



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(2-(2-STİRİLSİKLOPENTİL)BENZO[d]TİYAZOL) TÜREVLERİNİN
SENTEZİ VE PANKREAS HÜCRE HATLARINDA ANTİKANSER
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

NURAY ÜREMİŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2015

**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**(2-(2-STİRİLSİKLOPENTİL)BENZO[d]TİYAZOL) TÜREVLERİNİN
SENTEZİ VE PANKREAS HÜCRE HATLARINDA ANTİKANSER
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Nuray ÜREMİŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Metin KILINÇ

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Nurdan ÖZLÜ CEYLAN

KAHRAMANMARAŞ-2015

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Nuray ÜREMİŞ tarafından hazırlanan “(2-(2-Stirilsiklopentil)Benzo[d]Tiyazol) Türevlerinin Sentezi ve Pankreas Hücre Hatlarında Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 25/12/2015 tarihinde oy birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN (DANIŞMAN)
Tıbbi Biyokimya ABD, KSÜ

Prof. Dr. Metin KILINÇ (ÜYE)
Tıbbi Biyokimya ABD, KSÜ

Yrd. Doç. Dr. Nurdan ÖZLÜ CEYLAN (ÜYE)
Tıbbi Biyokimya ABD, Zirve Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mehmet BOŞNAK
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

.....

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Nuray ÜREMİŞ

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

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini tüm samimiyeti ile paylaşan danışman hocam Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN'a,

Yüksek Lisans laboratuvar çalışmalarım boyunca bilgi, deneyimi ve sabrı ile bana her zaman yardımcı olan, desteğini esirgemeyen ve karşılaştığım zorlukların üstesinden gelmemde yardımcı olan Yrd. Doç. Akif Hakan KURT'a

Her zaman desteğini yanımda hissettiğim, sevgili eşim Arş. Gör. Muhammed Mehdi ÜREMİŞ'e yardımları, sabrı ve sevgisi için sonsuz teşekkür ederim.

Bu araştırma, 2015/1-56M kodlu proje olarak Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Aralık - 2015

Nuray ÜREMİŞ

**(2-(2-STİRİLSİKLOPENTİL)BENZO[d]TİYAZOL) TÜREVLERİNİN
SENTEZİ VE PANKREAS HÜCRE HATLARINDA ANTİKANSER
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Nuray ÜREMİŞ

ÖZET

Bu çalışmada, 2-(stirilsiklopentil) grubu içeren benzotiyazol türevleri iki basamakta sentezlendi. Bunun için başlangıç maddesi olan cis-bisiklo[3.2.0]hept-2-en-6-on, ilgili aldehit türevleri ile bazik ortamda muamele edilerek α,β -doymamış karbonil bileşikleri sentezlendi. α,β -Doymamış karbonil bileşikleri, 2-aminobenzotiyazol ile etanol içerisinde *p*-TsOH varlığında reaksiyona sokularak 2-sübstitüe benzotiyazoller hazırlandı. Sentezlenen benzotiyazol türevleri kromatografik yöntemler ile saflaştırıldı ve spektroskopik metotlar (NMR, IR) kullanılarak yapıları aydınlatıldı. Sentezlenen bileşiklerin PANC-1 (Pankreas adenokarsinom kanser hücresi) hücrelerine karşı *in vitro* anti-tümör aktivite testleri yapıldı. Bu çalışmada; 2-sübstitüe benzotiyazol sentez bileşiklerinin PANC-1 hücrelerinde antiproliferatif etkisinin olup olmadığı, hücrelerin yaşam döngüsü üzerine etkisinin incelenmesi ve antioksidan- oksidan parametrelerle ilişkisinin açıklanması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler : 2-Substitüe Benzotiyazol, Tiyazol, Antikanser, İn vitro, PANC-1, apoptoz

Sayfa Adedi : 95

Danışman: Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN

**SYNTHESIS OF (2-(2-STYRYLCYCLOPENTYL)BENZO[d]THIAZOLE)
DERIVATIVES AND INVESTIGATION *IN VITRO* ANTICANCER ACTIVITIES ON
PANCREAS CELL LINE**

Master Thesis

Nuray ÜREMİŞ

ABSTRACT

In this study, benzothiazole derivatives containing 2-(styrylcyclopentyl) group was synthesized in two steps. Thus, treatment of cis-bicyclo[3.2.0]hept-2en-6-one with the corresponding benzaldehyde derivatives in alkaline medium afforded the α,β -unsaturated carbonyl compounds. α,β -unsaturated carbonyl compounds was reacted with 2-aminobenzothiazole and in the presence of *p*-TsOH in ethanol and prepared the 2-substituted benzothiazoles. Synthesized benzothiazole derivatives were purified by chromatographic methods and their structures elucidated using spectroscopic methods (NMR, IR). Finally, *in vitro* antitumor activities of benzothiazole derivatives were tested against PANC-1 cell. In this study we aimed to observe antiproliferative effects of synthesized 2-substituted benzothiazoles on PANC-1 pancreas cancer cells, to determine the effect of this compounds treatment to the cell cycle and to reveal relationship with antioxidan-oxidan parameters.

Key Words : 2-Substituted Benzothiazole, Thiazole, Anticancer, In vitro, PANC-1, Apoptosis

Page Number : 95

Supervisor : Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1.	GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.	GENEL BİLGİLER.....	2
2.1	Dünya Kanser İstatistikleri	2
2.2	Pankreas.....	2
2.3	Pankreas Kanseri	3
2.4	PANC-1 ve Diğer Pankreas Kanseri Hücre Hatlarının Karakteristik Özellikleri	4
2.5	Pankreas Kanserinde Tanı ve Evreleme	5
2.5.1	Laboratuvar tetkikleri	6
2.5.2	Görüntüleme yöntemleri	7
2.6	Pankreas Kanserinde Tedavi	8
2.6.1	Cerrahi tedavi.....	8
2.6.2	Radyasyon tedavisi	9
2.6.3	Kemoterapi.....	9
2.7	Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller	10
2.7.1	Serbest radikallerin hasara uğrattığı hücrel bileşenler.....	13
2.7.2	Antioksidanlar.....	16
2.1	Tiyazol ve Benzotiyazol'ün Yapısı	20
2.1.1	Benzotiyazol'ün özellikleri ve işlevi	20
2.2	Hücre Döngüsü ve Kanserle İlişkisi	21
2.2.1	Hücrenin yaşam döngüsü.....	21
2.2.2	Hücre yaşam döngüsünün düzenlenmesi	23
2.2.3	Hücre yaşam döngüsünün kanserle ilişkisi	27
2.3	Apoptozun Moleküler Mekanizması	28

2.3.1	Apoptoz nedir?.....	29
2.3.2	Apoptozun aşamaları	29
2.3.3	Apoptozun düzenlenmesi.....	30
2.3.4	Apoptoz mekanizması.....	32
2.3.5	Kanser tedavisinde apoptozun önemi	35
2.3.6	Apoptoz'un belirlenmesinde kullanılan yöntemler.....	36
3.	MATERYAL VE YÖNTEM	37
3.1	Kimyasallar.....	37
3.2	Cihazlar.....	38
3.3	(E/Z)-7-Arilidenbisiklo[3.2.0]hepta-6-on Sentezi	38
3.4	Benzotiyazol Türevlerinin Sentezi	40
3.5	PANC-1 Adenokarsinom Hücre Hattı	42
3.5.1	Hücrelerin dondurulması, çözündürülmesi ve pasajlanması	43
3.5.2	Hücrelerin sayılması	46
3.5.3	Benzotiyazol türevi bileşiklerin ve gemcitabine solüsyonlarının hazırlanması	47
3.5.4	MTT canlılık testi uygulaması	48
3.5.5	Cell death detection ELISAPLUS kolorimetrik apoptoz tayini (Roche)..	50
3.5.6	Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivite tayini	53
3.5.7	Protein düzeyi tayini	55
3.5.8	Malondialdehit (MDA) düzeyinin tayini	57
3.5.9	Glutasyon Peroksidaz (GPx) aktivite tayini	60
3.5.10	Total Antioksidan Status (TAS) düzeyinin ölçümü.....	61
3.5.11	Total Oksidant Status (TOS) düzeyinin ölçümü.....	62
3.5.12	İstatistiksel analiz.....	62
4.	BULGULAR	64
4.1	(E)-7-Arilidenbisiklo[3.2.0]hept-2-en-6-on Türevleri.....	64

4.2	(<i>E</i>)-2-(2-stirilsiklopent-3-en-1-il)benzo[<i>d</i>]tiyazol Türevleri	67
4.2.1	2-((1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-2-((<i>E</i>)-4-florostiril)siklopent-3-en-1-il)benzo[<i>d</i>]tiyazol	68
4.3	Benzotiyazol Türevlerinin Anti-proliferatif Etkisinin MTT Yöntemiyle Belirlenmesi	73
4.4	Kolorimetrik Apoptoz Tayini (Cell Death Detection ELISAPLUS-Roche) ..	75
4.5	Biyokimyasal Analiz Sonuçları	76
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	82
6.	REFERANSLAR	88
7.	ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	92
8.	TABLOLAR DİZİNİ	94
9.	ÖZGEÇMİŞ	95

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
J	Etkileşme Sabiti
δ	Kimyasal Kayma

Kısaltmalar	Açıklama
CDCl ₃	Dötorokloroform
DMSO	Dimetilsülfoksit
d	Dublet
m	Multiplet
s	Singlet
t	Triplet
dd	Dubletin dubleti
ddd	Dubletin dubletin dubleti
dt	Dubletin tripleti
IR	Infrared
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
Ppm	Milyonda bir kısım (NMR spektrumunda ölçü birimi)
PANC-1	Pankreas adenokarsinom kanser hücresi
UV	Mor ötesi
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
CDK	Siklin bağımlı kinaz (cyclin dependent kinase)
TNF	Tümör nekroz faktörü
TRAIL	TNFr-apoptoz-tetikleyici ligand (TNFr-apoptosis-inducing ligand)
DISC	Ölüm-tetikleyici sinyal kompleksi(death-inducing signaling complex)
PBS	Fosfat Tamponu (Phosphate buffered saline)
FBS	Fetal bovin serum
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid
CDD	Cell Death Detection ELISAPLUS yöntemi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser günümüzde en önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Bilimsel literatürün önemli bir kısmını bu hastalığın gelişiminin altında yatan nedenler ve olası tedavi yöntemlerinin araştırılması oluşturmaktadır. Ancak, yoğun çalışmalara rağmen birçok kanser türü için kesin tedavilere henüz ulaşılamamıştır. Kanser hastalıklarının etkin tedavisi için yeni ve etkin bileşiklerin keşfi ve geliştirme çalışmaları devam etmektedir.

Yaygın olarak görülen kanser hastalıkları ile kıyaslandığında pankreas kanseri kadınlarda dokuz, erkeklerde on birinci sırada yer almaktadır. Bunun yanı sıra pankreas kanserinin ölüm riski çok yüksektir. Pankreas kanseri olan kişilerin beş yıllık sürede yaşama şansı % 6 iken, teşhis konulduktan sonraki bir yıl içinde hastaların % 73'ü ölmektedir. Bu nedenle bu tez kapsamında antikanser etkisinin olabileceği düşünülen 2-Substitüe benzotiyazol sentez bileşiklerinin pankreas kanseri hücre hatları üzerine etkisi üzerine yoğunlaşmıştır.

Daha önce Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Organik Kimya Anabilim Dalında yeni 2-Substitüe benzotiyazol türevleri sentezlenmiş ve bunların HeLa (İnsan Servikal Kanser Hücresi) ve C6 (Sıçan Beyin Tümörü) kanser hücrelerine karşı in vitro aktiviteleri incelenmiştir. Bileşiklerin standartlar kadar aktif oldukları gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak bu tez kapsamında 2-Substitüe benzotiyazol türevlerinin insan pankreas kanseri hücre hatlarına karşı antitümör aktivitelerinin incelenmesi ve bu sentez bileşiklerinin farklı dozlarda uygulanmasıyla elde edilen hücre kültürü örneklerinin biyokimyasal parametrelerinin ölçümü amaçlanmıştır.

Sonuç olarak, bu tez kapsamındaki çalışmalar ile yeni sentezlenmiş olan ve yapısında benzotiyazol içeren bileşiklerin anti kanser aktiviteye sahip oldukları belirlenebilirse, bu yapılardan yararlanılarak yeni ve potent anti kanser ilaçların geliştirilmesi için önemli bir adım atılmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Dünya Kanser İstatistikleri

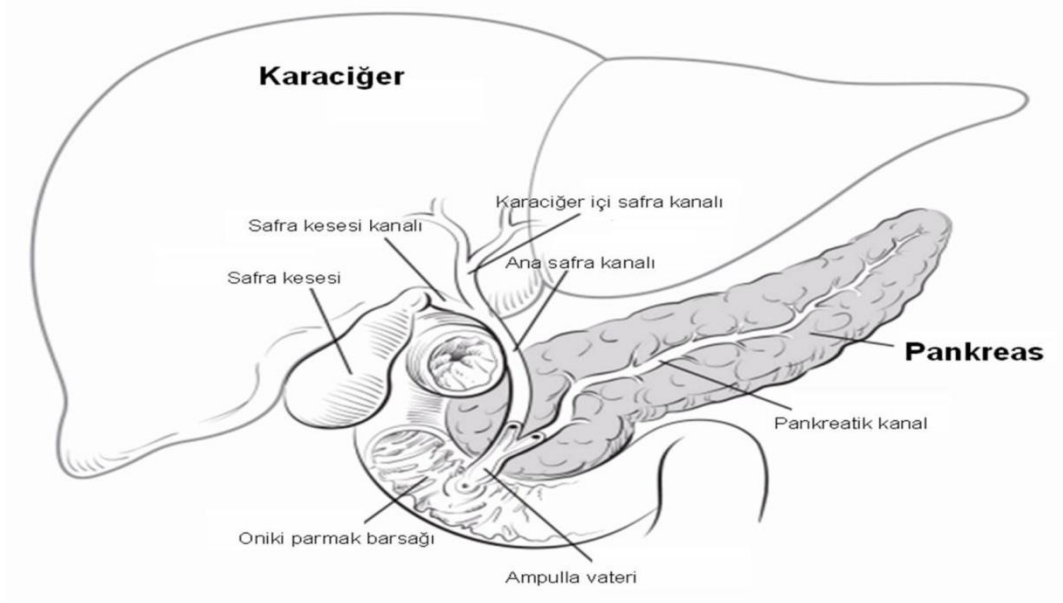
2014 Dünya Kanser Raporu'na göre 2012 yılında 14 milyon yeni kanser vakası olduğu rapor edilmiş ve bu sayının önümüzdeki 20 yıla kadar 22 milyona ulaşacağı tahmin edildiği belirtilmiştir. Ayrıca bu periyot süresince kanser ölümlerinin yıllık 8.2 milyondan 13 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. 2012'de dünya çapında en yaygın kanser teşhisleri akciğer(yılda 1.8 milyon vaka, total vakaların %13'ü), göğüs(yılda 1.7 milyon, total vakaların %11.9'u) ve kalın bağırsak (yılda 1.4 milyon, total vakaların %9.7'si) üzerine konulmuştur. Kanserden kaynaklı 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 gerçekleştiği görülmüştür (1).

Nüfus artışı ve yaş popülasyonuna bağlı olarak gelişmekte olan ülkeler artan kanser rakamlarından orantısız şekilde etkilenmektedir. Total vakaların % 60'ından fazlası Afrika, Asya, Orta ve Güney Amerika ülkelerinde ortaya çıktığı görülmektedir. Ayrıca dünyada kanser kaynaklı ölümlerin %70'inden daha fazlasının da bu bölgelerde olduğu görülmektedir. Erken teşhis ve ileri tedavi uygulamalarının eksik olması, kanser vakalarının ve ölümlerinin bu bölgelerde yoğunlaşmasının sebebi olarak düşünülmektedir (1).

Dünya çapında pankreas kanseri en yaygın görülen kanserler arasında 15. sırada ve en çok ölüme sebebiyet veren kanserler arasında 9.sırada yer almaktadır. 2012 yılında dünya çapında yaklaşık 178.000 insana pankreas kanseri teşhisi konulmuştur. Dünya genelinde pankreas kanserinin görülme sıklığı artmaktadır ve bu hastalığın erken teşhisi ve etkili bir tedavi yöntemi uygulaması zor olmaktadır. Çoğunlukla hastalığa teşhis konulana kadar kanser ileri safhalara ulaşmaktadır (2).

2.2 Pankreas

Pankreas, karın boşluğunu üst kısmında midenin arkasında yer alan, yaklaşık 16-17 cm uzunluğunda ve yaprak şeklinde büyük bir bezdir. Pankreas baş gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır. Pankreasın üst kısmı onikiparmak bağırsağı ile bağlantılı olup kuyruk kısmı da dalakla bitişik bir durumdadır (Şekil 1).



Şekil 1. Pankreas organının yerleşimi

Pankreasın vücutta iki önemli görevi vardır. Birincisi pankreatik (pankreas) özsuyu üretmektir. Bu madde sayesinde pankreas sindirimde son derece etkilidir. İkincisi ise insülin, glukagon ve diğer hormonları üretmektir. İnsülin ve glukagon ise özellikle şeker hastalığının kontrolünden sorumlu olan en önemli iki hormon olarak bilinmektedir. Pankreasın pankreatik özsuyu üreten kısmı ekzokrin pankreas olarak adlandırılır. İnsülin de dahil olmak üzere hormonları üreten bölümü ise endokrin pankreas olarak adlandırılır. Pankreasın bu iki farklı kısmından gelişen kanserler farklı şekilde davranırlar ve farklı belirtilere neden olurlar.

2.3 Pankreas Kanseri

En yaygın görülen pankreas kanseri adenokarsinom tipidir. Tüm pankreatik tümörler içinde bu tür en yüksek ölüm oranına sahiptir. Genellikle tanıdan sonraki yaşam süresi tedavi olunmadığında ortalama 3-6 ay arındadır. Ancak ameliyat ve destekleyici tedavi ile birlikte bu süre 23 aya kadar artmaktadır. Pankreas kanseri genellikle geç evrede teşhis edilir ve tüm kanser tedavi metotlarına direnç gösteren biyolojik bir fenotip ile karakterizedir (3). Pankreas kanseri gastrointestinal sistemdeki en önemli öldürücü tümörlerden bir tanesidir. Gastrointestinal sistemdeki kanser ilişkili ölüm nedenleri arasında kolorektal kanserden sonra ikinci sıradadır (4).

İngiltere ve Amerika Birleşik Devletlerinde yılda her bir milyon nüfusa karşılık yaklaşık 100 kişide pankreas kanseri görüldüğü belirtilmiştir. Pankreas kanseri bu ülkelerdeki

ölümle sonuçlanan kanser vakalarında dördüncü sırada yer almaktadır. Bu oran endüstride gelişmiş ülkelerde daha yüksektir (5,6).

Bu hastalık nadiren 45 yaşından önce görülmekle birlikte vakaların %80- 90'nı 60 ve 80 yaşları arasında görülmektedir. Ayrıca dünya genelinde pankreas kanserinin erkeklerde görülme sıklığı kadınlarınkine göre daha çoktur (7).

Pankreas içerisindeki hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlayınca tümör oluşur. Pankreas kanserlerinin büyük bir bölümünün başlangıç noktası, pankreas kanallarını çevreleyen ekzokrin hücrelerin bulunduğu bölgedir.

Bu bölgede başlayan pankreas kanseri adenokarsinom olarak da bilinen ekzokrin tümörüdür. Pankreas kanserinin çok daha nadir rastlanılan türü endokrin tümörü ise adacık hücrelerinde başlamaktadır. Pankreas ekzokrin kanserleri duktal ve epitel hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Asiner hücreler enzim salgılar, duktal hücreler ise sıvı ve elektrolit salgılaması yapar ve pankreas sıvısının duodenuma akmasını sağlar.

Duktal kanserlerin farklılaşımı; gland şekillenmesine, musin üretimine ve epitelyal anaplaziye göre iyi, orta ve az diferansiye tümörler olarak sınıflandırılır. Pankreas kanseri de, birçok kanserin başlangıcı gibi, duktal hiperplazi, atipik hiperplazi, in situ kanser ve invazif kanser sıralamasını takip eder.

Kanser nedeniyle pankreas rezeksiyonu yapılan hastaların çıkarılan pankreas dokusunda papiller epitelyal hiperplazi, atipik duktal hiperplazi, in situ duktal kanser ve kanallar içi papillomlar tespit edilmektedir. Pankreas kanseri için cerrahi eksplorasyon yapılan hastaların büyük bir kısmında metastaz mevcuttur (8).

2.4 PANC-1 ve Diğer Pankreas Kanseri Hücre Hatlarının Karakteristik Özellikleri

Pankreatik adenokarsinom hücre hattı farklı fenotip ve genotipte alt sınıflardan oluşmaktadır. Bu çeşitlilik, hücre hattında oluşan mekanizmaları anlamamızı ve neden sonuç ilişkisi ortaya koymamızı sağlamaktadır. Pankreas adenokarsinom hücre hattındaki fenotip farklılıklardan faydalanılarak yapılan çalışmalar, tümör büyümesinden, spesifik proteinlere, metastaz ve kimyasal ilaç direncine kadar hücre hatlarındaki farklılıkları ortaya koydukları için bu hücre hattı mekanizmalarına ışık tutmaktadır. Referans olarak alınan en yaygın bazı pankreas hücre hattı spesifik fenotip karakterlerine göre Tablo 1'de verilmiştir (9).

Tablo 1. Pankreas kanseri hücre hatları

Hücre Hattı	Yaş	Cinsiyet	Köken	Metastaz	Proliferasyon	Farklılaşma
AsPC-1	62	Bayan	Ascites	Evet	38-40 saat	Zayıf
BxPC-3	61	Bayan	Primer Tümör	Hayır	48-60 saat	Orta
Capan-1	40	Bay	Karaciğer Metastazı	Evet	***	İyi
Capan-2	56	Bay	Primer Tümör	Hayır	96 saat	İyi
CFPAC-1	26	Bay	Karaciğer Metastazı	Evet	31 saat	İyi
HPAC	64	Bayan	Primer Tümör	***	41 saat	Orta
HPAF-II	44	Bay	Ascites	Evet	42 saat	İyi
Hs 766T	46	Bay	Lenf Nodu Metastazı	Evet	6-7 gün	***
MIA PaCa-2	65	Bay	Primer Tümör	***	40 saat	Zayıf
PANC-1	56	Bayan	Primer Tümör	Evet	52 saat	Zayıf
Su. 86.86	57	Bayan	Karaciğer Metastazı	Evet	77 saat	Orta

Histolojik açıdan HS 766T ve MIA PaCa-2 hücre hatları 'karsinoma' olarak, diğer tüm hücre hatları 'adenokarsinoma' olarak tanımlanmaktadır. Proliferasyon hücre hattının katlanma süresini ifade etmektedir. ***Henüz tanımlanmamış.

Biz bu çalışmada epitel kökenli adenokarsinom PANC-1 hücre hattını kültüre ettik. PANC-1, 56 yaşında erkek bir hastanın adenokarsinomlu pankreasının baş kısmından alınan örneklerle primer kültürü yapılarak elde edilmiştir.

2.5 Pankreas Kanseri Tanı ve Evreleme

Pankreas kanseri, birçok diğer hastalığın belirtileri ile benzerlik gösterdiği ve hastalığın erken evrelerinde çoğunlukla herhangi bir belirti veya bulguya rastlanmadığı için pankreas kanserinde tanı koymak oldukça zordur. Ayrıca pankreas vücutta konumu bakımından mide, ince bağırsak, karaciğer, safra kesesi, dalak, safra kanalı gibi organların arkasında kaldığı için de hastalığa tanı koymak zor olmaktadır.

Pankreas kanseri teşhisi genellikle, çeşitli testlerin yardımı ve pankreas ile etrafındaki bölgenin detaylı görüntülenmesi yoluyla konur. Kanser hücrelerinin pankreas içine ve dışına ne derece yayıldığını belirleyen testlere evreleme (kanserin yayılma durumu) denir. Tanı koymak ve evresini belirlemek için kullanılan test ve diğer uygulamalar, genellikle aynı anda yapılır. Doğru bir tedavi planı uygulanması için, kanserin evresinin ve tümörün cerrahi müdahale ile alınıp alınamayacağını bilmesi önemlidir (10).

Kanserli hücreler genellikle vücudun içerisinde üç farklı şekilde yayılabilmektedirler.

- Doku yolu ile yayılabilir. Bu durumda kanserli hücreler, etrafında bulunan normal dokuları istila eder.
- Lenf sistemi aracılığı ile yayılabilir. Kanserli hücreler lenf sistemini istila ederek lenf kanalları aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine geçer.
- Kan yolu ile yayılabilir. Kanser hücreleri ana ve kılcal damarları istila ederek kan yolu ile vücudun diğer bölgelerine sıçrarlar.

Kanser hücreleri ana tümörden koparak kan damarları ya da lenf kanalları yolu ile vücudun başka bölümlerine geçmesi ile başka bir tümör oluşabilmektedir. Bu duruma metastaz denir. İkincil ya da metastazik tümörler ana tümör ile aynı özelliklere sahiptirler (10).

Pankreas kanserinin görüntüleme yöntemleri ve serum tümör belirteçleri ile tespit edilmektedir. Ayrıca özellikle görüntüleme sistemleri kullanılarak pankreas kanserinin evresi belirlenmektedir.

2.5.1 Laboratuvar tetkikleri

Pankreas kanserli hastalar için genellikle Serum bilirubinleri, alkalen fosfataz, karaciğer transaminazları ile CEA, CA 19-9, CA 125 gibi tümör belirteçleri ve idrarda bilirubin varlığı gibi laboratuvar tetkikleri yapılmaktadır (11).

Pankreas kanserinde tümör belirteçlerinin klinik rolü sınırlıdır. En yaygın olarak kullanılan belirteç CA-19-9'dur. CA 19-9 serum düzeyleri, pankreas kanseri, bilier kanserler, hepatoselüler kanser, daha nadir olarak gastrik, overian, kolorektal, akciğer, meme, uterus kanserlerinde; akut kolanjit, akut pankreatit, kronik pankreatit, siroz gibi benign hastalıklarda, safra taşları dahil diğer kolestatik hastalıklarda yükselmektedir (11). CA 19-9 un pankreatik kanser için yayınlanmış sensitivite ve spesifitesi, sırası ile %80 ve %90'dır (12,13); fakat bu değerler tümör çapı ile yakından ilişkilidir. Cerrahi olarak çıkarılabilir, küçük kanserlerin saptanmasında etkinliği sınırlıdır(12,14)

CA 19-9 37'un unit/mL üzerindeki serum düzeylerinin, pankreas kanserini diğer benign hastalıklardan ayırmada, en doğru cut-off değeri olduğu; bu değerde sensitivite ve spesifitesinin sırası ile %77 ve %87 olduğu saptanmıştır (15). 1000 U/ ml ve üzeri değerler ameliyat edilemeyen hastalık ile ilişkilidir. Ancak bu test histolojik tanının yerine geçmez, tedavi yanıtının izlenmesinde yararlı olabilir (16).

2.5.2 Görüntüleme yöntemleri

Pankreas kanseri tanısı rutin laboratuvar testleriyle birlikte radyolojik ve histolojik tanımlarla desteklenerek konulmaktadır. Tanı konulurken genellikle USG veya EUS, BT, ERCP, MRG ve MRCP görüntüleme yöntemlerinden bir veya daha fazlasından faydalanılmaktadır. Bu yöntemler pankreas kanserinin tanı ve evrenmesi için farklı sensitivite ve spesifiteye sahiptir (Tablo 2) (17).

Tablo 2. Pankreas kanserinde tanısal metotlar

Test	Sensitivite	Spesifite	Evrelemede kullanımı
USG	%80	%90	Yok
EUS	%90	%90	Var
BT	%90	%95	Var
ERCP	%90	%90	Yok
MRG	%90	%90	Yok
İİAB	%90	%98	Yok

2.5.2.1 Manyetik rezonans görüntüleme (MRI)

Önemli görüntüleme yöntemlerinden birisidir. Pankreasın komşu dokular ile olan ilişkisini ve karaciğer içi bulguları aydınlatmada yol göstericidir.

2.5.2.2 Bilgisayarlı tomografi (BT)

Kolay, ucuz ve yol gösterici görüntüleme yöntemlerinden birisidir. Görüntülerin daha net olması için, hastaya damar ya da ağız yoluyla kontrast madde verilebilir. Bu işleme, bilgisayarlı tomografi veya bilgisayarlı aksial tomografi de denebilir.

2.5.2.3 Endoskopik ultrason (EUS)

Genellikle makattan (rektumdan) ya da ağızdan içeriye ucunda ışık ve görüntüleme merceği bulunan ve ince boru şeklinde olan endoskopi cihazı sokularak yapılan bir işlemdir. Endoskopun ucunda aynı diğer ultrason cihazlarındaki gibi bir ultrason ileticisi bulunmakta ve vücut içerisinden orada bulunan organlara ses dalgaları göndermektedir. Yüksek frekanslı ses

dalgalarının oluşturduğu ekolar cihaz tarafından algılanarak organların sonogram adı verilen detaylı görüntüsü elde edilir.

2.5.2.4 Endoskopik retrograd kolanjiopankretikografi (ERCP)

Endoskopik yöntemle on iki parmak bağırsağından pankreatik kanal ve ana safra yolu ve safra kanallarının görüntülenmesidir. Pankreas kanseri, zaman zaman bu kanalların daralıp safra akışının zora girmesine ve bunun sonucu olarak da sarılık hastalığına neden olabilir. İşlem sırasında endoskop, ağızdan girerek ince bağırsağa kadar içeri sokulur. Ardından, küçük tüp şeklinde olan kateter, endoskop içerisinden pankreatik kanallara sokulur ve kontrast madde enjekte edilerek safra kanallarının detaylı görüntüsü alınır. Eğer, kanallar tümörle tıkalı ise stent adı verilen küçük tüp ile tıkanıklık giderilebilir (10).

2.6 Pankreas Kanserinde Tedavi

Tedaviye başlarken fizik muayene, laboratuvar ve radyolojik incelemelerin sonunda, pankreas tümörünün hangi evrede olduğu, komşu organlarla ilişkisinin ne durumda olduğu, özellikle komşu damarlara ve/veya uzak organlara yayılımının olup olmadığı ortaya konulup ameliyatla çıkarılma şansı değerlendirilir. İleri evredeki tümörlerde cerrahi uygulanamaz. Bu hastalara uygulanacak kemoterapi ile birlikte, mevcut sarılığının düzeltilmesi, beslenme desteğinin sağlanması, ağrının azaltılması yoluyla yaşam konforunu düzeltmek amacıyla bazı girişimler uygulanabilir. Bu amaçla ağızdan mide yoluyla yapılan endoskopi ile safra yoluna geçişi sağlayan bir boru (stent) konulması, karın cildinden karaciğer içi safra yollarına bir iğne yardımıyla konulan kateter ile safranın dışarı akıtılması, ağrı ile ileri mücadele teknikleri, onikiparmak bağırsağında tıkanıklığa yol açan tümörlerde bu kısma ağızdan endoskopik yöntemle girilerek stent takılması gibi yöntemler kullanılmaktadır.

2.6.1 Cerrahi tedavi

Yapılan incelemelerde tümör ameliyatla çıkartılmaya uygunsuz klasik olarak 'Whipple ameliyatı' uygulanmaktadır. Ayrıca tümör pankreasın gövde ve kuyruk kısmına yerleşmişse nispeten daha kolay rezeksiyon yöntemleri uygulanmaktadır. Tümörün cerrahi olarak çıkartılması bu hastalar için tek kür şansını oluşturmaktadır. Pankreas başı tümörlerinde, cerrahi olarak yalnızca pankreasın baş kısmını çıkartabilmek mümkün olmadığı için ameliyat daha karmaşık olmaktadır. Uygulanan Whipple ameliyatında; pankreasın başı ile birlikte, safra kesesi, ana safra kanalının bir kısmı, onikiparmak bağırsağı, midenin bir kısmı ve etraf

lenf bezleri blok halinde çıkarılmaktadır. Pankreas Kanserinin Cerrahi Tedavisi (Whipple Ameliyatı) Oldukça uzun süreli, çok çeşitli organların çıkartıldığı ve yeniden devamlılığın sağlandığı bu ameliyat sırasında veya kısa süre sonrasında hastanın ölüm (mortalite) veya kanama olması, sindirim sisteminin devamlılığını sağlamak için yapılan dikişlerden kaçak olması (fistül) gibi kötü durumlarla (morbidity) karşılaşabilmektedir. Dünyada kabul edilen ölüm oranı %5 ve altındaki orandır. Yine ameliyat sonrasında ortaya çıkan komplikasyonlar için dünyada kabul edilen oran %15-20'dir. Ülkemiz şartlarında bu oranlar %5-10 mortalite ve %20-25 morbidity oranlarıdır.

2.6.2 Radyasyon tedavisi

Kanser hücrelerini öldürmek için yüksek enerjili ışınların kullanılmasını içermektedir. Radyasyon tedavisi, yalnızca tedavi edilen alandaki hücreleri etkiler. Radyasyon bir makine aracılığı ile dışarıdan ışın verilmesi şeklindedir. Radyoterapi, özellikle tümörün yerleşimi ve büyüklüğü cerrahiye zorlaştırıyor ise veya cerrahi uygulanamayan durumlarda cerrahinin yerine tek başına veya kemoterapi ile kombine kullanılmaktadır. Cerrahi öncesinde tümörü küçültmek için kemoterapi ile birlikte radyoterapi kombine kullanılabilir. Bazı durumlarda ameliyat sonrası nüksleri engellemek amacı ile radyoterapi verilebilir.

2.6.3 Kemoterapi

Kanser hücrelerini öldürmek için antikanser ilaçların kullanılmasıdır. Pankreas kanserlerinde ameliyat öncesi veya sonrası hastaların genel durumları dikkate alınarak kemoterapi denilen ilaç tedavisi uygulanabilir. Kemoterapi cerrahi öncesinde tümörü küçültmek için veya cerrahinin yerine primer tedavi olarak radyoterapi ile birlikte kullanılabilir. Yaygın ileri evre hastalıkta cerrahi ve radyoterapinin yeri yoktur. Bu grup hastalara kemoterapi uygulanması ile hastaların hayat kalitelerinin belirgin iyileştirilebildiği ve sağ kalımlarında uzama olabileceği bildirilmiştir (11).

Gemcitabin ve 5-fluorouracil (5-FU) pankreas tedavisinde çoğunlukla kullanılan kemoterapi ilaçlarıdır. Cisplatin, irinotecan, paclitaxel, docetaxel, capecitabine ve oxaliplatin, gemcitabine veya 5-FU ile birlikte veya tek başına kullanılan diğer kemoterapi ilaçlarıdır.

2.7 Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Serbest radikaller, besinlerin oksijen kullanılarak enerjiye dönüşümü sırasında meydana gelen reaktif moleküllerdir. Organizmada oksidan- antioksidan dengenin bozulmasına neden olarak oksidatif strese neden olurlar (18).

Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS) ve sülfür merkezli radikaller oksidan sınıfına girer. Ancak tüm reaktif türler radikal değildir. Radikal olan ve olmayan reaktif türler Tablo 3’de özetlenmiştir. Oksijen ve azot molekülleri yaşam için vazgeçilmez olmakla birlikte, metabolizma sırasında serbest radikal kaynağı olarak bilinen ve son derece reaktif olan ara ürünler oluşur. Reaktif oksijen türleri/metabolitleri olarak bilinen bu moleküller lipit, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir (18).

Tablo 3. Radikal ve radikal olmayan ROS ve RNS türleri

Reaktif Türler	
Radikal	Radikal Olmayan
Hidroksil (OH [•])	Peroksinitrit(ONOO)
Alkoksil (L(R)O [•])	Hipoklorit (HOCl)
Hidroperoksil (HOO [•])	Hidroperoksit (L(R)OOH)
Peroksil (L(R)OO [•])	Singlet oksijen (¹ O ₂)
Nitrik oksit (NO [•])	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)
Süperoksit (O ₂ ^{•-})	Ozon (O ₃)

Antioksidan, serbest radikallerle tepkimeye giren, ortamda düşük derişimde bulunan ve substratın oksidasyonunu belirgin şekilde geciktiren veya engelleyen madde olarak tanımlanabilir. Bu tanıma göre antioksidanların fizyolojik rolü, serbest radikalleri içeren kimyasal tepkimelerin sonucunda hücresele bileşenlere gelebilecek zararı önlemektir (19).

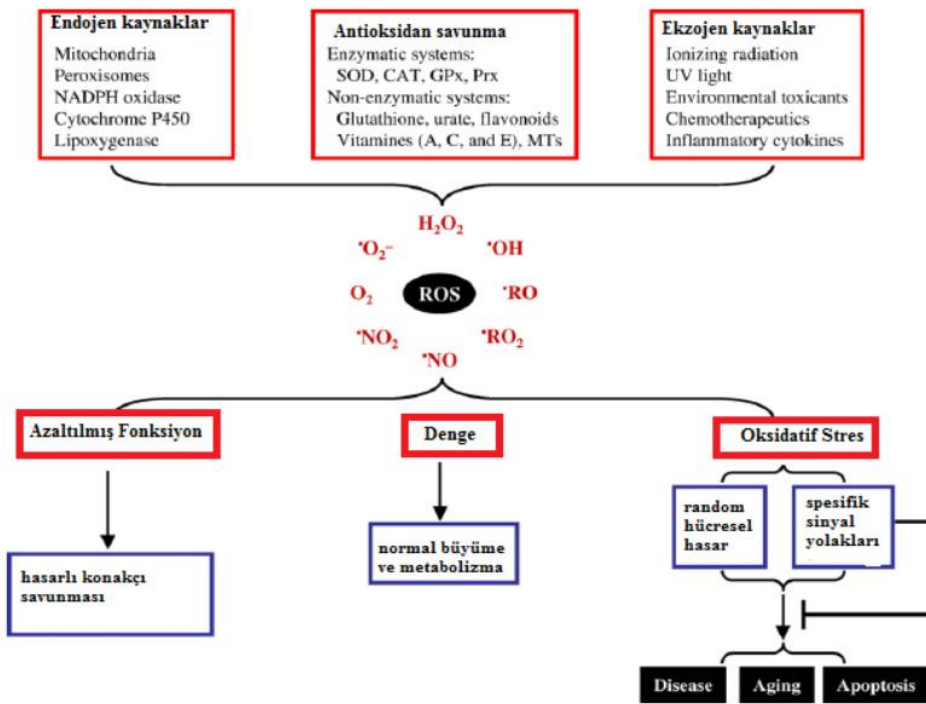
Bir molekülde eşleşmemiş elektron bulunuyorsa bu molekül serbest radikal olarak adlandırılır. Molekül yapısındaki eşleşmemiş elektronun, stabil hale geçebilmek için, eşleşecek başka bir elektron araması nedeniyle radikaller kimyasal olarak çok reaktiftir (20).

Serbest düşük molekül ağırlıklı ve eşleşmemiş elektron taşıyan radikaller çoğunlukla reaktif oksijen türleridir (21).

Pek çok sistem ve metabolizma üzerine etkili olan serbest radikaller, normal metabolik olaylar sırasında ortaya çıkabilir ve çok çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler (22). (Şekil 2)

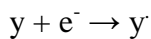
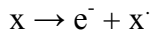
Endojen kaynaklar; mitokondriyal elektron transport sistemi, araşidonik asit metabolizması, endoplazmik retikulum redoks döngüsü, fagositik hücreler (monosit, makrofajlar, nötrofil ve eozinofil) endotelial hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, triptofan dioksijenaz, galaktoz oksidaz, lipooksijenaz, monoamin oksidaz gibi oksidan enzimler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır (23).

Eksojen kaynaklar ise; zararlı gazlar (ozon, oksijen ve hiperbarik oksijenin yüksek konsantrasyonları), iyonize ve non-iyonize radyasyon, ilaçlar, alkol, hava kirleticiler, patojenik bakteri ve virüslerdir (24).

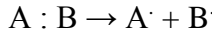


Şekil 2.ROS'ın metabolik ve biyolojik etkileri

Radikaller, non-radikalın bir elektron kaybetmesi veya bir elektron kazanması ile oluşabilmektedir.

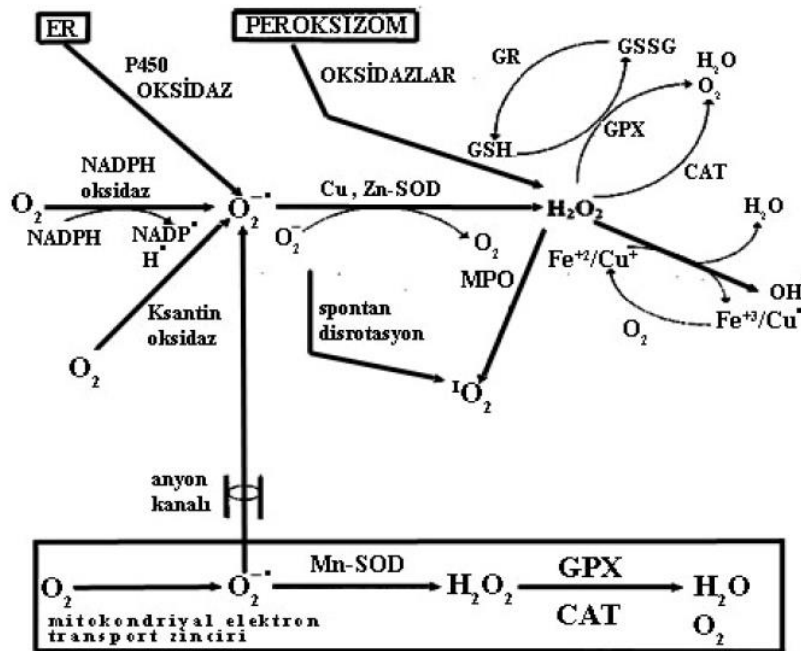


Radikaller kovalent bağı kırılmasıyla atomlarca paylaşılan elektronlardan her birinin bir atomda kalması olarak tanımlanan homolitik kırılma sonucu da oluşabilmektedir .



Aerobik organizmalar için O₂ esansiyel bir molekül olmakla birlikte oksidan bir ajandır. Normalde moleküler oksijenin çoğu sitokrom sistemi gibi hücre içi sistemler içinde tetravalan redüksiyona uğramaktadır. Bununla birlikte %1-2 oranında bu yoldan sızan oksijenin biyolojik yapılarda univalan redüksiyonu sonucu serbest oksijen radikalleri ortaya çıkmaktadır. Aerobik organizmalarda radikaller daha çok oksijen radikalleri şeklinde bulunmaktadır (24).

Serbest oksijen radikallerinin oluşumu sırasında, öncelikle tek elektron transferi ile moleküler oksijen süperoksit radikaline dönüşmektedir. Süper okside iki elektron eklenmesiyle hidrojen peroksit oluşmakta, hidrojen peroksitin elektron almasıyla oldukça toksik olan hidroksil radikali oluşmaktadır. Hidroksil radikali de univalan redüksiyon ile suya dönüşmektedir (Şekil 3).



Şekil 3.ROS Oluşumu ve ROS tarafından oluşturulan hasara karşı temel savunma mekanizması

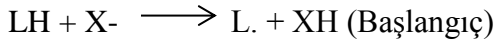
2.7.1 Serbest radikallerin hasara uğrattığı hücresel bileşenler

Endojen ve eksojen kaynaklardan oluşan ROS, hücrenin antioksidan savunma sistemlerini aşip karbonhidratlar, yağlar, proteinler, nükleik asitler gibi hücrenin temel komponentlerine zarar verirler.

2.7.1.1 Lipit peroksidasyonu

Lipitler serbest radikallere karşı en hassas biyomoleküllerdir. Kolesterol türevleri ve yağ asitlerinin doymamış çift bağları serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girer.

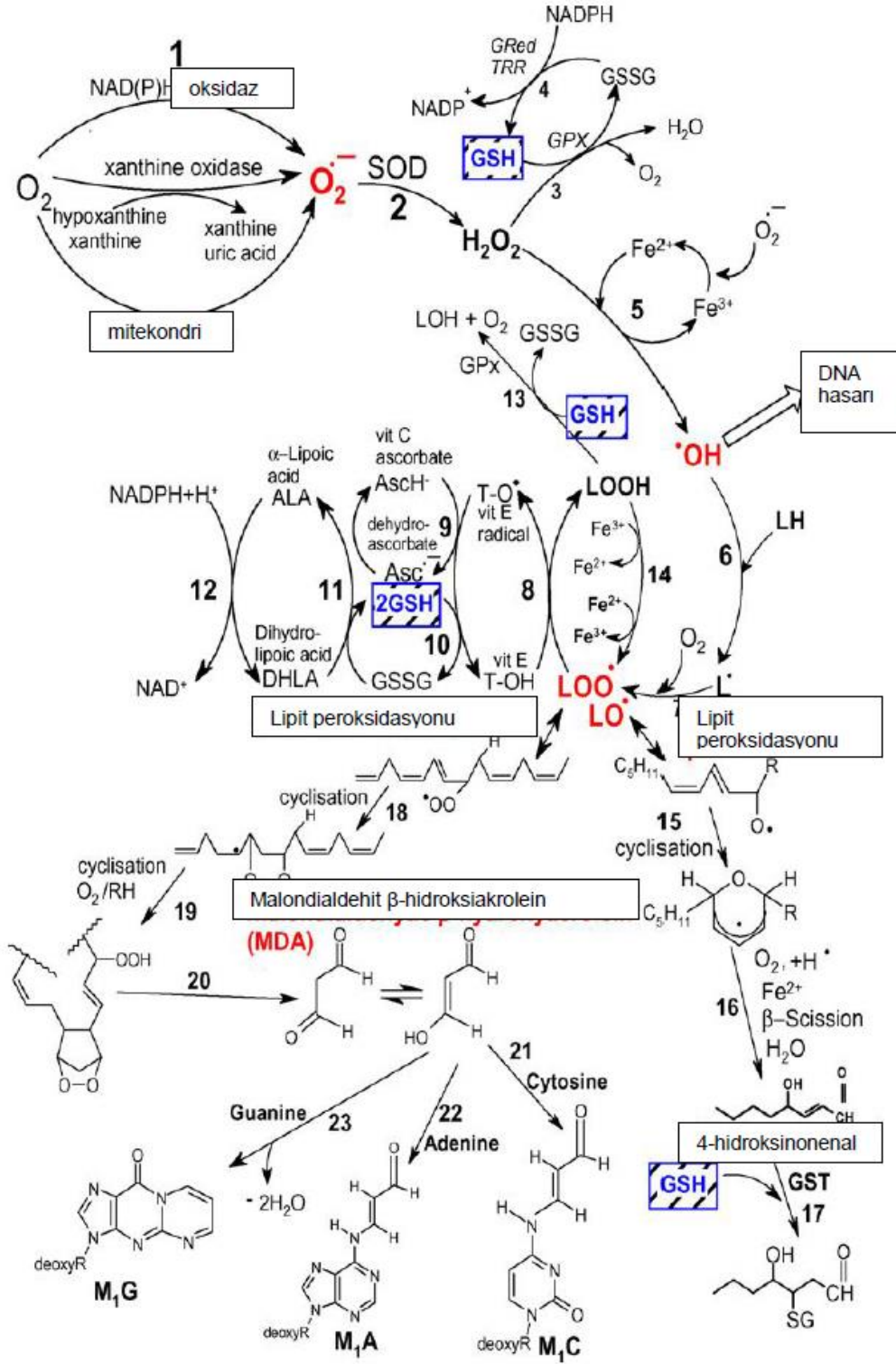
Lipit oksidasyonunun başlangıç aşamasında başlatıcı bir radikal (X[•]) yağ asidinden (LH) H atomu transfer ederek lipit radikali (L[•]) oluşumuna neden olur. İlerleyen aşamada lipit radikaline O₂ eklenmesiyle peroksi (LOO[•]) meydana gelir. Peroksi radikali kararlı bir yağ asidinden (LH) H atomu çalarak “lipit radikali peroksi radikali” zincirleme reaksiyonlarını başlatır. Böylelikle olay kendini katalizleyerek devam eder.



Sonuç olarak oluşan lipit hidroperoksitler (LPO) biyolojik olarak aktif olan aldehit, keton, alkol, eter, ester gibi çeşitli ürünlere dönüşürler (Şekil 4). Lipit peroksidasyonu adı verilen bu süreç hücre zarı ve organel zarları için önemli bir tehdittir. Zira zarların stabilitesi bozulmakta ve geçirgenlikleri artmaktadır.

Lipit peroksidasyonu sırasında oluşan ve üç karbonlu bir ketoaldehit olan malondialdehit (MDA), biyolojik materyallerde kolaylıkla ölçülebilen ve peroksidatif hasarı gösteren nispeten dayanıklı bir üründür (25).

MDA ölçümünün en yaygın metodu; 2-tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonuna dayanan spektrofotometrik ölçümdür. MDA'nın ölçümünde spesifitenin artırılması için yüksek basınçlı sıvı kromatografisinin (HPLC) kullanılması yaygındır (26).



Şekil 4. Reaktif oksijen türlerinin çeşitli hücresel komponentlere etkisi

2.7.1.2 Protein oksidasyonu

Protein oksidasyonunu esas olarak hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$) başlatır. Diğer taraftan süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidroperoksil (HO_2^-)'in de etkileri vardır.

Bu radikaller aminoasitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağları oluşumuna ve protein fragmentasyonuna yol açar. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri aminoasit içeriklerine bağlıdır. Çift bağ ve SH grupları içeren amino asitler serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Bu etkilenme sonucunda sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur.

Reaktif oksijen türlerinin proteinlerle etkileşimiyle histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda aminoasit kalıntısında ve peptit omurgasında meydana gelen hasar sonucunda, protein karbonil ürünleri (PCO) meydana gelir. Bu ürünler protein oksidasyonunda en yaygın olarak ölçülen ürünlerdir. PCO düzeylerinin saptanması oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı olmasına rağmen belirli bir aminoasit için spesifik değildir (27).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, yeni bir protein oksidasyon belirteci ileri düzey oksidasyon protein ürünleri (AOPP)'dir. AOPP, ditrozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanır ve protein hasarının saptanmasında güvenilir bir belirteç olduğu düşünülmektedir (27).

2.7.1.3 DNA hasarı

DNA hasarı primidin ve pürin bazları veya deoksiriboz şeker üzerinde görülebilmektedir. Hidroksil radikaline karşı özellikle pirimidin halkadaki $\text{C}_4\text{-C}_5$ çift bağı hassastır. $\text{OH}\cdot$ bu pozisyona atak yaparak timin glikol, urasil glikol, 5-hidroksideoksi üridin, 5-hidroksisitidin gibi ürünlerin oluşumuna yol açar. $\text{OH}\cdot$ radikalinin pürinler ile reaksiyonu sonucu da 8-hidroksideoksiguanozin, 8-hidroksideoksiadenozin gibi ürünler açığa çıkar. 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) DNA hasarının ölçülebilir bir markırıdır (28).

DNA' daki hasarın, yaşlanma, diabetes mellitus, enflamatuvar hastalıklar ve karaciğer hastalıklarının gelişiminden kısmen sorumlu olduğu bildirilmekte, oksidatif stres çok fazlaysa ve hasar onarım mekanizmalarıyla onarılamıyorsa mutagenез veya arsinogenез indüklenmektedir (29).

2.7.1.4 Karbohidratlar üzerine etki

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine de etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler otooksidasyona uğrayarak süperoksit ve hidrojen peroksiti meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonu protein çapraz bağlanmalarına yol açarak agregasyona sebep olur. Serbest radikaller bu etkilerinden dolayı diyabet, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, kanser ve yaşlılık gibi birçok hastalığın patogeneğinde rol oynamaktadır (30).

Tablo 4.İnsan vücudunda serbest radikal hasarları ve onarım sistemleri

Hasara Uğrayan Molekül	Hasar Çeşidi	Onarım Mekanizması
DNA	*Pürin (adenin, guanin) ve pirimidin (sitozin, timin) bazlarında değişiklik * Şekere (deoksiriboz) atak * DNA çift sarmalının bir zincirinde (tek sarmal kırılması) veya her iki zincirinde (çift sarmal kırılması) kırılma	DNA, onarıcı enzimlerince kontrol edilir ve hata saptandığında hatalı kısım çıkarılır yerine karşı zincir kalıp alınarak yenisi sentezlenir. Çift sarmal kırıkları bu durumu engeller, bu nedenle tek sarmal kırıklarından daha tehlikelidir.
Protein	* Protein iskeletinin kırılması * Tiyol gruplarının ve diğer amino asit rezidülerinin oksidasyonu * Amino asit radikallerinin farklı proteinleri birbirine bağlaması (çapraz bağlanma)	Özel enzimler anormal proteinleri tanıyıp yok eder.
Lipit	Membran bağımlı lipidlerin hasarı “Lipit peroksidasyonu sırasında doymamış yağ asitlerinin yan zincir oksidasyonu”	Membran bileşenlerinin normal yenilenmesi

2.7.2 Antioksidanlar

Antioksidan moleküller organizma tarafından sentezlenen endojen ve dışarıdan besinlerle alınan eksojen kaynaklı yapılardır (Tablo 5). Bu yapılar oluşan oksidan

moleküllerin hücreye hasar vermesini engellemektedir. Hücre dışında ve hücrede farklı organellerde yerleşerek savunma mekanizmasında rol alan biyomoleküller enzimatik yapıda olabilecekleri gibi non-enzimatik yapıda da olabilirler (31).

Hücre dışı savunma; albümin, bilirubin, serüloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler; glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bu enzimlerin fonksiyonları için bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler gereklidir (32).

Antioksidan ajanlar oksidan moleküllere karşı etkilerini dört yolla gösterir:

1) Radikal temizleyici etki gösterenler; yeni radikal oluşumunu engeller ve oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Süperoksit dismutaz, ferritin, glutatyon peroksidaz, serüloplazmin, metalotiyonin gibi metal bağlayıcı proteinler örnek olarak gösterilebilir.

2) Giderici etki gösterenler; oksidanlarla etkileşip onlara bir hidrojen aktarır ve aktivitelerini inhibe ederler. Beta karoten, vitamin C ve vitamin E bu tür etkiye örnektir.

3) Zincir kırıcı etki gösterenler; zincirleme devam eden reaksiyonları belli yerlerinden kırarak oksidan etkiyi durdururlar. Bazı mineraller, hemoglobin, ürik asit, bilirubin ve albümin örnek olarak verilebilir.

4) Onarıcı etki gösterenler; bu grupta DNA tamir enzimleri ve metiyonin sülfoksit redüktaz bulunur.

Tablo 5. Endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar

Endojen Antioksidanlar	
Enzimler	1. Süperoksit dismutaz(SOD) 2. Glutasyon peroksidaz(GSH-Px) 3. Glutasyon S-transferazlar(GST) 4. Katalaz(CAT) 5. Hidroperoksidaz
Metal Bağlayanlar	1. Seruloplazmin-bakırı bağlar 2. Transferrin-demiri bağlar 3. Myoglobin-demiri bağlar 4. Hemoglobin-demiri bağlar 5. Ferritin-demiri bağlar 6. Laktoferrin-demiri bağlar 7. Albumin-bakırı bağlar
Diğerleri	1. Melatonin 2. Ubikinon(koenzim-Q) 3. Ürat 4. Bilurubin 5. Sistein 6. Metiyonin 7. Glutasyon
Ekzojen Antioksidanlar	
1. α -tokoferol 2. β -karoten 3. Askorbik asit 4. Folik asit 5. Karotenoitler 6. Flavonoitler 7. Vitamin E analogları	

2.7.2.1 Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD, süperoksit anyonunu hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüren bir metalloenzimdir. O₂ kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi de yüksektir.

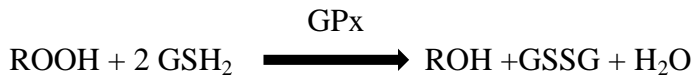


O₂' i uzaklaştıran SOD, intraselüler serbest radikal üretimine karşı ilk enzimatik savunma sistemidir ve memelilerde üç çeşit SOD bulunmaktadır (33).

- Sitolik SOD (Cu-ZnSOD): Genellikle sitozolde ve lizozomal fraksiyonlarda yer alır. Kofaktörleri çinko ve bakırdır; aktivitesinden bakır, stabilitesinden ise çinko sorumludur.
- Mitokondriyal SOD (Mn-SOD.): Mitokondride bulunur ve tetramerik yapıdadır. Kofaktörü mangandır.
- Ekstraselüller SOD (EC-SOD, SOD3); Tetramerik yapıdadır ve ekstraselüller bölümlere salgılanır. Çinko ve bakır kofaktörleridir. Ayrıca bazı bakterilerde Fe-SOD da saptanmıştır.

2.7.2.2 Glutasyon peroksidaz GPx

İnsan dokuları majör peroksit uzaklaştırıcı enzim olarak glutasyon peroksidaz içermektedir. GPx, kofaktör olarak glutasyonu (GSH) kullanır.



GPx, hücrede H₂O₂'nin temizlenmesinden sorumlu iki enzimden biridir, diğer enzim ise katalazdır. Glutasyon-GPx sistemi, H₂O₂'nin H₂O'ya indirgenmesini katalizlerken organik hidroperoksitleri de parçalar (33).

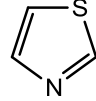
Tetramerik yapıda olan bu enzim en çok karaciğer ve eritrositte aktif olarak bulunmaktadır. Kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta ise düşük aktivite göstermektedir. % 60-75' i stoplazmada, % 25-40' ı mitokondride yer alır.

Selenyuma bağımlı ve selenyuma bağımsız olmak üzere iki tipi mevcuttur. Selenyuma bağımlı olan GPx (Se-GPx), sitozol ve mitokondride bulunmaktadır ve hem H₂O₂ hem de lipit hidroperoksitlerini metabolize eder. Selenyum bağımsız GPx (non-Se GPx) ise sadece lipit hidroperoksitleri metabolize eder. Bu özelliği ile lipit peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini önlemektedir (34).

Lipit peroksidasyonu ve DNA hasarını önlemede önemli role sahip olan GPx aktivitesinin tümör hücrelerinde sağlıklı dokulara göre belirgin şekilde arttığı bildirilmiştir.

2.1 Tiyazol ve Benzotiyazol'ün Yapısı

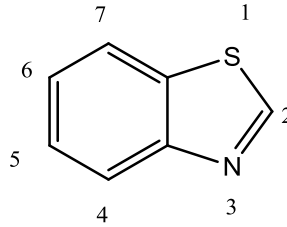
Bir azot ve bir kükürt atomu bulunduran beşli halka yapısına sahip heterosiklik bileşikler Tiyazol (Şekil 5) olarak adlandırılmaktadır. Tiyazol halkası; Tiyamin (B1 vitamini), basitrasin ve penisilinler gibi biyolojik aktif tabii bileşiklerin yanı sıra sentez yoluyla elde edilen birçok ilaç aktif maddesi, boya ve sanayide kullanılan bazı kimyasal maddelerin yapısında bulunur.



Şekil 5. Tiyazol

2.1.1 Benzotiyazol'ün özellikleri ve işlevi

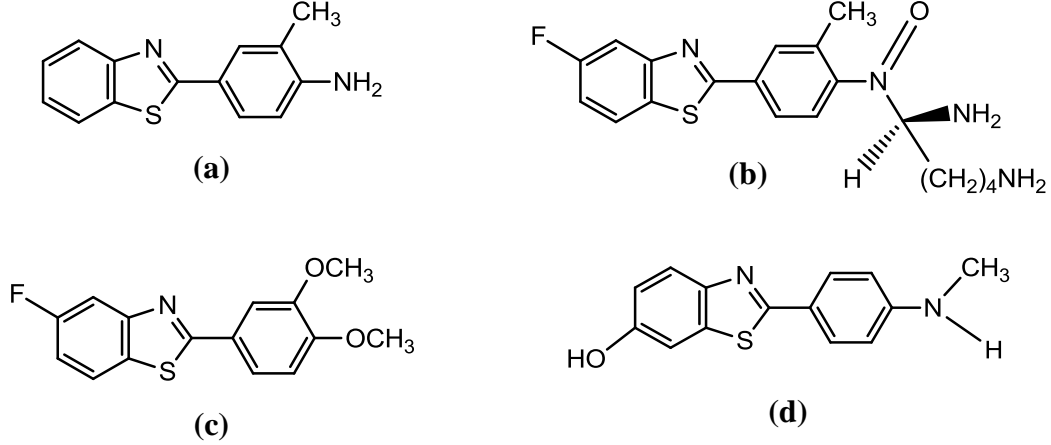
Benzotiyazol (Şekil 6) halka sistemi biyolojik aktiviteye sahip birçok molekülde bulunan önemli bir yapıdır. Benzotiyazol halkası lusiferaz enzimi gibi doğal bileşiklerin yanı sıra antitümör (35) ve antikanser (36) gibi önemli biyolojik ve farmakolojik aktiviteye sahip oldukları bilinen heterohalkalı bileşiklerin yapısında bulunur.



Şekil 6. Benzotiyazol

Günümüze kadar yapılan araştırmalar, benzotiyazol halka sisteminin en fazla 2 konumundan süstitüe edildiğini ortaya koymaktadır (37,38). Özellikle, 2-substituebenzotiyazoller, antitümör, antiviral ve antimikrobiyal ilaç gibi tıbbi özelliklerinden dolayı organik ve tıbbi kimyada yoğun bir şekilde araştırılmaktadırlar (39,40). Örneğin, 2-(4-amino-3-methylphenyl) benzotiyazol (Şekil 7. a) (DF 203)'un insan kanser hücre hatları panellerine karşı güçlü ve seçici antitümör aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiş (41,42) ve florlu türevi (Şekil 7. b) (Phortress)'nin kanser için ön ilaç olarak klinik çalışmalarına başlanmıştır. Benzer

bir yapıya sahip olan 2-(3,4- dimethoxyphenyl)-5-fluorobenzothiazole (Şekil 7. c) (PMX 610) ünde in vitro güçlü ve seçici olarak antitümör aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (43). Ayrıca, 2-phenylbenzothiazole türevi (Şekil 7.d) olan (Pittsburgh bileşik-B) Alzheimer hastalığının potansiyel tanısı için klinik uygulamalarında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. (44,45)



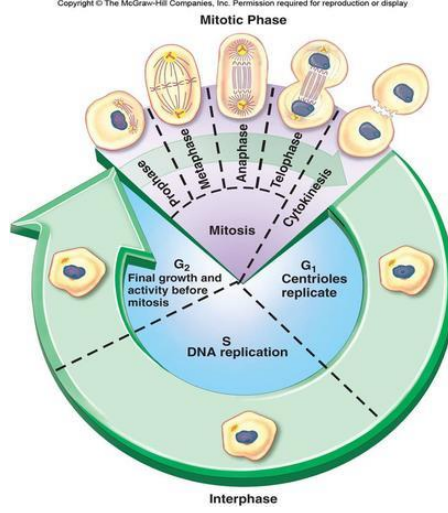
Şekil 7

2.2 Hücre Döngüsü ve Kanserle İlişkisi

2.2.1 Hücrenin yaşam döngüsü

Hücrenin; bir bölünme sonundan, ikinci bir bölünme sonuna kadar geçirdiği zaman sürecinde meydana gelen yaşamsal olaylara hücrenin yaşam döngüsü denir. Hücreler; canlıların büyüyüp gelişmesi, dokularının yenilenmesi, yara iyileşmesi, üreme faaliyetlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla bölünür.

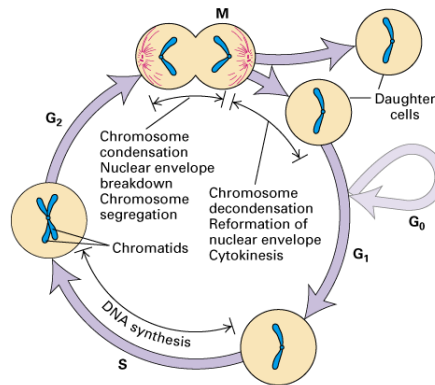
Hücrenin yaşamsal döngüsü; G1, S, G2 ve M evresi olmak üzere 4 aşamada gerçekleşir. Yaşam döngüsünün; G1, S ve G2 evreleri bölünmenin interfaz kısmını oluştururken; M evresi ise mitoz bölünmeyi oluşturur. İnterfaz evresinde hücre büyür ve genomunu kopyalar. Mitoz evresinde çekirdek ve sitoplazma bölünür (Şekil 8).



Şekil 8: Hücre yaşam döngüsü

İnterfaz sürecinin ilk fazı G1; mitozun (M) bitişi ile DNA sentezinin (S) başlangıcı arasında kalan sürece verilen isimdir. Mitozda şekillenen kardeş hücreler G1 evresine girer. Hücre hacmi bir önceki mitoz sonunda kardeş hücrelerde yarıya indiğinden bu evrede hızlı RNA ve protein sentezi gerçekleşir ve anne hücre hacmine ulaşılır. Bu faz, DNA sentezine yani replikasyona hazırlık fazıdır. Hücre bu fazdayken replikasyon için gerekli olan çeşitli proteinlerin sentezini gerçekleştirir. Çekirdekçiklerin yapımı tamamlanır. Sentriyoller kendilerini duplike etmeye başlar ve eşleme G2 evresinde tamamlanır.

Sentez (S) fazı DNA replikasyonunun gerçekleştiği fazdır. Histonlar da dâhil gerekli nükleoproteinlerin tümü DNA molekülüne katılır ve kromatin materyal oluşturulur. Kromozom sentezi bu fazda tamamlanır fakat kardeş kromatidler birbirinden ayrılmaz bu sayede hücre diploid özelliğini korumuş olur (Şekil 9).



Şekil 9

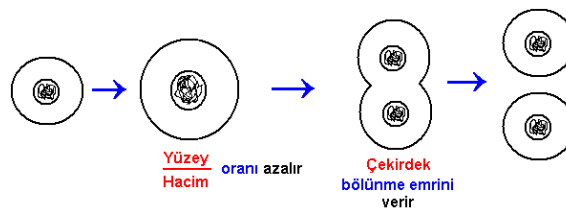
G2 fazı mitoz hazırlık fazıdır. G2 fazı sırasında, mitozda kullanılacak enerjinin üretimi, mitotik mikrotübüller için tubulin proteinlerinin üretilmesi gerçekleştirilir. G2'de aynı zamanda DNA hatalarının düzeltilmesi kontrol noktası da bulunur. Bu evrede DNA replikasyonu analiz edilir ve hata varsa düzeltilir. G2 evresinde mitozu başlatan, kromozomların kondensasyonunu sağlayan, çekirdek zarının kopmasını sağlayan ve mitozla ilgili diğer olayları indükleyen MPF protein kompleksi (maturation promoting factor) birikimi de vardır.

Mitoz (M) fazında ise nükleusun (karyokinez) ve sitoplazmanın (sitokinez) bölünmesi gerçekleşir. Kardeş kromatidlerin birbirlerinden ayrılması ve mikrotübüller aracılığı ile hücrenin zıt kutuplarına taşınması bu fazda gerçekleşir. Bu faz sonucunda iki yeni hücre meydana gelmektedir.

G₀ fazı ise normalde hücre siklusu içinde yer almayan ve siklusunu tamamladıktan sonra siklusa çıkan hücrelerin bulunduğu fazdır. G₀ evresi dinlenme evresidir. Bu fazda hücrede bölünme işlemi yoktur ancak tüm tüm biyokimyasal olaylar aktif bir şekilde gerçekleşmektedir. Hücreler bölünme uyarısı aldıktan sonra bu fazdan ayrılıp G1 fazına yani siklusun ilk fazına girerler. G₀ (outside) evresindeki hücreler stabil evredeki hücreler olarak adlandırılır.

2.2.2 Hücre yaşam döngüsünün düzenlenmesi

Hücreler, belirli bir büyüklüğe eriştikten sonra bölünme ihtiyacı duyarlar. Bunun temel nedeni; hücre büyüdükçe, hücrede hacim/yüzey oranı dengesinin bozulmasıdır. Hücre büyüdüğü zaman; hücrenin yüzeyi, yarıçapının karesi (r^2) kadar artar, hacmi ise yarıçapının küpü (r^3) kadar artar. Bunun sonucunda hücrenin yüzey / hacim oranı azalır ve bir zaman sonra hücrenin yüzeyi besin alış verişini, atık maddelerin atılımını ve gaz alış verişini bütün hücreye sağlayamayacak durumu gelir. Bu nedenle hücre ölüme sürüklenebilir. Ölümü engellemek için çekirdek bölünme emrini verir.

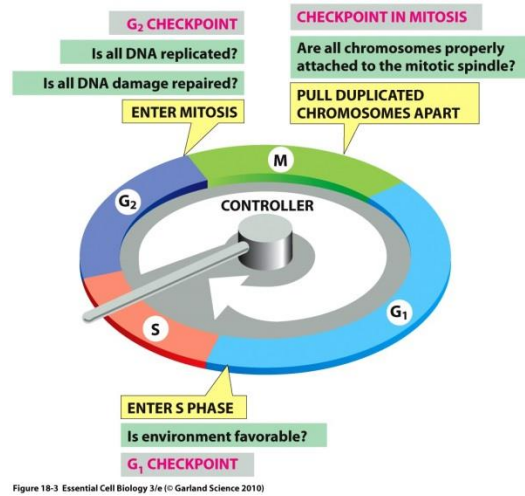


Hücreyi, hücre döngüsüne girmesi için uyaran faktörler şunlardır:

- mekanik güç (örn. düz kasların kasılması)
- dokunun haraplanması (örn. iskemi)
- hücre ölümü

Bu olayların tümü, ilgili dokudaki hücrelerden sinyal ligandlarının (sitokin) serbest bırakılmasına yol açar. Bu büyüme faktörleri (ligantlar-sitokin), hücre bölünmesini tetiklemek için hücre zarındaki reseptörlere bağlanırlar. Bağlanma ile sinyal ileti yollarından birini aktive ederler. Hücrelerin bölünüp bölünmeyeceğine karar veren, hücrenin yaşam döngüsündeki kontrol noktalarını etkileyen, hücre içindeki proteinler siklinler ve kinazlardır. Bu siklin proteinleri ve katalitik siklin bağımlı kinaz enzimleri bir arada heterodimer formunda aktivite gösterirler. Bu nedenle siklinlerin baskılanması hücre yaşam döngüsünün duraksamasına neden olur (46).

Hücre yaşam döngüsünde kontrol noktaları hücrenin bir fazdan diğerine geçişi için çeşitli faktörlerin uygunluğunun kontrol edildiği süreçlerdir (Şekil 10). Hücrenin içerisinde bulunduğu fazın tamamlanıp tamamlanmadığı ve bir sonraki faza geçiş için koşulların uygun olup olmadığı bu kontrol noktalarında kontrol edilir. G₁-S kontrol noktasında hücrenin replikasyon için hazır olup olmadığı hücre büyüklüğünün ve ortamdaki besin ve büyüme faktörünün yeterli olup olmadığı sorgulanır. G₂-M kontrol noktasında replikasyonda herhangi bir hata varlığı ve hücrenin mitozu uygunluğu sorgulanır. M-G₁ kontrol noktasında ise mitoz sonucu oluşan bütün ikili kromozomların eşleşmelerinin doğruluğu kontrol edilir (47).

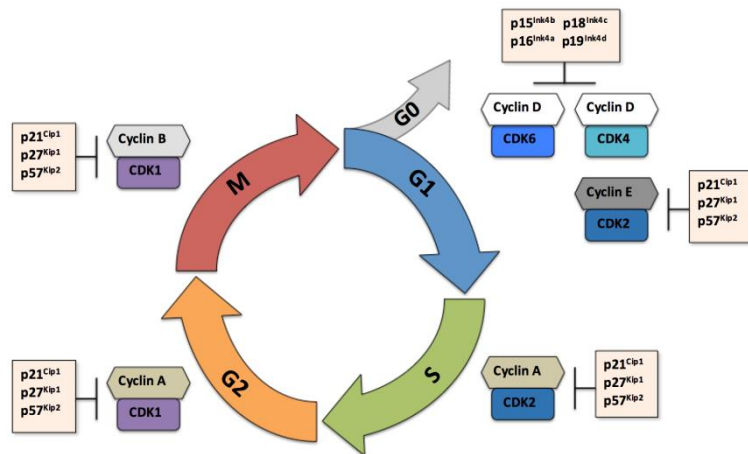


Şekil 10: Hücre döngüsünde kontrol noktaları

Hücre döngüsünün kontrol noktaları hücre döngüsüne özgü bir takım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından kontrol edilir. Siklinler, CDK ve CDI'lerinin düzeyleri hücre siklusunun çeşitli aşamalarında farklılık gösterir.

CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler. Ancak, siklin'e bağlandıklarında aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana gelir. Siklinler (A, B1, D ve E) siklusun çeşitli fazlarında periyodik olarak bir taraftan sentez edilirlerken diğer taraftan da yıkılırlar. Bu yüzden de siklinler olarak isimlendirilmişlerdir. Siklinlerin periyodik yapım ve yıkımları, dolayısıyla ilişkide buldukları CDK (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25)'ların aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar. CDK'ların aktiviteleri sadece siklinlerle düzenlenmez ayrıca özgün fosforilasyon/defosforilasyona yol açan başka yollarla da düzenlenir. CDI'leri (p15, p18, p19, p21 ve p27) ise ya siklinler, ya CDK'ların kendisi yada siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe ederler.

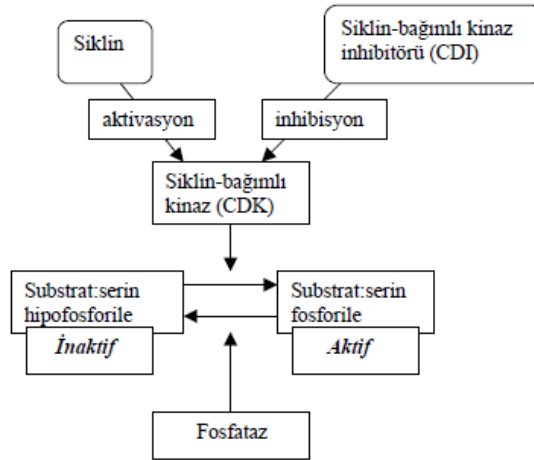
D tip (D1, 2, 3) siklinler başlama siklinleri olarak adlandırılırlar ve büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak eksprese edilirler. Mitojenler ortamdaki uzaklaştırıldığında ise hızla yıkılırlar. D tip siklinler CDK4 ve CDK6'yı regule ederler. Siklin E, G1/S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve hücre S fazına girdiği anda hızla yıkılır (Şekil 11). Siklin E, CDK2'yi regule eder (48).



Şekil 11. Hücre yaşam döngüsü ve siklinler

Siklin A ve B1 mitotik siklinlerdir. Siklin A, S fazı boyunca sentez edilir ve anafaz sırasında da yıkılır. Siklin A, CDK2 ile kompleks yapar ve bu kompleksin DNA replikasyonunda direkt rolünün olduğu düşünülmektedir. Siklin B1 ise S fazının geç döneminde sentez edilir ve G2 fazından M fazına geçerken sentezi maksimal düzeye erişir, ardından anafazda yıkılır. Siklin B, CDK1 ile etkileşime girer ve bu kompleks MPF (“M-phase/maturation promoting factor”) olarak da bilinir. Siklin B’nin anafazda yıkılmasıyla birlikte hücre mitozisten çıkar ve G1’e tekrar geri döner.

Görüldüğü gibi bu proteinler, biyokimyasal olarak ifade etmek gerekirse, birbirleriyle protein:protein kompleksleri oluşturarak birbirlerinin aktivitelerini düzenlerler. Bu aktivitelerin düzenlenmesi, moleküler düzeyde ifade etmek gerekirse, fosforillenme yoluyla gerçekleşir. CDK’lar siklinlerle kompleksi sonucu aktive olurlarken, CDI’lerle kompleks yapmaları halinde ise inhibe olurlar. CDK’ların aktif formları, substratları fosforilleyerek onları aktif hale getirir (Şekil 12). Böylece substrat aktivasyon durumuna göre hücre siklusu ya durur ya da bir sonraki aşamaya geçer.



Şekil 12: Siklin bağımlı protein kinaz (CDK) sistemi

Özetlemek gerekirse, hücre siklusunun çeşitli fazlarında bu üç grubun (siklinler, CDK’lar ve CDI’leri) çeşitli üyelerinin aktivasyonları gerçekleşir. Örneğin, siklin E en yüksek seviyeye G1 fazının geç döneminde; Siklin A ve B ise G2 ve M’de çıkar. Siklin D ise G1 fazının erken döneminde artmaya başlar ve fazın sonuna doğru gittikçe artar. Herbir siklin özellikle spesifik CDK’ına bağlanır. Değişik fazlarda spesifik siklinlerin ve CDK’ların varlığı

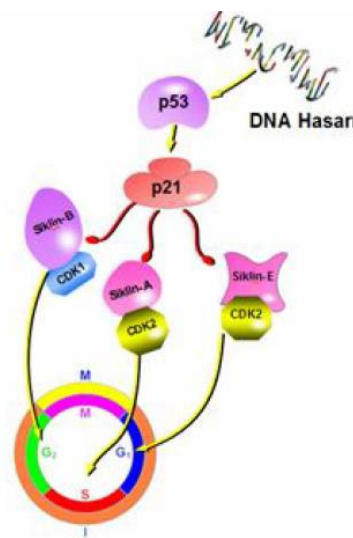
veya yokluğu herhangi bir fazda hangi kinazın aktifleşeceğini belirler. CDK'lar mitojenik büyüme faktörleri tarafından aktifleştirilirler.

Hücre siklusuna giren bir hücre DNA sentezi yapar, böylece DNA'sını replike eder (ikiye katlar) ve ardından da DNA mitozisle iki yavru hücreye eşit olarak dağılır. Genel olarak, G1 fazı DNA sentezine (S fazına) ve G2 fazı ise mitozise (M fazına) hazırlık fazlarıdır. Bu fazlarda RNA ve protein sentezleri yapılır ve ayrıca hücre kendisini bölünme için yeniden organize eder (48).

2.2.3 Hücre yaşam döngüsünün kanserle ilişkisi

Hücre yaşam döngüsü ve kanser gelişimi yakından ilişkili konulardır. Kanser öncelikle organlarda, dokularda değil hücresel aşamada başlar.

p53 proteini CDI (p15,p16, p18, p19, p21, p27,p53) ailesindedir ve görevi DNA hasarını algılayarak p21 proteinini aktifleştirip ve bu sayede hücre döngüsünün ilerlemesine engel olmaktır. Ancak, p53 proteini katı tümörlerin %50'sinden fazlasında mutasyona uğramış halde bulunur. p53, p21 ya da p16 gibi tümör baskılayıcı proteinler hücre yaşam döngüsünü duraksatma aktivitesi gösterirken siklinler ve CDKlar hücreyi bölünmeye yönlendirdiklerinden onkogen olarak adlandırılır (Şekil 13). Çeşitli kanser türlerinde bu tümör baskılayıcı proteinlerin (p15,p16,p18,p19, p21, p27,p53) eksikliği, siklin ve CDKların ise aşırı ekspresyonuna neden olur. Bu durum hücrelerin kontrolden çıkmasına, aşırı bölünmesine ve birçok kanser tipine yol açmaktadır (47).



Şekil 13: p53'ün hücre yaşam döngüsüne etkisi

RAS geni p53'e benzer etki gösterir. Tüm insan tümörlerinin %20-30unda RAS aktifleşmesi görülmektedir. RAS, proto-onkogen ailesinin bir üyesidir. Proto-onkogenler, hücrenin çoğalma yollarını kontrol eden genlerdir. Proto-onkogenlerdeki mutasyonlar, hücrelerin kontrolden çıkmasına, aşırı bölünmesine ve kanser oluşumuna yol açar. Mutasyona uğramış proto-onkogenler, onkogenler olarak adlandırılır.

Genel olarak kanser oluşum mekanizmasında ardışık mutasyonlar sonucu hücre döngüsünün kontrolden çıkması gözlenmektedir (Şekil 14). Bu mutasyonlar genellikle DNA tamir enzimlerinde inaktifleşme, proto-onkogenlerde aktifleşme-onkogene dönüşüm ve tümör baskılayıcı genlerde inaktifleşme görülmektedir.



Şekil 14. Kanser oluşumu

2.3 Apoptozun Moleküler Mekanizması

Hem prokaryot hem de ökaryot organizmalarda yaşam, belli başlı kısımlardan oluşmaktadır. Bunlar; doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölümdür. Yaşamın bu şekilde sürdürülebilmesi için canlıyı oluşturan hücrelerin sayısal dengesi çok önemlidir. Canlıda yeni hücreler oluşurken, varolan hücrelerin bir kısmı da hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta,

böylelikle sabit denge korunmaktadır. Varolan bu hücreler fizyolojik, programlanmış hücre ölümü olan apoptoz ve patolojik hücre ölümü nekroz gibi çeşitli hücre ölüm tipleriyle yok olmaktadır (49,50).

2.3.1 Apoptoz nedir?

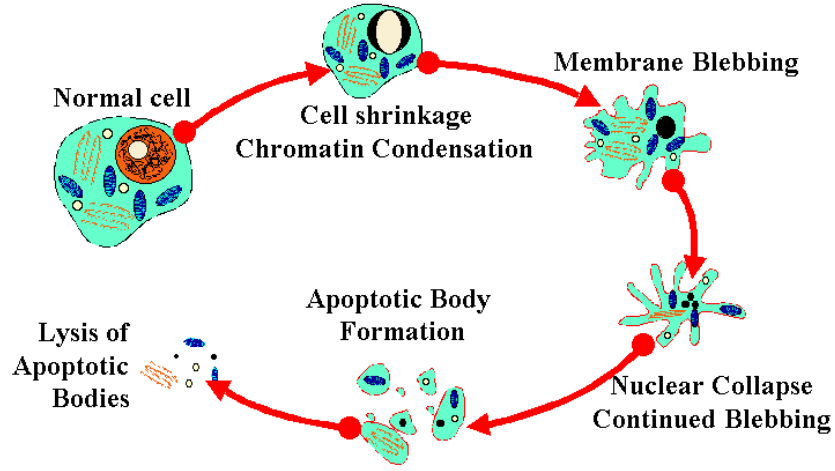
Apoptoz genel olarak hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazi koruyan bir olaydır.

Apoptoz ile ilgili çalışmalarda genelde *Caenorhabditis elegans* nematodu kullanılmıştır. Çok basit yapıda, bir çok hücreli olan bu nematod ile çalışan, Sydney Brenner, Robert Horvitz ve John E. Sulston adlı bilim adamları “programlanmış hücre ölümü ve organ gelişiminin genetik olarak düzenlenmesi” konusuyla 2002 yılında Nobel ödülü kazanmışlardır. Bu nematodlarda 3 gen; ced-3, ced-4 ve ced-9 apoptozu kontrol etmektedir. Mutasyon ile inaktif olmuş ced-3 ve ced-4 genlerini taşıyan nematodlarda apoptozun meydana gelmediği ve normalde ölmesi gereken hücreler yaşamaya devam ettiği görülmüştür. Bu nedenle ced-3 ve ced-4’ün ölüm genleri olup apoptozu indükledikleri, ced-9’un ise ölüme karşı koruyan gen olup apoptozu inhibe ettiği belirlenmiştir. Bugün bu genlerin insan genomundaki karşılıkları ced-3 için kaspazlar, ced-4 için Apaf-1 ve ced-9 için Bcl-2 olduğu tanımlanmıştır (51,52).

2.3.2 Apoptozun aşamaları

Apoptoz hücrenin kendini yok etmek için bir takım metabolik ve fizyolojik işlemleri devreye soktuğu bir olaydır. Apoptoz uyarısı alan hücre bulunduğu ortamdan uzaklaşır, komşu hücrelerle bağlantısını koparır ve büzülür, kromatini yoğunlaştırır, piknotik bir görünüm alır. DNA’sı nukleozomlarından kesilir jel elektroforezinde tipik merdiven bant görünümü alır. Ancak hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korur. Hücre zarı yapısında bulunan fosfatidil serin hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne transloke olur. Çekirdek küçülür, parçalara ayrılır. Hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde kopar, apoptotik cisimciklere ayrılır. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir, ancak enflamasyon görülmez (53).

Apoptosis (Programmed Cell Death)



Şekil 15. Apoptozun genel gösterimi

2.3.3 Apoptozun düzenlenmesi

Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondriyonlar rol oynar. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları; endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alır (53).

2.3.3.1 Bcl-2 ailesi

Bir hücrenin apoptoza eğilimli olup olmaması Bcl-2 ailesi genlerinin heterodimer ya da homodimer formuna bağlıdır. Bcl-2 ailesi birbirine zıt gruptan oluşur;

- Proapoptotik üyeler
- Antiapoptotik üyeler

Hücrede proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza eğilimlidir. Antiapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza daha az eğilimlidir. Proapoptotik üyeler Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dır. Bu proteinler sitozolde yer alırlar. Sitokrom-c ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını artırarak apoptozu indüklerler.

Antiapoptotik üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'dir. Bu proteinler de mitokondriyon dış membranında, endoplazmik retikülümde ve çekirdek zarında yer alırlar. Por oluşumunu sağlayıp iyon transportunu düzenlerler. Özellikle hücredeki Ca⁺⁺ oranını kontrol ederler. Ayrıca kaspazların öncü formlarıyla AIF ve sitokrom-c salınımını bloke ederek apoptozu inhibe ederler (53).

2.3.3.2 P53

Hücrede DNA hasarı olduğunda hücre siklusunu G1 fazında durdurup hücreye DNA tamiri için zaman veren bir transkripsiyon faktörüdür. Hasar tamir edilemeyecek durumda ise Bax, Apaf-1 ve Fas yapımını artırıp Bcl-2 ve Bcl-xL'yi baskılar ve apoptozu indükler (53).

2.3.3.3 FAS (APO-1 veya CD95)

24 üyeli TNF reseptör ailesinin en iyi tanımlanmış üyesidir. Bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eden Fas hücre reseptörü sitotoksik T hücreleri ve naturel killer hücreleri üzerinde bulunur. 43 kDa molekül ağırlığındaki Fas proteini hücre yüzeyinde kendi reseptörüne bağlanır ve reseptör trimerizasyonunu sağlar. Aktive olmuş reseptörler FADD reseptör molekülü ile birleşir. Bu şekilde; Fas reseptörünün karboksil ucuna (C) yakın 80 aminoasitlik bölgenin uyarılmasıyla prokaspazlar aktive olur ve apoptoz başlar. Fas ve TNF alfa dışında TRAIL ve TRAIL reseptörleri de benzer yolla apoptozu uyarabilir (54)

2.3.3.4 Kaspazlar

Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağına kırarlar. Hücrede inaktiftirler, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. 100 farklı hedef proteini keserek apoptozu neden olurlar.

Apoptoz süresince kaspazlar önemli yer tutmaktadır. Kaspazlar, birçok hücrede inaktif proenzim formunda yaygın bir şekilde bulunur ve bir kez aktive olduklarında bir proteaz kaskadının başlamasına izin veren diğer prokaspazları aktive edebilirler. Bir kaspazın diğer kaspazı aktive edebildiği bu proteolitik kaskat, apoptotik sinyal yolunu artırır ve böylece hızlı hücre ölümüne neden olur. Farklı kaspazlar komşu aminoasitin tanınmasında farklı spesifiteye sahip olmasına rağmen, bunlar proteolitik aktiviteye sahiptirler ve proteinleri aspartik asit birimlerine parçalayabilirler. Kaspazlar aktive olduklarında hücre ölümüne karşı geri dönüşümsüz bir zorunluluk ortaya çıkar (55). Kaspazlar 3 tiptirler:

I- Başlatıcı kaspazlar; (Kaspaz 2,8,9,10),

II- Efektör kaspazlar (Kaspaz 3,6,7),

III- İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14).

Başlatıcı kaspazlar, apopitotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini etkileyici kaspazlara iletirler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. Ölümü gerçekleştiren efektör kaspazlardır. Efektör kaspazlar, başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler (56).

Kaspazlar DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive ederler. Hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olurlar.

2.3.4 Apoptoz mekanizması

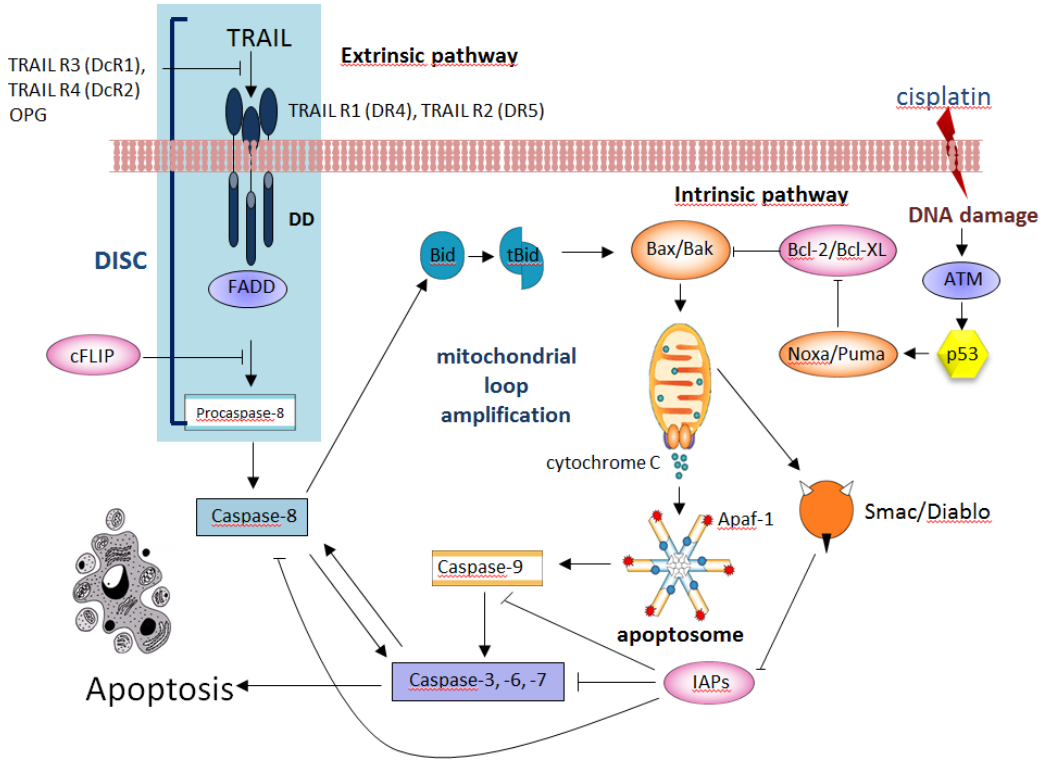
Apoptoz üç yolla gerçekleşir;

I- İnstrinsik yol (Mitokondriyal yol)

II- Ekstrinsik yol (Ölüm reseptörleri yolu)

III- Endoplazmik retikulum aracılıklı yol

Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksidir. Hücre dışı sinyaller ise büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS – FAS ligand aracılığı ile apoptoz, TNF aracılığı ile apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (İskemi, toksinler,UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon)'dir. Apoptozun üç sinyal yolunda kaspazlar görev almaktadır. Hücre içi sinyaller instrinsik apoptoz yolunu devreye sokarken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik yol ile apoptozu indükler (57-59).



Şekil 16: Apoptozun ekstrinsik ve intrinsik yolları

2.3.4.1 İntirinsik yol (mitokondriyal yol)

Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınmasından sonra proapoptotik proteinlerden Bid; bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive eder, Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondriyon membranında por oluşumunu indükleyip zar potansiyelini değiştirir. Böylelikle mitokondriyon membranındaki porlardan sitokrom-c, Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endo-G (Endonukleaz-G), Ca⁺⁺ ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını uyarır. Sitokrom-C, oksidatif fosforilasyon için elektron taşır. SMAC, IAF (İnhibitör apoptotik faktör)'ü inhibe eder ve apoptozu hızlandırır. IAF'nin ortamda bulunması ise kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu engeller. AIF, çekirdeğe transloke olur ve parçalara ayırır. ENDO-G de DNA'yı parçalar. Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılımıyla sitozolde Apoptozom denen bir kompleks oluşturur. Apoptozom kaspaz-9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur (59,60).

2.3.4.2 Ekstrinsik yol (ölüm reseptörleri yolu)

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL) bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Bu şekilde trimerik yapı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek DISC (Death inducing signaling complex) adı verilen yapıyı oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek aktif kaspaz-8'in oluşması sağlanır. Aktif kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere 2 yolla kaspaz-3'ü aktive eder. Ya direkt kaspaz-8 kaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid'i keserek dolaylı olarak intrinsik mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Her 2 yolla da aktive olan kaspaz-3 yine CAD aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna neden olur (53,54).

Ekstrinsik yollardan biriside sfingolipid yoludur. Sfingomyelin, hücre zarı yapı taşlarından biridir. Radyasyon, kemoterapi, ölüm reseptörleri ile aktive olan sfingomyelinaz, sfingomyelini seramid'e dönüştürür. Seramid ise seramidaz ile sfingozine dönüşür. Sfingozin de Bid yapımını artırarak apoptozu tetikler.

Ayrıca patojenle enfekte hücreler ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkili bir diğer yol ise Granzim-Perforin sistemidir. Perforinler ve Granzim B birer serin proteaz'dır. Sitotoksik T lenfositler ve Natural Killer hücrelerinin sitoplazmik salgı granülleri içinde bulunurlar. Sitotoksik T lenfositler hedef hücreye bağlandığında perforinler salınır. Perforinler hedef hücre üzerinde dairesel bir por oluştururlar. Bu perforin poru hücre içine Ca^{++} girişini artırır. Vezikülden Granzim B'nin serbest kalmasını sağlar. Granzim B de kaspaz aktivasyonunun ardından DNA fragmentasyonu sonucu apoptoza neden olur (53).

2.3.4.3 Endoplazmik retikulum aracılıklı yol

Endoplazmik retikulum, protein biyosentezinde ve katlanmasında, hücre içi kalsiyum dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Hücre içi kalsiyum homeostazisinin bozulması ve intraluminal oksitadif çevresinin değişmesi da dahil olmak üzere çeşitli şartlar, ER'un stresini artırabilir ve apoptosise yol açabilir (61). Dış uyaranlar, hücre içinde Ca^{+2} artışına neden olabilir bununla birlikte cAMP gibi hücre içi ikincil habercileri aktive edilir. Bu da kaspaz kaskadına sebep olur ve apoptosise başlatır (56). ER'un stresinin apoptozisin gelişimine etkisinin ne olduğunun tam olarak anlaşılmasına rağmen, son çalışmalar, ER proteazlarının, kaspaz-7 ve -12 nin apoptosise katıldığını öne sürmektedir (61).

2.3.5 Kanser tedavisinde apoptozun önemi

Malign hastalıkların çoğunda hücrelerde aşırı proliferasyonla birlikte Apoptozis düzenlenmesinde bozukluk görülmektedir. Bu nedenle günümüzde farklı kanserlerin tedavisinde, kanser hücrelerini ölüme götürmek için radyoterapi ve kemoterapiden sıklıkla yararlanılmaktadır (62).

Apoptozun hücre döngüsüyle olan ilişkisi de göz önüne alındığında apoptoz, hücre siklusu ve kemoterapi üçlüsünün aralarındaki etkileşimi kanser hastalarının gerek prognozunu gerekse tedaviye yanıtını belirleyeceğinden dolayı büyük öneme sahiptir. Bu nedenle apoptoz veya hücre döngüsünü etkileyen kanser ilaçlarının etkinliğini arttırmak, olası direnç mekanizmalarının önüne geçebilmek, apoptotik yollarının tanımlanmasını sağlamak ve moleküler düzeydeki özelliklerinin prognozla ve tedaviye yanıtla ilişkisinin araştırmak, güncel araştırma konularındandır (48).

15 yıldır devam eden çalışmalar, kanser tedavisinde kullanılan tüm ilaçların apoptozu tetikleyebildiğini göstermektedir. Apoptotik yolların aktifleştirilmesi kanser terapisinin temel ilkelerinden biridir. Çoğu kanser ilacı neden oldukları DNA hasarı üzerinden etki göstermektedir ve kanser hücrelerinin DNA tamir mekanizmalarındaki yetersizlikten yararlanarak hücreleri apoptotik sürece sürüklemektedir (47,63). Doxorubicin, etoposide, teniposide, methotrexate, cisplatin ve bleomycin gibi pek kemoteropik ilacın NF- κ B ve AP-1 yolları üzerinden FasL sentezini tetiklediği bilinmektedir (64). Ayrıca çoğu kemoteropik ilacın etkinliği, p53 tümör baskılayıcı proteininin fonksiyonel olmasına bağlıdır. DNA hasarına neden olan ajanlar p53 yolağı üzerinden Fas reseptör ekspresyonunun artışına neden olmaktadır (65). Her ne kadar bu bulgular ekstrensik yolağı işaret etse de, çeşitli gözlemler FasL ve Fas etkileşiminin ilaç ile tetiklenen apoptozda hücrelerin öldürülebilmesi için şart olmadığını ortaya koymaktadır (66).

Apoptotik programın merkezi bileşeni kaspazlardır (56). Apoptosisi aktive eden sinyaller tarafından tetiklenip, apoptosisin her üç yolunda da (mitokondriyal, ölüm reseptörleri, endoplazmik retikulum aracılıklı) aktif olarak görev alırlar (67). Mitokondriyal yol, başlatıcı kaspaz-9'un aktivasyonunu içerir. Kaspaz-9, bağlayıcı protein olan Apaf-1'in oligomerize olması, kaspaz-9 monomerlerinin bir araya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9 da etkileyici kaspazlar, kaspaz -3,-6,-7'yi aktive eder. Ölüm reseptörleri yolunda ise, TNF'nin indüklediği hücre ölümü, başlatıcı kaspazlar, kaspaz -8 ve -10 un aktivasyonunu içerir. Daha sonra bu kaspazlar, etkileyici kaspazları, kaspaz -3, -6 ve -7 aktive ederler (68).

2.3.6 Apoptoz'un belirlenmesinde kullanılan yöntemler

A. Morfolojik görüntüleme yöntemleri

1. Işık Mikroskobu
 - Hematoksilen Boyama
 - Giemsa Boyama
2. Floresan Mikroskobu
 - Propidium İyodür (PI)
 - Hoechst Dye
3. Elektron Mikroskobu
4. Faz Kontrast Mikroskobu

B. İmmunohistokimyasal yöntemler

1. Anneksin V Yöntemi
2. TUNEL Yöntemi
3. M30 Yöntemi
4. Kaspaz-3 Yöntemi

C. İmmunolojik yöntemler

1. Agaroz Jel Elektroforezi
 - DNA fragmentasyonu
2. Western Blotting
 - Substrat kırılmaları
 - Aktif kaspaz'ın belirlenmesi
 - Sitokrom c salıverilmesi
3. Flow Sitometri

D. Moleküler biyoloji yöntemleri

1. ELISA
 - DNA Fragmentasyonu
 - M30 Düzeyi
2. Fluorimetrik Yöntem
 - Kaspaz Aktivasyonu

E. Moleküler biyoloji yöntemleri

1. DNA Microarrays

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu yüksek lisans tezi Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından desteklenmiştir. (BAP-2015/1-56M). Bu tez çalışması Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Üniversite Sanayi Kamu İşbirliği Geliştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÜSKİM) Sağlık Bilimleri Laboratuvarı ve Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1 Kimyasallar

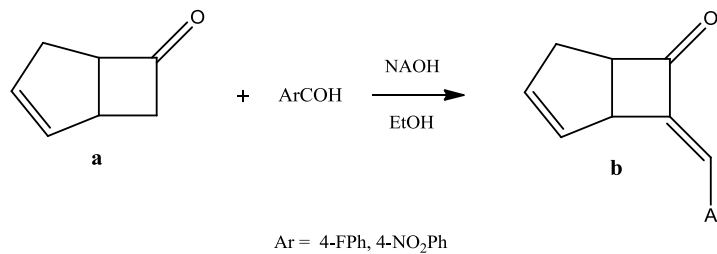
Sentez	Saflaştırma	Biyokimya	Hücre Kültürü
(±)-cis-Bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one 4-Nitrobenzaldehyde 4-Fluorobenzaldehyde 2-Amino benzotiyazol <i>p</i> -TsOH NaOH sodyum sülfat	Silika(0,063-0,200 mm) Eter Hegzan Etanol Kloroform	CAPS(3(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit) EDTA Ksantin INT Ksantin oksidaz Na ₂ CO ₃ CuSO ₄ Na-K NaOH Folin Cioacaltea Tris-HCl Glutasyon Glutasyon redüktaz NADPH t-butil hidroperoksit Sodyum Dodesil Sülfat Tiyobarbitürik asit n-Butanol/Piridin Asetik Asit Nitrik oksit ELISA kiti Hidrojen Peroksit ELISA kiti TotalAntioksidan Kapasite(TAS) ELISA kiti	PANC-1 Gemcitabin Tripsin-EDTA Amfoterisin B solüsyonu FBS DMEM L-glutamin DMEM Fenol Red'siz PBS L-glutamin DMSO Cell Death Detection ELISA kit Cell Proliferation Kit(XTT)

3.2 Cihazlar

- 1H-NMR Bruker 400 MHz Spektrometre
- 13C-NMR Bruker 100 MHz Spektrometre
- IR Jasco 430 FT/IR Spektrometre
- UV Spektrofotometresi (SHIMADZU TCC-240A)
- Su Banyosu (Memmert)
- pH Metre (Hanna Instruments HI 255 combine meter)
- Otomatik Hücre Sayım Cihazı (NanoEntek EVE)
- ELİSA (Thermo Scientific Multiskan FC microplate reader)
- İnkubator CO₂ Water-jacketed (Nüve)
- Laminer Flow (Nüve)
- Derin Dondurucu -80 °C
- Santrifüj (Hettich EBA21)
- Mikroskop
- Döner Buharlaştırıcı
- Manyetik Karıştırıcı

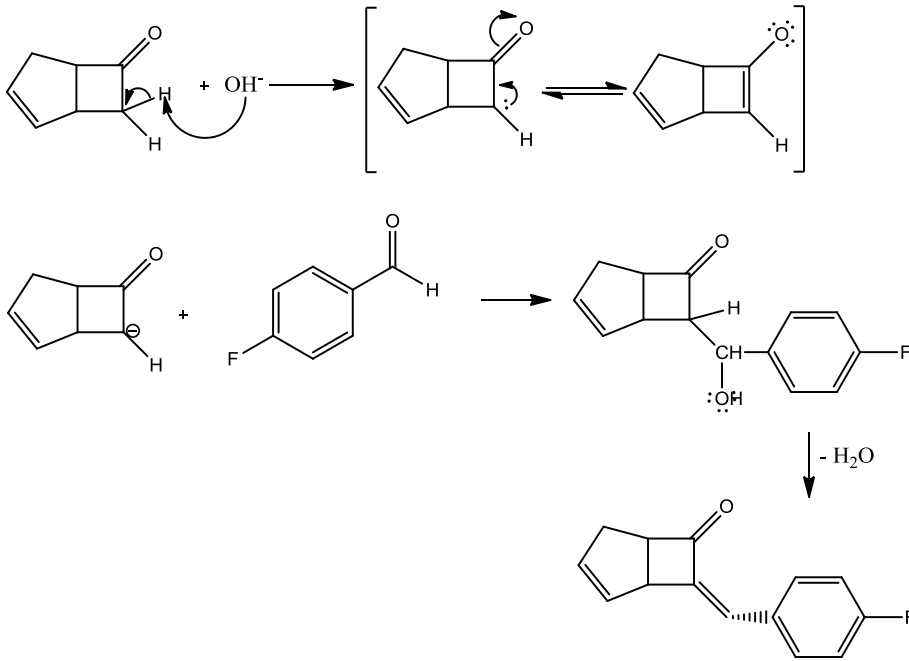
3.3 (E/Z)-7-Arilidenbisiklo[3.2.0]hepta-6-on Sentezi

Keton türevleri, bazık ortamda ilgili aldehit türevleri ile muamele edilerek aldol kondenzasyonu ile α,β -doymamış karbonil bileşikler elde edilmektedir. Oluşan bu bileşiklere kalkon da denmektedir. Daha önce bu kalkon bileşiklerinden bir kısmı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Organik Kimya Laboratuvarında sentezlenmiştir (69).



Şekil 17

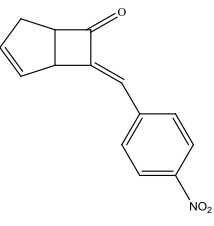
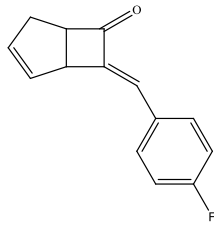
Bu çalışmada 5'li doymamış keton bileşiği olan bisiklo[3.2.0]hepta-6-on (Şekil 17.a) ile (E/Z)-7-arilidenbisiklo[3.2.0]hepta-6-on (Şekil 17.b) türevleri sentezlendi. Ekvivalent miktarda keton ve aldehit etanolde çözülerek katalitik miktarda NaOH varlığında 4,5 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra kloroform ilave edilerek ekstraksiyon yapıldı. Organik faz Na_2SO_4 üzerinden kurutularak çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı. Sentezlenen bileşiklerin yapıları Fourier dönüşüm infrared (FT-IR), $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve elementel analizle aydınlatıldı. Bu reaksiyonun sentez mekanizması Şekil 18'deki gibidir.



Şekil 18: α,β-Doymamış karbonil bileşiği sentez mekanizması

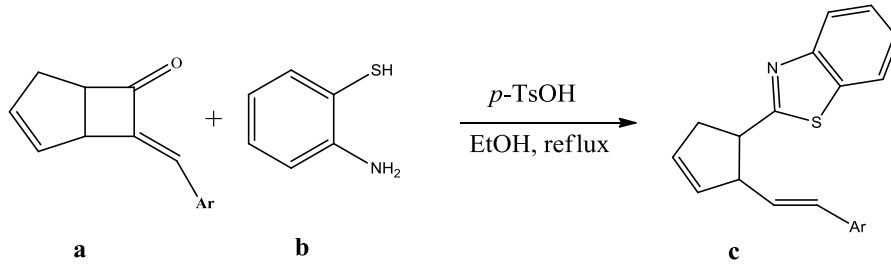
Bu basamakta 4- floro benzaldehit ve 4- nitro benzaldehit olmak üzere iki farklı aldehit türevi kullanıldı. Bu nedenle nitrolu ve florlu kalkon türevleri elde edildi. Oluşan ürünler ve verimler Tablo 6'da görülmektedir.

Tablo 6. Sentezlenen α,β -doymamış karbonil bileşikleri

Ar	Ürün	Verim
4-NO ₂ Ph		%87
4-FPh		%82

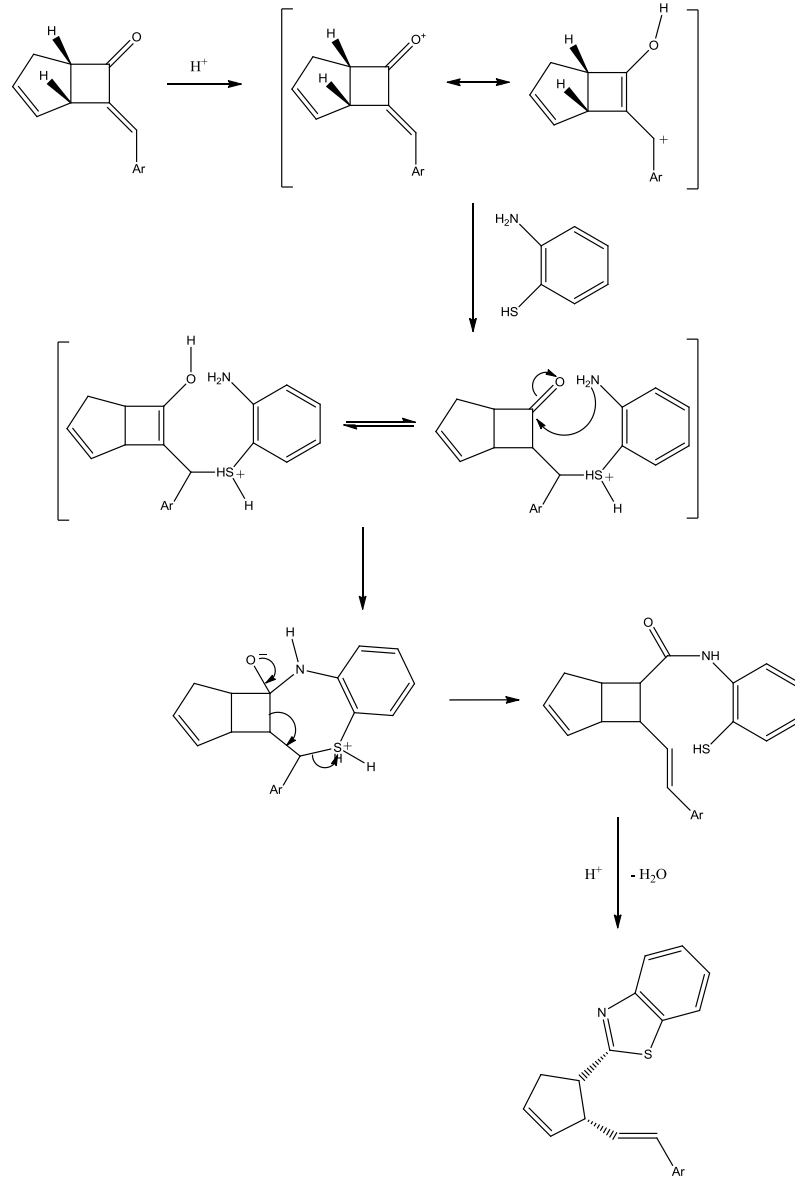
3.4 Benzotiyazol Türevlerinin Sentezi

α,β -Doymamış karbonil bileşiklerinin sentezlenmesinin ardından ikinci basamak olan benzotiyazol türevlerinin sentezine geçildi (Şekil 19).



Şekil 19

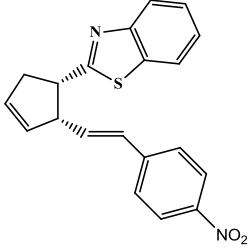
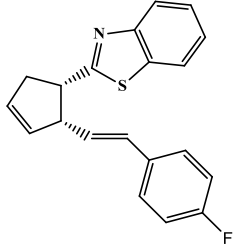
Eş molar miktarlarda alınan α,β -Doymamış karbonil bileşiği (Şekil 19.a), 2-aminotiyofenol (Şekil 19.b) ve katalitik miktarda alınan para-toluensülfonik asit, etanol içerisinde çözüldükten sonra 10 saat reflüks edildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışım 2x20 mL kloroform ile ekstrakte edilip Na₂SO₄ ile kurutuldu ve çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı. Bu reaksiyonun sentez mekanizması Şekil 20'deki gibidir.



Şekil 20: Benzotiyazol türevlerinin sentezi

Elde edilen ham ürünler, 19:1 hekzan/etil asetat ile silika jel kolon'dan yürütülerek benzotiyazol türevleri (Tablo 7) saflaştırıldı.

Tablo 7. Sentezlenen benzotiyazol türevleri

Ar	Ürün	Verim
4-NO ₂ Ph		%82
4-FPh		%80

3.5 PANC-1 Adenokarsinom Hücre Hattı

Bu çalışmada epitel kökenli pankreas kanser hücre hattı olan PANC-1adenokarsinoma hücre hattı kullanıldı. Hücre hattı ATCC (American Type Culture Collection)'den temin edildi. Aşağıda temin edilecek olan hücre hattına dair genel özellikler bulunmaktadır.

Kaynağı: 56 yaşındaki yetişkin erkekte elde edilen pankreas karsinoma primer kültürü. Özellikleri: Hücrelerin kromozom çalışmaları hipertriploid insan hücre hattı olduğunu göstermiştir. Hücreler nemli atmosferde %5 CO₂ basıncı altında 37°C de inkübe edilir. Kültür ortamında tek tabakalı, adheran, epitel benzeri çoklu hücre öbekleri şeklinde çoğalırlar ve 52 saatte dublike olurlar. Hücrelerde büyüme ortamı olarak 4 mM L-glutamin, 4500 mg/L glukoz, 1 mM sodyum piruvat ve 1500 mg/L sodyum bikarbonat Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kullanıldı.

3.5.1 Hücrelerin dondurulması, çözülmesi ve pasajlanması

Hücre kültürü; virüslerin incelenmesi, aşı geliştirilmesi, organ (doku) yenilenme, gen tedavilerinin geliştirilmesi, kanserlere karşı ilaç geliştirme ve akla gelebilecek her türlü canlı ve ona ait biyokimyasal moleküllerin incelenmesi için kullanılmaktadır. Bu amaçla canlı hücrelerin ait oldukları organizma dışında laboratuvar ortamında (in vitro) kültüre edilmesi gerekmektedir. Hücrelerin kültüre edilmesi, genel olarak hücrelerin dondurulması, çözülmesi ve pasajlanması işlemlerini kapsamaktadır.

3.5.1.1 Hücrelerin çözülmesi

Daha önceden primer doku kültürü yapılan hücreler soğuk zincirle donmuş halde gelmektedir. Donmuş olarak saklanmış hücrelerden araştırma ya da üretim amacıyla yeni kültürler hazırlanabilmektedir. Bu işlem esnasında ekstrasellüler ortam intrasellüler ortamdaki hücreler önce çözülür ve ani olarak serbest sıvı haline gelmektedir ve sonuçta hipotonik hücreler şişerek patlamaktadır. Bu olumsuzlukların önüne geçebilmek için çözülme işlemi olabildiğince hızlı yapılmalıdır.

Ayrıca soğuk zincirle gelen hücreler veya - 80 °C den çıkarılan hücreler DMSO ile dondurulmuş olarak bulunur. Hücrelerin çözülmesi aşamasındaki temel hedef hücreleri DMSO dan uzaklaştırıp kendi besiyeri ortamına aktarmaktır.

DeneySEL aşamada hücrelerin çözülmesi için uygulanan işlemin prosedürü aşağıdaki gibidir.

- Çözülürlecek olan hücreler -80°C derin dondurucudan çıkarılır çıkarılmaz 37 °Clik su banyosunda çözülene kadar (yaklaşık 1-2 dk) bekletildi.
- Su banyosundan dondurma tüpü alınıp çevresi temiz kağıt havlu ile kurulandı ve çevresine alkol sıkıldı.
- Bir tüp içine 7-9 ml yüksek glukoz içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) konuldu.
- Dondurma tüpü içindeki hücre karışımı sıvı çekilip tüpe konuldu ve pipetaj yapıp 500xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası tüpün üstündeki supernatant kısım pastör pipeti ile çekilerek atıldı.

- Tüpün dibinde kalan pelete 2 ml besiyeri eklenerek hassas bir şekilde pipetaj yapıldı.
- Tüpte oluşan hücre - besiyeri karışımı pipet ile çekilerek filitre kapaklı 25cm² lik kültür kabına alındı ve üzerine 3 ml kadar besiyeri eklendi (toplamda 5 ml ekildi).
- Mikroskopta hücreler kontrol edilip kültür kabı 37°C ve %5'lik CO₂ inkübatörüne konuldu.
- Hücreler yaklaşık 5 gün içerisinde 25cm² lik flaskları tamamen kapladı. Bu süre içerisinde haftada 2-3 kez medyum değişimi yapıldı.
- Daha sonra hücreler filitre kapaklı 75cm² lik flasklara alındı. 25cm² lik kültür kabı için 5 ml, 75cm² lik kültür kabı için 15 ml katkılı DMEM kullanıldı.
-

3.5.1.2 Hücrelerin pasajlanması

Hücreler sıkışık (konfluent) duruma gelince hem besi ortamı hücreler için yetersiz hale gelir, hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalmaları durur. Bu nedenle hücrelerin pasajlanmaları gerekmektedir.

DeneySEL aşamada hücrelerin pasajlanması için uygulanan işlemin prosedürü aşağıdaki gibidir.

- Etüvdeki kültür kabı mikroskopta incelenerek hücrelerin canlılığı ve pasajlama zamanının gelip gelmediği değerlendirildi.
- Hücre kabındaki besiyeri bir beher içine döküldü. Bekletmeden kültür kabındaki hücreler 2 ml PBS ile yıkandı. PBS de dökülerek uzaklaştırıldı.
- Başka bir pipet ile 1 ml Tripsin kültür kabına eklendi.
- Hücreler 37°C'de inkübatörde 10 dakika bekletildi.
- Etüvden alınan hücrelerin tripsin ile muamele sonrası kalkıp kalkmadığı mikroskopta değerlendirildi ve hücreler kalkmamış ise bir süre daha inkübe edildi.
- İnkübatürden alınan kültür kabına 20 ml DMEM eklendi ve bu karışım 50 ml'lik steril bir tüpe aktarıldı.
- Pastör pipeti ile hassas bir şekilde pipetaj yapıldı.

- 20 ml'lik hücre-besiyeri karışımının 10 ml si döküldü. Yerine 30 ml DMEM konularak seyreltilti. Tüpte en son 40 ml hücre-besiyeri karışımı elde edildi.
- Pastör pipeti ile hassas bir şekilde pipetaj yapıldı.
- Hücreler ve besiyerinden oluşan karışım her birinde yaklaşık 20 ml olacak şekilde 2 yeni kültür kabına ekildi.
- Kültür kabı üzerine hücre tipi, işlemin tarihi, kaçınıcı pasaj olduğu ve kullanılan besiyeri not edildi.
- Kültür kabına ekilen hücreler mikroskopta incelendi.
- Kültür kabı 37°C ve %5'lik CO₂ inkübatörüne yerleştirildi.

3.5.1.3 Hücrelerin dondurulması

In vitro kültürasyonlarda değerli hücre hatlarının korunabilmesi, pasaj sayısının ilerlemesine bağlı fenotipik ve genotipik değişimlerin önlenmesi; ayrıca bu çalışmalar sırasında güvenli olarak geriye dönebilme opsiyonunun sağlanabilmesi amacıyla hücre hatlarının kısa veya uzun süreli stoklanması gerekmektedir. Hücrelerin saklanabilmesi için en uygun yöntem -86°C veya -130°C'nin altında dondurma işlemidir. Dondurma işlemi sırasında hücrenin organellerinin korunması için dimetilsülfoksit (DMSO) ya da gliserol gibi kryoprotektan ajanlar kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan ajanlar suda eriyebilen maddelerdir; donma sürecinde oluşan buz kristali miktarını ve elektrolit konsantrasyonundaki artışı kontrol ederek optimal değerlerin üzerine çıkmasını engellemektedirler.

Deneysel aşamada hücrelerin dondurulması için uygulanan işlemin prosedürü aşağıdaki gibidir.

- Etüvdeki kültür kabı mikroskopta incelenerek hücrelerin canlılığı ve pasajlama zamanının gelip gelmediği değerlendirildi.
- Hücre kabındaki besiyeri bir beher içine döküldü. Bekletmeden kültür kabındaki hücreler 2 ml PBS ile yıkandı. PBS de dökülerek uzaklaştırıldı.
- Başka bir pipet ile 1 ml Tripsin kültür kabına eklendi.
- Hücreler 37°C'de inkübatörde 10 dakika bekletildi.
- Etüvden alınan hücrelerin tripsin ile muamele sonrası kalkıp kalkmadığı mikroskopta değerlendirildi ve hücreler kalkmamış ise bir süre daha inkübe edildi.

- Pipet yardımıyla hücreler ve tripsin bir tüpe alındı, üzerine bir miktar besiyeri eklenip 3500rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Bu sırada donmaya dayanıklı tüp içine %95 besiyeri, %5 oranında DMSO olacak şekilde toplam 1 ml karışım hazırlanıp buz üzerinde bekletildi.
- Santrifüj sonrası tüpün dibinde oluşan hücre pelletinin üstünde oluşan supernatant kısım pastör pipeti ile çekilerek atıldı.
- Dondurma tüpünde hazırlanan solüsyonla hücre pelleti 1-2 kez pipetaj yapıldı. Hücrelere zarar verilmeden hepsi çekildi ve dondurma tüpüne aktarıldı.
- Dondurma tüpü üzerine hücre tipi, işlemin tarihi, kaç kez pasajlandığı ve kullanılan besiyeri yazıldı.
- Önce +4°C'de 3-4 saat bekletildi. Daha sonra -20°C'de 1 gece (8-10 saat) bekletilip aşamalı olarak -80°C'e alındı.

3.5.2 Hücrelerin sayılması

Yapılacak tüm denemelerde belirli sayıda hücrenin flasklara ekilmesi için hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Yöntemin prensibi, membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin Tripan mavisi boyasını hücre içine almaları ve ölü hücre olarak değerlendirilmeleri veya membran bütünlüğünü koruyan hücrelerin ise membrandan boya geçişine izin vermemelerine dayanmaktadır (70).

DeneySEL aşamada hücrelerin dondurulması için uygulanan işlemin prosedürü aşağıdaki gibidir.

- Otomatik Hücre Sayım Cihazı (NanoEntek EVE) cihazı açılarak cihazın ön hazırlığı yapıldı.
- Kültür kabını kaplayan hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulandı.
- Tripsinizasyon işleminden sonra hücreler 5 dakika 3500 rpm'de yapılan santrifügasyon ile pellet olarak elde edildi.
- Elde edilen pelletin üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 1 ml besiyeri konulup pipetaj yapıldı.
- Resüspanse edilen hücrelerden 20 µl alınarak 0.2 ml'lik eppendorf içerisine aktarıldı. Bu hücrelerin üzerine 1:1 oranında steril distile su ile dilüe edilmiş 20 µl Tripan Mavisi (NanoEntek EVE) eklendi.

- Elde edilen karışım pipetaj işlemi ile homojen hale getirildi ve cihazın özel lamının üzerindeki hazneye bu karışımdan 20-40 µl eklendi.
- Cihazın özel lamı NanoEntek EVE hücre sayım cihazının haznesine yerleştirildi (Şekil 21).
- Yazılım üzerinden ölçüm komutu verilerek mavi boyayı alan hücreler ölü, boyayı dışlayan hücreler canlı olarak değerlendirme prensibiyle sayım gerçekleştirildi.



Şekil 21: NanoEntek EVE hücre sayım cihazı ve uygulaması

3.5.3 Benzotiyazol türevi bileşiklerin ve gemcitabine solüsyonlarının hazırlanması

Kemoterapide pankreas kanseri tedavisinde kullanılan Gemstabin, denemelerde pozitif kontrol olarak kullanıldı. Gemstabin hidroklorid (Sigma) ana stok çözeltisinin konsantrasyonu 10^{-1} M olacak şekilde hesaplandı ve tartım işlemleri yapıldı. Çözücü olarak FBS'si azaltılmış (%1) DMEM kullanıldı. Ana stok karışımının konsantrasyonu öncelikle 10^{-4} M'a seyreltildi (10^{-4} M=100 µM) ve bu karışımdan 100, 75, 50, 25, 5µM'lık farklı konsantrasyonlarda karışımlar hazırlanarak dozlama yapıldı. Böylece ilacın bu konsantrasyonlarda pankreas kanser hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Saf olarak sentezlenen benzotiyazol türevi bileşiklerin stok çözeltisi de aynı pozitif kontrol grubu gibi 10^{-1} M konsantrasyonunda hazırlandı. Çözücü olarak FBS'si azaltılmış (%1) DMEM kullanıldı. Daha sonra ana stok karışımı 10^{-4} M'a seyreltilip 100, 75, 50, 25, 5µM'lık farklı konsantrasyonlarda dozlama yapıldı. Böylelikle bu bileşiklerin pankreas

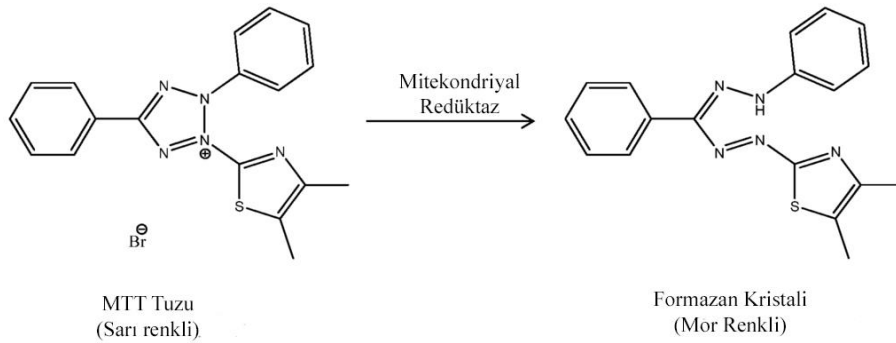
kanseri hücre hatları üzerinde hangi konsantrasyonda en iyi etki gösterdiğini incelemeyi ve aynı konsantrasyonlardaki Gemstbin ile kıyaslayıp hücreler üzerindeki farklı etkilerini ortaya çıkarmayı amaçladık.

3.5.4 MTT canlılık testi uygulaması

Farklı konsantrasyonlardaki Benzotiyazol sentez bileşiklerinin ve pozitif kontrol olarak kullanılan Gemstabinin aynı inkübasyon sürelerinde PANC-1 adenokarsinom hücreleri üzerine uygulandığında hücre canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.5.4.1 Yöntemin prensibi

Yöntem metabolik aktif hücrelerde mitokondriyel süksinat dehidrogenaz aktivitesi sonucunda sarı renkli MTT tuzunun (3-[4,5-dimethylthiazol- 2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) kolorimetrik olarak tayin edilebilen, mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmesi prensibine dayanır (Şekil 22). Her bir örnekten elde edilen absorbans değerleri, örnekteki canlı hücre miktarı ile doğru orantılıdır (71).



Şekil 22

DeneySEL aşamada MTT hücre canlılığı testi için uygulanan işlemin prosedürü aşağıdaki gibidir.

- 75cm² lik flasklarda çoğaltılan PANC-1 hücreleri tripsinize edildi ve hücreler hücre sayım cihazında sayıldı.
- PANC-1 hücreleri 200µL süspansiyon içinde 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Her bir konsantrasyon dozu için 6 kuyucuğa ekim yapıldı.

- Plaklar PANC-1 hücrelerinin yapışması ve hücre sayısının dublikasyonu için 24 saat inkübatörde bekletildi.
- Kuyucuklardaki besiyerler ortamdan uzaklaştırıldı ve yerine 5, 25, 50, 75, 100µM Gemsitabin ya da Benzotiyazol sentez bileşiklerini içeren bileşik-DMEM karışımları ilave edildi. Ayrıca 0µM Gemsitabin ya da Benzotiyazol sentez bileşiklerini içeren kuyucuklar kontrol olarak değerlendirildi ve o kuyucuklardaki hücrelerin üzerine sadece deney ortamı içeren DMEM konuldu.
- Plaklar 48 saat inkübatörde bekletildi.
- 48 saat sonra MTT boyası renksiz DMEM ile çözülülüp hazırlandı. (5 mg boya için 10 ml DMEM alındı)
- Plaklar inkübatörden çıkarıldı ve içindeki besiyeri uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa 150 µL MTT çözeltisi uygulandı ve plakalar 4 saat 37 °C'de etüvde bekletildi.
- 4 saat sonunda kuyucukların dibinde siyahlaşma gözlemlendi.
- Plakanın içindeki ortam uzaklaştırıldı ve hücrelerin emdiği boyayı ortaya çıkarması için 150 µL DMSO konuldu.
- Hücrelerin koyu mor renge dönüştüğü gözlemlendi.
- Plak kuyucuklarının absorbans değerleri ELISA cihazında 492/ 540/ 620nm dalga boyuna karşı okundu.
- 0 µM konsantrasyonlu kuyucuklardan okunan absorbans değeri %100 kabul edildi ve diğer örneklerin absorbansları ile kıyaslanarak rölatif canlılık değerleri hesaplandı.

3.5.4.2 Hesaplama

Her örnek için 6 ekim yapıldı. Elde edilen altılı absorbans değerlerinin ortalaması alınarak ortalama absorbans değerleri (ABSortalama) elde edilir. Örneklerin ortalama absorbans değerleri, kontrol hücrelerinden elde edilen ortalama absorbans değerine bölünür ve böylece kontrol hücrelerine karşı rölatif absorbans oranı elde edilir. Bu oran 100 ile çarpılarak her bir örnek için yüzde canlılık değeri hesaplanır. Sonuçlar ortalama değer +/- standart sapma olarak ifade edilmektedir.

$$\text{Yüzde Canlılık} = [\text{Örnek ABSortalama} / \text{Kontrol ABSortalama}] \times 100$$

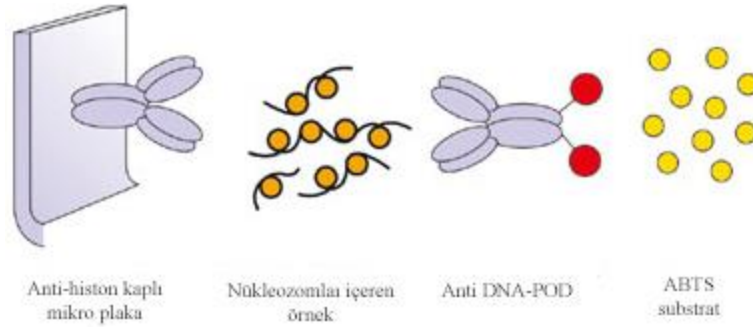
3.5.5 Cell death detection ELISAPLUS kolorimetrik apoptoz tayini (Roche)

Farklı konsantrasyonlardaki Benzotiyazol sentez bileşiklerinin PANC-1 hücrelerinde neden olduğu hücre ölüm tipinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.5.5.1 Yöntemin prensibi

CDD (Cell Death Detection ELISAPLUS) kiti hücrelerin sitoplazmik lizatlarındaki mono ve oligo-nükleozom içeriklerini karşılaştırarak örnekler arası oransal apoptoz değerlendirmesine olanak sağlar.

Kitin içeriğindeki Anti-Histon-Biyotin antikoru histon proteinleri üzerinden, apoptoz sırasında oluşan, sitoplazmadaki fragmente DNA parçalarına ve streptavidin kaplı plağa bağlanır. Böylece mono- ve oligo-nükleozomlar plak yüzeyine bağlanmış olur. Anti-DNA-Peroksidaz antikoru ise plağa bağlanan fragmente DNA'ya bağlanır (Şekil 23). ABST (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]- diammonium salt) substratı aracılığıyla Anti-DNA-Peroksidaz aktivitesi kolorimetrik olarak tayin edilebilir ve her bir örnekteki mono-, oligo-nükleozom miktarı belirlenmiş olur (47,70).



Şekil 23

3.5.5.2 Kit içeriği

- Anti-Histon-Biyotin (immünoaktif bileşeni): liyofilizat 1 ml bidistile su içerisinde 10 dakika boyunca karıştırılarak çözülür.
- Anti-DNA-POD (immünoaktif bileşeni): liyofilizat 1 ml bidistile su içerisinde 10 dakika boyunca karıştırılarak çözülür.

- Kaplama Solüsyonu: Konsantre halde bulunan 1 ml kaplama solüsyonu 9 ml bidistile su ile seyreltilir. 1 ml anti histon antibody kullanılmadan önce 9 ml kaplama solüsyonu ile seyreltilerek hazırlanır.
- Yıkama Solüsyonu: Konsantre yıkama solüsyonu 15 -25°C 'e ısıtılır ve 400 µl si 3600 µl bidistile suda seyreltilip iyice karıştırılır.
- Örnek Solüsyonu: Kullanılan hücre sistemine ve cell death'e göre işlem yapılır. Örneğin: 25 µl örnek, 225 µl inkübasyon Buffer'da seyreltilir.
- Konjüğe Solüsyonu: 1 ml anti-DNA-POD 9 ml inkübasyon solüsyonunda seyreltilir.
- ABTS Substrat Tableti: Örnek sayısına bağlı olarak 1, 2 ya da 3 tablet; 5, 10 ya da 15 mL substrat solüsyon içerisinde çözülür. Kullanmadan önce 15 -25°C'e gelmesi sağlanır.
- İnkübasyon Solüsyonu: Kullanıma hazır halde bulunur. Kullanmadan önce oda sıcaklığına gelmesi sağlanır.
- Substrat Solüsyonu: Kullanıma hazır halde bulunur. Kullanmadan önce oda sıcaklığına gelmesi sağlanır.

3.5.5.3 Deney prosedürü

Örneğin Hazırlanması:

- 75cm² lik flasklarda çoğaltılan PANC-1 hücreleri tripsinize edildi ve hücreler hücre sayım cihazında sayıldı.
- PANC-1 hücreleri 2 ml DMEM içinde 6 kuyucuklu plaklara ekildi. Her bir konsantrasyon dozu için 6 kuyucuğa ekim yapıldı.
- Plaklar PANC-1 hücrelerinin yapışması ve hücre sayısının dublikasyonu için 24 saat inkübatörde bekletildi. Kuyucuklardaki besiyerler ortamdan uzaklaştırıldı ve yerine 5, 25, 50, 75, 100µM Gemsitabin ya da Benzotiyazol sentez bileşiklerini içeren bileşik-DMEM karışımları ilave edildi. Ayrıca 0µM Gemsitabin ya da Benzotiyazol sentez bileşiklerini içeren kuyucuklar kontrol olarak değerlendirildi ve o kuyucuklardaki hücrelerin üzerine sadece deney ortamı içeren DMEM konuldu.
- Plaklar 48 saat inkübatörde bekletildi.
- Kuyucuklardan 1 ml besiyeri çekilip uzaklaştırıldı. Kalan medyum ve hücre kazınarak bir ependorfa aktarıldı.

- Kuyucuklarda hücre kalması ihtimaline karşı kuyucuklara 100µl renksiz medyum konuldu. Bu karışım da ependorfa aktarıldı.
- Ependorflar 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Kalan çökeltinin içine 600 µl renksiz medyum konuldu ve çokça pipetaj yapıldı. Böylece hücrelerin medyuma eşit bir şekilde dağılması sağlandı.
- Bu karışımın 100 µl'si cell death için ayrıldı. Bir ependorfa aktarıldı.
- Mikrosantrifüjde hücreler 5 dk 1500x g'de santrifüj edildi.
- Hücre peletine 500 µl inkübasyon Buffer eklenip pelet kaldırıldı. İyice pipetaj yapıldı. (her tüp için 1X10⁵ hücre/ml)
- Örnek yaklaşık 30 dk 15 -25°C de inkübe edildi.(lysis)
- Lizat 10 dk 20.000 g de santrifüj edildi.
- Süpernatantın 400 µl si dikkatlice uzaklaştırıldı. Süpernetan kısım stoplazmik fraksiyonu içermektedir.(Pelet kısmı yüksek molekül ağırlıklı parçalanmamış DNA moleküllerini içerdiği için bu basamakta pelet kısmının çalkalanmamasına dikkat edilmeli)

Kit Protokolü:

1. 96'lık mikro plakaya 100 µl kaplama solüsyonu pipetlendi ve sıkıca yapıştırıcı kağıt ile kapatıldı.
2. 15 -25°C'de 1 saat inkübe edildi. Bu sırada yıkama solüsyonu hazırlandı ve oda ısısında tutuldu.
3. Kaplama solüsyonunu vurarak ve emdirerek uzaklaştırıldı.
4. Her bir kuyucuğa 200 µl inkübasyon buffer pipetlendi. Yapıştırıcı kağıt ile kapatıldı ve 15 -25°C'de 30 dakika inkübe edildi.
5. Solüsyonu vurarak ve emdirerek uzaklaştırıldı. 250 - 300 µl yıkama solüsyonu ile her kuyucuk 3 kez durulandı ve yıkama solüsyonunu dikkatlice uzaklaştırıldı.
6. Her bir kuyucuğa 100 µl örnek pipetlendi.
7. Deneyde kör belirlemek amacıyla 2 kuyucuğa 100 µl inkübasyon buffer'dan eklendi. Yapıştırıcı kağıt ile kapatıldı.
8. 15 -25°C'de 90 dakika inkübe edildi.

9. Yıkama işleminden hemen önce Konjügasyon solüsyonu hazırlandı ve yıkama esnasında oda ısısına gelmesi sağlandı. Solüsyon vurarak ve emdirerek uzaklaştırıldı.
10. 250 - 300 µl yıkama solüsyonu ile her kuyucuğu 3 kez durulandı ve yıkama solüsyonu dikkatlice uzaklaştırıldı.
11. Kör kuyucukları hariç her kuyucuğa 100 µl Konjügasyon solüsyonundan pipetlendi. Yapıştırıcı kağıt ile kapatıldı. 15 -25°C’de 90 dakika inkübe edildi.
12. Yıkama işleminden hemen önce Substrat solüsyonunu hazırlandı ve yıkama esnasında oda ısısına gelmesi için bekletildi. Solüsyon vurarak ve emdirerek sertçe uzaklaştırıldı.
13. 250 - 300 µl yıkama solüsyonu ile her kuyucuğu 3 kez durulandı ve yıkama solüsyonu dikkatlice uzaklaştırıldı.
14. Her bir kuyucuğa 100 µl Substrat solüsyonunu pipetlendi.
15. Renk değişimi gözlenene kadar 250 rpm plate shaker’da inkübe edildi. (Yaklaşık 10-20 dakika)
16. 405 nm’de köre karşı absorbans değerleri okundu.

3.5.6 Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivite tayini

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit ve moleküller oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz (XO) kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (p-iyodonitrotetrazolium viyole: INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin (OD) okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırarak formazan reaksiyonunu inhibe eder. Sonuçta oluşan kırmızı rengin OD'si SOD yokluğunda oluşan renge göre azalır. Bu aradaki farkın belirlenmesiyle SOD aktivitesi ölçülür.

3.5.6.1 Standart eğrinin çizimi

Liofilize olarak hazırlanmış SOD standardı 10 ml bidistile su ile sulandırılır. Standart eğri çiziminde kullanılacak olan diğer SOD derişimleri fosfat tamponuyla aşağıdaki tabloda verildiği şekilde hazırlanır.

Tablo 8. SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Kullanılacak Standartlar	Standart Solüsyonun Hacmi	0.01 M Fosfat Tamponunun Hacmi	SOD Derişimi (Ü/ml)
S5	6 ml S6	5 ml	2.8
S4	5 ml S5	5 ml	1.4
S3	5 ml S4	5 ml	0.7
S2	3 ml S3	6 ml	0.23

S1: K r (fosfat tamponu)

Süperoksit dismutaz aktivite tayini için, örnek olarak hücrelerden hazırlanan süpernatant %30 ile %70 arasında % inhibisyon aralığı olacak Şekilde 0,1 M fosfat tamponu ile sulandırılarak aktivite tayini yapılır.

Tablo 9. SOD aktivite tayini için kuvars k vetlerinin hazırlanışı

	K�r (�l)	Standart (�l)	�rnek(�l)
Numune	-	25	25
0.01 M Fosfat Tamponu	25	-	-
Substrat Karışımı	850	850	850
Küvetler iyice karıştırılır			
Ksantin oksidaz	125	125	125

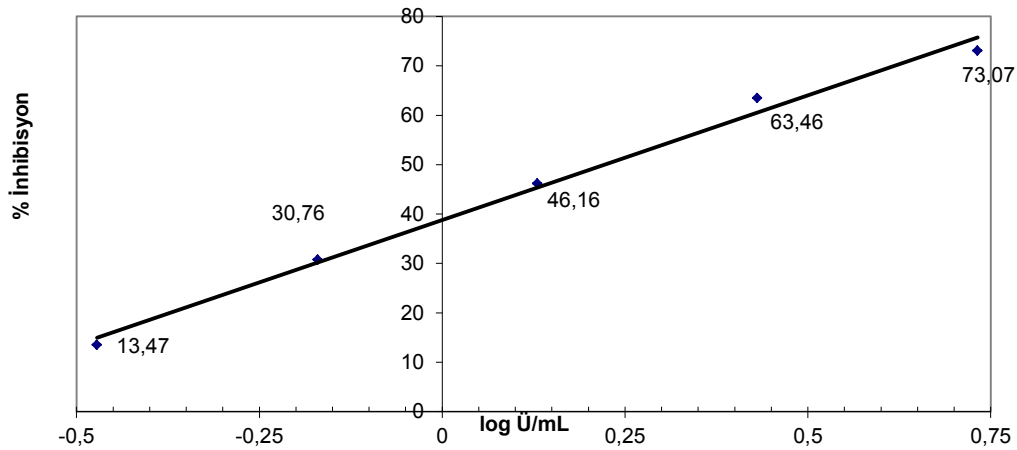
Tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra çalışma k r n n ve standardın 37 C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı 3 dakika boyunca kinetik okuması yapılıp ΔOD 'si okunur.

3.5.6.2 Hesaplama

Çalışma körü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edilir ve değeri %100 olarak alınır. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait çalışma körüyle oranlanarak 100'den çıkarılması sonucu hesaplanır.

$$\% \text{ inhibisyon standart} = 100 - \frac{\Delta A \backslash \text{dak standart} \times 100}{\Delta A \text{ çalışma körü}}$$

Hesaplama yapıldıktan sonra x yatay eksenine SOD derişimlerinin (Ü/ml) logaritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhisyon değeri yazdırılarak standart eğri elde edilir SOD standart eğrisi verilmiştir (Şekil 24).



Şekil 24. Süperoksit dismutaz standart eğrisi

Örneğe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri standart eğri kullanarak bulunur. Ü/ml biriminden ölçülen SOD spesifik aktivitesi Ü/mg protein birimlerinden verilmiştir.

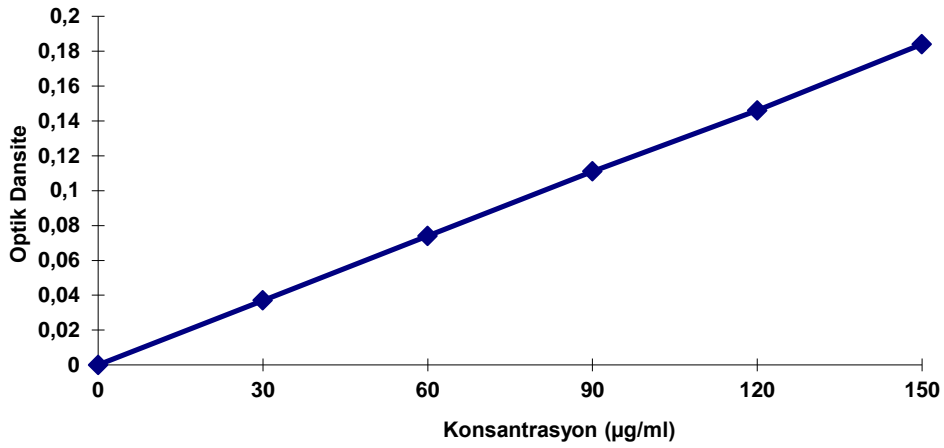
$$\text{SOD Spesifik Aktivitesi (Ü/mg protein)} = \frac{\text{SOD Değeri (Ü/ml)}}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

3.5.7 Protein düzeyi tayini

Bu metotta proteinlerin içerdiği tirozin ve triptofan rezidülerinin fosfotungstik-fosfomolibdik asit ile verdiği renk reaksiyonunun 750 nm'deki absorbans ölçümüne dayanır.

3.5.7.1 Standart eğri çizimi

Stok standart için 0,3 g/dl bovin albumin hazırlanır. Hazırlanan stok standarttan 5 ml alınıp 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamamlandığında 150 µg'lık konsantrasyon elde edilir. Bundan seri sulandırma ile 150, 120, 90, 60, 30 µg/ml'lik konsantrasyonlar elde edilerek 750 nm'de verdikleri absorbanlar kaydedilir. Bu verilere göre konsantrasyon-absorbans eğrisi çizilir ve her numune ölçümünde standart eğri tekrarlanır.



Şekil 25. Protein standart eğrisi

3.5.7.2 Örnek çalışması

PANC-1 hücrelerinden hazırlanan süpernatantta protein tayini için, süpernatant 1: 50 oranında serum fizyolojik ile sulandırılır ve protein tayini yapılır. Bunun için üç tüp alınır ve çözeltiler aşağıdaki şekilde konulur.

Tablo 10. Protein tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Serum fizyolojik	0.3	-	-
Standart	-	0.3	-
Süpernatant	-	-	0.3
C çözeltisi	3	3	3
Oda ısısında 15 dakika bekletilir			
D çözeltisi	0.3	0.3	0.3

Oda ısısında 30 dakika bekletilir, absorbans 750 nm'de okunur.

3.5.7.3 Hesaplama

Örneğin absorbansı standartın absorbansı ile karşılaştırılarak veya doğrudan standart eğriden değerlendirilir ve dilüsyon katsayısı ile çarpılarak sonuç verilir.

3.5.8 Malondialdehit (MDA) düzeyinin tayini

Aerobik şartlarda pH 3.4'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile örneğin 90–95 °C'de inkübasyonu sonucu oluşan lipit peroksidasyonun sekonder ürünü olan MDA'nın TBA ile pembe renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Oluşan renk şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır; 532 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

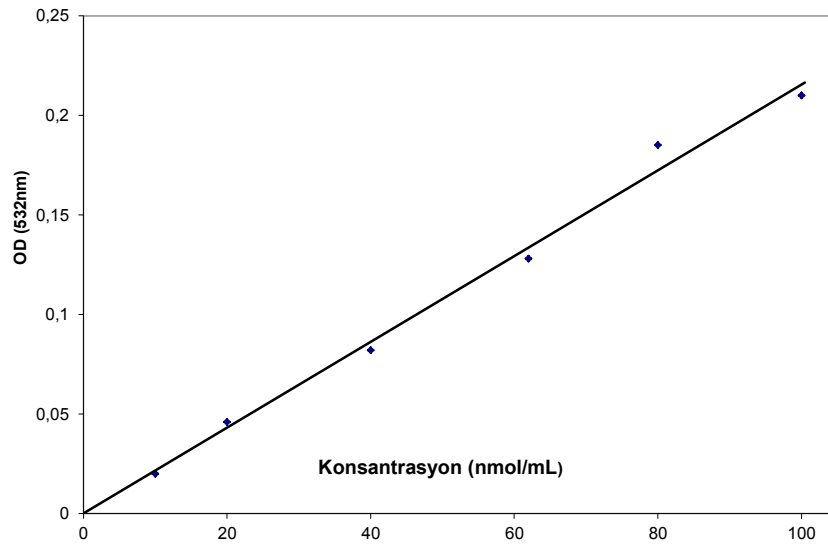
3.5.8.1 Standart eğri çizimi

Stok standarttan 6,6 µl alınıp 100 ml'ye saf su ile tamamlanarak günlük standart hazırlanır. 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/ml konsantrasyonunda çalışma standartları hazırlanır. Ayıraçlar tüplere aşağıda belirtildiği şekilde ilave edilir.

Tablo 11.MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp No.	0	1	2	3	4	5	6
Konsantrasyon(nmol/ml)	0	100	0	0	0	0	0
Standart (ml)	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
%8.1 SDS (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
%20 HAc (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
%0.8 TBA (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Saf su (ml)	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
95 °C'de 30 dakika inkübe edilir, soğutulur							
Saf su (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
nBu/Pri (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

n-butanol/pridin ilavesinden sonra vorteks edilir. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üsteki organik kısım alınıp 532 nm'de absorbans okunur. Standart eğri grafiği çizilir. Şekil 26'de MDA standart eğrisi verilmiştir.



Şekil 26.Malondialdehit standart eğrisi

3.5.8.2 Örnek çalışması

Örnek çalışması için yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanan belirli hacimde örnek alınıp MDA tayini yapılır. Örnek MDA tayini için aşağıda Tablo 12'de belirtildiği gibi tüplere ayıracılar konur.

Tablo 12. MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör (ml)	Std (ml)	Örnek (ml)
Std (60 nmol/ml)	-	0.1	-
Örnek	-	-	0.1
SDS	0.2	0.2	0.2
Hac	1.5	1.5	1.5
TBA	1.5	1.5	1.5
Saf su	0.8	0.7	0.7
95 °C'de 30 dakika inkübe edilir, soğutulur			
Saf su	1.0	1.0	1.0
nBu/Pi	5.0	5.0	5.0

Çözeltiler vortekslenir. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım alınarak 532 nm'de absorpsiyon okunur. Sonuç standart eğrisinden veya günlük standarttan değerlendirilir.

3.5.8.3 Hesaplama

nmol/ml biriminden ölçülen MDA düzeyi nmol/mg protein olarak verilmiştir.

$$\text{MDA Düzeyi (nmol/mg protein)} = \frac{\text{MDA Değeri (nmol/ml)}}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

3.5.9 Glutatyon Peroksidaz (GPx) aktivite tayini

GPx aktivitesi süpernatantta Beutler yöntemiyle saptanmıştır.

Tablo 13. GPx tayini için tüplerin hazırlanışı

1M Tris-HCl pH 8.0 tampon	100µl
0.1 M GSH	20µl
10 U/ml GR	100µl
2mM NADPH	100µl
Örnek	10µl
Distile su	660µl

37°C de 10 dakika inkübe edilir.

İnkübasyon sonrası örnekler 1cm kuvars küvete konur üzerine 10µl 7 mM t-butil hidroperoksit konulduktan sonra okuma başlatılır. Tepkime, 37 °C de enzim tarafından oksitlenen 1µmol NADPH'ın 340 nm dalga boyunda ışık yolu 1cm olan kuvars küvetlerde optik dansitedeki azalışı kinetik olarak 2,5 dakika süreyle okunur.

3.5.9.1 Hesaplama

$$\text{GPx Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1.0\text{ml})}{6,22 \times V_H (0,010 \text{ ml})}$$

ΔOD : Dakikadaki optik dansite değişimi

V_H : Örnek hacmi

V_T : Toplam hacim

6,22: 2mM NADPH yıkım hızının verdiği OD değeridir.

Ü/ml biriminden ölçülen GPx aktivitesi örnekte saptanan protein değerine bölünerek enzim spesifik aktivite sonucu Ü/mg protein biriminden verilir.

$$\text{GPx Spesifik Aktivitesi (Ü/mg protein)} = \frac{\text{GPx Değer (Ü/ml)}}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

3.5.10 Total Antioksidan Status (TAS) düzeyinin ölçümü

Örneklerin TAS düzeyi, Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçüldü. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS* katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalin antioksidan moleküllerin total konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edildi (72). Ölçüm işlemleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Uygulama	Reaktifler	Numune	Standart	Kör
1.Basamak	Assay Buffer	200 µl	200 µl	200 µl
	Numune (Hücre lizati)	12 µl	-	-
	Standart 1 (1 mmol trolox eq/L)	-	12 µl	-
	Standart 2 (Deiyonize H ₂ O)	-	-	12 µl
İlk absorbans için 660 nm'de başlangıç absorbanslar okundu ve değerler kaydedildi. 2. Basamaktaki işlemlere geçildi.				
2.Basamak	Renkli ABTS radikal çözeltilisi	30 µL	30 µL	30 µL
Karıştırıldı, oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İkinci absorbanslar için 660 nm'de okuma yapıldı.				

3.5.10.1 TAS sonuçlarının hesaplanması

Kit prosedüründeki işlemler yapıldıktan sonra aşağıdaki formül kullanılarak TAS için sonuçlar hesaplandı. Sonuçlar “mmol Trolox Eq/L” olarak ifade edildi.

$$\Delta A_{S1} - \Delta A_N$$

$$\text{Sonuç (mmol Trolox Eq/L)} = \frac{\Delta A_{S1} - \Delta A_N}{\Delta A_{S1} - \Delta A_{S2}}$$

$$\Delta A_{S1} - \Delta A_{S2}$$

$$\Delta A_{S1} = \text{Standart 1'in ikinci absorbansı} - \text{Standart 1'in ilk absorbansı}$$

$$\Delta A_{S2} = \text{Standart 2'nin ikinci absorbansı} - \text{Standart 2'nin ilk absorbansı}$$

$$\Delta A_N = \text{Numunenin ikinci absorbansı} - \text{Numunenin ilk absorbansı}$$

3.5.11 Total Oksidant Status (TOS) düzeyinin ölçümü

TOS ölçümü, ticari olarak üretilmiş ölçüm kiti kullanılarak gerçekleştirildi (Total Oxidant Status Assay Kit, Ürün Kodu: RL0024, Rel Assay Diagnostics® Mega Tıp Ltd., Gaziantep, Türkiye). Ölçüm işlemleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi.

Uygulama	Reaktifler	Numune	Standart	Kör
1.Basamak	Assay Buffer	200 µl	200 µl	200 µl
	Numune (Hücre lizati)	30 µl	-	-
	Dilüe standart 1 (20 µM H ₂ O ₂)	-	30 µl	-
	Standart 2 (Deiyonize H ₂ O)	-	-	30 µl
İlk absorbans için 530 nm'de başlangıç absorbanslar okundu ve değerler kaydedildi. 2. Basamaktaki işlemlere geçildi.				
2.Basamak	Prokromojen çözelti	10 µL	10 µL	10 µL
Karıştırıldı, oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İkinci absorbanslar için 530 nm'de okuma yapıldı.				

3.5.11.1 TOS sonuçlarının hesaplanması

Yukardaki tabloda belirtilen işlemler yapıldıktan sonra aşağıdaki formül kullanılarak TOS için sonuçlar hesaplandı. Sonuçlar “µmol H₂O₂ Eq/L” olarak ifade edildi.

$$\text{Sonuç (µmol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L)} = \frac{\Delta \text{AN}}{\Delta \text{AS2}} \times \text{CS2}$$

ΔAN = Numunenin ikinci absorbansı – Numunenin ilk absorbansı

ΔAS2 = Standart 2'nin ikinci absorbansı – Standart 2'nin ilk absorbansı

CS2 = Standart 2'nin konsantrasyonu (20 µmol H₂O₂ Eq/L)

3.5.12 İstatistiksel analiz

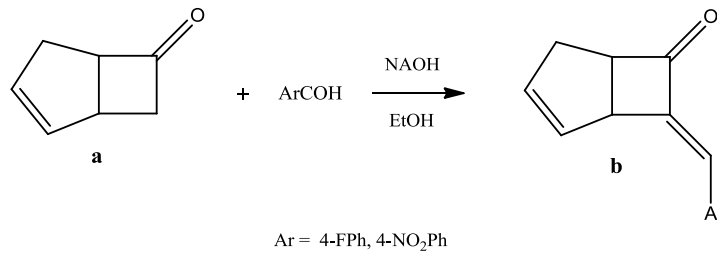
Bütün veriler ortalama ± standart sapma [mean ± standard deviation (SD)] olarak verildi. PANC-1 hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS, Windows 15.0 paket bilgisayar programı kullanılarak

istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Gruplar arası fark olup olmadığı Mann- Whitney U testi istatistiksel analizi ile değerlendirildi. Tüm istatistiki karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

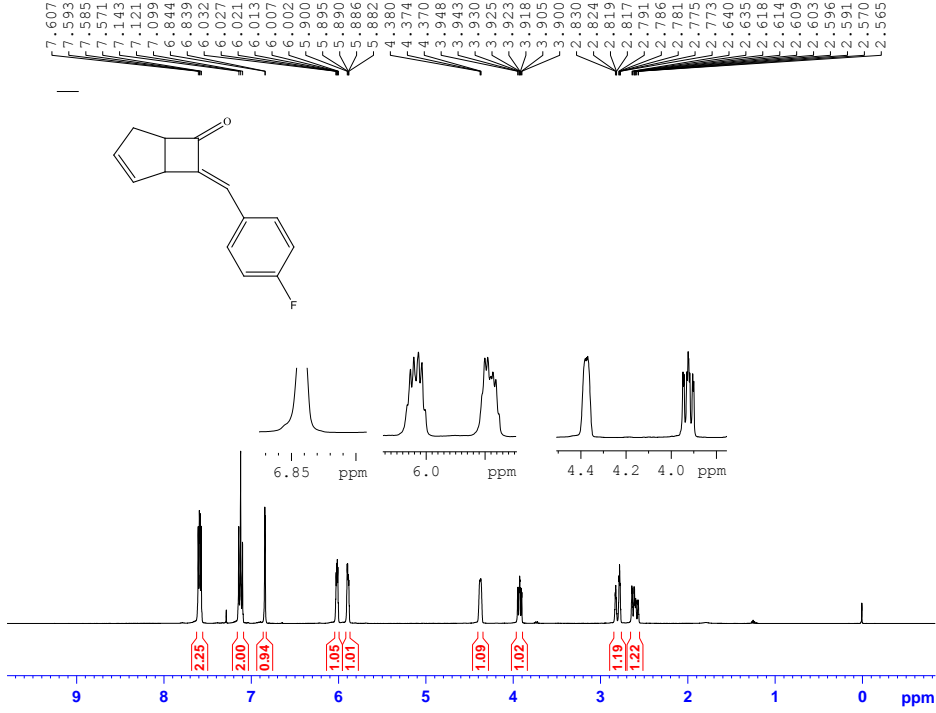
4.1 (E)-7-Arilidenbisiklo[3.2.0]hept-2-en-6-on Türevleri

Eş molar oranda keton ve ilgili benzaldehit türevleri etanolde çözülerek katalitik miktarda NaOH varlığında α,β -doymamış karbonil bileşiklerinin türevleri sentezlendi (Şekil 27). Bileşiğin 2 türevi sentezlendi. Sentezlenen α,β -doymamış karbonil bileşiklerinin analizi $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve FT-IR spektroskopisi ile gerçekleştirildi.



Şekil 27

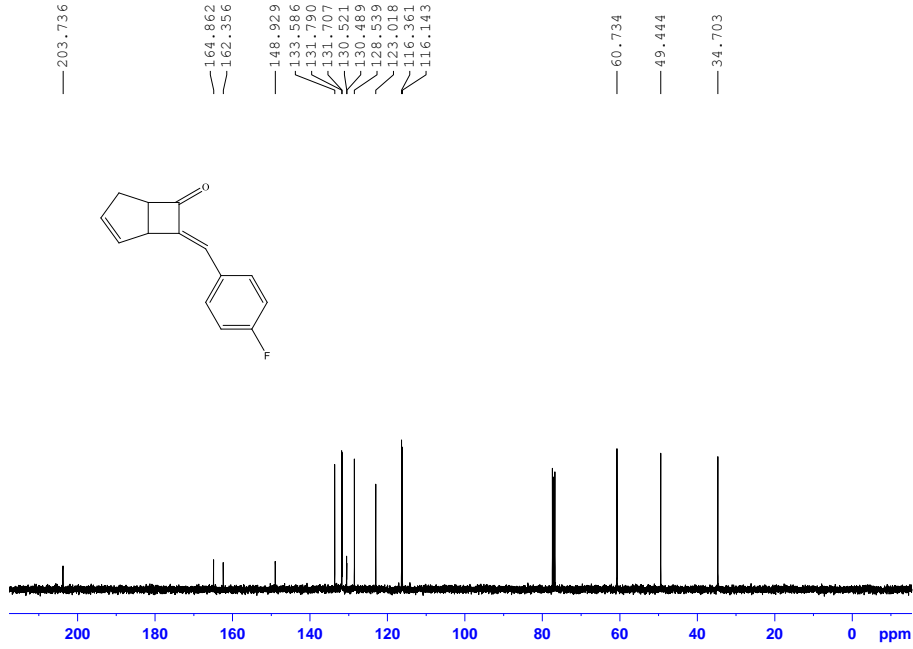
(E)-7-(4-florobenziliden)bisiklo[3.2.0]hept-2-en-6-on (Hata! Başvuru kaynağı ulunamadı.**b**) bileşiğine ait 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ spektrumu Şekil 28'de görülmektedir. Spektruma bakıldığında karbonile komşu çift bağ protonlarının $\delta = 6,85$ ppm'de dublet ($J = 2,0$ Hz) olarak rezonans verdiği gözlenmiştir. Karbonile komşu olan CH protonunun $\delta = 3,98$ ppm'de dubletin dubletin dubleti ($J = 10,0, 7,0, 1,9$ Hz) olarak ve çift bağa komşu olan CH protonu ise $\delta = 4,37$ ppm'de multipler olarak rezonans vermiştir. Beşli halkadaki çift bağ protonları sırası ile $\delta = 6,02$ ppm'de tripletin dubleti ($J = 4,5, 2,2$ Hz) olarak ve $\delta = 5,89$ ppm'de multipler olarak rezonans olmuştur. Ayrıca aromatik halkadaki 4 proton AA'BB' sistemi vermektedir. Sistemin AA' kısmı $\delta = 7,58$ ppm'de, BB' kısmı $\delta = 7,15$ ppm'de rezonans vermiştir.



Şekil 28: (E)-7-(4-fluorobenziliden)bisiklo[3.2.0]hept-2-en-6-on bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (400 MHz, CDCl_3)

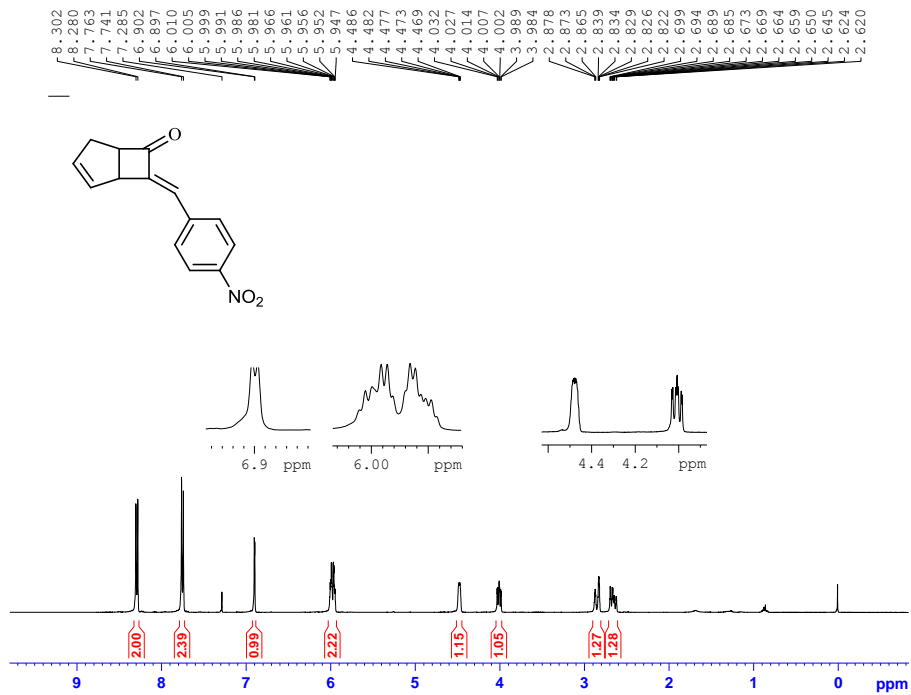
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.59 (dd, J = 8.8, 5.6 Hz, 2H), 7.12 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 6.84 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.03-6.00 (m, 1H), 5.90-5.88 (m, 1H), 4.38-4.37 (m, 1H), 3.95-3.92 (m, 1H), 2.83-2.77 (dm, J = 15.2 Hz, 1H), 2.64-2.56 (ddd, J = 15.2, 8.8, 2.9 Hz, 1H).

(E)-7-(4-fluorobenziliden)bisiklo[3.2.0]hept-2-en-6-on bileşiğine 100 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu Şekil 29’de görülmektedir. Spektruma bakıldığında yapıda bulunan karbonil grubunun δ = 203,7 ppm’de rezonans verdiği görülmektedir. Karbonile komşu olan çift bağ karbonunun δ = 148,9 ppm’de ve aromatik halkaya komşu olan çift bağ karbonu δ = 116,3 ppm’de rezonans olmuştur. Aromatik halkaya ait CH_2 karbonları sırasıyla δ = 131,7 ppm’de ve δ = 116,1 ppm’de sinyal vermiştir. Ayrıca beşli halkadaki çift bağ karbonları δ = 128,5 ppm ve δ = 123,0 ppm’de, halkadaki diğer üç karbon ise sırasıyla δ = 60,7 ppm ve δ = 49,4 ppm, δ = 34,7 ppm’de rezonans olması yapıyı doğrulamaktadır. Spektrumda, 12 sinyal beklenmesine rağmen 16 sinyal gözükmektedir. Bu durum flor atomunun aromatik halkadaki karbon atomlarıyla etkileşmesi sonucu çift sinyallerin oluşmasıyla açıklanabilir.



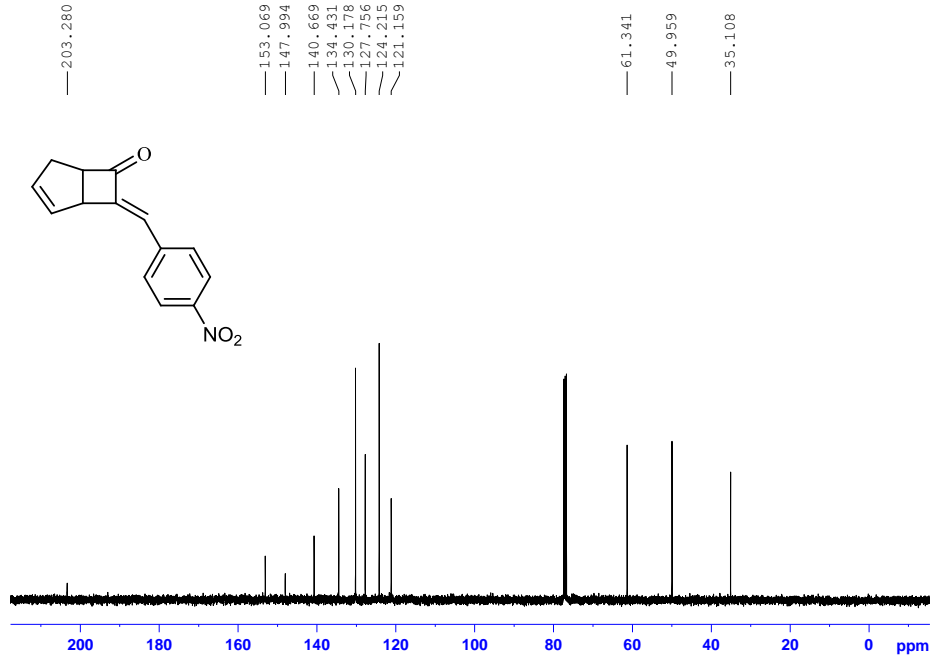
Şekil 29: (E)-7-(4-fluorobenziliden)bisiklo[3.2.0]hept-2-en-6-on bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (400 MHz, CDCl_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 203.7, 164.8, 162.3, 148.9, 133.6, 131.8, 131.7, 130.5, 130.4, 128.5, 123.0, 116.4, 116.1, 60.7, 49.4, 34.7$.



Şekil 30: (E)-7-(4-Nitrobenziliden)bisiklo[3.2.0]hept-2-en-6-on bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (400 MHz, CDCl_3)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.28 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.74 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.89 (s, 1H), 6.00-5.94 (m, 2H), 4.48-4.46 (m, 1H), 3.92-3.88 (m, 1H); 2.78 (bd, J = 17.6 Hz, 1H), 2.58 (dd, J = 17.6, 10.4 Hz, 1H).

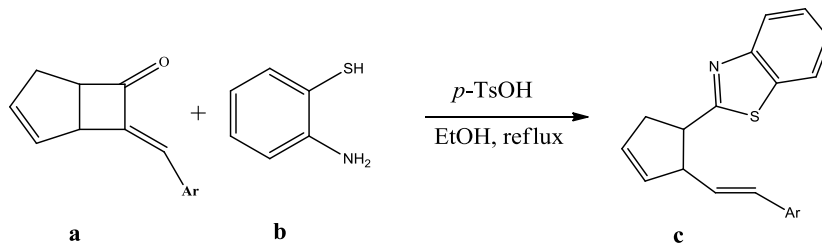


Şekil 31: (E)-7-(4-Nitrobenzyliden)bisiklo[3.2.0]hept-2-en-6-on bileşiğine ait $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu (100 MHz, CDCl_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 203.3, 153.1, 147.9, 140.6, 134.4, 130.2 (2 C), 127.7, 124.2 (2 C), 121.2, 61.3, 49.9, 35.1.

4.2 (E)-2-(2-stirilsiklopent-3-en-1-il)benzo[d]tiyazol Türevleri

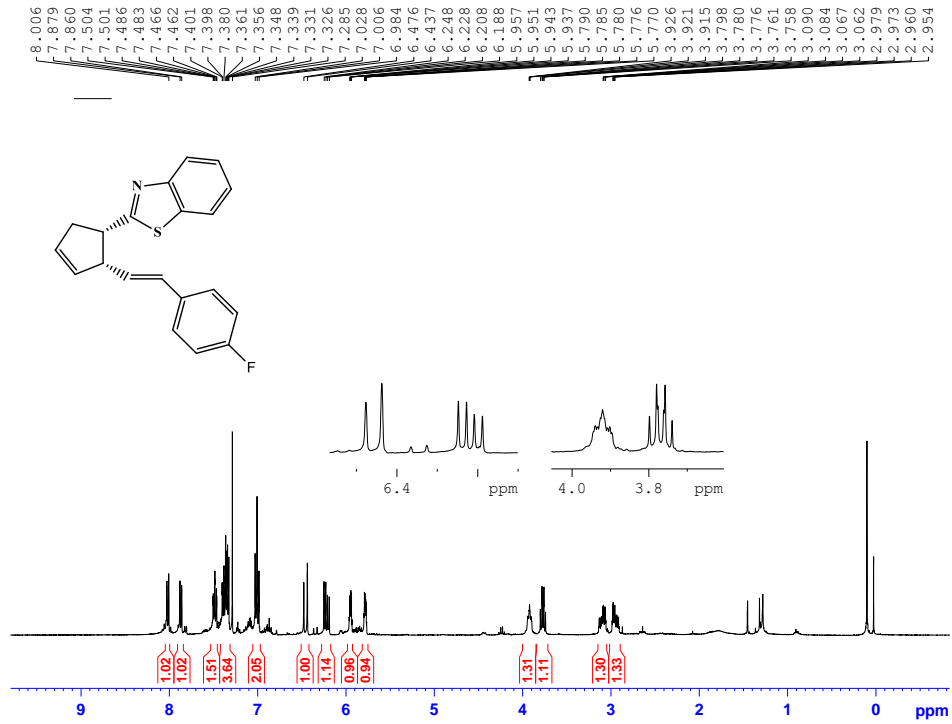
İlk basamakta sentezlenen α,β -doymamış karbonil bileşiği (a) ve 2-aminotiyofenol (b) muamele edilerek 2 yeni benzotiyazol türevi (c) sentezlendi.



Ar: 4-FPh 4- NO_2 Ph

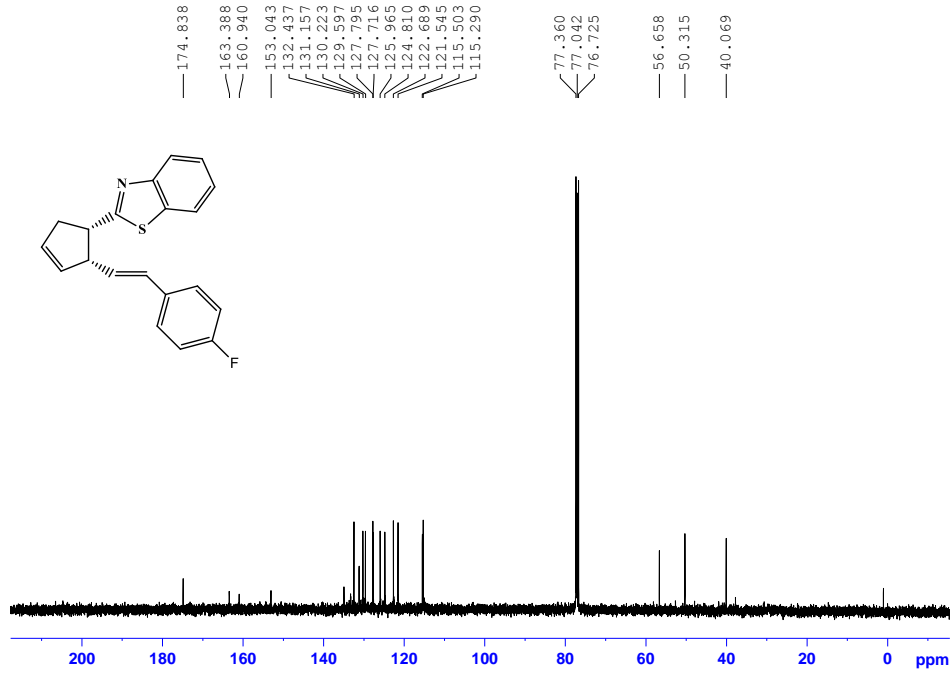
4.2.1 2-((1S,2S)-2-((E)-4-florostiril)siklopent-3-en-1-il)benzo[d]tiyazol

2-((1S,2S)-2-((E)-4-florostiril)siklopent-3-en-1-il)benzo[d]tiyazol 400 MHz ¹H-NMR spektrumu Şekil 32’de görülmektedir. Spektrumunda, tiyazol birimindeki benzen halkasının N’a komşu olan proton $\delta = 8,01$ ppm’de dublet ($J = 8,2$ Hz) , S’a komşu olan proton ise $\delta = 7,87$ ppm’de dubletin dubleti ($J = 7,9, 0,5$ Hz) olarak rezonans olurken, diğer iki proton ise sırası ile $\delta = 7,49$ ve $\delta = 7,38$ ppm’de triplet ($J = 7,2$ Hz) vererek rezonans olmaktadır. Flor grubunun bağlı olduğu fenil halkasının protonları beklenildiği gibi $\delta = 7,36$ ppm’de ve $\delta = 7,01$ ppm’de multipler olarak AA’BB’ sistemi vermektedir. $\delta = 6,46$ ppm’de ve $\delta = 6,21$ ppm’de görülen AB sistemi fenil’e bağlı vinil grubunun protonlarına ait olup, sistemin A kısmı $\delta = 6,46$ ppm’de dublet ($J = 15,8$ Hz), B kısmı ise $\delta = 6,21$ ppm’de dubletin dubletini ($J = 15,8, 8,1$ Hz) vererek rezonans olmaktadır. Siklopenten halkasındaki tersiyer protonlardan biri $\delta = 3,92$ ppm’de multipler olarak sinyal verirken, diğeri ise $\delta = 3,77$ ppm’de multipler olarak rezonans olmaktadır. Diğer metilenik protonlar $\delta = 3,10$ ve $\delta = 2,95$ ppm’de multipler verirken, çift bağ protonları $\delta = 5,95$ ppm’deki dubletin tripleti ($J = 8,0, 2,4$ Hz) ve $\delta = 5,78$ ppm’deki dubletin dubletinin dubleti ($J = 5,9, 4,1, 2,0$ Hz) olarak rezonans olmuştur.



Şekil 32: 2-((1S,2S)-2-((E)-4-florostiril)siklopent-3-en-1-il)benzo[d]tiyazol bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu (400 MHz, CDCl₃)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.02 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.48 (ddd, J = 8.3, 7.2, 1.3 Hz, 2H), 7.43-7.31 (m, 4H), 7.06-6.97 (m, 2H), 6.46 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 6.22 (dd, J = 15.8, 8.0 Hz, 1H), 5.98 – 5.92 (m, 1H), 5.82- 5.76 (m, 1H), 3.99- 3.87 (m, 1H), 3.77 (dt, J = 8.8, 7.3 Hz, 1H), 3.16- 3.03 (m, 1H), 3.00-2.89 (m, 1H).



Şekil 33: 2-((1S,2S)-2-((E)-4-florostiril)siklopent-3-en-1-il)benzo[d]tiyazol bileşigine ait ¹³C-NMR spektrumu (100 MHz, CDCl₃)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 174.82, 153.03, 134.91, 132.43, 131.17, 131.15, 130.21, 129.59, 127.79, 127.71, 125.96, 124.80, 122.68, 121.54, 115.50, 115.28, 77.36, 77.04, 76.72, 56.66, 50.31, 40.07.

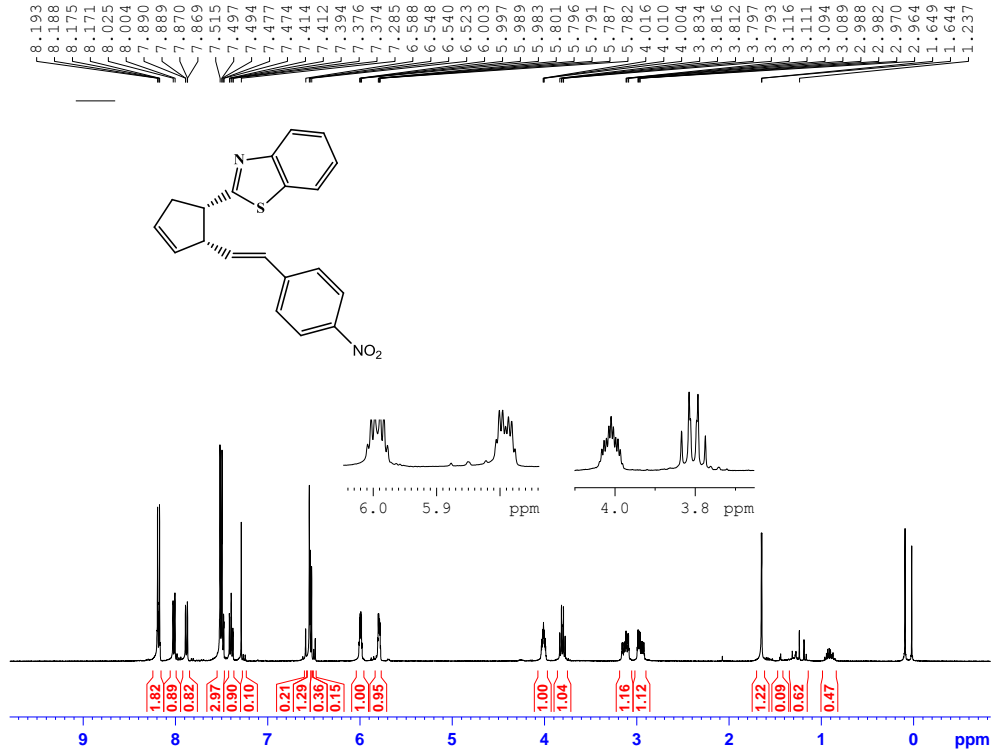
2-((1S,2S)-2-((E)-4-florostiril)siklopent-3-en-1-il)benzo[d]tiyazol bileşigine ait 100 MHz ¹³C-NMR spektrumu Şekil 33’de görülmektedir. Spektrumunda, benzotiyazol birimindeki N ve S’ e komşu olan karbon δ =174,8 ppm’de; tiyazol halkasındaki N’a komşu olan karbonun ise δ = 153,0 ppm’de, S’e komşu olan karbon δ = 132,4 ppm’de rezonans olmaktadır. Fenil halkasında florun bağlı olduğu karbon atomu δ = 163,3 ppm’de ve fenil’e bağlı vinil grubunun karbonlarına ait rezonans δ = 121,5 ppm ve δ = 115,5 ppm’de gerçekleşmektedir. Siklopenten halkasındaki tersiyer karbonlardan biri δ = 56,6 ppm’de diğeri

ise $\delta = 50,3$ ppm'de rezonans olurken, çift bağ karbonları biri $\delta = 131,1$ ppm'de ve biri $\delta = 129,5$ ppm'de rezonans göstermiştir. Bileşimin $^1\text{H-NMR}$ verileri ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumundaki yapıyı doğrulamaktadır.



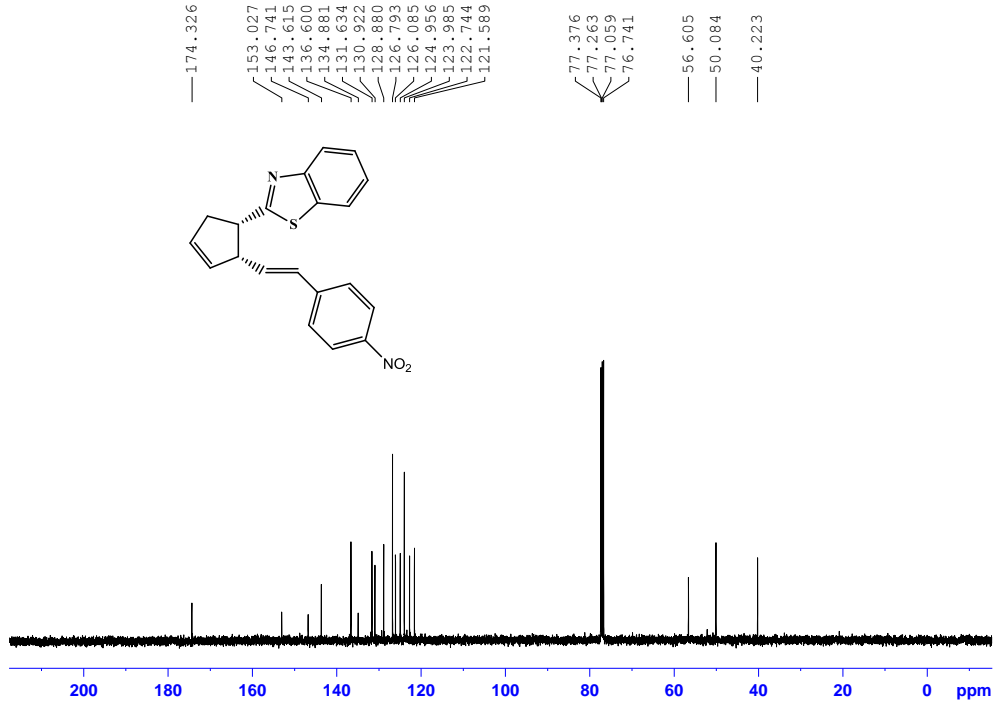
Şekil 34: 2-((1S,2S)-2-((E)-4-florostiril)siklopent-3-en-1-il)benzo[d]tiyazol bileşimine ait IR spektrumu

IR Spektrumu (KBr, cm^{-1}): 3064, 2925, 1599, 1506, 1434, 1326, 1221, 1157, 981, 822, 720, 707, 671, 532, 432



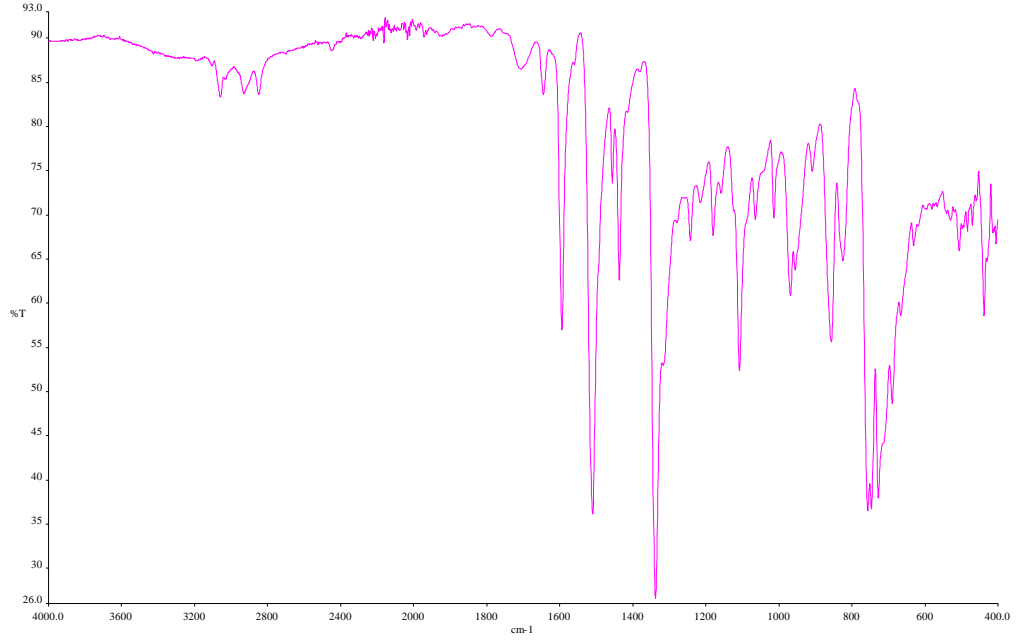
Şekil 35: 2-((1S,2S)-2-(4-Nitrostiril)siklopent-3-enil)benzo[d]tiyazol bileşiğine ait ^1H -NMR spektrumu (400 MHz, CDCl_3)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,18$ (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 8,01 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7,88 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7,61 – 7,44 (m, 3H), 7,39 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6,64 – 6,47 (m, 2H), 6,06 – 5,95 (m, 1H), 5,85 – 5,76 (m, 1H), 4,01 (ddt, $J = 6.9, 4.5, 2.2$ Hz, 1H), 3,80 (dt, $J = 8.8, 7.4$ Hz, 1H), 3,12 (ddt, $J = 13.3, 6.7, 2.2$ Hz, 1H), 3,02 – 2,89 (m, 1H).



Şekil 36: 2-((1S,2S)-2-(4-Nitrostiril)siklopent-3-enil)benzo[d]-tiyazol bileşiğine ait ^{13}C -NMR spektrumu (100 MHz, CDCl_3)

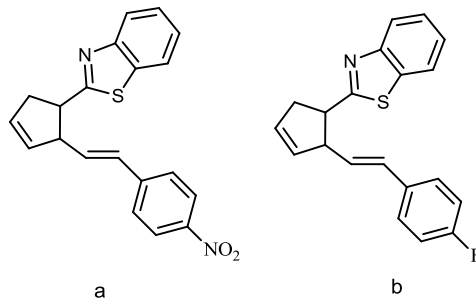
^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 174.31, 153.01, 146.73, 143.60, 136.59, 134.87, 131.62, 130.91, 128.87, 126.78, 126.07, 124.95, 123.98, 122.74, 121.58, 77.37, 77.06, 76.74, 56.61, 50.08, 40.22.$



Şekil 37. 2-((1S,2S)-2-(4-Nitrostiril)siklopent-3-enil)benzo[d]-tiyazol bileşiğine ait IR spektrumu

IR Spektrumu (KBr, cm^{-1}): 3058, 2848, 1593, 1503, 1436, 1337, 1107, 968, 856, 756, 727, 437

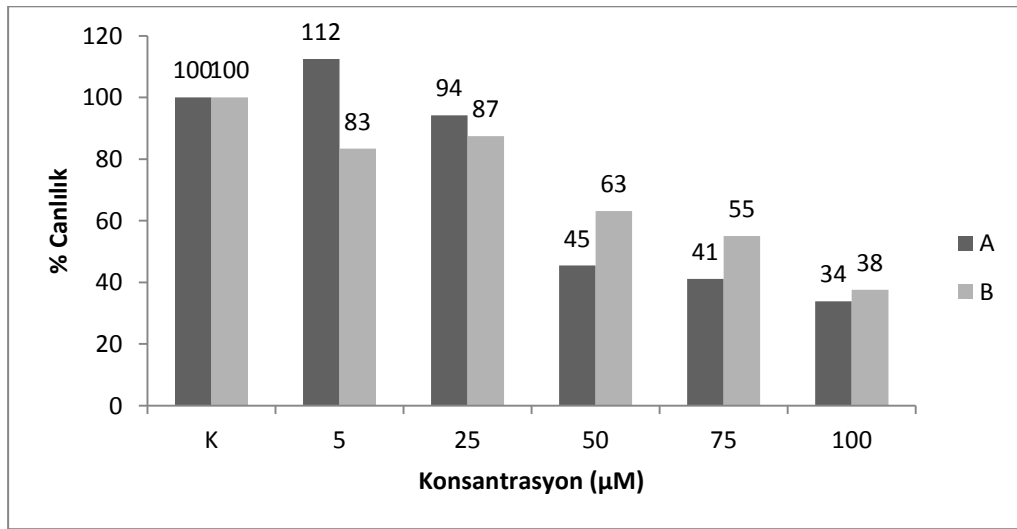
4.3 Benzotiyazol Türevlerinin Anti-proliferatif Etkisinin MTT Yöntemiyle Belirlenmesi



Şekil 38. 4.7.22-((1S,2S)-2-(4-Metilstiril)siklopent-3-enil)benzo[d]-tiyazol serisi

Sentezlenen benzotiyazol türevleri, PANC-1'e (Pankreas Kanseri Hücreleri) karşı antiproliferatif testleri incelendi. Hücre yoğunluğu, spektrofotometrik olarak ölçme metoduna dayanan MTT testi ile belirlendi. 96'luk plak içerisine PANC-1 hücre hattı ekildikten 24 saat

sonra hücrelerin metabolik fonksiyonlarının düzenlemeleri beklendi. Metabolik fonksiyonlarını düzenleyen hücrelerin medyumu içerisinde, kültür medyumu ile dilue edilen 5, 25, 50, 75, 100 µM konsantrasyonlarda benzotiyazol sentez bileşikleri (Şekil 38) ilavesi yapılarak 48 saat süreyle inkübasyonu yapıldı. Bu sürenin sonunda, MTT yöntemi ile hücre yoğunluğu ya da benzotiyazol bileşiklerinin hücreler üzerindeki olası etkisi mikropalak okuyucu ile okutularak logaritmik eğim çizgisi çizildi. Logaritmik eğim çizgisinden sentez bileşiklerinin doz etki eğrisi oluşturularak ilacın IC 50 değeri hesaplandı. A Bileşiğinin IC 50 değeri 27 µM, B bileşiğinin IC 50 değeri 35 µM olarak tespit edildi.



Şekil 39. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin PANC-1 hücre canlılığı üzerine etkisi

X eksenini µM cinsinden sentez bileşiklerinin konsantrasyonunu, Y eksenini ise her bir örneğin ortalama absorbans değerlerinden hesaplanan yüzde canlılık değerini ifade etmektedir. Yüzde Canlılık = $[\text{ABS}_{\text{ortalama}} (\text{her bir örnek}) / \text{ABS}_{\text{ortalama}} (\text{kontrol})] \times 100$

0 µM sentez bileşiği (kontrol) uygulamasının canlılığı %100 kabul edildi ve diğer örneklere ait canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplandı. Hücre canlılığının doz artışı ile ters orantılı olarak değiştiği tespit edilmiştir (Şekil 39).

Tablo 14. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin PANC-1 hücreleri üzerine % inhibisyon etkisi

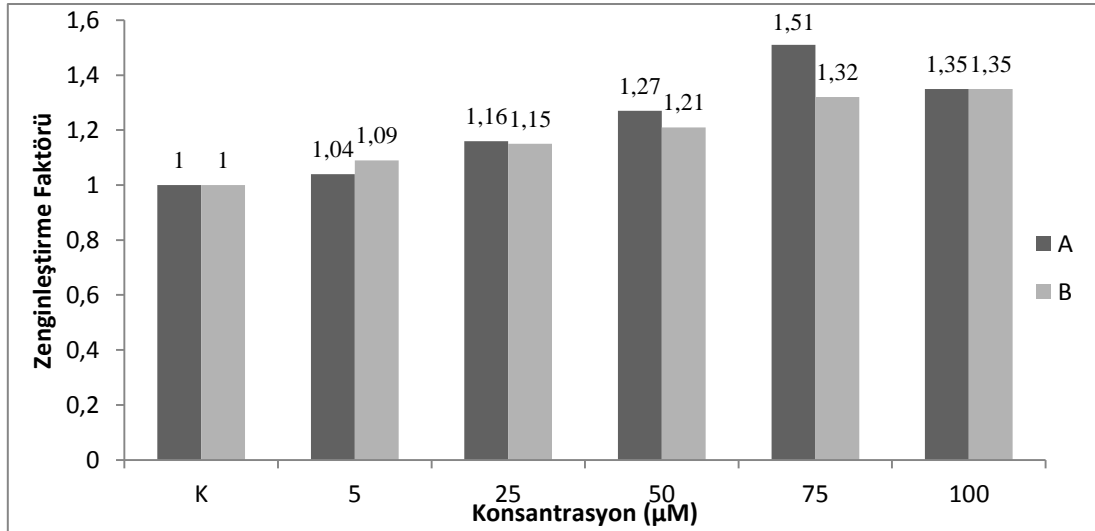
Konsantrasyon (μM)	A Bileşiği	B Bileşiği
Kontrol	0	0
5	1,53 \pm 0,14	16,67 \pm 0,07
25	5,8 \pm 0,15	12,58 \pm 0,08
50	54,54 \pm 0,06	36,84 \pm 0,11
75	58,84 \pm 0,04	44,98 \pm 0,09
100	66,14 \pm 0,11	62,39 \pm 0,09

Bulgular, sentez bileşiklerinin PANC-1 hücrelerinde doz bağımlı olarak hücre ölümünü tetiklediğini göstermektedir (Tablo 14). 100 μM konsantrasyonlardaki A ve B bileşiklerinin hücre canlılığını %62-66 arasında inhibe ettiği görülmüştür. Bileşiklerin PANC-1 hücrelerine karşı aktiviteleri genel olarak incelendiğinde özellikle 100 μM konsantrasyonunda aktiviteye sahip oldu görüldü.

4.4 Kolorimetrik Apoptoz Tayini (Cell Death Detection ELISAPLUS-Roche)

A ve B sentez bileşiklerinin 5, 25, 50, 75, 100 μM konsantrasyonları ile muamele edilmiş PANC-1 hücreleri ile kontrol grubu hücreler 48 saat inkübasyon sonunda, eşit sayıda toplanarak, histon kompleksi oluşturmuş DNA fragmentlerinin rölatif kantitasyonunun spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayalı bir test olan ‘Cell Death Detection ELISA Kit’ ile apoptotik hücre oranı belirlendi. Benzotiyazol A ve B sentez bileşikleri ile muamele edilmiş/ edilmemiş hücreler arasındaki apoptoz oranı farklılığı, ölçülen absorbansların kıyaslanması suretiyle kat değişimi ve yüzde artışı olarak belirlendi. Kitin çalışma prensibi gereğince absorbans artışı, apoptotik nükleozomların artışına; dolayısıyla apoptoz indüksiyonuna neden olmaktadır.

DNA fragmentasyonunu ifade eden mono ve oligo-nükleozom zenginleşmesi 0 μM ilaç uygulanan grup (kontrol hücreleri) için 1,00 kabul edildi ve diğer örneklere ait zenginleşme faktörleri oransal olarak hesaplandı.



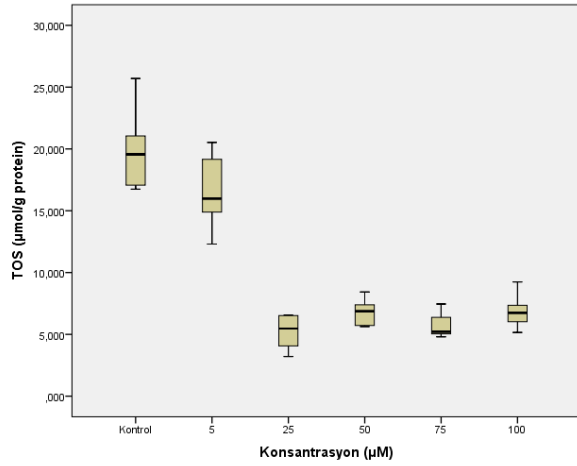
Şekil 40. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin PANC-1 hücrelerine apoptotik etkisi

Grafikte X eksenini A ve B bileşiklerinin konsantrasyonlarını, Y eksenini ise her bir örneğin ortalama absorban değerlerinin kontrolün absorban değerine oranından hesaplanmış olan zenginleşme faktörünü ifade etmektedir. (Zenginleşme Faktörü = ABSortalama (her bir örnek) / ABSortalama (kontrol))

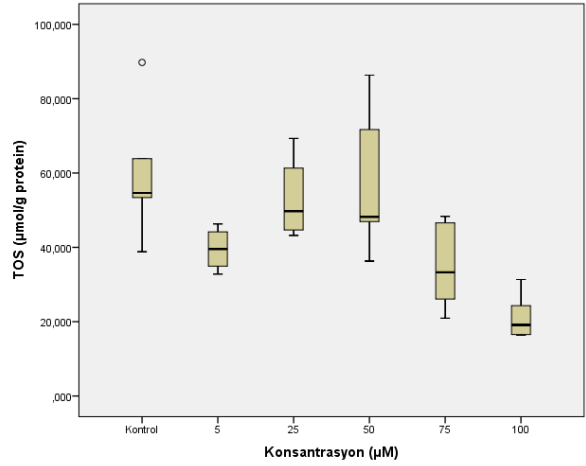
A ve B bileşiklerinin PANC-1 hücrelerinin apoptoz oranında artışa neden olup olmadığının belirlenmesi amacıyla uygulanan bu hücre ölümü testinde, kontrol grubu hücrelerden elde edilen absorban oranları A ve B bileşikleri verilen hücrelerle kıyaslandığında, A bileşiğinin 75µM konsantrasyonunda 1.51 katlık ve 100 µM konsantrasyonunda 1.35 katlık anlamlı bir artış saptandı. Ayrıca B bileşiğinin 75 ve 100 µM konsantrasyonlarında 1.32-1.35 katlık anlamlı bir artış saptandı.

4.5 Biyokimyasal Analiz Sonuçları

Total oksidan seviyesi değerlendirmesinde; benzotiyazol türevi bileşikleri A ve B'nin uygulaması yapılan gruplarda bileşiklerin 5-100 µM konsantrasyonlarda etkinlik gösterdiği görülmüştür (Şekil 41).



A Bileşiği

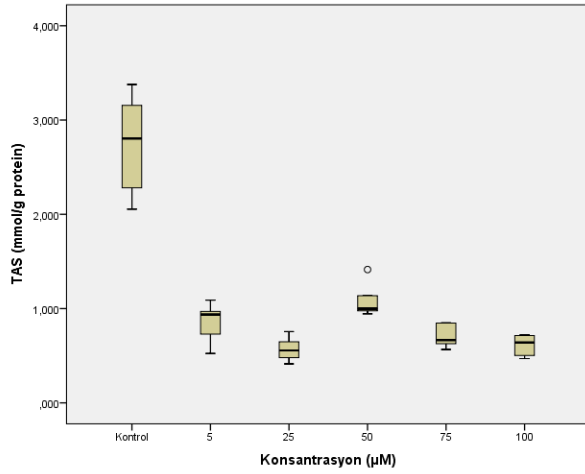


B Bileşiği

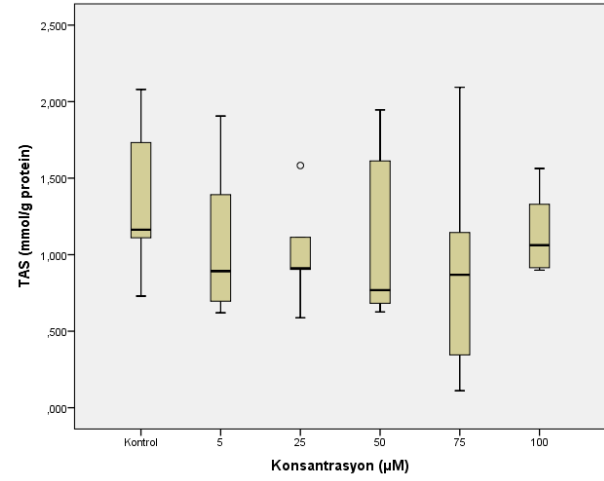
Şekil 41. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin TOS düzeyleri

A bileşiğinin uygulaması yapılan grupta total oksidan etkinliğin 25-100 µM konsantrasyonda olduğu gözlenmiştir (Tablo 15). Total oksidan seviyesi açısından özellikle 25-100 µM konsantrasyon aralığında uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0.01$). B bileşiğinin uygulaması yapılan grupta ise en yüksek total oksidan seviyenin 100 µM konsantrasyonda olduğu ve 5,75 ve 100 µM konsantrasyonlarında bileşiklerin etkin total oksidan seviyesinin olduğu gözlenmiştir (Tablo 16). Total oksidan seviyesi açısından 5 ve 75 µM konsantrasyona sahip grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu ($p\leq 0.05$), 100 µM derişimdeki grup ile kontrol grubu kıyaslandığında ise bu istatistiksel anlamlılığın arttığı dikkat çekmektedir ($p<0.01$).

Total antioksidan kapasitelerine baktığımızda ise A ve B bileşiğinin uygulaması yapılan gruplarda konsantrasyon artışı ile total antioksidan etkinlik arasında anlamlı bir artış gözlenmemektedir (Şekil 42).



A Bileşiği



B Bileşiği

Şekil 42. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin TAS düzeyleri

Ancak A bileşiğinin 5, 25, 50, 75 ve 100 µM konsantrasyon uygulamalarında kontrole göre anlamlı bir fark görülmüştür ($p < 0,01$). B bileşiğinin uygulaması yapılan gruplar total antioksidan kapasite açısından kıyaslandığında 75 µM konsantrasyonunun diğer gruplara göre daha fazla etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Ancak, kontrol grubu ile diğer derişimlerin total antioksidan kapasitesi istatistiksel açıdan kıyaslandığında anlamlı bir fark görülmemektedir ($p > 0,05$).

Tablo 15. A bileşiğine ait biyokimyasal parametre sonuçları (n=6, ortalama ± standart sapma)

		Biyokimyasal Parametreler				
		SOD (U/mg protein)	GPx (U/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)	TAS (mmol/g protein)	TOS (µmol/g protein)
Konsantrasyon (µM)	Kontrol (0)	175,18 ± 33,41	264,10 ± 38,30	5,84 ± 1,00	2,74 ± 0,53	20,02 ± 3,63
	5	68,64 ± 14,47*	150,46 ± 15,58*	3,83 ± 0,60**	0,85 ± 0,22**	16,57 ± 3,30
	25	71,03 ± 13,69*	74,36 ± 10,08*	2,45 ± 0,52**	0,56 ± 0,12**	5,21 ± 1,34**
	50	49,17 ± 11,28*	94,87 ± 9,52*	2,93 ± 0,28**	1,07 ± 0,17**	6,81 ± 1,07**
	75	44,44 ± 13,14*	76,26 ± 12,96*	2,65 ± 0,67**	0,71 ± 0,12**	5,77 ± 1,11**
	100	46,08 ± 7,18*	86,34 ± 6,06*	3,15 ± 0,22**	0,61 ± 0,11**	6,87 ± 1,40**

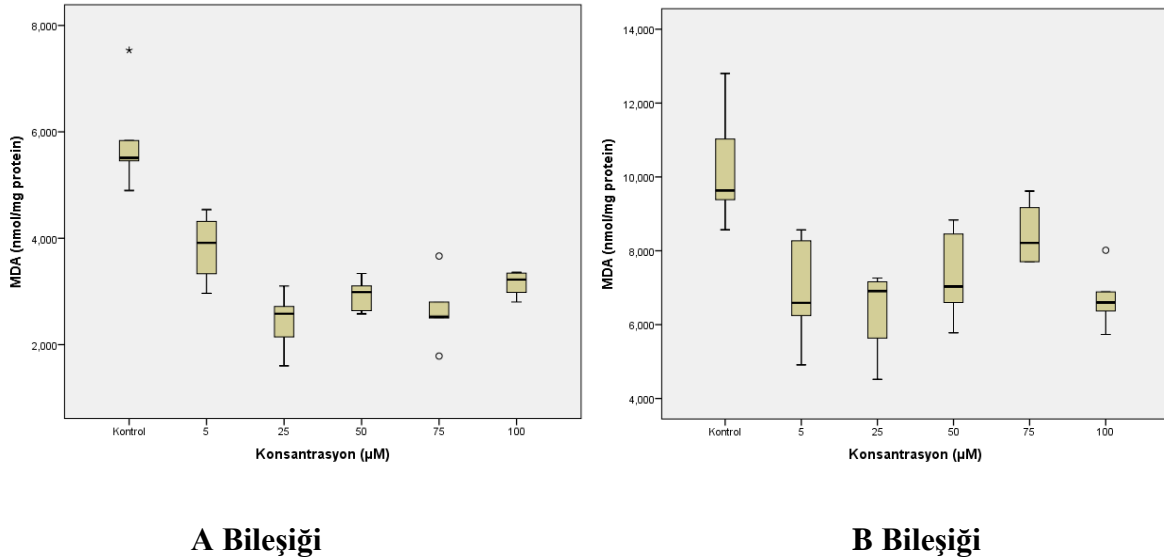
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlılık

Tablo 16. B bileşiğine ait biyokimyasal parametre sonuçları (n=6, ortalama ± standart sapma)

		Biyokimyasal Parametreler				
		SOD (U/mg protein)	GPx (U/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)	TAS (mmol/g protein)	TOS (µmol/g protein)
Konsantrasyon (µM)	Kontrol (0)	67,85 ± 25,95	231,43 ± 36,59	10,17 ± 1,51	1,32 ± 0,48	60,09 ± 18,85
	5	108,50 ± 19,72	163,53 ± 15,40*	6,91 ± 1,51**	1,06 ± 0,49	39,55 ± 5,86*
	25	97,26 ± 23,45	193,83 ± 34,86	6,39 ± 1,27*	1,01 ± 0,36	52,99 ± 11,66
	50	43,02 ± 10,84	225,72 ± 31,02	7,28 ± 1,17**	1,12 ± 0,60	57,89 ± 20,48
	75	86,63 ± 26,57	312,40 ± 52,77	8,43 ± 0,92	0,90 ± 0,69	34,75 ± 11,07*
	100	96,28 ± 28,01	271,31 ± 14,47	6,72 ± 0,83**	1,13 ± 0,25	21,12 ± 5,80**

*p≤0.05, **p<0.01 Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlılık

48 saat boyunca farklı derişimlerde (5, 25, 50, 75, 100µM) A ve B bileşikleri uygulanan PANC-1 hücrelerinin lipid peroksidasyonunun belirlenebilmesi için yapılan MDA analizlerinden elde edilen sonuçlar, uygulanan konsantrasyona göre farklılık gösterdiği görüldü (Şekil 43).

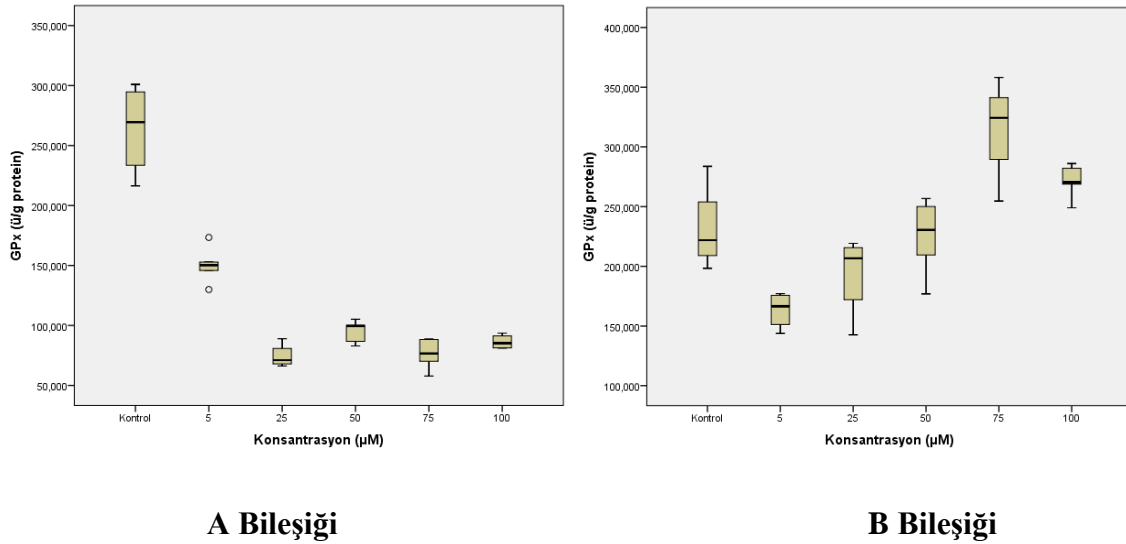


Şekil 43. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin MDA düzeylerine ait Boxplot grafiği

A bileşiği için 6 farklı konsantrasyonda elde edilen veriler karşılaştırıldığında, lipid peroksidasyonunun 5-100 µM konsantrasyonlarında olduğu görüldü (Tablo 15). 25 µM

konsantrasyonda elde edilen MDA miktarı 2,45 nmol/mg protein olarak belirlendi ve kontrol grubuna göre 2,38 katlık anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Bunun yanı sıra kontrol grubu ile diğer derişimlerin MDA düzeyleri kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0,01$). B bileşiği için konsantrasyona bağı MDA verileri kıyaslandığında ise 5, 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonunun gerçekleştiği ve bu konsantrasyonlarda elde edilen verilerin birbirine yakın olduğu ayrıca kontrole göre MDA miktarlarının azaldığı görüldü (Tablo 16). MDA düzeyi açısından 5, 50 ve 100 μM konsantrasyona sahip gruplar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p<0,01$), 25 μM derişimdeki grup ile kontrol grubu kıyaslandığında ise bu istatistiksel anlamlılığın azaldığı görülmektedir. ($p<0,05$).

48 saat boyunca farklı derişimlerde (0, 5, 25, 50, 75, 100 μM) A ve B bileşikleri uygulanan PANC-1 hücrelerinin GSH-Px analizlerinden elde edilen sonuçlar Şekil 44' de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; uygulanan konsantrasyona bağı olarak sonuçların farklılık gösterdiği ancak sonuçların konsantrasyon artışına bağımlılık göstermediği görülmüştür.

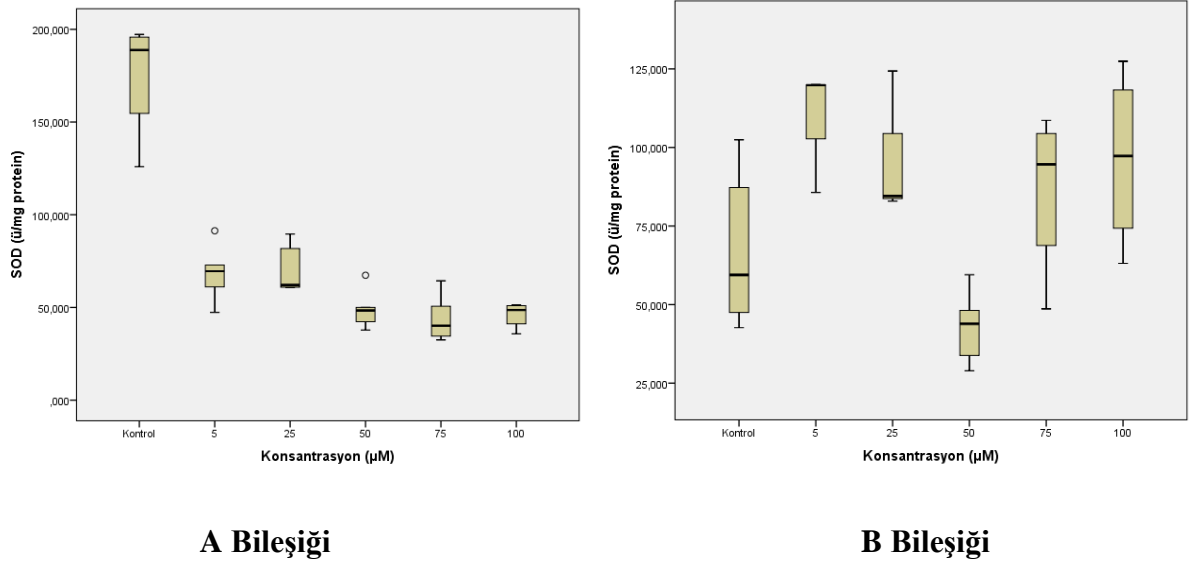


Şekil 44. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin GPx düzeylerine ait Boxplot grafiği

A bileşiği için 6 farklı konsantrasyonda elde edilen veriler karşılaştırıldığında, GPx düzeyleri kontrol grubuna kıyasla 5-100 μM konsantrasyonlarında anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0,01$) ve en iyi sonucun da 25 ve 75 μM konsantrasyonlarında elde edildiği

görüldü (Tablo 15). B bileşiği için konsantrasyona bağlı GPx verileri kıyaslandığında ise 5, 25 ve 50 μM derişimlerinde kontrole göre bir düşüş olduğu, bunların arasından sadece 5 μM konsantrasyonunda istatistiksel anlamlılık olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Bunun yanı sıra B bileşiginde 75 ve 100 μM uygulamaları PANC-1 hücrelerinde GPx seviyelerini kontrole göre arttırdığı belirlendi (Tablo 16).

A ve B bileşiklerinin farklı derişimlerde (0, 5, 25, 50, 75, 100 μM) 48 saat süreyle PANC-1 hücrelerine uygulanmasından sonra yapılan SOD analizinden elde edilen veriler Şekil 45’ da görülmektedir. Bu veriler göre SOD düzeylerinin konsantrasyon artışı ile bir paralellik göstermediği ancak belirli dozlarda kontrole göre SOD düzeylerinin düştüğü görülmektedir.



Şekil 45. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin SOD düzeylerine ait Boxplot grafiği

A bileşiginin 5, 25, 50, 75 ve 100 μM konsantrasyon uygulamalarında SOD düzeylerinde kontrole göre anlamlı bir azalma görülmüştür ($p < 0,01$) ve en etkin azalmanın 75 ve 50 μM konsantrasyonlarında olduğu belirlenmiştir (Tablo 15). B bileşiginin uygulaması yapılan gruplarda ise sadece 50 μM konsantrasyonda kontrole göre SOD düzeyinin azaldığı, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmadığı görülmüştür. (Tablo 16).

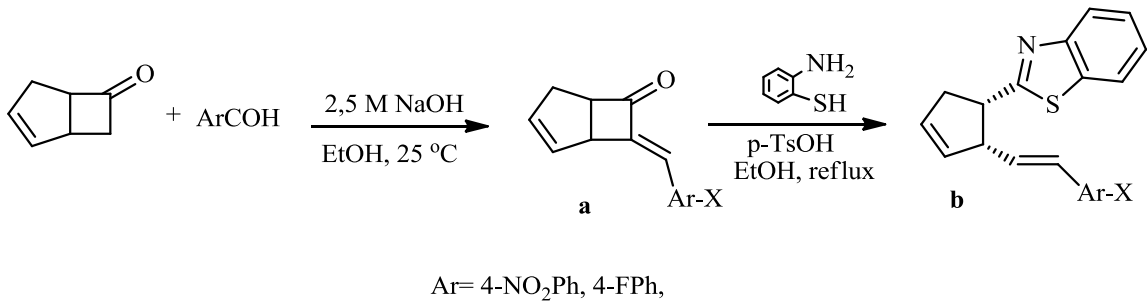
5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAP) tarafından desteklenen bu çalışmada doymamış keton bileşiğinden yola çıkılarak elde edilen 2 benzotiyazol bileşiği iki basamakta sentezlendi. Bu bileşiklerin PANC-1 hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi ve biyokimyasal parametreleri ölçülerek antioksidan ve oksidan mekanizması açıklanmaya çalışıldı.

Yaygın olarak görülen kanser hastalıkları ile kıyaslandığında pankreas kanseri kadınlarda dokuz, erkeklerde on birinci sırada yer almaktadır. Dünya çapında kanserden kaynaklı ölüm verileri karşılaştırıldığında ise pankreas kanseri dördüncü sırada yer almaktadır. Bunun yanı sıra pankreas kanserinin ölüm riski çok yüksektir. Pankreas kanseri olan kişilerin beş yıllık sürede yaşama şansı % 6 iken, teşhis konulduktan sonraki bir yıl içinde hastaların % 73'ü ölmektedir.

Pankreas kanserinin en çok görülen tipi adenokarsinomdur. Bu hastalığın ameliyat ve kemoterapi ile tedavisinin yanı sıra ilaçlarla da tedavisi mümkündür. Bu amaçla bu çalışmada, antitümör ve antikanser gibi yüksek biyolojik ve farmakolojik aktiviteye sahip olduğu bilinen benzotiyazol birimi içeren bileşiklerin sentezi gerçekleştirildi.

Çalışmanın ilk aşamasında Benzotiyazol türevi iki bileşik sentezlendi (Şekil 46). Sentezin birinci basamağında α,β -doymamış karbonil bileşiği (a) ve ikinci basamağında benzotiyazol türevleri (b) sentezlendi



Şekil 46. Genel reaksiyon şeması

Çalışmanın ilk basamağında elde edilen α,β -doymamış karbonil bileşiklerini kristallendirme yöntemi ile saflaştırılırken, ikinci basamağında elde edilen benzotiyazol

türevleri heksan/etil asetat (19:1) çözücü karışımı ile silika jel kolonda saflaştırıldı. Bileşikler %80-82 aralığında değişen yüksek verimlerle elde edildi.

Yapılan çalışmalarda sentezlenen benzotiyazol türevlerinin PANC-1'e (Pankreas Adenokarsinom Kanseri Hücreleri) karşı *in vitro* aktiviteleri incelendi. Yaptığımız literatür araştırması sonucunda pankreas kanseri olgularının çoğu adenokarsinoma olduğundan bu çalışmada adenokarsinoma türü pankreas kanser hücre hattı tercih edildi. Bileşikler farklı konsantrasyonlarda eşit inkübasyon şartlarında hücelere uygulanarak hücre canlılığına doz bağımlı etkileri incelendi.

Kanser hücrelerinde DNA hasarının onarımı ile ilişkili genlerde mutasyonlar sıklıkla gözlenmektedir. Bu nedenle normal hücrelerin DNA hasarı ile indüklenen apoptoza karşı kanser hücrelerine kıyasla daha dayanıklı oldukları söylenebilir. Kemoterapötik ajanlarda istenen özelliklerden biri normal hücelere minimum hasarı vererek kanser hücrelerini öldürmesidir. Bu amaçla çalışmamızda iki tane benzotiyazol türevi sentezlendi ve PANC-1 hücrelerine etkisi incelendi. Kontrol hücrelerindeki canlılık inhibisyonunun kanser hücrelerindeki canlılık inhibisyonu ile karşılaştırılmasının literatüre katkı sağlayacağı öngörüldü.

Çalışmada benzotiyazol sentez bileşiklerinin hücre canlılığı üzerine etkisi MTT canlılık analizi ile belirlendi. MTT ve aynı prensibi kullanan diğer yöntemler (XTT, MTS, WST1) hücre canlılığının analizi için sıklıkla kullanılan uygulaması kolay yöntemlerdir. Alternatif olarak tripan mavisi ile hücrelerin sayımı da canlılık değişiminin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir fakat otomatik bir sayıcı kullanılmadığı sürece hata payı spektrofotometrik MTT yöntemine kıyasla yüksektir. MTS ve WST1 yöntemlerinin MTT'den tek farkı MTT reaktifi elde edildikten sonra elde edilen formazan kristallerinin kendiliğinden çözünebilir özellikte olmasıdır. Bu nedenle hem işlem süresi kısaltmakta hem de yöntemin uygulanması basitleşmektedir. Buna karşın maliyeti MTT yöntemine kıyasla daha yüksektir ve bu nedenle tercih edilmemiştir.

Apoptozun tayini için kullanılan yöntemler apoptozun tetiklenmesi sırasında meydana gelen karakteristik olayların ölçümü prensibine dayanır. Özellikle de DNA fragmentasyonu ve fosfatidil serin kalıntılarının hücre membranının dış yüzeyine çıkması apoptozun belirlenmesinde en çok kullanılan özelliklerdir. DNA fragmentasyonu akış sitometrik TUNEL, kolorimetrik CDD veya elektroforetik DNA merdiveni oluşumu yöntemleri ile belirlenebilir. Çalışmamızda apoptoz tayini amacıyla Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kiti kullanılmıştır. Kit, fragmente DNA'nın plak tabanına bağlanarak spektrofotometrik olarak analiz edilmesi ile uygulanır. Yöntem pratiktir ve kısa sürede sonuç vermektedir. CDD

yöntemi örnek gruplarından elde edilen ortalama absorbans değerlerinin kontrole ait ortalama absorbans değerine oranlanması ile örneklerde tetiklenen apoptozun yarı-kantitatif olarak hesaplanmasına olanak sağlamaktadır. Çalışmamızda CDD yöntemi hem pratik olduğundan hem de kantitasyona olanak sağladığından tercih edilmiştir.

MTT sonuçları değerlendirildiğinde, sentezlenen benzotiyazol bileşiklerinin konsantrasyonu ile PANC-1 hücre canlılığı inhibisyonu arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmektedir (Şekil 39). A ve B bileşiklerinin hücre ölümünü tetikleyici etkisi konsantrasyona bağlı olarak artmaktadır. Bu bileşikler ile 48 saat inkübe edilen PANC-1 hücrelerinde canlılığın 5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarda çok düşük değişim gösterdiği görülmüştür. Bu değerler sırasıyla A bileşiği için %1 ve %5; B bileşiği için %16 ve %12 olarak belirlenmiştir. B bileşiğinin bahsi geçen konsantrasyonlarda A bileşiğine göre daha etkin olduğu görüldü. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise bu etkinin her iki bileşik için de arttığı saptanmıştır. Özellikle 50 µM ve 100 µM konsantrasyonlarında A bileşiğinin %58 ve %66; B bileşiğinin %44 ve %62 gibi yüksek oranlarda hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. A bileşiğinin yüksek konsantrasyonlarda B bileşiğine göre hücre ölümü üzerine daha etkin olduğu görülmüştür.

PANC-1 hücrelerinde 48 saat A ve B bileşiklerinin inkübasyonu için elde edilen IC₅₀ değeri, A bileşiği için 27,2 µM ve B bileşiği için 35,5 µM olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre eşit şartlarda 48 saat süreyle PANC-1 hücrelerine A ve B bileşiklerinin inkübasyonu için hesaplanan IC₅₀ değerleri 27-35 µM arasında değişmektedir. Elde edilen tüm sonuçlar A ve B bileşiklerinin konsantrasyonu ile PANC-1 hücrelerinde tetiklenen hücre ölümünün doğru orantılı olduğunu, bu etkinin konsantrasyona bağımlı olduğunu ortaya koymuştur.

Çalışmamızda elde edilen CDD verileri ve MTT verileri ile uyum göstermektedir. Hücrelerde 5 µM ve 25 µM konsantrasyonlarda A ve B bileşikleriyle 48 saat muamele edilen hücrelerde apoptotik hücre oranı kontrolden çok farklı değildir (sırasıyla A bileşiği için 1,04 ve 1,16; B bileşiği için 1,09 ve 1,15). Ancak, 75 ve 100 µM konsantrasyonlarda A ve B bileşikleriyle 48 saat inkübe edilen hücrelerde bu oran 1,35-1,5 arasında çıkmıştır. Bu nedenle 75 ve 100 µM konsantrasyonlarda A ve B bileşiklerinin apoptotik hücre oranlarını yaklaşık 1,5 kat arttırdığını ileri sürebiliriz.

Canlılarda oksidatif stres nedeniyle molekül, hücre ve organizma düzeyinde meydana gelen değişiklikler birikimsel bir süreç sonrasında birçok hastalığın ortaya çıkmasına neden olmakta özellikle de çeşitli kanser türlerinin oluşumunu tetiklemektedir. Canlılarda oluşan

oksidatif stres, ortaya çıkan bir takım yan ürünlerin, hatalı ya da hasarlı moleküllerin belirlenimine dayalı testlerle belirlenebilmektedir. Bu belirtiler genellikle serum, plazma, BOS (beyin omurilik sıvısı), idrar ve semen gibi biyolojik sıvılarda yapılabilmektedir. Bu tez çalışmasında biyolojik sıvılarda uygulanan testler hücre düzeyinde uygulandı. Bu nedenle sentezlenen iki farklı bileşiğin PANC-1 hücre hattına uygulanan değişik konsantrasyonlarının oksidatif strese duyarlılığındaki farklılıkları ortaya koyması açısından çalışma bilimsel öneme sahiptir. Sentezlenen bileşiklerin farklı konsantrasyonlarının hücre düzeyindeki etkisini ortaya çıkarmak amacıyla öncelikle canlılık açısından etkinlik düzeyleri ortaya konmuş, daha sonra ise MDA, SOD, GPx, TAS ve TOS gibi oksidatif stres parametrelerindeki değişiklikler incelenmiştir.

Çeşitli kanser türleri ile serbest radikaller arasındaki ilişkiyi aydınlatmak üzere çok sayıda çalışma literatürde mevcuttur. Bu çalışmalarda kanser hücrelerinde ROS, antioksidan ve diğer radikallerin yüksek olduğu gösterilmiştir. Serbest radikallerin protoonkogenleri aktifleştirerek tümör oluşumunu başlattığı öne sürülmüştür. Gorozhanskaya ve arkadaşları kanserin, tümörleşme sürecindeki serbest radikal işleyişini ifade etmek amacıyla 94 kanserli hastanın (mide, kolon, göğüs, akciğer, rahim kanseri) ve 40 sağlıklı bireyin serum örneklerinden oksidatif stres parametrelerini araştırmıştır. Bu çalışmada onkolojik hastaların MDA düzeyleri sağlıklı gruptan yaklaşık 1,5-1,8 kat daha yüksek olduğu görülmüştür. Tümörlü hastalarla kontrol grubunun SOD düzeyleri kıyaslandığında da yine tüm hasta grubunun SOD düzeyleri kontrole göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Ayrıca bu çalışma SOD ve MDA düzeylerinin hasta ve kontrol gruplarını çeşitli kanser modelleri bazında da kıyaslanmamıza olanak sağlamıştır. Buna göre sırasıyla rahim, akciğer ve mide kanserli hastaların MDA değerleri kontrol grubundan çok belirgin olarak farklılık göstermekle birlikte yine sırasıyla akciğer, kolon ve mide kanserli hastaların SOD düzeyleri kontrol grubundan yaklaşık iki kat yüksek olduğu görülmüştür. (73).

Lipitler serbest radikallere karşı en hassas biyomoleküllerdir. Kolesterol türevleri ve yağ asitlerinin doymamış çift bağları serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girerek lipit peroksidasyonu adı verilen bir dizi reaksiyonlar meydana gelir. Lipit peroksidasyonu hücre zarı ve organel zarları için önemli bir tehdittir. Çünkü zarların stabilitesi bozularak geçirgenlikleri artmaktadır (74). Kılıç ve arkadaşları göğüs kanserli hastalarda lipit oksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) ve antioksidan olan SOD düzeylerini ölçmüş ve buna göre hastaların MDA ve SOD değerleri kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur (75).

İnci ve arkadaşları gırtlak kanserli hastaların kanser dokusundan ve kanser oluşumu olmayan komşu dokulardan alınan örneklerden oksidatif stres parametrelerini çalışmış ve lipit peroksidasyon, GSH, GPx ve SOD seviyelerini kontrole göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (76).

Kronik pankreatit, pankreas kanseri için önemli bir risk faktörüdür ve reaktif oksijen türlerinin oluşumuyla ilişkilidir. Hücreler, reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu hasarı önlemek için çok miktarda antioksidan üretir. Memeli hücrelerinde SOD, katalaz ve peroksidaz olmak üzere üç tip öncül antioksidan bulunmaktadır ve glutatyon peroksidaz bunlardan en önemlisidir. Cullen ve arkadaşları normal pankreas, kronik pankreas ve pankreas kanseri türlerinde antioksidan enzim seviyelerini belirlemiştir. Buna göre normal pankreas hücrelerinin stoplazmik SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz değerleri kronik pankreatit ve pankreas kanseri türlerinden çok daha düşük olduğunu bulmuşlardır (77).

Yapılan bu araştırmaların neticesinde kontrol grubu olan ve herhangi bir uygulamanın yapılmadığı PANC-1 hücrelerine ait oksidatif stres düzeylerinin, A ve B bileşiklerinin çeşitli konsantrasyonlarının uygulandığı gruplara ait oksidatif stres düzeylerinden daha yüksek olmasını beklemekteyiz. Çalışmamızda PANC-1 hücreleriyle birlikte A ve B bileşiklerinin 48 saatlik inkübasyonu sonunda elde edilen IC₅₀ değerleri, A bileşiği için 27,2 µM ve B bileşiği için ise 35,5 µM olarak belirlenmiştir. Bu nedenle bileşiklerin 25 ve 50 µM konsantrasyonlarına ait oksidatif stres parametrelerinin kontrol gruplarına göre düzeylerini tartışmayı tercih ettik. Buna göre PANC-1 hücrelerine uygulanan A bileşiğinin kontrol grubunda ölçülen MDA, SOD, GPx, TAS ve TOS düzeyleri; 25 µM ve 50 µM derişimlerde ölçülen değerlerden anlamlı olarak düşük bulundu. B bileşiğinin kontrol grubunda ölçülen MDA, GPx, TAS ve TOS düzeyleri; 25 µM ve 50 µM derişimlerde ölçülen değerlerden düşük bulunurken SOD aktivitesi ise sadece 50 µM derişimde kontrole göre belirgin bir azalma göstermiştir. Elde edilen tüm bu veriler daha önce farklı kanser vakalarına ait doku ve serum örneklerinde yapılan oksidatif stres düzeylerinin gösterdiği sonuçlar ile uyumludur.

Oksidatif stresin malignant tümörün gelişmesi ile ilişkili olduğuna dair birçok çalışma mevcuttur. Biz çalışmamızda A ve B benzotiyazol bileşiklerinin konsantrasyon bazında pankreas kanserli hücelere etkisini inceledik. Yapılan konsantrasyon uygulamalarının PANC-1 hücrelerindeki oksidatif stres düzeyleri üzerine etkisinin farklılık gösterdi görüldü. İncelenen grupların SOD, GPx ve MDA düzeyleri kontrole göre düşük olduğu görüldü. Bu durum uygulanan bileşiklerin oksidatif stresin oluşumunu tetikleyen etmenleri baskıladığını

düşündürmektedir. Bu çalışma sentezlenen benzotiyazol A ve B bileşiminin metabolizmada oksidatif stres ile indüklenen bozukluklara uygulanabilirliği açısından bir bakış açısı ortaya koymaktadır.

Benzotiyazol türevi bileşiklerin potansiyel anti-kanser etkisinin daha derinlemesine anlaşılabilmesi için çalışmamızın temel oluşturabileceğine inanmaktayız. Sentezlenen A ve B bileşiklerinin PANC-1 kanser hücrelerine karşı iyileştirici etki vermesi bu maddelerin kanser hücrelerine yönelik kullanım potansiyelini arttırmaktadır. Yapılacak ileri çalışmalar ile Benzotiyazol türevi bileşiklerin etkisi *in vivo* çalışmalarla da desteklenerek disiplinler arası (biyoloji, eczacılık ve tıp gibi) çalışmalara imkân sağlayacaktır.

6. REFERANSLAR

1. Stewart BW, Wild CP, editors. World Cancer Report 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2014.
2. Pourhoseingholi MA, Vahedi M, Baghestani AR. Burden of gastrointestinal cancer in Asia; an overview. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench* 2015; 8:19-27.
3. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D ve ark. Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection A Randomized Controlled Trial. *Jama-Journal of the American Medical Association* 2010; 304:1073-1081.
4. DiMagno EP, Reber HA, Tempero MA. AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *American Gastroenterological Association. Gastroenterology* 1999; 117:1464-1484.
5. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T ve ark. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58:71-96.
6. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004; 363:1049-1057.
7. Pai M, Spalding D. Pancreatic cancer. *Medicine* 2015; 43:329-333.
8. Oğuzkan SB. (2014). Pankreas Kanseri Hastalarda Crp, IL6 ve IL10 Düzeyleri ve Crp Polimorfizminin Araştırılması. Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü Doktora Tezi. Gaziantep, .
9. Deer EL, Gonzalez-Hernandez J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL ve ark. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 2010; 39:425-435.
10. Pankreas Kanseri Tanı Koyma ve Evreleme, 2013, <http://www.pankreaskanserindeyenilikler.com/sayfa/350/pankreas-kanserinde-tani-koyma-ve-evreleme.html> Erişim Tarihi: 05.10.2015. Ağ
11. Pankreas Kanseri, 2013, <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-turleri/51-pankreas-kanseri.html> Erişim Tarihi. 05.10.2015.
12. Tumour markers in gastrointestinal cancers - EGTM recommendations. *Anticancer Research* 1999; 19:2811-2815.
13. Cwik G, Wallner G, Skoczylas T, Ciechanski A, Zinkiewicz K. Cancer antigens 19-9 and 125 in the differential diagnosis of pancreatic mass lesions. *Arch Surg* 2006; 141:968-973; discussion 974.
14. Goggins M. Molecular markers of early pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:4524-4531.
15. Kim HJ, Kim MH, Myung SJ, Lim BC, Park ET, Yoo KS ve ark. A new strategy for the application of CA19-9 in the differentiation of pancreaticobiliary cancer: Analysis using a receiver operating characteristic curve. *American Journal of Gastroenterology* 1999; 94:1941-1946.
16. Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM. Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology* 2005; 128:1606-1625.
17. Demirbaş S. (2010). Pankreas Kanseri Hastalarda Serumda Makrofaj İnhibitör Sitokin-1 (Mic-1) ve Doku Polipeptid Spesifik Antijen (Tps)'in Tanısal Etkinlikleri; Karbonhidrat Antijen 19-9 (Ca 19-9) İle Karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi.
18. Ma Q. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol Ther* 2010; 125:376-393.
19. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54:176-186.

20. Radak Z, Kumagai S, Taylor AW, Naito H, Goto S. Effects of exercise on brain function: role of free radicals. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; 32:942-946.
21. Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:1287-1312.
22. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18:872-879.
23. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899:136-147.
24. Podda M, Traber MG, Weber C, Yan LJ, Packer L. UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. *Free Radic Biol Med* 1998; 24:55-65.
25. de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 1999; 26:202-226.
26. Agarwal R, Chase SD. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 775:121-126.
27. Cakatay U, Telci A, Kayali R, Tekeli F, Akcay T, Sivas A. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clin Biochem* 2003; 36:51-55.
28. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160:1-40.
29. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother* 1999; 53:169-180.
30. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:7915-7922.
31. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 1995; 49:1341-1348.
32. Eu JP, Liu L, Zeng M, Stamler JS. An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry* 2000; 39:1040-1047.
33. Portakal O, Ozkaya O, Erden Inal M, Bozan B, Kosan M, Sayek I. Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem* 2000; 33:279-284.
34. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 2005; 79:157-165.
35. Hutchinson I, Bradshaw TD, Matthews CS, Stevens MFG, Westwell AD. Antitumour benzothiazoles. Part 20: 3'-cyano and 3'-alkynyl-substituted 2-(4'-aminophenyl)benzothiazoles as new potent and selective analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003; 13:471-474.
36. Huang ST, Hsei IJ, Chen CP. Synthesis and anticancer evaluation of bis(benzimidazoles), bis(benzoxazoles), and benzothiazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006; 14:6106-6119.
37. Yalcin I, Oren I, Sener E, Akin A, Ucarturk N. The Synthesis and the Structure-Activity-Relationships of Some Substituted Benzoxazoles, Oxazolo(4,5-B)Pyridines, Benzothiazoles and Benzimidazoles as Antimicrobial Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 1992; 27:401-406.
38. Yalcin I, Kaymakcioglu BK, Oren I, Sener E, Temiz O, Akin A ve ark. Synthesis and microbiological activity of some novel N-(2-hydroxyl-5-substitutedphenyl)benzacetamides, phenoxyacetamides and thiophenoxyacetamides as the possible metabolites of antimicrobial active benzoxazoles. *Farmaco* 1997; 52:685-689.

39. Bradshaw TD, Stevens MF, Westwell AD. The discovery of the potent and selective antitumour agent 2-(4-amino-3-methylphenyl)benzothiazole (DF 203) and related compounds. *Curr Med Chem* 2001; 8:203-210.
40. Bradshaw TD, Westwell AD. The development of the antitumour benzothiazole prodrug, Phortress, as a clinical candidate. *Curr Med Chem* 2004; 11:1009-1021.
41. Hutchinson I, Jennings SA, Vishnuvajjala BR, Westwell AD, Stevens MF. Antitumor benzothiazoles. 16. Synthesis and pharmaceutical properties of antitumor 2-(4-aminophenyl)benzothiazole amino acid prodrugs. *J Med Chem* 2002; 45:744-747.
42. Stone EL, Mortimer CG, Westwell A, Bradshaw T, Burger A, Sausville E ve ark. 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-5-fluorobenzothiazole: A novel experimental antitumor agent eliciting highly selective DNA damage and cytotoxicity. *Clinical Cancer Research* 2005; 11:9087s-9087s.
43. Mortimer CG, Wells G, Crochard JP, Stone EL, Bradshaw TD, Stevens MF ve ark. Antitumor benzothiazoles. 26.(1) 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-fluorobenzothiazole (GW 610, NSC 721648), a simple fluorinated 2-arylbenzothiazole, shows potent and selective inhibitory activity against lung, colon, and breast cancer cell lines. *J Med Chem* 2006; 49:179-185.
44. Mathis CA, Wang Y, Holt DP, Huang GF, Debnath ML, Klunk WE. Synthesis and evaluation of ¹¹C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J Med Chem* 2003; 46:2740-2754.
45. Henriksen G, Hauser AI, Westwell AD, Yousefi BH, Schwaiger M, Drzezga A ve ark. Metabolically stabilized benzothiazoles for imaging of amyloid plaques. *J Med Chem* 2007; 50:1087-1089.
46. Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 2004; 116:221-234.
47. Özkaya AB. (2009). Hct-116 Kolon Kanseri Hücre Hattında Yeşil Çay Etken Maddesi Olan (-)-Epigallocatekin-3-Gallat'ın Apoptoz Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Bölümü, Yüksek Lisans Tezi. İzmir, .
48. Engin K, Özyardımcı, N. (2001). Akciğer Kanseri Tanı Ve Tedavide Temel İlkeler Ve Uygulamalar. Bölüm 3, 1. Basım, Avrupa Tıp Kitapçılık İstanbul, .
49. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1995; 6:3-16.
50. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7:663-698.
51. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992; 356:494-499.
52. Renahan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *British Medical Journal* 2001; 322:1536-1538.
53. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2011; 20:145-158.
54. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J ve ark. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 2004; 52:821-831.
55. Yılmaz T. (2014). Pankreas Karsinoma (Bxpc-3) Hücre Hattında Doxorubicin'in Antikanser Etkisinin Araştırılması. Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi. Mersin, .
56. Kasar Z. (2013). Geldanamycin Uygulanmış Kolon Kanseri Hücre Dizinlerinde Apoptozis Mekanizmasının Araştırılması, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı, Yüksek Lisans Tezi. Manisa, .
57. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116:205-219.

58. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87:99-163.
59. Smaili SS, Hsu YT, Youle RJ, Russell JT. Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 2000; 32:35-46.
60. Palmer AM, Greengrass PM, Cavalla D, Society for Medicines R. The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News Perspect* 2000; 13:378-384.
61. Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2004; 101:227-257.
62. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73:2013-2026.
63. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000; 256:42-49.
64. Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 1996; 2:574-577.
65. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323-331.
66. Eischen CM, Kottke TJ, Martins LM, Basi GS, Tung JS, Earnshaw WC ve ark. Comparison of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cells: chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interactions. *Blood* 1997; 90:935-943.
67. Ozawa H, Keane RW, Marcillo AE, Diaz PH, Dietrich WD. Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 2002; 177:306-313.
68. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-257.
69. Ceylan M, Findik E. Synthesis and Characterization of New Chalcone Derivatives from cis-Bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-one. *Synthetic Communications* 2009; 39:1046-1054.
70. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184:39-51.
71. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P ve ark. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13:795-808.
72. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37:277-285.
73. Gorozhanskaia EG, Sviridova SP, Dobrovolskaia MM, Zybrikhina GN, Kashnia Sh R. [Selenium and oxidative stress in cancer patients]. *Biomed Khim* 2013; 59:550-562.
74. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 2014; 224C:164-175.
75. Kilic N, Yavuz Taslipinar M, Guney Y, Tekin E, Onuk E. An investigation into the serum thioredoxin, superoxide dismutase, malondialdehyde, and advanced oxidation protein products in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2014; 21:4139-4143.
76. Inci E, Civelek S, Seven A, Inci F, Korkut N, Burcax G. Laryngeal cancer: in relation to oxidative stress. *Tohoku J Exp Med* 2003; 200:17-23.
77. Cullen JJ, Mitros FA, Oberley LW. Expression of antioxidant enzymes in diseases of the human pancreas: another link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreas* 2003; 26:23-27.

7. ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

ŞEKİLLER

Şekil 1. Pankreas organının yerleşimi	3
Şekil 2.ROS'ın metabolik ve biyolojik etkileri	11
Şekil 3.ROS Oluşumu ve ROS tarafından oluşturulan hasara karşı temel savunma mekanizması.....	12
Şekil 4. Reaktif oksijen türlerinin çeşitli hücrel komponentlere etkisi	14
Şekil 5. Tiyazol.....	20
Şekil 6. Benzotiyazol.....	20
Şekil 7.....	21
Şekil 8: Hücre yaşam döngüsü	22
Şekil 9.....	22
Şekil 10: Hücre döngüsünde kontrol noktaları	24
Şekil 11. Hücre yaşam döngüsü ve siklinler	25
Şekil 12: Siklin bağımlı protein kinaz (CDK) sistemi.....	26
Şekil 13: p53'ün hücre yaşam döngüsüne etkisi	27
Şekil 14. Kanser oluşumu.....	28
Şekil 15. Apoptozun genel gösterimi	30
Şekil 16:Apoptozun ekstrinsik ve intirinsik yolları.....	33
Şekil 17.....	38
Şekil 18: α,β -Doymamış karbonil bileşiği sentez mekanizması.....	39
Şekil 19.....	40
Şekil 20: Benzotiyazol türevlerinin sentezi	41
Şekil 21: NanoEntek EVE hücre sayım cihazı ve uygulaması.....	47
Şekil 22.....	48
Şekil 23.....	50
Şekil 24. Süperoksit dismutaz standart eğrisi.....	55
Şekil 25. Protein standart eğrisi.....	56
Şekil 26.Malondialdehit standart eğrisi	58
Şekil 27.....	64

Şekil 28: (E)-7-(4-fluorobenziliden)bisiklo[3.2.0]hept-2-en-6-on bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃)	65
Şekil 29: (E)-7-(4-fluorobenziliden)bisiklo[3.2.0]hept-2-en-6-on bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃)	66
Şekil 30: (E)-7-(4-Nitrobenziliden)bisiklo[3.2.0]hept-2-en-6-on bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃)	66
Şekil 31: (E)-7-(4-Nitrobenziliden)bisiklo[3.2.0]hept-2-en-6-on bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu (100 MHz, CDCl ₃).....	67
Şekil 32: 2-((1S,2S)-2-((E)-4-florostiril)siklopent-3-en-1-il)benzo[d]tiyazol bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃).....	68
Şekil 33: 2-((1S,2S)-2-((E)-4-florostiril)siklopent-3-en-1-il)benzo[d]tiyazol bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu (100 MHz, CDCl ₃).....	69
Şekil 34: 2-((1S,2S)-2-((E)-4-florostiril)siklopent-3-en-1-il)benzo[d]tiyazol bileşiğine ait IR spektrumu	70
Şekil 35: 2-((1S,2S)-2-(4-Nitrostiril)siklopent-3-enil)benzo[d]-tiyazol bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz, CDCl ₃).....	71
Şekil 36: 2-((1S,2S)-2-(4-Nitrostiril)siklopent-3-enil)benzo[d]-tiyazol bileşiğine ait ¹³ C-NMR spektrumu (100 MHz, CDCl ₃).....	72
Şekil 37. 2-((1S,2S)-2-(4-Nitrostiril)siklopent-3-enil)benzo[d]-tiyazol bileşiğine ait IR spektrumu	73
Şekil 38. 4.7.2 2-((1S,2S)-2-(4-Metilstiril)siklopent-3-enil)benzo[d]-tiyazol serisi .	73
Şekil 39. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin PANC-1 hücre canlılığı üzerine etkisi ...	74
Şekil 40. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin PANC-1 hücrelerine apoptotik etkisi.....	76
Şekil 41. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin TOS düzeyleri	77
Şekil 42. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin TAS düzeyleri	78
Şekil 43. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin MDA düzeylerine ait Boxplot grafiği	79
Şekil 44. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin GPx düzeylerine ait Boxplot grafiği	80
Şekil 45. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin SOD düzeylerine ait Boxplot grafiği	81
Şekil 46. Genel reaksiyon şeması	82

8. TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Pankreas kanseri hücre hatları	5
Tablo 2. Pankreas kanserinde tanısal metotlar	7
Tablo 3. Radikal ve radikal olmayan ROS ve RNS türleri.....	10
Tablo 4. İnsan vücudunda serbest radikal hasarları ve onarım sistemleri.....	16
Tablo 5. Endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlar	18
Tablo 6. Sentezlenen α,β -doymamış karbonil bileşikleri	40
Tablo 7. Sentezlenen benzotiyazol türevleri	42
Tablo 8. SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı.....	54
Tablo 9. SOD aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı	54
Tablo 10. Protein tayini için tüplerin hazırlanışı	57
Tablo 11. MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	58
Tablo 12. MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı	59
Tablo 13. GPx tayini için tüplerin hazırlanışı	60
Tablo 14. Benzotiyazol sentez bileşiklerinin PANC-1 hücreleri üzerine % inhibisyon etkisi	75
Tablo 15. A bileşiğine ait biyokimyasal parametre sonuçları (n=6, ortalama \pm standart sapma)	78
Tablo 16. B bileşiğine ait biyokimyasal parametre sonuçları (n=6, ortalama \pm standart sapma)	79

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Nuray ÜREMİŞ
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 01.12.1987 - Siirt
Medeni hali : Evli
Telefon : 05364431366
e-posta : nuray_smile@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	2015
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2010
Lise	Antalya Lisesi	2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Tarihi
1 yıl	Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	2015 Eylül - Devam
1 yıl	Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	2014 Temmuz- 2015 Eylül

Yabancı Diller

İngilizce

Hobiler

Sinema, müzik, gezmek, kitap okumak, resim yapmak