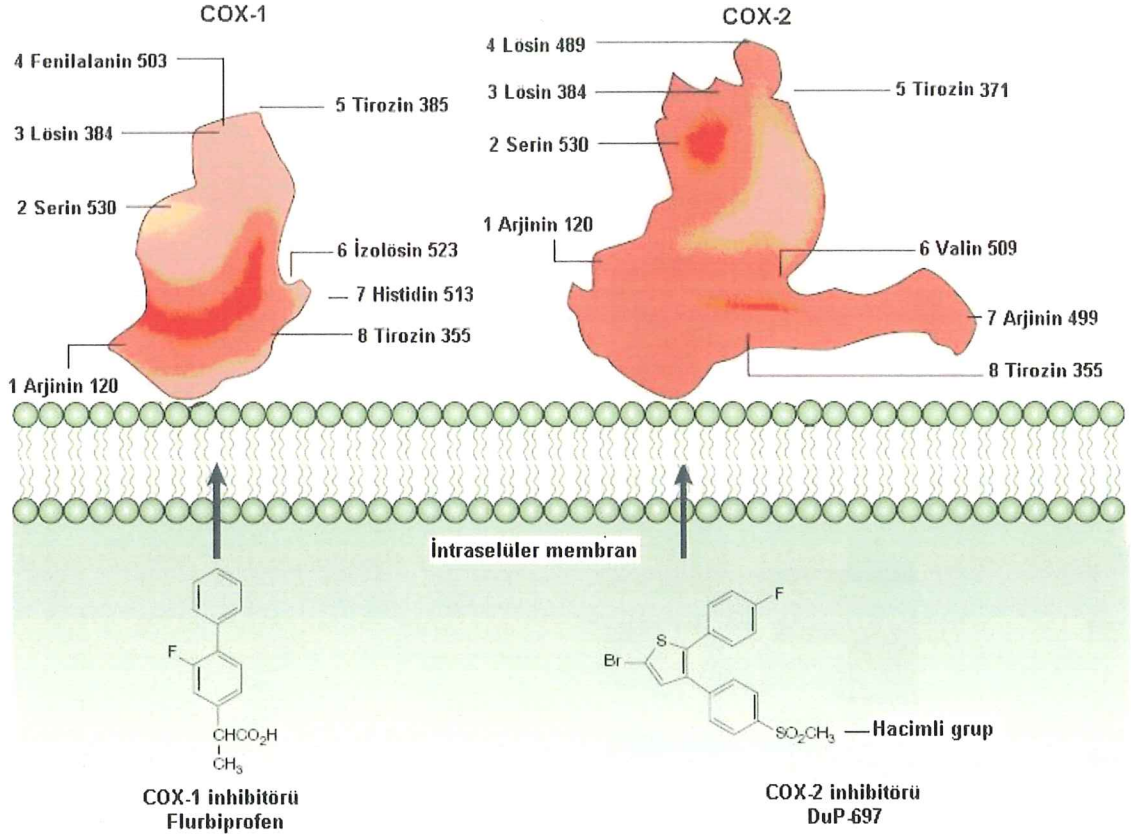
indüklendiği; COX-1'in ise IL-1 ve forbol esterleriyle indüklendiği yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir (Leval vd., 2002).

İnflamasyon sonucu oluşan prostaglandinlerin zaman içerisinde ortamdaki konsantrasyonunun değişmesi, inflamasyon sürecinde başlangıç konsantrasyonu yoğun olan PGE₂'nin COX-2 inhibitörleri ile azalması, inflamasyonun hafiflediği dönemde PGD₂'nin artması gibi gözlemlere dayanılarak bu geç aşamadaki PG'in COX-3'e bağlı olarak sentezlendiği ve bu enzimin COX-1 enzimi ile aynı gen kökenli olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca PCOX-1a ve PCOX-1b enzimleri de COX-1 varyantı olarak tanımlanmıştır (Şekil 1.2) fakat aktivitesi tam olarak aydınlatılamamıştır (Flower, 2003; Dannhardt ve Kiefer, 2001).



COX enzimleri endoplazmik retikulumda bulunan integral membran enzimlerindedir ve endoplazmik retikulumun lümenal yüzeyine yerleşmişlerdir. Koyun COX-1 enziminin, ayrıca fare ve insan COX-2 enziminin yapıları X-ışını analizleri ile incelendiğinde her iki COX iskeletinde de katalitik merkezden membran bağlama bölgesinin dış yüzeyine kadar genişleyen bir kanal yapısına sahip olduğu gözlemlenmiştir (Bachle, 1999) (Şekil 1.3).

Birçok NSAID (Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar) COX aktif bölgesine bağlanmak üzere araşidonik asit ile yarışmaktadır. Kanaldaki substrat/inhibitör bağlanmasında sekiz amino asit kalıntısının etkin rolü vardır. Amino asitlere verilen numaralar COX-1 ve COX-2'de amino asit dizisindeki yerlerini belirtmek içindir (Luo vd., 2005).



Şekil 1.3. COX-1 ve COX-2'nin aktif ve bağlanma bölgelerini nkarşılaştırılması (Flower, 2003)

COX-1 enziminin mide-barsak kanalının epitel hücrelerinde, damar endotelinde, trombositlerde, böbrek glomerül ve tubulus hücrelerinde fazla miktarlarda genellikle üretildiği, hücrelerde ise sürekli sentez edilmesi nedeniyle tüm vücutta bulunarak koruyucu ve fizyolojik işlev gördüğü tespit edilmiştir. Santral sinir sistemi, omurilik, mide, vasküler endotel, pankreatik hücreler, böbrek ve toplayıcı kanal hücreleri gibi bazı hücrelerde bazal durumda mevcut olduğu görülen COX-2 enziminin ise birçok doku ve organda sürekli olarak inaktif durumda bulunduğu ve inflamatuvar sinyallerle indüklendiği tespit edilmiştir (Sciulli vd., 2005).

COX-2 selektif inhibitörlerinin daha az gastrointestinal (GI) yan etkilere neden olduğuna dair kanıtlar olmasına karşın kronik hasar durumunda bu inflamatuvar lezyonun COX-2 sümüülasyonunu arttırdığı dolayısıyla selektif COX-2 inhibisyonunun tıpkı NSAID gibi lezyonda kötüleşmeye ve yara iyileşmesinde gecikmeye neden olduğu yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir (Turini vd., 2002; Leval vd., 2002).

COX-2 enziminin uterus epitelinde hamileliğin çeşitli dönemlerinde de sentezlendiği, hamileliğin başlangıcında ovumun harekete geçmesinde ve plasenta

oluşumu için gerekli anjiyogenezise katkıda bulunarak hamilelik döneminin sonlanmasında ve doğum eyleminin başlamasında rol oynadığı yapılan çalışmalarda açığa çıkarılmıştır (Charlier ve Michaux, 2003).

1.1.2.2. Lipoksijenaz (LOX)

Lipoksijenaz enzimleri çoklu doymamış yağ asitlerinin hidroperoksitlere oksidasyonunu katalize eden proteinlerdir (Brash,1999). Bu enzimler bitkilerde ve hayvanlarda mevcuttur ve bazı bakterilerde de tespit edilmiştir (Kuhn ve Thiele, 1999; Porta ve Rocha, 2001). Lipoksijenaz ürünleri, çeşitli fizyolojik düzenleyiciler ve ağrı mediatörleri oluşturacak şekilde açığa çıkmaktadır (Gardner, 1991).

Lipoksijenaz enzimlerinin doğal substratı, 13-hidroperoksiotadienoik aside (13-HPODE) dönüşen bir C18 bis-doymamış yağ asidi olan linoleik asittir (LA). İnsanlarda tanımlanan altı fonksiyonel LOX gen izoformu arasında, 5-lipoksijenaz (5-LOX), trombosit 12-lipoksijenaz (p-12-LOX) ve 15-lipoksijenaz-1 (15-LOX-1) başlangıçta lökositlerde keşfedilmiştir. 5-Lipoksijenaz nötrofil yapılarında yoğunlukla bulunan araşidonik asit (AA) metabolize edici bir enzimdir. AA'nın 5-hidroperoksi türevidir olan 5-hidroksieikosatetraenoik asit (5-HPETE) kararsız bir yapıda olduğu için 5-HETE yapısına indirgenir ve lökotrien (LT) olarak bilinen bileşiklere dönüşür. 5-HPETE'den türetilen ilk LT olan lökotrien A₄ (LTA₄), sırasıyla LTB₄ ya da LTC₄'e dönüşür. LTB₄ bazı makrofajlarda ve nötrofil hücrelerinde üretilir. LTB₄ nötrofil hücreleri için önemli bir kemotaktiktir. LTC₄'ün metabolitleri olan LTD₄ ve LTE₄ genellikle mast hücrelerinde üretilir ve damar geçirgenliğinde artışa sebep olduğu bilinmektedir (Jacquot vd., 2008).

Lipoksijenaz kaynaklı AA'ların varlığında lökosit hücreleri dokulara girmeye başlar ve bu AA ürünlerini lipoksine dönüştürür. Lipoksinlerin inflamasyon inhibitörleri olarak görev yaptığı bilinmektedir. Bu bağlamda 5-LOX yolunun, lökosit kemotaksisi, vasküler inflamasyon ve arttırılmış damar geçirgenliği yoluyla kardiyovasküler hastalıklara neden olduğu düşünülmektedir (Poeckel ve Funk, 2010).

Eikosanoidlerin iltihabi olaylarda kritik rol oynaması bu mediatörlerin sentezini inhibe edebilecek ajanların geliştirilmesinin ve klinik kullanımının önemi vurgulanmaktadır. Günümüzde ağrı ve ateş tedavisinde etkili olduğu bilinen aspirin ve ibuprofen gibi çok sayıda NSAID'lerin siklooksijenaz enzim aktivitesini ve böylece tüm

prostaglandin (PG) sentezini önlediği bilinmektedir. Son 25 yıl içerisinde 5-LOX inhibitörü olarak pazarlanan tek ilaç olan Zileuton astım kontrolünde de kullanılmaktadır fakat etkisi hakkında çok fazla tartışma vardır (Funk, 2001).

Trombosit tipi 12-lipoksijenaz (p-12-LOX) araşidonik asidin 12-HPETE'ye dönüşümünü katalize edebilir. p-12-LOX ekspresyonu, mide kanseri, prostat kanseri ve melanom dahil olmak üzere birçok tümör dokusunda gözlemlenmiştir (Wong vd., 2001; Lövey vd., 2013; Chou vd., 2009). p-12- LOX'in metaboliti (12-HETE), kardiyovasküler ve böbrek hastalıkları, birçok kanser türü ve inflamatuvar tepkiler ile ilişkilendirilmiştir (Aleem vd., 2008; Yiu vd., 2003). p-12-LOX ayrıca, araşidonik asidi 12-HETE'ye katalize ederek epidermal su bariyerinin korunmasında rol oynayabilmektedir (Morgan vd., 2010).

15-LOX-1'in ana reaksiyon ürünü 15-HPETE'dir. Akciğer epitel hücrelerinde 15-LOX-1'in artmış ekspresyonunun astım ve diğer inflamatuvar akciğer hastalıklarının patogenezinde proinflamatuvar etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Liu vd., 2009). Bir dizi çalışma, 15-LOX-1'in kolonik tümörgenezde kritik bir rol oynadığını göstermiştir (Zuo vd., 2012; Shureiqi vd., 2005; Shureiqi vd., 2000).

1.1.3. Kronik inflamasyon ve kanser ilişkisi

İnflamasyon; yaralanma, enfeksiyon veya hücre ölümünün neden olduğu hücresel hasara karşı immün sisteminin, zarar verici uyaranları ortadan kaldırmaya veya nötralize etmeye çalıştığı ve iyileşme ile rejeneratif süreçleri başlattığı, karmaşık biyokimyasal tepkinin bir parçası olarak bilinmektedir. Klasik olarak, kızarıklık, şişme, ısı, ağrı ve doku fonksiyon kaybı gibi semptomlarla karakterize edilen inflamasyon; mikrobiyal enfeksiyon, doku hasarı ve kalp enfarktüsü gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanmaktadır. Bu makroskobik semptomlar, vasküler endotelyumun geçirgenliğini arttırarak serum bileşenlerinin sızmasına ve immün hücrelerin ekstrasvazasyonuna izin vermektedir. İnflamatuvar yanıt daha sonra hızlı bir şekilde sonlandırılarak hasarlı dokuların tamir edilme süreci başlatılmaktadır. Bununla birlikte, sitokinlerin patojenleri baskılamak için bağışıklık hücreleri tarafından aşırı üretimi ölümcül olabilmektedir (Takeuchi ve Akira, 2010).

Hücrelerin mikroorganizmalar tarafından enfeksiyonunun immün yanıtları aktive etmesiyle patojen ve konakçı arasındaki karmaşık etkileşimler ilk olarak doğal

bağışıklık sistemi tarafından başlatılmış olur. Doğal bağışıklık sistemi hücreleri üzerinde bulunan patojen tanıma reseptörleri (PRR), patojen üzerinde bulunan patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PAMP) tanırlar (Kumar vd., 2011). Toll-benzeri reseptörler (TLR), PRR reseptörlerinin en geniş ailesi olarak kabul edilir ve patojen üzerinde bulunan PAMP'ları tanıyarak immün yanıtları oluştururlar (Rakoff vd., 2009). TLR'lerin aktif hale gelip hücre içi sinyal süreçlerini başlatabilmesi için bazı ligandlar ile etkileşime girmeleri gerekmektedir (Medvedev vd., 2006).

Enfeksiyonun algılanmasına, ilk olarak TLR'ler, RIG-I, NOD ve C tipi lektin reseptörlerini içeren PRR'ler aracılık etmektedir. Bu PRR'ler tarafından tetiklenen hücre içi sinyal kaskadları, patojenlerin ve enfekte olmuş hücrelerin ortadan kaldırılmasını koordine eden inflamatuvar mediatörlerin transkripsiyonel ekspresyonuna yol açmaktadır. Bu sistemin anormal aktivasyonu immün yetmezliğe, septik şoka veya otoimmünitinin indüklenmesine yol açmaktadır (Akira ve Takeuchi, 2006).

İnflamatuvar yanıtlar; tümör oluşumu, doku istilası (invazyon), habis (malign) dönüşümü, diğer dokulara yayılması (metastaz), olmak üzere tümör gelişiminin farklı aşamalarında belirleyici rol oynamaktadır. İnflamatuvar yanıtlar ayrıca immün sinyalleri ve tedaviye verilen yanıtları da etkilemektedir. Tümörlere sızan immün hücreleri, kanser hücreleri ile dinamik bir karşılık içine girmektedirler ve bu karşılığa aracılık eden bazı moleküler olaylar yapılan çalışmalarla kısmen ortaya çıkarılmıştır (Grivennikov vd., 2010).

İnflamatuvar yanıtlar; proinflamatuvar tümör nekroz faktör (TNF), interlökin (IL)-1 ve IL-6 gibi sitokinler tarafından düzenlenmektedir. Bu sitokinler, inflamatuvar hücrelerin ölümünü düzenleyen, vasküler endotel geçirgenliğini değiştiren, kan hücrelerini iltihaplı dokulara toplayan, akut faz proteinlerinin üretimini indükleyen proteinlerdir. TNF ve IL-6 esasen transkripsiyonel ve translasyonel seviyelerde düzenlenmesine rağmen, IL-1b'nin üretimi iki aşamalı bir mekanizma tarafından düzenlenir. İlk adım, mRNA'sı TLR sinyaline bağlı bir şekilde düzenlenen bir IL-1b zimogen (pro-IL-1b) ifadesidir (Akira ve Takeuchi, 2006).

Doğal bağışıklık sinyallerini regüle eden nod benzeri reseptörler (NLRs), antijen uyarıcı hücreler (ASC) ve kaspaz-1'i aktive eden kompleks yapı iltihaplanma olarak tanımlanmaktadır (Schroder ve Tschopp, 2010). Çok sayıda IFN- α formunu ve tekli IFN- β , IFN- γ vb. formlarını içeren Tip I interferonlar (IFN'ler) iltihabın modülasyonunda rol oynamaktadır (Honda vd., 2006).

Tip I IFN'ler, viral olarak enfekte olmuş hücrelerde apoptotik hücre ölümünü indükleyerek virüs enfeksiyonuna dirençli hücreleri meydana getirirler (Stark vd., 1998).

Kronik ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi inflamatuvar barsak hastalıkları olan kişilerde kolon kanserinin görülmesi kronik bir inflamasyonun malign hastalıklar ile ilişkili olduğunu gösteren bir örnektir (Weedon vd., 1973). Karaciğerdeki Hepatit C enfeksiyonu karaciğer karsinomasına yatkındır. Mesane ve kolon karsinomu riskinde artış schistosomiasis ile ilişkilendirilmektedir. Kronik H. pylori enfeksiyonunun mide kanserinin nedenlerinden biri olduğu bilinmektedir (Uemurd vd., 2001).

İnflamatuvar hücreler DNA hasarına neden olmaktadır ve bunu makrofajlardan ve T lenfositlerinden makrofaj göçü inhibe edici faktör (MIF) ile gerçekleştirmektedirler. MIF, transkripsiyonal aktiviteyi baskılayarak p53 proteininin üstesinden gelen güçlü bir sitokindir. Dokulardaki p53 düzenleyici işlevler DNA hasarına karşı yetersiz bir cevap veren bir ortam yaratarak potansiyel onkogenik mutasyonların birikmesini artırır (Miyashita ve Reed, 1995). DNA tümör virüsleri gibi enfeksiyöz viral ajanlar başka ön mekanizmalardan da sorumlu olmasına rağmen, aktif onkogenleri konak genomuna ekleyerek hücreleri doğrudan dönüştürebilir. Hayvanlarda birçok enfeksiyöz ajan türü mevcut olsa da insanda sadece insan papilloma virüsü, hepatit B virüsü (HBV) veya Epstein-Barr virüsü ile enfekte olmak virüsle ilişkili habislikler geliştirir (Thompson ve Kurzrock, 2004).

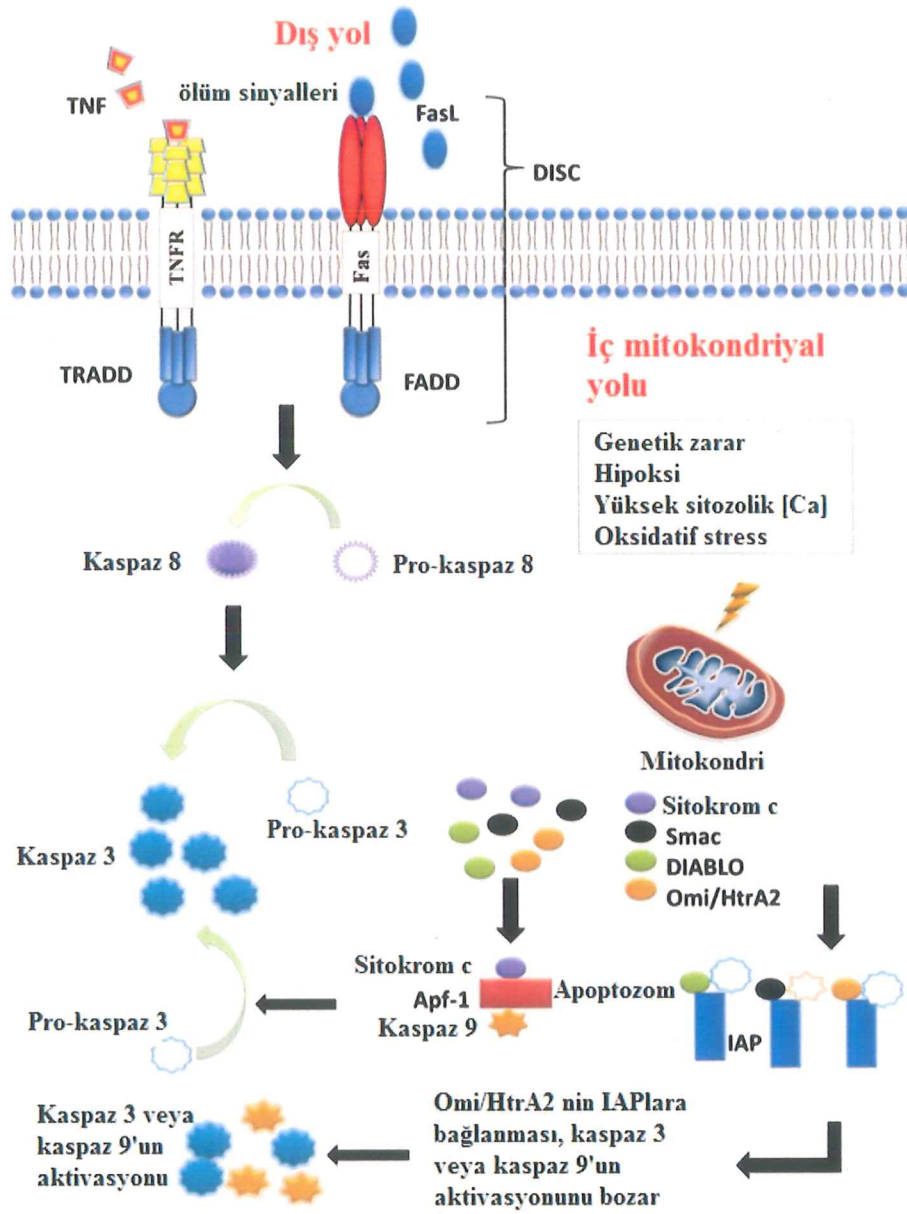
İnflamasyonun kanserin evrimindeki rolünü anlamak için, inflamasyonun ne olduğunu ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rollerini anlamak önemlidir. Doku yaralanmasına cevap olarak, çok faktörlü bir kimyasal sinyal ağı, etkilenen dokuyu "iyileştirmek" için tasarlanmış bir ana bilgisayar tepkisini başlatır ve sürdürür. Bu tepki lökositlerin (nötrofiller, monositler ve eozinofillerin) venöz sistemden hasar alanlarına göç etmesini içerir ve doku mast hücrelerinin de bu süreçte önemli bir rolü vardır (Metcalf vd., 1997).

Belirli lökosit popülasyonlarının kemoatraksiyonu sağlayan kemokinler isimli bir kemotaktik sitokin ailesi, akış aşağı efektör hücrelerini alır ve inflamatuvar yanıtın doğal evrimini belirler. İnflamasyonlu bölgede devam eden sitokin/kemokinlerin yoğunluk profili kronik hastalığın gelişiminde önemlidir. Normal iltihap yani yara iyileşmesiyle ilişkili iltihap genellikle kendi kendini sınırlar; bununla birlikte, iltihaplı bölgenin yakınlarda konumlanmış herhangi bir faktörün düzensizliği anormalliklere

ve dolayısıyla patogeneze neden olabilir (Hanada ve Yoshimura, 2002). Nötrofiller (ve bazen eozinofiller) akut inflamatuvar yanıtı başlatan ilk mediatörlerdir. Dokulardaki makrofajlara farklılaşan monositler, kemotaktik faktörlerin rehberliğinde hasarlı doku bölgesine göç ederler. Makrofajlar lokal mikro ortamdaki endotel, epitel ve mezenkimal hücreleri derinlemesine etkileyen büyüme faktörleri ve sitokinlerin ana kaynağıdır. Mast hücreleri akut inflamasyonda, histamin, sitokinler, yüksek sülfatlanmış proteoglikanlara komplekslenmiş proteazlar ve ayrıca lipid mediatörleri gibi depolanmış ya da yeni sentezlenmiş inflamatuvar mediatörleri salması nedeniyle önemlidir (Kishimoto vd., 1994).

1.1.4. Apoptoz

Apoptoz, embriyonik dönemden ölüme kadar pek çok fizyolojik veya patolojik olayda gözlemlenen programlı hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Apoptozda, hücre yüzeyinde, hücre organellerinde ve çekirdekte çeşitli değişiklikler meydana gelmektedir. Hücre içi (intrinsik) veya hücre dışı (ekstrinsik) kaynaklı ölüm sinyalleri eşliğinde hücre ölüm reseptörleri ve mitokondriyon aracılı apoptotik mekanizma aktive olmakta ve sonuçta DNA kırılması, sitoplazmada büzülme, membranda parçalanma meydana gelmektedir (Kasibhatla ve Tseng, 2003).



Şekil 1.5. Apoptotik dış ve iç mitokondriyal yolda etkili mekanizmalar (Wang, 2011)

Apoptoz bazı iyonlar (Ca^{2+}), moleküller (seramit), genler (c-myc), proteinler (p53) ve organeller (mitokondri) gibi çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenmektedir (Scaffidi vd., 1998). DNA hasarı, hücre içi Ca^{2+} düzeyi artışı, pH azalışı, hücre döngüsü bozuklukları ve hipoksi gibi hücre içi sinyaller apoptozu indüklemektedir (Şekil 1.5). Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli girişi gerçekleşen Ca^{2+} iyonunun, apoptotik mekanizmada endonükleaz aktivasyonunu, doku transglutaminaz aktivasyonunu, gen regülasyonunu, proteazların aktivasyonlarını ve hücre iskeleti organizasyonunu düzenlediği düşünülmektedir. Büyüme ve üreme

faktörlerinin yetersizliği, tümör nekrozis faktör (TNF) ya da tümör nekrozis ailesine ait tip-2 transmembran protein (FAS) ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, sitotoksik T lenfosit ve iskemi, toksinler, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon gibi sinyaller de apoptozu indükleyen hücre dışı etkenlerdir (Ulukaya vd., 2003).

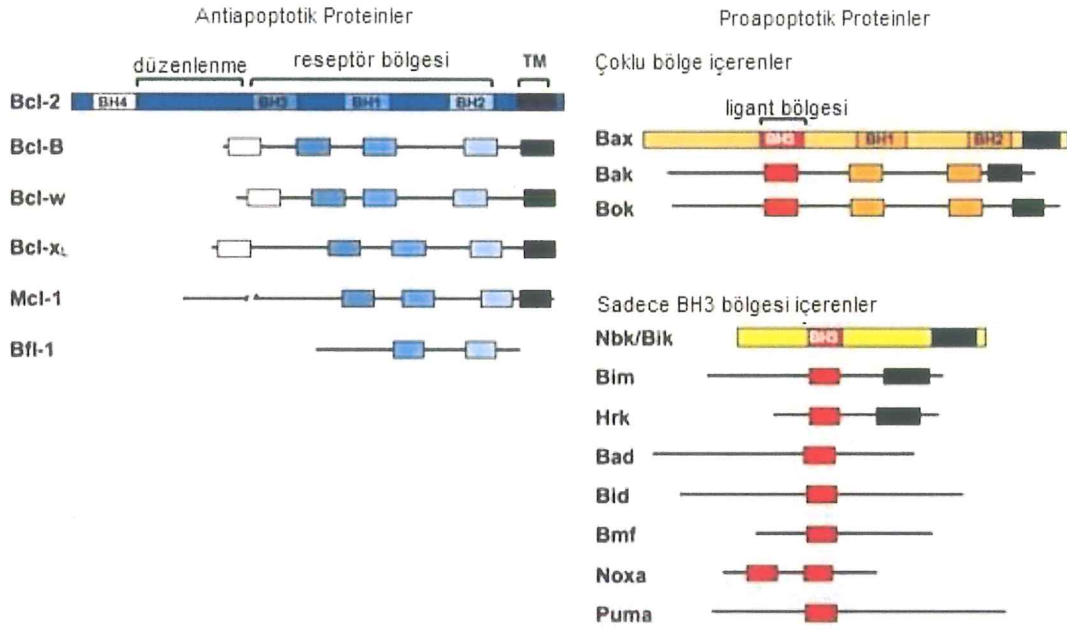
Kaspaz enzimleri hem hücre içi hem hücre dışı kaynaklı hücre ölüm sinyallerinin her iki sinyal yolunda da önemli görevi olan enzimlerdir. Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarının alınmasıyla proapoptotik proteinlerden Bid bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive ederek Bax ve Bak proteinlerini aktifleştirir. Bu proteinlerin aktivasyonu ile mitokondri membranında por oluşumu indüklenir ve bu durum da zar potansiyelinin değişmesine yol açar (Spierings vd., 2004). Böylece mitokondri membranındaki porlardan oksidatif fosforilasyon için elektron taşıyan sitokrom-c, mitokondriyel ikincil kaspaz aktivatörü (Smac), DNA'yı fragmentasyona uğratan Endonukleaz-G (Endo-G), Ca^{2+} ve apoptozda kritik sinyal görevleri olan kaspaz-3 ile kaspaz-8 enzimlerinin aktivasyonuna engel olan apoptoz indükleyici faktör (AIF) ekspresyonu uyarılmış olur. Mitokondriyal porlardan sitokrom-c ekspresyonu ise apoptotik proteaz aktive eden faktör (Apaf-1) ve ATP molekülü ile birlikte sitozolde kaspaz-9 enziminin aktifleştirdiği 'apoptozom' kompleks yapısını meydana getirir (Adams ve Cory, 2001).

kemoterapi gibi dış etkenlerle aktive olan sfingomyelinaz enzimi, sfingomyelini seramid'e dönüştürür. Seramid seramidaz enzimi ile sfingozine dönüştürülerek Bid sentezini uyarır ve apoptozu indükler (Lo ve Fisher, 2014). Sitotoksik T hücreleri ile doğal öldürücü (NK) hücreleri üzerinde bulunan ve bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eden Fas hücre reseptörünün, Fas-İlgili Ölüm Domain Proteini (FADD) reseptör molekülü ile birleşmesiyle prokaspazlar aktive olur ve böylece apoptoz başlatılır (Scaffidi vd., 1998).

İnflamatuvar sinyal harici durumlarda hücrelerde inaktif halde bulunan ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştiren ve hedef proteindeki peptid bağlarını kırarak hücreyi apoptoza götüren sistein proteaz kökenli kaspaz enzimleri; kaspaz 2, 8, 9 ve 10' u içeren başlatıcı kaspazlar; kaspaz 3, 6 ve 7'yi içeren efektör kaspazlar ve kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14'ü içeren inflamatuvar kaspazlar olarak 3 gruba ayrılmaktadırlar. Başlatıcı kaspazların apoptotik stimülasyon ile başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara ilemesiyle hücre iskeleti proteinleri ve nükleer membran proteini laminin A ve DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimeraz gibi ilgili proteinlerin parçalanması gerçekleşir ve böylece apoptotik hücre morfolojisi meydana getirilir (Li ve Yuan, 2008).

Kaspaz inhibitör ailesi olan apoptoz inhibitörleri (IAP), kaspazları seçici olarak inhibe ederek apoptotik mekanizmayı durdurabilmektedir. Tümörlerde yüksek ekspresyon düzeylerinde IAP olduğu tespit edilmiştir (Reed, 2000).

B-hücre lenfoma 2 (Bcl-2) ailesi onkogenlerinin homodimer ya da heterodimer formuna dönüşmeleri hücrelerin apoptoza sürüklenmesine karar veren önemli bir apoptotik sinyaldir. Bcl-2 gen ailesi apoptozu indükleyen proapoptotik ve apoptozu baskılayan antiapoptotik üyeler olmak üzere iki alt grupta incelenmektedir (Şekil 1.7). Sitozolde bulunan Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa proapoptotik üyeler sitokrom-c ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımını artırarak apoptozu indüklerler. Bax ve Bid mitokondri membranını depolarize ederek hücreleri apoptoza sürükleyen kaspaz-9 ve kaspaz-3 enzimlerinin aktivasyonunu da sağlamaktadırlar (Tsujimoto, 1998). Mitokondri membran yüzeyinde, endoplazmik retikulumda ve çekirdek zarında bulunan Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 antiapoptotik üyeler ise por oluşumunu sağlayıp iyon transportunu düzenleyerek hücrelerdeki Ca^{2+} konsantrasyonunu kontrol ederek prokaspaz formlarıyla AIF ve sitokrom-c salınımını engelleyip apoptozu inhibe ederler (Taneja vd., 2001).



Şekil 1.7. Proapoptotik ve antiapoptotik proteinler (Wang, 2011)

Bcl-2 ailesi çoğu hücre tipi için en bilinen antiapoptotik proteindir. Bcl-2 onkogenlerinin pek çok çalışmada yayılma eğilimi olan kanserde ve yüksek dereceli lezyonlarda daha fazla sentezlendiği ve apoptozu engelleyerek lenfomaya neden olduğu gözlemlenmiştir (Burt vd., 1991).

Proapoptotik Bax proteininin yoğun ekspresyonunun apoptozu arttırdığı bilinmektedir. Hücre ölüm sinyali ile Bax sentezinin arttığı ve mitokondri membranına transloke olan Bax'ın iyon kanallarını açıp mitokondriden kaspaz-3 aktivasyonunu sağlayan sitokrom c salınımını gerçekleştirerek apoptozu hızlandırdığı gözlemlenmiştir (Rosse vd., 1998).

Aktivasyonu hücre döngüsüne bağımlı olan antiapoptotik protein Bcl-xL'nin fosforilasyonunun yoğunlukla hücre döngüsünün S ve G2 fazlarında gerçekleştiği ve metafaz evresinde kaybolup telofaz evresinde yeniden ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. DNA hasarı durumunda G2 fazında hücre döngüsünün durdurularak Bcl-xL ekspresyonunun artırıldığı da yapılan çalışmalarda açığa çıkarılmıştır (Wang vd., 2011). Bcl-xL'nin TNF- α üzerinden gerçekleşen apoptotik süreçte önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Apoptotik döngüde hücrelerin hayatta kalmasında önemli rolü olan nükleer faktör kappa β (NF- $\kappa\beta$)'nin inhibisyonu ve Bcl-xL'nin tek başına devre dışı bırakılmasıyla TNF- α üzerinden apoptozun gerçekleşebildiği gözlemlenmiştir (Casanelles vd., 2013).

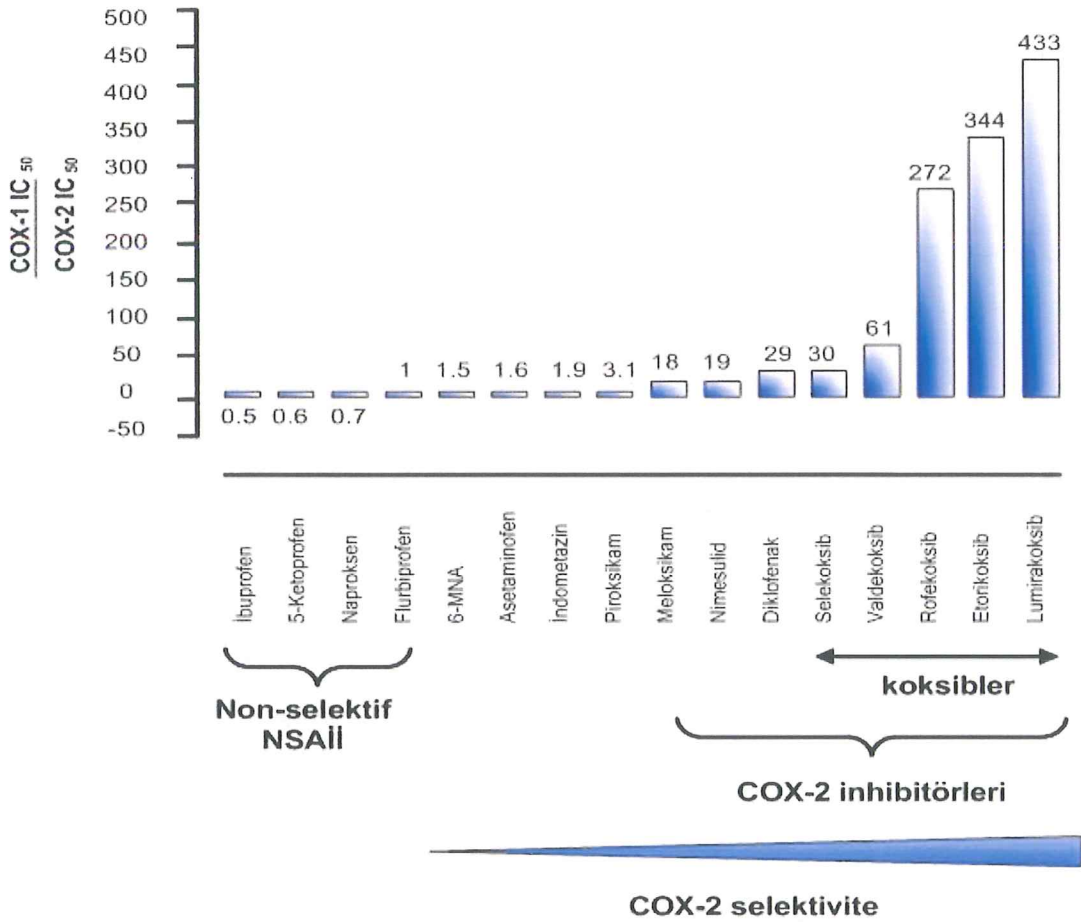
Birçok anti-tümör ilaç, hedef olarak hücre DNA'sını seçer ve p53 seviyesini artırır. p53 proteini hücrede DNA hasarı olduğunda hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak Bax, Apaf-1 ve Fas aktivasyonunu artırıp Bcl-2 ve Bcl-xL'yi baskılayarak apoptozu indükler ve hücreye DNA tamiri için zaman kazandırmış olur. Kromozom-17'nin kısa kolundaki bir genin (17p53) mutasyonu p53 salgılanmasına büyük ölçüde katkıda bulunur. Hücrenin belli noktalarında malign tip p53 bulunması, DNA tamir mekanizmasının doğru hasarı tamir etmesinde kontrol noktasıdır. Genomun içeriğini sürdürerek görev yapan p53 geninin mutasyonu sonucu mutant p53 geni taşıyan hücreler, genom içeriğini sürdüremedikleri için hücre döngüsünün durma sinyallerini alamazlar. p53 geninin mutasyonu tüm tümör türlerinde gerçekleşen en yaygın mutasyon olduğundan oldukça önemlidir. p53 ile aynı işlevi gören p63 ve p73 genlerine de literatürde yer verilmiştir (Miyashita ve Reed, 1995).

1.1.5. Kanser tedavisi

Kanser; hücrelerin olgunlaşma, bölünme, çoğalma özelliklerinde ve fonksiyonlarındaki bütünlüğün ve kontrolün kaybolması sonucunda oluşan öldürücü bir hastalıktır. Kanser, insanlık tarihi boyunca ölümcül bir hastalık olmasından dolayı bilim dünyasında önemli bir yere sahip olmuştur. Günümüzde kanser gelişmiş ülkelerde kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedeni olarak gösterilmektedir (Gibbs vd., 2000).

Kemoterapi tedavisi kanser vakalarında en yaygın olarak tercih edilen tedavi şeklidir. Kanser kemoterapisi ile ilgili çalışmalar 1990'larda antifolat ilaçların kullanımıyla başlamıştır. Bu kemoterapötik ilaçlarının habis (malign) tümörlere karşı klinik kullanımı, çoğu durumda başarılı olmasına rağmen ilaç direnci gelişimi ve normal hücrelere toksik etkiler göstermesi gibi yan etkiler ortaya çıkarmaktadır. Aynı zamanda kemoterapi ve radyoterapi gibi günümüzde kullanılmakta olan konvansiyonel kanser tedavi metodları pahalıdır. Bulantı, ishal, kabızlık saç dökülmesi gibi hafif yan etkilerden başlayarak nörolojik, kardiyak, renal toksisite ve kemik iliği baskılanması gibi ağır yan etkilere kadar uzanan çok sayıda yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Bu yan etkiler hastanın yaşam kalitesini azalttığı gibi tedavi protokollerinin kabulünde hastaların cesaretini kırmakta, bu durum kanserin progresyonunda ve kanser ile ilişkili komplikasyonlarda artışa yol açarak bu tedavilerin

sınırlı antikanser etkinlik göstermesine neden olmaktadır. Bu nedenle günümüzde kullanılmakta olan tedavilere alternatif olacak daha az toksit, daha seçici ve etkili, doğal, biyolojik ve sentetik maddelerden geliştirilmiş antikanser ilaçların bulunmasına ve etki mekanizmalarının aydınlatılmasına odaklanılmıştır (Gerl ve Vaux, 2005; Kumar vd., 2012; Alonso-Castro vd., 2011; Fang vd., 2012; Miralinaghi vd., 2013).



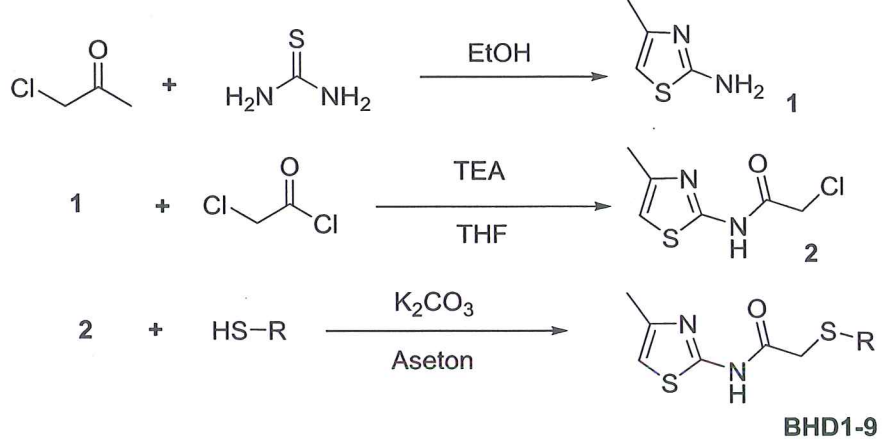
Şekil 1.8. COX inhibitörü ilaçlar (Flower, 2003)

Neoplastik ilerlemede iltihaplanmanın önemine dair belki de en iyi kanıt, aspirin ve steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçların (NSAİD'ler) uzun vadeli kullanıcıları arasındaki kanser riskinin araştırılmasıdır. Çok fazla veri bu ilaçların kullanımının bazı kanser türlerindeki ilerlemeleri azalttığına işaret etmektedir. NSAİD'lerin siklooksijenazları (COX-1 ve COX-2) inhibe etme kabiliyetleri (Şekil 1.8), kemoprevensiyon (kanserden korunmak için kimyasal önleme) mekanizmalarının altındadır. COX-2 araşidonik asidi prostaglandinlere dönüştürür ve bu da hasarlı

dokularda inflamatuvar reaksiyonlara neden olur. Aspirin, trombosit fonksiyonunun inhibe edilmesinde, hem COX-1 hem de COX-2'nin geri dönüşsüz olarak inaktive edilmesiyle seçici değildir. Bu enzimlerin inhibe edilmesiyle prostaglandinlerin, endoperoksitlerin ve tromboksan A₂'nin sentezi önlenmiş olur. Diğer NSAID'ler, örneğin, flurbiprofen, trombosit topaklanmasını inhibe edebilmesinden dolayı güçlü anti-metastatik etkilere sahip olabilir. Flurbiprofen, hem COX-1'i hem de COX-2'yi inhibe ettiği tespit edilen selektif olmayan COX inhibitörü ilaçlardan biridir (Flower, 2003).

2. YÖNTEM

2.1. 4-Metiltiyazol Türevlerinin Genel Sentez Yöntemi



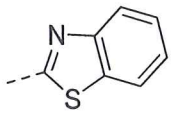
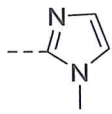
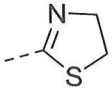
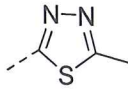
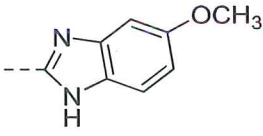
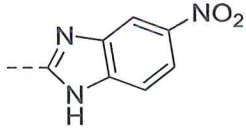
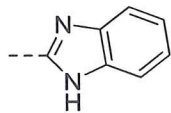
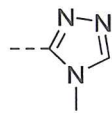
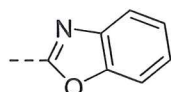
Şekil 2.1. Metiltiyazol türevlerinin genel sentez yöntemi

Yöntem A: 4-metiltiyazol-2-amin sentezi (1): Kloroaseton ve ona ekivalan oranda tiiyöre etanol içerisinde çözüldürülüp ve oda sıcaklığında karıştırılarak reaksiyon kontrolü ince tabaka kromatografisi (İTK) ile kontrol edilmiş ve ham ürün süzülerek alınmıştır.

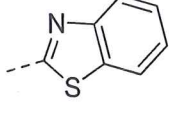
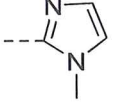
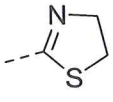
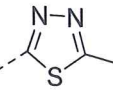
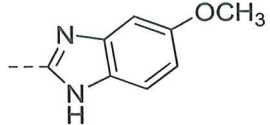
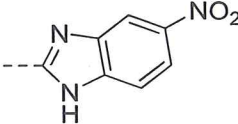
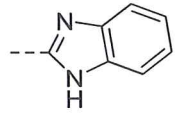
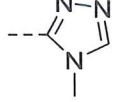
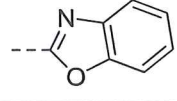
Yöntem B: 2-Kloro-N-(4-metiltiyazol-2-il) asetamit sentezi (2): 4-Metiltiyazol-2-amin ve ona eşdeğer oranda trietilamin 0-5 °C'de karıştırılarak THF içerisinde çözüldürülür, daha sonra tetrahidrofuran içerisinde seyreltilmiş olan kloroasetil klorür (eşdeğer oranda) bu çözeltiye damla damla ilave edilmiştir. Bu şekilde elde edilen reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 2 saat daha karıştırılarak solvent uçurulduktan sonra katı ürün, su ile yıkanarak süzlmüştür. Daha sonra, ham ürün etanolden yeniden kristallendirilmiştir.

Yöntem C: 2-(Süstitüe merkaptu)-N-(4-metiltiyazol-2-il) asetamit türevlerinin sentezi (BHD1-9): 2-Kloro-N-(4-metiltiyazol-2-il) asetamit, eşdeğer oranda uygun merkaptu türevi ve potasyum karbonat asetonda çözüldürülüp, oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyon bitimi İTK ile kontrol edilip son olarak, çözücü uçurulup katı madde su ile yıkanarak süzlmüştür.

Tablo 2.1. Sentezlenen bileşikler

Bileşik kodu	R	Bileşik kodu	R
BHD1		BHD2	
BHD3		BHD4	
BHD5		BHD6	
BHD7		BHD8	
BHD9			

Tablo 2.2. Sentezlenen bileşiklerin analizleri

Bileşik kodu	R/Ar	E.D.
BHD1		Kimyasal Formül: C ₁₃ H ₁₁ N ₃ OS ₃ Molekül Ağırlığı: 321,43 Elemental Analiz: C, 48.58; H, 3.45; N, 13.07; O, 4.98; S, 29.92
BHD2		Kimyasal Formül: C ₁₀ H ₁₂ N ₄ OS ₂ Molekül Ağırlığı: 268,35 Elemental Analiz: C, 44.76; H, 4.51; N, 20.88; O, 5.96; S, 23.89
BHD3		Kimyasal Formül: C ₉ H ₁₁ N ₃ OS ₃ Molekül Ağırlığı: 273,39 Elemental Analiz: C, 39.54; H, 4.06; N, 15.37; O, 5.85; S, 35.18
BHD4		Kimyasal Formül: C ₉ H ₁₀ N ₄ OS ₃ Molekül Ağırlığı: 286,39 Elemental Analiz: C, 37.75; H, 3.52; N, 19.56; O, 5.59; S, 33.58
BHD5		Kimyasal Formül: C ₁₄ H ₁₄ N ₄ O ₂ S ₂ Molekül Ağırlığı: 334,41 Elemental Analiz: C, 50.28; H, 4.22; N, 16.75; O, 9.57; S, 19.17
BHD6		Kimyasal Formül: C ₁₃ H ₁₁ N ₅ O ₃ S ₂ Molekül Ağırlığı: 349,38 Elemental Analiz: C, 44.69; H, 3.17; N, 20.05; O, 13.74; S, 18.35
BHD7		Kimyasal Formül: C ₁₃ H ₁₂ N ₄ OS ₂ Molekül Ağırlığı: 304,39 Elemental Analiz: C, 51.30; H, 3.97; N, 18.41; O, 5.26; S, 21.07
BHD8		Kimyasal Formül: C ₉ H ₁₁ N ₅ OS ₂ Molekül Ağırlığı: 269,34 Elemental Analiz: C, 40.13; H, 4.12; N, 26.00; O, 5.94; S, 23.81
BHD9		Kimyasal Formül: C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₂ S ₂ Molekül Ağırlığı: 305,37 Elemental Analiz: C, 51.13; H, 3.63; N, 13.76; O, 10.48; S, 21.00

2.2. Enzim İnhibitör Aktivite Çalışmaları

2.2.1. Siklooksijenaz (COX) enzimi inhibitör aktivite testi

Bileşiklerin COX enzim inhibisyon etkilerinin belirlenmesi “Cayman COX Inhibitor Screening Assay Kit, (katalog no:701050)”, ölçüm yönteminin uyarlanması şeklinde yapılmıştır. Tampon çözeltisi, 3 mL 0,1 M Tris-HCl (pH 8, 37 °C), 27 mL distile su karışımı olarak hazırlanarak COX enzimi çözeltisi için bu tampon kullanılmıştır. Hem çözeltisi tampon ile seyreltilmiştir. Araşidonik asit 100 µL 0,1 M KOH ile karıştırılıp dH₂O ile seyreltilmiştir. Mikroplate kör kuyucuklarına tampon, Hem çözeltisi, çözücü; enzim kuyucuklarına tampon, Hem çözeltisi, COX enzim çözeltisi; kontrol kuyucuklarına tampon, Hem çözeltisi, COX enzim çözeltisi, çözücü; inhibitör numune kuyucuklarına tampon, Hem çözeltisi, COX enzim çözeltisi, inhibitör test maddesi eklenerek 5 dakika 25 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası substrat çözeltisinden tüm kuyucuklara 20 µL ve araşidonik asit substrat çözeltisinden 20 µL ilave edilerek her kuyucukta son hacmin 220 µL olması sağlandıktan sonra mikroplate 2 dakika 25 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 590 nm’de absorbansları ölçülerek yüzde inhibisyonlar hesaplanmıştır. Deneyler dört tekrarlı olarak çalışılarak sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir.

2.2.2. Lipoksijenaz (LOX) enzimi inhibitor aktivite testi

Test maddelerinin LOX inhibisyon aktiviteleri, Baylac ve Racine tarafından tanımlanan metodun modifikasyonu ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Potasyum fosfat tamponu (1,94 mL; 100 mM; pH 9,0) 40 µL örnek çözeltisi ve 20 µL LOX çözeltisi karıştırılarak 25 °C’de 10 dakika boyunca inkübasyona bırakılıp, reaksiyon 50 µL linoleik asit substrat ilavesi ile başlatılmıştır. 234 nm’de 10 dakika boyunca absorbans değişimi kaydedilmiştir. Test bileşikleri ve pozitif kontrol NDGA (nordihidroguayaretik asit) uygun konsantrasyonlarda uygun çözücüde çözülerek hazırlanmıştır. Tüm ölçümler üç tekrarlı yapılarak sonuçlar ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir.

2.3. Biyolojik Etki Çalışmaları

2.3.1. Antikanser etki çalışmaları

Sentezlenen 4-Metiltiyazol bileşiklerin antikanser etkileri değerlendirilirken, birinci aşamada bileşiklerin sitotoksik etkileri MTT metodu ile tespit edilmiştir. İkinci aşamada önemli sitotoksik etki gösteren bileşiklerin apoptotik etkileri belirlenmiştir.

Hücre apoptoz uyarısı aldığı durumda hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunan fosfatidilserin hücre zarının dış lipid tabakasına yer değiştirmektedir. Bu yer değiştirme apoptozun erken döneminde gerçekleşmektedir. Anneksin V proteininin fosfatidilserine bağlanabilme özelliğinden yararlanılarak bu protein floresan bir madde (FITC) ile işaretlenip apoptotik hücre görünür hale getirilmektedir. Bu bağlanma oranı da akım sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerde de Anneksin bağlanması görülebileceği için ayrıca vital bir boya olan propidyum iyodür (PI) boyaması da yapılmaktadır. Canlı hücreler zarları sağlam olduğu için PI boyası ile boyanmamaktadırlar. Canlı hücreler FITC (-)/PI (-), erken apoptotik hücreler FITC (+)/PI (-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler FITC (+)/PI (+) olarak ayırt edilmektedir (Zhang vd., 1997; Kuş, 2011).

2.3.1.1. MTT yöntemi ile in vitro sitotoksik etki çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin in vitro sitotoksik etkileri MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür), literatürde tarif edildiğinin (Mossmann, 1983; Keiser, 2000) üzerinde küçük modifikasyonlarla ölçülmüştür. Çalışmada kullanılan A549 (insan akciğer adenokarsinoma epitelyal hücre dizisi), C6 (kanserli sıçan glioma hücre dizisi) ve NIH/3T3 (sağlıklı fare embriyonik fibroblast hücre dizisi) hücre dizileri sıvı azottan (-196 °C) çıkarılarak, santrifüj edildikten sonra, C6 ve NIH/3T3 hücreleri Dulbecco's Modified Eagle's Medium ve A549 hücreleri RPMI ve Eagle's Minimum Essential Medium ile %10 Fetal sığır serumu (FBS) içeren besi ortamının konulduğu flasklarda, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir. Deney için yeterli sayıya ulaşan hücreler Thoma lamı ile sayılarak 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 2×10^3 hücre gelecek şekilde ekilerek ve aynı zamanda hücrelere 0,5-500 µg/mL konsantrasyonlarında bileşenler eklenerek 37 °C'de inkübe edilmiştir. 24 saat inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 µL MTT boyası (5 mg/mL) ilave

edilerek hücreler 37 °C’de 2 saat daha inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda, hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılarak her bir kuyuya 200 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek 10 dakika inkübe edilmiştir. Renk değişimi, ELx808-IU Bio-Tek plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyu ile belirlenmiştir. Bileşen ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edilmiştir. Pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılıp sonuçlar bu pozitif kontrole göre kıyaslanmıştır. Doz ve zaman aralığı, literatürdeki benzer bileşiklerin çeşitli kanser hücre tiplerine karşı gösterdikleri sitotoksik konsantrasyonlara bağlı olarak belirlenmiştir. Bulunan sonuçlara göre doz aralığı IC₅₀ değeri belirlenene kadar genişletilmiştir.

2.3.3. Apoptotik etki çalışmaları

2.3.3.1. Annexin V-FITC: Erken faz apoptozun belirlenmesi

Test maddelerinin Annexin V-FITC: Erken faz apoptozun belirlenmesi testi (katalog no: 551302), ölçüm yönteminin uyarlanması şeklinde yapılmıştır. MTT metodu ile en aktif bileşikler belirlendikten sonra, IC₅₀ konsantrasyonlarına bağlı olarak A549 ve C6 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri akım sitometride BD belirlenmiştir. Hücreler, 800 rpm’de 4 dakika santrifüj edildikten sonra 1x PBS ile 2 kez yıkanarak ve 2-3×10⁶ hücre/mL olacak şekilde 1x Annexin V bağlanma çözeltisinde süspanse edildikten sonra hücre solüsyonundan 100 µL alınarak tüplere aktarılmıştır. Daha sonra her bir tüpe, 5 µL Annexin V-FITC ve 10 µL propidyum iyodür (PI) çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra her bir tüpe 400 µL 1x Annexin V bağlanma çözeltisi ilave edilerek ve hücreler 1 saatlik boyama süresi içerisinde akım sitometrisi (BD FACS Aria) ile analiz edilmiştir. Erken ve geç apoptotik hücre miktarı pozitif kontrole göre hesaplanmıştır.

2.3.3.2. Hücrelerin mitokondrial membrane bütünlüğünün belirlenmesi

MTT metodu ile en aktif bileşikler belirlendikten sonra, IC₅₀ konsantrasyonlarına bağlı olarak A549 ve C6 hücreleri üzerindeki mitokondriyal membran bütünlüğünün saptanması akım sitometride BD, Pharmingen akım sitometri kiti prosedürüne göre belirlenmiştir. Hücreler optimal bir yoğunlukta ekilerek test

edilecek maddeler ile uygun konsantrasyon ve zamanda inkübe edilmiştir. Sonraki aşamada her bir hücre süspansiyonu 15 mL'lik polistiren santrifüj tüpüne alınarak 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. 0,5 mL taze hazırlanmış çalışma solüsyonu her bir pellete ilave edilerek vortekslendikten sonra 37 °C'de hücreleri 10-15 dakika JC-1 çalışma solüsyonunda bekletilip iki kez yıkanmıştır. 1. yıkamada 2 mL 1x tampon eklenilerek hücreler hassas bir şekilde süspande edilmiştir. Daha sonra hücreler 5 dakika santrifüj edilerek dikkatli bir şekilde süpernatant uzaklaştırılmıştır. 2. yıkamada 1 mL 1x tampon ilave edilerek vortekslenip 5 dakika santrifüj edildikten sonra her bir hücre pelleti 0,5 mL'lik 1x tamponda süspande edilip tekrar vortekslenerek hücre akım sitometri ile analiz edilmiştir. Pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılıp sonuçlar bu pozitif kontrole göre kıyaslanmıştır.

2.3.3.3. Kaspaz- 3 aktivitesinin akım sitometri ile belirlenmesi

MTT metodu ile en aktif bileşikler belirlendikten sonra, IC₅₀ konsantrasyonlarına bağlı olarak A549 ve C6 hücreleri üzerindeki Kaspaz-3 aktiviteleri akım sitometride "BD, Pharmingen FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit, (katalog no: 550480)" ölçüm yönteminin uyarlanması ile belirlenmiştir. Belirlenen doz ve zamanda maddeler ile inkübe edilerek ve soğuk 1x PBS ile iki kez yıkanan hücreler BD Cytotfix/Cytoperm solüsyonu ile (1x10⁶ hücre/0,5 mL olacak şekilde) süspande edilerek 20 dk. buz üzerinde bekletilmiştir. Santrifüj edildikten sonra bu hücreler üzerinden BD Cytotfix/Cytoperm solüsyonu atılarak iki kez BD Perm/Wash™ tampon ile (1x10⁶ hücre/0,5 mL) yıkanmıştır. Bu hücreler yeniden BD Perm/Wash™ tampon ve antikor ile süspande edilerek 30 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Son olarak bu hücreler her bir test için 1 mL BD Perm/Wash™ tampon içinde yıkayıp 0,5 mL BD Perm/Wash™ tampon içinde süspande edilerek akım sitometri ile analiz edilmiştir. Pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılıp sonuçlar bu pozitif kontrole göre kıyaslanmıştır.

Kullanılan Kimyasal Maddeler:

- FITC Annexin V Apoptosis Belirleme Kiti, BD Pharmingen, San Diego.
- Tripsin-EDTA çözeltisi-10X steril filtre edilmiş, BioReagent, hücre kültürü için uygun, 5,0 g domuz tripsin ve 2 g EDTA, %0,9 sodyum klorür (20 mL) litrede 4 Na, Sigma Aldrich, ABD.
- Penisilin-Streptomisin çözeltisi; Sigma Aldrich, ABD, hücre kültürü (20 mL)

için uygun, %0,9 NaCl içerisinde mL başına 10,000 birim penisilin ve 10 mg streptomisin ile steril filtrelenmiş, BioReagent.

- Fetal Sığır Serumumu (FBS); Isı inaktive edilmiş, ABD kökenli olmayan, steril filtre edilmiş, hücre kültürü için uygun (500 mL), SigmaAldrich, ABD.
- Dimethyl Sulfoxide Hybri-max steril, BioFroxx, Germany.
- Sisplatin, Sigma Aldrich, USA.
- Teksol %96–5 litre, Sigma Aldrich, USA.
- RPMI-1640; sodyum bikarbonat ile, L-glutamin ile, sıvı, steril olarak filtrelenmiş, hücre kültürüne (500 mL) uygun besiyeri, Sigma Aldrich, ABD.
- Kaspaz-3 kiti, BD Pharmingen PE Caspase-3, San Diego.
- JC-1 kiti, BD MitoScreen, San Diego.
- COX Kolorimetrik Inhibitor Tarama Test Kiti, Cayman, ABD.
- Lipoksijenaz enzimi (soya fasülyesinden elde edilen), Sigma Aldrich, ABD.
- Linoleik asit, Sigma Aldrich, USA.
- Nordihydroguaiaretic Asit (NDGA), Sigma Aldrich, USA.
- Potasyum Fosfat monobazik, Sigma Aldrich, USA.
- Potasyum Fosfat dibazik, Sigma Aldrich, USA.

Kullanılan Cihazlar:

- ELISA spektrometre, BIOTEK.
- CO₂ inkübatörü, Panasonic.
- Steril kabin, Telstar.
- UV spektrometre, Shimadzu.
- Akım Sitometri, BD.

3. BULGULAR

3.1. Enzim İnhibitör Aktiviteleri

3.1.1. Siklooksijenaz-1 (COX-1) enzimi inhibitör aktivitesi

Tablo 3.1. Sentezlenen bileşiklerin COX-1 aktivitesi üzerindeki inhibisyon değerleri

Bileşikler [100µM]	%inhibisyon±standart sapma
BHD1	inhibisyon yok
BHD2	inhibisyon yok
BHD3	98,11±0,56
BHD4	inhibisyon yok
BHD5	inhibisyon yok
BHD6	inhibisyon yok
BHD7	inhibisyon yok
BHD8	90,47±2,14
BHD9	inhibisyon yok
SC-560 [1µM]	98±2,38

3.1.2. Siklooksijenaz-2 (COX-2) enzim inhibisyon aktivitesi

Tablo 3.2. Sentezlenen bileşiklerin COX-2 aktivitesi üzerindeki inhibisyon değerleri

Bileşikler [100µM]	%inhibisyon±standart sapma
BHD1	inhibisyon yok
BHD2	26,40±1,22
BHD3	12,63±0,76
BHD4	inhibisyon yok
BHD5	28,13±0,61
BHD6	28,35±0,30
BHD7	inhibisyon yok
BHD8	25,75±0,91
BHD9	inhibisyon yok
Rofekoksib [10µM]	99,45±1,72

3.1.3. Lipoksijenaz (LOX) enzim inhibisyon aktivitesi

Tablo 3.3. Sentezlenen bileşiklerin LOX aktivitesi üzerindeki inhibisyon değerleri

Bileşikler [100µg/ml]	%inhibisyon±standart sapma
BHD1	inhibisyon yok
BHD2	inhibisyon yok
BHD3	10,47±1,79
BHD4	22,43±2,02
BHD5	9,16±0,59
BHD6	1,23±0,01
BHD7	35,11±2,52
BHD8	inhibisyon yok
BHD9	1,42±0,36
NDGA [20µg/ml]	95,20±0,20

3.2. Sitotoksisite (MTT) Testleri

Tablo 3.4. MTT analizleri sonucu 24 saat sonundaki IC₅₀ değerleri

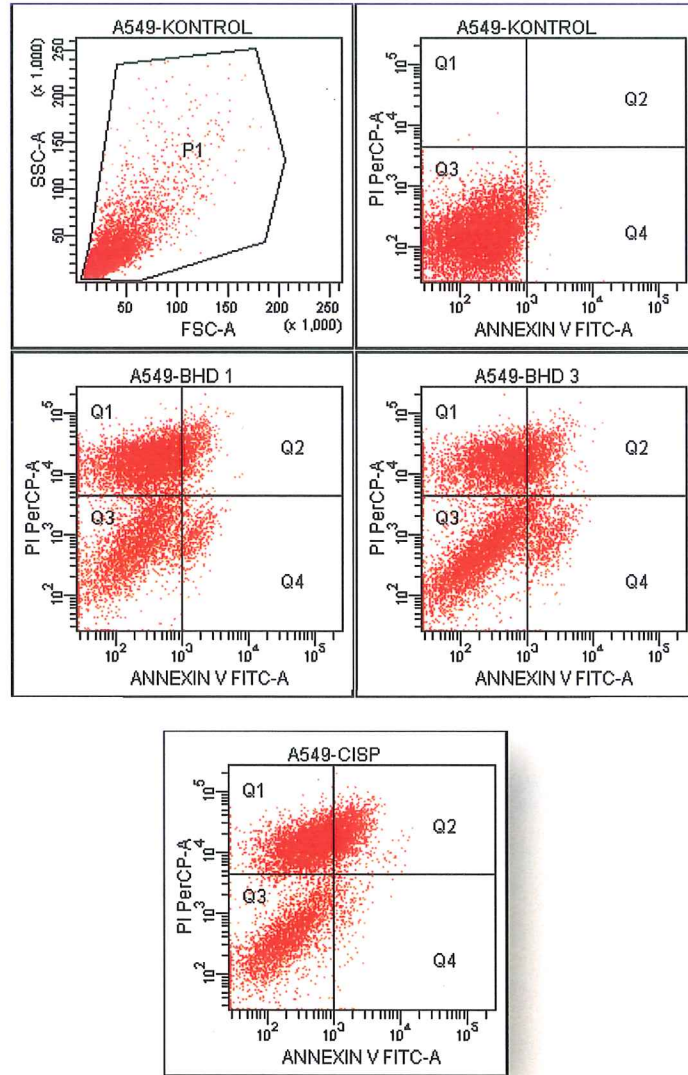
Test Maddeleri	C6 glioma hücre dizisi [µg/mL]	A549 hücre dizisi [µg/mL]	NIH/3T3 hücre dizisi [µg/mL]
BHD1	>500	8,33±1,53	>500
BHD2	2,17±0,29	71,67±7,64	>500
BHD3	2,83±0,29	30,67±2,31	90,0±21,79
BHD4	40,67±5,13	35,67±3,51	36,67±2,89
BHD5	>500	68,33±12,58	13,0±1,73
BHD6	18,6±3,21	>500	40,67±10,07
BHD7	>500	>500	>500
BHD8	2,33±0,29	>500	1,6±0,17
BHD9	>500	>500	>500
Cisplatin	17,0±4,36	14,0±1,41	N.D.

3.3. Erken/Geç Apoptotik ve Nekrotik Etki Testleri

3.3.1. Pozitif kontrol sisplatin, BHD1 ve BHD3 bileşiklerinin A549 hücre dizisi üzerine erken/geç apoptotik ve nekrotik etkileri

Tablo 3.5. *Anneksin V-FITC ve PI boyaması sonucu A549 hücrelerinde % canlılık.*
(Q1=Nekroz, Q2=Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4=Erken apoptoz)

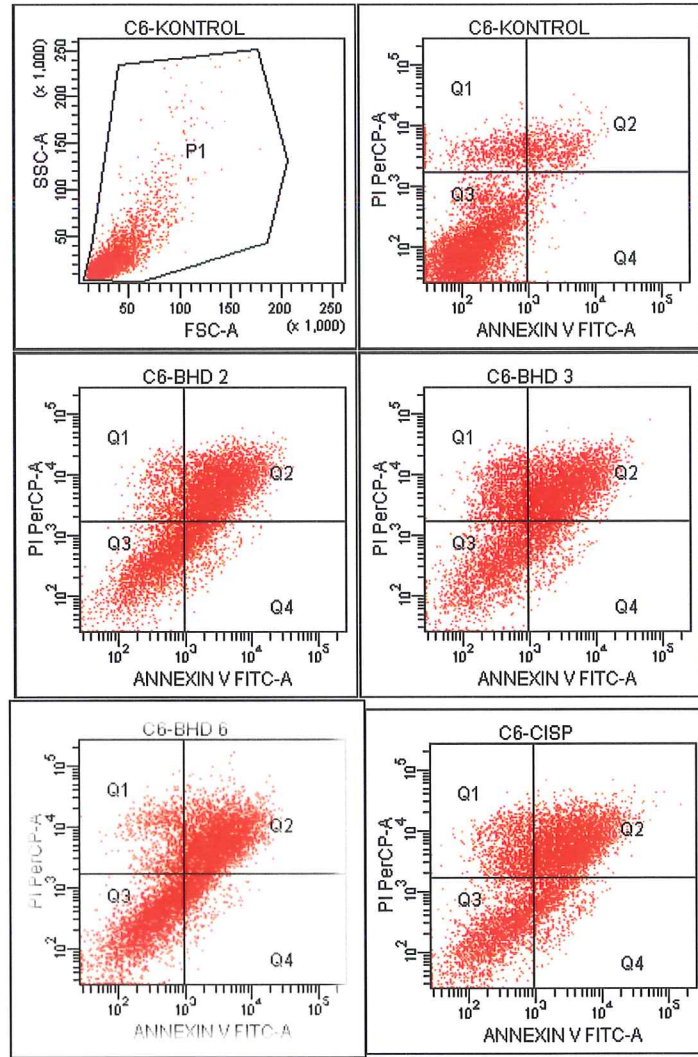
Annexin V- FITC ve PI boyama	Kontrol	Sisplatin (IC ₅₀)	BHD1 (IC ₅₀)	BHD3 (IC ₅₀)
Q1 (%)	0,1	51,1	54,8	35,3
Q2 (%)	0,0	17,2	8,4	11,5
Q3 (%)	98,2	29,8	32,4	44,9
Q4 (%)	1,8	1,9	4,4	8,3



Şekil 3.1. *A549 hücrelerinin 24 saat sonunda Anneksin V-FITC ve PI (propidyum iyodid) boyaması*

Tablo 3.6. *Anneksin V-FITC ve PI boyaması sonucu C6 hücrelerinde % canlılık (Q1=Nekroz, Q2=Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4=Erken apoptoz)*

Annexin V-FITC ve PI boyama	Kontrol	Sisplatin (IC ₅₀)	BHD2 (IC ₅₀)	BHD3 (IC ₅₀)	BHD6 (IC ₅₀)
Q1(%)	6,8	13,8	7,5	16,9	8,8
Q2(%)	6,2	50,7	51,2	49,2	48,3
Q3(%)	85,5	25,0	28,8	24,5	33,5
Q4(%)	1,6	10,5	12,6	9,4	9,5



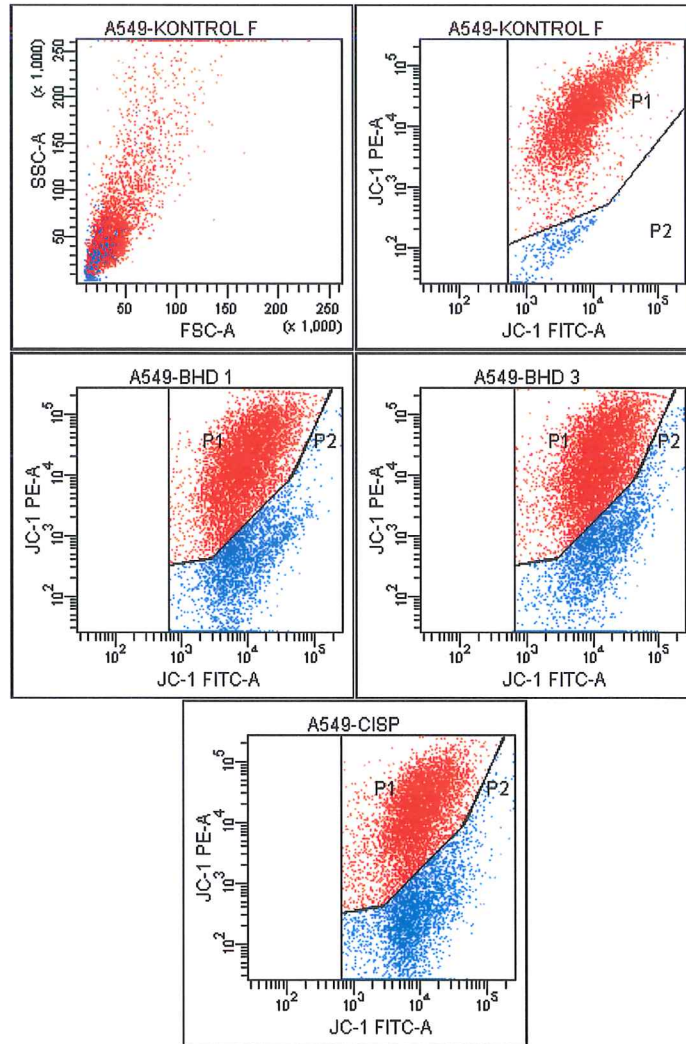
Şekil 3.2. *C6 hücrelerinin 24 saat sonunda Anneksin V-FITC ve PI (propidyum iyodid) boyaması*

3.4. Mitokondriyal Membran Potansiyeli Aktivitesi

3.4.1. Pozitif kontrol sisplatin, BHD1, BHD2, BHD3 ve BHD6 bileşiklerinin A549 ve C6 hücre dizisi üzerinde mitokondriyal membran potansiyeli aktivitesi

Tablo 3.7. JC-1 boyaması sonucu A549 hücrelerinde % canlılık. (P1=% Mitokondriyal membran polarize hücreler, P2= % Mitokondriyal membran depolarize hücreler)

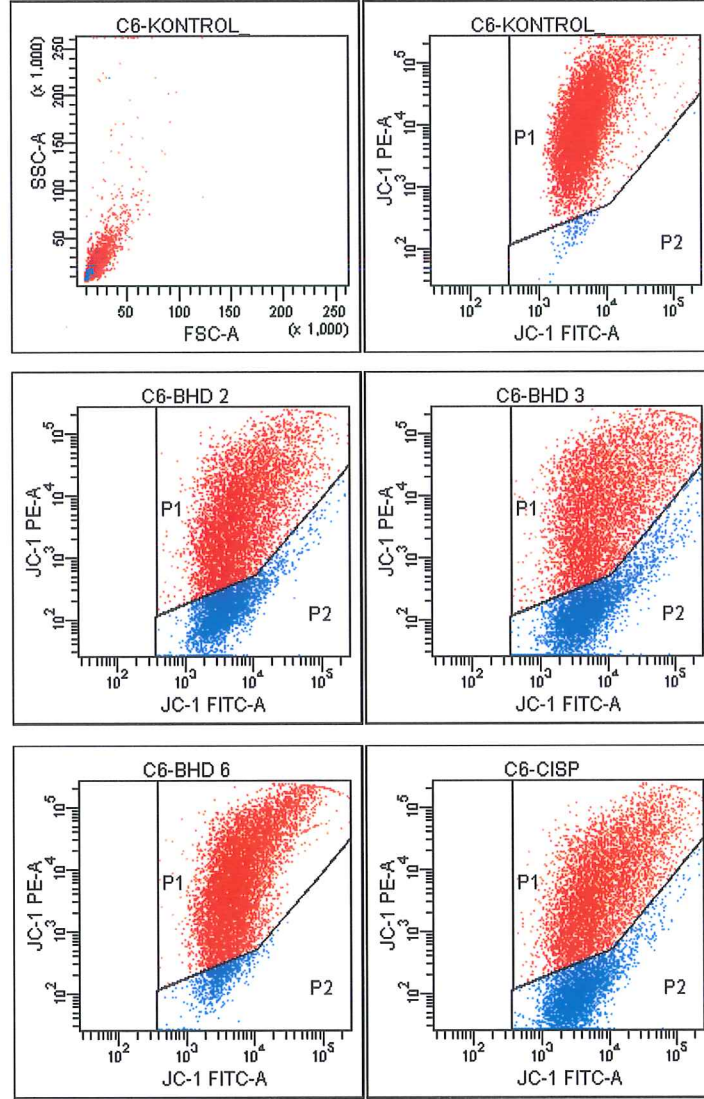
JC-1 boyama	Kontrol	Sisplatin (IC ₅₀)	BHD1 (IC ₅₀)	BHD3 (IC ₅₀)
P1 (%)	93,5	61,8	71,5	69,9
P2 (%)	5,5	34,4	27,3	28,6



Şekil 3.3. Mitokondriyal membran potansiyeli aktivitesi için A549 hücrelerinin 24 saat sonunda JC-1 boyaması

Tablo 3.8. JC-1 boyaması sonucu C6 hücrelerinde % canlılık. (P1=% Mitokondriyal membran polarize hücreler, P2= % Mitokondriyal membran depolarize hücreler)

JC-1 boyama	Kontrol	Sisplatin (IC ₅₀)	BHD2 (IC ₅₀)	BHD3 (IC ₅₀)	BHD6 (IC ₅₀)
P1 (%)	98,8	59,5	66,8	52,8	91,1
P2 (%)	1,2	39,9	33,1	47,0	8,7



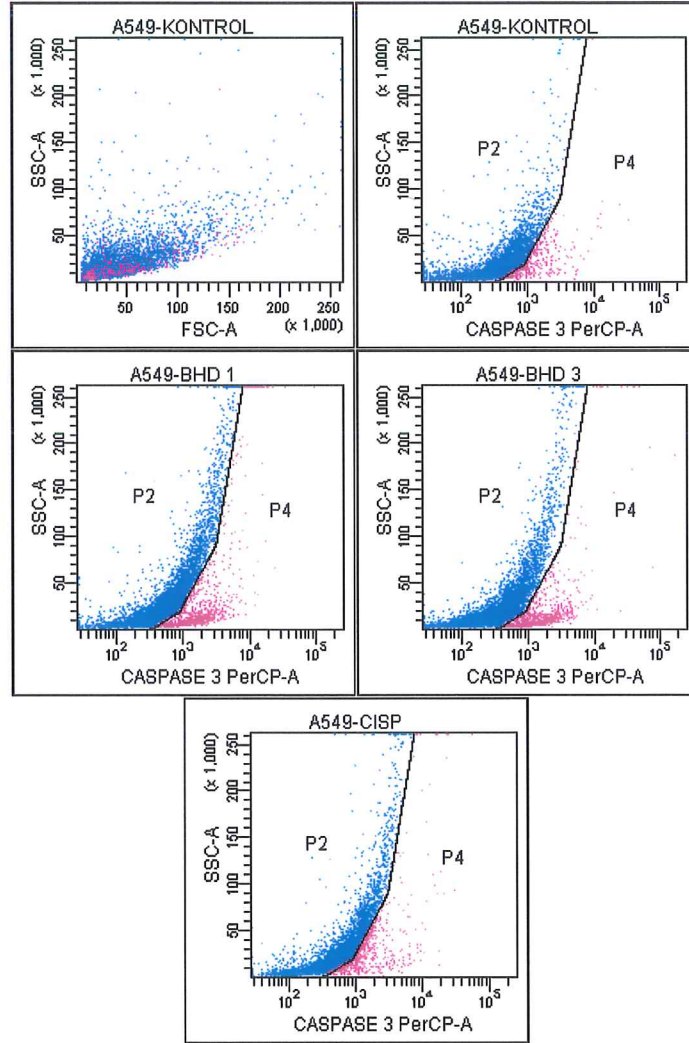
Şekil 3.4. Mitokondriyal membran potansiyeli aktivitesi için C6 hücrelerinin 24 saat sonunda JC-1 boyaması

3.5. Kaspaz-3 Aktivitesi

3.5.1. Pozitif kontrol sisplatin, BHD1, BHD2, BHD3 ve BHD6 bileşiklerinin A549 ve C6 hücre dizisi üzerinde kaspaz-3 aktivitesi

Tablo 3.9. Kaspaz-3 aktivitesi için A549 hücrelerinin 24 saat sonunda işaretlenmesi (P2=Kaspaz-3 aktivitesi negatif, P4=Kaspaz-3 aktivitesi pozitif)

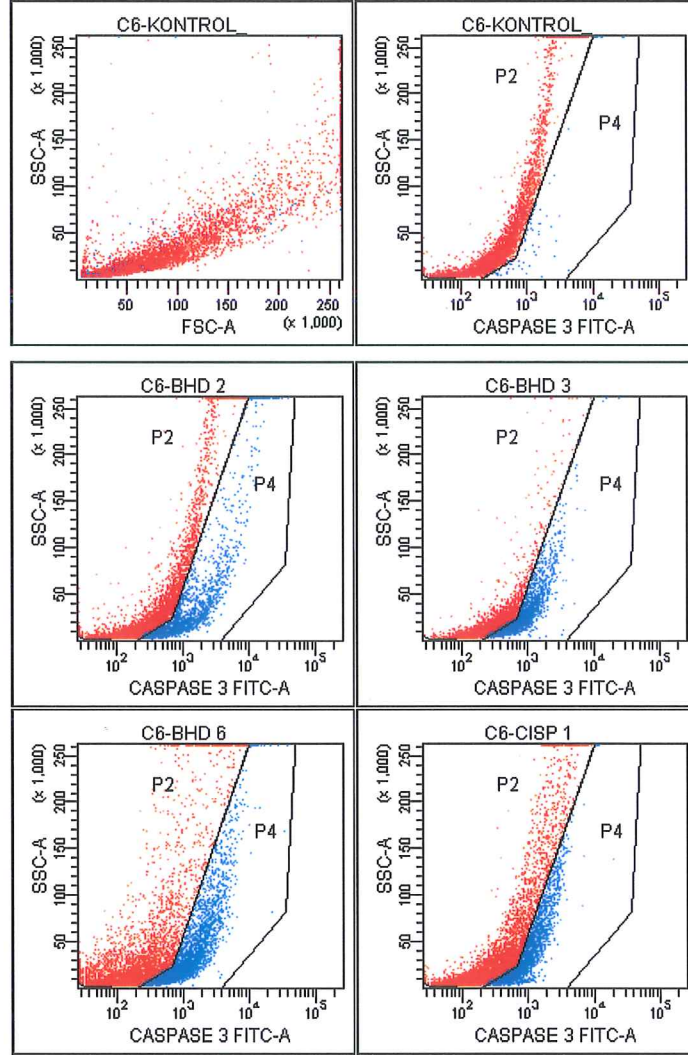
Kaspaz-3 aktivitesi	Kontrol	Sisplatin (IC ₅₀)	BHD1 (IC ₅₀)	BHD3 (IC ₅₀)
P2 (%)	96,0	91,7	90,1	89,7
P4 (%)	4,3	9,2	10,1	10,3



Şekil 3.5. Kaspaz-3 aktivitesi için A549 hücrelerinin 24 saat sonunda işaretlenmesi

Tablo 3.10. Kaspaz-3 aktivitesi için C6 hücrelerinin 24 saat sonunda işaretlenmesi
(P2=Kaspaz-3 aktivitesi negatif, P4=Kaspaz-3 aktivitesi pozitif)

Kaspaz-3 aktivitesi	Kontrol	Sisplatin (IC ₅₀)	BHD2 (IC ₅₀)	BHD3 (IC ₅₀)	BHD6 (IC ₅₀)
P2 (%)	96,1	60,9	72,1	50,0	47,6
P4 (%)	0,9	37,8	25,7	52,4	52,2



Şekil 3.6. Kaspaz-3 aktivitesi için C6 hücrelerinin 24 saat sonunda işaretlenmesi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde biyolojik olarak aktif birçok molekülün yapısında bulunan tiyazol molekülü, beş üyeli heterosiklik bir halka yapısındadır. Doğal moleküllerin önemli bir parçası olan tiamin (B1 vitamini), tiamin pirofosfat (TPP, Krebs döngüsünde solunum için önemli bir koenzim), penisilin, epotilonlar, karboksilaz ve geniş makrosiklik tiyopeptit antibiyotikler, tiyosentepton ve mikrokoksik P1 gibi önemli moleküllerin yapısında tiyazol halka yapısı bulunmaktadır (Cankılıç ve Yurttaş, 2017).

Biyolojik önemi ve halka sentezinin kolaylığından dolayı, tiyazol içeren bileşikler geniş çapta çalışılmıştır (Glotova vd., 2008; Yadlapalli vd., 2013; Yurttaş vd., 2015). Çeşitli heterosiklikler ile birleştirilen tiyazol türevlerinin; anestezik (Geronikaki ve Sotiropoulou, 1989; Geronikaki ve Theophilidis, 1992), antitüberküloz (Xiaouyun vd., 2012), antibakteriyel, antifungal (Ulusoy ve Küçükbasmacı, 2010; Ghorap ve El-Batal, 2002; Çapan vd., 1999), analjezik (Kumar vd., 2009) antikanser (Park vd., 2011) aktivitesi ve asetilkolinesteraz aktivitesinin inhibisyonu (Andreani vd., 2005) gibi etkileri biyolojik ve farmakolojik birçok çalışma ile açığa çıkarılmıştır.

Literatürde tiyazol halka sisteminin kimyası üzerine çalışmalar olduğu kadar biyolojik aktivitesi üzerine de çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Meme kanseri hücre dizilerine (MCF7, HCC1954 ve HCC1806) karşı 6,7-bis (hidroksimetil)-1H, 3H-pirrolo [1,2-c] tiyazollerin antikanser aktiviteleri incelenmiş ve 4-hidroksifenil sübstittüe edilmiş türevin HCC1806 hücre dizisine karşı en aktif bileşik olduğu bulunmuştur (Santos vd., 2014). Başka bir çalışmada ise bazı imidazol [2,1-b] tiyazol türevleri sentezlenerek bunların antikanser etkinlikleri ölçülmüştür. Bu bileşiklerden 2(a) ve 4-6(a)'nın CNS SNB 75 kanser hücre dizileri üzerinde etkili oldukları gözlenmiştir (Ali vd., 2014).

Yapılan bir çalışmada sentezlenen 1,3-tiyazol ve 1,3,4-tiyadiazollerin HepG2 (insan hepatoselüler karsinoma hücre dizisi), MCF-7 (insan meme kanseri hücre dizisi) ve A549 (insan akciğer kanser hücre dizisi) hücre dizileri üzerinde antikanser özellik gösterdikleri tespit edilmiştir (Dawood vd., 2013). Yapılan bir çalışmada sentezlenen YLT322 kodlu tiyazol türevi bileşiğinin HepG2 (insan hepatoselüler karsinoma hücre dizisi) hücre dizisi üzerinde kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunu sağlayarak dolayısıyla Bax ekspresyonunu artırarak apoptozu mitokondriyal yolak üzerinden indüklediğine dair bulgular mevcuttur (Xuejia vd., 2013). Başka bir çalışmada 4-Amino-2- arilamino-

5-indoloil/cinnamoitiazol'lerin HeLa hücre dizilerinde apoptozu indüklediğine dair bulgular elde edilmiştir. Bu bulgular analiz edildiğinde özellikle DIT3 kodlu bileşiğin HeLa hücrelerine karşı en sitotoksik bileşik olduğu (IC₅₀ 1 mM) dolayısıyla diaminoindoloiltiazollerin (DIT1e3) hücre büyümesini inhibe ettiği sonucu çıkarılmıştır (Juneja vd., 2013). Yapılan bir başka çalışmada sentezlenen 2-(2,4-disubstituted-thiazole-5-yl)-3-aryl-3H-quinazoline-4 moleküller, in vitro tahlillere dayanan bir hücre dizisinde NF-κβ ve AP-1 transkripsiyon faktörlerine karşı inhibitör aktiviteleri ve in vivo modelinde antiinflamatuvar aktiviteleri açısından ayrıca değerlendirilmiştir. 9m ve 9o kodlu bileşiklerin ikisinin de 3.3 mM'lik bir IC₅₀ ile NF-κB ve AP-1 aracılı transkripsiyonel aktivasyonu inhibe ettikleri ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca bu çalışmada 9n (IC₅₀¼ 5.5 mM) ve 9p (IC₅₀ ¼ 5.5 mM) kodlu bileşikler NF-κB aracılı transkripsiyonel aktivasyonun seçici inhibitörleri olarak, 9c (IC₅₀¼ 5.5 mM) ve 9d (IC₅₀¼ 5.5 mM) kodlu bileşikler ise AP-1'in seçici inhibitörleri olarak bulunmuştur (Giri vd., 2009). Geronikaki ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada bir dizi trimetilsiloksialkil ve trialkilsililalkil tiyazol türevi, antiinflamatuvar aktiviteleri, lipoksijenaz inhibe edici özellikleri ve sitotoksisite açısından değerlendirilmiştir (Geronikaki vd., 2007). Sharma ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada, 4-Benzyl-1,3-tiyazol türevi bileşiklerin LOX ve COX enzim inhibisyonu üzerinden antiinflamatuvar etkileri değerlendirilmiş bazı türevlerin yüksek inhibisyon gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca RS31 kodlu bileşiğin 60,8±1,45 değerinde antiinflamatuvar etkisi tespit edilmiştir (Sharma vd., 2009).

Günümüzde de yüksek biyolojik aktivitelerinden dolayı tiyazol türevi bileşiklere yoğun ilgi gösterilmektedir. Yapılan bir çalışmada sentezlenen bis-tiyazol türevi bileşiklerin A549, C6, 5RP7 H-ras ve NIH/3T3 hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılarak ayrıca bu bileşiklerin asetikolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri de değerlendirilmiş bir bileşiğin hem antikanser etki hem de DNA sentezi inhibe etkisi gözlemlenmiştir (Turan vd., 2016). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada 2-[(4-Klorobenzil) amino]-4-metil-1, 3-tiyazol-5-karboksilik asitin antidiyabetik, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri araştırılmıştır. Sentezlenen bu yeni tiyazol türevi, insüline bağımlı olmayan diabetes mellitus sıçanlarının yenidoğan modelinde 3 hafta boyunca uygulandığında kan glukoz değerini önemli ölçüde düşürdüğü, insülin seviyesini yükselttiği ve ayrıca insülin duyarlılığı seviyesini yükselttiği tespit edilmiştir. Ek olarak, bileşiklerin serum tümör

nekroz faktörü-a ve interlökin-6 seviyelerini düşürdüğü ve birkaç inflamatuvar sitokin oluşumunu da inhibe ettiği dolayısıyla güçlü bir antiinflamatuvar ve antioksidan etki değerinin olduğu açığa çıkarılmıştır (Paudel vd., 2017). Yapılan başka bir çalışmada çeşitli terapatik ajanlarda fonksiyonel gruplar olarak bilinen metiltiyazollerin hepatotoksitesisi ile mikrozomal epeksit hidrolaz enzim ekspresyonu ve indüksiyonu sıçan karaciğerinde değerlendirilmiş, düşük sitotoksite ve yüksek inhibitör etki gözlemlenmiştir (Cho ve Kim, 2000).

Bu tez çalışması kapsamında sentezlenen 4-Metiltiyazol türevi bileşikler; ilk defa sentezlenmiş olup, deneysel sonuçlardan elde edilen veriler değerlendirilerek bu bileşiklerin ilaç olma potansiyeli ve antikanser etkide rol oynayan mekanizmalar üzerindeki etkisi aydınlatılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin antikanser aktiviteleri A549 ve C6 hücre dizilerinde, antikanser aktivitenin selektivitesi ise NIH/3T3 hücre dizilerinde değerlendirilmiştir. Sitotoksik etkileri 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi kullanılarak belirlenmiştir. BHD2, BHD3 ve BHD6 kodlu bileşiklerin C6 hücre hattı üzerinde, BHD1 ve BHD3 kodlu bileşiklerin ise A549 hücre dizisi üzerinde pozitif kontrol sisplatin ile kıyaslandığında anlamlı sitotoksik etki değeri tespit edilmiştir. BHD2, BHD3 ve BHD6 kodlu bileşiklerin C6 hücre dizisi üzerinde sitotoksik etki değeri sırasıyla $2,17 \pm 0,29$, $2,83 \pm 0,29$ ve $18,6 \pm 3,21$ olarak tespit edilmiştir. Pozitif kontrol sisplatinin C6 hücre dizisi üzerinde sitotoksik etki değeri ise $17,0 \pm 4,36$ olarak tespit edilmiştir. BHD6 kodlu bileşiğin C6 hücre dizisi üzerinde sitotoksik etki değerinin pozitif kontrolün sitotoksik etki değerine daha yakın değerde olduğu görülmektedir. Bu bağlamda diğer test edilen bileşiklere ve pozitif kontrol sisplatine kıyasla BHD6 kodlu bileşiğin C6 kanserli hücre dizisinde sitotoksik etki yaparak az da olsa kanserli hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını sınırlandırdığı düşünülmektedir. BHD1 ve BHD3 kodlu bileşiklerin A549 hücre dizisi üzerinde sitotoksik etki değeri sırasıyla $8,33 \pm 1,53$ ve $30,67 \pm 2,31$ olarak tespit edilmiştir. Pozitif kontrol sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki değeri ise $14,0 \pm 1,41$ olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.4). BHD3 kodlu bileşiğin A549 hücre dizisi üzerinde sitotoksik etkisinin pozitif kontrolün sitotoksik etki değerinden dahi yüksek olduğu görülmektedir. Bu bağlamda BHD3 kodlu bileşiğin A549 kanserli hücre hattında oldukça yüksek sitotoksik etki yaptığı dolayısıyla biyolojik olarak aktif önemli bir bileşik olma potansiyeli taşıdığı sonucu elde edilmiştir.

Deneysel veriler değerlendirildiğinde BHD1 ve BHD3 kodlu bileşiklerin A549

hücre dizisi üzerinde apoptotik mekanizmayı uyardığı tespit edilmiştir (Şekil 3.1). A549 hücre dizisi üzerinde yapılan apoptotik etki deneyleri sonuçları değerlendirildiğinde BHD1 kodlu bileşiğin A549 hücre dizileri üzerinde yüzde 32,4 değerinde ve BHD3 kodlu bileşiğin ise yüzde 44,9 değerinde yüzde canlılık oranını değiştirdiği gözlemlenmiştir (Tablo 3.5). Pozitif kontrol sisplatinin ise A549 hücre dizileri üzerinde canlılık oranını yüzde 29,8 değerinde azalttığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda pozitif kontrol sisplatin ile kıyaslandığında A549 kanserli hücre dizisinde hücrelerin yaşamasının önlenmesinde BHD1 ve BHD3 kodlu bileşiklerin antikanser etkili bileşikler olduğu düşünülmektedir. C6 hücre dizisi üzerinde yapılan apoptotik etki deneyleri sonuçları değerlendirildiğinde ise BHD2, BHD3 ve BHD6 kodlu bileşiklerin C6 hücre dizisi üzerinde apoptotik mekanizmayı uyardığı tespit edilmiştir. Pozitif kontrol sisplatinin hücreleri apoptoz ölüm yolağına götürme yüzdesi 50,7 değeri baz alınır ise BHD3 kodlu bileşiğinin hücreleri apoptoza sürüklenme yüzdesi 49,2 değerinin pozitif kontrol değerine en yakın olduğu görülmektedir (Tablo 3.6). Bu bağlamda C6 kanserli hücre dizisinde kanserli hücrelerin yaşamasının önlenmesinde BHD3 kodlu bileşiğin antikanser etkili bir bileşik olduğu düşünülmektedir. Apoptotik etkili bulunan bu bileşiklerin ayrıca kaspaz-3 enzim aktivite değerinin de pozitif kontrol sisplatinin kaspaz-3 enzim aktivite değerlerine yakın değerinde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.9) (Tablo 3.10).

Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin tümünde COX-1 enzim inhibitör etki sonuçları değerlendirildiğinde 100 µM konsantrasyonda BHD3 ve BHD8 kodlu bileşiklerinin COX-1 enzimine inhibitör etkisi sırasıyla $98,11 \pm 0,56$ ve $90,47 \pm 2,14$ değerinde tespit edilmiştir. COX-1'nin selektif inhibitörü olan SC-560'ın 1 µM konsantrasyonunda ise $98 \pm 2,38$ değerinde inhibitör etki tespit edilmiştir. Bu bağlamda BHD3 ve BHD8 kodlu bileşiklerin COX-1 enzimi üzerinde diğer bileşiklere kıyasla yüksek inhibisyon yapması bu bileşiklerin antiinflamatuvar potansiyel taşıyabileceğine işaret etmektedir. Bu iki bileşik dışında test edilen diğer bileşiklerde ise COX-1 enzim inhibisyonu gözlemlenmemiştir (Tablo 3.1). COX-2'nin selektif inhibitörü olan Rofekoksib'in 10 µM konsantrasyonunda $99,45 \pm 1,72$ değerinde inhibitör etkisi tespit edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin tümünde COX-2 enzim inhibitör etki sonuçları değerlendirildiğinde 100 µM konsantrasyonda bileşik BHD2'nin $26,40 \pm 1,22$ değerinde, bileşik BHD3'ün $12,63 \pm 0,76$ değerinde, bileşik BHD5'in $28,13 \pm 0,61$ değerinde, bileşik BHD6'nın $28,35 \pm 0,30$ değerinde ve bileşik BHD8'in ise $25,75 \pm 0,91$ değerinde inhibitör

etki değeri tespit edilmiştir. Bu bağlamda bileşiklerin yüzde inhibisyon değerlerine bakıldığında test edilen doz değerinde düşük inhibitör etkiye sahip oldukları görülmektedir. Sentezlenen bu beş bileşik dışındaki diğer bileşiklerde ise COX-2 inhibisyonu gözlemlenememiştir (Tablo 3.2).

Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin LOX enzimi üzerindeki inhibitör aktivitesi deneylerinde ise LOX'un selektif inhibitörü olan NDGA'nın 20 µg/mL konsantrasyonunda 95,20±0,20 değerinde inhibitör etki değeri tespit edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin tümünde LOX enzim inhibitör etki sonuçları değerlendirildiğinde 100 µg/mL konsantrasyonda bileşik BHD3'ün 10,47±1,79 değerinde, bileşik BHD4'ün 22,43±2,02 değerinde, bileşik BHD5'in 9,16±0,59 değerinde, bileşik BHD6'nın 1,23±0,01 değerinde, bileşik BHD7'nin 35,11±2,52 değerinde ve bileşik BHD9'un ise 1,42±0,36 değerinde LOX enzimine inhibitör etki değeri tespit edilmiştir (Tablo 3.1). Bu bağlamda pozitif kontrol ile kıyaslandığında test edilen sentez bileşiklerinin LOX enzimi üzerindeki inhibisyon etkisinin çalışılan bu dozda oldukça düşük olduğu görülmektedir.

Tez kapsamında sentezlenen bileşikler 2-(süstitüe merkapt)-*N*-(4-metiltiyazol-2-il) asetamit (BHD1-9) yapısında olup, süstitüsyon olarak farklı heterosiklik halkaları içermektedirler. Bileşiklerin yapıları ve sitotoksik aktiviteleri değerlendirildiğinde beş üyeli halka taşıyanlarda aktivitenin bisiklik yapıdaki halka taşıyanlara göre daha aktif olduğu görülmüştür. Bileşiklerden benzimidazol halkası içeren BHD7 ve benzoksazol halkası içeren BHD9 bileşikleri test edilen en yüksek konsantrasyonda bile inhibisyon göstermemiş olup, en zayıf antiproliferatif aktivite gösteren bileşikler olarak belirlenmiştir. C6 glioma hücre dizisine karşı, yapısında 1-metilimidazol taşıyan BHD2, 2-tiyazolin taşıyan BHD3 ve 5-nitrobenzimidazol taşıyan BHD6 bileşikler en yüksek sitotoksik özellik göstermişlerdir. Bu durum BHD3 bileşiği için A549'a karşı da gözlenmiştir. A549 hücre hattına karşı benzotiyazol yapısını içeren BHD1 bileşiği ise en aktif olarak bulunmuş ve bu bileşiklerin selektif sitotoksikite gösterdikleri belirlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin COX-1 inhibisyon aktivitesi değerlendirildiğinde 2-tiyazolin içeren BHD3 ve 4-metil-1,2,4-triazol içeren BHD8 kodlu bileşikler pozitif kontrole yakın oranda inhibisyon göstermiş olup diğer bileşiklerde ihhibisyon etki gözlemlenmemiştir. Bu durumun küçük yapıda ve lipofilikliği diğerlerine göre daha az olan yapıların enzimle etkileşmesinden dolayı olabileceği düşünülmektedir. Küçük yapıda olan bileşiklerin hepsinde ve lipofiliklikleri hetero atomlarla azaltılmış olan

bisiklik yapılarda az da olsa inhibisyon görülmüştür. Sentezlenen bileşiklerin LOX enzimi üzerine aktivitesi değerlendirildiğinde ise 1,3,4-tiyadiazol yapısındaki BHD4 ve benzimidazol yapısındaki BHD7'nin en fazla inhibisyon yaptığı belirlenmiş fakat bu rakamlar pozitif kontrole yaklaşmamıştır. Biyolojik aktivite testlerinin sonuçları analiz edildiğinde, Anneksin V-FITC yöntemi ile ölçülen erken/geç apoptotik ve nekrotik hücre oranına, akım sitometrisi tarafından ölçülen mitokondriyal membran bütünlüğü ve kaspaz-3 aktivasyon düzeyine bakıldığında, BHD3 kodlu bileşiğin hem C6 hem de A549 hücre dizisi üzerinde pozitif kontrol sisplatine kıyasla biyolojik aktivitesi yüksek potansiyelde bir bileşik olduğu sonucu elde edilmiştir.

Sonuç olarak; bu tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen veriler analiz edildiğinde BHD3 kodlu bileşiğin test edilen bileşikler içinde en yüksek COX-1 enzim inhibisyonu gösterdiği aynı zamanda yüksek apoptotik etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Çalışmamızdan elde edilen veriler, BHD3 bileşiğinin antikanser ve antiinflamatuvar etkilerinin araştırılacağı in vivo çalışmalardan önemli bulgular elde edilebileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle, BHD3 bileşiğinin farklı biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ve ilaç olarak geliştirilebilmesi için yeni deneysel çalışmalar yapılmalıdır. Aynı zamanda BHD3 kodlu molekül baz alınarak antikanser ve antiinflamatuvar açıdan daha etkili moleküller sentezlenebilir.

KAYNAKÇA

- Adams, J. M., & Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26 (1), 61-66.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124 (4), 783-801.
- Aleem, A. M., Jankun, J., Dignam, J. D., Walther, M., Kühn, H., Svergun, D. I., & Skrzypczak-Jankun, E. (2008). Human platelet 12-lipoxygenase, new findings about its activity, membrane binding and low-resolution structure. *Journal of Molecular Biology*, 376 (1), 193-209.
- Ali, A. R., El-Bendary, E. R., Ghaly, M. A., & Shehata, I. A. (2014). Synthesis, in vitro anticancer evaluation and in silico studies of novel imidazo [2,1-b] thiazole derivatives bearing pyrazole moieties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 75, 492-500.
- Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., & Garcia-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133 (3), 945-972.
- Andreani, A., Granaiola, M., Guardigli, M., Leoni, A., Locatelli, A., Morigi, R., & Roda, A. (2005). Synthesis and chemiluminescent high throughput screening for inhibition of acetylcholinesterase activity by imidazo [2, 1-b] thiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40 (12), 1331-1334.
- Arora, D., & Jaglan, S. (2016). Nanocarriers based delivery of nutraceuticals for cancer prevention and treatment: A review of recent research developments. *Trends in Food Science & Technology*, 54, 114-126.
- Bakhle, Y. S. (1999). Structure of COX-1 and COX-2 enzymes and their interaction with inhibitors. *Drugs Today*, 35 (4-5), 237-250.
- Burt, R. K., Poirier, M. C., Link, C. J., & Bohr, V. A. (1991). Antineoplastic drug resistance and DNA repair. *Annals of Oncology*, 2 (5), 325-334.
- Brash, Alan R., Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 34 (1999): 23679-23682.
- Casanelles, E., Gozzelino, R., Marqués-Fernández, F., Iglesias-Guimaraes, V., Garcia-Belinchón, M., Sánchez-Osuna, M. & Yuste, V. J. (2013). NF- κ B activation fails to protect cells to TNF α -induced apoptosis in the absence of Bcl-xL, but not Mcl-1, Bcl-2 or Bcl-w. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833 (5), 1085-1095.
- Cankılıç, M. Y., & Yurttas, L. (2017). Study on the Antimicrobial Effects of Novel Thiazole Derivatives. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21

(3), 654-659.

- Charlier, C., & Michaux, C. (2003). Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38 (7-8), 645-659.
- Cho, M. K., & Kim, S. G. (2000). Enhanced expression of rat hepatic microsomal epoxide hydrolase by methylthiazole in conjunction with liver injury. *Toxicology*, 146 (2-3), 111-122.
- Chou, D. S., Hsiao, G., Lai, Y. A., Tsai, Y. J., & Sheu, J. R. (2009). Baicalein induces proliferation inhibition in B16F10 melanoma cells by generating reactive oxygen species via 12-lipoxygenase. *Free Radical Biology and Medicine*, 46 (8), 1197-1203.
- Çapan, G., Ulusoy, N., Ergenç, N., & Kiraz, M. (1999). New 6-phenylimidazo [2, 1-b] thiazole derivatives: Synthesis and antifungal activity. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 130 (11), 1399-1407.
- Dannhardt, G., & Kiefer, W. (2001). Cyclooxygenase inhibitors—current status and future prospects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 36 (2), 109-126.
- Dannhardt, G., & Laufer, S. (2000). Structural approaches to explain the selectivity of COX-2 inhibitors: is there a common pharmacophore. *Current Medicinal Chemistry*, 7 (11), 1101-1112.
- Dawood, K. M., Eldebss, T. M., El-Zahabi, H. S., Yousef, M. H., & Metz, P. (2013). Synthesis of some new pyrazole-based 1, 3-thiazoles and 1, 3, 4-thiadiazoles as anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 740-749.
- Dowhan, W., & Bogdanov, M. (2002). Functional roles of lipids in membranes. *New Comprehensive Biochemistry* (Vol. 36, pp. 1-35). Elsevier.
- Fang, F., Fall, K., Mittleman, M. A., Sparén, P., Ye, W., Adami, H. O., & Valdimarsdóttir, U. (2012). Suicide and cardiovascular death after a cancer diagnosis. *New England Journal of Medicine*, 366(14), 1310-1318.
- Fernandes, J. V., Cobucci, R. N. O., Jatobá, C. A. N., de Medeiros Fernandes, T. A. A., de Azevedo, J. W. V., & de Araújo, J. M. G. (2015). The role of the mediators of inflammation in cancer development. *Pathology & Oncology Research*, 21(3), 527-534.
- FitzGerald, G. A. (2007). COX-2 in play at the AHA and the FDA. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(7), 303-307.
- Flower, R. J. (2003). The development of COX2 inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(3), 179.
- Funk, C. D., Chen, X. S., Johnson, E. N., & Zhao, L. (2002). Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 68, 303-312.
- Funk, C. D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294 (5548), 1871-1875.

- Gardner, H. W. (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1084 (3), 221-239.
- Gerl, R., & Vaux, D. L. (2005). Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*, 26 (2), 263-270.
- Geronikaki, A., Hadjipavlou-Litina, D., Zablotskaya, A., & Segal, I. (2007). Organosilicon-containing thiazole derivatives as potential lipoxygenase inhibitors and anti-inflammatory agents. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2007.
- Geronikaki, A., Sotiropoulou, E., & Kourounakis, P. (1989). Synthesis of some thiazole derivatives with prospective local anaesthetic activity. *Die Pharmazie*, 44 (5), 349.
- Geronikaki, A., & Theophilidis, G. (1992). Synthesis of 2-(aminoacetyl-amino) thiazole derivatives and comparison of their local anaesthetic activity by the method of action potential. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 27 (7), 709-716.
- Ghorab, M. M., & El-Batal, A. I. (2002). Synthesis of some new thiazole derivatives. antifungal activity and ultrastructure changes of some mycotoxin producing fungi. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, 141 (2), 110-117.
- Gibbs, J. B. (2000). Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science*, 287 (5460), 1969-1973.
- Glotova, T. E., Dvorko, M. Y., Albanov, A. I., Kazheva, O. N., Shilov, G. V., & D'yachenko, O. A. (2008). 1, 3-Dipolar cycloaddition of 3-phenylamino-5-phenylimino-1, 2, 4-dithiazole to 1-acyl-2-phenylacetylenes—a new route to functionalized 1, 3-thiazole derivatives. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 44 (10), 1532-1537.
- Giri, R. S., Thaker, H. M., Giordano, T., Williams, J., Rogers, D., Sudersanam, V., & Vasu, K. K. (2009). Design, synthesis and characterization of novel 2-(2,4-disubstituted-thiazole-5-yl)-3-aryl-3H-quinazoline-4-one derivatives as inhibitors of NF- κ B and AP-1 mediated transcription activation and as potential anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (5), 2184-2189.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140 (6), 883-899.
- Güzeldemirci, N. U., & Küçükbasmacı, Ö. (2010). Synthesis and antimicrobial activity evaluation of new 1, 2, 4-triazoles and 1, 3, 4-thiadiazoles bearing imidazo [2, 1-b] thiazole moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (1), 63-68.
- Hale, A. J., Smith, C. A., Sutherland, L. C., Stoneman, V. E., Longthorne, V. L., Culhane, A. C., & Williams, G. T. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *European Journal of Biochemistry*, 236 (1), 1-26.
- Hanada, T., & Yoshimura, A. (2002). Regulation of cytokine signaling and

- inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13 (4-5), 413-421.
- Honda, K., Takaoka, A., & Taniguchi, T. (2006). Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*, 25 (3), 349-360.
- Jacquot, C., Peng, S., & van der Donk, W. A. (2008). Kinetic isotope effects in the oxidation of arachidonic acid by soybean lipoxygenase-1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18 (22), 5959-5962.
- Juneja, M., Vanam, U., Paranthaman, S., Bharathan, A., Keerthi, V. S., Reena, J. K., & Karunakaran, D. (2013). 4-amino-2-aryl-amino-5-indolyl/cinnamoylthiazoles, analogs of toposentin-class of marine alkaloids, induce apoptosis in hela cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 63, 474-483.
- Kasibhatla, S., & Tseng, B. (2003). Why target apoptosis in cancer treatment. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2 (6), 573-580.
- Keiser, K., Johnson, C. C., & Tipton, D. A. (2000). Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Endodontics*, 26 (5), 288-291.
- Kishimoto, T., Taga, T., & Akira, S. (1994). Cytokine signal transduction. *Cell*, 76 (2), 253-262.
- Korniluk, A., Koper, O., Kemon, H., & Dymicka-Piekarska, V. (2017). From inflammation to cancer. *Irish Journal of Medical Science* (1971-), 186 (1), 57-62.
- Kuhn, H., & Thiele, B. J. (1999). The diversity of the lipoxygenase family: many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Letters*, 449 (1), 7-11.
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30 (1), 16-34.
- Kumar, A., Lata, S., Saxena, K. K., & Chandra, T. (2009). Synthesis and evaluation of new substituted indolyl pyrazolines as anti-inflammatory and analgesic activities. *Indian Drugs*, 46 (9), 43-48.
- Leval, X. D., Julémont, F., Delarge, J., Pirotte, B., & Dogné, J. M. (2002). New trends in dual 5-LOX/COX inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, 9 (9), 941-962.
- Ichim, G., & Tait, S. W. (2016). A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, 16(8), 539.
- Li, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27 (48), 6194.
- Liu, C., Xu, D., Liu, L., Schain, F., Brunnstrom, A., Bjorkholm, M., ... & Sjöberg, J. (2009). 15-Lipoxygenase-1 induces expression and release of chemokines in cultured human lung epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297 (1), L196-L203.

- Lo, J. A., & Fisher, D. E. (2014). The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science*, 346 (6212), 945-949.
- Lövey, J., Nie, D., Tóvári, J., Kenessey, I., Tímár, J., Kandouz, M., & Honn, K. V. (2013). Radiosensitivity of human prostate cancer cells can be modulated by inhibition of 12-lipoxygenase. *Cancer Letters*, 335 (2), 495-501.
- Lu, X., Liu, X., Wan, B., Franzblau, S. G., Chen, L., Zhou, C., & You, Q. (2012). Synthesis and evaluation of anti-tubercular and antibacterial activities of new 4-(2, 6-dichlorobenzyloxy) phenyl thiazole, oxazole and imidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 164-171.
- Luo, C., He, M. L., & Bohlin, L. (2005). Is COX-2 a perpetrator or a protector? Selective COX-2 inhibitors remain controversial. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26 (8), 926.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436.
- Matt, S., & Hofmann, T. G. (2016). The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73 (15), 2829-2850.
- Medvedev, A. E., Sabroe, I., Hasday, J. D., & Vogel, S. N. (2006). Invited review: Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. *Journal of Endotoxin Research*, 12 (3), 133-150.
- Metcalfe, D. D., Baram, D., & Mekori, Y. A. (1997). Mast cells. *Physiological Reviews*, 77 (4), 1033-1079.
- Miralinaghi, P., Salimi, M., Amirhamzeh, A., Norouzi, M., Kandelousi, H. M., Shafiee, A., & Amini, M. (2013). Synthesis, molecular docking study, and anticancer activity of triaryl-1,2,4-oxadiazole. *Medicinal Chemistry Research*, 22 (9), 4253-4262.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., & Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, 9 (6), 1799-1805.
- Morgan, L. T., Thomas, C. P., Kühn, H., & O'Donnell, V. B. (2010). Thrombin-activated human platelets acutely generate oxidized docosahexaenoic-acid-containing phospholipids via 12-lipoxygenase. *Biochemical Journal*, 431 (1), 141-148.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2), 55-63.
- Murphy, D. J., & Vance, J. (1999). Mechanisms of lipid-body formation. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(3), 109-115.
- Nair, D. G., & Funk, C. D. (2009). A cell-based assay for screening lipoxygenase inhibitors. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 90 (3-4), 98-104.

- Osiri, M., & Moreland, L. W. (1999). Specific cyclooxygenase 2 inhibitors: a new choice of nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy. *Arthritis Care & Research*, 12 (5), 351-362.
- 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. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46 (12), 5769-5777.
- Paudel, Y. N., Ali, M. R., Shah, S., Adil, M., Akhtar, M. S., Wadhwa, R., Sharma, M. (2017). 2-[(4-Chlorobenzyl) amino]-4-methyl-1, 3-thiazole-5-carboxylic acid exhibits antidiabetic potential and raises insulin sensitivity via amelioration of oxidative enzymes and inflammatory cytokines in streptozotocin- induced diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 651-659.
- Poeckel, D., & Funk, C. D. (2010). The 5-lipoxygenase/leukotriene pathway in preclinical models of cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 86 (2), 243-253.
- Porta, H., & Rocha-Sosa, M. (2001). Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event. *Microbiology*, 147 (12), 3199-3200.
- Radmark, O. P. (2000). The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(supplement_1), S11-S15.
- Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 157 (5), 1415-1430.
- Rossé, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., & Borner, C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 391 (6666), 496.
- Ryn, J. V., Trummelitz, G., & Pairet, M. (2000). COX-2 selectivity and inflammatory processes. *Current Medicinal Chemistry*, 7 (11), 1145-1161.
- Santos, K., Laranjo, M., Abrantes, A. M., Brito, A. F., Gonçalves, C., Ribeiro, A. B. S., & e Melo, T. M. P. (2014). Targeting triple-negative breast cancer cells with 6, 7-bis (hydroxymethyl)-1H, 3H-pyrrolo [1,2-c] thiazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 79, 273-281.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., & Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO- 1/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal*, 17 (6), 1675-1687.
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, 140 (6), 821-832.
- Sciulli, M. G., Capone, M. L., Tacconelli, S., & Patrignani, P. (2005). The future of traditional nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of inflammation and pain. *Pharmacological Reports*, 57, 66.
- Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., & de Jong, S. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of*

Histochemistry & Cytochemistry, 52 (6), 821-831.

- Sharma, R. N., Xavier, F. P., Vasu, K. K., Chaturvedi, S. C., & Pancholi, S. S. (2009). Synthesis of 4-benzyl-1, 3-thiazole derivatives as potential anti-inflammatory agents: an analogue-based drug design approach. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24 (3), 890-897.
- Shureiqi, I., Chen, D., Lotan, R., Yang, P., Newman, R. A., Fischer, S. M., & Lippman, S. M. (2000). 15-Lipoxygenase-1 mediates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis independently of cyclooxygenase-2 in colon cancer cells. *Cancer Research*, 60 (24), 6846-6850.
- Shureiqi, I., Wu, Y., Chen, D., Yang, X. L., Guan, B., Morris, J. S., ... & Lynch, P. (2005). The critical role of 15-lipoxygenase-1 in colorectal epithelial cell terminal differentiation and tumorigenesis. *Cancer Research*, 65 (24), 11486-11492.
- Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R., Silverman, R. H., & Schreiber, R. D. (1998). How cells respond to interferons.
- Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., & Schlemper, R. J. (2001). Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *New England Journal of Medicine*, 345 (11), 784-789.
- Ulukaya, E., Colakogullari, M., & Wood, E. J. (2004). Interference by anti-cancer chemotherapeutic agents in the MTT-tumor chemosensitivity assay. *Chemotherapy*, 50 (1), 43-50.
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140 (6), 805-820.
- Taneja, N., Tjalkens, R., Philbert, M. A., & Rehemtulla, A. (2001). Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. *Oncogene*, 20 (2), 167.
- Thompson, M. P., & Kurzrock, R. (2004). *Epstein-Barr virus and cancer*. *Clinical Cancer Research*, 10 (3), 803-821.
- Turan-Zitouni, G., Altıntop, M. D., Özdemir, A., Kaplancıklı, Z. A., Çiftçi, G. A., & Temel, H. E. (2016). Synthesis and evaluation of bis-thiazole derivatives as new anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 107, 288-294.
- Turini, M. E., & DuBois, R. N. (2002). Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annual Review of Medicine*, 53 (1), 35-57.
- Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl- 2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria. *Genes to Cells*, 3 (11), 697-707.
- Yadlapalli, R. K., Chourasia, O. P., Jogi, M. P., Podile, A. R., & Perali, R. S. (2013). Design, synthesis and in vitro antimicrobial activity of novel phenylbenzamido-aminothiazole-based azasterol mimics. *Medicinal Chemistry Research*, 22 (6), 2975-2983.
- Yiu, S. S., Zhao, X., Inscho, E. W., & Imig, J. D. (2003). 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid participates in angiotensin II afferent arteriolar vasoconstriction by activating L-type calcium channels.

Journal of Lipid Research, 44(12), 2391-2399.

- Yurttas, L., Özkay, Y., Karaca Gençer, H., & Acar, U. (2015). Synthesis of some new thiazole derivatives and their biological activity evaluation. *Journal of Chemistry*, 2015.
- Vane, J. R., & EE, A. (2003). botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res*, 110, 255-258.
- Verma, A., & Saraf, S. K. (2008). 4-Thiazolidinone—A biologically active scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43 (5), 897-905.
- Wang, D., & DuBois, R. N. (2006). Prostaglandins and Cancer. *Gut*, 55 (1), 115-122.
- Wang, J., Beauchemin, M., & Bertrand, R. (2011). Bcl-xL phosphorylation at Ser49 by polo kinase 3 during cell cycle progression and checkpoints. *Cellular Signalling*, 23 (12), 2030-2038.
- Weedon, D. D., Shorter, R. G., Ilstrup, D. M., Huizenga, K. A., & Taylor, W. F. (1973). Crohn's disease and cancer. *New England Journal of Medicine*, 289 (21), 1099-1103.
- Wong, B. C. Y., Wang, W. P., Cho, C. H., Fan, X. M., Lin, M. C. M., Kung, H. F., & Lam, S. K. (2001). 12-Lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells. *Carcinogenesis*, 22 (9), 1349-1354.
- Zuo, X., Peng, Z., Wu, Y., Moussalli, M. J., Yang, X. L., Wang, Y., & Shureiqi, I. (2012). Effects of gut-targeted 15-LOX-1 transgene expression on colonic tumorigenesis in mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 104 (9), 709-716.

