Benzimidazolyum Bromür Türevlerinin Hücre Canlılığı ve Apoptoz Üzerindeki Etkilerinin Hücre Kültürü Yöntemiyle Belirlenmesi

Eda Gölebatmaz

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2020

The Determination of Benzimidazolium Bromide Derivatives Effects on Cell Viability and Apoptosis in Cell Culture Assay

Eda Gölebatmaz

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

January 2020

Benzimidazolyum Bromür Türevlerinin Hücre Canlılığı ve Apoptoz Üzerindeki Etkilerinin Hücre Kültürü Yöntemiyle Belirlenmesi

Eda Gölebatmaz

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. A. Pınar Öztopcu Vatan

Ocak 2020

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Eda GÖLEBATMAZ'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Benzimidazolyum Bromür Türevlerinin Hücre Canlılığı ve Apoptoz Üzerindeki Etkilerinin Hücre Kültürü Yöntemiyle Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman **:** Prof. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN

İkinci Danışman **:** -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN

Üye : Prof. Dr. Mediha CANBEK

Üye : Doç. Dr. Hakan ÜNVER

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. A. Pınar Öztopcu Vatan danışmanlığında hazırlamış olduğum "Benzimidazolyum Bromür Türevlerinin Hücre Canlılığı ve Apoptoz Üzerindeki Etkilerinin Hücre Kültürü Yöntemiyle Belirlenmesi" başlıklı tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik, ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi, tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

02.01.2020

Eda GÖLEBATMAZ

İmza

ÖZET

Bu çalışmada benzimidazolyum bromür türevi olan Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarının insan prostat kanseri hücreleri (LNCaP) üzerindeki morfolojik etkisi incelenmiş ayrıca 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile zamana ve konsantrasyon değişimine bağlı sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan 5-Florourasil (5-FU) ile MTT sonuçlarına göre daha sitotoksik olduğu belirlenen Bileşik 1 konsantrasyonları 1:1 oranında kombine olarak LNCaP hücrelerine uygulanmış ve hücre çoğalması üzerindeki antogonistik ve sinerjistik etkileri araştırılmıştır. Son olarak, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi kullanılarak Apoptotik DNA Fragmantasyonu belirlenmiştir.

Bileşik 1'in 24 saatte 100 µM, 48 saatte ise 25 µM konsantrasyonundan itibaren hücre morfolojisi üzerine etki etmeye başladığı gözlenmiştir. IC_{50} değerleri 24 ve 48 saat için sırasıyla 183 ve 90 µM olarak hesaplanmıştır. Bileşik 2'nin 24 ve 48 saatte 50 µM konsantrasyonundan itibaren hücre morfolojisi üzerine etki etmeye başladığı gözlenmiştir. IC_{50} değerleri 24 ve 48 saat için sırasıyla 488 ve 239 µM olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU'ın denenen konsantrasyonlarında ise 24 ve 48 saatte IC_{50} değeri bulunamamıştır. Kombine uygulamasında (Bileşik 1+5-FU), 24 saatte 200 µM, 48 saatte ise 100 µM konsantrasyonundan sonra antagonistik etkinin başladığı gözlenmiştir. Bileşik 1'in 100 ve 250 µM konsantrasyonlarının LNCaP hücrelerindeki Apoptotik DNA Fragmantasyonu araştırıldığında nekrotik etki görülmezken apoptotik etkinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı yani hücre ölümünün apoptozla gerçekleştiği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Benzimidazolyum, prostat kanseri, benzimidazolyum bromür, sitotoksisite, apoptoz

SUMMARY

In this study, the morphological effects of Compound 1 and Compound 2, which are derivatives of benzimidazolium bromide, on human prostate cancer cell line (LNCaP) concentrations of 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 and 500 µM were investigated. Furthermore, the time and dose dependent cytotoxic effects of 3- (4,5-DimethylThiazol-2-yl) -2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) test were investigated. 5-Fluoruracil (5-FU) used as positive control and Compound 1 concentrations determined to be more cytotoxic than MTT results were applied to LNCaP cells in a 1: 1 ratio and their antagonistic and synergistic effects on cell proliferation were investigated. Finally, Apoptotic DNA Fragmentation was determined using ELISA method.

Compound 1 was observed to have an effect on cell morphology at a concentration of 100 µM in 24 hours and 25 µM in 48 hours. IC_{50} values were calculated as 183 and 90 µM for 24 and 48 hours, respectively. It was observed that Compound 2 began to affect cell morphology at a concentration of 50 µM at 24 and 48 hours. IC_{50} values were calculated as 488 and 239 µM for 24 and 48 hours, respectively. In the doses of 5-FU, which was used as a positive control, IC_{50} values were not found at 24 and 48 hours. In combined administration (Compound 1 + 5-FU), antagonistic effect was observed after a dose of 200 µM in 24 hours and 100 µM in 48 hours. When the Apoptotic DNA Fragmentation of 100 and 250 µM concentrations of Compound 1 was investigated in the LNCaP cells, it was observed that the necrotic effect did not occur, whereas the apoptotic effect increased depending on the concentration cell death occurred with apoptosis.

Keywords: Benzimidazolium, Benzimidazolium bromide, Prostate Cancer, Cytotoxicity, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek her zaman yanımda olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPCU VATAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümünde görev yapmakta olan Doç. Dr. Hakan ÜNVER' e yardımlarını esirgemediği için çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca deneyimleri ile bana destek olan birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Doktora öğrencisi Merve YILDIZ' a ve çalışmalarım sırasında aynı laboratuvarı paylaşmış olduğum Elif Gözde GÖKKAYA ve Elif SARILAR' a yardımlarını esirgemedikleri için teşekkür ederim.

Son olarak; yaşamım boyunca sonsuz sevgilerini, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, görüş ve tecrübeleriyle hayatıma ışık tutan yol göstericilerim babam Ahmet Turan GÖLEBATMAZ, annem Mukaddes GÖLEBATMAZ, ablam Kübra KELLECİ ve kardeşim Kürşat GÖLEBATMAZ' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET vi
SUMMARY vii
TEŞEKKÜR viii
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI 3
2.1. Prostat Kanseri 3
2.2. Prostat Kanserinin Gelişimesinde Rol Oynayan Risk Faktörleri 5
2.2.1 Yaş 5
2.2.2 Irk / etnik çeşitlilik 6
2.2.3 Ailesel ve kalıtsal faktörler 6
2.2.4 Hormonlar ve büyüme faktörleri 6
2.2.5 Beslenme 8
2.2.6 Sigara ve alkol kullanımı 9
2.3 Prostat Kanseri Teşhisinde Kullanılan Yöntemler 9
2.3.1 Prostat spesifik antijen (PSA) 10
2.3.2 Dijital rektal muayene (DRE) 11
2.3.3 TRUS prostat biyopsisi 11
2.4 Prostat Kanseri Tedavisinde Kullanılan Yöntemler 12
2.4.1 Hormonal terapi 12
2.4.2 Radikal prostatektomi (RP) 13
2.4.3 Radyoterapi (RT) 13
2.4.4 Kemoterapi 13
2.5 Benzimidazolyum 15
3.MATERYAL VE YÖNTEM 18
3.1 Hücrelerin Temin Edilmesi ve Çoğaltılması 18
3.2 Hücrelerin Deneye Alınması ve Hücre Ekimi 18
3.3 Bileşik 1 ve 2' nin Konsantrasyonlarının Hazırlanması 19
3.3.1 Bileşik 1'in konsantrasyonlarının hazırlanması 19
3.3.2 Bileşik 2'nin konsantrasyonlarının hazırlanması 19

İÇİNDEKİLER (devam)

3.4 Pozitif Kontrol İçin İlaç Konsantrasyonlarının Hazırlanması 20
3.5 Hücre Morfolojisinin İncelenmesi 20
3.6 Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi 20
3.7 Kombine İlaç Uygulanması 22
3.7 Apoptotik DNA Fragmantasyonunun Belirlenmesi 23
4.BULGULAR VE TARTIŞMA 24
4.1. Bileşik 1'in Prostat Kanseri (LNCaP) Hücre Dizisi Üzerindeki Morfolojik Etkilerinin Belirlenmesi 24
4.2. Bileşik 2'nin Prostat Kanseri (LNCaP) Hücre Dizisi Üzerindeki Morfolojik Etkilerinin Belirlenmesi 28
4.3. Bileşik 1'in Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkilerinin Mitokondriyal Aktiviteye Bağlı Olarak Belirlenmesi 33
4.4 Bileşik 2'nin Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkilerinin Mitokondriyal Aktiviteye Bağlı Olarak Belirlenmesi 34
4.5. 5-Fluourasil'in (5-FU) Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkilerinin Mitokondriyal Aktiviteye Bağlı Olarak Belirlenmesi 38
4.6. Bileşik 1'in 5-FU ile Kombine Olarak Uygulanması 40
4.7 Apoptotik DNA Fragmantasyonu Uygulamasının Sonuçları 44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 47
KAYNAKLAR DİZİNİ 50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1 Prostatın zonal anatomisinin şeması……..3

2.2 Normal prostat bezi ve tümörlü prostat bezi …….4

2.3 Androjen Reseptör Geninin Genom yapısı ……...7

2.4 Androjen ve AR Mekanizması …….7

2.5 5-Fluorourasil kimyasal yapısı ……..14

2.6 Benzimidazol Halkasal yapısı ……15

2.7 Bileşik 1'in Halkasal Yapısı ……..….16

2.8 Bileşik 2'nin Halkasal Yapısı ……...….17

4.1 Yirmi dört saat süreyle uygulanan Bileşik 1'in farklı konsantrasyonlarının LNCaP hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişiklikleri…….....……..25

4.2 24 saat boyunca uygulanan Bileşik 1'in 150 µM konsantrasyonunun LNCaP hücre zarlarında oluşturduğu apoptotik keseler…….….26

4.3 LNCaP hücrelerine 48 saat uygulanan Bileşik 1 konsantrasyonlarının hücrelerde meydana getirmiş olduğu morfolojik değişimler …….……....27

4.4 LNCaP hücrelerine 24 saat uygulanan Bileşik 2 konsantrasyonlarının kontrol grubuna kıyasla hücrelerde meydana getirmiş olduğu morfolojik değişimler ……..29

4.5 LNCaP hücrelerine 48 saat uygulanan Bileşik 2 konsantrasyonlarının kontrol grubuna kıyasla hücrelerde meydana getirmiş olduğu morfolojik değişimler……...31

4.6 Bileşik 1'in LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 24 saatlik etkisi. …….33

4.7 Bileşik 1'in LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 48 saatlik etkisi ……..34

4.8 Bileşik 2'nin LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 24 saatlik etkisi. ……..35

4.9 Bileşik 2'nin LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 48 saatlik etkisi ……36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.10 5-FU'nun LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 24 saatlik etkisi……....39

4.11 5-FU'nun LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 48 saatlik etkisi……39

4.12 Kombine olarak uygulanan Bileşik 1 ve 5-FU'in LNCaP hücre dizisi üzerinde yirmi dört saatteki etkisi ……..……41

4.13 Kombine olarak uygulanan Bileşik 1 ve 5-FU'in LNCaP hücre dizisi üzerinde Kırk sekiz saatteki etkisi ……..……42

4.14 Bileşik 1'in 100 ve 250 µM konsantrasyonlarındaki apoptotik DNA fragmantasyon oranı ……...…….45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

2.1 Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) Tarafından Yayınlanan 2012 Verilerine Göre Erkeklerde En Sık Görülen İlk Beş Kanser Türünün Dağılımı ……4

2.2 Yaşa Bağlı Normal PSA Değerleri ……10

3.1 Deneyde kullanılan kombine uygulama konsantrasyonları……22

4.1 LNCaP hücrelerinde Bileşik 1, 5-FU ve kombine (Bileşik 1 + 5-FU) uygulamalarının yirmi dört saatte hücre sağ kalım yüzdeleri……..……...43

4.2 LNCaP hücrelerinde Bileşik 1, 5-FU ve kombine (Bileşik 1 + 5-FU) uygulamalarının kırk sekiz saatte hücre sağ kalım yüzdeleri…….……..…44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
˚C	Celcius degree (Santigrat derece)
µL	mikrolitre (10^{-6} litre)
µm	mikrometre (10^{-6} metre)
µM	mikromolar (10^{-6} molar)
cm	santimetre
cm^2	santimetrekare
dk	dakika
g	gram
mL	mililitre (10^{-3} litre)
mM	milimolar (10^{-3} molar)
nm	nanometre
ng	nanogram
rpm	revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
g	gravity (göreceli santrifüj kuvveti)

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
5-FU	5-Fluourasil
A 2780	İnsan yumurtalık kanseri hücre dizisi
A549	İnsan akciğer kanseri hücre dizisi
ABD	Amerika birleşik devletleri
ADT	Androjen yoksunluk tedavisi
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
AR	Androjen reseptörü
ARE	Androjen tepki elemanı
ATCC	Amerikan kültür koleksiyonu
BCR	Biyokimyasal nüks

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklamalar
BFTC-905	İnsan mesane papiller geçiş hücre kanseri hücre dizisi
BPH	Prostat hiperplazisi
BT	Brakiterapi
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DRE	Dijital rektal muayene
DU-145	İnsan prostat kanseri hücre dizisi
EBRT	Dış ışın radyasyon terapisi
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal bovine serum (Fetal dana serumu)
FdUTP	Florodeoksiuridin trifosfat
FUTP	Florouridin trifosfoat
HBSS	Hank's Balance Salt Solution (Hank'ın dengelenmiş tuz solüsyonu)
HCT 116	İnsan kolon kanseri hücre dizisi
HeLa	İnsan serviks karsinom hücre dizisi
HSP	Isı şok proteini
HL 60	İnsan lösemi hücre dizisi
IARC	Uluslararası Kanser Ajansı
IC_{50}	Hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon
LH	Luteinize edici hormonun
LHRH	Lüteinleştirici hormon-salıcı hormon
LNCaP	İnsan prostat kanseri hücre dizisi
mCRPC	Metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri
MES-SA	İnsan rahim sarkomu hücre dizisi
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklamalar
PBS	Fosfat buffer saline (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi)
PC	Prostat Kanseri
PC3	İnsan prostat kanseri hücre dizisi
PCPT	Prostate Cancer Prevention Trial (Prostat kanseri önleme denemeleri)
PSA	Prostat spesifik antijen
RD	İnsan embriyonel rabdomiyosarkom hücre dizisi
RNA	Ribonükleikasit
RP	Radikal prostatektomi
RT	Radyoterapi
SPSS	Statistics program for social and science
TRUS	Transrektal ultrason
TÜİK	Türkiye istatistik Kurumu
vb.	ve benzeri
vd.	ve diğerleri

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser; genetik ve çevresel etmenler aracılığı ile hücre yapılarında çeşitli değişikliklere neden olan, hücrelerin kontrolsüz ve zamansız bir şekilde çoğalması ile karakterize edilen ve bazı türleri ölüm ile sonuçlanabilen bir rahatsızlıktır. Mutasyonel olarak genellikle tek bir hücreden başlayıp diğer doku ve organları da istila ederek yok etme özellikleri bulunmaktadır. Ayrıca sağlıklı dokulara yerleşip kan ve lenfatik sisteme ulaşmaları halinde metastaz yaparak vücudun herhangi bir bölgesini etkileyebilir. Önemli bir halk sağlığı problemi olan kanserin hemen her ülkede morbidite ve mortalite açısından öne çıktığı, ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer aldığı bilinmektedir (Siegel vd., 2019). İstatistiki verilere bakıldığında yaklaşık her 6 ölümden 1 tanesinin kansere bağlı olduğu bilinmekte ve kanser kaynaklı ölüm sayısının 2025 yılına kadar yılda 19,3 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Küçükbay vd., 2016; Avcı ve Tunçbilek, 2017).

Literatür araştırılması yapıldığında 100'den fazla kanser türü olduğu ve ölüme yol açan başlıca kanser türleri arasında akciğer, prostat, mide, karaciğer, kolon ve meme kanserinin bulunduğu görülmektedir. Günümüzde kansere yönelik pek çok tedavi uygulanmaktadır. En yaygın kullanılan tedaviler arasında cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi bulunmaktadır.

Erkeklerde görülen kanserlerin üçte biri ürolojik neoplazilerdir (Tortajada vd., 2011). Prostat kanseri erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser türüdür. Prostat kanseri, idrar kesesi çıkışını saran normal boyutları 4 x 3 x 3 cm ve yaklaşık ağırlığı 15-20 g olan prostat bezindeki hücrelerin değişikliğe uğrayarak kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla başlar. Prostat kanserinin tedavi edilmesinde kullanılan yöntemlerin yan etkileri, maliyeti ve başarı oranları dikkate alındığında yeni yöntemlerin ve ilaçların geliştirilmesine yönelik çalışmalar oldukça önem arz etmektedir.

Son yıllarda yapısında heterosiklik bileşik bulunan kimyasal maddeler sentezlenmiş ve antikanser özellikleri araştırılmıştır. Heterosiklik bileşikler arasında, benzimidazol

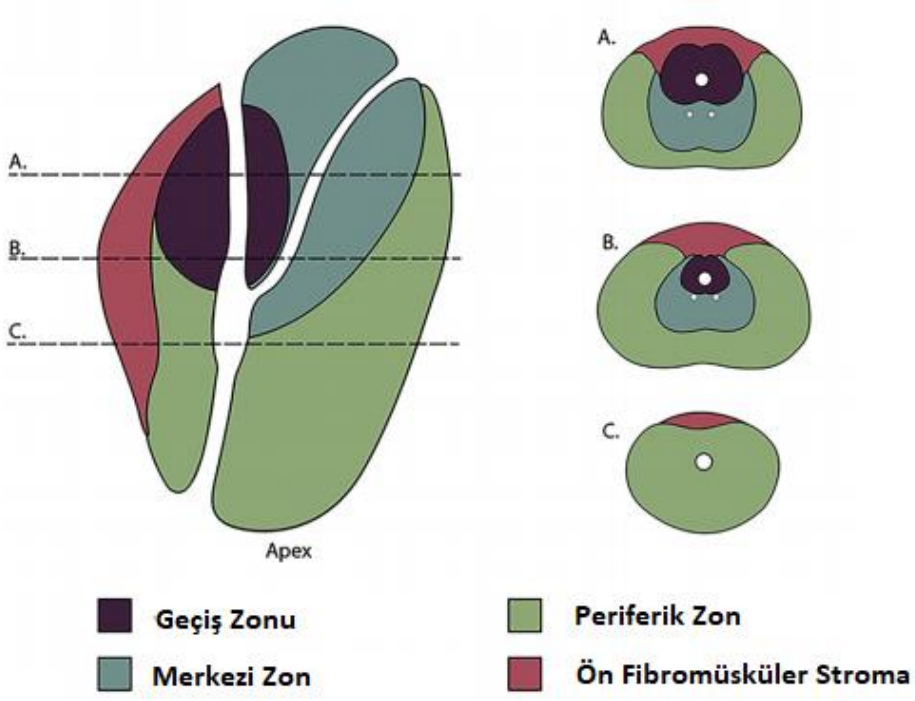
türevleri önemli bir yer tutmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda yeni sentezlenen farklı bir çok benzimidazol türevinin antiülser, antiviral, antifungal, antibakteriyel, antitüberküler ve antikanser gibi çeşitli biyolojik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Küçükbay vd., 2016). Bu özellikleri nedeniyle yeni bir kemopterapötik ajan olabileceği düşünülerek farklı pek çok benzimidazol türevinin sentezlenerek kanserli hücreler üzerindeki etkileri hakkında yeni araştırmalar yapılmaktadır. Özellikle son 20 senede çeşitli benzimidazol türevleri sentezlenip kanserli hücreler üzerinde araştırılmış ve umut verici sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışmada yeni sentezlenen benzimidazolyum bromür türevi olan Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 μM konsantrasyonlarının insan prostat kanseri (LNCaP) hücreleri üzerinde yaratmış olduğu morfolojik etki incelenmiş, ardından hücrelerin çoğalması üzerindeki etkisi ise 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile konsantrasyona ve zamana bağlı olarak araştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak 5-Florourasil (5-FU) denenmiş, daha sonra Bileşik 1 ile 5-FU aynı konsantrasyonlarda kombine kullanılarak (1:1) LNCaP hücrelerinde yaratmış olduğu antagonistik ve sinerjistik etkileri MTT yöntemiyle araştırılmıştır. Ayrıca, Bileşik 1'in 100 ve 250 μM konsantrasyonlarının LNCaP hücreleri üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkilerini belirlemek amacıyla ELISA yöntemi kullanılmıştır.

2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

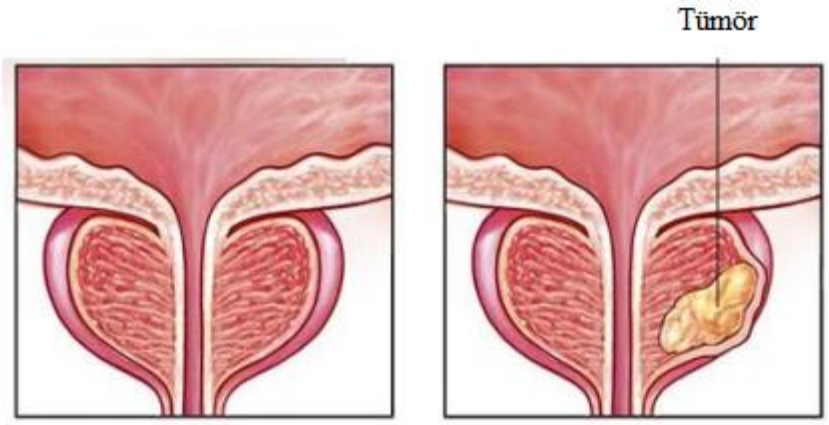
2.1. Prostat Kanseri

Prostat erkeklerde mesane çıkışını saran ceviz büyüklüğünde bir salgı bezidir. Prostat bezi, pubik sempatizin arka tarafında ve rektumun ön tarafında yer alan koni şeklinde bir organdır (Lee vd., 2011). Normal prostat bezi 4 x 3 x 3 cm boyutlarında ve yaklaşık 15 ila 20 g ağırlığındadır (Yacoub vd., 2018). Doktor John McNeal tarafından 1980 yılında yapılan bir dizi makalede, prostatın zonal anatomisi olarak bilinen lob yerine, bölgelere dayanan yeni bir prostat bezi anlayışı geliştirilmiştir (Cunha ve Ricke, 2011; Selman, 2011). McNeal, prostatın 4 farklı bölgesini, periferik zon, merkezi zon, geçiş zonu ve ön fibromüsküler stroma olarak tanımlamıştır (McNeal,1981; Şekil 2.1). Bu tanımlama günümüzde de prostat anatomisini anlamadaki ana model olarak kullanılmaya devam etmektedir.



Şekil 2.1: Prostatın zonal anatomisinin şeması. Şema; periferik zon, merkezi zon, geçiş zonu ve anterior fibromüsküler stroma arasındaki ilişkileri göstermektedir (Yacoub vd., 2018).

Kanser, sebebi bilinen ölümler sıralamasında kardiyovasküler sistem hastalıklardan sonra en sık görülen ikinci ölüm sebebi olması açısından önemli bir toplum sağlığı problemidir. Dünya'da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur. Kanserde benzer seyir devam ettiği takdirde 2030 yılına gelindiğinde yıllık 22 milyon yeni vaka ortaya çıkacağı tahmin edilmektedir. 2018 yılında ise ölüm vakalarının %38,4'ünü dolaşım sistemi hastalıkları oluştururken, %19,7 ile ikinci sırada kanser kaynaklı ölümlerin yer aldığı belirlenmiştir (TÜİK, 2019).



Şekil 2.2 Normal prostat bezi ve tümörlü prostat bezi (Büyüközer, 2018)

Prostat kanseri (PC), prostat bezi hücrelerinin malign büyümesi sonucu oluşmaktadır (Şekil 2.2). Prostat kanserinin ilerlemesi, hücrelerin çoğalması ve hücre ölümü arasında bulunan ilişkiye bağlıdır. Prostat kanserinde, hücre proliferasyon hızı hücre ölümünden daha yüksektir (Tan vd., 2014). Dünyada ve Türkiye'de erkeklerde en sık görülen kanserler akciğer ve prostat kanseridir. Türkiye'de ve dünyada erkeklerde en sık görülen kanser türleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) Tarafından Yayınlanan Globocan 2012 Verilerine Göre Erkeklerde En Sık Görülen İlk Beş Kanser Türünün Dağılımı (Sağlık Bakanlığı, 2017).

	Türkiye*	Dünya	ABD
1	Akciğer	Akciğer	Prostat
2	Prostat	Prostat	Akciğer
3	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal
4	Mesane	Mide	Mesane
5	Mide	Karaciğer	Böbrek

Erken teşhis edilen prostat kanseri hala prostat beziyle sınırlı olduğunda başarılı bir tedavi şansı yüksektir. İlerleyen yaş, ırk ve ailede prostat kanseri öyküsü önde gelen prostat kanseri risk faktörleridir. Ancak diyet, fiziksel aktivite, sigara ve alkol tüketimi gibi varsayılan risk faktörlerinin prostat kanserindeki rolleri ise tam olarak belirlenememektedir.

Prostat kanseri hücre hatları 3'e ayrılmaktadır; LNCaP, PC3 ve DU-145. LNCaP hücreleri, insan prostatik adenokarsinomudur. Lenf nodu üzerinde metastaz yapan, androjen reseptörleri içeren steroid hormonuna duyarlı hücre dizisidir (Morphy vd., 1980; Horoszewicz vd., 1983). DU-145, beyin metastazı yapan, hormona duyarsız hücre dizisidir (Stone vd., 1978). Son olarak, PC3 hücre dizisi, kemik iliği metastazı yapan bir prostat adenokarsinomudur ve hormona duyarsızdır (Kaighn vd., 1979).

2.2. Prostat Kanserinin Gelişimesinde Rol Oynayan Risk Faktörleri

PC gelişiminin, genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimi sonucu geliştiği düşünülmektedir. Yaş, etnik köken ve aile öyküsü en önemli risk faktörleri arasındadır. Ayrıca obezite ve diyet faktörlerinin PC gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. PC başlangıcında ise hormonal faktörlerin önemli olduğu, PC başlangıç yaşının serum testosteron düzeylerinin düşme yaşı ile çakıştığı görülmüştür. Serum testosteronunun östrojen oranının değişmesine neden olup PC riskinin önemli bir belirleyicisi olduğu varsayılmaktadır (Nelson ve Shah, 2019).

2.2.1 Yaş

En önemli risk faktörlerinden birisi yaştır. Yaşlanan nüfusa bağlı olarak PC insidansında gerçek bir artış görülmektedir (Center vd., 2012). Tüm olguların %0,6'sından azı 45 yaşından önce , %62-85'i ise 65 yaşından sonra prostat kanseri tanısı almaktadır (Fournier, 2004; Platz, 2006). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde beyaz popülasyonunda yapılan çalışmalarda da benzer şekilde 75-79 yaşları arasındaki erkeklerde

prostat kanseri olma riski 45-49 yaş grubundakilere göre 130 kat daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Platz, 2006).

2.2.2 Irk / etnik çeşitlilik

Yaşa göre düzenlenmiş prostat kanseri insidansında ırksal gruplar arasında önemli farklılıklar vardır. Dünya çapında en düşük insidansa sahip olan bölge Asyadır. Afrika kökenli Amerikalılarda risk %60'dan daha fazla, Asya kökenli Amerikalılarda ise risk %38'den daha az görülmektedir (Tortajada vd.,2011).

2.2.3 Ailesel ve kalıtsal faktörler

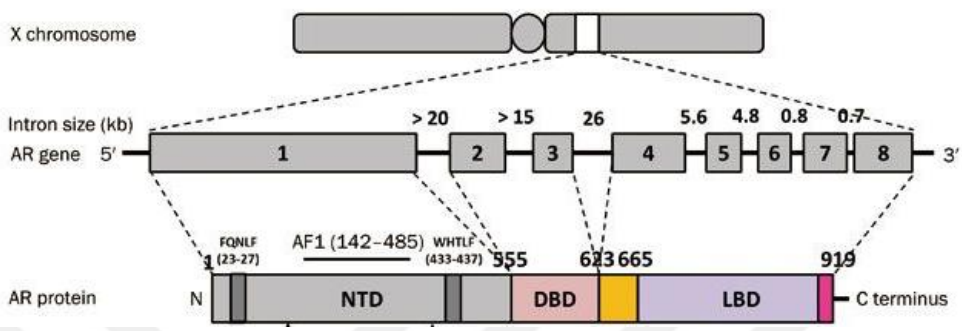
Prostat kanserlerinin %42'sinin genetik faktörlerle açıklanabileceği görülmüştür. Baba, erkek kardeş ve oğul gibi birinci derece bir erkek akrabasında prostat kanseri öyküsü olan erkeklerde prostat kanseri riskinin 2 ila 3 kat arttığı gözlenmiştir (Stanford vd., 2001). Klinik olarak, ailesel prostat kanseri sendromları daha genç yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Prostat kanseri teşhisi konulan hastaların %43'ü genetik yatkınlığa sahip 70 yaşın altındaki erkeklerden oluşurken; 85 yaş ve üzeri hastaların ise %9'unun genetik bir yatkınlığa sahip olduğu rapor edilmiştir (Cussenot O. vd.,2004).

2.2.4 Hormonlar ve büyüme faktörleri

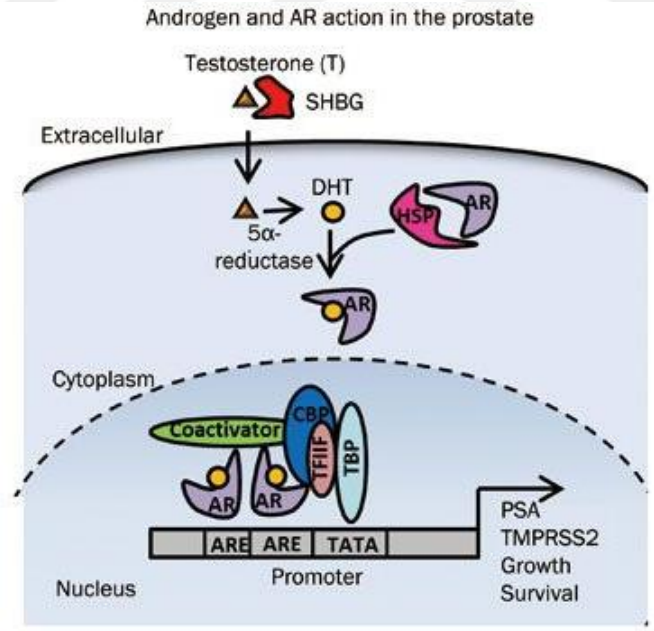
Androjenler, prostat bezinin gelişip olgunlaşmasını ve korunmasını; prostat epitel hücrelerinin ise çoğalıp farklılaşmasını etkileyen bir hormondur. Androjenlerin prostat hücrelerindeki etkisine androjen reseptörü (AR) aracılık eder, bu da DNA sentezi ve hücre çoğalmasında yer alan genlerin transkripsiyonunun aktivasyonuna yol açar (Cussenot vd., 2004).

Androjen reseptör geni, X-kromozomunun uzun kolunda (lokus: Xq11-q12) bulunmaktadır (Şekil 2.3). Farklı uzunluklarda (0.7-2.6 kb) intronlar tarafından kesilen sekiz

ekson içerir ve çeşitli fonksiyonel alanlardan (N-terminal alanı (NTD), DNA bağlayıcı alan (DBD) ve ligand bağlayıcı alan (LBD)) oluşan 919 amino asitli bir proteini kodlamaktadır (Tan vd., 2014).



Şekil 2.3 Androjen Reseptör Geninin Genom yapısı (Tan vd., 2014).



Şekil 2.4 Androjen ve AR Mekanizması (Tan vd., 2014).

Testosteron gibi androjenler, luteinize edici hormonun (LH) etkisi altında Leydig hücrelerinde sentezi gerçekleştirilir. Sentezlenen serbest formdaki testosteron hedef dokulara taşınır ve 5-*a*-redüktaz ile dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. DHT, ısı şok

proteinlerinin (HSP) AR'den ayrılmasını sağlar. AR ve DHT'nun bağlanması erkekte cinsel değişimi ve gelişimi başlatan unsurdur. AR daha sonra çekirdeğe taşınır ve burada prostat spesifik antijen (PSA) gibi hedef genlerin promotör bölgesinde bulunan androjen tepki elemanına (ARE) bağlanır. Androjen reseptörü kofaktörleri kendine çeker ve prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve sağ kalımını düzenleyen hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Şekil 2.4). Erkek cinsel gelişimi ve farklılaşması, androjen veya AR yokluğunda gerçekleşmez. Prostat kanserinin oluşumu ve ilerlemesi androjenlerin varlığına bağlıdır. Bu nedenle, prostat kanseri testosteron ve DHT gibi androjenlerden yoksun bırakılarak veya işlem basamaklarını bloke ederek tedavi edilebilir. Testosteron ve DHT'nin bulunmaması durumunda dokunun apoptoza girdiği belirlenmiştir. Fakat bazen kanser hücrelerinin adaptasyon geçirerek yaşamlarını devam ettirdikleri görülmüştür. Bunun temel sebebinin hücrelerin uğradıkları adaptasyon sonucunda androjenden bağımsız bir şekilde çoğalma özelliği kazanabilmeleridir (Çal ve Şimşir, 2005; Tan vd., 2014; Dadwal vd., 2018).

2.2.5 Beslenme

Çalışmalar, prostat kanseri oluşumu ile beslenme alışkanlığı arasında yüksek oranda güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir. Genellikle yağ oranı yüksek bir batı diyeti, androjen ve östrojen üretimini artırarak prostat kanseri riskini arttırırken, Asya ve vejeteryan diyetleri (düşük yağlı, yüksek lifli) dolaşımdaki hormon seviyesini düşürerek prostat kanseri riskini düşürdüğü belirlenmiştir (Hsing ve Chokkalingam, 2006). Çalışmalardan elde edilen bulgular hayvansal doymuş yağların prostat kanser riskini artırırken, doymamış yağların ise bu riski azalttığını göstermektedir. Et tüketimi, özellikle kırmızı et ve işlenmiş etin prostat kanseri riskinin artmasıyla da tutarlı bir şekilde bağlantılı olduğu rapor edilmiştir. Her ne kadar meyve ve sebze tüketiminin çeşitli kanser risklerinin azalmasıyla ilişkisi olsa da, prostat kanserindeki rolü henüz net değildir. Brokoli, lahana ve karnabahar gibi sebze alımının, muhtemelen izotiyosiyanatların içeriğinden dolayı prostat kanseri riskini azalttığına karar verilmiştir. Çin'de yapılan bir vaka kontrol çalışmasında ise soğan, sarımsak ve frenk soğanı gibi sebzelerin alımının prostat kanseri riskini düşürdüğü rapor edilmiştir. Bu koruyucu etki, organosülfür bileşiklerin tümör inhibe edici özelliklerinden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (Hsing ve Chokkalingam, 2006). Ayrıca Japon erkeklerinde PC insidansındaki azalmanın, bitki kaynaklı fitoöstrojenler bakımından çok

zengin olan geleneksel Japon diyetinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunların, tümör baskılayıcı östrojen reseptörü betalarının uyarılması ile birlikte PC gelişmesine karşı koruyucu olduğuna inanılmaktadır.

Bununla birlikte, ABD'de doğan Japon erkeklerinde PC görülme sıklığının yerel popülasyona yaklaştığı görülmüştür. Böylece çevresel faktörlerin PC gelişiminde güçlü bir etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Bunun sebebinin, batı diyetinde yüksek oranda hayvan kaynaklı östrojen içeren (östrojenin zararlı etkilerine aracılık eden östrojen reseptör alfalarını uyaran) hayvansal proteinlerin kısmen bundan sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (Nelson ve Shah, 2019).

2.2.6 Sigara ve alkol kullanımı

Sigara kullanımı kanserden ölümlerin önde gelen sebeplerinden bir tanesi olarak görülmektedir. Literatürden elde edilen verilerle prostat kanserinin sigara tüketimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda sigara kullanımının PC tedavisinde yüksek başarısızlık riski taşıdığı da bilinmektedir (Nunzio vd. 2015).

Alkol tüketimi ile prostat kanseri riski arasında da pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Yaşam boyu yüksek alkol tüketiminin prostat kanseri riskini arttırdığına dair kanıtlar elde edilmiştir (Demourya vd., 2016).

2.3 Prostat Kanseri Teşhisinde Kullanılan Yöntemler

Prostat kanseri (PC) tanısı geleneksel olarak dijital rektal muayene (DRE) ve prostat spesifik antijen (PSA) kan testi ile konulabilir. Ayrıca, transrektal ultrason (TRUS) rehberliğinde yapılan biyopside tanının konulmasına yardımcı olmaktadır (Descotes, 2019).

2.3.1 Prostat spesifik antijen (PSA)

Prostat spesifik antijen (PSA), prostat bezinde bulunan epitel hücreleri tarafından üretilen bir glikoprotein serin proteaz enzimidir. Prostata spesifik olmasına rağmen kansere özgü değildir. PSA değeri; enfeksiyon, bening prostat hiperplazisi (BPH) veya son zamanlarda idrar yollarının fiziksel durumu üzerindeki değişimler gibi iyi huylu nedenlerden dolayı önemli ölçüde yükselebilir. Bununla beraber bazı önemli prostat kanseri hastaların da PSA değerleri normal görülebilir. Bu nedenle kendi başına bir teşhis testi olma özelliği taşımamaktadır. Ancak bir risk göstergesi olarak göz ardı edilmemelidir**.** Kesinlikle dikkate alınmaması gereken bir PSA seviyesi yoktur; ancak hastanın yaşına göre kabul edilen normal PSA değerleri de Çizelge 2.2'de gösterilmektedir (Nelson ve Shah, 2019). Bu değerlere uymayan hastalardan biyopsi örneği alınır ve prostat kanseri tanısı ancak bu şekilde kesin olarak konulabilir.

Çizelge 2.2 Yaşa Bağlı Normal PSA Değerleri (Nelson ve Shah, 2019).

Yaşa Bağlı Normal PSA Değerleri	
Yaş	Normal PSA aralıkları (ng/ml)
40 – 49	< 2.5
50 – 59	< 3.5
60 – 69	< 4.5
> 70	< 6.5

PSA değerinin 10 ng/mL'nin üzerinde olduğu hastalarda prostat kanseri özgüllüğü %92'ye yaklaşır ve bu durum yüksek oranda malign hastalığın bir göstergesidir. Bu hastalara biyopsi yapılması şarttır (Cupp ve Oesterling, 1993). 4,1 ile 10 ng/mL arasındaki PSA değerlerinin yorumlanması zordur. Prostat kanseri ve iyi huylu prostat hiperplazisi hastaları örtüşen PSA değerlerine sahip olabilir. Bu nedenle özgüllüğü önemli ölçüde azalır. Ama bu erkeklerin tedavi edilebilecek prostat kanserine sahip olmaları muhtemeldir. PSA değerinin doğruluğunu arttırmanın yolu, PSA değeri ile birlikte prostat hacminin değerlendirilmesidir. Prostat hacmini belirlemek için en uygun ve güvenilir yöntem ise transrektal ultrason (TRUS)' dur (Cupp ve Oesterling, 1993).

Tarama veya tanı aracı olarak kullanmada zorluklarına rağmen PSA, prostat kanseri risk sınıflandırmasının önemli bir parçasıdır ve prostat kanseri hastaların da izlenmesi son derece faydalıdır. PSA verileri hastalık ilerlemesinin belirtilerini izlemek için kullanıldığı gibi tedavi uygulandıktan sonra da takip edilmesi önemlidir. PSA seviyesi tanımlanmış seviyelere yükseldiğinde daha fazla kurtarma tedavisine ihtiyaç olabileceğinin bir kanıtı olarak kabul edilir (Nelson ve Shah, 2019).

2.3.2 Dijital rektal muayene (DRE)

Dijital rektal muayene (DRE), prostat spesifik antijen (PSA) testinin yapılmasına kadar prostat koruyucu amaçlı yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Okotie vd., 2007). DRE, Amerikan Kanser Derneği tarafından 40 yaş ve üstü erkeklerde yıllık bir değerlendirme olarak önerilmektedir. Bu muayene prostatın büyüklüğü, nodülerliliğini ve asimetrisini incelemeye dayanmaktadır (Cupp ve Oesterling, 1993).

DRE'de bulunan nodüllerin her zaman kanseri işaret etmediği için DRE'yi prostat tarama protokollerine dahil etme ihtiyacı giderek tartışmalı bir hal almıştır (Okotie vd., 2007). Bununla birlikte; basit uygulanabilirlik, düşük maliyetli ve bazı potansiyel olarak tedavi edilebilir prostat kanseri vakalarını tespit edebilmesi ve herhangi bir yan etkisinin olmaması bu yöntemin kullanımının devam etmesini sağlamaktadır (Cupp ve Oesterling, 1993).

2.3.3 TRUS prostat biyopsisi

TRUS prostat biyopsisi yöntemi tanıyı doğrulamak için standart bir uygulamadır (Descotes, 2019). TRUS, anormal DRE sonuçları veya artmış PSA değerleri olan hastalara uygulanan bir yöntemdir. TRUS maliyetli bir yöntemdir. Bu sebeple DRE ve PSA tespitinin sonuçları normal olduğunda uygulanan bir yöntem değildir (Cupp ve Oesterling, 1993).

4 ng/mL PSA değeri biyopsi önerme düzeyi olarak kabul edilir. Ancak Prostate Cancer Prevention Trial'ın (PCPT)(Prostat kanseri önleme denemeleri) yaptığı araştırmalar sonucunda biyopsi uygulamak için belirli bir PSA değeri vermenin doğru olmadığını tüm

PSA değerlerinde prostat kanseri görülebileceğini, PSA değerlerinin kişiye göre (yaş, kullanılan ilaçlar, geçirilen rahatsızlıklar vb.) değerlendirilip biyopsi uygulanıp uygulanmayacağına öyle karar verilmesi gerektiğini önermektedir (Gemalmaz, 2012).

2.4 Prostat Kanseri Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

PC teşhisi konulan hastanın hikayesi ve vaka geçmişi öncelikle üroloji, onkoloji, radyoloji ve patoloji gibi uzmanlardan oluşan bir ekip tarafından incelenir ve sonrasında hasta için uygulanacak tedavi planı oluşturulur.

2.4.1 Hormonal terapi

Hormonal/androjen yoksunluğu tedavisi (ADT); metastatik ve ilerlemiş olan prostat kanserlerini yada tedavi uygulandıktan sonra hastalığı tekrar nükseden vakalar için kullanılmaktadır. ADT' nin amacı, PC hücrelerinin bağımlı olduğu testosteron hormonu seviyesini düşürerek hastalığı kontrol etmektir (Nelson ve Shah, 2019). Mevcut kullanımda çeşitli ADT formları vardır:

- lüteinleştirici hormon salgılayan hormon (LHRH) agonistleri (örneğin, goserin)
- LHRH antagonistleri (örneğin degarelix)
- anti-androjenler (örneğin bikalutamid, siproteron asetat vb.)
- cerrahi kastrasyon (yani, bilateral subkapsüler orkiektomi)

Bloke edici androjen reseptörleri, sentetik anti-androjenler kullanılarak elde edilebilir. Bunlar steroidal (örneğin, siproteron asetat vb.) veya nonsteroidal bileşikler (örneğin flutamid veya bikalutamid) olabilir.

En sık kullanılanlar LHRH agonistleridir. LHRH agonistleri tarafından ön hipofiz bezinin aşırı uyarılması, reseptörün aşağı regüle edilmesine yol açar, bu da LH salınım seviyelerinin azalmasına ve ardından testislerin Leydig hücrelerinden düşük testosteron salgılanmasına yol açar (pozitif geri besleme inhibisyonu) (Nelson ve Shah, 2019).

Bu bahsedilen tedavilerin tümü, testosteron seviyesinin düşürülmesi ile ilgili ortak ve önemli bir yan etki profilini paylaşır. Bunlar arasında erektil disfonksiyon ve libido kaybı, kilo alımı, yorgunluk, jinekomasti, depresyon, bilişsel değişiklikler ve artmış kemik kırığı riski olan osteoporoz sayılabilir (Nelson ve Shah, 2019).

2.4.2 Radikal prostatektomi (RP)

Prostat ve üreme bezlerinin cerrahi olarak çıkartılması işlemidir. Radikal prostatektomi, lokal olarak sınırlı prostat kanseri için "altın standart" tedavi olmuştur. Prostat kanseri cerrahi tedavisinin; kanser kontrolü ve kontrol devamlılığının korunması, aynı zamanda biyokimyasal tekrar olmaması (yani PSA değerinin bir daha yükselmemesi) gibi avantajları bulunmaktadır. Yıllar geçtikçe radikal prostatektominin komplikasyon oranlarının giderek azaldığı gözlenmiştir (Poppel vd.,2019).

2.4.3 Radyoterapi (RT)

Dış ışın radyasyon terapisi (EBRT) ve brakiterapi (BT), prostat kanseri teşhisi konulan hastalar için başlıca seçeneklerdir. Bu uygulamanın en büyük riski hastaların %22-69'nun radyoterapiyi (RT) takiben biyokimyasal nüks (BCR) geçirmesidir (Tsing vd.,2019). Brakiterapi, radyoaktif tohumların direkt prostata implantasyonudur. İşlem kısa bir genel anestezi gerektirir ve genellikle günlük olarak yapılır. En yaygın kullanılan radyoaktif izotip, 60 günlük yarılanma ömrüne sahip olan İyot' tur. Düşük riskli lokalize PC için en uygun olanıdır. Dış ışın radyoterapisi ile birlikte de kullanılabilir (Nelson ve Shah, 2019). Brakiterapi, EBRT sonrası biyokimyasal nüks olan erkeklerde uygulanabilir (Szymanska ve Hainaut, 2019).

2.4.4 Kemoterapi

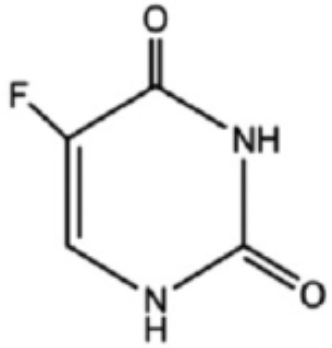
Metastatik hastalık geliştiğinde, hastalar başlangıçta androjen yoksunluğu tedavisi (ADT) ile tedavi edilir. Fakat ilerleyen dönemlerde prostat kanseri hücreleri düşük testosteron ortamında hatta ortamda hiç testosteron yokken bile gelişimini sürdürmeye

devam edebilir. Bu durumda hormon bağımlı olan prostat kanseri, hormon bağımsız olarak gelişmeye başlar. Bu aşamada devreye kemoterapi tedavisi girer.

Uzak metastaz hastaları genellikle dosetaksel ile tedavi edilir (Szymanska ve Hainaut, 2019). Dosetaksel kemoterapisi, sağ kalım sonucuna dayanarak metastatik kastrasyona dirençli prostat kanseri (mCRPC) için uygulanan ilk tedaviler arasındadır. Ancak androjen reseptörü (AR) sinyalinin direnç geliştirmesi üzerine tümör büyümesini artırmaya devam ettiği görülmüştür. Bunun üzerine yeni nesil ADT (yani abirateron asetat, enzalutamid) geliştirilerek uygulanmış ve mCRPC hastalarında hayatta kalma süresini uzattığı belirlenmiştir (Markowski ve Carducci, 2017).

Yapılan araştırmalar sonucunda, metastatik prostat kanseri tedavisi için ADT ve kemoterapinin birlikte kullanılması gerektiğini destekleyen sonuçlara ulaşılmıştır (Markowski ve Carducci, 2017).

5-Fluorourasil (5-FU); karaciğer, kolorektal, gastrik ve prostat kanserleri için yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ilaçlardan birisidir (Xua ve Tang, 2017). Bu nedenle çalışmamızda pozitif kontrol olarak 5-FU tercih edilmiştir (Şekil 2.5).



5-Florourasil

Şekil 2.5 5-Fluorourasil kimyasal yapısı(Avcı ve Tunçbilek, 2017).

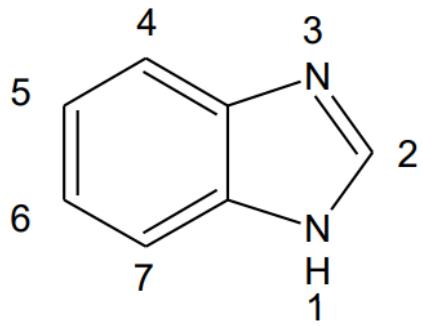
5-Florourasil, DNA ve RNA yapısına ve nukleozit metabolizmasına katılabilme özelliğindedir. DNA ve RNA ile etkileşmesini sağlayan ise trifosfat formları olan florouridin trifosfat (FUTP) ve florodeoksiuridin trifosfat (FdUTP)'tır (Avcı ve Tunçbilek, 2017).

Ayrıca, 5-FU'in monofosfat formu olan florodeoksiuridin monofosfat (FdUMP) sitotoksik özelliktedir. FdUMP, kararlı kompleks oluşturup timidilat sentazın irreversible inhibitörü olarak etki gösterdiği bilinmektedir (Avcı ve Tunçbilek, 2017). 5-FU tek başına yada diğer kemoterapötik ilaçlarla birlikte kombine olarak da kullanılabilir. Fakat genellikle ileri evre kanserlerde kemoterapide karşılaşılan başarısızlığın kilit nedeni kanser hücrelerinin 5-FU' e karşı direnç kazanmasıdır (Xua ve Tang, 2017).

2.5 Benzimidazolyum

Prostat kanserinin tedavi edilmesinde kullanılan yöntemlerin yan etkileri, maliyeti ve başarı oranları dikkate alındığında yeni yöntemlerin veya ilaçların geliştirilmesine yönelik çalışmalar oldukça önem arz etmektedir.

Benzimidazol, geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip olan heterosiklik bir parçadır. Benzimidazol türevlerinin biyolojik önemi, doğal olarak oluşan nükleotitlere yapısal benzerliklerinden dolayı canlı sistemlerde bulunan doğal biyopolimerler ile etkileşime girmelerinden dolayıdır. Bu özellik benzimidazol türevlerine biyolojik ve klinik önem kazandırmaktadır. Bazı benzimidazol türevleri üzerinde yapılan araştırmalar onların potansiyel bir antikanser aktiviteleri olabileceğini göstermiştir (Haquel vd., 2012).



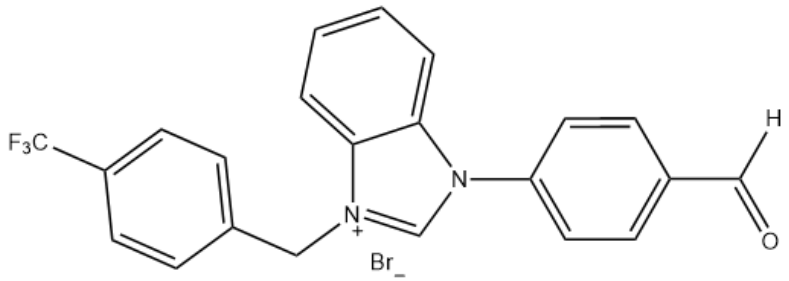
Şekil 2.6 Benzimidazol Halkasal yapısı (Nzeyimana, 2016)

Benzimidazol, imidazol halkasının 4. ve 5. konumlarından benzene kaynaşması ile meydana gelmiş heteroaromatik bir halka sistemidir (Şekil 2.6). Benzimidazol halka sistemi iki farklı yapıda azot atomu taşımaktadır. Üzerinde hidrojen atomu taşıyan azot "imino

azotu" veya "pirol azotu", tersiyer yapıdaki diğer azot ise "piridin azotu" veya "tersiyer azot" olarak adlandırılmaktadır. İmino azotunun taşıdığı hidrojen atomuna da, "imino hidrojeni" denir. Numaralandırmaya imino azotundan başlanır ve tersiyer azot atomuna 3 numara verilerek devam edilir. Benzimidazol türevi bileşikler genellikle yüksek erime ve kaynama noktasına sahip bileşiklerdir (Nzeyimana, 2016).

Organik bileşikler arasında heterosiklik bileşikler önemli bir yere sahiptir. Hetero atomların varlığından dolayı bu bileşikler daha fazla biyolojik aktivite gösterirler. En önemli hetero atomlardan biri nitrojendir, çünkü azot içeren ligandların kemoterapide ve asimetrik katalizinde çok önemli uygulamaları vardır. İmidazol veya benzimidazol türevleri, biyolojik aktiviteleri ve tıbbi kimyada önemli bir yere sahip olmaları sebebiyle dikkat çeken heterosiklik bileşiklerdendir. Benzimidazol grubuna sahip olan bileşik, anti-mikrobiyal, anti-kanser, anti-enflamatuar, anti-virüs, anti-oksidan, anti-alerjik, anti-diyabetik gibi bir çok biyolojik özelliği taşımaktadır (Fathima vd., 2018).

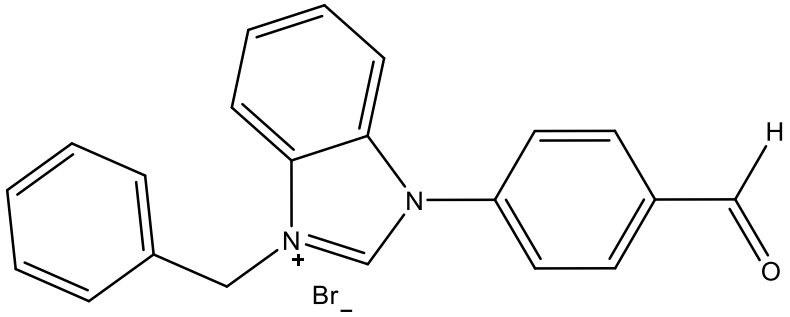
Bu tez çalışmasında Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde sentezlenmiş olan iki farklı benzimidazolyum türevi bileşik ile çalışılmıştır. Maddeler Bileşik 1 (Şekil 2.7) ve Bileşik 2 (Şekil 2.8) olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 2.7 Bileşik 1'in Halkasal Yapısı

Bileşik 1' in Moleküler Formülü: $C_{22}H_{16}BrF_3N_2O$

Bileşik 1' in Moleküler Ağırlığı: 461,28 g/mol



Şekil 2.8 Bileşik 2'nin Halkasal Yapısı

Bileşik 2' nin Moleküler Formülü:$C_{21}H_{17}BrN_2O$

Bileşik 2' nin Moleküler Ağırlığı: 393,28 g/mol

Çalışmada Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin insan prostat kanseri (LNCaP) hücreleri üzerindeki morfolojik, sitotoksik, apoptotik ve 5-FU ile sinerjistik/antagonistik etkisi konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre kültürü yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Hücrelerin Temin Edilmesi ve Çoğaltılması

Bu çalışmada daha önceden Amerikan Kültür Koleksiyonundan (ATCC) satın alınarak, -196˚C'de dondurulup saklanan insan prostat kanseri (LNCaP; CRL1740™) hücre dizisi kullanılmıştır. Prostat kanseri hücreleri %10 Fetal Dana Serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu ve 5 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içeren 25 cm^2'lik kültür kabına ekilerek, 37 ^{0}C'de, %5 CO_2 ve %95 nem içermekte olan inkübatör (Termo) içerisine kaldırılmıştır. Hücreler 2 günde bir besi ortamı tazelenerek ters ışık mikroskobu (Nikon Eclipse, TC100) ile takip edilmiştir. Hücre yoğunluğu %70-80'e ulaştığında 75 cm^2'lik kültür kabına aktarımı gerçekleştirilmiş ve hücrelerin besi ortamı 2 günde bir tazelenmiştir. Ters ışık mikroskobu kullanılarak hücre yoğunluğu ve kirliliği takip edilmiş, hücreler deneye alınana kadar pasajlanarak hücre hattının sürekliliği sağlanmıştır.

3.2 Hücrelerin Deneye Alınması ve Hücre Ekimi

Deneye alınacak olan prostat kanseri hücreleri (LNCaP) 5 dakika boyunca %0,25'lik Tripsin-EDTA solüsyonuna maruz bırakılmıştır. Süre bitiminde ters ışık mikroskobu altında kontrol edilerek hücrelerin kültür kabının yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığı gözlemlenmiştir. Ayrılan hücreler içinde 9 mL besi ortamı bulunmakta olan santrifüj tüpüne alınmış ve +10˚C de, 1200 rpm'de, 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süresi sonunda santrifüj tüpünde bulunmakta olan süpernatant kısmı atılmış, dibe çökmüş halde bulunan hücre pelleti ise 2 mL besiyeri ile pipetaj yapılarak homojenize hale getirilmiştir. Hücre sayısını ve canlılık yüzdesini belirlemek için Tripan Mavisi Boyası (Sigma-Aldrich) ile ölü hücreleri boyama yöntemi kullanılmıştır. Tripan Mavisi ile boyama yöntemi canlı ve ölü hücreleri birbirinden ayırmada kullanılmakta olan bir yöntemdir. Ölü olan hücrelerin hücre zarları zarar gördüğü için boyayı hücre içine alırken, canlı olan hücreler hücre zarları zarar görmemiş olduğu için boya hücre içine giremez (Uliasz ve Hewett, 2000). Bu yöntem sayede canlı olan hücre sayısı

ve canlılık yüzdesi belirlenebilir. Hücre sayımı için 0,5 mL Tripan Mavisi Boyası, 0,3 mL Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ve 0,2 mL hücre süspansiyonu karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan 1 mL'lik hücre süspansiyonu 5 dakika karanlık ortamda bekletildikten sonra hücre sayım cihazına (Cedex XS,Innovatis) bu karışımdan 10 µL yüklenerek hücre sayımı yapılmıştır.

Hücreler sayıldıktan sonra, her bir kuyucukta 100 µL besiyeri içerisinde $1x10^4$ canlı hücre olacak şekilde hesaplama yapılarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekim gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılan 96 kuyucuklu kültür kapları 37˚C %5 CO_2 ve %95 nem içermekte olan karbondioksitli inkübatörde 24 saat süre boyunca inkübasyona kaldırılmıştır.

3.3 Bileşik 1 ve 2' nin Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Bu tez çalışmasında Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde sentezlenmiş olan iki farklı benzimidazolyum bromür türevi kullanılmıştır. Maddeler Bileşik 1 ve Bileşik 2 olarak isimlendirilmiştir.

3.3.1 Bileşik 1'in konsantrasyonlarının hazırlanması

Toz halde bulunan Bileşik 1 ana stok konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüştür. Daha sonra 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonları ana stokdan besiyeri ile dilüe edilerek hazırlanmıştır. Ayrıca 500 µM çözücü kontrolü hazırlanarak DMSO'nun hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi olup olmadığı incelenmiştir.

3.3.2 Bileşik 2'nin konsantrasyonlarının hazırlanması

Toz halde bulunan Bileşik 2 ana stok konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözülmüştür. Daha sonra 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonları ana stokdan besiyeri ile dilüe edilerek hazırlanmıştır. Ayrıca 500 µM

çözücü kontrolü hazırlanarak DMSO'nun hücre canlılığı üzerinde negatif etkisi olup olmadığı incelenmiştir.

3.4 Pozitif Kontrol İçin İlaç Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Pozitif kontrol olarak günümüzde prostat kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta olan 5-Florourasil (5-FU) tercih edilmiştir. Toz formda satın alınan 5-FU (Sigma- Aldrich), DMSO yardımı ile çözülerek 100 mM'lık ana stok hazırlanmıştır. Bu ana stok solüsyonundan 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonları besiyeri ile seyreltilerek hazırlanmıştır. 500 µM için çözücü kontrol grubu deney planına eklenmiştir.

3.5 Hücre Morfolojisinin İncelenmesi

Çalışmamızda, LNCaP hücreleri 96 kuyucuklu kültür kaplarına $1x10^4$ hücre-kuyucuk olacak şekilde 100 µL besiyeri ortamı içinde ekilmiş ve 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. Süre bitiminde Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin hazırlanan konsantrasyonları (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM) kuyulara eklenmiş, konsantrasyona ve zamana bağlı (24-48 saat) olarak oluşturduğu morfolojik değişimler ters ışık mikroskobu yardımı ile incelenmiştir. Gözlenen değişiklikler "Kameram 21" programı ile kaydedilmiştir.

3.6 Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Bileşik 1, Bileşik 2 ve 5-FU konsantrasyonlarının prostat kanseri hücrelerinin çoğalması üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için pratik bir kolorimetrik yöntem olan 3 (4,5-Dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazoliumbromid (MTT) yöntemi kullanılmıştır. MTT pozitif yüklü bir bileşik olup, ökaryot hücrelerin membranını kolaylıkla geçerek mitokondride bulunan süksinatdehidrogenaz enzimi yardımıyla parçalanıp indirgenebilir. MTT'de bulunan tetrazolyum halkası ancak aktif mitokondri tarafından kırılabilir ve böylece renk reaksiyonu yalnızca canlı hücrelerde meydana gelir (Mossman, 1983). Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybeder ve herhangi bir renk değişimine

neden olmazlar (Riss ve Moravec, 2006). Bu sebeple oluşan formazan kristalinin yoğunluğu hücre canlılığının spektrofotometrik olarak belirlenmesinde kullanılabilmektedir (Abe and Matsuki, 2000). İndirgenme sonucu tetrazolyum içeren halka formazana dönüşür. Formazan suda çözünmez nitelikte olduğu için kristal şeklinde çökelir. Dolayısı ile absorbansın ölçülebilmesi için uygun bir çözücüde çözdürülmelidir. Denizot ve Lang (1986) tarafından, MTT testinde oluşan formazanı çözdürmek için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanımının uygun olduğu ortaya konulmuştur. MTT bileşiği sarı renklidir, oluşan formazan ise mor renkli olup suda çözünmezler.

Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin LNCaP hücre dizisi üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için öncelikle 96 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucukta 100 µL besiyeri içerisinde $1x10^4$ canlı hücre bulunacak şekilde hücre ekim yapılmış ve 24 saat inkübasyona kaldırılmıştır. Süre sonunda inkübasyondan alınan kültür kaplarına ilaç konsantrasyonları (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM) eklenerek 24 ve 48 saat süreyle inkübatöre kaldırılmıştır.

Deneylerden önce 5mg/mL MTT, Hank'in dengelenmiş tuz solüsyonu (HBSS) içerisinde çözülerek 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek taze olarak hazırlanmıştır. 24 ve 48 saat süreyle ilaç konsantrasyonlarına maruz bırakılan 96 kuyucuklu kültür kapları inkübatörden alınarak kuyucuklara 20 µL MTT (5mg/mL) konulmuştur ve 3 saat 37 ˚C'de, %5 CO_2 içermekte olan karbondioksitli inkübatöre kaldırılmıştır. İnkübasyon süresi bittiğinde kültür kabının içeriği dökülmüş ve her bir kuyuya 100 µL DMSO eklendikten sonra karanlık ortamda 5 dakika bekletilmiştir. Kültür kapları ELISA cihazında 550 nm dalga boyunda okunmuştur. Deneyler en az 3 kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar IBM SPSS Statistics v22 programında One-Way ANOVA testiyle analiz edilerek ve anlamlılık dereceleri hesaplandı (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$). Kontrole göre yaşayan hücrelerin yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Yıldız vd., 2018).

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Her Bir Kuyucuktaki İlaç Verilen Hücre Absorbansı x 100}}{\textit{Kontrol Hücrelerinin Ortalama Absorbansı}}$$

3.7 Kombine İlaç Uygulanması

Çalışmamızdan elde edilen MTT verilerine göre LNCaP hücre dizisi üzerinde Bileşik 1'in toksik etkisinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle Bileşik 1 ile 5-FU birlikte uygulanarak antagonistik/sinerjistik etkileşimleri araştırılmıştır. Bileşik 1 ve 5-FU ilaç konsantrasyonları 24 ve 48 saat süre ile 1:1 oranında uygulanması sonucunda oluşan çoğalmayı baskılayıcı etki MTT yöntemi ile belirlenmiş ve deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir. Uygulanan kombine konsantrasyonları Çizelge 3.1 de ki gibidir.

Çizelge 3.1 Deneyde kullanılan kombine uygulama konsantrasyonları.

Kontrol grubu: Sadece besiyeri
Bileşik 1 ve 5-FU 10 µM konsantrasyon grubu
Bileşik 1 ve 5-FU 25 µM konsantrasyon grubu
Bileşik 1 ve 5-FU 50 µM konsantrasyon grubu
Bileşik 1 ve 5-FU 75 µM konsantrasyon grubu
Bileşik 1 ve 5-FU 100 µM konsantrasyon grubu
Bileşik 1 ve 5-FU 150 µM konsantrasyon grubu
Bileşik 1 ve 5-FU 200 µM konsantrasyon grubu
Bileşik 1 ve 5-FU 250 µM konsantrasyon grubu
Bileşik 1 ve 5-FU 500 µM konsantrasyon grubu

Sonuçlar IBM SPSS Statistics v22 programında One-Way ANOVA testiyle analiz edilerek ve anlamlılık dereceleri hesaplandı (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$). Aşağıdaki formül kullanılarak ilaç etkileşim katsayıları hesaplanmıştır (Yıldız vd., 2018).

$$\text{CDI (İlaç Etkileşim Katsayısı)} = \frac{Kombine\ Doz\ Absorbansı}{Bileşik\ 1\ Absorbansı\ \times 5 - FU\ Absorbansı}$$

3.7 Apoptotik DNA Fragmantasyonunun Belirlenmesi

Apoptotik DNA fragmentasyonunu kantitatif olarak belirlemek amacıyla Roche Cell Death ELISA Plus Kit kullanıldı. Hücre sayımından sonra 96 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucukta $1x10^4$ canlı hücre bulunacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. MTT sonuçlarına göre Bileşik 1 için 100 ve 250 µM konsantrasyonlarının uygulanmasına karar verilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Bileşik 1'in 100 ve 250 µM konsantrasyonlarının kuyulara 100 µL içince olacak şekilde eklenmiş ve 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyucuklar ters ışık mikroskobunda incelenerek her konsantrasyon grubu ve kontrol grubu için iki adet kuyu seçildi. ELISA Kiti içerisinde yer alan protokole göre gerekli işlemler sırasıyla uygulandı.

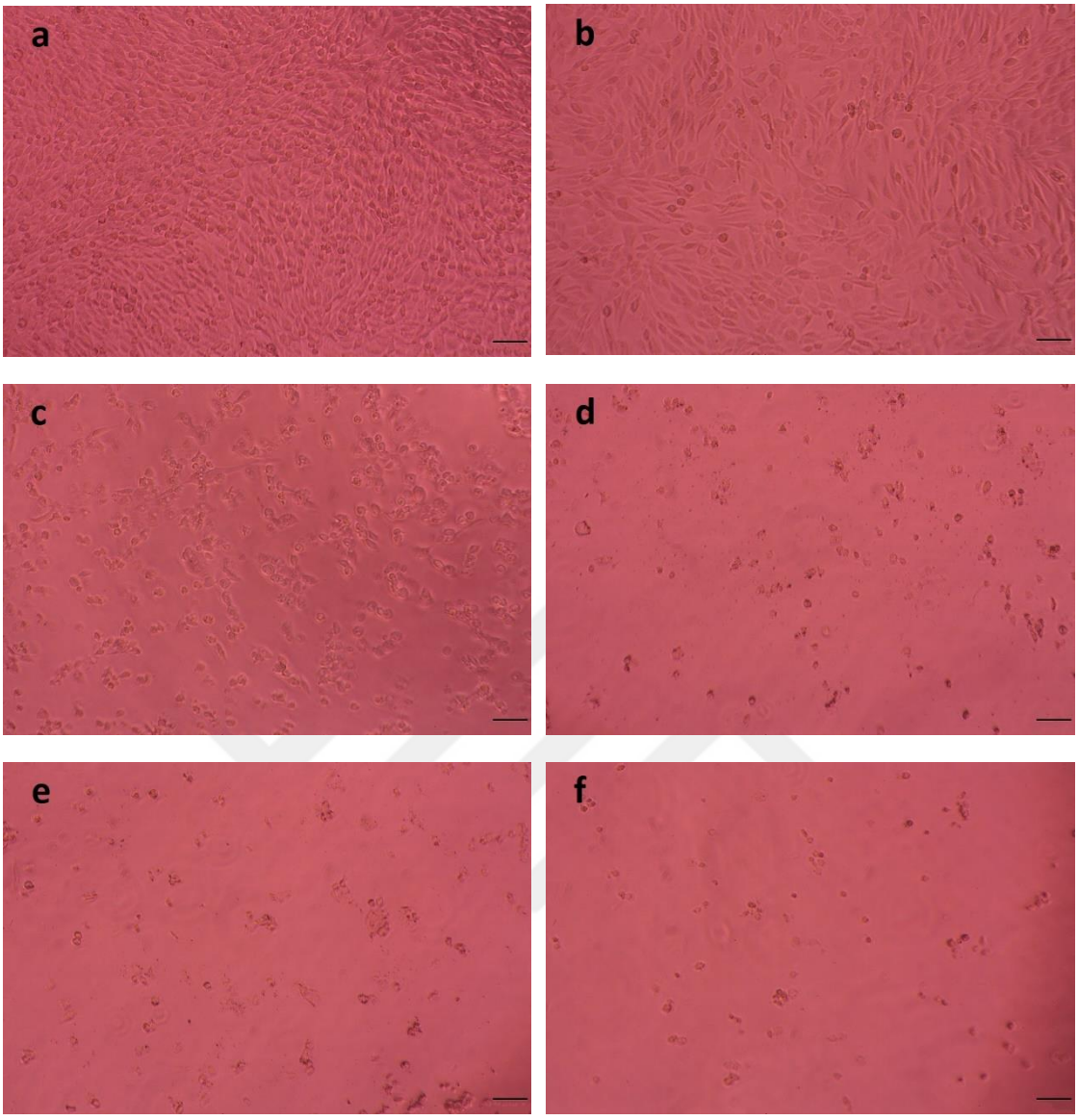
İnkübatörden alınan kültür kabı 10 dk 200g'de (25˚C'de) santrifüj edilmiştir. Santrifüj bitiminde, nekrozu belirlemek için seçilen kuyulardaki süpernatant kısım eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Apoptozun belirlenmesi için ise süpernatantı alınan kuyulara 200 µL lizis buffer eklenerek 30 dk boyunca oda sıcaklığında beklenmiştir. Uygulama süresi bittiğinde kültür kapları tekrar 10 dakika 200 g'de (25˚C'de) santrifüj edilmiştir. Streptavidin kaplı kuyulara 80 µL immuno reagent ve 20 µL nekroz-apoptoz örnekleri ve pozitif kontrol konulup 2 saat boyunca oda sıcaklığında 300 rpm de çalkalamaya bırakılmıştır. Çalkalama esnasında örneklerin üzeri alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Süresi sonunda kuyucukların içeriği dökülmüş ve her bir kuyuya 300 µL soğuk inkübasyon tamponu konularak 3 kez yıkanmıştır. Sonrasında her bir kuyucuğa 100 µL ABTS solüsyon eklenerek karanlıkta 250 rpm'de 10-15 dakika çalkalanmıştır. Reaksiyonu durdurmak için her bir kuyuya 100 µL ABTS-Stop Solüsyonu eklenmiş ve 405 nm dalga boyunda ELISA cihazında örnekler okutulmuştur. Elde edilen veriler GraphPad Prism 6 programında, Student's t-Test kullanılarak değerlendirilmiştir.(* :$p<0.05$).

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bileşik 1'in Prostat Kanseri (LNCaP) Hücre Dizisi Üzerindeki Morfolojik Etkilerinin Belirlenmesi

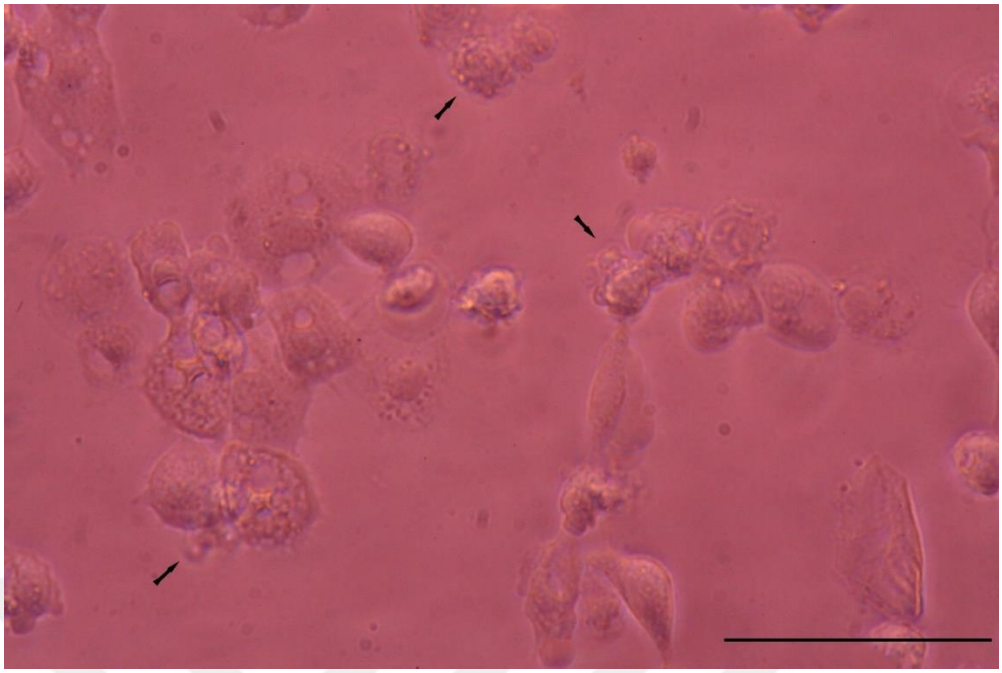
LNCaP hücreleri 24 ve 48 saat süre boyunca 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM'lık Bileşik 1'in farklı konsantrasyonlara maruz bırakılmış ve morfolojik değişiklikler ters ışık mikroskobu ile gözlemlenmiştir.

24 saat süre ile uygulanan Bileşik 1'in 10, 25, 50 ve 75 µM konsantrasyonlarında kontrol grubu ile kıyaslandığında LNCaP hücrelerinin morfolojisinde herhangi bir değişiklik oluşturmadığı gözlenmiştir. Hücre morfolojisinde ki değişimlerin 100 µM konsantrasyonundan itibaren başladığı belirlenmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak, normal mekik şeklinde olan hücre morfolojisinin değiştiği belirlenmiştir. Ayrıca, hücrelerin yuvarlaklaştığı, hücre-hücre bağlantılarının azaldığı ve hücre sayısının azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Özellikle 200 µM konsantrasyonundan itibaren konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre bütünlüğünün tamamen bozulduğu ve canlı hücre sayısının oldukça azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.1).



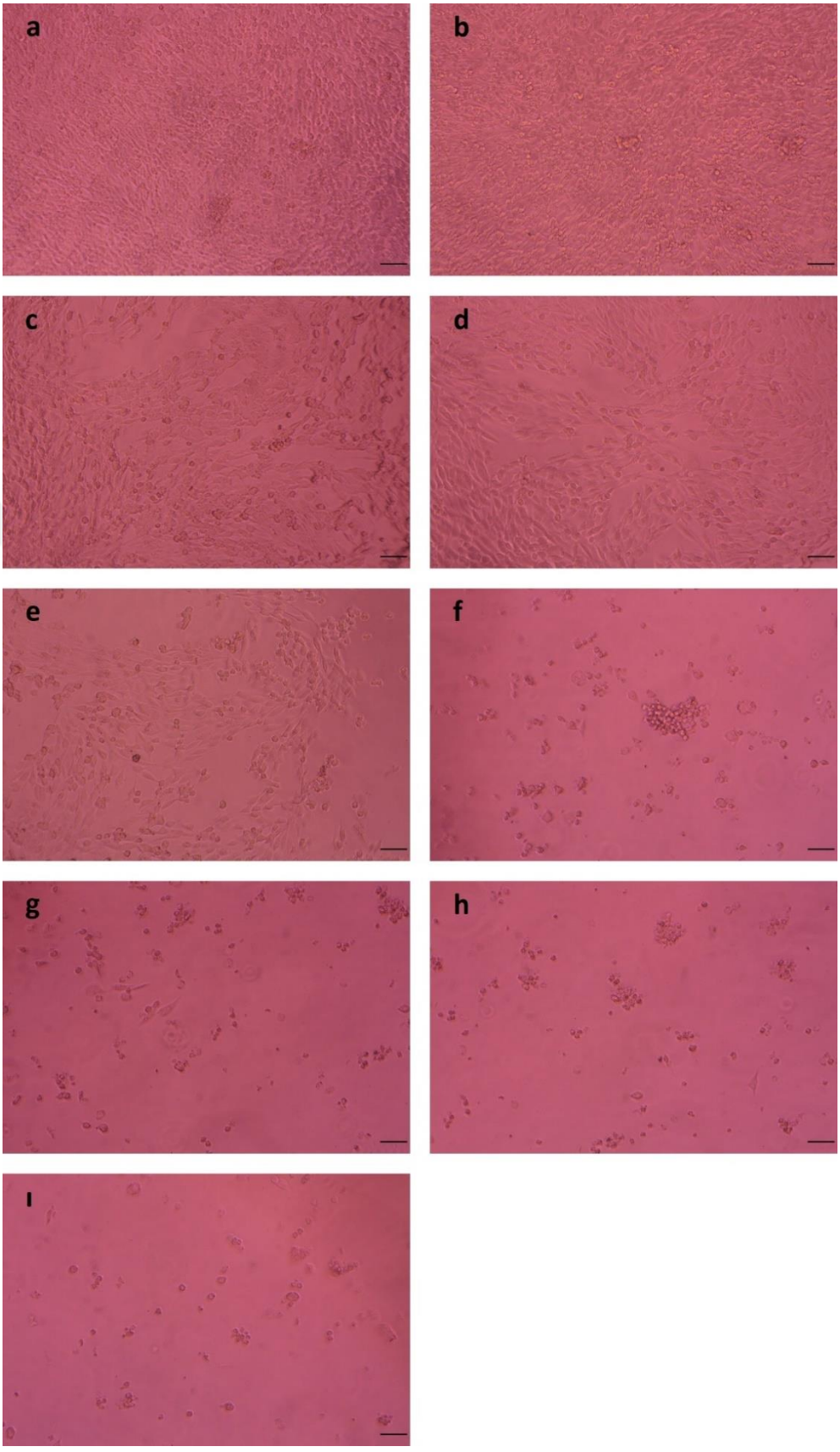
Şekil 4.1 Yirmi dört saat süreyle uygulanan Bileşik 1'in farklı konsantrasyonlarının LNCaP hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişiklikler (100x) (a:Kontrol; b: 100 µM; c: 150 µM; d: 200 µM; e: 250 µM; f: 500 µM). Skala bar 50 µm.

Ayrıca çalışmamızda 24 saat süreyle uygulanan Bileşik 1'in 150 µM konsantrasyonundan itibaren hücrelerde apoptotik hücre morfolojisi görüntülenmiştir. Hücrelerin zarlarında özellikle kabarcık şeklindeki oluşumların arttığı hücrelerin yuvarlaklaştığı apoptotik bulguları destekler niteliktedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 24 saat boyunca uygulanan Bileşik 1'in 150 µM konsantrasyonunun LNCaP hücre zarlarında oluşturduğu apoptotik keseler (400x). Skala bar Skala bar: 50 µm ok (→) hücre zarındaki apoptotik kabarcıkları göstermektedir.

Kırk sekiz saat süresince uygulanan Bileşik 1'in 10 µM konsantrasyonunda kontrol grubu ile kıyaslandığında LNCaP hücrelerinin morfolojisinde herhangi bir değişime neden olmadığı gözlenmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 25 µM konsantrasyonundan başlayarak hücre morfolojisinde değişimlerin görüldüğü belirlenmiştir. Konsantrasyon artışıyla birlikte, normal mekik şeklinde olan hücre morfolojisinin yuvarlaklaştığı, hücre-hücre bağlantılarının azaldığı ve hücre sayısının azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Özellikle 150 µM konsantrasyonundan itibaren konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre bütünlüğünün tamamen bozulduğu ve hücre sayısının oldukça azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.3).



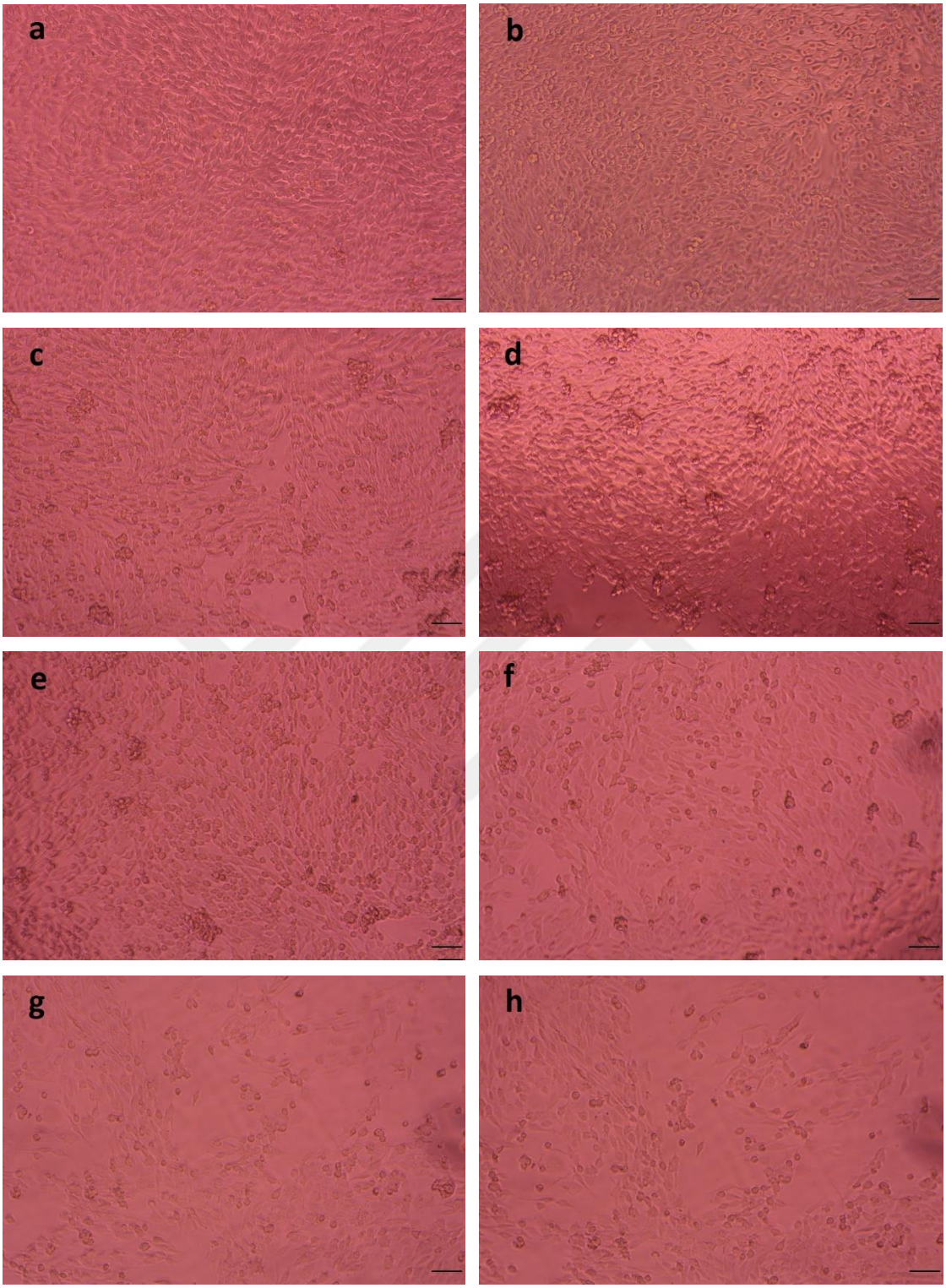
Şekil 4.3 LNCaP hücrelerine 48 saat uygulanan Bileşik 1 konsantrasyonlarının hücrelerde meydana getirmiş olduğu morfolojik değişimler (100x) (a:Kontrol; b: 25 µM; c: 50 µM; d: 75 µM; e: 100 µM; f: 150 µM; g:200 µM; h:250 µM; ı:500 µM). Skala bar: 50 µm

Çalışmamızda denenen Bileşik 1'in konsantrasyon artışı ve zaman değişimine bağlı olarak hücre morfolojisi üzerinde değişikliklere yol açtığı ilk kez belirlenmiştir.

4.2. Bileşik 2'nin Prostat Kanseri (LNCaP) Hücre Dizisi Üzerindeki Morfolojik Etkilerinin Belirlenmesi

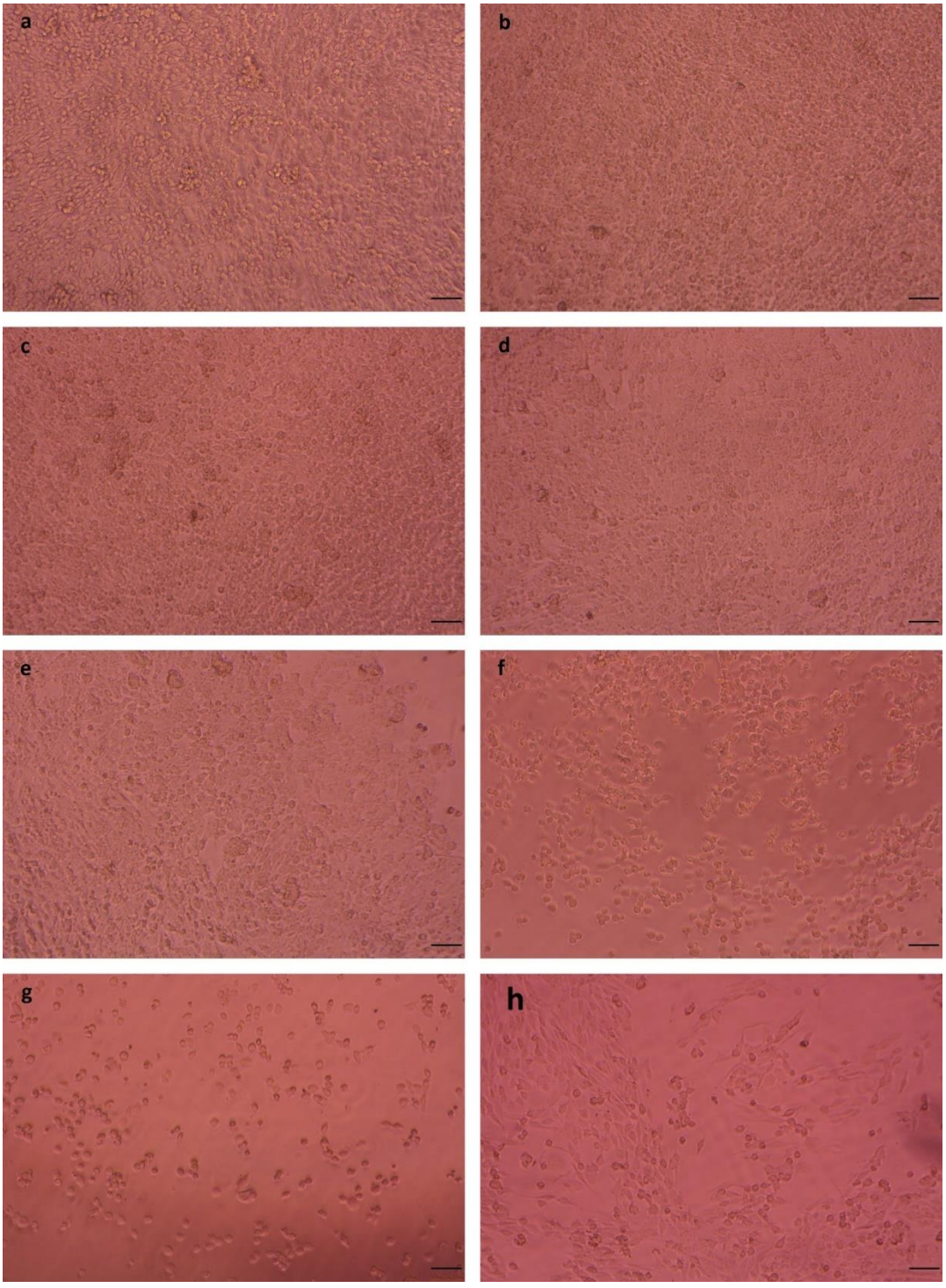
LNCaP hücreleri 24 ve 48 saat süresince 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM'lık Bileşik 2'nin farklı konsantrasyonlara maruz bırakılmış ve morfolojik değişiklikler ters ışık mikroskobu ile gözlemlenmiştir

24 saat süre ile uygulanan Bileşik 2'nin 10 ve 25 µM konsantrasyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında LNCaP hücrelerinin morfolojisinde herhangi bir değişiklik oluşturmadığı gözlenmiştir. Hücre morfolojisinde ki değişikliklerin 50 µM konsantrasyonundan itibaren başladığı belirlenmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak, hücrelerin yuvarlaklaştığı, hücre-hücre bağlantılarının azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 LNCaP hücrelerine 24 saat uygulanan Bileşik 2 konsantrasyonlarının kontrol grubuna kıyasla hücrelerde meydana getirmiş olduğu morfolojik değişimler (100x) (a:Kontrol; b: 50 µM; c: 75 µM; d: 100 µM; e: 150 µM; f: 200 Mm; g:250 µM; h:500 µM). Skala bar: 50 µm

48 saat süresince uygulanan Bileşik 2'nin 10 ve 25 µM konsantrasyonları kontrol grubu ile kıyaslandığında LNCaP hücrelerinin morfolojisi üzerinde değişikliğe yol açmadığı gözlenmiştir. Hücre morfolojisinde ki değişimlerin kontrol grubu ile kıyaslandığında 50 µM konsantrasyonundan itibaren hafif bir şekilde başladığı belirlenmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak, normal mekik şeklinde olan hücre morfolojisinin özellikle 150 µM konsantrasyonundan itibaren yuvarlaklaştığı, hücre-hücre bağlantılarının azaldığı ve hücre sayısının azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Özellikle 250 ve 500 µM konsantrasyonlarında hücre bütünlüğünün tamamen bozulduğu ve hücre sayısının oldukça azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 LNCaP hücrelerine 48 saat uygulanan Bileşik 2 konsantrasyonlarının kontrol grubuna kıyasla hücrelerde meydana getirmiş olduğu morfolojik değişimler (100x) (a:Kontrol; b: 50 µM; c: 75 µM; d: 100 µM; e: 150 µM; f: 200 µM; g:250 µM; h:500 µM). Skala bar: 50 µm

Çalışmamızda denenen Bileşik 2'nin konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre morfolojisi üzerinde değişikliklere yol açtığı ilk kez belirlenmiştir. Ayrıca Bileşik 1 ile

Bileşik 2'nin LNCaP hücreleri üzerinde oluşturduğu morfolojik değişiklikler karşılaştırıldığında Bileşik 1'in konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre morfolojisini ve sayısını daha fazla etkilediği saptanmıştır.

Yapılan literatür taramasında yeni sentezlenen Bileşik 1 ve Bileşik 2 ile ilgili herhangi bir hücre hattı üzerinde morfolojik değişiklikleri gözlemleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin farklı konsantrasyonlarının LNCaP hücreleri üzerindeki morfolojik etkileri konsantrasyona ve zamana bağlı olarak ilk kez araştırılmıştır.

Bununla birlikte, yapılan bir çalışmada yeni sentezlenen 6 değişik meta-ksilil bağlı bir dizi bis-benzomidazolium tuzunun insan kolon kanseri hücre hattı (HCT 116) üzerindeki 48 saatlik morfolojik etkileri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan bis-benzimidazolium türevi bileşiklerin hücre morfolojisinde değişikliklere yol açtığı hücrenin sitoplazmasında anormal şekilde vakuol oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca hücreler arasındaki bağlantıların azaldığı ve hücre sayısında azalmaların gözlendiği rapor edilmiştir. Özellikle 2 bromür bağlı benzimidazolyum tuzunun hücrelerde tipik apoptotik morfolojik değişikliklere benzer bir yapı oluşturduğu gözlendiği belirtilmiştir (Haque vd.,2012). Çalışmada kullanılan Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin yapısında da 2 bromür bulunmaktadır. Benzimidazolyum tuzunun yapısında bulunan bromür yapısının belki olası sitotoksik aktiviteyi arttırdığı düşünülebilir. Bromürün sitotoksiteyi arttırmasıyla ilgili farklı çalışmalar ileride planlanabilir.

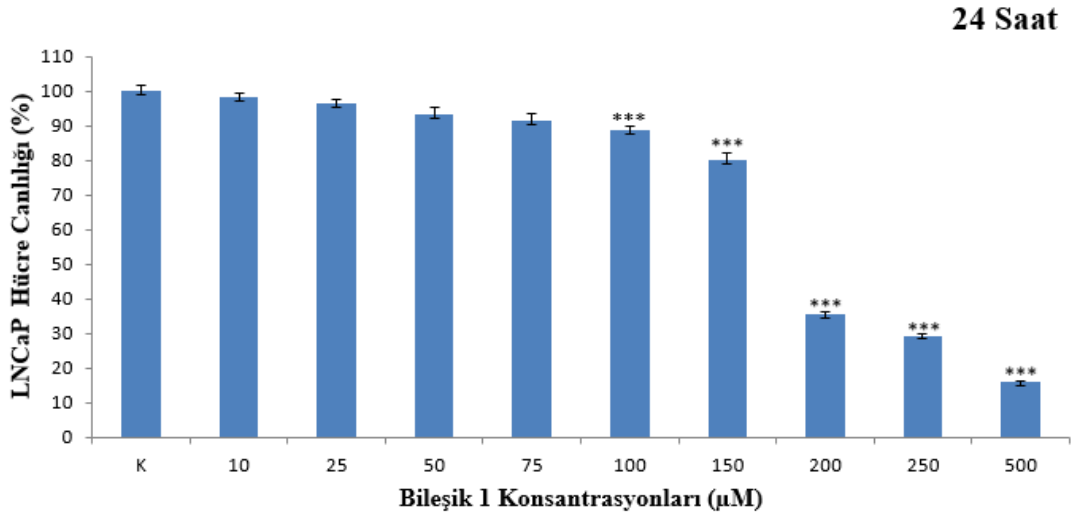
Yapılan başka bir çalışmada ise yine farklı bir benzimidazolyum türevi olan bileşik (1) ve bu bileşigin gümüş-karben kompleksi (2) sentezlenmiştir. Hem 1 hem de 2'nin farklı dozlarının insan kolorektal karsinoma (HCT 116) ve insan lösemi (HL 60) hücre dizileri üzerinde oluşturduğu morfolojik değişiklikler 48 saat süre boyunca incelenmiştir. HCT116 hücreleri ile yapılan çalışmada Bileşik (1) ile muamele edilen hücrelerde kontrol grubu ile kıyaslandığında normal hücre morfolojisini etkilediği ve psödopodial benzeri uzantıların kısmen ortadan kalkmasına neden olduğu belirlenmiştir. Kompleks (2) ile muamele edilen hücrelerde ise apoptotik bulgulara benzer görüntülerin oluştuğu rapor edilmiştir. HL60 hücreleri ile yapılan çalışmada Bileşik (1) ile muamele edilen hücrelerde kontrol grubu ile kıyaslandığında normal hücre morfolojisini etkilediği ve psödopodial benzeri uzantıların

kısmen ortadan kalkmasına neden olduğu belirlenmiştir. Kompleks (2) ile muamele edilen hücrelerde ise apoptotik bulgulara benzer görüntülerin oluştuğu rapor edilmiştir (Iqbal vd., 2013). Çalışmamızla uyumlu bir şekilde farklı sentezlenen benzimidazolyum tuzunun hücre morfolojisini etkilediği tespit edilmiştir.

4.3. Bileşik 1'in Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkilerinin Mitokondriyal Aktiviteye Bağlı Olarak Belirlenmesi

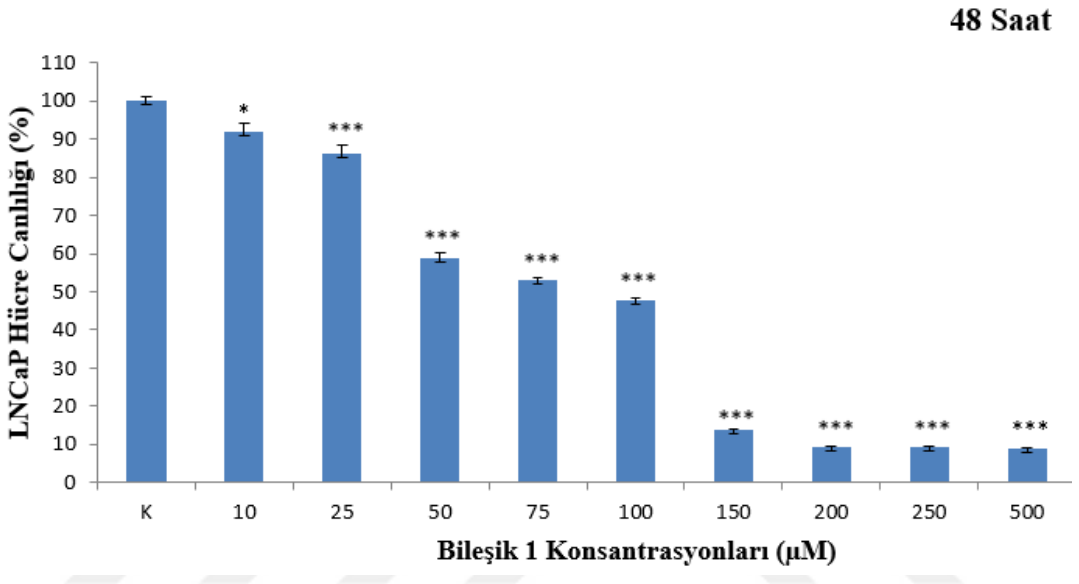
Bileşik 1'in prostat kanseri hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkilerini belirlemek için MTT yönteminden yararlanılmıştır. LNCaP hücreleri 24 ve 48 saat süresince 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM'lık konsantrasyonlara maruz bırakılmıştır.

LNCaP hücreleri 10, 25, 50 ve 75 µM konsantrasyonları 24 saat sonunda hücre çoğalmasın da anlamlı sayılabilecek bir değişiklik belirlenememiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarında, kontrol grubuyla kıyaslandığında sırası ile %11, 20, 65, 71 ve 84 oranlarında hücre canlılığını baskıladığı belirlenmiştir ($p<0,001$; Şekil 4.6). 24 saat için IC_{50} değeri 183 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6 Bileşik 1'in LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 24 saatlik etkisi. K: Kontrol. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: $p<0,001$).

LNCaP hücreleri 10 µM konsantrasyonuna 48 saat süresince maruz bırakıldığında hücre canlılığını kontrol grubuna kıyasla %10 baskıladığı belirlenmiştir (*:p>0,05). 25, 50, 75, 100, 150 µM konsantrasyonları ise kontrol grubuyla kıyaslandığında sırasıyla %14, 41, 47, 52 ve 82 oranında hücre canlılığını baskıladığı 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarında ise yaklaşık olarak %90 oranında canlılığı baskıladığı belirlenmiştir (***: p<0,001; Şekil 4.7). IC_{50} değeri ise 48 saat için 90 µM olarak hesaplanmıştır.



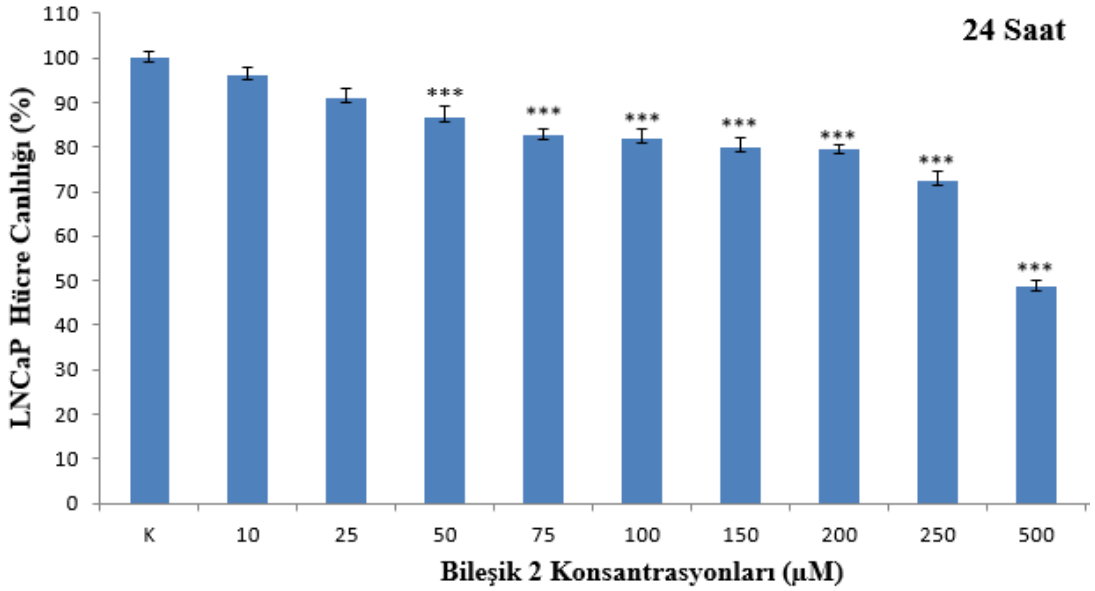
Şekil 4.7 Bileşik 1'in LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 48 saatlik etkisi. K: Kontrol. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (*: p<0,05;***: p<0,001).

4.4 Bileşik 2'nin Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkilerinin Mitokondriyal Aktiviteye Bağlı Olarak Belirlenmesi

Bileşik 2'nin prostat kanseri hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkilerini belirlemek için MTT yönteminden yararlanılmıştır. LNCaP hücreleri 24 ve 48 saat süresince 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM'lık konsantrasyonlara maruz bırakılmıştır.

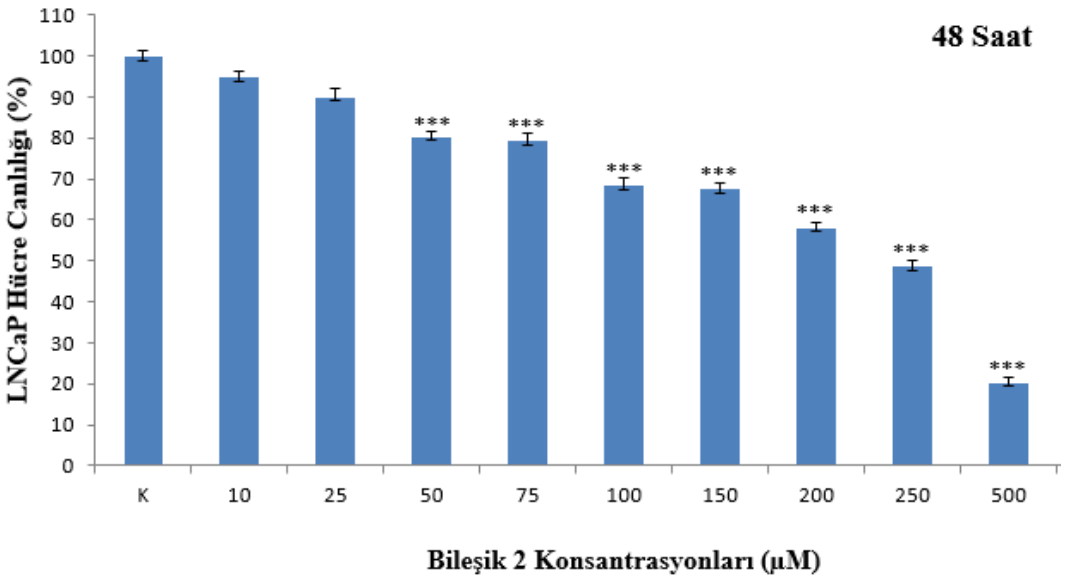
LNCaP hücreleri 10 ve 25 µM konsantrasyonları 24 saat sonunda hücre çoğalmasın da anlamlı sayılabilecek bir değişiklik belirlenememiştir (p>0,05). 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonları ise kontrol grubuyla kıyaslandığında sırası ile yaklaşık olarak % 13, 18, 18, 20, 20, 28 ve 51 oranlarında canlılığı baskıladığı hesaplanmıştır (***:

p<0,001; Şekil 4.8). Hücrelerin %50 oranında ölümüne neden olan konsantrasyon olarak ifade edilen IC_{50} değeri ise 24 saat için 488 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.8 Bileşik 2'nin LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 24 saatlik etkisi. K: Kontrol. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: p<0,001).

LNCaP hücreleri 10 ve 25 µM konsantrasyonlarına 48 saat süresince Bileşik 2'ye maruz bırakıldığında hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür (p>0,05). Kontrol grubuyla kıyaslandığında 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonları ise sırasıyla yaklaşık olarak % 20, 21, 31, 32, 42, 51 ve 80 oranlarında canlılığı baskıladığı hesaplanmıştır (***: p<0,001; Şekil 4.9). IC_{50} değeri ise 48 saat için 239 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.9 Bileşik 2'nin LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 48 saatlik etkisi. K: Kontrol. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: p<0,001).

Çalışmamızda kullandığımız benzimidazolyum türevi olan Bileşik 1 ve Bileşik 2 maddelerinin sitotoksitesi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bileşiklerin, bu çalışmada ilk kez prostat kanseri hücre dizisi olan LNCaP hücrelerindeki sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Bu nedenle çalışmamız bir ilk olma özelliği taşımaktadır. Bununla birlikte sentezlenmiş farklı benzimidazolium türevi maddelerin sitotoksik etkileri farklı hücre dizileri üzerinde araştırılmıştır.

Literatür taraması yapıldığında farklı benzimidazolyum tuzlarının değişik hücre dizileri üzerindeki sitotoksiteleri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda bizim çalışmamızla benzer bir şekilde bu bileşiklerin sitotoksik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir.

Örneğin; farklı bir çalışmada yeni sentezlenmiş bir dizi meta-ksilil bağlı bis-benzomidazolium tuzunun insan kolon kanseri hücre hattı (HCT 116) üzerindeki sitotoksik etkisi MTT testi ile doza (1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µM) bağlı olarak araştırılmış. Çalışmada sitotoksik etkiyi karşılaştırmak için pozitif kontrol olarak 5-FU kullanılmıştır. 72 saat sonuçlararına bakılmış ve bu bileşiklerin aktivitesinin standart referans ilaç olan 5-floroürasilden (IC_{50} 19,2 µM) daha güçlü olduğu bulunmuştur. Ayrıca sentezlenen bis-benzimidazolium tuzlarının tümünün potansiyel antikanser aktivitesi

gösterdiği ve bileşiklerin kolon kanseri hücrelerinde doza bağlı olarak sitotoksik etki oluşturduğu belirlenmiştir. Yapısında bromid anyonlarını bulunduran bileşiklerin daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Haque vd.,2012). Çalışmamızda kullandığımız bileşiklerin yapısında da brom bulunmaktadır. Moleküler yapısına giren bromların sitotoksiteyi artırdığını düşünmekteyiz.

Başka bir çalışmada ise; (4-metoksifenil) etil, (ftalimid-2-il) metil, 4-nitrobenzil, 2-feniletil, pentil veya alil gruplarına sahip olan yeni 7 farklı benzimidazolyum bromür tuzu sentezlenmiş. Bu bileşiklerin yumurtalık (A2780) ve prostat (PC-3) kanseri hücre hatlarında doza (1, 5, 25, 50 ve 100 μM) ve zamana (24 ve 48 saat) bağlı sitotoksik aktiviteleri MTT testi ile araştırılmıştır. 2- (4-metoksifenil) etil grubu taşıyan benzimidazol bileşiklerinin her iki kanser hücresinde de yüksek antitümör aktivite gösterdiğibelirlenmiştir. Aynı zamanda dozlardaki etki incelendiğinde tüm benzimidazolyum türevi bileşiklerin yumurtalık (A2780) kanseri hücre hattında daha etkili olduğu görülmüştür (Küçükbay vd.,2016).

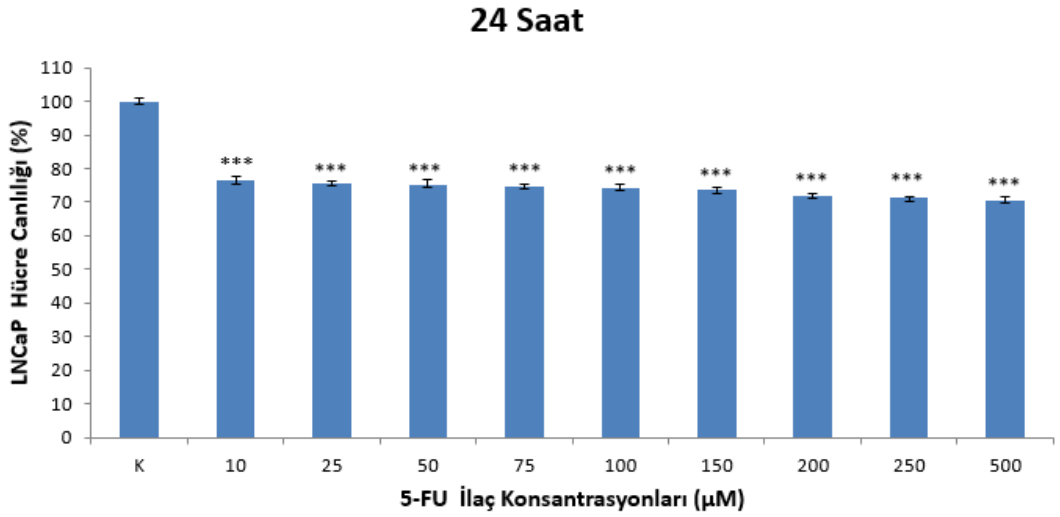
Başka bir çalışmada ise; bis-benzoksazol'un doğal ürünü olan UK-1'in (Streptomyces suşundan izole edilen UK-1 yapısal olarak bis-benzoksazol'a benzer ve kanser hücre hatlarına karşı kullanım potansiyeline sahiptir. Özellikle lösemi ve lenfoma da oldukça etkilidir.) yapısal olarak benzerleri sentezlenmiştir. Bu bileşikler insan mesane papiller geçiş hücre karsinomu hücre dizisi (BFTC-905), insan akciğer karsinoması hücre dizisi (A549), insan rahim sarkomu hücre dizisi (MES-SA) ve insan embriyonel rabdomiyosarkom hücre dizisi (RD) ve epitelyal (HeLa) karsinoma hücre hatları üzerinde 72 saat boyunca doza bağlı olarak (0, 5, 25, 50, 75 ve 100 μM) uygulanmıştır. Sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. MTT sonuçlarına göre benzimidazol parçasına sahip olan bileşikler, hücre dizilerine karşı benzoksazol veya benzotiyazol içerenlere göre daha güçlü sitotoksik aktivite sergilemişlerdir. Sonuçlar UK-1 ve bu analogların dördünün (15,16,17 ve 18) kanser hücre hatlarına karşı güçlü olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle bileşik 16, A549 ve HeLa hücre hatlarına karşı UK-1'den çok daha güçlü bir sitotoksik etki göstermiştir. Bu çalışmada kuyucuk başına $1x10^4$ hücre ekilerek çalışılmıştır (Huang vd.,2006).

Yapılan başka bir çalışmada benzimidazolyum türevi olan bileşik (1) ve bu bileşigin gümüş-karben kompleksi (2) sentezlenmiş. Hem 1 hem de 2, insan kolorektal karsinomuna (HCT 116) ve insan lösemi (HL 60) hücre hatlarına 48 saat boyunca doza bağlı olarak uygulanmış ve sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlenmiştir.. MTT sonuçlarına göre kompleksin (2) ve benzimidazolium tuzunun (1) hem HCT 116 hem de HL 60'da doza bağlı bir sitotoksik etkisi olduğu tesbit edilmiştir. Benzimidazolium tuzu (1), HCT 116 ($IC_{50:}$ 5,6 μM) hücre hattına göre, HL 60 ($IC_{50:}$ 4,1 μM) hücre hattında daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Iqbal vd., 2013).

4.5. 5-Fluourasil'in (5-FU) Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkilerinin Mitokondriyal Aktiviteye Bağlı Olarak Belirlenmesi

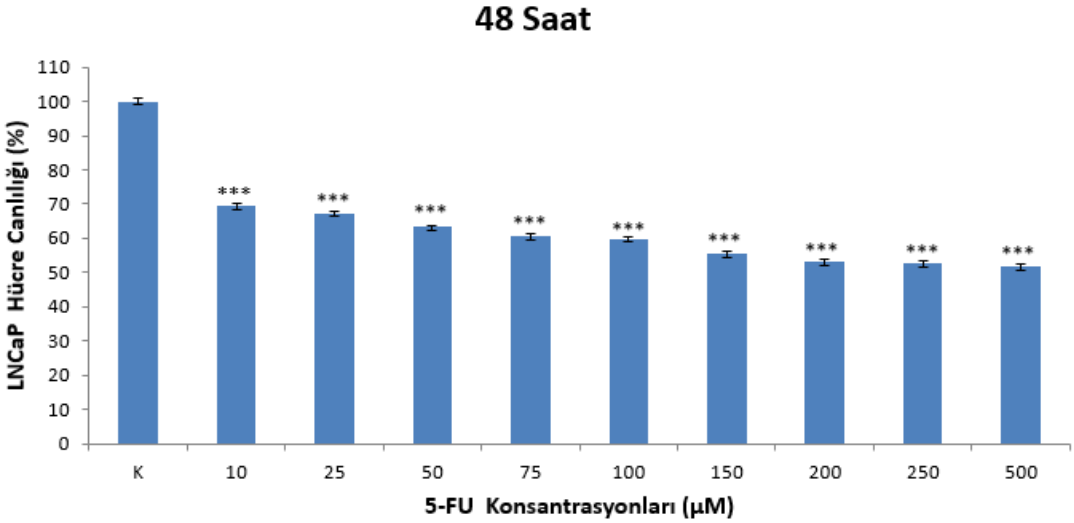
Prostat kanseri tedavisinde anti-kanser ilaç olarak kullanılan 5-Fluourasil (5-FU) çalışmada pozitif kontrol olarak seçilmiştir. 5-FU'in 24 ve 48 saat süreyle uygulanan 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 μM konsantrasyonlarının LNCaP hücreleri üzerindeki çoğalmayı baskılayıcı etkilerinin belirlenmesi için MTT yöntemi kullanılmıştır.

Hücrelere 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 500 μM 5-FU konsantrasyonları uygulandığında kontrol grubu ile kıyaslandığında sırasıyla % 24, 25, 25, 26, 26, 27, 28, 29 ve 30 oranında hücre çoğalmasını baskıladığı gözlenmiştir. IC_{50} değeri ise 24 saatlik uygulamada belirlenememiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 5-FU'nun LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 24 saatlik etkisi. K: Kontrol. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: p<0,001).

LNCaP hücrelerine 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarının hücre çoğalmasını sırasıyla % 30, 33, 37, 40, 41, 44, 47, 47 ve 48 oranında baskıladığı belirlenmiştir. IC_{50} değeri ise 48 saatlik uygulama sonunda yine belirlenememiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 5-FU'nun LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 48 saatlik etkisi. K: Kontrol. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: p<0,001).

Başka bir çalışmada, 5-fluorourasil (5-FU) 'in insan böbrek kanseri hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. 5-FU'in sitotoksik etkisi doza (25, 50 ve 100 µM) ve zamana

(24 ve 48 saat) bağlı etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda doza ve zamana bağlı sitotoksik etki belirlenmiş ancak IC_{50} değerleri verilmemiştir (Zheng vd., 2018).

Yapılan bir başka araştırmada ise 5-FU'in insan prostat kanseri (PC-3) üzerindeki sitotoksik etkisi 24 saat süresince doza bağlı (50, 100, 150 ve 200 µg/mL) olarak incelenmiştir. Bu çalışmada 5-FU'in doza bağlı sitotoksik etkisi tespit edilmiş aynı zamanda IC_{50} değeri 814,1 µg/mL olarak kaydedilmiştir (Yang vd., 2015).

Yapılan başka bir çalışmada ise benzimidazolyum türevi olan bileşik (1) ve bu bileşigin gümüş-karben kompleksi (2) sentezlenmiş. Hem 1 hem de 2, insan kolorektal karsinomuna (HCT 116) ve insan lösemi (HL 60) hücre hatlarına 48 saat boyunca doza bağlı olarak uygulanmış ve sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak 5-FU seçilmiştir. MTT sonuçlarına göre kompleksin (2) ve benzimidazolium tuzunun (1) test edilen her iki hücre hattına karşı doza bağlı bir sitotoksik etkisi olduğu tespit edilmiştir. Sentezlenen her iki kompleksin de (1 ve 2) 5-FU'den daha yüksek bir sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Iqbal vd., 2013).

Çalışmamızda yapılmış olan sitotoksite deneylerinin sonuçlarına bakıldığında 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM dozlarında 5-FU'in 24 ve 48 saatte ki IC_{50} değerleri belirlenememiştir. Bileşik 1'in 24 saatte ki IC_{50} değeri 183 µM ve 48 saatteki IC_{50} değeri 90 µM iken Bileşik 2'nin 24 saatte ki IC_{50} değeri 488 µM ve 48 saatteki IC_{50} değeri ise 239 µM olarak belirlenmiştir. Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin sitotoksik etkisi 5-FU'den daha fazlayken Bileşik 1 ve Bileşik 2'yi karşılaştırdığımızda, Bileşik 1'in LNCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin daha fazla olduğu görülmüştür.

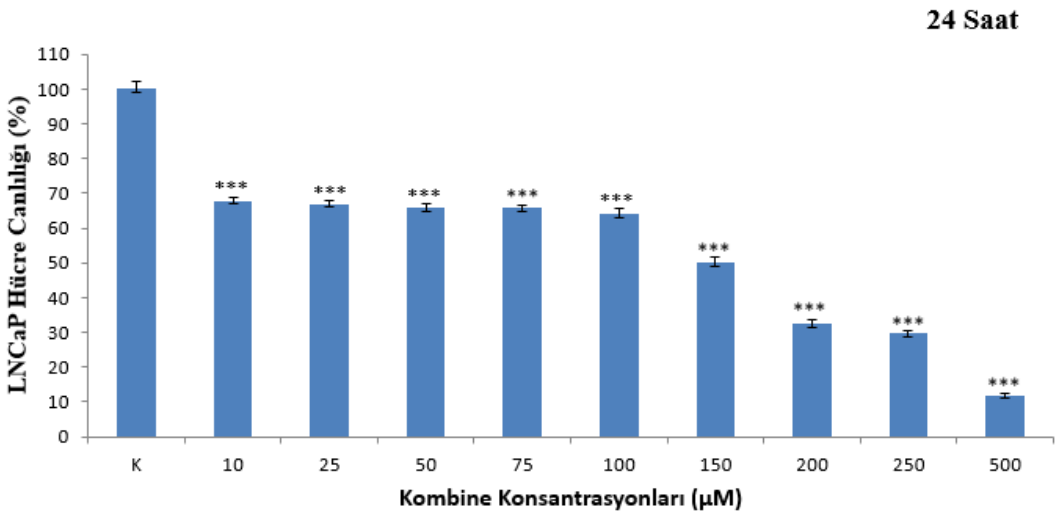
Literatür araştırması yapıldığında yapısında metil bulunan heterosiklik bileşiklerin yüksek sitotoksik etki göstermiş olduğu görülmüştür (Bonacorso vd., 2016). Yapılmış olan bir çalışmada F_3C grubunun varlığının molekülleri daha lipofilik hale getirdiği ve triflorometil grubu içeren ilaçların biyoyararlanımının arttığı rapor edilmiştir (Kaur vd.,2015). Yapmış olduğumuz sitotoksite deneylerinde kullanmış olduğumuz heterosiklik bileşikler olan benzimidazolyum bromür türevi Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin yapılarına baktığımızda, Bileşik 1'in yapısında Bileşik 2'den farklı olarak triflorometil grubu

bulunmaktadır. Bileşik 1'in daha yüksek sitotoksite göstermesinin sebebinin yapısında bulunan metil grubundan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

4.6. Bileşik 1'in 5-FU ile Kombine Olarak Uygulanması

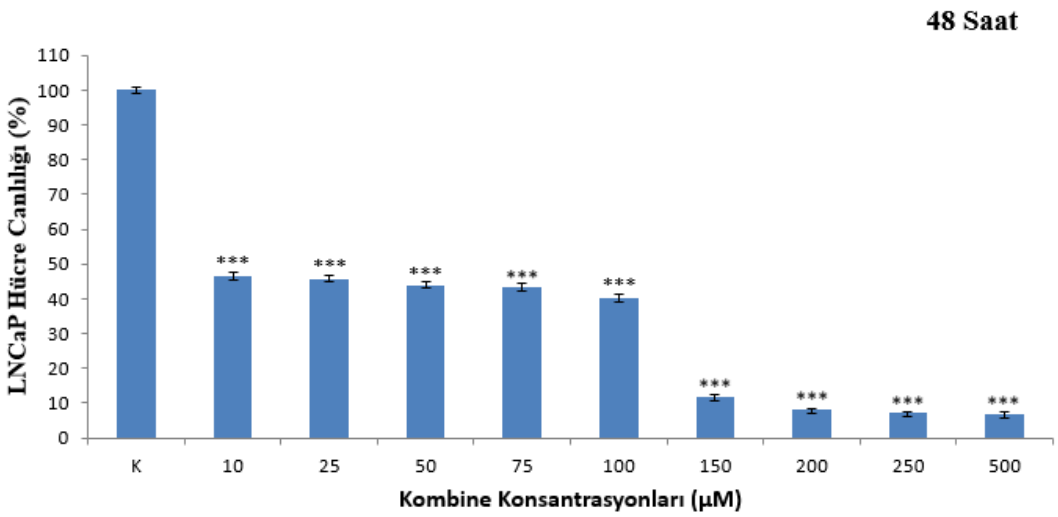
Çalışmada 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM Bileşik 1 ve 5-FU konsantrasyonları 1:1 oranında kombine edilerek hazırlanmış ve LNCaP hücreleri 24 ve 48 saat süresince bu konsantrasyonlara maruz bırakılmıştır.

Yirmi dört saatlik uygulama süresi sonunda LNCaP hücre canlılığı sırasıyla % 32, 33, 34, 34, 36, 50, 68, 70 ve 88 oranında baskıladığı gözlenmiştir ($p<0,001$; Şekil 4.12). IC_{50} değeri 24 saatlik uygulamada 150 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.12: Kombine olarak uygulanan Bileşik 1 ve 5-FU'in LNCaP hücre dizisi üzerinde 24 saatteki etkisi (***: $p<0,001$).

Kırk sekiz saatlik uygulama süresi sonunda LNCaP hücre canlılığı sırasıyla % 53, 54, 56, 56, 59, 88, 92, 93 ve 93 oranında baskıladığı gözlenmiştir ($p<0,001$; Şekil 4.13). IC_{50} değeri 48 saatlik uygulama için 9 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.13: Kombine olarak uygulanan Bileşik 1 ve 5-FU'in LNCaP hücre dizisi üzerinde 48 saatteki etkisi (***: p<0,001).

MTT sonucunda elde edilen veriler kullanılarak kombine uygulamasının LNCaP hücrelerindeki antagonistik/sinerjistik etkileşimleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{CDI (İlaç Etkileşim Katsayısı)} = \frac{Kombine\ Doz\ Absorbansı}{Bileşik\ 1\ Absorbansı\ \times 5 - FU\ Absorbansı}$$

Yapılan hesaplamaya göre kombine uygulamasında 24 saatte 10, 25, 50, 75, 100 ve 150 µM konsantrasyonlarında sinerjistik; 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarında ise antagonistik etki gösterdiği hesaplanmıştır.(Çizelge 4.1)

Çizelge 4.1: LNCaP hücrelerinde Bileşik 1, 5-FU ve kombine (Bileşik 1 + 5-FU) uygulamalarının 24 saatte hücre sağ kalım yüzdeleri. CDI: İlaç etkileşim katsayısı, (Antagonistik etki: CDI>1, Sinerjistik etki: CDI<1)

	Bileşik 1	**5-FU**	**Kombine**	**CDI**
Kontrol	100	100	100	
10 Mm	98,28	76,46	67,93	0,90
25 µM	96,35	75,72	67,02	0,91
50 µM	93,39	75,24	65,94	0,93
75 µM	91,55	74,84	65,78	0,96
100 µM	88,87	74,29	64,08	0,97
150 µM	80,08	73,53	49,95	0,85
200 µM	35,45	72,01	32,30	1,26
250 µM	29,33	71,19	29,74	1,42
500 µM	16,1	70,55	11,94	1,05

48 saat kombine uygulamasında 10 ve 25µM konsantrasyomlarında sinerjistik etki görülürken 100 µM konsantrasyonundan itibaren antagonistik bir etki görülmüştür. (Çizelge 4.2)

Çizelge 4.2: LNCaP hücrelerinde Bileşik 1, 5-FU ve kombine (Bileşik 1 + 5-FU) uygulamalarının 48 saatte hücre sağ kalım yüzdeleri. CDI: İlaç etkileşim katsayısı, (Antagonistik etki: CDI>1, Sinerjistik etki: CDI<1)

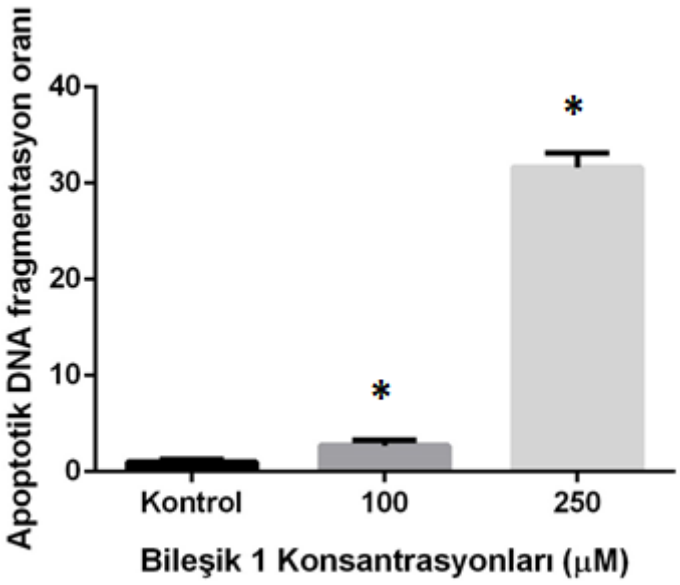
	Bileşik 1	**5-FU**	**Kombine**	**CDI**
Kontrol	100	100	100	
10 µM	89,83	69,32	46,49	0,75
25 µM	86,25	67,34	45,71	0,79
50 µM	58,8	63,23	44,02	1,18
75 µM	53,03	60,7	43,32	1,36
100 µM	47,64	59,82	40,28	1,41
150 µM	13,76	55,57	11,8	1,54
200 µM	9,3	53,21	8,05	1,63
250 µM	9,27	52,78	7,23	1,48
500 µM	9,1	51,76	6,72	1,43

Bu çalışmanın sonuçları incelendiğinde; 24 saatlik 200 µM ve 48 saatlik 150 µM konsantrasyonundan itibaren kombine uygulamanın antagonistik etki gösterdiği hesaplanmış olsa da bu konsantrasyonlarda görülen antagonistik etkinin gerçek bir etki olması oldukça düşüktür. Çünkü antagonistik bir etki yaratacak kadar canlı hücre ortamda bulunmamaktadır.

4.7 Apoptotik DNA Fragmantasyonu Uygulamasının Sonuçları

Bileşik 1'in MTT sonuçlarına göre seçilen 100 ve 250 µM konsantrasyonlarının apoptotik ve nekrotik etkileri LNCaP hücrelerinde araştırılmıştır. Hücre ölümünü belirlemek için hücre ölümü belirleme kiti (Roche Cell Death ELISA Plus) kullanılmıştır. Çalışmada denenmiş olan Bileşik 1'in 100 µM konsantrasyonunun apoptotik etkiyi 2,73 kat, 250 µM konsantrasyonunun ise 31,65 kat arttırdığı görülmüştür (***: $p<0,001$, Şekil 4.14).

Çalışmada kontrol grubu ile kıyaslandığında her iki konsantrasyonda da istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir nekrotik etkinin olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$). Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler doğrultusunda Bileşik 1'in LNCaP hücreleri üzerinde ilk kez apoptotik etkiye neden olduğu gözlenmiştir. Kanserli hücrelerin apoptozdan kaçtığı bilinmektedir. Bu nedenle Bileşik 1'in LNCaP hücrelerini apoptoza uğratması önemli bir veri olma özelliği taşımaktadır.



Şekil 4.14 Bileşik 1'in 100 ve 250 µM konsantrasyonlarındaki apoptotik DNA fragmantasyon oranı

Bu çalışmada ilk olarak yeni sentez edilen benzimidazolyum bromür türevi olan Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarının insan prostat kanseri (LNCaP) hücre dizisinde yaratmış olduğu morfolojik etkileri incelenmiştir. Ardından, hücrelerin çoğalması üzerindeki etkisi ise 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile konsantrasyon ve zaman değişimine bağlı olarak araştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak 5-Florourasil (5-FU) denenmiş, daha sonra Bileşik 1 ile 5-FU aynı konsantrasyonlarda kombine kullanılarak (1:1) LNCaP hücrelerinde yaratmış olduğu antagonistik ve sinerjistik etkileri MTT yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca, Bileşik 1'in 100 ve 250 µM konsantrasyonlarının hücre ölümü üzerindeki apoptotik/nekrotik etkilerini belirlemek amacıyla ELISA yöntemi kullanılmıştır.

Sonuç olarak çalışmada Bileşik 1'in Bileşik 2'ye oranla LNCaP hücreleri üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak daha fazla sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda çalışmada denenmiş olan 5-FU ile kıyaslandığında daha düşük konsantrasyonlarda hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. Bileşik 1 seçilerek yapılan kombine ilaç uygulamasında ise 24 saatte 5-FU ile düşük konsantrasyonlarda olumlu bir sinerjistik aktivite gösterdiği hesaplanmıştır. Son olarak da Bileşik 1'in apoptotik hücre ölümüne neden olarak hücreleri öldürdüğü gözlenmiştir.

Bu nedenle Bileşik 1'in prostat kanserinin tedavisinde ileride yapılacak olan ilaç çalışmalarında geliştirilebilir bir ilaç olma potansiyeli taşıdığını düşünmekteyiz.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Prostat hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile oluşan prostat kanseri, tüm dünya genelinde erkeklerde görülmekte olan kanser türleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Prostat kanseri tedavisinde genellikle kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerinin kullanılması tercih edilse de bu tedavi yöntemlerinin hasta üzerinde yıkıcı yan etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu nedenle prostat kanseri tedavisinde daha etkili ve yan etkileri daha az olan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Organik bileşikler arasında heterosiklik bileşikler önemli bir yere sahiptir. Hetero atomların varlığından dolayı bu bileşikler daha fazla biyolojik aktivite gösterirler. İmidazol veya benzimidazol türevleri, biyolojik aktiviteleri ve tıbbi kimyada önemli bir yere sahip olmaları sebebiyle dikkat çeken heterosiklik bileşiklerdendir.

Benzimidazol, geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip olan heterosiklik bir parçadır. Benzimidazol türevlerinin biyolojik önemi, doğal olarak oluşan nükleotitlere yapısal benzerliklerinden dolayı canlı sistemlerde bulunan doğal biyopolimerler ile etkileşime girmelerinden dolayıdır. Bu özellik benzimidazol türevlerine biyolojik ve klinik önem kazandırmaktadır. Benzimidazol grubuna sahip olan bileşik, anti-mikrobiyal, anti-enflamatuar, anti-virüs, anti-oksidan, anti-alerjik, anti-diyabetik gibi bir çok biyolojik özelliği taşımaktadır. Bazı benzimidazol türevleri üzerinde yapılan araştırmalar onların potansiyel bir antikanser aktiviteleri olabileceğini göstermiştir.

Çalışmamızda ilk olarak benzimidazolyum bromür türevi olan Bileşik 1 ve Bileşik 2 maddesinin 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarının insan prostat kanseri (LNCaP) hücreleri üzerindeki yarattığı morfolojik değişimler ters ışık mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Konsantrasyona ve zamana bağlı olarak bileşiklerin normal prostat kanseri hücrelerinin morfolojisinde değişikliklere yol açtığı belirlenmiştir.

Ardından Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile konsantrasyona ve zamana bağlı olarak araştırılmıştır. İlk 24 saatte Bileşik 1 ve Bileşik 2'nin IC_{50} değerleri sırasıyla 183 µM ve 488 µM olarak hesaplanmıştır. 48 saatteki IC_{50} değerleri

ise, sırasıyla 90 µM ve 239 µM olarak bulunmuştur. Dolayısıyla benzimidazolyum bromür türevi olan bu iki bileşiğin LNCaP hücreleri üzerindeki sitotoksik etkiyi hücrelerin mitokondrilerinde de hasar yaratarak oluşturduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada sadece 24 ve 48 saat uygulamaları yapılmıştır. İleride yapılacak başka çalışmalarda farklı uygulama süreleri denenerek sitotoksik etkideki değişimler tespit edilebilir. Ayrıca yapılacak başka çalışmalarda benzimidazolyum bromür türevi bileşiklerin farklı kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri de *in vitro* olarak araştırılabilir.

Çalışmamızda prostat kanserinin tedavisinde kemoteröpatik ilaç olarak güncel kullanımı bulunan 5-FU'in 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarının sitotoksik etkisi aynı konsantrasyonlarda uygulanan Bileşik 1 ve Bileşik 2 konsantrasyonları ile karşılaştırılmış ve her iki benzimidazolyum bromür türevi bileşiğin 5-FU'e göre çok daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak benzimidazolyum türevi bileşiklerin etkili bir kemoterapötik ajan olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda Bileşik 1 ile 5-FU konsantrasyonlarının 1:1 oranında kombine olarak uygulanmıştır. İlk 24 saatlik uygulamada 10, 25, 50, 75, 100 ve 150 µM konsantrasyonlarında sinerjistik bir etki gözlenirken 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarında ise antagonistik etki gösterdiği hesaplanmıştır. Bununla beraber 48 saatte 10 ve 25 µM konsantrasyonlarında sinerjistik bir etki gösterirken 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarında antagonistik etki gösterdiği hesaplanmıştır. Yirmi dört ve 48 saatlik uygulamalarda konsantrasyon artışıyla birlikte ortaya çıkan antagonistik etkiden dolayı, farklı kemoteropötik ajanlarla birlikte düşük konsantrasyonlarda uygulanabileceğini göstermektedir. Farklı ajanlarla yapılabilecek kombine ilaç denemelerinde birlikte verildiği ajanın etkinliğini artıp artmayacağı ise farklı bir çalışma konusu olabilir. Ayrıca ilaç direnci geliştiren hücrelerde de Bileşik 1'in kombine olarak verilmesinin ilaç etkinliğini arttıracağını düşünmekteyiz.

Ayrıca çalışmamızda Bileşik 1'in prostat kanseri hücrelerinde apoptotik etkiyi arttırdığı belirlenmiştir. Bileşik 1'in apoptozu hangi yolakla indüklediğini belirlemek ve apoptotik süreçte yer alan genlerin ekspresyon düzeyinde ne gibi değişikliklere neden olduğunu incelemek ve etki mekanizması hakkında daha detaylı bilgilere ulaşmak için farklı

çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızdan elde edilen verilerimizin ileride Bileşik 1 ve 2 ile ilgili yapılacak olan çalışmalara öncülük edeceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abe K., Maksuki N., 2000, Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT

Avcı T., Tunçbilek M., 2017, Turkiye Klinikleri J Med Sci, 37(4), 191-200

Bonacorso H.G., Nogaraa P.A., Silva F.A., Rosa W.C., Wiethan C.W., Zanatta N., Martins M.A.P., Rocha J.B.T., Convergent synthesis and cytotoxicity of novel trifluoromethyl-substituted (1H-pyrazol-1-yl)(quinolin-4-yl) methanones , 2016, Journal of Fluorine Chemistry 190 (2016) 31–40

Büyüközer F. B., 2018, Determinatiom of the expression levels of the expression levels of the kallikrein (KLK) gene family in prostate cancer, Yüksek lisans tezi

Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. Eur Urol 2012; 61: 1079e92.

Cunha GR, Ricke WA. A historical perspective on the role of stroma in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. Differentiation 2011;82(4–5): 168–72.

Cupp M.R., Oesterling J.E., Prostate-Specific Antigen, Digital Rectal Examination, and Transrectal Ultrasonography: Their Roles in Diagnosing Early Prostate Cancer, 1993, Mayo Clinic Proceedings, 68(3), 297-306

Cussenot O, Cancel-Tassin G. Facteurs de risque génétiques pour le cancer de la prostate. Med Sci (Paris). 2004;20:562---8.

Çal, Ç. Ve Şimşir, A., 2005, Prostate Kanseri Hücrelerinde Androjen Baskılama Tedavisine Direnç Gelişiminin Mekanizmaları, Türk Üroloji Dergisi, 31 (1), 21-30

Dadwal, U.C., Chang, E.S., Sankar, U., 2018, Androgen Receptor-CaMKK2 Axis in Prostate Cancer and Bone Microenvironment, Frontiers in Endocrinology, doi: 10.3389/fendo.2018.00335 (in press).

Demourya C., Karakiewicz P., Parent M.E., 2016, Association between lifetime alcohol consumption and prostate cancer risk: A case-control study in Montreal, Canada, Cancer Epidemiology 45, 11–17

Descotes J.L., Diagnosis of prostate cancer, 2019, Asian Journal of Urology , 6, 129-136

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Fathima K.S., Sathiyendran M., Anitha K., Structural investigation and molecular docking studies of 2-amino-1Hbenzimidazolium 2-hydroxybenzoate and 2-amino-1H-benzimidazolium pyridine 2-carboxylate single crystal, 2018, Materials Science & Engineering, 91, 103–114

Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M, 2016: Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocol*, DOI:10.1101/pdb.prot087379.

Tortajada J.F., et al. Factores de riesgo constitucionales en el cáncer de próstata. Actas Urol Esp. 2011;35:282---8.

Fournier G, Valei A, Mangin P, Cussenot O. Prostate cancer. Epidemiology. Risk factors. Pathology. Ann Urol (Paris). 2004;38:187---206.

Gemalmaz H., 2012, What is the best cutoff value of PSA in detection of prostate cancer, Üroonkoloji Bülteni, 11 (2), 92-95

Haquel R.A., Iqbal1 M.A., Khadeer Ahamed M.B.K., Majid A. and Hameed Z.A.A., Design, synthesis and structural studies of meta-xylyl linked bis-benzimidazolium salts: potential anticancer agents against 'human colon cancer', 2012, Chemistry Central Journal, 6:68

Hasan Küçükbay, Akın Mumcu, Suat Tekin, Süleyman Sandal, 2016, Synthesis and evaluation of novel *N;N′*-disubstituted benzimidazolium bromides salts as antitumor agents, Turkish Journal of Chemistry, 40, 393-401

Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Ming Chu, T., Mirand, E.A., Murphy, G.P., 1983. LNCaP model of human prostatic carcinoma. Cancer Res. 43, 1809–1818

Hsing, A.W., and Chokkalingam, A.P., 2006, Prostate Cancer Epidemiology, Frontiers in Bioscience, 11, 1388–1413.

Huang S., Hsei I., Chen C., 2006, Synthesis and anticancer evaluation of bis(benzimidazoles), bis(benzoxazoles), and benzothiazoles, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14, 6106–6119

Iqbal M.A., Haque R.A., Budagumpi S., Ahamed M.B.K., Majid A.M.S.A., 2013, Short metal–metal separations and in vitro anticancer studies of a new dinuclear silver(I)-N-heterocyclic carbene complex of para-xylyl-linked, Inorganic Chemistry Communications, 28, 64–69 bis-benzimidazolium salt

Joseph H. YacoubMD, AytekinOtoMD, 2018, MR Imaging of Prostate Zonal Anatomy, Radiologic Clinics of North America, 56, 2, 197-209

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kaighn, M.E., Naayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F., Jones, L.W., 1979. Establishment and characterisation of a human prostatic carcinoma cell line PC3 . Invest. Urol. 17, 16–23.

Kaur K., Kumar V., Gupta G.K., Trifluoromethylpyrazoles as anti-inflammatory and antibacterial agents: A review , 2015, Journal of Fluorine Chemistry 178 (2015) 306–326

Kristal AR, Stanford JL, Cohen JH, Wicklund K, Patterson RE. Vitamin and mineral supplement use is associated with reduced risk of prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1999; 8: 887–92.

Küçükbay A., Mumcu A., Tekin S., Sandal S., 2016, Turkish Journal of Chemistry, 40, 393-401

Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. Endocrinol Metab Clin North Am 2011;40(3):565–75. 2.

Markowski M.C., Carducci M.A., Early use of chemotherapy in metastatic prostate cancer, 2017, Cancer Treatment Reviews, 55, 218-224

McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. Prostate 1981;2(1):35–49.

Morphy, J.B., Emmott, R.C., Hicks, L.L., Walsh, P.C., 1980. Estrogen receptors in the human prostate, seminal vesicle, epididymis, testis, and genital skin: A marker for estrogen responsive tissues. J. Clin. Endocrinol. Metab. 50, 938–948

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

Nelson AW, Shah N, Prostate cancer, Surgery, https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2019.07.006

Nunzio C.D.,Andriole G.L.,Thompson Jr L.M., Freedland S.,2015, Smoking and Prostate Cancer: A Systematic Review, Europeanurologu Focus 1, 2 8 – 3 8

Nzeyimana A., 2016, Benzimidazolyum türevi platin komplekslerinin sentezi, yapılarının aydınlatılması ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi

Okotie O.T., Roehl K.A., Han M., Loeb S., Gashti S.N., Catalona W.J., 2007, Characteristics of Prostate Cancer Detected by Digital Rectal Examination Only, Urology, 70, 1117–1120

Platz EA, Giovannucci E. Prostate cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni Jr JF, editors. Cancer epidemiology and prevention. 3rd edition Oxford: Oxford University Press; 2006. p. 1128---50.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Poppel H.V., Everaerts W., Tosco L., Joniau S., 2019, Open and robotic radical prostatectomy, Asian Journal of Urology, 6 , 125-128

Riss TL, Moravec RA, 2006: Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. In "Cell Biology", Ed; Celis JE, Elseiver Academic Press, Burlington.

Haque A. R., Iqbal M. A., Ahamed M.B. K., AMS Abdul Majid, Zena A Abdul Hameed, 2012, Design, synthesis and structural studies of meta-xylyl linked bis-benzimidazolium salts: potential anticancer agents against 'human colon cancer', Chemistry Central Journal, 6, 68

Sağlık Bakanlığı, 2017, Türkiye Kanser İstatistikleri, Halk Sağlığı Kurumu.

Selman SH. The McNeal prostate: a review. Urology 2011;78(6):1224–8.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA Cancer J Clin 2018;68:7–30

Stanford, J. L. & E. A. ,2001, Ostrander: Familial prostate cancer. Epidemiol Rev 23, 19-23

Stone, K.R., Mickey, R.R., Wuderly, H., Mickey, J.H., Paulson, D.F., 1978. Isolation of a human prostate carcinoma cell line DU 145 . Int. Ž . J. Cancer 21, 274–281.

Szymanska K., Hainaut P., Prostate Cancer: Diagnosis and Treatment, 2019, Reference Module in Biomedical Sciences - Encyclopedia of Cancer (Third Edition) 292-298

Tan, M.H.E., LI, J., Xu, H.E., Melcher, K.,Yong, E., 2015, Androgen Receptor: Structure, Role In Prostate Cancer And Drug Discovery, Acta Pharmacologica Sinica,36, 3–23.

T. Tsing, J. Beretov, J. Ni, X. Bai, J. Bucci, P. Graham, Y. Li, Cancer stemcells in prostate cancer radioresistance, Cancer Letters, https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.08.020.

Tortajadaa J.F., García-i-Castellb J., Berbel-Torneroc 0., Ortega-Garcíad J.A., 2011, Constitutional risk factors in prostate cancer, Actas Urológicas Españolas, 5, 282-288

TÜİK, "Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2018", Erişim adresi: http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do;jsessionid=vJ3rd28frytNlcJ3HzfNGzpV0Kv1LynDbrKpQvb6P9BYsfcThnxq!-1686993174?id=30626 , Erişim Tarihi: 16.09.2019

Uliasz, T.F., Hewett, S.J., 2000, Microtiter Trypan Blue Absorbance Assay For The Quantitative Determination Of Excitotoxic Neuronal Injury In Cell Culture, Journal of Neuroscience Methods, 100, 157–163.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Xua G. ve Tang X., Troxerutin (TXN) potentiated 5-Fluorouracil (5-Fu) treatment of human gastric cancer through suppressing STAT3/NF-kB and Bcl-2 signaling pathways, 2017, Biomedicine & Pharmacotherapy, 92, 95-107

Yang, S., Long, M., Tachado, S.D., Seng, S., 2015, Cigarette Smoke Modulates PC3 Prostate Cancer Cell Migration By Altering Adhesion Molecules And The Extracellular Matrix, Molecular Medicine Reports, 12, 6990-6996

Yıldız M, Çolak, A.T., Yılmaz, M., İça, T., Oztopcu-Vatan, P., vd., 2017, The Syntheses, Characterization, Antimicrobial, DNA Cleavage And Cytotoxic Activities Of Novel Terephthalato Complexes, Journal of Molecular Structure, 1117, 668–674.