

T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



İYONİK SIVILARIN KOLON KANSERİ VE AKCİĞER KANSERİ
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF VE
ANTİMETASTATİK ETKİLERİN *İN VİTRO* KOŞULLARDA
İNCELENMESİ

ŞEYMA MENEVŞE ÇINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN

Ocak - 2022

Her hakkı saklıdır

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İYONİK SIVILARIN KOLON KANSERİ VE AKCİĞER KANSERİ
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF VE
ANTİMETASTATİK ETKİLERİN *İN VİTRO* KOŞULLARDA
İNCELENMESİ

ŞEYMA MENEVŞE ÇİNAR

TOKAT
Ocak - 2022

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

**Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
2020/70 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Şeyma MENEVŞE ÇİNAR tarafından hazırlanan “İYONİK SIVILARIN KOLON KANSERİ VE AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF VE ANTİMETASTATİK ETKİLERİN *İN VİTRO* KOŞULLARDA İNCELENMESİ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 31 OCAK 2022 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN

.....

Üye
Prof. Dr. İsa GÖKÇE
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye
Doç. Dr. Hüseyin AKBAŞ
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Sema BİLGİN
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Rızvan İMAMOĞLU
Bartın Üniversitesi

.....

ONAY

Prof. Dr. Mehmet GÜNEŞ

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü
31/01/2022

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Şeyma MENEVŞE ÇINAR

31 Ocak 2022

ÖZET/ABSTRACT

İYONİK SIVILARIN KOLON KANSERİ VE AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİPROLİFERATİF ve ANTİMETASTATİK ETKİLERİN İN VİTRO KOŞULLARDA İNCELENMESİ

ŞEYMA MENEVŞE ÇINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ SEÇİL ERDEN TAYHAN)
(İKİNCİ DANIŞMAN: DOÇ. DR HÜSEYİN AKBAŞ)

31.01.2022, 105 SAYFA

İyonik sıvılar, genel bir tanımla 100 °C'nin altındaki sıcaklıklarda sıvı olan tuzlardır. Kimyasal ve biyolojik sektörlerde kullanılmak üzere tasarımcı moleküller olarak düşünüldüğünden, iyonik sıvılara olan araştırmalar her geçen gün artmaktadır. Bu avantajlı özelliklerinden dolayı iyonik sıvılar farmakolojik olarak da yoğun bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında kullanılan iyonik sıvıların akciğer kanseri ve kolon kanseri hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkileri araştırılmış ve bunun sonucunda da migrasyon analizi ile antimetastatik açıdan değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, etkili bileşiklerin kanser hücrelerinin migrasyonunda etkili olan bazı genlerin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. Elde edilen verilere göre dietilentriamin salisilatın metastaz üzerinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun yanı sıra, dietilentriamin merkaptasetatın, anjiogenezi indükleyebilme potansiyelinin olduğu belirlenmiştir. Çalışılan bileşiklerin, metastazı baskılama ve anjiyogenezi destekler nitelikte olması yara iyileşmede de etkili olabileceğini akla getirmiş ve insan deri fibroblast hücresi üzerinde *in vitro* çizik testi uygulanmıştır. Analiz sonucunda, istatistiki açıdan anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: İyonik Sıvılar, Kanser, Hücre Proliferasyonu, Metastaz, Gen Ekspresyonu

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTIPROLIFERATIVE AND ANTIMETASTATIC EFFECTS OF IONIC LIQUID ON COLON CANCER AND LUNG CANCER CELLS IN VITRO CONDITIONS

ŞEYMA MENEVŞE ÇINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

**(SUPERVISOR)ASST. PROF. DR. SEÇİL ERDEN TAYHAN
(CO-SUPERVISOR) ASSOC. PROF. DR. HÜSEYİN AKBAŞ**

31.01.2022, 105 pages

Ionic liquids, with a general definition, are salts that are liquid at temperatures below 100°C. Research into ionic liquids is increasing day by day as they are considered designer molecules for use in the chemical and biological sectors. Due to these advantageous properties, ionic liquids have also been intensively studied pharmacologically. The antiproliferative effects of ionic liquids used in this thesis on lung cancer and colon cancer cell lines were investigated, and as a result, an antimetastatic evaluation was carried out by migration analysis. In addition, the expression levels of some genes that are effective in the migration of cancer cells of the effective compounds were analyzed. According to the obtained data, it was concluded that diethylenetriamine salicylate is effective on metastasis. In addition, it was determined that diethylenetriamine mercaptoacetate has the potential to induce angiogenesis. The fact that the studied compounds suppress metastasis and support angiogenesis suggests that they may also be effective in wound healing, and an in vitro scratch test was performed on human skin fibroblast cells. As a result of the analysis, statistically significant results could not be obtained.

KEYWORDS: Ionic Liquids, Cancer, Cell Proliferation, Metastasis, Gene Expression

ÖNSÖZ

Lisans-Yüksek lisans eğitim sürecinde ve bu tezi hazırlamamda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, benden her konuda desteğini, hoşgörüsünü ve yardımını esirgemeyen, hep yanımda olan ve bana güvenini her zaman hissettiren, tez danışmanım, çok kıymetli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çok kıymetli bilgi birikimleri sayesinde yoluma hep ışık tutan, işimi her zaman hakkıyla yapabilmem konusunda beni cesaretlendiren, çoğu kez içimdeki gücü ortaya çıkarmamı sağlayan sevgili hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sema BİLGİN'e, her şey için çok teşekkür ederim.

Değerli çalışmalarını ile tezime katkı sağlayan ikinci danışmanım Doç. Dr. Hüseyin AKBAŞ'a teşekkür ederim.

Tüm laboratuvar çalışmalarım boyunca hiçbir zaman desteğini eksik etmeyen, ihtiyacım olduğu her zaman yardımına koşan Aslı YILDIRIM ve Derya ATASOY'a çok teşekkür ediyorum.

Hayatım boyunca maddi, manevi desteklerini benden esirgemeyen, her konuda güvenen ve başarılı olacağıma benden çok inanan sevgili aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Şeyma MENEVŞE ÇINAR

31 Ocak 2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vvi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.1. Kanser	3
2.2. Kanser ve Metastaz.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.2.1. Metastazın moleküler kontrolü	5
2.3. Anjiogenez.....	7
2.4. İyonik Sıvılar ve Farmakolojik Özellikleri	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	12
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	12
3.1.1.Kullanılan cihazlar ve aletler.....	12
3.1.2.Kullanılan kimyasal ve sarf Malzemeler.....	13
3.2. Yöntem.....	14
3.2.1.Hücre hatlarının kültüre edilmesi ve stoklanması.....	14
3.2.2.İyonik sıvıların kanser hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesi.....	16
3.2.3.Hücre göçü analizi.....	20
3.2.4.Gen ekspresyon analizi.....	22
3.2.5.Yara iyileşme.....	29
4.BULGULAR	31
4.1. İyonik Sıvıların Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Anti-Proliferatif Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	29

4.2. İyonik Sıvıların Kansere Hücre Hatları Üzerindeki Migrasyon Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	37
4.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time-Pcr, Rt-Qpcr) Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	62
4.4. İyonik Sıvıların Yara İyileşmesi Üzerindeki Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	68
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	72
6. KAYNAKLAR	81
7. ÖZGEÇMİŞ.....	86



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simge

Gr	Gram
Mg	Miligram
μ M	Mikromolar
M	Molar
mM	Milimolar
Nm	Nanometre
Rpm	Dakikadaki devir sayısı

Açıklama

Kısaltmalar

A549	İnsan akciğer karsinomu hücre hattı
BJ	İnsan deri fibroblast hücre hattı
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	Epidermalbüyüme faktörü
EtOH	Etonol
FBS	Fötal sığır serum
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
HT-29	İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı
HUVEC	İnsan göbek kordonu toplar damarı endotel hücreleri
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium
PBS	Fosfat tamponu
RNA	Ribonükleik asit
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Enstitüsü'nde geliştirilen besi ortamı

RT-PCR

Ters transkriptaz- Polimeraz zincir reaksiyonu

UV

Ultraviole



ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Karsinogenezin oluşumu.....	3
Şekil 2.2. Kontrolsüz Bölünme Sonucu Tümör Oluşumu.....	4
Şekil 2.3. Metastaz aşamaları.....	5
Şekil 2.4. İyonik sıvıların yapısı.....	9
Şekil 3.1. Hücrelerin çözündürülmesi ve kültüre alınması.....	15
Şekil 3.2. Hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (a: HUVEC, b:A549, c: HT29, 10x görüntüsü).....	15
Şekil 3.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Dondurulması.....	16
Şekil 3.4. Dietilentriamin esaslı iyonik sıvılar.....	17
Şekil 3.5. İyonik sıvıların hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesinde kullanılan pleyt planları ve madde konsantrasyonlar.....	18
Şekil 3.6. Yara modelinin oluşturulması ve görüntülenmesi.....	22
Şekil 3.7. Programlı Hücre Göçü ile İlgili Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	23
Şekil 4.1. İyonik sıvıların (pk: pozitif kontrol 5-Fu, 1A, 1B, 1C) A549 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri (****P≤0.0001, ***P≤0.0005, **P≤0.001).....	31
Şekil 4.2. İyonik sıvıların (1D, 1E, 1F, 1G), A549 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri (****P≤0.0001, ***P≤0.0005, **P≤0.001, *P≤0.005).....	32

Şekil 4.1. İyonik sıvıların (pk: pozitif kontrol 5-Fu, 1A, 1B, 1C), HT29 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri (****P≤0.0001, **P≤0.001, *P≤0.005).....	33
Şekil 4.4. İyonik sıvıların (1D, 1E, 1F, 1G), HT29 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri (****P≤0.0005, **P≤0.001, *P≤0.005).....	34
Şekil 4.5. İyonik sıvıların (pk: pozitif kontrol 5-Fu, 1A, 1B, 1C), HUVEC hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri (****P≤0.0001, **P≤0.001, *P≤0.005).....	35
Şekil 4.6. İyonik sıvıların (1D, 1E, 1F, 1G), HUVEC hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri (****P≤0.0001, ***P≤0.0005, **P≤0.001, *P≤0.005)	36
Şekil 4.7. 1A maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon görüntüleri(4x).....	37
Şekil 4.8.1A maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001,*P≤0.005).....	38
Şekil 4.9. 1B maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon görüntüleri(4x).....	39
Şekil 4.10.1B maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001,*P≤0.005).....	39
Şekil 4.11. 1C maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon görüntüleri(4x)....	40
Şekil 4.12.1C maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001,***P≤0.0005,**P≤0.001,).....	40
Şekil 4.13. 1D maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x).....	41
Şekil 4.14.1D maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001,**P≤0.001).....	42
Şekil 4.15. 1E maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x).....	43

Şekil 4.16. 1E maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, **P≤0.001).....	43
Şekil 4.17. 1F maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x).....	44
Şekil 4.18. 1F maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001).....	44
Şekil 4.19. 1G maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x).....	45
Şekil 4.20. 1G maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, ***P≤0.0005).....	45
Şekil 4.21. 1A maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)....	46
Şekil 4.22. 1A maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001).....	47
Şekil 4.23. 1B maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)....	48
Şekil 4.24. 1B maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, ***P≤0.0005).....	48
Şekil 4.25. 1C maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x).....	49
Şekil 4.26. 1C maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001).....	49
Şekil 4.27. 1D maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)....	50
Şekil 4.28. 1D maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, **P≤0.001).....	50
Şekil 4.29. 1E maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x).....	51
Şekil 4.30. 1E maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon graf3ği (****P≤0.0001, *P≤0.005).....	52

Şekil 4.31. 1F maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x).....	53
Şekil 4.32. 1F maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001).....	53
Şekil 4.33. 1G maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü (4x)....	54
Şekil 4.34. 1G maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001).....	54
Şekil 4.35. 1A maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)..	55
Şekil 4.36. 1A maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001).....	55
Şekil 4.37. 1A maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon görüntüsü (4x)..	56
Şekil 4.38. 1B maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, ***P≤0.0005, **P≤0.001).....	56
Şekil 4.39. 1C maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)..	57
Şekil 4.40. 1C maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001).....	57
Şekil 4.41. 1D maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)..	58
Şekil 4.42. 1D maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001).....	58
Şekil 4.43. 1E maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)..	59
Şekil 4.44. 1E maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, **P≤0.001).....	59
Şekil 4.45. 1F maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)...	60

Şekil 4.46. 1F maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001).....	60
Şekil 4.47. 1G maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)..	61
Şekil 4.48. 1A maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, *P≤0.005).....	61
Şekil 4.49. 1E maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen A549 hücre hattındaki migrasyon genlerinin ekspresyon seviyeleri (****P≤0.0001).....	64
Şekil 4.50. 1G maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen A549 hücre hattında migrasyon genlerinin ekspresyon seviyeleri (****P≤0.0001).....	65
Şekil 4.51. 1E maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HT29 hücre hattında migrasyon genlerinin ekspresyon seviyeleri (****P≤0.0001).....	66
Şekil 2.52. 1G maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HT29 hücre hattında migrasyon genlerinin ekspresyon seviyeleri.....	66
Şekil 4.53. 1E maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HUVEC hücre hattında migrasyon genlerinin ekspresyon seviyeleri (****P≤0.0001, ***P≤0.0005).....	67
Şekil 4.54. 1G maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HUVEC hücre hattında migrasyon genlerinin ekspresyon seviyeleri(****P≤0.0001)	68
Şekil 4.55. 1E maddesinin BJ SN hücre hattındaki yara alanı görüntüleri (4x)...	69
Şekil 4.56. 1E maddesinin BJ SN hücre hattındaki yara iyileşme grafiği.....	69

Şekil 4.57. 1G maddesinin BJ SN hücre hattındaki yara alanı görüntüleri (4x).....70

Şekil 4.58. 1G maddesinin BJ SN hücre hattındaki yara iyileşme grafiği(*P≤0.005)..71



ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve aletler.....	12
Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler.....	13
Çizelge 3.3. Bileşiklerin adlandırılması.....	17
Çizelge 3.4. İyonik sıvıların kanser hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesi analizinde kullanılan başlangıç hücre sayıları.....	18
Çizelge 3.5. Tek bir reaksiyon için kullanılan PCR bileşenleri.....	
Çizelge 3.6. QRT-PCR'da kullanılan primer dizileri.....	27
Çizelge 3.7. Real-time pcr bileşenleri.....	27
Çizelge 3.8. Real-time pcr aşamaları.....	28
Çizelge 4.1. Total RNA ölçüm sonuçları.....	63
Çizelge 4.2. İyonik sıvı uygulanan hücre hatları üzerinde mRNA düzeyinde gen ekspresyon seviyeleri (Konrol grubu ile karşılaştırılmış değerler)...	64

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile ortaya çıkan, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında olan kompleks bir hastalıktır (Baykara, 2016). Yaygın sağlık problemlerinden biri olan kanserin tedavisinde kayda değer gelişmeler sağlanmış olsa da dünya genelinde ölüm oranları diğer hastalıklara göre oldukça fazla olduğu bilinmektedir.

Kansere karşı alternatif ve etkili tedavilerin araştırılması, ilaç endüstrisinin güncel hedefleri arasında yer almaktadır. İlaç endüstrisinin şu anda karşılaştığı birçok zorluk arasında, yenilikçi ve etkili tedaviler geliştirme ihtiyacı da bulunmaktadır. Bu sebeple bilim insanlarının amacı sadece yeni kimyasal madde sentezlemek değil; bunun yanı sıra, ekonomik değere sahip, hedefe yönelik ve insanlığa faydalı olabilecek bileşiklerin üretimidir.

Günümüz teknolojisiyle birlikte kanser biyolojisinin daha iyi anlaşılması, kanserden korunmada ve tedavisinde yeni görüşlere olanak sağlamıştır. Konvansiyonel tedavilere dirençli olup prognozu kötüleştirerek yaşam sürecini kısaltan metastaz gelişimi, bu noktada yoğun ilgi çekmiş ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasıyla metastaz basamaklarını hedefleyen yeni tedavi stratejileri gündeme gelmiştir. Metastaz biyolojisi ile ilgili yapılan çalışmaların ürünü olarak antimetastatik tedavi modalitelerinin konvansiyonel tedavilere eklenmesiyle kansere yönelik savaşta yeni umutlar doğmuştur. Ancak, son yıllarda kanser tedavisi için yapılan yoğun araştırmalarla birlikte metastaz mekanizmalarının kısmen de olsa aydınlatılmasıyla bu mekanizmaları hedef alan tedaviler geliştirilmeye başlanmış ve anti-metastatik tedaviler gündeme gelmiştir (Güllü ve ark., 2005).

Günümüzde teknolojinin hızla gelişmesi aynı zamanda büyük çevre kirliliklerine sebep olmaktadır. Hem endüstri hem akademik çevre daha az kirleten yöntemler bulmaya yönelmiştir. Birçok yöntemde kullanılan hammadde, katalizör, çözücü ve oluşan yan ürünlerin hepsi çevre kirleticisidir. Bunların yerine çevreye daha az zarar veren daha çevre dostu ürünleri kullanmak, Yeşil Kimya'nın konusu olmuştur (Kolonyacılar,

2010). Bu duruma alternatif olarak son yıllarda iyonik sıvılar (İS'ler) dikkatleri üzerine çekmiştir (Zhao ve ark., 2007).

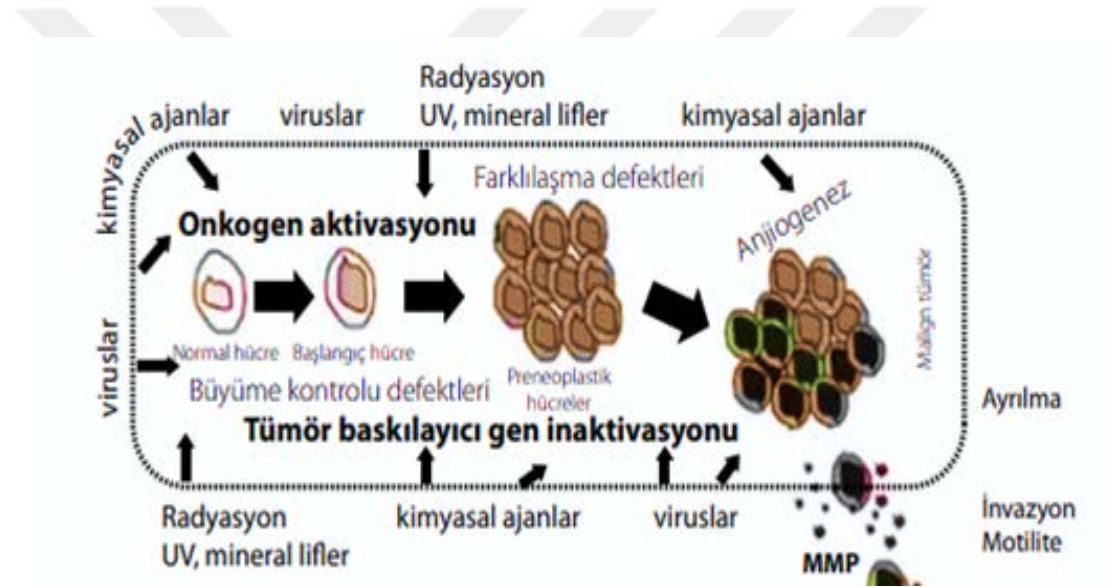
İlaç endüstrisindeki terapötik ajan arayışında olan araştırmacılar için yeni bir araştırma konusu olan İS'ler, 100°C'nin altında erime noktasına sahip, hatta oda sıcaklığında bile sıvı olan tuzlar olarak tanımlanmakta ve tamamen iyonlardan oluşmaktadır (Kolonyacılar, 2010). 100°C'nin altında eriyerek sıvı oluşturan hatta oda sıcaklığında bile sıvı olan tuzlar da iyonik sıvı tanımına uymaktadır. Bu tuzların, yağ, protein, plastik gibi çok çeşitli maddeleri çözmelerinin yanında polar organik ve aromatik çözücülerin çözdüğü birçok metal katalizörlerini de çözmeleri, onların birçok reaksiyonda kullanılmasını mümkün kılmıştır. Çok düşük buhar basınçlarına sahip olmaları onların çözücü olarak kullanımını da arttırmıştır. Olaya çözücü bazında bakıldığında, tonlarca çözücünün bir işlemde kullanıldığı görülebilmektedir. Çözücülerin işlemlerde kullanılırken o ortamda bulunan kişilerin çözücü buharlarını soluması kaçınılmazdır. Çözücülerin uçucu olmalarının yanında zehirli olmaları onların kullanılmalarının ne kadar sakıncalı olduğunu göstermektedir (Marsh ve ark. 2002). Bu özelliklerinden dolayı İS'ler farmakolojik olarak araştırılmaya başlanmış ve bu maddelerin kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif, antimetastatik etkileri incelenmiştir (Dias ve ark. 2017).

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. Kanser

Kanser, büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin kontrolsüz olarak bölünmesi ve çoğalması ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu duruma genetik ve çevresel koşulların etkiside bulunmaktadır. (Futreal ve ark., 2001).

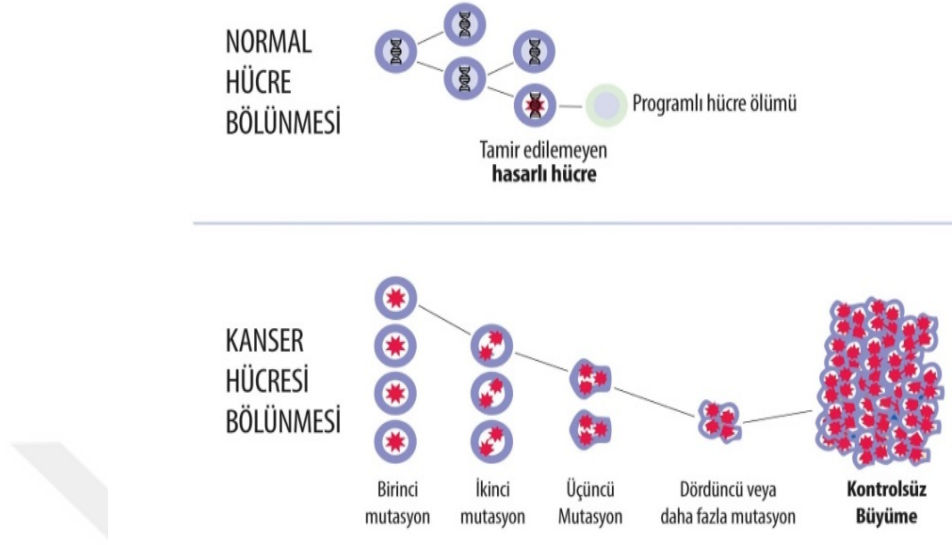
Karsinogenezin temelinde, hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve diferansiasyon gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır (Frank, 1999).



Şekil.2.1. Karsinogenezin oluşumu (Kahraman ve Karahan, 2018'den uyarlanmıştır.)

Büyüme özelliği bozulmamış, kontrollü bölünme yeteneğine sahip olan hücrelerde herhangi bir neden sonucunda bölünme kontrolünün kaybedilmesi ve anormal bir şekilde hücre çoğalması ile oluşan hücre topluluğu tümör olarak adlandırılmaktadır.

KANSER: NORMAL BÜYÜMENİN KONTROLÜNÜN KAYBEDİLMESİ



Şekil 2.2. KontROLSÜZ bölünme sonucu tümör oluşumu (Özdoğan, 2018’den uyarlanmıştır.)

Kanserin gelişimi sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellik kazanmaktadır. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmalarına ve çevre dokuya yayılmalarına neden olmaktadır. Ayrıca, bu hücreler özgün mikro çevreden bağımsız olarak yaşamını devam ettirme ve metastaz yapma özelliğine de sahiptir. Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seri mutasyonları farklı mekanizmalar aracılığıyla malign fenotipin oluşumuna katkıda bulmaktadır (McCormick, 1999).

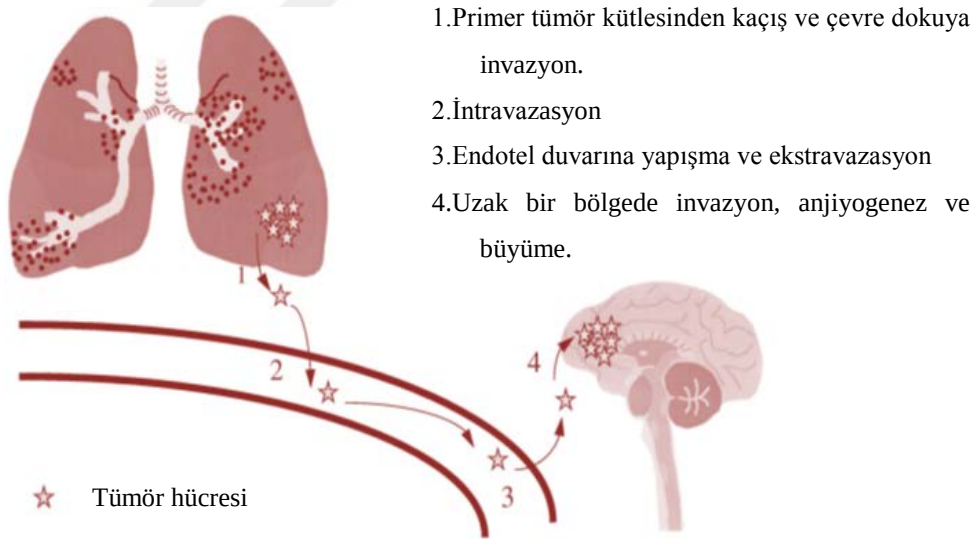
Sinyal iletimi yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkojenik mutasyonlara sık olarak rastlanmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2000). Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırmaktadır. Böylelikle, onkojenik sinyal iletimi, tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır. (Doğan ve ark 2004).

2.2. Kanser ve Metastaz

Metastaz, kanser hücrelerinin köken aldıkları bölgeden vücudun farklı doku ve organlarına yayılmasıdır. Malign tümörlerin metastaz yapma yeteneği, ölümcül olmalarından büyük ölçüde sorumludur (Meyer ve ark., 1998). Kanser kaynaklı ölümlerin % 90’ından metastaz gelişimi sorumludur. (Hanahan ve ark., 2000). Metastaz,

anjiojenez, invazyon, migrasyon-motilite, ekstrasvazyon ve proliferasyon gibi birbirleriyle ilişkili bir dizi kompleks ve çok basamaklı olaylar zinciri ile gerçekleşmektedir (Poste ve ark., 1980).

Bir tümör kitlesinden gerçekleşen metastazın temel basamakları şematik olarak Şekil 2.3' de gösterilmiştir. Birincil bölgesinden ayrılan metastatik tümör hücresi, öncelikle kendisini çevreleyen stromayı istila etmekte ve ardından, kan damarı veya lenfatik sisteme girmektedir. İlgili sistemlere girdikten sonra primer tümörden uzak bir bölgede tutuklanan malign hücre, buradan dokuya ekstrasvazyon yaparak kan temini sağladıktan sonra büyüyerek ikincil bir kütleye dönüşmektedir. İlgili anahtar süreçler, hücresel yapışmadaki değişiklikleri, stromayı parçalayabilen proteolitik enzimlerin üretimini, invazyon ve anjiogenez için kemotaktik süreçleri aktive eden çeşitli sitokinlerin salınımını içeren olaylar bütünüdür (Meyer ve ark. 1998).



Şekil 2.3. Metastaz aşamaları (Meyer ve ark. 1998 'den uyarlanmıştır.)

2.2.1. Metastazın moleküler kontrolü

Malign tümörlerde metastaz birbiri ile ilişkili çok basamaklı karmaşık bir süreçtir. Bu süreç çeşitli moleküler mekanizmalar ile kontrol edilmektedir. İlgili kontrollerde önemli moleküllerden birisi olan hipoksi ile indüklenen faktör (HIF) , hücresel oksijen düşüşüne yanıt veren major bir transkripsiyon faktörüdür. Hipoksi durumunda ilk olarak

HIF-1 ekspresyonu başlamaktadır. HIF bir nükleer proteindir ve hücrenin oksijenlenmesinde önemli rol almaktadır. HIF-1 proteini oksijen tarafından kontrol edilen HIF-1 alfa (HIF-1 α) alt ünitesi ile hücrede sürekli olarak eksprese edilen HIF-1 beta (HIF-1 β) alt ünitesinin bir araya gelmesiyle oluşan bir heterodimerdir. Hipoksik ortamda HIF-1 α yıkımı inhibe olur ve miktar olarak artar. Ardından, sitoplazmadan çekirdeğe yer değiştirerek HIF-1 β ile birleşip dimer oluşturmaktadır. HIF-1 α 'nın aktivasyonu, hücre proliferasyonu ve apoptozisde belirleyici bir öneme sahiptir. HIF-1 sayesinde endotel hücrelerin üzerinde güçlü bir mitojenik etkisi olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) hücrelerden salınarak anjiogenezi uyarmaktadır. (Zeynalov, 2018). Bu nedenle HIF-1 α , kanser tedavisi için yeni bir terapötik hedef olarak kabul edilmiştir ve kanserde HIF-1 ekspresyonunu modüle etmek için tasarlanmış hedefe yönelik tedaviler tasarlanmaya devam etmektedir.

HIF-1 α tarafından indüklenen VEGF, tümör hücreleri tarafından salgılanabilmekte ve çeşitli tümör tiplerinde hücre proliferasyonu ve metastazının önemli bir düzenleyicisi olarak hizmet edebilmektedir. Ek olarak HIF-1 α , matriks metalloproteinazları (MMP) da kodlayan genleri aktive ederek tümör invazyonu ve metastazı sırasında doku yeniden şekillenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Hiratsuka ve ark. 2006; Miyake ve ark. 2008).

MMP'ler, ekstrasellüler matriks (ESM) komponentlerini yıkıma uğratan çinko ve kalsiyum bağımlı nötral endopeptidazlardır. MMP-2 ve MMP-9, Tip IV, V, VII, X, XI ve XIV kollajen, jelatin, elastin, proteoglikan kor proteinleri myelin temel protein, fibronektin, fibrillin-1 gibi temel ESM proteinlerini yıkma özelliğine sahiptirler. MMP-2 ve MMP-9, ESM yıkımı, anjiogenez, dokunun yeniden şekillenmesi ve hücre migrasyonu süreçlerinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca birçok sitokin ve kemokin üzerinde etkileri vardır. MMP-9, IL-8'i parçalayarak daha potent IL-8 ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Böylece tümör hücrelerinin invazyonlarını engellemektedirler. Yine TNF- α , TGF- β ve IL-1 β 'yı inaktif formdan aktif forma dönüştürür. MMP-9, VEGF'nin salınımını arttırarak anjiogenezde de rol almaktadır. VEGF de MMP-2'nin damar endotel hücrelerinden salınımını arttırarak bazal membran yıkımına yol açmakta ve yeni damar oluşumuna sebebiyet vermektedir. Diğer fonksiyonlar arasında kemiğin yeniden yapılanması, yara iyileşmesi, embriyogenez, anjiogenez, inflamasyon, apoptozis,

immun cevap gelişimi sayılabilir. MMP-2 aynı zamanda tip 1 kollajeni yıkarak ESM'nin yeniden şekillenmesinde önemli rol üstlenmektedir. (Zeynalov, 2018). MMP2 ile MMP9 ekspresyonu ve aktivitesindeki azalmaların çeşitli kanser hücre dizilerindeki büyüme ve metastazı inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Tümör hücreleri ve endotel hücreleri için en önemli bariyer olan bazal membranın içerdiği tip-IV kollejeni yıkan MMP-2 ve MMP-9, malignitenin derecesiyle korele olarak birçok metastatik tümörde yüksek olarak bulunmuştur. Bu amaçla, proteolizi engelleyen gerek fizyolojik gerekse sentetik inhibitörlerin bulunması kanser tedavisinde yeni umutlar doğurmuştur (Zeng ve ark., 2016).

VEGF reseptörleri vasküler endotel hücrelerinin hücre yüzeyinde tanımlanmıştır. VEGF ekspresyonu HIF-1 aracılı mekanizma ile hipokside upregüle olmaktadır. VEGF mitojenik, anjiyojenik ve geçirgenlik artışı etkilerinden sorumludur. VEGF' nin fonksiyonları arasında mitogenez, anjiyogenez ve endotelial sağ kalım, arter, ven ve lenfatiklerden vasküler endotel hücrelerinin büyümesi yer almaktadır.

Hayatta kalma etkinliği ile uyumlu olarak VEGF, insan endotel hücrelerinde antiapoptotik proteinler Bcl-2 ve A1'in ekspresyonunu indüklemektedir. VEGF, kültürlenmiş sığır mikrovasküler endotel hücrelerinde serin proteazlar, ürokinaz tipi ve doku tipi plazminojen aktivatörlerinin ve ayrıca plazminojen aktivatör inhibitörü 1'in ekspresyonunu indüklemektedir.

2.3. Anjiyogenez

Anjiyogenez, öncelikle venüllerden olmak üzere mevcut damarlardan yeni kan damarlarının oluşma sürecidir. Endotel hücreleri ile kaplı, yeni geliştirilen kan damarları, dokulara oksijen ve besin sağlamakta, hematopoietik hücreler tarafından bağışıklık gözetimini teşvik etmekte ve atık ürünleri ortadan kaldırmaktadır. (Coultas ve ark., 2005; Carmeliet ve ark., 2011). Önceden var olan damarlardan yeni kan damarlarının gelişimi olan anjiyogenez, organ büyümesi, embriyonik gelişim ve yara iyileşmesi dahil olmak üzere çeşitli süreçler için hayati öneme sahiptir (Carmeliet, 2005). Bununla birlikte, bu süreç, yara iyileşmesi, iskelet büyümesi, hamilelik veya menstrüel döngü dönemleri dışında erişkinde uykuda kalmaktadır (Potente ve ark., 2015).

Hasar yerlerindeki iyileşme sürecinde, iskemi yerlerinde kollateral dolaşım gelişmesinde gözlenmektedir. Mevcut damarlardan yeni damarların filizlendiği bir süreç olan anjiyogenez sırasında, aşağıdaki aşamalar gerçekleşmektedir.

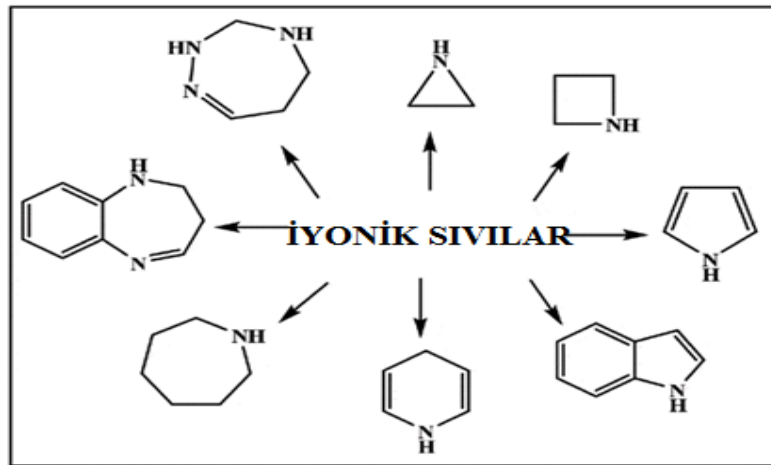
- VEGF etkisiyle damar geçirgenliğinin artması,
- Perisitlerin damarın lümenine uzak yüzeyinden ayrılması,
- Endotel hücrelerinin, doku hasarı bölgesine göç etmesi,
- Göç eden endotel hücrelerinin ön sırasının hemen arkasındaki endotel hücrelerinin proliferasyonu,
- Kılcal tüplerin oluşumu yönünde yeniden biçimlenmesi,
- Periendotelyal hücrelerin (küçük kapiller damarlar için perisitlerin, daha büyük damarlar için düz kas hücrelerinin) matür damar oluşturmak üzere toplanması,
- Endotel hücrelerinin proliferasyon ve göçünün baskılanması ve bazal membran depolanması anjiyogenez sürecinde çeşitli büyüme faktörleri, hücre-hücre etkileşimleri, ESM proteinleriyle etkileşim ve doku enzimleri rol alır (Clauss M, 2000).

Tümör anjiyogenezi malignite için gerekli bir olaydır (Kerbel, 2000). Tümör dokusunun progresyon, metastaz ve invazyonu için gerekli olan oksijen, büyüme faktörü ve besin maddelerinin karşılanabilmesi için yeni damar oluşumunun gerekli olduğu bildirilmektedir. Tümörün büyümesi sırasında mikrodamarlar, tümöre besin, oksijen ve büyüme faktörleri sağlamak amacıyla sayıca büyük oranda artış gösterirler. Tümör anjiyogenesinin düzenlenmesi normal fizyolojik anjiyogenesise göre farklılık göstermektedir. Uyarıcılar ve inhibe ediciler arasındaki dinamik denge bozulmakta, bu dengenin bozulmasında ise tümör ve endotel hücreleri temel bir rol oynamaktadırlar. Anjiyogenezi uyarmak için yalnızca anjiyogenik faktörlerin artması yeterli olmayıp, tümörün anjiyogenik özellik kazanması için anjiyogenesis inhibitörlerinin de azalması gereklidir. Anjiyogenesisin tümörün yayılmasındaki rolünün yanı sıra metastazı kolaylaştırdığı varsayımını destekleyici, deneysel ve klinik kanıtlar bulunmaktadır (Taşçı, 2012).

2.4. İyonik Sıvılar ve Farmakolojik Özellikleri

İS'ler genellikle, erime noktaları 100 °C' nin altında olan organik tuzlar olarak tanımlanmaktadır (Torimoto ve ark., 2011). İS'ler yüksek iyonik iletkenlik, yanmazlık, düşük buhar basıncı ve yüksek sulu çözünürlük ile karakterize edilmektedir (Kumar ve ark., 2017). En dikkat çekici özellikleri, moleküler bileşikler için mümkün olmayan katyon/anyon kombinasyonunun değiştirilebilme ve fizyokimyasal özelliklerinin ayarlanabilme potansiyelidir. Bu özellik, yeni ve geniş bilimsel araştırma alanı olarak İS yapımında sentez, malzemeler, özel kimyasallar vb. gibi çeşitli alanlarda uygulamalarının bulunmasına katkı sağlamıştır. (Kumar ve ark., 2009).

İS alanındaki gelişmeler ve uygulamaları, üç nesil halinde gruplaşmalarına olanak sağlamıştır. Birinci nesil İS'ler, erime noktası, yoğunluk, viskozite, ısıl kararlılık, iletkenlik ve hidrofobiklik gibi fiziksel özelliklerine dayanmaktadır (Dias ve ark., 2017). İkinci nesil üyeler fiziksel ve kimyasal özellikleri (kimyasal reaktivite, koordinasyon ve çözme) ile karakterize edilmektedirler. Daha yakın zamanda, biyolojik aktiviteye sahip İS'lerin üretiminde Aktif Farmasötik Bileşenleri (API'ler) kullanan üçüncü nesil ortaya çıkmıştır. (Hough ve ark., 2007- Smiglak ve ark., 2007). Üçüncü nesil İS'lerin oda sıcaklığında hem kimyasal hem de termal olarak kararlı olmaları çok önemli avantaj sağlamaktadır. İS'lere özgünlük katan diğer bir durum ise kimyasal çözücülerde çok nadir olarak çözünüp, genel olarak suda çözünmeleridir.



Şekil 2.4. İS'lerin yapısı (Navjeet, 2017'den uyarlanmıştır).

İS'lerin biyolojik aktivitesi ve bunların eczacılık ve tıptaki uygulamaları üzerine yapılan çalışmalar oldukça önemli alanlardır. Farmasötik istihdamın ana alanları, ilaç veya ilaç dağıtım sistemlerini ve ilaç sentezinde tamamlayıcı bileşenlerin kullanımını içermektedir. İS'lerin biyolojik aktiviteleri, çevresel toksisiteni, antimikrobiyal özelliklerini ve kanser hücrelerine karşı sitotoksosite çalışmalarını içermektedir. (Egorova ve ark., 2017)

Klinik çalışmalarda değerlendirilen ilaçların sadece %10'u pazardan piyasaya sürülmektedir. Bu nedenle, etkili ilaçlar ve tedaviler üretmek için yeni bilimsel ilerlemelere ihtiyaç söz konusudur (Ferraz ve ark., 2011). Kanser, dünya çapında önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Toksisitelerine rağmen, kemoterapi, ışınlama ve immünoterapi şu anda kanser tedavisinde temel standart yaklaşımlardır (Balk ve ark., 2015). Düşük toksisiteye sahip ve tümör direnci mekanizmalarından kaçabilen yeni antitümör ajanların geliştirilmesi, farmasötik araştırma alanındaki ana hedefleri arasında yer almaktadır (Dobler ve ark., 2013).

İS'lerin antitümör ajanlar olarak etkilerinin incelenmesi bu bileşik sınıfının kullanımı için yeni bakış açıları getirmiştir. İS'lerin antitümör ajanlar olarak etkilerinin incelenmesi bu bileşik sınıfının kullanımı için yeni bakış açıları getirmiştir. İS'lerin potansiyel antitümör aktivitesini değerlendirebilmek için, insan kanser hücre hatları ile sağlıklı insan hücre hatları karşılaştırılarak toksisitelerinin analizi yapılmıştır (Dias ve ark., 2017). Bu tür in vitro tahlil sistemleri, bu bileşiklerin biyolojik aktivitesini incelemek için faydalı olmuştur; IL'lerin sitotoksitesini hızlıca tespit etmek için kullanılabilirler ve insanlar üzerindeki muhtemel etkilere ilişkin in vitro verilerin ekstrapolasyonuna yardımcı olabilirler. IL sitotoksitesinin tahmin edilmesine yönelik öncü yöntemin, tetrazolyum boyasını (MTT) veya benzer WST boyalarını kolorimetrik formlarına indirgeyen hücresel enzimlerin aktivitesini ölçmeye dayanan MTT tahlili olduğunu gösterir (Egorova, 2014).

İyonik sıvıların toksisiteleri bakımından test edilmesinde, iyonik sıvıları içeren yeni ilaçların keşfedilmesine ilgi duyan araştırmacılar, yeni ilaçların test edilmesinde kullanılan gelenekleri izlemiştir. Bu nedenle, iyonik sıvıların toksisitesinin birçok testi insan olmayan hücrelerin kullanılmasını gerektirmiştir.

kanser ve tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçların önemli bir bileşeni olarak iyonik sıvıların kullanımında açık bir evrimsel eğilim gösteren başlıklar altında sunulması mümkün değildir (Smiglak ve ark., 2014; Organization, 2011). Bununla birlikte, katyonların ve anyonların yapısına bağlı olarak iyonik sıvıların tipindeki değişikliklerin, iyonik sıvıların toksisitesini nasıl etkilediğini ve bunun özellikle kanser hücrelerine referansla nasıl ölçüldüğünü göstermek için her türlü çaba gösterilmiştir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar ve aletler

Çalışmada kullanılan cihazlar/aletler çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve aletler

Cihaz/Alet Adı	Firma-Model
-80 Dondurucu	Hettich
Otoklav	HMC-Hirayama
Çalkalayıcı İnkübatör	Biosan-ES20
Buzdolabı	Vestel-GTP 455A
CO ₂ ’li inkübatör	Esco
Laminar akışlı steril kabin	Esco Airstream
Sirkülatörlü su banyosu	Nüve
Soğutmalı santrifüj cihazı	Nüve
Ters-faz mikroskop	Olympus CKX41
UV/VIS Spektrofotometresi	Denovix DS-11 FX+
Hassas Terazî	Radwag
Pipet tabancası	Greiner
Spin vortex	Biosan-Combi Spin FVL 2400N
Mikroplaka Elisa Okuyucu	Tecan
Buz makinası	Vision
Light Cyler Gerçek Zamanlı PCR Cihazı	qTOWER3G- Analytic Jena
Otomatik Pipet	Eppendorf
Mikro santrifüj	Hettich
PCR cihazı	Bio-Rad
Nanodrop	DeNovix

3.1.2. Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler

Kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kimyasal / Sarf Adı	Marka-Firma
DMSO	Sigma-Aldrich
DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium)	Florabio
DPBS	Pan Biotech
Fetal Bovine Serum (FBS)	Capricorn
RPMI 1640	Sigma-Aldrich
MTT	Sigma-Aldrich
5 Fluorouracil (5-FU)	Koçak Farma
Tripan blue boyası	Biological Industries
Trypsin-EDTA çözeltisi	Sigma-Aldrich
Kloroform	Merck
Etanol	Merck
MMLV Revers Transkriptaz	Geneone
TRIzol	Invitrogen, ABD
Oligo-dt	Macrogen
PFu	Laboratuvarımızda Üretildi
Evagreen	Biotium
dNTPs	Macrogen
L-Glutamin	Biochrom Ag
Gentamisin	Biochrom Ag
Hücre kültürü flaskları (25 ve 75 cm ²)	Greiner
Kriyotüp (Hücre dondurma ampülü)	NEST
Mikrosantrifüj tüpleri	Isolab
0,2 ml’lik PCR tüpleri	Isolab
15 ve 50 ml’lik Eppendorf tüpleri	Isolab
96 kuyucuklu mikropalakalar	SPL
6 kuyucuklu plakalar	SPL

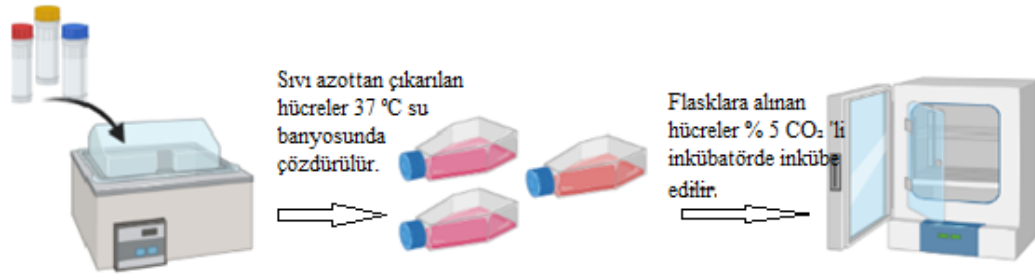
3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre hatlarının kültüre edilmesi ve stoklanması

Bu çalışma kapsamında kullanılan insan akciğer kanseri (A549), insan kolon kanseri (HT29), insan göbek kordonu toplar damar epitel (HUVEC) hücresi ve deri fibroblast (SN-BJ) hücre hatları Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarı'nda oluşturulan hücre stoklarından alınmıştır. A549; DMEM HG besi ortamı, %10 (v/v) fetal sığır serum, %1 (v/v) L-glutamin ve %0.1 (v/v) gentamisin, HT-29; RPMI 1640 besi ortamı, %10 (v/v) fetal sığır serum, %1 (v/v) L-glutamin ve %0.1 (v/v) gentamisin ve HUVEC; DMEM HG besi ortamı, %15 (v/v) fetal sığır serum, %1 (v/v) L-glutamin ve %0.1 (v/v) gentamisin ve BJ-SN; EMEM besi ortamı, %10 (v/v) fetal sığır serumu, %1 (v/v) L-glutamin %0.1 (v/v) gentamisin içeren besi ortamı içerisinde 37 °C' de, %5 CO₂ içeren %95 nemli inkübatörde kulture edilerek çoğaltılmıştır.

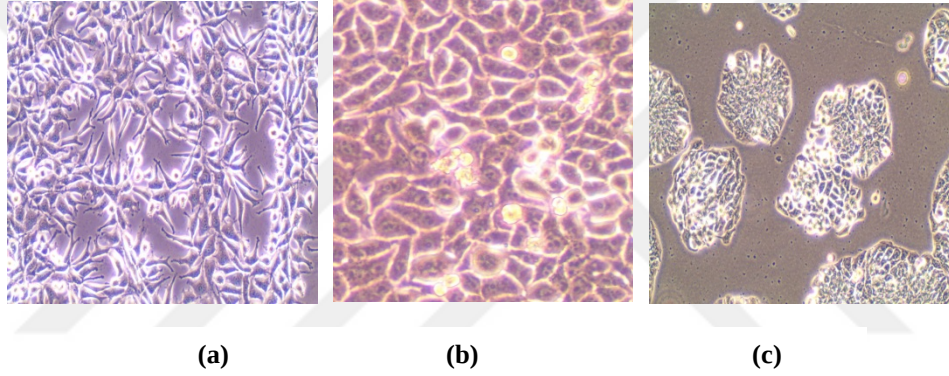
Hücrelerin Çözdürülmesi ve Kültüre Edilmesi

Sıvı azot tankında (-196°C) stoklanmış halde kriotüplerde bulunan hücreler, çıkartıldıktan hemen sonra 37°C'deki su banyosunda çözdürülmüştür. İçeriği çözünen kriotüpteki hücre süspansiyonu biyogüvenlik kabinine alınmıştır. Tüp içeriği her hücre için ayrı olarak hazırlanmış tam büyüme ortamı ile hızlı ve dikkatli bir şekilde toplanarak santrifüj tüpü içerisine aktarılmıştır. Hücreler 5 dakika boyunca 800 rpm (devir/dakika)'de +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonunda faz ayrımı oluşmuştur. Oluşan üst faz (süpernatant) atılarak, pellet üzerine her hücrenin taze besi ortamı eklenmiş ve hücre süspansiyonu homojenize edilmiştir. Homojenize edilen hücreler uygun yüzey alanına sahip kültür kabına alınmıştır. Etiketleme işlemi yapıldıktan sonra kültür kabı 37 °C' de, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin morfolojileri ters-faz ışık mikroskobu ile incelenmiştir ve hücrelerin besi ortamı gün aşırı olacak şekilde değiştirilmiştir. Konfluensisi % 80-90'na ulaşan hücreler, pasajlanarak çoğaltılmıştır.



Şekil 3.1. Hücrelerin çözündürülmesi ve kültüre alınması

Kültürün devamlılığını sağlamak için hücrelerin besi ortamı gün aşırı olacak şekilde tazelenmiştir.



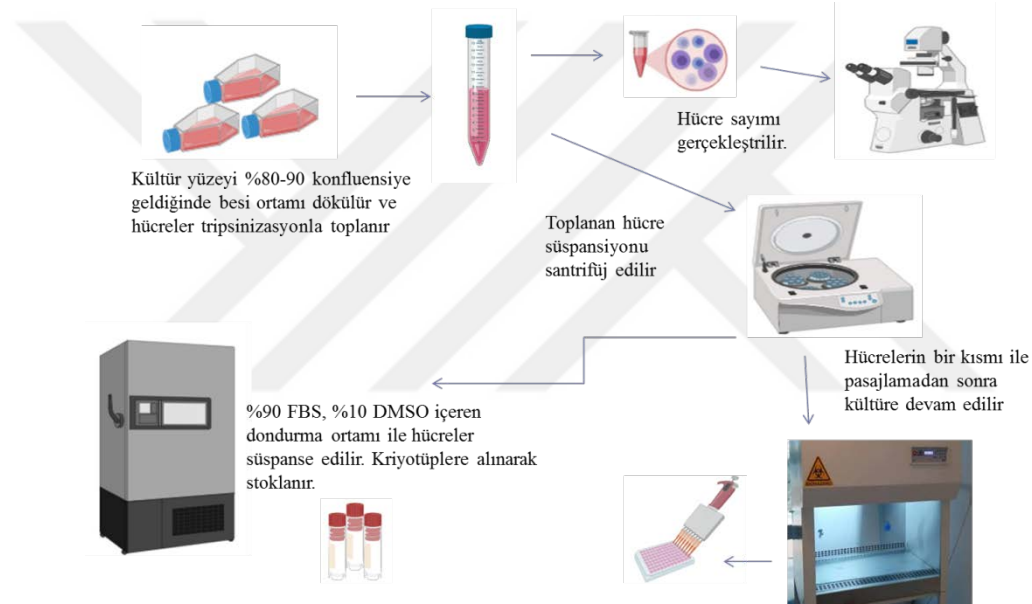
Şekil 3.2. Hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (a: HUVEC, b:A549, c: HT29, 10x görüntüsü)

Hücrelerin pasajlanması ve stoklanması

Kültür kapları %80-90 konfluensiye ulaştığında hücrelerin üzerindeki eski besi ortamı uzaklaştırılıp, üzerine 37°C’de ısıtılmış olan, steril Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen fosfat tamponlu salin (DPBS) ile hücrelerin yüzeyi yıkanmış ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkması kolaylaştırılmıştır. Sonrasında PBS uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine 37°C’de ısıtılmış tripsin- EDTA çözeltisi eklenerek 37°C’de % 5 CO₂ ‘li inkübatör içerisinde 3-5 dk bekletilerek, hücrelerin birbirlerinden ve yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Biribirinden ayrılan hücreler, tam besi ortamı ile (serum içeren besi ortamı) süspanse edilerek homojenize hale getirilmiştir. Ardından santrifüj tüpüne alınan hücre süspansiyonu 800 rpm(devir/dakika)’de +4°C’de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifügasyon işleminden sonra elde edilen üst faz (süpernatant) uzaklaştırılıp, pellet taze besi ortamı ile homojenize edilmiştir. Süspanse haldeki hücreler belirlenen pasaj

oranına göre seyreltilip yeni flasklara aktarılmıştır. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂ içeren % 95 nemli ortamda inkübe edilmiştir.

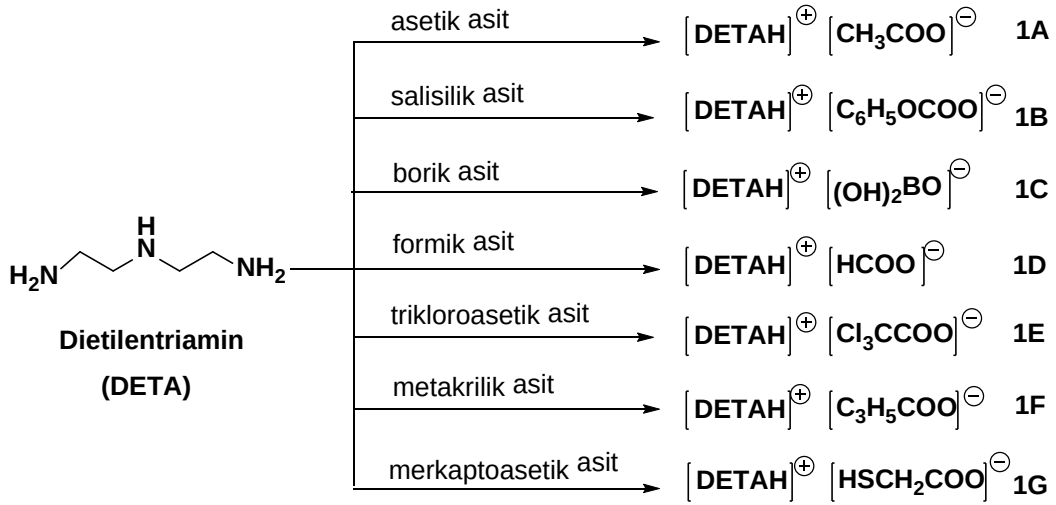
Kullanılan hücrelerin stoklanması için hücreler tripsinizasyon işleminden sonra santrifüj edilen hücre pelleti üzerine dondurma ortamı hazırlanarak (% 90 (v/v) FBS, % 10 (v/v) dimetilsülfoksit, DMSO) hücreler süspanse edilmiş ve kriyotüplere 1 mL hacimde olacak şekilde paylaştırılmıştır. Etiketleme yapıldıktan sonra kriyotüpler, gece boyunca -86 °C'de bekletildikten sonra ertesi gün teorik olarak sonsuza kadar stoklanabilecekleri, -196 °C sıcaklığa sahip sıvı azot tankına kaldırılmıştır.



Şekil 3.3. Hücrelerin pasajlanması ve dondurulması

3.2.2. İyonik sıvıların kanser hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesi

Dietilentriamin (DETA) esaslı İS'ler, DETA ile çeşitli organik ve inorganik asitlerin eşdeğer molar miktarda reaksiyonu ile literatür yöntemine göre sentezlenmiştir (Mucur ve ark., 2021). Söz konusu sentez çalışmaları, tezin ikinci danışmanı olan Doç. Dr. Hüseyin AKBAŞ tarafından gerçekleştirilmiştir.



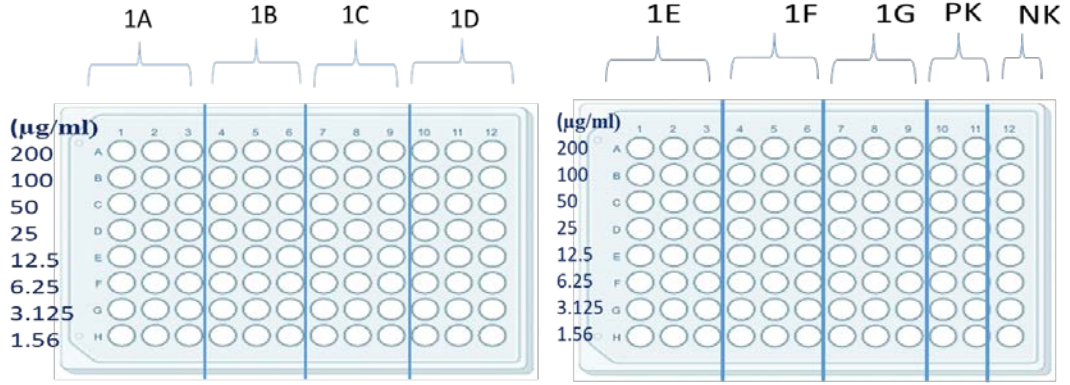
Şekil 3.4. DETA esaslı İS'ler

DETA esaslı İS'lerin kodlandırılması çizelge 3.3' te verilmiştir. Bu İS'lerin kanser hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesi için akciğer kanseri (A549) ve kolon kanseri (HT29) kullanılmıştır. Bunun yanı sıra, anjiogenik değerlendirmeyi yapabilmek için insan göbek kordonu toplardamar endotel hücresi (HUVEC) ve yara iyileşme için insan deri fibroblast (BJ) hücresi kültüre alınmış ve analiz için istenilen hücre sayısı yeterli olana kadar kültüre devam edilmiştir.

Çizelge 3.3. DETA esaslı İS'lerin kodlandırılması

MADDE ADI	KOD
dietilentriamin asetat	1A
dietilentriamin salisilat	1B
dietilentriamin borat	1C
dietilentriamin format	1D
dietilentriamin trikloroasetat	1E
dietilentriamin metakrilat	1F
dietilentriamin merkptoasetat	1G

Sentezlenen yedi İS için 0.05 mg/ml konsantrasyonda madde ana stokları distile su hazırlanmıştır. Ardından en düşük konsantrasyonda (200 µg/ml) ham besi ortamı ile ara stoklar hazırlanarak 0.02µM gözenek çapına sahip filtrelerden geçirilmiştir.



Şekil 3.5. İS'lerin hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesinde kullanılan pleyt planları ve madde konsantrasyonları

Tez çalışmasında biyolojik aktiviteleri incelenen maddelerin, çalışmada kullanılan hücreler ile etkileşiminin ve maddelerin etkinliğinin doğru analiz edilebilmesi için ilk olarak doğru hücre sayısının belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle laboratuvarıda daha önceki çalışmalarda yapılan büyüme eğrisi grafikleri incelenmiş ve çizelge 3.3' deki hücre sayılarına karar verilmiştir.

Çizelge 3.4. İS'lerin kanser hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesi analizinde kullanılan başlangıç hücre sayıları

Kullanılan Hücre Hattını Adı	Hücre Sayısı
HT29	5×10^4 h/ml
A549	5×10^4 h/ml
HUVEC	5×10^4 h/ml

Yeterli konfluensiye gelen kültür yüzeyi üzerindeki eski besi ortamı uzaklaştırılarak 37°C 'de ısıtılmış olan, steril Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen fosfat tamponu (DPBS) ile hücrelerin yüzeyi yıkanmıştır. Bu yıkama ile hücrelerinden yüzeyden ayrılması kolaylaştırılmıştır. Daha sonra flask içerisindeki DPBS çekilerek hücrelerin üzerine 37°C 'de tripsin – EDTA çözeltisinden eklenerek hücrelerin yüzeyden ve birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan hücrelerin üzerine tam besi ortamı ilave edilerek süspansiyon homojenize hale getirilmiştir ve santrifüj tüpüne alınmıştır. Bu aşamada hücre sayısını hesaplamak için homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan $200\mu\text{l}$ mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Santrifüj tüpünde bulunan hücre süspansiyonu $+4^\circ\text{C}$ ' 800 rpm 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelletinin taze tam besi ortamı içinde homojenizasyonu sağlanmıştır.

Sayım için alınan hücre süspansiyonlarının içerisindeki hücre sayısı *Neubauer* Lamı aracılığıyla ve tripan mavisi ile boyam yöntemi ile belirlenmiştir. Hücre sayılarının belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır

$$\text{Hücre sayısı (h/ml)} = \frac{\text{canlı hücre sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 10^4}{\text{sayılan kare sayısı}}$$

Hesaplanan miktarlarda hücre süspansiyonları, yapılan pleyt planındaki gibi 96 gözlü pleytlere, her göze 5×10^4 h/ml olacak şekilde 3 tekrarlı olarak ekimi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon için %5 CO₂ 'li 37°C' deki inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir.

24 saatlik inkübasyonun sonunda sentezi gerçekleştirilmiş olan İS'lerin 50 mg/ml olacak şekilde ana stok hazırlanmıştır. Steril ara stoklar hazırlandıktan sonra, ilk çalışma konsantrasyonu 200µg/ml olarak ayarlanmış, ardından seri dilüsyonlar yapılarak bileşikler sekiz farklı konsantrasyonda (200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,13 µg/ml, 1,56 µg/ml) çalışılmıştır. Bu uygulamada akciğer kanseri (A549) ve kolon kanseri (HT29) hücre hattı için pozitif kontrol olarak 5-Fluorourasil kemoterapi ilacı kullanılmıştır (Korkut, 2018). Maddelerin eklenmesi ve dilüsyon işlemlerinin tamamlanmasının ardından MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ile canlılık analizi yapmak üzere 37°C'de, %5 CO₂ içeren %95 nem oranına sahip inkübatöre kaldırılmıştır. 24. ve 48. saatin sonunda MTT testi uygulanmıştır.

İS'lerin kanser hücre hatları üzerindeki anti-proliferatif etkileri, MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Söz konusu yöntemin temelini, tetrazolyum tuzlarının elektron alarak indirgenmeleri oluşturmaktadır. Bu indirgenme tepkimesi, tetrazolyum tuzlarının formazan kristallerine dönüşmelerini sağlamaktadır. Tetrazolyum halkasının ancak aktif mitokondri tarafından kırılabilirdiği ve böylece renk reaksiyonunu yalnızca canlı hücrelerin meydana getirebildiğinden, ilgili analizde mor renk oluşumu hücre canlılığını ifade etmektedir. Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybederek ve herhangi bir renk değişimine neden olmamaktadırlar. Bu değişimin, in vitro ortamda yalnızca canlı hücreler tarafından yapılabilmesi, tetrazolyum bileşiklerini biyolojik anlamda oldukça önemli kılmıştır (Tokur ve Aksoy, 2017).

MTT için, pleytteki kullanılmış eski besi ortamı çekilmiştir ve hücrelerin üzerine 100µl MTT içeren besi ortamı hangi konsntrasyonda içeren eklenmiştir. Hücreler karanlıkta 37°C'deki %5 CO₂'li inkübatörde 3 saat boyunca inkübe edildikten sonra hücrelerin üzerine DMSO eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Pleyt okuyucu'da 570 nm dalga boyunda pleytler okutularak absorbans değerleri kaydedilmiştir.

Uygulanan testten elde edilen verilerin anlamlılık derecelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için GraphPad 9.0 Prism programı (versiyon 9, GraphPad Software, Inc., San Diego Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır. Her bir örnek için kaydedilen absorbans değeri, o deney setine ait hücre kontrolünün absorbans değerine oranlanıp % canlılık oranları belirlenerek grafiklenmiştir. Hesaplamalar maddeler arasındaki antiproliferatif etkinin istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı *Two-way ANOVA* testi uygulanarak belirlenmiştir

3.2.3. Hücre Göçü Analizi (*in vitro* çizik testi)

In vitro çizik testi, hücre göçünü ölçmek için kolay, düşük maliyetli ve iyi geliştirilmiş bir yöntemdir (Liang ve ark., 2007). Çizik veya migrasyon tahlili, farklı yeni ilaç adaylarına yanıt olarak migrasyon, anjiyogenez, hareket, proliferasyon ve iyileşme oranlarının *in vitro* çalışmaları için yaygın olarak kullanılan bir araçtır (Suarez, 2020; Arnedo ve ark., 2020). Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, *in vitro* çizik tahlili özellikle hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimlerinin hücre göçü üzerindeki etkileri üzerine çalışmalar için uygundur. Hücre göçü, tüm çok hücreli organizmalarda önemli bir süreçtir ve doku gelişimi, onarımı ve yenilenmesi için gereklidir. Yönlü göç, kemokinler ve hücre dışı matriks (ESM) bileşenleri gibi hücre dışı uyarılara yanıt olarak tetiklenmektedir (Goetsch ve ark., 2011). Bu bağlamda, *in vitro* çizik yara iyileştirme deneyi, hücreler şartlandırılmış ortamda mevcut metabolitlere maruz bırakılırken çoğalma ve göç sürecini değerlendirmek için faydalıdır. Bunun nedeni, bu yaklaşımın *in vivo* hücre göçü sürecini taklit eden bir ortam sağlamasıdır. Bu tahlilin en dikkat çekici avantajları, özel ekipman veya pahalı reaktiflerin düşük gereksinimleridir, bu da onu sınırlı bütçeli araştırma gruplarına uyarlanabilir hale getirmektedir. Ek olarak,

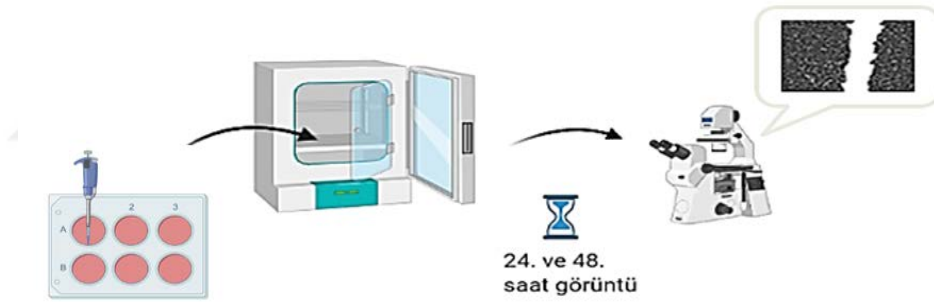
üretileen verilerin çok çeşitli açık erişim yazılım paketleri ile analiz edilmesi nispeten kolaydır.

Temel adımlar, tek tabakalı hücreler üzerinde bir "çizik" oluşturmayı, oluşan çizik alanında başlangıçta ve hücre göçü sırasında düzenli aralıklarla görüntülerin yakalanmasını ve hücre göçünün oranını belirlemek için görüntülerin karşılaştırılmasını içermektedir (Liang ve ark 2007).

Çalışma kapsamında kullanılan İS'lerden bazılarının kanser hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı MTT analizi sonucunda elde edilmiştir. Bu maddelerin hücre proliferasyonunu azalttığı gibi anti metastatik etkisinin var olup olmadığını anlamak için akciğer kanseri, kolon kanseri ve göbek kordonu toplardamar epitel hücreleri üzerinde yara modeli oluşturularak migrasyon analizi yapılmıştır. Yara iyileşmesi, doku hasarından sonra hücre yapının ve hücre dışı bileşenlerin onarılmasına yönelik karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Geleneksel çizik tahlili, yara iyileştirme analizinde yönlü hücre göçünü incelemek için basit bir in vitro yöntem sağlamaktadır. Bu tahlil, pipet ucu yardımıyla yapay bir yaralanma alanı oluşturularak hücre tek tabakasının çizilmesiyle gerçekleştirilir. Yara iyileşme sürecindeki hücre göçü, yara oluşturma noktasından hücre birleşmesi ile kapanmasına kadar zaman içinde fotoğrafik görüntüler yakalanarak izlenir izlenmektedir (Liang CC ve ark., 2007). Çizilmiş alanın iyileşmesini değerlendirerek, oranı ölçmek mümkündür. Yara kapanmasının incelenmesi ve hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerinin incelenmesi (Rodriguez Luis, ve ark., 2005), yara kapanma hızı, hem çözünür hem de katı substrat etkilerine yanıt olarak hücre göçü, proliferasyon ve morfolojik değişim dahil olmak üzere çok sayıda hücre sürecinin toplamıdır (Cai, Anna Q., ve ark., 2007). Bu tez projesinde de maddelerin anjiogenez üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla HUVEC hücresi kullanılmıştır.

Yapılan MTT testi sonucuna bakılarak sekiz farklı konsantrasyon (200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,13 µg/ml, 1,56 µg/ml) içerisinde HUVEC için; 200-100 µg/ml, HT29 için; 100-50-25 µg/ml ve A549 için; 50-25 µg/ml konsantrasyonlarda hücre ölümünü teşvik ettiği belirlenmiş olup, tüm maddelerin belirtilen dozlarda çalışılmasına karar verilmiştir.

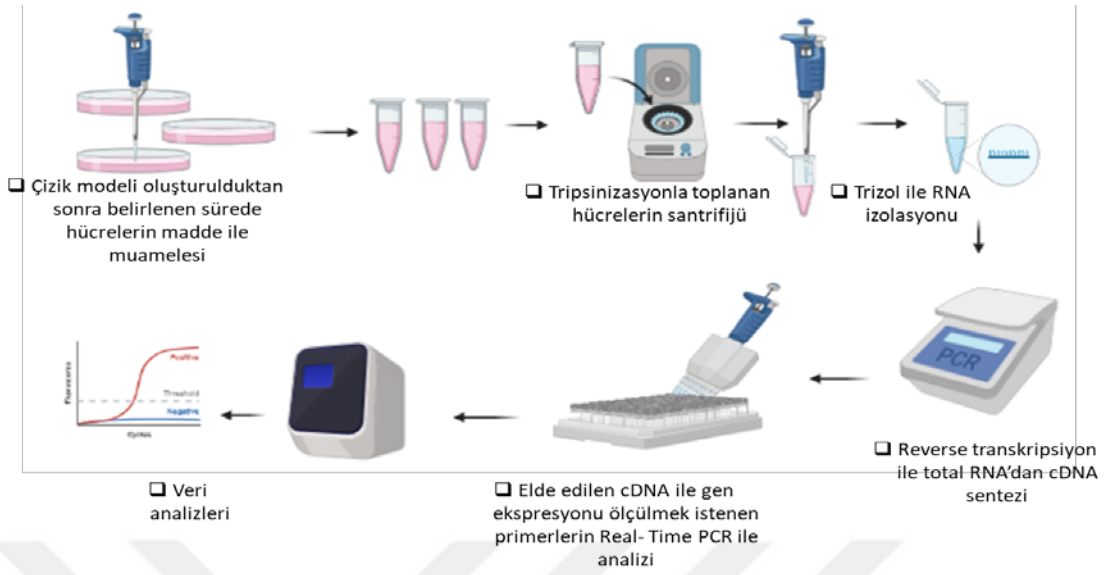
A549, HUVEC ve HT29 hücre hatları 6 gözlü kültür pleytlerine ekilerek gün aşırı olacak şekilde hücrelerin besi ortamları değiştirilmiştir. %80-90 konfluensiye ulaşan hücre hatları üzerinde eski besi ortamı uzaklaştırılmadan 200µm'lik pipet ucuyla yara modeli oluşturulmuştur. Yara modeli oluşturulduktan sonra eski besi ortamı uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkanarak yüzeyde kalan hücre parçaları uzaklaştırılmıştır. Daha sonra üzerine yukarıda belirtilen dozlarda ve hücre hatlarına uygun besi ortamlarıyla hazırlanan maddeler 6 gözlü kültür pleytlerine eklenmiştir (Rodriguez ve ark., 2005). Ardından, 0.-24. ve 48. saatte 4x boyutta fotoğraflar çekilerek migrasyon alanları Image J programı ile hesaplanmıştır. Uygulanan testten elde edilen verilerin anlamlılık derecelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için GraphPad 9.0 Prism programı (versiyon 9, GraphPad Software, Inc., San Diego Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır. Ayrıca istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı Two-way ANOVA testi uygulanarak belirlenmiştir.



Şekil 3.6. Yara modelinin oluşturulması ve görüntülenmesi

3.2.4. Gen ekspresyon analizi

Tez çalışması kapsamında, yapılan migrasyon analizi sonucuna bakılarak 1E ve 1G maddelerinin HT29 için; 100 µg/ml ve A549 için; 50 µg/ml konsantrasyonlarda migrasyonda etkili olduğu belirlenmiş ve gen ekspresyon çalışmalarına bu doğrultuda devam edilmiştir. Akciğer kanseri(A549) ve kolon kanser (HT29) hücrelerinde migrasyonda görev alan önemli genlerin (VEGF, HIF-1α, MMP2 ve MMP9) mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) kullanılarak belirlenmiştir (Yang ve ark., 2008). Bu amaçla hücrelerden önce RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş (Reagent, TRIzol, ve C. Safety, 2018) ardından, ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile cDNA sentezlenmiştir.



Şekil 3.7. Programlı hücre göçü (migrasyon) ile ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu

A549, HT29 ve HUVEC hücre hatları, 75 cm²'lik kültür kaplarına ekilmiştir. Ardından %80-90 konfluensiye sahip hücre yüzeyleri tripsinizasyon yöntemi ile kaldırılarak her bir hücre hattı için üçer petriye (20 cm²) hücreler ekilmiştir. %80-90 konfluensiye ulaşana kadar gün aşırı olarak hücrelerin besiy ortamları değiştirilmiştir. İstenilen yoğunlukta yüzey alanına ulaşıldığında hücrelerin üzerinde yara alanları oluşturulmuştur. Petrilerden birine etken madde verilmeyerek kontrol grubu oluşturulmuştur. Diğer petrilere de anti-metastatik etkisi olduğu tespit edilen madde/maddelerin etkin konsantrasyonlarıyla, etkinlik gösterdiği belirlenen süre boyunca muamele edilmiştir. İnkübasyon sonrası eski besiy ortamı uzaklaştırılıp, kültüre edilmiş hücrelerden total RNA, TRIzol kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda izole edilmiştir. Total RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu nanodrop spektrofotometre cihazı (Denovix DS-11) kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen total RNA -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucu 1E ve 1G maddelerinin çalışmalarda kullanılan akciğer kanseri hücre hattı (A549), kolon kanseri hücre hattı (HT-29) ve insan göbek kordonu epitel hücre hattı (HUVEC) üzerinde özellikle 48. saat sonunda anti-metastatik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Çalışma planı bu bilgiler doğrultusunda oluşturulmuştur.

1E ve 1G maddelerinin hücrelerle etkileşiminden 24. ve 48. saatlerinde alınan fotoğraf görüntüleri sonucunda yara alanlarındaki % kapanmalar image J programı ile hesaplanmış ve RNA izolasyonuna başlamadan önce hücrelere muamele edilecek madde miktarları belirlenmiştir.

Belirtilen bu hususlar doğrultusunda, 1E, 1G ve madde ile muamele edilmemiş kontrol grubu olmak üzere her hücre ayrı ayrı petriye alınmıştır. Devam eden günlerde hücrelerin %80-90 konfluensiye ulaştığı görüldüğünde 200 µl'lik pipet ucuyla hücrelerde yara alanları oluşturulmuş ve maddeler belirlenen konsantrasyonlarda besi ortamı ile seyreltilerek petrilerin içerisine eklenmiştir. Hücrelerin madde ile etkileşiminden 48 saat sonra DPBS ile yıkayıp ardından tripsin uygulanmıştır. 37 °C' de %5 CO₂'li inbübatörde 3-5 dk arası tripsin ile muamele edilmiştir. Ardından hücre kazıyıcılar ile hücrelerin petri yüzeyinden tamamen kaldırılması sağlanmıştır. Kaldırılan hücreler besi ortamı ile homojen olarak süspanse edildikten sonra eklenecek trizol miktarının belirlenmesi için hücre sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Sayım için hücre süspansiyonundan 200 µl mikrosantrifüj tüpüne örnek alınmış kalan süspansiyon santrifüj tüplerine alınarak, 800 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılmıştır ve hücre pelleti 1 ml besi ortamı ile toplanarak 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. RNA izolasyonu aşamasına geçmeden önce besi ortamını uzaklaştırmak için hücreler 4°C'de 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra, (sigma aldrich) TRIzol ile RNA izolasyon protokolü uygulanmıştır.

TRIZol protokolü;

- Başlangıç materyalimize göre örnekler trizol reaktifinde parçalandı ve homojenize edildi.
 - Monolayer kültür için;
 - a) Hücreler büyüme ortamından kaldırıldı.
 - b) 1×10^5 - 10^7 hücre için pellet üzerine 0.3-0.4 ml trizol solüsyonu eklendi.
 - c) Lizat, pipetaj yapılarak homojenize hale getirildi.
1. Nükleoprotein kompleksinin tamamen ayrışmasına izin vermek için 5 dakika inkübe edildi.

2. Lizis için kullanılan 1 ml trizol reaktifi başına 0,2 ml kloroform eklendi, ardından tüpü sıkıca kapatıldı.
3. 2-3 dakika santriüj yapıldı.
4. Örnekleri 15 dakika boyunca +4 °C' ,12000 x g'de santrifüjlendi.

Karışım, bir alt kırmızı fenol-kloroform ve ara yüze ve renksiz bir üst sulu faza ayrıldı.

5. RNA içeren sulu fazı yeni bir tüpe aktarıldı.
6. Sulu faza 1 ml trizol başına 0.5 ml izopropanol eklendi.
7. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. Ardından 15 dakika boyunca +4 °C' ,12000 x g'de santrifüjlendi.

Total RNA çökeltisi tüpün boğumunda beyaz jel benzeri yapı oluşturur.

9. Mikropipet ile süpernatant atıldı.
10. Pelleti 1 ml trizol başına %75 etanol içinde tekrar süspanse hale getirildi.
11. Numune kısa süreli vortekslendi, ardından 5 dakika 7500 x g'de 4'te santrifüjlendi.
12. Mikropipet ile süpernatant atıldı.

Bu yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı.

13. RNA pelletini 5-20 dakika tüpün kapağı açık halde hava ile kurutuldu.

Protokol uygulandıktan sonra izole edilen total RNA'nın ölçümü yapılmıştır.

Total RNA'ya 20 µl DEPC'li su (RNase inhibitörü) eklenerek mikropipet yardımı ile homojen hale getirilmiştir. Ardından nanodropta ölçüm yapılmıştır.

Total RNA'dan Revers Transkripsiyon ile Komplementer DNA (cDNA) Sentezi):

Her bir hücre ve maddeden izole edilen total RNA'dan tek zincirli cDNA, aşağıda verilen protokol doğrultusunda elde edilmiştir (Yıldırım, 2020)

Çizelge 3.5'de verilen tüm PCR bileşenleri, steril PCR tüpüne konulmuştur ve reaksiyon, 42 °C'de 60 dk. inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. Tek bir reaksiyon için kullanılan PCR Bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Total RNA	1 µl
10x MMLV Buffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	2.4 µl
10mM dNTP mix	1 µl
oligo dT	1 µl
MMLV Reverse Transkriptase	0.1 µl
DEPC'li su	12.5 µl
Toplam hacim 20 µl	

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time–PCR, qRT-PCR)

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR), qTOWER3G markalı Real-Time PCR Thermocycler'da gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu, kalıp DNA'nın başlangıç miktarını spesifik, hassas ve tekrarlanabilir şekilde tespit etmektedir. SYBR green çift sarmal DNA'ya bağlanabilen ancak tek zincirli DNA'ya bağlanamayan bir boyadır. Eş zamanlı PCR reaksiyonlarında ucuzluğu ve hassasiyeti sebebi ile çok tercih edilen bir boyadır. EvaGreen, PCR için daha az inhibe edici ve SYBR Green ile kıyaslandığında daha az toksik olan, çift sarmallı DNA bağlayıcı bir boyadır (Eischeid, 2011). Bu çalışmada belirtilen avantajlarından dolayı qRT-PCR analizlerinde çift iplikli DNA'ya bağlanarak ışıma yapan EvaGreen boyası kullanılmıştır. Serbest halde sulu çözelti içerisinde zayıf bir floresan olan bu boya çift sarmallı DNA ile bağlandığında oldukça floresan hale gelmektedir. Bu çalışmada, miktar tayini için göreceli kantifikasyon (relative quantification) yapılmıştır. Primerler MacroGen Europe şirketinden satın alınmış ve çizelge 3.6'da verilen VEGF, HIF-1 α , MMP2, MMP9 ve referans (housekeeping) gen olarak Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanılmıştır (Haifeng, 2017).

Çizelge 3.4. qRT-PCR 'da kullanılan primer dizileri (Haifeng, 2017)

PRİMER	DNA DİZİSİ (5'-3')	TM(°C)
MMP-2	5'- CCA ACT GCA AAA AAA GCC TCC -3' (21 mer)	59.4 °C
	5'- GTT TCT CGC TCC CAT TTC T -3' (19 mer)	55.2°C
MMP-9	5'- CCC TGG AGA CCT GAG AAC CAA -3' (21 mer)	63.3 °C
	5'- CAT CTC TGC CAC CCC ACT GTA -3' (21 mer)	63.3°C
HIF 1- α	5'- CCT ATG TAG TTG TGG AAG TTT ATG -3' (25 mer)	62.5°C
	5'- ACT AGG CAA TTT TGC TAA GAA TG -3' (23 mer)	57.5°C
VEGF	5' – CGG GAA CCA GAT CTC TCA CC – 3' (20 mer)	62.5°C
	5' – AAA ATG GCG AAT CCA ATT CC – 3' (20 mer)	54.3°C
GAPDH	5' – GGA TTT GGT CGT ATT GGG -3' (18 mer)	53.9 °C
	5' – GGA AGA TGG TGA TGG GAT T – 3' (19mer)	54.9°C

Çizelge 3.5. qRT-PCR bileşenleri

Bileşenler	Miktarlar
Primer 1	1 µL
Primer 2	1 µL
dNTP mix	0.2 µL
PFu	0.5 µL
10x Buffer	1 µL
20x EvaGreen	0.5 µL
cDNA	1.2 µL
DEPC'li Su	4.6 µL
Toplam Hacim 10 µL	

PCR reaksiyonu için belirtilen bileşenler her primer için ayrı ayrı karışımlar olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlar, vorteks ve spin işleminden sonra Real-Time PCR cihazı için üretilen şeffaf kapaklara sahip PCR tüplerine dikkatli bir şekilde eklenmiştir. Ardından PCR tüpleri cihaza konularak reaksiyon başlatılmıştır.

Çizelge 3.8. qRT-PCR aşamaları

Reaksiyon aşamaları			40 döngü
1)Başlangıç denatürasyonu	94°C	3 dakika	
2)Denatürasyon	94°C	30 saniye	
3)Annealing	56°C	30 saniye	
4)Uzama	72°C	1 dakika	

Erime eğrisi (melting curve) analizi için 40. döngünün sonuna melting curve eklenmiştir. PCR etkinliğini belirlemek ve dimer oluşup oluşmadığını tespit etmek için erime eğrisi (melting curve) analizi gerçekleştirilmiştir.

mRNA Ekspresyon Düzeylerinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ Analiz Yöntemine Göre Hesaplanması:

Real-time PCR ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin kantifikasyonu için “karşılaştırmalı $2^{-\Delta\Delta CT}$ ” yöntemi kullanılmıştır. $\Delta\Delta CT$ değeri; PCR ürünlerinin miktarındaki önemli artışın olduğu ilk döngüyü ifade etmektedir. Kalibratör olarak referans genden ve karşılaştırma yapabilmek için kontrol grubundan yararlanılmıştır. Referans hedef genin bir kontrol gene (GAPDH) göre relatif ekspresyonuna bakılmıştır. Bu yöntem düşük yoğunlukta sentezlenen genlerin ekspresyon çalışmaları için çok uygun bir yöntemdir. Hesaplama yaparken aşağıdaki denklemler kullanılmıştır:

$$\text{Kontrol } \Delta_{CT} = \text{Kontrol } CT_{(gen)} - \text{Kontrol } CT_{(GAPDH)}$$

$$\text{Örnek } \Delta_{CT} = \text{Örnek } CT_{(gen)} - \text{Örnek } CT_{(GAPDH)}$$

$$\Delta\Delta_{CT} = [(\text{Örnek } \Delta_{CT})_{\text{ort.}} - (\text{Kontrol } \Delta_{CT})_{\text{ort.}}]$$

$$\text{Hedef gen mRNA miktarı} = 2^{-\Delta\Delta_{CT}}$$

PCR eksponansiyel bir süreç olduğundan değişim 2'nin üstel fonksiyonu şeklinde ifade edilmektedir. Kontrol için elde edilen $\Delta\Delta_{CT}$ değerleri yaklaşık olarak “0” olduğu $2^{-\Delta\Delta_{CT}}$ için değerleri “1” dir (Livak ve ark., 2001). Elde ettiğimiz sonuç ilgilendiğimiz hedef genin örnek grubundaki ekspresyonunun kontrole göre relatif miktarıdır. Bir orantı ifadesi olduğundan birim içermez. Kontrole göre örnekteki hedef genin ekspresyonunun kaç kat arttığını veya azaldığını göstermektedir.

3.2.5. Yara iyileşme

Bu çalışmada, 1E ve 1G İS'lerin olası yara iyileştirici etkisi için in vitro çizik testi yapılmıştır. İlk adım, monolayer hücre tabakasında yapay bir yara oluşturmaktır. Daha sonra başlangıçta ve hücre göçü sırasında düzenli aralıklarla görüntü alma gerçekleştirilmiştir. Son olarak, hücrelerin göç hızı, hücre mikrografları karşılaştırılarak nicelendirilmiştir (Tayhan ve ark., 2018).

Bu çalışmada kullanılan insan deri fibroblast (BJ) hücre hattı Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarı'nda oluşturulan hücre stoklarından alınmıştır.

Sıvı azot tankında (-196°C) kriyotüplerde stoklanmış halde bulunan deri fibroblast hücresi (BJ SN), 37°C'deki su banyosunda çözündürülmüştür. İçeriği çözünen kryotüpteki hücre süspansiyonu biyogüvenlik kabinine alınmıştır. Tüp içeriği BJ hücre hattı için ayrı olarak hazırlanmış tam büyüme ortamı (EMEM besi ortamı, %10 (v/v) fetal sığır serumu, %1 (v/v) L-glutamin %0.1 (v/v) gentamisin) ile hızlı ve dikkatli bir şekilde toplanarak santrifüj içerisine aktarılmıştır. Hücreler 5 dakika boyunca 800 rpm (devir/dakika)'de +4°C'de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifigasyon sonunda faz ayrımı oluşmaktadır. Oluşan üst faz (süpernatant) atılarak, pellet üzerine her hücrenin taze besi ortamı eklenmiş ve hücre süspansiyonu homojenize edilmiştir. Homojenize edilen hücreler uygun yüzey alanına sahip kültür kabına alınmıştır. Etiketleme işlemi yapıldıktan sonra kültür kabı 37 °C' de, %5 CO₂ içeren %95 nemli inkübatörde kulture edilerek çoğaltılmıştır.

Hücrelerin morfolojileri ters-faz ışık mikroskobu ile incelenmiştir ve hücrelerin besi ortamı gün aşırı olacak şekilde değiştirilmiştir. Konfluensisi %80-90'na ulaşan hücreler, kültür yüzeyinden tripsin kullanılarak kaldırılıp 6 gözlü pleytlere alınmıştır. Hücre morfolojileri düzenli olarak kontrol edilmiş ve gün aşırı olacak şekilde besi ortamı değiştirilmiştir. %80 konfluensiye geldiğinde hücreler üzerinde 200µm'lik pipet ucuyla yara modeli oluşturulmuştur. Her kuyucuk PBS ile yıkanarak hücre artıkları uzaklaştırılmıştır. 1E (50-100 µg/ml) ve 1G (50-100 µg/ml) maddesi bu konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Hazırlanan madde konsantrasyonları yara modeli

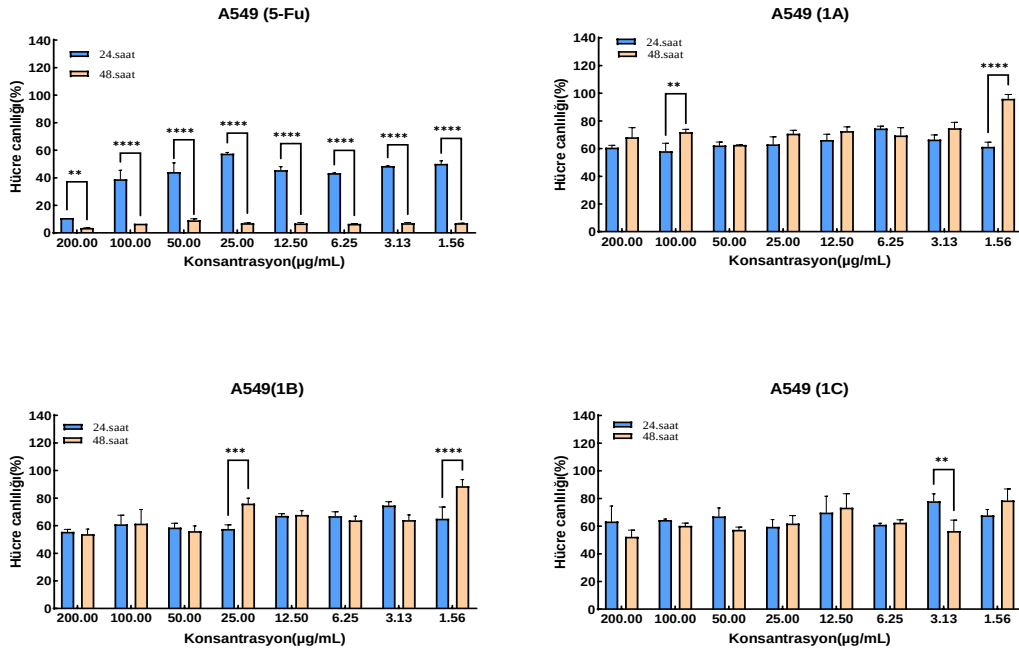
üzerine eklenerek 0., 24. ve 48. saatte fotoğraf görüntüleri alınarak negatif kontrolle kıyaslanmıştır.



4. BULGULAR

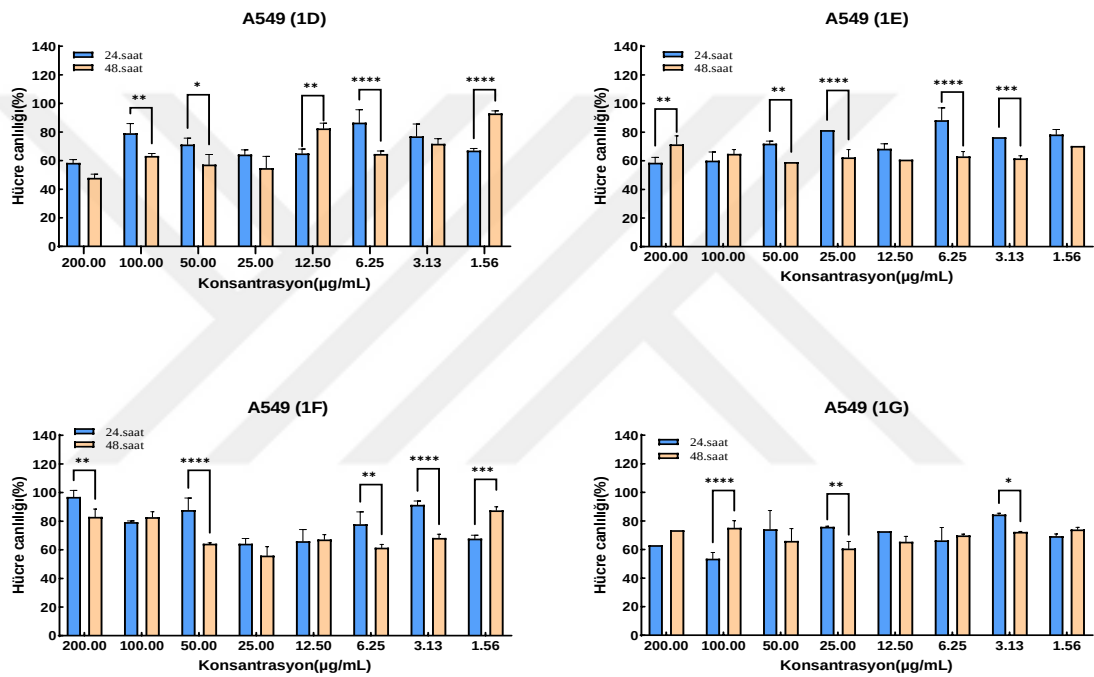
4.1. İyonik Sıvıların Kansere Hücresi Üzerindeki Anti-Proliferatif Etkilerinin Değerlendirilmesi

Sentezi gerçekleştirilmiş İS'lerin akciğer kanseri (A549), kolon kanseri (HT29) ve kordon epitel hücresi (HUVEC) olmak üzere üç ayrı hücre hattındaki antiproliferatif etkileri MTT analizi ile *in vitro* belirlenmiştir. MTT analizi, suda çözünür sarı boya MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]'ün mitokondriyal redüktazın etkisiyle çözünmeyen mor bir formazana dönüştürülmesini içermektedir. Formazan daha sonra çözülme ve konsantrasyon 570 nm'de optik yoğunluk ile belirlenmektedir. (Kumar ve ark., 2018). Analiz sonucunda elde edilen verilerin anlamlılık derecelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için GraphPad 9.0 Prism programı (versiyon 9, GraphPad Software, Inc., San Diego Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır. Oluşturulan yüzde canlılık grafiklerinde maddelerin konsantrasyonları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı *Two-way ANOVA* testi uygulanarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. İS'lerin (pk: pozitif kontrol 5-Fu, 1A, 1B, 1C) A549 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri (****P≤0.0001, ***P≤0.0005, **P≤0.001)

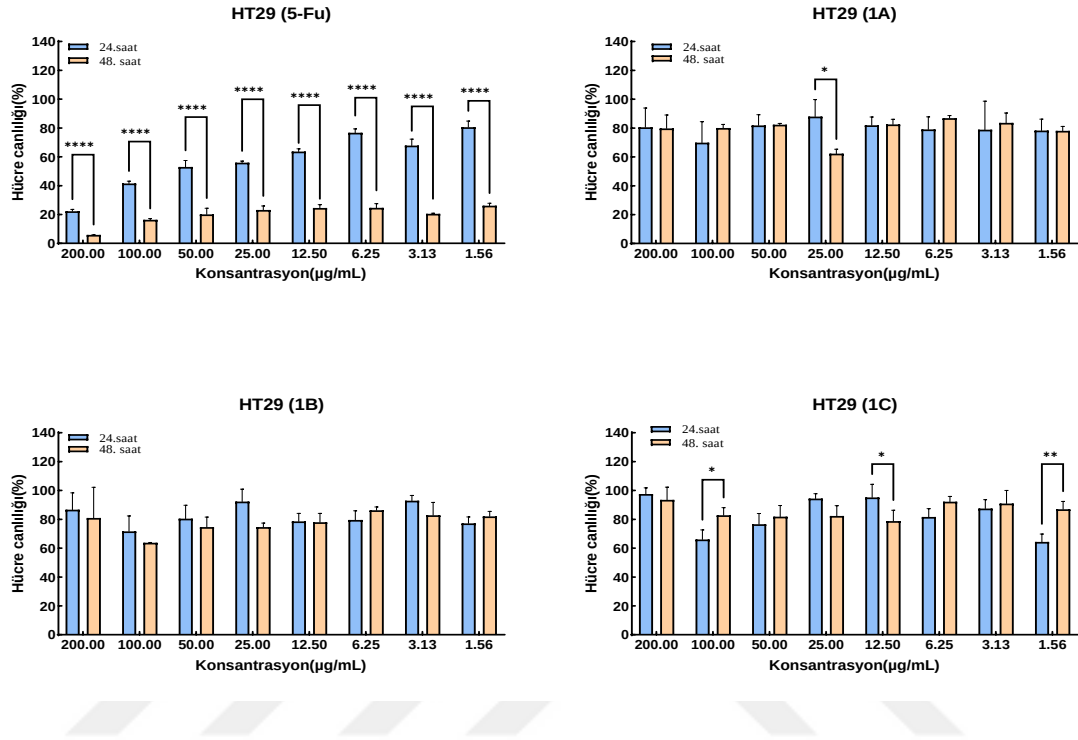
Şekil 4.1’de görüldüğü gibi, İS’lerin A549 hücre hattı etkileşime başladıktan sonra, bazı madde ve konsantrasyonlarda azda olsa etki göstermeye başladığı görülmektedir. Maddelerin antiproliferatif etkisi negatif kontrolle karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda 1A maddesinin 100 ve 1.56 µg/ ml konsantrasyonda akut etkisinin olduğu, 1B maddesinin 1.56 ve 25 µg/ ml konsantrasyonunda akut etkisi ve 1C maddesinin ise 3.13µg/ ml konsantrasyonunda kronik etkisi görülmektedir. Sonuçlar istatistiki açıdan değerlendirildiğinde belirtilen farklılıkların anlamlı düzeyde olduğu görülmektedir.



Şekil 4.2. İS’lerin (1D, 1E, 1F, 1G), A549 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri (****P≤0.0001, ***P≤0.0005, **P≤0.001, *P≤0.005)

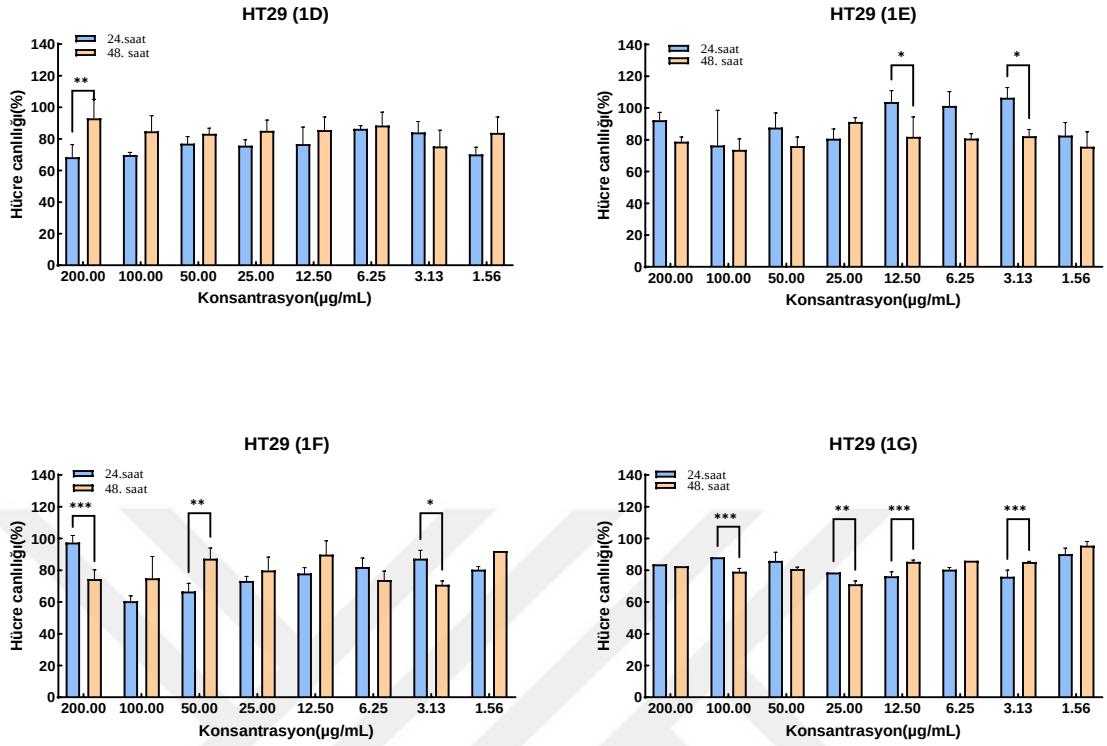
Şekil 4.2’ de görüldüğü gibi, İS’lerle A549 hücreleri etkileşime başladıktan sonra, bazı madde ve konsantrasyonlarda antiproliferatif etkisini göstermeye başlamıştır. Maddelerin antiproliferatif etkisi negatif kontrolle karşılaştırılmıştır. MTT sonuçları açısından, dört bileşiğin (1D-1G) test edilen sekiz konsantrasyondaki etkileri değerlendirilmiştir. 1D maddesi 6.25 µg/ ml konsantrasyonda kronik, 1.56 µg/ ml konsantrasyonda ise akut etki göstermiştir. 1E maddesi 50, 25, 6.25 ve 3.13 µg/ ml konsantrasyonda kronik etki göstermektedir. 1F maddesi 200, 50, 6.25 ve 3.13 µg/ ml konsantrasyonda kronik, 1.56 µg/ ml konsantrasyonda ise akut etki göstermiştir. 1G

madde 100 µg/ ml konsantrasyonda ise akut etki gösterdiği ve istatistiki olarak anlamlı oldukları görülmektedir.



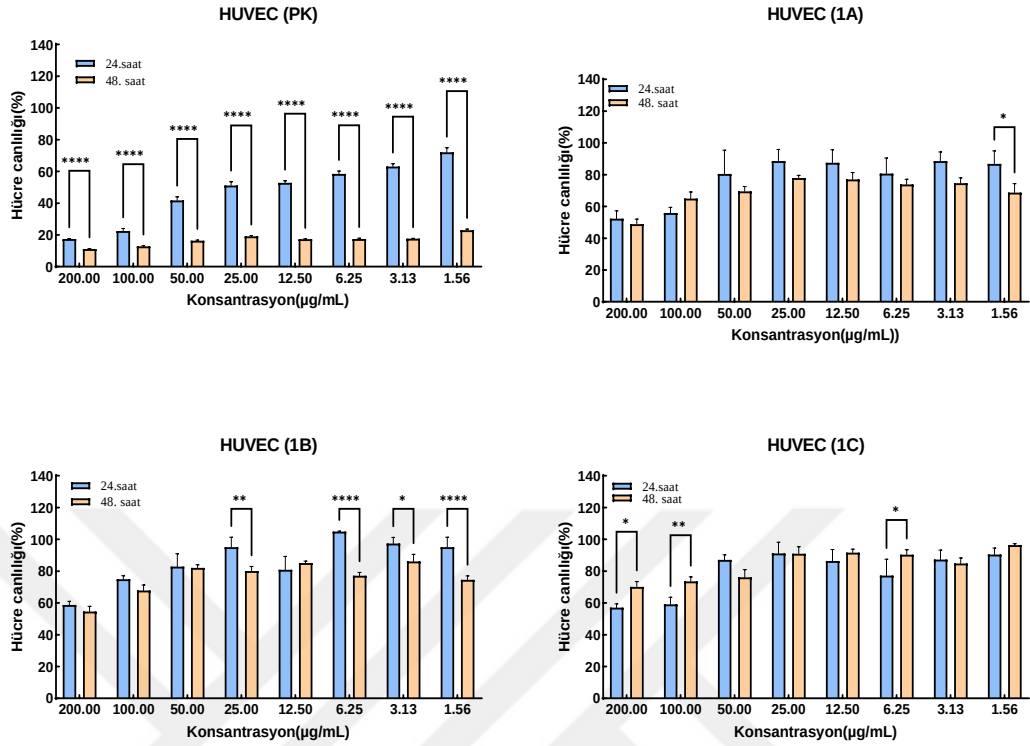
Şekil 4.3. İS'lerin (pk: pozitif kontrol 5-Fu, 1A, 1B, 1C), HT29 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri (****P≤0.0001, **P≤0.001, *P≤0.005)

Şekil 4.3' de görüldüğü gibi, İS'lerle HT29 hücreleri etkileşime başladıktan sonra, bazı madde ve konsantrasyonlarda antiproliferatif etkisini göstermeye başlamıştır. Maddelerin antiproliferatif etkisi negatif kontrolle karşılaştırılmıştır. MTT sonuçları açısından değerlendirildiğinde 1A maddesi 25 µg/ ml de kronik etki ve 1C maddesi ise 100 ve 1.56 25 µg/ ml konsantrasyonda akut etki gösterdiği görülmektedir. 1B maddesinin ise kolon kanseri hücrelerinin (HT29) proliferasyonunu inhibe etmediği de belirlenmiştir. Sonuçlar istatistiki açıdan değerlendirildiğinde belirtilen farklılıkların anlamlı düzeyde olmadığı görülmektedir.



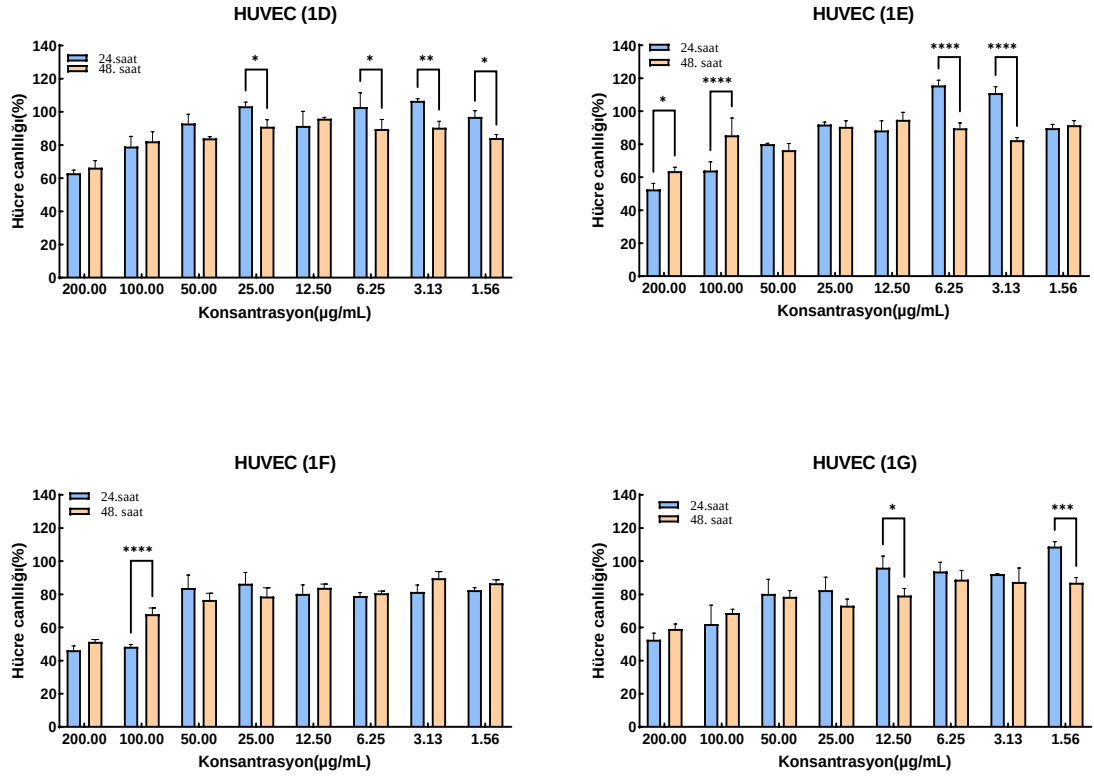
Şekil 4.4. İS'lerin (1D, 1E, 1F, 1G), HT29 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri (**P≤0.0005, **P≤0.001, *P≤0.005)

Şekil 4.4' de görüldüğü gibi, İS'lerle HT29 hücreleri etkileşime başladıktan sonra, bazı madde ve konsantrasyonlarda antiproliferatif etkisini göstermeye başlamıştır. Maddelerin antiproliferatif etkisi negatif kontrolle karşılaştırılmıştır. MTT sonuçları değerlendirildiğinde, 1D ve 1E maddesinin hücre proliferasyonunu inhibe etmediği ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir. 1F maddesinin 50 µg/ ml konsantrasyonda akut, 3.13 µg/ ml konsantrasyonda ise kronik etki ettiği görülmektedir. 1G maddesi ise 12.5 ve 3.13 µg/ ml konsantrasyonda az da olsa akut etki sergilemiştir.



Şekil 4.5. İS'lerin (pk: pozitif kontrol 5-Fu, 1A, 1B, 1C), HUVEC hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri (**** $P \leq 0.0001$, ** $P \leq 0.001$, * $P \leq 0.005$)

Şekil 4.5'de görüldüğü gibi, İS'lerle HUVEC hücreleri etkileşime başladıktan sonra, bazı madde ve konsantrasyonlarda antiproliferatif etkisini göstermeye başlamıştır. Maddelerin antiproliferatif etkisi negatif kontrolle karşılaştırılmıştır. MTT sonuçları açısından, 1A maddesi hücre proliferasyonunu inhibe etmeyip yalnızca 1.56 µg/ml konsantrasyonda azda olsa kronik etki gösterdiği için bu dozda anlamlı kabul edilmiştir. 1B maddesinin 24. saatte hücre proliferasyonunu inhibe etmemiştir. Fakat 48. saatte 25, 6.25, 3.13 ve 1.56 µg/ml konsantrasyonda çoğalmayı önleyici etkiler sergileyerek akut etkisinin olduğu görülmüştür. 1C maddesinde en yüksek iki dozda az da olsa akut etki göstererek, istatistiki olarak bu dozlarda anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.



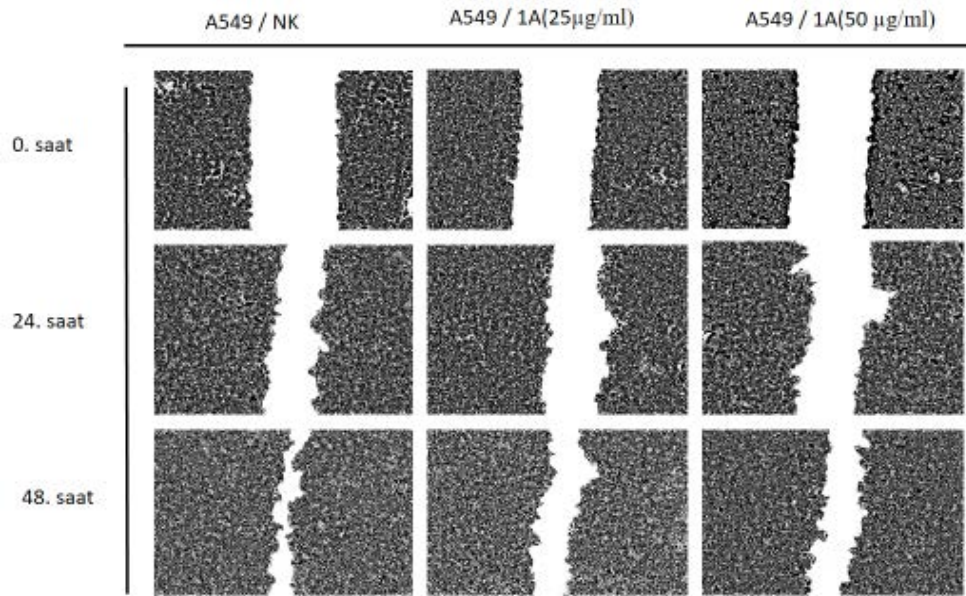
Şekil 4.6. İS'lerin (1D, 1E, 1F, 1G), HUVEC hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkileri (****P≤0.0001, ***P≤0.0005, **P≤0.001, *P≤0.005)

Şekil 4.6' da görüldüğü gibi, İS'lerle HUVEC hücreleri etkileşime başladıktan sonra, bazı madde ve konsantrasyonlarda antiproliferatif etkisini göstermeye başlamıştır. Maddelerin antiproliferatif etkisi negatif kontrolle karşılaştırılmıştır. MTT sonuçları açısından değerlendirilen 1D maddesi, 48. saatte konsantrasyonlar azaldıkça hücre proliferasyonunu azda olsa inhibe ettiği görülmüştür. 1E maddesi en yüksek iki dozda 200 ve 100 µg/ml'de akut etki gösterdiği, fakat konsantrasyonlar azaldıkça özellikle 6.25 ve 3.13 µg/ml'de yüksek konsantrasyonlardaki etkinin tam tersi olarak oldukça iyi kronik etki gösterdiği görülmektedir. 1F maddesi yalnızca 100 µg/ml konsantrasyonda istatistiki olarak anlamlı olup diğer tüm konsantrasyonlarda anlamlı olmadığı ve hücreyi inhibe etmediği görülmektedir. 1G maddesi ise yalnızca 1.56 µg/ml konsantrasyonda hücreyi inhibe ederek kronik etki gösterdiği ve istatistiksel olarak yalnızca bu dozda anlamlı olduğu görülmektedir.

4.2. İyonik Sıvıların Kanser Hücre Hatları Üzerindeki Migrasyon Analizi

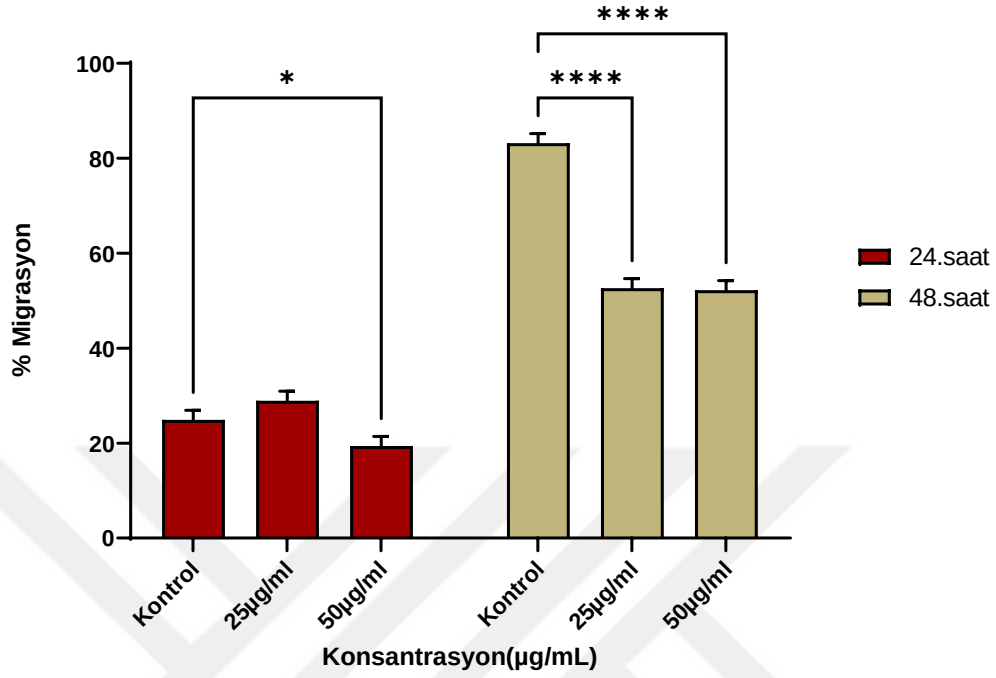
Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında, HT29 kolon kanseri, A549 akciğer kanseri ve HUVEC insan göbek kordonu epitel hücre hatları üzerinde MTT analizi sonucu etkin dozlar belirlenmiş ve her hücre hattı için etkili olduğu düşünülen konsantrasyonlarda maddeler çalışılmıştır. A549 hücre hattı için iki farklı konsantrasyon; 25 µg/ml ve 50µg/ml, HT29 için üç farklı konsantrasyon; 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml, HUVEC için iki farklı konsantrasyon 100 µg/ml ve 200 µg/ml kullanılmıştır. Yara modeli oluşturulan hücrelere, etkinliği belirlenen dozlar uygulanarak madde eklendikten hemen sonra 0.saatte, 24. saatte ve 48. saatte olacak şekilde fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen fotoğraflar, Image J programı kullanılarak negatif kontrolle kıyaslanmış ve migrasyon alanları hesaplanmıştır. Hesaplanan alanlar GraphPad Prism 9.0 programıyla grafik haline getirilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı *Two-way ANOVA* testi uygulanarak belirlenmiştir.



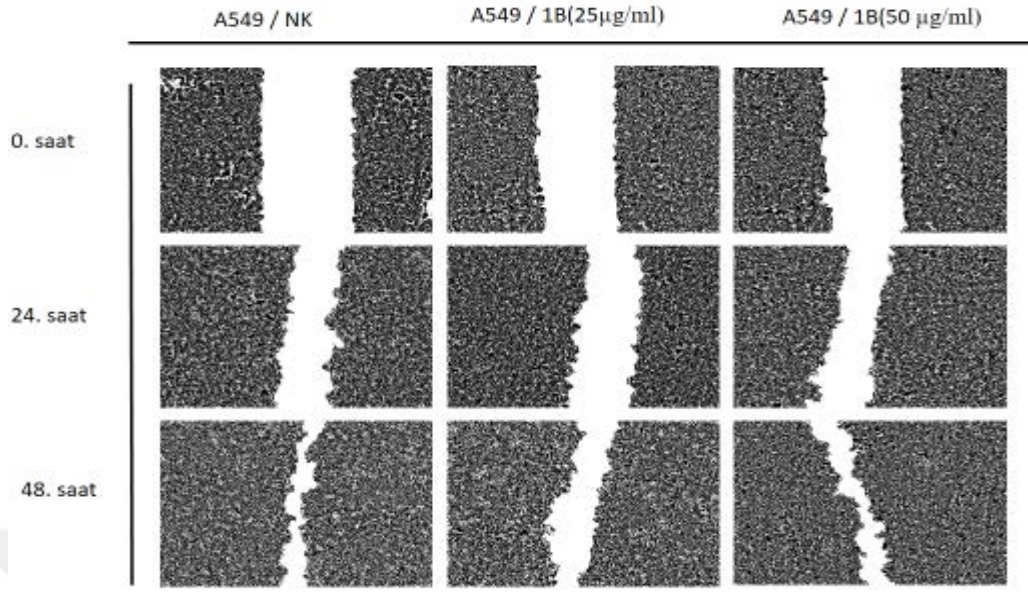
Şekil 4.7. 1A maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon görüntüleri(4x)

A549 1A

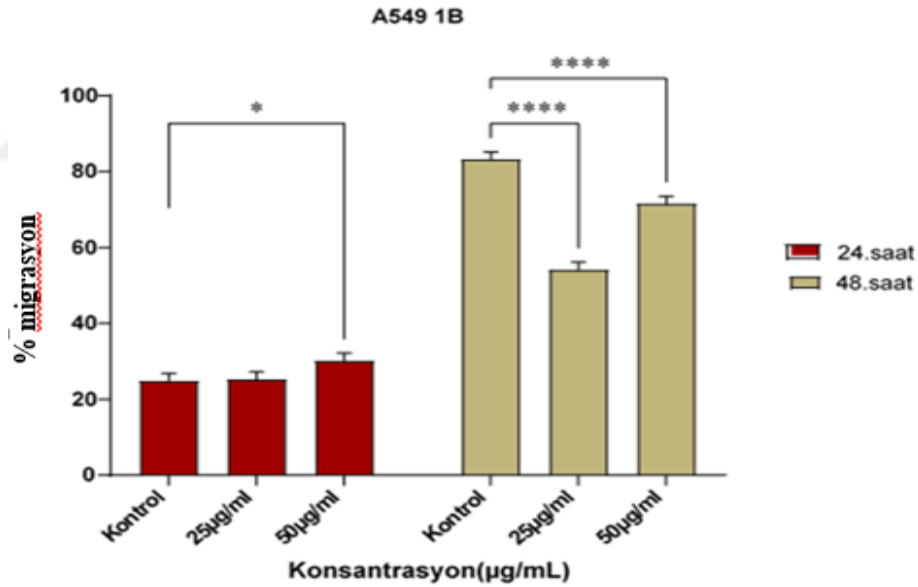


Şekil 4.8. 1A maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon grafiği (**** $P \leq 0.0001$, * $P \leq 0.005$)

Şekil 4.8’de görüldüğü gibi A549 hücre hattı için 1A maddesi 2 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1A maddesi negatif kontrolle kıyaslama yapıldığında 24. saatte (akut etki) tüm dozlar için migrasyon alanları (yara modelindeki kapanmalar) eşit gibi görülse de 48. saatte (kronik etki) maddenin kronik etkisinin az da olsa var olduğu görülmektedir. Fakat her iki dozda da maddenin aynı etkiyi (% kapanma) gösterdiği tespit edilmiştir. 1A maddesinin A549 hücre hattı üzerinde kronik etkisinin her iki konsantrasyonda da istatistiki olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Fakat akut etki açısından değerlendirildiğinde negatif kontrole göre 50 µg/ml konsantrasyonda yara alanının kapanmadığı ve istenilen sonucun elde edildiği görülmektedir. Bununla birlikte, söz konusu etkinin 50 µg/ml konsantrasyonda çok az, diğer konsantrasyonda (25 µg/ml) ise anlamlı olmadığı görülmektedir.



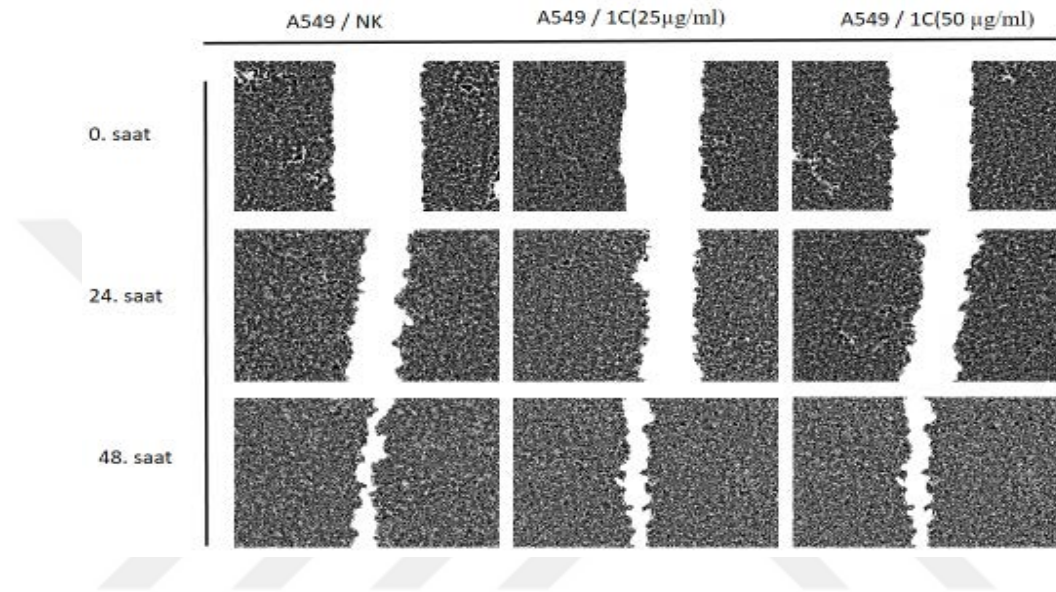
Şekil 4.9. 1B maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon görüntüleri(4x)



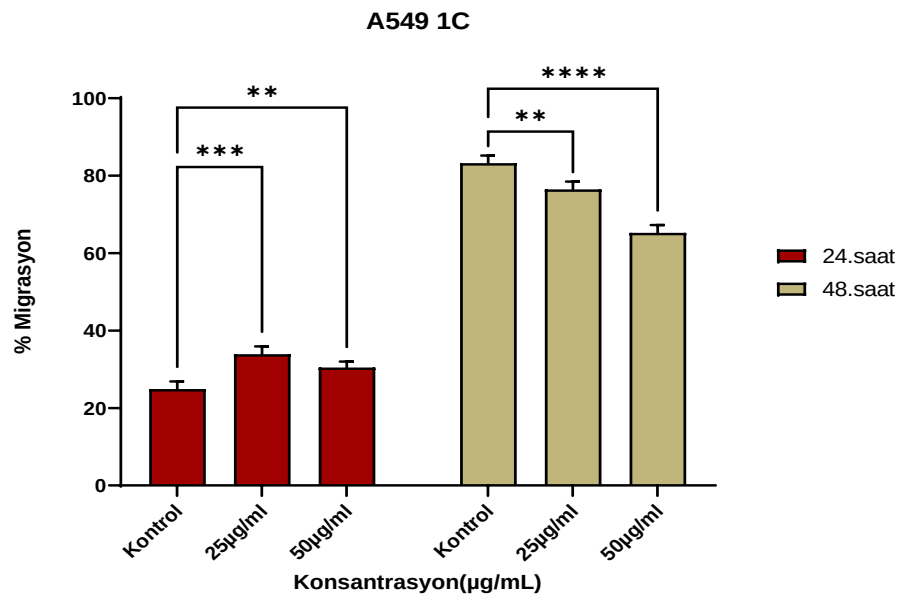
Şekil 4.10. 1B maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, *P≤0.005)

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi A549 hücre hattı için 1B maddesi iki farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1B maddesi negatif kontrolle kıyaslandığında 24. saatte tüm dozlar için kapanmalar eşit gibi görülse de 25 µg/ml konsantrasyonda azda olsa farklılık olduğu belirlenmiş ve bunun istatistiki olarak da anlamlı olmadığı görülmektedir. Akut etki bakımından madde değerlendirildiğinde, yara alanlarının kapandığı ve beklenen

sonucun elde edilemediği görülmüştür. 48. saatte ise maddenin yara alanlarını kapatmadığı ve istenilen etkisinin var olduğu görülmektedir. Fakat her iki doz için de madde aynı etkiye (% kapanmaya) sahip gibi görünse de 25 µg/ml’de daha iyi etki ettiği görülmektedir. 1B maddesinin A549 hücre hattı üzerinde akut etkisinin istatistiki olarak anlamlı olmadığı fakat kronik etkisi için anlamlı olduğu görülmektedir.

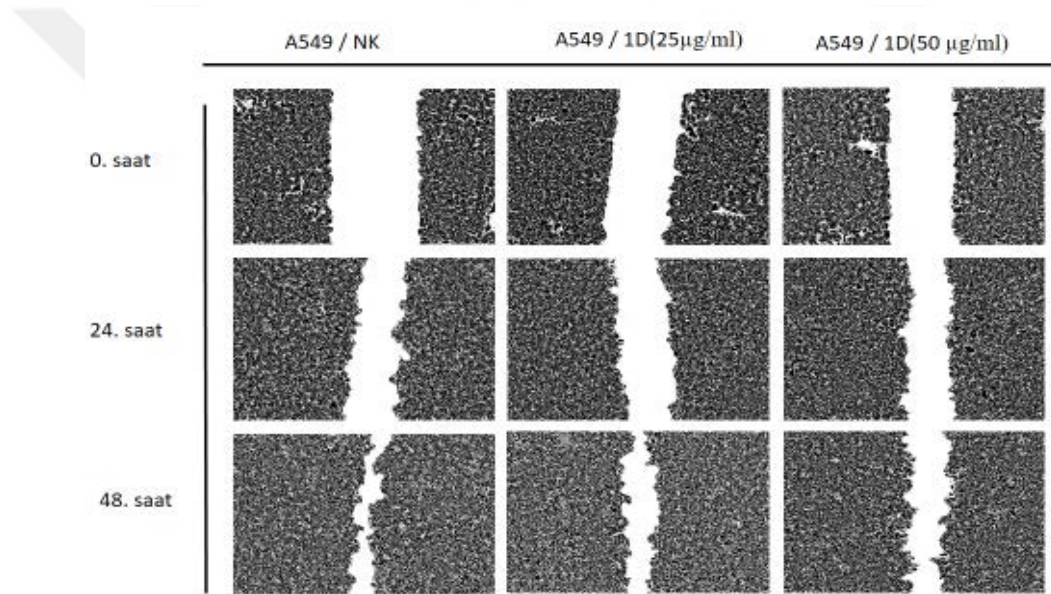


Şekil 4.11. 1C maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon görüntüleri(4x)

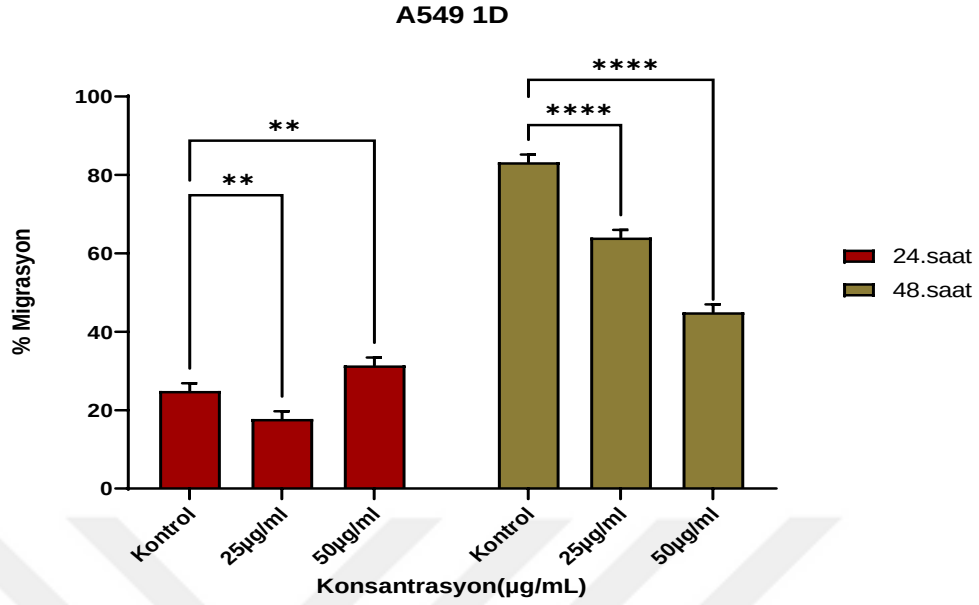


Şekil 4.12. 1C maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, ***P≤0.0005, **P≤0.001,)

Şekil 4.12’de görüldüğü gibi A549 hücre hattı için 1C maddesi 2 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1C maddesi negatif kontrolle kıyaslandığında 24. saatte tüm dozlarda % kapanmalar artmıştır. Bu nedenle, maddenin istatistiki olarak anlamlı olduğu görülse de hücre akut etkisi değerlendirildiğinde proliferasyonunu arttırdığı belirlenmiş ve istenilen sonuç elde edilememiştir. 48. saatte ise negatif kontrole göre karşılaştırma yapıldığında maddenin her ki dozda da kronik etkisinin var olduğu görülmektedir. Fakat 50 µg/ml konsantrasyonda daha etkili sonuç elde edildiği ve istatistiki açıdan anlamlı görülmektedir.

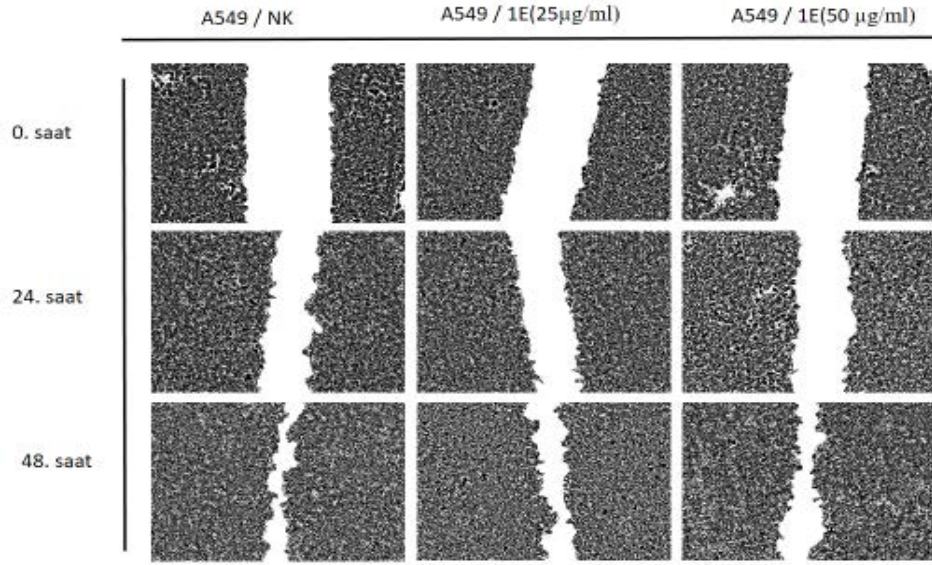


Şekil 4.13. 1D maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)

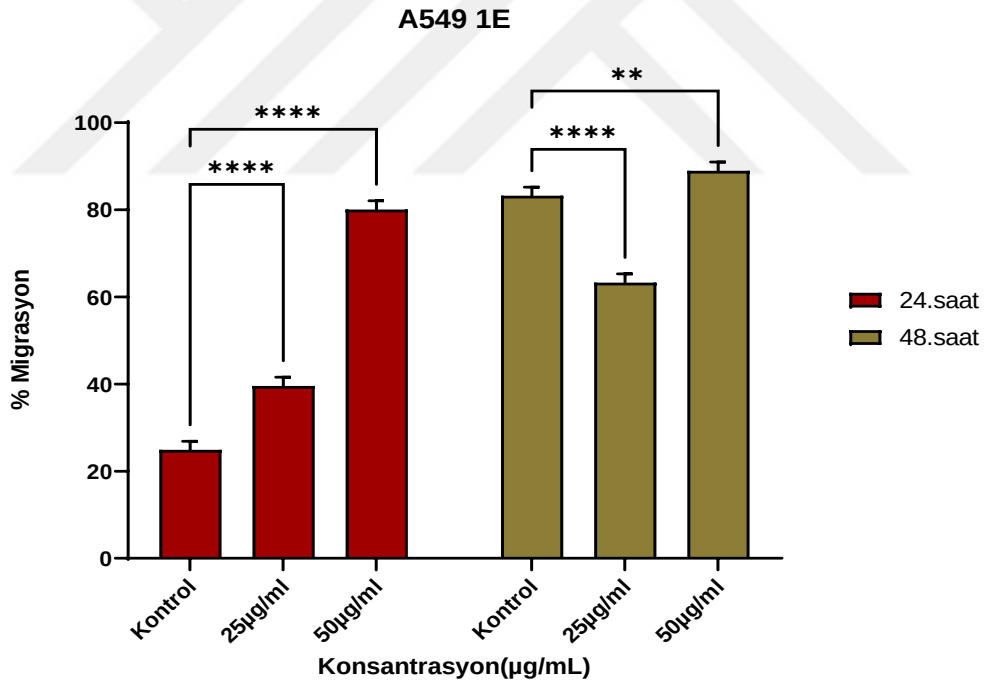


Şekil 4.14. 1D maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, **P≤0.001)

Şekil 4.14’de görüldüğü gibi A549 hücre hattı için 1D maddesi 2 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1D maddesi negatif kontrole kıyaslandığında 24. saatte 50 µg/ml’de % kapanmalar artarak hücre proliferasyonunu arttırdığı ve istenilen sonucun elde edilemediği görülmektedir. 25 µg/ml’de maddenin azda olsa akut etkisinin olduğu ve istatistiki açıdan her iki dozunda anlamlı olduğu görülmektedir. 48. saatte ise negatif kontrole göre karşılaştırma yapıldığında her iki konsantrasyonda da maddenin kronik etkisinin olduğu ek olarak, 50 µg/ml konsantrasyonda hücre proliferasyonunu daha iyi inhibe ederek istenilen sonucun elde edildiği görülmektedir. Bu nedenle her iki doz da istatistiki olarak anlamlı kabul edilmektedir.



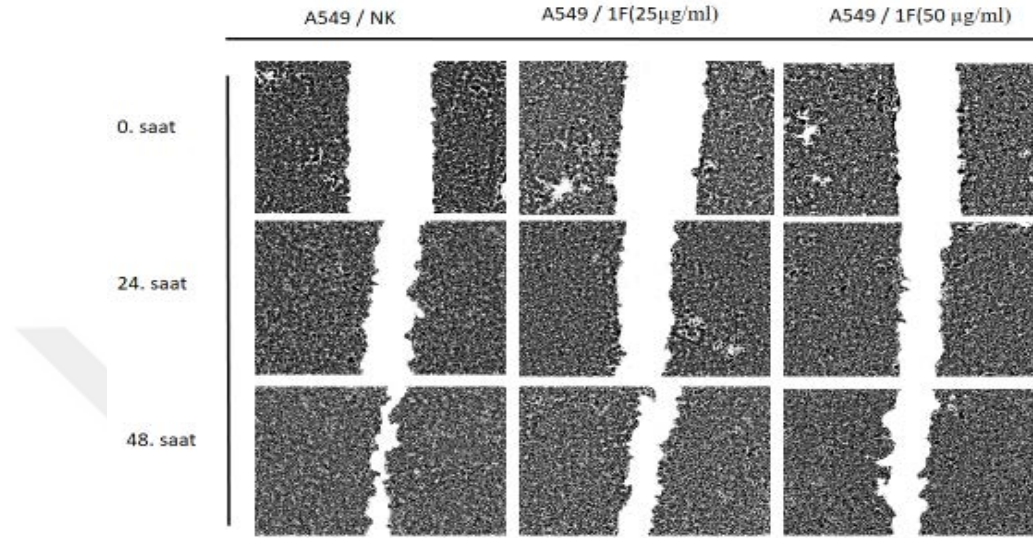
Şekil 4.15. 1E maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)



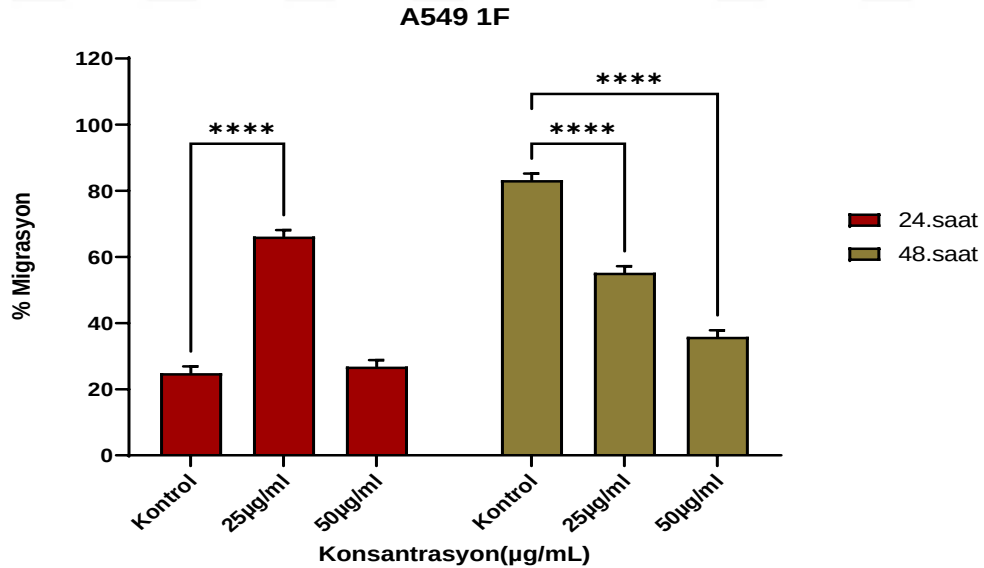
Şekil 4.16. 1E maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, **P≤0.001)

Şekil 4.16'da görüldüğü gibi A549 hücre hattı için 1E maddesi 2 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1E maddesi negatif kontrolle kıyaslandığında 24. saatte her iki konsantrasyonda maddenin % kapanmayı arttırarak, istenmeyen hücre proliferasyonu

görülmektedir. 48. saatte ise negatif kontrole göre karşılaştırma yapıldığında 25 $\mu\text{g/ml}$ 'de % kapanma azalmıştır. Şekil. 4.16 incelendiğinde, maddenin kronik etkisinin olduğu ve istatistiki açıdan da anlamlı görülmektedir.



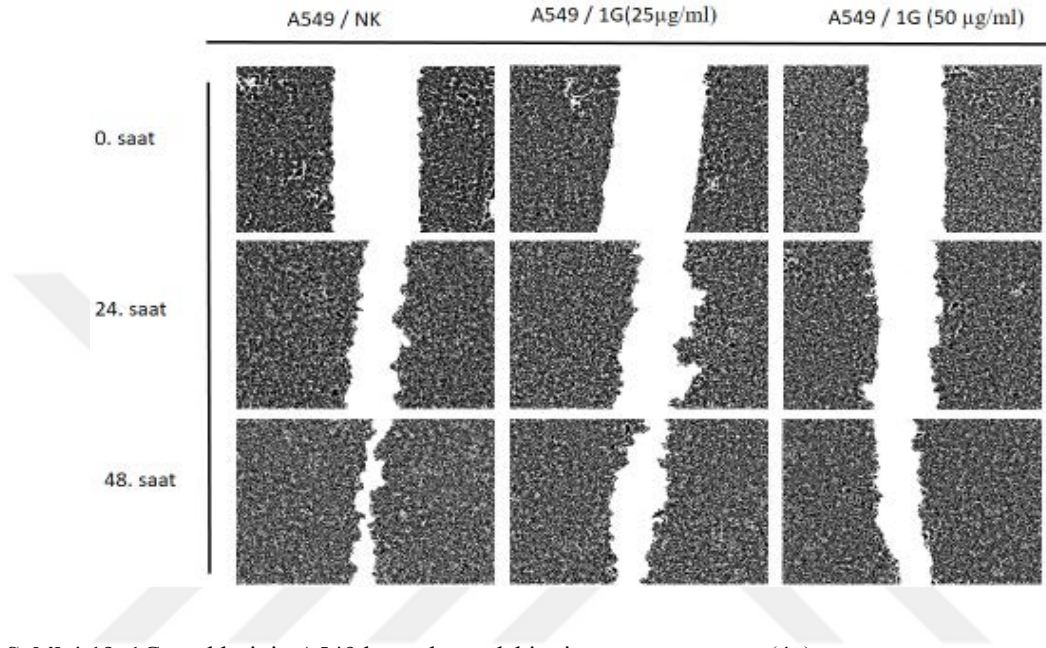
Şekil 4.17. 1F maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)



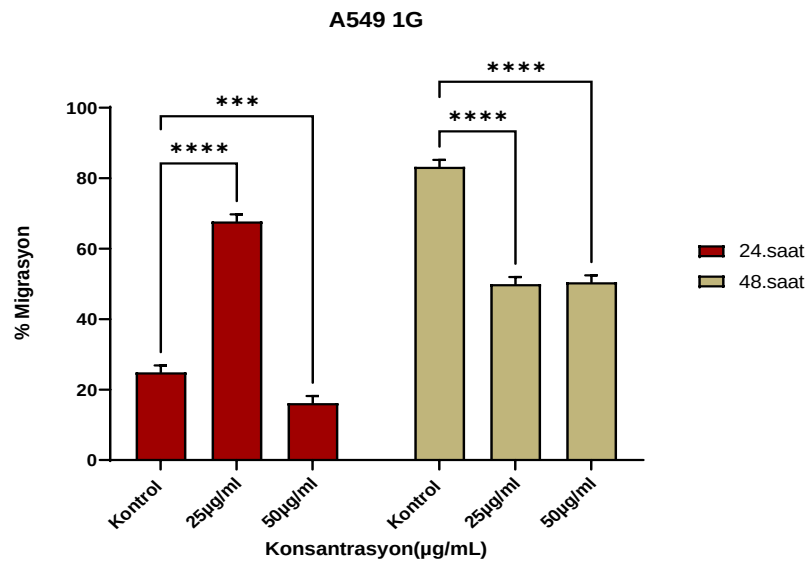
Şekil 4.18. 1F maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon grafiği (**** $P \leq 0.0001$)

Şekil 4.18'de görüldüğü gibi A549 hücre hattı için 1F maddesi 2 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 48. saatte negatif kontrole göre karşılaştırma yapıldığında her iki dozda

da yara alanlarının kapanmadığı ve istenilen sonucun elde edildiği görülmektedir. 25 $\mu\text{g/ml}$ 'de maddenin az da olsa etkili olduğu fakat 50 $\mu\text{g/ml}$ 'de maddenin kronik etkisinin daha iyi olduğu görülmektedir. Her iki konsantrasyonda da maddenin istatistiksel anlamlılığı söz konusudur.

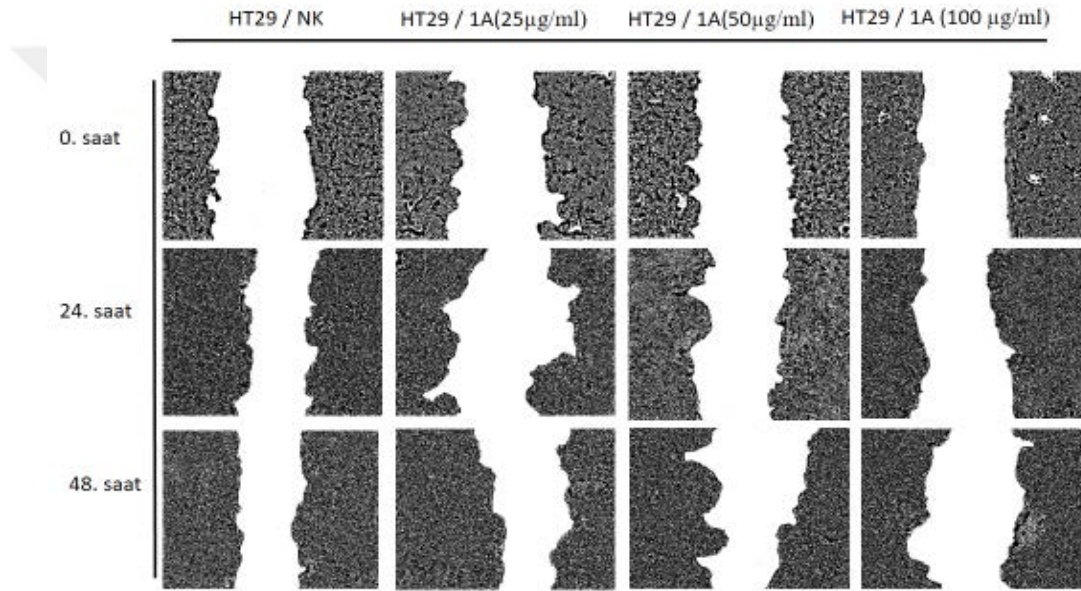


Şekil 4.19. 1G maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)

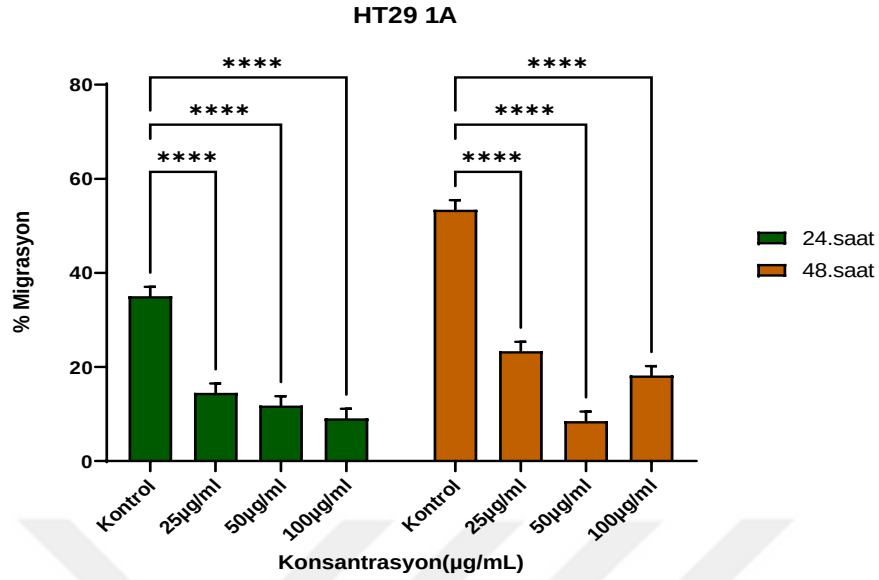


Şekil 4.20. 1G maddesinin A549 hücre hattındaki migrasyon grafiği (**** $P \leq 0.0001$, *** $P \leq 0.0005$)

Şekil 4.20’de görüldüğü gibi A549 hücre hattı için 1G maddesi 2 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 24. saate 50 µg/ml’ de % kapanma oranı oldukça azalmış ve beklenen sonuç elde edilmiştir. Fakat 25 µg/ml’ de hücre proliferasyonu artarak yara alanın kapandığı görülmektedir. 48. saatte ise negatif kontrole göre karşılaştırma yapıldığında her iki konsantrasyonda da madde eşit olarak % kapanmalara sahiptir. % kapanmaların azalmış olması maddenin kronik etkisinin oldukça iyi olduğu ve istatistiki olarak anlamlı görülmektedir.

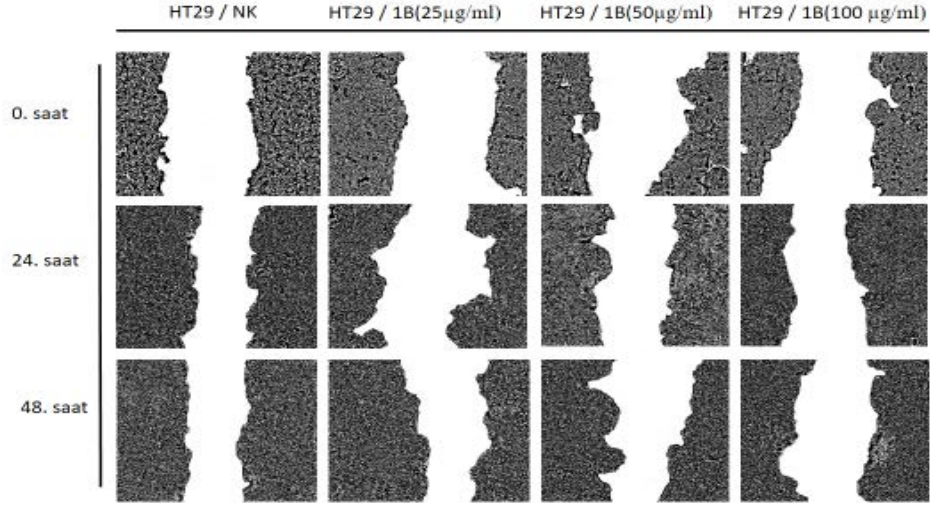


Şekil 4.21. 1A maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)

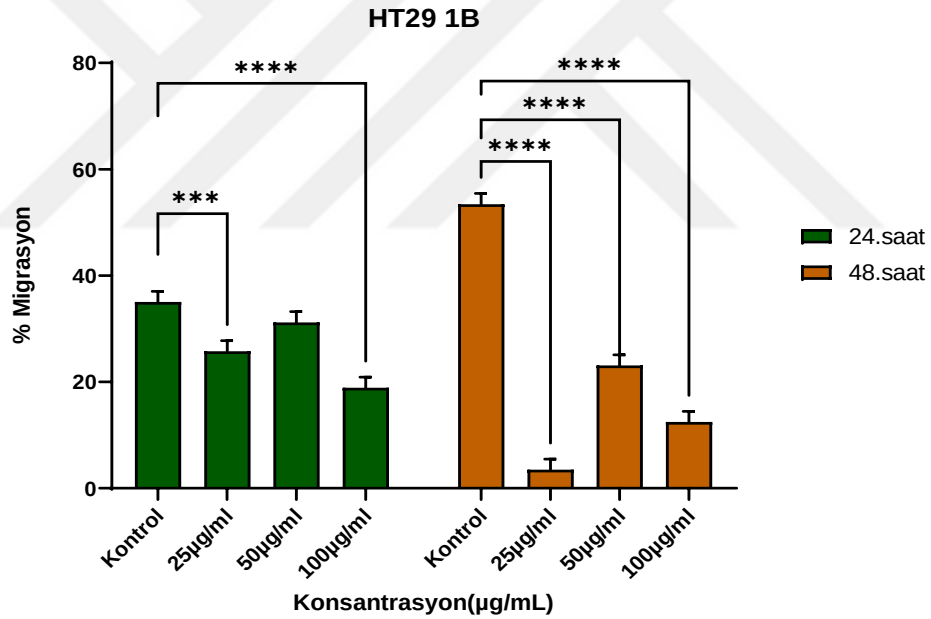


Şekil 4.22. 1A maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001)

Şekil 4.22’de görüldüğü gibi HT 29 hücre hattı için 1A maddesi 3 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1A maddesi negatif kontrolle kıyaslandığında 24. saatte tüm konsantrasyonlarda yara alanlarını kapatmadığı görülmektedir. Bunun yanı sıra, madde konsantrasyonu arttıkça daha iyi etki ettiği görülmektedir. Maddenin 25 µg/ml ve 100 µg/ml’de akut etkisi kronik etkisine göre daha iyi iken, 50 µg/ml’ de ise kronik etkisinin daha iyi olduğu görülmektedir. Her iki konsantrasyonda da madde hem akut hem de kronik etki bakımından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı olduğu görülmektedir.



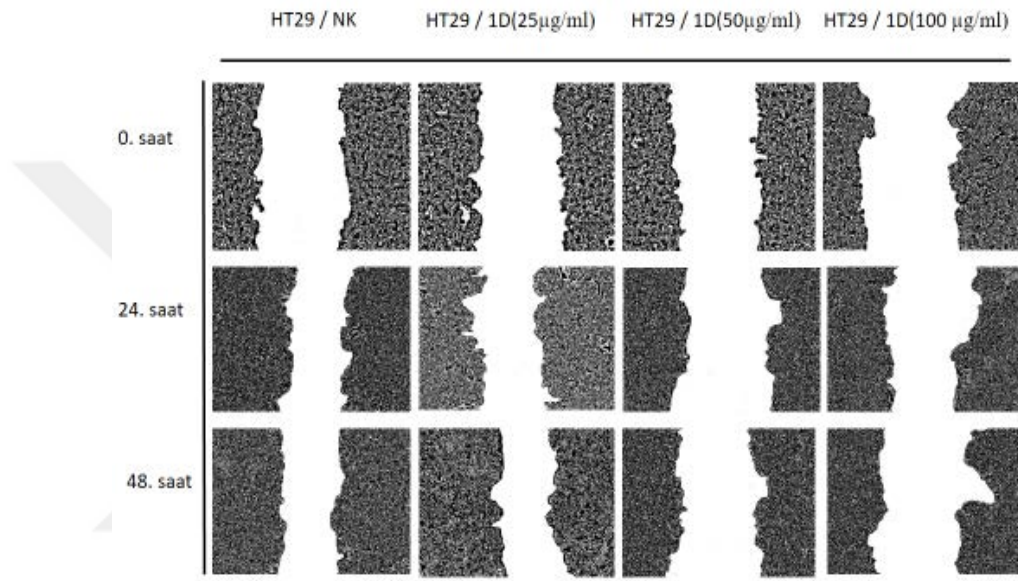
Şekil 4.23. 1B maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)



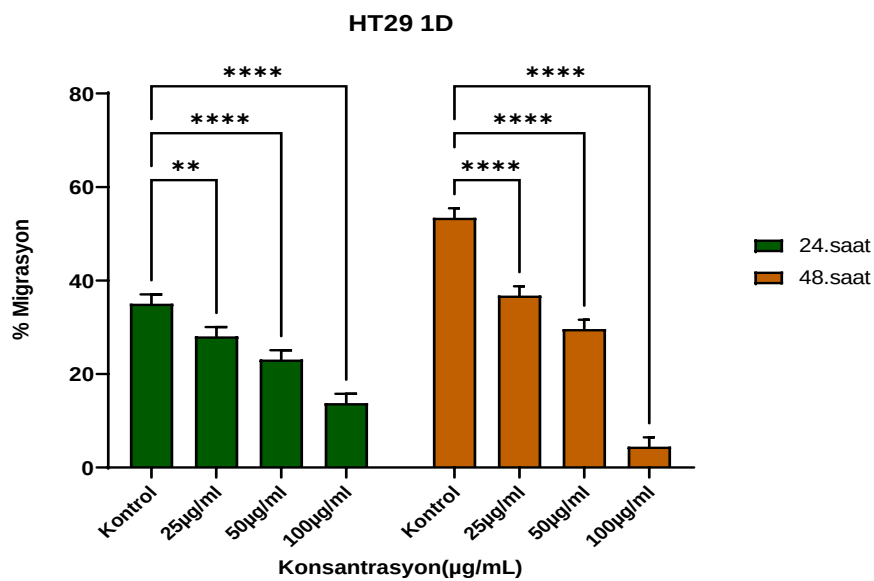
Şekil 4.24. 1B maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, ***P≤0.0005)

Şekil 4.24'de görüldüğü gibi HT29 hücre hattı için 1B maddesi 3 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1B maddesi negatif kontrolle kıyaslandığında 24. ve 48. saatte tüm konsantrasyonlarda yara alanlarının kapanmadığı görülmektedir. İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde akut etkisinin 25 µg/ml ve 100 µg/ml'de anlamlı olduğu, 50 µg/ml konsantrasyonda ise anlamlı olmadığı görülmektedir. Maddenin kronik etkisinin ise

konsantrasyonlarda yara alanının kapanmadığı görülmektedir. 1C maddesinin 100 µg/ml konsantrasyonda akut etkisinin olmadığı fakat diğer dozlarda etkili olduğu görülmektedir. Akut etki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 100 µg/ml’de anlamsız diğer konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Maddenin tüm konsantrasyonlarda kronik etkisinin olduğu görülmektedir. En etkili kronik dozun ise, 25 µg/ml olduğu ve tüm dozların istatistiki olarak anlamlı olduğu görülmektedir.

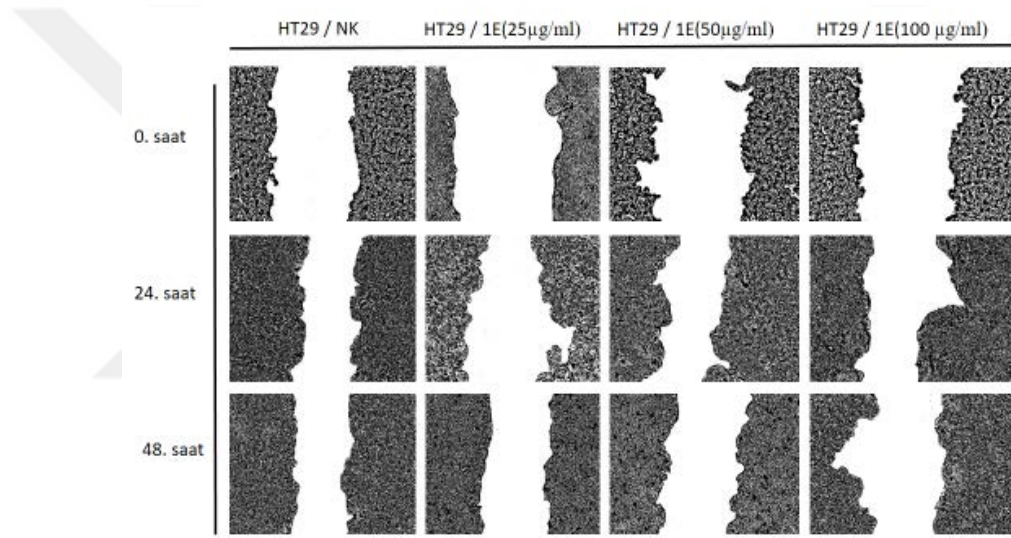


Şekil 4.27. 1D maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)

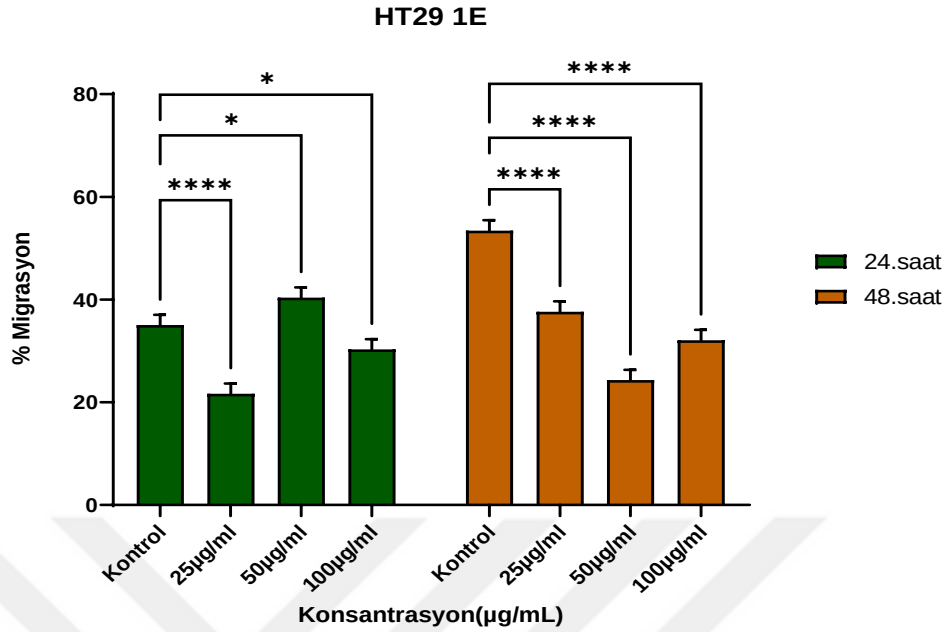


Şekil 4.28. 1D maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, **P≤0.001)

Şekil 4.28’de görüldüğü gibi HT 29 hücre hattı için 1D maddesi 3 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1D maddesi negatif kontrolle kıyaslandığında 24. ve 48. saatte tüm konsantrasyonlarda yara alanlarında kapanmadığı görülmektedir. Madde konsantrasyonu azaldıkça maddenin akut etkisinde de azalma görülmektedir. 25 µg/ml konsantrasyondaki % kapanmanın çok da iyi olmadığı ama istatistiki açıdan anlamlı olduğu görülmektedir. Maddenin 100 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonda kronik etkisinin oldukça iyi olduğu görülmektedir. 1D maddesi istatistiki olarak değerlendirildiğinde anlamlı olduğu görülmektedir.

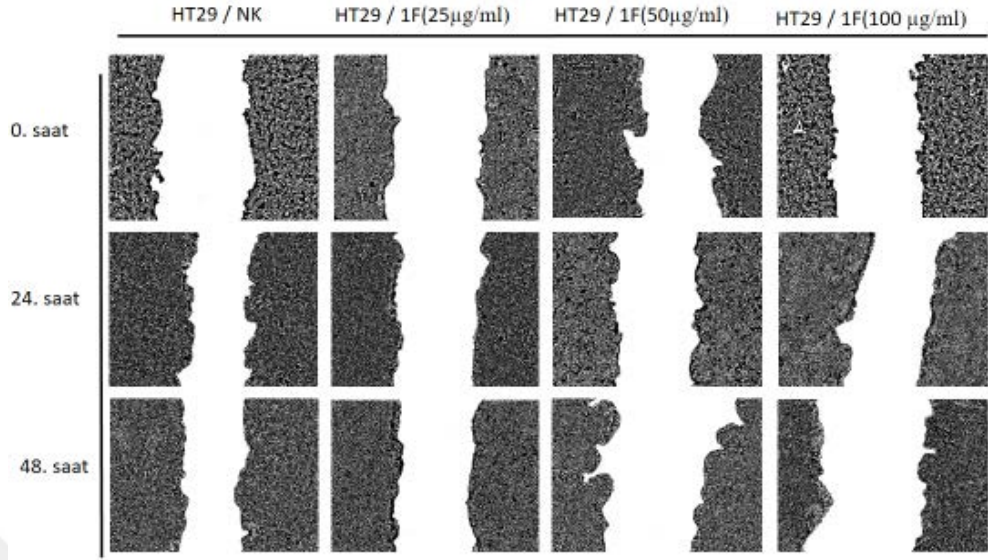


Şekil 4.29. 1E maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)

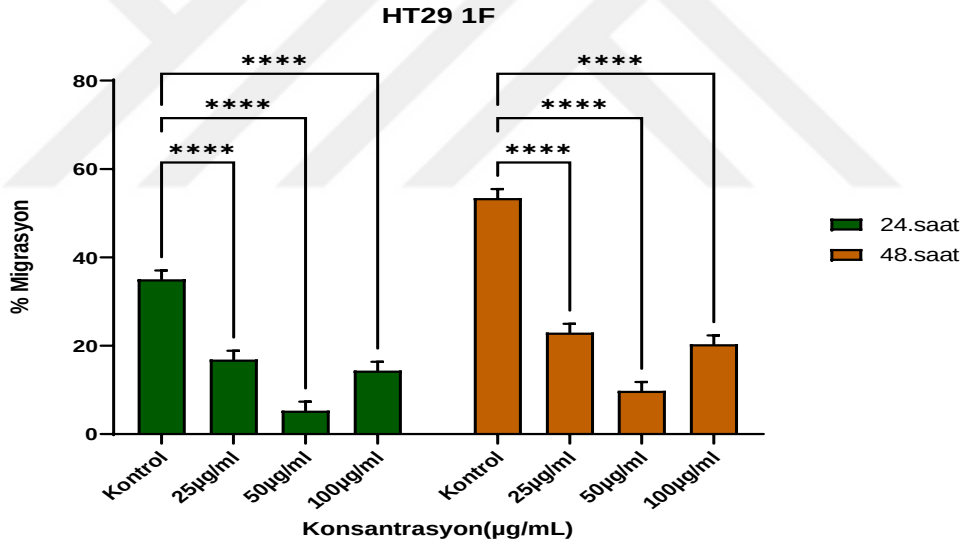


Şekil 4.30. 1E maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon grafiği (**** $P \leq 0.0001$, * $P \leq 0.005$)

Şekil 4.30'da görüldüğü gibi HT 29 hücre hattı için 1E maddesi 3 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1E maddesi negatif kontrolle kıyaslandığında 24. saatte hücre proliferasyonunu 50 µg/ml dozda arttırdığı, en düşük dozda ise hücre proliferasyonunu azaltarak yara alanını kapatmadığı görülmektedir. Maddenin 25 µg/ml konsantrasyonunun da akut etkisinin oldukça iyi olduğu ve istatistiki açıdan anlamlı olduğu görülmektedir. 48. saatte ise tüm konsantrasyonlarda maddenin etkili olup, 50 µg/ml'de en iyi etki ettiği ve istatistiki olarak anlam ifade ettiği görülmektedir.

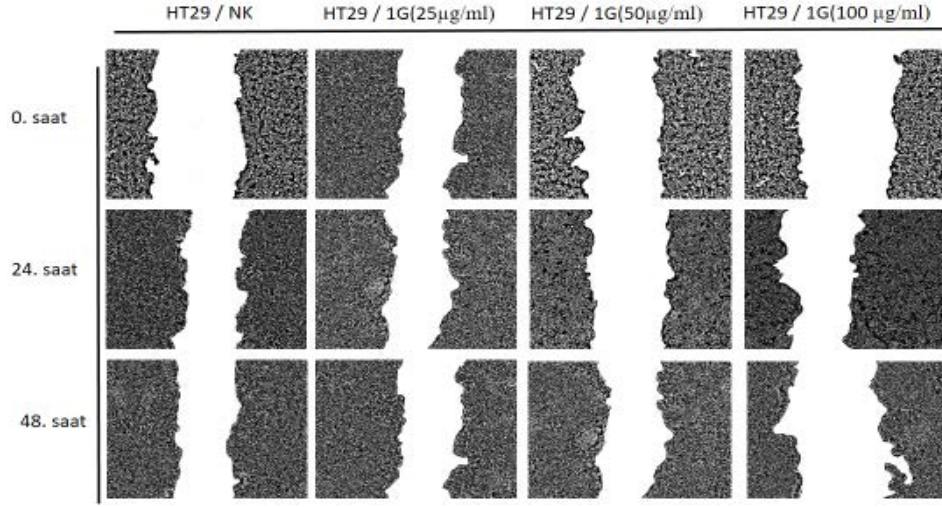


Şekil 4.31. 1F maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)

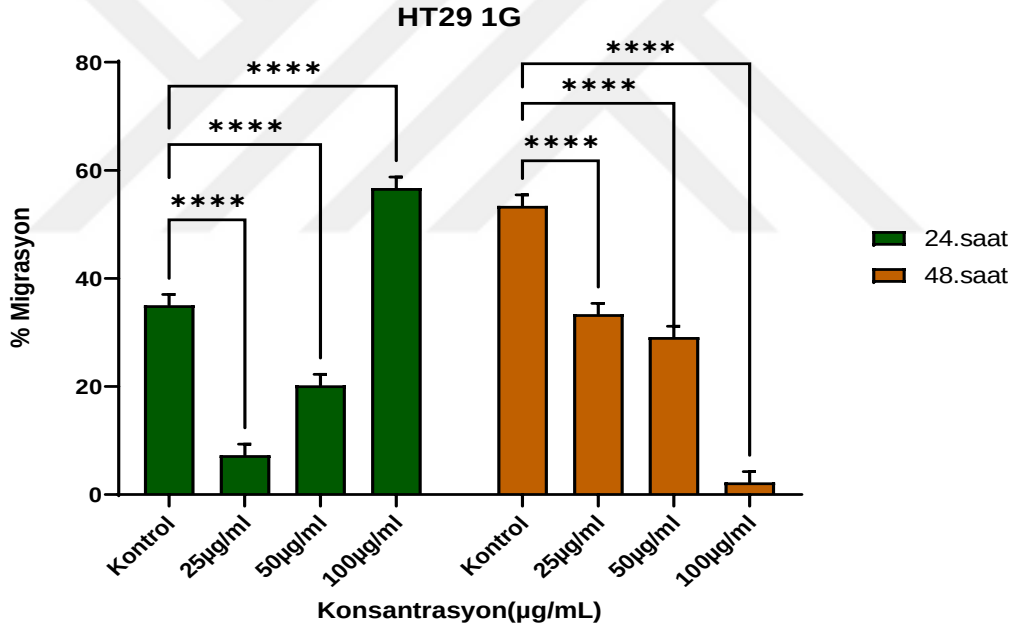


Şekil 4.32. 1F maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001)

Şekil 4.32’de görüldüğü gibi HT 29 hücre hattı için 1F maddesi 3 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1F maddesi negatif kontrolle kıyaslandığında 24. ve 48. saatte tüm konsantrasyonlarda yara alanlarında kapanmaların azaldığı görülmektedir. Maddenin 50 µg/ml konsantrasyonda ise hem akut hem de kronik etkisinin diğer dozlara göre en iyi olduğu görülmektedir. Maddelerin istatistiksel olarak tüm konsantrasyonlarda anlamlı olduğu görülmektedir.



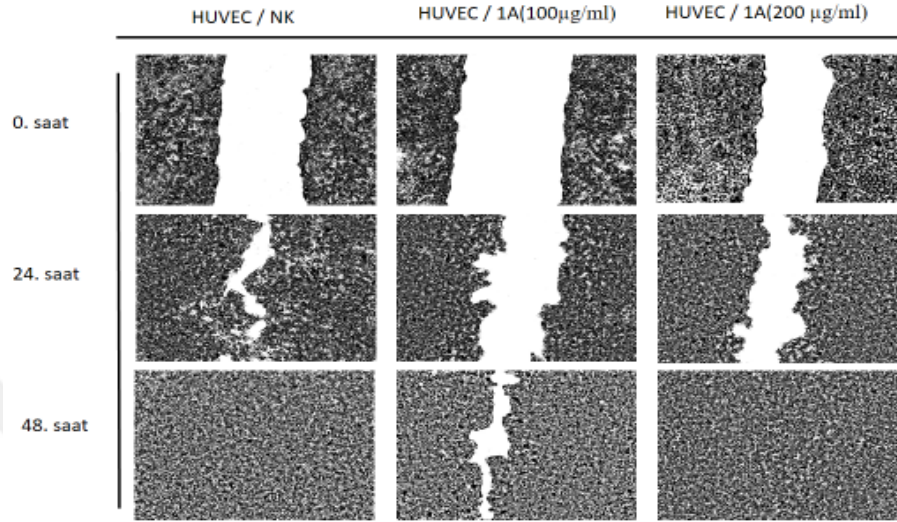
Şekil 4.33. 1G maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)



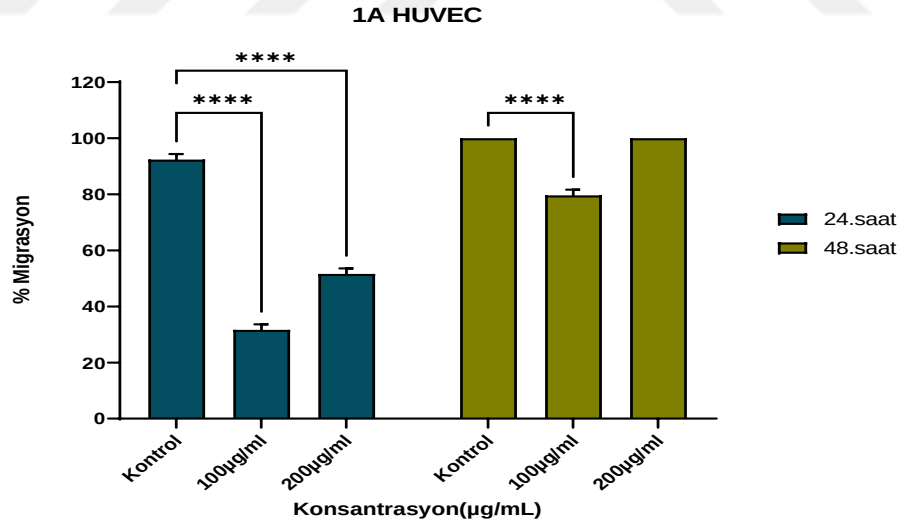
Şekil 4.34. 1G maddesinin HT29 hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001)

Şekil 4.34'de görüldüğü gibi HT 29 hücre hattı için 1G maddesi 3 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1G maddesi negatif kontrolle kıyaslandığında 24. ve 48. saatte tüm konsantrasyonlarda yara alanında kapanmaların azaldığı görülmektedir. Maddenin 25 µg/ml konsantrasyonda akut etkisinin olduğu görülmektedir. Fakat maddenin 100 µg/ml konsantrasyonda hücre proliferasyonunu arttırarak akut etkisinin hiç olmayıp, bunun

tam tersi olarak yine aynı konsantrasyonda kronik etkisinin ise en iyi olduğu görülmektedir. Madde tüm konsantrasyonda akut ve kronik etki bakımından istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir.



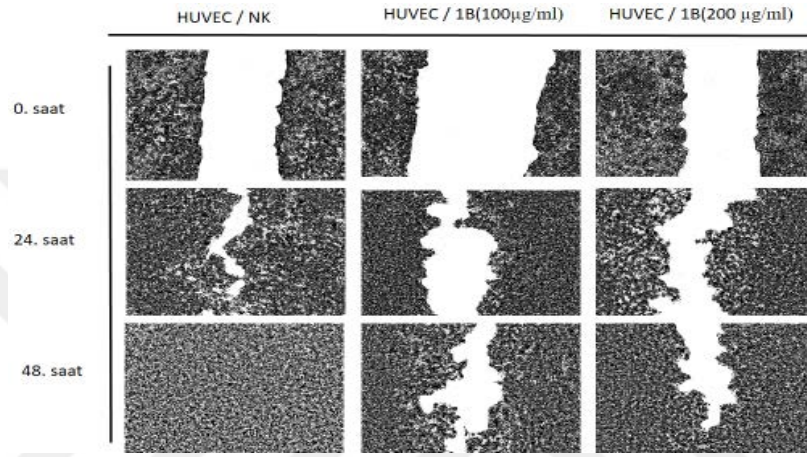
Şekil 4.35. 1A maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)



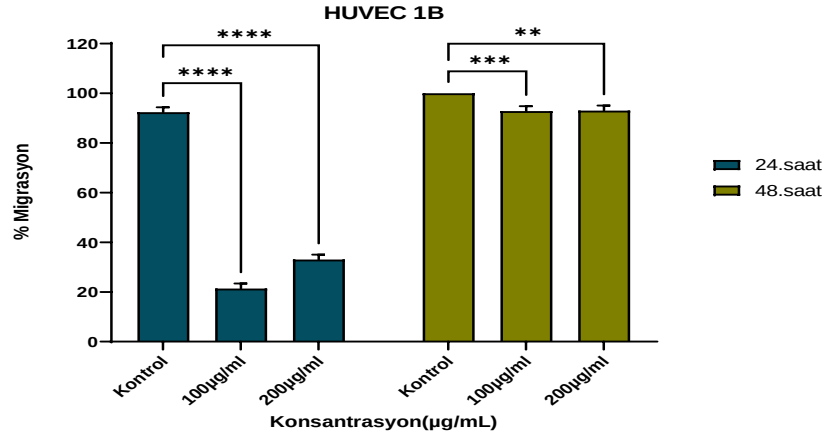
Şekil 4.36. 1A maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001)

Şekil 4.36’da görüldüğü gibi HUVEC hücre hattı için 1A maddesi 2 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1A maddesi negatif kontrolle kıyaslandığında 24. ve 48. saatte tüm konsantrasyonlarda yara alanlarında kapanmaların azaldığı görülmektedir. Maddenin

100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonda yara alanını kapatmayarak beklenen akut etkinin olduğu görülmektedir. Fakat maddenin 200 µg/ml konsantrasyonda hücre proliferasyonunu arttırdığı için bu dozda kronik etkisinin olmadığı ve yalnızca bu dozda istatistiki açıdan bir anlam ifade etmediği görülmektedir. İstatistiki olarak değerlendirildiğinde 200 µg/ml konsantrasyonda kronik etki açısından anlamlı olmayıp, diğer dozlarda anlamlı olduğu görülmektedir.



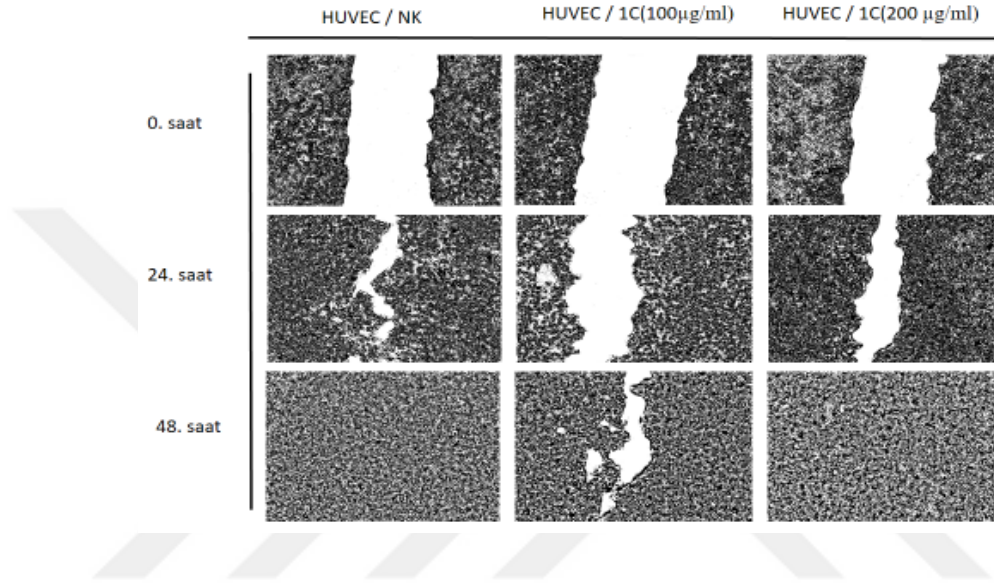
Şekil 4.37. 1A maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)



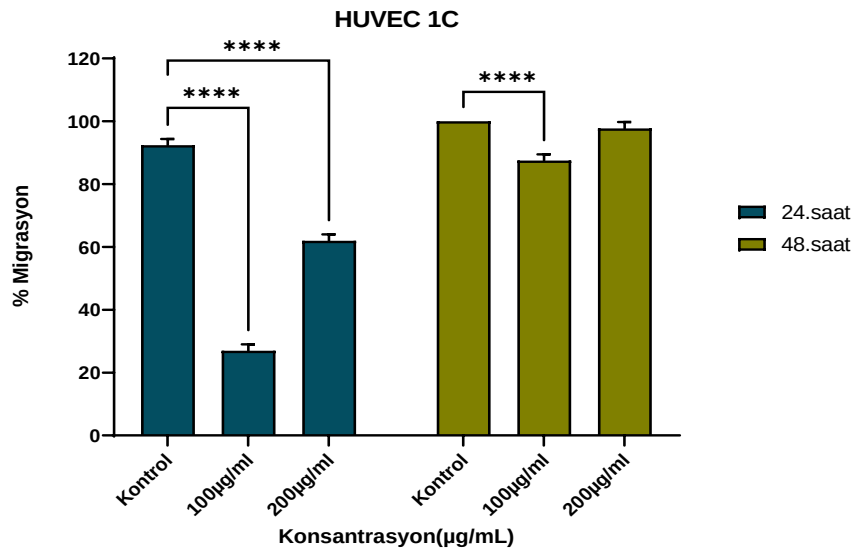
Şekil 4.38. 1B maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, ***P≤0.0005, **P≤0.001)

Şekil 4.38’de görüldüğü gibi HUVEC hücre hattı için 1B maddesi 2 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1B maddesi negatif kontrole kıyaslandığında tüm konsantrasyonlarda

beklenen etkiyi göstererek 24. saatte yara alanının kapanmadığı görülmektedir. Maddenin 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyondaki % kapanmalarda yalnızca akut etkisinin olduğu görülmektedir. Fakat maddenin her iki konsantrasyonda da kronik etkisi olmadığı görülmektedir. 1B maddesi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde hem akut etkisinin hem de kronik etkisinin anlamlı olduğu görülmektedir.

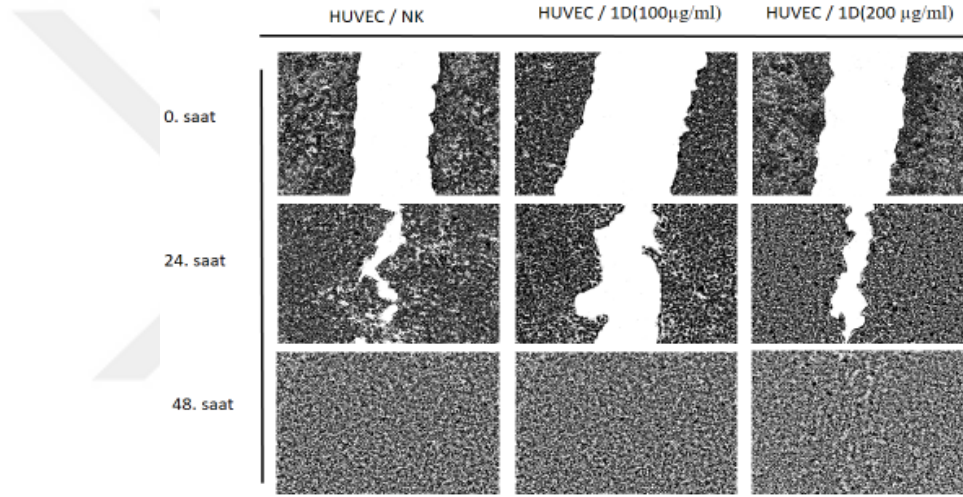


Şekil 4.39. 1C maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)

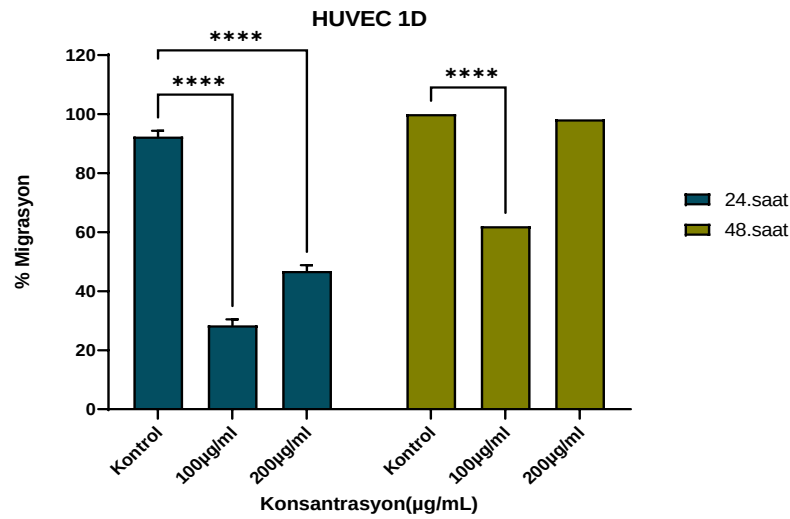


Şekil 4.40. 1C maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001)

Şekil 4.40'da görüldüğü gibi HUVEC hücre hattı için 1C maddesi 2 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1C maddesi negatif kontrolle kıyaslandığında tüm konsantrasyonlarda beklenen etkiyi göstererek 24. saatte yara alanını kapatmadığı görülmektedir. Maddenin 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyondaki % kapanmalarda akut etkisinin istatistiksel olarak anlam ifade ettiği görülmektedir. Fakat maddenin her iki konsantrasyonda da kronik etkisi olmadığı ama istatistiksel olarak 100 µg/ml konsantrasyonda anlamlı olup, 200 µg/ml konsantrasyonda anlamsız olduğu görülmektedir.

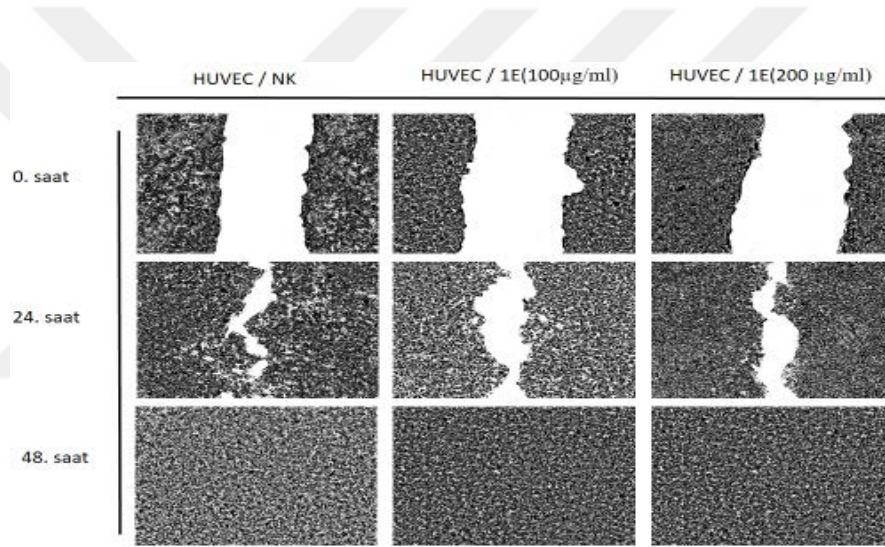


Şekil 4.41. 1D maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)

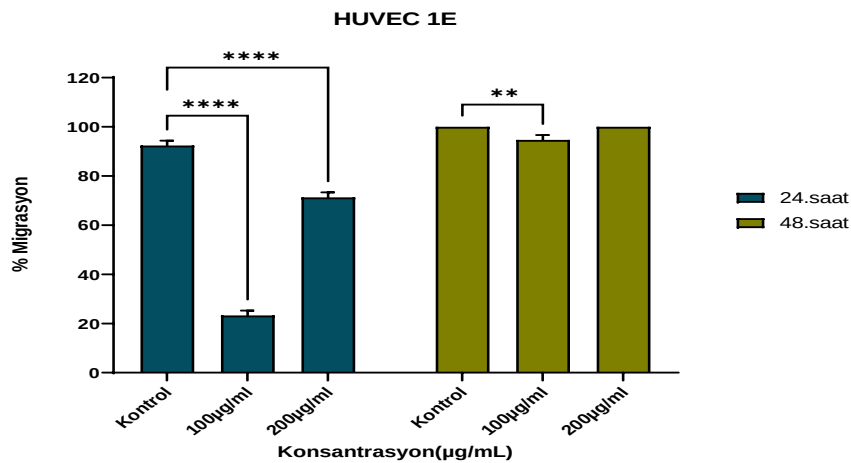


Şekil 4.42. 1D maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001)

Şekil 4.42’de görüldüğü gibi HUVEC hücre hattı için 1D maddesi 2 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1D maddesi negatif kontrolle kıyaslandığında, tüm konsantrasyonlarda 24. saatte yara alanının kapanmadığı görülmektedir. Maddenin her iki konsantrasyonda yara alanını kapatmayarak beklenen akut etkiyi gösterdiği istatistiki olarak da anlam ifade ettiği görülmektedir. Ayrıca 100 µg/ml konsantrasyonda maddenin 48. saatte beklenen kronik etkisinin olduğu fakat 200 µg/ml konsantrasyonda kronik etkisi olmadığı görülmektedir. Bu durumda 1D maddesinin 200 µg/ml konsantrasyonda istatikselsel olarak anlamlı olmayıp, 100 µg/ml konsantrasyonda anlamlı olduğu görülmektedir.

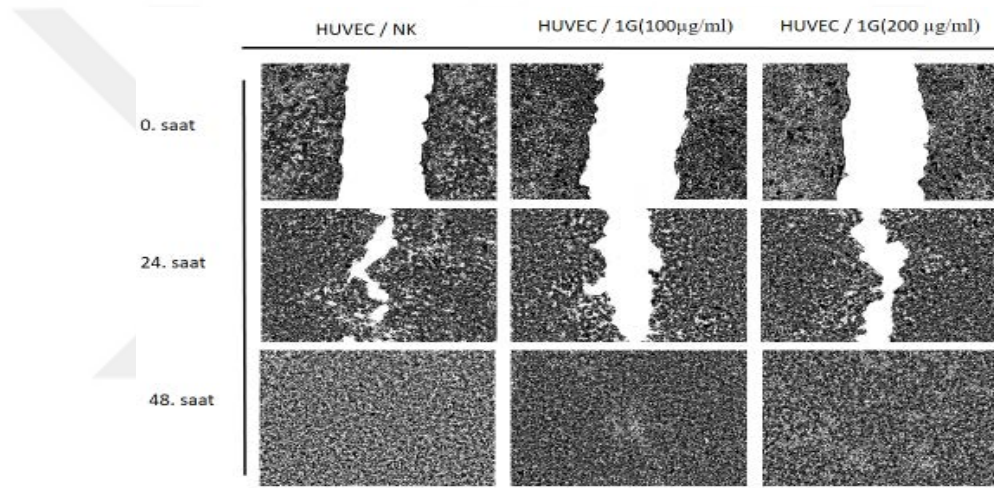


Şekil 4.43. 1E maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)

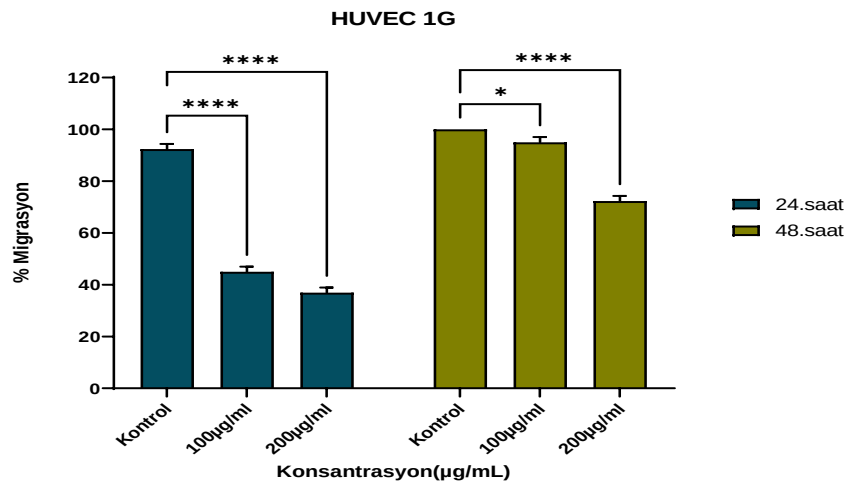


Şekil 4.44. 1E maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, **P≤0.001)

Şekil 4.46’da görüldüğü gibi HUVEC hücre hattı için 1F maddesi 2 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1F maddesi 24.saatte negatif kontrolle kıyaslandığında her iki dozda da azalma olduğu bunun yanı sıra, 100 µg/ml maddenin beklenen akut etkiyi oldukça iyi gösterdiği görülmektedir. 48. saatte ise 100 µg/ml konsantrasyonda kronik etkisinin daha iyi olduğu görülmektedir. Bu iki doz arasında kıyaslama yapıldığında, 100 µg/ml konsantrasyonda daha iyi etki göstererek 1F maddesi olduğu belirlenmiştir. İstatistiki olarak değerlendirildiğinde hem akut hem de kronik etki açısından tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.47. 1G maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon görüntüsü(4x)



Şekil 4.48. 1A maddesinin HUVEC hücre hattındaki migrasyon grafiği (****P≤0.0001, *P≤0.005)

Şekil 4.48’de görüldüğü gibi HUVEC hücre hattı için 1G maddesi 2 farklı dozda çalışılmıştır. Migrasyon analizinde maddelerin migrasyon alanlarını kapatmaması beklenmektedir. 1G maddesi 24.saatte negatif kontrolle kıyaslandığında her iki dozda beklenen etkiyi gösterdiği ve yara alanının kapanmadığı görülmektedir. 48. saatte ise 200 µg/ml konsantrasyonda kronik etkisinin olduğu ve 100 µg/ml konsantrasyonda kronik etkisinin olmadığı görülmektedir. Bu iki doz arasında kıyaslama yapıldığında 1G maddesinin 200 µg/ml konsantrasyonda daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. İstatistiki olarak değerlendirildiğinde de dozun negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında daha anlamlı olduğu görülmektedir.

Kullanılan İS’lerin, hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen analizlerden elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, A549 hücre hattı üzerinde antimigratif ve antiproliferatif açıdan en etkili maddenin 50 µg/ml konsantrasyon 1E olduğu, HT29 hücre hattı için 100 µg/ml konsantrasyonda 1G maddesi olduğu sonucuna varılmıştır. HUVEC hücre hattında antimigratif olarak en etkili maddenin 100 µg/ml konsantrasyonda 1E-1F olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, ileri analizlere (RT-qPCR ve yara iyileşme çalışmalarına, vb.) 1E ve 1G bileşikleri ve 50-100 µg/ml konsantrasyonları ile devam edilmiştir.

4.3.Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time–Pcr, RT-qPCR) Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tez çalışması kapsamında, İS’lerin akciğer kanseri (A549) ve kolon kanseri (HT29) hücre hatları üzerinde, migrasyon genleri ile gen ekspresyon seviyeleri belirlenmek istenmiştir. Bu aşamaya kadar gerçekleştirilen tüm verilere bakılarak gen ekspresyon çalışmaları için, hücreler üzerinde en belirgin anti-proliferatif ve anti metastatik etki gösteren 1E ve 1G maddelerinin kullanılması uygun görülmüştür.

Bir gene ait hedeflenen mRNA’nın yüksek duyarlılıkta belirlenebilmesi, hedef bölge çoğaltımı ve kantitatif belirleme aşamasının tek bir cihaz ile yapılabilmesi yönünden en yaygın olarak kullanılan yöntem RT-qPCR’dır ve gen ekspresyon analizlerinde kullanılan doğru, hızlı ve hassas bir tekniktir (Jarczak ve ark., 2014; Tilli ve ark., 2016).

Referans genler hücrelerin fonksiyonel rollerinden bağımsız olarak, bir hücrenin varlığı için gerekli olan genlerdir (Eisenberg ve Levanon, 2003). Bu nedenle; bir organizmanın tüm hücrelerinde doku tipine, gelişim evresine, hücre döngüsüne veya dış sinyallerine bakılmaksızın normal koşullar altında da eksprese olmaktadır (Sikand ve ark., 2012). Referans genler bu avantajlı özelliklerinden dolayı çeşitli deneysel ve sayısal veri araştırmalarında yaygın olarak kullanım alanı bulmuştur (Sikand ve ark., 2012; Tilli ve ark., 2016). Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile birlikte housekeeping genlerin ekspresyon seviyelerinin; gene, hücre tipine ve deneysel koşullarına bağlı olarak değişebildiği ortaya konmuştur. Örneğin; en sık kullanılan housekeeping genlerden biri olan GAPDH'nin doku tipine (Sullivan-Gunn ve ark., 2011), metabolik sürece (Gong ve ark., 2016) veya belirli çalışma koşullarına (Mahoney ve ark., 2004) bağlı olarak stabil olmadığı ortaya konmuştur. Bu nedenle; çalışma tasarımında ilgili hücrelerde normalizasyon için kullanılacak genin stabilitesinin belirlenmesi herhangi bir hedef genin ekspresyonunun doğru analizi için bir ön koşuldur (Panina ve ark., 2018).

A549 ve HT29 hücre hattı gen ekspresyonu analizi için kültüre alınmıştır. Yeterli konfluensiye sahip hücreler üzerinde yara modeli oluşturulmuştur. Ardından negatif kontrol için madde bulunmayan tam besi ortamı kültür petrisine eklenmiştir. Aynı şekilde 100 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlardaki maddeler kültür petrisine eklenerek 37°C ve %5 CO₂-li inkübatörde kulture edilmiştir. İnkübasyon süresi, maddelerin kronik etkisinin akut etkisinden daha iyi olduğu için 48 saat boyunca madde ile muamele edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler kazıyıcı ile toplanarak santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifügasyon sonunda hücrelerin RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

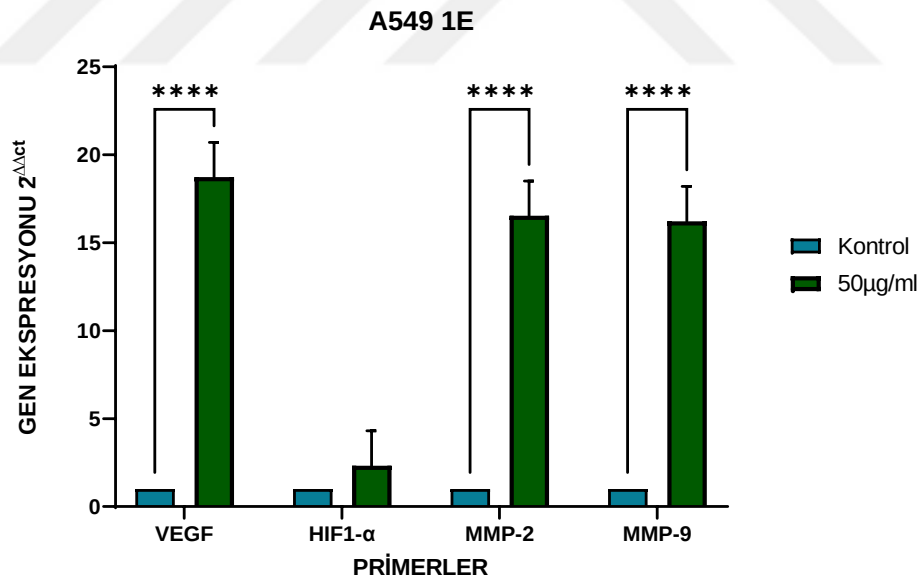
Çizelge 4.1. Total RNA ölçüm sonuçları

RNALAR	A 260	ng/ µl	260/280
HT29 NK	53.795	2151.79	1.91
A549 NK	26.848	1073.91	1.92
HT29 1E	22.713	908.51	1.98
A549 1E	29.321	1172.86	2.10
HT29 1G	92.046	3681.84	2.15
A549 1G	42.613	1704.54	2.07

Elde edilen cDNA'larla migrasyonda görev alan genlerin mRNA seviyesindeki ekspresyon oranları RT-qPCR (gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu) ile belirlenmiştir. Bu çalışmada tüm hücrelerde bulunan ve house keeping gen bölgesi olan GAPDH kullanılmıştır. GAPDH gen ekspresyon seviyesi değerini elde ettikten sonra, çalışmada kullanılan diğer genlerin ekspresyon değerleriyle oranlayarak hedef genin ekspresyon değeri hesaplanmıştır. Hesaplamalar gen ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı *Two-way ANOVA* testi uygulanarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. İyonik sıvı uygulanan hücre hatları üzerinde mRNA düzeyinde gen ekspresyon seviyeleri (Kontrol grubu ile karşılaştırılmış değerler)

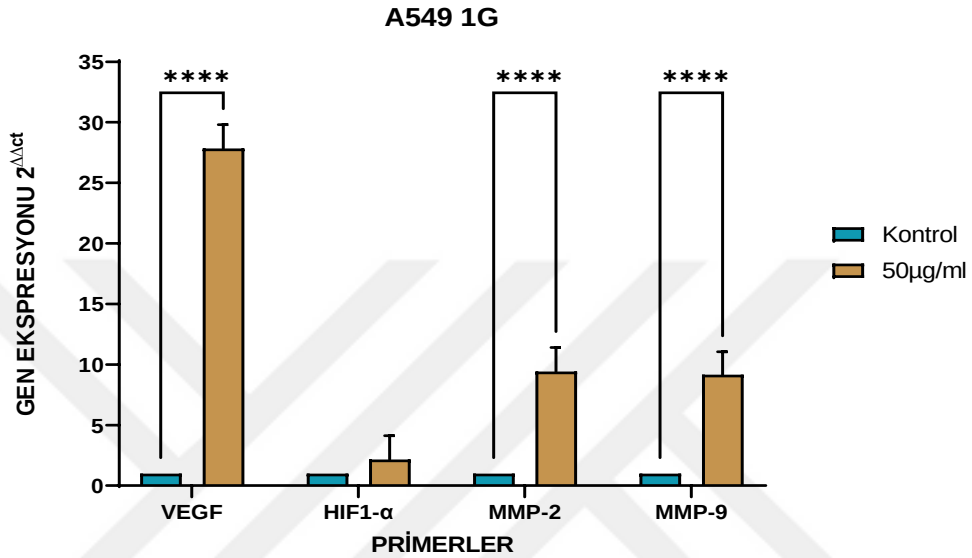
Primerler	A549-1E	A549-1G	HT29-1E	HT29-1G	HUVEC-1E	HUVEC-1G
VEGF	18.76	27.85	0.16	2.41	5.38	3.25
HIF-1 α	2.34	2.2	0.004	0.99	4.05	15.03
MMP2	16.56	9.44	0.17	1.47	1	0.4
MMP9	16.22	9.25	0.175	2.67	0.8	2.1



Şekil 4.49. 1E maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen A549 hücre hattındaki migrasyon genlerinin ekspresyon seviyeleri (****P≤0.0001)

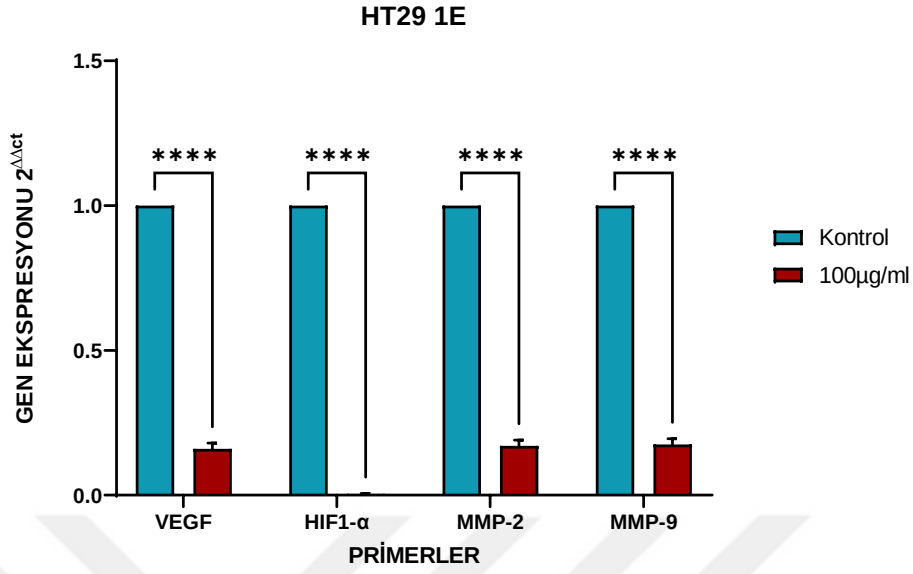
Şekil 4.49'da, 1E maddesinin A549 hücrelerindeki migrasyon genlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyelerine olan etkisi görülmektedir. Madde konsantrasyonu 50 μg/ml olarak uygulanmıştır. Oluşturulan bu grafikte 1E maddesinin VEGF, MMP2

ve MMP9 gen bölgesinin migrasyon mekanizması gereği baskılanması beklenirken beklenenin tersi bir durum gerçekleşmiştir. Bu gen bölgelerinde VEGF için; 19 kat, MMP-2 ve MMP-9 için; 16 kat ekspresyonu artırmış olduğu gözlemlenmiştir. Yalnızca HIF-1 α geni baskılanmıştır. İstatistiki olarak grafiğin anlamlı olduğu görülmektedir.



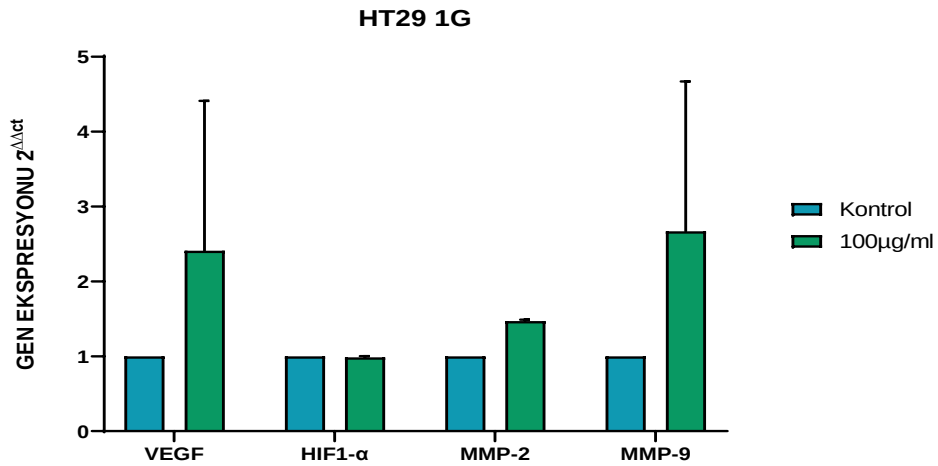
Şekil 4.50. 1G maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen A549 hücre hattında migrasyon genlerinin ekspresyon seviyeleri (****P≤0.0001)

Şekil 4.50' de, 1G maddesinin A549 hücrelerindeki migrasyon genlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyelerine olan etkisi görülmektedir. 1G maddesinin (50μg/ml konsantrasyonda) 48 saatlik inkübasyonundan sonra A549 hücrelerinde VEGF gen seviyesinin yaklaşık 28 kat arttığı görülmektedir. Aynı şekilde bu durum MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyon seviyelerini 10 kat arttırmış ve istatistiki açıdan anamı olduğu görülmektedir. HIF-1 α geni ise baskılanmış ve istatikselsel olarak değerlendirildiğinde anlamlı olmadığı görülmektedir.



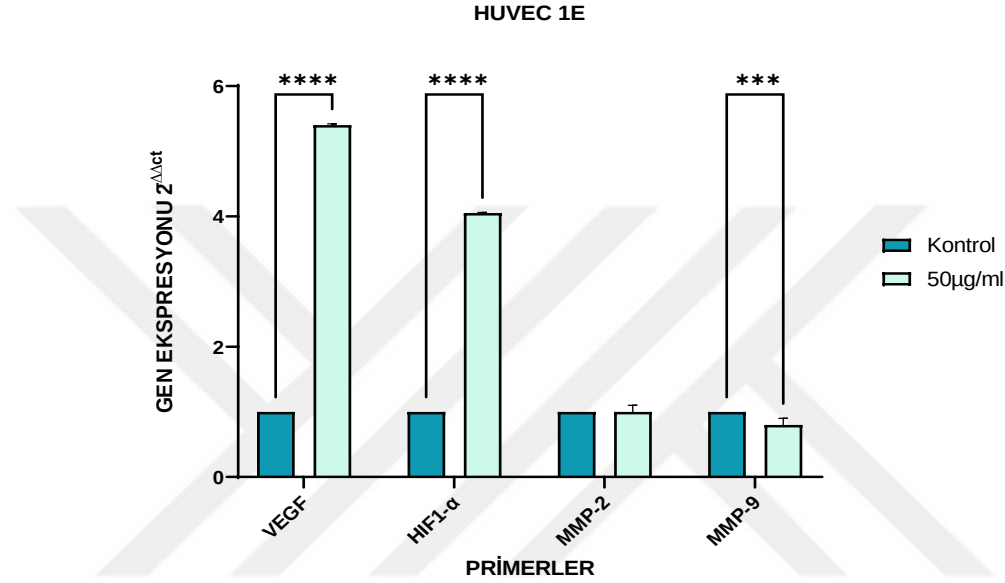
Şekil 4.51. 1E maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HT29 hücre hattında migrasyon genlerinin ekspresyon seviyeleri (**** $p \leq 0.0001$)

Şekil 4.51’ de, 1E maddesinin HT29 hücrelerindeki migrasyon genlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyelerine olan etkisi görülmektedir. Madde konsantrasyonu 100 $\mu\text{g/ml}$ olarak uygulanmıştır. Grafikte de görüldüğü gibi 1E maddesi negatif kontrolle kıyaslandığında tüm genlerde baskılanarak istenilen sonuçlar elde edilmiştir. En iyi sonuç HIF-1 α geninde görülmektedir. İstatiksel açıdan değerlendirildiğinde tüm genlerin anlamlı olduğu görülmektedir.



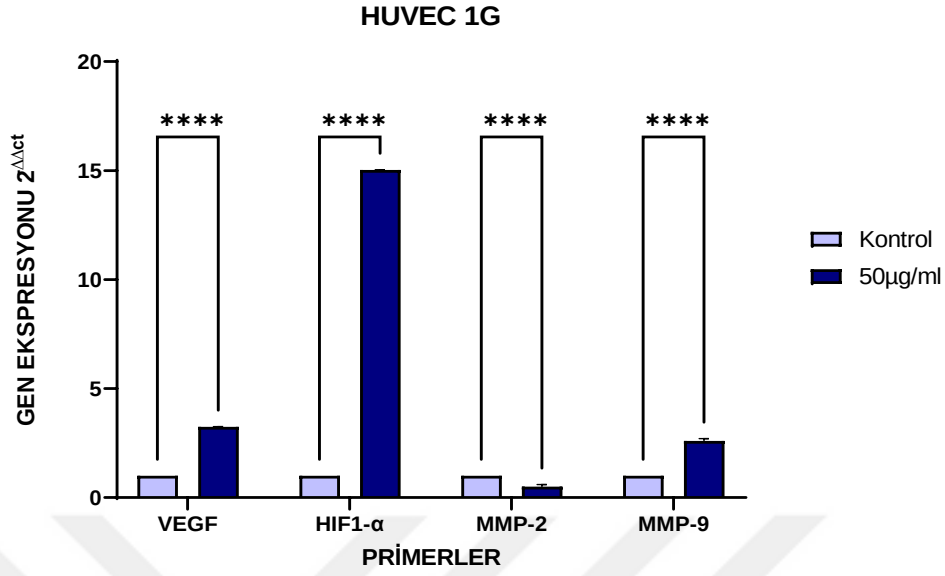
Şekil 4.52. 1G maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HT29 hücre hattında migrasyon genlerinin ekspresyon seviyeleri

Şekil 4.52’de görüldüğü üzere, HT29 hücre hattına 48 saat boyunca uygulanan 100µg/ml konsantrasyondaki 1G maddesinin migrasyon mekanizmasında HIF-1α geni negatif kontrolle aynı oranda baskılanırken VEGF, MMP2 ve MMP9 genlerinde 2-3 kat artış olduğu görülmektedir. Şekil 4.52 istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, grafiklerin anlamlı olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.53. 1E maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HUVEC hücre hattında migrasyon genlerinin ekspresyon seviyeleri (****P≤0.0001, ***P≤0.0005)

Şekil 4.53’ de, 1E maddesinin HUVEC hücrelerindeki migrasyon genlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyelerine olan etkisi görülmektedir. Madde konsantrasyonu 50 µg/ml olarak uygulanmıştır. Oluşturulan bu grafikte 1E maddesinin VEGF, HIF-1α, MMP-2 ve MMP-9 gen bölgelerinde artış olması beklenmektedir. Bu gen bölgelerinde VEGF ve HIF-1α genleri 4 ila 6 kat arasında artış gösterirken MMP-2 ve MMP-9 negatif kontrolle aynı seviyede olduğu gözlemlenmiştir. İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde MMP-2 hariç tüm genlerin anlamlı olduğu görülmektedir.



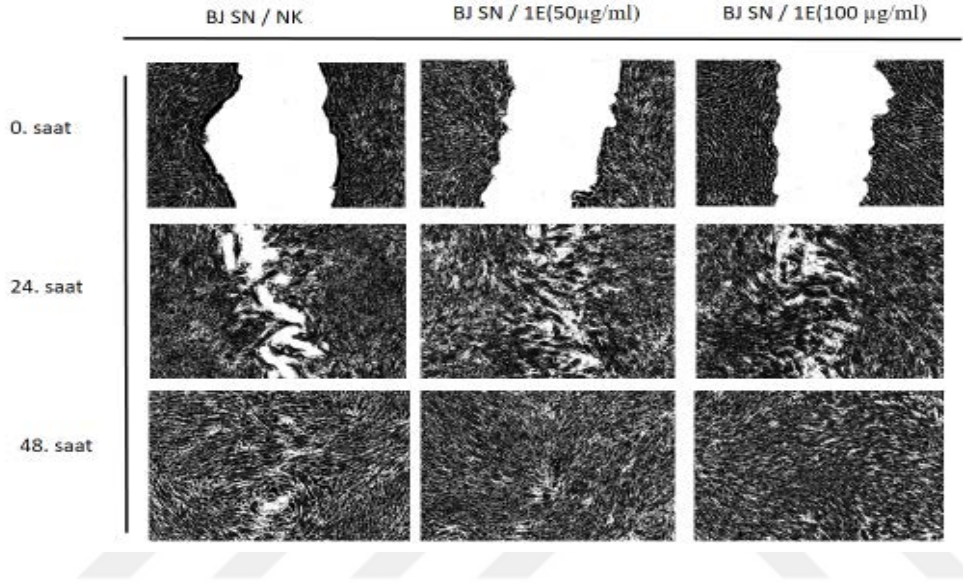
Şekil 4.54. 1G maddesi ile 48 saat boyunca muamele edilen HUVEC hücre hattında migrasyon genlerinin ekspresyon seviyeleri (****P≤0.0001)

Şekil4.54’de, 1G maddesinin HUVEC hücrelerindeki migrasyon genlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyelerine olan etkisi görülmektedir. Madde konsantrasyonu 50 µg/ml olarak uygulanmıştır. Oluşturulan bu grafikte 1G maddesinin VEGF, HIF-1α ,MMP2 ve MMP9 gen bölgelerinde artış olması beklenmektedir. Bu gen bölgelerinde VEGF ve HIF-1α ve MMP9 genleri sırasıyla 4 kat, 15 kat ve 3 kat artış göstermiştir. MMP2 gen, ise negatif kontrolle karşılaştırıldığında yarı yarıya baskılanmış olduğu görülmektedir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde tüm genlerde anlamlılık söz konusudur.

4.4.İyonik Sıvıların Yara İyileşmesi Üzerindeki Sonuçlarının Değerlendirilmesi

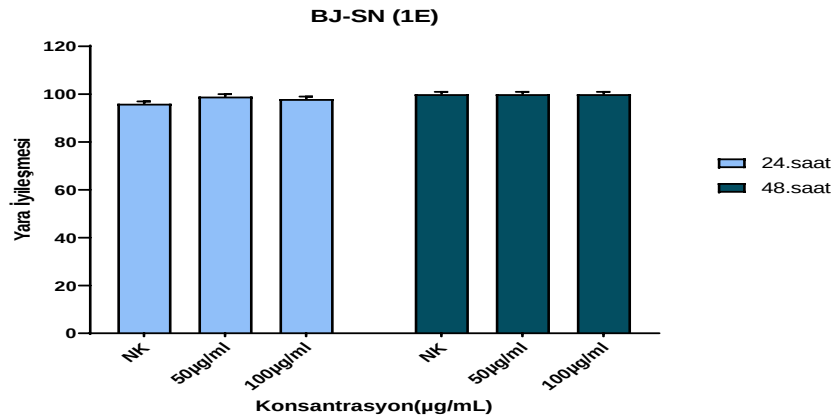
Yapılan çalışmaya ek olarak, migrasyon analizi sonucundan yola çıkarak yapılan gen ekspresyon düzeyinde elde edilen sonuçlarda, VEGF genindeki belirgin artışın söz konusu maddelerin yara iyileşmede etkili olabileceği düşünülmüştür. Belirlenen maddeler ve konsantrasyonları (1E ve 1G maddelerinin 50 µg/ml ve 100 µg/ml) aynı şekilde yara iyileşmesi için de kullanılmıştır. Yara modeli oluşturulan deri fibroblast (BJ SN-) hücre hattına, etkinliği belirlenen dozlar uygulanarak madde eklendikten

hemen sonra 0.saatte, 24. saatte ve 48. saatte olacak şekilde fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen fotoğraflar, Image J programı kullanılarak negatif kontrolle kıyaslanmış ve yara alanları hesaplanmıştır. Hesaplanan alanlar GraphPad Prism 9.0 programıyla grafik haline getirilmiştir. Hesaplamalar istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı *Two-way ANOVA* testi uygulanarak belirlenmiştir.



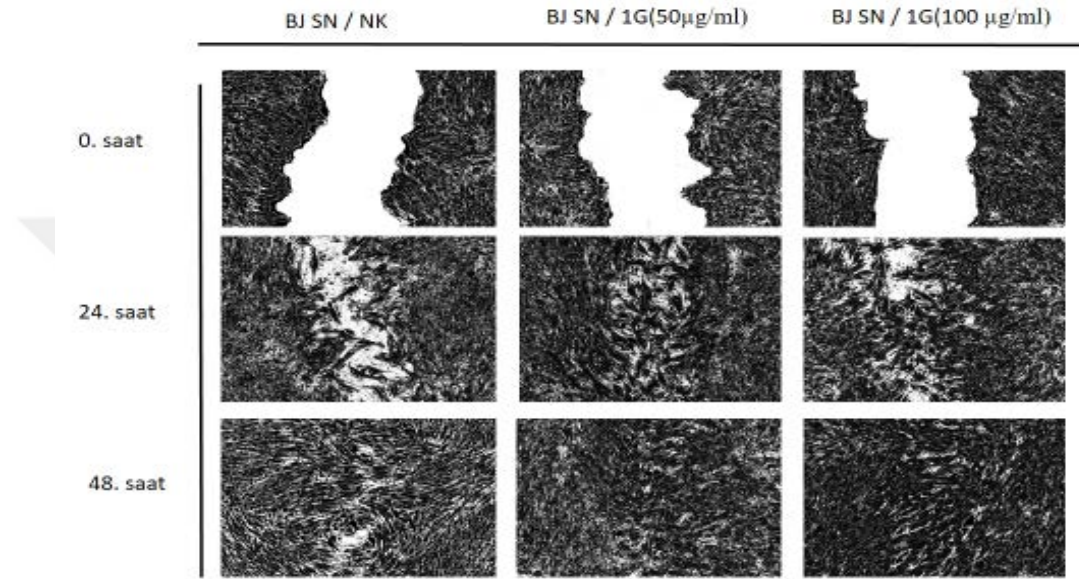
Şekil 4.55. 1E maddesinin BJ SN hücre hattındaki yara alanı görüntüleri (4x)

Şekilde 4.55’ de görüldüğü gibi BJ-SN hücre hattı üzerine yara alanları oluşturulmuş ve 50 µg/ml ila 100 µg/ml olmak üzere iki farklı konsantrasyon denenmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında alınan fotoğraf görüntüleri eklenmiştir.



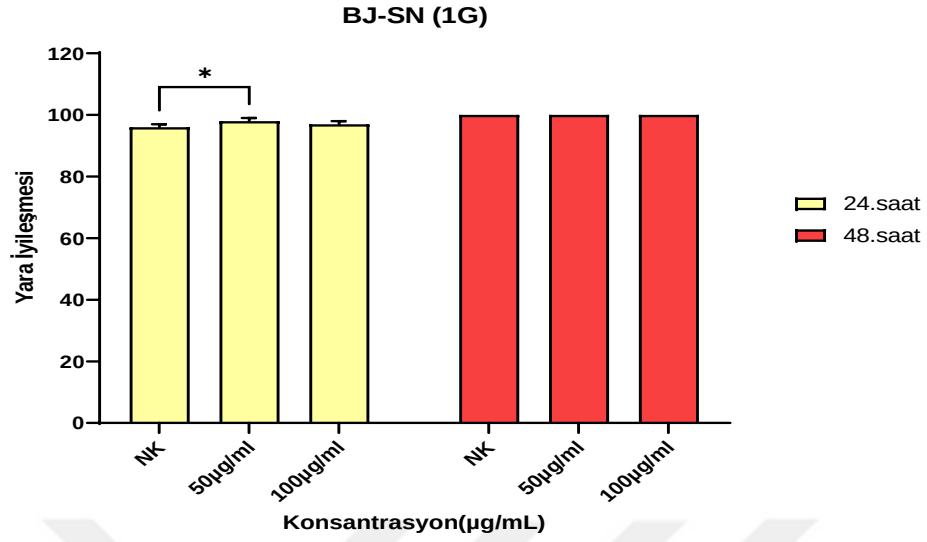
Şekil 4.56. 1E maddesinin BJ SN hücre hattındaki yara iyileşme grafiği

Verilen yara iyileşme grafiğinde görüldüğü gibi dozlar arasında gözle görülebilir farklılıklar söz konusu değildir. Dozların negatif kontrolle kıyaslanması durumunda ise 24. saatteki NK diğerlerine göre % 3 civarında daha az kapanmıştır. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde akut ve kronik etkisinin anlamlı olmadığı gibi madde konsantrasyonları arasında da anlamlılık söz konusu değildir.



Şekil 4.57. 1G maddesinin BJ SN hücre hattındaki yara alanı görüntüleri (4x)

Şekil 4.57’ de görüldüğü gibi BJ-SN hücre hattı üzerine yara alanları oluşturulmuş v iki farklı konsantrasyon denenmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında(0., 24. ve 48.saatte) alınan fotoğraf görüntüleri eklenmiştir.



Şekil 4.58. 1G maddesinin BJ SN hücre hattındaki yara iyileşme grafiği (* $P \leq 0.005$)

Verilen yara iyileşme grafiği 4.58’ de görüldüğü gibi iki farklı konsantrasyonda çalışılmıştır ve dozlar arasında hücre proliferasyonu bakımından farklılıklar olmadığı görülmektedir. Dozların negatif kontrolle kıyaslanması durumunda ise 24. saatteki NK diğerlerine göre % 2 civarında daha az kapanmıştır. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde akut etkide(* $P \leq 0.005$) anlamlı iken, kronik etki bakımından anlamlı olmadığı gibi konsantrasyonlar arasındaki farklılıklardan dolayı da anlamlı olmadığı görülmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser, insidansı ve mortalitesi her geçen gün hızla artan bir hastalıktır. Son yıllarda kanser tedavisi için ilaç ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiş olmasına rağmen günümüzde ilerlemiş kanser vakalarında tedavi edici seçenekler bulunmamaktadır. Bu durum kanser gelişim sürecinin karmaşıklığı ve aydınlatılması gereken çok konunun olduğunu göstermektedir.

Ülkemizde 2020 yılında en sık görülen kanser türleri arasında, akciğer kanseri, meme kanseri, kolorektal kanseri ilk 3 sırada yer almaktadır. En sık görülen kanser türleri erkeklerde akciğer (%22), kolorektal (%12) ve prostat (%11) iken kadınlarda ise meme (%26), kolorektal (%14) ve midedir (%7) (Özdoğan, 2020).

Bir maddenin sitotoksitesi biyolojik aktivitesinin bir şeklidir ve İS'lerin çeşitli hücrelere karşı sitotoksitesi üzerine çok sayıda çalışma rapor edilmiştir. İyonik sıvıların sitotoksite çalışmaları bazı insan hücre hatları (3215 LS, fibroblastlar; A549, akciğer karsinomu; A431, skuamöz karsinom; CaCo-2, kolon karsinomu; HaCaT, ölümsüzleştirilmiş keratinositler ; HCT-116, kolon karsinomu; HEK, embriyonik böbrek; HeLa, serviks kanseri; HepG2, hepatosit karsinom; HT-29, kolon karsinomu; MCF-7, meme kanseri; T98G, beyin kanseri; U937, histiositik lenfoma; ve diğer) üzerinde uygulanmıştır (Egorova ve ark., 2017).

İS'lerin sitotoksitesi yapılarına bağlı değişiklik gösterdiği gibi geniş konsantrasyon aralığı (mikromolardan milimolara) da bu durumu etkilemektedir. Sitotoksik etkinin belirgin hale gelmesindeki en büyük etken ise kontrol edilir ayarlanabilirliğe sahip olmasıdır. Çoğu araştırmacının elde ettiği sonuçlarda İS'lerin toksik etkilerinin doğrudan hücre zarının bozulmasıyla ilgili olduğuna dikkat çekmiştir (Bubalo ve ark., 2017). Dietilentramin esaslı İS'lerin katyonik kısmında sunulan uzun alkil zincirleri, İS molekülünün lipofilik karakterini arttırdığı, bu da onların hem hücre zarı fosfolipid çift tabakası hem de zar proteinlerinin hidrofobik alanları ile etkileşime girme yeteneklerinin de arttığı anlamına gelmektedir. Bu etkileşimler, membran fizyolojik fonksiyonlarının bozulmasına, hücresel içeriğin sızmasına ve sonuç olarak da hücre ölümüne neden olduğunu akla getirmektedir. İS'lerin toksisitesi ile alkil zincirinin uzunluğu arasında güçlü bir korelasyonun varlığı birçok, tek hücreli ve çok hücreli

organizmalarda test edilmiştir (Ranke ve ark., 2004). Bu sonuçlar doğrultusunda hücre zarı hasarı ile İS'lerin alkil zincir uzunluğu arasındaki ilişkiyi açıkça göstermiştir (Bubalo ve ark., 2017).

Anyonların İS'lerin sitotoksitesisi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ve katyonların sitostatik aktiviteye karşı önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir. Alkil zincir uzunluğundaki artışla birlikte, anti-tümör aktivitede önemli bir gelişme gözlenmiştir. Alkil zincir uzunluğundaki daha fazla artış, hem anti-tümör aktivitesini hem de bu bileşiklerin tümör hücre hatlarına karşı sitotoksitesisini artırmıştır. Alkil zincir uzunluğundaki artış ile anti-tümör aktivitede önemli bir gelişme elde edilebilir. (Malhotra ve Kumar, 2010). Anyon üzerindeki hem alkil zinciri hem de elektronegatif atomların biyolojik aktivite üzerinde değişken bir etkisi vardır, ancak elektronegatif atomların (floro, kloro, bromo gibi) anyon üzerindeki etkisi, ilaç olarak alkil zincirinden daha çok tercih edilmektedir (Kumer ve Khan, 2021). Tiyol gruplarına (-SH) sahip bileşiklerin, DNA sentezinde kullanılan ribonükleotid redüktaz (RR) enzimini de engellediği kanıtlanmıştır. Dolayısıyla, RR enziminin fonksiyonunu inhibe ederek veya bloke ederek, tümör hücrelerinin DNA replikasyonu ve sentezi kontrol edilebilir veya önlenabilir (Yusof ve ark., 2020). Bunun yanı sıra, anyonlarda bulunan tiolat ve kloro gruplarının, DNA'ya potansiyel olarak hidrojen bağı {N-H...S (tiolat) ve N H...Cl hidrojen bağı} oluşturabileceği ve sitotoksitesilerini belirgin şekilde artırdığı bildirilmiştir. (Scolaro ve ark., 2006). 1E ve 1G İS'lerinin belirgin sitotoksiste sonuçları göstermesi yukarıdaki literatür bilgileri ile uyumludur.

İS'ler, insan veya hayvan vücutlarına girdikten sonra çeşitli enzimlerle etkileşime girebilir ve aktivitelerini etkileyebilir. Bu nedenle, İS'lerin canlı organizmalar üzerindeki toksiste mekanizmalarını açıklamak için birçok araştırmacı, İS'lerin normal bir metabolizma fonksiyonu için gerekli olan enzimler üzerindeki etkilerini incelemiştir. Yapılan bir çalışmada, imidazolyum-İS'lerin toksik olmayan miktarlarının MDA-MB-231 model kanser hücre hattının göçü üzerindeki etkisine odaklanmışlardır. İS'lerin hücrelipid zarının esnekliğini azaltarak hücre hareketliliğini artırabildiğini ve hem hareketliliğin hem de esnekliğin İS konsantrasyonu ve İS katyon zinciri uzunluğu ile ayarlanabileceğini göstermişlerdir (Kumari ve ark., 2020).

Yaygın olarak görülen bu kanser türlerinden, akciğer ve kolon kanserleri üzerine İS'lerle biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Hücre hatlarında maddelerin antiproliferatif etkisini değerlendirebilmek adına MTT analizi yapılmıştır. MTT sonuçları değerlendirildiğinde akciğer kanseri hücresi (A549) için 50 ve 25 µg/ ml konsantrasyonda antiproliferatif etkiler sergilemiştir. HT29 hücre hattında ise, 100 ve 50 µg/ ml konsantrasyonda hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. 1E ve 1G İS'lerinin belirgin şekilde anti-proliferatif etki göstermesi yukarıdaki literatür bilgileri ile uyumludur. Kordon epitel hücreleri (HUVEC) içinse test edilen sekiz konsantrasyondan 200 ve 100µg/ml, hücre çoğalmasını önleyerek antimigratif etkiler sergilemiştir.

Bu tez çalışmasında, kanserde kritik süreçlerden olan metastazın hücreler üzerindeki etkisini genel olarak değerlendirebilmek için migrasyon analizi yapılmıştır. İS'ler hücre zarlarıyla olan yakınlıkları nedeniyle migrasyonda önemli rol oynayabilmektedir (Egorava, 2017). Yara modeli oluşturulan hücrelere, etkinliği belirlenen dozlar uygulandığında yara alanlarını kapatmayarak akciğer kanseri üzerinde en etkili dozun 50 µg/ml ve kolon kanseri için 100 µg/ml olduğu tespit edilmiştir.

Migrasyon analizi sonucunda en etkili olan 1E ve 1G İS'lerin A549 ve HT29 hücreleri üzerinde tümör metastazının araştırılması amaçlanmıştır ve sonuç olarak İS'lerin bahsi geçen ve migrasyonda görev alan genlerin (HIF-1α, VEGF, MMP2 ve MMP9) gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile ifadenme oranları mRNA seviyesinde tespit edilmiştir.

qRT-PCR analizlerinde çift iplikli DNA'ya bağlanarak ışıma yapan EvaGreen boyası kullanılmıştır. Hedef genlerin ekspresyonlarındaki relatif değişiklikler, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (relatif kantifikasyon) metodu kullanılarak analiz edilmiştir. $\Delta\Delta C_t$ değeri; PCR ürünlerinin miktarındaki önemli artışın olduğu ilk döngüyü ifade etmektedir (Ağaoğlu ve ark., 2020). Kalibratör olarak referans genden ve karşılaştırma yapabilmek için kontrol grubundan yararlanılmıştır. Hedef genin bir kontrol gene (GAPDH) göre relatif ekspresyonuna bakılmıştır. Bu yöntemin, düşük yoğunlukta sentezlenen genlerin ekspresyon çalışmaları için çok uygun bir yöntem olduğu bilinmektedir.

Çeşitli proteinler, HIF-1 α , VEGF, MMP2 ve MMP9 dahil olmak üzere tümör invazyonu ve metastazında birincil işlevleri yerine getirmektedir. HIF-1 α , vasküler endotelial hücre büyüme faktörünü (VEGF) ve matris metalloproteinazları (MMP'ler) kodlayanlar dahil olmak üzere birçok genin ekspresyonunu da düzenlemektedir (Kang ve ark., 2012). HIF-1 α tarafından indüklenen VEGF, tümör hücreleri tarafından salgılanabilir ve çeşitli tümör tiplerinde hücre proliferasyonu ve metastazının önemli bir düzenleyicisi olarak hizmet edebilmektedir (Decio ve ark., 2014). MMP'ler, tümör invazyonu ve metastaz sırasında doku yeniden şekillenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. MMP'ler, hücre dışı matrisi (ECM) oluşturan molekülleri bozmakta, böylece tümör ilerlemesini ve istilasını teşvik etmektedir. (Egeblad ve Werb, 2002).

Ekspresyonu gerçekleştirilen genlerin akciğer kanseri hücre hattında 1E ve 1G maddesi 50 μ g/ml dozda tüm primerler ile çalışılmış ve yalnızca HIF-1 α geninde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir baskılanma görülmektedir. MMP-2 ve MMP-9 genlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı (**** $P \leq 0.0001$) artışlar görülmektedir. Kolon kanseri hücre hattında ise, 1E ve 1G maddesi 100 μ g/ml dozda tüm primerler ile denenmiş, 1E maddesinin tüm genlerde baskılandığı ve en iyi baskılanmanın HIF-1 α geninde olduğu istatistiksel olarak (**** $P \leq 0.0001$) anlam ifade ettiği görülmektedir. MMP-2 ve MMP-9 genlerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan artışlar görülmektedir. Uslu ve Eltaş (2014)'ın yapmış olduğu bir derlemede, MMP sentezinin ve aktivitesinin sağlıklı dokularda düşüken enflamatuvar hastalıklar, tümoral oluşumlar ve metastazlar gibi birçok patolojik durumda seviyeleri artarak doku yıkımında rol oynadığını belirtmişlerdir. İS'lerinin gen ekspresyon seviyelerindeki artışlar bizim beklediğimizin aksi bir durumu gösterse de, yapılan bazı çalışmalarda elde edilen veriler yukarıdaki literatür bilgileri ile uyumludur.

Günümüzde vaskülarizasyonu engellemek için, büyüme faktörlerini ve reseptörlerini, bu süreçleri aktive eden moleküler mekanizmaları bozan tedaviler üzerinde çalışılmaktadır. Klinik pratikte hedeflenen faktörler HIF-1 α ve VEGF'dir. Bu yolların akciğer kanseri tedavisindeki yeri de çalışmalarla incelenmiş ve ortalama progresyon zamanının azaldığı, tümör yanıt oranının arttığı gösterilmiştir (Aslaner, 2015). Elde ettiğimiz sonuçlar yukarıdaki literatür bilgileri ile uyumludur.

Son yıllarda anti-anjiogenik tedaviler, mevcut konvansiyonel kemoterapiler ile beraber kullanılarak iyi sonuçlar alınmaya başlanmıştır. Bu tedavilere yönelmenin en önemli sebebi anjiogenezin tümör gelişimi, büyümesi ve uzak metastaz yapmasında ana mekanizmalardan olmasıdır. Tümör gelişimi ve metastaz yapma özelliği yeni damar gelişimine bağlıdır. Normal dokuda bu süreci yöneten anjiogenik ve anti-anjiogenik faktörler bir denge halinde çalışmaktadır. Ancak tümörlü dokuda ortaya çıkan monosit, mast hücreleri ve lenfositlerde dokuya ulaştıklarında başta VEGF olmak üzere birçok büyüme faktörleri salmaktadırlar. Salınan bu faktörler sonucu vasküler geçirgenlik artar, matriks metalloproteinaz enzimleri ile matriks sindiriminin ardından endotel hücre göçü için ortam hazırlanmış olur. Ardından kapiller yüzeyde boşluklar oluşur, bu boşlukta yeni damar duvarları oluşmaya başlar (Brown ve ark., 1997). Yeni oluşan damarlar aracılığı ile tümör dokusundan kopan hücreler vücutta başka bir dokuda metastaz oluşturur.

VEGF hem normal hemde patolojik anjiogenezisten sorumlu bir sitokindir. VEGF, tümör hücreleri tarafından salgılanır ve damar geçirgenliğini arttırarak hücre proliferasyonu ve metastazının önemli bir düzenleyicisi olarak rol alabilirler. HIF 1 α kanser hücresinin çoğalması döneminde gerekli olan oksijeni sağlayan bir transkripsiyon faktörüdür. HIF 1 α stimülasyonu VEGF yolağını aktive etmektedir. HIF 1- α 'nın aşırı ekspresyonu, kanserli hastalarda, metastaz riskinde artış ve azalmış sağkalım ile ilişkilidir. HIF-1 α tarafından indüklenen VEGF, tümör hücreleri tarafından salgılanabilir ve çeşitli tümör tiplerinde hücre proliferasyonu ve metastazının önemli bir düzenleyicisi olarak hizmet edebilir (Hiratsuka S ve ark. 2006). HIF 1- α , farklı insan kanser tiplerinde tanımlanmıştır ve tümör metastazında anahtar role sahip olduğu bilinmektedir. Kanser ve HIF-1 α alanında yapılan çalışmalar göstermiştir ki HIF-1 α , kanser oluşumuna katkıda bulunan esas element olmakla kalmaz, kanser progresyonunda da görev almaktadır.

Yapılan bir çalışmada, VEGF'nin akciğer kanseri dışında birçok tümörde (başta meme, kolon, renal kanserler olmak üzere) prognostik önemi saptanmış ve hedeflere yönelik tedaviler ile sağ kalım artışları sağlandığı belirlenmiştir (Aslaner, 2015). Shannon ve ark. Tümör hipoksisinin kemoterapötik ilaçların direnci üzerine etkisi ile ilgili yaptığı

bir çalışmada doku hipoksisi sonrası artan VEGF ve HIF 1 α ekspresyonunun kemoterapötik ilaç direncine neden olduğunu bulmuştur.

İncelenen bir literatür çalışmasında, matriks metaloproteaz inhibitörlerinin kullanımı mezenkimal göçü durdurabildiği, ancak genel olarak istilayı durduramadığı yer almaktadır (Gandalovičová, Aneta, ve ark., 2017). Bu durum, hücreler mezenkimal-amoeboid geçişe (MAT) uğraması ve proteazdan bağımsız istilaya geçmesiyle açıklanabilir. MMP'ler tümör invazyonu ve metastazı süresince dokunun yeniden şekillenmesinde kritik rol oynamaktadır. MMP2 ile MMP9 ekspresyonu ve aktivitesindeki azalmaların çeşitli kanser hücre dizilerindeki büyüme ve metastazı inhibe ettiği gözlemlenmiştir. (Zeynalov, 2018).

İS'lerin hücre hatları üzerinde yapılan gen ekspresyon analizlerinde elde edilen tüm verilerde genlerin baskılanması beklenilmektedir. Fakat istenilenin dışında da verilere ulaşılmıştır. Yapılan literatür aramalarında beklenmeyen sonuçların elde edilmesi yukarıdaki literatür bilgileriyle açıklanmaktadır.

Elde edilen sonuçlarda şekil 4.49 ve şekil. 4.50'de yer alan bazı genlerin baskılanmaması anjiogenez kaynaklı olabileceği durumunu akla getirmiştir. Bu kafa karışıklığını gidermek adına HUVEC hücre hattında yara modeli oluşturarak maddelerin anjiogenezdeki etkisine bakılmak istenmiş ve çalışma sonucunda da anjiogeneze teşvik ettiği görülmüştür. Çalışmanın biraz daha aydınlatılması adına yukarıda sözü edilen genler ile HUVEC hücre hattındaki ekspresyon seviyelerine bakılmıştır.

HUVEC hücresinde 1E ve 1G maddesi 50 μ g/ml dozda uygulanmış ve tüm gen bölgelerinde artış olması beklenmiştir. Bu gen bölgelerinde VEGF ve HIF-1 α genleri artış gösterirken (****P $\leq$ 0.0001), MMP-2 ve MMP-9 (***P $\leq$ 0.0005) negatif kontrolle aynı seviyede olduğu gözlemlenmiştir. İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde MMP-2 hariç tüm genlerin anlamlı olduğu görülmektedir.

Anjiyogenezin sadece kanser hücreleri için gerekli bir mekanizma olmadığı bilinmektedir. Embriyogenez boyunca gelişim için önemli olduğu gibi, erişkinlerde yara iyileşmesi ve dişi üreme döngüsü gibi durumlarda da çalışmaktadır (Taşçı, 2012). VEGF normal ve patolojik anjiogenezden sorumlu sitokindir. Normal dokularda az

miktarda, fetal doku, plesanta gibi yerlerde fizyolojik olarak yüksek miktarlarda bulunur. Anjiyogenezin basamakları çok sayıda hücrede farklı değişiklikler gerektirir. HIF-1 α sinyal yolağının ürokinaz plasminojen aktivator reseptör (uPAR), kollajen prolil4-hidroksilazlar, matriks metalloproteinazlar (MMP) ve matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP) gibi faktörleri etkilediği gösterilmiştir (Fukuda vd 2007). Anjiyogenezin başlaması için gerekli olan en önemli gen VEGF'tir ve bu genin transkribe edilmesi HIF-1 α tarafından indüklenmektedir.

VEGF' nin çeşitli yollar üzerinden gerçekleştirdiği uyarılar ile anjiyogenez için gerekli olan endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu ile birlikte yaşam oranında artış meydana gelir. VEGF de MMP-2'nin endotel hücrelerinden salınımını artırarak bazal membran yıkımına yol açar ve yeni damar oluşumuna neden olur. MMP-9, VEGF'ün salınımını artırarak anjiyogeneze rol alır. HIF-1 sayesinde endotel hücrelerin üzerinde güçlü bir mitojenik etkisi olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) hücrelerden salınarak anjiogenezi uyarmaktadır (Zeynalov, 2018). Yapılan bazı çalışmalarda MMP'lerin anjiyogenez üzerindeki çoklu etkileri nedeniyle, bileşiklerin anjiyogenezi artırmadığını gösterilmiştir. MMP'ler ayrıca belirli kollajen zincirlerinin ve plazminojenin proteolitik bölünmesiyle endojen anjiyogenez inhibitörlerinin üretilmesi ve ligand bağlama alanlarını keserek hücre reseptör sinyalini modüle etmesi yoluyla anjiyogeneze olumsuz katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu durum Şekil 4.53'te görüldüğü gibi bizim elde ettiğimiz sonuçlarla da örtüşmektedir.

Tez kapsamında, bileşiklerin olası antiproliferatif etkilerinin araştırıldığı analizler birlikte değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- A549 hücre hattında hücre proliferasyonunu 50 $\mu\text{g/ml}$ ve 25 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda inhibe ettiği tespit edilmiştir.
- A549 hücresinde maddelerin genel olarak etkili olduğu süre 48 saat yani kronik etki olarak belirlenmiştir.
- HT29 hücre hattında hücre proliferasyonunu 100 $\mu\text{g/ml}$ ve 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda inhibe ettiği tespit edilmiştir.

- HT29 hücresinde 1G maddesinin etkili olduğu süre 48 saat yani kronik etki olarak belirlenmiştir.
- 1F maddesi HUVEC hücre hattında 200 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonda hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görülmektedir. Bununla birlikte, maddenin etkili olduğu süre 24 saat yani akut etki olarak belirlenmiştir.
- Hücre hatlarında maddelerin etkili olduğu dozlar ve süreler değişiklik göstermektedir. Bunun nedeni olarak, vücut hücrelerindeki farklılıktan dolayı kanser tiplerinin metabolik, genetik ve moleküler düzeydeki farklılıklarından olabileceği düşünülmektedir.

Kanserde kritik süreçlerden olan metastazın hücreler üzerindeki etkisini genel olarak değerlendirebilmek için tüm maddeler ile yukarıda sözü edilen dozlarda kullanılarak migrasyon analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- HT29 hücre hattı üzerinde 100 µg/ml konsantrasyonda 1G maddesi kronik etki göstermiştir.
- A549 hücre hattında 50 µg/ml konsantrasyonda 1E maddesi kronik etki göstermiştir.
- HUVEC hücre hattında ise, 100 µg/ml konsantrasyonda 1E maddesi akut etki göstermiştir.

Kronik etkisi olan bu maddeler kanser hücreleri ile 48 saat boyunca muamele edilerek kültürden alınan hücrelerin RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'larla migrasyonda görev alan HIF-1 α , VEGF, MMP2, MMP9 genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak belirlenmiştir.

Ekspresyonu gerçekleştirilen genlerin;

- A549 hücre hattında 1E maddesinin 50 µg/ml konsantrasyonda VEGF, HIF1- α MMP2 ve MMP9 gen bölgesinin migrasyon mekanizması gereği baskılanması beklenmektedir. VEGF, HIF-1 α , MMP2 ve MMP9 gen bölgelerinin sırasıyla, 19 kat, 2 kat, 16 kat ve 16 kat ekspresyonlarında artış olduğu gözlemlenmiştir.

- A549 hücre hattında 1G maddesinin 100 µg/ml konsantrasyonda VEGF, HIF-1α, MMP2 ve MMP9 genini sırasıyla 28 kat, 2 kat, 9 katve 9 kat ekspresyonlarında artış olduğu gözlemlenmiştir.
- HT29 hücre hattında 1E maddesi 100 µg/ml konsantrasyonlarda VEGF, HIF-1α, MMP2 ve MMP9 gen bölgelerinde yalnızca HIF-1α 1 kat baskılanırken, diğer genlerin hepsi negatif kontrolle aynı olduğu görülmektedir.
- HT29 hücre hattında 1G maddesi 100 µg/ml konsantrasyonda VEGF, HIF-1α, MMP2 ve MMP9 gen bölgelerinde sırasıyla 2 kat, 1 kat, 1 kat ve 3 kat arttırdığı görülmektedir.
- HUVEC hücresinde VEGF, HIF-1α, MMP2 ve MMP9 gen bölgelerinde artış olması beklenmektedir. 1E maddesi 50 µg/ml konsantrasyonda VEGF ve HIF-1α, genlerini sırasıyla 5 ila 4 kat artış gösterirken, MMP2 ve MMP9 1 kat artış göstermektedir.
- HUVEC hücresinde 1G maddesi için bu durum, VEGF, HIF-1α ve MMP9 genleri sırasıyla 4 kat, 15 kat ve 3 kat artış göstermiştir. MMP2 genin ise negatif kontrole yakın olduğu görülmektedir.

Bu tez kapsamında biyolojik aktiviteleri gerçekleştirilen bazı İS'lerin anti-proliferatif ve anti-migratif etkilerinin olduğu görülmüştür. Fakat elde edilen sonuçlar, çalışılan İS'lerin kemoterapötik ilaç etken maddesi olabilme potansiyelinin düşük olduğunu işaret etmektedir. İlgili bileşikler yara iyileşme açısından değerlendirildiğinde, maddelerin birkaçının etkili olabileceği görülmüştür. Özellikle 1E maddesinin damarlanma (anjiogenez) üzerindeki etkilerinin tüp oluşum analizi ile daha ayrıntılı sorgulanmasının faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır.

7.KAYNAKLAR

- Ağaoğlu Korkmaz, Özgecan, ve Özge Sidekli. 2020."Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Çalışmalarında Uygun Housekeeping Genlerin (HKGs) Seçimi ve Validasyonu." Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 17.1: 76-83.
- Aslaner, H.,2015. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Hastalarında Serum Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Ve Hipoksi İle İndüklenen Faktör 1 α Düzeylerinin Prognostik Ve Prediktif Önemi (Tıpta Uzmanlık Tezi), Erciyes Üniversitesi , İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri
- Anonim,2021, Mustafa Özdoğan, Kanser nedir? Neden ve nasıl oluşur? [https://www.drozdogan.com/kanser-nedir-neden-ve-nasil-olusur-ozetle-tum-surec\(08.01.2022\)](https://www.drozdogan.com/kanser-nedir-neden-ve-nasil-olusur-ozetle-tum-surec(08.01.2022))
- Balk, Anja, Ulrike Holzgrabe, and Lorenz Meinel. "'Pro et contra' ionic liquid drugs—Challenges and opportunities for pharmaceutical translation." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 94 (2015): 291-304.
- Baykara, Onur. "Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar." *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* 5.3 (2016): 154-165.).
- Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS*. 1997;79:233-69.
- Bülbül, Muhammet Volkan. Bazı endemik onobrychis türlerinin kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi. MS thesis. İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2017.
- Cai, Anna Q., Kerry A. Landman, and Barry D. Hughes. "Multi-scale modeling of a wound-healing cell migration assay." *Journal of Theoretical Biology* 245.3 (2007): 576-594.
- Carmeliet, Peter, and Rakesh K. Jain. "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis." *Nature* 473.7347 (2011): 298-307.
- Carmeliet, Peter. "Angiogenesis in life, disease and medicine." *Nature* 438.7070 (2005): 932-936.
- Clauss, Matthias. "Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family." *Seminars in thrombosis and hemostasis*. Vol. 26. No. 05. Copyright© 2000 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662, 2000.
- Coultas, Leigh, Kallayanee Chawengsaksophak, and Janet Rossant. "Endothelial cells and VEGF in vascular development." *Nature* 438.7070 (2005): 937-945.
- Decio A, Taraboletti G, Patton V, Alzani R, Perego P, Fruscio R, Jurgensmeier JM, Giavazzi R, Belotti D: Vascular endothelial growth factor c promotes ovarian carcinoma progression through paracrine and autocrine mechanisms. *Am J Pathol* 2014;184:1050-1061.
- Deryugina EI, Quigley JP: Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:9-34
- Dias, Ana Rita, et al. "The anticancer potential of ionic liquids." *ChemMedChem* 12.1 (2017): 11-18.)
- Dobler, Dorota, et al. "Ionic liquids as ingredients in topical drug delivery systems." *International journal of pharmaceutics* 441.1-2 (2013): 620-627.

- Doğan, A. Lale, and Dicle Güç. "Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser." *Acta Medica* 35.1 (2004): 34-42.
- Egeblad M, Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161-174.
- Egorova, Ksenia S., Evgeniy G. Gordeev, and Valentine P. Ananikov. "Biological activity of ionic liquids and their application in pharmaceuticals and medicine." *Chemical Reviews* 117.10 (2017): 7132-7189.
- Eischeid, Anne C. "SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR." *BMC research notes* 4.1 (2011): 1-5.
- Ferrara, Napoleone, and Terri Davis-Smyth. "The biology of vascular endothelial growth factor." *Endocrine reviews* 18.1 (1997): 4-25.
- Ferraz, L. C. Branco, C. Prudêncio, J. P. Noronha, Z. Petrovski, *Chem- MedChem* 2011, 6,975–985.
- Futreal PA, Kasperzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton M. (2001). Cancer and genomics. *Nature* 6822: 850-2)
- Gandalovičová, Aneta, et al. "Migrastatics—anti-metastatic and anti-invasion drugs: promises and challenges." *Trends in cancer* 3.6 (2017): 391-406.
- Goetsch, K. P., and C. U. Niesler. "Optimization of the scratch assay for in vitro skeletal muscle wound healing analysis." *Analytical biochemistry* 411.1 (2011): 158-160.
- Güllü, İbrahim H., and İbrahim Akalın. "Metastaz biyolojisi." *Üroonkoloji Dergisi* 4 (2005): 16-19.
- Gür, Cihan. *Akciğer Kanseri Hücre Hattında Cetuximab, Cisplatin Ve Melatonin Uygulamalarının P53 Geni Ve Apoptoz Aktivasyonu Üzerine Etkilerinin Araştırılması*. Diss. 2014.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70)
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. "Characteristics of cancer." *cell* 100.1 (2000): 57-70.
- Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M: MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002;2:289-300.
- Hoffer, Max. U.S. Patent 2,541,651, 1951; *Chem. Abstr.* 1951, 45, 25275.; (b) Bestian, A. H. W. U.S. Patent 2,924,598, 1960; *Chem. Abstr.* 1960, 54, 80682.; (c) G.B. 1,136,667, 1968; *Chem. Abstr.* 1968, 70, 71063.; (d) E.S. 392,203, 1971; *Chem. Abstr.* 1971, 83, 552338.
- Hough, W. L., Smiglak, M., Rodríguez, H., Swatloski, R. P., Spear, S. K., Daly, D. T., ... & Davis Jr, J. H. (2007). The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients. *New Journal of Chemistry*, 31(8), 1429-1436.
- Isner JM, Asahara T: Angiogenesis and vasculogenesis as the therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999; 103:1231- 6.
- Kang KL, Chung JH, Herr Y, Bae WJ, Kim EC: Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the production of MMPs and prostaglandin E2 by hypoxia-inducible
- Kaur, Navjeet. "Ionic Liquids: Promising but Challenging Solvents for the Synthesis of NHeterocycles." *Mini-Reviews in Organic Chemistry* 14.1 (2017): 3-23.
- Kerbel, Robert S. "Tumor angiogenesis: past, present and the near future." *Carcinogenesis* 21.3 (2000): 505-515.
- Kolanyacılar, Hakan. "Klasik Çözücülere Bir Alternatif; İyonik Sıvılar." *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 11.2 (2010): 90-100.

- Korkut, Elif. A549 insan akciğer kanseri hücre hattında trastuzumab ve 5-Fluorourasil kombine ilaç tedavisinin etkisinin incelenmesi. MS thesis. Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2018.
- Kumar, Priti, Arvindhan Nagarajan, and Pradeep D. Uchil. "Analysis of cell viability by the MTT assay." *Cold spring harbor protocols* 2018.6 (2018): pdb-prot095505.
- Kumar, SP Jeevan, et al. "Technologies for oil extraction from oilseeds and oleaginous microbes." *Three Phase Partitioning*. Elsevier, 2021. 243-266.
- Kumar, Vineet, and Sanjay V. Malhotra. "Study on the potential anti-cancer activity of phosphonium and ammonium-based ionic liquids." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19.16 (2009): 4643-4646
- Kumer, Ajoy, and Md Wahab Khan. "The effect of alkyl chain and electronegative atoms in anion on biological activity of anilinium carboxylate bioactive ionic liquids and computational approaches by DFT functional and molecular docking." *Heliyon* 7.7 (2021): e07509..
- Liang CC, Park AY, Guan YL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007; 2: 329– 333
- Liang, Chun-Chi, Ann Y. Park, and Jun-Lin Guan. "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro." *Nature protocols* 2.2 (2007): 329-333.
- Liang, Chun-Chi, Ann Y. Park, and Jun-Lin Guan. "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro." *Nature protocols* 2.2 (2007): 329-333.
- Lipp, H.-P., Ed., 1st ed. *Anticancer Drug Toxicity: Prevention, Management, and Clinical Pharmacokinetics*; Informa HealthCare, 2009;
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta CT$ method." *methods* 25.4 (2001): 402-408.
- Malhotra, Sanjay V., and Vineet Kumar. "A profile of the in vitro anti-tumor activity of imidazolium-based ionic liquids." *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20.2 (2010): 581-585.
- McCormick, Frank. "Signalling networks that cause cancer." *Trends in Genetics* 15.12 (1999): M53-M56.
- Meyer, T., and I. R. Hart. "Mechanisms of tumour metastasis." *European journal of cancer* 34.2 (1998): 214-221.
- Miyake K, Yoshizumi T, Imura S, Sugimoto K, Batmunkh E, Kanemura H, Morine Y, Shimada M: Expression of hypoxia-inducible factor-1 α , histone deacetylase 1, and metastasis-associated protein 1 in pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation. *Pancreas* 2008;36:e1-9
- Muh-Hwa Yang & Kou-Juey Wu TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): Implications in metastasis and development, *Cell Cycle*, (2008) 7:14, 2090-2096,
- Nicholls, Craig, He Li, and Jun-Ping Liu. "GAPDH: a common enzyme with uncommon functions." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 39.8 (2012): 674-679.
- Pfannkuch, F.; Rettig, H.; Stahl, P. H.. In Wermuth, C. G., Stahl, P. H., Eds.; *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2002; p 130.

- Poste ve ark., George, and Isaiah J. Fidler. "The pathogenesis of cancer metastasis." *Nature* 283.5743 (1980): 139-146.
- Potente, Michael, Holger Gerhardt, and Peter Carmeliet. "Basic and therapeutic aspects of angiogenesis." *Cell* 146.6 (2011): 873-887.
- Ranke J, Mölter K, Stock F, Bottin-Weber U, Poczubutt J, Hoffmann J, Ondruschka B, Filser J, Jastorff B. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004;58:396-404. doi: 10.1016/S0147-6513(03)00105-2
- Rodriguez, Luis G., Xiaoyang Wu, and Jun-Lin Guan. "Wound-healing assay." *Cell migration*. Humana Press, 2005. 23-29
- Scolaro, Claudine, et al. "Influence of hydrogen-bonding substituents on the cytotoxicity of RAPTA compounds." *Organometallics* 25.3 (2006): 756-765.
- Sekhon, Bhupinder Singh. "Ionic liquids: Pharmaceutical and biotechnological applications." *Asian J Pharm Biol Res Jul-Sep* 1.3 (2011).
- Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer treatment reviews* 2003;29:297-307.
- Shukla, Shashi Kant, and Jyri-Pekka Mikkola. "Use of ionic liquids in protein and DNA chemistry." *Frontiers in Chemistry* 8 (2020): 1219.
- Smiglak, M., Metlen, A., & Rogers, R. D. (2007). The Second Evolution of Ionic Liquids: From Solvents and Separations to Advanced Materials □ Energetic Examples from the Ionic Liquid Cookbook. *Accounts of Chemical Research*, 40(11), 1182-1192.
- Suarez-Arnedo, Alejandra, et al. "An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays." *PloS one* 15.7 (2020): e0232565.
- Taşçı, M., 2012. Anjiojenesis ve Anti-Anjiojenesis Bileşikler (Bitirme ödevi), Erciyes Üniversitesi. Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Tokat
- Tayhan, Seçil Erden, Sema Bilgin, and Mahfuz Elmastaş. "Evaluation of the wound healing potential of Teucroside." *International Journal of Chemistry and Technology* 2.1 (2018): 16-19.
- Thurston, David E., and Ilona Pysz. *Chemistry and pharmacology of anticancer drugs*. CRC press, 2021.
- Tokur, Orhan, and Abdurrahman Aksoy. "In vitro sitotoksikite testleri." *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 6.1 (2017): 112-118.
- Torimoto, T., Tsuda, T., Okazaki, K. I., & Kuwabata, S. (2010). New frontiers in materials science opened by ionic liquids. *Advanced Materials*, 22(11), 1196-1221.
- Uslu, Mustafa ve Şeydanur Dengizek Eltas. "Periodontal Hastalıklarda MMP-8'in Rolü." *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 25: 80-85.
- Wermuth, C. G.; Stahl, P. H. In *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*; Wermuth, C. G., Stahl, P. H., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2002; p 1.
- Yang, M.-H.; Wu, K.-J. TWIST Activation by Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1): Implications in Metastasis and Development. *Cell Cycle* 2008, 7 (14), 2090–2096.
- Yıldırım, A., 2020. Kiral Polifenolik Bileşiklerin Kansere Oluşumu Ve Progresyonunda Görev Alan Bazı Genlerin Ekspresyon Düzeylerine Etkilerinin

- Araştırılması.(Yüksek lisans Tezi), Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Biyomühendislik Bölümü, Tokat.
- Yusof, Enis Nadia Md, et al. "Tin (IV) compounds of tridentate thiosemicarbazone Schiff bases: Synthesis, characterization, in-silico analysis and in vitro cytotoxicity." *Polyhedron* 189 (2020): 114729.
- Zeng R, Huang JP, Li XF, Xiong WB, Wu G, Jiang ZJ, Song SJ, Li JQ, Zheng YF, Zhang JR: Epb4113 suppresses esophageal squamous cell carcinoma invasion and inhibits MMP2 and MMP9 expression. *Cell Biochem Funct* 2016;34:133-141.
- Zeynalov, A.,2018 Sıçan Kasık Flep Modelinde Magnezyum Sülfat Uygulamasının Flep Fizyolojisi Ve Sağkalımına Etkisi. (doktora tezi), Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Plastik, Rekonstrüktif ve estetik cerrahi Anabilim dalı, İstanbul
- Zhao D, Liao Y, Zhang Z. Toxicity of Ionic Liquids. *Clean*. 35(1): 42–48, 2007.

