BENZOFURAN HALKASI BAĞLI 3-NİTROFENİL KALKON TÜREVİNİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Melih ÖZTEPE

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BENZOFURAN HALKASI BAĞLI 3-NİTROFENİL KALKON TÜREVİNİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Melih ÖZTEPE
0000-0003-2477-437X

Prof. Dr. Ferda ARI
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2022
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BENZOFURAN HALKASI BAĞLI 3-NİTROFENİL KALKON TÜREVİNİN KOLON KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ANTİKANSER AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Melih ÖZTEPE

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ferda ARI

Kalp ve damar hastalıklarından sonra başlıca ölüm nedenlerinin ikincisini oluşturan kanserin görülme sıklığı gün geçtikçe artmaktadır. Güncel istatistiki verilere göre kansere yönelik çeşitli belirtiler ile sağlık kuruluşuna başvuran her on kişiden birine kolon kanseri tanısı konmaktadır. Görülen artışa bağlı olarak, klinikte kullanılan kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi gibi tedavi seçeneklerine kıyasla yan etkisi daha az olan ve hedefe yönelik yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç doğmaktadır. Doğal olarak bitkilerde bulunan ya da yapay olarak sentezi yapılabilen bileşikler olan kalkonlar, anti kanser başta olmak üzere geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptir. Yapılan bu tez çalışmasında, benzofuran halkası bağlı 3-nitrofenil kalkon türevinin [3-(3-Nitrophenyl)-1-(benzofurane-2-yl)-2-propen-1-one] insan kolon kanseri hücreleri (HCT-116, HT-29) üzerindeki anti kanser etki ve mekanizmaları araştırılmıştır. Türevin hücre canlılığına etkisi SRB yöntemi ile belirlenip elde edilen sonuçlardan yola çıkarak ileri analizlerde kullanılmak üzere doz ve tedavi süresi seçimi yapılmıştır. Ayrıca, klinikte insan kolon kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ilaç olan 5-fluorouracil ile kombinasyon çalışması yapılmıştır. Hücre ölümünün hangi mekanizma üzerinden gerçekleştiği (apoptozis/nekrozis) Anneksin-V/Hoechst/Propidyum İyodür üçlü boyama yöntemi ile floresan mikroskopta analiz edilmiştir. Akım sitometrisi ile apoptotik yolakta görevli Kaspaz 3/7 moleküllerinin düzeyleri kantitatif olarak belirlenmiştir. Hücre döngüsünün hangi evrede baskılandığı akım sitometrisi kullanılarak analiz edilmiştir. Hücre ölüm mekanizmalarından olan apoptoz ile ilişkili proteinlerdeki değişimler Western Blot yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Son olarak, hücrelerin migrasyon ve koloni oluşturma yeteneklerine olan etkisi araştırılmıştır. Bulgular doğrultusunda, türevin insan kolon kanseri hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik aktivitenin artışına ve apoptozise neden olduğu, G_0/G_1 evresinde hücre bölünmesini baskıladığı, migrasyon ve koloni oluşturma yeteneklerinde ise azalmaya neden olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kalkon Türevleri, Kolon Kanseri, Sitotoksisite

2022, vii + 91 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF ANTI-CANCER ACTIVITY OF A BENZOFURAN RING-CONNECTED 3-NITROPHENYL CHALCONE DERIVATIVE ON COLON CANCER CELLS

Melih ÖZTEPE

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ferda ARI

The incidence of cancer, which is the second leading cause of death after cardiovascular diseases, is increasing day by day. According to current statistical data, one out of every ten people who apply to a health institution with various symptoms of cancer is diagnosed with colon cancer. Due to the increase seen, there is a need for new targeted treatment methods with less side effects compared to treatment options such as chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy used in the clinic. Chalcones, which are naturally found in plants or can be synthesized artificially, have a wide range of biological activities, especially anti-cancer. In this thesis study, it was determined that the 3-nitrophenyl chalcone derivative [3-(3-Nitrophenyl)-1-(benzofurane-2-yl)-2-propen-1 one] with benzofuran ring attached to human colon cancer cells (HCT-116, HT- 29) on the anti-cancer effects and mechanisms were investigated. The effect of the derivative on cell viability was determined by the SRB method and based on the results obtained, dose and treatment duration were selected to be used in further analysis. In addition, a combination study was conducted with 5-fluorouracil, a chemotherapeutic drug widely used in the treatment of human colon cancer in the clinic. The mechanism by which cell death occurs (apoptosis/necrosis) was analyzed under a fluorescent microscope with the AnnexinV/Hoechst/Propidium Iodide triple staining method. Current Levels of Caspase 3/7 molecules, which are involved in the apoptotic pathway, were determined quantitatively by cytometry. The stage of suppression of the cell cycle was analyzed using flow cytometry. Changes in proteins associated with apoptosis, which is one of the cell death mechanisms, were evaluated using Western blot method. Finally, the effects of cells on migration and colony formation abilities were determined. In line with the findings, the derivative caused an increase in cytotoxic activity and apoptosis in human colon cancer cells depending on the dose and time, suppressed cell division in the G_0/G_1 stage, was found cause a decrease in their migration and colony formation abilities.

Key words: Chalcone Derivatives, Colon Cancer, Cytotoxicity

2022, vii + 91 pages.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin düzenli işleyişi adına büyük bir özveri gösteren, manevi desteğiyle hep yanımda olan, benim için çok değerli olan bilgi ve tecrübeleriyle bana her daim yol gösteren ve bana her türlü imkânı sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ferda ARI'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini aktararak desteğini benden esirgemeyen hocalarım, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM ve Sayın Doç. Dr. Egemen DERE'ye,

Tez çalışmamda analizini gerçekleştirdiğim bileşiğin sentezini yapan ve kullanım izni veren hocam Sayın Doç. Dr. Demet COŞKUN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve önerilerini benimle paylaşarak sorularımı asla yanıtsız bırakmamış olan başta Sibel ÇINAR ASA, Gonca PEKEL TUNA, Oğuzhan AKGÜN ile tüm çalışma arkadaşlarıma,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden hiç eksik etmeyen ve hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak her zaman yanımda hissettiğim, bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu yüksek lisans tez çalışması, FYL-2021-720 No'lu yüksek lisans tez projesi olarak Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Melih ÖZTEPE
01/12/2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET....vi
ABSTRACT....vii
TEŞEKKÜR....viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ....xi
ŞEKİLLER DİZİNİ....xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ....xvi
1. GİRİŞ……....1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI....3
2.1. Kanser....3
2.2. Kolon Anatomisi, Fizyolojisi ve Histolojisi....8
2.3. Kolon Kanseri Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi....10
2.3.1. Epidemiyoloji....10
2.3.2. Etiyoloji....10
2.4. Kolon Kanseri Moleküler Karsinogenezi....14
2.5. Apoptozis....15
2.5.1. Apoptotik süreçte görev alan proteinler....16
2.5.2. Apoptozis yolakları....18
2.5.3. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler....22
2.6. Flavonoidler....22
2.7. Kalkonlar....23
2.8. Benzofuranlar....24
2.9. Tez Çalışmasında Kullanılan 3-nitrofenil Kalkon Türevinin Biyokimyasal Yapısı 25
2.10. Tez Çalışmasında Kullanılan Hücre Soyları....26
3. MATERYAL ve YÖNTEM....27
3.1. Materyal....27
3.1.1. Kimyasal Maddeler....27
3.1.2. Sarf Malzemeler....28
3.1.3. Cihazlar....29
3.2.Yöntem....30
3.2.1. Hücre Kültürü, Kullanılan Besiyerleri, Bileşiklerin Hazırlanması....30
3.2.2. SRB Canlılık Analizi....31
3.2.3. Hoechst, Anneksin-V, Propidyum İyodür Floresan Boyama....33
3.2.4. Kaspaz 3/7 Aktivite Analizi....34
3.2.5. Hücre Döngüsü Analizi....36
3.2.6. Hücre Migrasyon Analizi....37
3.2.7. Koloni Oluşturma Yeteneği Analizi....38
3.2.8. Western Blot Analizi....39
3.2.9. İstatistiksel Analiz....46

4. BULGULAR 47
4.1. SRB Canlılık Analizi 47
4.2. Hoechst, Anneksin-V, Propidyum İyodür Floresan Boyama 52
4.3. Kaspaz 3/7 Aktivite Analizi 56
4.4. Hücre Döngüsü Analizi 59
4.5. Hücre Migrasyon Analizi 62
4.6. Koloni Oluşturma Yeteneği Analizi 64
4.7. Western Blot Analizi 68
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 71
KAYNAKLAR 79
ÖZGEÇMİŞ 79

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ºC	Santigrat Derece

Kısaltmalar	Açıklama
5-FU	5-Flurourasil
AIF	Apoptozis İndükleyici Factor
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
Apaf-1	Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör
Apo-1	Fas İlişkili Ölüm Reseptörü
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin Trifosfat
BAX	Bcl-2 İlişkili X Proteini
BCA	Biçinkoninik Asit
Bcl	Gen Ailesi
Bcl1	B Hücre Lenfoma Geni1
Bcl2	B Hücre Lenfoma Geni2
Bcl-XL	Bcl-2 İlişkili XL Proteini
CARD	Kaspaz Takviye Alanı
CD95	Fas İlişkili Ölüm Reseptörü
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CDK-C	Siklin -Siklin Bağımlı Kinaz
CDKI	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
C-MYC	Onkogen
DD	Ölüm Domaini
DED	Kaspaz Ölüm Alanı
DISC	Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
Dnaz	Deoksiribonükleaz
DR	Ölüm Reseptörü
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ECM	Ekstraselüler Matriks
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
Endog	Endonükleaz G
FADD	Fas İlişkili Ölüm Alanı
FBS	Fetal Sığır Serumu

GAP	Gtpaz Aktive Edici Proteinler
GDP	Guanozin Difosfat
GEF	Guanine Exchange Factor
Globocan	Küresel Kanser Gözlemevi
GTP	Guanozin Trifosfat
H-1299	Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Hücre Dizisi
HCT-116	İnsan Kolon Kanser Hücre Soyu
HDI	Human Development Index
Hela	İnsan Rahim Ağzı Kanser Hücre Soyu
HEPG-2	İnsan Karaciğer Kanser Hücre Soyu
HER2	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HF-6	İnsan Foliküler Lenfoması
HT-29	İnsan Kolon Kanser Hücre Soyu
HUVEC	İnsan Endotel Hücre Soyu
IAP	Apoptoz İnhibitör Proteinleri
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
ICAD	Kaspazla Active Edilen Dnaz İnhibitörü
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü İnducing Ligand
IC_{50}	%50 Sitotoksik Etki Gösteren Konsantrasyon
Lncap	İnsan Prostat Kanser Hücre Soyu
LOH	(Loss Of Heterozygosity) Heterozigotluk Kaybı
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Kinaz Kaskadı
MCF-7	İnsan Meme Kanser Hücre Soyu
MDA-MB-231	İnsan Meme Kanser Hücre Soyu
MOMP	Mitokondri Dış Mem Bran Permeabilizasyonu
MLH1	Mutl Homolog 1
MRC-5	İnsan Fetal Akciğer Fibroblast Hücreleri
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NCI	“Nationel Cancer İnstutue” (Ulusal Kanser Enstitüsü)
NGF	Nöron Büyüme Faktörü
P21	Protein 21
P53	Protein 53
PARP	Poli (ADP-Riboz) Polimeraz
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
PC-3	İnsan Prostat Kanser Hücre Soyu
Ph	(“Power Of Hydrogen”) Hidrojenin Gücü
PI	Propidyum İyodür
RAS	Onkogen
Rb	Retinoblastoma
RIP	Reseptör Etkileşim Protein
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SMAC	İkinci Mitokondriya Türevi Kaspaz
SRB	Sulforhodamine B
TCA	Trikloroasetik Asit
TDC	Test Drug Concentration

TMÇ	Tümör Mikroçevresi
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TNFR	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TP53	Tümör Protein 53
TRADD	TNFR-1 İlişkili Ölüm Protein
TRAIL	TNF-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	Kanser oluşumu ve yayılımı……	3
Şekil 2.1.1.	Kanser hücresinin 14 temel özelliği…….....	5
Şekil 2.1.2.	2020'de teşhisi konulan ilk 10 kanser vakalarının her iki cinsiyet için dağılımı……..	6
Şekil 2.1.3.	2020'de meydana gelen ilk 10 kansere bağlı ölümlerin her iki cinsiyet için dağılımı……..……..	6
Şekil 2.1.4.	Günümüzden 2040'a kadar kanser görülme oranının tahminine yönelik hdı grafiği…….....	7
Şekil 2.2.	Alt gastrointestinal sistemin anatomik yapısı……	8
Şekil 2.2.1.	Kolonun histolojik yapısı……..	9
Şekil 2.3.	Kolorektal kanserin oluşumunda rol oynayan risk etmenleri…	10
Şekil 2.3.1.	Kolorektal kanserde kolon içerisinde oluşan polipler……	12
Şekil 2.3.2.	Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin kolon içerisindeki şematik gösterimi…….	13
Şekil 2.4.	Kolon kanseri gelişiminin Vogelstein ve Fearon moleküler modeli……	14
Şekil 2.5.	Kanser ve apoptoz ilişkisi…….....	16
Şekil 2.5.1	Kaspazların etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması…….	17
Şekil.2.5.1.1.	Efektör kaspaz 3 enziminin Parp proteinini aktifleştirmesi sonucu aktifleşen apoptoz yolağı…..……	18
Şekil 2.5.2.	Apoptozun içsel ve dışsal yolak üzerinden gerçekleşmesi……	19
Şekil.2.5.2.1.	ER aracılı apoptozis süreci……	21
Şekil 2.6.	Flavanoid bileşiğinin kimyasal yapısı……	23
Şekil 2.7.	Kalkon bileşiğinin kimyasal yapısı……	24
Şekil 2.8.	Benzofuran halkasının kimyasal yapısı…….	24
Şekil 2.9.	3-nitrofenil kalkon türevinin biyokimyasal yapısı……..….	25
Şekil 2.10.	Deneyde kullanılan HCT-116 insan kolon kanseri hücre soylarının faz kontrast görüntüleri…….	26
Şekil 2.10.1.	Deneyde kullanılan HT-29 insan kolon kanseri hücre soylarının faz kontrast görüntüleri…….	26
Şekil.3.2.2.	Sulforhadamine B moleküler yapısı……...	33
Şekil 3.2.3.	Hücre ölüm modunun floresan boya ile tespiti……..	34
Şekil 3.2.4.	Akım sitometrisinde lazer yardımıyla örnek tespiti…….	35
Şekil 3.2.4.1.	Kaspaz 3/7 aktivitesinin ölçülmesi…….	36
Şekil 3.2.5.	Hücre döngüsü analizi aşamaları……	37
Şekil 3.2.8.	Western Blot tekniği aşamalarının şematik gösterimi……	40
Şekil 4.1.	Farklı kimyasal yapılara sahip kalkon türevlerinin HCT-116 hücrelerinde 48 saat tedavi sonrası SRB canlılık testi sonuçlarının yüzde grafiği……	47
Şekil.4.1.1.	3-nitrofenil kalkon türevi (0,39-25 μM) uygulanan HCT-116 (A) HT-29 (B) ve CCD18-Co (C) hücrelerinde 24 ve 48 saat tedavi sonrası SRB canlılık testi sonuçlarının yüzde grafiği……	50

Şekil 4.1.2. HCT-116(A) ve HT-29(B) hücrelerinde 5-FU'nun 12,5 TDC'den itibaren azalan dozları ve 3-nitrofenil kalkon türevinin belirlenen IC_{50} sabit dozları sırasıyla 1,71 µM ve 7,77 µM kullanılarak yapılan kombinasyonun 48 saat boyunca hücrelere uygulanması sonucu canlılık analiz grafiği……..... . 52
Şekil 4.2. 3-nitrofenil kalkon türevi (3,125-25 µM) uygulanan HCT-116 hücrelerinde 24 saat tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri…….. 54
Şekil 4.2.1. 3-nitrofenil kalkon türevi (3,125-25 µM) uygulanan HT-29 hücrelerinde 24 saat tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri. 55
Şekil 4.3. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (3,125-12,5 µM) 48 saat tedavi sonrasında HCT-116 hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi sonucu ölüm evrelerinde yer alan hücre yüzdeleri …….. 57
Şekil 4.3.1. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (3,125-12,5 µM) 48 saat tedavi sonrasında HT-29 hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi sonucu ölüm evrelerinde yer alan hücre yüzdeleri …… 58
Şekil 4.4. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (3,125-12,5 µM) 24 saat tedavi sonrasında HCT-116 hücrelerinin döngü fazlarındaki (G_0/G_1, S ve G_2/M) dağılımlarının histogram grafiği……... 60
Şekil 4.4.1. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (3,125-12,5 µM) 24 saat tedavi sonrasında HT-29 hücrelerinin döngü fazlarındaki (G_0/G_1, S ve G_2/M) dağılımlarının histogram grafiği……..……. 61
Şekil 4.5. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (1,56-12,5 µM) 48 saat tedavi sonrasında HCT-116 hücrelerinin, yara iyileştirme yeteneği üzerine etki grafiği…… 63
Şekil 4.5.1. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (1,56-12,5 µM) 48 saat tedavi sonrasında HT-29 hücrelerinin, yara iyileştirme yeteneği üzerine etki grafiği…… 64
Şekil 4.6. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (1,56-6,25 µM) 48 saat tedavi sonrasında HCT-116 hücrelerinin, koloni oluşturma yeteneği üzerine etki grafiği……... 66
Şekil 4.6.1. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (1,56-6,25 µM) 48 saat tedavi sonrasında HT-29 hücrelerinin, koloni oluşturma yeteneği üzerine etki grafiği …….……. 67
Şekil 4.7. BSA standart eğri grafiği……...…. 68
Şekil 4.7.1. 3-nitrofenil kalkon türeviyle 48 saat tedavi sonrasında HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin apoptozis ile ilişkili olan protein düzeylerindeki değişimler……...…… 70
Şekil 5. 3-nitrofenil kalkon türevinin, uygulanan tedavi sonrasında HCT-116 ve HT-29 hücreleri üzerindeki antikanser etki mekanizmaları…….. 78

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 2.2.	WHO verilerine göre kolorektal kanserler türlerinin histolojik sınıflandırması ……...…..……	9
Çizelge 3.1.1.	Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler…….	27
Çizelge 3.1.2.	Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler…….	28
Çizelge 3.1.3.	Tez çalışmasında kullanılan cihazlar……..	29
Çizelge 4.1.	3-nitrofenil kalkon türevi uygulanan CCD18-Co, HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde SRB canlılık testi sonuçlarına göre 24 ve 48 saat tedavi süresindeki IC_{50} değerleri……..…….	50
Çizelge 4.3.	3-nitrofenil kalkon türevi uygulanan HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde 48 saat tedavi sonrası kaspaz 3/7 sonuçlarına göre hesaplanan apoptotik oran (Q2+Q4) yüzdeleri……59	

1. GİRİŞ

Günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser, hücrenin yaşam döngüsünün düzenlenmesini sağlayan kontrol mekanizmalarından kaçarak adeta freni bozulmuş aracın eğimli yolda sürekli hızlanması gibi "aşırı hücre büyümesi ve çoğalması ile sonuçlanan hastalık çeşidi" olarak tanımlanmaktadır (Skuse, 2015, s. 3). Kanserli hücreler genetik ve sporadik faktörler sonucunda dokuda birikerek tümör adı verilen hücre topluluğunu oluştururlar. Malign kanser hücreleri, oluştukları tümör mikroçevresinden kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine metastaz yapıp invazif özellik gösterebilirler (Fares ve ark., 2020). The Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) 2020 verilerine göre, yılda ortalama 19,3 milyon insan kanser tanısı almış olup maalesef ki hastalardan %50'sinde ölüm gözlenmiştir. Yine GLOBOCAN 2020 verilerine göre, kansere bağlı ölümlerin %9,4'ünü oluşturan kolon kanseri türü her iki cinsiyette de insidans açısından üçüncü sırada yer alırken mortalite açısından ikinci sırada yer almaktadır (Sung ve ark., 2021).

Kanser tedavisinde, klinikte rutin uygulanan tedavilerin sonucunda başarı sağlansa bile kanser hücresinin zamanla oluşturduğu direnç ile yeniden nüks gözlenmesi veya ilaçların genotoksik etkileri gibi sebeplerden dolayı kansere bağlı mortalite halen yüksek seviyededir (Hussaini ve ark., 2016). Kolon kanserinde uzun süredir klinikte kullanılan kemoterapötik ilaç çeşidinden biri olan 5-fluorouracil (5-FU) her ne kadar tedavi yöntemi olarak hastalara uygulansa da doğal bileşiklerden elde edilerek daha düşük dozda verilebilecek ve yan etkisi daha az olabilecek kemoterapötik ilaç adaylarına ihtiyaç her geçen gün artmaktadır (Barone ve ark., 2007).

Ekonomik yönden ulaşılması diğer kanser ilaçlarına göre daha kolay olan bazı sebze ve meyvelerin içerdikleri flavonoid bileşenleri, kanserli hücrelerin çoğalmasının engellenmesinde son derece önemli rol oynamaktadır (Yao ve ark., 2011). Kalkonlar, flavonoidlerin biyosentezinde ara metabolit ürün olup, 1,3-diaril-2-propen-1-on kimyasal iskeletine sahip bileşiklerdir (Zhuang ve ark., 2017).

Canlılar üzerindeki başta antikanser olmak üzere anti-inflamatuar (Gomes ve ark., 2017), antidiyabetik (Rocha ve ark., 2020), antioksidan (Lin ve ark., 2019) ve antimikrobiyal (Henry ve ark., 2020) gibi geniş biyolojik aktiviteleri, farklı moleküler hedeflerle etkileşimini sağlayan fonksiyonel yan gruplar (ariller, halojenler, hidroksiller, karboksil, fenil vb.) aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Mahapatra ve ark., 2017).

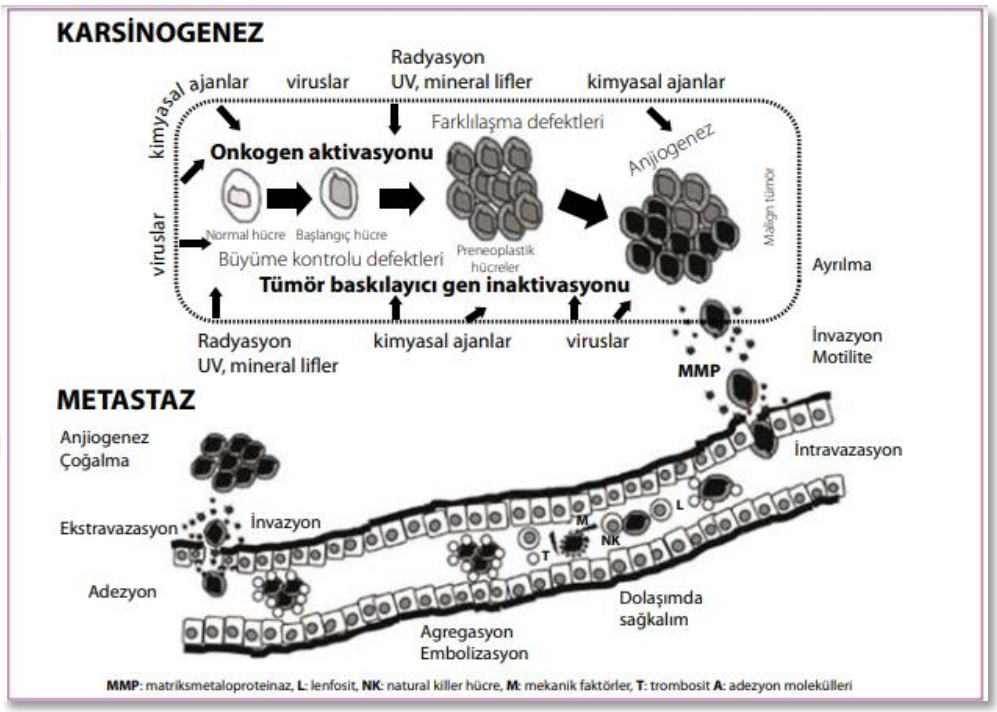
Son yüzyıldaki sistem biyolojisindeki ilerlemeler ve bilgisayar bilimi yardımıyla gelinen nokta, tümörogenezin moleküler temeli hakkındaki bilgilerimize önemli kazançlar sağlamaktadır (Lu ve ark., 2017). Tümör hücrelerinde dengesinin bozulduğu apoptoz, otofaji vb. gibi çeşitli ölüm yolaklarında görevli moleküllerin aktivasyonuna yönelik doğal veya sentetik yollarla sentezlenip sitotoksik etkisi olabilecek bileşiklerin, hali hazırda klinikte kullanılan ilaçlar ile kombinasyonu sonucu elde edilecek potansiyel terapötik antikanser bileşikler, kanserli bireylerin sağkalım oranında ciddi bir artış umudu vadetmektedir (Satari ve ark., 2021).

Elde edilen bilgiler ve mevcut gereksinimler doğrultusunda bu tez çalışmasında, insan kolon kanseri hücrelerinde (HCT-116 ve HT-29) öncelikle 3-nitrofenil kalkon türevinin tek başına ve 5-FU ile kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine olası sitotoksik etkileri sulforhodamine B (SRB) analizi ile araştırılmıştır. Seçilen doz/süre parametrelerinde tedavi uygulanan hücrelerde floresan mikroskopta yapılan morfolojik analiz ile apoptotik ya da nekrotik hücrelerin varlığı belirlenmiş, akım sitometrisinde kaspaz 3/7 düzeylerinin ölçülmesi ile floresan mikroskoptan elde edilen sonuçlar desteklenmiştir. 3-nitrofenil kalkon türevinin doza bağlı olarak hücre döngüsünü hangi evre/lerde baskıladığı yine akım sitometrisi ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Apoptotik ölüm yolağı sürecinde görev alan proteinlerin ekspresyonundaki değişimler western blot ile araştırılmış, yara iyileşmesi ve koloni oluşturma yetenekleri analiz edilmiştir. Literatürde çeşitli kalkon türevleri ile yapılmış bir çok yayın olmasına rağmen bu çalışma, 3-nitrofenil kalkon türevinin insan kolon kanseri hücreleri (HCT-116 ve HT-29) üzerindeki sitotoksik etkileri ve antikanser aktivitesinin ilk defa araştırılmasından dolayı önem taşımaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanser; büyüme dengesi genetik ve sporadik faktörler sonucunda bozulmuş hücrelerin aşırı ve kontrolsüz çoğalmasıyla oluşan bir hastalıktır (Şekil 2.1). Diğer bir ifadeyle, hücrede meydana gelen metabolik değişiklikler sonucunda metastatik ve invazif karakter kazanarak uzaktaki dokuları istila ettikleri çok basamaklı karsinogenez sürecidir (Futreal ve ark., 2001).



Şekil 2.1. Kanser oluşumu ve yayılımı (Bu şekil, Goymer (2008)'den uyarlanmıştır [s. 1048])

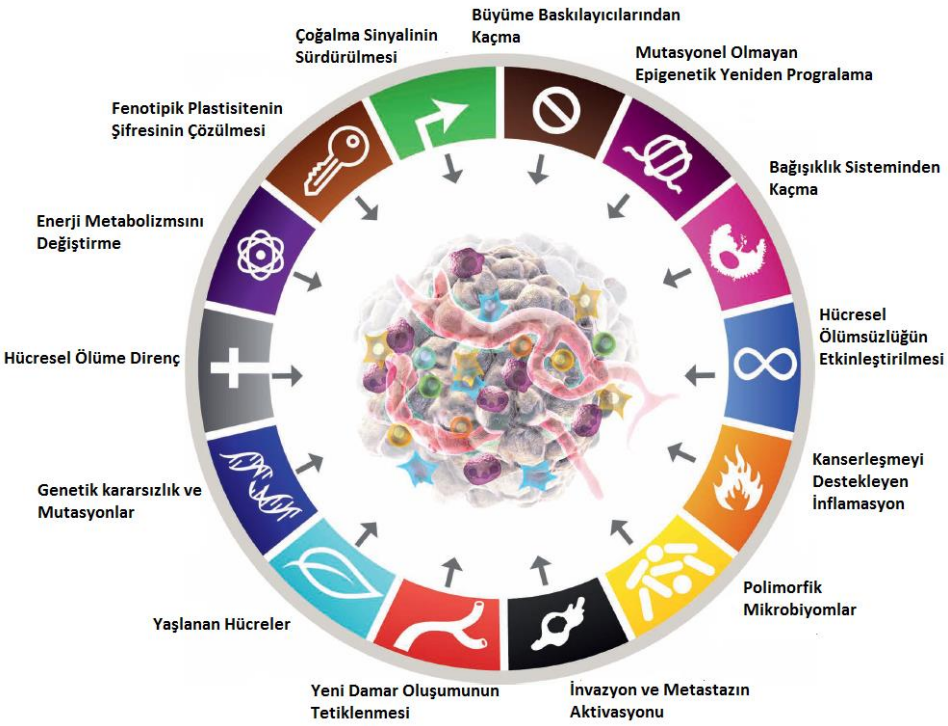
Kanser, ilk olarak M.Ö. 1500'lü yıllarda tanımlanan latince bir terim olup yengeç anlamına gelen cancer veya carcinos kelimelerinden Türkçe 'ye çevrilmiştir (Kumar ve ark., 2015). Tümör terimi ise ilk defa MÖ 3. yüzyılda Hipokrat tarafından, kanserli hücre topluluğu etrafındaki şişmiş damarları bir yengecin bacaklarına benzetmesi sonucu ortaya konmuştur (Baykara ve ark., 2016).

Sağlıklı hücreler dışarıdan gelen büyüme sinyalleri süresince standart büyüklüğe ve sayıya gelip çevrelerindeki hücrelerle temas edene dek büyümeyi sürdürürler. Hücre, DNA'da veya hücreye ait elemanlarda hasar görülmesi sonucunda büyüme ve bölünme gerçekleşmeden G_0 fazında durdurulur. Hücre bu fazda beklerken hasarı tamir edebilirse tekrar yaşam döngüsüne devam eder (Park ve Lee, 2003). Ancak hasar tamir edilemeyecek boyutta ise, hücrede çoğunlukla programlı ölüm modu olan apoptotik yolak aktifleşir veya bağışıklık sistemi hücreleri hasarlı hücreyi bulup fagosite eder (Asher ve ark., 1995). Böylece karsinogenez süreci erken aşamada engellenmiş olur (Coşkun ve Özgür, 2011)

Kanser hücreleri oluştuktan sonra, UV, radyasyon, stres ve yanlış diyet gibi çevresel etkenlerin genomda meydana getirdiği hasarın derecesine bağlı olarak prognozları kötü huylu hale dönüşebilir. Kanser hücresinin karakteristik özelliklerinin bilinmesi (Şekil 2.1.1), tümörün ileri evrelere geçmeden teşhisinin konulup uygun tedaviye başlanmasına olanak sağlamaktadır. Hanahan'ın son derlemesinde, kanser hücresinde karakteristik olarak görülen 14 özelliği tanımlanmıştır (Hanahan, 2022);

1) Kanser hücrelerinin immün sistem tarafından tanınmasından ve saldırısından kaçma yeteneği,
2) Tümör destekleyici enflamasyon,
3) Mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama,
4) Çok sayıda gerçekleşen mutasyon sonucunda oluşan genomik kararsızlık,
5) Kontrolsüz şekilde çoklu tabaka halinde çoğalabilme yeteneği,
6) Apoptoz gibi hücre ölümüne karşı çeşitli mekanizmalar ile direnç göstermek,
7) Büyümeyi durduran sinyalleri kendi lehine manipüle edip süreci devam ettirmek,
8) Büyüme ve çoğalma sürecinde gerekli olan besin ve oksijene daha hızlı ulaşmak için damarlanmanın artması(anjiyogenez),
9) Çevre dokulara(invazyon) yayılabildiği gibi dolaşım sistemi boyunca uzaktaki doku ve organlara metastaz yapabilme kabiliyeti,
10) Kromozom uçlarındaki telomer bölgelerinin kırılmasını engelleyerek veya sürekli telomeraz aktivitesi gerçekleştirerek ölümsüz hale gelmek,
11) Polimorfik mikrobiyomlar,

12) Oksijen varlığında bile enerji ihtiyaçlarını kısa sürede karşılamak ve büyümesi için gerekli metabolitleri hızlıca sentezlemek için aerobik glikoliz yolağını tercih etmesi (Warburg etkisi),
13) Yaşlanan hücreler,
14) Fenotipik plastisitenin şifresinin çözülmesi şeklinde verilebilir (Şekil 2.1.1).

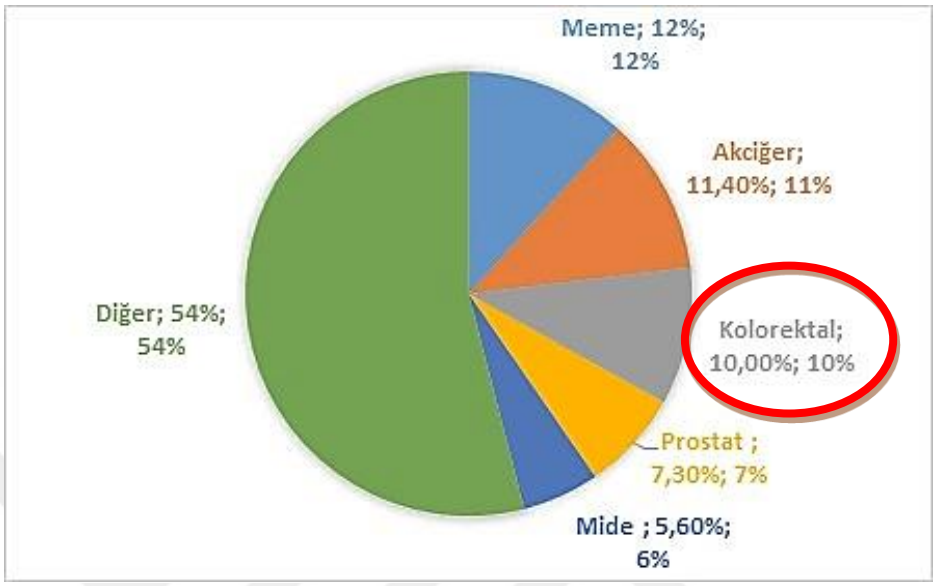


Şekil 2.1.1. Kanser hücresinin 14 temel özelliği (Bu şekil, Hanahan (2022)'den uyarlanmıştır [s. 43])

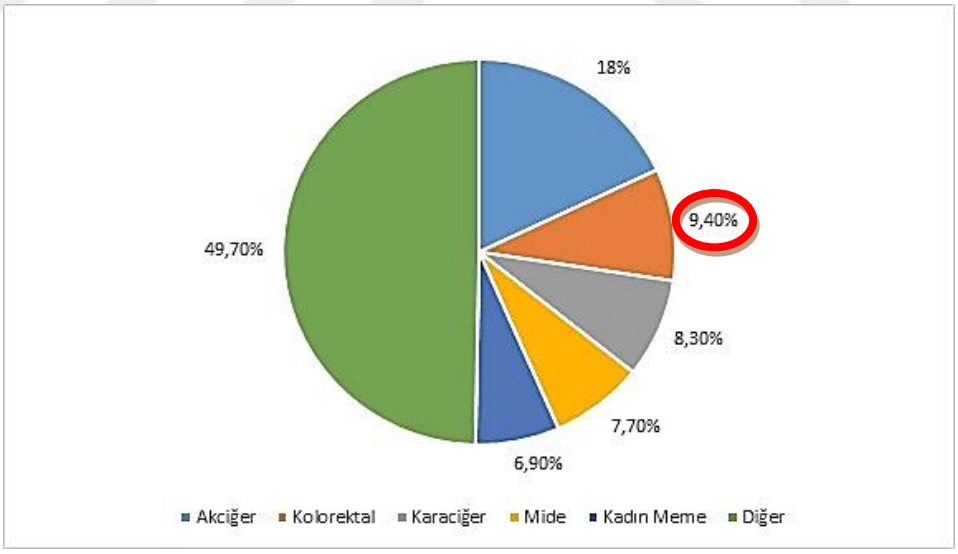
M.Ö. 1500'lü yıllardan itibaren birçok farkı kanser türleri tanımlanmış ve günümüze dek geçen süreçte keşfedilen farklı tedavi yöntemleri uygulanmıştır. Geliştirilmiş olan tüm tedavi yöntemlerine rağmen, hala kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık görülen ikinci hastalık çeşididir (Fouad ve Aanei, 2017).

GLOBOCAN 2020 verilerine göre, dünya çapında en sık teşhis edilen kanser türü memedir (%12). Bunu akciğer (%11,4), kolorektal (%10), prostat (%7,3) ve mide (%5,6) kanserleri takip etmektedir (Şekil 2.1.2). Her iki cinsiyette de kanserde meydana gelen ölümlerin nedenlerinden ilki akciğerdir (%18,0). Bunu kolorektal (%9,4), karaciğer (%8,3), mide (%7,7) ve kadın meme (%6,9) kanserleri izlemektedir (Şekil 2.1.3).

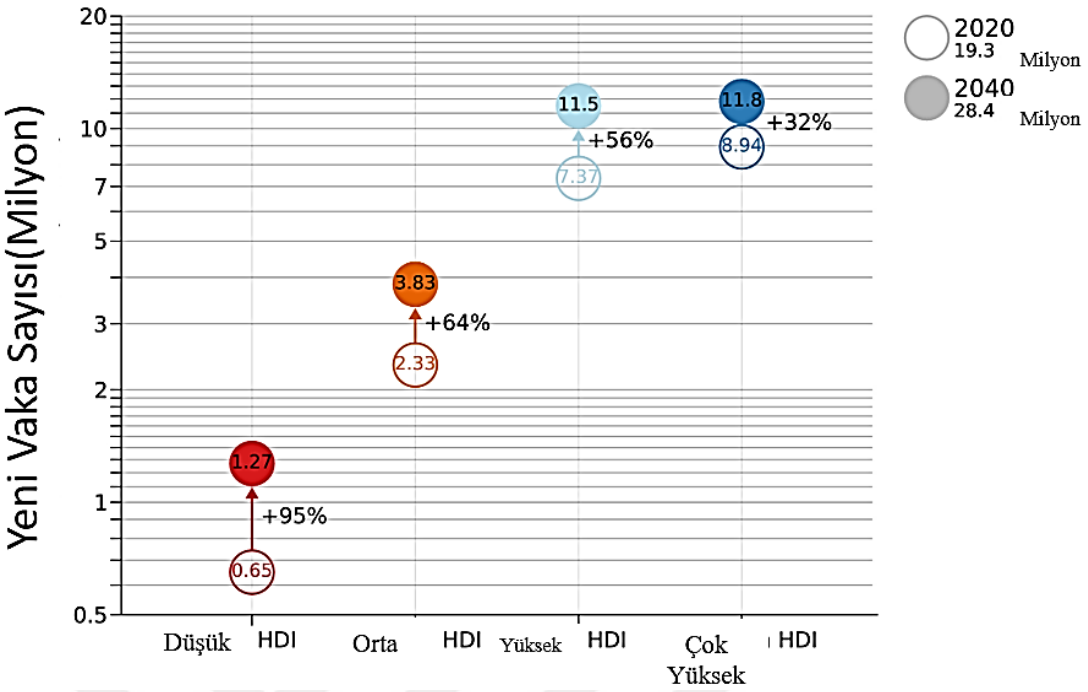
Genel tabloya baktığımızda 2020 yılında tahmini 19,3 milyon yeni vaka ve 10 milyon kişide kansere bağlı ölümler meydana gelmiştir. 2040 yılında ise insidansın 28,4 milyon olacağı öngörülmektedir (Şekil 2.1.4) (Sung ve ark., 2021).



Şekil 2.1.2. 2020'de teşhisi konulan ilk 10 kanser vakalarının her iki cinsiyet için dağılımı (Bu şekil, Sung ve ark. (2021)'den uyarlanmıştır [s. 213])



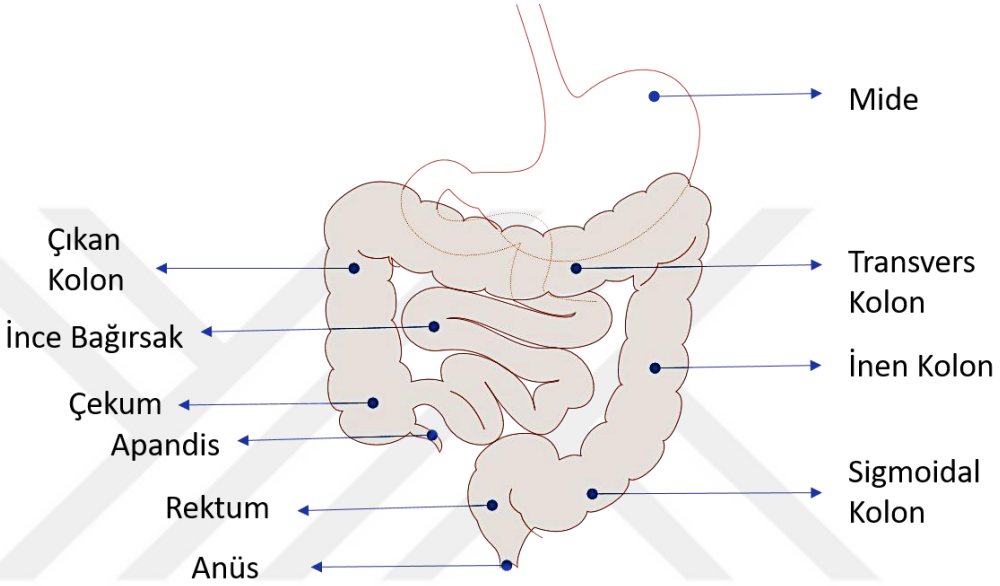
Şekil 2.1.3. 2020'de meydana gelen ilk 10 kansere bağlı ölümlerin her iki cinsiyet için dağılımı (Bu şekil, Sung ve ark. (2021)'den uyarlanmıştır [s. 213])



Şekil 2.1.4. Günümüzden 2040'a kadar kanser görülme oranının tahminine yönelik HDI grafiği (HDI: Human Development Index) (Bu şekil, Sung ve ark. (2021)'den uyarlanmıştır [s. 241])

2.2. Kolon Anatomisi, Fizyolojisi ve Histolojisi

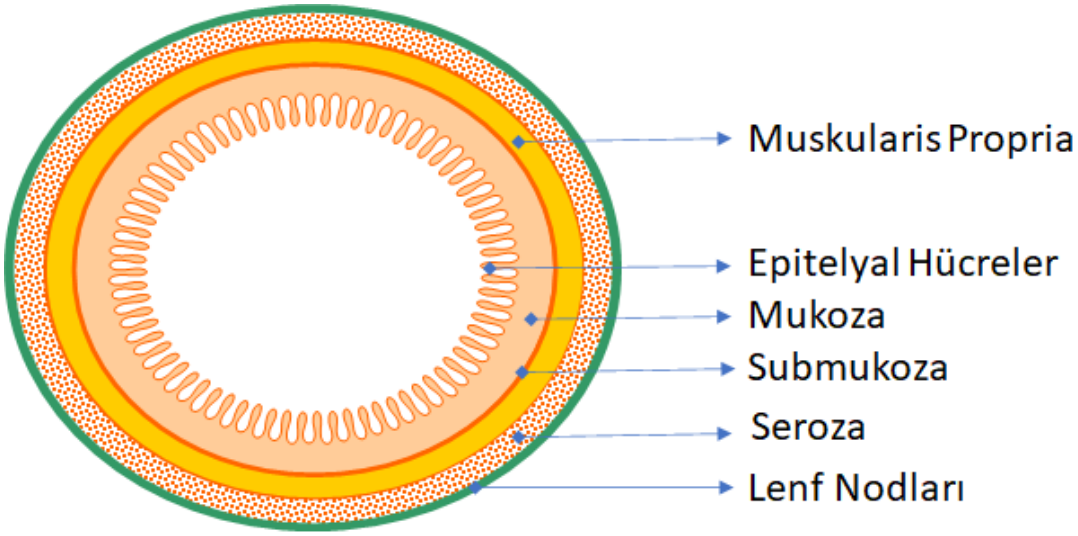
Sindirim sistemi sürecinde ince bağırsakta kimyasal sindirimi gerçekleşen besinler, su ve minerallerin geri emiliminde görevli organ olan kalın bağırsağa ulaşır. Ardından, çekumdan kolon içerisine girerek sırasıyla çıkan (sağ) kolon, transvers kolon, inen (sol) kolon, sigmoidal kolon ve rektuma ilerler ve vücuttan uzaklaştırılana kadar burada depolanırlar (Şekil 2.2) (Li ve Lai, 2009).



Şekil 2.2. Alt gastrointestinal sistemin anatomik yapısı (Bu şekil, Li ve Lai (2009)'dan uyarlanmıştır [s. 221] ve BioRender ile çizilmiştir)

Kolorektal kanserler, gerçekleştiği yere bağlı olarak kolon ve rektum olmak üzere ikiye ayrılır. Kanser, bu organların iç yüzeyini çevreleyen 4 farklı tabakada yer alan hücrelerden gelişmektedir.

Bu tabakalar dıştan içe doğru seroza, muskülaris propria, submukoza ve mukoza şeklinde sıralanmıştır (Şekil 2.2.1). Kolorektal kanserlerde dünya sağlık örgütü (WHO-World Health Organization) tarafından yapılan histolojik sınıflandırılma ise Çizelge 2.2'de verilmiştir (Nagtegaal ve ark., 2020).



Şekil 2.2.1. Kolonun histolojik yapısı (Bu şekil, Mercado-Perez ve ark. (2022)'den[s. 285] uyarlanmıştır ve BioRender ile çizilmiştir)

Çizelge 2.2. WHO verilerine göre kolorektal kanser türlerinin histolojik sınıflandırması (Bu çizelge, Nagtegaal ve ark. (2020)'den uyarlanmıştır [s. 183] ve Excel ile çizilmiştir)

Histolojik Tip	ICD-O Kodu	Tanım
Adenokarsinom	8140/3	Bez Epiteli Hücrelerinde Lokalize
Diferansiye Olmayan Karsinom	8020/3	Farklılaşmaya Belirtisi Göstermeyen
Adenoskuamoz Karsinom	8560/3	Adenokarsinom ve Yassı Hücre Karsinom Hücreleri ile Birlikte
Yassı Hücreli Karsinom	8070/3	Epiyel Hücresinin Yassı Hücreye Farklılaşması
Müsinöz Adenokarsinom	8480/4	Organ Yüzeyinde Müsin Yapısı
Medüller Karsinom Lenfosit İnfiltrasyonu	8510/3	Büyük Atipik Malign Hücre Adaları
*ICD-O: International Classification of Diseases for Oncology / Uluslararası Hastalık Sınıflandırması-Onkoloji)		

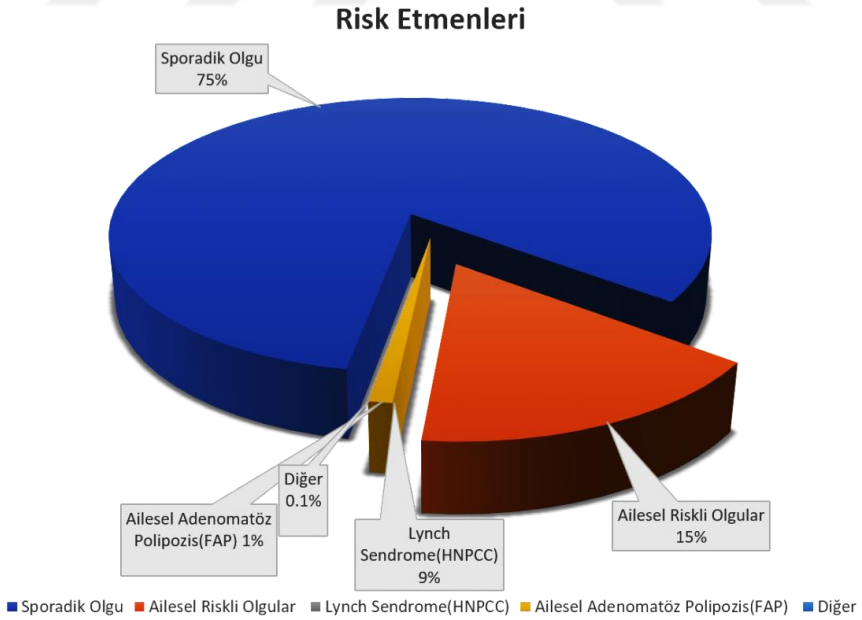
2.3. Kolon Kanseri Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi

2.3.1. Epidemiyoloji

Kolorektal kanserler morbidite ve mortalitenin başlıca nedenlerinden biridir (Sung ve ark., 2021). Dünya çapında %10'luk oranla en sık görülen üçüncü kanser türüdür ve kansere bağlı ölümün ikinci en yaygın nedeni olması dolayısıyla hızlı ve etkin tedaviye yönelik yeni yaklaşımlara ihtiyaç vardır.

2.3.2. Etiyoloji

Kolorektal kanser oluşum sürecinde birçok neden yer almaktadır. Bu nedenler arasında; ortam koşulları, yaş, diyet, inflamatuar bağırsak hastalığına sahip olma durumu ve aile öyküsü gibi birçok faktör yer almaktadır. Kolorektal kanserlerin yaklaşık olarak %15'i aile öyküsünde kanser geçmişi olan insanlardan, %10'u ebeveynlerden kalıtımla aktarılan genlerdeki bozukluklardan ve %75'i ise çevre şartlarına bağlı/sporadik (Şekil 2.3) olarak oluşmaktadır (Lynch ve ark., 2006).



Şekil 2.3. Kolorektal kanserin oluşumunda rol oynayan risk etmenleri (Bu şekil, Keum ve Giovannucci (2019)'dan uyarlanmıştır [s. 714] ve Biorender ile çizilmiştir)

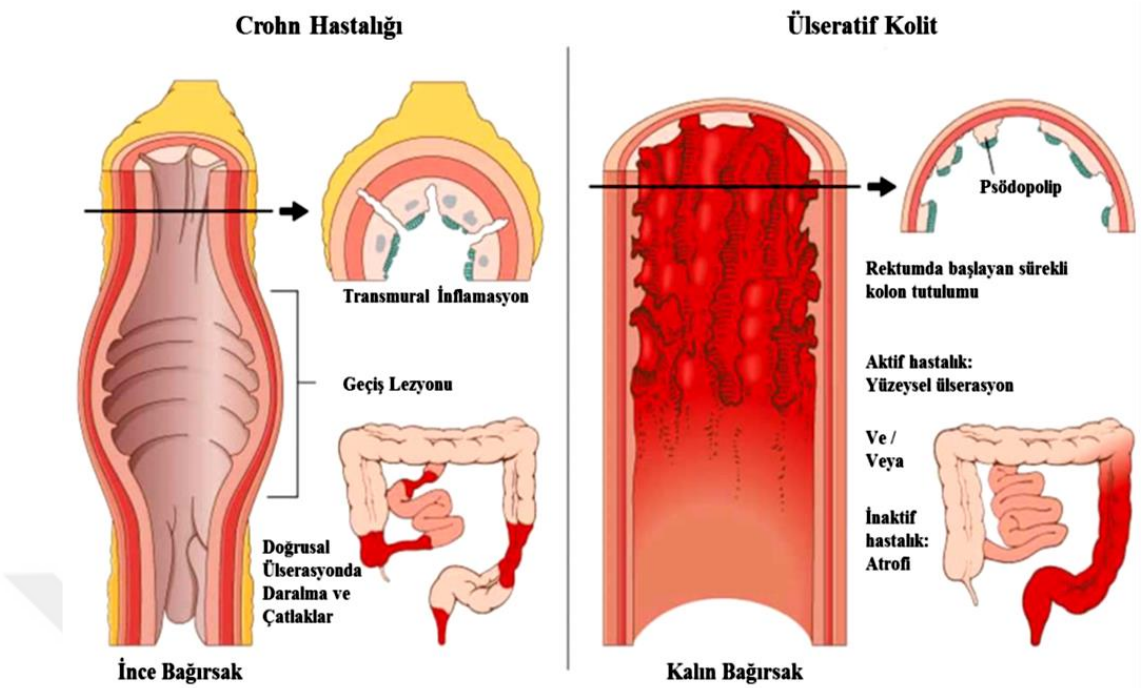
Kolorektal neden olan çevresel faktörlerle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bunlardan biri, meyve ve sebzelerin, lif, folik asit, antioksidanlar ve vitaminlerin zenginlikleri nedeniyle sigmoid kolonun pH'ını düşürerek, kolon transit süresini azaltması sonucu kolorektal kanserine karşı koruyucu bir etkisi olduğu görülmüştür (Fuchs ve ark., 1994). Normalden fazla et tüketimi ve uzun süre pişmeye maruz kalma sonucu vücutta insülin sekresyonunun uyarılması, demir absorpsiyonunun (heme) artması ve yağ alımının üst seviyelere çıkmasına bağlı olarak kanser riskinin arttığı gözlenmiştir. Özellikle alkol, sigara ve tütün kullanımı her iki cinste de kanser için risk faktörleridir. Yapılan bir çalışmada, 45 yıl boyunca sigara içmiş kişilerde kolorektal kanser riski arttığı belirlenmiştir (Ogino ve ark., 2009). Fiziksel aktivitenin koruyucu etkisinin mekanizması halen net olarak bilinmemekle birlikte kolonik tutulmayı en aza indirerek ve metabolizmada görevli önemli bir hormon olan insülin seviyelerini düşürerek kolorektal kanser oluşum riskini azalttığı tahmin edilmektedir (Gribovskaja-Rupp ve ark., 2011). Son olarak obezitenin, serum leptin düzeylerini arttırarak kolorektal kanser gelişimine yol açabildiği gözlenmiştir (Haque ve ark., 2002).

Kolorektal kanserlerin yaklaşık %90'ında tübüler ve villöz adenomlar gibi sporadik faktörlerin 5 ila 10 yıl arasında birikme periyodu sonucunda malignite gelişmektedir (Şekil 2.3.1) (Davies ve ark., 2005). Adenom öyküsü kolorektal kanser gelişme riskini artırmaktadır (Lynch ve ark., 2015).



Şekil 2.3.1. Kolorektal kanserde kolon içerisinde oluşan polipler (Bu şekil, Magri ve Bardelli (2019)'dan uyarlanmıştır [s. 652])

Ülseratif kolit hastalığı, kolondaki mukozanın ve rektumun iltihaplanmasına neden olur. Crohn hastalığı ise bağırsak duvarının tabakalarında iltihaplanmaya neden olur (Şekil 2.3.2). Bu iki hastalık çeşidini birlikte tanımlamamızı sağlayan inflamatuar bağırsak hastalığında, kolorektal kanser riski 4-20 kat arasında arttığı yapılan çalışmalar sonucu ortaya konmuştur (Janout ve Kollárová, 2001). Bu nedenle, inflamatuar barsak hastalığına sahip bireylerin daha sık tarama yaptırmaları gerekmektedir.



Şekil 2.3.2. Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin kolon içerisindeki şematik gösterimi (Bu şekil, Sartor (2006)'dan uyarlanmıştır [s. 397])

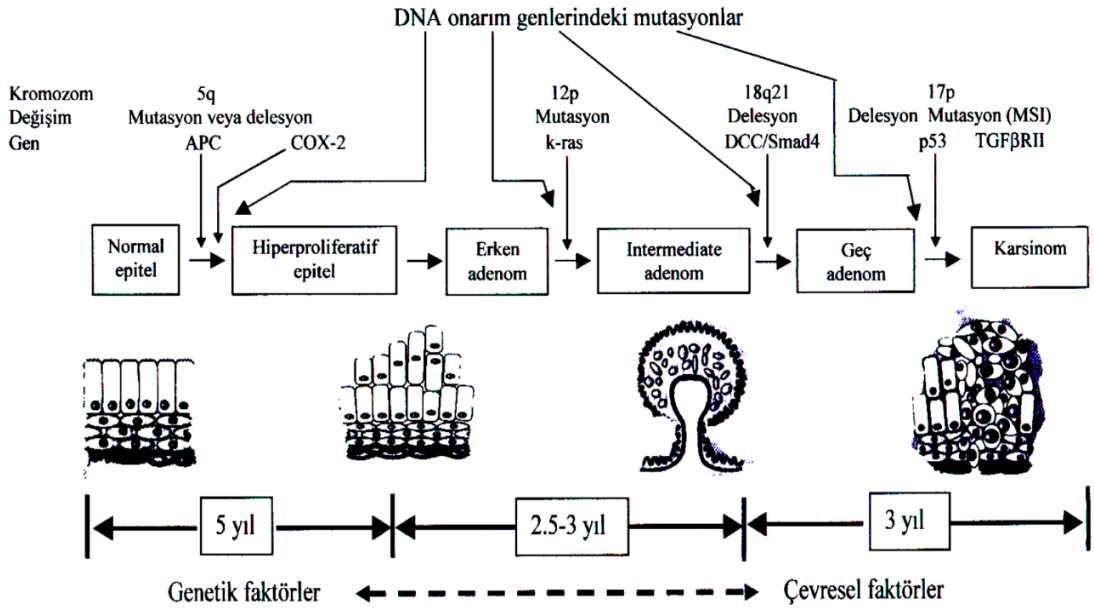
Kolorektal kanserlerin yaklaşık %10'u, ailesel adenomatöz polipozis (FAP) ve kalıtsal nonpolifozit kolorektal kanser (HNPCC) gibi kalıtsal faktörlere bağlı olarak oluşmaktadır (Jackson-Thompson ve ark., 2006). HNPCC ile ilişkili mutasyonlar, DNA onarım yolunda yer alan genlerdeki mutasyonlarla (MLH1 ve MSH2) ilişkilidir. HNPCCli bireyler, kolorektal kanser insidansının %2-6'sını oluşturabilir. Bu kişilerde kolorektal kanser riski, 40-60 yaşlarında ortalama %70-80 olabilir (Konishi ve ark., 1996). FAP, tümör baskılayıcı gen APC'deki mutasyonlardan kaynaklanır. FAP, tüm kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır. Yalnızca birkaç adenom gelişen HNPCC'li bireylerden farklı olarak, FAP'lı insanlar karakteristik olarak yüzlerce polip geliştirirler ve bu adenomlardan bir veya daha fazlası tipik olarak 20 yaşına kadar malign transformasyona uğramaktadır (Davies ve ark., 2005). Adenomatöz polipozis koliye (APC) eşlik eden polipozis koşulları, otozomal dominant bir şekilde kalıtsaldır. APC'ye bağlı polipozis koşulları olan kişilerin yaklaşık %75 ila 80'inde etkilenen ebeveynler vardır. Etkilenen bir aile üyesinde hastalığa neden olan bir mutasyon saptanırsa, doğum öncesi test ve preimplantasyon genetik teşhisi mümkündür (Lynch ve ark., 2015).

2.4. Kolon Kanseri Moleküler Karsinogenezi

Epitel hücresinin malign hale dönme sürecine girmesi için gerekli olan genetik değişimler temelde iki farklı mekanizma ile ortaya konmuştur. Bunlardan ilki bazı karmaşık DNA mutasyonları ve diploidinin artması ile kendisini gösteren değişikliklerken Microsatellite instability (MSI) diğeri de allelik kayıplar ve anöploidi ile karakterize olan kromozomal kararsızlıklardır ("genomic instability") (Rao ve Yamada, 2013; Kheirelseid, 2013).

Kolorektal kanserlerin oluşumunda rol oynayan olayları moleküler düzeyde açıklamak amacıyla Vogelstrein ve Fearon'un oluşturdukları modele göre (Şekil 2.4) kanser hücresinin kendi lehine süreci programlama mekanizmaları dört temel grupta incelenmektedir (Fearon ve Vogelstein, 1990);

1- Tümör baskılayıcı gen(lerin) aktivitesinin azalması veya kaybolması
2- Protoonkogenlerde oluşan değişiklikler
3- DNA onarımı (mismatch repair) ile ilgili genlerdeki değişiklikler
4- Kromozomlarda oluşan delesyonlar (Microsatellite Instability)



Şekil 2.4. Kolon kanseri gelişiminin Vogelstein ve Fearon moleküler modeli (Bu şekil, Fearon ve Vogelstein (1990)'dan uyarlanmıştır [s. 763])

Şekilde, farklı evrelerde etkili olan genetik değişikliklerden biri olan normal kolon mukozasından adenom gelişiminde kromozom 5q daki allelik kayıp, ortalama 5 yılda oluşabilecek erken evre kanseri teşhis etme adına önemlidir. Ras geni mutasyonu daha çok küçük adenomun ortaya çıkışı döneminde meydana gelmektedir. Kromozom 18q daki allelik kayıplar sıklıkla büyük ve displazik adenomlarda görülürken kromozom 17p deki allelik kayıplar sadece ileri derecede displazi saptanan adenomlarda ve karsinomlarda bulunmaktadır ve muhtemelen ileri derecede displazik adenom oluşumu veya karsinoma dönüşümden sorumludur. Özellikle HPCC'ni bireylerde DNA onarım genlerindeki mutasyonlar ve kayıplar kolorektal oluşumunun birden çok basamağında etkilidir (Clevers, 2004; Wang ve ark., 2014).

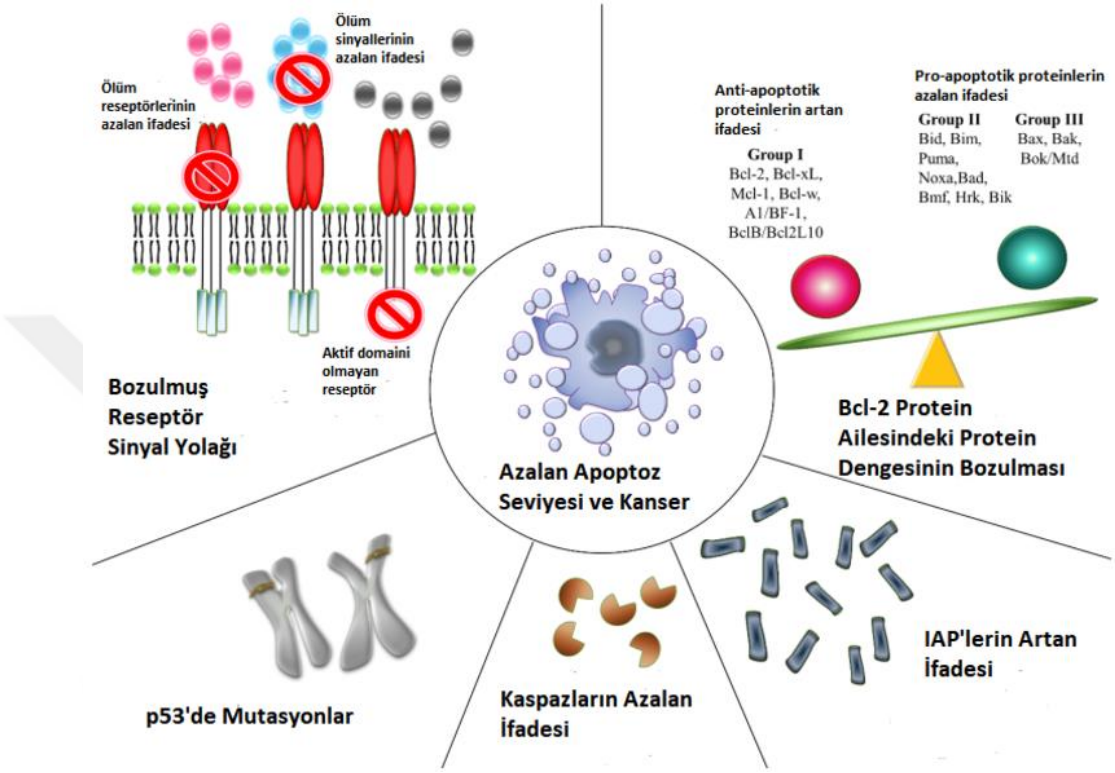
2.5. Apoptozis

İnsanların dâhil olduğu ökaryot grubu canlılarda 200'den fazla hücre tipi bulunmaktadır. Canlıda bulunan her bir hücrede doğum, büyüme, farklılaşma, işlev görme, yaşlanma ve ölüm evrelerinin döngüsü bazı mekanizmalar tarafından denge halinde sürdürülmektedir (Coşkun ve Özgür, 2011).

Erişkin bir organizmanın hücrelerinde homeostazı sürdürmek açısından genellikle, apoptozis olarak bilinen yolak aktif hale gelerek düzenli bir şekilde fizyolojik ölüm gerçekleşir. Gelişmekte olan lenfositlerin çoğu sayılarını sabit tutmak adına, komşu hücrelere zarar vermeden diğer bir ifadeyle enflamasyona neden olmadan ve doku bütünlüğünü en az etkileyecek şekilde ölürler. Ortaya çıkan hücresel artıklar ise yolakta görevli fagositler tarafından apoptotik veziküller oluşturularak membrandan ayrılır ve yeni bir hücre ölen hücrenin yerini alır. Apoptotik süreç bir dizi gen ve sistein proteaz ailesinin üyeleri olan kaspazlar tarafından düzenlenmektedir (Nicholson, 1999).

Hücrede apoptozu aktive eden farklı tetikleyiciler vardır. DNA hasarı, stres sinyalleri ve hipoksi dış etkenlere örnektir. Tümör nekroz faktörü (TNF) ailesine ait Apo1L, CD95L, TRAIL, FasL, TNFα gibi ölüm ligandları ise içsel yolak aracılığıyla ölümü başlatır (Zhang ve ark., 1999). Ayrıca katlanmamış proteinlerin oluşturduğu Endoplazmik Retikulum (ER) stresine bağlı olarak apoptoz ER aracılı yolak ile de gerçekleşebilmektedir. Apoptotik süreçte meydana gelen fonksiyon ya da düzenlenme

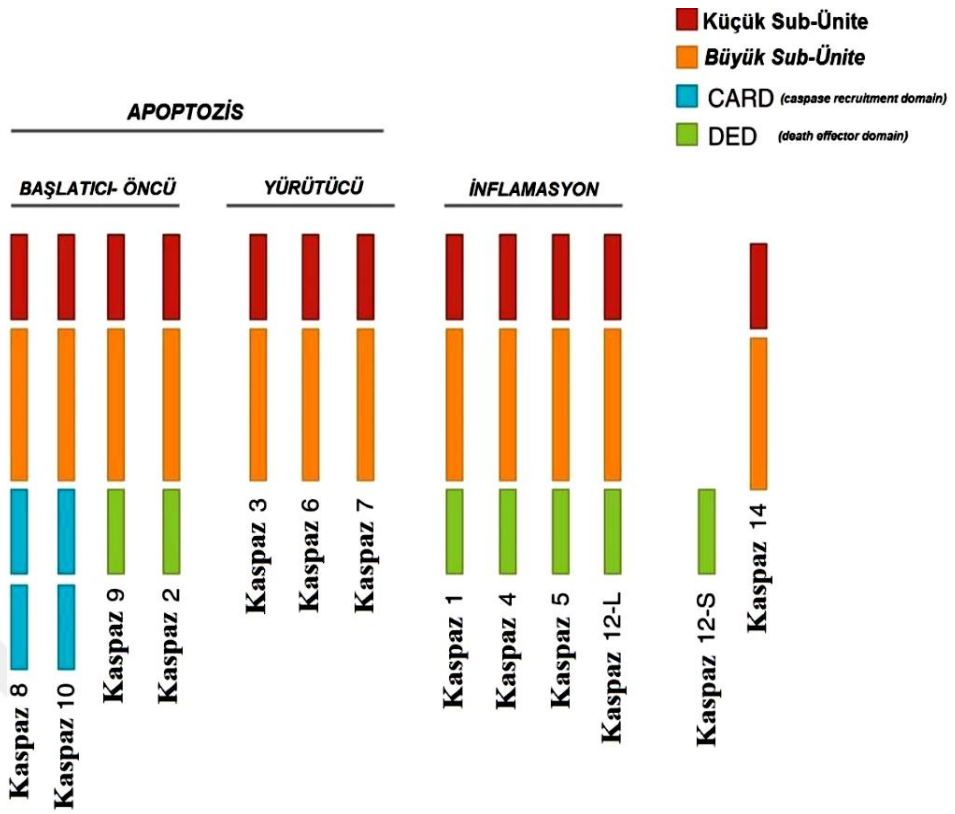
bozuklukları kanser, otoimmün hastalıklar ve viral enfeksiyonların yayılması gibi çeşitli patolojik durumlarla ilişkilidir. Kanser hücreleri apoptoza karşı genellikle çoklu seviyelerde güçlü bir dirence sahiptir. Bu sayede, temel özellikleri olan apoptozdan kaçabilmektedir (Şekil 2.5.1).



Şekil 2.5. Kanser ve apoptoz ilişkisi (Bu şekil, Wong (2011)'den uyarlanmıştır [s. 4])

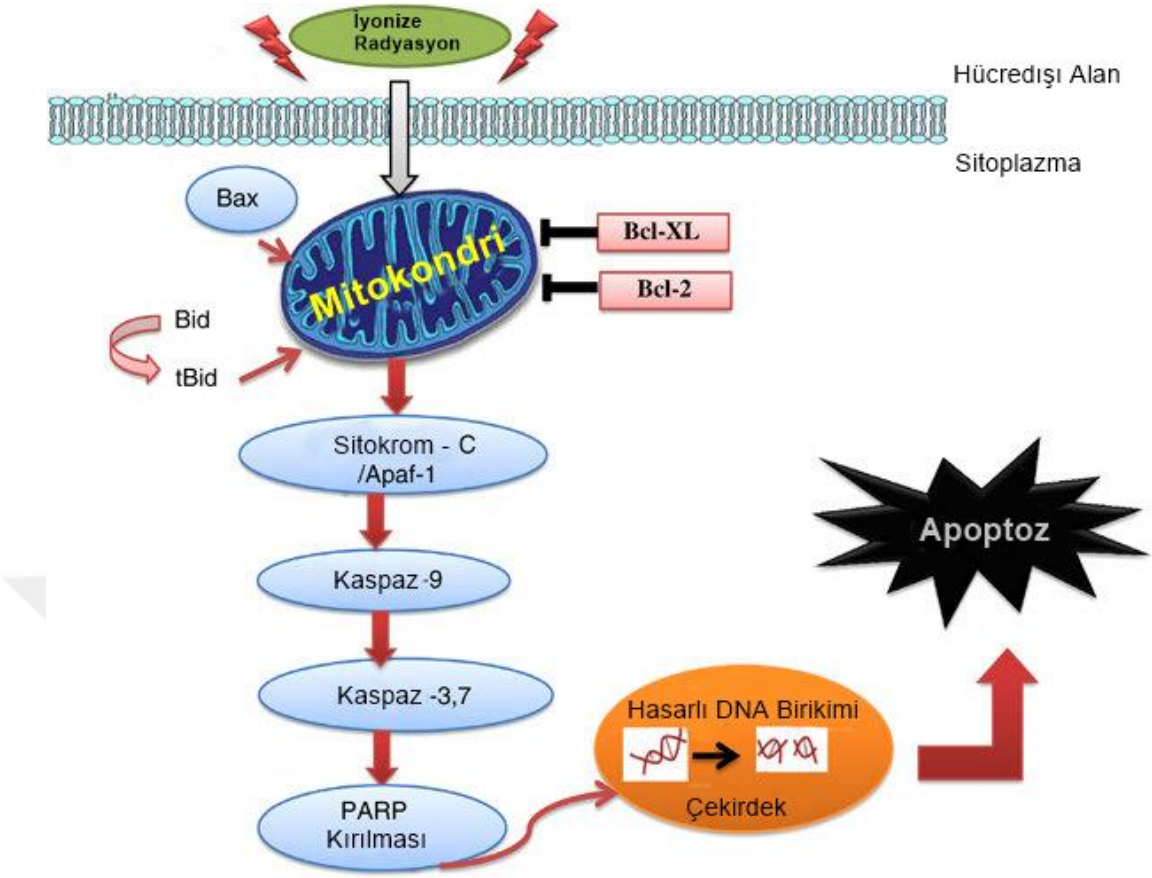
2.5.1. Apoptotik süreçte görev alan proteinler

Kaspazlar, yapısındaki katalitik sistein kalıntılarına bağlı olarak hücrelerin içindeki proteinlerin aspartik asit kalıntılarındaki peptit bağlarını hidroliz eden hücre içi proteaz enzim ailesi üyeleridir. Genel olarak vücutta homeostaziyi koruma amacıyla, apoptotik uyaranın şiddetine bağlı olarak programlı şekilde hücresel ölüm sürecinde görev alırlar. Apoptozda görevli olan alan kaspazlar, etki mekanizmalarına göre başlatıcı kaspazlar veya yürütücü/efektör kaspazlar olarak sınıflandırılmış olup 13 adet kaspaz tanımlanmıştır (Şekil 2.5.1).



Şekil 2.5.1. Kaspazların etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması (Bu şekil, Li ve Yuan (2008)'den uyarlanmıştır [s. 6195])

Kaspazlar, başlangıçta aktivasyon ya da dimerizasyon için enzimatik olarak kısmi kesilme gerektiren inaktif monomerik prokaspaz yapısında üretilirler. 13 adet prokaspazların oluşması için, içerisindeki prodomain spesifik bölgelere bağlanan çeşitli adaptör proteinler görev alır. Kaspaz 1, 2, 4, 5, 9 ve 12 bir ölüm efektör alanına (DED, "Dead Effector Domain") içerirken, kaspaz 8 ve 10 bir kaspaz alım alanına (CARD, "Caspase Recruitment Domain") sahiptir ve böylece aktifleştirici farklı adaptörlerle kompleks oluştururlar. Apoptozis sırasında başlatıcı kaspazlar önemli yapısal proteinleri yıkmak ve diğer enzimleri aktive etmek amacıyla yürütücü kaspazları aktive ederler. Bu sayede kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaspaz kaskadı oluştururlar (Taylor ve ark., 2008). Yürütücü kaspazların lamin, hücre içi iskelet ve çekirdek zarı proteinlerini parçalamak gibi birçok görevleri vardır. Örneğin Kaspaz 3, DNA onarımında görevli protein PARP'ı enzimatik olarak kırarak inaktive eder (Curtin ve Cotter, 2003). Hasarlı DNA'nın çekirdekte birikmesi sonucu hücrede apoptoza neden olur (Şekil 2.5.1.1).



Şekil.2.5.1.1. Efektör kaspaz 3 enziminin PARP proteinini aktifleştirmesi sonucu aktifleşen apoptoz yolağı (Bu şekil, Chang ve ark. (2014)'den uyarlanmıştır [s. 7])

2.5.2. Apoptozis yolakları

2.5.2.1. Ekstrinsik (dışsal) Yolak

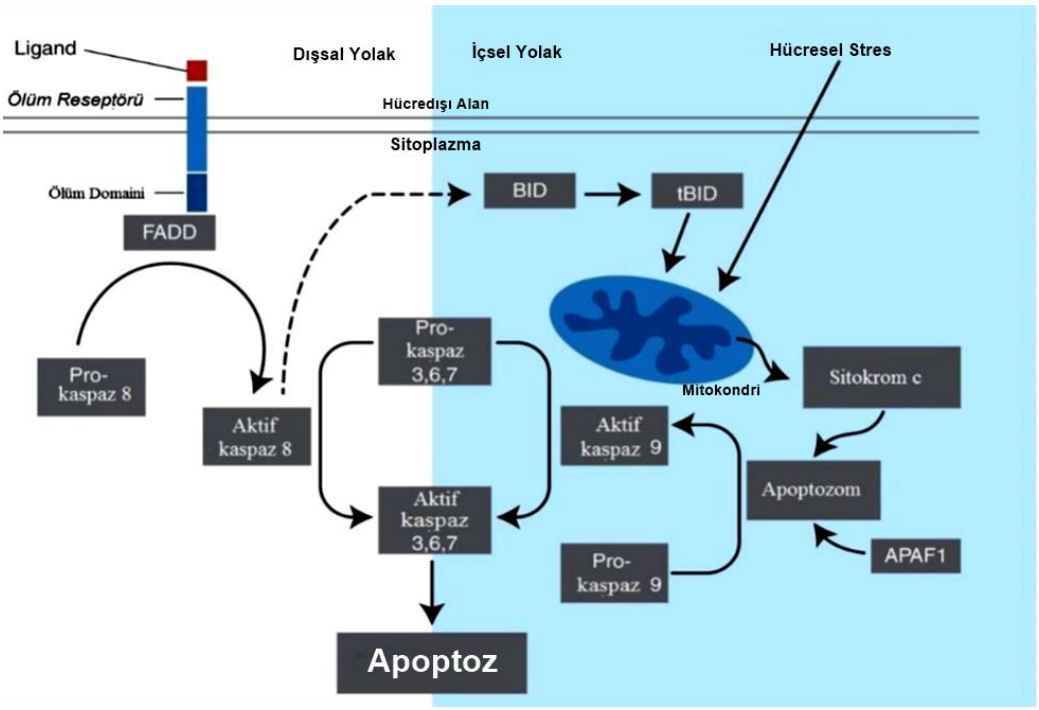
Kaspazları aktifleştirerek apoptozun gerçekleşmesinde görev alan üç ana yolak olduğu bilinmektedir. Bunlar; içsel (intrinsik) yolak, dışsal (eksrinsik) yolak ve ER stresi bağımlı yolaklardır.

Ekstrinsik yol, doku homeostazında ve enflamatuar yanıtta önemli rolü vardır. Plazma zarındaki TNF ölüm reseptörlerine (DR4, Fas, DR5, TNFR) ligandlarının (Apo1L, CD95L, TRAIL, FasL, TNFα) bağlanmasıyla reseptörler trimerik hale dönüşür. Prokaspaz-8 ve FADD ("Fas-activated protein with death domain") gibi adaptör proteinlerin eklenmesiyle de DISC ("death-inducing signaling complex") kompleks oluşur. Kompleksin kaspaz 8'i aktif hale getirmesi ile kaspaz-8 ya doğrudan ya da Bid'i

keserek kaspaz 9 üzerinden dolaylı olarak intrinsik mekanizmada görevli olan kaspaz-3'ü aktive eder (Şekil 2.5.2.1). Her iki yolla da aktif hale gelen kaspaz-3, kaspaz aktive edici DNaz (CAD) aktivasyonu ile PARP'ı keserek/c-PARP'ı aktifleştirerek DNA'da farklı sebeplerle oluşan hasarın onarılamaması sonucu apoptoza neden olur (Kroemer, 2004).

2.5.2.2. İntrinsik (İçsel) Yolak

İnstrinsik yolda ise, özellikle DNA hasarı, hücre içi iyon konsantrasyonun değişmesi, tetraklorodibenzo-p-dioksin, çeşitli ağır metaller, ditiyokarbamatlar ve bakteriyel toksinler gibi toksinler ve ER stresi gibi bazı stres faktörlerinin artması sonucu proapoptotik proteinlerden Bid'in Bax ve Bak'ı aktifleştirmesi ile mitokondri membran potansiteli kaybı oluşur (Andersen ve Kornbluth, 2013). Böylece mitokondri membran porlarından sitokrom-c'nin sitozole salınmasına neden olur (Youle ve Strasser, 2008). Sitokrom-c, Apaf-1 ve procaspase-9 birleşerek apoptozom kompleksini oluştururlar. Aktif kaspaz-9 da kaspaz3'ü aktive ederek diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlar (Şekil 2.5.2).

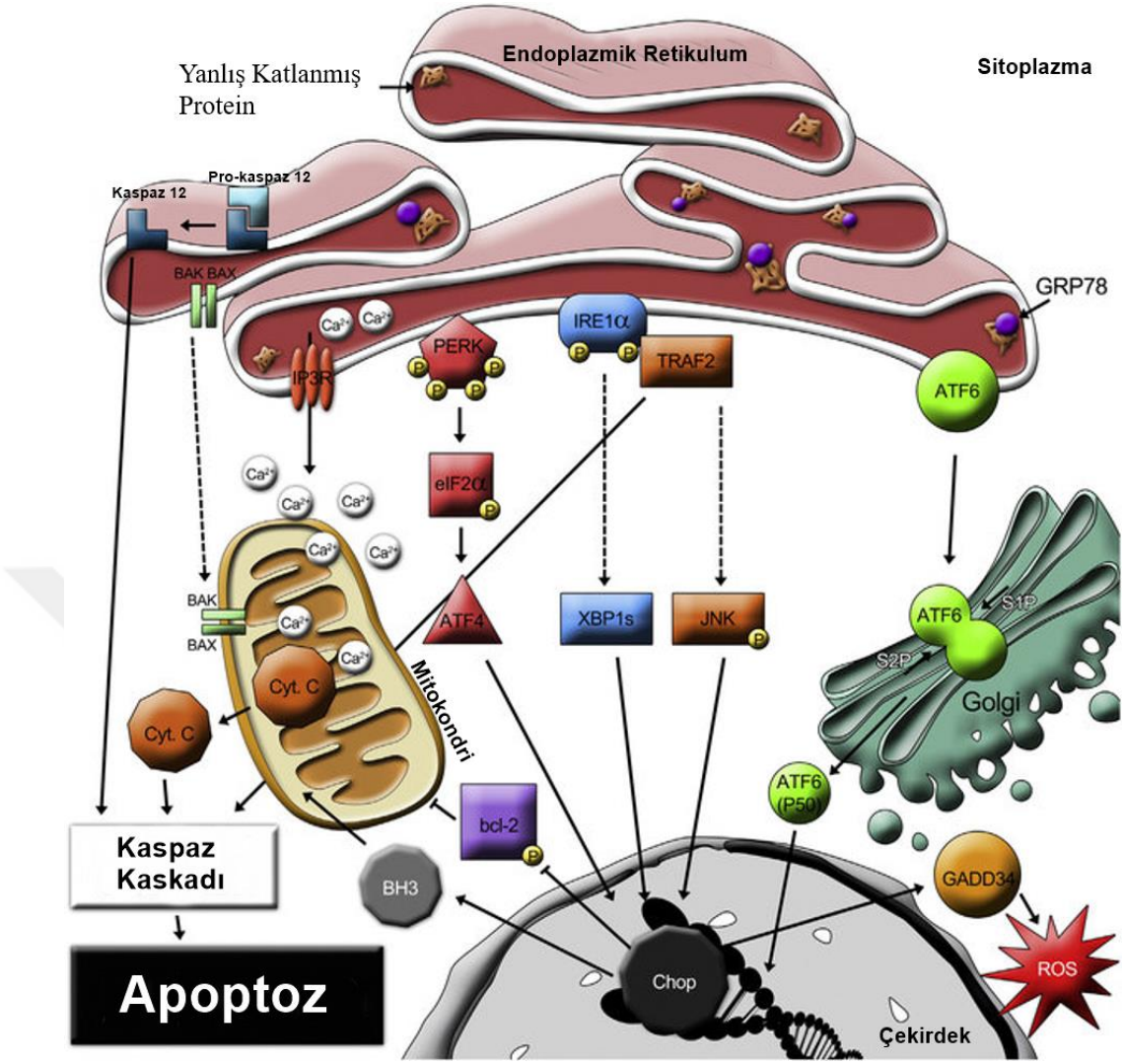


Şekil 2.5.2. Apoptozun içsel ve dışsal yolak üzerinden gerçekleşmesi (Bu şekil, Hui ve ark. (2004)'den uyarlanmıştır [s. 185])

Her iki yol da mekanizmaları gereği, kaspaz bağımlı apoptoziste görev almaktadır. Ayrıca kaspazlardan bağımsız olarak apoptoza neden olduğu düşünülen, kaspaz aktivasyonunun gerçekleşmediği mekanizma da bulunmaktadır. Bu mekanizmada, AIF, steroidler, granzyme B ve endonukleaz G görev alır. İçsel yolakta mitokondriden AIF salınıp nükleusa geçer ve nükleazlar aktifleşerek DNA hasarı oluşur (Porter ve Jänicke, 1999).

2.5.2.3. Endoplazmik retikulum aracılı yolak

Amiloid β nörotoksisitesine ya da Tip1&2 diyabetin oluşmasına neden olan ve hatalı katlanıp işlevini yerine getiremeyen proteinlerin hücrede birikimi (ER Stres) Bip (GRP78) proteini aracılığıyla tanınır ve ATF6, IRE1-α, PERK gibi stres-sinyal iletim yolakları aracılığıyla apoptoz süreci başlatılır. Kaspaz 12 normalde ER membranında inaktif halde bulunur. Hatalı katlanan proteinlerin geri düzeltilemeyecek şekilde çok miktarda birikmesi sonucu ER içerisinde Ca^{+2} seviyelerinin yükselmesine bağlı olarak Ca^{+2} iyonları ER membranından dışarı çıkıp mitokondri aracılı kaspazı aktifleştirir ve diğer yandan prokaspaz 12 aktifleşir. Aktifleşen bu kaspaz 12 sitoplazmaya gider ve kaspaz 9 ile etkileşir (Hotamisligil, 2010). Sonuç olarak sitozolik kaspaz kaskadını uyararak apoptozu başlatır (Şekil.2.5.2.1).



Şekil.2.5.2.1. ER aracılı apoptozis süreci (Bu şekil, Plácido ve ark. (2014)'den uyarlanmıştır [s. 1446])

2.5.3. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Apoptoziz süreci, keşfedildiği yıllarda yeterli teknolojik gelişme ve teknik bilginin olmaması dolayısıyla hücrenin dış görünümüne göre karar verilmiştir. 80'li yıllarda sonunda DNA kırıklarının oluştuğu gözlenerek, 90'lı yıllarda ise kaspazların keşfi ile, 90'ların sonunda ise fosfatidilserin proteininin süreçteki rolü ortaya çıkarılarak, 2000'li yılların başlarından günümüze kadar ise, kırılmış sitokeratin 18 proteininin, kırıldıktan sonraki miktarını ölçmeye olanak sağlayan ELISA yöntemini kullanarak çok daha spesifik olarak apoptozun belirlenmesi mümkün hale gelmiştir ve günümüzde halen yaygın olarak kullanılmaktadır (Stadelmann ve Lassmann, 2000).

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler ve analizler genel olarak;

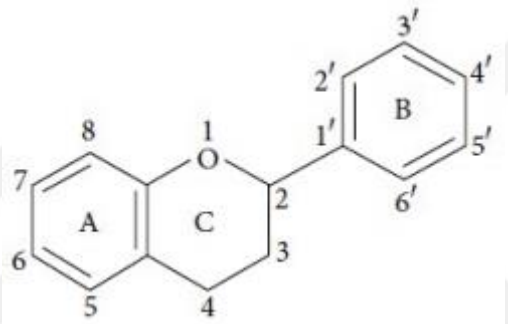
→ Morfolojik görüntüleme yöntemleri

→ İmmunohistolojik, Biyokimyasal, İmmünolojik ve de Moleküler Biyoloji analizleri ile yapılabilmektedir.

2.6. Flavonoidler

Kanser tedavisinde, moleküler hedeflere yönelik geliştirilmiş olan birçok kemoterapötik ilaç bulunmaktadır. Fakat çoklu ilaç direnci (MDR) ve ilaçların yan etkileri, kanser tedavi sürecindeki en önemli engelleri oluşturmaktadır. Bu sebeple klinikte kullanılan kemoterapi ilaçlarının yanında, bitkisel ya da diğer doğal kaynaklı ürünlerin kullanılması kanser tedavisinde giderek artan derecede umut vadetmektedir (Lean ve ark., 1999). Özellikle günlük besin ihtiyaçlarımız arasında bulunan sebze ve meyveler içerdikleri flavonoid bileşenleri ile dengeli hücre proliferasyonu ve karsinogenezin önlenmesinde son derece önemli doğal kaynaklardır (Satari ve ark., 2021).

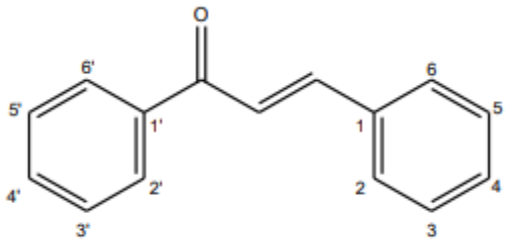
Geçmişten bugüne 6000 civarında flavonoid yapısında bulunan bileşikler, polifenol ailesinin en büyük grubunu oluştururlar. Kendi içerisinde flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, flavanoller ve antosiyaninler olmak üzere 5 alt sınıfa ayrılırlar. Kimyasal yapılarında iki fenolik benzen halkası ile bunları birbirine bağlayan üç karbonlu heterosiklik piren zincir yer alır (Şekil 2.6) (Yao ve ark., 2011). Flavonoidlerin-OH grupları kolayca glikozit bağı oluşturma özelliğindedir. Kimyasal yapılarında bulunan farklı yan gruplar vasıtasıyla vücutta antikanser başta olmak üzere antiallerjik, antikarsinojenik ve antiinflamatuar gibi çeşitli biyolojik aktiviteye sahip olup yeni ilaçların geliştirilmesi için önemli adaylardır.



Şekil 2.6. Flavanoid bileşiğinin kimyasal yapısı (Bu şekil, Panche ve ark. (2016)'dan uyarlanmıştır [s. 3] ve BioRender ile çizilmiştir)

2.7. Kalkonlar

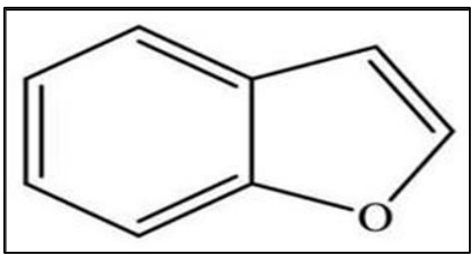
Flavonoid ailesinden olan kalkonlar hem doğal hem de sentetik olarak oluşturulabilen 1, 3-diaril-2-propen-1-on açık yapısına sahip bileşiklerdir (Şekil 2.7) ve antikanser aktivite başta olmak üzere vücutta serbest radikal salınımının engellenmesi, metallerle şelat oluşturma ve lipid peroksidasyonunu inhibe etmek gibi biyolojik aktiviteleri etkilediği bildirilmiştir (Pande ve ark., 2017). Kalkon yapılarının anti-kanser aktivite özelliği, aromatik halkalara ve onlara bağlı yan grupların içeriğine bağlı olduğu belirlenmiştir (da Silva Siqueira ve ark., 2021). Kalkon türevli bileşiklerin kanserli hücreler üzerinde çeşitli etki mekanizmaları tanımlanmıştır. Bunlar arasında apoptozis, DNA ve mitokondriyal hasarın indüklenmesi, anjiyogenezin inhibisyonu, tubulin inhibisyonu, kinaz inhibisyonu ve ilaç effluks proteinlerinin aktivitelerinde değişiklik bulunmaktadır (Rizeq ve ark., 2021).



Şekil 2.7. Kalkon bileşiğinin kimyasal yapısı (Bu şekil, Ouyang ve ark. (2021)'den uyarlanmıştır [s. 3] ve BioRender ile çizilmiştir)

2.8. Benzofuranlar

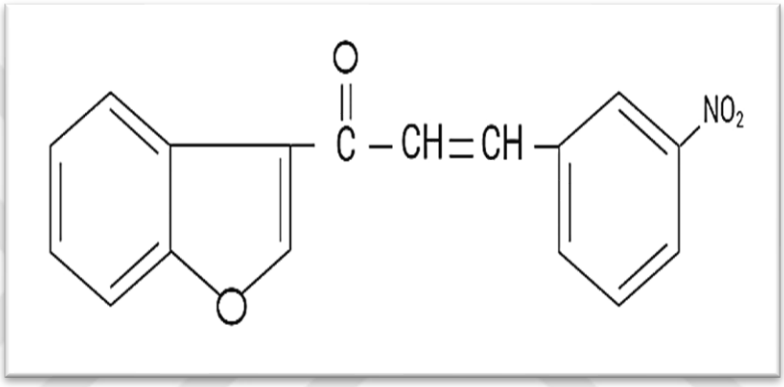
Bir furan halkası ile benzen çekirdeğinin birleşmesiyle oluşan bisiklik yapıdaki benzofuran bileşikleri (Şekil 2.8) kimyasal tarım ilaçları, tıbbi ilaçlar, sedatifler, hipnotik, antiinflamatuar, optik parlatıcılar, antitümör ve kozmetik alanında geniş bir kullanıma sahipken, birçok doğal benzofuran farmakolojik, toksik ve fizyolojik özelliklere sahiptir (Drutovic ve ark., 2014). Son birkaç yıldır, benzofuran halkası bağlı kalkon türevleri, anti-kanser, antimikrobiyal, nöroprotektif, bağışıklık sistemini düzenleyici, anti-enflamatuar ve antioksidan özellikleri de dâhil olmak üzere önemli biyolojik faaliyetlerinden dolayı özellikler kanserde sitotoksisite çalışan araştırmacıların odağı konumundadır.



Şekil 2.8. Benzofuran halkasının kimyasal yapısı ((Bu şekil, National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2022) sitesinden uyarlanmıştır ve BioRender ile çizilmiştir)

2.9. Tez Çalışmasında Kullanılan 3-nitrofenil Kalkon Türevinin Biyokimyasal Yapısı

Kaynak araştırması bölümünün 2.3.1 alt başlığında açıklanan kolon kanserinin artan insidans ve mortalite oranları ele alındığında, bu oranları düşürecek yeni bir tedavi seçeneğine ihtiyaç oluşmaktadır. Bu amaçla tez çalışmasında, Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümü tarafından sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmış benzofuran halkası bağlı 3-nitrofenil kalkon türevi [3-(3-Nitrophenyl)-1 -(benzofurane-2-yl)-2-propen-1-one] kullanılmıştır (Şekil 2.9.1) (Coşkun ve Ahmedzade, 2008).



Şekil 2.9. 3-nitrofenil kalkon türevinin biyokimyasal yapısı (BioRender ile çizilmiştir)

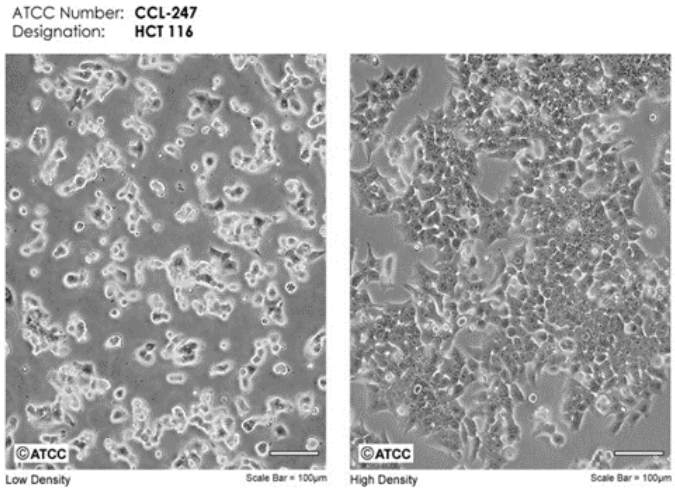
2.10. Tez Çalışmasında Kullanılan Hücreler

Çalışmamızda CCD18-Co insan sağlıklı kolon ve HCT-116 (Şekil 2.10) ve HT-29 (Şekil 2.10.1) insan kolon kanseri hücre soyları kullanıldı.

Kullanılan insan kolon kanseri hücrelerinin özellikleri aşağıda belirtilen şekildedir;

HCT-116 Kolon Kanser Hücre Soyu

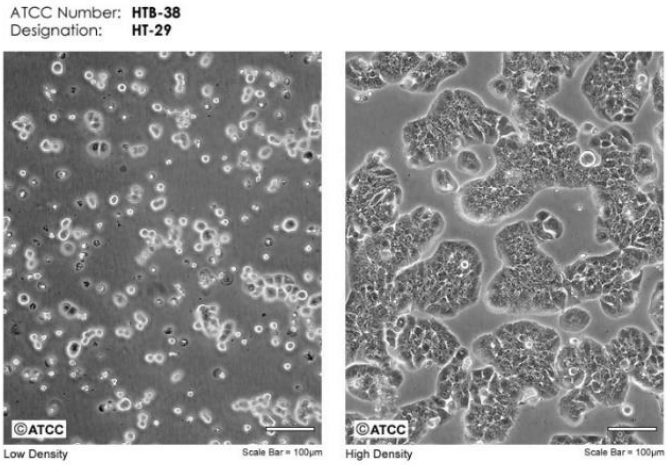
- Erkek hastadan izole edilmiş
- Dukes tip C, adenokarsinom
- Epitelyal morfolojisine sahip
- Keratin pozitif
- K-Ras pozitif



Şekil 2.10. Deneyde kullanılan HCT-116 insan kolon kanseri hücre soylarının faz kontrast mikroskobi görüntüleri (American Type Culture Collection [ATCC], 2021)

HT-29 Kolon Kanser Hücre Soyu

- Kadın hastadan izole edilmiş
- Myc pozitif (viral onkogen)
- Ras pozitif
- Myb pozitif (viral onkogen)
- p53 negatif
- Ros negatif
- Src negatif



Şekil 2.10.1. Deneyde kullanılan HT-29 insan kolon kanseri hücre soylarının faz kontrast mikroskobi görüntüleri (ATCC, 2021)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Çizelge 3.1.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Maddeler	Temin Edildiği Firma/Yer
Kalkon Bileşikleri	Fırat Üniversitesi
5-FU	Uludağ Üniversitesi Kemoterapi İlaç Hazırlama Merkezi
Fetal sığır serumu (FBS)	Gibco, USA
Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin)	
Fosfat tuz tamponu (PBS),	
Dulbecco‟s Modified Eagle‟s Medium (DMEM)	
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	
0.05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA)	
Dimetil sülfoksit Çözeltisi (DMSO)	Sigma, ABD
Trikloroasetik asit	
Biçinkoninik asit Kit	
Hoechst 33342 62249	Thermo Fisher Scientific, ABD
Sığır Serum Albumin (BSA) Standard	
LDS Sample Buffer (Nu-PAGE, 4X)	
Sample Reducing Agent (Nu-PAGE ,10X)	
MES SDS Running Buffer (Nu-PAGE, 20X)	
Protein standardı (MagicMark XP)	
Tris bazı	BioShop, Kanada
Sülforodamin B	Santa Cruz, ABD

Çizelge 3.1.1. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler (devam)

Antioksidant (Nu-PAGE)	İnvitrogen, ABD
Asetik asit 100063	Merck, Almanya
Tris-Buffer Saline-Tween20	
LumiGLO Reagent A	Cell Signaling, ABD
Peroxide Reagent B	

3.1.2. Sarf Malzemeler

Çizelge 3.1.2. Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Temin Edildiği Yer
25 cm^2 ve 75 cm^2'lik flask	Sunub, Şangay
Farklı kuyu sayılı steril plateler	
Serolojik pipet(ler)	
Steril santrifüj tüpleri	
5 ml ve 10 ml hacimlerinde enjektörler	Genject, Türkiye
Pipet uçları	SSBio, ABD
Hücre Dondurma Tüpleri	Sarstedt, Almanya
iBlot™ Gel Transfer Sistemi Parçaları	Thermo Fisher Scientific, ABD
Hücre Sayım Lamı	
Pastör pipetler (ISOLAB)	ISOLAB, Almanya

3.1.3. Cihazlar

Çizelge 3.1.3. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Cihazlar	Temin Edildiği Yer
Spektrofotometre EL800UV	Analytik Jena, Almanya
Saf su cihazı Direct-Q® 3 UV	Merck, Almanya
Hassas terazi	Shimadzu, Japonya
Steril Kabin	Esco, Singapur
CO_2 inkübatörü	Panasonic, Japonya
Muse Akım Sitometrisi	Merck, Almanya
UV-Görüntüleme Cihazı (Fusion FX-7)	Vilber Lourmat, Fransa
Inverted mikroskop	EUROMEX, Hollanda
Aspiratör	Rocker 300, Tayvan
Mikrospin-Vortex cihazı (FV-2400)	Biosan, Letonya
Manyetik mini-karıştırıcı (HI190M)	Hanna Instruments, ABD
Mini santrifüj	Scan Speed, ABD
Soğutmalı Santrifüj (NF 800R)	Nüve, Türkiye
Buharlı sterilizatör (Otoklav)	

3.2.Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü, Kullanılan Besiyerleri, Bileşiklerin Hazırlanması

Hücre kültürü, organizmadaki ortam şartlarına uyumu sağlayan inkübatör cihazı içerisinde hücrelerin bölünüp çoğalmasına olanak sağlayan son derece hassas bir tekniktir. Bu amaçla öncelikle, sıvı azot tankında dondurucu çözelti içerisinde saklanan insan kolon kanseri hücreleri (HCT-116 ve HT-29) sıcak su banyosuna alınarak hızlı bir şekilde çözüldü. Hücre süspansiyonu; insan kolon kanseri hücreleri (HCT-116 ve HT-29) için hacimce (v/v) %10 fetal bovin serum (FBS), %1 pensilin streptomisin, %1 non-essential amino asit (NEAA) ve RPMI-1640, insan sağlıklı kolon hücreleri CCD18-Co içinse hacimce (v/v) %10 fetal bovin serum (FBS), %1 pensilin streptomisin ve DMEM(1X) medium bileşenlerine sahip besiyeri içerisine alındı. Falkon tüpler 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatan kısım uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 5 ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı ve 25 cm^2'lik flasklar içerisine alınarak fizyolojik ortam koşullarında 37°C'de, %5 CO^2 'li inkübatörde kültüre edilip çoğaltıldı.

Deney aşamasında tüm hücrelerle aynı anda ekime başlamak için, 25cm^2'lik flask yüzeyini %90 oranında kaplayan (konfluent) kanser hücrelerine pasaj işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla öncelikle flask içerisindeki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Zemine yapışamayan/ölü hücrelerin uzaklaştırılması için flask içerisine 2ml 1x PBS ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandıktan sonra pipet yardımıyla ölü hücreler uzaklaştırıldı. Flask yüzeyine yapışan hücrelerin ayrılması için 0,5 ml civarı % 0,05 Tripsin-EDTA çözeltisi kullanıldı ve hücreler flask zemininden kalkana kadar inkübatörde bekletildi. Mikroskop altında hücrelerin yüzeyden kalkmaları gözlendikten sonra tripsin çözeltisinin hücre membranına zarar vermesinin engellenmesi için en az 10 katı kadar besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, santifüj yapılmak üzere falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatan kısım uzaklaştırıldı ve oluşan pellet yoğunluğuna göre hücreler uygun hacimde besiyeri ile çözündükten sonra deney planına göre bir kısmı 25cm^2'lik flaska geri ekildi, bir kısmı ise hücre stoğu oluşturmak üzere kapandı. Tüm hücrelerle aynı anda deneye başlamak adına istenilen sayıya gelene kadar inkübatörde çoğalmaları sağlandı.

Hücre kapatma işlemi için, pasaj işleminde gerçekleştirilen tripsin ile kaldırma aşamasının sonuna kadar tüm adımlar benzer şekilde uygulandı ve santrifüj sonrası süpernatanı uzaklaştırılan pellete, her bir kriyovial için yaklaşık 8 x10^5 hücre/ml olucak şekilde sayım yapılarak uygun hacimde dondurucu çözelti (5ml DMSO + 5ml FBS + 40ml DMEM falkon tüp içerisinde önceden hazırlandı) karanlık ortamda ilave edildi. Hücre süspansiyonu 1'er ml hacimde kriyovialler içerisine bölünerek -80 ºC'ye kaldırıldı.

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsin ile kaldırılıp santrifüj ile çöktürülen pellet üzerine besiyeri eklenmesi sonucu süspanse tek-hücre yapısında bulunan hücrelerden 20 µl alınarak 0,5 ml'lik eppendorf tüpe eklendi ve üzerine eşit miktarda % 0,5(v/v) tripan mavisi konarak iyice karışması sağlandı. Hemotositometre(thoma lamı) %70'lik etil alkol ile iyice temizlendi ve kurulandı. Ardından 2 gözeneğine hücre-boya karışımından 10'ar µl konularak mikroskopta hücre sayımı yapıldı. Elde edilen sonuç, sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml'deki hücre sayısı hesaplandı.

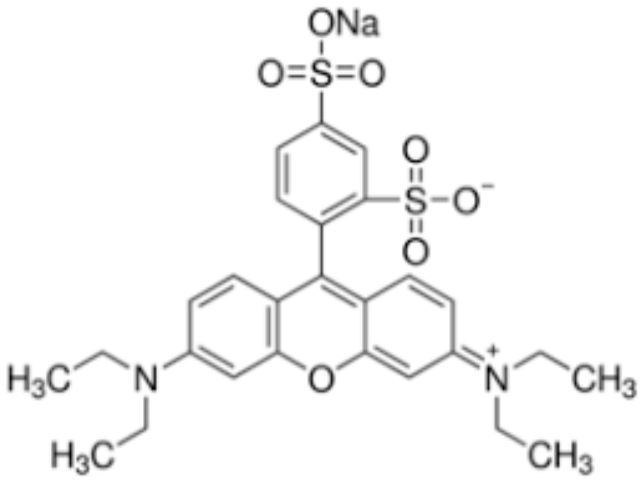
Liyofilize halde bulunan 3-nitrofenil kalkon türevinden, DMSO (dimetilsülfoksit) oranı %0.01'i geçmeyecek şekilde (toksik olmayan oran), 50 mM ana stok çözeltisi DMSO çözücüsü içerisinde hazırlandı. Stok çözelti alikotlar halinde -20°C'de saklandı. Kalkon türevinin, hücrelere sitotoksik etkisini ve ileri analizlerde kullanılacak dozlarını belirlemek için farklı konsantrasyonlarda seyreltilerek SRB canlılık analizi yapıldı.

3.2.2. SRB Canlılık Analizi

SRB metodu, hücrelerdeki total protein miktarının ölçümüne dayanarak hücre canlılığını belirlemek için kullanılır (Vichai ve Kirtikara, 2006). Bu metot, Amerika'da bu alanda referans merkez olarak kabul edilen NCI (Ulusal Kanser Enstitüsü)'nın da çalıştığı bir yöntem olduğundan, ilaç kaynaklı sitotoksisite ve anti-kanser etkinin belirlenmesinde kullanılan temel bir analiz yöntemidir (Orellana ve Kasinski, 2016).

SRB, asidik koşullar altında membran bütünlüğü bozulmamış hücrenin yüzeyindeki bazik aminoasit gruplarına bağlanan ve bazik koşullar altında ayrışan iki sülfonil gruba sahip parlak-pembe bir aminoksanten boyadır (Şekil 3.2.2) ve spektrofotometre ile ölçüm sonucunda bağlanan boyanın miktarı, hücre yoğunluğunun kantitatif analizinin yapılmasına imkan sağlar (Kamiloglu ve ark., 2020).

SRB testi için, uygulanacak 3-nitrofenil kalkon türevinin insan kolon kanseri (HCT-116 ve HT-29) hücreleri ve aynı dokudaki sağlıklı hücre üzerine olası toksik etkisinin belirlenmesi adına insan sağlıklı kolon (CCD18-Co) hücreleri $5x10^3$ hücre/kuyucuk olacak şekilde besiyerleri içinde 96 kuyucuklu platelere 100'er µl ekildi. Hücrelerin ekimi her doz için 3 kuyu tekrarı olacak şekilde gerçekleştirildi. Hücreler ekildikten hemen sonra 3-nitrofenil kalkon türevi ayrı bir plate içerisinde 25 µM'dan başlayarak 0,39 µM doza kadar seri dilüsyon yöntemiyle seyreltilip 100 µL hacimde hücrelerin üzerine uygulandı. Kalkon türevi uygulanmamış hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. Plate düz bir zemin üzerinde dikkatlice döndürülerek hücrelerin eşit bir şekilde dağılması sağlandı ve dağılımları mikroskopta gözlendikten sonra inkübatöre alındı. Hücreler, 24 ve 48 saat tedavi süresi boyunca 3-nitrofenil kalkon türevi ile inkübe edildi. Ayrıca, kemoterapötik olarak klinikte kullanılan 5-FU ile kombinasyon çalışması yapmak üzere, hücreye tek başına uygulandığında toksik olmayan doz değeri 12.5 TDC ("test drug concentration") dozu seçilerek kalkon türevi ile birlikte 48 saat hücrelere uygulandı. Tedavi süresince 37°C'de, %5 CO_2'li koşullarda inkübatörde bekletildi. Sürenin sonunda kuyulara % 10 (w/v) TCA (triklorik asit) çözeltisinden 50 µl eklenerek +4 ºC'de 60 dk inkübasyona bırakıldı. Kuyulardaki TCA, deiyonize su 5 kez yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra % 0,4 w/v SRB boyasından 50 µl eklenerek 37ºC'de karanlıkta 30 dk inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kuyular hacimce %1'lik asetik asit çözeltisi ile 5 kez yıkandı ve ardından tüm kuyulara 10mM (pH: 10.0) Tris bazından 150 µl eklenerek renk oluşumu spektrofotometre ile 564 nm'de ölçüldü.



Şekil.3.2.2. Sulforhadamine B moleküler yapısı (NCBI, 2022)

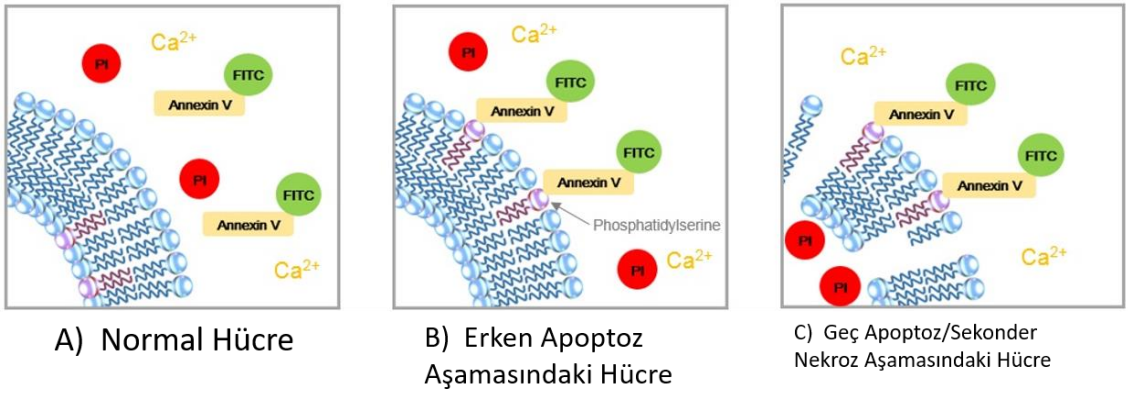
Canlılık hesabı (%): Tedavi edilen hücrelerin canlılık değerleri (Örnek Absorbans), tedavi edilmemiş kontrol hücrelerinin canlılık değerleri (Kontrol Absorbans) referans alınarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Canlılık (%) = [100 x (Örnek Absorbans)/(Kontrol Absorbans)]

3.2.3. Hoechst, Anneksin-V, Propidyum İyodür Floresan Boyama

Floresan boyalar, hücre yüzeyinde veya içerisindeki antijenlere bağlanıp onları mikroskop altında görünür hale getirebilmektedir. Apoptotik hücreler; çekirdeğin normal hücrelere kıyasla kısalıp kalınlaştığı(piknotik) ve membran bütünlüğünün geç safhaya kadar korunduğu bir morfolojide iken, nekrotik hücreler ise çekirdeğin normal hücrelere oranla daha büyük olması ve membranlarının genişleyerek geç safhada bütünlüğünün kaybolması ile karakterizedir(Ulukaya ve ark., 2011). Anneksin-V (Yeşil), apoptozisin erken aşamasında gerçekleşen kaspaz aktivasyonu sonucu hücrenin dış yüzeyine doğru konumlanan fosfotidilserine özgü floresan işaretli antikor olup floresan mikroskobu altında erken apoptotik hücrelerin tespitinde kullanılmaktadır (De ve ark., 2018). Hoechst 33342 (Mavi) boyası, canlı veya ölmekte olan(apoptotik/nekrotik) hücrelerin içerisine girip DNA'ya bağlanarak apoptotik/sekonder nekrotik hücrelere özgü olan piknotik çekirdek ve genel olarak hücrenin hacmi hakkında bilgi vermektedir fakat hücrenin erken ya da geç apoptotik aşamada olduğunu belirlemek için geç apoptotik aşamaya/sekonder nekroza özgü boya olan ve sadece hasarlı membrandan içeri geçebilen PI(Kırmızı) boyası kullanılabilmektedir (Şekil 3.2.3).

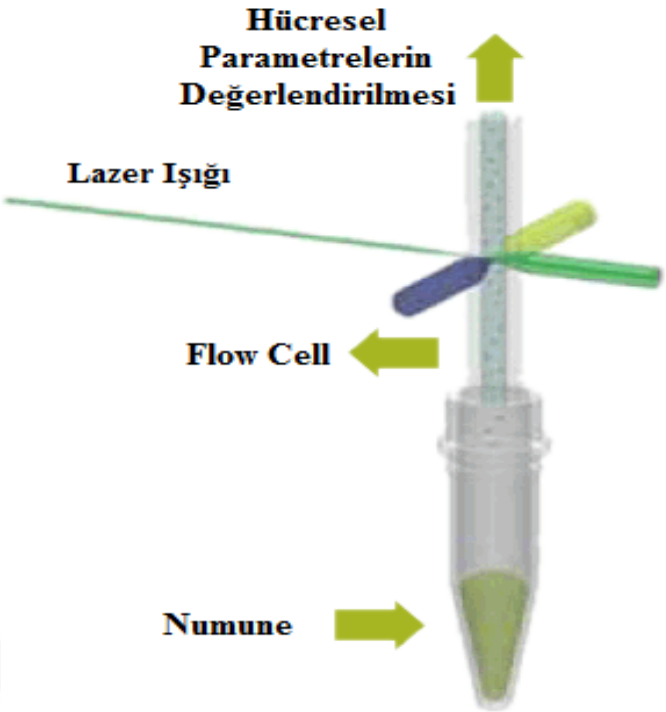
İnsan kolon kanseri hücreleri (HCT-116 ve HT-29) sayılarak 96 kuyulu platelere 100 µl içerisinde 5×10^3 hücre/kuyucuk 3 tekrarlı olacak şekilde ekim yapıldı (hücre sayısı, literatürdeki çalışmalar göz önünde bulundurularak yapılan optimizasyon sonucu belirlendi). Hücrelerin eşit dağılmasına dikkat edilerek zemine yapışması için bir gece inkübatörde bekletildi. Ertesi gün, hücre canlılık analizi sonucunda belirlenen etkin doz miktarını kapsayacak şekilde 3-nitrofenil kalkon türevi ayrı bir platede içerisinde seyreltilip 100 µL hacimde hücrelerin olduğu plate kuyularına dikkatli bir şekilde eklenip 37^0C'de %5'lik CO_2'li ortamda erken apoptotik hücreleri tespit edebilmek amacıyla 24 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda deney protokolüne uygun olarak floresan mikroskop altında 20x objektifte, her kuyuda 3 farklı boya analizi için aynı alanın görüntüsü kaydedildi.



Şekil 3.2.3. Hücre ölüm modunun floresan boya ile tespiti (Bu şekil, Woitok ve ark. (2020)'den uyarlanmıştır [s. 6] ve Biorender ile çizilmiştir)

3.2.4. Kaspaz 3/7 Aktivite Analizi

Akım sitometresi kullanılarak yapılan analizler genel olarak, süspanse (tek hücre) haldeki hücrelerin sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmesi esnasında ölçümüne dayanır. Akış sitometri cihazında bir saniyede binlerce hücre, flow cell adlı bölümden geçerken lazer ışığı tarafından uyarıldıklarından diğer bir ifadeyle ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, floresan ışığı yayarlar (Şekil 3.2.4). Floresan mikroskop analizine benzer şekilde hücrelerdeki antijenlere özgü floresan ışıma veren boyalar kullanılarak, analiz başladıktan sonra oluşan akış esnasında hücrelerin lazer ışını ile karşılaştığında verdiği floresan sinyaller sayesinde kantitatif olarak hücre miktarı belirlenmektedir (Ribera ve ark., 2002).



Şekil 3.2.4. Akış sitometrisinde lazer yardımıyla örnek tespiti (Bu şekil Luminex (2022) klavuzundan uyarlanmıştır [s. 3])

Akım Sitometrisi ile apoptozis varlığının belirlenmesi için öncelikle kontrol ve tedavi grubunda yer alan insan kolon kanseri hücreleri (HCT-116 ve HT-29), 6-kuyulu platelere 1 ml'de $1x10^5$ hücre/kuyucuk 2 tekrarlı olucak şekilde ekildi (Hücre sayısı, literatürdeki çalışmalar göz önünde bulundurularak yapılan optimizasyon sonucu belirlendi). 3-nitrofenil kalkon türevi, hücre canlılık analizi sonucunda belirlenen etkin doz miktarını kapsayacak şekilde 6-kuyulu platede içerisine dikkatli bir şekilde eklenip 37^0C'de %5'lik CO_2'li ortamda 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler plate zemininden kaldırılıp yüzeylerindeki veya hücre içindeki proteinlere özgül floresan işaretli Kaspaz 3/7 antikorlarıyla inkübe edildi (Crowley ve Waterhouse, 2016). Akım sitometrik incelemede farklı florokromlar ile işaretlenen hücrelerin, basınç altında "flow cell" kısmından geçme esnasında lazer ışını yardımıyla floresan ışımaları kaydedildi. 2. deney setinde yapılan 3'lü boyama ile ölüm modu tespit edilen hücrelere bu aşamada Muse™ Cell Analyzer (Millipore, Almanya) cihazında MuseTM Kaspaz 3/7 Activity Kiti kullanılarak elde edilen kaspaz 3/7 aktivite analizi değerleri ile apoptotik oran (Q2+Q4) hesabı yapıldı (Şekil 3.2.4.1).

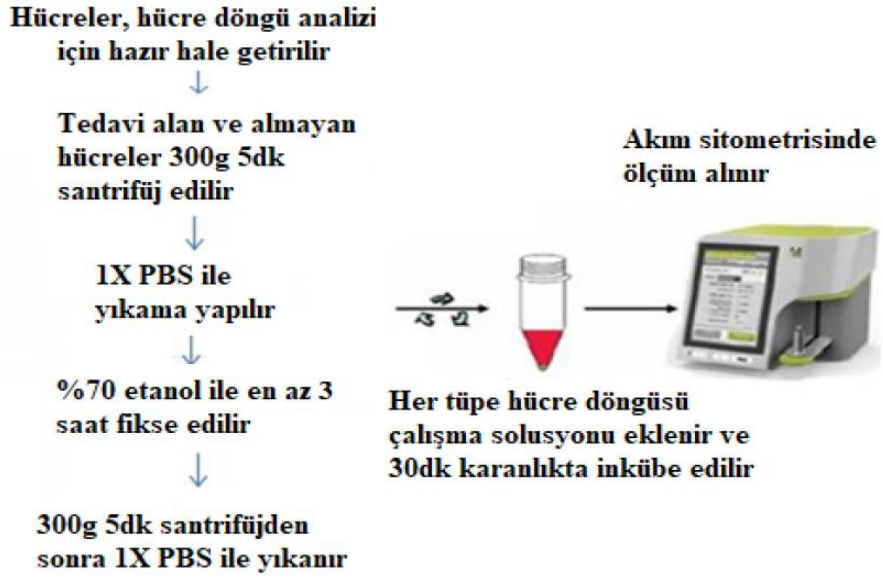


Şekil 3.2.4.1. Kaspaz 3/7 aktivitesinin ölçülmesi (Bu şekil, Millipore (2013) klavuzundan uyarlanmıştır [s. 2])

3.2.5. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü kontrol sisteminde görev alan siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKi) ile döngü esnasında olası bir hasarın yavru hücrelere aktarılması engellenmektedir. Hücreler, genetik mutasyonlar veya çevresel değişimler sonucunda hücresel bölünmeyi kontrol eden CDK inhibitörlerinden kaçarak tümör oluşum sürecine girerler. Zamanla, bu hücreler normal dokuyu koruyan p53 gibi tümör baskılayıcı proteinlere karşı daha dirençli hale gelerek invazif ve metastatik kazanırlar. Bu nedenle kanser tedavisinde hücre döngüsünün hedeflenmesi ana amaçlardan biri olmaktadır (Blasi ve ark., 2016; Park ve Lee, 2003).

Akım sitometrisi ile hücrelerin hangi döngüde baskılandıklarının belirlenmesi için kontrol ve tedavi grubunda yer alan insan kolon kanseri hücreleri (HCT-116 ve HT-29), 6-kuyulu platelere 1 ml'de $1x10^5$ hücre/kuyucuk 2 tekrarlı olucak şekilde ekildi (hücre sayısı, literatürdeki çalışmalar göz önünde bulundurularak yapılan optimizasyon sonucu belirlendi). Literatüre bakılarak, hücrelerin her bir bölünme zamanlarına göre uygulanan tedavi süresi sonunda hücreler plate zemininden kaldırılıp %70'lik soğuk ethanol içerisinde inkübe edilerek lizat elde edildi. Kit prosedürü takip edilerek hücrelerin döngü fazlarındaki dağılımları Muse Cell Analyzer (Millipore, Almanya) cihazında "Muse® Cell Cycle Reagent" kullanılarak belirlendi (Şekil 3.2.5).



Şekil 3.2.5. Hücre döngüsü analizi aşamaları (Bu şekil, Millipore (2013) klavuzundan uyarlanmıştır [s. 2])

3.2.6. Hücre Migrasyon Analizi

Kanserin ileri evrelerinde, hücreler normal doku sınırlarını aşarak vücutta farklı yerlere metastaz süreci ile yayılım yapabilmektedirler (Wang ve ark., 2019).

Uygulanan ilacın, hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimlerine etkisinin belirlenmesi amacıyla tek tabakalı (monolayer) yara iyileşmesi deneyi yapıldı. İnsan kolon kanseri hücreleri (HCT-116 ve HT-29) her kuyucukta 1 ml'de $15x10^4$ hücre 2 tekrarlı olacak şekilde 6 kuyulu platelere ekildi (hücre sayısı, literatürdeki çalışmalar göz önünde bulundurularak yapılan optimizasyon sonucu belirlendi) ve 37ºC'de %5'lik CO_2'li inkübatöre kaldırıldı. Kuyulardaki hücre alanı %90 doluluk oranına ulaşınca 200 µl'lik pipet ucuyla yüzeyde dikkatlice yatay ve dikey çizgiler oluşturulup kalkan hücreler 1x PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Ardından kontrol grubundaki hücrelere kendi besiyerleri eklenirken tedavi kuyularına da hücre canlılık dozlarına göre belirlenen 3-nitrofenil kalkon türevi uygulandı. Yara oluşturulmuş hücrelerin 0. saat görüntüleri invert mikroskopla 4x objektifte fotoğraflandı. Yara iyileşmesinin takibi 12'şer saat arayla, 48 saat tedavi süresi boyunca aynı noktadan görüntüleri alındı. Kalkon türevinin, doza ve zamana bağlı olarak hücrelerin yayılmaları üzerindeki etki oranı değerlendirildi.

3.2.7. Koloni Oluşturma Yeteneği Analizi

Klonojenik test veya koloni oluşumu testi, tek bir hücrenin bir koloni halinde büyüme yeteneğine dayalı hücre sağkalım testidir (Puck ve Marcus, 1956). Koloni; en az 50 hücreden oluşacak şekilde tanımlanmıştır. Bu yöntem, popülasyondaki her hücreyi "sınırsız" bölünmeye uğrama yeteneği açısından test eder (Crowley ve ark., 2016).

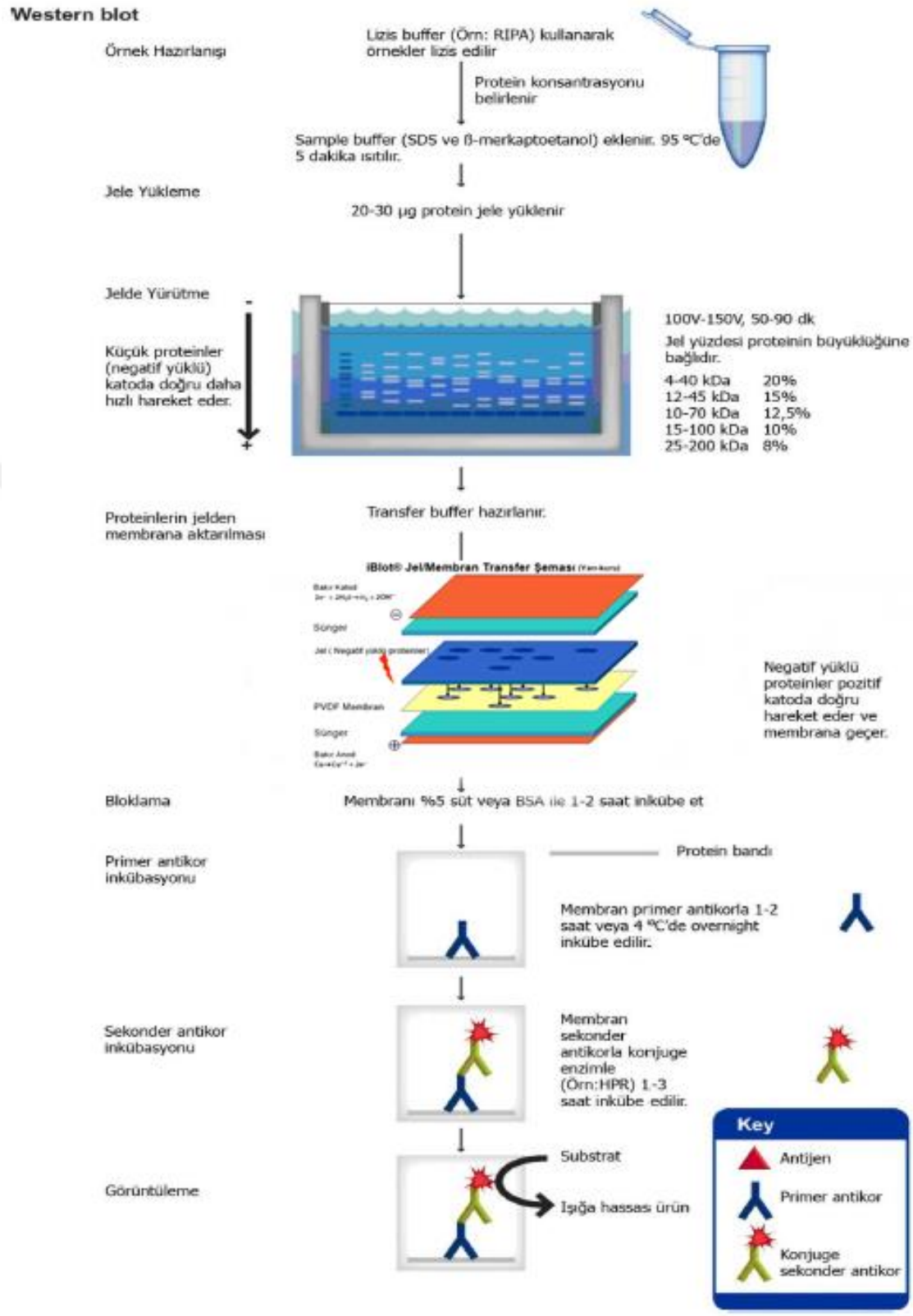
İnsan kolon kanseri (HCT-116 ve HT-29) hücrelerinin uygulanan ilacın dozuna bağlı olarak koloni oluşturma yeteneğindeki değişimleri kalitatif olarak gözlemlemek için öncelikle her kuyucukta 1 ml'de 2000 hücre olucak şekilde 6 kuyucuklu platelere 2 tekrarlı ekildi (hücre sayısı, literatürdeki çalışmalar göz önünde bulundurularak yapılan optimizasyon sonucu belirlendi). Hücreler tek-tek konumlandıkları ve görece az miktarda oldukları için zemine yapışmalarını sağlamak adına bir gece 37ºC'de %5'lik CO_2'li inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, SRB canlılık analizi sonucunda belirlenen doz değerlerine göre tedavi grubuna 3-nitrofenil kalkon türevi uygulandı ve 48 saat inkübusyona bırakıldı. Kontrol grubunda koloni başına 50 hücre oluşana dek 3 günde bir ilaçsız/taze besiyeri ile değiştirilerek hücrelerin büyümesi düzenli aralıklarla invert mikroskopta incelendi. Süre sonunda kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılıp her kuyuya 1 ml soğuk metanol konularak 15 dakika boyunca -20°C'de fikse edildi. Metanolün uzaklaştırılması için, 1 ml PBS(1X) ile 1 defa yıkama yapıldı, ardından 1 ml %0,05 (v/v) kristal viyole (metanol içerisinde hazırldı) ile 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilerek boyanmaları sağlandı. Süre sonunda, tekrar 1 ml PBS(1X) ile 1 defa yıkama yapıldı ve uygulanan tedavi dozuna bağlı koloni yoğunluğundaki değişim invert mikroskopta analiz edildi.

3.2.8. Western Blot Analizi

Moleküler biyolojide DNA'daki genetik bilginin RNA ve protein düzeyinde ekspresyon süreci 'santral dogma' olarak tanımlanmıştır. DNA'daki bilgi mRNA'ya transkripsiyon işlemi ile aktarılmakta, buradan da tRNA yardımıyla ribozom içerisinde hücrenin tüm yapısal ve enzimatik fonksiyonları için gerekli olan proteinler translasyon işlemi ile sentezlenmektedir (Taylor, 1998). Western blot tekniği, genetik bilgi akışının son basamağı olan proteinlerin tespit edilmesine dayanır (Lüleyap, 2021). Tekniği ilk tanımlayan 1979 yılında H. T. Towbin'dir (Towbin ve ark., 1979). Genel olarak, elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin destek membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immunolojik metotlarla ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Proteinler; hücre yüzeyi, hücre içi sitozolik ve çekirdek kaynaklı olabilmektedirler (Devita ve ark., 2001). Diğer bir tanımı 'immunoblotlama' olan yöntem sayesinde kanser açısından örnek verilecek olursa, dokudaki sağlıklı ve kanserli hücrenin protein düzeyinde profilleri karşılaştırılarak erken evrede önemli rol oynayabilecek biyobelirteç keşfi ile hasta sağ kalım oranını arttırabilecek potansiyelde hedefe yönelik tedavi yöntemleri belirlenebilmektedir (Doğan ve Güç, 2004).

Western blotlama tekniği genel olarak 4 basamaktan oluşmaktadır:

1. Proteinler, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle ayrıştırılır.
2. Ayrıştırılan proteinler, elektrik alan yardımıyla nitroselüloz membrana aktarılır.
3. Analizi yapılmak istenen proteine özgü birincil ve ikincil antikorlar ile bağlanma işlemi gerçekleştirilir,
4. Son olarak, floresan madde içeren ikincil antikor bağlı proteinin, görüntüleme solüsyonu içerisinde analizi gerçekleştirilir (Şekil 3.2.8).



Şekil 3.2.8. Western Blot tekniği aşamalarının şematik gösterimi (Bu şekil, Abcam-Protokol Kitabı (2010)'ndan uyarlanmıştır [s. 21])

Western Blot analizi için insan kolon kanseri hücreleri (HCT-116 ve HT-29) $1x10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde (hücre sayısı, literatürdeki çalışmalar göz önünde bulundurularak yapılan optimizasyon sonucu belirlendi) 6 kuyucuklu platelere 1'er mL 2 tekrarlı ekildi. Hücreler ekildikten hemen sonra, SRB canlılık analizi sonucunda belirlenen doz değerlerine göre tedavi grubuna 3-nitrofenil kalkon türevi uygulandı ve 48 saatlik tedavi süresince 37°C'de, %5 CO_2'li koşullarda inkübe edildi. Hücrelere, lizat hazırlama aşamasına geçmeden mikroskopta morfoloji analizi yapıldı.

Hücrelerden lizat eldesinde kullanılan RIPA-Lysis Extraction Buffer çözeltisi, hücrenin çekirdek ve hücre membranını parçalayıp hücre-içi proteinlerin dışarı çıkmasını sağlar. Böylece western blot tekniği için hücresel proteinler buffer içerisine toplanmış olur. Bu amaçla öncelikle, içeriği aşağıda maddeler halinde verilen RIPA çözeltisi, yarılanma ömrü yaklaşık 30 dk olduğu için hücreler 6-kuyucuklu plate zemininden kaldırılmadan hemen önce hazırlandı. Lizat işlemi, protein degredasyonunu önlemek için son aşamaya kadar buz aküsü üzerinde ve solüsyonun içerisindeki PMSF bileşeni ışığa duyarlı olduğundan dolayı karanlıkta gerçekleştirildi. Lizat işlemindeki görevleri verilen aşağıdaki bileşenler sırasıyla ependorf tüpe alınarak RIPA çözeltisi hazırlandı;
3 mL Lysis Buffer/RIPA ; İçeriğindeki Tris-HCl, NACl, NP-40, Sodium Deoxycholate ve SDS bileşenleri aracılığıyla sitoplazmik, hücre iskeleti ve hücre dışı matrix proteinlerini açığa çıkarmakta görevlidir. (100 mM) 30 uL Sodium Orthovanadate; ATPazları, Tirozin Fosfatazları ve diğer fosfat-transferring enzimlerin sayılarını azaltır. Böylece hücresel proteinlerin degredasyonunu önler. 45 uL Protease Inhibitör Cocktail; Protein degredasyonunu önler. (200 mM) 30 uL PMSF (Fenilmetil sülfonil florür)(en son eklenir); Serin proteaz inhibitörü (DMSO veya %100 EtOH'de çözünür. P-470, mW:174,19 g/mol).

Hazırlanan çözelti buz üstünde karanlıkta bekletilerek hücre kaldırma aşamasına geçildi. Hücreler tripsin ile kuyulardan etiketli falkonlara alınıp santrifüj ile çöktürüldükten sonra supernatan uzaklaştırıldı. Pellet üzerine önceden hazırlanmış olan RIPA çözeltisi eklenip +4º'te 30 dk inkübasyona bırakıldı. 30. dk'da falkondaki hücrelere santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası hücresel proteinlerin bulunduğu supernatan etiketli yeni ependorflara aktarıldı. Protein miktarlarını ölçmek üzere Biçinkoninik Asit (BCA) yöntemi ile konsantrasyon hesabı yapıldı.

3.2.8.1. BCA Yöntemi ile Konsantrasyon Hesabı

BCA protein konsantrasyon hesabı yöntemi, protein-çözelti karışımında oluşan renk değişimi şiddetinin spektrofotometrede kantitatif ölçümü prensibine dayanır., Ölçüm için kullanılan Biçinkoninik Asit Kit (Sigma, St. Louis, MO) içerisindeki bakır sülfat, BCA çözeltisine (50 Reagent A : 1 Reagent B) eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk alır (Çalışma çözeltisi). Protein içeriği çalışma çözeltisi ile tepkimeye girdiğinde Cu^{+2} değerlikli iyon yükü Cu^{+1}'e indirgenirken, BCA'nın protein dizisinde sistein, triptofan ve tirozin aminoasitleri ile peptid bağı kurması sonucu mor renk oluşumu gözlenir. Bu yöntem hızlı, hassas ve kesindir ancak deterjan ve organik solventlerle etkileşimlerine dikkat etmek gerekmektedir.

BCA yöntemi ile protein miktarlarını belirlemek için öncelikle konsantrasyonlarını bildiğimiz standart çözeltiler hazırlandı. Bu amaçla buz aküsü üzerindeki 96 kuyulu plate içerisinde, 2 mg/mL sığır serum albumin (BSA) proteininin 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 mg/ml konsantrasyonları ultra saf dH2O ile hazırlanarak bir alt kuyulara iki tekrarlı olucak şekilde 10'ar uL eklendi. Ardından, -20 ºC'deki konsantrasyonu bilinmeyen protein lizatları dışarı çıkartılarak hızlıca çözünmeleri sağlandıktan sonra 96 kuyulu plate içerisine iki tekrarlı olucak şekilde 10'ar uL eklendi. Ekim yapılan tüm kuyulara bir önceki aşamada hazırlanmış olan çalışma çözeltisinden 190'ar uL hızlıca eklendi. Plate, standart çözeltiye ait her bir kuyucuk arasındaki renk farkı belirgin oluncaya kadar (≈15 dk) oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Süre sonunda oluşan renk şiddeti, spektrofotometrede 570 nm'de okundu. Yapılan ölçüm sonucunda, excell dosyasında standart çözeltiye ait absorbans/protein konsantrasyon denklemi kullanılarak lizat çözeltilerindeki protein konsantrasyonu hesaplandı.

3.2.8.2. Elektroforez ve Transfer Aşaması

BCA ile total konsantrasyonları ölçülen hücresel proteinlerin, elektriksel alan altında moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılması işlemine elektroforez adı verilmektedir. İşleme başlamadan önce, proteinlerin jelde yürümesi ve sonraki aşama olan görüntüleme için gereken çözeltiler hazırlandı.

Running Buffer: 30ml Running buffer, ultra saf H_2O ile 600 ml'ye tamamlandı (pH:8). TBS-T (Tris-Buffer Saline-Tween20, 10X, pH:7,6): Tris baz 24,23g (Scharlau, Barcelona, Spain), NaCl (Merck, Darmstadt, Germany) 80,06g ve Tween20'den (Dako, CA, USA) 5ml alınarak total hacim 1L'ye ultrasaf H_2O ile tamamlandı.

Her kuyuya eşit miktarda (30 µg) yüklenmesi adına protein örneklerinin uygun hacimleri hesaplanarak, Nu-PAGE LDS Sample Buffer ve Nu-PAGE Sample Reducing Agent çözeltileri final konsantrasyonları 1X olacak şekilde 0.5 ml'lik ependorf tüplere pipetlendi. Tüpler buz aküsü üzerinden alınarak thermal blokta 95 ºC'de 7 dk inkübe edildi. Böylece protein zincirlerinin primer yapılı hale gelmesi sağlandı.İnkübasyona başlamadan önce tüplerin kapakları enjektör iğne ucu ile delindi. Kaleidoscope Prestained Standarts (Biorad, CA, USA) protein belirteci(marker), jel kuyusuna yüklenmeden önce 95 ºC'de 2 dk bekletildi.

Preteinlerin ısı ile denaturasyonu sürerken, diğer yandan elektroforezin yapılacağı tank kullanıma hazır hale getirildi. Bunun için öncelikle tank saf su ile yıkandı. Ardından buz dolu bir kaba düz zemin olucak şekilde yerleştirildi. % 4-12 gözenek yoğunluk oranında, NuPAGE Bis-Tris Mini Gels, 1 mm, 12 kuyucuk (İnvitrogen, CA, USA), paketinden çıkartıldı. Tarak dikkatli bir şekilde yukarı doğru hareket ettirilerek kuyuların belirgin hale gelmesi sağlandı. Jelin alt tarafındaki prob kısmın önündeki beyaz bant kaldırıldı. Ardından, yükleme kuyuları içe bakacak şekilde jel tanka yerleştirildi ve sızdırmayı önlemek için tank kilidi ile sabitlendi. Tarak duvarındaki işaretli yere kadar iç kısımdan x20 MES SDS Running Buffer eklendi. Jelde bulunan koruma sıvısı pipet yardımıyla al-ver yapılarak uzaklaştırıldıktan sonra 500 µl Nu-PAGE Antioksidant (İnvitrogen, CA, USA) eklendi.

Protein örneklerinin inkübasyon sürelerinin bitmesinin ardından, her kuyuda eşit konsantrasyonda yer alıcak şekilde farklı hacimlerde protein örnekleri ve 5 µl protein belirteci kuyulara yüklendi. 150 V (değişken akımda) 40 dk yürütme yapıldı. Örnekler jelden dışarı çıkmadan önce yürütme durduruldu.

Elektroforez işlemi sonucunda jelde oluşan bantların, görüntüleme yapılacak membrana elektrotransfer işlemi gerçekleştirildi. I-Blot jel transfer cihazına (İnvitrogen, CA, USA) alttan üste doğru sırasıyla anot bakır (+), membran, jel, filtre kâğıdı (ultra saf qH_2O ile ıslatıldı), katot bakır (-) ve sünger yerleştirildi. Üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda 8 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.2.8.3.Proteinlerin Belirlenmesi

-Bloklama

Bir kaba %5'lik yağsız kuru süt (25 mL/membran, 1x TBST) çözeltisi hazırlandı. Membran, bloklama çözeltisinde opsiyonel olarak shaker kullanılarak düşük bir hızda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bloklama sayesinde membrana non-spesifik bağlanmalar engellenmiş olur.

-Yıkama

3 kere 5 dk boyunca 1x TBST ile hafifçe köpürmesini sağlayacak şekilde membran elde yıkandı.

-Primer Antikor

Membran, 20-25 mL antikor çözeltisi içerisindeki kapta, +4'te bir gece boyunca opsiyonel olarak shaker üzerinde inkübe edildi. ilk olarak, bu aşamaya kadar ki işlemlerin kontrolü adına ilk olarak Gapdh housekeeping (her hücrede protein ifadesi mevcut olan) proteinine bakıldı. Ardından sırasıyla; Bcl-2, Bip, Parp ve DR-4 proteinlerine bakıldı.

-Yıkama

3 kere 5 dk boyunca 1x TBST ile hafifçe köpürmesini sağlayacak şekilde membran elde yıkandı.

-Sekonder Antikor

Membran, 20-25 mL sekonder antikor çözeltisi içerisindeki kapta, oda sıcaklığında karanlıkta (alüminyum folyo ile kapatılır) 1 saat opsiyonel olarak shaker üzerinde inkübe edildi.

-Yıkama

3 kere 5 dk boyunca 1x TBST ile hafifçe köpürmesini sağlayacak şekilde membran elde yıkandı.

-Görüntüleme (ışığa duyarlı, karanlıkta çalışılır)

Görüntüleme solüsyonu hazırlandı: Lumiglo Reagent A (20X, Cell Signaling, MA, USA) ve Peroksidaz Reagent B (20X, Cell Signaling, MA, USA) falconda total hacim 50 mL olucak şekilde iki kat seyreltildi.

Membran(lar) 20-25 mL hazırlanan solüsyon ile 1 dakika inkübe edildikten sonra oluşan kemiluminesans sinyal, FusionFX-7 cihazı kullanılarak görüntülendi. Gelinen bu aşamanın sonucunda; nitroselüloz membran üzerine transfer edilmiş olan proteinler, floresan ışıma yardımıyla görüntülenmiş oldu.

3.2.8.4.Stripping / Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması

Birbirine yakın moleküler ağırlıklardaki proteinlerin western blot tekniği ile görüntülenmesi adına membrana stripping işlemi uygulanmaktadır. Bu amaçla, membrandaki halihazırda görüntülemesi yapılan proteinlere bağlı antikorları uzaklaştırmak için, üretici firmanın yeniden işaretleme (reprobing) protokolü uygulandı. Stripping solüsyonu hazırlamak için; 1,52 g Tris-baz, 4g SDS (BioChemica Applicham, Almanya) ve 1,4 ml ß-merkaptoethanol (Merck, Schuchard, Almanya) bir miktar ultra saf H_2O içerisinde çözdürülüp totalde 200 mL'ye tamamlandı. (1X, pH:6,8). 3 kere 5 dk boyunca 1x TBST ile hafifçe köpürmesini sağlayacak şekilde membran elde yıkandıktan sonra stripping solüsyonu eklenerek 150-300 rpm, 50ºC'de 30 dakika opsiyonel olarak shaker üzerinde inkübasyona bırakıldı. Sinyalin ortadan kalktığından emin olduktan sonra membran 3 kez 5 dakika 1X TBS-T ile yıkama yapıldı ve yeniden bloklama aşamasına geçildi. Şekil 3.2.8.6'da western blot tekniğinin temel basamakları şematik olarak açıklanmıştır.

Deneyde sırasıyla; Gapdh, Bcl-2, Bip ve Parp proteini ilk aşamada bakıldı. DR-4 membranda Gapdh ile çakışacağı için stripping yapıldı ve son olarak apoptozla ilişkili protein olan DR4 proteinine bakıldı.

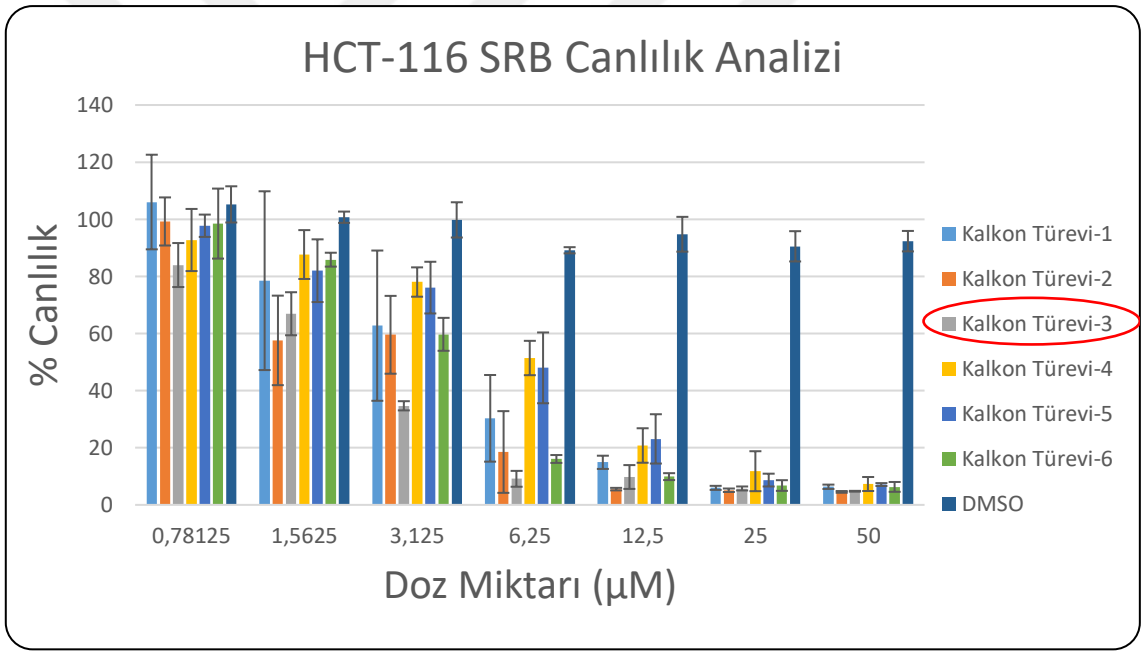
3.2.9. İstatistiksel Analiz

Sitotoksisite test sonuçları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edildi ve anlamlılığın fark grupları Tukey Honest Significance Testi (HSD) ile belirlendi. İstatistiksel anlamlılığın p değerleri <0,05 anlamlılık düzeyinde incelendi. Tüm veriler istatistiksel olarak GraphPad Prism 9.2.0 bilgisayar paket programı kullanılarak analiz edildi (Mitteer ve Greer, 2022).

4. BULGULAR

4.1. SRB Canlılık Analizi

Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümü tarafından sentezlenmiş ve karakterizasyonu tamamlanmış 6 farklı kalkon türevinden öncelikle sitotoksik etkisi en fazla olan türevi belirlemek üzere insan kolon kanseri hücrelerinde (HCT-116) 50 µM'dan başlayarak azalan konsantrasyonları ile 48 saat tedavi sonrası SRB canlılık testi yapıldı. Sonuçta, 3-nitrofenil kalkon türevinin (kalkon türevi-3) diğerlerine oranla daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği bulundu ve insan kolon kanseri hücreleri üzerindeki antikanser aktivite mekanizmasının belirlenmesine yönelik ileri analizlerde kullanılmak üzere kalkon türevi 3 seçildi (Şekil 4.1).

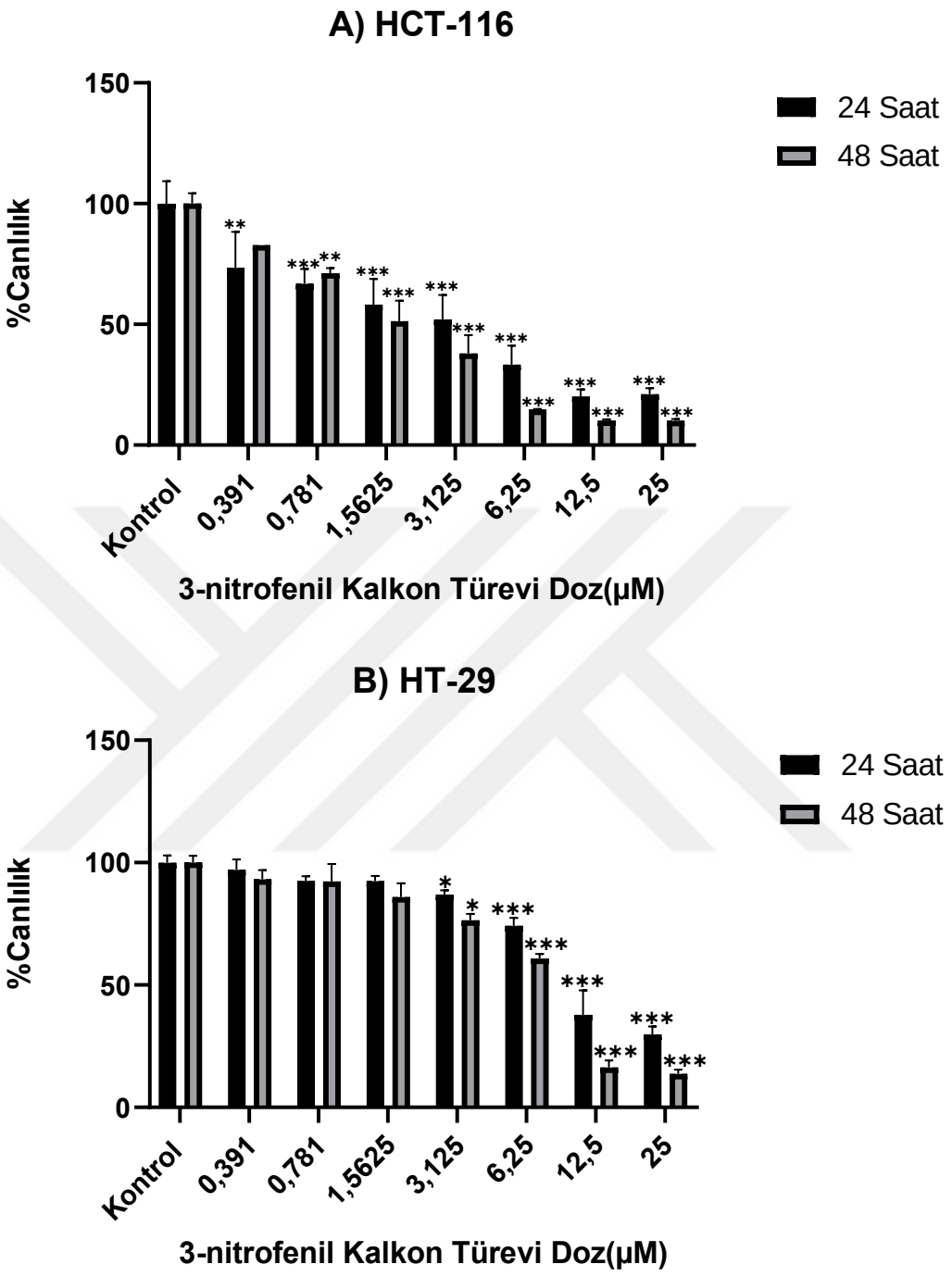


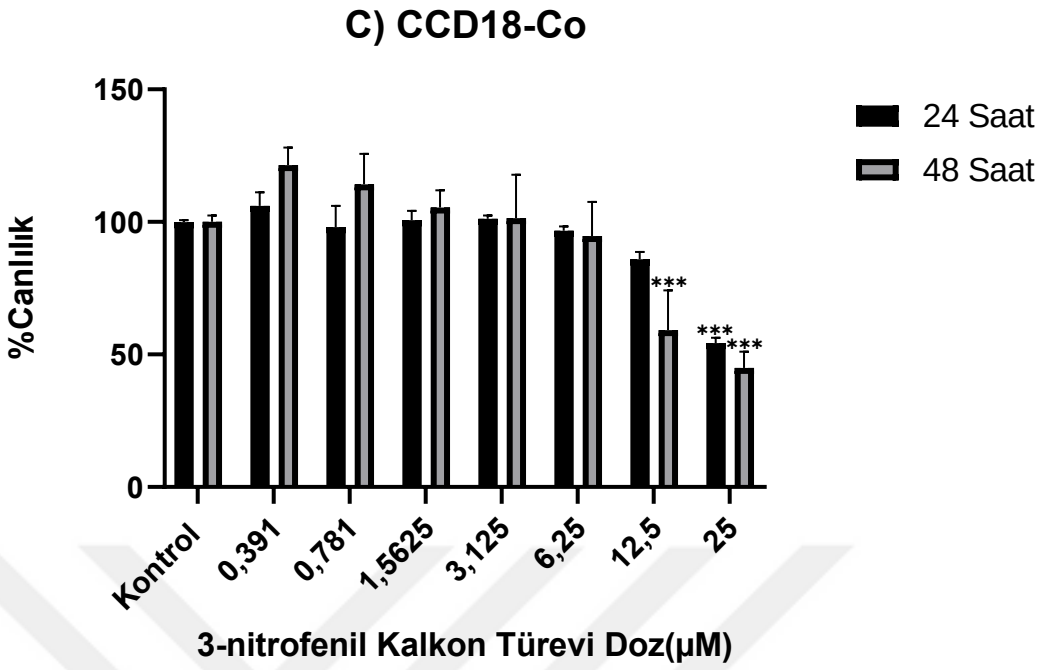
Şekil 4.1. Farklı kimyasal yapılara sahip kalkon türevlerinin HCT-116 hücrelerinde 48 saat tedavi sonrası SRB canlılık testi sonuçlarının yüzde grafiği

Farklı genomik ve morfolojik özelliklere sahip olan CCD18-Co (sağlıklı), HCT-116 ve HT-29 (kanser) insan kolon hücrelerine, 24 ve 48 saat boyunca 3-nitrofenil kalkon türevi, 25 μM'dan başlayarak azalan konsantrasyonları hücre besiyerinde hazırlanarak eş zamanlı uygulandı ve hücre canlılığı üzerine etkisi SRB testi ile belirlendi. 3-nitrofenil kalkon türevinin 24 saat uygulandığı HCT-116 insan kanser kolon hücrelerinde 0,39 μM dozundan itibaren kalkon türevi uygulanmayan hücrelere kıyasla hücre canlılığında anlamlı azalmalar gözlenirken, sitotoksisite analizlerinde ölçüt değer olarak kabul edilen hücrelerin %50'sini öldüren doz değerinin 3,125 μM civarı olduğu bulundu. 48 saat uygulama sonucunda ise 0,781 μM dozundan itibaren anlamlı azalmalar gözlenirken 24 saate kıyasla daha düşük doz değerinde sitotoksik etki (IC_{50}) gösterdiği tespit edildi. Totalde, zamana ve doza bağlı olarak hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlendi (Şekil 4.1.1 A) ($p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$).

HT-29 hücrelerinde 3-nitrofenil kalkon türevi uygulaması sonucu, HCT-116 hücrelerine kıyasla daha yüksek dozlarda sitotoksik etkiye neden olduğu görüldü. Her iki zaman periyodunda anlamlı azalmalar 3.125 μM dozundan itibaren gözlendi (Şekil 4.1.1 B) ($p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$). 24 saat sonunda, hücrelerin %50'sini öldüren doz değeri 10,4 μM iken, 48 saat sonunda bu değerin 7,76 μM'e düştüğü, dolayısıyla zamana bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığı belirlendi.

3-nitrofenil kalkon türevinin uygulandığı CCD18-Co sağlıklı kolon hücrelerinde, ise kanserli hücrelere kıyasla özellikle düşük dozlarda (0,39-6,25 μM) etkinin olmadığı görüldü. İnsan sağlıklı kolon hücrelerinde anlamlı azalmaya neden olabilecek sitotoksik (canlılığın %50 inhibe edildiği) değerin, insan kolon kanseri hücrelerindeki etkiye kıyasla ancak yüksek dozlarda (15-25 μM) kalkon türevi uygulanması sonucu meydana geldiği gözlendi (Şekil 4.1.1 C) Totalde, insan kolon kanseri hücrelerinde zamana ve doza bağlı olarak hücrelerin canlılık yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlendi. ($p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$).


A) HCT-116
24 Saat
48 Saat
%Canlılık
150
100
50
0
Kontrol
0,391
0,781
1,5625
3,125
6,25
12,5
25
3-nitrofenil Kalkon Türevi Doz(µM)
B) HT-29
24 Saat
48 Saat
%Canlılık
150
100
50
0
Kontrol
0,391
0,781
1,5625
3,125
6,25
12,5
25
3-nitrofenil Kalkon Türevi Doz(µM)



Şekil 4.1.1. 3-nitrofenil kalkon türevi (0,39-25 µM) uygulanan HCT-116 (A) HT-29 (B) ve CCD18-Co (C) hücrelerinde 24 ve 48 saat tedavi sonrası SRB canlılık testi sonuçlarının yüzde grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde tedavi uygulanmamış(kontrol) grubundaki verilere göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p<0,05$ **: $p<0,01$ ***: $p<0,001$) ifade etmektedir.

SRB analiz sonuçlarına göre; insan kolon hücrelerinde 3-nitrofenil kalkon türevinin sitotoksik aktivitesinin belirlenmesinde önemli olan IC_{50} (kontrol hücrelerine kıyasla hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon) değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

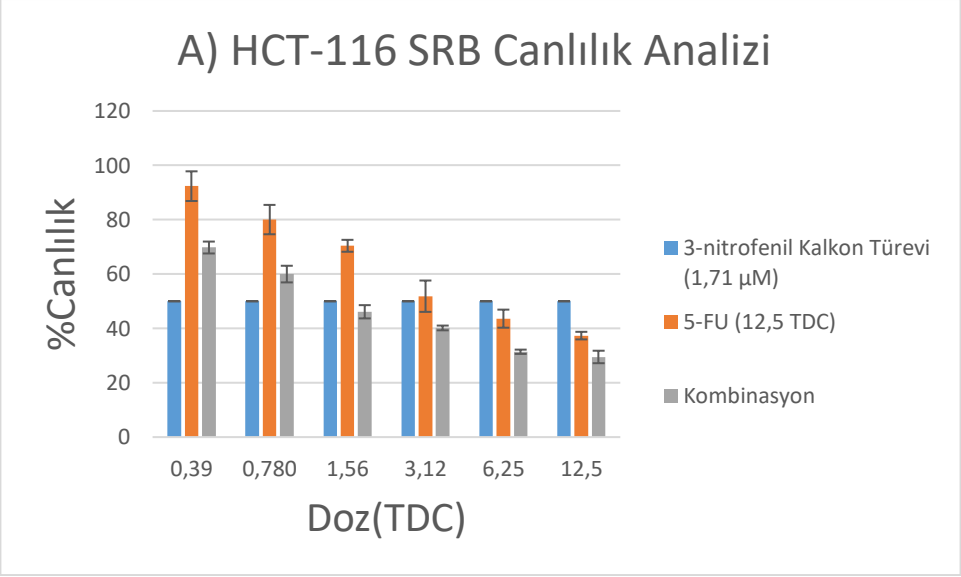
Çizelge 4.1. 3-nitrofenil kalkon türevi uygulanan HCT-116, HT-29 ve CCD18-Co hücrelerinde SRB canlılık testi sonuçlarına göre 24 ve 48 saat tedavi süresindeki IC_{50} değerleri

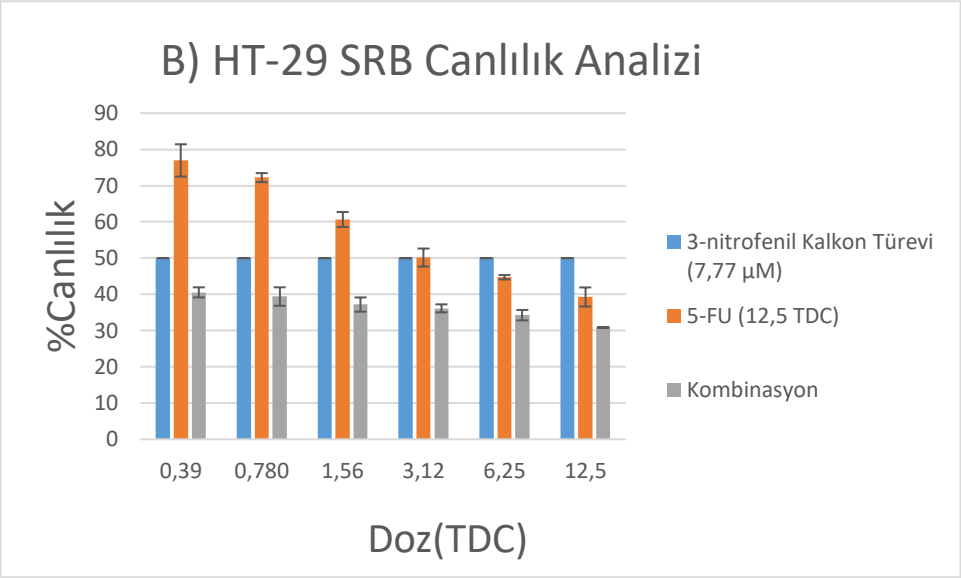
Hücre / Doz (µM)	HCT-116	HT-29	CCD18-Co
24 saat (IC_{50})	3,47	10,40	28,37
48 saat (IC_{50})	1,71	7,76	15,22

Ayrıca, kalkon türevinin klinikte kullanılmakta olan bir ilaç ile kombinasyon çalışması sonucu hücreye sitotoksik etkisinin ne yönde değişim göstereceğini belirlemek amacıyla, insan kolon kanserinde kullanılan kemoterapötik ilaç olan 5-FU'nun 12.5 TDC'den itibaren 0,39 TDC'ye kadar azalan dozları ve bir önceki canlılık analizi sonucu belirlenen 3-nitrofenil kalkon türevinin IC_{50} sabit dozları seçildi. 96 kuyucuklu plate içerisinde eş zamanlı kombinasyon tedavisi, 48 saat boyunca insan kolon kanseri hücrelerine (HCT-116 ve HT-29) uygulandı.

HCT-116 hücrelerinde, 5-FUv3-nitrofenil kalkon türevi kombinasyon uygulaması sonrası özellikle düşük dozlarda (0,39 – 1,56 TDC), kalkon türevinin tek başına olan etkisinden anlamlı ölçüde fark bulunmadığı, sağlıklı hücrelerde toksik etkiye neden olabilecek 6,258 TDC ve üzerindeki dozlarda kombinasyonun etkili olduğu gözlendi (Şekil 4.1.2 A).

HT-29 hücrelerinde, 0,39 TDC doz ile kombinasyondan itibaren 12,5 TDC doza kadar canlılık %30-40 seviyelerinde devam ettiği için anlamlı bir azalma olmadığı gözlendi. (Şekil 4.1.2 B). Genel olarak her iki hücrede de kombinasyonun etki oranı, türevinin tek başına olan etkisi ile benzer sonuç verdiği gözlendi. 5-FU&3-nitrofenil kalkon türevi kombinasyon çalışmasında ikinci bir kimyasalın hücreye ekstra olarak toksik etki oluşturabileceği düşünülerek sadece kalkon türevi ile ileri analizlerin yapılmasına karar verildi.





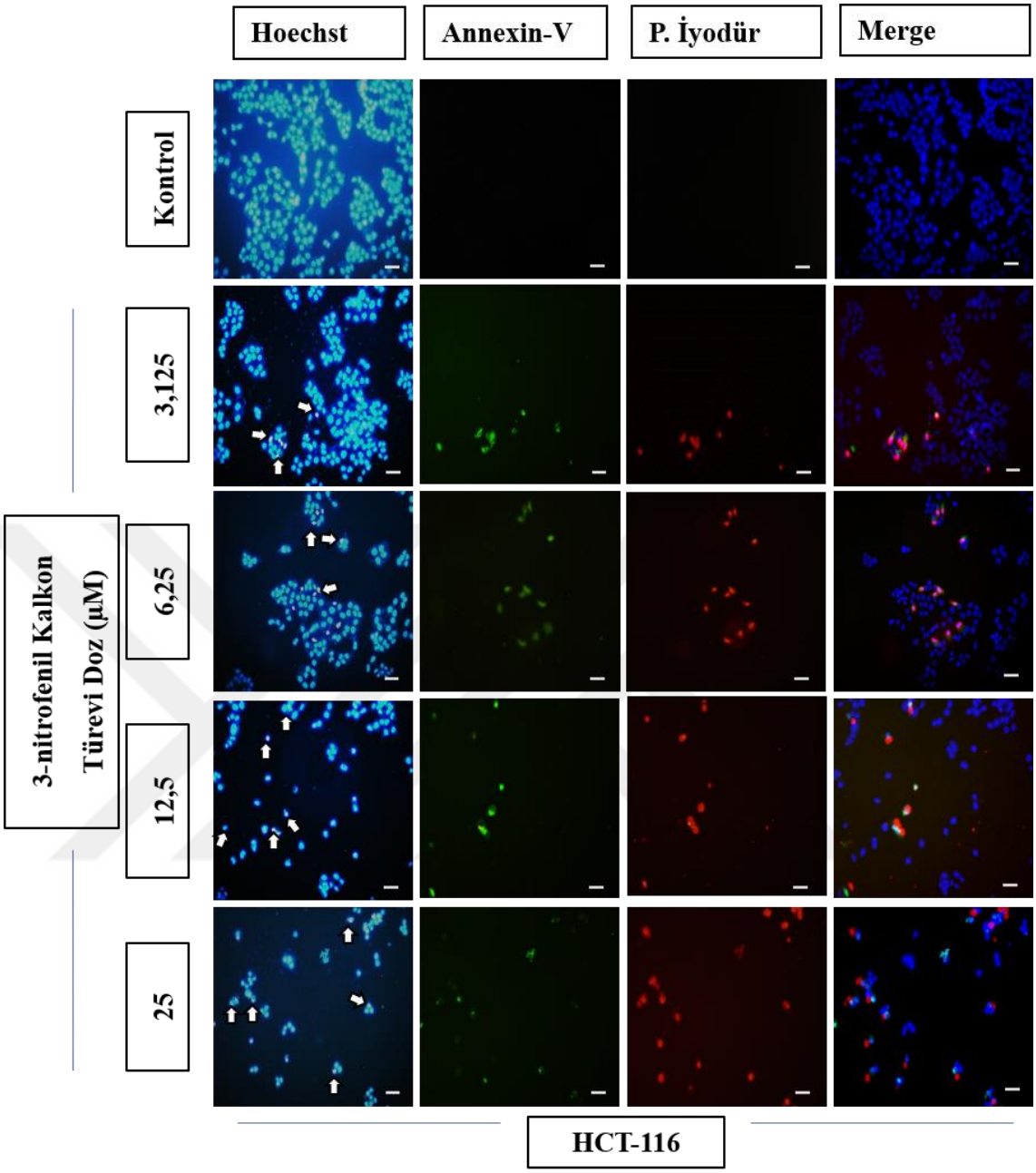
Şekil 4.1.2. HCT-116 (A) ve HT-29(B) hücrelerinde 5-FU'nun 12.5 TDC'den itibaren azalan dozları ve 3-nitrofenil kalkon türevinin belirlenen IC_{50} sabit dozları sırasıyla 1,71 µM ve 7,77 µM kullanılarak yapılan kombinasyonun 48 saat boyunca hücrelere uygulanması sonucu canlılık analiz grafiği. Her veri noktası 3 tekrarın ortalamasını temsil eder

4.2. Hoechst, Anneksin-V, Propidyum İyodür Floresan Boyama

Floresan boyalar, hücre yüzeyindeki veya içerisindeki antijenlere bağlanıp onları mikroskop altında görünür hale getirebilmektedir. Apoptotik hücreler; normal hücrelere kıyasla çekirdeğin kısalıp kalınlaştığı(piknotik) ve membran bütünlüğünün geç safhaya kadar korunduğu bir morfolojiye sahip iken, nekrotik hücreler ise çekirdeğin normal hücrelere oranla daha büyük olması ve membranlarının genişleyerek geç safhada bütünlüğünün kaybolması ile karakterizedir. Hücreler Hoechst (mavi), Anneksin-V (yeşil) ve non-vital boya olan propidyum iyodür (kırmızı) ile eş zamanlı olarak boyandığında; tedavi uygulanmamış kontrol grubu hücreleri Hoechst pozitif/Annexin-V negatif/ PI negatif, tedavi grubundaki erken apoptotik hücreler Hoechst pozitif/Annexin-V pozitif/PI negatif, tedavi grubundaki geç apoptotik/sekonder nekrotik hücreler veya nekrotik hücreler Hoechst pozitif/Anneksin-V pozitif/ PI pozitif sonuç verirken tedavi grubundaki primer nekrotik hücreler ise Hoechst pozitif/Annexin-V negatif/ PI pozitif ışıma verir (Ulukaya ve ark., 2011).

Hücrelerin ölüm modunu tespit etmek amacıyla (apoptoz-nekroz) insan kolon kanseri hücrelerine (HCT-116 ve HT-29) 24 saat boyunca 3-nitrofenil kalkon türevinin toksik olmayan dozu 3,125 µM'dan itibaren 25 µM'a kadar artan dozları uygulandı ve tedavi süresi sonunda üçlü boyama yöntemi (Hoechst 33342/AnneksinV/PI) ile boyama yapılarak floresan mikroskop altında 20x objektifte hücrelerin morfolojik analizi için her kuyuda aynı alan 3 farklı floresan filtre ile fotoğraflandı.

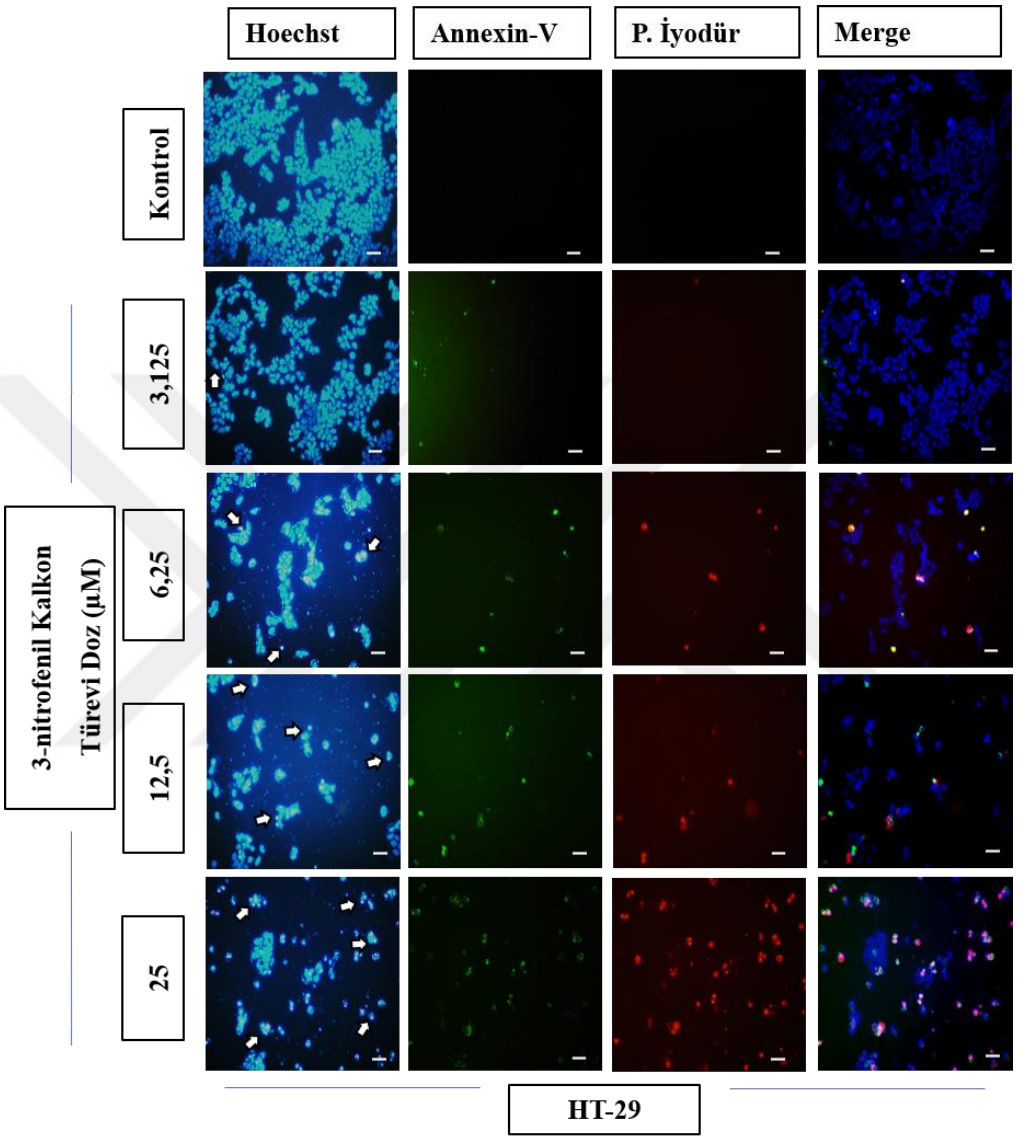
HCT-116 hücrelerinde 3-nitrofenil kalkon türevi ile 24 saat tedavi sonucu, 3,25 µM dozunda Annexin pozitif hücreler daha çok yer aldığı için erken apoptoz aşamasında oldukları gözlendi. Yine aynı dozda Hoechst boyası ile piknotik hücrelerin varlığı tespit edildi. Artan dozlarda (6,25 ve 12,5 µM) Annexin-V/PI pozitif hücrelerin sayısının arttığı, diğer yandan Hoechst boyama sonrasında ise apoptoza özgü piknotik ve kromatinleri yoğunlaşan hücrelerin olduğu görüldü. 25 µM dozunda ise PI pozitif hücrelerin sayısı daha çok olduğu ve kontrol grubuna göre Hoechst + hücre sayısında anlamlı şekilde azalma olduğu için bu doz değerinin hücrelere lethal etki gösterdiği belirlendi. 3'lü boyama analizi sonucunda elde edilen görüntüler Image J bilgisayar programı yardımıyla birleştirilerek(merge), 3,125 µM dozunda hücrelerin erken apoptoz aşamasında oldukları, 6,25 ve 12,5 µM dozlarında ise geç apoptoz/sekonder nekroz aşamasında oldukları belirlendi (Şekil.4.2). Mikroskobik sonuçların canlılık analizi sonuçlarını desteklediği görüldü.



Şekil 4.2. 3-nitrofenil kalkon türevi (3,125-25 µM) uygulanan HCT-116 hücrelerinde 24 saat tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri. Beyaz ok: Piknotik veya kondanse çekirdek (Ölçek çubuğu: 50 µm)

HT-29 hücrelerinde 3-nitrofenil kalkon türevi ile 24 saat tedavi sonucu, 3,25 µM dozunda herhangi bir etki gözlenmezken 6,25 µM dozundan itibaren 25 3,25 µM dozuna kadar sırasıyla artan dozlarda kontrole oranla apoptozise özgü olan piknotik hücrelerin sayısında artış olduğu ve özellikle 25 µM dozunda Anneksin-V/PI pozitif hücrelerin

sayısı diğer doz değerlerinden daha fazla olduğu için geç apoptoz/sekonder nekroz yolağı ile ölümün gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.2.1). Mikroskobik sonuçların canlılık analizi sonuçlarını desteklediği görüldü.



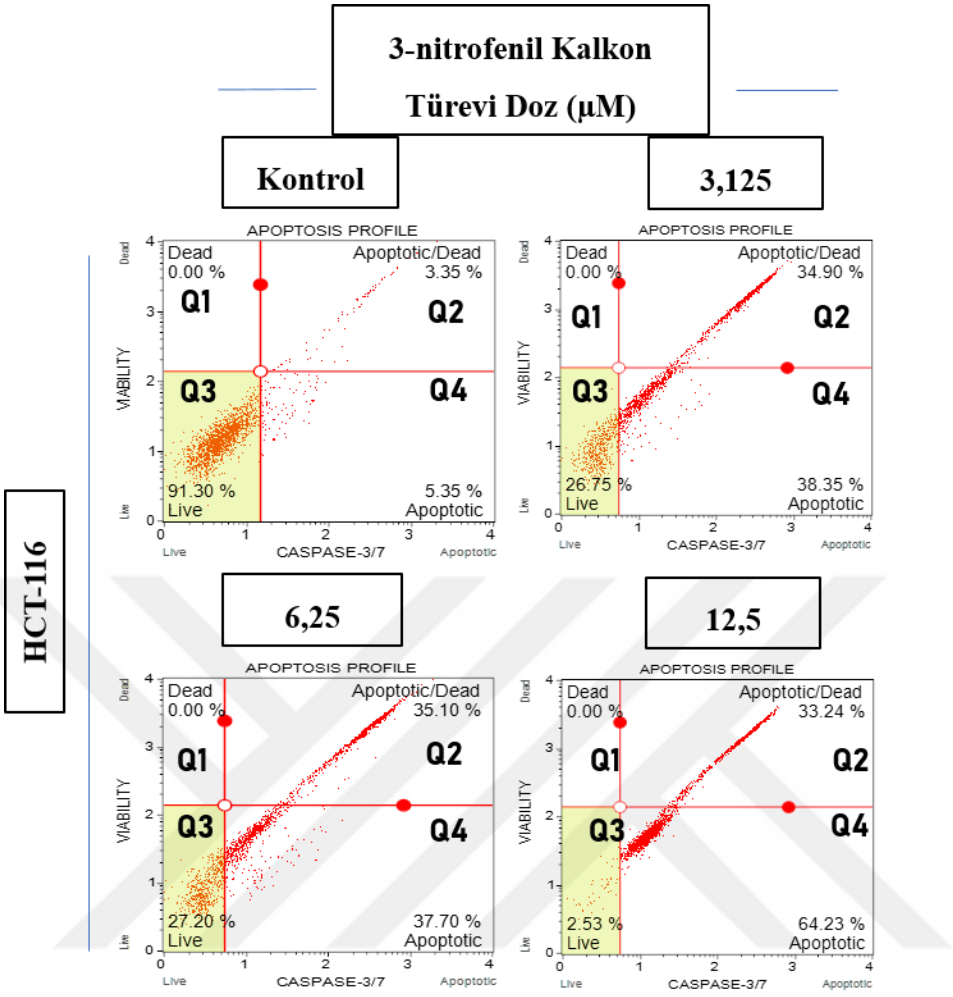
Şekil 4.2.1. 3-nitrofenil kalkon türevi (3,125-25 µM) uygulanan HT-29 hücrelerinde 24 saat tedavi sonrası floresan mikroskop görüntüleri. Beyaz ok: Piknotik veya kondanse çekirdek (Ölçek çubuğu: 50 µm)

Her iki kolon kanseri hücrelerinde apoptoz ile ölüm gerçekleştiği tespitinin ardından apoptoz mekanizmasını daha detaylı şekilde ortaya çıkarmak amacıyla ileri analizlerin yapılmasına karar verildi.

4.3. Kaspaz 3/7 Aktivite Analizi

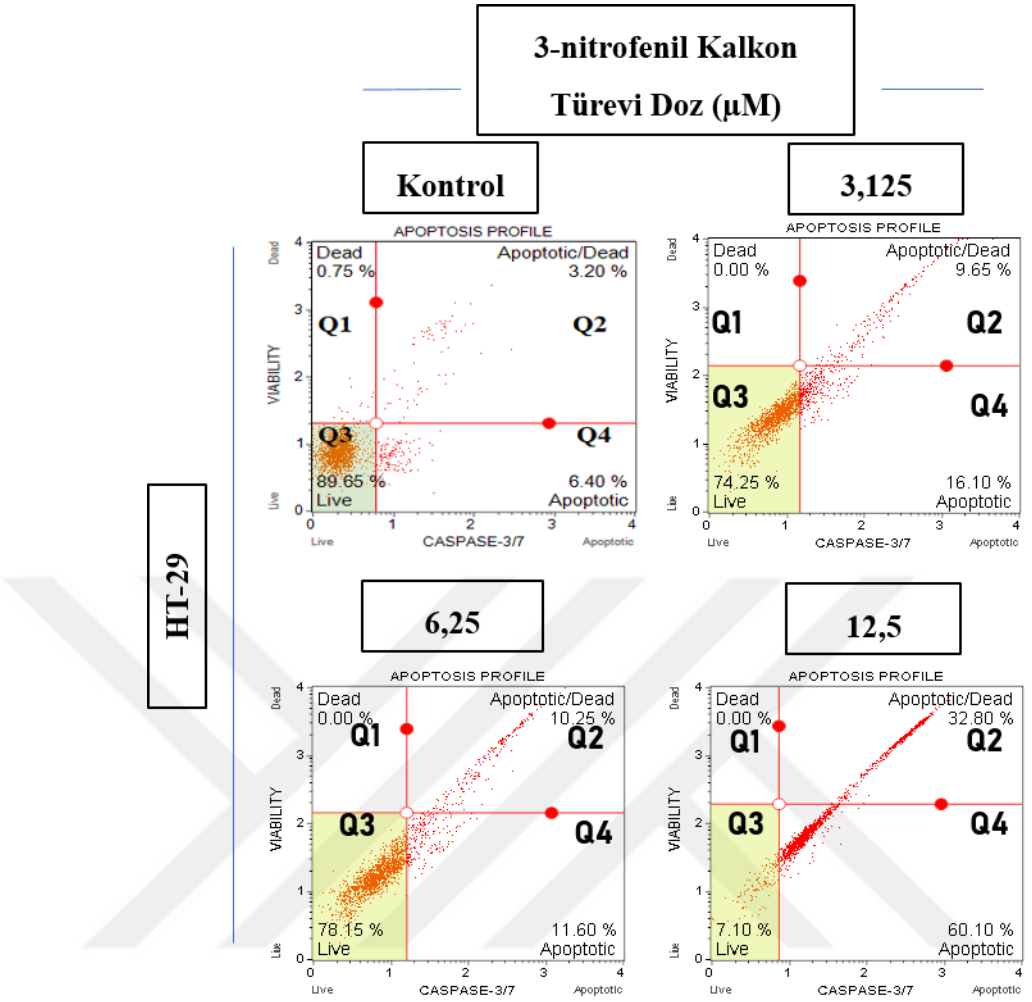
Kaspazlar, programlı hücre ölümü olan apoptoz sürecinde merkezi bir öneme sahip sistein proteazlardır (Riedl SJ. ve Shi Y., 2004). Apoptotik sinyal boyunca etkili olan sonlandırıcı kaspazlardan kaspaz 3/7'in aktivasyonu, membran integritesi ve hücre ölümü hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Bu çalışma için Muse^{TM} Annexin V & Dead Cell Kiti kullanıldı. İnsan kolon kanseri hücrelerinde (HCT-116 ve HT-29) 3-nitrofenil kalkon türevi ile 3,125 dozundan itibaren 12,5 µM'a kadar artan dozlarda uygulanan 48 saat tedavi sonrasında 'Muse cell analyzer' cihazı kullanılarak kaspaz 3/7 analizi yapıldı ve elde edilen verilerden hücrelerin apoptotik oran (Q2+Q4) yüzdeleri hesaplandı (Çizelge 4.3).

3-nitrofenil kalkon türevi ile 48 saat tedavi sonrasında HCT-116 hücrelerinde total apoptotik oran yüzdesi (kaspaz 3/7 aktivitesi), tedavi uygulanmamış kontrol grubuna göre kıyaslandığında 3,125 µM dozunda oldukça yüksek bir oran %72,8(Q2+Q4) gözlenmiştir. 6,25 µM dozunda apoptotik oran ise benzer şekilde %73,25(Q2+Q4) iken 12,5 µM dozunda %97,47(Q2+Q4)'lik oranla neredeyse maximum seviyede apoptoz aktivasyonu olduğu belirlendi (Şekil 4.3). Bu oran değerleri, türevin HCT-116 hücrelerindeki 48 saatlik uygulama sonrası SRB canlılık analizi IC_{50} değerinin 1,71 olduğu göz önünde bulundurulduğunda Floresan boyama analizi bulgularımızı destekler niteliktedir.



Şekil 4.3. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (3,125-12,5 µM) 48 saat tedavi sonrasında HCT-116 hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi sonucu ölüm evrelerinde yer alan hücre yüzdeleri (Q1("Dead") =Nekroz, Q2 ("Apoptotic/Dead") =Geç Apoptoz, Q3 ("Live") =% Canlılık, Q4 ("Apoptotic") =Erken Apoptoz).

3-nitrofenil kalkon türevi ile 48 saat tedavi sonrasında HT-29 hücrelerinde total apoptotik oran yüzdesi (kaspaz 3/7 aktivitesi), tedavi uygulanmamış kontrol grubuna göre kıyaslandığında 3,125 µM dozunda %21,85(Q2+Q4), 6,25 µM dozunda ise bir miktar artış göstererek %35,75(Q2+Q4) iken 12,5 µM dozunda %92,9(Q2+Q4)'luk oranla neredeyse maximum seviyede apoptoz aktivasyonu olduğu gözlendi (Şekil 4.3.1). Bu oran değerleri, türevin HT-29 hücrelerindeki 48 saatlik uygulama sonrası SRB canlılık analizi IC_{50} değerinin 7,76 olduğu göz önünde bulundurulduğunda Floresan boyama analizi bulgularımızı destekler niteliktedir.



Şekil 4.3.1. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (3,125-12,5 µM) 48 saat tedavi sonrasında HT-29 hücrelerinde kaspaz 3/7 değerlendirmesi sonucu ölüm evrelerinde yer alan hücre yüzdeleri (Q1("Dead") =Nekroz, Q2 ("Apoptotic/Dead") =Geç Apoptoz, Q3 ("Live") =% Canlılık, Q4 ("Apoptotic") =Erken Apoptoz).

Hücrelerde apoptotik yolak erken ve geç olmak üzere iki evrede gerçekleşebilmektedir. Akım sitometri analizi grafiklerindeki yüzdelik dilim verileri kullanılarak oluşturulan Çizelge 4.3'te apoptoz yolağı üzerinden ölmekte olan hücrelerin miktarı verilmiştir. Bu yüzdelik dilim nihai olarak, tedavi sonrası total apoptotik hücre oranını ifade etmektedir. HCT-116 hücrelerinde apoptotik oranın 3,125 µM gibi düşük dozlardaki tedaviden itibaren arttığı ve 12,5 µM dozunda maximum değerine yaklaştığı, HT-29 hücrelerinde se 6,25 µM'ün üstündeki dozlarda tedavi sonrası apoptotik oranın %92 civarına çıktığı yapılan hesap sonucu ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.3. 3-nitrofenil kalkon türevi uygulanan HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde 48 saat tedavi sonrası kaspaz 3/7 sonuçlarına göre hesaplanan apoptotik oran (Q2+Q4) yüzdeleri

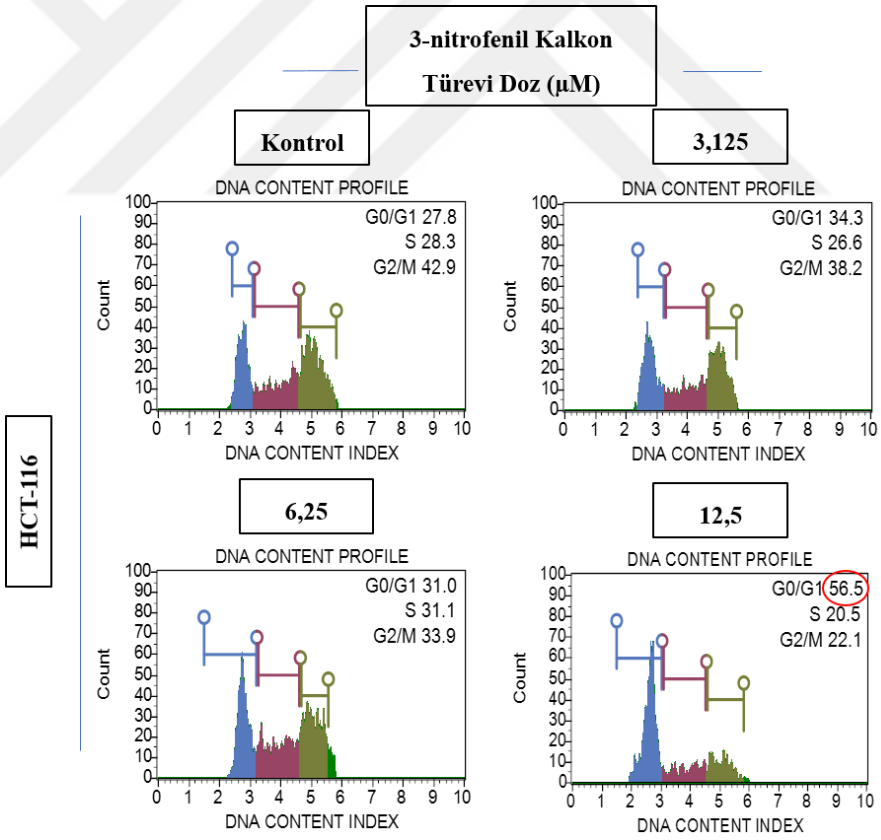
Q2+Q4(%)	HCT-116	HT-29
Kontrol	**8,7**	**9,6**
3,125 µM	**72,8**	**21,85**
6,25 µM	**73,25**	**35,75**
12,5 µM	**97,47**	**92,9**

Elde edilen sonuçlara göre 3-nitrofenil kalkon türevi ile 48 saat tedavi sonucu her iki insan kolon kanseri hücrelerinde 3,125 µM dozundan itibaren kontrole oranla apoptotik hücrelerin sayısında artış meydana geldiği görüldü. Apoptoz yolağı mekanizmasının protein düzeyinde incelenmesi amacıyla western blot tekniği kullanılarak apoptotik protein analizi yapılması kararlaştırıldı.

4.4. Hücre Döngüsü Analizi

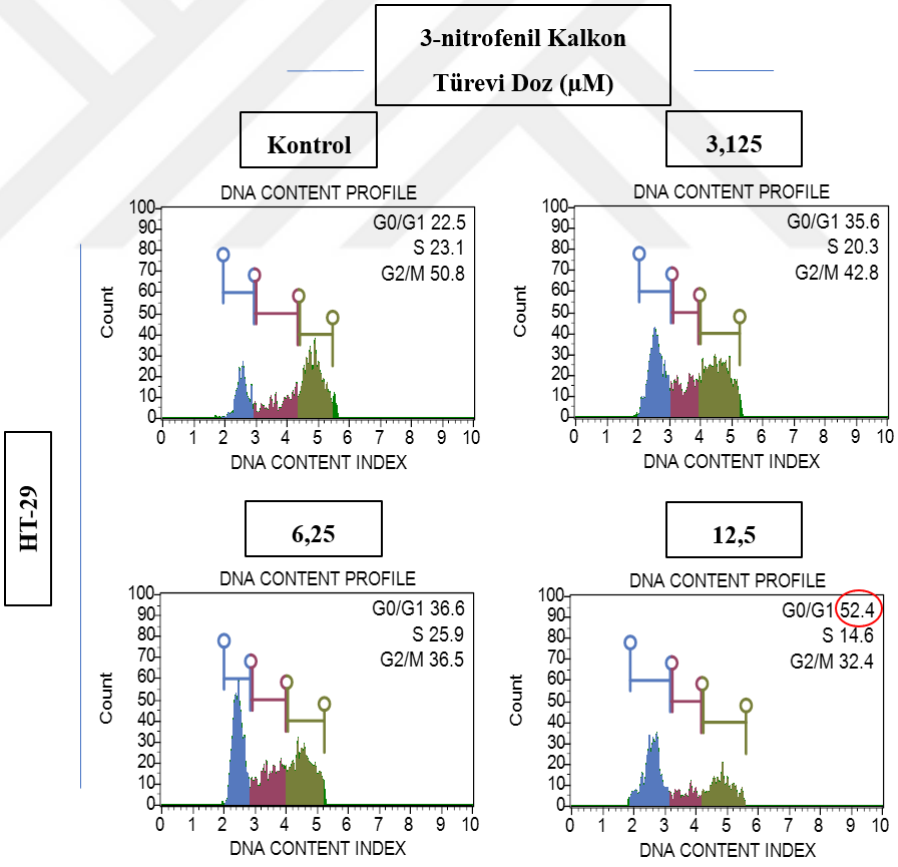
Hücreler, genetik mutasyonlar veya çevresel değişimler sonucunda hücresel bölünmeyi kontrol eden CDK inhibitörlerinden kaçarak karsinojenez sürecine girerler. Zamanla bu hücreler, normal dokuyu koruyan p53 gibi tümör baskılayıcı proteinlere karşı daha dirençli hale gelerek çoğalmalarını hızlandırmak amacıyla invazif ve/veya metastatik özellik kazanırlar. Bu nedenle kanser tedavisinde hücre döngüsünün hedeflenmesi ana odak noktalarından biri olmaktadır (Park ve Lee, 2003). İnsan kolon kanseri hücrelerinde (HCT-116 ve HT-29) 3-nitrofenil kalkon türevi ile 24 saat tedavi sonrası, kalkon türevinin hangi evrede bölünmeyi baskıladığını belirlemek amacıyla hücre döngüsü analizi yapıldı. Muse Cell Cycle Kit (Luminex, USA) prosedürü doğrultusunda, hücrelerin döngü fazlarındaki dağılımları Muse Cell Analyzer (Millipore, Almanya) cihazında "Muse® Cell Cycle Reagent" kullanılarak belirlendi.

HCT-116 hücrelerinde, kontrol grubundaki hücrelere kıyasla 3,125 µM dozundan itibaren 12,5 µM doz değerine kadar tedavi uygulanmış hücrelerde kalkon türevinin, hücre tutulma oranının G_0/G_1 fazında doz yükseldikçe %27,8'den 56,5'e artmasını sağlayarak hücre döngüsünü DNA sentez aşamasına girmeden baskıladığı gözlendi (Şekil 4.4). DNA sentez fazı olan S fazında kontrol grubu hücreleri %28.3 yoğunlukta yer alırken dozdaki artışa bağlı olarak hücre tutulma oranında azalıp artış gözlendi ve 12,5 µM dozunda %20,5 tutulma oranı ile azalma olduğu belirlendi. Hücrelerin bu fazda daha az bulunması, kanser hücresinin bölünmesinin engellenmesi için S fazına geçişin CDK'lar aracılığıyla durdurulduğu şeklinde yorumlandı. Mitoza giriş için hazırlık evresi olan G_2/M evresinde, kontrol grubunda %42,9 oranında hücre tutulması gözlenirken dozdaki artışa bağlı olarak fazdaki hücre sayısının azaldığı (%22.1) ve bu azalmanın kanser hücresinde mitoz bölünme sonucu 2 yavru hücre oluşumunun baskılanması için CDK'lar aracılığıyla gerçekleştiği şeklinde yorumlandı.



Şekil 4.4. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (3,125-12,5 µM) 24 saat tedavi sonrasında HCT-116 hücrelerinin döngü fazlarındaki (G_0/G_1, S ve G_2/M) dağılımlarının histogram grafiği

HT-29 hücrelerinde ise hücre tutulma oranının G_0G_1 fazında doz yükseldikçe %22,5'den 52,4'e artmasını sağlayarak hücre döngüsünü DNA sentez aşamasına girmeden baskıladığı gözlendi (Şekil 4.4). DNA sentez fazı olan S fazında kontrol grubu hücreleri %23 yoğunlukta yer alırken dozdaki artışa bağlı olarak hücre tutulma oranında azalıp artış gözlendi ve 12,5 µM dozunda %14,6 tutulma oranı ile azalma olduğu belirlendi. Hücrelerin bu fazda daha az bulunması, kanser hücresinin bölünmesinin engellenmesi için S fazına geçişin CDK'lar aracılığıyla durdurulduğu şeklinde yorumlandı. Mitoza giriş için hazırlık evresi olan G_2/M evresinde, kontrol grubunda %50,8 oranında hücre tutulması gözlenirken dozdaki artışa bağlı olarak fazdaki hücre sayısının azaldığı (%32,4) ve bu azalmanın kanser hücresinde mitoz bölünme sonucu 2 yavru hücre oluşumunun baskılanması için CDK'lar aracılığıyla gerçekleştiği şeklinde yorumlandı (Şekil 4.4.1). Sonuç, kalkon türevinin antikanser aktivitesini doğrular niteliktedir.



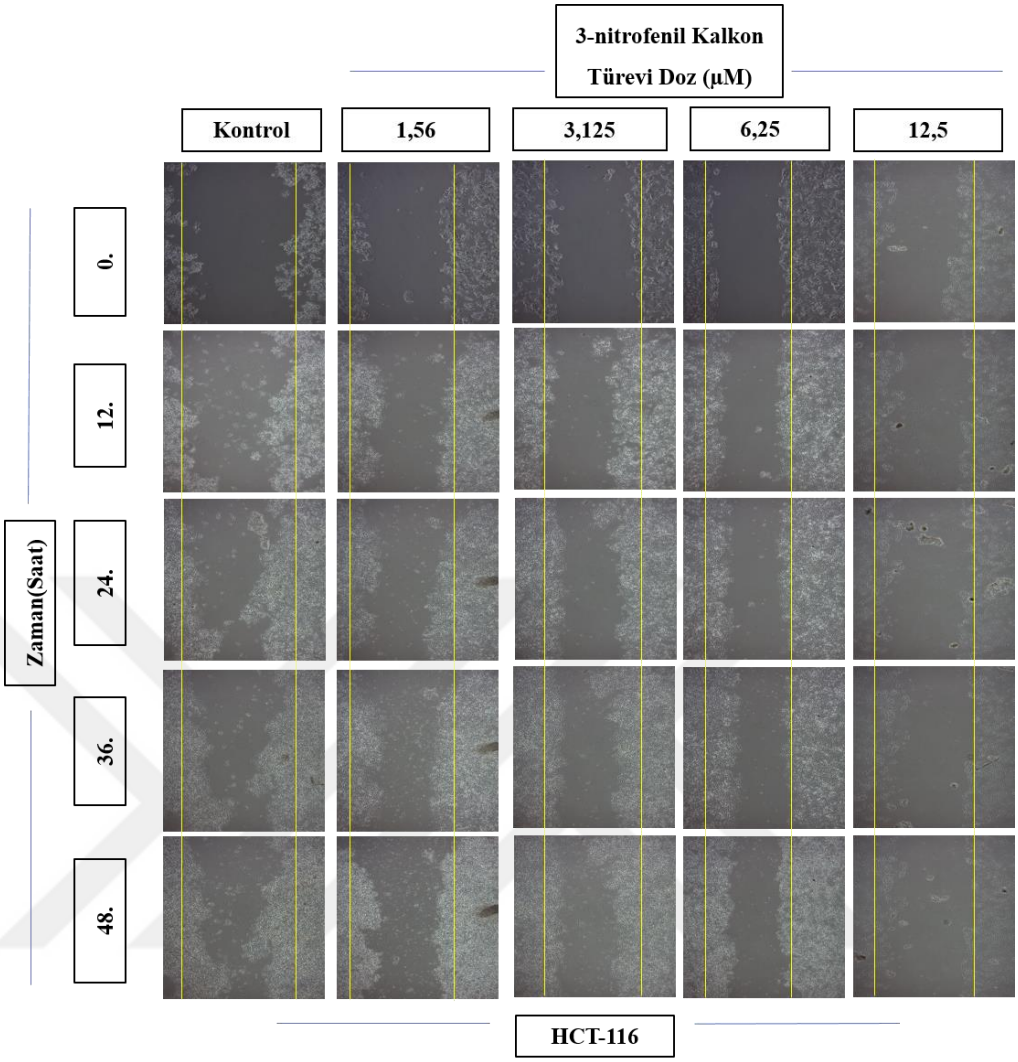
Şekil 4.4.1. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (3,125-12,5 µM) 24 saat tedavi sonrasında HT-29 hücrelerinin döngü fazlarındaki (G_0/G_1, S ve G_2/M) dağılımlarının histogram grafiği

4.5. Hücre Migrasyon Analizi

Kanser hücreleri karsinojenez sürecindeki evrelerine(erken/geç) bağlı olarak bulunduğu mikroçevreden lokal veya uzak dokulara yayılma/metastaz özelliğine sahiptirler. Lokal yayılım yeteneğini gözlemlemek üzere yapılan analiz çeşitlerinden biriyse migrasyon analizidir (Pang ve ark., 2014).

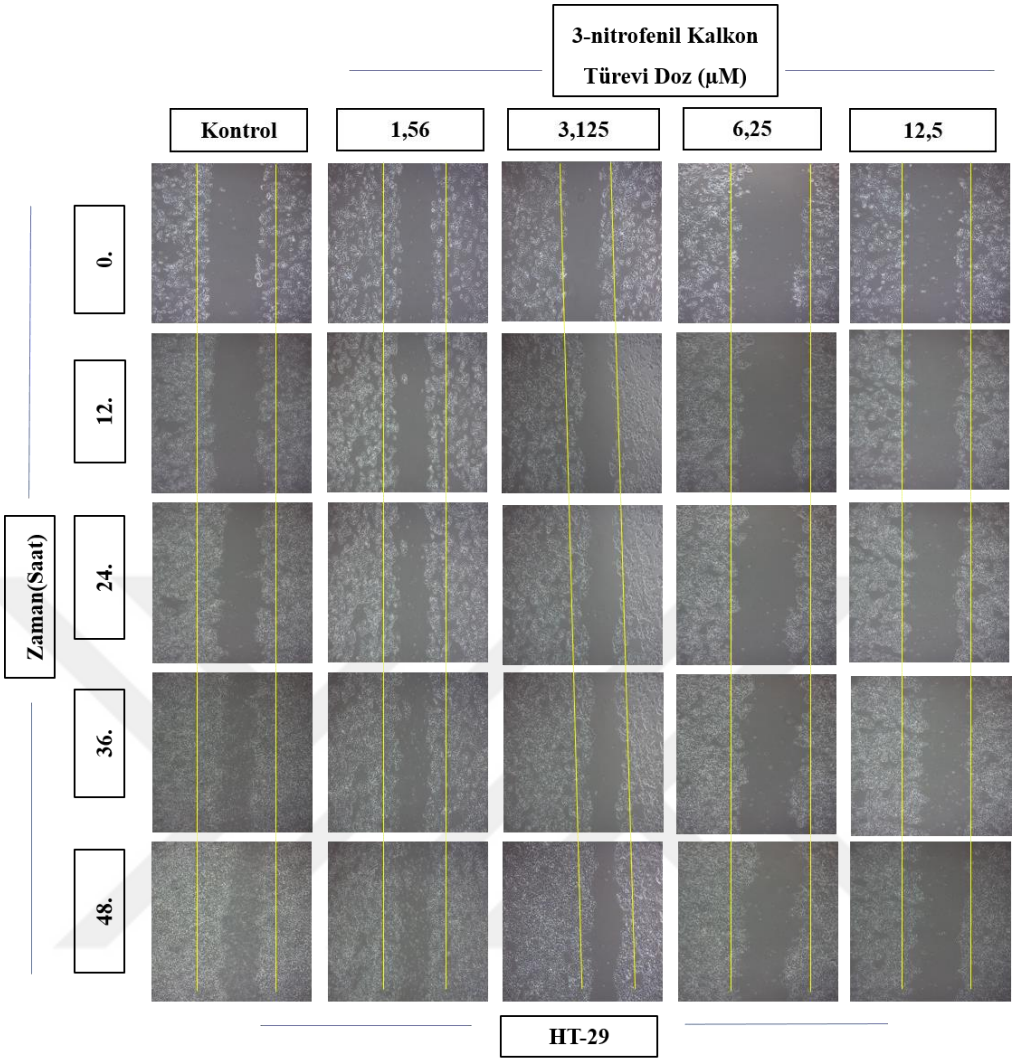
Migrasyon yeteneğini analiz etmek için 6-kuyulu plate içerisine HCT-116 ve HT-29 insan kolon kanseri hücreleri ekilerek plate yüzeyini %80-%90 kaplayana kadar inkübatörde bekletildi. Yüzeyi kaplayan hücreler arasındaki bağlantı mekanik olarak 1 ml'lik steril pipet ucu ile kuyu içerisinde iki düz çizgi çekilerek ayrıştırıldı(yara oluşumu). Yüzeyden kalkan hücreler 1x PBS ile yıkanarak 3-nitrofenil kalkon türevi, 1,56 µM dozundan itibaren 12,5 µM doza kadar plate içerisine eklendi. Kalkon türevi uygulanmamış kuyulardaki hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı ve üzerlerine taze besiyeri eklendi. Kuyulardaki hücreler, kalkon türevinin uygulandığı ilk andan (0. saat), canlılık analiz yönteminde belirlenen 48 saatlik sürenin sonuna kadar 12 saat aralıklarla invert mikroksop altında 4x objektifte her kuyu için aynı alan fotoğraflandı.

HCT-116 hücrelerinde 3-nitrofenil kalkon türevi ile 48 saat tedavi sonrası mikroskop görüntüleri incelendiğinde, kontrol grubu hücrelerinde 12. saatten itibaren yaranın kapanmaya başladığı, 48. saatte ise başlangıça göre %50'den fazla alanın kapandığı gözlendi. Kalkon türevi uygulanmış hücrelerde 12,5 µM dozunda hücre göçü gözlemlenmediği, aksine ortamdaki hücrelerin kalkon türeviyle maruziyeti sonucu yaşamlarını yitirdikleri gözlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (1,56-12,5 µM) 48 saat tedavi sonrasında HCT-116 hücrelerinin, yara iyileştirme yeteneği üzerine etki grafiği

HT-29 hücrelerinde 3-nitrofenil kalkon türevi ile 48 saat tedavi sonrası mikroskop görüntüleri incelendiğinde, HCT-116 hücrelerine benzer şekilde kontrol grubu hücrelerinde 12. saatten itibaren yaranın kapanmaya başladığı, 48. saatte ise başlangıça göre %50'den fazla alanın kapandığı gözlendi. Kalkon türevi uygulanmış hücrelerde özellikle 12,5 µM dozunda hücre göçü yeteneğinin inhibe olduğu gözlenmiştir. HCT-116 hücrelerinden farklı olarak HT-29 hücrelerinde 12,5 µM dozunda kuyu içerisindeki kanser hücrelerinin ölmemesi, SRB canlılık testi sonuçlarımıza paralel olarak kalkon türevinin HT-29 hücresine daha az etkide bulunabildiği şeklinde yorumlandı (Şekil 4.5.1).



Şekil 4.5.1. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (1,56-12,5 µM) 48 saat tedavi sonrasında HT-29 hücrelerinin, yara iyileştirme yeteneği üzerine etki grafiği

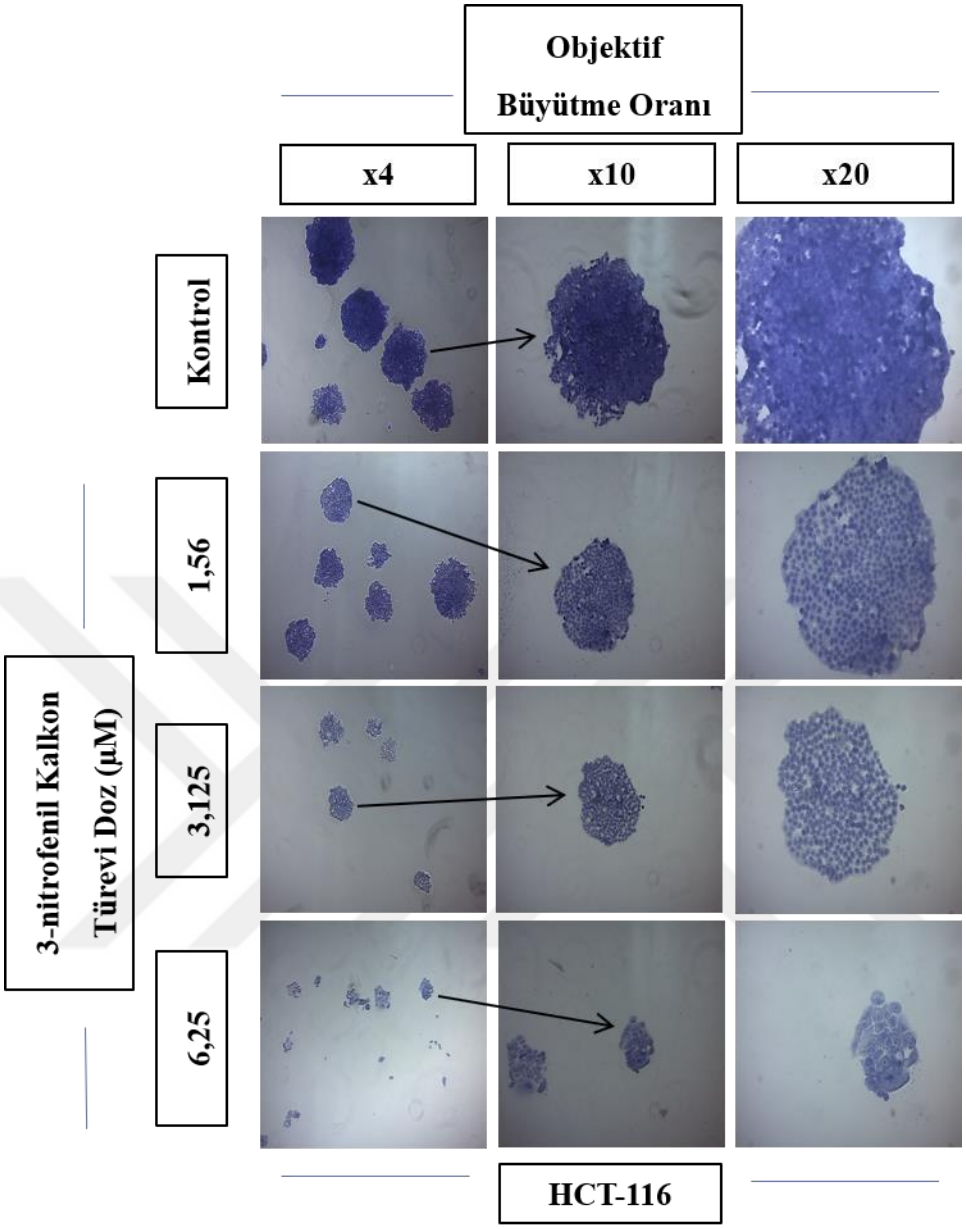
Genel olarak her iki hücre hattında da artan doza ve zamana bağlı olarak tedavi uygulanmamış (kontrol) gruba kıyasla migrasyon yeteneklerinde azalma görüldü

4.6. Koloni Oluşturma Yeteneği Analizi

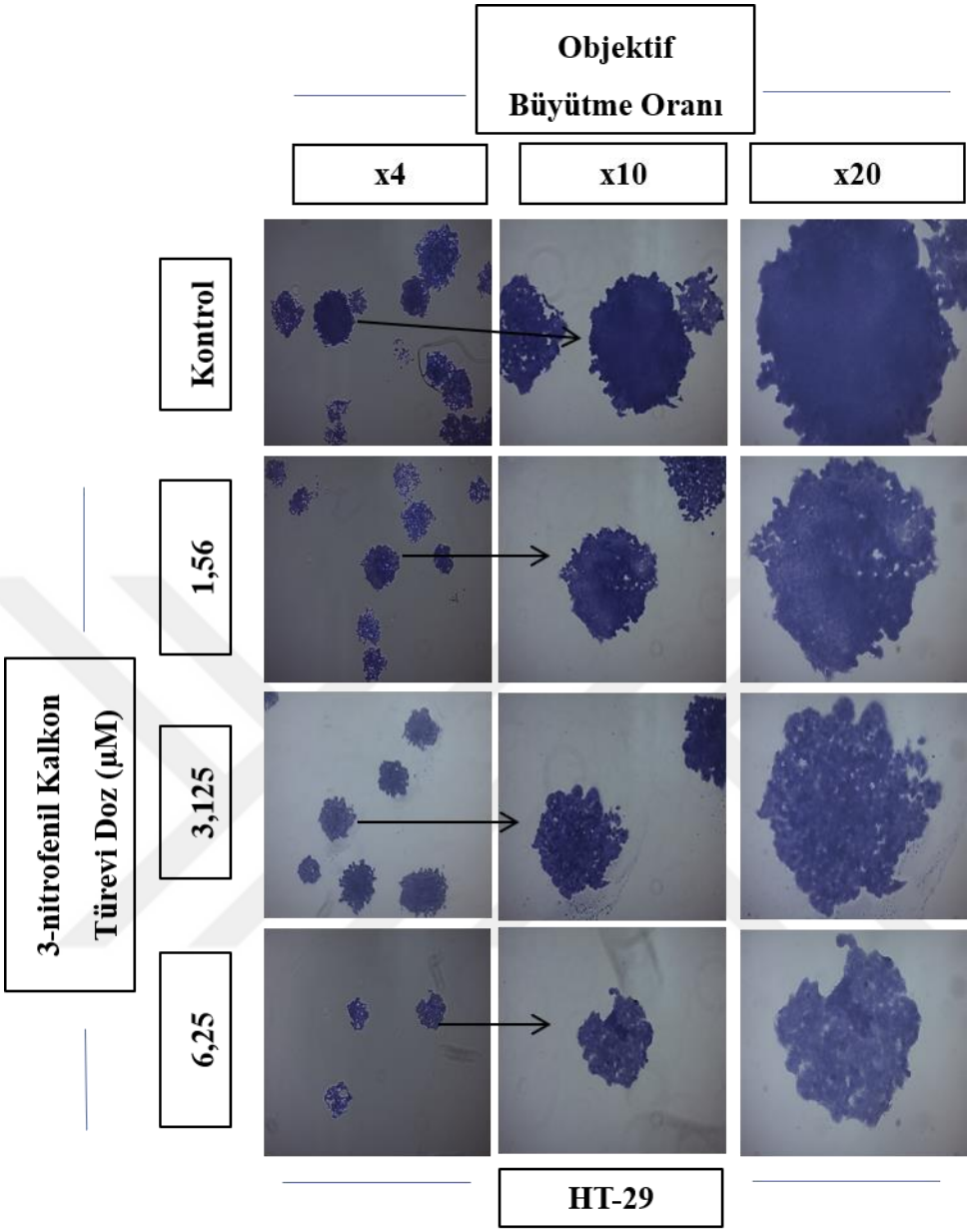
Klonojenik test veya koloni oluşumu testi, tek bir hücrenin bir koloni halinde büyüme yeteneğine dayalı hücre sağkalım testidir. Koloni; en az 50 hücreden oluşacak şekilde tanımlanmıştır. Bu yöntem, popülasyondaki her hücreyi "sınırsız" bölünmeye uğrama yeteneği açısından test eder (Crowley ve ark., 2016). Hücrenin büyüme esnasında potansiyel ajanların sitotoksik ya da genotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla tedavi sonrası koloni oluşturma yeteneğine sahip kanser hücreleri, kontrol grubuyla karşılaştırılarak doza bağlı değişim miktarı kalitatif veya kantitatif olarak değerlendirilebilmektedir.

Koloni oluşturma yeteneğini analiz etmek için HCT-116 ve HT-29 insan kolon kanseri hücreleri 3-nitrofenil kalkon türevinin 1,56 μM dozundan itibaren artan dozlarda 6,25 μM doza kadar 48 saat süreyle tedavi edildi. Tedavi süresinin ardından kalkon türevi ortamdan uzaklaştırılarak hücrenin mediumu eklendi ve tedavi uygulanmamış grupta koloni başına yaklaşık 50 hücre oluşuncaya kadar mikroskopta gözlem yapıldı.

Sonuçlara göre, HCT-116 (Şekil 4.6) ve HT-29 (Şekil 4.6.1) hücrelerinde uygulanan 3-nitrofenil kalkon türevi tedavisinde, tedavi uygulanmamış (kontrol) gruba kıyasla doz artışına bağlı olarak hücrelerin bir araya gelip koloni oluşturma yeteneğinde azalmalar olduğu gözlenmiştir. Oklar büyütme katsayısına bağlı olarak değişen alan görüntüsünde ilgili hücre kolonisini göstermektedir.



Şekil 4.6. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (1,56-6,25 µM) 48 saat tedavi sonrasında HCT-116 hücrelerinin, koloni oluşturma yeteneği üzerine etki grafiği (Üstteki kutucuklar, soldan sağa doğru büyütme katsayılarını ifade etmektedir)

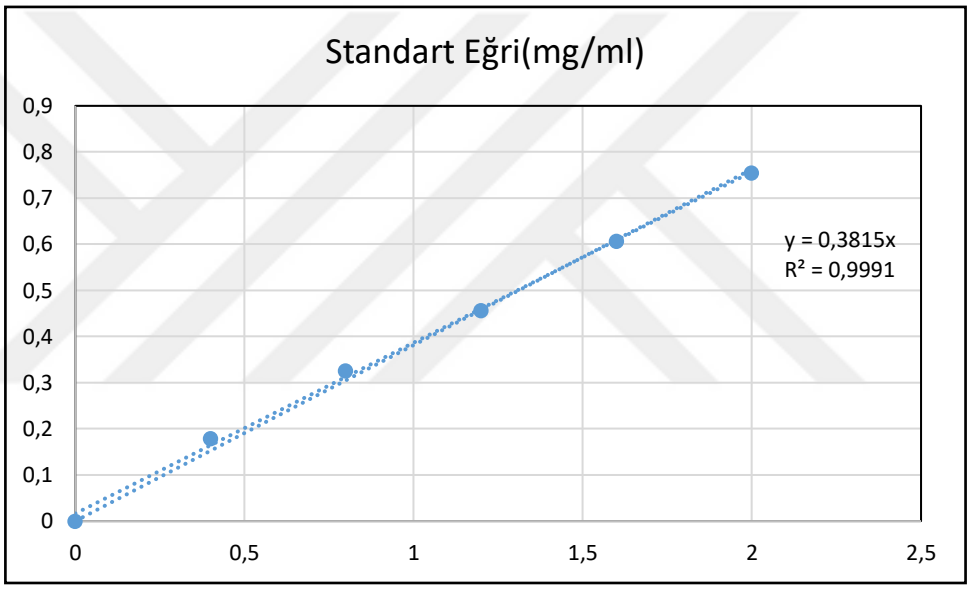


Şekil 4.6.1. 3-nitrofenil kalkon türeviyle (1,56-6,25 µM) 48 saat tedavi sonrasında HT-29 hücrelerinin, koloni oluşturma yeteneği üzerine etki grafiği (Üstteki kutucuklar, soldan sağa doğru büyütme katsayılarını ifade etmektedir)

4.7. Western Blot Analizi

Sitotoksik etkisi SRB ile belirlenen 3-nitrofenil kalkon türevinin, hücre ölüm modu floresan boyama ile belirlenip akım sitometrisi ile kaspaz 3/7 düzeyinin tespitinin ardından, bu aşamada apoptoz ile ilişkili proteinlerdeki değişiklikler Western Blot yöntemi kullanılarak değerlendirildi.

HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde, kalkon türevi ile 48 saat tedavi sonrası elde edilen lizatların protein konsantrasyonlarını belirlemek üzere BSA kullanılarak bir standart eğri grafiği hazırlandı (Şekil 4.7).

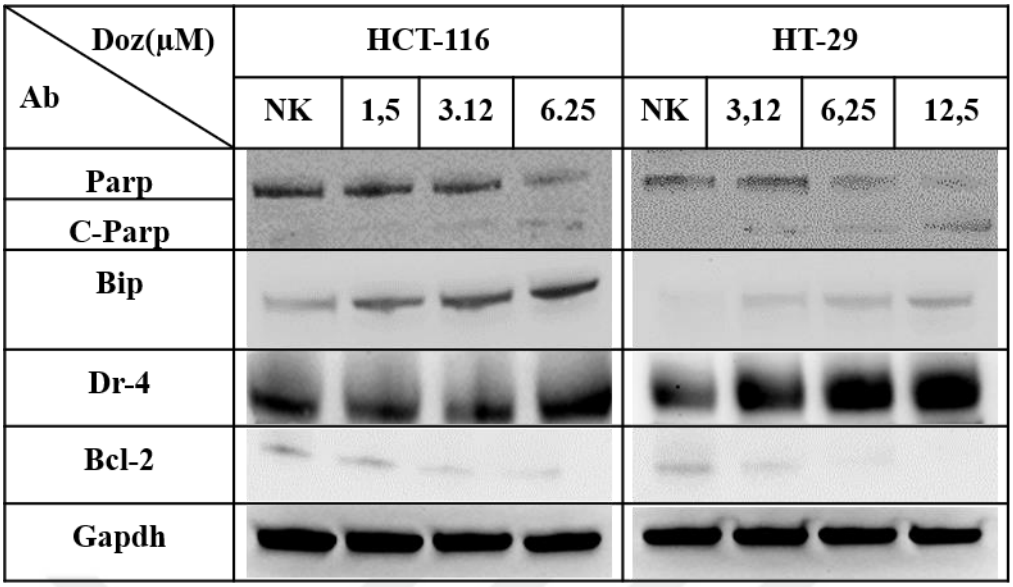


Şekil.4.7. BSA standart eğri grafiği

İnsan kolon kanseri hücrelerin (HCT-116 ve HT-29) 48 saat boyunca uygulanan 3-nitrofenil kalkon türevi tedavisi sonucunda hücresel protein lizatı hazırlandı ve western blot yöntemi ile hücrelerde yer alan proteinlerin bant yoğunluklarına göre miktar analizi yapıldı. Uygulanan kalkon türevinin dozları, SRB canlılık testi sonucunda sitotoksik doz değerini kapsayacak şekilde seçim yapılmıştır. İlk olarak tüm hücrelerde ifadesi gerçekleştiği bilinen protein çeşitlerinden biri olan GAPDH miktarı analizi yapıldı.

HCT-116 hücrelerinde tedavi sonrası membranda yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla, 'TNFR aracılı apoptozis belirteci' olarak incelenen kırılmış PARP seviyesinde kontrol grubuna kıyasla 3,125 ve 6,25 µM dozlarında artış olduğu görüldü. Analizi yapılan proteinler içerisinde membranda yukarıdan aşağıya ikinci sırada yer alan ve 'ER stres belirteci' olan BİP proteininin ifade düzeyinde 1,56 µM dozundan itibaren artışın belirgin olduğu görüldü. Analizi yapılan proteinler içerisinde membranda yukarıdan aşağıya üçüncü sırada yer alan 'TRAIL aracılı apoptozis belirteci' DR4 düzeylerinde, kontrole göre kıyaslandığında 6,25 µM gibi hücreye toksik etki gösterebilecek dozda artışın belirgin olduğu görüldü. Son olarak, apoptozun içsel yolağında görev alan 'anti-apoptotik' BcL-2 proteinin düzeyinde ise 1,5 µM dozundan itibaren normale göre düzenli olarak azalma gözlendi (Şekil 4.7.1).

HCT-116 hücrelerinde ise tedavi sonrası membranda yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla, 'TNFR aracılı apoptozis belirteci' olarak incelenen kırılmış PARP seviyesinde kontrol grubuna kıyasla 12,5 µM dozunda artışın belirgin olduğu görüldü. Analizi yapılan proteinler içerisinde membranda yukarıdan aşağıya ikinci sırada yer alan ve 'ER stres belirteci' olan BİP proteininin ifade düzeyinde 3,12 µM dozundan itibaren artışın belirgin olduğu görüldü. Analizi yapılan proteinler içerisinde membranda yukarıdan aşağıya üçüncü sırada yer alan 'TRAIL aracılı apoptozis belirteci' DR4 düzeylerinde, kontrole göre kıyaslandığında 3,12 µM dozundan artışın belirgin olduğu görüldü. Son olarak, apoptozun içsel yolağında görev alan 'anti-apoptotik' BcL-2 proteinin düzeyinde ise 3,12 µM dozundan itibaren normale göre düzenli olarak azalma gözlendi (Şekil 4.7.1).



Şekil 4.7.1. 3-nitrofenil kalkon türeviyle 48 saat tedavi sonrasında HCT-116 ve HT-29 hücrelerinin apoptozis ile ilişkili olan protein düzeylerindeki değişimler

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser insidansı ve mortalite oranı dünya çapında hızla artmaya devam etmektedir. Bu artış, ortalama yaşam süresine bağlı olarak, birçoğu sosyo-ekonomik gelişme ile ilişkili olan kanser için ana risk faktörlerinin yaygınlığı ve dağılımındaki değişiklikleri yansıtmaktadır (Siegel ve ark., 2022). Kanser tedavisi için kemoterapötik ilaçlara karşı çoklu direnç gelişiminden dolayı moleküler düzeyde hedefe yönelik yeni ilaçların araştırılması gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Hussain ve ark., 2019; Skuse, 2015).

Günümüzde klinikte çok sayıda antikanser ajan çeşitli doğal kaynaklardan (bitkiler, mantarlar, bakteriler, deniz organizmaları ve mikroorganizmalar gibi) elde edilerek kullanılmaktadır. Örneğin vinkristin, vinblastin, etoposit, paklitaksel, kamptotesin, topotekan, irinotekan gibi bileşikler bitkisel kökenli olup organizmada başta antikanser olmak üzere birçok biyolojik aktivitelere sahiptir (Go ve ark., 2005; Singh ve ark., 2014). Son zamanlarda, flavonoid ailesine bağlı kalkon türevleri yan gruplarındaki biyoaktif bileşenlerinden dolayı büyük bir dikkat çekmektedirler (Panche ve ark., 2016). Yapı-analiz çalışmaları, aromatik halkaya sadece bir ya da hiç metoksi grubunun bağlı olmadığı bileşiklerle karşılaştırıldığında optimal hücre çoğalma inhibisyonu için en az iki metoksi grubunun bağlanmasına ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Aromatik halkaya Br, Cl gibi elektron çekici gruplar bağlandığında aktivitede azalma görülürken, en az iki metoksi grubu bağlı bileşiklerle en iyi inhibitor etkileri elde edilmiştir (Sayed ve ark., 2015). Başka bir çalışmada, glisin/glukoz/kreatin gibi karbohidrat türevlerinin ısı ile teması sonucu oluşan heterosik1ik aromatik yapıdaki mutajen bileşiklere flavonun hücrelerde çoğalmayı baskılayıcı bir etki gösterdiği tespit edilmiştir (Pesaran ve ark., 2017). Antimutajenik aktivitenin, prokarsinojenlerin karsinojen haline gelmesine neden olan metabolik yolun engellenmesiyle sağlandığı bilinmektedir (Karthikeyan ve ark., 2014; Leon-Gonzalez ve ark., 2015). Yapılan bir çalışmada, mutajenlerin et ve et ürünlerinin pişirilmesi sonucu ortaya çıktığı ve etin patates, havuç gibi flavonoid bazlı besinlerle beraber pişirilmesinin bu tip karsinojenlerin oluşumunu ve etkisini azalttığı bildirilmiştir (Arasavelli ve ark., 2016).

In-vitro koşullarda yapılan SRB, MTT, ATP gibi hücre canlılık testleri, kanser tedavisinde ilaç potansiyeli olabilecek antikanser ajanların sitosisitelerinin ölçülmesinde kullanılan metodlardır (Kamiloglu ve ark., 2020). Literatürdeki yapılan çalışmalar göz

önünde bulundurularak bu tez çalışmasında, Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde sentezlenen ve karakterizasyonları yapılan benzofuran sübstitüe 3-nitrofenil kalkon türevinin insan kolon kanseri hücreleri üzerinde öncelikle sitotoksisitesi SRB canlılık testi ile araştırılmıştır. HCT-116 ve HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde 3-nitrofenil kalkon türevinin 24-48 saat süresince uygulanması sonucunda doza bağımlı anlamlı azalmalar gözlenmiştir ($p<0,001$). HCT-116 hücrelerinde 24 saat tedavi sonunda IC_{50} değeri 3,47 μM dozu iken, 48 saat tedavi sonunda IC_{50} değerinin 1,71 μM (Coskun ve ark., 2017; Done ve ark., 2022; Gündüz, 2020) dozunda görülmesi, kalkon türevinin zamana bağlı olarak etkinliğini artırdığını ortaya çıkarmaktadır. HT-29 insan kolon kanser hücrelerinde ise 3-nitrofenil kalkon türevinin değeri 24 saat uygulanması sonrasında IC_{50} değeri 10,4 μM dozu iken, 48 saat tedavi sonunda 7,76 μM dozunda görülmesi, öngörülen şekilde kalkon türevinin zamana bağlı olarak etkinliğini artırdığını ortaya çıkarmaktadır. Yapılan antikanser çalışmalarda, potansiyel antikanser ajan(lar)ın kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermesi beklenirken sağlıklı hücrelere ise etki etmemesi nihai hedef olmaktadır. Bu amaçla, CCD-18-Co sağlıklı insan kolon hücreleri, 3-nitrofenil kalkon türevinin etkisini belirlemek için kullanılmıştır. Sonuçlara göre, kalkon türevi ile 24 saat tedavi sonunda hücrelerin IC_{50} değeri 28,37 μM dozu iken, 48 saat tedavi sonunda 15,22 μM dozuna inmektedir. Canlılık analizi sonuçları ile, özellikle düşük dozlarda (1,56-6,25 μM) sağlıklı hücrelere toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Literatüre baktığımızda, günümüze kadar pek çok doğal ya da sentetik olan kalkon türevlerinin sitotoksik aktiviteye neden olduğu gözlenmiştir (de Vasconcelos ve ark., 2013; Gomes ve ark., 2017; Novilla ve ark., 2019; Taşkın ve Kırılmış, 2016). Kolon kanseri hücre soyunda (HCT-116) yapılan bir in-vitro çalışmada, kinazolinon kalkon türevinin etkisi araştırılmış ve 6, 12, 24 ve 48 saatleri sonunda IC_{50} değerleri sırası ile 600, 140, 26 ve 16 μM olarak hesaplanmıştır (Wani ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda ise aynı hücre soyunda IC_{50} değerleri 24 saat için 3,47 μM iken, 48 saat için 1,7 μM olması açısından daha etkili bir kalkon türevi olduğu söylenebilir.

3-nitrofenil kalkon türevi tarafından aktif hale gelen hücre ölüm modunu belirlemek amacıyla apoptotik belirteçler araştırılmıştır. Öncelikle apoptoz tespitinde temel yöntem sayılabilecek Hoechst/Annexin-V/PI 3'lü boyaması yapıldı ve floresan mikroskobu altında değerlendirildi. Anneksin-V boyama yöntemi ile erken dönem apoptotik hücreler

belirlenebilmektedir. Bunun nedeni Anneksin-V bağlanması membran hasarlanmadan önce nüklear kondensasyon ve fosfotidilserinlerin yüzeye translokasyonu safhasına denk gelmektedir. Ancak hücreler membran bütünlüğünü kaybetmeye başladığında (geç apoptosis/sekonder nekrozis veya primer nekrozis) Anneksin-V intraselüler fosfotidilserine bağlanarak yanlış-pozitif sonuç verebilmektedir. Bu nedenle membranı hasarlı hücreleri belirleyebilmek için Annexin-V ile birlikte propidyum iyodür kullanılır. Hoechst boyası, canlı hücrede membrandan geçip çekirdeğe bağlanarak piknozis varlığını tespit etmek için kullanılır (Rieger ve ark., 2011). Yapılan 24 saatlik üçlü boyama sonucunda, HCT-116 hücrelerinde 3-nitrofenil kalkon türevi ile 3,25 μM dozundan itibaren artan dozlarda Annexin-V ve PI pozitif hücrelerin sayısı attığı, diğer yandan Hoechst boyama sonrasında ise apoptoza özgü piknozis yani kromatinin yoğunlaştığı hücrelerin olduğu görüldü. 3'lü boyama analizi sonucunda (merge) hücrelerin, artan dozlarda erken ve geç evre apoptoz vasıtasıyla, özellikle 25 μM dozunda geç apoptoz/sekonder nekroz ile öldüğü belirlendi. HT-29 hücrelerinde, 3-nitrofenil kalkon türevi ile 6,25 dozundan itibaren sırasıyla artan dozlarda kontrole oranla apoptozise özgü olan piknozis hücrelerin sayısında artış olduğu ve HCT-116 hücrelerine benzer şekilde 25 μM dozunda daha yoğun Anneksin-V pozitif/PI pozitif boyandığı için geç apoptoz veya nekroz ile öldüğü belirlendi. Ayrıca her iki hücrede elde edilen mikroskobik sonuçların canlılık analizi sonuçlarını desteklediği gözlendi. Farklı kalkon türevi ile yapılan bir çalışmada 2-asetil tiyofenin kalkon türevinin insan kolon kanseri hücre soyunda (HT-29) antikanser aktivitesinin apoptozis ile gerçekleştiği gösterilmiştir (de Vasconcelos ve ark., 2013). Elde edilen sonuçlar 3-nitrofenil kalkon türevi bulgularımızı destekler niteliktedir. SRB canlılık analizi ve floresan boyama sonuçları değerlendirildikten sonra ileri analizleri, doza bağlı antikanser etkiyi ortaya çıkarmak için gerçekleştirildi.

Hücrelerin çoğunlukla yönlendiği ölüm yolağı olan apoptozis mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik olarak kaspaz 3/7 aktivitesi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 3-nitrofenil kalkon türevi ile 48 saat tedavi sonucu her iki insan kolon kanseri hücrelerinde 3,125 μM dozundan itibaren kontrole oranla apoptotik hücrelerin sayısında artış meydana geldiği görüldü. Kaspaz 3/7 aktivite analizi sonucunda, hücrelerdeki apoptoz aktivitesi floresan görüntüleme bulgularımızı destekler niteliktedir. Akciğer

kanseri hücre hatlarında (A-549) yapılan bir çalışmada, 1,2,4-triazole yan gruplarına sahip kalkon türevlerinin kaspaz 3 aktivitesi tek hücre akım sitometrisi ve protein düzeyinde incelenmiş, bizim bulgularımıza benzer şekilde, gözlenen artışa bağlı olarak apoptozun indüklendiği ortaya çıkmıştır (Ahmed ve ark., 2018).

Bursa Uludağ Üniversitesi Moleküler Kanser Arastırma Laboratuvarı (BUMKAL) ekibimizinde bulunduğu birçok çalışmada çeşitli kalkon türevlerinin antikanser özellikleri araştırılmıştır. Farklı biyokimyasal yapıdaki kalkon bileşiklerinin apoptoz yolağı üzerinden sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Avci, 2020; Coskun ve ark., 2017; Done ve ark., 2022; Gündüz, 2020).

Hücre döngüsünün evreleri, büyüme faktörleri, sitokinler, onkogenler, siklinler, CDK gibi proteinler ile birlikte düzenlenmekte ve evrelerin birinde DNA'da hasar meydana geldiğinde, tümör baskılayıcı genler döngüyü kontrol altına alarak durdurmaktadır. Örneğin; sentezlenen DNA hasarlı ise döngü M evresine girmeden G_2 evresinde durdurulmaktadır. G_0/G_1 evresinde, saptanan DNA hasarı orta derecede ise tümör baskılayıcı gen (p53) tarafından p21 proteininin sentezlenmesi sağlanmaktadır. Siklin-CDK kompleksi inhibe edilerek döngü G_1 veya G_2 evresinde kalıcı durdurulmakta yahut hasar ortadan kalkana kadar askıya alınmaktadır (Matthews ve ark., 2022). Elde edilen bilgiler göz önünde bulundurularak, 3-nitrofenil kalkon türevi ile 24 saat tedavi sonucunda, her iki insan kolon kanseri hücrelerinde G_0/G_1 evresinde tutulma gözlendi, diğer bir ifadeyle kalkon türevinin, DNA sentez fazı olan S fazına girmelerini önleyerek çoğalmayı durdurduğu yönünde sonuca varıldı. Bir kalkon türevi olan 3, 4, 4, 5-tetrametoksi kalkon türevlerinin, çeşitli kanser hücreleri üzerinde etkili bir antiproliferatif ajan olduğu bulunmuştur. Bu bileşik (3, 4, 4, 5-tetrametoksi kalkon) ana kalkon olarak seçilmiştir ve anahtar ara ürün olarak 4-bromopropiloksi-3',4',5'-trimetoksi kalkon kullanılarak bir dizi beş kalkon-poliamin bileşikleri elde edilmiştir.
Bileşiklerin in-vitro kolon kanseri (HT-29, HCT-116) ve prostat kanseri (PC-3, DU-145) hücre soylarında bölünmeyi sırasıyla G_1 ve G_2 evrelerinde baskılayarak belirgin bir antiproliferatif etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Rioux ve ark., 2021). Tez çalışmamızın sonuçlarında benzer şekilde her iki kolon kanseri hücre soyunun (HCT-116 ve HT-29), tedavi sonrası G_1 fazında birikerek bölünmelerinin engellendiği bulunmuştur.

Hücrelerin 3-nitrofenil kalkon türevi uygulaması sonrası migrasyon ve koloni oluşturma yetenekleri mikroskop altında incelendi ve her iki hücrede de kalkon türevinin doza ve zamana bağlı olarak büyümeyi ve çoğalmayı baskıladığı görüldü. Literatürde bulgularımıza benzer şekilde çeşitli hücreler üzerinde kalkon türevleri kullanılarak yapılan migrasyon ve koloni oluşturma yeteneği ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, CT26.WT (fare kolon kanser hücre soyu) hücrelerinde L2H17 kalkon türevinin, invazyonu ve migrasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Xu ve ark., 2015). Bir başka çalışmada LNCaP ve PC-3 prostat kanser hücre soylarında 4-Maleamik Asit ve 4-Maleamid Peptid kalkon türevlerinin, migrasyonun önlenmesinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Szliszka ve ark., 2010).

Çalışmamızda son olarak, 3-nitrofenil kalkon türevinin insan kolon kanseri hücre soyları (HCT-116 ve HT-29) üzerinde apoptotik yolakta görevli mekanizmalara etkisi protein seviyesinde western blot yöntemi kullanılarak analizi gerçekleştirildi. Bu amaçla apoptozun farklı aşamalarında yer alan PARP, Bip, Dr4 ve Bcl-2 protein seviyelerine bakıldı. PARP-1(Poly [ADP-ribose] polymerase 1) proteini normal koşullarda çevresel strese yanıt olarak içsel yolakta DNA onarımında görev alırken kanserli hücrelerde düzeyi artan c-kaspaz 3'ün substratı olan Parp-1'i parçalaması sonucu enzimatik olarak aktif haldeki c-Parp, DNA'nın uç kısımlarına geri dönüşümsüz olarak bağlanır ve DNA hasarı oluşturur (Boulares ve ark., 1999). Bu mekanizma, içsel ve dışsal uyaran(lar) sonucunda apoptoz yolağını aktifleştirerek hücrenin proliferasyonunu önlemekte rol almaktadır.

Uygulanan 3-nitrofenil kalkon türevi sonucunda kırılmış PARP seviyesinin artması hücrelerde apoptoz yoluyla ölümün gerçekleştiğini göstermektedir. PARP'ın kırılması kaspaz 3/7 tarafından gerçekleştiği için Muse kaspaz 3-7 aktivite sonuçlarımızı desteklemektedir.

ER-stres belirteci olan Bip, ribozomda sentezlendikten sonra hücrede aktivite gösterecek olan çeşitli proteinlerin ER lümeninde doğru şekilde katlanması için modifikasyonlarını gerçekleştirmede görev alır. Eğer proteinin eksik veya yanlış katlanması düzeltilemez ise Bip düzeyi artması sonucu PERK/ATF4/CHOP yolağı üzerinden ER-aracılı apoptoz

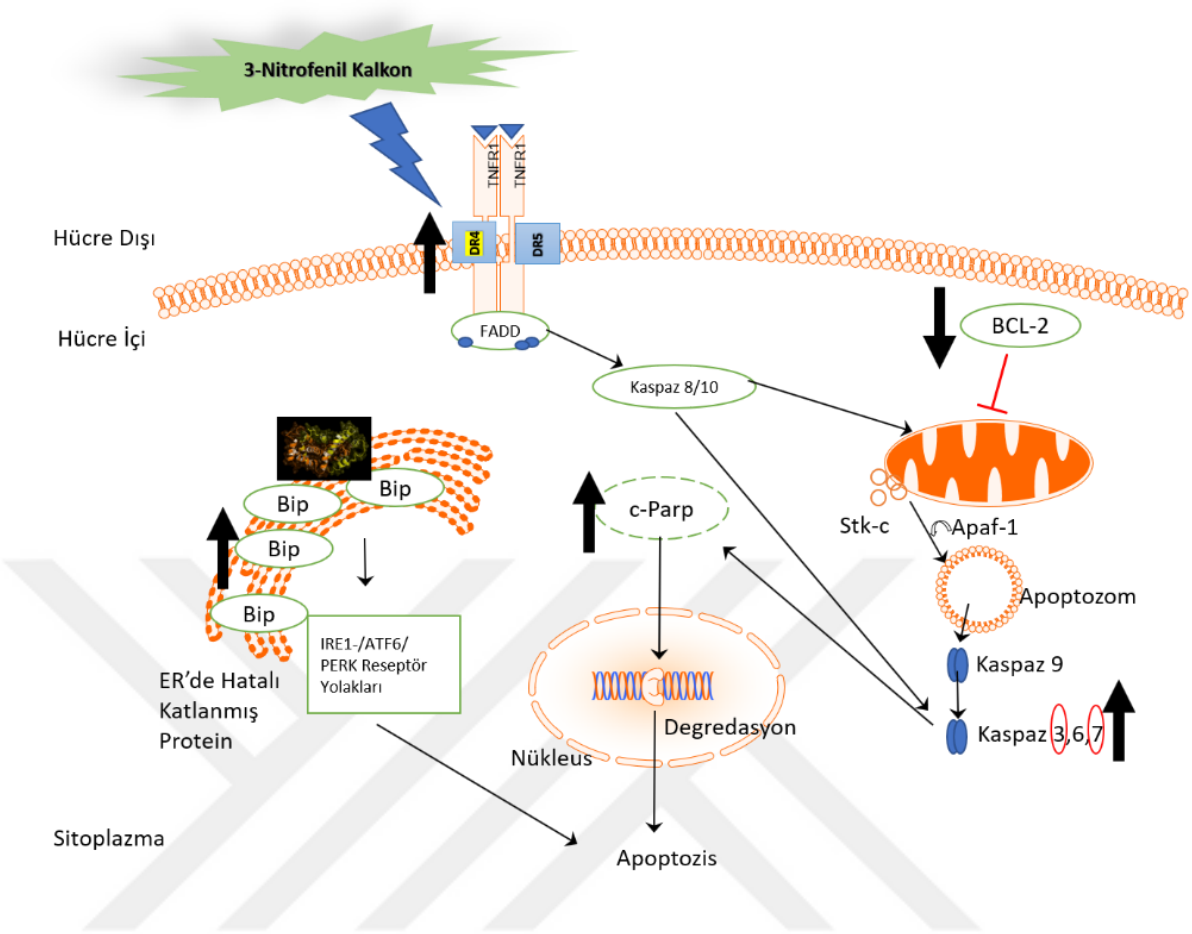
yolağı aktifleşir (Hourihan ve ark., 2016). ER'dan türetilen Hidrojen Peroksit (H_2O_2), NADPH oksidaz 4 (NOX4)'ten kaynaklanır ve ER stresine yol açmaktadır. Bu sebeple, İnositol Gerektiren Enzim-α (IRE1α) sülfenilasyonunun NOX-ER ve hücre ölümüyle bağlantılı mitokondriyal Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ekseni tarafından aktive edildiği bildirilmiştir (Yadav ve ark., 2014). Bu yüzden, kanser hücrelerinin özelliklerinden biri olan 'hücresel metabolitleri üretebilmek için yüksek protein sentezi yapması' düşünüldüğünde, uygulanan 3-nitrofenil kalkon türevi ile protein redoks dengesizliğine dayalı protein disfonksiyonunu tanıyan Bip proteinin miktarının artmasına bağlı olarak apoptotik hücre ölümü potansiyel antikanser terapötik mekanizmalardan biri olabilir. ER-stresine bağlı apoptozun analizi için yapılan bir çalışmada, Nedungadi ve grubu test ettikleri altı sentetik kalkon türevinden 2′-hidroksi-retro kalkonun, malign meme ve rahim ağzı kanseri hücrelerinde paraptoz adı verilen kapsamlı sitoplazmik vakuolasyon aracılı ölümü indüklemede etkili olduğunu ilk kez göstermişlerdir. ER işaretleyici protein kalretikülin ile immünofloresan, oluşan sitoplazmik vakuollerin ER'den kaynaklandığını göstermektedir. Bu ER genişlemesi, poliübikitinlenmiş proteinler, Bip ve CHOP'taki artış ile ispatlandığı için ER stresinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca 2′-hidroksi-retro kalkon tarafından hücre ölümü, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolması ve ATP miktarlarının azalması ile desteklenmiştir (Nedungadi ve ark., 2021).

Bcl-2 (B-cell lymphoma 2): Hücrede içsel yolakta görev alan Bcl-2 proteini, mitokondriden apoptozom kompleksi oluşumunu inhibe ederek apoptoz sürecini engelleyen antiapoptotik bir proteindir. Antikanser potansiyeli olan madde varlığında Bcl-2 baskılanarak mitokondri aracılı kaspaz kaspadı başlatılmış olur (Hsu ve ark., 2006). Literatüre benzer şekilde, uygulanan 3-nitrofenil kalkon türevi uygulanması sonucunda Bcl-2 protein seviyesinin azalması, apoptotik ölüm yolağının aktifleştiğini ortaya çıkarmaktadır.

DR4 (“Death receptor 4”): Hücre membranında lokalize olmuştur resöptör çeşididir. Apoptozis aktivitesi, FAS, TRAIL, DR4 gibi ölüm reseptörleri tarafından sitoplazmaya iletilen uyaranlar ile dışsal yolak üzerinden gerçekleşebilir. Reseptör trimerizasyonu, kaspaz-8 ve kaspaz-10'un aktivasyonu ile sonuçlanır. Aktif kaspaz-8 ve kaspaz-10 daha sonra efektör kaspasların aktivasyonu ile apoptozisi başlatır (Kazhdan ve Marciniak, 2004). HCT-116 ve HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde DR4 protein seviyelerindeki artış, 3-nitrofenil kalkon türevinin bu hücrelerde dışsal apoptotik yolağı uyardığını göstermiştir.

Bu tez çalışmasının sonuçlarından yola çıkarak, 3-nitrofenil kalkon türevinin insan kanseri hücrelerinde (HCT-116 ve HT-29) güçlü bir sitotoksik etkiye neden olduğu ve bu etkinin her iki hücre soyunda da apoptozis ile gerçekleştirdiği ortaya konmuştur. Bir sonraki inceleme basamağında, biyoinformatik analizlerin yapılması ile metastaz, hücre döngüsü ve yaşam yolaklarında görevli olan genler ve proteinlerle etkileşiminin aydınlatılmasına ek olarak in-vivo analizlerden elde edilecek sonuçlar ile hedefi spesifik olarak belirlenmiş antikanser aktiviteye sahip yeni terapötik ilaç geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

3-nitrofenil kalkon türevinin, uygulanan tedavi sonrasında HCT-116 ve HT-29 hücreleri üzerindeki antikanse etki mekanizmaları Şekil 5’de şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 5. 3-nitrofenil kalkon türevinin, uygulanan tedavi sonrasında HCT-116 ve HT-29 hücreleri üzerindeki antikanser etki mekanizmaları (BioRender ile çizilmiştir)

KAYNAKLAR

Abcam-Protocols Book (2010). *Protocols book.* https://docs.abcam.com/pdf/misc/abcam-protocols-book.pdf adresinden 26.11.2022 tarihinde alınmıştır.

Ahmed, F. F., Abd El-Hafeez, A. A., Abbas, S. H., Abdelhamid, D. ve Abdel-Aziz, M. (2018). New 1,2,4-triazole-Chalcone hybrids induce Caspase-3 dependent apoptosis in A549 human lung adenocarcinoma cells. *European journal of medicinal chemistry, 151*, 705-722. doi: 10.1016/J.EJMECH.2018.03.073

Andersen, J. L. ve Kornbluth, S. (2013). The Tangled Circuitry of Metabolism and Apoptosis. *Molecular cell*, *49*(3), 399-410. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2012.12.026

Arasavelli, A. M., Raghava Sharma, G. V. ve Vidavalur, S. (2016). Design, synthesis, and anticancer activity of novel aryl/heteroaryl chalcone derivatives. *Heterocyclic Communications*, *22*(1), 1-5. doi:10.1515/hc-2015-0271

Asher, E., Payne, C. M. ve Bernstein, C. (1995). Evaluation of cell death in EB v-transformed lymphocytes using agarose gel electrophoresis, light microscopy and electron microscopy: II. Induction of non-classic apoptosis ("para-apoptosis" by tritiated thymidine. *Leukemia and Lymphoma*, *19*(1-2), 107-119. doi:10.3109/10428199509059664

ATCC (2021). HCT-116 Product Sheet (CCL-247). https://www.atcc.org/products/ccl-247 adresinden 26.11.2022 tarihinde alınmıştır.

ATCC (2021). HT-29 Product Sheet (HTB-38). https://www.atcc.org/products/htb-38 adresinden 26.11.2022 tarihinde alınmıştır.

Avci, H. (2020). Benzofuran kalkon türevi kimyasallarının insan akciğer kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması [Yüksek lisans tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi] (Ulusal Tez Merkezi No: 661630).

Barone, C., Nuzzo, G., Cassano, A., Basso, M., Schinzari, G., Giuliante, F., Pozzo, C. (2007). Final analysis of colorectal cancer patients treated with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid neoadjuvant chemotherapy for unresectable liver metastases. *British Journal of Cancer, 97*(8), 1035-1039. doi: 10.1038/sj.bjc.6603988

Baykara, O. (2016). Kanser tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Balıkesir sağlık bilimleri dergisi*, *5*(3), 154-165. doi:10.5505/bsbd.2016.93823

Blasi, T., Hennig, H., …Summers, H. (2016). Label-free cell cycle analysis for high-throughput imaging flow cytometry. *Nat Commun, 7*, 10256-10265 https://doi.org/10.1038/ncomms10256

Boulares, A. H., Yakovlev, A. G., Ivanova, V., Stoica, B. A., Wang, G., Iyer, S., Smulson, M. (1999). Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *The Journal of biological chemistry*, *274*(33), 22932–22940. doi:10.1074/jbc.274.33.22932

Chang, L., Graham, P. H., Hao, J., Ni, J., Bucci, J., Cozzi, P. J., Li, Y. (2014). PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors enhance radiosensitivity in radioresistant prostate cancer cells through inducing apoptosis, reducing autophagy, suppressing NHEJ and HR repair pathways. *Cell Death and Disease*, *5*(10), 1-10. doi:10.1038/CDDIS.2014.415

Clevers, H. (2004). At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell*, *118*(6), 671-674. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.005

Coskun, D., Erkisa, M., Ulukaya, E., Coskun, M. F. ve Ari, F. (2017). Novel 1-(7-ethoxy-1-benzofuran-2-yl) substituted chalcone derivatives: Synthesis, characterization and anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *136*, 212-222. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.05.017

Coşkun, D. ve Ahmedzade, M. (2008). 3-(Substituted aryl)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propenones, part 1: Synthesis and characterization of some novel chalcones. *Synthetic Communications*, *38*(21), 3613-3622. doi:10.1080/00397910802178997

Crowley, L. C., Christensen, M. E., & Waterhouse, N. J. (2016). Measuring Survival of Adherent Cells with the Colony-Forming Assay. *Cold Spring Harbor protocols*, *2016*(8), 10.1101/pdb.prot087171. doi:10.1101/pdb.prot087171

Crowley, L. C. ve Waterhouse, N. J. (2016). Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor protocols*, *2016*(11), 958-962. doi:10.1101/PDB.PROT087312

Curtin, J. F. ve Cotter, T. G. (2003). Apoptosis: Historical perspectives. *Essays in biochemistry*, *39*, 1-10. doi:10.1042/BSE0390001

da Silva Siqueira, E., Concato, V. M., Tomiotto-Pellissier, F., Silva, T. F., da Silva Bortoleti, B. T., Gonçalves, M. D., Conchon-Costa, I. (2021). Trans-chalcone induces death by autophagy mediated by p53 up-regulation and -catenin down-regulation on human

hepatocellular carcinoma HuH7.5 cell line. *Phytomedicine*, *80*, 153373. doi:10.1016/j.phymed.2020.153373

Davies, R. J., Miller, R. ve Coleman, N. (2005). Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. Nature reviews. *Cancer*, *5*(3), 199-209. doi:10.1038/NRC1569

De, P., Carlson, J. H., Leyland-Jones, B., Williams, C. ve Dey, N. (2018). Triple Fluorescence staining to Evaluate Mechanism-based Apoptosis following Chemotherapeutic and Targeted Anti-cancer Drugs in Live Tumor Cells. *Scientific reports*, *8*(1). doi:10.1038/S41598-018-31575-3

de Vasconcelos, A., Campos, V. F., Nedel, F., Seixas, F. K., Dellagostin, O. A., Smith, K. R., Barschak, A. G. (2013). Cytotoxic and apoptotic effects of chalcone derivatives of 2-acetyl thiophene on human colon adenocarcinoma cells. *Cell Biochemistry and Function*, *31*(4), 289-297. doi:10.1002/cbf.2897

Devita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A., Lippincott, W. ve Publishers, W. (2001). Cancer: Principles and Practice of Oncology (6. Baskı) https://oncouasd.files.wordpress.com/2014/09/cancer-principles-and-practice-of-oncology-6e.pdf

Doğan, A. L. ve Güç, D. (2004). Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Acta Medica*, *35*(1), 34–42. https://actamedica.org/index.php/actamedica/article/view/180 adresinden 26.11.2022 tarihinde alınmıştır.

Done, G., Ari, F., Akgun, O., Akgun, H., Cevatemre, B. ve Gençkal, H. M. (2022). The Mechanism for Anticancer and Apoptosis-Inducing Properties of Cu(II) Complex with Quercetin and 1,10-Phenanthroline. *ChemistrySelect*, *7*(38). doi:10.1002/slct.202203242

Drutovic, D., Chripkova, M., Pilatova, M., Kruzliak, P., Perjesi, P., Sarissky, M., Mojzis, J. (2014). Benzylidenetetralones, cyclic chalcone analogues, induce cell cycle arrest and apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells. *Tumor Biology*. *35*(10), 9967–9975. doi:10.1007/s13277-014-2289-y

Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal transduction and targeted therapy*, *5*(1), 28. doi: 10.1038/s41392-020-0134-x

Fearon, E. R. ve Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, *61*(5), 759-767. doi:10.1016/0092-8674(90)90186-I

Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research, 7*(5), 1016–1036.

Fuchs, C. S., Giovannucci, E. L., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Speizer, F. E. ve Willett, W. C. (1994). A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *The New England journal of medicine, 331*(25), 1669-1674. doi:10.1056/NEJM199412223312501

Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., Wooster, R. ve Stratton, M. R. (2001). Cancer and genomics. *Nature*, *409*(6822), 850-852. doi:10.1038/35057046

Go, M., Wu, X. ve Liu, X. (2005). Chalcones: An Update on Cytotoxic and Chemoprotective Properties. *Current Medicinal Chemistry*, *12*(4), 483-499. doi:10.2174/0929867053363153

Gomes, M., Muratov, E., Pereira, M., Peixoto, J., Rosseto, L., Cravo, P., Neves, B. (2017). Chalcone Derivatives: Promising Starting Points for Drug Design. *Molecules, 22*(8), 1210. doi:10.3390/molecules22081210

Goymer, P. (2008). Natural selection: The evolution of cancer. *Nature, 454*(7208), 1046-1048. doi:10.1038/4541046A

Gribovskaja-Rupp, I., Kosinski, L. ve Ludwig, K. A. (2011). Obesity and colorectal cancer. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, *24*(4), 229-243. doi:10.1055/s-0031-1295686

Coşkun, G, Özgür, H. (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Archives Medical Review Journal*, *20*(3), 145-158. https://dergipark.org.tr/en/pub/aktd/issue/2215/29409

Gündüz, H. (2019). Benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin insan meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerin araştırılması. [Yüksek Lisans Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi] (Ulusal Tez Merkezi No: 592808)

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, *12*(1), 31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059

Haque, W. A., Shimomura, I., Matsuzawa, Y. ve Garg, A. (2002). Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 87*(5), 2395-2395. doi:10.1210/JCEM.87.5.8624

Henry, E. J., Bird, S. J., Gowland, P., Collins, M. ve Cassella, J. P. (2020). Ferrocenyl chalcone derivatives as possible antimicrobial agents. *The Journal of antibiotics*, *73*(5), 299-308. doi:10.1038/S41429-020-0280-Y

Hotamisligil, G. S. (2010). Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell*, *140*(6), 900. doi: 10.1016/J.CELL.2010.02.034

Hourihan, J., Moronetti~Mazzeo, L., Fernández-Cárdenas, L. ~Paulette ve Blackwell, T. ~Keith. (2016). Cysteine Sulfenylation Directs IRE-1 to Activate the SKN-1/Nrf2 Antioxidant Response. *Molecular Cell*, *63*(4), 553-566. doi: 10.1016/j.molcel.2016.07.019

Hsu, Y. L., Kuo, P. L., Tzeng, W. S. ve Lin, C. C. (2006). Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, *44*(5), 704-713. doi: 10.1016/j.fct.2005.10.003

Hui, H., Dotta, F., di Mario, U. ve Perfetti, R. (2004). Role of caspases in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death. *Journal of Cellular Physiology*, *200*(2), 177-200. doi:10.1002/JCP.20021

Hussain, S., Singh, A., Nazir, S. U., Tulsyan, S., Khan, A., Kumar, R., … Mehrotra, R. (2019). Cancer drug resistance: A fleet to conquer. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(9), 14213-14225. doi:10.1002/JCB.28782

Hussaini, S. M. A., Yedla, P., Babu, K. S., Shaik, T. B., Chityal, G. K. ve Kamal, A. (2016). Synthesis and Biological Evaluation of 1,2,3-triazole tethered Pyrazoline and Chalcone Derivatives. *Chemical Biology & Drug Design*, *88*(1), 97-109. doi:10.1111/cbdd.12738

Jackson-Thompson, J., Ahmed, F., German, R. R., Lai, S. M. ve Friedman, C. (2006). Descriptive epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998–2001. *Cancer*, *107*(S5), 1103-1111. doi:10.1002/CNCR.22007

Janout, V. ve Kollárová, H. (2001). Epidemiology of colorectal cancer. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, *145*(1), 5-10. doi:10.5507/BP.2001.001

Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T. ve Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, *1*(3), 332-349. doi:10.1002/fft2.44

Karthikeyan, C., Moorthy, N. S. H. N., Ramasamy, S., Vanam, U., Manivannan, E., Karunagaran, D. ve Trivedi, P. (2014). Advances in Chalcones with Anticancer Activities. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, *10*(1), 97-115. doi:10.2174/1574892809666140819153902

Kazhdan, I. ve Marciniak, R. A. (2004). Death receptor 4 (DR4) efficiently kills breast cancer cells irrespective of their sensitivity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Cancer gene therapy*, *11*(10), 691-698. doi: 10.1038/SJ.CGT.7700747

Kheirelseid, E. , Miller, N. and Kerin, M. (2013) Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature. *American Journal of Molecular Biology*, *3*, 72-80. doi: 10.4236/ajmb.2013.32010.

Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., Muraoka, M., Onda, A., Okumura, Y., Miyaki, M. (1996). Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology*, *111*(2), 307-317. doi:10.1053/GAST.1996.V111.PM8690195

Kroemer G. (2004). Early work on the role of mitochondria in apoptosis, an interview with Guido Kroemer. *Cell death and differentiation*, *11*, 33–36. doi:10.1038/sj.cdd.4401448

Kumar, V., Abbas, Abul. K., Aster, Jon. C. ve Turner, Jerrold. R. (2015). Pathologic Basis of disease (10. Baskı). *Elsevier*, eBook ISBN: 9780323609937

Lean, M. E. J., Noroozi, M., Kelly, I., Burns, J., Talwar, D., Sattar, N. ve Crozier, A. (1999). Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes*, *48*(1), 176-181. doi:10.2337/DIABETES.48.1.176

Leon-Gonzalez, A., Acero, N., Munoz-Mingarro, D., Navarro, I. ve Martin-Cordero, C. (2015). Chalcones as Promising Lead Compounds on Cancer Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, *22*(30), 3407-3425. doi:10.2174/0929867322666150729114829

Li, F. Y. ve Lai, M. de. (2009). Colorectal cancer, one entity or three. *Journal of Zhejiang University. Science*. B, *10*(3), 219. doi:10.1631/JZUS.B0820273

Li, J. ve Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, *27*(48), 6194-6206. doi:10.1038/onc.2008.297

Lin, Y., Zhang, M., Lu, Q., Xie, J., Wu, J. ve Chen, C. (2019). A novel chalcone derivative exerts anti-inflammatory and anti-oxidant effects after acute lung injury. *Aging*, *11*(18), 7805-7816. doi:10.18632/AGING.102288

Lu, D.-Y., Qu, R.-X., Lu, T.-R. ve Wu, H.-Y. (2017). Cancer Bioinformatics for Updating Anticancer Drug Developments and Personalized Therapeutics. *Reviews on recent clinical trials*, *12*(2), 101-110. doi:10.2174/1574887112666170209161444

Luminex (2022). Guava Muse Cell Analyzer: Laser-based fluorescence detection. https://www.luminexcorp.com/?wpdmdl=40608 adresinden 26.11.2022 tarihinde alınmıştır.

Lüleyap, H. Ü. (2021). Moleküler Genetiğin Esasları (1. Baskı). *Akademisyen Kitap Portalı*. ISBN-13 (15): 978-605-258-605-1 doi:10.37609/akya.487

Lynch, H. T., Boland, C. R., Gong, G., Shaw, T. G., Lynch, P. M., Fodde, R., de la Chapelle, A. (2006). Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *European journal of human genetics*, *14*(4), 390-402. doi: 10.1038/SJ.EJHG.5201584

Lynch, H. T., Snyder, C. L., Shaw, T. G., Heinen, C. D. ve Hitchins, M. P. (2015). Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nature Reviews Cancer*, *15*(3), 181-194. doi:10.1038/NRC3878

Mahapatra, D. K., Bharti, S. K. ve Asati, V. (2017). Chalcone Derivatives: Anti-inflammatory Potential and Molecular Targets Perspectives. *Current topics in medicinal chemistry*, *17*(28), 3146-3169. doi:10.2174/1568026617666170914160446

Magrì, A. ve Bardelli, A. (2019). Does early metastatic seeding occur in colorectal cancer?. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *16*, 651–653. doi:10.1038/s41575-019-0200-4

Matthews, H. K., Bertoli, C. ve de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. Nature reviews. *Molecular cell biology*, *23*(1), 74-88. doi:10.1038/S41580-021-00404-3

Mercado-Perez, A. ve Beyder, A. (2022). Gut feelings: mechanosensing in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *19*, 283–296. https://doi.org/10.1038/s41575-021-00561-y

Millipore, M. (2013). Muse ® Caspase-3/7 Kit User's Guide (Cat. No. MCH100108). https://www.merckmillipore.com/TR/tr/20151006_191750#mch100108 adresinden 26.11.2022 tarihinde alınmıştır.

Millipore, M. (2013). Muse ® Cell Cycle Kit User's Guide (Cat. No. MCH100106). http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/musekits/protocols/MCH100106%204600-3387MAN%20[B]%20MUSE%20CELL%20CYCLE%20KIT%20USER%27S%20GUIDE.pdf adresinden 26.11.2022 tarihinde alınmıştır.

Mitteer, D. R. ve Greer, B. D. (2022). Using GraphPad Prism's Heat Maps for Efficient, Fine-Grained Analyses of Single-Case Data. Behavior analysis in practice, 15(2), 505-514. doi:10.1007/S40617-021-00664-7

Nagtegaal, I. D., Odze, R. D., Klimstra, D., Paradis, V., Rugge, M., Schirmacher, P., Cree, I. A. (2020). The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*, *76*(2), 182-188. doi:10.1111/HIS.13975

National Center for Biotechnology Information (2022). *PubChem Compound Summary for CID 9223*, Benzofuran. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzofuran adresinden 26.11.2022 tarihinde alınmıştır.

National Center for Biotechnology Information (2022). *PubChem Substance Record for SID 386276809*, Sulforhodamine B. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/386276809 adresinden 26.11.2022 tarihinde alınmıştır.

Nedungadi, D., Binoy, A., Pandurangan, N., Nair, B. G. ve Mishra, N. (2021). Proteasomal dysfunction and ER stress triggers 2′-hydroxy-retrochalcone-induced paraptosis in cancer cells. *Cell Biology International*, *45*(1), 164-176. doi:10.1002/cbin.11480

Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation*, *6*(11), 1028-1042.
doi:10.1038/SJ.CDD.4400598

Novilla, A., Mustofa, M., Astuti, I., Jumina, J. ve Suwito, H. (2019). Cytotoxic Activity of Methoxy-4'amino Chalcone Derivatives Against Leukemia Cell Lines. *Molecular and Cellular Biomedical Sciences*, *3*(1), 34. doi:10.21705/mcbs.v3i1.44

Ogino, S., Nosho, K., Kirkner, G. J., Shima, K., Irahara, N., Kure, S., Fuchs, C. S. (2009). PIK3CA Mutation Is Associated With Poor Prognosis Among Patients With Curatively Resected Colon Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(9), 1477. doi:10.1200/JCO.2008.18.6544

Orellana, E. ve Kasinski, A. (2016). Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *BIO-PROTOCOL*, *6*(21). doi:10.21769/bioprotoc.1984

Ouyang, Y., Li, J., Chen, X., Fu, X., Sun, S., Wu, Q. (2021). Chalcone Derivatives: Role in Anticancer Therapy. *Biomolecules*. *11*(6) 894-930. doi:10.3390/biom11060894.

Panche, A. N., Diwan, A. D. ve Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*(47), 1-15. doi:10.1017/JNS.2016.41

Pande, A. N., Biswas, S., Reddy, N. D., Jayashree, B. S., Kumar, N. ve Rao, C. M. (2017). In vitro and in vivo anticancer studies of 2′-hydroxy chalcone derivatives exhibit apoptosis in colon cancer cells by hdac inhibition and cell cycle arrest. *EXCLI Journal*, *16*, 448-463. doi:10.17179/excli2016-643

Pang, M., Wu, G., Hou, X., Hou, N., Liang, L., Jia, G., Shuai, P., Luo, B., Wang, K., Li, G. (2014). LIN28B promotes colon cancer migration and recurrence. *PLOS ONE*, *9*(10), e109169. doi:10.1371/journal.pone.0109169

Park, M. T. ve Lee, S. J. (2003). Cell cycle and cancer. *Journal of biochemistry and molecular biology*, *36*(1), 60-65. doi:10.5483/BMBREP.2003.36.1.060

Pesaran Seiied Bonakdar, A., Vafaei, F., Farokhpour, M., Nasr Esfahani, M. H., Massah, A. R. (2017). Synthesis and Anticancer Activity Assay of Novel Chalcone-Sulfonamide Derivatives. *Iranian journal of pharmaceutical research, 16*(2), 565–568.

Plácido, A. I., Pereira, C. M. F., Duarte, A. I., Candeias, E., Correia, S. C., Santos, R. X., Moreira, P. I. (2014). The role of endoplasmic reticulum in amyloid precursor protein processing and trafficking: Implications for Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta- Molecular Basis of Disease*, *1842*(9), 1444-1453. doi:10.1016/J.BBADIS.2014.05.003

Porter, A. G. ve Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation*, *6*(2), 99-104. doi: 10.1038/SJ.CDD.4400476

Puck, T. T. ve Marcus, P. I. (1956). Action of x-rays on mammalian cells. *The Journal of experimental medicine*, *103*(5), 653-666. doi:10.1084/jem.103.5.653

Rao, C. V. ve Yamada, H. Y. (2013). Genomic instability and colon carcinogenesis: from the perspective of genes. *Frontiers in oncology*, *3*, 130-133. doi:10.3389/fonc.2013.00130

Ribera, J., Ayala, V. ve Esquerda, J. E. (2002). c-Jun-like immunoreactivity in apoptosis is the result of a crossreaction with neoantigenic sites exposed by caspase-3-mediated proteolysis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *50*(7), 961-972. doi:10.1177/002215540205000710

Riedl, S. J. ve Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Nature reviews. *Molecular cell biology*, *5*(11), 897–907. doi:10.1038/nrm1496

Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D. ve Barreda, D. R. (2011). Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments*, (50), 2597. doi:10.3791/2597

Rioux, B., Pinon, A., Gamond, A., Martin, F., Laurent, A., Champavier, Y., Barette, C., Liagre, B., Fagnère, C., Sol, V., Pouget, C. (2021). Synthesis and biological evaluation of chalcone-polyamine conjugates as novel vectorized agents in colorectal and prostate

cancer chemotherapy. *European journal of medicinal chemistry*, *222*, 113586. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113586

Rizeq, B., Gupta, I., Kheraldine, H., Elkhalifa, D., Al-Farsi, H. F., Moustafa, A.-E. al ve Khalil, A. (2021). Novel Nitrogen-Based Chalcone Analogs Provoke Substantial Apoptosis in HER2-Positive Human Breast Cancer Cells via JNK and ERK1/ERK2 Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(17), 9621. doi:10.3390/ijms22179621

Rocha, S., Ribeiro, D., Fernandes, E. ve Freitas, M. (2020). A Systematic Review on Anti-diabetic Properties of Chalcones. *Current medicinal chemistry*, *27*(14), 2257-2321. doi:10.2174/0929867325666181001112226

Sartor, R. (2006). Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *3*, 390–407. doi:10.1038/ncpgasthep0528

Satari, A., Ghasemi, S., Habtemariam, S., Asgharian, S. ve Lorigooini, Z. (2021). Rutin: A Flavonoid as an Effective Sensitizer for Anticancer Therapy; Insights into Multifaceted Mechanisms and Applicability for Combination Therapy. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, *2021*, Article ID:9913179. doi:10.1155/2021/9913179

Sayed, M., Rahman, S. M. M. ve Lee, D.-U. (2015). Synthesis, biological evaluation, quantitative-SAR and docking studies of novel chalcone derivatives as antibacterial and antioxidant agents. *Chemical Papers*, *69*(8), 1118-1129. doi:10.1515/chempap-2015-0113

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. ve Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: a cancer journal for clinicians*, *72*(1), 7-33. doi:10.3322/CAAC.21708

Singh, P., Anand, A. ve Kumar, V. (2014). Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *85*, 758-777.
doi:10.1016/j.ejmech.2014.08.033

Skuse, A. (2015). *Constructions of Cancer in Early Modern England* (1. Baskı). Palgrave Macmillan London, doi:10.1057/9781137487537

Stadelmann, C. ve Lassmann, H. (2000). Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell and tissue research*, *301*(1), 19-31. doi:10.1007/S004410000203

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. ve Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and

Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209-249. doi:10.3322/CAAC.21660

Szliszka, E., Czuba, Z. P., Mazur, B., Sedek, L., Paradysz, A. ve Krol, W. (2010). Chalcones Enhance TRAIL-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(1), 1. doi:10.3390/IJMS11010001

Taşkın, M., (2016). Benzofuran sübstitüe kalkonların sentezi. [Yüksek Lisans Tezi, Adıyaman Üniversitesi] (Ulusal Tez Merkezi No: 438944)

Taylor, M. B. (1998). The cell. A molecular approach; Edited by G H Cooper. ASM Press, Washington DC, Sinauer Associates, Sunderland, MA. 1997 ISBN 0-87893-119-8. *Biochemical Education*, *26*(1), 98-99. doi:10.1016/S0307-4412(98)00065-X

Taylor, R. C., Cullen, S. P. ve Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. Nature reviews. *Molecular cell biology*, *9*(3), 231-241. doi:10.1038/NRM2312

Towbin, H., Staehelin, T. ve Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(9), 4350-4354. doi:10.1073/PNAS.76.9.4350

Ulukaya, E., Acilan, C. ve Yilmaz, Y. (2011). Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell biochemistry and function*, *29*(6), 468-480. doi:10.1002/CBF.1774

Vichai, V. ve Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, *1*(3), 1112-1116. doi:10.1038/nprot.2006.179

Wang, H. W., Yang, S. H., Huang, G. da Lin, J. K., Chen, W. S., Jiang, J. K., Teng, H. W. (2014). Temsirolimus enhances the efficacy of cetuximab in colon cancer through a CIP2A-dependent mechanism. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *140*(4), 561-571. doi:10.1007/s00432-014-1596-4

Wang, X., Decker, C. C., Zechner, L., Krstin, S. ve Wink, M. (2019). In vitro wound healing of tumor cells: Inhibition of cell migration by selected cytotoxic alkaloids. *BMC Pharmacology and Toxicology*, *20*(1). doi:10.1186/s40360-018-0284-4

Wani, Z. A., Guru, S. K., Rao, A. V. S., Sharma, S., Mahajan, G., Behl, A., Mondhe, D. M. (2016). A novel quinazolinone chalcone derivative induces mitochondrial dependent apoptosis and inhibits PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human colon cancer HCT-116 cells. *Food and Chemical Toxicology*, *87*, 1-11. doi: 10.1016/J.FCT.2015.11.016

Woitok M, Grieger E, Akinrinmade OA, Bethke S, …, Pham AT. (2020) Using the SNAP-Tag technology to easily measure and demonstrate apoptotic changes in cancer and blood cells with different dyes. *PLOS ONE 15*(12): e0243286. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243286

Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *30*(87), 1-14. doi:10.1186/1756-9966-30-87/TABLES/3

Xu, S., Chen, M., Chen, W., Hui, J., Ji, J., Hu, S., Liang, G. (2015). Chemopreventive effect of chalcone derivative, L2H17, in colon cancer development. *BMC Cancer*, *15*(1). doi:10.1186/S12885-015-1901-X

Yadav, R. K., Chae, S.-W., Kim, H.-R. ve Chae, H. J. (2014). Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer. *Journal of Cancer Prevention*, *19*(2), 75-88. doi:10.15430/jcp.2014.19.2.75

Yao, H., Xu, W., Shi, X., & Zhang, Z. (2011). Dietary flavonoids as cancer prevention agents. *Journal of environmental science and health*. *29*(1), 1–31. doi:10.1080/10590501.2011.551317

Youle, R. J. ve Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature reviews. *Molecular cell biology*, *9*(1), 47-59. doi:10.1038/NRM2308

Zhang, J., Reedy, M. C., Hannun, Y. A. ve Obeid, L. M. (1999). Inhibition of caspases inhibits the release of apoptotic bodies: Bcl-2 inhibits the initiation of formation of apoptotic bodies in chemotherapeutic agent-induced apoptosis. *The Journal of cell biology*, *145*(1), 99-108. doi:10.1083/JCB.145.1.99

Zhuang, C., Zhang, W., Sheng, C., Zhang, W., Xing, C. ve Miao, Z. (2017). Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chemical Reviews*, *117*(12), 7762-7810. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00020