T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YENİ SENTEZLENMİŞ FLORLU ASETOFENON BİLEŞİKLERİNİN BAZI KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Zübeyde ÖDEMİŞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2018

Dr. Öğr. Üyesi Hatice AKTAŞ danışmanlığında, Zübeyde ÖDEMİŞ'in hazırladığı **"Yeni Sentezlenmiş Florlu Asetofenon Bileşiklerinin Bazı Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Etkileri"** konulu bu çalışma 27/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman	Dr. Öğr. Üyesi Hatice AKTAŞ	……..…….
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ebru UYAR	……..…….
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Nesrin HAŞİMİ	……..…….

Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. Halil Murat ALGIN
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 17073

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirilişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ vi
SİMGELER DİZİNİ vii
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 3
2.1. Kanser nedir? 3
2.2. Kanser tedavisinde kullanılan yöntemler 5
2.2.1.Cerrahi işlemler 6
2.2.2.Radyoterapi 6
2.2.3. Kemoterapi 6
2.2.4. İmmünoterapi 7
2.2.5.Hormon tedavisi 7
2.2.6.Lazer tedavisi 8
2.2.7. Tamamlayıcı ve alternatif tedavi 8
2.3. Hücre Siklusu, Kontrolü ve Siklusa Etkili Faktörler 8
2.4.Kanser ve kemoterapi 15
2.4.1. Antikanser ilaçlar ile kemoterapi 16
2.4.1.1.Alkilleyici bileşikler 17
2.4.1.2.Antimetabolitler 17
2.4.1.3.Antibiyotikler 18
2.4.1.4.Vinka Alkaloidleri 18
2.4.1.5.Steroid Hormonlar 19
2.4.1.6. Diğer Bileşikler 19
2.5. 5-Florourasil 19
2.6. Florlu Asetofenon bileşikleri 20
2.7. Sitotoksisite 23
2.8. Sitotoksisite Çalışmalarında Kullanılan Bazı Yöntemler 25
2.8.1. MTT testi 25
2.8.2. XTT 25
2.8.3. WST-1 ve WST-8 testleri 26
2.8.4. LDH Enzim Salıverilmesi Testi: 27
2.8.5. ATP Biyolüminesans Testi: 27
2.8.6. Tripan mavisi ile boyama 28
2.8.7. Alamar blue testi 28
2.8.8. Proteaz ve esteraz aktivitelerinin ölçümü 29
2.9. Proliferasyon ve Mitoz Çalışmalarında Kullanılan AT-2 ve MAT-LyLu Hücre Dizileri 30
3. MATERYAL ve YÖNTEM 33
3.1. Materyal 33
3.2. Yöntem 34
3.2.1. Hücre kültürü 34
3.2.2. Kimyasal bileşikler 34
3.2.3. Kontrol ve Deney mediumlarının hazırlanması 35
3.2.4.Toksisite 36
3.2.5.Hücre proliferasyonu 37
3.2.6.Mitoz indeksi (MI) 38
3.2.7. İstatistiksel Analizler 39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 40
4.1.Araştırma bulguları 40
4.1.1. Toksisite analizi sonuçları 40
4.1.2. Dimetilsülfoksit (DMSO)'in etkileri 41
4.1.3. 5-Fluorourasil (5-FU)'in etkileri 41

4.1.4. N,N–Etilen–bis–5 floro asetofenon (AF1) bileşiğinin etkileri 43
4.1.4.1.Hücre proliferasyonu 43
4.1.4.2.Mitotik aktivite 49
4.1.5. N,N–Propilen–bis–3,5 di floro asetofenon (AF2) bileşiğinin etkileri 53
4.1.5.1.Hücre proliferasyonu 53
4.1.5.2.Mitotik aktivite 60
4.1.6. N,N–Butilen–bis–3,5 di floro asetofenon (AF3) bileşiğinin etkileri 64
4.1.6.1.Hücre proliferasyonu 64
4.1.6.2.Mitotik aktivite 69
4.1.7. N,N–Propilen–bis–5 floro asetofenon (AF4) bileşiğinin etkileri 73
4.1.7.1.Hücre proliferasyonu 73
4.1.7.2.Mitotik aktivite 79
4.1.8. Bileşiklerin AT-2 hücreleri üzerindeki etkilerinin genel değerlendirmesi 83
4.1.9. Bileşiklerin MAT-LyLu hücreleri üzerindeki etkilerinin genel değerlendirmesi 84
4.4.Tartışma 85
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 88
KAYNAKLAR 90
ÖZGEÇMİŞ 98

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YENİ SENTEZLENMİŞ FLORLU ASETOFENON BİLEŞİKLERİNİN BAZI KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Zübeyde ÖDEMİŞ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hatice AKTAŞ
Yıl:2018, Sayfa: 98

Bu çalışmada, yeni sentezlenmiş bazı Florlu Asetofenon Bileşiklerinin [(5-F-2-OH-ASF-$(CH_2)_2$) N,N-Etilen-bis-5 floro asetofenon, (3,5-F_2-2-OH-ASF-$(CH_2)_3$) N,N-Propilen-bis-3,5 di floro asetofenon, (3,5-F_2-2-OH-ASF-$(CH_2)_4$) N,N-Butilen-bis-3,5 di floro asetofenon, (5-F-2-OH-ASF-$(CH_2)_3$) N,N-Propilen-bis-5 floro asetofenon], Dunning modeli sıçan prostat kanser hücre soyları MAT-LyLu ve AT-2 hücrelerinin proliferasyon ve mitotik aktivite gibi kinetik özellikleri üzerindeki etkilerini araştırarak kemoterapötik ajan olabilme kapasitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle tripan mavisi analizi yapılarak bileşiklerin hücreler üzerinde toksik etki oluşturmayan konsantrasyonu 5.0 μM olarak belirlenmiştir. Ardından farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 μM) hazırlanan bileşikler 24, 48, 72 veya 96 saat gibi sürelerle AT-2 veya MAT-LyLu hücrelerine uygulanmış ve alamar blue yöntemi ile absorbansları ölçülerek canlı hücre yoğunlukları belirlenmiştir. Bileşiklerin, hücrelerin mitotik aktiviteleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi için mitoz indeksleri saptanmıştır. Deneylerde, hücre siklusunun S fazına etkili olduğu ve AT-2 veya MAT-LyLu hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bilinen 5-fluorourasil, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca bileşikler için çözücü ortam olarak DMSO kullanıldığından deney gruplarının içerdiği kadar DMSO eklenmiş çözücülü kontrol grupları da oluşturulmuştur. Araştırma konusu bileşiklerin, çalışılan hücre soylarının proliferasyon ve mitotik aktiviteleri üzerinde inhibe edici etkisi herhangi bir etki sergilemedikleri tespit edilmiştir. Aksine bu bileşiklerden üçü; N,N–Propilen–bis–3,5 di floro asetofenon ($C_{19}H_{18}O_2N_2F_4$), N,N–Butilen–bis–3,5 di floro asetofenon ($C_{20}H_{20}O_2N_2F_4$), N,N–Propilen–bis–5 floro asetofenon bileşikleri, MAT-LyLu hücrelerinin mitotik aktivitesini stimüle etmiştir. Test edilen bileşiklerin uygulanması sonucu tespit edilen canlı hücre yoğunlukları incelendiğinde bu bileşiklerin çalışılan hücrelere (AT-2 ve MAT-LyLu) karşı kemoterapotik ajan olabilmek için yeterli düzeyde etkinliğe sahip olmadıkları anlaşılmıştır. Ancak kanserin bireye özgü bir hastalık olması nedeniyle farklı kanser türleri üzerinde test edilmesinin yararlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bileşiklerin DMSO içerisinde dahi çözünürlüklerinin çok düşük olması, 5.0 μM'dan daha yüksek konsantrasyonlar ile çalışmaya izin vermemiştir. Bu nedenle bileşiklerin dizaynında çözünürlüğü arttıracak bazı modifikasyonlar yapılmasının avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Kanser, florlu asetofenon bileşikleri, sitotoksisite, mitotik aktivite

ABSTRACT

MSc Thesis

THE EFFECTS OF NOVEL SYNTHESIZED FLUORINATED ACETOPHENONE COMPOUNDS ON THE SEVERAL CANCER CELL LINES

Zübeyde ÖDEMİŞ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hatice AKTAŞ
Year: 2018, Page: 98

In this study, it was aimed to determine being chemotherapeutic agents capacity of four newly synthesized fluorinated acetophenone compounds [N,N-Ethylene-bis-5 fluoroacetophenone ($C_{18}H_{18}O_2N_2F_2$), N,N-Propylene-bis-3,5 difluoroacetophenone ($C_{19}H_{18}O_2N_2F_4$), N,N-Butylene-bis-3,5 difluoroacetophenone ($C_{20}H_{20}O_2N_2F_4$), N,N-Propylene-bis-5 fluoroacetophenone ($C_{19}H_{20}O_2N_2F_2$)], by investigating the effect of these compounds on kinetic parameters such as proliferation and mitotic activity of Dunning model AT-2 and MAT-LyLu rat prostate cancer cell lines. For this purpose, at first, Trypan blue analysis was performed, and the concentration of the compounds, which did not cause toxic effects on the cells, was determined as 5.0 μM. Then, the compounds which prepared at different concentrations (0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 μM) were applied on AT-2 or MAT-LyLu cells for 24, 48 or 72 hours, and the viable cell numbers were determined by measuring the absorbances with Alamar Blue analysis. Mitotic indexes were determined to study the effects of the compounds on the mitotic activity of the cells. In the experiments, 5-fluorouracil, which was known as S-phase-inhibitor and suppress the proliferation of AT-2 or MAT-LyLu cells, was used as a positive control. In addition, since DMSO was used as the solvent for these compounds, solvent-control groups to which DMSO was added as much as in experimental groups were also formed. The investigational compounds were found to have no inhibitory effect on the proliferation of these studied cell lines. Moreover, three of these compounds *i.e.,* N,N-Propylene-bis-3,5 difluoroacetophenone ($C_{19}H_{18}O_2N_2F_4$), N,N-Butylene-bis-3,5 difluoroacetophenone ($C_{20}H_{20}O_2N_2F_4$) and N,N-Propylene-bis-5 fluoroacetophenone ($C_{19}H_{20}O_2N_2F_2$), stimulated the mitotic activity of the MAT-LyLu cells. When the viable cell numbers obtained from the treatment of the tested compounds were examined, it was realised that these compounds did not have sufficient activity to be a chemotherapeutic agent against the AT-2 and MAT-LyLu rat prostate cancer cells. However, since cancer is a disease unique to an individual, it has been considered that testing it on different types of cancer may be useful. Furthermore, the solubility of these compounds in different solvents was too low to allow to work with concentrations higher than 5.0 μM. Therefore, it is considered that some modifications in the compounds' design to increase the solubility of them may be advantageous.

KEY WORDS: Cancer, fluorinated acetophenone compounds, cytotoxicity, mitotic activity

TEŞEKKÜR

Lisans ve Yüksek Lisans öğrenimim ve tez çalışmalarım boyunca sevgisini, bilgisini ve deneyimlerini esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Hatice AKTAŞ'a; çalışmamızda kullandığımız kimyasalları sentezleyip bize temin eden Harran Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Veli KASIM'a; laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Hüda AYAN ve Hıdır SULAK'a teşekkür etmeyi borç bilirim.

Her zaman bana inanan, güvenen destek çıkan annem Fatma ÖDEMİŞ'e ve babam Tahir ÖDEMİŞ'e ayrıca, lisansüstü eğitime başladığımız günden beri her an yanımda olan ve her zaman olacağını bildiğim canım dostum Semra ALMAS'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Normal hücre ve kanserli hücrelerin çoğalması 3
Şekil 2.2. Bir dizi mutasyon sonucu kanser hücrelerinin oluşumu. 4
Şekil 2.3. Kanser hücrelerinin özellikleri. 5
Şekil 2.4. Kemotrapötik ilaç hedefleri. 7
Şekil 2.5. Hücre döngüsü evreleri ve kontrol noktaları 9
Şekil 2.6. 5-Florourasil'in kimyasal yapısı 20
Şekil 2.7. MTT, XTT ve MTS bileşiklerinin kimyasal yapıları. 26
Şekil 2.8. Canlı ve Cansız (ölü) hücre 28
Şekil 2.9. Dunning sıçan prostat kanser modelinin gelişim şeması 31
Şekil 2.10. A) MAT-LyLu hücreleri B) AT-2 hücreleri (Büyütme oranı: 40x). 32
Şekil 3.1. Bileşik 1'in açık formülü 34
Şekil 3.2. Bileşik 2'nin açık formülü 35
Şekil 3.3. Bileşik 3'ün açık formülü 35
Şekil 3.4. Bileşik 4'ün açık formülü 35
Şekil 3.5. Hücrelerin Alamar blue (AB) ile 4 saatlik inkübasyonu sonrası oluşan görüntü. 38
Şekil 3.6. A:Profaz, B:Metafaz, C: Anafaz, D:Telofaz evreleri 39
Şekil 4.1. Toksisite grafiği: AT-2 hücreleri üzerine florlu asetofenon bileşikleri (AF1, AF2, AF3, AF4) nin 5 µM konsantrasyonda uygulanması sonucu elde edilen % canlılık oranları. K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol. 40
Şekil 4.2. Toksisite grafiği: MAT-LyLu hücreleri üzerine florlu asetofenon bileşikleri (AF1, AF2, AF3, AF4) nin 5 µM konsantrasyonda uygulanması sonucu elde edilen % canlılık oranları. K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol. 41
Şekil 4.3. AT-2 hücreleri üzerine 5-FU'nun farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%) konsantrasyona bağlı grafiği (±SH) 42
Şekil 4.4. MAT-LyLu hücreleri üzerine 5-FU'nun farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%) konsantrasyona bağlı grafiği (±SH) 43
Şekil 4.5. AT-2 hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH). 45
Şekil 4.6. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH). 47
Şekil 4.7. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH). 49
Şekil 4.8. AT-2 hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH). 51
Şekil 4.9. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH). 53
Şekil 4.10. AT-2 hücreleri üzerine AF2 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda, 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH). 55
Şekil 4.11. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF2 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda, 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH). 57
Şekil 4.12. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF2 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH). 59
Şekil 4.13. AT-2 hücreleri üzerine AF2 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH). 61
Şekil 4.14. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF2 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH). 63
Şekil 4.15. AT-2 hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda, 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH). 66

Şekil 4.16. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda, 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH). 68
Şekil 4.17. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH)..... 69
Şekil 4.18. AT-2 hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH). 71
Şekil 4.19. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH). 73
Şekil 4.20. AT-2 hücreleri üzerine AF4 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda, 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH). 75
Şekil 4.21. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF4 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda, 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH). 77
Şekil 4.22. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF4 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH)..... 69
Şekil 4.23. AT-2 hücreleri üzerine AF4 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH). 81
Şekil 4.24. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF4 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH). 83
Şekil 4.25. AT-2 hücreleri üzerine AF1, AF2, AF3, AF4 bileşiklerinin 24, 48 ve 72 saat süreyle 5 µM'lık konsantrasyonda uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunluğu (%) (±SH)..... 84
Şekil 4.26. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF1, AF2, AF3, AF4 bileşiklerinin 24, 48 ve 72 saat süreyle 5 µM'lık konsantrasyonda uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunluğu (%) (±SH)..... 85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. AT-2 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda 5-FU uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunluğu (%) ve inhibisyon oranları (%) 42
Çizelge 4.2. MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda 5-FU uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunluğu (%) ve inhibisyon oranları (%)..... 42
Çizelge 4.3. AT-2 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF1 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%) 44
Çizelge 4.4. MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF1 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%) 46
Çizelge 4.5. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH). 48
Çizelge 4.6. AT-2 hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH) 50
Çizelge 4.7. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH) 52
Çizelge 4.8. AT-2 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF2 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%) 54
Çizelge 4.9. MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF2 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%) 56
Çizelge 4.10. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH). 58
Çizelge 4.11. AT-2 hücreleri üzerine AF2 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH) 60
Çizelge 4.12. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF2 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH) 62
Çizelge 4.13. AT-2 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF3 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%) 65
Çizelge 4.14. MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF3 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%) 67
Çizelge 4.15. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH). 68
Çizelge 4.16. AT-2 hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH) 70
Çizelge 4.17. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH) 72
Çizelge 4.18. AT-2 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF4 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%) 74
Çizelge 4.19. MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF4 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%) 76
Çizelge 4.20. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF4 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH). 78
Çizelge 4.21. AT-2 hücreleri üzerine AF4 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH) 80
Çizelge 4.22. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH) 82

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

5-FU	5-Florourasil
AB	Alamar Blue testi
AF1	Deneyde kullanılan 1 nolu bileşik
AF2	Deneyde kullanılan 2 nolu bileşik
AF3	Deneyde kullanılan 3 nolu bileşik
AF4	Deneyde kullanılan 4 nolu bileşik
MI	Mitoz İndeksi
MoI	Motilite İndeksi
TAT	Tamamlayıcı ve alternatif tedavi

1. GİRİŞ

Kanser birçok özelliğin karmaşık bir biçimde rol aldığı bir hastalıktır. (Alican, 1993). Kanser hücresi, kendi normal büyüme ve bölünmesini düzenleme mekanizmasını yitirmiş ve yeni yüzey karakterleri kazanmıştır. Kanser hücrelerinde normal çoğalma, farklılaşma ve sağ kalmayı düzenleyen mekanizmalarda anormallikler görülmektedir (Keeton ve Gould, 2000; Cooper ve Hausman, 2006).

Kanser tedavisinde; kanserin türüne, geliştiği dokuya/organa ve bireye bağlı olarak radyoterapi, cerrahi uygulamalar, kemoterapi, hormon uygulamaları gibi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Kanserin ilaçla tedavisi anlamına gelen kemoterapinin ana ilkesi, hastanın normal hücrelerine zarar vermeden veya çok az toksik etki yaparak tümör hücrelerinin çoğalmasını ve büyümesini durdurmak veya onları yok etmektir (Kayaalp, 1996). Bu amaçla çeşitli kemoterapötik maddeler ve ajanlar kullanılmaktadır. Fakat türü ne olursa olsun kanser hastalığı kişiye özgüdür. Bu nedenle yeni ve özgün bileşiklerin sentezlenmesi ve bu bileşiklerin olası antitümöral özellikler bakımından değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

Asetofenonların (AP, fenilmetilketon veya hipnon), endüstriyel amaçlarla parfüm üretiminde ve çözücü olarak kullanımlarının yanısıra biyolojik açıdan aktif bileşikler elde etmek için de kullanıldıkları bildirilmiştir (Anonymus, 2000). Asetofenon türevleri, ilaçların asimetrik sentezi için bir yapı taşı olarak etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Ikariya and Blacker, 2007; Wang ve ark., 2008). Birçok asetofenon türevi ise bitkilerde (Lavault ve ark., 1999) ve mantarlarda (Wilkins ve Scholl., 1989) doğal ürünler olarak bulunur. Asetofenonlar, mikobakterilere karşı etkili terapötik maddelerin de önemli bir bileşenidir (Rajabi ve ark., 2005). Asetofenonların ketoksim türevlerinin antifungal aktivite gösterdiği saptanmıştır (Gündoğdu-Karaburun ve ark., 2006). Bazı asetofenon türevleri, gram-pozitif bakterilere ve mantarlara karşı antimikrobiyal ve antifungal aktiviteye sahiptir (Chu ve ark., 1999; Gul ve ark., 2002) ve diğerleri herbisit olarak kullanılırlar (Hayashi ve Misumi, 1986). C-2'de bir hidroksil grubu taşıyan bazı asetofenonların *Salmonella*

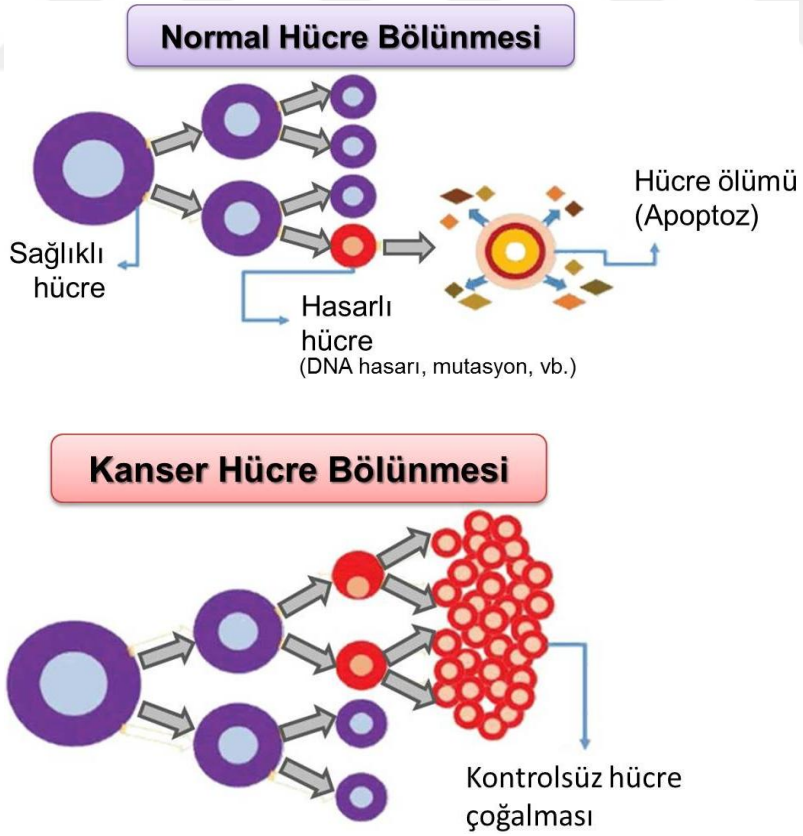
typhimurium üzerinde antimutajenik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Miyazawa ve ark., 2000). Bazı asetofenon türevlerinin ve çeşitli sentez basamaklarında asetofenon kullanılan bileşiklerin kanser hücrelerine karşı aktivite gösterdikleri de bildirilmiştir (Saxena ve ark., 2008; Prabhakar ve ark. 2014; Pessoto ve ark., 2015). Flor, sahip olduğu küçük boyut ve bileşikte oluşturduğu kararlılık bakımından son yıllarda ilaç geliştirme çalışmalarında çok tercih edilen değerli bir element haline gelmiştir (Fuglseth, 2010).

Bu tez çalışmasında, yeni sentezlenmiş bazı florlu asetofenon bileşiklerinin [N,N-Etilen-bis-5 floro asetofenon (5-F-2-OH-ASF-$(CH_2)_2$), N,N-Propilen-bis-3,5 di floro asetofenon (3,5-F_2-2-OH-ASF-$(CH_2)_3$), N,N-Butilen-bis-3,5 di floro asetofenon (3,5-F_2-2-OH-ASF-$(CH_2)_4$), N,N-Propilen-bis-5 floro asetofenon (5-F-2-OH-ASF-$(CH_2)_3$)], Dunning sıçan prostat kanseri modelinden MAT-LyLu ve AT-2 hücre soylarının proliferasyon ve mitotik aktivite gibi kinetik özellikleri üzerindeki etkilerinin araştırılması; böylece bileşiklerin kemoterapötik ajan olabilme kapasitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

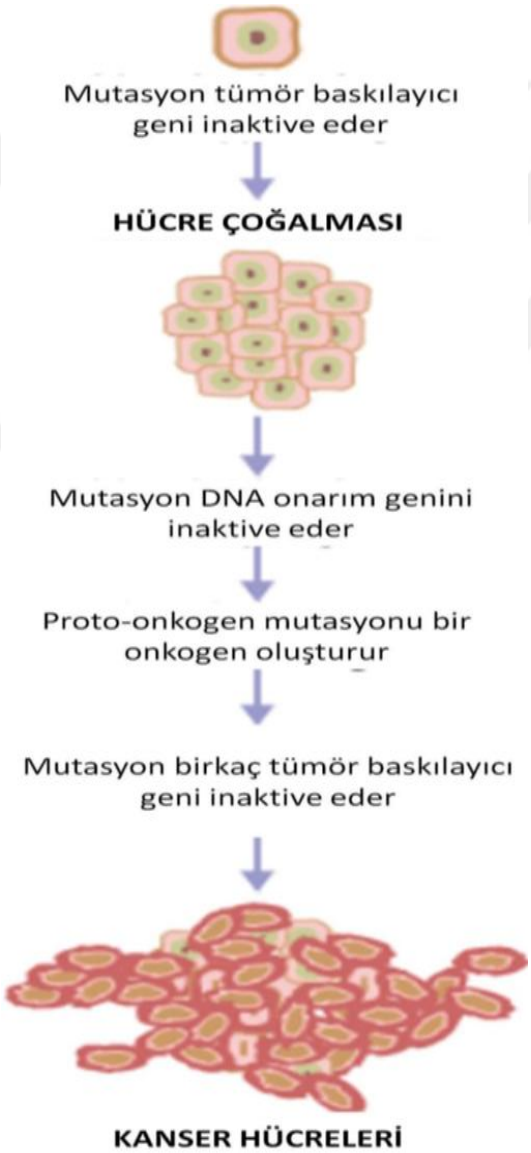
2.1. Kanser nedir?

Kanser; bir hücrenin denetim mekanizalarından kaçarak kontrolsüz şekilde bölünmesi sonucu oluşan hastalıklar grubudur. İnsan vücudu; milyonlarca hücreden meydana gelmektedir. İnsan hücresi, organizmanın büyümesi, yaralanma sonucu zedelenmiş dokuların onarılması gibi amaçlarla sınırlı bir kapasiteyle bölünürler. Ancak, kanserde, hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalırlar (Şekil 2.1.). Anormal düzeyde çoğalmaya başlayan bu hücreler bulundukları yerdeki ve hatta uzaklarında bulunan doku ve organları işgal eder ve bu bölgelerde işlevsel bozukluklara yol açarlar (Kutluk ve Kars, 1994). Büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin klonal yayılımı ile karakterize olan kanser, somatik ve genetik hastalıkların en yaygın, en sık ve aynı zamanda en karmaşık olanıdır (Futreal ve ark., 2001).



Şekil 2.1. Normal hücre ve kanserli hücrelerin çoğalması (Shirzadfar ve ark., 2017)

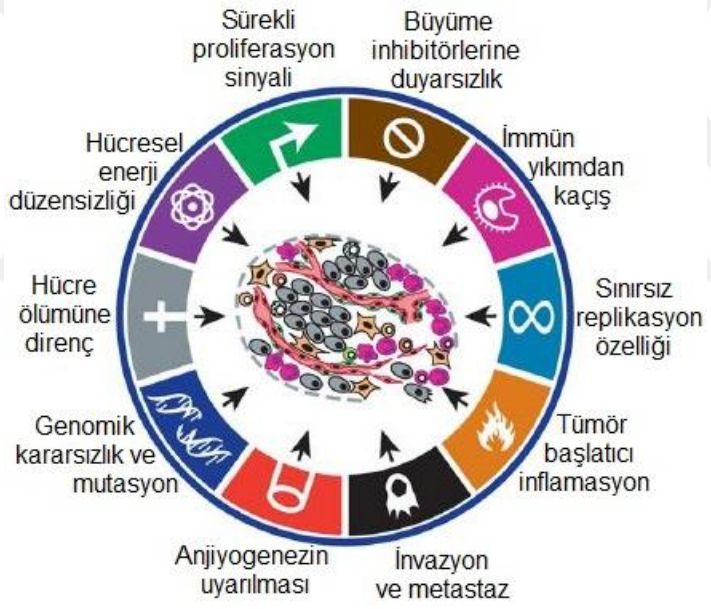
Batı toplumlarındaki her üç bireyden birinde kanser gelişmekte ve bireylerin beşte birinde ölümler görülmektedir (Futreal ve ark., 2001; Fearnhead, 2004). Bütün kanser türleri DNA dizisindeki birtakım anormallikler sonucunda oluşmaktadır. Kanserlerin % 10-15'inin, kalıtımsal olduğu yani ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı, geriye kalan % 85-90'lık kısmının ise yaşam boyunca canlı hücrelerdeki DNA'nın mutajenlere maruz kalması, hücre DNA'sındaki hafif progressif değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşması ile şekillendiği düşünülmektedir. Bazen oluşan bu mutasyonlardan biri, içinde bulunduğu hücrenin büyümesini ve bu hücreden türeyen bir kanser klonunun oluşmasını sağlar (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Bir dizi mutasyon sonucu kanser hücrelerinin oluşumu (Anonim, 2016).

Kanser multifaktöryel olup, radyasyondan kalıtıma, bakterilerden viruslara, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasallara kadar birçok faktör kanser oluşumunda etkilidir (Williams, 1992).

Kanser hücreleri normal hücrelere göre farklı bir takım özelliklere sahiptir. Bu özellikler; sürekli proliferasyon sinyali, büyüme faktörü üretiminde kendi kendine yeterlilik, hücre ölüm sinyaline / apoptoza direnç, büyüme inhibitörlerine duyarsızlık, sınırsız replikasyon özelliği, yeni damar oluşumu / anjiyogenezin uyarılması, genomik kararsızlık ve mutasyon, immün yıkımdan kaçış, tümör başlatıcı inflamasyon, hücresel enerji düzensizliği, doku invazyonu ve metastaz şeklinde sıralanabilir (Şekil 2.3.) (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 2.3. Kanser hücrelerinin özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.2. Kanser tedavisinde kullanılan yöntemler

Kanser tedavisinin asıl amacı; normal dokuları etkilemeden kanser hücresini yok etmektir (Lammers ve ark., 2008). Bu durum, kanser hücresinin selektif olarak hedeflendirilmesi ile mümkündür. Tümöre hedeflendirmedeki ideal özellikler;

- İlacın parçalanmadan korunması,

- İlacın tümördeki yerleşiminin aktif veya pasif hedeflendirilme ile arttırılması,
- Geçiş bölgelerinden olabilecek ilaç sızıntısının en aza indirilmesi,
- Hedeflendirilmemiş hücrelerdeki yerleşiminin azaltılması,
- Hücre içine alımın kolaylaştırılması,
- İlacın hedeflenen bölgede istenilen süre boyunca kalabilmesi,
- Taşıyıcı sistem bileşenlerinin biyo-uyumlu ve biyo-parçalanabilir olması şeklinde özetlenmektedir (Lammers ve ark., 2008).

Günümüzde kanser tedavisinde yalnız başına veya kombine olarak; cerrahi işlemler, lazer tedavisi, immünoterapi, hormon tedavisi, kemoterapi, radyoterapi, tamamlayıcı ve alternatif tedavi yöntemleri uygulanmaktadır (Kutluk ve Kars, 1994).

2.2.1.Cerrahi işlemler

Kanser tedavisinde en sık uygulanan tedavi yöntemi; Kanserli organ ve dokunu bir kısmının ve ya tümünün ameliyatla alınmasıdır (Anonim, 2013). Bu yayılım yapmamış, yada başka doku ve organlara yayılmamış birçok kanser için iyi bir tedavi seçeneği olmaktadır. Eğer kanser ilerlemişse ya da çevre dokulara yayılmışsa; cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi ile kombine uygulanabilmektedir.

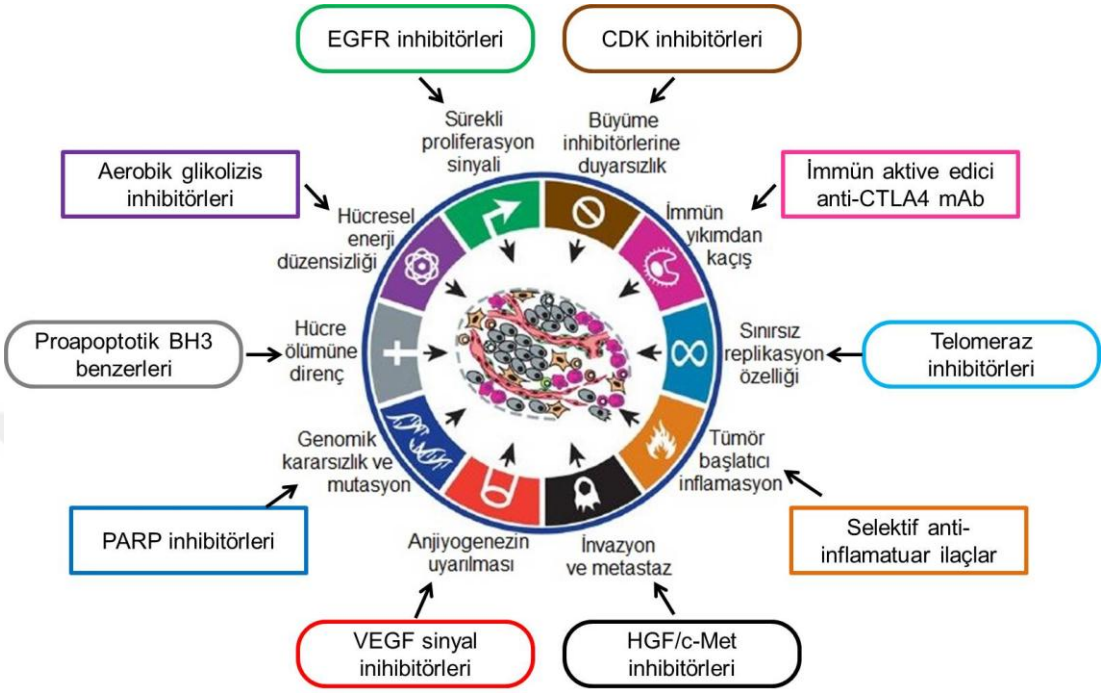
2.2.2.Radyoterapi

Radyoterapi yüksek enerji dalgalarından meydana gelen ışınların vücudun bir kısmına nüfuz etmesi veya belirli bir bölgeyi etkilemesi ile gerçekleştirilen bir tedavi şeklidir. Radyoterapide normal hücreler de zarar görebilir ama bu hücreler tekrar iyileşme gösterebilmektedirler (Anonim, 2013).

2.2.3. Kemoterapi

Kemoterapi, kanser hücrelerinin ortadan kaldırılması ve bu hücrelerin büyümesini kontrol altına alabilmek için antineoplastik ilaçlar kullanılarak yapılan tedavi yöntemidir (Anonim, 2013). Kullanılan kemoterapötik ilaçlar kanser

hücrelerini diğer hücrelerden ayıran spesifik özellikleri hedeflemektedir (Şekil 2.4.) (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 2.4. Kemotrapötik ilaç hedefleri (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.2.4. İmmünoterapi

İnsan vücudunun immun sistemi, kanser hücrelerini antijen olarak algılamaktadır. İmmünoterapi ise bu durumda doğal bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Kansere karşı immünoterapide en etkili bileşiğin interferon olduğu bildirilmiştir (Waldmann ve ark., 2003).

2.2.5.Hormon tedavisi

Hormon sekresyonuna bağlı olarak meydana gelen prostat kanseri ve meme kanseri gibi kanserlerde bazı özel hormonların kullanılmasıyla uygulanan bir tedavi yöntemidir (Kutluk ve Kars, 1994).

2.2.6.Lazer tedavisi

Cerrahi müdahalelerle beraber olumlu sonuçlar vermektedir. Bu yöntem gırtlak kanseri ve beyin tümörlerinde uygulanmaktadır (Kutluk ve Kars, 1994).

2.2.7. Tamamlayıcı ve alternatif tedavi

Amerikan Kanser Birliği (American Cancer Society) ve Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute), alternatif tedavileri hastalığın geleneksel tedavisinin yerine kullanılan uygulamalar şeklinde tanımlarken, tamamlayıcı tedavileri ise modern tıp ile birlikte kullanılan tedavileri tamamlayıcı yaklaşımlar olarak ifade etmektedir. Günümüzde sınırları tam olarak belirlenememiş olan Tamamlayıcı ve Alternatif Tedaviler (TAT), bu konudaki tartışmalarda genellikle birlikte uygulanmaktadır (Anonymous, 2008).

Kanser hastalarının TAT kullanım nedenleri arasında tedavi olma, tedaviye destek olma, kanserin tekrarlamasını önleme, konvansiyonel tedaviler yerine kullanma ve son bir çare olarak kullanma sayılabilir (Tatsumura ve ark., 2003).

2.3. Hücre Siklusu, Kontrolü ve Siklusa Etkili Faktörler

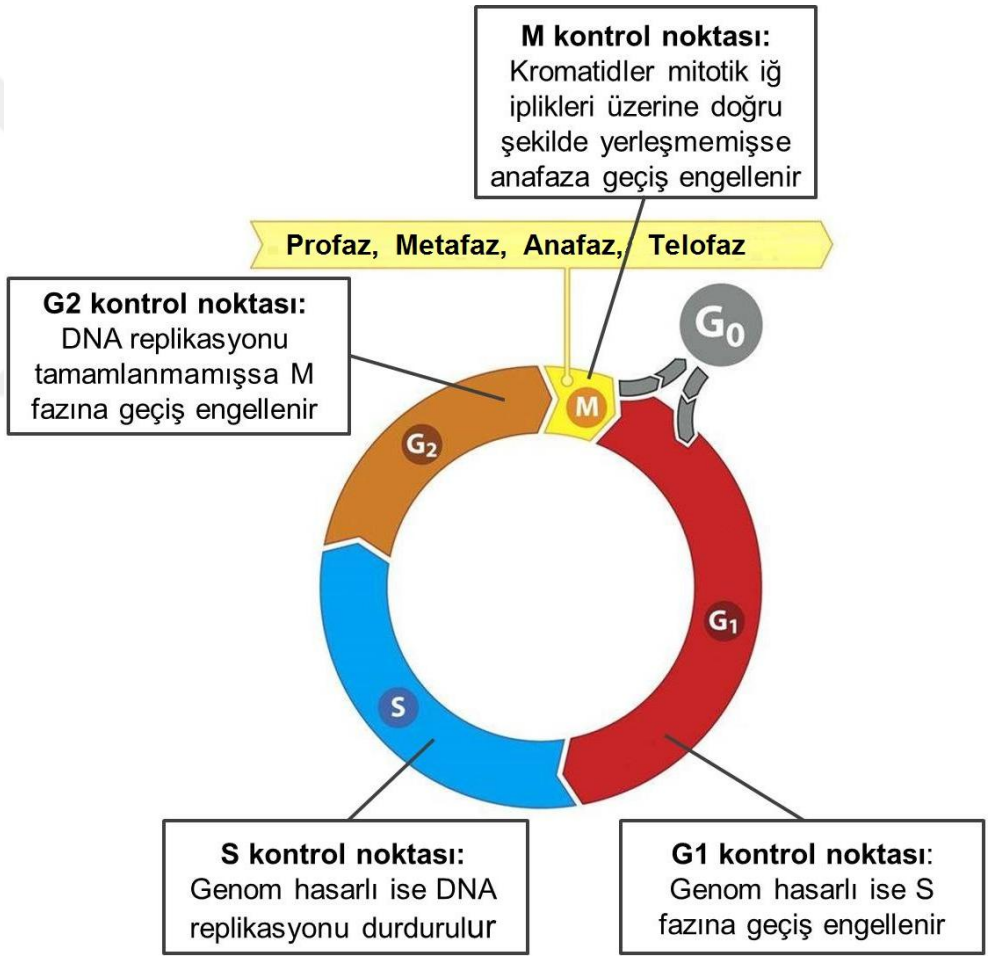
Çoğalmakta olan hücrelerin bir yavru hücre verebilmesi için geçirmiş olduğu evrelerin tamamına hücre siklusu (döngüsü) adı verilir (Şekil 2.5.). Hücre siklusu, hücre bölünmesi, hücre çoğalması ve hücre büyümesi için programlanmış bir mekanizmadır (Ho ve Dowdy, 2002). Hücre çoğalma mekanizması dokudan dokuya ve zamana göre değişen genler ile ayarlanabilmektedir. Hücre döngüsünün süresi, dakika, saat ve gün arasında değişmektedir. Hücre döngüsü G_1 (G=Gap), S (Sentez), G_2 ve M (Mitoz) evreleri olmak üzere dört evreden oluşur. Hücreler bölünme sinyali almadıklarında istirahat fazı G_0'da durmaktadırlar.

G_1 evresi: İlk bölünme sonucunda oluşan eş hücrelerin tekrar hücre bölünmesine girmeden S evresine hazırlandığı evredir. DNA replikasyonu olmaz, fakat RNA ve protein sentezi devam eder.

S evresi: Bu evrede; RNA ve protein sentezi, DNA replikasyonu, kromozom eşlenmesi gerçekleşir.

G_2 evresi: Bu evrede; DNA replikasyonu gerçekleşmez. RNA ve protein sentezi devam eder.

M evresi: Bu evrede; mitoz ve sitokinez olayları gerçekleşir (Alberts ve ark., 2004).



Şekil 2.5. Hücre döngüsü evreleri ve kontrol noktaları (Weinberg, 2006)

Hücre döngüsü biri S fazına girmeden önceki geç G_1 fazında (G_1 kontrol noktası), ikincisi S fazında (S kontrol noktası), bir diğeri G_2/M geçişinde (G_2 kontrol noktası) ve sonuncusu ise metafaz anafaz geçişinde (M kontrol noktası) olmak üzere

farklı noktalarda denetlenir (Şekil 2.5.) (Weinberg, 2006). Bu denetim noktalarının her birinde, ilgili proteinlerce döngünün ilerlemesine veya durmasına karar verilmektedir. Bu kararların verilmesinin kontrolü, hedef proteinleri seçip fosforile eden bir enzim ailesinden olan protein kinazlar ve hücre döngüsünün işlerliğini kontrol eden siklin adlı proteinler tarafından yapılır (Fışkın, 2002). İlk kontrol noktası geç G_1 fazında olup hücrenin G_1 fazını terkedip S fazına geçebilmesi için DNA'nın hasarsız olması gerekmektedir. Aksi takdirde hasar onarılana kadar hücre bu kontrol noktasında durur. Hasar onarılamayacak boyutta ise birkaç saat alan G_1 noktasındaki bu durma *p53*'ün girmesiyle uzatılır (Kastan ve Bartek, 2004; Cabadak, 2008). Normal hücrelerde DNA hasarı olduğunda, *p53* genomik kararlılığı sağlar ve hücre siklusunu G_1'de durdurarak hücreye tamir için zaman kazandırır. Hasar tamir edilemiyorsa hücre apoptoza gider. Hasarlı hücrenin ölüme gitme veya hücre siklusunda kalmasının nasıl sağlandığı tam olarak bilinmemektedir. Hasarlı olup G_1 kontrol noktasını geçen hasarlı hücrelerin S fazında DNA'larını replike etmelerine izin verilmez. Her iki kontrol noktasını geçen hasarlı hücrede DNA ve kromatin proteinlerinin kondanse olmaları G_2/M geçişindeki G_2 kontrol noktasında engellenir; yani bu kontrol noktası, sağlam olmayan kromozomların ayrılmasını önler. Buna ek olarak, tam bir kromozom takımının yavru hücrelere geçmesini sağlamak üzere kromozomların mitoz sırasındaki dizilimlerini kontrol eden bir diğer önemli kontrol noktası metafaz anafaz geçişinde yer alan M kontrol noktasıdır. Eğer hatalı dizilim sonucu kromozomların tam bir takımının yavru hücrelere dağılımında bir problem olursa hata giderilinceye kadar mitoz fazının metafazında siklus durur (Cabadak, 2008). Hücre siklusunun kontrol noktalarında ve düzenlenmesinde meydana gelen anormallikler; hücre döngü mekanizmasında yer alan bileşenlerin aşırı ve/veya anormal ekspresyonu mutasyona ve dolayısıyla kanser gelişimine neden olmaktadır. Mutasyon sonucu oluşan hücre döngüsü bileşenlerinin bazıları onkogen ve tümör baskılayıcı gen (antionkogenler) olarak bilinmektedir (Pucci ve Giordano, 1999).

Normalde hücreler proliferatif uyaranlara bağlı olarak gereken durumlarda bölünürler. Kanserli hücrelerde ise mutasyonlar sonucunda normal hücrelerde görülen kontrollü büyüme süreci kaybolmuştur (Evan ve Vousden, 2001). Kanser hücrelerinde sıklıkla hücre döngüsünün düzenlenmesinde bir defekt; yani hücre

döngüsünün kontrolünün herhangi bir basamakta bozulmasını sağlayan mutasyonlar söz konusudur. Örneğin G_1 kontrol noktasında görev alan kinazları ya da siklinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların hücrelerin malign dönüşümünde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Fışkın, 2002).

Özetle, normal hücreler DNA sekansında oluşan hasarlı nükleotidleri normal moleküllerle değiştirme, tamiri olanaksız DNA hasarında ya da yanlış, eksik, gereksiz olarak fazla transkribe olmuş DNA söz konusu olduğunda ise apoptoz adı verilen mekanizmanın devreye girmesi gibi hataları saptayan, yok etmeye çalışan mekanizmalara sahiptirler. Sonuç olarak, kontrol noktaları genetik defektlerin düzeltilmesi için hataların saptanmaya çalışıldığı önemli yerlerdir. Böylece, DNA'sını sadece doğru bir şekilde ve tam olarak replike etmiş hücrelerin döngüde ilerlemesine izin verilir. Buna karşılık kanser dokusunda hızlı bir hücre çoğalması ve dokunun büyümesi söz konusudur (Fışkın, 2002).

***Apoptoz*:** Apoptoz, hücre – doku dengesini düzenleyen bir mekanizma olup birçok fizyolojik olayda etkin rol oynamaktadır. Hücre yapım-yıkımı apoptozun rol aldığı önemli fizyolojik olaylardan biridir. Örneğin; deri, barsak epiteli, kan hücreleri gibi hücre yapım-yıkımının hızlı olduğu dokularda yaşlanan hücreler apoptozla ortadan kaldırılır ve yerine yeni hücrelerin yapımı sağlanır. Apoptoz ayrıca, fetusun implantasyonundan organogeneze kadar tüm gelişim sürecinde yani embriyogenezde, metamorfozda, insanın embriyolojik gelişiminde; parmak aralarındaki zarın, sinir sisteminde istenmeyen nöronların ortadan kaldırılmasında, kurbağa lavrasında kuyruğun ayrılması, erişkinde hormona bağlı involüsyonda; örneğin menstrüel siklusta endometriyal hücre yıkımında, menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin küçülmesinde ve bağışıklık sistemi hücrelerinin seçimi gibi pek çok olayda rol alır. Ek olarak, yenidoğan timusunun involüsyonu sonucunda T lenfositlerin yaklaşık %98'inin seleksiyona uğradığı bilinmektedir. Ayrıca B hücrelerinde de lenfositlerinin duyarlı olduğu uyaranla yeniden karşılaşması durumunda hazır bulunmasını sağlamak amacıyla apoptozun baskılandığı belirtilmektedir (Tomatır, 2003).

Çeşitli sinyal molekülleri, reseptörler, enzimler ve genleri düzenleyen proteinler apoptozun aktivasyonu için gereklidir. *Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-1* anti-apoptotik; *Bax, Bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bid* ise pro-apoptotik moleküller olarak apoptoz mekanizmasının düzenlenmesinde rol oynar. Apoptozun uyarılması sonucunda; kromatin yoğunlaşması, hücre küçülmesi, apoptotik cisimlerin oluşması ve DNA fragmentasyonu gibi çeşitli değişimler meydana gelir (Nagata, 2000).

Apoptoz, hücre içi veya hücre dışı etkenler ile uyarılabilir. Hücre içinde *p53*'ün aktivasyonu ile oluşan apoptotik sinyal, mitokondri membranının uyarılmasına ve mitokondriden sitokrom-c'nin salınmasına neden olur. Sitokrom-c proapoptotik moleküldür ve sitoplazmada apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1) ve prokaspaz-9 ile birlikte apoptozom kompleksini oluştururlar. Prokaspaz-9, aktif kaspaza-9'a dönüşür; aktif kaspaz-9 da diğer apoptotik molekülleri uyarır ve hücre apoptoza gönderilir. Hücre dışından gelen ölüm sinyallerinin hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR1, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2) bağlanmasıyla apoptotik sinyal başlatılır. Prokaspaz-8 ve 10, ölüm reseptörünün sitoplazmik bölgesinde bulunan özel bölgelere bağlanır ve aktifleşirler. Aktif kaspaz-8 ve 10 ise kaspaz-3 ve 7'yi aktifleştirirler. Aktif kaspaz-3, sitoplazmada bulunan yapısal proteinlerin sindirimini ve hücrenin fagosite edilmesini sağlar. Bu iki yolak dışında, endoplazmik retikulumdan sitoplazmaya kalsiyum akışı ve bunun sonucunda sitoplazmada kalsiyum seviyesindeki artışla da apoptoz uyarılmaktadır. Sitoplazmada kalsiyumun birikmesi kalpain'i, aktif kalpain, kaspaz-12'yi aktive eder. Bu süreç sonunda kaspaz-9 sinyal kaskadı aktive olur ve kaspaz-9, APAF-1'den bağımsız olarak inaktif kaspaz-3'ü aktive ederek hücrenin apoptoza gitmesini sağlar (Pınarbaşı, 2010).

Apoptoz genetik olarak düzenlenir, hatalı ya da hasarlı DNA'nın apoptoz ile yok edilememesi sonucunda kromozom sayısının korunumunda devamlılık sağlanamaz ve anöploidi gibi istenmeyen durumlar oluşur (Melet, 2008). Kanser hücrelerinde genellikle apoptoz baskılanmıştır. Bunun sonucu olarak tümör dokusu sürekli büyüme eğilimindedir.

***Genetik defektler*:** Kanser ile ilgili üç sınıf gen vardır: onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri. Protoonkogenler, normal hücrelerde hücre bölünmesinin kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmesinden sorumludur. Hücre membranındaki reseptöre bağlanan büyüme faktöründen, reseptöre ve nükleusa kadar giden yolakta rol alan tüm protoonkogenler gerektiği zamanlarda aktivite göstererek normal hücre bölünmesi olaylarını kontrol ederler. Bu süreçte rol alan genlerden herhangi birisinde aktivasyonu arttırıcı yönde bir değişiklik, mutasyon meydana gelirse bu durum genellikle hücre çoğalmasının kontrolünün kaybolması ile sonuçlanır. Hücre bölünmesinin düzenlenmesi için, bu genlerin ve/veya bu genlerin ürünlerinin inaktifleştirilmiş durumda olmaları gerekmektedir. Protoonkogen mutasyonlarının sonucunda onkogen adını verdiğimiz kontrolsüz hücre çoğalmasının uyarılmasına neden olan genler oluşur (Fışkın, 2002).

Büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, sinyal iletim proteinleri ve transkripsiyon faktörleri onkogenlere örnektir. En iyi bilinen onkogenler: *RAS, c-MYC, RET, MET, CDK4, BCR/ALB, BCL2*'dir (Kopnin, 2000).

***Tümör baskılayıcı genler*:** Tümör baskılayıcı genler, diğer bir deyişle antionkogenler, hücre bölünmesini durdurur. Yaptıkları işlev, genelde onkogenlerin tersi yönündedir ve inaktivasyonları sonucu tümör gelişimi söz konusu olur (Akbulut ve Akbulut, 2005). Tümör baskılayıcı genler ilk kez herediter ve sporadik formları olan ve çocukluk çağında en sık görülen göz içi tümörü retinoblastomda tespit edilmiştir (Fışkın, 2002). Tümör baskılayıcı gen ürünlerine örnek olarak pro veya antiapoptotik proteinler, hücre siklusu kontrol proteinleri, DNA tamir proteinleri, hücrelerarası iletişimde görevli proteinler verilebilir. En iyi bilinen tümör baskılayıcı gen *p53* olup diğerleri: *RB1, WT1, NF1, NF2, DCC, BRCA1, BRCA2*'dir (Kopnin, 2000).

Alfred Knudson'ın 1971 yılında "ikili vuruş" hipotezinde de önermiş olduğu gibi tümör baskılayıcı genin her iki allelinde oluşan mutasyonlar, ya da onkogenin tek kopyasında meydana gelecek bir mutasyon kanser gelişimini başlatabilmektedir (Knudson, 1971; Fışkın, 2002). DNA onarım genleri ise baz kesip çıkarma (BER),

hasarın direkt geriye döndürülmesi, yanlış eşleştirme onarımı (MMR), nükleotid kesip çıkarma (NER), homolog rekombinasyon gibi aktivitelere sahip olup hücre döngüsü süresince oluşan mutasyonların onarılmasını sağlamaktadırlar (Wood, 2001).

Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri kanserle bağlantılı mutasyonlarda ana nedenlerdir. Bununla birlikte mutasyonlar aynı zamanda karsinojenleri aktive ya da deaktive eden genlerde, hücre sinyal genlerinde, hücre döngüsü kontrol noktaları genlerinde, hücresel diferansiyasyon genlerinde, metastaz genlerinde, hücresel senesens genlerinde de olabilir (Pierotti, 2003).

***Tümör anjiyogenezi*:** Kanser ile ilgili gen bozukluklarının yanı sıra pek çok kanser hücresi kendi büyümesini stimüle eden büyüme faktörleri üretir. Bu da kanserin ilerlemesine zemin hazırlar. Yeni damar gelişimi olmayan tümörler asemptomatik lezyonlar olarak kalır. Bu, tümörlerin damar gelişimi olmaksızın nasıl yıllarca yaşamı tehdit etmeyecek şekilde dormant halde kaldıklarının en iyi açıklamasıdır (Zetter, 2008). Tümörlerin salgıladıkları büyüme faktörleri içinde Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) anjiyogenez oluşumunu sağlayan primer sitokindir.

Normal hücreler ile kanser hücreleri arasında en büyük fark G_1 evresinde gözlemlenir. Hücre bu evrede bölünme ya da bölünmemeyi seçer. Normal bir hücre komşu ya da daha uzaktaki hücreler tarafından gönderilen ‘çoğalma’ ya da ‘çoğal’ mesajına uymak zorundadır. Kanser hücrelerinin en önemli özellikleri durdurma sinyali gönderildiğinde ‘çoğalmayı durdur’ emrini dinlememeleridir. Hücreye çoğal / çoğalma mesajlarını getiren proteinler çoğalma için gereken enerjiyi sağlayan siklinler, çoğalmayı yöneten siklin bağımlı kinaz enzimleri (cdk), ve durdurucu / yavaşlatıcı görevi yapan siklin bağımlı kinaz enzimi susturucuları (cdki) olmak üzere 3 grupta toplanabilir: Kanser hücreleri sürekli bölünme ve çoğalma eğilimindedirler. Proteinler tarafından gönderilen çoğalmama sinyalini dinlememektedirler. Bundan dolayı; siklinlerin etkinliği artırılmış, cdki moleküllerinin etkinliği ise azaltılmış ya da tamamen ortadan kaldırılmıştır (Pitot, 1976).

2.4.Kanser ve kemoterapi

Kemoterapi, ilk defa 1940'lı yılların sonlarına doğru kanserle ilişkilendirilmiştir. İlk kemoterapi uygulaması, I. Dünya savaşında kullanılan hardal gazının kemik iliği üzerine depresif etkilerinin dikkate alınıp tedavi amaçlı olarak lenfomalı hastalarda denenmesi ile gerçekleştirilmiştir (Fırat ve Hayran, 1995). 20.yy'ın ortalarında İngiltere'de kemoterapi amacıyla kullanılmaya başlanan klorambusil, melfalan, busulfan ve bazı alkilleyici ajanlar myeloma, lenfoma ve bazı lösemilerin tedavisinde halen kullanılmaktadır (Arslan, 2007). Kemoterapide kullanılan ilaçların çoğunun sentetik kaynaklı olması bu ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Azırak, 2007).

Kemoterapi, hastanın normal hücrelerine zarar vermeden özellikle çoğalan hücrelere karşı seçici, öldürücü etkileri olan, doğal veya sentetik kimyasal ve biyolojik ajanlarla yapılan bir tedavi yöntemidir. Ancak ilaçlar kanser hücrelerinin proliferasyonunu önlediği gibi özellikle mitotik aktivitesi yüksek normal hücrelerin de (örneğin, kemik iliğinin hematopoietik hücreleri, kıl folikülü hücreleri, barsak ve ağız mukoza epitelyumu, vb) gelişip çoğalmasını engelleyebilmektedir (Sadırlı ve Ünsar, 2009).

Kanserin ilerlemesi sonucu, kanser tedavisi ve tedavi toksisitesi bedenin bütün sistemleri üzerinde sistemik ve lokal etkilere yol açmaktadır (Kara ve Fesci, 2004). Buna bağlı olarak kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötikler, tedavi etmenin yanı sıra yorgunluk, ağrı, iştahsızlık, ağızda yara, kusma-bulantı konstipasyon gibi fiziksel ve kimyasal yan etkilere yol açabilmektedir (Sadırlı ve Ünsar, 2009).

Kemoterapi ile malign hücrelerinin invazyonu yavaşlatılıp hücrelerin çoğalması önlenerek, hastalığın kontrol altına alınması sağlanmaktadır. Bunun yanısıra hastalığa bağlı semptomların ortadan kaldırılarak bireyin yaşam kalitesi yükseltilmeye çalışılmaktadır. Kemoterapinin, radyoterapi ve cerrahi müdahaleden önce uygulanma amacı yapılacak lokal tedavileri kolaylaştırmak; sonradan uygulanma amacı ise hastalığın nüks etmesini azaltmaktır (Başar, 2006).

Kemoterapide başarının sağlanması için ilaç dozlarının toksik düzeylere ulaşmayacak seviyede hedef dokulara ulaştırılması gerekmektedir. İlaçların etkisinin vücutta ortaya çıkış hızını, ilacın etki süresini ve ilaç etkisinin şiddetini kontrol eden dört temel mekanizma olduğu bilinmektedir. Bu mekanizmalar şöyle özetlenebilir:

1. İlacın uygulandığı bölgeden emilip plazmaya geçmesi,
2. İlacın kan dolaşımını geriye dönüşümlü olarak terk etmesi hücreler arası ve hücre içi sıvıya dağılması,
3. İlacın böbrekler ve karaciğer ile diğer dokular tarafından metabolize edilmesi,
4. Son olarak da ilaç ve metabolik atıkların feçes, idrar veya safra yoluyla vücuttan uzaklaştırılması (Başar, 2006).

2.4.1. Antikanser ilaçlar ile kemoterapi

Kemoterapi, kanserlerin üç ana tedavi yönteminden biridir. Diğer iki yöntem ise ışın tedavisi (radyoterapi, brakiterapi) ve cerrahi girişim yöntemleridir. Doğal veya sentetik kimyasal maddeler, biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavilerin tümü kemoterapinin kapsamı içindedir. Antikanser ilaçlar, hücre siklusunda etki ettikleri fazlara göre hücre siklusu faz spesifik olanlar ve faza spesifik olmayan ilaçlar şeklinde sınıflandırılabilmektedir (Dowling ve ark., 1970; Frei, 1974).

1) ***Hücre siklusu faz spesifik ilaçlar***; Hücre siklusunda spesifik bir faza karşı daha etkili olan ajanlardır. Daunorubisin, Acytinomycin-D gibi ilaçlar, G_2 fazına yöneliktir. Bu grup ajanlar, DNA, RNA ve protein sentezine etki etmektedir. DNA sentezini ve hücre metabolizmasını etkileyen 6-Mercaptopurine, Methotrexate, Procarbazine, 6-Cytarabine, Tyoguanin, gibi ilaçlar ise S fazına dönük ilaçlar (Antimetabolitler) olarak değerlendirilmektedir. Bitki alkoloidleri olan Vinblastine, Vincristine gibi ajanlar ise ana hücreden iki yavru hücre oluşmasını engelleyerek M fazına dönük ilaçlar sınıfında yer almaktadırlar.

2) ***Faza spesifik olmayan ilaçlar***; bu grup ilaçlarda hücre siklusuna spesifik ve spesifik olmayan şeklinde iki grupta incelenmektedir. Hücre siklusuna spesifik

ajanlar; hücre siklusuna etki eden fakat belirli bir faz gerektirmeyen ajanlardır. Bu grupta alkilleyici ajanlar, antitümör antibiyotikler sayılabilir. Hücre siklusuna spesifik olmayan ilaçlar, hücre siklusta ya da dinlenme fazında olsa bile etkili olabilmektedir. Bu grupta nitrojen mustard ve nitrozürealar örnek verilebilir (Randolph ve ark., 1978; Hitchings, 1983).

Antikanser ilaçlar, kimyasal yapılarına ve genel etki mekanizmalarına göre de 6 grupta sınıflandırılabilir:

2.4.1.1.Alkilleyici bileşikler

Alkilleyici bileşikler, malignant neoplazma tedavisinde klinik yararı ilk kez saptanan ve bugün de en yaygın kullanılan ilaç grubudur (Spiegel, 1984). Faza özgü olmayan sitotoksik maddelerdir ve hem dinlenme fazındaki hem de bölünen hücrelere karşı etkilidirler. Ancak hücre siklusunun geç G_1 ve S fazlarına en duyarlı olup G_2 fazında blokaj yapmaktadırlar (Salmon ve Sartorelli, 1989). Sitotoksik ve mutajenik etkilerinin yanı sıra birçok enzim, protein ve nüleik asid sentezini de durdurmaktadır. Siklofosfamit, klorambusil, melfalan gibi azotlu hardallar, etileniminler, nitrozoüreler ve busulfan gibi sülfonik asit esterleri alkilleyici bileşiklerdir.

2.4.1.2.Antimetabolitler

Bu grupta bulunan ilaçlar, hücre içinde ya çeşitli enzimleri inhibe ederek pirimidin ve pürin sentezini durdurur ya da onların gerekli nükleozid ve nükleik asit kompleksleri içine girmelerine engel olarak DNA ve RNA sentezini engellerler (Lemke ve ark., 2008). Antimetabolitler, başlıca üç grup altında incelenir:

***Nükleotid Antagonistleri*:** Pirimidin ve pürin nükleotidlerine benzer maddelerdir. Klinikte en çok kullanılan antimetabolit ilaçlar arasında pürin antagonistlerinden 6-merkaptopürin ve tiyoguanin; pirimidin antagonistlerinden ise

5florourasil (5-FU) sayıllabilir. 5-FU, timidilat sentetazı bloke ederek urasilin timidine dönüşümünü ve böylece DNA sentezini engeller (Katzung ve ark., 1992).

***Nükleozid Antagonistleri*:** Bu grup bileşiklere örnek olarak tegafur, sitarabin, ve pentostatin verilebilir. Bu bileşiklerden sitarabin, DNA sentezi için gerekli DNA polimerazı inhibe ederek etki gösterir (Namlı ve ark., 2007; Lind, 2011).

***Folik Asit Antagonistleri*:** Antimetabolit ilaçlar arasında en eskisi folik asit antagonistleridir. Folik asit DNA/RNA sentezinde nükleotid ve bunlardan da DNA/RNA polimer oluşmasında önemli rol oynar. Bu ilaçlara örnek olarak metotreksat, aminopterin ve ametopterin verilebilir. Ametopterin, pürin halkası için gerekli olan bir karbon transferini inhibe etmek suretiyle etki gösterir (Page ve ark., 2004; Namlı ve ark., 2007; Lind, 2011).

Antimetabolit ilaçlar, kanser hücresinin DNA sentezi ile normal hücrenin DNA sentezini ayıramamaktadır. Bu nedenle bu grup bileşiklerin sitostatik etkileri selektif olmayıp toksisiteleri yüksek ve klinikte kullanımları sınırlıdır (Namlı ve ark., 2007; Lind, 2011).

2.4.1.3.Antibiyotikler

Bu grup ilaçlar arasında, daunorubisin, aktinomisin-D, bleomisin, doksorubisin sayılabilir. Antibiyotikler, hücre kromozomu ile hücreye verilen metabolik ve işlevsel emirler zincirini RNA'yı etkileyerek bozarlar (Kayaalp, 1987).

2.4.1.4.Vinka Alkaloidleri

Hücre çoğalmasını mitoz fazında etkiledikleri için mitostatik ajan da denebilir. Kanser tedavisinde en çok kullanılan mitostatik ilaçlar; vinblastin, vinkristin alkaloidleridir (Trease ve Evans, 1996).

2.4.1.5.Steroid Hormonlar

Steroid hormonlardan androjen, östrojen ve progesteronlar, genellikle büyüme ve gelişmeleri hormonal etkilere bağlı kanser türlerinde kullanılırlar. Doğrudan kanserli dokuyu inhibe ederek veya dolaylı olarak diğer hormon salgılarını azaltarak etkilerini gösterirler (Zang, 1992).

2.4.1.6. Diğer Bileşikler

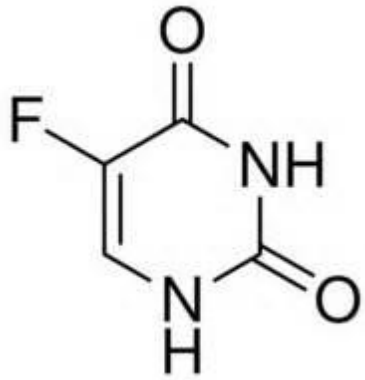
Metilhidrazin, hidroksiüre, kolsemid, karboksimit (DTIC), L-Asparaginaz, streptonigrin ve cis-platin bu grup ilaçlara örnek olarak verilebilir (Dancey ve ark.,2000; Page ve ark., 2004).

2.5. 5-Florourasil

İlk kez, Duchinsky ve Heidelberger tarafından sentezlenen 5-Florourasil (5-FU), C-5 pozisyonunda hidrojen yerine tek florin atomu içeren, bir urasil analoğudur (Şekil 2.12.) (Dushinsky ve Heidelberger, 1957; Longley ve ark., 2003). 5-FU, urasilin transport yollarını kullanarak rahat bir şekilde hücre içine girmekte ve hücre içerisinde aktif metabolitlerine dönüştürülmektedir. 5-FU örnekleri; florouridin trifosfat (FUTP), florodeoksiuridin trifosfat (FdUTP) ve florodeoksiuridin monofosfat (FdUMP)'tır. Bu aktif metabolitler, RNA sentezini ve timidilat sentaz (TS) aktivitesini bozmaktadırlar. 5-FU, hücre içinde dihidroprimidin dehidrogenaz (DPD) tarafından dihidroflorourasil'e (DHFU) dönüştürülerek inaktive edilir. Bu işlem, genellikle karaciğerde meydana gelmektedir (Longley ve ark., 2003).

Kemoterapide, özellikle kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılan 5 FU'nun hem RNA hem de DNA'nın sentezinde etkili olduğu bilinmekte ve bu etkilerini hem timidilat sentaz enzimini inhibe ederek hem de DNA ve RNA yapısıyla birleşip fonksiyonlarını bozarak yerine getirirler. Timidilat sentaz, metil vericisi olarak 5,10-methylenetetrahydrofolate'ı (CH_2THF) kullanarak dUMP'nin dTMP'ye metilasyonunu katalizleyen bir enzimdir. 5-FU'nun metaboliti olan FdUMP, bu

enzim üzerindeki nükleotid bağlayıcı kısma stabil bir şekilde bağlanarak, normal substratı olan dUMP'nin enzime bağlanması engeller. Bu, dTMP sentezinin engellenmesine neden olmaktadır. dTMP sentezinin engellenmesi, ileri aşamada dTTP'nin sentezinin engellenmesine neden olmakta ve böylece diğer deoksinükleotidlerin (dATP, dGTP, dCTP) miktarında bir artışa yol açmaktadır. Deoksinükleotid havuzunun dengesindeki bozulma (özellikle dATP/dDTP oranının bozulması) DNA onarımını ve sentezini bozarak, DNA üzerinde ölümcül bir hasara yol açar. TS inhibisyonu aynı zamanda dUTP miktarındaki artmayı da beraberinde getirir. Hem dUTP, hem de bir 5-FU metaboliti olan FdUTP, DNA ile yanlış biçimde birleşerek DNA hasarına yol açar (Longley ve ark., 2003).



Şekil 2.6. 5-Florourasil'in kimyasal yapısı (Dushinsky ve Heidelberger., 1957)

2.6. Florlu Asetofenon bileşikleri

Asetofenon (AP, fenilmetilketon veya hipnon), bileşiğinin kimyasal formülü C_8H_8O'dur ve molekül ağırlığı 120.15 g/mol'dur (Budavari ve Rahway, 1989). Asetofenonlar, suda çok az çözünen renksiz bileşiklerdir (Bethesda, 1993). Birçok asetofenon, bitkilerde ve mantarlarda doğal ürünler olarak bulunmaktadır (Wilkins ve Scholl, 1989; Guyot ve ark., 1998). Portakal çiçeği veya yasemin gibi bitkilerde bulunan asetofenon türevleri, tatlı ve keskin bir kokuya sahiptir (Budavari ve Rahway, 1989; Bethesda, 1993).

Asetofenon türevlerinin, insanlarda akut oral yayılımının hipnotik veya yatıştırıcı, hematolojik etkilere ve zayıflamış bir nabıza neden olduğu

gözlemlenmiştir (Sittig, 1985; Bethesda,1993). Asetofenonların hayvanlarda veya insanlarda kanserojen etkileri hakkında herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bir çalışmada, gebe sıçanlarda deri yoluyla asetofenona maruz bırakılan bölgelerde gelişme ve üreme üzerinde herhangi bir etki gözlenmemiştir (Bethesda, 1993). Yüksek oranda asetofenona maruz bırakılan sıçanlarda; böbrek, karaciğer ve akciğer tıkanıklığı ile inhalasyon hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Bethesda, 1993). Fare, sıçan ve tavşanlarla yapılan akut maruz kalma testleri, asetofenonların, oral veya dermal maruziyete bağlı olarak orta düzeyde akut toksisite sergileyeceğini göstermiştir (Bethesda, 1993). İnsanın asetofenon buharına akut maruz kalması, cilt tahrişi ve korneanın geçici olarak hasar görmesine neden olabilmektedir. Bir çalışmada asetofenona maruz kalan insanlarda ışığa olan duyarlılığın azaldığı belirtilmektedir (Rahway, 1989; Bethesda, 1993). Asetofenonun insanlarda üreme ve gelişim üzerindeki etkileri ile kronik (uzun süreli) veya kanserojen etkileri hakkında herhangi bir bilgi bulunamamıştır.

Asetofenon; sabun ve parfümlerde, gıda maddelerinde, alkolsüz içeceklerde ve tütünde aroma arttırıcı bir madde; endüstride plastik ve reçineler için bir çözücü (Singh ve ark., 2007); olefinlerin polimerizasyonu için bir katalizör olarak kullanılır (Rahway, 1989; Bethesda, 1993). Asetofenon ve türevleri, biyolojik açıdan aktif bileşikler elde etmek için önemlidir. Genel olarak asetofenonlar, mikobakterilere karşı etkili terapötik maddelerin önemli bir unsurudur (Rajabi ve ark., 2005). Benzofuran elde etmek için kullanılan asetofenonların ketoksim türevleri antifungal aktiviteler sergilemektedir (Gündoğdu-Karaburun ve ark., 2006). Buna ilaveten, halojen içeren asetofenonlar, seçici insan adenosin A3 reseptör antagonistinin (Jung ve ark., 2004) yanı sıra antifungal ve antibakteriyel aktivitelere sahip olan 1,3-tiyazol bileşiklerini sentezlemek için kullanılır. Bazı asetofenon türevleri, mantarlara ve gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve diğerleri herbisit olarak kullanılmaktadır (Teruyuki ve ark., 1986). Bazı asetofenonlar; oksim ve semikarbazon türevleri, biyolojik olarak aktif endüstriyel polimerler elde etmek için kullanılmaktadır (Soykan ve Erol, 2003). Asetofenon türevleri, biyotransformasyon için yabancı substratlar olarak çok ilginç model olan bileşiklerdir, çünkü kolaylıkla saptanabilen bir enantiyomer oluşturabilmektedir. (Yadav ve ark., 2001). Asetofenon

türevlerinin, ilaçların asimetrik sentezi için bir yapı taşı olarak etkili bir şekilde kullanıldığı bildirilmektedir (Ikariya and Blacker, 2007; Wang ve ark., 2006).

Birçok asetofenon bitkilerde (Guyot ve ark., 1998) ve mantarlarda doğal ürünler olarak bulunurlar (Wilkins ve Scholl, 1989). Lavault ve ark. (1999), ekspektoran, diüretik ve emetik olarak kullanılan *Vincetoxicum hirundinaria* (beyaz kırlangıç otu) bitkisinden asetofenon türevleri olan 2-hydroxyacetophenone, paeonol, apocynine, 4-hydroxyacetophenone ve 2,4-dihydroxyacetophenone, syringic acid, syringic aldehyde, 1-syringyl-1,2-dihydroxy-propane ve 1-4-hydroxyphenylethanol bileşiklerini izole etmişlerdir. Geleneksel Asya tıbbında uykusuzluk, anksiyete, anemi, yaşlanma gibi problemler için kullanılan bir bitki olan *Cynanchum wilfordii*'nin köklerinden izole edilen asetofenon türevi Cynandione A (Hwang ve ark., 1999) ve p-hydroxyacetophenone bileşiklerinin ateroskleroz ve vasküler inflamatuar hastalıklardan korunma ve tedavi amacıyla kullanılabileceği bildirilmiştir (Koo ve ark., 2015). Wilkins ve ark. (1989), arpa üzerinde yetişen bazı *Penicillium* türlerinden çeşitli asetofenonları izole etmişlerdir. Çeşitli asetofenon türevlerinin *Mycobacterium tuberculosis* bakterisine karşı etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada 4 – cyclohexyl acetophenone ve 4 – piperidino acetophenone'un bakteriyostatik aktivite sergilediği ortaya çıkarılmıştır (Rajabi ve ark., 2005). Gündoğdu-Karaburun ve ark. (2006), yeni sentezledikleri bir asetofenon-ketoksim bileşiğinin antifungal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Asetofenonların bazı mannik baz türevlerinin, gram-pozitif bakterilere ve mantarlara karşı antimikrobiyal ve antifungal aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (Gul ve ark., 2002). Başka bir araştırmada, yeni sentezlenmiş dokuz farklı asetofenon türevi içerisinde 2-hydroxy-6-methoxyacetophenone bileşiğinin *Salmonella typhimurium* üzerinde antimutajenik aktiviteye sahip olduğu; bu aktivite için bileşiğin C-2 pozisyonunda bir hidroksil grubu taşımasının gerekli olduğu tespit edilmiştir (Miyazawa ve ark., 2000). Hayashi ve Misumi (1986) sentezini gerçekleştirdikleri asetofenon oksim türevi bileşiğin herbisit özellik sergilediğini bildirmişlerdir.

Asetofenon türevlerinin antikanser aktivitesi olduğuna dair literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Pek çok araştırmacı, yeni sentezlenmiş (Saxena ve ark., 2008; Prabhakar ve ark., 2014; Pessoto ve ark., 2015; Chaudhary ve ark., 2016; Lee

ve ark., 2016; Mao ve ark., 2016) veya çeşitli bitkilerden izole edilmiş (Kouloura ve ark., 2012) çeşitli asetofenon türevlerinin meme, prostat, akciğer, over kanserleriyle melonoma hücrelerine karşı antikanser aktivite sergilediğini göstermişlerdir.

Periyodik tabloya göre halojen grubu bir element olan flor (florin, F), farmasötik bileşimlerde sıkça bulunmasıyla dikkat çekmektedir. Flor, metabolik bozulmaya eğilimli bir molekül içindeki konumları seçici olarak engellemede kullanılabildiği; protein ligand bağlanmasını güçlendirerek daha güçlü bir ilacın oluşmasını sağladığı; molekülün pKa değerini düşürerek daha yüksek oral biyoyararlılık ortaya çıkardığı; böylelikle kimyasal yapısında önemli değişiklikler yapmadan bir bileşiğin arzu edilen biyolojik veya fizyolojik özelliklerinin arttırılabilmesine olanak sağladığı için ilaç üretiminde tercih edilmektedir (Fuglseth, 2010). Şalkon ve piperazine arasında yeni bir dizi hibrit bileşik sentezleyerek yapı-aktivite ilişkilerini ayrıntılı olarak incelemek isteyen Mao ve ark. (2016), asetofenon taşıyanların, A549 (akciğer kanseri), HeLa (serviks kanseri), SGC7901 (mide kanseri) hücrelerine karşı diğer hibrit bileşiklerden ve sisplatinden daha yüksek oranda antikanser aktivite sergilediğini göstermişlerdir. Ayrıca, araştırıcılar, hibritlerde flor ve klor gibi halojen atomu varlığının antitümör aktivite için önemli rol oynadığını da bildirmişlerdir.

2.7. Sitotoksisite

Sitotoksisite terimi, hücre ölümünü anlamına gelmektedir. Sitotoksisite araştırmaları, bir maddenin sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Hücre temelli sitotoksisite çalışmaları, hayvan deneylerine alternatif olarak toksikoloji laboratuvarlarında sıkça tercih edilmektedir (Riss ve Moravec, 2004). Sitotoksisite, incelenen maddenin maruziyet süresine ve dozuna bağlı olarak hücrelere değişik derecelerde zarar veren bir olaydır. Hücreler, sitotoksik maddeye maruz kalırsa otofaji, apoptoz ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir veya sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler (Galluzzi ve ark., 2009). Hücre bazlı sitotoksisite çalışmaları ile test edilen maddenin sitotoksik ve sitostatik etkileri hakkında temel bilgi edinilmektedir (Riss ve ark.,

2006). Deneysel olarak biyolojik, fiziksel veya kimyasal etkenlere maruz bırakılan hücrelerin, maruziyet sonrasındaki canlılıklarının belirlenmesi sitotoksisite çalışmalarının önemli bir basamağını oluşturmaktadır (Niles ve ark., 2007). Hücre kültürü çalışmalarında hücre canlılığını ve çoğalmasını belirlemek için günümüze dek birçok yöntem geliştirilmiştir. Yapılan sitotoksisite çalışmasının tipi veya çeşidi ne olursa olsun, önemli olan çalışma sonundaki canlı ve ölü hücre sayısının belirlenmesidir (Riss ve ark., 2006). Sitotoksisite belirleme metodları genel olarak enzimatik, lüminesans ve kolorimetrik yöntemlerdir (Crouch ve ark., 1993; Longo-Sorbello ve ark., 2006; Fan ve Wood, 2007).

Sitotoksik etki, hücrenin fonksiyonunda veya hücre yapısında hasar oluşturan bir kimyasal bileşiğin sıklıkla bölünmekte olan hücreleri ortadan kaldırması olarak ifade edilir ve antikanser ilaçların tanımlanmasında kullanılmaktadır. Ancak bütün antikanser ilaçlar sitotoksik etkili olmadığı gibi, tüm sitotoksik yapılı bileşikler de kanser tedavisinde kullanılmamaktadır.

Sitotoksisite çalışmaları, inflamasyon ve karsinogenez gibi birçok patolojik sürecin anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Aynı zamanda irritantlar, serbest radikaller ve genotoksinlerin de içinde bulunduğu çeşitli kimyasal ajanların dokular ve hücreler üzerindeki aktivitelerinin ve aktivasyon mekanizmalarının anlaşılmasında kullanılan önemli yöntemlerdir (Putnam ve ark., 2002). Balık hücre hatları kullanılarak yapılan sitotoksisite deneyleriyle farklı organik fosin bileşikleri, ağır metaller ve birçok çevresel kimyasalın sitotoksik etkisi de belirlenebilmektedir (Fent, 2001).

Sitotoksisitenin, *in vitro* testler ile ölçülmesinin birçok faydası bulunmaktadır. Toksisite testlerinde kullanılan hayvan sayısının en aza indirilmesi, organ ya da hücrenin toksik etkiye karşı mekanizmasının belirlenebilmesi bu avantajlardan bazılarıdır. Yeni ürünlerin toksisitesinin *in vitro* yöntemlerle üretimin erken evrelerinde belirlenebilmesiyle harcanan paradan, zamandan ve deney hayvanlarından kazanç sağlanabilmektedir (Putnam ve ark., 2002).

İn vitro sitotoksisite testleri hücre proliferasyonu, hücre canlılığı, membran bütünlüğü, hücresel metabolizma yada DNA sentezi gibi çeşitli parametrelerin ölçülmesiyle birlikte temel hücre toksisitesini de belirlemede yardımcı olmaktadır. Bu parametreleri ölçen çeşitli sitotoksisite deneyleri bulunmaktadır. En çok kullanılan yöntemler arasında Lowry, Coomassie Blue ve Kenacid blue deneyleri (toplam hücre proteini ve hücre proliferasyonunu belirlemek için), neutral red uptake deneyi (hücre canlılığı için), intraselüler laktat dehidrogenaz (LDH), MTT, XTT, WST (mitokondriyal aktivite ve hücresel metabolizmayı belirlemek için) aktivite testleri sayılabilir (Gad, 2000; Putnam ve ark., 2002).

2.8. Sitotoksisite Çalışmalarında Kullanılan Bazı Yöntemler

2.8.1. MTT testi

MTT yöntemiyle bir hücre topluluğunda bulunan canlı hücreler kantitatif ve kolorimetrik olarak saptanabilmektedir (Genç ve ark., 2002). Sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) (Şekil 2.8.), canlı hücrelerde sağlam mitokondrilerin süksinatdehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanıp suda çözünmeyen mavi-mor renkli formazan kristallerini oluşturmaktadır (Langdon, 2004; Korkmaz, 2002). Oluşan formazan kristallerinin miktarı direkt olarak hücre sayısının oranını göstermektedir (Holst ve ark., 2005). Formazan kristalleri, izopropanol, DMSO veya formazan ürünlerini çözülebilen uygun çözücülerde çözüldükten sonra spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (Barile, 1994).

2.8.2. XTT

Hücre çoğalması deneylerinde, hücre biyolojisinde, hücre büyüme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Sitotoksik ajanlarla yapılan çalışmalarda ve canlı hücre proliferasyonunu belirlemek için XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) tuzu (Şekil 2.8.)

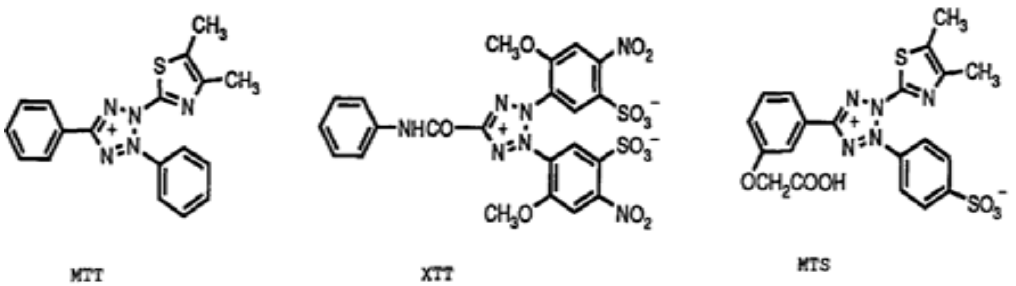
kullanılmaktadır. Ayrıca canlı hücrelerde mitokondrinin süksinatdehidrogenaz enzimi ile indirgenen bileşik, turuncu renkli ve suda çözünebilen bir form oluşturmaktadır. Bu nedenle metabolik olarak aktif hücreler boya konsantrasyonu ile orantılıdır (Lewis ve ark., 2001)

2.8.3. WST-1 ve WST-8 testleri

WST-1 ve WST-8 testleri sitotoksik etki ve metabolik aktivitenin belirlenmesi için yapılmakta ve canlı hücrelerden mitokondriyal süksinatdehidrogenaz enzimiyle tetrazolium tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan non-radyoaktif, spektrofotometrik, kolorimetrik bir testtir. Formazan kristalleri, metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından üretilmekte olup, spektrofotometre ile belirtilen dalga boyunda boyanan hücrelerin absorbansı ölçülmektedir (Mossman, 1983; Paull ve ark., 1988; Scudiero ve ark., 1988; Barltrop ve ark., 1991; Ishiyama ve ark., 1995; Tominaga ve ark., 1999).

MTT, XTT ve WST-1/8 tetrazolium tuzlarıdır ve canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimleriyle reaksiyona girerek indirgenip renkli formazan kristalleri oluştururlar. Formazan kristali yoğunluğu canlı hücre sayısının indirekt bir göstergesidir. MTT (570 nm), XTT (450-490 nm) ,WST-1 (420-480 nm) lerde ölçümler yapılmaktadır (Mossman, 1983; Paull ve ark., 1988; Scudiero ve ark., 1988; Barltrop ve ark., 1991; Ishiyama ve ark., 1995; Tominaga ve ark., 1999).

.



Şekil 2.7. MTT, XTT ve MTS bileşiklerinin kimyasal yapıları (Barltrop ve ark., 1991'den).

2.8.4. LDH Enzim Salıverilmesi Testi:

Hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan diğer bir yöntem ise ölü/hasarlı hücrelerden hücre ortamına salgılanan laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesinin belirlenmesidir (Decker ve Lohmann-Matthes, 1988; Korzeniewski ve Callewaert, 1983). Laktat dehidrogenaz, tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Hücreler, toksik etkilere maruz kaldığında plazma membran bütünlükleri bozulur ve LDH enzimi hücrelerden sızarak vasata geçer. Böylece maruziyet sonrası LDH enzim aktivitesi ölçülerek hücre hasarı değerlendirilebilir (Lappalainen ve ark., 1994; Riss ve Moravec, 2006).

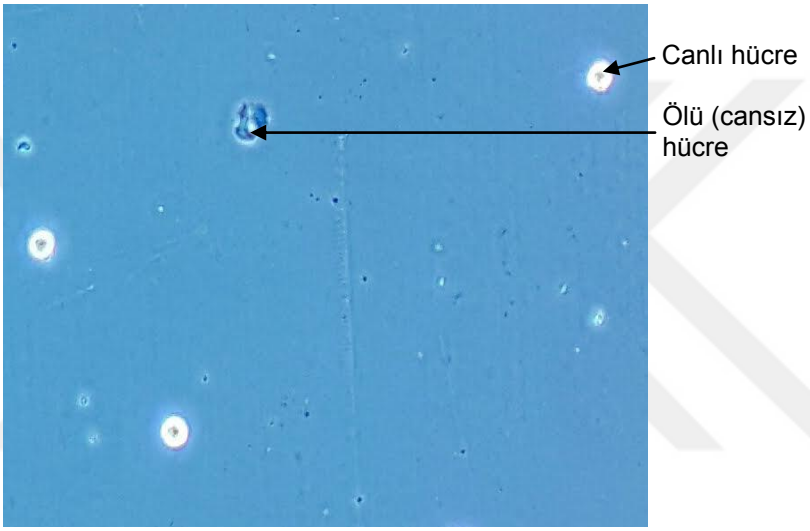
2.8.5. ATP Biyolüminesans Testi:

Adenozin trifosfat (ATP) molekülü, metabolik olarak aktif tüm hücrelerde bulunur ve biyolojik yapıdaki sistemlerde enerji kaynağı olarak görev yapar (Crouch ve ark., 1993). Hücre ölümünün gerçekleşmesiyle, hücrenin ATP sentez yeteneği ortadan kalkar ve endojen ATPazlar mevcut ATP'nin hızlı bir şekilde yıkılmasını sağlarlar. Bu sebeple intra-sellüler ATP içeriği, hücre canlılığının temel göstergesi olarak nitelendirilmiş ve canlılık belirleme yöntemleri arasında yerini almıştır. ATP biyolüminesans testi, multi-pleytlerde yapılan canlılık testleri arasında en hassas, en kolay ve en hızlı yöntem olarak bilinmektedir (Riss ve ark., 2006; Lomakina ve ark., 2015).

ATP konstrasyonu; biyolüminesans, radyografik ve enzimsel-spektrofotometrik gibi farklı metodlarla ölçülebilmektdir. Biyolüminesans metodu, bunların içerisinde en hassas metot olması nedeniyle ön plana çıkmıştır (Lomakina ve ark., 2015). Lüminesans özellik gösteren çok sayıda biyolojik madde bulunmakla beraber bu zamana kadar bunlardan sadece üç tanesi, Aequorin (*Aequorea sp*. denizanası), Firefly (*Photuris pennsylvanica,* ateşböceği) ve Renilla isimli (*Renilla reniformis*, deniz menekşesi) canlılardan elde edilen substratlar, biyolüminesans testlerine uyum sağlayabilmesiyle kullanıma girmiştir (Lomakina ve ark., 2015).

2.8.6. Tripan mavisi ile boyama

Tripan mavisi boyama yöntemi ile canlı hücre yüzdesi belirlenmektedir. Hücreler canlılıklarını korumuşlarsa membran bütünlükleri ve permeabiliteleri bozulmadığından tripan mavisi ile boyanmamaktadırlar. Ölü hücreler ise membran bütünlüğünün bozulmasıyla boyayı içlerine alarak mavi renkte görünmektedirler (Şekil 2.9.). Bu boyanma özelliklerine dayanarak boyanmış ve boyanmamış hücre oranı ile hücre canlılığı yüzde olarak hesaplanabilmektedir (Şencan, 2006).



Şekil 2.8. Canlı ve Cansız (ölü) hücre

2.8.7. Alamar blue testi

İlk kez 1950'lerde Erb ve Ehlers (1950) tarafından, sütte ve sıvılarda bakteriyel kontaminasyonun belirlenmesi amacıyla kullanılan Alamar mavisi testi, daha sonradan Ahmed ve ark. (1994), bu testi radyoaktif [^{3}H] timidin birleşme testine alternatif olarak hücre kültürüne uyarlamıştır. Bu yöntem, alamar mavisi (resazurin) adlı bileşiğin, canlı hücreler tarafından resorufin bileşiğine dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Resazurin, oksidatif formda bulunan koyu mavi renkte bir redoks boyasıdır. Resazurin hücre zarından serbestçe geçerek hücre içine girer ve burada indirgenerek floresans özellikteki pembe renkli resorufin bileşiğine dönüşür. Ölü hücreler ise, metabolik aktivitelerini kaybettikleri için resazurini indirgeyemez ve floresans sinyali oluşturamazlar. Oluşan sinyal, florometre kullanılarak tespit edilir

ve canlı hücre sayısı arttıkça sinyal şiddetlenir (Ahmed ve ark., 1994; O'brien ve ark., 2000; Riss ve Moravec, 2006; Silva ve ark., 2016).

Resazurin, PBS içinde çözülebilmektedir. Hücrelerin toksik madde ile maruziyeti sonrasında resazurin taşıyan test belirteci, direkt olarak hücre ortamına eklenir. Uygun bir inkübasyon periyodu sonrasında ölçüm yapılarak test sonuçlandırılır. Metabolik aktivitesi düşük hücre hatları ile yapılan deneysel uygulamalarda, yeterli sinyal oluşumunun sağlanması için inkübasyon süresinin artırılması oldukça önemlidir (Riss ve Moravec, 2006; Silva ve ark., 2016). Alamar mavisi testinde, lizis, ekstraksiyon ve yıkama gibi zaman ve emek gerektiren prosedürler bulunmamaktadır. pH değişikliklerine karşı dayanıklılığı gösterilen alamar mavisi testi, fötal dana serumu ve fenol kırmızısı içeren vasatlarda kullanıldığında, bu maddelerin ölçüm esnasında herhangi bir sinyal görüntüsüne yol açmadığı gösterilmiştir (Ahmed ve ark., 1994; Silva ve ark., 2016).

Alamar mavisi testinde, renk değişikliği oluştuktan sonra, hücreler vasattan çıkarılsa ya da sonradan ölse dahi renk değişikliği sabit kalır ve bu da kullanımını sınırlayan sebeplerden birisidir. Hücrelerin üreme ve gelişmeleri sırasında ortama verdikleri metabolitler ve vasat kompozisyonundan oldukça etkilenen alamar mavisi, hücreler öldükten sonra metabolitleri halen vasatta bulunduğu için tekrar eski okside formuna dönemez ve bu da testin belirleyiciliğini negatif etkilemektedir (Ahmed ve ark., 1994; Squatrito ve ark., 1995).

2.8.8. Proteaz ve esteraz aktivitelerinin ölçümü

Hücre canlılığını belirlemede kullanılan proteaz ve esteraz enzim aktivitesine dayalı iki farklı floresans metodu bulunmaktadır. Bu metodlar, canlı ve ölü hücrelerin, esteraz ve proteaz aktivitesi yönünden ayrılması prensibine dayanmaktadır (Niles ve ark., 2007, Sali ve ark., 2016). Proteaz aktivitesine dayalı metotta, hücre zarını geçebilen florojenik proteaz substratı (glisilfenilalanil-aminoflorokumarin; GF - AFC), canlı hücreler içerisine girmekte, sitoplazmik

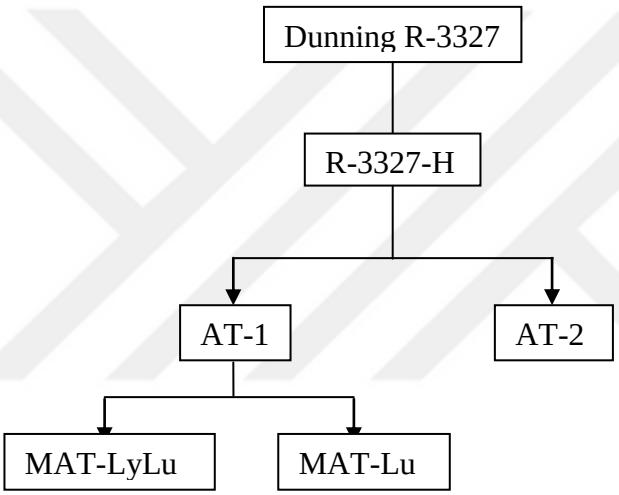
aminopeptidazlar tarafından glisin ve fenil amino asitlerinin uzaklaştırılmasıyla floresans sinyali yayan aminoflorokumarine (AFC) dönüştürülmekte ve böylelikle canlı hücre sayısı hakkında bilgi vermektedir. Yine GF-AFC substratına benzer şekilde, yine proteaz substratı bir peptid olan ancak hücre içine girme yeteneği olmayan rodamin (aminolusiferin), hücre ölümünü takiben vasata geçen proteazlar tarafından florojenik formuna dönüştürülür ve böylece ölü hücre sayısı hakkında bilgi verir. Metot, iki farklı substrattan birinin uygulanması şeklinde yapılabilse de bu iki belirtecin kombine halde uygulanması, proteaz testinin hassasiyetini önemli ölçüde artırmaktadır (Niles ve ark., 2007). Esteraz aktivitesinin ölçümüne dayalı metotta ise ester formunda substrat halinde bulunan kalsein-asetoksi-metilester (CAM) isimli madde, sadece canlı hücrelerin ester bağlarını kırabileceği prensibine dayanarak hücre canlılığını belirlemektedir. Canlı hücreler tarafından ester bağının yıkımlanmasıyla oluşan serbest kalsein, hücre içerisinde kalarak floresans gösterir ve oluşan sinyalin ölçümü florometre ile yapılır (Sali ve ark., 2016).

2.9. Proliferasyon ve Mitoz Çalışmalarında Kullanılan AT-2 ve MAT-LyLu Hücre Dizileri

Kanser araştırmalarının teşhis ve tedavi yöntemlerinde kullanılan *in vitro* ve *in vivo* deney modelleri çok büyük önem sağlamaktadır. Öncelikle *in vitro* olarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda *in vivo* yöntemler uygulanmakta ve bu sonuçlar doğrultusunda klinik araştırmalara geçilebilmektedir. Kanser araştırma çalışmalarında denek olarak genellikle sıçanlar ve fareler deneysel model olarak kullanılmaktadır (Tennant ve ark., 2000; Anisimov ve ark., 2005). Prostat kanserinde özellikle deneysel model olarak insan prostat kanserine en yakın model olması nedeniyle tercih edilmektedir (Oltean ve ark., 2008).

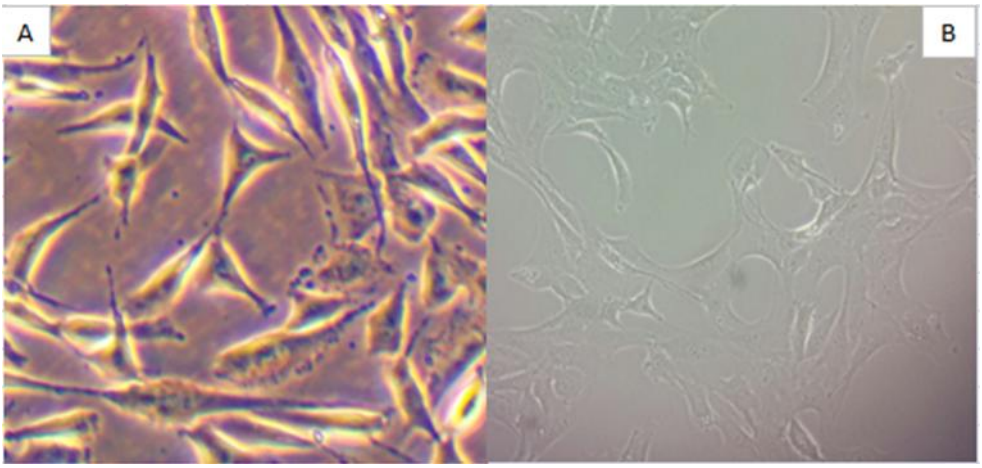
Dunning sıçan prostat kanser modeli, ilk olarak 1963 yılında Copenhagen ırkı bir sıçanın prostat epitelinde ortaya çıkan bir tümörden kökenlenmiştir (Luo ve ark.,1997). Bu tümörün seri pasajları sırasında orijinal tümörden farklı olarak büyüme hızı yavaş ve androjene hassas R-3327-H tümörü elde edilmiştir. R-3327-H tümörünün kastre edilmemiş ve herhangi bir uygulama yapılmamış hayvanlara seri

pasajlarına devam edilmiş; yavaş büyüyen ve androjene bağımsız R-3327HI tümörü elde edilmiştir. Yine R-3327-H tümörünün kastre edilmiş hayvanlara seri pasajları yapıldığında ise hızlı büyüyen, androjen bağımsız R-3327-AT tümörü elde edilmiştir. R-3327-AT tümörünün seri pasajları sırasında hızlı büyüyen zayıf metastatik AT-1 ve AT-2 tümörleri elde edilmiş ve AT-1 tümörünün pasajları sonucunda güçlü metastatik özellik gösteren, hızlı büyüyen ve androjen bağımsız MAT-LyLu ve MAT-Lu tümörleri elde edilmiştir. MAT-LyLu lenf nodu ve akciğere metastaz yaparken (Vieweg ve ark., 1994) MAT-Lu tümörü ise sadece akciğere metastaz yapmaktadır (Şekil 2.10.) (Navone ve ark., 1999; Tennant ve ark., 2000).



Şekil 2.9. Dunning sıçan prostat kanser modelinin gelişim şeması

Bu tez çalışmasında bileşik uygulamalarının yapıldığı hücre soyları AT-2 (zayıf metastatik) ve MAT-LyLu (güçlü metastatik) (Şekil 2.11.) hızlı büyüyen, androjenden bağımsız ve anaplastik özelliklere sahiptirler.



Şekil 2.10. A) MAT-LyLu hücreleri B) AT-2 hücreleri (Büyütme oranı: 40x).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

- Sınıf II güvenlik kabini (Thermo, USA)
- CO2'li inkübatör (Eppendorf, Almanya)
- İnverted ışık mikroskobu (Olympus, Japonya)
- Santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Su banyosu (Isolab, Almanya)
- Eliza mikroplaka okuyucu (Biochrom, İngiltere)
- 100 mm çaplı kültür kapları (Greiner, Almanya)
- 96 kuyucuklu pleyt (Greiner, Almanya)
- 12 kuyucuklu pleyt (Greiner, Almanya)
- 15 ml ve 50 ml'lik tüpler (Greiner, Almanya)
- 1-10, 20-200, 100-1000 µl otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)
- Steril pipet uçları (Greiner, Almanya)
- Hücre ortamı; RPMI 1640 (Invitrogen, USA)
- Fetal dana serumu (FBS) (Invitrogen, USA)
- Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich, USA)
- L-Glutamine (Invitrogen, USA)
- Dexamethasone (Sigma Aldrich, USA)
- Tripan mavisi (Sigma Aldrich, USA)
- Alamar blue (Invitrogen, USA)
- Dimetil sülfoksit (Merck, Almanya)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü

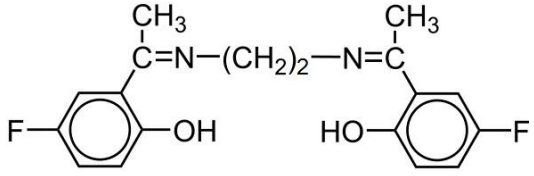
Dunning modeli sıçan prostat kanseri hücre soyları olan AT-2 ve MAT-Lylu hücreleri laboratuvarımıza İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı'ndan getirilmiştir. Hücreler (Şekil 2.11.) laboratuvarımızda % 1 fetal dana serumu (FBS), % 0.1 dexamethasone ve %1 L-Glutamine ilave edilerek hazırlanmış olan Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640) medium ile % 5 CO_2, 37 °C sıcaklık ve % 100 nem koşullarını sağlayan inkübatörde yaşatılmakta ve seri pasajları yapılarak çoğaltılmaktadır.

3.2.2. Kimyasal Bileşikler

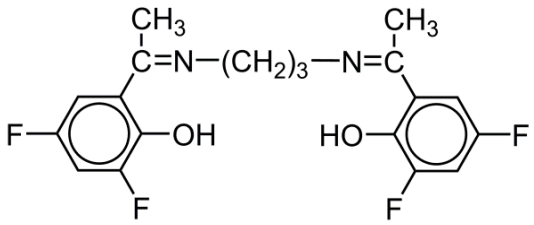
Çalışmada kullanılan Florlu asetofenon bileşikleri (AF1, AF2, AF3, AF4) (Şekil 3.1.–3.4.), Harran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Veli KASIM tarafından sentezlenmiştir. Bileşiklere ait bilgiler Tablo 3.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal bileşikler.

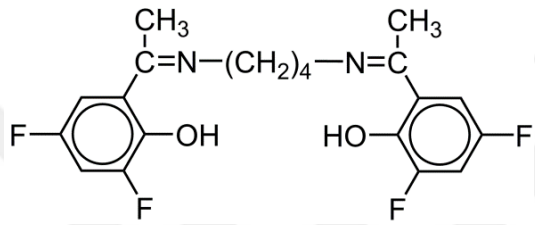
Bileşik no	Kısaltma	Kimyasal formülü	Molekül ağırlığı (g/mol)
1	AF1	$C_{18}H_{18}O_2N_2F_2$ (N,N–Etilen–bis–5 floro asetofenon)	332.34
2	AF2	$C_{19}H_{18}O_2N_2F_4$ (N,N–Propilen–bis–3,5 di floro asetofenon)	382.35
3	AF3	$C_{20}H_{20}O_2N_2F_4$ (N,N–Butilen–bis–3,5 di floro asetofenon)	396.38
4	AF4	$C_{19}H_{20}O_2N_2F_2$ (N,N–Propilen–bis–5 floro asetofenon)	346.37



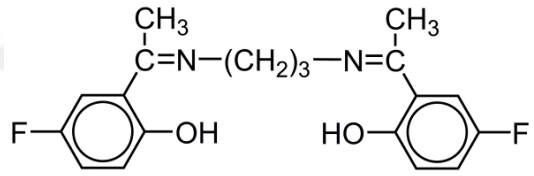
Şekil 3.1. Bileşik 1'in açık formülü



Şekil 3.2. Bileşik 2'nin açık formülü



Şekil 3.3. Bileşik 3'ün açık formülü



Şekil 3.4. Bileşik 4'ün açık formülü

3.2.3. Kontrol ve Deney mediumlarının hazırlanması

Kontrol grubuna, Bölüm 3.2.1'de anlatılan şekilde hazırlanmış ilaveli RPMI-1640 uygulanmış olup diğer gruplarda kullanılan tüm bileşikler kontrol mediumu içerisinde dilüe edilmiştir. Bu amaçla öncelikle AF1, AF2, AF3 ve AF4 bileşikleri dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 1 mM konsantrasyonlu stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Çözünen ve çözücü miktarları (3.1) numaralı formül ile hesaplanmıştır.

$$Kütle(g) = Konsantrasyon(mol/L) \times Hacim(L) \times Molekül\ ağırlığı(g/mol) \qquad (3.1)$$

Daha sonra stok çözeltiden ilaveli RPMI-1640 içerisine gerekli miktarda eklenerek 100 μM konsantrasyonlu ara stoklar oluşturulmuş ve 0.20 μm por çaplı filtreden geçirilmek suretiyle steril edilmiştir. Bu stok çözeltiler, ilaveli RPMI-1640 içerisinde dilüe edilerek 0.01 μM, 0.025 μM, 0.05 μM, 0.1 μM, 0.25 μM, 0.5 μM, 1 μM, 2.5 μM ve 5 μM konsantrasyonlarda deney mediumları hazırlanmıştır. Hücrelere uygulanan DMSO oranı, literatürde izin verilen şekilde, maksimum %0.5'tir. Ayrıca, bileşikler için çözücü olarak DMSO kullanıldığından deney mediumlarının içerdiği oranda DMSO ilave edilen kontrol grupları da oluşturulmuştur.

Deneylerde, hücre siklusunun S fazına etkili olduğu bilinen 5-Florourasil (5-FU), pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 5-FU, ilaveli RPMI-1640 içerisinde çözülerek hücrelere 1 μM, 5 μM, 10 μM, 15 μM, 20 μM, 25 μM ve 30 μM konsantasyonlarında uygulanmıştır.

3.2.4.Toksisite

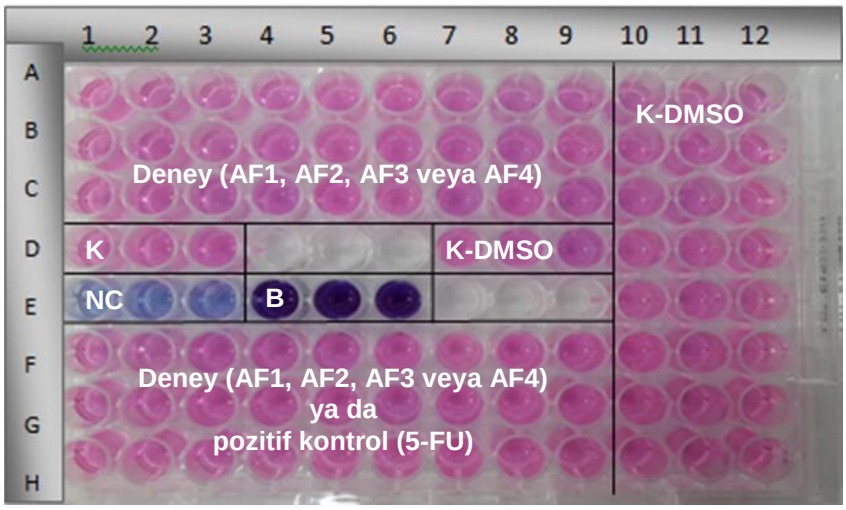
Deneylerde kullanılan bileşiklerin, sıçan prostat kanseri hücre soyu olan AT-2 veya MAT-LyLu hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olup olmadığı tripan mavisi kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için 35 mm çaplı steril petriler içerisine $3x10^4$ hücre ekilmiştir. Hücreler ekildikten sonraki 24. ve 48. saatlerde mikroskopla kontrolleri yapılmış ve kontrol grubu petrilerine normal büyüme mediumu, deney grubu petrilerine ise 5 μM konsantrasyonlarda yeni sentezlenmiş florlu asetofenon bileşikleri (1-4) içeren mediumlar eklenmiştir. Ayrıca, florlu asetofenon bileşikleri için çözücü olarak DMSO kullanıldığından DMSO içeren kontrol grubu da oluşturulmuştur. Hücrelerin ekilmesinden 48 saat sonra petrilerde bulunan medium çıkarılmış, 0.8 ml medium ile 0.2 ml % 4'lük tripan mavisi eklenerek 10 dk inkübe edilmiştir. 10 dk sonunda petrilerdeki tripan mavisi içeren medium çekilerek yeni medium eklenmiştir. İnverted mikroskopta, 40x objektifle petri başına 40 mikroskop alanında canlı ve ölü hücrelerin sayıları tespit edilerek bileşiklerin AT-2 veya MAT-Lylu hücrelerine toksik etkisi olup olmadığı belirlenmiştir. Bu deney üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.5.Hücre proliferasyonu

Bileşiklerin, hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi Alamar Blue (AB) yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla 96 kuyucuklu steril pleytlerin her bir kuyucuğuna $3x10^3$ AT-2 veya MAT-Lylu hücresi ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra, kontrol grubu kuyucuklarına normal büyüme mediumu; DMSO'lu kontrol grubu kuyucuklarına deney mediumlarının hazırlanmasında kullanılan oranlarda DMSO içeren mediumlar; pozitif kontrol grubu kuyucuklarına 1 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM ve 30 µM kosantrasyonlarında 5-FU içeren mediumlar; deney grubu kuyucuklarına ise 0.01 µM, 0.025 µM, 0.05 µM, 0.1 µM, 0.25 µM, 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM ve 5 µM konsantrasyonlarda AF1, AF2, AF3 veya AF4 içeren deney mediumları konulmuştur. Deney süresince hergün aynı saatte medium değiştirilmiştir. Belirlenen deney saatlerinde (ilk medium değişiminden 24, 48, 72 veya 96 saat sonra) kuyucuklardaki mediumlar çıkarılmadan, üretici firmanın önerisine göre, her kuyucuğa 10 µl alamar blue solüsyonu ilave edilmiştir. Pleytler folyoya sarılarak karanlıkta, 37 ^oC'de, 4 saat süre ile inkübe edilmiş; ardından, mikroplaka okuyucuda 570 ve 600 nm dalga boylarında absorbans ölçümleri yapılmıştır (Şekil 3.5.).

İki seri olarak planlanan deneylerde 1. seriye yukarıda belirtilen tüm konsantrasyonlar uygulanmış olup ilk medium değişiminden sonraki 24. ve 48. saatlerde absorbans ölçümleri yapılmıştır. 2. seride, bileşikler sadece en yüksek konsantrasyonda (5µM) uygulanmış ve absorbans ölçümleri, ilk medium değişiminden sonraki 24. 48. ve 72. saatlerde yapılmıştır. Deneyler en az üç kez tekrarlanmıştır.

Ölçümler sonucu elde edilen absorbans değerleri kullanılarak üretici firmanın belirttiği şekilde canlı hücre yoğunluğu (% indirgenme) hesaplanmıştır (ThermoFisher, datasheet, 2018):



Şekil 3.5. Hücrelerin Alamar blue (AB) ile 4 saatlik inkübasyonu sonrası oluşan görüntü.
K: Kontrol (Hücre + RPMI + AB),
NC: Negatif kontrol (RPMI + AB),
B: Blank (AB),
K-DMSO: Çözücülü kontrol (Hücre + DMSO ilaveli RPMI + AB),
Deney: (Hücre + İlaç ilaveli RPMI + AB)
Pozitif kontrol: (Hücre + 5-FU ilaveli RPMI + AB)

3.2.6.Mitoz indeksi (MI)

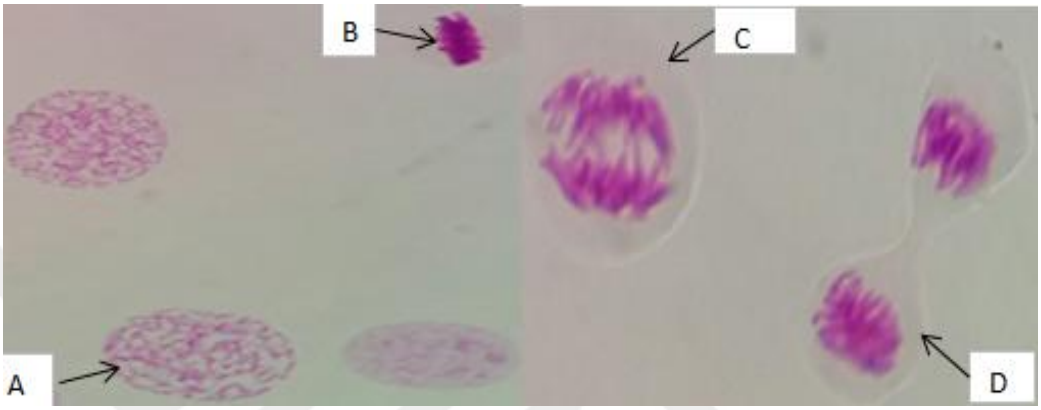
Yeni sentezlenmiş florlu asetofenon bileşiklerinin AT-2 ve MAT-LyLu hücrelerinin mitotik aktiviteleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, 12 kuyucuklu pleytlerin her kuyucuğuna 15 mm çapındaki bir yuvarlak lamel yerleştirilmiş ve her lamele 10^4 hücre ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra deney kuyucuklarına belirlenen konsantrasyonlarda (0.01µM, 0.25 µM ve 5 µM) deney mediumları, kontrol ve çözücülü kontrol kuyucuklarına ise sırasıyla normal büyüme mediumu ve deney mediumlarının hazırlandığı oranda DMSO içeren kontrol medyumları ilave edilerek 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Belirtilen sürelerin sonunda, lamellerdeki hücreler, asetik asit – etanol (1:3) ile 10 dk. fikse edilip 3 kez 5'er dk. % 70 etanol ile muamele edilmiştir. Lameller, hücreler üstte kalacak şekilde lamlara yapıştırılarak Feulgen boyama yöntemi (Bancroft, 1990) ile boyamaları gerçekleştirilmiştir. Feulgen boyama yönteminde preparatlar öncelikle 5 N hidroklorik asit içinde 1 saat tutularak hidroliz edilmiş daha sonra 1 saat Schiff ayracında bekletilerek boyama gerçekleştirilmiştir. Her preparatta ortalama 1000 hücre olmak üzere toplam 3000-5000 hücrede (C) profaz, metafaz, anafaz, ve telofaz evreleri (Şekil 3.6.) sayılarak mitotik hücre sayısı (n) tespit edilmiştir. Elde edilen

verilerden aşağıdaki formül (3.2) kullanılarak, mitoz indeksi (MI) değerleri (%) hesaplanmıştır (Özalpan 2001). Bu deney üç kez tekrarlanmıştır.

$$MI = (n/C) \times 100 \quad (3.2)$$

n: Mitotik hücre sayısı

C: Toplam hücre sayısı



Şekil 3.6. A: Profaz, B:Metafaz, C: Anafaz, D:Telofaz evreleri

3.2.7. İstatistiksel Analizler

Deneylerden elde edilen veriler, aritmetik ortalamalar ve her bir ortalama değerin standart hatası (±SH) şeklinde verilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı, Excel (Office 2010) programında ANOVA varyans analizi, student *t*-testi ve yüzde değerlerin karşılaştırılması testi kullanılarak değerlendirilmiş; anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

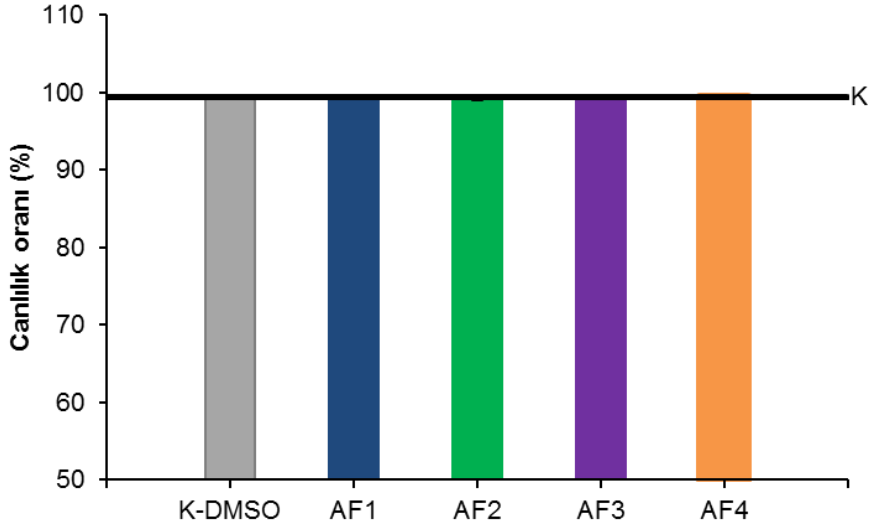
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1.Araştırma bulguları

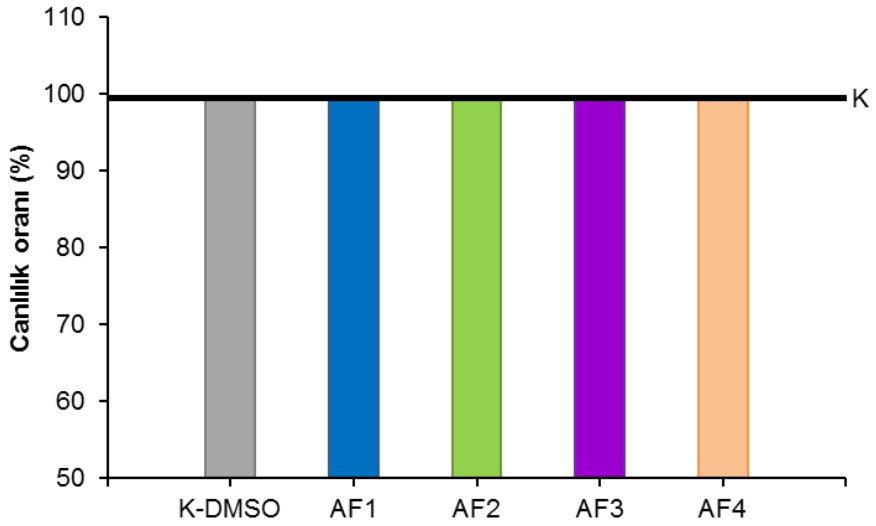
Bu çalışmada yeni sentezlenmiş Florlu Asetofenon bileşikleri (AF1, AF2, AF3, AF4) nin Dunning modeli sıçan prostat kanseri hücre soyları olan AT-2 ve MAT-Lylu hücrelerinin çoğalmaları üzerindeki etkileri Bölüm 3.2.5'te anlatılan şekilde alamar blue yöntemi ile incelenmiştir. Bunun için öncelikle bileşiklerin toksisitesi belirlendikten sonra seçilen konsantrasyonlarda 24, 48, 72 ve 96 saat gibi sürelerle uygulanarak hücrelerin çoğalmaları ve mitotik aktiviteleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

4.1.1. Toksisite analizi sonuçları

Bileşiklerin çözünürlükleri ve çözücü olarak kullanılan DMSO konsantrasyonunun sınırlayıcılığı gibi nedenlerle, deneylerde, bileşikler hücrelere en yüksek 5 µM konsantrasyonda uygulanmıştır. Tripan mavisi kullanılarak Bölüm 3.2.4'te anlatılan şekilde gerçekleştirilen toksisite analizi sonuçları incelendiğinde AF1, AF2, AF3 ve AF4 bileşiklerinin hem AT-2 (Şekil 4.1.) hem de MAT-LyLu (Şekil 4.2.) hücreleri üzerinde toksik bir etki oluşturmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).



Şekil 4.1. Toksisite grafiği: AT-2 hücreleri üzerine florlu asetofenon bileşikleri (AF1, AF2, AF3, AF4) nin 5 µM konsantrasyonda uygulanması sonucu elde edilen % canlılık oranları. K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol



Şekil 4.2. Toksisite grafiği: MAT-LyLu hücreleri üzerine florlu asetofenon bileşikleri (AF1, AF2, AF3, AF4) nin 5 µM konsantrasyonda uygulanması sonucu elde edilen % canlılık oranları. K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol

4.1.2. Dimetilsülfoksit (DMSO)'in etkileri

Bileşikler için çözücü olarak kullanılan DMSO, sahada izin verilen %0.05 oranını aşmayacak oranda kullanılmıştır. Bu orandaki DMSO'nun hem AT-2 hem de MAT-LyLu hücreleri üzerinde toksik etki oluşturmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.1. ve 4.2.). Hücre proliferasyonunun araştırıldığı analizler sonucunda DMSO'lu kontrol gruplarından elde edilen veriler kontrol grubu verileri ile karşılaştırılmış ve istatistiksel bakımdan anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Benzer şekilde mitotik indeks verileri de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel bakımdan anlamlı fark bulunmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3. – 4.24) (Şekil 4.5. – 4. 26).

4.1.3. 5-Fluorourasil (5-FU)'in etkileri

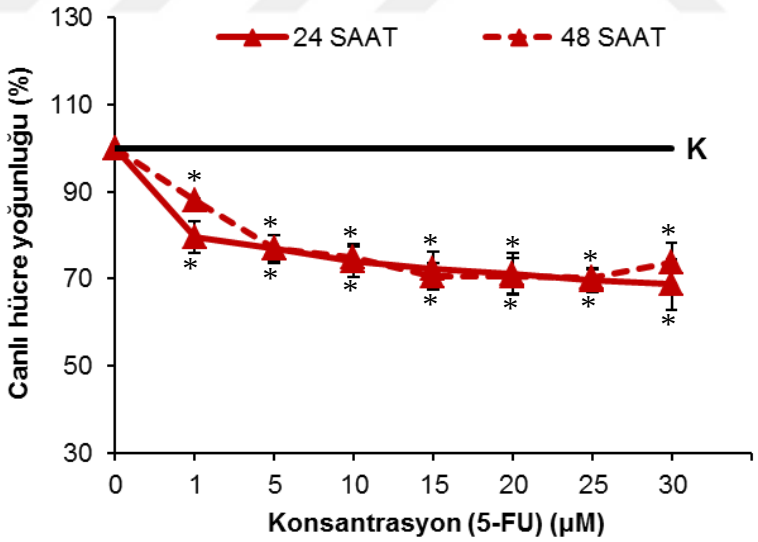
Pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU, AT-2 veya MAT-LyLu hücreleri üzerine 1, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 µM kosantrasyonlarda, 24 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır. Bölüm 3.2.5'te anlatılan şekilde alamar blue analizi yapılarak absorbans değerleri kaydedilmiştir. Elde edilen veriler kontrol grubu ile istatistiksel bakımdan karşılaştırılmış olup 5-FU'nun çalışılan tüm konsantrasyonlarda hem AT-2 hem de MAT-LyLu hücre proliferasyonunu anlamlı ($p<0.05$) şekilde inhibe ettiği

belirlenmiştir. Deneyler sonucu hesaplanan canlı hücre yoğunlukları (%) ve kontrol grubuna göre inhibisyon oranları (%) Çizelge 4.1. (AT-2) ve Çizelge 4.2.'de (MAT-LyLu) sunulmuştur. Çizelge değerleri kullanılarak oluşturulan canlı hücre yoğunluklarının konsantrasyona bağlı grafikleri de Şekil 4.3. (AT-2) ve 4.4.'te (MAT-LyLu) gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. AT-2 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda 5-FU uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunluğu (%) ve inhibisyon oranları (%)

		Canlı hücre yoğunluğu (%)		İnhibisyon (%)	
		24. saat	48.saat	24. saat	48. saat
Kontrol		100.00±0.00	100.00±0.00	-	-
5-Fluorourasil	**1 µM**	79.67±3.65*	87.94±0.46*	20.32*	12.05*
	5 µM	76.94±3.21*	76.96±2.94*	23.05*	23.03*
	10 µM	73.96±3.46*	74.90±3.01*	26.03*	25.09*
	15 µM	72.21±4.04*	70.69±3.07*	27.78*	29.30*
	20 µM	71.28±4.76*	70.58±4.34*	28.71*	29.41*
	25 µM	69.62±2.57*	70.18±2.37*	30.37*	29.81*
	30 µM	68.78±5.80*	73.65±4.76*	31.21*	26.34*

*:Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

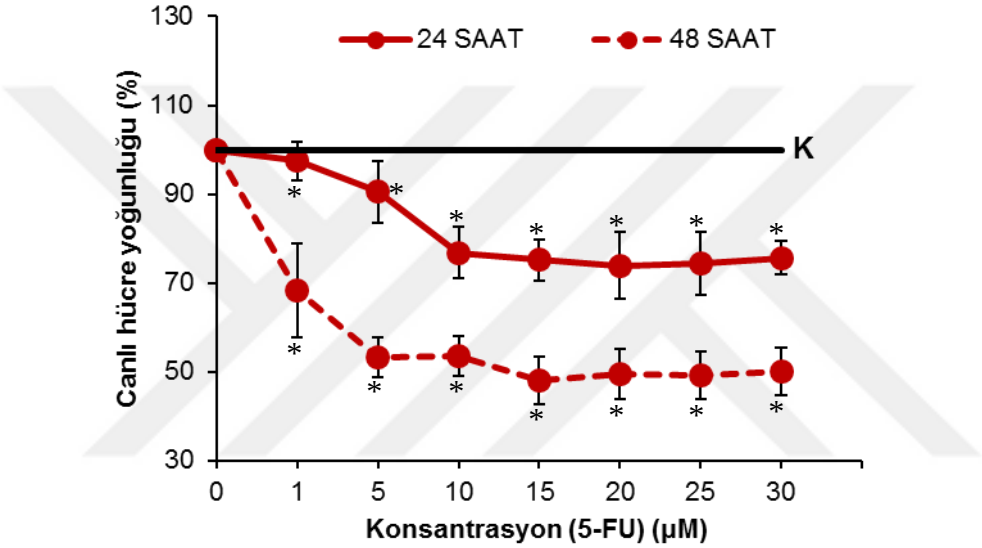


Şekil 4.3. AT-2 hücreleri üzerine 5-FU'nun farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%) konsantrasyona bağlı grafiği (±SH)
*:Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

Çizelge 4.2. MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda 5-FU uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunluğu (%) ve inhibisyon oranları (%)

		Canlı hücre yoğunluğu (%)		İnhibisyon (%)	
		24. saat	48.saat	24. saat	48. saat
Kontrol		100.00±0.00	100.00±0.00	-	-
5-Fluorourasil	**1 µM**	97.50±4.31*	68.32±10.47*	2.47	31.67*
	5 µM	90.52±7.01*	53.34±4.38*	9.47	46.65*
	10 µM	76.88±5.85*	53.64±4.53*	23.11*	46.35*
	15 µM	75.18±4.62*	48.19±5.39*	24.81*	51.80*
	20 µM	74.00±7.41*	49.63±5.57*	25.99*	50.36*
	25 µM	74.46±7.12*	49.21±5.38*	25.53*	50.78*
	30 µM	75.72±3.8*	50.20±5.40*	24.27*	49.79*

*:Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)



Şekil 4.4. MAT-LyLu hücreleri üzerine 5-FU'nun farklı konsantrasyonlarda uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%) konsantrasyona bağlı grafiği (±SH)
*:Kontrol grubuna göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

4.1.4. N,N–Etilen–bis–5 floro asetofenon (AF1) bileşiğinin etkileri

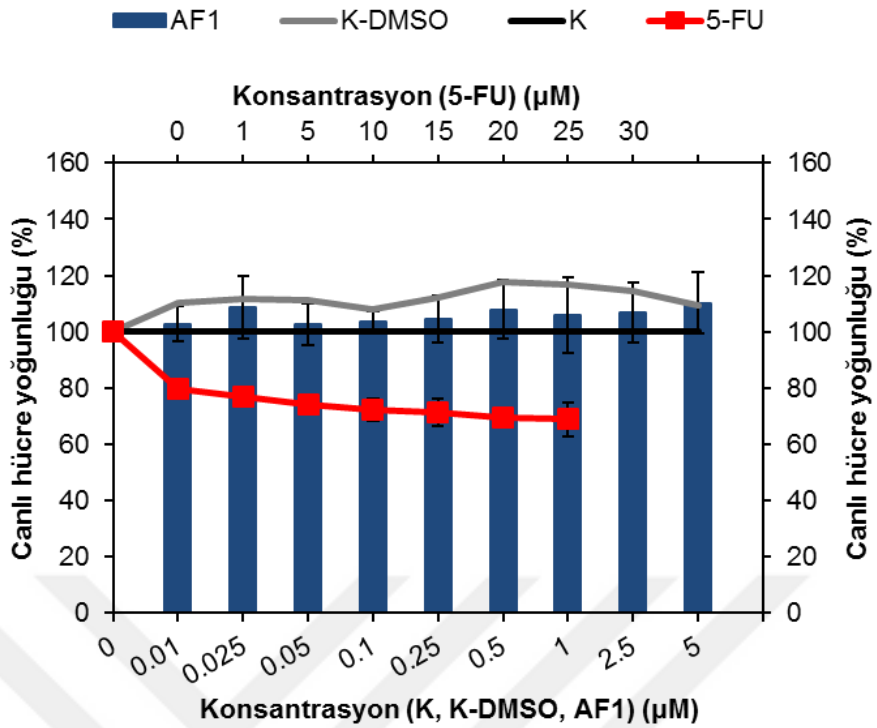
4.1.4.1.Hücre proliferasyonu

Florlu asetofenon türevi N,N–Etilen–bis–5 floro asetofenon ($C_{18}H_{18}O_2N_2F_2$) (AF1) bileşiğinin, AT-2 veya MAT-LyLu hücreleri üzerine 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 ve 5 µM konsantrasyonlarda AF1 içeren deney mediumları, 24 ve 48 saat boyunca uygulanmış ve belirtilen süreler sonunda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak canlı hücre yoğunlukları (%) hesaplanmıştır.

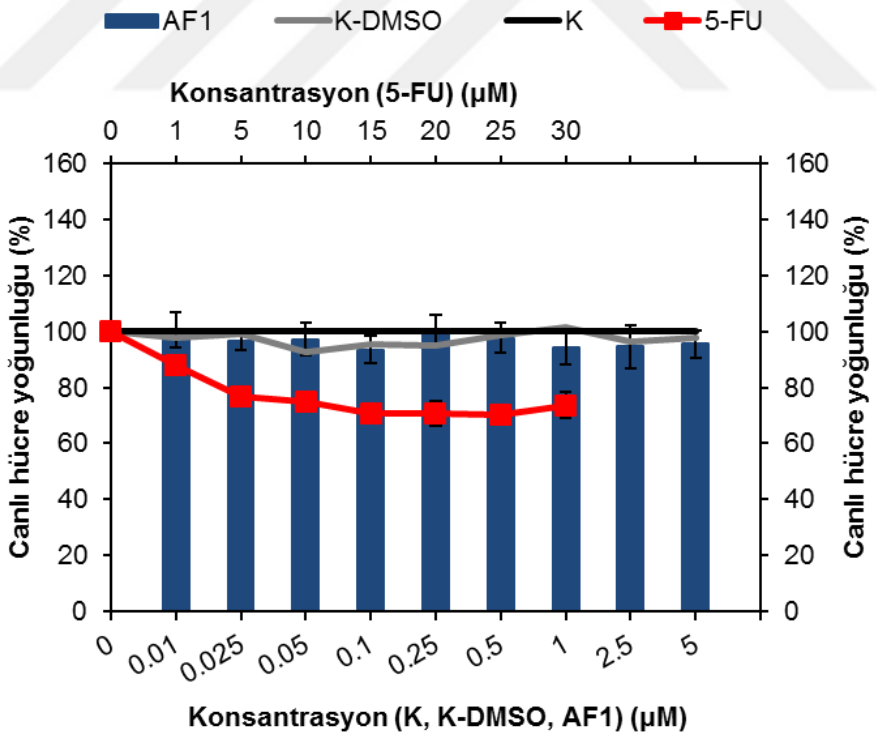
AT-2 hücreleri üzerindeki etkiler: Hesaplanan canlı hücre yoğunlukları (%) (Çizelge 4.3.) kullanılarak çizilen grafik Şekil 4.5.'te izlenmektedir. Elde edilen sonuçlara göre AF1'in 24 saat süreyle uygulanması sonucunda canlı hücre yoğunlukları en yüksek konsantrasyonda (5 µM) dahi 110.24±10.7 oranı ile kontrole benzer [K-DMSO (5 µM): 109.54±10.05] bulunmuştur. Bileşik uygulamasına 48 saat süreyle devam edildiğinde farklı konsantrasyonda %1.17 ile %7.33 arasında değişen oranlarda inhibisyonlar tespit edilmekle birlikte, veriler istatistiksel bakımdan değerlendirildiğinde aradaki farkın anlamlı olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. AT-2 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF1 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%)

		Canlı hücre yoğunluğu (%)		İnhibisyon (%)	
		24. saat	**48.saat**	**24. saat**	**48. saat**
Kontrol		100.00±0.00	100.00±0.00	-	-
K-DMSO	**0.01 µM**	110.38±10.46	97.49±6.96	-	2.50
	0.025 µM	111.6±14.18	99.25±6.67	-	0.74
	0.05 µM	111.05±14.31	92.79±12.32	-	7.20
	0.1 µM	108.10±5.71	95.60±6.00	-	4.39
	0.25 µM	112.12±8.71	94.89±5.63	-	5.10
	0.5 µM	117.72±10.83	98.84±7.08	-	1.15
	1 µM	116.75±10.47	101.34±7.58	-	-
	2.5 µM	114.42±10.89	96.52±5.61	-	3.47
	5 µM	109.54±10.05	97.57±7.47	-	2.42
AF1	**0.01 µM**	102.79±6.13	100.54±6.25	7.59	-
	0.025 µM	108.79±11.0	96.50±3.39	2.86	2.74
	0.05 µM	102.57±7.28	97.23±5.66	8.48	-
	0.1 µM	103.67±3.66	93.43±4.78	4.43	2.17
	0.25 µM	104.47±8.35	100.72±4.97	7.64	-
	0.5 µM	107.84±10.3	97.66±5.47	9.88	1.17
	1 µM	105.93±13.5	94.03±5.85	10.81	7.33
	2.5 µM	106.80±10.4	94.62±7.68	7.62	1.90
	5 µM	110.24±10.7	95.57±4.87	-	1.99



(A) 24 saat



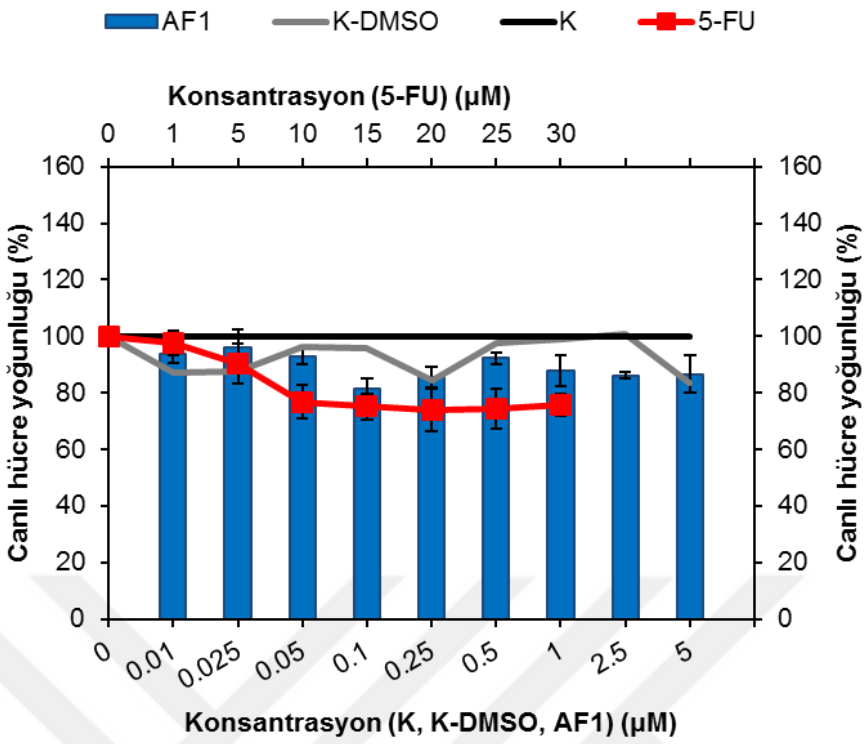
(B) 48 saat

Şekil 4.5. AT-2 hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol, 5-FU: Pozitif kontrol

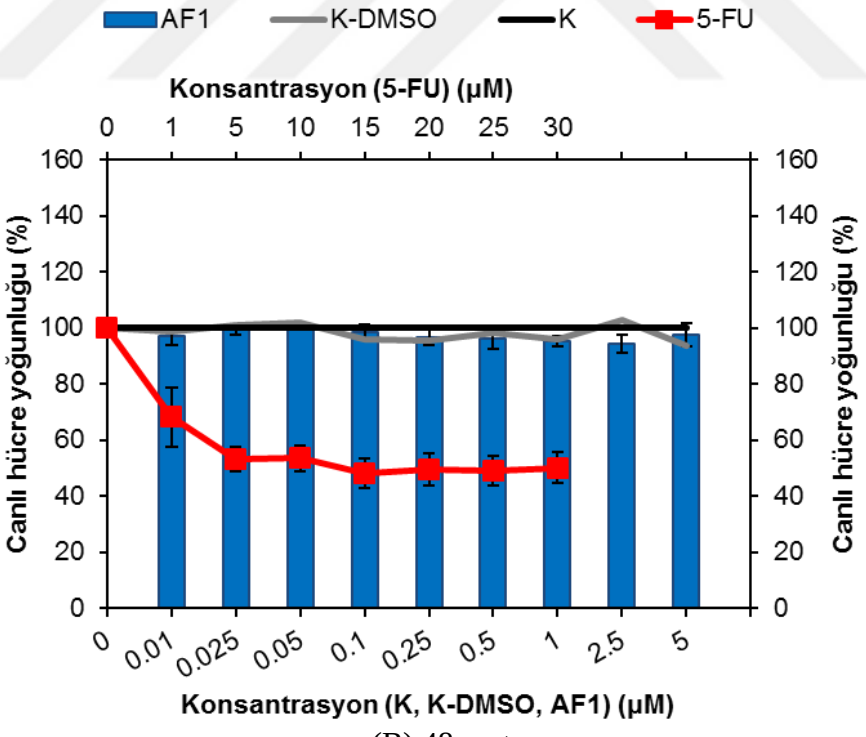
MAT-LyLu hücreleri üzerindeki etkiler: AF1 bileşiğinin MAT-LyLu hücreleri üzerine 24 ve 48 saat sürelerle uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) Çizelge 4.4.'te ve bu verilerle çizilen grafikler ise Şekil 4.6.'da verilmiştir. Çizelge ve grafikler incelendiğinde, AF1'in MAT-LyLu hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı ($p>0.05$) görülmektedir.

Çizelge 4.4. MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF1 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%)

		Canlı hücre yoğunluğu (%)		İnhibisyon (%)	
		24. saat	48.saat	24. saat	48. saat
Kontrol		100.00±0.00	100.00±0.00	-	-
K-DMSO	**0.01 µM**	86.96±5.71	98.59±1.15	13.03	1.40
	0.025 µM	87.59±7.49	100.92±2.61	12.40	-
	0.05 µM	96.33±0.84	102.15±1.98	3.66	-
	0.1 µM	95.88±6.05	95.94±3.50	4.11	4.05
	0.25 µM	84.51±5.14	95.70±1.64	15.48	4.29
	0.5 µM	97.52±7.37	98.39±2.66	2.47	1.60
	1 µM	98.84±4.77	96.22±5.46	1.15	3.77
	2.5 µM	100.74±6.24	102.96±1.85	-	-
	5 µM	83.54±3.02	93.53±3.92	16.45	6.46
AF1	**0.01 µM**	93.84±3.38	97.19±3.06	-	1.39
	0.025 µM	96.06±6.36	99.57±1.73	-	1.35
	0.05 µM	92.70±2.73	100.0±0.63	3.63	2.15
	0.1 µM	81.35±3.80	98.51±2.89	14.53	-
	0.25 µM	85.41±3.65	96.74±2.88	-	-
	0.5 µM	92.30±2.03	96.34±3.67	5.22	2.05
	1 µM	87.73±5.36	95.37±1.80	11.10	0.85
	2.5 µM	86.20±1.05	94.33±3.24	14.53	8.63
	5 µM	86.69±6.60	97.55±4.27	-	-



(A) 24 saat



(B) 48 saat

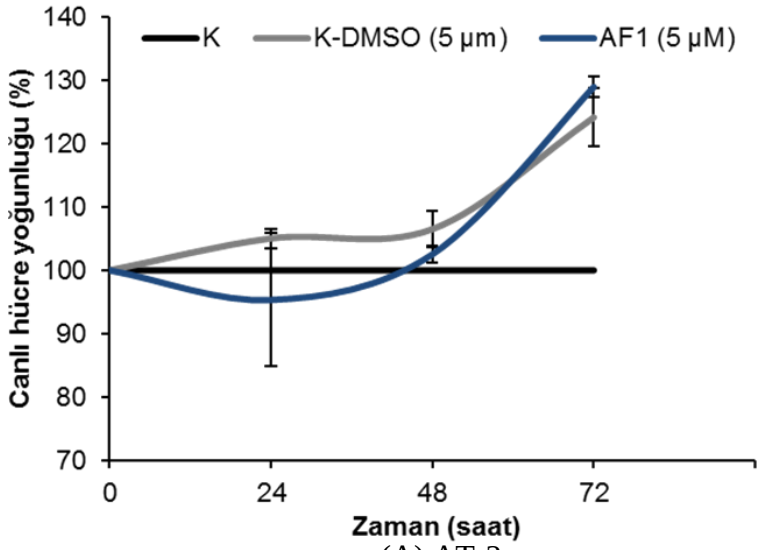
Şekil 4.6. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol, 5-FU: Pozitif kontrol

İlaç uygulama süresinin etkileri: AF1 bileşiğinin, çalışılan konsantrasyonlarda hem AT-2 hem de MAT-LyLu hücrelerinin proliferasyonu üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bunun üzerine bileşik, deneylerde kullanılan en yüksek konsantrasyonda (5 µM) daha uzun sürelerle uygulanmış (24, 48 ve 72 saat) ve tekrarlayan dozun hücre çoğalması üzerinde etkisi olup olmadığı da araştırılmıştır.

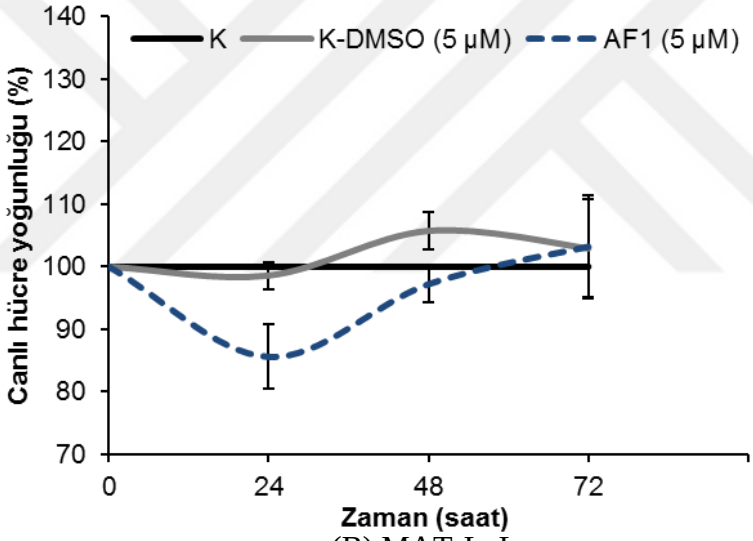
Hücre ekiminden 24 saat sonra ilk medium değişiminin gerçekleştirildiği, ilk medium değişiminden sonraki 24, 48 ve 72. saatlerde canlı hücre yoğunluklarının ölçüldüğü deneylerden elde edilen veriler (Çizelge 4.5.) ile çizilen grafikler Şekil 4.7.'de görülmektedir. AF1 bileşiğinin uygulama süresinin uzamasıyla AT-2 hücre proliferasyonunun artarak 128.9±1.53 olduğu gözlemlenmiştir. Ancak bu artışın istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Bileşiğin 72 saat süreyle uygulanması sonucunda canlı MAT-LyLu hücre yoğunluğu (%) ise kontrole benzer bulunmuştur.

Çizelge 4.5. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH)

	Canlı hücre yoğunluğu (%) AT-2			**Canlı hücre yoğunluğu (%) MAT-LyLu**		
	24. saat	**48.saat**	**72. saat**	**24. saat**	**48.saat**	**72. saat**
Kontrol	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00
K-DMSO (5 µM)	105.0±1.54	106.5±2.9	124.1±4.66	98.59±2.19	105.7±3.03	102.9±7.87
AF1 (5 µM)	95.3±10.54	102.5±1.27	128.9±1.53	85.58±5.10	97.19±2.81	103.2±8.22



(A) AT-2



(B) MAT-LyLu

Şekil 4.7. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol

4.1.4.2.Mitotik aktivite

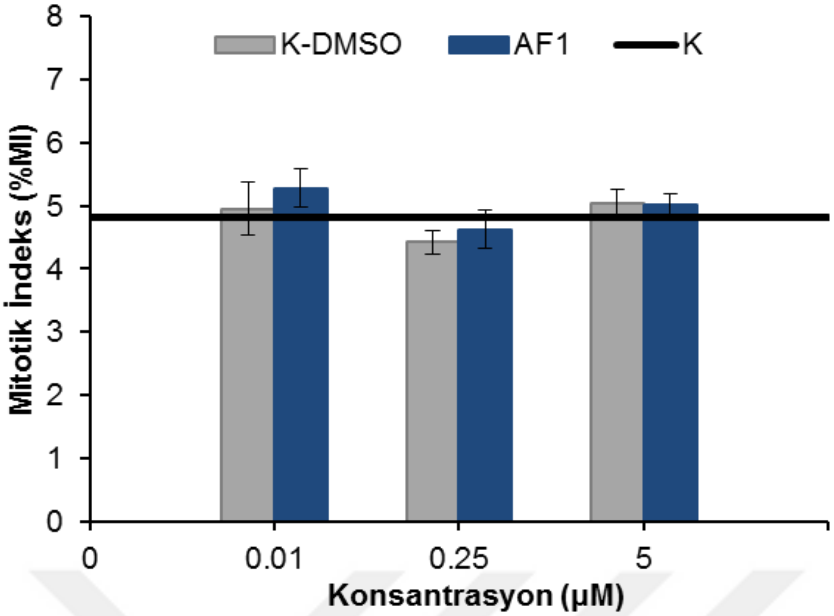
N,N–Etilen–bis–5 floro asetofenon ($C_{18}H_{18}O_2N_2F_2$) (AF1) bileşiğinin, AT-2 veya MAT-LyLu hücrelerinin mitotik aktiviteleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla; 0.01 µM, 0.25 µM ve 5 µM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmıştır. Uygulama sürelerinin sonunda Bölüm 3.2.6'da anlatılan şekilde

hazırlanan preparatlarda mitotik hücre sayıları belirlenerek formül (3.3) ile mitotik indeks değerleri hesaplanmıştır.

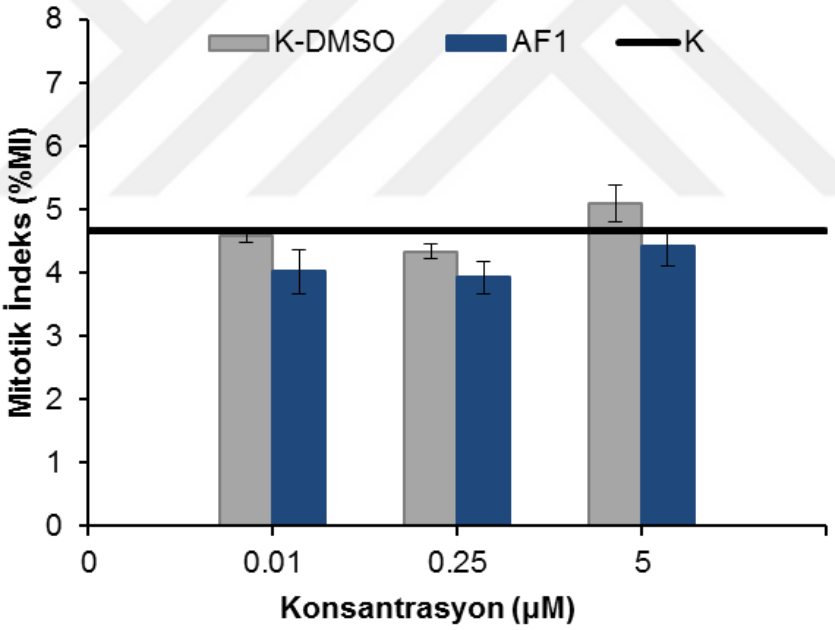
AT-2 hücreleri üzerindeki etkiler: Deneylerden elde edilen veriler Çizelge 4.6.'da sunulmuş olup bu veriler ile grafik (Şekil 4.8.) çizilmiştir. Çizelge değerleri incelendiğinde normal büyüme mediumunun uygulandığı kontrol gubunda AT-2 hücrelerinin mitotik indeks değeri 24. saatte 4.82±0.32, 48. saatte ise 4.67 ± 0.31 olarak tespit edilmiştir. Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun hücrelerin mitotik aktiviteleri üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadıkları ($p>0.05$) görülmüştür. AF1 bileşiğinin, deneylerde kullanılan en düşük konsantrasyonda (0.01 µM) 48. saat süreyle uygulanması sonucunda, kontrol grubunda (K-DMSO) 4.59±0.12 olan mitotik indeksin azalarak 4.02±0.35 olduğu belirlenmiştir. En yüksek konsantrasyonda ise hem 24 hem de 48 saatlik uygulama sonucunda mitotik indeksin azaldığı gözlemlenmiştir. Ancak yapılan değerlendirmede deney ve kontrol grupları arasındaki farkların istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır.

Çizelge 4.6. AT-2 hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH)

	Mitoz İndeksi (%)		**İnhibisyon (%)**	
	24. saat	**48.saat**	**24. saat**	**48.saat**
Kontrol	4.82±0.32	4.67±0.31	--	--
K-DMSO (0.01 µM)	4.96±0.43	4.59±0.12	--	1.70
K-DMSO (0.25 µM)	4.43±0.18	4.33±0.11	8.18	7.20
K-DMSO (5 µM)	5.05±0.20	5.09±0.29	--	--
AF1 (0.01 µM)	5.28±0.31	4.02±0.35	--	12.44
AF1 (0.25 µM)	4.62±0.31	4.36±0.26	--	--
AF1 (5 µM)	5.01±0.17	4.42±0.30	0.73	13.29



(A) 24 saat



(B) 48 saat

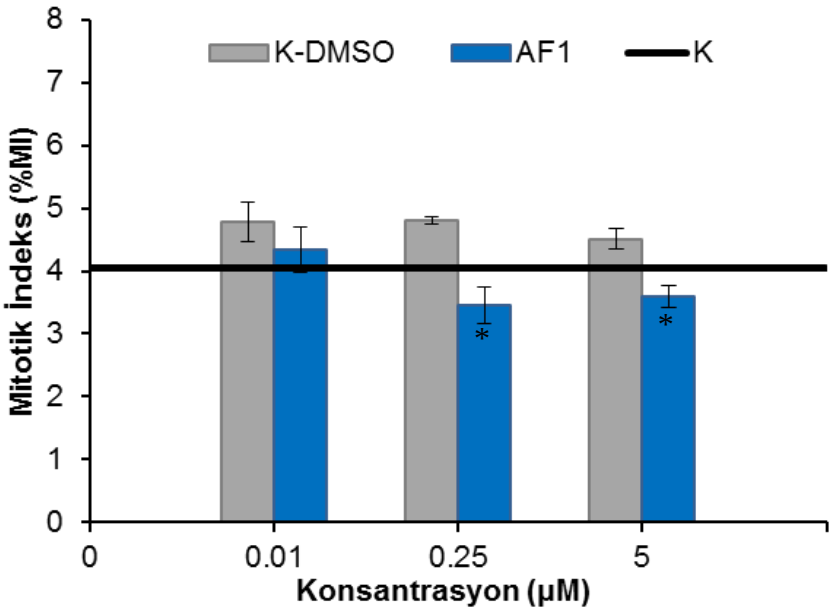
Şekil 4.8. AT-2 hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol

MAT-LyLu hücreleri üzerindeki etkiler: AF1 bileşiği, MAT-LyLu hücreleri üzerine 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmış ve hücrelerin mitotik aktiviteleri üzerinde oluşturduğu etki incelenmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.7.'de, bu veriler ile

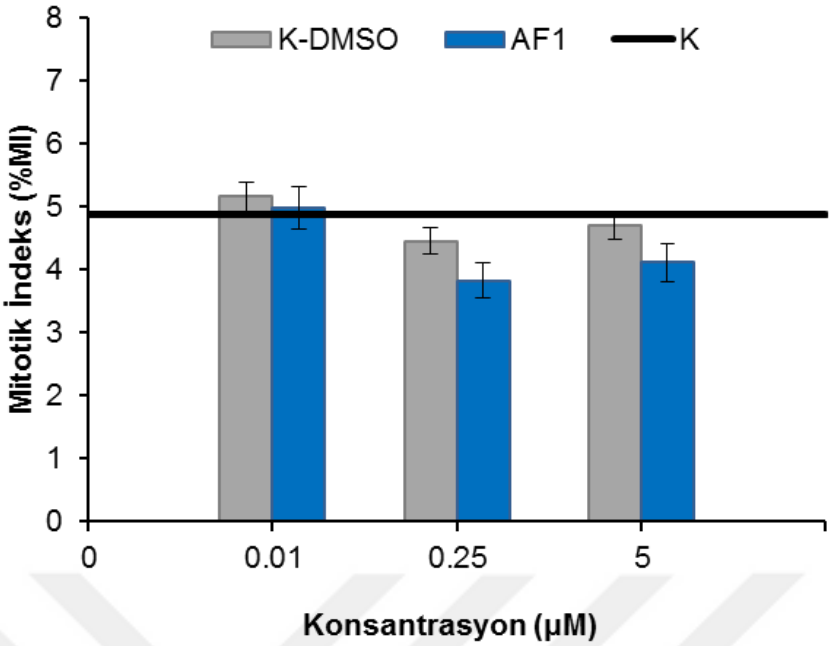
çizilen grafik ise Şekil 4.9.'da görülmektedir. Çizelge ve grafikler incelendiğinde MAT-LyLu hücrelerin mitoz indeksi değerleri 24 saatte 4.05±0.14; 48 saatte ise 4.86±0.22 olarak belirlenmiştir. AF1 bileşiğinin 0.25 ve 5 µM'lık konsantrasyonlarda 24 saat süreyle uygulanması sonucunda ise hücrelerin mitotik aktivitesinin sırasıyla % 28.00 ve % 20.46 oranlarında azaldığı görülmektedir. Bu azalma istatistik bakımdan anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. Uygulama süresinin 48 saate uzamasıyla inhibisyonun devam ettiği ancak istatistiksel bakımdan anlamın ortadan kalktığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH)

	Mitoz İndeksi (%)		**İnhibisyon (%)**	
	24. saat	**48.saat**	**24. saat**	**48.saat**
Kontrol	4.05±0.14	4.86±0.22	--	--
K-DMSO (0.01 µM)	4.78±0.32	5.16±0.23	--	--
K-DMSO (0.25 µM)	4.80±0.05	4.45±0.21	--	8.38
K-DMSO (5 µM)	4.51±0.16	4.70±0.22	--	3.23
AF1 (0.01 µM)	4.35±0.36	4.98±0.34	9.08	3.37
AF1 (0.25 µM)	3.46±0.29*	3.82±0.28	28.00*	14.12
AF1 (5 µM)	3.59±0.18*	4.11±0.29	20.46*	12.64



(A) 24 saat



(B) 48 saat

Şekil 4.9. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH).
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol
*: K-DMSO'ya göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

4.1.5. N,N–Propilen–bis–3,5 di floro asetofenon (AF2) bileşiğinin etkileri

4.1.5.1.Hücre proliferasyonu

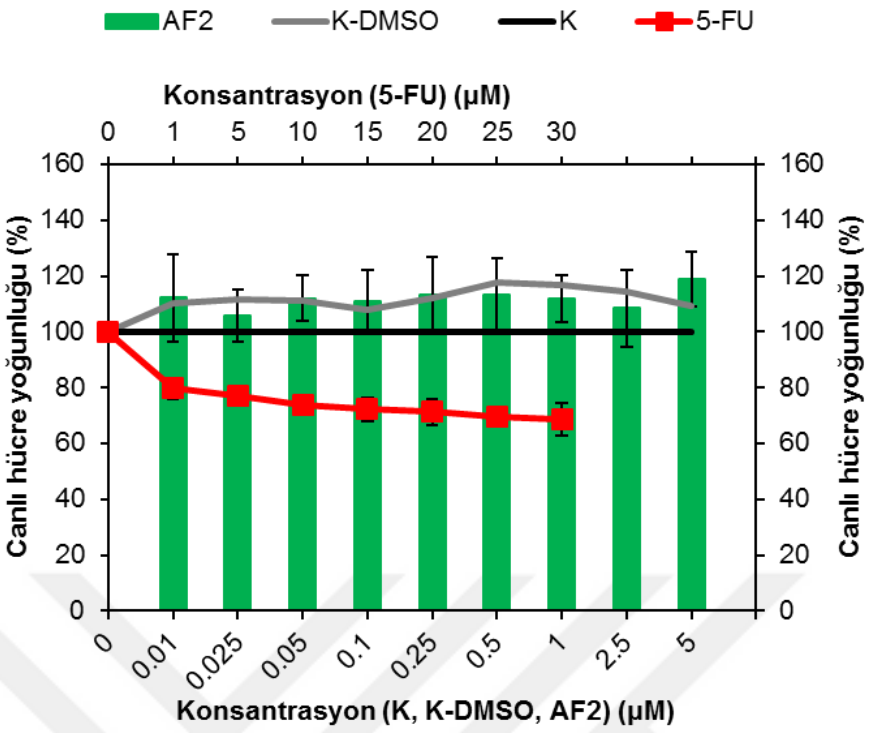
Yeni sentezlenmiş N,N–Propilen–bis–3,5 di floro asetofenon ($C_{19}H_{18}O_2N_2F_4$) (AF2) bileşiğinin, AT-2 veya MAT-LyLu hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri Bölüm 3.2.5'te anlatılan şekilde uygulanan alamar blue yöntemi ile belirlenmiştir. 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 ve 5 µM konsantrasyonlarda AF2 içeren deney mediumları, 24 ve 48 saat boyunca hücrelere uygulanmış ve belirtilen süreler sonunda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak canlı hücre yoğunlukları (%) hesaplanmıştır.

AT-2 hücreleri üzerindeki etkiler: AF2 bileşiğinin AT-2 hücreleri üzerine 24 ve 48 saat sürelerle uygulanması sonucunda elde edilen absorbans değerlerinden canlı hücre yoğunlukları hesaplanmış ve Çizelge 4.8.'de gösterilmiştir. Bu veriler ile canlı hücre yoğunluklarının konsantrasyona karşı grafiği çizilmiştir (Şekil 4.10.).

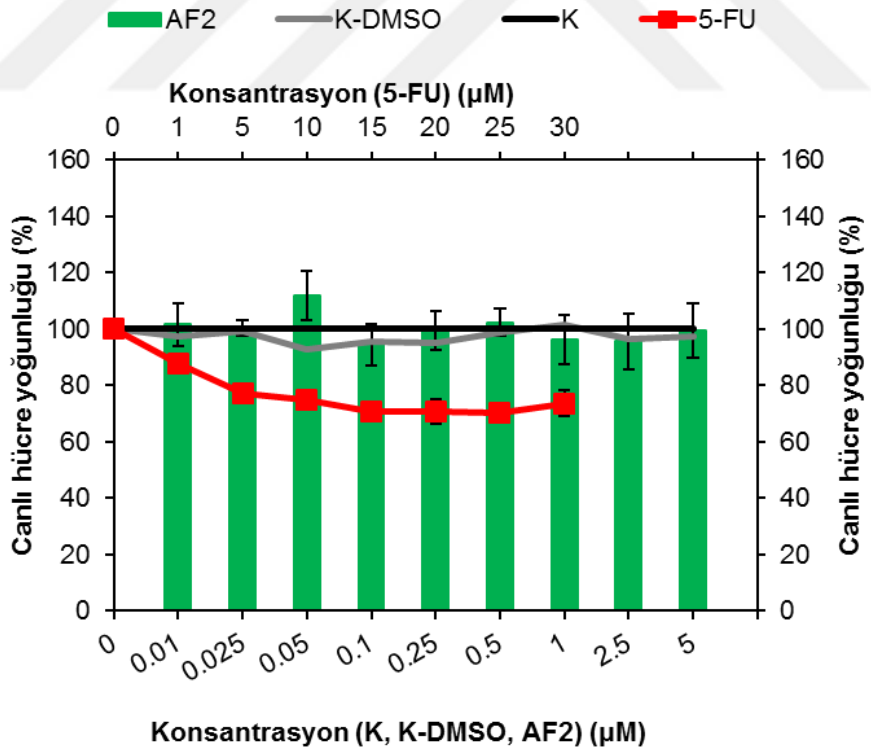
Çizelge (4.8.) ve grafik (Şekil 4.10.) incelenmiş ve bazı konsantrasyonlarda, canlı hücre yoğunluğunda zayıf bir azalma izlenmiş; ancak istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre deney ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. AT-2 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF2 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%)

		Canlı hücre yoğunluğu (%)		İnhibisyon (%)	
		24. saat	48.saat	24. saat	48. saat
Kontrol		100.0±0.00	100.0±0.00	-	-
K-DMSO	**0.01 µM**	110.38±10.46	97.49±6.96	-	2.50
	0.025 µM	111.66±14.18	99.25±6.67	-	0.74
	0.05 µM	111.05±14.31	92.79±12.32	-	7.20
	0.1 µM	108.10±5.71	95.60±6.00	-	4.39
	0.25 µM	112.12±8.71	94.89±5.63	-	5.10
	0.5 µM	117.72±10.83	98.84±7.08	-	1.15
	1 µM	116.75±10.47	101.34±7.58	-	-
	2.5 µM	114.42±10.89	96.52±5.61	-	3.47
	5 µM	109.54±10.05	97.57±7.47	-	2.42
AF2	**0.01 µM**	112.16±15.6	101.59±7.49	-	-
	0.025 µM	105.97±9.35	100.27±2.87	5.68	-
	0.05 µM	112.03±8.22	111.87±8.79	-	-
	0.1 µM	111.11±11.1	94.52±7.38	-	1.08
	0.25 µM	113.43±12.9	99.53±6.96	-	-
	0.5 µM	113.42±8.56	102.40±4.66	4.30	-
	1 µM	111.91±13.8	96.17±8.82	4.84	5.17
	2.5 µM	108.39±10.4	95.55±9.80	6.03	0.95
	5 µM	118.84±9.88	99.39±9.60	-	-



(A) 24 saat



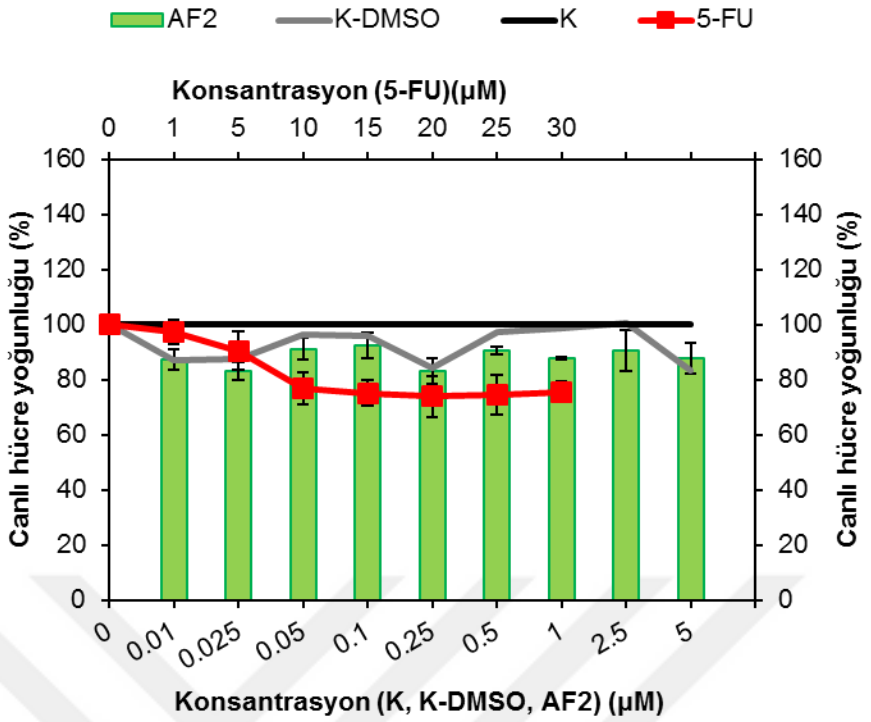
(B) 48 saat

Şekil 4.10. AT-2 hücreleri üzerine AF2 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda, 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol, 5-FU: Pozitif kontrol

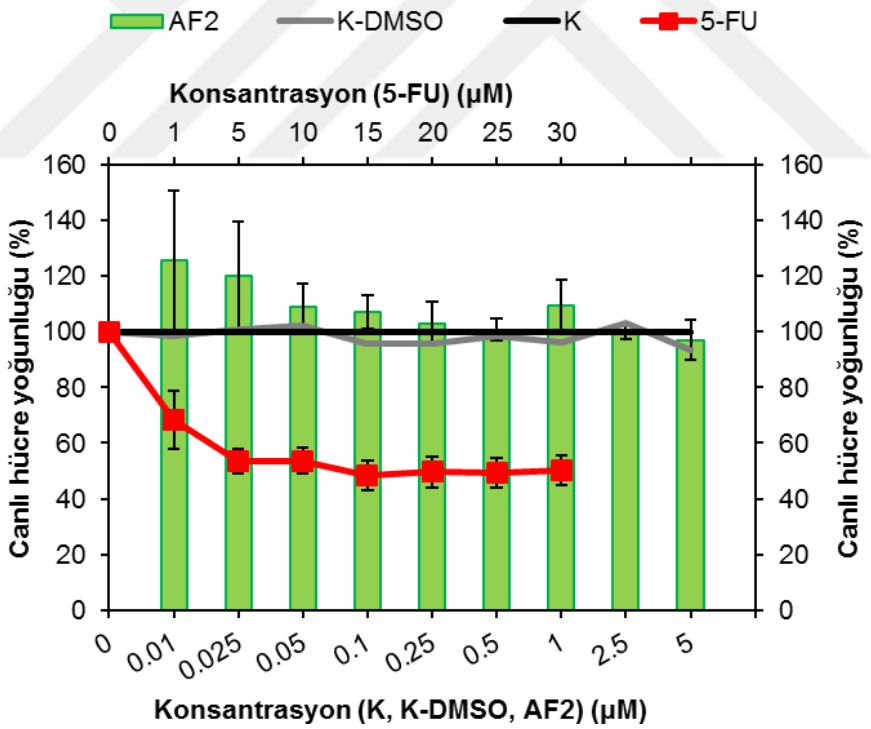
MAT-LyLu hücreleri üzerindeki etkiler: AF2 bileşiğinin, MAT-LyLu hücreleri üzerine 24 ve 48 saat sürelerle uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) çizelge halinde (Çizelge 4.9.) sunulmuş ve bu verilerle çizilen grafikler ise Şekil 4.11.'de gösterilmiştir. Elde edilen veriler ve çizilen grafikler incelenmiş olup bazı konsantrasyonlarda uygulanan AF2'nin MAT-LyLu hücre proliferasyonunu değişen oranlarda azalttığı gözlemlenmekle birlikte bu azalışların istatistik bakımdan anlamlı olmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF2 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%)

		Canlı hücre yoğunluğu (%)		İnhibisyon (%)	
		24. saat	48.saat	24. saat	48. saat
Kontrol		100.0±0.00	100.0±0.00	-	-
K-DMSO	**0.01 µM**	86.96±5.71	98.59±1.15	-	-
	0.025 µM	87.59±7.49	100.92±2.61	13.03	1.40
	0.05 µM	96.33±0.84	102.15±1.98	12.40	-
	0.1 µM	95.88±6.05	95.94±3.50	3.66	-
	0.25 µM	84.51±5.14	95.70±1.64	4.11	4.05
	0.5 µM	97.52±7.37	98.39±2.66	15.48	4.29
	1 µM	98.84±4.77	96.22±5.46	2.47	1.60
	2.5 µM	100.74±6.24	102.96±1.85	1.15	3.77
	5 µM	83.54±3.02	93.53±3.92	-	-
AF2	**0.01 µM**	87.38±3.76	125.62±25.2	-	-
	0.025 µM	83.16±3.16	120.13±19.6	4.42	-
	0.05 µM	91.30±4.01	108.816±8.56	5.03	-
	0.1 µM	92.61±4.61	107.19±6.01	2.37	-
	0.25 µM	83.35±4.71	103.13±7.64	1.15	-
	0.5 µM	90.83±1.40	100.76±4.07	6.68	-
	1 µM	87.93±0.53	109.41±9.35	10.91	-
	2.5 µM	90.58±7.50	99.79±2.58	10.15	3.17
	5 µM	88.03±5.57	97.02±7.19	-	-



(A) 24 saat



(B) 48 saat

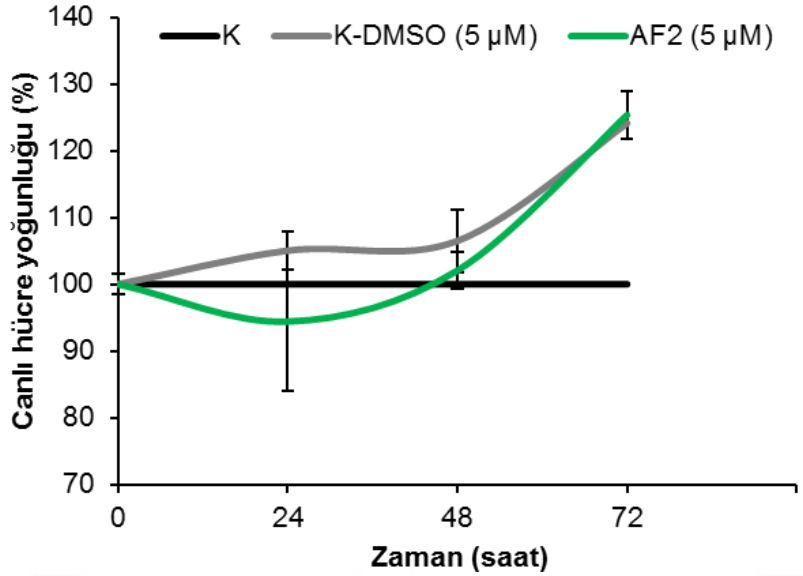
Şekil 4.11. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF2 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda, 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol, 5-FU: Pozitif kontrol

İlaç uygulama süresinin etkileri: AT-2 ve MAT-LyLu hücrelerinin çoğalması üzerinde AF2 bileşiğinin 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 μM konsantrasyonlarda anlamlı bir değişiklik oluşturmaması nedeniyle, deneylerde kullanılan en yüksek konsantrasyonda (5 μM) AF2'nin, uygulama süresinin uzatılması sonucunda hücre çoğalması üzerinde oluşturacağı etki araştırılmıştır.

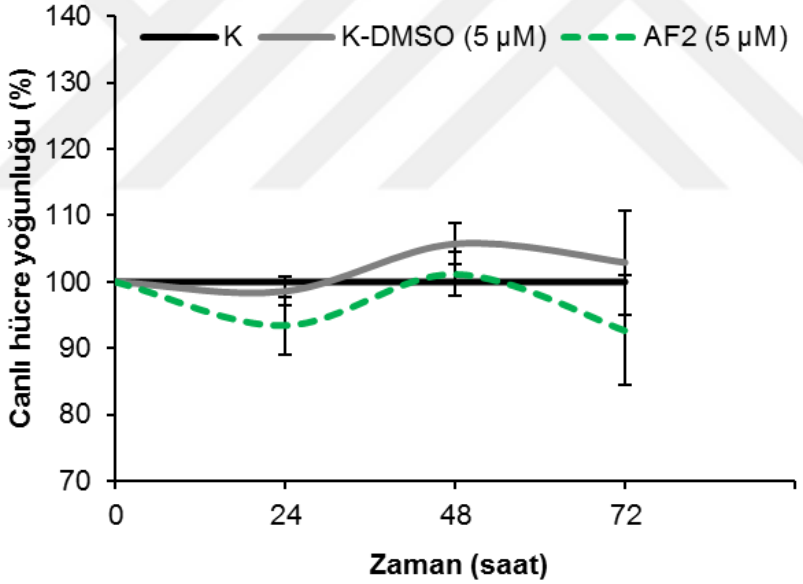
Hücre ekiminden 24 saat sonra ilk medium değişimi yapılmış, ilk medium değişiminden sonraki 24., 48. ve 72. saatlerde ise absorbanslar ölçülmüştür. Ölçüm sonuçlarından canlı hücre yoğunlukları hesaplanmış ve deneylerden elde edilen veriler (Çizelge 4.10.) ile çizilen grafikler Şekil 4.12.'de görülmektedir. AF2 bileşiğinin uygulama süresinin uzamasıyla AT-2 hücre proliferasyonunun 125.4±3.48'e yükseldiği; MAT-LyLu canlı hücre yoğunluğunun 92.6±8.27'ye gerilediği görülmektedir. Ancak yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda bu artış ve azalışın anlamlı olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF1 bileşiğinin 5μM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH)

	Canlı hücre yoğunluğu (%) AT-2			**Canlı hücre yoğunluğu (%) MAT-LyLu**		
	24. saat	**48.saat**	**72. saat**	**24. saat**	**48.saat**	**72. saat**
Kontrol	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00
K-DMSO (5 μM)	105.0±1.54	106.5±2.9	124.1±4.66	98.59±2.19	105.7±3.03	102.9±7.87
AF2 (5 μM)	94.4±10.43	102.1±2.77	125.4±3.48	93.4±4.31	101.2±3.26	92.6±8.27



(A) AT-2



(B) MAT-LyLu

Şekil 4.12. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF2 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol

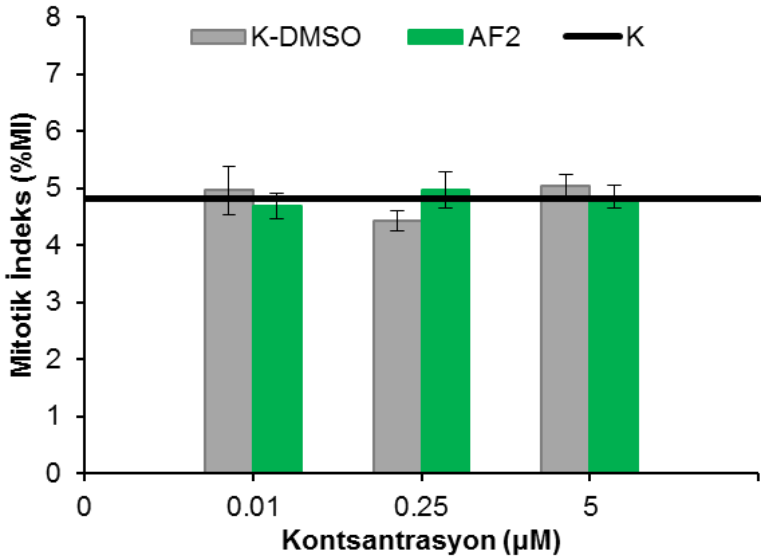
4.1.5.2.Mitotik aktivite

N,N–Propilen–bis–3,5 di floro asetofenon ($C_{19}H_{18}O_2N_2F_4$) (AF2) bileşiğinin, AT-2 veya MAT-LyLu hücreleri üzerine 0.01 µM, 0.25 µM ve 5 µM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanarak hücrelerin mitotik aktiviteleri üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

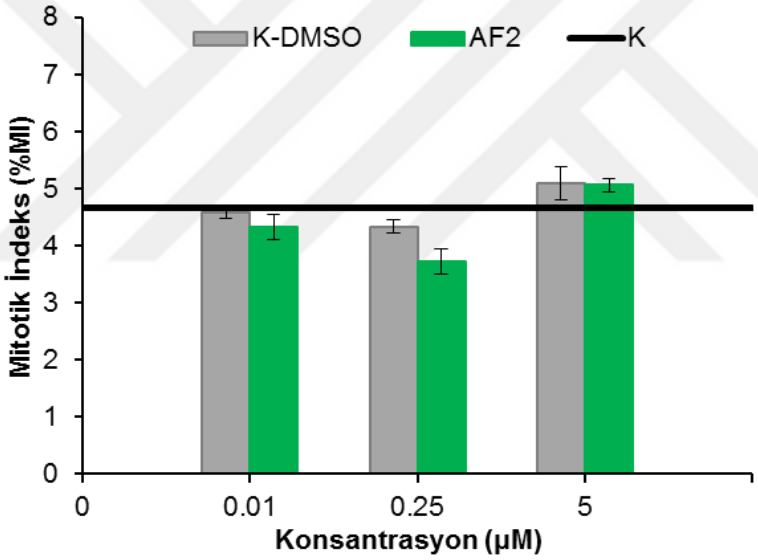
AT-2 hücreleri üzerindeki etkiler: Elde edilen veriler (Çizelge 4.11.) ve bu veriler ile çizilen grafik (Şekil 4.13.) incelendiğinde normal büyüme mediumunun uygulandığı kontrol gubunda AT-2 hücrelerinin mitotik indeks değeri 24. saatte 4.82±0.32, 48. saatte ise 4.67 ± 0.31 olarak tespit edilmiştir. Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun, hücrelerin mitotik aktiviteleri üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadıkları ($p>0.05$) görülmüştür. AF2 bileşiğinin, deneylerde kullanılan en düşük konsantrasyonda (0.01 µM) 48. saat süreyle uygulanması sonucunda, kontrol grubunda (K-DMSO) 4.59±0.12 olan mitotik indeksin azalarak 4.02±0.35 olduğu belirlenmiştir. En yüksek konsantrasyonda ise hem 24 hem de 48 saatlik uygulama sonucunda mitotik indeksin azaldığı gözlemlenmiştir. Ancak yapılan değerlendirmede deney ve kontrol grupları arasındaki farkların istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır.

Çizelge 4.11. AT-2 hücreleri üzerine AF2 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH)

	Mitoz İndeksi (%)		**İnhibisyon (%)**	
	24. saat	**48.saat**	**24. saat**	**48.saat**
Kontrol	4.82±0.32	4.67±0.31	--	--
K-DMSO (0.01 µM)	4.96±0.43	4.59±0.12	--	1.70
K-DMSO (0.25 µM)	4.43±0.18	4.33±0.11	8.18	7.20
K-DMSO (5 µM)	5.05±0.20	5.09±0.29	--	--
AF2 (0.01 µM)	4.68±0.22	4.33±0.23	5.56	5.64
AF2 (0.25 µM)	4.96±0.31	3.72±0.21	-12.25	14.12
AF2 (5 µM)	4.84±0.20	5.07±0.12	4.10	0.50



(A) 24 saat



(B) 48 saat

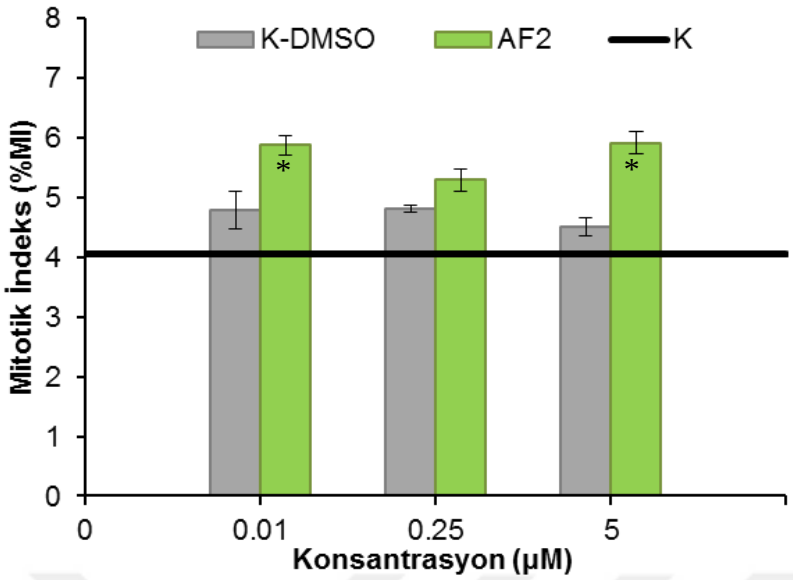
Şekil 4.13. AT-2 hücreleri üzerine AF2 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol

MAT-LyLu hücreleri üzerindeki etkiler: AF2 bileşiğinin MAT-LyLu hücrelerinin mitotik aktivitesi üzerindeki etkisini gösteren mitotik indeks değerleri Çizelge 4.12.'de izlenmektedir. Çizelgedeki veriler kullanılarak konsantrasyona karşı mitotik indeks grafiği çizilmiş ve Şekil 4.14.'te gösterilmiştir. Çizelge ve grafik incelendiğinde normal büyüme mediumunun uygulandığı kontrol gubunda AT-2 hücrelerinin mitotik indeks değeri 24. saatte 4.05±0.14, 48. saatte ise 4.86 ± 0.22

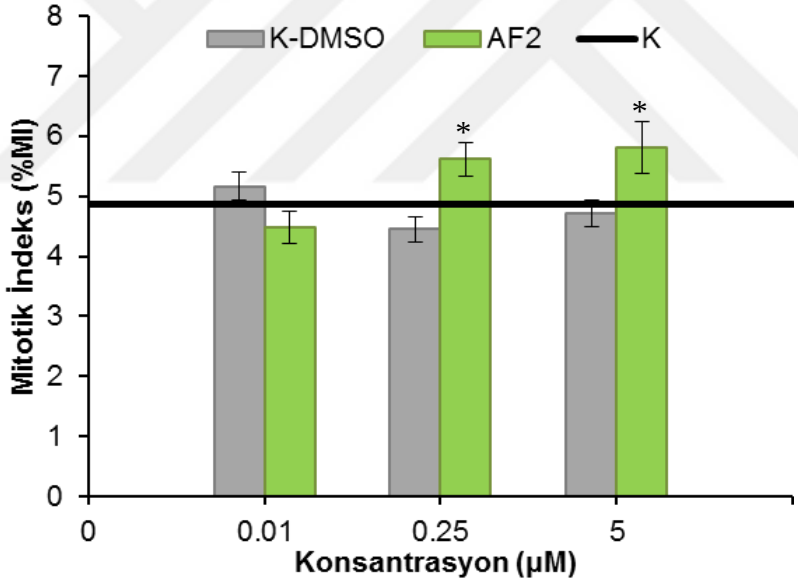
olarak tespit edilmiştir. Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun, hücrelerin mitotik aktiviteleri üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadıkları ($p>0.05$) görülmüştür. AF2 bileşiğinin, 24 saatlik uygulama sonucunda deneylerde kullanılan en düşük (0.01 µM) ve en yüksek (5 µM) konsantrasyonlarda; 48. saat süreyle uygulanması sonucunda ise 0.25 ve 5 µM konsantrasyonlarda kontrol grubuna (K-DMSO) göre mitotik indeksin stimüle olduğu gözlemlenmiş ve bu artışlar istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.12. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF2 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH)

	Mitoz İndeksi (%)		**İnhibisyon (%)**	
	24. saat	**48.saat**	**24. saat**	**48.saat**
Kontrol	4.05±0.14	4.86±0.22	--	--
K-DMSO (0.01 µM)	4.78±0.32	5.16±0.23	--	--
K-DMSO (0.25 µM)	4.80±0.05	4.45±0.21	--	8.38
K-DMSO (5 µM)	4.51±0.16	4.70±0.22	--	3.23
AF2 (0.01 µM)	5.89±0.16*	4.47±0.27	-23.14*	13.25
AF2 (0.25 µM)	5.29±0.19	5.61±0.27*	-10.09	-26.05*
AF2 (5 µM)	5.91±0.18*	5.80±0.44*	-31.03*	-23.43*



(A) 24 saat



(B) 48 saat

Şekil 4.14. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF2 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH).
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol
*: K-DMSO'ya göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

4.1.6. N,N–Butilen–bis–3,5 di floro asetofenon (AF3) bileşiğinin etkileri

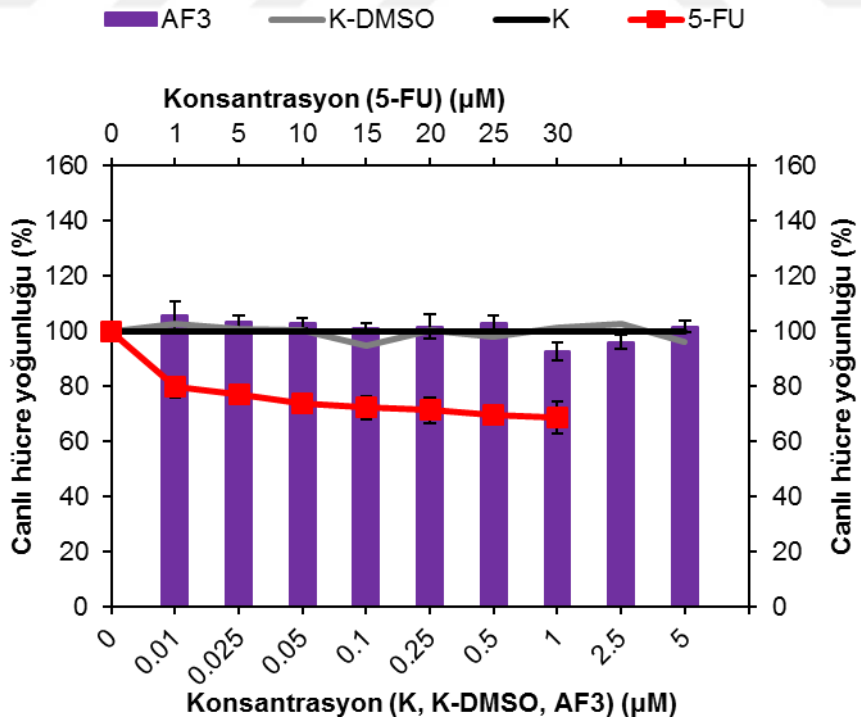
4.1.6.1.Hücre proliferasyonu

Yeni sentezlenmiş N,N–Butilen–bis–3,5 di floro asetofenon ($C_{20}H_{20}O_2N_2F_4$) (AF3) bileşiğinin, AT-2 veya MAT-LyLu hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri Bölüm 3.2.5'te anlatılan şekilde uygulanan alamar blue yöntemi ile belirlenmiştir. 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 ve 5 μM konsantrasyonlarda AF3 içeren deney mediumları, 24 ve 48 saat boyunca hücrelere uygulanmış ve belirtilen süreler sonunda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak canlı hücre yoğunlukları (%) hesaplanmıştır.

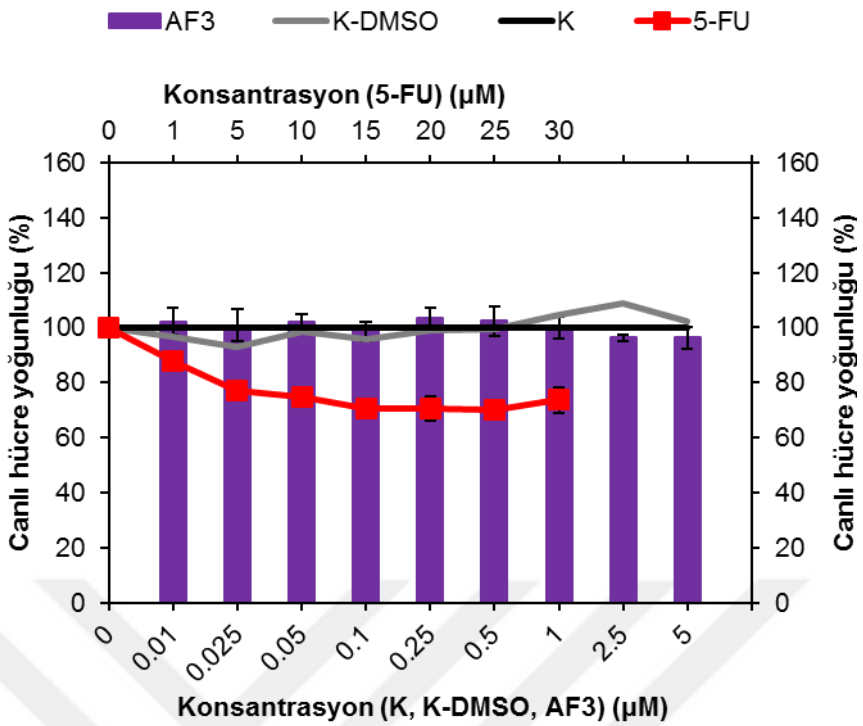
AT-2 hücreleri üzerindeki etkiler: AF3 bileşiği, AT-2 hücreleri üzerine 24 ve 48 saat sürelerle farklı konsantrasyonlarda uygulanmış ve ölçülen absorbans değerlerinden canlı hücre yoğunlukları hesaplanarak Çizelge (4.13.) ve grafik (Şekil 4.15.) halinde sunulmuştur. Çizelge (4.13.) verileri ve grafik (Şekil 4.15.) incelendiğinde ve bazı konsantrasyonlarda, canlı hücre yoğunluğunda zayıf bir azalma izlenmiş; ancak istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre deney ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.13. AT-2 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF3 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%)

		Canlı hücre yoğunluğu (%)		İnhibisyon (%)	
		24. saat	48.saat	24. saat	48. saat
Kontrol		100.0±0.00	100.0±0.00	-	-
K-DMSO	**0.01 µM**	102.81±3.98	96.53±3.33	-	3.46
	0.025 µM	100.81±4.36	92.90±3.77	-	7.09
	0.05 µM	100.13±2.25	98.60±2.43	-	1.39
	0.1 µM	94.92±2.00	95.89±0.69	5.07	4.10
	0.25 µM	100.36±5.48	99.20±3.63	-	0.79
	0.5 µM	97.93±2.48	99.59±2.56	2.06	0.40
	1 µM	101.24±2.49	104.66±6.94	-	-
	2.5 µM	102.56±7.06	108.90±6.94	-	-
	5 µM	96.25±4.38	102.50±2.19	3.74	-
AF3	**0.01 µM**	105.50±5.38	102.31±4.72	-	-
	0.025 µM	103.18±2.50	100.74±5.79	-	-
	0.05 µM	103.05±8,1.96	102.21±2.90	-	-
	0.1 µM	101.01±2.00	95.63±3.44	-	-
	0.25 µM	101.57±4.42	103.49±3.88	-	-
	0.5 µM	102.83±2.74	102.33±5.21	-	-
	1 µM	92.80±3.18	99.98±3.83	8.44	4.67
	2.5 µM	96.04±2.49	96.32±1.02	6.51	12.57
	5 µM	101.63±2.12	96.41±4.01	-	6.08



(A) 24 saat



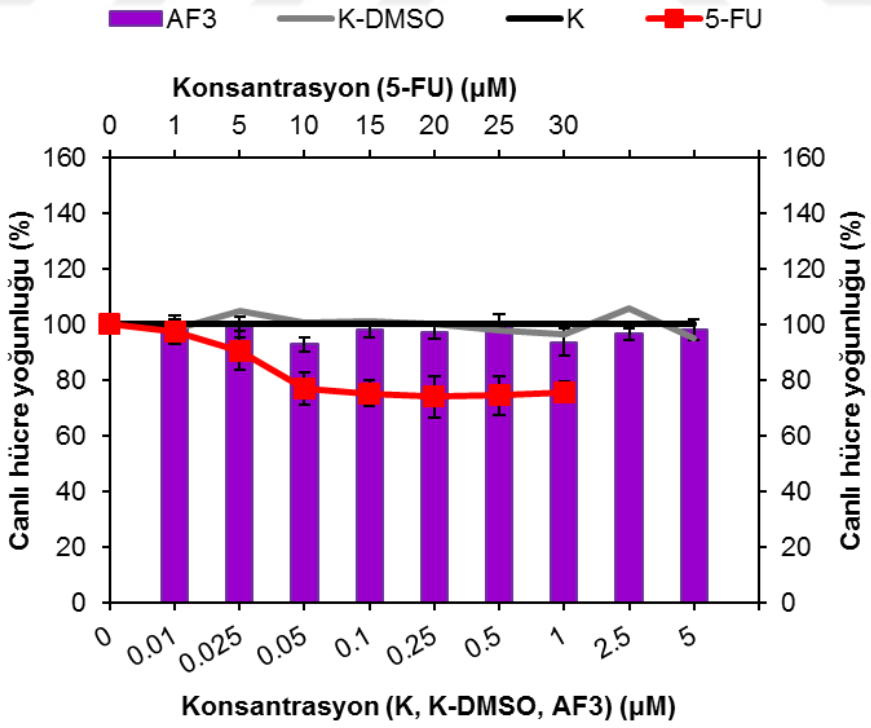
(B) 48 saat

Şekil 4.15. AT-2 hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda, 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol, 5-FU: Pozitif kontrol

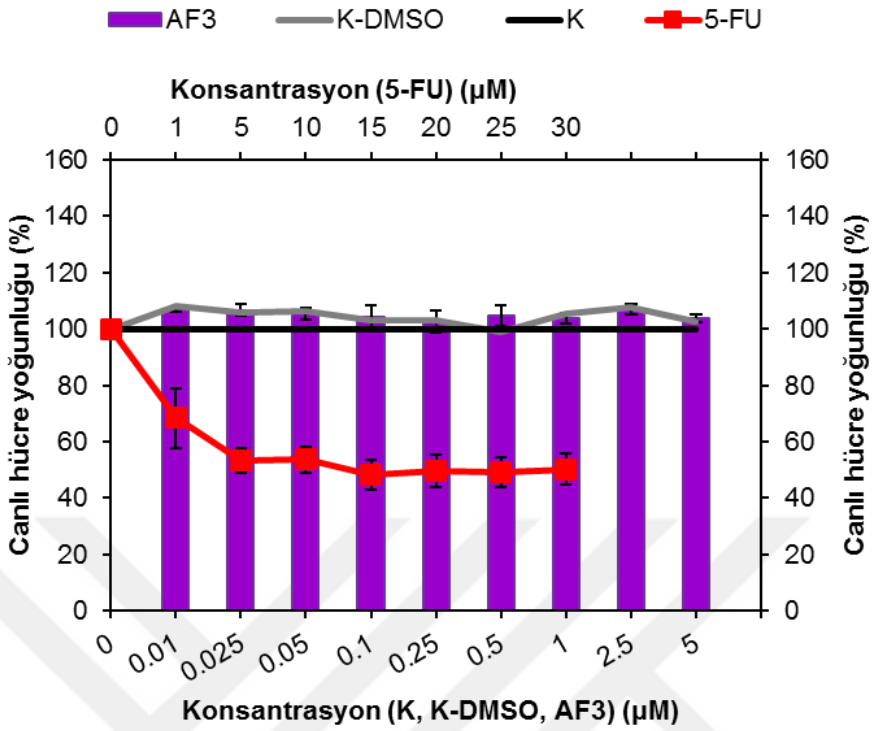
MAT-LyLu hücreleri üzerindeki etkiler: AF3 bileşiğinin MAT-LyLu hücreleri üzerine 24 ve 48 saat sürelerle uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) Çizelge 4.14.'te ve bu verilerle çizilen grafikler ise Şekil 4.16.'da gösterilmiştir. Çizelge ve grafikler incelendiğinde, AF3'ün MAT-LyLu hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı ($p>0.05$) görülmektedir.

Çizelge 4.14. MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF3 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%)

		Canlı hücre yoğunluğu (%)		İnhibisyon (%)	
		24. saat	48.saat	24. saat	48. saat
Kontrol		100.00±0.00	100.00±0.00	-	-
K-DMSO	**0.01 µM**	98.35±4.81	107.92±1.27	1.64	-
	0.025 µM	104.63±3.30	105.73±1.84	-	-
	0.05 µM	100.56±5.68	106.51±2.20	-	-
	0.1 µM	100.94±1.56	103.30±1.80	-	-
	0.25 µM	100.38±3.24	103.28±1.59	-	-
	0.5 µM	98.10±2.32	98.78±3.63	1.89	1.21
	1 µM	96.71±3.18	105.50±1.29	3.28	-
	2.5 µM	105.75±4.61	107.55±0.98	-	-
	5 µM	95.16±2.51	102.75±1.30	4.83	-
AF3	**0.01 µM**	93.84±3.38	97.19±3.06	-	1.26
	0.025 µM	96.06±6.36	99.57±1.73	5.59	-
	0.05 µM	92.70±2.73	100.0±0.63	7.77	1.12
	0.1 µM	81.35±3.80	98.51±2.89	2.95	-
	0.25 µM	85.41±3.65	96.74±2.88	3.31	0.67
	0.5 µM	92.30±2.03	96.34±3.67	-	-
	1 µM	87.73±5.36	95.37±1.80	3.19	1.90
	2.5 µM	86.20±1.05	94.33±3.24	9.23	0.68
	5 µM	86.69±6.60	97.55±4.27	-	-



(A) 24 saat



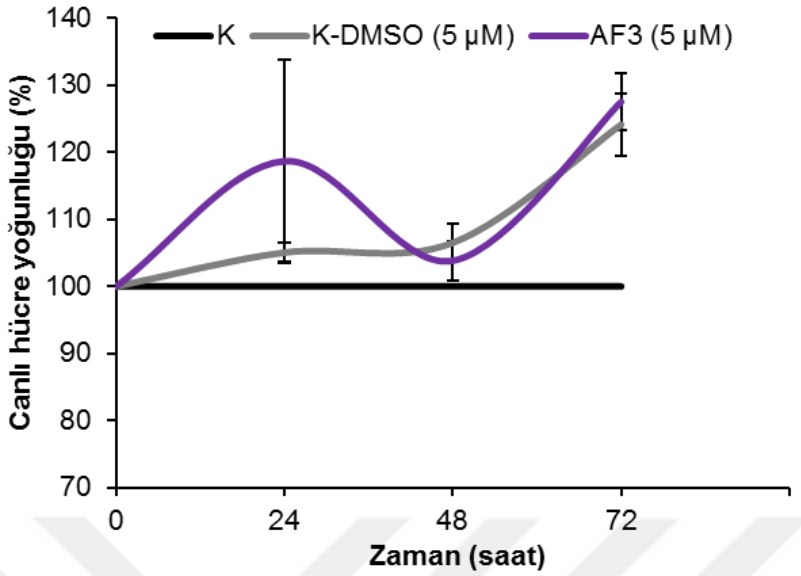
(B) 48 saat

Şekil 4.16. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda, 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol, 5-FU: Pozitif kontrol

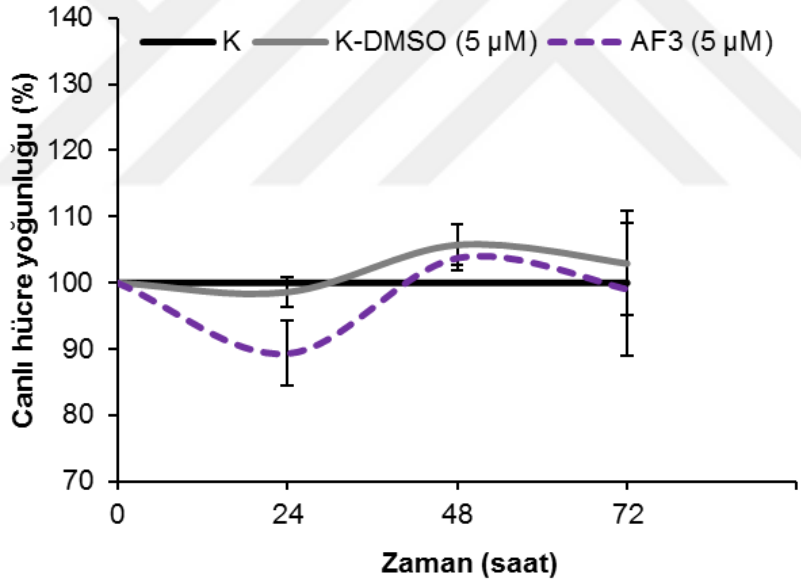
İlaç uygulama süresinin etkileri: AF3 bileşiğinin tekrarlayan konsantrasyonda ve 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanması sonucunda hem AT-2 hem de MAT-LyLu hücrelerinin proliferasyonunda meydana gelen değişiklik alamar blue yöntemiyle ölçülmüştür. AF3 bileşiğinin 72 saat süreyle uygulanması sonucunda hem AT-2 hem de MAT-LyLu canlı hücre yoğunluğu kontrole (K-DMSO) benzer (Çizelge 4.15., Şekil 4.17.) bulunmuştur.

Çizelge 4.15. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH)

	Canlı hücre yoğunluğu (%) AT-2			**Canlı hücre yoğunluğu (%) MAT-LyLu**		
	24. saat	**48.saat**	**72. saat**	**24. saat**	**48.saat**	**72. saat**
Kontrol	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00
K-DMSO (5 µM)	105.0±1.54	106.5±2.9	124.1±4.66	98.59±2.19	105.7±3.03	102.9±7.87
AF3 (5 µM)	118.7±15.0	103.8±2.91	127.5±4.22	89.30±4.89	103.8±1.81	99.0±10.03



(A) AT-2



(B) MAT-LyLu

Şekil 4.17. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol

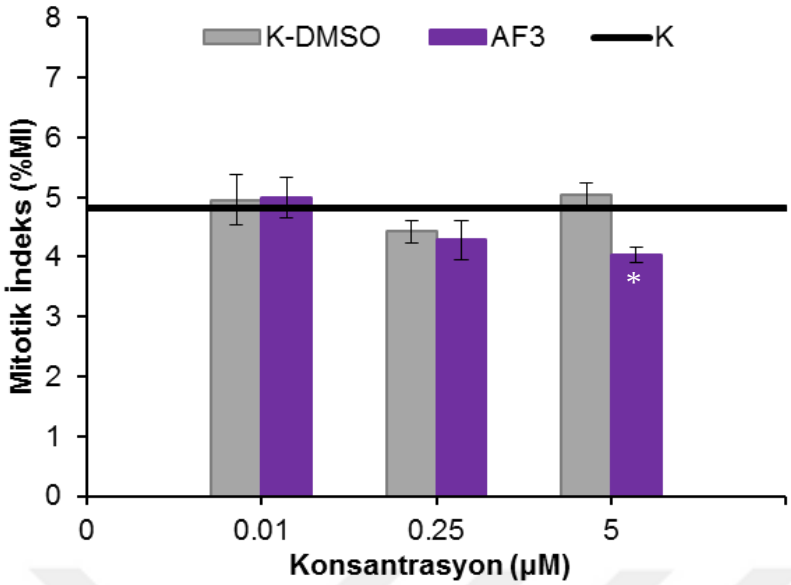
4.1.6.2.Mitotik aktivite

N,N–Butilen–bis–3,5 di floro asetofenon (AF2) bileşiğinin, AT-2 veya MAT-LyLu hücreleri üzerine 0.01 µM, 0.25 µM ve 5 µM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanarak hücrelerin mitotik aktiviteleri üzerindeki etkisi mitotik indeksin belirlenmesiyle tespit edilmiştir.

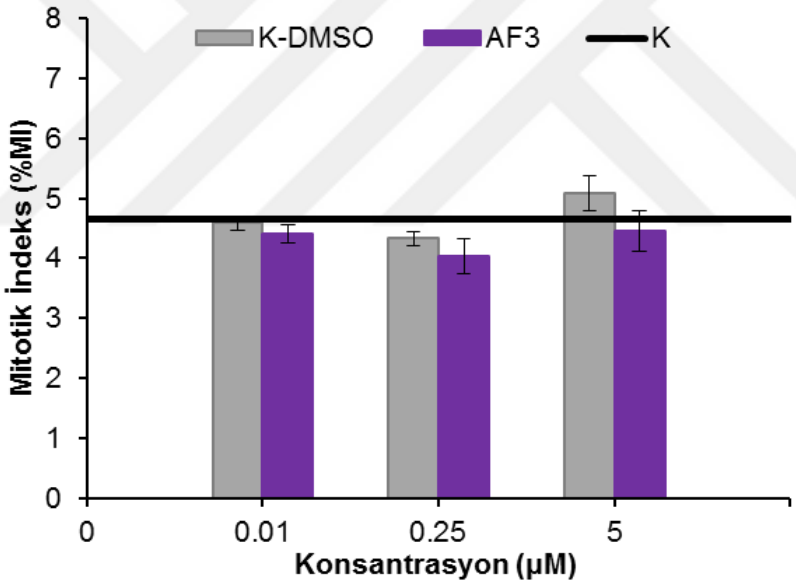
AT-2 hücreleri üzerindeki etkiler: Çizelge 4.16. ve Şekil 4.18. incelendiğinde normal büyüme mediumunun uygulandığı kontrol gubunda AT-2 hücrelerinin mitotik indeks değeri 24. saatte 4.82±0.32, 48. saatte ise 4.67 ± 0.31 olarak tespit edilmiştir. Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun, hücrelerin mitotik aktiviteleri üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadıkları ($p>0.05$) görülmüştür. AF3 bileşiğinin, deneylerde kullanılan en yüksek konsantrasyonda (5 µM) hem 24 hem de 48 saat süreyle uygulanması sonucunda, mitotik indeksin sırasıyla %20.03 ve %12.66 oranlarında azaldığı görülmüştür. Yapılan istatistiksel değerlendirmede 24 saatlik uygulama sonucunda deney ve kontrol grupları arasında ortaya çıkan farkın istatistiksel bakımdan anlamlı olduğu ($p<0.05$) saptanmıştır.

Çizelge 4.16. AT-2 hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH)

	Mitoz İndeksi (%)		**İnhibisyon (%)**	
	24. saat	**48.saat**	**24. saat**	**48.saat**
Kontrol	4.82±0.32	4.67±0.31	--	--
K-DMSO (0.01 µM)	4.96±0.43	4.59±0.12	--	1.70
K-DMSO (0.25 µM)	4.43±0.18	4.33±0.11	8.18	7.20
K-DMSO (5 µM)	5.05±0.20	5.09±0.29	--	--
AF3 (0.01 µM)	5.00±0.34	4.41±0.14	-0.86	3.97
AF3 (0.25 µM)	4.28±0.32	4.04±0.29	3.23	6.84
AF3 (5 µM)	4.04±0.13	4.45±0.34	20.03*	12.66



(A) 24 saat



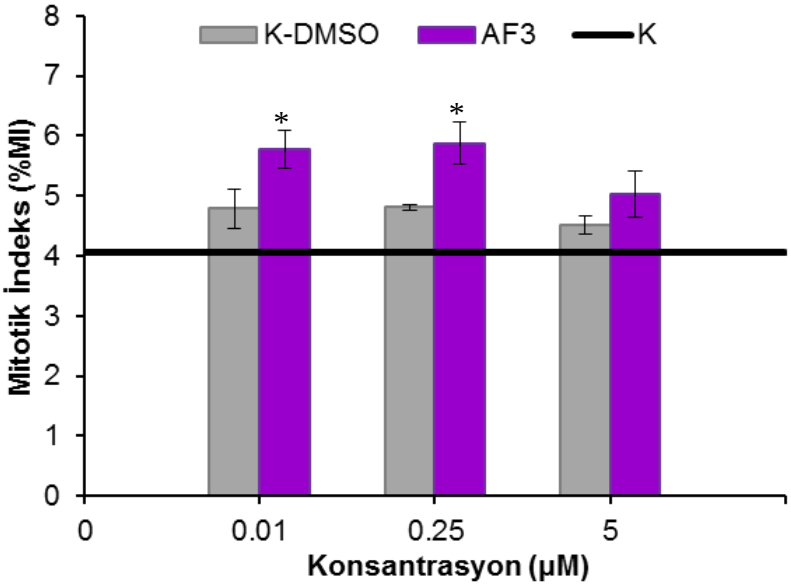
(B) 48 saat

Şekil 4.18. AT-2 hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol
*: K-DMSO'ya göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

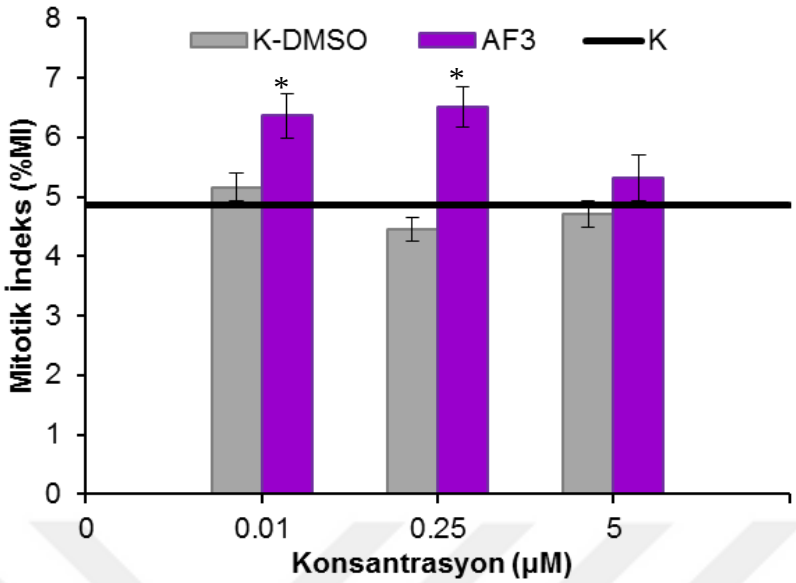
MAT-LyLu hücreleri üzerindeki etkiler: AF3 bileşiği MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.25, 5 µM) 24 ve 48 saat sürelerle uygulandıktan sonra mitotik indeks değerleri tespit edilmiş olup Çizelge 4.17.'de verilmiştir. Çizelgedeki veriler kullanılarak konsantrasyona karşı çizilen mitotik indeks grafiği Şekil 4.19.'da görülmektedir. Elde edilen verilere göre 0.01 ve 0.25 µM konsantrasyonlarda 24 saat süreyle uygulanan AF3 bileşiğinin, MAT-LyLu hücrelerinin mitotik indeksini, yaklaşık %20-22 civarında arttırdığı; bileşik uygulamasına 48 saat süreyle devam edildiğinde stimülasyoun artarak 0.25 µM'lık konsantrasyonda %46.04'e ulaştığı tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede bu artışların anlamlı olduğu ($p<0.05$) belirlenmiştir. En yüksek konsantrasyonda ise bileşiğin stimülasyon etkisinin devam ettiği ancak istatistik anlamın ortadan kalktığı görülmüştür.

Çizelge 4.17. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH)

	Mitoz İndeksi (%)		**İnhibisyon (%)**	
	24. saat	**48.saat**	**24. saat**	**48.saat**
Kontrol	4.05±0.14	4.86±0.22	--	--
K-DMSO (0.01 µM)	4.78±0.32	5.16±0.23	--	--
K-DMSO (0.25 µM)	4.80±0.05	4.45±0.21	--	8.38
K-DMSO (5 µM)	4.51±0.16	4.70±0.22	--	3.23
AF3 (0.01 µM)	5.78±0.31*	6.37±0.37*	-20.82*	-23.44*
AF3 (0.25 µM)	5.87±0.35*	6.50±0.34*	22.24*	-46.04*
AF3 (5 µM)	5.02±0.39	5.32±0.38	-11.41	-13.21



(A) 24 saat



(B) 48 saat

Şekil 4.19. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH).
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol
*: K-DMSO'ya göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

4.1.7. N,N–Propilen–bis–5 floro asetofenon (AF4) bileşiğinin etkileri

4.1.7.1.Hücre proliferasyonu

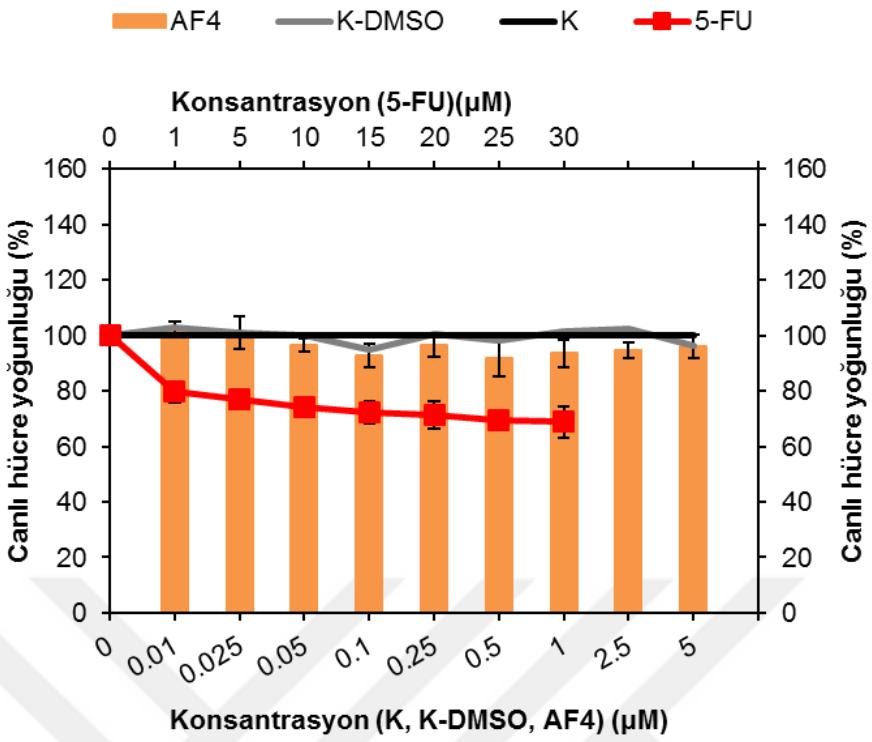
Yeni sentezlenmiş N,N–Propilen–bis–5 floro asetofenon ($C_{19}H_{20}O_2N_2F_2$) (AF4) bileşiğinin, AT-2 veya MAT-LyLu hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri alamar blue yöntemi ile belirlenmiştir. 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 ve 5 µM konsantrasyonlarda AF2 içeren deney mediumları, 24 ve 48 saat boyunca hücrelere uygulanmış ve belirtilen süreler sonunda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak canlı hücre yoğunlukları (%) hesaplanmıştır.

AT-2 hücreleri üzerindeki etkiler: AF4 bileşiğinin AT-2 hücreleri üzerine 24 ve 48 saat sürelerle uygulanması sonucunda elde edilen absorbans değerlerinden canlı hücre yoğunlukları hesaplanmış ve Çizelge 4.18.'de gösterilmiştir. Bu veriler ile canlı hücre yoğunluklarının konsantrasyona karşı grafiği çizilmiştir (Şekil 4.20.).

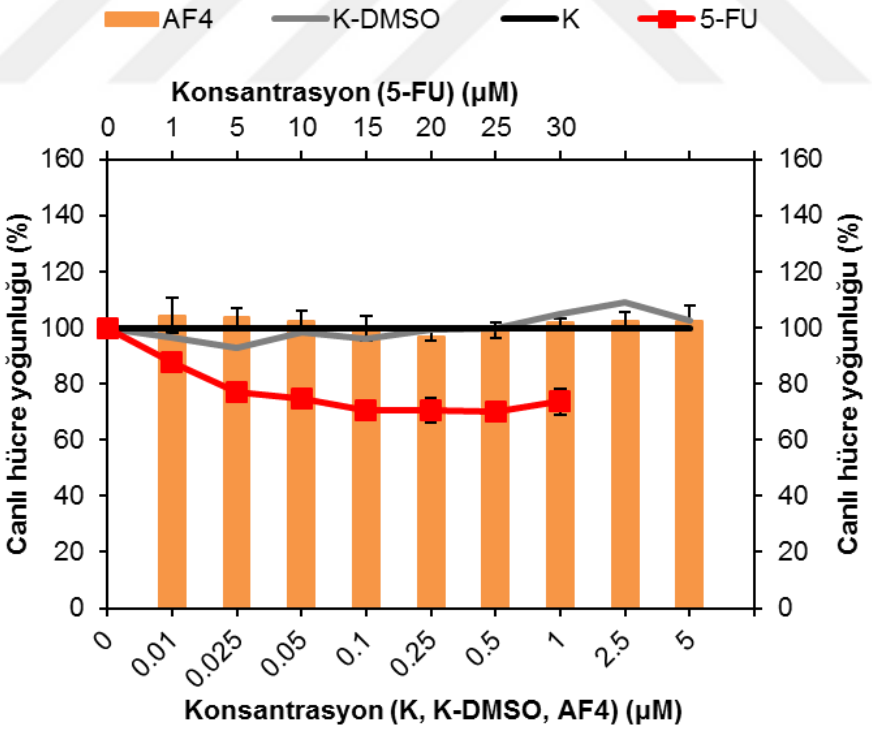
Çizelge (4.18.) ve grafik (Şekil 4.20.) incelenmiş ve bazı konsantrasyonlarda, canlı hücre yoğunluğunda zayıf bir azalma izlenmiş; ancak istatistiksel değerlendirme sonuçlarına göre deney ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.18. AT-2 hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF4 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%)

		Canlı hücre yoğunluğu (%)		İnhibisyon (%)	
		24. saat	48.saat	24. saat	48. saat
Kontrol		100.0±0.00	100.0±0.00	-	-
K-DMSO	**0.01 µM**	102.81±3.98	96.53±3.33	-	3.46
	0.025 µM	100.81±4.36	92.90±3.77	-	7.09
	0.05 µM	100.13±2.25	98.60±2.43	-	1.39
	0.1 µM	94.92±2.00	95.89±0.69	5.07	4.10
	0.25 µM	100.36±5.48	99.20±3.63	-	0.79
	0.5 µM	97.93±2.48	99.59±2.56	2.06	0.40
	1 µM	101.24±2.49	104.66±6.94	-	-
	2.5 µM	102.56±7.06	108.90±6.94	-	-
	5 µM	96.25±4.38	102.50±2.19	3.74	-
AF4	**0.01 µM**	102.18±2.64	104.23±6.24	-	-
	0.025 µM	100.95±5.83	103.70±3.07	5.68	-
	0.05 µM	96.44±2.27	102.54±3.71	-	-
	0.1 µM	92.81±4.29	99.92±4.36	-	-
	0.25 µM	96.50±4.40	96.94±1.61	-	2.25
	0.5 µM	91.66±6.37	99.12±2.75	4.30	0.46
	1 µM	93.62±4.95	101.73±1.29	4.84	2.92
	2.5 µM	94.72±2.80	102.36±3.07	6.03	6.54
	5 µM	96.03±4.40	102.30±5.56	-	0.19



(A) 24 saat



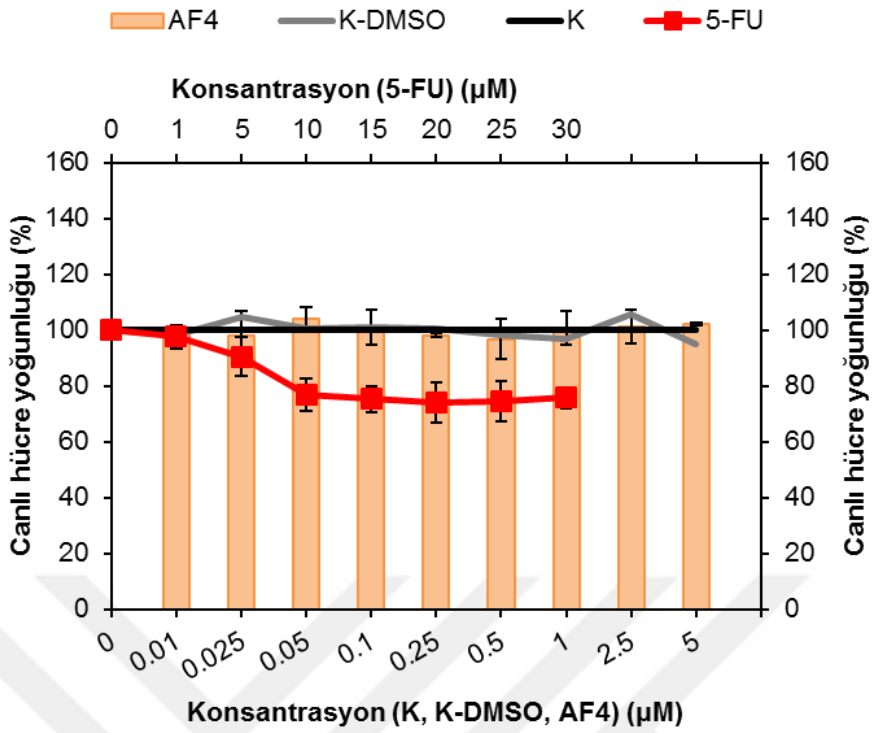
(B) 48 saat)

Şekil 4.20. AT-2 hücreleri üzerine AF4 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda, 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol, 5-FU: Pozitif kontrol

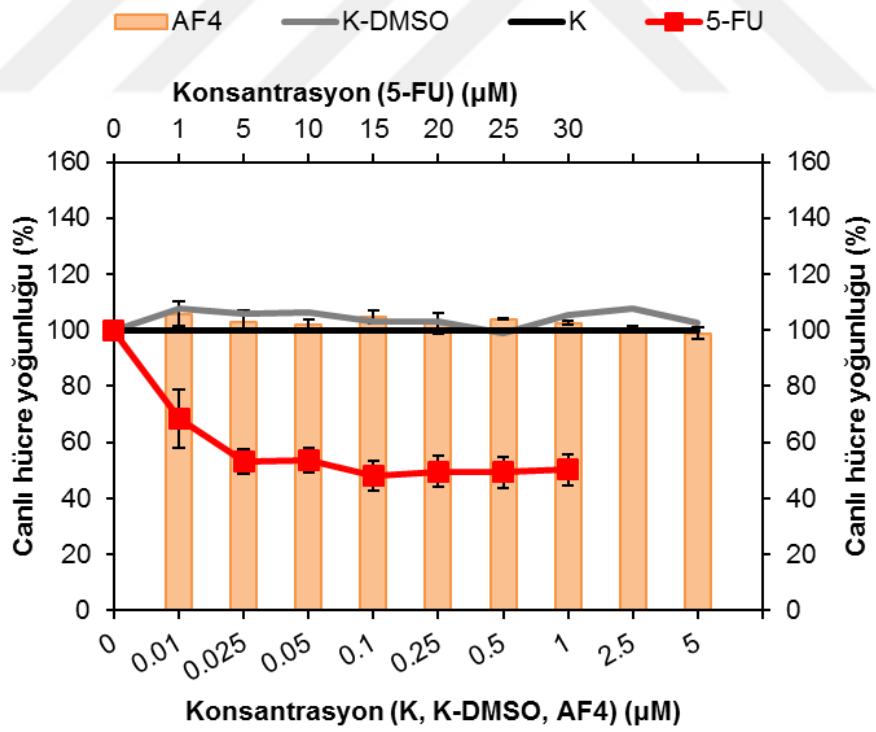
MAT-LyLu hücreleri üzerindeki etkiler: AF4 bileşiğinin MAT-LyLu hücreleri üzerine 24 ve 48 saat sürelerle uygulanması sonucunda elde edilen absorbans değerlerinden canlı hücre yoğunlukları (%) hesaplanmıştır (Çizelge 4.19.). Elde edilen veriler kullanılarak canlı hücre yoğunluklarının konsantrasyona karşı çizilen grafiği Şekil 4.21.'de gösterilmiştir. Çizelge (4.19.) ve grafik (Şekil 4.21.) incelendiğinde deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel bakımdan anlamlı fark bulunmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir.

Çizelge 4.19. MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlarda AF4 uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) ve inhibisyon oranları (%)

		Canlı hücre yoğunluğu (%)		İnhibisyon (%)	
		24. saat	48.saat	24. saat	48. saat
Kontrol		100.00±0.00	100.00±0.00	-	-
K-DMSO	**0.01 µM**	98.35±4.81	107.92±1.27	1.64	-
	0.025 µM	104.63±3.30	105.73±1.84	-	-
	0.05 µM	100.56±5.68	106.51±2.20	-	-
	0.1 µM	100.94±1.56	103.30±1.80	-	-
	0.25 µM	100.38±3.24	103.28±1.59	-	-
	0.5 µM	98.10±2.32	98.78±3.63	1.89	1.21
	1 µM	96.71±3.18	105.50±1.29	3.28	-
	2.5 µM	105.75±4.61	107.55±0.98	-	-
	5 µM	95.16±2.51	102.75±1.30	4.83	-
AF4	**0.01 µM**	100.85±0.63	105.85±4.24	-	2.07
	0.025 µM	98.17±8.47	103.10±3.82	6.45	2.62
	0.05 µM	104.15±4.19	102.03±1.91	-	4.48
	0.1 µM	101.04±6.34	104.92±2.31	-	-
	0.25 µM	98.14±0.74	102.41±3.70	2.24	0.86
	0.5 µM	96.76±67.30	103.96±0.19	1.34	-
	1 µM	100.61±6.03	101.53±0.67	-	2.96
	2.5 µM	101.13±5.99	100.57±0.78	4.61	6.97
	5 µM	102.00±0.44	98.93±2.19	-	3.81



(A) 24 saat



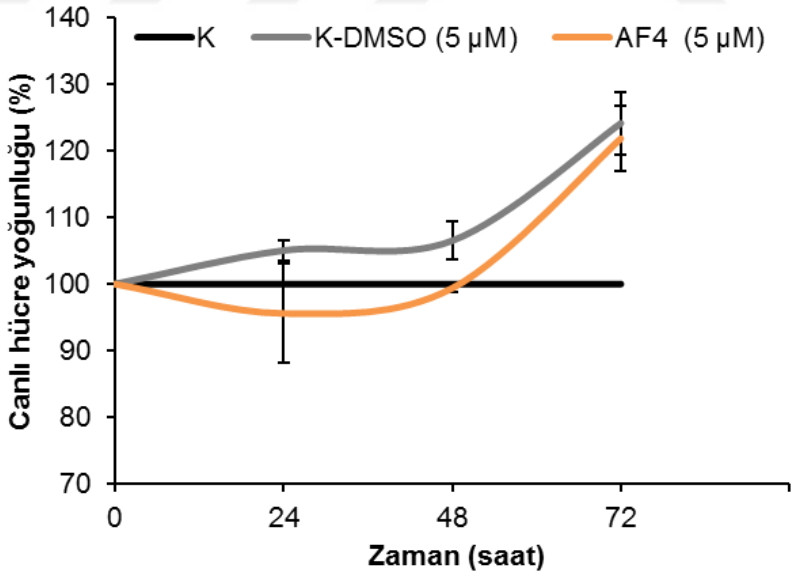
(B) 48 saat

Şekil 4.21. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF4 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda, 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunluklarının (%), konsantrasyona bağlı grafiği (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol, 5-FU: Pozitif kontrol

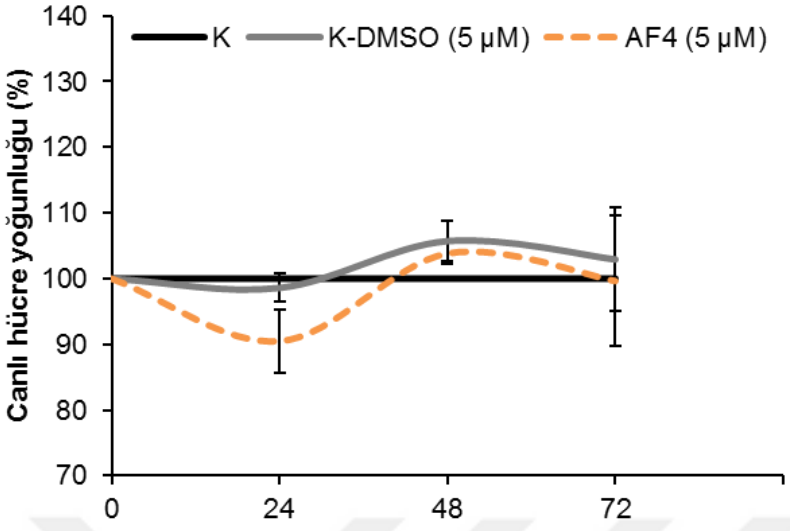
İlaç uygulama süresinin etkileri: AF4 bileşiğinin AT-2 ve MAT-LyLu hücrelerinin proliferasyonu üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı görüldüğünden ilaç uygulamasına devam edilerek uygulama süresinin uzamasının etkileri araştırılmıştır. Bileşiğin 72 saat süreyle uygulanması sonucunda, hem AT-2 hem de MAT-LyLu canlı hücre yoğunluğu kontrole (K-DMSO) benzer (Çizelge 4.20., Şekil 4.22.) bulunmuştur.

Çizelge 4.20. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF4 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH)

	Canlı hücre yoğunluğu (%) AT-2			**Canlı hücre yoğunluğu (%) MAT-LyLu**		
	24. saat	**48.saat**	**72. saat**	**24. saat**	**48.saat**	**72. saat**
Kontrol	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00
K-DMSO (5 µM)	105.0±1.54	106.5±2.9	124.1±4.66	98.59±2.19	105.7±3.03	102.9±7.87
AF4 (5 µM)	95.59±7.42	99.38±0.53	121.8±4.95	90.49±4.83	103.8±1.65	99.64±9.89



(A) AT-2



(B) MAT-LyLu

Şekil 4.22. AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine AF4 bileşiğinin 5µM konsantrasyonda 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen canlı hücre yoğunlukları (%) (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol

4.1.7.2.Mitotik aktivite

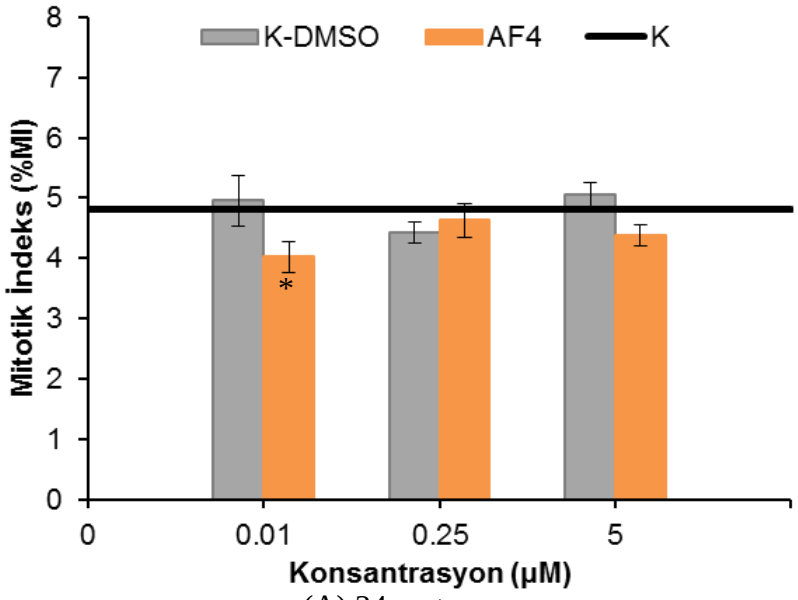
Yeni sentezlenmiş N,N–Propilen–bis–5 floro asetofenon (AF4) bileşiği, AT-2 veya MAT-LyLu hücreleri üzerine 0.01 µM, 0.25 µM ve 5 µM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmış ve belirtilen sürelerin sonunda Bölüm 3.2.6.'da anlatılan şekilde mitotik indeks belirlenmiştir.

AT-2 hücreleri üzerindeki etkiler: Elde edilen mitotik indeks değerleri Çizelge 4.21.'de izlenmektedir. Burada sunulan veriler kullanılarak konsantrasyona karşı mitotik indeks grafiği çizilmiş ve Şekil 4.23.'te gösterilmiştir. Çizelge (4.21.) ve grafik (Şekil 4.23.) incelendiğinde normal büyüme mediumunun uygulandığı kontrol gubunda AT-2 hücrelerinin mitotik indeks değeri 24. saatte 4.82±0.32, 48. saatte ise 4.67 ± 0.31 olarak tespit edilmiştir. Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun, hücrelerin mitotik aktiviteleri üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadıkları ($p>0.05$) görülmüştür. AF4 bileşiğinin, 0.01 µM konsantrasyonda 24 saat uygulandığında mitotik aktiviteyi baskılayarak mitoz indeksini 4.03±0.26'ya düşürdüğü ve bu inhibisyonun istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir. 48

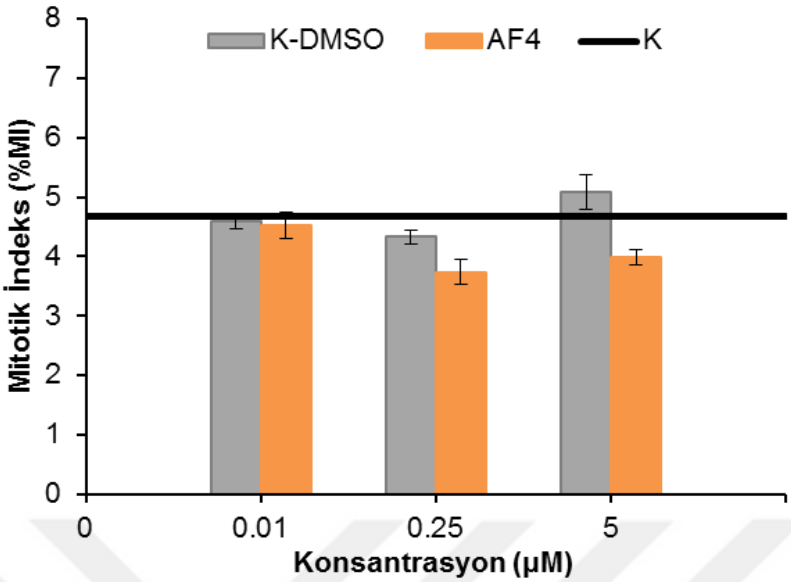
saatlik uygulama sonucunda ise konsantrasyonun yükselmesiyle artan bir şekilde, AT-2 hücrelerinin mitotik aktivitesini baskıladığı görülmektedir. AT-2 hücrelerinin mitotik aktivitesi 0.01, 0.25 ve 5 µM'lık AF4 uygulaması sonucunda sırasıyla %1.35; %6.84 ve %21.66 oranlarında baskılanmıştır. 5 µM'lık AF4'ün 48 saat süreyle uygulanması sonucu oluşan inhibisyonun istatistiksel bakımdan anlamlı ($p<0.05$) olduğu ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.21. AT-2 hücreleri üzerine AF4 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH)

	Mitoz İndeksi (%)		**İnhibisyon (%)**	
	24. saat	**48.saat**	**24. saat**	**48.saat**
Kontrol	4.82±0.32	4.67±0.31	--	--
K-DMSO (0.01 µM)	4.96±0.43	4.59±0.12	--	1.70
K-DMSO (0.25 µM)	4.43±0.18	4.33±0.11	8.18	7.20
K-DMSO (5 µM)	5.05±0.20	5.09±0.29	--	--
AF4 (0.01 µM)	4.03±0.26	4.53±0.22	18.77*	1.35
AF4 (0.25 µM)	4.63±0.28	3.74±0.22	--	6.84
AF4 (5 µM)	4.39±0.17	3.99±0.12	13.07	21.66*



(A) 24 saat



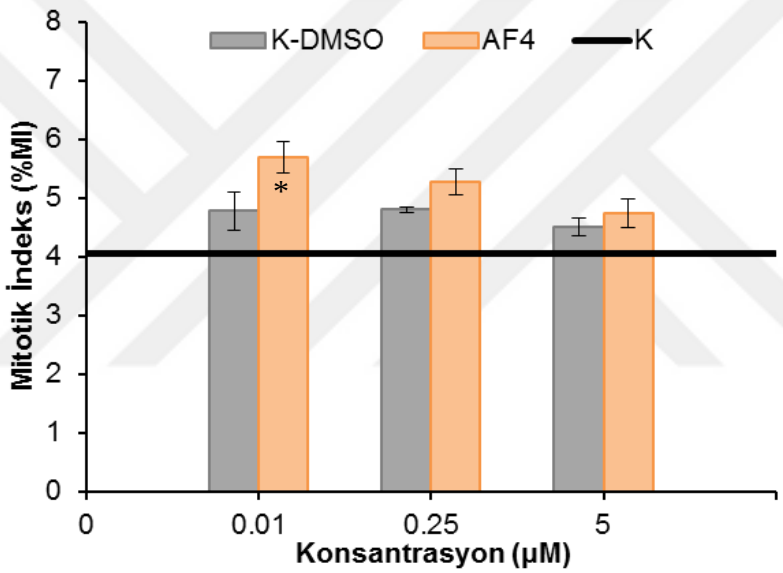
(B) 48 saat

Şekil 4.23. AT-2 hücreleri üzerine AF4 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol
*: K-DMSO'ya göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

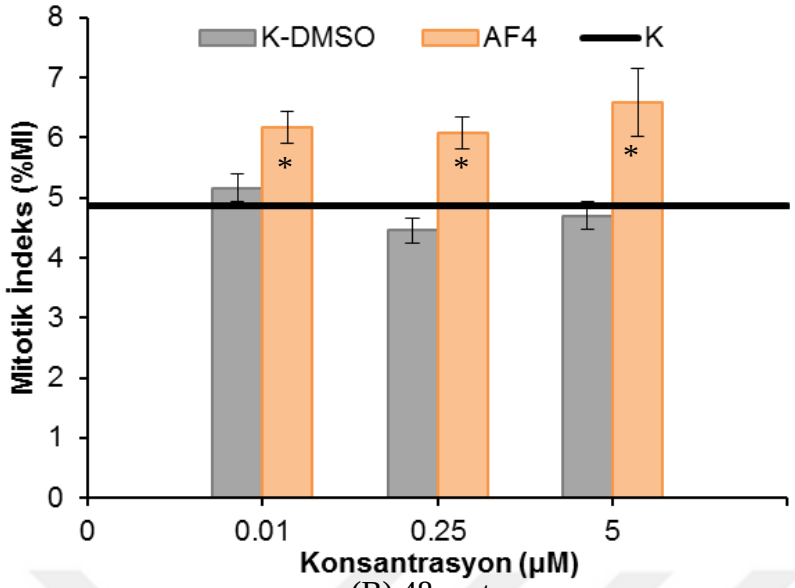
MAT-LyLu hücreleri üzerindeki etkiler: MAT-LyLu hücreleri üzerine farklı konsantrasyonlardaki (0.01, 0.25, 5 µM) AF4 bileşiğinin, 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasının ardından belirlenen mitotik indeks değerleri Çizelge 4.22.'de verilmiştir. Çizelgedeki veriler kullanılarak konsantrasyona karşı çizilen mitotik indeks grafiği Şekil 4.24.'te görülmektedir. Elde edilen verilere göre AF4 bileşiğinin MAT-LyLu hücrelerinin mitotik aktivitesini stimüle ettiği anlaşılmaktadır. 0.01 µM konsantrasyonda 24 saat süreyle uygulanan AF4 bileşiğinin, MAT-LyLu hücrelerinin mitotik indeksini, %18.93 oranında arttırırken; bileşik uygulamasına 48 saat süreyle devam edildiğinde stimülasyonun artarak 0.01, 0.25 ve 5 µM'lık konsantrasyonlarda sırasıyla %19.81, %36.77, %40.23 oranlarına ulaştığı saptanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmede bu artışların anlamlı olduğu ($p<0.05$) belirlenmiştir.

Çizelge 4.22. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF3 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen mitoz indeksi (%) değerleri (±SH)

	Mitoz İndeksi (%)		İnhibisyon (%)	
	24. saat	**48.saat**	**24. saat**	**48.saat**
Kontrol	4.05±0.14	4.86±0.22	--	--
K-DMSO (0.01 µM)	4.78±0.32	5.16±0.23	--	--
K-DMSO (0.25 µM)	4.80±0.05	4.45±0.21	--	8.38
K-DMSO (5 µM)	4.51±0.16	4.70±0.22	--	3.23
AF4 (0.01 µM)	5.69±0.27*	6.18±0.27*	-18.93*	-19.81*
AF4 (0.25 µM)	5.27±0.21	6.09±0.27*	9.73	-36.77*
AF4 (5 µM)	4.74±0.25	6.59±0.57*	-5.15	-40.23*



(A) 24 saat

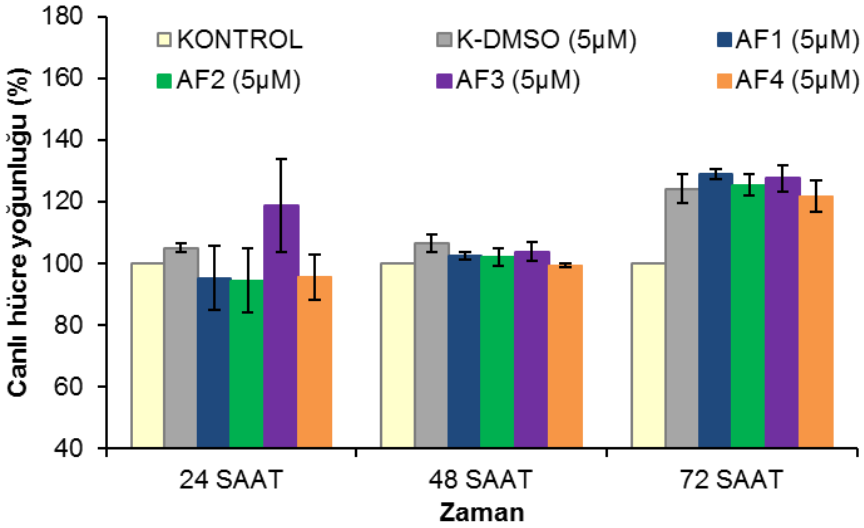


(B) 48 saat

Şekil 4.24. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF4 bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat sürelerle uygulanmasıyla elde edilen mitoz indeksi değerleri (%) (±SH)
K: Kontrol, K-DMSO: Çözücülü kontrol
*: K-DMSO'ya göre istatistik bakımdan anlamlı fark ($p<0.05$)

4.1.8. Bileşiklerin AT-2 hücreleri üzerindeki etkilerinin genel değerlendirmesi

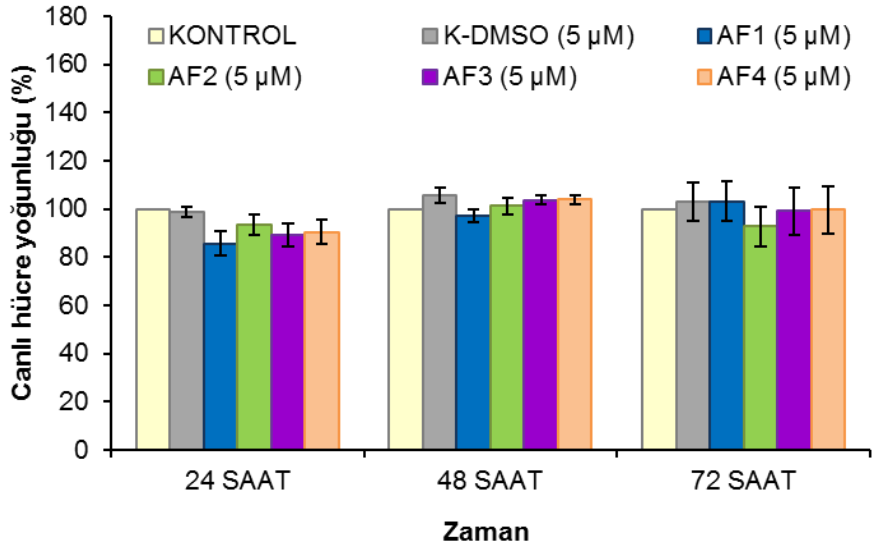
Deneylerde kullanılan N,N–Etilen–bis–5 floro asetofenon ($C_{18}H_{18}O_2N_2F_2$) (AF1), N,N–Propilen–bis–3,5 di floro asetofenon ($C_{19}H_{18}O_2N_2F_4$) (AF2), N,N–Butilen–bis–3,5 di floro asetofenon ($C_{20}H_{20}O_2N_2F_4$) (AF3), N,N–Propilen–bis–5 floro asetofenon ($C_{19}H_{20}O_2N_2F_2$) (AF4) bileşiklerinin 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonucunda AT-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerinde istatistiksel bakımdan anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bileşik uygulamasına 72 saat süreyle devam edildiğinde ise AF1 ve AF3'ün canlı hücre yoğunluğunu zayıf şekilde arttırdığı ancak bu artışın istatistiksel bakımdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.25.). AF1 ve AF2, AT-2 hücrelerinin mitotik aktivitesi üzerinde herhangi bir değişiklik oluşturmazken; AF3, 5 µM konsantrasyonda 24 saat süreyle uygulandığında mitoz indeksini baskılamış ancak bu etki konsantrasyonun artışı ve uygulama süresinin uzamasıyla ortadan kalkmıştır. AF4 bileşiğinin de 5 µM konsantrasyonda 48 saat süreyle uygulandığında mitotik indeksi azalttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.25. AT-2 hücreleri üzerine AF1, AF2, AF3, AF4 bileşiklerinin 24, 48 ve 72 saat süreyle 5 µM'lık konsantrasyonda uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunluğu (%) (±SH)

4.1.9. Bileşiklerin MAT-LyLu hücreleri üzerindeki etkilerinin genel değerlendirmesi

MAT-LyLu hücreleri üzerine N,N–Etilen–bis–5 floro asetofenon ($C_{18}H_{18}O_2N_2F_2$) (AF1), N,N–Propilen–bis–3,5 di floro asetofenon ($C_{19}H_{18}O_2N_2F_4$) (AF2), N,N–Butilen–bis–3,5 di floro asetofenon ($C_{20}H_{20}O_2N_2F_4$) (AF3), N,N–Propilen–bis–5 floro asetofenon ($C_{19}H_{20}O_2N_2F_2$) (AF4) bileşiklerinin 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanması sonucunda hücre proliferasyonu üzerinde istatistiksel bakımdan anlamlı bir değişiklik meydana gelmediği belirlenmiştir (Şekil 4.26.). AF1 bileşiği, MAT-LyLu hücrelerinin mitotik aktivitesini 0.25 ve 5 µM konsantrasyonda 24 saat süreyle uygulandığında baskılamış; ancak uygulama süresinin uzamasıyla bu etki ortadan kalkmıştır. AF2, AF3 ve AF4 bileşiklerinin ise hem 24 hem de 48 saatlik uygulamalarda hemen hemen tüm konsantrasyonlarda hücrelerin mitotik aktivitesini stimüle ettiği saptanmıştır.



Şekil 4.26. MAT-LyLu hücreleri üzerine AF1, AF2, AF3, AF4 bileşiklerinin 24, 48 ve 72 saat süreyle 5 µM'lık konsantrasyonda uygulanması sonucu elde edilen canlı hücre yoğunluğu (%) (±SH)

4.4.Tartışma

Ölüm nedenleri arasında önemli bir yer tutan kanser tedavisinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu tedavi metodları arasında özel bir yere sahip olan kemoterapiye henüz alternatif bir yöntem geliştirilememiştir. Kemoterapide kullanılan birçok kimyasal ve bitkisel kökenli kemoterapötik ajan bulunmasına rağmen henüz tam anlamıyla başarılı sonuçların elde edilebildiği ve yan etkileri minimuma indirilmiş bir kemoterapotik ajan bulunamamıştır. Bu nedenle kimyasal ve bitkisel kaynaklardan yeni kemoterapötik ajan arayışları dünya çapında hızla devam etmektedir.

Bitkilerde ve mantarlarda doğal ürünler olarak bulunan asetofenon bileşikleri (Wilkins ve Scholl, 1989; Guyot ve ark., 1998), tatlı ve keskin kokulu olup (Budavari ve Rahway, 1989; Bethesda, 1993) biyolojik olarak aktif endüstriyel polimerler elde etmek için kullanılabilmektedir (Soykan ve Erol, 2003). Asetofenon türevlerinin, ilaçların asimetrik sentezi için bir yapı taşı olarak etkili bir şekilde kullanıldığı da bildirilmektedir (Wang ve ark., 2006; Ikariya ve Blacker, 2007).

Literatürde, doğal olarak elde edilmiş veya yeni sentezlenmiş çeşitli asetofenon türevi bileşiklerin antikanser aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Saxena ve ark. (2008), gallik asitten asetofenon kullanarak sentez ettikleri bazı indanone türevlerinin MCF-7 meme kanseri hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Başka bir grup araştırıcı, yeni sentezledikleri iki asetofenon türevi bileşiğin meme (MCF-7, MDA-MB-231), prostat (PC-3, DU-145), ovaryum (OVCAR3, OVCAR4), akciğer (A549) gibi çeşitli hücre hatları üzerinde antikanser aktivite sergilediğini göstermişlerdir (Kumar ve ark., 2011). Geleneksel Uzakdoğu tıbbında yüzyıllardır kullanılan bir bitki olan *Acronychia pedunculata*'nın gövde kabuğundan izole edilen asetofenon türevi çeşitli bileşiklerin, DU145 (insan prostat kanseri), A2058 (insan melanoma) ve NHDF (normal) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, araştırıcılar, izole ettikleri bileşiklerden acrovestone ve acrovestenolün A2058 melanoma hücrelerine karşı sırasıyla 0.38 ve 2.8 μM'lık; DU145 prostat kanseri hücrelerine karşı ise 0.93 ve 2.7 μM'lık IC50 değerleri ile sitotoksik aktivite sergilediğini göstermişlerdir (Kouloura ve ark., 2012). Prabhakar ve ark. (2014), asetofenondan türevlendirdikleri yeni bazı şalkonların insan over kanseri hücre soyu A2780 hücreleri üzerinde sitotoksik aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Pessoto ve ark. (2015), yeni sentezledikleri asetofenon-tiyosemikarbazon türevi bileşiklerin K-562 hücrelerini öldürdüğünü bildirmişlerdir. Başka bir grup araştırıcı, yeni sentezledikleri bazı asetofenon türevlerinin akciğer kanseri A549 hücrelerine karşı antikanser aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir (Chaudhary ve ark., 2016). Lee ve ark. (2016), benzylideneacetophenone türevlerinin insan prostat kanseri hücrelerinde proteazomal aktiviteyi inhibe edip apoptozu indüklediğini göstermişler ve bileşiklerin antitümör ajan olarak değerlendirilebileceğini ifade etmişlerdir. Şalkon ve piperazine arasında yeni bir dizi hibrit bileşik sentezleyerek yapı-aktivite ilişkilerini ayrıntılı olarak incelemek isteyen Mao ve ark. (2016), asetofenon taşıyanların, A549 (akciğer kanseri), HeLa (serviks kanseri), SGC7901 (mide kanseri) hücrelerine karşı diğer hibrit bileşiklerden ve sisplatinden daha yüksek oranda antikanser aktivite sergilediğini göstermişlerdir. Ayrıca, bazı araştırıcılar, hibritlerde flor ve klor gibi halojen atomu varlığının antitümör aktivite için önemli rol oynadığını da bildirmişlerdir (Mao ve ark., 2016).

Yeni antikanser ilaçların keşfi için hücre kültürü (*in vitro*) uygulamaları ilk ve en önemli basamağı oluşturmaktadır. *İn vitro* kültür sonuçlarından elde edilecek ipuçlarının değerlendirilmesiyle yeni ajanların antikanser etkisini değerlendirmek ve daha ileri çalışmalarda bulunmak amacıyla *in vivo* çalışmalara başlamak mümkün olabilmektedir. Çalışmamızda Üniversite'miz Kimya Bölümü'nde sentezlenmiş olan 4 farklı florlu asetofenon türevi bileşiğin (AF1, AF2, AF3, AF4); Dunning modeli sıçan prostat kanseri hücreleri (AT-2 ve MAT-LyLu) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla yapılan Tripan mavisi analizi sonucunda, bileşiklerin, çalışılan hücrelere toksik etki göstermeyen konsantasyonları maksimum 5 μM olarak belirlenmiştir. Bileşiklerin 0.01 – 5 μM konsantrasyon aralığında hem AT-2 hem de MAT-LyLu hücrelerinin proliferasyonu üzerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı tespit edilmiştir. Bileşiklerin uygulanmasına 72 saat süreyle devam edildiğinde hücre sayısında anlamlı bir değişiklik gözlenmemekle birlikte 24 ve 48 saat süreyle uygulanan AF2, AF3 ve AF4 bileşiklerinin MAT-LyLu hücrelerinin mitotik aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Çalışmada, antikanser özelliği çok iyi bilinen ve hali hazırda kemoterapotik ajan olarak kanser tedavisinde kullanılan 5-FU, pozitif kontrol olarak kullanılmış ve hücre proliferasyonunu 1 – 30 μM konsantrasyon aralığında inhibe etmiştir.

Literatürde, doğal veya sentetik, çeşitli asetofenon türevlerinin çeşitli kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik ve antiproliferatif aktiviteleri bildirilmiştir. Ancak çalışmadan elde edilen sonuçlar, literatürün aksine, çalışılan bileşiklerin AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerinde antiproliferatif etki göstermediğini hatta MAT-LyLu hücrelerinin çoğalmasını stimüle edebileceğini ortaya çıkarmıştır. Ancak kanserin birey özgü bir hastalık olması nedeniyle bileşiklerin antiproliferatif aktiviteleri hakkında kesin bir yargıya varabilmek için farklı hücre hatları ile de çalışılmalıdır. Ayrıca çalışmada, diğer bir kısıtlayıcı nokta bileşiklerin zayıf çözünürlüğe sahip olmalarıdır. Bileşikler için çözücü olarak kullanılan DMSO'nun toksik etkileri nedeniyle 5 μM'dan daha yüksek konsantrasyonlar kullanılamamıştır. Bu sebeplerle bileşiklerin daha yüksek çözünürlüğe sahip formları dizayn edilerek farkı hücre hatları ile denemelere devam edilebilir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında yeni sentezlenmiş asetofenon bileşiklerinin [N,N–Etilen–bis–5 floro asetofenon ($C_{18}H_{18}O_2N_2F_2$) (AF1), N,N–Propilen–bis–3,5 di floro asetofenon ($C_{19}H_{18}O_2N_2F_4$) (AF2), N,N–Butilen–bis–3,5 di floro asetofenon ($C_{20}H_{20}O_2N_2F_4$) (AF3), N,N–Propilen–bis–5 floro asetofenon ($C_{19}H_{20}O_2N_2F_2$) (AF4)] Dunning modeli sıçan prostat kanseri MAT-LyLu ve AT-2 hücrelerinin proliferasyon, mitotik aktivite gibi kinetik özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle bileşiklerin çalışma konsantrasyonları belirlenmiş ve toksik olmayan konsantrasyonlar (0,01µM, 0,025 µM, 0.05 µM, 0,1 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM, 5 µM) seçilmiştir. Ardından bileşiklerin hücre proliferasyonu ve mitotik aktiviteleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışma ile yeni sentezlenmiş olan florlu asetofenon bileşiklerinin AT-2 ve MAT-LyLu hücrelerinin kinetik özellikleri üzerindeki etkileri ilk kez araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- Bileşiklerin, AT-2 ve MAT-LyLu hücreleri üzerine 24, 48 ve 72 saat gibi sürelerle uygulanmaları sonucunda hücre proliferasyonunda herhangi bir değişiklik oluşturmadıkları görülmüştür.

- AF1 ve AF2, AT-2 hücrelerinin mitotik aktivitesi üzerinde herhangi bir değişiklik oluşturmazken; AF3, 5 µM konsantrasyonda 24 saat süreyle uygulandığında mitoz indeksini baskılamış ancak bu etki konsantrasyonun artışı ve uygulama süresinin uzamasıyla ortadan kalkmıştır. AF4 bileşiği de 5 µM konsantrasyonda 48 saat süreyle uygulandığında AT-2 hücrelerinin mitotik indeksini azaltmıştır.

- AF1 bileşiği, MAT-LyLu hücrelerinin mitotik aktivitesini 0.25 ve 5 µM konsantrasyonda 24 saat süreyle uygulandığında baskılamış; ancak uygulama süresinin uzamasıyla bu etki ortadan kalkmıştır. AF2, AF3 ve AF4 bileşikleri ise hem 24 hem de 48 saatlik uygulamalarda hemen hemen

tüm konsantrasyonlarda (0.01, 0.25, 5 μM) hücrelerin mitotik aktivitesini stimüle etmiştir.

- Bileşikler için çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. DMSO'nun sınırlayıcı etkisi nedeniyle deneylerde kullanılan maksimum DMSO konsantrasyonu %0.5 olarak ayarlanmıştır.

- Bileşiklerin DMSO (ve diğer çözücüler) içerisindeki çözünürlüklerinin çok zayıf olduğu tespit edilmiştir. Zayıf çözünürlük, daha yüksek konsantrasyonlarla çalışmaya izin vermemiştir. Bu nedenle bileşiklerin dizaynında çözünürlüğü arttıracak bazı modifikasyonlar yapılmasının avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir.

Yukarıda özetlenen sonuçlar ışığında; çalışma kapsamında değerlendirilen yeni sentezlenmiş florlu asetofenon türevi bu dört bileşiğin çalışılan hücreler için antiproliferatif aktiviteye sahip olmadıkları belirlenmiştir. AT-2 hücreleri üzerinde dalgalı sonuçlar görünmekle birlikte, özellikle AF2, AF3 ve AF4 bileşiklerinin MAT-Lylu hücrelerinin mitotik aktivitesini belirgin şekilde stimüle etmeleri, bu maddelere uzun süreli maruz kalmanın kanser hücrelerinin çoğalmasını hızlandırabileceğini düşündürmektedir. Tez çalışması kapsamına alınan iki prostat kanseri hücre soyu ile ulaşılan bu sonuçlar, bütün kanser türleri için geçerli olmayabilir. Kanserin bireye özgü bir hastalık olması nedeniyle sahada önerilen hücre panelleri üzerinde denemeler yapılabilir. Ancak araştırma yaparken, bu bileşiklerin ya da yeni sentezlenecek olan başkalarının beklenenin aksine kanseri geliştirebileceği ihtimalinin daima göz önünde bulundurulması gereklidir.

KAYNAKLAR

AHMED, S.A., GOGAL, R.M. J.R., WALSH, JE., 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. J. Immunol. Methods, 170: 211-224.

AKBULUT, H., ve AKBULUT, K.G., 2005. Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, Editör İçli F. Sayfa 23.

ALİCAN, F., 1993. Kanser. Afa Matbaacılık, İstanbul, 48s.

ANISIMOV, V.N., UKRAINTSEVA, S.V. and YASHIN, A.I., 2005. Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans. Nature Reviews Cancer, 5: 807-819.

ANONİM, 2013. Wp. Sağlık. http://www.basurnedenolur.com/kanser-tedavisi.html. [Erişim tarihi: 20.02.2018].

ANONİM, 2016. Carcinogenesis. https://en.wikipedia.org/wiki/Carcinogenesis [Erişim tarihi: Eylül, 2016].

ANONYMOUS, 2000. Epa (U.S. Environmental Protection Agency), Acetophenone. https://www.epa.gov/sites/production/files/2016/09/documents/acetophenone. [Erişim tarihi: 10.02.2017].

ANONYMOUS, 2008. American Cancer Association. http://www.cancer.org/alt _therapy/overview.html. [Erişim tarihi: 25.05.2008].

ARSLAN, Ö., 2007. Kök Hücre Mobilizasyonu Yetmezliği. 4. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök hücre Tedavileri Kongresi, 1-4 Mart, Bursa, s17-22.

AZIRAK, S., 2007. Thymol ve Carvacrol'un in vivo Genotoksik Etkilerinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana,142s.

BARILE, F.A., 1994. Introduction to in vitro cytotoxicology mechanisms and methods. CRC Pres, Florida, USA, 240s.

BARLTROP, J.A., OWEN, T.C., CORY, A.H., CORY, J.G., 1991. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2- (4,5-dimethylthiazolyl)-3- (4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3- (4,5-dimethylthiazolyl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters, 1(11): 611-614.

BAŞAR, F., 2006. Taşıyıcı Enzimlerdeki Genetik Polimorfizmlerin İlaç Yanıtına Etkileri. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, Ankara, 70s.

BETHESDA, MD., 1993. U.S. Department of Health and Human Services. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS, online database). National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, 260: 1317-1320

CABADAK, H., 2008. Hücre Siklusu ve Kanser. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi. 9 (3): 51-61.

CHAUDHARY, M., CHAUDHARY, P., 2016. Anticancer activity of microwave assisted newly synthesized 2,3,4,9-tetrahydro-1h-carbazole derivatives.

International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 8(4): 390-392.

CHU, C.H., SUN, X.W., SUN, L., ZHANG, Z.Y., LI, Z.C., and LIAO, R.A., 1999. Synthesis and Biological Activity of ω-(S-Aryl-1 ,3,4-oxadiazol-2-thio)- and ω-(S-Aryl-1 ,3,4-oxadiazol-2-thioacetoxyl)- ω-(1-H-). Journal of the Chinese Chemical Society, 46(2): 229-232.

COOPER, G.M., HAUSMAN, R.E., 2006. Hücre: Moleküler Yaklaşım. 3. Baskı, İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 9944-5148-0-2.

CROUCH, S.P.M., KOZLOWSKİ, R., SLATER, K.J., FLETCHER, J., 1993. The use of ATP bioluminescence as a measure cell proliferation and cytotoxicity. J. Immunol. Methods, 160: 81-88.

DANCEY, J., ARBUCK, S., 2000. Cancer drugs and cancer drug development for the new millennium. In: Progress in Anti-cancer Chemotherapy. Editors: D Khayat, GN Hortobagyi. Springer, France, Berlin, Heidelberg, 91-107s.

DECKER, T., LOHMANN-MATTHES, M.L., 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. J. Immunol. Methods, 15: 61-69.

DOWLİNG, M.D., KRAKOFF, I. H., KARNOFSKY, D.D., 1970. Mechanism of Action of Anti-Cancer Drugs, Chemotepaphy of Cancer, Warren, C. (Ed.), Lea and Febiger, Philadelphia, s.1210-1230.

DUSHİNSKY, P., HEİDELBERGER, C., 1957. The synthesis of 5-flouropyrimidines. J. Am. Chem. Soc., 79: 4559.

ERB, R.E., EHLERS, M.H., 1950. Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen fertilizing capacity. J Dairy Sci, 33(12): 853-864.

EVAN, G.I. and VOUSDEN, K.H., 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. Nature 411: 342-348.

FAN, F., WOOD, K.V., 2007. Bioluminescent assays for highthroughput screening.Assay Drug Dev Techn., 5(1): 127-136.

FEARNHEAD, H.O., 2004. Getting back on track, or what to do when apoptosis is de-railed: recoupling oncogenes to the apoptotic machinery. Cancer Biol. Ther., 3(1): 21-28.

FENT, K., 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. Toxicology in vitro, 15(7): 477-488.

FIRAT, D., and HAYRAN, M. D., 1995. Cancer Statistics in Turkey and in the World 1990-92. Turkish Association for Cancer Research and Control, 1st Ed., İz Matbaacılık, Ankara, 12s.

FIŞKIN, K. 2002. Genetik Kavramlar. Altıncı baskıdan çeviri. Öner, C. Sayfalar 635-651.

FREİ, E., 1974. Effect of Dose and Schedule on Reponse; Cancer Medicine, Lea and Febiger, Philadelphia, s. 1519-1526.

FUGLSETH, E., 2010. Synthesis of 1-aryl-2-fluoroethanones and their use in the preparation of enantioenriched 1-aryl-2-fluoroethanols and 1-aryl-2-fluoroethylamines. Norwegian University of Science and Technology, Doctorate thesis, Trondheim, Norwegia, 133s.

FUTREAL, P.A., KASPRZYK, A., BİRNEY, E., MULLİKİN, J.C., WOOSTER,

R., STRATTON, M., 2001. Cancer and genomics. Nature 6822: 850-852.

GAD, S.C., 2000. In vitro toxicology, Second Edition. Taylor&Francis, New York, 481s.

GALLUZZİ, L., AARONSON, S.A., ABRAMS, J., ALNEMRİ, E.S., ANDREWS, D.W., BAEHRECKE, E.H., BAZAN, N.G., BLAGOSKLONNY, M.V., BLOMGREN, K., BORNER, C., BREDESEN, D.E., BRENNER, C., CASTEDO, M., CİDLOWSKİ, J.A., CİECHANOVER, A., COHEN, G.M., LAURENZİ, V.D., MARİA, R.D., DESGMUKH, M., DYNLACHT, B.D., FLAVELL, R.A., FULDA, S., GARRİDO, C., GOLSTEİN, P., GREEN, D.R., GRONEMEYER, H., 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. Cell Death Differ, 16(8): 1093-1107.

GENÇ, S., AKHİSAROĞLU, M., ve GENÇ, K., 2002. Eritropoetin'in PC12 hücre Hattında Amiloid-Beta peptid ile oluşturulan nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisi, Turkish Journal of Geriatrics, 5(1): 1-6.

GUL, H.I., DENIZCI, A.A., ERCIYAS, E., 2002. Antimicrobial evaluation of some mannich bases of acetophenones and representative quarternary derivatives. Arzneimittelforschung/Drug Research, 52(10): 773-777.

GUYOT, C., BOUSETA, A., SCHEİRMAN, V.V., COLLİN, S., 1998. Floral origin markers of chestnut and lime tree honeys. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 625–633.

GÜNDOĞDU-KARABURUN, N., BENKLİ, K., TUNALI, Y., UÇUCU Ü., DEMİRAYAK Ş., 2006. Synthesis and antifungal activities of some aryl [3-(imidazol-1-yl/triazol-1-ylmethyl) benzofuran-2-yl] ketoximes. European Journal of Medicinal Chemistry, 41: 651–656.

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. Cell, 100(1): 57–70.

HAYASHI, Y.Y.K., MISUMI, T., 1986. 5-(2-chloro-4-trifluoromethylphenoxy)-2-nitro-alpha-substituted-acetophenone, oxime derivative thereof, process for preparing thereof, herbicidal composition, and method for the destruction of undesirable weeds. Patent Number: 4: 708-734; Date of Patent: Nov. 24, 1987. https://www.google.com/patents/EP0186989A2?cl=fi, 0186. Publication number: 0186989 A2 , 1-115s.

HİTCHİNGS, G.H., 1983. "Rational design of anticancer drugs: here, imminent or illusive. In, Development of Target-Oriented Anticancer Drugs", Progress in Cancer Research and Theraphy, Raven Press, New York, 28: 227-238.

HO, A., DOWDY, S.F., 2002. Regulation of G1 cell-cycle progression by onkogenes and tumor suppressor genes. Current Opinion in Genetics & Development, 1: 47-52.

HOLST, C.M., and OREDSSON, S.M., 2005. Comparison of three cytotoxicity teste in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines. Toxicology in Vitro, 19: 379-387.

HWANG, B.Y., KİM, S.E., KİM, H.S., HONG, Y.S., RO, J.S., LEE, K.S. AND LEE, J.J., 1999. Pregnane glycoside multidrug-resistance modulators from Cynanchum wilfordii. J Nat Prod, 62: 640-643.

ISHİYAMA, M., TOMİNAGA, H., SHİGA, M., SASAMOTO, K., OHKURA, Y., UENO, K., WATANABE, M., 1995. Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produce formazan dye. In

Vitro Toxicology, 8: 187- 190.
IKARIYA, T., and BLACKER, J., 2007. Asymmetric Transfer Hydrogenation of Ketones with Bifunctional Transition Metal-Based Molecular Catalysts. Acc. Chem. Res., 40: 1300–1308.
JUNG, K. Y., KİM, S.K., GAO, Z.G., GROSS, A.S., MELMAN, N., JACOBSON, K.A., and KİM, Y.C., 2004. Structure-activity relationships of thiazole and thiadiazole derivatives as potent and selective human adenosine A[3] receptor antagonists. Bioorg. Med. Chem., 12: 613-623.
KARA, B., FESCİ, H., 2004. Kanserde öz-bakım ve yaşam kalitesi. Hematoloji-Onkoloji, 6(4): 124-29.
KASTAN, M., and BARTEK, J., 2004. Cell cycle check points and cancer. NATURE, 432: 316-323.
KATZUNG B.G., SALMON S.E., SARTORELLİ E.C., 1992, Basic &Clinical Pharmacology, Appleton&Lange, Lebanon, 766-801s.
KAYAALP, M., PEDERSEN, T., BRUCE, R., 1996. Signicant Lexical Relationships. Department of Computer Science & Engineering Southern Methodist University Dallas, TX: 75275.
KAYAALP, S.O., 1987, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Cilt 1, Dördüncü baskı, Toraman ve Ulucan Matbaası, Ankara, 1028s.
KEETON, W.T., GOULD, J.L., 2000. Genel Biyoloji, Cilt I, Palme Yayıncılık, 5. Baskı, Ankara, 694s.
KNUDSON, A.G., 1971. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 68(4): 820–823.
KO, H.H., TSAO, L.T., YU, K.L., LİU C.T., WANG, J.H., LİN, C.N., 2003. Structure-activity relationship studies on chalcone derivatives. The potent inhibition of chemical mediators release. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 11: 105–111.
KOPNİN, B.P., 2000. Targets of oncogenes and tumor supressors: Key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. Biochemistry, 65(1): 2-27.
KORKMAZ, K.S., ELBİ, C., KORKMAZ, C.G., LODA, M., HAGER, G.L. and SAATÇİOĞLU, F., 2002. Molecular Cloning and Characterization of STAMP1, a Highly Prostate-specific Six Transmembrane Protein that Is Overexpressed in Prostate Cancer. The Journal of Biological Chemistry, 277(27): 36689-36696.
KORZENİEWSKİ, C., CALLEWAERT, D.M., 1983. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. J. Immunol. Methods, 64: 313-320.
KOULOURA, E., HALABALAKİ, M., LALLEMAND, M.C., NAM, S., JOVE, R., LİTAUDON, M., AWANG, K., HADİ, H.A., and SKALTDOUNİS, A.L., 2012. Cytotoxic Prenylated Acetophenone Dimers from Acronychia pedunculata. 2012 American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy, 75: 1270−1276.
KUTLUK, T., KARS, A., 1994. Kanser Konusunda Genel Bilgiler, Ankara, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, 26s.
LAMMERS, T., HENNİNK, W.E., STORM, G., 2008. Tumour targeted nanomedicines: Principles and practice. Brit. J. Cancer, 99: 392-397.
LANGDON, S.P., 2004. Cancer Cell Culture, Methods and Protocolos. Humana Press, otowa, New Jersey, 360s.

LAPPALAİNEN, K., JÄÄSKELÄİNEN, I., SYRJÄNEN, K., URTTİ, A., SYRJÄNEN, S., 1994. Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. Pharm Res, 11(8): 1127-1131.

LAVAULT, M., RICHOMME, P., BRUNETON, J., 1999. Acetophenones and new pregnane glycosides from the roots of Vincetoxicum hirundinaria. Fitoterapia, 70: 216-220.

LEE, Y.B., GONG, Y.D., KİM, D.J., AHN, C.H., KONG, J.Y. ve KANG, N.S., 2012. Synthesis, Anticancer Activity and Pharmacokinetic Analysis of 1-[(substituted 2- 210 alkoxyquinoxalin-3-yl)aminocarbonyl]-4-(hetero)arylpiperazine Derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 20: 1303-1309.

LEMKE, T.L., DAWİD, A.W., ROCHE, V.F., ZİTO, S.W., 2008. Foyes Principles of Medicinal Chemistry. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins. 6th ed., 1374s.

LEWİS, E., ROGACHEV, B., SHAKED, G., DOUVDEVANİ, A., 2001. The in vitro effects of ketamine at large concentrations can be attributed to a nonspecific cytostatic effect. Anesth. Analg., 92: 927–929.

LİND, MJ., 2011. Principles of cytotoxic chemotherapy. Medicine, 39(12): 711-6.

LOMAKİNA, G.Y., MODESTOCA, Y.A., UGAROVA N.N., 2015. Bioluminescence assay for cell viability. Biochemistry (Mosc), 80(6): 701-713.

LONGLEY, D.B., HARKİN, D.P., JOHNSTON, G., 2003. 5-Fluorouracil: Machanisms of action and clinical strategies. Nature Reviews Cancer, 3: 330-338.

LONGO-SORBELLO, G.S.A., SAYDAM, G., BANERJEE, D., BERTİNO, JR., 2006. Cytotoxicity and cell growth assays. In "Cell biology: a laboratory handbook", Ed; Celis JE, Elseiver Academic Press, Burlington, 315-324s.

MAO, Z., ZHENG, X., Qİ, Y., ZHANG, M., HUANG,Y., WAN, C. AND RAO, G., 2016. Synthesis and biological evaluation of novel hybrid compounds between chalcone and piperazine as potential antitumor agents. The Royal Society of Chemistry, 6: 7723-7727.

MELET, A., SONG, K., BUCUR, O., JAGANİ, Z., GRASSİAN, A.R., 2008. Khosravi-Far, R. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy. Adv. Exp. Med. Biol., 615: 47-79.

MİYAZAWA, M., SHİMAMURA, H., NAKAMURA, S., 2000. Suppression of Furylfuramide-Induced SOS Response by Acetophenones Using Salmonella typhimurium TA1535/pSK1002 umu Test. J. Agric. Food Chem., 48(9): 4377-4380.

MOSSMAN, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, 65: 55-63.

NAGATA, S., 2000. Apoptotic DNA fragmentation. Exp. Cell Res., 256: 12–18.

NAMLI, Ş., ÖZKÖK, A., ÇOLAK, Y., ERTEN, N., KARAN, MA., TAŞÇIOĞLU, C. ve ark., 2007. L-tiroksin yerine yanlışlıkla uzun süre metotreksat kullanımına bağlı toksisite; hastaları tedavileri konusunda yeterince bilgilendiriyoruz muyuz. Nobel Med., 3(3): 31-4.

NAVONE, N., LABATE, M.E., TRONCOSO, P., PISTERS, L.L., CONTI, C.J., LOGOTHETIS, C.H., 1999. p53 mutations in prostate cancer bone

metastases suggest that selected p53 mutants in the primary site define foci with metastatic potential. The Journal of Urology, 161(1): 304-308.

NİLES, A.L., MORAVEC, R.A., HESSELBERTH, P.E., SCURRİA, M.A., DAİLY, W.J., RİSS, T.L., 2007. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. Anal Biochem, 336(2): 197-206.

OLTEAN, S., FEBBO, P.G., 2008. Dunning rat prostate adenocarcinomas and alternative splicing reporters: powerful tools to study epithelial plasticity in prostate tumors in vivo. Clin. Exp. Metastasis, 25: 611–619.

PAGE, R., TAKİMOTO, C., 2004.. In: Cancer Management: A Multidisciplinary Approach Medical, Surgical & Radiation Oncology. Principles of chemotherapy, PRR, New York, 21-38s.

PINARBAŞI, E., 2010. Apoptozis (programlı hücre ölümü), Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B (Editörler). Moleküler Biyoloji. 2. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, 425-470s.

PİEROTTİ, MA., SOZZİ, G., CROCE, CM., 2003. Oncogenes, Cancer Medicine. 6th ed. Hamilton, Ontario; BC Decker Inc., 73–85s.

PİTOT, H.C., 1976. Fundamentals of Oncology. 3 Ed., Marcel Dekker Inc., New York, 22s.

PUTNAM, K.P., BOMBICK, D.W., and DOOLITTLE, D.J., 2002. Evaluation of eight in vitro assays or assessing the cytotoxicity of cigarrette smoke condansate. in vitro Toxicology, 16(1): 599-607.

PAULL, K.D., SHOEMAKER, R.H., BOYD, M.R., PARSONS, J.L., RİSBOOD, P.A., BARBERA, W.A., SHARMA, M.N., BAKER, D.C., HAND, E., SCUDİERO, D.A., MONKS, A., ALLEY, M.C., GROTE, M., 1988. The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bioreducible to a water-soluble formazan. J. Heterocyclic Chem., 25: 911-914.

PRABHAKAR, V., BALASUBRAMANİAN, R., SATHES, P., KRİSHNA, C.M., JUVEKAR, A., 2014. In Vitro Anticancer Activity of Monosubstituted ChalconeDerivatives. International Journal of Tumor Therapy, 3(1): 1-9.

PESSOTO, F.S., YOKOMİZO, C.H., PRİETO, T., FERNANDES, C.S., SİLVA, A.P., KAİSER, C.R., BASSO, E.A. and NANTES, I.S., 2015. Thiosemicarbazone p-Substituted Acetophenone Derivatives Promote the Loss of Mitochondrial $\Delta\psi$, GSH Depletion, and Death in K562 Cells. Hindawi Publishing Corporation, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 15s.

PUCCİ, B., GİORDANO, A., 1999. Cell cycle and cancer. Clin. Ter. 2: 135-41.

RAHWAY, NJ., 1989. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 11th ed. Ed. S. Budavari., 98-86s.

RAJABİ, L., COURREGES, C., MONTOYA, J., AGUİLERA, R. J., Primm, T.P., 2005. Acetophenones with selective antimycobacterial activity. Letters in Applied Microbiology, 40: 212-217.

RANDOLPH, V.L., VALLEJO, A., SPİRO, R.H., SHAH, J., STRONG, E.W., HUVOS, A.G., WİTTES, R.E., 1978. Combination Theraphy of Advanced Head and Neck Cancer. Cancer, 41: 460-467.

RİSS, T.L., MORAVEC, R.A., 2006. Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. In Cell Biology, 1: 25-31.

RİSS, T.L., MORAVEC, R.A., O'BRİEN, M.A., HAWKİNS, E.M., NİLES, A., 2006. Homogeneous multiwell assays for measuring cell viability, cytotoxicity, and apoptosis. In "Handbook Of Assay Development In Drug Discovery", Florida, USA, s.384-387.

SADIRLI, S.K., ÜNSAR, S., 2009. Kanserli hastalarda Edmonton Semptom Tanılama Ölçeği (ESTÖ); Türkçe geçerlilik ve güvenirlik çalışması. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi, 4(1): 79-95.

SALİ, N., NAGY, S., POÓR, M., KÖSZEGİ, T., 2016. Multiparametric luminescent cell viability assay in toxicology models; A critical evaluation. J. Pharmacol Toxicol Methods, 79: 45-54.

SALMON, S. E., SARTORELLİ, A.C., 1989. Basic and Clinical Pharmacology Katzung, B.G. (Ed.), Prentice-Hall Int. Inc. , Connecticut, s.683-715.

SAXENA, H.O., FARİDİ, U., SRİVASTAVA, S., KUMAR, J. K., DAROKAR, M. P., LUQMAN, S., CHANOTİYA, C. S., KRİSHNA, V., NEGİ, A.S., KHANUJA, S. P. S., 2008. Gallic acid-based indanone derivatives as anticancer agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 18: 3914–3918.

SCUDİERO, D.A., SHOEMAKER, R.H., KENNETH, D.P., MONKS, A., TİERNEY, S., NOFZİGER, T.H., CURRENS, M.J., SENİFF, D., BOYD, M.R., 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res., 48: 4827-4833.

SHİRZADFAR, H., TAHERİ-KAFRANİ, A., TAVASSOLİ-KAFRANİ, E., 2017. Champter 5- Dendrimers and Dendrimers-Grafted Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles; Synthesis, Characterization, Functionalization and Biological Applications in Drug Delivery Ststems. Nano and Microscale Drug Delivery Systems, s.75-94.

SİLVA, F.S.G., STAROSTİNA, I.G., IVANOVA, V.V., RİZVANOZ, A.A., OLİVEİRA, P.J., PEREİRA, S.P., 2016. Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay. Curr. Protoc. Toxicol, 68: 2.24.1-2.24.15

SİTTİG, M., 1985. Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens. 2nd ed. Noyes Publications, Park Ridge, NJ., s.86-98.

SOYKAN, C. AND EROL, İ., 2003. Synthesis, Characterization, and Biologicaj Activity of N-(4-Acetylphenyl) maleimide and Its Oxime, Carbazone, Thiosemicarbazone Derivatives and Their Polymers. J.Polymer Science, Polymer Chem., 41: 1942-1951.

SPİEGEL, R.J., 1984. Anticancer and Interferon Agents, Synthesis and Properties, Ottenbrite, R.M., Butler, G.B. (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, s.253-256.

SQUATRİTO, R.C., CONNOR, J.P., BULLER, R.E., 1995. Comparison of a novel redox cell growth assay to the ATP bioluminescence assay. Gynecol Oncol, 58: 101-105.

ŞENCAN S., 2006. Warfarinin sitotoksik etkisinin K562 lösemik hücre soyunda çalışılması. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 55s.

TATSUMURA, Y., MASKARİNEC, G., SHUMAY, DM., KAKAİ, H., 2003. Religious and spiritual resources, CAM, and conventional treatment in the

lives of cancer patients. Altern. Ther. Health. Med., 9(3): 64-71.
TENNANT, T.R., KIM, H.K., SOKOLOFF, M. and RINKER-SCHAEFFER, C.W., 2000. The Dunning model. The Prostate, 43(4): 295-302.
TERUYUKİ, M., YOSHİHARU, H. and KA, Y., 1986. Oxime derivative there of, Process for preparing there of, Herbicidal composition and methods for the destruction of undesirable weeds. Asahi Chemical Ind., Japan.
TOMATIR, A.G., 2003. Apoptoz; Programlı Hücre Ölümü. T Klin Tıp Bilimleri, 23: 499-508.
TOMİNAGA H, ISHİYAMA M, OHSETO F, SASAMOTO K, HAMAMOTO T, SUZUKİ K, WATANABE M, 1999. A watersoluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. Analytical Communications, 36: 47- 50.
TREASE and EVANS, 1996. Pharmacognosy, 15th Ed., W.B. Sunders Company Ltd., s.569-570.
WALDMANN, T., 2003. Immunotherapy; Past, Present and Future. Nature Medicine, 9(3): 269-277.
WANG, J., WANG, W., CHİ, H.J. and YANG, Q.S., 2006. trans-2,2'-[(2-Butene-1,4-diyl)dithio]bis(4,5 dihydro-1,3-thiazine). Acta Cryst., E62: o4621-o4622.
WANG, X., KUMARAPELİ, A.R.K., SU, H., HUANG, W., TANG, M., ZHENG, H., HORAK, K.M., Lİ, M., 2008. B-Crystallin Suppresses Pressure Overload Cardiac Hypertrophy. Circ. Res., 103: 1473-1482.
WEINBERG, R., 2006. The Biology of Cancer. Garland Science; New York. 850s.
WILLIAMS, L.T., VRİES, C.D., ESCOBEDO, J.A., UENO, H., HOUCK, K., FERRARA, N., 1992. Thefms-Like Tyrosine Kinase, a Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor. Science Partner Journals, 255(5047): 989-991.
WİLKİNS, C.K., SCHOLL, S., 1989. Volatile metabolites of some barley storage molds. Int. J. Food Microbiol., 8(1): 11-17.
WOOD, L., KERN, P.A., RANGANATHAN, S., Lİ, C. And RANGANATHAN, G., 2001. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. Am J. Physiol. Endocrinol. Metab., 280: E745–E751.
YADAV, J. S., REDDY, P. T., NANDA, S. and RAO, A. B., 2001. Stereoselective synthesis of (R)-(−) denopamine, (R)-(−)-tembamide and (R)-(−)-aegeline via asymmetric reduction of azidoketones by Daucus carota in aqueous medium . Tetrahedron; Asymmetry, 12: 3381-3385.
ZETTER, B.R., 2008. The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research. Nature Reviews/ Cancer, 8: 647-654.
ZHANG, Y., SUN, K., 1992. Unscheduled DNA synthesis induced by the antitumor drug vincristine in germ cells of male mice. Mutation Research Letters, 281(1): 25-29.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Zübeyde ÖDEMİŞ
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Şanlıurfa / 29.02.1988
Telefon : 0542 770 28 91
e-mail : kanarya.zbd@gmail.com

EĞİTİM

Derece		Tarih
Lise	**:** Şanlıurfa Kız Lisesi Şanlıurfa/Merkez	2005
Lisans	**:** Harran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Şanlıurfa/Merkez	2012
Yüksek Lisans	**:** Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı-Şanlıurfa	2018

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Kurum	Görevi
2012-2016	Hastane	Biyolog

UZMANLIK ALANI: Hücre kültürü, Hücre canlılığı ve sitotoksisite testler, mitotik aktivite

YABANCI DİLLER: İngilizce

KATILDIĞI KONGRELER

1. Uluslararası Kanser ve İyon Kanalları Kongresi, 21-23, Eylül, 2017, Şanlıurfa