

T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SALIK İLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**4-(2-AMİNO ETİL) BENZEN SÜLFONAMİT
TÜREVİ BELİRLERİNİN ANTİKANSER
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Berrin UMURHAN

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. İsmail KOYUNCU

ANLIURFA

2017

T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SALİHLER ENSTİTÜSÜ
TİBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**4-(2-AMİNO ETİL) BENZEN SÜLFONAMİT
TÜREVİLERİNİN ANTİKANSER
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Berrin UMURHAN

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. İsmail KOYUNCU

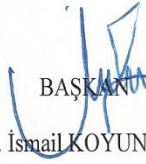
Bu tez, TÜBİTAK tarafından 115Z681 proje numarasıyla desteklenmiştir.

ANLIURFA

2017

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Berrin UMURHAN'ın hazırladığı "4-(2-aminoetil) Benzen Sülfonamid Türevi Bileşiklerin Antikanser Özelliklerinin İncelenmesi" konulu çalışması 28.07.2017 tarihinde jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.



BAŞKAN

Yrd.Doç. Dr. İsmail KOYUNCU (Danışman)

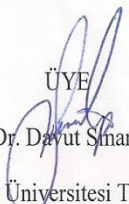
Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE


Yrd.Doç.Dr. Adnan KIRMİT
Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE


Yrd.Doç.Dr. Davut Sinan KAPLAN
Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim dalı

07.08.2017

ONAY


Prof. Dr. Mustafa DENİZ

Enstitü Müdürü

TE EKKÜR

Tez çal, mam süresince bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren ve bilgilendiren tez dan, man,m ve de erli hocam Say,n Yrd. Doç. Dr. smail KOYUNCUøya sonsuz te ekkür ederim.

Tezimde kulland, ,m sülfonamit bile iklerinin sentezini gerçekle tiren Yrd. Doç. Dr. Mustafa DURGUNøa te ekkür ederim.

Tez çal, mamda her türlü deste ini ve yard,m,n, esirgemeyen Özgür YÜKSEKDA ve Hasine YELøe te ekkür ederim.

Yüksek lisans,m boyunca her zaman destek ve katk,lar,n, eksik etmeyen T,bbi Biyokimya Laboratuvar, Çal, anlar,na te ekkür ederim.

Hayat,m boyunca her zaman yan,m,da olan, bana her konuda destek veren A LEME sonsuz te ekkür ederim.

Berrin UMURHAN

2017

EK L D Z N

SAYFA NO

- ekil 1.** Karbonik anhidrazlar,n genel tepkimesi í í í í í í í í í í í í í .8
- ekil 2.** Aktif CA izoenzimlerinin hücredeki yerle imleri í í í í í í ..í .í .9
- ekil 3.** CA IX'un üç boyutlu yap,s,í í í í í í í í í í .í í í í í í ..í ..10
- ekil 4.** Farkl, insan dokular,ndaki CA-IX seviyesi í í í í í ..í í .í í í ..13
- ekil 5.** Hipoksi ile indüklenbilir genlerin aktivasyonu í í í .í í í í .í í .15
- ekil 6.** min grubu içeren sülfonamitlerin eldesi için genel tepkime í í í í ...23
- ekil 7.** Amin grubu içeren sülfonamitlerin eldesi için genel tepkime í í ..í ...24



TABLO D Z N

SAYFA NO

- Tablo 1.** Çal, mada kullan,lan 4-(2-amino etil) benzen sülfonamit türevi bile iklerin kimyasal yap,lar, ve CA-IX inhibitör etkilerií í í í í ..í í í í í 25
- Tablo 2.** Sülfonamit türevi bile iklerin HELA hücreesindeki sitotoksik etkilerií í 35
- Tablo 3.** Sülfonamit türevi bile iklerin MDA-MB-231 hücreesindeki sitotoksik etkileri.í 38
- Tablo 4.** Sülfonamit türevi bile iklerin PNT-1A hücreesindeki sitotoksik etkileri.í í í í í í í ..í í í í í í í í í í í í í í í í í ..í 41



GRAFİK ZİN

SAYFA NO

Grafik 1. 1.maddenin HELA hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri	36
Grafik 2. 2.maddenin HELA hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri	37
Grafik 3. 3.maddenin HELA hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri	37
Grafik 4. 4.maddenin HELA hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri	38
Grafik 5. 1.maddenin MDA-MB-231 hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri	39
Grafik 6. 2.maddenin MDA-MB-231 hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri	39
Grafik 7. 3.maddenin MDA-MB-231 hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri	40
Grafik 8. 4.maddenin MDA-MB-231 hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri	40
Grafik 9. 1.maddenin PNT-1A hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri	42
Grafik 10. 2.maddenin PNT-1A hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri	42
Grafik 11. 3.maddenin PNT-1A hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri	43
Grafik 12. 4.maddenin PNT-1A hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri	43
Grafik 13. 2. maddenin 72.saatteki Hela hücre hatt,ndaki sitotoksit etkisi.....	44
Grafik 14. 2. maddenin HELA proliferasyonu üzerine etkisi	45
Grafik 15. 2. maddenin apoptotik etkinli inin incelenmesi	46
Grafik 16. 2.maddenin serbest radikal grafi	47

S M G E D Z N

AZM	: Asetazolamid
BrdU	: 5-bromodeoksiüridin
CA	: Karbonik Anhidraz
CAF	: Kansere Ba lı, Fibroblast
CAI	: Karbonik Anhidraz nhibitörleri
CA-IX	: Karbonik Anhidraz 9
CARP	: Karbonik Anhidraz li kili Proteinler
CCRCC	: Açık Renal Hücreli Karsinom
DMSO	: Di-Metil Sülfokside
EMT	: Epitel-Mezen imal Geçi leri
FBS	: Fetal Bovine Serum
FITC	: Floresan Bir Madde
FITC+PI (-)	: Erken Apoptotik Hücreler
FITC+PI (+)	: Geç Apoptotik Hücreler
HIF-1	: Hipoksi ndükleyici Faktör-1
PBS	: PhosphateBufferedSaline
PG	: Proteoglikan Bölge
PKA	: Protein Kinaz A
RCC	: Böbrek Hücreli Karsinom
ROS	: Hücre i Radikal de i imi
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VHL	: Von-Hippel Lindau
ZBG	: Çinko-Ba lama Grubu

ÖZET

4-(2-AMINO ETİL) BENZEN SÜLFONAMİT TÜREVİ BİLEŞİKLERİNİN ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Berrin UMURHAN

Biyokimya, Yüksek Lisans Tezi

Kanser tedavisinde kemoterapiyi kısıtlayan en önemli sorunlardan biri geleneksel kemoterapik ajanların kanserli dokuya spesifik olmamasıdır. Bu yüzden, kanser hücrelerine spesifik yeni moleküllerin tespitine yönelik yeni çalışmalar yapılmaktadır. Karbonik anhidraz-IX (CA-IX) birçok kanser türünde ve hipoksik koellülarda neredeyse tüm tümörlü dokuda ifade edilirken normal dokuların birçoğunda görülmemektedir. Daha önceki çalışmalar, kanser hücrelerinde CAIX ekspresyonunun tümörün tanınması ve prognozu ile ilişkili değerlendirilmesi bu enzimi kanser tedavisinde biyobelirteç ve kanser hücrelerine yönelik spesifik bir hedef haline getirmiştir. Sülfonamidler birçok biyolojik aktiviteye sahip olmakla birlikte antitümör etkisini tanımlayan çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. En belirgin mekanizması, CA-IX enzimi üzerine inhibisyon olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, CA-IX'a yüksek afinite gösteren, yeni sentezlenen dört adet 4-(2-amino etil) benzen sülfonamid türevi bileşiklerinin CA-IX sentezleyen HELA (insan serviks adenokarsinom hücre hattı), CA-IX sentezlemeyen MDA-MB-231 (insan metastazik göğüs adenokarsinom hücre hattı) ve PNT-1A (normal insan prostat hücre hattı) hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri belirlemektir. Ayrıca en yüksek sitotoksik etki gösteren bileşiklerinin HELA hücre proliferasyonu ve apoptozisi üzerindeki etkisi ile bu etkinin ROS seviyesi ile korelasyonunu incelemektedir.

Sülfonamid türevi bileşiklerin hücre canlılığı üzerine etkileri WST-1 testi ile belirlenerek her bir bileşik için IC₅₀ değeri hesaplandı. Sitotoksik etki düzeyi yüksek olan bileşiklerin; hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi BrdU ELISA yöntemi, apoptoz ve nekroz indüksiyonu flow sitometrik annexin-V analizi, hücre içi serbest radikal düzeyini ROS prop yöntemiyle araştırıldı.

Test edilen dört adet 4-(2-amino etil) benzen sülfonamid bileşiminden H4 bileşiminin HELA hücreleri üzerinde sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterdiği tespit edildi. Ayrıca H-4 bileşiminin hücrelerde apoptozu tetiklediği ve indüksiyonunun hücre içi serbest radikal artışıyla ilişkili olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen verilere göre, H4 bileşiminin 3 boyutlu hücre kültürü ve hayvan deneylerinde test edilmesi, kanser tedavisi için yeni ve spesifik ilaç geliştirmeye yönelik araştırmalara büyük katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Serbest radikal, apoptozis, sülfonamid, karbonik anhidraz-IX



ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTICANCER PROPERTIES OF DERIVATIVES OF 4-(2-AMINOETHYL) BENZENESULFONAMIDE

Berrin UMURHAN

Biochemistry, Master Thesis

One of the most important problems that limit chemotherapy in cancer treatment is traditional chemotherapeutic agents are not specific to cancerous tissue. Therefore, new studies carried out to discover new molecules specific to cancer cells. Carbonic anhydrase-IX (CA-IX) is not present in most of the normal tissues, although it is excreted in almost all tumor tissues in many types of cancer under hypoxic conditions. In previous studies, the association of CA-IX expression in solid tumors with tumor diagnosis and prognosis has made this enzyme a biomarkers for cancer diagnosis and also a specific target for cancer cells. Sulphonamides have many biologic activities as well as evidence that they have antitumor activity. Its most important effect has been shown to be inhibition on the enzyme CA-IX.

The aim of this study was to investigate the effect of four newly synthesized 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonamide derivative compounds on high affinity to CA-IX were tested for cytotoxic effects on CA-IX synthesized HELA (human cervical adenocarcinoma cell line), non CA-IX synthesized MDA-MB-231 (human metastatic breast adenocarcinoma cell line), PNT-1A (normal human prostate cell line) cell lines. Also to test the compound with highest cytotoxicity on proliferative and apoptotic effects on HELA cells and correlate the apoptotic effects with ROS levels.

The effects on the cell viability of the sulfonamide derivative compounds were determined by WST-1 test, and than IC_{50} value of each compound was calculated. The highest cytotoxic compound were used for a subsequent analyses; cell proliferation by BrdU, apoptosis and necrosis induction by annexin-V expression using flow cytometry, intracellular free radical exchange by ROS prop.

From the four tested 4- (2-aminoethyl) benzene sulfonamide compounds, compound H4 was found to have a high cytotoxic and antiproliferative effect on HELA cells. It also shows that H-4 induces apoptosis in cells and that induction may be due to increased intracellular free radicals.

According to the data obtained from this study, to test H4 compound in 3-dimensional cell culture and animal experiments will greatly contribute to research for development new and specific drug for cancer treatment.

Keywords: Free radical, apoptosis, sulfonamide, carbonic anhydrase-IX



1.G R

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaçların etki mekanizması, kısıtlayan bazı önemli sorun bulunmaktadır. Bunlardan biri, kullanılan kemoterapik ajanların kanser dokusuyla birlikte normal dokulara da zarar vererek istenmeyen yan etkilere sebep olmasıdır. Diğer ise kanser hücrelerinin kemoterapik ajanlara karşı, çoklu ilaç direnci kazanması, sonucu tedavinin yetersiz kalmasıdır (1,2). Bu nedenlerden dolayı, günümüzde kanser tedavisi için etkin ve spesifik ilaç geliştirme yöntemlerinin araştırılması, son derece önem kazanmıştır. Son zamanlarda kanser tedavisi araştırmaları, hedefe özgü biomarkör ve tedavi tekniklerinin geliştirilmesi üzerine odaklanmaktadır.

CA-IX, kanserli dokularda ifade edilen bir enzim olup CA enzim ailesinin bir üyesidir. Hücre içi mekanizması, karbondioksit ve sudan bir proton ile bikarbonatın üretildiği geri dönüşümlü reaksiyonu katalize eder. CA-IX transmembran bir enzim olup birçok kanser türünde sentezlenirken birkaç normal dokuda da sınırlı görülmektedir. CAIX, hipoksi de dahil olmak üzere stresli koşullarda tümörlerde aktive olduğu görülmüştür (3,4).

CA-IX, tümör pH'sını düzenleyerek kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlar. Hipoksi öncesi CA-IX aktivasyonu, tümör hücrelerinin hipoksik koşullarda hayatta kalmasını ve proton üreterek hücre dışı pH'ını dümesinde rol oynar. Normal hücreler için mikroçevre ortamının asidifikasyonu; hücresel solunum gibi yamsal hücre içi mekanizmalar, durdurarak öldürücü olabilmektedir. Tümör hücrelerinin CA-IX'ları, hücre içi pH'yı, alkalize eden HCO_3^- ü üreterek kanser hücresinin ölümünü önlemektedir. Bu nedenle, CA-IX tümör hücrelerinde normal hücrelere kıyasla hayatta kalma avantajı sağlar. (5).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda solid tümörlerdeki CAIX ifadesi tümörün tanınması ve prognozu ile ilişkilendirilmesi bu enzimin kanser tanınmasında biyobelirteç ve spesifik bir hedef haline getirmiştir. Kanser tedavisine yönelik yapılan çalışmalarda

CA-IX enzim inhibitörlerinin kullanılması, tedavisi için umut verici sonuçlar ortaya çıkarmıştır.

Sülfonamidler, hücre içi birçok biyolojik aktiviteye sahip inhibitörlerdir. Mikrotübüllerin bozulması, anjiyogenez inhibisyonu, G1 evresindeki hücre döngüsünün durması, gibi sülfonamidlerin antitümör etkisini tarif eden çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. En önemli mekanizması, CA-IX enzimi üzerine inhibisyon olduğu tespit edilmiştir (6-9).

Bu çalışmanın amacı, yeni sentezlenen, CA-IX inhibitör özelliği tespit edilen dört adet 4-(2-amino etil) benzen sülfonamid türevinin; hücre canlılığı üzerine etkileri WST-1 testi ile belirlenerek her bir bileşimin IC_{50} değeri hesaplandı. En yüksek sitotoksik etki gösteren bileşimin HELA hücre proliferasyonu ve apoptozisi üzerindeki etkisi ile bu etkinin ROS seviyesi ile karşılaştırıldı.

Çalışmanın sonucunda; WST-1 yöntemiyle yapılan sitotoksikite analizi sonucunda sentezlenen dört adet 4-(2-amino etil) benzen sülfonamid türevi bileşiklerden H-4 bileşiminin en güçlü sitotoksik etkiyi CAIX sentezleyen HELA hücreleri üzerinde gösterdiği tespit edildi. Ayrıca bu maddenin HELA hücrelerinde antiproliferatif etki gösterdiği BrDU ELISA yöntemiyle tespit edildi. Sitotoksik etki düzeyi yüksek olan 2. maddenin (H-4) HELA hücreleri üzerinde apoptotik etki gösterdiği flow sitometrik annexin-V ile tespit edildi. Doza bağlı olarak hücre içi serbest radikal (ROS) artışı, buna yol açarak apoptozise yol açtığı gözlemlendi.

2. GENEL B LG LER

2.1. Kanser

Kanser, insan hücrelerinin fiziksel ve fizyolojik i levlerini bozan, bir organ ya da dokudaki hücrelerin kontrolsüz bölünerek ço alması, sonucu olu an kötü huylu tümörler olarak tan,mlanmaktadır. Kanser, çözümlenememi önemli bir sa lık problemidir ve hastal,klara ba lı, ölüm nedenleri aras,nda ikinci s,rada bulunmaktadır (10,11).

Klinik olarak köken ald,klar, hücre tipine göre farklı, davran, lar sergileyen kanser, yüze yak,n kompleks hastal,klar, kapsayan bir olgu olarak tan,mlanmakla beraber ba lang,ç ya lar,na, büyüme oranlar,na, metastazlar,na, evrelerine ve tedaviye verdikleri yan,tlara göre çe itlilik göstermektedir. Bunlara ra men tüm kanserler, moleküler seviyede ortak karakteristik özellikler sergilemektedir (12). Kanser hücreleri ile normal vücut hücreleri birbirinden farklı,d,r. Normal vücut hücreleri sistemli olarak büyür, bölünür ve ölür. E er yeni hücreler gerekmiyorsa her hücre kendi mekanizmas,yla hücre bölünmesini durdurur. Bu durum kanser hücrelerinde farklı,d,r. Kanser hücreleri büyümeye, bölünmeye kontrolsüz ve ba ,ms,z bir ekilde devam ederek vücudun di er bölgelerine yay,l,rlar, birikerek tümörleri meydana getirirler. Tümörler normal dokular,n içlerine s,zabilir, normal dokular, s,k, t,rabilir ve tahrip edebilir. Tümörden ayr,lan kanser hücreleri kan ya da lenf yoluyla vücudun di er bölgelerine yay,labilirler. Kanserin vücudun di er bölgelerine yay,l,m,na metastaz ad, verilir (13).

Kansere çe itli faktörler sebep olmaktadır. Bu faktörler; ya am ekli ve beslenme, mesleki faktörler radyasyon, hava kirlili i, su kirlili i, kanserojen maddeler, bula ,c, ajanlar, endokrin ve hormon bozucular ve ba , ,kl, ,n azalması, gibi etkenlerdir (14). Kanser kompleks bir hastal,kt,r. Hücre sinyali ve apoptozis gibi birçok hücresel fizyolojik sistemini etkileyerek çok basamaklı, bir karsinogenez süreci olu turur ve bu kanseri daha da anla ,lmaz yapar (15). Kanser, önlenilmekte ve erken yakalan,ld, ,nda ise tedavi edilebilir bir hastal,k grubu olup dünyada oldu u

gibi Türkiye'de de hastalık yükü açısından önemli bir sağlık sorunu olarak görülmektedir (16, 17).

2.1.1. Kanser Epidemiyolojisi

Kanser, dünyada ölüm nedenleri arasında olup kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırada bulunmaktadır (18). Önümüzdeki yıllarda da kanser insidansının yüksek olacağı ve gelecekte birinci sırada ölüm nedeni olacağı tahmin edilmektedir (19). Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin verilerine bakıldığında kanser insidansları ve profillerinde ülkeler arasında farklılıklar görülmüştür. Gelişmiş ülkelerde erkeklerde akciğer ve prostat kanserleri görülürken kadınlarda ise meme ve kolorektal kanserlerinin daha sık olduğu gözlemlenmiştir. Gelişmekte olan ülkelere bakıldığında ise erkeklerde akciğer, mide ve karaciğer kanserleri; kadınlarda meme ve servikal kanserleri daha sık görülmüştür. Türkiye'de erkeklerde akciğer, prostat ve mesane kanseri daha yüksek oranda görülürken kadınlarda ise meme, tiroid ve kolorektal kanserler daha yaygın olarak gözlemlenmiştir (20).

Türkiye'de erkeklerin kanser insidansı, dünya insidansının üzerindedir ve kadınlarda ise bir miktar düşüktür. Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelerle kanser karşılaştırıldığında Türkiye'de hem kadınlarda hem de erkeklerde insidansın daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (21).

Globocan 2012 verilerine bakıldığında kanser vakaları ile kansere bağlı ölümlerin yarısından fazlasının az gelişmiş ülkelerde olduğu görülmüştür. 2012 yılında Dünya'da toplam 14,1 milyon kişi kansere yakalanmış ve 8,2 milyon kişi kansere bağlı hayatını kaybetmiştir. Artan nüfus ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak kanser artışı sürmesi durumunda 2025 yılında dünyada toplam 19,3 milyon kişinin kanser olacağı belirtilmiştir (22).

2.1.2. Kanser Tedavisi

Kanser halk aras,nda tedavisi olmayan bir hastal,k olarak bilinmektedir. Fakat erken tan, ve tedavi ile kanserli hastalarda önemli bir iyile me oldu u görülmektedir. Kanseri tek tür bir hastal,k de ildir, de i ik cinsleri vard,r ve de i ik organlar, tutar. Kanserin baz, türlerinin tedavisi güçlüken birçok kanser türünün tedavisi mümkün olmaktadır. Kanseri tedavisinde ba ar, kanserin cinsine, yayg,nl, ,na ve tedavinin düzenlili ine ba l,d,r (23). Kanseri hastal, ,n,n tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon terapi, immunterapi ve hedeflenmi terapi gibi çe itli tedavi yöntemleri kullan,lmaktadır (24). Genel olarak terapötik anlamda kullan,lan temel tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir (25).

2.1.2.1. Cerrahi Tedavi

Cerrahi tedavi, eski zamanlardan beri kullan,lan bir yöntem olup günümüzde de kanserden iyile en hastalar,n önemli bir k,sm,nda ilk tedavi yöntemi olarak kullan,lmaktadır. Cerrahi tedavi profilaktik olarak geli en kanserlerin engellenmesinde, dokudan bir parça al,narak (biyopsi) kanseri tan,s, konmas,nda ve metastaz olmayan durumlarda kanserli dokunun veya kitlenin vücuttan al,nmas,nda çok s,kl,kla kullan,lmaktadır (23,26). Cerrahi, kanserde farklı amaçlarla kullan,lmaktadır. Bunlar tan,sal cerrahi, önleyici cerrahi, küratif (radikal) cerrahi ve palyatif cerrahidir.

Tan,sal cerrahide kanserin kesin te hisi için kanserli dokudan örnek al,nmaktadır. Kanserli dokudan kanserin cinsi ve yayg,nl, ,na göre sadece biyopsi al,nmakta ya da kanserli dokunun tümü ç,kart,lmaktadır. Önleyici cerrahi "kanseri öncesi lezyonlar" olarak bilinmekte ve kendisi kanseri olmad, , halde kesin kansere dönü ece i bilinen dokular,n ç,kart,lmaktadır. Kanseri cerrahisinin esas, küratif cerrahidir. Bu cerrahide kanserli dokuyla yay,лма olası, ,n,n yüksek oldu u kom u bölgeler ç,kart,lmaktadır. Fakat birçok kanseri türünde, kanserli dokular ameliyatla tamamen ç,kar,lsa da gösterilemeyen mikroskopik yay,lmalar nedeniyle ço u zaman

cerrahiye ek olarak ilaç tedavisi ve radyoterapi gereklidir. Erken dönemde tanınan hastalarda hastalık yayılmadan yakalandığında, için başarıları, çok yüksektir. Palyatif cerrahi ilerlemiş kanser durumlarında hastanın acil sorun yaratan bazı bulgularını düzeltmek, önlemek, yaşamı uzatmak için yapılmaktadır (23).

2.1.2.2. Radyoterapi

Radyoterapi, iyonizan ışınlarla kanserli hücreleri öldürmeye dayanan bir tedavi yöntemidir. Radyoterapide X-ışınları, gamma ışınları, elektronlar gibi iyonize ışınlar kullanılır. Bu ışınlar kanserli hücreyi tahrip ederek etkisini göstermektedir. Fakat bazı kanser türleri radyoterapiye duyarlıyken bazıları da dirençlidir (23,26). Radyoterapi de cerrahi gibi radikal ve palyatif amaçlar içinde kullanılmaktadır. Radikal radyoterapiye bazı erken dönem bazı kanserleri, beyin tümörlerinde cerrahiden sonra radyoterapi uygulanması, ve rahim ağzı kanserleri gibi kanserler örnek verilebilir (23).

Palyatif radyoterapi, ameliyat sonrası kaybetmiş hastalarda, ameliyat riski yüksek hastalarda kanama, ağrı, organ tutulumları gibi durumları düzeltmek için yapılan tedavi yöntemidir (23). Radyoterapinin en büyük dezavantajlarından birisi zararlı hücreleri öldürürken sağlıklı hücreleri de öldürmesidir. Bu tedavi yönteminde kusma, saç kaybı, halsizlik, iştah kaybı gibi sık görülen yan etkiler görülmekte ve bu da hastanın yaşam kalitesini etkileyebilmektedir. Bu nedenle bazı tedavi yöntemleri göz önünde bulundurulmalıdır (26).

2.1.2.3. Kemoterapi

Kemoterapi, ilaçla yapılan bir tedavi yöntemi olup en etkili ve yaygın kullanılanıdır. Sitotoksik etkisiyle kanser hücresinin çoğalmasını önleyerek hücreleri yok etmekte ve normal dokulara en az zarar vermektedir (27). Kemoterapi, kanser tanısından sonra kanseri önlemede en yaygın uygulanan yöntemdir.

Kemoterapi insanda kanser gelişimini önleyici sentetik veya doğal maddelerin ayrı ayrı ya da birlikte kullanılması olarak tarif edilmektedir (28).

1940'den itibaren yıllarda mustard gazının kan hücrelerine etki ettiği gözlemlenmesiyle başlayan kemoterapi günümüzde çok yaygın biçimde kullanılmakta ve halen kullanılan 50'den fazla kanser ilacı bulunmaktadır. Kemoterapi sistemik bir tedavidir; sadece hastalığın bulaşacağı yere değil, uzak bölgelere yayılmaya olan, tespit edilen veya edilmeyen tüm kanserli hücrelere etki etmektedir. Bu amaçlar için kullanılan çeşitli kimyasal maddeler; alkaloidler, antibiyotikler ve bazı hormonlar vb. ilaçlardır (23). Günümüzde kemoterapi, cerrahi ve radyoterapi ile birlikte kullanılmaktadır. Bu sayede birçok kanser türünde iyileşme oranının artması gözlemlenmiştir (29).

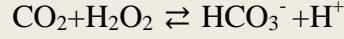
2.1.2.3.1. Kemoterapinin Yan Etkileri

Kemoterapi ilaçları, bulaşık ve akciğer mukoza epiteli, testisin germinatif epiteli, kök folikülü hücreleri, kemik iliğinin hematopoietik hücreleri, embriyo ve fötüs hücreleri gibi hem normal hem de kanserli hücrelerin gelişmesi ve çoğalmasının önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu ilaçların etki özelliklerinden dolayı, bireyde rahatsız edici bir dizi yan etkilere neden olabilmektedir (19,30,31). Hastalarda kemoterapi sürecinde veya sonrasında kemik iliğinin baskınlığı, ve buna bağlı olarak aneminin ortaya çıkması gözlemlenmiştir. Kistik tümör oluşumu ve tümör metastazı gibi yan etkilere neden olduğu tespit edilmiştir (32).

Kemoterapi ilaçlarının bazı yan etkileri; bulantı, kusma, saç dökülmesi, kemik iliğinin baskınlığı ve akyuvar sayısında düşmelerdir. Bu yan etkilerin çoğu geçicidir ve kolaylıkla kontrol altına alınabilmektedir. Bazı yan etkiler ise kalıcı olabilir; bunlar kalbe, akciğerlere, üreme sistemine olan etkilerdir. Uzun süre kemoterapi alanlarda kanserlik da görülebilmektedir (23). Kemoterapi gören hastaların metastazı olan bireylerde sürekli artmaları, metastazlar olmayanlarda ise aralıkları artmaları beklenenin üzerinde olduğu tespit edilmiştir (33).

2.2. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz enzimleri (CA), (E.C.4.2.1.1) çinko içeren metalloenzim ailesinin üyelerinden biridir ve karbondioksitin (CO₂) hidratasyonunu geri dönüşümlü olarak katalizler (34).



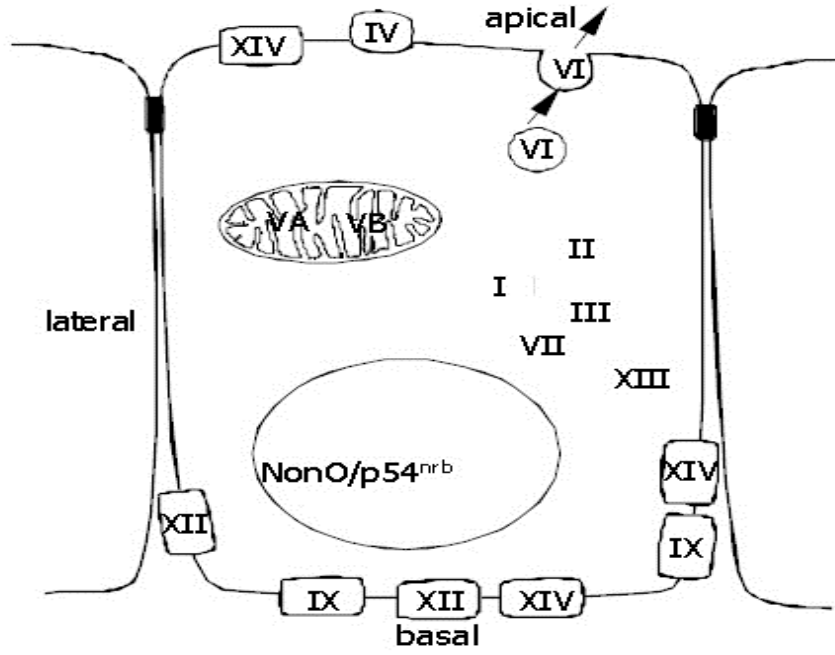
ekil 1. Karbonik anhidrazların genel tepkimesi.

CA'lar, canlı organizmalarda hemen hemen her yerde bulunur. Hayvan, bitki ve bakteri hücrelerinde çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Neredeyse tüm organizmalarda bulunan CA'ların katalitik aktivitesi oldukça yüksektir ve yüksek etkinlik izoenzimleri olarak bilinen en etkili enzimler arasındadır (35). CA aktivitesi, pH homeostazını düzenlenmesindeki rolünden başka bikarbonat gerektiren erken karboksilasyon basamağını içeren biyosentetik süreçleri kolaylaştırmaktadır. Bu süreçler glikoneogenesis, baz, aminoasitlerin sentezi (piruvat karboksilaz), lipojenez (piruvat karboksilaz ve asetil CoA karboksilaz), üreojenez (karbamil fosfat sentetaz) ve pürimid sentezi (Karbamil fosfat sentetaz II)dir (36).

2.3. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Türleri

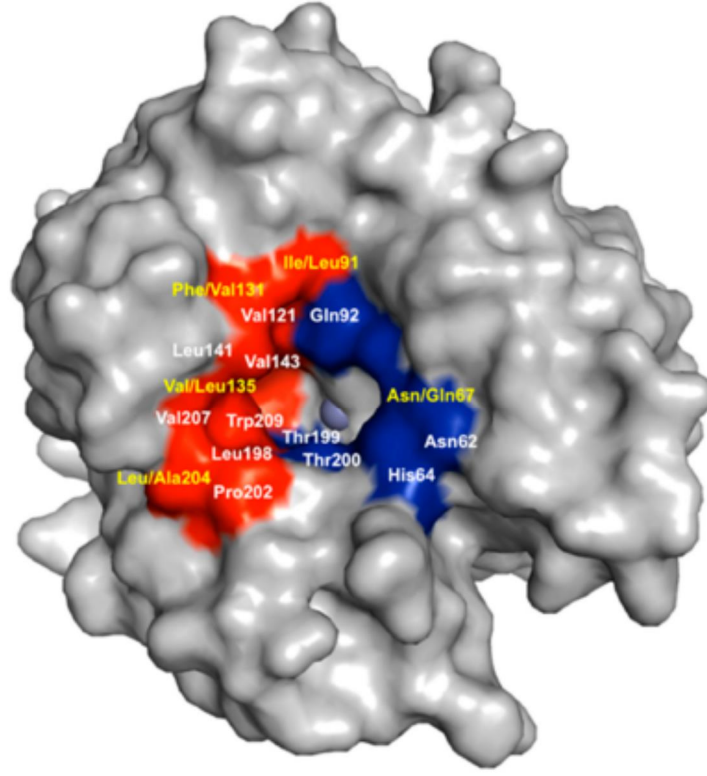
insanlarda CA'ların 15 izoformu (CA-I, CA-II, CA-III, CA-VA, CA-VB, CA-VI, CA-VII, CA-VIII, CA-IX, CA-X, CA-XI, CA-XII, CA-XIII, CA-XIV ve CA-XV) ifade edilmektedir. Bunlardan 12'si katalitik aktiviteyi göstermektedir. CA-VIII, CA-X ve CA-XI, katalitik aktiviteye sahip değildir ve bu enzimler CA ile ilgili proteinler (CARP'ler) olarak adlandırılmaktadır (37). Aktif izoformlar arasındaki katalitik etkinliğin farklılıklarından başka, hücresel dağılım ve lokalizasyonu da farklı olmaktadır. Bunun sonucu olarak farklı fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır (3,37,38). Bu izoenzimlerin bazıları, (CA-I, CA-II, CA-III, CA-VII, CA-XIII) sitosolik, bazıları ise (CA-IV, CA-IX, CA-XII ve CA-XIV) membrana

ba 1, ekilde bulunur. CA-V mitokondriyal,r. (ekil 2.) CA-VI salya ve süt içine salg,lanmaktad,r (39). CA izoenzimlerin anormal biçimde ekspresyonu genellikle bir dizi hastal,kla ili kilendirilmi tir. Bu hastal,kklar; irtifa hastal, , (CA-II), ödem (CA-II), glokom (CA-II, CA-IV), obezite (CA-VA) kanser (CA-IX, CA-XII), k,s,rl,k (CA-XIII), ve hemolitik anemi (CA-I) (38,40).



ekil 2. Aktif CA izoenzimlerinin hücredeki yerle imleri (41).

CA'lar,n alfa s,n,f,, birbirleri ile çak, an i levsel rollere sahiptir ve oldukça homologdur. nsanlarda sentezlenen CA'lar, kendi aralar,nda tüm katalitik izoformlar,n aktif bölgeleri içinde önemli bir koruma ile en az % 30 primer sekans kimli ini payla maktad,rlar (42). Aktif bölge, konik bir bo lu un alt,nda bulunur ve burada çinko iyonu üç histidin kal,nt,s, ve bir su / hidroksit molekülü ile bir tetrahedral koordinasyonda konumland,r,lm, t,r (43). CA'lar,n katalitik bölgesi, aktif bölgenin giri ine biti ik hidrofobik ve hidrofobik bölgeler taraf,ndan korunarak karakterize edilir. ekil 3øde CA-II ve CA-IX aras,ndaki benzerlikleri ve farklı,klar, aktif bölge ile çevresinde göstermektedir (44).



ekil 3. CA-IX'un üç boyutlu yap,s, (PDB ID: 3IAI). Hidrofobik (k,rm,z,) ve hidrofilik (mavi) aminoasitler; CA-II ve CA-IX aras,nda korunan aminoasitler (beyaz) ve de i ik olan aminoasitler (sar,) (45).

2.3.1. Karbonik Anhidraz IX (CA-IX)

Karbonik anhidraz-IX (CA-IX), karbondioksit ve sudan bir proton ve bikarbonat üretildi i geri dönü ümlü reaksiyonu katalize eden karbonik anhidraz (CA) enzim ailesinin bir üyesidir. Di er enzimlerin aksine birçok kanser formunda sentezlenmekte ancak ço u normal dokuda çok az görölmektedir (9). CA-IX sentezi do rudan hipoksi indükleyici faktör (HIF) elemanlar,n,n art , ile artmakta olup tümör hücrelerinin hayatta kal,m,, proliferasyon, migrasyon, büyüme, adezyon, pH düzenlenmesi ve hücre sinyal yollar,nda rol oynad , tespit edilmi tir.(46-48). CA-IX membrana ba l, bir ekilde hücre yüzeyinde bulunur ve solid tümörlerde görülür.

Özellikle böbrekle ilgili hücre karsinomlarında (RCC), serviks, over, kolon, baş, boyun karsinomlarında da, sentezlenmektedir.

CA-IX'ın hücre yüzeyinde aktivite göstermesi CO₂'ün hidrasyon ve dehidrasyonu sonucunda klorür-anyon değeri taşıyıcısı olarak hücre membranında yer alması ve HCO₃⁻ anyonlarının tekrar sitoplazmaya taşınmasında önemli görevleri vardır. Bu membran bağlı, tümör ili kili izoenzimin ekstrasellüler asiditeyi kontrol ettiği ve böylelikle katepsin B ve matris metaloproteaz B (MMP-9) gibi hücre yüzey proteazlarının aktivasyonuna etkisi, bu enzimin hipoksiya ve kanser terapisi için önemli olduğunu göstermektedir (49).

2.3.1.1 CA-IX'ın Yapı, ve Fonksiyonlar,

CA-IX geni, kromozom 9'un p12-p13 bölgesinde lokalize olup CA-IX proteinini kodlayan 11 ekzonu içermektedir (50). CA-IX geni, 459 amino asitten oluşan (aa) bir homodimer transmembran glikoproteini kodlar. Bir proteoglikan benzeri bölge (PG) (59 aa), katalitik bölge (CA) (257 aa) bir sinyal peptidi bölgesi (enzim olgunlaşmasından önce uzaklaştırılır) (37 aa), transmembran bölge (TM) (20 aa), ve bir C-terminal intrasellüler bölge (25 aa) içermektedir (51). CA-IX'da PG domaininin varlığı, diğer CA izoformlarıyla karşılaştırıldığında hücre adhezyon kabiliyetinden sorumlu olduğunu ve asidik tümör mikro çevresinde katalitik aktivitesini sürdürdüğü düşünülmektedir (52).

Kütle spektroskopisi ve X ışını kristalografisi, dimer arayüzü stabilize etmek için hidrofobik kalıntıların bir bölgesi ile birleştirildiğinde, olgun homodimerin komu Cys137 kalıntıları arasında moleküller arasında bir disülfid köprüsü bulunduğunu tespit etmiştir. (3,53). N-bağlı ve O-bağlı, glikozilasyon bölgelerinde sıklıkla Asn 309 ve 78'de bulunur (54). CA-IX'un katalitik domaini aktif bölgede yüksek amino asit muhafaza eden alfa-CA'lara yapısal olarak homologdur (55). CA-IX'da, üç histidin kalıntısı olan His 226, 228 ve 251, aktif bölge yarıkının tabanındaki çinko iyonunu koordine eder; Kristal yapıda (PDB ID: 3IAI) asetazolamid (AZM), çinko iyonu etrafında tetrahedral bir koordinasyonu koruyan çinko bağlı su / hidroksit (Zn-

OH / H₂O) molekülünün yerini alır. CA izoformlar, arasındaki de i kenlik aktif bölgenin hidrofobik ve hidrofilik cepleri ile yüzey amino asitlerinde görülür. (53,54,56).

CA-IX'un katalitik etkinliği ve CA-II'ninkinden hızlıdır; CA II, 1.4 x 10⁶ k katsayı, sergilerken, CA-IX'un kcat değeri 3.8 x 10⁵'tir (38,57). CA-IX'ın en kritik rolü, özellikle tümör mikro çevresinde hücre dışı, pH düzenlemesidir. Proliferatif kanser hücreleri, genellikle kanserojen metabolizmasında büyük miktarlarda laktat, karbondioksit ve proton üretir. Bu metabolik son ürünler hücre dışı, ortamda birikerek hücre dışı, pH değerini önemli ölçüde düşürür. Karbondioksitin hidrolizi sırasında CA-IX tarafından üretilen bikarbonat anyonlar, fizyolojik olarak hücre içi pH'ya yakın bir seviyede tutmak ve hücre içi pH seviyelerini tamponlamak için anyon taşıyıcılar, vasıtasıyla hücrenin içine taşınır. Reaksiyondan üretilen protonlar hücre dışı, kaldığından tümör çevresinin asidik yapısına katkıda bulunurlar CA-IX fonksiyonu tümör hücrelerinin hayatta kalmasında önemli rol oynar. (58).

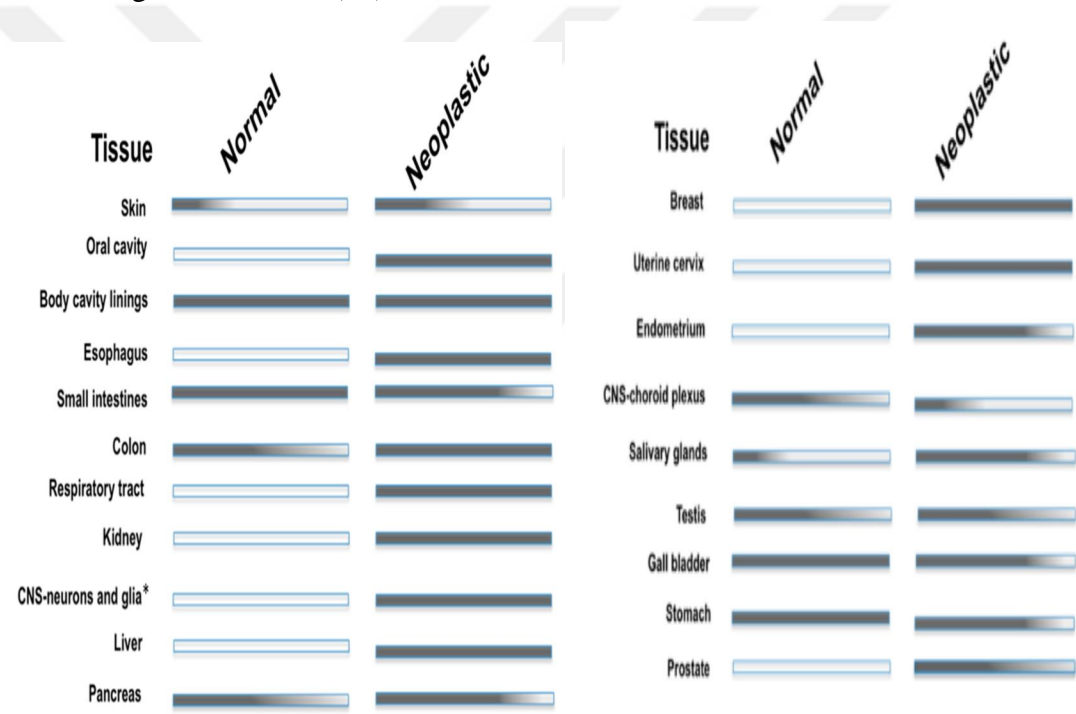
2.3.1.2. Kanser ve Normal Dokulardaki CA-IX Sentez Durumu

Hastalık dışı, bir durumda CA-IX'ın ifadesi özellikle duodenum, jejunum ve ileumdaki kriptik enterositlerin bazolateral yüzeyleri ile sınırlıdır (59). CA-IX'un en belirgin seviyeleri, bu proliferatif kript hücrelerinde görülmekle birlikte CA-IX, bağırsak kök hücre proliferasyonunda ve bazı metabolik fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynar (60). Northern blot ve immünohistokimyasal boyamayla CA-IX ifadesinin yumurtalık koelomik epitelyumda, saç folikül hücrelerinde, pankreatik duktal hücrelerde ve fetal rete testiste olduğu tespit edilmiştir (61,62).

Bağırsak, akciğer, iskelet kasının embriyonik dokularının gelişiminde ve yetkin dokuların azalmasıyla da yüksek CA-IX ekspresyon seviyeleri gözlemlenmiştir. Bu gözlemler CA IX ekspresyonunun öncelikle normal dokulardaki düşük pH ve yüksek hücre proliferasyon oranlarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. CA-IX ektopik olarak çeşitli neoplastik dokularda ifade edilmektedir. Göğüs, akciğer, böbrek, kolon / rektum, serviks uteri, ağız boşluğu (kafa / boyun), safra

kesesi, karaciğer, beyin (yüksek dereceli), pankreas ve gastrik epitel malignitelerinde ekspresyonu gözlemlenmiştir (58,61, 62).

Daha yakın zamanlarda, CA-IX, kanser hücreleri ile moleküler olarak, etkilemeye giren stromal hücrelerde anlamlı ekspresyon düzeylerine sahip olduğu görülmüştür. Özellikle HIF-1'in redoks temelli stabilizasyonu yoluyla kansere bağlı fibroblastlarda (CAF'ler) CA-IX'un ifade edildiği gösterilmiştir. CAF'lerde CA-IX ifadesinin komşu kanser hücrelerinde epitel-mezenkimal geçişleri (EMT) sürmesi için gerekli asidik hücre ortamı, sağladığı düşünülmektedir (63). Bu bulguların toplanması, birçok solid tümörde tümör hipoksi olaylarının bir tanesini belirteci olarak CA-IX'ı göstermektedir (61).



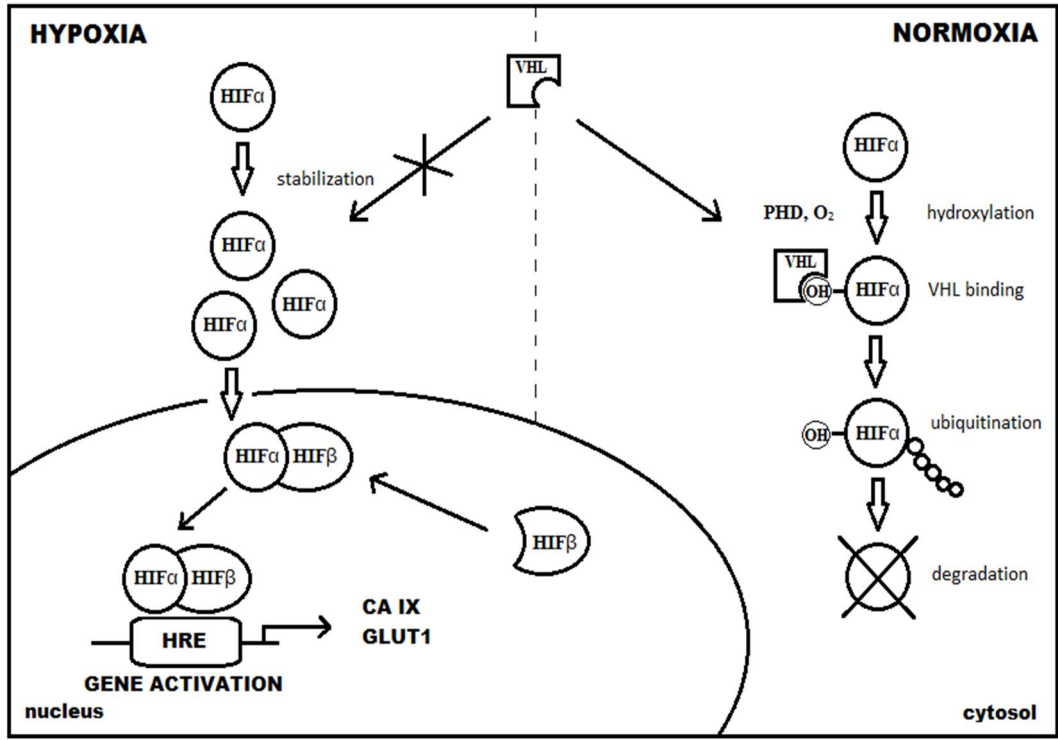
ekil 4. Farklı insan dokularındaki CA-IX seviyesi. (*): Yüksek dereceli tümör dokularını belirtir (64).

CA-IX ekspresyon seviyeleri, çeşitli kanser türleri için prognostik belirteçler olarak görev yapmaktadır. Özellikle beyin, göğüs, servikal, rektal veya akciğer kanseri muzdarip hastalardan aynı zamanda yüksek CA-IX düzeyleri gösteren hastalar tipik bir şekilde daha kötü bir prognoz göstermektedirler. Buna karşın, açık hücre renal hücreli karsinom (CCRCC) hastaları için düşük CA-IX seviyeleri kötü

bir klinik sonuca i aret etmektedir (48,52,58). CA-IX'un hipoksik tümör mikroçevre korunmas,na katkı,s, ve hastan,n prognozu ile yüksek korelasyona sahip olmas,, CA-IX'ın hem biyolojik belirteç hem de ilaç hedefi haline getirmi tir (52).

2.3.1.3. CA-IX'ın Hipoksi ve Kanserdeki Rolü

Hipoksi, metastatik tümörlerde yaygın görülen bir durum olup, hücrelerin hızla çoğalması, ve metabolizmalarında bir kayma nedeniyle oksijenden yoksun bırakılmasıdır (65). Hipoksi bölgeler genellikle tümörlerde görülür ve kanser biyolojisi ile tedavilere olan yanıtın, derinden etkilemektedir (66,67). Klasik olarak, tümör endotel hücrelerinin yapısal anomalileri ile kombine edilen yüksek oranda kanser hücresi çoğalması, düşük oksijen seviyelerine sahip tümör bölgelerini indüklemektedir. Tümör hücreleri, hipoksi indüklenebilir faktörlerin transkripsiyonel aktivitesini indükleyerek bu hipoksik mikroçevreye hızla uyum sağlayabilmektedir (68). Hipoksik hücreler, oksidatif DNA hasarı, DNA zincir kırılmaları, genetik hatalar gibi stres indüklü hasarlar ile karşılaşarak, kayıplarına uğrayarak hücrenin büyümesini kısıtlar ve hücre ölümüne yol açar. Fakat kanser hücreleri hipoksik ortamlara adapte olmaları, ve hayatta kalmaları, sağlayacak genetik değişiklikler geçirirler. Bunun sonucunda da hayatta kalmaya devam ederek daha invaziv, metastatik bir fenotip kazanırlar. Böylece radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavi yöntemlerine karşı, daha dirençli hale gelirler (69).



ekil 5. Hipoksi ile indüklenebilir genlerin aktivasyonu (70).

Tümör hücreleri, düşük oksijen konsantrasyonlarına maruz kaldığında çoğu faktörü kontrol eden hipoksi indükleyici faktör-1'in (HIF-1) ekspresyonunu artırır. HIF-1 sinyalinin aktivasyonu tümör hücrelerinin düşük oksijen koşullarında yaşabilmesi için önemli bir adaptasyondur (71). HIF-1, oksijen bağımlı olarak, HIF-1 alt ünitesi ve oksijenden bağımsız HIF-1 alt ünitesi bulundurur. HIF-1 alt birimi aril hidrokarbon nükleer reseptörü (ARNT) olarak da bilinmektedir (72). alt biriminin Pro 402 ve Pro 504 rezidüleri normoksik koşullarda prolin hidroksilaz domain proteini (PHD2) ile O₂ bağımlı olarak hidroksilasyona maruz kalmaktadır. Bu modifikasyon alt biriminin von-Hippel Lindau (VHL) tümör supresör proteini ile etkileşim kurmasına neden olur ve bu sayede alt biriminin proteozomal degradasyonu sağlanır (69). alt birimi hipoksik ortamda degrade olmaz. Çekirdekte taınarak altbirimi ile dimerize olur. Bu kompleks HIF hedef genlerinin enhansör promotor bölgesinde içinde bulunduğu hipoksi duyarlı elementin 5-RCGTG-3 konsensus sekansına bağlanmaktadır (72). Tümörlerin hipoksik ortama adaptasyonda, anjiyogenez, anaerobik enerji sağlanması, metabolik regülasyon, pH dengesi ve apoptozisde görev alan genlerin transkripsiyonuna hipoksi duyarlı element yardımcı

olmaktadır (73). Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve karbonik anhidrazlar, HIF-1'in yüzlerce hedefi arasında en çok çalışılanlar (69).

CA-IX ifadesi doğrudan HIF elementlerinin artmasıyla artmakta olup tümör hücrelerinin sağ kalması, proliferasyon, migrasyon, büyüme, adezyon, pH düzenlenmesi ve hücre sinyal yollarında rol oynadığı, gösterilmiştir (46-48). CA-IX'un başlıca işlevi, hipoksi ile indüklenen tümör progresyonu olgularda potansiyel önem taşıyabilecek beta-katenin ile etkileşimi yoluyla E-cadherin aracılığıyla hücre adezyonunu modüle etmesine rağmen, solid tümörlerde sık görülen hipoksik koşullar altında hücre içi pH homeostazını korumaktadır (74). Bu nedenle tümörlerdeki CA-IX ekspresyonu hipoksi belirteci ve kötü prognoz belirteci olarak kabul edilmekle birlikte antikanser tedavisi için bir klinik potansiyele sahiptir (75).

CA-IX ekspresyonu, hipoksi ve / veya asidozize karşı güçlü ve sık bir adaptif tepki oluşturduğunu göstermektedir ve bu da bu mikroçevre streslerine maruz kalan kanser hücreleri için faydalı olduğu gözlenmiştir. Hem deneysel hem de klinik bulgular, özellikle bozulmuş bir pH homeostazının fenotipik sonuçlarıyla ilişkili durumlarda CA-IX'un seçici avantajları sağladığını göstermektedir. Birincisi CA-IX, hipoksi ve / veya asidoz durumunda kanser hücrelerin için hayatta kalma avantajı sağlamaktadır. Bunu genetik olarak manipüle edilen CA IX ekspresyonu veya CA aktivitesinin inhibitörleri kullanılarak yapılan klinik öncesi birçok çalışmada açıkça gösterilmiştir. Tüm vakalarda, CA-IX'ın baskılanması, katalitik domainin silinmesi veya farmakolojik inhibisyon sonucunda tümör ksenograftlarının büyümesini önemli ölçüde azaltma ile sonuçlandırdığı görülmüştür (76-78).

İkincisi ise CA-IX'ın kemoterapi, radyoterapi ve anti-anjiyojenik tedavi de dahil olmak üzere birçok tedaviye karşı dirençli olduğu görülmektedir. Klinik öncesi çalışmalar CA-IX ekspresyonları farklı olan insan tümör hücreleri ile ksenograftlanmış hayvanların radyasyon veya seçici ilaçlarla (kemoterapötik ajanlar ve CA inhibitörleri) tedavi edilen çalışmaları dayanmaktadır. Yüksek bir CA-IX düzeyine sahip tümörlerin deneysel tedaviye daha az yanıt verdiğini ancak CA-IX katalitik aktivitesinin inhibisyonuyla kemo veya radyo duyarlılığı önemli ölçüde geliştirdiği görülmüştür (79,80). Benzer şekilde, CA-IX inhibisyonu, anti-anjiyojenik terapinin

anti-VEGF antikoru ile etkisini arttırdı, bilinmektedir (77). Yapılan bu çalışmalarda CA-IX'un pH düzenleyicisi olarak, tümör hücrelerinin ilaç veya radyasyonun toksik etkilerinden korunması için önemli olduğunu ve hücre dışı asidozun ilaç alımı ile radyasyon hasarını olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir (81).

CA-IX'ın kanser ile ilişkisini destekleyen çeşitli özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Bunlar;

- 1) Sadece birkaç normal dokuda, yani gastrointestinal epitelde bulunur (82).
- 2) CA-IX ekspresyonunun çoklukla karsinomalar olmak üzere geniş bir aralıkta tümörlerde görülür (83).
- 3) CA-IX ekspresyonu, yüksek bir renal hücreli karsinoma (RCC) yüzdesinde görülen von Hippel Lindau (VHL) inaktivasyonu ile ilişkilidir (84).
- 4) Hipoksiye bağlı ve çeşitli non-RCC tümörlerinin agresif bir fenotipi ile ilişkilidir (75).
- 5) CA-IX transkripsiyonel seviyede HRE aracılığıyla hipoksi indükleyici faktör tarafından transkripsiyon başlatılma alanı, yan yana lokalize olan HRE (HIF) (aslında, olarak HIF-1 izoformu) vasıtasıyla güçlü bir şekilde aktive edilmektedir (85).
- 6) Fonksiyonel düzeyde hipoksi ile indüklenmektedir (86).
- 7) PI3K / Akt yoluna sinyal iletiminde ve hipoksi ile aktive olan protein kinaz A'dan (PKA) sorumludur (86,87).
- 8) pH kontrol mekanizması, yeni olup tümör biyolojisinde aktif rol oynar. Tümör hücrelerini hipoksi ve onkojenik metabolizma kaynaklı strese koruyarak tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve tedavi direncine katkıda bulunur (76,79,88).
- 9) Aynı zamanda hücre ayrışmasını, adhezyonu, migrasyonu ve invazyonu kolaylaştırır (89-91).
- 10) Hücre yüzeyine maruz kalan katalitik alan, ve N-terminali proteoglikan bölgesi ekstraselüler bölgeye bakar ve böylece dış ortam (ECD) spesifik antikolar ve katalitik aktivitenin inhibitörleri için ulaşılabilir olmaktadır (78,92).
- 11) Yüksek derecede kararlı bir proteindir ve bir metalloproteinaza bağımlı bir şekilde atılabilir. (93-95).

12) Güçlü algı, lama ve antikanser özellikleri ile CA-IX'un farklı alanlar, için spesifik birkaç monoklonal antikor vardır ve CA-IX enzim aktivitesinin umut verici seçici inhibitörleri de geliştirilmektedir (96-98).

2.4. CA-IX inhibitörleri ve Kanser Hedeflemesindeki Roller

Sülfonamid bazlı bileşikler, karbonik anhidraz inhibitör (CAI) sınıfında en güçlü ve en çok kullanılanlardır. Bu bileşikler, çinko bazlı su / hidroksit molekülünün yerini çinko-bazlı grubu (ZBG) olarak bir sülfonamid yoluyla tetrahedral koordinasyonunu koruyan çinko iyonuna bağlanırlar (38,99). İnsanlarda sentezlenen CA'lar, arasındaki aktif bölgenin korunan mimarisinin dolaylı olarak, baz, sülfonamidler, CA-IX için alt nanomolar aralıkta inhibisyon sabitleri sergilemekte ve diğer CA'lar, inhibe etmektedir. İnsanlarda sentezlenen bütün katalitik CA'larda çinkoyu koordine eden üç histidin Thr 199 ve Glu 106 korunur (55). Hem T199 hem de E106 katalizde rol oynamaktadır (57,100). T199 hidrojen, OH grubuyla çinko bazlı su / hidroksit ile bağlanırken, E106 hidrojen T199 ile bağlanırlar (101). Bir ZBG'yi kullanan küçük moleküllü CAI'ler, aktif bölge bölümlerine derine bağlanma eylemindedir ve CA izoformları, arasında deiyonik amino asitlerle geniş çaplı etkileşim kurmazlar, böylece onların ayrı yapmayan inhibisyon profillerine katkıda bulunurlar. Bu nedenle daha iyi izoforma özgü CAI'ler için alternatif yaklaşımlar geliştirilmiştir. Kuyruk yaklaşımı, bu yöntemlerden en başarılı olanıdır. Kuyruk yaklaşımında bir kimyasal parça (heterosiklik veya aromatik) bir ZBG'nin bir organik iskelesi üzerine eklenmektedir (38,99).

Çeşitli CAI'lerin yapısal analizi, CA-IX'u seçici olarak inhibe etmekte yararlı olduğu gösteren, hem yere spesifik hedefleme hem de "ön ilaç benzerleri" özellikleri sergileyen, ilaçların tasarlanmasını mümkün hale getirmiştir. Küçük moleküllü inhibitörlerin geliştirilmesinin yanı sıra, CA-IX'a spesifik antikorlar ve bunların konjugeleri, günümüzde bazı Faz III klinik çalışmalarında geliştirilmektedir. M75 ve G250, enzimlerin proteoglikan domainini tanıyan iki monoklonal antikordur (102,103). CA IX'a bağlandıktan sonra bu antikorlar tümör hücrelerinde adhezyon ve motilitesinde bir azalmaya neden olur ve doğal öldürücü hücrelerin yok etmesi için

tümör hücrelerini hedeflemesine neden olur (54,104,105). Yüksek bağlanma afinitesi olan monoklonal antikorların geliştirilmesi, CAI ilaç tasarımı, yaygın olarak görülen hedef d, , etkileri sorununu ortadan kaldırır (103).

Ön ilaçlar, 2000'li yıllardan beri onaylanmış, tüm ilaçların %20'sini temsil etmektedir (106). Ön ilaç benzeri özelliklere sahip olan CAI'ler, floresanla etiketlenmiş sülfonamidler, kumarin türevleri, glikokonjugatlar şeklinde mevcuttur (107-109). İlk CAI'ler, CA-IX'u hedef almak için özel olarak tasarlanmamış, t.r. Bunun yerine çoğu ön ilaç CAI'si, glaukoma tedavisinde CA-II'yi hedef alacak şekilde tasarlanmış, t.r. De Simone ve diğerleri tarafından CA-IX'u hedef alan ilk ön ilaç CAI'leri geliştirilmiştir (110-114). Ön ilaç çalışmaları, malarında en umut verici bileşik olan 4-(2-merkaptofenilkarboksamido) benzen sülfonamid, inaktif durumda CA-IX için yaklaşık olarak 10⁶ M afinitesini göstermiş ve maskelenirken CA-IX için afinitesi yaklaşık 60 kat artmış, t.r. (115).

Pasif ön ilaçlar olarak hareket eden karbamoil fosfonatlar oldukça biyoyararlanım gösteren CAI'lerin bir sınıfıdır. Bu CAI'ler hafif asitli tümör mikro çevresini maskesiz kılmak için kullanılmaktadır. Nötr pH'da bu CAI'ler plazma zarına kolayca geçirgenliğini sürdürürler. Asidik tümör çevresine girdikten sonra iyonize olurlar ve membrana geçirimsizdirler. Daha önceleri iyonize karbamoil fosfonatlar artmış, CA-IX inhibisyonunu göstermektedirler (115,117).

CA-IX'un aktif bölgesinin ekstraselüler konumu tümör hücrelerinde enzimi hedeflemenin alternatif bir yöntemi sunmaktadır (118). Özellikle, CAI'ler, plazma zarına geçirimsiz kalmaları, sağlayacak fizyokimyasal özelliklere sahip olacak şekilde tasarlanabilir. Bu nedenle klasik CAI'ler tarafından gözlemlenen hedef d, , sitosolik CAI'ler, inhibe etmemiş, d, (41). Bu, inhibisyon profilindeki farklılıklar, tek başına kullanılmaları yerine, CA-IX'un konuma spesifik hedeflemesini içeren bir ilaç tasarımı stratejisi sunmaktadır. Bugüne kadar sınırlı membran geçirgenliği gösteren birkaç bileşik sentezlenmiş ve tasarlanmış, t.r. Bu tür bileşikler, albumin-asetazolamit gibi hacimli kimyasal yapılar, kullanılır veya floresanla etiketlenmiş sülfonamidler/kasyonik sülfonamid türevleri şeklinde yüklü yapılar kullanılırlar (34,107,119,120).

Daha yeni bir CAI s,n,f, olan glikokonjuge sülfonamidler, hem zar geçirgenli i hem de izoform seçici CA-IX inhibisyonu sergilemektedir (121,122). Bu özel CAI'ler, benzen sülfonamidleri, sülfonamidleri veya bir mono- veya disakkarit kuyruk konjuge edilmi siklik ikincil sülfonamidleri kullan,rlar. Bu CAI'lerin tasar,m,, klinik olarak kullan,lan Topiramet'n (anti epileptik terapötik) etkisi ile yap,lm, t,r (123,124).

Solid tümörlerde CA-IX'un fizyolojik rolü ile ilgili geni veriler, birincil i levinin pH düzenlenmesinin ötesine geçebilece ini dü ündürmektedir (52,107). CA-IX'un fizyolojik i levlerinin farklı, primer tümörler türleri aras,nda de i ti i gözlemlenmi tir. Bu sadece hipoksik tümörlerdeki CA aktivitesini bloke etmenin, tümörlerin büyümesi ve hayatta kalmas, için zararlı, olabilecek bir eilde tümör ortam,n, tamamen bozulmayabilece ini göstermektedir. Bu nedenle, hipoksik tümörlerde CA-IX ekspresyonunun tamamen ortadan kald,r,mas, yaln,zca aktivitesini hedeflemekten daha yararlı, bir terapi takti i olabilmektedir. Tümörlerde CA-IX ekspresyonunu terapötik olarak dü ürmenin uygun bir yolu kanser de dahil olmak üzere çe itli hastal,klar,n tedavisi için halihaz,rda uygulanm, RNA interferans (RNAi) teknolojisinin kullan,lm,as,d,r (125).

Çe itli kanser modellerinde CA IX ekspresyonunun modülasyonunu içeren birçok çal, ma, RNAi teknolojisini kullanmaktad,r. Örne in karaci er, gö üs, böbrek, beyin, prostat ve di er baz, kanser türlerinde CA-IX ekspresyonunu modüle etmek için spesifik siRNA teknolojisi kullan,lm, t,r. siRNA arac,l, ,ya CA-IX'un ba ar,yla bloke edilmesi gö üs kanseri modellerinde birincil tümör büyümesini ve proliferasyonu azaltt, ,n, ve karaci er kanseri tedavisinde umut verici bile ikler olan heksokinaz inhibitörlerin etkilerini artt,rd, ,n, göstermi tir. Bu tedavi ekli CA-IX aktivitesindeki modülasyonlar,n, tümör fonksiyonunun bozulmas,nda önemli katkı,da bulunmayabilece i dü ünülmekte baz, kanserlerde seçici izoform CAI'lerin geli tirilmesine bir alternatif olarak hareket edebilmektedir (54,65,126-133).

Cerrahi ve radyasyon terapisi, olgular,n büyük bir ço unlu unda etkilidir fakat, yaln,zca neoplastik dokunun s,n,r,l, lokal bölgelerini hedef alabilmeleri ve yüksek metastatik kanser vakalar,n,n tedavisinde etkili olmad,klar, için k,s,tlamalar

meydana getirmektedir (133). Bu a amada, çoklu kemoterapötiklerin kombinasyonlar, genellikle birincil tümör alan,ndan göç eden kanser hücrelerini öldürmek için kullanılır. Agresif ve hipoksik tümörler genellikle radyasyona ve bazı kemoteraplere karşı direnç geliştirir veya çalmaz; dolayısıyla alternatif veya kombinasyonel kemoterapötikler bu özel vakalarda mevcut tek tedavi yöntemidir (134-136). Hipoksinin bu özelliği, radyasyona ve kemoteraplere dirençle ilişkili kısıtlı kanser türlerinde görülmüştür (136,137). Bu dirençlerin nedeni, radyasyon terapisi için gerekli olan serbest radikallerin üretimi sağlayan toplam oksijen içeriğinde bir azalmadır, alkilleyici ajanlar, düşük hücre pH bozucu ilaçları ve HIF'ler tarafından uyarılan ilaç direnci faktörlerinin artmasıyla artması gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (52,65).

2.5. CA-IX inhibitörü olarak Kullanılan Sülfonamidlerin Yapı ve Fonksiyonlar,

1940 yılında karbonik anhidraz inhibitörü olan sülfanilamidler Mann ve Keilin tarafından keşfedilmiştir. İlaç olarak kullanılabilecek yeni bileşiklerin sentezi için bilimsel bakımdan önemli bir dönüm noktası olmuştur. Örneğin glaukom tedavisinde enzim inhibitörü olarak kullanılan sülfonamid bileşikleri, antihipertansiyon ve diüretik tipi ilaçlar, antitiroit ilaçlar, hipoglisemik sülfonamidler yeni tip antikanser ilaçlardır (138,139).

CA enzimleri hayvanlarda ve özellikle de insan hastalarında birçokunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Asetazolamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi sülfonamid türevleri olan ilaçlar karbonik anhidraz izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (140,141). Sülfonamidler, etkin inhibitörlerdir ve sübstitüe olmama, bir $-SO_2 NH_2$ grubu veya bir $SO_2 NH(OH)$ grubu içermektedirler. İlk olarak Sülfonamid grubunun azot atomu aracılığıyla enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna anyonlar halinde, ($R-SO_2 NH^{\ominus}$ veya $R-SO_2 N-OH^-$) iyonik olarak bağlanmaktadır. İkinci olarak da hidrofobik etkilemelerle inhibitörün enzime bağlanması tamamlanır. Bu iki etkinin toplamı, sonucunda sülfonamidler, karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde

ba lan,r (142,143). Örne in insanlarda glokom hastal, nda kullan,lan CA inhibitörleri farmakolojik ajan eklide yayg,n kullan,lmaktad,r (144). Günümüzde sülfonamidler glokom hastal, , tedavisi d, nda diüretik, antibakteriyel ve antifungal hastal,klar,n tedavilerinde ilaç olarak yayg,n kullan,lmaktad,rlar. Bu nedenden dolayı, dünyanın birçok yerinde farklı gruplar tarafından yeni sülfonamid türevleri sentezlenmektedir (145).



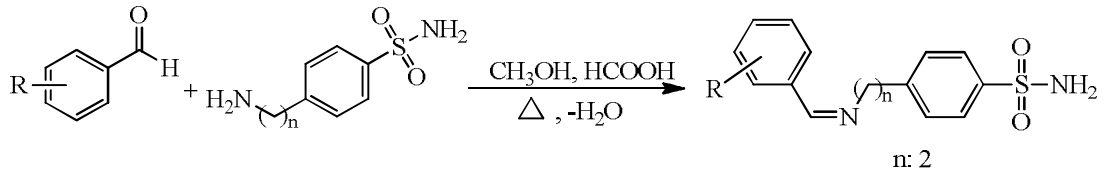
3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. 4-(2-Amino Etil) Benzen Sülfonamit Türevi Bileşiklerin Sentezi

3.1.1. min Grubu İçeren Sülfonamitlerin Sentezlenmesi İçin Genel Yöntem

Hedeflenen bileşikler, 4-(2-aminoetil) benzen sülfonamit'in farklı, aromatik aldehitler (4-metilbenzaldehit ve 5-kloro-2-hidroksi-benzaldehit) ile kondenzasyon tepkimesi sonucu literatüre göre sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır (146-148).

30 mL metanol ve/veya etanol içinde çözülmuş sülfonamit (10 mM) iki boyunlu reaksiyon balonuna koyularak manyetik karıştırıcı ile karıştırılmaya başlandı. Sonra 30 mL metanol ve/veya etanolda çözülmuş uygun aromatik aldehit (10 mM) bu karışım üzerine damla damla eklenerek 10 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra katalizör görevi görmesi için tepkime ortamına formik asit damlatılarak eklendi. Bu işlemler sonucunda tepkime ortamında 20 dakika sürdürüldü. Daha sonra tepkimenin sıcaklığı artırılmaya başlandı ve 3 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Tepkime ortamından alınan numune örnekleri ince tabaka kromatografisi ve IR spektroskopisi ile takibi yapıldı. Bu takip sonucunda tepkimelerin gerçekleştiği ve tamamlandığı gözlemlendi. Tepkime tamamlandıktan sonra ortamın soğuması beklenildi. Daha sonra elde edilen ürün (çözelti veya çökelti halinde) beherelere konularak oda sıcaklığında beklemeye alındı. Katı ürün süzülerek soğuk etanolla yıkandı ve kurutuldu. Daha sonra metanol/etanol karışımında yeniden kristallendirildi ve 40 °C de vakumda kurutuldu.

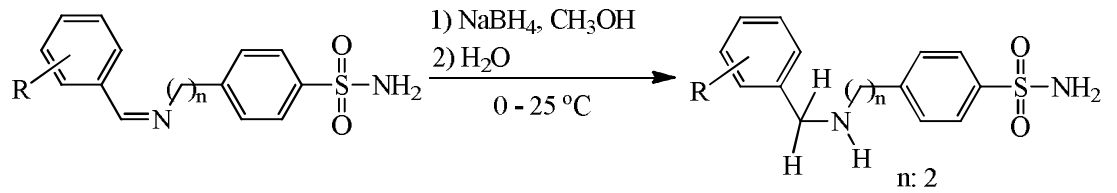


ekil 6. min grubu içeren sülfonamitlerin eldesi için genel tepkime.

3.1.2. Amin Grubu İçeren Sülfonamitlerin Sentezi İçin Genel Yöntem

Hedeflenen bileşikleri sentezlemek için 4-(2-aminoetil) benzensülfonamitin de iki aromatik aldehitler ile kondenzasyon tepkimesiyle elde edilen imin grubu taşıyan bileşikler, karışık gelen sekonder aminlere NaBH_4 ile indirgenerek dönüştürülmüştür. Bu işlemler literatüre göre gerçekleştirilmiştir (146-148).

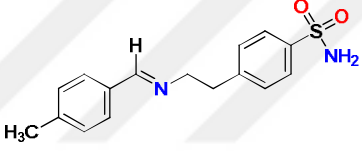
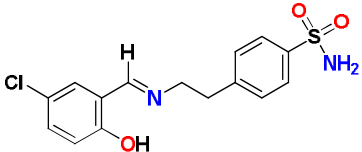
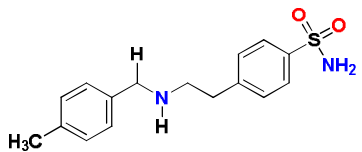
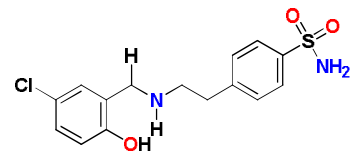
Bu amaçla, elde edilmiş olan bileşiklerin (10 mM) metanol veya etanol (60 ml) de süspansiyonlar/hazırlanarak üzerlerine ayrı ayrı 70 mmol MNaBH_4 , 1 saat süreyle küçük porsiyonlar halinde önce buz banyosunda 0°C 'de ilave edildi. Renkli olan süspansiyonlar NaBH_4 eklenmesiyle çözünmeyen madde çözünmeye başladı, ve çözelti berraklaştı. Daha sonra bu tepkimelere 24 saatten fazla oda sıcaklığında devam edildi. Tepkime ortamından alınan numune örneklerinin ince tabaka kromatografisi yöntemi ve IR spektroskopisi ile takibi yapıldı. Bu takip sonucunda tepkimelerin gerçekleştiği ve tamamlandığı gözlemlendi. Daha sonra çözücü 10 ml kalıncaya kadar uçuruldu ve üzerine 30 ml buzlu su ilave edildi. Sonrasında asetik asit ile asitlendirildiğinde ürünün çöktüğü gözlemlendi. Daha sonra 2 saat kadar sulu süspansiyon halinde bekletildi, süzüldü ve kurutuldu. Diklorometan veya kloroformda iyi çözünenler ise sulu ortamdayken bu çözücülerle ekstrakte edildi, organik faz ayrıldı, çözücüsü uzaklaştırıldı, ve kurutuldu. Daha sonra etanol/metanol (30/70) de yeniden kristallendirildi. Bu işlemler sonucu elde edilen ürünler vakumda 40°C de kurutulmaya bırakıldı.



ekil 7. Amin grubu içeren sülfonamitlerin sentezi için genel tepkime.

Çal, mam,zda kullanaca ,m,z maddeler Durgun 2014 Doktora tez çal, mas,nda sentezlenmi olup CA-IX inhibitör özelli i tespit edilmi tir. Bu çal, mada da bu maddeler Durgun 2014œ göre yeniden sentezlenip, karakterizasyonu Harran Üniversitesi Kimya Bölümünde Durgun taraf,ndan yap,lm, t,r. Antikanser özelli i incelenen maddelerin listesi Tablo 1œde verilmi tir. Tablodaki maddelerin antikanser çal, malar, biyolojik aktivite numarasa,na göre yap,lm, t,r.

Tablo 1. Çal, mada kullan,lacak bile iklerin kimyasal yap,lar, ve CA-IX inhibitör etkisi. (hCA-IX K_I : Enzim inhibisyonu katsay,s,) (146, 147).

Biyolojik Aktivite Numaras,	Bile ik No	Bile ik	Kapal, Formülü	Molekül A ,rl, , (g/mol)	hCA IX K_I (nM)
1	H-3		$C_{16}H_{18}N_2O_2S$	302.39	123
2	H-4		$C_{15}H_{15}ClN_2O_3S$	338.81	106
3	H-3		$C_{16}H_{20}N_2O_2S$	304.41	10.2
4	H-4		$C_{15}H_{17}ClN_2O_3S$	340.83	15.6

3.2. 4-(2-Amino Etil) Benzen Sülfonamid Türevi Bileşiklerin Antikanser Özelliğinin İncelenmesi

Çalışma, mamula deneylerde sırasıyla, azotta stoklanan PNT-1A (normal insan prostat hücre hattı), HELA (insan serviks adenokarsinom hücre hattı) ve MDA-MB-231 (insan metastazik göğüs adenokarsinom hücre hattı) kullanılarak, 4-(2-amino etil) benzen sülfonamid türevi bileşiklerin antikanser aktiviteleri şu amaçla gerçekleştirilmiştir;

- 1- 4 bileşiğinin farklı doz (0-200 μ M) ve zamanlarda (24, 48 ve 72 saat) MDA-MB-231, HELA ve PNT-1A hücrelerinde sitotoksik etkisi WST-1 ile incelendi.
- 2- Yüksek sitotoksik etki gösteren H-4 bileşiğinin (2. madde) antiproliferatif etkileri incelendi.
- 3- 2.maddenin apoptotik etkisi Annexin-V ile flow sitometrik analizi yapıldı.
- 4- Apoptotik etki gösteren bileşiğinin apoptozis yolundaki hücre içi serbest radikal düzeyini ROS analizi ile ölçüldü

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Araç Gereçler

1. CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific Steri Cycle 1160)
2. Laminer ak, 1, kabin (Telster Bio II Advance)
3. İnvörted , mikroskopu (Olympus CKX41)
4. Derin dondurucu (-86°C) (Thermo Forma -86 Freezer)
5. Etüv (Nüve)
6. Otoklav (Nüve)
7. MPV santrifüjler
8. Vortex
9. Hassas terazi
10. pH metre
11. Soğutmalı, santrifüj
12. Manyetik karıştırıcı, t,r,c,
13. 6 kuyucuklu ve 96 kuyucuklu hücre kültür kapları,

3.2.2. Hücre Kültürü Çal, malar,nda Kullan,lan Kimyasal Maddeler

1. Hücre ortam,; DMEM F12
2. Fötal bovine serumu (FBS)
3. Penisilin/streptomisin
4. DMSO
5. L-Glutamin
6. Tripsin-EDTA
7. %0.4 Tripan mavisi solüsyon
8. Fosfat tamponu (PBS/PhosphateBufferedSaline)

3.2.3. Hücre Kültürü Yöntemleri

3.2.3.1. Hücre Hatlar,

Çal, mam,zda daha önce s,v, azotta stoklanan kanser ve normal hücre hatlar, kullan,ld,. Çal, mada MDA-MB-231 ve HELA hücre hatt,; %10 FBS, %1 streptomisin %1 l-glutamine eklenmi DMEM:F-12, PNT-1A hücre hatt,; %10 FBS, %1 streptomisin ve %1 l-glutamine eklenmi RPMI-1640 (Gibco) besiyerinde nemli atmosferde, %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°Cde kültüre edilerek bir gün arayla besi ortamlar, de i tirildi. Hücreler pleyt yüzeyini kaplad,klar,nda tripsin ile yüzeyden kald,r,larak deney setleri olu turmak üzere kullan,ld,lar. Hücre stoklama i lemlerinde ise %5 DMSO içeren ortamlar kullan,ld,. K,sa süreli stoklar için -86°Cdeki dolap, uzun süreli stoklar için -196°Cdeki s,v, azot tanklar, kullan,ld,.

3.2.3.2. Madde Uygulamalar,

Hücreler 96đ,k pleytlere (10⁴ hücre/ml) ekildi ve 24 saat sonra besiyerleri de i tirildi. Normal ve kanser hücre hatlar,na de i en dozlarda (0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 M) ve inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) maddeler uyguland,.

Madde uygulamasından sonra hücre ortamı, taze mediumla değiştirilerek her kuyucu a WST-1 testi uygulandı.

3.2.4. WST-1 Yöntemiyle Hücrelerdeki Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

WST-1 testinin prensibi, canlı hücrelerdeki metabolik aktiviteyi, hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aracılığıyla WST-1'i parçalayarak, çözülebilir formazan tuzları oluşturmasını dayanır. Bunun için hücreler stoktan açılarak küçük petri kaplarına ekildi. Hücreler, petri kaplarında %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırıldı, ve 96 kuyucuklu steril plaklara 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırıldı, ve sonra her bir madde için 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 μ M dozlar, toplamda 200 μ l besiyeri olacak şekilde hücrelere uygulandı. Kontrol olarak da hücrelere kemoterapide yaygın kullanılan cisplatin ve Fluorouracil kullanıldı. Maddelerin hücreler üzerinde sitotoksik etkilerini tespit etmek için WST-1 hücre proliferasyon kiti (Rosche) kullanıldı, ve böylece ilaçların sitotoksik etkileri araştırıldı.

Hücrelere farklı sürelerde (24, 48 ve 72 saat) madde uygulandıktan sonra her kuyucu a 10 μ l WST-1 reaktifi eklenerek inkübatörde 4 saatlik inkübasyona bırakıldı. Inkübasyondan sonra pleyt okuyucuda (spektramax M5) 450 ve 630 nm'de ölçümler yapılarak absorbans değerleri elde edildi. Ölçümler sonucu elde edilen absorbans değerlerinden background sinyali test sinyalinden çıkarılarak (OD450-OD630) grafikler oluşturuldu ve her maddenin IC₅₀ değeri hesaplandı.

3.2.5. Hücre Proliferasyon (BrdU) Testi

Hücre proliferasyonu, genomik DNA replikasyonu ile tespit edilebilmektedir. Bromodeoksiüridin (BrdU) testi, proliferasyon gösteren hücrelerdeki DNA'ya BrdU bağlanması, tespit eden bir testtir. Metil grubunun (CH₃) bağlanma özellikleri ile brom, klor ve iyot atomlarının bağlanma özellikleri büyük benzerlik gösterir. BrdU, halojenli pirimidinler grubunda yer almaktadır. BrdU, yapısında bulunan halojen

gruplar,ndan dolay, DNA molekülünün normal yap,s,ndaki timidinede bulunan metil grubu ile çok benzemektedir. DNA sentezi s,ras,nda halojenli pirimidinler, timidin molekülünün yerine geçerek DNA zincirinin yap,s,na kat,l,rlar. Bu nedenden dolay, bu maddelere timidin analo uøad, verilmektedir.

Proliferasyon olan hücrelerin DNAø,ndaki timidinle BrdU yer de i tirmektedir. Bu yöntemde sadece S faz,ndaki hücreler BrdU ile i aretlenir. aretlenen hücre grubunun hücre siklusundaki ilerlemesi izlenir. S faz,ndaki bromodeoksiüridine ba lanan hücrelerin tespiti BrdU antikorlar,n,n kullan,m, ile sa lan,r. Anti-BrdU-peroksidaz antikoru eklendikten sonra olu an immünkompleksler spektrofotometrede ölçülerek de erlendirilir.

WST-1 testinden sonra 4 maddeden IC₅₀ de eri dü ük olan 2. maddenin en yüksek sitotoksik etki göstermesinden dolay, bu maddenin HELA hücresi proliferasyonu üzerindeki etkisi, ticari olarak sat,n ald, ,m,z BRDU Hücre Proliferasyon Test kiti (Biovision) ile üretici firman,n önerdi i protokole uygun ekilde yap,ld,. Bu yöntemde 96ø,k platelere (10⁴ hücre/ml) HELA hücreleri ekildi. Hücre ekildikten 24 saat sonra, besiyerleri de i tirilip, 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 M dozlar,nda ve 72 saat maddeler uyguland,. Sonras,nda a a ,daki protokol takip edildi;

- 1-** Besiyerleri döküldükten sonra, her kuyucu a 100 µl 1X BrdU reaktifi eklenerek 4 saat %5 CO₂, %95 hava içeren inkübatörde 37 °Cøde inkübasyona b,rak,ld,.
- 2-** Besiyeri uzakla t,r,ld,ktan sonra 100 µl fiksatif/denatürasyon solüsyonu eklendi ve 30 dk oda ,s,s,nda inkübasyona b,rak,ld,.
- 3-** Solüsyon dikkatlice uzakla t,r,ld, ve sonra her kuyucu a 100 µl 1X BrdU antikor solüsyonu eklenip, oda ,s,s,nda, dü ük h,zdaki shaker üzerinde 1 saat inkübasyona b,rak,ld,.
- 4-** Solüsyon uzakla t,r,ld, ve sonras,nda 2 defa 300 µl 1X y,kama solüsyonu ile y,kand,.
- 5-** Y,kamadan sonra, 100 1 1X Anti-mouse HRP-linked antikor solüsyonu eklendi ve oda ,s,s,nda 1 saat inkübasyona b,rak,ld,.
- 6-** Solüsyon uzakla t,r,ld,ktan sonra, 3 defa 300 µl 1X y,kama solüsyonu ile y,kand,.

7- 100 μ l TMB substrate solüsyonu eklendikten sonra 5 dk inkübe edildi. Süre sonunda renk ölçümü tespit edildi. Daha sonra 100 μ l stop solüsyonu eklendi ve 450 nm'de okuma yapıldı.

3.2.6. Maddelerin Hücrelerdeki Apoptotik Etkisinin Annexin-V ile Flow Sitometrik Analizi

Annexin-V apoptoz analizinde kullanılan FITC ile konjüge Annexin-V lektini, apoptotik hücrelerin hücre membranından yüzeyindeki fosfatidil serin fosfolipidine bağlanmaktadır. FITC, Annexin-V bağlanan hücrelerin flüoresan (FL1 detektörü; eksitasyon= 488nm Emisyon=535nm) , ,mas,na neden olur. Hücrelerdeki bu flüoresan , ,ma, ak, sitometrideki FL1 detektörü ile tespit edilebilir. I ,man,n iddetine göre hücreler s,n,fland,r,larak bir diyagrama yerleştirilir. Ölü (mekrotik) hücreler ise nükleik asitlere bağlanabilen flüoresan PI (FL2 detektörü, eksitasyon= 488nm Emisyon=562 ó 588nm) boyası ile tespit edilmektedir. PI nekrotik hücrelerin zarar görmüş hücre membranından geçerek DNA'da ,n, boyar. Ak, sitometrideki FL2 detektörü, DNA'da ,n, boyanan hücrelerdeki flüoresan , ,may, tespit eder. I ,man,n iddetine göre hücreler s,n,fland,r,larak bir diyagrama yerleştirilir.

Sentezlenen bileşiklerden yüksek sitotoksik etki gösteren 2. maddenin (H-4) olas, sitotoksik etkilerinin apoptotik yola ,n aktiflenerek mi yoksa hücrelerde nekrozis mi olduğunu Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC kit protokolü uygulandıktan sonra flow sitometri (BD FACSVia) ile analiz edildi.

Çalışmada 6 well pleytlere ekilen HELA hücrelerine 2. maddenin 0, 10, 25, 50, 100 ve 200 μ M dozlarında 72 saat madde uygulaması yapıldı ve sonra aşağıdaki protokolü uygulandı;

1-Hücreler 2 kez PBS ile yıkandı. Pelet 1×10^6 /ml hücre olacak biçimde 1X binding buffer ile süspansiyon edildi.

2-100 μ L hücre süspansiyonu (1×10^5 hücre) 5 ml'lik yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı.

- 3- Sonra üzerine 5 µL of fluorochrome-conjugated Annexin V ve 5 µL Propidium Iodide Staining solüsyonu eklendi.
- 4- Hücreler hafifçe vortekslendi ve karanlıkta oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı,
- 5- Elde edilen pelete 400 µL 1X Bindig Solüsyonu eklendi ve sonra flow sitometride analiz edildi.

3.2.7. Hücre İçi Serbest Radikal Değişimi (ROS) Analizi

Normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur. Bunlar; süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH)'dir. Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonları, başlatıcılar ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R), peroksit radikalleri (ROO), alkoksi radikalleri (RO), tiyil radikalleri (RS), sülfenil radikalleri (RSO), tiyil peroksit radikalleri (RSO_2) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücre hasarı, önemli bir nedeni hücredeki serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasıdır.

Hücrelerde doza bağlı olarak hücre içi serbest radikal miktarı artar, tespit etmek amacıyla 6 well pleytlere ekilen HELA hücrelerine 2.maddenin 0, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM dozlarında 72 saat madde uygulandı. Daha sonra aynı kit protokolü kullanılarak uygulandı;

- 1-Hücreler tripsinize edilerek kaldırıldı. Sonra hücrelerin bulunduğu ortam içerisine 20 µM diklorofloresan diasetat (DCFDA) solüsyonu eklendi.
- 2-Bu hücreler 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 3- inkübasyonun ardından hücreler yıkandı.
- 4- inkübasyon süresinin ardından, hücreler iyice süspansiyon edilerek flow sitometri cihazında 485/535 nm dalga boylarında okutuldu ve analizi yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. 4-(2-Amino Etil) Benzen Sülfonamit Türevi Bileşiklerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

Sülfonamit türevlerinin sentezi için, bu çalışmada, ilk basamakta, 4-(2-aminoetil)benzen sülfonamit ile iki aromatik aldehitler (4-metilbenzaldehit ve 5-kloro-2-hidroksi-benzaldehit) ile kondenzasyon tepkimeleri gerçekleştirilmiştir. (H_3-H_4). Bileşiklerin (H_3-H_4) sentezi için 4-(2-aminoetil)benzen sülfonamit ile iki aromatik aldehitlerin 1:1 mol oranında, formik asit katalizörlü ortamda tepkimesi sonucu elde edilmiştir.

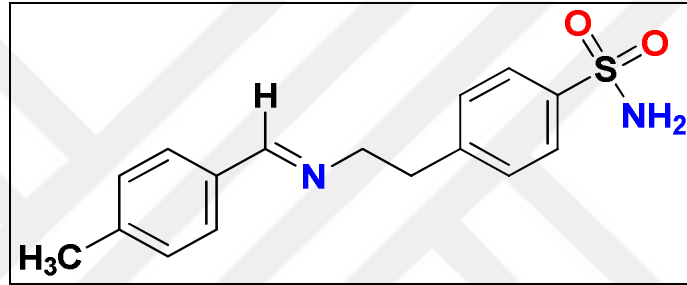
Bu çalışmada, ikinci basamakta, 4-(2-aminoetil)benzen sülfonamit ile iki aromatik aldehitler ile kondenzasyon tepkimesi sonucu elde edilmiş imin grubuna sahip bileşikler (H_3-H_4), $NaBH_4$ ile indirgenerek karbonyl gelen sekonder aminlere dönüşümü tür ($H_{3i}-H_{4i}$) Sentezlenen bütün bileşikler oda sıcaklığında hava ve nemle karışabilir şekilde incelendi. Bu bileşikler, DMSO, DMF, Asetonitril, Metanol (s, t, l, nca) de iyi çözünürken, etanol, kloroform, diklorometan'da çözünmediği gözlemlenmiştir.

Sentezlenen tüm bileşiklerin FT-IR spektrumları, katı, KBr diskleri şeklinde 4000 - 400 cm^{-1} aralığında alınmıştır. Tüm bileşiklerin FT-IR spektrum verileri ve spektrumları, ilgili kaynaklarda (146, 147) verilmiştir. Bileşiklerin FT-IR spektrumları, incelendiğinde, elde edilen sonuçlar ile önerilen yapıya uyumlu olduğu ve önerilen yapıdaki bileşiklerin oluştuğu görülmüştür. Sentezlenen bütün bileşiklerin 1H -NMR ve ^{13}C NMR spektrumları, DMSO- d_6 içinde alınmış ve tüm kimyasal kayma değerleri ppm olarak ve spektrumları, ilgili kaynaklarda (146, 147) verilmiştir. Bileşiklerin 1H -NMR ve ^{13}C NMR spektrumları, incelendiğinde elde edilen sonuçlar ile önerilen yapıya uyumlu olduğu ve önerilen yapıyı desteklediği görülmüştür.

Sentezlenen 4-(2-amino etil) benzen sülfonamid türevlerinin karakterizasyonu u ekildedir;

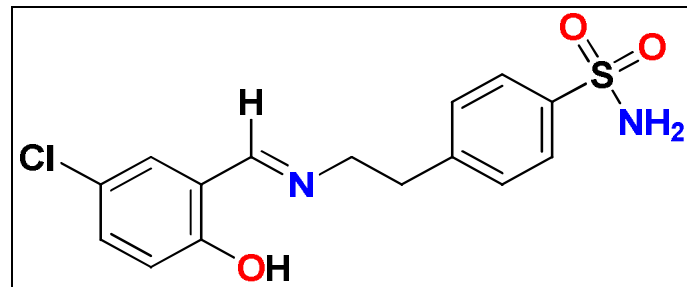
1. Madde (4-(2-((4-Metilbenziliden) amino) etil) benzensülfonamid (H-3))

4-(2-((4-Metilbenziliden)amino)etil)benzensülfonamid (H-3), 4-(2-aminoetil) benzensülfonamid ile 4-metilbenzaldehitin reaksiyonu sonucu elde edilmi tir.



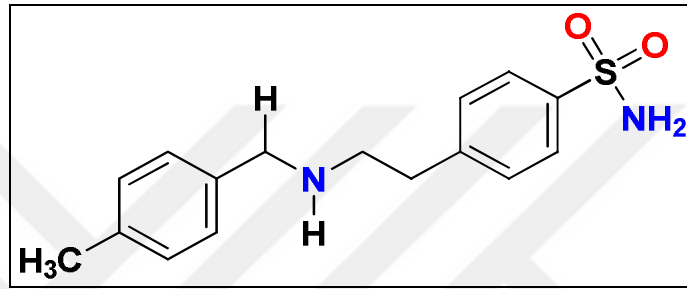
2. Madde (4-(2-((5-Kloro-2-hidroksi-benziliden)amino)etil)benzensülfonamid (H-4))

4-(2-((5-Kloro-2-hidroksi-benziliden)amino)etil) benzensülfonamid (H-4), 4-(2-aminoetil)benzensülfonamid ile 5-kloro-2-Hidroksi-benzaldehyitinin reaksiyonu sonucu elde edilmi tir.



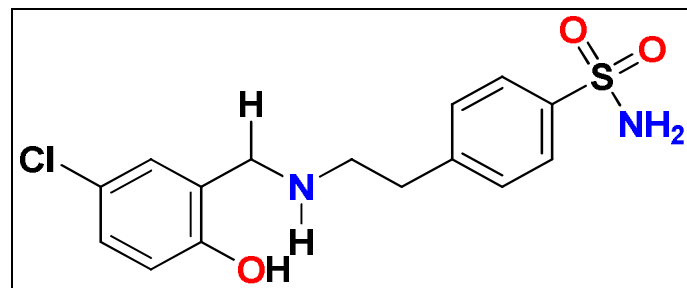
3. Madde (4-(2-((4-Metilbenzil)amino)etil)benzensülfonamid (H-3i))

4-(2-((4-Metilbenzil)amino)etil)benzensülfonamid (H-3i), 4-(2-((4-metoksi benziliden) amino) etil)benzensülfonamid (H-3) ile NaBH_4 'ün reaksiyonu sonucu elde edilmi tir.



4. Madde (4-(2-((5-Kloro-2-hidroksi-benzil)amino)etil)benzensülfonamid (H-4i))

4-(2-((5-Kloro-2-hidroksi-benzil)amino)etil)benzensülfonamid (H-4i), 4-(2-((5-kloro-2-hidroksibenziliden)amino)etil)benzensülfonamid (H-4) ile NaBH_4 'ün reaksiyonu sonucu elde edilmi tir.



4.2. Bileşiklerin Antikanser Özellikleri ile İlgili Bulgular

4.2.1. Bileşiklerin Hücre Hatları, Üzerindeki Sitotoksik Etkileri

Yeni sentezlenen 4 adet 4-(2-amino etil) benzen sülfonamid türevi bileşiklerin serviks adenokarsinom (HELA), metastazik göğüs adenokarsinom (MDA-MB-231) ve normal insan prostat (PNT-1A) hücreleri üzerindeki etkileri WST-1 metodu ile incelendi ve IC₅₀ değerleri hesaplandı.

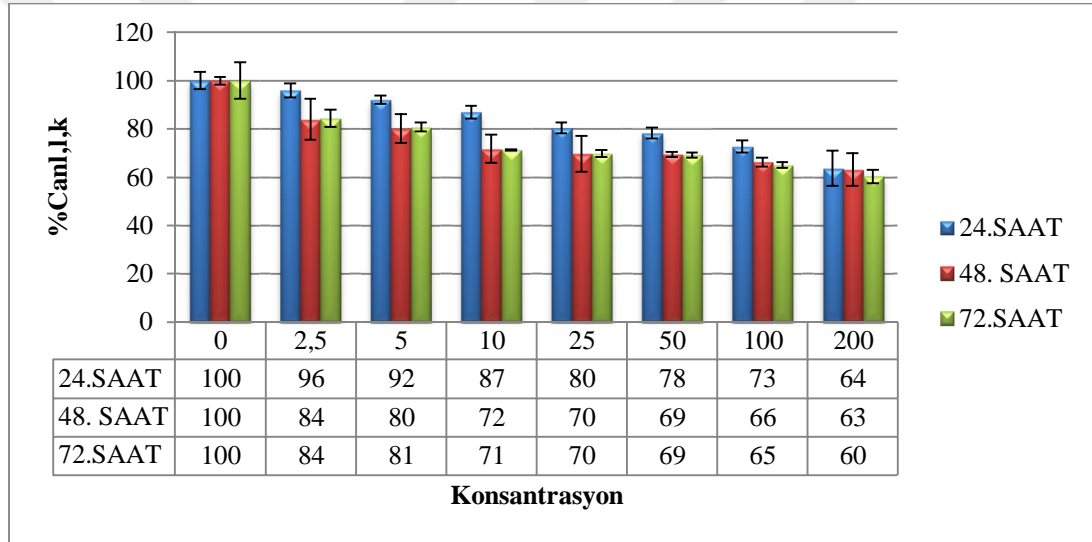
4.2.1.1. Bileşiklerin HELA Hücre Hattı, Üzerindeki Etkileri

Sentezlenen 4-(2-amino etil) benzen sülfonamid türevi bileşiklerin HELA hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi WST-1 metodu ile doz (0,25-200 µM) ve zamana göre (24,48 ve 72 saat) incelenmiştir. Sentezlenen tüm maddelerin HELA hücreleri üzerinde farklı dozlarda sitotoksik etki gösterdiği ancak bu etki inkübasyon süresine bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Maddelerin HELA hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi incelendiğinde sırasıyla en güçlü 2 > 3 > 4 > 1 olduğu tespit edilmiştir. Bu maddeler içerisinde en güçlü sitotoksik etkiyi 2. maddenin gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 2. Maddelerin HELA hücresindeki sitotoksik etkileri

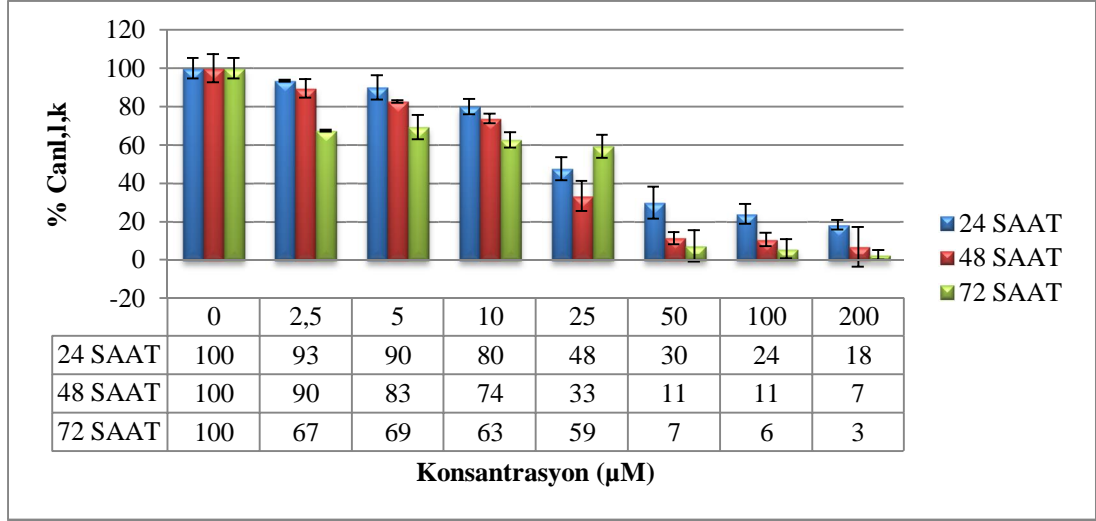
Biyolojik aktivite numarası,	IC ₅₀ (µM)		
	24 saat	48 saat	72 saat
1	262,5	326,3	244,7
2	28,9	17,4	13,7
3	203,1	479,5	123,8
4	217,7	111,9	98,9
C S	28,9	7,6	6,1
5-FU	37,8	31,2	14,7

2. maddenin HELA hücreleri üzerinde zamana ba l, olarak sitotoksik etkilerini arttırdı, tespit edilmiş ve bu maddenin 24 saatte HELA hücreleri üzerinde IC₅₀ de erinin 100 µM altında sitotoksik etki gösterdiği (IC₅₀;28,9) saptanmış, t.r. 48. saatte 2. maddenin, 72. saatte ise 2. ve 4. maddenin 100 µM altında sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Kontrol olarak kullanılan 5-Fu ve cisplatinin ise doz ve zamana ba l, olarak sitotoksik etki gösterdiği tespit edilerek cisplatinin daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Sülfonamid türevi maddeler arasında HELA hücreleri üzerindeki en güçlü sitotoksik etkiyi 72. saatte 2. madde göstermiş ve 5-Fu'dan daha etkili olduğu tespit edilmiştir.



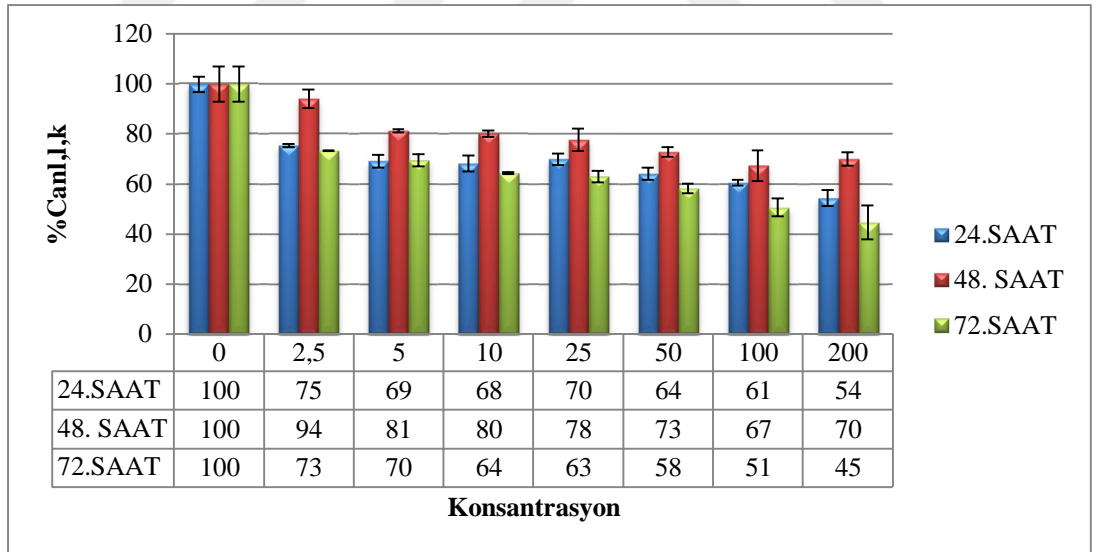
Grafik 1. 1.maddenin HELA hücre hattındaki sitotoksik etkileri.

1.maddenin HELA hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi incelendiğinde güçlü sitotoksik etki göstermediği görülmüştür.



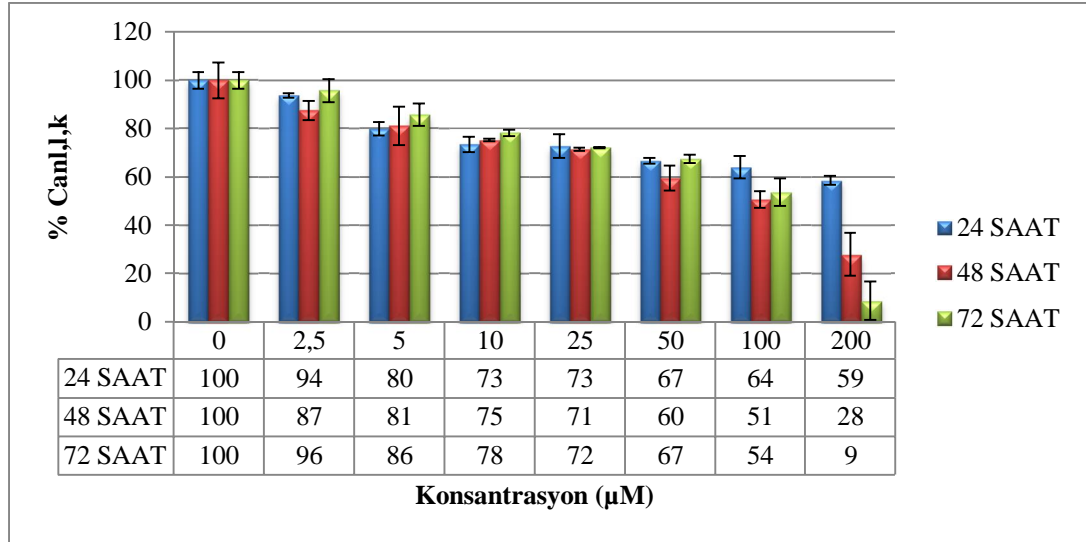
Grafik 2. 2.maddenin HELA hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri.

2. maddenin HELA hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi incelendi inde doza ve zaman ba l, olarak sitotoksik etki gösterdi i görülmü tür. 200 µM dozda tüm zaman aral,klar,nda güçlü sitotoksik etki gösterdi i saptanm, t,r.



Grafik 3. 3.maddenin HELA hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri.

3.maddenin HELA hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine bak,ld, ,nda güçlü sitotoksik etki göstermedi i tespit edilmi tir.



Grafik 4. 4.maddenin HELA hücre hattındaki sitotoksik etkileri.

4. maddenin HELA hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi incelendi inde doza ba l, sitotoksik etki gösterdi i görülmü tür. En güçlü sitotoksik etkisini 72. Saatte 200 µM dozda göstermi tir.

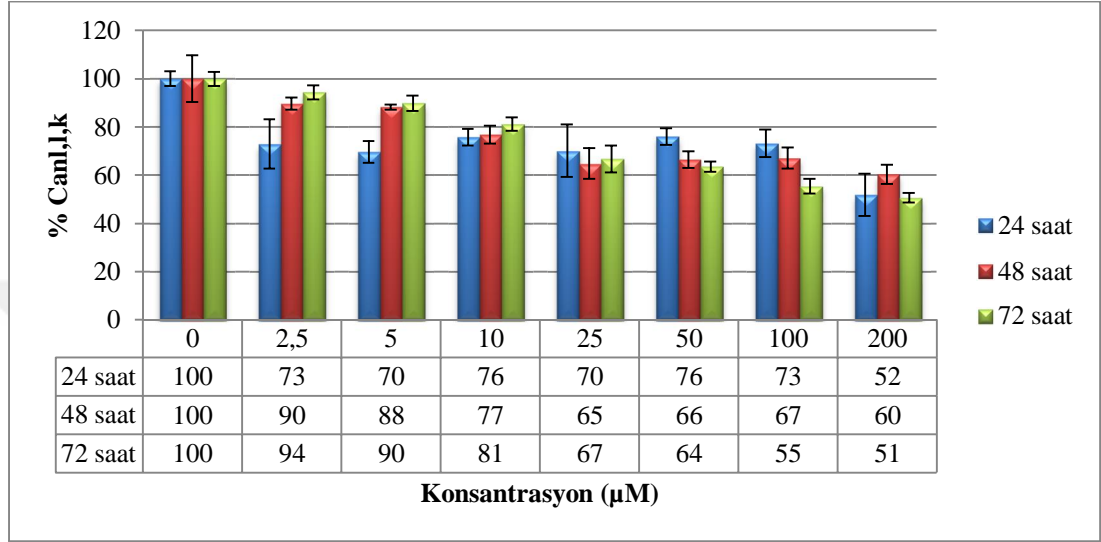
4.2.1.2 Bile iklerin MDA-MB-231 Hücre Hatt, Üzerindeki Etkileri

Tablo 3. Maddelerin MDA-MB-231 hücresindeki sitotoksik etkileri

Biyolojik aktivite numaras,	IC ₅₀ (µM)		
	24 saat	48 saat	72 saat
1	232,7	690,5	178,3
2	293,1	65,9	37,3
3	576,1	578,4	9947,5
4	492,2	595,3	243,3
C S	21,2	10,2	7,0
5-FU	42,6	37,9	21,0

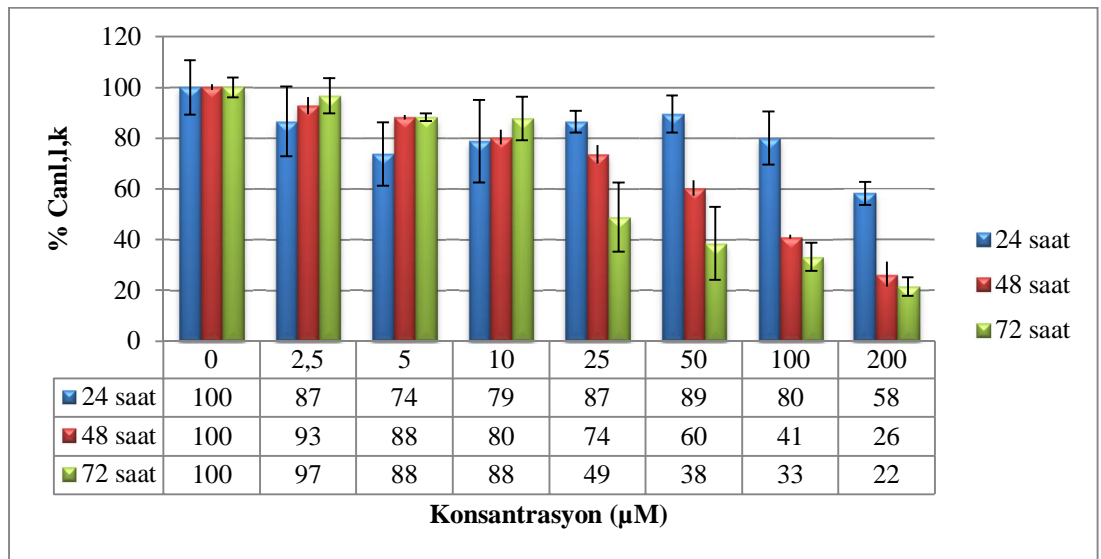
Sentezlenen dört sülfonamid türevi maddenin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelendi inde 24. saatte hiçbir maddenin 100 µM alt,nda etki göstermedi i tespit edilmi olup IC₅₀ de erlerinin 232.7 ile 576.1

aras,nda de erlerde oldu u tespit edilmi tir. 2.maddenin IC₅₀ de erinin 48. ve 72. saatte 100 µM alt,nda oldu u saptanarak MDA-MB-231 hücreleri üzerinde en güçlü sitotoksik etkiyi 72. saatte (37.3 µM) gösterdi i gözlemlenmi tir. Kontrol olarak kullan,lan 5-Fu ise doz ve zamana ba l, olarak sitotoksik etki gösterdi i saptanm, t,r.



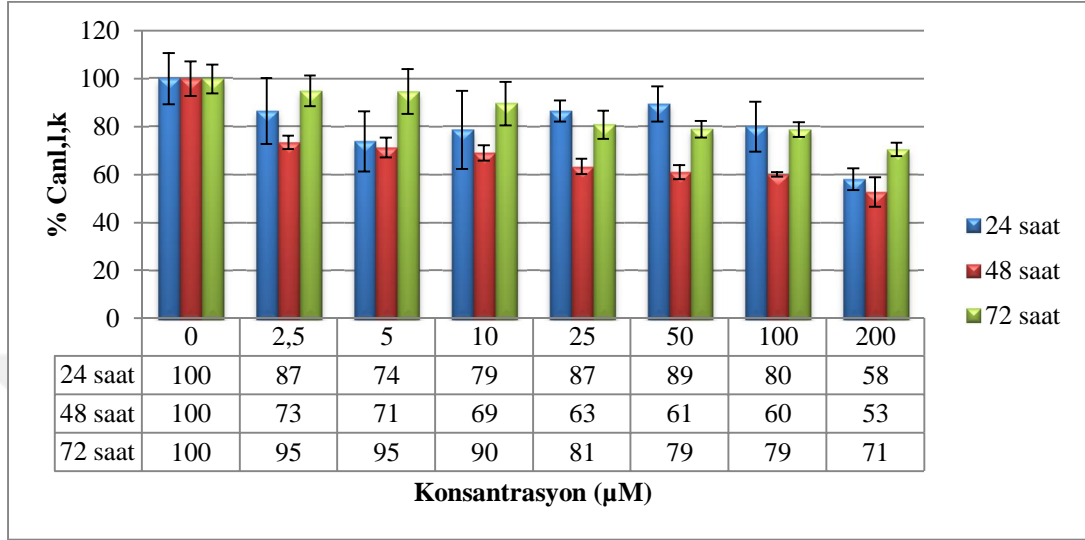
Grafik 5. 1.maddenin MDA-MB-231 hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri.

1.maddenin MDA-MB-231 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri WST-1 ile incelendi inde 1.maddenin güçlü sitotoksite göstermedi i tespit edilmi tir.



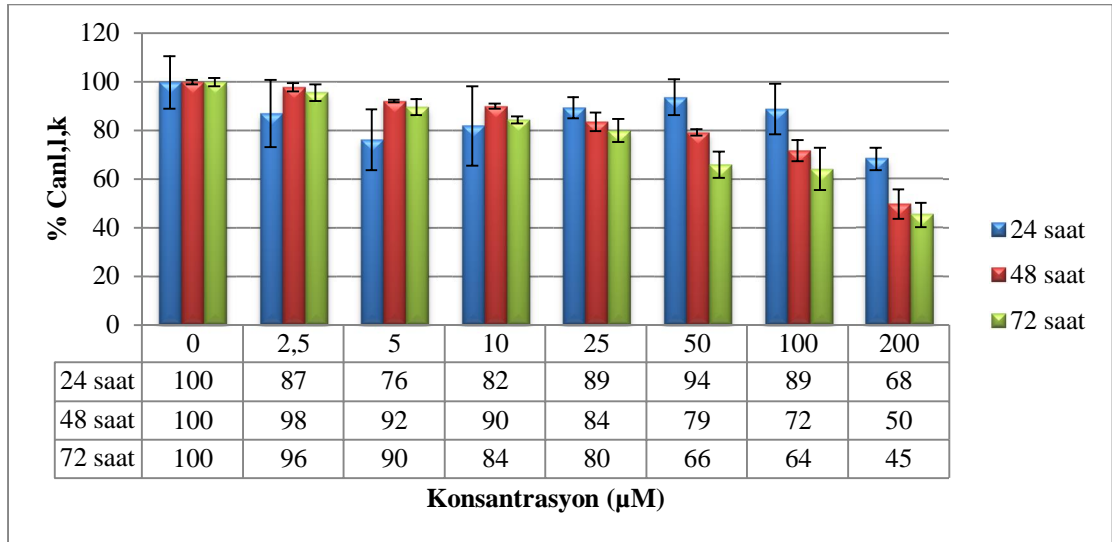
Grafik 6. 2.maddenin MDA-MB-231 hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri.

2.maddenin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri WST-1 ile incelendi inde 2. maddenin 48. ve 72.saatte 200 μ M dozda sitotoksik etki gösterdi i tespit edilmi tir.



Grafik 7. 3.maddenin MDA-MB-231 hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri.

3.maddenin MDA-MB-231 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri WST-1 ile incelendi inde 3. maddenin güçlü sitotoksik etki göstermedi i tespit edilmi tir.



Grafik 8. 4.maddenin MDA-MB-231 hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri.

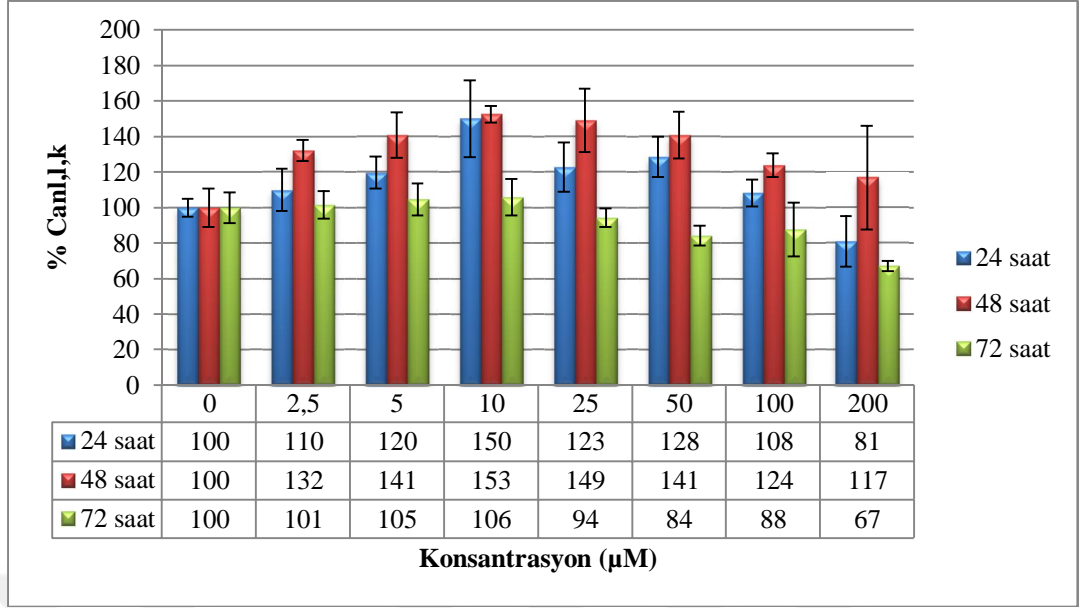
4.maddenin MDA-MB-231 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri WST-1 ile incelendi inde güçlü sitotoksik etki göstermedi i tespit edilmi tir

4.2.1.3. Bile iklere PNT-1A Hücre Hatt, Üzerindeki Etkileri

Maddelerin 24. saatte PNT-1A hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelendi inde tüm maddelerin 100 µM üzerinde etki gösterdi i tespit edilmi tir. 48. saatte 2. ve 4. maddelerin s,ras,yla 110,5 ve 189,7 µM sitotoksik etki gösterdi i di er maddelerin ise 200 µM üzerinde sitotoksik etki gösterdi i, 72. saatte ise; tüm maddelerin 200 µM üzerinde sitotoksik etki gösterdikleri tespit edilmi tir. Kemoterapik olarak kullan,lan 5-Fu ve Cis maddelerinin ise normal hücreler (PNT-1A) üzerindeki sitotoksik etkisinin sentezlenen bile iklere göre çok yüksek oldu u (IC₅₀; 17,5 ve 23,1) tespit edilmi tir.

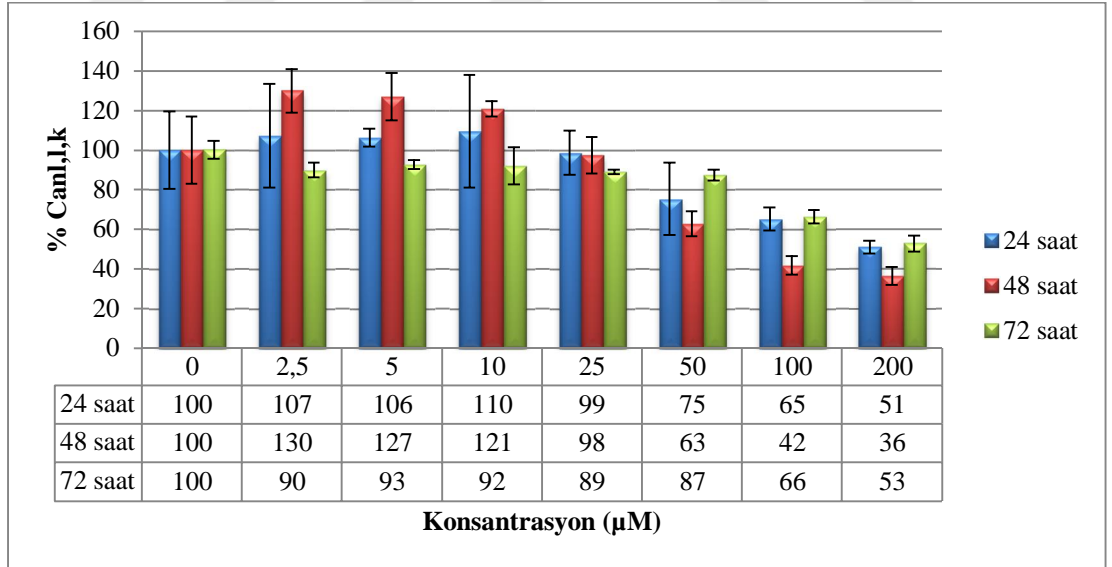
Tablo 4. Maddelerin PNT-1A hücrelerindeki sitotoksik etkileri.

PNT-1A IC ₅₀ (µM)			
	24 SAAT	48 SAAT	72 saat
1	403,5	1074,0	294,9
2	388,9	110,5	202,6
3	630,5	731,7	319,6
4	593,1	189,7	371,6
C S	13,4	11,4	8,2
5-FU	23,1	21,2	17,5



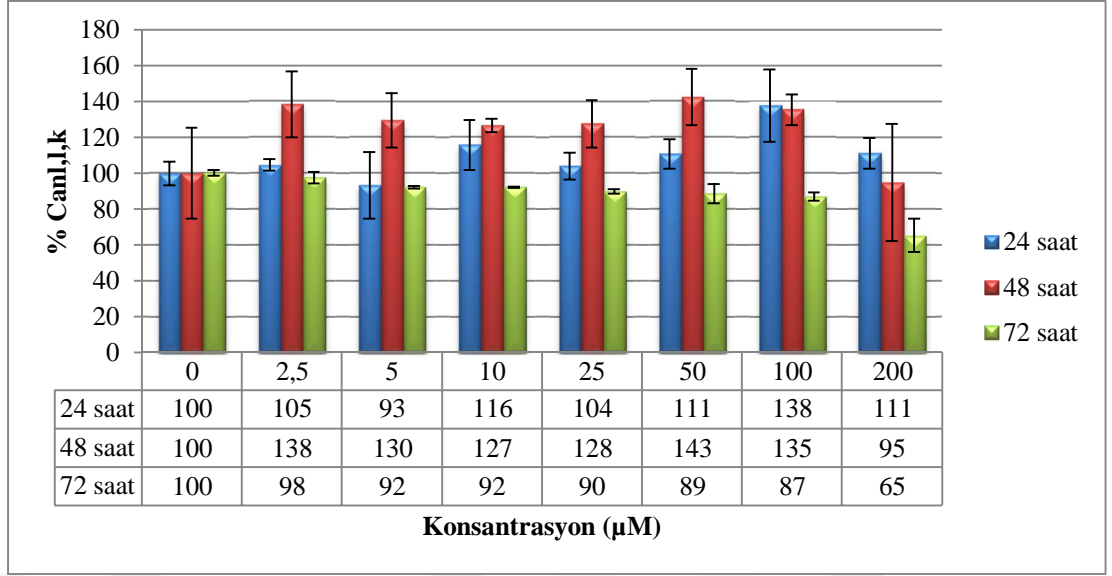
Grafik 9. 1.maddenin PNT-1A hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri.

1.Maddenin PNT-1A hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine bak,ld, ,nda 200 µMde 72. saatte en yüksek sitotoksik etki gösterdi i tespit edilmi tir.



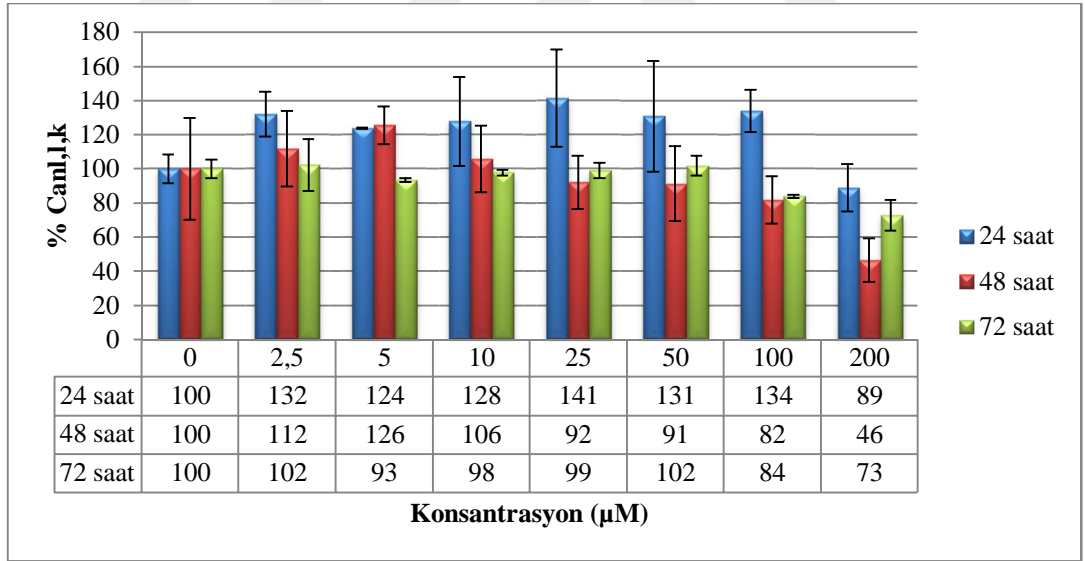
Grafik 10. 2.maddenin PNT-1A hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri.

2.maddenin PNT-1A hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine bak,ld, ,nda en güçlü sitotoksik etkiyi 48. saatte 200 µM dozda gösterdi i tespit edilmi tir.



Grafik 11. 3.maddenin PNT-1A hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri.

3.maddenin PNT-1A hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine bak,ld, ,nda yüksek sitotoksik etki göstermedi i tespit edilmi tir.



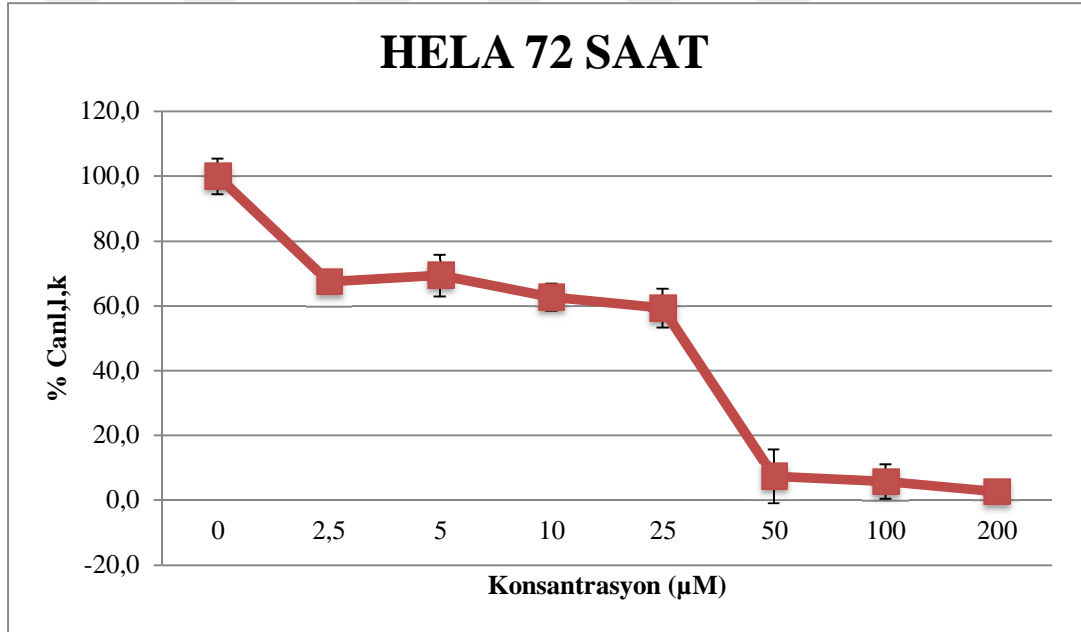
Grafik 12. 4.maddenin PNT-1A hücre hatt,ndaki sitotoksik etkileri.

4. maddenin PNT-1 hücre hatlar,nda sitotoksik etkisine bak,ld, ,nda 48. saatte 200 µM dozda güçlü sitotoksik etki göstermi tir.

4.2.2. 2.Maddenin (H-4) HELA Hücre Hatt, Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

HELA, MDA-MB-231 ve PNT-1A hücre hatları, kullanılarak WST-1 yöntemiyle incelenen sitotoksik analiz sonucunda, sentezlenen 4 sülfonamid türevi madde arasında 2. maddenin (H-4) en güçlü sitotoksik etkiyi CA-IX ekspresyon düzeyi yüksek olan HELA hücre hattında 72. saatte gösterdiği tespit edilmiştir.

2.maddenin PNT-1A hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin HELA hücrelerine göre çok düşük olduğu saptanmıştır. Sentezlenen 4 sülfonamid türevi maddeden 2. maddenin en güçlü sitotoksik etki göstermesinden dolayı, bu maddeyle proliferasyon ve apoptozis analizlerinin yapılmasına karar verilmiştir.

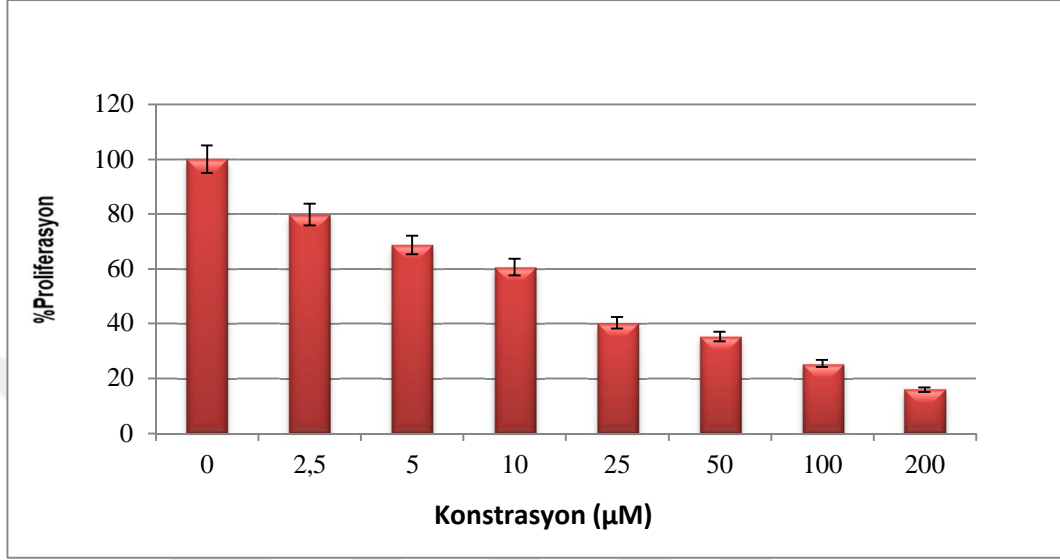


Grafik 13. 2. maddenin 72.saatteki HELA hücre hattındaki sitotoksik etkisi.

4.2.2.1. 2. Maddenin (H-4) HELA Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkisi

2. maddenin HELA hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi BrDU Elisa yöntemiyle (Biovision) incelendi. 2. maddenin 72.saat HELA hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda 2. maddenin tüm dozlarda hücre proliferasyonu üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Proliferasyon

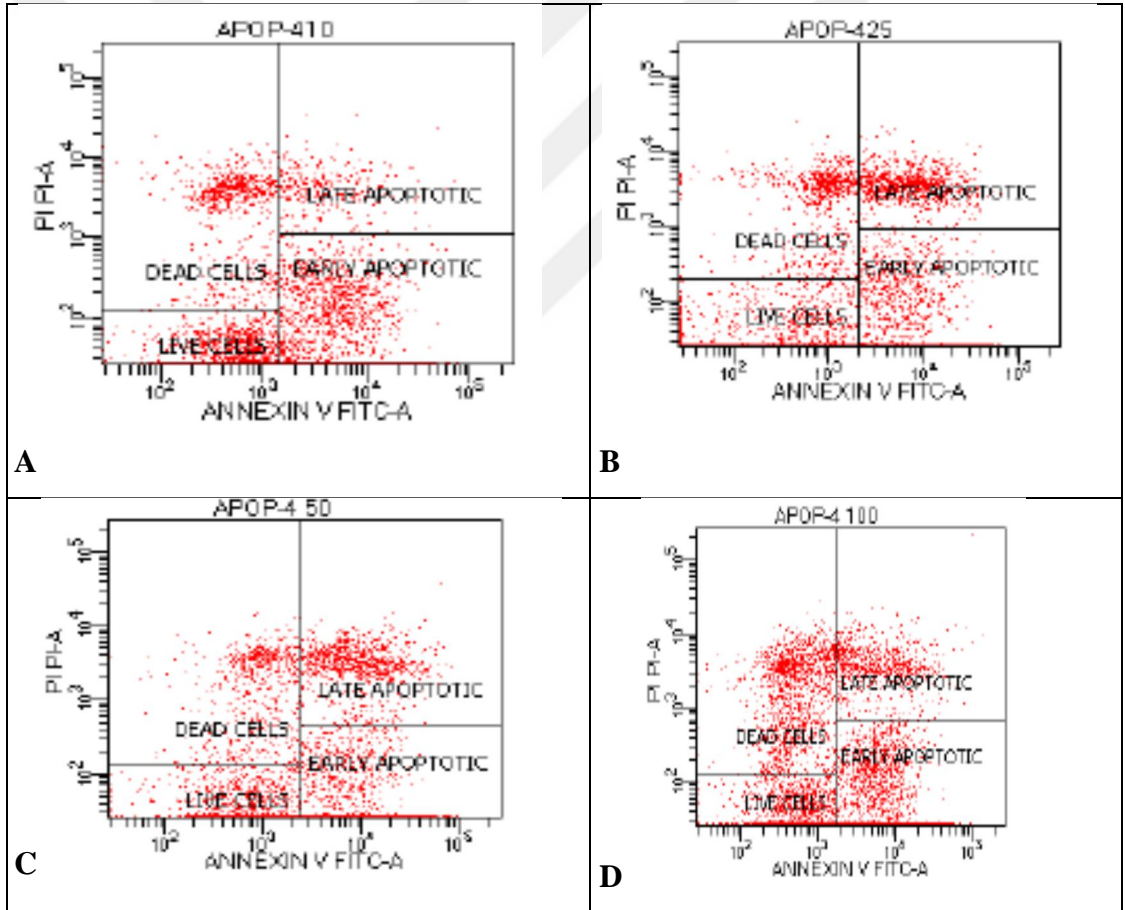
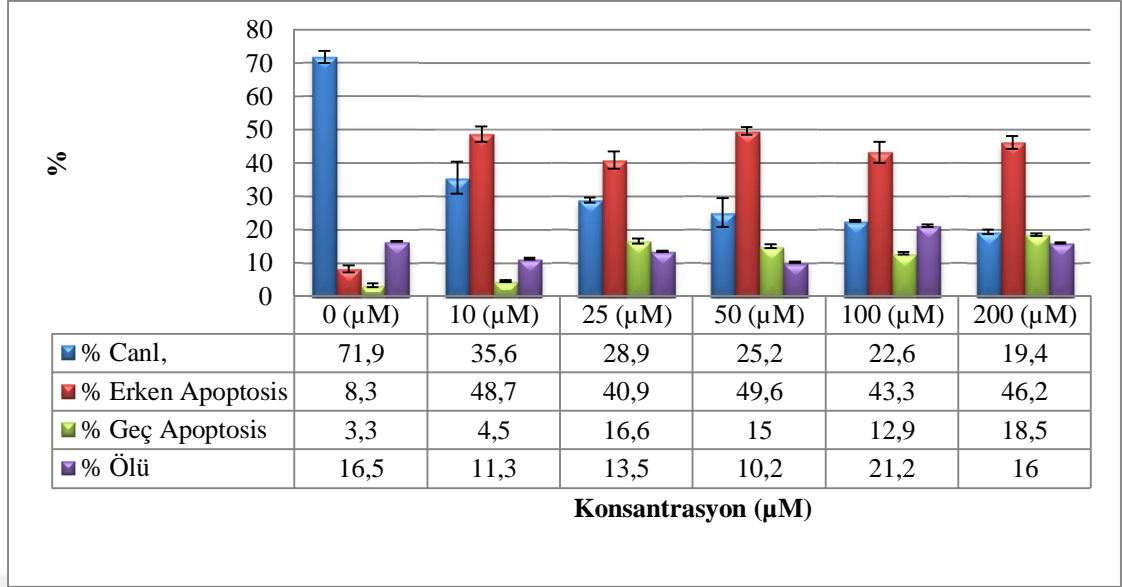
e risinde yap,lan hesaplama göre HELA hücrelerinin IC_{50} de eri 18,14 μM oldu u tespit edildi.



Grafik 14. 2.maddenin HELA proliferasyonu üzerine etkisi.

4.2.2.2. 2. Maddenin (H-4) Flow Sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi

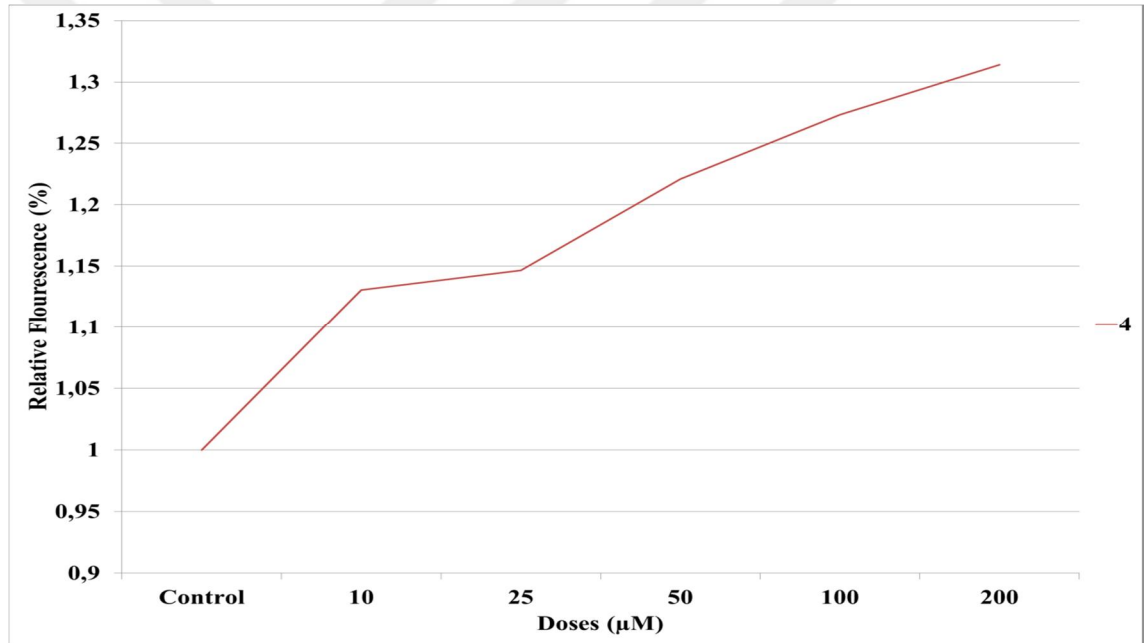
HELA hücrelerinde 2. madde 10-25-50-100-200 μM dozlar,nda uygulan,p 72 saat inkübe edildikten sonra Annexin-V ile analizi yap,ld,. Analizin sonucunda 2.maddenin HELA hücrelerinde apoptozise yol açt, , tespit edilmi tir. Kontrol grubuna göre apoptotik/nekrotik hücre ölüm oranlar, kar ,la t,r,ld, ,nda apoptotik hücre ölümünün tüm dozlarda gerçekleşti i, 10 M dozunda dahi erken apoptozisin %48,7, geç apoptozisin %4,5, nekrozun % 11, oldu u, doz art, ,yla beraber apoptotik etkinin artt, , saptanm, t,r. Ayr,ca 10 M dozunda yüksek oranda apoptozise neden olmas,n,n yan,s,ra en dü ük nekrozise yol açt, ,da saptanm, t,r. Apoptotik etkinin ço unlukla erken apoptozis evresinde oldu u (%40,9-48,7), doz art, ,yla beraber geç apoptozis evresinin artt, , (%4,5-18,5) tespit edilmi tir (Grafik 15).



Grafik 15. 2. maddenin apoptotik etkinli inin incelenmesi (A: 10 µM , B:25 µM ,C:50 µM ve D:100 µM dozda 72 saat madde uygulanm, t,r).

4.2.2.3. 2. Maddenin (H-4) ROS(Hücre İçi Serbest Radikal De i imi) Analizi

2. maddenin HELA hücrelerinde apoptotik etkiye yol açt, , yap,lan Annexin-V ile tespit edildi. Hücreyi apoptozise sevk eden nedenlerden bir tanesi de hücre içi artan serbest radikal miktar,d,r. Çünkü artan hücre içi ROS, lipit, protein ve DNA hasar,na yol açarak hücrede hasara neden olur ve hücreyi apoptozise sevk eder. Bu çal, mada 2. maddenin HELA hücrelerinde ROS miktar, de i imi, 10-100 µM dozda 72 saat uygulad,ktan sonra DFCA yöntemiyle incelendi. Analiz sonucunda 2. maddenin (H-4)doz art, ,na ba l, olarak hücre içi ROS miktar,n, art,rd, , tespit edilmi tir.



Grafik 16. 2.maddenin serbest radikal grafi i.

5. TARTI MA ve SONUÇ

Kanser tedavisinde kullanılan ilaç ve kombinasyonların yan etkileri, etkiye selektive sorunlar, ve kemoterapik yetersizliklerin nedeniyle son zamanlarda kanser ara tırmalar, hedefe özgü tedavi ve tekniklerinin geliştirilmesi üzerine odaklanılmı tır. Daha önceki yapılan çal, malarda özellikle solid tümörlerdeki CAIX ekspresyonunun tümörün tan, s, ve prognozu ile ilişkilendirilmesi bu enzimi kanser tedavisinde biyobelirteç ve kanser hücrelerine yönelik spesifik bir hedef haline getirmi tir.

Karbonik anhidraz IX (CA IX) bir membrana bağlı, metaloenzim olup ifadesi birçok solid tümörlerde görülmektedir (150). CA ailesinin diğer enzimlerinin aksine, CAIX birçok kanser formunda sentez edilir, ancak birkaç normal dokuda sınırlı, görülmektedir. CAIX, hücre yoğunluğuna bağlı ve hipoksiyi de içeren stresli koşullarda tümörlerde aktive olduğunu gösterilmiştir. Bu enzim karbon dioksit ve sudan bir proton ile bikarbonat üretildiğini geri dönüşümlü reaksiyonu katalize eder (4).

Tümör hücreleri pH'ları, düzenlemek için önemli stratejiler geliştirmi tir. Çünkü 0.1 pH'lık değişim ATP üretimi, protein sentezi, hücre proliferasyonu, migrasyon ve apoptoz gibi çoklu biyolojik fonksiyonlar, bozabilmektedir. (151-153). CA-IX, pH kontrol mekanizmasını bileşeni olup tümör biyolojisinde aktif rol oynar. Tümör hücrelerini hipoksi ve onkogenik metabolizma kaynaklı streslerden koruyarak tümör hücresinin hayatta kalmasını ve tedavi direncine katkıda bulunur (76,79,88). Ayrıca CA-IX'ın kanser hücrelerinin ayrışmasını, adhezyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu kolaylaştırır, görülmüştür (89-91).

Hipoksi indükleyici faktör 1'in (HIF-1), dokulardaki hipoksik koşullara adaptif yanıt olarak stabilize edilmesi anjiogenezis, hücre sağ kalım, glikoz metabolizması, ve hücre invazyonu gibi kansere bağlı süreçlerde önemli rol oynayan birçok genin transkripsiyonel olarak aktive edilmesine neden olur (73). CA-IX kodlayan genin transkripsiyonu, transkripsiyon başlatma alanında bulunan hipoksi yanıt elemanı (HRE) başlıca hipoksi indükleyici (HIF-1) transkripsiyon faktörü tarafından aktive edilir.

CA-IX'ın en önemli rolü, özellikle tümör mikroçevresindeki hücre dışı pH'ı düzenlemesidir (154). Proliferatif kanser hücreleri, genellikle kanserojen metabolizmasında büyük miktarlarda laktat, karbondioksit ve proton üretir. Bu metabolik son ürünler hücre dışı ortamda birikerek hücre dışı pH değerini önemli ölçüde düşürür. CA-IX tarafından karbondioksitin hidrolizi sırasında üretilen bikarbonat anyonlar, fizyolojik olarak hücre içi pH'sı, yakın bir seviyede tutmak ve hücre içi pH seviyelerini tamponlamak için anyon taşıyıcılar, vassıyla hücrenin içine taşırlar. Reaksiyondan üretilen protonlar hücre dışı kaldığından tümör çevresinin asidik yapısına katkıda bulunurlar. CA-IX fonksiyonu tümör hücrelerinin hayatta kalmasında önemli rol oynar (58).

CA-IX'ın kanser ile ilişkilerini gösteren birçok çalışmada yapılmıştır. Çeşitli klinik çalışmalarda meme kanserlerinin %48'inde (155) servikal kanserlerin %79'unda (156) ve akciğer kanserlerinin %81'inde (157) CA-IX ekspresyonunun yüksek olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada CA-IX ekspresyonunun özofagus kanserlerinde özellikle gastrik kanser ve adenokarsinomlarda daha fazla bir prognostik belirteç olduğu görülmüştür (158). Küçük hücreli akciğer kanserinde, kanser dokularında artmış CA-IX mRNA ifadesi ile proteinin artmış ekspresyonunun anlamlı korelasyon gösterdiği görülmüştür. (159). İn vitro çalışmalarda, CA-IX'un göğüs kanseri hücrelerinin büyümesinde ve hayatta kalmasında rol oynadığı gösterilmiştir (9). Michael ve ark., skuamöz hücreli baş ve boyun tümöründe CA-IX ekspresyonunun, kemoradyoterapiye karşı direnç ile anlamlı bir ilişkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (160).

Tanaka ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada in vitro olarak CA-IX mRNA'sı, üç ESCC hücre dizisi olan TE-2, TE-8 ve TE-15'te hipoksik koşullar altında ekspresye edildiğini bildirilmişlerdir. Ayrıca CA-IX'un hipoksik koşullar altında bu üç ESCC hücre dizisinde protein seviyesinde ekspresye edildiğini tespit etmişlerdir. Yapmış oldukları bu çalışmanın sonucunda hipoksik koşullar altında hücre proliferasyonu ve CA-IX ekspresyonu indüklendiği ve bunun kötü prognoza bağlı olduğunu göstermişlerdir (161). HT1080 tümör hücrelerinde CA-IX eksikliğine neden olan shRNA susturulması, hipoksik hücre dışı asidozun azalmasına neden olmuştur. CA-

IX'dan yoksun tümör hücreleri veya enzim aktivitesinin mikroçevre stresinin zararlı etkileri ile ba edemedi i gösterilmi tir. (116).

Daha önceki çal, malarda sülfonamid ve türevi bile iklerin, CA-IX sentezi olan kanser hücreleri üzerinde birçok etkisi ara t,r,lm, t,r. İlk defa Neri ve arkadaş lar, in vivo ortamda sülfonamid CA-IX inhibitörlerinin antitümör üzerine etkisini ara t,rm, , asetazolamid iskeleye floresan karboksilik asit veya albümin k,s,mlar, ba lanarak elde etti i bile iklerin membran geçirgen özelli i olmayan türevlerini kullanarak CA-IX inhibitörleri elde etmi . Elde etti i CA inhibitörleri ile bir ay boyunca hayvanlara (böbrek karsinom hatt, SK-RC-52 ksenograft edilen fareler) uygulayarak tedavi etmi ve bu tedavi sonucunda tümörlerin a ,r, derecede küçüldü ünü göstermi tir (162).

Birçok çal, mada aromatik veya heteroaromatik sülfonamidlerin tümör asidifikasyon etkisini tersine çevirerek, kanser hücrelerinin büyümesini engelledi ini ve karbonik anhidrazlar,n arac,l,k etti i tümör invazyonunu bast,rd, , gösterilmi tir. (163,164) Dubois ve ark., hipoksik kolorektal tümörleri transfer edilen fareler üzerine CA-IX inhibitörü sülfonamid ile tümör , ,n terapisini birlikte uygulam, ve bunun sonucunda antitümör etkinin artt, ,n, göstermi tir (79).

Yap,lan çal, malarda, asetazolamid (AZ) veya AZ bazlı, yeni bile ikler gibi CA inhibitörlerin in vitro ortamda tek ba ,na veya di er antikanser ajanlarla kombinasyon halinde uyguland, ,nda renal kanser hücrelerinin invaziv kapasitesini veya çe itli tümör tiplerinin büyümesini inhibe etti i gösterilmi tir (165,166).

Cianchi ve ark, yapm, oldu u bir çal, mada CA-IX sentezleyen kanser hücre hatlar, üzerine yeni sentezlenmi , iki aromatik sülfonamid bile ik olan 2-(4-sülfamoilfenil-amino) -4,6-dikloro-1,3,5-triazin (TR1) ve 4-[3-(N,N-dimetilaminopropil)tiyoreidofenil sülfonil amino etil] benzensülfonamid (GA15)'in antitümör etkisini incelemi . TR1 ve GA15'in HELA ve 786-O hücrelerinde hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azaltt, ,, apoptozu artt,rd, , ve seramid üretimini indükledi ini tespit etmi tir (167).

Tüm bu verilerin , , ,nda laboratuvar,m,zda yeni sentezlemi olan 4 adet 4-(2-amino etil) benzen sülfonamid türevi bileşiklerin CA-IX sentezleyen HELA, CA-IX sentezlemeyen MDA-MB-231 ve PNT1A hücre hatları, üzerine antikanser özelliklerini inceledik. Sentezlenen sülfonamid türevi maddelerin HELA, MDA-MB-231 ve PNT-1A hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini inceleyerek IC₅₀ değerlerini hesapladık.

Yapılan tüm bu çalışmalar, sonuçunda H-4 bileşiminin (2.maddenin) HELA hücrelerinde 72. saatte güçlü sitotoksik etki gösterdiğini, MDA-MB-231 ve kontrol olarak kullanılan, PNT-1A hücrelerinde güçlü sitotoksik etki göstermediğini tespit ettik. Yüksek sitotoksik etki gösteren H-4 bileşiminin hücre proliferasyonu üzerine etkilerini BRDU yöntemiyle ölçtüğümüzde H-4 bileşiminin IC₅₀:18,14 µM olduğu, tüm dozlarda hücre proliferasyonunu üzerinde etkili olduğu saptandı. Güçlü sitotoksik etki gösteren H-4 bileşiminin sitotoksik etkisini apoptotik yola , aktifleştirerek mi kullandığı , yoksa nekrozis mi olduğunu tespit etmek için flow sitometrik annexin-V analizi kullandık. H-4 bileşiminin doza bağlı olarak apoptozu arttırdığını, saptadık. H-4 bileşiminin sitotoksik ve apoptotik etki mekanizmasını , serbest radikal üretimini tetiklediğini tespit ettik.

Çalışma sonucunda H-4 bileşiminin HELA hücreleri üzerinde sitotoksik ve antiproliferatif etki gösterdiğini tespit edildi. Ayrıca H-4 bileşiminin hücrelerde apoptozu tetiklediğini ve indüksiyonunun hücre içi serbest radikal artışı , na bağlı olarak olabileceğini sonucuna vardık. Bu çalışmalar, elde edilen verilere göre H-4 bileşimini , 3 boyutlu hücre kültürü ve hayvan deneylerinde test edilerek, kanser tedavisi için yeni, spesifik ilaç geliştirmeye yönelik araştırmalara büyük katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bashandy MS, Alsaïd MS, Arafa RK, Ghorab MM. Design, synthesis and molecular docking of novel N,N-dimethylbenzenesulfonamide derivatives as potential antiproliferative agents. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2014;29(5):619-27.
2. Ghorab MM, Ceruso M, Alsaïd MS, Nissan YM, Arafa RK, Supuran CT. Novel sulfonamides bearing pyrrole and pyrrolopyrimidine moieties as carbonic anhydrase inhibitors: synthesis, cytotoxic activity and molecular modeling. *Eur J Med Chem*. 2014;87:186-96.
3. Alterio V, Hilvo M, Difiore A, Supuran C, Pan P, Parkkila S, Scaloni A, Pastorek J, Pastoreková S, Monti SM, De Simone G. Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(38):16233-38.
4. Robertson, N. Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. *Cancer Research*. 2004;64(17):6160-5.
5. TMWastová E, Hul,ková A, Rafajová M, Gibadulinová A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J, Pastoreková S. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 2004;577(3):439645.
6. Drews J. Drug discovery: a historical perspective. *Science*. 2000;287:1960-1964.
7. Supuran CT, Casini A, Mastrolorenzo A, Scozzafava A. COX-2 selective inhibitors, carbonic anhydrase inhibition and anticancer properties of sulfonamides belonging to this class of pharmacological agents. *Mini Rev Med Chem*. 2004;4:625-32.
8. Abbate F, Casini A, Owa T, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: E7070, a sulfonamide anticancer agent, potently inhibits cytosolic isozymes I and II, and transmembrane, tumor-associated isozyme IX. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14(1):217-23.
9. Manasa KL. E7010: investigational anticancer agents targeting the microtubules. *IJPSR*. 2015;6(9):3713-25.

10. Kayaalp SO. Kanser kemoterapisinin esaslar, ve antineoplastik ilaçlar, Rasyonel Tedavi Yönünden T,bbi Farmakoloji.Cilt 1, 8. bas,m, Feryal Matbaac,l,k. Ankara. 1998;1007- 72
11. <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir/4-kanser-nedir.html>. Eri im:15.05.2017.
12. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. Concepts of Genetics. Pearson UK. 2006;0-1319:1883-88.
13. At,c, E. T,p tarihinde kanser ve lösemi. Türk Onkoloji Dergisi. 2007;22(4):1976 204.
14. Armstrong L, Dauncey G, Wordsworth A. Çev. Topuz E. Kanser Salg,n, Önlemek için 101 Çözüm Önerisi. Alfa yay,nlar, . 1. Bas,m. stanbul. 2009.
15. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. Nat Rev Cancer. 2005;5(4):263-74.
16. Yard,m N, Mollahalilo lu S, Bora Ba ara B. Türkiyede kanser durumu ve uluslararası göstergeler ile uyumun de erlendirilmesi. çinde: Türkiyeøde Kanser Kontrolü Eds Tuncer AM, Özgül N, Olcayto E, Gültekin M. TC Sa l,k Bakanl, ,, Kanserle Sava Dairesi Ba kanl, ,, Koza Matbaac,l,k Ankara. 2009;1-63.
17. Hatipo lu A. Kanserde erken tan, ve tarama problemleri. Sa l,k Bakanl, , Kanserle Sava Dairesi 2007.
18. Forman D, Ferlay J. The global and regional burden of cancer. In: Stewart BW, Wild CP (eds). IACR World Cancer Report 2014. Lyon, France: International Agency for Cancer Reports (IACR) Publications; 2014:16-53.
19. Forman D, Ferlay J, Stewart B, Wild C. The global and regional burden of cancer. World cancer report. 2014:16-53.
20. Türkiye Kanser Kontrol Program, Ankara 2016 http://kanser.gov.tr/Dosya/Kitaplar/turkce/Turkiye_Kanser_Kontrol_Programi_2016.pdf.
21. Türkiye Kanser statikleri. Ankara 2017 http://kanser.gov.tr/Dosya/2017Haberler/2014 RAPOR._uzun.pdf. Eri im: 16.05.2017.
22. Globocan 2012. öEstimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwideö. <http://globocan.iarc.fr/> 16.05.2017.

23. Kutluk T, Kars A. Kanser Konusunda Genel Bilgiler. Kanser ve Sava Daire Ba kanl, ,, Sa lık Bakanl, ,, Sa lık Projesi Genel Koordinatörlü ü. Ankara 2001;9-98.
24. American Cancer Society, Cancer Facts & Figures. Atlanta: American Cancer Society; 2014.
25. Boyle P, Levin B (Ed). Dünya Kanser Raporu. Uluslararası, Kanser Ara tırmalar, Kurumu, Lyon.2008;12-497.
26. Baykara O Kanser Tedavisinde Güncel Yakla mlar. Balıkesir Sa lık Bilimleri Dergisi Ankara. 2016;154-65.
27. Bozkurt MK. Kemoterapi ve Kanser Kök Hücreleri. Uyum Yay,nc,lık. stanbul 2007;20-148.
28. Abdullaev F, Plant-driven agents against cancer. In: Pharmacology And Therapeutics In The New Millennium.(Eds:Gupta SK) Narosa Puplicing House, New Delhi, India. 2001;345-54.
29. Occupational Health and Safety Administration 2001. OSHA Directorate of technical support controlling occupational exposure to hazardous drugs. OSHA published. 2001;1(15):7-42.
30. Thompson J, Nugent SMJ, Walczak RJ. Clinical Nursing, 4th Ed., St Louis, Mosby. 1997;1330-31.
31. White L. Foundations of Nursing: Caring for the whole person, Texas, Delmar. 2001;659- 81.
32. Aykan FN. Meme Kanseriinde Adjuvan Kemoterapinin Baz, Humoral İmmün Sistem Parametreleri Üzerine Etkisi stanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Tıbbi Onkoloji Bilim Dal,, Uzmanlık Tezi stanbul.1991;2.
33. Af ar, F. Kanserli bireylerde a r, ve a r, ile ba etme yöntemlerinin de erlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sa lık Bilimleri Enstitüsü stanbul. 2002.
34. Supuran CT. Carbonic Anhydrase: Novel therapeutic applications for inhibitors and activators. Nature Reviews. 2008;7:168.
35. Tashian RE. The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function. Bioessays. 1989;10:186-92.

36. Chegwiddden WR, Dodgson SJ, Spencer IM. The roles of carbonic anhydrase in metabolism, cell growth and cancer in animals. *EXS*. 2000;343:663
37. Aggarwal M, Boone CD, Kondeti B, McKenna R. Structural annotation of human carbonic anhydrases. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2013;28:267-77.
38. Alterio V, Di Fiore A, D'Ambrosio K, Supuran CT, De Simone, G. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: How to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chem Rev.* 2012;112:4421-668.
39. Pastorekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran CT (2004) Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2004; 19(3): 199-229
40. Eichhorn, M. Mode of action, clinical profile and relevance of carbonic anhydrase inhibitors in glaucoma therapy. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde.* 2013;230:146-49.
41. Kivelä AJ, Kivelä J, Saarnio J, Parkkila S. Carbonic anhydrases in normal gastrointestinal tract and gastrointestinal tumours. *World J Gastroenterol.* 2005;11(2):155-63.
42. Aggarwal M, Kondeti B, McKenna R. Insights towards sulfonamide drug specificity in α -carbonic anhydrases. *Bioorg Med Chem.* 2013;21:1526-33.
43. Boone CD, Pinard M, McKenna R, Silverman D. Catalytic Mechanism of α -Class Carbonic Anhydrases: CO₂ Hydration and Proton Transfer. *Subcell Biochem.* 2014;75:31-52.
44. Pinard MA, Boone CD, Rife BD, Supuran CT, McKenna R. Structural study of interaction between brinzolamide and dorzolamide inhibition of human carbonic anhydrases. *Bioorg Med Chem.* 2013;21:7210-15.
45. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4; Schrödinger, LLC: New York, NY, USA. 2013.
46. Türeci O, Sahin U, Vollmar E, Siemer S, Göttert E, Seitz G, Parkkila AK, Shah GN, Grubb JH, Pfreundschuh M, Sly WS. Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(13):7608-13.

- 47.** Ilie MI, Hofman V, Ortholan C, Ammadi RE, Bonnetaud C, Havet K, Venissac N, Mouroux J, Mazure NM, Pouysségur J. Overexpression of carbonic anhydrase XII in tissues from resectable non-small cell lung cancers is a biomarker of good prognosis. *Int J Cancer*. 2011;128:1614623.
- 48.** Liao SY, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of transmembrane carbonic anhydrases, CAIX and CAXII, in human development. *BMC Dev Biol*. 2009;9:22.
- 49.** Olive LP, Aquina-Parsons A, MacPhail HS, Liao SY, Raleigh JA, Lerman IM, Stanbridge JE. Carbonic Anhydrase 9 as an endogenous marker for hypoxic cells in cervical cancer. *Cancer Research*. 2001;61: 8924-29.
- 50.** Nakagawa Y, Uemura H, Hirao Y. Radiation hybrid mapping of the human MN/CA9 locus to chromosome band 9p126p13. *Genomics*. 1998;53: 11869.
- 51.** Opavský R, Pastoreková S, Zelník V, Gibadulinová A, Stanbridge EJ, Závada J, Kettmann R, Pastorek J. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics*. 1996;33: 48067.
- 52.** Mahon BP, McKenna R. Regulation and role of carbonic anhydrase IX and use as a biomarker and therapeutic target in cancer. *Res. Trends Curr Top Biochem Res*. 2013;15:1621.
- 53.** De Simon G, Supuran CT. Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:40469.
- 54.** Hilvo M, Baranauskiene L, Salzano AM, Scaloni A, Matulis D, Innocenti A, Scozzafava A, Monti SM, Di Fiore A, De Simone G. Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J Biol Chem*. 2008;283:277996809.
- 55.** Pinard MA, Mahon BP, McKenna R. Probing the Surface of Human Carbonic Anhydrase for Clues towards the Design of Isoform Specific Inhibitors. *Bio Med Res Int*. in press. 2014.
- 56.** Barathova M, Takacova M, Holotnakova T, Gibadulinova A, Ohradanova A, Zatovicova M, Hulikova A, Kopacek J, Parkkila S, Supuran CT. Alternative splicing variant of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX expressed independently of hypoxia and tumour phenotype. *Br J Cancer* 2008;98:129636.

57. Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: an editorial. *Expert Opin Ther Pat.* 2013;23: 67769.
58. Benej M, Pastorekova S, Pastorek J. Carbonic Anhydrase IX: Regulation and Role in Cancer. In *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*; Frost SC, McKenna R. Eds.; Subcellular Biochemistry: Springer, The Netherlands. 2014;1996219.
59. Saarnio, J, Parkkila S, Parkkila AK, Waheed A, Casey MC, Zhou XY, Pastoreková S, Pastorek J, Karttunen T, Haukipuro K. Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity. *J Histochem Cytochem.* 1998;46: 4976504.
60. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, Haukipuro K, Pastoreková S, Pastorek J, Kairaluoma MI, Karttunen TJ. Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am J Pathol.* 1998;153:279685.
61. Leibovich BC, Sheinin Y, Lohse CM, Thompson RH, Cheville JC, Zavada J, Kwon ED. Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2007;25: 4757664.
62. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol.* 2001;158:905619.
63. Fiaschi T, Giannoni E, Taddei ML, Cirri P, Marini A, Pintus G, Nativi C, Richichi B, Scozzafava A, Carta F. Carbonic anhydrase IX from cancer-associated fibroblasts drives epithelial-mesenchymal transition in prostate carcinoma cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 2013;12: 17916801.
64. Mahon BP, Pinard MA, McKenna R. Targeting Carbonic Anhydrase IX Activity and Expression. *Molecules* 2015;20(2):2323-48.
65. Moulder JE, Rockwell S. Tumor hypoxia: Its impact on cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 1987;5: 313641.
66. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:393-410.

- 67.** Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med.* 2010; 14:771-94.
- 68.** Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 alpha and HIF 2 alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:9-22.
- 69.** Poon E, Harris AL, Ashcroft M. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert Rev Mol Med.* 2009;11:1-18.
- 70.** Nordfors K, Haapasalo J, Haapasalo H, Parkkila S. Carbonic anhydrase IX in adult and pediatric brain tumors. *Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications.* Intech. 2013;533-53.
- 71.** Bryant JL, Meredith SL, Williams KJ, White A. Targeting hypoxia in the treatment of small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2014; 86(2):126-32.
- 72.** Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene.* 2010;29(5):625-34.
- 73.** Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):721-32.
- 74.** Svastova E, Zilka N, Zatovicova M, Gibadulinova A, Ciampor F, Pastorek J, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Exp Cell Res.* 2003;290(2):3326345.
- 75.** Potter C, Harris AL. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumor hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle.* 2004;3(2):16467.
- 76.** Chiche J, Ilc K, Laferrière J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res.* 2009;69:358668.
- 77.** McIntyre A, Patiar S, Wigfield S, Li JL, Ledaki I, Turley H, Leek R, Snell C, Gatter K, Sly WS, Vaughan-Jones RD, Swietach P, Harris AL. Carbonic anhydrase IX promotes tumor growth and necrosis in vivo and inhibition enhances anti-VEGF therapy. *Clin Cancer Res.* 2012;18:3100611.
- 78.** Lou Y, McDonald PC, Oloumi A, Chia S, Ostlund C, Ahmadi, A. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. *Cancer Res.* 2011;71: 3364676.

- 79.** Dubois L, Peeters S, Lieuwes NG, Geusens N, Thiry A, Wigfield S. Specific inhibition of carbonic anhydrase IX activity enhances the in vivo Therapeutic effect of tumor irradiation. *Radiother Oncol.* 2011;99:424631.
- 80.** Dubois L, Peeters SG, Van Kuijk SJ, Yaromina A, Lieuwes NG, Saraya, R. Targeting carbonic anhydrase IX by nitroimidazole based sulfamides enhances the therapeutic effect of tumor irradiation: a new concept of dual targeting drugs. *Radiother Oncol.* 2013;108(3):523628.
- 81.** Wojtkowiak JW, Verduzco D, Schramm KJ, Gillies RJ. Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Mol Pharm.* 2011;8:203238.
- 82.** Pastoreková S, Parkkila S, Parkkila AK, Opavský R, Zelník V, Saarnio J, Pastorek J. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology.* 1997;112:3986408.
- 83.** Pastorekova S, Parkkila S and Zavada J. Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance. *Adv Clin Chem.* View Article. Google Scholar. PubMed/NCBI. 2006;42:1676216.
- 84.** Mandriota SJ, Turner KJ, Davies DR, Murray PG, Morgan NV, Sowter HM, Wykoff CC, Maher ER, Harris AL, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell.* 2002;1:459668.
- 85.** Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible regulation of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 2000;60(24):7075-83.
- 86.** Ditte P, Dequiedt F, Svastova E, Hulikova A, Ohradanova-Repic A, Zatovicova M, Csaderova L, Kopacek J, Supuran CT, Pastorekova S and Pastorek J. Phosphorylation of carbonic anhydrase IX controls its ability to mediate extracellular acidification in hypoxic tumors. *Cancer Res.* 2011;71:7558667.
- 87.** Dorai T, Sawczuk IS, Pastorek J, Wiernik PH and Dutcher JP: The role of carbonic anhydrase IX overexpression in kidney cancer. *Eur J Cancer.* 2005;41:293562947.

- 88.** McIntyre A, Patiar S, Wigfield S, Li JL, Ledaki I, Turley H, Leek R, Snell C, Gatter K, Sly WS, Vaughan-Jones RD, Swietach P, Harris AL. Carbonic anhydrase IX promotes tumour growth and necrosis in vivo and inhibition enhances anti-VEGF therapy. *Clin Cancer Res.* 2012;18:3100611.
- 89.** Svastová E, Zilka N, Zatøvicová M, Gibadulinová A, Ciampor F, Pastorek J, Pastoreková S. Carbonic anhydrase reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Exp Cell Res.* 2003;290:332645.
- 90.** Svastova E, Witarski W, Csaderova L, Kosik I, Skvarkova L, Hulikova A, Zatovicova M, Barathova M, Kopacek J, Pastorek J, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain. *J Biol Chem.* 2012;287:33926402.
- 91.** Csaderova L, Debreova M, Radvak P, Stano M, Vrestiakova M, Kopacek J, Pastorekova S and Svastova E: The effect of carbonic anhydrase IX on focal contacts during cell spreading and migration. *Front Physiol.* 2013;4:271.
- 92.** Zatovicova M, Jelenska L, Hulikova A, Csaderova L, Ditte Z, Ditte P, Goliaova T, Pastorek J, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX as an anticancer therapy target: preclinical evaluation of internalizing monoclonal antibody directed to catalytic domain. *Curr Pharm Des.* 2010;16: 3255663.
- 93.** Zatovi ová M, Pastorekova S. Modulation of cell surface density of carbonic anhydrase IX by shedding of the ectodomain and endocytosis. *Acta Virol.* 2013;57: 257664.
- 94.** Rafajová M, Zatovicová M, Kettmann R, Pastorek J and Pastoreková S. Induction by hypoxia combined with low glucose or low bicarbonate and high posttranslational stability upon reoxygenation contribute to carbonic anhydrase IX expression in cancer cells. *Int J Oncol.* 2004;24:99561004.
- 95.** Zatovicova M, Sedlakova O, Svastova E, Ohradanova A, Ciampor F, Arribas J, Pastorek J, Pastorekova S. Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. *Br J Cancer.* 2005;93:1267676.
- 96.** Oosterwijk-Wakka JC, Boerman OC, Mulders PF, Oosterwijk E. Application of monoclonal antibody G250 recognizing carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2013;14:11402623.

- 97.** Murri-Plesko MT, Hulikova A, Oosterwijk E, Scott AM, Zortea A, Harris AL, Ritter G, Old L, Bauer S, Swietach P and Renner C. Antibody inhibiting enzymatic activity of tumour-associated carbonic anhydrase isoform IX. *Eur J Pharmacol.* 2011;657:173-183.
- 98.** Xu C, Lo A, Yammanuru A, Tallarico AS, Brady K, Murakami A, Barteneva N, Zhu Q, Marasco WA. Unique biological properties of catalytic domain directed human anti-CAIX antibodies discovered through phage-display technology. *PLoS One.* 2010;5:9625.
- 99.** McKenna R, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors drug design. *Subcell Biochem.* 2014;75: 291-323.
- 100.** Kolayli S, Karahalil F, Sahin H, Dincer B, Supuran CT. Characterization and inhibition studies of an α -carbonic anhydrase from the endangered sturgeon species *Acipenser gueldenstaedti*. *J Enzym Inhib Med Chem.* 2011;26(6):895-900.
- 101.** Avvaru BS, Kim CU, Sippel KH, Gruner SM, Agbandje-McKenna M, Silverman DN, McKenna R. A short, strong hydrogen bond in the active site of human carbonic
- 102.** Siebels M, Rohrmann K, Oberneder R, Stahler M, Haseke N, Beck J, Hofmann R, Kindler M, Kloepfer P, Stief C. A clinical phase I/II trial with the monoclonal antibody cG250 (RENCAREX®) and interferon-alpha-2a in metastatic renal cell carcinoma patients. *World J Urol.* 2011;29(1):121-126.
- 103.** Macis G, Di Giovanni S, Di Franco D, Bonomo L. Future perspectives for diagnostic imaging in urology: from anatomic and functional to molecular imaging. *Urologia.* 2013;80:29-41.
- 104.** Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25:1605-12.
- 105.** Závada J, Zavadová, Z, Pastorek J, Biesová Z, Jezek J, Velek J. Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *Br J Cancer.* 2000;82:1808-13.
- 106.** Weidle UH, Tiefenthaler G, Georges G. Proteases as activators for cytotoxic prodrugs in antitumor therapy. *Cancer Genomics Proteomics.* 2014;11:67-79.

- 107.** McDonald PC, Winum JY, Supuran CT, Dedhar S. Recent developments in targeting carbonic anhydrase IX for cancer therapeutics. *Oncotarget*. 2012;3: 84697.
- 108.** Casey JR, Morgan PE, Vullo D, Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Design of selective, membrane-impermeant inhibitors targeting the human tumor-associated isozyme IX. *J Med Chem*. 2004;47:2337647.
- 109.** Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee JH, Kruhlak M, Levine M. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J*. 2007;21:366677.
- 110.** Grove J, Gautheron P, Plazonnet B, Sugrue MF. Ocular distribution studies of the topical carbonic anhydrase inhibitors L-643,799 and L-650,719 and related alkyl prodrugs. *J Ocul Pharmacol*. 1988;4:279690.
- 111.** Barrese AA, Genis C, Fisher SZ, Orwenyo JN, Kumara MT, Dutta SK, Phillips E, Kiddle JJ, Tu C, Silverman DN. Inhibition of carbonic anhydrase II by thioxolone: A mechanistic and structural study. *Biochemistry*. 2008;47:3174684.
- 112.** De Simone G, Vitale RM, Di Fiore A, Pedone C, Scozzafava A, Montero JL, Winum JY, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: Hypoxia-activatable sulfonamides incorporating disulfide bonds that target the tumor-associated isoform IX. *J Med Chem*. 2006;49(18): 5544651.
- 113.** Hurvitz LM, Kaufman PL, Robin AL, Weinreb RN, Crawford K, Shaw B. New developments in the drug treatment of glaucoma. *Drugs*. 1991;41:514632.
- 114.** Carta F, Maresca A, Scozzafava A, Supuran CT. 5- and 6-membered (thio)lactones are prodrug type carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22:267670.
- 115.** Reich R, Hoffman A, Veerendhar A, Maresca A, Innocenti A, Supuran CT, Breuer E. Carbamoylphosphonates control tumor cell proliferation and dissemination by simultaneously inhibiting carbonic anhydrase IX and matrix metalloproteinase-2. Toward nontoxic chemotherapy targeting tumor microenvironment. *J Med Chem*. 2012;55(17):7875682.
- 116.** Smith R, Solberg R, Jacobsen LL, Voreland AL, Rustan AC, Thoresen GH, Johansen HT. Simvastatin inhibits glucose metabolism and legumain activity in human myotubes. *PLUS One*. 2014;9(3):e93202.

- 117.** Wong BCK, Zhang H, Qin L, Chen H, Fang C, Lu A, Yang Z. Carbonic anhydrase IX-directed immunoliposomes for targeted drug delivery to human lung cancer cells in vitro. *Drug Des Dev Ther.* 2014;8:99361001.
- 118.** Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605612.
- 119.** Casey JR, Morgan PE, Vullo D, Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Design of selective, membrane-impermeant inhibitors targeting the human tumor-associated isozyme IX. *J Med Chem.* 2004;47:2337647.
- 120.** Groves K, Bao B, Zhang J, Handy E, Kennedy P, Cuneo G, Supuran CT, Yared W, Peterson JD, Rajopadhye M. Synthesis and evaluation of near-infrared fluorescent sulfonamide derivatives for imaging of hypoxia-induced carbonic anhydrase IX expression in tumors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22:65367.
- 121.** Moeker J, Mahon BP, Bornaghi LF, Vullo D, Supuran CT, McKenna R, Poulsen SA. Structural insights into carbonic anhydrase IX isoform specificity of carbohydrate-based sulfamates. *J Med Chem.* 2014;57:863568645.
- 122.** Mahon BP, Hendon AM, Driscoll JM, Rankin GM, Poulsen SA, Supuran CT, McKenna R. Saccharin: A Lead Compound for Structure-Based Drug Design of Carbonic Anhydrase IX Inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2015;23(4): 849654.
- 123.** Meyer H, Vitavska O, Wiczorek H. Identification of an animal sucrose transporter. *J Cell Sci.* 2011;124:1984691.
- 124.** Carroux CJ, Rankin GM, Moeker J, Bornaghi LF, Katneni K, Morizzi J, Charman SA, Vullo D, Supuran CT, Poulsen SA. A prodrug approach toward cancer-related carbonic anhydrase inhibition. *J Med Chem.* 2013;56:9623634.
- 125.** Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:475688.
- 126.** Lock FE, McDonald PC, Lou Y, Serrano I, Chafe SC, Ostlund C, Aparicio S, Winum JY, Supuran CT, Dedhar S. Targeting carbonic anhydrase IX depletes breast cancer stem cells within the hypoxic niche. *Oncogene.* 2013;32:521069.
- 127.** Radvak P, Repic M, Svastova E, Takacova M, Csaderova L, Strnad H, Pastorek J, Pastorekova S, Kopacek J. Suppression of carbonic anhydrase IX leads to aberrant focal adhesion and decreased invasion of tumor cells. *Oncol Rep.* 2013;29:1147653.

- 128.** Yu S, Yoon J, Lee J, Myung S, Jang E, Kwak M, Cho E, Jang J, Kim Y, Lee H. Inhibition of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-IX enhances hexokinase II inhibitor-induced hepatocellular carcinoma cell apoptosis. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32:912-20.
- 129.** O'Keefe EP. siRNAs and shRNAs: Tools for protein knockdown by gene silencing. *Methods.* 2013;3:197
- 130.** Lerch TF, Xie Q, Chapman MS. The structure of adeno-associated virus serotype 3B (AAV-3B): Insights into receptor binding and immune evasion. *Virology* 2010;403:266-36.
- 131.** Al-Lazikani B, Banerji U, Workman P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nat Biotechnol.* 2012;30:679-92.
- 132.** Meena AS, Sharma A, Kumari R, Mohammad N, Singh SV, Bhat MK. Inherent and acquired resistance to paclitaxel in hepatocellular carcinoma: Molecular events involved. *PLoS One.* 2013;16;8(4):e61524
- 133.** Alisi A, Cho WC, Locatelli F, Fruci D. Multidrug resistance and cancer stem cells in neuroblastoma and hepatoblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14: 24706-25.
- 134.** Peitzsch C, Perrin R, Hill RP, Dubrovskaya A, Kurth I. Hypoxia as a biomarker for radioresistant cancer stem cells. *Int J Radiat Biol.* 2014;90: 636-52.
- 135.** Sugrue T, Lowndes NF, Ceredig R. Hypoxia enhances the radioresistance of mouse mesenchymal stromal cells. *Stem Cells.* 2014;32:2188-200.
- 136.** Wang M, Li X, Qu Y, Xu O, Sun, Q. Hypoxia promotes radioresistance of CD133-positive Hep-2 human laryngeal squamous carcinoma cells in vitro. *Int J Oncol.* 2013;43:131-40.
- 137.** Crowder SW, Balikov DA, Hwang YS, Sung HJ. Cancer stem cells under hypoxia as a chemoresistance factor in breast and brain. *Curr Pathobiol Rep.* 2014;2:33-40.
- 138.** Supuran CT, Scozzafava A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Curr Med Chem.* 2001;363 (1):61-97.
- 139.** Supuran CT, Scozzafava A. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorg Med Chem.* 2007;15(13):4336-50.
- 140.** Bülbül M, Saraço lu N, Küfrevio lu Ö , Çiftçi M. Bile acid derivatives of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors:

Synthesis and investigation of inhibition effects. *Bioorg Med Chem*. 2002;10(8):2561-67.

141. Supuran CT, Casini A, Scozzafava A. Inhibitors protease inhibitors of the sulfonamide type: Anticancer, anti-inflammatory, and antiviral agents. *Medicinal Research Reviews*. 2003;23(5):535-58.

142. Lindskog S, Wistrand PJ. Inhibitors of carbonic anhydrase. In: *Design of enzyme inhibitors as drugs*. pp. 1988;698-723.

143. Liesegang TJ, Glaucoma: Changing concepts and future directions. *Mayo Clin Proc*. 1996;71:689.

144. Casini A, Antel J, Abbate F, Scozzafava A, David S, Waldeck H, Schafer S, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II, and IVö , *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13: 841645.

145. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications c for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;1:14.

146. Durgun M. Baz, yeni sülfonamit türevlerinin sentezi, biyolojik aktivitelerinin incelenmesi ve kantitatif yap, ó etki ili kilerinin (QSAR) de erlendirilmesi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, anl,urfa. 2014;223.

147. Durgun M, Turkmen H, Ceruso M, Supuran CT. Synthesis of Schiff base derivatives of 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonamide with inhibitory activity against carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XIIö. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015;25(11); 2377-81.

148. Durgun M, Turkmen H, Ceruso M, Supuran CT. Synthesis of 4-sulfamoylphenyl-benzylamine derivatives with inhibitory activity against human carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XIIö. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2016;24(5):982-8.

150. Pastorekova S, Zatovicova M, Pastorek J. Cancer-associated carbonic anhydrases and their inhibition. *Curr Pharm Des* 2008;14(7):6856698.

151. Roos A, Boron WF. Intracellular pH. *Physiol Rev*. 1981; 61: 2966434.

152. Pouyssegur J, Sardet C, Franchi A, LøAllemain G & Paris S. A specific mutation abolishing Na⁺/H⁺ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81:4833637.

- 153.** Chambard JC, Pouyssegur J. Intracellular pH controls growth factor-induced ribosomal protein S6 phosphorylation and protein synthesis in the G0/G1 transition of fibroblasts. *Exp Cell Res* 164, 282-294.
- 154.** Pantuck AJ, Zeng G, Beldegrun AS, Figlin RA. Pathobiology, prognosis, and targeted therapy for renal cell carcinoma: exploiting the hypoxia-induced pathway. *Clin Cancer Res*. 2003;9(13): 464-652.
- 155.** Chia SK, Wykoff CC, Watson PH, Han C, Leek RD, Pastorek J, Gatter KC, Ratcliffe P, Harris AL. Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol*. 2001;19(16):3660-668.
- 156.** Lancaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, Wykoff CC, Pastorek J, Ratcliffe PJ, Stratford IJ, West CM. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res*. 2001;61(17):6394-699.
- 157.** Swinson DE, Jones JL, Richardson D, Wykoff C, Turley H, Pastorek J, Taub N, Harris AL, O'Byrne KJ. Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(3):473-682.
- 158.** Driessen A, Landuyt W, Pastorekova S, Moons J, Goethals L, Haustermans K, Naftoux P, Penninckx F, Geboes K, Lerut T, Ectors N. Expression of carbonic anhydrase IX (CA IX), a hypoxia-related protein, rather than vascular-endothelial growth factor (VEGF), a pro-angiogenic factor, correlates with an extremely poor prognosis in esophageal and gastric adenocarcinomas. *Ann Surg*. 2006;243(3): 334-40.
- 159.** Simi L, Venturini G, Malentacchi F, Gelmini S, Andreani M, Janni A, Pastorekova S, Supuran CT, Pazzagli M, Orlando C. Quantitative analysis of carbonic anhydrase IX mRNA in human non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2006;52(1): 59-66.
- 160.** Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos K, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, Harris AL. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9)

relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res.* 2001;7(11):3399-403.

161. Tanaka N, Kato H, Inose T, Kimura H, Faried A, Sohda M, Nakajima M, Fukai Y, Miyazaki T, Masuda N, Fukuchi M, Kuwano H. Expression of carbonic anhydrase 9, a potential intrinsic marker of hypoxia, is associated with poor prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2008; 99(9): 14686-75.

162. Ahlskog JK, Schliemann C, Marlind J, Qureshi U, Ammar A, Pedley RB, Neri D. Human monoclonal antibodies targeting carbonic anhydrase IX for the molecular imaging of hypoxic regions in solid tumours. *Br J Cancer.* 2009;101(4):645-57

163. Mojzych M, Ceruso M, Bielawska A, Bielawski K, Fornal E, Supuran CT. New pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazine sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2015;23:3674-80.

164. Ebbesen P, Pettersen EO, Gorr TA, Jobst G, Williams K, Kienninger J, Wenger RH, Pastorekova S, Dubois L, Lambin P, Wouters BG, Supuran CT, Poellinger L, Ratcliffe P, Kanopka A, Grolach A, Gasman M, Harris AL, Maxwell P, Scozzafava A. Taking advantage of tumor cell adaptations to hypoxia for developing new tumor markers and treatment strategies. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2009;24:1-39.

165. Ahlskog JK, Dumelin CE, Trüssel S, Marlind J, and Neri D. In vivo targeting of tumor-associated carbonic anhydrases using acetazolamide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19:4851656.

166. Morsy SM, Badawi AM, Cecchi A, Scozzafava A, and Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Biphenylsulfonamides with inhibitory action towards the transmembrane, tumor-associated isozymes IX possess cytotoxic activity against human colon, lung and breast cancer cell lines. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2009;24:4996505.

167. Cianchi F, Vinci MC, Supuran CT, Peruzzi B, De Giuli P, Fasolis G, Perigli G, Pastorekova S, Papucci L, Pini A, Masini E, Pucetti L. Selective inhibition of carbonic anhydrase IX decreases cell proliferation and induces ceramide-mediated apoptosis in human cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;334(3):710-19.

4-(2-AMİNO ETİL) BENZEN SÜLFONAMİT TÜREVİ BİLEŞİKLERİN ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU



BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	pharmacy.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
2	ekutuphane.tusak.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	kanser.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
4	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
5	www.kimyaders.com İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
8	acikerisim.istanbulbilim.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1