



SELÇUK
ÜNİVERSİTESİ

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI FONKSİYONEL GRUPLARA SAHİP
KALİKS[4]AREN TÜREVLERİNİN
HEDEFLENDİRİLMİŞ ANTİKANSER
UYGULAMALARININ
NANOBİYOTEKNOLOJİK YAKLAŞIMLA
GELİŞTİRİLMESİ**

KERİME KÜBRA ÇİNİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ocak-2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Kerime Kübra ÇİNİ tarafından hazırlanan “Farklı Fonksiyonel Gruplara Sahip Kaliks[4]aren Türevlerinin Hedeflendirilmiş Antikanser Uygulamalarının Nanobiyoteknolojik Yaklaşımla Geliştirilmesi” adlı tez çalışması 13/02/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Doç. Dr. Esra MALTAŞ ÇAĞIL

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN

İmza

.....
E. Maltaş Çağıl

.....
Pembegül Uyar Arpacı

.....
Tuğba Nur Aslan

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.



Kerime Kübra ÇİNI

13/02/2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI FONKSİYONEL GRUPLARA SAHİP KALİKS[4]AREN TÜREVLERİNİN HEDEFLENDİRİLMİŞ ANTİKANSER UYGULAMALARININ NANOBİYOTEKNOLOJİK YAKLAŞIMLA GELİŞTİRİLMESİ

Kerime Kübra ÇİNİ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI
Yardımcı Danışman: Prof. Dr. Şeref ERTUL

2019, 70 Sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI
Doç. Dr. Esra MALTAŞ ÇAĞIL
Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN

Kanser, insanoglu için ölümlerle sonuçlanan hastalıklardandır. Dünya çapındaki araştırmacılar, sağlıklı hücreleri etkilemeden, seçici olarak kanseri hedef alacak en uygun tedaviyi arıyorlar. Kaliksaren temelli moleküller bu açıdan oldukça umut vericidir ve hedefli tedavi için tercihli sitotoksiteyi artırmak için modifiye edilebilir. Bu çalışmada, piridinyum grupları ile fonksiyonlandırılmış kalix[4]aren türevlerinin meme kanseri hücreleri üzerindeki tercihli sitotoksitesi incelenmiştir.

p-tert-bütilkaliks[4]arenler, farklı konumlarda (2, 3 ve 4 AMP) uygun prosedürlerle piridinyum grubu ile türevlendirildi. İnsan meme adenokarsinoma hücreleri (MCF-7) ve sağlıklı fare fibroblastı hücreleri (L929), maddelerin dozu maximum 500 µM olacak şekilde inkübe edildi. 24 saat inkübasyondan sonra hücre proliferasyonu analizi, XTT metodu ile yapıldı. xCELLigence analiz sistemi ile hücre canlılığı 180 saat boyunca incelendi. Hücre ölüm mekanizmasını incelemek için flow sitometri analizi yapıldı.

XTT metodu ile elde edilen IC₅₀ değerleri sırasıyla 2-3 ve 4 AMP için 391.40 µM, 40.96 µM ve 105.52 µM olarak bulundu. xCell sonucuna göre de piridinyum grup 3 pozisyonunda bulunan bileşik, 2 ve 4 pozisyonlarına göre daha sitotoksik bulundu. L929 hücrelerine karşı, hem XTT hem de XCell analizleri sonucunda sitotoksik etkinin bulunmadığı görüldü. Flow sitometri analizi sonucunda hücre ölüm şekli olarak DOX'un %53.2 ile nekroza gittiği 3AMP'nin ise konsantrasyonu 25 µM'dan 50 µM'a yükseldiğinde erken apoptoz popülasyonu %6.5'ten %17.9'a yükseldiği görüldü.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, *p-tert*-butilkaliks[4]aren'in L929 hücrelerine kıyasla MCF-7'ye karşı tümöre pasif hedefleme yaparak in vitro sitotoksitesinin, etkinliği kanıtlanmış antikanser ilaçlarına alternatif, etkin ve güvenli kanser tedavisi için umut verici bir yaklaşım sunduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Antikanser, Kaliks[4]aren, Sitotoksite, xCELLigence, MCF-7, L929

ABSTRACT

MS THESIS

IMPROVEMENT OF TARGETED ANTICANCER APPLICATIONS OF CALIX[4]AREN DERIVATIVES WITH DIFFERENT FUNCTIONAL GROUPS BY NANOTECHNOLOGICAL APPROACH

Kerime Kübra ÇİNİ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN NANOTECHNOLOGY AND
ADVANCED MATERIALS

Advisor: Asst. Prof. Dr. Pembegül UYAR ARPACI

Co-Advisor: Prof. Dr. Şeref ERTUL

2019, 70 Pages

Jury

Asst. Prof. Dr. Pembegül UYAR ARPACI

Assoc. Prof. Dr. Esra MALTAŞ ÇAĞIL

Asst. Prof. Dr. Tuğba Nur ASLAN

Cancer is one of the diseases that cause death for human beings. Researchers worldwide have been searching for the optimal treatment that will selectively target cancer, without afflicting healthy cells. The calixarenes based molecules are highly promising in this respect and may be modified to increase preferential cytotoxicity for targeted therapy. In this present study, the effect of derivation of calixarene by pyridinium groups on preferential cytotoxicity in breast cancer cells were examined.

p-tert-butyl calix[4]arenes were functionalized with the pyridinium group by appropriate procedures in different positions (AMP at positions 2,3 and 4). Human breast adenocarcinoma cells (MCF-7) and healthy mouse fibroblast cells (L929) were incubated with samples at maximum concentrations 500 µM. After 24 hours of incubation, the cell proliferation analysis was performed by XTT assay. xCELLigence analysis system were used to observe cell viability for 180 hours. Cell death mechanisms were also observed by flow cytometry.

IC₅₀ values were 391.40 µM, 40.96 µM and 105.52 µM for 2-3 and 4 AMP, respectively in XTT assay. The compound in the pyridinium group 3 position was also more cytotoxic than the 2 and 4 positions in xCell analysis. Both XTT and xCell analysis revealed no cytotoxic effect against L929 cells. As a result of flow cytometry analysis, it was observed that DOX had necrosis with 53.2% as cell death and when the concentration of 3 AMPs increased from 25 µM to 50 µM, early apoptosis population increased from 6.5% to 17.9%.

The results obtained in this study showed that the *in vitro* cytotoxicity of *p-tert*-butyl calix[4]aren which performing passive targeting to the tumor against MCF-7 compared to L929 cells offers a promising approach for effective and safe cancer treatment as alternative to proven anticancer drugs.

Keywords: Anticancer, Calix[4]aren, Cytotoxicity, xCELLigence, MCF-7, L929,

ÖNSÖZ

Bu tezi yazmamda bana fazlasıyla yardımcı olan, bana bilgilerini ve tecrübelerini hoşgörü ve sevgiyle paylaşan çok kıymetli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI'ya ve yardımcı danışmanım Prof. Dr. Şeref ERTUL'a,

Tüm hayatım boyunca her türlü destek veren ve yanımda olan sevgili ailem; annem, babam, kardeşlerim Zeynep ve Ayşe'ye,

İLTEK laboratuvarlarında gerek tez ile ilgili deneylerde gerek başka deneylerde bana her türlü yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Müslüm AĞAÇ, Emine GÖK, Noora OMAR, Zuhair NAZAR, Esin ŞİRİN ve H. Esra AKGÜL arkadaşlarıma,

Deneylerde kullandığım maddelerin yapımında rolü olan Dr. Fatih ÖZCAN hocama,

Laboratuvar uzmanımız Dr. Emine YAVUZ hocama,

Hayatıma sonradan giren ve psikolojik desteğini sürekli hissettiğim nişanlım Sinan'a

Ve ismini yazamadığım tüm hocam ve arkadaşlarıma ayrı ayrı teşekkür ediyorum.

Kerime Kübra ÇİNİ
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	2
2.1. Kaliksarenler	3
2.1.1. Kaliksarenlerin tarihçesi	3
2.1.2. Kaliksarenlerin adlandırılması	3
2.1.3. Kaliksarenlerin fonksiyonlandırılması	5
2.1.4. Kaliksarenlerin biyolojik uygulama alanları	6
2.2. İnsan Adenokarsinoma Meme Kanseri (MCF-7) ve Fare Fibroblast (L-929) Hücre Hattı	8
2.2.1. İnsan adenokarsinoma meme kanseri (MCF-7) hücreleri	8
2.2.1.1. MCF-7 hücrelerinin kökeni ve temel özellikleri	8
2.2.1.2. MCF-7 ve estrogen reseptörü	8
2.2.1.3. MCF-7 hücrelerinin çalışmalardaki uygulanabilirliği	9
2.2.2. Fare fibroblast (L-929) hücreleri	9
2.3. Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu Analizleri	10
2.3.1. XTT analizi	10
2.3.2. XCELLigence (gerçek zamanlı) analizi	11
2.3.3. Hücre ölümü ve flow sitometri analizi	12
2.3.3.1. Apoptotik hücre ölümü	12
2.3.3.2. Nekrotik hücre ölümü	13
2.3.3.3. Flow sitometri analizi	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Kimyasal Numunelerin Sentezi ve Analizi	15
3.1.1. Kimyasal sıvı çözeltilerinde 2-AMP, 3-AMP, 4-AMP'lerin sentez mekanizması	15
3.1.2. Kimyasal sıvı çözeltilerinde 2-AMP, 3-AMP, 4-AMP'lerin analizi	16
3.2. Biyolojik Numunelerin Belirlenmesi ve Analizleri	16
3.2.1. MCF-7 ve L929 hücre hatları	16
3.2.1.1. MCF-7 hücre hattı	16
3.2.1.2. L929 hücre hattı	17
3.2.2. Hücrelerin çözündürülme (thawing) işlemleri	17

3.2.3. Hücrelerin kültüre edilmesi ve pasajlanması	18
3.2.4. Hücrelerin sayımı ve ekimi	19
3.2.5. Hücrelerin, hücre canlılığı (viabilite) ve sitotoksosite (XTT) analizleri	21
3.2.6. Hücrelerin gerçek zamanlı (xCELLigence) analizi	22
3.2.7. Hücrelerin flow sitometri (Annex. / 7AAD) yöntemi ile analizi.....	23
3.2.8. İstatistiksel Analiz.....	25
3.2.9. Hücrelerin dondurulma (freezing) işlemi	25
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	26
4.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin Yapıları, Sentezi ve Analiz Sonuçları.....	26
4.1.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin FT-IR analizleri	26
4.1.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin ¹ H-NMR spektrumları	27
4.2. XTT Yöntemi ile 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin MCF-7 Hücrelerine karşı Sitotoksosite Analizleri.....	29
4.2.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin XTT yöntemi kullanılarak invert mikroskop altındaki MCF-7 hücrelerine etkisinin görüntülenmesi.....	31
4.2.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin MCF-7 hücreleri üzerinde % hücre canlılığı grafiğinin ve IC ₅₀ değerlerinin hesaplanması	34
4.3. XTT Yöntemi ile 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin L-929 Hücrelerine karşı Sitotoksosite Analizleri.....	36
4.3.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin XTT yöntemi kullanılarak invert mikroskop altındaki L-929 hücrelerine etkisinin görüntülenmesi.....	37
4.3.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin L-929 hücreleri üzerinde % hücre canlılığı grafiğinin ve IC ₅₀ değerlerinin hesaplanması	38
4.4. Gerçek Zamanlı (xCELLigence) Analizi Yöntemi ile 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin MCF-7 Hücrelerine Karşı Sitotoksosite Analizleri.....	39
4.4.1. 3-AMP ve 4-AMP'lerin gerçek zamanlı (xCELLigence) analizi yöntemi kullanılarak invert mikroskop altındaki MCF-7 hücrelerine etkisinin görüntülenmesi.....	41
4.5. Gerçek Zamanlı (xCELLigence) Analizi Yöntemi ile 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin L-929 Hücrelerine Karşı Sitotoksosite Analizleri	42
4.5.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin gerçek zamanlı (xCELLigence) analizi yöntemi kullanılarak invert mikroskop altındaki L-929 hücrelerine etkisinin görüntülenmesi.....	44
4.6. Flow Sitometri Yöntemi ile Hücre Ölümü Görüntüleme Analizi.....	45
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	50
5.1 Sonuçlar	50
5.2 Öneriler	52
KAYNAKLAR	53
EKLER	57
ÖZGEÇMİŞ	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μ : Mikro
 α : Alfa
 β : Beta
 δ : Delta
 J : Joule

Kısaltmalar

2-AMP : 2-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren
3-AMP : 3-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren
4-AMP : 4-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren
Annexin V: Flow Sitometri Ölçümleri için Hücre Görüntüleme Boyası
7-AAD: Flow Sitometri Ölçümleri için Hücre Görüntüleme Boyası
CO₂ : Karbondioksit
CHCl₃ : Kloroform
CHCl₂ : Diklormetan
cm : Santimetre
DMSO : Dimetil Sülfoksit
Dulbecco-MEM : L-929 Hücre Hattının Kültür Besiyeri
ER: Östrojen Reseptörü
FBS : Fetal Dana Serumu
FT-IR : Fourier Transform İnfrared Spektroskopi
g : Gram
H₂O : Su
Hanks's Salt Solution : Tuz Tampon Çözeltilisi
IC₅₀ : Hücrelerin %50'sinin Yaşadığı Kimyasal Konsantrasyon Değeri
L : Litre
L-929: Sağlıklı Fare Fibroblast Hücre Hattı
MCF-7: İnsan Adenokarsinoma Meme Kanseri Hücre Hattı
mL : Mililitre
mV : Milivolt
nm : Nanometre

NMR : Nükleer Manyetik Rezonans

PBS: Fosfat Tampon Tuzu

PCD: Programlı Hücre Ölümü

ppm : Milyonda Bir Birim

RPMI-1640 : MCF-7 Hücre Hattının Kültür Besiyeri

μM : Mikromolar

XTT : 3 - [4, 5- Dimethyl thiazol-2-yl] 1-2, 5-diphenyl tetrazolium bromid



1. GİRİŞ

Kanser, belirli mutasyonların hücrelerde biriktirilmesinden kaynaklanan genetik bir hastalıktır. Kanser hücreleri kontrolsüz şekilde çoğalıp canlı vücudunun diğer kısımlarına yayılır ve canlı için büyük bir tehdit oluşturmaya başlar. Kanser hücrelerindeki temel anormallik, kontrolsüz ve sürekli çoğalma halindedir; çünkü hücreler, büyüme ve bölünme için gerekli düzenlemeleri içermezler. Böylece kanser "kontrol edilemeyen hücrelerin çoğalması" olarak tanımlanabilir.

Dünya'da her yıl 14 milyon insana kanser teşhisi konulmaktadır. Her yıl kanser nedeniyle hayatını kaybedenlerin sayısı 8.2 milyondur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2030 yılında kanser tanısı konulan hasta sayısının %50 fazla artacağını öngörmektedir. Ölüm oranı sıralamasında kanser dünyada kalp damar hastalıklarından sonra 2. sırada yer almaktadır. Her 3 kanserden 1'i önlenebilir. Kanser tedavisinde kullanılan temel yöntemlerin (cerrahi, kemoterapi ve hormon) ve ilaçların tedavide yetersiz oluşu, yan etkileri ve tedavilerin uzun sürmesi nedeniyle alternatif tedavi yöntemleri aranmaktadır. Bu yüzden organik türevlendirilmiş pridin amido grubu kaliks[4]arenler de kanser tedavisinde destekleyici tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır.

Normal dokuları etkilemeden sadece kanser hücrelerini hedefleyen yeni antikanser ilaçları arayışı sürekli devam etmektedir. Supramoleküler kaliksaren (p-tert-bütikaliks[4]aren) bu açıdan oldukça umut vadeden bir adaydır. Hedeflenmiş tedavi açısından tercihli sitotoksositeyi artırmada modifiye edilebilir özelliktedir. Kaliksarenler, metilen köprüleriyle bir aldehitte bağlanmış fenol ünitelerinden oluşan, kase veya koni şekilli sentetik supramoleküler makrosiklikler grubu bileşiklerdir.

Etkili antikanser tedavisi için önemli şart, tümör seçici bir araçtır. Süper moleküllerin nanokütle büyüklüğü ve büyük yüzey alanı ile hacim oranı, karakteristik özelliklerini yeniden yapılandırarak biyomoleküllerle ayrı bir şekilde etkileşime girmelerini sağlar. Bu özellik, kanser tedavisinde, hücre görüntüleme, bio-algılamada ve ilaç taşınımında ihtiyaca göre yüzey mühendisliği olasılığını arttırmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada, supramoleküler kimyada sıklıkla kullanılan kaliksarenlerin bir türeviden olan 5,11,17,23 -Tetra-tert-bütül -25,27-bis (2,3 ve 4-aminometil-piridinamid)-26,28 -dihidroksi kaliksarenlerin pasif hedefli tedavi için tercihli sitotoksosite etkisi MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerinde in-vitro ortamda araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Organizmanın en temel yapı birimi olan hücreler belli iş birlikleri yaparak bir araya gelirler ve dokuları oluştururlar. Dokular da yine belli görevleri üstlenip birleşerek organları oluştururlar. Daha sonra sistemleri ve en sonunda canlıyı oluştururlar. Canlıyı oluşturan bu hücreler görevlerini yerine getirmek için kontrollü bir şekilde ve belli hızlarda çoğalmaktadırlar. İşlevini yitiren ve olgunlaşması tamamlanmış hücrelerin de programlı bir şekilde ölümleri gerçekleşmektedir. Böylece organizma belli bir süreçte yaşamını devam ettirmektedir.

Kanser, DNA hasarı sonucu hücrelerin vücudun herhangi bir yerinde kontrolsüz ve anormal şekilde çoğalıp, bölgesel olarak yayılmasını ifade eden hastalıklar bütünüdür. Kanserler buldukları organ ve dokuların yerlerine göre adlandırılıp, bulgu ve tedavi yöntemleri de kanserin türüne göre değişkenlik göstermektedir.

Kanser, gelişmiş ülkeler kadar gelişmekte olan ülkelerde de insan ölümüne yol açan en zararlı hastalıklardan biridir. 2012'de ise dünya genelinde 14.1 milyon kanser vakası bildirilmiş, bunlardan% 52.5'i erkeklerde,% 45.4'ü kadındır (Sultana ve ark., 2014). Kanser vakalarının sayısının 2035 yılında yaklaşık% 70 oranında artacağı tahmin edilmektedir (Ferlay ve ark., 2014). Meme ve servikal kanserler dünya genelinde kadınlarda en sık görülen iki kanser nedenidir (WCR, 2008; Srisuwan ve ark., 2014; Elsayed ve ark., 2015).

Tüm kanser türleri arasında meme kanseri kadınlarda daha yaygın hale gelmektedir. Aslında, ABD'de kadınlarda meme kanserinin kanser ölümlerinin ikinci önemli nedeni olduğu bildirilmiştir (Abu ve ark., 2013).

Aslında, meme kanserini tedavi etmek için kullanılan en ünlü ilaçlardan biri doksorubisindir. Doksorubisin her zaman birkaç kanser hücre hattında apoptosisi indüklediği bilinmektedir. İlaç kaynaklı apoptoz, yeni ilaçların geliştirilmesinde önemli bir sorundur. Anti-kanser ajanlarının nekrozdan ziyade apoptosisi tetiklemesi olumlu bir özelliktir çünkü nekrotik hücreler inflamasyona neden olabilir. Ek olarak apoptosis ve nekroz arasındaki denge, verilen ilacın dozuna bağlı olarak değişebilir. Bu nedenle, ilacın dozajı ve indüklediği hücre ölümü tipi arasında bir nispi bağlantı kurmak çok önemlidir. Doksorubisinin meme kanserini tedavi etmedeki etkinliğine rağmen, kardiyak toksisite de dahil olmak üzere olumsuz yan etkileri vardır. Bu nedenle, yeni bir ilaç arayışı ortaya çıkmıştır (Abu ve ark., 2013).

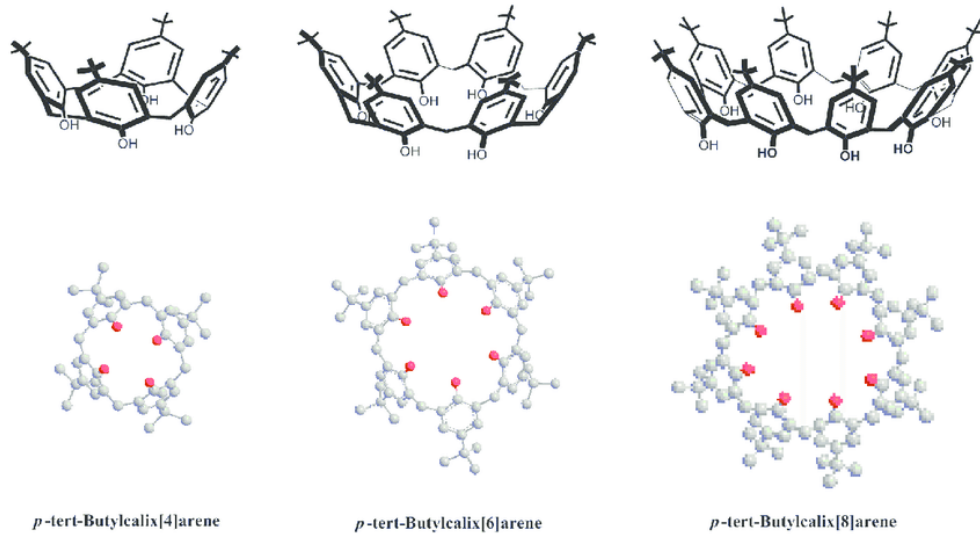
Gelişen teknolojiyle birlikte birçok fiziksel, kimyasal, biyolojik sebeplerden dolayı bazı genetik dejenerasyonlar ve hastalıklar ortaya çıkmıştır. Bu sebeplerden ötürü

yeni ilaçların geliştirilmesi önemli görülmektedir. Kaliksarenlerin kolayca fonksiyonel hale gelebilmesi, halkalı yapılara sahip olması ve molekül boşluklarının farklı boyutlarda olması sebepleriyle birçok dallarda kullanılan bileşiklerdir. Bu bileşikler birçok alanda uygulama imkanı bulurken biyolojik alanda da kullanımları araştırılmaktadır (Özkan, 2011).

2.1. Kaliksarenler

2.1.1. Kaliksarenlerin tarihçesi

Kaliksarenler, bazik ortamlı formaldehit ile *p-ter*-bütil fenolün kondenzasyonu sonucu oluşan makrosiklik moleküllerdir. 1905'te Nobel ödülü alan Adolf von Baeyer'in çalışmasına dayandırılarak geliştirilmiştir (Gutsche 1989). Kaliksaren kimyasının babası olarak kabul gören Gutsche, 1970'de 4, 5, 6, 8 fenolik birimden oluşan kaliks[n]arenlere uygun "kupa" sentetik prosedürü oluşturmuştur. Bu prosedür, kaliksarenlerin konak-konuk kimyasında fazlaca kullanılmasına imkan sağlamaktadır (Şahin, 2011) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *p-ter*-Bütikaliks[n]arenlerin yapıları

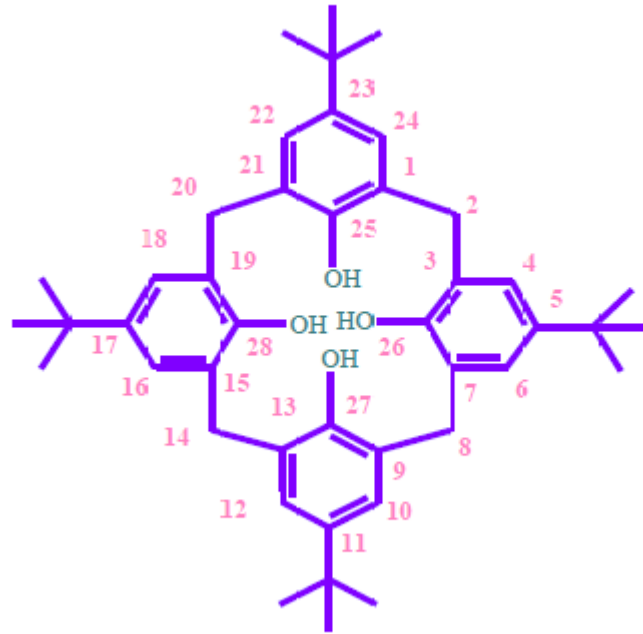
2.1.2. Kaliksarenlerin adlandırılması

Fenolik halkalarla, metilen gruplarının birbirine bağlanarak oluşturduğu siklik tetramer taç yapılardır. Kaliksarenler birçok araştırmacı tarafından farklı adlandırılmıştır (Gutsche, 1989).



Şekil 2.2.Kaliksarenlerin kupaya benzer yapısı

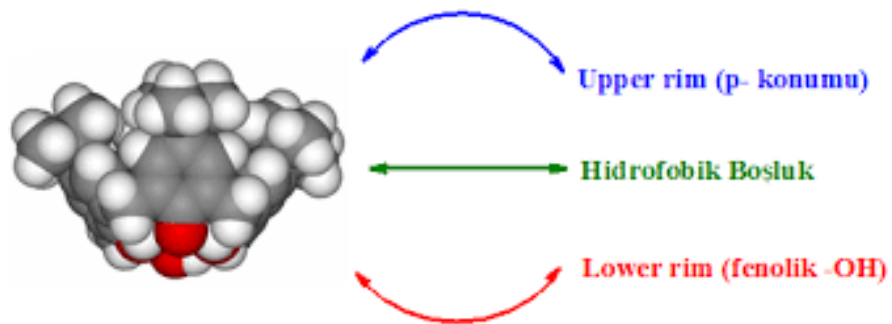
Kaliks[n]aren terimi, organik kimyadaki aromatik halkayı ifade eden “aren” ve Yunan dilinde taç anlamına gelen “Chalice” kelimelerinin birleşmesinden oluşur ve farklı sayılarda (4,5,6,7) sentezlenebilmektedir. Bu sayılar, kaliks ve aren kelimelerinin arasındaki köşeli parantez içine yazılır ve bu bileşikteki “n” ifadesi fenolik birimlerin miktarını yani makrosiklinin halka sayısını ifade eder. Bu bileşiklerin adlandırılmasında ya aromatik halkaların süstituentlerinin yerlerini gösteren numaralandırma sistemi kullanılır ya da fenolün substitue kısmı ile fenolik birimin sayısını gösteren adlandırma sistemi kullanılır. Kaliks[n]arenler 4,5,6,7,8 gibi farklı sayılarda fenolik birimlerden ve yer değiştirmiş gruplardan meydana gelirler. Farklı substitue fenoller için kaliksarenler adlandırılırken fenolün substitue kısmı kaliksarenlerin ön kısmına yazılır. Bununla ilgili olarak literatürlerde *p*- alkil fenolden oluşan dört üyeli siklik tetramer yapıdaki kaliksaren daha sistematik olarak 5, 11, 17, 23- tetra-alkil-25, 26, 27, 28- tetra-hidroksi kaliks[4]aren şeklinde, daha kısa olarak da *p*- alkilkaliks[n]arenler şeklinde adlandırılır. (Gutsche, 1989)



Şekil 2.2. 5, 11, 17, 23- Tetra-ter-bütül- 25, 26, 27, 28- tetrahidroksi- kalik[4]aren veya *p-tert*-Bütüikaliks[4]aren

2.1.3. Kaliksarenlerin fonksiyonlandırılması

Amaca uygun kaliksarenleri oluşturmak için, lower rim (fenolik OH) veya upper rim (fenil halkasının para konumundan) üzerinden değiştirilerek fonksiyonel gruplarla türevlendirilmesi gerekmektedir (Özkan, 2011).



Şekil 2.2. Kaliksaren bölgelerinin konumlanması (Özkan, 2011)

2.1.4. Kaliksarenlerin biyolojik uygulama alanları

Eşsiz üç boyutlu yüzeyleri ile kaliksarenler, siklodekstrinler, kabakgiller, kriptanlar ve taç eterleri ile birlikte bilinen en iyi konakçı moleküllerden biridir. Potansiyel yapı blokları arasında moleküler iskeletin üst veya alt kenarı boyunca kullanılabilirliği ve işlevsel oluşu, sentez ve moleküler tanıma, algılama, kataliz ve ilaç keşfi gibi nanoteknoloji için gerekli supramoleküler platformlar olarak uygulamalarda önemli reseptörler haline gelmiştir. Biyolojik bileşikler ile seçici komplekslerin tanınması ve oluşumu, işlevselleştirilmiş kaliksarenlerin özellikle ilgi çekici uygulamalarıdır. Benzer şekilde protein yüzeyi tanıma, bir kaliksaren çekirdeğine bağlı çeşitli siklik peptidler kullanılarak ve protein grubu yüzeylerinde fonksiyonel grubun ve tamamlayıcı geometrinin öneminin belirlenmesi üzerine çalışılmıştır (Nimse ve Kim, 2013).

Biyolojik moleküllerin sentetik bileşiklerle son derece spesifik olarak tanınması, hem akademik hem de uygulamalı araştırmalarda hızlı büyüyen ve zorlu bir alandır. Kaliksarenlerin kullanımı, son yirmi yılda, biyokimyasal tanıma ve aminoasit, peptid, protein, lektin, nükleotid, nükleosit, sakkarit ve steroid gibi biyoaktif moleküllerin ayrılması için güçlü bir araç olarak artan bir ilgi çekmiştir. 2005 yılında Oshima ve ark. bir kaliks [6] aren karboksilik asit türevinin organik ortamda ekstraksiyonunu teşvik ederek sitokrom c (Cyt c) gibi katyonik proteinler için yüksek bir afinite sergilediğini bildirmiştir. Aynı grup, aynı zamanda, p-tert-oktilkaliks [6] aren ve p-tert-oktilkaliks [8] karboksilik asit türevlerinin büyük boşluklarının ortaya çıktığını ortaya koyan birkaç kaliks [4,6,8] arenini protein ekstraksiyon ajanları olarak da araştırmıştır (Nimse ve Kim, 2013).

Toksisite, güçlü ilaç moleküllerinin keşfedilmesinde ve geliştirilmesinde büyük bir engeldir. Bu engellere rağmen, çoğu kaliksaren türevleri hayvan modellerinde düşük toksisite ya da hiç toksisite göstermemiştir. Kaliksarenler çeşitli antiviral, antibakteriyel, antifungal, antitüberküler ve antikanser aktiviteler göstermiştir. Perret ve ark. Bazı kaliks [4] aren fosfonat türevlerinin insan fibroblastlarının hücre büyümesi üzerinde hiçbir etki göstermediğini belirtmiştir. Aynı özetinde yazarlar, amfifilik fosfonato-kaliks [4] aren türevlerine dayanan dev vesiküllerin, hücre ölümüne neden olmadan insan fibroblastlarının hücre zarları ile birleşebildiğini belirtmişlerdir (Da Silva ve ark., 2004).

Kaliksarenler DNA üzerindeki etkilerin incelenmesinde gittikçe önemli hale gelen kanser tedavilerinde başarılı ilaç olarak kullanılabilir. Böylece tümörlü hücrelere etkisinin olup olmadığı yönünde araştırmalara ışık tutmaktadır. Literatürde;

Baggetto ve ark.(2010), çeşitli tümör hücreleri (MU2, MU2F, HT1080, SP6.5, 1PC227, Jurkat, MEWO, HI-60, Huh7, Hep-G2, MEWO, DLM) üzerinde calix [4] aren türevlerinin etkisini sentezlemiş ve incelemişlerdir ve bu bileşiklerin aktivitesini standart anti-kanser ilaçlarıyla karşılaştırmışlardır. Bu işlevsel hale getirilmiş kalix [4] aren türevlerinin, özellikle lenfoblastik lösemi ve melanoma hücre çizgilerinde güçlü anti kanser ajanları olduğunu keşfetmişlerdir.

Santos ve ark.(2015) alt kenarda amid makrosiklik ve asiklik türevleri içeren bir dizi para-tert-butilkalks [4] aren sentezlemişlerdir ve hücrel etkileri değerlendirmişlerdir. G-quadruplex etkileşimi ve stabilizasyonu, kanser hücre çizgileri üzerindeki güçlü antiproliferatif etkiyi G-quadruplex tanınmasıyla ilişkilendirmek için bileşik calix-NH₂ ile değerlendirilmiştir. Kalix-NH₂, G-quadruplex MYC22 ve h22L'yi etkileşir ve dengeler ve MCF-7, LNCaP, U87 kanser hücre dizilerinde düşük mikromolar konsantrasyonda aktiviteyi göstermiştir.

Magoulas ve ark.(2017) araştırmasında, artemisinin yapısal olarak modifiye edildiği ve potansiyel anti-kanser aktivitesi değerlendirilen yeni artemisinin dimerik konjugatları elde etmek için doğal olarak oluşan poliaminlere demirlendiği belirtilmiştir. Test edilen tüm artemisinin konjugatları, MCF7 meme kanseri hücrelerinin sayısını azaltmada artemisinin kendisinden daha etkili olmuştur. Potansiyel etki mekanizmasını aydınlatmak için en etkin 6, 7, 9 ve 12 konjugatlarını kullanmışlardır ve kanser hücrelerinin kendileri tarafından anjiyojenik büyüme faktörü pliotrofinin ekspresyonunu ve salınımını azalttığını ve in vitro olarak angiogenesis in vivo ve endotel hücre büyümesini inhibe ettiğini bulmuşlardır . Bu verilerin, yeni artemisinin dimerlerinin etkin antikanser ilaçlarının geliştirilmesi için iyi bir aday olduğuna işaret etmektedir.

Duarte ve ark.(2017) hormonal bağımlı ve hormonal bağımsız meme kanseri hücrelerinde 7-klorokinolin-1,2,3-triazol karboksamid türevleri ile indüklenen seçicilik profili, apoptotik hücre ölümü ve hücre döngüsü arrestini değerlendirmişlerdir. Sonuçlar, 7-klorokinolin türevleri QTCA-1, QTCA-2 ve QTCA-3 ile muamele edildikten sonra doz bağımlı biçimde in vitro MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Apoptoz indüksiyonu, hormonal bağımsız meme kanseri hücrelerinde % 16.8'lik bir artış ile belirgin olarak yüksekti. Sonuç olarak, MCF-7 hücrelerinde G₀ / G₁ döngüsü tutuklaması gözlemlenmiştir.

2.2. İnsan Adenokarsinoma Meme Kanseri (MCF-7) ve Fare Fibroblast (L-929)

Hücre Hattı

2.2.1. İnsan adenokarsinoma meme kanseri (MCF-7) hücreleri

2.2.1.1. MCF-7 hücresinin kökeni ve temel özellikleri

İnsan adenokarsinoma meme kanseri hücre hattı 1970’de 69 yaşındaki Frances Mallon adlı Beyaz Avrupalı bir kadından izole edilerek elde edilmiştir. Hastada, sağ memede iyi huylu bir tümör ortaya çıkarak meme dokusu alındı. Sonrasında ikinci bir operasyon sonunda MCF-7 hücre soyuna yol açacak olan dokudan alınan bir plevral efüzyonda bir malign adenokarsinom ortaya çıktı. Verici radyoterapi ve hormonoterapi ile meme kanseri için tedavi edildi. Böylelikle ilk meme kanseri hücre hattı kültürleri yapılmaya başlandı. MCF-7 hücreleri, meme kanseri hakkında yapılan birçok araştırma için araştırmacılara temel ve büyük bilgi kaynağı oluşturmuştur. MCF-7’nin adlandırılmasında, Michigan Kanser Kuruluşu’nun (Michigan Cancer Foundation) baş harfleri kullanılmıştır (Jordan2, 1997) ve Soule’ın kanser hücre dizisi üretme girişiminde yedinci girişimi temsil etti (Lee ve ark., 2015).

2.2.1.2. MCF-7 ve estrogen reseptörü

MCF-7 hücre hattının meme kanseri araştırmasına en önemli katkılarından biri, hücre çizgisinin, invaziv insan meme kanserlerinin çoğunluğunu taklit ederek önemli ER düzeylerini ifade etme yeteneği, östrojen reseptörü (ER) alfa çalışması için faydalı olmuştur. Kültürlenmiş hücre dizilerinde östrojen reseptörü alfa ekspresyonunun muhafaza edilmesinin özellikle zor olması ER-pozitif insan göğüs kanseri hücre dizilerinden çok daha fazla ER-negatif oluşmasına neden olmuştur. Kanıtlar, kültür hücre hatlarında ER’nin kaybında hücre dışı matris ve uygun olmayan büyüme alt-tabakasının (yani iki boyutlu plastik) rolüne işaret ederken, Dr. Soule’nin standart izolasyon teknikleri üzerinde herhangi bir değişiklik göstermediği görülmektedir. Bu durum, ER-pozitif MCF-7 hücre hattının izolasyonunun aslında tesadüfi olduğu anlaşılmaktadır (Lee ve ark., 2015).

MCF-7 hücre hattı sitoplazmik estrogen reseptörleri aracılığıyla estradiol işleyebilme özelliğine sahip olduğu için meme epitelindeki birçok özelliğini korumuştur.

2.2.1.3. MCF-7 hücrelerinin çalışmalardaki uygulanabilirliği

MCF-7 hücresi, meme kanserinde östrojen çalışmaları için önemli olmasının yanında bu hücreler androjen, progesteron ve glukokortikoid reseptörleri de ifade ederler. Tüm bu steroid sinyal yollarına karşı hedeflenen ajanlar metastatik meme kanseri olan bazı hastaların tedavisinde de aktif olduğu için MCF-7 hücreleri, hormon tepkisinin ve direncinin diğer yollarını aydınlatmak için değerli bir model hücre dizisi olmuştur (Lee ve ark., 2015).

MCF-7, doğrulama ve aşağı akım fonksiyonel çalışmalarını sağlamak için sınırsız miktarda RNA / DNA üretme kabiliyeti nedeniyle birçok genomik çalışma için temel bir referans hücre dizisi olarak görev yapmıştır. Örneğin, ER çip verilerinin çoğunluğu MCF-7'den kaynaklanmaktadır ve gen yönlendirmeli ER yönlendirmeli DNA dolaşımının ilk raporu ChIA-PET tarafından MCF-7'de gerçekleştirilmiştir (Lee ve ark., 2015).

İnsan meme kanseri hücreleri, kanserin ilerlemesi, çoğalması, apoptozu ve göç etmesi gibi süreçlerin anlaşılabilmesi için araştırmalarda kullanılmaktadır. Bu hücre dizilerinin kullanımında genler ve mekanizma süreçlerini düzenleyen sinyal yollarının bilgileri elde edilebilir. Kullanılan bu hücreler genetik işlemlere genel olarak uyumlu, kolay çoğaltılabilen, in vitro koşullarda tekrar üretilebilir ve sayılabilir sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Organizmalar arasındaki temel farklılıklardan ötürü hayvanlardan alınan hücrelerle karşılaştırıldığında insanlardan alınan kanser hücreleri araştırmalarda sıklıkla tercih edilirler.

2.2.2. Fare fibroblast (L-929) hücreleri

Fare fibroblast hücre dizisi (L929), 1948 yılının Mart ayında 100 günlük bir erkek C₃H /An faresinin normal deri altı adipoz dokusundan türetilen L cinsinin NTCL 929 klonudur. Bu klon, sürekli olarak kültürde oluşturulacak ilk hücre klonlarından biridir ve ana klonun 95. alt kültür üretiminden (tek hücre izolasyonu için kılcal tekniğiyle) kuruldu (ATCC® CCL-1™). Bu hücre dizisi, ana maddesi fibrosarkom hücre çizgilerinden türetilmiştir (Ma ve ark., 2012). Tek katmanlı olarak büyüyen bu hücre dizisi yüzeye yapışarak çoğalır. Bu hücre dizisi genellikle sitoksisite testleri için kontrol grubu olarak kullanılır ve uygun bir transfeksiyon konakçısıdır.

Fibroblastların yara iyileşme sürecinde kritik olduğu kabul edilir. Günümüzde enflamatuvar hücreleri doku zedelenmesi alanlarına uyguladıkları ve yapısal proteinlerin

sentezi yoluyla yaralanmaya karşı katkıda buldukları kabul edilmektedir. Ayrıca yaranın büzülerek küçülmesini ve hücre dışı matriksin yeniden düzenlenmesini de kolaylaştırırlar (Mori T ve ark., 1997).

L-929 hücre dizisi genellikle birçok standart testte araç olarak kullanılır. Malzeme biyouyumluluk testi, ilaç sitotoksitesisi testi ve hücre biyolojisi çalışmaları gibi birçok deneysel açıdan popüler olan bir hücre dizisidir (Theerakittayakorn K ve T, 2011).

2.3. Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu Analizleri

2.3.1. XTT analizi

Paull ve arkadaşları (1988) tarafından yeni bir tetrazolyum tuzu, XTT sentezlenmiştir. XTT'nin biyolojik olarak indirgenmesi, Mq "F" gibi suda çözünen diğer tetrazolyum tuzlarının tersine, Scudiero ve diğerleri (1988) tarafından yapılan çalışmaların XTT'nin insan tümör hücreleri ile kullanımını değerlendirdiği ve elektronun yeteneğini gösterdiği oldukça renkli bir formazan ürünü verir. XTT, absorbands ölçümlerinden önce formazan ürününü çözme ihtiyacını ortadan kaldırarak zaman ve işçilikte önemli ölçüde tasarruf sağlarken yüksek derecede hassasiyet sunar (W. ve ark., 1991).

XTT hücre proliferasyon analizi, ilk olarak 1988'de Scudiero ve arkadaşları tarafından, tümör hücre dizilerinde hücre büyümesi ve ilaç duyarlılığını ölçmek için etkili bir yöntem olarak tarif edilmiştir. XTT, azaldığında parlak turuncu renge dönüşen renksiz veya hafif sarı bir bileşiktir. Bu renk değişimi, pozitif yüklü dörtlü tetrazol halkasının parçalanmasıyla gerçekleştirilir. XTT indirgemenin formazan ürünü çözünürdür ve gerçek zamanlı analizlerde kullanılabilir. Bir XTT tahlilinin hassasiyeti, ara elektron taşıyıcısı PMS (N-metil dibenzopirazin metil sülfat) kullanımı ile büyük ölçüde iyileştirilmiştir. PMS, XTT hücre proliferasyon deneyi kitinde XTT'yi aktive eden bir reaktiftir. PMS, XTT'nin azaltılmasını ve formazan türevinin oluşumuna yardımcı olur (XTT hücre proliferasyon kiti, ATCC™).

XTT analizinde, kontrol koşullarından daha yüksek olan absorbands değerleri, hücre çoğalması ve canlılığının arttığını göstermektedir. Kontrol koşullarından daha düşük absorbands değerleri ise hücre proliferasyonunda bir azalmaya işaret eder ve hücrel nekroz veya apoptozun sonucu olabilir (XTT hücre proliferasyon kiti, ATCC™).

Multiwell tarama spektrofotometreleri (ELISA okuyucular) çok sayıda numuneyi yüksek hassasiyetle ölçebilir ve böylece renk reaksiyonuna bağlı olarak canlı hücre sayısı ölçümü yapılır (Mosmann, 1983).

2.3.2. XCELLigence (gerçek zamanlı) analizi

Hücre canlılığının ölçülmesi, hücre biyolojisinde temel bir adımdır. Teknolojinin gelişmesiyle, artan hassasiyet ve özgülüğe sahip yeni alternatif canlılık yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yeni yöntemlerden biri de xCELLigence sistem gerçek zamanlı hücre analizi yöntemidir. Hücrelerdeki biyolojik olaylar bu sistemle gerçek zamanlı olarak analiz edilebilir (Ozdemir ve Ark., 2013).

XCELLigence sisteminde, genellikle Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı (RTCA) ile ölçüm yapılmaktadır. Cihaz, standart bir hücre kültürü inkübatörünün içine yerleştirilerek, kontrollü bir sıcaklık, nem ve CO₂ ortamında 96 kuyucuklu bir E-plakayı kabul eder. Elektronik sensörler, her bir kuyunun altında bulunan elektrotlar aracılığıyla hücre empedansını ölçer. Ölçülen elektrot empedansı Hücre İndeksi (CI) cinsinden ifade edilir. Hücre İndeksi, zaman içinde algılama elektrodu ile temas halinde olan bir hücre popülasyonunun empedans değişikliklerini temsil eden boyutsuz bir değerdir. XCELLigence Sisteminin altında yatan elektronik algılama ilkesi, hücrelerin, özel olarak tasarlanmış e-plakalarının her bir hücre kültürünün tabanında yer alan sensör yüzeyine yapışıp yapışmadığının değerlendirilmesidir. Elektronik sensörle temas halinde, yapışık hücreler elektron akışına direnç oluşturan izolatörler gibi davranırlar. Empedanstaki bu küçük değişiklikler, RTCA aletleri tarafından sürekli olarak ölçülür ve cihaz yazılımı tarafından hücre indeksi olarak zamana bağlı olarak entegre ve ifade edilir (System, 2013).

Cihazda hücre indeksinin belirlenmesinde, hücrelerin boyutu, hücre proliferasyonu, hücrelerin yapışma gücü, hücre canlılığı ve hücrelerin morfolojileri etkili ölçüm yapılması için önemlidir (System, 2013).

RTCA cihazı, hücrelerin ilaç geliştirme, toksikoloji, kanser biyolojisi, tıbbi mikrobiyoloji ve viroloji dahil olmak üzere geniş bir araştırma alanı yelpazesinde nasıl tepki verdiğini ele almak için uygundur (Solly ve ark., 2004).

XCELLigence sisteminin hücre çoğalmasını, sitotoksitesini ve göçünü belirleyen diğer geleneksel hücre tabanlı yöntemlere birçok avantajı vardır. Hücrelerin invaziv olmayan gerçek zamanlı izlenmesi ve her bir kuyucuğu aynı anda kontrol ederek canlı hücrelerin uzun süreli izlemesini sağlar. Bu uzun süreli izleme,

araştırmacıların testi gerçekleştirmek için en uygun zaman noktalarını belirlemesine yardımcı olur. Aynı zamanda, farklı uygulamalar tek bir plakada aynı anda değerlendirilebilir. Ek olarak, IC₅₀ ve eğrilerin ortalama değeri gibi parametrelerin elde edilmesini sağlar (Ozdemir ve Ark., 2013).

2.3.3. Hücre lm ve flow sitometri analizi

Genetik olarak programlanmış hücre ölümü, çok hücreli organizmalarda temel hücrenel bir süreçtir. Apoptoz ve nekroz, hücre ölümlerinin iki yaygın şekli olmasının yanında çok hücreli organizmalarda homeostazinin korunmasında yaşamsal bir öneme sahiptir. Hücrelerin uygun olmayan ölümü, organların işlev bozukluklarına ve hatta ölümlere bile yol açabilir. Bazı araştırmacılar morfolojik görünüm, enzimatik özellikler, fonksiyonel veya immünolojik özellikler de dahil çeşitli kriterlere göre hücre ölümlerini sınıflandırmışlardır.

2.3.3.1. Apoptotik hücre lm

Programlı hücre lm (PCD), bir hücrenel programın aracılık ettiği hücre ölüm formudur. PCD'nin arketipik formu olan apoptoz ilk kez Kerr ve ark. morfolojik kriterlere dayanan zgn tanımını, apoptosisin nekrozdan farklı olduğunu vurgulamıştır. Apoptosisin morfolojik özellikleri arasında kabarcıklanma, kromatin kondensasyonu, nükleer parçalanma, adezyon ve yuvarlanma kaybı (yapışık hücrelerde) ve hücre büzülmesi yer alır (Ting Dong ve ark., 2015).

Apoptoz, doku bütünlüğünün, tümörün gerilenmesinin ve bağışıklık tepkisi gelişiminin homeostatik kontrolünde, embriyoenez sırasında temel bir rol oynayan ökaryotlarda yaygın bir hücre ölüm şeklidir. Spesifik sinyaller alındığında, hücrede bir dizi farklı biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler meydana gelir. Kaspazlar ve belki de diğer proteazlar olarak bilinen bir protein ailesi, apoptosisin ilk aşamalarında aktive edilir. Bu proteinler, sitoskeleton ve nükleer proteinlerdeki yapısal proteinler dahil olmak üzere normal hücrenel fonksiyon için gerekli olan anahtar hücrenel substratları ayırır. Bu biyokimyasal olayların sonucu hücredeki morfolojik değişiklikler ve geniş DNA bölünmeleri ortaya çıkmaktadır. Apoptozun dinamik bir süreç olmasının yanında ve apoptotik hücrelerin karakteristik özelliklerini sergiledikleri kısa bir “zaman penceresi” olduğu da söylenebilir. Bu nedenle, farklı yöntemler apoptoz sürecinin zamanına bağlı olarak farklı sonuçlar üretebilir (Riccardi ve Nicoletti, 2006).

Apoptoz, morfolojik özelliklerinin tanımlanmasından, sinyal yollarının moleküler bir anlayışına kadar uzun bir yol kat etmiştir. Kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığın oluşum mekanizmasını anlamada yeni değerlendirmeler oluşturur (Salami ve Karami-Tehrani, 2003).

Programlı ölüm çeşidi olan apoptoz, tüm PCD formlarını tanımlamak için yeterli gelmemiştir. Birçok araştırma, gelişme ve hastalıkta apoptotik olmayan diğer programlanmış hücre ölüm yollarını keşfetmiş ve karakterize etmiştir. Bunlara nekroptoz, otofajik hücre ölümü, pirotoz, netozis ve ferroptoz örnek verilebilir (Ting Dong ve ark., 2015).

2.3.3.2. Nekrotik hücre ölümü

Nekroz, apoptotik olmayan bir hücre ölümü çeşididir. Morfolojik olarak hücre şişmesi, mitokondrinin işlevinin bozulması ve sitoplazmik membranın patlaması ile karakterizedir. Uzun bir süre boyunca nekrozun sadece kontrol edilemeyen bir hücre ölüm formu olduğu düşünülmüştür. Fakat buna karşı kanıtlar ortaya çıkmış ve daha önce yapılan görüşleri değiştirmiştir (Ting Dong ve ark., 2015). Hücrede bulunan ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile indüklenen hücre ölümü nekrotoz yoluyla da gerçekleştirilebilir (Christofferson ve Yuan, 2010).

Temel programlanmış hücre ölüm süreçlerini incelemek için bir dizi güçlü küçük moleküllü bileşik geliştirilmiştir; Bu küçük moleküllerin bazıları, anormal hücre ölümünün neden olduğu kanser ve enflamatuar hastalıklar gibi hastalıklar için yeni terapötik ajanların geliştirilmesi için büyük bir potansiyel göstermektedir. Böylelikle, kimyacıların ve biyologların küçük moleküllü ve kimyasal genetik yaklaşımları bu alanda yeni anlayışlar üretmeye devam edecektir (Ting Dong ve ark., 2015).

2.3.3.3. Flow sitometri analizi

Önceki yıllarda, yeni ve güvenilir toksisite deneylerinin geliştirilmesine yönelik araştırma alanları geliştirilmiştir. Bu çalışma alanlarında yapılan in vitro toksisite analizleri, düşük maliyetli, ihtiyaç duyulan laboratuvar hayvanlarının sayısını dengeleyen ve şüpheli kimyasalların ilk seçimini yapmak için hassas ve yüksek verimli tarama fırsatı sunarak önemli faydalar sağlarlar (Vanparys ve ark., 2006).

Flow sitometrik hücre döngüsü analizi, hücre döngüsünün farklı aşamalarında hücrelerin dağılımını ölçer ve bu nedenle hücre proliferasyonunun daha ayrıntılı olarak değerlendirilmesine izin verir. Flow sitometrinin kimyasalların zehirli etkilerini ön-taramada kullanımı son zamanlarda in vitro test için gösterilmiştir (Tuschl ve Schwab, 2004). Açıkça görülen avantajları, testler için gereken kısa sürede, aynı anda birkaç parametrenin araştırılması ve performansın kolay olması olarak söylenebilir.

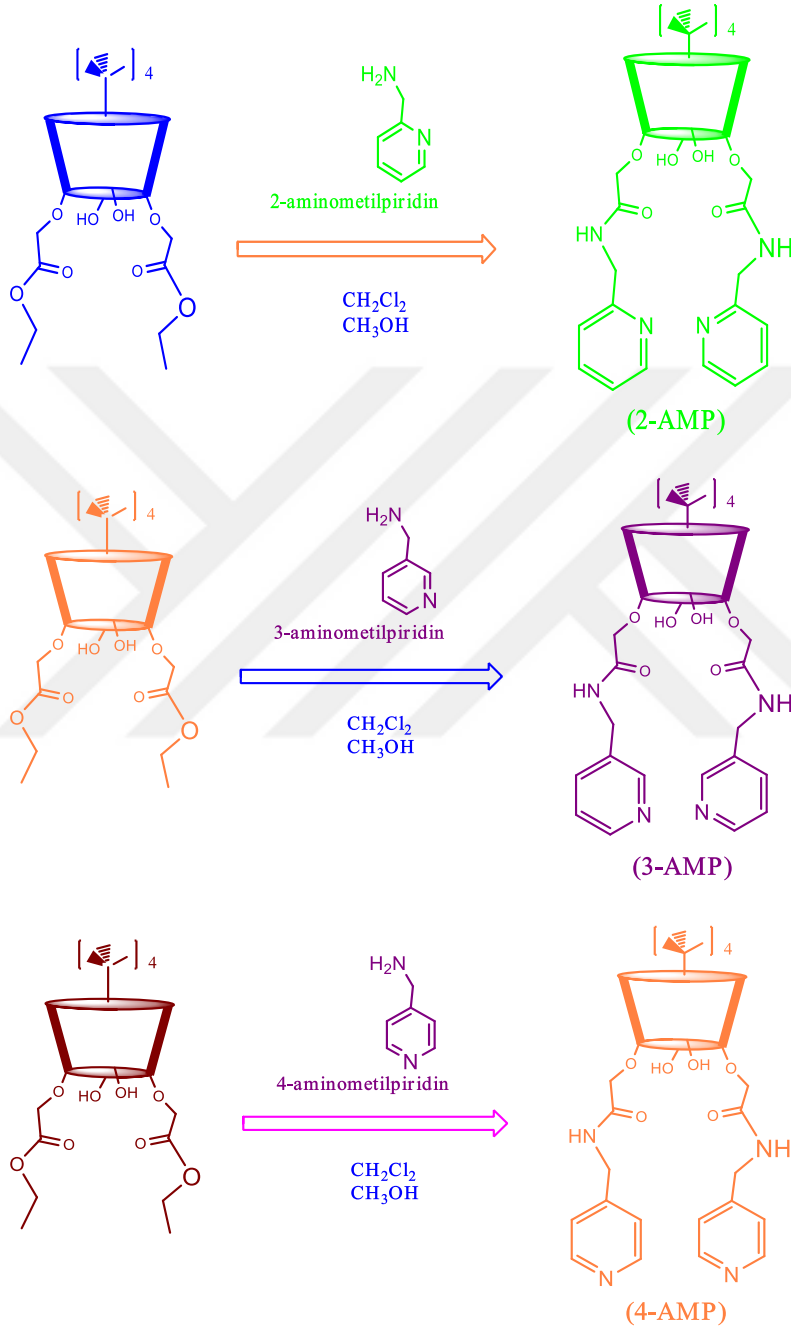
Flow sitometrisi, ışık saçılımı ve floresans ölçümü ile binlerce bireysel hücrenin fiziksel ve kimyasal özelliklerini incelemek için hızlı bir yöntemdir. Bu teknik, klinik ve farmasötik çalışmalara yaygın bir şekilde uygulanmış olmasına rağmen, toksikolojik çalışmalarda bir araç olarak potansiyeli kısa süre önce keşfedilmiştir (Stauber ve ark., 2002).

Sağlıklı hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzeylerinde membran yağı olan fosfatidilserin (PS) vardır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS'ler hücre zarının dış yüzüne taşınırlar. Bu yer değiştirme işlemi hücre zarı bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde görülür. Annexin V, hücrenin dış yüzeyine taşınan, PS'ye bağlanabilen bir protein olduğundan floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücre görüntüsü elde edilir. Böylece hücrelerin ölüm oranları flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak 7-AAD kullanılabilir. Boyanan bu hücreler erken ya da geç apoptotik hücreleri, nekrotik hücreleri ayırt edebilir (GÜLEŞ ve EREN, 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Numunelerin Sentezi ve Analizi

3.1.1. Kimyasal sıvı çözeltilerinde 2-AMP, 3-AMP, 4-AMP'lerin sentez mekanizması



Şekil 3.1. 2-AMP, 3-AMP, 4-AMP'lerin diamit türevleri

Çizelge 3.1. Araştırmadaki *p-tert*-bütilkaliks[4]arenin diamit türevlerinin isimlendirilmesi

<i>Kısaltmalar</i>	<i>İsimlendirilmesi</i>
2-AMP	2-Aminometilpridin <i>p-tert</i> -bütilkaliks[4]aren
3-AMP	3-Aminometilpridin <i>p-tert</i> -bütilkaliks[4]aren
4-AMP	4-Aminometilpridin <i>p-tert</i> -bütilkaliks[4]aren

Araştırmada kullanılan maddeler, Ek-1'deki gibi sentez işlemleri yapıp çalışmamız için uygulandı.

3.1.2. Kimyasal sıvı çözeltilerinde 2-AMP, 3-AMP, 4-AMP'lerin analizi

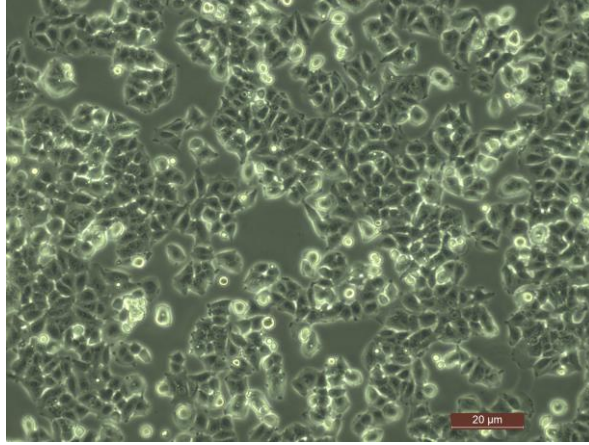
DeneySEL çalışmalarımızda kullandığımız ve Ek-1'de sentez aşamaları gösterilen supramolekül bir kimyasal bileşik olan kurutulmuş 2-AMP, 3-AMP, 4-AMP'lerin yapıları; FTIR, 1H-NMR, MS, 13C-NMR gibi spektroskopik teknikler kullanılarak analizleri yapıldı.

3.2. Biyolojik Numunelerin Belirlenmesi ve Analizleri

3.2.1. MCF-7 ve L929 hücre hatları

3.2.1.1. MCF-7 hücre hattı

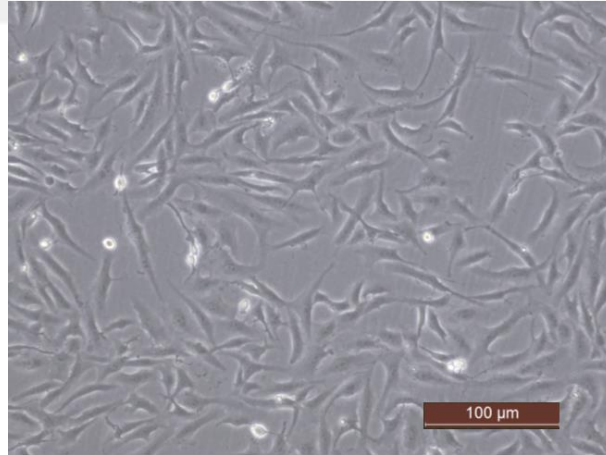
MCF-7 hücreleri 1970'de 69 yaşında bir Kafkas kadınının göğüs dokusundan izole edilen ve östrojen pozitif (ER+) bir hücre dizisidir. Göğüs adenokarsinomasından türetilmiş (ATCC® HTB-22™) geniş çapta incelenen bir epitel kanseri hücre hattı olan MCF-7, farklı meme epitelinin özelliklerine sahiptir. Ayrıca, sitoplazmik östrojen reseptörleri vasıtasıyla, bu hücreler östradiolü işleme yeteneğine sahiptir. YüzeYE yapışarak kültüre edilen ve tek katmanlı (monolayer) bir hücre hattıdır.



Şekil 3.2. İvert mikroskopta 10x objektifte görüntülenen MCF-7 hücresi

3.2.1.2. L929 hücre hattı

Fare fibroblastı hücre dizileri (L-929), (ATCC® CCL-1™) 1948’de C3H/100 günlük bir erkek farenin deri altı bağ dokusundan türetilip, L cinsinin NTCL 929 klonudur. Yüzeye yapışarak büyüyen bu hücre dizisi monolayer (tek katmanlı) olarak büyür. Kültür işlemi yapılırken sadece tripsin kullanılır. Hücreler yüzeyi kapladığında haftada 2 veya 3 kere pasajlanarak kültürleri yapılır.



Şekil 3.3. İvert mikroskopta 10x objektifte görüntülenen L929 hücresi

3.2.2. Hücrelerin çözündürülme (thawing) işlemleri

Sıvı azotta (-196 °C) saklanan MCF-7 hücre hattı, oda sıcaklığında çözündürüldükten sonra içerisinde antibakteriyal gentamisin (1mg/ml) bulunan RPMI-1640 (Biochrom-Merck, Almanya; FG-1215) besiyeri ile seyreltildi ve T-25 hücre kültür kabı içine konulup inkübe edildi. T-25’teki MCF-7 hücresi, belli bir yoğunluğa ulaşıp yüzeyi kapladıktan sonra T-75 kültür kabına aktarıldı. Bu işlem, hücre pasajlama

yöntemiyle yapıldı. T-75 hücre kültür kabına aktarımı yapılan MCF-7 hücreleri canlılıklarını incelemek için invert mikroskop altında görüntülendi. Aynı şekilde, sıvı azottan alınmış olan L929 hücre hattı oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra içerisinde antibakteriyal penicilin (5mg/ml) bulunan Dulbecco-MEM (Sigma D6429, composed of 4,500 mg/l glucose, sodium pyruvate, and sodium bicarbonate) besiyeri ile seyreltilip T-25 hücre kültür kabı içerisinde konularak inkübe edildi. Belli yoğunluğa ulaştıktan sonra T-75 hücre kültür kabına aktarımı yapılan L929 hücreleri de canlılıklarının incelenmesi için invert mikroskop altında görüntülendi. Her iki hücre hattı da deneyler için gerekli miktarda hücre sayısına ve yoğunluğa ulaşana kadar pasajlandı.

3.2.3. Hücrelerin kültüre edilmesi ve pasajlanması

MCF-7 hücrelerinin kültür ortamında %10 (v/v) fetal bovine serumu (fetal dana serumu, FBS, Bichrom-Merck, Almanya; S-0115), 2 mM L-glutamin içeren RPMI1640 besiyeri kullanıldı. RPMI1640 besiyerine, bakteri enfeksiyonunu engellemek için gentamisin (1mg/ml) eklenerek kompleks bir besiyer elde edildi. Daha sonra hücreler 37°C sıcaklıkta %5'lik CO₂ 'li inkübatörde kültüre edildi.

Yine aynı şekilde L929 hücrelerinin kültür ortamında %10 (v/v) fetal bovine serumu (fetal dana serumu, FBS), Dulbecco-MEM besiyeri kullanıldı. Bakteri enfeksiyonunu engellemek amacıyla Dulbecco-MEM besiyerine penicilin (5mg/ml) eklenerek kompleks besiyer elde edildi. Daha sonra hücreler 37°C'de, %5'lik CO₂ inkübatörde kültüre edildi.

Belli yoğunluğa ulaşarak kültür kabı yüzeyini dolduran hücreler tuz tampon (Hanks tuz solüsyon Biochrom-Merck, Almanya; L-2045) çözeltisi ile kap yüzeyini kaplayacak şekilde yıkandı ve ardından tripsin-EDTA (Biochrom-Merck, Almanya; L-2143) çözeltisi eklenerek, hücreler yüzeyden kalkana kadar 37 °C % 5'lik CO₂'li etüvde inkübe edildi. Daha sonra üzerine yeterli miktarda kompleks besiyeri eklenerek tripsin aktivitesi durduruldu. Santrifüj tüpüne aktarılan hücreler, 5 dk. 1200 rpm'de santrifüj edildi. Hücre pelleti kompleks büyüme besiyeri ile seyreltilerek T-75 kültür kabına aktarıldı ve 37 °C'de, % 5'lik CO₂'li etüvde kültür ortamına bırakıldı (Uyar ve ark., 2014).



Şekil 3.4. MCF-7 ve L929 hücrelerinin subkültüründe kullanılan cihazlar; (a) su banyosu, (b) santrifüj, (c) inkübatör (d) invert mikroskop

3.2.4. Hücrelerin sayımı ve ekimi

Hücre ekimi için önce inkübe edilmiş MCF-7 hücre kültür kabı, invert mikroskop altında incelendi. İncelemenin ardından kültür kabında yaklaşık % 75-85 oranında yoğunluğa ulaşan hücreler atık besiyeri uzaklaştırılarak hanks tuz solüsyonu ile yıkandı. Sonrasında kültür kabı, taban yüzeyini kaplayacak şekilde tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 37 °C’de, % 5’lik CO₂ içeren etüvde tripsinin aktifleşip tek katmanlı hücre tabakasının yüzeyden kalkması için beklendi. Beklemenin ardından tripsin aktivitesini durdurmak için içerisine hazırlanmış kompleks besiyeri eklenerek hücrelerin süspansiyonu için pipetaj yapıldı. Bu sayede hücre kümelerinin ayrılması sağlandı. Oluşan süspansiyon, 15 ml’lik santrifüj tüpü içine alınarak 5 dk. 1200 rpm’de santrifüj edildikten sonra pelletin süpernatant kısmı ayrıldı. Geriye kalan hücre pelleti kompleks besiyeri ile çözdürülerek iyice pipetaj yapıldı (Akbulut ve ark., 2016).

Hücre sayımı yönteminde çok küçük hacimli hücrelerin mikroskop ortamında rahatlıkla sayılabilmesi hedeflenmektedir. Bu mikroskopik lamda, hemositometrik lam üzerinde yatay ve dikey kesilmiş çizgiler bulunur ve üç bölümlü 9 büyük kareden oluşur. Bu 9 büyük karenin her birinin alanı 1 mm²’dir. Sıvının slayt bölmesindeki derinliği 0,1 mm’dir. Her bir kare üzerindeki toplam hacim aşağıdaki şekilde hesaplanır:

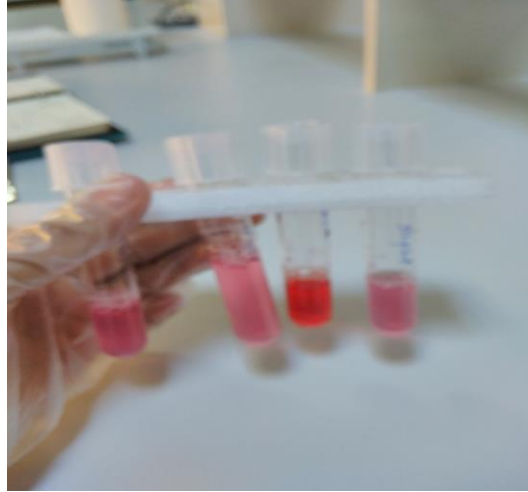
$$\text{ml'deki hücre sayısı} = \text{thoma'daki hücre sayısı} / 2 \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4 \quad (3.1)$$

Lam üzerinde bulunan hücelere, ışık mikroskobu altında görüntülenerek belli bir yöntemle göre sayım işlemi uygulanır. Ölü hücelerde hücre membranı geçirgenliği bozulduğu için ölü olan hücreler triphan mavisiniyle boyanmaktadır. Canlı hücreler de boyayı önce içine alıp hemen dışarı attığı için parlak ve saydam olarak gözlenmektedir. Böylece gerekli hücre canlılık oranı saptanmaktadır (Celebi ve ark., 2017).

Bu hesaplama yöntemiyle MCF-7 hücresi pelleti ile oluşturulmuş süspansiyondan ve triphan mavisinden 100'er µl alınarak thoma lamına eklenip gerekli hücre sayımı yapıldı. Hücrelerin 96 kuyucuklu plakaya ve 16 kuyucuklu e-plakaya 10×10^4 ve 15×10^4 hücre/ml olacak şekilde ekimleri yapıldı. Daha sonra plakalar 24 saat boyunca inkübasyona (37 °C'de, %95 nem, %5 CO₂'li doku kültürü inkübatörü) bırakıldı. Hücreler yüzeye tutunup yeterli yoğunluğa ulaştığında 1-500 µM aralıklarındaki çeşitli konsantrasyonlarda 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'ler hücrelerin üzerine eklenerek, hücrelerin maddelerle olan etkileşimleri gözlemlendi. Aynı prosedürler L929 hücresi için de uygulandı.



Şekil 3.5. MCF-7 ve L929 hücrelerinin ekim için hazırlanması



Şekil 3.6. 25 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarındaki 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'ler

3.2.5. Hücrelerin, hücre canlılığı (viabilite) ve sitotoksisite (XTT) analizleri

Sitotoksisite testleri, sitotoksik maddelerin ya da büyüme faktörleri gibi test kimyasallarının hücreler üzerinde denenerek canlı hücre sayısını tespit etmede kullanılmaktadır. Genel olarak MTT ile XTT testleri kullanılmaktadır.

Bu araştırmadaki sitotoksisite analizlerinde 3 - [4, 5- Dimethyl thiazol-2-yl] 1-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (XTT) ajanı kullanıldı. Kullanılan pridin grubu türevli kaliks[4]arenlerin (2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP), MCF-7 hücrelerine karşı sitotoksik etkisi 96 kuyucuklu kültür kaplarında test edildi. Kontrol kuyucukları hariç her kuyucuğa 5×10^3 hücre ekildikten sonra 37°C etüvde inkübe edildi. Hücrelerin yeterli yoğunluğa ulaşmasından sonra 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'ler yüksek konsantrasyondan (500 μM) düşük konsantrasyona (3 μM) yatay olarak seyreltildi. Daha sonra maddelerin hücrelerle olan etkileşimi için 24 saat etüvde inkübe edildi. Aynı şekilde L929 hücreleri de kontrol (besiyer) kuyucukları hariç her kuyucuğa 10×10^3 hücre ektikten sonra 37°C de inkübe edildi. Daha sonra 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin 500, 250, 100 μM konsantrasyonları kullanılarak maddelerin hücre üzerindeki sitotoksik etkisi gözlemlendi. İki hücre hattı için de her göze XTT solüsyonu eklendi. Daha sonra canlı hücrelerin meydana getirdiği formazan kristallerinin oluşumunun gözlenmesi için 5 saat etüvde bekletildi. Hücre üremesindeki azalmanın ve oluşan ürünün 460-650nm (referans 630nm) dalga boylarında ELISA okuyucu cihazı ile optik yoğunluğunun belirlenmesi ve IC_{50} değerlerinin hesaplanması ile belirlendi (Zengin ve ark., 2015).



Şekil 3.7. Elisa cihazı

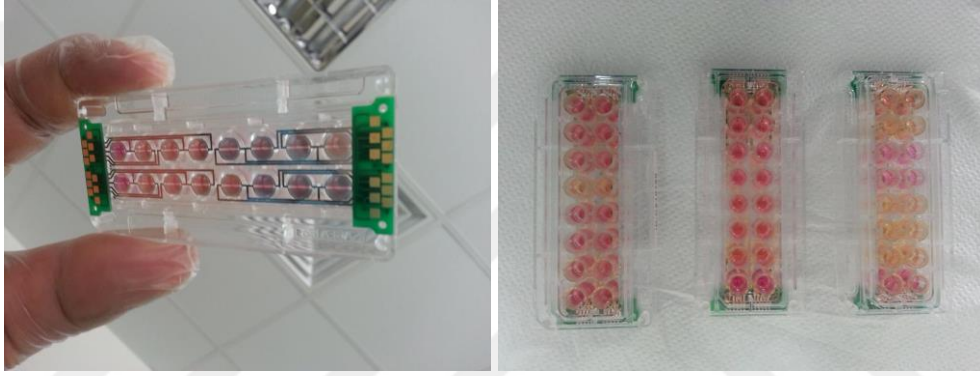
3.2.6. Hücrelerin gerçek zamanlı (XCELLigence) analizi

XCELLigence sistemi (Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı, RTCA SP®), empedans değeri ölçümüne dayanarak hücre çoğalmasının gerçek zamanlı izlenmesini sağlar. Bu teknoloji, bir elektrik empedans hücre sensörü olarak mikroelektrotlarla kaplı tabanları olan spesifik 16 kuyucuklu hücre kültürü e-plakaları kullanır. Analiz, kuyucukların tabanını kaplayan yüksek yoğunluklu elektrot dizisi boyunca bağlı hücrelerin oluşturduğu elektriksel empedans ölçümüne dayanmaktadır (Hasan ve ark., 2014). Empedans değeri, yüzeyde büyüyen hücreler tarafından oluşturulan elektriksel empedansta göreceli değişim olarak tanımlanan boyutsuz bir parametre olan hücre endeksine otomatik olarak dönüştürülür. Hücresel durumun kantitatif ölçümü olarak hücre endeksi değeri, hücreyle kaplı alanın genişliğini temsil eder ve hücre sayısı, hücre proliferasyon oranı, hücre şekli ve boyutu, hücre canlılığı gibi etmenlerde nicel veriler elde edilmesini sağlar (Atienza ve ark., 2005).



Şekil 3.8. RTCA (xCELLigence) cihazı

2-AMP, 3-AMP, 4-AMP'lerin MCF-7 ve L929 hücrelerindeki sitotoksik etkilerine RT-CES 16X xcelligence analizi cihazı kullanılarak (ACEA Biosciences) bakıldı. 100.000 hücre/ml olacak şekilde ekilen MCF-7 hücreleri, inkübatör içerisindeki 16 kuyucuklu e-plakalara %10 FBS (Fetal sığır serumu) ve %1 gentamisin ilave edilmiş kompleks besiyeriyle kültüre edildi. Yüzeyle tutunan ve yeterli yoğunluğa ulaşan MCF-7 hücreleri, cihazın hücre endeksi değeri olarak adlandırılan mikroelektrotların empedans değeri 1.00'a ulaştığında kaliksaren maddelerin çeşitli konsantrasyonları (25,100,250 μM) hücrelerin üzerine eklendi ve maddelerin hücre ile etkileşimleri her 15 dk.'da bir empedans ölçerek belirtilen süre boyunca gerçek zamanlı olarak gözlemlendi.

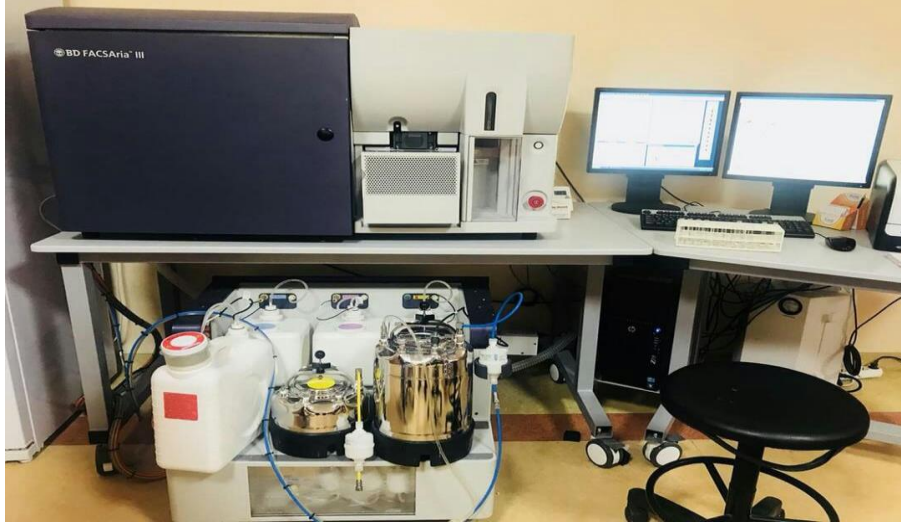


Şekil 3.9. E-plaka VIEW 16

3.2.7. Hücrelerin flow sitometri (Annex. / 7AAD) yöntemi ile analizi

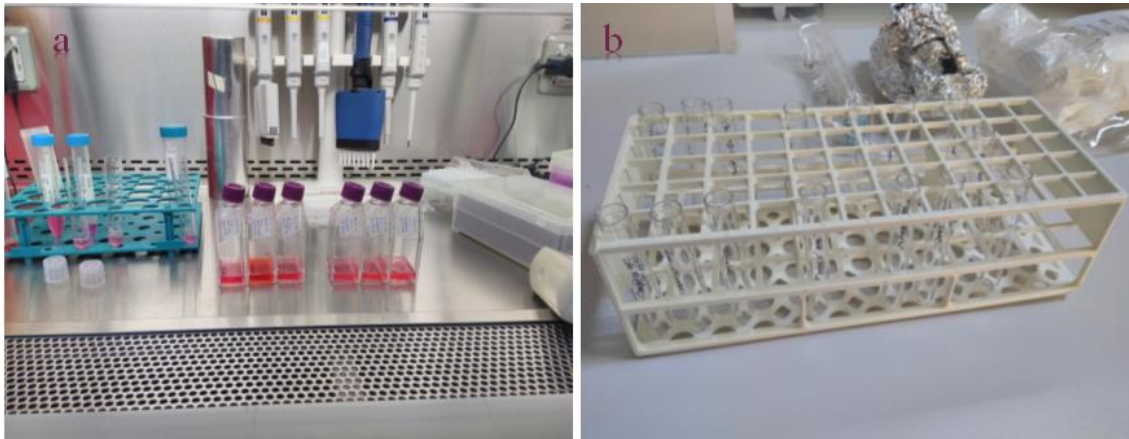
Flow sitometri analizi, süspansiyon edilmiş hücre veya partiküllerin bir akışkanın içinden geçerek karakteristik yapılarının ölçümüne dayalı bir analiz sistemidir. Flow sitometrisi ile süspansiyon halindeki bu hücre veya partiküller lazer ışığı ile aydınlatılmış bir bölmeden geçirilerek hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanır ve analiz edilir. Böylece hücre ya da partikülün enzim aktiviteleri, hücre canlılığı, hücre ya da partikülün immünofenotipi, DNA içeriği, hücre membran potansiyeli gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplayabilme imkanı sağlar (Dunphy, 2004).

Araştırmada hücre ölüm karakteri hakkında bilgi vermesi için flow sitometri yöntemi kullanıldı. Buna göre hücrenin programlı hücre ölümü olan apoptoza mı yoksa hasarlı (istenmeyen) hücre ölümü olan nekroza mı gittiği bu yöntemle analiz edildi.



Şekil 3.10. Flow sitometri cihazı

T-25 flasklara 15×10^4 hücre/ml olacak şekilde ekilen MCF-7 hücresi, 10, 25 ve 50 μM konsantrasyonlarında hazırlanmış kaliksarenler ile 8 saat süreyle büyümeye bırakıldı. Hücreler öncelikle yüzeyden kaldırılma işlemine kadar getirildi. Oluşan pellet soğuk PBS (Fosfat tampon tuzu) ile iki defa yıkandı. Daha sonra pelletin üzerine 200 μl 1x bağlama tamponu eklenerek hücreler süspansiyon haline getirildi. Hücreler flow tüplerine aktarılarak üzerlerine Annexin V / 7AAD boyama kitinde bulunan boyama protokolü modifiye edilerek hücrelerin boyanması sağlandı. Hücrelerin bu maddeler ile etkileşmesiyle oluşan apoptoz ve nekroz, Annex. / 7AAD ile flow sitometride analiz edildi. Bu sonuçlarla birlikte hücre ölümlerinin hangi karakterde oldukları karşılaştırıldı.



Şekil 3.11. Flow sitometri aşamaları; (a) T-25 flasklara ekilmiş olan hücreler, (b) flow tüpleri

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Belirtilen analiz sürecinde, tüm deneyler üçer kez yapıldı. Deney sonuçları ortalama \pm standart sapma değerleri olarak ifade edildi. Grafikler ve veri analizleri, GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) kullanılarak analizi gerçekleştirildi.

3.2.9. Hücrelerin dondurulma (freezing) işlemi

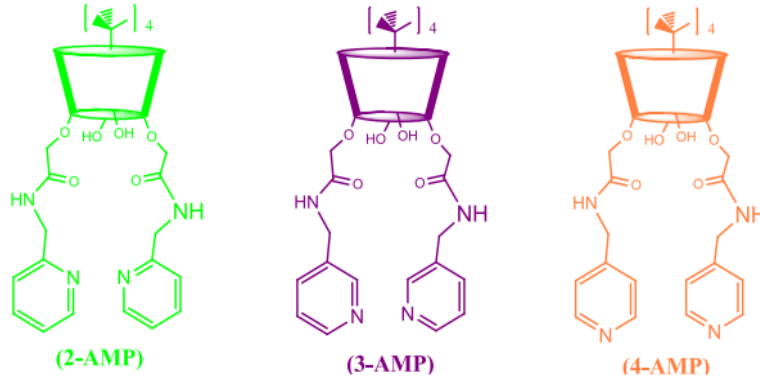
MCF-7 ve L929 hücrelerine, santrifüj aşamasına kadar normal pasaj işlemleri aynen uygulandı. Santrifüjden sonra hücrelerin süpernatantı atılarak santrifüj tüpünde bulunan hücre pelleti hücre dondurma medyumuna ile (% 90 Fetal Sığır Serumuna, %10 DMSO) seyreltilip viallere aktarıldı. Bu vialler, içinde izopropil-alkol olan özel delikli kaba (Mr.Frosty) konuldu ve $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bir gün bekletildi. Daha sonra delikli kap dışına alınan vialler $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de stoklandı. Sonrasında $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de sıvı azot tanklarında stoklandı. Böylece hücreler daha sonraki çalışmalar için dondurulup saklanarak tekrar tekrar kullanılabilir.



Şekil 3.12. Hücre dondurma cihazları; (a) izopropil ile dolu delikli vial kabı, (b) $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ dondurucu dolap (c) $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıvı azot tankı

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin Yapıları, Sentezi ve Analiz Sonuçları

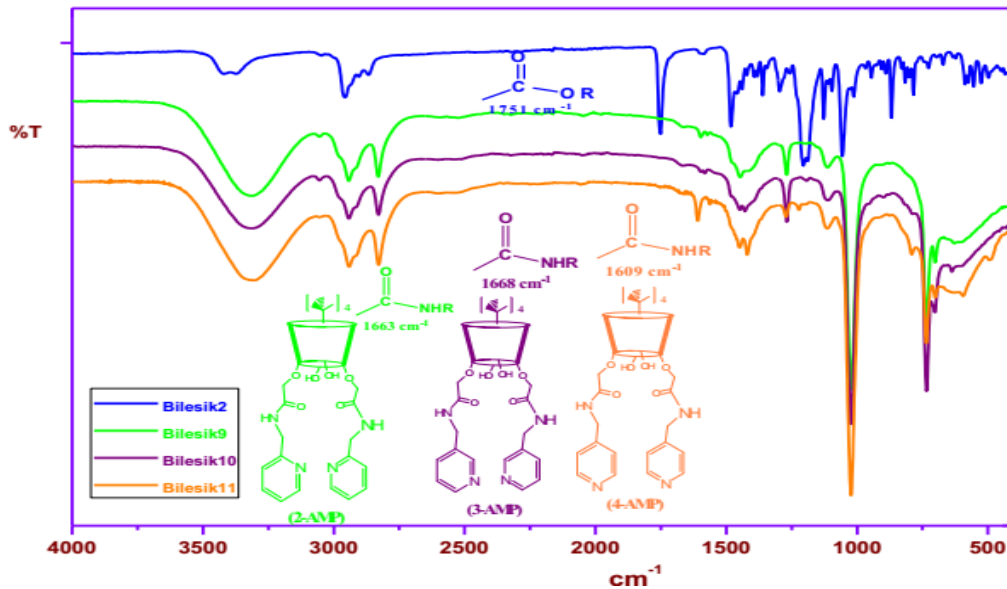


Şekil 4.1. 2-Aminometilpridin, 3-Aminometilpridin, 4-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren türevleri

Araştırmamız süresince etkili ve pasif olarak hedeflendirilmiş antikanser tedavi için toz halindeki 2-AMP 3-AMP ve 4-AMP'lerin sitotoksik etkileri incelenmiştir.

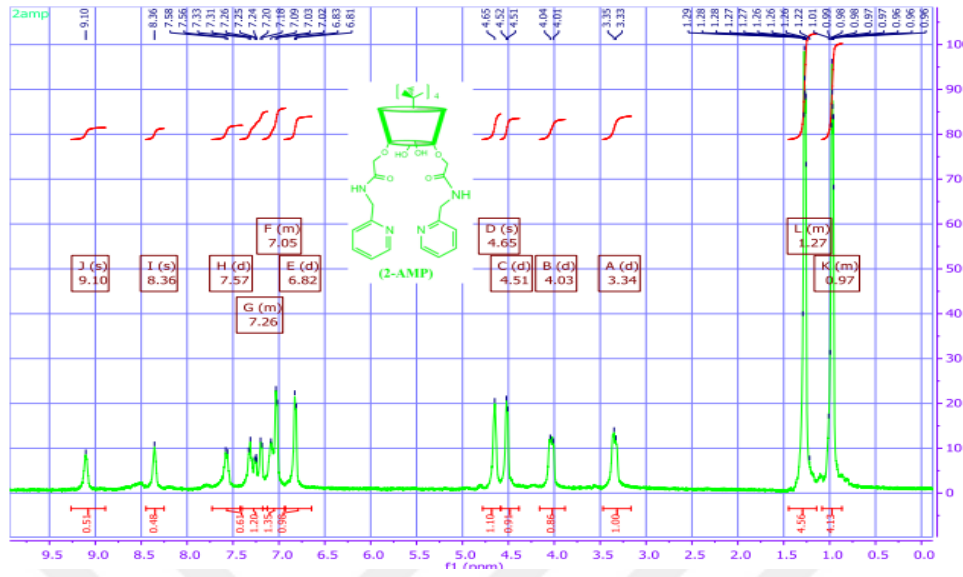
4.1.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin FT-IR analizleri

2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin FT-IR analizlerine bakıldığında FT-IR spektroskopisinde 1751 cm^{-1} deki ester karbonil bandının 2-AMP için 1663 cm^{-1} , 3-AMP için 1668 cm^{-1} 4-AMP için 1609 cm^{-1} amid karbonil bandına dönüşümü gözlemlendi (Şekil 4.2) (Sayin ve ark., 2011; Ozcan ve ark., 2015).



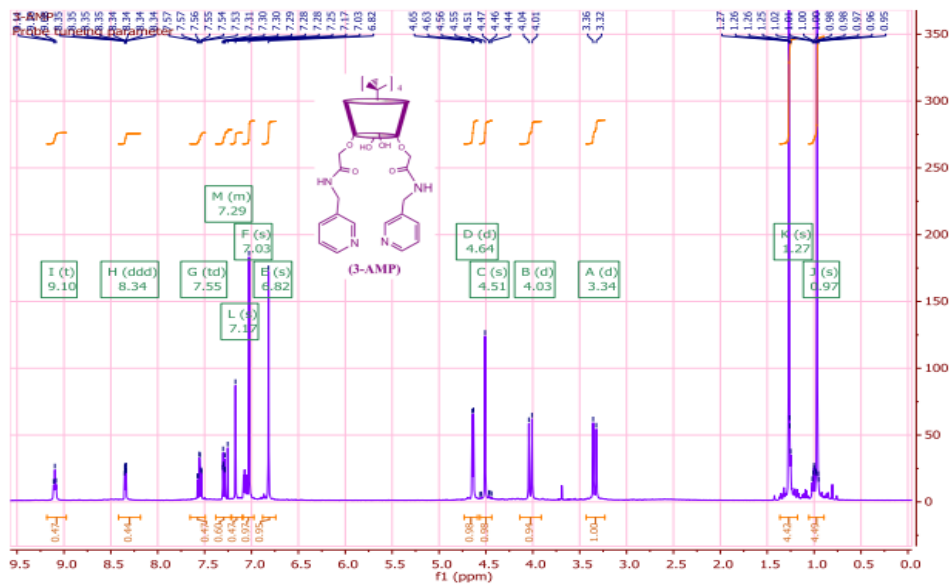
Şekil 4.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin FT-IR analizleri

4.1.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları



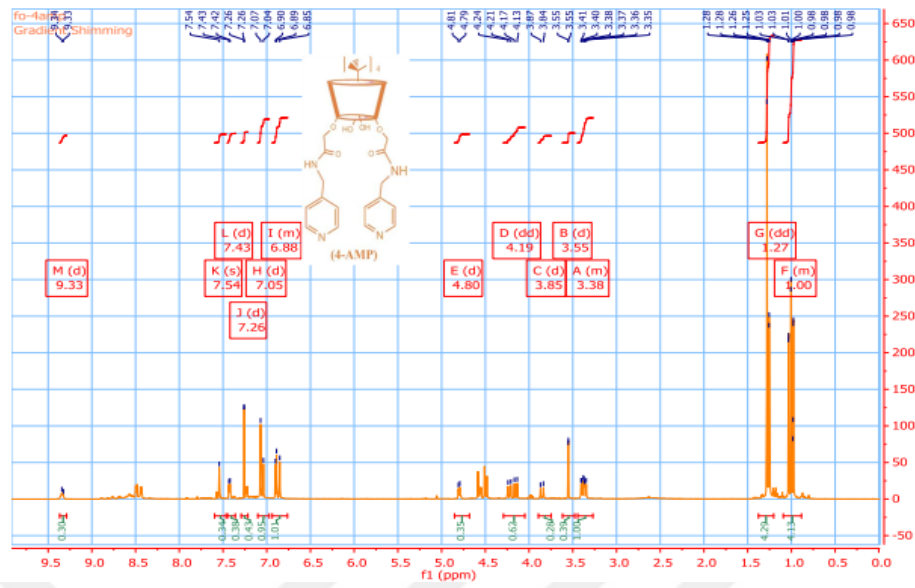
Şekil 4.3. 2-AMP (2-Aminometilpridin)'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

2-AMP; Verim:1.48 g, (% 65.0), E.N: 259-262 IR :1676 cm^{-1} (C=N) ν_{max} (ATR): 3454, 3358, 1676 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz CDCl_3) : δ 0.97 (18H, s, tBu), 1.27 (18H, s, tBu), 3.34 (4H, d, $J=13.3$ Hz, ArCH_2Ar), 4.03 (4H,d, $J=13.3$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 6.82 (4H, s, Ar-H), 7.05 (4H, s, Ar-H), 4.51–4.65 (8H, m, OCH_2 , $\text{Ar-CH}_2\text{-NH}$), 7.31 (2H, s, OH), 7.57 (2H, d, $J=7.8$ Hz, PyH), 8.45 (2H, d, $J=4.5$ Hz, PyH), 7.06–7.10 (2H, m, PyH), 9.21(2H, t, NH), 8.62 (2H, d, PyH). Analitik Hesaplama $\text{C}_{60}\text{H}_{72}\text{O}_6\text{N}_4$: C, 76.24; H, 7.68; N, 5.93 Bulunan; C, 76.28; H, 7.70; N, 5.88% (MA: 944.56 g/mol) (Şekil.4.3).



Şekil 4.4. 3-AMP (3-Aminometilpridin)'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

3-AMP; Verim: 1.5 g, (% 65.8), E.N: 239-242 IR :1681 cm^{-1} (C=N) v_{max} (ATR): 3454, 3358, 1681 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz CDCl_3): δ 0.98 (18H, s, tBu), 3.27 (4H, d, $J=13.3$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 3.90 (4H, d, $J=13.3$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 4.46–4.49 (8H, m, OCH₂, ArCH₂NH), 1.22 (18H, s, tBu), 6.85 (4H, s, Ar-H), 7.18 (2H, s, OH), 7.00 (4H, s, Ar-H), 7.61 (2H, d, $J=7.8$ Hz, PyH), 7.06–7.10 (2H, m, PyH), 8.45 (2H, d, $J=4.5$ Hz, PyH), 9.21 (2H, t, NH), 8.62 (2H, d, PyH). Analitik Hesaplama $\text{C}_{60}\text{H}_{72}\text{O}_6\text{N}_4$: N, 5.93; H, 7.68; C, 76.23 Bulunan: H, 7.74; C, 76.31; N, 5.83% (MA: 944.56 g/mol) (Şekil 4.4.).



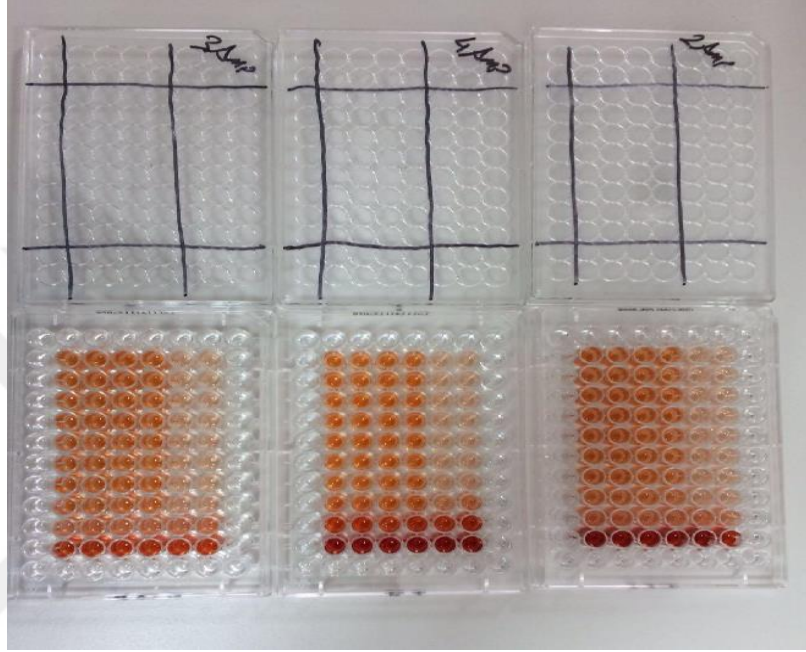
Şekil 4.5. 4-AMP (4-Aminometilpridin)'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

4-AMP; Verim: 1.72 g, (% 75.5), E.N: 239-242 IR :1638 cm^{-1} (C=N) ν_{max} (ATR): 3358, 3454, 1638 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz CDCl_3): δ 1.0 (18H, s, tBu), 3.38 (4H, d, $J=13.3$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 1.27 (18H, s, tBu), 3.86 (4H, d, $J=13.3$ Hz, Ar- CH_2 -Ar), 4.80 (4H, s, O- CH_2), 6.85 (4H, s, Ar-H), 7.26 (2H, d, $J=7.8$ Hz, PyH), 3.55 (4H, s, Ar- CH_2 -NH), 6.88 (4H, s, Ar-H), 7.05 (2H, m, PyH), 7.54 (2H, d, $J=7.8$ Hz, PyH), 7.48 (2H, s, OH), 9.33 (2H, t, NH). Analitik Hesaplama $\text{C}_{60}\text{H}_{72}\text{O}_6\text{N}_4$: C, 76.23; N, 5.93, H, 7.68 Bulunan: H, 7.74; C, 76.31; N, 5.83% (MA: 944.56 g/mol) (Şekil 4.5.).

4.2. XTT Yöntemi ile 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin MCF-7 Hücrelerine karşı Sitotoksisite Analizleri

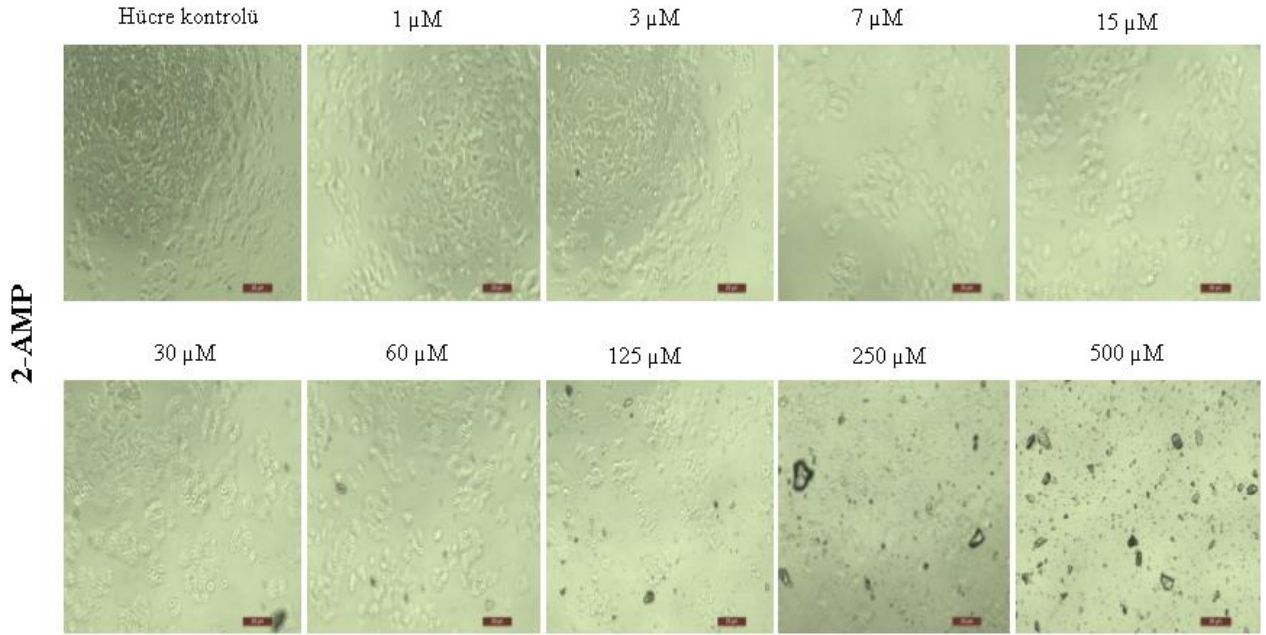
Bu yöntemde MCF-7 hücreleri, 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başı 5×10^3 hücre olacak şekilde üç plaka olarak ekimi yapıldı ve plakalar inkübatörde bir gece bekletildi. Daha sonra sitotoksisite analizi için kaliks[4]aren bileşikler % 0.1 DMSO + kompleks besiyeri ile partikül kalmayınca kadar çözdürüldü. Yeterli düzeyde çoğalmış olan hücre plakalarının üzerine çözdürülmüş maddeler, konsantrasyonları 500 μM 'den 2 μM 'ye kadar çoklu pipet yardımıyla seyrelterek eklendi ve 24 saat inkübatörde bekletildi. Daha sonra XTT solüsyonu eklenmeden önce invert mikroskop altında görüntüler elde edildi. Sonrasında XTT eklenip inkübatöre konularak 5 saat renk değişimi tamamlanıncaya kadar bekletildi. Araştırmamızda kullanılan maddelerin hücre ölümü üzerine etkisi, eklenen XTT solüsyonundaki tetrazolyum tuzunu formazana

çeviren canlı MCF-7 hücre hattının mitokondriyel aktivitesi sonucunda meydana gelen turuncu renkle anlamlandırıldı. Daha sonra ise elisa cihazı ile 460 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Böylece 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin MCF-7 hücre hattına olan IC_{50} değerleri de hesaplandı. Hücre canlılığını tayin eden yöntemlerden biri olan XTT yöntemi ile tekrarlı deneylerin sonucunda kaliks[4]arenlerin hücrelere olan sitotoksik etkisi değerlendirildi.



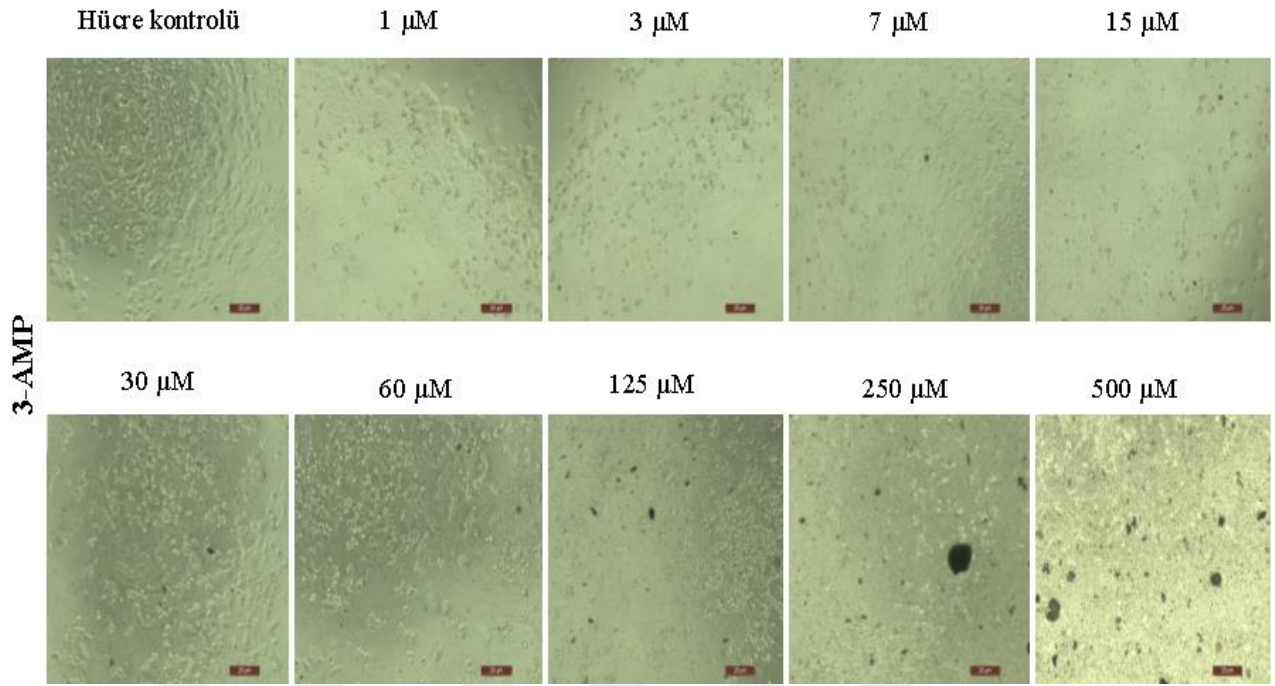
Şekil 4.6. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş olan MCF-7'ye etkisinde XTT ile renk değişimi

4.2.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin XTT yöntemi kullanılarak invert mikroskop altındaki MCF-7 hücrelerine etkisinin görüntülenmesi



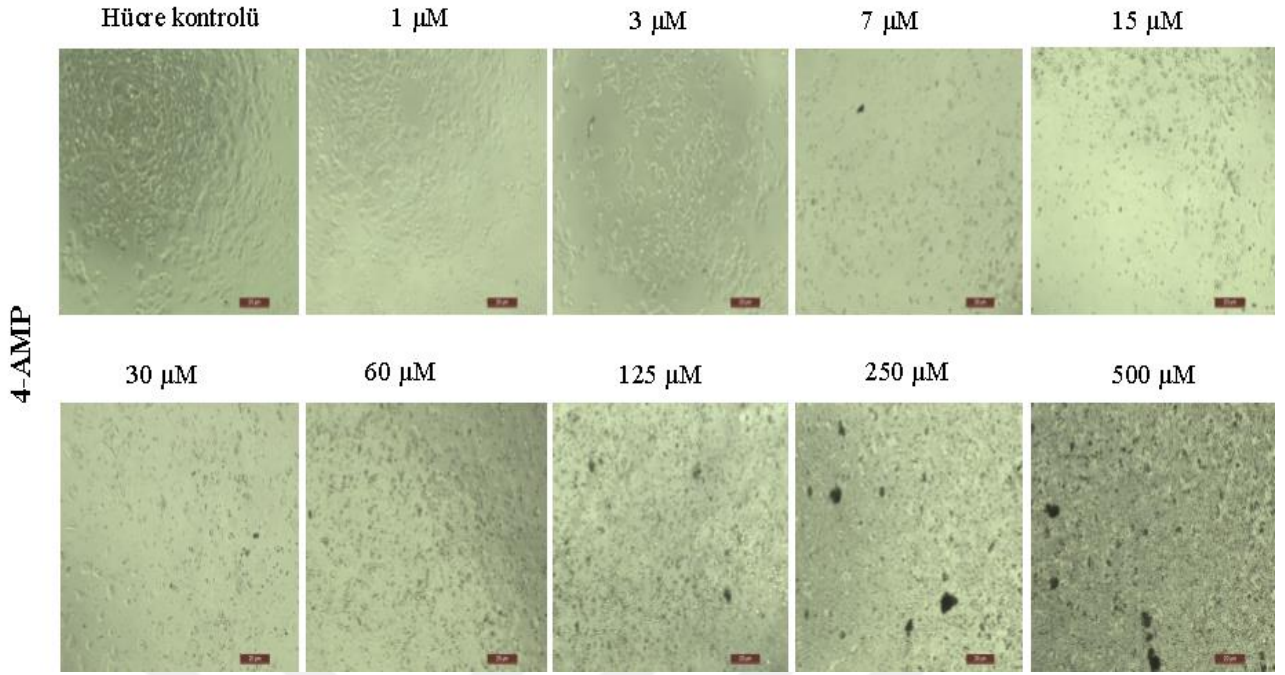
Şekil 4.7. 2-AMP'lerin 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş MCF-7 hücrelerine olan etkisinin 24 saat sonraki 20 µm ölçekli ve 10x objektifteki mikroskop görüntüleri

Şekil 4.7'deki mikroskop görüntülerinde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş olan MCF-7 hücreleri, 1-500 µM konsantrasyonlarında kalix[4]aren, 2-AMP'lerle 24 saat boyunca inkübe edildi. Bu maddenin MCF-7 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisi mikroskopta gözlemlendi ve konsantrasyonlar arttıkça hücrelerin morfolojik özelliklerinde değişiklikler meydana geldiği görüldü. Ayrıca 250 µM ve 500 µM konsantrasyonlarındaki madde yoğunluğu fazla olduğu için hücreler görülememektedir.



Şekil 4.8. 3-AMP'lerin 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş MCF-7 hücrelerine olan etkisinin 24 saat sonraki 20 µm ölçekli ve 10x objektifteki mikroskop görüntüleri

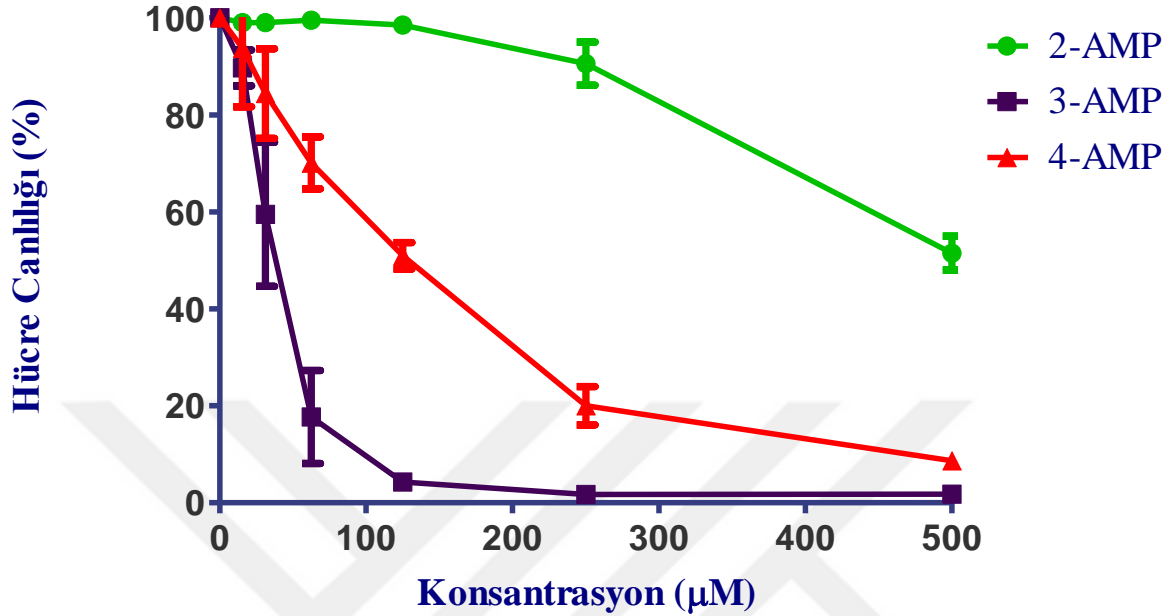
Şekil 4.8'deki mikroskop görüntülerinde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş olan MCF-7 hücreleri 1-500 µM konsantrasyonlarında kalix[4]aren, 3-AMP'lerle 24 saat boyunca inkübe edildi. Bu maddenin MCF-7 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisi mikroskopta incelenerek konsantrasyonlar arttıkça hücrelerin morfolojik özelliklerinde değişiklikler meydana geldiği gözlemlendi. Hücre yapılarının düşük konsantrasyonlardan itibaren daha yuvarlak hale gelerek ölmeye başladığı gözlemlendi. Yüksek konsantrasyonlar olan 250 ve 500 µM da hücrelerin tamamen öldüğü görüldü.



Şekil 4.9. 4-AMP'lerin 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş MCF-7 hücrelerine olan etkisinin 24 saat sonraki 20 μm ölçekli ve 10x objektifteki mikroskop görüntüleri

Şekil 4.9'daki mikroskop görüntülerinde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş olan MCF-7 hücreleri 1-500 μM konsantrasyonlarında kalix[4]aren, 4-AMP'lerle 24 saat boyunca inkübe edildi. Bu maddenin MCF-7 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisi mikroskopta incelenip konsantrasyonlarının artmasına bağlı olarak hücrelerin morfolojik özelliklerinde değişiklikler meydana geldiği gözlemlendi. Ayrıca 250 ve 500 μM olan yüksek konsantrasyonlarda hücrelerin neredeyse tamamında ölüm gerçekleştiği gözlemlendi.

4.2.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin MCF-7 hücreleri üzerinde % hücre canlılığı grafiğinin ve IC₅₀ değerlerinin hesaplanması



Şekil 4.10. Maddelerin MCF-7 hücreleri üzerindeki konsantrasyonlarına bağlı olarak 24 saat sonraki % hücre canlılığı grafiği

Şekil 4.10'daki % hücre canlılığı grafiğine göre MCF-7 hücrelerine etki eden artan konsantrasyonlarda uygulanan kalix[4]aren bileşikler belli konsantrasyon aralıklarında % hücre canlılığını düşürmüştür. Kullanılan kalix[4]aren bileşiklerden 2-AMP'de artan konsantrasyona bağlı olarak % hücre canlılığı eğrisi fazla düşmemiştir. Buna bağlı olarak IC₅₀ değeri de 391.40 µM olarak belirlenip en yüksek konsantrasyona yakın bir değer olduğu görülmektedir (Şekil 4.11). Bu sonuca göre 2-AMP'nin MCF-7 hücrelerine olan sitotoksik etkisinin çok az olduğu açıkça görülmektedir.

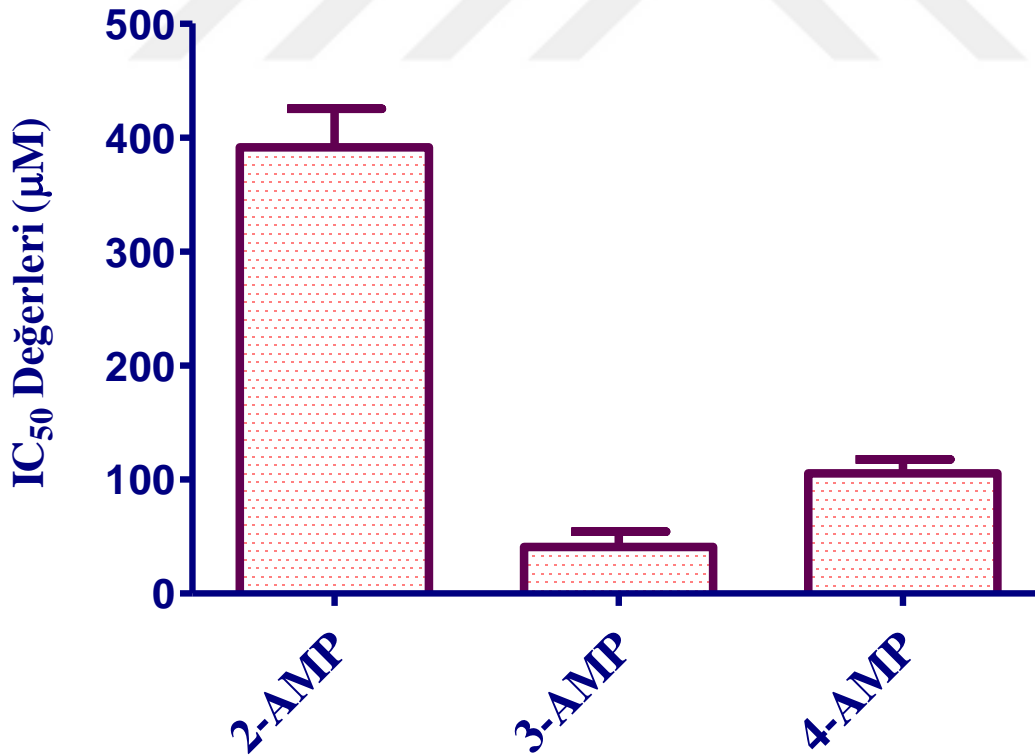
3-AMP'de ise artan konsantrasyonlara bağlı olarak % hücre canlılığı eğrisi düşük konsantrasyon aralığında düşüş göstermeye başlamıştır. Maddenin IC₅₀ değeri de 40.96 µM olarak belirlenerek MCF-7 hücreleri üzerinde düşük konsantrasyonda etkili sitotoksik olduğu görülürken en yüksek konsantrasyon olan 500µM'da kuyucuktaki MCF-7 hücrelerinde neredeyse tamamında ölüm gerçekleşmiştir (Şekil 4. 11).

4-AMP'de de artan konsantrasyona bağlı olarak % hücre canlılığı eğrisi belli konsantrasyon aralığından sonra düşüş göstermiştir. IC₅₀ değeri ise 105.52 µM olarak

belirlenerek maddenin yüksek konsantrasyon aralığında MCF-7 hücre morfolojilerinde değişiklikler meydana getirdiği ve en yüksek konsantrasyonda maddenin MCF-7 hücrelerine olan sitotoksik etki gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.11).

Çizelge 4.1. Araştırmada kullandığımız *p-tert*-bütilkaliks[4]arenin diamit türevlerinin konsantrasyonlara bağlı IC_{50} değerleri

Numuneler	IC_{50} (μ M) / MCF-7
2-AMP	391.40 \pm 33.89
3-AMP	40.96 \pm 13.45
4-AMP	105.52 \pm 11.97



Şekil 4.11. Maddelerin MCF-7 hücreleri üzerindeki konsantrasyonlarına bağlı olarak 24 saat sonraki IC_{50} değerleri grafiği

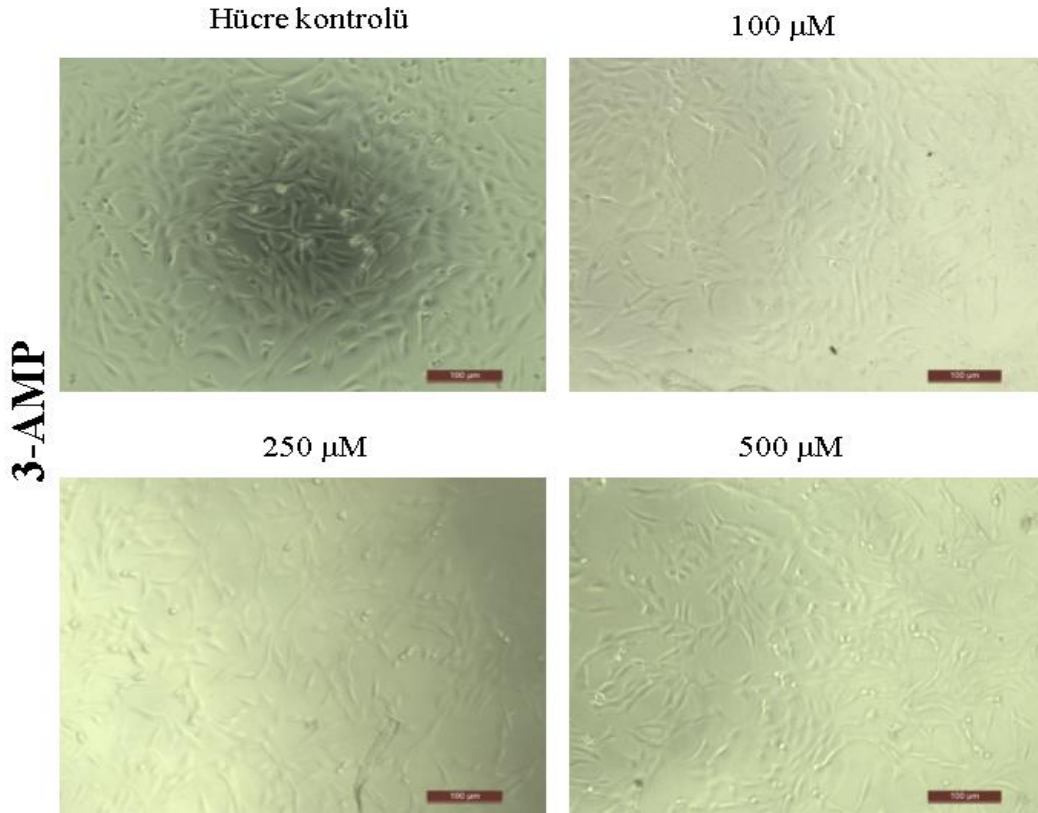
Uyguladığımız XTT yöntemindeki sonuç grafikleri ile görüntülenen mikroskop görüntüleri de birbirleriyle uyum içindedir ve birbirini desteklemektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak MCF-7 kanseri hücrelerine karşı en fazla ve en etkili sitotoksik etki gösteren madde 3-AMP daha sonra 4-AMP ve en az sitotoksik olan madde ise 2-AMP'dir. Araştırmalarımız, kaliks[4]arenlerin MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı 3. pozisyonda piridinyum grubunun modifikasyonu ile gösterilen geliştirilmiş tercihlili sitotoksosite ile 25 ile 100 μM 'lık bir konsantrasyon aralığında etkili tercihlili sitotoksositeyi gösterdiğini ileri sürmektedir.

Kanserleşmiş hücreler kontrolsüz çoğalma gösterdikleri için araştırmamızda kullandığımız maddelerin bir de sağlıklı hücreler üzerinde etkisine bakılması gereklilik göstermektedir. Sağlıklı hücrelerin normal hücre yaşam döngüsü üzerindeki etkisini de görmek için kontrol grubu ve model alınan organizma olarak L-929 fare fibroblast hücrelerini kullandık.

4.3. XTT Yöntemi ile 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin L-929 Hücrelerine karşı Sitotoksosite Analizleri

Yine benzer şekilde L-929 hücreleri, 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başı 10×10^3 hücre olacak şekilde üç plaka olarak ekimi yapıldı ve plakalar inkübatörde bir gece bekletildi. Daha sonra sitotoksosite analizi için kaliks[4]aren bileşikler % 0.1 DMSO + kompleks besiyeri ile partikül kalmayınca kadar çözdürüldü. Yeterli düzeyde çoğalmış olan hücre plakalarının üzerine çözdürülmüş maddeler, maksimum 500 μM konsantrasyonda eklenerek 24 saat inkübatörde bekletildi. Daha sonra XTT solüsyonu eklenmeden önce invert mikroskop altında görüntüler elde edildi. Sonrasında XTT eklenip inkübatöre konularak 5 saat renk değişimi tamamlanınca kadar bekletildi. Araştırmamızda kullanılan maddelerin hücre ölümü üzerine etkisi, eklenen XTT solüsyonundaki tetrazolyum tuzunu formazana çeviren canlı L-929 hücre hattının mitokondriyel aktivitesi sonucunda meydana gelen turuncu renkle anlamlandırıldı. Daha sonra ise elisa cihazı ile 460 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Böylece 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin L-929 hücre hattına olan IC_{50} değerleri hesaplanarak % hücre canlılığı eğimi çizildi. Hücre canlılığını tayin eden yöntemlerden biri olan XTT yöntemi ile tekrarlı deneylerin sonucunda kaliks[4]arenlerin hücrelere olan sitotoksik etkisi değerlendirildi.

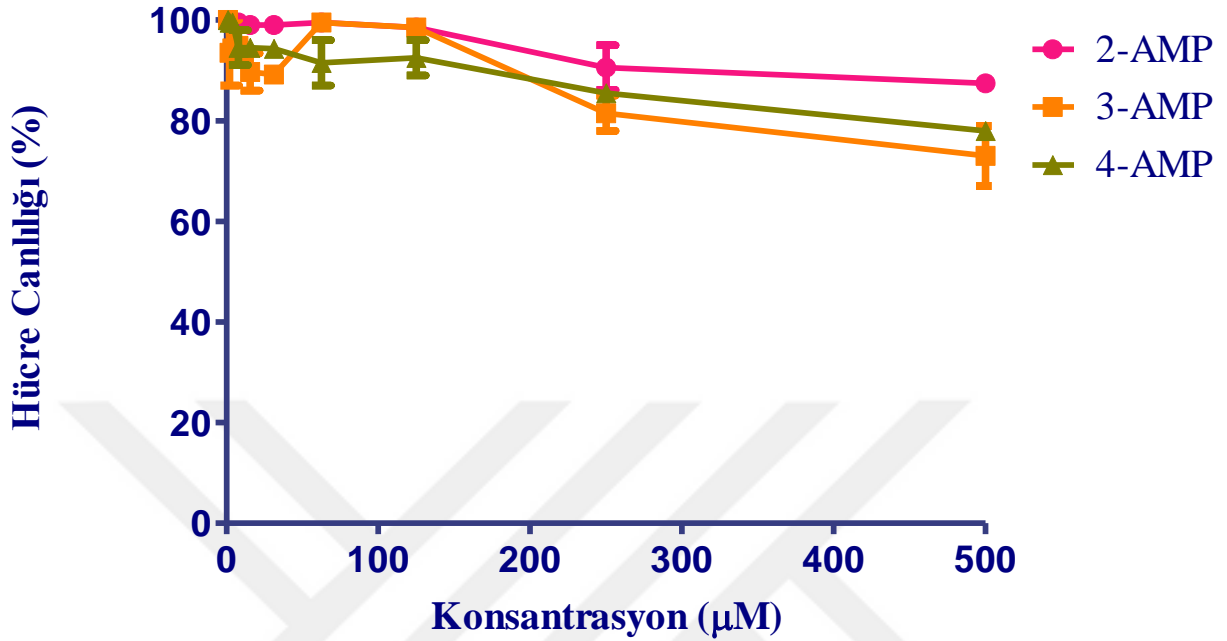
4.3.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin XTT yöntemi kullanılarak invert mikroskop altındaki L-929 hücrelerine etkisinin görüntülenmesi



Şekil 4.12. 3-AMP'lerin 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş L-929 hücrelerine olan etkisinin 24 saat sonraki 100 µm ölçekli ve 10x objektifteki mikroskop görüntüleri

Şekil 4.12'deki mikroskop görüntülerinde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş olan L-929 hücreleri 100-250-500 µM konsantrasyonlarında kalix[4]aren, 3-AMP'lerle 24 saat boyunca inkübe edildi. Bu maddenin L-929 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisi mikroskopta incelenerek konsantrasyonların artmasına rağmen hücrelerin morfolojik özelliklerinde büyük değişiklikler meydana getirmediği gözlemlendi. MCF-7 kanser hücresine karşı sitotoksik etkisi fazla olan 3-AMP'nin sağlıklı bir hücre olan L-929 hücrelerine karşı sitotoksik etkisi olmadığı gözlemlendi.

4.3.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin L-929 hücreleri üzerinde % hücre canlılığı grafiğinin ve IC₅₀ değerlerinin hesaplanması



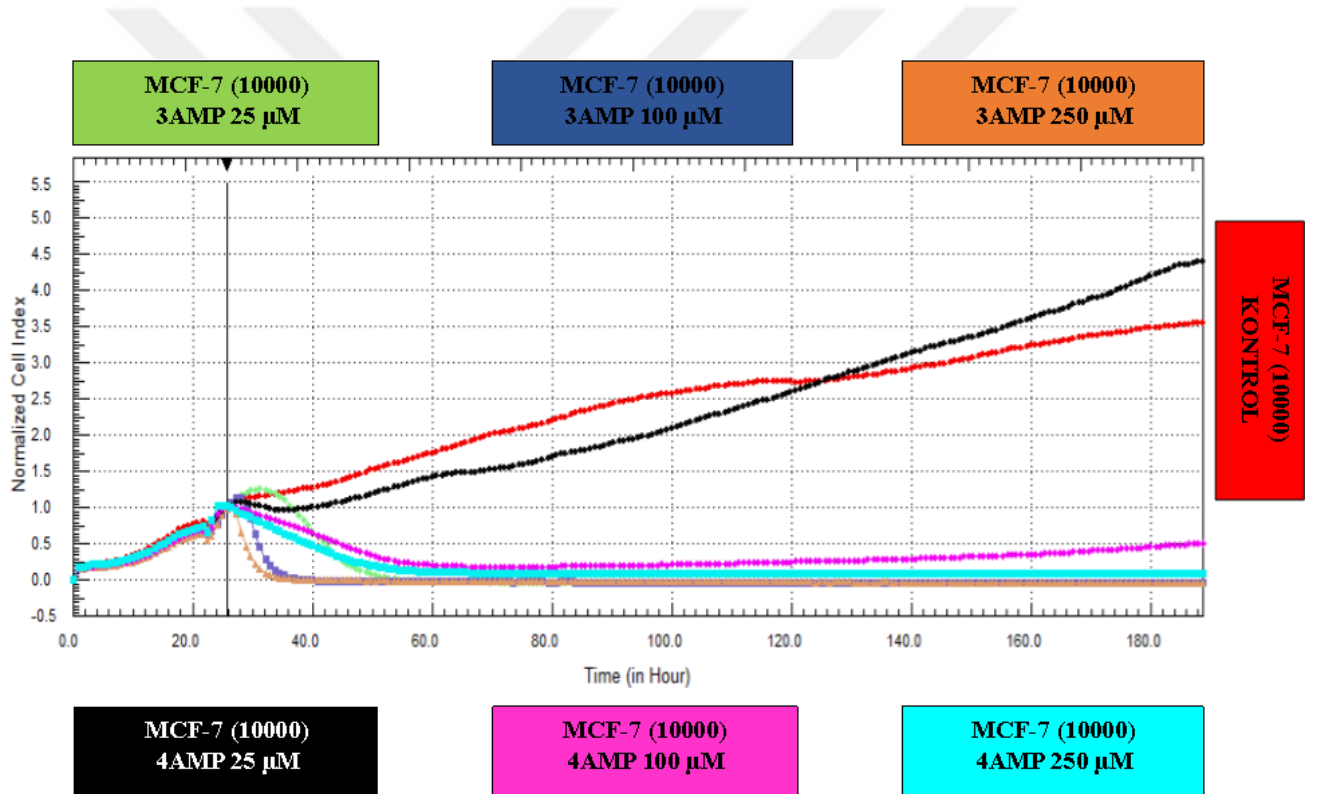
Şekil 4.13. Maddelerin L-929 hücreleri üzerindeki konsantrasyonlarına bağlı olarak 24 saat sonraki % hücre canlılığı grafiği

Şekil 4.12'deki % hücre canlılığı grafiğine göre L-929 hücrelerine etki eden artan konsantrasyonlarda uygulanan kalix[4]aren bileşikler belli konsantrasyon aralıklarında % hücre canlılığını çok az miktarda düşürmüştür. Fakat en yüksek konsantrasyon olan 500 µM' da bile % hücre canlılığı eğrisi her maddede yüksek görülmektedir. Dolayısıyla IC₅₀ değerleri de 500'den büyük olup yüksek konsantrasyonlarda dahi hücreler canlılığını korumaktadır. Bu sonuçlara göre 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin L-929 hücrelerine sitotoksik etkisi olmadığı açıkça görülmüştür.

Araştırmamızda uygulanan XTT yöntemindeki % hücre canlılığı grafiği ve görüntülenen mikroskop görüntüleri de birbirleriyle uyum içinde ve birbirini desteklemektedir. Bu yöntemle tezin amacına uygun sonuçlar alınmıştır. Fakat daha gerçek zamanlı ve her aşamasını rahatlıkla gözlemleyebileceğimiz sonuçlar elde edebilmek için xCELLigence sistemiyle de sonuçların desteklenmesi gerekmektedir.

4.4. Gerçek Zamanlı (xCELLigence) Analizi Yöntemi ile 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin MCF-7 Hücrelerine Karşı Sitotoksosite Analizleri

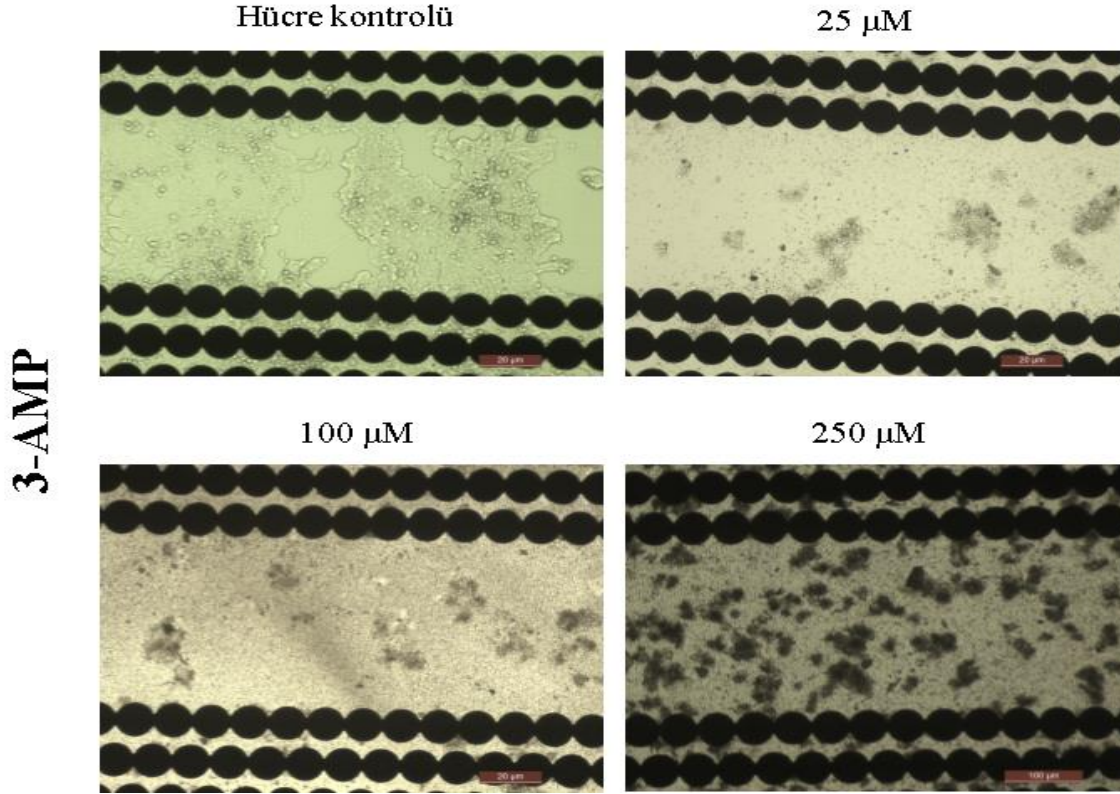
16 kuyucuklu e-plakaya 200000 hücre/ml olacak şekilde MCF-7 hücresi birer plaka olarak ekimi yapıldı ve bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Sitotoksosite analizi için kullanılan 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'ler de % 0.1 DMSO+kompleks besiyeri ile çözdürüldü. Hücre indeksi 1'e ulaşan ve elektrotlar üzerinde yeterince büyüyen hücre e-plakalarına maddelerin 25-100-250 μ M konsantrasyonları eklendi. Daha sonra maddelerin hücrelere olan etkisi gerçek zamanlı olarak gözlemlendi (Şekil 4.14). Hücre kontrol grubunun belli büyüme ve çoğalma kapasitesi dolduğunda ise cihaz kapatılarak veriler kaydedildi.



Şekil 4.14. Maddelerin, 16 kuyucuklu e-plakalara kuyucuk başı 10^4 ekilmiş MCF-7 hücresine etkisinin gerçek zamanlı xCELLigence grafiği

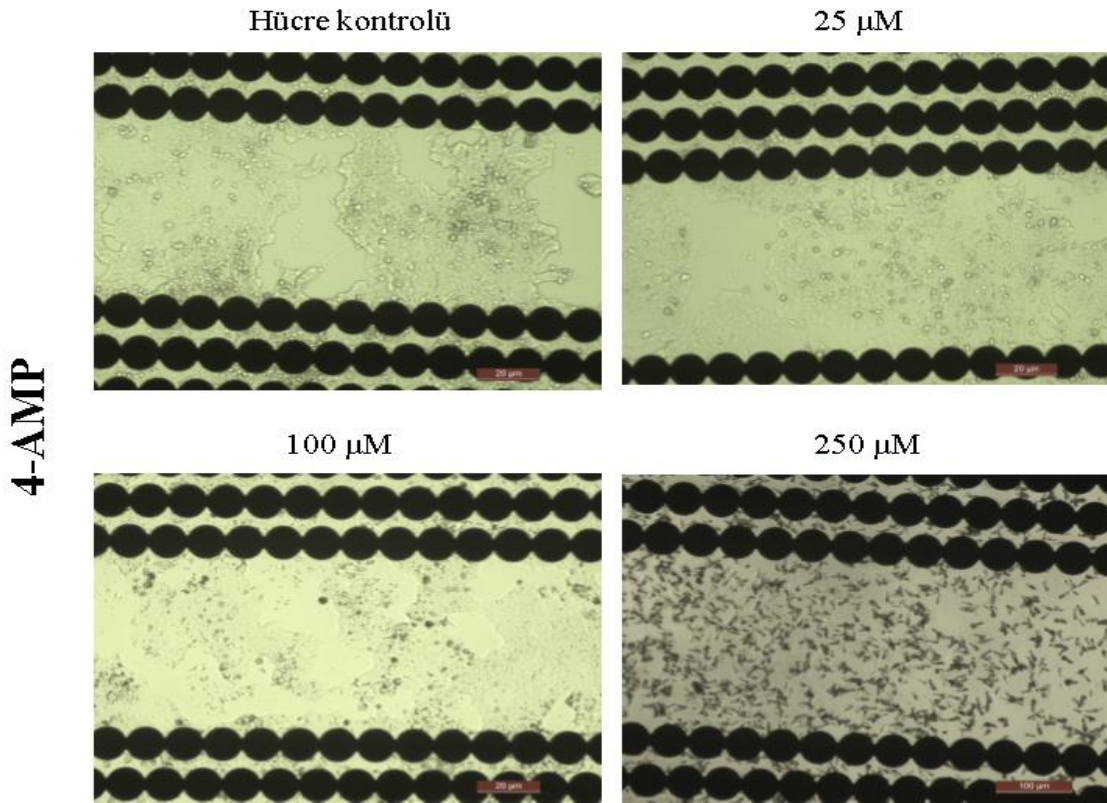
Şekil 4.14'deki xCELLigence grafiğine göre kullanılan 3-AMP ve 4-AMP'ler MCF-7 hücreleri üzerinde 25, 100 ve 250 μM konsantrasyonlarında değerlendirilerek yaklaşık 180 saat boyunca gerçek zamanlı olarak gözlenmiştir. Maddeler eklendikten sonra 3-AMP'nin 25 μM konsantrasyonunda hücre ölümünün henüz başlamadığı, 100 μM konsantrasyonunda ise hücre ölümünün hemen başladığı görülmektedir. 250 μM konsantrasyonunda ise hücreler üzerinde yüksek konsantrasyon kullanıldığı için hücre ölümü hızlı gerçekleşmiştir. XTT sonuçlarıyla da tutarlı görülen xCELLigence grafiğinde de 3-AMP'nin MCF-7 hücrelerini 40 μM konsantrasyonu civarlarında hücre ölümü üzerinde etkilediği ve sitotoksik bir madde olduğu gözlenmiştir. 4-AMP'nin 25 μM konsantrasyonunda hücrelerin neredeyse hiç etkilenmediği ve çoğalmaya devam ettiği, 100 μM konsantrasyonunda ise hücrelerin ölmeye başladığı görülmektedir. Yüksek olan 250 μM konsantrasyonunda ise hücrelerin hemen ölümleri gerçekleşmiştir ve 180. saate kadar belli zaman aralıklarında gözlenmesine rağmen grafikteki eğride değişiklik olmamıştır. Dolayısıyla 4-AMP'nin de yaklaşık olarak 104 μM konsantrasyonunda hücre ölümü üzerinde etkisi olduğu ve sitotoksik bir madde olduğu gözlenmiştir.

4.4.1. 3-AMP ve 4-AMP'lerin gerçek zamanlı (xCELLigence) analizi y3ntemi kullanılarak invert mikroskop altındaki MCF-7 h3crelerine etkisinin g3r3nt3lenmesi



Şekil 4.15. 3-AMP'lerin 16 kuyucuklu e-plakalara ekilmiş MCF-7 h3crelerine olan etkisinin 20 µm ve 100 µm 3lekli 10x objektifteki mikroskop g3r3nt3leri

Şekil 4.15'deki invert mikroskopik g3r3nt3lere g3re h3cre kontrol3 ile karşılaştırma yapıldığında 3-AMP'nin 100 ve 250 µM konsantrasyonlarında h3crelerin tamamen 3ld3ğ3 g3r3lmektedir. Şekil 4.14'deki XCELLigence grafiğiyile de mikroskopik g3r3nt3ler 3rt3şmektedir.



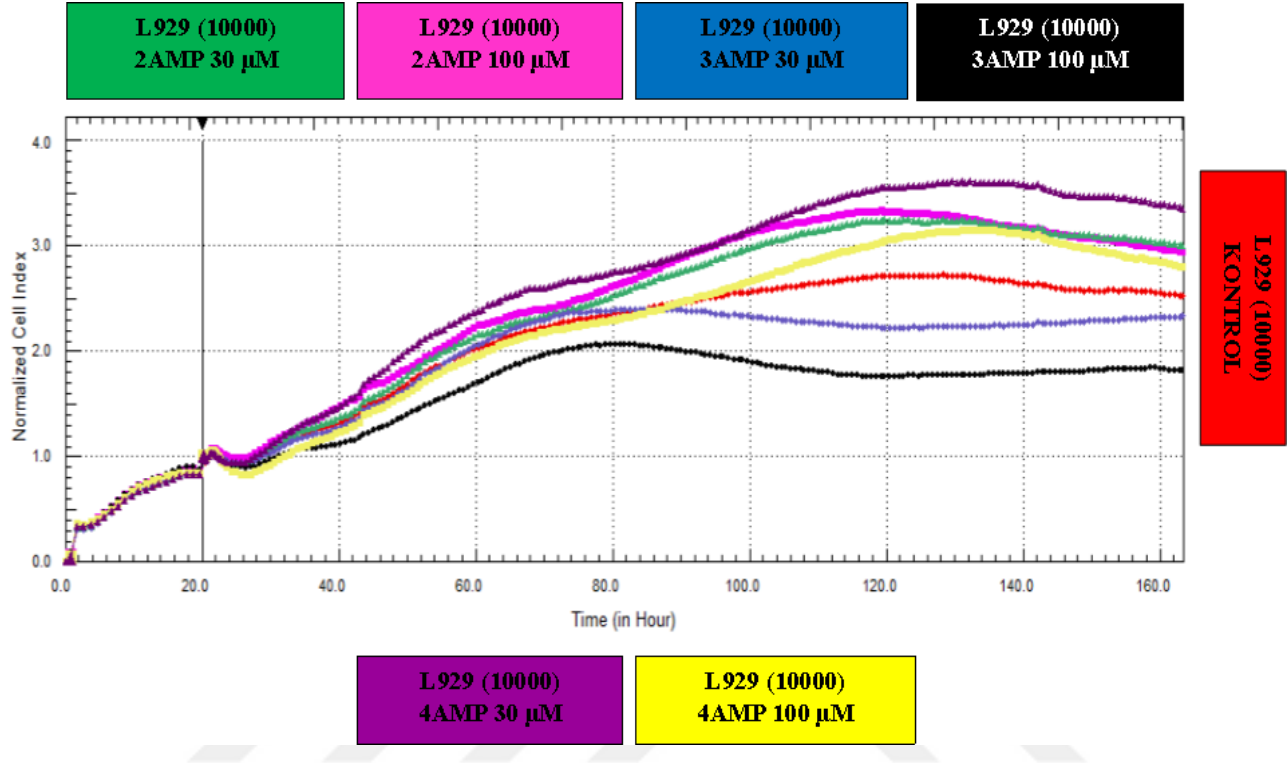
Şekil 4.16. 4-AMP'lerin 16 kuyucuklu e-plakalara ekilmiş MCF-7 hücrelerine olan etkisinin 20 μ m ve 100 μ m ölçekli 10x objektifteki mikroskop görüntüleri

Şekil 4.16'deki invert mikroskopik görüntülere göre düşük konsantrasyon olan 25 μ M 'da hücre kontrolü ile karşılaştırma yapıldığında hücrelerin ölümleri üzerinde fazla etkili olmadığı görülürken, yüksek konsantrasyon olan 250 μ M'da ise tamamen etkilediği ve nerdeyse hiç canlı hücre kalmadığı gözlenmektedir ve madde tamamen ölü hücrelerin üzerini kaplamıştır. 100 μ M'da ise hücrelerin üzerinde morfolojik değişiklikler meydana getirerek hücre ölümlerinin başladığı görülmektedir. Şekil 4.14'deki XCELLigence grafiğiyle de mikroskopik görüntüler uyumlu görünmektedir.

4.5. Gerçek Zamanlı (xCELLigence) Analizi Yöntemi ile 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin L-929 Hücrelerine Karşı Sitotoksosite Analizleri

16 kuyucuklu e-plakaya 200000 hücre/ml olacak şekilde L-929 hücresi birer plaka olarak ekimi yapıldı ve bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Sitotoksosite analizi için kullanılan 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'ler de % 0.1 DMSO+kompleks besiyeri ile çözdürüldü. Hücre indeksi 1'e ulaşan ve elektrotlar üzerinde yeterince büyüyen hücre e-plakalarına maddelerin 30 μ M ve 100 μ M konsantrasyonları eklendi.

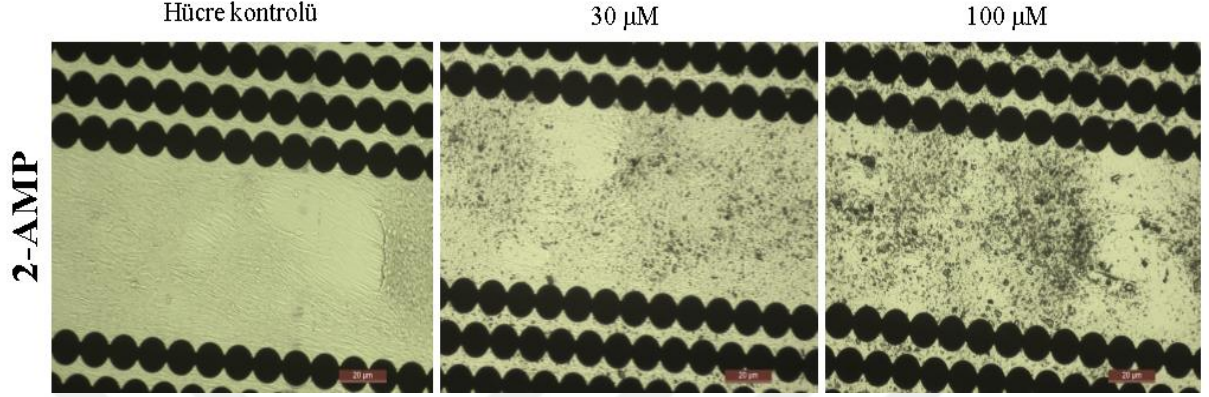
Daha sonra maddelerin hücrelere olan etkisi gerçek zamanlı olarak gözlemlendi. Hücre kontrol grubunun belli büyüme ve çoğalma kapasitesi dolduğunda ise cihaz kapatılarak veriler kaydedildi.



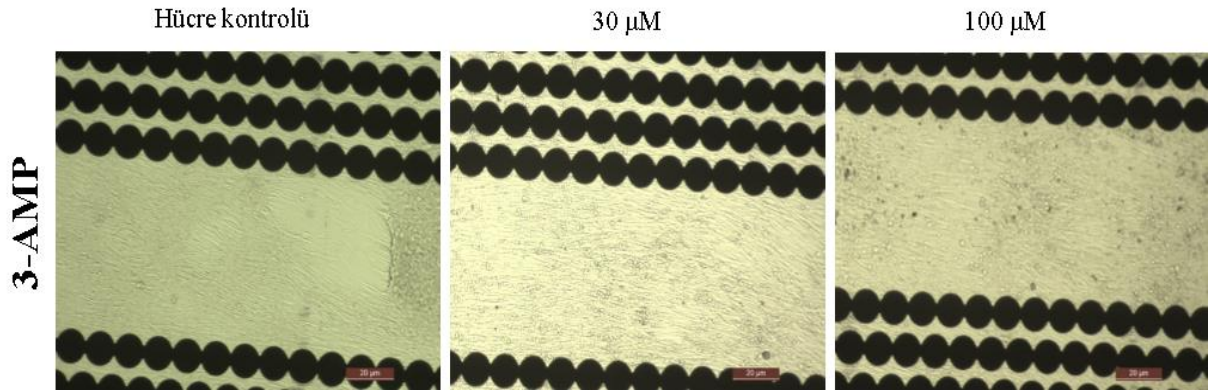
Şekil 4.17. Maddelerin, 16 kuyucuklu e-plakalara kuyucuk başı 10^4 ekilmiş L-929 hücrelerine etkisinin gerçek zamanlı xCELLigence grafiği

Şekil 4.17'deki xCELLigence grafiğine göre kullanılan 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'ler L-929 hücreleri üzerinde 30 ve 100 μM konsantrasyonlarında değerlendirilerek yaklaşık 160 saat boyunca gerçek zamanlı olarak gözlenmiştir. Maddeler eklendikten sonra L-929 hücrelerine olan etkisine baktığımızda grafikte 20. saatten itibaren madde konsantrasyon eğrilerinde bir düşüş gözlenmemektedir. Bu durum 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin sağlıklı fare fibroblast hücresi olan L-929'a etkisi olmadığını ve sitotoksik etki göstermediğini gerçek zamanlı olarak izleme imkanı sağlamıştır.

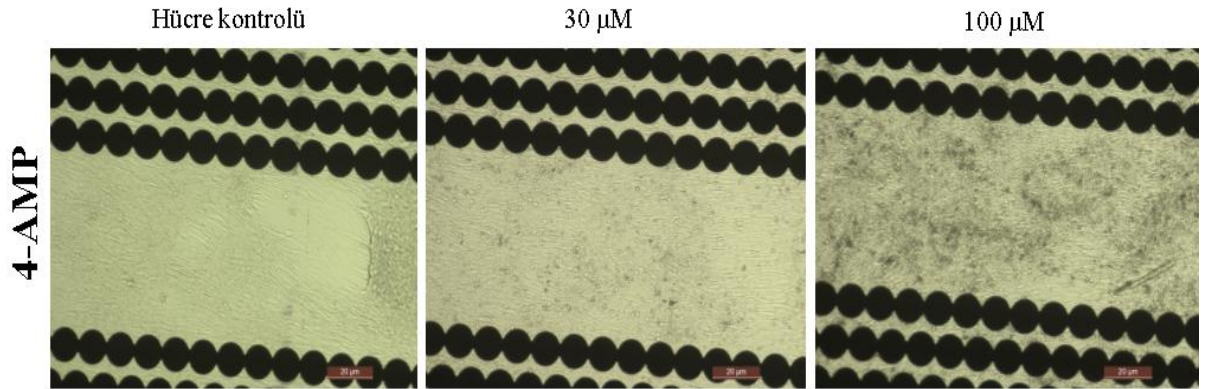
4.5.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin gerçek zamanlı (xCELLigence) analizi yöntemi kullanılarak invert mikroskop altındaki L-929 hücrelerine etkisinin görüntülenmesi



Şekil 4.18. 2-AMP'lerin 16 kuyucuklu e-plakalara ekilmiş L-929 hücrelerine olan etkisinin 20 µm ölçekli 10x objektifteki mikroskop görüntüleri



Şekil 4.19. 3-AMP'lerin 16 kuyucuklu e-plakalara ekilmiş L-929 hücrelerine olan etkisinin 20 µm ölçekli 10x objektifteki mikroskop görüntüleri



Şekil 4.20. 4-AMP'lerin 16 kuyucuklu e-plakalara ekilmiş L-929 hücrelerine olan etkisinin 20 µm ölçekli 10x objektifteki mikroskop görüntüleri

XCELLigence yönteminde kullanılan 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin farklı konsantrasyonların L-929 hücreleri üzerine etkisinde hücrelerin morfolojik olarak değişiklikleri invert mikroskopla da incelenmiştir. Görüntülerde de maddelerin eklendikten sonraki durumlarında L-929 hücrelerine sitotoksik etkisi bulunmadığı görülmektedir. Mikroskop görüntüleri ve şekil 4.17'deki xCELLigence grafiğinden çıkardığımız sonuçlar birbirleriyle uyumluluk göstermektedir.

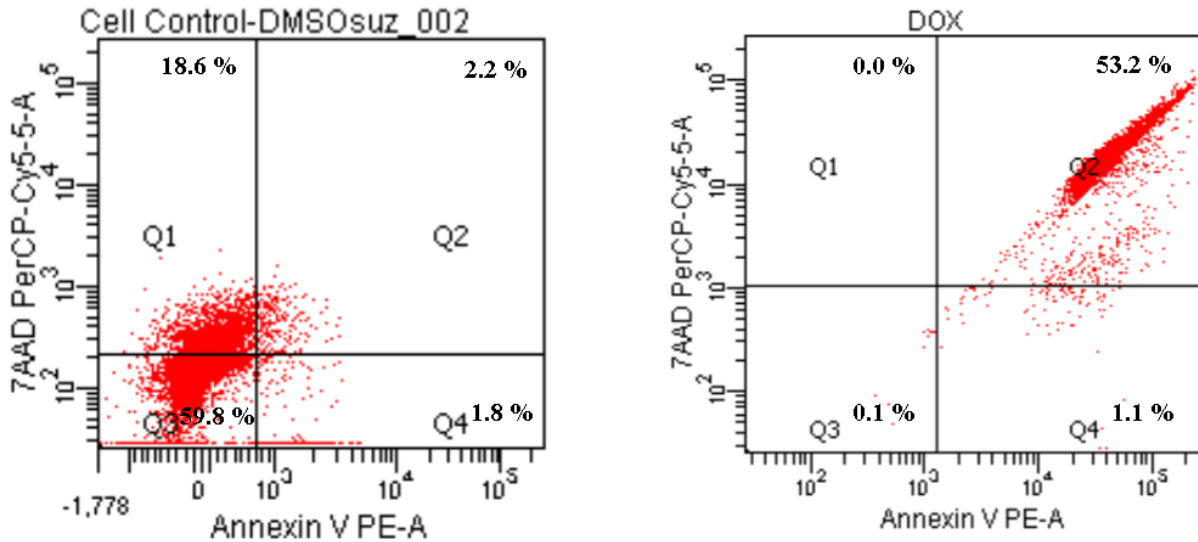
Hem XTT hem de xCELLigence yönteminden çıkan analiz sonuçlarına göre 3-AMP'nin konsantrasyona bağlı olarak meme kanseri hücreleri (MCF-7) üzerine olan sitotoksik etkisi olarak düşük konsantrasyon olan 40 μM 'da görülmüştür. Yine 4-AMP'nin ise konsantrasyona bağlı olarak meme kanseri hücreleri (MCF-7) üzerine olan sitotoksik etkisi olarak biraz daha yüksek bir konsantrasyon olan 100 μM 'da olduğu görülmektedir. Fakat sağlıklı hücre olan L-929 hücrelerine sitotoksik etkisinin olmadığı da yaptığımız analiz sonuçlarından anlaşılmaktadır.

4.6. Flow Sitometri Yöntemi ile Hücre Ölümü Görüntüleme Analizi

Çalışmamızda hücre ölüm karakteri hakkında bilgilerin toplanabilmesi için flow sitometri analizi yöntemi kullanıldı. MCF-7 hücreleri, T-25 kültür kaplarına 15×10^4 hücre/ml olacak şekilde ekilerek 10, 25 ve 50 μM konsantrasyonlarında hazırlanan 3-AMP ile 8 saat boyunca inkübe edildi. Hücrelerin yüzeyden kaldırılma işleminden sonra oluşan pellet soğuk PBS (Fosfat tampon tuzu) ile iki defa yıkandı. Daha sonra pelletin üzerine 200 μl 1x bağlama tamponu eklenip hücreler süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon halindeki hücreler flow tüplerine aktararak üzerlerine Annexin V / 7-AAD boyaları ile hücre boyamaları yapıldı. Boyanan hücreler 15 dk. karanlıkta inkübasyona bırakıldıktan sonra her tüpe 300 μl 1x bağlama tamponu eklendi. Tüpler sırayla cihaza konularak hücrelerin 3-AMP ile etkileşmesiyle oluşan apoptoz ve nekroz ölüm şekilleri Annexin V / 7AAD ile BD FACSAria™ III flow sitometri (BD Bioscience USA) cihazında analiz edildi. Bu sonuçlarla birlikte hücre ölümünün hangi karakterde oldukları karşılaştırılması sağlandı.

Bu yöntemin analizinde, grafiklerde hücrelerin ışıkla temas ettiği andaki verdikleri sinyallere göre dört ayrı bölge meydana gelmektedir. Bu bölgeler Q₁, Q₂, Q₃ ve Q₄ diye adlandırılır. Q₁ bölgesi hücrelerin nekroza uğradığını, Q₂ bölgesi nekroza ve/veya geç apoptoza uğradığını, Q₃ bölgesi hücrelerin normal metabolik aktivite

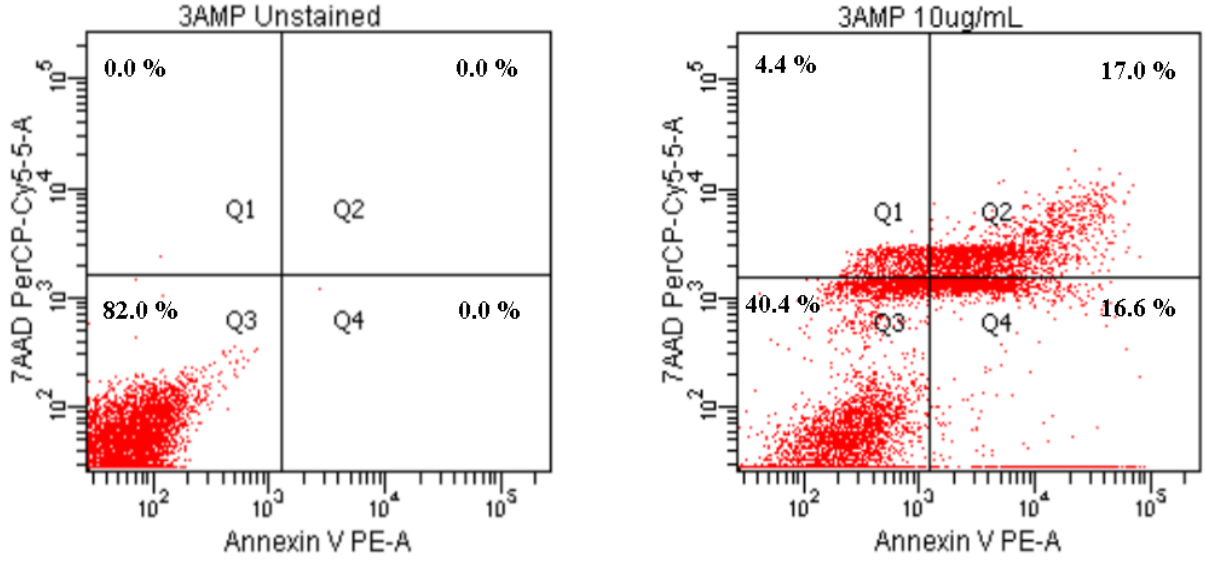
gösterip canlı olduğunu, Q₄ bölgesi ise erken apoptoza uğradığını göstermektedir. 7-AAD canlı hücrelerin belirlenmesinde, Annexin V hücrelerin ölüm evrelerinin belirlenmesinde kullanılan boyalardır.



Şekil 4.21. MCF-7 hücrelerinin hücre kontrolünün ve DOX maddesinin hücre ölüm mekanizmalarının flow sitometri yöntemiyle analizi grafiği

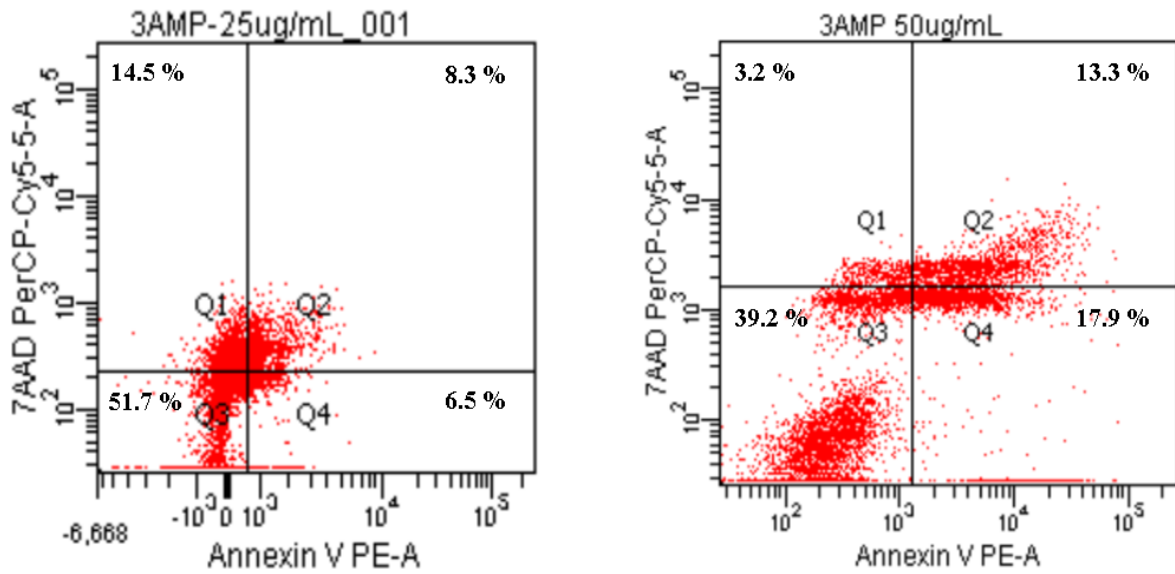
Şekil 4.21’de gösterilen hücre kontrol grafiğinde Q₃ bölgesinde yer alan ve iki floresan antikor boyalama işleminin olduğu bölgede hücre popülasyonu % 59.8’ken, Q₁ bölgesinde yer alan hücre popülasyonu ise % 18.6’dır. Bu grafikten elde edilen sonuçlarda hücrelerin genelinin boyalarla etkileşime girmediği ve metabolik aktivitelerini devam ettirdiği görülmektedir.

Yine şekil 4.21’de gösterilen grafiğe göre DOX maddesi birçok araştırmada kanıtlanmış kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi olan bir maddedir. Bu yüzden biz de çalışmamızda DOX’u pozitif (+) kontrol olarak kullandık. DOX’un düşük konsantrasyonunda (25 µM) bile hücrelerin çoğu Q₃ bölgesine yani geç apoptoza ya da nekroza gittiği görülmüştür. Buradaki nekrotik hücre ölüm popülasyonu ise % 53.2 ‘dir.



Şekil 4.22. 3-AMP'nin MCF-7 hücreleri üzerine etkisinde, boyama yapılmadan (unstained) ve 10 μ M konsantrasyonunda hücre ölüm mekanizmalarının flow sitometri yöntemiyle analizi grafiği

Şekil 4.22'de gösterilen grafiğe göre, unstained grafiğinde 3-AMP'nin MCF-7 hücrelerine karşı floresan özellik gösterip göstermediğini gözlemleyebilmek için hem 7-AAD hem de Annexin V'le boyama işlemi yapılmadan hücrelerin ölüm mekanizmalarını inceledik. Bu grafiğe göre Q₃ bölgesinde hücre popülasyonu % 82.0'dır ve hücreler diğer bölgelere geçiş yapmamıştır. Bu sonuçlarda hücrelerin ölüm mekanizması üzerinde kullandığımız maddenin floresan özellik göstermediği açıktır.



Şekil 4.23. 3-AMP'nin MCF-7 hücreleri üzerine etkisinde 25 ve 50 µM konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre ölüm mekanizmalarının flow sitometri yöntemiyle analizi grafiği

Şekil 4.22 ve şekil 4.23'de gösterilen grafiklerde artan konsantrasyonlara bağlı olarak hücre popülasyonlarında değişimler meydana gelmiştir. 25 µM'lık konsantrasyon grafiğinde canlı hücre popülasyonu % 51.7 iken hücrelerin apoptoza uğradıkları popülasyon yüzdesi azınlıkta kalarak % 6.5 olarak belirlenmiştir. Yani hücreler programlı ölüm fazla gösterememiştir. XTT ve XCell yöntemleriyle belirlenen, hücrelerin sitotoksik etki göstermeye başladığı konsantrasyonun altında kalmıştır.

Aynı şekilde 50 µM'lık konsantrasyon grafiğinde de hücrelerin konsantrasyonları arttıkça canlı hücre popülasyonu azalarak % 39.2'ye düşüş göstermiştir. XTT ve Xcell yöntemlerinden de belirlendiği üzere hücrelerin apoptoza gittiği popülasyon yüzdesi, Q₄ bölgesinde bulunan % 17.9'luk bir popülasyondur. Daha sonra % 13.3 olan Q₂ bölgesinde bulunan hücreler nekroza uğrayıp ölmeye devam etmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, kontrol grubuyla da karşılaştırıldığında hücreler 25 ve 50 µM konsantrasyonları aralığında apoptotik hücre ölüm mekanizması gerçekleştirmiştir. Bu da bizim maddemizin düşük konsantrasyonda etkili sitotoksik olduğunu göstermiştir (Şekil 4.23).

Baggetto ve ark.(2010), çeşitli tümör hücreleri (MU2, MU2F, HT1080, SP6.5, 1PC227, Jurkat, MEWO, HI-60, Huh7, Hep-G2, MEWO, DLM) üzerinde calix [4] aren türevlerinin etkisini sentezlemiş ve incelemişlerdir ve bu bileşiklerin aktivitesini standart anti-kanser ilaçlarıyla karşılaştırmışlardır. Bu işlevsel hale getirilmiş kalix [4] aren türevlerinin, özellikle lenfoblastik lösemi ve melanoma hücre çizgilerinde güçlü anti kanser ajanları olduğunu keşfetmişlerdir. Bizde araştırmamızda kullandığımız türevlendirilmiş haldeki kaliksaren maddelerin insan meme kanseri (MCF-7) hücreleri üzerine pasif hedefleme yapılarak etkili sitotoksosite gösterdiğini ve güvenli bir antikanser ajanı olabileceğini belirledik.

Santos ve ark.(2015) alt kenarda amid makrosiklik ve asiklik türevleri içeren bir dizi para-tert-butilkalks [4] aren sentezlemişlerdir ve hücrel etkileri değerlendirmişlerdir. G-quadruplex etkileşimi ve stabilizasyonu, kanser hücre çizgileri üzerindeki güçlü antiproliferatif etkiyi G-quadruplex tanınmasıyla ilişkilendirmek için bileşik calix-NH₂ ile değerlendirilmiştir. Kalix-NH₂, G-quadruplex MYC22 ve h22L'yi etkileşir ve dengeler ve MCF-7, LNCaP, U87 kanser hücre dizilerinde düşük mikromolar konsantrasyonda aktiviteyi göstermiştir. Bu çalışmaya alternatif olarak bizde araştırmamızda pridinyum grubu P-tert-bütül-kalix[4]aren türevlerinin MCF-7 hücrelerine düşük konsantrasyonda etkili bir antikanser ajanı olabileceğini, aynı zamanda sağlıklı hücrelere de zarar vermediğini gösterdik. Bu çalışmalardan ve elde ettiğimiz sonuçlardan yola çıkarak araştırmamızda kullandığımız 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'ler, sağlıklı hücreleri sitotoksik olarak etkilemeyip kanserli hücrelere karşı pasif hedefleme yaparak kanserli hücre ajanı olarak kullanılması yönünden uygun bir aday olarak kullanılabilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Çalışmamızda MCF-7 hücrelerinin bulunduğu 96 kuyucuklu plakalara farklı fonksiyonel gruplara sahip (2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP) p-tert-bütikaliks[4]aren bileşikleri 1-500 μ M aralığında değişen konsantrasyonlarında eklenerek 24 saat inkübe edildi. Bu maddenin MCF-7 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisi mikroskopta incelenerek konsantrasyonlar arttıkça hücrelerin morfolojik özelliklerinde değişiklikler meydana geldiği gözlemlendi. Hücre yapılarının düşük konsantrasyonlardan itibaren daha yuvarlak hale gelerek ölmeye başladığı gözlemlendi. Yüksek konsantrasyonlar olan 250 ve 500 μ M da hücrelerin tamamen öldüğü görüldü. XTT sonuçlarından elde edilen sonuçlara göre MCF-7 hücrelerinde 3-AMP ve 4-AMP'nin kullanılan en düşük dozlarında dahi hücrelerin canlılığı % 50'nin altına düşmüş, ancak 2-AMP'nin en yüksek dozunda bile canlılık %50'nin altına düşmemiştir. L-929 hücrelerin de ise 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP 'nin en yüksek dozunda bile canlılık %50'nin altına düşmemiştir.

XCELLigence hücre analiz sistemi, gerçek zamanlı elektriksel iç direnci kullanılarak hücrelerin çoğalmasını, hücre göçünü, morfoloji değişimini ve hücre invazyonu gibi hücrelerdeki fenotipik değişiklikleri ölçerek hücre hareketlerinin izlenmesine olanak verir. Kullanılan bileşiklerin farklı konsantrasyonların L-929 hücreleri üzerine etkisinde hücrelerin morfolojik olarak değişiklikleri invert mikroskopla da incelenmiştir. Görüntülerde de maddelerin eklendikten sonraki durumlarında L-929 hücrelerine sitotoksik etkisi bulunmadığı görülmektedir. xCELLigence grafiğine göre kullanılan 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'ler L-929 hücreleri üzerinde 30 ve 100 μ M konsantrasyonlarında değerlendirilerek yaklaşık 160 saat boyunca gerçek zamanlı olarak gözlenmiştir. Maddeler eklendikten sonra L-929 hücrelerine olan etkisine baktığımızda grafikte 20. saatten itibaren madde konsantrasyon eğrilerinde bir düşüş gözlenmemektedir. Bu durum 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin sağlıklı fare fibroblast hücresi olan L-929'a etkisi olmadığını ve sitotoksik etki göstermediğini gerçek zamanlı olarak izleme imkanı sağlamıştır.

Yine kullanılan 3-AMP ve 4-AMP'lerin MCF-7 hücreleri üzerinde etkisinde 25, 100 ve 250 μ M konsantrasyonlarında değerlendirilerek yaklaşık 180 saat boyunca gerçek zamanlı olarak gözlenmiştir. Maddeler eklendikten sonra MCF-7 hücrelerine olan etkisine baktığımızda grafikte 25. saatten itibaren madde konsantrasyonlarında

değişiklik meydana gelmiştir. 3-AMP'nin 25 ve 100 μM konsantrasyon aralığında grafikte bir düşüş olmuştur. 4-AMP'de ise 100 μM konsantrasyondan sonra grafik eğrisinde düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, kaliks[4]arenlerden MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı 3.pozisyonda piridinyum grubunun modifiye edilmesi ile gösterilen artmış tercihli sitotoksosite ile 25 ila 100 μM 'lık bir konsantrasyon aralığında pasif hedefleme yapılarak başarılı antikanser etkisini göstermektedir. Pridinyum grup 3 pozisyonunda bulunan bileşik, 2 ve 4 pozisyonlarına göre daha sitotoksik olduğu görülmektedir.

Hücre ölüm karakteri hakkında bilgilerin toplanabilmesi için flow sitometri yöntemi kullanıldı. Buna göre hücrenin programlı hücre ölümü olan apoptoza mı yoksa hasarlı (istenmeyen) hücre ölümü olan nekroza mı gittiği bu yöntemle analiz edildi. MCF-7 hücreleri, T-25 kültür kaplarına 15×10^4 hücre/ml olacak şekilde ekilerek 10, 25 ve 50 μM konsantrasyonlarında hazırlanan 3- AMP ile 8 saat boyunca inkübe edildi. Pozitif kontrol grubu olarak da DOX maddesi kullanıldı. Süspansiyon haline getirilen MCF-7 hücreleri Annexin V / 7-AAD boyaları ile hücre boyamaları yapılarak flow sitometri cihazında analiz edildi. Hücre kontrol grafiğinde Q_3 bölgesinde yer alan ve iki floresan antikor boyalama işleminin olduğu bölgede hücre popülasyonu % 59.8 'dir. Bu grafik sonucuna göre hücreler boyalarla etkileşime girmemekte ve metabolik aktivitelerini devam ettirmektedir. DOX grafiğinde ise DOX'un düşük konsantrasyonunda (25 μM) bile hücrelerin çoğu geç apoptoza ya da nekroza gitmiştir. Buradaki nekrotik hücre ölüm popülasyonu ise % 53.2 'dir. Unstained grafiğine göre Q_3 bölgesinde hücre popülasyonu % 82.0'dır ve hücreler diğer bölgelere geçiş yapmamıştır. Bu sonuçlara göre de 3-AMP'nin MCF-7 hücrelerine karşı floresan özellik göstermediği görülmektedir. Konsantrasyon grafiklerinde ise artan konsantrasyonlara bağlı olarak hücre popülasyonlarında değişimler meydana gelmiştir. 10 ve 25 μM 'lık konsantrasyon grafiklerinde hücrelerin apoptoza uğradıkları popülasyon yüzdesi canlı hücre yüzdesinin çok altında kalmıştır. Yani hücreler apoptozik ölüm fazla gösterememiştir. XTT ve XCell yöntemleriyle belirlenen, hücrelerin sitotoksik etki göstermeye başladığı konsantrasyonun altında kalmıştır. Yine 50 μM 'lık konsantrasyon grafiğinde de hücrelerin konsantrasyonları arttıkça canlı hücre popülasyonu azalarak % 39.2'ye düşüş göstermiştir. XTT ve Xcell yöntemlerinden de belirlendiği üzere hücrelerin apoptoza gittiği popülasyon yüzdesi, Q_4 bölgesinde bulunan % 17.9'luk bir popülasyondur. Bu

sonuçlardan yola çıkarak, kontrol grubuyla da karşılaştırıldığında hücreler 25 ve 50 μM konsantrasyonları aralığında apoptotik hücre ölüm mekanizması gerçekleştirmiştir.

5.2 Öneriler

Her yıl en çok ölüm oranları kanser nedeniyle olmaktadır. Bu yüzden kanserin önlenmesi konusunda araştırmalar artmıştır. Kanser tedavisinde kullanılan temel yöntemlerin (cerrahi, kemoterapi ve hormon) ve ilaçların tedavide yetersiz kalması, çeşitli yan etkileri göstermesi, hastaların tedavi sürecinde yaşadıkları olumsuzluklar ve tedavilerinin uzun sürmesi nedeniyle alternatif tedavi yöntemleri aranmaktadır.

Pasif hedefleme yapılarak gerçekleştirilen tedavi yöntemlerinden en etkili olanlardan biri de tümörün yakalandığı bir araç olması gerektiğidir. Biyokimyada ve nanotıpta da kullanılan birçok moleküllerin nanokütle büyüklüğü ve yüksek yüzey alanı ile hacim oranı, karakteristik özelliklerini yeniden yapılandırarak biyomoleküllerle ayrı bir şekilde etkileşime girmelerini sağlar. Bu özellik, kanser tedavisinde, hücre görüntüleme, bio-algılamada ve ilaç dağıtımında ihtiyaca göre yüzey mühendisliği olasılığını arttırmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada da supramoleküler kimyada sıklıkla kullanılan türevlendirilmiş kalixarenlerin pasif hedefli terapi için tercihli sitotoksosite etkisi MCF-7 insan meme kanseri hücreleri üzerinde in-vitro ortamda araştırılıp düşük dozda etkin bir antikanser ajanı olarak kullanılabileceğini öngörmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abu, N., Akhtar, M. N., Ho, W. Y., Yeap, S. K. ve Alitheen, N. B., 2013, 3-Bromo-1-hydroxy-9,10-anthraquinone (BHAQ) inhibits growth and migration of the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB231, *Molecules*, 18 (9), 10367-10377.
- ACEA Biosciences Inc. xCelligence System, **2013**, Real-Time and Dynamic Monitoring of Cell Proliferation and Viability for Adherent Cells. San Diego, USA: 1-2.
- Akbulut, M. B., Uyar Arpacı, P. ve Unverdi Eldeniz, A., 2016, 'Effects of novel root repair materials on attachment and morphological behaviour of periodontal ligament fibroblasts: Scanning electron microscopy observation', *Microsc Res Tech*, 79 (12), 1214-1221.
- Atienza, J. M., Zhu, J., Wang, X., Xu, X. ve Abassi, Y., 2005, Dynamic Monitoring of Cell Adhesion and Spreading on Microelectronic Sensor Arrays, *Journal of Biomolecular Screening*, 10 (8), 795-805.
- Baggetto L.G., Coleman W.A., Lazar A.N., Magnard S., Michaud M.H., 2010, Calixarene Derivatives as Anticancer Agent., *US Patent 20100056482 A1*, March 4.
- Begnini, K. R., Duarte, W. R., da Silva, L. P., Buss, J. H., Goldani, B. S., Fronza, M., Segatto, N. V., Alves, D., Savegnago, L., Seixas, F. K. ve Collares, T., 2017, Apoptosis induction by 7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides in triple negative breast cancer cells, *Biomed Pharmacother*, 91, 510-516.
- Celebi, H., Arpacı, P. U., Celik, I. ve Akman, S., 2017, The Effects of Laser with Different Parameters and Crosshatching on Fibroblast Adhesion and Proliferation to Implant Surfaces, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 32 (6), 1231-1240.
- Christofferson, D. E. ve Yuan, J., 2010, Necroptosis as an alternative form of programmed cell death, *Current Opinion in Cell Biology*, 22, 263–268.
- Da Silva, E., Lazar, A. N. ve Coleman, A. W., 2004, Biopharmaceutical applications of calixarenes, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 14 (1), 3-20.
- D.A., S., Shoemaker R. H., Paul K.D., A., M., S., T., H., N. T., M.J., C., D., S. ve M.R., B., 1988, Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines, *CANCER RESEARCH*, 48, 4827-4833.
- Elsayed, E. A., Sharaf-Eldin, M. A. ve Wadaan, M., 2015, In vitro Evaluation of Cytotoxic Activities of Essential Oil from *Moringa oleifera* Seeds on HeLa, HepG2, MCF-7, CACO-2 and L929 Cell Lines, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16 (11), 4671-4675.

- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. ve Bray, F., 2015, Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int J Cancer*, 136 (5), E359-386.
- GÜLEŞ, Ö. ve EREN, Ü., 2008, Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 72-78.
- Hasan, M., Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyob, M., Kahn, C. J., Jabbari, E., Linder, M. ve Arab-Tehrany, E., 2014, Liposome encapsulation of curcumin: physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation, *Int J Pharm*, 461 (1-2), 519-528.
- Industries, Biological., **2012**, Cell Proliferation Kit (XTT based). 1.
- Instruction Manual, 2011, XTT Cell Proliferation Assay Kit, ATCC.
- Jordan2, A. S. L. a. V. C., 1997, MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line.
- Lee, A. V., Oesterreich, S. ve Davidson, N. E., 2015, MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years, *J Natl Cancer Inst*, 107 (7).
- Ma, Z., Hu, Y., Jiang, G., Hou, J., Liu, R., Lu, Y. ve Liu, C., 2012, Spontaneous generation of germline characteristics in mouse fibrosarcoma cells, *Sci Rep*, 2, 743.
- Magoulas, G. E., Tsigkou, T., Skondra, L., Lamprou, M., Tsoukala, P., Kokkinogouli, V., Pantazaka, E., Papaioannou, D., Athanassopoulos, C. M. ve Papadimitriou, E., 2017, Synthesis of nomicronvel artemisinin dimers with polyamine linkers and evaluation of their potential as anticancer agents, *Bioorg Med Chem*, 25 (14), 3756-3767.
- Mori T, M, O., M, M., K, U., S, T., Y, O., S, M. ve T, F., 1997, Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro, *Biomaterials*, 18 (13), 947-951.
- Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Nimse, S. B. ve Kim, T., 2013, Biological applications of functionalized calixarenes, *Chem Soc Rev*, 42 (1), 366-386.
- Ozcan, F., Bayrakçı, M. ve Ertul, Ş., 2015, Synthesis and Preparation of Novel Magnetite Nanoparticles Containing Calix[4]arenes With Different Chelating Group Towards Uranium Anions, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 52 (8), 599-608.

- Ozdemir, A. ve Ark, M., 2014, xCELLigence Real Time Cell Analysis System: A New Method for Cell Proliferation and Cytotoxicity, *Niche Journal*, 2 (2), 15-17.
- Riccardi, C. ve Nicoletti, I., 2006, Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *Nat Protoc*, 1 (3), 1458-1461.
- Salami, S. ve Karami-Tehrani, F., 2003, Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines, *Clinical Biochemistry*, 36 (4), 247-253.
- Santos, D., Medeiros-Silva, J., Cegonho, S., Alves, E., Ramilo-Gomes, F., Santos, A. O., Silvestre, S. ve Cruz, C., 2015, Cell proliferation effects of calix[4]arene derivatives, *Tetrahedron*, 71 (40), 7593-7599.
- Sayin, S., Ozcan, F. ve Yilmaz, M., 2011, Preparation and Application of Calix[4]arene Derivatives Bearing Pyridinium Units-Grafted Magnetite Nanoparticles for Removal of Dichromate and Arsenate Anions, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 48 (5), 365-372.
- Solly, K., Wang, X., Xu, X., Strulovici, B. ve Zheng, W., 2004, Application of Real-Time Cell Electronic Sensing (RT-CES) Technology to Cell-Based Assays, *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2 (4), 363-372.
- Srisuwan, S., Hamontri, S., Kongsomboon, K., Bhamarapratana, K. ve Suwannarurk, K., 2014, See-and-Treat Approach to Cervical Intraepithelial Lesions in HRH Princess Maha Chakri Sirindhorn Medical Center, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (8), 3483-3486.
- Stauber, J. L., M., N., and, F. ve Adams, M. S., 2002, Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae, *TRENDS in Biotechnology*, 20 (4).
- Sultana, S., Asif, H. M., Nazar, H. M. I., Akhtar, N., Rehman, J. U. ve Rehman, R. U., 2014, Medicinal Plants Combating Against Cancer - a Green Anticancer Approach, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (11), 4385-4394.
- Ting Dong, DaohongLiao, XiaohuiLiu ve XiaoguangLei, 2015, Using Small Molecules to Dissect Non-apoptotic Programmed Cell Death Necroptosis, Ferroptosis, and Pyroptosis, *ChemBioChem*, 16, 2557 – 2561.
- Tuschl, H. ve Schwab, C. E., 2004, Flow cytometric methods used as screening tests for basal toxicity of chemicals, *Toxicology in Vitro*, 18 (483–491).
- Theerakittayakorn K ve T, B., 2011, Differentiation Capacity of Mouse L929 Fibroblastic Cell Line Compare With Human Dermal Fibroblast, *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Medical and Health Sciences*, 5 (2).
- Uyar, P., Coruh, N. ve İscan, M., 2014, Evaluation of in Vitro Antioxidative, Cytotoxic and Apoptotic Activities of Rheum ribes Ethyl Acetate Extracts, *Journal of Plant Sciences (Science Publishing Group)*, 2 (6), 339.

- W., R. N., H., R. G., M., H. S. ve L., G. A., 1991, An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT, *Journal of Immunological Methods*, 142, 257-265.
- World Cancer Report (WCR) (2008), International agency for research on cancer, Retrieved 2011-02-26.
- Vanparys, C., Maras, M., Lenjou, M., Robbens, J., Van Bockstaele, D., Blust, R. ve De Coen, W., 2006, Flow cytometric cell cycle analysis allows for rapid screening of estrogenicity in MCF-7 breast cancer cells, *Toxicol In Vitro*, 20 (7), 1238-1248.
- Yousaf, A., Hamid, S. A., Bunnori, N. M. ve Ishola, A. A., 2015, Applications of calixarenes in cancer chemotherapy: facts and perspectives, *Drug Des Devel Ther*, 9, 2831-2838.
- Zengin, G., Sarikurkcu, C., Uyar, P., Aktumsek, A., Uysal, S., Kocak, M. S. ve Ceylan, R., 2015, *Crepis foetida* L. subsp. *rhoeadifolia* (Bieb.) Celak. as a source of multifunctional agents: Cytotoxic and phytochemical evaluation, *Journal of Functional Foods*, 17, 698-708.

EKLER

EK-1:

Kimyasal sıvı çözeltilerinde 2-AMP, 3-AMP, 4-AMP'lerin sentezlenmesi

2.13 g (2.5 mmol) ilk basamakta oluşan Diester bileşiği CH_2Cl_2 : CH_3OH (45 ml/45 ml) içerisinde çözüldü. Üzerine 15 mmol (1.62 g) ilave edildi. Reaksiyon 72 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Reaksiyon İTK den takip edilerek başlangıç maddelerinin ürüne dönüşümü gözlemlendi (Etilasetat : n-Hekzan, 1:1). Ayrıca reaksiyon FT-IR spektroskopisinde 1751 cm^{-1} deki ester karbonil bandının 2-AMP için 1676 cm^{-1} , 3-AMP 1681 cm^{-1} 4-AMP için 1638 cm^{-1} amid karbonil bandına dönüşümü gözlemlendi. Reaksiyon sonunda çözücü evaporasyon ile uzaklaştırılıp, geriye kalan katı partikül 250 ml CHCl_3 ile çözüldü ve ayırma hunisinde pH'ı 7 olan saf H_2O ile yıkandı, yıkama sonunda organik faz kuru MgSO_4 ile kurutulup oluşan süzüntüye CH_3OH damlatılarak evaporatör ile yoğunlaştırıldı ve kristallenmeye bırakıldı. Kristaller süzülerek alındı. (Sayin ve ark., 2011; Ozcan ve ark., 2015).

2-AMP (2-Aminometilpridin *p*-tert-bütikaliks[4]aren); Verim: 1.48 g (% 65.0), E.n : 259-262 IR : 1663 cm^{-1} (C=N) ν_{max} (ATR): 3454, 3358, 1676 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz CDCl_3): δ 0.98 (18H, s, tBu), , 3.31 (4H, d, $J=13.3\text{ Hz}$, ArCH_2Ar), 4.02 (4H, d, $J=13.3\text{ Hz}$, ArCH_2Ar), 1.22(18H, s, tBu), 4.50–4.55 (8H, m, OCH_2 , $\text{Ar-CH}_2\text{-NH}$), 6.85 (4H, s, ArH), 7.00 (4H, s, ArH), 7.18 (2H, s, OH), 7.61 (2H, d, $J=7.8\text{ Hz}$, PyH), 8.45 (2H, d, $J=4.5\text{ Hz}$, PyH), 7.06–7.10 (2H, m, PyH), 8.62 (2H, d, PyH), 9.21(2H, t, NH). Anal. Hesapl. $\text{C}_{60}\text{H}_{72}\text{O}_6\text{N}_4$: C, 76.24; N, 5.93; H, 7.68. Bulunan; H, 7.70; C, 76.28; N, 5.88% (MA: 944.56 g/mol).

3-AMP (3-Aminometilpridin *p*-tert-bütikaliks[4]aren); Verim: 1.5 g, (% 65.8) , E.n : 239-242 IR : 1668 cm^{-1} (C=N) ν_{max} (ATR): 3454, 3358, 1681 cm^{-1} ; 1.22(18H, s, tBu), 3.27 (4H, d, $J=13.3\text{ Hz}$, ArCH_2Ar), $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz CDCl_3): δ 0.98 (18H, s, tBu), 3.90 (4H, d, $J=13.3\text{ Hz}$, ArCH_2Ar), 4.46–4.49 (8H, m, OCH_2 , $\text{Ar-CH}_2\text{-NH}$), 6.85 (4H, s, ArH), 7.18 (2H, s, OH), 7.61 (2H, d, $J=7.8\text{ Hz}$, PyH), 7.00 (4H, s, ArH), 7.06–7.10 (2H, m, PyH), 8.45 (2H, d, $J=4.5\text{ Hz}$, PyH), 8.62 (2H, d, PyH), 9.21(2H, t, NH). Anal. Hesapl. $\text{C}_{60}\text{H}_{72}\text{O}_6\text{N}_4$: H, 7.68; N, 5.93; C, 76.23. Bulunan: C, 76.31; H, 7.74; N, 5.83% (MA: 944.56 g/mol).

4-AMP (4-Aminometilpridin *p*-tert-bütikaliks[4]aren); Verim: 1.72 g, (% 75.5) , E.n : 239-242 IR :1609 cm^{-1} (C=N) ν_{max} (ATR): 3454, 3358, 1638 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz CDCl_3): δ 1.0 (18H, s, tBu), 3.38 (4H, d, $J=13.3$ Hz, ArCH_2Ar), 3.55 (4H, s, $\text{Ar-CH}_2\text{-NH}$), 3.86 (4H, d, $J=13.3$ Hz, ArCH_2Ar), 1.27 (18H, s, tBu), 4.80 (4H, s, OCH_2), 6.85 (4H, s, ArH), 7.05 (2H, m, PyH), 7.26 (2H, d, $J= 7.8$ Hz, PyH), 6.88 (4H, s, ArH), 7.48 (2H, s, OH), 7.54 (2H, d, $J= 7.8$ Hz, PyH), 9.33 (2H, t, NH). Anal. Hesapl. $\text{C}_{60}\text{H}_{72}\text{O}_6\text{N}_4$:C, 76.23; H, 7.68; N, 5.93. Bulunan: H, 7.74; C, 76.31; N, 5.83% (MA: 944.56 g/mol).



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Kerime Kübra ÇİNİ
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Meram 09/08/1991
Telefon : 05075904853
Faks : -
e-mail : kubra.cini.12@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Meram Konya Lisesi (Anadolu), Meram, Konya	2009
Üniversite	: Sinop Üniversitesi, Merkez, Sinop	2013
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2019
Doktora	: -	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2015	MEB	Ücretli Öğretmenlik
2017	MEB	Ücretli Öğretmenlik
2016-2018	Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji ve Araştırma Uygulama Merkezi (İLTEK-ARGE)	Araştırmacı Öğrenci

UZMANLIK ALANI

- Fen Bilimleri

YABANCI DİLLER

İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

- Kübra Çini, Fatih Özcan, Şeref Ertul, Pembegül Uyar Arpacı, ‘Surface Modified Supramolecular p-tert-butylcalix[4]arene: New Opportunities for Anticancer Drug Development’, 5th International BAU Drug Design Congress : Novel Methods and Emerging Targets in Drug Discovery & Patented Drug Development, Bahcesehir University School of Medicine, Istanbul-Turkey, 2017. (Poster Sunum)
- Kübra Çini, Fatih Özcan , Şeref Ertul, Pembegül Uyar Arpacı, ‘Passive Targeting of Supramolecular p-tert-butylcalix[4]arene to Breast Cancer’, 4th International Turk-Pak Conference on Chemical Sciences (ITPCCS 2017), Konya-Turkey, 2017. (Poster Sunum)