

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİR KOJİK ASİT TÜREVİ OLAN "KOJİLMETİL DİKLOROBENZİL  
PİPERAZİNİN" İN VİTRO ORTAMLARDA DOZA VE ZAMANA  
BAĞLI ANTI KANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**MERVE YAVUZ**

**KOCAELİ 2021**

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİR KOJİK ASİT TÜREVİ OLAN "KOJİLMETİL DİKLOROBENZİL  
PİPERAZİNİN" İN VİTRO ORTAMLARDA DOZA VE ZAMANA BAĞLI ANTI  
KANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**MERVE YAVUZ**

**Dr.Öğr.Üyesi Zeynep BETTS**  
**Danışman, Kocaeli Üniversitesi**

.....

**Doç. Dr. Canan SEVİMLİ GÜR**  
**Eş Danışman, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi**

.....

**Doç.Dr. Özlem AKSOY**  
**Jüri üyesi, Kocaeli Üniversitesi**

.....

**Doç.Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ**  
**Jüri üyesi, Kocaeli Üniversitesi**

.....

**Dr. Öğr. Üyesi Gülşah KARAKAYA**  
**Jüri üyesi, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi**

.....

**Tezin Savunulduğu Tarih:05.10.2021**

## ÖZSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu zorlu süreçte desteklerini esirgemeyen danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Zeynep BETTS' e ve tez çalışmamda destek olan, bir dönem danışmanlığımı yürütmüş olan Doç. Dr. Canan SEVİMLİ GÜR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Hücre kültürü Laboratuvarları alt yapı imkanları kullanılmıştır. Çalışmamızda bizden desteğini esirgemeyen laboratuvar ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda kullanılan Koji MG84, Ankara'da faaliyet gösteren Koji Kozmetik Kim. San. Tic. Aş. tarafından temin edilmiştir. Desteklerinden dolayı Prof. Dr. Mutlu DİLSİZ AYTEMİR' e teşekkürlerimi sunarım.

Aramıza mesafeler girse de, her zaman varlıklarını hissettirerek destek olan sevgili dostlarım Famanur OCAKÇI ve Gizem FİLİZ' E,

Ve destekleri olmadan buralara gelmem imkansızdı. Her kararımda yanımda olan, her zorluk karşısında beni cesaretlendiren sevgili annem Ayfer YAVUZ' a, babam Savaş YAVUZ' a ve kardeşlerim Ayşe YAVUZ, Betül YAVUZ, Hatice Kübra YAVUZ, Zeynep YAVUZ ve Gökçe YAVUZ' a sonsuz minnetlerimi sunarım.

Ekim – 2021

Merve YAVUZ

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iii
TABLolar DİZİNİ .....	iv
SİMGELEr VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT .....	viii
GİRİŞ .....	1
1. GENEL BİLGİLER .....	3
1.1. Kojik asitin kullanım alanları .....	4
1.2. Bir tirozinaz inhibitörü olarak kojik asit.....	5
1.3. Bir anti-karsinojen ajan olarak kojik asit.....	10
1.4. Koji MG84' ün yapısı ve özellikleri .....	12
2. MATERYAL-METOD .....	16
2.1. Materyal .....	16
3.1.1.Koji MG84' ün elde edilmesi .....	16
3.1.2.Kullanılan teknik aletler.....	16
3.1.3.Hücre kültürü ve sitotoksosite için kullanılacak hücre hatları.....	16
2.2. Metod .....	17
2.2.1.Koji MG84' ün hazırlanması.....	17
2.2.2.Hücre kültürlerinin hazırlanması.....	17
2.2.3.Hücrelerin pasajlanması .....	17
2.2.4. MTT hücre canlılık analizi .....	18
2.2.5. İstatistik .....	20
3. BULGULAR.....	22
3.1. Doza bağlı sitotoksosite bulguları .....	23
3.2. Koji MG84' ün çeşitli kanser hücreleri üzerindeki IC <sub>50</sub> değerleri .....	26
3.3. Zamana bağlı sitotoksosite bulguları.....	27
4. TARTIŞMA .....	31
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	38
KAYNAKLAR .....	40
KİŞİSEL YAYIN ve ESERLER.....	45
ÖZGEÇMİŞ .....	46

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1. Koji MG84' ün yapısı ..... 12
- Şekil 1.2. Koji MG84' ün sentezi ..... 13
- Şekil 2.1. Deney düzeneğinin kurulumu NK(negatif kontrol); sadece hücre, NK2 (Negatif kontrol 2) : Hücre ve DMSO, PK (pozitif kontrol); Doksorubisin, 1; 100 µg/ml, 2; 50 µg/ml, 3; 25 µg/ml, 4; 12,5 µg/ml, 5; 6,25 µg/ml, 6; 3,125 µg/ml , 7; 1,562 µg/ml, 8; 0,780 µg/ml , 9; 0,39 µg/ml Koji MG8 .....19
- Şekil 2.2. MTT için hazırlanan hücreler (NK: Negatif kontrol (sadece hücre) NK2: Negatif Kontrol 2 (Hücre+DMSO), PK: Pozitif Kontrol (Doksor.....21
- Şekil 3.1. Hücre hatlarının mikroskobu altındaki görüntüleri. A) A549 Hücre hattı mikroskobik görüntüsü sırasıyla 4X ve 10X. B) SK BR 3 Hücre hattı mikroskobik görüntüsü sırasıyla 4X ve 10X. C) SK MELHücre hattı mikroskobik görüntüsü sırasıyla 4X ve 10X. D) HT 29 Hücre hattı mikroskobik görüntüsü sırasıyla 4X ve 10X. E) VERO Hücre hattı mikroskobik görüntüsü sırasıyla 4X ve 10X..... 22
- Şekil 3.2. 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39 µg/ml Koji MG84'ün kanser hücre hatlarının (SK MEL , SK-BR-3, A549, HT-29) ve VERO normal hücre hattının hücre canlılık yüzdesi üzerindeki etkisinin karşılaştırılması. NK, negatif kontrol (% 0.1 mg/ml DMSO), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin 10 µg /ml) .....25
- Şekil 3.3. 3.13 µ/ml konsantrasyondaki Koji MG84' ün 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat inkübasyonun ardından SK MEL hücre canlılık yüzdesi üzerindeki etkisinin grafiksel gösterimi. NK, negatif kontrol (% 0.1 mg/ml DMSO), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin 10 µg /ml).....28
- Şekil 3.4. 3.13 µ/ml konsantrasyondaki Koji MG84' ün 24, 48, 72, 96, 120. ve 144 saat inkübasyonun ardından SK BR 3 hücre canlılık yüzdesi üzerindeki etkisinin grafiksel gösterimi. NK, negatif kontrol (% 0.1 mg/ml DMSO), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin 10 µg /ml).....29
- Şekil 3.5. 3.13 µ/ml konsantrasyondaki Koji MG84' ün 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat inkübasyonun ardından VERO hücre canlılık yüzdesi üzerindeki etkisinin grafiksel gösterimi. NK, negatif kontrol (% 0.1 mg/ml DMSO), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin 10 µg/ml).....30

## TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1.	Koji MG84'ün elemental analizi.....	13
Tablo 3.1.	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39µg/ml Koji MG84' ün A549 hücre hattında hücre canlılık yüzdesine etkisinin gösterimi. NK negatif kontrol (hücre+medium), PK pozitif kontrol (doksorubisin, 10 µg/ml ).....	23
Tablo 3.2.	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39µg/ml Koji MG84' ün SK MEL1 hücre hattında hücre canlılık yüzdesine etkisinin gösterimi. NK, negatif kontrol (hücre+medium), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin, 10 µg/ml).....	23
Tablo 3.3.	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39 µg/ml Koji MG84' ün SK-BR 3 hücre hattının hücre canlılık yüzdesine etkisinin gösterimi. NK, negatif kontrol (hücre+medium), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin, 10 µg/ml ) .....	24
Tablo 3.4.	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39 µg/ml Koji MG84' ün HT 29 hücre hattının hücre canlılık yüzdesine etkisinin gösterimi. NK, negatif kontrol (hücre+medium), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin, 10 µg/ml ) .....	24
Tablo 3.5.	100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39 µg/ml Koji MG84' ün VERO hücre hattının hücre canlılık yüzdesine etkisinin gösterimi. NK, negatif kontrol (hücre+medium), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin, 10 µg/ml ).....	25
Tablo 3.6.	Koji MG84' ün ve Doksorubisin' in IC <sub>50</sub> değerleri .....	27
Tablo 3.7.	3.13 µ/ml konsantrasyondaki Koji MG84' ün 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat inkübasyonun ardından SK MEL hücre canlılık yüzdesi üzerindeki etkisinin karşılaştırılması. NK, negatif kontrol (% 0.1 DMSO), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin 10 µg /ml) .....	27
Tablo 3.8.	3.13 µ/ml konsantrasyondaki Koji MG84' ün 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat inkübasyonun ardından SK-BR 3 hücre canlılık yüzdesi üzerindeki etkisinin karşılaştırılması. NC, negatif kontrol (% 0.1 DMSO), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin 10 µg /ml) .....	28
Tablo 3.9.	3.13 µ/ml konsantrasyondaki Koji MG84' ün 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat inkübasyonun ardından VERO hücre canlılık yüzdesi üzerindeki etkisinin karşılaştırılması. NC, negatif kontrol (% 0.1 DMSO), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin 10 µg /ml).....	29

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu$ l	: Mikrolitre
$\mu$ g	: Mikrogram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
ml	: Mililitre
mg	: miligram
$\mu$ M	: Mikro molar
gr	: Gram
ng	: Nanogram

### Kısaltmalar

A549	: İnsan akciğer karsinomu hücreleri
A375	: İnsan derisi maling melanomu hücreleri
A431	: İnsan derisi karsinomu hücreleri
CIREP	: Cometic Ingredient Review Expert Panel ( Kozmetik İçerik İnceleme Uzaman Paneli)
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksit
DMEM-F12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleikasit
DMPD	: N-dimetil-p-fenilendiamin
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrasil
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid (Etilendiamin tetra asetik asit)
EC <sub>50</sub>	: Half maximal effective concentration (Yarı maksimal etkili konsantrasyon)
FBS	: Fetal Bovine Serun (Fetal Sığır Serumu)
FDA	: Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç İdaresi)
FTIR	:Fourier-transform infrared spectroscop (Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi)
FRAP	: Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü
HEPG2	: İnsan Karaciğer Kanser Hücre Hattı
HGF-1	: İnsan diş eti fibroblastı hücreleri
HT 29	: İnsan kolon adenokarsinomu hücreleri
IC <sub>50</sub>	: The Half Maximal Inhibitory Concentration (Yarı Maksimal İnhibisyon Konsantrasyonu)
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentezi
L-DOPA	: L-3,4-dihidroksifenil alanin
L1210	: Mürin lösemi hücreleri
LPS	: Lipopolisakkarit
MCF7	: İnsan meme adenokarsinomu hücreleri
MRC-5	: İnsan akciğer fibroblastı hücreleri
MTT	: 3-4,5-dimetil-tiyazolil-. 2,5- difeniltetrazolyum bromid

NO	: Nitrik oksit
PBS	: Phosphate-Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Tuz)
PPO	: Polifenoloksidoz
PRAP	: Phosphomolybdenum
rpm	: Revolutions per Minute (Dakikadaki devir sayısı)
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT-qPCR	: Real time quantitative Polymerase Chain Reaction (Gerçek zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
SD	: Standart hata
SK MEL	: İnsan melanoma karsinomu hücreleri (Melanosit)
SK MEL 2	: İnsan melanoma karsinomu hücreleri (poligonal)
UV	: Ultraviyole
VERO	: Afrika yeşil maymunu böbrek epiteli hücreleri





## **BİR KOJİK ASİT TÜREVİ OLAN "KOJİLMETİL DİKLOROBENZİL PİPERAZİNİN" İN VİTRO ORTAMLARDA DOZA VE ZAMANA BAĞLI ANTI KANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

### **ÖZET**

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, invazif özellik kazanması ve metastaz yapması ile karakterize olan ölümcül bir hastalıktır. Kemoterapide uygulanan antikanser etkili ilaçların etki mekanizmaları kesin olarak bilinmemesine rağmen güçlü antiproliferatif etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Ayrıca bu ilaçlar, kanser hücresi üzerinde toksik etki göstermenin yanı sıra sağlıklı hücreler üzerinde de etki göstermektedir. Günümüzde, kanser hücresi ile sağlıklı hücreleri birbirinden ayırt ederek, kanser hücrelerini hedef alan antikanserojen ajanlar üzerine birçok çalışma yapılsa da kanser ilaçlarının sağlıklı hücreleri de etkilemesinin önüne geçilememiştir. Bu nedenle yeni antikanserojen ajan arayışları içerisine girilmiş, bu amaç doğrultusunda da son zamanlarda yapılan çalışmalarda çeşitli kanser tiplerine karşı sentetik, bitkisel ve fungus kaynaklı metabolitlerin antikanser etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalardan bazıları da bir mantar metaboliti olan, anti-mikrobiyal, anti-trozinaz, pestisit, anti-diyabetik ve anti-konvülsan aktiviteye sahip olan Kojik asiti (5-hidroksi-2-(hidroksimetil)-4H-piran-4-on) hedef almıştır. Bu çalışmada, anti-karsinojenik etkisi keşfedilmiş kojik asitin bir türevi olan patentli Koji MG84 bileşiğinin 4 farklı kanser hücre hattı ile bir sağlıklı hücre hattı üzerindeki anti-karsinojenik etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla, Koji MG84'ün 100µg/ml ile 0.39µg/ml aralığındaki 9 farklı konsantrasyonu DMSO içerisinde süspanse edilerek hazırlandı. Sitotoksik aktivitesi, doza ve zamana bağlı olarak MTT analizi ile test edildi. Sitotoksik aktivite çalışmalarının sonunda bileşik, 5,8µM'lik IC<sub>50</sub> değeri ile SK MEL hücre hattı üzerinde en yüksek anti-proliferatif etkiyi gösterirken, sağlıklı hücre hattı VERO üzerinde 30,3µM'lik IC<sub>50</sub> değeri göstermiştir. Koji MG84'ün SK MEL hücre hattı üzerindeki anti-proliferatif etkisi, VERO hücre hattı üzerindeki etki ile karşılaştırıldığında 5.5 kat daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızın sonuçlarına göre, Koji MG84'ün kanser tedavisi için umut verici bir ajan olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Anti-kanser Aktivite, Anti-karsinojenik Ajanlar, Kojik Asit, Kojilmetil Diklorobenzil Piperazin, Mannich Bazlar.

## **INVESTIGATION OF DOSE AND TIME-DEPENDENT ANTI-CANCER EFFECTS OF "KOJILMETHYL DICHLOROBENZYL PIPERAZINE", A KOJIC ACID DERIVATIVE, IN VITRO ENVIRONMENTS**

### **ABSTRACT**

Cancer is a fatal disease characterized by the uncontrolled proliferation of cells, their invasiveness and metastasis. Although the mechanisms of action of anticancer drugs used in chemotherapy are not known exactly, they are known to have a strong antiproliferative effect. In addition, these drugs have toxic effects not only on cancer cells but also on healthy cells. Today, although many studies have been conducted on anticarcinogenic agents targeting cancer cells by distinguishing cancer cells from healthy cells, it has not been prevented that cancer drugs affect healthy cells. For this reason, a search for new anticarcinogenic agents has been started, and in recent studies, the anticancer effects of synthetic, herbal and fungal metabolites against various cancer types have been investigated. Some of these studies also include Kojic acid (5-hydroxy-2- (hydroxymethyl) - 4H-pyran-4-one), a fungal metabolite, which has anti-microbial, anti-trosinase, pesticide, anti-diabetic and anti-convulsant activity. targeted. In this study, it was aimed to investigate the antiproliferative effect of the patented Koji MG84 compound, which is a derivative of kojic acid whose anti-carcinogenic effect was discovered, on 4 different cancer cell lines and a healthy cell line. For this purpose, 9 different concentrations of Koji MG84 in the range of 100 $\mu$ g / ml to 0.39 $\mu$ g / ml were prepared by suspending them in DMSO. Its cytotoxic activity was tested by MTT analysis depending on the dose and time. At the end of the cytotoxic activity studies, the compound showed the highest anti-proliferative effect on the SK MEL cell line with an IC<sub>50</sub> value of 5,8 $\mu$ M, while the IC<sub>50</sub> value of 30,3 $\mu$ M on the healthy cell line VERO. The anti-proliferative effect of Koji MG84 on the SK MEL cell line was 5.5 times higher compared to the effect on the VERO cell line. According to the results of our study, Koji MG84 is thought to be a promising agent for cancer treatment.

**Keywords:** Anti-cancer Activity, Anti-carcinogenic Agents, Kojic Acid, Kojylmethyl Dichlorobenzyl Piperazine, Mannich Bases.

## GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi, çoğalması ve metastaz yaparak başka doku ve organları istila etmesiyle karakterize olan ölümcül bir hastalıktır ve şu anda dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Kanser, ortak bir özellikle karakterize edilen karmaşık bir hastalık grubunu temsil eder: malign hücrenin, konağın olağan homeostatik büyüme kontrol mekanizmalarına yanıt vermemesi. Bu, habis progenitörleri tarafından tüm yavru hücrelere aktarılan otonom kanser hücresi çoğalmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu nedenle kanser, öncelikle genetik bir problem olarak algılanabilir, ancak kanser oluşumunda genetik faktörlerin yanında çevresel faktörler, beslenme alışkanlıkları, yaşam standartları, stres gibi birçok faktörün sinerjik etkileşimi ile kanser oluşumu daha sık görülmektedir. Kanser ayırt edici özellikleri, insan tümörlerinin çok aşamalı gelişimi sırasında kazanılan altı biyolojik yeteneği içermektedir [1]. Belirleyici özellikler, neoplastik hastalığın karmaşıklıklarını rasyonelleştirmek için bir organizasyon prensibi oluşturmaktadır. Bunlar, proliferatif sinyalleme sürdürmeyi, büyüme baskılayıcılarından kaçmayı, hücre ölümüne direnmeyi, replikatif ölümsüzlüğü sağlamayı, anjiyogenezi indüklemeyi ve istila ve metastazı aktive etmeyi içermektedir. Son on yıldaki kavramsal ilerleme, bu listeye potansiyel genelliğin ortaya çıkan iki ayırt edici özelliğini daha eklemiştir: enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve bağışıklık yıkımından kaçınma [2].

Kanserin neden olduğu ölümlerin çoğundan primer tümörler yerine, metastazlar sorumludur. Kanser tedavisi yaygın olarak, tümör dokusunun cerrahi işlemlerle çıkarılması, kemoterapi, radyoterapi ve hormon tedavisi ile desteklenmesi şeklinde ilerlemektedir. Kemoterapide uygulanan anti-karsinojenik ilaçların güçlü proliferatif etkilerinin olmasının yanı sıra etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca bu ilaçların çoğu yalnızca kanser hücrelerine spesifik olmayıp, aynı zamanda sağlıklı hücreleri ayırt edemeyerek sağlıklı hücreler üzerinde de toksisite göstermektedir. Bu dezavantaja ek olarak kanser hücreleri kemoterapide kullanılan bu ilaçlara direnç kazanarak tedaviyi etkisizleştirmektedir. Kemoterapideki bu

dezavantajların önüne geçmek, sadece kanser hücrelerini hedefleyerek hastanın sağlıklı dokularına hasar vermeyen anti-karsinojenik ajanları keşfetmek için sentetik, bitkisel ve fungus kaynaklı metabolitlerin arayışlarına geçilmiştir. İlaç keşfinde doğal ürünlerin rolü, özellikle kemoterapötik ajanların geliştirilmesi için çok büyüktür ve bu ürünler, mevcut antikanser ajan kaynaklarını besleyen birincil katkıda bulunan kaynaklardır. Doğal kaynakların katkısı, sadece modifiye edilmemiş ikincil metabolitlerin doğrudan uygulanmasıyla sınırlı olmayıp, aynı zamanda bunların yarı sentetik analogları gibi öncül yapıların türevlerine ve doğal ürünlerden esinlenen sentetik yapısal benzerliklerine kadar uzanmaktadır. Birçok ülkede, doğal kaynaklı metabolitlerin farklı kanser türleri üzerindeki anti-proliferatif etkilerini belirleme ve ilaç olarak kemoterapide uygulanabilirliğini sağlamaya yönelik çalışmalar hızla devam etmektedir. Bir mantar metaboliti olan kojik asit, keşfedilmesinden günümüze kadar birçok biyoaktivite çalışmalarına konu olmuş, farklı türevleri sentezlenerek ilaç ve dermokozmetik ürün formülasyonlarında yerini almıştır. Anti-karsinojenik aktivitesinin de keşfedilmesiyle, anti-kanser ajan çalışmalarına dahil edilmiş, bu doğrultuda çok fazla türevi sentezlenmiştir. Ancak, kojik asit ve türevlerinin kanser tedavisinde yerini alabilmesi, etki mekanizmalarının aydınlatılması ve formülasyonunun geliştirilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, 9 farklı konsantrasyonda hazırlanan, patentli, bir kojik asit türevi olan Koji MG84' ün farklı kanser hücre hatları üzerindeki anti-karsinojenik aktivitesini değerlendirmektir.

## 1. GENEL BİLGİLER

Bir mantar metaboliti olan kojik asit (5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one), Japonya'da Saito tarafından buharda pişirilmiş pirinçte yetiştirilen *Aspergillus oryzae* mantarının miselyumundan 1907 yılında izole edilerek keşfedilmiş ve 1924 yılında Yabuta tarafından yapısı aydınlatılmıştır [4]. 1930'da kimyasal sentezle D-glikozdan kojik asit elde edilmiştir [5]. Pek çok *Aspergillus*, *Acetobacter* ve *Penicillium* türü tarafından üretilen biyolojik olarak önemli bir mantar metabolitidir [4]. Kojik asit, herhangi bir değişiklik olmaksızın vakum koşullarında süblimleşen renksiz, prizmatik iğneler şeklinde kristalleşmektedir [6]. Erime noktası 151°C - 154°C arasında değişmektedir ve pKa değerleri 7.90 ve 8.03'tür. Kojik asit suda, etanolde ve etil asetatda çözünürken eter, alkol eter karışımı, kloroform ve piridinde daha az çözünmektedir. Bir C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub> formülü için kriyoskopik yöntemle belirlendiği üzere kojik asidin moleküler ağırlığı 142.1'dir [7]. Kojik asit, 280-284 nm'de maksimum ultraviyole absorpsiyon spektrumuna sahiptir. Kojik asit, 500 nm'de maksimum absorpsiyona sahip kırmızımsı mor renk üretmek için ferrik iyonlarla bir kompleks oluşturmaktadır [8]. Bu renklendirme, kojik asidin kantitatif tayini için temel bir yöntem olarak çok yararlıdır. Kojik asit, katılım, alkilasyon, açılasyon, oksidasyon, halka açma ve nükleofilik-elektrofilik yer değiştirme reaksiyonları gibi önemli kimyasal reaksiyon bölgesine dahil olan oksijen içeren bir iskelete sahip çok işlevli heterosiklik bir bileşiktir. Zayıf asidik özelliklere sahip çok işlevli, reaktif bir  $\gamma$ -piron olarak sınıflandırılır ve çeşitli totomerik formlarda bulunmasını sağlayan esnek bir yapıya sahiptir [6]. Kojik asidin doğal kaynağı, zararlı olmayan biyolojik bozunmasının, türetilmesi yoluyla biyolojik olarak aktif bileşiklerin geliştirilmesi için çekici ve karlı bir iskelet haline getirdiğini doğrulamaktadır. Halka üzerinde her pozisyonda reaktiftir ve metal şelatlar, piridonlar, piridinler, eterler, azodiler, mannich bazlar gibi endüstriyel kimyada değeri olan bir dizi ürün ve kojik asitten siyanoetilasyon ürünleri oluşturulabilir [9]. Karbon 5 pozisyonlarında, hidroksil grubu, sodyum, çinko, bakır, kalsiyum, nikel ve kadmiyum gibi birkaç metalle tuz oluşturabilen zayıf bir asit görevi görmektedir [6].

Karbon 5'in yan zincirleri, çekirdekdeki bitişik oksijen atomu tarafından reaktivitesi arttırılabilen birincil alkol gibi davranmaktadır [10]. Kojik asidin etki mekanizması iyi tanımlanmıştır ve hayvan ve bitki polifenol oksidazları, ksantin oksidaz ve bazı amino asit oksidazların rekabetçi ve geri dönüşümlü bir inhibitörü olarak hareket ettiği gösterilmiştir. Keşfedilmesinden günümüze esnek kimyasıyla oldukça dikkat çeken kojik asitin 20.yüzyıldan itibaren biyoaktivitesi arttırılmış çok fazla sayıda türevi sentezlenmektedir.

### **1.1. Kojik Asitin Kullanım Alanları**

Kojik asidin çeşitli alanlarda çeşitli uygulamaları vardır. Kozmetik sanayi, ilaç, gıda sanayi, tarım ve kimya sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde, kojik asit, hasat sonrası işlemden, zirai ürün için leke önleyici bir ajan olarak kullanılır. Ayrıca kojik asit, insektisit üretiminde kenetleme maddesi ve aktivatör olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca biyo-pestisit olarak kullanılmak üzere çok fazla kojik asit türevleri üretilmektedir. Antibakteriyel ve fungisidal özelliklerine göre kojik asit gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Kimya endüstrilerinde, azo boyaları ve diğer bazı önemli ve biyolojik olarak parçalanabilir bileşiklerin yapımında başarıyla kullanılmaktadır. Kimya endüstrisinde kojik asit, katyonların belirlenmesi için analitik bir araç olarak kullanılabilir, çünkü kojik asitin eser miktarda  $Fe^{+3}$  iyonları ile reaksiyonu koyu kırmızı bir kompleks oluşturabilmektedir. Tıp alanında kojik asit, potansiyel bir anti-bakteriyel, anti-mikrobiyal, anti-lösemik ve anti-fungal ajan olarak rapor edilmiştir [11]–[14]. Kojik asit, anti-inflamatuar bir ilaç ve ağrı kesici olarak tıp alanındaki ekonomik potansiyeli nedeniyle dikkat çekmeye devam etmektedir. Kojik asidin en çarpıcı faydası kozmetik ve sağlık hizmetleri endüstrilerinde bulunmaktadır. Kozmetik endüstrisinde kojik asit, ultraviyole radyasyonunun zararlı etkilerinden koruyan ve pigmentasyona neden olan tirozinaz aktivitelerini inhibe eden doğal bir cilt beyazlatıcı ajandır. Kojik asitin bir tirozinaz inhibitörü olması, özellikle malesma tedavisinde, cilt kararmasını önlemede, cilt rengini açmada ilaç ve dermokozmetik ürünlerin formülasyonunda yer almasını sağlamıştır. Özellikle cilt beyazlatıcı kremlerin, cilt koruyucu losyonların, beyazlatıcı sabunların ve diş bakım ürünlerinin üretimi için temel malzeme olarak işlev görmektedir. Kojik asit ve bazı türevleri, melanin oluşumunu inhibe ederek ve UV ışığından koruyucu etki yoluyla bir cilt beyazlatma etkisi elde etmek için

kozmetik preparatlarda kullanılmaktadır. Ayrıca kozmetik endüstrisi tarafından kullanılan bir antioksidandır ve cilt aydınlatmasında hidrokanona bir alternatif olarak tanımlanmıştır. Kozmetik ürünlerdeki varlığı, hem kimyasal hem de mikrobiyal bozunmaya karşı koruyucu etkileri sayesinde ürünün raf ömrünü de arttırmaktadır. Bu organik molekülün çeşitli kullanımları nedeniyle, kojik asit talebi hızla artmaktadır. Kojik asit pazarı, Charles Pfizer, ABD şirketinin bu organik asidi ilk üretme girişimini açıkladığı 1955'ten bu yana yaklaşık 40 yıldır gelişmektedir. Bu doğrultuda kojik asit üretimini iyileştirmeye yönelik çalışmalar halen yoğun bir şekilde yürütülmektedir. Birçok araştırmacı bunu yeni bileşiklerin hazırlanmasında başlangıç malzemesi olarak kullanmıştır. Endüstride kojik asitin önemi nedeniyle, kojik asitin üretimi artmaktadır ve kojik asitin biyosentezine önemli miktarda araştırma yapılmıştır ve çok sayıda yayın bu bileşiğin kimyasal ve biyolojik özelliklerini ele almıştır. Kojik asit, cilt beyazlatma ajanı olarak yaygın olarak kullanılmasına rağmen, birçok çalışma, anti-oksidan, anti-neoplastik, anti-inflamatuar, anti-bakteriyel, antiviral, anti-fungal, anti-konvülsan, anti-tirozinaz ve yaşlanma karşıtı özellik içerdiğini göstermiştir [5], [11], [15]–[20]. Ek olarak kojik asit, maltol ve türevlerinin hazırlanmasında önemli bir ara ürün olan kometik aside dönüştürülebilmektedir. Ayrıca kojik asit, tarımda bir kenetleme maddesi ve böcek ilacı etkinleştiricisi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.

## **1.2. Bir Tirozinaz İnhibitörü Olarak Kojik Asit**

Bakır içeren bir enzim olan tirozinaz (EC 1.14.18.1) mantarlar, bitkiler ve hayvanlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Tirozinaz, bakır içeren ve iki aşamalı bir reaksiyonda melanin sentezini düzenleyen bir enzimdir. Melanin, mikroorganizmalardan bitkilere ve hayvanlara kadar her yerde bulunan en önemli pigmentlerden biridir. Melanosit hücreleri tarafından salgılanır ve memelilerde deri ve saç rengini belirler. UV güneş ışığını emerek ve reaktif oksijen türlerini (ROS) ortadan kaldırarak cildi foto-karsinogenezden korumaktadır [21]. Melanogenez, cildin UV radyasyonuna maruz kalması üzerine melanositlerin tirozinaz tarafından başlatılan melanin ürettiği bir süreçtir. Tirozinaz, tirozinden melanin sentezlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Tirozinin monofenolaz olarak L-3,4-dihidroksifenil alanine (L-DOPA) hidroksilasyonu ve L-DOPA'nın difenolaz olarak dopakinona oksidasyonu yoluyla moleküler oksijeni içeren iki farklı reaksiyonu

katalize etmektedir. İnsan derisindeki melanin üretimi, UV ışığına karşı önemli bir savunma mekanizması olmasına rağmen, fazla epidermal pigment birikimi, melazma, yaşlılık lekeleri ve aktinik hasar alanları gibi çeşitli hiperpigmentasyon bozukluklarına neden olabilmektedir. Ek olarak melanomaya özgü antikarsinojenik aktivitenin tirozinaz aktivitesi ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. Polifenoloksidaz (PPO) olarak da bilinen tirozinaz ekspresyonu veya aktivitesi, pigmentasyon bozukluklarından sorumludur. Bu nedenle tirozinaz, pigmentasyon bozukluklarının tedavisi için çok önemli bir hedeftir. Ayrıca tirozinazın Parkinson hastalığı ve diğer nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu da bildirilmiştir [22], [23]. Aşırı düzeyde melanin pigmentasyonu, senil lentigo, melazma, postinflamatuar melanoderma, çiller, efelid, yaşlılık lekeleri gibi hiperpigmentasyonlar ve estetik problemlere yol açabilen aktinik hasar bölgeleri gibi çeşitli dermatolojik bozukluklara neden olmaktadır [24]. Tirozinaz enzim inhibitörleri, melanin hiperpigmentasyon bozukluklarını önlemek veya tedavi etmek için kullanılabilir. Melanin hiperpigmentasyonu ile ilişkili bazı dermatolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmasının yanı sıra tirozinaz inhibitörlerinin güneş yanığı sonrası depigmentasyon aktivitesi nedeniyle kozmetik endüstrisinde ilaç ve dermokozmetik ürün formülasyonuna dahil olmuştur. Tirozinaz inhibitörleri rekabetçi inhibitörler, rekabetçi olmayan inhibitörler, karışık tip inhibitörler ve rekabetçi olmayan inhibitörler olarak dört sınıfa ayrılmaktadır [25]. Kojik asit, monofenolaz aktivitesi üzerinde rekabetçi bir inhibitör etki ve mantar tirozinazının difenolaz aktivitesi üzerinde karışık bir inhibitör etki göstermektedir. Kojik asidin enzimin aktif bölgesinde bakırı şelatlama yeteneği, gözlemlenen rekabetçi inhibitör etkiyi açıklamaktadır. Tirozinazın aktif merkezindeki iki bakır iyonu UV ışınlarına maruz kaldığında tirozinazın daha aktif hale gelmesini sağlamaktadır. Kojik asit ise, tirozinazdaki bakır iyonu ile 5-hidroksil ve 4-karbonil grupları aracılığıyla bir şelat oluşturarak tirozinaz aktivitesini inhibe etmektedir. Son zamanlarda, kojik asit ve manganez, çinko metallerinin şelatları, gama ve radyo ışınlarına karşı koruyucu maddeler olarak bildirilmiştir[17], [26]. Ek olarak, kojik asidin tirozinazın difenolaz aktivitesinin yavaş bağlanan bir inhibitörü olduğu bildirilmektedir [27]. Bu, substratın varlığında katalitik döngüde üretilen aktif tirozinaz formunun, inhibitörün enzime bağlanmasından önce gerekli olduğu anlamına gelmektedir. Kojik asitin anti-tirozinaz aktivitesinden dolayı birçok çalışmaya konu olmuş, çok fazla sayıda türevi



sentezlenerek tirozinaz inhibisyon aktivitesi arttırılmak istenmiştir. Ayrıca, yeni tirozinaz inhibitörlerini keşfetmek için yapılan çoğu çalışmada, kojik asit iyi bilinen bir tirozinaz inhibitörü olarak pozitif bir standart olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Kojik asit, cildin hiperpigmentasyonunu tedavi etmek için klinik olarak kullanılan, doğal olarak oluşan bir tirozinaz inhibitörüdür. Bununla birlikte, kojik asit, önemli ölçüde toksisite ile yetersiz inhibitör aktiviteye ve stabiliteye sahiptir. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için, kojik asidin sentetik türevlerini geliştirilmeye devam edilmektedir. Kojik asit, 4. pozisyondaki keton grubu ve 5. pozisyondaki hidroksil grubu nedeniyle tirozinazın aktif bölgesinde bakır iyonunu şelatlayarak tirozinazı inhibe edebildiğinden, bakır için afinitenin artmasının daha güçlü bir tirozinaz inhibisyonu ile sonuçlanabileceği varsayılmaktadır. Bundan yola çıkarak yapılan bir çalışmada 3-hidroksipiridin-4-one'un karşılık gelen hidroksipiranonlardan daha yüksek bir bakır afinitesine sahip olduğu tahmin edildiğinden, N-1 pozisyonunda bir hidrofobik alkil grubu ile bir dizi 3-hidroksipiridin-4-on türevi sentezlenmiş ve tirozinaz aktiviteleri incelenmiştir. Bileşiklerden birinin (((S)-(5-(benzyloxy)-1-octyl-4-oxo-1,4-dihydropyridin-2-yl)methyl-2-amino-3-phenylpropanoate) mantar tirozinazına karşı güçlü inhibitör etki gösterdiği, monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri için IC<sub>50</sub> değerlerinin sırasıyla 12,6 ve 4,0 µM olduğu bulunmuştur. Ek olarak sentezlenen tüm konjugatların, hem serbest enzime hem de enzim – substrat komplekslerine bağlanabileceklerini düşündüren karışık tip inhibitörler olduğu gösterilmiştir. MTT analizinin sonuçlarına göre, aynı konjugatın üç hücre çizgisi için toksik olmadığını göstermiştir. Bu bileşiğin, gıda koruma ve kozmetikte uygulama için umut verici bir potansiyele sahip olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [28]. Nitrik oksit (NO), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ile sentezlenen önemli bir inflamatuvar mediyatördür. Aşırı NO üretimi iltihaplı hastalıklara yol açmaktadır. Bu nedenle, doğal kaynaklardan NO üretiminin güçlü inhibitörlerini bulmaya veya bunları doğal ürünleri değiştirerek geliştirmeye çok fazla çaba harcanmıştır. Her ne kadar kojik asit, kozmetikte bir depigmentasyon maddesi olarak ve gıdalarda bir tüylenmeyi önleyici bir madde olarak kullanılsa da, kojik asidin ayrıca serbest radikalleri temizlediği ve ışık hasarını önlediği bilinmektedir. Bununla birlikte, kojik asit ve türevlerinin NO inhibitörleri olarak kullanımı üzerine çok az çalışma yapılmıştır. Kojik asidin biyolojik aktiviteleri, bir enolik hidroksil grubu içeren γ-piranon yapısına atfedilmektedir. Enolik hidroksil

grubu korunursa, aktivitesi tamamen kaybolur. Daha öncelerde, kojik asidin 3,4-metilendioksisinnamik asit esterinin tirozinaz üzerinde kojik asitten daha güçlü inhibe edici etkiler sergilediği Ho Sik Rho ve ekibi tarafından bildirilmiştir [29]. Yine aynı ekibin kojik asidin ester türevleri üzerine yaptığı çalışmada, önceki çalışmadaki türevlere ek olarak 2-hidroksi benzoik asit ve adamantan parçaları içeren yeni kojik asit türevleri tasarlanmıştır [30]. 2-hidroksi benzoik asit grubu, kojik asidin enolik hidroksil grubu gibi bakıra kenetlenmektedir. İnhibisyon için gerekli yapıları belirlemek için, kojik asit türevlerinin ve 2,4-dihidroksi benzoik asit türevlerinin, lipopolisakkarit (LPS) ile aktive edilmiş makrofajlarda tirozinaz ve NO üretimine karşı inhibitör aktivitelerini değerlendirilmiştir. Tirozinaz testinde, kojik asidin sinamat veya benzoat esteri güçlü inhibe edici aktivite göstermiştir. Bununla birlikte, adamantan kısmını içeren kojik asidin hidroksibenzoat türevleri, hiçbir inhibitör aktivite göstermediği bildirilmiştir. NO üretimine karşı inhibitör aktiviteler LPS tarafından indüklendiğinde biraz farklı bir deneysel sonuç elde edildiği bildirilmiştir. Bir adamantan kısmı içeren 2,4-dihidroksibenzoik asidin metil veya etil esterleri, güçlü inhibe edici aktivite gösterdiği de sonuçlar arasında yer almıştır [30].

Cilt beyazlatıcılar, hiperpigmentasyonun neden olduğu cilt rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılabilen bir tür terapi yöntemidir. Melanin sentezini inhibe edebilmektedirler. Kojik asit ile yapılan birçok çalışma bu metabolitin yüksek anti-tirozinaz aktivite gösterdiğini kanıtlamış, bu özelliğinden yola çıkarak kojik asite göre arttırılmış anti-tirozinaz aktiviteye sahip türevlerini sentezleyerek hiperpigmentasyona bağlı cilt hastalıklarının tedavisinde ana etken madde olarak yer alması sağlanmıştır. Pek çok çalışmada kojik asit ester, kojik asit laureate, kojik asit dipalmitate ve aldehitli kojik asit etil fosfonat gibi çeşitli kojik asit türevlerinin kojik asitten daha etkili olduğu bildirilmiştir [17], [31], [32]. Hidrokanon cilt pigmentasyonunu azaltmada kullanılan etkili bir ajandır. Ancak hidrokanonun kanserojenitesi nedeniyle kullanımı birçok ülkede sınırlandırılmıştır. Kojik asit, pigmenti azaltmada hidrokanon kadar etkili bulunur bu nedenle FDA kojik asiti hidrokanon için bir alternatif olarak sunmuştur. Hidrokanonu tolere edemeyen hastalarda faydalıdır ve tahrişi azaltmak için topikal bir kortikosteroid ile kombine edilebilmektedir. Her iki ajanın kombinasyonu bu inhibisyonu daha da artırmaktadır.

% 2 Hidrokanon ile kombine kojik asit, diğerk formülasyonlarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha iyi sonuçlar göstermiştir. Ayrıca bazı çalışmalar kojik asitin malezma tedavisinde diğerk ajanlarla kombinsyonunun monoterapiden daha etkili olduğunu göstermiştir [33], [34].

Kojik asit ve türevleri tirozinaz inhibitör aktiviteleri nedeniyle ilaç ve kozmetik ürünlerde antioksidan, anti-proliferatif, anti-inflamatuar, UV radyosyonundan koruyucu ve cilt beyazlatma maddesi olarak kullanılmaktadır [26], [35], [36]. Ancak kozmetik uygulamalarında tahriş, kızarıklık, ciltte kaşıntı ve ağrı gibi bazı yan etkileri görülmüştür. Ayrıca hassas ciltlerde cilt kanseri ile sonuçlanabilmektedir. Ancak kojik asitin depigmentasyon ve güvenli uygulama mekanizmalarını değerlendirmek için yapılan çalışmaların sonucunda bu etkilerin kojik asitin yüksek dozdaki uygulamalarında görüldüğünü bildirilmiştir. Kojik asitin topikal preparasyonu için en iyi konsantrasyon aralığının% 1 veya daha az olduğu, çünkü bu aralıklarda kojik asit eriyiklerinin etkili ve güvenli özellikler gösterdiğini öne sürülmüştür [37]. Uluslararası kanser araştırma ajansı, memelilerin genetik toksisitesi üzerine in vivo çalışmalara dayanarak kojik asiti 3. grup kanserojen olarak tanıtmıştır [38]. Ayrıca, FDA reçetesiz farmasötik ürünlerde kullanım için kojik asiti onaylamamıştır. Ancak Avrupa Komisyonu Bilimsel Komitesi kojik asitin, akut, kronik, üretken ve genotoksisite şeklinde toksik olmadığını belirtip, kojik asitin cilt bakımı formülasyonunda güvenli dozunu % 1 olarak kabul etmiştir. Ek olarak, Kozmetik İçerik İnceleme Uzman Paneli' ne (Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, CIREP) göre kojik asitin %1 konsantrasyonda kozmetikte kullanılması güvenli olarak belirlenmiştir. Sitotoksitesinden kaynaklanan cilt tahrişi ve saklama sırasındaki dayanıksızlığı nedeniyle kozmetikte kullanımının sınırlandırılmasının önüne geçebilmek için, alkollü hidrosil grubunu bir ester, hidrosifenil eter, glikozit, amino asit türevleri veya tripeptit türevlerine dönüştürerek özelliklerini geliştirmek için birçok yarı sentetik kojik asit türevi sentezlenmiştir. Ancak, kojik asit ve türevlerinin diğerk potansiyel yararlarını veya risklerini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

### 1.3. Bir Anti-Karsinojen Ajan Olarak Kojik Asit

Kanser tedavisine yönelik çok çeşitli yaklaşımlar denenmiş ve klinik olarak (cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi) kullanılmış olmasına rağmen, kanser tedavilerinin toksik yan etkileri hastalar üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir ve kanseri tedavi etmedeki ilerlemeyi engellemektedir. Bitki türleri, binlerce yıldır tıbbi tedavide kullanılmaktadır. Ek olarak, bitkilerden türetilen metabolitlerin çeşitli terapötik amaçlar ve biyoteknolojik uygulamalar için yararlı olduğu bildirilmiştir. Bitki metabolitleri, kanser önleyici, analjezik, anti-inflamasyon ve anti-mikrobiyal aktiviteler dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik fonksiyonlar sergilemektedirler [39]. Ayrıca bitkiler, klinik olarak kullanılan ilaçların yaklaşık% 25'ini oluşturmaktadır [40]. Ek olarak anti-kanser aktivitesine sahip ilaçların% 60'ından fazlası bitkilerden elde edilmiştir [41]. Sonuç olarak bitki ve fungal metabolitler gibi çeşitli doğal ürünler birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta, kanser gibi tedavisi oldukça zor hastalıklarda sağkalımı arttırmak için araştırılmaya devam edilmektedir. Çok geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip, esnek bir yapısı olan kojik asitin anti-kanser aktivitesini aydınlatmaya yönelik ilk çalışmalar 1980'li yıllarda başlamış, sonrasında kanser hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisinin keşfedilmesiyle anti-karsinojenik ajan araştırması çalışmalarına dahil olmuştur. 1995 Yılında Janette Bransova ve ekibi kojik asitin halojen türevlerini sentezlemiş ve L1210 murin lösemi hücrelerinin büyümesini önleyici etkileri olduğunu göstermişlerdir [13]. Diğer bir çalışmada kojik asit ve 10 farklı türevi, olası antikanser etkileri açısından HEPG2 hücre hattı üzerinde test edilmiş ve bunların yedisinin sitotoksik olduğu gözlemlenmiştir [42]. Aynı çalışma, intrinsik apoptotik yolun, tedavinin hücre içi ROS'un artmasına, TP53 geninin indüksiyonuna ve kaspaz 3 / 7'nin aktivasyonuna yol açtığı için hücrelerin türevin IC<sub>50</sub> konsantrasyonuna maruz bırakılmasıyla tetiklendiğine işaret etmiştir. Pro-apoptotik Jnk ve Bax genlerinin tetiklenmemesi apoptotik yolun alternatif bir yoldan ilerlediğini düşündürmektedir [42]. Tamamlayıcı deneylere ihtiyaç duyulsa da, mevcut bulgular türevin uygulanan konsantrasyonlar dahilindeki sağlıklı hücelere zararlı olmadığı ve ilaç direncini uyardığı için hepatoselüler karsinoma karşı yeni bir umut verici yaklaşım sunduğunu göstermektedir. Kojik asidin etkili dozda sitotoksik olması ve saklama sırasında kimyasal dengesizliği bilinmektedir. Bununla birlikte kojik asit, yetersiz inhibitör aktiviteye ve stabiliteye sahiptir. Bu nedenle, düşük toksisiteye ve

yüksek etkinliğe sahip sentezlenmiş yeni kojik asit türevleri sentezlenmeye devam etmektedir. Kojik asit türevleriyle yapılan çok fazla çalışma bu bileşiklerin anti-karsinojenik sınıfına dahil edileceğini göstermiştir [16], [43]–[46].

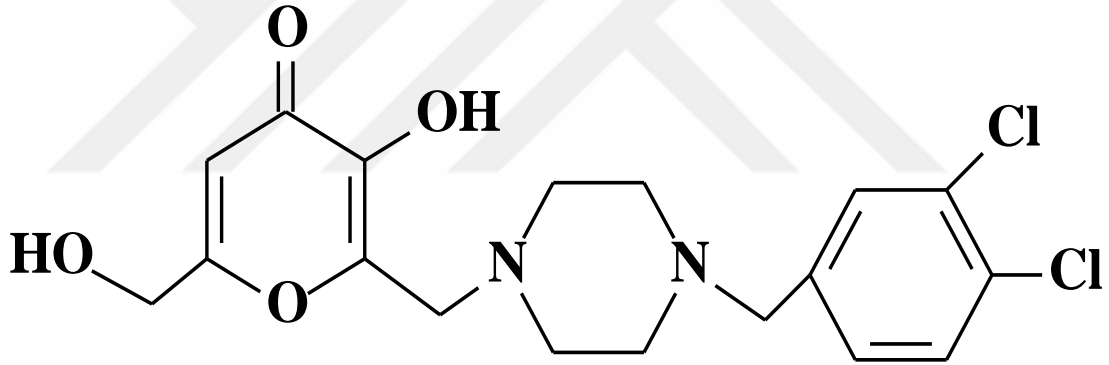
Sun-Long CHENG ve ekibi 2006 yılında yaptıkları çalışma ile DNA mikroarray teknolojisi kullanılarak, kojik asidin insan derisi A375 malign melanom hücrelerinin gen ekspresyonu profillemesi üzerindeki genel biyolojik etkileri incelemişlerdir. Kojik asit ile muameleden sonra, farklı şekilde ifade edilen toplam 361 gen, 136 yukarı-düzenlenmiş gen ve 225 aşağı-düzenlenmiş gen ile belirgin bir şekilde değiştirildiği bildirilmiştir [47]. Tipik olarak RT-qPCR analiz teknolojisi ile doğrulanan APOBEC1, ARHGEF16, CD22, FGFR3, GALNT1, UNC5C ve ZNF146'nın yedi aşağı regüle geninin, melanom kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı genler olduğu görülmüştür [47]. Bu nedenle, RT-qPCR ile birleştirilmiş mikrodizi teknolojisi, kojik aside ve biyolojik işlevlerine yanıt veren farklı şekilde ifade edilen genlerin sayısını keşfetmek için yüksek verimli bir yöntem sunmuş ve cilt kanseri terapisi ve ilgili yan etkiler üzerindeki kojik asit etkilerinin daha fazla anlaşılmasına yol açmıştır [47]. Ayrıca, farklı şekilde ifade edilen genler, daha ileri teşhis ve terapötik uygulamalar için deri habis melanomunun yararlı markörleri haline gelebilir. Bir başka çalışmada kojik asitin bazı yeni çinko (II), paladyum (II), platin (II), rutenyum (II), rodyum (III) ve gümüş (I) komplekslerinin hem yokluğunda hem de varlığında sentezleri, N- (2,2'-bipiridil) ve P- (trifenilfosfin) ligandları bildirilmiştir [48]. Aynı çalışmada, birkaç kompleksin in vitro antikanser aktiviteleri, insan yumurtalık hücre hatlarına karşı incelenmiştir. [Ag (ka) (PPh<sub>3</sub>)] 'ün hücre büyümesi proliferasyonu için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 8,80 ve 8,87 µM, cisplatin için karşılık gelen IC<sub>50</sub> değerleri 9,12 ve 10,07 µM olarak bildirilmiştir [48].

Bir diğer çalışmada, FTIR mikrospektroskopisi, sesamol ve kojik asidin melanogenez inhibisyonunda biyolojik değişimi tanımlamak için yeni bir yöntem bulma girişimi olarak kullanılarak, sesamol ve kojik asidin tirozinaz inhibisyonu ve melanin içeriği değerlendirilmiştir. Deney sonuçlarına göre sesamol ve kojik asit, sırasıyla 0,33mg/ml ve 6,1±0.4mg/ml' lik IC<sub>50</sub>'de mantar tirozinazını inhibe etmiştir [49]. Ayrıca, 30mg /ml sesamol, insan SK MEL 2 hücrelerinde % 23,55±8,25 hücresel tirozinaz aktivitesini inhibe ederken, 600 mg/ml kojik asit, aynı hücrelerde % 33,9±1.4 hücresel tirozinaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir [49]. Hem

sesamol hem de kojik asit, farklı derecelerde de olsa benzer bir anti-melanogenez aktivitesi modeli sergilemiştir. Bu çalışmanın sonuçları, insan melanom hücrelerinde biyomoleküler değişikliklerin karakterizasyonu için basit ve reaktifsiz bir yöntem olarak FTIR mikrospektroskopisinin alternatif kullanımını desteklemektedir [49].

Belirli bir farmasötik üretim ile yapılan yüksek saflıktaki (% 99) kojik asidin, özellikle Japonya'da topikal uygulama için kozmetik bir cilt beyazlatma ürünü (yarı ilaç) olarak yaygın bir şekilde kullanılmasının yanı sıra kanser tedavisinde de kullanılma potansiyeline sahip bir ajan sınıfı olduğu yapılan çalışmalar tarafından desteklenmektedir. Ancak kojik asitin terapötik indeksini arttırmaya ve yüksek dozlardaki sitotoksik etkisinin önüne geçmeye yönelik çalışmalara hala ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlara ek olarak faz çalışmalarına da ağırlık verilmelidir.

#### 1.4. Koji MG84' ün Yapısı ve Özellikleri



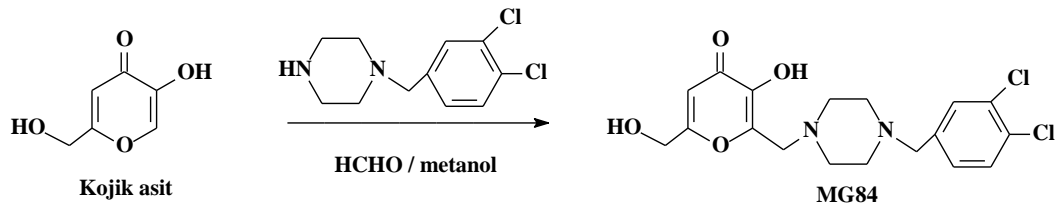
Şekil 1.1. Koji MG84' ün yapısı

Bir kojik asit türevi olan Koji MG84, kojik asit, piperazin ve formaldehitten hareketle sentezlenmiş patentli bir bileşiktir (IUPAC ismi: 2-((4-(3,4-Diklorobenzil)piperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(hidroksimetil)-4H-piran-4-on; INCI ismi: Kojilmetil Diklorobenzil Piperazin; CAS numarası: 2056101-70-1) (Patent numaraları: (TR2015 07653 B; WO 2016/209180 A1; US 9,975,884 B2; EP 16 732 363.3). Erime derecesi 180-1 °C, Verim: % 90'dır. Beyaz renkte toz kristaller halinde bulunmaktadır. Suda çözünmez, metanol, etanol ve asetonda az çözünür, kloroformda çözünür. Gliserinde süspande olur.

Tablo 1.1. Koji MG84' ün elemental analizi

Elemental Analiz	: C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (M.A.: 399.27 g/mol)		
	%C	%H	%N
Hesaplanan	: 54.15	5.05	7.02
Bulunan	: 54.01	5.10	7.27

IR spektrumunda 1607 (C=O, gerilim), 1455 (C=C, gerilim), 1196 cm<sup>-1</sup>'de (C-O, gerilim) pikler görülmektedir. 1H-NMR spektrumunda  $\delta$  (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) 2.37 (4H; brs; piperazin), 2.47 (4H; brs; piperazin), 3.45 (2H; s; -CH<sub>2</sub>-), 3.51 (2H; s; -CH<sub>2</sub>-fenil), 4.28 (2H; s; -CH<sub>2</sub>OH), 5.61 (1H; brs; -CH<sub>2</sub>OH); 6.31 (1H; s; H<sub>5</sub>), 7.28 (1H; dd; J= 8; J= 2; Ar-H<sub>6</sub>'), 7.51 (1H; d; J= 2; Ar-H<sub>2</sub>'), 7.56 (1H; d; J= 8; Ar-H<sub>5</sub>') 8.89-8.98 (1H; br; -OH) pikler görülür. 13C-NMR spektrumunda  $\delta$  (DMSO, 400 MHz) 52.27 (-CH<sub>2</sub>), 52.32 (-CH<sub>2</sub>), 53.46 (-CH<sub>2</sub>), 59.51 (-CH<sub>2</sub>), 60.24 (-CH<sub>2</sub>), 108.85 (-CH), 128.84 (-CH), 129.24 (-CH), 130.24 (-CH), 130.33 (-Cfenil), 130.74 (-Cfenil), 139.56 (-Cfenil), 143.59 (-Cpiron), 146.41 (-Cpiron), 167.49 (-Cpiron), 173.49 (-Cpiron) de pikler görülmektedir. Kütle spektrumunda (ESI-MS) m/z 399 (% 100, M<sup>+</sup>), 401 (M<sup>++2</sup>), 421 (M<sup>++Na</sup>)' de pikler görülmektedir [50].



Şekil 1.2. Koji MG84' ün sentezi

Koji MG84' ün *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*, *Epidermophyton floccosum* ve *Microsporum gypseum*' a karşı anti-dermatofitik aktivitesi ve aynı zamanda *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) ve *M. avium* (ATCC 15769) karşı anti-mikobakteriyel aktivitesi MRC-5 ve HeLa hücre hatları üzerinde toksik olmayan konsantrasyonlar altında analiz edilmiştir [51]. Ayrıca anti-tirosinaz aktivitesi, substrat olarak L-DOPA kullanılarak spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Ek olarak anti-oksidan aktivitesi 2,2-difenil-1-pikrilhidrasil (DPPH), N, N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD) radikal süpürme aktivitesi, metal şelasyon

etkisi, demir- (FRAP), phosphomolybdenum (PRAP) indirgeyici antioksidan gücü yöntemleri ile belirlenmiştir. Yaşlanma karşıtı aktiviteyi belirlemek için elastaz ve kolajenaz enzim inhibisyonları gerçekleştirilmiştir [52]. Anti-tirozinaz, anti-oksidan, yaşlanma karşıtı, anti-dermatofitik ve anti-mikobakteriyel etkileri nedeniyle, Koji MG84 tıp, kozmetik, gıda ve tekstil endüstrisinde kullanılabilir [50].

Koji MG84'ün dopamin yolu ile hem fungal tirozinazı hem de insan tirozinazı inhibe ettiği gösterilmiştir. Özellikle Koji MG84'ün, şu anda cilt kanserinin tedavisinde kullanılan vemurafenib kadar melanogenezi inhibe ettiği bulunmuştur. Koji MG84, fungal tirozinazı, standart bileşik kojik asitten altı kat daha fazla inhibe etmiştir. Ayrıca Koji MG84 sağlıklı insan hücreleri HGF-1 insan gingival fibroblast ve MRC-5 akciğer fibroblast hücre hatları için toksik olmamakla birlikte A375 malign melanoma hücrelerine karşı sitotoksik etkiye sahip olduğu ve melanogenez yolunu baskıladığı gösterilmiştir. Kojik aside benzilpiperazin grubu eklenerek daha lipofilik ve bazik Koji MG84 sentezlenmiştir. Böylece, elde edilen bileşiğin yağda çözünürlüğü artırılarak kojik asidin düşük geçirgenlik sorunu ortadan kaldırılmıştır [51].

Koji MG84 mantar tirozinazını standart bileşik kojik asite kıyasla 6 kat daha fazla inhibe etmektedir. Ayrıca leke giderici, cilt rengi açıcı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca irrite edici olmadığı ve non-sitotoksik olduğu bildirilmiştir [50].

Koji MG84 ile yapılan çalışmalar, bu bileşiğin güçlü bir tirozinaz inhibitörü olmasının yanı sıra anti-dermatofitik, anti-bakteriyel biyoaktivite sergilediğini göstermiş ve aynı zamanda güçlü bir de anti-karsinojen ajan olabileceğini desteklemiştir. Ayrıca Koji MG84 bir cilt açıcı ajan olarak da dermokozmetik formülasyonlarında da yerini almaya başlamıştır. Yine de biyoaktivitesini arttırmak, ve kanser tedavisinde de ana bileşik olarak yer alabilmesi için kanser hücreleri üzerindeki aktivitesini aydınlatmaya yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, Koji MG84'ün çeşitli kanser hücreleri üzerindeki anti-karsinojenik etkisini gösteren bir çalışma olmamasından yola çıkarak, Koji MG84' ün dört farklı kanser hattı üzerindeki (A549 (İnsan akciğer karsinomu), SK MEL (İnsan melanoma karsinomu), HT 29 (insan kolorektal adenokarsinomu), SK-BR 3 (İnsan meme adenokarsinomu) ) anti-proliferatif etkisini belirlemek amaçlanmıştır.



Aynı zamanda bileşimin kanser hücre hatlarındaki sitotoksik aktivitesi, sağlıklı hücre hattı Vero (Afrika yeşil maymunu böbrek epiteli) üzerindeki sitotoksik aktivitesi ile karşılaştırılarak terapötik indeksi ile toksik dozu değerlendirilmiştir.



## **2. MATERYAL VE METOD**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Koji MG84' ün elde edilmesi**

Bu çalışmada Ankara'da faaliyet gösteren Koji Kozmetik Kim. San. Tic. Aş. tarafından temin edilen Koji MG84 bileşiği kullanıldı.

#### **2.1.2. Kullanılan teknik aletler**

- Laminar-hava akışlı kabin
- CO<sub>2</sub>'li inkübatör
- Inverted mikroskop
- Ultrasonik su banyosu
- Otomatik pipet tabancası
- Mikroplaka okuyucu

#### **2.1.3. Hücre Kültürü Ve Sitotoksite Testi İçin Kullanılan Hücre Hatları**

- A-549 (İnsan akciğer karsinomu)
- SK MEL (İnsan melanoma karsinomu)
- HT 29 (insan kolorektal adenokarsinomu)
- SK-BR 3 (İnsan meme adenokarsinomu)
- Vero (Afrika yeşil maymunu böbrek epiteli)

### **2.2. Metod**

#### **2.2.1. Koji MG84' ün stok solüsyonlarının hazırlanması**

Koji MG84' ü çözmek için DMSO kullanılır. Molekül konsantrasyonu 20 mg toz halindeki madde için 1000 ml DMSO olarak belirlenmiştir. Ana stoktan 8,7 mg toz halindeki molekül tartıldı, üzerine 435 ml DMSO eklendi. Su banyosunda yeteri kadar çözünmediği için ultrasonik su banyosu kullanıldı. 40°C'de, yaklaşık 24-36 saat aralığında molekül çözünmüştür. Aynı zamanda metalle etkileşim göstermesi istenmediğinden kağıt bisturi kullanıldı. Kullanılacak konsantrasyonlar 1/100, 1/50, 1/25, 1/12,5, 1/6,25, 1/3,125, 1/1,562, 1/0,78 ve 1/0,390 olarak belirlenmiştir.

Konsantrasyon aralığı doza bağılı olarak 100 – 0,39 µg/ml olarak belirlenmiştir. Hazırlanan çözeltiler +4°C’de saklanmıştır.

1/100’lük konsantrasyon için; 8,7 mg madde, 435 ml DMSO içerisinde çözüldü. Diğer konsantrasyonlar ½ oranında olacak şekilde seri dilüsyon yöntemi ile hazırlandı.

### **2.2.2. Hücrelerin kültüre edilmesi**

Derin dondurucudan çıkarılan hücreler, +37°C’deki su banyosuna konuldu ve çözülünceye kadar bekletildi. Daha sonra çözülme işlemi biter bitmez %70’lik alkol ile tüpler steril edildi ve hücreler kabin içerisine alındı. Hücreleri strese sokmamak adına 5 ml besiyeri damla damla hücrelerin üzerine eklendi. Daha sonra +4°C’de 1000 rpm (200 g)’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santifügasyondan sonra süpernatant kısmı atıldı, pellet üzerine 5 ml besiyeri eklendi. Yavaşça pipetaj yaparak hücrelerin besiyeri içerisinde eşit dağılması sağlandı. Daha sonra hücreler T75’lik flasklara aktarıldı ve 37°C’de %5 CO<sub>2</sub>’li inkübatör içerisinde inkübasyona bırakıldı.

### **2.2.3. Hücrelerin pasajlanması**

Pasajlama işlemi, flasklarda tek tabaka halinde bulunan hücrelere zarar vermeden, yüzeyden ısı ve tripsin yardımıyla kaldırıp sıvı içinde süspanse ederek başka ortama aktarılma prensibine dayanır. Her hücre tipi, kendine özgü bir hızla bölünerek çoğalır. Hücreler konfluent duruma gelince hem besi ortamı hücreler için yetersiz hale gelir, hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalmaları durur. Bu nedenle hücrelerin pasajlanması gerekir.

Hücre kültür ortamı, PBS ve tripsin-EDTA su banyosunda 37°C’ye ısıtıldı. Monolayer olarak üretilen hücrelerin yetiştirildiği kültür kaplarındaki, kullanılmış besi ortamı hücrelere zarar vermeyecek şekilde uzaklaştırıldı. Daha sonra hücrelerin olmadığı yüzeyden PBS ortama eklendi ve yavaşça 2-3 kez hücreler üzerinde dolaştırılarak PBS ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı. Daha sonra, yine hücrelerin bulunmadığı yüzeyden, tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildikten sonra hücrelerin üzerinde tamamen yayılması sağlandı. Kültür kapları inkübatöre kaldırılarak tripsin-EDTA solüsyonunun enzimatik reaksiyon göstermeleri sağlandı. Bu işlemle

hücrelerin yuvarlaklaşarak yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Bu süre, her kültüre göre farklı olacağı için hücreleri uzun süre solüsyon içerisinde bekletmemek gerekir. Hücreler mikroskopta incelenerek kalkıp kalkmadığı kontrol edildi. Hücreler yüzeyden kalktıktan sonra tripsin-EDTA solüsyonunun aktivasyonunu durdurmak için ortama 6-7 ml besiyeri eklendi ve hücreler homojenize edildi. Daha sonra hücreler santrifij tüpüne aktarıldı. 5 dakika +4°C'de 1000 rpm (200 g)'de santrifüj edildi. Besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve tüpe 10 ml besiyeri eklendi. Yavaşça pipetaj yaparak hücre paketlerinin parçalanarak homojen bir hücre süspansiyonunun oluşması sağlandı. Hücre süspansiyonu pipet yardımıyla T75'lik flaskların içine aktarıldı ve kültür kabının üzerine hücre adı, pasaj numarası, tarihi yazıldı. Bu işlemlerden sonra kültür kapları üreme yüzeyleri alta gelecek şekilde inkübatöre konuldu.

#### **2.2.4. MTT hücre canlılık analizi**

Koji MG84'ün çeşitli kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesini belirlemek üzere MTT deneyi kullanıldı. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid), sarı renkli bir tetrazolyum tuzudur. 1983'te Mosmann tarafından geliştirilen MTT analiz yöntemi, günümüzde en yaygın olarak kullanılan hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksikite belirleme yöntemlerinin başında gelmektedir. MTT' nin tetrazolyum halkası süksinat dehidrogenaz enzimleri tarafından parçalanarak formazan denilen yapıya dönüşür ve sonucunda sarı renkli MTT bileşiği mor renge döner. Tetrazolyum halkasındaki bu kırılma ancak canlı hücrelerin aktif mitokondrileri tarafından kırılabilir. Dolayısıyla yalnızca canlı hücreler mor renkli formazan kristalleri oluşturabilir. Bu kristaller suda çözünmez, DMSO veya izopropil alkolde çözünür. Hücre canlılığının spektrofotometrik olarak belirlendiği bu testte uygulama yapılmayan hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek, uygulama yapılan hücrelerin canlılığı bu hücrelere göre yüzde (%) olarak belirlenir.

Hücre kültürü örnekleri (1:1) %0.5 (w/v) Tripan mavisi ile seyreltildi, bu karışımdan 100 µl Neubauer hemositometreye konuldu ve ışık mikroskobu altında gözlemlendi. Hem toplam hücre sayısı hem de canlı hücrelerin sayısı 0.11 mm<sup>3</sup>'lük alan görünümünde sayıldı.

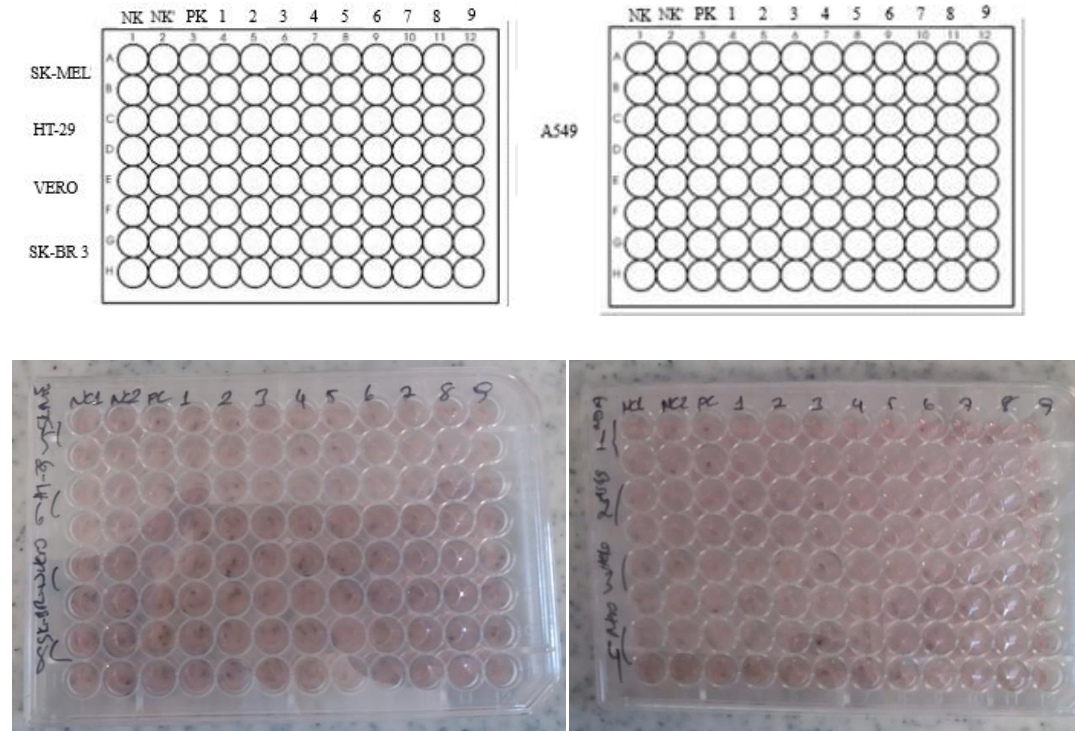
Hücre sayısı şu şekilde hesaplanmıştır:

$$\text{ml}^{-1} \text{deki hücre sayısı} = (n \times \text{Dilüsyon Faktörü}) \times \text{Düzeltilme Faktörü}$$

Burada  $n$ ,  $0.11 \text{ mm}^3$  başına denk gelen ortalama hücre sayısıdır.

Hücreler  $6 \times 10^3$  hücre/ml olacak şekilde besi ortamı ile dilüe edildi. Hücreler,  $6 \times 10^3$  hücre / well yoğunlukta 96 kuyulu mikrotitre plakalarına yerleştirildi, daha sonra hücreler,  $100 \mu\text{g/ml}$  ile  $0.39 \mu\text{g/ml}$  arasında değişen dokuz konsantrasyonda Koji MG84 ile işleme tabi tutuldu ve 48 saat süreyle inkübe edildi. Negatif kontrol 1 % 0.1 DMSO, negatif kontrol 2 hücre ve DMSO içerirken, pozitif kontrol doksorubisin  $10 \mu\text{g/ml}$  idi.

Deney düzeneği:



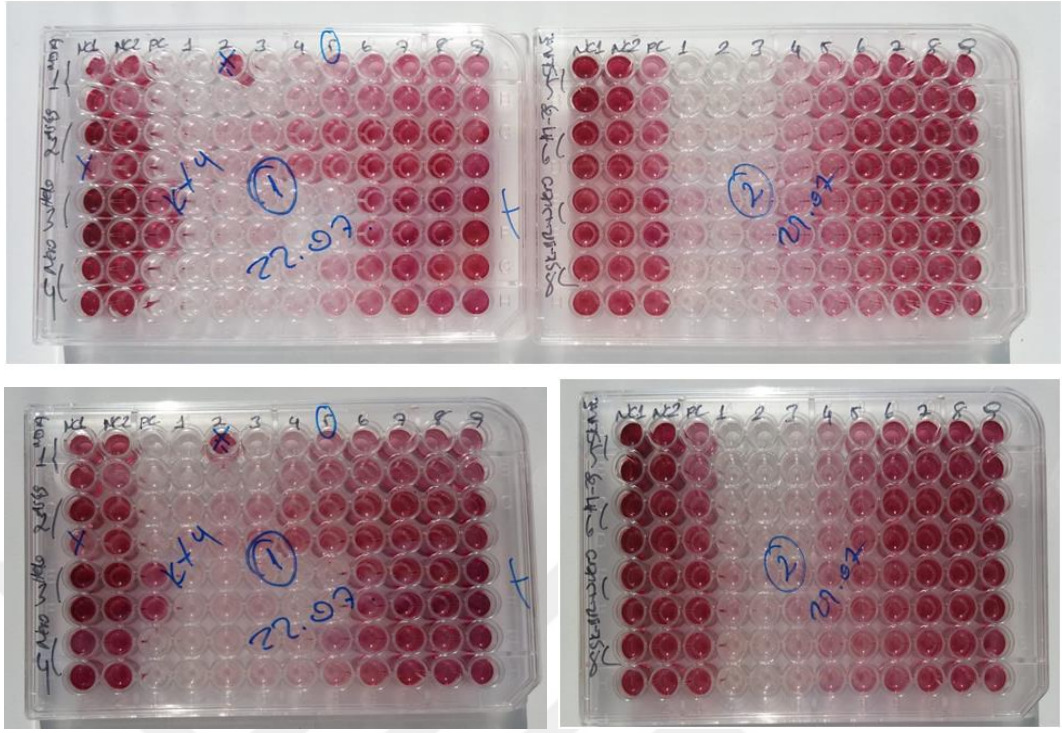
Şekil 2.1. Deney düzeneğinin kurulumu NK; sadece hücre, NK2 : Hücre ve DMSO, PK; Etkisi bilinen sitotoksik bir madde-Doksorubisin, 1; 1/100 konsantrasyonunda Koji MG84, 2; 1/50 konsantrasyonunda Koji MG84, 3; 1/25 konsantrasyonunda Koji MG84, 4; 1/12,5 konsantrasyonunda Koji MG84, 5; 1/6,25 konsantrasyonunda Koji MG84, 6; 1/3,125 konsantrasyonunda Koji MG84, 7; 1/1,562 konsantrasyonunda Koji MG84, 8; 1/0,780 konsantrasyonunda Koji MG84, 9; 1/0,390 konsantrasyonunda Koji MG84

Doza bağı MTT analizi için hazırlanan Hücrelerin bulunduğu pleytlerdeki besi ortamı boşaltıldı ve 100µl/well MTT çalışma solüsyonu eklenip,72 saat boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda solüsyon boşaltılıp, 200µl DMSO eklenerek oluşan formazan kristalleri çözülmüştür. Ardından, mor formazan ürün miktarları mikropılaka okuyucu (Versamax, Tunable Microplate Reader, ABD) kullanılarak 570 ile 690 nm arasında ölçülmüştür. MTT testi yapılırken, işlemlerin tümü olabildiğince az ışıklı ortamda yapılmıştır.

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, çalışmaların devamında SK MEL, SK BR 3 ve VERO hücre hatları ile zamana bağı bir sitotoksik etki çalışması yapılmasına karar verilmiştir. SK-BR-3, SK MEL kanser hücreleri ve VERO sağlıklı hücre hatları üzerinde Koji MG84'ün zamana bağı sitotoksik analizi, MTT testi ile kullanılarak yapılmıştır. Hücreler, 6x10<sup>3</sup> hücre/well olacak şekilde 96 kuyulu mikropılaka plakalarına yerleştirildi ve hücreler, her oyuğa 3.13µg/ml konsantrasyonundaki Koji MG84'e maruz bırakıldı, ardından 48, 72, 96, 120 ve 144 saat inkübasyon yapıldı. Hücreler, % 0,1 DMSO (negatif kontrol 1), hücre+DMSO (negatif kontrol 2) ve doksorubisin (pozitif kontrol) 10µg/ml ile muamele edildi. Bir mikropılaka okuyucu (Versamax, Ayarlanabilir Mikropılaka Okuyucu, ABD) kullanılarak 570-690 nm'de absorbans değeri ölçüldü. Sitotoksik etkiler, hücre canlılığı yüzdesine göre ifade edildi.

### **2.2.5. İstatistik**

Verilerin istatistiksel analizleri Microsoft Office-Excel 2010 kullanarak, 'Student's t-testi ile yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermek için P≤0.05 değeri değerlendirildi ve anlamlılığın gücünü göstermek için P≤0.01 kullanıldı. Veriler ortalama değerler ± S.D olarak sunulmuştur (Ortalamanın Standart Hatası). Deneyler / kültürler, her konsantrasyon için üç kopya halinde gerçekleştirildi.

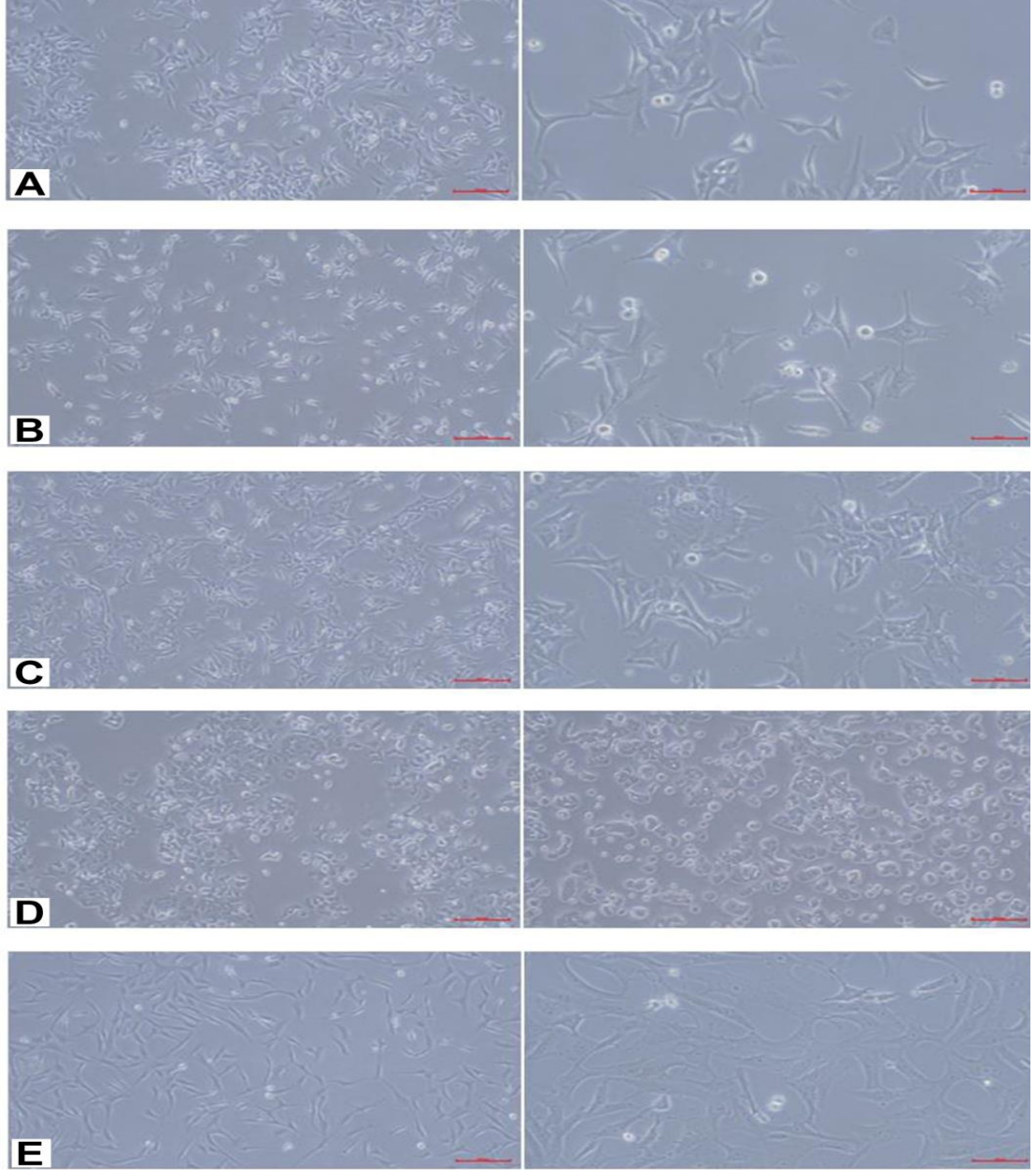


Şekil 2.2. MTT testi için hazırlanan hücreler (NK: Negatif kontrol (sadece hücre) NK': Negatif Kontrol 1 (Hücre+DMSO), PK: Pozitif Kontrol (Etkisi bilinen sitotoksik bir madde-Doksorubisin))



### 3. BULGULAR

Koji MG84 ile muamele edilmiş A549, SK MEL, HT 29, SK-BR 3, VERO hücre hatlarına karşı IC<sub>50</sub> değerleri, yüzde hücre canlılık oranları aşağıdaki tablo, grafik ve şekillerde verilmiştir.



Şekil 3.1. Hücre hatlarının inverted ışık mikroskop mikroskobu altındaki görüntüleri. A) A549 Hücre hattı mikroskopik görüntüsü sırasıyla 4X ve 10X. B) SK BR 3 Hücre hattı mikroskopik görüntüsü sırasıyla 4X ve 10X. C) SK MEL Hücre hattı mikroskopik görüntüsü sırasıyla 4X ve 10X. D) HT 29 Hücre hattı mikroskopik görüntüsü sırasıyla 4X ve 10X. E) VERO Hücre hattı mikroskopik görüntüsü sırasıyla 4X ve 10X.



### 3.1. Doza Bağlı Sitotoksisite Bulguları

A549 hücre hattının 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.78 ve 0.39µg/ml konsantrasyonlarındaki Koji MG84 ile 72 saatlik muamelesinde sırasıyla %12.6, 14.0, 19.5, 32.8, 37.3, 52.6, 61.2, 58.0, 66.2' lik hücre canlılık görülmüştür.

Tablo 3.1. 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39 µg/ml Koji MG84' ün A549 hücre hattının hücre canlılık yüzdesine etkisi. NK, negatif kontrol (hücre+medium), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin, 10 µg/ml )

A549		Konsantrasyonlar (µg/mL)									
	NK (%0,1DMS O ve hücre)	PK	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39
Koji MG 84	100 (±0)	7.3 (±0.4)	12.5 (±0.4)	14.0 (±0.4)	19.5 (±0.5)	32.8 (±0.6)	37.3 (±0.6)	52.6 (±0.8)	61.2 (±0.9)	58.0 (±0.9)	66.2 (±0.9)

SK MEL hücre hattının 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.78 ve 0.39µg/ml konsantrasyonlarındaki Koji MG84 ile 72 saatlik muamelesinde sırasıyla %5.0, 5.2, 6.1, 15.5, 28.0, 45.0, 58.1, 64.6, 76.2' lik hücre canlılığı görülmüştür.

Tablo 3.2. 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39 µg/ml Koji MG84' ün SK MEL hücre hattının hücre canlılık yüzdesine etkisi. NK, negatif kontrol (hücre+medium), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin, 10 µg/ml )

SK MEL		Konsantrasyonlar (µg/ml)									
	NK (%0,1DMS O ve hücre)	PK	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39
Koji MG 84	100 (±0)	28.2 (±0.6)	5.0 (±0.3)	5.2 (±0.4)	6.1 (±0.4)	15.5 (±0.4)	28.0 (±0.6)	45.0 (±0.7)	58.1 (±0.9)	64.6 (±0.9)	76.2 (±0.9)

SK BR 3 hücre hattının 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.78 ve 0.39 $\mu$ g/ml konsantrasyonlarındaki Koji MG84 ile 72 saatlik muamelesinde sırasıyla %11.7, 11.4, 17.0, 26.9, 39.3, 47.5, 75.7, 95.3, 96.8'lik hücre canlılığı görülmüştür.

Tablo 3.3. 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39  $\mu$ g/ml Koji MG84' ün SK-BR 3 hücre hattının hücre canlılık yüzdesine etkisi. NK, negatif kontrol (hücre+medium), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin, 10  $\mu$ g/ml )

SK-BR 3		Konsantrasyonlar ( $\mu$ g/ml)									
	NK (%0,1DMS O ve hücre)	PK	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39
<b>Koji MG 84</b>	100 ( $\pm$ 0)	86.8 ( $\pm$ 1.1)	11.7 ( $\pm$ 0.4)	11.4 ( $\pm$ 0.5)	17.0 ( $\pm$ 0.5)	26.9 ( $\pm$ 0.6)	39.3 ( $\pm$ 0.7)	47.5 ( $\pm$ 0.8)	75.7 ( $\pm$ 1.0)	95.3 ( $\pm$ 1.2)	96.8 ( $\pm$ 1.2)

HT 29 hücre hattının 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.78 ve 0.39 $\mu$ g/ml konsantrasyonlarındaki Koji MG84 ile 72 saatlik muamelesinde sırasıyla %12.0, 9.7, 11.9, 23.1, 38.5, 103.2, 87.8, 112.2, 89.6' lik hücre canlılığı görülmüştür.

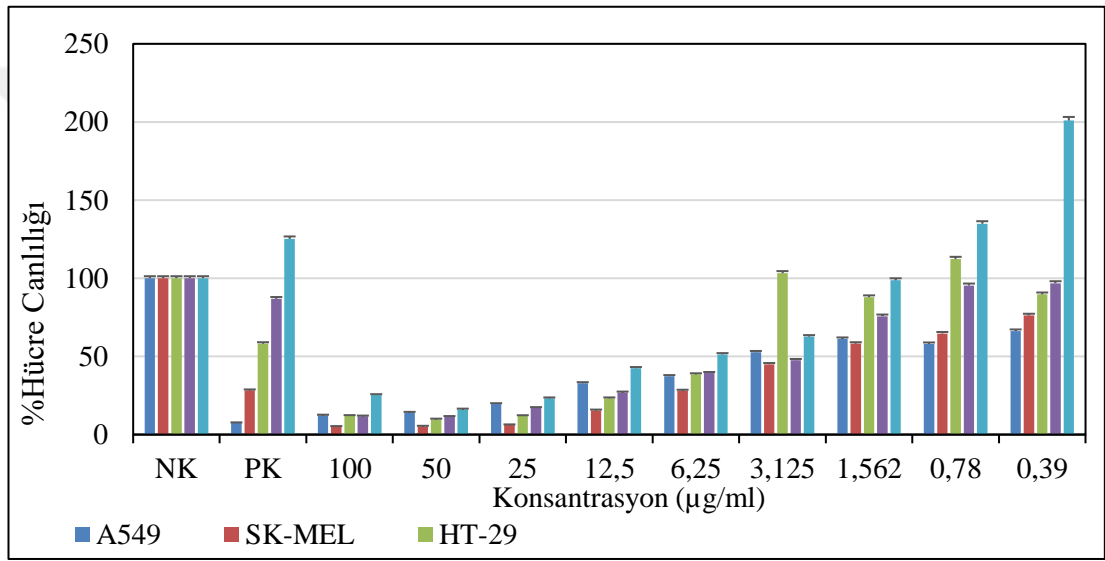
Tablo 3.4. 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39  $\mu$ g/ml Koji MG84' ün HT 29 hücre hattının hücre canlılık yüzdesine etkisi. NK, negatif kontrol (hücre+medium), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin, 10  $\mu$ g/ml ).

HT 29		Konsantrasyonlar ( $\mu$ g/ml)									
	NK (%0,1DMS O ve hücre)	PK	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39
<b>Koji MG 84</b>	100 ( $\pm$ 0)	58.1 ( $\pm$ 0.9)	12.0 ( $\pm$ 0.4)	9.7 ( $\pm$ 0.4)	11.9 ( $\pm$ 0.5)	23.1 ( $\pm$ 0.5)	38.5 ( $\pm$ 0.7)	103.2 ( $\pm$ 1.3)	87.8 ( $\pm$ 1.2)	112.2 ( $\pm$ 1.4)	89.6 ( $\pm$ 1.2)

VERO hücre hattının 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781 ve 0.390 $\mu$ g/ml konsantrasyonlarındaki Koji MG84 ile 72 saatlik muamelesinde sırasıyla %25.2, 16.1, 23.2, 42.4, 51.2, 62.6, 98.6, 134.8, 200.9' luk hücre canlılığı görülmüştür.

Tablo 3.5. 100,50,25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39µg/ml Koji MG84' ün VERO hücre hattı hücre canlılık yüzdesine etkisi.NK, negatif kontrol (hücre+medium),PK pozitif kontrol,(doksorubisin, 10µg/ml)

VERO		Konsantrasyonlar (µg/m)									
	NK (%0,1DMS O ve hücre)	PK	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39
Koji MG 84	100 (±0)	125.1 (±1.5)	25.2 (±0.5)	16.1 (±0.4)	23.2 (±0.5)	42.4 (±0.7)	51.2 (±0.8)	62.6 (±0.9)	98.6 (±1.3)	134.8 (±1.6)	200.9 (±2.3)



Şekil 3.2. 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39 µg/ml Koji MG84'ün farklı tümör hücre hatlarının (SK MEL, SK-BR-3, A549, HT-29) ve VERO normal hücre hattının hücre canlılık yüzdesi üzerindeki etkisinin karşılaştırılması. NK, negatif kontrol (% 0.1 DMSO), PK, pozitif kontrol (doksorubisin 10 µg/ml)

### **3.2 Koji MG84' ün çeşitli kanser hücreleri üzerinde elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri**

Her hücre hattı, Koji MG84' ün 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.78 ve 0.39µg/ml konsantrasyonlarında 72 saat boyunca 37°C' de inkübe edilerek, MTT analizi ile bileşiğin IC<sub>50</sub> değerleri her hücre hattı için belirlenmiştir. Her analiz ve her bir hücre hattı için üç bağımsız analizden elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

Koji MG84 ile yapılan sitotoksikite çalışmalarına göre, Koji MG84 en yüksek sitotoksik etkiyi, diğer bir deyişle en düşük IC<sub>50</sub> değerini SK MEL hücre hattında göstermiştir. SK MEL hücre hattı için Koji MG84' ün IC<sub>50</sub> değeri 5,8µM olarak belirlenmiştir.

SK MEL hücre hattından sonra, SK MEL' e oldukça yakın bir IC<sub>50</sub> değeri sergileyen SK-BR 3 hücre hattı için Koji MG84' ün IC<sub>50</sub> değeri 6,1µM olarak belirlenmiştir.

Koji MG84, A549 hücre hattı üzerinde 8,3µM oranında IC<sub>50</sub> değeri sergileyerek, SK MEL ve SK-BR 3 hücre hattına yakın bir sitotoksik etki göstermiştir.

Koji MG84' ün HT 29 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini gösteren IC<sub>50</sub> değeri 13,3µM olarak belirlenmiştir.

Tüm kanser hücre hatlarında birbirine yakın ve düşük IC<sub>50</sub> değerlerine sahip olan Koji MG84, sağlıklı hücre grubunu temsil eden VERO hücre hattı üzerinde 30,3µM' lik yüksek IC<sub>50</sub> değeri göstermiş, diğer bir deyişle VERO hücre hattı üzerinde oldukça düşük bir sitotoksik etki gösterilmiştir. Doksorubisin ile karşılaştırıldığında sağlıklı hücreler üzerinde doksorubisinden daha az sitotoksik etki göstermiştir.

Tablo3.6. Koji MG84' ün ve Doksorubisin' in IC<sub>50</sub> değerleri

IC <sub>50</sub> (µM) (±SD)		
Hücreler	Koji MG84	Doksorubisin
A549	8,3 (±0,343)**	1,97 (±0,78)
SK MEL	5,8 (±0,165)**	2,13 (±0,69)
HT 29	13,3 (±0,497)*	1,89 (±0,45)
SK BR 3	6,1 (±0,341)**	2,11 (±0,32)
VERO	30,3 (±2,165)*	3,84 (±0,52)

Veriler üç bağımsız deneyden elde edildi ve ortalama ± SD olarak sunuldu. Elde edilen veriler \* p ≤ 0.05 ve \*\* p ≤ 0.01 seviyelerinde istatistiksel anlamlılığı belirlemek için Student *t* testine tabi tutuldu.

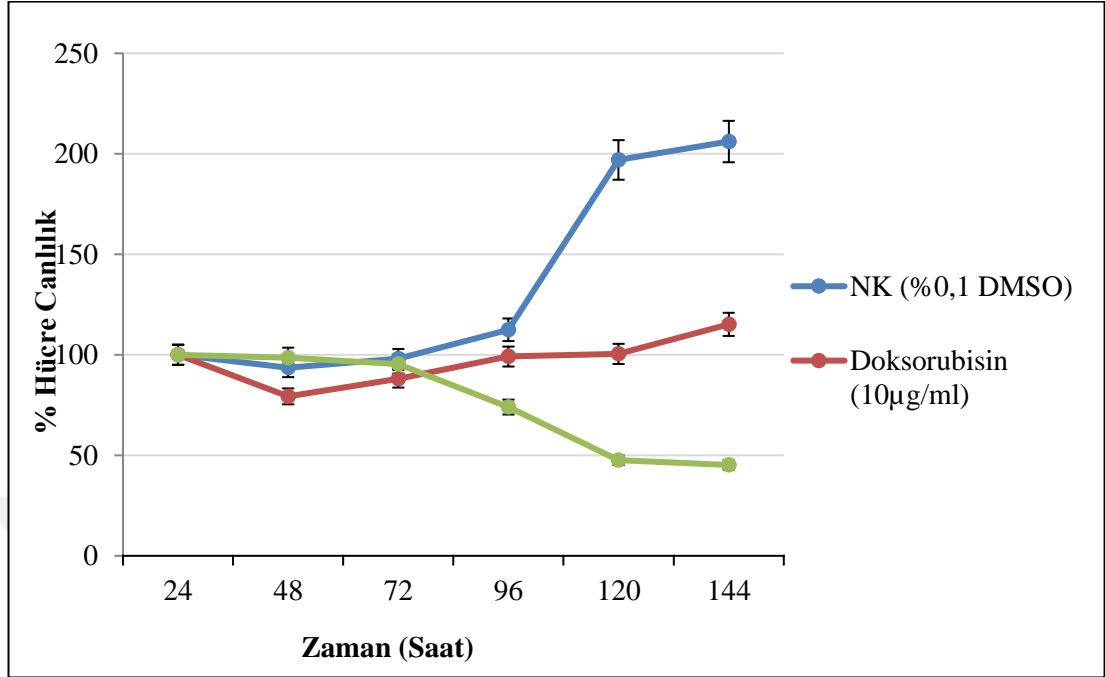
### 3.3. Zamana Bağlı Sitotoksosite Bulguları

Koji MG84 ile muamele edilmiş A549, SK MEL, HT 29, SK-BR 3, VERO hücre hatlarına karşı doza bağlı IC<sub>50</sub> değerlerini baz alarak en düşük, diğer deyişle Koji MG84' ün en yüksek sitotoksik aktivite sergilediği hücre hatları olan SK MEL ve SK-BR 3 hücre hatları ve sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksitesiyile karşılaştırmak amacı doğrultusunda VERO hücre hattı ile zamana bağlı sitotoksik aktivite çalışmaları yapılmasına karar verilmiştir.

SK MEL hücre hattı 3.13µ/ml konsantrasyondaki Koji MG84 ile muamelesinin ardından 48, 72, 96, 120, 140 saatlik inkübasyon sürelerinde sırasıyla %98.6, 95.4, 74.0, 47.5 ve 45.1 oranında hücre canlılığı göstermiştir.

Tablo 3.2. 3.13 µ/ml konsantrasyondaki Koji MG84' ün 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat inkübasyonun ardından SK MEL hücre canlılık yüzdesi üzerindeki etkisinin karşılaştırılması. NK, negatif kontrol (% 0.1 DMSO), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin 10 µg /ml)

	İnkübasyon süresi					
	24	48	72	96	120	144
	SK MEL Hücre canlılık yüzdesi (%) – (±SD)					
NK (%0,1 DMSO )	100 (±0)	93,5 (±6.5)	98,0 (±6.8)	112,4 (±8.2)	196,9 (±16.2)	206,1 (±17.6)
Doksorubisin (10µg/ml)	100 (±0)	79,3 (±4.9)	88,1 (±5.8)	99,1 (±6.9)	100,4 (±7.0)	115,1 (±8.5)
Koji MG84 (3,13µg/ml)	100 (±0)	98,6 (±6.4)	95,4 (±6.0)	74,0 (±5.9)	47,5 (±2.4)	45,1 (±1.0)

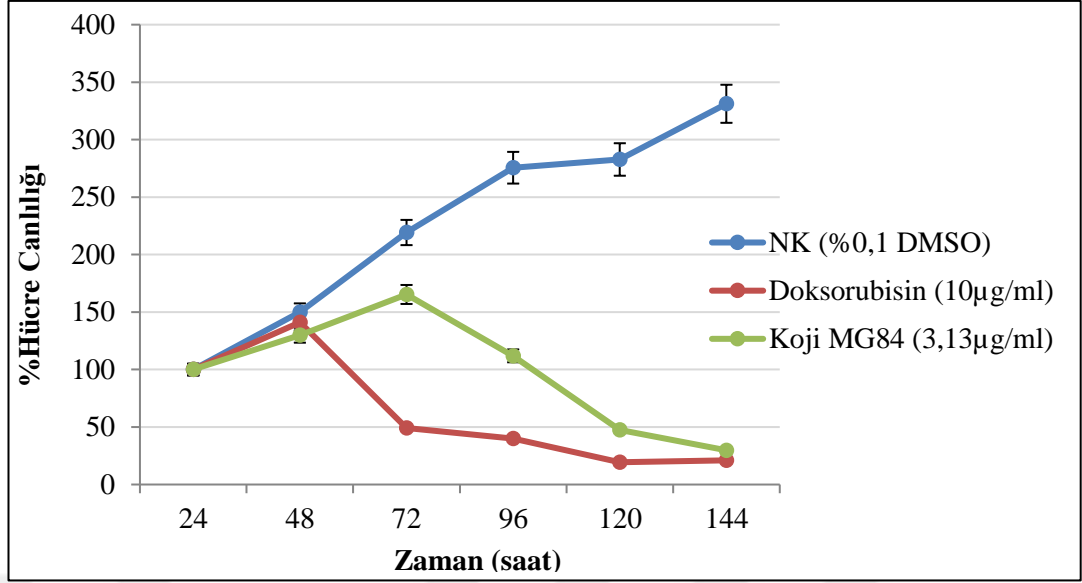


Şekil 3.3. 3.13 µ/ml konsantrasyondaki Koji MG84' ün 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat inkübasyonun ardından SK MEL hücre canlılık yüzdesi üzerindeki etkisinin grafiksel gösterimi. NC, negatif kontrol (% 0.1 DMSO), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin 10 µg /ml)

SK-BR 3 hücre hattı 3.13µ/ml konsantrasyondaki Koji MG84 ile muamelesinin ardından 48, 72, 96, 120, 140 saatlik inkübasyon sürelerinde sırasıyla %129.8, 165.3, 111.9, 47.5, 29.7 oranında hücre canlılığı göstermiştir.

Tablo 3.3. 3.13 µg/ml konsantrasyondaki Koji MG84' ün 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat inkübasyonun ardından SK-BR 3 hücre canlılık yüzdesi üzerindeki etkisinin karşılaştırılması. NC, negatif kontrol (% 0.1 DMSO), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin 10 µg /ml)

	İnkübasyon süreleri					
	24	48	72	96	120	144
	<b>SK BR 3Hücre canlılık yüzdesi (%) – (±SD)</b>					
<b>NK (%0,1 DMSO(w/v))</b>	100(±0)	150,0 (±12.8)	219,2 (±12.2)	275,5 (±13.4)	282,7 (±12.5)	331,1 (±14.0)
<b>Doksorubisin (10µg/ml)</b>	100(±0)	141,0 (±12.1)	49,2 (±11.9)	39,9 (±11.0)	19,3 (±8.9)	21,1 (±9.1)
<b>Koji MG84 (3,13µg/ml)</b>	100(±0)	129,8 (±13.9)	165,3 (±23.5)	111,9 (±19.1)	47,5(±15.1)	29,7 (±7.9)

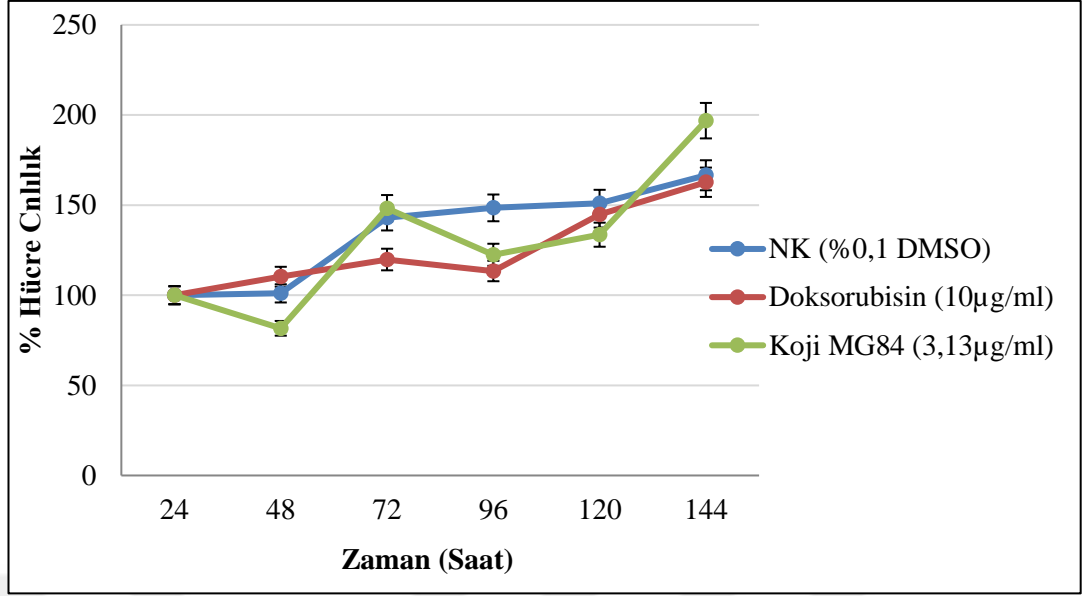


Şekil 3.4. 3.13 µ/ml konsantrasyondaki Koji MG84' ün 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat inkübasyonun ardından SK-BR 3 hücre canlılık yüzdesi üzerindeki etkisinin grafiksel gösterimi. NC, negatif kontrol (% 0.1 DMSO), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin 10 µg /ml).

Sağlıklı hücre grubunu temsil eden VERO hücre hattı ise 3.13µg/ml konsantrasyondaki Koji MG84 ile muamelesinin ardından 48, 72, 96, 120, 140 saatlik inkübasyon sürelerinde sırasıyla %81.6, 148.1, 122.4, 133.5 ve 196.8 gibi oldukça yüksek hücre canlılık oranları göstermiştir.

Tablo 3.4. 3.13 µ/ml konsantrasyondaki Koji MG84' ün 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat inkübasyonun ardından VERO hücre canlılık yüzdesi üzerindeki etkisinin karşılaştırılması. NC, negatif kontrol (% 0.1 DMSO), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin 10 µg /ml).

	İnkübasyon süreleri					
	24	48	72	96	120	144
	VERO Hücre canlılık yüzdesi (%) – (±SD)					
<b>NK (%0,1 DMSO(w/v) )</b>	100(±0)	101,0 (±18.8)	143,0 (±15.9)	148,4 (±15.7)	150,9 (±15.6)	166,5 (±15.0)
<b>Doksorubisin (10µg/ml)</b>	100(±0)	110,2 (±18.0)	119,8 (±17.3)	113,4 (±17.8)	144,7 (±15.9)	162,6 (±15.1)
<b>Koji MG84 (3,13µg/ml)</b>	100(±0)	81,6 (±21.2)	148,1 (±15.7)	122,4 (±17.1)	133,5 (±16.4)	196,8 (±14.0)



Şekil 3.5. 3.13 µ/ml konsantrasyondaki Koji MG84' ün 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat inkübasyonun ardından VERO hücre canlılık yüzdesi üzerindeki etkisinin grafiksel gösterimi. NC, negatif kontrol (% 0.1 DMSO), PK, pozitif kontrol, (doksorubisin 10 µg /ml).



#### 4. TARTIŞMA

100µg/ml konsantrasyondaki Koji MG84 çözültisi ile 72 saatlik inkübasyonun sonunda en düşük hücre canlılığını gösteren kanser hücre hattı %5.0 oranı ile SK MEL hücre hattı olurken en yüksek hücre canlılığı gösteren kanser hücre hattı %12.6 oranı gösteren A549 hücre hattı olmuştur. Aynı konsantrasyondaki Koji MG84 çözültisinin VERO hücre hattı üzerindeki doza bağlı sitotoksitesisi ile karşılaştırıldığında, 100µg/ml konsantrasyonda VERO hücre hattı %25.2 hücre canlılığı göstermiştir.

50µg/ml konsantrasyondaki Koji MG84 ile muamelede, en düşük hücre canlılığı gösteren kanser hücre hattı %5.2 ile yine SK MEL hücre hattı olurken, en yüksek hücre canlılığı gösteren kanser hücre hattı yine %14.0 hücre canlılığı ile A549 hücre hattı olmuştur. Aynı dozda sağlıklı hücre hattı VERO %16.1 hücre canlılığı göstermiştir.

25µg/ml konsantrasyondaki çözülti ile muamele ardından 72 saatlik inkübasyonun sonunda en düşük hücre canlılığı gösteren kanser hücre hattı %6.1 ile yine SK MEL hücre hattıdır. En yüksek hücre canlılığı gösteren A549 hücre hattı ise %19.5 hücre canlılığı sergilerken, VERO hücre hattı bu konsantrasyonda %23.2 hücre canlılığı sergilemiştir.

12.5µg/ml konsantrasyondaki Koji MG84 ile muamele edilen kanser hücrelerinden en düşük hücre canlılığı sergileyen hücre hattı %15.5 ile SK MEL olurken, en yüksek hücre canlılığı A549 hücreleri tarafından %32.8 oranı ile belirlenmiştir. Bu doz aralığında VERO hücre hattı %42.4 hücre canlılığı göstermiştir.

6.25 µg/ml konsantrasyonda Koji MG84' e maruz kalan kanser hücreleri arasında en hassas olan hücre hattı %28.0 oran ile yine SK MEL olurken, bu kez en yüksek hücre canlılığı sergileyen hücre hattı %39.3 ile SK-BR 3 hücre hattı olmuştur. Bu konsantrasyondaki VERO hücre hattının hücre canlılık değeri %51.2 olarak belirlenmiştir.

72 saat boyunca 3.125µg/ml konsantrasyondaki Koji MG84 çözeltilisine maruz kalan kanser hücreleri arasında en düşük hücre canlılığı sergileyen hücre hattı %45.0 ile SK MEL olmuştur. SK MEL hücre hattını %47.5 ile SK-BR 3 hücre hattı takip ederken, ilginç bir şekilde en yüksek hücre canlılığı sergileyen hücre hattı %103.2 hücre canlılık oranı ile HT 29 hücre hattı olmuştur. HT 29 hücre hattı bir üst konsantrasyon değeri olan 6.25µg/ml konsantrasyonunda %38.5 gibi umut verici bir hücre canlılığı sergilemişken 3.125µg/ml konsantrasyonda %103.2 hücre canlılığı sergilemesi oldukça ilginç olarak değerlendirilmektedir. 3.125µg/ml konsantrasyonda sağlıklı hücre grubunu temsil eden VERO hücre hattı %62.6 hücre canlılığı oranı sergilemiştir.

1.562µg/ml konsantrasyonda en düşük hücre canlılığı %58.1 ile SK MEL hücre hattı olurken, onu %61.2 hücre canlılığı oranı ile A549 hücre hattı takip etmiştir. %87.8 hücre canlılığı oranı ile en yüksek hücre canlılığı oranını HT 29 hücre hattı sergilemiştir. Aynı konsantrasyonda VERO hücre hattı %98.6 hücre canlılığı oranı sergilemiştir.

Koji MG84' ün 0.78µg/ml konsantrasyonuna maruz kalan hücreler arasında en düşük hücre canlılığı %58.0 ile A549 olurken, SK MEL hücre hattı %64.6 hücre canlılığı göstermiştir. En yüksek hücre canlılığı gösteren hücre hattı %112.2 ile HT 29 olurken, onu %95.3 hücre canlılığı ile SK-BR 3 hücre hattı takip etmiştir. VERO ise aynı konsantrasyonda %134.8 hücre canlılığı göstermiştir.

Son konsantrasyon değeri olan 0.39 µg/ml konsantrasyonda en düşük hücre canlılık oranını %66.2 ile A549 hücre hattı olmuştur. A549 hücre hattını %76.2 ile SK MEL hücre hattı takip ederken en yüksek hücre canlılık oranını %96.8 değeri ile SK-BR 3 hücre hattı sergilemiştir. VERO hücre hattı ise %200.9 oranında hücre canlılığı sergilemiştir.

0.78 µg/ml ve 0.39 µg/ml Koji MG84 ile muamele edilen VERO hücre hattının negatif kontrole (hücre+0,1 DMSO) göre daha yüksek canlılık oranı göstermesi bu konsantrasyon değerlerinde Koji MG84'ün VERO hücre hattı için iyileştirici bir etkisi olabileceğine işaret etmektedir. Doksorubisin ile muamele edilen VERO hücreleri Koji MG84' e göre daha düşük hücre canlılığı sergilemiştir.

1960' larda ilk bulunan antrasiklin grubu olan ve bulunduğu yıllardan itibaren yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajan olan doksorubisin, *Streptomyces peucetius* (var.caesius) bakterisinin varyantından izole edilen bir antibiyotiktir. Yaklaşık olarak eşdeğer konsantrasyonlarda hem DNA hem de nükleolar RNA sentezini inhibe eden nükleolar seçici olmayan sınıf I antrasiklidir. Kitle tümörlerinin (özellikle meme kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, yumurtalık kanseri vb) tedavisinde kullanılan en etkili ilaçlardan birisidir. Ayrıca idrar torbası, mide, karaciğer, tiroid, yumuşak doku sarkoması, nöroblastoma, myeloma, birçok çeşit lösemi, T-hücre lenfoma ve çeşitli kemik tümörlerine karşı da etkili bir aktiviteye sahiptir. Çalışmamızda doksorubisin 10 µg/ml konsantrasyon değeri ile pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. A549 hücre hattında %7,3 hücre canlılığı sergileyerek, belirlediğimiz konsantrasyon değerinin bu hücre hattı üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. SK MEL hücre hattında % 28.2'lik değer ile yine düşük hücre canlılığına neden olarak bu hücre hattında sitotoksik etki göstermiştir. Ancak meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan doksorubisinle muamele edilen SK-BR 3 hücre hattında %86.8 hücre canlılığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda 10 µg /ml kullandığımız doksorubisinin IC<sub>50</sub> değerini 2,11µM olarak belirledik. Çetin ve diğerlerinin (2021), doksorubisini pozitif kontrol olarak kullandıkları bir çalışmada SK BR 3 hücre hattı için doksorubisinin IC<sub>50</sub> değerini 34 µg /ml olarak belirlemişlerdir [53]. Diğer bir çalışmada ise doksorubisinin IC<sub>50</sub> değeri 0.1 ng/ml olarak belirlenirken, başka bir çalışmada 0.67 µM/ml olarak belirlenmiştir [54], [55]. Literatür göz önüne alındığında doksorubisin ile muamele edilen SK-BR 3 hücre hattının yüksek hücre canlılığı oranı göstermesi belirlediğimiz dozun, doksorubisinin IC<sub>50</sub> değerinin çok altında kalmasından kaynaklanabilir. Benzer şekilde HT 29 hücre hattında da doksorubisin ile muamelenin ardından %56.1 hücre canlılığı görülmüştür. Yine Çetin ve diğerlerinin (2021), yaptığı çalışmada doksorubisinin IC<sub>50</sub> değeri 14.6 µg /ml olarak hesaplanmıştır [53]. Serpe ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada, 48 saatlik inkübasyonun ardından HT 29 hücre hattı için doksorubisinin IC<sub>50</sub> değeri 259.8 ng/ml olarak belirlenirken, 300 ng/ml konsantrasyonundaki doksorubisinin, HT 29 hücrelerinin büyümesini %60 oranında azalttığı görülmüştür [56]. Sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde bulgularımız literatüre benzerlik göstermektedir. Sağlıklı hücre grubunu temsil eden VERO hücre hattı ise %125.1 hücre canlılığı sergilemiştir. Doksorubisinin pozitif kontrol olarak kullanıldığı iki farklı çalışmada

IC<sub>50</sub> değerleri 60.85 µg /ml ve 43.74 µg /ml olarak belirlenmiştir [53], [57]. Bu doğrultuda belirlediğimiz doksorubisin değeri literatürde yer alan IC<sub>50</sub> değerlerinin çok altında kalmasından dolayı yüksek hücre canlılığı gözlemlenmiştir.

Koji MG84 ile doksorubisinin IC<sub>50</sub> değerlerini karşılaştırdığımızda, SK MEL, SK BR 3 ve A549 hücre hatları için doksorubisine alternatif bir ilaç adayı olabileceğini göstermektedir. HT 29 hücre hattı diğer hücre hatlarına kıyasla Koji MG84' e daha az duyarlıdır. Ayrıca VERO hücre hattında doksorubisine göre oldukça yüksek IC<sub>50</sub> değerine sahip olması, sağlıklı hücreler üzerinde doksorubisine göre çok daha az sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Koji MG84, 6.25 µg/ml ve 3.125µg/ml konsantrasyonlarda A549 hücre hattında yüksek sitotoksosite gösterirken, VERO standart hücre hattında aynı konsantrasyonlarda % 50'nin üzerinde hücre canlılığı göstermesi, bu bileşiğin akciğer kanseri tedavisinde alternatif bir ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Bileşiğin, 6.25µg/ml konsantrasyonda HT-29 hücre hattında % 38' lik umut verici bir hücre canlılık oranı gösterirken, 3.125 µg/ml konsantrasyonda % 103.2 gibi çok yüksek hücre canlılığı göstermesi oldukça dikkat çekicidir. Bu artış, insan kolorektal adenokarsinom hücrelerinin Koji MG84' e karşı direnç oluşturma yeteneğine sahip olabileceğini düşündürmektedir.

3.125 µg/ml konsantrasyondaki Koji MG84 ile muamelenin ardından SK MEL ve SK-BR-3 hücre hatlarının düşük hücre canlılığı yüzdesi (sırasıyla% 45 ve% 47.5) göstermesi, Koji MG84'ün umut verici yeni bir anti-kanserojenik ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca, bu konsantrasyonda VERO standart hücre dizisindeki hücre canlılık oranının% 62,5 kadar yüksek olması, yani terapötik dozu ile lethal dozu arasında oldukça yüksek bir fark olması, Koji MG84' ün sağlıklı hücreler ve kanser hücreleri arasında ayırım yapabilen bir ajan olabileceğini gösterir.

Doza bağlı sitotoksosite çalışmalarında iyi değerler gösteren SK MEL ve SK-BR-3 kanser hücre hatları ile zamana bağlı sitotoksosite çalışmalarında, en düşük hücre canlılık oranları 120 ve 144 saat inkübasyon sürelerinde gözlemlenmiştir. Öte yandan

VERO hücre hattı, 3.13µg/ml konsantrasyonda herhangi bir inkübasyon süresinde sitotoksik olarak değerlendirilmemiştir.

72 saatlik inkübasyon süresi içerisinde Koji MG84 ile muamelenin ardından SK MEL hücre hattı %95.4 ( $\pm 6.0$ ), SK-BR 3 hücre hattı ise %165.3 ( $\pm 23.5$ ) hücre canlılık gösterirken sağlıklı hücre grubunu temsil eden VERO hücre hattında %148,1( $\pm 15.7$ ) hücre canlılığı göstermesi bileşiğin ilk 72 saat içerisinde kanser hücrelerinde henüz etki etmediğini düşündürmektedir. Ancak doza bağlı sitotoksisite analizlerimizin sonuçlarına göre 3.13 µg/ml konsantrasyon değerine yakın olan 3.125µg/ml konsantrasyon değerinde bileşiğimiz SK MEL ve SK-BR 3 hücre hatları üzerinde sırasıyla %45.0 ( $\pm 0.7$ ) ve %47.5 ( $\pm 0.8$ ) gibi düşük bir hücre canlılık oranı sergilemiştir. Zamana bağlı sitotoksisite çalışmalarının standart sapma değerlerindeki yüksekliğe dayanarak, birbirine yakın konsantrasyon değerlerinde aynı inkübasyon süresindeki bu farklılığın nedeni zamana bağlı sitotoksisite çalışmaları esnasında oluşan deneysel hatalardan kaynaklanabilir. Aynı şekilde VERO hücre hattında da 3.125 µg/ml konsantrasyon değerinde %62.6 ( $\pm 0.6$ ), 3.13 µg/ml değerinde ise %148.1 ( $\pm 15.7$ ) hücre canlılığı sergileyerek zamana bağlı sitotoksisite çalışmalarında deneysel hata olabileceğine işaret etmektedir. Doza bağlı sitotoksisite çalışmalarında doksorubisin SK MEL hücre hattında yüksek sitotoksisite gösterirken, zamana bağlı çalışmalarda aynı konsantrasyonda düşük sitotoksisite sergilemiştir. Bunun nedeni yine deneysel hataya işaret ederken, Çetin ve diğerlerinin yaptığı çalışmada SK MEL için doksorubisinin IC<sub>50</sub> değerinin 20 µg/ml olarak belirlenmiş olması, belirlediğimiz (10 µg/ml) konsantrasyonun doksorubisinin terapötik dozunun altında kalmasından da kaynaklanabilir [53]. SK BR 3 ve VERO hücre hattı ise doza 48 saatlik inkübasyon süresi içinde doza bağlı çalışmalara benzerlik göstererek doksorubisin varlığında prolifer olmaya devam etmiştir.

96 saatlik inkübasyon süresinde Koji MG84 kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermeye başlayarak hücre canlılık oranını düşmesine neden olmuştur. 72 ve sonraki inkübasyon süreleri içerisinde doksorubisinin Koji MG84' e göre SK BR 3 hücre hattı üzerinde daha sitotoksik olduğu görülmüştür. Doza bağlı çalışmalarımızın sonuçlarıyla çelişen bu sonuçlara göre, Koji MG84' ün en etkili olduğu inkübasyon süresi 120 ve 144. saatlerde bile Koji MG84, doksorubisinin gerisinde kalsa da hücre canlılık oranlarına bakarak bu süreler içerisinde VERO üzerinde daha az sitotoksik

etki göstermiştir. Ancak VERO üzerinde iki ajanın da sitotoksik olmaması ve 10 µg/ml doksorubisinin SK BR 3 hattı üzerinde 3.13 µg/ml Koji MG84' e göre daha kısa sürede daha yüksek etki göstermesi nedeniyle meme kanseri tedavisinde doksorubisinin daha kullanışlı bir ajan olduğuna işaret etmektedir. Yine de literatüre baktığımızda düşük konsantrasyon değerindeki doksorubisinin SK-BR 3 hücre hattı üzerinde yüksek sitotoksik etki gösterdiğine dair bir çalışma bulunmaması ve çalışmamızın standart sapma değerlerinin yüksek olması deneysel bir hatanın da söz konusu olabileceğini düşündürmektedir.

120 saatin sonunda ise SK MEL ve SK-BR 3 hücre hatları %47.5 gibi düşük bir hücre canlılığı sergilerken, VERO hücre hattı ise %133.5 hücre canlılığı sergileyerek proliferasyona devam etmiştir. Doksorubisin ise SK MEL ve VERO üzerinde sitotoksik etki göstermezken, SK BR 3 üzerinde yüksek sitotoksik etki göstererek hücre canlılığını %19.3 oranına düşürmüştür.

3.13µg/ml konsantrasyondaki Koji MG84 ile muamelenin 144. saatinin ardından SK-BR 3 hücre hattı en duyarlı hücre hattı olarak %29.7 oranında hücre canlılığı göstermiştir. SK MEL hücre hattı ise %45.1 gibi oldukça düşük bir hücre canlılığı göstermiştir. VERO ise hücre sayısını arttırarak %196.8 oranına yükselmiştir.

Karakaya ve diğerleri (2018), Koji MG84'ün kojik asit, klorokojik asit ve allomaltolden daha etkili olduğunu kanıtlamışlardır [51]. Ayrıca Koji MG84'ün, malign melanoma için etkisi bilinen ve hala kemoterapide kullanılan terapötik ajan olan Vemurafenib gibi melanogenezde eşit derecede etkili olduğunu göstermişlerdir. A375'in insan melanom hücrelerinin melanojenik davranışını azalttığı gözlenmiştir. A375 hücre hattında IC<sub>50</sub> değeri 43.81 µM olarak belirlenmiş ve Koji MG84'ün (% 27.7 inhibisyon) melanogenezin azaltılmasında vemurafenib (% 27 inhibisyon) kadar etkili olduğu görülmüştür [51]. Çalışmamızda Koji MG84, 5,8 µM IC<sub>50</sub> değeri ile insan melanom karsinom hücrelerinin yüksek inhibisyonunu gösterdi. Her iki hücre tipi de insan melanom kanser hücresi olmakla birlikte A375 hücre hattı epitel hücreden SK MEL ise melanosit hücreden köken alarak birbirinden ayrılmaktadır. Ancak iki hücre tipini birbirinden ayıran en önemli fark A375 hücreleri amelanotik melanom hücreleridir ve gözle görülür pigmentasyon göstermezler. Bu nedenle amelanotik melanom geç teşhis edilen ölümcül bir melanoma türüdür. SK MEL ise gözle görülür pigmentasyon gösteren melanom hücreleridir. Bu iki çalışmanın

sonuçlarına göre Koji MG84'ün farklı hücre tiplerinden köken alan cilt kanserlerinin tedavisinde etkili bir ajan olduğu düşünülmektedir.

Öncül ve ekibinin yaptığı bir çalışmada (2019), çeşitli kojik asit türevlerinin hepatocellular karsinoma tedavisinde etkili bir ajan grubunu temsil edip edemeyeceğini göstermeyi amaçlamıştır [42]. Bu doğrultuda içinde Koji MG84'ü de barındıran 10 farklı kojik asit türevinin HEPG2 hücre hattı üzerindeki sitotoksitesini test edilmiştir. Koji MG84 40.04  $\mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değeri ile HEPG2 hücre hattı üzerinde sitotoksik olarak değerlendirilmiştir.

Başka bir çalışmada, Fickova ve diğerleri (2008), MTT analizi ile iki yeni selenyum-kojik asit türevinin MCF-7 ve A431 hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkisini değerlendirdi. 72 saatlik inkübasyonda,  $\text{EC}_{50}$  değerleri A431 ve MCF-7 hücre hatlarında 8.85-26.7  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyon aralığı olarak belirlendi [58]. Bizim çalışmamızda ise bir insan melanoma karsinomu hücreleri olan SK MEL ve meme adenokarsinomu olan SK-BR 3 hücre hatlarında sırasıyla  $\text{IC}_{50}$  değeri 5,8-6,1 $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın ve bizim çalışmamızın sonuçlarını beraber değerlendirdiğimizde A431 (insan deri karsinoma) hücre hattı ve SK MEL (insan melanoma karsinomu) hücre hatlarının farklı kojik asit türevleriyle muamesinde düşük proliferatiflik görülmüştür. Deri kanseri hücrelerinin kojik asit türevlerine diğer hücrelere göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Koji MG84' ün meme kanseri türlerinde selenyum-kojik asit türevlerinden daha etkili olacağı düşünülmektedir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kojik asidin biyolojik aktivitesi kullanılacak kadar güçlü değildir. Ayrıca uzun süre saklanamayacak kadar dengesizdir ve kozmetiklerde veya gıdalarda güvenli dozlarda katkı maddesi olarak kullanılmak için yeterli değildir. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için, kojik aside göre artan inhibitör aktivite gösteren kojik asit ve amino asit türevleri geliştirilmiştir. Bu çalışmada, yeni geliştirilen ve patentli bir bileşik olan Koji MG84'ün farklı kanser hücre hatları üzerindeki doza ve zamana bağlı sitotoksik etkisi incelenmiştir. Koji MG84 ile yapılan doza bağlı sitotoksikite analizi sonucunda en hassas kanserojen hücre hatları sırasıyla 5,8 µM ve 6,1 µM IC<sub>50</sub> değerine sahip SK MEL ve SK BR 3 hücre hatları olarak belirlenirken, VERO' daki IC<sub>50</sub> değeri 30,3 µM olarak bulundu. SK-BR-3, A549, HT-29 hücre hatları, sırasıyla IC<sub>50</sub> değerlerine göre SK MEL hücre hattını takip etti. Koji MG84'ün SK MEL hücre hattına karşı anti-proliferatif aktivitesinin, sağlıklı hücre hattı VERO 'ya göre 5.5 kat daha yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca sonuçlara göre, Koji MG84 tüm kanser hücre hatları üzerinde normal hücre hattından daha fazla sitotoksik etki gösterdi. Sonuçlarımıza göre Koji MG84, 120 ve 144 saatlik inkübasyon sürelerinde SK-BR-3 ve SK MEL kanser hücre hatlarında en yüksek sitotoksik aktiviteyi gösterdi. Ayrıca, sağlıklı hücre hattı VERO üzerinde zamana bağlı sitotoksik aktivite çalışmalarında, bileşiğin sitotoksik olmadığı görülmüştür.

Birçok çalışma, kojik asit türevlerinin kanser hücreleri için kojik asitten daha toksik olduğunu bildirmiştir. Aynı zamanda tirozinaz inhibitörü olması cilt kanseri türlerinde daha etkili olmasını sağlamıştır. Dahası, kojik asit türevlerinin sağlıklı hücreler için toksik olmadığı gerçeği, kanser hücreleri için toksisitenin kemoterapideki en büyük zorluklardan birini önleyebileceğini göstermektedir. Ayrıca kojik aside uygulanan modifikasyonlar sayesinde yüksek dozlarda insan sağlığı için toksik olmaması sağlanmaktadır.

Bu çalışma, bir kojik asit türevi olan Koji MG84'ün A549, HT-29, SK MEL ve SK-BR-3 kanser hücre hatları üzerinde yüksek sitotoksik etkilere sahip olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Sonuçlarımız, Koji MG84'ün etkili bir anti-kanserojen ajan olabileceğini ve sağlıklı hücreler için toksik olmadığını gösteriyor. Ayrıca yapılan



çalışmalarda bu molekülün özellikle cilt kanserine karşı faydalı bir ilaç adayı olabileceği ortaya çıkmıştır. Ancak terapötik indeksi artırmak için ileriki dönem Faz çalışmalara ihtiyaç vardır.



## KAYNAKLAR

- [1] Hanahan D. Weinberg R. A., "The hallmarks of cancer," *Cell*, 2000, **1** (100), 57-70.
- [2] Hanahan D., Weinberg R. A., "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, 2011, **5** (144), 646-674.
- [3] Balkwill F. R., Capasso M., Hagemann T., "The tumor microenvironment at a glance," *J. Cell Sci.*, 2012, **23** (125), 5591-5596.
- [4] Zirak, M., Eftekhari-Sis B. Kojic Acid In Organic Synthesis. *Turkish Journal of Chemistry*, 2015, **39**(3) 439-496.
- [5] Aytemir M.D., Karakaya G.. Kojic Acid Derivatives, Medicinal Chemistry and Drug Design, *IntechOpen*, 2012.
- [6] Chaudhary J., Pathak A. N., Lakhawat S., "Production Technology and Applications of Kojic Acid," *Science domain International* , 2014, **21** (4), 3165-3196.
- [7] Rosfarizan M., Mohamed M. S., Suhaili N., Salleh M. M., Ariff A. B., "Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production," *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, 2010, **2** (5), 24-37.
- [8] Crueger, W., Crueger A., *Biotechnology: a textbook of industrial microbiology. Sinauer Associates*, 1984, Sunderland, Mass. 200.
- [9] Wilson BJ, Miscellaneous Aspergillus toxins. In: Ciegler A, Kadis S, Ajl SJ (eds) *Microbial toxins*, 1971, **6**, 207-295.
- [10] Beelik A., Kojic acid. *Advance in Carbohydrate Chemistry*. 1956;11145-183
- [11] Kim J. H.; Chang, P. K.; Chan, K. L.; Faria, N. C.; Mahoney, N.; Kim, Y. K.; Martins Mde, L.; Campbell, B. C., "Enhancement of Commercial Antifungal Agents by Kojic Acid," *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, **13**, 13867-13880.
- [12] Zie C., Sie W., Ngaini Z., Suhaili N., Madiahlagan E., "Synthesis of Kojic Ester Derivatives as Potential Antibacterial Agent," *Journal of Chemistry*, 2018, **7**.
- [13] Bransová J., Brtko J., Uher M., Novotný L., "Antileukemic activity of 4-pyranone derivatives," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1995. **7** (27), 701-706.
- [14] Aytemir M. D., Çalış, Ü., Özalp M., "Synthesis and Evaluation of Anticonvulsant and Antimicrobial Activities of 3-Hydroxy-6- methyl-2-substituted 4 H -Pyran-4-one," *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem*, 2004, **337**, 281-288.

- [15] M. Zirak and B. Eftekhari-sis, "Kojic acid in organic synthesis," 2015, 439–496.
- [16] Aytemir M. D., Özelik B., "A study of cytotoxicity of novel chlorokojic acid derivatives with their antimicrobial and antiviral activities," *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **9** (45), 4089–4095.
- [17] Noh J., Kwak S., Seo H., Seo J., Kim B., Lee Y., "Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Kojic acid – amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19** (19), 5586–5589.
- [18] Xiong X., Pirrung M. C., "Modular synthesis of candidate indole-based insulin mimics by claisen rearrangement," *Org. Lett.*, 2008, **6** (11), 1151–1154.
- [19] Montazeri M., Emami S., Asgarian-Omran H., Azizi S., Sharif M., Sarvi S., Rezaei F., Sadeghi M., Gohardehi S., Daryani A. Experimental Parasitology In Vitro and In Vivo Evaluation of Kojic Acid Against Toxoplasma Gondii in Experimental Models of Acute Toxoplasmosis. *Experimental Parasitology*, 2019; **200**, 7–12.
- [20] J. Brtko J., Rondahl L., Ficková M., Hudecová D., Eybl V., Uher M., "Kojic acid and its derivatives: History and present state of art," *Cent. Eur. J. Public Health*, 2004, **5** (12).
- [21] Sapkota K., Roh E., Lee E., Ha E.-M., Yang J.-H, Lee E.-S., Kwon Y., Kim Y., Na Y. "Bioorganic & Medicinal Chemistry Synthesis and anti-melanogenic activity of hydroxyphenyl benzyl ether analogues," *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **7** (19), 2168–2175.
- [22] Asanuma M., Miyazaki I., Ogawa N., "Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease," *Neurotox. Res.*, 2003, **3** (5), 165–176.
- [23] Higashi Y., Asanuma M., Miyazaki I., Ogawa N., "Inhibition of tyrosinase reduces cell viability in catecholaminergic neuronal cells," *J. Neurochem.*, 2000, **4** (75), 1771–1774.
- [24] Briganti S., Camera E., Picardo M., "Review : Innovative Technology Chemical and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation," *Pigment Cell Research*, 2003, **16**, 101–110.
- [25] Darusman L.K., Batubara I., Mitsunaga T., Rahminiwati M., Djauhari E., Tyrosinase Kinetic Inhibition of Active Compounds from Intsiapalembanica, *Research Journal of Medicinal Plant*, 2012, .
- [26] Emami S., Hosseinimehr S. J., Taghdisi M., "Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents" *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, **17**, 45–48.
- [27] Chang TS (2009), Review an update review of tyrosinase inhibitors *Intern. J Molecul Sci* **10**, 2440–2475.

- [28] Li D.F., Hu P.P., Liu M.S, Design and synthesis of hydroxypyridinone-L-phenylalanine conjugates as potential tyrosinase inhibitors. *J Agric Food Chem*, 2013, **61** (27).
- [29] Rho, H. S., Baek, H. S., You, J. W., Kim, S., Lee, J. Y., Kim, D. H., Chang, I. S. “New 5-Hydroxy-2- ( hydroxymethyl ) -4H-pyran-4-one Derivative Has Both Tyrosinase Inhibitory and Antioxidant Properties,” *Bull. Korean Chem. Soc*, 2007, **3** (28), 471–473.
- [30] H. S. Rho Goh M., Lee J., Mi Ahn S., Yeon J., Yoo D.S , Kim D.K, Kim H.K., Cho J.Y., “Ester Derivatives of Kojic Acid and Polyphenols Containing Adamantane Moiety with Tyrosinase Inhibitory and Anti-inflammatory Properties,” *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2011, **4** (32).
- [31] Ashari S. E., Mohamad R., Ariff A., Basri M., Salleh A. B., “Optimization of Enzymatic Synthesis of Palm- based Kojic Acid Ester Using Response Surface Methodology,” *Journal of Oleo Science* 2009, **10** (510), 503–510.
- [32] Lee Y. S., Park J. H., Kim M. H., Seo S. H., Kim H. J., “Full Paper Synthesis of Tyrosinase Inhibitory Kojic Acid Derivative,” *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*, 2006, **3** (339), 111–114.
- [33] Monteiro R. C., Kishore B. N., Bhat R. M., Sukumar D., Martis J., “A Comparative Study of the Efficacy of 4 % Hydroquinone vs 0 . 75 % Kojic Acid Cream in the Treatment of Facial Melasma,” *Indian J Dermatol* 2013, **58** (2).
- [34] Alicia Garcia Bs, James E. Fulton Jr Md, Phd, The Combination of Glycolic Acid and Hydroquinone or Kojic Acid for the Treatment of Melasma and Related Conditions, *Dermatologic Surgery*, 1996 , **5** (22), 443-447.
- [35] Hosseinimehr S. J., Emami S., Ahmadi A., Daryiush M., “Radioprotective effects of kojic acid against mortality induced by gamma irradiation in mice,” *Saudi medical journal* 2014.
- [36] Li X., Jeong J. H., Lee K. T., Rho J. R., Choi H. D., Kang J. S., “7-Pyrone Derivatives , Kojic Acid Methyl Ethers from a Marine- Derived Fungus *Altenaria* sp .,” *Archives of Pharmacal Research* ,2003 **7**(26),532–534.
- [37] Elsner P, Maibach HI. *Cosmeceuticals and Active Cosmetics: Drugs versus Cosmetics* (2nd edn). Marcel Dekker: New York,2005.
- [38] Saeedi M., Eslamifar M., Khezri K., “Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations,” *Biomed. Pharmacother.*,2019, **10**, 582–593.
- [39] Shin S., Moon S. Y., Kim W., Paek S., Structure-Based Classification and Anti-Cancer Effects of Plant Metabolites, *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19(9), 26-51
- [40] Schmidt B. M., Ribnicky D. M., Lipsky P. E., Raskin I., “Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics,” *Nature Chemical Biology*, 2007, **7**(3), 60–367.

- [41] Gordaliza M., “Natural products as leads to anticancer drugs,” *Clin Transl Oncol*, 2007, 767–776.
- [42] Oncul S, Karakaya G, Dilsiz Aytemir, M, Ercan, A. A Kojic Acid Derivative Promotes Intrinsic Apoptotic Pathway of Hepatocellular Carcinoma Cells Without Incurring Drug Resistance. *Chem Biol Drug Des*, 2019; **94**: 2084–2093.
- [43] Moto M., Mori T., Okamura M., Kashida Y., Mitsumori K., “Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice,” *Archives of toxicology*, 2006. 299–304.
- [44] Peroković V. P., Car Ž., Usenik A., Opačak-Bernardi T., Jurić A., Tomić S., “Adamantyl pyran-4-one derivatives and their in vitro antiproliferative activity,” *Mol. Divers.*, , 2020, **1**, (24), 253–263.
- [45] Takizawa T., Imai T., Onose J., Ueda M., Tamura T., Mitsumori K., “Enhancement of Hepatocarcinogenesis by Kojic Acid in Rat Two-Stage Models after Initiation with N -bis ( 2-hydroxypropyl ) nitrosamine or N -diethylnitrosamine,” *Toxicological Science*, , 2004, 49, 43–49.
- [46] Chen Y. H., Lu P. J., Hulme C., Shaw A. Y., “Synthesis of kojic acid-derived copper-chelating apoptosis inducing agents,” *Med. Chem. Res.*, , 2013, **2**(22), 995–1003.
- [47] Tsay, G.J. (2007). Toxicogenomics of A375 human malignant melanoma cells treated with arbutin. *J. Biomed. Sci.*, 14, 87–105
- [48] Annan N. A., Butler I. S., Titi H. M., El-lazeik Y., Jean-claude B. J., Mostafa S. I., “Inorganica Chimica Acta DNA interaction and anticancer evaluation of new zinc ( II ), ruthenium ( II ), rhodium ( III ), palladium ( II ), silver ( I ) and platinum ( II ) complexes based on kojic acid ; X-ray crystal structure of [ Ag ( ka )( PPh 3 )]· H,” *Inorganica Chim. Acta*, , 2019, (487), 433–447.
- [49] Srisayam M., Weerapreeyakul N., Barusrux S., “Application of FTIR microspectroscopy for characterization of biomolecular changes in human melanoma cells treated by sesamol and kojic acid,” *J. Dermatol. Sci.*, 2014, **3** (43), 241–250.
- [50] Aytemir M, Ozcelik B, Orhan İ.E., Karakaya G, Senol F.S., Kojic Acid-Derived mannich bases with biological effect. WO2016209180, (PCT/TR2016/000070), December 29, 2016.
- [51] Karakaya G., Ercan A., Oncul S., Aytemir M. D., “Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Kojic Acid Derivatives with Inhibitory Activity on Melanogenesis in Human Melanoma Cells,” *Anti Cancer Agents Medicinal Chemistry*, 2018, 2137–2148.
- [52] Karakaya G, Kojik Asit Türevi Mannich Bazlarının Sentezi Ve İnsan Melanoma Hücrelerine Etkisi İle Antitirozinaz Aktivitelerinin Araştırılması, Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2017.

- [53] Çetin E.Ö, Salmanoğlu D.S, Özden İ, Kumoğlu G.O, Akar S, Demirözer M, Karabey F, Kılıç K.D, Kırılmaz L, Uyanıkgil Y, Gür C.S,“Preparation of Ethanol Extract of Propolis Loaded Niosome Formulation and Evaluation of Effects on Different Cancer Cell Lines Preparation of Ethanol Extract of Propolis Loaded Niosome Formulation and Evaluation of Effects on Different Cancer Cell Lines,” *Nutr. Cancer*,2021.
- [54] Marc E. W, Bell C, Landfair D, Lynam E, BendeleR. A. “Anthracycline Efficacy in vitro : Cytotoxicity of Liposomal / Nonliposomal Daunorubicin and Doxorubicin for Multiple Tumor Cell Types Anthracycline Efficacy In Vitro : Cytotoxicity of Liposomal / Nonliposomal Daunorubicin and Doxorubicin for Multiple Tumor Cell Types,” *Drug Delivery*, 2018
- [55] Chowdhury, N, Chaudhry, S, Hall, N, Olverson, G, Zhang, Q. J, Mandal, T, Kundu, A, Targeted Delivery of Doxorubicin Liposomes for Her-2+ Breast Cancer Treatment. *AAPS PharmSciTech*, 2020
- [56] Serpe, L., Catalano, M. G., Cavalli, R., Ugazio, E., Bosco, O., Canaparo, R., ... & Zara, G. P., Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*,2004.
- [57] Handayani, D., Rasyid, W., Rustini, Z. E., & Hertiani, T., Cytotoxic activity screening of fungal extracts derived from the West Sumatran marine sponge *Haliclona fascigera* to several human cell lines: HeLa, WiDr, T47D, and Vero. *J Appl Pharm Sci*, 2018
- [58] Fickova M., Pravdova E., Rondhal L., Uher M., And Brtko J. In Vitro Antiproliferative and Cytotoxic Activities of Novel Kojic Acid Derivatives : 5-Benzyloxy-2-Selenocyanatomethyl- and 5-Methoxy-2-Selenocyanatomethyl-4-Pyranone. *Journal of Applied Toxicology*, 2008; 28(4),

## KİŞİSEL YAYIN VE ESERLER

- [1] Arpacı E, Ocakçı F, **Yavuz M**, Engin H, Karakas Celik S, CAN TOLL-LIKE RECEPTOR 4 GENE POLYMORPHİSM PLAY A ROLE IN PATHOGENESIS OF BREAST CANCER? *International Congress on Oncological Sciences*, Sözlü Bildiri, 27 Eylül-1 Ekim 2017, Antalya
- [2] Sevimli GÜR C, **YAVUZ M**, Kojik Asitin Biyolojik Aktiviteleri Ve Medikal Uygulamalardaki Önemi ISSN 1309-4254, *TÜRK BİLİM*, 2020
- [3] **YAVUZ M**, SEVİMLİ GÜR C, INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF A KOJIC ACID DERIVATIVE “KOJYLMETHYL DICHLOROBENZYL PIPERAZINE” ON VARIOUS CANCER CELL LINES, Sözlü Bildiri *International Marmara Sciences Congress (Spring 2020)* KOCAELI ABSTRACT E-BOOK, 19 – 20 June 2020; 126-127

## ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise öğrenimini Kocaeli' de tamamladı. 2013 yılında girdiği Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen ve Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden 2017 yılında mezun oldu. 2020 yılı güz döneminde Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji bölümü Tezli yüksek lisans programını kazandı. 2020 Kasım ayında Özel Kocaeli Acıbadem Hastanesi' nde Eczane Teknisyeni olarak çalışmaya başladı ve halen görevine devam etmektedir.

