İki Farklı Benzimidazolyum Bileşiğinin Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Prostat Kanseri (DU145) Hücre Dizisinde Araştırılması

Elif Sarılar

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Aralık 2019

The Investigation of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Two Different Benzimidazolium Compounds in Prostate Cancer (DU145) Cell Line

Elif Sarılar

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

December 2019

İki Farklı Benzimidazolyum Bileşiğinin Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Prostat Kanseri (DU145) Hücre Dizisinde Araştırılması

Elif Sarılar

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

Aralık 2019

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Elif Sarılar'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "İki Farklı Benzimidazolyum Bileşiğinin Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Prostat Kanseri (DU145) Hücre Dizisinde Araştırılması" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği 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 ‘’İki Farklı Benzimidazolyum Bileşiğinin Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Prostat Kanseri (DU145) Hücre Dizisinde Araştırılması’’ başlıklı YÜKSEK LİSANS 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. 23/12/2019

Elif SARILAR

İmza

ÖZET

Prostat kanseri erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık görülen kanser türüdür. Bu sebeple yeni ve daha etkili tedavi seçenekleri arayışı her geçen gün artmaktadır. Yapılan son çalışmalar benzimidazolyum türevlerinin kanser hücreleri üzerindeki inhibe edici etkisini ortaya koymaktadır.

Çalışmada prostat kanseri hücreleri (DU145) kullanılarak yeni sentezlenen benzimidazolyum türevlerinin (Bileşik A ve B) sitotoksik etkisi MTT yöntemiyle araştırılmıştır. Bileşik A için 24 saatlik IC_{50} değeri 113 µM, 48 saat için ise 80 µM olarak hesaplanmıştır. Bileşik B'nin 24 saat için IC_{50} değeri 420 µM, 48 saat için 363 µM olarak belirlenmiştir. Bileşik A ve B'nin sağlıklı hücrelerde oluşturduğu sitotoksik etkiyi belirlemek için insan sağlıklı akciğer bronşiyal epitelyal hücre hattı (BEAS-2B) kullanılmıştır. Bileşik A'nın IC_{50} değeri 24 saatte 144 µM, 48 saatte ise 109 µM olarak hesaplanmıştır. Bileşik B için 24 saatte hesaplanan IC_{50} değeri 307 µM, 48 saatte ise 200 µM olarak belirlenmiştir. 5-Fluorourasil çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmış ve hem 24 hem de 48 saatlik uygulamalarında herhangi bir IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Bileşik A konsantrasyonlarının 5-Fluorourasil dozları ile kombine uygulanması sonucunda 24 saatlik IC_{50} değeri 91 µM, 48 saatlik uygulamada ise 66 µM olarak belirlenmiştir. DU145 hücrelerinde Bileşik A'nın 100, 150 ve 200 µM konsantrasyonlarının hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölümünü arttırdığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, DU145 ve BEAS-2B hücrelerine uygulanan Bileşik A ve B'nin doza ve zamana bağlı olarak hücre çoğalmasını inhibe ettiği gözlenmiştir. Ayrıca, DU145 hücrelerinde Bileşik A konsantrasyonlarının 5-Fluorourasil dozları ile kombine uygulanmasının sinerjistik bir etkiye neden olduğu belirlenerek Bileşik A'nın apoptotik ve nekrotik hücre ölümünü arttırdığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Benzimidazolyum, prostat kanseri, sitotoksisite, apoptoz, nekroz.

SUMMARY

Prostate cancer is the most common type of cancer in men after lung cancer. For this reason, the search for new and more effective treatment options is increasing every day. Recent studies reveal the inhibitory effect of benzimidazolium derivatives on cancer cells.

In the study, the cytotoxic effect of newly synthesized benzimidazolium derivatives (compounds A and B) using prostate cancer cells (DU145) was investigated by MTT method. The 24 hours IC_{50} value for compound A was calculated as 113 μM and 80 μM for 48 hours. The IC_{50} value of compound B was 420 μM for 24 hours and 363 μM for 48 hours. Human healthy lung bronchial epithelial cell line (BEAS-2B) was used to determine the cytotoxic effect of compounds A and B in healthy cells. The IC_{50} value of compound A was calculated as 144 μM in 24 hours and 109 μM in 48 hours. For compound B, the IC_{50} value calculated at 24 hours was 307 μM and at 48 hours it was 200 μM. 5-Fluorouracil was used as a positive control in the study and no IC_{50} value was calculated in both 24 and 48 hours applications. Combined administration of compound A concentrations with 5-Fluorouracil doses determined that the 24 hours IC_{50} value was 91 μM and 66 μM in 48 hours application. Concentrations of compound a of 100, 150, and 200 μM in DU145 cells have been found to increase both apoptotic and necrotic cell death.

As a result, compounds A and B applied to DU145 and BEAS-2B cells have been observed to inhibit cell proliferation depending on dose and time. Furthermore, combined administration of compound a concentrations in DU145 cells with 5-Fluorouracil doses was determined to cause a synergistic effect, and compound A was found to increase apoptotic and necrotic cell death.

Keywords: Benzimidazolium, prostate cancer, cytotoxicity, apoptosis, necrosis.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitime adım attığım andan itibaren bilgisini ve sevgisini benden esirgemeyerek her türlü desteği sağlayan, her konuda yardımcı olan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarımda bana katkı sağlayan ve üzerimde emeği olan tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sevgili arkadaşlarım Merve YILDIZ ÖZER ve Elif Gözde GÖKKAYA'ya, ve çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Merve ÖZCAN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında beni hiçbir konuda yalnız bırakmayan, her zaman en büyük destekçim olan değerlim, erkek arkadaşım Burak ŞANDIR'a teşekkür ederim.

Son olarak uzaktayken bile yakınmış gibi hissettirip, her konuda beni desteklediklerı ve hiçbir zaman yalnız hissettirmedikleri için bu hayattaki en değerlilerim annem Gülfidan SARILAR, babam Halil SARILAR ve kardeşim Nil Su SARILAR'a en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vi
SUMMARY vii
TEŞEKKÜR viii
İÇİNDEKİLER ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xii
ÇİZELGELER DİZİNİ xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI 3
2.1. Kanser 3
2.1.1. Kanser hücrelerinin sahip olduğu ortak özellikler 3
2.1.2. Kanserlerin köken aldıkları hücreye göre sınıflandırılması 4
2.1.2.1. Karsinomalar 4
2.1.2.2. Sarkomlar 4
2.1.2.3. Lösemi ve lenfomalar 4
2.2. Prostat Bezi 4
2.3. Prostat Kanseri Etyoloji ve Patolojisi 5
2.4. Prostat Kanseri İnsidansı 6
2.5. Prostat Kanseri Risk Faktörleri 6
2.5.1. Yaş 6
2.5.2. Aile öyküsü 6
2.5.3. Irk 7
2.5.4. Hormonal faktörler 7
2.5.5. Beslenme 8
2.6. Prostat Kanseri Tümörlerinin Sınıflandırılması 8
2.6.1. Epitelyal tümörler 8
2.6.2. Stromal tümörler 8
2.7. Prostat Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması 8
2.7.1. Gleason sınıflandırması 8
2.8. Prostat Kanseri Teşhisi 9

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.8.1. Rektal muayene 10
2.8.2. Prostat spesifik antijen (PSA) testi 10
2.8.3. Transrektal ultrasonografi 10
2.8.4. Biyopsi 11
2.9. Prostat Kanseri Tedavisi 11
2.9.1. Aktif gözetim 11
2.9.2. Radyoterapi 11
2.9.2.1. Brakiterapi 11
2.9.3. Kemoterapi 12
2.9.4. Cerrahi yöntem 12
2.9.5. Hormon tedavisi 13
2.10. Hücre Ölümü 13
2.10.1. Nekroz 13
2.10.2 Apoptoz 14
2.11. Apoptoz Mekanizmaları 14
2.11.1. İntrinsik yol 14
2.11.2. Ekstrinsik yol 15
2.12. Otofaji 15
2.13. Benzimidazol ve Türevleri 15
3. MATERYAL VE YÖNTEM 18
3.1. Hücrelerin Çoğaltılması ve Deney Planı 18
3.2. Hücre Morfolojilerinin Ters Işık Mikroskobunda Görüntülenmesi 20
3.3. Bileşik A ve B'nin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi 21
3.4. 5-Fluorourasil'in Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi 22
3.5. Bileşik A Konsantrasyonları ve 5-Fluorourasil Dozlarının Kombine Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi 22
3.6. İstatistiksel Analiz 23
3.7. Apoptotik ve Nekrotik DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi 23
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 25

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.1. Bileşik A'nın DU145 Hücre Hattında Oluşturduğu Morfolojik Değişikliklerin Ters Işık Mikroskobunda İncelenmesi 25

4.2. Bileşik B'nin DU145 Hücre Hattında Oluşturduğu Morfolojik Değişikliklerin Ters Işık Mikroskobunda İncelenmesi 25

4.3. Bileşik A'nın DU145 Hücre Hattında Oluşturduğu Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi 33

4.4. Bileşik B'nin DU145 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi 34

4.5. Bileşik A'nın BEAS-2B Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi 39

4.6. Bileşik B'nin BEAS-2B Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi 40

4.7. 5-Fluorourasil'in DU145 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksisitesinin Belirlenmesi 45

4.8. Bileşik A Konsantrasyonları İle 5-Fluorourasil Dozlarının Kombine Uygulamasının Oluşturduğu Sitotoksik Etkinin İncelenmesi 48

4.9. Apoptotik ve Nekrotik DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi 52

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 54

KAYNAKLAR DİZİNİ 57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1. Prostat bezinin anatomisi 4
2.2. Normal ve kanserli prostat bezi görüntüsü 5
2.3. Prostat bezinin iç yapısı 6
2.4. Prostat kanserinin 1975-2007 yılları arasında ırka bağlı olarak görülme sıklığı ve ölüm oranları 7
2.5. Prostat kanseri hücrelerinin Gleason dereceleri 9
2.6. Prostat kanseri risk grupları 10
2.7. Kemoterapide kullanılan 5-Fluorourasil'in yapısı 12
2.8. Benzimidazolün yapısı 16
2.9. Bileşik A'nın kimyasal yapısı 17
2.10. Bileşik B'nin kimyasal yapısı 17
4.1. DU145 hücre hattına 24 saat süreyle uygulanan Bileşik A'nın hücrelerde oluşturduğu morfolojik değişikliklerin incelenmesi 29
4.2. DU145 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan Bileşik A'nın hücrelerde oluşturduğu morfolojik değişikliklerin incelenmesi 30
4.3. DU145 hücre hattına 24 saat süreyle uygulanan Bileşik B'nin hücrelerde oluşturduğu morfolojik değişikliklerin incelenmesi 31
4.4. DU145 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan Bileşik B'nin oluşturduğu morfolojik değişikliklerin incelenmesi 32
4.5. Bileşik A konsantrasyonlarının 24 saat süreyle DU145 hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi 33
4.6. Bileşik A konsantrasyonlarının 48 saat süreyle DU145 hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi 34
4.7. Bileşik B konsantrasyonlarının 24 saat süreyle DU145 hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi 35
4.8. Bileşik B konsantrasyonlarının 48 saat süreyle DU145 hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi 35
4.9. Bileşik A konsantrasyonlarının 24 saat süreyle BEAS-2B hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi 39
4.10. Bileşik A konsantrasyonlarının 48 saat süreyle BEAS-2B hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi 40
4.11. Bileşik B konsantrasyonlarının 24 saat süreyle BEAS-2B hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi 41

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.12. Bileşik B konsantrasyonlarının 48 saat süreyle BEAS-2B hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi 41

4.13. Bileşik A'nın 24 ve 48 saatlik uygulamaları sonucunda DU145 ve BEAS-2B hücrelerindeki canlılık oranları 42

4.14. Bileşik B'nin 24 ve 48 saatlik uygulamaları sonucunda DU145 ve BEAS-2B hücrelerindeki canlılık oranları 43

4.15. Bileşik A ve B'nin DU145 ve BEAS-2B hücrelerinde 24 ve 48 saatlik uygulamaları sonucunda hesaplanan IC_{50} değerleri 43

4.16. 5-Fluorourasil dozlarının 24 saat süreyle DU145 hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi 44

4.17. 5-Fluorourasil dozlarının 48 saat süreyle DU145 hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi 44

4.18. Bileşik A konsantrasyonları ve 5-Fluorourasil dozlarının 24 saat süreyle 1:1 oranında kombine uygulamasının DU145 hücre hattında oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi 48

4.19. Bileşik A konsantrasyonları ve 5-Fluorourasil dozlarının 48 saat süreyle 1:1 oranında kombine uygulamasının DU145 hücre hattında oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi 49

4.20. Bileşik A, 5-Fluorourasil ve kombine uygulamaların 24 saat süreyle DU145 hücre hattında oluşturduğu mitokondriyal aktivite sonucu hücrelerdeki canlılık yüzdeleri 50

4.21. Bileşik A, 5-Fluorourasil ve kombine uygulamaların 48 saat süreyle DU145 hücre hattında oluşturduğu mitokondriyal aktivite sonucu hücrelerdeki canlılık yüzdeleri 51

4.22. DU145 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan Bileşik A'nın 100, 150 ve 200 µM konsantrasyonlarında oluşturduğu apoptotik ve nekrotik DNA fragmentasyon oranları 53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

3.1. Bileşik A ve Bileşik B konsantrasyon grupları 19
3.2. 5-Fluorourasil doz grupları 20

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
° C	Celcius degree (Santigrat derece)
μg	mikrogram (10^{-6} gram)
μL	mikrolitre (10^{-6} litre)
μM	mikromolar (10^{-6} molar)
cm	santimetre (10^{-2} metre)
cm^2	santimetrekare
g	gram
g	gravity (göreceli santrifüj kuvveti)
kb	kilobaz (1000 nükleotide eş uzunluk birimi)
mg	miligram (10^{-3} gram)
mL	mililitre (10^{-3} litre)
mM	milimolar (10^{-3} molar)
ng	nanogram (10^{-9} gram)
nm	nanometre
rpm	rounds per minute (dakikadaki devir sayısı)

Kısaltmalar	Açıklama
5-FU	5-Fluorourasil
A549	İnsan akciğer adenokarsinomu hücre dizisi
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
APAF-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
ark.	Arkadaşları
ATTC	Amerikan kültür koleksiyonu
BEAS-2B	İnsan sağlıklı akciğer bronşiyal epitelyal hücre dizisi
Caco-2	İnsan kolorektal kanseri hücre dizisi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklama
CAD	Kaspaz ile aktifleşen DNaz
CCD-18Co	İnsan normal kolon fibroblast hücre dizisi
CDI	İlaç etkileşim katsayısı
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DLD-1	İnsan kolon kanseri hücre dizisi
DMEM	Dulbecco's modified eagles's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DU145	İnsan prostat kanseri hücre dizisi
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
Fas	Apoptoz antijeni 1
FBS	Fetal bovine serum (Fetal dana serumu)
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi
HCT-116	İnsan kolon kanseri hücre dizis
HEK-239T	Embriyonik böbrek hücre dizisi
Hep3B	Hepatosellüler karsinom hücre dizi
HL-60	İnsan lösemi hücre dizisi
IC_{50}	Hücrelerin % 50'sini öldüren doz
ICAD	Kaspaz ile aktifleşen DNaz inhibitörü
L-929	Sağlıklı fare fibroblast hücre dizisi
LHRH	Lüteinleştirici hormon salıcı hormon
MCF-7	İnsan meme karsinom hücre dizisi
MDA-MB-231	Meme adenokarsinoma hücre dizisi
MPT	Mitokondriyal permeabilite geçiş poru
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PC-3	İnsan prostat kanseri hücre dizisi
PEPSI	Piridinle önleyici madde hazırlama stabilizasyonu ve başlatılması
PSA	Prostat spesifik antijen

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklama
RNA	Ribonükleik asit
SNU449	Hepatosellüler karsinom hücre dizi
SNU475	Hepatosellüler karsinom hücre dizi
SPSS	Statistics program for social and science
Stuart SMP-30	Erime noktası tayin cihazı
SW13	İnsan prostat kanseri hücre dizisi
TNF	Tümör nekroz faktör
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
TS	Timidilat sentaz
vd.	ve diğerleri

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, hücrelerin bölünme kontrollerini kaybederek hızlı bir şekilde kontrolsüz olarak çoğalması olarak tanımlanabilir. Dünya kanser istatistiklerine göre ölüm nedenleri arasında kanser ikinci sırada yer almaktadır (Dünya Sağlık Örgütü, 2019). Ülkemizde de kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci en önemli ölüm sebebidir (T.C Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2015; Türkiye İstatistik Kurumu, 2019) Kanser tedavisi, hücrelerde meydana gelen değişimler, görülme sıklığı ve tedavinin başarı oranına göre değişiklik göstermektedir. Günümüzde kullanılan ilaçların tedavide yetersiz kalması, kullanıldıktan sonra ciddi yan etkilerinin olması ve kanser hücrelerinin bu ilaçlara karşı direnç oluşturması sebebiyle tedavinin olumlu sonuçlanma oranı düşmektedir (Montenegro vd., 2015).

Prostat kanseri erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık görülen ve ölüme neden olan kanser türüdür (Attard vd., 2016). Prostat kanseri, epitel dokudaki glandüler yapının malign hücrelere dönüşümüyle ortaya çıkmaktadır (Pullar ve Shah, 2016). Yaş, genetik, ırk, beslenme tarzı, aile öyküsü, sosyo-ekonomik durum gibi faktörler prostat kanseri riskini etkilemektedir (Mandair vd., 2014; Ryu vd., 2017). Tedavi seçenekleri arasında radikal prostatektomi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi yer almaktadır (Weiner ve Kundu, 2018). Günümüzde halen prostat kanserini tedavi etmek amacıyla yeni terapötik ajanların arayışı devam etmektedir.

Benzimidazole farklı yan gruplar eklenmesi ile çeşitli kimyasal özelliklere sahip farklı benzimidazolyum tuzları sentezlenmektedir. Yapılan çalışmalarda benzimidazolyum tuzlarının farklı antimikrobiyal, antifungal, antioksidan ve antiproliferatif gibi farklı biyolojik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir (Huda vd., 2019). Son dönemlerde farklı benzimidazolyum tuzlarının insan kolon kanseri ve lösemi (HCT-116 ve HL-60) hücreleri (Iqbal vd., 2013), kolon kanseri ve prostat kanseri (HCT-116 ve PC-3) hücreleri (Iqbal vd., 2015), kolon kanseri ve meme kanseri (DLD-1 ve MDA-MB-231) hücreleri (Akkoç vd., 2016), akciğer kanseri (A549) hücreleri (Apohan vd., 2017), kolorektal kanser ve meme kanseri (Caco-2 ve MCF-7) hücreleri (Karlık vd., 2018), kolon kanseri ve insan meme kanseri (HCT-116 ve MCF-7) hücreleri (Huda vd., 2019) gibi farklı kanser hücreleri

üzerindeki çoğalmayı baskılayıcı etkilerinin incelendiği görülmektedir. Bu çalışmalardan alınan olumlu sonuçlar araştırmacıları bu bileşiklere yöneltmektedir.

Çalışmada öncellikle yeni sentezlenen iki farklı benzimidazolyum bileşiğinin 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarının prostat kanseri hücreleri (DU145) ve insan sağlıklı akciğer bronşiyal epitelyal hücreleri (BEAS-2B) üzerindeki morfolojik ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Daha sonra çalışmada yine MTT verilerine göre seçilen benzimidazolyum tuzu konsantrasyonları ile prostat kanserinin tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaç olan 5-Fluorourasil dozları 1:1 oranında kombine olarak uygulanarak DU145 hücreleri üzerindeki antagonistik/sinerjistik ilaç etkileşimi gözlenmiştir. Son olarak çalışmada MTT verilerine göre seçilen benzimidazolyum tuzunun 100, 150 ve 200 µM konsantrasyonlarının hücre ölümü üzerindeki etkisi Hücre Ölümü Belirleme Kiti kullanılarak incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanser genel olarak, hücrelerin bölünme mekanizmalarının bozularak kontrolsüz bir şekilde çoğalması anlamına gelmektedir. Oluştuğu hücrenin yanı sıra farklı hücre, doku ve organlara yayılım göstererek onları da etkileyebilmektedir. Kanserin ortaya çıkmasında genetik etmenlerin yanında sigara, alkol, yaş, beslenme, virüsler ve iyonize ışınlar gibi çevresel etmenler de etkilidir (Baykara, 2016).

2.1.1. Kanser hücrelerinin sahip oldukları ortak özellikler

Kanser hücreleri normal hücrelerden farklı olarak birtakım özelliklere sahiptirler. Bu özellikler kanser hücrelerinin tespit edilmesinde ve tedavi hedeflerinin belirlenmesinde rol oynamaktadır. Bu özelliklerden bazıları şunlardır:

- Kanser hücreleri apoptozdan kaçma yeteneğine sahiptirler,
- Proliferatif sinyaller kontrol edilip durdurulmadığından kontrolsüz şekilde çoğalırlar,
- Hücrelerin birbirleriyle temas etmesi halinde bölünmeyi durdurmak yerine çoğalmaya devam ederler,
- Telomeraz aktiviteleri sayesinde sürekli çoğalabilirler,
- Yeni damar sistemleri geliştirerek besin ve oksijen gereksinimlerini karşılayabilirler (anjiogenez),
- Kan dolaşımına girerek farklı dokulara yerleşip kanserleşme sürecini başlatabilirler (metastaz) (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.1.2. Kanserlerin köken aldıkları hücreye göre sınıflandırılması

2.1.2.1. Karsinomalar

Karsinomalar epitel hücrelerden köken alarak oluşurlar. Kanserlerin % 90'ını bu sınıf oluşturmaktadır.

2.1.2.2. Sarkomlar

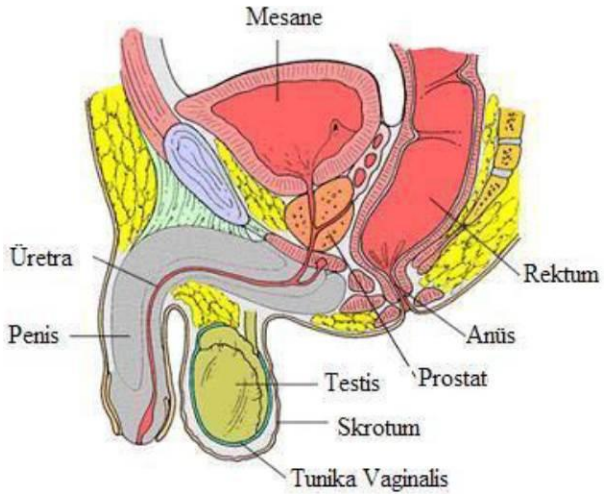
Kas, kemik ve kıkırdak dokusundan gelişen solid yapıdaki tümörlerdir.

2.1.2.3. Lösemi ve Lenfomalar

Bu gruptaki kanserler immün sistem ya da kan hücrelerinden gelişmektedirler (Eroğlu, 2014).

2.2. Prostat Bezi

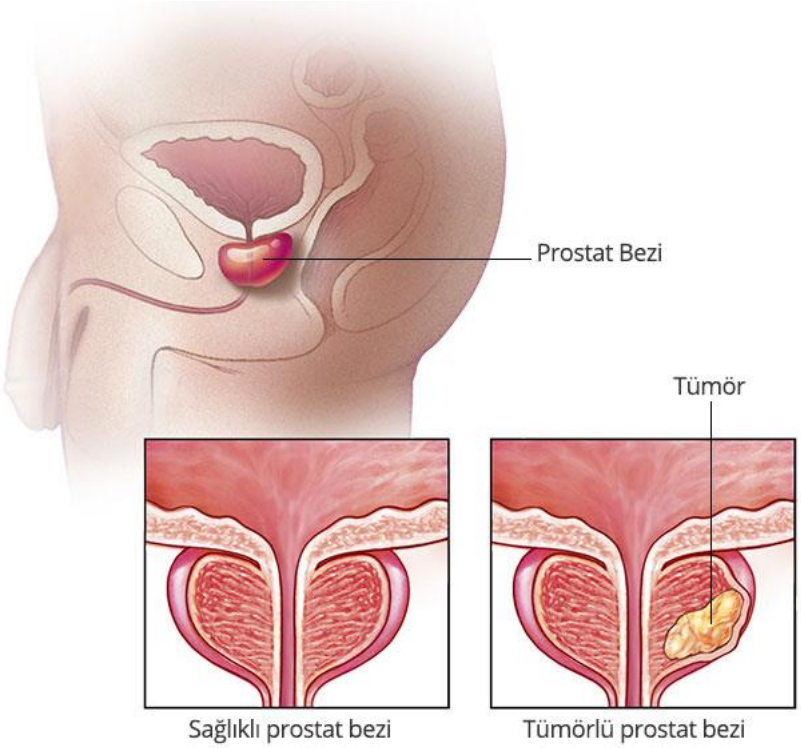
Prostat, pelvis boşluğunda bulunan koni şeklinde bir organdır (Şekil 2.1). Embriyonik dönemde 12. haftadan itibaren sinüsten gelişmeye başlar. Ortalama hacmi 20 mL, kalınlığı 2,5 cm, yüksekliği 3 cm ve genişliği 4 cm olan bez erkeklerde en önemli üreme ve salgı bezidir (Yıldızhan, 2006).



Şekil 2.1. Prostat bezinin anatomisi (Eroğlu, 2014).

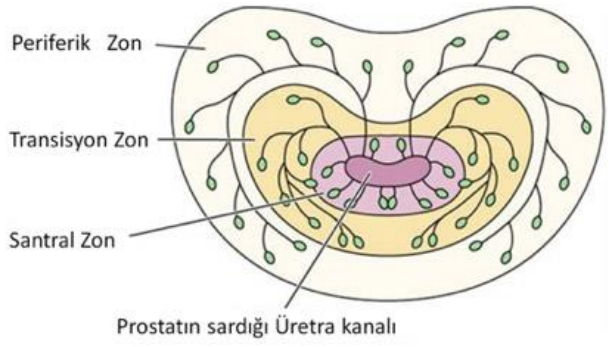
2.3. Prostat Kanseri Etyoloji ve Patolojisi

Prostat kanseri epitel dokuda bulunan glandüler yapının malign hücrelere dönüşmesiyle ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Normal ve kanserli prostat bezi görüntüsü (Önal, 2019).

Prostat kanserinin % 95'i adenokarsinom şeklindedir. Kalan % 5'lik kısım çoğunlukla periferik zondan, daha az olarak da santral ve transizyonel zondan köken alır (Şekil 2.3). Prostat kanseri mesane ve penis gibi çevre dokulara ilerleyerek hasar oluşturabilme eğilimindedir. Gelişimde hem çevresel hem de genetik faktörler rol oynamaktadır. Yaş, ırk, aile öyküsü, hormonal faktörler ve beslenme en önemli risk faktörleridir (Pullar ve Shah, 2016).



Şekil 2.3. Prostat bezinin iç yapısı (Erdoğru, 2019).

2.4 Prostat Kanseri İnsidansı

Prostat kanseri görülme sıklığı bakımından erkeklerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Attard vd., 2016). 2012 yılında dünya genelinde 1,11 milyon erkeğe prostat kanseri teşhisi konulmuştur. İnsidansı yaşla birlikte artmakta olup, 50 yaş ve üzeri erkeklerde ortaya çıkma ihtimali daha fazladır (Pullar ve Shah, 2016).

2.5. Prostat Kanseri Risk Faktörleri

2.5.1. Yaş

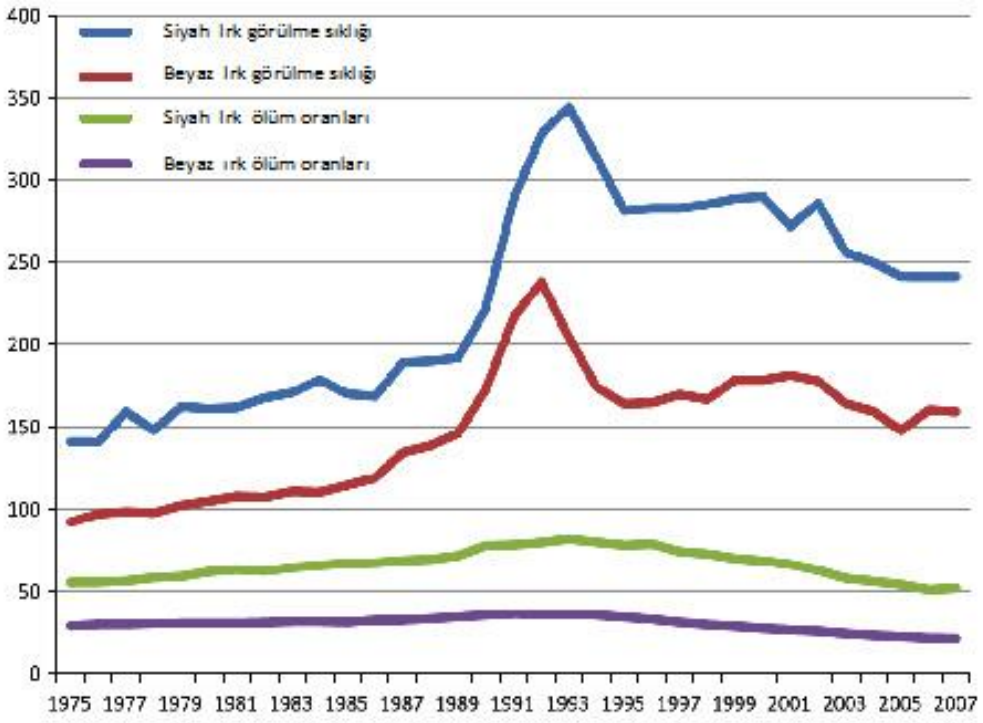
Yapılan çalışmalarda prostat kanseri tanısı alan erkeklerin yaş ortalaması 60 olarak belirlenmiştir (Grönberg, 2003). 70 yaşına kadar her sekiz erkekten birinde görülmekte olup 40 yaş altı bireylerde teşhisi nadirdir (Siegel vd., 2016). Yaş ilerledikçe artış göstermektedir.

2.5.2. Aile öyküsü

Ailesinde kanser öyküsü olan bireylerin olmayan bireylere göre kansere yakalanma oranı iki kat artmaktadır (Pullar ve Shah, 2016).

2.5.3. Irk

Yapılan çalışmaların sonuçları ülkelerarası ve ırklar arasında prostat kanserine yakalanma riskinin oldukça farklı olduğunu göstermiştir. Afrikalı erkeklerin prostat kanserine yakalanma riski beyaz erkeklere göre % 70 daha fazladır (Şekil 2.4). Afrika ve Asya'da görülme oranı Kuzey Amerika'ya göre daha azdır (Yıldızhan, 2006).



Şekil 2.4. Prostat kanserinin 1975-2007 yılları arasında ırka bağlı olarak görülme sıklığı ve ölüm oranları (Atuğ, 2019).

2.5.4. Hormonal faktörler

Testosteron ve dihidrotestosteron gibi androjenlerin miktarının artması sonucu hücre bölünmesi artmakta ve kanserleşme süreci başlamaktadır. Testosteron, insülin, östorojen, leptin gibi hormonlar prostat kanseri gelişme riskini arttırmaktadır (Eroğlu, 2014).

2.5.5. Beslenme

Vücuda besinlerle alınan yağ miktarının artması sonucu androjenik uyarı artmakta, bu şekilde artan androjen miktarı prostat kanseri riskini arttırmaktadır (Eroğlu, 2014).

2.6. Prostat Kanseri Tümörlerinin Sınıflandırması

Prostat kanseri tümörleri epitelyal ve stromal tümörler olarak ikiye ayrılmaktadır (Yıldızhan, 2006).

2.6.1. Epitelyal tümörler

1. Adenokarsinom
2. Transizyonel hücreli karsinom
3. Nöroendokrin karsinom
4. Müsinöz
5. Saf duktal

2.6.2. Stromal tümörler

1. Leiyomyosarkom
2. Rabdomyosarkom

2.7. Prostat Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması

2.7.1. Gleason sınıflandırması

Gleason sınıflandırması prostat kanseri için yapılan diğer dereceleme yöntemleri arasında en çok kabul gören sınıflandırmadır. Kanser şüphesi bulunan hastalarda teşhis amacıyla yapılan biyopsilerin incelenmeleri sonucunda histolojik sınıflama yapılır (Yıldızhan, 2006). Histolojik sınıflama 1960'lı yıllardan bu yana Gleason derecelendirme sistemine göre yapılmaktadır. Gleason sınıflandırması mikroskop altında görülen bez farklılaşmasına göre 5 gruba ayrılmaktadır (Brawley vd., 2018) (Şekil 2.5).

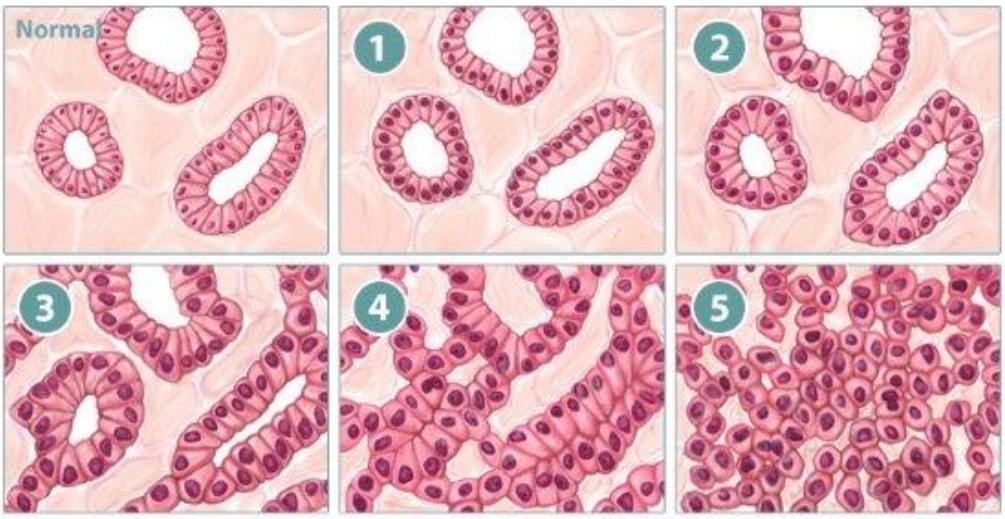
Gleason 1: Yapılan incelemede tümörün sınırları belirli, sıkışık yapıda, birbiriyle aynı olan oval veya yuvarlak yapılardan oluşur.

Gleason 2: Tümörün sınırları genel olarak belli olmakla birlikte tümöre ait olmayan dokuya uzantılar mevcuttur. Yapılar gevşek yerleşimli ve birbiriyle aynı değildir.

Gleason 3: Bez yapılarının şekil ve boyutları birbirinden farklıdır. 1. ve 2. sınıflamaya göre yapılar daha küçük görülmektedir. En sık rastlanan sınıflamadır.

Gleason 4: Tümör sınırları belirsizleşmiş ve yapılar birbiriyle birleşmiş durumdadır.

Gleason 5: Glandüler yapıya benzerlik ortadan kalkmış, normal yapılar kaybolmuştur. Ortası nekroz olan kribriform yapılar mevcuttur (Yıldızhan, 2006; Başaran, 2008).



Şekil 2.5. Prostat kanseri hücrelerinin Gleason dereceleri (Yücel, 2019).

2.8. Prostat Kanseri Teşhisi

Prostat kanseri teşhisi için başlıca 4 yönteme başvurulur:

2.8.1. Rektal muayene

Bilinen en eski yöntem olup kanser varlığında sertleşen prostatın parmak yardımıyla muayenesi yapılmaktadır. Duyarlılığı diğer yöntemlere göre daha az olduğundan şüpheli bir durumda ileri tetkik gerektirmektedir (Eroğlu, 2014).

2.8.2. Prostat spesifik antijen (PSA) testi

PSA prostat bezinde epitel hücreler tarafından üretilen serin proteaz enzimidir. Görevi üretilen seminal sıvının sıvılaştırılması ve spermlerin korunması olarak bilinmektedir. 1980 yılından bu yana prostat kanseri teşhisinde kullanılmaktadır. 4 ng/mL'nin altındaki değerler normal kabul edilmektedir (Şekil 2.6). Prostata özgü olmasının yanında prostat kanserine özgü değildir. İyi huylu oluşumlar nedeniyle de kandaki seviyesi yükselebilmektedir. Bu sebeple şüpheli bir durumda PSA testine ek ikincil bir teşhis yöntemi kullanılmalıdır (Pullar ve Shah, 2016).

Düşük Risk Grubu	Orta Risk Grubu	Yüksek Risk Grubu
PSA <10 T1-2a Gleason<7	PSA 10-20 T2b Gleason=7	PSA >20 T2c Gleason>7

Şekil 2.6. Prostat kanseri risk grupları (Oğuz, 2019).

2.8.3. Transrektal ultrasonografi

Rektal muayeneyi desteklemek ve prostat bezinin görüntülenerek incelenmesi amacıyla ultrasonografik dalgalar kullanılarak yapılır. Bu işlem sırasında biyopsi almak mümkün olduğundan prostat kanseri teşhisinde güvenilir bir yöntemdir (Eroğlu, 2014).

2.8.4. Biyopsi

Prostat kanseri teşhisinde en güvenilir yöntem biyopsi alınması işlemidir. Özel iğneler yardımıyla hastanın prostat bezinden alınan parçalar sayesinde teşhis mümkün olmaktadır (Pullar ve Shah, 2016).

2.9. Prostat Kanseri Tedavisi

Prostat kanseri tedavisinde kullanılan beş yöntem vardır: Bunlar; Aktif gözetim, radyoterapi, kemoterapi, cerrahi tedavi ve hormon tedavisidir.

2.9.1. Aktif gözetim

Bu tedavi seçeneğinde hastanın belli aralıklarla PSA seviyesinin ölçülmesi ve gerekli görüldüğünde diğer teşhis yöntemlerinin uygulanması gerekmektedir. Gleason skoru 7'den küçük ve PSA düzeyi 10 ng'dan düşük olan erkeklerde tercih edilen tedavi yöntemidir (Weiner ve Kundu, 2018).

2.9.2. Radyoterapi

İleri seviye prostat kanseri olan hastalar için uygulanan tedavi yöntemidir. Tek başına uygulanabileceği gibi diğer tedavilerle kombine olarak da uygulanabilir. Cerrahi tedaviden önce tümör büyümesini engellemek ve boyutunu küçültmek, cerrahi müdahale sonrasında ise tümör gelişimini engellemek amacıyla uygulanabilir. Tedavinin süresi ve dozu hastalığın evresine, hastanın yaşına bağlı olarak değişmektedir (Brawley vd., 2018).

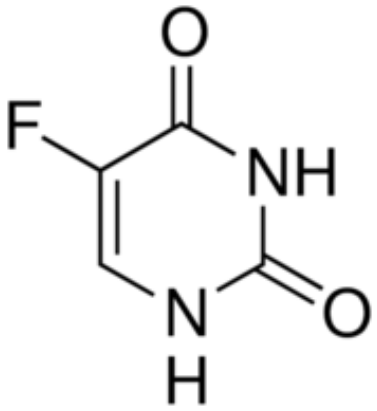
2.9.2.1. Brakiterapi

Prostat kanseri tedavisinde kullanılan radyoterapi yöntemlerinden birisidir. Tümörün yakınına yerleştirilen implantlar sayesinde radyasyonun hedef dokuya ulaşması sağlanır. Prostat kanserinde genellikle iyodin 125 veya paladyum 103 radyoaktif maddeleri kullanılmaktadır (Dönmez-Yılmaz ve Ünsal, 2013).

2.9.3. Kemoterapi

Prostat kanserinin ilerlemiş evrelerindeki hastalara çeşitli kimyasal ilaçlar verilerek kanser hücrelerinin hasara uğratılıp büyümesinin engellenmesi amaçlanır (Baykara, 2016). Kemoterapi ilaçları oral, intravenöz, intramusküler veya subkutan gibi çeşitli yollarla hastaya verilmektedir.

Prostat kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan 5-Fluorourasil bir pirimidin analoğudur (Şekil 2.7). 5-Fluorourasil, ilk kez 1957 yılında sentezlenen kemoterapötik bir ilaç olup prostat, akciğer, meme, karaciğer, kolorektal ve mide gibi birçok farklı kanser türünde halen kullanılmaktadır (Yang vd., 2014; Ji vd., 2017). 5-Fluorourasil, DNA ve RNA'da bulunan pirimidin moleküllerine benzer heterosiklik yapıda bir bileşiktir. Beşinci karbon molekülüne flor bağlıdır (Yang vd., 2014). 5-Fluorourasil timin veya urasil yerine DNA veya RNA'ya bağlanarak ve timidilat sentazı inhibe ederek antikanser etkisini göstermektedir (Hamouda vd., 2017). TS apoptoz ve protein sentezinin düzenlenmesinde rol alan bir enzimdir (Zhang vd., 2008).



Şekil 2.7. Kemoterapide kullanılan 5-Fluorourasil'in yapısı (Wisniewska-Jarosinska vd., 2011).

2.9.4. Cerrahi Yöntem

Radikal prostatektomi olarak da bilinen bu yöntemde tüm prostat dokusu cerrahi yöntemle çıkarılır. Radikal prostatektomi sonrasında PSA seviyesinin ölçülemeyecek seviyeye düşmesi beklenir (Brawley vd.,2018).

2.9.5. Hormon Tedavisi

Hormon tedavisindeki amaç testosteron düzeylerini düşürerek kanser hücrelerini testosterondan yoksun bırakmaktır. Androjen yoksunluk tedavisi olarak da bilinir. Çeşitli yollarla yapılmaktadır (Pullar ve Shah, 2016).

1. LHRH agonistleri (örneğin goserelin)
2. LHRH antagonistleri (örneğin degarelix)
3. Anti-androjenler (örneğin bikalutamid)
4. Cerrahi kastrasyon (yani bilateral subkapsüler orchiektomi).

2.10. Hücre Ölümü

Çeşitli sebeplerle mutasyona uğrayan hücrelerin kanserleşme sürecini başlatmamaları için organizma tarafından yok edilmeleri gerekir. Hücre homeostazının korunması ve mutasyona uğrayan hücrelerin yok edilmesi hücre ölümü olarak adlandırılmaktadır (Güleş ve Eren, 2008). Hücre ölüm şekilleri nekroz, apoptoz ve otofaji olarak 3'e ayrılmaktadır (Kroemer vd., 2009).

2.10.1. Nekroz

Nekrozun sebepleri arasında hipertermi, hipoksi, oksidatif fosforilasyon ve çeşitli toksinler yer alır. Nekrotik ölümde hücre apoptozdakinden farklı olarak büzüşmek yerine şişer ve parçalanır. Hücrelerdeki enerjinin azalmasıyla birlikte hücre zarının geçirgenliği bozularak sodyum ile su hücre içine girerek hücrenin şişmesine sebep olur. Sonuçta hücre zarı parçalanır ve yapısal bütünlüğü bozulur. Bunun sonucunda plazma hücre boşluklarına sızar ve inflamasyona sebep olur (Tomatır, 2003). Nekrozun genler tarafından kontrol edilemediği bilinmesine rağmen bazı çalışmalarda ölüm reseptörlerinin kaspaz inhibitörleri varlığında nekroza sebep olduğu tespit edilmiştir (Kroemer vd., 2009).

2.10.2. Apoptoz

Patolog Kerr tarafından apoptoz terimi programlı hücre ölümünü tanımlamak amacıyla ilk kez 1972 yılında kullanılmıştır (Kerr vd., 1972). Canlı vücudunda yeni hücreler oluşurken var olan bazı hücrelerin de yok edilip hücre homeostazının korunması sağlanmaktadır. Genler tarafından düzenlenen ve fizyolojik hücre ölümü olan apoptoz genel olarak hücrelerin aldıkları sinyaller sonucunda kendi kendilerini yok etmeleri olarak tanımlanabilir. Bu şekilde hücre homeostazı korunmaktadır. Apoptozun tetiklenmesinde sitokinler, büyüme faktörleri, sitotoksik ajanlar glukokortikoidler, kalsiyum miktarı, tümör nekroz faktör (TNF), TGF-β (Transforming growth factor beta), bakteriyal-viral enfeksiyonlar, kimyasallar, radyasyon gibi hücre içi ve hücre dışı sinyaller etkilidir (Tomatır, 2003).

2.11. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz mekanizmaları enerji gerektiren kompleks olayları içermektedir. İntrinsik (diğer adıyla mitokondriyal) ve ekstrinsik yol olmak üzere iki ana apoptotik yol vardır. Bu iki yol birbiriyle bağlantılıdır ve bir yolda kullanılan molekül diğer yolda da etkili olabilmektedir (Igney ve Krammer, 2002).

2.11.1. İntrinsik yol

İntrinsik yolda reseptör olmayan uyaranlar hücre içerisindeki hedeflerle etkileşim halinde olup hücre içi sinyal oluşturmaktadırlar. Bu uyaranlar negatif veya pozitif biçimde intrinsik yolu başlatabilirler. Negatif sinyaller bazı sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar gibi uyaranların olmadığı durumlarda apoptozu tetikleyerek etki ederler. Toksin, hipotermi, hipoksi, radyasyon, serbest radikaller gibi uyaranlar pozitif sinyal oluşturarak mitokondriyal permeabilite geçiş poru (MPT)'nun açılmasına ve sitokrom c salınımına sebep olurlar (Saelens vd., 2004). Sitokrom c ve Apaf-1 birleşerek sitozolde apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptozom kaspaz-9'u aktifleştirdikten sonra kaspaz-9'da prokaspaz-3'ü kaspaz-3 haline dönüştürür. Kaspaz-3 ICAD (DNase enzim inhibitörü)'nü inaktif hale getirerek CAD (DNase) 'ı aktifleştirir. CAD DNA'nın fragmante olmasını

sağlar. Mitokondriden salınan AIF çekirdeğe transloke olarak DNA'nın 50-300 kb'lık parçalara bölünmesine neden olur (Du vd., 2000; Hill vd., 2004).

2.11.2. Ekstrinsik yol

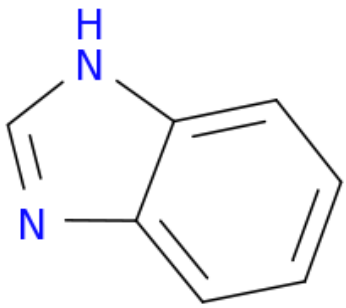
Ekstrinsik yolda apoptoz, transmembran reseptör aracılı etkileşimlerle başlatılır. Ölüm reseptörü aracılı apoptoz da denir. TNF ölüm reseptörleri rol almaktadır. Hücrenin yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR) ölüm sinyalleri (FasL, TNF-α) bağlanarak reseptörler trimerik bir yapı kazanırlar. Trimerik yapıdaki reseptörler prokaspazla birleşir, DISC (death inducing singnaling complex) oluşur ve prokaspaz-8 aktif hale geçer. Kaspaz-8 aktive olduğunda apoptoz tetiklenir. Kaspaz-8 ya doğrudan kaspaz-3 ü aktive eder ya da mitokondriyal yolla kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ün aktive olmasını sağlar. Kaspaz-3 CAD'ı aktif hale getirerek DNA'nın fragmante olmasına neden olur (Eröz vd., 2012).

2.12. Otofaji

Hücre organelleri veya makro moleküller bir kese yardımıyla lizozomlara taşınır ve burada lizozomla birleşip parçalanır. Bu mekanizmaya otofaji denilmektedir. Otofaji hücrenin karşılaştığı oksidatif stres, açlık gibi fizyolojik koşullarda besin elde etmek amacıyla moleküllerin geri dönüşümünü sağlayan bir mekanizmadır. Otofaji yaşlanma, metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak patojenlerin yıkımında rol oynamaktadır. Otofaji mekanizmasında meydana gelen aksaklıklar kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve enfeksiyon hastalıklarının oluşmasına sebep olabilmektedir (Öz-Arslan vd., 2011).

2.13. Benzimidazol ve Türevleri

Benzimidazol, benzen halkasının 4,5 pozisyonlarında imidazole bağlanmasıyla oluşur (Şekil 2.8). İmidazolde bulunan azot atomu nükleofilik özelliği sayesinde nükleotitlerle yapısal benzerlik göstermektedir. Bu sebeple biyolojik öneme sahiptirler. Çeşitli antifungal, antidiyabetik, antibakteriyal, antioksidan ve antikanser etkileri sebebiyle hem biyolojik hem de farmakolojik olarak ilgi görmektedirler (Huda vd., 2019).



Şekil 2.8. Benzimidazolün yapısı (Anonim, 2019).

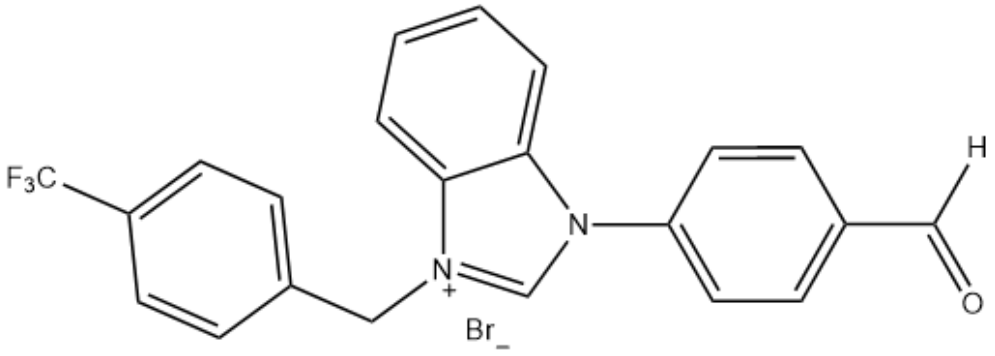
Kimyasal formül: $C_7H_6N_2$

Moleküler ağırlık: 118,135 g/mol

Son yıllarda yapılan çalışmalarda heterosiklik bileşikler sentezlenerek çeşitli etkileri araştırılmaktadır. Bu heterosiklik bileşiklerin en önemlilerinden biri olan benzimidazol birçok geçiş metali için ligand görevi görmektedir. Benzimidazole farklı element ve yan grupların da eklenmesiyle çeşitli benzimidazolyum tuzları ve kompleksleri sentezlenmekte ve bileşiğin etkinliği artmaktadır (Tonelli vd., 2017).

Çalışmada kullanılan iki farklı benzimidazolyum türevi olan Bileşik A ve B toz halinde Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde sentezlenmiştir (Şekil 2.9; 2.10). Benzimidazolyum türevi bileşikler sentezlenirken azot atmosferi altında ve geleneksel yöntemlerle 50 mL'lik balon içerisinde ve manyetik karıştırıcı ile sentezlenmiştir. Saflaştırma işlemi için uygun çözücüler varlığında yeniden kristallendirme yöntemi kullanılmıştır. Elementel analiz ölçümleri VarioEL III cihazı ile gerçekleştirilmiştir. FT-IR analizleri Perkin Elmer Spektrum 100 spektrometresi ile gerçekleştirilmiştir. Erime noktası analizleri Stuart SMP-30 erime noktası tayin cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Bileşik A

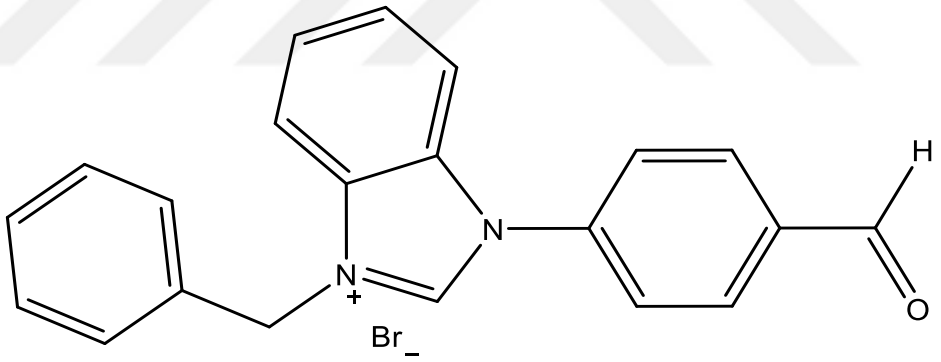


Şekil 2.9. Bileşik A'nın kimyasal yapısı.

Kimyasal formül: $C_{22}H_{16}BrF_3N_2O$

Moleküler ağırlık: 461,28 g/mol

Bileşik B



Şekil 2.10. Bileşik B'nin kimyasal yapısı.

Kimyasal formül: $C_{21}H_{17}BrN_2O$

Moleküler ağırlık: 393,2 g/mol

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Hücrelerin Çoğaltılması ve Deney Planı

Çalışmada iki farklı benzimidazolyum türevinin (Bileşik A ve B) sitotoksik etkilerini araştırmak için daha önce Amerikan Kültür Koleksiyonu'ndan satın alınan ve -196 ^{o}C'de saklanan insan androjen bağımsız prostat kanseri hücre hattı (DU145; ATCC® HTB-81) kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada iki farklı benzimidazolyum türevinin sağlıklı hücre üzerindeki etkisini de gözlemleyebilmek için aynı koşullarda saklanan insan sağlıklı akciğer bronşiyal epitelyal hücre hattı (BEAS-2B; ATCC® CRL-9609) kullanılmıştır.

Çalışmalarda hücreler % 1 penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu, % 10'luk Fetal Bovine Serum (FBS) ve Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içeren besiyeri içerisinde önce 25 cm^{2}'lik, daha sonra 75 cm^{2}'lik kültür kaplarında, 37 ^{o}C'de, % 5 CO_2 ve % 95 nem içeren ortamda inkübe edilerek karbondioksitli inkübatörde (Thermo) çoğaltılmıştır. Hücrelerin çoğalması ve kontaminasyon takipleri ters ışık mikroskobu (Nikon Eclipse, TC100) kullanılarak günlük olarak yapılmıştır.

Hücreler 75 cm^{2}'lik flasklarda % 70-80 yoğunluğa ulaştıktan sonra deneye alınmıştır. Hücrelerin flaskın tabanından ayrılması için flaskın içerisindeki besiyeri çekilerek PBS (dengelenmiş fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkama yapılmış ve sonrasında hücreler 5 dakika % 0,25'lik Tripsin EDTA (Sigma-Aldrich) ile muamele edilmiştir. Daha sonra hücreler, içerisinde 9 mL besiyeri bulunan tüplere aktarılmış ve +10 ^{o}C'de, 1200 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin sonunda tüpteki süpernatant boşaltılarak yerine yeni besiyeri eklenmiş ve hücrelerin besiyeri içerisinde homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Hücrelerin sayılması için Tripan Mavisi Boyası (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Canlı hücreler Tripan Mavisi Boyasını hücre zarı bozulmadığı için içlerine almazken, ölü hücrelerde ise hücre zar yapısı bozulduğu için boya direkt olarak hücrenin içerisine geçerek mavi renk almasına neden olur. Bu sayede canlı hücre ile ölü hücreler birbirinden kolaylıkla ayırt edilebilir duruma gelmektedir (Avelar-Freitas vd., 2014). Canlı hücre sayısını belirlemek için hücreler 5 dakika süreyle Tripan Mavisi ile muamele edilmiş ve süre sonunda hücre sayım cihazında (Cedex XS, Innovatis) sayılmıştır.

Sayım sonuçlara göre hücreler 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyuda 100 µL hacimde 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Kültür kapları hücrelerin tabana yapışması için 37 ^{o} C'de, % 5 CO_2 ve % 95 nem içeren karbondioksitli inkübatörde 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Bileşikler dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde 100 mM ana stok olacak şekilde çözdürülmüştür. Ana stok solüsyonundan DMEM ile dilüe edilerek 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM'lık dokuz farklı konsantrasyon hazırlanmıştır (Çizelge 3.1.). Deneyde bileşiklerin çözdürülmesi için kullanılan DMSO'nun hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla en yüksek konsantrasyon olan 500 µM konsantrasyonu için sadece DMSO içeren çözücü kontrol grubu konsantrasyonlar arasına eklenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hazırlanan konsantrasyonlar her bir kuyuya 100 µL hacim içerisinde olacak şekilde ilave edilerek, hücreler 24 ve 48 saat süreyle muamele edilmiştir. Deney planında kontrol gruplarına sadece 100 µL besiyeri ilave edilmiştir. Her doz için en az 8 kuyu kullanılmış ve deneyler 3 kez tekrar edilmiştir.

Çizelge 3.1. Bileşik A ve Bileşik B konsantrasyon grupları

Sıra	**Uygulanan İlaç Konsantrasyonları**
1	Kontrol grubu (sadece besiyeri)
2	10 µM Bileşik A ve B konsantrasyon grubu
3	25 µM Bileşik A ve B konsantrasyon grubu
4	50 µM Bileşik A ve B konsantrasyon grubu
5	75 µM Bileşik A ve B konsantrasyon grubu
6	100 µM Bileşik A ve B konsantrasyon grubu
7	150 µM Bileşik A ve B konsantrasyon grubu
8	200 µM Bileşik A ve B konsantrasyon grubu
9	250 µM Bileşik A ve B konsantrasyon grubu
10	500 µM Bileşik A ve B konsantrasyon grubu
11	500 µM çözücü kontrol doz grubu (DMSO)

Çalışmada 5-Fluorourasil (5-FU, Sigma-Aldrich) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 5-Fluorourasil kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan antimetabolit ilaç grubuna dahil bir urasil analoğudur. 5-Fluorourasil baş ve boyun, göğüs, kolon kanseri ve

özellikle prostat gibi birçok kanser türünde yaygın olarak kullanılan kemoteröpatik bir ilaçtır. Kanserleşen hücrelerin çoğalmasını DNA'nın replikasyonu sırasında timidilat sentazın inhibe edilmesi sayesinde durdurmaktadır. Bu sayede timin yerine urasil geçerek DNA'nın replikasyonunu durdurmaktadır (Grem, 1997; Zhang vd., 2008). Toz halinde satın alınan 5-Fluorourasil (Sigma-Aldrich) DMSO içerisinde 100 mM ana stok olacak şekilde çözdürülmüştür. Ana stok solüsyonu DMEM ile dilüe edilerek 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM'lık dokuz farklı doz grubu hazırlanmıştır (Çizelge 3.2.). DMSO'nun hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla en yüksek doz olan 500 µM dozu için çözücü kontrol grubu dozlar arasına eklenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 100 µL hacim içerisinde hazırlanan dozlar her bir kuyuya ilave edilmiştir. Kontrol grubu kuyularına sadece 100 µL besiyeri eklenmiştir. Hücreler hazırlanan 5-Fluorourasil dozları ile 24 ve 48 saat süre boyunca muamele edilmiştir. Her doz için en az 8 kuyu seçilmiş ve deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

Çizelge 3.2. 5-Fluorourasil doz grupları

Sıra	**Uygulanan 5-Fluorourasil Dozları**
1	Kontrol grubu (sadece besiyeri)
2	10 µM 5-Fluorourasil doz grubu
3	25 µM 5-Fluorourasil doz grubu
4	50 µM 5-Fluorourasil doz grubu
5	75 µM 5-Fluorourasil doz grubu
6	100 µM 5-Fluorourasil doz grubu
7	150 µM 5-Fluorourasil doz grubu
8	200 µM 5-Fluorourasil doz grubu
9	250 µM 5-Fluorourasil doz grubu
10	500 µM 5-Fluorourasil doz grubu
11	500 µM çözücü kontrol doz grubu (DMSO)

3.2. Hücre Morfolojilerinin Ters Işık Mikroskobunda Görüntülenmesi

Çalışmamızda, DU145 hücre hattında Bileşik A ve B'nin farklı konsantrasyonlarının oluşturduğu morfolojik değişiklikleri belirlemek amacıyla 96 kuyucuklu kültür kaplarına

$1x10^4$ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonunda gözlenen morfolojik değişiklikler ters ışık mikroskobunda incelenmiş ve Kameram 21 programıyla görüntülenmiştir.

3.3. Bileşik A ve B'nin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmamızda, DU145 ve BEAS-2B hücrelerine uygulanan Bileşik A ve B konsantrasyonlarının sitotoksik etkisi 3-(4,5-dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) yöntemi ile belirlenmiştir (Mossmann, 1983). Bu yöntem hücre canlılığının belirlenmesi için güvenilir, kolay uygulanan, duyarlı, pratik ve sık kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. MTT, canlı hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri sırasında mitokondride bulunan süksinatdehidrogenaz enzimi ile formazan kristallerine dönüştürülebilen bir boyadır. Oluşan boya hücre zarının içerisinde toplanmakta ve uygun çözücüler ile muamele edildiğinde çözülerek serbest kalmaktadır. Elde edilen renk yoğunluğu canlı hücre sayısıyla doğru orantılıdır. Bu nedenle yapılan spektrofotometrik ölçümler sayesinde hücre canlılığının yüzdesi hesaplanabilmektedir (Beytur vd., 2011; Riss vd., 2016).

Sitotoksik etkiyi belirlemek amacıyla 96 kuyucuklu kültür kaplarına $1x10^4$ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM'lık dokuz farklı konsantrasyon grubu 100 µL hacim içerisinde her bir kuyuya ilave edilmiştir. Muamele sürelerinin sonunda her bir kuyuya taze hazırlanmış 20 µL (5 mg/mL, Applichem), MTT solüsyonu konularak, 37 ^{o}C'de, 3 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde kültür kabının içeriği dökülmüş ve her kuyuya 100 µL DMSO ilave edilerek 5 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. 5 dakikanın sonunda 96 kuyucuklu kültür kaplarının absorbans değerleri ELISA cihazında (Biotek, Powerwave XS) 550 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir. Kuyulardaki absorbans değerlerinin yüzdesi doz grubunun absorbansının yüz ile çarpılıp kontrol grubunun absorbansına bölünmesiyle hesaplanmıştır (Cao vd., 2010; Beytur vd., 2011; Turan vd., 2017).

3.4. 5-Fluorourasil'in Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Sitotoksik etkiyi belirlemek amacıyla 96 kuyucuklu kültür kaplarına $1x10^4$ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler 10 ile 500 µM arasında hazırlanan 5-Fluorourasil dozları ile 24 ve 48 saat süreyle muamele edilmiş ve süre sonunda her bir kuyuya 20 µL MTT eklenerek 37 ^{o} C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde kültür kaplarının içeriği dökülerek uzaklaştırılmış ve her kuyuya 100 µL DMSO ilave edilerek 5 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. 5 dakikanın sonunda çalışılan grupların absorbans değerleri ELISA cihazında (Biotek, Powerwave XS) 550 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir. Kuyulardaki absorbans değerlerinin yüzdesi doz grubunun absorbansının yüz ile çarpılıp kontrol grubunun absorbansına bölünmesiyle hesaplanmıştır.

3.5. Bileşik A Konsantrasyonları ve 5-Fluorourasil Dozlarının Kombine Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmada MTT sonuçlarından elde edilen veriler göz önüne alınarak Bileşik A'nın DU145 hücreleri üzerinde daha yüksek bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle kombine ilaç uygulamasında Bileşik A konsantrasyonları ile 5-Fluorourasil dozlarının kombine uygulanmasına karar verilmiştir. Bu amaçla 96 kuyucuklu kültür kaplarına $1x10^4$ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Çalışmada 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM Bileşik A konsantrasyonları ve 5-Fluorourasil dozlarının 1:1 oranında 24-48 saat süreyle kombine uygulanmasının DU145 hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT yöntemiyle araştırılmıştır.

Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir. Kuyulardaki absorbans değerlerinin yüzdesi doz grubunun absorbansının yüz ile çarpılıp kontrol grubunun absorbansına bölünmesiyle hesaplanmıştır.

Antogonistik ve sinerjistik etki ise ilaç etkileşim katsayısı (CDI) formülüne göre, kombine doz grubu absorbansının Bileşik A absorbans değeri ve 5-Fluorourasil absorbans değeri çarpımına bölünüp yüz ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır.

CDI<1 değerinde iki madde arasında sinerjistik etkileşim, CDI>1 değerinde antagonistik etkileşim olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Daphu vd., 2014).

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmada Bileşik A, B, 5-Fluorourasil'in ve Bileşik A konsantrasyonları ile 5-Fluorourasil dozlarının kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla elde edilen veriler IBM SPSS Statistics v22 programında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve ardından Tukey'in Çok Yönlü Karşılaştırma Yöntemiyle istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Apoptotik ve nekrotik DNA fragmentasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar IBM SPSS Statistics v22 programında student t-testi kullanılarak analiz edilmiş ve anlamlılık dereceleri hesaplanmıştır Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel anlamlılıklar grafiklerde (*) ile gösterilmiştir.

3.7. Apoptotik ve Nekrotik DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada DU145 hücrelerinde MTT verilerine göre seçilen 100, 150 ve 200 µM Bileşik A konsantrasyonlarının neden olduğu apoptotik/nekrotik hücre ölümünü araştırmak için Hücre Ölümü Belirleme ELISA Kiti (Roche) kullanılmıştır. Kullanılan kit kolorimetrik olarak sonuçların kantitatif olarak analiz edilmesini sağlamıştır.

Hücre sayımından elde edilen sonuçlara göre 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyuya 1×10^4 hücre ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun sonunda kuyulara seçilen konsantrasyonlar ilave edilerek hücreler ile 24 saatlik muamelesi sağlanmıştır. Kontrol grubu kuyularına sadece besiyeri ilavesi yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda ters ışık mikroskobu yardımıyla kuyular incelenmiş ve deneye alınmak üzere seçilmiştir. Ardından kültür kabı 25 ^{o}C'de, 200 g'de, 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda seçilen kuyulardaki süpernatant alınıp eppendorf tüplere aktarılarak nekrotik hücre ölümünü belirlemek için kullanılmıştır. Daha sonra seçilen kuyulara 200 µL lizis tamponu ilave edilmiş ve apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi için oda sıcaklığında 30 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Süre sonunda kültür kabı tekrar 25 ^{o}C'de, 200 g'de, 10 dakika

santrifüj edilmiştir. Nekroz için eppendorf tüplere aktarılan süpernatanttan, apoptoz içinse hücre lizatı örneklerinden streptavidin kaplı kuyulara 20 µL ilave edilmiş ve kuyulara Anti-Histon Biotin, Anti-DNA POD ve inkübasyon tamponu karışımından 80 µL eklenmiştir. Karanlık ortamda 2 saat süreyle inkübe edilen kültür kaplarının süre sonunda içerikleri dökülerek 3 kere 300 µL yıkama tamponuyla kuyular yıkanmıştır. Yıkama işleminin sonrasında kuyulara 100 µL 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) substratı ilave edilmiş ve karanlık ortamda 15 dakika 250 g'de çalkalanmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde 100 µL ABTS durdurma solüsyonu eklenen kuyular 405 nm dalga boyunda ELISA cihazında spektrofotometrik olarak okunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre DNA fragmentasyon oranları doz grubu absorbansının kontrol grubu absorbansına bölünmesiyle hesaplanmıştır (Sommer vd., 2005).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bileşik A'nın DU145 Hücre Hattında Oluşturduğu Morfolojik Değişikliklerin Ters Işık Mikroskobunda İncelenmesi

DU145 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanan 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM Bileşik A konsantrasyonlarının hücre morfolojisinde oluşturduğu değişiklikler incelenmiştir. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında hem 24 hem de 48 saat uygulamalarında 10 ve 25 µM konsantrasyonlarında hücre morfolojisinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bununla beraber denenen diğer konsantrasyonlarda ise doza ve zamana bağlı olarak hücre morfolojilerinde değişiklik ve hücre sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir. Doz artışına bağlı olarak hücrelerin birbirinden ayrıldığı, parçalanarak hücresel bütünlüklerini kaybettikleri görülmüştür (Şekil 4.1; 4.2).

4.2. Bileşik B'nin DU145 Hücre Hattında Oluşturduğu Morfolojik Değişikliklerin Ters Işık Mikroskobunda İncelenmesi

DU145 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanan 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM Bileşik B konsantrasyonlarının hücre morfolojisinde oluşturduğu değişiklikler incelenmiştir. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında 24 saat uygulamasında denenen 10, 25 ve 50 µM konsantrasyonlarında hücre morfolojisinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bununla beraber 75 µM konsantrasyonundan itibaren doz artışına bağlı olarak hücre morfolojisinde değişiklik ve hücre sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 4.3). 48 saatlik uygulamada ise 10 ve 25 µM konsantrasyonlarında hücre morfolojisindeki herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Oysa 50 µM konsantrasyonundan itibaren doz ve uygulama süresinin artışına bağlı olarak hücrelerin normal iğ şeklindeki morfolojilerinin bozulduğu ve hücrelerin yuvarlaklaştığı tespit edilmiştir. Hücre sayısındaki azalmayı takiben hücreler arasındaki bağlantıların koptuğu, hücrelerin birbirinden uzaklaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.4).

Çalışmada denenen Bileşik A ve B'nin daha önce herhangi bir hücre hattında oluşturabileceği morfolojik değişiklikler incelenmemiştir. Bu nedenle bileşiklerin oluşturduğu hücre morfolojisindeki değişiklikler ilk defa ortaya konmaktadır.

Bununla birlikte yeni sentezlenen pek çok farklı yapı içeren benzimidazolyum tuzlarının oluşturduğu hücre morfolojisindeki değişiklikler farklı çalışmalarla ortaya konmuştur. Örneğin, Haque vd. yaptıkları çalışmada insan kolon kanseri (HCT-116) hücrelerine 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında *meta*-ksilil bağlı *bis*-benzimidazolyum tuzlarını uygulayarak 48 saat sonunda meydana gelen morfolojik değişiklikleri faz-kontrast mikroskobunda incelemişlerdir. Hücrelerin sitoplazmalarında çok sayıda vakuol oluşumunun gözlenmesi hücrelerdeki otofajik karakteristiği ortaya koymuştur. Ayrıca kompleksler güçlü sitotoksik etki göstererek hücrelerin normal morfolojilerini kaybetmelerine, hücre sayısında ve hücre canlılığında önemli ölçüde azalmaya sebep olmuştur. HCT-116 hücrelerinde apoptoza özgü morfolojik değişikliklerin olduğu rapor edilmiştir (Haque vd., 2012).

İnsan kolon kanseri (HCT-116) hücrelerinde yapılan bir çalışmada 48 saat süreyle uygulanan 25, 50, 100, 200 ve 400 µM konsantrasyonlarındaki *para*-ksilil bağlı *bis*-benzimidazolyum tuzlarının ve bu tuzlara bağlı olarak sentezlenen gümüş komplekslerinin morfolojik etkileri faz-kontrast mikroskobunda incelenmiştir. Çalışmada sentezlenen komplekslerin doza bağlı olarak hücre sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca hücrelerin normal morfolojilerini kaybederek vakuol oluşturdukları tespit edilmiştir. Vakuol oluşumuna bağlı olarak hücrelerde otofaji belirtilerinin görüldüğü rapor edilmiştir (Haque vd., 2013).

Iqbal vd. tarafından yapılan bir çalışmada ise insan kolon kanseri (HCT-116) ve insan lösemi hücrelerine (HL-60) 48 saat süreyle uygulanan farklı *para*-ksilil bağlı *bis*-benzimidazolyum tuzlarının ve gümüş bağlı komplekslerinin etkileri araştırılmıştır. Çalışmada ligand ve komplekslerin 1,5625 ve 100 µM arasındaki konsantrasyonları denenmiştir. Çalışmada bizim bulgularımızla benzer şekilde HCT-116 ve HL-60 hücrelerinin morfolojilerinde değişiklikler olduğu gözlenmiştir. 48 saatlik *bis*-benzimidazolyum tuzu uygulamasının sonucunda HCT-116 hücrelerinde normal hücre morfolojilerinin bozulduğu ve hücrelerdeki pseudopodial uzantılarının belli kısımlarda

kaybolduğu tespit edilmiştir. Ayrıca gümüş kompleksi uygulanan hücrelerde ise apoptoza bağlı hücre membranında kabarcık oluşumu gözlenmiştir. Aynı bileşikler HL-60 hücrelerine uygulandığında ise her iki bileşiğin de hücre sayısında azalmaya ve hücre morfolojisinde bozulmaya sebep olduğu rapor edilmiştir (Iqbal vd., 2013).

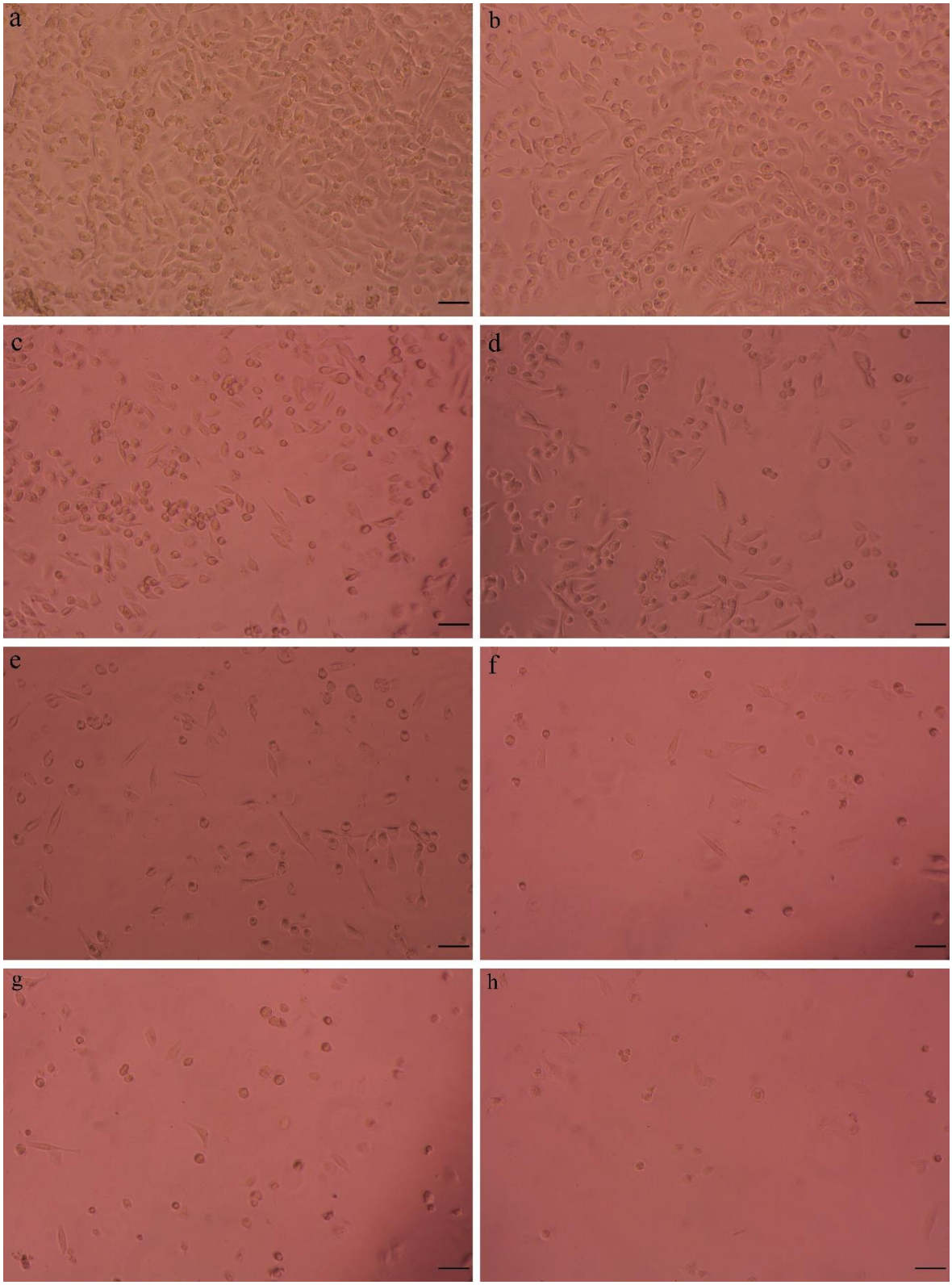
Iqbal vd. yaptıkları farklı bir çalışmada yeni sentezlenen benzimidazolyum bromür tuzu (II) ve gümüş içeren kompleksinin (III) anti-proliferatif etkilerini insan kolon kanseri (HCT-116), insan prostat kanseri (PC-3) ve insan normal kolon fibroblast hücre hatlarında (CCD-18Co) araştırmışlardır. Kırk sekiz saatlik uygulama sonucunda meydana gelen morfolojik değişiklikler faz-kontrast mikroskobunda incelenmiştir. Bileşik II'nin kontrol grubu hücreleriyle kıyaslandığında HCT-116 ve PC-3 hücrelerinde hücre çoğalmasını inhibe ettiği görülmüştür. Kompleks III ile muamele edilen HCT-116 ve PC-3 hücrelerinde ise gümüş metal iyonunun hücrelerde birikmesine bağlı olarak sitotoksisitenin arttığı, hücrelerin normal morfolojilerini kaybettikleri ve hücre canlılıklarının azaldığı belirtilmiştir. Hücre membranında kabarcık oluşumu, kromatin yoğunlaşması ve hücrelerin sitozollerinde apoptotik cisimciklerin oluşmasıyla apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiği rapor edilmiştir. CCD-18Co hücrelerine 48 saat süreyle uygulanan bileşik II ve kompleks III'ün ise hücreler üzerinde zayıf sitotoksik etki gösterdikleri faz-kontrast mikroskobuyla tespit edilmiştir (Iqbal vd., 2015).

Farklı bir çalışmada ise yine benzimidazolyum tuzları ve bu tuzlara bağlı gümüş ve paladyum içeren komplekslerin 20 µM konsantrasyonları 72 saat süreyle insan kolon kanseri hücrelerinde (DLD-1) denenmiştir. Yirmi dört saat sonunda meydana gelen morfolojik değişiklikler floresans bir boya olan Hoechst ve propidyum iyodür ile belirlenmiştir. Çalışmada birkaç saat içerisinde hücresel morfolojik değişikliğe rastlanmamakla birlikte 24 saatte özellikle bileşik 2 ve 4'ün hücre sayısında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Kırk sekiz ve 72. saat uygulamalarında ise 24 saatte görülen morfolojik değişikliklere ek olarak farklı herhangi bir değişiklik gözlenmediği rapor edilmiştir (Akkoç vd., 2016)

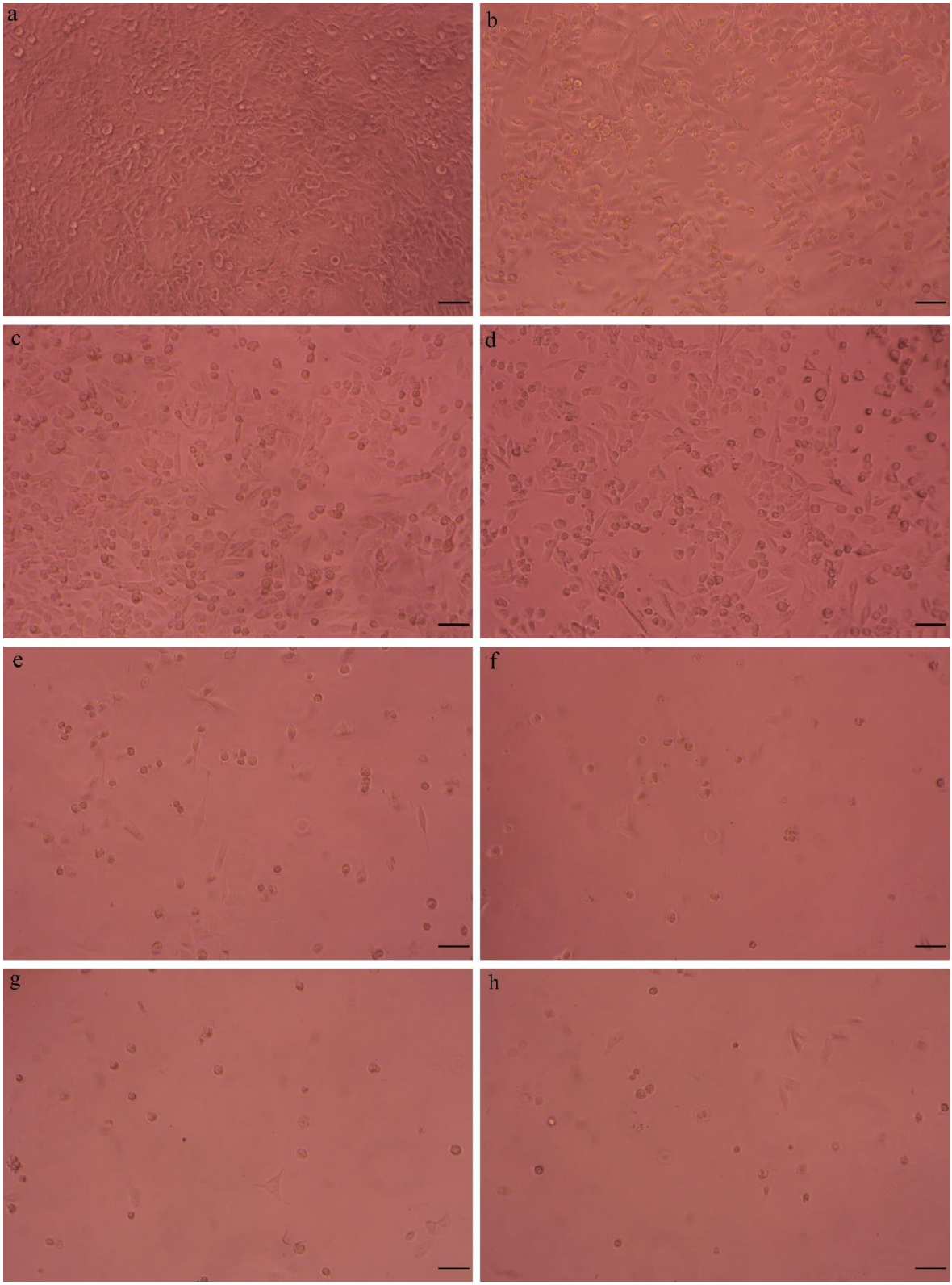
Yapılan diğer bir farklı çalışmada ise yeni sentezlenen benzimidazol-gümüş (I) kompleksleri (2a-d) sağlıklı fare fibroblast hücrelerine (L-929) 24 saat süreyle 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında uygulanarak oluşturduğu morfolojik etkiler floresans ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Hücrelerin membran bütünlüğünü

kaybettikleri ve özellikle 2c bileşiğinin hücre çoğalmasını inhibe ederek hücre membranında kabarcık oluşumuna neden olduğu rapor edilmiştir (Karlık vd., 2018).

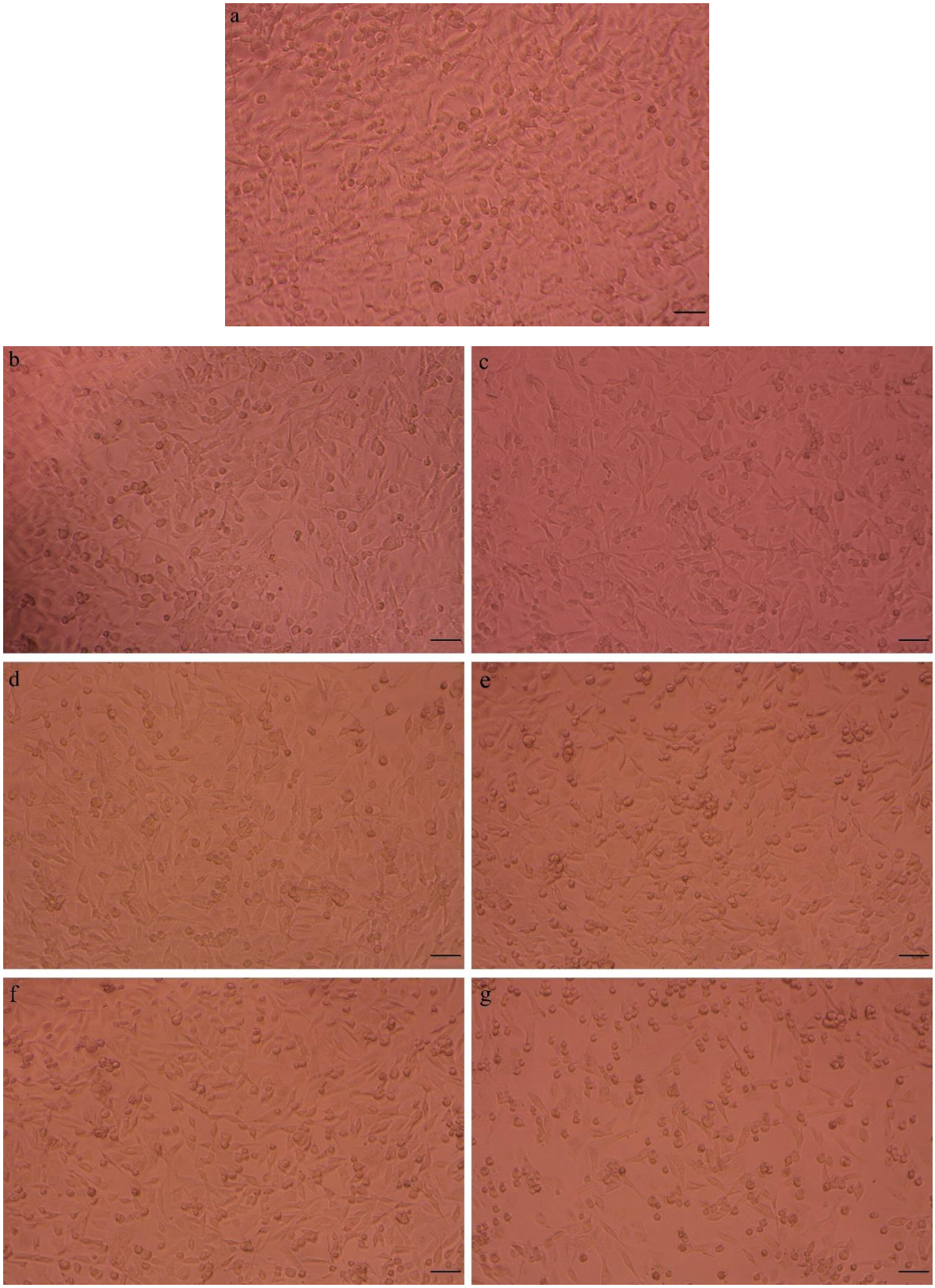
Çalışmaların sonuçlarından elde edilen veriler her yeni sentezlenen benzimidazolyum ve türevlerinin birbirinden farklı morfolojik etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Sentez esnasında eklenen her bir atom, bileşiğin yapısını değiştirmekle birlikte hücre üzerindeki morfolojik etkisini de değiştirmektedir. Bu nedenle yeni sentezlenen bu bileşiklerin farklı morfolojik etkilere sahip olduğu açık bir şekilde gözlenmektedir.



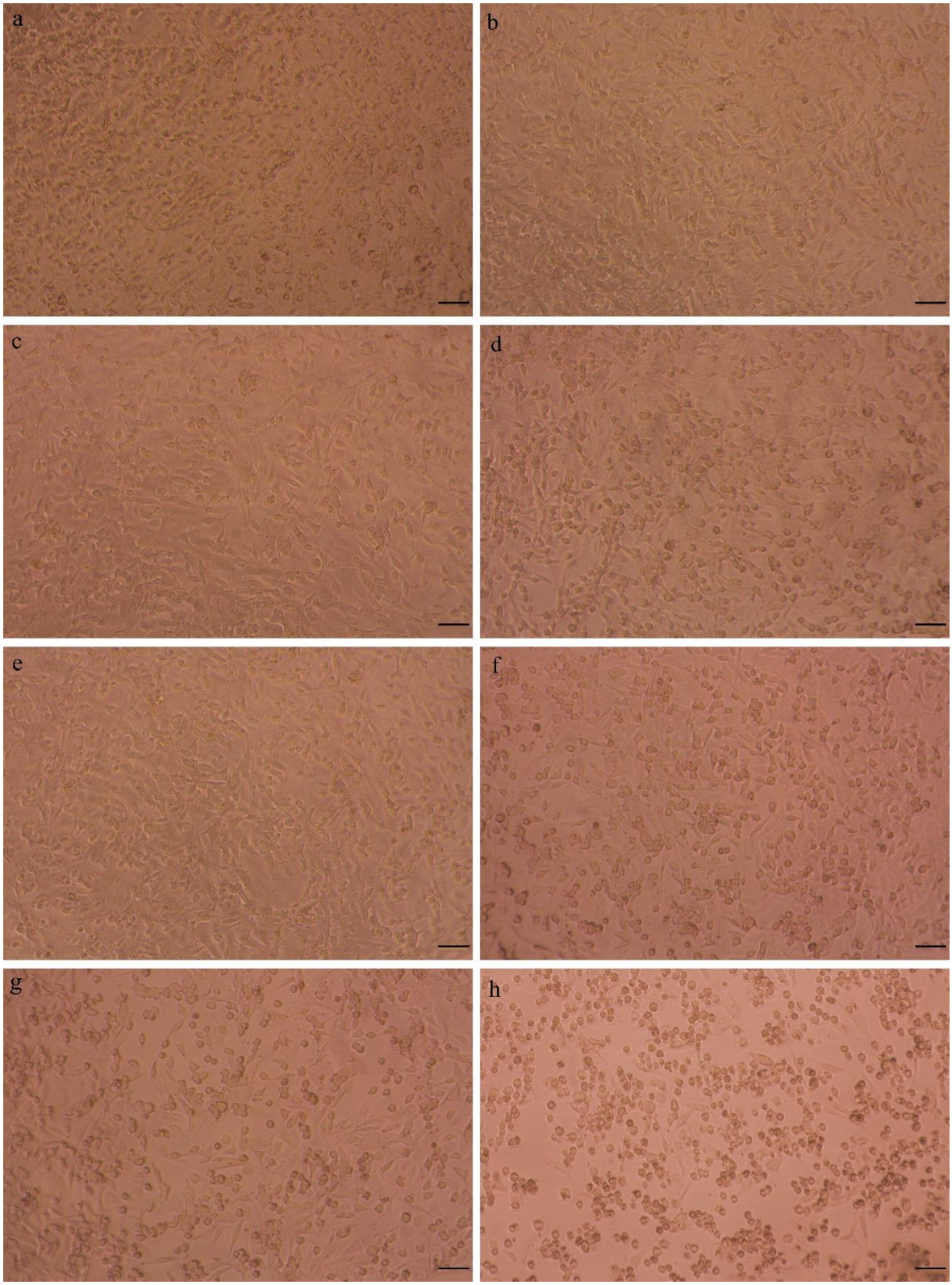
Şekil 4.1. DU145 hücre hattına 24 saat süreyle uygulanan Bileşik A'nın hücrelerde oluşturduğu morfolojik değişikliklerin incelenmesi (a: Kontrol, b: 50 µM, c: 75 µM, d: 100 µM, e:150 µM, f: 200 µM, g: 250 µM, h: 500 µM, Skala bar:50 µm).



Şekil 4.2. DU145 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan Bileşik A'nın hücrelerde oluşturduğu morfolojik değişikliklerin incelenmesi (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).



Şekil 4.3. DU145 hücre hattına 24 saat süreyle uygulanan Bileşik B'nin hücrelerde oluşturduğu morfolojik değişikliklerin incelenmesi (a: Kontrol, b: 75 µM, c: 100 µM, d: 150µM, e: 200 µM, f: 250 µM, g:500 µM, Skala bar:50 µm).

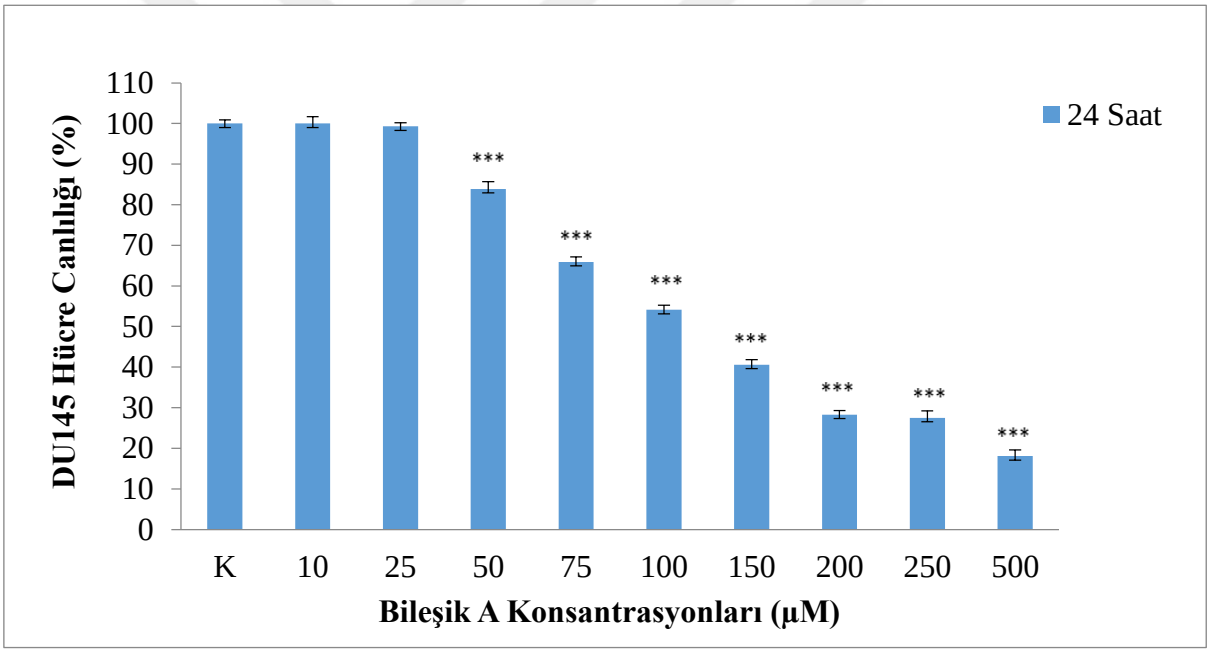


Şekil 4.4. DU145 hücre hattına 48 saat süreyle uygulanan Bileşik B'nin oluşturduğu morfolojik değişikliklerin incelenmesi (a: Kontrol, b: 50 µM, c: 75 µM, d: 100 µM, e:150 µM, f: 200 µM, g: 250 µM, h: 500 µM, Skala bar:50 µm).

4.3. Bileşik A'nın DU145 Hücre Hattında Oluşturduğu Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

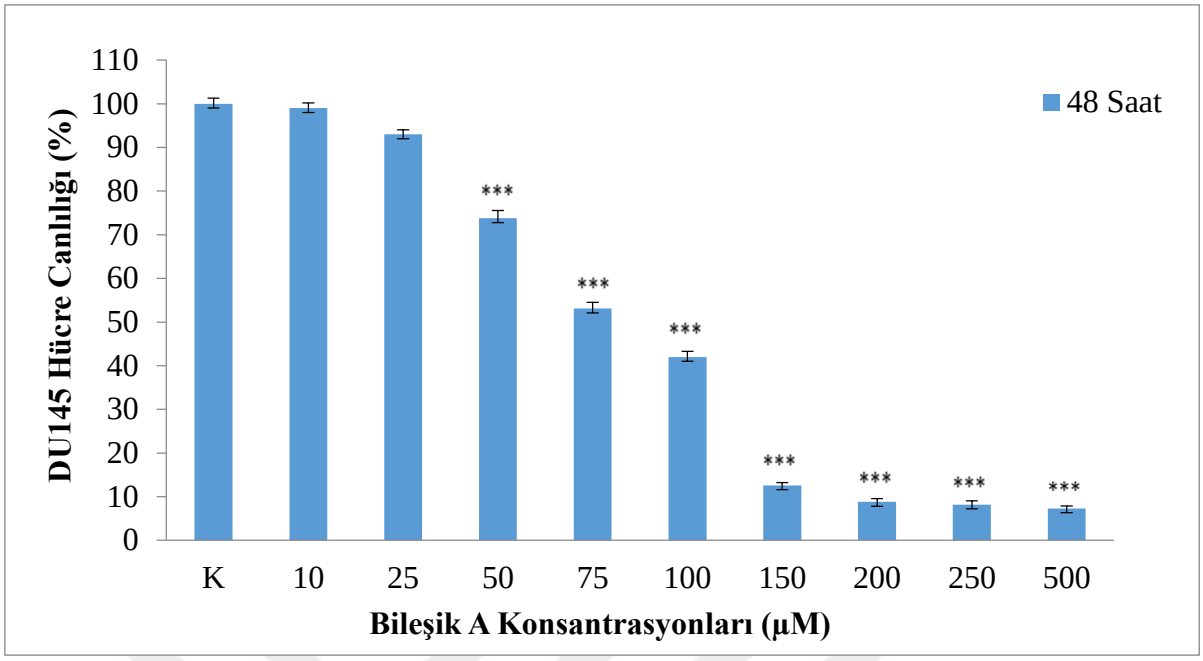
Çalışmamızda DU145 hücreleri Bileşik A'nın 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonları ile 24-48 saat süreyle muamele edilmiştir.

Yirmi dört saatlik muamele süresi sonunda Bileşik A'nın 10 ve 25 µM konsantrasyonlarının DU145 hücre çoğalması üzerinde herhangi bir inhibe edici etkisi gözlenmezken ($p>0,05$), 50 µM konsantrasyonundan itibaren hücre canlılığını % 16, 34, 46, 59, 72, 72 ve 82 oranında azalttığı belirlenmiştir (***: $p<0,001$; Şekil 4.5). Hücreleri % 50 oranında öldüren IC_{50} değeri 24 saat için 113 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Bileşik A konsantrasyonlarının 24 saat süreyle DU145 hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi. Kontrol grubu hücreleri % 100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır (K: Kontrol, ***: $p<0,001$).

Kırk sekiz saatlik muamele süresi sonunda ise Bileşik A'nın 10 ve 25 µM konsantrasyonlarının DU145 hücre çoğalması üzerinde herhangi bir inhibe edici etkisi gözlenmezken ($p>0,05$), 50 µM konsantrasyonundan itibaren hücre canlılığını sırasıyla % 26, 47, 58, 87, 91, 92 ve 93 oranında azalttığı tespit edilmiştir (***: $p<0,001$; Şekil 4.6). Kırk sekiz saat için bulunan IC_{50} değeri 80 µM olarak hesaplanmıştır.

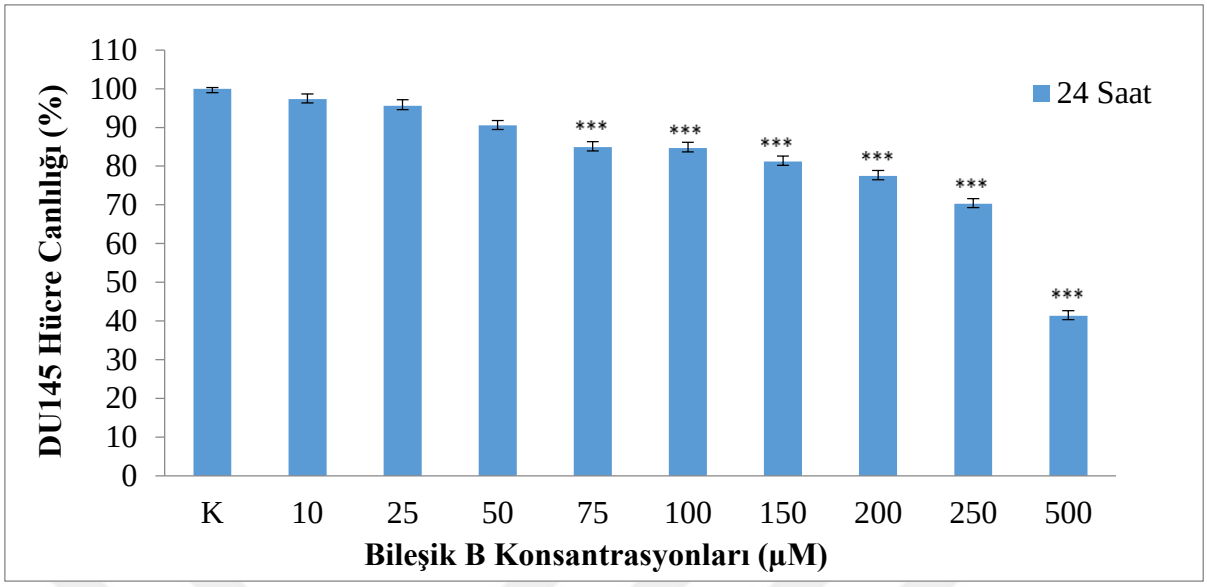


Şekil 4.6. Bileşik A konsantrasyonlarının 48 saat süreyle DU145 hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi. Kontrol grubu hücreleri % 100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır (K: Kontrol, ***: $p<0,001$).

4.4. Bileşik B'nin DU145 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

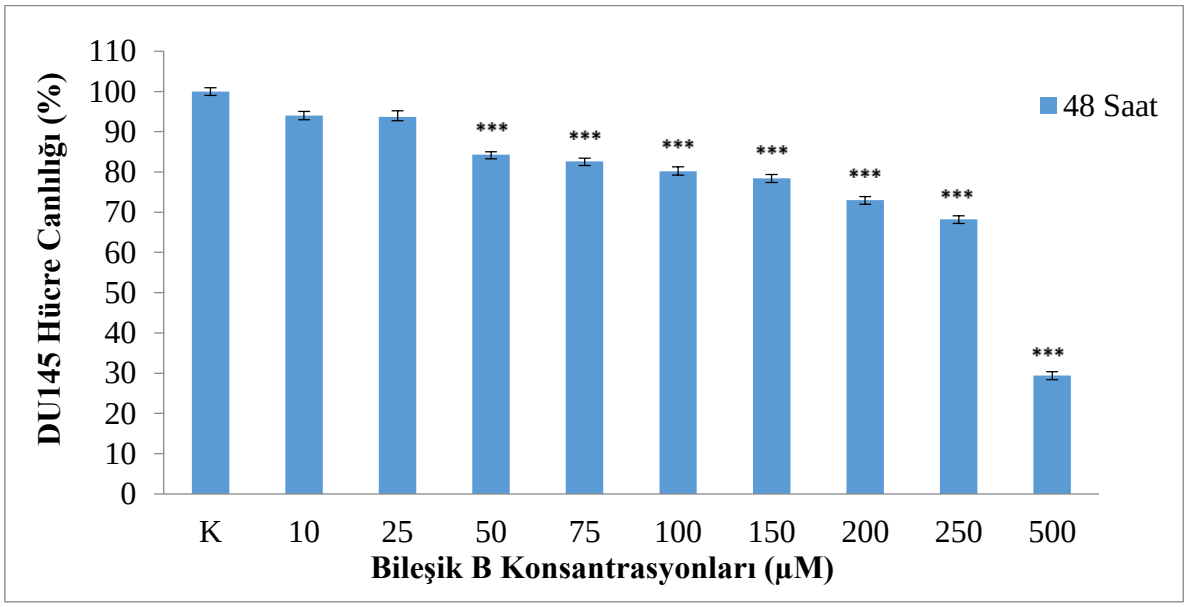
Çalışmamızda DU145 hücreleri Bileşik B'nin 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonları ile 24-48 saat süreyle muamele edilmiştir.

Yirmi dört saatlik muamele sonunda 10, 25 ve 50 µM konsantrasyonlarının DU145 hücre canlılığı üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisi gözlenmezken ($p>0,05$), 75 µM konsantrasyonundan itibaren hücre canlılığını sırasıyla % 15, 15, 19, 22, 30 ve 59 oranında azalttığı tespit edilmiştir (***: $p<0,001$; Şekil 4.7). Bileşik B'nin IC_{50} değeri 24 saat için 420 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Bileşik B konsantrasyonlarının 24 saat süreyle DU145 hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi. Kontrol grubu hücreleri % 100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır (K: Kontrol, ***: p<0,001).

Kırk sekiz saatlik muamele sonunda 10 ve 25 µM konsantrasyonlarının DU145 hücre canlılığı üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisi gözlenmezken (p>0,05), 50 µM konsantrasyonundan itibaren hücre canlılığında sırasıyla % 16, 17, 20, 22, 27, 32 ve 71 oranında azalma meydana gelmiştir (***: p<0,001; Şekil 4.8). Kırk sekiz saat için IC_{50} değeri 363 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.8. Bileşik B konsantrasyonlarının 48 saat süreyle DU145 hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi. Kontrol grubu hücreleri % 100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır (K: Kontrol, ***: p<0,001).

Her iki bileşiğin en yüksek konsantrasyonları için denenen çözücü kontrol uygulamalarında kullanılan DMSO miktarının hücre canlılığı üzerine herhangi bir etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir.

Yapılan farklı bir çalışmada 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında 72 saat süreyle HCT-116 hücrelerine uygulanan *meta*-ksilil bağlı *bis* benzimidazolyum tuzlarının anti-proliferatif etkisi MTT yöntemiyle araştırılmıştır. Sentezlenen 6 farklı bileşikten bileşik 8, 10 ve 12 iki tane bromür anyonu içermektedir ve IC_{50} değerleri sırasıyla 0,2 µM, 0,1 µM ve 1,1 µM olarak hesaplanmıştır. Bileşik 9, 11 ve 13 ise iki tane hekzaflorofosfat anyonu içermektedir. Yetmiş iki saatlik IC_{50} değerleri sırasıyla 4,1 µM, 8,7 µM ve 17,6 µM olarak belirlenmiştir. Bromür anyonu içeren bileşiklerin kolon kanseri üzerinde daha fazla sitotoksik etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir (Haque vd., 2012).

Iqbal vd. yaptıkları bir çalışmada insan kolon kanseri (HCT-116) ve lösemi (HL-60) hücre hatlarını kullanmışlardır. Hücrelere 48 saat süreyle 1,5625 ve 100 µM arasında değişen 7 farklı konsantrasyonda *para*-ksilil bağlı *bis*-benzimidazolyum tuzu ve gümüş içeren kompleks uygulayarak sitotoksik etkilerini MTT yöntemiyle incelemişlerdir. *Para*-ksilil bağlı *bis*-benzimidazolyum tuzu için HCT-116 hücre hattında IC_{50} değeri 5,6 µM, HL-60 hücre hattında IC_{50} değeri 4,1 µM olarak belirlenmiştir. Gümüş içeren kompleks için yapılan deneylerden elde edilen verilere göre HCT-116 hücre hattı için IC_{50} değeri 0,3 µM, HL-60 hücre hattı içinse IC_{50} değeri 0,08 µM olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre gümüş kompleksi, *para*-ksilil bağlı *bis*-benzimidazolyum tuzuna göre her iki hücre hattı içinde altı kat daha fazla sitotoksik etki göstermiştir (Iqbal vd., 2013).

Iqbal vd. yaptıkları başka bir çalışmada yeni sentezlenen benzimidazolyum bromür tuzu (II) ve gümüş içeren kompleksinin (III) anti-proliferatif etkilerini insan kolon kanseri (HCT-116) ve insan prostat kanseri (PC-3) hücre hatlarında araştırmışlardır. HCT-116 hücrelerinde denenen 0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5 ve 25 µM konsantrasyonlarının 48 saatlik uygulaması sonucunda IC_{50} değeri bileşik II için 4,4 µM, kompleks III için IC_{50} değeri 1,7 µM olarak hesaplanmıştır. PC-3 hücrelerinde denenen 6,25; 12,5; 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarının 48 saatlik uygulaması sonucunda bileşik II için IC_{50} değeri 159 µM, kompleks III için ise IC_{50} değeri 50,2 µM olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında

gümüş bağlı kompleksin (III) benzimidazolyum bromür tuzuna (II) göre her iki hücre hattında da çoğalmayı baskılayıcı etkisinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Iqbal vd., 2015).

Yapılan farklı bir çalışmada yeni sentez benzimidazolyum tuzları (2 ve 3), bu tuzların gümüş bağlı kompleksi (4) ve Pyridine Enhanced Precatalyst Preparation Stabilization and Initiation (PEPPSI) paladyum bağlı kompleksleri (6 ve 7) 0,5-200 µM konsantrasyonları arasında 72 saat süreyle insan kolon kanseri (DLD-1) ve meme kanseri (MDA-MB-231) hücrelerine uygulanmıştır. Yetmiş iki saat sonunda PEPPSI paladyum bağlı kompleksler (6 ve 7) hem DLD-1 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde zayıf anti-proliferatif etki göstererek IC_{50} değerlerinin 200 µM'dan büyük olduğu tespit edilmiştir. Gümüş bağlı kompleks (4) en güçlü anti-proliferatif etkiyi göstererek DLD-1 hücrelerinde IC_{50} değeri 12,41 µM, MDA-MB-231 hücrelerinde IC_{50} değeri 11,98 µM hesaplanmıştır. Yeni sentez benzimidazolyum tuzları 2 ve 3'ün ise DLD-1 hücrelerindeki IC_{50} değerleri sırasıyla 127,37 µM, 21,07 µM iken, MDA-MB-231 hücrelerinde 134,55 µM, 15,25 µM olarak belirlenmiştir. Benzimidazolyum tuzları birbiriyle karşılaştırıldığında benzimidazolyum tuzu 3'ün pentametilbenzil grubu içermesi nedeniyle benzil grubu içeren benzimidazolyum tuzu 2'den daha yüksek anti-proliferatif etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca benzimidazolyum tuzu 3 ve kompleks 4 yüksek sitotoksik etki göstererek DLD-1 ve MDA-MB-231 hücreleri için potansiyel anti kanser ilaç olma özelliği taşıdıkları rapor edilmiştir (Akkoç vd., 2016).

Yapısında kobalt (II) bulunan yeni sentez benzimidazol kompleksleri (2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 14) ve çinko (II) bulunan (1, 3, 5, 7, 9 ve 13) yeni sentez benzimidazol kompleksleri insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (A549) hücrelerine 0-100 µg/mL konsantrasyonları arasında 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanmıştır. Kırk sekiz saatlik uygulama sonucunda en güçlü anti-proliferatif etkiyi kompleks 1, 5 ve 8 göstermiş ve IC_{50} değerleri sırasıyla 27,84 µg/mL, 15,02 µg/mL ve 23,94 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Yetmiş iki saatlik uygulama sonunda ise kompleks 1, 4 ve 5 diğer komplekslere göre daha yüksek sitotoksik etki göstermiş ve IC_{50} değerleri sırasıyla 1,97 µg/mL, 1,87 µg/mL ve 1,9 µg/mL olarak belirlenmiştir. En güçlü sitotoksik etkiyi gösteren kompleks 4, 4-bromobenzil substitüenti içermektedir (Apohan vd., 2017).

Yapılan farklı bir çalışmada yeni sentezlenen benzimidazol-gümüş (I) kompleksleri (2a-d) ve 1-benzil-3*H*-benzimidazolyum *p*-toluensulfonat türevleri (1a-d) 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında 24 saat süreyle insan kolorektal kanser (Caco-2) ve insan meme kanseri (MCF-7) hücrelerine uygulanmıştır. Muamele süresi sonunda -benzil-3*H*-benzimidazolyum *p*-toluensulfonat türevlerinin (1a-d) anti-proliferatif bir etki göstermedikleri tespit edilmiştir. Ayrıca uygulanan komplekslerin MCF-7 hücrelerinde sitotoksik bir etki göstermedikleri ve 2a-d kompleksleri için de 2,5-100 µM arasındaki konsantrasyonlarda herhangi bir IC_{50} değeri hesaplanamadığı rapor edilmiştir. Yirmi dört saatlik uygulama sonunda en yüksek anti-proliferatif etkiyi yapısında klorid anyonu bulunduran 2d kompleksi göstermiş ve IC_{50} değeri 9 µM olarak hesaplanmıştır. 2a, 2b ve 2c kompleksleri de yüksek anti-proliferatif etki göstererek IC_{50} değerleri sırasıyla 57 µM, 40 µM ve 52 µM olarak belirlenmiştir (Karlık vd., 2018).

Yapılan diğer bir çalışmada 0,25; 0,5 ve 1 µg/mL konsantrasyonlarında 6 farklı 1,1`-(1,3-fenilen bis (metilen)) bis (3-alkil/aril-1*H*-benzimidazol-3-yum) tuzlarının sitotoksik etkisi HCT-116 ve MCF-7 hücrelerinde incelenmiştir. Bileşik 6 HCT-116 hücre çoğalmasını 1 µg/mL konsantrasyonunda % 75 oranında inhibe ederek en yüksek anti-proliferatif etkiyi gösterirken bileşik 1, 2, 3, 4 ve 5 tüm dozlarda zayıf sitotoksik etki göstermiştir. Bileşik 6'nın MCF-7 hücrelerinde 0,25; 0,5 ve 1 µg/mL konsantrasyonlarında çoğalmayı inhibe edici etki ise % 9, 15 ve 28 oranında tespit edilmiştir. HCT-116 hücrelerinde olduğu gibi MCF-7 hücrelerinde de bileşik 1, 2, 3, 4 ve 5 zayıf sitotoksik etki göstermiştir. Bileşik 6'nın heptil grubu içererek yüksek lipofilik karakterde olmasının anti-proliferatif etkiyi güçlendirdiği rapor edilmiştir (Huda vd., 2019).

Farklı benzimidazolyum türevleriyle farklı kanser hücrelerinde yapılan deneyler ve yaptığımız çalışmanın sonuçları birbirleriyle benzerlik göstererek benzimidazolyum türevlerinin kanser hücreleri üzerinde anti-proliferatif etki gösterdiği tespit edilmiştir.

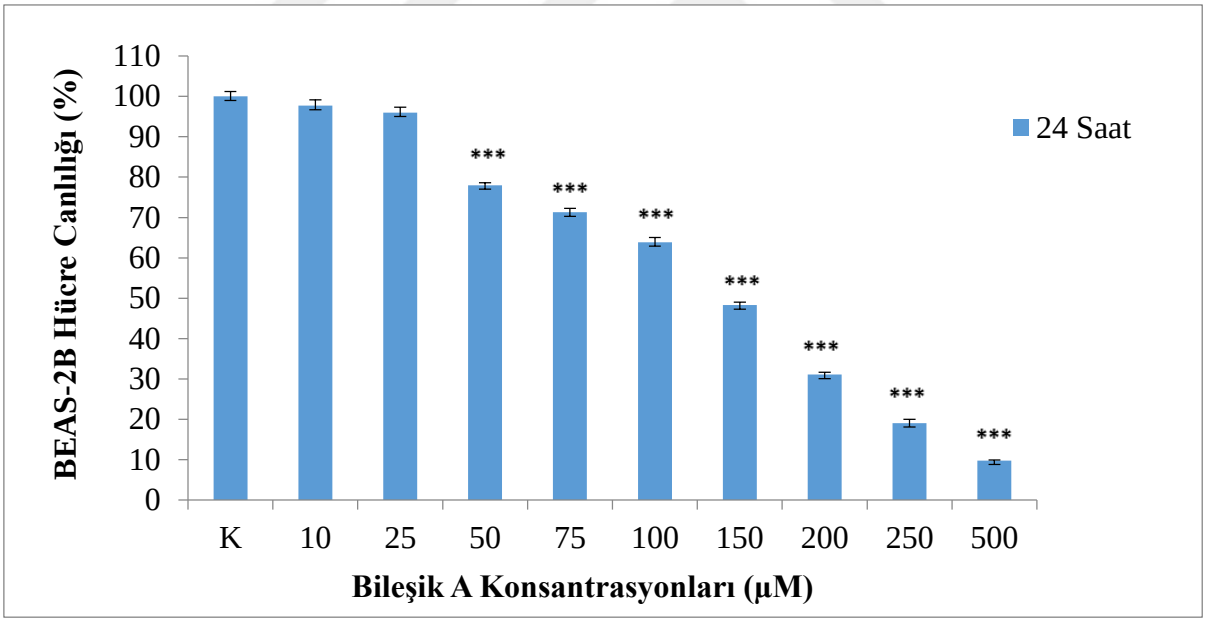
Çalışmaların sonuçlarından elde edilen veriler her yeni sentezlenen benzimidazolyum ve türevlerinin birbirinden farklı sitotoksik etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Sentez esnasında eklenen her bir atom bileşiğin yapısını değiştirmekle birlikte hücre üzerindeki sitotoksik etkisini de değiştirmektedir. Ayrıca yeni sentezlenen bu

bileşiklerin farklı hücre hatlarında da farklı sitotoksik etkilere sahip olduğu da açık bir şekilde gözlenmektedir.

4.5. Bileşik A'nın BEAS-2B Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmamızda BEAS-2B hücreleri Bileşik A'nın 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonları ile 24-48 saat süreyle muamele edilmiştir.

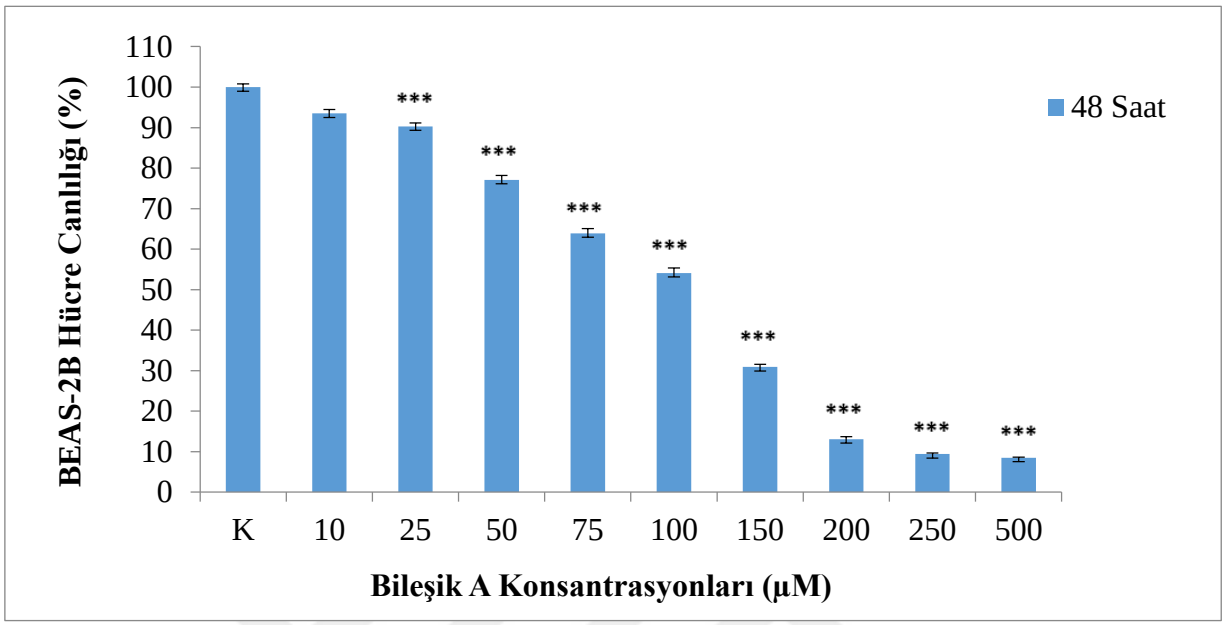
Yirmi dört saatlik muamele sonucunda 10 ve 25 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığını baskılayıcı herhangi bir etki gözlenmezken ($p>0,05$), 50 µM konsantrasyonundan itibaren hücre canlılığında sırasıyla % 22, 29, 36, 52, 69, 81 ve 90 oranında azalma meydana gelmiştir (***: $p<0,001$; Şekil 4.9). Yirmi dört saat için % 50 oranında hücreyi öldüren IC_{50} değeri 144 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.9. Bileşik A konsantrasyonlarının 24 saat süreyle BEAS-2B hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi. Kontrol grubu hücreleri % 100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır (***: $p<0,001$).

Kırk sekiz saatlik muamele süresi sonunda ise Bileşik A'nın 10 µM konsantrasyonunun BEAS-2B hücre çoğalması üzerinde herhangi bir baskılayıcı etkisi gözlenmezken ($p>0,05$), 25 µM konsantrasyonundan itibaren hücre canlılığını sırasıyla %

10, 23, 36, 46, 69, 87, 91 ve 91 oranında azalttığı tespit edilmiştir (***: p<0,001; Şekil 4.10). Kırk sekiz saatlik IC_{50} değeri 109 µM olarak hesaplanmıştır.



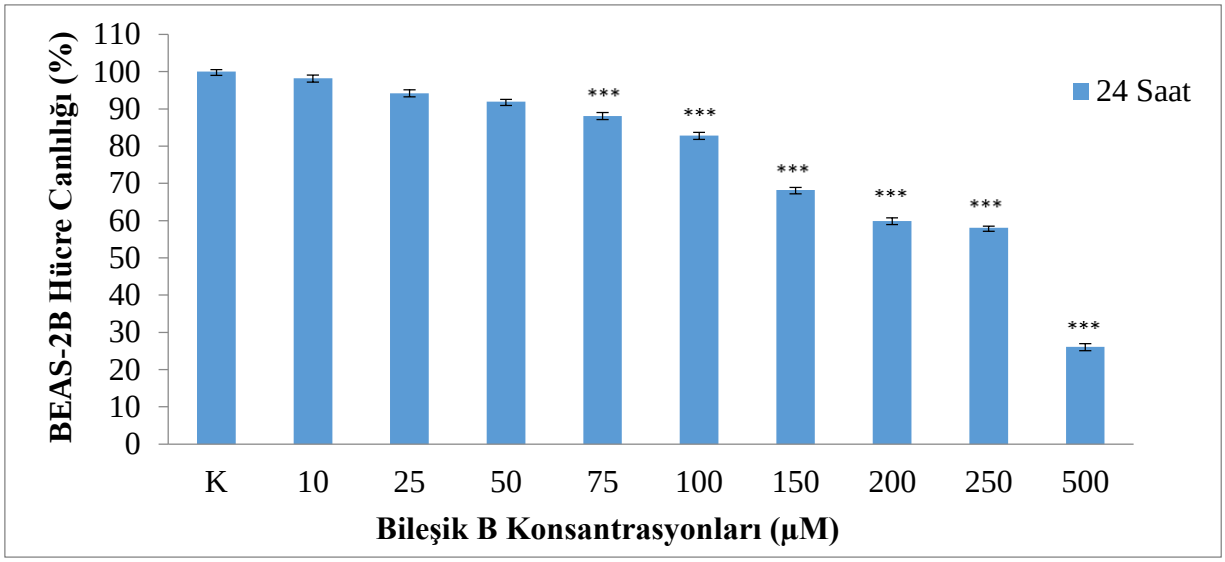
Şekil 4.10. Bileşik A konsantrasyonlarının 48 saat süreyle BEAS-2B hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi. Kontrol grubu hücreleri % 100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır (***: p<0,001).

Çalışmamızda Bileşik A konsantrasyonlarının DU145 ve BEAS-2B hücre dizisinde yarattığı toksik etki karşılaştırılmıştır. DU145 hücrelerinde Bileşik A'nın BEAS-2B hücrelerine oranla sitotoksik aktivitesinin fazla olduğu hem 24 hem de 48 saatte belirlenmiştir.

4.6. Bileşik B'nin BEAS-2B Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

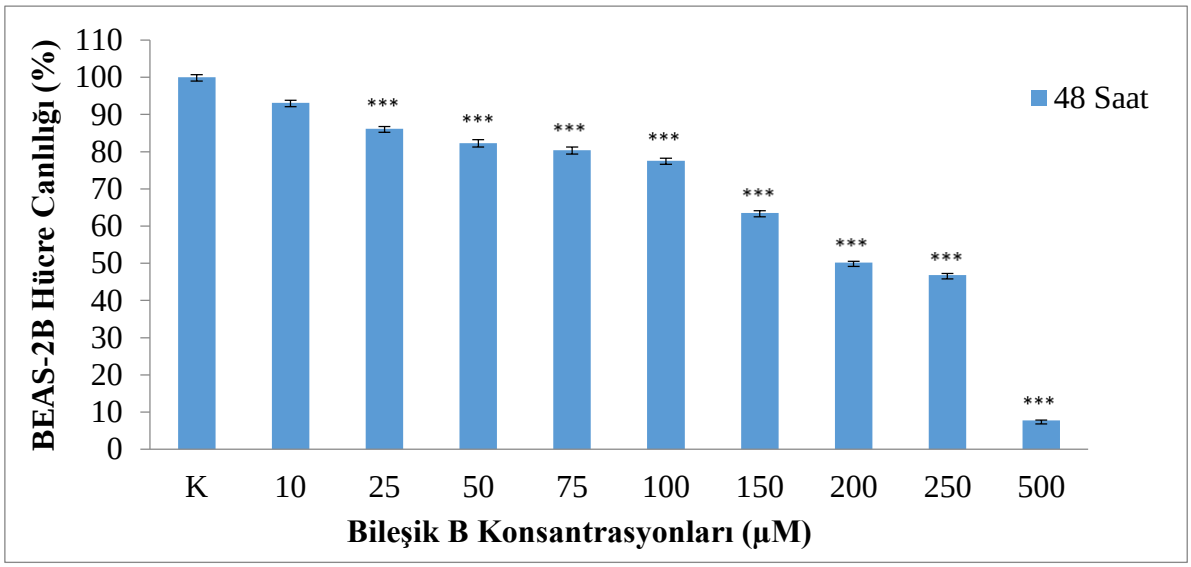
Çalışmamızda BEAS-2B hücre hattı Bileşik B'nin 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarıyla 24 ve 48 saat süreyle muamele edilmiştir.

Yirmi dört saatlik muamele sonucunda 10, 25 ve 50 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığı üzerinde herhangi bir baskılayıcı etki gözlenmezken (p>0,05), 75 µM konsantrasyonundan itibaren hücre canlılığında sırasıyla % 12, 17, 32, 40, 42 ve 74 azalma meydana gelmiştir (***: p<0,001;Şekil 4.11). Yirmi dört saat için % 50 oranında hücreyi öldüren IC_{50} değeri 307 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. Bileşik B konsantrasyonlarının 24 saat süreyle BEAS-2B hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi. Kontrol grubu hücreleri % 100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır (***: p<0,001).

Kırk sekiz saatlik uygulama sonucunda ise Bileşik B'nin 10 µM konsantrasyonunun BEAS-2B hücre çoğalması üzerinde herhangi bir inhibe edici etkisi bulunmazken (p>0,05), 25 µM konsantrasyonundan itibaren % 14, 18, 20, 22, 36, 50, 53 ve 92 oranında hücre ölümüne neden olmuştur (***: p<0,001; Şekil 4.12). Kırk sekiz saat için % 50 oranında hücreyi öldüren IC_{50} değeri 200 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.12. Bileşik B konsantrasyonlarının 48 saat süreyle BEAS-2B hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi. Kontrol grubu hücreleri % 100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır (***: p<0,001).

Çalışmamızda Bileşik B konsantrasyonlarının DU145 ve BEAS-2B hücrelerinde yarattığı toksik etki de karşılaştırılmıştır. DU145 hücrelerinde Bileşik B'nin daha az toksik etki gösterirken, sağlıklı BEAS-2B hücrelerinde daha toksik olduğu hem 24 hem de 48 saatte belirlenmiştir.

Bileşik A ve B'nin BEAS-2B hücrelerinde oluşturduğu sitotoksik etki karşılaştırıldığında ise Bileşik A'nın Bileşik B'ye oranla sağlıklı hücre dizisi üzerinde daha toksik olduğu da gözlenmektedir.

	BİLEŞİK A 24 SAAT		**BİLEŞİK A 48 SAAT**	
	DU145	**BEAS-2B**	**DU145**	**BEAS-2B**
KONTROL	% 100 canlı	% 100 canlı	% 100 canlı	% 100 canlı
10 µM	Etki yok	Etki yok	Etki yok	Etki yok
25 µM	Etki yok	Etki yok	Etki yok	% 90 canlı
50 µM	% 84 canlı	% 78 canlı	% 74 canlı	% 77 canlı
75 µM	% 66 canlı	% 71 canlı	% 53 canlı	% 64 canlı
100 µM	% 54 canlı	% 64 canlı	% 42 canlı	% 54 canlı
150 µM	% 41 canlı	% 48 canlı	%13 canlı	% 31 canlı
200 µM	% 28 canlı	% 31 canlı	% 9 canlı	% 13 canlı
250 µM	% 28 canlı	% 19 canlı	% 8 canlı	% 9 canlı
500 µM	% 18 canlı	% 10 canlı	% 7 canlı	% 9 canlı

Şekil 4.13. Bileşik A'nın 24 ve 48 saatlik uygulamaları sonucunda DU145 ve BEAS-2B hücrelerindeki canlılık oranları.

	BİLEŞİK B 24 SAAT		BİLEŞİK B 48 SAAT	
	DU145	**BEAS-2B**	**DU145**	**BEAS-2B**
KONTROL	% 100 canlı	% 100 canlı	% 100 canlı	% 100 canlı
10 µM	Etki yok	Etki yok	Etki yok	Etki yok
25 µM	Etki yok	Etki yok	Etki yok	% 86 canlı
50 µM	Etki yok	Etki yok	% 84 canlı	% 82 canlı
75 µM	% 85 canlı	% 88 canlı	% 83 canlı	% 80 canlı
100 µM	% 85 canlı	% 83 canlı	% 80 canlı	% 78 canlı
150 µM	% 81 canlı	% 68 canlı	% 78 canlı	% 64 canlı
200 µM	% 78 canlı	% 60 canlı	% 73 canlı	% 50 canlı
250 µM	% 70 canlı	% 58 canlı	% 68 canlı	% 47 canlı
500 µM	% 41 canlı	% 26 canlı	% 29 canlı	% 8 canlı

Şekil 4.14. Bileşik B'nin 24 ve 48 saatlik uygulamaları sonucunda DU145 ve BEAS-2B hücrelerindeki canlılık oranları.

	24 SAAT IC_{50}		48 SAAT IC_{50}	
	BİLEŞİK A	**BİLEŞİK B**	**BİLEŞİK A**	**BİLEŞİK B**
DU145	113 µM	420 µM	80 µM	363 µM
BEAS-2B	144 µM	307 µM	109 µM	200 µM

Şekil 4.15. Bileşik A ve B'nin DU145 ve BEAS-2B hücrelerinde 24 ve 48 saatlik uygulamaları sonucunda hesaplanan IC_{50} değerleri.

Iqbal vd. yaptıkları çalışmada yeni sentezlenen benzimidazolyum bromür tuzu (II) ve gümüş içeren bir kompleksi (III)'nin insan kolon kanseri (HCT-116) ve insan prostat

kanseri (PC-3) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini incelemişlerdir. Aynı çalışmada bu maddelerin sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini de gözlemlemek için insan normal kolon fibroblast hücre hattını (CCD-18Co) kullanmışlardır. Çalışmada sağlıklı hücre hattı olarak seçilen CCD-18Co hücre hattında her iki madde için hesaplanan IC_{50} değerinin 200 µM'dan daha yüksek olduğu ifade edilirken, HCT-116 kanser hücrelerinde IC_{50} değeri bileşik II için 4,4 µM, kompleks III için IC_{50} değeri 1,7 µM olarak hesaplanmıştır. PC-3 hücrelerinde ise bileşik II için IC_{50} değeri 159 µM, kompleks III için ise IC_{50} değeri 50,2 µM olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak denen benzimidazolyum bromür tuzu (II) ve gümüş içeren kompleksi (III)'nin sağlıklı hücreler üzerinde daha az toksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Iqbal vd., 2015). Ayrıca çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan 5-Fluorourasil'in IC_{50} değeri normal hücreler üzerinde 19 µM olarak hesaplanırken, CCD-18Co hücre hattında her iki madde için hesaplanan IC_{50} değerinin 200 µM'dan daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde kemoterapide aktif olarak kullanılan bir ajan olan 5-Fluorourasil'e oranla yeni sentezlenen her iki maddenin sağlıklı hücre üzerinde daha az toksisite oluşturduğu belirlenmiştir.

Yapılan literatür araştırmasında yeni sentez benzimidazolyum tuzları (2 ve 3), bu tuzların gümüş bağlı kompleksi (4) ve Pyridine Enhanced Precatalyst Preparation Stabilization and Initiation (PEPPSI) paladyum bağlı kompleksleri (6 ve 7) 0,5-200 µM konsantrasyonları arasında 72 saat süreyle embriyonik böbrek hücrelerine (HEK 293T) uygulanmıştır. Muamele sonunda PEPPSI pladyum bağlı komplekslerinin IC_{50} değerlerinin 200 µM'dan büyük olduğu tespit edilerek anti-proliferatif etki göstermedikleri rapor edilmiştir. En yüksek anti-proliferatif etkiyi gümüş bağlı kompleksin (4) gösterdiği ve IC_{50} değerinin 4,21 µM olarak hesaplandığı belirtilmiştir. Benzimidazolyum tuzları için ise (2 ve 3) IC_{50} değerleri sırasıyla 64,06 µM ve 8,73 µM olarak hesaplanmıştır (Akkoç vd., 2016).

Yapısında kobalt (II) bulunan yeni sentez benzimidazol kompleksleri (2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 14) ve çinko (II) bulunan (1, 3, 5, 7, 9 ve 13) yeni sentez benzimidazol kompleksleri BEAS-2B hücrelerine 0-100 µg/mL konsantrasyonları arasında 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanmıştır. Sentezlenen 14 kompleks arasından 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonucunda en güçlü anti-proliferatif etkiyi kompleks 4, 5 ve 8 gösterirken, 72 saatlik uygulama sonucunda ise en güçlü anti-proliferatif etkiyi kompleks 4, 6 ve 8'in gösterdiği tespit edilmiştir. Kompleks 4, 5 ve 8'in 24 saatlik uygulamaları sonucunda IC_{50} değerleri sırasıyla

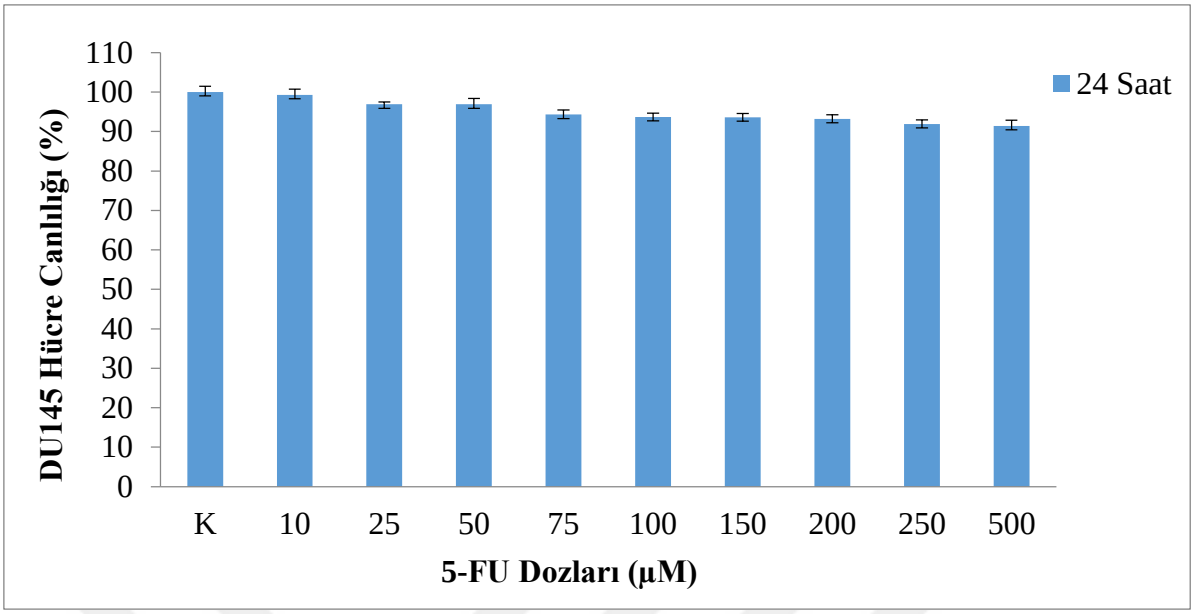
40,54 µg/mL; 37,81 µg/mL ve 39,78 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Kırk sekiz saatlik uygulamalar sonucunda ise IC_{50} değerleri sırasıyla 28,57 µg/mL; 33,35 µg/mL ve 20,76 µg/mL olarak belirlenmiştir. Yetmiş iki saatlik uygulamanın sonucunda kompleks 4, 6 ve 8 için IC_{50} değerlerinin sırasıyla 24,5 µg/mL, 1,99 µg/mL ve 12 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar dikkate alındığında yapısında kobalt bulunan komplekslerin daha güçlü sitotoksik etki gösterdikleri rapor edilmiştir. (Apohan vd., 2017).

Yapılan farklı bir çalışmada yeni sentezlenen benzimidazol-gümüş (I) kompleksleri (2a-d) sağlıklı fare fibroblast hücrelerine (L-929) 24 saat süreyle uygulanarak oluşturduğu etkiler incelenmiştir. 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında uygulanan benzimidazol-gümüş kompleksleri için IC_{50} değeri MTT yönteminden elde edilen sonuçlara göre hesaplanmıştır. L-929 hücrelerinde en güçlü anti-proliferatif etkiyi 2d kompleksi göstermiştir. 2d kompleksinin IC_{50} değeri 10 µM olarak hesaplanırken, 2a kompleksi için IC_{50} değeri 26 µM, 2b kompleksi için 47 µM, 2c kompleksi için 39 µM olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak uygulanan sisplatinin IC_{50} değeri 46 µM olarak bulunmuştur. 2d kompleksinin sisplatine göre 5 kat güçlü anti-proliferatif etkiye sahip olmasının yapısında bulunan klorid anyonundan kaynaklandığı rapor edilmiştir (Karlık vd., 2018).

4.7. 5-Fluorourasil'in DU145 Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksisitesinin Belirlenmesi

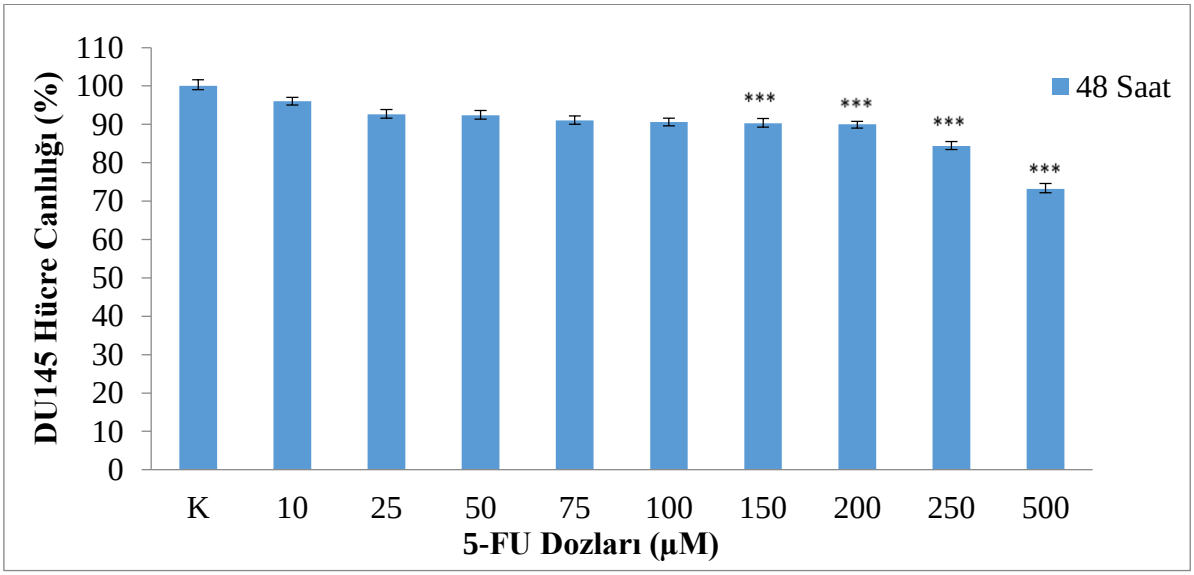
Çalışmamızda DU145 hücreleri 24 ve 48 saat süreyle 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM 5-Fluorourasil dozlarıyla muamele edilmiştir.

Yirmi dört saatlik muamele sonunda 10, 25 ve 50 µM dozlarında hücre canlılığı üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Hücre çoğalmasını baskılayıcı etkinin ise 75 µM dozundan itibaren başladığı belirlenmiştir. Hücre canlılığındaki azalma oranı sırasıyla % 6, 6, 6, 7, 8 ve 9 olarak hesaplanmıştır. Fakat bu azalma istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık göstermemektedir ($p>0,05$). Bu nedenle denenen dozlar için herhangi bir IC_{50} değeri hesaplanamamıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. 5-Fluorourasil dozlarının 24 saat süreyle DU145 hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi. Kontrol grubu hücreleri % 100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır (K: Kontrol, $p>0,05$).

Kırk sekiz saatlik uygulama sonunda ise 5-Fluorourasil 10, 25, 50, 75 ve 100 µM dozlarında hücre çoğalması üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı belirlendi ($p>0,05$). Sitotoksik etkinin 150 µM dozundan itibaren başladığı ve sırasıyla % 10, 10, 16 ve 27 oranında hücre canlılığında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (***: $p<0,001$). Bununla beraber 48 saat için de herhangi bir IC_{50} değeri hesaplanamamıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. 5-Fluorourasil dozlarının 48 saat süreyle DU145 hücre hattına uygulanması sonucu oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi. Kontrol grubu hücreleri % 100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır (K: Kontrol, ***: $p<0,001$).

Györffy vd. yaptıkları bir çalışmada 30 farklı kanser hücre hattı üzerinde 11 antikanser ilacı kullanarak bu ilaçların hücreler üzerindeki direnç mekanizmalarını ve gen ekspresyonlarını incelemişlerdir. Yapılan çalışmada DU145 hücre hattının 5-Fluorourasil'e karşı % 88,1 dirençli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Çalışma 5-Fluorourasil için IC_{50} değeri bulanmamıştır. Bu bulgular çalışmamızı destekler niteliktedir. Ayrıca yapılan çalışmada prostat kanseri (SW13), göğüs kanseri (MDA-MB-231), hepatosellüler karsinom (SNU449, SNU475, Hep3B), hücre hatlarının da 5-Fluorourasil'e karşı dirençli olduğu rapor edilmiştir (Györffy vd., 2006).

Yapılan farklı bir çalışmada ise PC-3 hücreleri 24 saat süreyle 0, 50, 100, 150 ve 200 µg/mL dozlarında 5-Fluorourasil ile muamele edilmiştir. Yirmi dört saat süre sonunda IC_{50} değeri 814,1 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Yang vd., 2012).

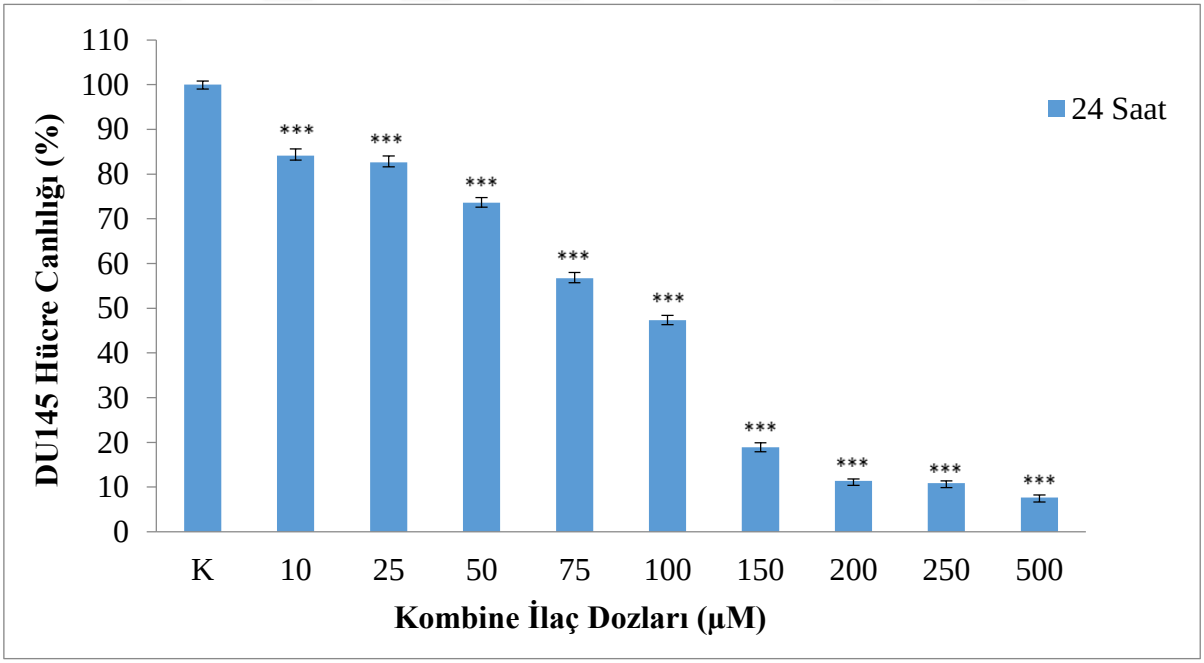
Yapılan bir çalışmada 72 saat süreyle 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µM dozlarında HCT-116 hücrelerine uygulanan 5-Fluorourasil'in sitotoksik etkisi MTT yöntemiyle belirlenmiştir. 5-Fluorourasil'in HCT-116 hücrelerindeki 72 saatlik IC_{50} değeri 19,2 µM olarak tespit edilmiştir (Haque vd., 2013).

HCT-116 hücrelerinde pozitif kontrol olarak kullanılan 5-Fluorourasil'in 0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5 ve 25 µM dozlarının 48 saatlik uygulaması sonucunda IC_{50} değeri 7,6 µM olarak belirlenirken, HCT-116 hücrelerinde aynı konsantrasyonlarda bileşik II ve III'ün 48 saatlik uygulanmaları sonucunda bileşik II için IC_{50} değeri 4,4 µM, kompleks III için IC_{50} değeri 1,7 µM olarak hesaplanmıştır. Aynı çalışmada prostat kanseri hücre dizilerinden birisi olan PC-3 hücrelerinde pozitif kontrol olarak kullanılan 5-Fluorourasil'in 6,25; 12,5; 25, 50, 100 ve 200 µM dozlarında 48 saatlik uygulanması sonucunda IC_{50} değeri 13,7 µM olarak belirlenmiştir. PC-3 hücrelerine aynı konsantrasyonlarda 48 saatlik bileşik II ve kompleks III'ün uygulanması sonucunda bileşik II için IC_{50} değeri 159 µM, kompleks III için ise IC_{50} değeri 50,2 µM olarak hesaplanmıştır (Iqbal vd., 2015). Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, HCT-116 hücrelerinde denenen bileşik II ve III'ün sitotoksik etkisinin çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan 5-Fluorourasil'e göre daha yüksek olduğu belirlenirken, PC-3 hücrelerinde ise denen bileşiklerin sitotoksik etkisinin 5-Fluorourasil'den daha az olduğu belirlenmiştir. Bu da bize bileşiklerin farklı hücreler üzerinde farklı sitotoksik etkilere neden olabileceğini göstermektedir.

Yapılan diğer bir çalışmada ise pozitif kontrol olarak kullanılan 5-Fluorourasil'in 0, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µM dozları MDA-MB-231 ve HCT-116 hücrelerine uygulanmıştır. 5-Fluorourasil'in MDA-MB-231 hücrelerindeki IC_{50} değeri 7,5 µM olarak hesaplanırken, HCT-116 hücrelerindeki IC_{50} değeri ise 5,5 µM olarak hesaplanmıştır (Habib vd., 2019).

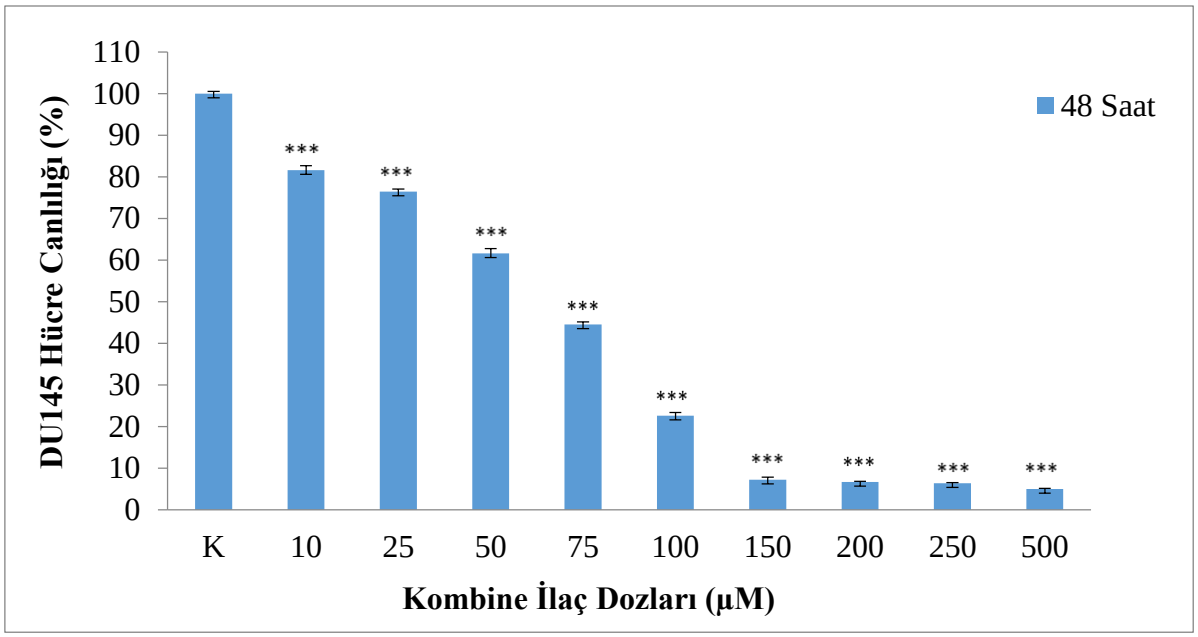
4.8. Bileşik A Konsantrasyonları İle 5-Fluorourasil Dozlarının Kombine Uygulamasının Oluşturduğu Sitotoksik Etkinin İncelenmesi

Bileşik A'nın 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 konsantrasyonları ile 5-Fluorourasil'in 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 dozları 1:1 oranında kombine olarak hazırlanarak 24 ve 48 saat süreyle DU145 hücrelerine uygulanmıştır. Yirmi dört saatlik muamele sonucunda DU145 hücre hattına uygulanan tüm dozların hücre çoğalmasını baskılayıcı bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Dozlara göre bu etki sırasıyla % 16, 17, 26, 43, 53, 81, 89, 89 ve 92 oranında hesaplanmıştır (***: $p<0,001$; Şekil 4.18). Bileşik A konsantrasyonları ve 5-Fluorourasil dozlarının 24 saatlik kombine uygulanması sonucunda IC_{50} değeri 91 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.18. Bileşik A konsantrasyonları ve 5-Fluorourasil dozlarının 24 saat süreyle 1:1 oranında kombine uygulamasının DU145 hücre hattında oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi. Kontrol grubu hücreleri % 100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır (K: Kontrol, ***: $p<0,001$).

Kırk sekiz saat süre ile 1:1 oranında kombine uygulanan Bileşik A konsantrasyonları ile 5-Fluorourasil dozlarının tüm dozlarda DU145 hücre çoğalmasını baskılayıcı bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Dozlara göre bu etki sırasıyla % 18, 24, 38, 55, 77, 93, 93, 94 ve 95 oranında hesaplanmıştır (***: p<0,001; Şekil 4.19). Kırk sekiz saat için IC_{50} değeri 66 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.19. Bileşik A konsantrasyonları ve 5-Fluorourasil dozlarının 48 saat süreyle 1:1 oranında kombine uygulamasının DU145 hücre hattında oluşturduğu mitokondriyal aktivitenin belirlenmesi. Kontrol grubu hücreleri % 100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır (K: Kontrol,***: p<0,001).

MTT sonuçlarına göre Bileşik A ve 5-Fluorourasil arasındaki antagonistik ve sinerjistik etki ise ilaç etkileşim katsayısı (CDI) formülüne göre, kombine doz grubu absorbansının Bileşik A absorbans değeri ve 5-Fluorourasil absorbans değeri çarpımına bölünüp yüz ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır.

CDI<1 değerinde sinerjistik etkileşim, CDI>1 değerinde antagonistik etkileşim olduğu kabul edilmiştir (Daphu vd., 2014).

DU145 24 SAAT				
	BİLEŞİK A CANLILIK	**5-FU CANLILIK**	**KOMBİNE CANLILIK**	**CDI**
KONTROL	% 100	% 100	% 100	
10 µM	% 100	% 99,3	% 84,1	0,85
25 µM	% 99,3	% 96,9	% 82,6	0,86
50 µM	% 83,9	% 96,9	% 73,6	0,91
75 µM	% 65,9	% 94,3	% 56,7	0,91
100 µM	% 54,1	% 93,7	% 47,3	0,93
150 µM	% 40,6	% 93,6	% 18,9	0,5
200 µM	% 28,3	% 93,2	% 11,4	0,43
250 µM	% 27,5	% 91,9	% 10,9	0,43
500 µM	% 18,1	% 91,4	% 7,7	0,47

Şekil 4.20. Bileşik A, 5-Fluorourasil ve kombine uygulamaların 24 saat süreyle DU145 hücre hattında oluşturduğu mitokondriyal aktivite sonucu hücrelerdeki canlılık yüzdeleri. Kontrol grubu hücreleri % 100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır.

Çalışmada Bileşik A ve 5-Fluorourasil'in kombine uygulanması sonucunda sinerjistik bir etki gösterdiği ve bu sayede hücre çoğalması üzerindeki sitotoksisiteyi arttırdıkları görülmüştür. Yirmi dört saat süreyle uygulanan 10, 25, 50, 75 ve 100 µM Bileşik A ve 5-Fluorourasil'in kombine uygulanması sonucunda zayıf bir sinerjistik etki gösterdiği hesaplanmıştır. Bununla beraber 150 µM dozundan itibaren ise ilaç etkileşimlerinin hücre çoğalması üzerindeki baskılayıcı etkisinin daha fazla olduğu gözlenmiş ve güçlü bir sinerjistik etki oluşturduğu hesaplanmıştır.

DU145 48 SAAT				
	BİLEŞİK A CANLILIK	**5-FU CANLILIK**	**KOMBİNE CANLILIK**	**CDI**
KONTROL	% 100	% 100	% 100	
10 µM	% 99	% 96	% 81,6	0,86
25 µM	% 93	% 92,6	% 76,4	0,89
50 µM	% 73,8	% 92,4	% 61,6	0,90
75 µM	% 53,1	% 91	% 44,5	0,92
100 µM	% 42	% 90,6	% 22,6	0,59
150 µM	% 12,6	% 90,3	% 7,2	0,63
200 µM	% 8,8	% 90	% 6,7	0,85
250 µM	% 8,2	% 84,4	% 6,4	0,92
500 µM	% 7,3	% 73,2	% 5	0,94

Şekil 4.21. Bileşik A, 5-Fluorourasil ve kombine uygulamaların 48 saat süreyle DU145 hücre hattında oluşturduğu mitokondriyal aktivite sonucu hücrelerdeki canlılık yüzdeleri. Kontrol grubu hücreleri % 100 kabul edilerek hesaplama yapılmıştır.

Kırk sekiz saat süreyle uygulanan 10, 25, 50 ve 75 µM dozlarında Bileşik A ve 5-Fluorourasil'in kombine uygulanması sonucunda zayıf bir sinerjistik etki gösterdiği hesaplanmıştır. Bununla beraber 100 ve 150 µM uygulamalarında güçlü bir sinerjistik etki oluşturduğu, fakat bu etkinin 200, 250 ve 500 µM uygulamalarında ise tekrar zayıf sinerjistik etkiye dönüştüğü belirlenmiştir.

Kanser tedavisinde karşılaşılan en önemli sıkıntılardan birisi tedavi amaçlı kullanılan ilaçlara karşı ilaç direncinin gelişmesidir. 5-Fluorourasil prostat kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılmakla birlikte, hastalığın tedavisinde kanser hücrelerinin ilaca karşı direnç oluşturmasına neden olabilmektedir. DU145 hücreleriyle yapılan bir çalışmada 5-Fluorourasil'e karşı hücrelerin % 88.1 oranında dirençli olduğu belirlenmiştir (Györffy vd., 2006). Direnç kazanan hücreleri öldürmek oldukça zorlaşmakta ve bu durum tedavi sürecini zora sokmaktadır. Bu nedenle günümüzde direnç kazanan hücreleri yok etmek için daha etkili kemoterapötik ajanların arayışı sürmektedir. Literatür araştırmasında herhangi bir benzimidazolyum türevinin ve 5-Fluorourasil'in kombine uygulamasıyla ilgili bir çalışmaya

rastlanmamıştır. Çalışmamızda ilk defa DU145 hücrelerinde benzimidazolyum türevi olan Bileşik A konsantrasyonları ile 5-Fluorourasil dozları birlikte kombine olarak uygulanmış ve 5-Fluorourasil sitotoksisitesini arttırdığı belirlenmiştir.

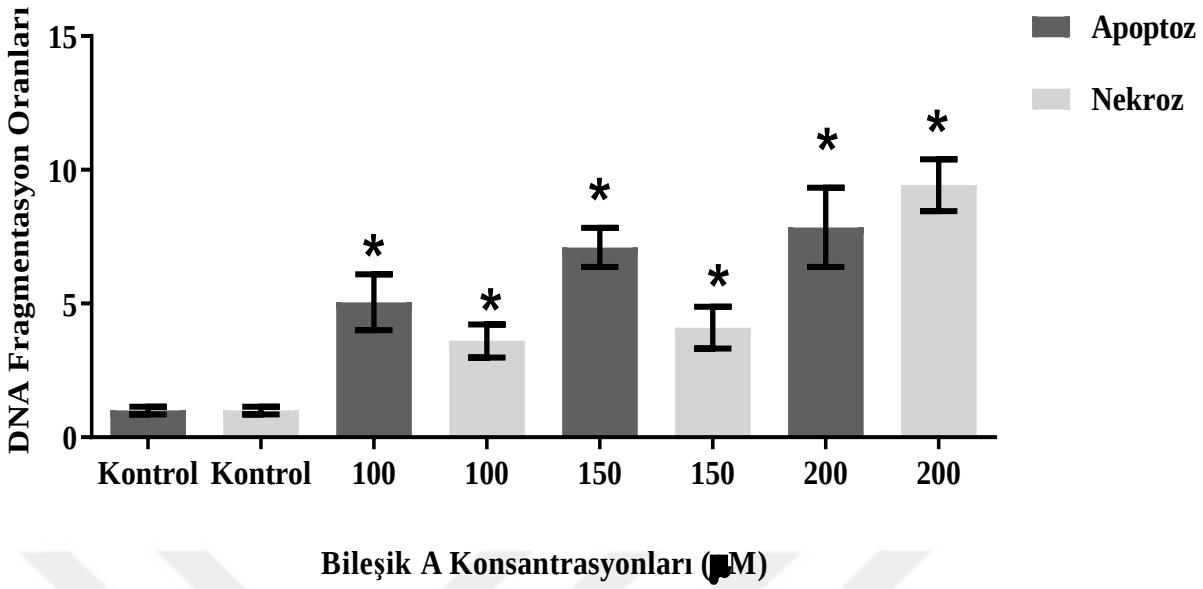
4.9. Apoptotik ve Nekrotik DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi

DU145 hücrelerindeki apoptotik ve nekrotik hücre ölümünün belirlenmesi için Hücre Ölümü Belirleme ELISA Kiti kullanılmıştır. Bileşik A'nın MTT sonuçlarından elde edilen verilere göre 100, 150 ve 200 µM konsantrasyonları seçilmiş ve kuyulara seçilen konsantrasyonlar ilave edilerek hücreler 24 saat süre ile muamele edilmiştir.

Bileşik A'nın seçilen 100, 150 ve 200 µM konsantrasyonlarının DU145 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü 100 µM konsantrasyonunda 5 kat, 150 µM konsantrasyonunda 7,1 kat ve 200 µM konsantrasyonunda ise 7,9 kat arttırdığı görülmüştür. Özellikle Bileşik A'nın doz artışına bağlı olarak apoptotik hücre ölümünü arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.22.).

Yapılan istatistiksel analizlere göre Bileşik A'nın DU145 hücrelerinde nekrotik hücre ölümünü 100 µM konsantrasyonunda 3,6 kat, 150 µM konsantrasyonunda 4,1 kat ve 200 µM konsantrasyonunda ise 9,4 kat arttırdığı görülmüştür. Özellikle Bileşik A'nın 200 µM konsantrasyonunda nekrotik hücre ölümünün arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.22.).

Çalışmamızla benzer bir şekilde Iqbal vd. tarafından yapılan bir çalışmada HCT-116 hücreleri benzimidazolyum-gümüş kompleks III'ün 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarıyla muamele edilmiş ve hücreler Hoechst 33342 ile boyanarak mikroskop altında görüntülenmiştir. Sonuçlara göre kompleks III'ün doza bağlı olarak HCT-116 hücrelerinde oluşturduğu apoptoz oranı artarak 100 µM konsantrasyonunda % 90'a ulaşmıştır. Yapılan FAM-FLICA analizi ile HCT-116 hücrelerinde kompleks III'ün neden olduğu apoptotik indüksiyonun kaspaz yolu ile bağlantılı olduğu rapor edilmiştir (Iqbal vd., 2015).



Şekil 4.22. DU145 hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan Bileşik A'nın 100, 150 ve 200 µM konsantrasyonlarında oluşturduğu apoptotik ve nekrotik DNA fragmentasyon oranları.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda androjen bağımsız DU145 prostat kanseri hücre hattında benzimidazolyum türevi olan Bileşik A ve B'nin morfolojik ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

DU145 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle uygulanan Bileşik A ve B'nin hücre morfolojisinde farklılıklara yol açtığı ilk kez belirlenmiştir. Kontrol gruplarıyla kıyaslandığında özellikle uygulanan en yüksek konsantrasyonlarda doza ve zamana bağlı olarak hücre sayısında azalma olduğu tespit edilmiş, hücrelerin yuvarlaklaştığı, birbirinden ayrıldığı ve parçalanarak normal morfolojilerini kaybettikleri görülmüştür. Ayrıca Bileşik A'nın Bileşik B'ye oranla hücreleri daha fazla öldürdüğü görülmüştür.

Bileşik A ve B'nin sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla hücrelere MTT testi uygulanmıştır. MTT sonuçlarına göre 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarında uygulanan Bileşik A doza ve zamana bağlı olarak güçlü bir sitotoksik etki göstermiştir. Yirmi dört saat için IC_{50} değeri 113 µM, 48 saat için ise 80 µM olarak hesaplanmıştır. Aynı konsantrasyonlarda uygulanan Bileşik B'nin IC_{50} değeri 24 saat için 420 µM, 48 saat için ise 363 µM olarak hesaplanmıştır. Bileşik A ile Bileşik B'nin DU145 hücre canlılığı üzerindeki etkisi kıyaslandığında Bileşik A'nın daha güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Bileşik A ve B'nin sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması için insan sağlıklı akciğer bronşiyal epitelyal hücre hattı BEAS-2B kullanılmıştır. Aynı konsantrasyonlarda uygulanan Bileşik A için IC_{50} değeri 24 saatte 144 µM, 48 saatte 109 µM olarak hesaplanmıştır. Bileşik B için 24 saatlik IC_{50} değeri 307 µM, 48 saatlik IC_{50} değeri 200 µM olarak belirlenmiştir. Bileşik A ve B'nin sağlıklı hücrelerde oluşturduğu sitotoksik etki karşılaştırıldığında, Bileşik A'nın Bileşik B'ye oranla BEAS-2B hücrelerinde daha toksik olduğu gözlenmektedir.

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların sağlıklı hücreyi öldürmesi karşılaşılan en önemli sorunlardan birisidir. Bu nedenle yeni kemoterapötik ilaç denemelerinde ilacın kanserli hücreyi öldürürken sağlıklı hücreye büyük oranda zarar vermemesi istenmektedir. Bileşik A hem 24 saat hem de 48 saatlik uygulamalarda DU145 hücrelerinde sağlıklı hücreye oranla daha güçlü sitotoksik aktivite göstermiştir. Bileşik B'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarında ise DU145 hücrelerinde daha az toksik etki gösterirken, sağlıklı hücrelerde daha güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kemoterapide sıklıkla kullanılan bir antikanser ilaç olan 5-Fluorourasil kullanılmıştır. Aynı dozlarda hücrelere uygulanan 5-Fluorourasil'in 24 ve 48 saatlik muamelesi sonucunda DU145 hücre hattında zayıf bir sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiş ve IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. MTT verilerinden elde edilen sonuçlara göre bileşiklerin DU145 hücrelerinde meydana getirdiği sitotoksik etki 5-Fluorourasil'in sitotoksik etkisiyle karşılaştırıldığında hem Bileşik A hem de Bileşik B 5-Fluorourasil'e oranla hücre çoğalması üzerinde daha fazla toksik etki göstermiştir.

Bileşik A'nın 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM konsantrasyonları ile 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 500 µM 5-Fluorourasil dozlarının kombine olarak hücrelere uygulanması sonucunda hücre çoğalmasını inhibe edici etkinin arttığı görülmüştür. Yirmi dört saatlik uygulama sonucunda IC_{50} değeri 91 µM, 48 saatlik uygulama sonucunda ise IC_{50} değeri 66 µM olarak belirlenmiştir. Yirmi dört ve 48 saat süreyle uygulanmış kombine dozlar için hesaplanan ilaç etkileşim katsayısı 1 değerinden küçük olduğu için Bileşik A ve 5-Fluorourasil'in sinerjistik bir etkiyle çalıştıkları sonucuna varılmıştır.

Bileşik A'nın 100, 150 ve 200 µM konsantrasyonlarının neden olduğu apoptotik/nekrotik hücre ölümünü araştırmak için Hücre Ölümü Belirleme ELISA Kiti kullanılmıştır. Hücre ölümünün belirlenmesi için denenen konsantrasyonlarda hem apoptoz hem de nekroz oranlarının arttığı gözlenmekle birlikte 100 ve 150 µM konsantrasyonlarında apoptotik etkinin, 200 µM konsantrasyonunda ise nekrotik etkinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Yaptığımız çalışmaya göre yeni sentezlenen benzimidazolyum türevi Bileşik A ve B'nin DU145 ve BEAS-2B hücre hatları üzerinde doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik aktivite gösterdiği ilk kez rapor edilmiştir. Bileşik A yapısında bulunan triflorometil grubu ile Bileşik B'den hem yapısal hem de aktivite açısından farklılık göstermektedir. Sitotoksik etkinin Bileşik A da, Bileşik B'ye göre daha yüksek olduğu da gözlenmiştir. Ayrıca Bileşik A'nın 5-Fluorourasil ile doza ve zamana bağlı olarak sinerjistik bir etki gösterdiği de ilk kez belirlenmiştir. Son olarak Bileşik A'nın DU145 hücrelerinde hücreyi apoptoz ve nekroza sürükleyerek hücre ölümüne sebep olduğu ilk kez tespit edilmiştir.

Bu çalışmada sadece prostat kanseri hücre dizisi ile çalışılmıştır. Bu nedenle aynı bileşiklerin farklı kanser hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkilerinin ve etki mekanizmalarının araştırılması gerektiğini, bu etkilerin farklı sürelerde incelenebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca prostat kanseri tedavisinde ya da farklı kanserlerin tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçlarıyla kombine olarak Bileşik A ve B'nin etkileşimlerinin incelenmesi farklı çalışmaların konusu olabilir. Bu nedenle çalışmamızın gelecek çalışmalar için kaynak olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Akkoç, S., İlhan, İ. Ö., Gök, Y., Upadhyay, P. J., Kayser, V., 2016, In vitro cytotoxic activities of new silver and PEPPSI palladium N-heterocyclic carbene complexes derived from benzimidazolium salts, Inorganica Chimica Acta, 449, 75-81.

Anonim, 2019, BENZIMIDAZOLE, https://www.molinstincts.com/structure/BENZIMIDAZOLE-cstr-CT1001963573.html, Erişim tarihi: 16.12.2019.

Apohan, E., Yılmaz, Ü., Yılmaz, Ö., Serindağ, A., Küçükbay, H. vd., 2017, Synthesis, cytotoxic and antimicrobial activities of novel cobalt and zinc complexes of benzimidazole derivatives, Journal of Organometallic Chemistry, 828, 52-58.

Attard, G., Parker, C., Eeles, R. A., Schröder, F., Tomlins, S. A. vd., 2016, Prostate cancer, Lancet, 387, 70-82.

Atuğ, F., 2019, Prostat Kanseri Epidemiyoloji, https://www.prostatkanseriameliyati.com/prostat-kanseri-epidemiyoloji.html, Erişim tarihi: 17.12.2019.

Avelar Freitas, B. A., Almeida, V. G., Pinto, M. C. X., Mourao, F. A. G., Massensini, A. R. vd., 2014, Trypan blue exclusion assay by flow cytometry, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 47(4), 307-315.

Başaran, A., 2008, Lokalize Prostat Adenokarsinomunda VEGF, E-CADHERİN ve BIM Ekspresyonlarının Prognostik Faktörler İle İlişkisi, Uzmanlık tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 1. Üroloji Kliniği, 69 s. (yayımlanmamış).

Baykara, O., 2016, Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5, 3, 154-165.

Beytur, A., Tekin, S., Keleştimur, T., Ergin, Z., Sandal, S., 2011, Yeni Sentezlenen Bir Tiyosemikarbazon Türevinin Prostat Kanseri Hücre Kültürleri Üzerine Antikanserojenik Özelliklerinin Belirlenmesi: *In Vitro* Bir Çalışma, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi, 25(1), 25-32.

Brawley, S., Mohan, R., Nein, C. D., 2018, Localized Prostate Cancer: Treatment Options, American Academy of Family Physicians, 97, 12, 798-805.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Cao, H., Feng, Q., Xu, W., Lı, X., Kang, Z. vd., 2010, Genipin Induced Apoptosis Associated with Activation of the c-Jun NH2- Terminal Kinase and p53 Protein in HeLa Cells, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 33(8), 1343-1348.

Daphu, I., Horn, S., Stieber, D., Varughese, J. K., Spriet, E. vd., 2014, *In Vitro* Treatment of Melanoma Brain Metastasis by Simultaneously Targeting the MAPK and PI3K Signaling Pathways, International Journal of Molecular Sciences, 15, 8773-8794.

Dönmez Yılmaz, B., Ünsal,, M., 2013, Brakiterapi, Okmeydanı Tıp Dergisi, 29 (Ek sayı 1), 35-40.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X., 2000, Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c–Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition, Cell, 102, 33-42.

Dünya Sağlık Örgütü, https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer, (Erişim tarihi: 20.11.2019).

Erdoğru, T., 2019, Prostat Nedir?, https://tibeterdogru.com/prostat-nedir/, Erişim tarihi: 16.12.2019.

Eroğlu, C., 2014, PC-3 ve LNCaP Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Ferulik Asitin Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 117 s. (yayımlanmış).

Eröz, R., Karataş, A., Alkoç, O. A., Baltacı, D., Oktay, M. vd., 2012, Apoptozis Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması), Düzce Tıp Dergisi, 14(2), 87-101.

Grem, J. L., 1997, Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil, Seminars in Radiation Oncology, 7, 4, 249-259.

Grönberg, H., 2003, Prostate cancer epidemiology, Lancet, 361, 859–864.

Güleş, Ö., Eren, Ü., 2008, Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2, 73-78.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Györffy, B., Surowiak, P., Kiesslich, O., Denkert, C., Schafer, R. vd., 2006, Gene expression profiling of 30 cancer cell lines predicts resistance towards 11 anticancer drugs at clinically achieved concentrations, International Journal of Cancer, 118, 1699-1712.

Habib, A., Iqbal, M. A., Bhatti, H. N., 2019, Polynuclear Ag(I)-*N*-heterocyclic carbene complexes: synthesis, electrochemical and *in vitro* anticancer study against human breast cancer and colon cancer, Journal of Coordination Chemistry, 72, 12, 2065-2079.

Hamouda N., Sano, T., Oikawa, Y., Ozaki, T., Shimakawa, M. vd., 2017, Apoptosis, Dysbiosis and Expression of Inflammatory Cytokines are Sequential Events in the Development of 5-Fluorouracil- Induced Intestinal Mucositis in Mice, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 121, 159-168.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, Cell, 144, 5, 646-674.

Haque, R. A., Iqbal, M. A., Ahamed, M. B. K., Majid, A. M. S. A., Hameed, Z. A. A., 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.

Haque, R. A, Iqbal, M. A., Asekunowo, P., Majid, A. M. S. A., Ahamed, M. B. K. vd., 2013, Synthesis, structure, anticancer, and antioxidant activity of paraxylyl linked bis benzimidazolium salts and respective dinuclear Ag(I) N-heterocyclic carbene complexes (Part-II), Medical Chemistry Research, 22, 10, 4663–4676.

Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M., Martin, S. J., 2004, Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes, The EMBO Journal, 23, 2134–2145.

Huda, N., Islam, S., Zia, M., William, K., Abbas, F. vd., 2019, Anticancer, antimicrobial and antioxidant potential of sterically tuned bis-*N*-heterocyclic salts, Zeitschrift für Naturforschung, 74(1–2)c, 17–23.

Igney, F. H., Krammer, P. H., 2002, Death And Anti-Death: Tumour Resistance To Apoptosis, 2, 277-288.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

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 bis-benzimidazolium salt, Inorganic Chemistry Commınications, 28, 64-69.

Iqbal, M. A., Umar, M. I., Haque, R.A., Ahamed, M. B. K., Asmawi, M. Z. B. vd., 2015, Macrophage and colon tumor cells as targets for a binuclear silver(I) N-heterocyclic carbene complex, an anti-inflammatory and apoptosis mediator, Journal of Inorganic Biochemistry, 146, 1-13.

Ji, N., Jiang, L., Deng, P., Xu, H., Chen, F. vd., 2017, Synergistic effect of honokiol and 5-fluorouracil on apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells, Journal of Oral Pathology & Medicine, 46, 201–207.

Karlık, Ö., Balcıoğlu, S., Karataş, M. O., Ateş, B., Alıcı, B vd., 2018, Synthesis, structural characterization and cytotoxicity studies of T-shaped silver(I) complexes derived from 1-benzyl-3Hbenzimidazolium p-toluenesulfonates, Polyhedron, 142, 63-70.

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R., 1972, Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wideranging Implications In Tissue Kinetics, British Journal of Cancer, 26, 239.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, ES. vd., 2009, Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, National Institutes of Health Public Access Author Manuscript. 16(1), 3-11.

Mandair, D., Rossi, R. E., Pericleous, M., Whyand, T., Caplin, M. E., 2014, Prostate cancer and the influence of dietary factors and supplements: a systematic review, Nutrition & Metabolism, 11, 30.

Montenegro, MF., Sanchez-del-Campo, L., Fernandez-Perez, MP., Saez-Ayala, M., Cabezas-Herrera, J. vd., 2015, Targeting the epigenetic machinery of cancer cells, Oncogene, 34, 135-143.

Mossmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay, Journal of Immunological Method, 65, 1-2, 55-63.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Oğuz, U., 2019, Prostat Kanseri, http://www.uraloguz.com/index.php/prostat-kanseri/, Erişim tarihi: 15.12.2019.

Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2018. (2019, Nisan). Türkiye İstatistik Kurumu Haber Bülteni 30626. Erişim adresi: http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=30626.

Önal, B., 2019, Prostat Kanseri, http://www.bulentonal.com.tr/prostat-kanseri/, Erişim tarihi: 16.12.2019.

Öz Arslan, D., Korkmaz, G., Gözüaçık, D., 2011, Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması, Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2, 4, 184-194.

Pullar, B., Shah, N., 2016, Prostate cancer, Surgery (Oxford), 34, 10, 505-511.

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellmann, S., Benink, H. A. vd., 2016, Cell Viability Assays, National Library Medicine Citation.

Ryu, S., Lim, W., Bazer, F. W., Song, G., 2017, Chrysin induces death of prostate cancer cells by inducing ROS and ER stress, Journal of Cellular Physiology, 232, 3786–3797.

Saelens, X., Festjens, N., Walle, L. V., Gurp, M., Loo, G. vd., 2004, Toxic proteins released from mitochondria in cell death, Oncogene, 23, 2861–2874.

Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A., 2016, Cancer Statistics, 2016, Cancer Journal for Clinicians, 66, 7-30.

Sommer, U., Costello, C. E., Hayes, G. R., Beach, D. H., Gilbert, R. O. vd., 2005, Identification of *Trichomonas vaginalis* Cysteine Proteases That Induce Apoptosis in Human Vaginal Epithelial Cells, The Journal of Biological Chemistry, 280, 25, 23853-23860.

Tomatır, A. G., 2003, Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 23, 499-508.

Tonelli, M., Gabriele, E., Piazza, F., Basilico, N., Parapini, S. vd., 2018, Benzimidazole derivatives endowed with potent antileishmanial activity, Journal of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry, 33, 1, 210-226.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

T.C Sağlık Bakanlığı, 2018, Türkiye Kanser İstatistikleri 2015, T.C Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, s. 1.

Turan, İ., Demir, S., Aliyazıcıoğlu, R., Aliyazıcıoğlu, Y., 2017, *Primula vulgaris* Yaprak Ekstraktının Antioksidan ve Sitotoksik Özelliklerinin Değerlendirilmesi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi, 20(4), 361-367.

Yang, Y., Zhou, Z., He, S., Fan, T., Jin, Y. vd., 2012, Treatment of prostate carcinoma with (Galectin-3)-targeted HPMA copolymer- (G3-C12)-5-Fluorouracil conjugates, Biomaterials, 33, 2260-2271.

Yang, L., Wang, M. J., Zhang, Z. J., Morris-Natschke, S. L., Goto, M. vd., 2014, Synthesis of novel spin-labeled derivatives of 5-FU as potential antineoplastic agents, Medical Chemistry Research, 23, 3269–3273.

Yıldızhan, E., 2006, Prostat Kanseri Tedavisinde Rektal Muayene, PSA, Trus Sonuçlarının Trus Biyopsi Sonuçları İle Karşılaştırılması, Uzmanlık tezi, T.C Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Radyoloji Kliniği, 55 s. (yayımlanmamış).

Yücel, S., 2019, Prostat Kanseri, https://www.selcukyucel.com.tr/prostat-kanseri.html, Erişim tarihi: 15.12.2019.

Zhang, N., Yin, Y., Xu, S. J., Chen, W. S., 2008, 5-Fluorouracil : Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies, Molecules, 13, 1551-1569.

Weiner, A. B., Kundu, S. D., 2018, Prostate Cancer A Contemporary Approach to Treatment and Outcomes, Medical Clinics of North America, 102, 2, 215-229.

Wisniewska-Jarosinska, M., Sliwinski, T., Kasznicki, J., Kaczmarczyk, D., Krupa, R. vd., 2011, Cytotoxicity and genotoxicity of capecitabine in head and neck cancer and normal cells, Molecular Biology Reports, 38, 3679-3688.