



**BAZI 2-HİDRAZİNOTİYAZOL TÜREVLERİNİN BİYOKİMYASAL
ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Zennure Şevval ÇİYANCI

Eskişehir 2021

**BAZI 2-HİDRAZİNOTİYAZOL TÜREVLERİNİN BİYOKİMYASAL ETKİ
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Zennure Şevval ÇİYANCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2021

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Zennure Şevval ÇİYANCI'nın “Bazı 2-Hidrazinotiyazol Türevlerinin Biyokimyasal Etki Mekanizmalarının Araştırılması” başlıklı tezi 17.06.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



ÖZET

BAZI 2-HİDRAZİNOTİYAZOL TÜREVLERİNİN BİYOKİMYASAL ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Zennure Şevval ÇİYANCI

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2021

Danışman: Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Kanser, dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden birisidir. 2018 yılında dünyada 18,1 milyon vaka teşhis edilmiş ve 9,5 milyon kanser nedenli ölümler gözlenmiştir. Bu sayıların 2040 yılında 29,5 milyon yeni teşhis ve 16,4 milyon kansere bağlı ölüm olmak üzere artması bekleniyor. Değişen metabolizma, kanserin ayırt edici bir özelliğidir. Günümüzde kullanılan kemoterapi ilaçlarının şiddetli böbrek sorunları, alerjik reaksiyonlar, enfeksiyonlara karşı bağışıklığın azalması, gastrointestinal bozukluklar ve kanama gibi çok sayıda istenmeyen yan etkileri nedeniyle sağlıklı hücrelere toksik olmayan ve çok hafif yan etkiye sahip alternatif ilaç arayışları devam etmektedir.

Heterosiklik bileşik olan tiyazoller ilaç tasarımı en çok kullanılan bileşiklerdendir. Tiyazol halkasında birkaç reaksiyon bölgesinin varlığı, uygulama alanlarını genişletir ve sentetik ve tıbbi kimyadaki zorluklar için yeni çözümlere yol açar. 1,3-tiyazollerin moleküler mimarisi, onları ilaç geliştirme için uygun parçalar haline getirmektedir. Antibakteriyel, antifungal, anti-inflamatuar, antitümör, antidiyabetik, antiviral ve antioksidan gibi birçok farklı biyolojik aktivite gösterdiği bildirilmektedir.

Bu tez çalışmamızda, kanser tedavisinde, sağlıklı hücrelere zarar vermeden veya en az zararlar tedavinin mümkün olabilmesi için, ilk defa sentezlenen 2-hidrazinotiyazol türevi bileşenlerin A549 insan akciğer adenokarsinomu hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin, gen ekspresyonlarının in vitro olarak araştırılması hedeflendi.

Anahtar Sözcükler: Tiyazoller, Apoptoz, Akciğer kanseri.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BIOCHEMICAL ACTION MECHANISMS OF SOME 2-HYDRAZINOTHIAZOLE DERIVATIVES

Zennure Şevval ÇİYANCI

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2021

Supervisor: Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Cancer is among the leading causes of death worldwide. In 2018, 18,1 million cases were diagnosed and 9,5 million cancer-related deaths were observed in the world. The numbers are expected to increase to 29,5 million new diagnoses and 16,4 million cancer-related deaths by 2040. Altered metabolism is the hallmark of cancer. Due to the many undesirable side effects of chemotherapy drugs used today such as severe kidney problems, allergic reactions, decreased immunity against infections, gastrointestinal disorders and bleeding, the search continues for alternative drugs that are non-toxic to healthy cells and have very mild side effects.

Thiazole is the most common heterocyclic compound in heterocyclic chemistry and drug design. The presence of several reaction zones in the thiazole ring expands the fields of application and leads to new solutions for the challenges in synthetic and medicinal chemistry. The molecular architecture of 1,3-thiazoles makes them suitable components for drug development. It has been reported to exhibit many different biological activities such as antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, antitumor, anti-diabetic, antiviral and antioxidant.

In this thesis study, we aimed to investigate the cytotoxic and apoptotic effects and gene expressions of 2-hydrazinothiazole derivative compounds synthesized for the first time on A549 human lung adenocarcinoma cells in vitro, so that treatment can be possible without damaging healthy cells or with minimal damage.

Keywords: Thiazoles, Apoptosis, Lung cancer.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım boyunca güler yüzü ve sabrı ile karşılaştığım sorunlarda bana yol gösteren, değerli tecrübelerinden yararlandığım iyi ki bu yolda danışmanım olan Sayın Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ'ye

Çalışmamızda kullandığımız bileşiklerimizin sentezi ve moleküler doking çalışması için Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Sayın Prof. Dr. Leyla YURTTAŞ'a ve Sayın Öğr. Gör. Asaf Evrim EVREN'e

Laboratuvar çalışmalarında bana akademik ve bilimsel tecrübeleriyle yol gösteren, desteğini esirgemeyen sevgili Dr. Bio. Şennur GÖRGÜLÜ'ye

Laboratuvara uyum sağlamamda bana yardımcı olan, deneylerdeki bilgi ve tecrübelerini aktaran ve bu süreçte beni destekleyen değerli arkadaşım Uzm. Ecz. Hüda ÇAY'a

Yıllardır süregelen dostluğumuzda ne zaman ihtiyacım olsa desteğini yanı başımda hissettiğim ve tez dönemimde en zor zamanımda desteğiyle beni rahatlatan sevgili dostum Ecz. Perihan Dilekçi'ye

Hayatımın her alanında sonsuz destekleriyle her zaman yanımda olan, beni cesaretlendiren sevgili babam Mehmet ÇİYANCI, sevgili annem Ümmü Gülsüm ÇİYANCI ve sevgili kardeşim Süleyman Faruk ÇİYANCI'ya

Bana benden daha çok inanan, çıktığım bu yolda her zaman desteğini hissettiğim sevgili kuzenim ve ablam Medine DÜDÜKÇÜ YÜCEL'e

Bu süreçte zorlandığım noktalarda manevi destekleriyle her zaman yanımda olan arkadaşlarım Büşra Nur CESUR, Aslı Nur TOSUN ve Neslihan SAYAN'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Zennure Şevval ÇİYANCI

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAZI 2-HİDRAZİNOTİYAZOL TÜREVLERİNİN BİYOKİMYASAL ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	4
2.1. Kanser ve Biyolojisi	4
2.2. Akciğer Kanseri	5
2.2.1. Erken başlangıç gösteren akciğer kanseri.....	5
2.2.2. Akciğer kanseri risk faktörleri.....	6
2.2.3. Akciğer kanserinde gözlenen klinik bulgular	6
2.2.4. Akciğer kanserinin tanısal olarak değerlendirilmesi	7
2.2.5. Akciğer kanseri tedavi yöntemleri	7
2.3. Genetik ve Kanser	7
2.3.1. Akciğer kanserinde genetik yatkınlık.....	8
2.3.2. Kanserde Genler	8
2.3.2.1. Proto-onkogenler	9
2.3.2.2. Onkogenler.....	9

2.3.3. Tümör baskılayıcı genler	10
2.3.3.1. <i>p53 fonksiyonu</i>	11
2.3.4. Genomik ve akciğer kanseri	11
2.3.4.1. <i>Büyüme faktörleri</i>	12
2.3.4.2. <i>Büyüme faktörü reseptörleri</i>	12
2.3.4.2.1. <i>Epidermal büyüme faktörü reseptörü</i>	13
2.3.4.3. <i>Sinyal dönüştürücüler</i>	13
2.3.4.4. <i>Transkripsiyon faktörleri</i>	14
2.3.4.5. <i>Akciğer kanserinde siklin-bağımlı kinazlar ve siklinler</i>	14
2.4. Kanserde Hücre Ölüm Yolaklarının İncelenmesi	15
2.4.1. Otojani	15
2.4.2. Nekroz	15
2.4.3. Apoptoz	16
2.4.3.1. <i>Kaspaz ailesi</i>	16
2.4.3.2. <i>İntrinsik (içsel) yolak</i>	17
2.4.3.2.1. <i>BCL-2 ailesi</i>	18
2.4.3.3. <i>Ekstrinsik yolak (Dışsal yolak)</i>	18
2.4.3.3.1. <i>TNF (tümör nekroz faktörü) ailesi</i>	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM	21
3.1. Materyaller	21
3.1.2. Kullanılan Bilgisayar Programları	21
3.1.3. Ekipmanlar	21
3.1.4. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri	22
3.1.5. Kullanılan ticari kitler	22
3.2. Metodlar	23
3.2.1. 2-Hidrazinotiyazol türevlerinin genel sentez yöntemi	23

3.2.1.1. 2-Hidrazinotiyazol bileşiklerine ait spektroskopik verilerin değerlendirilmesi	24
3.3. Kullanılan Maddelerin Hazırlanması	30
3.3.1. Sentez bileşiklerinin hazırlanması	30
3.3.2. Sisplatin Hazırlanması	30
3.3.3. Çalışmalarda kullanılan hücreler	30
3.4. Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Deneylere Hazırlık ...	30
3.4.1. Kullanılan materyallerin sterilizasyonu	30
3.4.2. Hücrelerin stoklanması ve pasajlanması	31
3.4.3. Hücre Sayımı	31
3.5. Sitotoksosite Belirleme Testi	32
3.5.1. Mtt metodu ile hücrelerin sitotoksitelerinin analizin yapılması	32
3.5.1.1. Yöntemin uygulanması	32
3.6. Akış Sitometri Cihazı ile Yapılan Deneyler	33
3.6.1. JC-1 boyama ile hücrelerin mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi	33
3.6.1.1. Yöntemin uygulanması	33
3.6.2. Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi	34
3.6.2.1. Yöntemin uygulanması	34
3.6.3. Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkilerin belirlenmesi	35
3.6.3.1. Yöntemin uygulanması	35
3.6.4. Hücre Döngüsü Analizi	35
3.6.4.1. Yöntemin uygulanması	36
3.7. RT- PCR (Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi ile VEGF, AKT, Bcl-2, Bax, CYD1, cMYC, ERK, pERK ve Housekeeping gen ifadelerinin (ekspresyon) belirlenmesi	37

3.7.1. PCR'nin temel bileşenleri	38
3.7.2. RNA izolasyonu	39
3.7.3. Komplementer DNA (c-DNA) sentezi.....	39
3.7.4. Supermix, Taqman prob ve primerlerin hazırlanması.....	40
3.7.5. Real-time kantitatif PCR analizi	40
4. SONUÇLAR VE BULGULAR	42
4.1. MTT Analizi Sonuçları	42
4.1.1. Sisplatin ve sentezlenmiş 2-hidrazinotiyazol türevli bileşiklerin A549 akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri	42
4.1.2. Sentezlenmiş 2-hidrazinotiyazol türevli bileşiklerin L-929 sağlıklı hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri.....	45
4.1.3. A549 hücre hattının L929 hücre hattına göre selektivite indeksi	47
4.2. Sisplatin ve Sentez Bileşiklerin, Akım Sitometrisi Yöntemleri ile A549 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkilerin Belirlenmesi.....	49
4.2.1. Akım sitometrisinde Annexin-V FITC-PI analizi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi	49
4.2.1.1. A549 hücre hattı üzerinde sisplatin ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 24. saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi.....	49
4.2.1.2. A549 hücre hattı üzerinde sisplatin ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 48. saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi.....	53
4.2.2. Akım sitometrisinde JC-1 analizi ile mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi	57

4.2.2.1. A549 hücre hattı üzerinde sisplatin ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 24. saatte oluşan mitokondriyal aktivitelerinin belirlenmesi	57
4.2.3. Akım sitometrisinde kaspaz-3 analizi ile kaspaz aktivitesinin belirlenmesi.....	60
4.2.3.1. A549 hücre hatları üzerinde 24. saatte kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi.....	60
4.2.4. Akım sitometrisinde Cycle test Plus DNA analizi ile hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonu analizi	63
4.2.2.1. A549 hücre hattı üzerinde sisplatin ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 24. saatteki hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonun belirlenmesi	63
4.3. RT-PCR (Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi Sonuçları.....	69
4.4. Bileşik 4 ve 5'in AKT Geni Üzerindeki Moleküler Doking Pozisyonları	71
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	82
KAYNAKÇA	83
EK-1.....	

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. İnsan ölüm reseptörleri ve bunlara karşılık gelen ligandlar	20
Tablo 3.1. Kullanılan bilgisayar programları	21
Tablo 3.2 Kullanılan ekipmanlar	21
Tablo 3.3. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri.....	22
Tablo 3.4. Kullanılan ticari kitler.....	22
Tablo 3.5. Kullanılan bileşiklerin kodu	29
Tablo 3.6. RT-PCR bileşenleri.....	40
Tablo 4.1. Sisplatin ve sentez bileşiklerinin A549 hücre hattındaki 24. ve 48. saatlerdeki IC ₅₀ konsantrasyon değerleri.....	42
Tablo 4.2. Sentez bileşiklerinin L-929 hücre hattındaki 24. ve 48. saatlerdeki IC ₅₀ konsantrasyon değerleri.....	45
Tablo 4.3. 24. saat IC ₅₀ değerlerine göre A549 hücre hattının L-929 hücrelerine göre selektivite indeksi. (Selektivite indeksi (S.I) = Sağlıklı hücre IC ₅₀ değeri / Kanserli hücre IC ₅₀ değeri)	47
Tablo 4.4. A549 hücre hatlarının 24. saatteki % canlılık oranları Annexin-V FITC	52
Tablo 4.5. Sisplatinin A549 hücre hatlarının üzerindeki 24. saatteki % canlılık oranları Annexin-V FITC	52
Tablo 4.6. Sentez bileşiklerin A549 hücre hatları üzerindeki 24. Saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC	52
Tablo 4.7. A549 hücre hatlarının 48. saatteki % canlılık oranları Annexin-V FITC	56

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.8. Sisplatinin A549 hücre hatlarının üzerindeki 48. saatteki % canlılık oranları Annexin-V FITC	56
Tablo 4.9. Sentez bileşiklerin A549 hücre hatları üzerindeki 48. saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	56
Tablo 4.10. Sisplatin ve sentez bileşiklerin A549 hücre hatları üzerindeki 24. Saat analizi sonrası % mitokondriyal membran potansiyeli.....	60
Tablo 4.11. Sisplatin ve sentez bileşiklerin A549 hücre hatları üzerindeki kaspaz-3 24. saatteki % aktivasyonları.....	63
Tablo 4.12. A549 hücre hattı üzerindeki hücre döngüsü faz dağılımlarının 24. saatteki % değerleri.....	69
Tablo 4.13. Sisplatin ve sentez bileşiklerin A549 hücre hatları üzerindeki hücre döngüsü faz dağılımlarının 24. saatteki % değerleri.....	69
Tablo 4.14. A549 hücre hatlarındaki VEGF, Bcl-2, Bax, CYD1 c-MYC, ERK, pERK ve AKT genlerindeki kat değişimleri.....	70
Tablo 4.15. AKT reseptörünün bileşik 4 ve 5 ile etkileşim bölgeleri.....	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	1,3 Tiyazol Halkası..... 2
Şekil 1.2.	1,3 Tiyazol Biyolojik Profilleri 3
Şekil 3.1.	2-Hidrazinotiyazol türevi bileşiklerin genel sentez yöntemi. Reaksiyon koşulları: a. DMF, K ₂ CO ₃ , 300 °C, 3 saat. b. Tiyosemikarbazit, EtOH, 200 °C, 2 saat. c. α-haloketon türevleri, EtOH, oda sıcaklığı, 5 saat 24
Şekil 3.2.	Sonuç bileşiklerinin sentez şeması..... 24
Şekil 4.1.	A) Bileşik 1 B) Bileşik 2 C) Bileşik 4'ün MTT testi kullanılarak 24 saat ve 48 saat sonra A549 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri. Canlılık verileri ortalama ±SD'dir (her zaman noktasında ve konsantrasyonda n=3). Tek yönlü ANOVA ile P<0.0001..... 43
Şekil 4.2.	A) Bileşik 1 B) Bileşik 2 C) Bileşik 4'ün MTT testi kullanılarak 24 saat ve 48 saat sonra L929 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri. Canlılık verileri ortalama ±SD'dir (her zaman noktasında ve konsantrasyonda n=3). Tek yönlü ANOVA ile P<0.0001..... 46
Şekil 4.3.	Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı ve kontrol B) Bileşik 1'in A549 hücre hattı üzerinde 24. saatteki IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri..... 49
Şekil 4.4.	C) Bileşik 2 A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri. D) Bileşik 4 A549 hücre hattı üzerinde 24. saatteki, IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri..... 50

Şekil 4.5.	E) Bileşik 5 A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri. F) Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 24. saatteki, IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.....	51
Şekil 4.6.	A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı ve kontrol B) Bileşik 1'in A549 hücre hattı üzerinde 48. saatteki, IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri	53
Şekil 4.7.	C) Bileşik 2 A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri. D) Bileşik 4 A549 hücre hattı üzerinde 48. saatteki, IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.....	54
Şekil 4.8.	E) Bileşik 5'in A549 hücre hattı üzerinde 48. saatteki, IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri F) Sisplatin'in A549 hücre hattı üzerinde 48. saatteki, IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.....	55
Şekil 4.9.	Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol	57
Şekil 4.10.	A) Bileşik 1'in A549 hücre hattı üzerinde 24. saatteki IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri....	57
Şekil 4.11.	B) Bileşik 2'in A549 hücre hattı üzerinde 24. saatteki IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri.....	58
Şekil 4.12.	C) Bileşik 4'ün A549 hücre hattı üzerinde 24. saatteki IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri...	58
Şekil 4.13.	Bileşik 5'in A549 hücre hattı üzerinde 24. saatteki IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri	59
Şekil 4.14.	Sisplatinin'in A549 hücre hattı üzerinde 24. saatteki IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri...	59
Şekil 4.15.	Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol.....	60
Şekil 4.16.	A) Bileşik 1'in IC ₅₀ ve IC _{50/2} analizleri B) Bileşik 2'nin IC ₅₀ ve IC _{50/2} analizleri C) Bileşik 4'ün IC ₅₀ ve IC _{50/2} analizleri.....	61
Şekil 4.17.	A) Bileşik 1'in IC ₅₀ ve IC _{50/2} analizleri B) Bileşik 2'nin IC ₅₀ ve IC _{50/2} analizleri C) Bileşik 4'ün IC ₅₀ ve IC _{50/2} analizleri.....	62

Şekil 4.18.	Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol.....	63
Şekil 4.19.	A) Bileşik 1'in IC_{50} dozunda B) Bileşik 1'in $IC_{50/2}$ dozunda 24. saatteki hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonu.....	64
Şekil 4.20.	C) Bileşik 2'nin IC_{50} dozunda D) Bileşik 2'nin $IC_{50/2}$ dozunda 24. saatteki hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonu.....	65
Şekil 4.21.	E) Bileşik 4'ün IC_{50} dozunda F) Bileşik 4'ün $IC_{50/2}$ dozunda 24. Saatteki hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonu.....	66
Şekil 4.22.	G) Bileşik 5'in IC_{50} dozunda H) Bileşik 5'in $IC_{50/2}$ dozunda 24. saatteki hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonu.....	67
Şekil 4.23.	I) Sisplatinin IC_{50} dozunda İ) Sisplatinin'in $IC_{50/2}$ dozunda 24. saatteki hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonu.....	68
Şekil 4.24.	A) Bileşik 4' ün AKT reseptörünün aktif bölgesindeki iki boyutlu ve üç boyutlu etkileşim modeli. B) Bileşik 5'in AKT reseptörünün aktif bölgesindeki iki bayotulu ve üç boyutlu etkileşim modeli. C) Bileşik 4 ve 5'in AKT reseptörünün aktif bölgesindeki etkileşiminin 3 boyutlu gösterimi.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A549	: İnsan akciğer kanseri hücre hattı
AdC	: Adeno karsinoma
AKT	: Serin-treonin protein kinaz
ALK	: Anaplastik lenfoma
ANOVA	: Varyans analizi
Apo2L/TRAIL	: TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
ATCC	: Amerikan tip kültür koleksiyonu
ATM	: Mutant ataksi telajiektazi geni
ATP	: Adenozin tirifosfat
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
BAX	: Bcl-2 bağlı protein
BID	: BH3 ile etkileşen ölüm alanı agonisti
BRAF	: Murin sarkom viral onkogen homologu B1
CT	: Bilgisayarlı tomografi taraması
CTNNB1	: Kaderin ile ilişkili protein beta 1
CYD-1	: Siklin D1
DDR2	: Diskoidin alanı içeren reseptör 2
DMEM	: Dubelcco's modified eagle's medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ECM	: Hücre dışı matrisi
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü
EML-4	: Ekinoderm mikrotübül ile ilişkili protein benzeri-4
ERRB2	: Östrojenle ilişkili reseptör beta tip 2
ERK	: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar

FADD	: Ölüm alanı ile FAS ilişkili protein
FBS	: Fötal sığır serumu
FGFR-1	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1
FT-NMR	: Dörtlü Dönüşümü Nükleer Manyetik Rezonans
GIS	: Gasrik inhibitör polipeptit
GSTM1	: Glutasyon S transferaz mu1
GSP	: Glikozile serum proteini
GTP	: Guanozin trifosfat
HRAS	: Harvey sıçan sarkom viral onkogen homoloğu
HRMS	: Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi
IC ₅₀	: Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan doz
IC _{50/2}	: Maksimum inhibisyonun %25'ini oluşturan doz
ICE	: İnterlökin-1-beta dönüştürücü enzim
IUPAC	: Uluslararası temel ve uygulamalı kimya birliği
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
JAK	: Janus kinaz
JC-1	: 5,5,6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'tetraetilbenzimi-dazoilkarbosiyanin iyodür
KRAS	: Kirsten sıçan sarkomu viral onkogen homoloğu
LC-MS-IT-TOF	: Yüksek hızlı sıvı kromatografi iyon trap / uçuş zamanlı kütle spektrometre
LDCT	: Düşük doz bilgisayarlı tomografi
L-929	: Normal fare fibroblastik hücre hattı
MAP	: Mitojenle aktifleşen kinazlar
MAPK	: Mitojenle aktifleşen protein kinaz
MMP1	: Matriks metalloproteinaz 1
MMOP	: Mitokondriyal dış zar geçirgenliği
MTT	: 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid

NSCLC	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
NTP	: Nükleotit trifosfat
OD	: Optik dansite
P53	: Protein 53
PBS	: Fosfat tuz tampon çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PI	: Propidyum iyodür
PI3KCA	: Fosfotidilinositol-4,5-bifosfat-3-kinaz katalitik alt birim
PS	: Fosfotidilserin
RAF-1	: Protoonkogen serin/treonin protein kinaz
RB-1	: Retinoblastoma 1
RET	: Transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenen gen
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RTK	: Reseptör protein kinaz
SCC	: Skuamöz hücreli karsinom
SCLC	: Küçük hücreli akciğer kanseri
SD	: Standart sapma
S.I.	: Selektivite indeksi
STAT	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon proteinin aktivatörü
TBG	: Tümör baskılayıcı gen
TK	: Tirozin kinaz
TME	: Tümör mikroçevresi
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNF-R	: Tümör nekroz faktörü reseptörü

TNF- α	: Tümör nekroz faktörü alfa
UV	: Ultraviole
VEGF	: Vasküler endotelyal faktör
$\Delta\Psi\text{M}$	: Mitokondriyal membran potansiyeli



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanserli hücreler kontrolsüz olarak büyür ve vücuda yayılabilir bu yayılma (metastaz) kontrol edilmediği takdirde ölümle sonuçlanabilir (Society, 2020).

Kanser vakalarının ve ölümlerinin sayısının, popülasyonlar büyüdükçe, yaşlılık ve kanser riskini artıran yaşam tarzı davranışlarını benimsedikçe hızla artması bekleniyor (Torre vd., 2016).

Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği'nin açıklamasına göre Avrupa'da her yıl kanser yaklaşık 2 milyon insanı öldürüyor ve 3 milyondan fazla yeni vaka ortaya çıkıyor. Şu anda yaklaşık 6 milyon insan kanserle yaşıyor. Kanser çoğunlukla erkeklerde prostat ve akciğerde, kadınlarda ise memede görülür. Dört kişide birden fazla ölümden kanser sorumludur. Tütün, diyet ve enfeksiyonlar Avrupa'daki kanser ölümlerinin %40'ından fazlasına neden oluyor (International Union Against Cancer, 2004).

Küresel kanser gözlemevinin istatistiklerine göre, 2018'de her yaş ve her iki cinsiyette teşhis edilen vaka sayısı toplamda 18.078.957, en çok görülen kanser tipleri olan akciğer, meme ve kolorektum kanserlerinde sırasıyla; 2.088.876 (%11,6), 2.088.849 (%11,6), 1.849.186 (%10,2), diğer kanserlerde ise 7.753.946 (%42,9) vaka gözlemlendiği ve yine 2018'de her yaş ve her iki cinsiyetteki ölüm sayısı toplamda 9.555.027, akciğer, meme ve kolorektum kanserlerinde sırasıyla; 1.761.007 (%18,4), 626.679 (%6,6), 880.792 (%9,2) ve diğer kanserlerde 3.422.417 (%35,8) ölüm gözlemlendiği bildirilmiştir (The Global Cancer Observatory, 2019).

Kanserin nedenleri tam olarak anlaşılmamış olsa da, değiştirilebilir olanların çoğu (örneğin, tütün kullanımı ve aşırı vücut ağırlığı) ve olmayanlar (örneğin, kalıtsal genetik mutasyonlar) dahil olmak üzere, hastalığın oluşumunu artıran çok sayıda faktör bilinmektedir. Tüm bu risk oluşturan faktörler kanserin büyümesini başlatabilir ve / veya oluşumuna katkı sağlayabilir. 2020'de 1,8 milyondan fazla yeni kanser vakasının teşhisi beklenmiştir (Society, 2020).

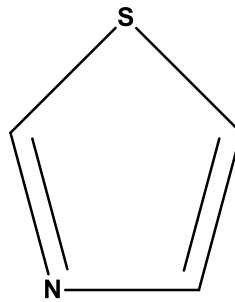
Avrupa, dünya nüfusunun sadece %9,0'una sahiptir buna rağmen, dünyadaki kanser vakalarının %23,4'ünü ve kanser ölümlerinin %20,3'ünü oluşturmaktadır. Amerika kıtası ise dünya nüfusunun %13,3'üne sahiptir ve dünya çapında %21,0 kanser vakası ve %14,4 ölüm oranını oluşturmaktadır. Bu oranlar bize enfeksiyona ve yoksulluğa bağlı kanserlerden, gelişmiş ve sanayileşmesi yüksek olan ülkelere has yaşam biçimleriyle bağlantılı kanserlere bir geçişin söz konusu olduğunu göstermiştir (Cancer, 2018).

Tümör Mikroçevresi (TME), tümörün insan vücudunda yerleşim gösterdiği hücresel ortamdır. TME, tümörü besleyen kan damarlarını, enflamatuar hücreleri bağışıklığa katkı sağlayan hücreleri, fibroblastları, sinyallemeyi, lenfositleri ve hücre dışı matrisi (ECM) içeren tümörün hayatta kalmasını sağlayan bir ortamdır (Joyce ve Fearon, 2015), (Spill vd., 2016).

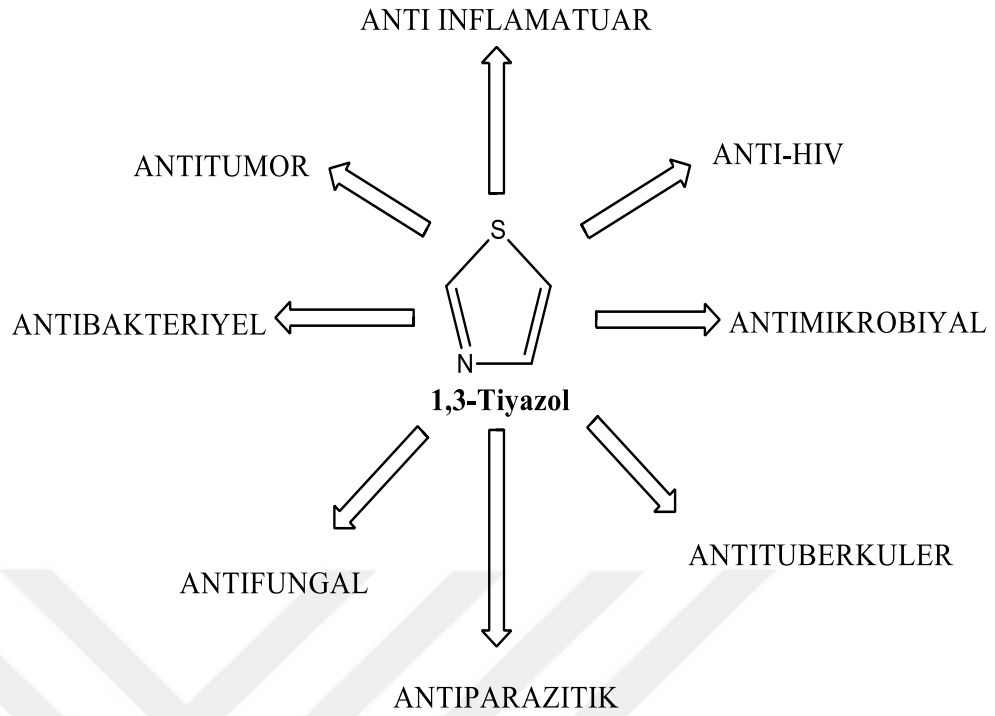
Tümör mikro ortamı, klinik deney testlerinin, yeni ilaçlar gibi birçok tedavi türünün, cerrahi veya radyasyon terapisinin kullanıldığı tedavi yöntemine yeni yaklaşımların veya yeni bir tedavi kombinasyonunun araştırılmasını sağlayacaktır. Tümör hücrelerinin yavaş veya hızlı büyümesi, kan damarlarının tümör hücrelerine oksijenasyon ve besin sağlayamamasıyla sonuçlanarak tümör içinde oksijen yetersizliği veya hipoksik bölgelere yol açar. Günümüzde uygulanan geleneksel kanser tedavileri kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı doku ve hücrelere zarar verdiği için kanser tedavisinde yeni tedavi yöntemleri uygulanmaktadır (J. J. Wang vd., 2018).

Heterosiklik bileşiklerin kimyasal ve biyolojik çalışması, tıbbi kimyada uzun süredir ilginç bir alan olmuştur. (Li vd., 2014) Tiyazoller, aromatik beş üyeli heterosikllerin en yoğun araştırılan sınıflarından biridir. İlk olarak 1887'de Hantzsch ve Weber tarafından tanımlanmıştır. Sırasıyla -1 ve -3 pozisyonlarında kükürt ve nitrojen heteroatomları içeren bu beş üyeli halka sistemi, birçok doğal üründe yer almaktadır (Breslow, 1958).

Sentezdeki çok yönlülüğü ve geniş farmakolojik etkileri nedeniyle, bu çekirdek tıbbi kimyada dikkat çekerek birçok doğal ve sentetik bileşikte çok hedefli bir yapı iskelesi görevi görmüştür (de Siqueira vd., 2019).



Şekil 1.1. 1,3 Tiyazol Halkası



Şekil 1.2. 1,3 Tiyazol Biyolojik Profilleri

Tiyazol bazlı bileşikler; kinaz inhibitörü, tübül/mikrotübül inhibitörleri, HIF degradasyonu indükleyicileri olarak görev yaparlar (de Siqueira vd., 2019). Kinaz sinyal yollarının, proliferasyon, hayatta kalma, hareketlilik, metabolizma, anjiyogenez ve antitümör immün yanıtlarından kaçınma dahil olmak üzere tümör biyolojisinin ayırt edici fenotiplerinin çoğunu yönlendirdiği gösterilmiştir (Gross vd., 2015). α - ve β - tübül veya mikrotübüllerin polimerleri, organellerin hareketi, hücre içi taşıma, hücre şekli oluşumu ve bakımı dahil olmak üzere hücrelerde birçok rolü bulunur (Aylett vd., 2011).

Bu tez çalışmasının amacı, kanser tedavisinde, sağlıklı hücrelere zarar vermeden veya en az zararla tedavinin mümkün olabilmesi için, sentezlenen 2-hidrazinotiyazol türevi bileşenlerin A549 insan akciğer adenokarsinomu hücreleri üzerindeki sitotoksik, apoptotik ve antikanser etkilerinin ve gen ekspresyonlarının in vitro olarak araştırılması hedeflendi.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Kanser ve Biyolojisi

Değişen metabolizma, kanserin ayırt edici özelliğidir. Hemen hemen tüm katı ve hematolojik malignitelerde tümörün yaşamını devam ettirebilmesi için metabolik yollar tümöre spesifik bir şekilde değiştirilir ve tümörün hızla yayılmasına ve büyümesine sebep olur. Bundan dolayı kansere metabolik bir hastalıkta denilebilir (Nagarajan vd., 2016).

Tümör, işlevsel amacı olmayan ve bitişik hücrelere veya organlara veya vücudun diğer kısımlarına yayılma potansiyeli olmayan hücrelerin anormal büyümesidir. İyi huylu tümörler metastaz yapmadığı için tüm tümörler kansere sebep olur denilemez. İnsanları etkileyen birçok kanser türü vardır ve kanser hücreleri, gelişimin erken bir aşamasında hiçbir belirti veya semptom göstermez (Smith vd., 2007). İyi huylu tümörün nedenleri çok net değildir ve genetik bozukluklar, sağlıksız beslenme alışkanlıkları, mesleki stres, radyasyona maruz kalma ve/veya toksin alımı gibi enfeksiyon veya iltihaplanma vb. nedenlerden kaynaklanabilir. Tümörün sistemik semptomları, doğrudan veya metastatik yayılma ile ilgisi olmayan etkiler nedeniyle ortaya çıkar. Yaygın olarak görülen semptomlar açıklanamayan kilo kaybıdır; ateş, yorgunluk hissi, cilt durumundaki değişiklikler vb (J. J. Wang vd., 2018).

Kanserin metastaz formu, orijinal büyüme konumundan yakın bölgelere komşu hücrelere veya dokulara bölgesel lenf düğümlerine lenfatik yayılmayla veya kan yoluyla vücudun çeşitli bölgelerine hematojen yayılma yoluyla yayılır (Wong ve Hynes, 2006) .

Kanser hücresinde genel olarak gözlenen özellikler; hücrenin çoğalması, ilaç direnci oluşturup hücre ölümüne direnmesi, büyüme baskılayıcılarından kaçması, anjiyogenezi indüklemesi, metastaz yapmasıdır (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanser hücrelerinin bağışıklık sistemini etkisiz hale getiren bir seçim sürecinden geçtiği giderek daha belirgin hale geldi. Kanser hücreleri dönüşüme uğramış hücrelerdir. Birçok kanser dokusu çok karmaşık dokulardır. Bir kanserin beslenmeyle, sigara kullanımıyla ve başka birçok faktörle değiştirilebilen fenotipik davranışı, tamamen genetik profiline değil, konağın genotipine ve giriş yoluna göre de değişiklik gösteren konakçı faktörlere de bağlı olabilir (Cree, 2011).

2.2. Akciğer Kanseri

Küresel olarak, akciğer kanseri erkeklerde en yaygın kanser ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir ve üçüncü en yaygın kanserdir (meme ve kolorektal kanserlerden sonra) ve kadınlarda kanser ölümlerinin (meme kanserinden sonra) ikinci önde gelen nedenidir (Mao vd., 2016).

Akciğer kanseri, yılda 1,37 milyon ölümle sonuçlanan kansere bağlı en yaygın ölümdür (Ferlay vd., 2010). Bunun nedeni büyük ölçüde başlangıçta asemptomatik olması ve tipik olarak ileri aşamalarda keşfedilmesidir. Düşük doz bilgisayarlı tomografi (LDCT) ile akciğer kanseri taramasının mortalite açısından bir faydası olduğu yakın zamanda gösterilmiştir ve bu uygulamanın uygulanması giderek artmaktadır. Şüphelenildiğinde, akciğer kanseri teşhis edilmeli ve aşamalandırılmalıdır ve bu süreç yardımcı olacak yeni yönergeler vardır (Komagata vd., 2018).

Birincil akciğer kanserlerinin birçoğu akciğer karsinomudur ve küçük hücreli akciğer karsinomu (SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu (NSCLC) olarak iki gruba ayrılırlar. SCLC, epitel ve nöroendokrin hücrelerden çoğalan küçük tümör hücrelerinden oluşan ve agresif seyreden bir nöro-endokrin tümördür. Bu tip akciğer kanseri, kötü prognozludur ve sigara tüketimi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Bu tümörlerin hızlı yayılması nedeniyle SCLC'li hastalar nadiren ameliyat edilir (Rekhtman, 2010).

NSCLC, akciğer kanseri vakalarının yaklaşık olarak % 80'ini oluşturur ve skuamöz hücreli karsinom (SCC) , adenokarsinom (AdC) ve büyük hücreli karsinom (LCC) olmak üzere üç alt tipi vardır (Sun vd., 2007).

Birçok AdC vakası sigara dumanı ile ilişkilidir ve totalde tüm akciğer kanserlerinin %20'sini oluşturur. Fakat yine de, sigara içmeyenler ve kadınlar arasında, AdC çoğu durumda görülür. SCC ise akciğer kanseri vakalarını %30'unu oluşturur (Witschi, 2001).

SCC, normalde solunum epitelinde bulunmayan, ancak tütün dumanının bir sonucu olarak metaplastik değişikliklerle glandüler veya sekretuar hücrelerden ortaya çıkan çok katmanlı skuamöz hücrelerden kaynaklanır (Belinsky, 2004; Sun vd., 2007).

2.2.1. Erken başlangıç gösteren akciğer kanseri

Ortalama olarak 60-70 yaşları akciğer kanserinin başlama yaşları olduğu tahmin edilmektedir. Tüm vakaların %10'undan azı erken yaşta akciğer kanseri geliştirir (51 yaşın altında) (Rosenberger vd., 2008). Sigara içmek de bu grup için en önemli risk

faktörüdür, ancak histolojik tip, cinsiyet dağılımı ve genetik yatkınlığın erken başlangıçlı akciğer kanseri hastalarında farklı olduğu gösterilmiştir (Kreuzer vd., 1998).

Risk çalışmaları, matriks-metaloproteinaz 1 (MMP1), Glutasyon S transferaz mu1 (GSTM1) ve Sitokrom P 450 (CYP450) genlerindeki SNP'lerin hastalığın erken başlangıcı ile ilişkili olduğunu belirlemiştir. (M. Timofeeva vd., 2010; M. N. Timofeeva vd., 2009) Ek olarak, genç akciğer kanseri hastalarında yapılan risk çalışmaları, birinci derece akrabalarda kanser varsa, ebeveyn veya bir kardeş akciğer kanserinden etkilenmişse daha da yüksek bir risk göstermiştir (Bromen vd., 2000; Kreuzer vd., 1998).

2.2.2. Akciğer kanseri risk faktörleri

Eksojen noxae (sağlığa zararlı herhangi bir şey), akciğer kanserinin gelişiminde belirleyici bir role sahiptir -özellikle sigara dumanı solunması. Akciğer kanseri geliştirilmesi %90 oranında bu sebebe bağlanır (AJ vd., 2007). Sigara bırakıldıktan sonra akciğer kanserine yakalanma riski zamanla azalır. Diğer ilgili etiyolojik faktörler ise çeşitli kimyasallara maruz kalınmasıdır. Bunlar asbest, kromat, arsenik, polisiklik hidrokarbonlar (katran ve kurum içinde) ve nikel olabilir. Her iki durumda da akciğer kanseri vakalarının lokal olarak kümelenmesine neden olabilir. Akciğer kanserlerinin %9 ila %15'inin sigara içimi dışında nedenlere sahip olduğu tahmin edilmektedir. Bir akciğer kanserinin karsinogenezinin on yıllar öncesine dayandığı düşünülmektedir. Bu süre zarfında, etkilenen hücreler moleküler düzeyde çok sayıda değişikliğe uğrar ve bu da sonunda istilacı olarak büyüyen bir akciğer karsinomuna yol açar (Hammerschmidt ve Wirtz, 2009).

2.2.3. Akciğer kanserinde gözlenen klinik bulgular

Akciğer kanserine sahip olan hastaların çoğu zaman tanıda semptomatik oldukları görülmüştür. Birincil tümörler bu semptomlara neden olabilir (örn., Öksürük, hemoptizi); uzak metastazlar (örneğin, kemik ağrısı) toraks içi yayılma. Bu semptomlar, tümör kaynaklı anormal hormon üretiminin veya vücudun tümöre tepkisinin bir sonucudur ve doğrudan tümör veya metastaza atfedilemez. Akciğer kanseri olan hastaların yaklaşık %10'u bir paraneoplastik sendrom ile başvurur ve bu oran SCLC'li hastalarda daha yüksektir (Latimer ve Mott, 2015).

Parmakta çomaklaşma ve hemoptizi akciğer kanseri olasılığını ciddi derecede artıran semptomlardır. İştahsızlık, kilo kaybı görülmesi, göğüs veya kaburga ağrısı, nefes darlığı, yorgunluk ve kalıcı öksürük akciğer kanserinde gözlenen diğer semptomlardır (Hamilton vd., 2005).

2.2.4. Akciğer kanserinin tanısal olarak değerlendirilmesi

Akciğer kanserinin tanısal olarak değerlendirilmesi, tanının histolojik olarak doğrulanmasını, tümörün evrelemesini ve tedavi seçenekleri bakımından hastanın fonksiyonel durumunu içeren bir analiz olmalıdır. Özellikle küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, tedavinin önemli yönleri doğru evrelemeye ve hastanın fonksiyonel durumunun doğru değerlendirilmesine bağlıdır. Akciğer kanserinin evrenmesi için uluslararası bir evreleme sistemi kullanılmaktadır (Hammerschmidt ve Wirtz, 2009).

Moleküler testler önemli miktarda doku gerektirir. Moleküler testler, skuamöz hücreli tümörleri olan hiç sigara içmeyenlerde de standarttır ve bu tür hastalarda bol miktarda doku daha gerekli hale gelir (Rivera vd., 2013). Küçük veya periferik yerleşimli akciğer kanserleri için bu zor olabilir (Latimer ve Mott, 2015).

2.2.5. Akciğer kanseri tedavi yöntemleri

Lokal terapi yöntemleri cerrahi ve radyoterapidir. Sistemik terapi yöntemi olarak, geleneksel kemoterapi ve giderek yaygınlaşan hedefe yönelik tedaviler (moleküler düzeyde tümöre spesifik yapıları etkileyen) kullanılmaktadır. Akciğer kanseri tedavisinde radyoterapi ve kemoterapi aynı vea verilebilir (Hammerschmidt ve Wirtz, 2009).

2.3. Genetik ve Kanser

İstisnalar haricinde kanserler tekli somatik hücrelerden ve onların soylarından oluşur. Oluşan hücrelerde genetik veya epigenetik değişiklikler gözlenir. (Nowell, 1976). Sonuçta normal olanı göz ardı edebilecek bir hücre popülasyonu gelişir, çoğalmayı ve bölgeyi kontrol eden kansere dönüşür (Ponder, 2001).

Tümör oluşumuna neden olan genetik değişikliklerin karmaşık hücresel ağların oluşumuna nasıl yol açtığını ve biyolojik süreç çeşitliliğini indüklediğini anlamak için, kanser genetiğine ilişkin son araştırmalar, kanserli ve normal dokular arasındaki

moleküler farklılıkların tanımlanmasına odaklanmıştır (Futreal vd., 2004; Hornberg vd., 2006). Bununla birlikte transkripsiyonel olarak tanımlanan aday kanserlerin ekspresyon seviyeleri, polimeraz zincir reaksiyon PCR (RT- qPCR) gibi moleküler yöntemler aracılığıyla deneysel doğrulama gerektirir. Bugüne kadar, kanser araştırmacıları ağırlıklı olarak GAPDH ve β -aktin referans genlerini dahili referans kontrolleri olarak kullanmışlardır, çünkü mRNA ekspresyon seviyeleri birçok farklı hücre ve dokuda yüksek ve sabit olarak belirlenmiştir (Eisenberg ve Levanon, 2013; Zhu vd., 2008).

Tümör karyotipleri nadiren normaldir ve çoğu hem sayı hem de yapı bakımından birden fazla anormallik gösterir. Bu kanser kavramı için ilk doğrudan kanıt, kanserde onkogenlerin ve gen transkripsiyonunun düzenlenmesinin önemini ortaya çıkaran lösemilerde ve lenfomalarda tümöre özgü translokasyon çalışmalarından geldi, kanser hücresi kromozomlarının giderek artan şekilde rafine edilmiş analizleri, kronik miyeloid lösemide 9 ve 22 numaralı kromozomlar arasındaki translokasyon gibi spesifik ve tekrarlayan genomik anormalliklerin belirli kanser türleri ile ilişkili olduğunu gösterdi. Genetik yatkınlık bazı kanser çeşitleri için yüksek risk teşkil eder. Yaklaşık son on yılda, bu tür kalıtsal kanserler için 30'dan fazla mutant gen klonlandı. Bu genlerin çoğu tümör baskılayıcı genler diğerleri ise DNA tamir genleri veya onkogenlerdir. Tümör baskılayıcılardan bazıları transkripsiyonu düzenler bazıları ise sinyal iletim yollarında aktivite gösterir. Elde edilen bu bilgiler kanserin tedavisinde ve oluşmasını önlemede alternatif yeni yollar bulunmasına ışık tutuyor (Alfred G. Knudson, 2002; Krontiris ve Cooper, 1981; Shih vd., 1981).

2.3.1. Akciğer kanserinde genetik yatkınlık

Sigara dumanına maruz kalmak akciğer kanseri vakalarında ana sebebi oluşturmaktadır. Bununla birlikte, çok fazla sigara tüketenlerin %10-15 gibi küçük bir kısmının akciğer kanseri geliştirdiği göz önüne alındığında, kişiler arası varyasyonlar, genetik veya epigenetik gibi ek faktörlerin de bireysel hastalığa yakalanma riskini etkileyebileceğini düşündürmüştür (Hung vd., 2008; Y. Wang vd., 2008).

2.3.2. Kanserde Genler

Kanserde normal hücrelere kıyasla hızla çoğalma, büyüme gibi özellikler taşıyan genlerin tanımlandığı görülmüştür. Bu genlerin tanımlanması ve karakterizasyonu, tümör

virüsleriyle ilgili çalışmalardan kaynaklanmıştır. Özellikle, neoplastik transformasyonun moleküler yönlerine ve dolayısıyla normal hücre proliferasyonuna ve farklılaşmasına ilişkin eşsiz bilgiler sağlayan onkogenik retrovirüslerin çalışmaları olmuştur (Torry ve Cooper, 1991).

2.3.2.1. Proto-onkogenler

Tümör hücresi gen ekspresyon programları tipik olarak proto-onkogenlerin kodlama dizisini veya ekspresyonunu değiştiren somatik mutasyonlar tarafından yönlendirilir ve hasta genomlarında bu tür mutasyonları tanımlamak, kanser genomiklerinin ana hedefidir. Proto-onkogenlerin düzensizliği sıklıkla transkripsiyonel güçlendiricileri bu genlerin yakınlığına getiren mutasyonları içerir (Hnisz vd., 2016).

Proto-onkogenler, birçok proteini kodlar bunlar; büyüme faktörleri, tirozin kinaz aktivitesine sahip büyüme faktörü reseptörleri, serin\treonin kinazlar, sinyal iletiminde düzenleyici proteinler, reseptör olmayan tirozin kinazlar ve transkripsiyon faktörleridir. Kodlanan bu proteinler apoptozda, hücrenin büyümesi ve farklılaşmasında önemli roller üstlenirler. Viral onkogenler, hücrel proto-onkogenler ve dönüşmeyen retrovirüslerin genomu arasındaki rekombinasyonla ortaya çıkar. Gen amplifikasyonu, nokta mutasyonu ve translokasyon gibi yeniden düzenlemelerle proto-onkogenler kansere yol açan onkogenlere dönüştürülebilir (Veerson vd., 1992).

2.3.2.2. Onkogenler

Onkogenler, tümör büyümesinin temel sürücü güçleridir. Kanseri harekete geçiren çeşitli mekanizmalar tanımlanmış olmasına rağmen, onkojenlerin kanser hücrelerinde metabolik kalıpları şekillendirmedeki rolü henüz takdir edilmeye başlanmıştır. Onkogenlerin metabolik sinyal yollarını ve metabolik enzimlerini doğrudan düzenlediği yapılan son çalışmalarla bildirilmiştir (Nagaraajan vd., 2016).

Akciğer kanserinde onkogeneiz mekanizmaları, son 20 yılda büyük ölçüde deşifre edilmiştir. KRAS, ALK ve EGFR genlerinin yeniden düzenlenmesi mutasyonları torasik (göğüs ile ilgili) onkoloji alanında görülen temel onkogenik etkenlerdir. Çoğunlukla adenokarsinomlarda bildirilmişlerdir. Bununla birlikte, son zamanlarda yeni moleküler hedefler vurgulanmıştır: BRAF mutasyonları, HER2 ve PIK3CA ve ROS1 ve RET gibi yeni translokasyonlar. Terapötik stratejiler, aralarında monoklonal antikolar ve tirozin-

kinaz inhibitörleri bulunan bu sinyal yollarını inhibe etmek için tasarlanmıştır (Calvayrac vd., 2017).

Onkogenleri (1) büyüme faktörleri, (2) büyüme faktörü reseptörleri, (3) transkripsiyon faktörleri, (4) sinyal dönüştürücüler ve (5) programlanmış hücre ölümü düzenleyicileri olmak üzere proto-onkogenlerin protein ürünlerinin özellikleri dikkate alınarak sınıflandırmak mümkündür (Pierotti vd., 2017).

2.3.3. Tümör baskılayıcı genler

1969'da Knudson, sporadik ve kalıtsal retinoblastomasının gelişiminin kinetiğine dayanarak ilk olarak tümör baskılayıcı genlerin (TBG'ler) varlığını tahmin etti. 1986'da retinoblastoma 1 (RB1) geninin başarılı bir şekilde klonlanmasıyla desteklenen karsinogenez için "2 vuruşlu" bir model önerdi (Knudson, 1971). Klasik olarak, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, yalnızca genin her iki kopyası da kaybolduğunda bir fenotipe yol açacaktır (Friend vd., 1986).

Kanserde, bir TBG'nin bir kopyasının inaktivasyonunun ardından genin kalan kopyasının kaybı ve ardından tümör fenotipinin ortaya çıkması gerekir. Kinzler ve Vogelstein, TBG'lerin 2 kategoriye ayrıldığını öne sürdüler: "bekçi" genleri ve "bakıcı" genleri (Kinzler ve Vogelstein, 1997). Bekçi genleri, hücrelerin büyüme veya bölünme döngüleri boyunca nasıl ilerleyeceğini kontrol ederken, bakıcı genleri genomun bütünlüğünü korur. Bu 2 gen sınıfı arasındaki ayrım, terapi yaklaşımları geliştirmek için kritiktir. Şu anda, hemen hemen tüm moleküler hedefli tedaviler, kinazlar gibi onkogenlerin inhibitörleridir. Kinaz inhibitörleri, bugüne kadar geliştirilen en başarılı kanser ilacı sınıflarından biri olmuştur. Sezgisel olarak, hiperaktif edilmiş bir onkogeni inhibe etmek, inaktif edilmiş bir TBG'nin işlevini eski haline getirmekten daha basit görünmektedir (Morris ve Chan, 2015).

Sürücü genler, mutasyona uğradıklarında hastalık sürecine katkıda bulundukları şekilde sınıflandırılır. Tümör baskılayıcılar, mutasyonlar (veya bazı durumlarda epigenetik susturma) fonksiyon kaybına (LOF) neden olduğunda kanserin gelişmesine katkıda bulunur. Bu genlerdeki değişiklikler genellikle moleküler olarak resesiftir, burada genin her iki kopyası da hastalığa neden olmak için bir LOF kusuru gerektirir (Islam, 2017).

TP53, insan kanserlerinin %30 ila %50'sinde mutasyona uğramıştır, özellikle yumurtalık, akciğer, kolorektal, baş ve boyun, pankreas, rahim, meme ve mesane kanserinde yüksek yaygınlık (> %50) gösterir (Cerami vd., 2012).

2.3.3.1. p53 fonksiyonu

p53 normalde sitoplazmada bulunur ve hücrel stres üzerine çeşitli kinazlarla doğrudan veya dolaylı fosforilasyonun ardından çekirdeğe transloke olur. Fosforile nükleer p53 bir tetramer oluşturur ve Fas, Bax, Bim, Noxa ve PUMA gibi hem ölüm reseptörüne hem de mitokondriyal yollara aracılık eden çeşitli pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu destekleyen bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Ek olarak, MOMP'yi yöneten Bcl-2 ailesi proteinlerini düzenleyerek sitoplazmik monomerik p53 ile de modifiye edilebilir. Burada p53, mitokondriye transloke olur. p53 aracılı apoptozda intrinsik (içsel) yol temel rolü oynar, buna karşılık p53 ekstrinsik (dışsal) yolu da düzenleyebilir. Bcl-2 ailesini kontrol etmenin yanında p53, Apaf-1 ve kaspaz-6 ekspresyonunu da teşvik eder ve bu da apoptozla sonuçlanır (Liu vd., 2017).

2.3.4. Genomik ve akciğer kanseri

Akciğer kanserinde geleneksel tedavi kararı, histoloji sınıflandırmasına dayanmaktadır. Onkogenik özelliklere sahip ve bu nedenle AdC'de tedavi için hedef olarak uygun olan en yaygın sürücü mutasyonları, vakaların %5-15'ini oluşturan Epidermal büyüme faktörü reseptöründe (EGFR) ve Kirsten sıçan sarkomu viral onkogen homologunda (KRAS) görülür. AdC'nin %5'inde görülen diğer iyi tanımlanmış genetik anormallikler, ekinoderm mikrotübül ile ilişkili protein benzeri 4 (EML4) ve anaplastik lenfoma kinaz (ALK) füzyon geni, östrojenle ilişkili reseptör beta tip 2 (ERBB2), NRAS, v-raftır. Murin sarkom viral onkogen homologu B1 (BRAF), fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz, katalitik alt birim alfa (PIK3CA), met proto-onkogen (MET) ve kaderin ile ilişkili protein beta 1 (CTNNB1) mutasyonları (Pao ve Girard, 2011; Seo vd., 2012).

SCC'nin genomik görünümünde önemli bir fark olduğu ortaya çıkmıştır (Hammerman vd., 2012). Örneğin, KRAS, EGFR mutasyonları ve ALK yeniden düzenlemeleri, AdC'ye kıyasla nadirdir ve bunun yerine ERBB genleri, Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1 (FGFR1), tirozin kinaz DDR2 ve JAK/STAT yolu, SCC'deki

mutasyonlar veya amplifikasyonlar tarafından sıklıkla değiştirilir. Bu, alt tipe özgü değişikliklerin akciğer kanserinde tedavi kararlarında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Sigara içenler, içmeyenlere göre 10 kat daha yüksek mutasyon oranına sahiptir. BRAF, JAK2, JAK3, TP53 ve uyumsuzluk onarım genlerindeki mutasyonlar sigara içmeyle güçlü bir şekilde ilişkilirken, EGFR, ROS1 ve ALK yeniden düzenlemeleri hiç sigara içmeyenlerde de görünmektedir (Govindan vd., 2012).

2.3.4.1. Büyüme faktörleri

Büyüme faktörleri, belirli bir büyüme faktörüne yanıt vermek için belirli bir reseptöre sahip hedef hücrelerin proliferasyonunu uyarmak için hücre dışı sinyaller olarak işlev gören ve salgılanan polipeptitlerdir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Simian sarkom virüsünün sis onkogeninin incelenmesi sonucu retroviral onkogenler ve büyüme faktörleri arasında bağlantı olduğu görülmüştür. İlk olarak bir maymun fibrosarkomundan retrovirüs izolasyonu yapıldı ve sekans analizi sis onkogeninin, PDGF'nin beta zincirini kodladığını gösterdi. Bu keşif, uygun olmayan bir şekilde ifade edilen büyüme faktörlerinin, reseptörlerini yapısal olarak aktive edebileceği, kendi kendine devam eden anormal hücre çoğalmasına ve dolayısıyla onkogen olarak işlev görmesine neden olabileceği ilkesini ortaya koydu (Heldin, 2012).

2.3.4.2. Büyüme faktörü reseptörleri

Viral onkogenlerden bazıları, intrinsik tirozin kinaz (TK) aktivitesi gösteren normal büyüme faktörü reseptörlerinin değiştirilmiş çeşitleridir. Reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler), bu büyüme faktörü reseptörleri topluca bilindiği için, üç ana alandan oluşan karakteristik bir protein yapısına sahiptir: (1) hücre dışı ligand bağlama alanı, (2) zar geçiş alanı ve (3) hücre içi TK katalitik alan.

RTK'lar, sinyal moleküllerinden aldıkları bilgiyi hücre zarında baştan sona iletirler. Bir büyüme faktörünün reseptörünün hücre dışı ligand bağlama alanına bağlanması, genellikle dimerizasyondan sonra hücre içi TK katalitik alanının aktivasyonu ile sonuçlanır ve esas olarak mitojen tarafından temsil edilen RTK ile fiziksel olarak etkileşime giren aşağı akış proteinlerinin aktivasyonuna yol açar. Esas olarak mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'lar) yolu, PI3K-AKT eksenini ve STAT proteinleri ile temsil edilir. Bu yollar, spesifik RTK'ya bağlı olarak farklı şekilde aktive edilir ve genel

olarak anormal hücre çoğalmasına ve programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kaçmaya neden olur. RTK listesi, genellikle tümör tipine bağlı olarak farklı mekanizmalarla onkogenlere dönüştürülebilen ERB B1, ERB B2, MET, RET, ROS, ALK ve TRK'yı içerir (Pierotti vd., 2017).

2.3.4.2.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörü

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR; erbB-1; HER1), ERBB tirozin-kinaz reseptör ailesine aittir (Hynes ve Lane, 2005). EGFR geni, tirozin kinaz aktivitesine sahip olan bir transmembran glikoproteini kodlar. Spesifik bir liganda bağlandıktan sonra EGFR, konformasyonel değişiklik ve fosforilasyona uğrar, bu da diğerlerinin yanı sıra PI3K/AKT, RAS/ERK ve JAK/STAT gibi hücre hayatta kalması ve proliferasyonunda rol oynayan çeşitli yolların aktivasyonuna yol açar (Henson ve Gibson, 2006). 1980'lerden itibaren, yapılan klinik çalışmalar sonucunda akciğer kanserinde, özellikle adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomda artan EGFR ekspresyon seviyeleri gözlenmiştir (Hirsch vd., 2003; Ohsaki vd., 2000).

2.3.4.3. Sinyal dönüştürücüler

Mitojenik sinyallerin iletimi, sinyal iletim kaskadı ile hücre yüzeyindeki reseptör tirozin kinazlar ile sağlanır. Bu bilgi aktarımı, kısmen sitozoldeki etkileşen proteinlerin aşamalı fosforilasyonu ile gerçekleştirilir. Sinyal iletimi ayrıca guanin nükleotid bağlayıcı proteinleri ve adenilat siklaz sistemi gibi ikinci habercileri içerir. Birçok proto-onkogen, sinyal iletim yollarının üyeleridir ve reseptör olmayan protein kinazlar ve guanozin trifosfat (GTP) -bağlayıcı proteinler olarak iki ana gruptan oluşur. Reseptör olmayan protein kinazlar, TK'lar (örn., ABL, LCK ve SRC) ve serin/treonin kinazlar (örn., RAF-1, MOS ve PIM-1) olarak alt sınıflara ayrılır. GTP bağlayan proteinler, monomerik ve heterotrimerik olarak iki ayrı gruba bölünmüştür. Monomerik GTP bağlayan proteinler, RAS proto-onkogen ailesinin üyeleri olan HRAS, KRAS ve NRAS'tır. Proto-onkogen olan heterotrimerik GTP bağlayan proteinler (G proteinleri), GIP ve GSP'yi içerir. Sinyal dönüştürücüler genellikle, kontrolsüz hücrel proliferasyona ve düzenlenmemiş aktivitelere yol açan mutasyonlarla onkogenlere dönüştürülür (Pierotti vd., 2017).

2.3.4.4. Transkripsiyon faktörleri

Transkripsiyon faktörleri, hedeflenen genlerin veya gen ailelerinin ekspresyonunu düzenleyen, hücre dışındaki sinyalleri gen ekspresyonu ile modüle edilmiş değişikliklere dönüştüren siyal iletiminin son bağlantısıdır. Örnek olarak ERB A, FOS, ETS, MYB, JUN ve C-MYC verilebilir (Pierotti vd., 2017).

MYC proteinleri (c-MYC, N-MYC ve L-MYC), gen promoterlerinde güçlendirici kutu (E-box) sekanslarına bağlanan transkripsiyon faktörleridir ve transkripsiyonu aktive edebilir veya baskılayabilir, böylelikle hücrel transformasyon ve tümör büyümesinin çeşitli yönlerini kontrol eder (Nagarajan vd., 2016).

2.3.4.5. Akciğer kanserinde siklin-bağımlı kinazlar ve siklinler

Sikline bağımlı kinazlar (CDK'ler), hücre döngüsü devam etmesinin, hem malign hem de normal hücrelerde önemli düzenleyicileridir. CDK'ya bağlı yolların deregülasyonu, hem küçük hücreli olmayan hem de küçük hücreli akciğer kanserinde yaygın olarak bulunur ve bu düzensizlikler, klinik fayda için yararlanılabilecek zayıflıkları göstermektedir. Akciğer kanserinde hücre döngüsü düzensizdir. Akciğer kanserinde ilk tanımlanan tümör süpresör gen RB genidir ve bu genin inaktive olması akciğer karsinogenezi ile sonuçlanır. RB fonksiyonu kaybı, SCLC'lerin %90'ından fazlasında gözlenir ve vakaların çoğunda, RB'nin inaktivasyonu, bir allel kaybından ve kalan allelin inaktivasyonundan kaynaklanır. Aksine, NSCLC'lerin %10-50'sinde anormal RB1 ekspresyonu ve daha küçük bir alt kümede RB2'de mutasyonlar meydana gelir. G1'den S fazına geçiş, p16 ve siklin D1 dahil olmak üzere çeşitli yukarı akış düzenleyiciler aracılığıyla CDK4/6-siklin D kompleksi tarafından RB'nin fosforilasyonu ile düzenlenir.

İnvazif olmayan bronşiyal epitelyal lezyonlarda yüksek seviyelerde siklin D1 proteini bulunur, bu da siklin D1 aşırı ekspresyonunun akciğer karsinogenezinde erken bir olay olduğunu düşündürür. Yüksek seviyelerde p16 ekspresyonu NSCLC'de artmış hayatta kalma ile ilişkilendirilirken, siklin D1'in aşırı ekspresyonu, sonuç üzerinde çelişkili etkilerle ilişkilendirilmiştir. Siklin E akciğer tümörlerinde yüksek oranda gözlenir ve overekspresyonun fare modellerinde displaziye ve akciğer karsinomuna yol açtığı yapılan çalışmada bildirilmiştir (Qin vd., 2020).

2.4. Kanserde Hücre Ölüm Yolaklarının İncelenmesi

Kanser ve diğer hastalıklar için efektif tedavilerin geliştirilebilmesi için hücreyi ölüme götürebilecek yolların anlaşılabilmesi gerekmektedir.

2.4.1. Otofaji

Otofaji, memeli hücrelerinde farklı türleri olan kendi kendini sindiren bir süreçtir. Makrotofaji, genellikle otofaji olarak adlandırılan baskın bir formdur. Otofaji, besin açlığı, hücre içi patojenlerin yok edilmesi ve hasarlı organellerin bozulması gibi çeşitli faaliyetlerde yer alır. Otofaji, büyük organelleri ve protein agregalarını parçalamak için benzersiz bir mekanizmadır. Bu nedenle, otofaji hücre homeostazını koruyabilir ve stresli koşullar altında hücrenin hayatta kalmasını sağlayabilir. Otofajinin çok işlevli rolleri, hem uyarlanabilir hem de zararlı sonuçlar için potansiyelini kullanır. Otofajinin işlev bozukluğu, mikrobiyal enfeksiyon, nörodejenerasyon ve kanserojenez gibi insan hastalıklarında patojenik bir rol oynar (K. Wang, 2015). NSCLC'de otofaji ve apoptozun etkileşimi karmaşıktır. Aslında, otofaji, karsinogenezde iki ucu keskin bir kılıç görevi görür. Bir taraftan otofaji, stresli tümör hücrelerinde Bcl-1, PI3K, AKT ve mutant p53 gibi aşırı protein yıkımını önleyebilen farklı onko-proteinler tarafından daima inhibe edilir. Öte yandan, otofajinin kalıcı aktivasyonu, otofajik programlanmış hücre ölümüne veya apoptoza neden olur. Otofaji, genellikle endoplazmik retikulum ve mitokondri arasındaki temas bölgelerinde bulunan izolasyon membranı oluşumuyla başlar. Otofajik yolun sonraki aşamaları, vezikül uzaması, otofagozom olgunlaşması (yükün sekestrasyonu), otofagozom-lizozom füzyonu ve degradasyonu içerir (Liu vd., 2017).

2.4.2. Nekroz

Apoptozun aksine, nekroz, hücrenin işlevini yerine getiremeyecek kadar şiddetli bir şekilde ani bir şokla (radyasyon, ısı, kimyasallar, hipoksi vb.) hasar gördüğü, enerjiden bağımsız bir hücre ölümü biçimidir. Hücre, çevresi ile homeostazı sürdürmede başarısız olduğu için genellikle şişerek (onkoz olarak bilinen bir süreç) yanıt verir. Apoptoza karşı bir karşı nokta olarak nekrozun bu tanımı yararlı bir kavramdır, ancak nekroz genellikle ortamdaki hücresel fragmanların varlığı ile hücre kültüründe bir son nokta durumu olarak gözlendiğinden, çoğu durumda bir hücre kültürü ortamında şu şekilde açıklanmaktadır:

Nekroz genellikle apoptotik gövdeleri bütünlüğünü yitirmiş geç apoptotik hücrelerin kalıntılarıdır (D'Arcy, 2019).

2.4.3. Apoptoz

Apoptoz kelimesi ilk olarak 1972 tarihli bir makalede Kerr, Wyllie ve Currie tarafından morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü türünü tanımlamak için kullanılmıştır. Apoptoz, bir hücrenin büyümesini ve bölünmesini durdurduğu ve bunun yerine, içeriğini çevreleyen ortama dökülmeden hücrenin kontrollü ölümüyle sonuçlanan bir süreç girdiği süreçtir ve programlanmış hücre ölümü olarakta bilinir. Apoptozun başlaması için, bir dizi sistein-aspartik proteazın yani kaspazların aktivasyonu gereklidir. Sonuç, çevreleyen dokulara minimum zarar vererek hücrelerin vücuttan temizlenmesidir. Hücrelerin apoptoza gidememesi ve sonuç olarak vücutta hasarlı hücrelerin birikmesi, çeşitli kanser türlerine neden olur. Bu nedenle, etkili kemoterapötik ajanların geliştirilmesinde ölüm yollarının anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Son zamanlarda apoptozun bir dizi alt tipi olduğu ve apoptoz, nekroz ve otofaji arasında bir örtüşme olduğu netleşmiştir (D'Arcy, 2019).

Apoptoz süreci, çok hücreli organizmalar içinde oldukça korunur ve genetik olarak kontrol edilir. Apoptoz, bir dizi hücre içi sensör yoluyla hasar tespit ettiğinde intrinsik olarak bilinen bir mekanizma ile hücrenin kendisi tarafından başlatılabilir. Apoptozun iki temel yolu vardır bunlar, ekstrinsik ölüm reseptör yolunu ve intrinsik mitokondri yolunu içerir. Bu yollar hatalı hücreleri vücuttan uzaklaştırmak, sağlıklı hücreleri ise korumak için birbirleriyle sinerjik olarak çalışır. (D'Arcy, 2019).

2.4.3.1. Kaspaz ailesi

Kaspazlar iki gruba ayrılır: bir sinyale yanıt olarak ilk etkinleştirilen başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9 ve -10) ve apoptozun yıkım aşamasını gerçekleştiren uygulayıcı kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7). Birçok geleneksel kanser terapisi, bu kaspazları dolaylı olarak devreye sokarak kanser hücresinden kurtulmak için apoptozu indükler. Gen terapisi yaklaşımları ve hücrede halihazırda mevcut olan kaspazların doğal inhibitörlerini baskılayan küçük moleküller kullanılarak bireysel kaspazları spesifik olarak aktive edenler dahil olmak üzere yeni terapötik uygulamalar tasarlanmıştır. Bu tür yaklaşımların maksimum klinik etkinliğe sahip olması için, bu kaspazların apoptotik olmayan rollerine ilişkin yeni kavrayışlar dikkate alınmalıdır. Apoptozdan kaçılması kaserin ayırt edici

özelliklerinden bir tanesidir. Bu sebeple günümüzde var olan tedaviler kaspaz yollarını hedefleyerek bu sorunun çözülmesini amaçlamaktadır. Kaspaz işlevlerine ilişkin ortaya çıkan kavrayışlar ve kaspazları doğrudan hedeflemeye dayanan yeni tedavi stratejileri bazı umutlar vaat etmeye başlıyor. Kaspazlar aktive edildikten sonra, hücreyi içeriden ayırmak için bir dizi yapısal ve düzenleyici proteini parçalarlar. Bunların sonucunda apoptozun ayırt edici özellikleri olan plazma membranının kabarması, DNA parçalanması, nükleer yoğunlaşması gözlenir. Memeli kaspaz proteaz ailesinin ve apoptotik hücre ölümündeki rollerinin tanımlanması, *Caenorhabditis elegans* geni Ced3'ün nematodda apoptoz için gerekli olduğunun keşfedilmesiyle mümkün olmuştur. Ced3 geninin protein ürünü klonlandığında ve dizilendiğinde, memeli sistein proteaz kaspaz-1'e homolog olduğu ve daha sonra interleukin-1 β dönüştürücü enzim (ICE) olarak bilindiği belirlendi. Şu anda bilinen 14 tane memeli ve 12 tane insan kaspazları vardır. Apoptoz ile sonuçlanan kaspaz aktivasyonunun iki ana yolu, intrinsik yol ve ekstrinsik yol olarak adlandırılır, çünkü bunlar genellikle sırasıyla hücrelerin dışından veya hücre içinden gelen streslere bağlı olurlar (Boice ve Bouchier-Hayes, 2020).

2.3.4.2. *İntrinsik (içsel) yolak*

Metabolik stres, DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi gibi hücresel streslerle aktive edilen intrinsik yolak, kanser tedavisinde kemoterapötik ajanlar kullanılarak devereğe sokulur. Bu uyarılar mitokondri üzerinde birleşerek mitokondriyal dış zar geçirgenliğine (MOMP) ve mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitokrom c'nin sitozole salınmasına yol açar. Sitozole girdikten sonra, sitokrom c, APAF1'e bağlanarak molekülü açan konformasyonel bir değişikliğe neden olur. dATP veya ATP varlığında, APAF1 daha sonra APAF1 apoptozomunu oluşturmak için oligomerleşir. Buna karşılık, apoptozomlar, uygulayıcı kaspazlar -3 ve -7'yi ayırarak kaspaz kaskadını sürdüren kaspaz-9'u aktive eder. Kaspaz-3'ü parçalayabilmek için kaspaz-9'un apoptozoma bağlı kalması gerekir ve kaspaz-9'un p35 / p17 alt birimlerine bölünmesi apoptozomdan ayrışmayı indükler (Boice ve Bouchier-Hayes, 2020).

Mitokondriden salınan faktörlere bağlı olan bu apoptoz çeşiti pozitif veya negatif bir yoldan başlatılabilir. Eğer hücrenin yakın çevresinde hormonlar, sitokinler ve büyüme faktörleri yoksa negatif sinyallerle başlatılır. Puma, Noxa ve Bax gibi hücre içindeki pro-apoptotik moleküller bu sinyaller olmadan normalde inhibe halde bulunur ve bu sinyaller

ile aktif hale gelir ve apoptozu başlatır. Toksinler, hipoksi, radyasyon, virüsler reaktif oksijen türleri ve çeşitli toksik ajanlara maruz kalmak pozitif sinyalleri içerir, ancak hipoksi bazı hücrelerde (nötrofiller gibi), hücrenin hayatta kalmasını sağlayabilir (D'Arcy, 2019).

İçsel apoptotik yol pro-apoptotik üyelerden (Bax, Bak, Bad, BCL-X_S, BID, Bik, Bim, HRK, Noxa ve PUMA gibi) oluşan Bcl-2 ailesi proteinleri ve anti apoptotik üyeler (BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, Bfl-1 ve MCL-1 gibi) tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir (Liu vd., 2017) .

2.3.4.2.1. BCL-2 ailesi

BCL-2 ailesi, apoptozdaki rolü nedeniyle uzun süredir tanımlanmıştır. 1980'lerde B hücreli lenfoma bağlamında BCL-2'nin ilk keşfinin ardından, o zamandan beri bir dizi homolog protein tanımlanmıştır. Bu hastalıkta 14 ve 18. kromozom arasındaki bir kromozomal translokasyon, t (14;18), BCL-2 transkripsiyonunun artmasına neden olur ve bu da kanserli hücrelere bir hayatta kalma avantajı sağlar. BCL-2 homoloji (BH) alanları, aile üyelerinin birbirleriyle etkileşimlerini kolaylaştırır ve pro- veya anti-apoptotik işlevi gösterebilir, aile üyelerinin etkileşimini kolaylaştırdıkları için alt aile kategorilerinin merkezi olarak kabul edilir. Bu proteinler; anti-apoptotik, yalnızca BH3 (pro-apoptotik) ve "uygulayıcı" (pro-apoptotik) proteinler olarak 3 alt aileye sınıflandırılır. BH3, apoptotik aktivitesinin yanı sıra anti-apoptotik BCL-XL ve BAK'ın etkileşimi için hayati olduğu gösterildiğinden önemli bir alan olarak vurgulanmıştır. BH3 alanı, BCL-2 üyelerinin etkileşime girebileceği hidrofobik bir cebin doğru katlanması için hayati öneme sahiptir. Sonuç olarak, BH3 alanının nokta mutasyonları veya delesyonlarının, bir dizi sadece BH3 (only BH3) proteininin pro-apoptotik aktivitesini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Warren vd., n.d.).

BCL-2 protein ailesinin işlevsel öneminin bir özelliği de, bütünleyici zar proteinleri olma yetenekleridir ve bir diğer önemli özelliği de iyon kanalları oluşturmalarıdır (Siddiqui vd., 2015).

2.3.4.3. Ekstrinsik yolak (Dışsal yolak)

Apoptozun ölüm reseptörü yolu olarak da bilinen dışsal yol, doğal öldürücü hücreler veya makrofajlar tarafından ölüm ligandları ürettiklerinde başlatılır; bu ölüm

ligandlarının hedef hücre zarındaki ölüm reseptörleriyle bağlanması üzerine, prokaspaz 8'in kaspaz 8'e aktivasyonu yoluyla dışsal yolu indükler. Ölüm reseptörleri, tümör nekroz faktörü (TNF) süper ailesinin üyeleridir ve her ölüm reseptörünün ona karşılık gelen bir ölüm ligandına sahip olduğu birkaç üye içerir (D'Arcy, 2019).

Dışsal yol olarak adlandırılan ikinci bir yaygın apoptoz yolu, ölüm reseptörleri olarak bilinen hücre zarı proteinleri tarafından başlatılır. Fas (fizyolojik ligandı FasL'dir), tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörleri TNFR1 ve TNFR2 ve TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) reseptörleri DR4 (ölüm reseptörü-4) ve DR5 (ölüm reseptörü-5) pro-apoptotik ölüm reseptörleri arasında bulunur.

Proapoptotik ölüm reseptörlerinin hücre içi alanları, ölüm alanı olarak adlandırılan, korunmuş bir protein-protein etkileşim alanını içerir. Ligva bağlanması üzerine, ölüm reseptörleri hücre zarı içinde trimerize olur ve kümelenir (kapama olarak bilinen bir fenomen). Bu işlemi, FADD gibi adaptör proteinlerinin ve kaspaz 8 ve kaspaz 10 gibi başlatıcı kaspazların toplanması izler.

Dışsal yolda, başlatıcı kaspazların aktivasyonu, CASP8 ve FADD benzeri apoptoz düzenleyici (genellikle FLIP olarak adlandırılır) tarafından negatif olarak düzenlenir. Başlatıcı kaspaz 8 ve 10'un aktivasyonu, efektör kaspazlarının aktivasyonuna ve daha sonra miristoillenen ve mitokondriye yer değiştiren BID'nin bölünmesine yol açar, böylece sitokrom c'nin salınmasına katkıda bulunur (Carneiro ve El-Deiry).

2.3.4.3.1. *TNF (tümör nekroz faktörü) ailesi*

Tümör nekroz faktörü (TNF), patolojik ve fizyolojik süreçlere katkı sağlayan önemli bir sitokindir. İmmün bozukluklarında ve tümör gelişmesinde önemli bir roller üstlenir. TNF, tümör hücresinin nekrozuna (hücrenin şişmesi, organel yıkımı ve son olarak hücre lizisini içeren bir süreç) ve apoptoza (hücre küçülmesini, yoğunlaşmış cisimlerin oluşumunu ve DNA parçalanmasını içeren bir süreç) yol açar. Tümör nekroz faktörü (TNF) ailesi, TNF alfa (TNF α), TNF beta (TNF β), CD40 ligand (CD40L), Fas ligve (FasL), TNF-ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) dahil en önemli sitokinlerden bazılarını içerir. TNF α esas olarak makrofajlar tarafından üretilirken, TNF β esas olarak T lenfositleri tarafından üretilir (Chu, 2013).

Saflaştırılmış TNF veya TNF ifade eden hücre hatlarının kullanıldığı deneyler, yerleşik tümör modellerinde TNF'nin tümör nekrozunu indükleyebileceğini gösterir.

Genel olarak, mevcut deneysel veriler, TNF'nin kötü huylu hücrelere karşı en zayıf sitotoksik veya sitostatik olduğunu ve TNF ile indüklenen apoptozun ilerlemesi için aşağı akış TNF sinyal faktörlerini baskılayan metabolik inhibitörlerin varlığının gerekli olduğunu göstermektedir. TNFR1 ve TNFR2, çok sayıda hücre içi sinyal yoluna bağlanır. Dengeli olarak, TNF, NF- κ B, RNA sentezi veya protein sentezinin inhibisyonu eşlik etmediği sürece zayıf bir apoptoz indükleyicisidir. Daha sınırlı bir hücre alt kümesinde ifade edilen TNFR2, hücre hayatta kalma, çoğalması ve göçünde yer alan yolları aktive eder ve düzenleyici T hücre fonksiyonunu modüle eder. Transmembran TNF'nin multimerizasyonu (yüzeyde eksprese edilen reseptörlerin birleşmesinden veya iki değerlikli antikorlara bağlanmanın neden olduğu) ayrıca TNF eksprese eden hücrelerin hücre içi sinyallemesini (yani ters sinyalleme) indükleyerek apoptoza, hücre aktivasyonuna veya sitokin baskılanmasına yol açabilir (Lebrec vd., 2015).

Tablo 2.1. İnsan ölüm reseptörleri ve bunlara karşılık gelen ligandları

Ölüm reseptörleri	Ölüm ligandları
TNF reseptör 1 (TNFR1)	TNF
CD95 (ayrıca Fas ve APO-1 olarak bilinir)	CD95-ligand (CD95-L, ayrıca Fas-L olarak bilinir)
Ölüm reseptörü 3 (DR3)	TLIA
TNF-bağımlı apoptoz indükleyici ligve reseptör 1 (TRAIL-R1, ayrıca DR4 olarak bilinir)	TRAIL (ayrıca Apo2-L olarak bilinir)
TNF-bağımlı apoptoz indükleyici ligve reseptör 1 (TRAIL-R2, ayrıca DR4 olarak bilinir)	TRAIL (ayrıca Apo2-L olarak bilinir)

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.2. Kullanılan Bilgisayar Programları

Tablo 3.1. *Kullanılan bilgisayar programları*

İsim	Şirket
Chemdraw Ultra 12.0	PerkinElmer, Amerika Birleşik Devletleri
Mendeley Desktop	Elsevier, Hollanda
Graphpad Prism 7	Amerika Birleşik Devletleri

3.1.3. Ekipmanlar

Tablo 3.2. *Kullanılan ekipmanlar*

İsim	Şirket
Soğutmalı santrifüj	Hettich Lab Teknoloji, Almanya
Çok modlu mikropilaka okuyucu HTX Synergy	BioTek, Amerika Birleşik Devletleri
AFL	
Telstar Bio II Adevance Laminar Kabin	Thermo, Kanada
Etüv	Heraeus, Almanya
Otoklav	Eryiğit A.Ş., Türkiye
Doğrusal çalkalayıcı	Heidolph, Almanya
Otomatik mikropipetler	Thermo, FinnPet, Kanada
Pipetör	Starlab, Almanya
Vorteks	Heidolph, Almanya
Steril CO ₂ inkübatörü	Panasonic, Japonya
Ters mikroskop	Leica, Almanya
Mr. Frosty	Nalgene, Amerika Birleşik Devletleri
-80 dondurucu	Nuaire, Amerika Birleşik Devletleri
Akış sitometri cihazı	Beckman Coulter CytoFLEX, Amerika Birleşik Devletleri
Distile su cihazı	Sartorius Stedim, Almanya
Erime Derecesi Cihazı: MP90 digital melting point apparatus	Mettler Toledo, Amerika Birleşik Devletleri
1H-NMR: Bruker 300 MHz FT-NMR	Bruker Bioscience, Amerika Birleşik Devletleri
Spektrometre	
13C-NMR: Bruker 75 MHz FT-NMR	Bruker Bioscience, Amerika Birleşik Devletleri
Spektrometre	
Kütle Spektrometresi (MS): Shimadzu LCMS-IT-TOF system	Shimadzu, Japonya
Elemental analiz Leco 932 CHNS cihazı	Leco, Amerika Birleşik Devletleri
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystem, Amerika Birleşik Devletleri

3.1.4. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri

Tablo 3.3. *Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeleri*

İsim	Şirket
10, 200, 1000 µl'lik mikropipet uçları	Axygen, Birleşik Krallık
25 ve 75 cm ² ' lik hücre kültür flakları	Greiner bio-one, Amerika Birleşik Devletleri
12 kuyucuklu 5 ml'lik rezervuarlar	Isolab, Almanya
15 ve 50 ml'lik falkon tüpleri	Isolab, Almanya
10 ml'lik steril enjektör	Hayat, Türkiye
6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakaları	TPP, İsviçre
Flow tüpleri	Isolab, Almanya
25 µ fitreler	Isolab, Almanya
1,5 ml'lik ependorf tüpler	Isolab, Almanya
Thoma lamı	Isolab, Almanya
A549 hücre hattı	ATCC, Amerika Birleşik Devletleri
L-929 hücre hattı	ATCC, Amerika Birleşik Devletleri
CCD-19 lu hücre hattı	ATCC, Amerika Birleşik Devletleri
MTT boyası (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide %98)	Alfa Aesar, Almanya
Fosfat tamponlu salin (PBS)	Sigma-Aldrich, Almanya
Fetal sıgır serumu (FBS)	PAN, Almanya
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, Almanya
Penisilin-streptomisin çözeltisi	10.000 U/mL Penisilin / 10 mg/ml Streptomisin, PAN, Almanya
Cis-Diamindikloroplatinum(II)	Sigma Aldrich, Amerika
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Almanya
Tripsin-EDTA çözeltisi	PAN, Almanya
RPMI 1640 medium	Sigma-Aldrich, Almanya
Etil alkol	Merck, Almanya
Lamel	Isolab, Almanya

3.1.5. Kullanılan ticari kitler

Tablo 3.4. *Kullanılan ticari kitler*

İsmi	Şirket
Annexin V-FITC/PI apoptoz tayin kiti 1	BD Biosciences, Amerika Birleşik Devletleri
PE aktif kaspaz-3 tayin kiti	BD Biosciences, Amerika Birleşik Devletleri
Mitoscreen (JC-1) mitokondriyal membran potansiyeli tayin kiti	BD Biosciences, Amerika Birleşik Devletleri
Cell Cycle Dna içeriği kiti	BD Biosciences, Amerika Birleşik Devletleri

3.2. Metodlar

3.2.1. 2-Hidrazinotiyazol türevlerinin genel sentez yöntemi

4-(Benziloksi)benzaldehitin genel sentez yöntemi (1)

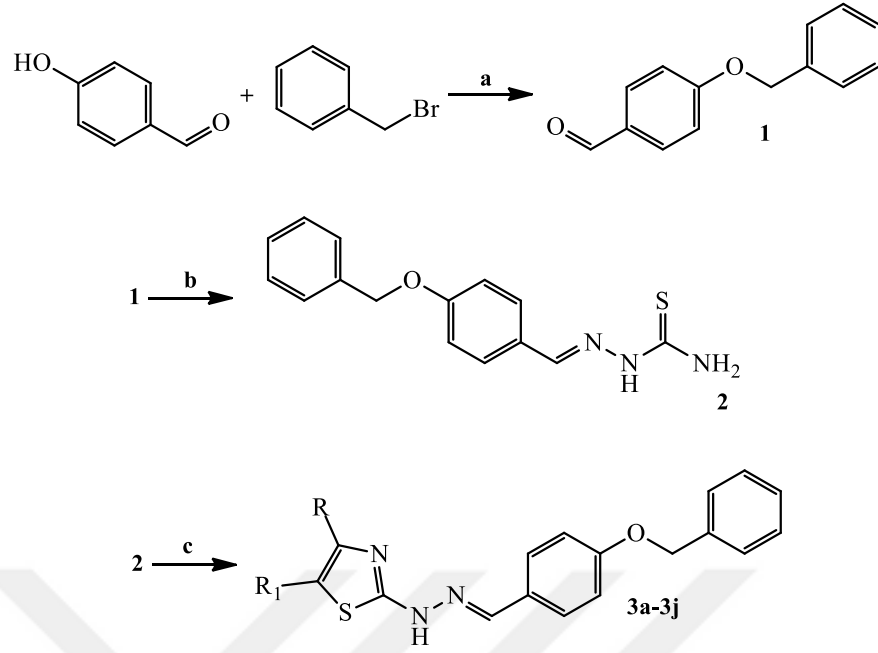
4-Hidroksibenzaldehit (0,04 mol, 5,0 g) ve benzil bromür (0,049 mol, 5,9 mL), 250 mL dimetilformamit içerisinde potasyum karbonat (0,04 mol, 5,66 g) katalizörlüğünde 3 saat kaynatıldı. Reaksiyonun tamamlanması ince tabaka kromatografisi (İTK) ile kontrol edildi. Reaksiyon tamamlanmış ise reaksiyon karışımı buzlu suya dökülerek hedeflenen maddenin çökmesi sağlandı. Çöken madde süzülüp suyla yıkandı. Kurutulduktan sonra etanolden kristallendirildi.

2-(4-(Benziloksi)benziliden)hidrazinkarbotiyoamit genel sentez yöntemi (2)

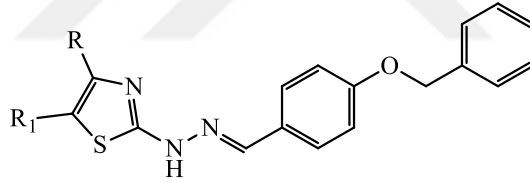
4-(Benziloksi)benzaldehit (0,03 mol, 6,36 g) ve tiyosemikarbazit (0,03 mol, 2,73 g) etanol içerisinde 2 saat kaynatıldı. Reaksiyonun kontrolü İTK ile yapıldı. Çöken kısım süzülerek alındı ve alkolle yıkandı.

2-(2-(4-(Benziloksi)benziliden)hidrazinil)tiyazol türevlerinin sentezi (3a-3j)

2-(4-(Benziloksi)benziliden)hidrazinkarbotiyoamit (0,001 mol, 0,3g) ve eşdeğer orvea α -haloketon türevleri (0,001 mol) 5 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyonun kontrolü İTK ile yapıldı. Çöken kısım süzülerek alındı. Sonuç ürünler alkolden kristalize edildi.



Şekil 3.1. 2-Hidrazinotiyazol türevi bileşiklerin genel sentez yöntemi. Reaksiyon koşulları: **a.** DMF, K_2CO_3 , 300 °C, 3 saat. **b.** Tiyosemikarbazit, EtOH, 200 °C, 2 saat. **c.** α -haloketon türevleri, EtOH, oda sıcaklığı, 5 saat.



Şekil 3.2. Sonuç bileşiklerinin sentez şeması

3.2.1.1. 2-Hidrazinotiyazol bileşiklerine ait spektroskopik verilerin değerlendirilmesi

2-(2-(4-(Benziloksi)benziliden)hidrazinil)-4-(4-nitrofenil)tiyazol (3a)

E.n. 227-228°C, 1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 5,15 (s, 2H, CH_2), 7,06-7,10 (m, 2H, Ar-H), 7,34-7,48 (m, 5H, Ar-H), 761 (dd, $J_1=2,77$ Hz, $J_2=8,85$ Hz, 2H, Ar-H), 7,70 (s, H, Ar-H), 8,01 (s, H, $N=CH$), 8,08-8,12 (m, 2H, Ar-H), 8,25-8,29 (m, 2H, Ar-H), 12,16 (brs, H, NH).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 69,78 (CH_2), 108,78, 115,66, 124,59, 123,77, 127,52, 128,26, 128,36, 128,93, 137,23, 141,17, 142,22, 146,62, 148,97, 159,88, 169,20.

% Elementel analiz : C₂₃H₁₈N₄O₃S için
Hesaplanan : C, 64,17; H, 4,21; N, 13,01;
Bulunan : C, 64,20; H, 4,23; N, 12,99.

HRMS (m/z): [M+1]⁺

Hesaplanan : 431,1172

Bulunan : 431,1183

2-(2-(4-(Benziloksi)benziliden)hidrazinil)-4-(4-florofenil)tiyazol (3b)

E. n. 206-207°C, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 5,14 (s, 2H, CH₂), 7,06-7,09 (m, 2H, Ar-H), 7,23-7,28 (m, 3H, Ar-H), 7,34-7,47 (m, 5H, Ar-H), 7,60 (dd, *J*₁=2,69 Hz, *J*₂=8,84 Hz, 2H, Ar-H), 7,86-7,91 (m, 2H, Ar-H), 7,99 (s, H, N=CH), 12,05 (brs, H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 69,77 (CH₂), 103,59, 115,76, 116,05, 127,65, 127,88 ve 127,99, 128,26, 128,3, 131,81, 137,24, 141,75, 149,89, 159,78, 160,42, 163,65, 168,89.

% Elemental Analiz : C₂₃H₁₈FN₃OS için

Hesaplanan : C, 68,47; H, 4,50; N, 10,41;

Bulunan : C, 68,44; H, 4,52; N, 10,42.

HRMS (m/z): [M+1]⁺

Hesaplanan : 404,1227

Bulunan : 404,1238

2-(2-(4-(Benziloksi)benziliden)hidrazinil)-4-(4-klorofenil)tiyazol (3c)

E. n. 213-214°C, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 5,14 (s, 2H, CH₂), 7,07 (d, *J*=8,51 Hz, 2H, Ar-H), 7,36-7,46 (m, 8H, Ar-H), 7,59 (d, 2H, Ar-H), 7,86 (d, *J*=8,43 Hz, 2H, Ar-H), 7,97 (s, H, N=CH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 74,52 (CH₂), 109,42, 120,40, 132,41, 133,02, 133,68, 133,84, 137,08, 138,78, 141,98, 146,56, 164,55, 173,67.

% Elemental Analiz : C₂₃H₁₈ClN₃OS için

Hesaplanan : C, 65,78; H, 4,32; N, 10,01;

Bulunan : C, 65,82; H, 4,31; N, 10,03.

HRMS (m/z) : [M+1]⁺

Hesaplanan : 420,0932;

Bulunan : 420,0932.

2-(2-(4-(Benziloksi)benziliden)hidrazinil)-4-(4-siyanofenil)tiyazol (3d)

E. n. 208-210°C, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 5,13 (s, 2H, CH₂), 7,04-7,08 (m, 2H, Ar-H), 7,34-7,44 (m, 5H, Ar-H), 7,56-7,61 (m, 3H, Ar-H), 7,82-7,87 (m, 2H, Ar-H), 7,97-8,03 (m, 3H, Ar-H ve N=CH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 74,52 (CH₂), 112,54, 114,77, 120,38, 124,23, 131,33, 133,00, 133,67, 137,89, 141,95, 143,82, 147,06, 153,70, 164,62, 173,84.

% Elemental Analiz : C₂₄H₁₈N₄OS için

Hesaplanan : C, 70,22; H, 4,42; N, 13,65

Bulunan : C, 70,20; H, 4,43; N, 13,67

HRMS (m/z) : [M+1]⁺

Hesaplanan : 411,1274

Bulunan : 411,1287

2-(2-(4-(Benziloksi)benziliden)hidrazinil)-4-feniltiyazol (3e)

E. n. 203-204°C, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 5,15 (s, 2H, CH₂), 7,05-7,11 (m, 2H, Ar-H), 7,24 (d, *J*=7.06 Hz, H, Ar-H), 7,29-7,38 (m, 4H, Ar-H), 7,41-7,48 (m, 4H, Ar-H), 7,60-7,64 (m, 2H, Ar-H), 7,84-7,87 (m, 2H, Ar-H), 8,03 (s, H, N=CH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 69,76 (CH₂), 103,69, 115,66, 126,04, 127,53, 128,26, 128,40, 128,94, 129,11, 134,68, 137,22, 142,32, 159,87, 168,80.

% Elemental Analiz : C₂₃H₁₉N₃OS için

Hesaplanan : C, 71,66; H, 4,97; N, 10,90;

Bulunan : C, 71,63; H, 4,95; N, 10,89.

HRMS (m/z) : [M+1]⁺

Hesaplanan : 386,1322;

Bulunan : 386,1331.

2-(2-(4-(Benziloksi)benziliden)hidrazinil)-4-(4-metilfenil)tiyazol (3f)

E. n. 191-192°C, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 2,33 (s, 3H, CH₃), 5,15 (s, 2H, CH₂), 7,05-7,11 (m, 3H, Ar-H), 7,23 (d, *J*=7.73 Hz, 2H, Ar-H), 7,34-7,49 (m, 6H, Ar-H), 7,59-64 (m, 2H, Ar-H), 7,74 (d, *J*=8,08 Hz, H, Ar-H), 8,04 (s, H, N=CH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 21,31 (CH₃), 69,77 (CH₂), 103,14, 115,65, 126,03, 127,47, 128,26, 128,41, 128,93, 129,37, 129,68, 131,76, 137,20, 137,56, 142,61, 159,91, 168,74.

% Elemental Analiz : C₂₄H₂₁N₃OS için

Hesaplanan : C, 72,15; H, 5,30; N, 10,52

Bulunan : C, 72,19; H, 5,29; N, 10,52

HRMS (m/z) : [M+1]⁺

Hesaplanan : 400,1478

Bulunan : 400,1479

2-(2-(4-(Benziloksi)benziliden)hidrazinil)-4-(4-metoksifenil)tiyazol (3g)

E. n. 154-155°C, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 3,79 (s, 3H, OCH₃), 5,15 (s, 2H, CH₂), 6,97 (d, *J*=8.87 Hz, H, Ar-H), 7,04-7,10 (m, 2H, Ar-H), 7,13 (s, H, Ar-H), 7,20-7,25 (m, H, Ar-H), 7,34-7,48 (m, 6H, Ar-H), 7,56-7,62 (m, 2H, Ar-H), 7,78 (d, *J*=8,79 Hz, H, Ar-H), 8,00 (s, H, N=CH), 12,12 (brs, H, Ar-H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 55,59 (OCH₃), 69,76 (CH₂), 101,74, 114,41, 115,64, 127,33, 128,27, 128,40, 128,93, 137,23, 141,83, 159,25, 159,78, 168,68.

% Elemental Analiz : C₂₄H₂₁N₃O₂S için

Hesaplanan : C, 69,37; H, 5,09; N, 10,11

Bulunan : C, 69,35; H, 5,12; N, 10,10.

HRMS (m/z) : [M+1]⁺

Hesaplanan : 416.1427

Bulunan : 416.1430

2-(2-(4-(Benziloksi)benziliden)hidrazinil)-4-(2-naftil)tiyazol (3h)

E. n. 176-177°C, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 5,16 (s, 2H, CH₂), 7,10 (d, *J*=8.81 Hz, H, Ar-H), 7,35-7,44 (m, 3H, Ar-H), 7,48-7,54 (m, 5H, Ar-H), 7,63 (d, *J*=8,78 Hz, 2H, Ar-H), 7,90-7,96 (m, 3H, Ar-H), 8,00-8,03 (m, 3H, Ar-H), 8,39 (s, H, N=CH), 12,12 (brs, H, Ar-H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 69,78 (CH₂), 104.69, 104.74, 115.66, 124.40, 126.48, 126.92, 127.64, 128.27, 128.40, 128.57, 128.94, 132.52, 132.88, 133.61, 137.24, 141.86, 150.71, 159.81, 168.87.

% Elemental Analiz : C₂₇H₂₁N₃OS için

Hesaplanan : C, 74,46; H, 4,86; N, 9,65;

Bulunan : C, 74,42; H, 4,83; N, 9,67

HRMS (m/z) : [M+1]⁺

Hesaplanan : 436,1478

Bulunan : 436,1480

Etil 2-(2-(2-(4-(benziloksi)benziliden)hidrazinil)tiyazol-4-il)asetat (3i)

E. n. 168-169°C, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 1,22 (t, *J*=7,11 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 3,78 (s, 2H, CH₂), 4,12 (q, *J*₁=7,11 Hz, *J*₂=14,16 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5,17 (s, 2H, CH₂), 6,87 (s, H, Ar-H), 7,12 (d, *J*=8,73 Hz, 2H, Ar-H), 7,35-7,49 (m, 5H, Ar-H), 7,72 (d, *J*=8.35 Hz, 2H, Ar-H), 8,29 (s, H, N=CH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 14,53 (CH₂CH₃), 63,48 (CH₂CH₃), 69,84 (CH₂), 72.99 (O=C-CH₂-tiyazol), 107,18, 115,69, 126,59, 128,44, 128,94, 129,31, 137,08, 160,65, 169,61.

% Elemental Analiz : C₂₁H₂₁N₃O₃S için

Hesaplanan : C, 63,78; H, 5,35; N, 10,63

Bulunan : C, 63,81; H, 5,33; N, 10,64

HRMS (m/z) : [M+1]⁺

Hesaplanan : 396,1376

Bulunan : 396,1382

Etil 2-(2-(4-(benziloksi)benziliden)hidrazinil)-4-metiltiyazol-5-karbosilat (3j)

E. n. 174-175°C, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 1,27 (t, *J*=7,7. Hz, 3H, OCH₂CH₃), 2,48 (s, 3H, CH₃), 4,20 (q, *J*₁=7,08 Hz, *J*₂=14,16 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 5,16 (s, 2H, CH₂), 7,09 (d, *J*=8,85 Hz, 2H, Ar-H), 7,35-7,49 (m, 5H, Ar-H), 7,64 (d, *J*=8,84 Hz, 2H, Ar-H), 8,08 (s, H, N=CH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, ppm) δ 14,77 (CH₂CH₃), 17,41 (CH₃), 60,61 (CH₂CH₃), 69,78 (CH₂), 109,10, 115,66, 127,13, 128,27, 128,42, 128,82, 128,94, 137,17, 145,15, 160,26, 162,33, 169,42.

% Elemental Analiz : C₂₁H₂₁N₃O₃S için

Hesaplanan : C, 63,78; H, 5,35; N, 10,63

Bulunan : C, 63,77; H, 5,36; N, 10,64.

HRMS (m/z) : [M+1]⁺

Hesaplanan : 396,137

Bulunan : 396,1371.

Tablo 3.5. Kullanılan bileşiklerin kodu

Lab kodu	Tezde/Makalede Kodu	R	R ₁
GBSO-1	3a.	4-Nitrofenil	H
GBSO-2	3b.	4-Florofenil	H
GBSO-3	3c.	4-Klorofenil	H
GBSO-4	3d.	4-Siyanofenil	H
GBSO-5	3e.	Fenil	H
GBSO-6	3f.	4-Metilfenil	H
GBSO-7	3g.	4-Metoksifenil	H
GBSO-8	3h.	2-Naftil	H
GBSO-9	3i.	-CH ₂ COOEt	H
GBSO-10	3j.	-CH ₃	-COOEt

3.3. Kullanılan Maddelerin Hazırlanması

3.3.1. Sentez bileşiklerinin hazırlanması

Bileşiklerin tartımı, stok çözeltinin konsantrasyonu 40 mg/ml olacak şekilde hassas terazide de yapıldı ve 500 µl DMSO (dimetilsülfoksit) içinde çözdürüldü. Bu stoklardan sitotoksisite testinde kullanılmak üzere 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125, 3,9062, 1,9535, 0,9765 ve 0,4882 µg/ml konsantrasyonları seyreltme dilüsyonu yapılarak hazırlandı. Konsantrasyonlardaki en yüksek DMSO oranı %0,1 olarak kullanıldı.

3.3.2. Sisplatin Hazırlanması

Bilinen bir kemoterapi ilacı olan sisplatin deneylerde pozitif kontrol olarak kullanıldı. Deneyler için 20 mg tartılarak hazırlandı ve 500 µl DMSO içinde çözdürülerek ana stok çözelti hazırlandı. Bu stoklardan sito-toksisite testinde kullanılmak üzere 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125, 3,9062, 1,9535, 0,9765 ve 0,4882 µg/ml konsantrasyonları seyreltme dilüsyonu yapılarak hazırlandı. Konsantrasyonlardaki en yüksek DMSO oranı %0,1 olarak kullanıldı.

3.3.3. Çalışmalarda kullanılan hücreler

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı (A549-ATCC® CCL-185™), Normal fare fibroblast hücre hattı (L-929 ATCC® CCL-1™) kullanıldı. %10 fetal sıgır serumu, %1 penisillin/streptomisin, %1 L-glutamin ve %1 amfoterisin-B içeren RPMI-1640 besiyerinde, %5 CO₂ inkübatörde, %95 bağıl nem' de 37°C' de kültür ortamında çoğaltıldı. Kültür kabı %70 oranında hücre yoğunluğuna ulaştığında (~ 2-3 gün) alt kültürlerle ayrılarak büyümesi sağlandı.

3.4. Hücrelerin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Deneylere Hazırlık

3.4.1. Kullanılan materyallerin sterilizasyonu

Deneyler steril ve tek kullanımlık malzemeler ile yapıldı. Cam ve metal olan malzemelerin sterilizasyonu kapak kısımları tamamen alimünyum folyo ile kaplanacak şekilde kuru hava sterilizatöründe 200 °C de 2 saat bekletilerek, sıvı olanlar ise 121 °C

1,5 atm basınç altında 20 dakika boyunca otoklavda sterilize edildi. Otoklavlanamayan sıvılar için ise 0,25 µ'luk filtreler kullanıldı.

3.4.2. Hücrelerin stoklanması ve pasajlanması

Hücreler (A549, L929) gerektiğinde kullanılmak üzere metabolik aktivitelerinin en aza indiği -196 °C de stoklandı. İlk olarak kullanılan media ortamı uzaklaştırıldı, sonrasında PBS ile yıkandı ve tripsin ile hücreler yüzeyden kaldırıldı ve santrifüj edildi. 2 ml'lik viallere hücre yoğunluğu 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde aktarıldı. Hücreler hızla donmaya başladığında artan ani ozmotik basınçtan hücreleri korumak için kriyoprotektif ajan olan DMSO 100 µl olarak viallere eklendi. Bir gece Mr.Frosty içerisinde -86 °C de bekletildi ve ertesi gün sıvı azot tankına (-196 °C) alındı.

Hücreler gerekli olduklarında sıvı azot tankından çıkarılarak hızlıca çözündürülüp 1200 rpm de 4 dakika santrifüj edilerek DMSO dan arındıldı. Sonrasında flasklara alınıp inkübatöre koyuldu 2-3 güne besi yeri ortamı yenilendi. Flasktaki hücre yoğunluğu %70'e gelince alt kültürlerle ayrıldı.

3.4.3. Hücre Sayımı

Deneylerden önce hücreler thoma lamında sayılarak kullanıldı. Öncelikle hücreleri kültüre ettiğimiz flask 1x PBS ile yıkandı. Kültür ortamına, hücrelerin birbirleriyle ve flaskın yüzeyiyle olan bağlantılarını koparmak için 1000 µl tripsin eklendi ve inkübatörde 3-4 dakika beklendi. Sonrasında tripsini inhibe etmek için eklediğimiz tripsin miktarının 4,5 katı kadar media eklenip santrifüj tüpüne alındı 1200 rpm de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant döküldü ve kalan pellete 1 ml media eklenip pipetaj yapılarak hücrelerin eşit şekilde karışması sağlandı. Thoma lamına 10 µl alınarak belirlenen alandaki karelere ne kadar hücre düştüğü mikroskopta tespit edildi ve aşağıdaki formüle (3.1) göre hesaplama yapıldı.

$$\frac{\text{Karelerde bulunan ortalama hücre miktarı} \times \text{Belirtilen alanın hacmi} \times \text{Toplam kare miktarı}}{1 \text{ ml de istenen hücre miktarı}}$$

(3.1)

3.5. Sitotoksikite Belirleme Testi

3.5.1. Mtt metodu ile hücrelerin sitotoksikite analizinin yapılması

Hücre kültüründeki hücreler için proliferasyon ve canlılık deneyleri, büyük oranda renksiz tetrazolyum tuzlarının renkli formazanlara indirgenmesine dayanır. MTT, in vitro hücre canlılığını, sitotoksikitesini ve proliferasyonu belirlemek amacıyla çalışmaları için oldukça yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisidir. MTT analizi, plakadaki kuyucuk başına canlı hücre sayısı ile hücre içi dehidrojenaz enzimleri tarafından üretilen formazan miktarı arasında doğrusal bir ilişki olduğu gerçeğine dayanmaktadır. MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2)-2,-5diphenyltetrazolium bromide) boyasında bulunan tetrazolyum halkası, metabolik olarak aktif hücrelerden gelen dehidrojenazlar tarafından canlı hücrelerin mitokondrilerinde formazan kristallerine indirgenir ve mor renkli bir renk değişimi meydana gelir. Bu formazon kristalleri uygun bir çözücü de çözünür (Stockert vd., 2018). Spektrofotometrik plaka okuyucuda okunur. Absorbans değerlerine göre canlılık hakkında yorum yapılabilir.

3.5.1.1. Yöntemin uygulanması

Hücreler 96'lık plakalara her kuyucukta 1×10^5 kadar hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün besi yeri değiştirilerek kullanacağımız sentez maddelerin konsantrasyonları ile hücreler muamele edildi. 24 ve 48 saat olacak şekilde inkübasyona bırakıldı. Belirtilen sürelerin sonunda plakadaki hacmin %10'u kadar MTT boyası eklendi. 2-4 saat arasında inkübasyona bırakıldı. Sonrasında besi yeri uzaklaştırıldı ve oluşan formazan kristallerini çözmek için 100 µl DMSO eklendi. Plakalar yaklaşık 15 dk karanlık bir ortam oluşturularak lineer çalkalayıcı kullanılarak süspanse edildi. Sonrasında 540 nm dalga boyunda, spektrofotometrik mikroparka okuyucu da okuması yapıldı.

Okunan absorbans değerleri canlılık değerleri olarak kabul edildi. Hücreslerin %50 sinin inhibisyonunu sağlayan konsantrasyon değeri olan IC₅₀ Graphpad Prism 7 yazılımı kullanılarak hesaplandı.

3.6. Akış Sitometri Cihazı ile Yapılan Deneyler

Çalışma prensibi yüzeyde bulunan hücre dışı molekülleri veya hücre içindeki hücre içi molekülleri hedefleyen boyalardan veya monoklonal antikorlardan türetilen, araştırılan hücrelerin ışık saçma özelliklerine bağlıdır. Bu yaklaşım, akış sitometrisini kısa sürede karmaşık popülasyonların ayrıntılı analizi için güçlü bir araç haline getirir (Adan vd., 2017).

3.6.1. JC-1 boyama ile hücrelerin mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi

Apoptoz, bir hücrenin ölümüne neden olan genetik olayları içeren hücresel bir süreçtir. Mitokondride birkaç önemli olay meydana gelir ve bunlardan en önemlisi mitokondriyal transmembran potansiyelinin ($\Delta\Psi$) kaybıdır. Mitokondriyal membran potansiyelinin yönü (organelin iç kısmı elektronegatif olmak üzere), katyonların içe doğru taşınmasını ve anyonların dışa taşınmasını sağlayacak, böylece mitokondride katyon birikimini teşvik edecek şekildedir. Bu elektrokimyasal gradyan, ATP'nin sentezini yönlendirir. Bununla birlikte, apoptoz sırasında, mitokondriyal geçirgenlik gözeneklerinin açılması ve elektrokimyasal gradyan kaybı ilişkili olduğundan $\Delta\Psi$ azalır. Bu nedenle $\Delta\Psi$, mitokondri hücrelerinin apoptotik sürecine doğal olarak dahil olduğundan hücre sağlığının bir göstergesi olarak kullanılabilen mitokondriyal fonksiyonun temel bir parametresidir. 5,5,6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazoilkarbosiyanin iyodür (JC-1) boyasının kullanıldığı teknik, birden çok hücre tipinde sağlıklı ve apoptotik hücrelerde $\Delta\Psi$ 'yi tespit etmek için geliştirilmiştir (Sivvezade vd., 2019).

3.6.1.1. Yöntemin uygulanması

Kit protokolüne göre adımlar uygulandı. Hücre sayısı 1×10^6 olacak şekilde 6'lı plakalara ekim yapıldı ve 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Hücreler hesaplanan IC₅₀ dozları ile 24 ve 48 saat muamele edildi. Bu sürenin sonunda plakadaki hücreler

kaldırılarak flow tüplerine koyuldu 1200 rpm’de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant dikkatlice atıldı ve 1 ml soğuk 1x PBS ile yıkandı tekrar santrifüjlendi bu işlem iki kere yapıldı. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı pellete 1x assay buffer ve JC-1 stok solüsyonu ile hazırlanan çalışma solüsyonundan 0,5 ml eklendi, yavaşça pipetaj uygulandı ve 15 dk inkübatörde bekletildi. Bu süre sonunda önce 2 ml sonra 1 ml assay buffer ile santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. En son 0,5 ml assay buffer eklendi ve akım sitometrisinde analizi gerçekleştirildi.

3.6.2. Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi

Sağlıklı hücrelerin yüzeyi, plazma zarının iç ve dış yaprakçıklarına asimetrik olarak dağılmış lipidlerden oluşur. Bu lipidlerden biri olan fosfatidilserin (PS) normal olarak plazma zarının iç yaprakçığı ile sınırlıdır ve bu nedenle sadece hücre sitoplazmasına maruz kalır. Bununla birlikte, apoptoz sırasında lipid asimetrisi kaybolur ve PS, plazma membranının dış yaprakçığında açığa çıkar. 36 kDa’lık bir kalsiyum bağlayıcı protein olan Annexin V, PS’ye bağlanır; bu nedenle, floresan etiketli Annexin V, apoptotik hücrelerin dışında maruz kalan PS’yi saptamak için kullanılabilir. Annexin V ayrıca nekrotik hücreleri de boyayabilir çünkü bu hücreler Annexin V’in tüm plazma membranına erişmesine izin veren parçalanmış membranlara sahiptir (Crowley vd., 2016). Propidyum iyodür (PI), ölü hücreler tarafından hapsedilen spesifik olmayan bir DNA ara katmanı maddesidir. PI boyamanın, apoptotik hücreleri nekrotik ve canlı hücrelerden, DNA fragmentasyonundan bağımsız bir şekilde ayırt edebildiği de gösterilmiştir (Eray vd., 2001).

3.6.2.1. Yöntemin uygulanması

Kit protokolüne göre adımlar uygulandı. Hücre sayısı 1×10^6 olacak şekilde 6’lı plakalara ekim yapıldı ve 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Hücreler hesaplanan IC_{50} dozları ile 24 ve 48 saat muamele edildi. Bu sürenin sonunda plakadaki hücreler kaldırılarak flow tüplerine koyuldu 1200 rpm de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant dikkatlice atıldı ve 1 ml soğuk 1x PBS ile yıkandı tekrar santrifüjlendi bu işlem iki kere yapıldı. Santrifüjden sonra süpernatant atılarak her flow tüpüne 1x olarak hazırlanan assay bufferdan 100 μ l koyuldu ve yavaşça pipetlendi. Sonra 5 μ l

Annexin-V ve 5 µl PI boya lar ı eklendi ve karanlıkta 15 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda 400 µl assay buffer eklenip analiz edildi.

3.6.3. Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkilerin belirlenmesi

Kaspaz-3 efektör kaspazlardandır. Sitokrom c sitoplazmaya salınınca apoptozomu oluşturan ve kaspaz-9'u aktive eden Apaf-1'e bağlanabilir. Kaspaz-9 aktif olduktan sonra kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi doğrudan parçalayabilir ve aktive edebilir. Kaspaz-3'ün aktivasyonu, plazma membranında kabarcıklanma, kromatin yoğunlaşması, DNA bölünmesi ve plazma membranının hücre dışı tarafında fosfatidilserin açığa çıkmasına neden olur (Jiang vd., 2020).

3.6.3.1. Yöntemin uygulanması

Kit protokolüne göre adımlar uygulandı. Hücre sayısı 1×10^6 olacak şekilde 6'lı plakalara ekim yapıldı ve 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Hücreler hesaplanan IC_{50} dozları ile 24 saat muamele edildi. Bu sürenin sonunda plakadaki hücreler kaldırılarak flow tüplerine koyuldu 1200 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant dikkatlice atıldı ve 1 ml soğuk 1x PBS ile yıkandı tekrar santrifüjlendi bu işlem iki kere yapıldı. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve her tübe 500 µl Cytofix/Cytoperm solüsyonundan eklendi ve 20 dk boyunca tüpler buzda bekletildi. Bu sürenin sonunda tekrar santrifüj edildi. Süpernatant atılıp her tüpe 500 µl Permwash solüsyonu eklendi ve tekrar santrifüj edildi bu işlem iki kere tekrarlandı. 100 µl 1x Perm/Wash solüsyonu içerisine 20 µl antikor eklenerek hazırlanan çözelti tüplere eklendi ve hücreler 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda santrifüj edildi süpernatant atıldı ve 1 ml Permwash çözeltisinden eklenip tekrar santrifüj edildi. En son 0,5 ml Permwash eklendi ve analiz edildi.

3.6.4. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü dağılımını ve hücre çoğalmasını değerlendirmek, hücre büyümesi farklılaşması, yaşlanma ve apoptozu incelemek için önemlidir. Bu, anti-kanser ilaçlarının

terapötik etkinliklerinin değerlendirilmesinin yanı sıra, altta yatan temel mekanizmaları araştırmayı da mümkün kılar. Hücre döngüsü ilerlemesi sırasında, çoğalan hücreler, DNA sentezi, hücre bölünmesinin hazırlanması ve müteakip mitoz süreçleri için sırayla $G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M$ fazlarının bir geçişine maruz kalır. Belirli koşullarda hücreler dinlenme fazı denilen hücrenin bölünmediği $G0$ fazına da girebilir. Bu faza giren hücreler, minimum düzeyde hücre döngüsü mekanizmasına sahip olurlar ve hücre proliferasyonuna devam etmezler bunun yerine özel hücresel işlevleri sürdürler. Hücre döngüsünü analiz etmek için en basit ve en eski yöntem, hücresel DNA içeriğini tek bir zaman noktasında ölçmektir. Bu, üç farklı grup (yani, $G0/G1$, S ve $G2/M$ fazı) arasındaki hücre döngüsü durumunun anlık görüntüsünü gösterir. Fakat bu yöntem ayrıntılı hücre döngüsü durumunu anlamak için yeterli değildir çünkü DNA içeriği tek başına $G0$ fazındaki dinlenme durumunda olan hücreler ile $G1$ fazındaki hücreleri birbirinden ayırt edemez. Bunun için çeşitli boyalara ihtiyaç vardır (Kim ve Sederstrom, 2015).

3.6.4.1. Yöntemin uygulanması

Kit protokolüne göre adımlar uygulandı. Hücre sayısı 1×10^6 olacak şekilde 6'lı plakalara ekim yapıldı ve 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Hücreler hesaplanan IC_{50} dozları ile 24 saat muamele edildi. Bu sürenin sonunda plakadaki hücreler kaldırılarak flow tüplerine koyuldu 1200 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant dikkatlice atıldı ve 1 ml soğuk 1x PBS ile yıkandı tekrar santrifüjlendi bu işlem iki kere yapıldı. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve 250 µl solüsyon A (tripsin buffer) eklendi, tüp yavaşça el ile sallandı ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda tüpe 200 µl solüsyon B (tripsin inhibitörü, RNaz buffer) eklendi yavaşça el ile sallandı ve oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 200 µl soğuk, solüsyon C (PI boya solüsyonu) eklendi. 10 dk karanlıkta ve buz üzerinde inkübasyona bırakıldı, bu sürenin sonunda akış sitometri cihazında analizi gerçekleştirildi.

3.7. RT- PCR (Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi ile VEGF, AKT, Bcl-2, Bax, CYD1, cMYC, ERK, pERK ve Housekeeping gen ifadelerinin (ekspresyon) belirlenmesi

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), PCR reaksiyonunun her döngüsü sırasında amplifikasyon ürünlerinin üretimini izlemek için floresan raportör molekülleri kullanır. DNA da bulunan ve dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltma prensibine dayanır. Basitliği, özgüllüğü ve hassasiyeti, yüksek verim potansiyeli ve devam eden yeni kimyasalların tanıtımı, daha güvenilir enstrümantasyon ve geliştirilmiş protokoller ile birlikte, RNA seviyelerinin saptanması ve/veya karşılaştırılması için gerçek zamanlı RT-PCR'yi kıyaslama teknolojisi haline getirmiştir (Bustin vd., 2005).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), moleküler patolojideki en önemli tekniklerden biridir. PCR yardımı ile tekli veya hedef DNA parçaları birçok kat büyütülebilir

PCR'nin temel ilkeleri:

- Çift sarmal hedef DNA'ya, ısı uygulayarak tek sarmallı DNA'ya dönüştürülür.
- İki oligonükleotid ipliği veya primeri eklenir. Oligonükleotid ipliği, tamamlayıcı DNA ipliği ile 3' uçlarına bağlanır.
- DNA zinciri DNA polimeraz (Taq polimeraz) yardımıyla genişletilir. Bu polimeraz enzimi, DNA zincirinin uzamasını sağlamak için DNA'daki nükleotidleri birleştirir.
- Döngü tekrarlanır.

Spesifik gen, ısıya dayanıklı olan DNA polimeraz enzimi, bir çift DNA primeri, ve nükleotidler kullanılarak amplifiye edilir.

Adımlar:

- Denatürasyon: Isı, çift sarmallı DNA'yı tek sarmallı DNA'ya böler.
- Hibridizasyon: İleri ve ters DNA primeri, her ayrılmış DNA zincirinin 3' bölgesinde tamamlayıcı DNA zinciri ile bağlanır.

- Uzatma: Isıya dayanıklı DNA polimeraz (Taq polimeraz) enzimi nükleotitleri alır ve DNA zincirini 3' ucundan 5' yönüne uzatır.

Bu termal döngünün 25 kez tekrarlanması DNA ürününü artırır.

Denatürasyon, 94 °C: DNA'yı, tek iplikli hale getirmek için 94 °C'ye ısıtılır. Bu ısıtma işlemine her döngüde sadece 1-2 dakika verilir.

- Hibridizasyon, 54 °C: Sıcaklık hızla soğutulur. Bu düşürülmüş sıcaklıkta, primer, ilgili DNA bölgesi ile hızlı bir şekilde hibride edilir. Taq polimeraz ile reaksiyon, primer DNA şablon bölgesinde başlar.

- Uzatma, 72 °C.

- Tamamlayıcı nükleotidler, DNA'nın 3' - 5' ucundan eklenir. Her döngüde gen sayısında üstel bir artış olur. Her PCR'de en az 30 döngü denatürasyon-hibridizasyon-uzatma yapılır.

3.7.1. PCR'nin temel bileşenleri

Primerler: Primerler, aslında hedef DNA'nın her bir zincirinin 3' ucunun tamamlayıcı iplikleri olan yapay olarak yapılmış DNA zincirlerinin küçük parçalarıdır.

DNA polimeraz (Taq polimeraz): Taq polimeraz, yeni oluşan DNA zincirinin uzamasını sağlayan DNA polimeraz enzimidir. Hedef DNA'ya tamamlayıcı olan 3' ucundaki DNA zincirine sırasıyla yeni nükleotidler ekler. DNA'yı denatüre etmek için yüksek sıcaklık gereklidir ve normal DNA polimeraz bu sıcaklığa dayanamaz ve bozulur bu yüzden yüksek sıcaklıkta çalışabilme özelliğine sahip olan Taq polimeraz kullanılır.

Deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP'ler): dATP, dCTP, dGTP ve dTTP'dir. Bunlar, yeni oluşan DNA zincirlerinin temel elemanlarıdır. Taq polimeraz, bu dNTP'leri yakalayarak primerlerin terminal kısmına bağlar ve DNA zincirini uzatır.

Hedef DNA numuneden ekstrakte edilir.

- Tampon çözelti: Reaksiyonun oluşabilmesi için optimum kimyasal ortamı sağlar.

- Magnezyum klorür (MgCl₂): Taq polimerazın bir kofaktörü olarak aktivite gösterir.

3.7.2. RNA izolasyonu

PCR analizine geçmeden önce ilk başta RNA izolasyonu yapılmalıdır. Bu aşamalarda A549 hücre hattı kullanıldı.

Kontrol grubu olarak sentez bileşiklerle muamele edilmeyen A549 hücre hatlarının flaskları seçildi. Deney grubu olarak ise A549 hücre hatlarına MTT analizi sonuçlarına göre hesaplanan IC₅₀ dozları verildi ve 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. RNA izolasyonu kit protokolüne göre uygulandı.

Hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için Tripsin ile muamele edildi. Tripsini inhibe etmek için ise taze besiyeri kullanıldı ve 15 ml'lik tüplere konuldu ve santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı.

Hücreler mikrosantrifüj tüplerine sayıları 1×10^5 olacak şekilde bölündü. 4 °C'de 2000 rpm'de santrifüj edildi süpernatant uzaklaştırıldı ve 100 ul Script RT-PCR numune hazırlama reaktifi (sitoplazmik RNA'nın izolasyonu ve stabilizasyonu için liziz tamponu) eklendi. 30 saniye vortekslendi ve 15.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi sonrasında süpernatant dikkatlice toplandı.

PCR analizi Bio-Rad'ın IQTM SYBR® Green Supremix veya IQTM süpermix'inde verilen talimatlarına göre uygulandı. İşlemler için deney olarak kullandığımız hücre hatlarımıza uygun Housekeeping gen olan Beta-Aktin geni seçildi ve buna uygun primerler kullanıldı.

Kendi hücre hatlarımızın analiz sonucunda etkin RNA miktarını görmek için sonuçlar değerlendirilmiş ve IScript RT-qPCR numune hazırlama reaktifi tarafından işlenebilecek maksimum hücre konsantrasyonunu belirlemek için hücre konsantrasyonun loguna karşı Plot Ct değerleri olarak çizilmiştir.

3.7.3. Komplementer DNA (c-DNA) sentezi

RT-PCR analizi için hem kontrol grubu hem de deney gruplarının analizinde kullanılmak üzere, A549 hücrelerinden izole edilen RNA'lar kullanılarak komplementer DNA (c-DNA) sentez edilmiştir. c-DNA sentezi kit protokolüne uygun olarak yapıldı.

2 µl'lik nükleaz içermeyen (DNA/RNA içermeyen) tüpler kullanıldı.

Deney grubu olarak ayrılan tüplere 4 µl, 5x IScript reaksiyon karışımı, 1 µl IScript revers transkriptaz, 7,5 µl RNA şablonu (1 µg RNA) ve 7,5 µl nükleaz içermeyen su (DNA-RNA Free water) eklendi. Toplam hacim 20 µl'ye tamamlandı.

Sonrasında örnekler PCR cihazına yerleştirildi ve 25 °C'de 5 dakika, 42 °C'de 30 dakika, 85 °C'de 5 dakika ve 4 °C'de sonsuz olarak termal profil oluşturuldu ve PCR başlatıldı.

Analiz sonunda ise tüpler real time kantitatif PCR'da kullanılmak için 20 °C'de muhafaza edildi.

3.7.4. Supermix, Taqman prob ve primerlerin hazırlanması

Hazırlama ve seyreltme işlemleri, süpermix, Taqman problemleri ve primerlerinin protokollerine göre gerçekleştirildi. Supermix hazırlanırken liyofilize pelet şeklindeki tüpe 1 ml seyreltme çözeltisi eklendi ve vorteksenerek 2x süpermix çözeltisi hazırlandı. Kullanılincaya kadar -20 °C'de saklandı. RT-PCR sırasında, ekte bulunan primerler son konsantrasyonların 0,5 uM (pmol / ul) olacak şekilde ayarlanarak çalışma tamamlandı.

3.7.5. Real-time kantitatif PCR analizi

RT-PCR analizi Bio-RAD SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supemix kit kontrolüne göre gerçekleştirildi. Antikor aracılı sıcak başlangıç Sso7d füzyon polimeraz, dNTP'ler MgCl₂, SYBR® Green I boya arttırıcılar, stabilizatörler ve pasif referans boyaalarının bir karışımını içerir.

Tablo 3.6. RT-PCR bileşenleri

Bileşenler	20 µl reaksiyon başına hacim	Final konsantrasyonu
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supemix (2x)	10 µl	1x
Forward ve Reverse Primerler	1 µl	0,5 uM (pmol/ul)
DNA template	7,5 µl	100 ng-100 fg
Nükleaz-Free H ₂ O	1,5 µl	-
Total reaksiyon hacmi	20 µl	-

SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix ve diğ er dondurulmuş reaksiyon bileşenlerini oda sıcaklığına getirildi ve güzelce karıştırıldı, tüpün dibinde kalan c z ltleri toplamak için az bir süre santrifüjlendi, ışıktan korunarak muhafaza edildi ve buz üzerinde saklandı.

DNA şablonu hariç tüm gerekli bileşenleri eklendi, tüm qPCR reaksiyonları için (buz üzerinde) yeterli reaksiyon karışımı hazırlandı.

Homojenliği sağlamak ve her bir qPCR tüpüne veya bir qPCR plakasının kuyucuklarına eşit kısımlar dağıtmak için reaksiyon karışımı iyi bir şekilde karıştırıldı. Bütün bu işlemler sırasında pipetleme dikkatli ve iyi bir şekilde yapılmalıdır.

Tüplere veya kuyucuklara DNA numuneleri ve DNA-Free H₂O eklendi.

Kuyucukların olduğu plaka veya tüpler optik olarak geçirgen bir filmle kapatıldı ve reaksiyon bileşimlerinin karışmasını sağlamak için 30 saniye vortekslendi. Hava kabarcığı kalmaması ve reaksiyon karışımını kap altından toplamak için tüpler ve plaka döndürüldü.

qPCR tüplerini veya plakasını RT-PCR'a yükledikten sonra cihazın PCR protokolü başlatıldı veri analizi yapıldı.

4. SONUÇLAR VE BULGULAR

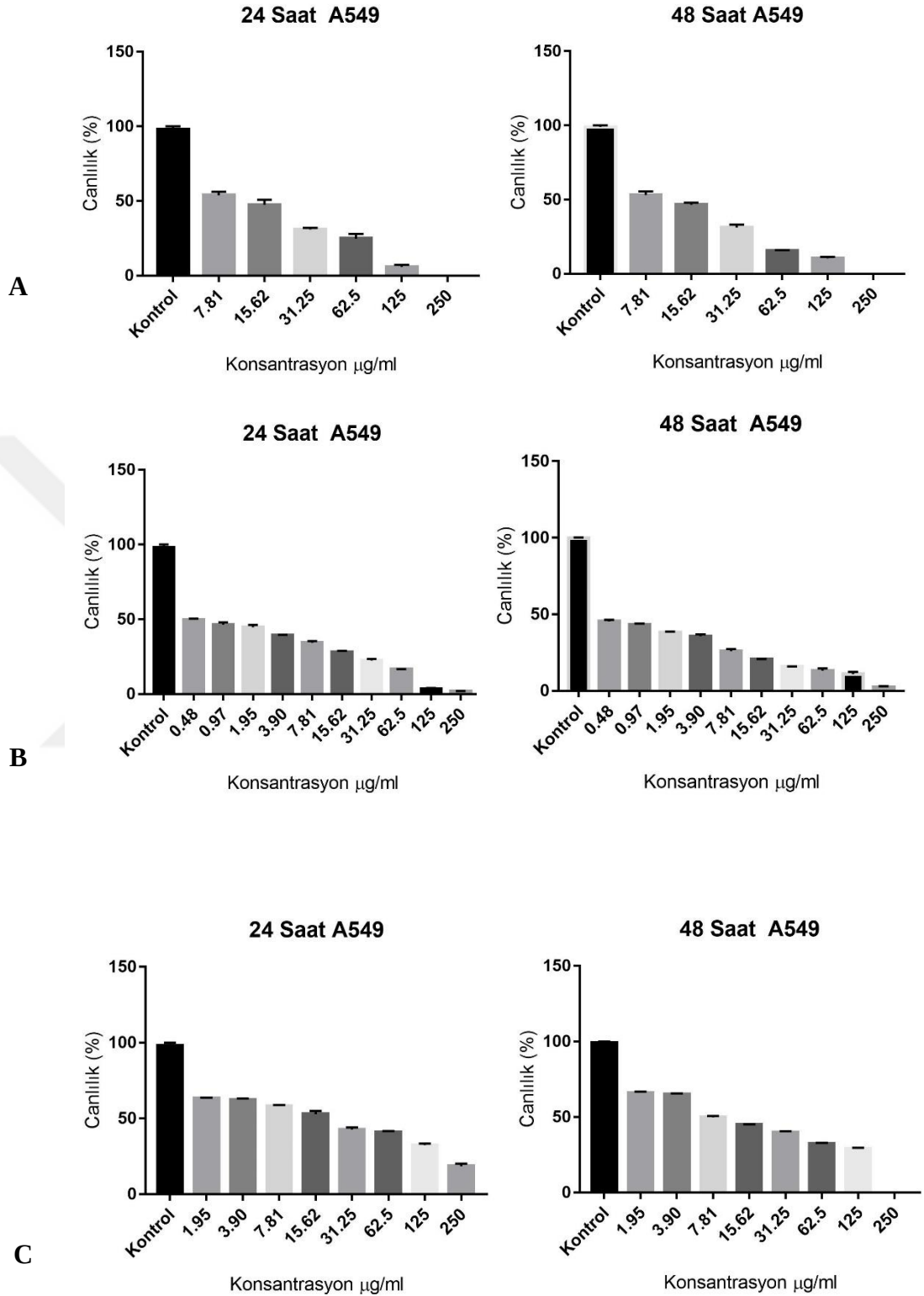
4.1. MTT Analizi Sonuçları

4.1.1. Sisplatin ve sentezlenmiş 2-hidrazinotiyazol türevli bileşiklerin A549 akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri

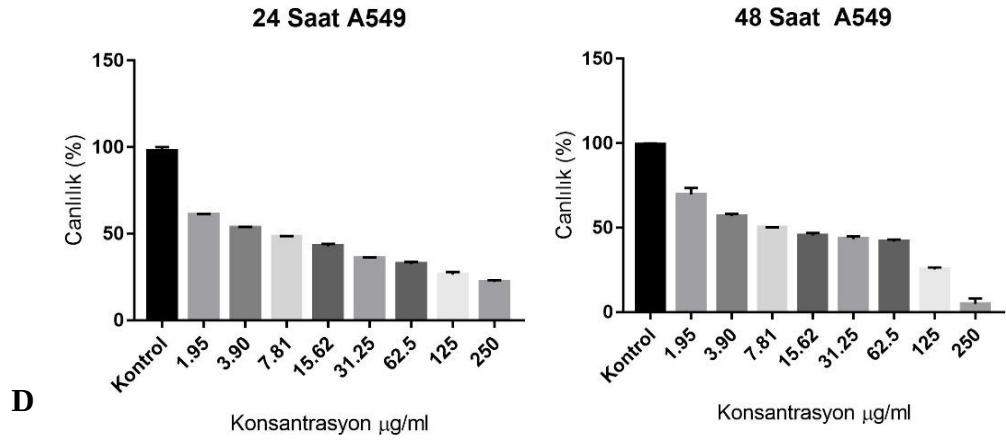
A549 hücre hattına, sisplatin ve sentezlenen bileşikler 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125, 3,90625, 1,953125, 0,97656 ve 0,48828 µg/ml konsantrasyonları ile muamele edildikten sonra 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler MTT boyası ile boyandı ve 3 saatlik inkübasyona bırakıldı bu sürenin sonunda ELISA Reader cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapıldı. Hesaplamalar kontrol canlılığını %100 kabul ederek ve her kuyucuk için ayrı ayrı yapıldı. Sisplatin ve sentez bileşiklerin 24 ve 48 saatlik etkilerinin IC₅₀ ve IC_{50/2} değerleri Graphpad Prism 7 programı kullanılarak hesaplandı. Deneyler 3'er kuyucuklu ve tekrarlı olarak yapıldı, pozitif kontrol olarak sisplatin kullanıldı. Tablo 4.1.'de MTT analiz sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 4.1. *Sisplatin ve sentez bileşiklerinin A549 hücre hattındaki 24. Ve 48. saatlerdeki IC₅₀ konsantrasyon değerleri.*

Uygulanan bileşik ve pozitif kontrol	A549 hücre hattı 24. saat IC ₅₀ değerleri	A549 hücre hattı 48. saat IC ₅₀ değerleri
Sisplatin	11,56±0,38 µg/ml	7,03±0,41 µg/ml
Bileşik-1	11,64±0,30 µg/ml	9,87±0,24 µg/ml
Bileşik-2	0,66±0,33 µg/ml	1,71±0,41 µg/ml
Bileşik-3	8,99±0,31 µg/ml	1,34±0,33 µg/ml
Bileşik-4	15±0,52 µg/ml	10,2±0,43 µg/ml
Bileşik-5	6,2±0,46 µg/ml	8,66±0,3 µg/ml
Bileşik-6	>250 µg/ml	>250 µg/ml
Bileşik-7	1,62±0,37 µg/ml	1,48±0,34 µg/ml
Bileşik-8	1,32±0,42 µg/ml	0,87±0,39 µg/ml
Bileşik-9	2,85±0,41 µg/ml	1,14±0,37 µg/ml
Bileşik-10	>250 µg/ml	>250 µg/ml



Şekil 4.1. A) Bileşik 1, B) Bileşik 2, C) Bileşik 4'ün MTT testi kullanılarak 24 saat ve 48 saat sonra A549 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri. Canlılık verileri ortalama $\pm$ SD'dir (her zaman noktasında ve konsantrasyonda $n = 3$). Bileşik 1, 2 ve 4 tarafından A549 hücrelerinde hücre proliferasyonu inhibisyonu gözlemlendi. Tek yönlü Anova ile $P < 0.0001$.



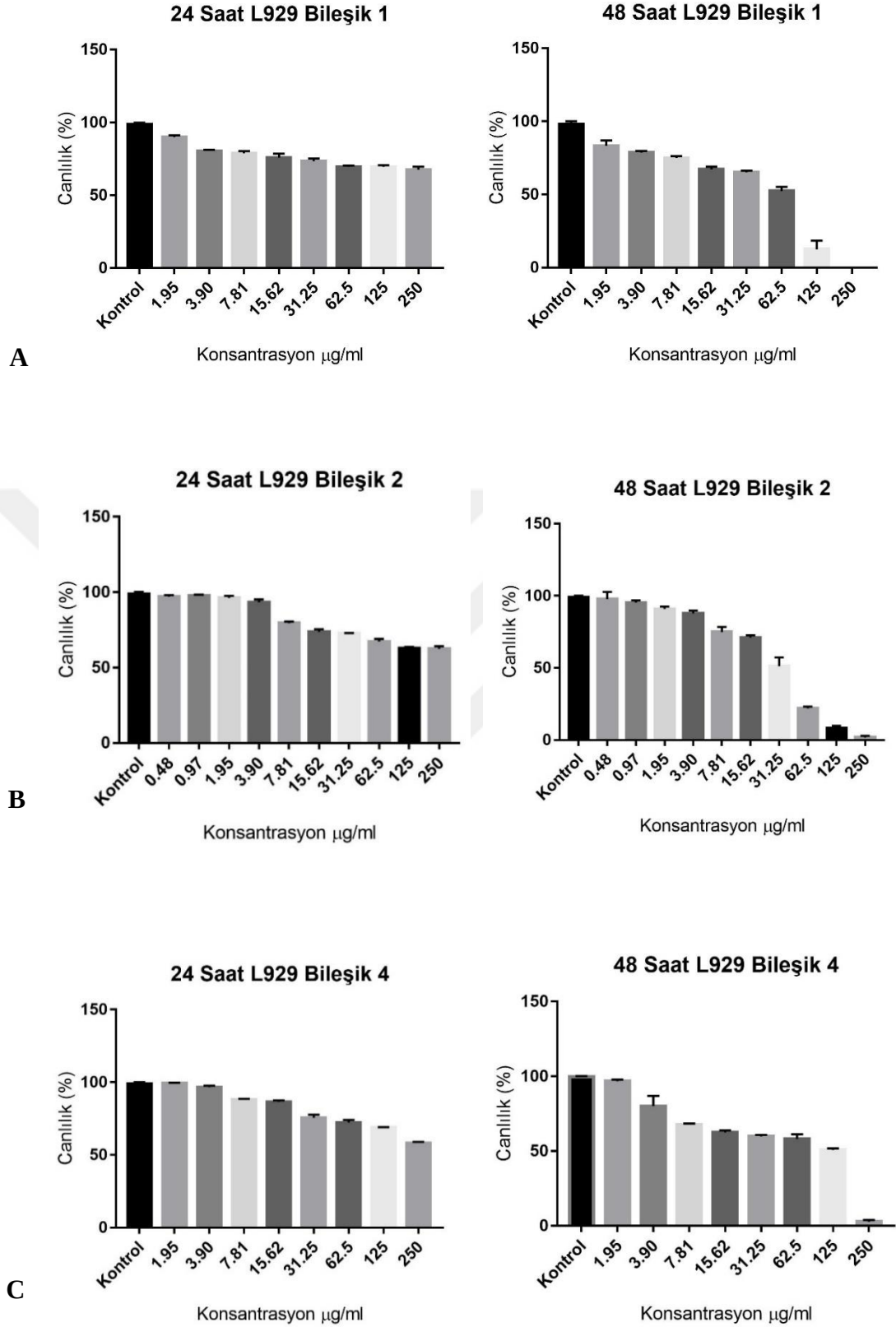
[Şekil 4.1. (Devam) D) Bileşik 5'in MTT testi kullanılarak 24 saat ve 48 saat sonra A549 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri.] Canlılık verileri ortalama $\pm$ SD'dir (her zaman noktasında ve konsantrasyonda $n = 3$). Bileşik 5 tarafından A549 hücrelerinde hücre proliferasyonu inhibisyonu gözlemlendi. Tek yönlü ANOVA ile $P < 0.0001$.

4.1.2. Sentezlenmiş 2-hidrazinotiyazol türevli bileşiklerin L-929 sağlıklı hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri

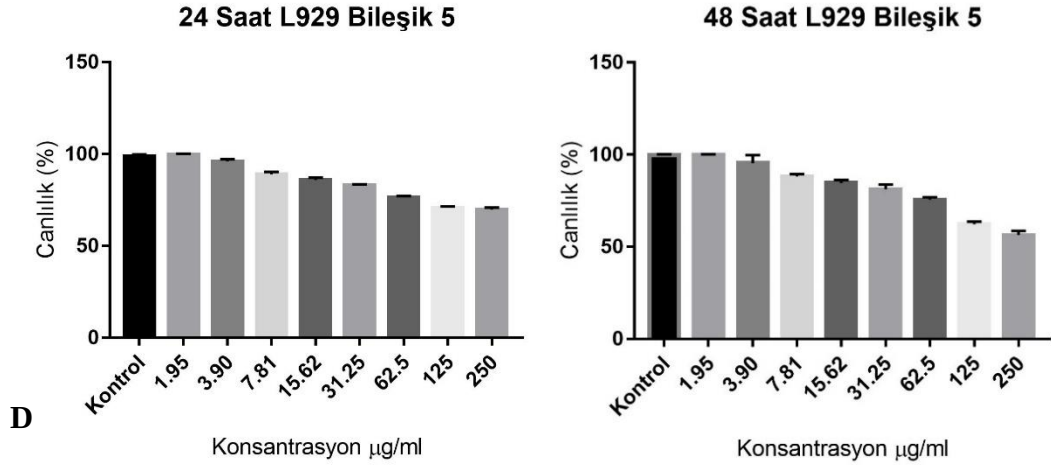
L-929 hücre hatlarına sentezlenen bileşikler 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125, 3,90625, 1,953125, 0,97656 ve 0,48828 µg/ml konsantrasyonları ile muamele edildikten sonra 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler MTT boyası ile boyandı ve 3 saatlik inkübasyona bırakıldı bu sürenin sonunda ELISA Reader cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapıldı. Hesaplamalar kontrol canlılığını %100 kabul ederek ve her kuyucuk için ayrı ayrı yapıldı. Sisplatin ve sentez bileşiklerin 24 ve 48 saatlik etkilerinin IC₅₀ ve IC_{50/2} değerleri Graphpad Prism 7 programı kullanılarak hesaplandı. Deneyler 3'er kuyucuklu ve tekrarlı olarak yapıldı, pozitif kontrol olarak sisplatin kullanıldı.

Tablo 4.2. Sentez bileşiklerinin L-929 hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC₅₀ konsantrasyon değerleri.

Uygulanan bileşikler	L-929 hücre hattı 24. saat IC ₅₀ değerleri	L-929 hücre hattı 48. saat IC ₅₀ değerleri
Bileşik-1	>250 µg/ml	62,75±0,43 µg/ml
Bileşik-2	>250 µg/ml	31,77±0,28 µg/ml
Bileşik-3	6,1±0,39 µg/ml	14,04±0,3 µg/ml
Bileşik-4	>250 µg/ml	125±0,58 µg/ml
Bileşik-5	>250 µg/ml	>250 µg/ml
Bileşik-6	24,85±0,53 µg/ml	12,16±0,44 µg/ml
Bileşik-7	11,45±0,5 µg/ml	9,78±0,35 µg/ml
Bileşik-8	7,96±0,36 µg/ml	6,17±0,26 µg/ml
Bileşik-9	6,76±0,44 µg/ml	17,63±0,43 µg/ml
Bileşik-10	3,2±0,42 µg/ml	8,35±0,52 µg/ml



Şekil 4.2. A) Bileşik 1, B) Bileşik 2, C) Bileşik 4'ün MTT testi kullanılarak 24 saat ve 48 saat sonra L929 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri. Canlılık verileri ortalama $\pm$ SD'dir (her zaman noktasında ve konsantrasyonda $n = 3$). Tek yönlü Anova ile $P < 0.0001$.



[Şekil 4.2. (Devam) D) Bileşik 5'in MTT testi kullanılarak 24 saat ve 48 saat sonra L929 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri] Canlılık verileri ortalama $\pm$ SD'dir (her zaman noktasında ve konsantrasyonda $n = 3$). Tek yönlü Anova ile $P < 0.0001$.

4.1.3. A549 hücre hattının L929 hücre hattına göre selektivite indeksi

Bileşiklerin MTT analiz sonuçlarına göre selektivite indeksi belirlenmektedir. Bunu belirlemek için sağlıklı hücre ile yapılan deneyin IC_{50} değeri, kanserli hücrenin IC_{50} değerine bölünür. Selektivite indeksi için 24. saat IC_{50} değerleri alınmıştır.

Tablo 4.3. 24. Saat IC_{50} değerlerine göre A549 hücre hattının L-929 hücrelerine göre selektivite indeksi. (Selektivite indeksi (S.I) = Sağlıklı hücre IC_{50} değeri / Kanserli hücre IC_{50} değeri)

Hücreler	Bileşik 1 IC_{50} µg/ml	Bileşik 2 IC_{50} µg/ml	Bileşik 3 IC_{50} µg/ml	Bileşik 4 IC_{50} µg/ml	Bileşik 5 IC_{50} µg/ml	Bileşik 6 IC_{50} µg/ml	Bileşik 7 IC_{50} µg/ml	Bileşik 8 IC_{50} µg/ml
L-929	>250	>250	6,1	>250	>250	24,85	11,45	7,96
A-549	11,64	0,66	8,99	15	6,2	>250	1,62	1,32
S.I.	>250	>250	0,6	>250	>250	0	7,06	6,03

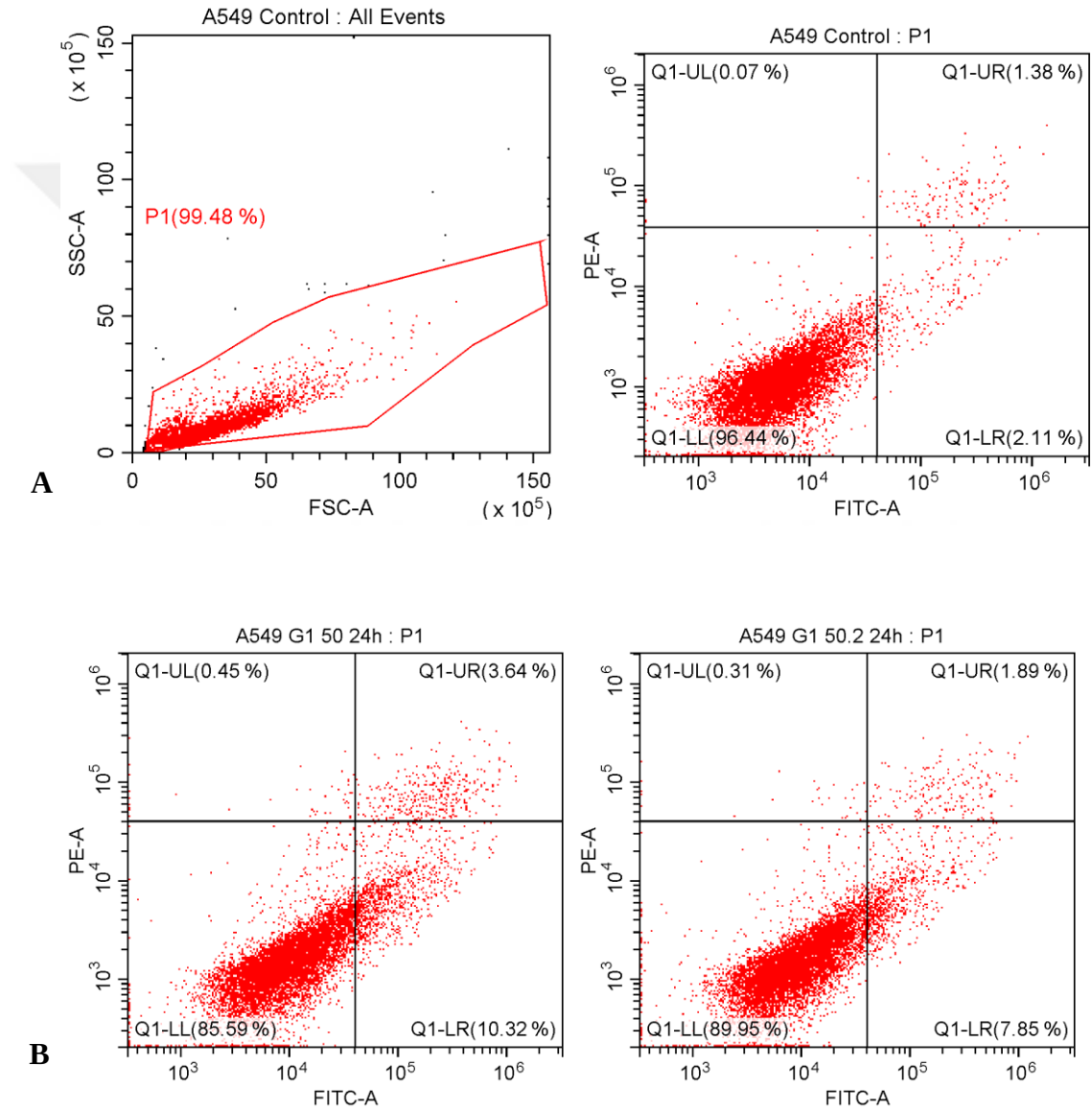
[Tablo 4.3. (Devam) 24. Saat IC_{50} değerlerine göre A549 hücre hattının L-929 hücrelerine göre selektivite indeksi] (Selektivite indeksi (S.I) =Sağlıklı hücre IC_{50} değeri / Kanserli hücre IC_{50} değeri)

Hücreler	Bileşik 9 IC_{50} µg/ml	Bileşik 10 IC_{50} µg/ml
L-929	6,76	3,2
A-549	2,85	>250
S.I.	2,37	0,01

4.2. Sisplatin ve Sentez Bileşiklerin, Akım Sitometrisi Yöntemleri ile A549 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkilerin Belirlenmesi

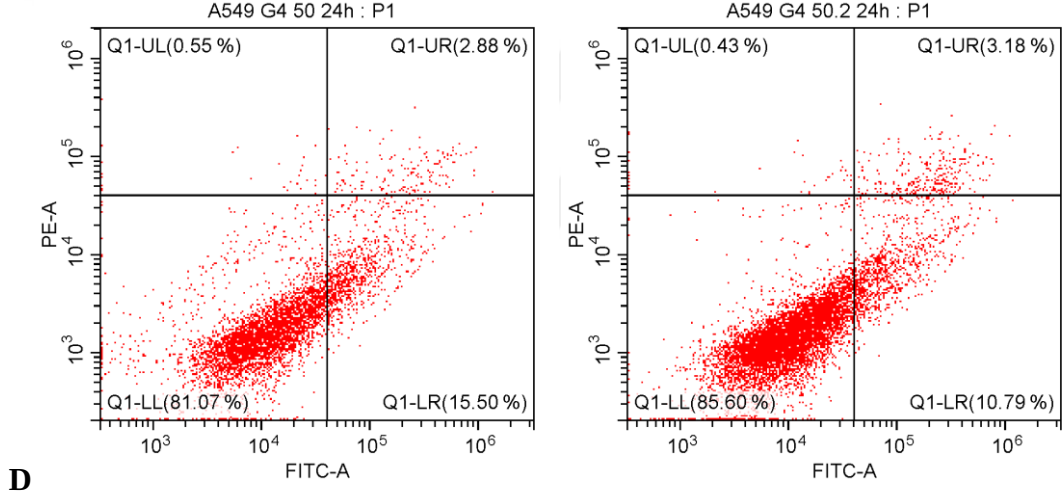
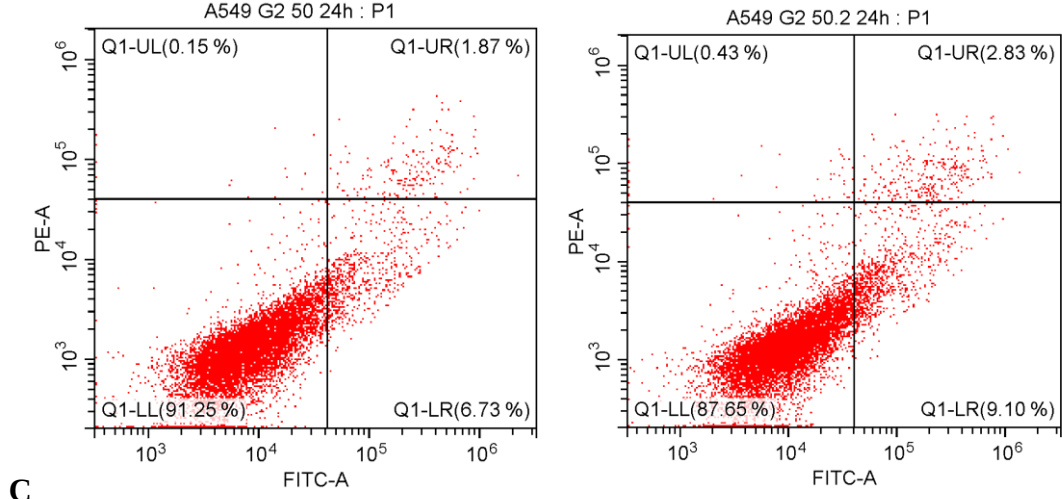
4.2.1. Akım sitometrisinde Annexin-V FITC-PI analizi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi

4.2.1.1. A549 hücre hattı üzerinde sisplatin ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 24. saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi



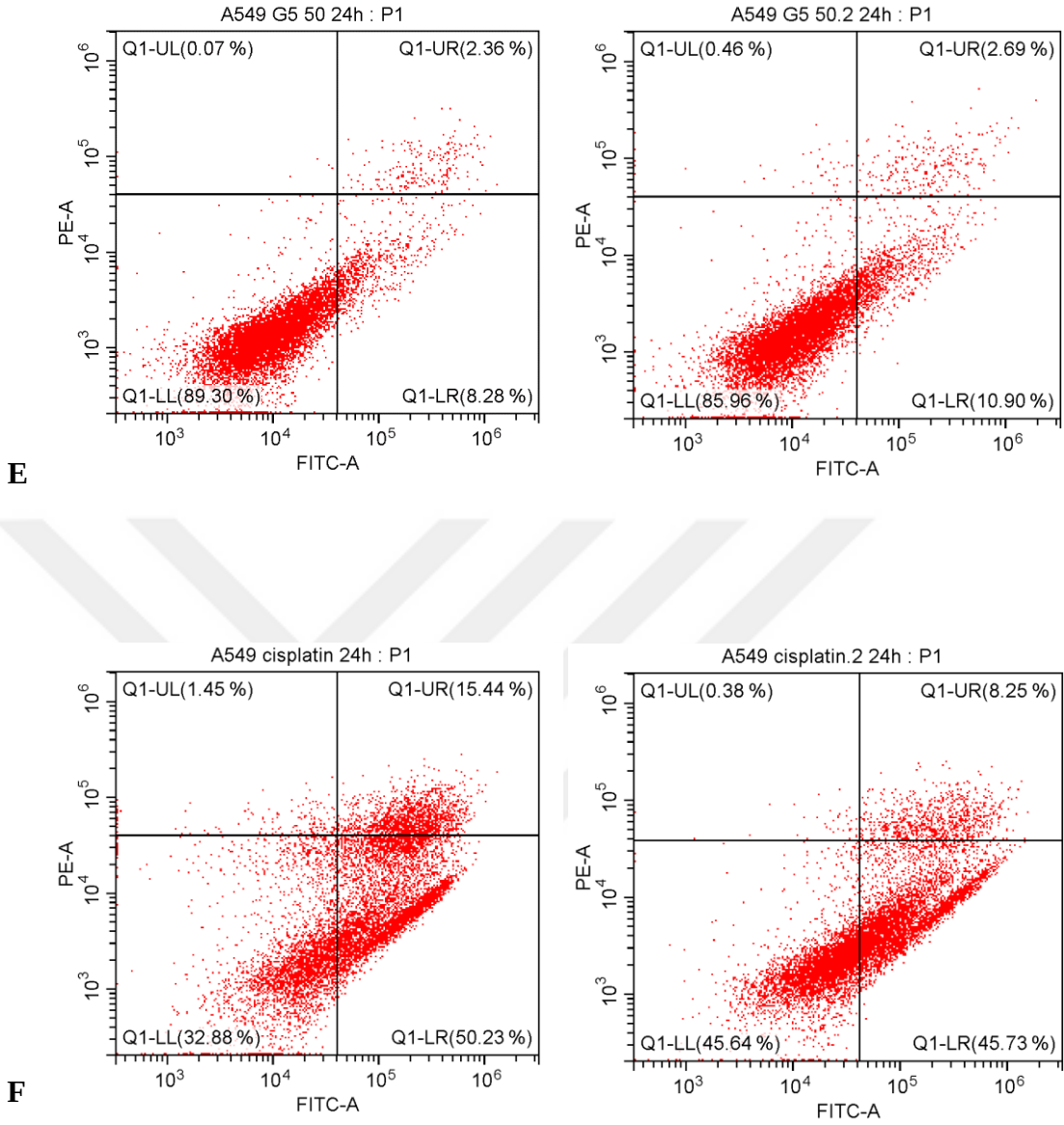
Şekil 4.3. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı ve kontrol B) Bileşik 1'in A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.

(LL = Canlılık, UL= Nekroz, UR=Geç apoptoz, LR=Erken apoptoz)



Şekil 4.4. C) Bileşik 2 A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının apoptotik etkileri. D) Bileşik 4 A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.

(LL = Canlılık, UL= Nekroz, UR=Geç apoptoz, LR=Erken apoptoz)



Şekil 4.5. E) Bileşik 5 A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının apoptotik etkileri. F) Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.

(LL = Canlılık, UL= Nekroz, UR=Geç apoptoz, LR=Erken apoptoz)

Tablo 4.4. A549 hücre hatlarının 24. saatteki % canlılık oranları Annexin-V FITC

(LL = Canlılık, UL= Nekroz, UR=Geç apoptoz, LR=Erken apoptoz)

24. Saat	LL	UL	UR	LR
K	96,44	0,07	1,38	2,11

Tablo 4.5. Sisplatinin A549 hücre hatlarının üzerindeki 24. saatteki % canlılık oranları Annexin-V FITC

(LL = Canlılık, UL= Nekroz, UR=Geç apoptoz, LR=Erken apoptoz)

24. Saat	LL	UL	UR	LR
Sisplatin IC ₅₀	32,88	1,45	15,44	50,23
Sisplatin IC _{50/2}	45,64	0,38	8,25	45,73

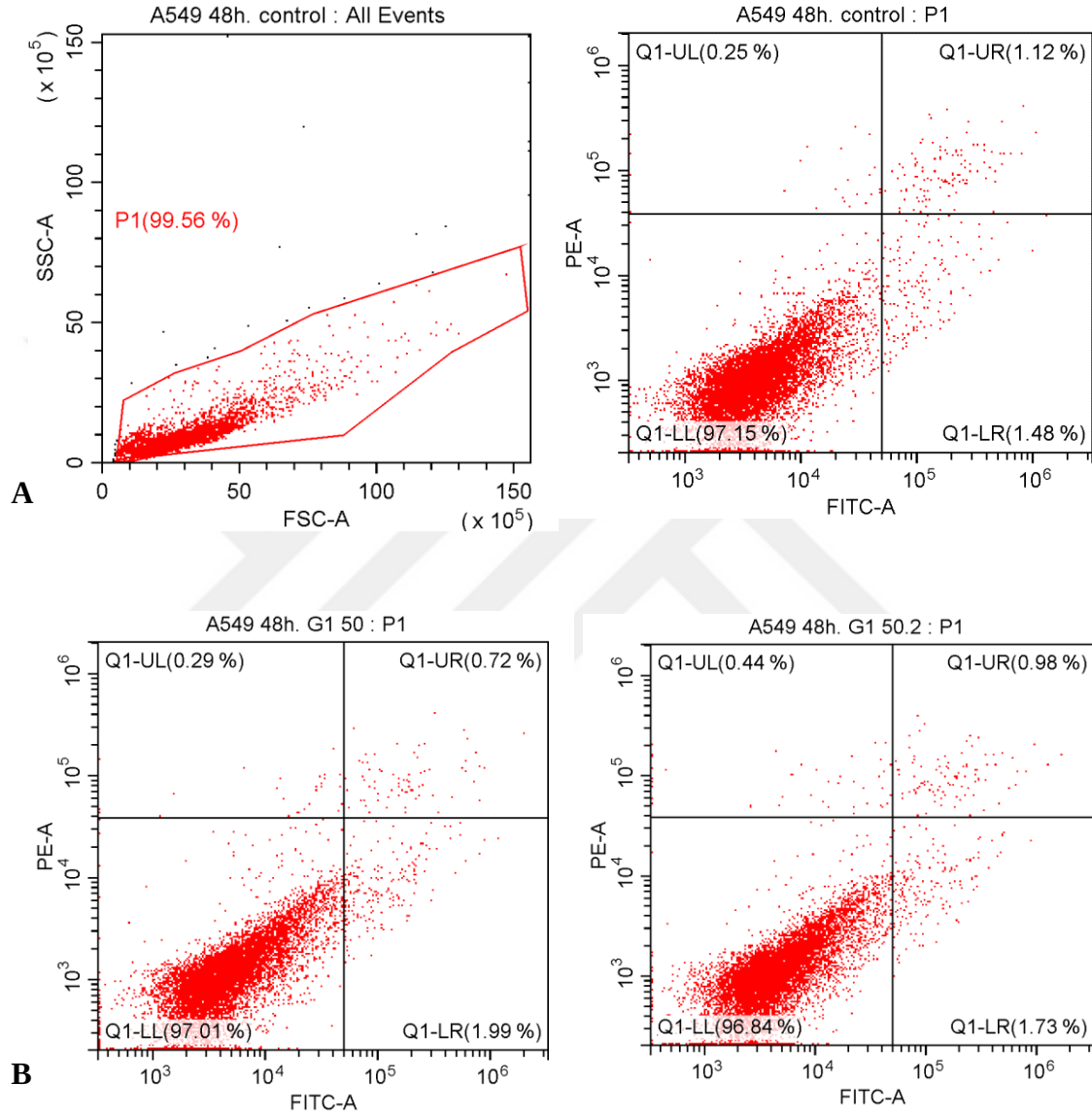
Tablo 4.6. Sentez bileşiklerin A549 hücre hatları üzerindeki 24. Saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC

(LL = Canlılık, UL= Nekroz, UR=Geç apoptoz, LR=Erken apoptoz)

24. Saat	LL(%)	UL(%)	UR(%)	LR(%)
Bileşik 1 IC ₅₀	85,59	0,45	3,64	10,32
Bileşik 1 IC _{50/2}	89,95	0,31	1,89	7,85
Bileşik 2 IC ₅₀	91,25	0,15	1,87	6,73
Bileşik 2 IC _{50/2}	87,65	0,43	2,83	9,10
Bileşik 4 IC ₅₀	81,07	0,55	2,88	15,50
Bileşik 4 IC _{50/2}	85,60	0,43	3,18	10,79
Bileşik 5 IC ₅₀	89,30	0,07	2,36	8,28
Bileşik 5 IC _{50/2}	85,96	0,46	2,69	10,90

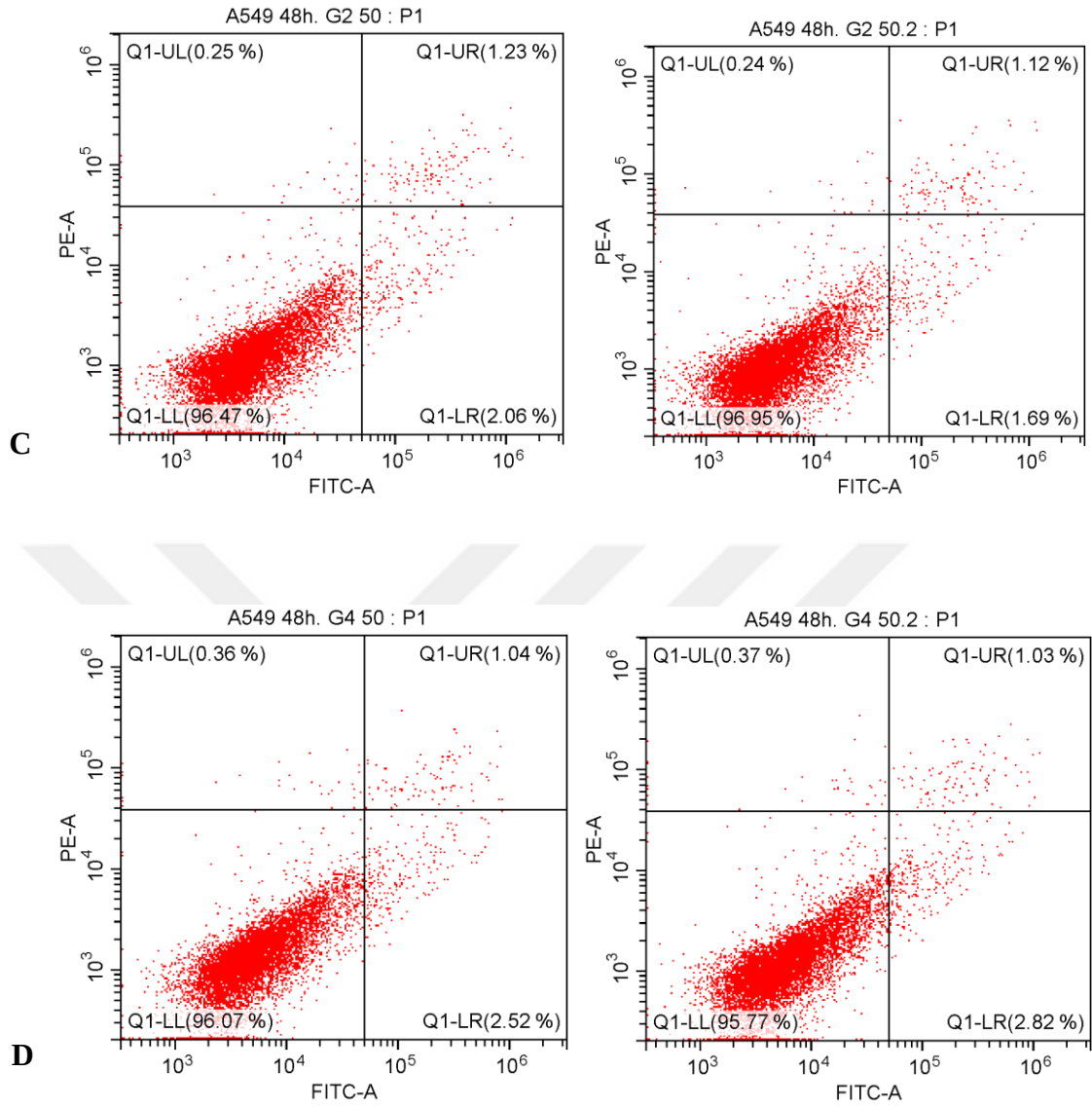
4.2.1.2. A549 hücre hattı üzerinde sisplatin ve sentez maddelerin uygulanması sonrası

48. saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi



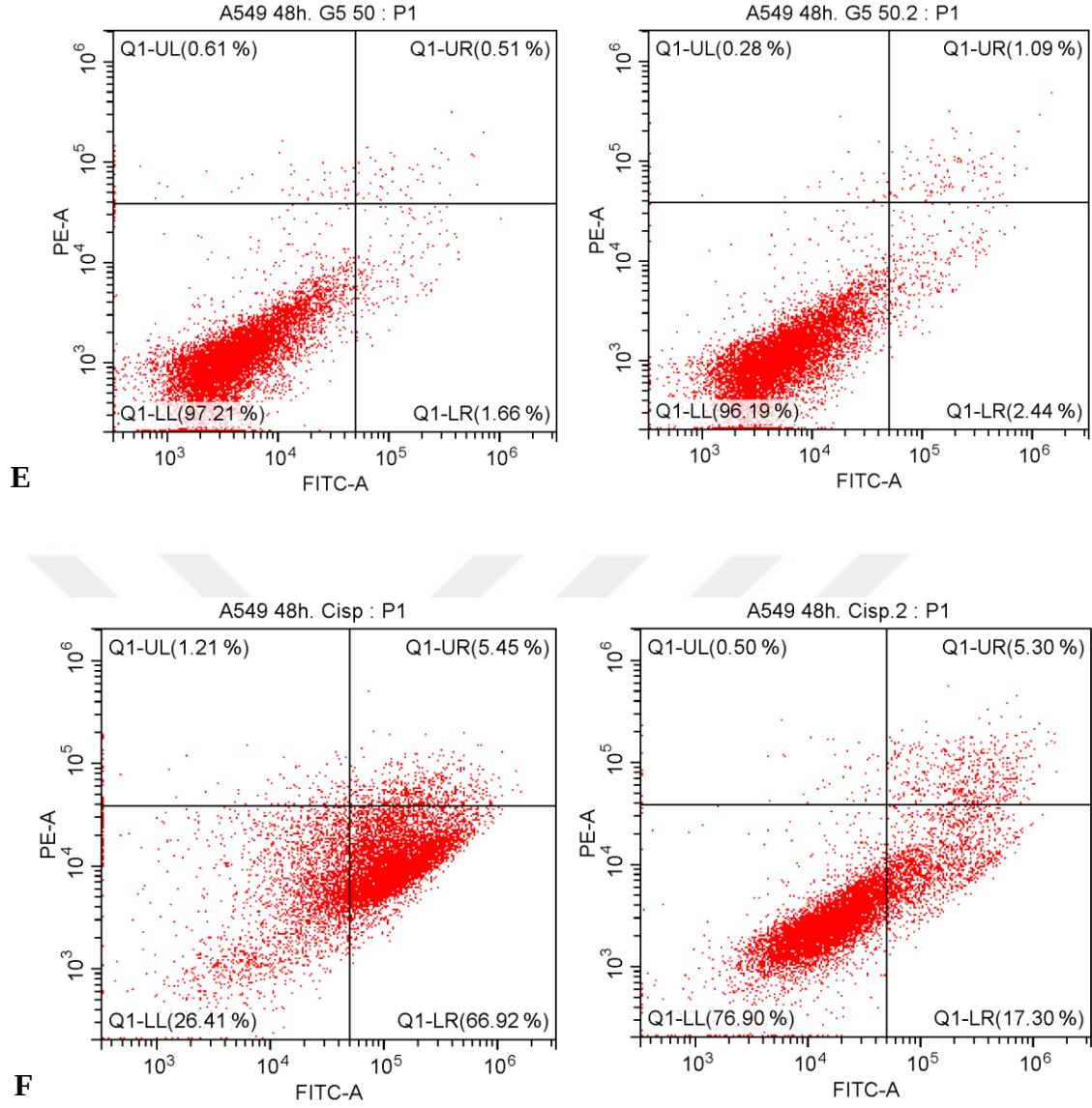
Şekil 4.6. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı ve kontrol B) Bileşik 1'in A549 hücre hattı üzerinde 48. saatteki, IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.

(LL = Canlılık, UL= Nekroz, UR=Geç apoptoz, LR=Erken apoptoz)



Şekil 4.7. C) Bileşik 2 A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının apoptotik etkileri. D) Bileşik 4 A549 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.

(LL = Canlılık, UL= Nekroz, UR=Geç apoptoz, LR=Erken apoptoz)



Şekil 4.8. E) Bileşik 5'in A549 hücre hattı üzerinde 48. saatteki, IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının apoptotik etkileri F) Sisplatin'in A549 hücre hattı üzerinde 48. saatteki, IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.

(LL = Canlılık, UL= Nekroz, UR=Geç apoptoz, LR=Erken apoptoz)

Tablo 4.7. A549 hücre hatlarının 48. saatteki % canlılık oranları Annexin-V FITC

(LL = Canlılık, UL= Nekroz, UR=Geç apoptoz, LR=Erken apoptoz)

24. Saat	LL(%)	UL(%)	UR(%)	LR(%)
Kontrol	97,15	0,25	1,12	1,46

Tablo 4.8. Sisplatinin A549 hücre hatlarının üzerindeki 48. saatteki % canlılık oranları Annexin-V FITC

(LL = Canlılık, UL= Nekroz, UR=Geç apoptoz, LR=Erken apoptoz)

24. Saat	LL(%)	UL(%)	UR(%)	LR(%)
Sisplatin IC ₅₀	26,41	1,21	5,45	66,92
Sisplatin IC _{50/2}	76,90	0,50	5,30	17,30

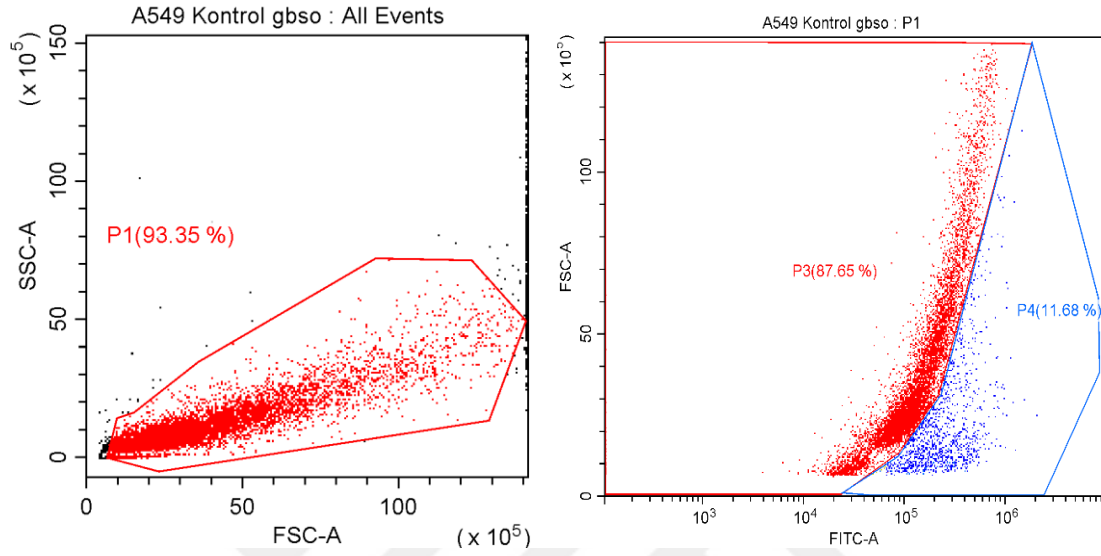
Tablo 4.9. Sentez bileşiklerin A549 hücre hatları üzerindeki 48. saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC

(LL = Canlılık, UL= Nekroz, UR=Geç apoptoz, LR=Erken apoptoz)

48. Saat	LL(%)	UL(%)	UR(%)	LR(%)
Bileşik 1 IC ₅₀	97,01	0,29	0,72	1,99
Bileşik 1 IC _{50/2}	96,84	0,44	0,98	1,73
Bileşik 2 IC ₅₀	96,47	0,25	1,23	2,06
Bileşik 2 IC _{50/2}	96,95	0,24	1,12	1,69
Bileşik 4 IC ₅₀	96,07	0,36	1,04	2,52
Bileşik 4 IC _{50/2}	95,77	0,37	1,03	2,82
Bileşik 5 IC ₅₀	97,21	0,61	0,51	1,66
Bileşik 5 IC _{50/2}	96,16	0,28	1,09	2,44

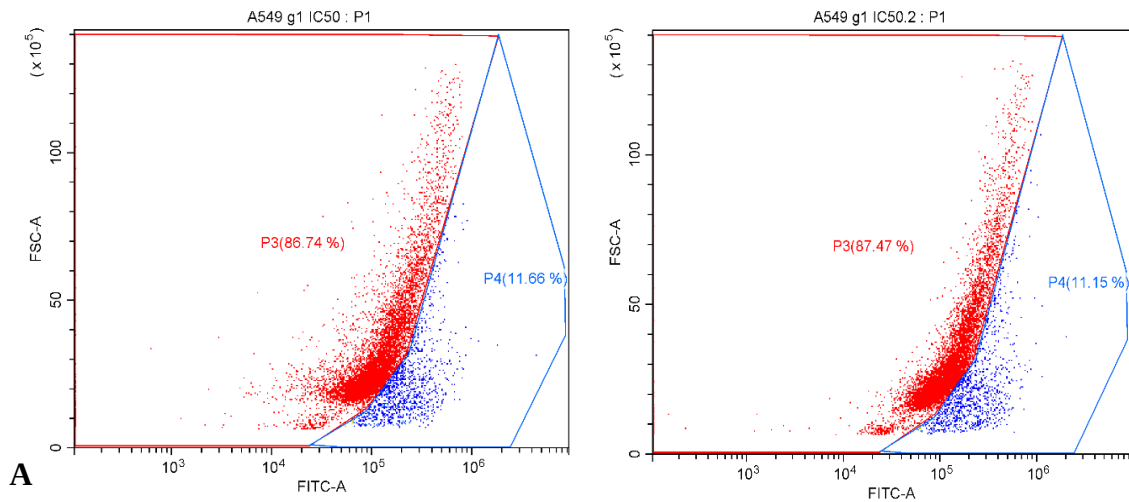
4.2.2. Akım sitometrisinde JC-1 analizi ile mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi

4.2.2.1. A549 hücre hattı üzerinde sisplatin ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 24. saatte oluşan mitokondriyal aktivitelerinin belirlenmesi



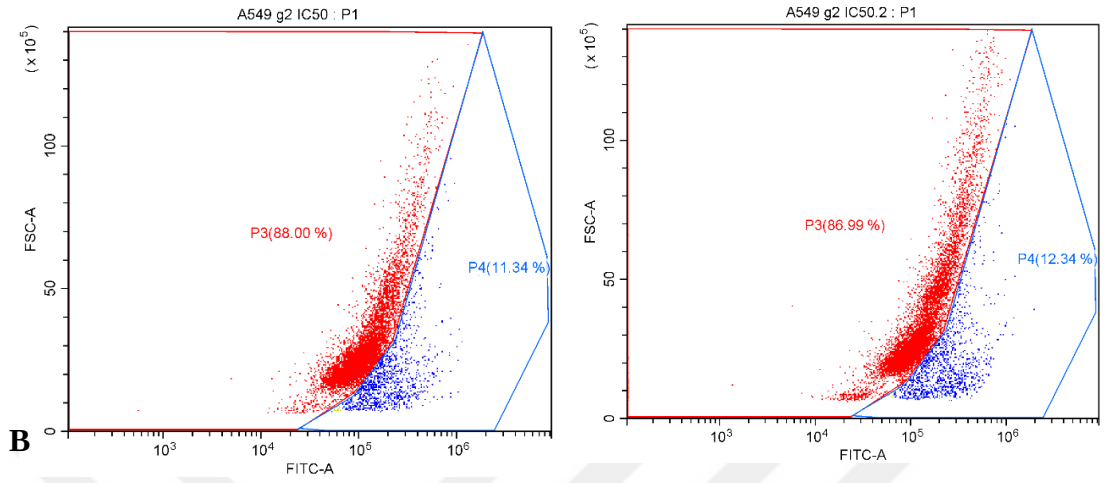
Şekil 4.9. Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol.

(P3= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P4= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

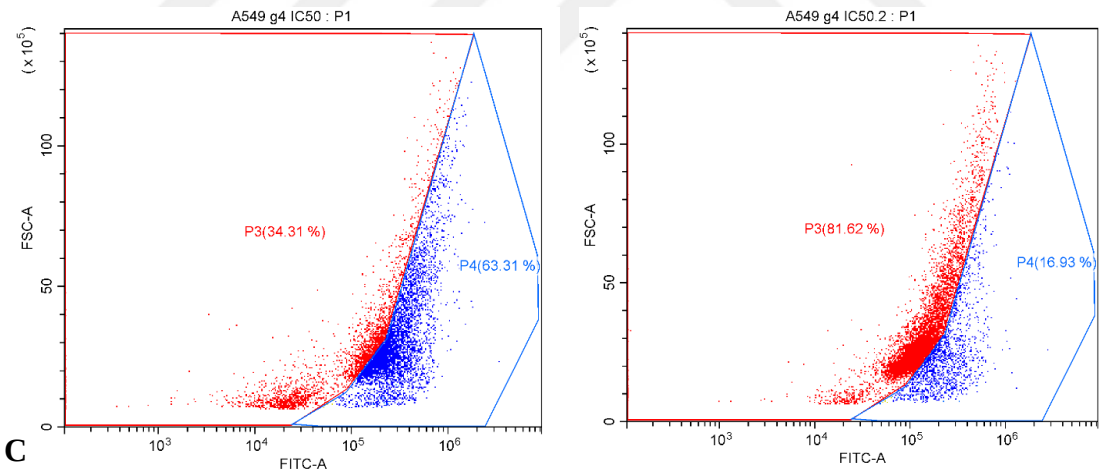


Şekil 4.10. A) Bileşik 1'in A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki IC₅₀ ve IC_{50/2} konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri.

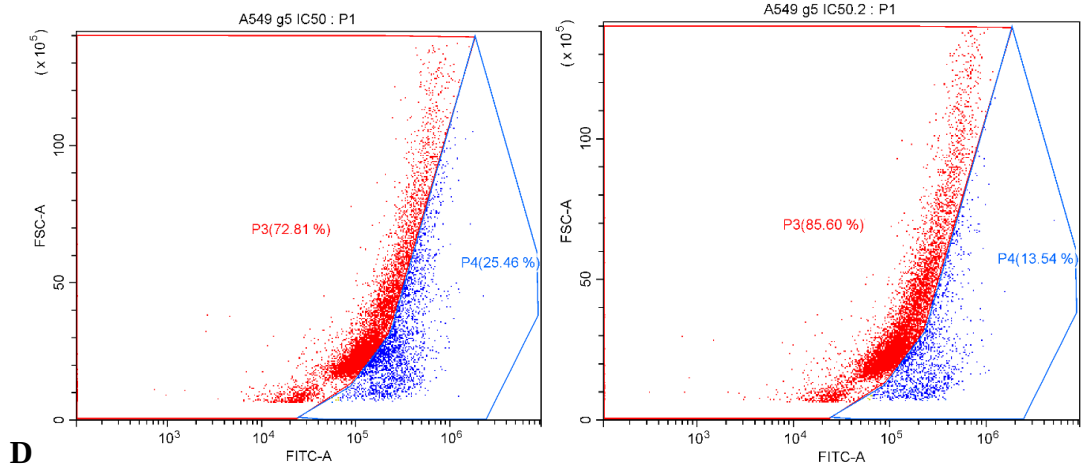
(P3= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P4= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)



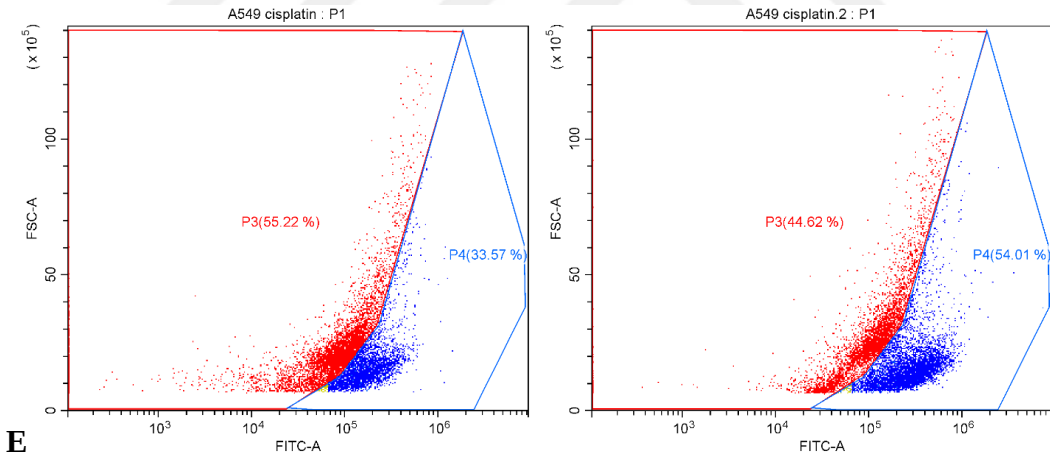
Şekil 4.11. B) Bileşik 2'in A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri
(P3= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P4= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)



Şekil 4.12. C) Bileşik 4'ün A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri
(P3= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P4= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)



Şekil 4.13. D) Bileşik 5'ün A549 hücre hattı üzerinde 24. saatteki IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri
(P3= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P4= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)



Şekil 4.14. E) Sisplatinin'in A549 hücre hattı üzerinde 24. saatteki IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının mitokondriyal membran aktiviteleri
(P3= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P4= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

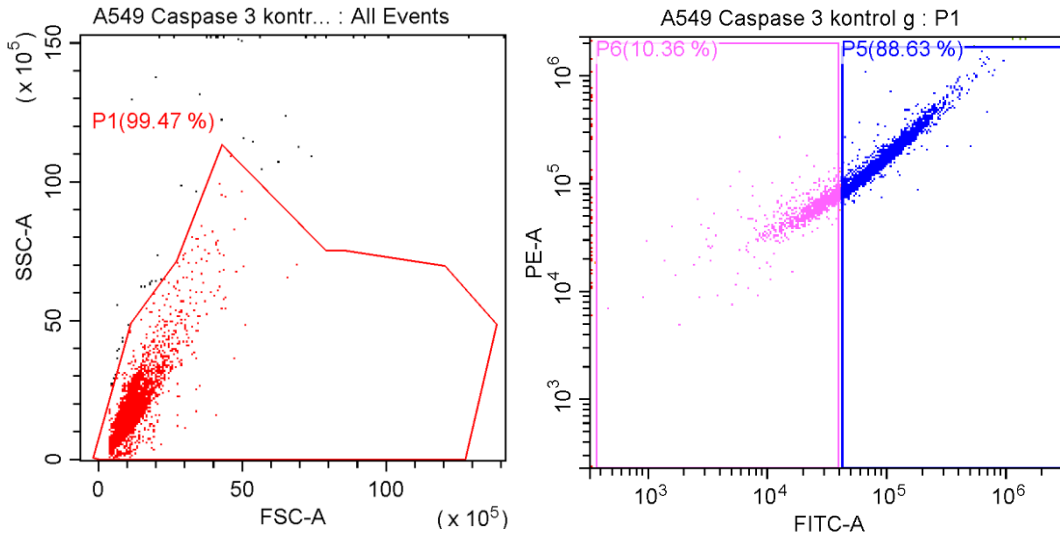
Tablo 4.10. *Sisplatin ve sentez bileşiklerin A549 hücre hatları üzerindeki 24. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite değerleri*

(P3= Mitokondriyal aktivite göstermeyen canlılık, P4= Mitokondriyal aktivite gösteren canlılık)

24. Saat	P3(%)	P4(%)
Kontrol	87,65	11,48
Sisplatin IC₅₀	55,22	33,57
Sisplatin IC_{50/2}	44,62	54,01
Bileşik 1 IC₅₀	86,74	11,66
Bileşik 1 IC_{50/2}	87,47	11,15
Bileşik 2 IC₅₀	88,00	11,34
Bileşik 2 IC_{50/2}	86,99	12,34
Bileşik 4 IC₅₀	34,31	63,31
Bileşik 4 IC_{50/2}	81,62	16,93
Bileşik 5 IC₅₀	72,81	25,46
Bileşik 5 IC_{50/2}	85,60	13,54

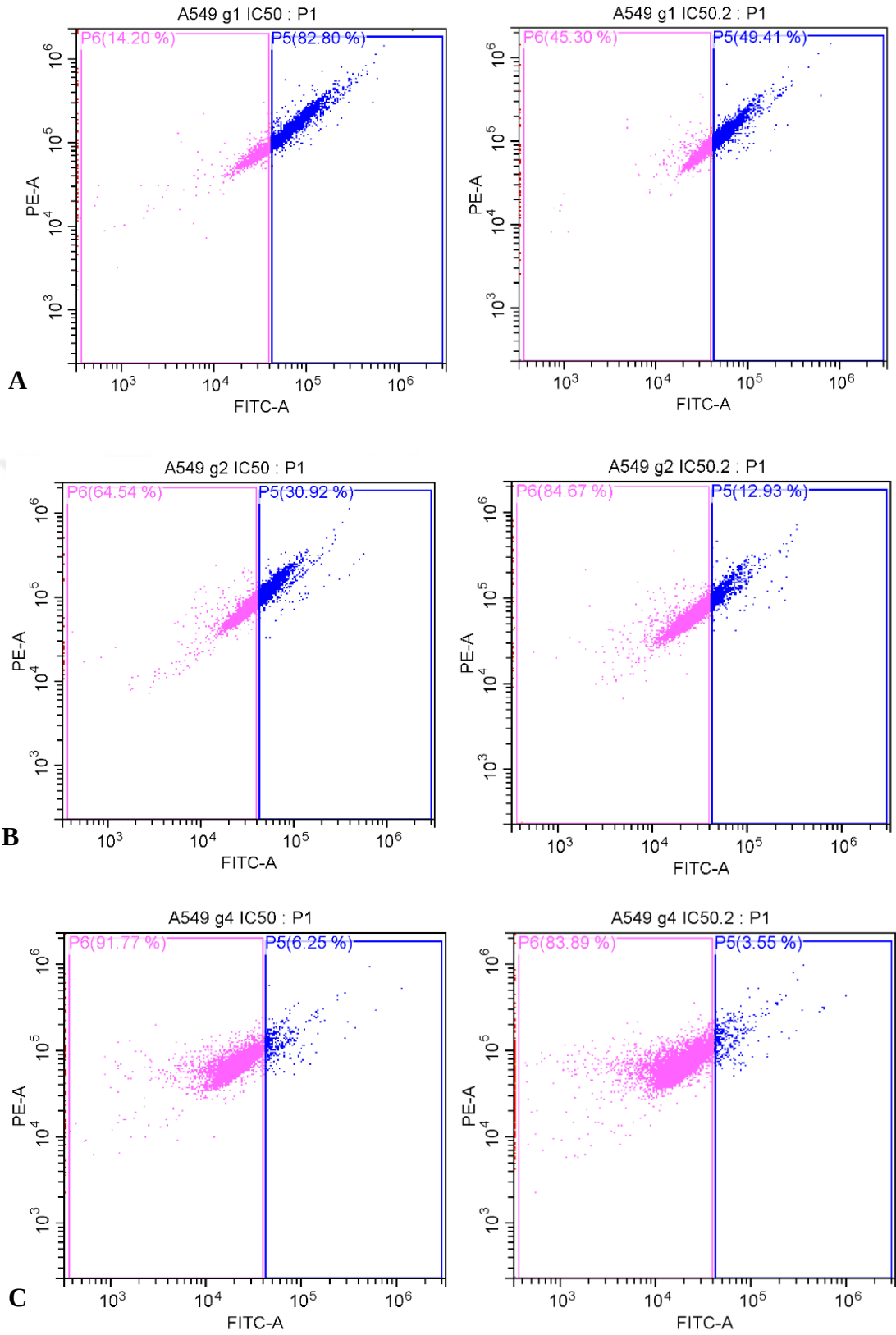
4.2.3. Akım sitometrisinde kaspaz-3 analizi ile kaspaz aktivitesinin belirlenmesi

4.2.3.1. A549 hücre hatları üzerinde 24. saatte kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi



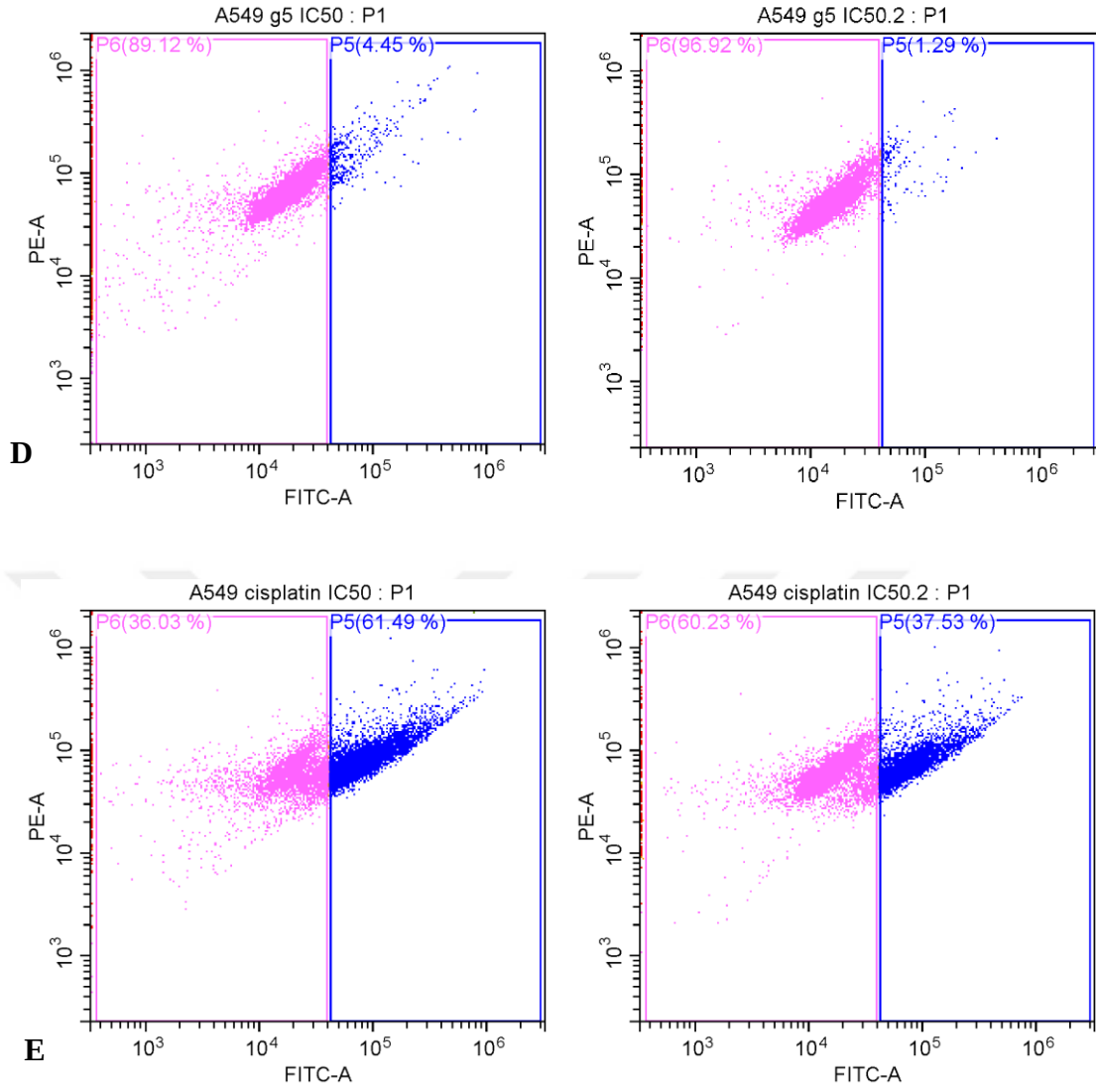
Şekil 4.15. *Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol*

(P5= Negatif kaspaz-3 yüzdesi, P6= Pozitif kaspaz-3 yüzdesi)



Şekil 4.16. A) Bileşik 1'in IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri B) Bileşik 2'nin IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri C) Bileşik 4'ün IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri

(P5= Negatif kaspaz-3 yüzdesi, P6= Pozitif kaspaz-3 yüzdesi)



Şekil 4.17. D) Bileşik 5'in IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri E) Sisplatin'nin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri
(P5= Negatif kaspaz-3 yüzdesi, P6= Pozitif kaspaz-3 yüzdesi)

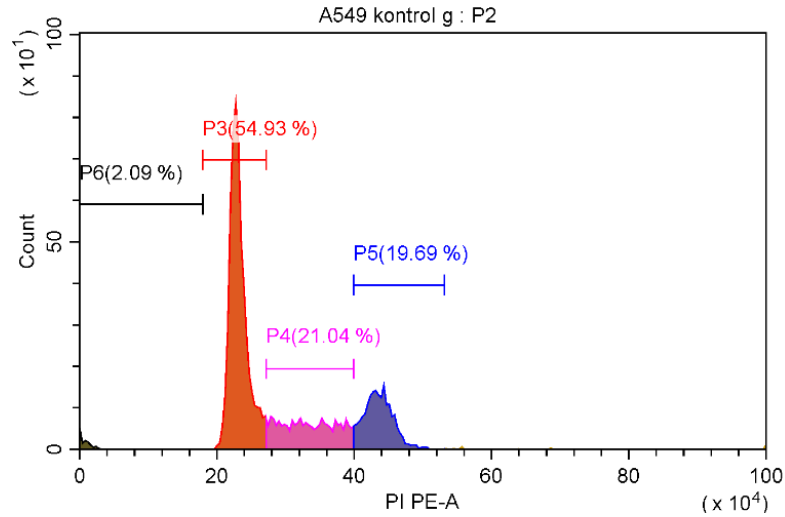
Tablo 4.11. *Sisplatin ve sentez bileşiklerin A549 hücre hatları üzerindeki kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları*

(P5= Negatif kaspaz-3 yüzdesi, P6= Pozitif kaspaz-3 yüzdesi)

24. Saat	P5(%)	P6(%)
Kontrol	88,63	10,36
Sisplatin IC₅₀	61,49	36,03
Sisplatin IC_{50/2}	37,53	60,23
Bileşik 1 IC₅₀	82,80	14,20
Bileşik 1 IC_{50/2}	49,41	45,30
Bileşik 2 IC₅₀	30,92	64,54
Bileşik 2 IC_{50/2}	12,93	84,67
Bileşik 4 IC₅₀	6,25	91,77
Bileşik 4 IC_{50/2}	3,55	83,89
Bileşik 5 IC₅₀	4,45	89,12
Bileşik 5 IC_{50/2}	1,29	96,92

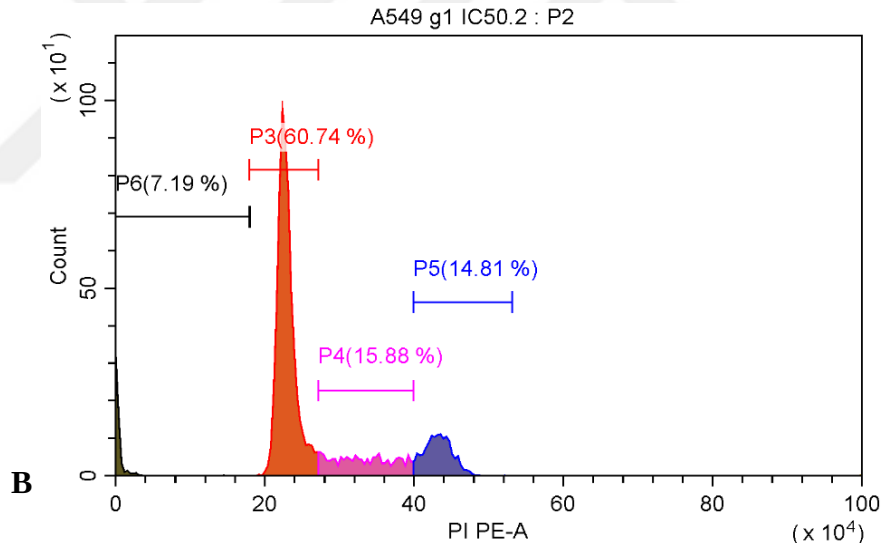
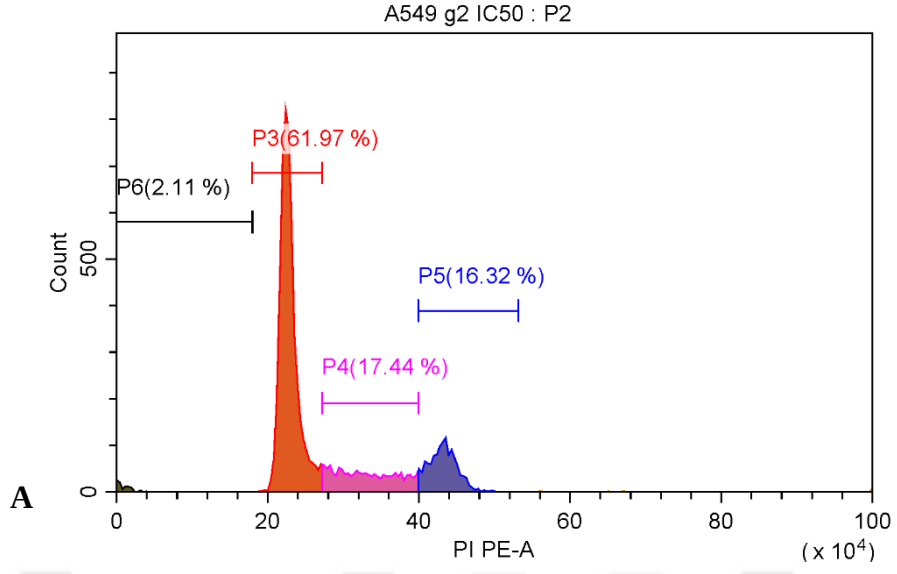
4.2.4. Akım sitometrisinde Cycle test Plus DNA analizi ile hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonu analizi

4.2.2.1. A549 hücre hattı üzerinde sisplatin ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 24. saatteki hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonunun belirlenmesi

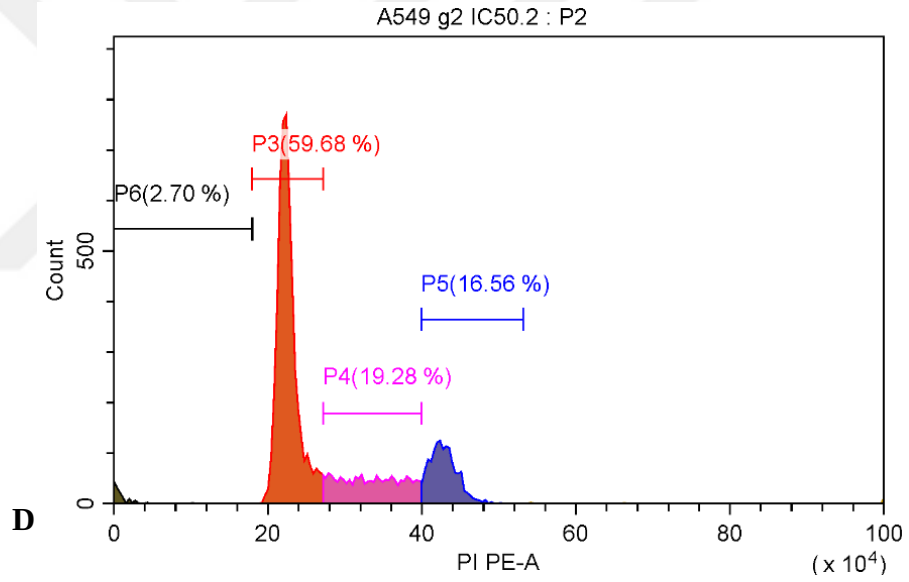
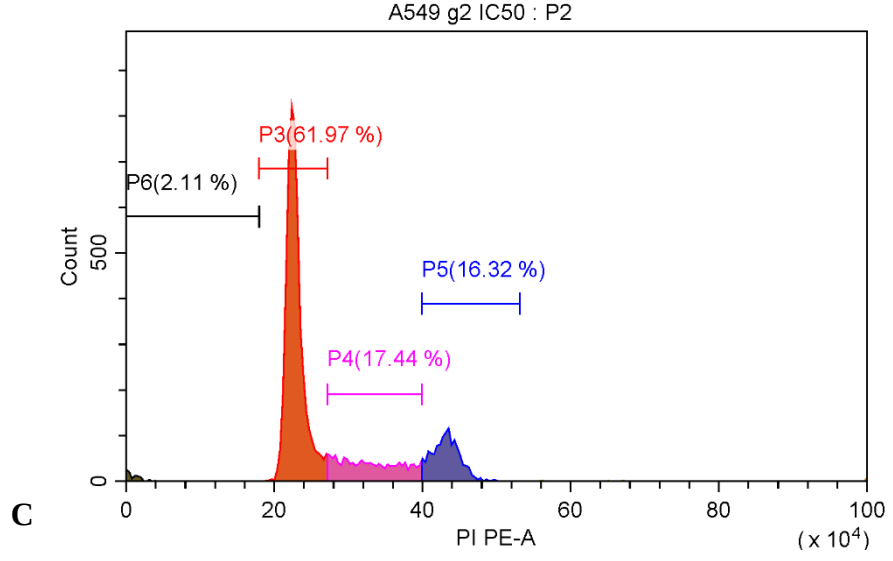


Şekil 4.18. Kontrol

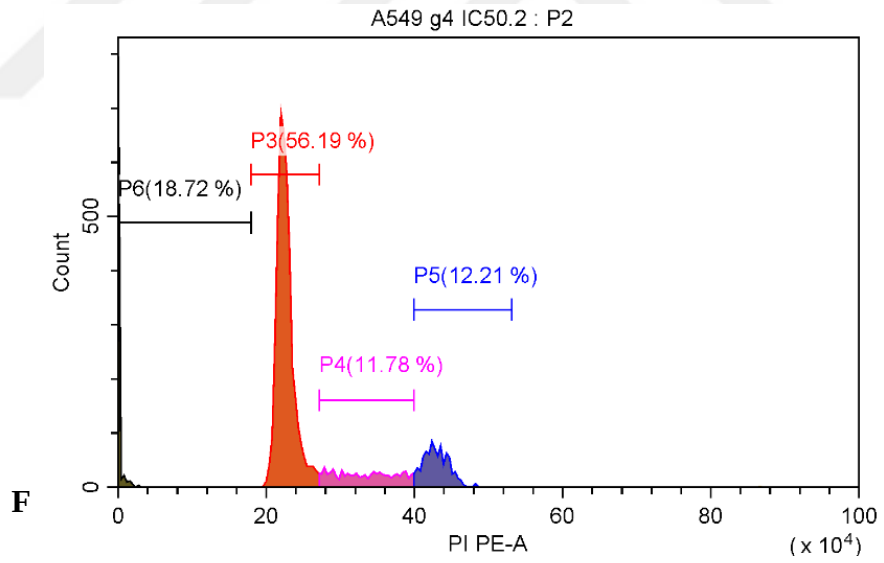
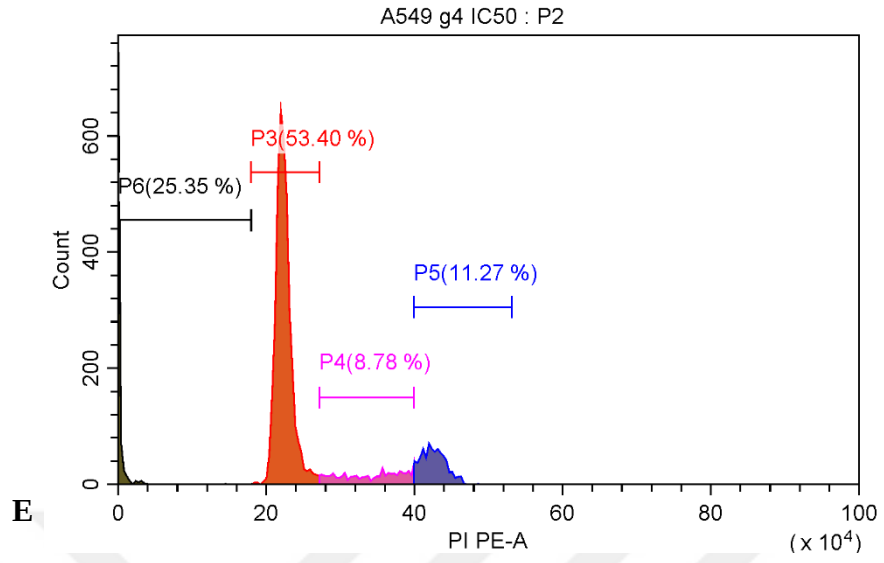
(P3= G₀/G₁, P4= S (sentez), P5= G₂/M)



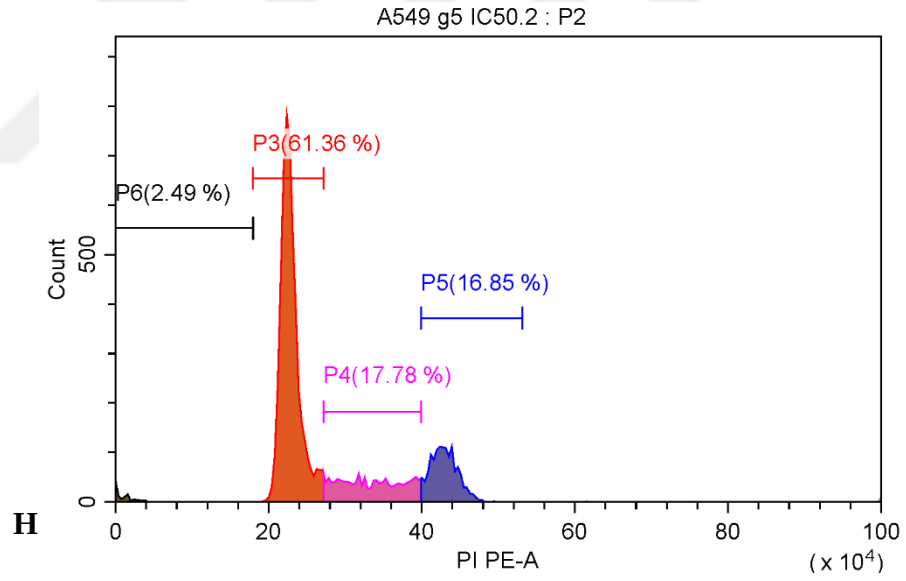
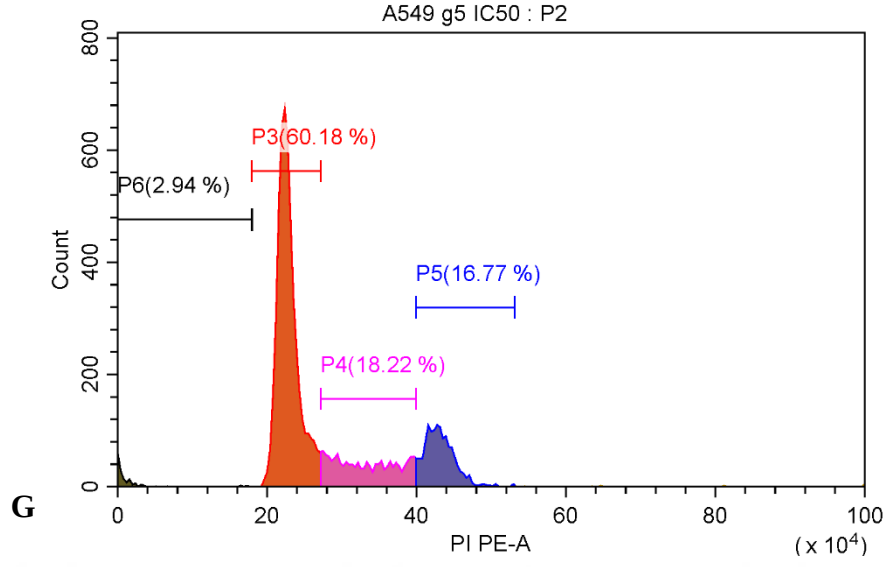
Şekil 4.19. A) Bileşik 1'in IC₅₀ dozunda B) Bileşik 1'in IC_{50/2} dozunda 24. saatteki hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonun
(P3= G₀/G₁, P4= S (sentez), P5= G₂/M)



Şekil 4.20. C) *Bileşik 2'nin IC₅₀ dozunda* D) *Bileşik 2'nin IC_{50/2} dozunda 24. saatteki hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonun*
 (P3= G₀/G₁, P4= S (sentez), P5= G₂/M)

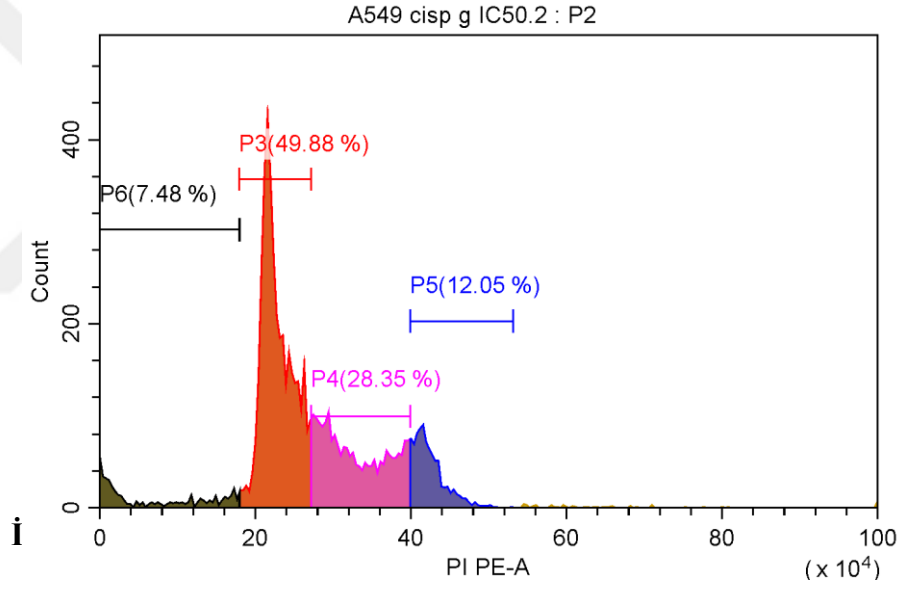
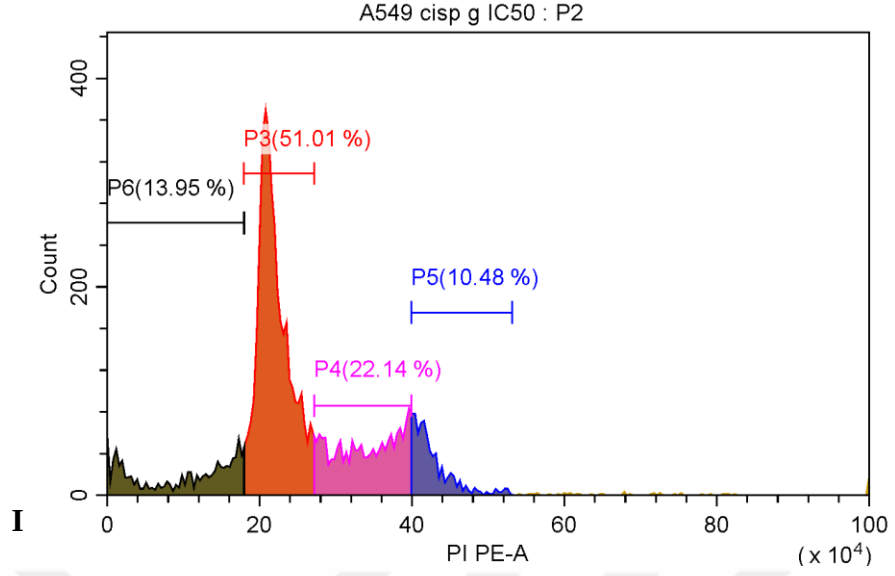


Şekil 4.21. E) Bileşik 4'ün IC₅₀ dozunda F) Bileşik 4'in IC_{50/2} dozunda 24. saatteki hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonun
(P3= G₀/G₁, P4= S (sentez), P5= G₂/M)



Şekil 4.22. G) Bileşik 5'in IC₅₀ dozunda H) Bileşik 5'in IC_{50/2} dozunda 24. saatteki hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonun

(P3= G₀/G₁, P4= S (sentez), P5= G₂/M)



Şekil 4.23. I) Sisplatinin IC_{50} dozunda İ) Sisplatinin'in $IC_{50/2}$ dozunda 24. saatteki hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonun
(P3= G_0/G_1 , P4= S (sentez), P5= G_2/M)

Tablo 4.12. A549 hücre hattı üzerindeki hücre döngüsü faz dağılımlarının 24. saatteki % değerleri
(P3= G₀/ G₁, P4= S (sentez), P5= G₂/M)

24. Saat	P3 (%)	P4 (%)	P5 (%)
Kontrol	54,93	21,04	19,69

Tablo 4.13. Sisplatin ve sentez bileşiklerin A549 hücre hatları üzerindeki hücre döngüsü faz dağılımlarının 24. saatteki % değerleri
(P3= G₀/ G₁, P4= S (sentez), P5= G₂/M)

24. Saat	P3 (%)	P4 (%)	P5 (%)
Sisplatin IC ₅₀	51,01	22,14	10,48
Sisplatin IC _{50/2}	49,88	28,35	12,05
Bileşik 1 IC ₅₀	60,50	13,27	14,43
Bileşik 1 IC _{50/2}	60,74	15,88	14,81
Bileşik 2 IC ₅₀	61,97	17,44	16,32
Bileşik 2 IC _{50/2}	59,68	19,28	16,56
Bileşik 4 IC ₅₀	53,40	8,78	11,27
Bileşik 4 IC _{50/2}	56,19	11,78	12,21
Bileşik 5 IC ₅₀	60,18	18,22	16,77
Bileşik 5 IC _{50/2}	61,36	17,78	16,85

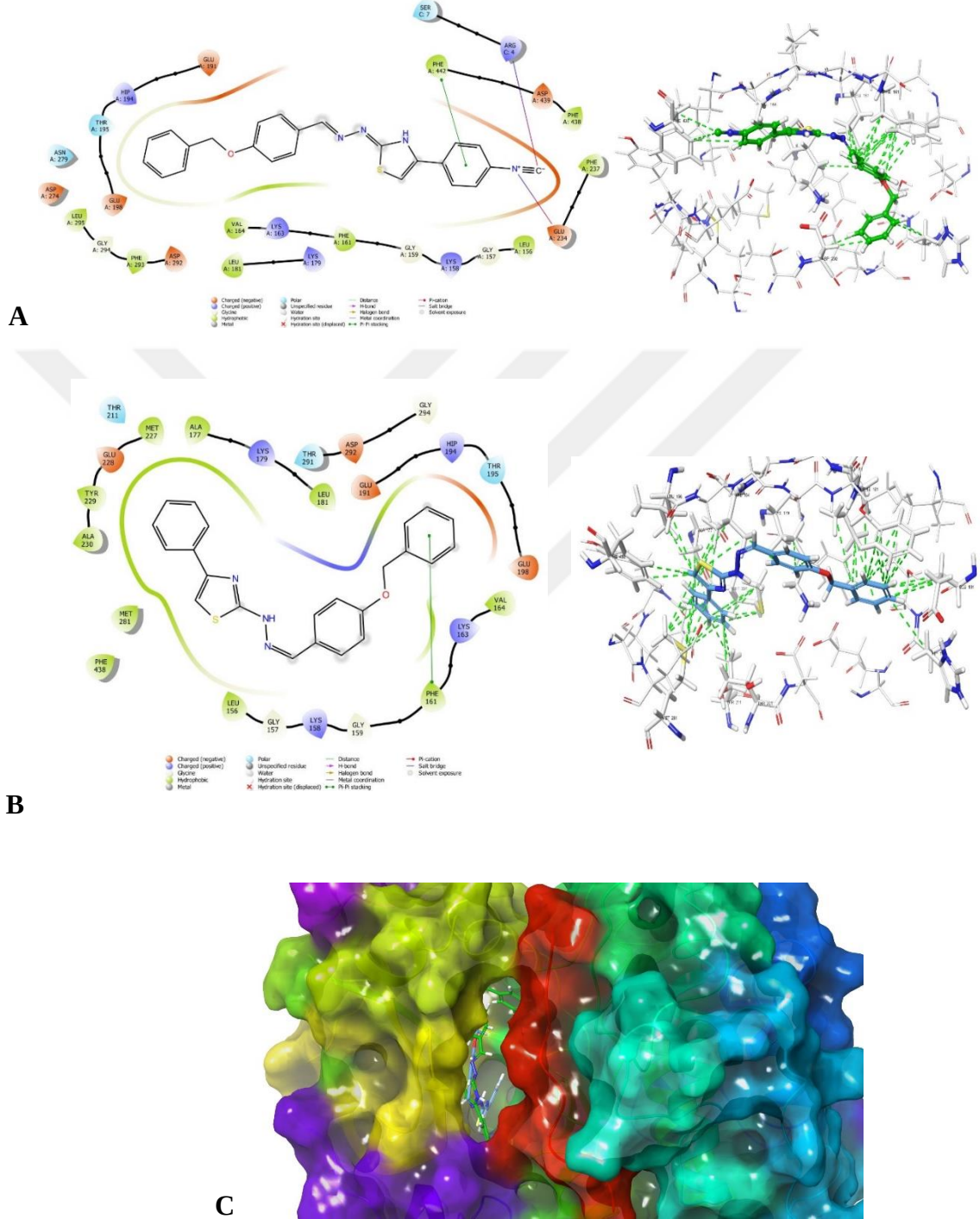
4.3. RT-PCR (Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi Sonuçları

A549 hücrelerinde eksprese olduğu bilinen VEGF, Bcl-2, Bax, CYD1 c-MYC, ERK, pERK ve AKT genlerinin ve Beta Aktin housekeeping genini, pozitif kontrol olarak ise sisplatin kullanılarak A549 hücreleri bileşik 4 ve 5'in MTT analizi sonucu hesaplanan IC_{50/2} ve IC₅₀ dozları ile 24 saat muamele edildikten sonra RT-PCR analizi yapıldı. Analiz sonucunda kontrol değerleri 1 kabul edildi. Buna göre sisplatin ve bileşiklerin Bcl-2, Bax, CYD1 c-MYC, ERK, pERK ve AKT genlerinin ifade düzeyleri 1'in üzerinden kat değişimine göre hesaplandı. 1'den büyük olan overeksprese, 1'den küçük olanlar ise down eksprese olarak belirlendi. Kontrole göre olan kat değişimleri Tablo 4.14. de verildi.

Tablo 4.14. A549 hücre hatlarındaki *VEGF*, *Bcl-2*, *Bax*, *CYD1* *c-MYC*, *ERK*, *pERK* ve *AKT* genlerindeki kat değişimleri

Bileşikler	VEGF	CYD1	ERK	c-MYC	BCL-2	BAX	AKT	pERK
Kontrol	1	1	1	1	1	1	1	1
Sisplatin IC ₅₀	0,392292	0,366021	0,203063	2,394957	0,392292	0,29937	0,628507	4,40762
Sisplatin IC _{50/2}	0,68302	0,752623	0,142595	2,158456	1,526259	1,239708	0,812252	0,476319
Bileşik 4 IC ₅₀	0,806642	0,547147	0,135842	2,250117	0,426317	0,309927	0,336808	0,586417
Bileşik 4 IC _{50/2}	2	1,189207	0,358489	6,19026	1,79005	1,239708	0,742262	1,172835
Bileşik 5 IC ₅₀	0,80107	0,543367	0,174343	6,062866	1,681793	0,444421	0,482968	0,590496
Bileşik 5 IC _{50/2}	5,464161	3,5801	0,594604	5,502167	2,281527	4,198867	5,35171	4,40762

4.4. Bileşik 4 ve 5'in AKT Geni Üzerindeki Moleküler Dokimg Pozisyonları



Şekil 4.24. A) Bileşik 4'ün AKT reseptörünün aktif bölgesindeki iki boyutlu ve üç boyutlu etkileşim modeli. B) Bileşik 5'in AKT reseptörünün aktif bölgesindeki iki boyutlu ve üç boyutlu etkileşim modeli. C) Bileşik 4 ve 5'in AKT reseptörünün aktif bölgesindeki etkileşiminin 3 boyutlu gösterimi.

Tablo 4.15. *AKT reseptörünün bileşik 4 ve 5 ile etkileşim bölgeleri*

Bileşikler	Reseptör	Aromatik H Bağı	$\pi - \pi$ Etkileşimi	Tuz Köprüsü	Van Der Walls Bağları
Bileşik 4	AKT	Glu 191 Glu 198	Phe 442	Arg 4 Glu 234	Phe 161 Val 164 Lys 179 Leu 181 HIP 194 Asp 292 Phe 438
Bileşik 5	AKT	Glu 191 Glu 198 Glu 228	Phe 161		Leu 156 Phe 161 Val 164 Ala 177 Lys 179 Leu 181 Glu 191 HIP 194 Thr 211 Met 227 Met 281 Thr 291 Phe 438

5. TARTIŞMA

Küresel olarak, akciğer kanseri erkeklerde en yaygın kanser ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir ve üçüncü en yaygın kanserdir (meme ve kolorektal kanserlerden sonra) ve kadınlarda kanser ölümlerinin (meme kanserinden sonra) ikinci önde gelen nedenidir. (Mao vd., 2016) Sisplatin iyi bilinen bir kemoterapötik ilaçtır. Karsinomlar, germ hücreli tümörler, lenfomalar ve sarkomlar dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerine karşı etkilidir. Ancak ilaç direnci ve şiddetli böbrek sorunları, alerjik reaksiyonlar, enfeksiyonlara karşı bağışıklığın azalması, gastrointestinal bozukluklar, kanama ve özellikle genç hastalarda işitme kaybı gibi çok sayıda istenmeyen yan etkileri nedeniyle başka ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılmaktadır (Ghosh, 2019). Bu istenmeyen etkilerinden dolayı daha spesifik ve sağlıklı hücreler üzerinde toksik etkiye sahip olmayan yeni ilaç adayları araştırılmaktadır.

Leite ve diğerlerinin 2016'da yaptığı bir çalışma 1,3-tiyazol türevi bileşiklerin sadece kanser hücrelerinde sitotoksikite sergilemekle kalmayıp, aynı zamanda nekroz ve apoptozu indükleyerek geri dönüşü olmayan kanser hücresi hasarını destekleyebildiğini gösterdi. Dahası, bu bileşikler, bağışıklık sistemini kanser hücresi çoğalmasını modüle etme lehine yönlendirerek mümkün olan interlökin 10 ve tümör nekroz faktörü gibi bağışıklık faktörlerini düzenledi. Bu nedenle, yeni güçlü ve seçici antikanser bileşikler tanımlayabildiler (dos Santos vd., 2016).

Bu tez çalışmasında A549 insan akciğer karsinoma epitel hücre hattı üzerinde pozitif kontrol olarak sisplatin kullanılarak, yeni sentezlenen 2-Hidrazinotiyazol türevli bileşiklerin sitotoksik, apoptotik ve gen ekspresyon düzeylerindeki etkilerinin in vitro analizler kullanılarak değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışmamızda öncelikli olarak sisplatinin ve bileşiklerimizin, A549 (akciğer karsinoma epiteli) ve L929 (normal fare fibroblast) hücre hatları kullanılarak sitotoksik etkileri ve IC₅₀ değerleri MTT deneyi ile belirlendi. Bu değerlere göre kanserli hücre hattına karşı toksik olan ancak sağlıklı hücre hattına karşı toksik olmayan bileşikler belirlendi ve akım sitometri cihazında Annexin-V FITC, JC-1, Kaspaz-3 Aktivasyon kitleri kullanılarak bileşiklerin A549 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkileri, Cycle test Plus DNA kiti kullanılarak ise hücre döngüsü faz dağılımının karakterizasyonu analiz edildi.

Yüksek apoptotik etkiye sahip olan bileşiklerin ise, apoptotik ve hücre proliferasyonunda rol oynayan genler üzerindeki ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile saptandı.

A549 ve L929 hücreleri üzerinde, MTT yöntemi ile Sisplatinin ve 10 yeni sentez 2-Hidrazinotiyazol türevi bileşiklerimizin zaman ve konsantrasyona bağlı olarak sitotoksikite değerleri belirlendi. Konsantrasyon aralığı olarak 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125, 3,90625, 1,953125, 0,97656 ve 0,48828 µg/ml belirlendi. Belirlenen bu konsantrasyonlar 96'lık plakalara uygulandıktan sonra 24 ve 48 saatlik etkileri gözlemlendi. Her bileşiğin kontrol gruplarına göre % canlılık oranları tespit edildi. L929 normal fibroblast hücre hattı, bileşiklerin sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacı ile kullanıldı. Deneyler n=3 tekrarlı olmak üzere yapıldı.

2017 yılında Y.H.E. Mohammed ve diğerleri tarafından 4-Fenil-2-Fenoksiasetamid tiyazol analogları ile MCF-7, A549, EAC ve DLA hücreleri gibi farklı kökenli çok sayıda kanser hücresine karşı yapılan *in vitro* bir çalışmada, floroz ve metil ikameli bileşik 8'nin ortalama IC₅₀ değeri ~13 µM bulunmuş (Hussein vd., 2017).

2019 yılında Piechowska ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada çeşitli kanser hücre dizilerine karşı yüksek antiproliferatif aktivite gösteren yeni tropinon-tiyazol türevleri tasarlanmış. Türevler arasında 3b-3h' nin A549 hücre hattına karşı 5,43-11,06 µM IC₅₀ değeri ile yüksek aktivite gösterdiği bulunmuş. (Piechowska vd., 2019)

2015 yılında Wenbo Zhou ve diğerleri tarafından aril-tiyazoller ile MCF-7 östrojen reseptörü pozitif hücre hattı ve MDA-MB-231 östrojen reseptörü negatif hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada bileşik 9'nin hem meme kanseri hücrelerinin büyümesini hem de *in vitro* göçü inhibe etmek için güçlü aktivitelere sahip olduğunu gösterdi. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 3,18±0,70 µM ve 2,00±0,02 µM olarak bulunmuş (Zhou vd., 2015).

Bizim çalışmamızda A549 hücreleri üzerinde yapılan MTT analiz sonuçlarına göre Sisplatinin IC₅₀ değeri 24. saatte 11,56±0,38 µg/ml, 48. saatte ise 7,03±0,41 µg/ml olarak hesaplandı.

Bileşiklerimizden 6 ve 10'nun IC₅₀ değerlerinin belirlediğimiz en yüksek konsantrasyon olan 250 µg/ml den fazla olduğu görüldü. Bileşik 2'nin 24. saatteki 0,66±0,33 µg/ml IC₅₀ değeri ile en aktif bileşik olduğu gözlemlendi. Fakat 48. saatte küçüktse IC₅₀ değerinde bir artış görüldü. Sisplatin, bileşik 1, 3 ve 4 hem konsantrasyon hem

de zaman artışına bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı görüldü. Bileşik 7, 8 ve 9 konsantrasyon artışına bağlı olarak proliferasyonu azalttı fakat 48. saatteki IC_{50} değerlerinde 24. saatle kıyaslandığında belirgin bir fark olmadığı görüldü. Bileşik 2 ve 5 ise konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttı fakat zaman artışına bağlı olarak proliferasyonu arttırdığı yani zamana bağımlı olmadığı gözlemlendi. 24. saatte bileşik 1, 2, 3, 5, 7, 8 ve 9'un IC_{50} değerlerinin Sisplatinden düşük olduğu, 48. saatte ise bileşik 2, 3, 7, 8 ve 9'un IC_{50} değerlerinin Sisplatinden düşük olduğu görüldü.

Sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkiyi belirlemek için L929 hücre hattı kullanıldı ve MTT analizi yapıldı. Bu analizin 24. saatinin sonunda bileşik 1, 2, 4 ve 5 'in IC_{50} değerinin belirlediğimiz en yüksek konsantrasyon olan 250 $\mu g/ml$ 'den büyük olduğu gözlemlendi. Ayrıca bileşik 5'in 48. saatteki IC_{50} değeri de 250 $\mu g/ml$ 'den büyüktü. Bileşik 1,2 ve 4' ün 48. saatteki IC_{50} değerleri 24. saatteki IC_{50} değerlerine göre sırasıyla 3, 9, 7, 8 ve 2 kat azaldı. Bileşik 6, 7 ve 8 zamana ve doza bağımlı olarak düşük konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdi. Bileşik 3, 9 ve 10 ise doza bağlı fakat zamana bağımlı olmadan düşük konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdi.

Tüm MTT analiz sonuçlarını değerlendirdiğimizde sentez bileşiklerinin sağlıklı hücre hattı üzerine olan sitotoksiteleri göz önüne alındığında selektiviteleri en yüksek olan bileşik 1, 2, 4 ve 5 akım sitometrisinde yapılacak analizler için seçildi.

Aktif olarak seçilen bileşiklerin ve Sisplatinin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonları MTT analizi ile hesaplandı ve bu konsantrasyonların 24 ve 48 saatlik apoptotik etkileri akım sitometri cihazı kullanılarak Annexin-V FITC deneyi ile belirlendi.

A549 hücre hatları üzerinde yapılan IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının erken ve geç apoptoz belirleme analizlerinde **sisplatin** 24 ve 48. saatlerde zamana ve doza bağlı olarak yüzdelerinin arttığı gözlemlendi.

Bileşik 1 için; zamana bağlı olarak erken apoptoz yüzdesinin 24. saatte yüzde 10,32'den 48. saatte yüzde 1,99'a önemli ölçüde azaldığı, geç apoptoz yüzdesinin ise 24. saatte 3,64'ten 48. saatte 0,72'ye önemli ölçüde olmasada azaldığı gözlemlendi. Doz olarak ise 24. saatte hem geç hem de erken apoptozda doz artışına bağımlı bir artış gözlemlendi. 48. saatte ise hem geç hem de erken apoptoz doza bağımlı değildi.

Bileşik 2 için; MTT analiz sonuçlarına göre en aktif bileşik olmasına rağmen erken ve geç apoptozda neredeyse kontrole yakın yüzdelerde sonuç verdiği gözlemlendi. (24. saatte kontrol için, erken ve geç apoptoz yüzdeleri sırasıyla 2,11 ve 1,38 idi. Bileşik 2 için

sırasıyla 6,3 ve 1,87 idi. 48. saatte bileşik 2 için sırasıyla 2,06 ve 1,23 idi.) Etkileri doza ve zamana bağımlı değildi.

Bileşik 4 için; zamana bağlı olarak erken apoptoz yüzdesinin 24. saatte yüzde 15,50'den 48. saatte 2,52'ye önemli ölçüde azaldığı, geç apoptoz yüzdesinin de 24. saatte 2,88'den 48. saatte 1,04'e düştüğü gözlemlendi. Doz olarak ise 24. saatte erken apoptozun doz artışına bağlı olarak arttığı geç apoptozun ise doz artışına bağlı olarak azaldığı gözlemlendi.

Bileşik 5 için; 24. saatte apoptoz yüzdelğinde doz artışına bağlı bir azalma gözlemlendi. Erken apoptoz yüzdesi IC_{50} ve $IC_{50/2}$ için sırasıyla yüzde 8,28'den 10,90'a geç apoptoz yüzdeleri ise sırasıyla 2,36'dan 2,69'a düştüğü gözlemlendi. 48. saatte apoptotik olarak önemli etkileri yoktu.

IC_{50} dozlarında erken apoptozda en aktif madde bileşik 4'tür (%15,50) fakat hiçbir bileşik IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozlarında sispaltinin yüzdesini geçmediği gözlemlendi.

Seçmiş olduğumuz sentez bileşiklerinin erken ve geç apoptotik etkilerinde zamana göre önemli ölçüde düşüş gözlemlendi. Bileşiklerin apoptotik yüzdeleri kontrol grubunun yüzdelrine çok yakındı ve aynı zamanda 48. saatteki etkileri doza da bağımlı değildi. Bu sebeple ileri akım sitometri deneylerinde sadece 24 saat için analizler yapıldı.

Daha sonra mitokondriyal membran potansiyelini belirlemek için akım sitometrisinde, sispaltin ve aktif olarak belirlediğimiz bileşiklerin, MTT analizi ile hesapladığımız IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozlarında 24. saat sonunda A549 hücre hattı üzerinde JC-1 boyama yöntemi ile analiz edildi.

A549 hücre hattı üzerinde yaptığımız analizde sispaltin, bileşik 4 ve 5 kontrolle karşılaştırıldığında mitokondriyal membran potansiyelinde artış gözlemlendi.

Bileşik 4 ve 5'te IC_{50} dozlarındaki mitokondriyal aktivite gösteren canlılık oranının $IC_{50/2}$ dozlarına göre daha yüksek olduğu gözlemlendi bu da bu bileşiklerin doz artışına doğrusal bir şekilde bağımlı olduğunu gösterdi. Sispaltinde $IC_{50/2}$ (%54,01) dozunda mitokondriyal aktivite gösteren canlılık oranı, IC_{50} (%33,57) dozuna göre daha yüksek olduğu yani doza bağımlı olmadığı gözlemlendi. IC_{50} dozunda en aktif Bileşik 4 (%63,31) sispaltine göre 1,8 kat daha yüksek mitokondriyal membran aktivitesi gösterdi.

Bileşik 1 ve 2 de ise hem IC_{50} hem de $IC_{50/2}$ dozlarında önemli bir mitokondriyal membran aktivitesi gözlenmedi. Yüzdeler kontrol grubu yüzdelrine yakındı.

Çalışmamızdaki bir sonraki aşama ise sentez bileşiklerimizin 24. saat sonunda A549 hücre hattı üzerinde kaspaz-3 aktivasyonunu akım sitometri cihazı ile analiz edilmesidir. Kaspaz-3 apoptozun yıkım aşamasını gerçekleştiren uygulayıcı kaspazdır.

Son zamanlarda, Lamie ve diğerleri bir tiyazol serisini test etti ve $IC_{50} = 0.027$ mM değerleri ile insan hepatik adenokarsinomunu (HepG2) hücre hattı üzerinde bileşik 30'un kaspaz-3 ve kaspaz-9'un aktivasyonu nedeniyle apoptozu desteklediğini gösterdi (Labib vd., 2018).

2019 yılında Piechowska ve diğerleri tarafından yeni tropinon-tiyazol türevleri ile yapılan bir çalışmada öncü bileşik 3g'nin A549 hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesini kontrolden 25 kat ve referans ilaç Kamptotesin'den 2 kat daha fazla arttırdığı gözlenmiştir (Piechowska vd., 2019).

Bizim çalışmamızda A549 hücre hattı üzerinden yapılan analiz sonuçlarımıza göre sisplatin ve bileşik 1, 2, 4 ve 5 hem IC_{50} hem de $IC_{50/2}$ dozlarında pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösterdi. Bileşik 4 hariç tüm bileşikler ve sisplatin, $IC_{50/2}$ dozlarında daha yüksek pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösterdi. En aktif olan bileşik 4'ün IC_{50} dozundaki pozitif kaspaz-3 aktivitesinin (%91,77) kontrolden yaklaşık olarak 8,8 kat, sisplatinden ise yaklaşık 2,5 kat daha fazla olduğu gözlemlendi.

Bileşikler, hücre döngüsü durdurmaları yönünden analiz edildi. 2019 yılında G. Akalın Çiftçi ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada tiyadiazol türevli bileşiklerin hücre döngüsü durdurması sonuçları A549 hücrelerinde incelenmiş ve G2/M fazını durdurdukları bildirilmiştir (Akalın Çiftçi vd., 2019). Bizim çalışmamızda ise bileşik 1, 2 ve 5 G1 fazında döngüyü durdurmuştur. Bileşik 4'ün ise döngü durdurmaya bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bileşiklerde IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Tüm bileşikler sisplatine göre daha fazla G1 fazında döngü durdurmasına sebep olmuştur.

Yeni sentezlenen 2-Hidrazinotiyazol türevi bileşiklerimizin A549 ve L929 hücre hattı üzerindeki sitotoksitesi MTT analizi ile belirlendi. Aktif olarak seçtiğimiz bileşikler, hesapladığımız IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozları ile muamele edildi ve akım sitometri cihazı kullanılarak apoptotik etkileri analiz edildi. Bu analiz sonuçlarına göre Bileşik 4 ve 5'in diğer bileşiklere göre daha fazla apoptozu tetiklediği sonucuna varıldı ve belirlediğimiz genler (VEGF, Bcl-2, Bax, CYD1 c-MYC, ERK, pERK ve AKT)

üzerindeki, apoptotik ve hücre proliferasyonu moleküler düzeyde etkisini incelemek üzere RT-PCR analizi yapıldı.

AKT'nin aşırı aktivasyonu, insan malignitelerinin ortak bir moleküler özelliğidir. AKT1 geni, onkojenler olarak bilinen bir gen sınıfına aittir. Mutasyona uğradıklarında, onkojenler normal hücrelerin kanserli hale gelmesine neden olma potansiyeline sahiptir. AKT1 (v-akt murin timoma viral onkogen homolog 1), RAC-alfa serin / treonin-protein kinaz proteinini kodlayan bir gendir. AKT proteini, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) ile fosforile edilir (S.M. vd., 2017).

2005 yılında Nature'da yayımlanan Gordon B. Mills ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada, fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)/AKT yolağının çeşitli bileşenlerinin, kanser hastalarında diğer yolaklardan daha sık amplifikasyon, mutasyon ve translokasyon tarafından hedeflendiğini ve sonuçta yolun aktivasyonu ile sonuçlandığını belirtmişlerdir.

VEGF, kanserin büyümesine ve doğrudan tümör hücrelerini hedef alan metastaza katkıda bulunur. Akciğer kanserinde aşırı VEGF ekspresyonu ve yüksek VEGF serum seviyeleri bildirilmiştir (Frezzetti vd., 2017).

Prashanth ve diğerleri tarafından sentezlenen 2- (4-benzoil-fenoksi) eN- (4-fenil-tiyazol-2-il) asetamid dizisinde, bileşik 48'in güçlü tümör inhibisyonunun, VEGF-A'yı (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A) inhibe etme kapasitesi ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmış. Yazarlar, bileşik 48'in etkisinin sırasıyla fenoksi, benzoil ve tiyazolün fenil halkasına bağlanan metil, floro ve metoksi gruplarından kaynaklanabileceğini öne sürüyorlar (de Siqueira vd., 2019).

C-myc, hücre döngüsünü harekete geçiren proteinlerin aktivasyonu yoluyla büyüme, direnç, ölüm ve yayılma, anti-apoptotik proteinlerin hücresel seviyelerinde artış ve metabolizmanın modülasyonu dahil olmak üzere akciğer kanseri hücre davranışlarının düzenlenmesinde rol oynar (Chanvorachote, Sriratanasak, ve Nonpanya, 2020).

Siklin D1 (CYD-1), hücre döngüsü ilerlemesinin önemli bir düzenleyicisidir ve bir transkripsiyon ortak düzenleyicisi olarak işlev görebilir. Siklin D1 proto-onkogeni, birçok farklı hücre tipinde G1'den S fazına ilerlemenin önemli bir düzenleyicisidir. Siklin D1'in aşırı ekspresyonu, kanserin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Düzensiz siklin D1 degradasyonu, çeşitli kanserlerde artan siklin D1 seviyelerinden sorumlu gibi görünmektedir (Alao, 2007).

Anti-apoptotik proteinlerin temsilcisi olan Bcl-2 ve yaygın olarak bir pro-apoptotik faktör olarak tanımlanan Bax, karşıt işlevler sunan programlanmış hücre ölümünün geç sinyalleşme fazında yer alır. Yüksek düzeyde Bcl-2 ekspresyonu, hücrelerin sitotoksik faktörlerin veya hücrel stresin neden olduğu apoptozu önler. Bu fenomen, normal koşullar altında ortadan kaldırılması gereken DNA hasarı olan hücrelerin birikimine katkıda bulunan Bcl-2'nin onkojenik potansiyelini açıklamaktadır. Bax ile ilişkili proteinler, Bcl-2 etkisinin baskın inhibitörleri gibi görünmektedirler, diğer apoptotik mediyatörlerin, özellikle sitokrom c'nin salınmasını kolaylaştıran mitokondriyal membran hasarı ile apoptozu teşvik ederler, kaspaz kaskad aktivasyonuna ve ardından hücre ölümüne neden olurlar (Irena, vd.,).

Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2 (ERK), sinyal kaskadlarında rol oynayan ve hücre dışı sinyalleri hücre içi hedeflere ileten mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) ailesine aittir. Bu nedenle, MAPK kademeleri, hücre çoğalması, farklılaşması ve stres tepkileri dahil olmak üzere temel süreçleri düzenleyen merkezi sinyalleşme elemanlarıdır. ERK yolağındaki down-stream (yukarı akış) proteinlerinin ve kinazlarının aşırı aktivasyonunun, kanser, dahil olmak üzere çeşitli hastalıkları indüklediği gösterilmiştir (Guo vd., 2020).

İnsan tümör hücre dizilerinde PERK kinaz aktivitesinin bozulması, in vitro hipoksi altında apoptozu arttırdığı ve in vivo tümör büyümesini bozduğu gösterilmiştir. Tümör hücreleri, yetersiz kan temini ve anormal kan damarı işlevi nedeniyle büyümeleri sırasında hipoksi ve besin yoksunluğu dönemleri yaşarlar (Atkins vd., 2013).

A549 hücrelerinde eksprese olduğu bilinen VEGF, Bcl-2, Bax, CYD1 c-MYC, ERK, pERK ve AKT genlerinin ve Beta Aktin housekeeping genini, pozitif kontrol olarak ise sisplatin kullanılarak A549 hücreleri bileşik 4 ve 5'in MTT analizi sonucu hesaplanan $IC_{50/2}$ ve IC_{50} dozları ile 24 saat muamele edildikten sonra RT-PCR analizi yapıldı. Analiz sonucunda kontrol değerleri 1 olarak kabul edildi ve sonuçlar kontrole göre kat değişimi olarak ifade edildi.

Analiz sonuçlarımıza göre A549 hücre hattı üzerinde IC_{50} dozunda Sisplatinin; pro-apoptotik Bax genini up-regüle etmesi beklenirken 3,3 kat down-regüle ettiği, $IC_{50/2}$ dozunda ise 1,2 kat up-regüle ettiği ve doza bağımlı etki göstermediği gözlemlendi. IC_{50} dozunda anti-apoptotik Bcl-2 genini 2,5 kat down regüle ettiği, $IC_{50/2}$ dozunda ise 0,6 kat up-regüle ederek doza bağımlı bir etki gözlemlendi.

Birçok kanser türünde ekprese edilen AKT geninin sisplatin IC₅₀ dozunda yaklaşık 1,6 kat down regüle edildiği, IC_{50/2} dozunda ise 1,2 kat down regüle ettiği gözlemlendi. Yani sisplatinin AKT geni üzerinde doza bağımlı etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

Akciğer kanserinde overeksprese edilen CYD-1 geninin sisplatin IC₅₀ dozunda 2,5 kat down regüle edildiği, IC_{50/2} dozunda ise 1,4 kat down regüle edildiği ve doza bağımlı etki gösterdiği gözlemlendi.

Akciğer kanserinde overeksprese edilen VEGF'nin sisplatin IC₅₀ dozunda 2,5 kat down regüle edildiği IC_{50/2} dozunda ise 1,4 down regüle edildiği gözlemlendi.

Yine akciğer kanserinde overeksprese edilen c-MYC geninin down regüle olması beklenirken sisplatin IC₅₀ dozunda 2,39 kat up- regüle, IC_{50/2} dozunda ise 2,15 kat up regüle edildiği gözlemlendi.

ERK geninin sisplatin IC₅₀ dozunda 4,9 kat down regüle edildiği, IC_{50/2} dozunda ise 1,4 kat down- regüle edildiği ve doza bağımlı etki gösterdiği gözlemlendi.

Tümör metastazında rol oynadığı bilinen pERK geninin sisplatin IC₅₀ dozunda down regüle edilmesi beklenirken 4,4 kat up-regüle, IC_{50/2} dozunda ise 2,09 kat down regüle edildi. Bu durumda doza bağımlı etki gözlenmediğini söyleyebiliriz

Bileşik 4 için; pro-apoptotik Bax genini IC₅₀ dozunda up regüle edilmesi beklenirken 3,2 kat down regüle edildi IC_{50/2} dozunda ise 1,2 kat up regüle edildiği ve doza bağımlı etki göstermediği gözlemlendi. Anti-apoptotik BCL-2 geninin IC₅₀ dozunda 2,3 kat down regüle edildiği IC_{50/2} dozunda 1,7 kat up-regüle edildiği gözlemlendi. IC₅₀ dozunda AKT geninin 2,9 kat, IC_{50/2} dozunda ise 1,3 kat down regüle edildiği görüldü.

Akciğer kanserinde overeksprese edilen VEGF geninin IC₅₀ dozunda 1,2 kat down-regüle edildiği IC_{50/2} dozunda ise 2 kat up regüle edildiği gözlemlendi. CYD-1 geninin IC₅₀ dozunda 1,8 kat down regüle edildiği, IC_{50/2} dozunda ise 1,1 kat up regüle edildiği gözlemlendi. ERK geninin ise IC₅₀ dozunda 7,3 kat down regüle edildiği, IC_{50/2} dozunda ise yaklaşık 2,8 kat down regüle edildiği gözlemlendi. Yine akciğer kanserinde overeksprese edilen c-MYC geninin down regüle olması beklenirken IC₅₀ dozunda 2,2 kat, IC_{50/2} 6,1 kat up regüle edildiği gözlemlendi. Tümör metastazında rol oynadığı bilinen pERK geninin IC₅₀ dozunda 1,7 kat down regüle edildiği, IC_{50/2} dozunda ise 1,1 kat up regüle edildiği gözlemlendi.

Bileşik 5 için; pro-apoptotik Bax genini IC_{50} dozunda up regüle edilmesi beklenirken 2,2 kat down regüle edildi $IC_{50/2}$ dozunda ise yaklaşık 4,2 kat up regüle edildiği ve doza bağımlı etki göstermediği gözlemlendi. Anti-apoptotik BCL-2 geninin down regüle edilmesi beklenirken IC_{50} dozunda 1,6 kat up regüle edildiği $IC_{50/2}$ dozunda 2,2 kat up-regüle edildiği gözlemlendi. AKT geninin IC_{50} dozunda 2 kat down-regüle edildiği, $IC_{50/2}$ dozunda ise 5,3 kat up-regüle edildiği görüldü. Akciğer kanserinde overeksprese edilen VEGF geninin IC_{50} dozunda 1,2 kat down-regüle edildiği $IC_{50/2}$ dozunda ise 5,4 kat up regüle edildiği gözlemlendi. CYD-1 geninin IC_{50} dozunda 1,8 kat down regüle edildiği, $IC_{50/2}$ dozunda ise 3,5 kat up regüle edildiği gözlemlendi. ERK geninin ise IC_{50} dozunda 5,7 kat down regüle edildiği, $IC_{50/2}$ dozunda ise 1,6 kat down-regüle edildiği gözlemlendi. Yine akciğer kanserinde overeksprese edilen c-MYC geninin down regüle olması beklenirken IC_{50} dozunda 6 kat, $IC_{50/2}$ 5,5 kat up regüle edildiği gözlemlendi. Tümör metastazında rol oynadığı bilinen pERK geninin IC_{50} dozunda yaklaşık 1,7 kat down regüle edildiği, $IC_{50/2}$ dozunda ise 4,4 kat up regüle edildiği gözlemlendi.

Bileşik 4 ve 5 için AKT geni üzerinde moleküler doküman çalışması yapıldı ve bileşiklerin AKT'nin aktif bölgesine yerleştiği üç boyutlu olarak gösterilmiştir. Bileşiklerin yerleşecekleri aktif cepte aminoasitlerle yaptıkları bağlar tablo 4.15.'te gösterilmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmamızda kullandığımız 2-Hidrazinotiyazol türevi bileşiklerimizin hepsi ilk defa sentezlendi. Pozitif kontrol olarak ise kemoterapide yaygın olarak kullanılan sisplatin kullanıldı. A549 hücrelerinde sitotoksik etkisi yüksek olan seçtiğimiz bileşikler ile akım sitometrisi cihazı kullanılarak apoptotik etki analizleri yapıldı. %15,50 yüzdesi ile en yüksek erken apoptoz oranı gösteren bileşik 4, %63,31 yüzdesi ile en yüksek mitokondriyal aktivite gösteren canlılık oranı ve %91,77 ile en yüksek pozitif kaspaz-3 aktivitesi gösteren en aktif bileşik olarak seçildi. İkinci en aktif bileşiğimiz ise bileşik 5 idi. 3d kodlu 4-siyanofenil substitüenti içeren bileşik 4 (**2-(2-(4-(Benziloksi)benziliden)hidrazinil)-4-(4-siyanofenil)tiyazol**) ve 3e kodlu fenil substitüenti içeren bileşik 5 (**2-(2-(4-(Benziloksi)benziliden)hidrazinil)-4-feniltiyazol**) ile RT-PCR analizi yapıldı.

Analiz sonuçlarına göre bileşik 4'ün pro-apoptotik Bax genini IC_{50/2} dozunda up-regüle ederek, BCL-2 anti-apoptotik genini ise IC₅₀ dozunda down-regüle ederek ve akciğer kanserinde overeksprese olduğu bilinen VEGF, CYD-1, AKT, ERK ve pERK genlerini down regüle ederek apoptozu tetiklediğini düşünmekteyiz.

Bileşik 5 ise Bax genini down regüle ederken BCL-2 genini up regüle ettiği fakat diğer akciğer kanserinde over eksprese olduğu bilinen genleri IC₅₀ dozunda down-regüle ettiği gözlemlendi.

Aktif olarak seçtiğimiz bileşiklerin L929 sağlıklı hücre hattına karşı sitotoksitelerinin önemli ölçüde düşük olduğu ve selektivite indekslerinin de yüksek olduğu görüldü. Akım sitometri deneylerinde apoptotik yolları indüklediği ve RT-PCR sonuçlarımıza göre akciğer kanserinde overeksprese olan genleri down regüle etmesi sebebiyle bu bileşiklerin tedavi sürecine yardımcı olabilecek ilaç adayları olduğunu düşünmekteyiz. Literatür ayrıca tiyazollerin sentezinin nispeten basit olduğunu ve tatmin edici verimlere izin verdiğini bildirmektedir. Tiyazol gibi birden fazla hedefi olan ilaçlar, birlikte etki gösteren sinerjik etkileri sebebiyle tek hedefli ilaçlara göre terapötik olarak avantaj sağlar ve bu da daha basitleştirilmiş bir terapötik tedaviyi mümkün kılar. Bizim bileşiklerimizde en aktif sonuçlar veren bileşik 4'ün gelecekte biyokimyasal ve moleküler etki mekanizmalarının *in vivo* ve *in situ* yöntemleriyle aydınlatılmasıyla, bileşiğin bir tedavi ajanı olarak geliştirilebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKÇA

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176.
- AJ, A., JG, F., & JM, S. (2007). Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *American College Of Chest Physicians*, 132(3), 29-55.
- Akalın Çiftçi, G., Sever, B., & Altıntop, M. D. (2019). A comprehensive study on thiadiazole-based anticancer agents inducing cell cycle arrest and apoptosis/necrosis through suppression of akt activity in lung adenocarcinoma and glioma cells. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(2), 119–131.
- Alao, J. P. (2007). The regulation of cyclin D1 degradation: Roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. In *Molecular Cancer*. 6, 24.
- American Cancer Society. (2020). Cancer Facts & Figures 2020. *American Cancer Society*, 1–52.
- Anderson, M. W., Reynolds, S. H., You, M., & Maronpot, R. M. (1992). Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 98, 13-24.
- Atkins, C., Liu, Q., Minthorn, E., Zhang, S. Y., Figueroa, D. J., Moss, K., Stanley, T. B., Sanders, B., Goetz, A., Gaul, N., Choudhry, A. E., Alsaid, H., Jucker, B. M., Axten, J. M., & Kumar, R. (2013). Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Research*, 73(6), 1993–2002.
- Aylett, C. H. S., Löwe, J., & Amos, L. A. (2011). New Insights into the Mechanisms of Cytomotive Actin and Tubulin Filaments. In *International Review of Cell and Molecular Biology*. 292, 1-71.
- Belinsky, S. A. (2004). Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(9), 707–717.
- Boice, A., & Bouchier-Hayes, L. (2020). Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1867(6), 118688.
- Breslow, R. (1958). On the mechanism of thiamine action. IV. evidence from studies on model systems. *Journal of the American Chemical Society*, 80(14), 3719–3726.

- Bromen, K., Pohlabein, H., Jahn, I., Ahrens, W., & Jöckel, K.-H. (2000). Aggregation of lung cancer in families: results from a population-based case-control study in Germany. *American Journal of Epidemiology*, 152(6), 497-505.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR - A perspective. In *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3), 597-601.
- Calvayrac, O., Pradines, A., Pons, E., Mazières, J., & Guibert, N. (2017). Molecular biomarkers for lung adenocarcinoma. *European Respiratory Journal*, 49(4), 1-17.
- Carneiro, B. A., ve El-Deiry, W. S. (n.d.). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(7), 395-417.
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, 2(5), 401-404.
- Chanvorachote, P., Sriratanasak, N., Nonpanya, N. (2020). C-myc contributes to malignancy of lung cancer: A potential anticancer drug target. *Anticancer Research*, 40(2), 609-618
- Chu, W. M. (2013). Tumor necrosis factor. *Cancer Letters*, 328(2), 222-225.
- Cree, I. A. (2011). *Cancer cell culture*. Amerika Birleşik Devleti: Humana Press Yayınları.
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11), 953-957.
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582-592.
- de Siqueira, L. R. P., de Moraes Gomes, P. A. T., de Lima Ferreira, L. P., de Melo Rêgo, M. J. B., & Leite, A. C. L. (2019). Multi-target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 170, 237-260.
- dos Santos, T. A. R., da Silva, A. C., Silva, E. B., de Moraes Gomes, P. A. T., Espíndola, J. W. P., de Oliveira Cardoso, M. V., Moreira, D. R. M., Leite, A. C. L., & Pereira, V. R. A. (2016). Antitumor and immunomodulatory activities of thiosemicarbazones and 1,3-Thiazoles in Jurkat and HT-29 cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 82, 555-560.
- Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. In *Trends in Genetics*, 29(10), 569-574.

- Eray, M., Mättö, M., Kaartinen, M., Andersson, L. C., & Pelkonen, J. (2001). Flow cytometric analysis of apoptotic subpopulations with a combination of Annexin V-FITC, propidium iodide, and SYTO 17. *Cytometry*, 43(2), 134–142.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2893–2917.
- Frezza, D., Gallo, M., Maiello, M. R., D'Alessio, A., Esposito, C., Chicchinelli, N., Normanno, N., & De Luca, A. (2017). VEGF as a potential target in lung cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(10), 959-966.
- Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M., & Dryja, T. P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323(6089), 643–646.
- Futreal, P. A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N., & Stratton, M. R. (2004). A census of human cancer genes. *Nature Reviews Cancer*, 4(3), 177-183.
- Ghosh, S. (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*, 88, 102925.
- Govindan, R., Ding, L., Griffith, M., Subramanian, J., Dees, N. D., Kanchi, K. L., Maher, C. A., Fulton, R., Fulton, L., Wallis, J., Chen, K., Walker, J., McDonald, S., Bose, R., Ornitz, D., Xiong, D., You, M., Dooling, D. J., Watson, M., Wilson, R. K. (2012). Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell*, 150(6), 1121-1134.
- Gross, S., Rahal, R., Stransky, N., Lengauer, C., & Hoeflich, K. P. (2015). Targeting cancer with kinase inhibitors. *Journal of Clinical Investigation*, 125(5), 1780–1789.
- Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(3), 1997–2007.
- Hamilton, W., Peters, T. J., Round, A., & Sharp, D. (2005). What are the clinical features of lung cancer before the diagnosis is made? A population based case-control study. *Thorax*, 60(12), 1059-1065.
- Hammerman, P. S., Voet, D., Lawrence, M. S., Voet, D., Jing, R., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Stojanov, P., McKenna, A., Lander, E. S., Gabriel, S., Getz, G., Imielinski, M., Helman, E., Hernandez, B., Pho, N. H., Meyerson, M., Chu, A., Hye-Chun, J. E., Shen, R. (2012). Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, 489(7417), 147–154.

- Hammerschmidt, S., & Wirtz, H. (2009). Lungenkarzinom - Aktuelle diagnostik und therapie. *Deutsches Arzteblatt*, 106(49), 809–820.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674
- Heldin, C. H. (2012). Autocrine PDGF stimulation in malignancies. In *Upsala Journal of Medical Sciences*, 117(2), 83-91.
- Henson, E. S., & Gibson, S. B. (2006). Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: Implications for cancer therapy. *Cellular Signalling*, 18(12), 2089-2097.
- Hirsch, F. R., Varella-Garcia, M., Bunn, P. A., Di Maria, M. V., Veve, R., Bremnes, R. M., Barón, A. E., Zeng, C., & Franklin, W. A. (2003). Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: Correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, 21(20), 3798-3807.
- Hnisz, D., Weintraub, A. S., Day, D. S., Valton, A. L., Bak, R. O., Li, C. H., Goldmann, J., Lajoie, B. R., Fan, Z. P., Sigova, A. A., Reddy, J., Borges-Rivera, D., Lee, T. I., Jaenisch, R., Porteus, M. H., Dekker, J., & Young, R. A. (2016). Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods. *Science*, 351(6280), 1454–1458.
- Hornberg, J. J., Bruggeman, F. J., Westerhoff, H. V., & Lankelma, J. (2006). Cancer: A Systems Biology disease. *BioSystems*, 83, 81–90.
- Hung, R. J., McKay, J. D., Gaborieau, V., Boffetta, P., Hashibe, M., Zaridze, D., Mukeria, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Rudnai, P., Fabianova, E., Mates, D., Bencko, V., Foretova, L., Janout, V., Chen, C., Goodman, G., Field, J. K., Liloglou, T., Brennan, P. (2008). A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*, 452(7187), 633-637.
- Hussein, Y., Mohammed, E., Malojirao, V. H., Thirusangu, P., Al-ghorbani, M., Prabhakar, B. T., & Khanum, S. A. (2017). The critical role of novel benzophenone analogs on tumor growth inhibition targeting angiogenesis and apoptosis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 9, 639-656.
- Hynes, N. E., & Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 5(5), 341-354
- International Union Against Cancer. (2004). Evidence-based cancer prevention strategies for NGOs: *UICC regional Handbooks*, (8. baskı) İsviçre.
- Islam, M. (2017). Alive failures behind the windows of cancer therapy. *International Journal of Medicine*, 5(2), 179-185.

- Jiang, M., Qi, L., Li, L., & Li, Y. (2020). The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. *Cell Death Discovery*, 6,112
- Joyce, J. A., & Fearon, D. T. (2015). T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*, 348(6230), 74-80.
- Kim, K. H., & Sederstrom, J. M. (2015). Assaying cell cycle status using flow cytometry. *Current Protocols in Molecular Biology*, 28(6), 1-11.
- Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 386(6627), 761-763.
- Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(4), 820–823.
- Knudson, Alfred G. (2002). Cancer genetics. *American Journal of Medical Genetics*, 111(1), 96–102.
- Komagata, H., Yoneda, S., Mao, Y., Yang, D., He, J., Krasna, M. J., Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., Jemal, A., Nanavaty, P., Alvarez, M. S., Michael Alberts, W., Nasim, F., Sabath, B. F., Eapen, G. A., Oberndorfer, F., Müllauer, L., Minárik, M., Jacobsson, H. (2018). Lung Cancer. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 25(2), 717–722.
- Kreuzer, M., Kreienbrock, L., Gerken, M., Heinrich, J., Bruske-Hohlfeld, I., Muller, K. M., & Wichmann, H. E. (1998). Risk Factors for Lung Cancer in Young Adults. *American Journal of Epidemiology*, 147(11), 1028–1037.
- Krontiris, T. G., & Cooper, G. M. (1981). Transforming activity of human tumor DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78(2), 1181–1184.
- Labib, M. B., Philoppes, J. N., Lamie, P. F., ve Ahmed, E. R. (2018). Azole-hydrazone derivatives: Design, synthesis, in vitro biological evaluation, dual EGFR/HER2 inhibitory activity, cell cycle analysis and molecular docking study as anticancer agents. *Bioorganic Chemistry*, 76, 67-80.
- Latimer, K. M., & Mott, T. F. (2015). Lung cancer: Diagnosis, treatment principles, and screening. *American Family Physician*, 91(4), 250–256.
- Lebrec, H., Ponce, R., Preston, B. D., Iles, J., Born, T. L., & Hooper, M. (2015). Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor inhibition, and cancer risk. *Current Medical Research and Opinion*, 31(3), 557–574.
- Li, H., Wang, X. M., Wang, J., Shao, T., Li, Y. P., Mei, Q. B., Lu, S. M., & Zhang, S. Q. (2014). Combination of 2-methoxy-3-phenylsulfonylaminobenzamide and 2-aminobenzothiazole to discover novel anticancer agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22(14), 3739–3748.

- Liu, G., Pei, F., Yang, F., Li, L., Amin, A. D., Liu, S., Ross Buchan, J., & Cho, W. C. (2017). Role of autophagy and apoptosis in non-small-cell lung cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 367.
- Mao, Y., Yang, D., He, J., & Krasna, M. J. (2016). Epidemiology of Lung Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 25(3), 439–445.
- Morris, L. G. T., & Chan, T. A. (2015). Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer*, 121(9), 1357–1368.
- Nagarajan, A., Malvi, P., & Wajapeyee, N. (2016). Oncogene-Directed Alterations in Cancer Cell Metabolism. *Trends in Cancer*, 2(7), 365–377.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260), 23–28.
- Ohsaki, Y., Tanno, S., Fujita, Y., Toyoshima, E., Fujiuchi, S., Nishigaki, Y., Ishida, S., Nagase, A., Miyokawa, N., Hirata, S., ve Kikuchi, K. (2000). Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients with p53 overexpression. *Oncology Reports*, 7(3), 603-607.
- Pao, W., & Girard, N. (2011). New driver mutations in non-small-cell lung cancer. In *The Lancet Oncology*, 12(2), 175-180.
- Piechowska, K., Świtalska, M., Cytarska, J., Jaroń, K., Łuczykowski, K., Chałupka, J., Wietrzyk, J., Misiura, K., Bojko, B., Kruszewski, S., & Łączkowski, K. Z. (2019). Discovery of tropinone-thiazole derivatives as potent caspase 3/7 activators, and noncompetitive tyrosinase inhibitors with high antiproliferative activity: Rational design, one-pot tricomponent synthesis, and lipophilicity determination. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 175, 162–171.
- Pierotti, M. A., Frattini, M., Molinari, F., Sozzi, G., ve Croce, C. M. (2017). Oncogenes. F. Khuri (Editör) *Cancer Medicine* içinde (s. 1–22). Amerika Birleşik Devletleri: Wiley-Blackwell Yayınları.
- Ponder, B. A. J. (2001). Cancer genetics. *Nature*, 411(6835), 336–342.
- Qin, A., Reddy, H. G., Weinberg, F. D., & Kalemkerian, G. P. (2020). Cyclin-dependent kinase inhibitors for the treatment of lung cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 21(8), 941–952.
- Rekhtman, N. (2010). Neuroendocrine tumors of the lung. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 134(11), 1628–1638.
- Rivera, M. P., Mehta, A. C., & Wahidi, M. M. (2013). Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, *Chest*, 143(5), 142-165.
- Rosenberger, A., Illig, T., Korb, K., Klopp, N., Zietemann, V., Wölke, G., Meese, E., Sybrecht, G., Kronenberg, F., Cebulla, M., Degen, M., Drings, P.,

- Gröschel, A., Konietzko, N., Kreymborg, K., Häußinger, K., Höffken, G., Jilge, B., Ko, Y. D., Wichmann, H. E. (2008). Do genetic factors protect for early onset lung cancer?. *BioMed Central Cancer*, 8(1), 60.
- AACR project genie: Powering precision medicine through an international consortium. (2017). *Cancer Discovery*, 7(8), 818-831.
- Seo, J. S., Ju, Y. S., Lee, W. C., Shin, J. Y., Lee, J. K., Bleazard, T., Lee, J., Jung, Y. J., Kim, J. O., Shin, J. Y., Yu, S. B., Kim, J., Lee, E. R., Kang, C. H., Park, I. K., Rhee, H., Lee, S. H., Kim, J. Il, Kang, J. H., & Kim, Y. T. (2012). The transcriptional landscape and mutational profile of lung adenocarcinoma. *Genome Research*. 22(11), 2109-2119.
- Shih, C., Padhy, L. C., Murray, M., & Weinberg, R. A. (1981). Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature*, 290(5803), 261-264.
- Siddiqui, W. A., Ahad, A., & Ahsan, H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. In *Archives of Toxicology*, 89(3), 289-317.
- Sivandzade, F., Bhalerao, A., & Cucullo, L. (2019). Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-Protocol*, 9(1), 1–13.
- Smith, J. S., Lindsay, L., Hoots, B., Keys, J., Franceschi, S., Winer, R., & Clifford, G. M. (2007). Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *International Journal of Cancer*, 121(3), 621–632.
- Spill, F., Reynolds, D. S., Kamm, R. D., & Zaman, M. H. (2016). Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. In *Current Opinion in Biotechnology*, 40, 41-48.
- Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, 120(3), 159–167.
- Sun, S., Schiller, J. H., & Gazdar, A. F. (2007). Lung cancer in never smokers - A different disease. *Nature Reviews Cancer*, 7(10), 778–790.
- Timofeeva, M., Kropp, S., Sauter, W., Beckmann, L., Rosenberger, A., Illig, T., Jäger, B., Mittelstrass, K., Dienemann, H., Bartsch, H., Bickeböller, H., Chang-Claude, J., Risch, A., Wichmann, H. E., Kleen, H., Bonnet, R., Ko, Geisen, Stier, Wiesholzer, M. (2010). Genetic polymorphisms of MPO, GSTT1, GSTM1, GSTP1, EPHX1 and NQO1 as risk factors of early-onset lung cancer. *International Journal of Cancer*, 127(7), 1547-61.

- Timofeeva, M. N., Kropp, S., Sauter, W., Beckmann, L., Rosenberger, A., Illig, T., Jäger, B., Mittelstrass, K., Dienemann, H., Lucy-Consortium, T., Bartsch, H., Bickeböllner, H., Chang-Claude, J. C., Risch, A., & Wichmann, H.-E. (2009). CYP450 polymorphisms as risk factors for early-onset lung cancer: gender-specific differences. *Carcinogenesis*, 30(7), 1161–1169.
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., ve Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends - An update. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 25(1), 16–27.
- Torry, D. S., ve Cooper, G. M. (1991). Proto-oncogenes in development and cancer. *American Journal of Reproductive Immunology*, 25(3), 129–132.
- Wang, J. J., Lei, K. F., & Han, F. (2018). Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(12), 3855–3864.
- Wang, K. (2015). Autophagy and apoptosis in liver injury. *Cell Cycle*, 14(11), 1631–1642.
- Wang, Y., Broderick, P., Webb, E., Wu, X., Vijayakrishnan, J., Matakidou, A., Qureshi, M., Dong, Q., Gu, X., Chen, W. V., Spitz, M. R., Eisen, T., Amos, C. I., ve Houlston, R. S. (2008). Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. *Nature Genetics*, 40(12), 1407–1409.
- Warren, C. F. A., Wong-Brown, M. W., & Bowden, N. A. (n.d.). *BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer*, 10(3), 177.
- Witschi, H. (2001). A short history of lung cancer. *Toxicological Sciences*, 64(1), 4–6.
- Wong, S. Y., & Hynes, R. O. (2006). Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide. *Cell Cycle*, 5(8), 812–817.
- Zhou, W., Huang, A., Zhang, Y., Lin, Q., Guo, W., You, Z., Yi, Z., Liu, M., & Chen, Y. (2015). Design and optimization of hybrid of 2,4-diaminopyrimidine and arylthiazole scaffold as anticancer cell proliferation and migration agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 96, 269–280.
- Zhu, J., He, F., Hu, S., & Yu, J. (2008). On the nature of human housekeeping genes. In *Trends in Genetics*, 24(10), 481–484.
- http-1: <https://www.iarc.who.int/featured-news/latest-global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-18-1-million-new-cases-and-9-6-million-cancer-deaths-in-2018/> International Agency For Research On Cancer (Erişim Tarihi: 13.06.2021)
- http-2: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers> Global Cancer Observatory (Erişim Tarihi: 10.11.2020)

EK-1

