

**BAZI TİYAZOL TÜREVLERİNİN BİYOKİMYASAL ETKİ
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Büşra EKSELLİ
Eskişehir 2019

**BAZI TİYAZOL TÜREVLERİNİN BİYOKİMYASAL ETKİ
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

BÜŞRA EKSELLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Temmuz 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Büşra EKSELLİ'nin "Bazı Tiyazol Türevlerinin Biyokimyasal Etki Mekanizmalarının Araştırılması" başlıklı tezi 22.08.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

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

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN
Enstitü Müdürü



ÖZET

BAZI TİYAZOL TÜREVLERİNİN BİYOKİMYASAL ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Büşra EKSELLİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2019

Danışman: Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Dünyada her yıl yaklaşık 12 milyon insana kanser teşhisi konulmaktadır aynı zamanda yıllık 7 milyon hasta kanserden ölmekte ve 25 milyon kişi kanser tanısı ile yaşamaktadır. Şimdiye kadar antikanser ajan olarak birçok kemoterapötik ilaç geliştirilmiştir ancak birçoğu kanser hücrelerine karşı spesifik olmaması ve normal hücrelere karşı toksisitesinin yüksek olması sebebiyle kanser tedavisinde yetersiz kalmaktadır. Bu sebeplerden ötürü daha spesifik ve daha az toksik antikanser ajanların geliştirilmesine duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır.

Tiyazol halkası, biyolojik olarak aktif bileşiklerin yapısında bulunması nedeni ile yeni ilaç tasarımında oldukça önemli bir yere sahiptir ve tiyazol halkasının belirli bir konumundaki sübstitüentler biyolojik aktivitesini önemli derecede etkilemektedir. Tiyazollerin, antibakteriyel, antifungal, anti-inflamatuvar, antitümör, antitüberküloz, antidiyabetik, antiviral ve antioksidan gibi birçok biyolojik aktivite gösterdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Antikanser etkili dasatinib, bleomisin, ixabepilone ve tiazofurin yapılarında tiyazol halkası taşımaktadırlar. Ayrıca son zamanlarda tiyazol halkası taşıyan bileşiklerin apoptotik mekanizmayı indükledikleri de bulunmuştur.

Bu çalışmanın amacı, sentezlenen tiyazol türevlerinin sitotoksik, apoptotik ve gen ekspresyon etkilerinin değerlendirilmesidir. Tiyazol türevi elde edilen bileşiklerin MTT deneyi ile A549, PANC-1 (kanser hücre hatları) ve CCD-19lu ve hTERT-HPNE (normal hücre hatları) hücrelerine karşı sitotoksiteleri araştırılmıştır. Önemli sitotoksik etki gösteren bileşiklerin; akım sitometrisi yöntemleri ile apoptotik etkileri değerlendirilmiş akabinde apoptotik ve hücre proliferasyonunda rol alan genler üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Tiyazol, Apoptoz, Antikanser aktivite, A549, PANC-1

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BIOCHEMICAL IMPACT MECHANISMS OF SOME THIAZOL DERIVATIVES

Büşra EKSELLİ

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2019

Supervisor: Assoc.Prof.Dr Gulsen AKALIN CIFTCI

Every year, around 12 million people are diagnosed with cancer over the world. Annually 7 million patients die of cancer, and 25 million people are living with a diagnosis of cancer. By now, many chemotherapeutic drugs have been developed as anticancer agents, but most of them are inadequate for cancer treatment because of their absence of specificity against cancer cells and their high risk of toxicity to normal cells. As a consequence, pharmaceutical researchers have concentrated on the create of more spesific and less toxic anticancer agents.

Thiazole ring, has gained great importance due to its presence in the structures of biologically active molecules and the substituents in a particular position of the thiazole ring significantly affect the biological activity. There are studies that thiazoles have many biological activities such as antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antitumor, antituberculosis, antidiabetic, antiviral and antioxidant. In the literature, many natural and synthetic thiazole derivatives have been reported. Bleomycine, dasatinib, ixabepilon and tiazofurin, anticancer agents, carry thiazole ring and also, in recent years, compounds bearing thiazole ring have been found in inducing apoptotic mechanism.

The aim of this study is to evaluate the cytotoxic, apoptotic gene expression effects of synthesized thiazole derivatives. The cytotoxicity against compounds A459, PANC-1 (cancer cell lines) and CCD-19-lu and Htert-hpne (normal cell lines) cells will be investigated by MTT assay of thiazole derivative derived compounds. Compounds with significant cytotoxic effect; apoptotic effects will be evaluated with flow cytometry methods and then their effects on apoptotic and cell proliferation genes will be investigated.

Keywords: Tiazoles, Apoptosis, Antikanser activity, A549, Panc-1

TEŞEKKÜR

22/08/2019

Biz kadınların hayatın ve bilimin her alanında eşit şartlarda var olması için geçmişteki devrimleri ve geleceğe dair öngörülerıyla bizlere ışık tutan hayatımın her alanındaki ilham kaynağım Ulu Önder Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK' e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca değerli bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve sabrı, güler yüzü ile karşılaştığım her sorunda bana destek olan Sayın Danışman Hocam Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ 'ye

Akademik birikimini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve bana yeni bakış açıları kazandırmanın yanı sıra manevi desteğini her zaman hissettiğim Sevgili Hocam Doç. Dr. Halide Edip TEMEL' e

Yüksek lisans deney çalışmalarında desteklerini esirmeyen Sevgili Hocalarım Doç. Dr. Mehlika Dilek ALTINTOP ve Araş. Gör. Belgin SEVER'e

Tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan ve deneyimlerini paylaştan Sevgili Dr. Bio. Şennur GÖRGÜLÜ' ye

Tez deneylerimde en az benim kadar emeği olan sabrı ve enerjisi ile beni hep motive eden sevgili laboratuvar arkadaşım Bio. Onur AKSOY' a

Tüm yaşamım ve eğitim hayatım boyunca bana her zaman maddi manevi destek olan beni karşılıksız seven bana iyi bir insan olmayı öğreten en büyük destekçilerim sevgili Babam Ercan EKSELLİ, sevgili Annem Medine EKSELLİ ve biricik kardeşlerim Beyza ve Buğra'ya

Lisans hayatımdan beri her zaman yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bu akademik serüvende beraber yürüdüğüm yol arkadaşım, meslektaşım, sevgili eşim Akın ELMASKAYA' ya

Sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım...

Büşra EKSELLİ

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAZI TİYAZOL TÜREVLERİNİN BİYOKİMYASAL ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. Kanserin Oluşumu ve Gelişimi	3
2.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri	3
2.3. Kanserin Tanısı	4
2.4. Kanserde Çevresel Etmenlerin Rolü	5
2.4.1. Sigara kullanımı	5
2.4.2. Diyet ve fiziksel aktivite	5
2.4.3. Çevresel kirleticiler	6
2.5. Kanserde Genlerin Rolü	6
2.5.1. Onkogenler	6
2.5.1.1. Protoonkogenler	6
2.5.1.2. Onkogenler.....	7
2.5.2. Tümör baskılayıcı genler	8
2.6. Kanserde Sinyal Yolaklarının Rolü.....	8
2.6.1. MAPK sinyal yolağı	8
2.6.1.1. Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolu ve kanser.....	9

2.7. Kanser Türleri.....	10
2.7.1. Akciğer kanseri	10
2.7.2. Pankreas kanseri	11
2.8. Kanser ve Hücre Ölümü.....	12
2.8.1. Otofaji	13
2.8.2. Nekroz	13
2.8.3. Apoptoz	14
2.8.3.1. Apoptozun aşamaları	15
2.8.3.2. Apoptozun düzenlenmesi.....	17
2.8.3.3. Apoptozun mekanizması.....	20
2.9. Ppar- γ ve Kanser	22
2.10. Tiyazoller ve Kanser	24
2.11. Kanserin Tedavisi	25
2.11.1. Radyoterapi	25
2.11.2. Kemoterapi	25
2.11.3. Kök hücre tedavisi	26
2.11.4. Cerrahi yöntemler	26
2.11.5. Biyolojik tedaviler	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1. Materyaller	27
3.1.1. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler	27
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	28
3.2. Metodlar.....	29
3.2.1. Sentez Çalışmaları.....	29
3.2.1.1. 4-[2-(Dimetilamino)etoksi]benzaldehit tiyosemikarbazonun genel sentez yöntemi.....	29

3.2.1.2. 2-[2-(4-(2-(Dimetilamino)etoksi)benziliden)hidrazinil]-4-ariltiyazol türevlerinin genel sentez yöntemi	30
3.2.2. Sonuç Bileşikleri	30
3.2.3. Tiyazol türevi bileşiklere ait ¹ H NMR spektroskopik verilerin değerlendirilmesi.....	31
3.3. Kullanılan Maddelerin Hazırlanması	34
3.3.1. Sentezlenen Bileşiklerin Hazırlanması.....	34
3.3.2. Sisplatinin Hazırlanması	35
3.4. Deneylerde kullanılan hücreler.....	35
3.4.1. İnsan akciğer karsinoma epitelyal hücre hattı (A549)	35
3.4.2. Normal insan fibroblast hücre hattı (CCD-19Lu)	35
3.4.3. İnsan pankreas karsinoma hücre hattı (PANC-1)	36
3.4.4. Normal pankreas hücre hattı (Htert- HPNE).....	36
3.5. Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Deneylere Hazırlık.....	36
3.5.1. Malzeme sterilizasyonu.....	36
3.5.2. Hücrelerin stoklanması ve pasajlanması	37
3.5.3. Hücre sayımları.....	37
3.6. Sitotoksik etki belirleme testleri	38
3.6.1.1. MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi.....	38
3.6.1.2. İnhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	39
3.7. Akım Sitometri Cihazı ile Yapılan Deneyler	39
3.7.1. Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi	39
3.7.2. JC-1 boyama ile hücrelerin mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi.....	41
3.7.3. Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin belirlenmesi.....	42

3.8. RT-PCR (Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile PPAR-, Bcl-2, Bax, CYD1, cMYC, ERK, pERK ve housekeeping genlerinin ifade (ekspresyon) düzeylerinin belirlenmesi:	43
3.8.1. RNA izolasyonu	44
3.8.2. Komplementer DNA (c-DNA) sentez safhası.....	45
3.8.3. Supermix, Taqman prob ve primerlerin hazırlanması	46
3.8.4. Gerçek zamanlı kantitatif PCR reaksiyonu.....	46
4. SONUÇLAR VE BULGULAR.....	48
4.1. MTT Sonuçları	48
4.1.1. Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 Hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi	48
4.1.2. Sentezlenen bileşiklerin CCD19-Lu hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi.....	49
4.1.3. Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin PANC-1 Hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi	50
4.1.4. Sentezlenen bileşiklerin Htert-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi.....	51
4.2. Sisplatinin ve Sentezlenen Maddelerin A549 ve Panc-1 Hücrelerinde Apoptotik Etkilerinin Akım Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi	52
4.2.1. Akım sitometri’de Annexin-V FITC-PI yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi.....	52
4.2.1.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik apoptotik etkilerin değerlendirilmesi	52
4.2.1.2. A549 hücrelerindeki 48 saatlik apoptotik etkilerin değerlendirilmesi	55
4.2.1.3. Panc-1 hücrelerindeki 24 saatlik apoptotik etkilerin değerlendirilmesi.	58
4.2.1.4. Panc-1 hücrelerindeki 48 saatlik apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi	61

4.2.2. Flow sitometri’de JC-1 yöntemi ile mitokondriyal membran aktivitesinin değerlendirilmesi.....	64
4.2.2.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerinin değerlendirilmesi	64
4.2.2.2. A549 hücrelerindeki 48 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerinin değerlendirilmesi	67
4.2.2.3. PANC-1 hücrelerindeki 24 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerinin değerlendirilmesi	70
4.2.2.4. PANC-1 hücrelerindeki 48 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerinin değerlendirilmesi	73
4.2.3. Flow sitometride kaspaz-3 yöntemi ile mitokondriyal membran aktivitesinin değerlendirilmesi.....	76
4.2.3.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi	76
4.2.3.2. A549 hücrelerindeki 48 saatlik Kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi	79
4.2.3.3. PANC-1 hücrelerindeki 24 saatlik Kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi	82
4.2.3.4. PANC-1 hücrelerindeki 48 saatlik Kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi	85
4.3. RT-PCR (Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) analiz sonuçları	88
5. TARTIŞMA.....	89
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	98
KAYNAKÇA.....	99
EK-1	107
ÖZGEÇMİŞ	109

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Onkogenlerin sınıflandırılması	7
Çizelge 2.2. Apoptoz ve nekrozun kıyaslaması.....	15
Çizelge 3.1. RT-PCR analizinde kullanılan primer prob dizileri.....	45
Çizelge 3.2. RT-PCR reaksiyonu bileşenleri.....	46
Çizelge 4.1. Sentezlenen bileşiklerin ve sisplatinin A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatlerdeki IC ₅₀ değerleri.....	49
Çizelge 4.2. Sentezlenen bileşiklerin ve CCD19-Lu hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatlerdeki IC ₅₀ değerleri.....	50
Çizelge 4.3. Sentezlenen bileşiklerin ve sisplatinin PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatlerdeki IC ₅₀ değerleri.....	51
Çizelge 4.4. Sentezlenen bileşiklerin ve Htert-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatlerdeki IC ₅₀ değerleri.....	52
Çizelge 4.5. A549 hücrelerinin 24. Saatteki % canlılık değerleri	55
Çizelge 4.6. Sisplatinin A549 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki % canlılık değerleri.....	55
Çizelge 4.7. Sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki % canlılık değerleri.....	55
Çizelge 4.8. A549 hücrelerinin 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	58
Çizelge 4.9. Sisplatinin A549 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	58
Çizelge 4.10. Sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	58
Çizelge 4.11. Panc-1 hücrelerinin 24. Saatteki % canlılık değerleri.....	61
Çizelge 4.12. Sisplatinin Panc-1 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki % canlılık değerleri.....	61
Çizelge 4.13. Sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki % canlılık değerleri.....	61
Çizelge 4.14. Panc-1 hücrelerinin 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	64
Çizelge 4.15. Sisplatinin Panc-1 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	64

Çizelge 4.16.	Sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki % canlılık değerleri.....	64
Çizelge 4.17.	Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 24 saatteki % canlılık değerleri.....	67
Çizelge 4.18.	Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 48 saatteki % canlılık değerleri.....	70
Çizelge 4.19.	Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 24. saatteki % canlılık değerleri.....	73
Çizelge 4.20.	Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 48. saatteki % canlılık değerleri.....	76
Çizelge 4.21.	Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 24. saatteki kaspaz-3 aktivasyonunun % canlılık değerleri.....	79
Çizelge 4.22.	Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 48. saatteki Kaspaz-3 aktivasyonunun % canlılık değerleri.....	82
Çizelge 4.23.	Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 24. saatteki Kaspaz-3 aktivasyonunun % canlılık değerleri.....	85
Çizelge 4.24.	Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 48. saatteki Kaspaz-3 aktivasyonunun % canlılık değerleri.....	88
Çizelge 4.25	PPAR-gama, Bcl-2, Bax, CYD1, cMYC, ERK, pERK genlerinin kat değişimi değerleri.....	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. MAPK ailesi ve sinyal iletimi.....	10
Şekil 2.2. Apoptotik hücrede meydana gelen değişiklikler.....	16
Şekil 2.3. Bcl-2 ailesi proteinleri.....	18
Şekil 2.4. Apoptozun inhibisyon ve aktivasyonu.....	19
Şekil 2.5. İç ve dış apoptotik yolak.....	22
Şekil 2.6. PPAR'ın yapısı.....	23
Şekil 2.7. Tiyazollerin kimyasal yapısı.....	24
Şekil 3.1. Tiyazol türevi bileşiklerin sentez şeması.....	30
Şekil 3.2. Sentezlenen sonuç bileşiği.....	30
Şekil 3.3. MTT molekülünün formazan kristallerine dönüşümü.....	38
Şekil 3.4. Hücrede erken ve geç apoptotik süreçte meydana gelen değişimler.....	40
Şekil 3.5. RT-PCR termal profil.....	48
Şekil 4.1. Sisplatin ve sentezlenen maddelerin A549 hücreleri üzerinde 24. saatteki apoptotik etkileri.....	53
Şekil 4.2. Sisplatin ve sentezlenen maddelerin A549 hücreleri üzerinde 48. saatteki apoptotik etkileri.....	56
Şekil 4.3. Sisplatin ve sentezlenen maddelerin A549 hücreleri üzerinde 24. saatteki apoptotik etkileri.....	59
Şekil 4.4. Sisplatin ve sentezlenen maddelerin Panc-1 hücreleri üzerinde 48. saatteki apoptotik etkileri.....	62
Şekil 4.5. Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 24. saatteki mitokondriyal membran etkileri.....	65
Şekil 4.6. Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 48. saatteki mitokondriyal membran etkileri.....	68
Şekil 4.7. Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 24. saatteki mitokondriyal membran etkileri.....	71
Şekil 4.8. Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 48. saatteki mitokondriyal membran etkileri.....	74

Şekil 4.9.	Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerinde 24. saatteki kaspaz-3 aktivasyonunun etkileri.....	77
Şekil4.10	Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerinde 48. saatteki kaspaz-3 aktivasyonunun etkileri.....	80
Şekil 4.11	Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerinde 24. saatteki kaspaz-3 aktivasyonunun etkileri.....	83
Şekil 4.12	Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerinde 48. saatteki kaspaz-3 aktivasyonunun etkileri.....	86

.

.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A549	: İnsan akciğer karsinoma epitelyal hücre hattı
AB	: Deney tamponu
ANOVA	: Varyans analizi
DED	: Ölüm resertör alanı
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
CARD	: Kaspaz istihdam alanı
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
FBS	: Fetal sığır serumu
IC _{50/2}	: %25 inhibe eden konsantrasyon
IC ₅₀	: %50 inhibe eden konsantrasyon
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolyum bromür
MAPK	: Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
PANC-1	: İnsan pankreas karsinoma hücre hattı
PBS	: Fosfat tuz tampon çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PPAR	: Peroksizom proliferatör aktivatör reseptör
PI	: Propidium iyodür
PS	: Fosfatidil serin
RhEGF	: Rekombinant epidermal büyüme faktörü
RNA	: Ribo nükleik asit
RPMI	: Roswell park memorial institüsü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde sağlık, tüm çalışmaların odaklandığı en önemli alanlardan biridir ve kanser en önemli sağlık problemidir. Her yıl dünya çapında milyonlarca insana kanser teşhisi konmakta ve teşhis konulanların yarısı kanser sebebiyle hayatını kaybetmektedir bu nedenle son yıllarda kanser tedavisi ile ilgili araştırmalar artış göstermektedir (Popat vd., 2013, Noolvi, Patel ve Kaur, 2012).

Kanser, hücreleri ve onların mikroçevrelerini içeren kompleks bir problemidir (Metzcar vd., 2019). Ve bir neoplazmanın alt grubu olarak karakterizedir bu nedenle tıbbi olarak kötü huylu neoplazm olarak adlandırılır. Kanserli bir durumda hücreler kontrolsüz bir biçimde bölünür, çoğalır ve vücudun diğer bölgelerine yayılabilecek kötü huylu tümörler haline alır. Kanserli hücreler özellikle lenfatik sistemi ve kan dolaşımını istila ettiği takdirde tüm vücuda hızla yayılabilir. Kansere yol açan nedenler tam olarak anlaşılamamakla birlikte; sigara, diyet, çevresel kirleticilerin kanser gelişimini etkileyebileceği bilinmektedir bu faktörler genler üzerinde doğrudan ve dolaylı olarak hasara yol açabilir (Oyouni,2017). Kanser vakalarının %90-95 inin çevresel etmenlerden kaynaklandığı %5-10'unun ise genlerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Anand vd., 2008).

Kemoterapi, kanserde en çok kullanılan tedavi şeklidir. Kanser kemoterapisi ile ilgili çalışmalar 1990'larda antifolat ilaçların ve nitrojen mustardların kullanımıyla başlamıştır. Bu sitotoksik kemoterapötik ilaçların malign tümörlere karşı klinik kullanımı çoğu durumda başarılıdır. Ancak, ilaç direncinin gelişimi,normal hücrelere toksik etkiler göstermesi, kanserli hücreye karşı seçici olmaması gibi sakıncaları da vardır (Kumar ve vd., 2012). Bu nedenle, araştırmacılar, kanser tedavisi için tamamen yeni mekanizmalı antikanser ilaç keşfine odaklanmışlardır (Nussbaumer vd., 2011; Shaharyar vd., 2010).

Apoptoz, kemoterapi ile uyarılan hücre ölüm yollarından biri olarak öne çıkmaktadır ve ayrıca birçok preklinik ilaç keşfi araştırmaları apoptotik mekanizmaları düzenleyen yollar üzerine yoğunlaşmıştır. Apoptoz genetik olarak programlanmış bir hücre ölüm şeklidir. Apoptotik sürece giren hücrelerde biyokimyasal değişikliklere ek olarak morfolojik değişimlerde gözlenmektedir (Ricci ve vd., 2006). Apoptotik hücrede küçülme ve büzülme söz konusudur, hücrenin kromatininde kondenzasyon gözlenmektedir, hücre membranı bütünlüğünü kaybetmez ve membranda blebsler oluşur ayrıca apoptozun en belirgin özelliklerinden birisi DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları

oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bunlara ek olarak apoptotik hücrelerde görülen en önemli değişikliklerden birisi de normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinlerin erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır (Ulukaya, 2003; Dikmen vd., 2010). Apoptotik yol kaspazlar denen proteolitik enzimleri aktive eder. Bu enzimler, hücreyel organellerin ve yapıların hızlıca bozulmasına neden olur. Kaspazlar, aspartik asit içeren motiflerin parçalanmasına katılan nükleofilik sistein kalıtı içeren protein ailesindendir ve apoptozun başlaması ve devamı için önemli bir rol oynarlar (Thornberry vd., 1998). Bunların arasından en önemli olan ve iyi tanımlananı Kaspaz-3'dür. Kaspaz-3 sıklıkla çoğu anahtar hücreyel proteinlerin spesifik ayrılmasını katalize eden ölüm proteazlarını aktive eder (Mosieniak vd., 2006; Thayyullathıl vd., 2008). Ayrıca instrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar için ortak olup, hücrenin programlı ölümünde geri dönülmez yola girdiği, bu nedenle apoptotik yolk için en önemli basamağı oluşturduğu söylenebilir.

Tiyazoller, sırasıyla 1. ve 3. konumunda kükürt ve azot içeren, başlıca heterosiklik bileşiklerin önemli bir sınıfıdır. Tiyazol türevlerinin çeşitli biyolojik faaliyetlere sahip olduğu bildirilmiştir, örneğin; antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiinflamatuvar, antitüberküler, antiplazmoidal, antikanser, antialerjik, antiplazmoidal. Tiamin (vitamin B1), nizatidin (antiülser), penisilin (antibiyotik), fanetizol, meloksikam (anti-inflamatuvar ajanlar), ritonavir (anti-HIV), bleomisin (antineoplastik) gibi halen tedavide kullanılmakta olan moleküllerin içinde tiyazol halkasının varlığı onları farmakolojik olarak önemli bileşikler haline getirmiştir (Arora vd.,2016)

Ayrıca tiyazol türevlerinin Peroksizom proliferatör-aktiviteli reseptör- γ (PPAR- γ) aktivasyonu yaptıklarına dair çalışmalar da mevcuttur (Yea vd., 2010). PPAR'lar nükleer hormon reseptör ailesinin bir üyesidir. Gen ekspresyonun modölatörü ve transkripsiyon faktörleri olarak rol oynarlar. Bu etkileri PPAR'ların çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rolleri olduğunu göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar kanser gelişimindeki önemlerini vurgulamıştır (Youesef ve Badr., 2010).

Bu tez çalışmasının amacı; alternatif tiyazol türevleri sentezlemek ve sentezlenen tiyazol türevlerinin sitotoksik, apoptotik ve gen ekspresyon etkilerinin değerlendirerek bileşiklerimizin antikanser etkilerini araştırmak eğer var ise bu etkinin biyokimyasal mekanizmasını aydınlatmaktır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Kanserin Oluşumu ve Gelişimi

Kanser, hücrelerin mekanizmalarında oluşan moleküler bozukluklar sebebiyle meydana gelmektedir. Bu yüzden kanser çalışmalarında hücreler yıllardır moleküler düzeyde çalışılmaktadır. Örneğin, sinyal iletim yollarında, hücre siklusunda ve apoptozda yer alan proteinler ve bunların görevleri, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde işleyen mekanizmaları incelenirken aydınlanmıştır (Cooper vd., 2006).

Karsinogenez üç basamaktan oluşmaktadır;

- İnitasyon (Başlangıç)
- Proliferasyon (Artma)
- Progresyon (İlerleme)

Bu evrelerin sonucunda; çoğalma, hayatta kalma, invazyon ve metastaz yapma kabiliyetleri artmış olan hücreler diğer hücrelerden ayrılmış olur.

İnitasyon aşamasında, başlatıcı bir etken bir hücrede DNA'yı mutasyona uğratarak, hücrenin anormal şekilde çoğalmasını tetiklemektedir ve burada oluşan mutasyon geri dönüşümsüzdür. Sonra proliferasyonu sağlayan promotör etmenler devreye girerek DNA üzerinde dönüşümlü mutasyonlara neden olurlar. Böylece klon hücrelerden oluşan topluluk hızla büyümeye devam eder.

Progresyon aşaması genomik instabilitenin meydana geldiği evredir. Burada karyotipik değişimler ve çoğul mutasyonlar oluşmaktadır. Bu değişimleri geçiren hücreler, daha hızlı çoğalma ve metastaz yapma özellikleri bakımından daha avantajlı hale gelirler ve malign hale dönüşürler. Çoğalma hızları artan hücreler bulunduğu bölgenin çevresindeki dokulara yayılmaya başlar ayrıca kan ve lenf dolaşımına katılarak vücudun diğer doku ve organlarına ulaşabilir ve yeni tümör dokuları oluşturabilir. Diğer doku ve organlara yayılma sürecine metastaz adı verilmektedir (Abercrombi ve Ambrose,1962).

2.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser hücreleri ise normal hücrelerin sahip olmadığı birçok özelliğe sahiptir.

- Hücre yüzeyindeki reseptörler daha sık sinyal alır
- Kontrolsüz şekilde çoğalmayı sağlayan kendi sinyal sistemleri vardır

- Yandaki hücreye temas sonrası bölünmeyi durdurmaz ve büyümeye ve çoğalmaya devam eder yani çoğalmaya bağlı inhibisyon göstermez.
- Sağlıklı hücreler her tipteki besini kullanabilirken kanser hücreleri sadece glikolizden gelen glukozu kullanabilirler. Şekeri normal hücreler oranla yaklaşık 100 kat fazla olarak kandan alırlar ve laktat üreterek enerji sağlarlar (Warburg etkisi)
- Gerekli besin ve oksijeni almak üzere çevrelerindeki stromayı etkileyerek yeni damar sistemleri oluşturabilirler (neo-vaskülarizasyon)
- Telomerlerini sabitleyerek veya telomerez aktivitesini koruyarak sonsuz şekilde replike olup çoğalabilirler
- Dolaşım sistemine girip uzaktaki bir yere hareket edebilir ve yeni bir yerleşerek kanserleşmeyi başlatabilirler (metastaz)
- Apoptozdan kaçabilirler
- Genetik ve epinegetik olarak stabil değillerdir (Cooper vd., 2006; Abercrombi ve Ambrose,1962).

2.3. Kanser Tanısı

Düzenli kontroller kanserin teşhisinde çok önemlidir ancak birçok insan herhangi bir ciddi sağlık problemi ile karşılaştığında kontrollerini yaptırmaktadır. Aile öyküsünde kanser olan kişilerin ise rutin kontroller konusunda daha hassas olması gerekmektedir.

Röntgen, kan testleri, bilgisayarlı tomografi taramaları, manyetik rezonans görüntüleme, endoskopi ve genetik görüntüleme testleri kanserin erken teşhisinde kullanılabilecek araçlardır.

Özellikle virüslerin neden olduğu bazı kanser türlerinin engellenebilmesi adına, çeşitli aşılar geliştirilmiştir. Örneğin rahim ağzı kanserine karşı koruyucu olduğu iddia edilen HPV aşısının yapılmasını savunan çalışmalar olduğu gibi, zıt yönde görüşler de mevcuttur. Genelde sosyoekonomik durumu kötü olan ve yeterli bakımı görmeyen düşük gelirli ve düşük eğitimli kesimlerde yapılan araştırmalar aşının koruyuculuğunu ön plana çıkarırken, belli bir eğitim ve gelir seviyesinin üstündeki ülke ve bireylerde yapılan çalışmalar bu tip aşının belirtildiği kadar etkin olmadığını göstermektedir (Wagner vd.,2015). Özellikle ailesinde kanser hikayesi olan bireylerde kansere yatkınlığın belirlenmesi amacı ile yapılan genetik testler ile erken teşhis yapılması mümkündür.

Ayrıca bu testler ile hastalığın arkasındaki sebepler de daha kesin şekilde belirlenebilmektedir. Ancak bu testler sayesinde faydalı bilgiler elde edilebilse de kişinin hastalığa yol açan geni bünyesinde taşımasına rağmen o hastalığa hiç yakalanmayacağı olasılığı da akılda tutulmalıdır.

Kanser tiplerine bağlı olarak sıklıkla uygulanan testlere örnek olarak meme ve over kanseri için BRCA1 ve BRCA2; meme, sarkom, lösemive birçok başka tip için TP53; over, kolorektal, endometriyal, beyin kanserleri için MSH2, MLH1, MSH6; kolon ve rektum, ince bağırsak, mide, cilt kanserleri için APC; göz, kemik, cilt için RB1 genlerindeki değişimler genetik testler için saptanabilir (Guo vd.,2013).

2.4. Kanserde Çevresel Etmenlerin Rolü

2.4.1. Sigara kullanımı

Sigara kullanımının kanser üzerindeki etkileri yıllardır bilinmektedir (Doll vd., 2005). Gelişmiş ülkelerde sigara kullanımı prevalansı azalmış olsa da gelişmemiş ülkelerde artmaya devam etmektedir.

IARC 2004 yılında tütün kullanımının akciğer, pankreas, mide ve karaciğer gibi bölgelerdeki kanserlerde etkisinin olduğunu gösteren bir monograf yayınladı (IARC, 2004). Şu anki verilere göre yılda yaklaşık beş milyon insan sigara kullanımı sebebiyle hayatını kaybetmekte ve bu sayının 2030 yılına gelindiğinde on milyonu bulacağı ve gelişmekte olan ülkelerdeki sigara kullanımına bağlı ölümlerin %70 artacağı ön görülmektedir (Jha vd., 2006).

2.4.2. Diyet ve fiziksel aktivite

Aşırı kalori alımı ve fiziksel hareketsizlikten kaynaklanan obezite birçok gelişmiş ülkede önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Ogden vd., 2006). Obezite ve aşırı kilo; kolon, meme ve prostat da dahil olmak üzere birçok kanser türüyle ilişkilendirilmiştir. Yüksek kalorili diyet ve hareketsiz yaşam tarzı; hiperinsülinemi, dislipidemi, hipertansiyon ve metabolik sendroma sebep olur. Örneğin, insülin direnci, kanser, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok rahatsızlıkla ilişkilendirilmiştir (Kahn ve Hull, 2006).

2.4.3. Çevresel kirleticiler

Hava kirliliği ve pestisidler gibi çevresel kirlenmeye maruz kalmanın kansere yakalanma riskini arttırdığı bilinen bir gerçektir. Dünya nüfusunun yarısından fazlası temel enerji ihtiyaçlarını karşılamak için odun, kömür ve gübreyi yakıt olarak kullanmaktadır. Bu tür katı yakıtların uygunsuz kullanılması hava kirliliğine yol açar ve iç mekandaki hava kirliliği, akciğerlere nüfuz edebilen küçük partiküller olarak akciğer kanseri ve diğer solunum yolu hastalıklarına yakalanma riskini artırır.

Pestisitlere gelince; gelişmekte olan ülkelere pazarlanan pestisidlerin yaklaşık %70 i kabul edilebilir kalite standartlarında değildir. Bu düşük kaliteli pestisidler sıklıkla yasaklanmış kimyasal maddeler kısıtlanmış tehlikeli maddeler ve safsızlıklar içerir bu nedenle insan sağlığı ve çevre için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Ma ve Yu,2006).

2.5. Kanserde Genlerin Rolü

İki gen tipindeki değişiklikler kansere neden olur; onkogenler, tümör baskılayıcı genler. Tek bir gendeki değişim kansere yol açmamaktadır invaziv bir kanser oluşması için birden fazla genin mutasyona uğraması gerekmektedir.

2.5.1. Onkogenler

2.5.1.1. Protoonkogenler

Hücrenin bölünmesini ve büyümesini ilerleten genlerdir. Protoonkogenler hücre zarında, sitoplazmada veya çekirdekte bulunabilir. Protoonkogenlerin aktiviteleri transkripsiyon ve translasyon seviyelerinde yapılan düzenleme ile değişebilir. Başlıca görevleri; hücre içi sinyal iletimi, apoptozun baskılanması, kromatinin modifiye edilmesidir. Hücreler G0 evresine girdiğinde veya bölünme işlemi bittiğinde protoonkogenler de baskılanır ama kanser hücrelerinde bu baskılanma ortadan kalkar ve protoonkogenlerin aktiviteleri kontrol edilemez bu sayede hücreyi devamlı olarak bölünmesi için uyarır.

2.5.1.2. Onkogenler

Protoonkogenler mutasyona uğradığında ve kanseri tetiklediğinde onkogen adını alırlar. Onkogenlerin bazıları hücreyi apoptozdan korurken bir kısmı da hücrenin büyüme faktörü (GF) ihtiyacını azaltarak sürekli olarak proliferasyonunu sağlar. Protoonkogenler nokta mutasyonu, aşırı gen aktivasyonu, amplifikasyon artışı gibi sebeplerle onkogenlere dönüşmektedir (Oyouni, 2017).

Onkogenler 3 harf ile ifade edilir örneğin myc-ras. Onkogenlerin kökenine göre eğer virüs kökenli ise -v hücre veya kromozom kökenli ise -c ekleri kullanılmaktadır. Onkogenlerin sınıflandırması Çizelge1.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Onkogenlerin sınıflandırılması

Büyüme faktörleri	PDGF,FGF, EGF, IL-2, IL-4, KS3, HST
Büyüme faktörü tirozin kinazlar	EGFR,ERBB2(HER2/neu), ERBB3, ERBB4, CKIT, MET, RET
Tirozin kinazlar	SRC, MEK, BCR/ABL
Membran ilişkili G proteinleri	HRAS, KRAS, NRAS
Serin treonin kinazlar	BRAF, MAPK, AKT
Nüklear proteinler	CMYC, FOS, c-jun, TEL, RUNX(CBFA), MLL

2.5.1.2.1 Myc onkogeni

Myc proteini çekirdekte bulunur ve hücre büyümesi ile ilgili genlerin ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. Myc ekspresyonunda normal olmayan bir artış normal olmayan bir büyüme ile ilgilidir. Küçük hücreli akciğer kanserinde c-myc geninin overeksprese olduğu ve bu kanserli hücrelerin overeksprese olmayan hücrelere göre daha hızlı çoğaldığı saptanmıştır.

2.5.1.2.2 Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar

Siklinler, CDK’lar (siklin bağımlı kinazlar) ile kompleks oluşturur ve hedef proteinlerde fosforilasyon sağlayarak hücre siklusunu düzenlemektedir yani oluşturulan siklin-CDK kompleksi hücre siklusunun her aşamasında önemli olan düzenleyici bir moleküldür. Hücre döngüsünde görevli siklinler ve siklin CDK’ların aktive edici mutasyonları onkogen, CDK inhibitörleri ise tümör baskılayıcı gen fonksiyonunu taklit etmektedir.

Birçok siklin geninin kanser gelişimi ile ilgili bağlantısı olduğu düşünülmektedir. Örneğin, siklin D1'i kodlayan CYD-1 geni meme, mesane, akciğer ve yemek borusu kanserlerinde overeksprese olmuştur. Yüksek seviyelerdeki genin, S fazına kontrolsüz geçişlere katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Pazarbaşı ve Kasap, 2003).

2.5.2. Tümör baskılayıcı genler

Hücresinin proliferasyonunu kontrol altında tutan genlerdir. Bu genlere örnek olarak p53, BRCA1, MLH1 verilebilir. Etkilerini;

- Hücre siklusu bozulursa siklusun devamını engelleyerek,
- Hücreleri gerekli durumlarda apoptoza yönlendirerek,
- Hücre içindeki DNA replikasyonunu ve tamirinin doğru yapılmasını kontrol altında tutarak gösterirler (Oyouni, 2017).

2.6. Kanserde Sinyal Yolaklarının Rolü

Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin bir dizi mutasyonları farklı mekanizmalar aracılığıyla kanser oluşumuna katkıda bulunur ancak sinyal iletimi yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkogenik mutasyonlara sık olarak rastlanmaktadır. Sinyal iletiminde ortaya çıkan değişimler hücrenin çoğalma veya yaşama işlevlerinin düzenli halini ortadan kaldırır. Böylelikle, onkogenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon ve metastaz sürecinde önemli bir yere sahiptir (Doğan ve Güç, 2004).

İnsan genomundaki genlerin yaklaşık %20'si sinyal iletim sürecinde görev alan proteinleri kodlamaktadır. Bu proteinler; hücre zarında bulunan reseptörler, sinyal ileten enzimler ve G-proteinlerdir.

Protein kinazlar, sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonunu-aktivasyonunu sağlarlar. Protein kinazlar membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olarak iki ana gruba ayrılmaktadır (Pawson, Raina ve Nash, 2002; Pawson, 2002).

2.6.1. MAPK sinyal yolağı

MAP kinazlar (mitojenler tarafından aktive edilmiş protein kinazlar) süper ailesinde yer almaktadır bu proteinler ökaryotik yapıdaki tüm hücrelerde bulunmaktadır. MAP kinazlar hücre membranından nükleuse bilgi taşınması noktasında önem taşımaktadır. Bu

sinyal iletim dizisi; yaşama, çoğalma, apoptoz ve embriyogenez için önem taşımaktadır (Liem vd.,2002).

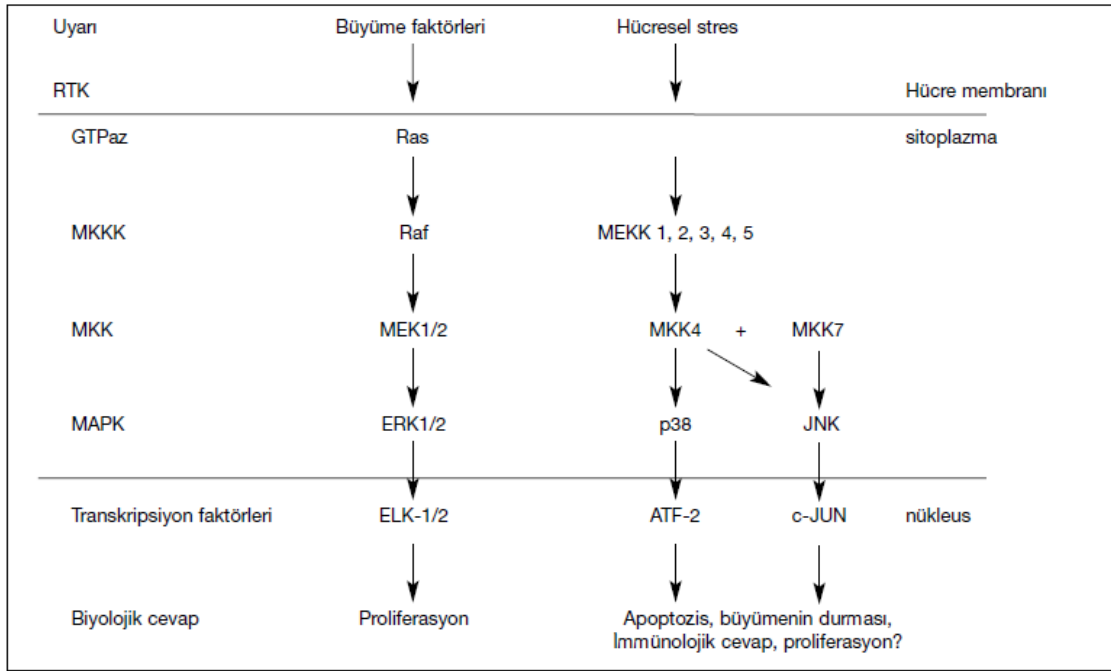
MAP kinaz'lar 3 ana gruba ayrılmaktadır.

- I. P38 MAP kinaz ailesi,
- II. ERK (hücre dışı sinyal düzenleyen kinazlar) ailesi,
- III. JNK (c-Jun NH₂- terminal kinase) ailesi.

MAP kinaz sinyal yolu, reseptör aracılığıyla gelen sinyallerin hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak işlemektedir. Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olur. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin biyolojik cevabı meydana gelir (Kolch, 2002). MAPK sinyal iletim yolu Şekil 1.1'de gösterilmiştir.

2.6.1.1. Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolu ve kanser

Büyüme faktörleri, hormonlar, tümör promoter maddeler bu sinyal iletim yolunu kullanmaktadır. Ras'ın aktifleşmesi ile sinyal iletim kaskad başlar ve sırası ile Raf (= MAPKKK), MEK (= MAPKK) ve Erk (= MAPK) diye ilerler. İnsanda görülen tümörlerin yaklaşık %30'unda bu sinyal yolunun aktivasyonu söz konusudur. Örneğin farnesil transferaz'lar Ras aktivasyonunu önleyerek bu yolağı inhibe etmektedir (Lee ve McCubrey, 2002).



Şekil 2.1. MAPK ailesi ve sinyal iletimi (Doğan ve Güç,2004).

2.7. Kanser Türleri

2.7.1. Akciğer kanseri

Akciğer parankimi ve bronş ağacı hücrelerinin normal dışı kontrolsüz çoğalması ile oluşan tümöre akciğer kanseri denir. Akciğer kanseri ileri seviyelere ulaşana kadar hastada belirli bir şikâyeteye yol açmamaktadır. Akciğer dokusunun içinde ağrı hissini beyne taşıyan lifler olmaması nedeni ile kanser belli büyüklüğe ulaşana kadar hastada neredeyse hiçbir şikâyet oluşturmamaktadır. Bu gizli davranış, akciğer kanserini ölümcül kanser tiplerinden biri yapan önemli bir faktördür. Oluşan kitle öncelikle bulunduğu ortamda büyür, daha sonra lenfatik ya da kan yolu ile yayılmaya metastaz yapmaya başlamaktadır. Metastaz öncelikle beyin, kemik dokular, karaciğer ve böbrek üstü bezlerine olmaktadır. Kanser hastalarının kaybedilme nedenlerinin başında metastazlar gelmektedir (Yener ve Apa,2014). Akciğer kanserinin semptomları genellikle hastalık ilerleyene kadar ortaya çıkmaz ancak yine de sürekli geçmeyen öksürük, kanlı balgam çıkarma, nefes darlığı, göğüste kuvvetli ağrı ve nükseden zatürre ve pnömoni ile kendini belli etmektedir.

Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu'nun 2010 yılında yayınladığı raporda, akciğer kanserinin dünyada en sık görülen ve en çok ölüme sebep olan kanser türü olduğu görülmektedir. Akciğer kanseri histopatolojik olarak küçük hücreli ve büyük hücreli

olmayan akciğer kanseri olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Her iki kanser türü de mortalite olarak ilk sırada yer almaktadır.

IARC'ın raporuna göre dünyadaki kanser sebepli ölümlerin yaklaşık 1/5'i akciğer kanserinden kaynaklanmaktadır. Akciğer kanseri kadınlarda meme kanserinden sonra erkeklerde ise prostat kanserinden sonra görülme sıklığı en yüksek olan kanser türüdür. Akciğer kanserinin erkeklerde görülme oranı kadınlarda görülme oranından daha yüksek olmasına rağmen, sigara içiminin kadınlarda da artması nedeniyle aradaki fark belirgin bir şekilde düşmeye başlamıştır. Akciğer kanseri teşhisi konulan vakaların yaklaşık 4'te 1'i ölümle sonuçlanmaktadır. Akciğer kanseri hastalarının yalnızca %16'sı lokalize olmuş bir evrede iken teşhis edilebilmektedir ve teşhis edilenlerin 5 yıllık sağ kalım oranı %55'tir. Küçük hücreli akciğer kanseri için 5 yıllık sağ kalım oranı küçük hücreli olmayandan daha düşüktür (Travis, Lubin ve Devesa, 1996).

Akciğer kanseri lenfatik metastaz ve uzak metastaz yapmamış, yani erken evrelerde saptanmış ise en iyi sağ kalıma sahip tedavi yöntemi cerrahidir. Bu yöntem için hastanın ameliyatı tolere edebilmesi gerekmektedir. Ayrıca kemoterapi ve kemoradyoterapi diğer tercih edilen yöntemlerdir. Lenf nodu yayılımı saptanmış olgularda kanserin lenf nodu yolu ile venöz sisteme geçişini engellemek için önce kemoterapi daha sonra cerrahi, ardından tekrar kemoterapi yapılabilir. Akciğer kanseri hücre tipine göre, etki/yan etki profilleri göz önünde bulundurularak kombine kemoterapi protokolleri oluşturulmaktadır (Kılıç ve Cansaran Duman, 2017).

2.7.2. Pankreas kanseri

Pankreas, ikinci ve üçüncü lomber vertebralar arasında yer alan, işlevlerine göre endokrin ve ekzokrin pankreas olarak ikiye ayrılan lobüler yapılı, sindirim ve glukoz metabolizmasıyla ilişkili salgılama işlevli bir organdır. Pankreas kanseri, büyük çoğunluğu (%95) ekzokrin pankreas, kalan kısmı ise (%5) endokrin panreastan köken alan her türlü malign neoplazmalardır (Dimaio, 2014).

Pankreas kanseri batı dünyasındaki en sık görülen ikinci gastrointestinal kanser olmakla birlikte insan solid kanserlerinin en ölümcüllerinden biridir. Diğer malignitelere kıyasla pankreas kanserini öne çıkartan durum, iyileştirilmiş sağ kalım açısından son on yıl içerisinde klinik ilerlemenin eksikliğidir ve 5 yıllık sağ kalım oranı %5'in altındadır (Soreide ve Sund,2015).

Pankreas kanserinin etiyolojisi tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, risk artışıyla ilişkili olduğu bilinen birkaç faktör mevcuttur. Bunlar sigara kullanımı, alkol kullanımı, beslenme biçimi, yaş, etnik köken ve genetik sebepler olarak özetlenebilir.

Erken evredeki pankreas kanseri genellikle klinik olarak sessizdir ve hastalık yalnızca tümörün çevre dokulara yayılması ya da uzak organlara metastazı sonrası belirgin hale gelir; pankreas kanseri ile ilişkili belirtileri gösteren çoğu hastalarda kanser ilerlemiş durumdadır. Hastaların çoğunda karın ağrısı, kilo kaybı, halsizlik ve anoreksia (iştahsızlık) şikayetleri vardır, hastaların yaklaşık %50'si diyabetlidir. Sarılık, pankreas başı tümörlerinin en yaygın belirtisidir ve bu yerleşim kaynaklı sarılık genellikle ağrısız ilerleyici ve kaşıntı eşliklidir (Ryan, Hong ve Bardeesy, 2014).

Pankreas kanserinde kullanılan en temel tedavi yöntemi cerrahi operasyondur. Cerrahi operasyonun temel amacı, lenf nodu metastazı olduğu durumlarda bile tüm makroskobik ve mikroskobik tümörün tamamen temizlendiği rezeksiyon yapmaktır. Pankreas kanseri tedavisinde cerrahi operasyon kabul edilebilir sonuçlar sağlasa da hastaların yaklaşık %80'inde kanserin nüksettiği ve 5 yıllık sağ kalım oranının %10-24 olduğu belirtilmiştir. Diğer tedavi seçenekleri; tek başına uygulanan sistemik kemoterapi ve radyasyon ile kemoterapinin kombine halde uygulandığı kemoradyoterapi şeklindedir. Pankreatik kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçları; gemsitabin, 5-fluourasil, kapesitabin, sisplatin, ve oksaliplatinidir. Bu ilaçlar, reaktif bölgeleri ile DNA ya da RNA nükleotitleri arasında çapraz bağlanma mekanizması ile etkileşime girerek iş görürler; böylece kanser hücrelerinde hücre döngüsünün durdurur ve apoptoza yol açarlar (Housain, 2014).

2.8. Kanser ve Hücre Ölümü

Bir canlının yaşamını düzenli bir şekilde devam ettirebilmesi hücre bölünmesi ve programlı hücre ölümü arasındaki denge ile sağlanmaktadır bir yandan canlıda yeni hücreler meydana gelirken diğer yandan bazı hücreler çeşitli şekillerde yok olmakta ve bu da canlının yaşam dengesini meydana getirmektedir.

Canlı organizmalar bu dengeyi koruyabilmek için birçok hücre ölüm mekanizmasına sahiptir. Hücre ölüm mekanizmaları biyokimyasal ve morfolojik farklılıklar nedeniyle Otofaji, Nekroz ve Apoptoz olmak üzere üçe ayrılır (Ouyang vd., 2012).

2.8.1. Otofaji

Otofaji, organizmanın fizyolojik ve evrimsel olarak kendini koruması için geliştirdiği hayatta kalma mekanizmasıdır (Galluzzi vd., 2007). Kelime anlamı kendini yeme olan bu hücre ölüm şekli, açlık durumunda besin elde etmek için hücre içi makromoleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlar aracılığıyla kendini parçalaması demektir. Kısa ömürlü proteinlerin ubiquitin-proteozom sisteminde parçalanmasına karşın, uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji sistemi tarafından parçalanırlar ve oluşan yapı taşları (Örneğin; aminoasitler) hücre kullanımı için yeniden kazandırılırlar.

Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği böylelikle hücre homeostazisinin korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir (Wang vd., 2018). Son on yılda yapılan çalışmalar ise otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Ayrıca araştırmalar otofaji anormalliklerinin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da nedenleri arasında yer aldığını göstermektedir (Arslan, Korkmaz ve Gözüaık, 2011).

2.8.2. Nekroz

Nekroz, genler tarafından kontrolü sağlanamayan, düzensiz bir şekilde meydana gelen hücre ölüm şeklidir. En yaygın nedeni hipoksi olmakla birlikte arsenik, siyanür , insektisitler gibi toksik maddeler ve ağır metallerde nekroza sebep olmaktadır. Nekroz sırasında mitokondriyal ROS üretimi artar, nonapoptotik proteazlar aktive olur, ATP üretimi azalır ve Ca^{++} kanalları açılır.

Dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılar (ısı, yanma, toksik maddeler gibi) hücrenin iyon dengesini bozar. DNA tamirinden sorumlu nuklear enzim PARP (Poli ADP-riboz polimeraz) NAD^{+} 'ı ikiye bölerek NAD kaybına neden olur. Bu durumda gerçekleşen ATP eksikliği, iyon pompası yetersizliğine yol açar. Böylece hücre sıvı alır ve organeller şişer. Plasma membran bütünlüğü bozulur ve osmotik basın nedeniyle hücre patlar. Hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin hücreler arası boşluğ salınması yangı (enflamasyon, iltihaplanma) olayına sebep olur. Bu olayın karakteristik özelliğ makrofaj ve nötrofillerin nekrotik dokuya gö etmesidir. Gö eden bu hücreler nekrotik

dokuyu fagosit eder. Bu nedenle enflamasyon nekrozun önemli bir işaretidir (Golstein ve Kroemer,2007; Nicotera ve Melino, 2007).

2.8.3. Apoptoz

Apoptoz, canlının kendi otonom mekanizması tarafından düzenlenen yaşlanmış, zararlı ve istenmeyen hücrelerin enerji kullanılarak iz bırakmadan öldürülmesidir. Apoptoz, kısaca programlı hücre ölümü olarak tanımlanabilir ve hücrenin normal gelişimi sırasında görülen fizyolojik bir olaydır (Alles vd.,1991). Apoptoz Yunanca’da ağaçların yapraklarını dökmesi anlamına gelmektedir, Apo: Ayrı, Ptoxis: düşme demektir ve ilk kez 1972 yılında Avusturyalı patolog J.F.K. Kerr tarafından tanımlanmıştır (Yates,1997). Apoptoz, genel olarak hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır. Apoptoz ile ilgili çalışmalarda genelde *Caenorhabditis elegans* nematodu kullanılmıştır. Bu nematodlarla çalışan Brenner, Robert Horvitz ve John E. Sulston 2002 yılında “programlanmış hücre ölümü ve organ gelişiminin genetik olarak düzenlenmesi” konusu ile Nobel ödülü kazanmışlardır (Renahan, Booth ve Potten, 2001). Apoptoz, embriyonik dönemde; el ve ayak parmaklarının arasındaki dokunun ortadan kalkması, merkezi sinir sisteminin şekillenmesi, kan damarlarının sayısının azaltılması gibi durumlarda görülebilirken postnatal dönemde ise kemik iliğinde kan üretiminin dengede tutulması için 5.1011 kan hücresinin uzaklaştırılması, menstruel siklus sonunda korpus luteumun involusyonu apoptoz ile gerçekleşir (Marti vd., 2001).

Çizelge 2.2. Apoptoz ve nekrozun kıyaslanması (Coşkun ve Özgür,2014).

Özellik	Apoptoz	Nekroz
Yol Açan Nedenler	Büyüme faktörü eksikliği, Hücre yaşlanması, HIV, Kanser ilaçları, Radyasyon, Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, Sitotoksik T lenfositler	İskemi, Hipertermi, Hipoksi, Litik viral enfeksiyon, Toksik maddeler, Ağır metaller, Şiddetli oksidatif stress
Morfolojik Özellikleri	Hücre membranı sağlamdır. Hücre küçülür. Blebler oluşur. Kromatin kondensasyonu gerçekleşir. Organeller sağlamdır. Apoptotik cisimcikler oluşur. Erken evrede fosfatidil serin translokasyonu gözlenir.	Hücre membranı bütünlüğü kaybolur. Hücre şişer. Büyük vakuoller oluşur. Organellerin parçalanır. Hücre lizisi gerçekleşir. Fosfatidilserin translokasyonu yoktur.
Biyokimyasal özellikleri	Programlıdır. ATP gerektirir. DNA kırıkları merdiven şeklini alır (jel elektroforezinde ladder).	İyon dengesi bozulur. ATP gerekmez. DNA rastgele parçalanır (Jel elektroforezinde smear).
Diğer özellikleri	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür. Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir. Makrofajlar tarafından fagosit edilirler. Enflamasyon görülmez	Hücreler gruplar halinde ölür. Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir. Lizozomal enzimler salınır. Enflamasyona neden olur.

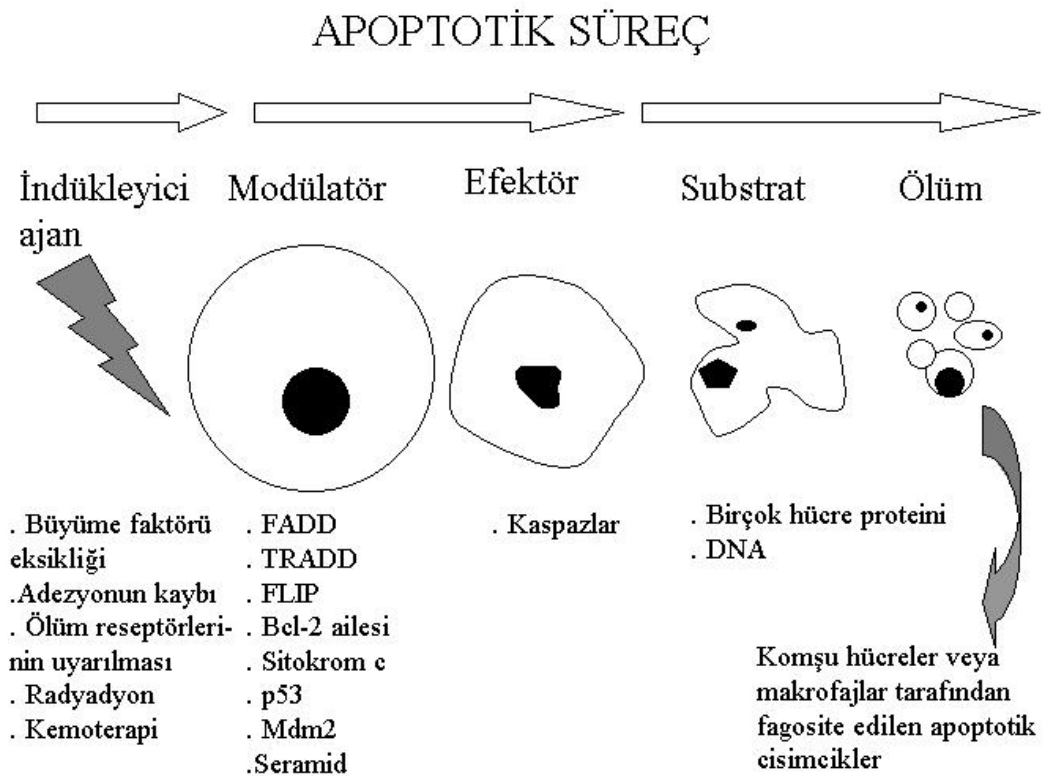
2.8.3.1. Apoptozun aşamaları

Apoptoz, hücrenin kendini yok etmek için bir takım biyokimyasal ve metabolik işlemleri devreye soktuğu bir süreçtir. Hücre apoptoz uyarısı aldığı anda;

- Bulunduğu ortamdan uzaklaşır, komşu hücreleri ile bağlantısını koparır ve büzülür, büzülmesinin temel nedenlerinden birisi Na^+ , K^+ , Cl^- iyon kanallarının kapanması ve hücre içi ve hücre dışı arasındaki geçişlerin

durmasıdır. Bir diğer neden ise aktin ve lamininlerin ayrılması nedeniyle hücrenin iskelet yapısının bozumasıdır.

- Kromatini yoğunlaşır ve piknotik bir görünüm alır, DNA'sı nükleozomlardan kesilir jel elektroforezinde apoptoza özgü olan 'merdiven bant' görünümünü alır.
- Hücre organelleri bütünlüğünü korur.
- Hücre zarında bulunan ve iç yüzeye dönük olan fosfotidil serinler dış yüzeye doğru transloke olur. Bu durum hücrelerin makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar ve nekrozun aksine fagosite edilmek için elverişli hale gelir.
- Çekirdek küçülür ve parçalara ayrılır. Hücre zarıyla sarılı parçalar şeklinde kopar, apoptotik cisimciklere ayrılır. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir, ancak enflamasyon görülmez (Bellamy vd.,1995; Ellis, Yuan ve Horvitz,1991).



Şekil 2.2. Apoptotik hücrede meydana gelen değişiklikler (Ulukaya, Acilan ve Yılmaz,2011).

2.8.3.2. Apoptozun düzenlenmesi

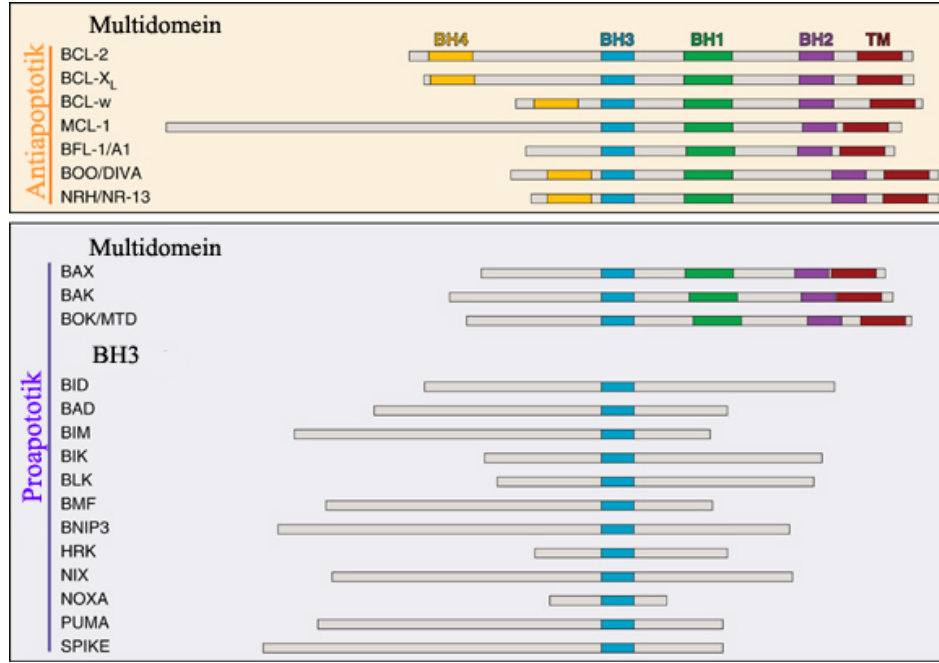
Apoptozun düzenlenmesinde; Ca^{++} , Seramid, bcl-2 ailesi gibi moleküller, kaspazlar, sitokrom-C, p53 gibi proteinler rol oynamaktadır.

2.8.3.2.1 Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ailesi apoptozun düzenlenmesinde önemli bir yere sahip olan bir onkoprotein grubudur. Hücrenin apoptoza eğilimli olup olmaması Bcl-2 ailesi genlerinin formuna bağlıdır. Bcl-2 ailesinin tanımlanmış olan 20 üyesi bilinmektedir bunlar proapoptotik ve antiapoptotik olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Proapoptotikler apoptotik süreci indüklerken antiapoptotikler inhibe etmektedir. Hücrede proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza eğilimlidir. Antiapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza daha az eğilimlidir.

- Proapoptotik üyeler Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim 'dir
- Antiapoptotik üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1, Bcl-w, Bfl-1'dir

Proapoptotik üyeler sitozolde bulunmaktadır, sitokrom-c ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını artırarak apoptozu indüklerler. Antiapoptotik üyeler ise mitokondrinin dış membranında, endoplazmik retikulumde ve çekirdek zarında yer alırlar. Por oluşumunu sağlayıp iyon geçişini regüle ederler. Özellikle hücredeki Ca^{++} oranını kontrol ederler. Ayrıca kaspazların öncü formlarıyla AIF ve sitokrom-C salınımını bloke ederek apoptozu inhibe ederler.



Şekil 2.3. Bcl-2 ailesi proteinleri (Walensky,2006).

2.8.3.2.2 Kaspazlar

Kaspazlar, hücre ölümü ve inflamasyonu düzenleyerek homeostazisin korunmasında önemli olan bir gen ailesidir aspartik aside spesifik sistein proteazlardan oluşan bir grup enzim ailesindendir, aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar. Kaspazlar, üç alt üniteli aktif olmayan monomerik prokaspaz halinde üretilir ve aktivasyon için özgün proteoliziz ile dimerizasyon gerçekleşmesini gerektirir (McIlwain, Berger ve Mak, 2013). Kaspazlar üçe ayrılmaktadır.

- I. Başlatıcı kaspazlar; (Kaspaz 2, 8, 9, 10)
- II. Efektör kaspazlar (Kaspaz 3 ,6, 7)
- III. İnflamatuvar kaspazlar (Kaspaz 1 ,4, 5, 11, 12, 13, 14)

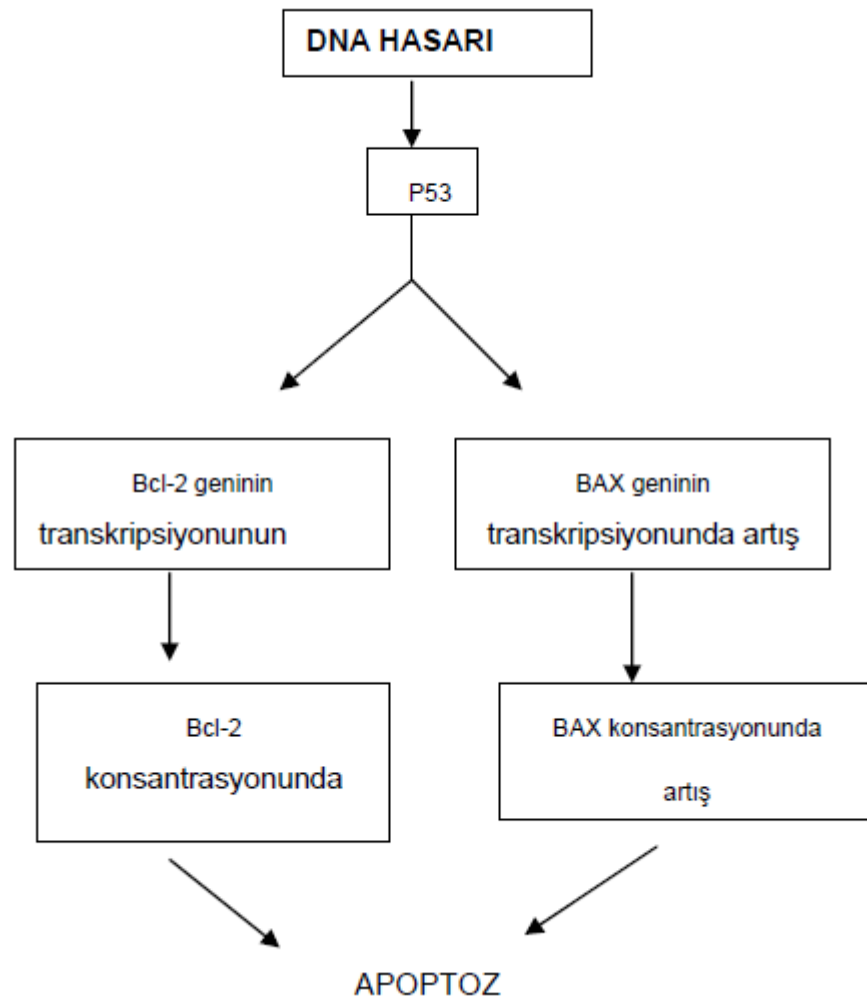
Her aktif kaspaz iki özdeş büyük alt ve küçük alt birimden oluşan tetramer yapıdadır. Ölüm efektör alanları (DED) veya kaspaz istihdam alanları (CARD) içerebilirler. Bu alanların yardımıyla aktif kaspazlar hücrenin içinde veya dışında diğer moleküllere bağlanabilirler.

Ölüm sinyali alan hücre, başlatıcı kaspazlar ile apoptotik sürece girmektedir, apoptotik sürece giren hücre bu ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletir ve efektör kaspazlar ise DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive ederler. Hücre

iskeleti proteinlerini keserek hücre morfolojisinde değişikliklere sebep olurlar (Adams ve Corry,2001; Adrain ve Martin, 2001; Spierrings vd., 2004).

2.8.3.2.3 p53

p53 hücrede bir DNA hasarı oluştuğunda hücre siklusunu G1 fazında durdurup hücreye DNA tamiri için zaman kazandıran bir transkripsiyon faktörüdür. Hasar tamir edilemeyecek durumda ise Bax, Apaf-1, v Fas yapımını arttırıp bcl-2 ve bcl-xl yi baskılayarak apoptozu indükler (Vousden ve Lu, 2002).



Şekil 2.4. Apoptozun inhibisyon ve aktivasyonu (Pazarbaşı ve Kasap,2003).

2.8.3.2.4 FAS (APO-1 veya CD95)

24 üyeli TNF reseptör ailesinin en iyi tanımlanmış üyesidir. Fas proteini 43 kDa molekül ağırlığındadır, Fas hücre reseptörü ise sitotoksik T hücreleri ve naturel killer hücreleri üzerinde bulunur.

Fas proteini hücre yüzeyinde kendi reseptörüne bağlanır ve reseptör trimerizasyonunu sağlar. Aktive olmuş reseptörler FADD reseptör molekülü ile birleşir. Bu şekilde; Fas reseptörünün karboksil ucuna (C) yakın 80 aminoasitlik bölgenin uyarılmasıyla prokaspazlar aktive olur ve apoptoz başlar. Fas ve TNF alfa dışında TRIL ve TRAIL reseptörleri de benzer yolla apoptozu uyarabilir (Curtin ve Cotter, 2003).

2.8.3.3. Apoptozun mekanizması

Apoptoz iki yol ile gerçekleşmektedir.

- I. İç reseptör ölüm yolu (intrinsik yolak, mitokondriyal yolak)
- II. Dış reseptör ölüm yolu (ekstrinsik yolak)

Apoptozu etkileyen hücre içi sinyaller; hipoksi, hücre içi Ca^{++} düzeyi artışı, DNA hasarı, pH azalışı ve hücre siklus bozukluklarıdır. Hücre dışı sinyaller ise büyüme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS-FAS ligand aracılığı ile apoptoz, TNF aracılığı ile apoptoz) ve dış etkenler (toksinler, ultraviyole ışınlar, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon)'dir.

Hücre içi sinyaller intrinsik yolak ile hücre dışı sinyaller ekstrinsik yolak ile apoptozu indükler ancak her iki yolağın da başlatıcı ve durdurucu merkezleri kaspazların aktivasyonundan geçmektedir (Daniel ve Korsmeyer, 2004).

2.8.3.3.1 İç reseptör ölüm yolu

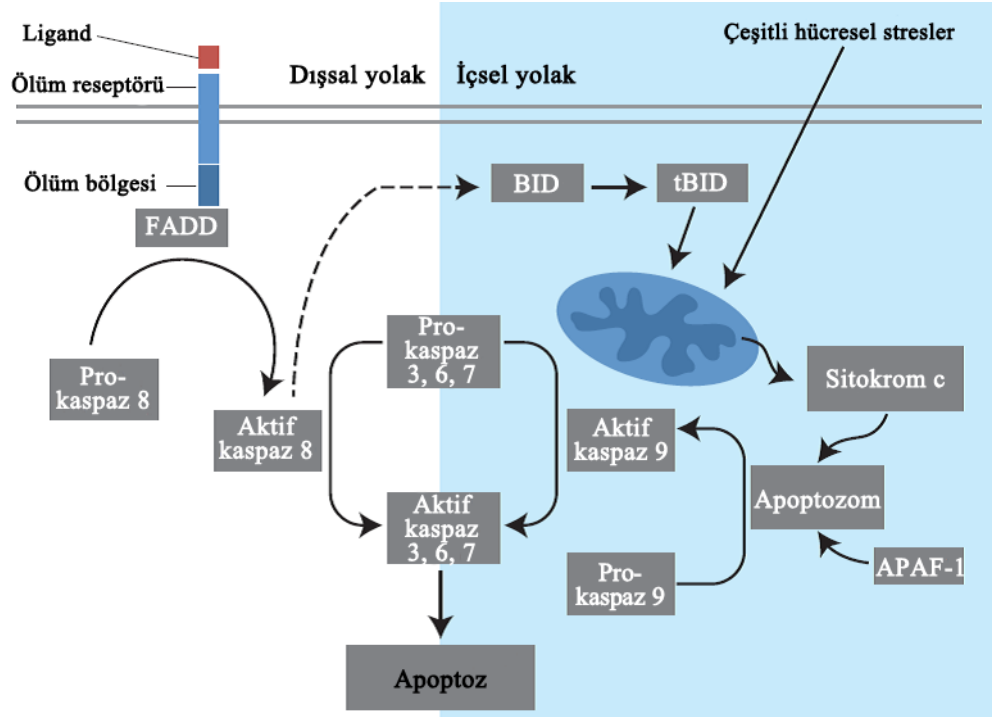
Hücre içi sinyaller ile apoptotik uyarı alınmasından sonra proapoptotik proteinlerden olan Bid, antiapoptotik bir protein olan Bcl-2' yi inaktive edip Bax ve Bak'ı aktifleştirir, aktifleşen Bax ve Bak mitokondriyal membranda por oluşumunu indükleyip membran potansiyelini değiştirir (Spierrings vd.,2004). Bu sayede, mitokondri membranından Sitokrom-C, SMAC (ikinci mitokondri kökenli kaspaz aktivatörü), Endo-G (Endonükleaz-G), Ca^{++} ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını uyarır.

- Sitokrom-C, oksidatif fosforilasyon için elektron taşır.
- SMAC, IAF (İnhibitör apoptotik faktör)'ü inhibe eder ve apoptozu hızlandırır.
- AIF, çekirdeğe transloke olur ve parçalara ayırır.
- Endo-G ise DNA'yı parçalar.

Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılmasıyla sitozolde **Apoptozom** denen bir kompleks oluşturur. Apoptozom kaspaz- 9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9 da pro-kaspaz-3'ü aktif Kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz) 'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz tarafından aktive edilen DNaz)'ı serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur (Adams ve Corry,2001; Adrain ve Martin, 2001).

2.8.3.3.2 Dış reseptör ölüm yolu

Hücre yüzeyindeki Fas, TNF-R, DR5 gibi ölüm reseptörlerine, Fas-L, TNF-alfa, TRAIL gibi ölüm sinyallerinin bağlanması ile reseptörler trimerik yapı kazanır. Trimerik yapı kazanan reseptör, adaptör molekülleri ve pro-kaspazlarla birleşerek DISC (Death inducing complex,ölüm tetikleyici sinyal kompleksi) adı verilen yapıyı oluşturur. DISC inaktif durumdaki pro-kaspaz-8'i aktif Kaspaz-8'e dönüştür. Aktif hale gelmiş olan kaspaz-8, kaspaz-3'ü aktive eder ve bunu ya direkt olarak kaspaz-3'ü aktive ederek ya da dolaylı olarak Bid'i uyarıp Kaspaz-9'u aktive ettikten sonra Kaspaz-3'ü aktive ederek yapar (Adams ve Corry,2001; Adrain ve Martin,2001).



Şekil 2.5. İç ve dış apoptotik yolak (McIlwain, Berger ve Mak, 2013).

2.9. Ppar- γ ve Kanser

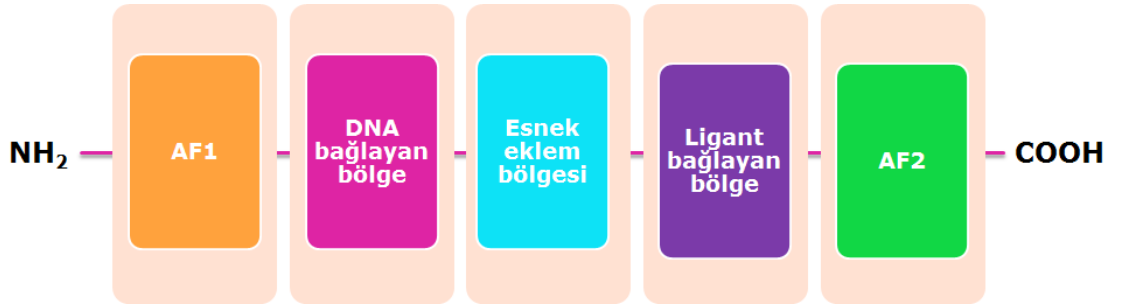
1990'lı yıllarda Isseman ve Green tarafından dislipdemi ve diyabete karşı fibratların ve tiyazolidindionların moleküler hedefi olan bir steroid hormon süper ailesi tanımlanmış ve peroksizom proliferatör ile etkinleştirilen reseptör (peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR) olarak adlandırmışlardır (Beaven ve Tontonoz, 2016, s.313).

PPAR'ları kısaca, hücre içine yerleşmiş gen transkripsiyonunu düzenleyen nükleer reseptörler olarak tanımlayabiliriz. Yağ asidi ve karbonhidrat metabolizmasını düzenleyen güçlü transkripsiyon faktörlerleridir. PPAR'lar sınıf II nükleer reseptörler grubuna dahildir.

PPAR'lar farklı genler tarafından eksprese edilmektedir ve farklı dokularda farklı işlevsel özellik kazanmışlardır. Ligant tarafından etkinleştirildiğinde gen transkripsiyonunu etkinleştirirler ya da baskırlar. Ligant ile etkinleşince, liganda özgü reseptör proteinin liganda özgül olmayan retinoid reseptörü (*retinoid X receptor*; RXR) ile birleşerek etkin heterodimer biçimine dönerler (Aydoğan vd., 2013).

PPAR yapısı 5 bölgeden oluşmaktadır:

- I. Özelleşmiş PPAR agonistlerinin bağlandığı ligant bağlayan bölge.
- II. Mitojen ile etkinleştirilen protein kinaz (MAPK) ile fosforilasyon yoluyla liganttan bağımsız olarak etkinleşen, N ucunda bulunan AF1 bölgesi.
- III. PPAR ile etkinleştirilen hedef genlerin promotör bölgesinde bulunan PPAR yanıt elementi (PPRE) ile etkileşen bölge.
- IV. Ligant bağlanmasına karşılık olarak transkripsiyonel etkinleşme için gerekli olan yapısal değişikliğe uğrayan C ucunda bulunan AF2 bölgesi.
- V. İşlevi tam olarak anlaşılmamış olmasına karşın, deoksiribonükleik asit ile bağlanma için önemli olduğu düşünülen esnek eklem bölgesi.



Şekil 2.6. PPAR'ın yapısı.

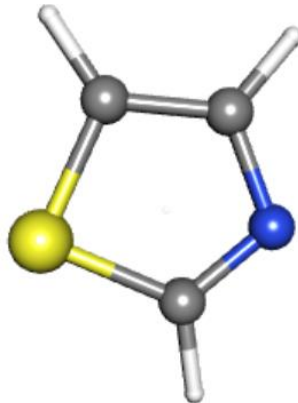
Günümüze dek PPAR α , PPAR β ve PPAR γ olmak üzere 3 alt tür tanımlanmıştır. PPAR γ , adiposit proliferasyonu, glukoz homeostazı, lökotrien yıkımının hızlandırılması, hücre döngüsü kontrolü, karsinojenez, ateroskleroz ve enflamasyonda önemli rolü olan düzenleyici bir proteindir (Aydoğan vd., 2013).

Transjenik fare modelleri ile yapılan bir çalışmada, PPAR β ve PPAR γ gen ekspresyonunun baskılanması ile akciğer kanserinin şiddetlenmesi arasında bir ilişki bulunmuştur. PPAR γ aktivatörlerinin, hücrelerin farklılaşma ve apoptozisinde rol oynadığı anlaşılmıştır. Diyabet tedavisinde bir PPAR γ agonisti olan tiyazolidindion kullanan hastalarda akciğer kanseri gelişme riskinin, başka bir tedavi alan hastalara oranla anlamlı şekilde daha az olduğu gösterilmiştir. Yine diğer bir PPAR γ agonisti olan rosuglitazonun ise nude farelerde A549 içerikli tümörlerin baskılanmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. PPAR γ agonistler hücre siklusu arestini kullanarak tümör gelişimini ve invazyonu kontrol etmektedir (Roman, 2008).

PPAR γ aktivasyonunun pankreas kanseri hücre gelişimini azaltmanın yanı sıra migrasyon ve invazyon kapasitesinde küçülme sağladığını göstermiştir. Kanserli nude farelerde PPAR γ aktivasyonunun pankreas kanseri gelişimini inhibe ettiği ve tümör anjiyojenesisini baskıladığı gösterilmiştir (Polvani vd., 2016, s.2441).

2.10. Tiyazoller ve Kanser

Kimyacıların yıllardır dikkatini çeken azot, kükürt ve oksijen gibi çeşitli heteroatomları içeren biyolojik olarak aktif birçok molekül vardır. Tiyazoller, sırasıyla -1 ve -3 pozisyonlarında kükürt ve azot içeren önemli bir beş üyeli heterosiklik bileşik sınıfıdır. Tiyazollerin kimyasal yapısı Şekil 2.7’de gösterilmiştir. Tiyazoller ilk olarak 1887 yılında Hantzsch ve Weber (1887) tarafından tanımlanmıştır. Tiyazoller kaynama noktası, bazlık, suda çözünürlük ve elektrofillerle reaktiviteye direnç gibi fizikokimyasal özelliklerinde piridin ve pirimidine benzerler ancak bazı tiyazol türevleri davranış ve özelliklerinde tiyofen ve furanı andırır. Tiyazol türevlerinin çeşitli biyolojik faaliyetlere sahip olduğu bildirilmiştir örneğin, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiinflamatuvar, antitüberkülar, antiplazmoidal, antikanser, antialerjik, antiplazmoidal. Tiamin (vitamin B1), nizatidin (antiülser), penisilin (antibiyotik), fanetizol, meloksikam (anti-inflamatuvar ajanlar), ritonavir (anti-HIV), bleomisin (antineoplastik) gibi halen tedavide kullanılmakta olan moleküllerin içinde tiyazol halkasının varlığı onları farmakolojik olarak önemli bileşikler haline getirmiştir (Arora vd., 2016).



Şekil 2.7. Tiyazollerin kimyasal yapısı (¹<http>)

Yapılan literatür araştırmasına göre tiyazollerin neden olduğu antikanser etkilerin hangi mekanizma üzerinden yürüdüğüne dair çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Son dönemlerde bu bileşiklerin PPAR- γ reseptörleri üzerindeki aktive edici özellikleri ile kanserli hücrelerde kematöropatik etkileri söz konusudur. Bazı kanser hücre hatlarında PPAR- γ reseptörleri ekspresyonunun bulunduğu gösterilmiştir. A549 insan akciğer adenokarsinoma ve PANC-1 pankreas adenokarsinoma hücreleri bu özelliği taşıyan hücrelerden ikisidir. Bu nedenle, çalışmamızda, yeni sentezlenen tiyazollerin sitotoksik, apoptotik ve gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini A549 insan akciğer adenokarsinoma ve PANC-1 pankreas adenokarsinoma hücreleri üzerinde araştırmayı planlamış bulunmaktayız.

2.11. Kanser Tedavisi

Kanserin tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemleri en sık başvurulmuş yöntemler olmakla birlikte, hormon terapisi ve biyolojik yöntemlerin kullanılması gibi farklı yaklaşımlar da diğer yöntemlere destek olacak şekilde birlikte veya tek başına kullanılabilir. Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin kişiye özgü bir hastalık olması, tedavilerin kişiden kişiye farklılık gösterebilmesi nedeniyle tek bir kesin tedavi yönteminin varlığından bahsetmek imkansızdır (Baykara,2016).

2.11.1. Radyoterapi

Radyoterapi (RT), kanserli hücreleri iyonizan ışınlar (Radyum-223, Stronsiyum-89, Samaryum-153) kullanılarak öldürmeye dayanan bir tedavi yöntemidir. Vücudun sadece belli bir bölgesini hedef alarak yapılabildiği gibi tüm vücudu hedef alan tedaviler de uygulanmaktadır. Radyasyon terapisinde genelde cerrahi işlem öncesi uygulanarak tümörün küçülmesi hedeflenir.

Ancak RT'nin en büyük dezavantajlarından birisi zararlı hücreleri öldürürken sağlıklı olanları da öldürmesidir. Ayrıca kusma, saç kaybı, halsizlik, iştah kaybı gibi sık görülen yan etkiler de hastanın yaşam kalitesini etkileyebilir (Kihnikar vd., 2014).

2.11.2. Kemoterapi

Kemoterapi (KT), kemoterapotik ajanlar kullanılarak kanser hücrelerini öldürme temeline dayanan tedavi yöntemidir ve bu tedavide sitotoksik anti-neoplastik ajanlar

kullanılmaktadır. Kemoterapi radyoterapide olduğu gibi cerrahi girişimden önce tümörü küçültmek için veya tek başına tedavi olarak kullanılabilir. Lösemi veya lenfoma gibi kanser türlerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır.

Kemoterapi uygulamaları esnasında verilen ilaçlar; alkilleyici ajanlar, kortikosteroidler, anti metabolitler, anti tümör antibiyotikler, mitotik inhibitörler ve topoizomeraaz inhibitörlerdir (Mian vd., 2016).

2.11.3. Kök hücre tedavisi

Kök hücreler diğer hücrelere dönüşebilen özel hücrelerdir ve her kök hücrenin başka yeni bir kök hücre üretme yeteneği vardır. Kök hücre bölündüğünde kök hücre olarak kalabilir veya farklılaşarak başka bir hücreye dönüşebilir.

Kök hücreler istenen hücre tipine dönüşebilme, transplantasyondan sonraki dönemde hücrede sağ kalabilme, hücrenin işlevini yerine getirebilme ve aynı zamanda çevre doku ve organlara zarar vermeme şartlarını taşıdığı takdirde kanser tedavisinde kullanılabilir (Takahashi ve Yamanaka, 2013).

2.11.4. Cerrahi yöntemler

Cerrahi yöntemler radyoterapi ve kemoterapi ile birlikte kullanıldığı gibi tek başına da tedavide kullanılabilir. Kanser tanısında; şüpheli dokudan biyopsi alınarak incelenmesi yoluyla tedavide ise eğer metastaz yok ise kanserli dokunun diğer dokulara hasar vermeden çıkarılması yoluyla kullanılabilir.

2.11.5. Biyolojik tedaviler

Biyolojik tedavilerin amacı biyolojik materyaller kullanılarak kanserin tedavi edilmesidir. Bunlara örnek olarak; monoklonal antikorlar, kanser aşılari, antitümörjenikler, interferonlar, interlökinler ve gen terapisi verilebilir (Baykara, 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

10, 200, 1000, 5000 µL'lik mikropipet uçları (Axygen, İngiltere),
15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya),
25 ve 75 cm²'lik hücre kültür flaskları (Corning, Amerika),
2 mL'lik santrifüj tüp (Eppendorf, Almanya),
5 ve 10 mL'lik steril enjektör (Hayat, Türkiye),
12 kuyulu 5 mL'lik rezervuarlar (Isolab, Almanya),
5-10 ve 25 mL'lik tek kullanımlık serolojik pipet (Costar, Sigma-Aldrich, Almanya),
6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası (TPP, İsviçre),
5 mL'lik flow tüpleri 12x75 mm (BD Biosciences, Amerika)
Lamel (Isolab, Almanya),
Lam (Isolab, Almanya),
Filtre (Sartorius stedim, Almanya),
Karyotüp (2mL) (Greiner bio-one, Amerika),
Parafilm (Pechiney, Fransa),
pH indikatör kağıdı (Macherey- Nagel, Almanya)
Thoma Lamı (Marienfeld, Almanya),
PANC-1 hücre hattı (ATCC, Amerika)
hTERT-HPNE hücre hattı (ATCC, Amerika)
A549 hücre hattı (ATCC, Amerika)
CCD19-LU hücre hattı (ATCC, Amerika)
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide % 98, Sigma-Aldrich, Almanya)
Fosfat tampon (PBS, Pan Biotech)
Dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich, Almanya),
Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma-Aldrich, Almanya),
Penisilin-streptomisin Solüsyonu (Isolab, Almanya),
Cis-Diamineplatinum(II) dichloride (Sigma Aldrich, ABD),
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, Almanya),
RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Almanya),

M3 Base Medium (Incell Corporation, Amerika)
Tripan mavisi (Biological Industries, İsrail),
Trypsin-EDTA Solüsyonu (Biochrom, Almanya),
Annexin V-FITC/PI Apoptoz Tayin Kiti 1 (BD Biosciences, Amerika),
PE Active Caspase-3 Tayin Kiti (BD Biosciences, Amerika),
MitoScreen (JC-1) Membran Potansiyeli Tayin Kiti (BD Biosciences, Amerika),
2,4'-Dibromoasetofenon (Acros, Belçika),
2-Bromo-2'-asetonafton (Sigma-Aldrich, Almanya),
2-Bromo-4'-floroasetofenon (Acros, Belçika),
2-Bromo-4'-kloroasetofenon (Acros, Belçika),
2-Bromo-4'-metilasetofenon (Acros, Belçika),
2-Bromo-4'-metoksiasetofenon (Acros, Belçika),
2-Bromo-4'-nitroasetofenon (Acros, Belçika),
2-Bromo-4'-siyanoasetofenon (Acros, Belçika),
2-Bromo-4'-triflorometilasetofenon (Sigma-Aldrich, Almanya),
2-Bromoasetofenon (Sigma-Aldrich, Almanya),
4-[2-(Dimetilamino)etoksi]benzaldehit (Maybridge, İngiltere),
Absolü etanol (J.T. Baker, Hollanda),
Dimetil sülfoksit-*d*₆ (DMSO-*d*₆) (Merck, Almanya),
Metanol (Sigma-Aldrich, Almanya),
Tiyosemikarbazit (Fluka, Almanya).

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

İnverted mikroskop (Olympus, Amerika),
Multimod mikropilaka okuyucu (BioTek, Synergy HTX, Amerika),
Akış sitometri cihazı (BD, FACS Aria ICell Sorter, Amerika),
Konfokal mikroskop (Leica, TCS-SP5 II, Almanya),
Işık Mikroskobu (Leica, Almanya)
Rotator (Stuart SB2, Almanya)
Laminar air flow kabini (Mars Scanlaf, Danimarka),
Masaüstü soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya),
Derin dondurucu buzdolabı (Nuair, Amerika),
Steril CO₂ inkübatörü (Binder, Almanya),

Sterilizatör (Heraeus, Almanya)
Su banyosu (Nüve, Türkiye),
Sıvı azot tankı (Taylor Wharton RS- Series, Amerika),
Hassas terazi (Mettler Toledo, Amerika),
Otoklav (Eryiğit A.Ş. Türkiye),
Şarjlı pipetör (Starlab, Almanya),
Farklı hacimlerde otomatik mikropipetler (Thermo, FinnPet, Kanada),
Farklı hacimlerde otomatik mikropipetler (Eppendorf, Research Plus, Almanya),
Çok kanallı otomatik mikropipet (Thermo, FinnPet, Kanada),
Vorteks (Daihan, Güney Kore),
Distile Su Cihazı (Sartorius Stedim, Almanya),
Mr. Frosty (Nalgene)
Erime derecesi tayin cihazı (Mettler-Toledo MP90, ABD),
IR spektrofotometresi (Shimadzu, Japonya),
Kütle spektrometresi (Shimadzu, Japonya),
Magnetik tabanlı ısıtıcı karıştırıcı (Heidolph, Almanya),
NMR spektrometresi (Bruker, ABD).

3.2. Metodlar

3.2.1. Sentez Çalışmaları

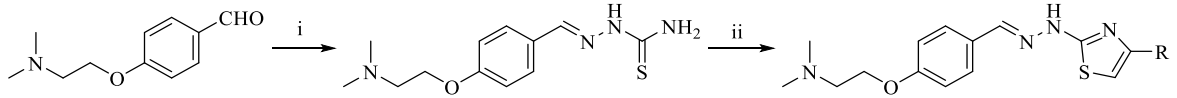
Deneylerimizde kullanılacak Tiyazol türevi bileşiklerin sentez çalışmalarında izlenen yol aşağıda belirtilmiştir.

3.2.1.1. 4-[2-(Dimetilamino)etoksi]benzaldehit tiyosemikarbazonun genel sentez yöntemi

4-[2-(Dimetilamino)etoksi]benzaldehit, tiyosemikarbazit ile etanol içinde 12 saat geri çeviren soğutucu altında kaynatılmıştır. Çöken madde süzülerek alınmış ve kurutulmuştur. Elde edilen madde etanol ile saflaştırılmıştır.

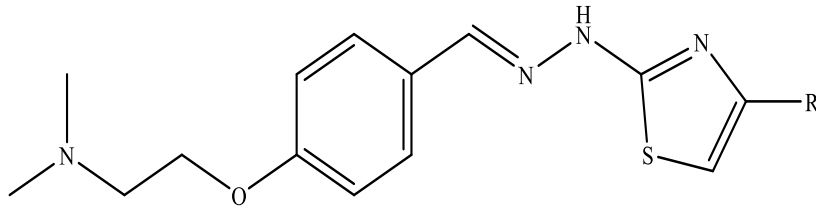
3.2.1.2. 2-[2-(4-(2-(Dimetilamino)etoksi)benziliden)hidrazinil]-4-ariltiyazol türevlerinin genel sentez yöntemi

Eşdeğer miktar tiyosemikarbazon türevi aril açıl bromürler ile etanol içinde 6 saat geri çeviren soğutucu altında kaynatılmıştır. Çöken madde süzülerek alınmış ve kurutulmuştur. Elde edilen madde etanol ile saflaştırılmıştır.



Şekil 3.1. Tiyazol türevi bileşiklerin sentez şeması, (i) $\text{NH}_2\text{CSNHNH}_2$, etanol, 12 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtma; (ii) RCOCH_2Br , etanol, 6 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtma.

3.2.2. Sonuç Bileşikleri



Şekil 3.2 Sentezlenen sonuç bileşiği

Bileşik	R
1	Fenil
2	4-Florofenil
3	4-Klorofenil
4	4-Bromofenil
5	4-Nitrofenil
6	4-Siyanofenil
7	4-Triflorometilfenil
8	4-Metilfenil

3.2.3. Tiyazol türevi bileşiklere ait ^1H NMR spektroskopik verilerin değerlendirilmesi

HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{OS}$ için hesaplanan: 417.1744, bulunan: 417.1743.

2-[2-(4-(2-(Dimetilamino) etoksi)benziliden)hidrazinil]-4-feniltiyazol (1)

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 2.88 (s, 6H), 3.55 (t, $J= 4.56$ Hz, 4.80 Hz, 2H), 4.38 (t, $J= 4.53$ Hz, 4.83 Hz, 2H), 7.08 (d, $J= 8.79$ Hz, 2H), 7.27-7.32 (m, 2H), 7.38-7.43 (m, 2H), 7.64 (d, $J= 8.73$ Hz, 2H), 7.85 (d, $J= 7.23$ Hz, 2H), 8.02 (s, 1H), 12.05 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 43.34 (2CH_3), 55.88 (CH_2), 62.74 (CH_2), 103.88 (CH), 115.60 (2CH), 125.97 (2CH), 127.97 (C), 128.26 (2CH), 128.36 (CH), 129.06 (2CH), 135.17 (C), 141.46 (CH), 151.03 (C), 158.88 (C), 168.73 (C).

HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{OS}$ için hesaplanan: 367.1587, bulunan: 367.1582.

2-[2-(4-(2-(Dimetilamino)etoksi)benziliden)hidrazinil]-4-(4-florofenil)tiyazol (2)

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 2.88 (s, 6H), 3.55 (t, $J= 4.92$ Hz, 5.01 Hz, 2H), 4.38 (t, $J= 4.80$ Hz, 5.19 Hz, 2H), 7.08 (d, $J= 8.82$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J= 8.94$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J= 6.57$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J= 8.85$ Hz, 2H), 7.89 (dd, $J= 5.55$ Hz, 8.88 Hz, 2H), 8.01 (s, 1H), 12.04 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 43.36 (2CH_3), 55.91 (CH_2), 62.73 (CH_2), 103.65 (CH), 115.59 (2CH), 115.90 (d, $J= 21.75$ Hz, 2CH), 127.95 (d, $J= 8.25$ Hz, 2CH), 128.28 (2CH), 128.33 (C), 131.83 (C), 141.54 (CH), 149.98 (C), 158.90 (C), 160.43 ve 163.67 (C), 168.83 (C).

HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{FN}_4\text{OS}$ için hesaplanan: 385.1493, bulunan: 385.1490.

2-[2-(4-(2-(Dimetilamino)etoksi)benziliden)hidrazinil]-4-(4-klorofenil)tiyazol

(3)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.88 (s, 6H), 3.55 (t, J = 4.92 Hz, 4.95 Hz, 2H), 4.38 (t, J = 4.80 Hz, 5.16 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 8.82 Hz, 2H), 7.37 (s, 1H), 7.46 (d, J = 8.61 Hz, 2H), 7.64 (d, J = 8.82 Hz, 2H), 7.87 (d, J = 8.58 Hz, 2H), 8.02 (s, 1H), 12.06 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 43.35 (2CH₃), 55.90 (CH₂), 62.74 (CH₂), 104.71 (CH), 115.60 (2CH), 127.68 (2CH), 128.30 (2CH), 129.08 (2CH), 129.69 (C), 132.36 (C), 134.04 (C), 141.65 (CH), 149.81 (C), 158.92 (C), 168.88 (C).

HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ C₂₀H₂₁ClN₄OS için hesaplanan: 401.1197, bulunan: 401.1189.

2-[2-(4-(2-(Dimetilamino)etoksi)benziliden)hidrazinil]-4-(4-bromofenil)tiyazol (4)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.88 (s, 6H), 3.55 (t, J = 4.65 Hz, 4.68 Hz, 2H), 4.38 (t, J = 4.77 Hz, 5.19 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 8.85 Hz, 2H), 7.38 (s, 1H), 7.60 (d, J = 8.61 Hz, 2H), 7.64 (d, J = 8.85 Hz, 2H), 7.80 (d, J = 8.58 Hz, 2H), 8.01 (s, 1H), 12.06 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 43.36 (2CH₃), 55.93 (CH₂), 62.72 (CH₂), 104.80 (CH), 115.60 (2CH), 120.95 (C), 123.32 (C), 128.00 (2CH), 128.31 (2CH), 131.99 (2CH), 134.37 (C), 141.66 (CH), 149.90 (C), 158.92 (C), 168.88 (C).

HRMS (ESI) (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ C₂₀H₂₁BrN₄OS için hesaplanan: 445.0692, bulunan: 445.0689.

2-[2-(4-(2-(Dimetilamino)etoksi)benziliden)hidrazinil]-4-(4-nitrofenil)tiyazol

(5)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.88 (s, 6H), 3.55 (t, J = 4.80 Hz, 4.86 Hz, 2H), 4.39 (t, J = 4.59 Hz, 5.07 Hz, 2H), 7.09 (d, J = 8.82 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 8.85 Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 8.10 (d, J = 8.97 Hz, 2H), 8.27 (d, J = 9.03 Hz, 2H), 12.17 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 43.36 (2CH₃), 55.89 (CH₂), 62.76 (CH₂), 108.83 (CH), 115.61 (2CH), 124.57 (2CH), 126.80 (2CH), 128.19 (C), 128.37 (2CH), 141.16 (C), 142.06 (CH), 146.66 (C), 149.01 (C), 159.01 (C), 169.16 (C).

HRMS (ESI) (m/z): $[M+H]^+$ $C_{20}H_{21}N_5O_3S$ için hesaplanan: 412.1438, bulunan: 412.1433.

2-[2-(4-(2-(Dimetilamino)etoksi)benziliden)hidrazinil]-4-(4-siyanofenil)tiyazol (6)

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.88 (s, 6H), 3.55 (t, J = 4.89 Hz, 5.01 Hz, 2H), 4.39 (t, J = 4.80 Hz, 5.16 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 8.82 Hz, 2H), 7.62-7.66 (m, 3H), 7.86 (d, J = 8.52 Hz, 2H), 8.02-8.05 (m, 3H), 12.13 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 43.36 (2CH₃), 55.89 (CH₂), 62.75 (CH₂), 107.81 (CH), 110.02 (C), 115.61 (2CH), 119.46 (C), 126.57 (2CH), 128.22 (C), 128.36 (2CH), 133.16 (2CH), 139.26 (C), 141.94 (CH), 149.32 (C), 158.98 (C), 169.06 (C).

HRMS (ESI) (m/z): $[M+H]^+$ $C_{21}H_{21}N_5OS$ için hesaplanan: 392.1540, bulunan: 392.1535.

2-[2-(4-(2-(Dimetilamino)etoksi)benziliden)hidrazinil]-4-(4-triflorometilfenil)tiyazol (7)

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.88 (s, 6H), 3.55 (t, J = 4.95 Hz, 4.98 Hz, 2H), 4.39 (t, J = 4.77 Hz, 5.19 Hz, 2H), 7.09 (d, J = 8.85 Hz, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.65 (d, J = 8.85 Hz, 2H), 7.76 (d, J = 8.34 Hz, 2H), 8.03 (s, 1H), 8.06 (d, J = 8.04 Hz, 2H), 12.12 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 43.36 (2CH₃), 55.90 (CH₂), 62.75 (CH₂), 106.72 (CH), 115.61 (2CH), 123.02 (C), 126.06 (d, J = 3.75 Hz, 2CH), 126.51 (2CH), 127.77 (C), 128.26 (C), 128.34 (2CH), 138.86 (C), 141.83 (CH), 149.49 (C), 158.96 (C), 169.03 (C).

HRMS (ESI) (m/z): $[M+H]^+$ $C_{21}H_{21}F_3N_4OS$ için hesaplanan: 435.1461, bulunan: 435.1451.

2-[2-(4-(2-(Dimetilamino)etoksi)benziliden)hidrazinil]-4-(4-metilfenil)tiyazol (8)

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.32 (s, 3H), 2.88 (s, 6H), 3.54 (t, J = 4.89 Hz, 5.04 Hz, 2H), 4.38 (t, J = 4.80 Hz, 5.16 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 8.85 Hz, 2H), 7.20-7.22 (m, 3H), 7.64 (d, J = 8.88 Hz, 2H), 7.74 (d, J = 8.13 Hz, 2H), 8.00 (s, 1H), 12.01 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 21.28 (CH₃), 43.37 (2CH₃), 55.93 (CH₂), 62.73 (CH₂), 102.95 (CH), 115.59 (2CH), 125.92 (2CH), 127.96 (C), 128.25 (2CH), 128.39 (C), 129.62 (2CH), 132.55 (C), 137.23 (CH), 141.33 (C), 158.86 (C), 168.63 (C).

HRMS (ESI) (m/z): $[M+H]^+$ $C_{21}H_{24}N_4OS$ için hesaplanan: 381.1744, bulunan: 381.1741.

2-[2-(4-(2-(Dimetilamino)etoksi)benziliden)hidrazinil]-4-(4-metoksifenil)tiyazol (9)

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.88 (s, 6H), 3.54 (t, J = 4.71 Hz, 5.16 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 4.37 (t, J = 4.80 Hz, 5.16 Hz, 2H), 6.96 (d, J = 8.91 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 8.85 Hz, 2H), 7.12 (s, 1H), 7.64 (d, J = 8.85 Hz, 2H), 7.78 (d, J = 8.85 Hz, 2H), 8.00 (s, 1H), 12.00 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 43.37 (2CH₃), 55.58 (CH₃), 55.95 (CH₂), 62.73 (CH₂), 101.72 (CH), 114.43 (2CH), 115.58 (2CH), 127.29 (2CH), 128.02 (C), 128.24 (2CH), 128.41 (C), 140.45 (CH), 141.31 (C), 158.85 (C), 159.25 (C), 168.61 (C).

HRMS (ESI) (m/z): $[M+H]^+$ $C_{21}H_{24}N_4O_2S$ için hesaplanan: 397.1693, bulunan: 397.1695.

2-[2-(4-(2-(Dimetilamino)etoksi)benziliden)hidrazinil]-4-(naft-2-il)tiyazol (10)

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.88 (s, 6H), 3.56 (t, J = 4.95 Hz, 4.98 Hz, 2H), 4.39 (t, J = 4.77 Hz, 5.19 Hz, 2H), 7.09 (d, J = 8.85 Hz, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.49-7.53 (m, 2H), 7.66 (d, J = 8.85 Hz, 2H), 7.89-7.96 (m, 3H), 7.99-8.04 (m, 2H), 8.38 (s, 1H), 12.12 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 43.36 (2CH₃), 55.90 (CH₂), 62.75 (CH₂), 104.73 (CH), 115.61 (2CH), 124.41 (CH), 124.52 (CH), 126.46 (C), 126.90 (C), 128.04 (CH), 128.30 (2CH), 128.35 (CH), 128.55 (CH), 128.61 (CH), 132.62 (CH), 132.90 (C), 133.63 (C), 141.58 (CH), 150.96 (C), 158.91 (C), 168.82 (C).

3.3. Kullanılan Maddelerin Hazırlanması

3.3.1. Sentezlenen Bileşiklerin Hazırlanması

Sentezlenen bileşiklerde çözücü olarak Sigma Aldrich'den alınan dimetilsülfoksit kullanılmıştır. Bileşikler 20 mg tartılarak 500 mikrolitre DMSO içinde çözündürülmüş ve ana stok oluşturulmuştur. Bu ana stoktan çalışmalarda kullanılmak üzere 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531 ve 0,9765 mg/mL konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlarda en yüksek DMSO oranı %0,1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her çalışmada ana stoklar yeniden hazırlanmıştır.

3.3.2. Sisplatinin Hazırlanması

Sisplatin deneylerde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Toz halinde Acros Organics'ten alınan sisplatin 500 mikrolitre DMSO içinde 20 mg tartılarak ana stok oluturulmuştur. Bu ana stoktan çalışmalarda kullanılmak üzere 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531 ve 0,9765 mg/mL konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlarda en yüksek DMSO oranı %0,1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her çalışmada ana stoklar yeniden hazırlanmıştır.

3.4. Deneylerde kullanılan hücreler

3.4.1. İnsan akciğer karsinoma epitelyal hücre hattı (A549)

Bu tezde kullanılan A549 hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC) firmasından CCL-185™ ticari kodu ile satın alınmıştır. A549 hücre hattı insan 58 yaşında Kafkasyalı bir erkekten alınmış insan alveolar bazal epitelyal hücreleridir. Bu hücreler tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir.

Bu hücreler ATCC'nin önerdiği şekilde, %10 fötal sığır serumu, %1 penisillin/streptomisin, içeren RPMI 1640 besiyerinde, CO₂'li etüvde, %95 bağıl nem' de 37°C' de kültür ortamında çoğaltılmıştır. 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek yenilenmiştir.

3.4.2. Normal insan fibroblast hücre hattı (CCD-19Lu)

Bu tezde kullanılan CCD-19Lu hücre hattı ATCC firmasında CCL-210™ ticari kodu ile satın alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan hücreler laboratuvarımızda var olan stoklardan kullanılmıştır. CCD-19Lu hücre hattı kafa travması sonucu ölen sağlıklı bireylerden alınmıştır. Bu hücreler tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir.

Bu hücreler ATCC'nin önerdiği şekilde, %10 fötal sığır serumu, %1 penisillin/streptomisin, içeren EMEM besiyerinde, CO₂' li etüvde, % 95 bağıl nem' de 37°C' de kültür ortamında çoğaltılmıştır. 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek yenilenmiştir. Sağlıklı hücrenin kullanılma amacı sentezlenen bileşiklerin seçiciliğini değerlendirmektir.

3.4.3. İnsan pankreas karsinoma hücre hattı (PANC-1)

Bu tezde kullanılan PANC-1 hücre hattı ATCC hücre bankasından CRL-1469 koduyla temin edilmiştir. PANC-1 hücre hattı 56 yaşında Kafkasya kökenli bir erkeğin pankreas kanalından izole edilmiştir. Epitelyal morfoloji gösteren epitelyoid karsinom hücreleri, tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir.

Bu hücreler ATCC'nin önerdiği şekilde, %10 fetal sığır serumu, %1 penisillin/streptomisin, içeren DMEM besiyerinde, CO₂'li etüvde, %95 bağıl nemde 37 °C'de kültür ortamında çoğaltılmıştır. 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek yenilenmiştir.

3.4.4. Normal pankreas hücre hattı (Htert- HPNE)

Bu tezde kullanılmak üzere ATCC hücre bankasından CRL-4023 koduyla temin edilmiş olan hTERT-HPNE hücreleri, 52 yaşında bir erkeğin pankreas kanalından, asinar- duktal metaplazi sırasında oluşan hücrelerden izole edilmiştir. Epitelyal benzeri morfoloji gösteren normal ölümsüzleştirilmiş hücreler, tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir.

Bu hücreler ATCC'nin önerdiği şekilde, %75 konsantrasyonda Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM), %25 konsantrasyonda M3 Base Medium, %5 konsantrasyonda FBS, 10 mg/mL insan rekombinant epidermal büyüme faktörü (rhEGF), 750 mg/mL puromisin antibiyotik karışımı içerisinde CO₂' li etüvde, % 95 bağıl nemde 37°C'de kültür ortamında çoğaltılmıştır. 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek yenilenmiştir. Sağlıklı hücrenin kullanılma amacı sentezlenen bileşiklerin seçiciliğini değerlendirmektir.

3.5. Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Deneylere Hazırlık

3.5.1. Malzeme sterilizasyonu

Deneylerde tek kullanımlık steril malzemeler kullanılmıştır. Bunların haricinde kullanılacak olan cam ve metal malzemelerin sterilizasyonu için alüminyum folyo ile sarılmış halde kuru hava sterilizatöründe 180°C'de 2 saat, sıvı solüsyonlar ve pipet uçları için 121°C, 1.5 atmosfer basıncında otoklavda 20 dakika arındırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Otoklavlanamayacak solüsyonlar için 0,22 mikronluk tek kullanımlık filtreler kullanılmıştır.

3.5.2. Hücrelerin stoklanması ve pasajlanması

Çalışmalar da kullanılacak olan A549, CCD-19Lu, PANC-1 ve hTER-HPNE hücre hatları 2000 µL ilgili besiyeri içerisinde 100 µL DMSO eklenerek 2 mL'lik viallere koyulmuştur. Bu vialler Mr. Frosty'de -86 °C'de bir gece bekletildikten sonra ileride yapılacak olan çalışmalarda kullanılmak üzere sıvı azota (-196 °C) alınmıştır.

Çalışmada kullanılan hücre hatları sıvı azottan (-196 °C) çıkarılarak, 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek stok yapma sırasında kullanılan DMSO uzaklaştırılmıştır. Hücre hatları ilgili besiyerinde, CO₂' li etüvde, %95 bağıl nemde 37 °C'de kültür ortamında çoğaltılmıştır. Hücreler kültür kabında %70'lik oranda bir doluluğa ulaştığı zaman (yaklaşık 2-3 gün) alt kültürlerle ayrılarak büyümesi ve çoğaltılması sağlanmıştır.

3.5.3. Hücre sayımları

Kültür kaplarında büyütülen A549, Panc-1, CCD-19Lu ve hTER-HPNE hücreleri 1x Pbs ile 2 kez yıkanmıştır. Yapışık halde bulunan hücreleri kaldırmak için kültür kaplarının boyutu ve hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak 500-1000 µL 1x Tripsin-EDTA solÜsyonu eklenmiş ve inkübatörde 2-3 dakika bekletilmiştir. Tripsin'in etkisini nötralize edebilmek için, hücrelerin üzerine 5 mL besiyeri ilave edilmiş ve hücreler santrifüj tüplerine alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atılarak üzerine 1000 µL besiyeri eklenmiş ve pipetleme ile homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. MTT, Annexin-V/PI, JC-1, Kaspaz-3 ve RT- PCR yöntemleri yapılmadan önce hücreler sayılmıştır. Sayma işlemi için Tripan mavisi hücre solisyonundan bire bir oranında karıştırılarak Thoma Lamı'nda sayım yapılmıştır. Yapılan sayım ile elde edilen sonuç aşağıdaki formül ile hesaplanarak hücre sayısı elde edilmiştir.

$$\text{Toplam hücre sayısı} = 16 \text{ büyük karedeki hücre sayısı} \times 10,000 \times \text{dilüsyon faktörü} \quad (3.1.)$$

3.6. Sitotoksik etki belirleme testleri

3.6.1.1. MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

Hücre canlılığı belirlemek amacı ile birçok sitotoksikite analizi yapılmaktadır. MTT analizi ise bu sitotoksikite testlerinden biridir. 1983 yılında ilk kez Mossman tarafından belirtilen MTT protokolü günümüzde hala geçerliliğini koruyan bir yöntemdir. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) sarı renkli bir boyadır. Yöntemin işleyiş mekanizması sağlıklı hücrelerde mitokondriyal süksinik dehidrojenazın MTT tetrazolyum tuzunun formazan kristallerine dönüştürmesine dayanmaktadır. Oluşan formozan kristalleri DMSO ile çözündürülür ve mavi-mor renkli bir çözelti oluşturulur. Bu çözelti spektrofotometrik olarak okutularak formazan kristallerinin miktarı belirlenir. Böylece ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücrelerin miktarları belirlenebilmektedir (Mossmann,1983).



Şekil 3.3. MTT molekülünün formazan kristallerine dönüşümü (http-2)

Yöntemin uygulanması

Sentezlenen maddelerin ve sisplatinin in vitro sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda inkübatörde flasklarda büyütülen hücreler, 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğunda 5×10^3 yoğunlukta olacak şekilde sayımı yapılmıştır. Sayımı yapılan hücreler plakalara 200 μ L besiyeri içerisinde ekilmiştir. 24 saat boyunca inkübatörde bekletilmiştir. 24 saat sonunda hücrelerin üzerinden 100 μ L besiyeri çekilmiş ve taze 100 μ L besiyeri içinde 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625,

7.8125, 3.90625, 1.9531 ve 0,9765 mg/mL konsantrasyonlarında ilaç uygulaması yapılmıştır. Plakalar inkübatörde 24, 48 saat süresince bekletilmiştir. Bekleme sonunda 1x PBS (phosphate buffer saline) içerisinde 5 mg/mL olacak şekilde MTT tozundan solüsyon hazırlanmış ve karanlıkta laminar air flow kabinde her bir kuyucuğa 20 µL eklenmiştir. MTT boyası eklenen plakalar 2-4 saat süresince inkübatörde bekletilmiştir. 2-4 saatin sonunda plakalardaki besiyeri ortamı uzaklaştırılarak formazan kristallerinin çözünmesini sağlamak için 100 µL DMSO eklenmiştir. Plakaların ışık görmesini engellemek amacıyla aliminyum folyo ile sarılarak oda sıcaklığında 15 dakika orbital çalkalayıcıya koyulmuştur. Mikroplaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okutulmuştur.

3.6.1.2. *İnhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi*

Spektrofotometreden alınan absorbans değerleri hücre canlılığı ile direkt olarak ilişkilendirilmiştir. Herhangi bir maddenin uygulanmadığı, sadece hücrenin kendi büyümesinin ölçüldüğü kuyucukların sonuçları canlılık formülüne göre hesaplanıp % canlılık olarak belirlenmiştir. % canlılık belirlenirken aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Örneğin absorbans değeri}}{\text{Kontrolün absorbans değeri}} \times 100 \quad (3.2)$$

Bulunan sonuçlara göre doz aralığı IC₅₀ değeri (hücre populasyonunun %50'sini inhibe eden konsantrasyon) ve IC_{50/2} (hücre populasyonunun %50'sini inhibe eden konsantrasyon) değeri belirlenene kadar genişletilmiştir. Tespit edilen çoğalmayı durduran konsantrasyon yani IC₅₀ ve IC_{50/2} değerleri apoptoz belirleme analizlerinde ve gen çalışmalarında kullanılmıştır.

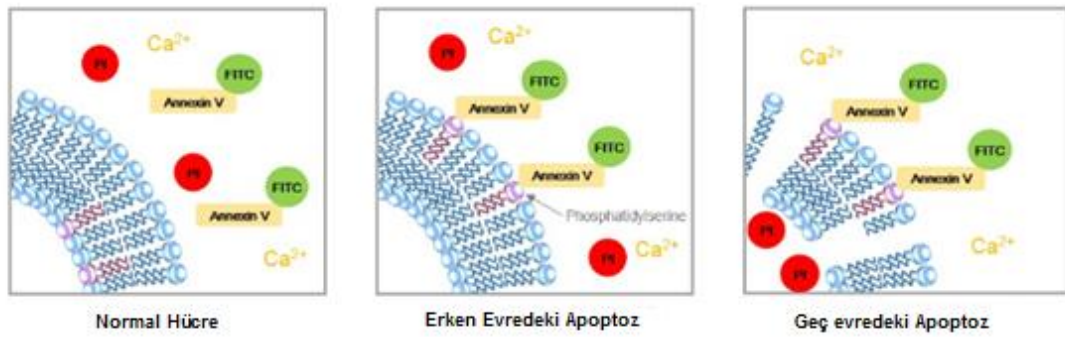
3.7. Akım Sitometri Cihazı ile Yapılan Deneyler

3.7.1. Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Bu yöntemin mekanizması, apoptoz sırasında hücrelerin fosfatidilserin ve DNA ya da RNA'larında meydana gelen değişimlere dayanmaktadır. Sağlıklı bir hücre de fosfatidil serinler (PS), hücre membranının iç kısmına lokalize olmuşlardır. Hücrenin apoptotik sürece girmesi halinde PS'ler dış membrana doğru yer değiştirerek burada lokalize olmaktadır. Bu yer değiştirme sırasında, hücre membran bütünlüğü

bozulmadığı apoptotik evreye erken evre denmektedir. Dış yüzeye bakan PS'ler, erken evre apoptoz belirteci olan Ca^{2+} bağımlı bir protein olan Annexin-V ile kompleks oluşturabilmektedir. Annexin V FITC gibi floresan maddeler ile işaretlenerek apoptotik hücreler görünür hale getirilebilmektedir (Overbeeke vd.,1998; Zhang vd.,1997).

Geç evredeki apoptoz ve nekrozda membran yapısında bozukluklar meydana gelmektedir. Bu bozukluklar ile membranda porlar oluşmakta ve Propidyum iyodid (PI) boyası bu porlardan hücre içine girerek DNA ya da RNA'ya bağlanabilmektedir. Böylece geç apoptoz ve nekroz tespiti yapılabilmektedir. Hücrede apoptotik süreçte meydana gelen değişimler Şekil 3.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Hücrede erken ve geç apoptotik süreçte meydana gelen değişimler (<http-3>)

Yöntemin uygulanması

Yöntem, üretici firmanın kit prosedüründe önerdiği şekilde uygulanmıştır. A549, Panc-1 hücre hatları, 6 kuyucuklu plakalara her kuyu başına 3×10^5 adet hücre gelecek şekilde sayılarak, 2 mL besiyeri içerisinde ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonucunda her kuyudan 1 mL besiyeri uzaklaştırılmıştır. IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozları belirlenen sentezlenen bileşiklerin ve sisplatinin maddeleri 1 mL besiyeri içerisinde hücrelere uygulanmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılarak ilaçların etki etmesi beklenmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında, hücreler ortamları ile beraber kaldırılarak flow tüplerine alınmıştır. Soğuk 1x PBS ile 2 kez yıkanarak ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj ederek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Kit içeriğinden çıkan bağlama solüsyonu (AB: Assay Buffer) 10x halledir ve distile su ile 1x hale getirilmiştir. Santrifüj sonrasında her bir flow tüpüne 100 μ L bağlama solüsyonu eklenerek nazikçe pipetlenmiştir. 5 μ L Annexin V, 5 μ L Propidium Iodür (PI) eklenerek hücreler oda sıcaklığında 15 dakika karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir. 15 dakikalık süre sonunda bağlama solüsyonundan her bir flow tüpüne

400 µL aktarılarak bir saat içerisinde akım sitometri cihazı ile analiz edilmiştir. Erken ve geç apoptotik hücre miktarları pozitif kontrole göre hesaplanmıştır.

3.7.2. JC-1 boyama ile hücrelerin mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi

Mitokondriyal solunum zincirindeki oksidasyon reaksiyonları sırasında bir enerji salınmaktadır ve bu salınan enerji mitokondriyal membran boyunca negatif bir elektrokimyasal gradyan olarak depolanmaktadır. Bu elektrokimyasal gradya $\Delta\psi_m$ polarize olarak ifade edilmektedir. $\Delta\psi_m$ 'nin çökmesi genellikle erken apoptoz sırasında meydana gelmektedir. Bazı çalışmalarda apoptozun ilk basamaklarından birisinin mitokondrinin depolarizasyonu olduğu bildirilmiş ve hatta sitokrom-C salımı için olmazsa olmaz bir koşul olduğu iddia edilmiştir. Ancak $\Delta\psi_m$ 'nin çökmesi her zaman apoptoz sırasında meydana gelmemektedir. Ayrıca $\Delta\psi_m$ 'nin depolarizasyonu her apoptotik süreçte meydana gelecek diye bir şart yoktur yani her sistem apoptoz sürecini farklı bir mekanizma aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Nekroz, hücre döngüsü durması (hiperpolarizasyon) sırasında da $\Delta\psi_m$ 'de değişiklikler olduğu bilinmektedir.

Akım sitometrisi hemen hemen tüm hücrelerde $\Delta\psi_m$ analizinde tercih edilen bir tekniktir. Lipofilik katyonik florokromlar $\Delta\psi_m$ problemleri olarak kullanılır; hücrelere penetre olur ve floresanı $\Delta\psi_m$ 'yi yansıtmaktadır. JC-1 (5,5', 6,6'-tetrakloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolkarbosiyanin iyodid), $\Delta\psi$ 'nin durumunu değerlendirmek için kullanılan lipofilik bir florokromdur. JC-1'in floresan emisyon spektrumu, JC-1 konsantrasyonuna bağlı olarak $\Delta\psi_m$ 'nin durumuna göre belirlenmektedir. JC-1 agregat veya monomer şeklinde, her biri farklı emisyon spektrumuna sahip iki farklı duruma sahiptir. Düşük boya konsantrasyonlarında monomer olarak bulunurken, daha yüksek konsantrasyonlarda agregatlar oluşturmaktadır. JC-1'in agregat ve monomer şeklindeki her iki formunda, akış sitometrelerde FL-1 (yeşil) kanalında ölçülen spektrumun en sonunda yeşil flüoresan şeklinde görünmektedirler. Canlı hücreler JC-1 boyası ile inkübe edildiğinde, JC-1, hücrelerin plazma membranına monomerler olarak nüfuz eder. JC-1'in mitokondriye alınması $\Delta\psi_m$ tarafından kontrol edilmektedir. Normal, sağlıklı mitokondrinin $\Delta\psi_m$ 'si polarizedir ve JC-1 böyle mitokondriler tarafından hızla alınmaktadır. Bu alım JC-1 boyasının konsantrasyonunun gradyantını arttırmakta ve mitokondride agregat (J-agregatları olarak bilinir) oluşumuna yol açmaktadır. J-

agregatlar, çoğu akım sitometresinde FL-2 (Kırmızı) kanalında ölçülmektedir (Kuo vd.,2008).

Yöntemin uygulanması

Mitokondriyal membran bütünlüğünün saptanabilmesi için kullanılan bu yöntem üretici firmanın kendi kit prosedüründe önerdiği şekilde uygulanmıştır. 6 kuyucuklu plakalara A549 ve Panc-1 hücreleri 2 mL besiyeri içerisinde kuyu başına 3×10^5 adet hücre gelecek şekilde ekilmiştir. 24 saat inkübatörde bekletilen hücreler üzerine daha önceden belirlenen sentezlenen bileşiklerin ve sisplatinin IC₅₀ ve IC_{50/2} dozları 1mL taze besiyeri içerisinde eklenmiştir. Plakalar, ilaçların etkisini göstermesi için inkübasyona bırakılmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında hücreler kaldırılarak flow tüplerine alınmıştır. Hücreler oda sıcaklığında 2 kez 1x Soğuk PBS ile yıkanarak ve 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Kit içeriğinde bulunan bağlanma solüsyonu (AB:Assay Buffer) içerisinde hazırlanan JC-1 boyasından her bir flow tüpüne 0.5 mL gelecek şekilde eklenerek nazıkçe pipetlenmiştir. 15 dakika 37 C°’de hücreler inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında hücreler iki kez bağlanma solüsyonu ile yıkanmıştır. Birinci yıkamada hücrelere 2’şer mL, ikinci yıkamada hücrelere 1’er mL çalışma solüsyonu eklenerek 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj ile süpernatant uzaklaştırılmıştır. Son olarak her bir hücre pelletine 0.5 mL çalışma solüsyonu eklenerek nazıkçe pipetlenmiş ve hemen akım sitometri cihazı ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar pozitif kontrole göre kıyaslanarak hesaplanmıştır.

3.7.3. Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Kaspazlar, apoptozun ana basamaklarında kilit anahtar rolü oynayan proteazlardır. Kaspaz-3 apoptoz mekanizmasının her bir yolağının son kısmında aktive olmaktadır ve sonlandırıcı kaspazlar olarak iş görmektedir. Kaspaz-3 bir hücrenin apoptoz sürecine girdiğini belirten en önemli enzimlerden biridir çünkü aktifleştikten sonra DNA fragmentasyonundan ve hücre iskeletine ait proteinlerin yıkımından sorumludur.

Kit içerisinde bulunan Cytofix/Cytoperm solüsyonu ile hücreler önce geçirgen hale getirilir. Geçirgen haldeki hücreler PE Rabbit Anti-Aktif kaspaz 3 boyası ile aktif kaspaz 3’ler boyanır. Boyanan aktif kaspaz 3 yüzdelерinin okuması flow sitometri cihazında yapılır (Kaufmann ve Hengartner, 2001).

Yöntemin uygulanması

Kaspaz-3 aktivitesi belirlemek için uygulanan yöntem, üretici firmanın kit prosedüründe önerdiği şekilde uygulanmıştır. 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyu başına 2 mL besiyeri içerisinde 3×10^5 adet A549 ve Panc-1 hücresi gelecek şekilde ekilerek inkübatörde 24 saat bekletilmiştir. Sentezlenen maddeler ve sisplatinin daha önceden belirlenen IC_{50} ve IC_{50} dozları 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmak üzere 1 mL taze besiyeri içerisinde hücrelere uygulanmıştır. 24 ve 48 saatlik ilaç muamelesi sonrasında her bir kuyu içeriği kendine ait flow tüplerine alınmıştır. Flow tüpleri 2 kez soğuk 1x PBS ile yıkanmış her yıkama sonrasında 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek supernatant uzaklaştırılmıştır. Kit içeriğinde bulunan Cytofix/Cytoperm solisyonundan her bir flow tüpüne 0.5 mL eklenerek 20 dakika buz üzerinde bekletilerek santrifüj ile supernatant uzaklaştırılmıştır. Distile su ile 1x haline getirilen Perm/Wash tampon çözeltisinden hücrelerin üzerine 0.5 mL konularak 2 kez yıkaması yapılmıştır. Daha önceden 100 μ L 1x Perm/Wash çözeltisi içersine 20 μ L antibodi eklenerek hazırlanmış olan çözeltiden yıkama işlemleri tamamlanan hücrelerin üzerine eklenmiştir. Hücreler oda ısısında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak her bir örnek 1mL 1x Perm/Wash tampon çözeltisi ile yıkanarak santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen hücrelere 0.5 mL 1x Perm/Wash tampon çözeltisi eklenerek akım sitometrisi cihazından kaspaz-3 aktivitesi analiz edilmiştir.

3.8. RT-PCR (Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile PPAR-, Bcl-2, Bax, CYD1, cMYC, ERK, pERK ve housekeeping genlerinin ifade (ekspresyon) düzeylerinin belirlenmesi:

Polimeraz zincir reaksiyonu, nükleik asitlerin uygun koşullarda *in-vitro* koşullarda çoğaltılması olarak tanımlanır. PCR reaksiyonu 3 ana aşamadan oluşmaktadır.

1. Denatürasyon: DNA'nın zincirlerinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması aşaması.
2. Hibridizasyon: Sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması aşaması.
3. Uzama: Zincirin uzama aşaması.

PCR uygulamasında yer alan bileşenlerimiz; çoğaltılacak olan hedef DNA'yı içeren kalıp DNA, kalıp DNA'nın tamamlayıcısı olacak şekilde seçilmiş oligonükleotid primerler, sıcaklığa karşı dayanıklı olan Taq polimeraz enzimi'dir. Taq polimeraz

enziminin görevi DNA moleküllerinin tamamlayıcı oligonükleotidleriyle eşlenmesine yardımcı olup onların uzamasını sağlamaktır. Bu uzama işleminin başlatılabilmesi için kısa DNA dizilerine ihtiyaç vardır bu dizilere primer denir. Primerler ile başlayan ikinci ipliğin oluşumu Taq polimerazın d-NTP (Nükleotid tri fosfatlar)'lar kullanarak uzaması ile devam eder. Burada ortamda Mg^{+2} iyonunun varlığı kofaktör görevi görmektedir. Mg^{+2} konsantrasyonu önemlidir çünkü az olması durumunda yeterli eşleşme sağlanamayabilir fazla olması halinde ise hatalı eşleşmeler meydana gelebilir.

Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR); hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retrovirüslerden izole edilen Revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabilirdiği hızlı ve hassas bir yöntemdir.

3.8.1. RNA izolasyonu

Sisplatin veya sentezlediğimiz bileşiklerin uygulanmadığı A549 hücreleri kontrol grubu olarak seçilmiştir. Deney grubu olan A549 hücrelerine ise MTT deneyi sonuçlarına göre elde ettiğimiz IC_{50} dozları uygulanmış ardından 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. RNA izolasyonu kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

- Önce tripsin-EDTA yardımıyla hücreler tutunmuş olduğu zeminden kaldırılmış ve besiyeri eklenerek resüspanse edilmiş ardından 15 ml'lik santrifüj tüpünde toplanır ve PBS solüsyonu ile yıkanmıştır.
- Ardından ayrı mikrosantrifüj tüplerine maksimum 1×10^5 hücre olacak şekilde bölünmüştür. $4^{\circ}C$ 'de 2000 rcf'de santrifüj edilir ve süpernatant atılır içeride 5 μL 'den fazla PBS kalmamasına dikkat edilmiştir.
- 100 μL Script RT-qPCR numune hazırlama reaktifi (Sitoplazmik RNA'nın izolasyonu ve stabilizasyonu için liziz tamponu) eklenmiş ve orta şiddette 30 saniye vortekslenmiştir.
- 15.000 rcf'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve pellete dokunulmadan süpernatant dikkatlice toplanmıştır kısa süreli duracak ise buz üzerinde uzun süreli ise -20 veya $-80^{\circ}C$ 'de saklanılmıştır.
- PCR'yi Bio-Rad'nin iQ TM SYBR® Green supermix veya iQ TM supemix'inde verilen talimatlara göre gerçekleştirilmiştir. Bu gerçekleştirilirken kendi hücre hattımıza uygun olan housekeeping gen olan GAPDH seçilmiştir ve valide edilmiş primerler kullanılmıştır. Kullanılan primerler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

- Kendi hücre tipimize için etkin RNA miktarını görmek için sonuçlar değerlendirilmiş ve iScript RT-qPCR numune hazırlama reaktifi tarafından işlenebilecek maksimum hücre konsantrasyonunu belirlemek için hücre konsantrasyonunun loguna karşı Plot Ct değerleri grafik olarak çizilmiştir.

Çizelge 3.1. RT-PCR analizinde kullanılan primer prob dizileri

Gen sembolü	Sekanslar	Primer	Ürün uzunluğu (bp)
Ppar-gamma	CACAAGAACAGATCCAGTGGTTGCAG AATAATAAGGTGGAGATGCAGGCTCC	Forward Reverse	101
Bcl-2	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC TGAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC	Forward Reverse	196
Bax	AGCAAACCTGGTGCTCAAGG GCTGAGGCAGGTGAATCG	Forward Reverse	93
CYD1	AATGACCCCGCACGATTT GATTGGAAATGAACTTCACATCT	Forward Reverse	134
Myc	TCGGTGGTCTTCCCCTACC CTGCGTAGTTGTGCTGATGT	Forward Reverse	358
Mapk1 (ERK)	TCTGGAGCAGTATTACGACCC CTGGCTGGAATCTAGCAGTCT	Forward Reverse	134
pERK	CGGAACCAGACGATGAGACA ACATCCAAATCCCCTGCTT	Forward Reverse	127

3.8.2. Komplementer DNA (c-DNA) sentez safhası

Gerçek zamanlı PCR’da kullanılma üzere A549 hücrelerinden izole edilen RNA’dan c-DNA sentezlemek amacıyla ters transkriptaz PCR işlemi yapılmıştır. Hem kontrol grubu olan RNA’dan hem de deney grubu RNA’dan cDNA sentezlenmiştir cDNA sentezi kit protokolüne uygun yapılmıştır.

- 0,2 µL’lik nükleaz içermeyen tüpler kullanılmıştır.
- Deney grubu için işaretlenen tüplere 4 µL 5x iScript reaksiyon karışımı, 1 µL iScript revers transkriptaz, 7,5 µL RNA templatı (içinde 1µg RNA olacak şekilde) ve 7,5 µL nükleaz içermeyen su eklenmiştir ve toplam hacim 20 µL’ye tamamlanmıştır.

- Ardından tüpler PCR cihazına yerleştirilmiş ve 25°C’de 5 dakika, 42°C’de 30 dakika, 85°C’de 5 dakika ve 4°C’ de sonsuz olarak termal profil oluşturulmuş ve PCR başlatılmıştır.
- İşlem bittikten sonra tüpler gerçek zamanlı kantitatif PCR’da kullanılabilece kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.8.3. Supermix, Taqman prob ve primerlerin hazırlanması

Hazırlama ve sulandırma işlemleri supermix, Taqman prob ve primerlerin protokollerine göre yapılmıştır. Supermix hazırlanırken liyofilize pellet şeklinde olan tüpe 1 ml sulandırma çözeltisi eklenmiş vorteksenerek 2x supermix çözeltisi hazırlanmıştır. Kullanılana kadar -20 derecede muhafaza edilmiştir. Real time PCR sırasında ise ekte bulunan primerler final konsantrasyonları 0.5 uM(pmol/ul) olacak şekilde ayarlanarak çalışma tamamlanmıştır

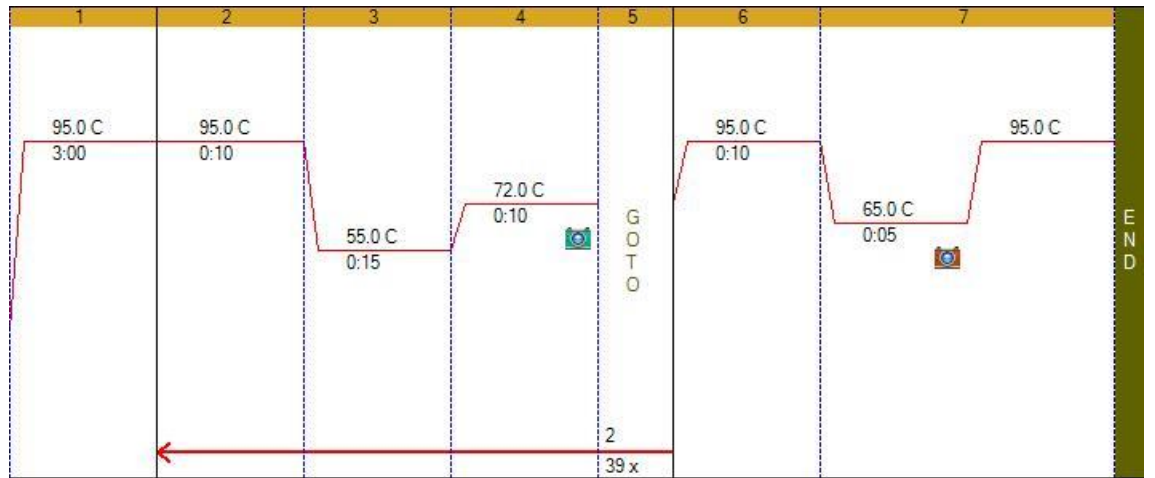
3.8.4. Gerçek zamanlı kantitatif PCR reaksiyonu

PCR reaksiyonu Bio-RAD SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix kit protokolüne göre yapılmıştır. Buradaki SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, gerçek zamanlı herhangi bir PCR cihazında boya bazlı gerçek zamanlı PCR için optimize edilmiş, 2x konsantre, kullanıma hazır bir reaksiyon supermix'idir. Antikor aracılı sıcak başlangıç Sso7d füzyon polimeraz, dNTP'ler, MgCl₂, SYBR® Green I Boya, arttırıcılar, stabilizatörler ve pasif referans boyalarının bir karışımını içerir.

Çizelge 3.2. RT-PCR reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	20 µL reaksiyon başına hacim	Final konsantrasyonu
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (2x)	10 µL	1x
Forward ve Reverse Primerler	1 µL	0.5 uM(pmol/ul)
DNA template	7,5 µL	100 ng-100 fg
Nükleaz-free H ₂ O	1,5 µL	--
Total Reaksiyon Hacmi	20 µL	--

- SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix ve diğer donmuş reaksiyon bileşenlerini oda sıcaklığına getirilir iyice karıştırılır, tüplerin altındaki çözeltileri toplamak için kısa süre santrifüjlenir muhafaza edilirken ışıktan korunur ve buz üzerinde saklanır.
- **Çizelge 3.2.**'deki bilgilere göre, DNA şablonu hariç tüm gerekli bileşenleri eklenir, tüm qPCR reaksiyonları için (buz üzerinde veya oda sıcaklığında) yeterli reaksiyon karışımı hazırlanır.
- Homojenliği sağlamak ve her bir qPCR tüpüne veya bir qPCR plakasının oyuklarına eşit kısımlar dağıtmak için reaksiyon karışımını iyice karıştırılır. Testin kesinliğini ve doğruluğunu sağlamak için iyi pipetleme uygulamasına dikkat edilmelidir.
- PCR tüplerine veya reaksiyon karışımını içeren kuyucuklara DNA numuneleri ve nükleaz içermeyen H₂O) eklenmiştir.
- Tüpler veya kuyular düz kapaklarla veya optik olarak şeffaf bir filmle kapatılır ve reaksiyon bileşenlerinin tamamen karışmasını sağlamak için 30 saniye veya daha fazla vortekslenir. Hava kabarcıklarını gidermek ve reaksiyon karışımını kap altından toplamak için tüpler ve plaka döndürülür.
- Termal döngü protokolünü **Şekil 3.5.**'deki gibi gerçek zamanlı PCR cihazında programlanır.
- QPCR tüplerini veya plakasını gerçek zamanlı PCR'a yüklenir cihazın ve PCR çalışmasını başlatılır ardından cihaza özgü talimatlara göre veri analizi yapılır.



Şekil 3.5. RT-PCR termal profil

4. SONUÇLAR VE BULGULAR

4.1. MTT Sonuçları

4.1.1. Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 Hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

A549 hücrelerine sisplatin ve sentezlenen maddelerin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531 ve 0,9765 mg/mL konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Her bir inkübasyon süresi sonunda MTT yöntemi ile maddelerin sitotoksik etkileri belirlenmiş kontrol ve maddeler ELIZA (Enzim bağlantılı immunosorbent yöntemi) cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapılarak sonuçlar elde edilmiştir. Her bir grubun hesaplamaları yapılarak % canlılık değerleri belirlenmiştir.

A549 hücrelerinde sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin 24 ve 48 saatlik sitotoksik etki belirlemek için yapılan MTT analizine göre maddelerin IC₅₀ ve IC_{50/2} değerleri belirlenmiştir. Bu değerler hesaplanırken Microsof Excell grafiksel değerlendirme kullanılmıştır. Deneyler 3 tekrar olarak yapılmıştır. Çizelge 3.1’de Sentezlenen bileşiklerin ve sisplatinin A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatlerdeki IC₅₀ değerleri gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Sentezlenen bileşiklerin ve sisplatinin A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatlerdeki IC₅₀ değerleri

	A549 hücresi 24 saat IC ₅₀ değeri	A549 hücresi 48 saat IC ₅₀ değeri
Bileşik 1	35,0±3,0 µg/mL	31,67±0,47 µg/mL
Bileşik 2	18.67 ±4,04 µg/mL	7,5±0,41 µg/mL
Bileşik 3	19,67±4,73 µg/mL	19,0±2,94 µg/mL
Bileşik 4	>500	>500
Bileşik 5	>500	>500
Bileşik 6	23,33±4,73 µg/mL	17,5±1,47 µg/mL
Bileşik 7	>500	>500
Bileşik 8	3,83±1,04 µg/mL	6,5±1,78 µg/mL
Bileşik 9	9,87±1,87 µg/mL	4,5±0,41 µg/mL
Bileşik 10	>500	>500
Sisplatin	133,33±12,58 µg/mL	37,67±2,05

4.1.2. Sentezlenen bileşiklerin CCD19-Lu hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi

CCD19-Lu hücrelerine ssentezlenen maddelerin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531 ve 0,9765 mg/mL konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Her bir inkübasyon süresi sonunda MTT yöntemi ile maddelerin sitotoksik etkileri belirlenmiş kontrol ve maddeler ELISA (Enzim bağlantılı immunosorbent yöntemi) cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapılarak sonuçlar elde edilmiştir. Her bir grubun hesaplamaları yapılarak % canlılık değerleri belirlenmiştir.

CCD19-Lu hücrelerinde sentezlenen bileşiklerin 24 ve 48 saatlik sitotoksik etki belirlemek için yapılan MTT analizine göre maddelerin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ değerleri belirlenmiştir. Bu değerler hesaplanırken Microsoft excell grafiksel değerlendirme kullanılmıştır. Deneyler 3 tekrar olarak yapılmıştır. Çizelge 3.2’de Sentezlenen bileşiklerin ve CCD19-Lu hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatlerdeki IC_{50} değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Sentezlenen bileşiklerin ve CCD19-Lu hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatlerdeki IC_{50} değerleri

	CCD19-Lu hücresi 24 saat IC_{50} değeri	CCD19-Lu hücresi 48 saat IC_{50} değeri
Bileşik 1	15±5 µg/mL	<0,9
Bileşik 2	>500	>500
Bileşik 3	>500	>500
Bileşik 4	22,33±2,52 µg/mL	<0,9
Bileşik 5	20,6±6,08 µg/mL	<0,9
Bileşik 6	128,5±5,20 µg/mL	>500
Bileşik 7	49,67±8,08 µg/mL	>500
Bileşik 8	6,37±1,30 µg/mL	16,33±1,25 µg/mL
Bileşik 9	18,3±1,53 µg/mL	30,5±0,71 µg/mL
Bileşik 10	>500	>500

4.1.3. Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin PANC-1 Hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

A549 hücrelerine sisplatin ve sentezlenen maddelerin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531 ve 0,9765 mg/mL konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Her bir inkübasyon süresi sonunda MTT yöntemi ile maddelerin sitotoksik etkileri belirlenmiş kontrol ve maddeler ELIZA (Enzim bağlantılı immunosorbent yöntemi) cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapılarak sonuçlar elde edilmiştir. Her bir grubun hesaplamaları yapılarak % canlılık değerleri belirlenmiştir.

A549 hücrelerinde sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin 24 ve 48 saatlik sitotoksik etki belirlemek için yapılan MTT analizine göre maddelerin IC₅₀ ve IC_{50/2} değerleri belirlenmiştir. Bu değerler hesaplanırken Microsoft Excell grafiksel değerlendirme kullanılmıştır. Deneyler 3 tekrar olarak yapılmıştır. Çizelge 4.3'te Sentezlenen bileşiklerin ve sisplatinin PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatlerdeki IC₅₀ değerleri gösterilmiş olup yapılan çalışmalarda pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılmıştır.

Çizelge 4.3. Sentezlenen bileşiklerin ve sisplatinin PANC-1 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatlerdeki IC₅₀ değerleri

	PANC-1 hücresi 24 saat IC ₅₀ değeri	PANC-1 hücresi 48 saat IC ₅₀ değeri
Bileşik 1	37,33±2,08 µg/mL	31,0±1,73 µg/mL
Bileşik 2	19,67±1,53 µg/mL	8,9±0,36 µg/mL
Bileşik 3	20,67±1,15 µg/mL	14,0±1,73 µg/mL
Bileşik 4	31,0±2,65 µg/mL	17,0±1,0 µg/mL
Bileşik 5	30,33±4,51 µg/mL	17,67±1,53 µg/mL
Bileşik 6	9,67±2,08 µg/mL	12,0±1,0 µg/mL
Bileşik 7	27,0±2,65 µg/mL	16,0 ±2,65 µg/mL
Bileşik 8	27,33±2,31 µg/mL	13,33±1,53 µg/mL
Bileşik 9	24,33±4,04 µg/mL	26,67±6,11 µg/mL
Bileşik 10	14,33±2,08 µg/mL	10,67±0,58 µg/mL
Sisplatin	30,67±3,21 µg/mL	2,17±0,29 µg/mL

4.1.4. Sentezlenen bileşiklerin Htert-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkisi

Htert-HPNE hücrelerine sentezlenen maddelerin 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531 ve 0,9765 mg/mL konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Her bir inkübasyon süresi sonunda MTT yöntemi ile maddelerin sitotoksik etkileri belirlenmiş kontrol ve maddeler ELIZA (Enzim bağlantılı immunosorbent yöntemi) cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapılarak sonuçlar elde edilmiştir. Her bir grubun hesaplamaları yapılarak % canlılık değerleri belirlenmiştir.

Htert-HPNE hücrelerinde sentezlenen bileşiklerin 24 ve 48 saatlik sitotoksik etki belirlemek için yapılan MTT analizine göre maddelerin IC₅₀ ve IC_{50/2} değerleri belirlenmiştir. Bu değerler hesaplanırken Microsoft excell grafiksel değerlendirme kullanılmıştır. Deneyler 3 tekrar olarak yapılmıştır. Çizelge 3.4.'te Sentezlenen bileşiklerin ve Htert-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatlerdeki IC₅₀ değerleri gösterilmiştir.

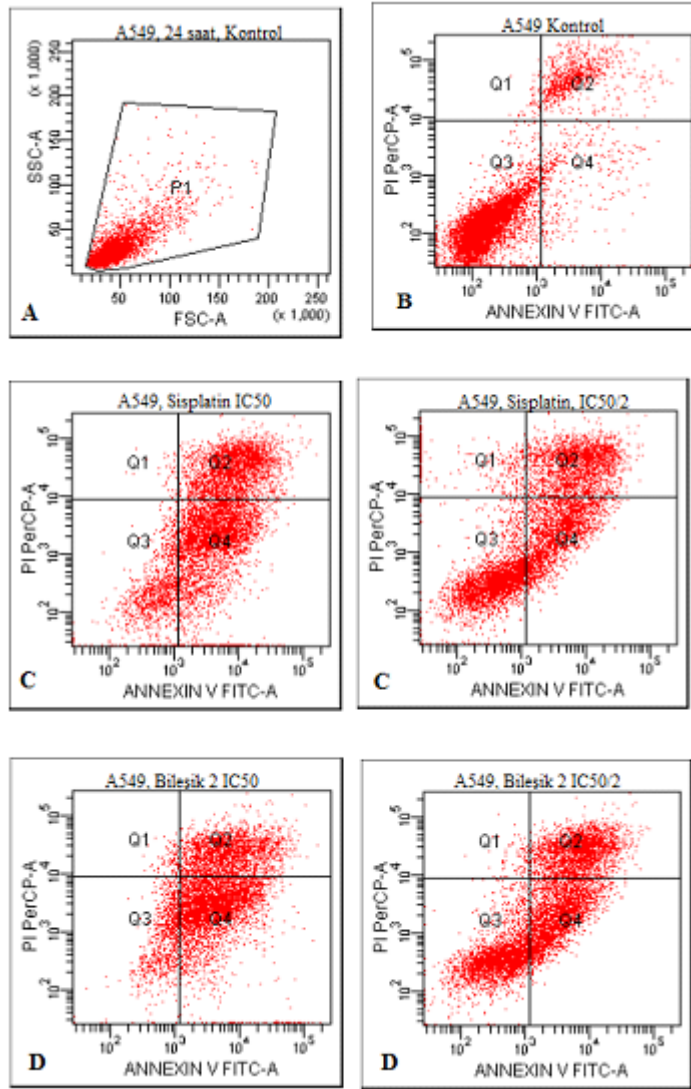
Çizelge 4.4. Sentezlenen bileşiklerin ve Htert-HPNE hücre hattı üzerindeki 24 ve 48. saatlerdeki IC₅₀ değerleri.

	Htert-HPNE hücresi 24 saat IC ₅₀ değeri	Htert-HPNE hücresi 48 saat IC ₅₀ değeri
Bileşik 1	22,33±2,58 µg/mL	<0,9
Bileşik 2	>500	>500
Bileşik 3	>500	>500
Bileşik 4	14,67±0,58 µg/mL	<0,9
Bileşik 5	29,67±2,52 µg/mL	<0,9
Bileşik 6	126,0±3,61 µg/mL	>500
Bileşik 7	46,33±1,53 µg/mL	>500
Bileşik 8	8,2±0,72 µg/mL	16,33±1,25 µg/mL
Bileşik 9	27,67±2,52 µg/mL	30,5±0,71 µg/mL
Bileşik 10	>500	>500

4.2. Sisplatinin ve Sentezlenen Maddelerin A549 ve Panc-1 Hücrelerinde Apoptotik Etkilerinin Akım Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi

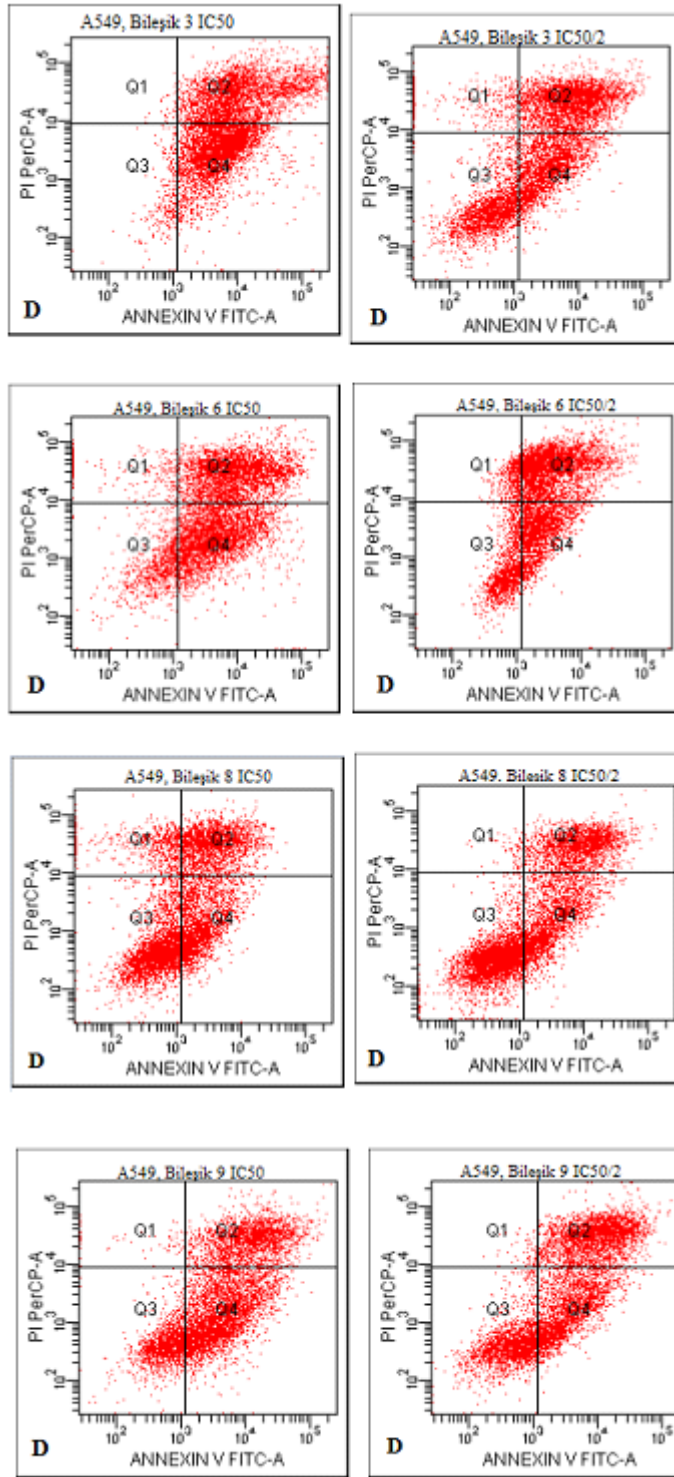
4.2.1. Akım sitometri’de Annexin-V FITC-PI yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi

4.2.1.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik apoptotik etkilerin değerlendirilmesi



Şekil 4.1. *Sisplatin ve sentezlenen maddelerin A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki apoptotik etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} D) Sentezlenen bileşikler IC₅₀ ve IC_{50/2}*

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)



Şekil 4.1. *Sisplatin ve sentezlenen maddelerin A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki apoptotik etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} D) Sentezlenen bileşikler IC₅₀ ve IC_{50/2}*

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

Çizelge 4.5 A549 hücrelerinin 24. Saatteki % canlılık değerleri, Annexin v-fitc

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

A549 24. Saat	Q1 (%)	Q2(%)	Q3 (%)	Q4 (%)
Kontrol	0,6	9,2	86,0	4,2

Çizelge 4.6. Sisplatinin A549 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki % canlılık değerleri, Annexin v-fitc

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

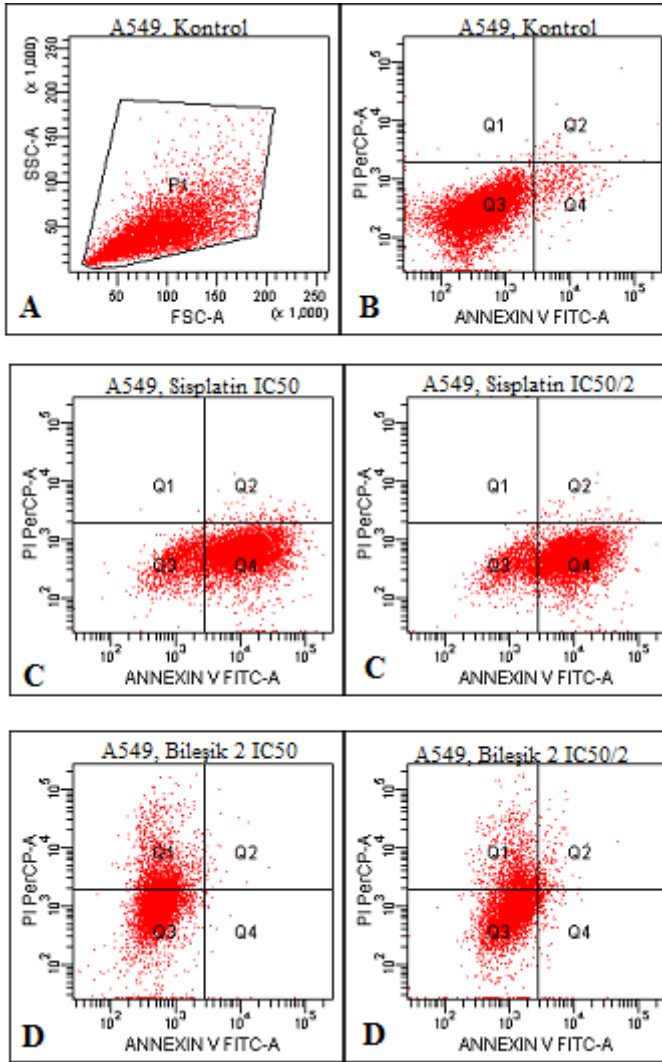
A549 24. Saat	Q1 (%)	Q2(%)	Q3 (%)	Q4 (%)
Sisplatin IC ₅₀	3,8	27,3	23,8	45,1
Sisplatin IC _{50/2}	7,2	24,1	41,8	26,8

Çizelge 4.7.Sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki % canlılık değerleri, Annexin v-fitc

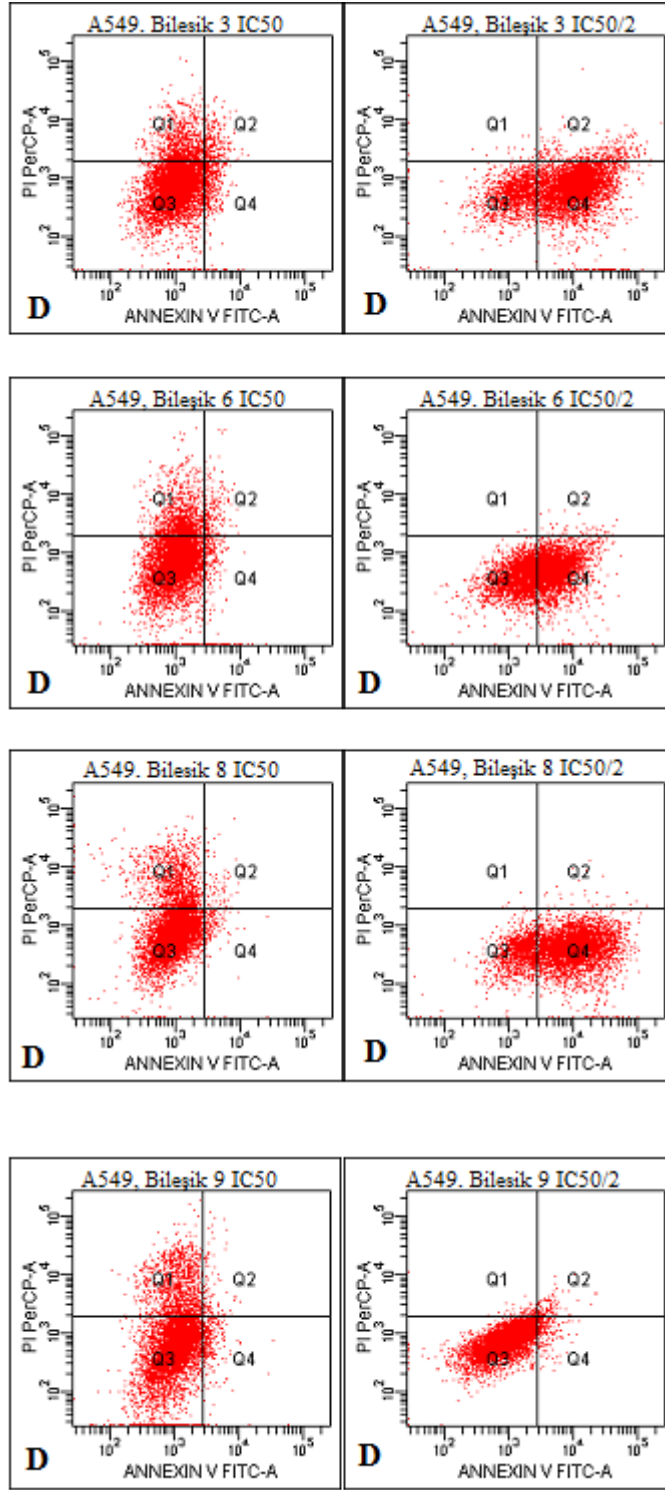
(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

A549 24. Saat	Q1 (%)	Q2(%)	Q3 (%)	Q4 (%)
Bileşik 2 _{ic50}	4,5	23,9	24,1	47,5
Bileşik 2 _{ic50/2}	3,2	25,5	38,2	33,5
Bileşik 3 _{ic50}	3,6	35,6	9,8	51,1
Bileşik 3 _{ic50/2}	6,9	34,2	29,4	29,5
Bileşik 6 _{ic50}	5,7	34,2	18,00	42,00
Bileşik 6 _{ic50/2}	8,0	38,7	24,4	28,9
Bileşik 8 _{ic50}	9,9	22,6	42,6	24,8
Bileşik 8 _{ic50/2}	2,1	23,1	47,9	26,8
Bileşik 9 _{ic50}	3,1	24,2	24,3	48,4
Bileşik 9 _{ic50/2}	4,0	32,7	29,8	33,5

4.2.1.2. A549 hücrelerindeki 48 saatlik apoptotik etkilerin değerlendirilmesi



Şekil 4.2. Sisplatin ve sentezlenen maddelerin A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki apoptotik etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} D) Sentezlenen bileşikler IC₅₀ ve IC_{50/2} (Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)



Şekil 4.2. *Sisplatin ve sentezlenen maddelerin A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki apoptotik etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} D) Sentezlenen bileşikler IC₅₀ ve IC_{50/2}*

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

Çizelge 4.8. A549 hücrelerinin 48. Saatteki % canlılık değerleri, Annexin v-fitc

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

A549 48. Saat	Q1 (%)	Q2(%)	Q3 (%)	Q4 (%)
Kontrol	0,4	0,8	95,00	3,8

Çizelge 4.9. Sisplatinin A549 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki % canlılık değerleri, Annexin v-fitc

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

A549 48. Saat	Q1 (%)	Q2(%)	Q3 (%)	Q4 (%)
Sisplatin IC ₅₀	0	1,2	28,9	69,9
Sisplatin IC _{50/2}	0	0,8	30,7	68,7

Çizelge 4.10 Sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki % canlılık değerleri, Annexin v-fitc

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

A549 48. Saat	Q1 (%)	Q2(%)	Q3 (%)	Q4 (%)
Bileşik 2 _{IC50}	20,5	0,4	78,9	0,2
Bileşik 2 _{IC50/2}	15,4	1,8	81,1	1,7
Bileşik 3 _{IC50}	0,3	3,1	49,8	46,8
Bileşik 3 _{IC50/2}	10,3	2,9	82,1	4,7
Bileşik 6 _{IC50}	13,2	2,2	81,9	2,7
Bileşik 6 _{IC50/2}	0	0,7	57,1	42,2
Bileşik 8 _{IC50}	14,5	1,0	83,00	1,5
Bileşik 8 _{IC50/2}	0,1	0,4	37,4	62,4
Bileşik 9 _{IC50}	16,3	1,2	79,7	2,9
Bileşik 9 _{IC50/2}	0,9	1,2	95,5	2,4

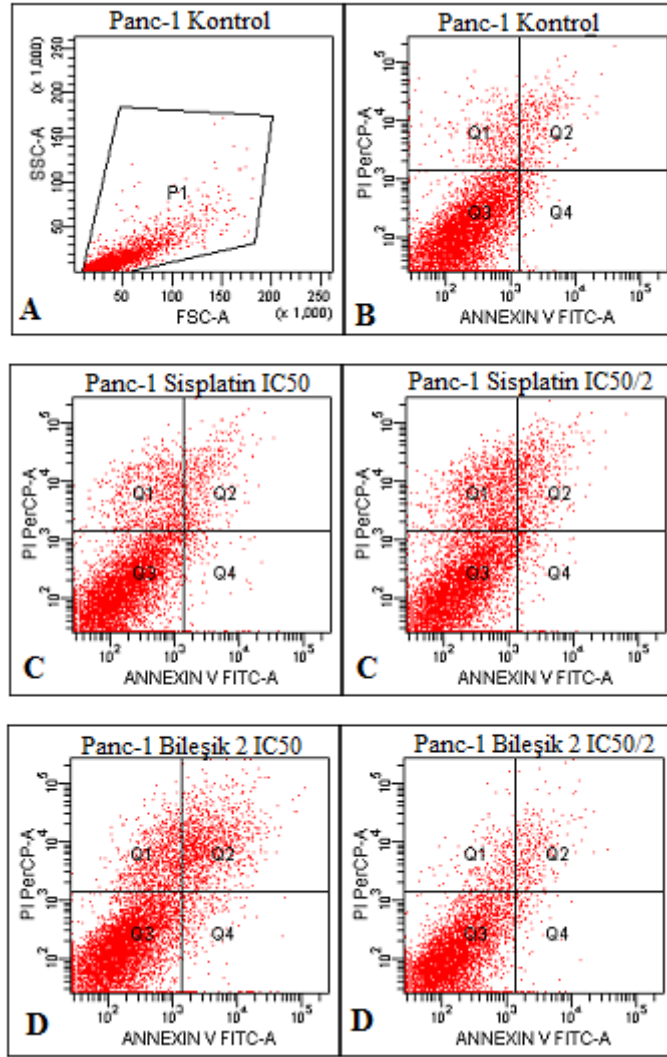
Çizelge 4.5., 4.6., 4.7. 'de belirtilen sonuçlara göre sisplatin ve sentezlenen bileşikler in A549 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki erken apoptotik etkisinin uygulanan her iki konsantrasyon için de kontrol grubuna göre arttığı gözlemlenmiştir. 24. saatteki kontrol grubunun erken apoptozu %4,2 geç apoptoz miktarı ise %9,2'dir.

Sisplatin'in IC₅₀ ve IC_{50/2} dozlarının 24. Saatteki erken apoptoz miktarı sırasıyla %45,1 %26,8 ve geç apoptoz miktarları sırasıyla %27,3 %24,1'dir. Sentezlenen bileşiklerin apoptoz oranlar ise tabloda görüldüğü gibidir.

Çizelge 4.8., 4.9., 4.10.'de belirtildiği gibi sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki erken apoptotik etkisi kontrol grubuna göre uygulanan her iki konsantrasyon için de arttığı gözlemlenmiştir. 48 saatteki kontrol grubu için erken apoptoz oranı %3,8 geç apoptoz oranı ise %0,8 olarak görülmüştür.

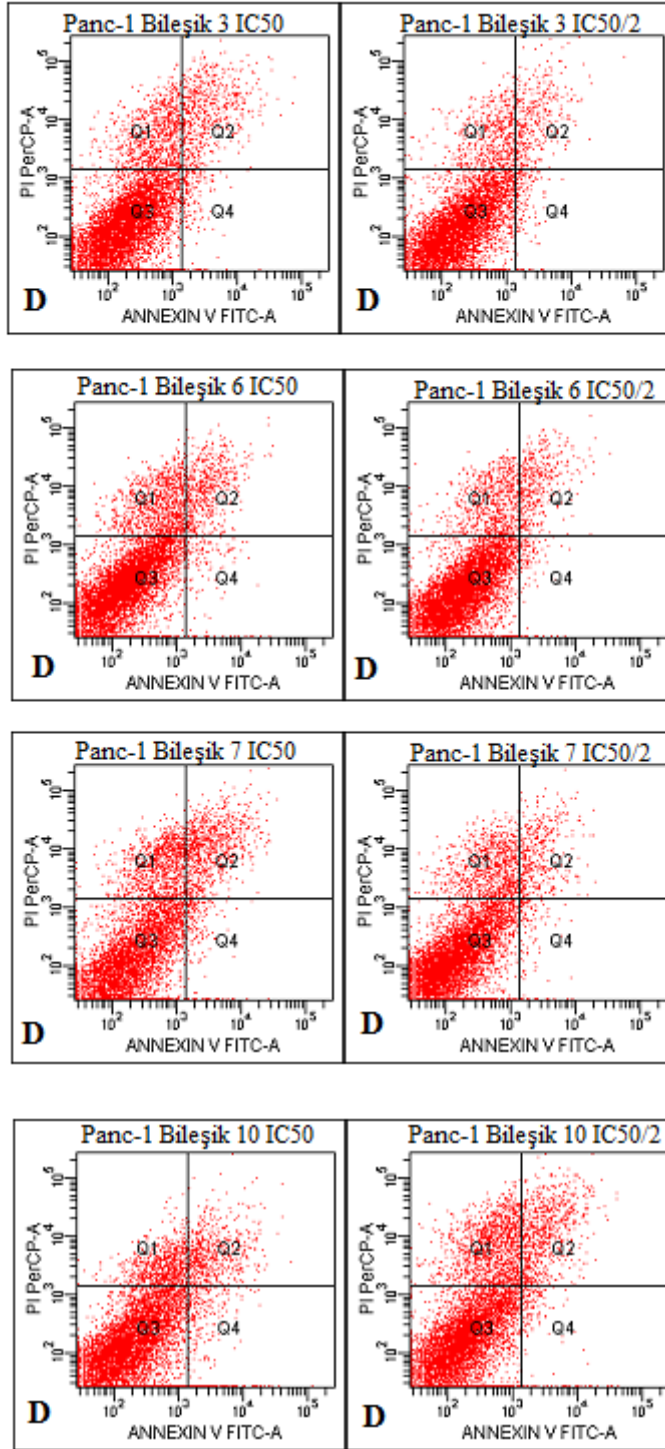
Sisplatinin ise IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozlarının 48. saatteki apoptoz miktarları sırası ile %69,9 ve 68,7 olarak saptanmıştır.

4.2.1.3. Panc-1 hücrelerindeki 24 saatlik apoptotik etkilerin değerlendirilmesi.



Şekil 4.3. Sisplatin ve sentezlenen maddelerin Panc-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki apoptotik etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ D) Sentezlenen bileşikler IC_{50} ve $IC_{50/2}$

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)



Şekil 4.3. (Devam) *Sisplatin ve sentezlenen maddelerin A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki apoptotik etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} D) Sentezlenen bileşikler IC₅₀ ve IC_{50/2}*

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

Çizelge 4.11. *Panc-1 hücrelerinin 24. Saatteki % canlılık değerleri*

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

Panc-1 24. Saat	Q1 (%)	Q2(%)	Q3 (%)	Q4 (%)
Kontrol	4,0	3,8	90,2	2,0

Çizelge 4.12. *Sisplatinin Panc-1 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki % canlılık değerleri,*

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

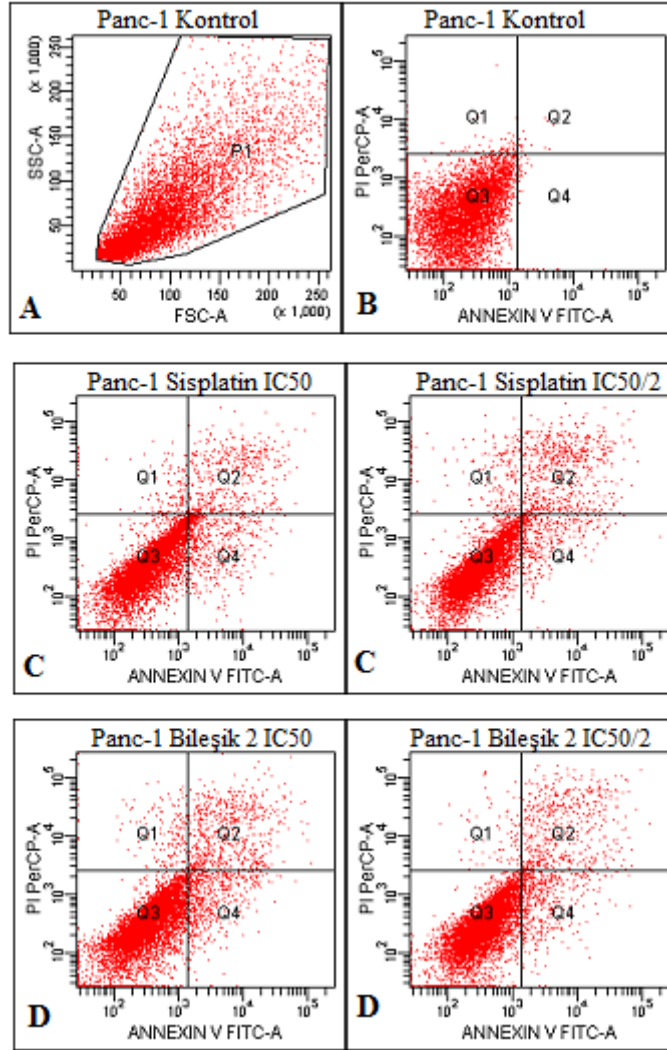
Panc-1 24. Saat	Q1 (%)	Q2(%)	Q3 (%)	Q4 (%)
Sisplatin IC ₅₀	7,9	4,6	86,1	1,4
Sisplatin IC _{50/2}	12,3	6,1	79,9	1,8

Çizelge 4.13. *Sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki % canlılık değerleri*

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

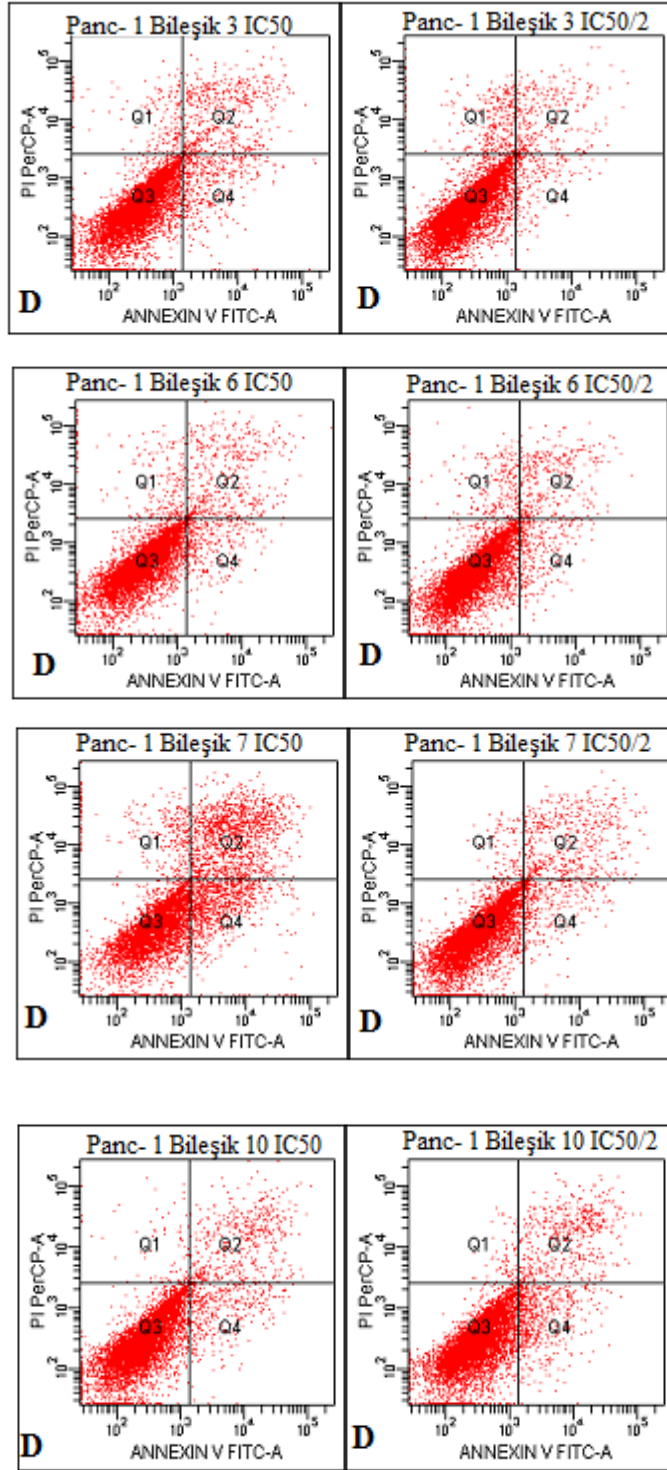
Panc-1 24. Saat	Q1 (%)	Q2(%)	Q3 (%)	Q4 (%)
Bileşik 2 _{IC50}	8,6	11,3	77,3	2,7
Bileşik 2 _{IC50/2}	2,7	2,8	93,4	1,1
Bileşik 3 _{IC50}	8,7	6,3	83,4	1,6
Bileşik 3 _{IC50/2}	5,3	3,8	89,5	1,8
Bileşik 6 _{IC50}	10,3	5,6	82,7	1,3
Bileşik 6 _{IC50/2}	7,2	4,2	87,5	1,1
Bileşik 7 _{IC50}	10,3	8,3	79,6	2,0
Bileşik 7 _{IC50/2}	8,7	4,2	85,9	1,2
Bileşik 10 _{IC50}	7,4	6,2	83,3	3,2
Bileşik 10 _{IC50/2}	13,8	8,2	76,3	1,2

4.2.1.4. Panc-1 hücrelerindeki 48 saatlik apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi



Şekil 4.4. Sisplatin ve sentezlenen maddelerin Panc-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki apoptotik etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} D) Sentezlenen bileşikler IC₅₀ ve IC_{50/2}

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)



Şekil 4.4. Sisplatin ve sentezlenen maddelerin Panc-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki apoptotik etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} D) Sentezlenen bileşikler IC₅₀ ve IC_{50/2}

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

Çizelge 4.14. *Panc-1 hücrelerinin 48. Saatteki % canlılık değerleri*

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

A549 48. Saat	Q1 (%)	Q2(%)	Q3 (%)	Q4 (%)
Kontrol	1,1	1,0	96,9	1,0

Çizelge 4.15 *Sisplatinin Panc-1 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki % canlılık değerleri*

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

Panc-1 48. Saat	Q1 (%)	Q2(%)	Q3 (%)	Q4 (%)
Sisplatin IC ₅₀	1,8	6,2	84,9	7,9
Sisplatin IC _{50/2}	3,4	7,1	83,6	5,9

Çizelge 4.16. *Sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki % canlılık değerleri*

(Q1= Nekroz Q2= Geç apoptoz Q3= Canlılık Q4= Erken apoptoz)

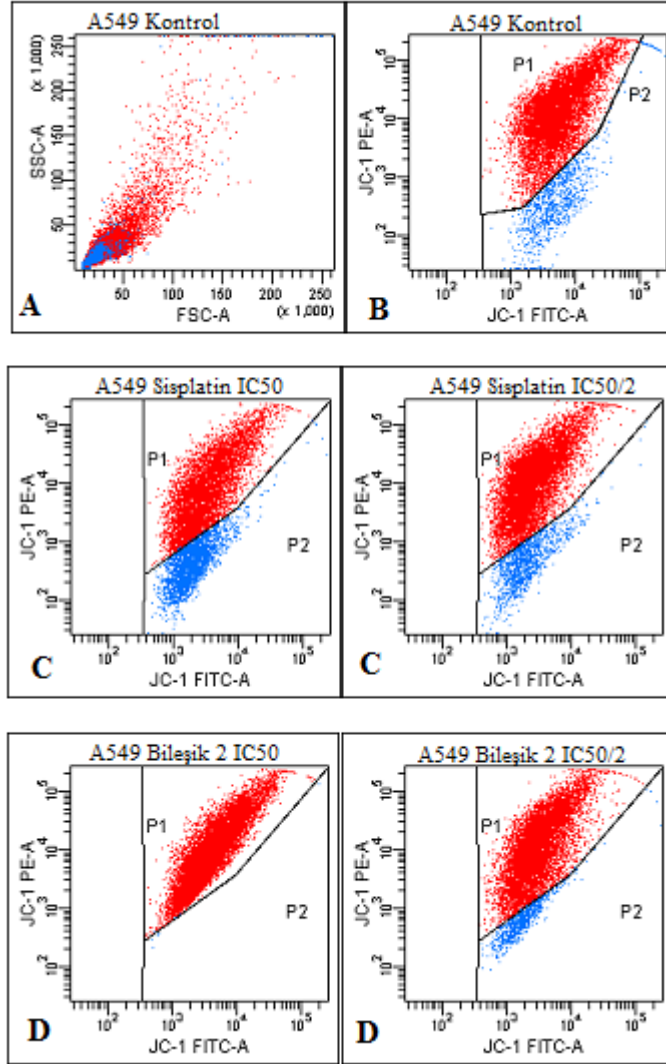
Panc-1 48. Saat	Q1 (%)	Q2(%)	Q3 (%)	Q4 (%)
Bileşik 2 _{IC50}	2,3	8,5	80,3	8,8
Bileşik 2 _{IC50/2}	1,7	7,0	83,5	7,8
Bileşik 3 _{IC50}	2,5	7,1	83,8	6,7
Bileşik 3 _{IC50/2}	3,8	4,2	89,5	2,6
Bileşik 6 _{IC50}	3,1	7,0	83,5	4,6
Bileşik 6 _{IC50/2}	3,2	4,9	88,1	3,9
Bileşik 7 _{IC50}	4,0	16,9	63,7	15,4
Bileşik 7 _{IC50/2}	1,8	7,0	85,7	6,0
Bileşik 10 _{IC50}	1,2	6,1	86,3	6,4
Bileşik 10 _{IC50/2}	1,3	6,8	83,8	8,1

Çizelge 4.11., 4.12., 4.13.' de belirtilen sonuçlara göre 24. saatteki kontrol grubu için erken apoptoz oranı %2,0 geç apoptoz oranı %3,8 olarak saptanmıştır. Sisplatinin ise 24. Saatteki geç apoptoz oranları sırası ile IC₅₀ ve IC_{50/2} dozları için %4,6 ve %6,1 olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.14., 4.15., 4.16.' de belirtilen sonuçlara göre sisplatinin IC₅₀ dozundaki erken ve geç apoptoz oranı sırasıyla %7,9 ve %6,2 olarak belirlenmiştir. IC_{50/2} dozundaki erken ve geç apoptoz oranları ise sırasıyla %5,9 ve %7,1 olarak belirlenmiştir.

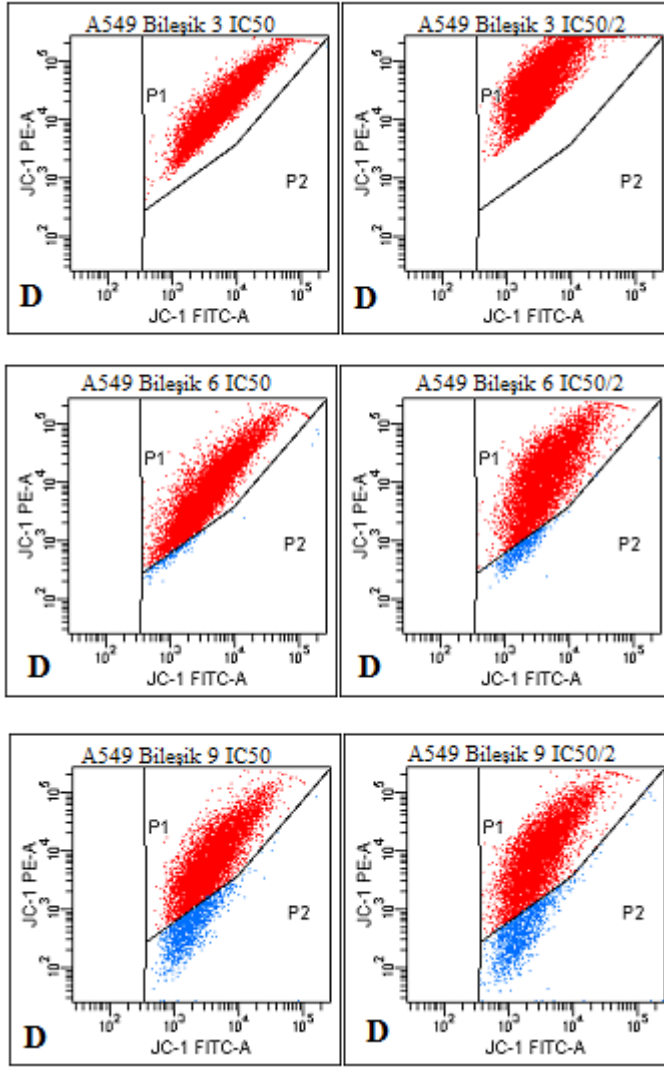
4.2.2. Flow sitometri’de JC-1 yöntemi ile mitokondriyal membran aktivitesinin değerlendirilmesi

4.2.2.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerinin değerlendirilmesi



Şekil 4.5. Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki mitokondriyal membran etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} D) Sentezlenen bileşikler IC₅₀ ve IC_{50/2}

(P1=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P2= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)



Şekil 4.5. (Devam) Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki mitokondriyal membran etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} D) Sentezlenen bileşikler IC₅₀ ve IC_{50/2}

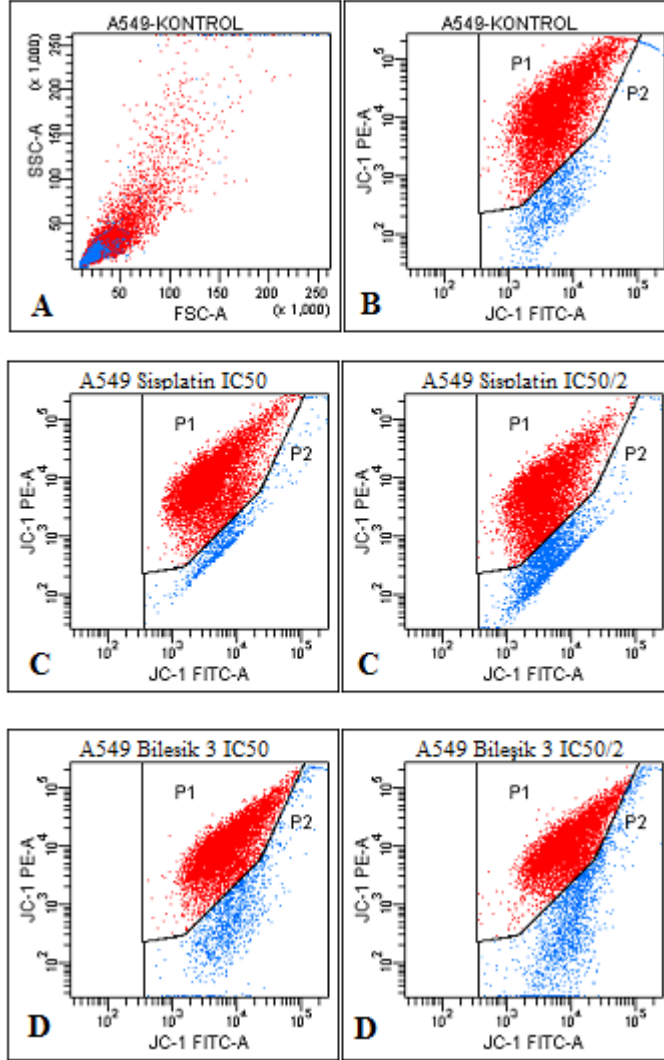
(P1=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P2= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

Çizelge 4.17. *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 24 saatteki % canlılık değerleri*

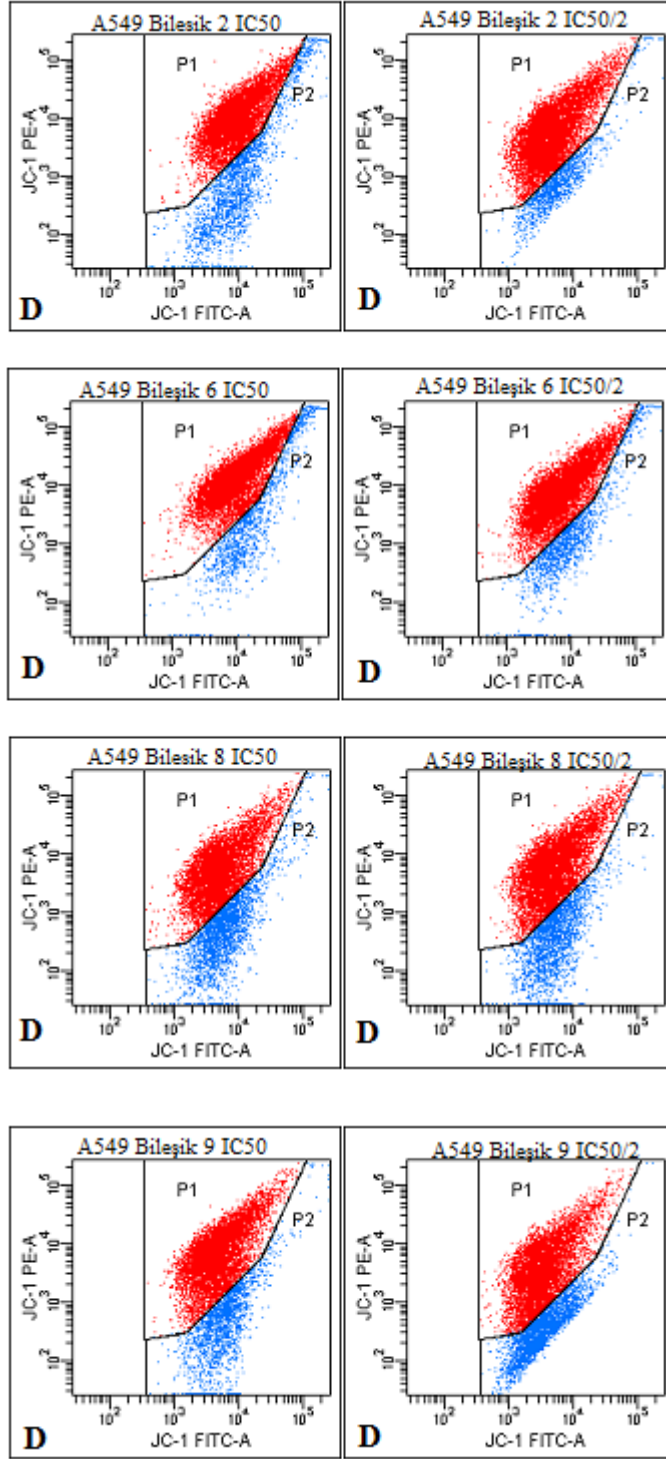
(**P1**=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, **P2**= Mitokondriyel aktivite gösteren canlılık)

A549 24.saat	P1 (%)	P2 (%)
Kontrol	95	5
Sisplatin IC₅₀	68,9	31,0
Sisplatin IC_{50/2}	87,5	12,3
Bileşik 2_{IC50}	99,7	0,2
Bileşik 2_{IC50/2}	90,1	9,0
Bileşik 3_{IC50}	99,8	0,2
Bileşik 3_{IC50/2}	99,4	0,6
Bileşik 6_{IC50}	96,9	2,0
Bileşik 6_{IC50/2}	94,3	5,6
Bileşik 8_{IC50}	86,1	13,2
Bileşik 8_{IC50/2}	83,5	16,5
Bileşik 9_{IC50}	83,5	16,5
Bileşik 9_{IC50/2}	85,9	13,6

4.2.2.2. A549 hücrelerindeki 48 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerinin değerlendirilmesi



Şekil 4.6. Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki mitokondriyal membran etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} D) Sentezlenen bileşikler IC₅₀ ve IC_{50/2} (P1=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P2= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)



Şekil 4.6.(Devam) *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki mitokondriyal membran etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} D) Sentezlenen bileşikler IC₅₀ ve IC_{50/2}*

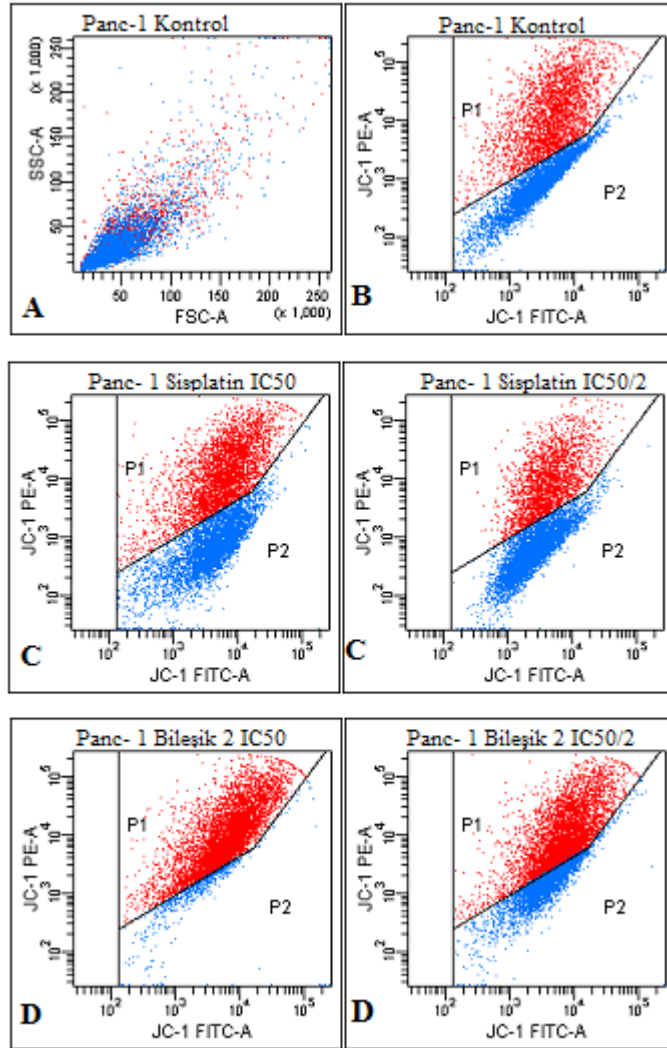
(P1=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P2= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

Çizelge 4.18. *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 48 saatteki % canlılık değerleri*

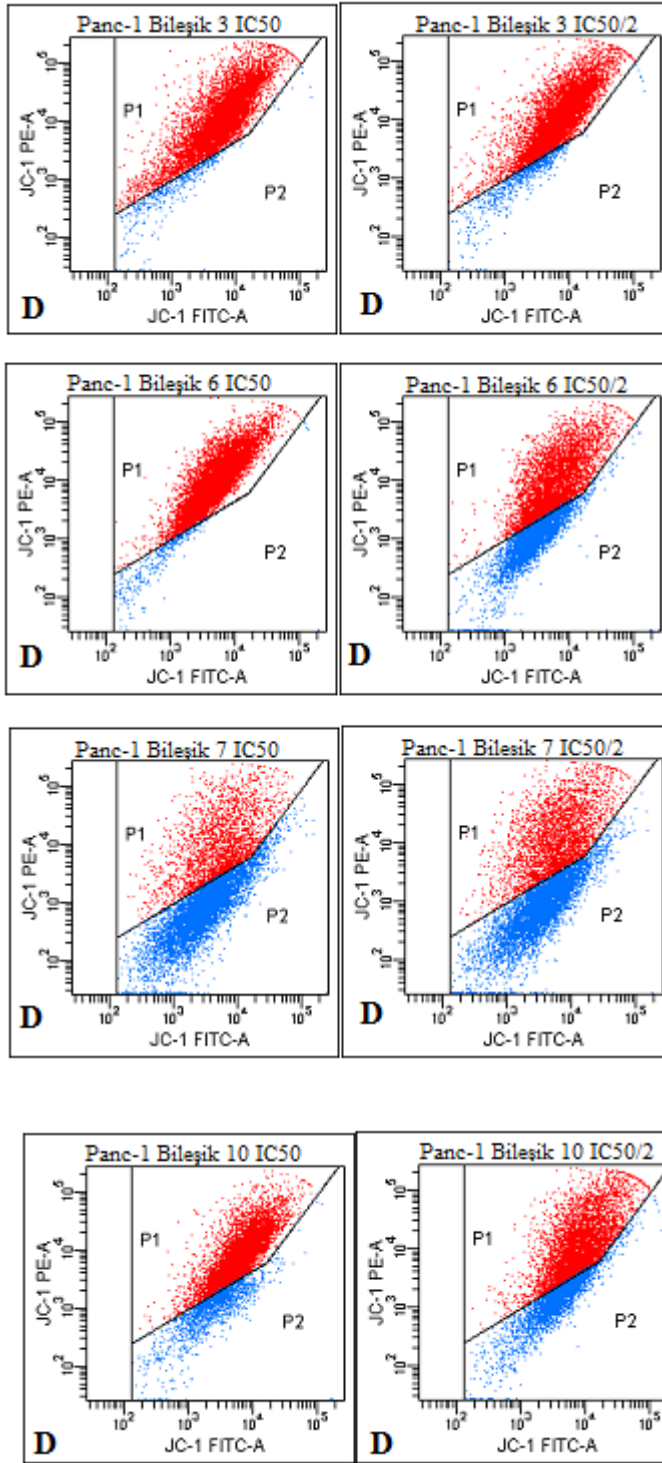
(**P1**=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, **P2**= Mitokondriyel aktivite gösteren canlılık)

A549 48.saat	P1 (%)	P2 (%)
Kontrol	98,7	1,3
Sisplatin IC₅₀	61,9	40,7
Sisplatin IC_{50/2}	75,7	25,7
Bileşik 2_{IC50}	62,7	39,2
Bileşik 2_{IC50/2}	73,0	29,0
Bileşik 3_{IC50}	73,6	29,2
Bileşik 3_{IC50/2}	80,6	20,8
Bileşik 6_{IC50}	70,0	31,6
Bileşik 6_{IC50/2}	75,7	26,8
Bileşik 8_{IC50}	81,2	21,00
Bileşik 8_{IC50/2}	79,5	22
Bileşik 9_{IC50}	76,2	25,8
Bileşik 9_{IC50/2}	83,6	17,7

4.2.2.3. PANC-1 hücrelerindeki 24 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerinin değerlendirilmesi



Şekil 4.7. *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki mitokondriyal membran etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} D) Sentezlenen bileşikler IC₅₀ ve IC_{50/2} (P1=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P2= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)*



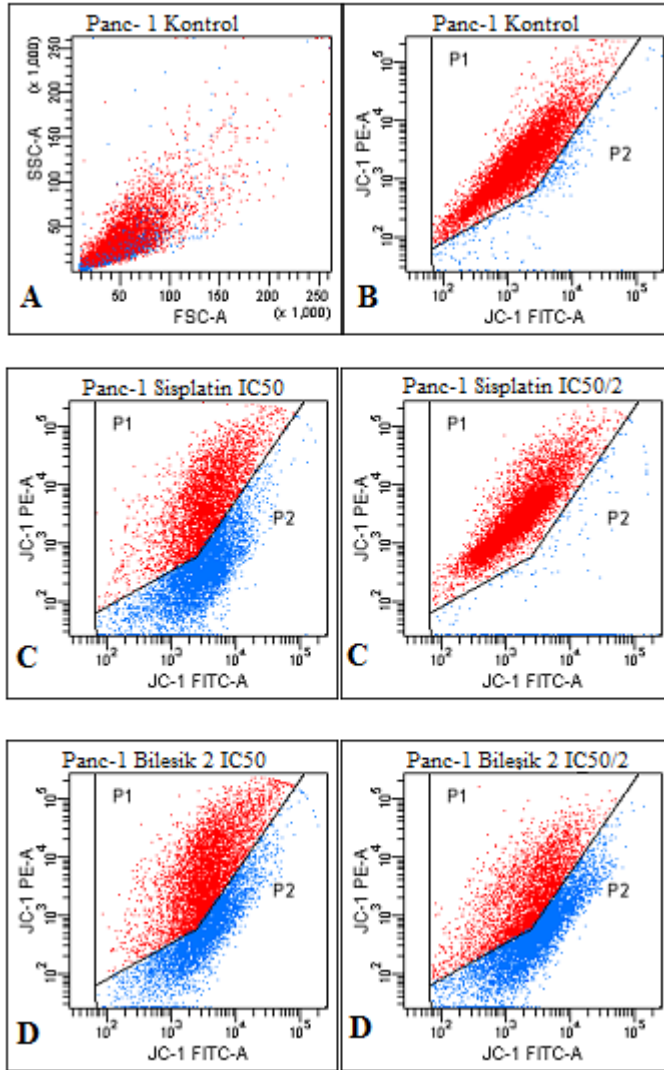
Şekil 4.7.(Devam) Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki mitokondriyal membran etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} D) Sentezlenen bileşikler IC₅₀ ve IC_{50/2}
(P1=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P2= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

Çizelge 4.19. *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki % canlılık değerleri*

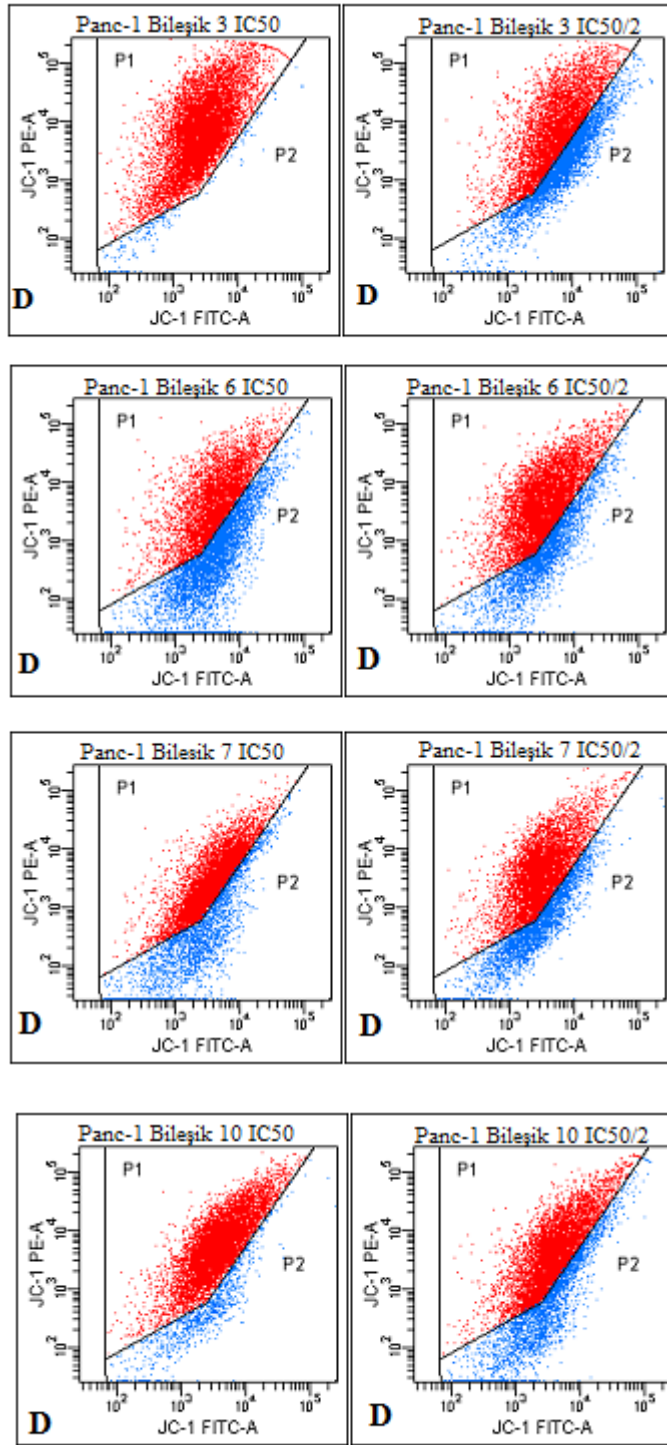
(**P1**=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, **P2**= Mitokondriyel aktivite gösteren canlılık)

Panc-1 24.saat	P1 (%)	P2 (%)
Kontrol	95	5
Sisplatin IC₅₀	41,8	57,3
Sisplatin IC_{50/2}	26,2	74,0
Bileşik 2_{IC50}	92,0	8,4
Bileşik 2_{IC50/2}	60,4	41,0
Bileşik 3_{IC50}	94,5	4,6
Bileşik 3_{IC50/2}	88,7	8,1
Bileşik 6_{IC50}	95,3	3,8
Bileşik 6_{IC50/2}	53,6	47,4
Bileşik 7_{IC50}	25,8	74,8
Bileşik 7_{IC50/2}	34,3	66,2
Bileşik 10_{IC50}	82,5	18,3
Bileşik 10_{IC50/2}	62,2	39,6

4.2.2.4. PANC-1 hücrelerindeki 48 saatlik mitokondriyal membran aktivitesinin etkilerinin değerlendirilmesi



Şekil 4.8. *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki mitokondriyal membran etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC50 ve IC50/2 D) Sentezlenen bileşikler IC50 ve IC50/2*
(**P1**=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, **P2**= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)



Şekil 4.8. (Devam) *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 48. Saatteki mitokondriyal membran etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} D) Sentezlenen bileşikler IC₅₀ ve IC_{50/2} (P1=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P2= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık*

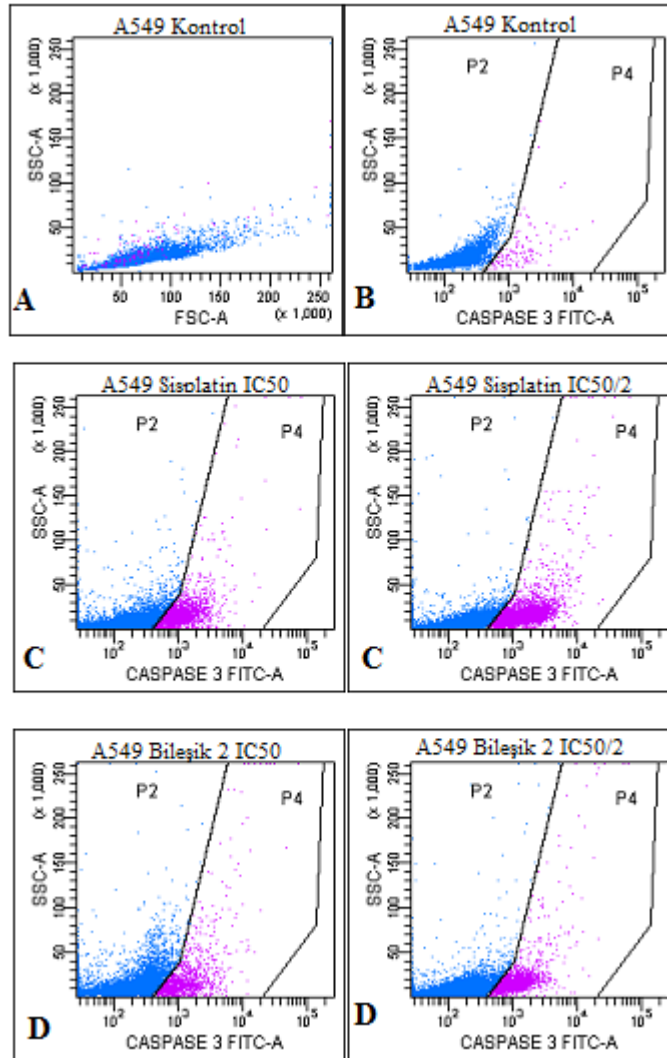
Çizelge 4.20. *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 48. saatteki % canlılık değerleri*

(**P1**=Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, **P2**= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

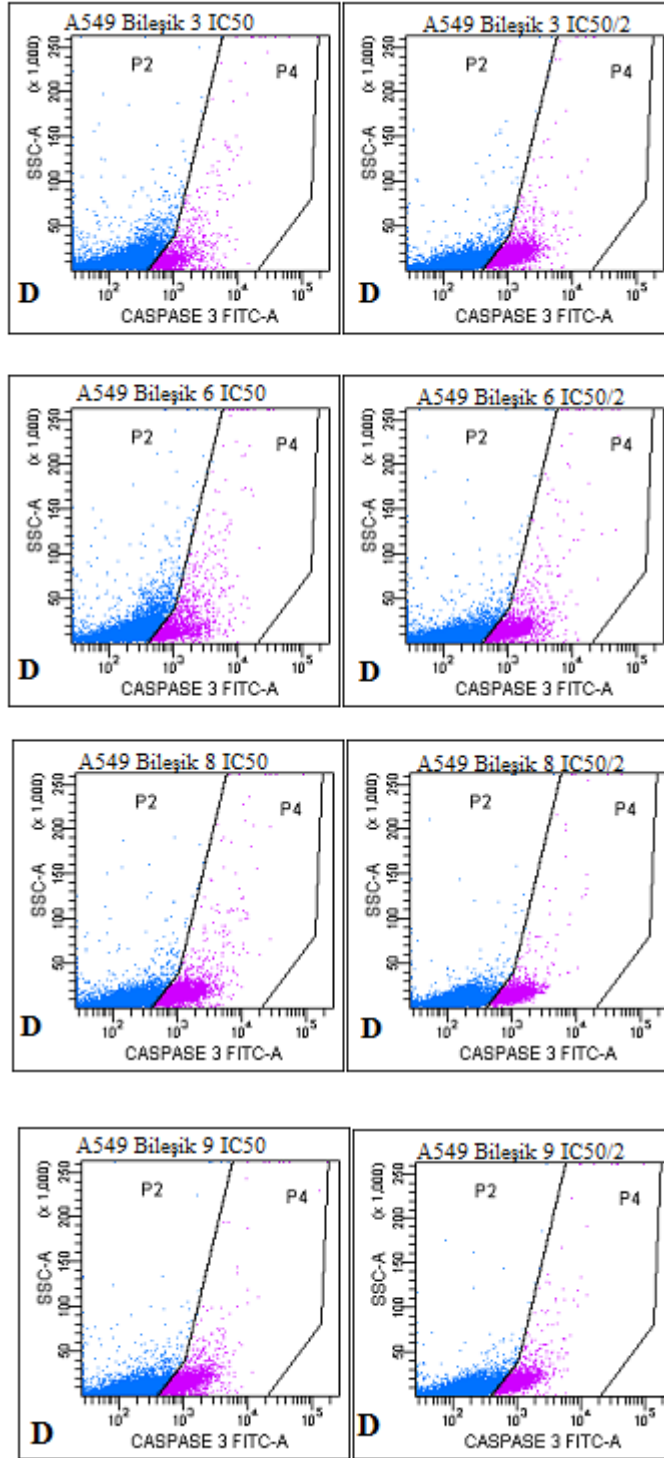
Panc-1 48.saat	P1 (%)	P2 (%)
Kontrol	95,6	3,8
Sisplatin IC₅₀	43,4	56,6
Sisplatin IC_{50/2}	36,0	63,0
Bileşik 2_{IC50}	54,6	45,9
Bileşik 2_{IC50/2}	37,1	63,0
Bileşik 3_{IC50}	77,6	23,2
Bileşik 3_{IC50/2}	59,5	41,7
Bileşik 6_{IC50}	48,3	52,1
Bileşik 6_{IC50/2}	68,8	31,9
Bileşik 7_{IC50}	75,7	24,8
Bileşik 7_{IC50/2}	70,7	29,8
Bileşik 10_{IC50}	90,8	9,1
Bileşik 10_{IC50/2}	72,4	28,1

4.2.3. Flow sitometride kaspaz-3 yöntemi ile mitokondriyal membran aktivitesinin değerlendirilmesi

4.2.3.1. A549 hücrelerindeki 24 saatlik kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi



Şekil 4.9. *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki kaspaz-3 aktivasyonunun etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC50 ve IC50/2 D) Sentezlenen bileşikler IC50 ve IC50/2 (P2= Negatif kaspaz-3 aktivasyonu gösteren canlılık, P4=Pozitif kaspaz-3 aktivasyonu)*



Şekil 4.9. (Devam) Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerinde 24. Saatteki kaspaz-3 aktivasyonunun etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC50 ve IC50/2 D) Sentezlenen bileşikler IC50 ve IC50/2

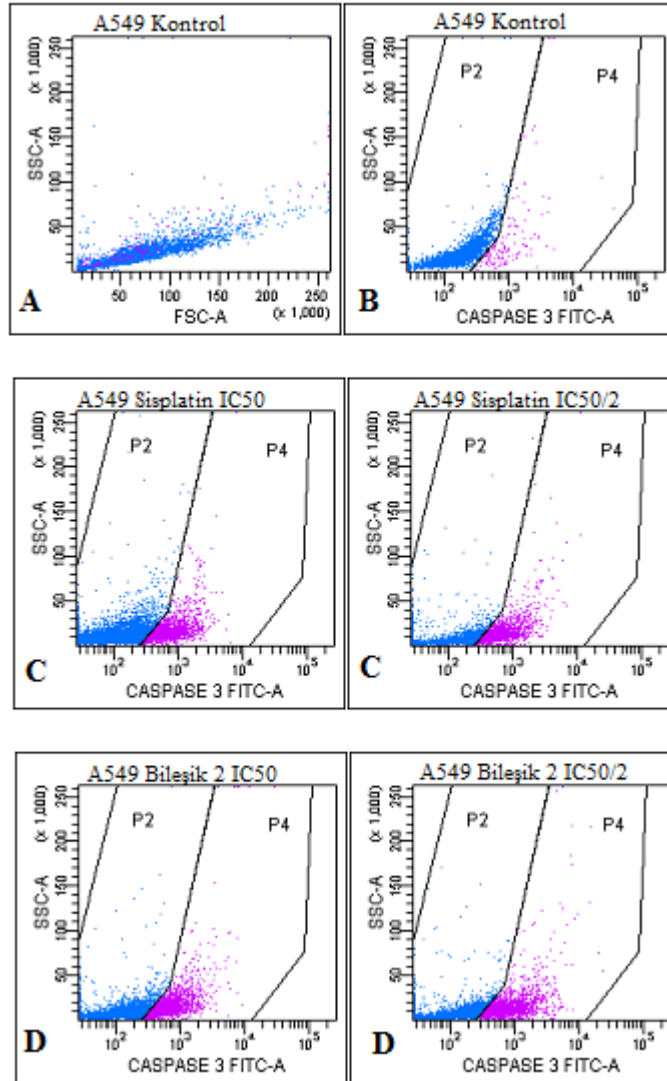
(P2= Negatif kaspaz-3 aktivasyonu gösteren canlılık, P4=Pozitif kaspaz-3 aktivasyonu)

Çizelge 4.21. *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 24. saatteki kaspaz-3 aktivasyonunun % canlılık değerleri*

(**P2**=Negatif kaspaz-3 aktivasyonu, **P4**= Pozitif kaspaz-3 aktivasyonu gösteren canlılık)

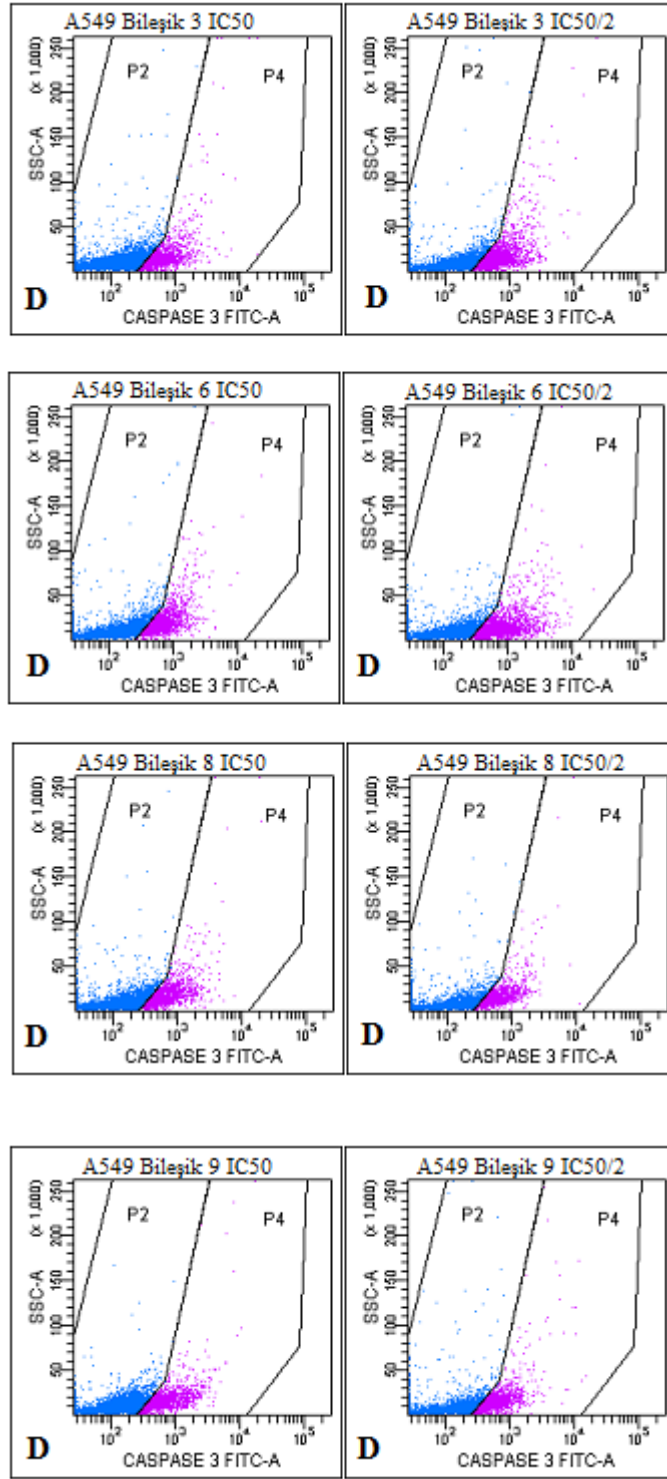
A549 24.saat	P2(%)	P4 (%)
Kontrol	98,8	1,1
Sisplatin IC₅₀	56,3	41,9
Sisplatin IC_{50/2}	74,4	24,8
Bileşik 2_{IC50}	74,2	24,0
Bileşik 2_{IC50/2}	86,6	12,6
Bileşik 3_{IC50}	68,7	29,2
Bileşik 3_{IC50/2}	88,8	10,4
Bileşik 6_{IC50}	75,00	23,5
Bileşik 6_{IC50/2}	82,9	16,0
Bileşik 8_{IC50}	77,3	21,1
Bileşik 8_{IC50/2}	66,4	31,7
Bileşik 9_{IC50}	73,2	25,5
Bileşik 9_{IC50/2}	68,2	29,5

4.2.3.2. A549 hücrelerindeki 48 saatlik Kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi



Şekil 4.10. Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki kaspaz-3 aktivasyonunun etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC50 ve IC50/2 D) Sentezlenen bileşikler IC50 ve IC50/2

((P2= Negatif kaspaz-3 aktivasyonu gösteren canlılık, P4=Pozitif kaspaz-3 aktivasyonu)



Şekil 4.10. (Devam) *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerinde 48. Saatteki kaspaz-3 aktivasyonunun etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC50 ve IC50/2 D) Sentezlenen bileşikler IC50 ve IC50/2*

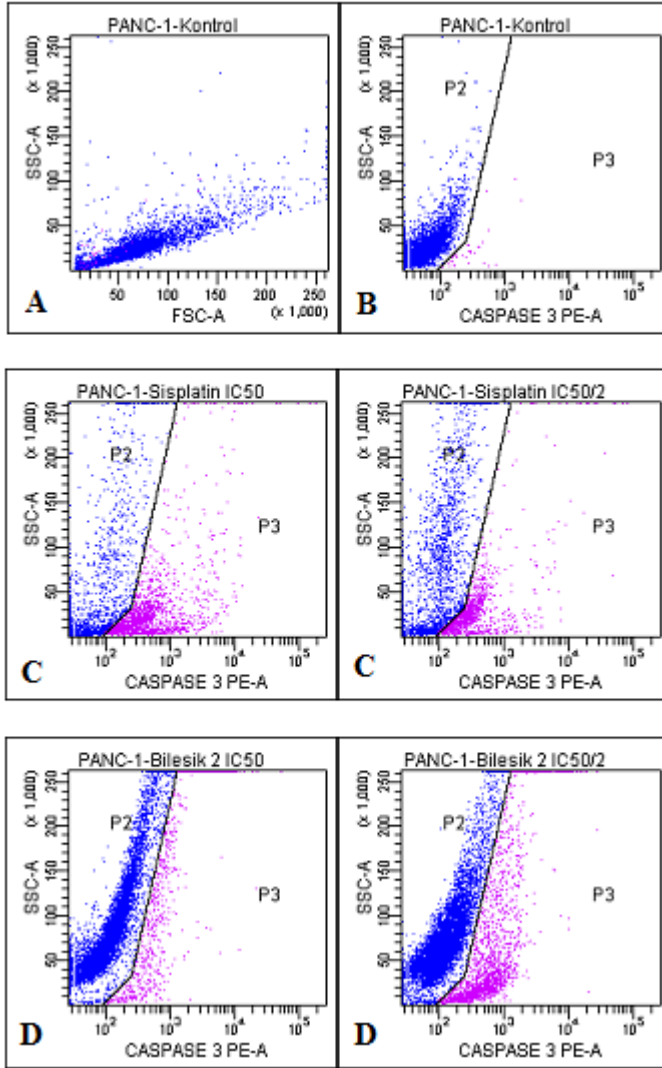
(P2= Negatif kaspaz-3 aktivasyonu gösteren canlılık, P4=Pozitif kaspaz-3 aktivasyonu)

Çizelge 4.22. *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 48. saatteki Kaspaz-3 aktivasyonunun % canlılık değerleri*

(**P2**=Negatif kaspaz-3 aktivasyonu, **P4**= Pozitif kaspaz-3 aktivasyonu gösteren canlılık)

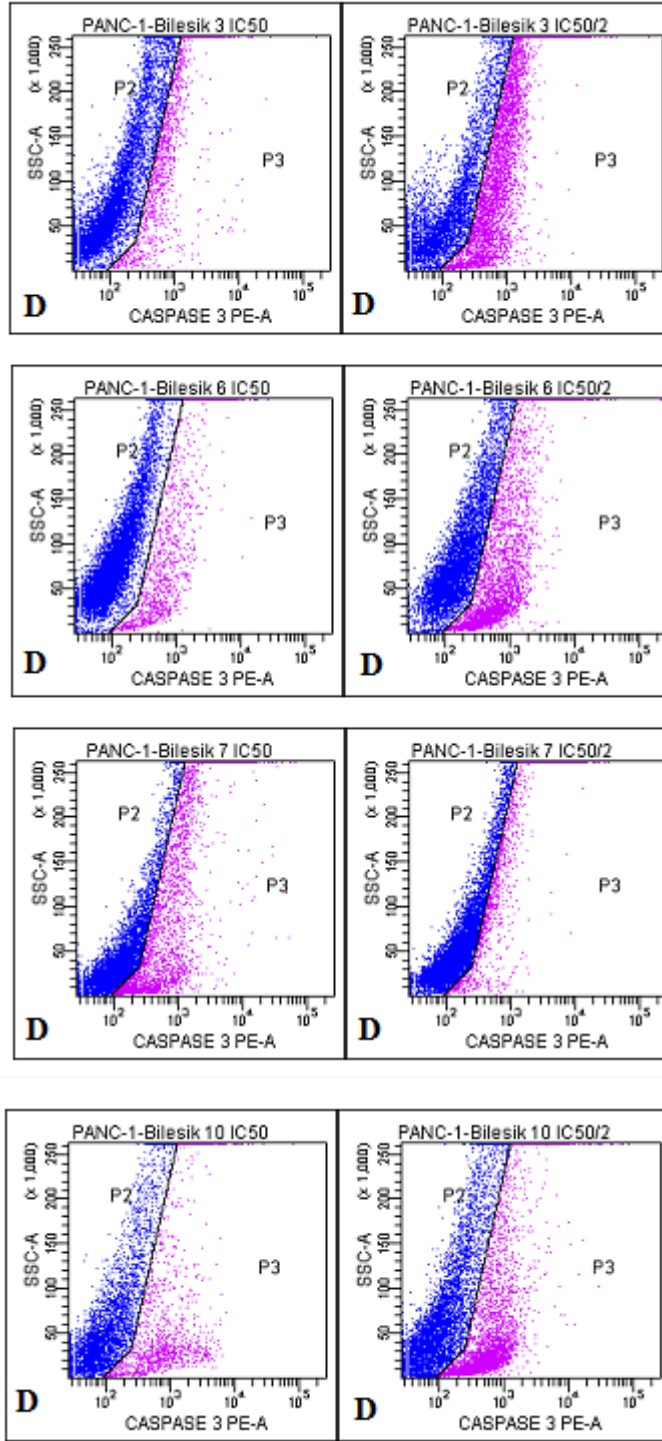
A549 48.saat	P2(%)	P4 (%)
Kontrol	98,7	1,3
Sisplatin IC₅₀	61,9	40,7
Sisplatin IC_{50/2}	75,7	25,7
Bileşik 2_{IC50}	62,7	39,2
Bileşik 2_{IC50/2}	73,0	29,0
Bileşik 3_{IC50}	73,6	29,2
Bileşik 3_{IC50/2}	80,6	20,8
Bileşik 6_{IC50}	70,0	31,6
Bileşik 6_{IC50/2}	75,7	26,8
Bileşik 8_{IC50}	81,2	21,00
Bileşik 8_{IC50/2}	79,5	22
Bileşik 9_{IC50}	76,2	25,8
Bileşik 9_{IC50/2}	83,6	17,7

4.2.3.3. PANC-1 hücrelerindeki 24 saatlik Kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi



Şekil 4.11. Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki kaspaz-3 aktivasyonunun etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC50 ve IC50/2 D) Sentezlenen bileşikler IC50 ve IC50/2

(P2= Negatif kaspaz-3 aktivasyonu gösteren canlılık, P4=Pozitif kaspaz-3 aktivasyonu)



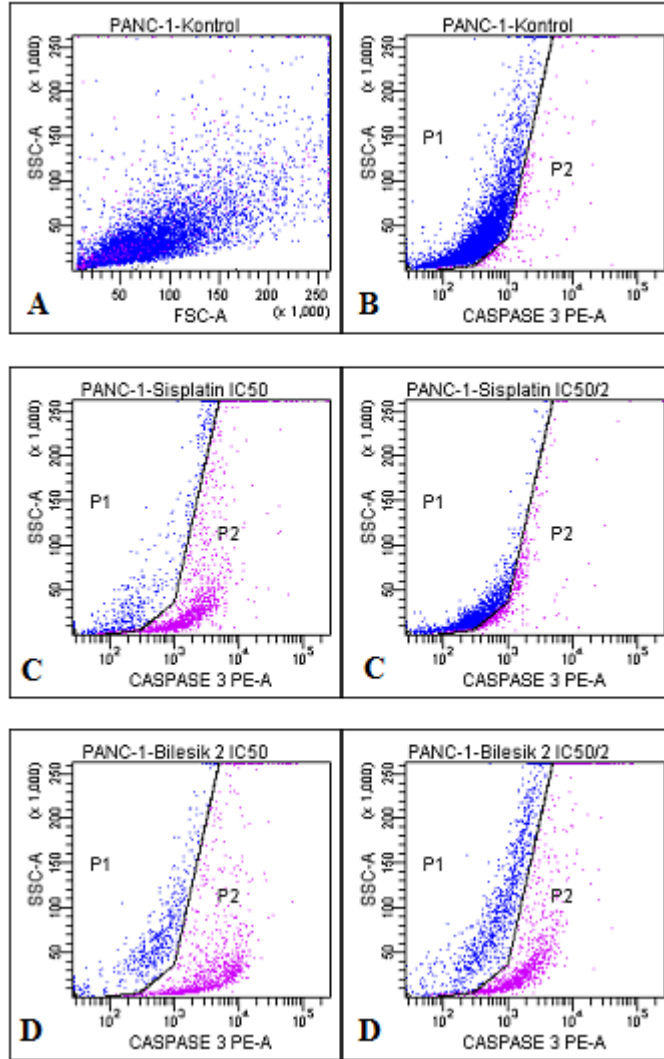
Şekil 4.11. (Devam) Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerinde 24. Saatteki kaspaz-3 aktivasyonunun etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC50 ve IC50/2 D) Sentezlenen bileşikler IC50 ve IC50/2 (P2= Negatif kaspaz-3 aktivasyonu gösteren canlılık, P4=Pozitif kaspaz-3 aktivasyonu)

Çizelge 4.23. *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 24. saatteki Kaspaz-3 aktivasyonunun % canlılık değerleri*

(**P2**=Negatif kaspaz-3 aktivasyonu, **P4**= Pozitif kaspaz-3 aktivasyonu gösteren canlılık)

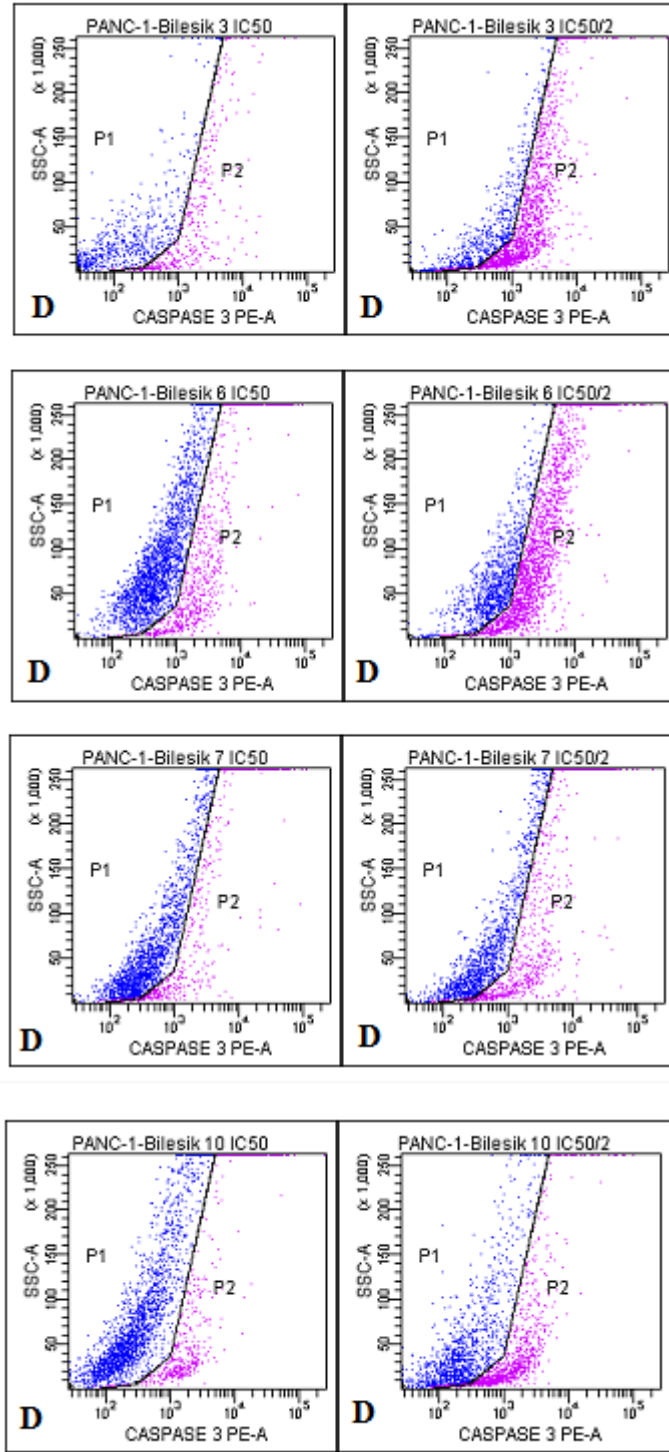
Panc-1 24. saat	P2(%)	P3 (%)
Kontrol	99,7	0,4
Sisplatin IC₅₀	55,3	45,8
Sisplatin IC_{50/2}	66,2	35,1
Bileşik 2_{IC50}	90,9	9,2
Bileşik 2_{IC50/2}	78,9	21,3
Bileşik 3_{IC50}	84,0	16,2
Bileşik 3_{IC50/2}	51,6	48,8
Bileşik 6_{IC50}	88,3	11,8
Bileşik 6_{IC50/2}	60,5	39,8
Bileşik 7_{IC50}	55,6	45,0
Bileşik 7_{IC50/2}	76,2	24,4
Bileşik 10_{IC50}	76,3	23,9
Bileşik 10_{IC50/2}	58,3	42,2

4.2.3.4. PANC-1 hücrelerindeki 48 saatlik Kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi



Şekil 4.12. *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki Kaspaz-3 aktivasyonunun etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC50 ve IC50/2 D) Sentezlenen bileşikler IC50 ve IC50/2*

(P2= Negatif kaspaz-3 aktivasyonu gösteren canlılık, P4=Pozitif kaspaz-3 aktivasyonu)



Şekil 4.12. (Devam) Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerinde 48. Saatteki Kaspaz-3 aktivasyonunun etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı B) Kontrol C) Sisplatin IC50 ve IC50/2 D) Sentezlenen bileşikler IC50 ve IC50/2

(P2= Negatif kaspaz-3 aktivasyonu gösteren canlılık, P4=Pozitif kaspaz-3 aktivasyonu)

Çizelge 4.24. *Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin Panc-1 hücreleri üzerindeki 48. saatteki Kaspaz-3 aktivasyonunun % canlılık değerleri*

(**P2**=Negatif kaspaz-3 aktivasyonu, **P4**= Pozitif kaspaz-3 aktivasyonu gösteren canlılık)

Panc-1 48. saat	P2(%)	P3 (%)
Kontrol	95,3	3,0
Sisplatin IC₅₀	24,4	74,6
Sisplatin IC_{50/2}	75,3	20,5
Bileşik 2_{IC50}	26,9	66,5
Bileşik 2_{IC50/2}	44,0	56,0
Bileşik 3_{IC50}	38,0	62,0
Bileşik 3_{IC50/2}	26,8	74,0
Bileşik 6_{IC50}	73,6	26,4
Bileşik 6_{IC50/2}	32,0	68,0
Bileşik 7_{IC50}	67,3	31,9
Bileşik 7_{IC50/2}	53,9	45,8
Bileşik 10_{IC50}	76,6	23,0
Bileşik 10_{IC50/2}	48,8	50,2

4.3. RT-PCR (Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) analiz sonuçları

A549 hücrelerinde eksprese olduğu PPAR-gama, Bcl-2, Bax, CYD1, cMYC, ERK, pERK genlerinin ve GADPH house keeping geninin bileşik 2, 3, 6, 8'in ve pozitif kontrol olarak kullandığımız sisplatinin MTT deneyi sonucu bulunan IC₅₀ değerleri hücreler uygulanmış ve 24 saat inkübasyon süresi sonrasında RT-PCR analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda kontrol 1 olarak ifade edilmiş buna göre bileşiklerin ve sisplatinin PPAR-gama, Bcl-2, Bax, CYD1, cMYC, ERK, pERK genlerinin ifade düzeyleri 1'in üzerinden kat değişimi olarak hesaplanmıştır. 1'in üzerindeki değerler over eksprese altındaki değerler ise down eksprese olarak belirlenmiştir. Kat değişimi değerleri Çizelge 4.25' te verilmiştir.

Çizelge 4.25. PPAR-gama, Bcl-2, Bax, CYD1, cMYC, ERK, pERK genlerinin kat değişimi değerleri

	CYD1	cMYC	ERK	BCL2	BAX	pERK	PPARG
Bileşik 2	0,639493	0,163799	0,76313	0,602904	2,386671	1,125058	0,41466
Bileşik 6	3,363586	3,271608	1,035265	0,604997	2,540302	1,500039	0,882703
Bileşik 8	3,986161	2,770219	1,385109	0,835088	2,514027	2,703822	0,650671
Bileşik 9	1,647182	0,852635	0,765779	0,726986	7,260153	0,664343	1,180993
Sisplatin	0,582367	0,532185	0,272627	0,222211	1,717131	0,297302	0,290176
Kontrol	1	1	1	1	1	1	1

5. TARTIŞMA

Sisplatin kanser tedavisinde kullanılan en iyi bilinen antikanser ilaçlardan biridir. Ancak bulantı-kusma, nefrotoksisite ve genotoksisite gibi yan etkilere sahiptir ve bu yan etkiler hastanın tedaviye uyuncunu zorlaştırmakta, kombine preparatlar kullanımını zorunlu kılmakta dolayısıyla tedavi sürecini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle kanserli hücrelere karşı daha spesifik ve daha az toksik etkiye sahip yeni antikanser ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır (Kumar ve vd., 2012).

Bu tez çalışmasında; A549-insan akciğer karsinoma epitelyal hücre hattı ve Panc-1 insan pankreas karsinoma hücre hattı üzerinde pozitif kontrol olarak Sisplatin baz alınarak sentezlediğimiz yeni tiyazol türevi bileşiklerin sitotoksik, apoptotik ve gen ekspresyon etkileri değerlendirilmiştir. Bileşiklerin MTT deneyi ile A549, PANC-1 (kanser hücre hatları) ve CCD-19lu ve hTERT-HPNE (normal hücre hatları) hücrelerine karşı sitotoksiteleri belirlenmiş ve önemli sitotoksik etki gösteren bileşiklerin; akım sitometrisi yöntemleri ile apoptotik etkileri saptanmış ardından apoptotik ve hücre proliferasyonunda rol alan genler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

A549, Panc-1, CCD-19Lu ve hTERT-HPNE hücreleri üzerinde Sisplatin ve sentezlenen 10 yeni tiyazol türevi bileşiklerimizin MTT yöntemi kullanılarak zaman ve konsantrasyona bağlı sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Konsantrasyonlar 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.9531 ve 0,9765 µg/mL olarak seçilmiş ve bu konsantrasyonların 24 ve 48 saatlik etkileri gözlenmiştir. Her bir bileşiğin kontrol grubuna göre % canlılık değeri hesaplanmıştır. CCD-19Lu ve hTERT-HPNE hücre hatları sağlık hücre hatları olması sebebiyle ilaçların sitotoksik etkilerini belirlemek amacı ile seçilmiştir.

2018 yılında Yurttaş L. ve arkadaşları bir çalışmada yeni tiyazol türevleri sentezlemiş ve bunların A549 ve C6 glioma hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini değerlendirmişlerdir bu çalışmada Sisplatinin A549 hücreleri üzerindeki 24. Saatteki IC₅₀ değeri 566 µm olarak belirtilmiştir ve MTT sonucuna göre en aktif olan bileşiğin IC₅₀ değeri 37 µm olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda, A549 hücreleri ile yapılan MTT analizi sonucunda, Bileşik 4, 5, 7 ve 10'un IC₅₀ değerininin çalıştığımız maksimum konsantrasyon olan 500 µg/mL'den büyük olduğu belirlenmiştir. Sisplatin, Bileşik 1, 2, 6 ve 9 un hem konsantrasyon artışına bağlı olarak hem de zaman artışına bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı görülmüştür. Bileşik 3'ün konsantrasyona artışına bağlı olarak sitotoksik etkisinin arttığı ancak zamana bağlı olarak önemli bir değişiklik

göstermediği belirlenmiştir. Bileşik 8 de ise yine konsantrasyon artışına bağlı olarak sitotoksikite artmış ancak zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunda artma görülmüştür. Sentezlenen bileşikler pozitif kontrol olan sisplatin ile kıyaslandığında bileşik 1, 2, 3, 6, 8 ve 9'un 24 ve 48 saatte daha fazla etkili oldukları görülmüştür.

PANC-1 hücreleri ile yapılan MTT analizi sonucunda, sisplatin, bileşik 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 ve 10'un hem konsantrasyon hem de zaman artışına bağlı olarak hücre proliferasyonunu arttırdığı görülmüştür. Bileşik 6 ve 9 un ise konsantrasyon artışına bağlı olarak sitotoksik etkisinin arttığı ancak zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunda artma görülmüştür. Tüm bileşikler pozitif kontrol olan sisplatin ile kıyaslandığında bileşik 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10'un hem 24 hem de 48 saatte daha etkili olduğu görülmüştür.

Sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkiyi belirlemek amacıyla CCD-19Lu ve hTERT-HPNE hücre hatları kullanılmış ve MTT analizi yapılmıştır. CCD-19Lu hücre hattında yapılan MTT analizi sonucunda Bileşik 2, 3 ve 10'un 24 ve 48. Saatteki IC₅₀ değerinin çalıştığımız maksimum konsantrasyon olan 500 µg/mL'den büyük olduğu belirlenmiştir. Bileşik 1,4,5'in sitotoksikitesinin dozu ve zaman artışına bağlı olarak arttığı belirlenmiştir ve IC₅₀ değerleri 48 saatin sonunda çalıştığımız minimum konsantrasyon olan 0,9765 µg/mL'nin altına düştüğü görülmüştür. Bileşik 6 ve 7'nin sağlıklı hücre hattı üzerindeki sitotoksikitesi zamana bağlı olarak azalmıştır ve IC₅₀ değerinin 500 µg/mL'nin üzerine çıktığı görülmüştür. Bileşik 8 ve 9 için ise sağlıklı hücre hattında doz arttıkça hücre canlılığının azaldığı ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin her iki sağlıklı hücre hattındaki MTT analizi sonucunda aldığımız veriler birbirleriyle orantılı ve tutarlı bulunmuştur.

Bu MTT analizleri sonucunda sentezlenen bileşiklerin sağlıklı hücre hatlarındaki sitotoksikite de göz önünde bulundurularak kanserli hücre proliferasyonunu sağlıklı hücrelere göre daha fazla oranda durdurduğu tespit edilmiş ve pozitif kontrol olan sisplatin ile zamana ve doza bağlı kıyaslama yapılarak diğer bileşiklere göre daha aktif bileşikler seçilmiştir. Bu sonuçlara göre A549 hücre hattı için **Bileşik 2, 3, 6, 8 ve 9**; PANC-1 hücre hattı için ise **Bileşik 2, 3, 6, 7 ve 10** seçilmiş olup ve akım sitometrisi yöntemleri ile apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi aşamasına geçilmiştir.

Çalışmamızda sisplatin ve aktif olarak seçilen bileşiklerin A549 ve PANC-1 hücrelerinde MTT testi ile belirlenen konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik apoptotik etkileri Annexin V-PI yöntemi ile akım sitometrisi cihazında analiz edilmiştir.

A549 hücreleri üzerinde yapılan erken ve geç apoptoz belirleme analizlerine göre, **sisplatin** için 24 ve 48 saatlerde erken ve geç apoptotik hücre yüzdelерinin doz artışı ile doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür. Zamana bağılı olarak değерlendirecek olursak erken apoptoz oranının zamana bağımlı olarak 48. Saatte artmış, geç apoptoz oranı ise azalmıştır yani yalnızca erken apoptoz oranı zamana bağımlı olarak artmıştır (**Çizelge 4.6.; Şekil 4.1.**).

Bileşik 2 için; zamana bağımlı olarak erken ve geç apoptoz oranlarında ciddi oranlarda azalma görülmüştür (Geç apoptoz yüzdesi yüzde 23,9'dan yüzde 0,4'e düşmüş erken apoptoz oranı yüzde 47,9'dan yüzde 0,2'ye düşmüştür.) Doz açısından ise geç apoptoz oranında doza artışına bağılı bir artış görülmüş ancak erken apoptozda doz artışına bağılı olarak yaklaşık %20 oranında azalma görülmüştür. Burada bileşik 2'nin A549 üzerindeki etkisinin zamana bağımlı olmadığını ve yalnızca geç apoptozda doz ile bağımlı bir artış gözleendiğini söyleyebiliriz (**Çizelge 4.7.; Şekil 4.1.**).

Bileşik 3 için; zamana bağılı olarak erken ve geç apoptoz oranlarında azalma görülmüştür. 24 ve 48. Saatte doz artışına bağılı olarak erken ve geç apoptoz oranlarında artış gözlenmiştir ancak zamana bağımlı olarak erken ve geç apoptoz oranlarında düşüş gözlenmiştir bu nedenle bileşik 3'ün apoptotik etkisi zamana bağımlı değil doza bağımlı olduğu görülmüştür (**Çizelge 4.7.; Şekil 4.1.**).

Bileşik 6 için; 24. Saatte geç apoptoz oranı doza bağılı olarak azalmış (yüzde 38,7'den yüzde 34,2'ye düşmüş) ancak erken apoptoz oranı doz artışına bağılı olarak artmıştır (yüzde 28,9'dan yüzde 42,0'a) zamana bağılı olarak ise apoptoz oranları azalmıştır yine bileşik 6'nın apoptotik etkisinin zamana bağılı olmadığı sadece erken apoptotik etkisinin doza bağımlı olduğu görülmüştür (**Çizelge 4.7.; Şekil 4.1.**).

Bileşik 9 için; geç apoptoz oranının doza bağılı olarak azaldığı (%32,7'den % 24,8'e düşmüştür.) ancak erken apoptoz oranının doz artışına bağılı olarak yaklaşık yüzde 12 arttığı saptanmıştır. Zamana bağımlı olarak erken ve geç apoptoz oranlarının azaldığı görülmüştür. Bileşik 9 için apoptotik etkinin zamana bağımlı olmadığı ve geç apoptoz oranının doza bağımlı olduğu görülmüştür (**Çizelge 4.7.; Şekil 4.1.**).

Maddeler sisplatin ile kıyaslandığında 24. Saatte bileşik 3'ün geç ve erken apoptoz oranlarını sırasıyla IC₅₀ dozunda 1,30 ve 1,13 kat arttırdığı IC_{50/2} dozunda ise geç ve erken apoptoz oranlarını sırasıyla 1,41 ve 1,1 kat arttırdığı görülmüştür. Bileşik 9'un ise IC₅₀ dozunda yalnızca erken apoptoz oranını 1,07 kat arttırdığı IC_{50/2} dozunda ise sırasıyla geç ve erken apoptoz oranlarını 1,35 ve 1,25 kat arttırdığı belirlenmiştir. Bileşik 2'nin

IC₅₀ dozunda yalnızca erken apoptoz oranını 1,06 kat arttırdığı IC_{50/2} dozunda ise sırasıyla geç ve erken apoptoz oranlarını 1,05 ve 1,25 kat arttırdığı görülmüştür. Bileşik 6'nın ise IC₅₀ dozunda yalnızca geç apoptoz oranını 1,25 kat arttırdığı IC_{50/2} dozunda ise sırasıyla geç ve erken apoptoz oranlarını 1,60 ve 1,07 kat arttırdığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre en aktif bileşikler; 3, 6, 9 ve 2 orta dereceli aktif bileşik ise 8'dir.

PANC-1 hücreleri üzerinde yapılan erken ve geç apoptoz belirleme analizlerine göre, sisplatinin 24 ve 48. Saatlerdeki apoptotik etkilerinin A549'a oranla oldukça düşük olduğu görülmüştür. Sisplatinin erken ve geç apoptoz oranları doza bağlı değildir ancak zamana bağlı olarak arttığı görülmüştür (Çizelge 4.12.; Şekil 4.3).

Bileşik 2 için; erken ve geç apoptotik etki doza bağımlı olarak artmış, erken apoptoz da zamana bağımlı bir artış gözlenmiştir (yüzde 2,7'den yüzde 8,8'e çıkmıştır) ancak apoptoz oranları yine de A549 hücreesindeki kadar yüksek değildir. **Bileşik 3, 6 ve 7** için ise erken ve geç apoptoz oranlarında doza ve zamana bağlı artış görülmüştür. **Bileşik 10** için erken ve geç apoptoz oranlarında zamana bağlı artış gözlenmiştir erken apoptoz oranının doza bağımlı olarak artış gösterdiği (%1,2'den %3,2'ye) geç apoptozun ise doza bağlı olmadığı saptanmıştır.

PANC-1 hücrelerinde erken ve geç apoptoz oranlarının oldukça düşüktür bu yüzden bileşiklerimizin A549 hücrelerinde 24. Saat sonunda daha etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda sisplatin ve aktif olarak seçilen bileşiklerin A549 ve PANC-1 hücrelerinde MTT testi ile belirlenen konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat süresince mitokondriyal membran potansiyeli üzerine etkileri JC-1 boyama yöntemi ile akım sitometrisi cihazında belirlenmiştir.

Guggilapu ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı çalışmada tiyazol bağlı indolil-3-glikoksilamid türevleri sentezlemişler ve çalışmalarında en etkili bileşik olarak seçtikleri 13-d kodlu 5-metoksibenzotiyazol bileşiğinin A549 hücresi üzerindeki mitokondriyal membran potansiyelini üzerine etkileri JC-1 boyama yöntemi ile belirlemişler ve IC₅₀ dozunda mitokondriyal membran depolarizasyonu yüzdesini yüzde 64,65 IC_{50/2} dozunda ise yüzde 57,05 olarak belirlemişlerdir.

A549 hücreleri ile yapılan çalışmamızda 24. saat sonunda kontrole göre sisplatin, bileşik 6, 8 ve 9'da mitokondriyal membran potansiyelinde artışa neden olmuştur. 24 saatte sisplatine göre mitokondriyal membran depolarizasyonunda IC_{50/2} dozunda bileşik 8'in yaklaşık 1,34 kat bileşik 9'un 1,10 kat artış görülmüştür. Sisplatinin 24 saatte doza

bağlı olarak mitokondriyal membran depolarizasyonu yüzdesinde yaklaşık 3 kat, 48 saatte ise yaklaşık 2 kat artış görülmüş bunun yanı sıra zamana bağımlı olarak mitokondriyal membran depolarizasyonunda artış görülmüştür. Bileşik 3, 6, 8 ve 9'da ise doza ve zamana bağlı olarak mitokondriyal membran depolarizasyonunda artış görülmüştür. Bileşik 2'nin olarak mitokondriyal membran depolarizasyonu yüzdesinde zamana bağlı olarak artış görülmüştür (IC_{50} dozunda %0,2'den %39,2'ye çıkmıştır). 48. saatte ise doza bağlı olarak 1,35 kat artış görülmüştür. Ayrıca 48 saat sonunda sisplatine oldukça yakın yüzdelere elde edilmiştir (Sisplatin IC_{50} %40,7 bileşik 2 %39,2) 48 saatte sisplatine göre mitokondriyal membran depolarizasyonunda $IC_{50/2}$ dozunda yaklaşık 1,12 kat artış görülmüştür. Sisplatinin ve diğer tüm bileşiklerin her iki dozunda da mitokondriyal membran potansiyelinin 48. saatte daha iyi olduğu görülmüştür (Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.; Çizelge 4.17. ve 4.18.)

PANC-1 hücrelerinde yapılan 24 ve 48 saatlik mitokondriyal membran depolarizasyonu belirleme analiz sonuçlarına göre, **bileşik 2** ve **3** için zamana bağlı olarak mitokondriyal membran depolarizasyonunda artış gözlenmiş ancak bu etkinin doz ile bağımlı olmadığı gözlenmiştir. **Bileşik 6** için zaman artışına bağlı olarak mitokondriyal membran depolarizasyonu yüzdesinde artış gözlenmiş bunun yanı sıra 48. Saatte doz artışına bağlı yaklaşık 1,63 kat bir artış görülmüştür. **Bileşik 7** için ise yalnızca 24. Saatte doza bağımlı bir membran depolarizasyonu yüzdesi artışı görülmüş zamana bağlı bir artış saptanmamıştır ayrıca yine 24. Saatte IC_{50} dozunda sisplatine göre yaklaşık 1,30 kat artış görülmüştür.

Yapılan bazı çalışmalarda tiyazol türevlerinin antikanser aktivitelerini apoptotik mekanizma üzerinden yürüttüklerine dair çalışmalar da mevcuttur. Xuejia ve arkadaşlarının 2013'te gerçekleştirdiği bir çalışmada HepG2 hücrelerine karşı YLT322 kodlu tiyazol bileşiğinin apoptozu mitokondriyal yoldan indüklediklerine dair çalışmalar mevcuttur. Bu etkilerini Kaspaz-3 ve Kaspaz-9 aktivasyonuna neden olarak ve Bax ekspresyonunu artırarak gerçekleştirmişlerdir.

Tez çalışmamızda A549 ve PANC-1 hücrelerinde 24 ve 48 saat süresi boyunca sisplatin ve aktif olarak seçilen bileşiklerin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozlarının kaspaz 3 aktivasyonu üzerindeki etkileri akım sitometri cihazı ile araştırılmıştır. Kaspazlar ailesinden kaspaz-3 dış yolak, iç yolak ve endoplazmik retikulum yolağı üzerinden aktifleşebilmektedir (Adams ve Corry,2001; Adrain ve Martin, 2001; Spierrings vd.,2004).

A549 ile yapılan 24 ve 48 saatlik kaspaz-3 aktivasyonu belirleme çalışmalarında sisplatin ve tüm bileşiklerin tüm dozlarının aktif kaspaz yüzdesi kontrole göre artış göstermiştir. Sisplatin, bileşik 2,3 ve 6'nın aktif kaspaz-3 yüzdesi doza ve zamana bağımlı olarak artmıştır. Bileşik 9'da ise doza bağımlı artış görülmemiş ancak IC₅₀ dozunda zamana bağımlı az da olsa bir artış gözlenmiştir (%25,5'ten %25,8'e çıkmıştır). 24 saatte IC₅₀ dozunda en çok kaspaz-3 aktivasyonu bileşik 3'te daha sonra bileşik 2 de görülmüştür (Sisplatin %41,9, bileşik 3 %29,2, bileşik 3 %24,0). 48. Saatte en çok kaspaz-3 aktivasyonu bileşik 2'de belirlenmiş olup bu değerler hem IC₅₀ hem de IC_{50/2} için sisplatine oldukça yakın yüzdelere vermiştir (Sisplatin IC₅₀: %40,7 bileşik 2 IC₅₀: %39,2 Sisplatin IC_{50/2}: %25,7 bileşik 2 IC_{50/2}: %29,7) (Çizelge 4.23 ve Çizelge 4.24.)

PANC-1 ile yapılan 24 ve 48 saatlik kaspaz-3 aktivasyonu belirleme çalışmalarında sisplatin ve tüm bileşiklerin tüm dozlarının aktif kaspaz yüzdesi kontrole göre artış göstermiştir. Sisplatin doza bağımlı olarak kaspaz-3 aktivasyonunda artış göstermiş (yüzde 35,1'den yüzde 45,8'e çıkmıştır) ayrıca yalnızca IC₅₀ dozunda yalnızca zamana bağımlı bir aktif kaspaz-3 yüzdesi artışı göstermiştir. Bileşik 2'nin aktif kaspaz-3 yüzdesi zaman bağımlı olarak artmış bunun yanı sıra yalnızca 48. saatte doza bağımlı bir yüzde artışı da belirlenmiştir. Bileşik 3 ve 6'nın aktif kaspaz-3 yüzdesi yalnızca zamana bağımlı olarak artmıştır. Bileşik 3'ün 24 saatte IC_{50/2} dozunda sisplatinin IC_{50/2} dozuna oranla yaklaşık 1,39 kat daha fazla yüzde aktif kaspaz-3 miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. 48. saat verilerine göre ise Bileşik 2, 3 ve 6'nın IC_{50/2} dozunun sisplatinin IC_{50/2} dozundaki aktif kaspaz-3 yüzdesine göre yaklaşık 3 kat arttığı bileşik 7 ve 10'un yaklaşık 2,5 kat arttığı saptanmıştır. Bileşik 7'de ise aktif kaspaz-3 yüzdesinde doza ve zamana bağımlı bir artış olduğu saptanmıştır. 24. Saatte bileşik 7'nin sisplatine oldukça benzer yüzdelere verdiği görülmüştür (Sisplatin IC₅₀: %45,8; Bileşik 7 IC₅₀: %45,0). Ayrıca 24. Saatte sisplatine en benzeyen ve en yüksek aktif kaspaz-3 yüzdesini veren bileşik, **bileşik 7** olmuştur.

Sentezlediğimiz yeni tiyazol türevlerinin MTT deneyi ile A549, PANC-1 (kanseri hücre hatları) ve CCD-19lu ve hTERT-HPNE (normal hücre hatları) hücrelerine karşı sitotoksik etkileri belirlenmiş ve önemli sitotoksik etki gösteren bileşiklerin; akım sitometrisi yöntemleri ile apoptotik etkileri belirlenmiştir akım sitometrisi deneyleri sonucunda bileşiklerimizin A549 hücre hattına karşı daha etkili olduğunu düşünmekteyiz bu sebeple A549 hücreleri üzerinde RT-PCR yöntemi ile apoptotik ve hücre

proliferasyonunda rol alan genler üzerindeki ifade düzeylerinin araştırılması aşamasına geçilmiştir.

Bax, proapoptotik bir onkoproteindir sitozolde yer alır ve sitokrom-c ve AIF salınımını uyararak apoptozu indükler bir hücrede Bax ifadesinin artması hücrenin apoptoza gittiğini gösteren bir belirteçtir. Bcl-2 ise antiapoptotik bir onkogendir Bax'ın zıddına sitokrom-c ve AIF salınımını bloke ederek apoptozu bloke eder (McIlwain, Berger ve Mak, 2013). c-Myc ise bir onkogendir ve nükleer proteinler sınıfında yer almaktadır akciğer kanserinde myc'in overeksprese olduğu ve çok hızlı çoğaldığı bilinmektedir. CYD-1 ise bir onkogendir ve siklinler ve siklin bağımlı kinazlar grubunda yer almaktadır. Siklin bağımlı kinazlar hedef proteinlerle fosforilasyon sağlayarak hücre siklusunu düzenlemektedir. Siklin D1'i kodlayan CYD-1 geni akciğer kanserinde overeksprese olmuş durumdadır (Pazarbaşı ve Kasap,2003). ERK ise mitojenler tarafından aktive edilmiş protein kinazlar süper ailesinde yer almaktadır ve MAP Kinaz sinyal iletim yolu yaşama, çoğalma, apoptoz ve embriyogenez için önem taşımaktadır insanda görülen tümörlerin yaklaşık %30'unda bu yolağın aktivasyonu söz konusudur. Perk kinaz tümörün invazyonunda ve metastazında kritik rol oynamaktadır. Perk sinyali ki bu sinyal katlanmamış protein cevabı ile aktive olan bir sinyaldir kanser hücrelerinin tipik olarak tümör mikro ortamlarında gözlemlenen olumsuz koşullardan sağ çıkmasını sağlar. Perkin aktive olması global protein sentezini azaltan eif2a'yı fosforile eder. Kanser metastatik ilerlemesini yönlendirmedeki rolü göz önüne alındığında perk anti kanser ilaç keşfi için önemli bir yol haline gelmiştir (Liem vd., 2002).

Yea ve arkadaşları 2016'da tiyazol türevlerinin Peroksizom proliferatör-aktiviteli reseptör- γ aktivasyonu yaptıklarını göstermişlerdir. Yapılan literatür araştırmasına göre tiyazollerin neden olduğu antikanser etkilerin hangi mekanizma üzerinden yürüdüğüne dair çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Son dönemlerde bu bileşiklerin PPAR- γ reseptörleri üzerindeki aktive edici özellikleri ile kanserli hücrelerde kematöropatik etkileri söz konusudur. Bazı kanser hücre hatlarında PPAR- γ reseptörleri ekspresyonunun bulunduğu gösterilmiştir. A549 insan akciğer adenokarsinoma ve PANC-1 pankreas adenokarsinoma hücreleri bu özelliği taşıyan hücrelerden ikisidir. Shaik ve arkadaşlarının 2017'de yaptığı çalışmada ise yeni imidazo tiyazol türevleri sentezemişler ve bunların biyokimyasal etkilerini değerlendirmişlerdir burada yapılan western-blot analizinde 4g ve 4h kodlu bileşiklerin A549 hücreleri üzerindeki 48 saat sonunda bcl-2'yi down regüle

ettiği bax'ı up regüle ettiği görülmüştür ve bu veriler bu tiyazol türevlerinin A549 hücrelerinde apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur.

A549 hücrelerinde eksprese olduğu PPAR-gama, Bcl-2, Bax, CYD1, cMYC, ERK, pERK genlerinin ve GADPH house keeping geninin bileşik 2, 3, 6, 8'in ve pozitif kontrol olarak kullandığımız sisplatinin MTT deneyi sonucu bulunan IC₅₀ değerleri hücreler uygulanmış ve 24 saat inkübasyon süresi sonrasında RT-PCR analizi yapılmıştır. Sonuçlar ise kontrol 1 olarak kabul edilmiş ve kontrole göre kat değişimi olarak ifade edilmiştir.

Deney sonuçlarımıza göre, **sisplatinin** proapoptotik Bax onkoproteinini 1,71 kat up-regüle etmiştir antiapoptotik olan Bcl-2 onkoproteinini ise 4,54 kat down-regüle etmiştir. Literatür taramalarımız sonucunda akciğer kanserinde overeksprese halde olduğu bilinen CYD-1 geni sisplatinin uygulanması sonucu kontrol grubuna göre 1,72 kat down-regüle olmuştur. Yine akciğer kanserinde overeksprese olduğunu bilinen c-myc, ERK ve Perk genleri sisplatin uygulanması sonrasında sırası ile 1,88; 3,70; 3,44 kat down-regüle olmuştur. PPar- γ ise akciğer kanserinde eksprese halde bir gendir PPar - γ agonistlerinin PPar- γ 'yı aktive etmesi sebebiyle akciğer kanserinde tedavi ajanı olabilecekleri düşünülmektedir bu sebeple bileşiklerimizin PPar- γ 'nın ekspresyonunu arttırmasını öngördük ancak bu etkiyi sisplatine gözlemleyemedik PPar- γ 3,44 kat down regüle olmuştur (Çizelge 4.25.).

Bileşik 2, proapoptotik Bax onkoproteinini 2,38 kat up-regüle etmiştir, antiapoptotik olan Bcl-2 onkoproteinini ise 1,66 kat down-regüle etmiştir. Akciğer kanserinde overeksprese halde olduğu bilinen CYD-1, c-myc, ERK genlerini ise sırası ile 1,51; 6,25; 1,36 kat down regüle etmiştir. Buna rağmen akciğer kanserinde overeksprese halde olduğu bilinen Perk'in down regüle olması beklenirken 1,1 kat bir up-regülasyon görülmektedir. Yine bileşik-2'de sisplatin gibi PPar - γ agonisti bir etki göstererek PPar - γ ekspresyonunu arttırmasını öngördük ancak böyle bir etki görülmedi (Çizelge 4.25.).

Bileşik 6, yalnızca proapoptotik Bax onkoproteinini 2,54 kat up-regüle etmiştir, antiapoptotik olan Bcl-2 onkoproteinini ise 1,66 kat down-regüle etmiştir. **Bileşik 8** ise Bax onkoproteinini 2,51 kat up-regüle etmiştir, antiapoptotik olan Bcl-2 onkoproteinini ise 1,25 kat down-regüle etmiştir (Çizelge 4.25.).

Bileşik 9, proapoptotik Bax onkoproteinini 7,2 kat up-regüle etmiştir, antiapoptotik olan Bcl-2 onkoproteinini ise 1,42 kat down-regüle etmiştir. Akciğer kanserinde overeksprese halde olduğu bilinen c-myc, ERK, Perk genlerini ise sırası ile 1,20;

1,31;1,51 kat down regüle etmiştir. Ayrıca bunun yanı sıra Ppar- γ ekspresyonunu 1,18 kat up-regüle etmiştir. Bu veriye göre bileşik 8'in Ppar- γ agonisti gibi davrandığını yorumlayabiliriz (Çizelge 4.25.).

Tüm bu verilere bakılığında pozitif kontrolümüz olan sisplatin ile en uyumlu sonuçları veren bileşiğin 4-florofenil sübstitüentine sahip **bileşik-2** olduğunu ve kontrol grubuna göre proapoptotik Bax onkoproteinini up regüle ederek, antiapoptotik olan Bcl-2 onkoproteinini down-regüle ederek ve yine akciğer kanserinde overeksprese olduğunu bilinen c-myc, ERK genlerini down-regüle ederek apoptozu indüklediğini düşünmekteyiz. Öngördüğümüzün aksine bileşik-2'de Ppar- γ agonisti bir etki gözlemlenemedi ancak bileşik -9'da bu etkinin olabileceğini düşünmekteyiz bunun için moleküler docking çalışmasını ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda sentezlenen yeni 10 tiyazol türevinin hepsi özgün olup ilk defa sentezlenmiştir ve MTT deneyi ile A549, PANC-1 (kanser hücre hatları) ve CCD-19lu ve hTERT-HPNE (normal hücre hatları) hücrelerine karşı sitotoksiteleri belirlenmiş ve önemli sitotoksik etki gösteren bileşikler A549 hücre hattı için bileşik 2,3,6,8 ve 9 PANC-1 hücre hattı için bileşik 2,3,6,7 ve 10 seçilmiştir burada sağlıklı hücre hatları seçiciliği sağlamak için ve sağlıklı hücreye verdiği zararı görmek için kullanılmıştır. Önemli sitotoksik etki gösteren bu bileşiklerimiz akım sitometrisi yöntemiyle apoptotik etkilerin belirlenmesi için Annexin-V FITC-PI, JC-1 yöntemi ile mitokondriyal membra potansiyelinin belirlenmesi ve Kaspaz-3 aktivitesinin değerlendirilmesi deneylere tabi tutulmuş ve bu deneyler sonucunda A549 hücre hattı için en aktif bileşik **bileşik 2 (2-[2-(4-(2-(Dimetilamino)etoksi)benziliden)hidrazinil]-4-florofeniltiyazol)** PANC-1 hücre hattı için ise **bileşik 7 (2-[2-(4-(2-(Dimetilamino)etoksi)benziliden)hidrazinil]-4-triflorometiltiyazol)** olarak seçilmiştir. Genel olarak bileşiklerimizin A549 hücre hattında PANC-1'e göre daha etkili olduğunu düşünmekteyiz bu nedenle A549 hücre hattında RT-PCR yöntemi ile apoptotik ve hücre proliferasyonunda önemli olan PPAR-gama, Bcl-2, Bax, CYD1, cMYC, ERK, pERK genlerinin ekspresyon düzeylerini inceledik ve 4-florofenil substitüentine sahip **bileşik 2**'nin diğer deneylerimiz ile uyumlu olarak kontrol grubuna göre proapoptotik Bax onkoproteinini up regüle ederek, antiapoptotik olan Bcl-2 onkoproteinini down-regüle ederek ve yine akciğer kanserinde overeksprese olduğunu bilinen c-myc, ERK genlerini down regüle ederek apoptozu indüklediğini düşünmekteyiz.

Aktif çıkan bileşiklerimizin sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri oldukça düşüktür ve apoptotik süreci indükledikleri akım sitometrisi ve gen ifade düzeyi ölçümü çalışmalarımızda görülmüştür bu nedenle bu bileşiklerin etki mekanizması aydınlatılarak kombine tedavilerde veya yalnız başına tedavi ajanı adayı olarak ileri testlere alınabileceğini düşünmekteyiz. Bu mekanizmaların daha da aydınlatılması için hayvan deneylerine ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abercrombie, M., & Ambrose, E. J. (1962). The surface properties of cancer cells: a review. *Cancer research*, 22(5 Part 1), 525-548.
- Adams, J. M. ve Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in biochemical sciences*, 26(1), 61-66.
- Adrain, C. ve Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in biochemical sciences*, 26(6), 390-397.
- Ali A.R., El-Bendary E.R., Ghaly M.A., Shehata I.A. Synthesis, in vitro anticancer evaluation and in silico studies of novel imidazo[2,1-b]thiazole derivatives bearing pyrazole moieties, *Eur J Med Chem.*, 21, 492-500, (2014).
- Alles, A., Alley, K., Barrett, J. C., Buttyan, R., Columbano, A., Cope, F. O., Copelan E.A., Duke R.C., Farel P.B., Green D.R., Martin D.B., Server A.C. ve Gershenson, L. E. (1991). Apoptosis: a general comment. *The FASEB journal*, 5(8), 2127-2128.
- Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sun B ve Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research*, 25(9), 2097-2116.
- Arora, P., Narang, R., Nayak, S. K., Singh, S. K. ve Judge, V. (2016). 2, 4-Disubstituted thiazoles as multitargeted bioactive molecules. *Medicinal Chemistry Research*, 25(9), 1717-1743.
- Arslan, D. Ö., Korkmaz, G. ve Gözüa ık, D. (2011). Otofaji: Bir hücresel stres yanıtı ve ölüm mekanizması.
- Aydoğan, H. Y., Kurt,  ., Kurnaz,  ., Teker, B. A. ve K     seyin,  . (2013). Koroner kalp hastalığında peroksizom proliferatör-aktif reseptör (PPAR) izoformları. *Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi*, 38(4).
- Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 154-165.
- Beaven SW, Tontonoz P. Nuclear Receptors In Lipid Metabolism: Targeting the Heart of Dyslipidemia. *Annu Rev Med* 2006; 57:313–29.
- Bellamy, C. O., Malcolmson, R. D., Harrison, D. J., & Wyllie, A. H. (1995). Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 6, No. 1, pp. 3-16). Academic Press.

- Cooper, G. M., Hausman, R. E., Sakızlı, M., & Atabey, N. (2006). *Hücre: moleküler yaklaşım*. İzmir Tıp Kitabevi.
- Coşkun, G., & Özgür, H. (2014). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158.
- Curtin, J. F. ve Cotter, T. G. (2003). Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular signalling*, 15(11), 983-992.
- Danial, N. N. ve Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- Dawood K.M., Eldebss T.M., El-Zahabi H.S., Yousef M.H., Metz P. Synthesis of some new pyrazole-based 1,3-thiazoles and 1,3,4-thiadiazoles as anticancer agents, *Eur J Med Chem.*, 70, 740-9, (2013).
- Dikmen M., Canturk Z., Ozturk Y., Tunalı Y. Investigation of the apoptotic effect of curcumin in human leukemia HL-60 cells by using flow cytometry, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 25, 749-755, (2010).
- DiMaio, C. J. (2014). Pancreatic cysts and tumors. *Mount Sinai Expert Guides: Gastroenterology*, 304-322.
- Doğan, A. L., & Güç, D. (2004). Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Acta Medica*, 35(1), 34-42.
- Doll, R., Peto, R., Boreham, J. ve Sutherland, I. (2005). Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors. *British journal of cancer*, 92(3), 426.
- Ellis, R. E., Yuan, J., & Horvitz, H. R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annual review of cell biology*, 7(1), 663-698.
- Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M. F. ve Hamadeh R, (2015). The global burden of cancer 2013. *JAMA oncology*, 1(4), 505-527.
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L. ve Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications.
- Galmarini C.M., Mackey J.R., Dumontet C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies, *Leukemia*, 15, 875-890, (2001).

- Golstein, P. ve Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*, 32(1), 37-43.
- Guo, C., Manjili, M. H., Subject, J. R., Sarkar, D., Fisher, P. B. ve Wang, X. Y. (2013). Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. In *Advances in cancer research* (Vol. 119, pp. 421-475). Academic Press.
- Gupta S.P. Quantitative Structure-Activity Relationship Studies on Anticancer Drugs, *Chem. Rev.*, 94, 1507-1551, (1994).
- Husain, K. (2014). Pancreatic cancer treatment. *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*, 5(01), 1-5.
- Jha, P., Chaloupka, F. J., Chaloupka, F. J. ve Corrao, M., (2006). Reducing the burden of smoking world-wide: effectiveness of interventions and their coverage. *Drug and alcohol review*, 25(6), 597-609.
- Juneja M., Vanam U., Paranthaman S., Bharathan A., Keerthi V.S., Reena J.K., Rajaram R., Rajasekharan K.N., Karunagaran D. 4-Amino-2-arylamino-5-indoloyl/cinnamoythiazoles, analogs of topsentin-class of marine alkaloids induce apoptosis in HeLa cells, *Eur J Med Chem.*, 63, 474-83, (2013).
- Kahn, S. E., & Hull, R. L. (2006). Utzschneider. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(14), 840-846
- Kaufmann, S. H. ve Hengartner, M. O. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in cell biology*, 11(12), 526-534.
- Kılıç, N., & Cansaran-Duman, D. (2017). Akciğer kanseri tedavisinde farmakogenomik. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 74(2).
- Kinhikar, R. A., Pawar, A. B., Mahantshetty, U., Murthy, V., Dheshpande, D. D. Ve Shrivastava, S. K. (2014). Rapid Arc, helical tomotherapy, sliding window intensity modulated radiotherapy and three dimensional conformal radiation for localized prostate cancer: A dosimetric comparison. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10(3), 575.
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/Mek/Erk signal transduction pathway. *Biochem. J*, 351, 289-305.

Kumar T., Gupta A., Kashaw V, et al. Synthesis and anticancer evaluation of some novel 3-3-[5-(4-substituted) phenyl-1,3,4-oxadiazole-2yl]-2-phenylquinazoline4(3H)-ones. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4:502, (2012).

Kuo, C. T., Hsu, M. J., Chen, B. C., Chen, C. C., Teng, C. M., Pan, S. L. ve Lin, C. H. (2008). Denbinobin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells via Akt inactivation, Bad activation, and mitochondrial dysfunction. *Toxicology letters*, 177(1), 48-58.

Lee Jr, J. T. ve McCubrey, J. A. (2002). The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia*, 16(4), 486.

Liem, A. A., Chamberlain, M. P., Wolf, C. R. ve Thompson, A. M. (2002). The role of signal transduction in cancer treatment and drug resistance. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 28(6), 679-684.

Ma, X., & Yu, H. (2006). Cancer issue: global burden of cancer. *The Yale journal of biology and medicine*, 79(3-4), 85.

Marti, A., Ritter, P. M., Jager, R., Lazar, H., Baltzer, A., Schenkel, J., Declercq W., Vandenabeele P. ve Jaggi, R. (2001). Mouse mammary gland involution is associated with cytochrome c release and caspase activation. *Mechanisms of development*, 104(1-2), 89-98.

McIlwain, D. R., Berger, T. ve Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(4), a008656.

Metzcar, J., Wang, Y., Heiland, R., & Macklin, P. (2019). A review of cell-based computational modeling in cancer biology. *JCO clinical cancer informatics*, 2, 1-13.

Mian, M., Tinelli, M., De March, E., Turri, G., Meneghini, V., Pescosta, N. Ve Pizzolo, G. (2016). Bortezomib, Thalidomide and Lenalidomide: Have They Really Changed the Outcome of Multiple Myeloma. *Anticancer research*, 36(3), 1059-1065.

Mosieniak G., Sliwinska M., Piwocka K., Sikora E. Curcumin abolishes apoptosis resistance of calcitriol-differentiated HL-60 cells. *FEBS Lett.*, 580, 4653-60, (2006).

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

Nicotera, P. ve Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis–necrosis switch. *Oncogene*, 23(16), 2757.

- Noolvi, M. N., Patel, H. M., ve Kaur, M. (2012). Benzothiazoles: search for anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry*, 54, 447-462.
- Nussbaumer S., Bonnabry P., Veuthey J.-L., Fleury-Souverain S. Analysis of anticancer drugs: A review, *Talanta*, 85, 2265-2289, (2011).
- Nussbaumer S., Bonnabry P., Veuthey J.L., Fleury-Souverain S. Analysis of anticancer drugs: A review, *Talanta*, 85, 2265-89, (2011).
- Ogden, C. L., Carroll, M. D., Curtin, L. R., McDowell, M. A., Tabak, C. J. ve Flegal, K. M. (2006). Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *Jama*, 295(13), 1549-1555.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B. ve Bao, J. K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*, 45(6), 487-498.
- Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., & Haanen, C. (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3(2), 115-121.
- Oyouni, A. A. A. (2017). Human Cancer Genetics, Stem Cells, and Medical Molecular Biology: An Epigrammatic Review. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 14(3), 881-885.
- Pawson, T. (2002). Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *European journal of cancer*, 38, S3-S10.
- Pawson, T., Raina, M., & Nash, P. (2002). Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS letters*, 513(1), 2-10.
- Pazarbaşı, A., & Kasap, M. Kanser Genetiği. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 12(4).
- Polvani, S., Tarocchi, M., Tempesti, S., Bencini, L. ve Galli, A. (2016). Peroxisome proliferator activated receptors at the crossroad of obesity, diabetes, and pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 22(8), 2441.
- Renahan, A. G., Booth, C. Ve Potten, C. S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? Education and debate. *Bmj*, 322(7301), 1536-1538.
- Ricci M. S., Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways, *Oncologist*, 11, 342, (2006).
- Roman, J. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor γ and lung cancer biology: implications for therapy. *Journal of Investigative Medicine*, 56(2), 528-533.

- Ryan, D. P., Hong, T. S. Ve Bardeesy, N. (2014). Pancreatic adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*, 371(11), 1039-1049.
- Santos K., Laranjo M., Abrantes A.M., Brito A.F., Gonçalves C., Sarmiento Ribeiro A.B., Botelho M.F., Soares M.I., Oliveira A.S., Pinho E., Melo T.M. Targeting triple-negative breast cancer cells with 6,7-bis(hydroxymethyl)-1h,3h-pyrrolo[1,2-c]thiazoles, *Eur J Med Chem*.
- Shaharyar M., Abdullah M.M., Bakht M.A., Majeed J. Pyrazoline bearing benzimidazoles: search for anticancer agent, *J Eur J Med Chem.*, 45, 114-9, (2010).
- Smoke, T. ve Smoking, I. (2004). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *IARC, Lyon*, 1-1452
- Soreide, K. ve Sund, M. (2015). Epidemiological-molecular evidence of metabolic reprogramming on proliferation, autophagy and cell signaling in pancreas cancer. *Cancer letters*, 356(2), 281-288.
- Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., Hollema H. ve Jong, S. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(6), 821-831.
- Takahashi, K. ve Yamanaka, S. (2013). Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development*, 140(12), 2457-2461.
- Thayyullathi L F., Chathoth S., Hago A., Patel M., Galadari S. Rapid reactive oxygen species (ROS) generation induced by curcumin leads to caspase-dependent and – independent apoptosis in L929 cells. *Free Radic Biol Med.*, 45, 1403-12, (2008).
- Thornberry N.A., Lazebnik Y. Caspases: enemies within, *Science*, 281, 1312-6, (1998).
- Travis, W. D., Lubin, J., Ries, L. ve Devesa, S. (1996). United States lung carcinoma incidence trends: declining for most histologic types among males, increasing among females. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 77(12), 2464-2470.
- Ulukaya, E., Acilan, C., & Yilmaz, Y. (2011). Apoptosis: why and how does it occur in biology?. *Cell biochemistry and function*, 29(6), 468-480.
- Vousden, K. H. ve Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 594.

- Wagner, S. C., Ichim, T. E., Ma, H., Szymanski, J., Perez, J. A., Lopez, J., Bogin V., Patel A.N., Marincola F.M. ve Kesari, S. (2015). Cancer anti-angiogenesis vaccines: Is the tumor vasculature antigenically unique?. *Journal of translational medicine*, 13(1), 340.
- Walensky, L. D. (2006). BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell death and differentiation*, 13(8), 1339.
- Wang, H., Wang, L., Cao, L., Zhang, Q., Song, Q., Meng, Z., Wu X. ve Xu, K. (2018). Inhibition of autophagy potentiates the anti-metastasis effect of phenethyl isothiocyanate through JAK2/STAT3 pathway in lung cancer cells. *Molecular carcinogenesis*, 57(4), 522-535.
- Xuejiao S., Yong X., Ningyu W., Lidan Z., Xuanhong S., Youzhi X., Tinghong Y., Yaojie S., Yongxia Z., Luoting Y. A novel benzothiazole derivative YLT322 induces apoptosis via the mitochondrial apoptosis pathway in vitro with anti-tumor activity in solid malignancies, PLoS One., 30, e63900, (2013).
- Yates, C. R. (1997). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Ann Intern Med*, 126(8), 608-614.
- Yea XY, Chen S, Zhang H, Locke KT, O'Malley K, Zhang L, Srivastava R, Miao B, Meyers D, Monshizadegan H, Search D, Grimm D, Zhang R, Lippy J, Twamley C, Muckelbauer JK, Chang C, An Y, Hosagrahara V, Zhang L, Yang T-J, Mukherjee R, Cheng PTW, Tino JA (2010) Synthesis and structure-activity relationships of 2-aryl-4-oxazolylmethoxy benzylglycines and 2- aryl-4-thiazolylmethoxy benzylglycines as novel, potent PPAR α selective activators - PPAR α and PPAR γ selectivity modulation. *Bioorg Med Chem Lett*, 20:2933–2937
- Yener, N. E. ve Apa, D. D. (2014). Akciğer kanserinde morfolojik tanı ve sınıflama. *Türk Radyoloji Seminerleri*, 2, 281-9.
- Youssef J, Badr M. Peroxisome proliferator-activated receptors and cancer: challenges and opportunities. *Br J Pharmacol*. 2011;164: 68–82
- Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R. ve Yan, G. (1997). Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques*, 23(3), 525-531.
- ¹<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thiazole#section=3D-Conformer> Erişim Tarihi (04.07.2019)
- ²https://www.researchgate.net/profile/Kemal_Avci/publication/315647834, Erişim tarihi: 05.07.2019

³<https://www.dojindo.eu.com/store/p/833-Annexin-V-FITC-Apoptosis-Detection-Kit.aspx>

EK-1

A549	MTT 24h	MTT 48h	Annexin 24h	Annexin 48h	Annexin 48h	JC-1 24h	JC-1 48h	JC-1 24h	JC-1 48h	Kaspaz3 24h	Kaspaz3 48h	Kaspaz3 48h
	IC ₅₀	IC _{50/2}	IC ₅₀	IC _{50/2}	IC _{50/2}	IC ₅₀	IC _{50/2}	IC _{50/2}	IC _{50/2}	IC _{50/2}	IC ₅₀	IC _{50/2}
Bileşik 2	18,67 µg/mL	7,5 µg/mL	Q ₃ : 23,9 Q ₄ : 47,9	Q ₃ : 25,5 Q ₄ : 33,5	Q ₃ : 0,4 Q ₄ : 1,7	P2: 0,2 Q ₄ : 1,7	P2: 0,2 Q ₄ : 1,7	P2: 0,2 Q ₄ : 1,7	P2: 0,2 Q ₄ : 1,7	P4: 12,6	P4: 39,2	P4: 29,7
Bileşik 3	19,7 µg/mL	19,0 µg/mL	Q ₃ : 35,6 Q ₄ : 51,1	Q ₃ : 34,2 Q ₄ : 29,5	Q ₃ : 3,1 Q ₄ : 46,8	P2: 0,2 Q ₄ : 4,7	P2: 0,2 Q ₄ : 4,7	P2: 0,2 Q ₄ : 4,7	P2: 0,2 Q ₄ : 4,7	P4: 10,4	P4: 29,2	P4: 20,8
Bileşik 6	23,3 µg/mL	17,5 µg/mL	Q ₃ : 34,2 Q ₄ : 42,0	Q ₃ : 38,7 Q ₄ : 28,9	Q ₃ : 0,7 Q ₄ : 2,7	P2: 0,2 Q ₄ : 2,2	P2: 0,2 Q ₄ : 2,2	P2: 0,2 Q ₄ : 2,2	P2: 0,2 Q ₄ : 2,2	P4: 16,0	P4: 31,6	P4: 26,8
Bileşik 8	3,83 µg/mL	6,5 µg/mL	Q ₃ : 22,6 Q ₄ : 24,8	Q ₃ : 23,1 Q ₄ : 26,8	Q ₃ : 1,0 Q ₄ : 1,5	P2: 0,2 Q ₄ : 0,4	P2: 0,2 Q ₄ : 0,4	P2: 0,2 Q ₄ : 0,4	P2: 0,2 Q ₄ : 0,4	P4: 31,7	P4: 21,0	P4: 22,0
Bileşik 9	9,87 µg/mL	4,5 µg/mL	Q ₃ : 24,8 Q ₄ : 48,4	Q ₃ : 32,7 Q ₄ : 33,5	Q ₃ : 1,2 Q ₄ : 2,9	P2: 0,2 Q ₄ : 2,4	P2: 0,2 Q ₄ : 2,4	P2: 0,2 Q ₄ : 2,4	P2: 0,2 Q ₄ : 2,4	P4: 25,5	P4: 25,8	P4: 17,7
Sisplatin	133,3 µg/mL	37,67 µg/mL	Q ₃ : 27,3 Q ₄ : 45,1	Q ₃ : 24,1 Q ₄ : 26,8	Q ₃ : 1,2 Q ₄ : 69,9	P2: 0,2 Q ₄ : 8,7	P2: 0,2 Q ₄ : 8,7	P2: 0,2 Q ₄ : 8,7	P2: 0,2 Q ₄ : 8,7	P4: 41,9	P4: 24,8	P4: 25,7

PANC-1	MTT 24h	MTT 48h	Annexin 24h	Annexin 48h	Annexin 48h	JC-1 24h	JC-1 48h	JC-1 24h	JC-1 48h	Kaspaz3 24h	Kaspaz3 48h	Kaspaz3 48h
	IC ₅₀	IC _{50/2}	IC ₅₀	IC _{50/2}	IC _{50/2}	IC ₅₀	IC _{50/2}	IC _{50/2}	IC _{50/2}	IC _{50/2}	IC ₅₀	IC _{50/2}
Bileşik 2	18,67 µg/mL	7,5 µg/mL	Q ₃ : 11,3 Q ₄ : 2,7	Q ₃ : 2,8 Q ₄ : 1,4	Q ₃ : 8,5 Q ₄ : 8,8	P2: 0,2 Q ₄ : 7,8	P2: 0,2 Q ₄ : 7,8	P2: 0,2 Q ₄ : 7,8	P2: 0,2 Q ₄ : 7,8	P4: 21,3	P4: 66,5	P4: 56,0
Bileşik 3	19,7 µg/mL	19,0 µg/mL	Q ₃ : 6,3 Q ₄ : 1,6	Q ₃ : 3,8 Q ₄ : 1,8	Q ₃ : 7,1 Q ₄ : 6,7	P2: 0,2 Q ₄ : 2,6	P2: 0,2 Q ₄ : 2,6	P2: 0,2 Q ₄ : 2,6	P2: 0,2 Q ₄ : 2,6	P4: 16,2	P4: 48,8	P4: 74,0
Bileşik 6	23,3 µg/mL	17,5 µg/mL	Q ₃ : 5,6 Q ₄ : 1,3	Q ₃ : 4,2 Q ₄ : 1,3	Q ₃ : 7,0 Q ₄ : 4,6	P2: 0,2 Q ₄ : 3,9	P2: 0,2 Q ₄ : 3,9	P2: 0,2 Q ₄ : 3,9	P2: 0,2 Q ₄ : 3,9	P4: 11,8	P4: 39,8	P4: 68,0
Bileşik 7	3,83 µg/mL	6,5 µg/mL	Q ₃ : 8,3 Q ₄ : 2,0	Q ₃ : 4,2 Q ₄ : 1,2	Q ₃ : 16,9 Q ₄ : 15,9	P2: 0,2 Q ₄ : 6,0	P2: 0,2 Q ₄ : 6,0	P2: 0,2 Q ₄ : 6,0	P2: 0,2 Q ₄ : 6,0	P4: 45,0	P4: 24,4	P4: 45,8
Bileşik 10	9,87 µg/mL	4,5 µg/mL	Q ₃ : 6,2 Q ₄ : 3,2	Q ₃ : 8,2 Q ₄ : 1,2	Q ₃ : 6,7 Q ₄ : 6,4	P2: 0,2 Q ₄ : 8,1	P2: 0,2 Q ₄ : 8,1	P2: 0,2 Q ₄ : 8,1	P2: 0,2 Q ₄ : 8,1	P4: 23,9	P4: 42,2	P4: 50,2
Sisplatin	133,3 µg/mL	37,67 µg/mL	Q ₃ : 4,6 Q ₄ : 1,4	Q ₃ : 6,1 Q ₄ : 3,8	Q ₃ : 6,2 Q ₄ : 7,9	P2: 0,2 Q ₄ : 5,9	P2: 0,2 Q ₄ : 5,9	P2: 0,2 Q ₄ : 5,9	P2: 0,2 Q ₄ : 5,9	P4: 45,8	P4: 35,1	P4: 20,5