

**BAZI FLUOREN TİYAZOL TÜREVLERİNİN ANTİKANSER ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Aydan HÜSEYNLİ

Eskişehir 2024

**BAZI FLUOREN TİYAZOL TÜREVLERİNİN ANTİKANSER ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Aydan HÜSEYNLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ocak 2024

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Aydan HUSEYNLI'nın "Bazı fluoren tiyazol türevlerinin antikanser etkilerinin araştırılması." başlıklı tezi **01 Şubat 2024** tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca toplanan **Biyokimya Anabilim Dalı Biyokimya programında, yüksek lisans tezi** olarak değerlendirilerek kabul edilmiştir.

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : **Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ**

Üye : **Prof. Dr. Halide Edip TEMEL**

Üye : **Doç. Dr. Emel ERGENE**

Prof. Dr. Saime ÖNCE
Anadolu Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

BAZI FLUOREN TİYAZOL TÜREVLERİNİN ANTİKANSER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Aydan HÜSEYNLİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2024

Danışman: Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Kanser, hücrelerde oluşan moleküler mekanizma bozuklukları sebebiyle meydana gelir. Bu nedenle kanser çalışmalarında hücreler yıllardır moleküler düzeyde çalışılmaktadır. Örneğin, sinyal iletim yollarında, apoptoz ve hücre döngüsünde yer alan proteinler ve bunların görevleri, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde işleyen mekanizmaları incelenirken aydınlanmıştır. Küresel olarak, akciğer kanseri erkeklerde en yaygın kanser ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerindendir. Meme ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü en yaygın kanser tipidir. Kadınlarda ise kanser ölümlerinin (meme kanserinden sonra) ikinci önde gelen nedenidir.

Antikanser, antialerjik, anti-enflamatuar, antibakteriyel, antihipertansif, antimalaryal, antipsikotik, diüretik, antifungal, hipnotik, nöroprotektif ve antioksidan nitelikler daha önce tiyazol içeren bileşikler için gösterilmiştir. Beş üyeli heterosiklik organik molekül 1,3-tiyazol bir azot, bir sülfür ve üç karbon atomundan oluşur. Tiyazollerin antiviral ve antikanser özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Hem deniz hem de mikrobiyolojik kaynaklardan elde edilirler. Bir östrojen reseptör ligandı olarak bilinmesinin yanı sıra, tiyazolün özel bir tür adenosin reseptör antagonisti olduğu da düşünülmektedir.

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

Anahtar kelimeler: Tiyazoller, Akciğer kanseri, Apoptoz

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTICANCER DERIVATIVES OF SOME FLUORENE THIAZOLE DERIVATIVES

Aydan HUSEYNLI

Department of Biochemistry

Anadolu University, Postgraduate Education Institute, January 2024

Supervisor: Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Cancer arises from abnormalities within cellular molecular processes. For this reason, cells have been studied at the molecular level in cancer research for many years. For example, proteins involved in signaling pathways, apoptosis, and the cell cycle and their roles have been elucidated by studying the mechanisms by which cells function uncontrollably. Globally, lung cancer is the most common cancer in men and the leading cause of cancer-related deaths. It is the third most common cancer after breast and colorectal cancer. In women, it is the second leading cause of cancer deaths (after breast cancer).

Anticancer, antiallergic, anti-inflammatory, antibacterial, antihypertensive, antimalarial, antipsychotic, diuretic, antifungal, hypnotic, neuroprotective, and antioxidant properties have been previously demonstrated for thiazole-containing compounds. The five-membered heterocyclic organic molecule 1,3-thiazole consists of one nitrogen, one sulfur, and three carbon atoms. Thiazoles have been shown to have antiviral and anticancer properties. They are derived from both marine and microbiological sources. Besides being known as an estrogen receptor ligand, thiazole is also considered a special adenosine receptor antagonist.

In this thesis, we aimed to investigate the cytotoxic and apoptotic effects and gene expressions of fluorene thiazole derivative compounds synthesized for the first time on A549 human lung adenocarcinoma cells in vitro to be able to treat cancer without damaging healthy cells or with minimal damage.

Keywords: Thiazoles, Lung cancer, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans yaptığım süre boyunca akademik olarak bana yol gösteren, her zaman güler yüzü ve sabrı ile yanımda olan, beni yüreklendiren, desteğini esirgemeyen, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ'ye

Çalışmamda desteklerini aldığım ve çalışmada adı geçen bileşiklerin sentezi konusunda sağladıkları yardımdan dolayı Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Leyla YURTTAŞ'a ve Sayın Öğr. Gör. Dr. Asaf Evrim EVREN'e

Laboratuvar çalışmalarında bana tecrübeleriyle yol gösteren, desteğini esirgemeyen sevgili Dr. İpek ERTORUN'a ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını aldığım laboratuvar arkadaşım Arş. Gör. Şevval KARACA'ya

Tez yazım sürecinde teknik tecrübeleriyle bana yol gösteren sevgili hocam İsmail DAĞDELEN'e

Doğduğumdan beri her zaman yanımda olan, hayatımın her alanında ne zaman ihtiyacım olsa desteğini hissettiğim ve tez dönemimde en zor zamanımda beni cesaretlendiren sevgili kardeşim Fidan HÜSEYNLİ'ye

Hayatımın her alanında maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili babam Vahid HÜSEYNOV ve sevgili annem Mane HÜSEYNOVA ŞABANOVA'ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Aydan HÜSEYNLİ

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 aşamalarında 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.

Aydan HÜSEYNLİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAZI FLUOREN TİYAZOL TÜREVLERİNİN ANTİKANSER ETKİLERİNİN

ARAŞTIRILMASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	4
2.1. Kanser Biyolojisi ve Gelişimi	4
2.2. Akciğer kanseri	5
2.2.1. Akciğer kanseri nedenleri ve risk faktörleri.....	6
2.2.2. Erken akciğer kanseri tespiti	6
2.2.3. Akciğer kanserinin klinik belirtileri.....	6
2.2.4. Sigara kullanımı	7
2.2.5. Akciğer kanseri tedavi yöntemleri.....	8
2.2.5.1. Cerrahi yolla müdahale	8
2.2.5.2. Radyoterapi	8
2.2.5.3. Kemoterapi	9
2.2.5.4. Hedefe yönelik tedavi	9
2.3. Kanser genetiği.....	9
2.3.1. Kanserde genetik faktörler	10
2.3.1.1. Proto-onkogenler.....	10
2.3.1.2. Onkogenler	11
2.3.2. Tümör baskılayıcı genler.....	12
2.3.2.1. RB1 geni	12
2.3.2.2. p53 fonksiyonu	13
2.3.3. Akciğer kanserinin gelişimine katkıda bulunan onkogenler.....	13
2.3.3.1. Büyüme faktörü reseptörleri.....	14
2.3.3.1.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörü.....	14
2.3.3.1.2. Ras'ın aktifleşmesi ve sinyal iletim kaskadı	15
2.3.3.2. Akciğer kanserinde siklinler, siklin bağımlı kinazlar	16

2.3.3.3. FOX-M1 geni	16
2.4. Hücre ölüm mekanizmaları.....	17
2.4.1. Apoptoz, otofaji, nekroz	17
2.4.1.1. Hücre içi (intrinsik) apoptotik yol	18
2.4.1.2. Hücre dışı (ekstrinsik) apoptotik yol	18
2.4.1.3. Kaspazlar	19
2.4.1.4. Bcl-2 Ailesi	20
3. MATERYAL VE METOD.....	20
3.1. Materyaller	20
3.1.1. Sarf malzemeler ve kimyasallar	20
3.1.2. Kullanılan ekipmanlar	21
3.2. METODLAR.....	23
3.2.1. Fluoren-tiyazol türevlerinin sentezi.....	23
3.2.2. Fluoren türevlerine ait spektroskopik verilerin değerlendirilmesi	24
3.3. Malzemelerin hazırlanması	30
3.3.1. Bileşiklerinin hazırlanması.....	30
3.3.2. Sisplatin'in hazırlanması	30
3.3.3. Kullanılan hücreler	31
3.4. Hücrelerin kültür ortamında çoğaltılması.....	31
3.4.1. Stoklanma ve pasajlanma.....	31
3.4.2. Hücre Sayımı	32
3.5. Sitotoksosite Belirleme Testleri.....	32
3.5.1. MTT metodu ile hücrelerin sitotoksitelerinin belirlenmesi	32
3.5.2. MTT yönteminin uygulanması.....	33
3.6. Akım Sitometri Cihazı ile gerçekleştirilen deneyler.....	34
3.6.1. Annexin V-FITC/PI yöntemi ile hücre ölüm etkilerinin belirlenmesi.....	34
3.6.1.1. Yöntemin uygulanması	34
3.6.2. Kaspaz-3 aktivasyonu ile hücre ölüm etkilerinin belirlenmesi	35
3.6.3. Yöntemin uygulanması	35
3.7. RT- PCR (Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi ile AKT, Bcl-2, Bax, CYD1, ERK, FOX-M1ve Housekeeping gen (β - actin) ifadelerinin (ekspresyon) belirlenmesi.....	36
3.7.1. RNA izolasyonu	37
3.7.2. c-DNA (komplementar DNA) sentezi	40
3.7.3. RT-PCR analizi	41

4. SONUÇLAR VE BULGULAR	42
4.1. Sitotoksite (MTT) Testi Sonuçları	42
4.1.1. Sentezlenen fluoren tiyazol bileşiklerinin A549 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri	42
4.1.2. Sentezlenen Fluoren tiyazol bileşiklerinin L929 hücreleri üzerine sitotoksik etki sonuçları	44
4.1.3. A549 hücrelerinin L929 hücrelerine kıyasla selektivite indeksi (SI)	46
4.2. Sentezlenen Bileşiklerin, Akım Sitometri Metodu ile A549 Hücreleri.....	47
4.2.1. Apoptotik Etkilerin Akım sitometrik olarak Annexin-V FITC-PI analizi ile ölçülmesi.....	47
4.2.1.1. Bileşiklerin A549 hücreleri üzerine apoptotik etki sonuçlarının belirlenmesi.....	47
4.2.2. kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometrik analizi	51
4.2.2.1. A549 hücreleri üzerine 24 saatlik kaspaz-3 aktivite sonuçlarının değerlendirilmesi.....	51
4.3. RT-PCR (Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi Sonuçlar	55
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
KAYNAKÇA	
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. 1,3 Tiyazol halkası.....	3
Şekil 1.2. Fluoren halkası	4
Şekil 3.1. Bileşiklerin (2a-2m) sentezi. Reajanlar, reaktanlar, reaksiyon koşulları. a:EtOH,12s kaynatma;b:EtOH 6s, kaynatma.....	24
Şekil 3.2. MTT molekülünün formazan kristaline dönüşmesi.....	33
Şekil 4.1. A) Bileşik 1, B) Bileşik 7, C) Bileşik 9 D) Bileşik 13'ün MTT testi kullanılarak 24 saat sonra A549 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri. Canlılık verileri ortalama $\pm$ SD'dir (her zaman noktasında ve konsantrasyonda n = 3). Bileşik 1, 7, 9 ve 13 tarafından A549 hücrelerinde hücre proliferasyonu inhibisyonu gözlemlendi. Tek yönlü Anova ile $P < 0.0001$	43
Şekil 4.2. A) Bileşik 1, B) Bileşik 7, C) Bileşik 9 D) 13'ün MTT testi kullanılarak 24 saat sonra L929 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri. Canlılık verileri ortalama $\pm$ SD'dir (her zaman noktasında ve konsantrasyonda n = 3). Bileşik 1, 7, 9 ve 13 tarafından L929 hücrelerinde hücre proliferasyonu inhibisyonu gözlemlendi. Tek yönlü Anova ile $P < 0.0001$	45
Şekil 4.3. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı ve kontrol B) Bileşik 1'in A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC50 ve IC50/2 konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.....	47
Şekil 4.4. C) Bileşik 7 A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC50 ve IC50/2 konsantrasyonlarının apoptotik etkileri. D) Bileşik 9 A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC50 ve IC50/2 konsantrasyonlarının apoptotik etkileri	48
Şekil 4.5. E) Bileşik 13 A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC50 ve IC50/2 konsantrasyonlarının apoptotik etkileri. F) Sisplatinin A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC50 ve IC50/2 konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.....	49
Şekil 4.6. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol B) Bileşik 1'in IC50 ve IC50/ analizler	51

Şekil 4.7. C) Bileşik 7'in IC50 ve IC50/2 analizleri D) Bileşik 9'nin IC50 ve IC50/2 analizleri.....	52
Şekil 4.8. E) Bileşik 13'in IC50 ve IC50/2 analizleri F) Sisplatinin IC50 ve IC50/2 analizleri.....	53
Şekil 4.9. A) BCL-2, B) BAX genleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile kat değişimleri hesaplandı. (n= 3). Tek yönlü Anova ile $P > 0,05$	56
Şekil 4.10. C) ERK, D) AKT genleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile kat değişimleri hesaplandı. (n= 3). Tek yönlü Anova ile $P > 0,05$	57
Şekil 4.11. E) CYD1, F) FOXM1 genleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile kat değişimleri hesaplandı. (n= 3). Tek yönlü Anova ile $P < 0,05$	58

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Onkogenler ve bulunduğu kanser tipleri.....	12
Tablo 3.1. Kullanılan bileşiklerin kodu.....	30
Tablo 3.2. RT-PCR analizi primerleri.....	37
Tablo 3.3. RNA izolasyon değerleri ve saflığı.....	39
Tablo 3.4. RT-PCR bileşenleri.....	41
Tablo 4.1. Sisplatin ve sentez bileşiklerinin A549 hücre hattındaki 24.saatdeki IC ₅₀ konsantrasyon değerleri.....	42
Tablo 4.2. Sentez bileşiklerinin L929 hücre hattındaki 24.saatdeki IC ₅₀ konsantrasyon değerleri.....	44
Tablo 4.3. 24. Saat IC ₅₀ değerlerine göre A549 hücre hattının L929 hücrelerine göre selektivite indeksi.....	46
Tablo 4.4. A549 hücre hatlarının 24. saatteki % canlılık oranları Annexin-V FITC.....	50
Tablo 4.5. Sisplatinin A549 hücre hatlarının üzerindeki 24. saatteki % canlılık oranları Annexin-V FITC.....	50
Tablo 4.6. Sentez bileşiklerin A549 hücre hatları üzerindeki 24. Saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	50
Tablo 4.7. Sisplatinin A549 hücre hatları üzerindeki kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları.....	54
Tablo 4.8. Sentez bileşiklerin A549 hücre hatları üzerindeki kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları.....	54
Tablo 4.9. A549 hücre hatlarındaki Bcl-2, Bax, ERK, AKT, CYD1, FOXM1 genlerindeki kat değişimleri.....	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A549	: İnsan akciğer kanseri hücre hattı
ABL	: Abelson mürin lösemi virusu
AdC	: Adenokarsinoma
AKT	: Serin-treonin protein kinaz
ALK	: Anaplastik lenfoma kinaz
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktifleştirici faktör 1
BCL-2	: B-hücreli lenfoma 2
BCR	: Kesme noktası küme proteini
CDK	: Siklin bağımlı kinazlar
CYP	: Sitokrom P540
DDP	: Sisplatin
DMEM	: Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	: Dimetilsulfoksit
DNA	: Deoksiriboz nukleik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü
EMT	: Epitelyal-mezenkimal geçişler
FADD	: Ölüm alanı ile FAS ilişkili protein
FBS	: Fetal sıgır serumu
GTP	: Guanozin trifosfat
HRAS	: Harvey sıçan sarkomu virüsü onkogeni
HPV	: İnsan papillomavirusu
IC ₅₀	: Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan doz
IC _{50/2}	: Maksimum inhibisyonun %25'ini oluşturan doz

ITK	: İnce Tabaka Kromotografisi
LCC	: Büyük hücreli karsinomu
KRAS	: Kirsten sıçan sarkomu virüsü onkogeni
MAPK	: Mitojenle aktive edilen protein kinaz
mTOR	: Tirozin protein kinaz
NSCLC	: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
NRAS	: İnsan nöroblastomu ras onkogeni
P53	: Protein 53
PI3K	: Fosfoinozimid-3 kinaz
RB1	: Retinoblastom 1 geni
PBS	: Fosfat tuz tampon çözeltisi
PTEN	: Protein tirozin fosfataz ve tensin homologu
RT	: Işın radyoterapisi
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
RT- PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SCC	: Skuamöz hücreli karsinomu
SCLC	: Küçük hücreli akciğer karsinomu
STAT	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon proteinin aktivatörü
TGF β	: Transforme edici büyüme faktörü-beta
TME	: Tümör mikroçevresi
TNF	: Tümör nekroz faktörü
UGT	: Üridin difosfat glukuronil transferaz
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
İTK	: İnce tabaka kromorografisi

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri dünya çapında kanserden ölümlerin ana nedenidir. Sigara içen kişiler akciğer kanserine yakalanma riski en yüksek olan kişilerdir, ancak hiç sigara içmemiş kişilerde de ortaya çıkabilir. Akciğer kanseri riski, sigara içilen süre ve sigara miktarı ile artar. Uzun yıllar sigara içmiş olsanız bile, sigarayı bırakmak akciğer kanserine yakalanma riskinizi büyük ölçüde azaltabilir (Mayo Clinic Family Book).

2020 yılında dünya genelinde yaklaşık 19,3 milyon yeni kanser vakası (melanom dışı cilt kanseri hariç 18,1 milyon) ve yaklaşık 10,0 milyon kanser ölümü (melanom dışı cilt kanseri hariç 9,9 milyon) olacağı tahmin edilmektedir. Kadınlarda meme kanseri, tahmini 2,3 milyon yeni vaka (%11,7) ile akciğer kanserini geçerek en sık teşhis edilen kanser haline gelmiş, bunu akciğer (%11,4), kolorektal (%10,0), prostat (%7,3) ve mide (%5,6) kanserleri izlemiştir. Akciğer kanseri yaklaşık 1,8 milyon ölümle (%18) kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olmaya devam ederken, bunu kolorektal (%9,4), karaciğer (%8,3), mide (%7,7) ve kadın memesi (%6,9) kanserleri takip etmektedir.

Genel kanser insidansı geçiş sürecindeki ülkelerde her iki cinsiyet için de geçiş sürecindeki ülkelere kıyasla 2 ila 3 kat daha yüksekken, ölüm oranları erkeklerde ve kadınlarda daha az değişiklik göstermektedir. Bununla birlikte, kadınlarda meme ve rahim ağzı kanserleri için ölüm oranları geçiş sürecindeki ülkelerde geçiş sürecindeki ülkelere kıyasla önemli ölçüde daha yüksektir.

Küresel kanser yükünün 2040 yılında 28,4 milyon vakaya ulaşacağı öngörülmektedir; bu da 2020 yılına göre %47'lik bir artışa işaret etmektedir. Geçiş sürecindeki ülkelerin, demografik değişiklikler nedeniyle geçiş sürecindeki ülkelere (%32 ila %56) kıyasla daha büyük bir artış (%64 ila %95) yaşaması beklenmektedir. Bu artış, küreselleşme ve ekonomik büyümeyle ilişkili artan risk faktörleriyle daha da şiddetlenebilir. Kanser küresel ölçekte etkili bir şekilde kontrol altına almak için geçiş sürecindeki ülkelere kanser önleme tedbirlerini yaygınlaştırmak ve yeterli kanser bakımı sağlamak için sürdürülebilir altyapı oluşturmaya odaklanmak çok önemlidir (Global Cancer Statistics, 2020).

Amerikan Kanser Derneği, her yıl merkezi kanser kayıtlarından ve Ulusal Sağlık İstatistikleri Merkezi'nden veri toplayarak Amerika Birleşik Devletleri'ndeki kanser ve ölüm oranlarına ilişkin tahminler sunmaktadır. 2023 yılı için Amerika Birleşik

Devletleri'nde yaklaşık 1.958.310 yeni kanser vakası ve 609.820 kansere bağlı ölüm olacağı öngörülmektedir.

Devam eden pandemiye rağmen ve diğer önde gelen ölüm nedenlerinin aksine, kansere bağlı ölümlerin oranı 2019'dan 2020'ye kadar sürekli azalmıştır (%1,5 oranında). Bu düşüş, 1991'den bu yana genel olarak %33'lük bir azalmaya katkıda bulunarak tahmini 3,8 milyon ölümün önlenmesini sağlamıştır. Bu olumlu eğilim, sabit veya artan insidans oranlarının varlığında bile lösemi, melanom ve böbrek kanseri için ölüm oranlarındaki önemli düşüşte (2016'dan 2020'ye kadar yılda yaklaşık %2) özellikle dikkat çeken tedavideki ilerlemelere bağlanabilir. Özellikle akciğer kanserinde de hızlı düşüşler yaşanmıştır. Özetle, kanser ölüm oranları düşmeye devam etse de gelecekteki ilerleme, farklı ırk grupları arasında ölüm oranlarında en büyük eşitsizlikleri sergileyen meme, prostat ve uterus korpus kanserlerinin artan oran nedeniyle engellenebilir (American Cancer Society, 2023).

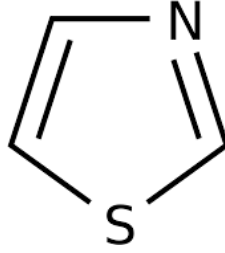
Bir tümör yalnızca kanser hücrelerinden oluşan bir küme değildir; bunun yerine, salgılanan maddeler ve hücre dışı matris ile birlikte infiltre eden ve yerleşik konak hücrelerinin çeşitli bir karışımıdır. Tümör hücreleri, tümörün büyümesini ve ilerlemesini kolaylaştırmak için çevrelerindeki dokularda önemli moleküler, hücrel ve fiziksel dönüşümleri tetikler. TME, tümör gelişimi sırasında ortaya çıkan karmaşık ve sürekli değişen bir varlıktır. Tümör mikroçevresinin spesifik bileşimi çeşitli tümör tipleri arasında farklılık gösterse de tipik olarak bağışıklık hücreleri, stromal hücreler, kan damarları ve hücre dışı matriksi karakteristik bileşenler olarak içerir (Anderson vd., 2020).

Tümör mikroçevresi, dolaşım ve lenfatik sistemler aracılığıyla kendi yakınındaki hücrelerle etkileşime giren tümör hücrelerini içerdiğinden genellikle tümör oluşumuyla ilişkilidir. Bu etkileşimlerin kanserin büyümesi ve ilerlemesi üzerinde etkisi vardır. Ayrıca, tümör mikroçevresinde kanserli olmayan hücreler, düzenlenmemiş hücre büyümesini teşvik ederek ve destekleyerek kanser gelişiminin çeşitli aşamalarında önemli işlevlere sahiptir (Arneth, 2019).

Anti-tümör immün yanıtlar, artan TME'nin bir sonucu olarak baskılanmaktadır. TME'deki düzenleyici T hücreleri ve miyeloid türevli baskılayıcı hücreler gibi immün hücreler, sitotoksik T hücrelerinin ve doğal öldürücü hücrelerin işlevini engelleyerek tümörün bağışıklık sistemi tarafından tespit edilmesine ve saldırıdan kaçınabilmesine yol

açar. Ayrıca TME, immün yanıtları daha da azaltan transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF β) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi maddeler salgılayarak immünosupresif bir ortam oluşturabilir (Sun, 2016). Geleneksel kanser tedavilerinin yaygın bir yan etkisi olan sağlıklı doku ve hücrelere verilen zararı en aza indirmek için kanser tedavisinde yeni yöntemler kullanılmaktadır (Wang vd., 2018).

Organik ve tıbbi kimyanın temel hedeflerinden biri, insan ilaçları için terapötik potansiyele sahip bileşiklerin tasarımı, sentezi ve geliştirilmesidir. Bu süreç, sağlık alanında önemli katkılar sağlamaktadır. Heterosiklik iskeletler, tıbbi kimyada kanıtlanmış kullanışlı bileşikler sınıfına ait oldukları için özel ilgi görmüştür. İki heteroatom içeren beş üyeli halkalara sahip birçok biyolojik olarak aktif molekül bulunmaktadır. Bunlardan biri de tiyazol halkasıdır (Niu vd., 2023).

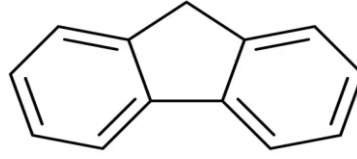


Şekil 1.1. 1,3 Tiyazol halkası

Daha önce tiyazol içeren bileşiklerin, antikanser, antialerjik, anti-enflamatuar, antibakteriyel, antihipertansif, antimalaryal, antipsikotik, diüretik, antifungal, hipnotik, nörokoruyucu ve antioksidan özelliklere sahip olduğu görülmüştür (Petrou, 2021). 1,3-tiyazol, üç karbon, bir kükürt ve bir azot atomu içeren beş üyeli heterosiklik bir organik bileşiktir (Kashyap vd., 2012).

Tiyazoller, mikrobiyal ve denizel kökenlerden bulunmuş ve antitümör ile antiviral aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. Tiyazol, östrojen reseptörlerinin bir ligandı olarak tanınır ve aynı zamanda adenosin reseptörleri için benzersiz bir tür antagonist olarak kabul edilir (Alam, 2023).

Floren tiyazol türevleri, biyolojik etkileri araştırılan bir kimyasal sınıftır. Tiyazoller, tiyazolidinonlar ve azetidinonlar, yüksek biyolojik aktivite potansiyelleri nedeniyle en önemli doğal ve sentetik heterosiklik türevler arasındadır.



Şekil 1.2. Fluoren halkası

Floren tiyazol türevleri, biyolojik işlevleri için araştırılan bir kimyasal ailesidir. Tiyazoller, tiyazolidindionlar ve azetidin, biyolojik aktivite açısından en umut verici doğal ve sentetik heterosiklik türevler arasındadır. Floren tiyazol bileşiklerinin antikanser ve antibakteriyel aktiviteleri keşfedilmiştir (Hussein vd., 2020)

Bu tezin temel amacı, sentezlenen bazı floren-tiyazol türevlerinin A549 insan akciğer adenokarsinom hücreleri üzerindeki etkilerini incelemektir. Odak noktası, sitotoksik, apoptotik ve antikanser özelliklerini araştırmak ve laboratuvar ortamlarında (in vitro) gen ifadelerini incelemektir. Nihai hedef, sağlıklı hücrelere zararı en aza indiren veya mümkün olan en az hasara neden olan bir kanser tedavisi yaklaşımı bulmaktır.

1. KAYNAK BİLGİSİ

1.1. Kanser Biyolojisi ve Gelişimi

Kanser, hücrelerin doğal sınırlarının ötesinde anormal bir şekilde büyümesi ve gelişmesiyle tanımlanan bir hastalıktır. Kanser, dünya genelinde görülme sıklığını azaltmaya yönelik tüm çabalara rağmen, son 50 yılda başlıca ölüm nedeni olmuştur (Ullah & Aatif, 2009).

Kanseri, zamanla bir dizi histolojik, morfolojik ve genetik değişiklikleri içeren çok adımlı bir süreçle büyür (Riscal vd., 2019). Hücrel DNA bilgisi bozulduğunda kanser, anormal gen ifadesi modellerine neden olan genetik bir hastalıktır (Angelis vd., 2020). Başlangıçta normal hücrelerden oluşan kanserler, zamanla anormal şekilde çoğalma yeteneğine sahip olur ve sonunda kötü huylu hale gelir. Bu kanser hücreleri klonal tümörlere dönüşür ve metastaz yapma potansiyeline sahiptir (Chen vd., 2017).

Tümör hücrelerinin kan veya lenf damarları yoluyla göç etme ve farklı uzak bölgelerde tümörler oluşturma yeteneği, kanser metastazının temel özelliklerinden

biridir. Sitoskeletonun bozulması ve yeniden düzenlenmesi, kanser ilerlemesinin bir işaretidir (Lekka vd., 2012).

Tümörlerin kökeni net olmamakla birlikte, genetik hastalıklar, kötü beslenme alışkanlıkları, mesleki stres, radyasyon maruziyeti ve toksin tüketimi, enfeksiyonlar veya iltihaplanmalar gibi nedenlerle ortaya çıkabilir (Wang vd., 2018). Tümör hücreleri hücrelere nüfuz ederek nüfuz eder, bu alanda ilerler ve yakındaki dokulara geçer veya kan dolaşımına girerek uzak bölgeleri etkiler. Bunu yaparak varlıklarını sürdürür ve yayılmaya devam ederler (Altundağ vd., 2005)

Kanser hücreleri, hücre çoğalması, hücre ölümüne direnmek için ilaç direnci, büyüme baskılayıcılarından kaçınma, anjiyogenezi başlatma ve metastaz gibi genel özellikler sergiler (Hanahan & Weinberg, 2011).

Kanser hücrelerinin, bağışıklık sistemini etkisiz hale getiren bir seçim sürecinden geçtiği açık hale gelmiştir. Birçok kanser dokusu oldukça karmaşıktır. Kanser fenotipik davranışı, beslenme, sigara içme ve diğer faktörler gibi değişkenlerden etkilenebilir ve sadece genetik profilinden değil, aynı zamanda konak faktörlerinden de belirlenebilir, ki bu konak faktörler ise konakçının genotipine ve enfeksiyon yoluna bağlı olarak değişebilir (Zafar, 2013).

1.2. Akciğer kanseri

Birçok iyi bilinen risk faktörüne rağmen, akciğer kanseri hem erkeklerde hem de kadınlarda kansere bağlı ölümlerin ana nedeni olmaya devam ediyor. Akciğer kanseri geliştirme açısından en belirgin ve etkili risk faktörü, aktif olarak sigara içme veya pasif olarak ikinci el dumanın maruz kalınmasıdır (Alberg & Samet, 2003). ABD ve dünya genelinde, erkekler ve kadınlarda kanserle ilişkili ölümlerin en önemli sebebi hala akciğer kanseridir. Akciğer kanserinin yaklaşık olarak %90'ı sigara içme ve tütün ürünleri kullanma sonucu meydana gelir. Bununla birlikte, radon gazı, hava kirliliği maruziyeti ve tekrarlayan enfeksiyonlar gibi ek faktörler de akciğer kanserine yol açabilir. Başka bir deyişle, akciğer kanseri çeşitli etkenlerden kaynaklanabilmektedir (Salem vd., 2019).

Birincil akciğer kanseri, akciğerlerde başlayan kanserdir. İkincil akciğer kanseri ise vücudun başka bir yerinden akciğerlere yayılan kanserdir. Farklı tipte birincil akciğer kanseri bulunmakta ve bunlar 2 ana gruba ayrılmaktadır: küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) (Zarogoulidis vd., 2013). NSCLC, tüm akciğer kanseri oluşumlarının yaklaşık %85'i oluşturan baskın akciğer

kanseri formu olarak durmaktadır. Bu tip akciğer kanseri, akciğer dokusunda küçük olmayan hücrelerin varlığı ile tanımlanır ve üç ana alt tipe ayrılabilir: adenokarsinom (AdC), büyük hücreli karsinom (LCC), skuamöz hücreli karsinom (SCC) (Matthew vd., 2011).

1.2.1. Akciğer kanseri nedenleri ve risk faktörleri

Akciğer kanserinin çoklu bir hastalık olduğunu kabul etmek hem önleme hem de tedavide başarı gerektirir (Gabrielson & Hopkins 2006). Sigara içmek, tüm akciğer kanseri vakalarının %80 ila %90'ını oluşturan başlıca nedenidir. Sigara dumanında yaklaşık 4000 kimyasal bileşen bulunmaktadır. (Norum & Nieder 2018).

Tütün içmenin bilinen bir kanserojen olduğu için, akciğer kanserinin diğer nedenleri sıklıkla göz ardı edilir. Ancak, asla sigara içmeyenler arasındaki akciğer kanseri ayrı bir hastalık grubu olarak sınıflandırılıyor, dünya genelinde kanser ölümlerinin yedinci en yaygın nedeni ve rahim, pankreas ve prostat kanserlerini aşarak, Amerika Birleşik Devletleri'nde ölümün ilk on nedenlerinden birisi (Field & Wither 2012).

Sigara içmenin yanı sıra, çevresel maruziyet (iyonizan ışınlar maruziyet), obezite, çevresel kirleticiler (Radon, asbest, arsenik, radyoaktif cevherler, solunan kimyasallar) ve mutasyonlar akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Uygun olmayan beslenme, alkol tüketimi, marihuana kullanımı, östrojen ve insan papillomavirüsü (HPV) enfeksiyonları da akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Akhtar & Bansal 2017).

1.2.2. Erken akciğer kanseri tespiti

Akciğer kanseri yüksek bir ölüm oranına sahip olsa da erken teşhis hastanın daha olumlu bir görünüme sahip olmasına katkıda bulunabilir (Seller vd., 2021). Akciğer kanserini erken teşhis etmek olumlu bir prognozla ilişkilidir, ancak yaklaşık olarak akciğer kanseri hastalarının %57'si ileri evrelerde teşhis edildiği için bu hastaların son yıllarda sağkalım oranı sadece %18'dir (Shin vd., 2020).

1.2.3. Akciğer kanserinin klinik belirtileri

Akciğer kanseri teşhisi konulan hastaların çoğunda genellikle semptomlar görülmüştür. Yaklaşık olarak 1953 yılında akciğer kanseri, erkekler arasında kanser

kaynaklı ölümlerin en yaygın nedeni haline geldi ve 1985 yılında kadınlar arasında da kanser kaynaklı ölümlerin başlıca sebebi haline geldi. Ancak hem erkekler hem de kadınlar arasında akciğer kanseri ölümleri azalmaya başladı, bu da sigara içme alışkanlığının azalmasına bağlı olarak gerçekleşti (Sasco vd., 2004).

Uzun süre devam eden öksürük, akciğer kanserinin erken belirtilerinden biridir. Birincil tümörler nefes darlığı, solunum zorluğu yaşama veya nefes alma güçlüğü, göğüs bölgesinde ağrı veya rahatsızlık hissi, iştah kaybı ve kilo kaybı, sürekli halsizlik, yorgunluk ve enerji kaybı, öksürürken kanlı balgam çıkması (hemoptozi). Kanser kemiklere metastaz yapmış olduğu durumlarda ortaya ise kemik ağrıları ve kırıklara neden olabilir (Lei, vd., 2021).

1.2.4. Sigara kullanımı

Tütün kullanımı akciğer kanseri vakalarının %80'den fazlasından sorumlu olsa da sadece sigara içenlerin küçük bir yüzdesi (%15) hayatları boyunca akciğer kanseri geliştiriyor (Sugimura vd., 2011). Sigara içmenin burun boşluğu ve paranazal sinüsler, nazofarenks, mide, karaciğer, böbrek ve rahim ağzı kanserine neden olur ve ayrıca yemek borusu adenokarsinomu ve miyeloid lösemi ile de ilişkilendirir. Hiç sigara içmemiş kişiler arasında yapılan 50'den fazla çalışmanın meta-analizi, pasif sigara içmenin, çevresel tütün dumanına maruz kalmanın ve akciğer kanseri riski arasında tutarlı ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir (Sasco vd., 2004). Sigara dumanı, birçok genotoksik akciğer kanserojeni içeren karmaşık bir kimyasal karışımdır. Tütün dumanının içinde bulunan çok sayıda bileşen arasında laboratuvar hayvanlarında veya insanlarda akciğer tümörlerine kesin olarak neden olan 20 kanserojen bulunmaktadır ve bu nedenle bu maddelerin akciğer kanserinin oluşumunda rol oynaması muhtemeldir (Moolgavkar, vd., 2012). Sigara dumanında bulunan kanserojen maddelerin çoğu, vücut içindeki ilaç metabolizması enzimleri tarafından kolayca atılabilir, suda çözünebilen formlara dönüştürülür. Bu dönüşüm, sitokrom P450 (CYP), glutatyon S-transferazları ve UDP-glukuronosil transferazları (UGT) gibi ilaç metabolizması enzimleri tarafından kolaylaştırılır. Bu dönüşüm, bu zararlı bileşenleri vücudu idrar veya diğer suya çözünebilen yollarla atması daha kolay hale getirir (Hecht, 2012).

1.2.5. Akciğer kanseri tedavi yöntemleri

Akciğer kanserinin tedavisinde sıkça başvurulan yöntemler arasında, hedefe yönelik tedavi, radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi bulunmaktadır. Hem küçük hücreli hem de küçük hücreli olmayan akciğer kanseri başarıyla tedavi edilen kişiler, sigara içme ve diğer faktörlere bağlı ikincil kanserler geliştirme riski taşımaya devam etmektedir. Erken evre küçük hücreli olmayan akciğer kanseri vakalarında geleneksel olarak cerrahi müdahale yapılmaktadır (Johnson vd., 1998).

1985 yılından bu yana, adenokarsinom, akciğer kanserinin en yaygın histopatolojik alt türü olarak ortaya çıkmıştır. Akciğer kanseri için cerrahi müdahale yaklaşık olarak %25 seviyesindeyken, tedavide kemoterapiye karşı artan bir eğilim gözlenirken, radyoterapinin kullanımı azalmıştır (Lu vd., 2019).

Hangi tedavinin uygulanacağını belirlenmesi, tümörün boyutu ve yeri, gelişim aşaması, hücre döngüsü hızı, reseptörlerin ve hormonların durumu, lenf düğümlerinin varlığı ve hastanın yaşı, genel sağlık durumu ve kişisel tercihleri gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (American Cancer Society 2010).

1.2.5.1. Cerrahi yolla müdahale

Ameliyat kanser tedavisi için tercih edilen ilk yöntemlerden biridir. Lobektomi, erken evre küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) için yaygın olarak tercih edilen tedavi yöntemi olarak kabul edilmiştir, sublobektomi ise (segmentektomi) yıllar içinde alternatif bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Sadece birkaç çalışma bu iki cerrahi girişimin tedavi etkilerini karşılaştırmıştır (Kawaguchi, 2014). Lobektomi çapı 3 cm ve daha fazla olan tümörler için tercih edilir. Çapı 3 cm'den küçük olan tümörler için ise sublobektomi tercih edilir (Seki, 1992).

1.2.5.2. Radyoterapi

Tercih edilen tedavi yöntemi cerrahi müdahale olsa da akciğer kanseri hastalarının %80'i tıbbi veya teknik nedenlerle ameliyat edilemez durumdadır; çünkü hastaların büyük bir kısmında tümörün göğüs dışına yayılması, yerel bölgesel tümörün yayılması veya tanı anındaki kötü fiziksel durum gibi sebepler mevcuttur. Tedavi edilemeyen akciğer kanseri hastaları için dış ışın radyoterapisi (RT), genellikle kemoterapi ile birlikte uygulanan başlıca tedavi seçeneğidir (Delaney vd., 2003)

Radyoterapi, kanserli hücreleri öldürmek için doğrudan hücre DNA'sına zarar vererek veya hücre içinde serbest radikal üreterek işlev görür. Bu tedavi yöntemi, bazı dokular ve ciltte yan etkilere neden olabilmesine rağmen, genellikle hedefe yönelik ve etkili bir tedavi olarak kabul edilir (Jassem, 2007; Lazzari vd., 2018).

1.2.5.3. Kemoterapi

Kemoterapi, kanser tedavi yöntemi olarak kanserli hücreleri ortadan kaldırmak için anti-kanser ilaçlarını kullanır. Kemoterapinin genel hedefleri arasında tümör hücrelerini öldürmek ve tekrarlamasını önlemektir. Ayrıca akciğer kanserli hastaları iyileştirmek amacıyla kemoterapi, çeşitli nedenlerle radyoterapiye de dahil edilmiştir. Bu nedenler arasında radyoterapi öncesinde tümörün boyutunu azaltmak ve metastazı kontrol etmek vardır. Akciğer kanseri tedavisinde kullanılan ilaç sisplatindir (DDP). Sisplatin SCLC için kullanılan ilk kemoterapi ilacıdır (Guohua vd., 2017). NSCLC tedavisinde kullanılan en yaygın ilaçlar sisplatin, karboplatin, paklitaksel (taksol), albümine bağlı paklitaksel (nab-paklitaksel, abraxane), docetaxel (taxotere), gemsitabin (gemzar), vinorelbine (navelbine), etoposid gibi kemoterapik ilaçlar kullanılmaktadır (Kikuchi vd., 2003).

1.2.5.4. Hedefe yönelik tedavi

Akciğer kanseri tedavisi, kanser hücrelerini öldüren ancak istenmeyen yan etkilere neden olabilen normal hücreleri de etkileyebilir. Hedefe yönelik tedaviler olarak adlandırılan akciğer kanseri ilaçları sağlıklı hücrelere verilen zararı azaltmaya yardımcı olur. Lung adenocarcinoma içinde, EGFR, PI3K/AKT/mTOR ve RAS-MAPK gibi hedeflenebilir ana yollar tanımlanmıştır. Bu yolları hedefleyen bir dizi ilaç geliştirilmiş ve klinik yararları kanıtlanmıştır. Bunlardan bazıları, EGFR inhibitörleri olan erlotinib ve gefitinib, PI3K/AKT/mTOR inhibitörleri everolimus dahil olmak üzere, şimdi ilk tedavi olarak kemoterapinin yerini almıştır. Ancak, akciğer kanseri için hedefe yönelik tedavi hastalığı kontrol altına alsa da tümörlerde ilaç direnci kaçınılmazdır (Herbst vd., 2018; Yuan vd., 2019).

1.3. Kanser genetiği

Kanser, büyümeyi düzenleyen genleri etkileyen genetik değişiklikler nedeniyle tümör hücrelerinin normal öncüllerinden sapmış olduğu genetik bir bozukluktur (Hainaut

vd., 2011). Tümörlerin somatik hücrelerdeki genetik değişikliklerden kaynaklandığı fikri ilk olarak 1900'lerin başlarında ortaya çıktı. Ancak, gerekli teknolojilerin erken 1970'lerde erişilebilir hale gelmesiyle bilim insanları tümörlerin gelişimi ile belirli genlerin etkinliği arasında bir bağlantı kurabildiler (Ponder, 2001).

Tümör karyotipleri genellikle normal olmayıp, çoğunluğu çeşitli yapısal ve sayısal anormalliklere sahiptir. Lösemiler ve lenfomalardaki tümörlere özgü translokasyon araştırmaları, bu kanser teorisine ilk doğrudan kanıtı sunmuş ve onkogenlerin ile gen transkripsiyonunun hastalıktaki kontrolünün önemini vurgulamıştır (Knudson, 2002). Aynı zamanda kanserlerin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) gibi moleküler tekniklerle doğrulama gerektirir (Eisenberg & Levanon, 2013).

1.3.1. Kanserde genetik faktörler

Normal hücrenin kansere dönüşmesi için tek bir mutasyon yeterli değildir. Bunun için kansere yol açabilen çeşitli genetik değişikliklerin olması gereklidir. Kansere neden olan genler onkogenler, tümör baskılayıcı genler, mikroRNA genleri olarak bilinirler. Kansere yol açan DNA mutasyonların çoğu, proteinleri veya mikroRNA gibi özelleşmiş RNA'ları üretmek için gerekli talimatları taşıyan genlerde meydana gelir (Knudson, 2002). Bu mutasyonların çoğu somatiktir ve kalıtsal değildir. Ancak mutasyon germ hattında olursa, kalıtsal hastalıklara dönüşebilir.

1.3.1.1. Proto-onkogenler

Tüm hücreler proto-onkogen adı verilen bir dizi normal gen içerir. Bunlar hücre bölünmesini, farklılaşmasını ve büyümesini kontrol etmek için çok önemlidir. Bu genler, onları onkogenlere dönüştürebilecek mutasyon veya değişime açıktır. Proto-onkogenler (*src*, *ras*, *raf* gibi) genellikle hücre bölünmesinin düzenlenmesine yardımcı olarak uygun zamanda ve yerde gerçekleşmesini sağlar. Mutasyona uğradıklarında, kansere yol açabilecek kontrolsüz hücre bölünmesini teşvik edebilirler. Proto-onkogenler, mutasyona uğradıkları takdirde neoplastik dönüşümü (normal hücrenin kanser hücresine dönüşmesi için meydana gelen değişiklikler) teşvik etme kapasitesine sahiptir. Proto-onkogenlerin aktivasyonu ise bir proto-onkogenin onkogene dönüştüğü süreçtir (Torry & Cooper, 1991).

1.3.1.2. Onkogenler

Onkogenler, onkojenik retrovirüslerin genomlarında bulunan ve tümörjenik kapasitelerinden sorumlu olan farklı genlerdir. Buna rağmen, insan kanserlerinin büyük çoğunluğu (yaklaşık %80'i) virüslerden değil, radyasyon ve kimyasal karsinogenez gibi diğer faktörlerden kaynaklanmaktadır. Moleküler genetik araştırmalar, normal ökaryotik hücrelerin retroviral onkogenlere oldukça benzeyen genlere sahip olduğunu ortaya koymuştur. İnsan tümöründe en çok rastlanılan onkogenler *ras* gen ailesinin *rasH* onkogenidir. *Ras* genleri, akciğer kanserlerinin yaklaşık %25'inde, kolon kanserlerinin %50'inde etkili rol oynamaktadır (Cooper & Hausman, 2016).

Onkogenleri protoonkogenlerin protein ürünlerinin biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklerine göre birkaç gruba ayırmak mümkündür: 1) Programlanmış hücre ölümü düzenleyicileri 2) Transkripsiyon faktörleri 3) Sinyal dönüştürücüler 4) Büyüme faktörü reseptörleri ve 5) Büyüme faktörleri, (Pierotti vd., 2017).

Proliferasyon ve farklılaşma bu normal hücresel genler (proto-onkogenler) tarafından düzenlenir. Hücresel protoonkogenler, onkogen aktivasyonunun bir sonucu olarak genetik değişikliklere uğrar. Bu genetik değişiklikler sonuç olarak hücreye büyüme açısından avantaj sağlar. İnsan neoplazmalarında birkaç genetik mekanizmalar onkogenleri aktive eder:

- Nokta mutasyonlar
- Gen amplifikasyonu
- Kromozomal translokasyon

Nokta mutasyonları, bir proto-onkogenin DNA dizisinde, tipik olarak bir nükleotid bazının diğerinin yerine geçmesiyle oluşan değişiklikleri içerir. Bu mutasyonlar genin aktivitesinin artmasına yol açabilir. Örneğin, tek bir baz değişikliği geni büyüme sinyallerine karşı daha duyarlı hale getirebilir (Jiang vd., 2001).

Bir kromozomal kolun belirli bir alanının kopya sayısındaki artış gen amplifikasyonu olarak bilinir. Amplifiye genin aşırı ekspresyonu ile bağlantılıdır ve çeşitli tümörlerde yaygındır. Genom, tek bir lokusta tekrarlayan birimler veya ektrakromozomal elementler olarak, her tarafa serpiştirilmiş amplifiye DNA içerebilir. DNA replikasyon hataları veya telomer disfonksiyonu gen amplifikasyonu destekleyebilir (Albertson, 2006).

Kromozomal translokasyon genin veya kromozomun tamamen veya bir kısmının başka bir kromozoma bağlandığı genom sapmasıdır. Örneğin, abelson murin lösemi virüsü onkogeninin (ABL) hücrel homologu ve kesme noktası küme bölgesi geni (BCR), kimerik bir füzyon proteini (BCR-ABL) oluşturmak için birleştirilebilen ayrı genlerdir (Aplan, 2006).

Tablo 2.1. Onkogenler ve bulunduğu kanser tipleri

Onkogenler	Kanser tipi
HER2	Meme kanseri
BCR/ABL1	Kronik miyeloid lösemi
c-MYC	Burkitt lenfoması
n-MYC	SCLC
EGFR	Akciğer adenokarsinomu
K-ras	Akciğer, pankreas ve kolon adenokarsinomu
N-ras	Miyeloid lösemi

1.3.2. Tümör baskılayıcı genler

1.3.2.1. RB1 geni

Hücrel onkogenlerin aktivasyonu, kanser oluşumuyla ilgili iki temel genetik değişiklikten biridir; diğeri ise tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonudur. Onkogenler, ya gen ifadesini hızlandıran ya da kodladıkları proteinlerin aktivitesinde kontrol edilemez bir artış yaratan genetik değişiklikler sonucunda anormal hücre çoğalması neden olurlar. Tümör baskılayıcı genler ise tam tersi şekilde hücre çoğalmasını kontrol ederek normal koşullar altında hücre çoğalmasını ve tümör oluşumunu azaltır. Bu genler birçok kanserde hasar görür veya inaktive olur, böylece hücre çoğalmasının başarısız olmasına ve tümör hücrelerinin anormal şekilde büyümesine neden olur (Cooper & Hausman, 2016; Yu vd., 1986).

İlk kez tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu 1969 yılında Henry Harris ve arkadaşları tarafından göz tümörü olan retinoblastomun incelenmesiyle tanımlanmıştır (Lipsick, 2020). İlk tanımlanan tümör baskılayıcı gen olan RB1 geninin mutasyonu ile sonucunda RB1 alelinin yapısal kaybı bireyi kansere yatkın hale getirir; diğeri alelin kaybı

ise retinoblastoma tümörlerinin gelişimine neden olur (Gallie vd., 2012). Knudson 1971 yılında retinoblastom gelişimi için iki mutasyonun gerekli olduğunu öne sürmüştür. Yani, RB genin tek bir kopyasının hücrelerde olması onun resesif bir şekilde çalıştığını gösterir ve tümörü başlatmak için tek başına yeterli değildir. Retinoblastom, normal RB alelinin işlevini yitirmesine neden olan ikinci bir somatik mutasyon ortaya çıktığında gelişir. (Knudson, 1971; Yu vd., 1986).

1.3.2.2. p53 fonksiyonu

İkinci olarak tanımlanan tümör baskılayıcı gen ise lösemi, lenfoma, meme, beyin, kolon ve akciğer karsinomları gibi birçok insan kanserlerinde işlevini kaybeden p53 genidir. p53 geni insan genomunun bütünlüğü korur. Dna hasara uğradığında, p53 proteini etkilenen hücrede birikerek hücre döngüsünün durmasına neden olur ve DNA onarımı için zaman tanır. Sonuç olarak, p53 geninin mutasyonel inaktivasyonu genomik instabilite, kromozom aberasyon birikimi ve kanser oluşumuyla sonuçlanabilir. (Kandioler vd., 1994; Williamson vd., 2012).

p53'ün apoptoza katılımı, ölüm reseptörü ve mitokondriyal yolların aktivasyonunu içeren karmaşık bir süreçtir. Birincil süreçlerinden biri mitokondriyal membranlardan sitokrom c ve Smac salınımıdır. p53 proapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini uyarırken antiapoptotik üyeleri baskılar. Ayrıca Apaf-1, PTEN ve ölüme neden olan kimyasallar için reseptörler gibi diğer genleri de transaktif edebilir (Kaelin, 1999; Shivapurkar vd., 2003).

1.3.3. Akciğer kanserinin gelişimine katkıda bulunan onkogenler

Araştırmacılar, hastalığın moleküler temellerini çözmek için yoğun çaba sarf etmiş ve akciğer kanserinin gelişiminde çok önemli bir rol oynayan çeşitli onkogenlerin keşfedilmesine yol açmıştır. Akciğer kanseri oluşumunda etkili olduğu tespit edilen bu onkogenler EGFR, KRAS, ALK.

Akciğer tümörlerinde EGFR mutasyonları otokrin ve indüklenabilir büyüme faktörü üretimine ve aktivasyonuna neden olabilir. Ligandına bağladıktan sonra EGFR, aşağı akış sinyal yollarını (örn. PI3K/AKT, RAS/MAPK/ERK, JAK/STAT) aktive ederek biyolojik aktiviteler gerçekleştirir (Fu vd., 2022).

KRAS mutasyonları, akciğer kanseri hastalarında en sık rastlanan onkogenik sapmalardır. KRAS geni, hücre büyümesini, farklılaşmayı ve apoptozu düzenleyen

guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı membran proteini ailesini kodlar. Bu proteinler, mitojen-aktif protein kinaz (MAPK), sinyal transdüktör ve aktivatörü (STAT) ile fosfoinozitol 3-kinaz (PI3K) sinyal basamakları dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlevleri düzenler. KRAS genindeki mutasyonlar, akciğer, kalın bağırsak, pankreas ve safra yolu kanseri gibi farklı insan kanserlerinde sıkça görülür. NSCLC hastalarının yaklaşık %15 ila %25'inde KRAS mutasyonları bulunur. Akciğer kanserinde başka bir onkogenik faktör ALK'tır. ALK adenokarsinomlarda daha yaygın bulunur (Calvayrac vd., 2017; Karachaliou vd., 2013)

1.3.3.1. Büyüme faktörü reseptörleri

Büyüme faktörü reseptörleri, spesifik büyüme faktörlerini bağlayan ve hücre farklılaşması ve çoğalması için hücre içi sinyal yollarını başlatan transmembran proteinlerdir. Tipik olarak reseptör tirozin kinazlar (RTK'lar) olan bu reseptörler hücre dışı, transmembran ve sitoplazmik alanlara sahiptir ve büyüme faktörü ligandları tarafından aktive edilerek hücrelere büyüme ve bölünme talimatı verirler (Trenker & Yura, 2020).

2.3.3.1.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörü

Tirozin kinazlardan oluşan erbB ailesinin bir üyesi olan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), hücreler arası sinyalizasyon ve düzenlemede önemli bir rol oynar. Bu aile, erbB1 (EGFR veya HER1 olarak da bilinir), erbB2 (HER2), erbB3 ve erbB4 dahil olmak üzere çeşitli üyelerden oluşur. Her bir reseptör, öncelikle tirozin kinaz aktivitelerinde farklılık gösteren benzersiz özelliklere sahiptir. EGFR yapısı, bir hücre dışı ligand bağlama alanı, bir transmembran segmenti ve tirozin kinaz aktivitesi ve düzenleyici işlevlerden sorumlu hücre içi alanları içeren farklı alanlarla karakterize edilir (Bethune vd., 2010). Özellikle EGFR'nin işlevi, epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi spesifik ligandların bağlanmasıyla tetiklenir. Bu bağlanma olayı, hücre içi alan içindeki tirozin kalıntılarının fosforilasyonunun eşlik ettiği reseptörde önemli bir konformasyonel değişikliğe neden olur. Bu fosforilasyon olayı, çok sayıda aşağı akış yolunun aktivasyonuna yol açan bir dizi hücre içi sinyalizasyon olayını başlatır. Bunlar aşağı yönlü sinyal yolları Raf1-hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) yolağını, Fosfoinositid 3-kinaz PI3K/Akt yolağını ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon

aktivatörü (STAT) faktörleri yolağını içerir. Bu yolların aktivasyonu çeşitli hücrel tepkileri ortaya çıkarabilir. Örneğin, Raf1-ERK yolu öncelikle hücre çoğalması ile ilişkilidir ve hücre döngüsü ilerlemesinde yer alan genlerin düzenlenmesini etkiler. Öte yandan PI3K/Akt yolu, apoptozu inhibe ederek ve hücre metabolizmasının çeşitli yönlerini düzenleyerek hücre sağkalımını teşvik etmede önemli bir rol oynar (Hasan vd., 2023; Sharma vd., 2007)

EGFR büyüme faktörleri ailesi, hücre membranlarını geçememeleri nedeniyle akciğer kanserinin gelişimi ve yayılmasında temel moleküller olarak tanımlanmıştır, salgılanan büyüme faktörleri, biyolojik bilgiyi EGFR'den akciğer hücrelerinin içine taşıyan özel sinyal iletim yolları aracılığıyla işlev görür (Liu, vd., 2017).

2.3.3.1.2. *Ras'ın aktifleşmesi ve sinyal iletim kaskadı*

Ras onkogeni akciğer kanseri gelişiminde rol oynar ve NSCLC'in %15-20'inde saptanmıştır. Üç insan RAS geni tanımlanmıştır: HRAS geni (Harvey sıçan sarkomu virüsünün onkogeni ile homolog), KRAS geni (Kirsten sıçan sarkomu virüsünün onkogeni ile homolog) ve NRAS geni (ilk olarak bir insan nöroblastomundan izole edilmiştir) (Molina & Adjei, 2006).

Ras aktive olduğunda gerekli sinyal yolağını başlatır. Ras/Raf/MAPK yolu, hücre biyolojisinde en iyi çalışılmış sinyal iletim sistemidir. Bu yolun işlevi, hücre büyümesini, bölünmesini ve farklılaşmasını teşvik etmek için belirli genlerin tetiklendiği hücre dışı ortamdan hücre çekirdeğine sinyal taşımaktır. Hücre döngüsü düzenlemesi, yara iyileşmesi ve doku onarımı, integrin sinyali ve hücre göçüne ek olarak, Ras/Raf/MAPK yolağı hücre göçünde rol oynar. Son olarak, Ras/Raf/MAPK yolu, yeni kan damarlarının gelişiminde rol oynayan genlerin ifadesini değiştirerek anjiyogenezi teşvik edebilir. Böylece, Ras/Raf/MAPK yolu üzerinden sinyalizasyon, karsinogenez için kritik olan bir dizi hücrel aktiviteyi düzenler (Han vd., 2021; Wen vd., 2019)

Raf, Ras efektörleri arasında en iyi çalışılan bir serin/treonin kinaz ailesine aittir ve Raf-1, A-Raf ve B-Raf'ı içerir. Raf aktivasyonu, MAPK'ı fosforile ederek sinyal kaskadını başlatır ve bu da daha sonra ERK1 ve ERK2 gibi aşağı akış proteinlerini fosforile ederek aktive eder. MAPK, memelilerde MEK olarak da bilinir ve birçok sinyale, büyüme hormonları ve sitokinler aracılığıyla hücre yaşamını destekleyen ve apoptozu teşvik eden hücre içi sinyal ileti sistemidir (Mascaux vd., 2005; Wen vd., 2019).

1.3.3.2. Akciğer kanserinde siklinler, siklin bağımlı kinazlar

Siklinler hücre döngüsünü düzenleyen bir protein ailesidir. Aşağı akış substratlarını fosforile eden ve hücre döngüsü ilerlemesini sağlayan siklin bağımlı kinazlara (CDK'ler) bağlanır ve bunları aktive ederler. Siklin düzensizliği, akciğer kanseri de dahil olmak üzere birçok farklı kanser türünün gelişimi ve ilerlemesiyle bağlantılıdır. Siklinlerin hedeflenmesi, akciğer kanseri tedavisi için potansiyel bir terapötik yöntem olarak önerilmiştir. CDK aktivitesini bloke ederek aşağı akış sinyal yollarını sınırlayan CDK inhibitörleri oluşturulmuş ve akciğer kanseri tedavisi için klinik çalışmalarda test edilmektedir. Bununla birlikte, bu ilaçların akciğer kanserindeki etkinliği halen araştırılmaktadır (Goh & Lim 2020).

Bu kompleksler (siklinler ve siklin bağımlı kinazlar) işlevsel olarak aktiftir ve retinoblastoma proteinleri gibi hücre döngüsü düzenleyici unsurlara fosfat grupları ekleyerek çalışır. Bu etkileşimlerde, siklin bağımlı kinazlar katalitik bileşenler olarak görev yaparken, siklinler belirli hücre döngüsü aşamalarında zirve yapan düzenleyici moleküller olarak hareket eder. Şu anda, tanımlanmış ve üzerinde çalışılmış beş ana siklin ailesi (A, B, C, D ve E) bulunmaktadır. Siklin A ve B1 ve 2, hücre döngüsünün sonraki aşamalarında, özellikle mitoz geçişin düzenlenmesinde rol oynadıkları S ve G2 fazlarında ekspresyonda artış gösterir. Buna karşılık, siklin C, D1-3 ve E, G1 fazı sırasında en yüksek sentez ve aktivite seviyelerine ulaşır ve öncelikle G1'den S fazına geçişi düzenler. Bu geçiş, memeli hücre büyümesini düzenlemek için kritik bir kontrol noktasıdır ve bu siklinleri potansiyel onkogenler haline getirir (Han vd., 2022).

Siklin D1'in hedeflenmesi, akciğer kanseri tedavisi için potansiyel bir terapötik yöntem olarak önerilmiştir. CDK4/6 kompleksinin aktivitesini bloke ederek aşağı yönlü sinyal yollarını bozan CDK4/6 inhibitörleri oluşturulmuş ve akciğer kanseri tedavisi için klinik çalışmalarda test edilmektedir. Bununla birlikte, bu ilaçların akciğer kanserindeki etkinliği hala araştırılmaktadır (Żuryń vd., 2019).

1.3.3.3. FOX-M1 geni

FOX-M1 (Forkhead box) geni, akciğer kanseri gelişimi ve ilerlemesinde işlevi olan, insanda 12. kromosomda bulunan bir transkripsiyon faktörüdür (Alvarez-Fernández & Medema, 2013). Akciğer kanseri hücrelerinde ifade edilir ve hücre çoğalması, hayatta

kalma, tedavi direnci ve hedef genlerin transkripsiyonel kontrolünde rol oynar. FOX-M1 aynı zamanda akciğer kanseri tedavisinde olası bir terapötik hedeftir (Kim vd., 2006). P53, RB, miRNA'lar, ve FOXO3a gibi tümör baskılayıcılar FOXM1'in ifadesini azaltırken, KRAS, EGFR, MYC, ve AKT gibi onkoproteinler FOXM1'in ifadesini artırır. Kanser hücrelerinde FOXM1'in inhibe edilmesiyle azalmış anjiyogenez, EMT (Epithelial Mesenchymal Transition), ilaç direnci, metastaz ve hücre göçü ortaya çıkmaktadır. Bu araştırmalar bir dizi akciğer hastalığı hakkında yeni bilgiler sunmakta ve FOXM1 düzenleyici ağının özellikle akciğer kanserinde olumsuz sonuçların önemli bir belirleyicisi olduğunu göstermektedir (Li vd., 2019; Liao vd., 2018).

1.4. Hücre ölüm mekanizmaları

1.4.1. Apoptoz, otofaji, nekroz

DNA hasarı, oksidatif stres ve viral enfeksiyonla birlikte çeşitli uyarıcılara yanıt olarak gerçekleşen apoptoz planlı bir hücre ölümü türüdür. Belirli substratları parçalayan ve hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve membran kanaması gibi apoptotik hücre morfolojik değişikliklerine neden olan proteazlar olan kaspazların aktivasyonunu içeren düzenlenmiş bir süreçtir. Hücreler zarla çevrili çok küçük parçalara (apoptotik cisimcikler) bölünür ve bunlar fagositoz yoluyla iltihabi bir tepkiye yol açmadan uzaklaştırılır. Apoptotik cisimciklerin atılması, Yunanca'da "düşmek" anlamına gelen ve sonbaharda dökülen ağaç yapraklarını çağrıştıran "apoptoz" teriminin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Reed, 2000).

İkinci tip hücre ölümü olan nekroz, apoptozdan hemen hemen her yönden farklıdır. Bu ifade Yunanca "ölü" anlamına gelen "nekroz" kelimesinden gelmektedir ve sert çevresel veya genetik olarak kodlanmış stres faktörlerine maruz kalan hücrelerin kasıtsız ölümünü ifade etmektedir. Nekroz geçiren yaralı hücreler, apoptoz geçiren hücreler tarafından sergilenenlerle çarpıcı bir şekilde tezat oluşturan makroskopik morfolojik ve ultrastrüktürel özelliklere sahiptir. Ölüm, hücrenin önemli ölçüde şişmesi, çoklu hücreyel organellerin şişmesi, nükleer DNA'nın kümelenmesi ve rastgele yok edilmesi, yaygın plazma membranı endositozu ve otofaji ile karakterize edilir. Nekroz genellikle pasif bir süreç olarak kabul edilir çünkü yeni protein sentezi gerektirmez, düşük enerji gereksinimi vardır ve herhangi bir homeostatik mekanizma tarafından düzenlenmez (Syntichaki & Tavernarakis, 2002).

Otofaji, gelişimin kritik aşamalarında ve besin stresine yanıt olarak enerji kaynaklarını dengelemek için gerekli olan kendi kendini yok eden bir süreçtir. Otofaji ayrıca yanlış katlanmış veya toplanmış proteinlerin uzaklaştırılması, mitokondri, endoplazmik retikulum ve peroksizomlar gibi hasarlı organellerin temizlenmesi ve hücre içi enfeksiyonların ortadan kaldırılması gibi temizlik işlevlerini de yerine getirir. Bu nedenle, otofaji, düzensizliği apoptotik olmayan hücre ölümüyle ilişkili olmasına rağmen, genellikle bir hayatta kalma mekanizması olarak görülür (Glick vd., 2010).

1.4.1.1. Hücre içi (intrinsik) apoptotik yol

Bilinen iki temel apoptotik süreç vardır: intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar. DNA hasarı, iskemi ve oksidatif stres dahil olmak üzere çeşitli harici ve endojen olaylar, intrinsik yolu aktive eder. Mitokondriyal yol olarak da bilinen intrinsik yol ya BAX ve BAK'ın (BCL-2 ailesinin proapoptotik üyeleri) aracılık ettiği porlara yanıt olarak ortaya çıkan mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu (MOMP) ile tetiklenir ve sitokrom c'nin mitokondriyal intermembran boşluktan sitozole salınmasına yol açar. Anti-apoptotik proteinler Bcl-2 ve Bcl-XL sitokrom c salınımını inhibe ederken, tüm pro-apoptotik proteinler olan Bax, Bak ve Bid mitokondriden salınımını teşvik eder. Sitokrom c sitozole salındıktan sonra Apaf-1'e bağlanarak apoptozom oluşumunu ve kaspaz -9 aktivasyonunu tetikler. Kaspaz -9 aktifleştğinde, en sonunda hücre ölümüne yol açarak kaspaz -3 ve kaspaz -7 gibi efektör kaspazları etkinleştirir. Ayrıca mitokondriyon Smac/Diablo adı verilen bir proteini sitozole salar. Smac/Diablo, apoptoz proteinlerinin inhibitörü (IAPs) olarak bilinen bir anti-apoptotik protein grubunun aktivitelerini inhibe ederek dolaylı olarak apoptozu indükler (Boice & Bouchier-Hayes, 2010; Gökhan vd., 2020, Loreto vd., 2014).

1.4.1.2. Hücre dışı (ekstrinsik) apoptotik yol

Hücre dışı apoptotik yol hücrenin dış yüzeyinde bulunan özel reseptörlerin aktive olmasıyla başlar. Ekstrinsik yol, belirli ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar tarafından aktive edilir. Fas ligand (FasL) veya tümör nekroz faktörü ile birlikte apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) reseptörleri DR4 ve DR5 ile ligasyonu takiben, birincil ölümreseptörleri -Fas ve tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL)reseptörleri-hücre ölümünü indükler ve bunu prokaspaz -8'in (intrinsik yolda ise kaspaz

-9) aktifleşmesine sebep olur. Bu reseptörler tipik olarak hücrelerin yüzeyinde sistein bakımından zengin alanlara sahip homotrimerik tip I transmembran proteinleri olarak üretilir. Kaspaz -8 bu sürecin bir sonucu olarak aktive olur. İkincisi, kaspaz -3'ü doğrudan aktive ederek veya BID'i parçalayarak apoptozu indükler, bu da mitokondriyal arızaya ve ardından sitokrom C salınımına ve kaspaz -9 ve -3 aktivasyonuna neden olur. Kaspaz -3, çeşitli dokularda DNA parçalanması ve hücre ölümü neden olur (Salvesen & Duckett, 2022).

Başka bir ölüm reseptörü olan TNF reseptör (TNFR) ailesi, homotrimerler halinde organize olan ve ligand etkileşimi ile aktive edilen 29 transmembran reseptör proteininden oluşan geniş bir ailedir. TNF reseptör süper ailesinden TNF- ile TNFR1 gibi ölüm reseptörleri, apoptozun ekstrinsik yoluna aracılık eder. Sistein bakımından zengin alanlara sahip olan bu reseptörler, homotrimerik tip I transmembran proteinleri olarak hücrelerin yüzeyinde yaygın olarak üretilir. Bir ölüm ligandı bir ölüm reseptörüne bağlandığında, TNF ile etkileşime girerek FADD ve TRADD gibi adaptör proteinlerin aktivleşmesine neden olur, bu da ekstrinsik yolun kritik bir aracısı olan Caspase -8 de dahil olmak üzere bir dizi aşağı akış faktörünü devreye sokarak apoptozu neden olur (Elmore, 2007).

1.4.1.3. Kaspazlar

CED-3 geninin kodladığı kaspazlar aktif bölgelerinde sistein bulunan proteaz ailesidir. Kaspazlar 100'den fazla hedef proteinleri kırarak hücre ölümünü yürütür. Apoptoz kaspazları iki türe ayrılır: başlatıcı kaspazlar (kaspaz -1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12) ve yürütücü kaspazlar (kaspaz -3, -6 ve -7). Başlatıcı kaspazlar, daha sonra önemli yapısal proteinleri yıkmak ve diğer enzimleri aktive etmek için aktivitelerini koordine eden ve DNA parçalanması ve membran kanaması gibi apoptotik morfoloji ile sonuçlanan yürütücü kaspazları tetikler (Li & Yuan 2008). Kaspazlar başlangıçta inaktif pro-kaspazlar olarak sentezlenir ve granzim B, ölüm reseptörleri ve apoptozom uyarılarına yanıt olarak hızla parçalanır ve aktive olur. Daha sonra aşağı akış kaspazları, mitokondriyal proteinler, plazma membran proteinleri, nükleer proteinler de dahil olmak üzere bir dizi substratı parçalayacak hücre ölümüne yol açarlar (Howley & Fearnhead, 2008).

1.4.1.4. Bcl-2 Ailesi

BCL2 ailesi öncelikle bir hücrenin apoptoza girip girmeyeceğini belirlemekten sorumludur ve ayrıca gelişim, doku homeostazı ve immünolojide önemli roller oynar. Bu kontrol değişirse, kanser ve otoimmün hastalıkları teşvik edebilir veya iskemi koşullarını şiddetlendirebilir ve dejeneratif bozukluklara katkıda bulunabilir. BCL2 ailesinin üç grubu arasındaki etkileşimler bir hücrenin kaderini belirler: anti-apoptotik, pro-apoptotik “sadece BH3” proteinleri ve pro-apoptotik efektör proteinleri (Czabotar vd., 2014). Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyeleri (Bcl-2, Bcl- XL) programlı hücre ölümünün baskılayıcıları olarak işlev görürler. Diğer üyeleri pro-apoptotik efektör proteinler (Bax ve Bak) ve pro- apoptotik sadece BH3 proteinleri (Bid, Bad, Noxa, Puma, Bim) kaspaz aktivasyonunu uyararak hücre ölümüne neden olur. Proapoptotik efektör ve antiapoptotik Bcl-2 aile üyeleri dört adet korunmuş BH bölgesi içerirken, proapoptotik “sadece BH3 proteinleri bir bölge içerir. (Hausman & Cooper 2016).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyaller

2.1.1. Sarf malzemeler ve kimyasallar

10, 200, 1000, µL’lik mikropipet uçları (Axygen, İngiltere),

15 ve 50 mL’lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya),

12.5, 25 ve 75 cm²’lik hücre kültür flasks (T12.5, T25 ve T75 Flasks; Greiner bio-one, Amerika)

1,5 ve 2 mL’lik Ependorf tüp (Greiner bio-one, Amerika),

12 kuyulu 5 mL’lik rezervuarlar (Isolab, Almanya)

5 ve 10 mL’lik steril enjektör (Hayat, Türkiye),

5-10 mL’lik tek kullanımlık serolojik pipet (Costar, Sigma-Aldrich, Almanya),

6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası (TPP, İsviçre),

Lamel (Isolab, Almanya),

Filtre (Sartorius stedim, Almanya);

Kriyotüp (1,5 ve 2 mL) (Greiner bio-one, Amerika),
Parafilm (Pechiney, Fransa),
Flow tüpleri (Isolab Almanya),
Toma lamı (Marienfeld, Almanya),
A549 hücre hattı (ATCC, Amerika Birleşik Devletleri)
L-929 hücre hattı (ATCC, Amerika Birleşik Devletleri)
Rna İzolasyon Kiti (A.B.T.TM Blood/Tissue RNA Purification Kit for Leukemia)
Beta Merkaptotanol (M3148 Sigma-Aldrich 2-Mercaptoethanol)
Proteinaz K (Thermo ScientificTM Proteinase K, recombinant, PCR grade)
Kloroform İzooamilalkol (Merck Isoamyl Alcohol)
Nükleaz Free Ultra Distile Su (Biochrom AG Ultra Pure Water, Sterile, Suitable for HPLC)
cDNA Kiti (VitaScriptTM FirstStrand cDNA Synthesis Kit)
Water (Thermo Fisher)
PBS (Thermo ScientificTM Water, Nuclease-free, Molecular Biology Grade, Ultrapure)

2.1.2. Kullanılan ekipmanlar

Ters mikroskop (Leica, Almanya),
Mikroplaka Okuma Cihazı (ELIZA Reader, BioTek, USA),
Akım sitometri cihazı (Beckman Coulter, USA),
RT PCR Isıl Döngü (Stratagene Mx3005P) Cihazı, (Agilent Technologies, USA),
Masaüstü soğutmalı santrifüj (Hettich Lab Teknoloji, Almanya),
Telstar Bio II Adevance Laminar Kabin (Thermo, Kanada)
Derin dondurucu (-20 °C) buzdolabı (Uğur, Türkiye),
Steril ortam sağlayan CO₂ inkübatör (Panasonic, Japonya),

Hücre Kültürü Sterilizatörü (Heraeus, Almanya),
Azot tankı (sıvı) (Taylor Wharton, USA)
Hassas ölçüm terazisi (Precisa, İsviçre),
Otoklav (Eryiğit A.Ş. Türkiye),
Şarj edilebilir pipetör (Starlab, Almanya),
Değişik hacimli mikropipetler (Eppendorf, Hamburg, Germany),
Nanodrop (Thermo Fisher)
Real Time PCR Master Mix (2X Magic SYBR Mix)
Real Time PCR (CFX Connect Real Time PCR Detection System)
Primer (50 nmol OPC Grade)

2.2. METODLAR

2.2.1. Fluoren-tiyazol türevlerinin sentezi

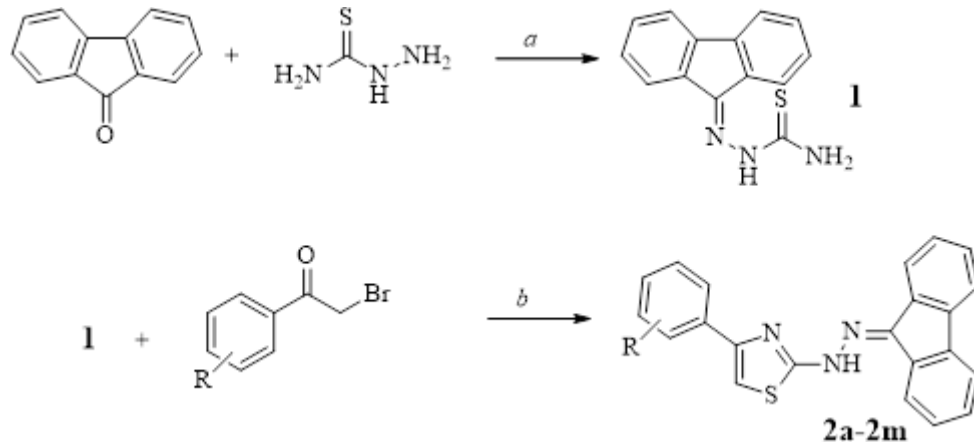
-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinkarbotiyoamit (1) sentezi

9H-Fluoren-9-on ve ona eşdeğer oranda tiyosemikarbazit etanol içerisinde 12 saat kaynatılmış, reaksiyonun bitimi İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile kontrol edilmiştir. Bir gece oda sıcaklığında bekletildikten sonra reaksiyon ortamında çöken ham ürün süzülerek alınmış, etanolden kristallendirilmiştir.

2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-ariltiyazol (2a-2m) türevlerinin sentezi

2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinkarbotiyoamit (1) ve çeşitli fenaçil bromür türevleri eşit molde etanol içerisinde 6 saat kaynatıldıktan sonra, ürünün oda sıcaklığında çökmesi beklenmiştir. Reaksiyon ortamında çöken ham ürün süzülerek alınmış, daha sonra etanolden kristallendirilmiştir.

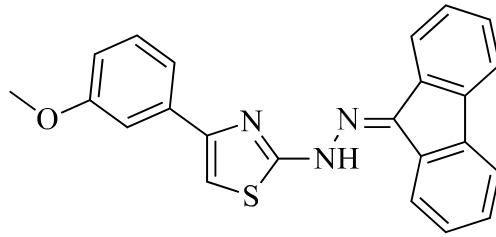
13 adet yeni fluoren-tiyazol türevi(2a-2m) sentezlenmiş ve bileşiklerin yapıları NMR ile doğrulanmıştır. Bileşiklerin sentezinde başlangıç maddesi olarak 9H-fluoren-9-on'dan kullanılarak önce tiyosemikarbazit ile ilgili bileşiğin hidrazinkarbotiyoamidi oluşturulmuş (1), sonra bu bileşikten hareketle Hantzsch tiyazol sentezi yöntemiyle 2-[2-(9H-fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-ariltiyazol (2a-2m) türevlerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin sentezi Şekil 3.1'de verilmiştir. Sonuç bileşiklerin % 63-72 arasında verimle elde edilmiştir. Bileşiklerin analizinde ¹H NMR ve ¹³C NMR kullanılmıştır. Fenil halkası üzerinde metoksi taşıyan türevlerde metoksi sübstitüentine ait sinyaller 3.78-3.85 ppm aralığında ve 55.70-55.77 ppm aralığında görülmüştür. Metil taşıyan türevlerde metil grubuna ait sinyaller 2.31-2.37 ppm aralığında belirlenmiştir. Bileşikler sayıca fazla aromatik proton içerdiğinden NMR'da aromatik bölge bir hayli karışık ve multipler pikler olarak gözlenmiştir. Bazı bileşiklerde tiyazol halkasının 5. karbonuna bağlı proton singlet pik olarak gözlenebilmiş ve 7.05-7.71 ppm aralığında olduğu tespit edilmiştir. Spektrumlarda N-H protonu gözlenememiştir.



Şekil 3.1. Bileşiklerin (2a-2m) sentezi. Re ajanlar, re aktanlar, reaksiyon koşulları. a:EtOH,12s kaynatma;b:EtOH 6s, kaynatma.

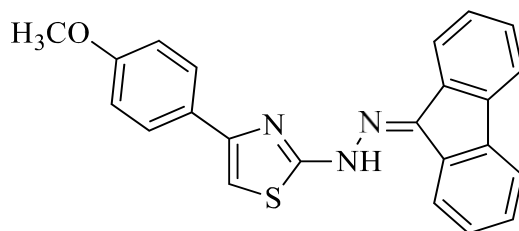
2.2.2. Fluoren türevlerine ait spektroskopik verilerin değerlendirilmesi

2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(3-metoksifenil)tiyazol (2a) FUR1



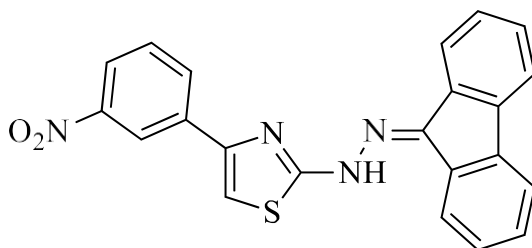
e.d. 216-217 °C, verim 64 %, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 3.85 (s, 3H, OCH₃), 6.96 (d, J: 7.87 Hz, 1H, Ar-H), 7.26 (s, 1H, Ar-H), 7.33-7.51 (m, 7H, Ar-H), 7.78 (d, J: 6.58 Hz, 1H, Ar-H), 7.85 (d, J: 6.84 Hz, 1H, Ar-H), 7.90 (d, J: 7.15 Hz, 1H, Ar-H), 8.69 (d, J: 7.33 Hz, 1H, Ar-H). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 55.77, 103.10, 111.14, 114.73, 118.24, 120.69, 121.13, 128.24, 129.54, 129.95, 130.37, 130.41, 130.98, 131.42, 133.07, 137.34, 139.24, 140.77, 147.79, 160.07, 173.34.

2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(4-metoksifenil)tiyazol (2b)(FUR2)



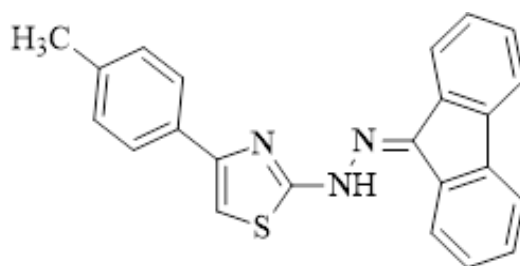
e.d. 240-241 °C, verim 67%, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 3.82 (s, 3H, OCH₃), 7.01 (d, J: 6.89 Hz, 1H, Ar-H), 7.05 (s, 1H, Ar-H), 7.35-7.50 (m, 5H, Ar-H), 7.76-7.90 (m, 4H, Ar-H), 8.70 (d, J: 6.97 Hz, 1H, Ar-H). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 55.70, 100.23, 114.65, 120.65, 121.23, 122.81, 124.27, 127.33, 128.19, 129.42, 129.74, 130.28, 131.10, 137.38, 138.45, 139.21, 140.68, 144.44, 159.85.

2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(3-nitrofenil)tiyazol (2c) (FUR3)



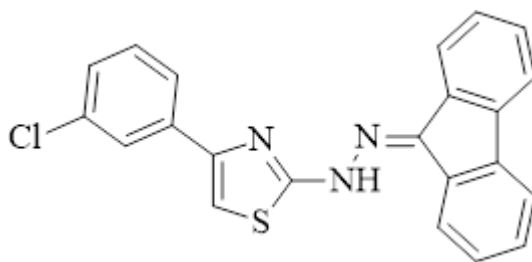
e.d. 220-221 °C, verim 68 %, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 7.35-7.47 (m, 3H, Ar-H), 7.52 (t, J:7.37 Hz, 1H, Ar-H), 7.71 (brs, 1H, Ar-H), 7.78 (d, J: 8.41 Hz, 1H, Ar-H), 7.86 (d, J: 7.29 Hz, 1H, Ar-H), 7.92 (d, J: 7.29 Hz, 1H, Ar-H), 8.21 (d, J: 7.69 Hz, 1H, Ar-H), 8.35 (d, J: 7.85 Hz, 1H, Ar-H), 8.57 (d, J: 7.29 Hz, 1H, Ar-H), 8.91 (s, 1H, Ar-H). ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 120.42, 120.76, 120.91, 121.38, 122.98, 128.03, 129.95, 130.82, 130.93, 132.11, 137.14, 139.22, 141.13, 148.81.

2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(4-metilfenil)tiyazol (2d) (FUR4)



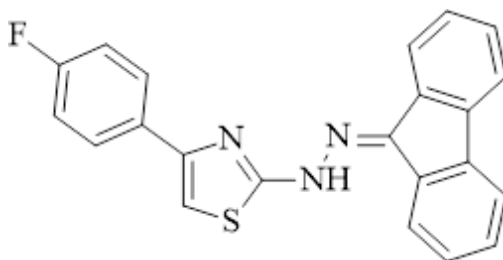
e.d. 219-220 °C, verim 63 %, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 2.33 (s, 3H, CH₃), 7.11 (s, 1H, Ar-H), 7.26-7.49 (m, 6H, Ar-H), 7.72-7.89 (m, 5H, Ar-H), 8.70 (d, J: 7.26 Hz, 1H, Ar-H).

2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(3-klorofenil)tiyazol (2e) (FUR5)



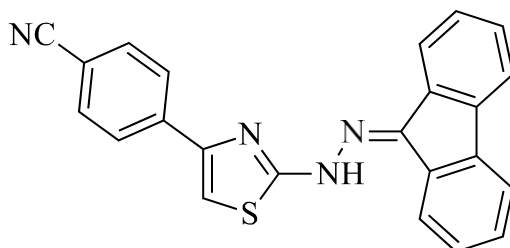
e.d. 202-203 °C, verim 64 %, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 7.33-7.52 (m, 7H, Ar-H), 7.77 (d, 1H, J: 6.74 Hz, Ar-H), 7.85 (d, 2H, J: 7.58 Hz, Ar-H), 7.91 (d, J: 7.37 Hz, 1H, Ar-H), 7.97 (s, 1H, Ar-H), 8.60 (d, 1H, J: 6.02 Hz, Ar-H).

2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(4-florofenil)tiyazol (2f) (FUR6)



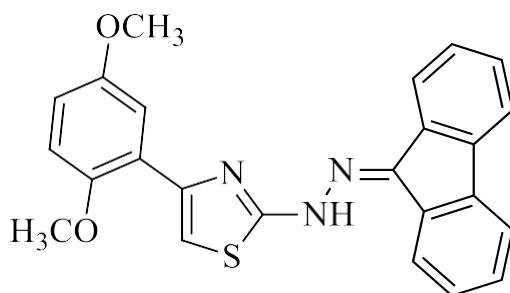
e.d. 193-195 °C, verim 72 %, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 7.22-7.51 (m, 7H, Ar-H), 7.75-7.93 (m, 5H, Ar-H), 8.63 (d, 1H, J:6.95 Hz, Ar-H).

2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(4-siyanofenil)tiyazol (2g) (FUR7)



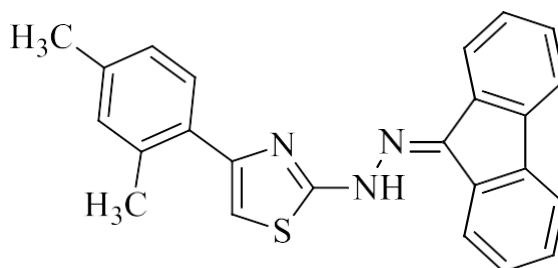
e.d. 200-202 °C, verim 69 %, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 7.22-7.51 (m, 7H, Ar-H), 7.75-7.93 (m, 5H, Ar-H), 8.63 (d, 1H, J:6.95 Hz, Ar-H).

2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(2,5-dimetoksifenil)tiyazol (2h) (FUR8)



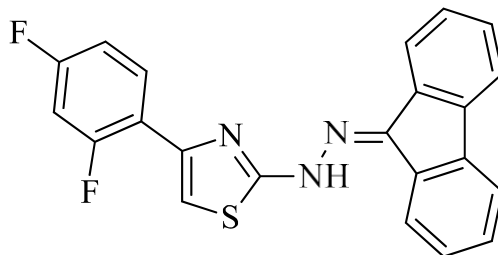
e.d. 180-181 °C, verim 63 %, $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6 , ppm) δ 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 6.94 (d, 1H, J:8.72 Hz, Ar-H), 7.07 (d, 1H, J:8.72 Hz, Ar-H), 7.32-7.52 (m, 5H, Ar-H), 7.75-7.89 (m, 3H, Ar-H), 8.04 (d, 1H, J:7.15 Hz, Ar-H).

2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(2,4-metilfenil)tiyazol (2i) (FUR9)



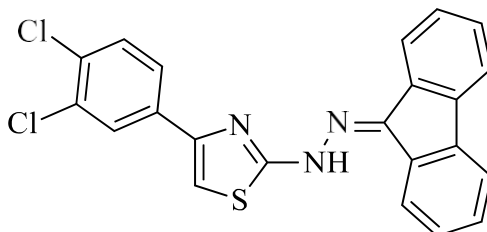
e.d. 190-195 °C, verim 67 %, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.37 (s, 3H, CH₃), 6.63 (s, 1H, Ar-H), 7.08-7.14 (m, 2H, Ar-H), 7.30-7.46 (m, 5H, Ar-H), 7.76-7.88 (m, 3H, Ar-H), 8.68 (d, 1H, J:7.21 Hz, Ar-H).

2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(2,4-diflorofenil)tiyazol (2j) (FUR10)



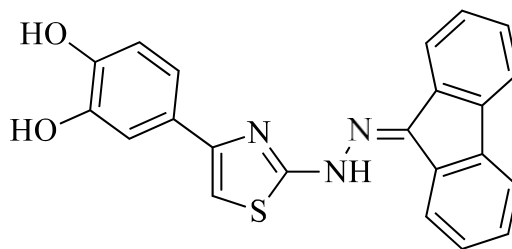
e.d. 179-180 °C, verim 68 %, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 7.22-7.53 (m, 7H, Ar-H), 7.77 (d, 1H, J:7.51 Hz, Ar-H), 7.85 (d, 1H, J:7.11 Hz, Ar-H), 7.91 (d, 1H, J:7.51 Hz, Ar-H), 8.04 (d, 1H, J:6.55 Hz, Ar-H), 8.54 (brs, 1H, Ar-H).

2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(3,4-diklorofenil)tiyazol (2k) (FUR11)



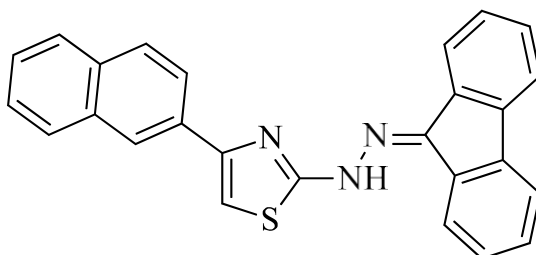
e.d. 216-217 °C, verim 67 %, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 7.33-7.55 (m, 5H, Ar-H), 7.71-7.77 (m, 2H, Ar-H), 7.83-7.97 (m, 3H, Ar-H), 8.16 (d, 1H, J:2.00 Hz, Ar-H), 8.55 (brs, 1H, Ar-H).

2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(3,4-dihidroksifenil)tiyazol (2l) (FUR12)



e.d. 260-261 °C, verim 69 %, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 6.81 (d, 1H, J:8.41 Hz, Ar-H), 7.11-7.21 (m, 2H, Ar-H), 7.32-7.53 (m, 4H, Ar-H), 7.76 (d, 1H, J:7.36 Hz, Ar-H), 7.84 (d, 1H, J:7.36 Hz, Ar-H), 7.89 (d, 1H, J:7.36 Hz, Ar-H), 8.74 (brs, 1H, Ar-H), 9.11 (brs, 1H, Ar-H), 9.38 (brs, 1H, OH), 12.04 (brs, 1H, OH).

2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(4-naftaalen-2-il)tiyazol (2m) (FUR13)



e.d. 250-251 °C, verim 65 %, ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, ppm) δ 7.37-7.60 (m, 7H, Ar-H), 7.79-8.00 (m, 7H, Ar-H), 8.45 (s, 1H, Ar-H), 8.73 (d, 1H, J:7.12 Hz, Ar-H).

Tablo 3.1. Kullanılan bileşiklerin kodu

Lab kodu	Tezde/Makalede kodu	R
Fur 1	2a	3-OCH ₃
Fur 2	2b	4-OCH ₃
Fur 3	2c	3-NO ₂
Fur 4	2d	4-CH ₃
Fur 5	2e	3-Cl
Fur 6	2f	4-F
Fur 7	2g	4-CN
Fur 8	2h	2,5-diOCH ₃
Fur 9	2i	2,4-diCH ₃
Fur 10	2j	2,4-diF
Fur 11	2k	3,4-diCl
Fur 12	2l	3,4-diOH
Fur 13	2m	2-asetonafton

2.3. Malzemelerin hazırlanması

2.3.1. Bileşiklerinin hazırlanması

Sentez bileşikleri terazide tartıldıktan sonra, ana stoğun konsantrasyonu 100µM olacak hazırlanarak 100 µl DMSO'un (dimetilsülfoksit) çözündürüldü. Konsantrasyon aralığı 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125, 3,9062, 1,9535, 0,9765 ve 0,4882 µM olacak şekilde dilüsyon edildi ve 24 saat inkubasyona bırakıldı.

2.3.2. Sisplatin'in hazırlanması

Sisplatin deneylerde pozitif kontrol olarak kullanıldı. 30 mg/ml sisplatin tartılarak 100 µl çözücü (DMSO) içinde çözündürülerek ana stok hazırlandı. Hazırlanan stoklardan sitotoksite testinde kullanılmak amacıyla 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125, 3,9062 µg\ml konsantrasyonları dilüsyon yöntemiyle oluşturuldu.

2.3.3. Kullanılan hücreler

A549 hücre hattı (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) ve L929 hücre hattı (normal fare fibroblast hücre hattı) kullanıldı. %10-%20 fetal sığır serumu, 37°C’de kültür ortamında, DMEM besiyerinde (high glucose), %1 penisilin/streptomisin, %5 CO₂ inkübatörde, %95 bağıl nemde çoğaltılmıştır. T75’lik flaskın hücre yoğunluğu %70-80’e ulaştıktan sonra (~ 2-4 gün) alt kültürlerle ayrılarak (pasaj yapılarak) çoğaltılmıştır. Hücrelerin daha az çoğaldığı sürede %20 fetal sığır serumu kullanılmıştır.

2.4. Hücrelerin kültür ortamında çoğaltılması

Hücre kültürü için kullanılan cam ve metal olan malzemelerin sterilizasyonunda kaplarını 1 tur açık bırakılacak şekilde kapattıktan sonra alimünyum folyo ile tamamen sarılarak otoklavda sterilize edilmiştir. Cam ve metal olanlar için 200°C 2,5 saat, diğer kuru malzeme için 121°C 30 dakika, sıvı olanlar için ise 121°C 23 dakika 1,5 atm basınçta otoklav sterilizasyonu yapılmıştır ayrıca bazı sıvıların sterilizasyonu için de filtreler (0.25 µ) kullanılmıştır.

2.4.1. Stoklanma ve pasajlanma

A549 ve L929 hücre hatlarının saklanma koşulu -196 °C’dir. Bu uzun süre hücrelerin metabolik aktivitelerini an aza indirir. Stokladığımız hücre hatlarını yeniden kullanmak için ilk olarak eski mediumu uzaklaştırmak gerekir. Bunun için hücreler 50 mL’lik tüplere alınarak yeni 8 ml DMEM ilave ederek santrifüjda 4 dakika 12000 RPM’de santrifüj edildi ve DMSO uzaklaştırıldı. Tüpdeki süpernatantı atdıktan sonra pellete 5 ml DMEM eklendi ve küçük flaslara alınarak inkubatöre kaldırıldı.

Hücreler 2-3 gün içinde çoğaldıktan sonra ortamdaki DMEM uzaklaştırılarak flasklar PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler 2X Tripsin EDTA ile yüzeyden kaldırılarak santrifüj işlemi yapıldı. 100-75 µl DMSO kriyoprotektif etki amacıyla hücrelerle (1x10⁶ hücre/ml) birlikte 2 ve 1.5 ml’lik viallere aktarıldı. Mr.Frosty’de (18 kuyucuk içerir) 1 gün -85°C’de bekletildikten sonra vialler, sıvı azot tankında (-196 °C) ilgili yerlere alındı. Hücreler yeniden kullanılmak üzere sıvı azot tankından çıkarıldıktan sonra çözümleri sağlanıp 4 dk. 1200 rpm de santrifüj edildiler ve ortamdaki DMSO’nun uzaklaştırılması sağlandı. Sonrasında küçük flaslara alınıp inkübatöre koyuldu ve 2 gün bekletildikten sonra büyük flaskalara alındı. Büyük flastaki hücre yoğunluğu %70-80’egeline yeniden pasaj edildi.

2.4.2. Hücre Sayımı

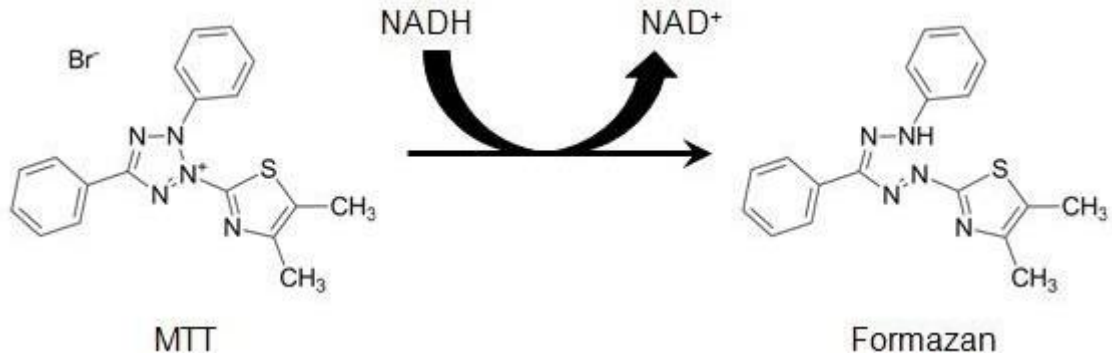
Hücreleri deneye hazırlamak için flasklar inkübatörden alındı. Eski medium atıldıktan sonra kültüre ettiğimiz flasklar 1x PBS ile 2 kez yıkandı. Hücrelerin flaskın yüzeyinden kalkması için 1.5 ml Tripsin EDTA eklendi ve inkübatörde 1-2 dakika bekletildi. Sonraki aşamada tripsini inhibe etmek için eklediğimiz tripsinin 1:2 oranında medium eklenerek 4dk. 1200 rpm’de santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatant döküldükten sonra ve tüpteki pellet üzerine 3 ml (eğer hücrelerin yoğunluğu fazlaysa 5 ml) medium eklenip pipetaj yapıldı ve hücreler eşit şekilde karıştırıldı. Toma lamına 10 µl alınarak karelerdeki hücreler mikroskop altında sayılmıştır. Sayım için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Hücre sayısı} = \frac{\text{Karelerde sayılan hücre miktarı} \times 25 \times 10^4}{1 \text{ ml'de kullanılan hücre miktarı}}$$

2.5. Sitotoksite Belirleme Testleri

2.5.1. MTT metodu ile hücrelerin sitotoksitelerinin belirlenmesi

MTT testi, canlı hücreler tarafından substratın kromojenik ürüne dönüştürülmesine dayanan en çok yönlü ve yaygın canlılık testlerinden biridir. MTT testi, suda çözünen sarı boya MTT'yi (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) çözünmeyen mor formazana dönüştürmek için mitokondriyal redüktaz kullanır. Mitokondriyal süksinik dehidrogenaz aktivitesinin ölçümü, MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) tetrazolyum tuzunu içeren bir yöntemle dayanmaktadır. Bu tuz, mitokondriyal süksinik dehidrogenazın faaliyeti sonucunda formazan kristallerine dönüşerek renk değişimine yol açmaktadır ve formazan adlı mor renkli kristalleri oluşturur. Bu kristaller hücrelerin canlılık seviyelerini gösteren bir indikatördür. Oluşan kristaller uygun bir çözücünde çözüldükten sonra spektrofotometrik plaka okuyucuda okunur. Bu yöntem, hücrelerin genel canlılığını ve mitokondriyal fonksiyonlarını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Grela 2018).



Şekil 3.2. MTT molekülünün formazan kristaline dönüşmesi

2.5.2. MTT yönteminin uygulanması

Deneylerde kullanılan sentez maddeler ve pozitif kontrol olan sisplatin, in vitro sitotoksisiteyi MTT analizi belirlenmiştir. Flasklarda inkübatör içerisinde kültüre edilen hücreler, 96 kuyucuklu plakalara, kuyucuk başı 5×10^6 sayıda olacak şekilde sayılıp 200 μ L besi yeri içerisinde kuyucuklara ekimi yapılmış ve 24 saatlik inkübasyona bırakılarak bir gece beklenmiştir. Bekleme sonunda hücrelerin besi yerleri değiştirilerek üzerlerine 100 μ L yeni besi konulmuştur. Hücrelere vermeden önce laminar kabin içerisinde ayarlanan sentez madde ve pozitif kontrollerin konsantrasyonları 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 ve 3.90625 μ g/mL olarak kuyucuklara 100 μ L olarak uygulanmıştır. Plakalar inkübatörde 24 saat süresince bekletilerek okumaya hazır hale gelmiştir. Okuma yapma öncesinde 1xPBS içerisinde 5 mg/mL olacak şekilde MTT tozu eklenerek solüsyon hazırlanmıştır. Boya eklenen plakalar 2-4 saat süresince inkübatörde bekletildikten sonra besiyeri uzaklaştırılarak, formazan kristallerinin çözülebilmesi için 100 μ L DMSO eklenmiştir. Plakaların ışık görmesini engellemek için alüminyum folyo ile sarılarak oda sıcaklığında orbital çalkalayıcı ile süspanse edilmiştir. Plakalar işlem sonunda 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik mikropilaka okuyucuda okunmuştur.

Hesaplama sonuçlarına göre, hücre popülasyonunun %50'sini inhibe eden IC₅₀ konsantrasyonu ve bu konsantrasyonun yarısı olan IC_{50/2} değeri belirlenmiştir. Tanımlanan bu dozlar, apoptotik etki testleri ile gen aktivasyonu/inhibisyonu deneylerinde kullanılmıştır.

2.6. Akım Sitometri Cihazı ile gerçekleştirilen deneyler

2.6.1. Annexin V-FITC/PI yöntemi ile hücresel ölüm etkilerinin belirlenmesi

Annexin V-FITC/PI yöntemi apoptoz sırasında fosfatidilserin, DNA veya RNA'da meydana gelen değişikliklere dayanmaktadır. Normal hücrelerde fosfatidilserinler (PS), hücre membranının iç kısmında bulunur. Hücre yüzeyinde meydana gelen apoptozun erken evresinde, bu plazma membran değişikliklerinden biri fosfatidilserinin (PS) plazma membranının iç tarafından dış katmana translokasyonudur, bu sayede PS hücrenin dış yüzeyinde açığa çıkar. Annexin V-FITC, PS için yüksek afiniteye sahip bir fosfolipid bağlayıcı proteindir ve PS'nin hücre membranına maruz kalması için hassas bir prob olarak kullanılır. Apoptotik hücreler, onları Annexin V FITC gibi floresan maddelerle etiketleyerek gözlemlenebilir. Propidyum iyodür (PI), zar bütünlüğü bozulmuş hücrelere giren, DNA veya RNA'ya bağlanan ve kırmızı floresans üreten boyadır. Hücre zarında translokasyon olmayan ve membran bütünlüğünde herhangi bir bozulma olmayan hücrelerin PI geçirgenliği bulunmamaktadır. Ancak ölmüş veya zarar görmüş zarları olan hücrelere girebilen PI, apoptoz veya nekrozun ileri aşamalarındaki hücrelerin gözlemlenmesini sağlar. Bu şekilde, canlı, erken apoptotik, geç apoptotik/nekrotik ve ölü hücreler annexin V-FITC ve PI için çift etiketleme temelinde ayırt edilebilir ve akış sitometrisi veya floresan mikroskobu ile analiz edilebilir (Van England 1998, Chen vd., 2008).

2.6.1.1. Yöntemin uygulanması

Yöntem, üretici firmanın kit prosedürüne tam olarak uygun bir şekilde uygulanmıştır. A549 hücre hattı, her bir kuyuya 2×10^5 hücre olacak şekilde sayılarak 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 2 mL besiyeri içinde inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından, her kuyudan 1 mL besiyeri alınmıştır. Sentezlenen bileşiklerin ve sisplatinin belirlenen IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozları, her bir kuyuda bulunan hücrelere 1 mL besiyeri içinde uygulanmıştır. Hücrelere ilaçların etki etmesi için 24 saat daha inkübe edilmiştir.

İncelenen hücreler, 24 saat sonunda mediumları ile birlikte akım sitometri tüplerine alındılar. 1x PBS (soğuk) ile yıkama ve 4dk. 1200 rpm'de santrifüj işlemi yapılarak mediumları ortamdaki alındı. Kit içinde bulunan bağlama solüsyonu (Assay Buffer), D.S. aracılığıyla dilüe edildi (1: 10 oranında). Santrifüj işlemi sonunda her bir tüpe 100 µL bağlama solüsyonu ilave edilerek hassas bir şekilde pipetlenmiş ve hücrelerin boyanması

amacıyla 5'er µL Annexin V ile Propidium Iodür (PI) boyaları eklenmiştir. Daha sonra hücreler karanlık ve oda sıcaklığı ortamında 15 dk. inkübe edilmişlerdir. Bu sürenin sonunda, tüm akım sitometri tüplerine 400'er µL eklenerek akım sitometri cihazı ile ölçümleri yapılmıştır.

2.6.2. Kaspaz-3 aktivasyonu ile hücresel ölüm etkilerinin belirlenmesi

Kaspazlar, programlanmış hücre ölümü (apoptoz) sürecinin önemli düzenleyicilerindendir. Bu kaspazlar arasında kaspaz-3, birçok önemli hücre proteinin spesifik bölünmesini katalize eden ve sıkça aktive olan bir ölüm proteazıdır. Ancak, bu kaspazın apoptozdaki spesifik gereksinimleri uzun bir süre boyunca tam olarak anlaşılamamıştır. Mitokondriyal sitokrom c salınımına ve kaspaz-9 fonksiyonuna bağımlı ya da bunlardan bağımsız kaspaz-3 aktivasyon yolları tanımlanmıştır. Kaspaz-3'ün etkinleşmesi, bir hücrenin apoptozisine girdiğini gösteren kritik bir olaydır; çünkü bu etkinleşme, DNA parçalanması ve hücre iskeletine ait proteinlerin bozunumu gibi önemli süreçlerden sorumludur. Bu nedenle, kaspaz-3'ün aktivasyonu, hücrenin apoptotik yola girdiğini işaret eden temel bir enzimatik adımdır (Asadi, 2022).

2.6.3. Yöntemin uygulanması

Kaspaz 3 aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılan metod, üretici firmanın kit prosedürüne tam uygunluk göstermektedir. 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna, 3×10^5 hücre /2mL medium olacak şekilde A549 hücreleri eklenmiş ve inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. Daha önceden belirlenen IC50 ve IC50/2 dozları, sentezlenen maddeler ve sisplatinin 24 saatlik inkübasyon sonrasında 1 mL taze besiyeri içinde hücrelere uygulanmıştır.

İlaç muamelesinin ardından, her bir kuyunun içeriği kendi tüpüne aktarılmıştır. Akım sitometri tüpleri, 2 defa 1x PBS (soğuk) ile yıkanarak bu işlemin her uygulanması sonrasında 4dk. 1200 rpm'de santrifüj işlemi uygulanarak supernatantları atılmıştır. Kit içinde bulunan Cytofix/Cytoperm solüsyonundan tüm akım sitometri tüplerine 0.5'er mL eklenerek, 20 dk. boyunca buzlu ortamda bekletilmiş ve santrifüj işlemi ile sonrasında supernatantı atılmıştır.

D.Su ile dilüe edilen Perm/Wash tampon çözeltisinden akım sitometri tüplerindeki hücreler üzerine 0.5'er mL eklenerek, bu tüpler 2'ser defa yıkanmıştır. Daha önceden hazırlanan çözelti içerisine 20 µL antikör eklenerek, yıkama işlemleri tamamlanan hücrelere eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak,

her bir örnek 1 mL 1x Perm/Wash tampon çözeltisi ile yıkanmış, santrifüj edilmiş ve santrifüj edilen hücrelere 0.5 mL 1x Perm/Wash tampon çözeltisi eklenerek akım sitometrisi cihazıyla kaspaz-3 aktivitesi analiz edilmiştir.

2.7. RT- PCR (Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi ile AKT, Bcl-2, Bax, CYD1, ERK, FOX-M1 ve Housekeeping gen (β - actin) ifadelerinin (ekspresyon) belirlenmesi

Gerçek zamanlı RT-PCR, RNA seviyelerini tespit etmek için kullanılan bir moleküler biyoloji tekniğidir. Bu teknik, bir enzimatik amplifikasyon süreci olan PCR'nin modifikasyonu olarak düşünülebilir. RT-PCR, RNA'nın önce ters transkripsiyonu (RT) adı verilen bir aşama ile cDNA'ya çevrilmesini içerir. Daha sonra, bu cDNA, standart PCR'nin aşamalarını içeren bir reaksiyona tabi tutulur. RT-PCR'nin en önemli özelliği, amplifikasyonun gerçek zamanlı olarak izlenmesidir. Bu, her döngüde oluşan amplifikasyon ürünlerinin floresan raportör molekülleri aracılığıyla sürekli olarak ölçülmesini sağlar. PCR'nin temel prensipleri şu üç basamaktan oluşur:

1. Aşama: Denaturasyon (15 saniye). Bu aşamada, DNA sarmalı yüksek sıcaklıklarda (genellikle 94-98°C arası) ayrıştırılır. Bu, DNA'nın çift sarmalının ayrılmasıyla sonuçlanır, böylece her bir sarmal tek zincirli hale gelir.

2. Aşama: Annealing (hibridizasyon) (30 saniye). DNA şablonlarına önceden belirlenmiş oligonükleotid primerler, ısıya (37-65°C) dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi eşliğinde eklenir. Bu primerler, hedef bölgeye spesifik olarak bağlanır ve DNA sentezi için başlangıç noktasını sağlar.

3. Aşama: Elongasyon (uzama) (1,5 saniye)

Bu aşamada, DNA polimeraz enzimi, primerlere bağlanarak sıcaklığın arttığı bir ortamda (genellikle 72°C'de) yeni DNA zincirini sentezler. Mg^{2+} iyonlarının varlığı, DNA polimerazın etkinliğini artırır.

PCR ürün miktarı, bu üç aşamadaki döngü sayısına bağlıdır. İlk aşamada, sıcaklığın artırılmasıyla nükleotidler arasındaki hidrojen bağlarının ayrılması hedeflenir, bu da DNA'nın helikal yapısını korur ve denatürasyona neden olur. Ardından sıcaklığın düşürülmesi, Taq polimeraz enziminin, DNA molekülüne tamamlayıcı primerlerle (oligonükleotidler) bağlanmasını sağlar. Primer bağlanmasından kaynaklanan ikinci ipliğin gelişimi, deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP'ler) kullanılarak uzatma ile devam eder, bu da polimerizasyon aşamasını işaret eder. Primerler, DNA şablonlarına spesifik olarak bağlanarak DNA polimeraz enzimi tarafından tanımlanan yeni ipliğin uzunluğunu

belirler. Bu aşama, her bir döngüde DNA'nın çoğaltılmasını sağlar. Primerler uzatıldıktan sonra, DNA fragmenti üzerindeki ara bölgeler temizlenir. DNA'nın denatürasyonundan sonra yeni primerlerin bağlanması sağlanır ve DNA'nın sentez işlemi tekrardan başlatılır. Her bir döngü ile DNA fragment miktarı iki misli olur. Ayrıca, çevredeki Mg²⁺ iyonları bu yöntemde kofaktör görevi üstlenir; bu iyonların eksikliği eşleşme hatalarına yol açabilir.

Tablo 3.2. RT-PCR analizi primerleri

Primer Adı	Dizi	Ürün uzunluğu (Bç)
Beta Actin Forward	AGCAAGAGAGGCATCCTCACC	21
Beta Actin Reverse	ACAGGGATAGCACAGCCTGGA	21
BCL-2 Forward	GGTGAAGTGGGGGAGGATTG	20
BCL-2 Reverse	GCCCAGACTCACATCACCAA	20
Bax Forward	CCCCCGAGAGGTCTTTTCC	20
Bax Reverse	GTCCAATGTCCAGCCCATGA	20
AKT Forward	GGAGGTTTTTGGGCTTGCG	19
AKT Reverse	GTCCATGGTGTTCTACCCA	20
ERK Forward	CCCTGCCTGTGTGCACTTAT	20
ERK Reverse	CTTGGTCCGTAGCCAGTTGT	20
CYD-1 Forward	TGAGGGACGCTTTGTCTGTC	20
CYD-1 Reverse	GCCTTTGGCCTCGATACA	18
FOXO1 Forward	CCAAAACCTGCAGCTAGGGA	20
FOXO1 Reverse	GGAGCCCAGTCCATCAGAAC	20

2.7.1. RNA izolasyonu

PCR analizinden önce, RNA izolasyonu işlemi gerçekleştirilmelidir. Bu amaçla A549 hücreleri bileşik muamelesi yapılmadan kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca en

etkili bileşikler MTT ve akım sitometri ile belirlenmiş ve bu bileşiklerin IC₅₀ dozları ile A549 hücreleri 24 saat inkübe edildikten sonra ilgili prokoller uygulanmıştır.

Öncelikle adeziv hücrelerin, yüzeyden kaldırılması amacıyla tripsin uygulaması yapıldı ve üzerine taze medium eklendi ve bu içeriğin tamamı 2 ml'lik tüplere alınarak santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılarak hücrelerin PBS ile yıkanma işlemi gerçekleştirildi.

Lizis Tamponu için (1 örnek için) 500 µl Lizis Tamponu (L) ve 10 µl 14,3 M Beta-merkaptotanol kullanılır. 10-20 mg materyale 200 µl PBS (Ca Mg içermeyen), 10 µl Proteinaz K (20 mg/ml), 500 µl Lizis Tamponu ve 60 mg zirkonyum bead eklenir ve homojenize edilir.

Homojenizat yeni bir 2 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılır. 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Üzerine 500 µl Çökeltme Tamponu (P) ekleyip iyice vorteksle ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Karışımın üzerine 200 µl Kloroform-izoamil alkol (49:1) karışımı eklenir. Alt-üst edilerek karıştırılır ve oda sıcaklığında 2 dakika bekletilir. Karışım, 4°C'de 12000 x g'de 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası en üstte bulunan sıvı fazdaki süpernatant (yaklaşık 600 µl) yeni bir tüpe aktarılır. Üzerine 1,25 kat etanol (%96-100) eklenir (yaklaşık 800 µl) ve pipetle karıştırılır. 700 µl lizat, bir kolona transfer edilir ve oda sıcaklığında 12000 x g'de 20 saniye santrifüj edilir. Tüp dökülür ve kolon tekrar tüpün içerisine yerleştirilir. Tüm lizatlar kolona transfer edilinceye kadar bu adım tekrarlanır. Kolonun üzerine 700 µl Yıkama Tamponu 1 solüsyonu eklenir, oda sıcaklığında 12000 x g'de 20 saniye santrifüj edilir. Tüp dökülür ve kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirilir. Üzerine 600 µl Yıkama Tamponu 2 solüsyonu eklenir, oda sıcaklığında 12000 x g'de 20 saniye santrifüj edilir. Tüp dökülür ve kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirilir. Kolonun üzerine 600 µl Yıkama Tamponu 2 solüsyonu eklenir, oda sıcaklığında 12000 x g'de 20 saniye santrifüj edilir.

Tüp dökülür ve kolon tekrar 1 dakika maksimum hızda santrifüj edilir. Kolon, 1,5 ml'lik Eppendorf tüpünün üzerine yerleştirilir. Kolonun merkezine 50-100 µl, 65-70°C'de bekletilmiş nükleazdan arındırılmış, ultra distile su veya DEPC'li su eklenir. Oda sıcaklığında 12000 x g'de 1 dakika santrifüj edilir. RNA hemen kullanılır veya -80°C'de kullanılıncaya kadar saklanır.

Tablo 3.3. RNA izolasyon değerleri ve saflığı

Örnek adı	ng/µl	260/280 nm
Kontrol	967	1,95
Kontrol	878	2,03
Kontrol	1038,3	1,98
Sisplatin	290	1,95
Sisplatin	333,3	1,95
Sisplatin	830	1,97
Bileşik 1	1020,3	2,03
Bileşik 1	1089,8	2,03
Bileşik 1	664,9	2,01
Bileşik 9	1557,9	2,02
Bileşik 9	701,3	2,03
Bileşik 9	1140,9	2,02
Bileşik 13	1055,2	2,02
Bileşik 13	387,9	1,91
Bileşik 13	1560,4	2

2.7.2. c-DNA (komplementar DNA) sentezi

RT-PCR analizi için A549 hücre hatlarından izole edilen RNA'ların kontrol ve deney gruplarında cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi, kitin içeriğindeki protokole uygun olarak yapılmıştır.

Deney grubu için ayrılan tüplerin içine; 1-6'şar μL nükleaz içermeyen su (DNA/RNA Free water), 4'er μL 5x iScript reaksiyon karışımı, 1'er μL iScript ters transkriptaz ve 7.5'er μL RNA şablonu (1 μg RNA) eklenmiştir.

Total hacim 20'şer μL olacak şekilde tamamlanmıştır. Bu işlem sonrasında, örnekler cihaza yerleştirilerek 42°C 120 dk. 80°C 10 dk ve 4°C sonsuz şekilde termal profili oluşturularak reaksiyon başlatıldı.

2.7.3. RT-PCR analizi

PCR analizi 2X Magic SYBR Green mix RT-PCR kit kontrolüne göre gerçekleştirildi. Master Mix dNTP, Tag polimeraz, MgCl₂, az miktarda DMSO, SYBR Green boyasının bir karışımını içerir.

Tablo 3.4. *RT-PCR bileşenleri*

Real Time PCR Standart Reaksiyon (1 örnek için)	Hacim
Master Mix	10 µl
cDNA (10 ng/µl)	2 µl
Forward Primer (10µM)	1 µl
Reverse Primer (10µM)	1 µl
Dna free saf su	6 µl
Total Hacim	20 µl
cDNA haricinde komponentler mix biçiminde hazırlanarak kuyulara dağıtılır. Ardından kuyulara cDNA eklererek PCR kuyuları reaksiyona hazır hale getirilir.	

2X süper karışım ve ek donmuş reaksiyon bileşenleri oda sıcaklığına ulaşıldı ve kapsamlı bir şekilde karıştırıldı. Tüpün dibindeki hücreleri toplamak için santrifüj yapıldı, ardından ışıktan korunarak saklandı ve buz üzerinde muhafaza edildi.

Reaksiyon karışımı qPCR plakalarına eşit miktarda dağıtıldı, pipetleme dikkatli bir şekilde yapıldı.

İlgili kuyulara DNA örnekleri ve DNAsız H₂O eklendikten sonrak kuyucukların bulunduğu plaka, film yardımıyla kapatıldıktan sonra, bileşenlerin homojen bir şekilde karıştığından emin olmak amacıyla 20 saniye boyunca vortekslenmiştir. Ardından, pPCR plakası RT-PCR'a yüklenmiş ve cihazın PCR protokolü başlatılmıştır. Elde edilen veriler analiz edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE BULGULAR

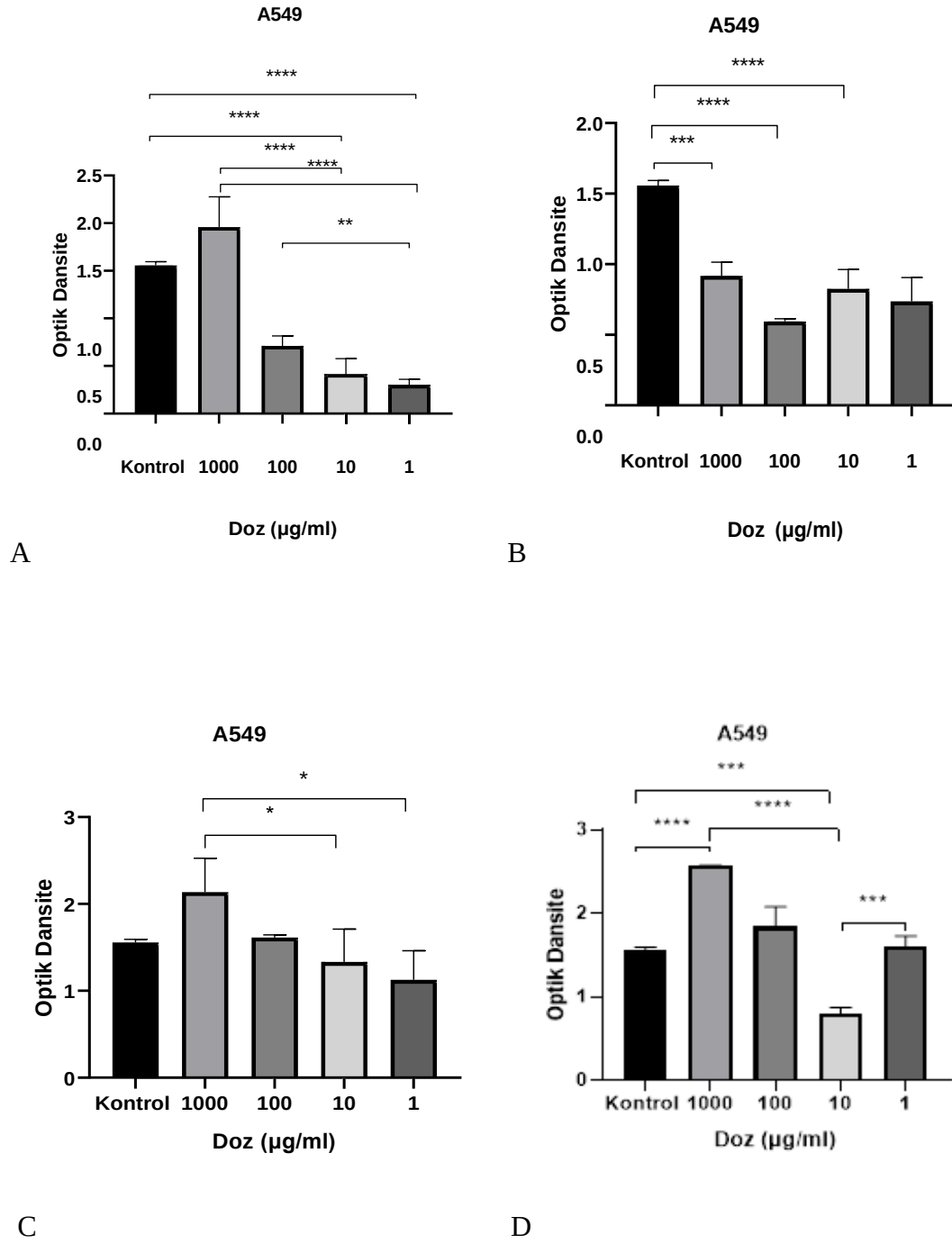
4.1. Sitotoksite (MTT) Testi Sonuçları

4.1.1. Sentezlenen fluoren tiyazol bileşiklerinin A549 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

Akciğer adenokarsinoma hücreleri üzerine, sentez bileşiklerinin ve sisplatinin farklı konsantrasyonları (1000, 100, 10, 1 µg/ml) kuyucuklara eklendikten sonra 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda hücreler, MTT boyası ile boyandı ve bu boyanmış hücreler 2,5-3 saat boyunca inkübasyona alındı. İnkübasyon sonrasında ELIZA okuyucuda bu ölçüm için uygun olan 540 nm dalga boyunda ölçümler gerçekleştirildi. Muamele edilmeyen hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek, her bir kuyucukta bulunan hücrelerin % canlılıkları hesaplanmıştır. Sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin 24 saat sonundaki etkilerinin IC₅₀ ve IC_{50/2} konsantrasyon değerleri, Graphpad Prism 8 programı kullanılarak hesaplandı. Deneyler, her biri 3 kuyucuk içeren tekrarlı örneklemeler şeklinde gerçekleştirildi ve sonuçların değerlendirilmesi amacıyla sisplatin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. MTT analiz sonuçları Tablo 4.1'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerine 24.saatlik IC₅₀ konsantrasyon değerleri

Uygulanan bileşikler ve pozitif kontrol	A549 hücre hattı 24. saat IC ₅₀ değerleri (µg/ml)
Sisplatin	60,00±0,13
Bileşik 1	12,52±0,18
Bileşik 2	89,59±0,2
Bileşik 3	116,43±0,2
Bileşik 4	167,46±9,48
Bileşik 5	42,12±0,18
Bileşik 6	203,34±0,2
Bileşik 7	1,54±0,29
Bileşik 8	65,21±0,18
Bileşik 9	53,58±0,24
Bileşik 10	13,53±0,16
Bileşik 11	>1000
Bileşik 12	169,92±19,62
Bileşik 13	13,06±0,15



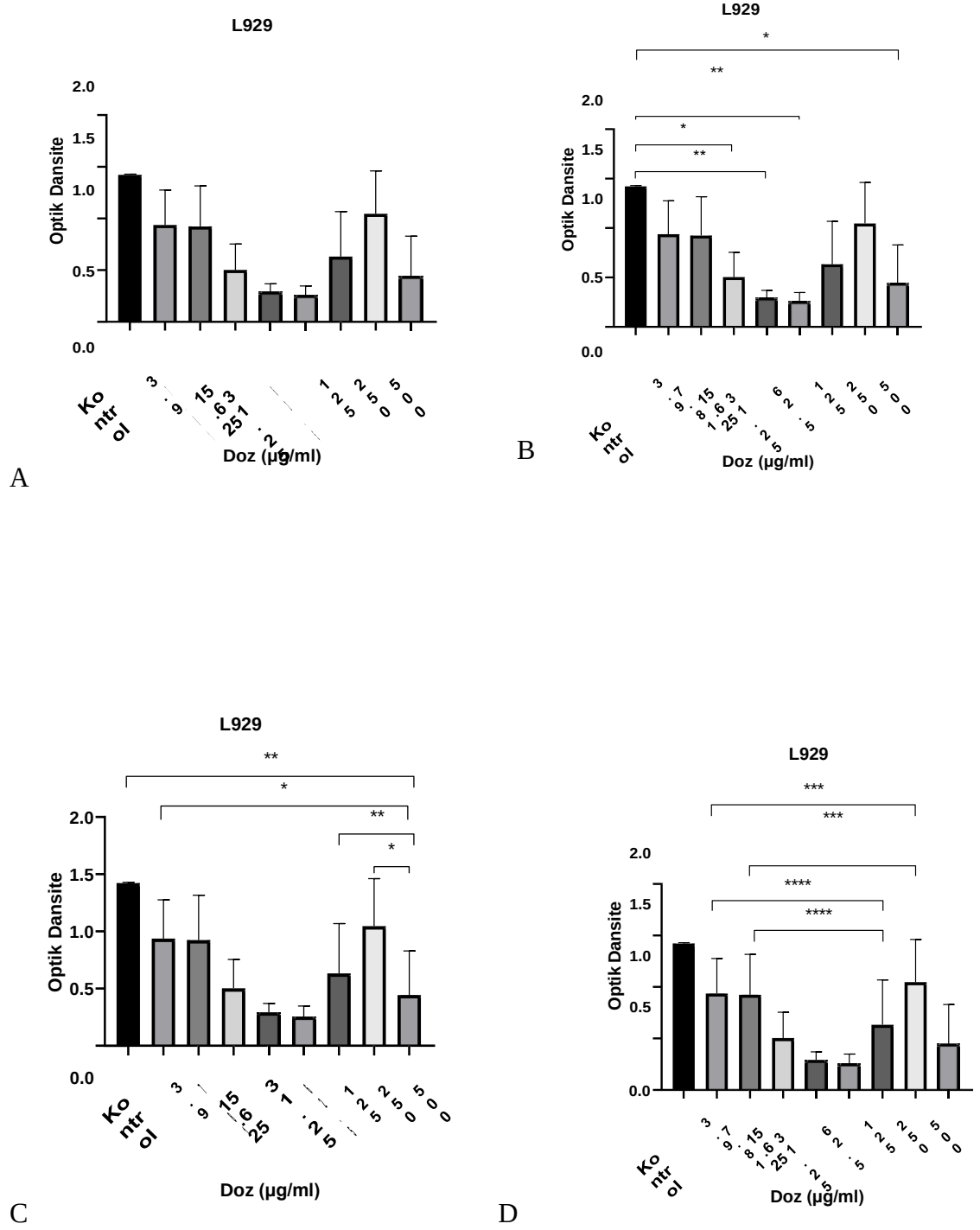
Şekil 4.1. A) Bileşik1, B) Bileşik7, C) Bileşik9 D) Bileşik 13'in MTT deneyi ile 24 saat inkübasyon sonrası A549 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri. Canlılık verileri ortalama $\pm$ SD'dir (her zaman noktasında ve konsantrasyonda $n = 3$). Bileşik 1, 7, 9 ve 13 tarafından A549 hücrelerinde hücre proliferasyonu inhibisyonu gözlemlendi. Tek yonlu Anova ile $P < 0.0001$

4.1.2. Sentezlenen Fluoren tiyazol bileşiklerinin L929 hücreleri üzerine sitotoksik etki sonuçları

L929 hücrelerine uygulanan sentezlenmiş bileşikler, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125, 3,90625 µg/ml konsantrasyonlarında 24 saat boyunca inkübe edildiler. Bu sürenin sonrasında hücrelere 5 mg/mL konsantrasyonunda MTT boyası eklenerek boyandı ve bu işlem 2.5-3 saat sürdü. Daha sonra ELISA Reader cihazında 540 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Hesaplamalar, kontrol canlılığını %100 olarak kabul edilerek her bir kuyucuk için ayrı ayrı gerçekleştirildi. Sentezlenen bileşiklerin 24 saatlik etkilerinin IC₅₀ ve IC₅₀/2 değerleri, Graphpad Prism 8 programı kullanılarak hesaplandı. Deneyler, 3 kuyucuklu ve tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Tablo 4.2. Sentez bileşiklerinin L929 hücre hattındaki 24.saatteki IC₅₀ konsantrasyon değerleri

Uygulanan bileşikler	L929 hücre hattı 24.saatte IC ₅₀ değerleri (µg/ml)
Bileşik1	84,94±0,28
Bileşik2	37,92±0,11
Bileşik3	95,15±0,17
Bileşik4	121,4±0,19
Bileşik5	79,18±0,53
Bileşik6	10,48±0,23
Bileşik7	7,78±0,23
Bileşik8	16,01±0,43
Bileşik9	281,63±85,28
Bileşik10	11,06±0,2
Bileşik11	12,92±0,15
Bileşik12	10,15±0,12
Bileşik13	55,61±1,47



Şekil 4.2. A) Bileşik 1, B) Bileşik 7, C) Bileşik 9 D) Bileşik 13'ün MTT deneyi ile 24 saat inkübasyon sonrası L929 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri. Canlılık verileri ortalama $\pm$ SD'dir (her zaman noktasında ve konsantrasyonda $n = 3$). Bileşik 1, 7, 9 ve 13 tarafından L929 hücrelerinde hücre proliferasyonu inhibisyonu gözlemlendi. Tek yönlü Anova ile $P < 0.0001$

4.1.3. A549 hücrelerinin L929 hücrelerine kıyasla selektivite indeksi (SI).

MTT analizine dayanarak bileşiklerin SI belirlendi. Bu indeksi hesaplamak için sağlıklı hücrelerle gerçekleştirilen analizin sonuçlarına göre hesaplanan IC₅₀ değeri, kanserli hücrelerle gerçekleştirilen analizin sonuçlarına göre hesaplanan IC₅₀ değerine bölünür. SI, her iki hücre hattının 24. saat IC₅₀ değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.3. A549 hücrelerinin L929 hücrelerine kıyasla SI değerleri (24. saatte) SI=L929 hücresi IC₅₀ dozu/ A549 hücresi IC₅₀ dozu

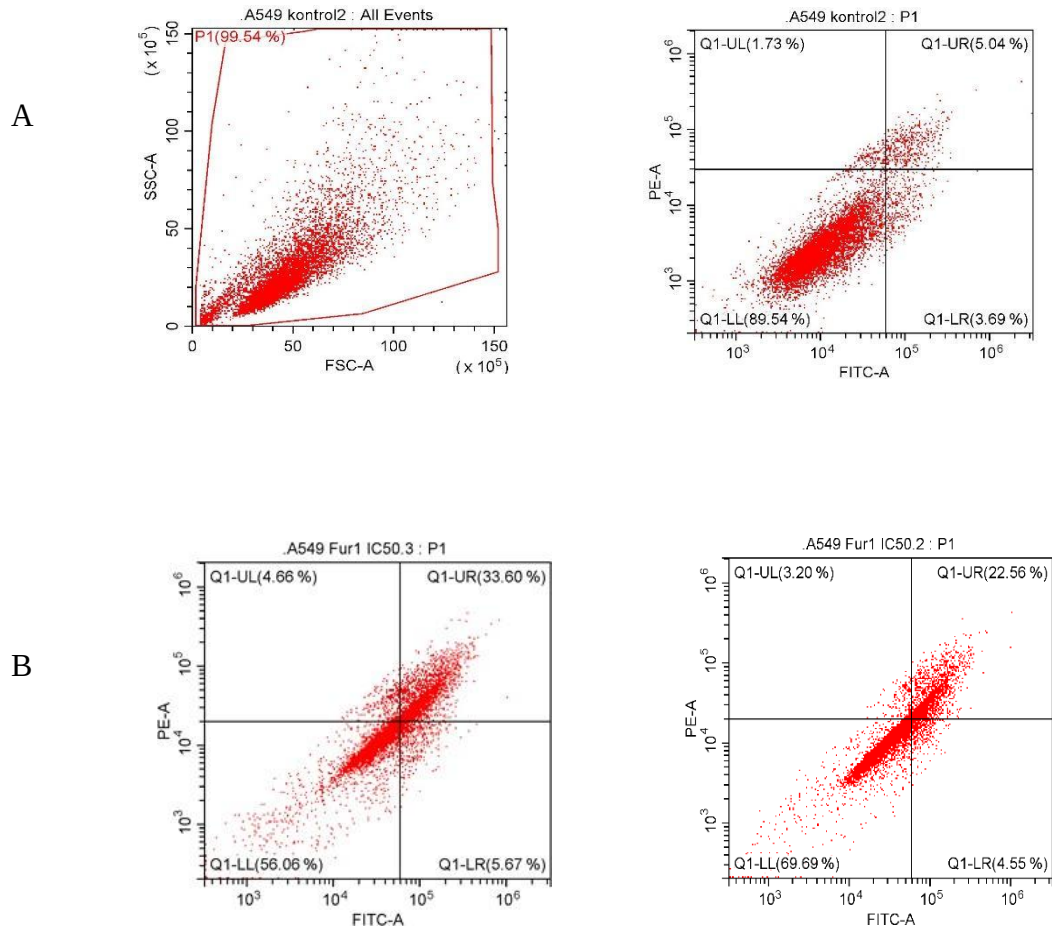
Hücre hatları	Bileşik1 IC ₅₀ dozu	Bileşik2 IC ₅₀ dozu	Bileşik3 IC ₅₀ dozu	Bileşik4 IC ₅₀ dozu	Bileşik5 IC ₅₀ dozu	Bileşik6 IC ₅₀ dozu	Bileşik7 IC ₅₀ dozu	Bileşik8 IC ₅₀ dozu
A549	12,5	89,59	116,4	167,4	42,12	203,3	1,54	65,2
L929	84,94	37,92	95,15	121,4	79,18	10,48	7,78	16,01
S.I.	6,79	0,42	0,81	0,72	1,87	0,05	5,05	0,24

Hücre hatları	Bileşik9 IC ₅₀ dozu	Bileşik10 IC ₅₀ dozu	Bileşik11 IC ₅₀ dozu	Bileşik12 IC ₅₀ dozu	Bileşik13 IC ₅₀ dozu
A549	53,58	13,53	>1000	169,9	13,06
L929	281,6	11,06	12,9	10,15	55,6
S.I.	5,25	0,81	>0,01	0,05	4,25

4.2. Sentezlenen Bileşiklerin, Akım Sitometri Metodu ile A549 Hücreleri üzerine Apoptotik Etki Sonuçlarının Değerlendirilmesi

4.2.1. Apoptotik Etkilerin Akım sitometrik olarak Annexin-V FITC-PI analizi ile ölçülmesi

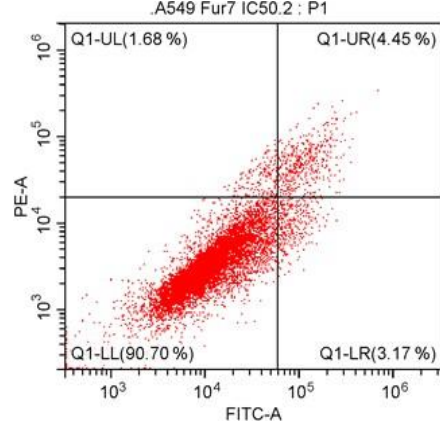
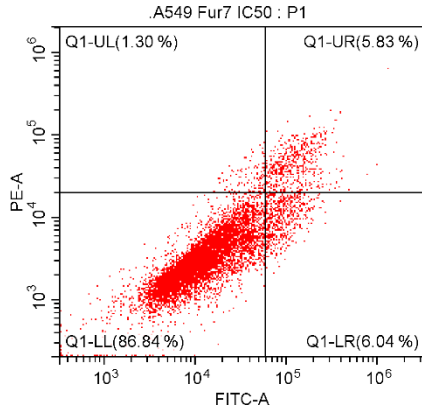
4.2.1.1. Bileşiklerin A549 hücreleri üzerine apoptotik etki sonuçlarının belirlenmesi



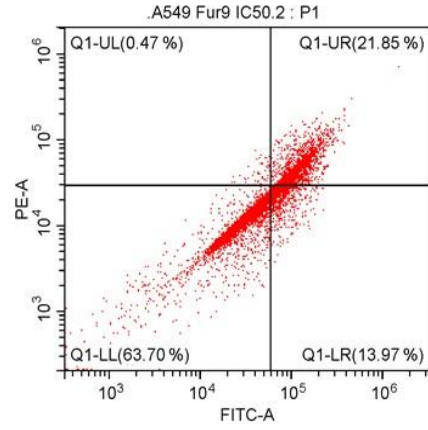
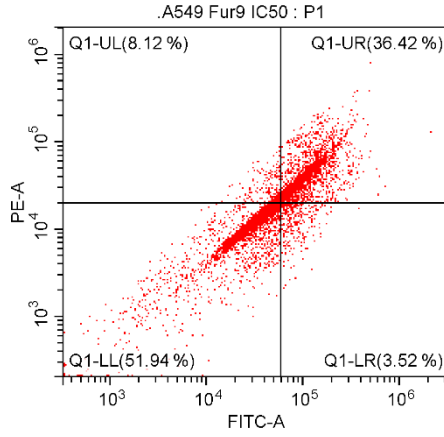
Şekil 4.3. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı ve kontrol B) Bileşik 1'in A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC₅₀ ve IC_{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.

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

C



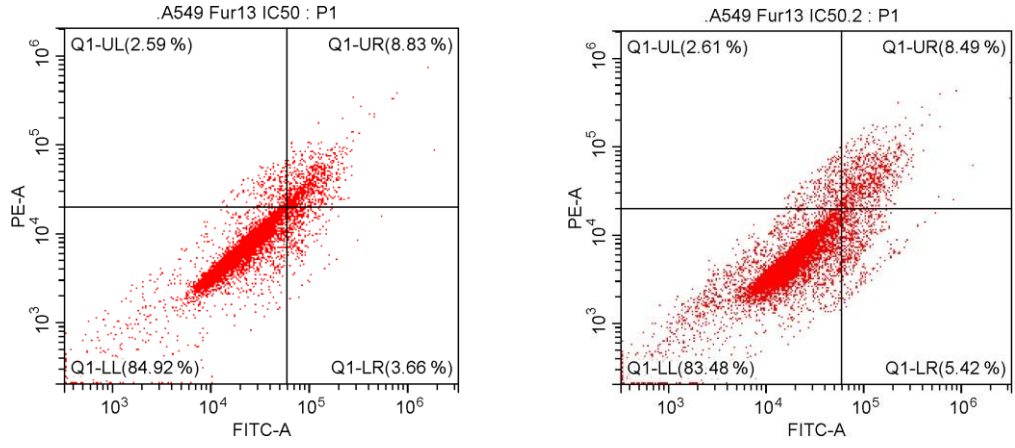
D



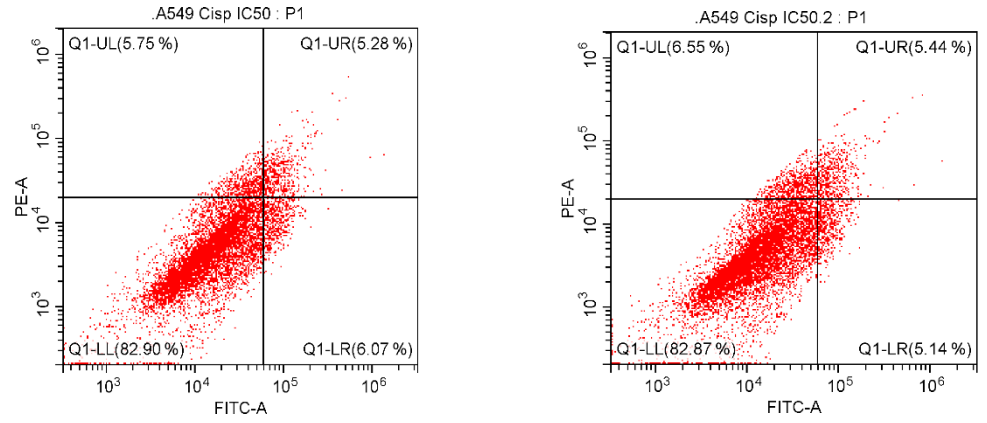
Şekil 4.4. C) Bileşik 7'nin A549 hücreleri üzerine 24. Saat IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozlarının apoptotik etkileri. D) Bileşik 9 A549 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.

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

E



F



Şekil 4.5. E) Bileşik13 A549 hücreleri üzerine 24. Saat IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozlarının 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. Bileşiklerin A549 hücreleri üzerinde 24 saat % canlılık oranları (Annexin-V FITC)

24. saat	LL	UL	UR	LR
K	89,54	1,73	3,04	3,69

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)

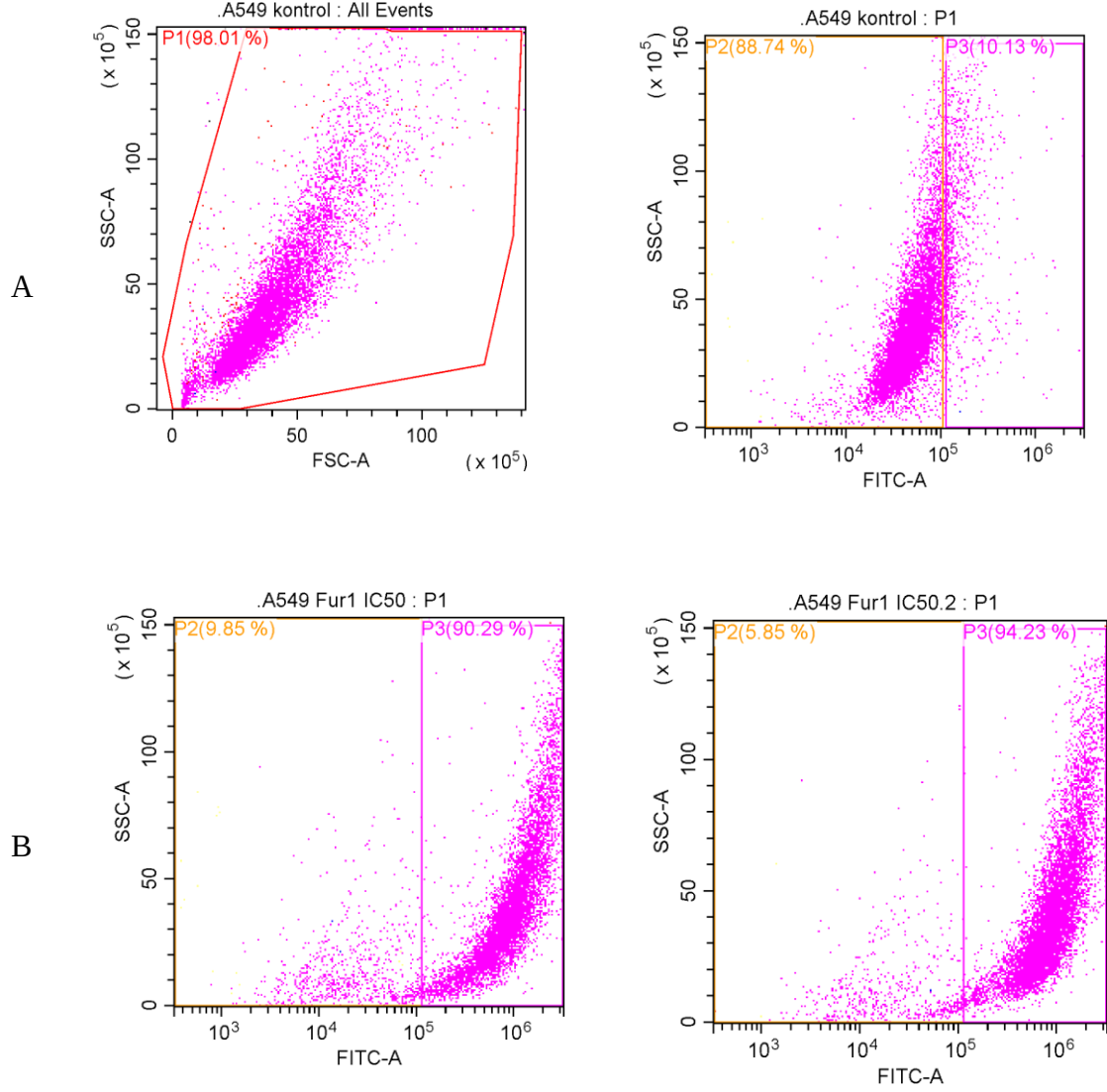
24 saat sonrası	Canlılık (LL)	Nekroz (UL)	Geç apoptoz(UR)	Erken Apoptoz (LR)
Sisplatin IC ₅₀	82,90	5,75	5,28	6,07
Sisplatin IC _{50/2}	82,87	6,55	5,44	5,14

Tablo 4.6. Sentezlenen bileşiklerin A549 hücreleri üzerine 24 saat yüzde canlılık oranları (Annexin-V FITC)

24.saat	LL	UL	UR	LR
Bileşik 1 IC ₅₀	56,06	4,66	33,60	5,67
Bileşik 1 IC _{50/2}	69,69	3,20	22,56	4,55
Bileşik 7 IC ₅₀	86,84	1,30	5,83	6,04
Bileşik 7 IC _{50/2}	90,70	1,68	4,45	3,17
Bileşik 9 IC ₅₀	51,94	8,12	36,42	3,52
Bileşik 9 IC _{50/2}	63,70	0,47	21,85	13,97
Bileşik 13 IC ₅₀	84,92	2,59	8,83	3,66
Bileşik 13 IC _{50/2}	83,46	2,61	8,49	5,42

4.2.2. kaspaz-3 aktivitesinin akım sitometrik analizi

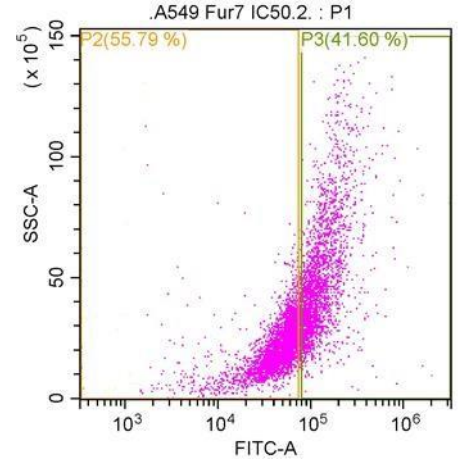
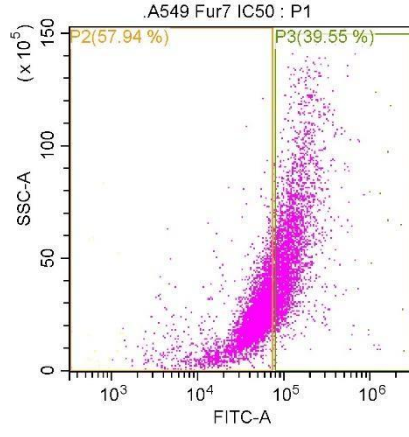
4.2.2.1. A549 hücreleri üzerine 24 saatlik kaspaz-3 aktivite sonuçlarının değerlendirilmesi



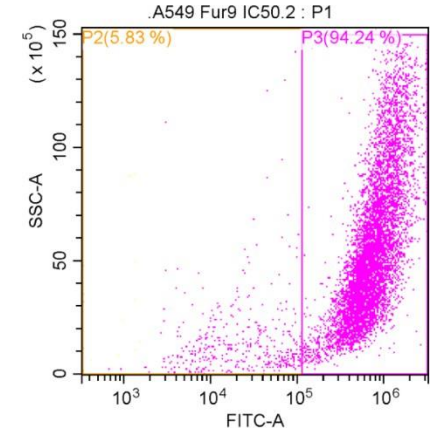
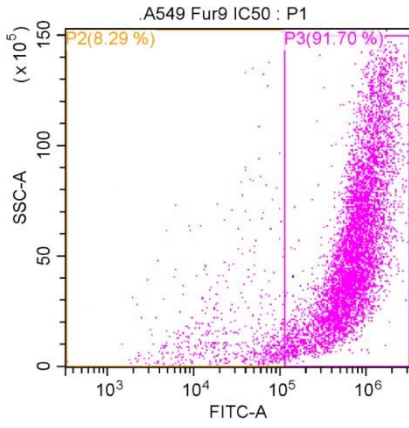
Şekil 4.6. A) Hücre grupları içinde seçilmiş kontrol ve anapı B) Bileşik 1'in IC50 ve IC50/2 dozu analizleri

(P2= Kaspaz3 aktivasyonu bulunmayan, P3= Kaspaz3 aktivasyonu bulunan)

C



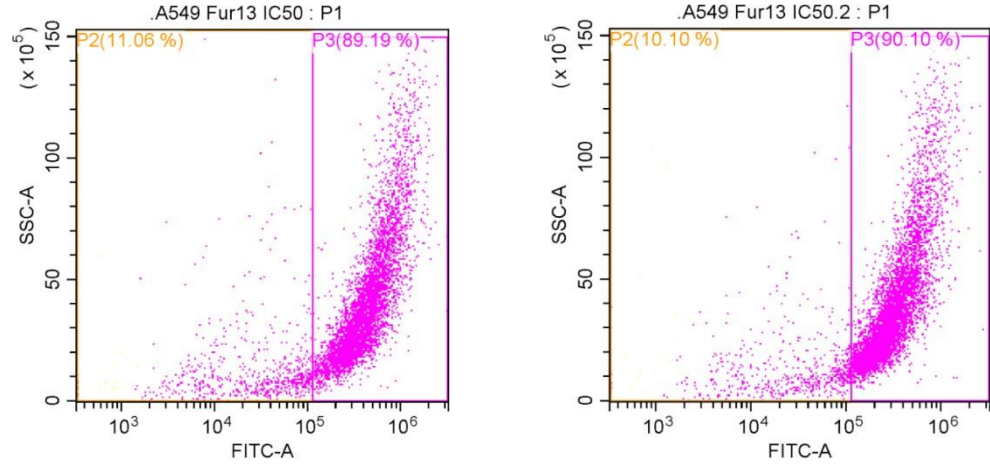
D



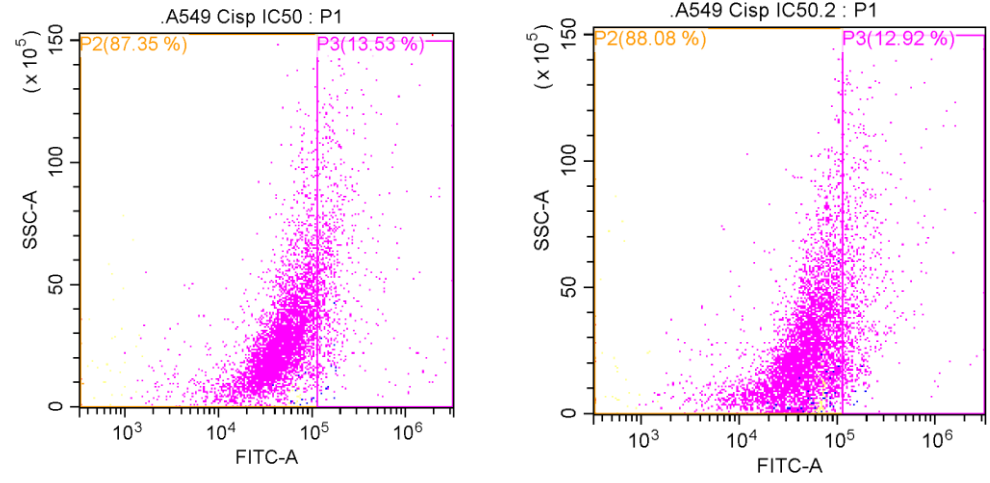
Şekil 4.7. C) Bileşik 7'in IC50 ve IC50/2 doz analiz sonuçları D) Bileşik9'un IC50 ve IC50/2 doz analiz sonuçları

(**P2**= Kaspaz-3 aktivasyonu göstermeyen, **P3**= Kaspaz-3 aktivasyonu gösteren)

E



F



Şekil 4.8. E) Bileşik13'ün IC50 ve IC50/2 dozları analizleri F) Sisplatinin IC50 ve IC50/2 dozları analizleri

(P2= Kaspaz3 aktivasyonu bulunmayan, P3= Kaspaz3 aktivasyonu bulunan)

Tablo 4.7. Sisplatinin A549 hücre hatları üzerindeki kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları

(P2= Negatif kaspaz-3 yüzdesi, P3= Pozitif kaspaz-3 yüzdesi)

24 saat	P2 (%)	P3 (%)
Kontrol	88,74	10,13
Sisplatin IC ₅₀	87,35	13,53
Sisplatin IC _{50/2}	88,08	12,92

Tablo 4.8. Sentez bileşiklerin A549 hücre hatları üzerindeki kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları

(P2= Negatif kaspaz-3 yüzdesi, P3= Pozitif kaspaz-3 yüzdesi)

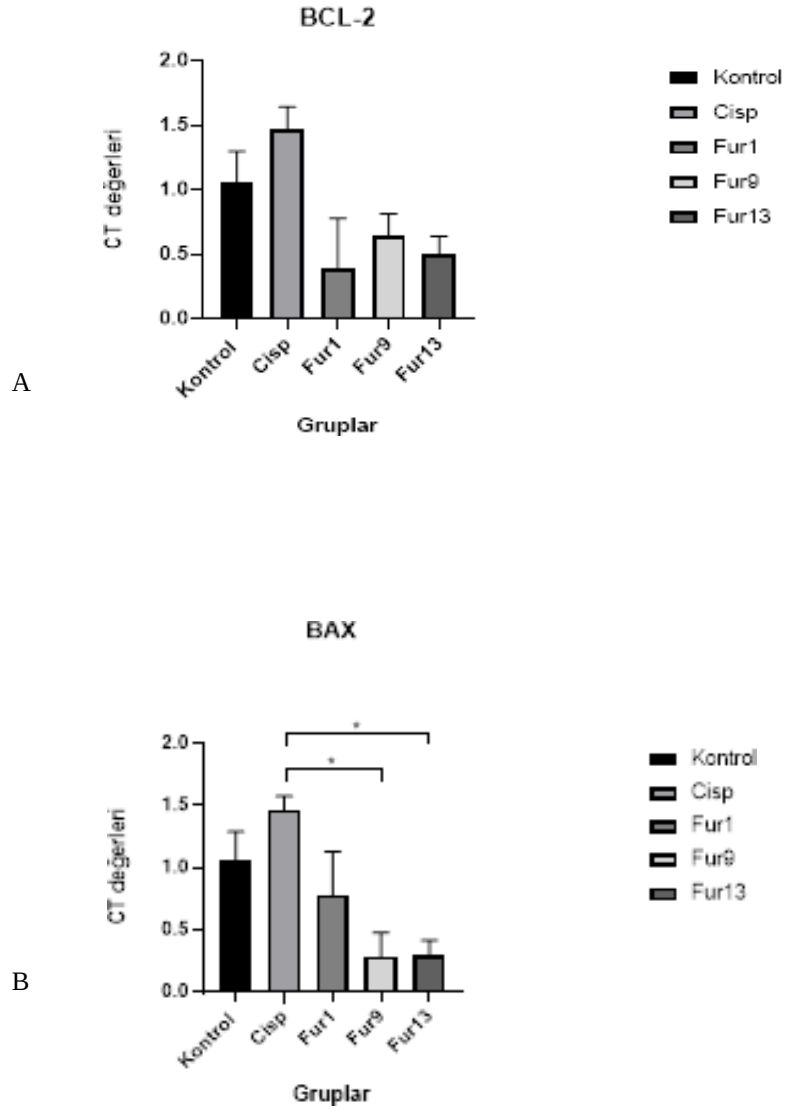
24. saat	P2 (%)	P3 (%)
Bileşik 1 IC ₅₀	9,85	90,29
Bileşik 1 IC _{50/2}	5,85	94,23
Bileşik 7 IC ₅₀	57,94	39,55
Bileşik 7 IC _{50/2}	55,79	41,60
Bileşik 9 IC ₅₀	8,29	91,70
Bileşik 9 IC _{50/2}	5,83	94,24
Bileşik 13 IC ₅₀	11,06	89,19
Bileşik 13 IC _{50/2}	88,08	12,92

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

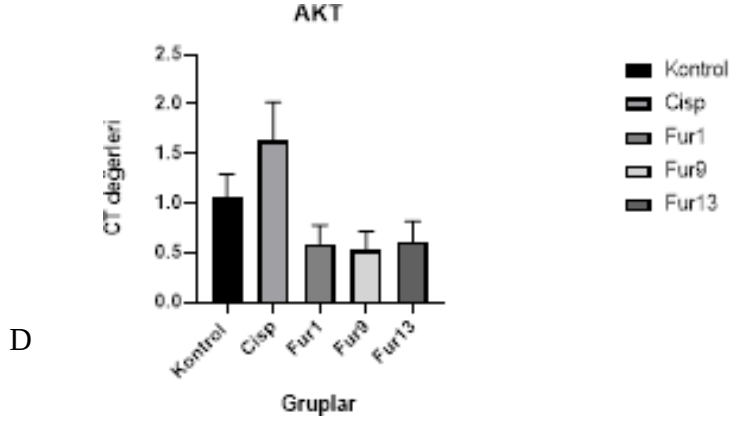
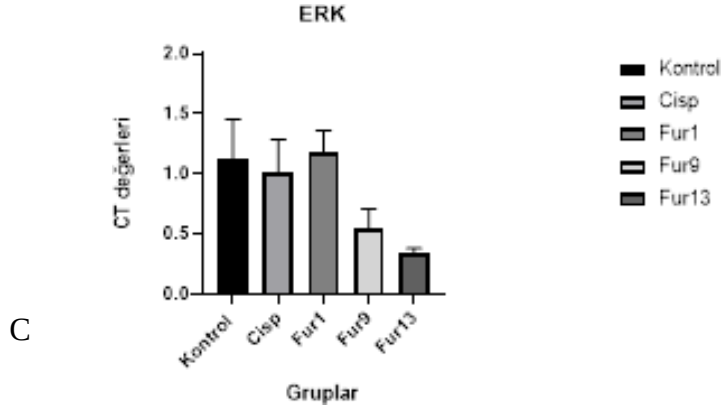
Yeni sentezlenen fluoren tiyazol türevi bileşiklerin L929 ve A549 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri MTT deneyi ile belirlenmiştir. Seçilen en etkili bileşikler, hesaplanan IC50 konsantrasyonları ile inkübe edildi ve apoptotik etkileri flow sitometrik ölçümler ile değerlendirildi. Ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde, bileşik 1, 9 ve 13'ün diğer bileşiklere göre kıyaslandığında daha fazla apoptotik etkilere neden oldukları belirlenmiştir. Bu bileşiklerin gen düzeyindeki etkilerini belirlemek amacıyla Bcl-2, Bax, CYD1, ERK, AKT, FOXM1 genleri için RT-PCR analizleri gerçekleştirildi.

Tablo 4.9. A549 hücre hatlarındaki Bcl-2, Bax, ERK, AKT, CYD1, FOXM1 genlerindeki kat değişimleri (n=3).

Bileşikler	BCL-2	BAX	ERK	AKT	CYD1	FOXM1
Kontrol IC50	1	1	1	1	1	1
Siplatin IC50	1,38358	1,38662	0,903831	1,543287	0,806686	0,197901
Fur 1 IC50	0,368121	0,741029	1,044147	0,561735	1,00988	0,970459
Fur 9 IC50	0,606417	0,271748	0,488949	0,509369	0,80456	0,565727
Fur 13 IC50	0,465867	0,284573	0,307308	0,578163	0,75957	0,712429

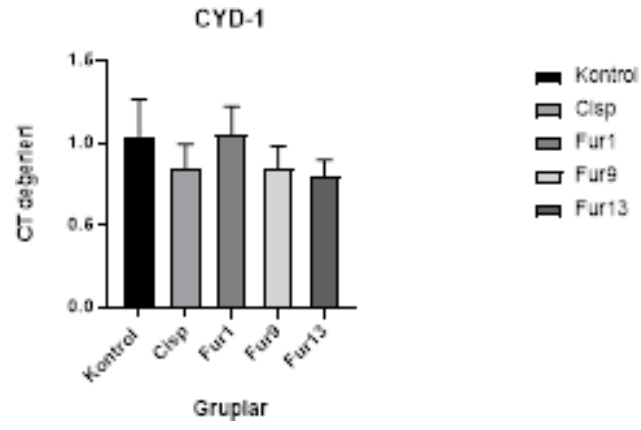


Şekil 4.9. A) BCL-2, B) BAX genleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile kat değişimleri hesaplandı. (n= 3). Tek yönlü Anova ile $P > 0,05$

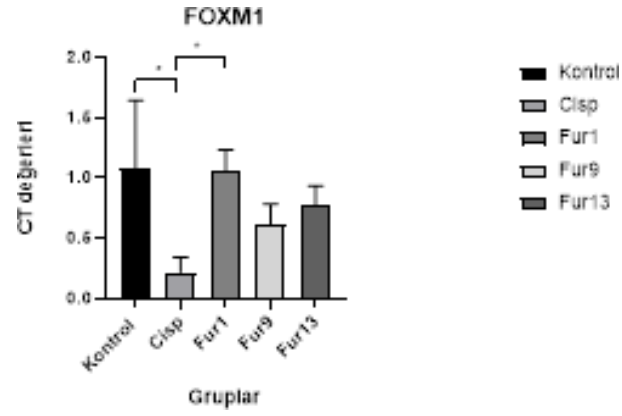


Şekil 4.10. C) ERK, D) AKT genleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile kat değişimleri hesaplandı. ($n=3$). Tek yönlü Anova ile $P>0,05$

E



F



Şekil 4.11. E) CYD1, F) FOXM1 genleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile kat değişimleri hesaplandı. (n= 3).

Tek yönlü Anova ile $P < 0,05$

5. TARTIŞMA

Kanser, önemli bir küresel sağlık sorunu olarak varlığını sürdürmekte ve dünya genelinde ölümlere önemli bir katkıda bulunmaktadır. İstatistikler, akciğer kanserinin tüm kanserle ilgili ölümler arasında önde gelen ölüm nedeni olarak konumunu koruduğunu göstermektedir; bu durum gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeleri de etkilemektedir. Son on yıllarda, kanseri kapsamlı bir şekilde ele almaya yönelik etkili yöntemleri belirleme konusuna önemli bir vurgu yapılmıştır. Çeşitli kanser tedavilerinin sürekli olarak ilerlemesine rağmen, kemoterapi, kanserli bireylerin yaşam süresini uzatmak için yaygın olarak kullanılan bir yöntem olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, yan etkilerin ve ilaç direncinin varlığı, yenilikçi, hedefe yönlendirilmiş kanser karşıtı ajanlar geliştirmek için acil bir ihtiyacı vurgulamaktadır (Lin vd., 2020).

Son birkaç yılda, fluoren tiyazol türevleri geniş kapsamlı sentetik ve tıbbi uygulamalarda öncü olarak etkili kullanımlara maruz kalmıştır. Bu tez araştırmasının amacı, A549 insan akciğer karsinoma epitel hücre hattında yakın zamanda geliştirilen Fluoren tiyazol türevlerinin sitotoksikite, apoptoz ve gen ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkilerini değerlendirmektir. Bu, sisplatin'i pozitif kontrol olarak kullanarak ve in vitro analizler yaparak gerçekleştirildi.

Çalışmamızda, öncelikle A549 ve L929 hücreleri üzerinde sisplatin ve bileşiklerimizin sitotoksik etkilerini ve MTT analizi ile değerlendirerek IC50 değerlerini hesapladık. Bu değerlere dayanarak, kanser hücrelerine toksik olan ancak sağlıklı hücre hatlarına (zarar vermeyen bileşikleri belirledik. Ardından, bileşiklerin A549 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkilerini akış sitometri ve Annexin-V FITC ve Kaspaz-3 Aktivasyon kitleri kullanarak inceledik.

Sisplatin ve 13 yeni sentezlenen fluoren tiyazol türevinin sitotoksikite değerlendirmeleri, MTT yöntemi ile A549 ve L929 hücreleri üzerinde zaman ve konsantrasyona bağlı olarak gerçekleştirildi. A549 için konsantrasyon aralığı 1000, 100, 10, 1 µg/ml ve L929 hücre hattı için konsantrasyon aralığı 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,8125, 3,90625, 1,953125 ve 0,97656 µg/ml doz aralığı kullanıldı. Bu konsantrasyonların 96 kuyucuklu plakalara uygulanmasını takiben etkileri 24 saatte gözlemlendi. Her bileşiğin canlılık yüzdeleri kontrol gruplarına göre belirlendi. Sağlıklı hücreler üzerinde bileşiklerin sitotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla L929 normal fibroblast hücre hattı kullanıldı. Deneyler üç kez tekrarlandı (n=3).

2020 yılında Essam M. Hussein ve arkadaşları tarafından biyoaktif ajan olan dikloro-9H-fluoren bazlı tiyazolidinon analogları sentezlemiş ve A549, MCF-7 hücreleri gibi farklı kökenli kanser hücresinde incelendikten sonra 4-nitrofenil ikameli 6g bileşiğin IC50 değeri ~29 µM bulmuştur (Hussein vd, 2020).

2023 yılında Rupali Rana ve diğerleri tarafından sentezlenmiş, elastaz inhibitörü olarak büyük potansiyel gösteren amino-tiyazol türevleri olan 12Ba ve 12Bb bileşiklerin A549 ve MCF-7 hücre hatlarında incelendikten sonra IC50 değeri sırasıyla 32,9 ve 32,1 µM bulunmuştur (Rana vd., 2023).

Çalışmamızda, A549 hücreleri üzerinde yapılan MTT analizi sonuçlarına göre Sisplatinin 24. saatteki IC50 değeri $60 \pm 0,13$ µg/ml olarak hesaplandı. Bileşiklerimizden 11'in IC50 değeri A549 için belirlenen en yüksek konsantrasyon olan 1000 µg/ml'den daha yüksekti. Özellikle, bileşik 7'nin 24. saatteki IC50 değeri olan $1,54 \pm 0,29$ µg/ml ile en aktif bileşik olarak belirlendi. Sisplatinin, bileşik 3, 4, 6 ve 12 ile birlikte konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemlendi. 24. saatte bileşik 1, 7, 10 ve 13'ün IC50 değerlerinin Sisplatinin IC50 değerinden düşük olduğu, diğer bileşiklerin ise Sisplatinin IC50 değerinden yüksek olduğu gözlemlendi.

Bileşiklerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla L929 hücreleri sağlıklı kontrol hücreleri olarak kullanılmış ve MTT testi yapılmıştır. Testin 24 saat sonrasında bileşik 9'un IC50 değerinin ölçülen konsantrasyondan (250 µg/mL) daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bileşik 6, 7, 10, 11 ve 12 kodlu bileşiklerin ise doza bağımlı olarak sitotoksik etkilere neden oldukları gözlemlenmiştir.

MTT deneyi sonuçlarına göre, sentezlenen bileşiklerin L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri dikkate alındığında, SI'ları en yüksek olan bileşikler 1, 7, 9 ve 13 apoptotik etkilerin değerlendirilmesi için akım sitometrik analizler için seçilerek hazırlandılar. Bu etkili bileşikler ve pozitif kontrol sisplatinin IC50 ve IC50/2 konsantrasyonları MTT analizi ile hesaplandı ve bu konsantrasyonların apoptotik etkileri 24. saatte Annexin-V FITC deneyi ile akım sitometri cihazı kullanılarak belirlendi.

A549 hücrelerinde gerçekleştirilen IC50 ve IC50/2 dozlarının erken ve geç apoptotik etki belirleme deneylerinde, Sisplatinin 24 saat sonunda doza bağlı bir artış göstermediği gözlemlendi.

Bileşik 1 için; Doz olarak 24 saat sonunda geç ve erken apoptozda doz artışına bağlı olarak artış gözlemlenmiştir.

Bileşik 7 için; MTT analizinde en aktif bileşik olarak görüldü ancak kaspaz-3 analiz sonuçlarına göre erken ve geç apoptotik etkilerde kontrole benzer sonuçlara neden olduğu gözlenmiştir. 24. saatte kontrol için, erken ve geç apoptoz yüzdeleri sırasıyla 3,69 ve 5,04 idi. Bileşik 7 için sırasıyla 5,83 ve 6,04 idi. Etkileri doza bağımlı değildi.

Bileşik 9 için; 24 saat sonunda doza bağlı olarak erken apoptotik hücre oranının azaldığı (13,97'den 3,52'e) geç apoptozun ise doz artışına bağlı olarak arttığı (21,85'den 36,42'e) görüldü.

Bileşik 13 için; 24 saat sonunda apoptotik hücre oranlarında doza bağımlı olmayan bir azalma gözlemlendi. Erken apoptoz yüzdesi IC50 ve IC50/2 için sırasıyla yüzde 3,66'dan 5,42'e arttığı; geç apoptoz yüzdeleri ise sırasıyla 8,83'den 8,49'a düştüğü gözlemlendi.

IC50 dozlarında erken apoptozda en aktif madde bileşik 7'dir (6,04%) fakat sisplatin yüzdesini geçmediği gözlemlendi.

Araştırmamızdaki bir sonraki aşama, A549 hücre hattındaki kaspaz-3 aktivasyonunun 24 saat sonra akım sitometri kullanılarak incelenmesini içermektedir. Kaspaz-3, apoptozun yıkım aşamasının gerçekleştirilmesinden sorumlu olan yürütücü kaspaz olarak görev yapmaktadır.

Rupali Rana ve arkadaşlarının ürettiği amino tiyazol türevlerinden olan bileşik 15'in A549 hücre hattında apoptoza yol açan kaspaz 3/7 aktivasyonuna neden olduğunu göstermiştir ve en yüksek inhibisyonun EGFR'de görüldüğü sonucuna varılmıştır (Rana vd., 2023).

2021 yılında Beata Donarska ve diğerleri tarafından ftali mid-tiazol türevleri ile yapılan bir çalışmada bileşik 6e'in A549 hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesini kontrolden 16 kat artırttığı gözlenmiştir (Donarska vd., 2021).

Şuanki çalışmamızda A549 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre bileşik 1, 7, 9 ve 13 ve pozitif kontrol sisplatin hem IC50 hem de IC50/2 konsantrasyonlarında kaspaz-3 aktivitesi göstermişlerdir. Bileşik 7 ve sisplatin dışında diğer bileşikler, IC 50 ve IC50/2 konsantrasyonlarında daha fazla kaspaz 3 aktivitesine neden olmuşlardır. Bileşik 1 ve 9 en aktif bileşikler olarak, IC50 dozlarında kaspaz3 aktivitesini (%94,23, %94,24) kontrole kıyasla oldukça artırdıkları gözlenmiştir.

Apoptoz sürecinde BCL-2 ailesi proteinlerinin önemli rolü tanımlanmıştır. Bu protein ailesi, hem pro- hem de antiapoptotik proteinleri içerir; bunlar yapısal ve işlevsel benzerliklere sahiptir ve dört adet BCL-2 homoloji (BH) motifini (BH1-4) içerir. Ayrıca,

belirli besinsel faktörler, BCL-2 ailesi proteinleri aracılığıyla apoptozu düzenlemede rol oynar. Tümör hücreleri genellikle kendi ölümlerinden kaçınmak için antiapoptotik proteinleri bir strateji olarak kullanır, bu da kanserin gelişimine ve çeşitli terapötik maddelere karşı direncin gelişimine önemli ölçüde katkıda bulunur. Dolayısıyla, antiapoptotik proteinlere yönelik hedefleme, kanser tedavisi için umut vaat eden bir yaklaşım olarak ortaya çıkar (Senichkin vd., 2020; Zheng vd., 2020).

2024 yılında Sama W. Helmy ve diğerleri tiyazol bazlı bileşik olan 8g'nin BCL2 genini %47,13 inhibe ettiğini bulmuştur (Helmy vd., 2024).

Cyclin D1 (CYD-1), hücre döngüsünün ilerlemesini düzenlemede kritik bir rol oynar ve transkripsiyonun bir ortak düzenleyicisi olarak görev yapar. Cyclin D1 proto-onkogeni, çeşitli hücre tiplerinde G1'den S fazına geçişin kontrolünde önemli bir faktördür. Cyclin D1'in yüksek düzeyde ifadesi, kanserin başlangıcı ve ilerlemesi ile ilişkilidir (Alao, 2007).

ERK1/2 (hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1/2), mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) ailesinin bir parçası olarak, hücre dışı sinyallerin hücre içi hedeflere iletilmesinde kritik bir rol oynar ve aynı zamanda proliferasyon, hayatta kalma, farklılaşma ve hareketlilik gibi çeşitli hücresel süreçlerin kontrolünde önemli bir belirleyicidir ve bu, sinyal kaskadlarına katkı sağlar. Bu MAPK kaskadları, hücre proliferasyonu, diferansiyasyon ve stres tepkileri gibi temel süreçleri düzenlemede önemli unsurlar olarak görev yapar (Guo vd., 2020; Hilger vd., 2002).

Protein kinase B (PKB), diğer adıyla Akt, serin/treonin belirli olduğu üç protein kinaz grubunu içerir. AKT1 geni, bir onkogen sınıfına ait olarak kategorize edilir AKT'nin aşırı aktivasyonu, insan tümörlerinin yaygın bir moleküler özelliğidir. Bu genlermutasyona uğradığında normal hücrelerin kanserli hale dönüşmesine neden olabilir. AKT geninin ürünü olan AKT proteini fosfoinositid 3 kinaz (PI3K) tarafından fosforillenir. PI3K/Akt sinyal yolağı, hücre çoğalması, hücre döngüsü ve apoptoz gibi süreçleri önemli ölçüde etkileyen kritik bir hücresel yolağı. Akciğer kanseri dahil olmak üzere farklı kanser türleri arasında, bu yolağı anormal bir şekilde aktive ettiği görülmüştür. Son araştırmalar, belirli kanser ilaçlarının, G2/M duraklamasını tetikleyerek aynı zamanda Akt aktivitesini azaltabileceğini göstermiştir (Xu vd., 2011; Vivanco vd., 2014).

Altıntop ve arkadaşları, A549 hücre hatlarında sitotoksik etkilerini değerlendirmek için tiyazol/benzotiyazol bazlı yeni 1,3,4-oksadiazol türevleri sentezlemiştir. 10e

bileşimini antikanser aktivitesi için en umut verici bileşik olarak tanımladı. Bu bileşik AKT'ye karşı belirgin bir inhibisyon göstermiştir (Altıntop vd., 2018).

FOX M1, hücre döngüsüne özgü genlerin düzenlenmesi, hücre çoğalması ve farklılaşması ve organ gelişimi de dahil olmak üzere bir dizi fizyolojik süreçte hayati bir rol oynayan FOX transkripsiyon faktörü ailesinin önemli bir üyesidir. Son araştırmalar, FOX M1'in hücre çoğalmasını uyarabildiğini ve bunun da kötü huylu tümörlerin oluşumu ve gelişimi için büyük önem taşıdığını göstermiştir. FOX M1'in aşırı yukarı regülasyonu gen transkripsiyonunu uyararak onkogenez ve malign tümör ilerlemesine neden olabilir (Liang vd., 2021).

2009 yılında Uppoor G. Bhat ve arkadaşları tiyazol antibiyotiği aynı zamanda FOX M1 inhibitörü olan Syomicin A'nın kanser hücrelerinde Fox M1 genini downregüle ettiği gözlenmiştir (Bhat vd., 2009)

Analiz sonuçlarına göre A549 hücreleri üzerinde IC₅₀ konsantrasyonunda pozitif kontrol sisplatinin Bax genini 1,3 up-regüle ederken anti-apoptotik Bcl-2 genini IC₅₀ konsantrasyonunda 1,3 kat up-regüle etmiştir.

Kanser türlerinin çoğunda eksprese edilen AKT geninin sisplatin IC₅₀ dozunda up-regüle olması gerekirken yaklaşık olarak 1,5 kat down regüle edildiği farklı çalışılarda gözlenmiştir.

Akciğer kanserinde overeksprese edilen CYD1 geni yaklaşık 1,3 kat down regüle edildiği gözlemlendi.

Birçok tümörde eksprese edilen FOX M1 geninin sisplatin yaklaşık 5,2 kat down-regüle edildiği gözlemlendi.

ERK geni ise sisplatin IC₅₀ konsantrasyonunda 1,1 kat down regüle edilmiştir.

Bileşik 1 için; IC₅₀ konsantrasyonunun pro-apoptotik Bax genini up regüle etmesi beklenirken 1,4 kat down regüle ettiği belirlenmiştir. Anti-apoptotik BCL-2 geninin 3,3 kat down regüle edildiği gözlemlendi. IC₅₀ dozunda AKT geninin 1,8 kat down-regüle edildiği gözlemlendi.

ERK geninin A549 hücrelerinde bileşik 1'in IC₅₀ dozu ile down-regüle olması beklenirken, 1,1 kat up-regüle olduğu belirlenmiştir. CYD-1 geninin yaklaşık 1,1 kat down-regüle olduğu ölçülmüştür. Tümör metastazında rol oynadığı FOX M1 geninin yaklaşık 1,1 kat down-regüle olduğu da gözlenmiştir.

Bileşik 9 için; IC50 konsantrasyonunda pro-apoptotik Bax geninin up-regüle edilmesi beklenirken 3,7 kat down-regüle olduğu, antiapoptotik BCL2 geninin 1,6 kat down-regüle olduğu belirlenmiştir. AKT geninin IC50 konsantrasyonunda 2 kat down regüle olduğu CYD-1 geninin ise IC50 konsantrasyonunda ise 1,3 kat down regüle olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan ERK geninin 2 kat down regüle olduğu ve FOXM1 geninin 1,8 kat downregüle olduğu belirlenmiştir.

Bileşik 13 için; IC50 konsantrasyonunda proapoptotik Bax geninin up regüle edilmesi beklenirken 3,6 kat downregüle olduğu görülmüştür. Antiapoptotik BCL2 geninin 2,2 kat downregüle olduğu gözlenmiştir. AKT geninin ise bu dozda 2 kat downregüle olduğu değerlendirilmiştir. Ayrıca CYD1 geninin kullanılan dozda 1,3 kat down regüle olduğu ölçülmüştür. ERK geninin ise IC50 dozunda 3,3 kat down regüle olduğu ve FOXM1 geninin ise 1,4 kat downregüle olduğu belirlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız kapsamında kullanılan Fluoren tiyazol türevi bileşiklerin tamamı, bu çalışma için özgün olarak sentezlendi. Pozitif kontrol olarak ise genellikle kemoterapi tedavisinde kullanılan sisplatin tercih edildi. Seçtiğimiz bileşiklerin A549 hücrelerinde gösterdiği yüksek sitotoksik etkileri değerlendirmek amacıyla akım sitometrisi cihazı kullanılarak apoptotik etki analizleri gerçekleştirildi. En yüksek erken apoptoz oranı (%6,07) gösteren bileşik 13, aynı zamanda yüksek pozitif kaspaz-3 aktivitesine sahip olan (%89,19) bileşiklerden biri olarak belirlendi. İkinci en aktif bileşiğimiz ise bileşik 9 idi. (Pozitif kaspaz-3 aktivitesi %91,70). 2a kodlu 3-OCH₃ substituenti içeren bileşik **-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinkarbotiyoamit**, 2i kodlu 2,4 diOCH₃ substituenti içeren bileşik **9 2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(2,4-metilfenil)tiyazol** ve 2m kodlu 2-asetonafton substituenti içeren bileşik **13 2-[2-(9H-Fluoren-9-iliden)hidrazinil]-4-(4-naftaalen-2-il)tiyazol** ile RT-PCR analizi yapıldı.

Sonuçlara göre bileşik 9 ve 13'ün proapoptotik Bax genini kullanılan konsantrasyonlarda downregüle etmelerine rağmen, BCL2 antiapoptotik genini bu konsantrasyonlarda downregüle etmiş ve akciğer kanserinde overeksprese olduğu bilinen, ERK, AKT, CYD-1, ve FOXM1 genlerini ise down regüle etmiştir. Bu bileşikler gen düzeyinde ölçülen gen ekspresyonlarını değiştirerek apoptozu tetiklemişlerdir.

Literatür, tiyazol sentezinin ilaç tedavisinde tatmin edici sonuçlar verdiğini belirtmektedir. Tiyazol çoklu hedeflere sahip ilaç türlerinden biridir. Sinerjik etkiler nedeniyle terapötik avantajlar sunar; bu da basitleştirilmiş bir tedavi yaklaşımına olanak tanır ve daha düzenli bir tedaviyi kolaylaştırır.

Sağlıklı hücrelerde düşük toksisite gösteren, seçicilik belirten ve akım sitometrisi deneylerinde apoptotik yollarda aktif rol oynayan bileşikler, bilimsel bağlamda tedavi sürecine katkıda bulunabilecek adaylar olarak öne çıkıyor. Kötü huylu hücrelerin sürekli evrim geçirmesi ve kanser ilaçlarına karşı direnç geliştirmesi göz önüne alındığında, bu ilaçların sürekli olarak geliştirilmesi önemlidir. Deneylerimizde en umut verici sonuçları veren Bileşik 13'ün, ileri *in vivo*, *in vitro* ve *in situ* yöntemlerle daha fazla açıklığa kavuşturulması durumunda, gelecekte bir tedavi ajanı olabilme potansiyeline sahip bir adayı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Akhtar, N., & Bansal, J. G. (2017). Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Current problems in cancer*, 41(5), 328-339.
- Alam, M. M., Hussien, M., Bollikolla, H. B., Seema, V., Dubasi, N., Amanullah, M., & Varala, R. (2023). Applications of phenyliodine (III) diacetate in heterocyclic ring formations: An update from 2015 to date. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 60 (8), 1326–1355.
- 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.
- Alberg, A. J., & Samet, J. M. (2003). Epidemiology of lung cancer. *Chest* ,123(1) 21S-49S.
- Albertson, D. G. (2006). Gene amplification in cancer. *Trends in Genetics* 22 (8), 447–455.
- Altıntop, M. D., Sever, B., Çiftçi, G. A., Turan-Zitouni, G., Kaplancıklı, Z. A., & Özdemir, A. (2018). Design, synthesis, in vitro and in silico evaluation of a new series of oxadiazole-based anticancer agents as potential Akt and FAK inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 155, 905-924.
- Altundag, O., Gullu, I., Altundag, K., Yalcin, S., Ozyar, E., Cengiz, M., Akyol, F., Yucel, T., Hosal, S., & Sozeri, B. (2005). Induction chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil followed by chemoradiotherapy or radiotherapy alone in the treatment of locoregionally advanced resectable cancers of the larynx and hypopharynx: Results of single-center study of 45 patients. *Head and Neck*, 27(1), 15–21.
- Alvarez-Fernández, M., & Medema, R. H. (2013). Novel functions of FoxM1: From molecular mechanisms to cancer therapy. *Frontiers in Oncology* 3.
- Angelis, V., Tippu, Z., Joshi, K., Reis, S., Gronthoud, F., Fribbens, C., Okines, A., Stanway, S., Cottier, E., McGrath, S., Watkins, D., Noble, J., Bhosle, J., Gerlinger, M., Hamid, I., Soliman, H., Nenclares, P., Jones, R., Harrington, K., & Gennatas, S. (2020). Defining the true impact of coronavirus disease 2019 in the at-risk population of patients with cancer. *European Journal of Cancer*, 136, 99–106.
- American Cancer Society (2023), Cancer Facts and Figures: A Cancer Journal for Clinicians.
- American Cancer Society (2010), Cancer Facts and Figures: Treatment Choices for Non-Small Cell Lung Cancer.
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology*, 30(16), R921-R925.
- Aplan, P. D. (2006). Causes of oncogenic chromosomal translocation. *Trends in Genetics* 22(1), 46–55.
- Arneth B. (2020). Tumor Microenvironment. *Medicina*. 56(1), 15.
- Asadi M., Taghizadeh S., Kaviani E., Vakiki O., Taheri- Anganeh M., Tahamtan M., Savardashtaki A. (2022). *Biotechnology and applied biochemistry*, 69(4) 1633-1645.

- Bethune, G., Bethune, D., Ridgeway N., Xu, Z. (2010). Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. *Thorac Dis*, 2, 48-51.
- Bhat, U. G., Halasi, M., & Gartel, A. L. (2009). Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells. *PloS one*, 4(5), e5592.
- Boice, A., & Bouchier-Hayes, L. (2020). Targeting apoptotic caspases in cancer. In *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1867(6).
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, 34(3), 597-601.
- Calvayrac, O., Pradines, A., Pons, E., Mazières, J., & Guibert, N. (2017). Molecular biomarkers for lung adenocarcinoma. In *European Respiratory Journal* 49(4).
- Chen S., Cheng A., Wang M., Peng X. (2208) Detection of apoptosis induced by new type gosling viral enteritis virus in vitro through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling. *World J Gastroenterol*, 14(14): 2174-2178.
- Chen, Y. K., Bonaldi, T., Cuomo, A., Del Rosario, J. R., Hosfield, D. J., Kanouni, T., Kao, S. C., Lai, C., Lobo, N. A., Matuszkiewicz, J., McGeehan, A., O'Connell, S. M., Shi, L., Stafford, J. A., Stansfield, R. K., Veal, J. M., Weiss, M. S., Yuen, N. Y., & Wallace, M. B. (2017). Design of KDM4 Inhibitors with Antiproliferative Effects in Cancer Models. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 8(8), 869–874.
- Cooper G. M., Hausman E. R. (2016) *The Cell: A Molecular Approach*, 7th edition, *Sinauer Associates*, USA, 691-694.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 49–63.
- Delaney G., Barton M., Jacob S., Jalaludin B. (2003). A model for decision making for the use of radiotherapy in lung cancer. *Lancet Oncology*, 4, 120–28.
- Donarska, B., Świtalska, M., Płaziński, W., Wietrzyk, J., & Łączkowski, K. Z. (2021). Effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives. Rational design, synthesis, elastase, caspase 3/7, and EGFR tyrosine kinase activity and molecular modeling study. *Bioorganic Chemistry*, 110, 104819.
- Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics* 29(10), 569–574.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35(4), 495–516.
- Field, R. W., & Withers, B. L. (2012). Occupational and Environmental Causes of Lung Cancer. *Clinics in Chest Medicine*, 33(4), 681–703.
- Fu, K., Xie, F., Wang, F., & Fu, L. (2022). Therapeutic strategies for EGFR-mutated non-small cell lung cancer patients with osimertinib resistance. *Journal of Hematology & Oncology* 2022, 15(1), 1–32.

- Gabrielson, E., & Hopkins, J. (2006). INVITED REVIEW SERIES: LUNG CANCER Worldwide trends in lung cancer pathology. *Respirology*, 11, 533–538.
- Gallie, B. L., Helen Dimaras, R., Kimani, K., O Dimba, E. A., Gronsdahl, P., White, A., & L Chan, H. S. (2012). Retinoblastoma. *The Lancet*, 379, 1436–1446.
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *Journal of Pathology*, 221(1), 3–12.
- Grela E., Kozłowska J., Grabowiecka A. (2018). Current methodolg of MTT assay in bacteria. *Acta Hisyochemica*. 120(4) 303-311.
- Goh, K. Y., & Lim, W. T. (2020). Cyclin D1 expression in KRAS mutant non-small cell lung cancer-old wine into new skins. In *Translational Lung Cancer Research*. 9(6), 2302–2304.
- Gökhan, A., Kılıç, K. D., Gülle, K., Uyanıkgil, Y., & Çavuşoğlu, T. (2020). Apoptotik Yolaklar ve Hedefe Yönelik Tedaviler. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 27(4), 565–573.
- Guo, Y. J., Pan, W. W., Liu, S. B., Shen, Z. F., Xu, Y., & Hu, L. L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and therapeutic medicine*, 19(3), 1997-2007.
- Guohua, H., Hongyang, L., Zhiming, J., Danhua, Z., & Haifang, W. (2017). Study of small-cell lung cancer cell-based sensor and its applications in chemotherapy effects rapid evaluation for anticancer drugs. *Biosensors and Bioelectronics*, 97, 184–195.
- Hainaut, P., Boff etta, P., Brennan, P., Hainaut, P., & Boff etta, P. (2011). Genetics of lung-cancer susceptibility. *Lancet Oncology*, 12, 399–408.
- Han, J., Liu, Y., Yang, S., Wu, X., Li, H., & Wang, Q. (2021). MEK inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer. *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 14, Issue 1). BioMed Central Ltd.
- Han, T., Zhang, L., Tong, W., Zhao, J., & Wang, W. (2022). Exploring the interaction of calycosin with cyclin D1 protein as a regulator of cell cycle progression in lung cancer cells. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(5).
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144(5), 646–674.
- Hasan, G. M., Hassan, M. I., Sohal, S. S., Shamsi, A., & Alam, M. (2023). Therapeutic Targeting of Regulated Signaling Pathways of Non-Small Cell Lung Carcinoma. In *ACS Omega*, 8(30), 26685–26698.
- Hecht, S. S. (2012). Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *International Journal of Cancer*, 131(12), 2724–2732.
- Helmy, S. W., Shahin, M. I., Samir, N., Lasheen, D. S., & Ella, D. A. A. E. (2024). Targeting apoptosis; design, synthesis and biological evaluation of new benzoxazole and thiazole based derivatives. *BMC chemistry*, 18(1), 1.

- Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. In *Nature*, 553(7689), 446–454.
- Hilger, R. A., Scheulen, M. E., & Strumberg, D. (2002). The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Oncology Research and Treatment*, 25(6), 511-518.
- Hussein, E. M., Alsantali, R. I., Morad, M., Obaid, R. J., Altass, H. M., Sayqal, A., Abourehab, M. A. S., Elkhawaga, A. A., Aboraia, A. S. M., & Ahmed, S. A. (2020). Bioactive fluorenes. Part III: 2,7-dichloro-9H-fluorene-based thiazolidinone and azetidinone analogues as anticancer and antimicrobial against multidrug resistant strains agents. *BMC Chemistry*, 14 1-24.
- Jassem, J. (2007). The role of radiotherapy in lung cancer. *Radiotherapy and Oncology* 83(2), 203–213.
- Jiang, C. Q., Xiao, L. W., Lam, T. H., Xie, N. W., & Zhu, C. Q. (2001). Occupational cancer genetics: Infrequent ras oncogenes point mutations in lung cancer samples from chromate workers. *American Journal of Industrial Medicine*, 40(1), 92–97.
- Johnson, B. E. (1998.). Second Lung Cancers in Patients After Treatment for an Initial Lung Cancer. *Journal of National Cancer Institute*,
- Kaelin, W. G. (1999). The p53 gene family. *Oncogene*, 18, 7701-7705.
- Kandioler, D., Foedinger M., Mueller, R.M., Eckersberger, F., Mannhalter C., Wolner, E. (1994) Carcinogen-specific mutations in the p53 tumor suppressor gene in lung cancer. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 107(4), 1095-1098.
- Karachaliou, N., Mayo, C., Costa, C., Magrí, I., Gimenez-Capitan, A., Molina-Vila, M. A., & Rosell, R. (2013). KRAS mutations in lung cancer. *Clinical Lung Cancer* (Vol. 14, Issue 3, pp. 205–214).
- Kashyap, S. J., Garg, V. K., Sharma, P. K., Kumar, N., Dudhe, R., & Gupta, J. K. (2012). Thiazoles: Having diverse biological activities. *Medicinal Chemistry Research*, 21(8), 2123–2132).
- Kawaguchi, K., Yokoi, K., Niwa, H., Ohde, Y., Mori, S., Okumura, S., ... & Saito, H. (2014). Trimodality therapy for lung cancer with chest wall invasion: initial results of a phase II study. *The Annals of Thoracic Surgery*, 98(4), 1184-1191.
- Kim, I. M., Ackerson, T., Ramakrishna, S., Tretiakova, M., Wang, I. C., Kalin, T. V., Major, M. L., Gusarova, G. A., Yoder, H. M., Costa, R. H., & Kalinichenko, V. V. (2006). The Forkhead Box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer. *Cancer Research*, 66(4), 2153–2161.
- Knudson, A. G. (1971). Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc.Nat.Acad.Sci*, 68(4), 820-823
- Knudson, A. G. (2002). Cancer genetics. *American Journal of Medical Genetics*. 111(1), 96–102.

- Lazzari, C., Karachaliou, N., Bulotta, A., Viganó, M., Mirabile, A., Brioschi, E., Santarpia, M., Gianni, L., Rosell, R., & Gregorc, V. (2018). Combination of immunotherapy with chemotherapy and radiotherapy in lung cancer: is this the beginning of the end for cancer? *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 10.
- Lei, H., Tian, X., Jin, Y. F., Tang, L., Chen, W. Q., & Jiménez-Herrera, M. F. (2021). The chain mediating role of social support and stigma in the relationship between mindfulness and psychological distress among Chinese lung cancer patients. *Supportive Care in Cancer*, 29(11), 6761–6770.
- Li, Y., Wu, F., Tan, Q., Guo, M., Ma, P., Wang, X., Zhang, S., Xu, J., Luo, P., & Jin, Y. (2019). The multifaceted roles of FOXM1 in pulmonary disease. *Cell Communication and Signaling* 2019 17:1, 17(1), 1–16.
- Liang, S. K., Hsu, C. C., Song, H. L., Huang, Y. C., Kuo, C. W., Yao, X., ... & Wang, I. C. (2021). FOXM1 is required for small cell lung cancer tumorigenesis and associated with poor clinical prognosis. *Oncogene*, 40(30), 4847-4858.
- Liao, G. Bin, Li, X. Z., Zeng, S., Liu, C., Yang, S. M., Yang, L., Hu, C. J., & Bai, J. Y. (2018). Regulation of the master regulator FOXM1 in cancer. *Cell Communication and Signaling* 2018 16:1, 16(1), 1–15.
- Lin, Z., Wang, Z., Zhou, X., Zhang, M., Gao, D., Zhang, L., ... & Kong, F. (2020). Discovery of new fluorescent thiazole–pyrazoline derivatives as autophagy inducers by inhibiting mTOR activity in A549 human lung cancer cells. *Cell Death & Disease*, 11(7), 551.
- Lipsick, J. (2020). A history of cancer research: Tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(2).
- Liu, T. C., Jin, X., Wang, Y., & Wang, K. (2017). Role of epidermal growth factor receptor in lung cancer and targeted therapies. *American Journal of Cancer Research*, 7(2), 187.
- Loreto, C., La Rocca, G., Anzalone, R., Caltabiano, R., Vespasiani, G., Castorina, S., Ralph, D. J., Celtek, S., Musumeci, G., Giunta, S., Djinovic, R., Basic, D., & Sansalone, S. (2014). The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. *BioMed Research International*, 2014.
- Lu, T., Yang, X., Huang, Y., Zhao, M., Li, M., Ma, K., Yin, J., Zhan, C., & Wang, Q. (2019). Trends in the incidence, treatment, and survival of patients with lung cancer in the last four decades. *Cancer Management and Research*, 11, 943–953.
- Mascaux, C., Iannino, N., Martin, B., Paesmans, M., Berghmans, T., Dusart, M., Haller, A., Lothaire, P., Meert, A. P., Noel, S., Lafitte, J. J., & Sculier, J. P. (2005). The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: A systematic review of the literature with meta-analysis. *British Journal of Cancer* 92(18), 131–139.
- Mayo Clinic Family Health Book (2018) *Mayo Clinic Press*
- Matthew, A. G., Paradiso, C., Currie, K. L., Finelli, A., Hartman, M. E., Trachtenberg, L., Shuman, C., Horsburgh, S., Chitayat, D., Trachtenberg, J., & Ritvo, P. (2011). Examining

- risk perception among men with a family history of prostate cancer. *Patient Education and Counseling*, 85(2).
- Molina, J. R., & Adjei, A. A. (2006). The Ras/Raf/MAPK Pathway. *Journal of Thoracic Oncology*, 1(1), 7–9.
- Moolgavkar, S. H., Holford, T. R., Levy, D. T., Kong, C. Y., Foy, M., Clarke, L., Jeon, J., Hazelton, W. D., Meza, R., Schultz, F., McCarthy, W., Boer, R., Gorlova, O., Gazelle, G. S., Kimmel, M., McMahon, P. M., De Koning, H. J., & Feuer, E. J. (2012). Impact of reduced tobacco smoking on lung cancer mortality in the united states during 1975-2000. In *Journal of the National Cancer Institute* 104(7), 541–548.
- Niu, Z. X., Wang, Y. T., Zhang, S. N., Li, Y., Chen, X. B., Wang, S. Q., & Liu, H. M. (2023). Application and synthesis of thiazole ring in clinically approved drugs. In *European Journal of Medicinal Chemistry*, 250.
- Norum, J., & Nieder, C. (2018). Tobacco smoking and cessation and PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer (NSCLC): A review of the literature. *ESMO Open*, 3(6).
- Petrou, A., Fesatidou, M., & Geronikaki, A. (2021). Thiazole ring- a biologically active scaffold. *Molecules* 26 (11).
- Pierotti, M. A. (2017). The molecular understanding of cancer: From the unspeakable illness to a curable disease. *Cancer Medical Science*, 11.
- Ponder A. J. B. (2011). Cancer genetics. *Nature*, 411.
- Rana, R., Kumar, N., Gulati, H. K., Sharma, A., Khanna, A., Badhwar, R., ... & Bedi, P. M. S. (2023). A comprehensive review on Thiazole based Conjugates as Anti-cancer Agents. *Journal of Molecular Structure*, 136194.
- Reed, J. C. (2000). Warner-Lambert/Parke-Davis Award Lecture Mechanisms of Apoptosis. *American Journal of Pathology*, 157(5).
- Riscal, R., Skuli, N., & Simon, M. C. (2019). Even Cancer Cells Watch Their Cholesterol! *Molecular Cell*, 76(2), 220–231.
- Salem, A., Little, R. A., Latif, A., Featherstone, A. K., Babur, M., Peset, I., Cheung, S., Watson, Y., Tessyman, V., Mistry, H., Ashton, G., Behan, C., Matthews, J. C., Asselin, M. C., Bristow, R. G., Jackson, A., Parker, G. J. M., Faivre-Finn, C., Williams, K. J., & O'Connor, J. P. B. (2019). Oxygen-enhanced MRI is feasible, repeatable, and detects radiotherapy-induced change in hypoxia in xenograft models and patients with Non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 25(13), 3818–3829.
- Salvesen, G. S., & Duckett, C. S. (2002). IAP proteins: Blocking the road to death's door. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(6), 401–410.
- Sasco, A. J., Secretan, M. B., & Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer*, 45, 3–9.
- Seki, M., Nakagawa, K., Tsuchiya, S., Matsubara, T., Kinoshita, I., Weng, S.-Y., Tsuchiya, E., & Tokyo, J. (1992). Surgical treatment of pulmonary metastases from uterine

cervical cancer Operation method by lung tumor size. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*.

- Seller, V. T., Brilliant, C. D., Morgan, C., Lewis, S. P., Duckers, J., Boy, F. A., & Lewis, P. D. (2021). Anti-perspirant deodorant particulate matter temporal concentrations during home usage. *Building and Environment*, 195.
- Senichkin, V. V., Pervushin, N. V., Zuev, A. P., Zhivotovsky, B., & Kopeina, G. S. (2020). Targeting Bcl-2 family proteins: what, where, when? *Biochemistry (Moscow)*, 85, 1210-1226.
- Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J., & Haber, D. A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. In *Nature Reviews Cancer* 7(3), 169–181.
- Shin, H., Oh, S., Hong, S., Kang, M., Kang, D., Ji, Y. G., Choi, B. H., Kang, K. W., Jeong, H., Park, Y., Kim, H. K., & Choi, Y. (2020). Early-Stage Lung Cancer Diagnosis by Deep Learning-Based Spectroscopic Analysis of Circulating Exosomes. *ACS Nano*, 14(5), 5435–5444.
- Shivapurkar, N., Reddy, J., Chaudhary, P. M., & Gazdar, A. F. (2003). Apoptosis and lung cancer: A review. In *Journal of Cellular Biochemistry* 88(5), 885–898.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249
- Sugimura, H., Tao, H., Suzuki, M., Mori, H., Tsuboi, M., Matsuura, S., Goto, M., Shinmura, K., Ozawa, T., Tanioka, F., Sato, N., Matsushima, Y., Kageyama, S., Funai, K., Chou, P.-H., & Matsuda, T. (2011). Genetic susceptibility to lung cancer. In *Frontiers in Bioscience* 3.
- Sun, Y. (2016). Tumor microenvironment and cancer therapy resistance. In *Cancer Letters* 380(1) 205–215.
- Syntichaki, P., & Tavernarakis, N. (2002). Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Reports*, 3(7), 604–609.
- Torry, D. S., & Cooper, G. M. (1991). Proto-oncogenes in development and cancer. *American Journal of Reproductive Immunology*, 25(3), 129–132.
- Trenker, R., & Jura, N. (2020). Receptor tyrosine kinase activation: From the ligand perspective. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 63, pp. 174–185). Elsevier Ltd.
- Ullah, M. F., & Aatif, M. (2009). The footprints of cancer development: Cancer biomarkers. *Cancer Treatment Reviews* 35(3), 193–200.
- Van England, M., Nieland, L.J.W., Ramaekers, F.C.F., Shutte, B. Reutelingsperger, C.P.M. (1998). Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31, 1-9.

- Vivanco, I., Chen, Z. C., Tanos, B., Oldrini, B., Hsieh, W. Y., Yannuzzi, N., & Mellinghoff, I. K. (2014). A kinase-independent function of AKT promotes cancer cell survival. *Elife*, 3, e03751.
- Wang, J.-J., Lei, K.-F., & Han, F. (2018). Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments, 15, 3855-3864
- Wen, Z., Jiang, R., Huang, Y., Wen, Z., Rui, D., Liao, X., & Ling, Z. (2019a). Inhibition of lung cancer cells and Ras/Raf/MEK/ERK signal transduction by ectonucleoside triphosphate phosphohydrolase-7 (ENTPD7). *Respiratory Research*, 20(1).
- Wen, Z., Jiang, R., Huang, Y., Wen, Z., Rui, D., Liao, X., & Ling, Z. (2019b). Inhibition of lung cancer cells and Ras/Raf/MEK/ERK signal transduction by ectonucleoside triphosphate phosphohydrolase-7 (ENTPD7). *Respiratory Research*, 20(1).
- Williamson, C. T., Kubota, E., Hamill, J. D., Klimowicz, A., Ye, R., Muzik, H., Dean, M., Tu, L., Gilley, D., Magliocco, A. M., McKay, B. C., Bebb, D. G., & Lees-Miller, S. P. (2012). Enhanced cytotoxicity of PARP inhibition in mantle cell lymphoma harbouring mutations in both ATM and p53. *EMBO Molecular Medicine*, 4(6), 515–527.
- Xu, X., Zhang, Y., Qu, D., Jiang, T., & Li, S. (2011). Osthole induces G2/M arrest and apoptosis in lung cancer A549 cells by modulating PI3K/Akt pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30, 1-7.
- Yu, M. C., C Ho, J. H., Lai, S. H., Elwood, J. M., G Pearson, J. C., Skippen, D. H., Martin, S., Thomas, D. C., Cancer, B. J., & Weinberg, R. A. (1986). 43. E. Lanza and P. Greenwald, Cancer Prev. (Philadelphia). *J. Cancer Res. Clin. Oncol* 46 (1).
- Yuan, M., Huang, L. L., Chen, J. H., Wu, J., & Xu, Q. (2019). The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2019 4(1), 1–14.
- Zafar, S. Y., Peppercorn, J. M., Schrag, D., Taylor, D. H., Goetzinger, A. M., Zhong, X., & Abernethy, A. P. (2013). The Financial Toxicity of Cancer Treatment: A Pilot Study Assessing Out-of-Pocket Expenses and the Insured Cancer Patient's Experience. *The Oncologist*, 18(4), 381–390.
- Zarogoulidis, K., Zarogoulidis, P., Darwiche, K., Boutsikou, E., Machairiotis, N., Tsakiridis, K., Katsikogiannis, N., Kougioumtzi, I., Karapantzios, I., Huang, H., & Spyrtatos, D. (2013). Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Thoracic Disease* 5(4).
- Zheng, C., Liu, T., Liu, H., & Wang, J. (2020). Role of BCL-2 family proteins in apoptosis and its regulation by nutrients. *Current Protein and Peptide Science*, 21(8), 799-806.
- Zuryn, A., Krajewski, A., Klimaszewska-Wiśniewska, A., Grzanka, A., & Grzanka, D. (2019). Expression of cyclin B1, D1 and K in non-small cell lung cancer H1299 cells following treatment with sulforaphane. *Oncology Reports*, 41(2), 1313–1323.