



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN NİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BİR DİZİ SÜLFONAMİDO BENZOKSAZOL
TÜREVİ BİLEŞİĞİN *İN VİTRO* ANTİKANSER
AKTİVİTELERİ VE YAPI - AKTİVİTE
İLİŞKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Esra Sultan ÇELİK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Haziran-2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Esra Sultan ÇELİK

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİR DİZİ SÜLFONAMİDO BENZOKSAZOL TÜREVİ BİLEŞİĞİN *İN VİTRO* ANTİKANSER AKTİVİTELERİ VE YAPI - AKTİVİTE İLİŞKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Esra Sultan ÇELİK

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Egemen FOTO

2022, 81 Sayfa

Jüri

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Egemen FOTO

Prof. Dr. Esra MARTİN

Doç. Dr. İdris SARGIN

Benzazol halka sistemi olarak geliştirilen benzoksazol; nükleik asitler, proteinler, vitaminler gibi biyolojik sistemlerdeki organik bileşiklerle kolaylıkla etkileşime girebildiği ve nükleik asit bazlarına olan yapısal benzerliğinden dolayı antikanser ajan olarak kullanılabilir. Bu çalışmada, yeni antikanser ajan geliştirmek amacıyla, yapısı gereği antikanser olarak aktif olabileceği düşünülen bir grup sülfonamido benzoksazol türevi bileşik sentezlenmiştir. Antikanser aktivite testleri; insan karaciğer kanseri hücresi (A549), insan meme kanseri hücresi (MCF7), sıçan glial tümör hücresi (C6) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca test bileşiklerinin sağlıklı hücreler üzerindeki etkileri ise fare bağ doku fibroblast hücresi (L929) hücre serisi kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre; TN1, TN2, TN10, TN12 bileşiklerinin sitotoksik etkilerinin L929 hücre hattında en yüksek olduğu görülmüştür. TN3 bileşiğinin sitotoksik etkisinin C6 hücre hattında en yüksek olduğu görülmüştür. TN4 bileşiğinin sitotoksik etkisinin L929, A549 hücre hatlarında en yüksek olduğu görülmüştür. TN5, TN6, TN11, TN13, TN14 bileşiklerinin sitotoksik etkilerinin MCF7 hücre hattında en yüksek olduğu görülmüştür. L929 hücre hattı için en etkili bileşiğin 8,64 μM IC_{50} değeri ile TN1 bileşiği olduğu bu değer pozitif kontrol bileşiği etoposidin 24,99 μM olan IC_{50} değerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. MCF7 hücre hattı için en etkili bileşiğin 18,66 μM IC_{50} değeri ile TN13 bileşiği olduğu bu değer pozitif kontrol bileşiği etoposidin 39,47 μM olan IC_{50} değerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. C6 hücre hattı için en etkili bileşiğin 4,01 μM IC_{50} değeri ile TN3 bileşiği olduğu bu değer pozitif kontrol bileşiği etoposidin 4,01 μM olan IC_{50} değeriyle aynı olduğu görülmüştür. A549 hücre hattı için en etkili bileşiğin 17,92 μM IC_{50} değeri ile TN4 bileşiği olduğu bu değer pozitif kontrol bileşiği etoposidin 32,49 μM olan IC_{50} değerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Test bileşiklerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla SRB (sülforodamin B testi) yöntemi uygulanmıştır. Tez kapsamında elde edilen biyolojik aktivite verileri ve bileşiklerin yapı aktivite ilişkileri değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antikanser, Sitotoksisite, Sülfonamido Benzoksazol, Sülforodamin B Testi (SRB)

ABSTRACT

MS THESIS

Evaluation of *in vitro* Anticancer Activities and Structure-Activity Relationships of a Series of Sulfonamido Benzoxazole Derivatives

Esra Sultan ÇELİK

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE BIOTECHNOLOGY**

Advisor: Asst. Prof. Egemen FOTO

2022, 81 Pages

Jury

Advisor: Asst. Prof. Egemen FOTO

Prof. Dr. Esra MARTİN

Assoc. Prof. İdris SARGIN

Benzocazole, developed as a benzazol ring system, can be used as an antibody agent because it can easily interact with organic compounds in biological systems such as nucleic acids, proteins, vitamins, and because of its structural resemblance to nucleic acid bases. In this study, a group of sulfonamido benzoxazole derivative compound synthesized in order to develop new antibody agents, which is thought to be active as antibodies by nature. The synthesis of the compounds is carried out according to the methods of literature. The antiquated activity tests were performed on the human liver cancer cell (A549), the human breast cancer cell (MCF7), the rat glial tumor cell (C6). In addition, the effects of test compounds on healthy cells were determined using the mouse bag tissue fibroblast cell (L929) cell series. According to this; The cytotoxic effects of TN12, TN2, TN10, TN12 owners are thought to be highest in L929 cell line. It was accepted that cytotoxic 1 of TN3 strain is highest in C6 cell line. The cytotoxic example of TN4 well is thought to be highest in L929, A549 cell images. The cytotoxic effects of TN5, TN6, TN11, TN13, TN14 lines are thought to be highest in MCF7 cells. It is seen that the most effective IC50 value and TN1 value with 8, 64 μ M value for L9 cell29 line, and this value is higher than the 24.99 μ M IC50 value of the positive control etoposide. For the MCF cell7 line, the most effective is TN13 with an IC50 value of 18.66 μ M and a TN13 value, which seems to be higher than the 39.47 μ M IC50 value of the positive control etoposide. The most effective for the C6 cell line is counted as TN3, with an effective value of 4.01 μ M. It is seen that the most effective IC50 value and TN4 value for the A5 cell line is 17.92 μ M with the TN4 IC50 value, which is higher than the 32.49 μ M IC50 value of the positive control etoposide. The SRB (sulphorham B test) method has been applied to determine the sitotoxic effects of test compounds. The biological activity data and structure activity relationships of the compounds obtained within the thesis were evaluated.

Keywords: Anticancer, Cytotoxicity, Sulfonamido Benzoxazole, Sulforhodamine B Test (SRB)

ÖNSÖZ

Dünyanın salgınla savaştığı böyle bir dönemde; bilimle ilgilenmek, bilim adına ufak da olsa katkıda bulunabilecek bir şeyler yapmak benim için çok kıymetli. Biyoteknoloji, çok inandığım ve ülkemde de hak ettiği değeri görmesini sabırsızlıkla beklediğim bir alan. Severe okuduğum bu alanın yüksek lisans derecesini de alacak olmak benim için büyük bir onur. Dilerim Antikanser aktivite çalışmaları her zaman desteklenir ve yardıma ihtiyacı olan insanlara şifa olarak döner.

Bu yolda her zaman yanımda olan, hem danışman hem yol gösteren bir abi olarak yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Egemen FOTO 'ya çok teşekkür ederim. Hayata başka bir pencereden bakıp, yolumu çizmeme yardımcı olmuştur, minnettarım.

Yolumu her zaman aydınlatan, en büyük destekçim Okan ÖLMEZ' e ve dostluğu kalbimi diri tutan canım kardeşim Nevin YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Değerli aile üyelerime, en çok da annem sevgili Canan ÇELİK' e çok şey borçluyum. Benim yürüdüğüm yola benden çok inandığı ve dualarıyla her zaman yanımda olduğu için teşekkür ederim. Babam Hulusi ÇELİK'e gölgesinde dinlenmeme fırsat veren bir çınar olduğu için, kardeşim Berkay ÇELİK'e ise yükümü hafiflettiği ve her zaman yanımda olduğu için tüm kalbimle teşekkür ederim.

Esra Sultan ÇELİK

KONYA-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Kanser Nedir?.....	3
2.2.1. Kanserin Mekanizması.....	4
2.2.2. Kanser Nasıl Oluşur?.....	6
2.2.3. Kanser Tedavi Yöntemleri.....	8
2.3. Heterosiklik Bileşikler.....	11
2.4. Sülfonamido Benzoksazol Türevi Bileşikler.....	12
2.4.1. Benzoksazol Halkasının Önemi.....	12
2.4.2. Benzoksazol Yapısı, Türevleri, Farklı Aktiviteleri.....	13
2.4.3. Benzoksazol Türevi Bileşiklerin Biyolojik Aktivitesi.....	16
2.4.4. Sülfonamido Benzoksazol.....	18
2.5. Yapı-Aktivite İlişkileri.....	20
2.5.1. Moleküler Modelleme Teknikleri.....	20
2.5.2. Hedef Bazlı Tasarım.....	21
2.5.3. Efektör Bazlı Tasarım.....	22
2.6. Hücre Kültürü.....	24
2.6.1. Hücre Kültürü Yöntemi Nedir?.....	24
2.6.2. Hücre Kültürü Çeşitleri.....	24
2.6.3. Tümör Hücre Kültürü Modeli.....	25
2.6.4. Hücre Kültürünün Avantajları-Dezavantajları.....	26
2.7. İn vitro Sitotoksikite Testleri.....	28
2.7.1. Sülforodamin B (SRB) Testi.....	30
3. MATERYOL VE METOT.....	32
3.1. Test Edilen Bileşikler.....	32
3.2. Çalışmada Kullanılan Bileşiklerin Hazırlanması.....	34
3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	34
3.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	35
3.3.2. Kültür Ortamının Hazırlanması ve Hücre Dizilerinin Çoğaltılması.....	35
3.3.3 Hücrelerin Pasajlanması.....	35

3.3.4. Tripan Mavisi Ekstraksiyon Testi ile Canlı Hücre Sayımı.....	36
3.3.5. Hücrelerin Dondurularak Saklanması.....	36
3.4. Sülforodamin B (SRB) Testi.....	37
3.4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	38
3.4.2. Yöntemin Aşamaları.....	38
3.4.2.1 Hücrelerin Hazırlanması.....	38
3.4.2.2. Fiksasyon ve Boyama.....	39
3.4.2.3. Spektrofotometrik Ölçüm ve Analiz.....	39
3.4.2.4. İstatistiksel Analizler.....	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	41
4.1. Sülforodamin B (SRB) Testine Ait Sonuçlar.....	41
4.1.1. Çalışmada Test Edilen Bileşiklerin A549 Hücreleri Üzerindeki AntikanserEtkileri.....	41
4.1.2. Çalışmada Test Edilen Bileşiklerin C6 Hücreleri Üzerindeki AntikanserEtkileri.....	47
4.1.3.Çalışmada Test Edilen Bileşiklerin MCF7 Hücreleri Üzerindeki AntikanserEtkileri.....	53
4.1.4. Çalışmada Test Edilen Bileşiklerin L929 Hücreleri Üzerindeki AntikanserEtkileri.....	60
4.1.5. Çalışmada Test Edilen Bileşiklerin Hücreler Üzerindeki AntikanserEtkilerine Ait Toplu Değerlendirme.....	66
4.2. Tartışma.....	70
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	74
5.1 Sonuçlar	74
5.2 Öneriler	75
KAYNAKLAR.....	76

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
2.1. TÜİK ölüm nedeni istatistikleri.....	<u>4</u>
2.2. Benign tümör.....	<u>5</u>
2.3. Malign tümör.....	<u>5</u>
2.4. Hücre siklusu.....	<u>6</u>
2.5. Normal hücre bölünmesi.....	<u>8</u>
2.6. Kanserli hücre bölünmesi.....	<u>8</u>
2.7. Birden fazla halka bulunduran heterosiklik bileşikler.....	<u>11</u>
2.8. Benzoksazol halka yapısı.....	<u>12</u>
2.9. Çeşitli biyolojik aktivite gösteren benzoksazol türevleri.....	<u>14</u>
2.10. Yüksek lisans tezi kapsamında sentezlenmesi tasarlanan bileşikler.....	<u>19</u>
2.11. Rasyonel ilaç etken madde tasarım yöntemleri.....	<u>21</u>
2.12. MTT, XTT ve MTS bileşiklerinin kimyasal yapıları.....	<u>29</u>
2.13. SRB testinin uygulanışı.....	<u>31</u>
3.1. Tripın mavisi ekstraksiyon testi.....	<u>36</u>
3.2. SRB testi sonrası plak düzeni ve görünümü.....	<u>39</u>

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

3.1. Çalışmada test edilen sülfonamido benzoksazol türevi bileşiklerin kimyasal özellikleri.....	32
4.1. TN1 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB test sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	41
4.2. TN2 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB test sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	42
4.3. TN3 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	42
4.4. TN4 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	43
4.5. TN5 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	43
4.6. TN6 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	44
4.7. TN10 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	44
4.8. TN11 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	45
4.9. TN12 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	45
4.10. TN13 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	46
4.11. TN14 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	46
4.12. TN1 bileşiğinin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	47
4.13. TN2 bileşiğinin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	47

4.14. TN3 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçlar ve doz cevap eğrisi.....	48
4.15. TN4 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçlar ve doz cevap eğrisi.....	48
4.16. TN5 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçlar ve doz cevap eğrisi.....	49
4.17. TN6 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçlar ve doz cevap eğrisi.....	49
4.18. TN10 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	50
4.19. TN11 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	50
4.20. TN12 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	51
4.21. TN13 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	51
4.22. TN14 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	52
4.23. Etoposid bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	52
4.24. Çalışmada test edilen bileşiklerin MCF7 hücreleri üzerindeki antikanser etkileri.....	53
4.25. TN1 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	54
4.26. TN2 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	54
4.27. TN3 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	55
4.28. TN4 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	55
4.29. TN5 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	56
4.30. TN6 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	56

4.31. TN10 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	57
4.32. TN11 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	57
4.33. TN12 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	58
4.34. TN13 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	58
4.35. TN14 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	59
4.36. Etoposid bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	59
4.37. TN1 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	60
4.38. TN2 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	61
4.39. TN3 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	61
4.40. TN4 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	62
4.41. TN5 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	62
4.42. TN6 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	63
4.43. TN10 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	63
4.44. TN11 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	64
4.45. TN12 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	64
4.46. TN13 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	65

4.47. TN14 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	65
4.48. Etoposid bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi.....	66
4.49. Tez çalışmasında kullanılan sülfonamido benzoksazol türevlerinin C6, MCF7, A549 ve L929 hücreleri üzerindeki <i>in vitro</i> antikanser etkilerine ait SRB testinden elde edilen toplu sonuçları.....	69

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

M : mikron
°C : santigrad
g: Gram
kg: Kilogram

Kısaltmalar

ACAE: Akarboz eşdeğeri
AChE: Asetilkolinesteraz
AFLP: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Poliformizmi
ATCC: Amerikan Tipi Hücre Koleksiyonu
A549: İnsan Karaciğer Kanseri Hücresi
BchE: Bütirilkolinesteraz
C6: Sıçan Glial Tümör Hücresi
DMEM: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO: Dimetil sülfoksit
DOPA: Dihidroksi fenilalanin
DPPH: 2.2.-Difenil-1-pikrihidrazil
FBS: Fetal Bovine Serum
FCM: Akış Sitometri
FID: Alev İyonizasyon Dedektörü
GALAE: Galatamine eşdeğeri
GC: Gaz Kromatografisi
HCl: Hidroklorikasit
HEK: İnsan Normal Embriyonik Böbrek Hücreleri
HeLa: Serviks Adenokarsinoma Hücre Hattı,
Hep-G2: Hepatoselüler Karsinom Hücre Hattı
HIV: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
IC50: Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonu
JET 3: Koriokarsinom Hücreleri
KAE: Kojik Asit Eşdeğeri
KYSE: İnsan Asya Yassı Epitel Hücreli Karsinomu Hücre Hattı
L929: Fare Bağ Doku Fibroblast Hücresi
MCF7: İnsan Meme Kanseri Hücresi
SRB: Sülfürodamin B Testi
TCA: Trikloroasetik Asit

1. GİRİŞ

Günümüzde ilaç tasarımıyla ilgili çalışmaların odak noktası olarak antimikrobiyal ajanlar ile antikanser ajanlar gösterilmektedir. Bunun en büyük nedenleri terapide kullanılan, yüksek etkili olarak görülen ve umut vadeden ilaçlara karşı zamanla organizmaların geliştirmiş olduğu direnç mekanizmaları ile toksik yan etkileri gösterilmektedir. Bu nedenle literatüre bakıldığında her geçen gün yeni bileşiklerin ilaç ön maddesi olarak tasarlandığı ve biyolojik etkisi açısından değerlendirildiği görülmektedir. Benzoksazol halka sistemi olarak geliştirilen benzimidazol, benzotiyazol, benzoksazol bileşiklerinin heterosiklik yapılarından dolayı nükleik asitler, proteinler, vitaminler gibi biyolojik sistemlerdeki organik bileşiklerle kolaylıkla etkileşime girebildikleri uzun yıllardır bilinmektedir. (Turker ve ark., 1990) Bu nedenle de ilaç tasarımı çalışmalarında oldukça ilgi gören türevlerdir.

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda, antimikrobiyal ve antitümöral aktiviteye sahip olabileceği düşünülen yeni benzoksazol türevleri sentezlenmiştir. Bu bileşikler antimikrobiyal açıdan değerlendirilmiş ve bazı dirençli suşlar üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Ertan-Bolelli ve ark., 2017). Tez çalışması kapsamında sentezi yapılmış ve yalnızca antimikrobiyal etkileri açısından değerlendirilmiş 11 adet sülfonamido benzoksazol türevi bileşiğin *in vitro* antikanser aktiviteleri ve yapı-etki ilişkileri değerlendirilmiştir. Böylece kanser terapilerinde kullanılabilecek çok yönlü ilaç ön maddelerinin saptanması ve bu çalışmalar ışığında bileşiklerin yapı etki analizleri ile birlikte daha etkin bileşiklerin tasarlanabilmesi hedeflenmektedir.

Tez çalışmasının amacı, yapısı gereği antikanser olarak aktif olabileceği düşünülen bir grup sülfonamido benzoksazol türevi bileşiğin biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesidir. Heterosiklik bileşiklerin vücuttaki organik moleküllere olan yapısal benzerliği nedeniyle biyolojik sistemlerdeki çeşitli moleküller için uygun hedefler olabileceği bilinmektedir. Test edilen benzoksazol türevi bileşiklerin de nükleik asitlerin yapısına katılan organik bazlara olan benzerliği nedeniyle özellikle DNA ve RNA ile ilgili süreçlerde işe karışan molekülleri hedefleyebileceğine dair bulgulara rastlanmaktadır (Gautam ve ark., 2012; Demmer ve Bunch, 2015). Bu nedenle özellikle antikanser süreçlerde rol oynayan ajanların tasarımında bu tür moleküllere yer verilmektedir.

Literatürde antikanser yolakları etkileyen ve antikanser ajan tasarımlarında kullanılan çeşitli benzoksazol türevlerinin biyolojik aktiviteleriyle ilgili çalışmalar rapor edilmiştir (Gautam ve ark., 2012; Lokwani ve ark., 2011).

Tez çalışması kapsamında antikanser aktivitesi açısından daha önce değerlendirilmemiş bu bileşiklerin memeli hücre kültürleri üzerinde sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi, böylece biyolojik aktivitelerinin çok yönlü olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Antikanser aktivitesi değerlendirilen bileşiklerin kanser hücrelerini ölüme götürmesi temel amaçtır. Bu nedenle ilk aşamada bu bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri belirlenmiştir. Bununla birlikte normal dokulara daha az zarar veren bir antikanser ajan seçiciliği açısından tercih edilmektedir. Bu nedenle çalışmada bileşiklerin sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri de belirlenmiştir. Sonuç olarak elde edilen biyolojik aktivite verileri incelenerek bileşiklerin yapı-aktivite ilişkileri değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser Nedir?

Kanser hakkındaki ilk belgeler Mısır papirüslerinde bulunmuştur. İnsan kanserleri ile ilgili en eski örnek, Mısır'da M.Ö. 1600-1900 yılları arasında bir kadına ait kafatası iskeleti kalıntısında görülmüştür (Tektemur, 2020). Hipokrat, tümörün görünümünü yengece benzettiği için yengecin İngilizcesi olan 'cancer' kelimesini tümörü tanımlamak için kullanmıştır (Berk, 2014).

Kanser, hücrenin genetik materyalinde meydana gelen hasarların birikmesi sonucu hücrelerin düzensiz olarak çoğalmasıyla ortaya çıkan hastalıklar grubuna verilen genel addır. En fazla ölüme neden olan hastalıklardan biridir. Ölümcül hastalıklarda kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırada gelmektedir (Majidova, 2020).

Hücrelerin bölünmesi genlerin kontrolü altında olduğundan dolayı kanser de temelde genlerle ilişkili olan bir hastalıktır. DNA da biriken hasarlar kanserleşmeye neden olduğuna göre DNA da da hasar birikmesine neden olan birçok olay vardır. Bunlar:

- Hücresel metabolizmada meydana gelen hasarlar
- DNA onarımı sırasında meydana gelen hatalar
- DNA eşlenmesi sırasında ortaya çıkan hatalar
- Zararlı kimyasal maddelerin yarattığı zararlar
- Programlı hücre ölümünün engellenmesi
- Hücre bölünmesinin durdurulması
- Ultraviyole ışınları

Kanser; kişinin metabolizmasına, bağışıklığına, hücresel yapısına göre değişen bir hastalıktır. Çünkü her insanın DNA yapısı farklıdır. Bu da hastalığın ilerleyişinde ve tedavi yöntemlerinde farklılıklar olmasının sebebidir (Baykara, 2016).

Türkiye’de sağlıkla ilgili en son analiz edilen verilere bakıldığında (2017-2018) kanserden gerçekleşen ölümlerin ikinci sırada olduğu görülmektedir. Bu durum da kanserin ne kadar ciddi bir hastalık olduğunun göstergesidir.

	2017 ⁽¹⁾		2018	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Toplam	423 878	100,0	421 164	100,0
Dolaşım sistemi hastalıkları	167 267	39,5	161 920	38,4
<u>İyi huylu ve kötü huylu tümörler (benign ve malign neoplazmlar)</u>	81 886	19,3	83 163	19,7
Solunum sistemi hastalıkları	50 224	11,8	52 568	12,5
Sinir sistemi ve duyu organları hastalıkları	20 623	4,9	20 766	4,9
Endokrin (iç salgı bezi), beslenme ve metabolizmayla ilgili hastalıklar	20 219	4,8	20 074	4,8
Dışsal yaralanma nedenleri ve zehirlenmeler	21 533	5,1	18 462	4,4
Diğer (enfeksiyon ve parazit hastalıkları, mental ve davranışsal bozukluklar, kas-iskelet sistemi ve bağ dokusunun hastalıkları vb.)	62 126	14,7	64 211	15,2

Şekil 2.1. TÜİK ölüm nedeni istatistikleri, 2018

2.2.1. Kanser Mekanizması

Kanser, çok basamaklı ve uzun süreçli bir hastalıktır ve anormal bir doku kitlesinden oluşur. (Yokuş ve Ülker, 2012).

❖ Kanser hücrelerinin özellikleri:

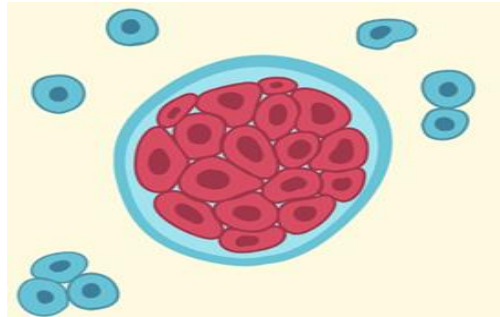
- Gelişim gösterme şekli normal dokulara göre daha hızlıdır.
- Kontrolsüz olarak üremeyi sağlayan sinyal sistemleri vardır.
- Kanser hücreleri ancak glikolizden gelecek olan glukozu kullanabilirler.
- Şekeri, normal hücrelere oranla 100 kat fazla olacak şekilde kandan alırlar (Warburg etkisi).
- Kolaylıkla yeni damar sistemleri oluştururlar.
- Zamanla şekillerini değiştirebilirler.
- Büyüme baskılayıcılarından kaçabilirler.
- Hücrenin bağışıklık sisteminden kaçabilirler.
- Hücresel olarak ölümsüzlüklerini etkinleştirirler.

- Hücresel ölüme direnç gösterirler.
- Kanserleşmeyi destekleyen inflamasyon yaratırlar.
- Genetik kararsızlık ve mutasyonlara sebebiyet verirler.
- İnvazyon ve metastazın aktivasyonunu sağlarlar (Baykara, 2016).

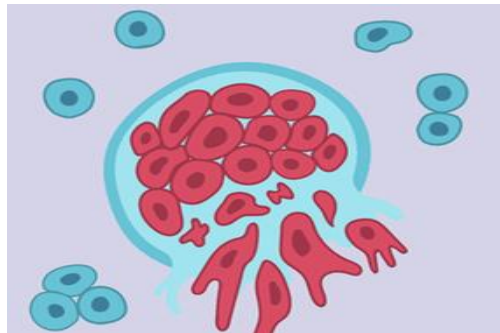
Kanserli hücrelerin gelişimi tümör başlangıcı ve tümör ilerlemesi olmak üzere iki basamakta incelenir (Tektemur, 2020). Tümörler de kendi içinde sınıflandırılırlar:

➤ **Biyolojik davranışa göre:**

- Benign Tümör: İyi huylu tümörlere benign tümör denilir. Vücudun diğer dokularına metastaz yapmazlar ve yavaş büyürler.
- Malign Tümör: Kötü huylu tümörlere malign tümör denilir. Vücudun diğer dokularına metastaz yaparlar ve hızlı büyürler.



Şekil 2.2. Benign tümör



Şekil 2.3. Malign tümör

➤ **Köken aldığı dokuya göre (Histogenetik):**

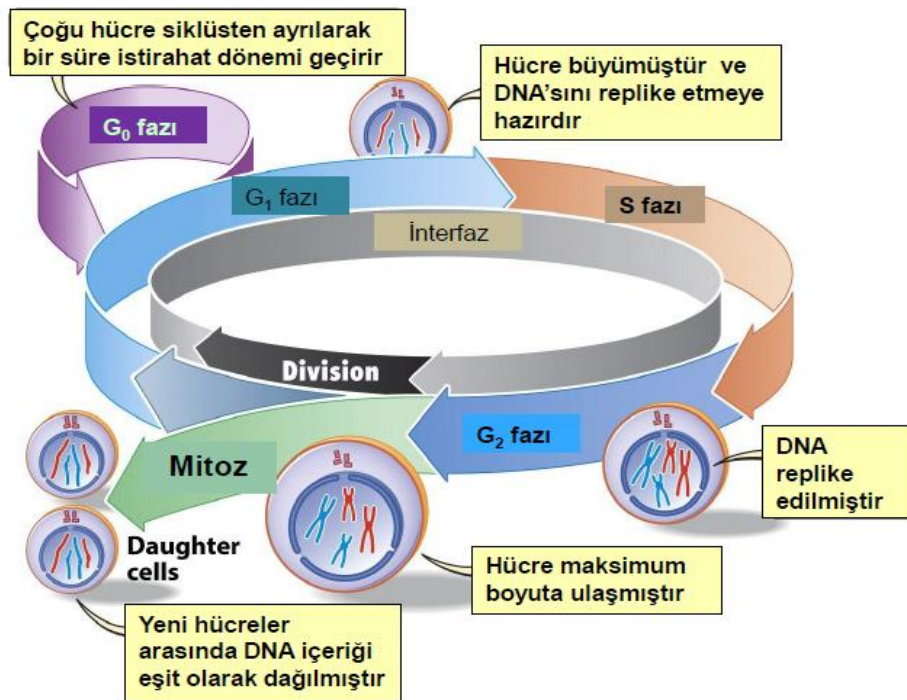
- Epitelyal, mezenkimal, hematopoetik, sinir dokusu olarak sayılır.

➤ **Morfolojik sınıfına göre:**

- Makroskopik: Polipoid, ülseratif, diffüz vs. olarak sayılabilmektedir.
- Mikroskopik: Papiller, Folliküller olarak sayılabilmektedir (Berk, 2014).

2.2.2. Kanser Nasıl Oluşur?

Hücrelerin kendine has bir yaşam döngüsü vardır. Bu döngü DNA tarafından kontrol edilir. Mitoz evrelerine, tamir mekanizmasına, apoptozis talimatına kadar DNA, hücrede bir kılavuzluk görevi görür. Buna hücre siklusu denir (Özdoğan, 2021).



Şekil 2.4. Hücre siklusu

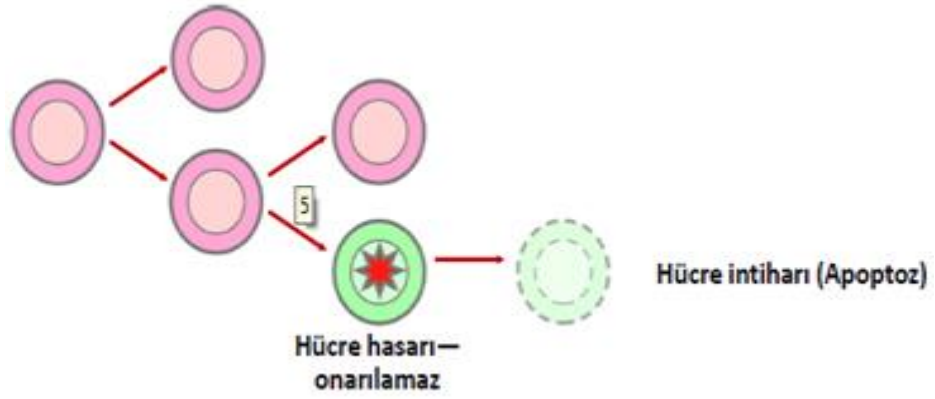
Sağlıklı bir hücrenin kanserli hücreye dönüşmesi bir anda gerçekleşmez. Bu durum yıllar içinde DNA da biriken hasarlarla ortaya çıkar. Hücrenin kanserleşmesi için birçok aşamadan geçmesi gerekir, bu aşamaların tümüne karsinogenez denir (Özdoğan, 2021).

❖ Karsinogenez ve Aşamaları

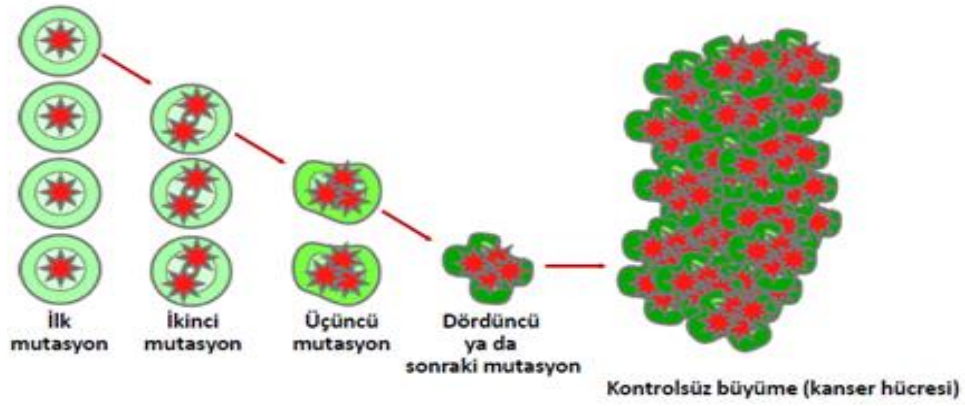
Dokularda birden fazla şekilde hücre bulunur. Bundan dolayı bir dokudan birden fazla şekilde kanser meydana gelebilir. Her bir hücreden meydana gelen tümör dokusu da kendi içinde farklılıklar gösterebilir. Karsinogenezin moleküler temelini, kanser oluşum mekanizmaları olarak adlandırılan;

- Proto-onkogenlerin aktivasyonu
- Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu oluşturur.

1. **İnisiyasyon:** Karsinogenezin ilk aşamasıdır. Bir hücrede mutasyon oluşmasıyla rastlantısal olarak meydana gelir ve bu etkileşim zamanı birkaç yıl sürebilir.
2. **Promosyon:** Karsinogenezin ikinci aşamasıdır. Hücreler kendine has özellik kazanır ve büyümeye başlar. Epigenetik olarak değişimler oluşur. Hücreler, küçük hücre gurupları meydana getirerek büyümeye devam eder.
3. **Progresyon:** Genetik mutasyonların oluşum süreci hızlanır. Bu evrede hücre kendi özgürlüğünü kazanmıştır ve diğer hücrelerden bağımsız hareket etmeye başlar. Bu evrede meydana gelen değişiklikler geri döndürülemezdir.
4. **İnvazyon ve Metastaz:** Tümörün vücudun diğer dokularına yayılım göstermesine invazyon denir. Hücre etrafındaki dokularla iletişimini kaybeder ve bireysel hareket ederek dokulara yayılım gerçekleştirir (Berk, 2014).



Şekil 2.5. Normal hücre bölünmesi



Şekil 2.6. Kanserli hücre bölünmesi

2.2.3. Kanser Tedavi Yöntemleri

Kanserin tedavi edilebilmesi için önce tanı konulması gerekir. Kanserin hastada bulunduğu kanıtlandıktan sonra hastalığın evresi ve durumuna göre tedavi yöntemi belirlenir. Kanserin birçok tedavi yöntemi vardır ve bu tedavi yöntemleri hastaya ve hastalığın durumuna bağlıdır.

Tedavi yöntemleri: Cerrahi, Radyoterapi, İmmünoterapi, Hormon tedavisi ve Kemoterapi olarak sayılabilmektedir (Mondal, 2016).

- **Cerrahi Tedavi Yöntemi:** Metastazın gerçekleşmediği durumlarda kanserli doku vücuttan çıkarılır. Dokuların zarar görebileceği durumlarda ise kanserli dokunun bir kısmı alınıp küçültme yapılabilir. Bu yöntem cerrahi tedavi yöntemi denir. Bu yöntem tek başına olduğu gibi kemoterapi ve radyoterapi tedavileri ile de birlikte kullanılabilir (Mohammadi, 2016).
- **Radyoterapi Yöntemi:** Radyasyon kelime anlamıyla elektromanyetik enerji şeklindedir. Radyoterapi yöntemi ise kanserli dokuları iyonizan ışınlar ile öldürmeye dayalı bir yöntemdir (Kurtman, 2017).
- **İmmünoterapi Yöntemi:** İmmünite, vücudun kendini korumak adına vücuda giren yabancı maddelere karşı savaşması olarak tanımlanabilmektedir. İmmünoterapi ise, kanserli hücrelerin zarar verdiği immün sistemin güçlendirilmesi esasına dayanmaktadır (Kışla ve ark., 2018).
- **Hormon Tedavisi Yöntemi:** Kanser hücreleri büyümek için hormonları kullanabilirler. Kanserli hücrelerin büyümesini durdurmak ve yavaşlatmak için kullanılan tedaviye hormon tedavisi denilmektedir. Radyoterapi ile birlikte kullanıldığında kanserli hücreler üzerinde daha fazla etki gösterdiği saptanmıştır (Haliloğlu, 2004).
- **Kemoterapi:** Kanser hücrelerinin kimyasal maddeler ile öldürülmesine kemoterapi denir. Kemoterapinin amacı; hastanın normal hücrelerine zarar vermeden tümörü tamamen yok etmek, vücuda yayılımını durdurmak, sebep olduğu etkileri ortadan kaldırmaktır. Bunlar tümörün durumuna ve uygulanan kişinin verdiği yanıtı göre değişmektedir (Berk,2014).

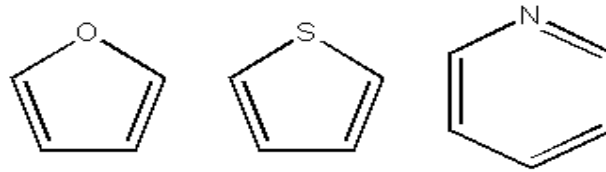
Kemoterapide temel hedef; malign hücreleri ortadan kaldırmak, onkogen sinyal yollarını inaktive etmek, tümör baskılayıcı genleri harekete geçirmek ve bağışıklığı güçlendirmektir. Bundan dolayı kemoterapi de sitotoksik, sitostatik ilaçlar kullanılır. Sitotoksik ajanlar, kanser hücresinin çekirdeğine zarar verir ve hücreyi öldürürler. Sitostatik ajanlar, bölünmekte olan hücrenin bölünmesini durdurur ve yaptıkları etki hücrenin hangi bölünme fazında olduğuna göre değişir. Bu ilaçlar kan dolaşımı sayesinde vücuttaki tüm kanser hücrelerine ulaşabilirler. Bölünme evresinde olan kanser hücresi sitotoksik, sitostatik ilaçlardan daha fazla etkilenir (Alam, 2018).

Kanserin tedavisinde genel olarak kullanılan yöntemlerin temeli hücrenin ölüm mekanizmasını tetiklemektir. Apoptoz kanserli hücrede tetiklenmek istenen ölüm mekanizmalarından birisidir, aynı zamanda kanserli hücrenin de apoptozdan kaçmak, temel özelliklerinden biridir. Hem hücre ölüm mekanizmasını tetiklemek hem de daha güçlü bir bağışıklık yanıtı oluşturabilmek kanser tedavisinin hedeflerini oluşturmaktadır (Özdoğan, 2021).

Bu tez çalışmasında da kansere alternatif tedaviler araştırmak amacıyla; bir heterosiklik bileşik olan sülfonamido benzoksazol türevi bileşikler kullanılmıştır. Kullanılan bileşiklerin sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanserli hücreyi yok etme potansiyeli araştırılmıştır.

2.3. HETEROSİKLIK BİLEŞİKLER

Organik bileşikler yapısal olarak birbirlerinden çok farklıdır. Bu farkı oluşturan yapılardan biri de halka yapısıdır. Halka içindeki atomlardan en az biri hetero atomlardan yani Oksijen, Kükürt, Azot atomlarından oluşursa bu bileşiklere heterosiklik bileşikler denir (Akday ve ark., 2003).



Şekil 2.7. Birden fazla halka bulunduran heterosiklik bileşikler

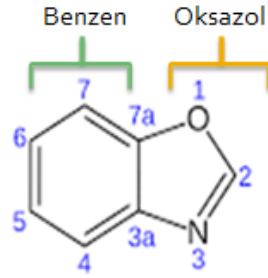
Doğada bulunan organik bileşiklerin neredeyse yarısının heterosiklik yapıda olduğu bilinmektedir. Doğada yaygın bulunması, geniş bir uygulama alanına sahip olması, kararlı yapıya sahip olması heterosiklik bileşiklerin önemini artırmaktadır (Hür, 2004). Üçgen, dörtgen halkalarda aradaki açıda gerginlik olduğu için üçlü, dörtlü yapılar çok kararlı değildir. Beşgen, altıgen oluşturan yapılar daha kararlıdır Benzoksazol halkası da beşgen ve altıgen yapılardan oluşan kararlı bir yapıya sahiptir. Bu durum benzoksazol türevlerinin incelenmesinin önemini artırmıştır. Altıgen halkada bir ya da daha fazla hetero atom bulunabilir fakat kükürtün (S) bulunduğu altıgen halka genellikle kararsızdır. Oksijen (O) ve azot (N) içeren halkalar ise nispeten daha kararlıdır. Altılı halkalardan oluşan ve biyolojik aktivite için çok önemli olan pürin ve pirimidin de heterosiklik bileşiklerdendir. Yaşamın kaynağını oluşturan nükleik asitler de pürin ve pirimidin türevlerindendir (Arisoy ve ark., 2012).

Heterosiklik bileşikler yapısı itibarıyla kanser terapilerinde kullanılmak için geliştirilen yeni ilaçların ön maddeleri olarak farmasötik kimyada, canlı yapısında da bulundukları için biyolojik proseslerde sıklıkla kullanılmaktadır (Arisoy ve Temiz- Arpacı, 2016). 1958 yılında Clayton benzoksazol halkası ve kimyasal reaksiyonlarda etkisi üzerine bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmanın sonucunda benzoksazolün bir kanser hastası üzerinde tümörü yok edici etki gösterdiğini kanıtlamıştır. Clayton 'un keşfiyle başlayan benzoksazol türevlerinin incelenmesi önemini koruyarak devam etmektedir. (Erdoğan, 2020).

2.4. SÜLFONAMİDO BENZOKSAZOL TÜREVİ BİLEŞİKLER

2.4.1. Benzoksazol Halkasının Önemi

Benzoksazol; benzen ile birlikte bir oksazol halka yapısına sahip, moleküler formülü C_7H_5NO olan aromatik bir organik bileşiktir (Satyendra ve ark., 2011).



Şekil 2.8. Benzoksazol halka yapısı

Benzotiyazol, benzoksazol ve benzimidazol gibi halka sistemleri genel olarak benzazoller olarak tanımlanır. Bu benzazoller grubunda yer alan 1,3-benzoksazol yapısının farmakolojik etkilerinin keşfedilmesiyle benzoksazol türevleri daha çok araştırılmaya başlanmıştır (Kuzu, 2021). Birçok benzoksazol türevi ticari olarak önemlidir. Genellikle biyoaktif yapıların sentezi için bir başlangıç malzemesi olarak kullanım bulurlar. 25 °C ‘de basit benzoksazoller sıvı halde bulunurken, birçok benzoksazol türevi kristalleşmiş katı halde bulunur. Termal kararlılıkları iyi düzeydedir (Osmaniye, 2017).

Benzoksazol halka yapısı, nükleik asitlerde bulunan heterosiklik adenin ve guanin bazlarının yapısal olarak benzeridir. Bundan dolayı bu halka sistemine sahip olan türevlerin nükleik asit sentezini inhibe ederek antikanser aktivitelerini gösterebilecekleri düşünülmektedir. Bu yaklaşım benzoksazol türevlerine olan ilgiyi daha da artırmaktadır (Ertan-Bolelli, 2012).

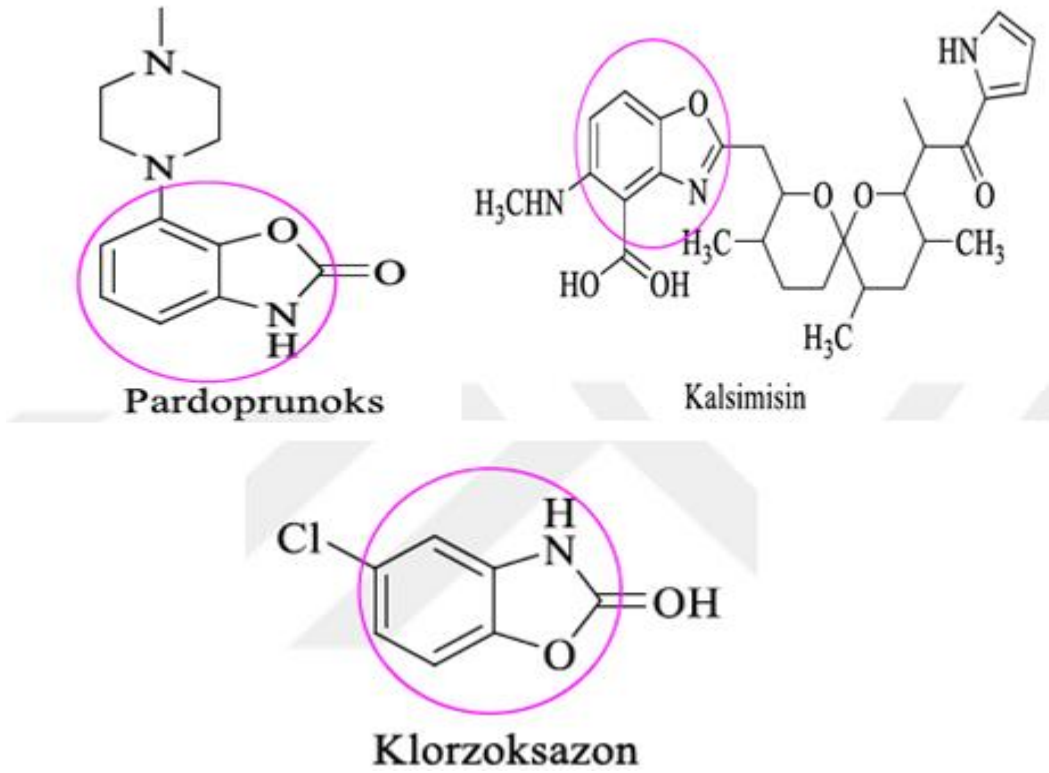
Benzoksazol halka sistemi üzerinden yapılan araştırmalar, 2. ve 5. halka konumlarından elde edilmiş türevlerdir. Yapılan araştırmalar göstermektedir ki heterosiklik çekirdek bulunduran yapılar etkili antitümöral özellikler gösterebilmektedir. Benzoksazol ve türevleri nükleik asitlerin yapısında bulunan heterosiklik bazlarla biyolojik olarak ortak özelliklere sahip oldukları için, bu ortak noktanın antikanser çözümlere giden yolda çok

önemli bir adım olduğu bilinmektedir (Erol ve ark., 2021). Benzoksazol halka yapısı; antimikrobiyal, antiviral, antiparkinson, antienflamatuar, antikanser gibi kemoterapötik etkiler açısından önemli bir halka sistemidir (Ertan-Bolelli, 2012).

2.4.2. Benzoksazol Yapısı, Türevleri, Farklı Aktiviteleri

Benzoksazolün heterosiklik yapısı biyolojik çalışmaların, antikanser aktivitelerin araştırma konusu olmuştur. Benzoksazol türevlerine kemoterapötik maddeler de denilmektedir. Kemoterapötik madde; bir organizmada bulunan mikroorganizmalara karşı tehdit oluştururken organizmanın kendisine zarar vermeyen maddedir. Benzoksazol türevlerinin kemoterapötik aktivite göstermesi hücreye giren, hücrenin yapısını bozan ajanların, hücre içine yerleşmesine ve orada gelişmesine engel olması anlamına gelmektedir. Benzoksazol türevleri bunu gerçekleştirirken, istenmeyen mikroorganizmayı öldürür ve hücrenin ihtiyacı olan mikroorganizmaya zarar vermez (Yoneyama ve ark., 2006).

Yapısında benzoksazol halkası taşıyan Kalsimisin, Gram pozitif bakterilere karşı etkili bulunmuştur. Başka bir kalsimisin analogu; 11-demetilsezomisin yapısındaki frankamid, patojenik funguslara karşı son derece öldürücüdür (Bolelli, 2012). 1993 yılında *Actinomyces* 517-02 suşundan elde edilen, benzoksazol çekirdeği bulunduran UK-1 isimli bileşiğin güçlü antitümöral etki gösterdiği gözlenmiştir. Geliştirilen çalışmalar sonucunda 2008 yılında faz 1 klinik çalışmaları WX-UK1'in kapesitabin ile kullanımının test edildiği çalışmalar sonucunda tamamlanmış ve ilaç, 25 hastadan 23'ünde başarı göstermiştir. Faz-3 çalışmaları tamamlanmış antiparkinson etkisi bulunduran Pardoprunoks (SLV-308), santral etkisi bulunduran kas gevşetici Klorzoksazon da yapılarında benzoksazol halkası bulundurmaktadır (Osmaniye, 2017).



Şekil 2.9. Çeşitli biyolojik aktivite gösteren benzoksazol türevleri

Yapılan araştırmalara göre benzazol türevlerinin birbirlerinin izosteri olduğu tespit edilmiştir. Benzoksazol halkası bulunduran UK-1 gibi benzimidazol halkası bulunduran Bendamustin'in de antikanser etki gösterdiği saptanmıştır. Dolayısıyla benzazol türevlerinin izoster olma durumundan yararlanarak antikanser etki gösteren birçok bileşik sentezlenmiştir (Bagchi, 2007).

1999 yılında benzotiyazol-benzoksazol-benzimidazol türevlerinin sentezlendiği bir çalışmada; 2-(2-(1-(piridin-2-il)etiliden)hidrazinil)benzo[d]oksazol bileşiğinin antikanser etki gösterdiği ve THP-1 hücrelerindeki $IC_{50}=1,50 \mu M$ olduğu tespit edilmiştir (Hall ve ark., 1999). Benzoksazol türevleri kimyasal olarak gerçekleşen bir reaksiyonda oldukça işlevsel davranırlar. Bu esnek ve işlevli yapıları sayesinde reaksiyona giren diğer bileşikler kendilerine özgü olarak değişim geçirebilirler. Bu reaksiyonda tanınan esneklik, kimyasal olarak oldukça önemlidir. Böylelikle benzoksazol bu durumdan ötürü kemoterapötik birçok araştırma ve çözüm bulma yolunda oldukça fazla olarak kullanılmaktadır (Kuzu, 2021).

2002 yılında Metil 2-(2-hidroksifenil)-benzoksazol-4-karboksilat bileşiğinin sentezlendiği çalışmada bileşiğin IC₅₀ değeri 0,88-9 µM aralığında bulunmuş ve kanser hücreleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Kumar ve ark., 2002).

2006 yılında benzimidazol, benzoksazol ve benzotiyazol bulunduran türevler sentezlenmiştir. Metil 2-(2-hidroksifenil)benzo[d]oksazol-7-karboksilat bileşiğinin çocuklarda en sık görülen yumuşak doku tümörü üzerinde (rabdomyosarkom) etkili olduğu bildirilmiştir (Huang ve ark., 2006).

2008 yılında yapılan bir çalışmada sentezlenen benzoksazol türevleri sonucunda MCF7 ile MDA468 hücrelerine karşı antikanser etki tespit edilmiştir (Aiello ve ark., 2008).

2011 yılında HeLa, MCF7, A549, SW-480 hücre tipleriyle yapılan antikanser çalışmalarda, 2-Süstitüe-1, 3-benzoksazol ve 3-[(3-Süstitüe) propil]-1,3-benzoksazol-2(3H)-on türevleri sentezlenmiş ve 2-(4-Benzilpiperazin-1-il)-1,3-benzoksazol bileşiğinin HeLa hücre hattında etkili olduğu gözlemlenmiştir (Murty ve ark., 2011).

2012 yılında benzoksazol türevlerinin antikanser etkilerinin incelendiği çalışmada; 2-Metoksi-N-(2-(2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenilamino)-2oksoetiltiyo)benzo[d]oksazol-6-il)-benzamid bileşiğinin antikanser etki gösterdiği saptanmıştır (Xiang ve ark., 2012).

2013 yılında benzoksazol, benzimidazol, imidazol ve tetrazol türevlerinin sentezlendiği bir çalışmada; N-bis(2-(Benzo[d]oksazol-2-il)etil-6-fenil-1,3,5-triazin-2,4-diamin bileşiğinin MCF7 hücreleri üzerinde antikanser aktivite gösterdiği görülmüştür (Arulmurugan ve ark., 2013).

2014 yılında benzoksazol ve imidazol türevlerinin kullanıldığı bir çalışmada benzoksazol türevlerinin, imidazol türevlerine göre antikanser aktivite göstermede daha başarılı olduğu gözlemlenmiştir (El-Hady ve ark., 2014).

2016 yılında HL-60 hücre tipi üzerinde benzoksazol türevlerini incelemek adına 2-(p-Sübstüebenzil/fenil)-5-(nitrofenilsülfonamido) benzoksazol türevi bileşikler sentezlenmiş ve Etoposid kullanılmıştır ve N-(2-(4-klorobenzil)benzo[d]oksazol-5-il)-4-nitrobenzensülfonamid bileşiğinin antikanser aktivite üzerinde Etoposid 'den daha etkili olduğu saptanmıştır (Oksuzoglu ve ark., 2016).

2017 yılında A549 hücre tipi üzerindeki etkinin araştırıldığı çalışmada, benzoksazol-benzotiyazol ve pirazol bileşikleri sentezlenmiş ve 4-[(4-Benzoksazol-ilfenil)hidrazono]-5-[(4-nitrobenzilidin)amino]-2,4-dihidropirazol-3-on bileşiği antikanser aktivite olarak A549 üzerinde etkili bulunmuştur (Belal ve ark., 2017).

2.4.3. Benzoksazol Türevi Bileşiklerin Biyolojik Aktivitesi

Antibakteriyel etki: Benzoksazol türevi bileşikler organizmada bulunan bakterinin üremesine, organizmaya yerleşmesine ve orada gelişmesine engel olurlar (Ören ve Yalçın, 2002). Bunu da DNA ve mRNA sentezine engel oluşturarak yaparlar. Yine memelilerde biyolojik sentezde kullanılan GlcN-6-P sentaz enzimi mikroorganizmada yarattığı ani ölümlerle bilinir. Bu ani ölümler yani kısa süreli inhibisyon özelliğinden dolayı; benzoksazol türevi bileşikler GlcN-6-P sentaz inhibitörü olarak kullanılır. Yani bu enzimin gösterdiği davranış da bir tür antibakteriyel etkidir.

Bir diğer antibakteriyel etkinin ise yapılan araştırmalara göre hyalüronik asit olduğu tespit edilmiştir. Hyalüronik asit; hücrenin yenilenmesine, gelişmesine, hücreler arası iletişime katkıda bulunur. Hücrenin bölünmesi hyalüronik asit açısından baktığımızda olumludur çünkü doku yenilenir. Fakat aynı olay kanserli hücrede de gerçekleşir ve bu da olumsuz bir durumdur. Hyalüronik asit ile kanserin arasında böyle bir doğru orantı vardır. Hyaluron bir dokuda ne kadar aktifse orada kanser olma ihtimali ve kanserin ne derecede olduğu tespit edilebilir. Hyaluron enziminin inhibitörleri antibakteriyel etki gösterir (Braun ve ark.,2011).

Antiviral Etki: Benzoksazol türevlerinin antiviral etkisi 1948 yılından beri araştırılmaktadır. Fakat antimikrobiyal etkiye göre süstitüe oranının daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Son yapılan araştırmaya göre benzoksazol türevlerinin HIV (İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü) karşı da inhibitor etki gösterdiği görülmektedir (Akı ve ark., 2018).

Antihelminetik Etki: Helminter, ökaryotik parazitlerdir. Konağa yerleşir ve oradan beslenirler, konağın doğal dengesini ve yaşam kalitesini kötü yönde etkilerler. Antihelminetik etki bu parazitleri öldürmeye, kısmen felç etmeye yönelik bir etkidir. Kısaca bunlara bağırsak solucanları da diyebiliriz. Yapılan araştırmalara göre benzoksazol türevlerinin bağırsaktaki bu helminterin, bağırsakta oluşturdukları emilim sistemine etki ederek engel oldukları ve helminterin kısmi felcine sebep oldukları görülmüştür (Satyendra ve ark., 2011).

Antineoplastik Etki: Kemoterapi uygulanan hastada görülmek istenen sonuç kanserli hücrelerin ölmesi, sağlıklı hücrelerin ise zarar görmemesidir. Antineoplastik etki bunu anlatır. Bu etki kemoterapide olduğu gibi sağlıklı hücreleri öldürmez fakat bulantı, kusma, saç dökülmesi gibi yan etkilere sebep olur. Böyle zamanlarda hücrede protein kinaz adı verilen protein devreye girer ve kanserli hücrenin yayılımına, verdiği zarara destek olur. Yapılan araştırmalarda görülmüştür ki; benzoksazol türevi bileşikler kanserli bir hücrede protein kinazı engelleyen, durdurmaya çalışan etki göstermiştir (Berta ve ark., 2005). DNA da bulunan topoizomerez enzimi üzerine yapılan çalışmalarda benzoksazol türevi bileşiklerin topoizomerez inhibitörü olduğu tespit edilmiştir (Pınar-Yurdakul ve ark., 2004).

Antifungal Etki: 1958 yılından beri benzoksazol halkasının antibakteriyel, antikanser etkilerinin yanı sıra antifungal etkileri de incelenmiş ve antifungal aktivite de gösterdikleri saptanmıştır. 2007 yılında tiyadiazolbenzoksazol türevi bileşiklerle yapılan çalışmada *Aspergillus niger* ve *Penicillium worthmanni*'ye karşı antifungal aktivite tespit edilmiştir (Hegde, 2007). 2011 yılında yapılan bir çalışmada ise, 1,3-benzoksazol-4-karbonitril türevi bileşiklerin *Candida sp.* üzerindeki antifungal etkileri gözlemlenmiş ve oldukça etkili aktivite gösterdiği saptanmıştır (Kuroyanagi ve ark.,2011).

Antitümör Etki: İlk olarak 1958 yılında sıçanlarla yapılan çalışmalar sonucunda benzoksazol türevlerinin antitümör etkisini düşük de olsa gösterdiği görülmüştür (Clayton, 1958). 1981 yılında yapılan çalışmada ise benzoksazol türevi 2-(2-(benzodioksan-5-il)sitiril)' in güçlü antitümör etki gösterdiği saptanmıştır (Bahner ve ark., 1981). Bununla birlikte benzoksazol türevleriyle olan çalışmalar daha çok ilgi görmeye başlamıştır (Ertan-Bolelli, 2012).

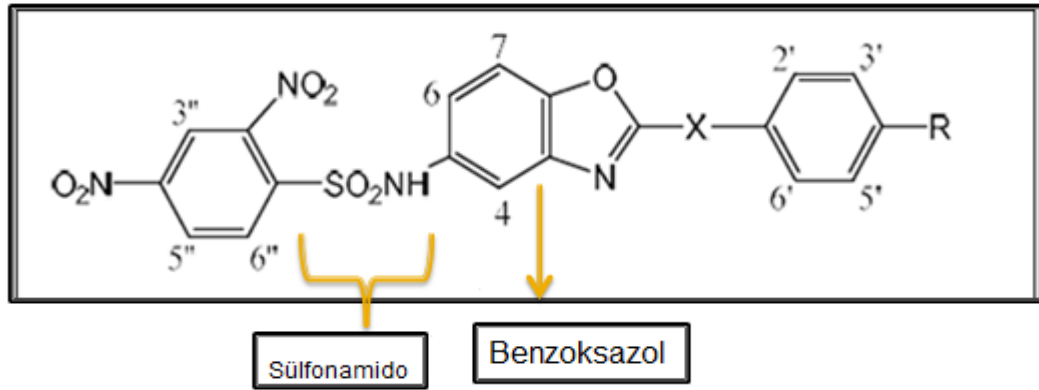
2.4.4. Sülfonamido Benzoksazol

Sülfonamidler, antikanser, antibakteriyel, antifungal, antiglokom gibi oldukça geniş aktiviteye sahip olan, karbonik anhidraz (CA) inhibitörleri olarak kullanılan bileşiklerdir (Supuran, 2008; Kazancıoğlu ve ark., 2012). Oldukça eski zamanlardan beri tıpta kullanılan, özellikle bakteriyel hastalıkların tedavisinde etkin olan kemoterapötiklerdir. Asetazolamid, nimesulide, sülfapiridin ve sülfadiazin piyasada en çok kullanılan sülfonamid türevi ilaçlardır (Akın-Kazancıoğlu ve Sentürk, 2020). Sülfametoksazol, sülfasetamid, sülfadoksin gibi sülfonamid türevi antibiyotikler güncel olarak halen kullanılmaktadır. Sülfonamid türevlerinin önemli derecede antitümör aktiviteye sahip olduğu yapılan araştırmalarca kanıtlanmıştır (Akın-Kazancıoğlu, 2021).

Yapılan bir araştırmada sülfonamid yapısı bulunduran bazı 2-aminobenzoksazol türevlerinin HIV proteaz enzimi üzerinde oldukça önemli aktivite gösterdiği saptanmıştır. Araştırmada HIV-1 ile enfekte olmuş ve bir takım ilaçlar kullanılarak tedavi edilememiş olan hastaların sülfonamid yapısı bulunduran benzoksazol türevleri kullanıldığında tedaviye yanıt verdiği görülmüştür (Ertan-Bolelli, 2012).

Sülfonamid türevi antibiyotikler PABA analoglarıdır ve dihidropteroat sentetaz enzimi üzerinden aktivite gösterirler. Antibiyotiğe artan direnç nedeniyle hem dihidropteroat sentetaz enzimi üzerinden hem de daha önce kullanılmamış enzimler üzerinden yeni antibiyotikler geliştirmek için çalışılmaktadır. Bu enzimlerden bir tanesi de enoil-açıl taşıyıcı protein (ACP) redüktaz enzimidir. Yapılan araştırmalarda sülfonamid grubu taşıyan moleküllerin ACP inhibitör özelliklerinin olduğu saptanmıştır (Kratky ve ark., 2012).

Bu bilgiler ışığında yüksek lisans tez çalışmamızda benzoksazol halka sisteminin 5.konumundan sülfonamid grupları ile sübstitüsyonunun antikanser etkiyi arttırıcı şekilde rol oynayacağı hipotezi ile 2. konumunda değişik özelliklere sahip atom veya atom grupları ile sübstitüe edilmiş sülfonamido benzoksazol türevi bileşikler tasarlanmıştır. Tez çalışması kapsamında, tasarlanan bu bileşikler literatürde yalnızca antimikrobiyal etkileri açısından değerlendirilmiş olup antikanser etkileri incelenmemiştir. Bu yüksek lisans tezinde 11 adet sülfonamido benzoksazol türevi bileşiğin memeli hücre kültürleri üzerinde ve *in vitro* antikanser aktiviteleri değerlendirilmiştir.



Bileşikler		
Kod	X	R
TN1	-	H
TN2	-	Cl
TN3	-	F
TN4	-	Br
TN5	-	C ₂ H ₅
TN6	-	CH ₃
TN10	CH ₂	H
TN11	CH ₂	Cl
TN12	CH ₂	F
TN13	CH ₂	Br
TN14	CH ₂	CH ₃

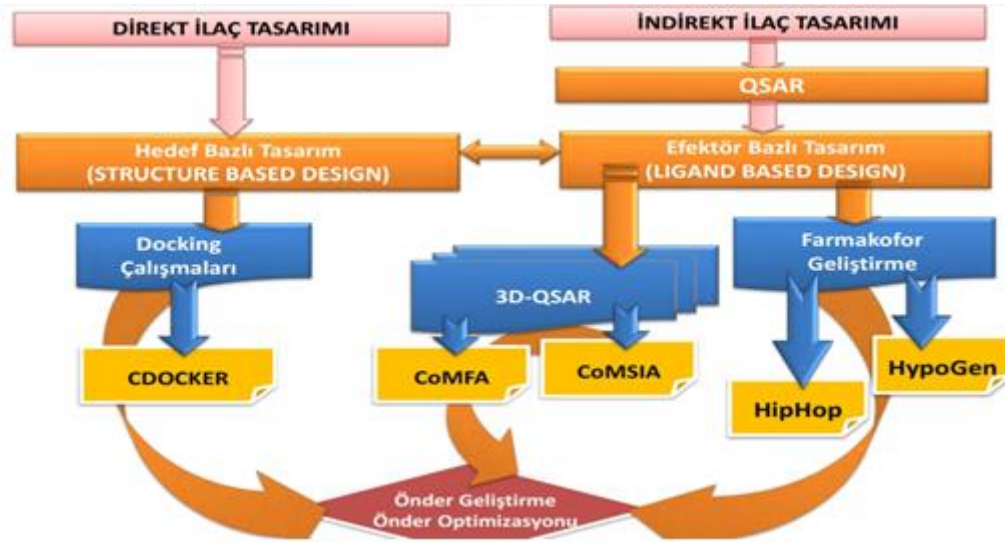
Şekil 2.10. Test edilen sülfonamido benzoksazol türevleri

2.5. YAPI-AKTİVİTE İLİŞKİLERİ

2.5.1.Moleküler Modelleme Teknikleri

Günümüzde ilaç tasarımıyla ilgili çalışmaların odak noktası olarak antimikrobiyal ajanlar ile antikanser ajanlar görülmektedir. Bunun en büyük nedenleri terapide kullanılan, yüksek etkili olarak görülen ve umut vadeden ilaçlara karşı zamanla organizmaların geliştirmiş olduğu direnç mekanizmaları ile toksik yan etkileri gösterilmektedir. Bu nedenle literatüre bakıldığında her geçen gün yeni bileşiklerin ilaç ön maddesi olarak tasarlandığı ve biyolojik etkileri açısından değerlendirildiği görülmektedir. Bir molekülün fiziksel ve kimyasal özellikleri arasında bulunan bağlantıyı, bu molekülün kimyasal ve üç boyutlu (3D) yapısını ortaya çıkarmak moleküler modellemenin hedefidir. İlaç geliştirmek için kullanılan güncel strateji; in silico modelleme yoluyla yeni bileşik kütüphaneleri oluşturulması ile terapiye yönelik yeni hedeflerin bulunması yönündedir. Hastalıkların moleküler temellerini aydınlatmak için yapılan çalışmalar ilerleyen teknolojinin de yardımıyla araştırmacılara yeni biyolojik hedefler sunmaktadır (Ertan-Bolelli, 2012).

İlaç tasarımı yapılırken hedefe en doğru şekilde uyacak ve biyolojik sistemlerde kolay tolere edilebilecek bileşiklerin seçilmesi çok önemlidir. Bu nedenle araştırmalarda, seçilen aday bileşiklerin biyolojik etkilerinin iyi değerlendirilmesi gerekmektedir. İlaç tasarımı hedef yapısına dayalı tasarım ve ligand yapısına dayalı tasarım olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Hedef yapısına dayalı tasarımda etkisi yüksek olabilecek moleküller bilinen reseptörden yararlanılarak tasarlanır. Ligand yapısına dayalı tasarımda ise, reseptör yapısının yorumlanması için etkisi yüksek olan moleküllerden faydalanılır (Young, 2009).



Şekil 2.11. Rasyonel ilaç etken madde tasarım yöntemleri

2.5.2. Hedef Bazlı Tasarım

1. **Docking Yöntemi:** Moleküler docking, bilgisayar destekli ilaç tasarımında en önemli araçlardan biridir. Moleküler docking yönteminin amacı, ilaçların, enzimlerin, nükleik asit ve reseptör proteinlerinin birbirleriyle bağlanma modlarını tahmin etmektir. Yapılan docking çalışmaları ligand verilerini skorlama yaparak sayısal verilere dönüştürür (Morris ve LimWilby, 2008).

Docking, efektörün uygun konformasyonu ile hedef arasında anahtar-kilit ilişkisi kurar. Efektörler çözücünün içinde farklı konformasyonlarda bulunurlar. Bazı docking çalışmalarında efektör ve hedefin tek bir konformasyonu kullanılmaktadır. Fakat bu yöntem daha az uygulanmaktadır (Barlas, 2019).

- **CDocker Yöntemi:** CDocker yönteminde protein sabit, ligandlar hareketlidir. Moleküler dinamik altyapılı bir algorithmadan oluşur ve docking yönteminde sıklıkla kullanılır. CDocker yönteminde güç alanı olarak CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) kullanılır. CHARMM güç alanı parametrelerin en iyi

şekilde analiz edilmesi için kullanılır. 41 adet protein-ligand parametresiyle yapılan bir çalışmada %66-76 oranında başarı elde edilmiş, CDocker yönteminin başarısı kanıtlanmıştır (Wu ve ark., 2003).

2.5.3. Efektör Bazlı Tasarım

1. **Farmakofor Analizi:** Farmakofor, biyolojik aktiviteler için kullanılan parametrelerin uzaysal olarak düzenlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Reseptörün yapısı bilinemediğinde hedef yapıların karakterizasyonları biyolojik olarak belirlenir ve reseptörün yapısı haritalanabilir. (Ertan-Bolelli, 2012).

Farmakofor modeli, bir dizi aday bileşik içinden hedefe yönelik oluşturulan, hedef için en uygun olan düzenlenmeyi ifade eder. Bileşikler moleküler düzene uygunlukları açısından kontrol edilir. Hedefe yönelik, uygun olan lider bileşiğin önce en düşük enerjili yapısı analiz edilir, sonra diğer bileşiklerin lider bileşik ile çakışabilen parametreleri tespit edilerek karşılaştırma yapılır. Böylelikle farmakofor analizi, yapı-etki ilişkilerini incelemek ve yeni ilaç adaylarını tasarlamak için bir kılavuz oluşturmuş olur (Foto, 2016).

- **HipHop Yöntemi:** HipHop metodu, özel olarak biyolojik aktiviteleri bilinen ya da bilinmeyen bir dizi molekülün ortak özelliklerini belirleyen farmakofor modelleri oluşturur. Bu modeller hedef olarak tespit edilen bölgelere bağlanmak için yeterli olan fonksiyonlardan oluşmaktadır. İdeal bir HipHop çalışması 2-32 molekülden oluşmalıdır. Sonuçta da yeni bileşik adayları bulabilmek için kullanılabilecek üç boyutlu farmakofor hipotezi oluşturulur (Akı-Yalçın ve ark., 2018).

- **HypoGen Yöntemi:** HypoGen yönteminde farmakofor modelleri, bileşiklerin moleküler yapıları ile biyolojik aktiviteleri arasındaki ilişki tanımlanarak oluşturulur. Oluşturulan farmakofor modeli sayesinde ilaç adayı gösterilebilecek lider bileşiklerin biyolojik aktivite parametreleri öngörülebilir. Biyolojik aktivite parametrelerinden edinilen bilgiye göre bileşikler inaktiften aktife doğru olacak şekilde sıralanır. Aktif moleküller ortak özellikler barındırırken, inaktif moleküller ortak özellikler barındırmaz. Bu şekilde HypoGen yöntemiyle bir algoritma oluşturulmuş olur (Foto, 2016).
- **QSAR-SAR Yöntemi:** Eftörör bazlı yaklaşımlarda elde edilen biyolojik aktivite verileri ile bileşiklerin yapılarının değeriendirilmesinde Yapı-Aktivite İlişkisi (SAR), Kalitatif Yapı Aktivite İlişkisi (QSAR) gibi yöntemler kullanılabilir. SAR, bir grup bileşiğin yapısında bulunan özelliklerin biyolojik aktiviteye etkisinin nitel olarak değeriendirilmesidir. Bileşikte değeriştirilen herhangi bir grubun aktivitede meydana getirdiği etki dikkate alınır. QSAR ise bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ile kimyasal ve geometrik özellikleri arasındaki matematiksel ilişkileri ifade eder. Belirlenen bu nicel veriler yeni bileşiklerin sentezi için bir kılavuz oluşturur (Zilifdar-Foto, 2016).

2.6. HÜCRE KÜLTÜRÜ

2.6.1. Hücre Kültürü Yöntemi Nedir?

Canlı bir dokudan veya organdan bir takım yöntemlerle ayrıştırılmış, *in vitro* ortamda yaşatılmaya ve üretilmeye çalışılan hücre topluluğuna hücre kültürü denir. Bu amaçla çeşitli canlılardan alınan organlar hücrelerine ayrıştırılarak laboratuvar ortamında vitaminler, tuzlar gibi çeşitli besleyici maddelerle muamele edilerek şişelere konulurlar. Oluşturulan hücre süspansiyonu 36°C’de bekletildiğinde hücreler üremeye başlar (Çiçek ve Bilgiç, 2006).

Hücre kültürü yöntemi ilk olarak 1907 yılında Harrison’un laboratuvarında kurbağa embriyolarını üretmesiyle başlamıştır. İnsanda hücre kültürü ilk kez 1951 yılında HenriettaLack isimli hastadan alınan kanserli dokuların laboratuvarda kültürünün yapılmasıyla gerçekleşmiştir. Hasta kanserden kaybedilmiştir fakat ölümsüz hücrelerinin kültürü HeLa adıyla günümüzde halen insan kanser hücre hattı olarak kullanılmaktadır (Masters, 2002)

2.6.2. Hücre Kültürü Çeşitleri

1. **Primer Kültürler:** Direkt olarak dokunun kendisinden elde edilen hücre kültürleridir. Primer kültürler meydana gelen dokunun özelliklerini taşırlar. Primer kültürde, dokular petri kabına ekildikten sonra tek bir hücre popülasyonu oluşturacak şekilde süspanse edilebilir Buradaki hücreler kendi özelliklerini korurlar ve yaşam süreleri kısadır (Freshney, 2006).
2. **Sekonder Kültürler:** Mediumda yeterli besin kalmadığında ya da hücrelerin çoğalma alanı yeterli gelmediğinde primer kültürde elde edilen hücreler yeni bir mediuma aktarılır. Böylelikle hem sekonder kültür elde edilmiş hem de pasajlama yapılmış olunur. Bu hücrelerin 50 kez pasajları yapılabilir (Çiçek ve Bilgiç, 2006).

3. **Devamlı Kültürler:** Genellikle malign tümör hücrelerinden elde edilen kültürlerdir. Malign oldukları için hızlı ürerler, değişime uğrarlar, kolay klonlanırlar ve sonsuz pasajlanabilirler. En iyi stoklama için sıvı nitrojen kullanılır. -80°C 'de hücreler 6 ay-1 yıl canlılıklarını koruyabilirler (Çiçek ve Bilgiç, 2006).
4. **Süspansiyon Kültürler:** Kemik iliği, dalak, kan ve bazı tümör hücrelerinden yapılır. Bu hücreler yapışmaz havada asılı kalır ve bu şekilde büyürler. Hücrelerin sıvı içindeki davranışları kökenleriyle ilgi bilgi verir. Çok sayıda hücre aynı anda büyütülebildiği ve kültürden kolaylıkla toplanabildiği için avantajlıdır (Yabushita ve ark., 2004).
5. **Tek Tabaka (Monolayer) Kültürler:** Genellikle epitelyal, endotelyal, nöronal hücreler ile fibroblastlardan oluşur. Buradaki hücreler tutunma ihtiyacı hissederler ve yapışırlar. Bu durum mikroskop, hibridizasyon, fonksiyonel testlerde ve lamel yüzeyine hücrenin yayılmasında kolaylık sağladığından dolayı bir avantajdır (Yang ve ark., 2015).

2.6.3. Tümör Hücre Kültürü Modelleri

Günümüzde geliştirilen ilaçlarda ve kanser araştırmalarında hem kolaylık hem düşük maliyet açısından tümör hücre kültür modellerinin önemli bir yeri vardır. Kanser karmaşık ve yayılım gösteren bir hastalık olduğu için bu modeller kanser tedavisinin gelişim durumuna, tümörün büyüme durumuna ve metastazının moleküler mekanizmasının anlaşılmasına olanak sağlar (Moriah ve ark., 2016).

1. **Transvel-Tabanlı Model:** Kanser hücresinin bir yerden başka bir yere yayılım (metastaz) göstermesine hücre göçü denir. Bu model hücrenin göç ve yayılım durumunu belirlemede kullanılır. Migrasyon (göç) analizi, invazyon analizi ve transendotelyal göç analizi olmak üzere üç varyasyonda kullanılır (Marshall, 2011).

2. **Hibrid Model:** Sınıflandırılmayan *in vitro* tümör modelleri vardır. Hibrid model, gömülü *ex vivo* tümör kesitlerini, 3D invazyon modellerini ve avasküler mikro akışkan modellerini barındırır. 3D invazyon modelleri, özel hücre dizgelerin net bir şekilde görünmesini ve metastatik olayların tespit edilmesini sağlayarak, gömülü biyopsi örneklerinde bulunan karmaşıklıkların bir kısmını azaltır (Moriah ve ark., 2016).
3. **Sferoid-Temelli Model:** 3D hücre kültürüne göre daha pahalıdır ve zaman açısından daha uzun süreçlidir. İlaç taramada, tümör büyümesinde ve bağışıklıkta yaygın olarak kullanım bulur (LaBarbera ve ark., 2012).
4. **Tümör Mikro-Damar Modeli:** Tümör hücreleri ile tümördeki damarlanmalar arasındaki etkileşimleri inceler. Tümör mikro ortamının hem beslenmesi ve büyümesi için gereken maddeleri hem de bastırılması için gereken faktörleri sağlar (Moriah ve ark., 2016).

2.6.4. Hücre Kültürünün Avantajları-Dezavantajları

Hücrenin kültür ortamı dışında çoğaltılması, incelenmesi oldukça zor, maliyetli ve meşakkatli bir işlemdir. Vücut dışında hücrenin canlılığının devam ettirilebilmesi avantajlı olduğu kadar dezavantaj da yaratan bir durumdur.

Avantajları

- ✓ *In vitro* hücre kültürü, fizyolojik koşulların sabit tutulabilmesi açısından oldukça avantajlıdır.
- ✓ Sıcaklık, pH, osmotik basınç, O₂ ve CO₂ yoğunluğu gibi parametrelerin laboratuvar ortamında istenilen düzeyde tutulabilmesi, araştırmacının kontrolünde olması önemli bir faktördür.
- ✓ Araştırmacının tek tip değil birden fazla hücre tipi üzerinde çalışabilir olması ya da spesifik bir hücre üzerinde araştırma yapabilmesi hücre kültürünün tercih edilmesinin sebeplerindendir.

- ✓ Hücrelerin pasajlanmasıyla zamanla hem istenilen homojen hücre elde edilebilir hem de başka araştırmalar için hücreler uzun yıllar saklanabilir.
- ✓ Hücreler üzerindeki değişiklikler gözle görülebildiği için hızlı sonuçlar alınabilir.
- ✓ Deney hayvanlarıyla çalışmaktan daha az maliyetlidir ve daha az hücre için daha fazla can kaybı engellenmiş olur.
- ✓ Etik kurul iznine gerek kalmadan gerçekleştirilebilir.
- ✓ Hücre soyları korunabilir, taşınabilir (Polat ve Kamiloğlu, 2019).

Dezavantajları

- ✓ Hücre kültürü organizmadan izole şekilde yapıldığı için çıkan sonuçlar in vivo ortamdan farklı olabilir.
- ✓ Kültür ortamında bakteri, mantar bulunabilmesi durumu verimliliği kötü yönde etkiler. Kontaminasyon hücre kültüründe kaçınılmaz bir faktördür.
- ✓ Sürekli pasajlama işlemleri hücrenin homojenitesini bozabilir ve farklılaşmasına neden olabilir.
- ✓ Uygulanan kimyasal maddelerin etkilerinin incelenememesi ve tek başına doku kültürünün de yeterli olmaması da bir dezavantajdır.
- ✓ Özellikle kanser hücreleri normal hücreler gibi sürekli kullanılabilse de in vivo ortama göre oldukça farklı davranışlar sergileyebilmektedir (Polat ve Kamiloğlu, 2019).

2.7. İN VİTRO SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ

Bir bileşik hücrede değişikliklere, maruziyete, ölüme yol açarsa sitotoksik olarak kabul edilir. Kimyasallar, fiziksel etkenler hücrede birçok dramatik değişikliğe sebep olabilirler. İn vitro sitotoksosite testleri, hücrenin biyolojik davranışını belirleyebilmek için hücre kültüründe uygulanan ölçüm metotlarıdır (Nenni, 2019).

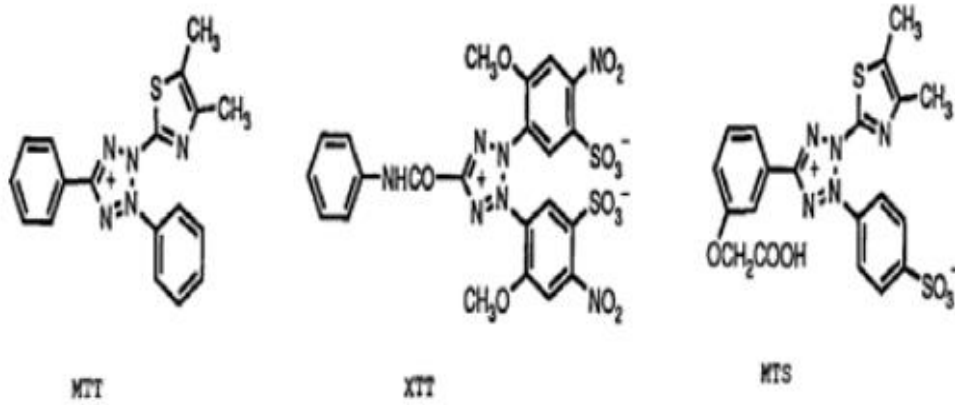
İn vitro sitotoksosite testleri bileşiğin faz I klinik çalışmalarında kullanılır ve bileşiğin biyolojik davranışı erkenden belirlenebilir. Toksik, kanserojenik etki gösteren bileşikler klinik faz çalışmalarından önce elenmiş olur (Eisenbrand ve ark., 2002). Özellikle yeni ilaçların keşfinde yapılan finansal yatırımlar, uzun süreçler ve ilaçların toksisitesi gibi etkenler *in vitro* sitotoksosite testlerinin duyarlılığı ile faz I aşamasında tespit edilebildiği için çalışmanın verimi arttırılmış, zaman ve maliyetler de azaltılmış olur. İn vitro sitotoksosite testleri üç ana başlıkta toplanmıştır. Tetrazolyum tuzları ile yapılan testler, LDH enzim salınım testi, Lüminesans metodlar (Tokur ve Aksoy, 2017).

Tetrazolyum tuzları, heterosiklik özelliğe sahip organik bileşiklerdir. Tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenir ve formazana dönüşür. Formazana dönüşen bileşik renk değiştirir. Tetrazolyum halkası ancak canlı hücrelerde bulunan mitokondri sayesinde açılabilir. Canlı hücrelerde bulunan mitokondri renk değişimine sebep olur. Ölü hücreler tetrazolyum bileşiklerini indirgeyemez ve renk değişimi geçirmezler. Bu renk değişiminin yalnızca canlı hücreler tarafından gerçekleştiriliyor olması tetrazolyum tuzlarının önemini artırmıştır. MTT, XTT, MTS, WST-1, WST-8 gibi bileşikler sıkça kullanılan bazı tetrazolyum testlerindendir (Riss ve Moravec, 2006).

MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür), hücre içinde indirgenebilen, pozitif yüklü bir bileşiktir. Vasata kristal şeklinde çökelir çünkü indirgenmediği formazon suda çözünmez. MTT bileşiği sarı renklidir, oluşan formazan mor renklidir. Bundan dolayı oluşan mor renkli formazanı çözebilmek için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılır. MTS, XTT ve WST bileşikleri ise negatif yüklü bileşiklerdir. Tek başlarına indirgenemezler bundan dolayı indirgenmenin gerçekleşebilmesi için elektron alıcı moleküller kullanılır. İndirgenen bileşikler suda

çözünür ve vasatta çözülmüş şekilde görünür. Bu bileşiklerle yapılan testler MTT'ye göre daha hassas bilgiler vermektedir (Tokur ve Aksoy, 2017). Bu bileşikler ile yapılan testler üç aşamada gerçekleşir:

1. Öncelikle hücreler toksik maddeye maruz bırakılır.
2. Toksik madde hücrelerden uzaklaştırılır ve vasata tetrazolyum tuzu eklenir. (1-4 saatlik bekleme süresiyle canlı hücreler bileşiği formazana indirger ve renk değişimi meydana gelir).
3. Oluşan renk değişimi spektrofotometreyle ölçülerek canlı-ölü hücre sayısı tespit edilir (Riss ve Moravec, 2006).



Şekil 2.12. MTT, XTT ve MTS bileşiklerinin kimyasal yapıları
(Barltrop ve ark., 1991)

LDH Enzim Salıverilmesi Testi de hücre canlılığını ölçen diğer testlerdendir. Laktat dehidrogenaz (LDH) tüm hücrelerde bulunur. Eğer hücreler sitotoksik bir etki altındaysa LDH enzimi vasata sızar. Dolayısıyla hücrelerin sitotoksitesisi LDH aktivitesi ölçülerek anlaşılabilir (Moravec, 2006).

Alamar Mavisi Floresans Testi, alamar mavisi (resazurin) bileşiğinin resofurin bileşiğine dönüştürülmesiyle gerçekleşir. Resazurin, bir redoks boyasıdır, koyu mavi renkte bulunur. Hücrede indirgenir ve pembe renkli resofurine dönüşür. Canlı hücreler resazurini, resofurine dönüştürürler. Florometre ile floresans sinyali

belirlenir ve canlılık arttıkça sinyal şiddeti artar. Ölü hücrelerin aktiviteleri olmadığı için sinyal oluşturamazlar (Tokur ve Aksoy, 2017).

ATP Biyoluminesans Testi, adenozin trifosfat (ATP) molekülü, tüm hücrelerde bulunan enerji kaynağıdır. Hücreler öldüğü zaman ATP sentezleyemez. Bundan dolayı bu test hücre canlılığını tespit etmekte kullanılmaktadır. Canlılık testleri arasındaki en hızlı, en kolay test olduğu bilinmektedir (Lomakina ve ark., 2015).

Gerçek Zamanlı (Real Time) Biyoluminesans Testi, bu testte farklı dozların etkileri farklı zaman aralıklarında incelenebilmektedir. ATP Biyoluminesans testinde olduğu gibi burada da lusiferaz enzimi kullanılır ve lusiferaz prosubstratı olarak koelenterazin kullanılır. Canlı hücreler koelenterazinin üzerindeki modifikasyonları uzaklaştırır ve koelenteramide dönüştürür. Böylelikle mavi renkli sinyal oluşur. Ölü hücrelerin metabolik aktivitesi olmadığı için sinyal oluşturamazlar (Riss ve ark., 2016).

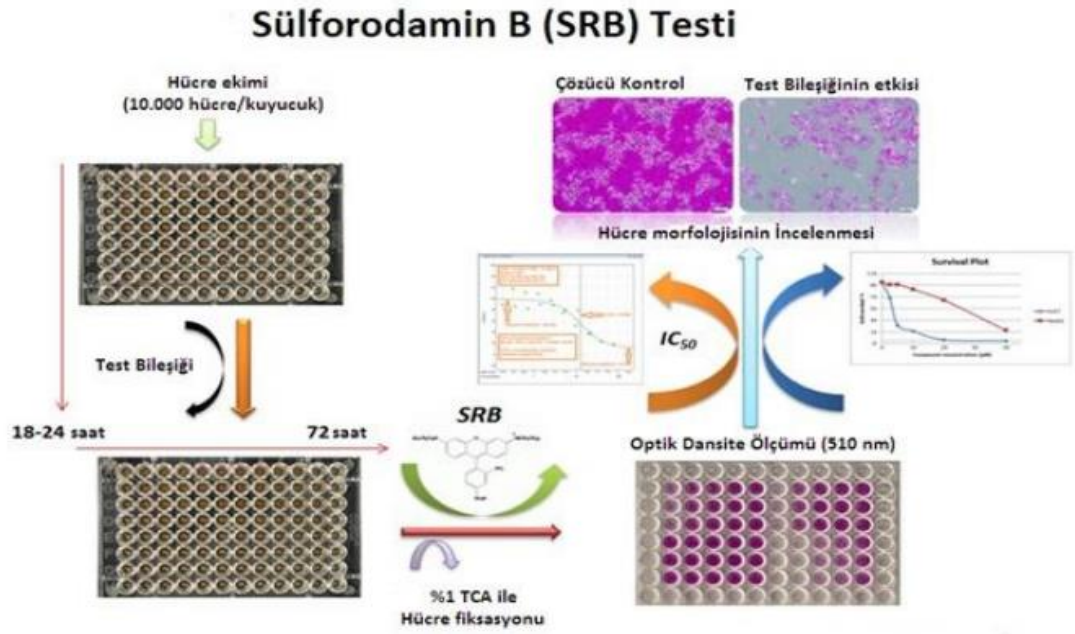
2.7.1. Sülförödamın B Testi (SRB)

Tetrazolyum tuzlarıyla yapılan testlerdeki dezavantajlardan dolayı araştırmacılar tetrazolyum bazlı olmayan yöntem arayışına girmişlerdir. 1990 yılında Skehan ve arkadaşları tarafından geliştirilen SRB yöntemi bunlar arasında en iyi sonuç veren en dikkat çeken yöntem olmuştur. Yöntem hücresel proteinlerin SRB ile boyanıp toplam biyokütlenin kolorimetrik olarak hesaplanması esasına dayanır. SRB yapısında iki tane sülfonik grup ($S(=O)_2$) bulunduran ve asit red-52 olarak tanımlanan, anyonik bir aminoksanten boyadır ve açık pembe renktedir. Boyanın bağlanabilmesi için zayıf asidik ortam, boyanın çözülmesi için ise bazik ortam gereklidir (Foto, 2016).

SRB testinde hücreler test bileşikleriyle kuyucuklara konulduktan sonra TCA (Trikloroasetik asit) ile sağlam bir şekilde yerleştirilir. SRB boyasıyla kuyucuklar yıkanır. Boya çözüldükten sonra spektrofotometrik okuma yapılır. Bu yöntemde hücre canlılığı protein ve biyokütle miktarı ölçülerek tespit edilir. Boyaya bağlanan protein miktarı canlılığı belirler. SRB yönteminde lineer grafik elde edilmesi, MTT, XTT, WST-1; NR, LDH testlerine göre daha hassas olması, kültür koşullarından daha az

etkilenmesi, malzemelerin ucuz ve kolay bulunabilir olması yöntemin tercih edilme sebeplerindendir (Zilifdar-Foto, 2016).

SRB yöntemi, Ulusal Kanser Enstitüsü'nce (NCI) anti-kanser ilaç etken maddesi tarama çalışmaları için elverişlidir (Foto, 2016). Bu yüksek lisans tez çalışmasında antikanser aktiviteleri incelenen bileşiklerde Sülförodamin B (SRB) testi uygulanmıştır.



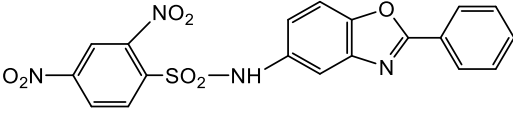
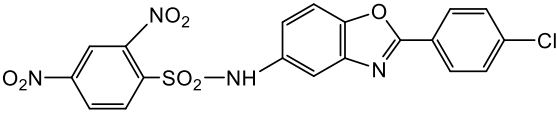
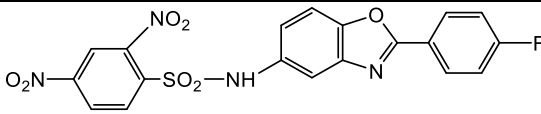
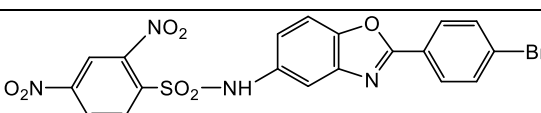
Şekil 2.13. SRB Testinin Uygulanışı (Foto, 2016).

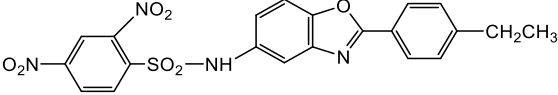
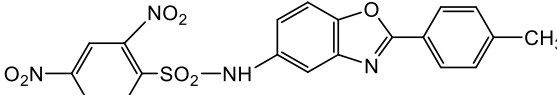
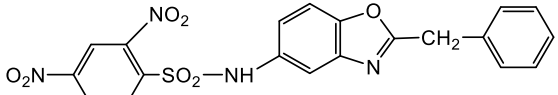
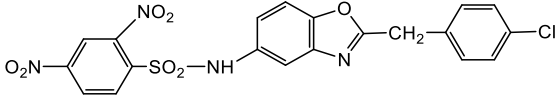
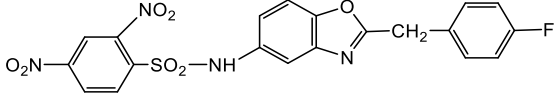
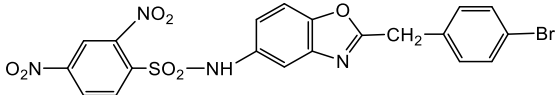
3. MATERYAL VE YÖNTEM

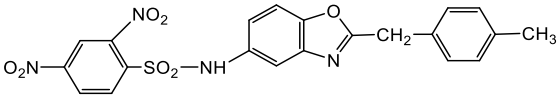
3.1 Test Edilen Bileşikler

Tez çalışmasında kullanılan 11 adet sülfonamido benzoksazol türevi bileşik Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda sentezlenmiştir (Ertan-Bolelli ve ark., 2017). Tez çalışmasında test edilen bileşiklerin yapı ve moleküler özellikleri Tablo 3.1. 'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada test edilen sülfonamido benzoksazol türevi bileşiklerin kimyasal özellikleri

TN1	 Chemical Formula: C₁₉H₁₂N₄O₇S Exact Mass: 440,04 Molecular Weight: 440,39 m/z: 440.04 (100.0%), 441.05 (21.0%), 442.04 (4.8%), 442.05 (3.7%), 441.04 (2.3%), 443.04 (1.0%) Elemental Analysis: C, 51.82; H, 2.75; N, 12.72; O, 25.43; S, 7.28
TN2	 Chemical Formula: C₁₉H₁₁ClN₄O₇S Exact Mass: 474,00 Molecular Weight: 474,83 m/z: 474.00 (100.0%), 476.00 (36.8%), 475.01 (20.9%), 477.00 (8.4%), 476.01 (3.7%), 475.00 (2.3%), 478.00 (2.2%) Elemental Analysis: C, 48.06; H, 2.34; Cl, 7.47; N, 11.80; O, 23.59; S, 6.75
TN3	 Chemical Formula: C₁₉H₁₁FN₄O₇S Exact Mass: 458,03 Molecular Weight: 458,38 m/z: 458.03 (100.0%), 459.04 (20.9%), 460.03 (4.8%), 460.04 (3.7%), 459.03 (2.3%), 461.03 (1.0%) Elemental Analysis: C, 49.79; H, 2.42; F, 4.14; N, 12.22; O, 24.43; S, 6.99
TN4	 Chemical Formula: C₁₉H₁₁BrN₄O₇S Exact Mass: 517,95 Molecular Weight: 519,28 m/z: 519.95 (100.0%), 517.95 (97.9%), 520.95 (22.8%), 518.96 (20.5%), 521.95 (4.9%), 519.96 (3.6%), 521.96 (3.5%), 518.95 (2.2%) Elemental Analysis: C, 43.95; H, 2.14; Br, 15.39; N, 10.79; O, 21.57; S, 6.17

TN5	 Chemical Formula: C₂₁H₁₆N₄O₇S Exact Mass: 468,07 Molecular Weight: 468,44 m/z: 468.07 (100.0%), 469.08 (23.2%), 470.07 (4.9%), 470.08 (4.2%), 469.07 (2.3%), 471.07 (1.1%) Elemental Analysis: C, 53.84; H, 3.44; N, 11.96; O, 23.91; S, 6.84
TN6	 Chemical Formula: C₂₀H₁₄N₄O₇S Exact Mass: 454,06 Molecular Weight: 454,41 m/z: 454.06 (100.0%), 455.06 (24.3%), 456.05 (4.5%), 456.07 (2.3%), 456.06 (1.9%), 457.06 (1.1%) Elemental Analysis: C, 52.86; H, 3.11; N, 12.33; O, 24.65; S, 7.06
TN10	 Chemical Formula: C₂₀H₁₄N₄O₇S Exact Mass: 454,06 Molecular Weight: 454,41 m/z: 454.06 (100.0%), 455.06 (24.3%), 456.05 (4.5%), 456.07 (2.3%), 456.06 (1.9%), 457.06 (1.1%) Elemental Analysis: C, 52.86; H, 3.11; N, 12.33; O, 24.65; S, 7.06
TN11	 Chemical Formula: C₂₀H₁₃ClN₄O₇S Exact Mass: 488,02 Molecular Weight: 488,85 m/z: 488.02 (100.0%), 490.02 (38.4%), 489.02 (24.2%), 491.02 (8.4%), 490.03 (2.3%), 492.02 (1.5%), 492.01 (1.5%) Elemental Analysis: C, 49.14; H, 2.68; Cl, 7.25; N, 11.46; O, 22.91; S, 6.56
TN12	 Chemical Formula: C₂₀H₁₃FN₄O₇S Exact Mass: 472,05 Molecular Weight: 472,40 m/z: 472.05 (100.0%), 473.05 (24.2%), 474.04 (4.5%), 474.06 (2.3%), 474.05 (2.0%), 475.05 (1.1%) Elemental Analysis: C, 50.85; H, 2.77; F, 4.02; N, 11.86; O, 23.71; S, 6.79
TN13	 Chemical Formula: C₂₀H₁₃BrN₄O₇S Exact Mass: 531,97 Molecular Weight: 533,31 m/z: 531.97 (100.0%), 533.97 (99.2%), 532.97 (24.2%), 534.97 (23.3%), 533.96 (4.5%), 535.96 (4.4%), 535.97 (4.3%), 533.98 (2.3%), 534.96 (1.5%), 536.97 (1.4%) Elemental Analysis: C, 45.04; H, 2.46; Br, 14.98; N, 10.51; O, 21.00; S, 6.01

TN14	 Chemical Formula: C₂₁H₁₆N₄O₇S Exact Mass: 468,07 Molecular Weight: 468,44 m/z: 468.07 (100.0%), 469.08 (23.2%), 470.07 (4.9%), 470.08 (4.2%), 469.07 (2.3%), 471.07 (1.1%) Elemental Analysis: C, 53.84; H, 3.44; N, 11.96; O, 23.91; S, 6.84

3.2. Çalışmada Kullanılan Bileşiklerinin Hazırlanması

Antikanser aktivite çalışmalarında kullanılan bileşikler; %100 dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözündürülerek stok çözeltileri hazırlanmış ve kullanılıncaya kadar -20°C’ de saklanmıştır. Her çalışma öncesinde bu stok çözeltiler oda sıcaklığında çözündürülüp, her bir bileşiğe ait farklı konsantrasyonları DMSO ile sulandırılarak her defasında taze olarak hazırlanmıştır. DMSO’nun çalışmada kullanılan test sistemine etkisi “çözücü kontrol” olarak çalışmanın başında incelenmiş ve test sistemlerine etkisi olmadığı bulunmuştur.

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada 11 farklı benzoksazol türevinin potansiyel antikanser aktiviteleri; insan meme kanseri hücresi (MCF7), insan karaciğer kanseri hücresi (A549) ve sıçan glial tümör hücresi (C6) olmak üzere 3 farklı hücre serisi üzerinde denenmiştir. Ayrıca test bileşiklerinin sağlıklı hücreler üzerindeki etkileri ise fare bağ doku fibroblast hücresi (L929) hücre serisi kullanılarak belirlenmiştir. Bu hücre dizilerden L929 Doç. Dr. Aylin Gürpınar’dan (Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fizyoloji A.B.D.) diğer hücreler ise Amerikan tipi hücre kültür koleksiyonu (ATCC)’den temin edilmiştir. Hücre kültürü ile yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

3.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (HyClone, Utah,USA), fetal bovine serum (FBS) (Lonza, Belçika), penisilin-streptomisin çözeltisi (Lonza, Belgium), tripsin-EDTA (Gibco-BRL, Gaithersburg, USA) ve %0.4'lük Tripan mavisi (Sigma, USA) ticari olarak temin edilmiştir.

3.3.2. Kültür Ortamının Hazırlanması ve Hücre Dizilerinin Çoğaltılması

Hücre Kültür Vasatı.....	(5 ml)
Fetal Sığır Serum.....	0.5 ml
Penisilin-Streptomisin (1:1).....	50 µl
DMEM.....	4.45 ml

%10 serum (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin antibiyotikleri ile desteklenmiş DMEM ortamı ile L929, MCF7, C6 ve A549 hücreleri süspanse edilerek, 37°C'de, %95 nem ve %5 CO₂ içeren etüvde, aseptik şartlarda çoğaltılmıştır. Bu amaçla farklı büyüklüklerde (25 cm² ve 75 cm²'lik) hücre kültür flaskları kullanılmıştır. Hücre kültürasyon periyotlarında; hücrelerin yüzeye tutunması, kap yüzeyini doldurma potansiyelleri (confluent durumu) ve hücrelerin yoğunluğu inverted mikroskopda (Olympus) incelenmiştir.

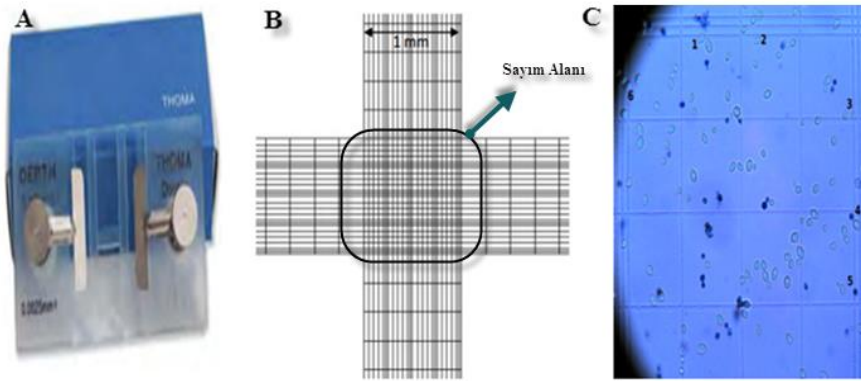
3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması

%80-90 oranda confluent hücreler, pasajlanarak çoğaltılmıştır. Pasajlama işlemlerinde; besi yeri kültür kaplarından uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Hücrelerin yapışık olduğu kap yüzeylerinden ayrılması için hücrelerin üzerine 1 ml tripsin/EDTA çözeltisi eklenip, 3-4 dak. 37°C'lik CO₂'li inkübatörde bekletilmiştir. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra; 4-5 ml serum içeren DMEM kültür kabına eklenip, 5 dak. 1000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra hücre içeren pelet 10 ml hücre kültür vasatı içinde süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu 5 ml olacak şekilde 2 farklı kültür kabına payda edilerek, kültür kapları inkübasyona bırakılmıştır. Her pasajlama öncesinde eskimiş hücre kültür vasatı 2-3 günde bir taze vasat ile yenilenmiştir.

3.3.4. Tripan Mavisi Ekstraksiyon Testi ile Canlı Hücre Sayımı

Hücre sayımı ve canlılığı trypan mavisi ekstraksiyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla; hazırlanan 10 µl hücre süspansiyonları % 0.4'lük tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra thoma lamında yükleme bölgesine eklenerek mikroskop altında ölü ve canlı hücre sayımları gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.1.'de görüldüğü üzere ölü hücreler membran dinamiği zarar gördüğü için boyayı içine alarak mavi renkte, canlı hücreler ise kararlı zar yapılarından dolayı boya almadığı için beyaz (şeffaf) renkte görülmüştür.

Hücreler sayımı için thoma lamındaki sayım alanının tamamı kullanılarak yapılmış ve hücre yoğunluğu (hücre/ml) $H \times DF \times 10^4$ formülüne göre hesaplanmıştır. (H: Sayım alanında sayılan hücre sayısı; DF: Sulandırma faktörü)



Şekil 3.1. Tripan mavisi ekstraksiyon testi,

(A: Çalışmalarda kullanılan Thoma lamı, B: Sayım alanı, C: Canlı ve ölü hücrelerin mikroskopik görünümü (Ölü hücreler mavi, canlı hücreler renksiz (şeffaf) görülmektedir))

3.3.5. Hücrelerin Dondurularak Saklanması

Hücrelerin dondurulma aşamasında; kriyoprotektif madde varlığında kademeli dondurma işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla hücreler tripsinizasyon ile toplanmıştır. Daha sonra 800 rpm'de 5 dak. santrifüjleme ile tripsin ortamdan uzaklaştırılmıştır. Peleti oluşturan hücreler %5 DMSO + % 95 FBS içinde süspanse edilerek, buz

üzerindeki 1,5 ml' lik kriyojenik tüplere aktarılıp hızlıca - 70 °C'lik derin dondurucuya alınmıştır. Dondurulmuş hücreler - 70 °C' de 1-2 ay saklanabilir. Uzun süreli saklamalar için ise hücreler - 70 °C'de 2-4 saat bekletilip sıvı azot içerisine (-196 °C) alınmıştır.

DMSO; hücrelerin etrafında hiper ozmotik çevre oluşturmaktadır. Böylelikle viskozitesi düşük olduğu için hemen kristalize olma özelliği olan suyun; hem kristalleşmeden katı hale geçmesini (vitrikasyon) sağlar hem de hücrelerin dehidrasyonunu önler. Aynı zamanda hücre içi suyu ile yer değiştirip, buz kristallerinin oluşumunu önleyerek, hem hücre zarını kararlı kılar hem de hücre zarı ve hücre içi organellerini buz kristallerinin zararlı etkilerinden korumuş olur.

-196°C'deki sıvı azot tankında saklanan L929 ve HeLa hücreleri, tanktan çıkarılıp önceden 37°C' ye ayarlanmış su banyosuna alınarak hücrelerin hızlı bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Seri bir şekilde çözünen hücreler, 5 ml DMEM içerisinde süspanse edilmiştir. 1000 rpm' de 5 dak. santrifügasyon sonrasında DMSO içeren süpernatant uzaklaştırılmıştır. Böylelikle; dondurma işlemi sırasında kullanılan %5'lik DMSO'nun olası toksik etkisi önlenmiştir. Pelet 1 ml kültür ortamı içinde tekrar süspanse edildikten sonra hücre canlılığı ve sayımı mikroskopik olarak gerçekleştirilmiştir. % 95-99 canlılıkta olduğu tespit edilen hücre süspansiyonu çalışmalarda kullanılmıştır.

3.4. Sülforodamin B (SRB) Testi

Test bileşiklerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla SRB yöntemi; Vichai ve Kirtikara'nın (2006) önerdiği yöntem üzerinde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır.

Yöntem, anyonik sulforhodamine B boyasının, fikse edilmiş hücrelerdeki bazik proteinlere bağlanmasını esas alır. 96 kuyucuklu mikropiplaklarda her bir kuyucukta canlı kalan hücrelerin toplam protein miktarları kolorimetrik olarak ölçülmüştür (Skehan, 1990).

3.4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sitotoksisite çalışmalarında trikloroasetik asit (TCA)(Sigma, USA), Tris (Sigma, USA), sülförhodamine B (SRB) (Sigma, USA) ve asetik asit (Sigma, USA) kullanılmıştır.

3.4.2. Yöntemin Aşamaları

Yöntem; mikropklara hücrelerin ekimi, test bileşikleri ile muamele edilmesi, fiksasyon ve yıkama, boyama, spektrofotometrik ölçüm sonrası analiz aşamalarından oluşmaktadır. Her bir aşama birçok parametre açısından [hücre yoğunluğu (1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 *, 2×10^4 hücre/kuyucuk), fiksatif konsantrasyonu (%10*, %16, %18, %20 TCA), fiksatif miktarı (50, 75, 100 μ l* TCA), fiksasyon süresi (30, 60*, 90 dakika), boya miktarı (50, 75, 100 μ l*), boyama süresi (30*, 60, 90 dakika)] optimize edilmiştir. Sonuç olarak 1×10^4 hücre yoğunluğu, 60 dakika %10'luk TCA ile fiksasyon, 100 μ l SRB ile 30 dakika boyama ile deneylere devam edilmiştir.

Negatif kontrol olarak (%0,5 son konsantrasyonda) DMSO kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak rutinde kemoterapötik ajan olarak kullanılan etoposid (ETOP) ve kamptotesin (CPT) kullanılmıştır.

3.4.2.1. Hücrelerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan hücre dizileri; çoğaltılıp, hücre sayımı yapıldıktan sonra 10^5 hücre/mL hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyonundan 96'lı mikropklara hücre sayısı 10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek, mikropklar 37 $^{\circ}$ C'de, %95 nem ve %5 CO₂ ortamında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

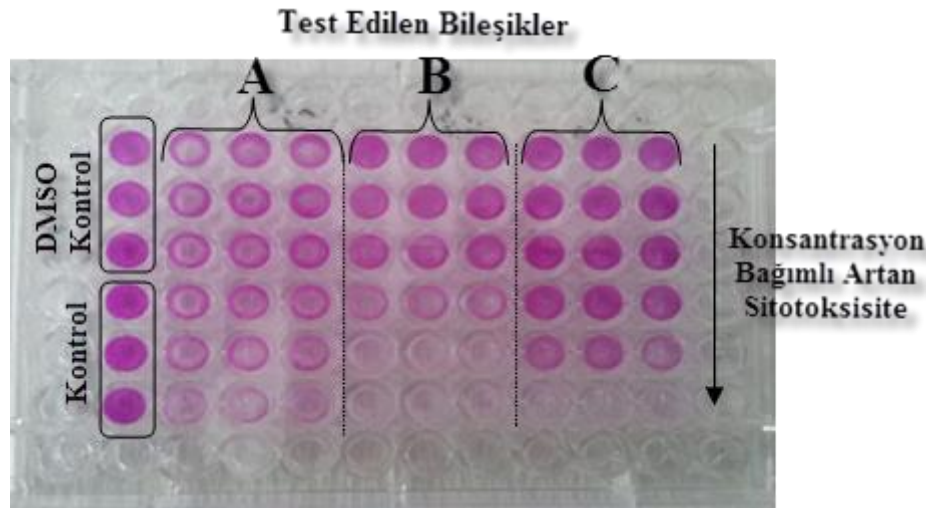
İnkübasyon sonrasında mikropkalardaki hücre vasatı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler, 5 farklı son konsantrasyonda (12.5, 25, 50, 100 ve 200 μ M) sülfonamido benzoksazol bileşiklerini içeren hücre kültür vasatı ile muamele edilerek 48 saat inkübe edilmiştir.

3.4.2.2. Fiksasyon ve Boyama

72 saatlik total inkübasyondan sonra; kuyucuklardaki besi yeri uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklara 100µl/kuyucuk olacak şekilde %10' luk soğuk TCA eklenerek fiksasyon sağlanmıştır. TCA uzaklaştırılıp plakalar distile su ile 5 kez yıkanmıştır. Mikroplaklar; 0.057 (g/ml)%'lik SRB ile boyanıp, %1'lik asetik asit ile yıkanarak kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.2).

3.4.2.3. Spektrofotometrik Ölçüm ve Analiz

Proteinlerin çözünmesi için her bir kuyucuğa 200 µl tris (10mM pH:10,5) eklenip, 510 nm'de absorbansları ölçülmüştür.



Şekil 3.2. SRB testi sonrası plak düzeni ve görünümü

Test bileşikleriyle muamele edilmiş kuyucukların optik dansite (OD) verileri kontrol grubu OD verileri ile karşılaştırılmıştır. Muamele edilen konsantrasyona karşılık gelen % canlılık değerleri için $\% \text{ Canlılık} = \frac{OD_{(\text{Örnek})}}{OD_{(\text{Kontrol})}} \times 100$ formülü kullanılmıştır. Son olarak; test bileşiklerine ait hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon (IC₅₀) değerleri S-probit analizi ile hesaplanmıştır. Test edilen benzoksazol türevlerinin her bir konsantrasyonunun etkisi 3 kuyucukta tekrarlı olarak denenmiş ve deneyler 3 biyolojik tekrar içerecek şekilde uygulanmıştır. Deneyler sonrası saptanan verilerin istatistiksel analizleri yapılarak, her bir benzoksazol türevinin

her konsantrasyonu için saptanan % canlılık değerleri $\pm$ standart sapmalarına ait tablolar oluşturulmuştur.

3.4.2.4. İstatistiksel Analizler

SRB testlerinden elde edilen veriler Graphpad Prism5 paket programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği bağımsız grup sayısı iki olduğunda Student's t testi ile; ikiden fazla grup arasındaki farkın önemliliği ise Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Dunn's çoklu karşılaştırma testi kullanılarak anlamlı farklılığa neden olan doz grup/grupları belirlenmiştir. Verilere ait tanımlayıcı istatistikler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir.

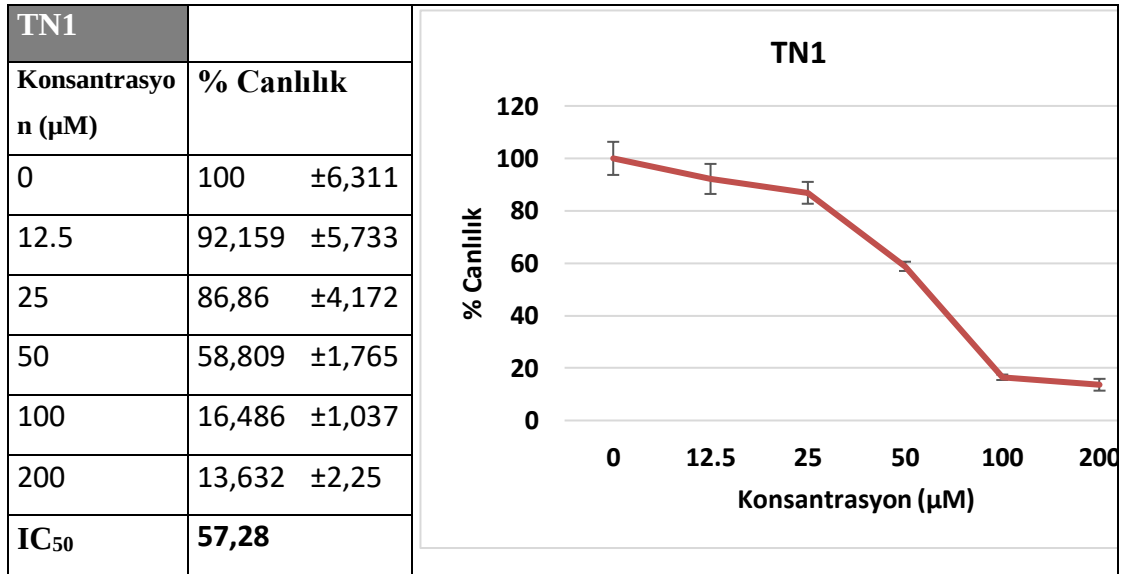
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. SRB Testine Ait Sonuçlar

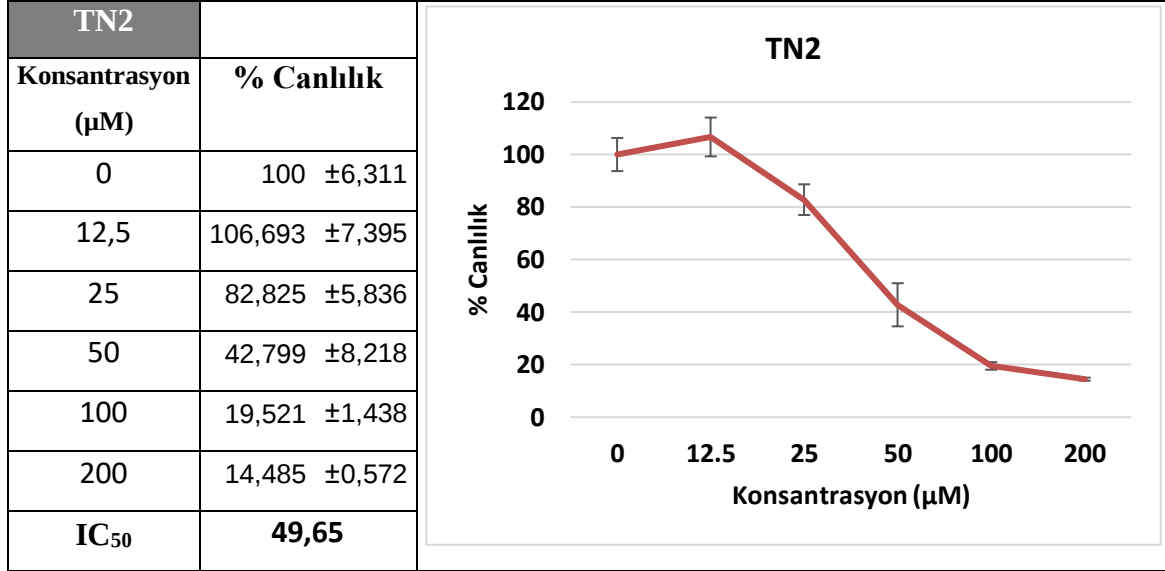
4.1.1 Çalışmada Test Edilen Bileşiklerin A549 Hücreleri Üzerindeki Antikanser Etkileri

A549 hücre hattı için en etkili bileşiğin 17,92 μM IC_{50} değeri ile TN4 bileşiği olduğu bu değer pozitif kontrol bileşiği etoposidin 32,49 μM olan IC_{50} değerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca 29,55 μM IC_{50} değerine sahip TN 11 bileşiğinin de pozitif kontrolden daha etkili olduğu belirlenmiştir. Diğer bileşiklerin IC_{50} değerleri de pozitif kontrolden yüksek olup 45,83-89,89 μM arasında değişmektedir.

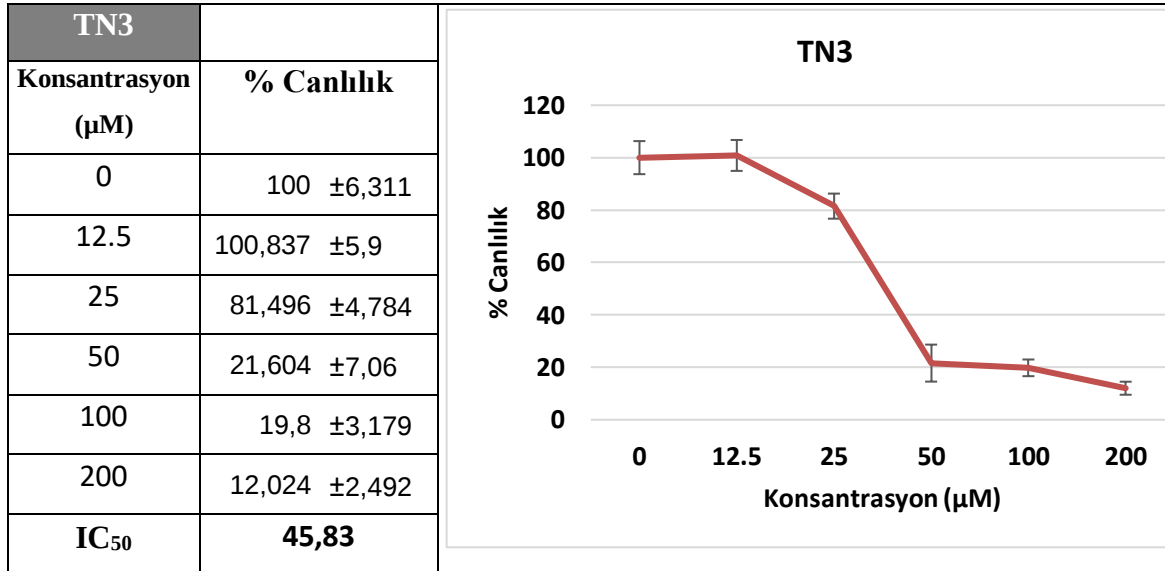
Tablo 4.1. TN1 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



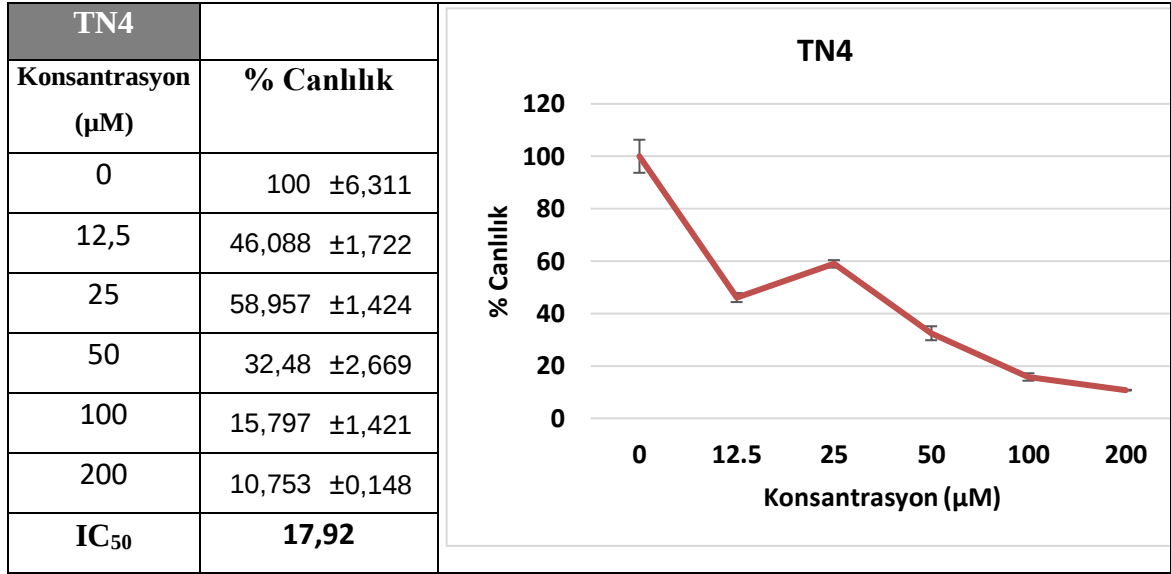
Tablo 4.2. TN2 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



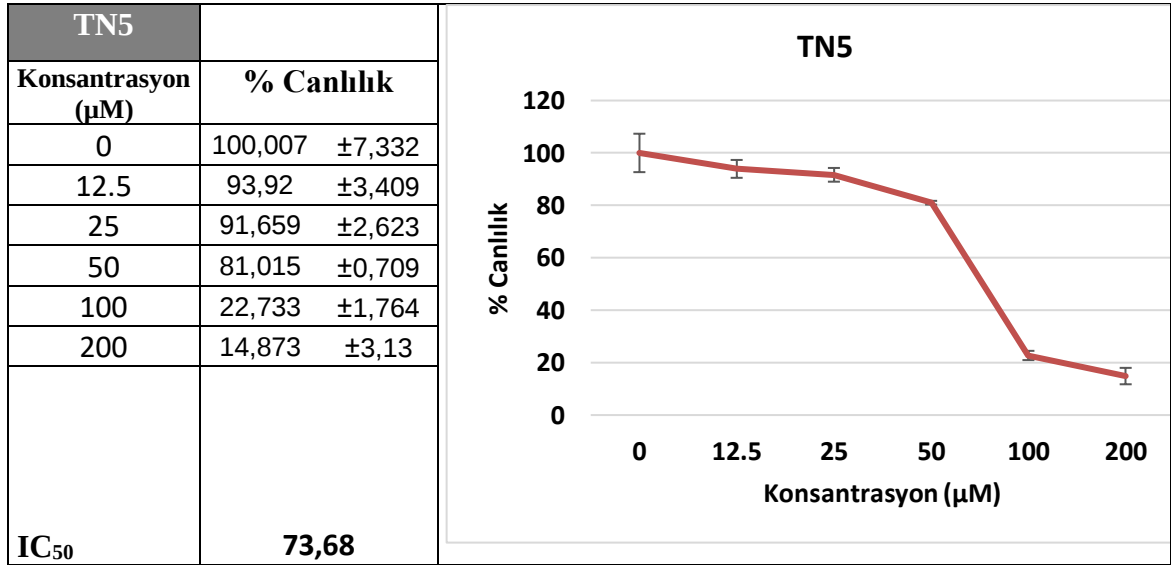
Tablo 4.3. TN3 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



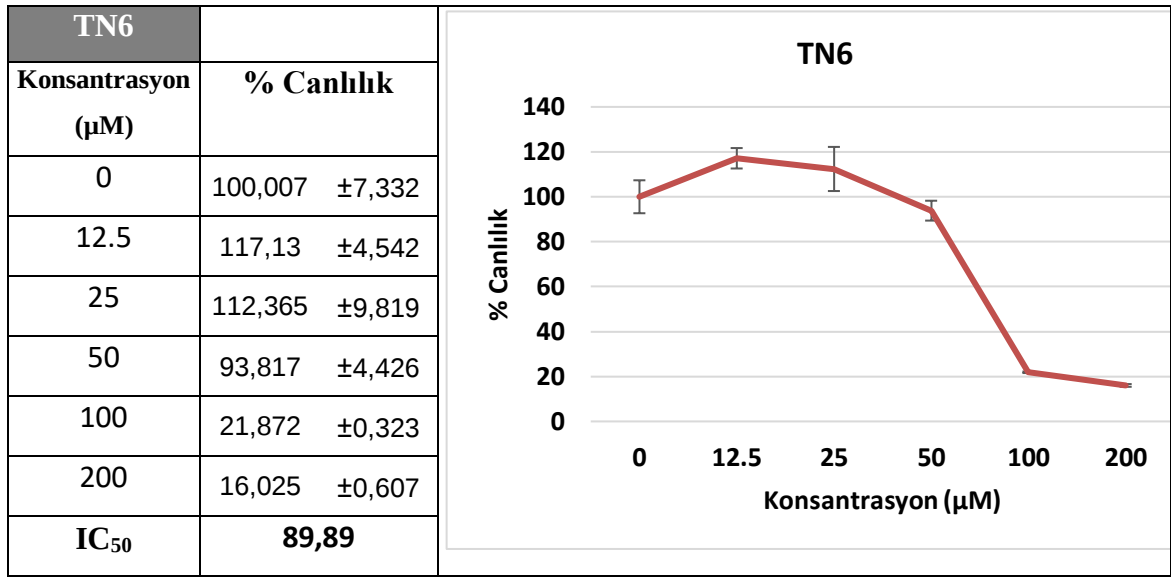
Tablo 4.4. TN4 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



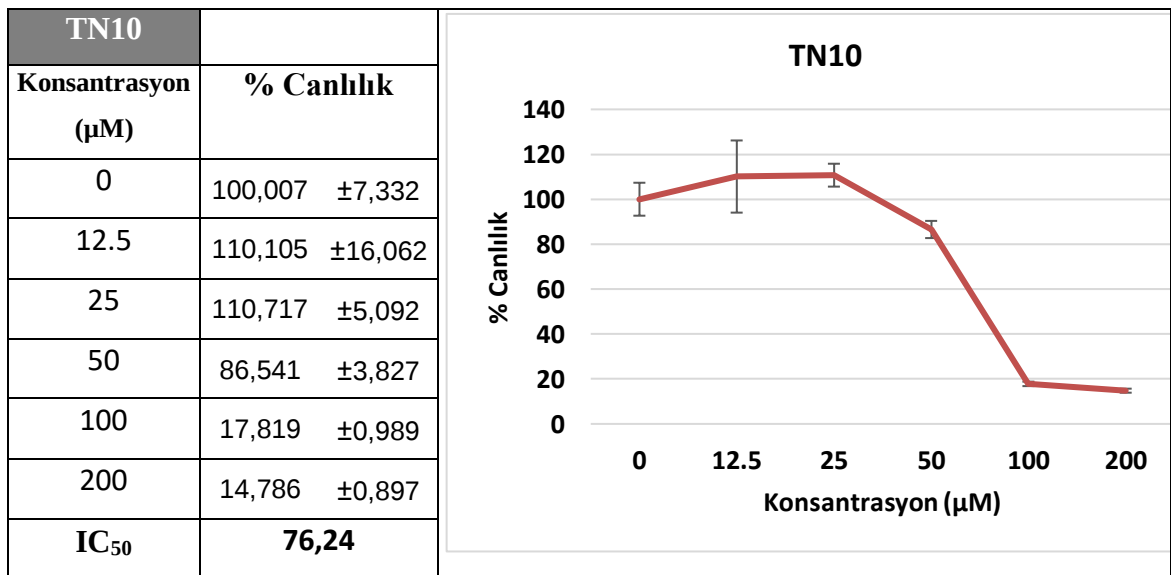
Tablo 4.5. TN5 bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



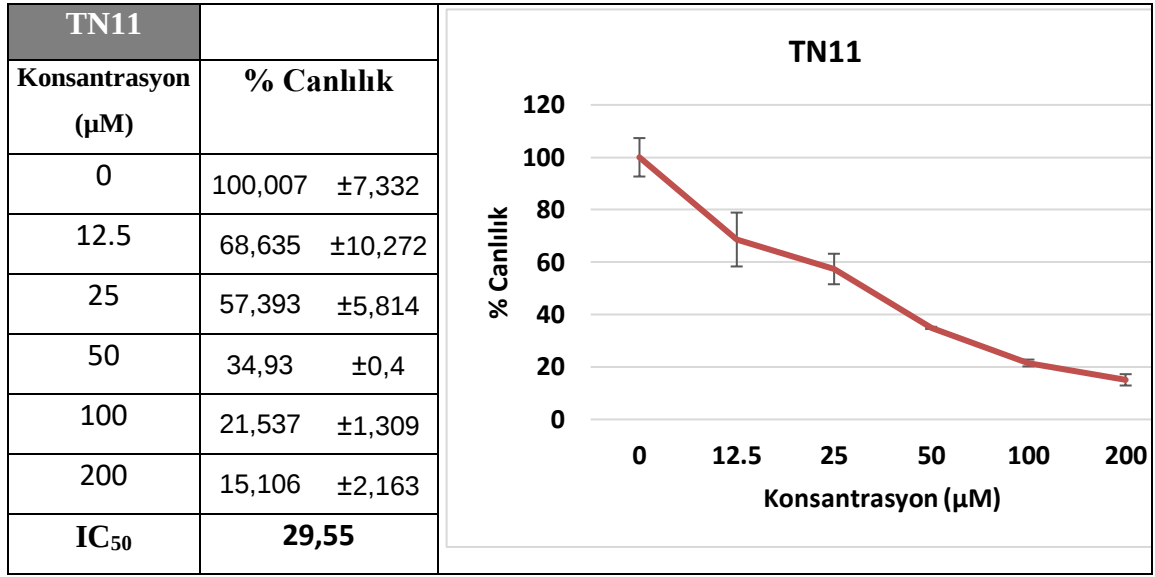
Tablo 4.6. TN6 bileşiminin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



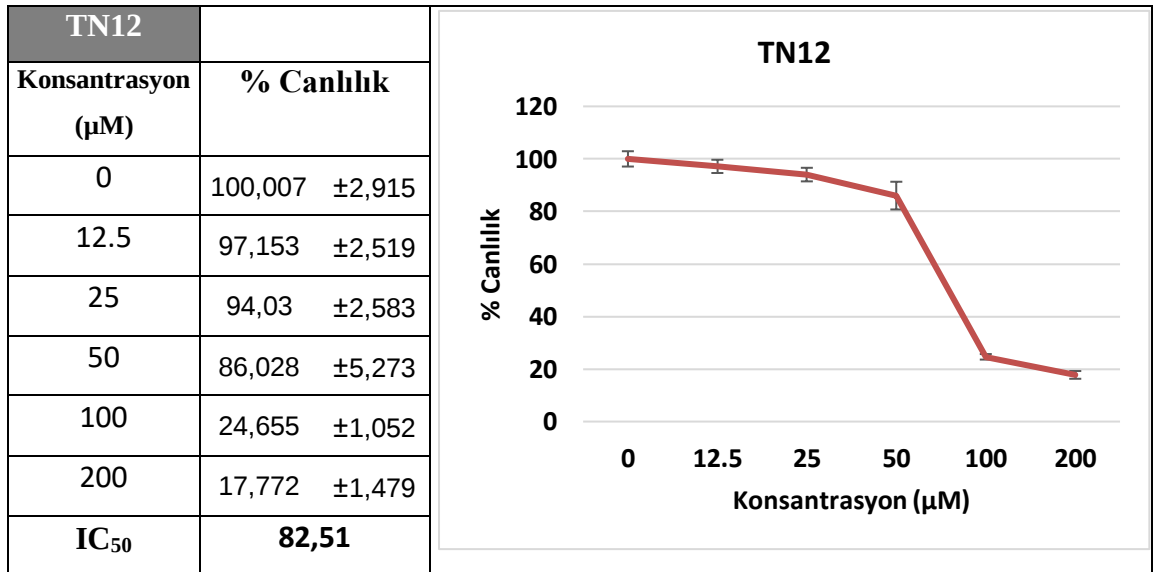
Tablo 4.7. TN10 bileşiminin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



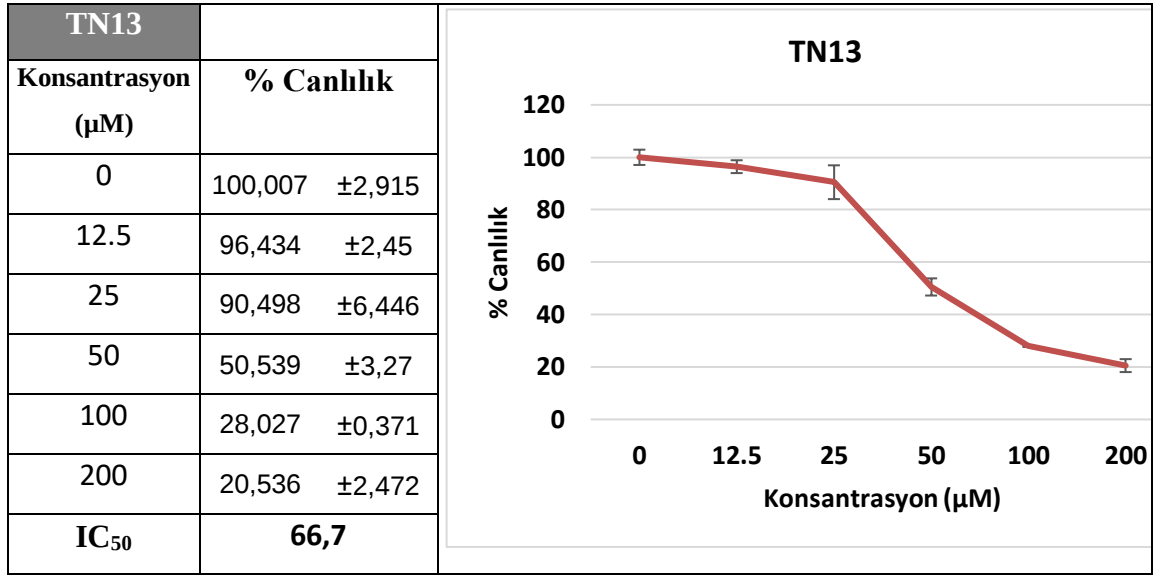
Tablo 4.8. TN11 bileşiminin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



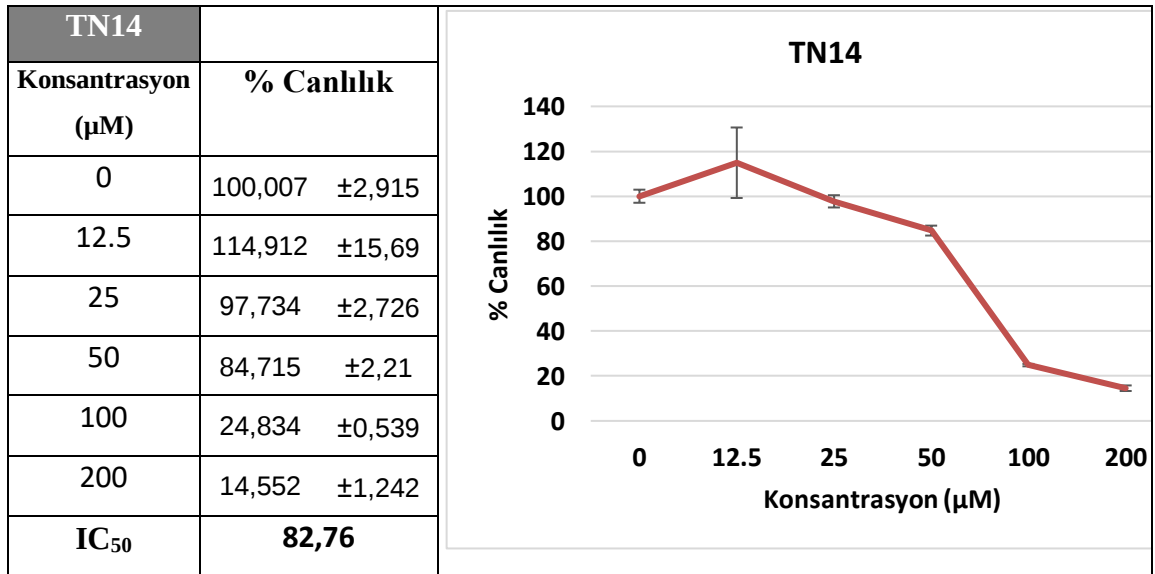
Tablo 4.9. TN12 bileşiminin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



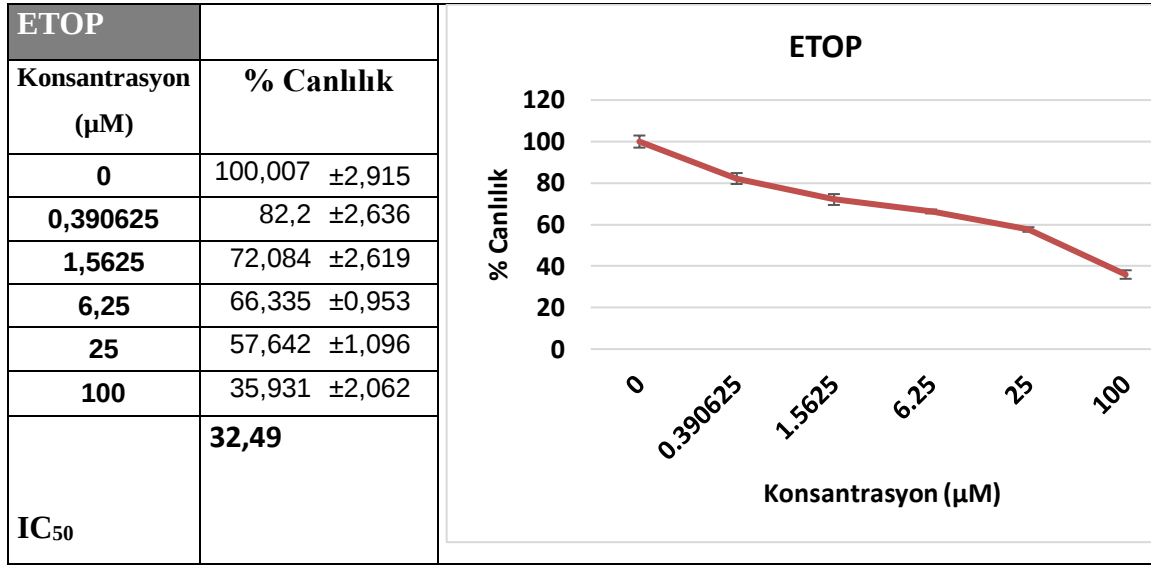
Tablo 4.10. TN13 bileşiminin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



Tablo 4.11. TN14 bileşiminin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



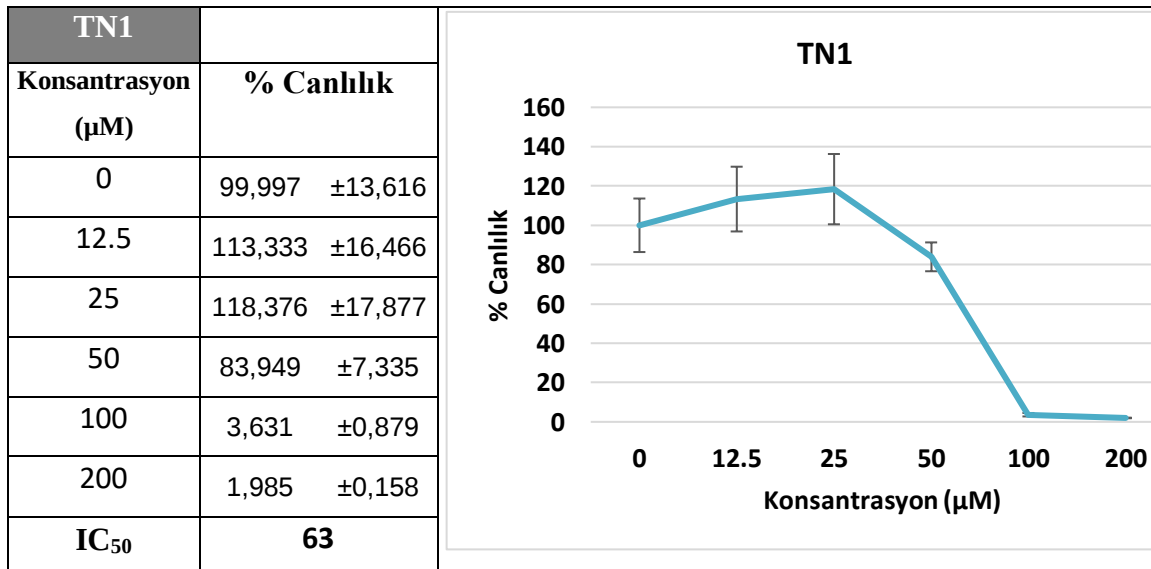
Tablo 4.12. Etoposid bileşiğinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



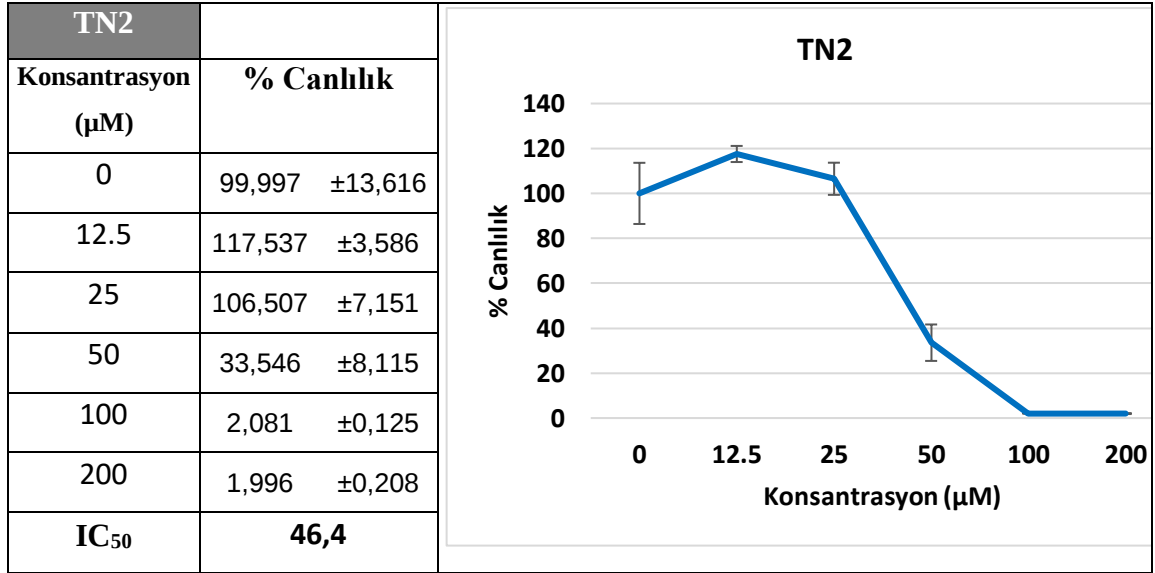
4.1.2 Çalışmada test edilen bileşiklerin C6 hücreleri üzerindeki antikanser etkileri

C6 hücre hattı için en etkili bileşiğin 4,01 µM IC₅₀ değeri ile TN3 bileşiği olduğu bu değerın pozitif kontrol bileşiği etoposidin 4,01 µM olan IC₅₀ değeriyle aynı olduğu görülmektedir. Diğer bileşiklerin IC₅₀ değerleri de pozitif kontrolden yüksek olup 20,59-69,52 µM arasında değişmektedir.

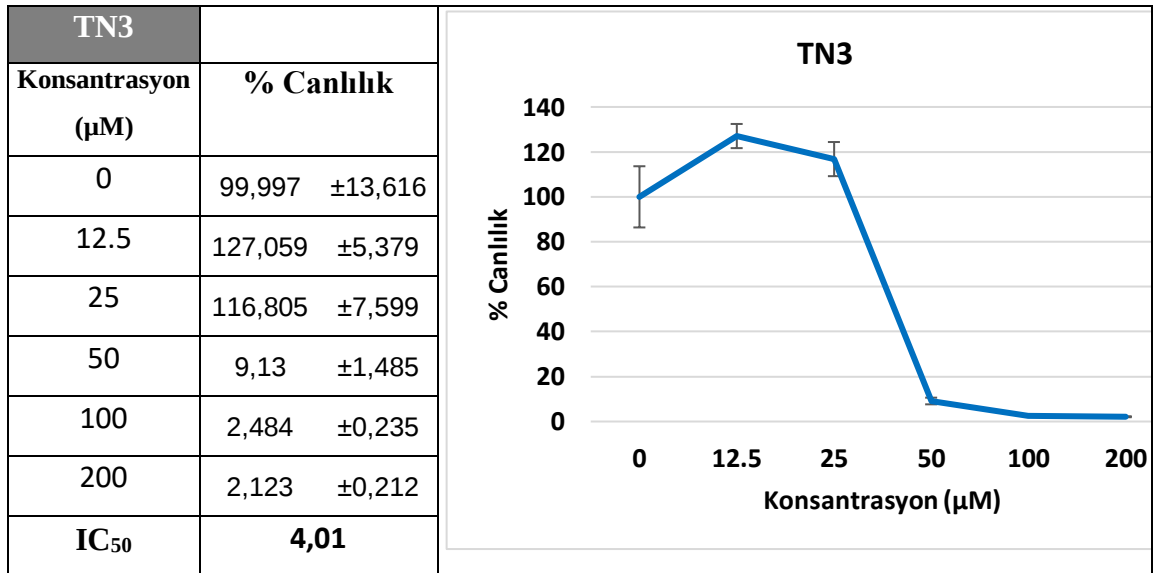
Tablo 4.13. TN1 bileşiğinin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



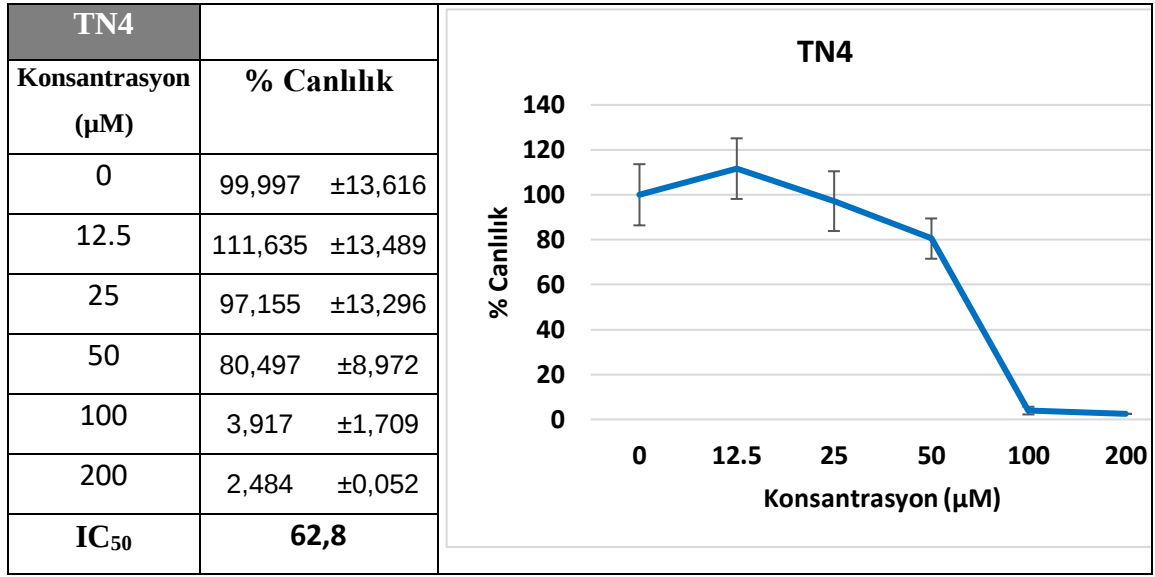
Tablo 4.14. TN2 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



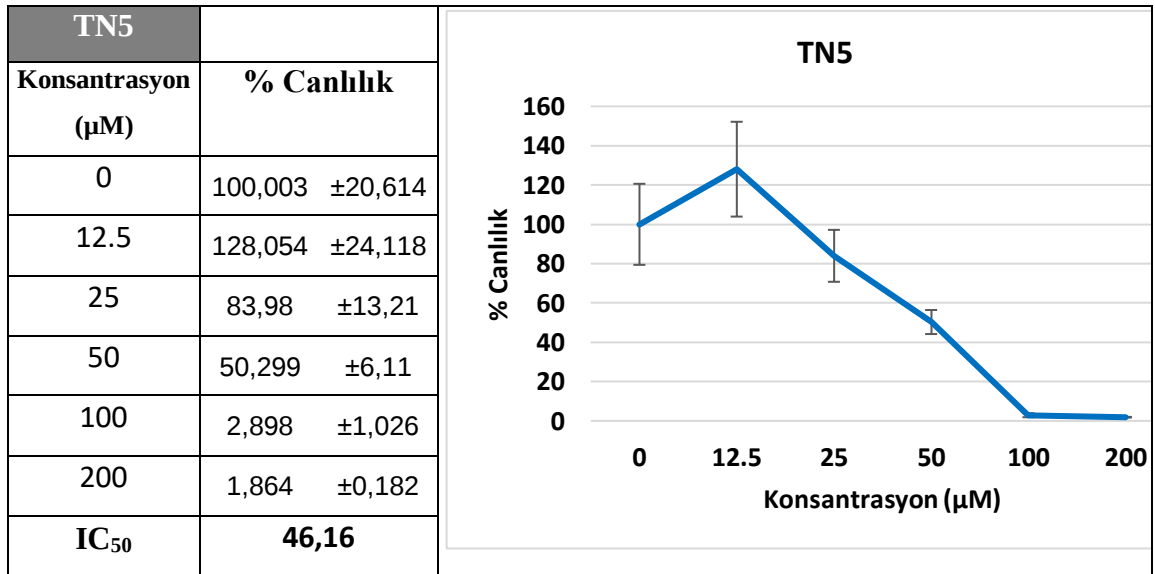
Tablo 4.15. TN3 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



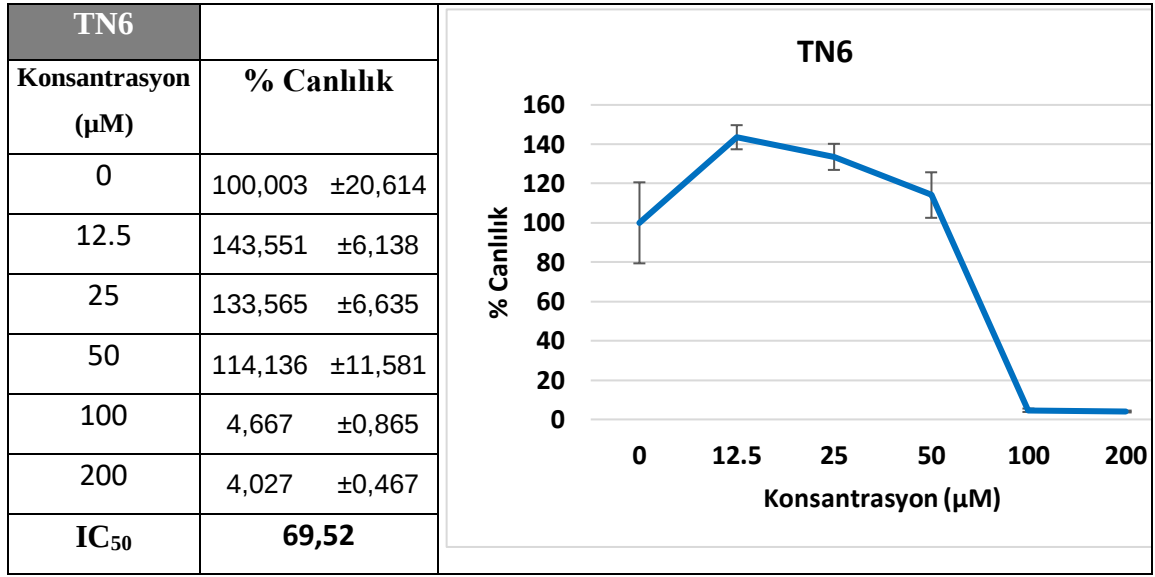
Tablo 4.16. TN4 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



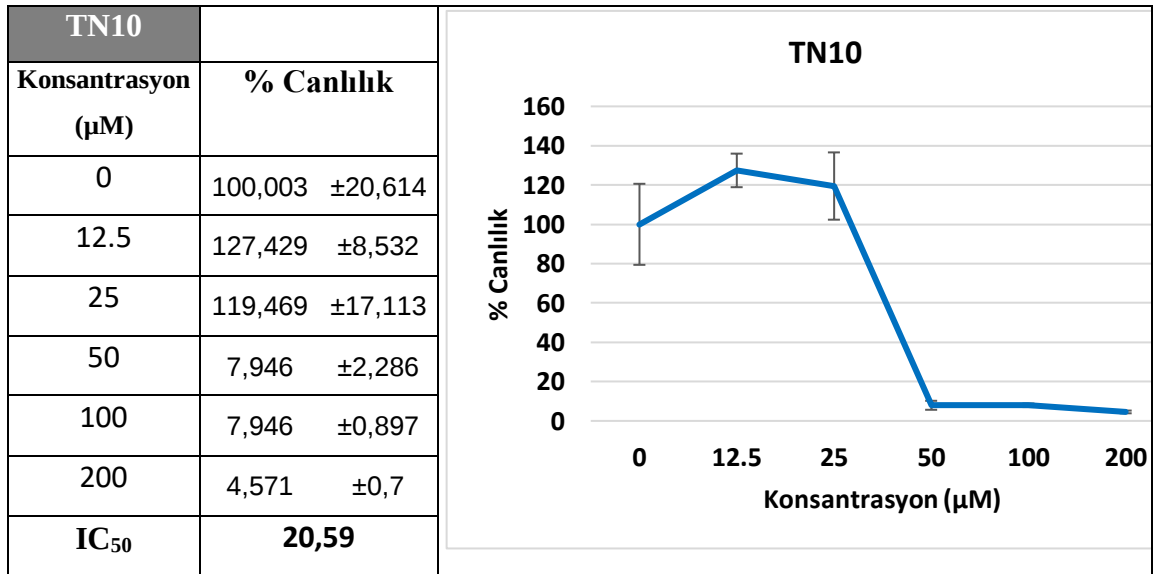
Tablo 4.17. TN5 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



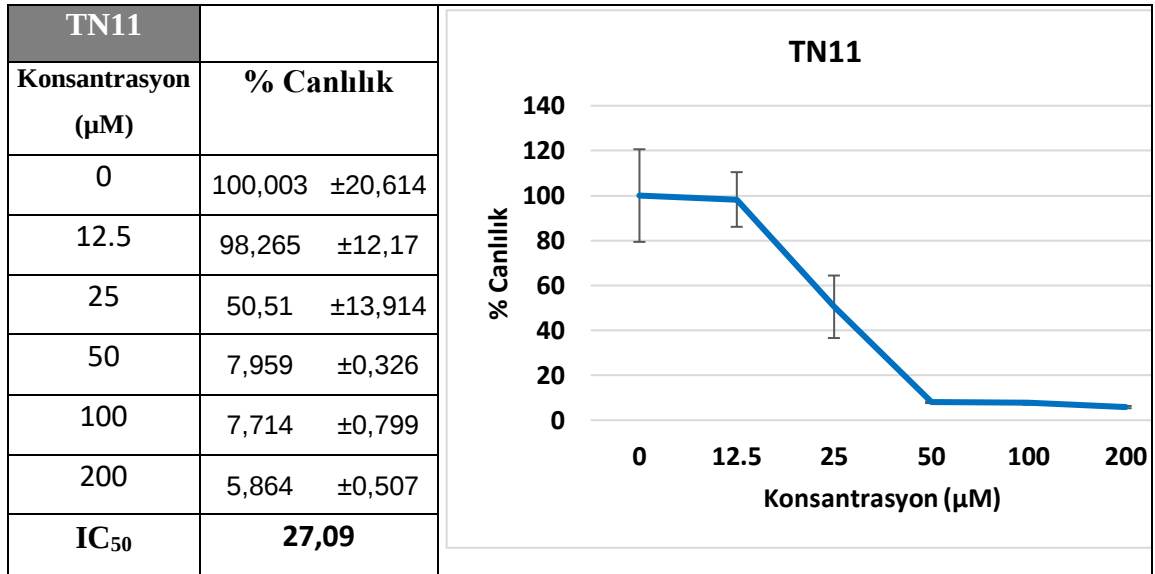
Tablo 4.18. TN6 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



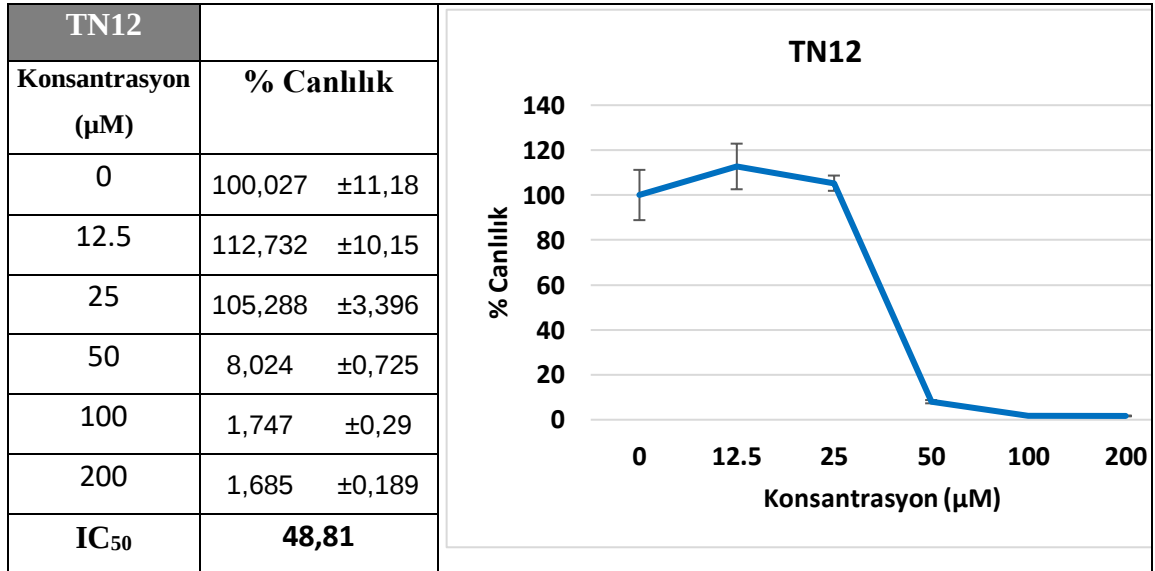
Tablo 4.19. TN10 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



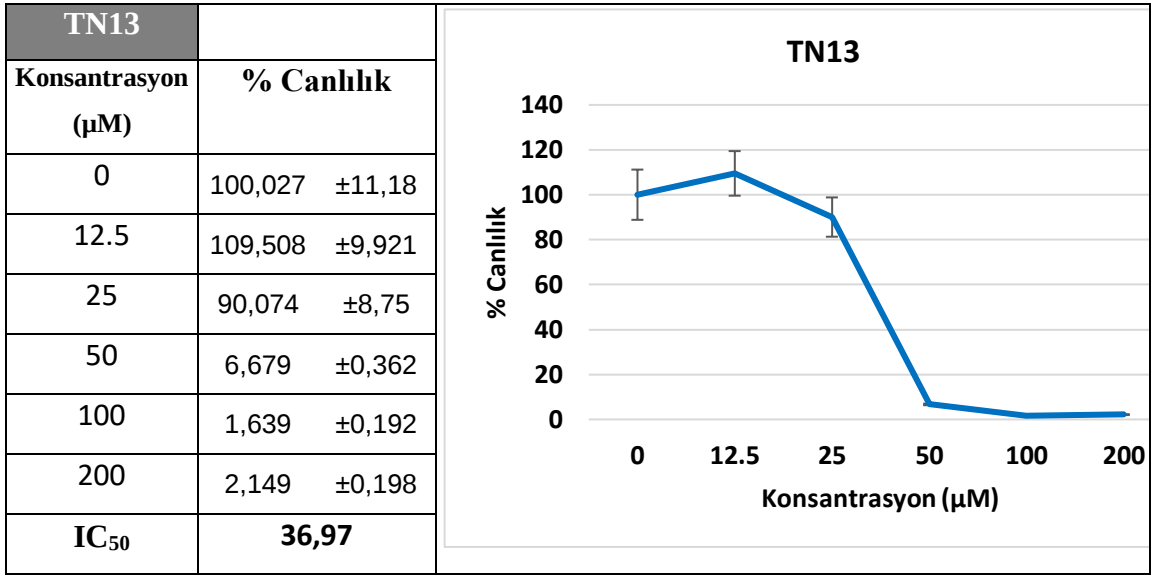
Tablo 4.20. TN11 bileşiğinin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



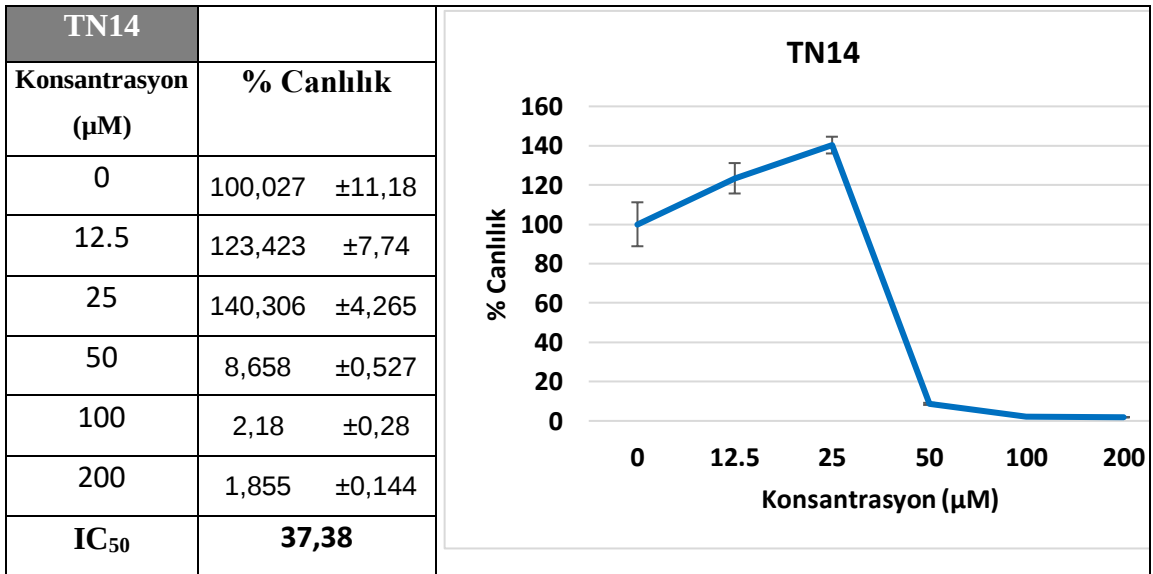
Tablo 4.21. TN12 bileşiğinin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



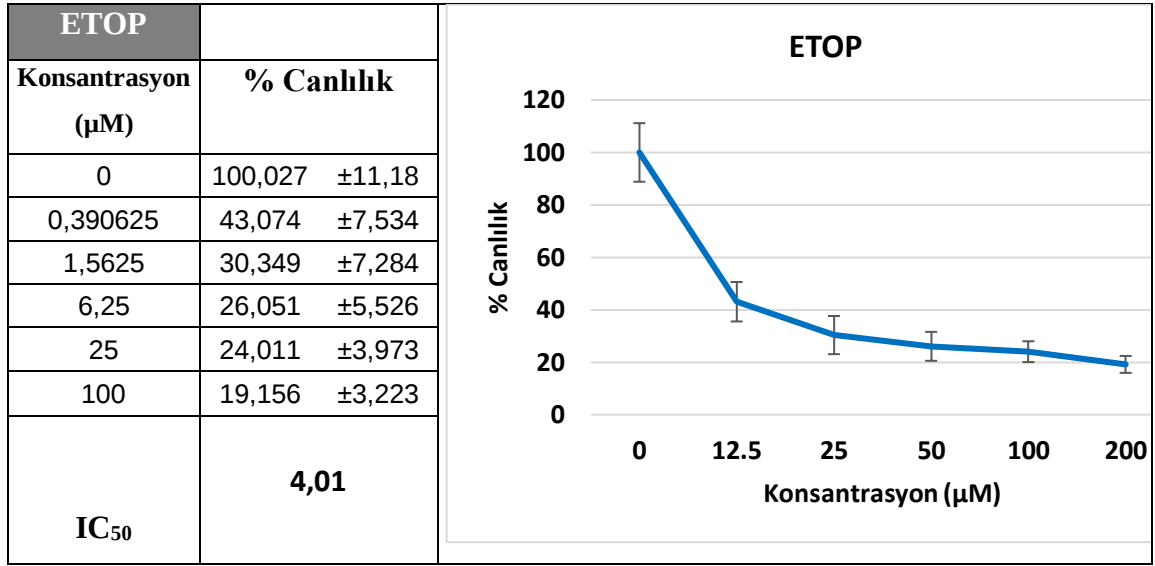
Tablo 4.22. TN13 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



Tablo 4.23. TN14 bileşiminin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



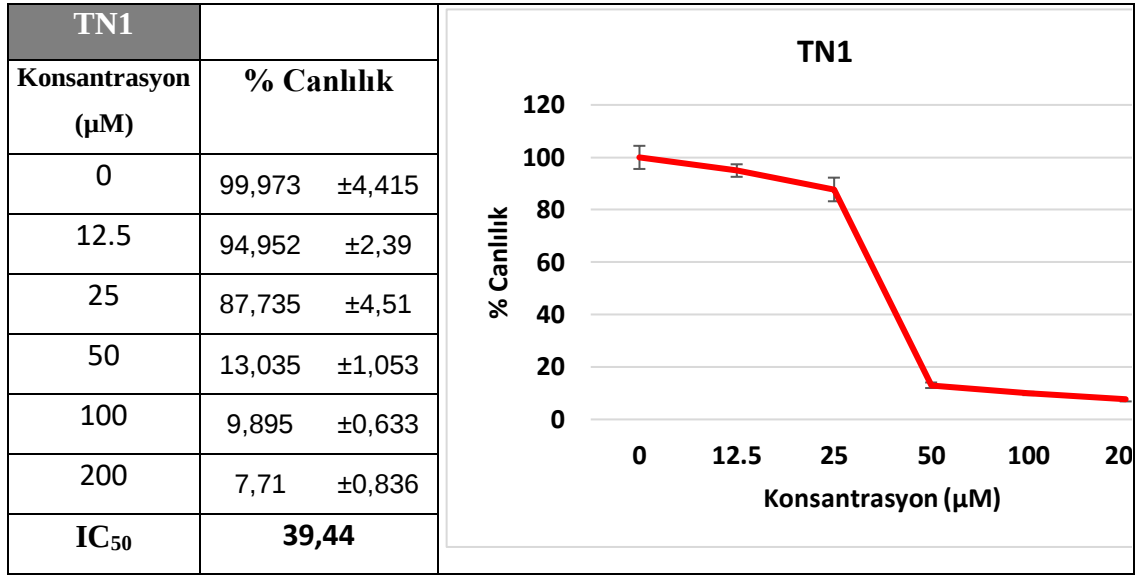
Tablo 4.24. Etoposid bileşiğinin C6 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



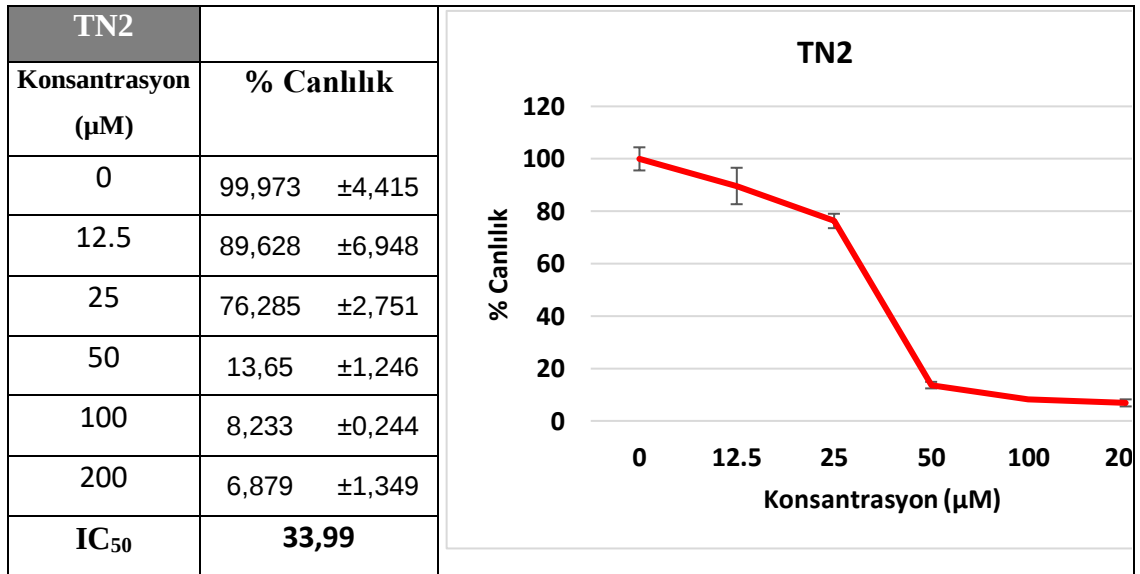
4.1.3 Çalışmada Test Edilen Bileşiklerin MCF7 Hücreleri Üzerindeki Antikanser Etkileri

MCF7 hücre hattı için en etkili bileşiğin 18,66 µM IC₅₀ değeri ile TN13 bileşiği olduğu bu değerın pozitif kontrol bileşiği etoposidin 39,47 µM olan IC₅₀ değerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca IC₅₀ değerleri 20,78-39,44 µM arasında değişen TN4 ve TN6 (IC₅₀: 42,22 ve 39,74 µM) dışındaki tüm bileşiklerin de pozitif kontrolden daha etkili olduğu belirlenmiştir.

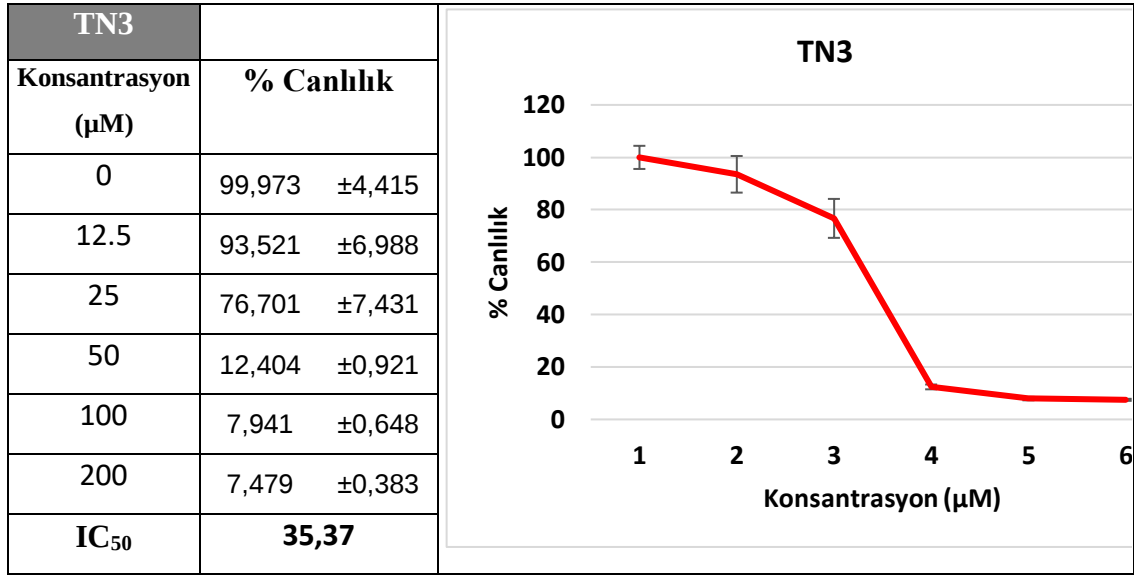
Tablo 4.25. TN1 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



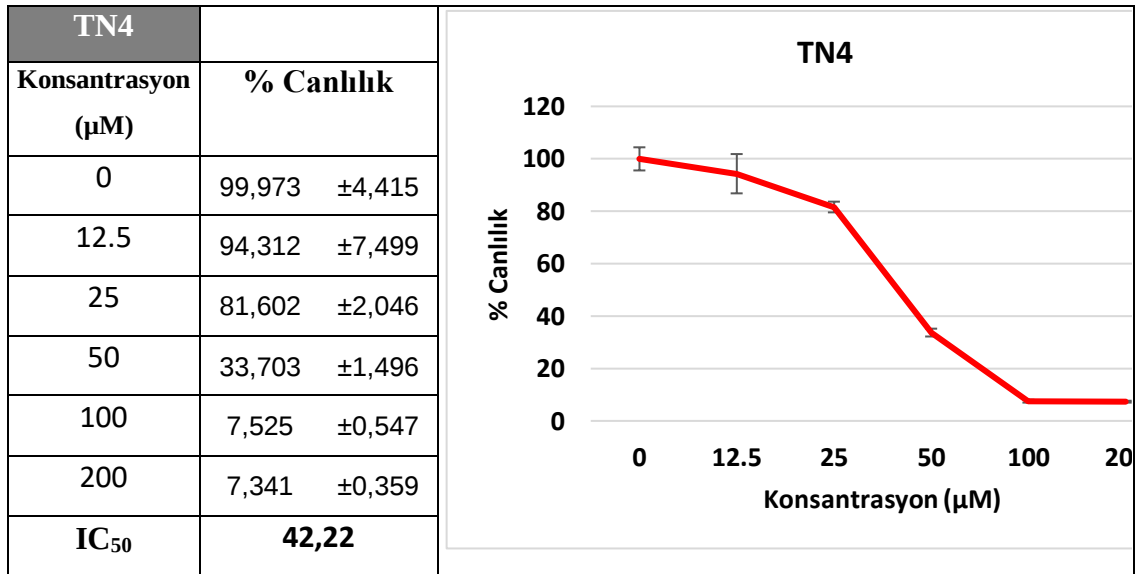
Tablo 4.26. TN2 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



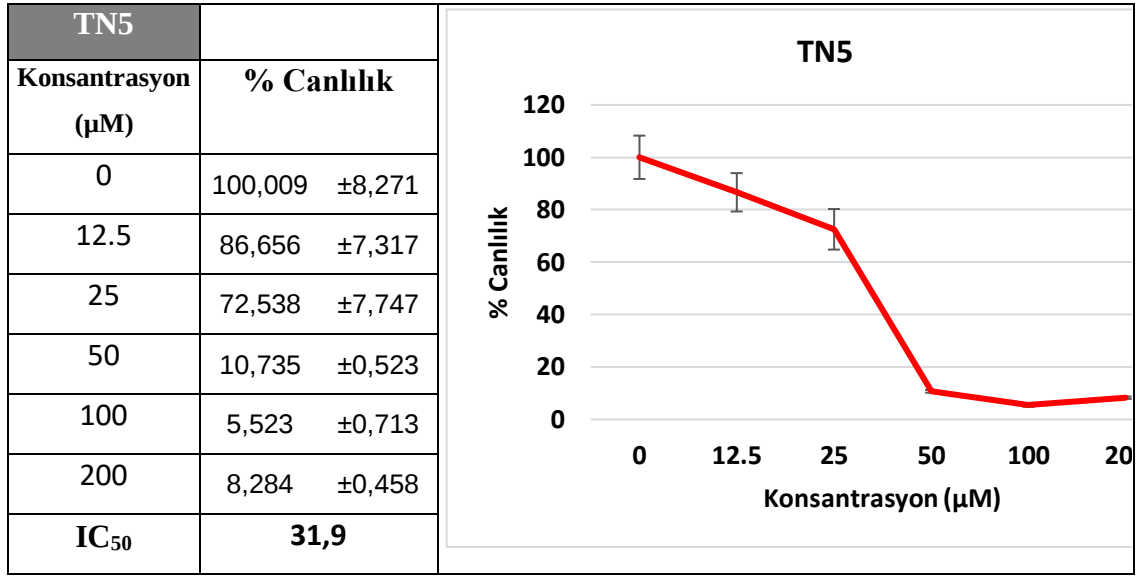
Tablo 4.27. TN3 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



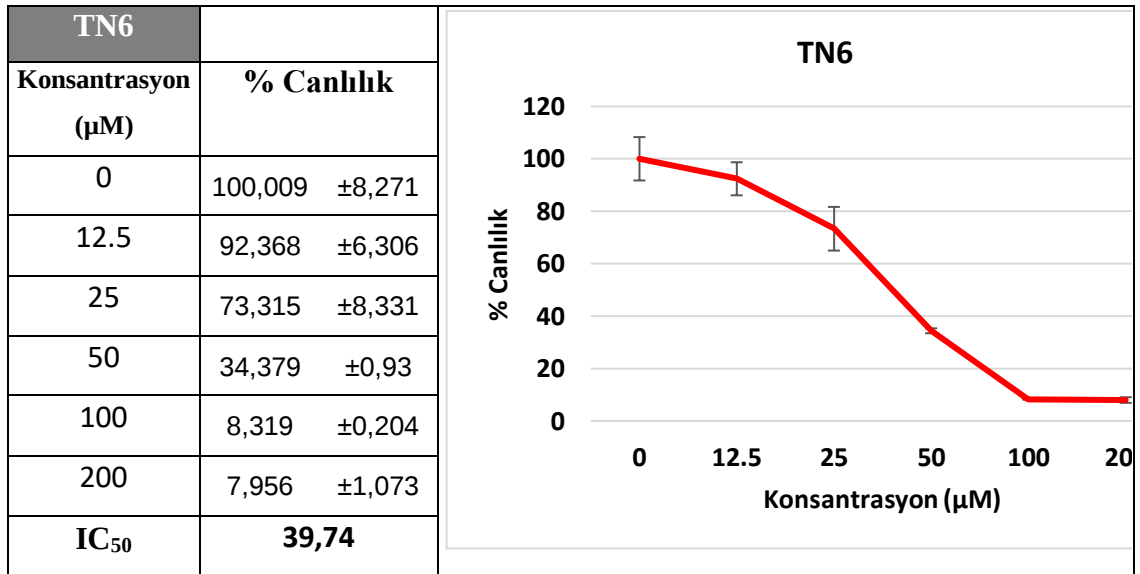
Tablo 4.28. TN4 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



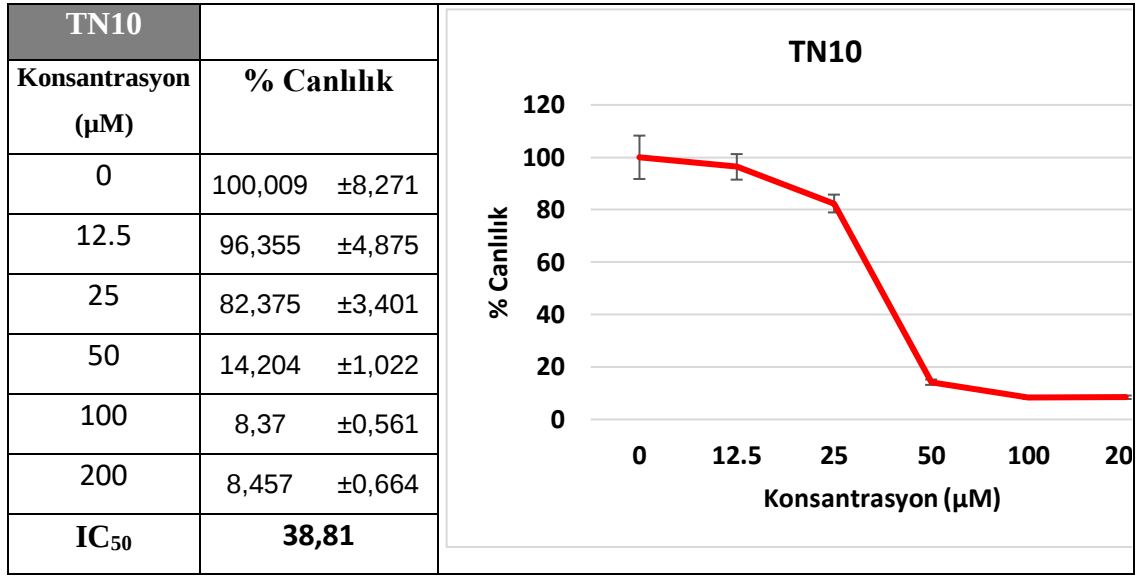
Tablo 4.29. TN5 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



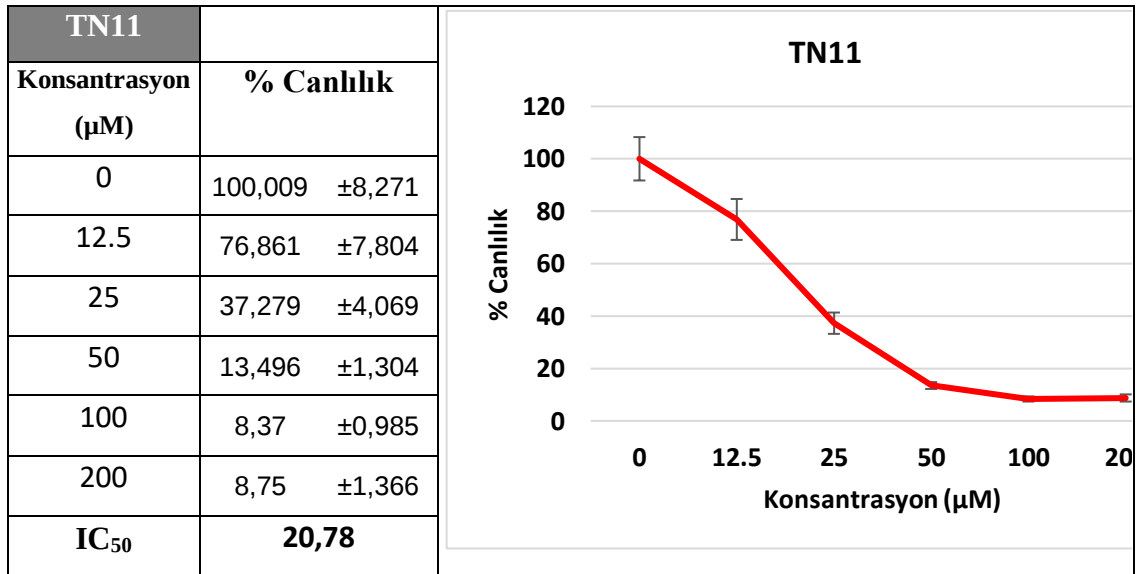
Tablo 4.30. TN6 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



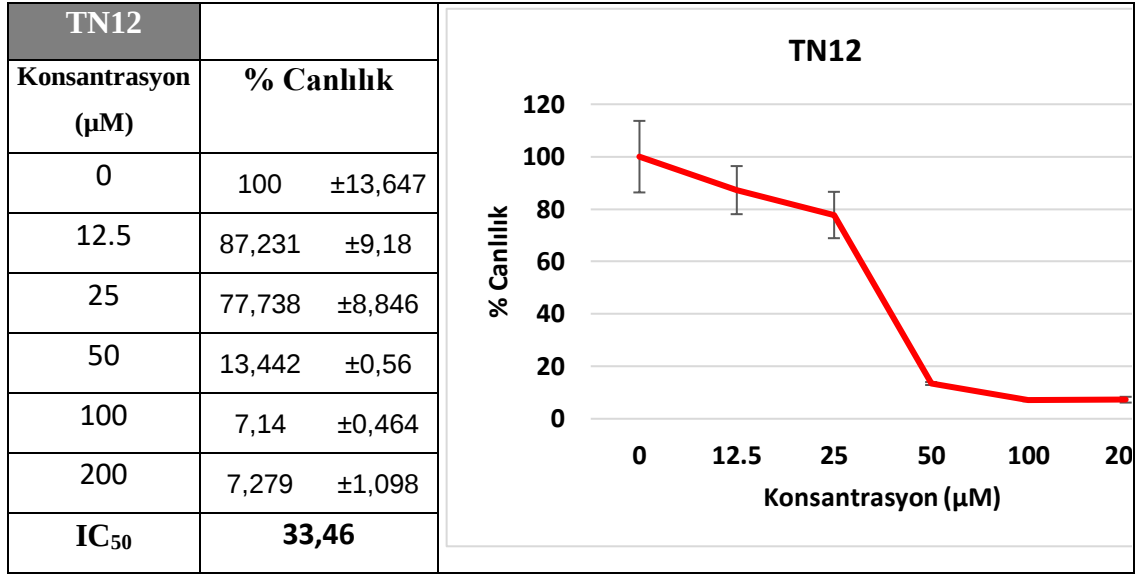
Tablo 4.31. TN10 bileşiğinin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



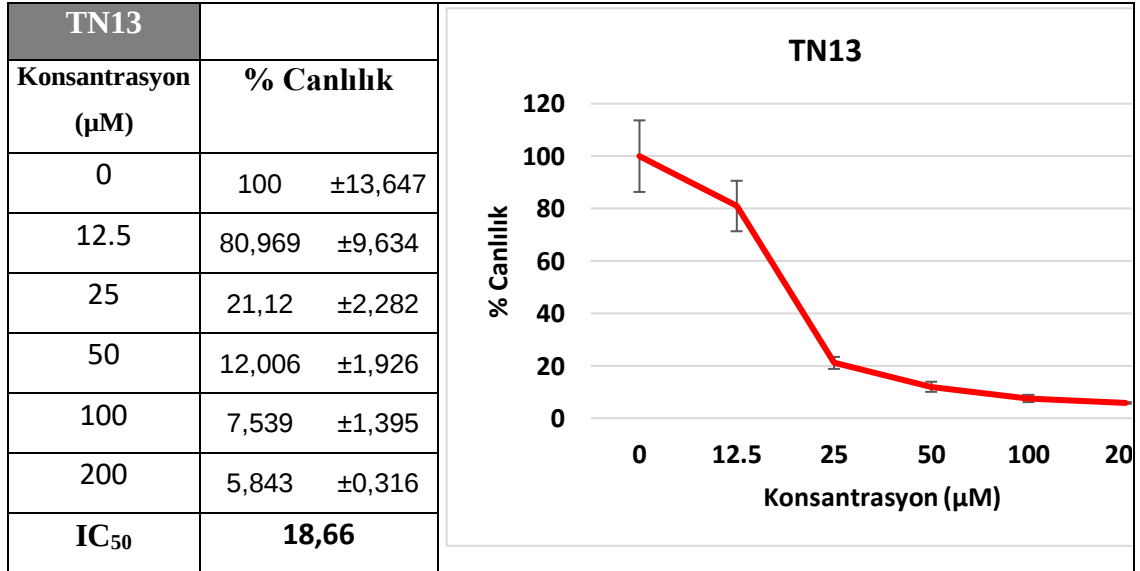
Tablo 4.32. TN11 bileşiğinin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



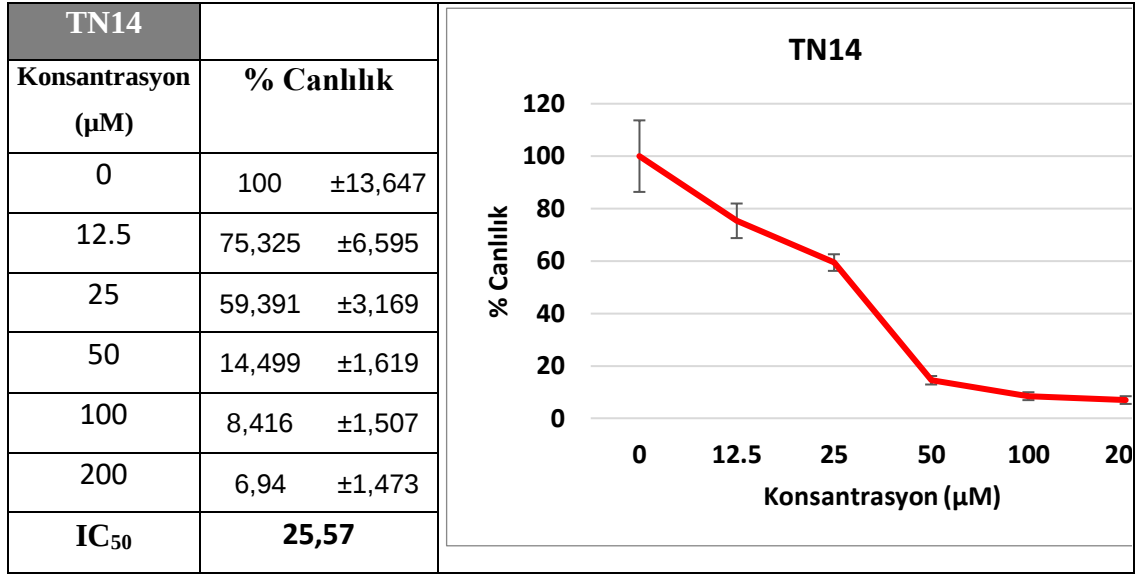
Tablo 4.33. TN12 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



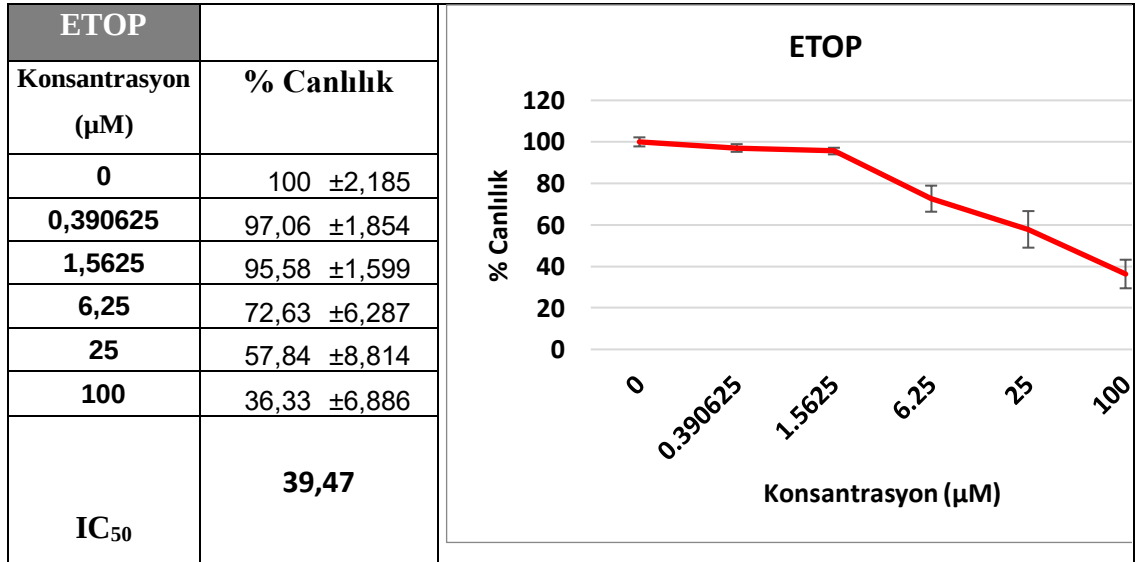
Tablo 4.34. TN13 bileşiminin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



Tablo 4.35. TN14 bileşiğinin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



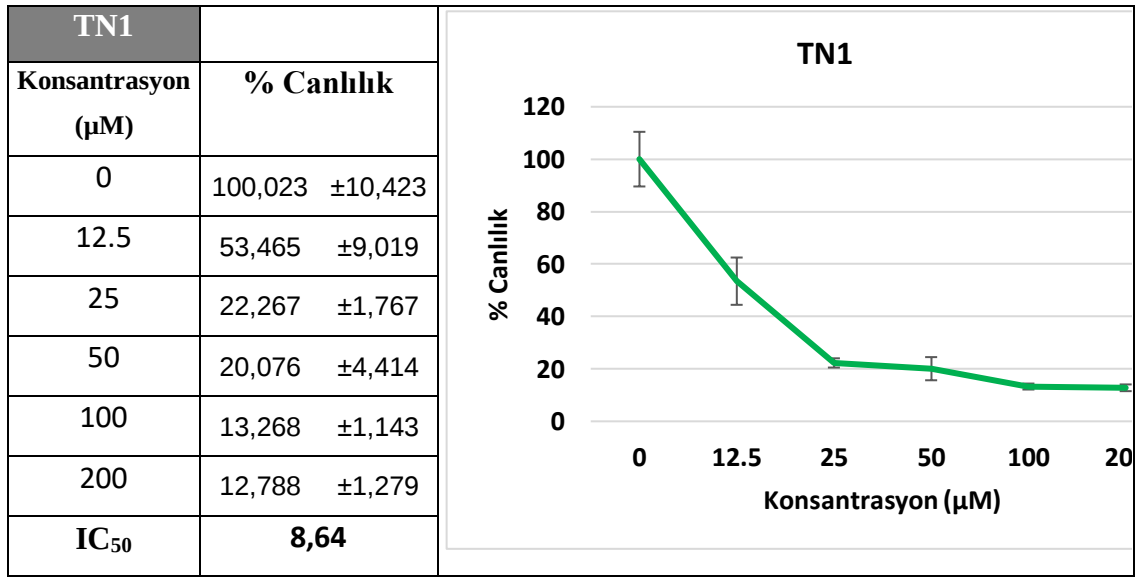
Tablo 4.36. Etoposid bileşiğinin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



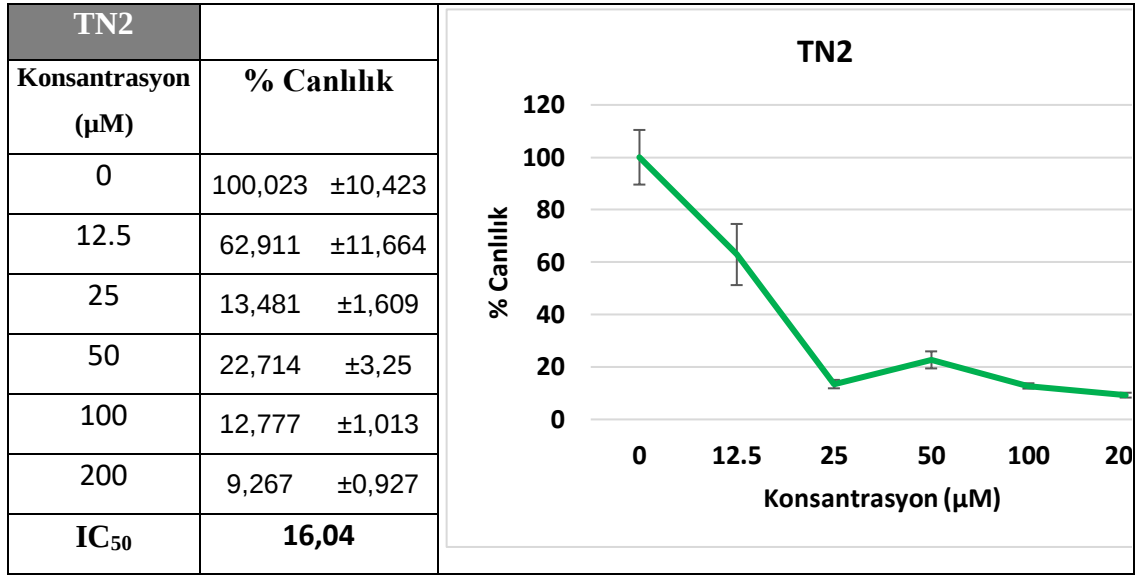
4.1.4 Çalışmada Test Edilen Bileşiklerin L929 Hücreleri Üzerindeki Antikanser Etkileri

L929 hücre hattı için en etkili bileşiğin 8,64 μM IC_{50} değeri ile TN1 bileşiği olduğu bu değer pozitif kontrol bileşiği etoposidin 24,99 μM olan IC_{50} değerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca TN2, TN3, TN4, TN10 ve TN11 bileşiklerinin de pozitif kontrolden daha etkili olduğu belirlenmiştir. Diğer bileşiklerin IC_{50} değerleri de pozitif kontrolden yüksek olup 24,25-57,72 μM arasında değişmektedir.

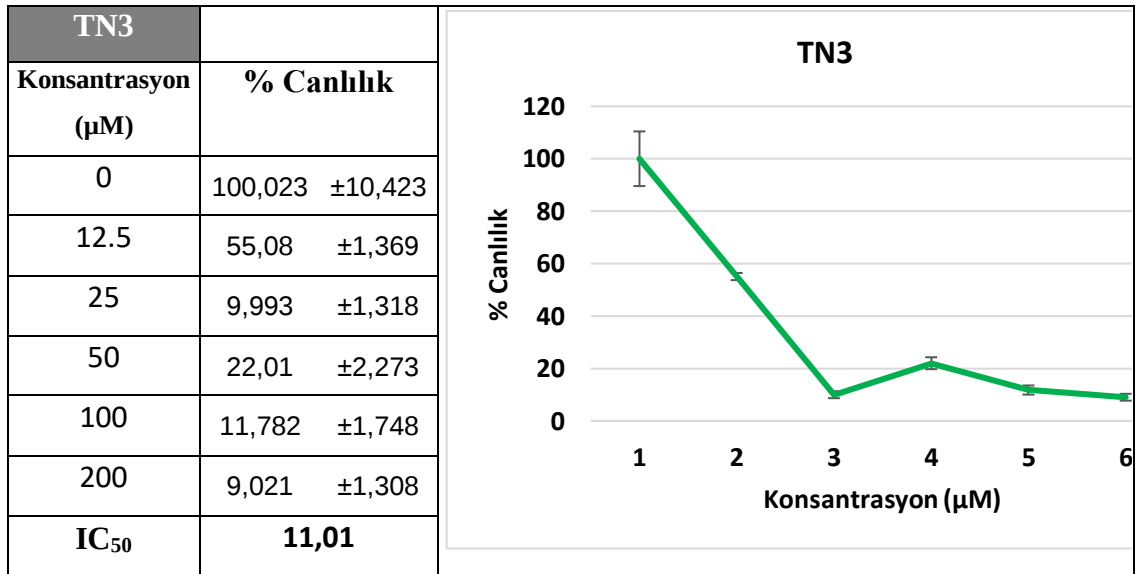
Tablo 4.37. TN1 bileşiğinin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



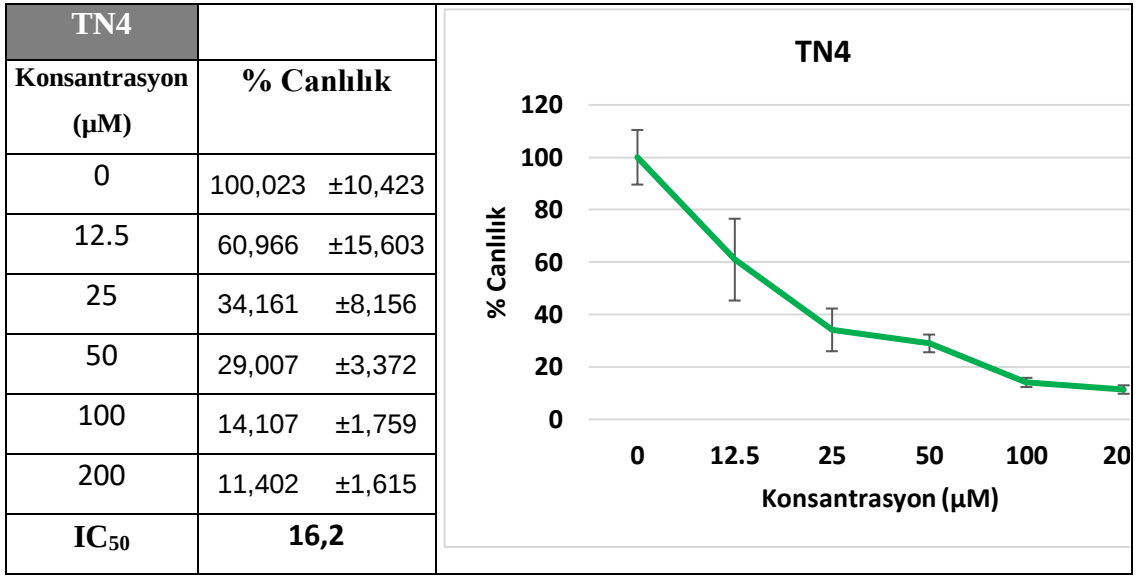
Tablo 4.38. TN2 bileşığının L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



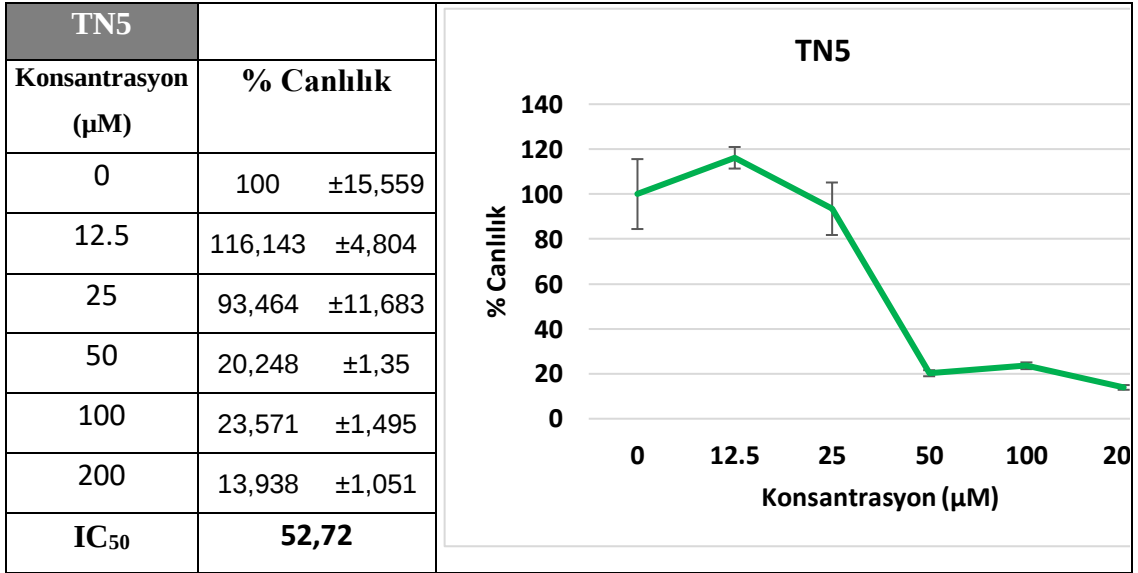
Tablo 4.39. TN3 bileşığının L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



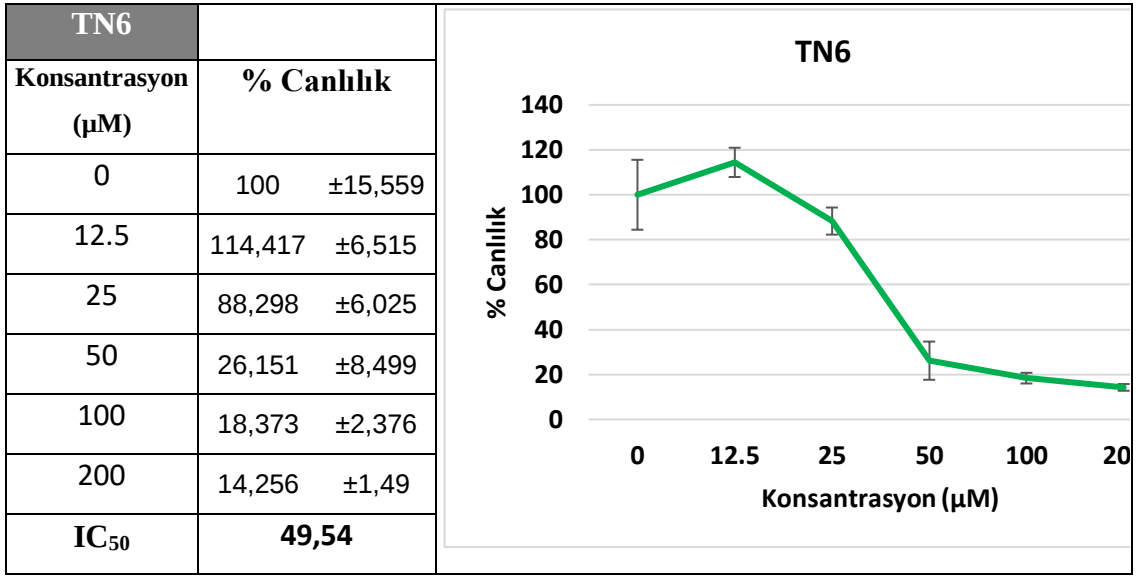
Tablo 4.40. TN4 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



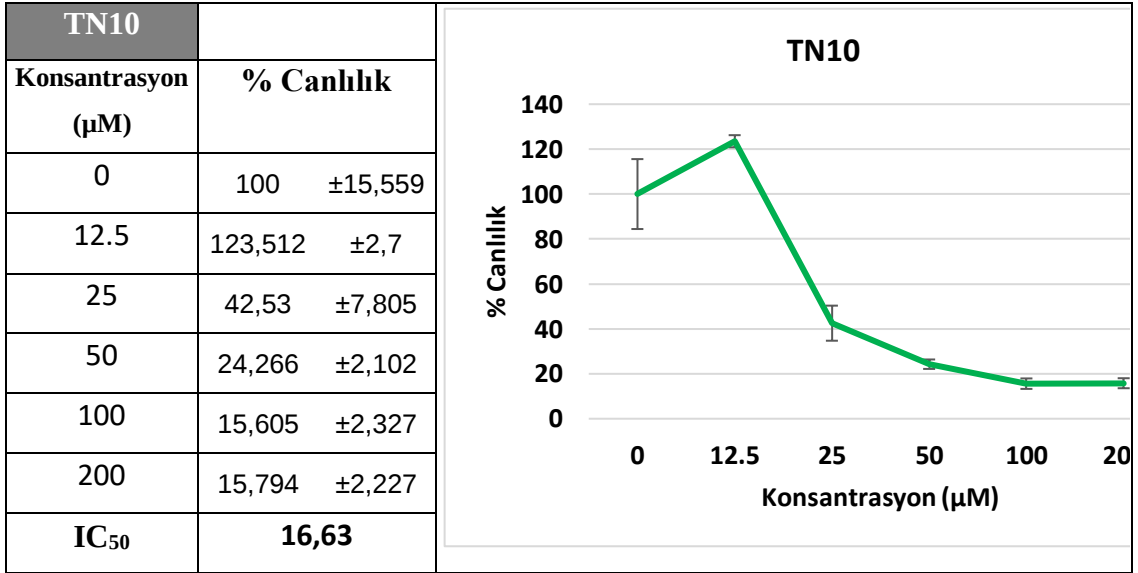
Tablo 4.41. TN5 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



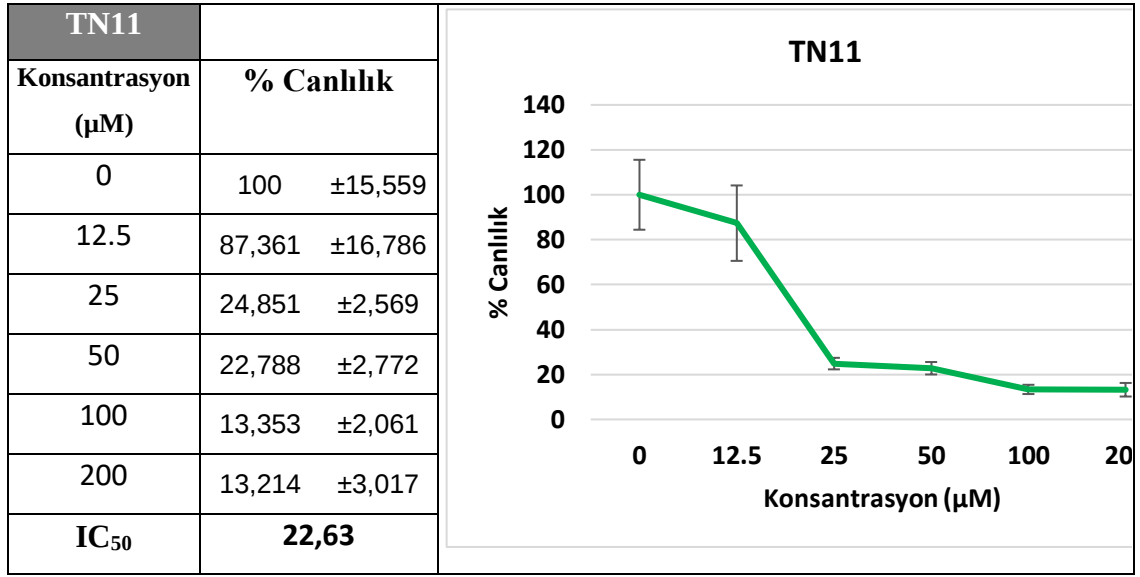
Tablo 4.42. TN6 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



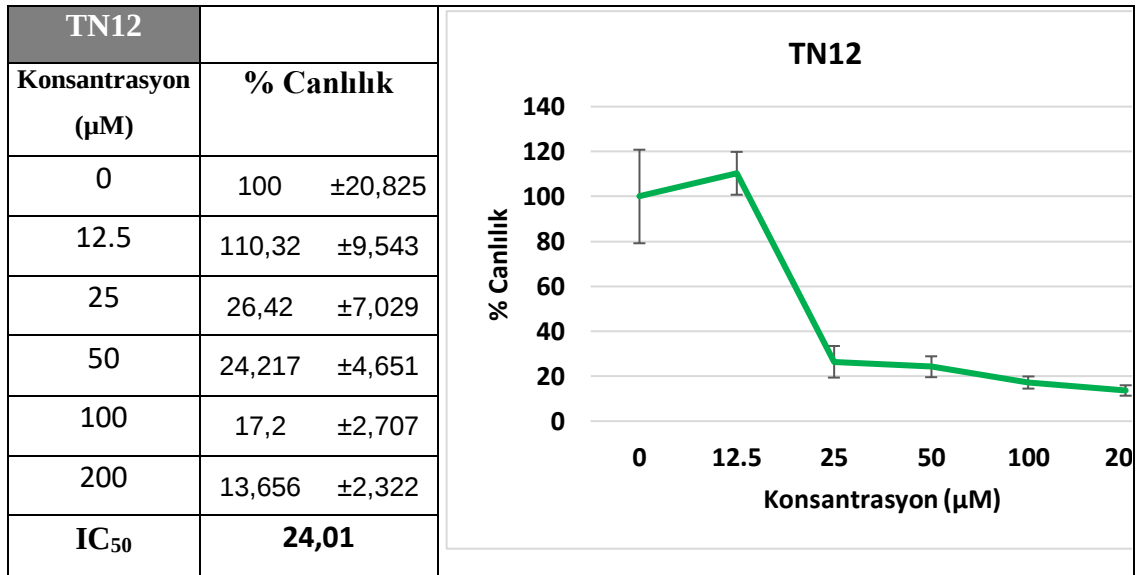
Tablo 4.43. TN10 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



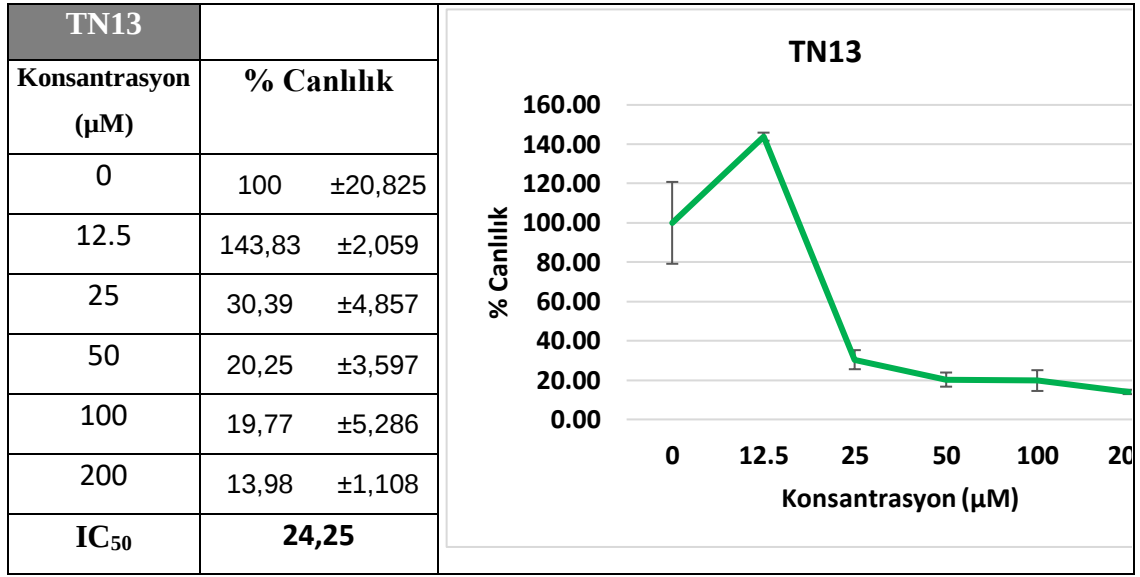
Tablo 4.44. TN11 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



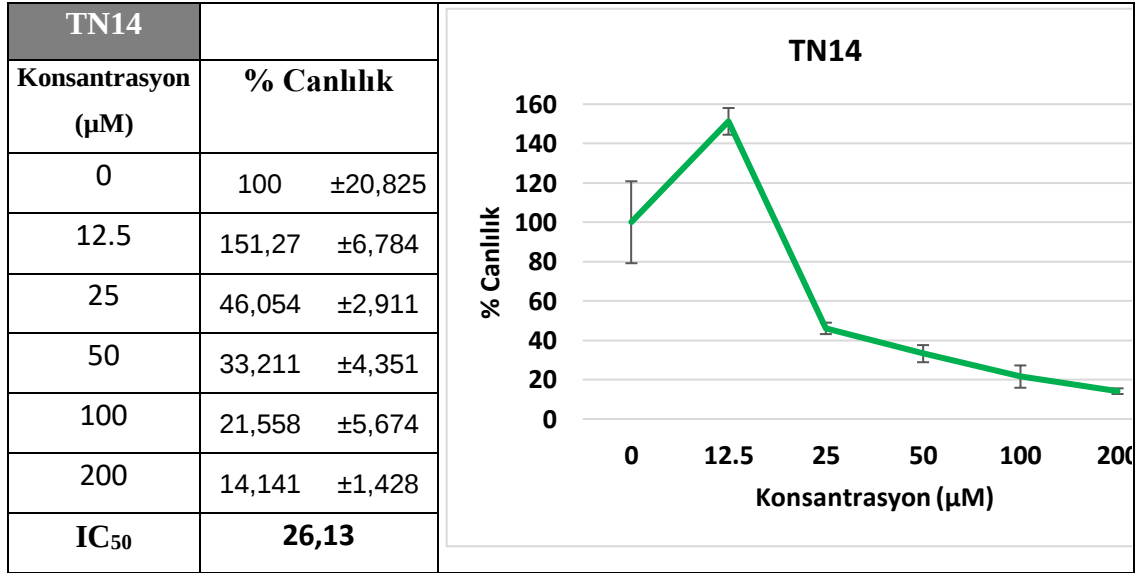
Tablo 4.45. TN12 bileşiminin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



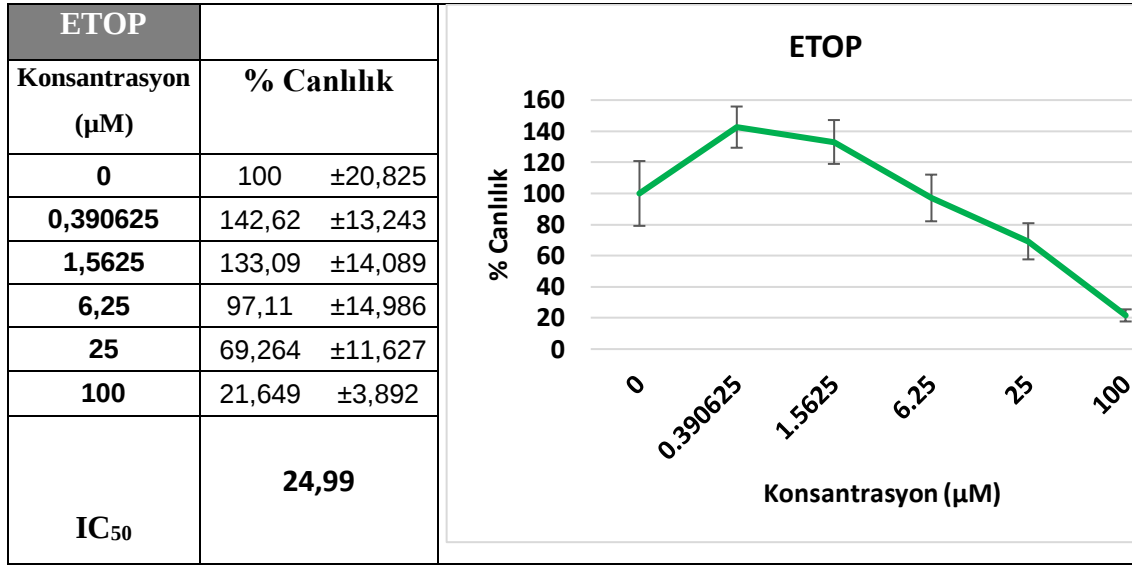
Tablo 4.46. TN13 bileşğinin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



Tablo 4.47. TN14 bileşğinin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



Tablo 4.48. Etoposid bileşiğinin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerine ait SRB testi sonuçları ve doz cevap eğrisi



4.1.5 Çalışmada Test Edilen Bileşiklerin Hücreler Üzerindeki Antikanser Etkilerine Ait Toplu Değerlendirilmesi

TN1 bileşiği için, % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığa neden olan ilk dozun A549 hücre hattı için 100 µM, C6 hücre hattı için 100 µM, MCF7 hücre hattı için 50 µM, L929 hücre hattı için ise 25 µM olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri; A549 için 57,28 µM, C6 için 63 µM, MCF7 için 39,44 µM, L929 için 8,64 µM olarak belirlenmiştir. Buna göre TN1 bileşiğinin sitotoksik etkisinin L929 hücre hattında en yüksek olduğu görülmektedir.

TN2 bileşiği için, % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığa neden olan ilk dozun A549 hücre hattı için 100 µM, C6 hücre hattı için 50 µM, MCF7 hücre hattı için 50 µM, L929 hücre hattı için ise 25 µM olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri; A549 için 49,65 µM, C6 için 46,4 µM, MCF7 için 33,99 µM, L929 için 16,04 µM olarak belirlenmiştir. Buna göre TN2 bileşiğinin sitotoksik etkisinin L929 hücre hattında en yüksek olduğu görülmektedir.

TN3 bileşiği için, % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığa neden olan ilk dozun A549, C6 ve MCF7 hücre hatları için 50 μ M, L929 hücre hattı için ise 25 μ M olduğu saptanmıştır (p<0.05). Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri; A549 için 45,83 μ M, C6 için 4,01 μ M, MCF7 için 35,37 μ M, L929 için 11,01 μ M olarak belirlenmiştir. Buna göre TN3 bileşiğinin sitotoksik etkisinin C6 hücre hattında en yüksek olduğu görölmektedir.

TN4 bileşiği için,% canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığa neden olan ilk dozun A549 hücre hattı için 12,5 μ M, C6 hücre hattı için 100 μ M, MCF7 hücre hattı için 50 μ M, L929 hücre hattı için ise 12,5 μ M olduğu saptanmıştır (p<0.05). Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri; A549 için 17,92 μ M, C6 için 62,8 μ M, MCF7 için 42,22 μ M, L929 için 16,2 μ M olarak belirlenmiştir. Buna göre TN4 bileşiğinin sitotoksik etkisinin L929 ve A549 hücre hatlarında en yüksek olduğu görölmektedir.

TN5 bileşiği için,% canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığa neden olan ilk dozun A549 hücre hattı için 100 μ M, C6, MCF7 ve L929 hücre hatları için ise 50 μ M olduğu saptanmıştır (p<0.05). Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri; A549 için 73,68 μ M, C6 için 46,16 μ M, MCF7 için 31,9 μ M, L929 için 57,72 μ M olarak belirlenmiştir. Buna göre TN5 bileşiğinin sitotoksik etkisinin MCF7 hücre hattında en yüksek olduğu görölmektedir.

TN6 bileşiği için,% canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığa neden olan ilk dozun A549 ve C6 hücre hattı için 100 μ M, MCF7 ve L929 hücre hattı için ise 50 μ M olduğu saptanmıştır (p<0.05). Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri; A549 için 89,89 μ M, C6 için 69,52 μ M, MCF7 için 39,74 μ M, L929 için 49,54 μ M olarak belirlenmiştir. Buna göre TN6 bileşiğinin sitotoksik etkisinin MCF7 hücre hattında en yüksek olduğu görölmektedir.

TN10 bileşiği için,% canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığa neden olan ilk dozun A549 hücre hattı için 100 μ M, C6 ve MCF7 hücre hattı için 50 μ M, L929 hücre hattı için ise 25 μ M olduğu saptanmıştır (p<0.05). Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri; A549 için 76,24 μ M, C6 için 20,59 μ M,

MCF7 için 38,81 μM , L929 için 16,63 μM olarak belirlenmiştir. Buna göre TN10 bileşiğinin sitotoksik etkisinin L929 hücre hattında en yüksek olduğu görülmektedir.

TN11 bileşiği için, % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığa neden olan ilk dozun A549 hücre hattı için 12,5 μM , C6, MCF7 ve L929 hücre hattı için ise 25 μM olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değerleri; A549 için 29,55 μM , C6 için 27,09 μM , MCF7 için 20,78 μM , L929 için 22,63 μM olarak belirlenmiştir. Buna göre TN11 bileşiğinin sitotoksik etkisinin MCF7 hücre hattında en yüksek olduğu görülmektedir.

TN12 bileşiği için, % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığa neden olan ilk dozun A549 hücre hattı için 100 μM , C6 ve MCF7 hücre hattı için 50 μM , L929 hücre hattı için ise 25 μM olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değerleri; A549 için 82,51 μM , C6 için 48,81 μM , MCF7 için 33,46 μM , L929 için 24,01 μM olarak belirlenmiştir. Buna göre TN12 bileşiğinin sitotoksik etkisinin L929 hücre hattında en yüksek olduğu görülmektedir.

TN13 bileşiği için, % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığa neden olan ilk dozun A549 ve C6 hücre hattı için 50 μM , MCF7 ve L929 hücre hattı için ise 25 μM olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değerleri; A549 için 66,7 μM , C6 için 39,97 μM , MCF7 için 18,66 μM , L929 için 24,25 μM olarak belirlenmiştir. Buna göre TN13 bileşiğinin sitotoksik etkisinin MCF7 hücre hattında en yüksek olduğu görülmektedir.

TN14 bileşiği için, % canlılık açısından kontrole göre anlamlı farklılığa neden olan ilk dozun A549 hücre hattı için 100 μM , C6 ve MCF7 hücre hattı için 50 μM , L929 hücre hattı için ise 25 μM olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca S-probit analizi sonucu elde edilen IC_{50} değerleri; A549 için 82,76 μM , C6 için 37,38 μM , MCF7 için 25,57 μM , L929 için 26,13 μM olarak belirlenmiştir. Buna göre TN14 bileşiğinin sitotoksik etkisinin MCF7 hücre hattında en yüksek olduğu görülmektedir.

Tez çalışmasında kullanılan 11 adet sülfonamido benzoksazol türevi bileşiğin C6, MCF7, A549 ve L929 hücreleri üzerindeki *in vitro* antikanser etkileri topluca Tablo.9.49.'da özetlenmiştir.

Tablo 4.49. Tez çalışmasında kullanılan sülfonamido benzoksazol türevlerinin C6, MCF7, A549 ve L929 hücreleri üzerindeki *in vitro* antikanser etkilerine ait SRB testinden elde edilen toplu sonuçları

Bileşikler			SRB testine ait her hücre için belirlenen IC ₅₀ değerleri			
Kod	X	R	A549	C6	MCF7	L929
TN1	-	H	57,28	63	39,44	8,64
TN2	-	Cl	49,65	46,4	33,99	16,04
TN3	-	F	45,83	4,01	35,37	11,01
TN4	-	Br	17,92	62,8	42,22	16,2
TN5	-	C ₂ H ₅	73,68	46,16	31,9	57,72
TN6	-	CH ₃	89,89	69,52	39,74	49,54
TN10	CH ₂	H	76,24	20,59	38,81	16,63
TN11	CH ₂	Cl	29,55	27,09	20,78	22,63
TN12	CH ₂	F	82,51	48,81	33,46	24,01
TN13	CH ₂	Br	66,7	36,97	18,66	24,25
TN14	CH ₂	CH ₃	82,76	37,38	25,57	26,13
Etoposid	Pozitif kontrol		32,49	4,01	39,47	24,99

4.2. TARTIŞMA

Kanser çok çeşitli, kişiye göre değişen, karmaşık bir hastalıktır. Tedavisi için en fazla araştırma yapılan hastalıkların başında gelmektedir. Çok fazla terapötik ilaç keşfedilmesine rağmen organizmaların ilaçlara karşı zamanla geliştirdiği direnç, araştırmacıları sürekli yeni ve etkili ilaç bulma arayışına itmektedir Bundan dolayı literatüre bakıldığında her geçen gün antikanser etkisi olabileceği düşünülen yeni heterosiklik bileşiklerin ilaç ön maddesi olarak tasarlandığı görülmektedir.

Biyolojik olarak aktif heterosiklik bileşik gruplarından biri olan benzoksazol türevi bileşiklerin de nükleik asitlerin yapısına katılan organik bazlara olan benzerliği nedeniyle özellikle DNA ve RNA ile ilgili süreçlerde işe karışan molekülleri hedefleyebileceği düşünüldüğünden sentetik ilaç tasarım çalışmalarında oldukça ilgi görmektedirler. (Gautam ve ark., 2012; Demmer ve Bunch, 2015).

Literatür taraması yapıldığında 1,2- ve 1,5-benzoksazol halkası içeren bileşiklerin ve bunların okso türevlerinin ilaç geliştirme çalışmalarının öncülleri olduğu görülmektedir. Benzoksazol türevi bileşiklerin antimikrobiyal, anti-inflamatuvar, antitüberküloz, antiviral, antifungal etkilerinin araştırıldığı bununla birlikte antikanser etkinin de giderek önem kazandığı görülmektedir. Hall ve arkadaşları tarafından benzotiyazol-benzoksazol-benzimidazol türevlerinin sentezlendiği bir çalışmada; 2-(2-(1-(piridin-2-il)etiliden)hidrazinil)benzo[d]oksazol bileşiğinin antikanser etki gösterdiği ve THP-1 hücrelerindeki $IC_{50}=1,50 \mu M$ olduğu tespit edilmiştir (Hall ve ark., 1999). Bu çalışmayla birlikte benzoksazol türevleri antikanser etkileri açısından da incelenmeye başlanmıştır. Bir diğer çalışmada; Metil 2-(2-hidroksifenil)-benzoksazol-4-karboksilat bileşiği sentezlenmiş ve bileşiğin IC_{50} değeri $0.88-9 \mu M$ aralığında bulunmuş ve kanser hücreleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Kumar ve ark., 2002). Çalışmalar devam ettikçe daha başarılı antikanser aktivite gösteren türevler bulunmuştur. 2011 yılında HeLa, MCF7, A549, SW-480 hücre tipleriyle yapılan antikanser çalışmalarda, 2-Süstitüe-1, 3-benzoksazol ve 3-[(3-Süstitüe) propil]-1,3-benzoksazol-2(3H)-on türevleri sentezlenmiştir ve sonuç olarak 2-(4-Benzilpiperazin-1-il)-1,3-benzoksazol bileşiğinin HeLa hücre hattında etkili olduğu gözlemlenmiştir (Murty ve ark., 2011). Benzoksazol türevi burada MCF7 de antikanser etki göstermezken 2013 yılında yapılan bir çalışmada; N-bis(2-(Benzo[d]oksazol-

2-il)etil-6-fenil-1,3,5-triazin-2,4-diamin bileşiğinin MCF7 hücreleri üzerinde antikanser aktivite gösterdiği görülmüştür (Arulmurugan ve ark., 2013). Bu yüksek lisans tez çalışmasında antikanser aktivitesi test edilen bileşiklerden 18,66 μM IC_{50} değeriyle TN13'ün MCF7 hücre hattı için en iyi değeri gösterdiği ve bu değer pozitif kontrol bileşiği etoposidin 39,47 μM olan IC_{50} değerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca IC_{50} değerleri 20,78-39,44 μM arasında değişen TN4 ve TN6 (IC_{50} : 42,22 ve 39,74 μM) dışındaki tüm bileşiklerin de pozitif kontrolden daha etkili olduğu belirlenmiştir. Yüksek lisans tez çalışmasında test edilen bileşiklerin günümüzde mevcut olarak kullanılan kemoterapi ilacından (Etoposid) daha etkili olduğu *in vitro* ortamda yapılan deneylerle tespit edilmiştir.

Literatür tarandığında sülfonamido benzoksazol türevi bileşiklerin 2012 yılında yapılan bir çalışmada 2. konumunda sübstitüe fenil veya sübstitüe benzil yapısı taşıyan; 5. konumunda 4-nitro/aminobenzensülfonamido grubu taşıyan 24 adet (2a-2l ve 3a-3l) ve 5. konumunda amino grubu taşıyan ve ara basamakta elde edilen 12 adet (1a-1l) bileşiklerle birlikte toplam 36 adet benzoksazol türevi bileşiğin sentezlendiği ve bu sentezlenen bileşiklerin yalnızca antibakteriyel ve antifungal etkileri açısından değerlendirildiği görülmüştür (Ertan-Bolelli, 2012). Antikanser etkileri değerlendirilmemiştir. Buradan hareketle sülfonamido benzoksazol türevlerinin antikanser aktivite etkileri bu tez çalışması kapsamında araştırılmıştır.

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında 2. konumunda sübstitüe fenil veya sübstitüe benzil yapısı taşıyan; 5. konumunda 4-nitro/aminobenzensülfonamido grubu taşıyan 11 adet benzoksazol türevi bileşik sentezlenmiş, antikanser aktiviteleri; insan karaciğer kanseri hücresi (A549), insan meme kanseri hücresi (MCF7), sıçan glial tümör hücresi (C6) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca test bileşiklerinin sağlıklı hücreler üzerindeki etkileri ise fare bağ doku fibroblast hücresi (L929) hücre serisi kullanılarak belirlenmiştir. Hücrelerin canlılığının belirlenmesi için trypan mavisi ekstraksiyon yöntemi, test bileşiklerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için de SRB (sülforodamin B testi) yöntemi uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak Etoposid kullanılmıştır. Çalışmada test edilen bileşiklerin SRB testine ait toplu sonuçları Tablo 4.49'da özetlenmiştir.

Çalışmada test edilen bileşiklerin hücreler üzerindeki antikanser etkileri incelendiğinde; A549 hücre hattı için en etkili bileşiğin 17,92 μM IC_{50} değeri ile TN4

bileşdiği olduğu bu değerin pozitif kontrol bileşdiği etoposidin 32,49 μM olan IC_{50} değerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca 29,55 μM IC_{50} değerine sahip TN 11 bileşığının de pozitif kontrolden daha etkili olduğu belirlenmiştir. Diğer bileşiklerin IC_{50} değerleri de pozitif kontrolden yüksek olup 45,83-89,89 μM arasında değişmektedir. C6 hücre hattı için en etkili bileşğin 4,01 μM IC_{50} değeri ile TN3 bileşdiği olduğu bu değerin pozitif kontrol bileşdiği etoposidin 4,01 μM olan IC_{50} değeriyle aynı olduğu görülmektedir. Diğer bileşiklerin IC_{50} değerleri de pozitif kontrolden yüksek olup 20,59-69,52 μM arasında değişmektedir. MCF7 hücre hattı için en etkili bileşğin 18,66 μM IC_{50} değeri ile TN13 bileşdiği olduğu bu değerin pozitif kontrol bileşdiği etoposidin 39,47 μM olan IC_{50} değerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca IC_{50} değerleri 20,78-39,44 μM arasında değişen TN4 ve TN6 (IC_{50} : 42,22 ve 39,74 μM) dışındaki tüm bileşiklerin de pozitif kontrolden daha etkili olduğu belirlenmiştir. L929 hücre hattı için en etkili bileşğin 8,64 μM IC_{50} değeri ile TN1 bileşdiği olduğu bu değerin pozitif kontrol bileşdiği etoposidin 24,99 μM olan IC_{50} değerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca TN2, TN3, TN4, TN10 ve TN11 bileşiklerinin de pozitif kontrolden daha etkili olduğu belirlenmiştir. Diğer bileşiklerin IC_{50} değerleri de pozitif kontrolden yüksek olup 24,25-57,72 μM arasında değişmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu tez kapsamında; çalışmada test edilen bileşiklerin, A549, C6, MCF7, L929 hücreleri üzerindeki antikanser etkileri ve bu hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Buna göre:

TN1, TN2, TN10, TN12 bileşiklerinin sitotoksik etkilerinin L929 hücre hattında en yüksek olduğu görülmüştür.

TN3 bileşiğinin sitotoksik etkisinin C6 hücre hattında en yüksek olduğu görülmüştür.

TN4 bileşiğinin sitotoksik etkisinin L929, A549 hücre hatlarında en yüksek olduğu görülmüştür.

TN5, TN6, TN11, TN13, TN14 bileşiklerinin sitotoksik etkilerinin MCF7 hücre hattında en yüksek olduğu görülmüştür.

L929 hücre hattı için en etkili bileşiğin 8,64 μM IC_{50} değeri ile TN1 bileşiği olduğu bu değer pozitif kontrol bileşiği etoposidin 24,99 μM olan IC_{50} değerinden daha yüksek olduğu görülmüştür.

MCF7 hücre hattı için en etkili bileşiğin 18,66 μM IC_{50} değeri ile TN13 bileşiği olduğu bu değer pozitif kontrol bileşiği etoposidin 39,47 μM olan IC_{50} değerinden daha yüksek olduğu görülmüştür.

C6 hücre hattı için en etkili bileşiğin 4,01 μM IC_{50} değeri ile TN3 bileşiği olduğu bu değer pozitif kontrol bileşiği etoposidin 4,01 μM olan IC_{50} değeriyle aynı olduğu görülmüştür.

A549 hücre hattı için en etkili bileşiğin 17,92 μM IC_{50} değeri ile TN4 bileşiği olduğu bu değerin pozitif kontrol bileşiği etoposidin 32,49 μM olan IC_{50} değerinden daha yüksek olduğu görülmüştür.

5.2 Öneriler

Tez çalışması kapsamında antikanser aktivitesi açısından daha önce değerlendirilmemiş olan bu bileşikler, memeli hücre kültürleri üzerinde sitotoksik etkileri bakımından değerlendirilmiştir. Böylece biyolojik aktiviteleri çok yönlü olarak belirlenmiş ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere literatüre kazandırılmıştır.

Tez çalışması kapsamında antikanser aktivitesi değerlendirilen 11 sülfonamido benzoksazol bileşiğin daha önce denenmemiş olması, kanser hücrelerini öldürmesiyle birlikte sağlıklı hücelere de daha az zarar veriyor olması ilerde bu konuyla ilgili araştırma yapacak olan bilim insanlarına daha yüksek etki gösterebilecek antikanser çalışmaların yapılabilmesi adına yol gösterici olabilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Aiello, S., Wells, G., Stone, E.R., Kadri, H., Bazzi, R., Bell, D.R., Stevens, Matthews, Bradshaw, M.F.G., C.S., T.D., Westwell, A.D., 2008, Synthesis and Biological Properties of Benzothiazole, Benzoxazole, and Chromen-4-one Analogues of the Potent Antitumor Agent 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-fluorobenzothiazole (PMX 610, NSC 721648)1. *J. Med. Chem.*, 51, 5135-5139.
- Akbay, A., Ören, A., Temiz-Arpaci, Ö., Aki-Sener, E., Yalcın, I., 2003, Synthesis and HIV-1 reverse transcriptase inhibitor activity of some 2,5,6-substituted benzoxazole, benzimidazole, benzothiazole and oxazolo(4,5-b)pyridine derivatives, *Arzneim. Forschung Drug Research*, 53, 266–271.
- Akı, E., 2018, 3D Qsar 3D Kantitatif Yapı-Etki İlişkileri, *Dergi Park*, 15-22. for novel antibiotic development., *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70(5), 1060-1075.
- Akin-Kazancıoğlu E., Senturk M., 2020, Synthesis of N-Phenylsulfonamide Derivatives and Investigation of Some Esterase Enzymes Inhibiting Properties. *Bioorganic Chemistry*, 104:104279.
- Akın-Kazancıoğlu, E., 2021, Bis(Sülfonamid) İhtiva Eden Kalkon Türevlerinin Etkin Bir Şekilde Sentezi ve Karakterizasyonu, Araştırma Makalesi, *Journal of The Institute of Science and Technology*, 11(2):1341-1353, 2021
- Akı-Yalçın, E., Yılmaz, S., Bolelli, K., Öztürk, Ö., Yalçın, İ., 2018, Yeni İlaç Molekülü Keşfinde Bilgisayar Destekli Moleküler Modelleme Yöntemleri Uygulamaları, Bildiri, *2.Ulusal Marmara Eczacılık Kongresi*.
- Alam, A., 2018, Chemotherapy Treatment and Strategy Schemes, A Review, *Open Access Journal of Toxicology*, Doi 10.19080/oajt.2018.02.555600.
- Altınışik, M., 2006, Alisiklik, Aromatik ve Heterosiklik Bileşikler II, Ders Sunumu, *Adnan Menderes Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı*, Aydın, 10-15.
- Arisoy, M., Temiz-Arpaci, Ö., 2016, Bazı Benzoksazol Türevlerinin Moleküler Modelleme Çalışmaları, *Dergi Park*, 13-18.
- Arisoy, M., Temiz-Arpaci, Ö., Kaynak-Onurdağ, F., Ozgen, S., 2012, Synthesis and Antimicrobial activity of novel benzoxazoles. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 145-154.
- Arpaci, Ö., Akı-Şener, E., Yalçın, İ., Altanlar, N., 2002, Synthesis and antimicrobial activity of some 2-[p-substituted-phenyl]benzoxazole-5-yl-arylcarboxyamides, *Archiv der Pharmazie.*, 6, 283-288.

- Arulmurugan, S., Kavitha, H.P., 2013, Synthesis and potential cytotoxic activity of some new benzoxazoles, imidazoles, benzimidazoles and tetrazoles. *Acta Pharm.*, 63, 253-264.
- Bagchi, S., 2007, Bendamustine for advanced sarcoma. *Lancet Oncol.*, 8(8), 674.
- Bahner, C-T., Rives, L-M., McGaha, S-W., Rutledge, D., Ford, D., Gooch, E., Westberry, D., Ziegler, D., Ziegler, R., 1981. Di- and Tri-methoxystyryl Derivatives of Heterocyclic Nitrogen Compounds. *Arzneim.-Forsch.*, 31(3): 404-406.
- Barlas, A-B., 2019, Moleküler Modelleme Yöntemleri İle Integrin İnhibitörlerinin Tasarlanması, Yüksek Lisans Tezi, *Biyomühendislik Anabilim Dalı*, İzmir, 56-60.
- Barltrop, J-A., Owen, T-C., Cory, A-H., Cory, J-G., 1999, 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3- (4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell viability indicators, *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, 1, 11, 611-614.
- Baykara, O., 2016, Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar (online), Derleme, *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* <https://www.journalagent.com/bsbd/pdfs/BSBD-93823-REVIEW-BAYKARA.pdf> (Ziyaret Tarihi: 10 Mart 2022).
- Belal, A. ve Abdelgawad, M.A., 2017, New benzothiazole/benzoxazole-pyrazole hybrids with potential as COX inhibitors: design, synthesis and anticancer activity evaluation. *Res Chem Intermed*, Doi 10.1007/s11164-016-2851-x. (03.03.2022).
- Berk, V., 2014, Temel Onkoloji, *İmmuno Onkoloji ve Hedeflenmiş Tedaviler Kursu*, 10-35.
- Berta, D., Villa, M., Vulpetti, A., and Felder, E., 2005, Pyrazolyl–benzoxazole derivatives as protein kinase inhibitors. Design and validation of a combinatorial library, *Tetrahedron* 6110801–10810.
- Braun, S., Botzki, A., Salmen, S., Textor, C., Bernhardt, G., Dove, S., Buschauer, A., 2011, Design of Benzimidazole- and Benzoxazole-2-thione Derivatives as İnhibitors of Bacterial Hyaluronan Lyase, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 4419-4429.
- Çiçek, C., ve Bilgiç, A., 2006, Klinik viroloji laboratuvarında uzmanlık öğrencisine verilen hücre kültürü eğitim programı: bir model. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 20(3):231-241.

- El-Hady, H.A. ve Abubshait, S.A., 2014, Synthesis and anticancer evaluation of imidazolinone and benzoxazole derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, <http://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.006> (12.03.2022).
- Erdoğan, M., 2020, 3,6-Disübsitütie Benzoksazol-2(3H)-On/Benzotiyazol-2(3H)On Türevlerinin Sentezi ve Alzheimer Hastalığı Üzerindeki Etkilerinin İn vitro Olarak İncelenmesi, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 49-54.
- Erol, M., Çelik, İ., Kuyucuklu, G., Uzunhisarcıklı, E., 2021, Synthesis, Antimicrobial and Cytotoxic Activity Studies of Some New Benzoxazole Derivatives *European Journal of Science and Technology*, (21), 445-462.
- Ertan-Bolelli, T., 2012, Bazı Yeni Sülfonamido Benzoksazol Türevi Bileşiklerin Sentez, Yapı Aydınlatması, Antimikrobiyal Etki ve Moleküler Modelleme Çalışmaları, Doktora Tezi, *Farmasötik Kimya Anabilim Dalı*, Ankara, 34-55-67-79.
- Foto, E., 2016, Bir Seri 1,4-Benzoksazin-3-On Türevi Bileşiğin Sitotoksik, Genotoksik Mutajenik Potansiyellerinin Araştırılması ve Farmakofor Modellemesi, Doktora Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı*, Ankara, 19-44-57.
- Gautam, M. K., Neeraj, S., Sharma, K., Jha, K. K., 2012, Pharmacological Profile and Pharmaceutical Importance of Substituted Benzoxazoles: A Comprehensive Review, *International Journal of ChemTech Research*, 4(2),640-650.
- Hall, I.H., Peaty, N.J., Henry, J.R., Easmon, J., Heinisch, G., Pürstinger, G., 1999, Investigations on the Mechanism of Action of the Novel Antitumor Agents 2-Benzothiazolyl, 2-Benzoxazolyl, and 2-Benzimidazolyl Hydrazones Derived from 2-Acetylpyridine. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem*, 332, 115-123.
- Haliloğlu, A-H., 2004, Hormon Tedavisi ve Radyoterapi Uygulanan Lokal ve Lokal İnvaziv Prostat Kanseri Hastalarının Takip Sonuçları, Tıpta Uzmanlık Tezi, *Üroloji Anabilim Dalı*, Ankara, 44-48.
- Hegde, V-S., Kolavi, G-D., Lamani, R-S., Khazi, I-A-M., 2007, Dimethyldithioimido carbonates-Mediated Heterocyclizations: Synthesis of Imidazolidines and Benzheterocycles as Potent Antitubercular Agents. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*,182(4): 911–920.
- Huang, S.T., Hsei, I.J. ve Chen, C., 2006, Synthesis and anticancer evaluation of bis(benzimidazoles), bis(benzoxazoles), and benzothiazoles, *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 6106-6119.
- Hür, D., 2004, Sentetik ve Kuantum Kimyasal Yöntemleri Kullanarak Heterosiklik Bileşikler Üzerine Çalışmalar, Doktora Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Eskişehir, 22-36.

- Kumar, D., Jacob, M.R., Reynolds, M.B., Kerwin, S.M., 2002, Synthesis and Evaluation of Anticancer Benzoxazoles and Benzimidazoles Related to UK-1. *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 3997-4004.
- Kuroyanagi, J., Kanai, K., Horuichi, T., Takeshita, H., Achiwa, I., Yoshida, K., Nakamura, K., Kawakami, K., 2011, Structure–Activity Relationships of 1,3- Benzoxazole-4-carbonitriles as Novel Antifungal Agents with Potent in Vivo Efficacy. *Chem. Pharm. Bull.* 59(3) 341-352.
- Kurtman, C., 2017, Radyoterapi, Radyasyon Fiziği, *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 16(1).
- Kuzu, B., 2021, Karboksamit Süstitüe Benzoksazol Ana Yapısı Taşıyan Bileşikleri Tasarımı, Sentezi, Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması ve Yapı Etki İlişkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Mersin, 17-30.
- LaBarbera, D-V., Reid, B-G., Yoo, B-H., 2012, The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 7: 819–830.
- Lomakina, G-Y., Modestoca, Y-A., Ugarova, N-N., 2015, Bioluminescence assay for cell viability, *Biochemistry (Mosc)*, 80(6), 701-713.
- Majidova, N., 2020, Renal Hücreli Karsinom Hastalarının Klinik ve Tedavi Özelliklerinin Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı*, Samsun, 15-28.
- Marshall, J., 2011, Transwell invasion assay in Cell Migration, eds C.M. Wells, and M. Parsons, 97-110.
- Masters, J-R., 2002, HeLacells 50 years on, the good, the bad and the ugly. *Nat. Rev. Cancer*, 2: 315–319.
- Moriah, E-K., Amanda, L-P., Andrew, D-W., Zinnia, SXU., Peter, C-S., 2016, In vitro Tumor Models, Advantages, Disadvantages, Variables and Selecting the Right Platform. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 4:12.
- Morris, G. M. and Lim-Wilby, M., 2008, Molecular docking, *Methods in Molecular Biology*, 443, 365–382 pp.
- Murty, M.S.R., Ram, K.R., Rao, R.V., Yadav, J.S., Rao, J.V., Cheriyan, V.T., Anto, R.J., 2011, Synthesis and preliminary evaluation of 2-substituted-1,3 benzoxazole and 3-[(3-substituted)propyl]-1,3-benzoxazol-2(3H)- one derivatives as potent anticancer agents. *Med. Chem. Res.*, 20, 576-586.

- Nenni, M., 2019, Toksikolojide *In Vitro* Hücre Temelli Sitotoksosite Çalışmaları, Yüksek Lisans Tezi, *Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı*, İzmir, 27-45.
- Onur, E., Nalbantsoy, A., Kışla, D., 2018, İmmünoterapi ve Propolisin Kansere İmmünoterapisinde Kullanım Potansiyeli, *Food and Health*, 4(4), 231-246.
- Öksüzoglu, E., Ertan-Bolelli, T., Can, T., Tarhan, M., Ozturk, K., Yildiz, I., 2016, Antitumor activities on HL-60 human leukemia cell line, molecular docking, and quantum-chemical calculations of some sulfonamide-benzoxazoles. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, <http://dx.doi.org/10.1080/21691401.2016.1241796>.
- Ören, Ü., Yalçın, İ., 2002, Kemoterapötik Etkili Benzoksazol Türevleri ve Halka Analogları Üzerinde Gerçekleştirilmiş Yapı Etki İlişkileri, *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara Üniversitesi*, Vol.25 No:2.
- Özdoğan, M., 2021, Karsinogenez Nedir? Normal Bir Hücre Nasıl Kansere Dönüşür?, *Medical Oncology*, 17(2).
- Pinar, A., Yurdakul, P., Yildiz, İ., Temiz-Arpaci, Ö., Acan, L., Aki-Sener, E., and Yalcin, I., 2004, Some Fused Heterocyclic Compounds as Eukaryotic Topoisomerase II Inhibitors, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317, 670–674.
- Polat, G-P., Kamiloğlu, N-N., 2019, Deneysel Araştırmalarda Hücre Kültürü Modelleri ve Tümör Hücre Kültürü Modelleri, Avantaj ve Dezavantajları, *2nd International Health Sciences and Life Congress*, Burdur, 24-27.
- Riss, T-L., Moravec, R-A., 2006, Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Techn*, 2, 1, 51-62.
- Satyendra, R., Vishnumurthy, A., Vagdevi, M., Rajesh, P., Manjunatha, H., Shruthi, A., 2011, Synthesis, *in vitro* antioxidant, anthelmintic and molecular docking studies of novel dichloro substituted benzoxazole-triazolo-thione derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46 3078-3084.
- Satyendra, R., Vishnumurthy, K., Vagdevi, H., Rajesh, K, P- G., Manjunatha, H., Shruthi, A., 2012, *In vitro* antimicrobial and molecular docking of dichloro substituted benzoxazole derivatives, *Medicinal Chemistry Research*, 4193– 4199.
- Supuran CT, 2008. Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7 (2): 168-81.
- Tektemur, A., 2020, Kansere Biyolojisi, 2019 - 2020 Eğitim-Öğretim Dönemi 2. *Komite*, 10-17.

- Tugba Ertan-Bolelli, Kayhan Bolelli, Suzan Okten, Fatma Kaynak-Onurdag, Esin Aki-Tokur, O., Aksoy, A., 2017, *In Vitro* Sitotoksikite Testleri, Derleme, *Harran Üniv Vet. Fak Derg*, 2017; 6 (1): 112-118.
- Vichai, V., Kirtikara, K., 2006, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nature Protocols* 1, 1112 – 1116.
- Xiang, P., Zhou, T., Wang, L., Sun, C.Y., Hu, J., Zhao, Y.L., Yang, L., 2012, Novel Benzothiazole, Benzimidazole and Benzoxazole Derivatives as Potential Antitumor Agents: Synthesis and Preliminary *in Vitro* Biological Evaluation. *Molecules*, 17, 873-883.
- Yalcin, Ismail Yalcin, 2017, Synthesis, Antimicrobial Activities of New Sulfonamido benzoxazoles and Molecular Docking Studies on Escherichia coli TEM-1 β -Lactamase”, *Croatica Chemica Acta*, 90(1), 67.
- Yabushita, H., Ohnishi, M., Komiyama, M., Mori, T., Noguchi, M., Kishida, T., 2004, Usefulness of collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity testing in ovarian cancer. *Oncol. Rep.* 12: 307–311.
- Yang, F., Hu, M., Lei, Q., Xia, Y., Zhu, Y., Song, X., 2015, Nifuroxazide induces apoptosis and impairs pulmonary metastasis in breast cancer model, *Cell Death Dis*, 6: 1701.
- Yokuş, B., ve Ülker, D-Ü., 2012, Kanser Biyokimyası, *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1(2):7-18.
- Yoneyama, H., Katsumata, R., 2006, Antibiotic resistance in bacteria and its future Schraufsttter, E., Naturforsch, Z., 1950, Formation of heavy metal complexes an antibacterial action, 190-195
- Zilifdar-Foto, F., 2016, Benzoksazol, Benzamit, Benzenasetamit Türevlerinin Sitotoksik Genotoksik, Epigenetik ve Topoizomeraz I Enzim İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, *Biyoloji Anabilim Dalı* Ankara, 10-12-45-48.