T.C

HARRAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FLORLU SCHİFF BAZLARININ PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ANTİPROLİFERATİF ETKİSİNİN CFSE BOYAMA METODU İLE BELİRLENMESİ

Nihal ALAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2019

Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ' ün danışmanlığında, Nihal ALAN' nın hazırladığı **"Florlu Schiff Bazlarının Pankreatik Kanser Hücre Hatları Üzerine Antiproliferatif Etkisinin CFSE Boyama Metodu İle Belirlenmesi"** konulu bu çalışma 24/05/2019 tarihinde aşağıdaki jürü tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı' nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman: Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ

Üye: Dr. Öğretim.Üyesi Sevgi İRTEGÜN KANDEMİR

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Zafer Hasan Ali SAK

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

Doç. Dr. İsmail HİLALİ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.
Proje no: 113Z134

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişleri, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak 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 v
SİMGELER DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
2.1. Kanser 4
2.1.1. Kanserin dünyada ve ülkemizde görülme sıklığı 5
2.1.2. Kanser biyolojisi 6
2.2. Pankreas 7
2.2.1. Pankreas kanseri 8
2.2.2. Pankreas kanseri epidemiyolojisi 9
2.2.3. Pankreas kanserinde tedavi yöntemleri 9
2.2.3.1. Cerrahi tedavi 10
2.2.3.2. Radyasyon tedavisi 10
2.2.3.3. Kemoterapi 11
2.3. Schiff Bazları 12
2.3.1. Schiff bazları tanımı 12
2.3.2. Schiff bazı kullanım alanları 14
2.3.3. Schiff bazları ve metal kompleksleri İle yapılan önceki çalışmalar. 15
2.4. Flor Atomunun Özellikleri ve Kullanım Alanları 20
2.5. Flor Atomunun İlaç Sanayinde Kullanımı 21
2.6. Florlu Schiff Bazları ile Yapılan Önceki Çalışmalar 22
2.7. Hücre Proliferasyonu 24
2.7.1. Hücre proliferasyon ölçüm yöntemleri 25
2.7.2. CFSE yöntemi. 26
2.8. Flow Sitometri 26
2.8.1. Flow sitometri çalışma prensibi 28
2.8.2. Flow sitometri analiz 29
3. MATERYAL ve METOD 30
3.1. Materyal 30
3.1.1. Bileşikler 30
3.1.2. Hücre hatları 33
3.1.2.1. Normal epitelial hücre hattı (PNT1a) 33
3.1.2.2. Pankreas karsinom hücre hattı (Capan-1) 33
3.1.2.3. Pankreas adacık hücre tümörü hattı (TGP52) 34
3.2. Metod 35
3.2.1. Bileşiklerin analizlere hazırlanması 35
3.2.1.1. Bileşiklerin tartımı 35
3.2.2. Hücre hatlarının hazırlanması 35
3.2.2.1. Hücrelerin çoğaltılması 35
3.3. CFSE Yöntemi 36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 40
4.1. Bulgular 40
4.1.1. Bileşiklerin PNT-1a hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri 40
4.1.2. Bileşiklerin Capan-1 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri 42
4.1.3. Bileşiklerin TGP52 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri 43
4.2. Tartışma 44
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 48
5.1. Sonuçlar 48
5.2. Öneriler 49
KAYNAKLAR 51
ÖZGEÇMİŞ 56

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FLORLU SCHİFF BAZLARININ PANKREAS KANSERİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ANTİPROLİFERATİF ETKİSİNİN CFSE BOYAMA METODU İLE BELİRLENMESİ

Nihal ALAN

Harran Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ

Yıl: 2019, Sayfa:56

Pankreas kanseri hemen daima ölümcül seyreden bir kanser türü olup, hastalığın sağaltımında kullanılacak yan etkileri minimumda bir kemoterapotik ajan keşfedilebilmiş değildir. Bu nedenle yeni kemoterapötik ajan arayışları devam etmektedir. Çalışmamızda, florlu Schiff bazlarının pankreas kanseri üzerindeki antikanser etkinliğinin belirlenmesi amacıyla, antiproliferatif etki yetenekleri in vitro kültür ortamında test edilmiştir. Salisilaldehit türevi 9 adet florlu schiff bazının antiproliferatif etkileri, normal (PNT1a) ve pankreas kanseri türleri olan adenokarsinoma (Capan-1) ve insülinoma (TGP52) hücreleri üzerine CFSE yöntemiyle test edilmiştir. CFSE ile boyanan hücrelerin bileşiklerle 72 saat inkübasyon sonrası flow sitometrik analizleri gerçekleştirilmiş ve her bir bileşiğin hücre hatları üzerindeki antiproliferatif indeksleri (Pİ) belirlenmiştir. PNT1a hücreleri üzerinde Bileşik 1'in (F2,3-SAL, Pİ: 7.52), Capan-1 hücreleri üzerine Bileşik 2' nin (F2,4-SAL, Pİ: 8,75) ve TGP52 hücreleri üzerine de Bileşik 6' nın (F2,3,4-SAL, Pİ: 5.19) güçlü antiproliferatif etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Çalışmamızda, Salisilaldehit türevi florlu Schiff bazlarının pankreas kanseri hücre hattları üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu, bu etkinliğin bileşiklerdeki flor atomu sayısıyla ve konumuyla korelasyon göstermediği sonucuna varılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: florlu schiff bazları, pankreas kanseri, proliferasyon, cfse boyası

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINING OF ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF FLOURINATED SCHIFF BASES ON PANCREATIC CANCER CELL LINES BY USING CFSE STAINING METHODS

Nihal ALAN

Harran University

Graduate School of Applied and Natural Science

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ

Year: 2019, Page:56

Pancreatic cancer is a type of cancer that is almost always fatal and a chemotherapeutic agent, to be used in the treatment of the disease, with mininmum side effects has not been discovered yet. Therefore, the search for new chemotherapeutic agents continues. In our study, the antiproliferative effect capabilities of fluorinated Schiff bases were tested in vitro in order to determine the anticancer effects on pancreatic cancer. The antiproliferative effects of 9 fluorinated schiff bases of salicylaldehyde derivative were tested using CFSE method in flow cytometry on normal (PNT1a) and pancreatic cancer types adenocarcinoma (Capan-1) and insulinoma (TGP52) cells. Flow cytometric analysis of the cells stained with CFSE after 72 hours of incubation with the compounds were performed and the antiproliferative index (PI) of each compound on the cell lines were determined. It is determined that Compound 1 (F2,3-SAL, PI: 7.52) on PNT1a cells, Compound 2 on Capan-1 cells (F2,4-SAL, PI: 8,75) and Compound 6 on TGP52 cells (F2,3,4-SAL, PI: 5.19) have potent antiproliferative effect. In our study, it was concluded that salicylaldehyde-derived fluorine Schiff bases have antiproliferative effect on pancreatic cancer cell lines and this activity does not correlate with the number and location of fluorine atoms in the compounds.

KEYWORDS: fluorinated schiff bases, pancreatic cancer, proliferation, cfse staining

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminde ve tezimi hazırlama aşamalarında desteğini hiç esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ'e ve çalışmada kullanılan bileşiklerin sentezini yapan Prof. Dr. Veli KASIM'a ayrıca tüm içtenlikleri ile beni destekleyen sevgili aileme sonsuz teşekkürler.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Pankreas organının yerleşimi……7
Şekil 2.2. Schiff bazı genel yapısı……. 13
Şekil 2.3. Azometin oluşumu…….. 13
Şekil 2.4. İmin oluşumu…… 12
Şekil 2.5. Hücre bölünme safhaları…… 24
Şekil 2.6. Flow sitometri temel bileşenleri……... 27
Şekil 2.7. Flow sitometri Çalışma Prensibi ……. 28
Şekil 3.1. Florlu Schiff bazlarından F2,3-SAL bileşiğinin açık formulü…… 30
Şekil 3.2. Florlu Schiff bazlarından F2,4-SAL bileşiğinin açık formula..…….. 30
Şekil 3.3. Florlu Schiff bazlarından F2,5-SAL bileşiğinin açık formula…….. 31
Şekil 3.4. Florlu Schiff bazlarından F3,4-SAL bileşiğinin açık formulü…….. 31
Şekil 3.5. Florlu Schiff bazlarından F3,5-SAL bileşiğinin açık formulü…..…… 31
Şekil 3.6. Florlu Schiff bazlarından F2,3,4-SAL bileşiğinin açık formulü…… 31
Şekil 3.7. Florlu Schiff bazlarından F2,4,5-SAL bileşiğinin açık formulü…… 31
Şekil 3.8. Florlu Schiff bazlarından F3,4,5-SAL bileşiğinin açık formulü…… 32
Şekil 3.9. Florlu Schiff bazlarından F4-SAL bileşiğinin açık formulü…… 32
Şekil 3.10. PNT1a normal prostat hücreler…… 33
Şekil 3.11. Capan-1 pankreas adenosarkoma hücreleri…… 34
Şekil 3.12. TGP52 pankreas adacık tümörü hücreleri…… 34
Şekil 3.13. Hücrelerin CFSE ile boyanmasının ardından floresan boyanma düzeylerinin floresan mikroskobik görüntüleri……. 37
Şekil 3.14. Hücrelerin CFSE ile boyanmasının ardından floresan yoğunlukları ve jenerasyonlar…. 37
Şekil 3.15. Hücrelerin CFSE ile boyanmasının ardından FL1 kanalında analizleri…… 38
Şekil 3.16. Florlu Schiff bazlarıyla 72 saat inkübasyon sonrası hücrelerin geçirdiği bölünmelere işaret eden folresan yoğunlukları ve meydana gelen jenerasyonları…… 39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Florlu Schiff bazlarının kimyasal formülleri ve IC değerleri……..….32
Çizelge 4.1. Florlu Schiff bazlarının PNT1a hücre hattı üzerinde 72 saat inkübasyon sonrası antiproliferatif etkilerinin flow sitometrik CFSE analiz verileri……..…41
Çizelge 4.2. Florlu Schiff bazlarının Capan-1 hücre hattı üzerinde 72 saat inkübasyon sonrası antiproliferatif etkilerinin flow sitometrik CFSE analiz verileri…… 42
Çizelge 4.3. Florlu Schiff bazlarının TGP52 hücre hattı üzerinde 72 saat inkübasyon sonrası antiproliferatif etkilerinin flow sitometrik CFSE analiz verileri……43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µM	Mikro Molar
5-FU	5 floro Urasil
A549	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hattı
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CFSE	Karboksifluorescein Süksinimidil Ester
DMSO	Dimetil Sülfoksid
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FCS	Fötal Dana Serumu
FL1	Yeşil Floresan Kanalı
IC50	% 50’ lik İnhibitör Konsantrasyonu
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KT	Kemoterapi
MCA	Mikro Sitotoksisite Assay Yöntemi
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
OD	Optik Dansite
PBS	Fosfat Tampon Solusyonu
Pİ	Poliferatif İndex
WHO	Dünya Sağlık Örgütü'nün
BT	Bilgisayarlı Tomografi
MCA	Sitotoksisite Assay Yöntemi
MCF-7	İnsan Göğüs Adeonakarsinoma
HT-29	Kolon Karsinoma
MDA-MB231	Metastatik Meme Kanseri Hücreleri
K562	Kronik Miyelositik lenfoma Hücreleri
Colo-205	Kolon karsinoma Hücreleri
IMR-32	Nöroblastoma Hücreleri

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin bölünüp çoğalma özelliklerinin kontrolünü kaybetmesi ile ortaya çıkan, genetik ve çevresel koşulların da etki ettiği kompleks bir durumdur. Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı özelliklere sahiptir. Kanserli hücre yüzeyi normal hücrelere göre reseptörleri ile daha fazla sinyal alırlar.

Pankreastaki hücreler kontrolsüz çoğaldıklarında tümör oluştururlar. Pankreas kanseri solid kanserler arasında en ölümcül olanlarındandır. Gastrointestinal kanser olarak batı dünyasında en sık görülen ikinci kanser türüdür. Pankreas kanserini diğer kanser türlerinden farklı kılan durum, diğer malignitelere kıyasla iyileştirilme ve sağkalım çok azdır.

Pankreas tümörünün hangi evrede olduğu ve çevresindeki organlarla ilişkisinin ne aşamada olduğu, özellikle de komşu damarlara ve/veya uzak organlara yayılıp yayılmadığı ortaya konulup cerrahi yolla çıkarılabilirliği değerlendirilir. Pankreas kanserinde, ileri evre tümörlerinde cerrahi müdahale yapılamaz. Bu hastalarda kemoterapi uygulanır, kemoterapi ile birlikte, gelişen sarılığının düzeltilmesi, beslenme desteğinin sağlanması, ağrının azaltılması ile yaşam konforunu tekrar sağlayabilmek için bazı girişimler uygulanabilir.

Kemoterapi uygulamaları sırasında verilen ilaçlar, alkilleyici ajanlar, kortikosteroidler, anti metabolitler, anti tümör antibiyotikler, mitotik inhibitörler ve topoizomeraz inhibitörlerini içermektedir.

Kemoterapi en yaygın tedavi yöntemi olup apoptoza dirençli veya tedavi esnasında kimyasala direnç geliştiren kanser hücrelerinde etkili değildir. Ayrıca kemoteropotikler sürekli çoğalan hematopoetik ve kıl hücreleri üzerinde olumsuz etki yaparlar.

Günümüzde sadece kanser hücreleri üzerinde etkili ve kanser hücrelerinin direnç geliştiremediği, yan etkileri olmayan kanser ilaçlarının keşfedilmesi için bilim dünyasında birçok araştırma yapılmaktadır.

Schiff bazı türevlerinin DNA ve RNA sentezini durdurucu etkilerinin olduğu ve bu etkilerini ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe ederek gerçekleştirdikleri bilinmektedir. Schiff bazlarının halo ve nitro türevlerinin oldukça etkili antimikrobiyal, antitümör, antifungal aktivitelerinin olduğu saptanmıştır.

Flor içeren ilaçlar tıpta anestezik, antibiyotik, anti-kanser ve anti-enflamatuar ajanlar, psikofarmasötikler ve diğer birçok uygulamada kullanılmaktadır. Florlanmış bileşikler tıptaki uygulamaları nedeniyle artan bir öneme sahiptir. Florun yer değiştirmesi florla oluşturulan organik bileşiklerin etkileri üzerinde önemlidir.

Biyolojik olarak aktif moleküllerin suni flor ikamesi, özellikleri ve aktiviteleri üzerinde etkilidir. Bir hidrojen atomunun ve / veya bir hidroksil grubunun bir flor atomu ile değiştirilmesi, ilaç geliştirmede yaygın stratejilerdir.

Tümör oluşturan hücrelerin biyolojisini temel parametreleri ile anlayabilmek için hücre proliferasyon hızının saptanması gerekmektedir. Tümörün büyüme hızını saptama onun biyolojik davranışı bağlamında belirleyici olduğuna inanılır.

CFSE, floresan ve süksinimid fonksiyonel grup olmak üzere iki gruptan oluşur. Karboksifloresan süksinimidil ester hücre zarından geçebilen bir boyadır. Hücre içine girdikten sonra esteraz aktivitesi ile floresan grubun asetatları kesilir, sonuç olarak floresan ışıma ortaya çıkar, bununla birlikte hücre zarından geçebilme özelliği yitirir. Hücre içindeki proteinlerin aminlerine bağlanır ve her bölünme ile yavru hücrelere geçer, dolayısıyla hücre prolifere oldukça florasan yayılımı yarıya düşer.

CFSE boyamasını takiben hücrelerin flow sitometride analizi ile, hücrelerin aldığı maksimum boya belirlenebilmektedir. Hücrelere bileşiklerin uygulanmasını müteakip tekrarlanan flow sitometri analizlerinde ise, hücrelerin bölünmeyle CFSE boyasını paylaşmaları sonucu floresan yoğunluklarındaki azalmalar takip edilmektedir. Bölünme esnasında hücrenin sahip olduğu boyayının iki yeni hücre tarafından eşit olarak paylaşıldığı düşünüldüğünde, her bir hücrenin taşıdığı floresan miktarı o hücrenin kaç bölünme geçirdiğinin bilgisini vermektedir.

Genel bir perspektifle, çalışmamızda florlu Schiff bazlarının pankreatik kanser hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkileri flow sitometride CFSE yöntemiyle araştırılarak, geç belirti veren ve teşhis edildikten sonra sağ kalım süresi az olan ve kemoterapik ajanların yetersiz kaldığı pankreas kanseri tedavisi için yeni kemoterapotik ajan adayları belirlenmeye çalışılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin bölünüp çoğalma özelliklerinin kontrolünü kaybetmesi ile ortaya çıkan, genetik ve çevresel koşulların da etki ettiği kompleks bir hastalıktır. Kanserleşen hücreler sürekli çoğalıp özelliklerini kaybederek fonksiyonlarını yerine getiremezler. Bölünebilme (kas ve sinir hücreleri hariç) özelliği tüm hücrelerimizde bulunan bir özelliktir. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve hasar gören dokuların tamiri için bu özelliğin devam etmesi gereklidir. Hücrelerin bu özelliği sınırlıdır. Sağlıklı bir hücre ne kadar bölüneceğini ve öleceği zamanı bilir. Hücrelerin çoğalması DNA tarafından genetik olarak komutun verilmesi ile başlar. Hücrelerin bölünmesi ve kontrolü genlerin kontründe olduğundan kanser genlerle ilişkili olan bir hastalıktır.

Sağlıklı bir hücrede bölünme çekirdekte DNA tarafından gerçekleştirilir. DNA hasara uğradığı zaman ya tamir edilir ya da immün sistem tarafından parçalanır. Kanser hastalığında ise hücrelerin çeşitli faktörlerden (kimyasallar, UV ışını, radyasyon, yanlış eşleşme gibi) dolayı DNA ları hasar görür ve parçalanmaz, çoğalmaya devam eder ve kümeleşme oluşturur. Bu hücre kümelerine tümör denir. İyi huylu tümörler tehlike oluşturmaz ve cerrahi müdahale ile alınırlar ve tekrarlanmazlar. Kötü huylu tümörler çoğalarak yanındaki dokuları sıkıştırırlar, bu hücreler kan ve lenf sistemine geçerek başka doku ve organlara yayılarak metastaz yaparlar ve bulundukları yerde kümelenerek tümör oluştururlar.

Kanserin nedeni kesin olarak bulunamamıştır. Ancak sebep olan etmenleri, değiştirilebilen ve değiştirilemeyen etmenler olarak sınıflandırabilir. Değiştirilemeyen etmenleri; ailesel, yaş, cinsiyet olarak sıralanabilir. Değiştirilebilen etmenler; sigara ve alkol kullanımı, radyasyona maruz kalma, kötü beslenme, bazı virüsler, gıdalardaki katkı maddeleri, hava kirliliği ve uzun süre güneşe maruz kalma olarak sıralanabilir. (saglik.gov.tr)

2.1.1. Kanserin dünyada ve ülkemizde görülme sıklığı

Dünya Sağlık örgütü WHO'nun 2014'te yayımladığı rapora göre gelişmekte olan ülkeler, nüfus artışı ve yaş popülasyonunun artmasına bağlı olarak kanser vakaları oranında, gelişmiş ülkelere nazaran daha fazla etkilenmektedirler. Saptanan toplam vakaların %60 ından fazlası Afrika, Asya, Orta ve Güney Amerika ülkelerinde ortaya çıktığı görülmektedir. Vakaların ölümle sonuçlananların %70 inden fazlasının bu bölgelerde görüldüğü saptanmıştır. Bu bölgelerdeki ölüm oranının artması, erken teşhis ve tedavide uygulamalarının eksik olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir.

Yine aynı tarihli 2014 Dünya Kanser Raporu'na göre 2012 yılında 14 milyon yeni kanser vakası olduğu rapor edilmiştir. Bu sayının önümüzdeki 20 yıla kadar 22 milyona çıkacağı tahmin edilmiştir. Ayrıca bu süreçte kanser ölümlerinin yıllık 8.2 milyondan 13 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. 2012'de dünya çapında en yaygın kanser teşhisleri akciğer (yılda 1.8 milyon vaka, total vakaların %13'ü), meme (yılda 1.7 milyon, total vakaların %11.9'u) ve kalın bağırsak (yılda 1.4 milyon, görülen vakaların %9.7'si) üzerine olduğu belirtilmiştir. Kanser türlerinde gerçekleşen ölümlerin çoğu, akciğer kanseri (1.6 milyon, total ölümlerin %19.4'ü), karaciğer kanseri (0.8 milyon, total ölümlerin % 9.1'i) ve mide kanseri(0.7 milyon, total ölümlerin %8.8'i) vakalarında olduğu bildirilmiştir. (worldcancerreport,2012).Yine Dünya Sağlık örğütü verilerine gore 2025'e kadar 19 milyona , 2030'a kadar 22 milyona ve 2035'te 24 milyona çıkacağı öngörülmektedir (WHO,2015). (Burmaoğlu, 2017)

Ülkemizdeki bir yıl içerisinde resmi rakamlara bakıldığında yaklaşık olarak 96.200 erkek ve 67.200 kadında kanser teşhisi konulduğu tahmin edilmektedir. Son 5 yılın verileri değerlendirildiğinde; kanser sıklığında herhangi bir artış ya da azalış olmadığı belirtilmiştir.

Kanser tiplerinin görülme sıklığı açısından kadın ve erkekler farklılık göstermektedir. Coğrafi bölgelere ve ırka göre de kanser sıklığı farklılıklar gösterir. Hem erkeklerde, hem kadınlarda en çok görülen kanser çeşidi, deri kanseridir.

Türkiye'de bunu erkeklerde akciğer, prostat, kalın barsak, rektum, mide ve pankreas; kadınlarda meme, akciğer, kalın barsak, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri takip etmektedir. (hsgm.saglik.gov.tr)

2.1.2. Kanser biyolojisi

Kanser, birden fazla mekanizmadaki bozukluğa bağlı olarak gelişir. Bunların başında en büyük role sahip olan genler gelir. Bu genler, onkogenler, tumör baskılayıcı genler, ve DNA tamir genleri olarak gruplandırılır.

Hücre bölünmesini ve büyümesini sağlayan normal hücrelere proto-onkogen adı verilir. Mutasyon, artmış gen ifadesi, gen dublikasyonları, yeni kromozomal düzenlemeler sonucu aktifleşerek proto-onkogenler, onkogenlere dönüşürler. Onkogenlerde hücrenin büyüme ve bölünmesini etkileyen proteinleri kodlar. Genin yapısındaki hatadan dolayı kodladıkları proteinler anormal yapılı olur. Anormal yapıdaki proteinler hücre büyüme ve bölünmesini kontrol edemezler ve kanser hücreleri oluşur.

Hücrenin büyümesini ve çoğalmasını kontrol eden tümor baskılayıcı genler, hasar durumunda DNA tamirini başlatırlar. Tamir mekanizması başarısız olursa apoptozu tetiklerler. Bu genlerdeki hasar hücre kontrolünü engeller. Bunlardan en bilineni TP53 genidir. Delesyon, nokta mutasyonları, epigenetik susturmalar, kromozomlarda ayrılmama, mitotik rekombinasyonlar tümör baskılayıcı genin işlevini yapamamasına yol açar. Hücre döngüsü kontrol edilemez ve karsinogeneze neden olur.

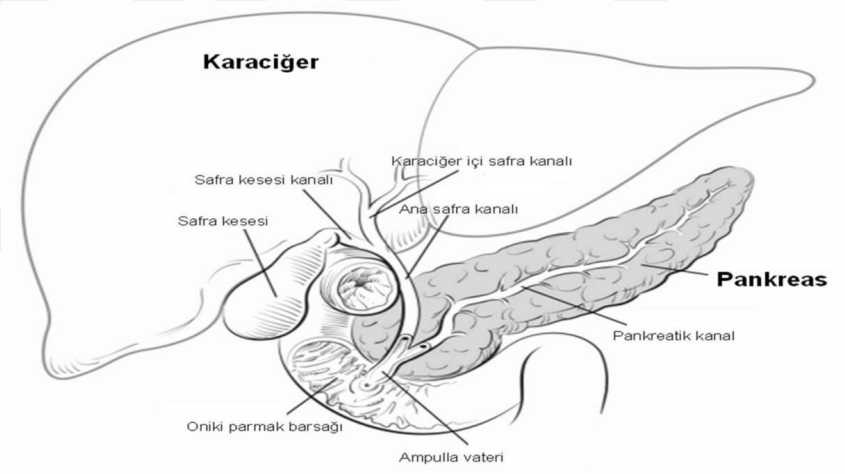
Diğer önemli gen grubu olan DNA tamir genleri, hasarlı DNA yı tamir etmek için gerekli proteinleri o bölgeye yönlerdirir. Böylece gen işlevini yeniden kazanmış olur. Bu genlerin bir diğer önemli görevi, tamirin başarılı olamaması durumunda hücrenin yok edilmesini sağlamaktır. DNA onarım genlerinde meydana gelen mutasyon sonucu hücre kontrol mekanizması görevini yapamaz ve kontrolsüz hücre çoğalmaları gerçekleşir.

Sağlıklı hücreler her türlü besini kullanabilirler. Kanser hücreleri ise sadece glikolizden gelen glukozu kullanabilirler. Şekeri normal hücrelere oranla 100 kat fazla kullanırlar ve laktat sentezleyerek enerji sağlarlar.

Kanser hücreleri çevrelerindeki stromayı etkileyerek yeni damar sistemi oluştururlar, besin ve oksijenlerini buradan sağlarlar. Dolaşım sisteminde uzak yerlere hareket ederek yerleşebilirler. Metastaz oluşturarak kanserleşmeyi çevre organlara taşırlar, herhangi bir yere tutunmadan büyüyüp gelişebilirler (Baykara, 2016).

2.2. Pankreas

Karın boşluğunun içinde yerleşmiş olan pankreas yaklaşık 15-20 cm uzunluğunda kabaca şekli çekice benzeyen sarımtırak renkte, ortalama 100 gr ağırlığında iki kanallı salgı bezidir. Pankreası çevreleyen organlar, mide, ince bağırsak dalak ve karaciğerdir. Pankreas üç kısımdan oluşur. Baş kısmını en geniş kısmı oluşturur, orta kısmına gövde, en ince kısmına ise kuyruk denir.



Şekil 2.1. Pankreas organının yerleşimi

Pankreas vücutta fonksiyonlarına göre endokrin ve ekzokrin pankreas olarak ikiye ayrılır. Pankreasın ekzokrin kısmı asinar ve duktal hücrelerinden oluşur. Fonksiyonu sindirime yardımcı olan özsuyunu salgılamak ve bu salgıyı mide ve ince bağırsaga iletmektir. Langerhans adacıklarını oluşturan hücreler insulin ve glucagon hormonlarının salınımını sağlar. Bu hormonlar birlikte çalışarak kandaki glikoz miktarını düzenlerler.

2.2.1. Pankreas kanseri

Pankreastaki hücreler kontrolsüz çoğaldıklarında tümör oluştururlar.Pankreas kanserinin büyük bir bölümü pankreas kanallarını çevreleyen ekzokrin hücrelerin olduğu yerde görülür (%95) Bu bölgede başlayan pankreas kanseri adenokarsinom olarak isimlendirilen ekzokrin tümörüdür. Daha nadir rastlanan türü adacık hücrelerinde başlayan endokrin tümörüdür (%5).

Pankreas kanseri gelişmiş ülkelerde mortalitesi en yüksek kanser türlerinin önde gelenlerinden biridir (Yu Is at all., 2018). Bulunduğu yer itibari ile ilerlemiş evrede cerrahi müdahalesi mümkün değildir. Metastaz hızı çok yüksektir. Erken tanısı çok mümkün olmadığından tedavide geç kalınmaktadır. Bu nedenle yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır.

Dünya genelinde yapılan araştırmalarda pankreas kanseri en yaygın görülen kanserler arasında 15.Sırada yer almaktadır. En çok ölümle sonuçlanan kanser türleri arasında ise 9.sırada yer almaktadır. 2012 yılında tüm dünyada pankreas kanseri teşhisi konulan insan sayısı ise yaklaşık 178.000 dir. Dünyada pankreas kanseri insidansı artış göstermektedir. Bu hastalığın erken teşhisi zor olduğu gibi etkili bir tedavi uygulama yöntemi de çoğu durumda mümkün olmamaktadır. Çoğunlukla hastalığa teşhis konulana kadar kanser ileri safhalara ulaşmaktadır. Sigara, tip 2 diyabetus mellitus, beslenme biçimi ve obezite pankreatik kanser için risk faktörü olarak yaygın kabul edilmektedir (Pourhoseıngholı at all., 2015).

Pankras kanseri, 45 yaşından önce nadiren de olsa görülmekle birlikte tanı konulan hastaların %80- 90'ını 60 ve 80 yaş aralığında olduğu görülmektedir. Ayrıca tüm dünyada pankreas kanserinin erkeklerde görülme sıklığı kadınlarınkine göre daha yüksektir (Pai at all., 2015).

Tedavi yöntemleri olarak kemoterapi/radyoterapi, cerrahi müdahaleden önce ve sonra kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan kemoterapotik ilaçlar hücre DNA ve RNA'sındaki nükleotidlerin reaktif bölgeleri ile etkileşim sağlayan çapraz bağlanma sistemine dayanmaktadır. Bu sayede hücre döngüsü kesintiye uğrar ve proliferasyonu engellenir (Gökçe, 2015).

2.2.2.Pankreas kanseri epidemiyolojisi

Pankreas kanserini diğer kanser türlerinden farklı kılan durum, diğer malignitelere kıyasla iyileştirilme ve sağkalım çok azdır. Son on yıl içerisinde klinik ilerleme yetersizdir ve 5 yıllık sağ kalım oranı %5'in altındadır (Søreide and Sund., 2015).

Pankreas kanseri kötü seyir gösterir, dünya genelinde yılda 331.000 kişinin ölümün nedenidir ve kansere bağlı ölümler arasında yedinci sırada yer almaktadır. Kanser türleri arasında görülme sıklığı olarak on ikinci sırada yer almaktadır (Ferlay at all., 2013). Pankreas kanseri insidansı Avrupa Birliği ülkeleri içinde, erkeklerde 8,2/100 000 kadınlarda ise 5,6/100 000 görülme oranına sahiptir. 2009-2015 yılları arası değerlendirildiğinde erkeklerde %4 ve kadınlarda %5 artış gösterdiği bildirilmiştir. Pankreas kanseri ölüm oranı cinsiyete göre değişmez, her iki cinste de olumsuz bir durum sergilemektedir. Edinilen bilgilere göre; 2015 yılında, kanser ölümlerinin %6'sını pankreas kanserinin oluşturacağı ve bu sayısının 85.300 olacağı tahmin edilmiştir (Malvezzi at all., 2015). Ülkemizde ise pankreatik kanser insidans oranı GLOBOCAN-2012 verilerine göre erkeklerde 6,1 (10. sırada), kadınlarda 3,1(14. sırada), pankreatik kanser ölüm oranı ise erkeklerde %6, kadınlarda %2,9'dur (Ferlay at all., 2013).

2.2.3. Pankreas kanserinde tedavi yöntemleri

Pankreas kanserinde, fiziki muayene, laboratuvar ve radyolojik bulgular tedaviye başlamadan önce değerlendirilir. Bunun sonucunda, pankreas tümörünün hangi evrede olduğu ve çevresindeki organlarla ilişkisinin nasıl ve hangi aşamada olduğu, özellikle de çevresindeki damarlara ve/veya daha uzak organlara yayılıp yayılmadığı ortaya konulur. Cerrahi yolla çıkarılma olasılığı değerledirilir. Pankreas kanserinde, ileri evre tümörlerinde cerrahi müdahale yapılamaz. Bu aşamadaki hastalarda kemoterapi uygulanır, uygulanan kemoterapi ile birlikte, gelişen sarılığının düzeltilmesi, beslenme desteğinin verilmesi, ağrının azaltılması ile yaşam kalitesini tekrar sağlayabilmek için bazı uygulamalar yapılabilir. Bunun için endoskopi yardımıyla, ağızdan mide yoluyla safra yoluna geçmeyi sağlayan bir boru (stent) konulur. Karaciğer içinde safra yollarına bir iğne yardımıyla bırakılan kateter ile safra sıvısının dış ortama akıtılmasını sağlamak, ağrıya karşı mücadele teknikleri,

onikiparmak bağırsağında tıkanıklık oluşturan tümörler için bu bölgeye ağızdan endoskopik yöntemle girilerek stent takma işleminin yapılması gibi uygulamalar yapılmaktadır.

2.2.3.1. Cerrahi tedavi

Pankreas kanserinde yapılan incelemelerde, ameliyatla tümörün çıkartılması uygun ise klasik olarak 'Whipple ameliyatı' yapılmaktadır. Ayrıca oluşan tümör pankreasın gövde ve kuyruk kısmında bulunuyorsa, diğer bölgelere oranla daha kolay rezeksiyon yöntemleri uygulanmaktadır. Bu hastalar için tümörün cerrahi olarak çıkartılması tek kür şansını oluşturmaktadır. Pankreas baş kısmında yerleşen tümörlerde, cerrahi olarak sadece pankreasın baş kısmını çıkartabilmek mümkün değildir. Dolayısıyla bu bölgede ameliyat daha karmaşık olmaktadır. Whipple ameliyatı uygulamasında; pankreasın başı ile birlikte blok halinde safra kesesi, ana safra kanalının bir bölümü, onikiparmak bağırsağı ile midenin bir kısmı çıkarılmaktadır. Pankreas Kanserinin cerrahi tedavisi olan Whipple Ameliyatı çok uzun süren bir ameliyattır, nedeni ise ameliyatta farklı birçok organ çıkartılır. Whipple ameliyatı devamlılık sağlamak için yapılan bir ameliyattır. Bu ameliyat esnasında ya da kısa bir süre sonrasında hastada ölüm (mortalite) ile karşılaşılması veya hastada kanama olması, sindirim sisteminde yapılan dikişlerden kaçak olması (fistül) gibi istenmeyen kötü durumlar (morbidite) gelişebilmektedir. Dünyada öngörülen ölüm oranı %5 ve altıdır. Ayrıca Whipple ameliyatı sonrasında belirtilmiş olan komplikasyonların ortaya çıkma oranı dünyada %15-20 olarak kabul edilmektedir. Ülkemizde ameliyat sonrası bu oranlar %5-10 mortalite ve %20-25 morbidite oranlarıdır (Avcı., 2015).

2.2.3.2. Radyasyon tedavisi

Pankreas kanser hücrelerini öldürme amacıyla yüksek enerjili ışınların kullanıldığı tedavi biçimidir. Radyasyon tedavisi, özellikle tedavi edilen alandaki hücreler üzerine etki etmektedir. Genellikle kemoterapi ile birlikte uygulanan radyoterapi uygulamasında, vücudun dışında bulunan bir makineden (eksternal-ışın radyasyon tedavisi) yada vücudun içerisinde, kanser hücrelerine yakın bir yere konulan radyoaktif maddeden yayılan (internal radyasyon tedavisi ya da brakiterapi) radyasyondan yararlanılır. Cerrahi tedavinin uygulanamayacağı durumlarda cerrahinin

yerine tek başına veya kemoterapi ile birlikte kullanılmaktadır. Tümörü küçültmek için cerrahi uygulama öncesinde kemoterapi ile birlikte radyoterapi birlikte kullanılabilir. Radyoterapi ayrıca ameliyat sonrası gelişen bazı nüksleri engellemek amacı ile de uygulanabilir.

2.2.3.3. Kemoterapi

Kemoterapinin asıl amacı kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlar kullanarak yoketmektir. Sitotoksik olan anti-neoplastik ajanlar kemoterapide başroldedir. Kemoterapi, radyoterapide olduğu gibi cerrahi uygulama öncesinde tümörün boyutunu küçültmek amacıyla neoadjuvan tedavi şeklinde uygulanır veya tek başına uygulanabilir. Kemoterapi uygulamaları boyunca verilen ilaçlar, alkilleyici ajanlar, kortikosteroidler, anti metabolitler, anti tümör antibiyotikler, mitotik inhibitörler ve topoizomeraz inhibitörlerini içermektedir (Avcı., 2015).

Kemoterapi en yaygın tedavi yöntemi olup apoptoza dirençli veya tedavi esnasında kimyasala direnç geliştiren kanser hücrelerinde etkili değildir. Ayrıca kemoteropotikler sürekli çoğalan hematopoetik ve kıl hücreleri üzerinde olumsuz etki yaparlar. Kemoterapi ilaçlarının uygulanmasında, kanser hücrelerini tedavi etmek için mümkün olduğunca tümörleri hedef alması ve sağlıklı dokular üzerinde sınırlı etkisinin olması, tedavideki başarısının en önemli esasıdır (kanser.gov). Bu husus ayrıca hastanın yaşam süresi ve kalitesinin artması bakımından önemlidir. Pankreas kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan Gemcitabin ve 5-fluorouracil (5-FU) kemoterapi ilaçlarıdır. Cisplatin, irinotecan, paclitaxel, docetaxel, capecitabine ve oxaliplatin, gemcitabine veya 5-FU ile birlikte veya tek başına kullanılan diğer kemoterapi ilaçlarıdır. Günümüzde sadece kanser hücreleri üzerinde etkili ve kanser hücrelerinin direnç geliştiremediği, yan etkileri olmayan kanser ilaçlarının keşfedilmesi için bilim dünyasında bir çok araştırma yapılmaktadır.

Pankreas kanserinin görülme sıklığı artmaktadır ve hayatta kalma oranı %5 in altındadır. Pankreas kanseri ile ilgili yukarıda belirtilen tedavi yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Nedenleri şu şekilde sıralanabilir:

- Erken tanı mümkün değildir, tümör yaygın bir şekilde oluşur.

- Pankreasın anatomik konumu, cerrahi tedavinin kapsamlı olmasını gerektirir.

- Radyasyon tedavisi, bitişik hassas gastrointestinal mukoza ve diğer organları iyonlaştırıcı radyasyona maruz bırakır.

- Kemoterapotik ajanlar, insülinoma için streptozotosin hariç, genel olarak etkisiz kalmıştır (Lokich J at all., 1974).

Bizim çalışmamızda florlu Schiff bazları sentezlenerek pankreatik kanser hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkisi araştırıldı. Geç belirti veren ve teşhis edildikten sonra sağ kalım süresi az olan ve kemoterapik ajanların yetersiz kaldığı pankreas kanseri tedavisine destek olmak amaçlandı.

2.3. Schiff Bazları

2.3.1. Schiff bazları tanımı

1864 tarihinde ilk kez Hugo Schiff tarafından kullanılan bir primer amin ve reaktif bir karbonil grubun kondenzasyonundan elde edilen azometin grubu içeren ligandlara Schiff bazı denir (Şekil 2.2). Koordinasyon bileşikleri merkezde metal iyonu ile buna bağlanmış farklı sayılarda yüklü ve yüksüz gruplardan meydana gelir. İşte bu merkezdeki metal iyonuna bağlı bulunan yüklü veya yüksüz gruplara ligand denir.

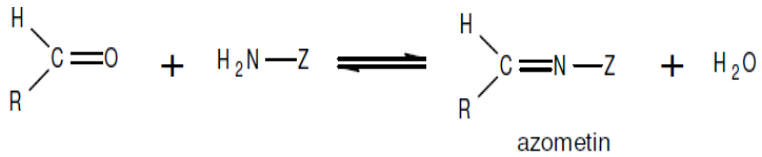
Bilinen birçok ligand olmasına rağmen günümüzde yeni türleri araştırılmaktadır. Bunların en çok bilinenleri ve araştırılanları azot, kükürt ve oksijendir. Schiff bazları azot donör ligandı olarak bilinmektedir. 1937'de Pfeiffer bunu ligand olarak kullanmıştır.

Kondenzasyon ile elde edilmekte olan karbon ve azot arasındaki çift bağ (C=N) azometin bağı ya da imin bağı olarak adlandırılır (Schiff, 1869). Karbonil bileşiği, aldehit ile bağlanırsa azometin ya da aldimin, keton ile bağ yaparsa imin yada ketimin olarak adlandırılır. Reaksiyon oluşumu gösterilmiştir (Şekil2.3., Şekil2.4.).

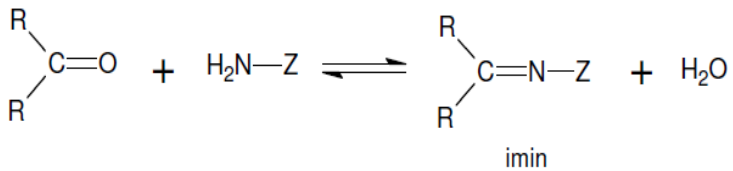
Schiff bazları aminotiyoller, aminofenol, aminoasit ve aminoalkollere, asetilaseton ve salisilaldehit katılmasıyla türetilir. Schiff bazları, primer aminlerin, aldehit ve ketonlarla meydana getirdiği kondenzasyon ürünleridir. Çok esnek ve değişken yapısal özelliklerinden dolayı çok sayıda Schiff bazı ve kompleksi sentezlenmiş ve araştırılmıştır (Oylar., 2011). Schiff bazlarının genel yapısı aşağıda gösterildiği gibidir.



Şekil 2.2. Schiff Bazı genel yapısı



Şekil 2.3. Azometin oluşumu



Şekil 2.4. İmin oluşumu

Aldehitler oldukça kolay bir şekilde primer aminlerle reaksiyona girerken, ketonların aminler ile reaksiyonu kolay değildir. Ketonlardan Schiff bazı elde etmek için kabul edilebilecek pH değeri, uygun katalizör seçimi, reaksiyon sonucunda ortaya çıkan su ile azeotrop oluşturacak çözücü belirlenmelidir. Ayrıca reaksiyon için gerekli sıcaklık faktörlerinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Aromatik aminler ve aldehitlerden oluşan Schiff bazları, alifatik aminlerle aldehitlerden oluşmuş olan Schiff bazlarından çok daha kararlıdırlar (Mülazımoğlu, 2009).

2.3.2. Schiff bazı kullanım alanları

Günümüzde koordinasyon bileşiklerinin endüstrideki önemi giderek artmaktadır. Boyar madde ve polimer teknolojisinde, ilaç sanayiinde, tıpta, biyolojik olayların anlaşılmasında, tarım sektöründe, roket yakıtı hazırlanması gibi pek çok alanda bu bileşiklerden yararlanılmaktadır. Halen de yeni sentezler yapılması konusunda çalışmalar devam etmektedir.

Biyolojik sistemlerde de bu bileşiklerin önemi büyüktür. Kanda oksijen taşımakla görevli hemoglobinin yapısı, bitkilerde bulunan klorofil pigmentinin yapısı, ayrıca B12 vitaminin yapısı kompleks bir yapıya sahiptir (metal prol halka sistemine bağlanarak kompleks oluşturur) ve bu üç yapı kordinasyon bileşikleridir (Archana ve ark., 2016). Schiff bazlarının yapılarında oksokrom gruplar bulunduğu takdirde, bunlardan elde edilen metal kompleksleri renkli maddeler olduklarından boya endüstrisinde özellikle tekstil boyacılığında pigment boyar maddesi olarak kullanılmaktadır.

Antikanser aktivitesi göstermesi özelliğinden dolayı Schiff bazı komplekslerinin tıp dünyasındaki önemi giderek artmaktadır. Schiff bazı türevlerinin DNA ve RNA sentezini durdurucu etkilerinin olduğu ve bu etkilerini ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe ederek gerçekleştirdikleri bilinmektedir. Schiff bazlarının halo ve nitro türevlerinin oldukça etkili antimikrobiyal, antitümör, antifungal aktivitelerinin olduğu saptanmıştır (Wong at all., 1999).

Metal merkezine bağlı fonksiyonel ligantlar metal kökenli kanser tedavi ilaçlarının başarısında önemli rol oynamaktadırlar (Yaşar, 2016). Metal komplekslerinin lipofilik ve hidrofilik özelliklerini dengeleyen, metal merkezinin değişik şartlarda değişik yükseltgenme basamaklarına sahip olmasını ve kolayca ligant değişimi yapabilmesini sağlayan metal merkezine bağlı fonksiyonel ligantlardır (Galanskı at all., 2005).

Aromatik aminlerin Schiff bazı kompleksleri özellikle kemoterapi alanında, çeşitli kimyasal reaksiyonlarda bazı substratlara oksijen taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bunların kompleksleri tarım sahasında, polimer teknolojisinde kullanılmaktadır. Polimerler için anti-statik madde olarak ve yapılarındaki bazı grupların özelliklerinden dolayı da boya endüstrisinde kullanılmaktadır.

Schiff bazları hemen tüm metallerle kompleks bileşikler oluşturması, kolay sentezlenmesi, antitümoral, antiviral, antidiyabetik gibi özeliklerinden dolayı yeni kemoterapötik ilaç araştırmalarında en çok çalışılan kimyasallardandır. Metalofarmasötiklere karşı duyulan bu ilginin nedenlerinin başında kanserli hücrelere karşı seçiciliğin normal hücre türlerine olan seçiciliginden fazla olması ve sitotoksisite değerlerinin cis-platinden daha düşük değerler vermesinden kaynaklanmaktadır. Yapılan mekanistik değerlendirmelerle hücre içerisindeki biomolekülerin ve bu moleküller ile olan etkileşimleri daha iyi açıklandıkça dizayn edilecek ilaçların hedef alınan kanserli hücreler ile etkileşime girmesi ve kanserli hücreleri kontrol altına alması veya onları yok etmesinin ileriki dönemlerde daha etkili olması için çalışmalara devam edilmektedir (Raman at all., 2003).

2.3.3. Schiff bazları ve metal komplekleri ile yapılan önceki çalışmalar

Teröpatik İlaçlarda istenmeyen durum olarak karşımıza toksisitenin indüksiyonu ve çoklu ilaç direncinin (MDR) nin gelişmesi çıkar. Bu durum kanser tedavisini önündeki en büyük engellerden birisidir.

Bu sorunların üstesinden gelmek için uygun stratejilerin geliştirilmesi kemoterapide büyük önem kazanmıştır. Bilim dünyasında bu konuda geniş kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır.

Schiff bazlarının Mn (II) kompleksleri birçok mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda redoks enzim sistemlerinde katalizör görevindedir. Birçok yükseltgenme basamağına sahiptir. Son yıllarda Mn (III) iyonu ile birtakım çalışma yapılmaktadır (Ağır, 2011).

Schiff bazı nikel şelatı spektroskopik yolla elde edilerek nikel-(II) N(-(2-Hidroksiasetofenon) glisinat olarak karekterize edilmiştir. Yapılan çalışmada MDR'nin üstesinden gelmek için önemli bir etkiye sahip geniş spektrumlu antikanser ajanı olduğu kanıtlanmıştır. Normal hücreler üzerinde toksisite yaratmadan ilaca dirençli kanser hücreleri üzerinde seçici davranmıştır (Banerjee., 2017).

Çinko prostat kanser hücreleri tarafından kenetlenerek enerji metabolizmasını kontrol altına alabilmektedir. Bir çok araştırmacı bu konuyla ilgili araştırmalar yapmıştır.PC3 tümör hücreleri üzerinde yapılan araştırmalarda çinko –schiff bazı – Novicidin kompleksinin apoptozu aktive ettiği saptanmıştır (Mılosavljevıc at all., 2017).

Başka bir çalışmada Schiff bazı çinko koordinasyon bileşiği sentezlenmiştir ve insan osteokarsinom MG-63 hücrelerin büyümesi, proliferasyonu ve apoptozu üzerinde etkileri araştırılmıştır. Hücre canlılığı CCK-8 testi ile belirlenmiştir. Hücre döngüsü ilerlemesi, mitokondriyal membran potansiyeli ve apoptotik hücreler, akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Apoptoza bağlı protein seviyeleri, immünoblotlama ile belirlenmiştir. MG-63 hücrelerinin schiff bazı çinko koordinasyon bileşiği ile tedavisi, G1 fazında hücre proliferasyonunun ve hücre siklüsünün durdurulmasının engellenmesi ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Dahası bu kompleks, mitokondriyal membran potansiyelini ve indüklenen apoptozu önemli ölçüde azalttığı söylenmiştir. Elde edilen sonuçlar, sentezlenmiş yeni kompleksin proliferasyonu inhibe edebildiğini ve hem mitokondriyal hem de hücre ölüm reseptörü apoptoz yollarını aktive ederek MG-63 hücrelerinin apoptozunu indükleyebileceğini göstermiştir. Bu da çinko kompleksinin antikanser ilaçları olarak gelişmesi için umut verici bir ajan olduğunu düşündürmüştür (Yan at all., 2015).

Potansiyel ilaç gelişimi için Cu (II) ile dehidrobietilamin Shiff bazı bileşiği ile oluşturulan kompleksin hidrofilik ve lipofilik özelliği olduğu saptanmıştır. HepG2, Hela, MCF-7, A549, HUVEC hücreleri üzerinde farklı oranlarda Cu (II) iyonu ile oluşturulan schiff bazlarının inkübasyonu sonucunda analiz yapılmış ve proliferasyonun stabil olduğu saptanmıştır. Elde edilen bulgular bu kompleksin yüksek antitümör ve düşük toksisitesinin olduğunu göstermiştir (Zhao at all., 2018).

Başka bir çalışmada yeni schiff bazı ligandları, 7-hidroksi-3-formilkromonun semikarbazon ve fenil semikarbazon ile yoğunlaştırılmasıyla hazırlanmıştır. Bu ligandların Cu (II) iyonu ile kompleksleştirilmiştir. İnsan meme kanseri (MCT-7) ve akciğer karsinom (A549) hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkisinin olduğu saptanmıştır (Kalaıarası at all., 2018).

Kumarin türevleri uzun yıllardır organik ve tıbbi kimyada kullanılmaktadır. Ayrıca kozmetik ve gıda sektöründe de kullanılmaktadır. Kumarin türevleri antikoagulan olarak geniş çapta kullanılmaktadır. Özellikle antibakteriyel ve antitümör aktiviteleri onlara hayati önem kazandırmaktadır.Schiff bazları, bazı insan tümör hücreleri üzerinde poliferatif inhibitor olarak etki göstermektedir (Lıng at all., 2012). Bazı geçiş metaller ile yaptıkları kompleksler ile antitümör ajanlar olarak son zamanlarda çokça kullanılmaktadırlar.

Cisplatin kompleksi kanser tedavisinde en yaygın kullanılan metal kompleksleridir (Jakupec, 2008). P t(II) ve Pd (II) Schiff bazı komplekslerinin de antikanser etkileri saptanmıştır. Ancak normal hücreler üzerinde de toksik etkisi saptanmıştır (Şahin at all., 2018). Ayrıca fareler üzerinde yapılan in vivo araştırmalar ise Schiff bazının Ascites Carcinoma Virüsüne karşı antikanser aktivitesinin oldukça yüksek olduğunu göstermiştir.

Başka bir çalışmada yeni sentezlenen (N1,N3-bis(furan-2-ylmethylene)propane-1,3-diamin)'in çeşitli geçiş metal iyonları (Co(II), Ni (II), Cu (II), Mn (II), Cd (II), Zn (II) ve Fe (III)) ile yapılan Schiff bazı komplekslerinin antikanser tarama çalışmaları, insan kolorektal kanseri (HCT), hepatik kanser (HepG2) ve meme kanseri (MCF-7) hücre hatları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hazırlanan bileşiklerin farklı konsantrasyonları ile hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyona sokulmuştur. Çalışılan hücre hatları üzerinde güçlü sitotoksik etkiler gözlenmiş ve

farklı değerlerde (IC50) sonuçlar elde edilmiştir.En yüksek sitotoksik etkiyi HCT(koletetal kanser hücresi) hücre hattı üzerinde gösterdiği saptanmıştır (Mohammed at all., 2015).

Yeni sentezlenen İmidazolun-bisimidazol-tetraklororutenatın (III) P388 lösemiye karşı ve B16 melanoma karşı antitümör aktivitesi araştırılmıştır. Test bileşiği, bu tümör modellerine karşı yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır. Tümörün inhibe edici etkisi, pozitif kontroller olarak test edilen siklofosfamid, cisplatin veya 5-fluorourasil bileşiklerinin etki alanına benzer veya daha iyi olmuştur (Keppler at all., 1986).

Bir inorganik platin kompleksi olan cisplatin'in geliştirilmesinden bu yana, birçok platin ve platin olmayan metal kompleksleri sentezlenmiş ve antikanser aktivitesi açısından test edilmiştir. Rutenyum kompleksleri, özellikle dirençli tümörler üzerinde cisplatin aktivitesini iyileştirmek veya aktif dozlarda konak toksisitesini azaltmak için hazırlanmıştır. Uzun yıllardan beri birçok bilimsel araştırma grubu, inorganik antitümör ilaç alanında çalışmış ve güçlü antitümor özellikli ve her şeyden önce antimetastatik özelliklere sahip olduğu gösterilen Ru (II) ve Ru (III) kompleksleri geliştirmiştir. Rutenyum kompleksleri günümüzde tıbbi kimya alanında, seçici antimetastatik özelliklere ve düşük sistemik toksisiteye sahip olan antitümör maddeler olarak büyük ilgi görmüştür. Rutenyum bileşikleri, tümör hücrelerine iyi nüfuz eder ve DNA'ya etkili bir şekilde bağlanır. Kostova ve arkadaşlarının 2006'da yapmış oldukları çalışma sonrası, Ru (II) ve Ru (III) komplekslerinin antikanser ajanları olarak gösterdikleri etkilerin sonuçları tartışılmıştır. Ayrıca geçmişten günümüze rutenyum bileşiklerinin kanser tedavisindeki önemli bir rolünün olduğu vurgulanmıştır (Kostova., 2006).

N-benzilideneanilin (NBA) çekirdekleri içeren bir dizi Schiff bazları sentezlenmiştir. Elde edilen kimyasal ürünler küçük hücreli akciğer kanser hücreleri (A549) ve servikal kanser hücre (HeLa) dizileri üzerinde biyokimyasal analizler ile sitotoksik ve proliferasyon etkileri araştırılmıştır. HeLa hücrelerine daha toksik olduğu saptanmıştır. Bileşiklerin gücü farklı hücre hatlarında değişmiştir. Buda bileşiklerin yapısal özelliklerin hücre tipleri arasında ayrım yapma potansiyeline sahip olduğunu düşündürmüştür (Ozkay ve ark., 2008).

Ehrlich asit tümörlü 6-8 haftalık Sweiss albino farelerle gerçekleştirilen bir in vivo çalışmada, PDH,.PHP ve.HHP olarak adlandırılan yeni sentezlenen Schiff bazı bileşiklerin antitümor ajan olabilecekleri bildirilmiştir.(Jesmin at all .,2010)

Başka bir çalışmada bazı metal kompleksli nitrofenol Schiff bazlarının antikanser ve antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. İn vitro şartlarda gerçekleştirilen bu araştırmada Pd (II) kompleksinin MCF-7 hücre serisi üzerinde (insan meme adenokarsinoma) güçlü antikanser aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Osowole at all ., 2012)

Tiyosemikarbazonlu schiff bazlarının türevleri ile metal komplekslerinin antitümör, antifungal ve antibakteriyel aktivitesi olduğu saptanmıştır (Sarı ve ark., 2008).

Antikanser ilaçlarında en önemli sorunlardan biri gelişen çoklu ilaç direncidir (MDR). Bu sorunun üstesinden gelmek için çok fazla çalışma yapılmaktadır. Tiyasemikarbazonlu Schiff bazlarını kullanarak MCF (meme kanseri) ve MCF-7/ADR (Doxurubusine dirençli meme kanseri hücre hattı) hücre hattı üzerinde DNA interkalasyonu aracılığı ile hücre bölünmesini önlediği saptanmıştır.Güçlü sitotoksik etki göstermese de P-gp aracılı MDR direncinin üstesinden gelebileceği belirtilmiştir. (Bai at all., 2017).

PC3 (prostat) kanser hücresi hattı, benzophenone-bis-schiff bazları ile inkübe edilerek reaksiyona sokulmuştur. Belirli saat aralıkları ile farklı yoğunluklarda yapılan inkübasyon sonuçları değerlendirilmiştir. Bu kompleksin önemli sitotoksik aktiviteye sahip olduğu ve güçlü antikanser olduğu tanımlanmıştır (Khalıd ve ark., 2016).

Gümüş (I) fosfin komplekslerinin antitümör aktiviteleri ilk olarak Sadler tarafından 1988 de incelenmiştir. Gümüş metalinin gösterdiği bu aktivite akıllarda Ag (I)-NHC komplekslerinin de aktivite gösterebileceği kanısını düşündürmüştür. Bu düşünce ile beraber çok sayıda Ag (I)-NHC kompleksi sentezlenip in vitro şartlarında insan kanserli hücreleri OVCAR-3, MB157 (göğüs kanser hücresi), ve HeLa hücreleri üzerinde etkileri değerlendirilmiştir. Bu araştırmalar sonucunda OVCAR3 ve MB157 tipi hücrelerde gümüş (I) komplekslerinin cisplatin ile benzer aktivite gösterdikleri

belirlenmiştir. Bununla beraber HeLa kanser hücreleri üzerinde ise çok az bir antikanser aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Thatı at all., 2007).

Thymoquinone (TQ) nigella sativa özütünden elde edilen biyoaktif kompanenttir. Çeşitli kanser hücreleri üzerine antiproliferatif etkilerinin olduğu literatüre geçmiştir (Woo at all., 2012). TQ analogları ile sentezlenen schiff bazları pankreatik hücre hatları üzerinde etkileri değerlendirilmiştir. Bu hücrelere karşı anti proliferatif aktivite, kemo-duyarlılaştırma aktivitesi bulunduğu bildirilmiştir (Yusufi at all., 2013).

2.4. Flor Atomunun Özellikleri ve Kullanım Alanları

Son yıllarda flor ihtiva eden ilaç ya da ilaç adayı bileşikler oldukça yaygın hale gelmiştir. Florlanmış bileşikler, kimyanın farklı alanlarında yeni materyallerin şekillendirilmesinde, biyolojik fonksiyonlu yeni moleküllerin sentezinde önemli başlangıç materyalleri olarak başarılı uygulamaları nedeniyle gittikçe artan bir ilgiye sahiptirler.

Flor atomunu önemli kılan özellikler şöyledir; en reaktif elementtir, O2 ve asal gazlar dahil olmak üzere tüm elementler ile tepkimeye girer, bunun nedeni F-F bağının kolay kopması yani dissiyasyon enerjisinin az olmasıdır. Sadece (-1) oksidasyon sayısına sahiptir. Tek bağ yapabilme özelliği taşımaktadır. Fakat ortaklanmamış elektronları sayesinde metallerle –F şeklinde köprülü bileşikler yapabilir. Florun yüksek elektronegatifliği molekülün elektron dağılımını değiştirebilir. Bu değişim absorbsiyon, dağılım ve metabolizmayı etkilemektedir.

Flor atomu küçük atomik yarı çapa sahiptir. Elektronegatiftir bu yüzden karbon atomu ile güçlü bağ oluştururlar (Begue at all., 2008). C-F bağı organik kimyada güçlü polar bir bağdır. Flor karbon atomu ile sabit kovalent bağ oluşturur. Bir flor yada CF3 grubunun bir H veya OH ile yer değiştirmesi ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılan yaygın yontemlerdendir (Fang at all., 2007).

Küçük sterik boyutu özelliği ile flor, amino asitler de dahil bir çok biyolojik aktif moleküllerde hidrojen yerine kullanılır. Flor elementi elektrofilik veya nükleofilik tepkimeler yolu ile organik bir moleküle katılır. Oluşturulan florlu yapı

blokları, yeni ilaçların araştırılmasında ve bulunmasında veya var olanların aktivitesinin arttırılmasında önemli rol oynar (Sıngh at all., 2010).

Bir ilaç molekülündeki flor ikamesi, sadece emilim, doku dağılımı, sekresyon ve biyo transformasyonun rotası ve oranı gibi farmakokinetik özellikleri değil, aynı zamanda farmakodinamik ve toksikolojisini de etkileyebilir. Şu anda iki yüzden fazla florinli ilaç mevcuttur ve yapılan çalışmalar bu sayının artacağını göstermektedir. Tıp dünyasında florlanmış ilaçların yararı çok iyi bilinmektedir. Flor içeren ilaçlar tıpta anestezik, antibiyotik, anti-kanser ve anti-enflamatuar ajanlar, psikofarmasötikler ve diğer birçok uygulamada kullanılmaktadır (Strunecka at all., 2004).

2.5. Flor Atomunun İlaç Sanayinde Kullanımı

Florlanmış bileşikler tıbbi kimyada kullanımı 1970 lere kadar nadirdir. Son 20 yılda yapılan araştırmalarda florun kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. 2002 yılında onaylanan 31 yeni kimyasal ilaç üretiminden, dokuzu florlu bileşik içermektedir. Florlu bileşikler farmasötik araştırmada rutin olarak sentezlenir ve pazarlanan birçok farmasötik bileşik flor içerir, florin içeren farmasötik ilaçların oranının %28 olduğu tahmin edilmektedir. Sıklıkla, metabolik olarak kararsız bölgeleri bloke ederek metabolik stabiliteyi arttırmak için flor eklenir. Bununla birlikte, florin, lipofiliklik veya bazlık gibi fizikokimyasal özellikleri modüle etmek için de kullanılabilir. Bir molekülün konformasyonu üzerinde önemli etkisi olabilir (Böhm at all., 2004).

İlaç sanayinde kullanılan florlu bileşiklerin bazılarından söz edersek bunlardan biri florokinolonlardır. Florokinolonların antibakteriyel olarak keşfi, Flor atomlarının moleküler özellikleri üzerindeki güçlü etkisinin çarpıcı bir örneğidir. Florokinolonlar yaygın olarak kullanılan oldukça aktif ve güvenli antibakteriyel ajanlardır (Domagala .,1994).

Gemsitabin (dFdC, 2 ', 2'-diflorodeoksisitidin), içinde iki flor atomunun deoksiriboz halkasına yerleştirildiği bir deoksisitidin nükleosid analoğudur. Diğer nükleosid analogları gibi, gemsitabin bir ön ilaçtır. Orijinal haliyle etkin değildir. Farmakolojik aktivite kazanması için hücre içi aktive edilmesi gereklidir. Gemsitabini diğer nükleosid analoglarından farklı kılan, hücre zarı boyunca aktif olarak taşınması, daha verimli fosforile edilmesi ve daha yavaş bir şekilde yok edilmesidir.

Gemsitabinin çok çeşitli tümörlere karşı sitotoksik aktivite kaynağıdır. Pankreatik kanser tedavisinde de kullanılmaktadır (Gesto at all., 2012).

5-Floroürasil (5FU) Heidelberger ve arkadaşları tarafından 1957'de antimetabolit olarak sentezlenmiştir. 5FU kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son 20 yılda yapılan çalışmalar, etki mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Florourasilin bu etkisi Timidilat sentetazı geri dönüşümsüz inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır. 5-FU'in eylem mekanizmasının anlaşılması önemli terapötik ilerlemelere neden olmuştur. Ancak toksisitesi nedeniyle üzerinde araştırmalar devam etmektedir. Tek bir ajan olarak ya da meme, yumurtalık ve gastrointestinal sistemin karsinomlarında ve pankreatik kanser tedavisinde diğer ilaçlarla kombinasyon halinde yaygın olarak kullanılır. Her ne kadar 5-FU gastrointestinal kanserli hastaların yaklaşık % 20'sinde olumlu yanıtlar üretse de, bu ilacın hastanın sağkalımı üzerindeki etkisi belirsizliğini korumaktadır (Moran at all., 1979).

2.6. Florlu Schiff Bazları ile Yapılan Önceki Çalışmalar

Flor diğer elementlere göre daha lipofiliktir. Termal kararlılığı da yüksektir.1,2,4 Triazol geniş bir biyolojik özelliğe sahiptir. İnsektisidal, antifungal, anti enflamatuar ve bitki büyümesi düzenleyicidirler (Ceylan., 2016). Bununla birlikte antikanser çalışmaları sınırlıdır.

Flor veya triflorometil bileşikleri biyokimyada önemli rol oynamaktadır. Triflorometil içeren1,2,4 triazol bileşikleri sentezlenmiştir. 4 farklı hücre hattı üzerinde denenmiştir (K562, Colo-205,MDA-MB231). MTT kolorimetrik analizi kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkisi farklı değerlerde saptanmıştır (Prasanna at all., 2013).

Proetto ve arkadaşlarının 2012'de platin schiff bazı kompleksine farklı noktalarda flor ikamesiyle yeni bileşikler sentezlemişlerdir. Platinin antitümör aktivitesinin keşfinden bu yana bir çok Schiff bazı türevleri sentezlenmiştir. Kanser kemoterapisinde platin bazlı ilaçlar kullanılmaktadır. Ancak sağlıklı hücreler üzerindeki toksisitesinden dolayı kullanımı sınırlı tutulmaktadır. Tümör hücreleri üzerinde aktifliği arttırmak ve sitotoksisiteyi azaltmak için yeni sentezler yapılmıştır.

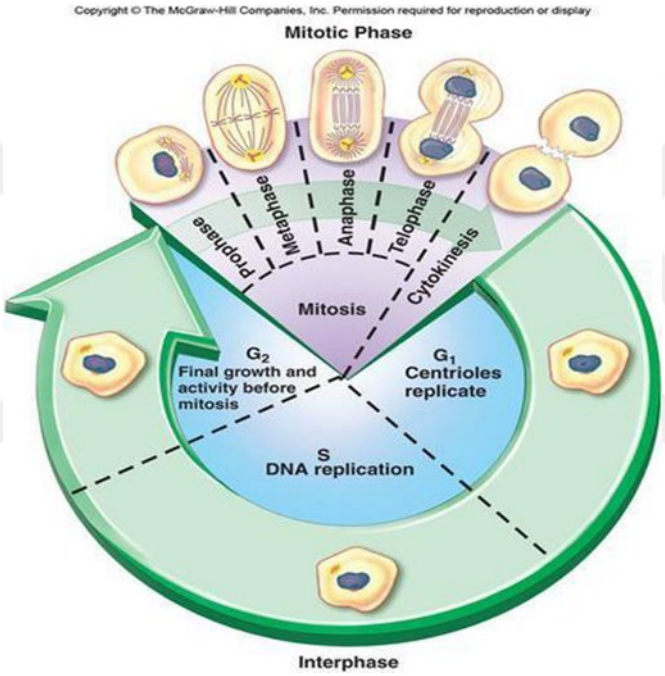
Yeni sentezlenen diarilserin Pt(II) komplekslerinin florürün konumuna göre antiproliferatif etkilerini araştırmak için MDA-MB231, HT239 hücrelerine karşı test edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin belirlenen konsatrasyonları belirtilen hücreler ile 96 saatlik inkübasyon sonucunda kristal moru boyası ile biyo kütlesi belirlenip fotometrik ölçümü yapılmıştır. Cisplatin kompleksi testin sonuna doğru maksimum aktivite gösterirken florlu platin komplesleri 48-72 saatlik süreçte aktivite gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca florun konumuna göre antiproliferatif etkinin çeşitlilik gösterdiği belirtilmiştir.

Florlu Schiff bazları ile yapılan başka bir çalışmada Timokuoninden sentezledikleri bileşiklere flor eklenerek yeni bir kompleks oluşturulmuştur. Yeni bileşiğin pankreas kanser hücre hatlarında Gemcitabinle kıyaslandığında daha üstün antiproliferatif etkisi olduğu saptanmıştır (Yusufi at all., 2013).

Gürol ve arkadaşları tarafından 2017'de yapılmış olan başka bir çalışmada, K562 myelomonositik lösemik hücre hattı üzerinde florinlenmiş Schiff bazlarının antiproliferatif etkilerini saptamak ve önemli niceliksel veriler sağlayabilmek için CFSE (Karboksifloresan süksinimidil ester) testi kullanılmıştır. K562 hücreleri CFSE boyası ile inkübe edildikten sonra doksorubisin ve sentezi yapılan florlu schiff bazları ile 96 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücrelerin flow sitometrik analizleri yapılmıştır. Florlu schiff bazlarının antiproliferatif etkileri saptanmış ancak doksorubusin aktivasyonundan düşük olduğu belirtilmiştir. Antikanser çalışmalarda hücrelerin niceliksel değerlerini saptamak için kullanılan CFSE hücre etiketleme yöntemi bu çalışmada da kullanılmıştır. CFSE boyası hücre proteinleri ile sabit kovalent bağlar oluşturur. İn vitro hücre proliferasyonu 9 jenerasyona kadar takip edilebilir. Her hücresel bölünmeden sonra yavru hücrelere eşit paylaşılan bir CFSE floresan bölünmesi oluşur. Bu floresan hücre izleme analizi, antikanser ilaçların geliştirilmesinde, bitkisel ve kimyasal bileşiklerin in vitro olarak antiproliferatif etkilerini incelemek için güçlü bir araç olma potansiyelinde olduğu belirtilmiştir.

2.7. Hücre Proliferasyonu

Hücrelerin proliferasyonu yani çoğalması hücrelerin bölünmesi üzerinden gerçekleştirilmektedir. Bir çok hücrenin bolünme aşaması dört safhada meydana gelmektedir. Bunlar G1- S -G2 ve M olarak adlandırılmaktadır. G1- S ve G2 aşamaları hazırlık aşaması olan interfaz safhasıdır. Hücre mitoz bölünmeye hazırlık yapar. M- ise bölünmenin gerçekleştiği safhadır. Aşağıdaki şekilde bölünme safhaları gösterilmiştir.



Şekil.2.5. Hücre bölünme safhaları

Hücreler bölünme sinyali almadıkları sürece G0 fazında beklerler. Dinlenme fazında olan hücreler, büyüme faktörlerinin uyarması ile harekete geçerek hücre döngüsünün G1 fazına geçerler. G1fazına giren hücre büyür ve normal fonksiyonlarına devam eder. S evresinde de DNA sentezi başlar aynı zamanda sentrioller sentezlenir, ardından G2 evresine giren hücre büyümeye devam eder, G2 evresinde hücre bölünmeye hazırlanır son olarak hücre M evresine girerek hücre bölünmesi tamamlanır.

Hücre bölünmesi tüm evrede farklı basamaklarda kontrol edilmektedir. -S- evresindeki deoksiribonükleik asit (DNA) sentezinden önce -G1- evresinde DNA bütünlüğü, -G2- evresinde -S- evresindeki DNA sentezinin doğruluğu, -M- evresinde kromozomların tümünün mitotik iğlere bağlanması bunu takiben düzgün biçimde ayrılarak yavru hücrelere aktarılması kontrol edilmektedir (Dıgrak ve ark., 2017).

Antikanser çalışmalarında hücre bölünme hızının tespit edilmesi önemlidir, bu nedenle bölünme hızı saptanarak tümör ikilenme zamanı gibi parametreler belirlenebilir. Kanser hücrelerinin oluşmasına neden olan mutasyonların bir kısmı da hücre proliferasyonun kontrol edildiği sinyal yolaklarında meydana gelmektedir. Retinoblastoma (Rb), protein 53 (p53) gibi hücre döngüsünü baskılamakla görevli olan düzenleyicilerin yok olması ve sıçan sarkoma onkogeni (Ras), miyelositomatoz onkogeni (Myc) gibi hücre çoğalmasını artıran düzenleyicilerdeki artış, hücrenin proliferasyon döngüsünün bozulmasına, bunu takiben kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olur, kontrolsüz çogalan hücrelerde kansereli hücreleri oluşturur (Terzioğlu ve ark., 2013).

2.7.1. Hücre proliferasyon ölçüm yöntemleri

Tümör proliferasyonuna neden olan değişkenlerin saptanması yönünde çaba harcanmaktadır. Bunun için de çeşitli proliferasyon ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemleri ana başlıklar olarak , DNA sentez hızının ölçülmesine dayalı testler, metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı testler, hücredeki ATP miktarının ölçümüne dayalı testler ve proliferasyon işaretleyicilerin (marker) ölçümüne dayalı testler olarak sıralanabilir.

Pankreatik kanser hücreleri üzerinde florlu Schiff bazlarının antiproliferatif etkilerini araştırmak için yaptığımız çalışmada, metabolik aktivitenin ölçülmesine dayalı metod kapsamında olan CFSE boyası kullanılmıştır.

2.7.2 CFSE (karboksiflorasan süksinidimil ester) boyası

CFSE, floresan ve süksinimid fonksiyonel grup olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Karboksifloresan süksinimidilester hücre zarından kolay geçen bir boyadır. Boya hücre içine girdikten sonra floresan grubun asetatları esteraz aktivitesi ile kesilir, devamında floresan ışıma ortaya çıkar, bununla birlikte boyanın hücre zarından geçebilme özelliği kaybolur. Hücre içindeki proteinlerin aminlerine bağlanan CFSE boyası, her bölünme ile yavru hücrelere geçer, dolayısıyla hücre prolifere oldukça florasan yayılımı yarıya düşer. CFSE ile yapılan çalışmaların bir kısmında, hücrelerin çoğalması dokuz nesile kadar takip edilmiş ise de üreticisine göre altı nesile kadar hücrelerin takip edilmesi sağlanmıştır. Florasan ömrünün uzun olması da hücre proliferasyon ölçümlerinde avantaj sağlar.

2.8. Flow Sitometri

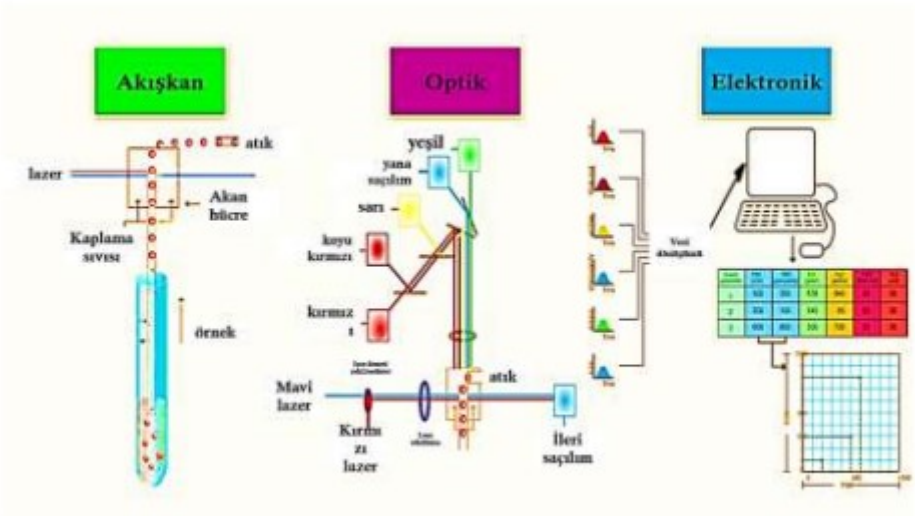
Hücrelerin biyokimyasal ve fiziksel yapıları çok eski yıllardan beri mikroskobik özellikleri kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Günümüzde ise buna karşılık flow sitometri tekniği kullanılmaya başlanmıştır. Flow sitometri, süspansiyon haline getirilen çeşitli hücrelerin teker teker bir akış kanalından geçirilmesidir. Geçirilmiş olan hücreler, büyüklüğüne ve granülaritesine göre sınıflandırılmaktadır. Flow sitometri bu esasa göre çalışan bir cihazdır. Hücrelerin yüzeyi ve iç proteinleri, organelleri, diğer bir kısım bileşenleri flow sitometri tekniği ile analiz edilir ve ayrımı yapılır. Yapılan ayrım lazer ve elektronik teknolojisi kullanılarak büyüklük, granülarite ve de floresan emisyonu esasına göre gerçekleştirilmektedir.

Flow sitometri cihazını oluşturan sistem dört kısımdır. Bunlar;1-Hücre akış (sıvı) sistemi, 2-Işık kaynağı (lazer ışını), 3-Sinyal dedektörleri ve filtreler, 4-Ayırma mekanizması (cell sorting) ve bilgisayar ile yazılım programı bölümlerinden oluşmaktadır.

Flowsitometri cihazı. temel olarak üç bileşenden meydana gelmektedir.(Şekil 6). Hidrolitik bileşen, Partüküllerin ya da hazırlanan hücresel.süspansiyonun lazer önünden geçişi için taşıyıcı sistem olarak görev alan bir akış sistemidir. Optik bileşen, lazer önünden geçiş yapan hücrelerin açığa çıkardıkları floresan yayılımının çapraz ve silindirik filtreler ile bir araya getirilmesi ve bu florasan yayılımının doğru bir

şekilde foto detektöre aktarılmasından sorumlu olan bileşendir. Üçüncü bileşen ise elektronik bileşendir, elde edilmiş olan optik sinyalin photo multipler tubes (PMT) tarafından amplifiye edilerek elektrik sinyaline dönüştürülmesinden sorumludur, elektrik sinyaline dönüştürülen sinyaller ise analiz edilmek üzere bilgisayara aktarılmaktadır. (Kanev, 2016)

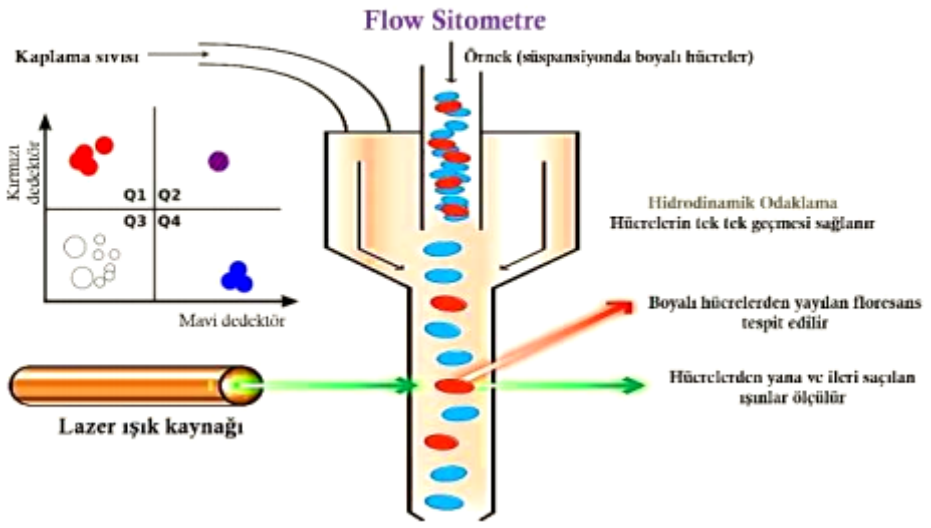
Akış sistemi merkezi bir kanaldan meydana gelir. Numune bu kanaldan cihaza verilir. örnek numuneyi içeren sıvı (laminar akıntı)merkezde ve onu çevreleyen sıvı (sheath fluid) birbirine karışmadan ilerlemektedir. Bu sayede cihazdangeçirilen numune de bulunan partiküllerin tek bir sıra halinde tek tek dizilmesi hidrodinamik odaklanma olarak isimlendirilir. Böylece lazer ışını ile aynı anda tek hücreye düşer ve bu hücrenin analizi yapılır. Florasan ışını öne doğru yayıldığında tipik olarak lazer ile aynı yönde 20˚ etrafa yayılan ışınlar forward scatter chanel (FSC) olarak adlandırılan bir lens yardımıyla toplanırlar. FSC detektörü hücrenin boyutu hakkında bilgi verir. Eksitasyon çizgisine yaklaşık 90˚ açıyla yayılan ışının ölçülmesi ise side scatter olarak adlandırılır. SSC partiküllerin granüler içerikleri ve iç yapısı hakkında bilgi verir (Craıg at all., 2008)



Şekil.2.6. Flow sitometri temel bileşenleri

2.8.1. Flow sitometri çalışma prensibi

Flow sitometri cihazı floresan ışının şiddetine bağlı olarak süspansiyon halindeki hücrelerin, granülarite ve büyüklüklerinin ayrımını yaparak tek hücre seviyesinde kantitatif ölçüm yapar. Süspansiyon haline getirilen hücreler hava basıncı yardımı ile sıvı içinden geçirilir. Bu sıvının çok hızlı olarak akışıyla yüksek bir hidrostatik basınç meydana gelir ve oluşan basınç sayesinde hücreler cam veya quartzdan yapılmış (flowcell) akış kabininde toplanırlar. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminer akışı hücrelerin tek bir sıra halinde lazer ışın kaynağı önünden geçmesini sağlar. Hücrelerin analizi için sistemde forward scatter (FS), side scatter (SS) ve floresan (FL-1,FL-2,FL-3 vb.) dedektörler bulunur. Flow sitometri cihazında temel olarak ileri saçılma grafiği (Forward scatter) ile yaklaşık büyüklüğü, yana saçılma grafiği (Side scatter) ile yaklaşık granülitesi, floresan grafiği (belli dalga boyuna has parıldama eldesi) ile yaklaşık floresan miktarı hakkında bilgiler ediniriz.



Şekil.2.7. Flow sitometri çalışma prensibi

2.8.2. Flowsitometri analizi

Flow sitometri cihazı tekniği sayesinde son derece hızlıdır, çok kısa bir sürede binlerce hücreyi analiz edebilir ve detaylı sonuç raporları elde edilir. Flow sitometrinin en güçlü yönü ve kendisine özgü avantajı, hücrelerin fiziksel özellliklerine göre birbirlerinden ayırt edilebilmesidir. Böylece daha ileri analizler yapabilmek için, farklı hücrelerin saf örneklerini elde etmek mümkün olur. Spesifik hücre analiz edilerek yapılan çalışmalar son dönemde kök hücre ve gen terapi çalışmalarında kullanılmaktadır. Flow sitometri cihazı hücre proliferasyonu ölçüm yöntemi olarak kanser araştırmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Az bir zamanda çok sayıda hücre sayması ve çoklu analiz yapması diğer yöntemlere göre bu cihaz ile yapılan çalışmaları avantajlı kılmıştır.

Flow sitometride yapılan analiz çeşitleri; 1-Hücrelerin büyüklük ve granül yapısına gore yapılan analizin yapılması. 2-Tek floresan boya kullanılarak işaretlenen monoklonal antikor kullanılarak analizin yapılabilmesi. 3-Çok renkli floresan boyalar (2-17 renk) ile işaretlenebilen antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen analiz. 4-Hücre içerisinde bulunan antijenlerin ve yapıların hücre zarının geçirgenliğinin artırılması sonucu eklenen hücre içi antijenlerin floresan boya ile işaretlenip monoklonal antikorlar ile yapılan analizi şeklinde sayılabilir.

3. MATERYAL ve METOD

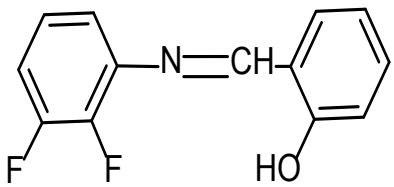
3.1. Materyal

Çalışmada, florlu anilinler ve salisil aldehit temelinde 9 adet Schiff bazının antiproliferatif özellikleri, normal epitelyal hücre hattı (PNT1a), pankreas adenosarkoma hücre hattı (Capan-1), pankreas adacık hücre tümörü [insülinoma] hücre hattı (TGP52) üzerinde araştırılmıştır.

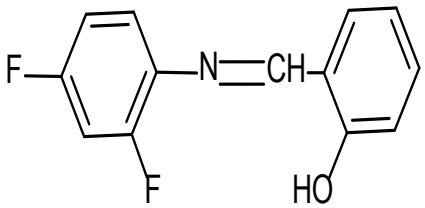
3.1.1. Bileşikler

Çalışmada kullanılan florlu Schiff bazları 113Z134 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında, Harran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Anorganik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Veli KASIM tarafından sentezlenmiştir.

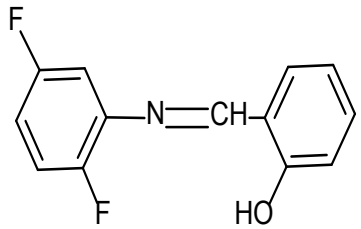
Normal ve pankreas kanseri hücre hatları üzerine antiproliferatif etkileri Test edilen 9 adet florlu Schiff bazının kimyasal formülleri ve hücre hatları üzerine IC50 değerleri Çizelge 3.1. de verilmektedir. Sentezi yapılan bileşiklerin açık formülleri ise sırasıyla aşağıda belirtilmiştir.



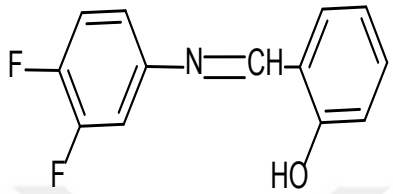
Şekil 3.1. Florlu Schiff bazlarından F2,3-SAL bileşiğinin açık formulu



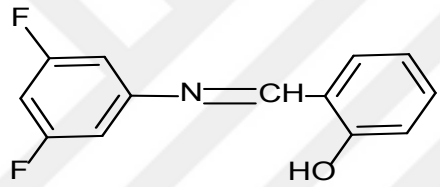
Şekil 3.2. Florlu Schiff bazlarından F2,4-SAL bileşiğinin açık formulu



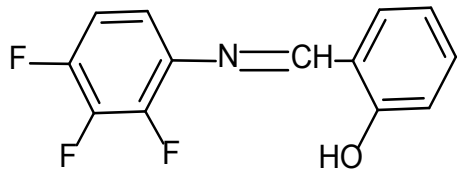
Şekil 3.3. Florlu Schiff bazlarından F2,5-SAL bileşiğinin açık formulu



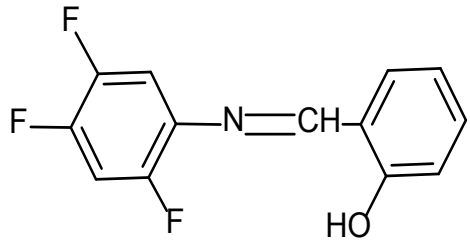
Şekil 3.4. Florlu Schiff bazlarından F3,4-SAL bileşiğinin açık formulu



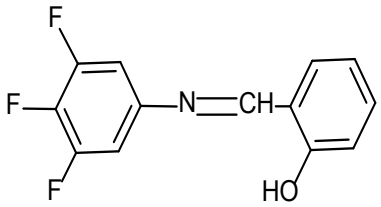
Şekil 3.5. Florlu Schiff bazlarından F3,5-SAL bileşiğinin açık formulu



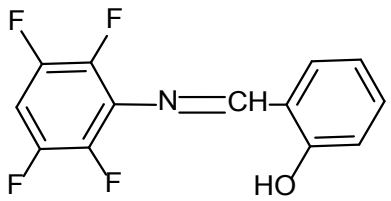
Şekil 3.6. Florlu Schiff bazlarından F2,3,4-SAL bileşiğinin açık formulu



Şekil 3.7. Florlu Schiff bazlarından F2,4,5-SAL bileşiğinin açık formulu



Şekil 3.8. Florlu Schiff bazlarından F3,4,5-SAL bileşiğinin açık formulu



Şekil 3.9. Florlu Schiff bazlarından F4-SAL bileşiğinin açık formulu

Çizelge 3.1. Florlu Schiff bazlarının kimyasal formülleri ve IC değerleri.

KOD	KIMYASAL FORMULU	IC_{50} (µM)*		
		PNT1a	Capan-1	MIA PaCa-2
Bileşik 1	$F_{2,3}$-SAL	670,1	101,2	389,3
Bileşik 2	$F_{2,4}$-SAL	69,4	149,3	92,7
Bileşik 3	$F_{2,5}$-SAL	23,9	64,4	78,4
Bileşik 4	$F_{3,4}$-SAL	172,3	188,1	307,4
Bileşik 5	$F_{3,5}$-SAL	16,0	106,7	592,1
Bileşik 6	$F_{2,3,4}$-SAL	43,3	65,5	68,8
Bileşik 7	$F_{2,4,5}$-SAL	10,8	157,0	187,4
Bileşik 8	$F_{3,4,5}$-SAL	33,8	254,3	31,6
Bileşik 9	F_4-SAL	128,3	143,0	92,6

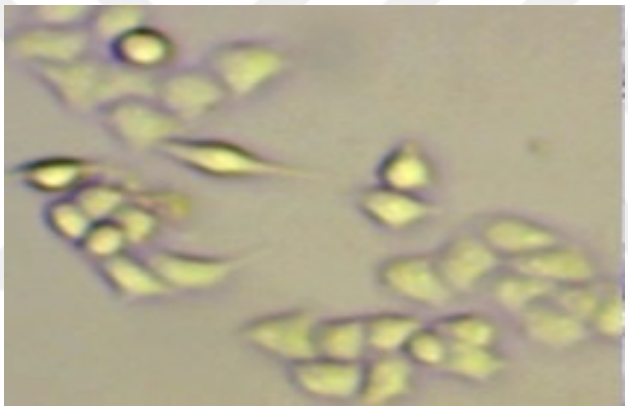
*Bileşiklerin IC50 değerleri 113Z134' nolu TÜBİTAK projesi verilerinden, proje Yürütücüsünün izni ile alınmıştır.

3.1.2. Hücre hatları

Sentezi gerçekleştirilen florlu 9 adet Schiff bazının antiproliferatif özellikleri, pankreas kanseri kökenli 2 hücre hattı (Capan-1 ve TGP52) ve kontrol amaçlı olarak prostat epiteli kökenli sağlıklı hücre hattı (PNT1a) kullanılmıştır.

3.1.2.1. Normal epitelial hücre hattı (PNT1a)

PNT1a hücreleri epitel kökenli olup, normal insan prostat hücrelerinden elde edilmiştir. PNT1a hücreleri kültür ortamında zemine yapışarak üreme özelliği göstermektedir (Şekil 3.10). Kültür için % 10 fötal dana serumu (FBS, Sigma) içeren RPMI1640 (sigma) kullanılmıştır.



Şekil 3.10. PNT1a normal prostat hücreleri (x100)

3.1.2.2.Pankreas karsinom hücre hattı (Capan-1)

Capan-1 hücreleri pankreas adenokarsinomasının karaciğer metastazından elde edilmiştir. Epitel doku kökenli olan bu hücreler, zemine yapışarak üreme özelliği göstermektedir.

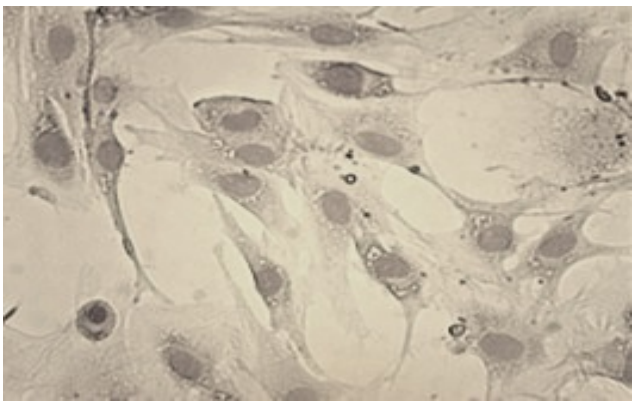
Kültür başlangıcında soliter hücreler olarak, değişik görünümler alarak çoğalmaktadırlar (Şekil 3.11). Kültür sürecinin devam etmesi ile çoğalan hücreler sıkı bağlantılarla blok yapılar oluşturmaktadır. Kültür için % 20 fötal dana serumu (FBS, Sigma) içeren IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco) kullanılmıştır.



Şekil 3.11. Capan-1 pankreas adenokarsinoma hücreleri (x100)

3.1.2.3. Pankreas adacık hücre tümörü hücre hattı (TGP52)

Pankreas adacık hücre tümörü kökenli (insülinoma) olan TGP52 hücreleri, transgenik fareden elde edilmiştir. Epiteliyal kökenli olup, zemine yapışarak, soliter hücreler şeklinde görünüm alarak çoğalmaktadırlar (Şekil 3.12). Kültür için; % 10 fötal dana serumu (FBS, Sigma) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) Hams F12 Medium kullanılmıştır.



Şekil 3.12. TGP52 pankreas adacık tümörü hücreleri (x100)

3.2. Metod

3.2.1. Bileşiklerin analizlere hazırlanması

3.2.1.1. Bileşiklerin tartımı

Çizelge 3.1' de kapalı formülleri verilen 9 adet florlu Schiff bazlarının molar çözeltileri, bileşiklerin molekül ağırlıklarına göre 1 mM konsantrasyonda olacak şekilde hassas terazide (Sartorius) tartılmıştır ve daha sonra ependorf tüplerine alınarak alkolde çözdürülmüştür.

Bileşiklerin sterilizasyonu, 20 μm por çapında enjektör tip filtrelerden (Millipore) geçirilmek suretiyle gerçekleştirilmiş, sterilizasyondan sonra bileşikler 2 ml hacimli kriyotüplere alınarak, analizlere kadar -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Hücre hatlarının hazırlanması

Hücre hatları, üretici firma (ATCC, ABD) tarafından önerilen yöntemle kültür ortamı hazırlanmıştır. Her bir hücre hattına ait çözünen hücreler, 10 ml mediuma transfer edilmiştir. Bir sonraki işlemde, 1800 RPM' de 10 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Hücreler yeniden medium ile süspanse edilerek seri kültürlere hazır hale getirilmiştir.

Hücrelerin başlangıç kültürleri 25 cm2' lik kültür flasklarında gerçekleştirilmiştir. Çözünerek süspansiyon haline getirilen hücreler; 10 ml medium içerisinde, 37 °C' de, % 5 CO2' li nemli kültür ortamında inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin kültür flaskında % 70-80 düzeyinde konfluent üremesini takiben seri kültürlere geçilmiştir.

3.2.2.1. Hücrelerin çoğaltılması

25 cm2' lik kültür flasklarında çoğalan hücreler, sürekli kültürler ve stoklama için kültür flaskı zemininden toplanmıştır. Bu amaçla, kültür flaskları PBS ile 3 defa yıkanmış, sonrasında kültür flasklarına tripsin-EDTA eklenerek; 37 °C de CO2' li (%5) kültür ortamında 1-2 dak. bekletilmiştir. Bu aşamada kültür flaskları hafifçe çevrilerek, hücrelerin kültür plağının zemininden ayrılması hızlandırılmıştır. İnverted mikroskop kullanılarak hücrelerin zeminden ayrılmaları ve yuvarlak şekil alışı, kültür mediumunda yüzer duruma geldikleri izlenmiştir.

Kültür flasklarının içeriği falkon tüplerine alınarak, 1800 RPM' de 10 dak. santrifüj edilmiştir. Santrifuj sonrası hücreler kültür taze mediumuyla yeniden süspanse edilerek sürekli kültürler ve hücre saklama işlemleri için kullanılmıştır.

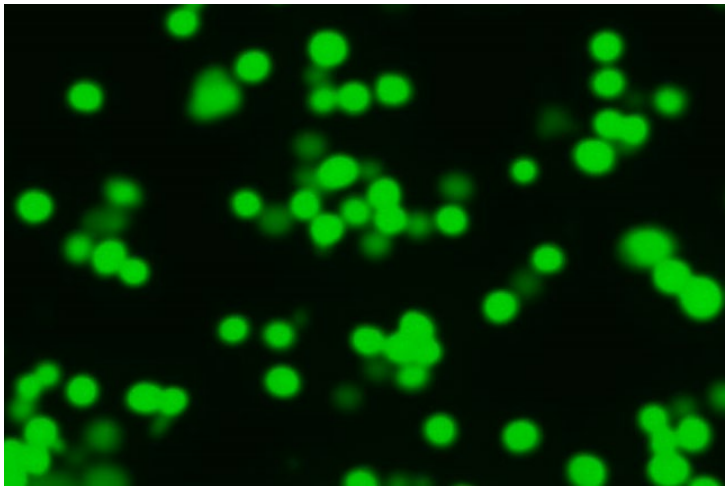
Hücrelerin sürekli kültürleri için 75 cm2' lik kültür flaskları kullanılmıştır. İlk kültür sonrası elde edilen hücrelerin bir kısmı sürekli kültürleri başlatmak amacıyla 75 cm2' lik kültür flasklarına 106 hücre/ml dozunda ekilmiştir. Hücreler, her bir hücre hattına özel kültür medium ortamı içerisinde, 37 °C' de % 5 CO2' li nemli kültür ortamında inkübe edilmiş ve hücrelerin çoğalmaları inverted mikroskopta takip edilmiştir. Kültür flasklarında çoğalan hücreler, tripsinizasyonla kültür flasklarından toplanarak analizlerde kullanılmıştır.

3.3. CFSE Yöntemi

Hücre proliferasyonu, hücrelerin replikasyon sırasında, yeni oluşan hücreler tarafından eşit paylaşılan 5 (6) -karboksifluoresan süksinimidil ester (CFSE) boyasının flow sitometrik ölçümlerine göre değerlendirilmiştir.

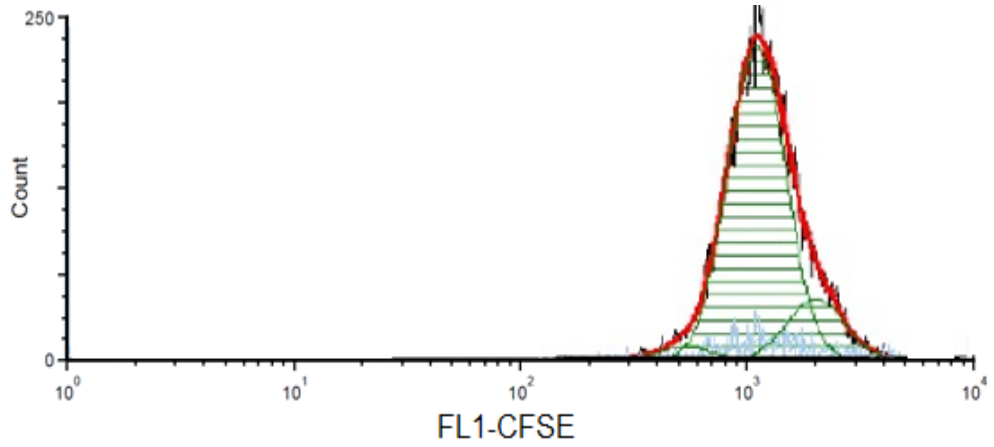
CFSE analizlerinde her bir hücre hattı için, 75 cm2' lik kültür flasklarına ekilen hücreler kullanılmıştır. Normal (PNT1a) ve pankreas kanseri (Capan-1, TGP52) hücreleri 75 cm2' lik kültür flasklarından tripsinizasyonla toplandıktan sonra, 106 hücre/mL dozunda süspansiyon haline getirilmiştir.

Hücrelerin santrifüj sonrası kültür mediumu uzaklaştırılmasından sonra, PBS ile süspanse edilmiş ve 15 μM' konsantrasyonunda CFSE (Carboksiflorasan süksinimidil ester, Sigma) ile, 37º C' de CO2' li kültür ortamında, 20 dak. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, hücrelerin boyanma düzeyleri floresan mikroskopta (Juli, Nano EnTek) incelenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Hücrelerin CFSE ile boyanmasının ardından floresan boyanma düzeylerinin floresan mikroskobik görüntüleri

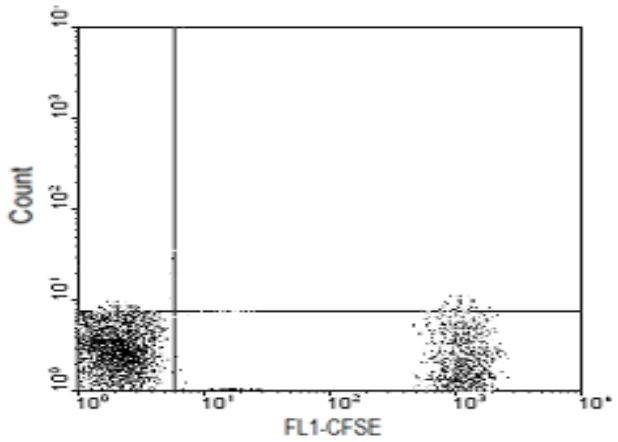
Boyanma düzeylerinin floresan mikroskop incelemesinin ardından, hücreler flow sitometri cihazından (Beckman Coultr FCX 500) geçirilerek, hücrelerin gösterdiği maksimum yeşil floresan değerleri FL1 histogramında belirlenmiştir (Şekil 3.14.).



Şekil 3.14. Hücrelerin CFSE ile boyanmasının ardından floresan yoğunlukları ve jenerasyonlar. Siyah histogramlar floresan yoğunluğunu, yeşil pikler meydana gelen jenerasyonları göstermektedir

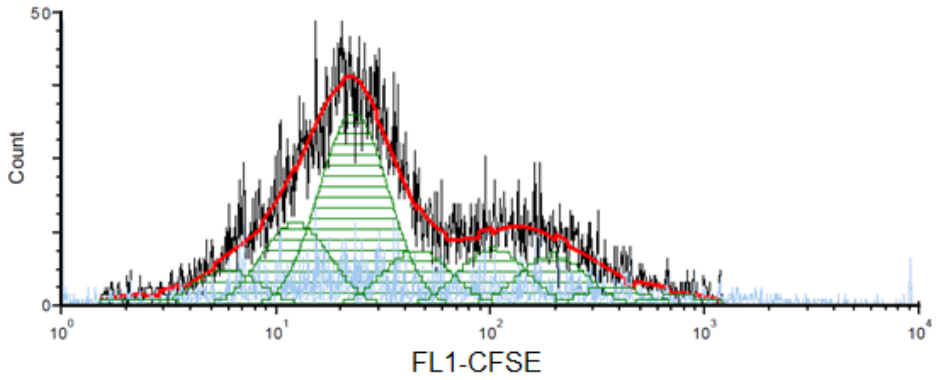
Kültür plaklarına ekim öncesi hücreler santrifüj edilerek, CFSE içeren PBS uzaklaştırılmış ve hücreler kendilerine özgü kültür mediumu ile süspanse edilmiştir. Florlu Schiff bazları, her bir bileşiğin IC50 değeri dozunda (Çizelge 3.1.), oval zeminli (U bottom) 96 kuyucuklu kültür plaklarının kuyucuklarına eklenmiştir. CFSE boyalı hücreler, florlu Schiff bazları ekilen kültür plaklarına ekilerek, 37 ºC' de CO2 kültür ortamında 72 saat inkübe edilmiştir.

Kültür sonrasında, hücreler tekrar flow sitometri cihazından (Coulter FCX500) geçirilerek, FL1 histogramında gösterdikleri floresan yoğunlukları belirlenmiş ve veriler LISTMOD formatında kaydedilmiştir (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Hücrelerin CFSE ile boyanmasının ardından FL1 kanalında analizleri

Flow sitometrik analizden elde edilen LISTMOD verileri, FCS Express 5 (analiz V. demo) programında değerlendirilmiş ve gösterdikleri floresan yoğunluğundaki değişimler referans alınarak, hücrelerin kültür sürecinde geçirdikleri bölünme sayıları ve dolayısıyla proliferatif indeks (Pİ) değerleri belirlenmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Florlu Schiff bazlarıyla 72 saat inkübasyon sonrası hücrelerin geçirdiği bölünmelere işaret eden floresan yoğunlukları ve meydana gelen jenerasyonlar. Siyah histogramlar floresan yoğunluğunu, yeşil pikler meydana gelen jenerasyonları göstermektedir

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Çalışmada 9 adet Florlu Schiff bazlarının PNT1a, Capan-1 ve TGP52 hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkilerin araştırmak amacıyla, bileşiklerin hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkileri incelenmiştir.

Bileşiklerin hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkilerine ilişkin olarak, proliferasyon indeksi (PI), bölünme indeksi, bölünme geçiren hücrelerin yüzde değerleri, kültür ortamındaki orijinal hücreler ve meydana gelen jenerasyon sayıları araştırılmıştır.

4.1.1. Bileşiklerin PNT1a hücre hattı üzerine antiproliferatif etkileri

Florlu Schiff bazlarının PNT1a hücre hattı üzerinde 72 saatlik inkübasyonu sonucu yapılan analiz verleri Çizelge 4.1' de gösterilmektedir.

Bileşik 1' in (F2,3-SAL) PNT1a hücre hattı üzerinde belirlenen PI değeri 7.52, Bileşik 8'in (F3,4,5-SAL) PI değeri 7.53 olarak bulunmuştur. Bu iki bileşiğin PNT1a hücreleri üzerinde antiproliferatif etkileri birbirine yakın olarak bulunmuş ve bu bileşiklerin güçlü antiproliferatif etkiye sahip oldukları belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Florlu Schiff bazlarının PNT1a hücre hattı üzerinde 72 saat inkübasyon sonrası antiproliferatif etkilerinin flow sitometrik CFSE analiz verileri.

	PNT1a hücre hattı					
Bileşikler	**Proliferasyon indeksi**	**Bölünme indeksi**	**% Bölünen**	**Sayılan hücreler**	**Orijinal hücreler**	**Jenarasyon sayısı**
Kontrol	11.63	11.63	100	8591	733	9
Bileşik 1	7.52	9.33	77.82	7890	956	9
Bileşik 2	13.54	13.54	100	5612	395	9
Bileşik 3	8.49	8.49	100	6178	706	8
Bileşik 4	8.33	8.33	100	8945	1037	9
Bileşik 5	15.35	15.35	100	7795	491	9
Bileşik 6	9.2	9.2	100	5108	534	9
Bileşik 7	11.2	11.2	100	6649	743	9
Bileşik 8	7.53	7.53	100	6592	780	8
Bileşik 9	9.06	9.06	100	6657	700	9

Schiff bazlarından Bileşik 5' e (F3,5-SAL) ait PI değeri bu bileşiğin en zayıf antiproliferatif etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu bileşiğe ait PI değeri kontrol grubunun PI değerinde de yüksek olarak belirlenmiştir. Özellikle Bileşik 5 ve Bileşik 2' nin PNT1a hücreleri üzerinde antiproliferatif etkiden ziyade proliferative etki gösterdiği belirlenmiştir.

Hücrelerin bölünme oranına baktığımızda Bileşik 1 hariç diğer bileşiklerin uygulandığı hücrelerin tamamında bölünme gerçekleştiği gözlenmiştir. Bileşik 1' in eklendiği kültür kuyucuğunda de ise bölünme oranı % 77.82 de kalmıştır.

Schiff bazlarının uygulandığı PNT1a hücrelerinden orijinal hücreler en yüksek düzeyde Bileşik 5' in uygulandığı kültür ortamına gözenmiştir. Çalışmamızı gerçekleştirdiğimiz CFSE yöntemi ile hücrelerin bölünmesi sonucu oluşan populasyonların 8-9 nesile kadar devam ettiği gözlenmiştir.

4.1.2. Bileşiklerin Capan-1 hücre hattı üzerine antiproliferatif etkileri

Florlu Schiff bazlarının Capan-1 hücre hattı üzerinde 72 saatlik inkübasyonu sonucu yapılan analiz verleri Çizelge 4.2' de gösterilmektedir.

Bileşik 2' nin (F2,4-SAL) Capan-1 hücre hattı üzerinde belirlenen PI değeri 8.75, olarak bulunmuştur. Bu bileşiğin Capan-1 hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisi en güçlü olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Florlu Schiff bazlarının Capan-1 hücre hattı üzerinde 72 saat inkübasyon sonrası antiproliferatif etkilerinin flow sitometrik CFSE analiz verileri.

	Capan-1 hücre hattı					
Bileşikler	**Proliferasyon indeksi**	**Bölünme indeksi**	**% Bölünen**	**Sayılan hücreler**	**Orijinal hücreler**	**Jenarasyon sayısı**
Kontrol	12.53	12.53	100	8435	961	7
Bileşik 1	30.32	30.32	100	9043	287	9
Bileşik 2	8.75	8.75	100	9093	1000	9
Bileşik 3	9.17	9.17	100	9007	936	9
Bileşik 4	15.34	15.34	100	9033	564	9
Bileşik 5	13.91	13.91	100	9054	620	9
Bileşik 6	11.44	11.44	100	7728	644	9
Bileşik 7	15.88	15.88	100	8984	539	9
Bileşik 8	12.62	12.62	100	8898	661	8
Bileşik 9	12.48	12.48	100	8964	685	9

Schiff bazlarından Bileşik 1,4 5 ve 7' e (F3,5-SAL) ait PI değerleri bu bileşiklerin antiproliferatif etkiye sahip olmadıklarını göstermektedir. Bu bileşiklere ait PI değerleri kontrol grubunun PI değerinde de yüksek olarak belirlenmiştir. Özellikle Bileşiklerin Capan-1 hücreleri üzerinde antiproliferatif etkiden çok proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir.

Hücrelerin bölünme oranına baktığımızda tüm bileşiklerin uygulandığı hücrelerin tamamında bölünme gerçekleştiği gözlenmiştir. Schiff bazlarının uygulandığı Capan-1 hücrelerinden orijinal hücreler en yüksek düzeyde Bileşik 2' in uygulandığı kültür ortamında gözlenmiştir. Çalışmamızı gerçekleştirdiğimiz CFSE yöntemi ile hücrelerin bölünmesi sonucu oluşan populasyonların 7-9 nesile kadar devam ettiği gözlenmiştir.

4.1.3. Bileşiklerin TGP52 hücre hattı üzerine antiproliferatif etkileri

Florlu Schiff bazlarının Capan-1 hücre hattı üzerinde 72 saatlik inkübasyonu sonucu yapılan analiz verileri Çizelge 4.3' te gösterilmektedir.

Çizelge 4.3. Florlu Schiff bazlarının TGP52 hücre hattı üzerinde 72 saat inkübasyon sonrası antiproliferatif etkilerinin flow sitometrik CFSE analiz verileri.

	TGP52 hücre hattı					
Bileşikler	**Proliferasyon indeksi**	**Bölünme indeksi**	**% Bölünen**	**Sayılan hücreler**	**Orijinal hücreler**	**Jenarasyon sayısı**
Kontrol	16.14	16.14	100	8304	453	9
Bileşik 1	16.01	16.01	100	8059	436	9
Bileşik 2	9.19	9.19	65.19	8625	1212	9
Bileşik 3	9.25	9.25	100	7000	698	9
Bileşik 4	12.31	12.31	100	7388	594	9
Bileşik 5	14.79	13.47	90.46	8216	576	9
Bileşik 6	11.35	5.19	40.50	8030	1447	9
Bileşik 7	12.35	12.35	100	8591	787	9
Bileşik 8	12.32	12.32	100	8056	630	9
Bileşik 9	20.8	20.80	100	9035	415	9

Bileşik 6' nin (F2.3.4-SAL) TGP52 hücre hattı üzerinde belirlenen PI değeri 5.19 olarak bulunmuştur. Bu bileşiğin TGP52 hücreleri üzerinde en güçlü antiproliferatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Schiff bazlarından Bileşik 9' a (F5-SAL) ait PI değeri bu bileşiğin en zayıf antiproliferatif etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu bileşiğe ait PI değeri kontrol grubunun PI değerinde de yüksek olarak belirlenmiştir. Özellikle Bileşik 9' un TGP52 hücreleri üzerinde antiproliferatif etkiden ziyade proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir.

Hücrelerin bölünme oranına baktığımızda Bileşik 2, 5 ve 6 hariç diğer bileşiklerin uygulandığı hücrelerin tamamında bölünme gerçekleştiği gözlenmiştir. Bileşik 6' nın eklendiği kültür kuyucuğunda de ise bölünme oranı % 40.50 düzeyinde kalırken, Bileşik 2' nin uygulandığı kültür kuyucuğunda % 65.19, Bileşik 5'nin uygulandığı kültür kuyucuğunda % 90.19 düzeyinde kalmıştır.

Schiff bazlarının uygulandığı TGP52 hücrelerinden orijinal hücreler en yüksek düzeyde Bileşik 6' in uygulandığı kültür ortamına gözenmiştir. Çalışmamızı gerçekleştirdiğimiz CFSE yöntemi ile hücrelerin bölünmesi sonucu oluşan populasyonların 9 nesile kadar devam ettiği gözlenmiştir.

4.2. Tartışma

Prasanna ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada 1.2.4-triazol temelinde bazı florlu Schiff bazları sentezlemişler ve bu Schiff bazı bileşiklerinin antiproliferatif etkilerini insan kanser hücre dizilerinde (K562. COLO-205. MDA-MB231 ve IMR-32) 24 saat inkübasyon süresi sonrası MTT yöntemi ile analiz etmişlerdir. Antiproliferatif analiz sonuçları, bu Schiff bazı türevlerinin Colo-205, IMR-32 ve MDA-MB231'e karşı yüksek antiproliferatif aktiviteye fakat K562 hücre serisine karşı zayıf antiproliferatif aktivite sahip olduğunu göstermişler. Bu Schiff bazlarının antiproliferatif etkilerinin triflorometil grubunun elektron çekme özelliğinden kaynaklanabileceği varsayılmıştır. Çalışmamızda, benzer olarak, florlu Schiff bazı türevlerinin değişik hücre hatları üzerinde farklı düzeylerde antiproliferatif etkiye sahip olduğu, pankreas kanseri hücreleri açısından bakıldığında, bazı bileşiklerin yüksek antiproliferatif etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Wang ark. (2012) tarafından bir dizi florin veya triflorometan içeren 3.5-ikame edilmiş 1.2.4-triazol türevleri sentezlenmiştir. Akciğer karsinomu (NCI-H226) hücreleri. T hücreli lösemi (Jurkat) hücreleri kültürlendikten sonra sentezlenen

bileşikler ile farklı konsantrasyonlarda 72 saat inkübe edilip ve MTT kolorimetrik yöntem ile analiz edilmiştir. Hücrelerin büyüme inhibisyonu, IC50 molar konsantrasyon değerleri saptanmıştır. Bu değerlere göre, NCI-H226 hücre hattına karşı monoflorin içeren 1.2.4-triazol bileşiğin hücre proliferasyonuna daha etkili olduğu, bununla birlikte triflorometan içeren 1.2.4-triazol bileşiklerinde T hücreli lösemi hücresine karşı daha az tatmin edici antiproliferatif aktivite sonuçları verdiği bildirilmiştir. Antiproliferatif etki belirlenmesinde, yukarıdaki çalışmada olduğu gibi farklı metotlar kullanılmakta ve yeni sentezlenen bileşiklerin antiproliferatif etkileri analiz edilmektedir. Bizim çalışmamızda, test edilen florlu Schiff bazlarının antiproliferatif etkilerinin analizinde farklı bir metoda başvurulmuştur. Belirtilen çalışmada hücre proliferasyonunun belirlenmesinde bu tür yöntemlere karşın, bizim çalışmamızda flow sitometri ile CFSE yönteminin kullanılmış olması ve bileşiklerin antiproliferatif etkilerinin değerlendirilmesinde çoklu parametrelere dayalı izlem ve değerlendirme yapılması avantajlı bir durumdur.

Proetto ve ark. (2012) platin schiff bazı kompleksine farklı noktalarda flor ikamesiyle yeni bileşikler sentezlemişlerdir. Yeni sentezlenen diarilserin Pt(II) kompleklerinin florürün konumuna göre antiproliferatif etkilerini araştırmak için MDA-MB231. HT239 hücrelerine karşı test edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin belirlenen konsatrasyonları belirtilen hücreler ile 96 saatlik inkübasyon sonucunda kristal moru boyası ile biyo kütlesi belirlenip fotometrik ölçümü yapılmıştır.

Cisplatin kompleksi testin sonuna doğru maksimum aktivite gösterirken florlu platin komplesleri 48-72 saatlik süreçte aktivite gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca florun konumuna göre antiproliferatif etkinin çeşitlilik gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmamızda, salisiladehit temeline dayalı florlu Schiff bazlarının kullanılması ve özellikle flor atomunun bileşiğin davranışı üzerindeki etkilerin araştırılması, belirtilen çalışmayla bir sinerji durumunu ortaya koymaktadır. Bileşiğin sahip olduğu flor atomunun sayısı ve konumundan ziyade antiproliferatif etki gücü üzerinde önemli tesire sahip olduğunu çalışmamızda gözlemlemiş durumdayız.

Gürol ark. (2017) sentezini yaptıkları florlu Schiff bazlarının antiproliferatif etkisini doksorubisin ile karşılaştırmalı olarak aynı hücre hattı üzerinde değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada K562 myelomonositik lösemik hücre çizgisi

üzerinde florinlenmiş Schiff bazlarının antiproliferatif etkilerini saptamak ve önemli niceliksel veriler sağlayabilmek için CFSE testi kullanılmıştır. K562 hücreleri CFSE boyası ile inkübe edildikten sonra doksorubisin ve sentezi yapılan florlu schiff bazları ile 96 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücrelerin flow sitometrik analizleri yapılmıştır. Flow sitometrik verilerin analizide, proliferatif indeksin yanı sıra 92 saat boyunca bölünmeden kalan hücre yüzdesini, jenerasyon sayısını, bölünen hücre sayısını vermiştir. Bizim çalışmamızda da benzer işlemler yapılmış ve sonuçlar benzer şekilde detaylandırılarak sunulmuştur. Farklı hücre hatlarıyla gerçekleştirilmesine karşın, sunulan ve bizim gerçekleştirdiğimiz çalışma sonuçlarının kantitatif verilere dayalı olması sayesinde, bu iki çalışmadan elde edilen bilimsel çıktıları karşılaştırıabilme olanağı doğmaktadır. Antiproliferatif etki değerlendirilmesinde bu metodun kullanılmasıyla, birçok araştırmadan elde edilecek verinin aynı anda değerlendirilmesinin yapılabileceği geniş ve güvenilir bir platform meydana getirmek olası görünmektedir.

Zhenzhen ve ark. (2019) yaptıkları floride benzoilhidrazon porfirin ligandlarına dayanan neotip suda çözünür Cu (II)-komplekslerinin DNA bağlanması ve in vitro antineoplastik aktivitesi ile ilgili çalışmada üç adet neotip suda çözünür asilhidrazon porfirin Cu (II)-kompleks tasarlanmıştır. Üç kompleksin ct-DNA ile bağlanma derecesini test etmek için çok yönlü fizikokimyasal yaklaşımlar kullanılmıştır. Ayrıca bu Cu (II) bazlı porfirin bileşiklerinin antitümör aktiviteleri çeşitli kanser hücre dizilerine (A549, H-1975, HepG2, T47D) ve kanserli olmayan hücrelere (Hs 578Bst) karşı incelenmiştir. Test edilen dört kanser hücresi hattına hücresel alım kapasitesini belirlemek için bir ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. İlginç bir şekilde CuP3 sadece en güçlü DNA bağlanma afinitesi göstermekle kalmayıp aynı zamanda H-1975 cell hattına karşı en yüksek hücre alımının yanı sıra analoglarından daha düşük IC50 değeri sergilenmiştir. Hücre döngüsü ilerlemesinin düzenlenmesi ile ilişkisini araştırmak için H-1975 hücreleri toplanıp ve propidium iyodür (PI) ile inkübe edilmiştir. Hücresel DNA içeriği akış sitometrisi ile belirlenmiştir. Hücre döngüsünün farklı fazlarındaki hücrelerin yüzdesi analiz edilmiş ve 24 saat ve 48 saatlik sentezlenen bileşiklere maruz kalan hücre hatları her iki zaman noktasında da G2 fazında anlamlı bir birikimine neden olduğu tespit edilmiştir. Hücrelerin G1 ve S fazlarına baskılayıcı etkileri olduğu saptanmıştır. Ayrıca MTT

yöntemiylede ikinci bir antiproliferatif etki tespiti yapılmıştır. Sonuçlar birbirini destekler nitelikte bulunmuştur. Bu çalışmada hücre proliferasyonunu belirlemek için farklı yöntemlere başvurulmuştur. Ayrıca farklı kanser hücreleri üzerinde sentezi yapılan bileşikler test edilmiştir. Bunlar bizim çalışmamızın eksik yönleridir. Sonuç olarak H-1975 akciğer kanser hücresi üzerinde Cu(II) bazlı porfirin bileşiklerinin antiproliferatif etkisi tespit edilmiştir. Buda bize florlu Schiff bazlarının farklı kanser hücreleri üzerine etkilerinin farklı miktarlarda olduğunu göstermiştir.

Kasım ark. (2014) yaptıkları başka bir çalışmada poliflorlu Cu(II) ligandlarının. 5fluorourasil ile kıyaslanarak K562 monositik lösemi hücreleri üzerinde sitotoksistesi araştırılmıştır. 72 saat hücre hatları ile inkübe edilen ligandların MTT yöntemi kullanılarak IC50 (%50 hücre büyümesini önleyen mikromolar konsantrasyon) değerleri saptanmıştır. IC50 değerlerine göre pentaflorlanmış ligandların en güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Poliflorlu Cu(II) kompleksi 5FU kompleksinie göre daha sitotoksik olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak anilin halkalarındaki flor sayısı ve bulunduğu konum florlu ligandların sitoksisitesini etkilediği belirtilmiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Çalışmamızda 9 adet florlu Schiff bazının normal (PNT1a) ve bir pankreas kanseri türleri olan adenokarsinoma (Capan-1) ve insülinoma (TGP52) hücreleri üzerine antiproliferatif etkileri flow sitometrik bir yöntem olan CFSE proliferasyon analizi ile incelenmiş ve her bir bileşiğin hücreler üzerindeki antiproliferatif etkisi proliferatif indeks olarak belirlenmiştir.

Çalışmalarımızda hücrelerin proliferasyonlarını önleme açısından güçlü bileşikler olarak, normal PNT1a hücreleri için Bileşik 1'in (F2,3-SAL), Capan-1 hücreleri üzerine Bileşik 2' nin (F2,4-SAL) ve TGP52 hücreleri üzerine de Bileşik 6' nın (F2,3,4-SAL) en güçlü antiproliferatif etkiyi gösterdikleri belirlenmiştir.

Bir kemoterapotik ajanın sitotoksik gücünün olduğu kadar antiproliferatif etkisinin de kanser tedavisinde önemli olduğu altı çizilmesi gereken hususlardan biridir. Yeni kemoteraptik ajan araştırması niteliğindeki çalışmamız, florlu Schiff bazlarının kanser hücreleri üzerine sahip olduğu antiproliferatif potansiyeli ortaya koyma açısından önem taşımaktadır. Çalışmamızda sitotoksik etkileri güçlü olsa da bazı bileşiklerin kanser hücrelerinin üremesi üzerindeki baskısının zayıf kaldığı dikkatleri çekmiştir. Böylesi bir durumda, bileşiklerin sitotoksisite ve antiproliferatif etki gibi, kemoterapinin başarısını derinden etkileyen bu iki faktörden azami ölçüde yararlanmanın yolunu açabilmek için belki de bunların kombine kullanımının önemi ön plana çıkaracak çalışmalar yapılmalıdır.

Yapmış olduğumuz çalışmamızda kullanılan CFSE yöntemi antikanser çalışmalarında henüz dikkati çeken sofistike bir antiproliferatif etki belirleme yöntemidir. Yöntem özellikle immünoloji alanında hücre proliferasyonunun belirlenmesinde sıklıkla kullanılmakla birlikte, antikanser araştırmalarında son zamanlarda dikkatleri üzerine çekmektedir. CFSE yöntemiyle hücre proliferasyonunun önlenmesinin flow sitometrik olarak takip edilmesi, MTT gibi diğer yöntemlere kıyas ile antikanser araştırmaları için kalitatif sonuçların yerine daha kantitatif sonuçların elde edilmesine olanak sağlayabilmektedir. Bu metod sayesinde,

kültür ortamındaki hücrelerin sayısından ziyade, hücrelerin geçirdiği bölünme sayıları, meydana gelen jenerasyonlar, bölünme geçiren hücrelerin yüzde oranları gibi izlenebilir ve tartışılabilir verilere ulaşma imkanınına kavuşulmaktadır. Yine diğer yöntemlerde elde edilen oransal sonuçların yerine, CFSE analizleriyle test edilen materyallerin hücrelerin bölümesi ve çoğalması üzerindeki etkileri bir indeks olarak (proliferatif indeks, PI) değerlendirilmektedir.

CFSE yönteminin bir diğer elverişli yanı da, kültürdeki hücrelerin bölünme ve çoğalma davranışlarının uzun süreli takip edilebilmesine olanak sağlamasıdır. Bu sayede, hücrelerin kültür ortamında uzun süreli takiplerine, geçirdikleri bölünme sayılarına, meydana getirdikleri yeni jenerasyonların takibine imkan oluşmaktadır. Böylece, test edilecek bileşiklerin kemoterapotik ajan adayı olabilme potansiyelleri, nitelikten öte nicel verilerle değerlendirilebilmektedir. CFSE analizlerinden elde edilecek verilerle, hâlihazırda kullanılan kemoterapotik ajanların antiproliferatif etkileri ile test edilecek kemoterapotik ajan adaylarının bu etkileri parametrik istatistiksel analizlerle, çok hassas bir şekilde değerlendirilme olanağına kavuşacaktır.

5.2. Öneriler

*Çalışmamızda florlu Schiff bazlarının antiproliferatif etkilerinin izlenmesi 72 saatlik inkübasyondan elde edilen verilere dayanmaktadır. Çalışma kültür sürecinin daha kısa zaman periyotlarında (24, 48 saat) ya da daha uzun zaman periyotlarında (1 hafta, 2 hafta) test edilerek, her bir bileşiğe ait antiproliferatif etkinin optimum zaman süreci belirlenebilir. Bu durum, halihazırda kullanılmakta olan kemoterapotik ajanlar için, özellikle kemoterapi öncesi belirlenerek, daha uygun kemoterapi rejimlerinin oluşturulmasına katkı sağlayabilir düşüncesindeyiz.

*Çalışmamız pankreas kanser hücreleri üzerine gerçekleştirilmiş ve test edilen bileşiklerin üzerinde uygulama gerçekleştirilen hücrelerin ifade ettiği kanser türlerine karşı verilere dayanmaktadır. Çalışmada kullanılan bileşiklerin antiproliferatif etkilerinin başka kanser kökenli hücre hatları üzerinde denenmesinin, değişik kanser türleri için de önemli sayılabilecek etkinliklerin ortaya çıkarılması için yararlı olabileceği kanaatindeyiz.

*Çalışmamız, flow sitometrik verilere dayalı sofistike bir araştırma olmakla birlikte, elde ettiğimiz verilerin doğrulanması amacıyla, test edilen bileşiklerin antiproliferatif etkilerinin in vivo çalışmalarla da desteklenmeye ihtiyacı bulunmaktadır. Bu amaçla, deneysel hayvan modelleri kullanılarak, bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkilerinin yaşayan organizma üzerinde de gösterilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bilindiği üzere, herhangi bir bileşiğin organizmaya girdikten sonra, fizyolojik ve biyokimyasal faktörler tarafından etkilendiği dikkate alınması gereken bir gerçekliktir.

KAYNAKLAR

AĞIR, H., 2011. Bazı Schiff Bazları ve Mn(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II) Komplekslerinin Nükleolitik Aktivitelerinin İncelenmesi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Rize, 66s.

ARCHANA, S., SUMAN, M., and SHEERAZ, A, T., 2016. A Review on Biological Studies of Metal Complexes of Macrocyclic Schiff BaseLigands. International Journal of Science, Engineering and Technology Research (IJSETR), 5:2964-2967.

AVCI. E., 2015. Juglonun BxPC-3 Pankreas Kanseri Hücrelerinde, Sitotoksisitelerinin degerlendirilmesi, İnvazyon ve Anjiyogenez üzerine etkisinin Araştırılması. Selçuk Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi, Konya, 63s.

AVANCÈS, C., GEORGET, V., TÉROUANNE, B., ORIO, F., CUSSENOT, O., MOTTET, N., COSTA, P.and SULTAN, C., 2011. Human prostatic cell line PNT1A, a useful tool for studying androgen receptor transcriptional activity and its differential subnuclear localization in the presence of androgens and antiandrogens. Elsevıer, 184:13-24.

AYDINLI, EA., 2006. Bazı Schiff Bazların Antimikrobiyal Aktiviteleri, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 45s.

BAI, J., WANG, R.H., QIAO, Y., WANG, A. and FANG, C.J., 2017. Schiff base derived from thiosemicarbazone and anthracene showed high potential in overcoming multidrug resistance in vitro with low drug resistance index. Drug Des Devel Ther, 11:2227-2237.

BURMAOĞLU, S., 2017. Fluoro-substituted chalcone compounds as anticancer agent. Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi, 7:658-664.

BAYKARA, O., 2016. Kanser Tedavisinde Güncel yaklaşımlar, Balikesir Saglik Bil Derg, 5:154-165.

BÉGUÉ, P., BONNET-DELPON, D., 2008. Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine, 280-299.

BANERJEE, K., BISWAS, M.K. and CHOUDHURI, SK., 2017. A newly Synthesized Nickel Chelate Canselectively Target and Overcome Multidrug Resistance in Cancer Through Redox Imbalance both In vivo and In vitro. J Biol Inorg Chem, 22:1223-1249.

BANERJEE, S., AZMI, A. S., PADHYE, S., SINGH, M. W., BARUAH, J. B.,PHILIP, P. A., SARKAR, F. H. and MOHAMMAD, R. M., 2010. Structure-Activity Studies on Therapeutic Potential of Thymoquinone Analogs in Pancreatic Cancer. Pharm. Res, 27: 1146.

BÖHM, H., 2004. Fluorine in medicinal chemistry. Chembio chem, 15: 637–643.

CRAIG, F.E., FOON, K.A., 2008. Flow Cytometric Immunophenotyping for Hematologic Neoplasms. Blood, 111: 3941-3967.

CEYLAN, Ş., 2016. Synthesis and Antimicrobial activities of New 1,2,4- Triazoles, Mannich Bases, Conazoles, and Fluoroquinolones,28th National Chemistry Congress and submitted to JOTCSA, 3:747-764.

DIGRAK, M., KASIMOV, V., OĞUZTANSU, E., 2017. Bazı Schiff bazlarının antimikrobiyal özellikleri üzerinde in vitro Araştırılmaları II.Ulusal Kızılırmak Fen bilimleri kongresi, 20-22 Mayıs1997, Kırıkkale, 350s.

DOMAGALA, J.M., 1994. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 33:685-706.

FANG.B., ZHAO, Z., XINXIN LI., PINGPING WU & ZHEWEN HAN., 2007. Preparation and Surface Properties of Fluorine-Con taining Diblock Copolymers PLMA.Block.PFAEA. Journal of Macromolecular Science, 44:1235-1243.

GALANSKI, M., JAKUPEC, M, A., KEPPLER, B. K., 2005. Update of the Preclinical Situation of Anticancer Platinum Complexes: Novel Design Strategies and Innovative Analytical Approaches. Current Medicinal Chemistry, 12: 2075-2094.

GEHAD, G.M., EHAB, M.Z., AHMED, M, HINDY, M., 2015. Coordination behavior of new bis Schiff base ligand derived from 2-furan carboxaldehyde and propane-1,3-diamine. Spectroscopic, thermal, anticancer and antibacterial activity studies. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 145: 76–84.

GESTO, D. S., CERQUEİRA, N. M., FERNANDES, P. A. and RAMOS, M. J., 2012. Gemcitabine: a critical nucleoside for cancer therapy, Curr.Med. Chem,19: 1076–1087.

GUROL, A.O., KASIMOV, V. and SUZERGOZ, F., 2017. Antiproliferative Effects of Fluorine Substitute 3,5-di-tert-Butylphenol Bearing Schiff bases using CFSE-Based Cell Proliferation Assay. Current Science, 112:619-624.

GÖKÇE, T., 2015. Pankreas Kanser Tedavisinde Kullanilan Kemoterapi Ajanlarının Hücre Canlılığı ve Cox Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisi. Balikesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir, 46s.

JAKUPEC, M.A., GALANSKI, M., ARION, V.B., HARTINGER, C.G. and KEPPLER, BK., 2008. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. Dalton Trans, 14:183-194.

JESMIN, M., ALI, M.M. and KHANAM, J.A., 2010. Antitumour activities of some schiff bases derived from benzoin, salicylaldehyde, amino phenol and 2,4 dinitrophenyl hydrazine. Thai J. Pharm. Sci, 34: 20-31.

KANEV, M.O., GÖKALP MURANLI, F.D., 2016. Flow Sitometri kullanım Alanları. SAÜ Fen Bil. Der. 20. Cilt, 1. Sayı, s. 33-38. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

KALAIARASI, G., REX JEYA RAJKUMAR, S., DHARANI, S., RATH, N.P. and PRABHAKARAN, R., 2018 Mar New Cationic and Neutral Copper (II) Complexes Containing 7-hydroxy-4-oxo-4[H]-Chromene Derived ONO Pincer Ligands: Synthesis Karacterization and In vitro Biological Evaluations. J Photochem Photobiol, 180:77-88.

KHALID MOHAMMED, K., HUMA, R., BIBI, F., MUHAMMAD, H., FAZAL, F., HAYAT, U., ABDUL, H., MUHAMMAD, T., TAFFAN, T. and SHAHNAZ, P., 2016. Anti-Cancer Potential of Benzophenone-Bis-Schiff bases on Human Pancreatic Cancer Cell Line. Journal of the Chemical Society of Pakistan, 38:954-958.

KASIM, V. T., SUZERGOZ, F., SAHIN, E., CELIK, O. and ASLANOGLU, M., 2014. Synthesis, characterization and effect of fluorine substitution on the redox reactivity and in vitro anticancer behaviors of N polyfluorophenyl-3, 5-di-tert-butylsalicylaldimines and their Cu (II) complexes. J. Fluor. Chem. 162, 78–89.

KEPPLER, BK., RUPP, W., 1986. Antitumor Activity of imidazolium-bisimidazole-tetrachlororuthenate (III). A representative of a newclass of inorganic antitumor agents. J Cancer Res Clin Oncol, 111:166-168.

KOSTOVA, I., 2006. Ruthenium complexes as anticancer agents. Curr Med Chem, 12:1085-107

LING, JUN., RONG, MIN ZHI. and ZHANG, MING.,2012. Qiu.Photo-stimulated self-healing polyurethane containing dihydroxyl coumarin derivatives, Polymer, 53:2691-2698.

LOKICH, J., CHAWLA, PL., BROOKS, J. and FREİ, E., 1974. Chemotherapy in pancreatic carcinoma: 5 fluorouracil (5FU) and 1,3 bis-(2 chloretjyl)-1-nitrosourea (BCNU).Annals of Surgery,179:450-453.

MILOSAVLJEVIC, V., HADDAD, Y., MERLOS RODRIGO, M.A., MOULICK, A., POLANSKA, H., HYNEK, D., HEGER, Z., KOPEL, P. and ADAM, V., 2016. The Zinc-Schiff Base-Novicidin Complex as a Potential Prostate Cancer Therapy. PLoS One, 11:1-19.

MORAN, R.G., SPEARS., C.P., HEIDELBERGER, C., 1979. Biochemical determinants of tumor sensitivity to 5-fluorouracil: ultrasensitive methods for the determination of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate, 2'-deoxyuridylate, and thymidylate synthetase. Proc Natl Acad Sci U S A, 76:1456-60.

OSOWOLE, A.A., OTT, I., and OGUNLANA, O. M., 2012. Synthesis, Spectroscopic, Anticancer, and Antimicrobial Properties of SomeMetal (II) Complexes of (Substituted) Nitrophenol Schiff Base. International Journal of Inorganic Chemistry, 2012:1-6.

OYLAR, Ö., TEKIN, I., 2011. Kanser teşhis ve Tedavisinde Nanoteknolojinin Önemi., Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, Cilt 16, Sayı 1.

OZKAY, Y., INCESU, Z., IŞIKDAĞ, I., YEŞILKAYA M., 2008. Antiproliferative effects of some N-benzylideneanilines. Cell Biochem Funct, 26:102-106.

PRASANNA, K., BASAVAPATNA, N., MOHANA, KIKKERI, N. and MALLESHA, P., 2013. Synthesis and antiproliferative activity of some new fluorinated Schiffbases derived from 1,2,4-triazoles.In Journal of Fluorine Chemistry,156:15-20.

POURHOSEINGHOLI, M.A., VAHEDI, M., BAGHESTANI, A.R., 2015. Burden of gastrointestinal cancer in Asia; an overview. Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench, 8:19-27.

PROETTO, M., LIU, W., HAGENBACH, A., ABRAM, U. and GUST, R., 2012. Synthesis, characterization and in vitro antitumour activity of a series of novel platinum (II) complexes bearing Schiff base ligands. Eur J Med Chem, 53:168-175.

RAMAN, N., MUTHURAJ, V., RAVICHANDRAN, S. and KULANDAISAMY, A., 2003. Synthesis Characterization and ElectrochemicalBbehaviour of Cu (II), Co (II), Ni (II) and Zn (II) Complexes Derived from Acetylacetone and p-anisidine and their Antimicrobial Activity. Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.), 115: 161-167.

ROMAR, G.A., KUPPER, T.S. and DIVITO, S.J., 2016. Research Techniques Made Simple: Techniques to Assess Cell Proliferation. J Invest Dermatol, 136:1-7.

SARI, A., ÇUKUROVALI, A.,2008. Siklobütan Halkalı Tiyosemikarbazon Türevli Schiff Bazlarının Tavşan Karaciğerindeki Yağ Asitlerine Etkisinin İncelenmesi,Fırat Üniversitesi ,Fen Fakültesi Kimya Bölümü. no:585 FÜBAP projesi, Elazığ.

SINGH, H.L., 2010. Synthesis and characterization of tin (II) complexes of fluorinated Schiff bases derived from amino acids. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 76:253-258.

SØREIDE, K., SUND, M., 2015. Epidemiological-molecular evidence of metabolic reprogramming on proliferation, autophagy and cell signaling in pancreas cancer. Cancer Lett, 28: 356.

STRUNECKÁ, A., PATOČKA, J., CONNETT, P., 2004. Fluorine in medicine. Journal of Applied Biomedicine, 2: 141–150.

ŞAHIN, O., OZDEMIR U, Ö., SEFEROĞLU, N., GENC, Z.K., KAYA, K., AYDINER, B., TEKIN, S. and SEFEROĞLU, Z., 2018. New platinum (II) and palladium (II) complexes of coumarin-thiazole Schiff base with a fluorescent chemosensor properties: Synthesis, spectroscopic characterization, X-ray structure determination, in vitro anticancer activity on various human carcinoma cell lines and computational studies. J Photochem Photobiol B, 178:428-439.

TERZIOĞLU, G., KESKIN, A.İ., YANIKKAYADEMIREL, G., 2013. Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. Turk.J.Immunol,1:74-89.

THATI, A., NOBLE, B., CREAVEN, M., WALSH, M., MCCANN, K., KAVANAGH, M. and DEVEREUX, D. EGAN., 2007. In vitro anti-tumour and cyto-selective effects of coumarin-3-carboxylic acid and three of its hydroxylated derivatives, along with their silver-based complexes, using human epithelial carcinoma cell lines. Cancer Letters, 248:321–331.

WOO, C. C., KUMAR, A. P., SETHI, G., TAN, K. H., 2012. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. Biochem. Pharmacol, 83: 443-451.

WANG, L.Y., TSENG, W.C., WU, T.S., KANEKO, K., TAKAYAMA, H., KİMURA, M., YANG, W.C., WU, J.B., JUANG, S.H. and WONG F.F., 2011. Synthesis and antiproliferative evaluation of 3,5-disubstituted 1,2,4-triazoles containing flurophenyl and trifluoromethanephenyl moieties. Bioorg Med Chem Lett, 21:5358-5362.

WONG, E., GIANDOMENICO,C.M., 1999. Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs. Chemistry Reviews, 99: 2451-2466.

YAN, M., PANG, L., MA, T.T., ZHAO, C.L., ZHANG, N., YU, BX. and XIA, Y., 2015. A Novel Schiff Base Zinccoordination Compound İnhibits

Proliferation and Induces Apoptosis of Human Osteosarcoma Cells. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 35:700-706.

YAŞAR, S., 2016. Yeni Nesil Kanser İlaçları: Rutenyum Komplekslerinin Kanserli Hücrelerdeki Etkileri., Türkiye Kimya Derneği, Cilt: 2 Sayı: 8.

YU, I.S., CHEUNG W.Y., 2018. A Contemporary Review of the Treatment Landscape and the Role of Predictive and Prognostic Biomarkers in Pancreatic Adenocarcinoma. Can J Gastroenterol Hepatol, 2018:10.

YUSUFI, M., KHAN, E.M., PADHYE,S., BANERJEE, S., ABOUKAMEEL, A., SARKAR, F.H., MOHAMMAD,M., KHATAL, S. and VENKATESWARA SWAMY, K., 2013. Synthesis, characterization and anti-tumor activity of novel thymoquinone analogs against pancreatic cancer. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 23:3101-3105.

YUSUFI, M., BANERJEE, S., MOHAMMAD, M., KHATAL, S., VENKATESWARA SWAMY, K., KHAN, EM., ABOUKAMEEL, A., SARKAR, FH.and PADHYE, S., 2013. Synthesis characterization and anti-tumor activity of novel thymoquinone analogs against pancreatic cancer. Bioorg Med Chem Lett, 23:3101-3104.

ZHAO, F., WANG, W., LU, W., XU, L., YANG, S., MA, M., XU, H.J. and CAO, F., 2018. High anticancer potency on tumor cells of dehydroabietylamine Schiff-base derivatives and a copper (II) complex. Eur J Med Chem, 146:451-459.

ZHENZHEN, L.I., QİAN, Z., HUA, L., GUANGYING, W., JIACHENG, L., 2019. DNA binding and in vitro antineoplastic activity of neotype water-soluble Cu (Ⅱ)-complexes based on fluorinated benzoylhydrazone porphyrin ligands. Dyes and Pigments, 163:647-655.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nihal ALAN

Uyruğu : T.C

Doğum Yeri ve Tarihi : Diyarbakır – 19.06.1976

Telefon : 506 330 73 08

E-mail : nihallalan@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Ad	İl	İlçe	Bitirme Yılı
Lise	Batman Lisesi	Batman	Merkez	1994
Üniversite	İnönü Üniversitesi	Malatya	Merkez	1998

İŞ DENEYİMLERİ

Dicle Üniversitesi Doku Tipleme Laboratuvarı

UZMANLIK ALANI

Kanser Biyolojisi

İmmünoflorasan

Histokimya,

Solid Faz Yöntemleri

YABANCI DİLLER

İngilizce