BENZOFURAN KALKON TÜREVİ KİMYASALLARININ İNSAN AKCİĞER KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hediye AVCI

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BENZOFURAN KALKON TÜREVİ KİMYASALLARININ İNSAN AKCİĞER KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hediye AVCI
000-0000-00000

Prof. Dr. Ferda ARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA–2020
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BENZOFURAN KALKON TÜREVİ KİMYASALLARIN
İNSAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hediye AVCI

Bursa Uludağ Üniveristesi
Fen Blimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ferda ARI

Akciğer kanseri dünyada ve ülkemizde en sık rastlanan sağlık sorunlarından biridir. Günümüzde akciğer kanseri için çeşitli tedavi yöntemleri (cerrahi operasyon, kemoterapi, radyoterapi) geliştirilmiş olmasına rağmen yeni stratejilere ve ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle doğal kaynaklardan elde edilebilecek anti kanser ajanlar oldukça ilgi çekmektedir. Anti kanser aktiviteye sahip olan flavonoidlerin bir alt grubu olan kalkonlar son yıllarda biyolojik aktiviteleri bakımından büyük bir ilgi görmektedir. Farklı yapılardaki doğal ya da sentetik kalkon türevlerinin kanser hücrelerinde anti kanser aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.

Bu tez çalışmasında sentezi ve karakterizasyonları gerçekleştirilen benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin (Kompleks 1 ve Kompleks 2) antikanser aktivitesi insan akciğer kanser hücreleri (A549 ve H1299) üzerinde araştırılmıştır. Komplekslerin, sağlıklı hücrelerde olası etkilerini belirleyebilmek için sağlıklı akciğer hücre soyu (BEAS-2B) kullanılmıştır. Komplekslerin hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisi SRB (24, 48 ve 72 saat) ve ATP (48 ve 72 saat) canlılık testleri ile belirlenirken, hücrelerde ki ölüm modu (apoptosis/nekrozis), floresan boyama ile belirlenmiştir. Ayrıca komplekslerin hücrelerdeki migrasyon yetenekleri yara iyileşmesi testi ile araştırılmıştır.

Sonuç olarak benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin insan akciğer kanser hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik aktivite göstererek hücre büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur. Ayrıca bu komplekslerin hücrelerde apoptozu indükleyerek, invazyon yeteneklerinde azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Alınan sonuçlara göre benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin akciğer kanseri tedavisinde umut vadeden ajanlar olabileceği ve ileri analizlerin yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, Antikanser aktivite, Apoptoz, Kalkonlar

2020,ix+87

ABSTRACT

Master's Thesis

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF BENZOFURAN SUBSTITUTE CHALCONE DERIVATIVES ON HUMAN LUNG CANCER CELLS

Hedıye AVCI

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

Supervisor: Prof. Dr. Ferda ARI

Lung cancer is one of the most common health problems in the world and in our country. Although various treatment methods (surgical operation, chemotherapy, radiotherapy) have been developed for lung cancer, new strategies and drugs are needed. In particular, anti-cancer agents that can be obtained from natural sources attract great attention. Chalcones, which are a subgroup of flavonoids with anticancer activity, have attracted great interest in terms of their biological activities in recent years. It has been observed that natural or synthetic chalcone derivatives with different structures have anticancer activity in cancer cells. In this thesis, the anticancer activity of benzofuran substituted chalcone derivatives (Complex 1 and Complex 2) whose synthesis and characterization was performed was investigated on human lung cancer cells (A549 and H1299). The healthy lung cell line (BEAS-2B) was used to determine the possible effects of the complexes on healthy cells. Cytotoxic effect of the complexes on cell viability was determined by SRB (24, 48 and 72 hours) and ATP (48 and 72 hours) viability tests, while the mode of death (apoptosis / necrosis) in cells was determined by fluorescent staining. In addition, the migration abilities of the complexes in cells were investigated by the wound healing test. As a result, it was found that benzofuran substituted chalcone derivatives inhibited cell growth in human lung cancer cells by showing cytotoxic activity depending on dose and time. In addition, it has been determined that these complexes induce apoptosis in cells, causing a decrease in invasion capabilities. According to the results, it was concluded that benzofuran substituted chalcone derivatives could be promising agents in the treatment of lung cancer and further analysis should be done.

Keywords: Anticancer activity, Apoptosis, Chalcones, Lung cancer

2020, ix +87

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecimde sabrı, bilgisi ve deneyimleri ile her konuda rehberlik eden değerli hocam Prof. Dr. Ferda ARI'ya,

Bu süreçte güler yüzü ve bilgi birikimi ile çalışmalarımda yardımcı olan ve sorularımı yanıtsız bırakmayan sayın hocam Doç. Dr. Egemen DERE'ye

Benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin sentezini yapan ve tez çalışmamda kullanılmasına izin veren Sayın Dr. Demet Coşkun'a

Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan arkadaşım Hülya GÜNDÜZ' e

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak her zaman yanımda olan, aldığım her kararda beni destekleyen ve bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Hediye AVCI

21/09/2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELER DİZİNİ xi
1.GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 5
2.1. Kanser 5
2.1.2. Karsinogenezis 6
2.1.3. Kanser hücrelerinin temel özellikleri 7
2.2. Akciğer Kanseri 8
2.2.1. Akciğer kanseri epidemiyolojisi 8
2.2.2. Akciğer kanseri etiyolojisi 9
2.2.3. Risk faktörleri 9
2.2.4. Akciğer kanserinin histolojik sınıflandırılması 12
2.2.5. Akciğer kanseri moleküler biyolojisi 13
2.2.6. Tümör mikro çevresi ve akciğer kanseri 16
2.3. Apoptoz 17
2.3.1. Apoptozun düzenlenmesi 19
2.3.2. Apoptoziste rol oynayan mediatörler 19
2.3.3. Apoptoz mekanizmaları 21
2.3.4. Ekstrinsik/Dışsal yolak 21
2.3.5. İntrinsik/İçsel yolak 22
2.3.6. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis 24
2.3.7. Hücre ölümünde gerçekleşen morfolojik değişiklikler 25
2.3.8. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar 25
2.4. Flavonoidler 27
2.5. Kalkonlar 28
2.6. Benzofuranlar 29
2.7. Pirazolinler 29
2.8. Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite 30
2.9. Tez Çalışmasında Kullanılan Hücre Soyları 32
3. MATERYAL ve YÖNTEM 33
3.1. Materyal 33
3.1.1. Kimyasal maddeler 33
3.1.2. Sarf malzemeler 33
3.1.3. Cihazlar 34
3.2. Yöntem 35
3.2.1. Benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin (Kompleks 1ve kompleks 2 bileşikleri) hazırlanması 35
3.3. Hücre Kültürü 35
3.3.1. Hücre soylarının stoktan çıkartılması 35
3.3.2. Hücre soylarının pasajlanması 35

Sayfa

3.3.3. Hücre soylarının stoklanması 36
3.3.4. Kullanılan besiyerinin hazırlanması 36
3.3.5. Hemositometre ile hücrelerin sayımı 37
3.4. SRB (Sulforhadamine B) Canlılık Metodu 37
3.5. ATP (adenozin trifosfat) Canlılık Metodu 38
3.6. Hoechst 33342, Propidiyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi 40
3.7. Yara İyileşmesi 41
3.8. İstatistiksel Analiz 41
4.BULGULAR 42
4.1. SRB Canlılık Testi Bulguları 42
4.2. ATP Canlılık Testi Bulguları 49
4.3. Faz/ Kontrast Mikroskop İle Morfolojik Görüntü Bulguları 53
4.4. Hoechst 33342, Propidium İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi Bulguları 55
4.5. Yara İyileşmesi (Migrasyon Yeteneği) Bulguları 60
TARTIŞMA ve SONUÇ 65
KAYNAKLAR DİZİNİ 72
ÖZGEÇMİŞ 87

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
^{O}C	Santigrat Derece

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
A549	Akciğer kanser hücresi soyu
AIF	Apoptozis indükleyici factor
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive eden faktör
Apo-1	Fas ilişkili ölüm reseptörü
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin trifosfat
BAX	Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl	Gen ailesi
Bcl1	B hücre lenfoma geni1
Bcl2	B hücre lenfoma geni2
Bcl-XL	Bcl-2 ilişkili XL proteini
BEAS-2B	Sağlıklı akciğer hücre soyu
BH1-BH4	Bcl-2 homolog bölgesi
Bim	Gen
Bmf	Gen
BPDE	Benzopiren dimetiloksit
C6	Sıçan gliomu
CARD	Kaspaz takviye alanı
CaSki	İnsan ince bağırsak kanser soyu
CD95	Fas ilişkili ölüm reseptörü
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CDK-C	Siklin -siklin bağımlı kinaz
CDKI	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
C-MYC	Onkogen
CSF	Koloni uyarıcı factor
CT26.WT	İnsan kolon kanser hücre soyu
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
DD	Ölüm domaini
DED	Kaspaz ölüm alanı
DISC	Ölüm indükleyici 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
DU145	İnsan prostat kanseri hücre soyu
ECM	Ekstraselüler matriks
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktör reseptörü
EndoG	Endonükleaz G
FADD	Fas ilişkili ölüm alanı
Fas	Gen
FasL	Gen
FBS	Fetal sığır serumu
GAP	GTPaz aktive edici proteinler
GDP	Guanozin difosfat
GEF	Guanine exchange factor
Globocan	Küresel kanser gözlemevi
GTP	Guanozin trifosfat
H1299	Küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre dizisi
HCT116	İnsan kolon kanser hücre soyu
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
HIF1-α	Hipoksi indükleyici faktör 1- α
Ht29	İnsan kolon kanser hücre soyu
HtrA2/omi	HtrA Mitokondriyal serin proteaz
HUVEC	İnsan endotel hücre soyu
IAP	Apoptoz inhibitör proteinleri
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
ICAD	Kaspazla active edilen DNaz inhibitörü
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü inducing ligand
IL2	İnterlökin2
IMR-32	İnsan nöroblastom hücre soyu
KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
L2H17	Kalkon türevi
LC_{50}	%50 letal konsantırasyon
LC_{70}	%70 letal konsantırasyon
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
Kısaltmalar	**Açıklamalar**

MOMP	Mitokondri dış mem bran permeabilizasyonu
MRC-5	İnsan fetal akciğer fibroblast hücreleri
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NCAM	Nöral hücre adhezyon molekülü
NCI	"Nationel cancer instutue" (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
PCNA	Prolifere hücre çekirdek antijeni
Ph	("Power of Hydrogen") Hidrojenin gücü
PI	Propidyum iyodür
RAS	Onkogen
Rb	Retinoblastoma
RIP	Reseptör etkileşim protein
ROCK I	Rho ilişkili sarmal oluşturan kinaz I
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SMAC	İkinci mitokondriya türevi kaspaz
SRB	Sulforhodamine B
TCA	Trikloroasetik asit
TMÇ	Tümör mikroçevresi
TNF	Tümör nekrozis faktör
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
TP53	Tümör protein 53
TRADD	TNFR-1 ilişkili ölüm protein
TRAIL	TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
USA	United States of America
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Kanser ve normal hücre çoğalması (Anonim 2015c). 6
Şekil 2.2. Kanserin temel özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011) 8
Şekil 2.3. Histolojik açıdan akciğer kanserinin sınıflandırılması (Motadi ve ark. 2007). 13
Şekil 2.4. Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu (Fulda ve Debatin 2006'dan değiştirilerek alınmıştır). 22
Şekil 2.5. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması (Zimmermann ve ark. 2001) 24
Şekil 2.6.. Apoptoz ve nekrozun şematik karşılaştırılması (Anonim 2016) 27
Şekil 2.7. Flavonoid yapısı (Taşkın 2016) 28
Şekil 2.8. Kalkon yapısı (Taşkın 2016)..... 28
Şekil 2.9. Benzofuran halkası (Taşkın 2016)..... 29
Şekil 2.10.Tezde kullanılan komplekslerin kimyasal yapıları A) Kompleks 1 ve B) Kompleks 2 (Coşkun ve Ahmedzade 2008, Coşkun ve ark. 2011) 30
Şekil 2.11. Deneyde kullanılan A549 ve H1299 akciğer kanseri hücre soyları faz kontrast görüntüleri (Anonim 2019) 32
Şekil 3.1. Sulforhodamine B'nin kimyasal yapısı (Polat ve ark. 2011). 37
Şekil 3.2. ATP ve Mg^{+2} iyonları varlığında lüsiferin substratı ile lüsiferaz enziminin oksilüsiferine katalizlenerek luminesans sinyal (ışık) oluşturması (Anonim 2013). 39
Şekil 4.1. Benzofuran sübstitüe kalkon türevileri (Kompleks 1 ve Kompleks 2) ile muamele edilen BEAS-2B hücresinin 24 ve 48 saat sonrası SRB testine göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını göstermektedir. ***Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,001$) ifade etmektedir. 43
Şekil 4.2. Kompleks 1 ile muamele edilen A549 ve H1299 hücre soylarının 24, 48 ve 72 saat sonrası SRB testine göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını göstermektedir.***Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0.001$) ifade etmektedir.. 45
Şekil 4.3. Kompleks 2 ile muamele edilen A549 ve H1299 hücre soylarının 24, 48 ve 72 saat sonrası SRB testine göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını göstermektedir.***Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0.001$) ifade etmektedir. 47
Şekil 4.4. Kompleks 1 ile 48 ve 72 saaat süreyle muamele edilen A549 ve H1299 hücre soylarının ATP canlılık testi sonucuna göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir.***Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,001$) ifade etmektedir. 50
Şekil 4.5. Kompleks 2 ile 48 ve 72 saat süreyle muamele edilen A549 ve H1299 hücre soylarının ATP canlılık testi sonucuna göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir.***Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,001$) ifade etmektedir. 51
Şekil 4.6. A549 ve H1299 hücrelerinde Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 48 saatlik muamele sonrasında ki faz/kontrast mikroskop görüntüleri. Oklar piknotik hücreleri

Sayfa

göstermektedir.. 54
Şekil 4.7. A549 ve H1299 hücrelerinde Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 72 saatlik muamele sonrasında ki faz/kontrast mikroskop görüntüleri. Oklar piknotik hücreleri göstermektedir.. 55
Şekil 4.8. A549 hücresinin Kompleks 1 ve Kompleks 2 bileşikleri ile 48 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. Oklar piknotik hücreleri göstermektedir.. 57
Şekil 4.9. H1299 hücresinin Kompleks 1 ve Kompleks 2 bileşikleri ile 48 saatlik muamelesi sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. Oklar piknotik hücreleri göstermektedir.. 58
Şekil 4.10. A549 hücresinin Kompleks 1 ve Kompleks 2 bileşikleri ile 72 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. Oklar piknotik hücreleri göstermektedir.. 59
Şekil 4.11. H1299 hücresinin Kompleks 1 ve Kompleks 2 bileşikleri ile 72 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. Oklar piknotik hücreleri göstermektedir.. 60
Şekil 4.12. Kompleks 1 uygulanan A549 akciğer hücre soyunun migrasyon yeteneği.. 61
Şekil 4.13. Kompleks 2 uygulanan A549 akciğer hücre soyunun migrasyon yeteneği.. 62
Şekil 4.14. Kompleks 1 uygulanan H1299 akciğer hücre soyunun migrasyon yeteneği. .. 63
Şekil 4.15. Kompleks 2 uygulanan H1299 akciğer hücre soyunun migrasyon yeteneği .. 64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1. BEAS-2B, A549 ve H1299 hücre soylarının SRB canlılık testine göre hesaplanan IC_{50} ve IC_{70} değerleri..... 48
Çizelge 4.2. A549 ve H1299 hücre soylarının ATP canlılık metoduna göre hesaplanan IC_{50} ve IC_{70} değerleri. 52

1. GİRİŞ

Günümüzde bulaşıcı olmayan hastalıklar (diyabet, kronik hava yolu hastalıkları, dolaşım sistemi hastalıkları, kanser vb.) dünyada en sık rastlanan ve ölüme neden olan hastalıklar haline gelmişlerdir. Bunlardan biri olan kanser, ekonomik yönden gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önde gelen ölüm sebeplerinden ikinci sırada yer almaktadır (Anonim 2015a). Tüm dünyada meydana gelen her altı ölümden birinden, ülkemizde ise her beş ölümden birinden kanserin sorumlu olduğu belirtilmektedir (Anonim 2015b, Anonim 2018). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı ve Dünya Sağlık Örgütünün yapmış oldukları tahminlere göre 2030 yılında 27 milyon insan kansere yakalanacak, 17 milyon insan ise kanser sebebiyle yaşamlarını kaybedecektir (Tuncer 2009). En önemli kanser çeşitlerinden biri olan akciğer kanseri ise 20. yüzyılın başlarına kadar ender rastlanan bir hastalık iken günümüzde tüm dünyada yaygın bir şekilde görülen ve yüksek ölüm oranına sahip olan kanser türlerinden bir tanesidir. Her yıl akciğer kanseri sebebi ile bir milyondan fazla insan hayatını kaybetmektedir. Erken evrelerde beş yıllık sağkalım oranı %60 ile %70 olarak gözlenirken, ileri evre olgularda bu oran %5'ten daha az bir seviyede kaldığı görülmektedir (Travis ve ark. 1996, Mountain 1997, Ginsberg 2005). Akciğer kanserinde kabul gören en uygun tedavi yöntemi cerrahi rezeksiyondur (Shields 2000, Pearson 2002). Cerrahi tedavinin başarılı olabilmesi ancak hastalığa erken evrede tanı konulması ile mümkün olmaktadır. Fakat akciğer kanserleri genellikle erken evrede çok belirgin bulgular vermediği için hastalığın teşhisinde geç kalınmaktadır. Mortalitesi oldukça yüksek olan akciğer kanseri günümüzde lokal ve sistemik adjuvant çeşitliliği ve gelişimine rağmen ölümlerin çoğu tedaviye dirençli metastazlardan dolayı meydana gelmektedir (Ginsberg ve Rubinstein 1995, Shields 2000, Myrdal ve ark. 2001). Farklı organlarda veya aynı organın farklı bölgesinde meydana gelen metastazların cerrahi, kemoterapi veya radyoterapi yöntemleri ile tamamen yok edilmesi neredeyse imkansız olduğu görülmektedir. Özellikle cerrahi operasyon şansını yitirmiş kanser hastaları için kemoterapiyi destekleyici yeni tedavi yaklaşımları günümüzde büyük önem taşımaktadır. Dünya sağlık örgütü 2000 yılında yayınlamış olduğu raporda Avustralya, Avrupa, Kuzey Amerika'da yaşayan insanların yaklaşık %50'sinin destekleyici tedavi yöntemlerinden bir tanesini kullandıklarını daha çok kullanılanın ise bitkisel ilaçlar olduğunu belirtmiştir. Bitkisel ilaçlar ile yapılan tedaviye olan ilgi giderek artmaktadır (Gürün ve Süzer 2005). Akciğer kanserinde

kemoterapi hemen hemen tüm hastalara uygulanmakta fakat kritik yan etkileri bulunmaktadır (Shapiro ve Recht 2001, Selwood 2009, Monsuez ve ark. 2010, Collins ve ark. 2011). Bu kritik yan etkilerden dolayı doğal bileşiklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır (Nobili ve ark. 2009).

Epidemiyolojik çalışmalar, yüksek oranda lif ve düşük oranda yağ içeren tam tahıllı besinler, sebze ve meyve tüketiminin akciğer, kolon, prostat ve meme gibi farklı kanser tiplerine yakalanma riski ile ters ilişkili olduğunu göstermektedir (Anonim 2003, Béliveau ve Gingras 2007, Guha 2009). Bitkilerde çok yaygın bulunan ve insan diyetinde önemli yeri olan flavonoidler doğal polifenoller olarak adlandırılmaktadır. Doğada 5000'den fazla flavonoid belirlenmiştir (Garcia-Lafuente ve ark. 2009, Wang ve ark. 2009). Flavonoidler, üç lineer karbon zinciri tarafından meydana getirilmiş iki benzen halkası ve oksijenlenmiş heterohalka (C6-C3-C6) tarafından oluşturulan moleküler yapılarına göre sınıflandırılırlar. Çoklu hidroksil, O-glikozit ve metoksil gruplarının temel pirion benzo (C6-C3-C6) parçası üzerinde birbirlerinin yerine geçmeleriyle de farklı gruplar oluşmaktadırlar (Hodek ve ark. 2002).

Flavonoidler; flavon, kateşin, flavanon, flavonol, izoflavon ile antosiyanidin olarak altı ana grup şeklinde ayrılmıştır (Aherne ve O'Brien, 2002). Flavonoidler; antitümör, antioksidan, antiviral, antimutajenik, antienflamatuar ve antiproliferatif gibi aktiviteleriyle dikkat çekmektedir (Gibellini ve ark. 2011). Yapılan çalışmalar özellikle kanser riskini düşürmesinden ve kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki umut veren etkilerinden dolayı flavonoid bileşiklerinin önemini göstermiştir (Garcia-Lafuente 2009, Wang ve ark. 2009). Geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahip olan flavonoidler ayrıca serbest radikal söndürme, metaller ile şelat meydana getirme ve lipid peroksidasyonunu inhibe etmek gibi önemli özelliklere de sahiptirler. Bu özelliklerin hücreleri kanser, enflamasyon ve kardiyovasküler hastalıklardan korudukları bilinmektedir (Heim ve ark. 2002). Flavonoidler, karsinojen metabolizmasını ve detoksifikasyonunu etkinleştirerek, DNA'yı oksidatif hasardan koruyarak, hücre proliferasyonunu önleyerek veyahut hücresel sitotoksisiteyi indükleyerek karsinogenezisin çeşitli basamaklarında aktif rol oynarlar (Castillo-Pichardo ve ark. 2009, Aggarwal ve Shishodia 2006, Ren ve ark. 2003, Ramos 2007, Fresco ve ark. 2006). Flavonoid ailesine üye bileşikler olan kalkonlar geniş bir biyolojik aktivite

spektrumuna sahip olup hem sentetik hem de doğal olarak elde edilebilirler (Lunardi ve ark. 2003). Doğal ve sentetik kalkonların çoğunun göstermiş olduğu biyolojik potansiyele bağlı olarak çeşitli kanser hücrelerinde anti- kanser aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Gezegen 2006, Mahapatra ve ark. 2015).

Kanser hastalığınnın tedavisi için yeni ilaç geliştirme çabaları ve yeni kemoterapötik stratejilere rağmen, kanser hastalığı hala dünyada çok önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde pek çok kanser tedavisi bulunmasına rağmen bunun yanında yan etkileri ve sınırlılıkları için araştırmacılar daha güçlü, daha güvenli ve daha seçici anti-kanser ajanları geliştirmek için uğraşmaktadırlar. Bu sebeplerden dolayı anti-kanser özelliği bulunan kalkonlar ile ilgili çalışmalar oldukça artmıştır (Lu ve ark. 2012). Yapılan bir çalışmada çeşitli kalkon türevlerinin sitotoksik aktiviteleri; A549 (Akciğer kanser hücresi soyu), WRL-68 (Hepatik fetal insan epitel hücre soyu), MCF-7 (İnsan meme kanser hücre soyu), HT-29 (İnsan kolon kanser hücre soyu) ve PC3 (İnsan prostat kanser hücre soyu) kanser hücreleri MTT canlılık analizi ile araştırılmış, çalışma sonucunda ise kalkon türevlerinin belirtilen kanser hücre hatlarına karşı yüksek sitotoksik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (Syam ve ark. 2012). Zhu ve ark. bir kalkon analoğu olan α-β-doymamış keton taşıyan bir bileşik sentezi ve karekterizasyonu yapmış ve NCI-H460 (Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre soyu), A549 ve H1975 hücre soylarında sitotoksisite gösterdiğini bulmuşlardır (Zhu ve ark. 2018). Kanserin temelinde kontrolsüz hücre çoğalmasının veya apoptotik süreçlerin baskılanmasının olduğu düşünülmektedir. Kanser oluşumuna sebep olacak sitotoksisiteye karşı apoptoz önemli bir hücre ölüm mekanizmasıdır (Lu ve ark. 2012). Çok hücreli organizmalarda mitozla meydana gelen hücreler ve apoptozdan dolayı ölen hücreler arasında hassas bir denge bulunmaktadır. Bu dengede meydana gelen bir bozulma kanser oluşumuna sebep olmaktadır (Cotter 2009). Organizmada kanser geliştiğinde ölüm sinyali alması gereken hücrelerin bu sinyalleri alamadığı ve bu nedenle hassas dengenin bozulduğu ortaya çıkmaktadır (Wong 2011). Tümör baskılayıcı olarak tanınan p53 geninin zarar görmesi durumunda apoptoz sinyali alması gereken hücrelerin bu sinyalleri alamadığı ve bölünerek gelişmeye devam ettiği bilinmektedir (Bauer ve Helfand 2006, Morton ve ark. 2010). Yapılan literatür çalışmalarının birçoğunda doğal bileşiklerin apoptozu indüklenmesinde antikanser aktivitesinin önemli olduğunu göstermiştir. Ayrıca organizmada kanser vaziyetinde;

kaspaz-3 etkinliğinin yitirilmesi, pro-apoptotik/antiapoptotik protein dengesindeki bozulmalar ve ölüm sinyallerinde meydana gelen hasarlar gibi nedenler gözlenmektedir (Hunter ve ark. 2007, Wong 2011). Kanser tedavilerinde bu sebeplerden dolayı apoptoz uyarıcı ajanların kullanıldığı bilinmektedir (Cotter 2009, Wong 2011). Coşkun ve ark. 2017 yılında kalkon türevleri ile yaptıkları çalışmalar sonucunda akciğer, prostat ve meme kanseri hücrelerinde bir kalkon türevi olan 3a'nın kaspaza bağlı yolaklar yolu ile apoptozu indüklediğini rapor etmişlerdir (Coşkun ve ark. 2017).

Yaptığımız bu tez çalışmasında tüm bu bilgileri göz önünde bulundurarak, sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiş olan benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin, insan akciğer kanseri A549 ve H1299 hücre soyları üzerinde ki sitotoksik, apoptotik ve anti invazyon aktiviteleri araştırılmıştır.

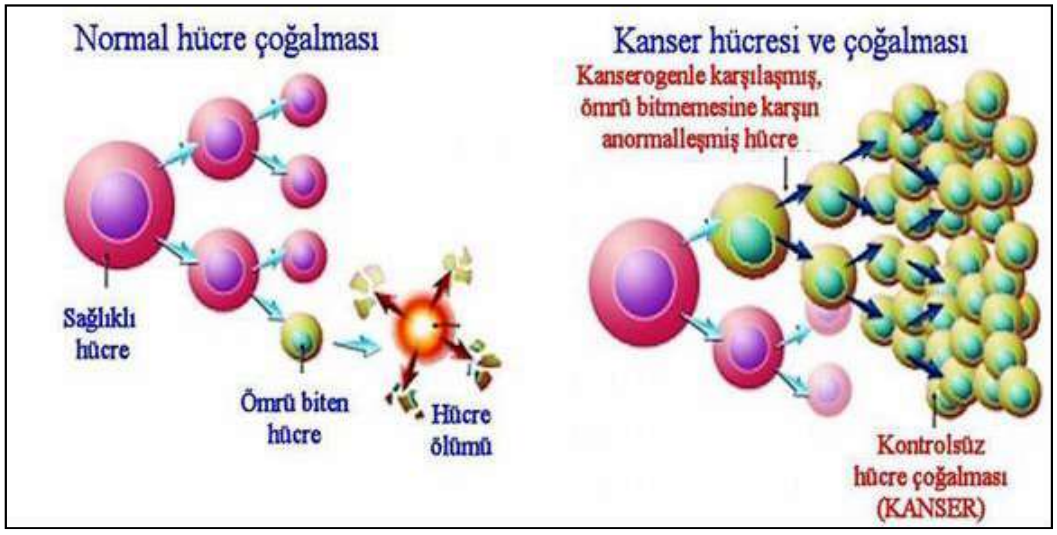
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2. 1. Kanser

Hücrelerin kontrolsüz bir biçimde çoğalarak bu hücrelerin meydana getirdiği dokuların işlevlerini yitirmesi olarak adlandırılan kanser son derece ölümcül bir hastalıktır (Tozkoparan ve Aytaç 2007, Nikitovic ve ark. 2013). Latince yengeç manasına gelen "cancer'' veya ''carcinos'' kelimelerinden türemiş olan kansere dair bilinen en eski kaynaklar MÖ 3000'lere dayanmaktadır. Hipokrat tümör terimini ilk defa MÖ 3. yüzyılda tümörün etrafındaki şişmiş damarları bir yengecin bacaklarına benzettiği için kullanılırken, Galen ise şişme anlamında "oncos" terimini kullanmıştır (Harris ve ark. 1993, Sigerist 1960**)**. Tümörler iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Benign tümörler primer alanlarında kalarak vücudun diğer kısımlarına invazyon yapmazlar. Malign tümörler ise kan ve lenf dolaşım sistemlerini kullanarak metastaz yaptıklarından dolayı kötü prognoza sahiptirler (Dalay 2000).

Kanser tedavisinde cerrahi yöntemler, kemoterapi ve radyoterapi olmak üzere temel olarak üç teknik kullanılmaktadır. Cerrahi yöntem ile tümör dokusu kesilerek çıkarılırken, radyoterapi ve kemoterapide ise kanser hücrelerini öldürmeye yönelik olan tekniklerdir (Tozkoparan ve Aytaç 2007). Akciğer kanseri ise hem kadınlarda hem de erkeklerde en sık rastlanan ve ölüme sebep olan kanser türlerinden biridir. Kadınlarda ikinci sırada meme kanseri gelirken, erkeklerde ise prostat kanseri gelmektedir (Siegel ve ark. 2015).

Sağlıklı hücrelerden farklı olarak kanser hücreleri kendi büyüme hormonlarını sentezleyerek kendi proliferasyonlarını uyarma özelliklerine sahiptirler. Kanser hücreleri büyüyebilmek için hücre dışı yüzeye ihtiyaç duymayarak alt alta veya üst üste büyürler. Sağlıklı hücrelerde, hücre yoğunluğu belirli bir seviyeye ulaşınca proliferasyon durururken tümör hücrelerinde ise hücreler bölünerek çoğalmaya devam ederler (Şekil 2.1.) (Dalay 2000).



Şekil 2.1. Kanser ve normal hücre çoğalması (Anonim 2015c).

2.1.2. Karsinogenezis

Kanser gelişim süreci olarak adlandırılan karsinogenezis, farklı moleküler ve hücresel değişikliklerin meydana geldiği basamaklı ve karmaşık bir zincirler bütünü olarak kabul edilir. Kanser, hücrelerin normal büyüme sürecinden çıkarak kontrolsüz ve aşırı çoğalmaları sonucunda oluşan tüm lezyonların genel adı olup, kontrolsüz bir şekilde çoğalan bu hücrelerin, komşu dokulara invazyon ve kaynağını aldığı organdan vücudun diğer kısımlarına kan-lenf yolu ile taşınmasıyla sonuçlanan bir hastalıktır (Anonim 2012a).

Kanser olgularında, hücreler hızlı çoğalır ancak aynı oranda hücre kaybının olmaması sonucunda hücreler birikmeye başlamaktadır. Bu durum kanser hücrelerindeki genetik anormalliklerden ve/veya immün sistemin bu hücreleri tanıma ve yok etmedeki başarısızlığından kaynaklanmaktadır. Bu şekilde biriken kitlelere tümör denilmektedir (Yılmaz ve Altunok 2011). Kanser gelişiminin başlangıç aşamasına tek bir hücrenin anormal çoğalmasına sebep olan genetik değişikliklerin sebep olduğu düşünülmektedir. Sonrasında ise hücre çoğalması ile klonal bir şekilde tümör hücrelerinin populasyonu artmakta ve bu hücrelerde meydana gelen ek mutasyonlarla tümör gelişimi ilerlemektedir. Bu mutasyonlardan bazıları hücrelere daha hızlı büyüyebilmeleri için seçici bir avantaj sağlamakta ve böylece mutasyon taşıyan hücreler tümör populasyonu içerisinde dominant hale gelmektedir. Mutasyona uğramış tek bir hücreden gelişen ilk hücre kitlesi, iyi huylu tümor olarak adlandırılmakta ve bu tümör hücrelerinin büyüme kontrolünde azalmalar olup vücudun diğer bölümlerine yayılma yetenekleri bulunamamaktadır. Fakat ilerleyen çoğalma sürecinde kötü huylu tümörlere dönüşerek

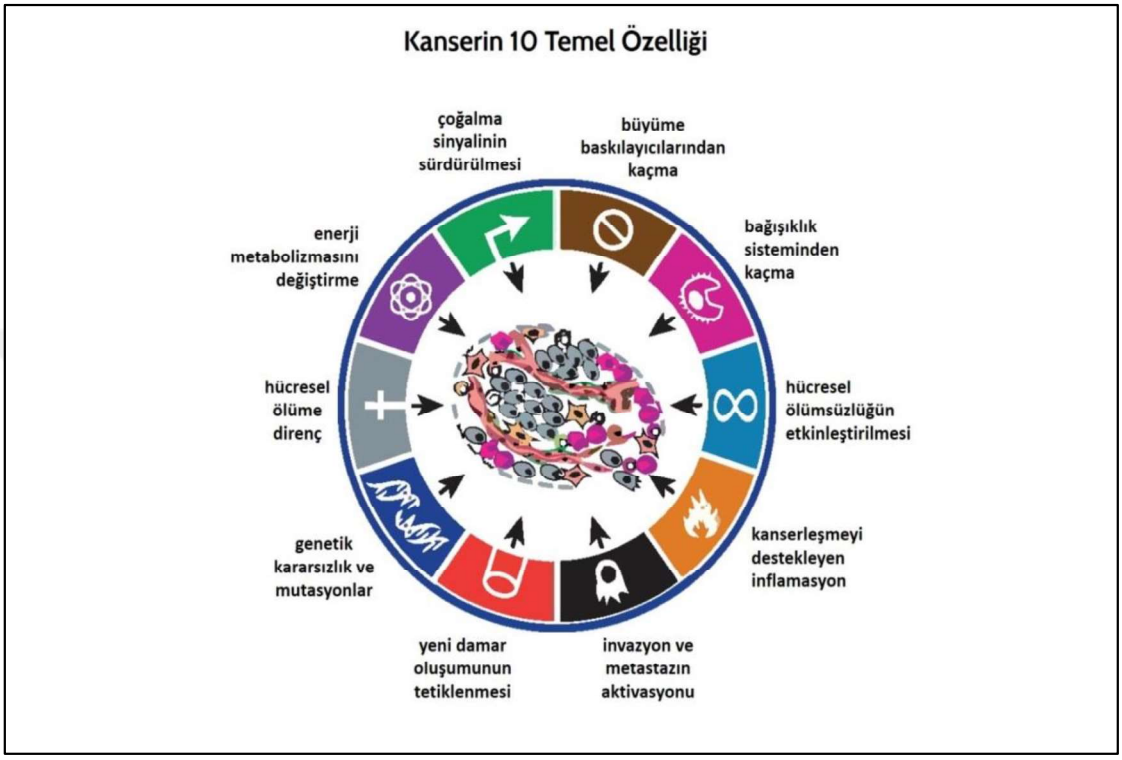
başka dokulara yayılabilme özelliği kazanmakta ve dolaşım sistemi yolu ile gittiği dokularda kanserin yayılmasına sebep olmaktadır (Clark 1991, Yokota 2000, Alberts ve ark. 2002, Yokota ve Kohno 2004).

2.1.3. Kanser hücrelerinin temel özellikleri

Kanser gelişimi çok basamaklı bir süreçtir ve bu süreçte kanser hücrelerinin temel özellikleri aşağıda maddeler halinde verilmektedir (Şekil 2.2.).

- Normal hücreler yoğunluğa bağlı inhibisyondan etkilenirken, kanser hücreleri etkilenmezler.
- Kanser hücreleri kendi büyüme faktörlerini salgılayabilirler.
- Tutunma yetenekleri normal hücrelerden düşüktür. Bu özellik tümör hücrelerinin metastaz yapma yeteneklerini arttırmaktadır.
- Normal hücreler, hücre-hücre temaslarında hareket ve çoğalma yeteneklerini kaybederlerken kanser hücreleri hareket etmeye ve çoğalmaya devam ederler. Bu şekilde birbirleri üzerine çıkarak çok katmanlı yapılar oluşturabilirler.
- Kanser hücreleri salgıladıkları proteazlar sayesinde komşu dokuları parçalayarak içlerine girebilirler. Bu şekilde metastaz yetenekleri artmış olur.
- Kanser hücreleri yeteri kadar besin ve oksijeni karşılayamadıklarında yeni kapiller oluşturacak olan büyüme faktörleri salgılarlar. Bu özellik yine metastaz yapmada önemli bir faktördür.

- Normal hücrelerde bulunan farklılaşma yeteneği büyümenin inhibisyonu için önemli faktörlerden biridir. Kanser hücrelerinde farklılaşma özelliği bulunmadığından dolayı büyüme sürekli olarak devam etmektedir. (Dalay 2006, Halliwell ve Aruoma 1991).



Şekil 2.2. Kanserin temel özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011).

2.2. Akciğer Kanseri

2.2.1. Akciğer kanseri epidemiyolojisi

Dünya sağlık örgütü akciğer kanserini bronş, bronşiyol ve alveol epitelinden gelişen tümörler olarak adlandırmaktadır (Horn ve ark. 2015). 20. yüzyılın ortalarına kadar ender görülen akciğer kanseri, 21. yüzyılda özellikle sigara kullanımının tüm dünyada yaygınlaşmasıyla birlikte halk sağlığı üzerinde önemli bir tehdit unsuru olmaya başlamış günümüzde ise tüm dünyada en sık rastlanan kanser türü haline gelmiştir. Akciğer kanseri sebebi ile her yıl ortalama 1 milyon insan hayatını kaybetmektedir, bu da kanser sebebi ile meydana gelen ölümlerin %19'una denk gelmektedir (Lozano ve ark. 2012). Erkeklerde ve kadınlarda görülen en yaygın ikinci kanser türünü, akciğer kanseri meydana getirmektedir. Kadınlarda meme kanseri daha yaygın gözlenirken, erkeklerde ise prostat kanseri daha yaygın olarak görülmektedir (Testa ve ark. 2018).

Erkeklerde meydana gelen kansere bağlı tüm ölümlerin %26'sına, kadınlarda ise kansere bağlı tüm ölümlerin %25'ine akciğer kanseri sebep olmaktadır (Torre ve ark. 2018). 1930 ile 2000 yılları arasında akciğer kanseri insidansında artış gözlenmiştir. Akciğer kanserine 1990''lı yıllarda erkeklerde daha sık raslanırken 2000'li yıllarda ise kadınlarda görülme sıklığı artmıştır. Yapılan epidemiyolojik analizler göstermiştir ki, akciğer kanseri mortalitesi ve insidansı farklı ülkelerin sosyo-ekonomik durumundan ciddi bir biçimde etkilenmektedir (Testa ve ark. 2018). Pasif içicilerde ve sigara içmeyenlerde, en sık rastlanan histolojik alt tip adenokarsinomdur (Özsu ve Özlü 2013).

2.2.2. Akciğer kanseri etiyoloji

Akciğer kanserinin doğru bir şekilde anlaşılabilmesi hastalıktan korunmak için son derece önemlidir. Akciğer kanserinin meydana gelmesinde sigara içimi ile pasif sigara maruziyeti dışında hava kirliliği, ırk, yaş, cinsiyet, meslek, radyasyon, diyet, geçirilmiş akciğer hastalığı sekeli, immunolojik faktörler ve viral enfeksiyonların da önemli etkilerinin olduğu bilinmektedir (Shigematsu ve ark. 2005). Aralarındaki bağlantılar tam olarak aydınlatılamamış olsa da akciğer kanserinden korunmada etiyolojik faktörler son derece önemlidir. Başta sigara ve diğer tütün ürünleri olmak üzere genetik ve çevresel birçok faktörün akciğer kanseri etiyolojisinde rol almasına dair çalışmalar hala devam etmektedir.

2.2.3. Risk faktörleri

Akciğer kanseri etiyolojisinde çeşitli risk faktörlerinin rol oynadığı bilinmektedir. Risk faktörlerinin başında; sigara, çevresel karsinojenler, hava kirliliği, diyet, genetik ve immünolojik faktörler, geçirilmiş akciğer hastalıkları ile viral enfeksiyonlar gelmektedir. Kanser hastalarının birinci dereceden yakınlarında kanser riskinin arttığı da yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Anonim 2006, Alberg ve Samet 2003).

Sigara ile akciğer kanseri arasındaki ilişkiye dair ilk bulgular 1962 yılına dayanmaktadır (Spiro ve Porter 2002). Sigaranın akciğer kanserinin gelişimi üzerinde %94 gibi son derece önemli bir etkisi vardır. Sigara içenlerde içmeyenlere oranla akciğer kanseri riski 24-36 kat daha fazladır (Halilçolar ve ark. 1999). Vinil klorid, Polisiklik hidrokarbonlar, nikel, benzopiren, aldehidler, nitrozaminler ve peroksitler sigara dumanında tanımlanmış olan yaklaşık 40 karsinojenden birkaçıdır. Akciğer kanseri olgularının

erkeklerde %90, kadınlarda ise yaklaşık %78 oranında doğrudan sigara içimi ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Alberg ve Samet 2003, Özlü ve Bülbül 2005). Günlük içilen sigara sayısı, sigara içme süresi ve sigaraya başlama yaşı ile birlikte sigaranın ve tütünün tipi (puro, pipo, nikotin oranı, mentollü, filtreli) gibi faktörler de kanserin gelişmesi üzerinde önemlidir (Halilçolar ve ark. 1999). Sigara tüketiminin vücutta vitamin seviyesini (özellikle vitamin C) düşürdüğü saptanmıştır. Meyve, taze sebze, vitamin C ve karonetoidlerin akciğer kanseri riskini sigara tüketenlerde ve tüketmeyenlerde tüm histopatolojik tipler için kadınlarda ve erkeklerde azalttığı bilinmektedir (Smith ve ark. 1998, Alkoçlu ve Özkurt, 2000).

Dünya genelinde sigara içme prevelansı erkeklerde %47-52, kadınlarda ise bu oran %10-12 olduğu tahmin edilmektedir (Spiro ve Porter 2002). Gelişmekte olan ülkelerde ise kadınlarda %2-10, erkeklerde %20-60 iken gelişmiş olan ülkelerde ise bu oran sırasıyla %20-40 ve %30-40'tır (İtil 2000). Ülkemizde sigara içme prevalansı erkeklerde %63, kadınlarda ise %24'tür. Yüksek sigara tüketiminin toplumumuzun büyük bir kısmını kapsadığı göz önünde bulundurulduğunda, gerekli önlemler alınmadığı takdirde gelecekte akciğer kanseri epidemisi ile karşı karşıya kalabileceğimizi söylemek yanlış olmaz (İtil 2000). Sigara içilen ortamda sigara dumanına maruz kalmakta (pasif sigara içiciliği) akciğer kanser riskini arttıran faktörlerdendir (Palmarini ve Fan 2001, Thun ve ark. 2008). Ayrıca yapılan çalışmalar elektronik sigaranın, sigaradan kurtulmada etkili bir yol olmadığı ve kanserojen maddeler içerdiğini göstermiştir (Anonim 2012b). Akciğer kanserinin kadınların %20-25'inde ve erkeklerde %10'unda gelişmesinde tütün ve tütün mamüllerinin herhangi bir ilişkisi yoktur (Palmarini ve Fan 2001, Thun ve ark. 2008). Fazla alkol tüketimi, hücrelerin yapısında değişikliklere sebep olarak kanser riskini arttırdığı düşünülmektedir. Alkolün karsinojenez riskini arttırdığına dair önemli kanıtlardan biri sırası ile alkol dehidrojenaz ve aldehit dehidrojenaz ile katalizlenen reaksiyonlarda, sırası ile asetaldehide ve asetata kadar yıkılmasıdır. Her ne kadar etanol tek başına mutajenik olmasa da, asetaldehit proteinlere ve DNA yapısına bağlanabilmesinden dolayı mutajenik ve karsinojeniktir (LoConte ve ark. 2018). Alkolün karaciğer, meme ve kolon kanserlerinde rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca ağız boşluğu, larinks, farinks, özofagus, rektum ve kolon kanseri ile arasında nedensel bir ilişki olduğu bilinmektedir. Akciğer ve pankreas kanserleri ile arasında da bir bağlantı olabileceği düşünülmektedir

(Boffetta ve Hashibe 2006). Ancak 2018 yılında Çin'de yapılan bir çalışma sonucuna göre erkeklerde alkol tüketimi ile akciğer kanseri riski arasında anlamlı bir bağlantı kurulamamıştır (Wei ve ark. 2018). Ayrıca hava kirliliği, diyet ve mesleki faktörler de akciğer kanseri risk faktörlerindendir. Hava kirliliği, bütün akciğer kanser olgularının yalnızca %1-2'sinde rol aldığı tahmin edilmektedir (Doll ve Peto 1981, Kabir ve ark. 2007, Gorlova ve ark. 2007). Şehirlerde yaşayan bireylerde kırsal kesimde yaşayanlara oranla akciğer kanseri insidansı daha fazladır. Poliaromatik hidrokarbonlar, krom, nikel, arsenik gibi metaller, kömür dumanı, fosil yakıt ürünleri ve motorlu araçların egzoz dumanı da hava kirliliği kaynaklı karsinojenik etkenlerdir (Schottenfeld ve ark. 2000). Diyet ve akciğer kanseri arasındaki ilişkiye dair yapılan çalışmalarda genellikle antioksidan bakımından zengin gıdalar ile beslenen insanlarda akciğer kanseri riskinin azaldığı ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Bouchardy ve ark. 2001). Bazı besinler içerdikleri vitaminler ve antioksidanlar sayesinde akciğer kanserine karşı koruyucu görev üstlenirler. Bilinen en önemli koruyucular beta karotenlerdir (Smith ve ark. 1998). Çevresel ve mesleki risk özellikle endüstriyel fabrikalarda ve çalışma ortamında gerekli tedbirler alınmadığı takdirde hücre DNA'sını etkileyerek tümör gelişimine yol açabilir. Tüm kanser vakalarının ortalama %2-8 kadarının mesleksel maruziyet sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Akciğer kanserlerinde ise bu oran %15 kadar olduğu tahmin edilmektedir (Siegel ve ark. 2017). Mesleki faktöre bağlı meydana gelen akciğer kanserli olguların yarısından fazlası asbest maruziyeti ile bağlantılıdır. Asbest doğada bulunan, kimyasal maddelere ve ısıya dayanıklı, bir grup fibröz silikatın genel ismidir. Otomobil, inşaat, uçak, gemi ve tekstil sektöründe kullanılmaktadır (Kern ve McLennan 1998). Asbest dışında kömür, nikel, radon, uranyum parçalanma ürünleri, krom, kadmiyum, alüminyum, arsenik, demir, formaldehit ve polisiklik hidrokarbonlar'a maruz kalmak da akciğer kanseri riskini arttıran mesleki risk faktörlerindendir (Ruano-Ravina ve ark. 2003).

Akciğer kanseri daha çok orta ve ileri yaş gruplarında rastlanan ve insidansı yaşla birlikte artan bir hastalıktır. Akciğer kanseri hastalarının %95'i 50-70 yaş aralığındaki bireylerden meydana gelmektedir (Cruz ve ark. 2011, Halilçolar ve ark. 1999). Türkiye'de genç erkekler üzerinde yapılan bir çalışmada ise olguların tanı konma yaşı ortalama 53 olarak bildirilmiştir. Ayrıca tüm akciğer kanserlerinin %1'i 40 yaş altındadır ve 35 yaşından önce akciğer kanserine çok nadir rastlanılmaktadır (Elci ve

Akpinar-Elci 2007). Genç yaşlarda rastlanan akciğer kanseri olgularında bireylere teşhis konulduğunda kanserin metastaz yapmaya eğilimli ve daha çok beyin'e metaztaz yaptığı bildirmiştir (Özen ve ark. 2012).

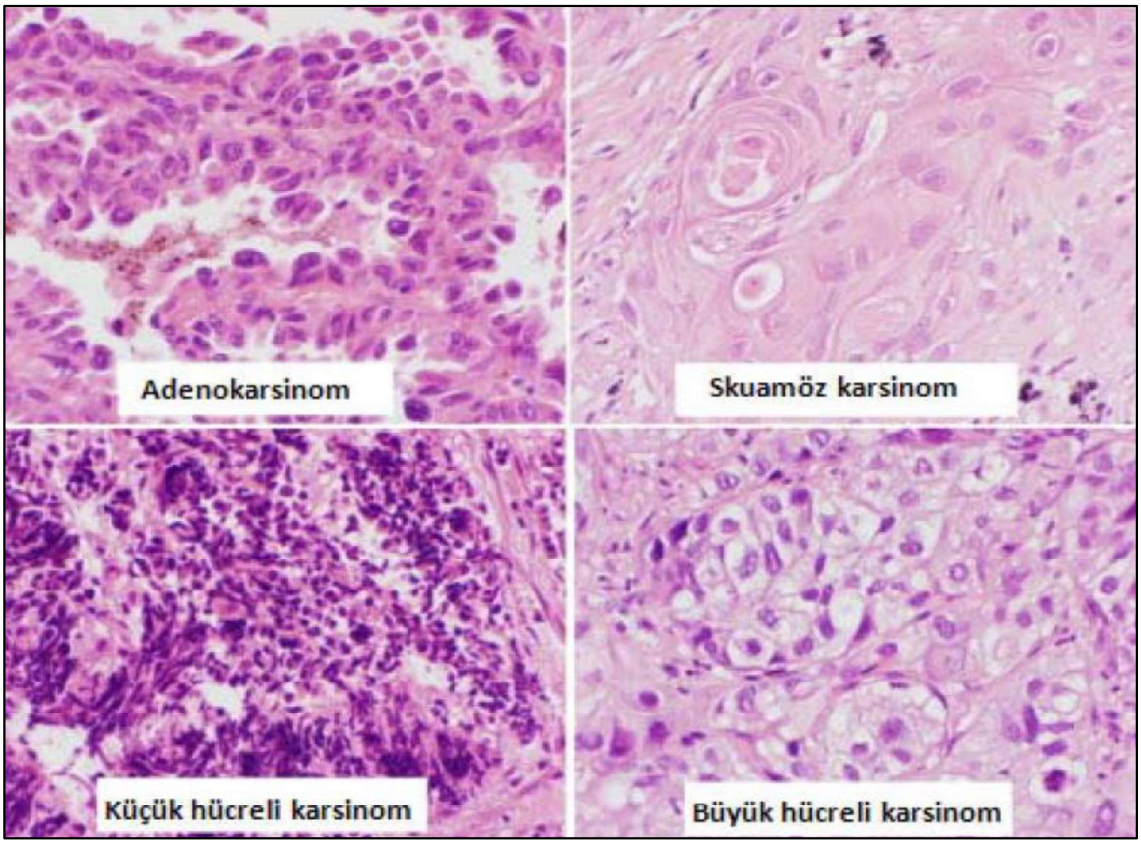
Son yıllarda yapılan çalışmalara göre kadınlarda akciğer kanserine bağlı olarak meydana gelen ölümlerde artış gözlenirken, erkeklerde ise bu oranda bir azalma meydan gelmiştir (Thomas ve ark. 2005). Zamanla böyle bir değişimin meydana gelmesinin sebepleri ise sigara alışkanlıklarındaki değişim, epidemiyolojik bulgulardaki değişiklikler ayrıca cinsiyet, yaş ve tümör tipi gibi özellikler ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir (Radzikowska ve ark. 2002, Wisnivesky ve Halm, 2007). Akciğer kanseri aile öyküsü ile ilgili 32 çalışmayı kapsayan bir metaanaliz sonucuna göre sigara içmeyenler de dahil olmak üzere akciğer kanseri aile öyküsü bulunması akciğer kanser riskini 2 kat arttırdığını göstermektedir (Bailey-Wilson ve ark. 2004). Artmış ailesel riskin sigara içiciliğinden, cinsiyet, yaş ve mesleksel maruziyetten bağımsız olduğu ve akciğer kanserine yatkın bir otozomal genin Mendeliyen kodominant kalıtımla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Wei ve Spitz 1997).

2.2.4. Akciğer kanserinin histolojik sınıflandırılması

Dünya sağlık örgütü akciğer kanserinin histolojik sınıflandırılmasında tümörün büyüme hızı, radyoterapi ve kemoterapiye verdiği yanıt, metastazın zamanlaması ve yayılımına göre temelde küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzere iki ana başlık altında gruplandırmıştır. KHDAK ise kendi aralarında; skuamoz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom olarak alt gruplara ayrılmıştır (Şekil 2.3.).

KHAK'da tümör hızlı bir şekilde büyür ve kısa zamanda metastaz yapmaktadır. Tüm organlara metastaz yapabilse de daha çok kemik, kemik iliği, karaciğer, beyin, adrenal bez, mediastinal ve retroperitoneal lenf bezlerine metastaz yapabilmektedir. Hastalar için genellikle primer tedavi yöntemi olarak kemoterapi tercih edilmektedir. Kemoterapiden %80-90 oranında yanıt alınmaktadır. KHDAK tedavisi için ise ilk olarak cerrahi tedavi tercih edilmektedir (Altınbaş 2000). Akciğer kanseri çoğunlukla metastaz evresinde tanısı koyulan ve kötü prognoza sahip bir hastalık türü olarak karşımıza çıkmaktadır (Müsellim 2007). Akciğer kanserinin en yaygın türünü %85'lik bir orana sahip olan KHDAK oluştururken, KHAK ise %15'lik bir orana sahiptir

(Travis 2011). Erkeklerde daha çok skuamöz hücreli karsinom tipi (%41,5) akciğer kanserine rastlanırken kadınlarda ise en sık adenokarsinom tipi (%42,2) akciğer kanserine rastlanır (Kefeli ve ark. 2015). Sulu ve ark. (2007) 20 senelik bir periyot süresince yıllara göre karşılaştırmalı bir şekilde yaptığı çalışmada kadınlarda adenokarsinom oranının %27'den %46'ya yükselirken erkeklerde ise bu oranın zaman sürecinde %11'den %23'e yükseldiği bildirilmiştir (Sulu ve ark. 2007).



Şekil 2.3. Histolojik açıdan akciğer kanserinin sınıflandırılması (Motadi ve ark. 2007).

2.2.5. Akciğer kanseri moleküler biyolojisi

Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi üzerine yapılan çalışmalarda onkogenlerde, DNA tamirinden sorumlu genlerde ve tümör supressör genlerinde meydana gelen birtakım değişiklikler ile akciğer kanseri arasındaki ilişki ortaya konulmuştur. 3. ve 11. kromozomların kısa kolundaki DNA sekans kayıpları, Myc ailesi (C-Myc, L-Myc ve N-Myc), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), Ras ailesi (H-Ras, K-ras, N-Ras) ile p53 tümör supresör genlerin amplifikasyonu karsinogeneziste genetik faktörler olarak rol oynamaktadır (Alberg ve Samet 2003, Lynch ve ark. 2004). Tümör

suppressör genler hücre döngüsünü kontrol eden ve hücre çoğalmasında negatif yönde görev alan genlerdir. Ayrıca DNA tamir mekanizması ile tamir edilemeyen yapısında hasar meydana gelmiş hücreleri apoptoza sürüklemektedirler (Chee ve ark. 2013). Hücre proliferasyonunda anahtar pozisyonunda görev alan TP53 önemli bir tümör suppressor genidir (Muller ve Vousden, 2014). TP53 geni tarafından kodlanan p53 proteini genomun koruyucusu olarak isimlendirilmektedir. Bunun sebebi genom mutasyonlarının önüne geçerek genom stabilitesini korumasıdır (Prives 1998). Ayrıca hücre döngüsü ve apoptozis gibi iki önemli süreçte görev almaktadır. Transkripsiyon faktörü olarak görev yapan Mdm2 tarafından p53 gen aktivitesi kontrol edilmektedir. Normal durumda Mdm2 p53'e bağlanarak aktivitesini baskı altına alabilirken, DNA'da meydana gelen bir hasar söz konusu olduğunda p53'ün fosforilasyonu artmakta ve Mdm2'den ayrılmaktadır (Ozaki ve Nakagawara 2011). p53; hücre'de meydana gelen DNA hasarı, nükleotid düzensizliği, onkogen aktivasyonu, oksijen yetmezliği (hipoksemi), oksidatif hasar gibi olaylara cevap olarak hızlıca nükleusta birikerek hücre siklusunu G1 fazında durdurur. Böylece DNA hasarı meydana gelmiş olan hücre için iki yol vardır ya hücre hasarı onarılır veya onarılamayan hücre apoptozise yönlendirilir. DNA hasar onarımının gerçekleşemediği durumlarda p53 tarafından Bax, Noxa, Puma, ve p53 AIP1 genleri aktifleştirilerek mitokondriyal zar potansiyelinin bozulmasına katkıda bulunur. Mutant p53'e sahip hücrelerdeyse DNA tamiri olmaksızın kontrolsüz bir çoğalma gözlenir. p53 insan kanserlerinde en sık bozulan gendir. Mesane, meme, akciğer, karaciğer, kolon, prostat ve cilt kanserlerini de içeren kanserlerin %50'den daha fazlası p53 mutasyonu ile ilişkilidir (Cachot ve ark. 1998, Sandal 2002, Köktürk ve ark. 2003, Ozaki ve Nakagawara 2011).

İnsan kanserlerinde en çok rastlanan mutant gen olan P53, tüm kanserlerin %50'sinde gözlenirken, KHAK'lerinin %90'ında, büyük hücreli kanserlerin %60'ında, yassı hücreli akciğer kanserlerinin %65'inde ve adeno kanserlerin %33'ünde gösterilmiştir (Mabry 1998, Hussain ve Harris 2000). Tümör hücrelerinde kontrolünü kaybetmiş bir şekilde protein kodlayan ve kanser gelişiminin başlangıcında rol oynayan mutant p53 geninin onkogen olarak görev yaptığı bilinmektedir (Muller ve Vousden 2014). Tümör hücrelerinde mutant p53'ün ekspresyonu, normal hücrelerdeki p53'e oranla daha fazla gerçekleşir ve bu şekilde tümör hücrelerinde büyümeyi ve bölünmeyi arttıran faktörlerin sayısı da arttırılmış olur. Bu faktörlerin tümör hücresinde kontrolsüz bir şekilde artması

ile tümör hücresi daha hızlı ve kontrolsüz bir biçimde bölünür (Addadi ve ark. 2010). p16, hücre siklusunda G1-S faz geçişini kontrol eden p16-siklin D1-Cdk4-Rb yolağının bir parçasıdır. Hücre siklusunun düzenlenmesinde görev alan bu kritik yolak akciğer kanseri de dahil olmak üzere pek çok kanser türünde değişmiş veya mutasyona uğramış haldedir (Fong ve ark. 2003). p16 /pRb ve p53 yolaklarındaki değişiklikler KHDAK hücre soylarında artan proliferasyona neden olmaktadır. Bu durum agresif tümör fenotipi ve 5 yıl daha kısa yaşam süresi ile ilişkilendirilmektedir (Michalides 1998). K-Ras proteini K-Ras geni tarafından kodlanır ve bu protein normal doku sinyalizasyonunda esansiyel rol oynar. Bu gende oluşan mutasyonlar birçok kanserin meydana gelmesinde esansiyeldir (Kranenburg 2005). K-Ras mutasyonları akciğer kanserinde erken olaylardan biri kabul edilmekte olup akciğer adenokarsinomlarının üçte birinin erken aşamalarında K-Ras mutasyonu gözlenmektedir (Rodenhuis ve ark. 1987). KHDAK'lerinin %15-50'sinde rastlanan K-Ras mutasyonu sağ kalım süresinde azalım, erken relaps ve kötü prognoz ile ilişkisi saptanmıştır (Groeger ve ark. 1997, Lecture 1996, Jacobson 1999, Fong ve ark. 1999, Spivack ve ark. 1997, Mabry 1998). Akciğer kanseri gelişiminde rol alan bir başka gen ise retinoblastom (Rb) geni olup hücresel farklılaşmada önemli bir rolü bulunmaktadır. Rb ailesi, hücre döngüsünü G1evresinde durdurarak hücre bölünmesini kontrol eder ve bu yoldaki proteinlerin fonksiyon bozukluğu mitojenik aktivite ile sonlanır. Rb protein yokluğu KHAK'lerinin neredeyse tümünde görülürken, KHDAK'lerinin yalnızca %10-30'unda görülmektedir (Fong ve Minna 2002). Myc genleri, hücre çoğalmasında, farklılaşmasında ve DNA sentezinin başlatılmasında rol oynayan üç fosfoproteini kodlamaktadır. Bunlar N-Myc, C-Myc ve L-Myc'dir (Mabry 1998). Amplifikasyon ve transkripsiyonel bozukluklar sonucunda onkogen halini alan Myc genleri KHDAK'lerinin %8-20'sinde aktif hale gelmektedirler (Köktürk ve ark 2003). C-Myc amplifikasyonu gerçekleşen hücrelerde büyüme faktörlerine duyulan ihtiyaç azalır, hücre döngüsünde G1 faz süresi kısalır ve bu olaylar sonucunda proliferasyon artmaktadır. C-Myc tümör büyüme hızı ve sağkalım süresinde kısalma ile ilişkilidir (Fong ve ark. 1999).

NCAM (Nöral hücre adhezyon molekülü) nöronal dokulardaki esas hücre-hücre kontakt proteinidir. KHDAK hastalarının %20-30 NCAM molekülü eksprese ettiği belirlenmiştir (Broers ve Ramaekers 1994). Yapılan bir çalışmada Kibbelaar ve ark.

(1991) NCAM eksprese eden KHDAK hastalarının belirgin bir şekilde kısa sağkalım süresine sahip olduklarını göstermişlerdir (Kibbelaar ve ark. 1991).

2.2.6. Tümör mikro çevresi ve akciğer kanseri

20. yüzyılın ikinci yarısından beri malign sürecin devamlılığını sağlayan malign hücrelerdeki genetik ve epigenetik farklılıklar kanser biyolojisi ve terapisi konularının odak noktası haline gelmiştir (Stratton ve ark. 2009). Bu malign süreçte yalnızca tümör hücrelerinin değil, bu hücrelerle yakın etkileşim halinde bulunan ekstraselüler matriks (ECM) ve genetik-olmayan değişimlere sahip olan stromal hücrelerin oluşturduğu tümör mikro çevresinin (TMÇ) de çok önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Hanahan ve Coussens 2012).

Tümör mikro çevresi; bağışıklık hücreleri, fibroblastlar, kan damarları, sinyal molekülleri, diğer hücreler, ECM ve tümör'ün de dahil olduğu hücresel bir ortamdan meydana gelmektedir. Tümörü çevreleyen hücreler kanser stromasını oluşturur. Bu stromayı oluşturan form; endotel, glia, fibroblast, yağ, düz kas hücrelerinden, epitelyal ve ECM'den meydana gelir (Li ve ark. 2007). TMÇ, tümörün bulunduğu bölgeye göç eden lenfositler, makrofajlar ve bu hücrelerin salgılamış oldukları farklı büyüme faktörleri, kemokinler, antikorlar, sitokinler, protoezlar, diğer tip enzimler ve çeşitli metabolitler gibi birçok faktörü bir arada barındırır (Witz ve Levy-Nissenbaum 2006). Hiçbiri tek başına malign hücre olmayan bu hücreler, TMÇ'ninde birbirleriyle ve kanser hücresiyle direkt ve yahut indirekt etkileşimi sonucunda anormal fenotip kazanırlar ve fonksiyonlarında değişim meydana gelmektedir (Li ve ark. 2007). Tümör'ün gelişimini ve devamlılığını sürdürebilmesi adına, tümör hücreleri dört kritik özellik geliştirir. Bu özellikler; hareket yeteneği, ECM'yi degrede edebilme yeteneği, kanda hayatta kalabilme özelliği kazanma ve son olarak yeni bir çevreye uyum sağlayabilmesidir. Çalışmalardan biri kanser hücrelerinin embriyonel gelişim sürecinde rol oynayan bazı transkripsiyon faktörlerini aktifleştirerek pleiotropik özellik kazandıkları ve bu şekilde bu yetenekleri kazanabildiklerini ifade etmektedir. Bu süreçte ise tümör mikroçevresinin kritik öneme sahip olduğu ileri sürülmektedir. (Weinberg 2007).

TMÇ ve akciğer kanseri ile ilgili yapılan çalışmalar, angiogenesiz ve hipoksi üzerine yoğunlaşmıştır (Graves ve ark. 2010). Tümör mikroçevresi genellikle hipoksik'tir.

Tümörün kütlesi arttıkça kan damarlarından uzaklaşılır ve kan tedarik edilemez hale gelir. Meydana gelen bu hipoksik çevre nükleotid eksizyon tamir mekanizması, genetik stabilite ve yanlış eşleşme tamir mekanizması regülasyonunu azaltarak bozar ve bu şekilde kanser gelişimi hızlanır. Ayrıca hipoksi, HIF1-α (hipoksi indükleyici faktör1-alfa) expresyonunu uyarır. HIF1-α angiogenesizi indükleyerek, metastaz ile bağlantılı genlerin aktifleşmesini sağlar (Blagosklonny 2004, Bindra ve Glazer 2005). Düzensiz damarlaşma, hipoksi ile birlikte alınan ilaçların etkili olarak kanserli bölgeye ulaşmasını zorlaştırır (Graves ve ark. 2010).

2.3. Apoptoz

Çok hücreli canlılarda iç dengenin (homeostaz) korunması, yeni hücrelerin proliferasyonunun kontrol edilmesi ve istenmeyen hasarlı hücrelerin yok edilmesi gerekmektedir (Messmer ve Pfeilschifter 2000). Doku homeostazisinin sağlanabilmesi ise yapım ve yıkım olaylarının bir düzen içerisinde olmasına bu da apoptozis ve proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesine bağlıdır (Hıkım ve ark. 1995, Erdoğan 2003). Hücre proliferasyonunun dengelenmesi, hasar görerek işlevlerini yitiren hücrelerin organizmadan uzaklaştırılması ve homeostazın dengelenmesi amacıyla hücrelerin programlı bir şekilde ölüm sürecine girmesi anlamına gelen apoptozis, hücre içi ve hücre dışı uyaranlar ile başlayan bir süreçtir (Dalay 2006, Öktem ve ark. 2001, Coşkun ve Özgür 2011). 1971 yılında Currie, Wylie ve Kerr programlı hücre ölümünü ilk kez tanımlamışlar ve bu olaya ‘apoptoz’ ismini vermişlerdir (Solakoğlu 2009). Apoptozis sürecini başlatan hücre dışı uyaranlar arasında; Tümör Nekroz Faktörü (TNF), Nöron Büyüme Faktörü (NGF), Koloni Uyarıcı Faktörler (CSF), İnsülin benzeri Büyüme Faktörü (IGF), sfingolipidler, glukokortikoidler, ilaçlar, çeşitli antijenler ve radyasyon gibi faktörler bulunmaktadır. Apoptozu başlatan iç sinyaller arasında ise viral enfeksiyonlar, hücresel stres ve kimyasallar sayılabilir (Ulukaya 2001, Kandaş 2004, Akşit ve Bildik 2008).

İç ve dış yolaktan bir grup medyatör protein ile başlayan apoptozis süreci hücre nükleusunda bulunan kromatinlerin kondensasyonu ile 200 nükleotidlik bir kesim şeklinde devam eder. Hücre membranının stabilitesi bozulur ve dışa doğru baloncuk benzeri yapılar oluşur, hücre küçük parçalar şeklinde paketlenir. Bu süreç fagositoz ile sonlanır (Elmore 2007). Hücre ölümünün bir başka şekli de nekrozisdir. Nekrozis,

apoptozisden tamamen farklı özelliklere sahiptir. Nekrozisde hücre membranları ya da hücredeki metabolik mekanizmalar zarar görür ve hücre membranının seçici geçirgenliği bozularak şişmeye başlar. Bunun sonucunda da hücre patlayarak hücrenin içinde bulunan maddeler dışarı sızar ve inflamasyon mekanizması uyarılmış olur (Solakoğlu 2009, Bonfoco ve ark. 1995). Bir hücrenin apoptoza mı yoksa nekroza mı gideceğini uyaranın derecesi ve şekli belirlemektedir. Çevrenin ısısı, radyasyona maruz kalma, hipoksi ve antikanserojenik ilaçların kullanımı gibi durumların düşük dozlarında apoptoz, yüksek dozlarında ise nekroz gerçekleşmektedir (Elmore 2007). Kanser ile ilgili apoptozun aktivasyonunda ve inhibisyonunda birtakım genler rol oynamaktadır. Bu genler proapoptotik genler ve antiapoptotik genler olarak isimlendirilmektedir. Proapoptotik genler p53, Bad, Bax, Bak, Bim, Bid, Bcl-xs, Puma ve Noxa'dır. Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 ise antiapoptotik genlerdir. Bir hücrenin apoptoza gideceğini belirlemede o hücrenin içindeki Bcl-2/Bax oranı önem göstermektedir. Hücrede Bax oranı fazla olduğunda hücre apoptoza giderken hücrede Bcl-2 geni fazla olduğu durumlarda ise apoptoz inhibisyona uğrar (Dalay 2006, Moll ve Zaika 2001, Ersöz 2007).

Normal hücrelerde, tümör süpresör geni olan p53 geni kaspaz (3, 7, 8 ve 9) enzimlerini aktive ederek apoptozu sağlamaktadır. Fakat P53 geni kanser hücrelerinde mutasyona uğramaktadır. Bu mutasyonlar her kanser türü için farklı spektrumda görülür ve bu genin inaktivasyonuna neden olur. Sonuç olarak da apoptoz engellenerek malignant kanser gelişimine neden olur (Solakoğlu 2009, Hollstein ve ark. 1991, Roemer 1999).

Apoptoz sürecinin gelişim, farklılaşma, proliferasyon ve homeostaz olaylarının yanı sıra immün sistemin düzenlenmesinde ve işlevinde, hasarlı ve zararlı hücrelerin ortadan kaldırılmasın da ki rolünün önemi büyüktür. Apoptozis sürecinde meydana gelebilecek bir hata; viral enfeksiyonların yayılması, kanser ve otoimmün hastalıkların oluşması ile sonuçlanabilmektedir. Ancak apoptozisin çok fazla gerçekleştiği durumlarda ise insüline bağımlı tip diyabet (tip 1 diyabet), alzheimer, parkinson, miyokard enfarktüsü ve hepatit C enfeksiyonu gibi hastalıklar gelişebilmektedir (Fadeel ve ark.1999, Evan ve Vousden 2001, Gewis 2003).

2.3.1. Apoptozun düzenlenmesi

Apoptozun düzenlenmesinde çok çeşitli ve sayıca fazla mediatör görev almaktadır. Bunlar; kalsiyum iyonu, seramid molekülü, Bcl-2, p53 ve c-myc gibi gen aileleri, kazpaz enzim ailesi, endoplazmik retikulum ve mitokondri organelleri apoptozu düzenleyen mediatörlerdendir (Elmore 2007, Zeiss 2003).

2.3.2. Apoptoziste rol oynayan mediatörler

Apoptozisin gerçekleşmesinde önemli bir grup ise kaspazlardır. Sistein proteazlar olarak bilinen kaspazlar hücre sitoplazmasında zimojen (inaktif) halde bulunurlar ve aktifleşebilmek için proteolitik olarak birbirlerini keserek bir kaspaz kaskadı meydana getirirler (McIlwain ve ark. 2013). Tek bir polipeptit zinciri halinde sentez edilen kaspazlar özel bölgelere sahiptir. Bunlar kaspaz toplama bölgesi (CARD), efektör ölüm bölgesi (DED) ve ölüm bölgesi (DD) olmak üzere 3 ayrı bölgedir (Ulukaya 2003, Chowdhury ve ark. 2006). Apoptozisde rol oynayan 14 tane kaspaz ailesi tanımlanmıştır (Cryns ve Yuan 1998). Apoptoziste 3, 6, 7, 8, 9 kaspazları görev alırken inflamasyonda ise 1, 4, 5, 12 kaspazları rol oynar (McIlwain ve ark. 2013). Ayrıca 2, 8, 9, 10 başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken 3, 6, 7 kaspazları ise efektör kaspazlar olarak bilinmektedir (Ulukaya 2003). Birbirlerini aktifleştiren kaspazlar proteolitik bir şelale oluştururlar. Başlatıcı kaspazlar, ölüm sinyalini efektör kaspazlara taşırlar. Bazı efektör kaspazlar hücre içi iskelet, lamin ve çekirdek zarı proteinlerini parçalarlar. Kaspaz 3, DNA tamirinde görev alan PARP'ı kırarak inaktive eder ve DNA onarımını engeller. Bazı kaspazlar ise bir dizi DNaz'ı aktifleştirerek DNA'nın parçalanmasına yol açarlar (Ulukaya 2001, Oliver ve Vallette 2005). Kaspaz aktivasyonu hücrelerde IAP (apoptozis inhibitör protenleri) denilen hücresel proteinler sayesinde kontrol altında tutulurlar (Salvesen ve Duckett 2002). İnsanlarda 6 tane IAP tanımlanmıştır. Bunlar, NAIP, c-IAP1 (HIAP2), c-IAP2 (HIAP-1), survivin, XIAP ve BRUCE94. IAP'nin aşırı salınımı proapoptotik Bcl-2 ailesinin uyararak apoptozisi inhibe etmektedir (Küçükaltun 2007). Membrana bağlı asit sfingomiyelinaz aktivasyonunun bir ürünü olan seramid molekülü mitokondri hassasiyeti meydana getirir. Apoptozda ve hücre döngüsünde görev alan seramidin, plazma zar hasarına karşı bir sinyal olduğu ve meydana gelen hasarlara karşı apoptozisi başlattığı belirlenmiştir (Desdicioğlu 2005).

Bir transkripsiyon faktörü olan p53 hücrede bir DNA hasarı meydana geldiğinde hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak DNA tamiri için hücreye zaman tanır. DNA'daki hasar, tamir edilemeyecek durumda ise Fas, Apaf-1 ve Bax yapımını artırarak Bcl-xL ve Bcl-2'yi baskılayarak apoptozu indükler (Vousden ve Lu 2002). Transkripsiyon düzenleyici faktör protein olan miyelositoma onkogen (C-myc), hücre çoğalmasında ve apoptozda başlıca rol oynamaktadır. Hücrede uygun büyüme faktörleri ile birlikte c-myc yok ise büyüme dururken, ikisinin de yeterli düzeyde olması durumunda proliferasyon gözlenir. Ancak c-myc'nin bulunup büyüme faktörlerinin bulunmadığı durumlarda ise apoptoz gözlenebilmektedir (Evan ve ark. 1994).

Mitokondri hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. İçerdiği Smac/DIABLO sitokrom c ve apoptozis indükleyici faktör (AIF) gibi bazı mitokondriyal proteinlerin sitoplazmaya salınımının farklı apoptotik yolları aktifleştirdiği bilinmektedir (Mirabella ve ark. 2000). Mitokondriden bu faktörlerin salınması mitokondri zarında por oluşumu sonucunda gerçekleşmektedir. Bu porların serbest radikal hasarı, hücresel stres veya büyüme faktörü yoksunluğu gibi apoptotik sinyaller ile aktifleşen Bcl-2 gen ailesi proteinlerinin pro-apoptotik üyelerinin (Bad, Bax vb.) aktivitesi yoluyla oluştuğu düşünülmektedir. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelere sahip olan Bcl-2 ailesi ya sitokrom c'nin sitozole salınmasını sağlayarak apoptozisi uyarır veya sitokrom c'nin salınımına engel olur ve apoptozisin baskılanmasını sağlar (Palmer ve ark. 2000, Suh 2002).

Apoptozis sürecinin düzenlenmesinde Bcl-2 proteinleri; hücre yüzeyi ve hücre içi ölüm sinyalleri arasında denetimi sağlayarak apoptozisin oluşum evresinde kaspaz kaskadının aktivasyonunda anahtar rol oynarlar (Sato ve ark 1994, Burlacu 2003). Hücrenin apoptoza olan eğilimi Bcl-2 ailesi genlerinin heterodimer veya homodimer formuna bağlıdır. Bcl-2 ailesi proapoptotik ve antiapoptotik olmak üzere birbirine zıt iki gruptan meydana gelmektedir. Hücrede proapoptotik proteinler daha fazla eksprese ediliyorsa hücre apoptoza eğilim gösterirken, antiapoptotik proteinler daha fazla eksprese edildiği durumlarda ise hücre apoptoza daha az eğilim göstermektedir (Adams ve Cory 2001). Proapoptotik üyeler Bid, Bax, Bad, Bak, Bim, Puma, BclXs ve Noxa'dır. Bu proteinler genellikle sitozolde yer alırlar ve hücresel stres ya da hasarın algılayıcıları olarak görev yaparlar. AIF ve sitokrom-c'nin salınımına artırarak apoptozu indüklerler. Antiapoptotik

üyeler olan Bcl-xL, Bcl-2 ve Mcl-1 proteinleri ise endoplazmik retikulum, çekirdek zarı ve mitokondri dış zarında yer alırlar. İyon transportunda ve por oluşumunda görev alırlar. Hücredeki Ca^{++} oranını kontrol ederler. Kaspazların öncü formları ile birlikte sitokrom-c ve AIF salınımını bloklayarak apoptozu inhibe etmektedirler (Adams ve Cory 2001, Adrain ve Martin 2001, Spierings ve ark. 2004)

2.3.3. Apoptoz mekanizmaları

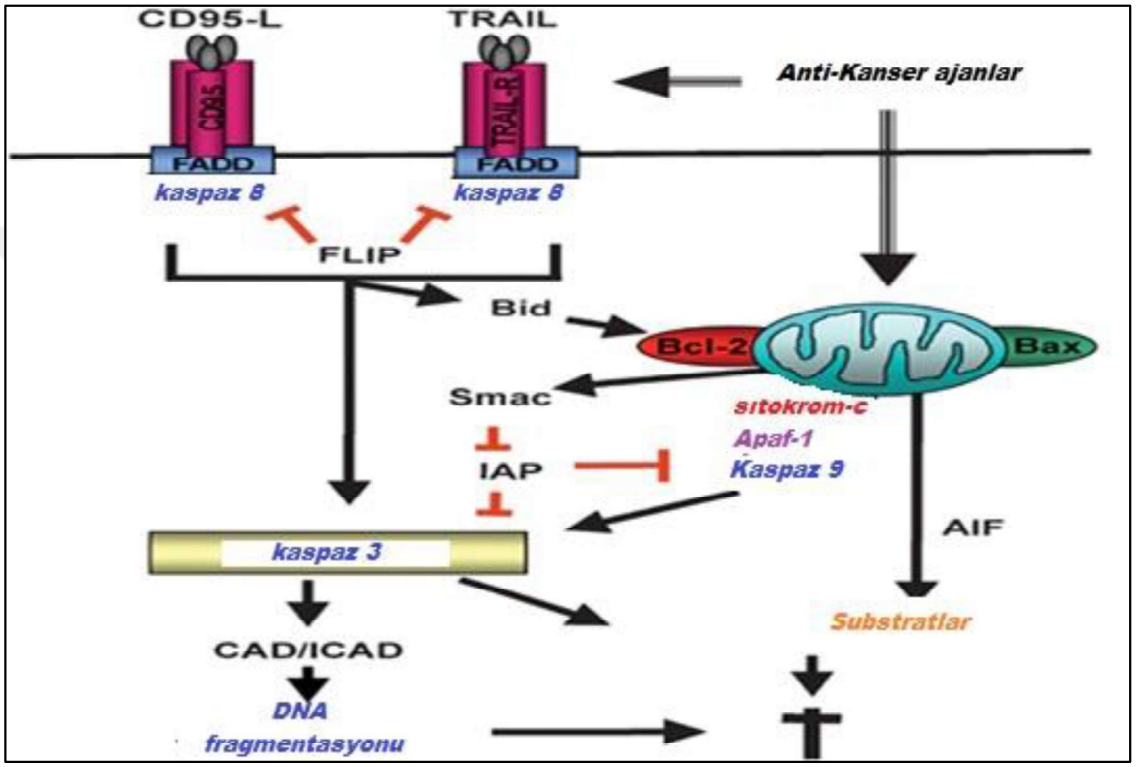
Apoptozisin indüklenmesinde;

1. Dışsal (ekstrinsik) yolak
2. İçsel (intrinsik) yolak ve
3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis olmak üzere üç sinyal yolunun rol oynadığı bilinmektedir.

2.3.4. Ekstrinsik/Dışsal yolak

Ölüm reseptörleri (DR) olarak bilinen ve Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü (TNFR) gen ailesinin üyesi olan; Fas/CD95/APO-1, TNFR-1 ve Tnf-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand (TRAIL) reseptörleri olan DR-3 (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1) ve DR-5 (TRAIL-R2)'in alakadar ligandlar ile etkileşime girmesi sonucunda apoptozis indüklenir. TNFR süper ailesi üyeleri, tip I transmembran proteinleri olup sistein açısından zengin ekstrasellüler subdomainler içermektedirler. Bu özellik TNFR super ailesi üyelerinin kendilerine has ligandları tarafından teker teker tanınmasını sağlamaktadır. Ölüm reseptörleri apoptotik sinyalin transdüksiyonu için ihtiyaç duyulan 80 aminoasit uzunluğunda intraselüler Ölüm Domaini (DD; Death Domain) içerir. Ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar FasL, TNFα ve TRAIL yapısal olarak reseptörler ile ilişkili proteinler olmakla birlikte TNF süper ailesine aittirler. Bu ölüm ligandları, tip II transmembran proteinleri gibi eksprese edilirler. Bazı hallerde, bu proteinler proteolitik kırılabilir ve serbest kalabilirler (Ghobrial ve ark., 2005, Guicciardi ve Gores 2009). Ölüm reseptörlerinin ligandları reseptörlerin oligomerizasyonuna yol açarak aktifleşmelerine sebep olmaktadır. Reseptörlerin aktivasyonu, Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (DISC) adı verilen ve proteinlerden oluşmuş bir kompleksin meydana gelmesine sebep olur. DISC, adaptör protein Fas ilişkili ölüm alanını (FADD) ve TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi proteinini (TRADD) barındırır. Bu ölüm bölgeleri prokaspaz-8'i aktifleştirmektedir. DISC yapısında yer alan

prokaspaz 8'in aktivasyonunu takiben, kaspaz 8 sırası ile kaspaz 3, 6 ve 7'nin aktive olduğu kaspaz kaskatını harekete geçirir. Kaspaz 8'in aktif hale gelmesi ayrıca Bid'in aktive olmasına sebep olur. Kırılmış Bid (tBid) daha sonra mitokondriye geçerek sitokrom c, SMAC ve kalsiyum salınımını uyarır (Şekil 2.4.), (Elmore 2007, Solakoğlu 2009, Dickens ve ark. 2012).



Şekil 2.4. Reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu (Fulda ve Debatin 2006'dan değiştirilerek alınmıştır).

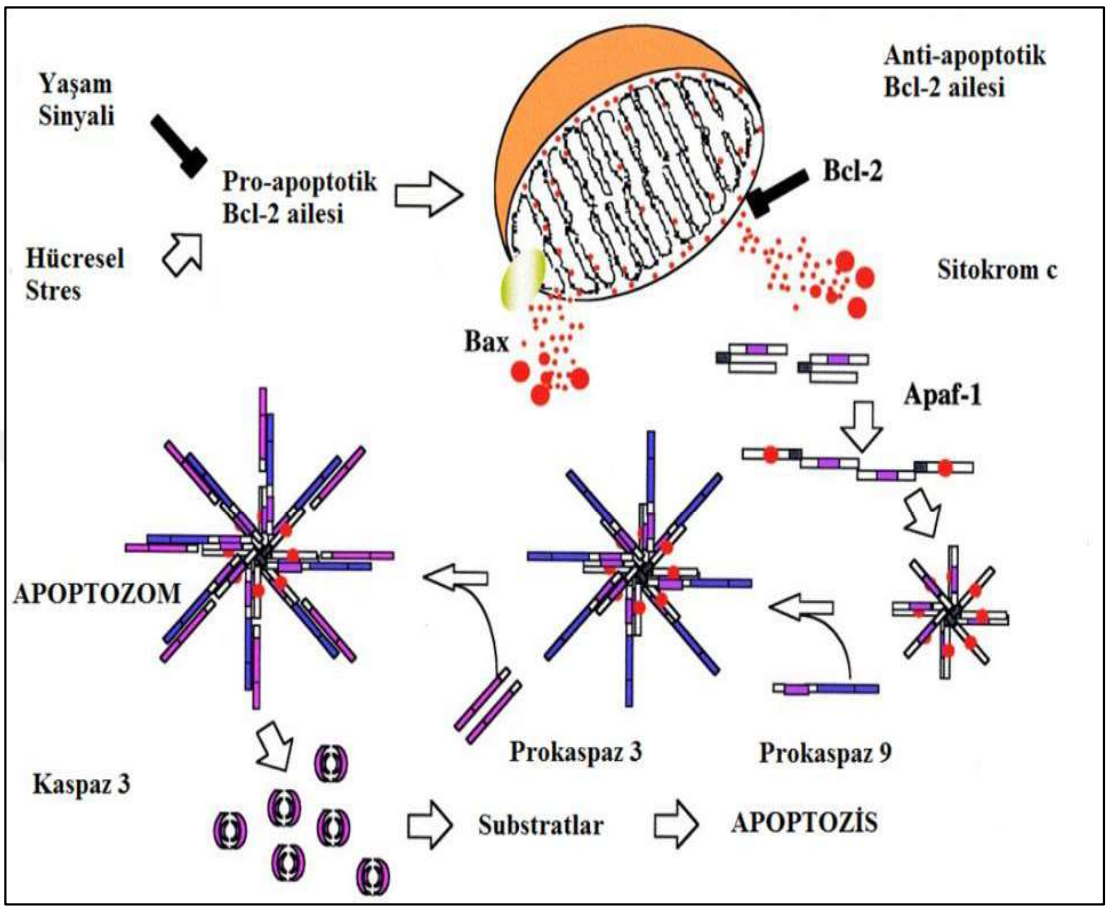
2.3.5. İntrinsik/İçsel yolak

Mitokondriyal/içsel yolak, apoptozu baskılayan ve apoptozu indükleyen üyelere sahip olan Bcl-2/Bax gen ailesi ile düzenlenir ve uyarıldığında mitokondriden sitokrom-c salınımına sebep olur. Bunun sonucunda ise ölüm sinyali verilir (Şekil 2.5.). İçsel ve dışsal yolakların her ikisi de yapısal ve düzenleyici molekülleri kıran ve bunun sonucunda hücrenin ölümüne neden olan kaspaz adı verilen proteaz kaskadının aktivasyonunu içeren ortak bir yolda kesişirler (Ghobrial ve ark. 2005). Bcl-2 ve Bcl-XL anti-apoptotik üyelerdir ve kaspazların öncü formlarını durdurarak veyahut apoptogenik faktörlerin mitokondriden salınmasının önüne geçerek hücrenin yaşamasını

teşvik ederken; pro-apoptotik olan Bid, Bad, Bim ve Bax gibi üyeler ise hücreyi apoptozise teşvik ederler. Bax ve Bak proteinleri normal koşullarda Bcl-2 tarafından inaktif bir halde tutulur. Apoptotik sinyal oluştuğunda Bcl-2 inaktifleşirken, aktifleşen Bak ve Bax mitokondri dış zarında por oluşumuna ve membran potansiyelinde değişime neden olur. Mitokondriyal yolda anahtar olay mitokondri dış membran permeabilizasyonudur (MOMP) ve bunun neticesinde sitokrom c, mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/IAP bağlayıcı protein Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, AIF ve endonükleaz D (EndoG) gibi mitokondri zar proteinleri sitozole salınır. Sitokrom c'nin mitokondri iç zar yüzeyinden salınması ile sitoplazmik protein olan Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1'e (Apaf-1) bağlanarak aktive eder, Apaf-1/sitokrom c kompleksi ortamda dATP/ATP'nin bulunması ile heptamerik bir yapıya oligomerize olur. Bu yapının meydana gelmesi, prokaspaz 9'un Apaf-1 ile etkileşimine olanak tanır ve apoptozom kompleksi oluşur. Apoptozomun vazifesi başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9'u aktive ederek aktif kaspaz 9, kaspaz-3'ü veya diğer efektör kazpazları aktifleştirerek kaspaz kaskadına aracılık eder. Aktif kaspaz 3, Rho ilişkili sarmal oluşturan kinaz I (ROCKI; "Rho-associated coiledcoil forming kinase I"), kaspazla aktive edilmiş DNaz inhibitörü (ICAD; "inhibitor of caspase-activated DNase") poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP, DNA tamir enzimi), fodrin, aktin ve lamin gibi hücresel substratları kırarak apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlar. Kaspaz aktive edici DNaz (CAD) normal hücrelerde ICAD'üne bağlı ve inaktif halde bulunur ve aktif hale geçtiğinde kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nükleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına sebep olur. Ayrıyeten kaspaz aktivitesini inhibe eden ve aktiviteleri Smac veya Omi/HtrA2 gibi fonksiyonel analoglar ile engellenmiş birçok apoptozis inhibitörleri (IAP) vardır. Ölen hücrelerde Smac ve Omi/HtrA2 (mitokondriyel proteinler, pro-apoptotik proteinler) mitokondriden salındığında IAP'lar inaktive olmaktadır. Böylece efektör kaspazların inhibisyonu engellenerek hücrelerin apoptozise gitmeleri sağlanmaktadır (Ulukaya 2001, Zhang ve ark. 2003, Riedl ve Salvesen 2007, Li ve Yuan 2008, Akşit ve Bildik 2008, Duprez ve ark. 2009).

Bu içsel ve dışsal yolak mekanizmaları kaspaz aracılığı apoptozisi göstermektedir. Ayrıca kaspazlardan bağımsız kaspaz aktivasyonunun gerçekleşmediği bir apoptozis mekanizması da bulunmaktadır. Buna gore, AIF mitokondriden salınarak çekirdeğe geçmekte ve nükleazları aktive ederek DNA hasarına yol açmaktadır. AIF, granzyme B,

steroidler ile endonukleaz G kaspazlardan bağımsız bir şekilde apoptozise sebep olmaktadır (Ulukaya 2003, Dash 2007).



Şekil 2.5. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması (Zimmermann ve ark. 2001).

2.3.6. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis

Amiloid β nörotoksisitesine katkıda bulunan, kaspaz 12'ye bağımlı Endoplazmik Retikulum aracılı apoptotik bir yolak tanımlanmıştır (Nakamura ve ark. 2000, Keane ve ark. 2001). Bu yolak mitokondrial/sitokrom-c ile ölüm reseptör bağlantılı apoptozisten değişik bir yol olup kaspaz 12, ER zarında lokalize halde bulunur ve ER aracılı apoptozisin gerçekleşmesi için gerek duyduğu bir kaspazdır. Yapılan son çalışmalar göstermiştir ki Ca^{++} seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz 12 aktive edilir ve aktifleşen kaspaz 12 sitoplazmaya ilerleyerek kaspaz 9 ile etkileşir ve sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (Rao ve ark. 2001).

2.3.7. Hücre ölümünde gerçekleşen morfolojik değişiklikler

Apoptotik hücreler, hücre nükleusunun küçülmesi (piknoz), nüklear fragmentasyon, deformasyon ve komşu hücreler ile temas kaybı ve benzeri tipik morfolojik özellikler ile tanımlanırlar. Kromatin kondanse olarak nükleer zarın altında konumlanır ve plazma zarı bleblenir. Hücre sitozol, kondanse kromatin ve organelleri içeren membranla çevrili yapılara (apoptotik cisimciklere) parçalanır. Apoptotik cisimcikler; parankimal hücreler, makrofajlar ya da neoplastik hücreler tarafından fagosite edilirerek dokuda herhangi bir inflamatuvar yanıt meydana gelmeden uzaklaştırılırlar. Bu morfolojik değişimler, apoptotik bir hücrede meydana çıkan karakteristik moleküler ve biyokimyasal olayların sonucudur. Sitoplazma ve organellerin şekil ile bütünlüğünü belirleyen bazı protein substratları ve DNA'nın oligonükleozomal parçalanmasını sağlayan proteolitik enzimlerin aktivasyonu bu olaylardan öne çıkan olaylardandır. (Saraste ve Pulkki 2000, Gewis 2003, Kepp ve ark. 2011). Bir başka hücre ölüm şekli olan nekrozis ise yaralanmalar sonucu hücrelerin zarar görerek şişip, patlayarak ölmesi olarak tanımlanır. Apoptozis gibi programlı fizyolojik bir mekanizma olmadığı ayrıca kontrolsüz gerçekleştiği kabul görmektedir. Fakat nekrotik ölümde anahtar düzenleyiciler olan Reseptör Etkileşim Protein (RIP; receptor interacting protein) kinazlar ve PARP'ın keşfi ile programlı nekrozis terimi kabul görmeye başlamıştır. Programlı nekrozisin potansiyel sinyal bileşenleri olarak RIP kinazlar, poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP1), kalpainler ve NADPH oxidazlar tanımlanmıştır. Hücre bu yol ile ölüme gittiğinde hücrenin zar bütünlüğü bozularak hücre içeriği dışarıya yayılır. Komşu hücreler bu durumdan zarar görerek dokuda güçlü bir inflamatuvar cevap oluşur (Golstein ve Kroemer 2007, Galluzzi ve Kroemer 2008, Ouyang ve ark. 2012).

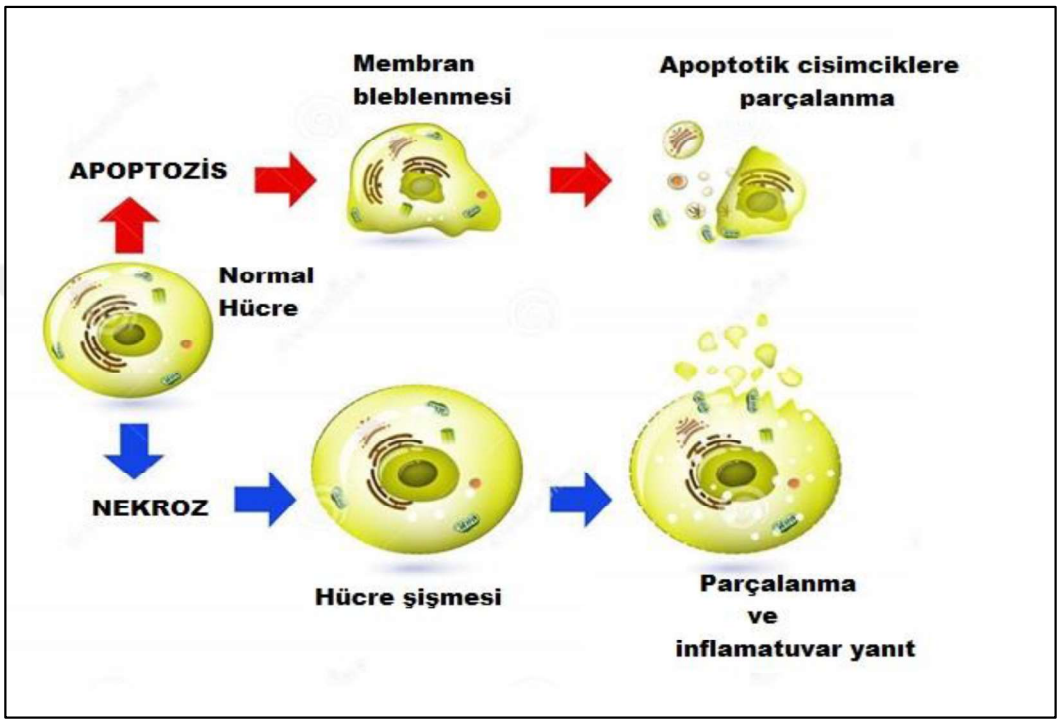
2.3.8. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar

Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar maddeler halinde aşağıda (Şekil 2.6.) verilmektedir.

- Apoptoziste hücreler tek tek etkilenirken, nekrozda ise genellikle bileşik hücre gruplarının etkilendiği gözlenir (Holdenrieder ve Stieber 2004).
- Apoptozis fizyolojik ve fizyolojik olmayan uyaranlar ile başlarken, nekrozun ise fizyolojik olmayan uyaranlar ile başladığı bilinmektedir (Wyllie 1980, Lu ve ark. 2000).

- Apoptozis sonucu ölen bir hücrenin kromatini çekirdek zarının etrafında toplanır ve kromatin kondensasyonu gözlenirken, nekrozla ölen hücrenin kromatin yapısı normal hücrelerdeki kromatin yapısı ile hemen hemen benzerdir (Ulukaya 2010).
- Apoptozis sonucunda hücre apoptotik cisimciklere ayrılır ancak membran bütünlüğü asla bozulmaz. Nekrozda ise membran bütünlüğü bozulur. Bundan dolayı nekrozda inflamatuar cevap gözlenirken, apoptozisde ise inflamatuar bir cevap gözlenmez (Spencer ve ark. 1996, Cummings ve ark. 1997, Yılmaz 2005).
- Hücreler, hücre içi ATP seviyesine göre nekroz veya apoptoz sonucu ölürler. Ciddi olarak zarar görmüş hücrelerde, apoptozis için ihtiyaç duyulan enerji sağlanamadığı için hücre nekroz ile ölür (Chandra ve ark. 2000).
- Nekrozda hücrenin içine çok fazla sıvı girmesi neticesinde mitokondride ve sitoplazmada şişme gözlenirken, apoptozisde ise bu olayın tam tersi yaşanır ve apoptotik hücrede büzülme ile nükleus yoğunlaşması görülür (Ulukaya 2003).
- Apoptozise uğrayan hücreler çevreye kemotaksik madde yaymazlar. Makrofajlar veya epitel hücreleri aracılığı ile fagosite edilirler. Ancak nekroza uğrayan hücreler çevreye kemotaksik madde yayarlar ve bu maddeler aracılığı ile nekroz hücreler makrofajlar tarafından fagositoza uğrarlar (Wyllie 1980, Lu ve ark. 2000).
- Nekroz sırasında hücrenin DNA'sının rastgele sindirimi mevcuttur. Ancak apoptozisde DNA'nın, intranükleozomal bölgelerinden 180-200 baz çifti ya da bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanması söz konusudur. Agaroz jel elektroforezinde apoptozis icin karakteristik olan "ladder pattern" denen merdiven şeklinde kırılmalar gözlenir (Wyllie 1980, Ulukaya 2003).

- Apoptotik hücrede nekrozdan ayrı olarak normalde plazma zarının iç yüzünde bulunan fosfotidilserin zarın dış yüzüne doğru transloke olur. Zar da meydana gelen bu değişiklik sayesinde apoptotik hücre makrofajlar ve komşu hücreler tarafından tanınır ve fagosite edilmesi sağlanır (Ulukaya 2003).

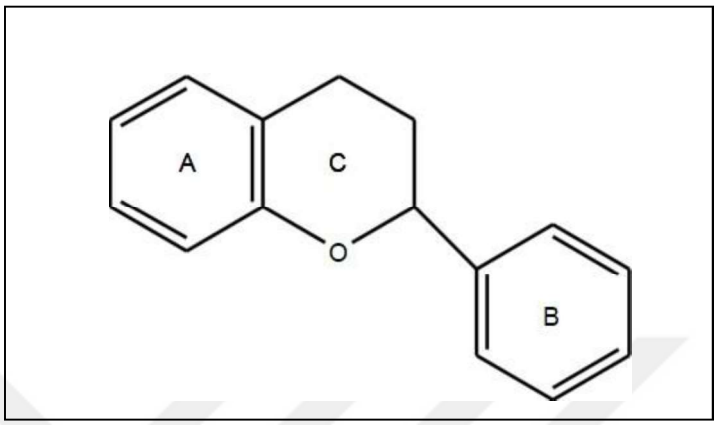


Şekil 2.6. Apoptoz ve Nekrozun şematik karşılaştırılması (Anonim 2016).

2.4. Flavonoidler

Flavonoidler, polifenolik moleküllerin bir sınıfıdır ve hemen hemen her bitkide (yaprak, tohum, meyve, dal ve çiçek) bulunan pigment bileşikleridir (Şekil 2.7.). Flavonoidler hücrede farklı birçok işlevde bulunmaktadır. Bu işlevler arasında fizyolojik düzenleyici, kimyasal haberci ve hücre döngüsünün inhibitörleri olarak görev alabilmeleri sayılabilir. Flavonoidlerin güçlü antioksidan etkisi dışında yaşlanma, kanser, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar (alzheimer, parkinson), iskemik yaralanma, kardiyovasküler düzensizlikler ve inflamasyon gibi hastalıklarla bağlantılı oldukları belirlenmiştir (Sghaiera ve ark. 2011). Flavonoller, flavanonlar, flavonlar, kateşinler, antosiyanidinler, isoflavonlar dihidroflavonoller ve kalkon'ları bulunduran ana flavonoid grubunda 4.000'den fazla farklı flavonoid tanımlanmıştır.

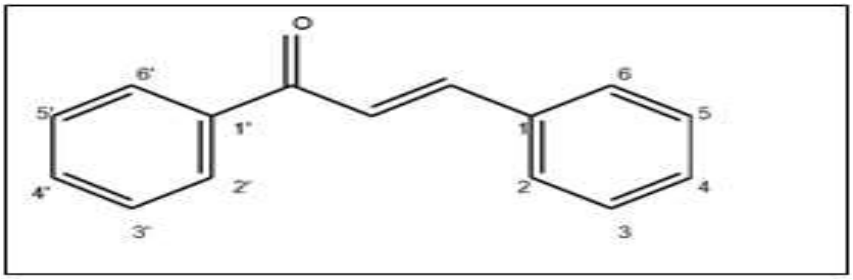
Besleyici bir özelliği bulunmayan bileşikler olmaları nedeniyle vitaminlere benzetilirler (Cook ve Samman 1996). Kanserin önlenmesinde flavonoidler açısından zengin olan turunçgiller gibi doğal besinler ile beslenmenin önemli bir rolü olabileceği ileri sürülmektedir (Meiyanto ve ark. 2012).



Şekil 2.7. Flavonoid yapısı (Taşkın 2016).

2.5. Kalkonlar

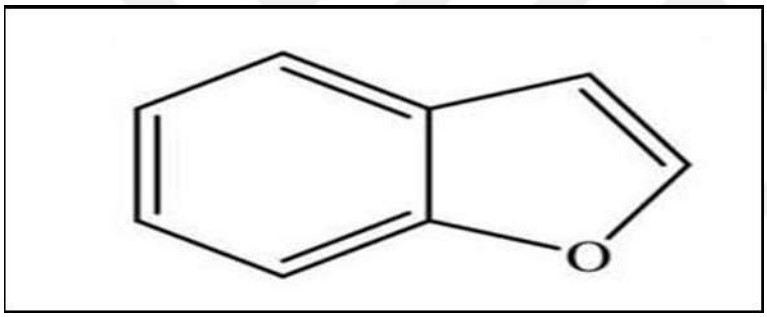
Bitkilerde izo-flavonoid ve flavonoid biyosentezinde yer alan bir ara bileşik olan kalkonlar, α, β-doymamış karbonil ara zinciri ile bağlı iki aromatik halkadan meydana gelen 1, 3-difenil-2-propen-1-on yapısı anlamına gelmektedir (Şekil 2.8.), (Rybka ve ark. 2014). Sentetik ve doğal olarak oluşturulabilen kalkonlar geniş biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerdir (Lunardi ve ark 2003). Yapılan çalışmalar kalkonların antioksidan, sitotoksik, antikanser, analjezik, antienflamatuvar, antimalarial, antianjinal, antialerjik, antihepatotoksik, antimikrobial ve antipretik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Kim ve ark. 2008, Mohamed ve ark. 2012). Kalkonların antikanser özellik göstermelerinin nedeninin ise tubüline bağlanmaları ve mikrotübül polimerizasyonunu engellemelerine bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (Hijova 2006).



Şekil 2.8. Kalkon yapısı (Taşkın 2016).

2.6. Benzofuranlar

Bir furan halkası ile benzen çekirdeğinin birleşmesinden meydana gelen benzofuranların bir diğer ismi 'kumaron'dur (Şekil 2.9.). Benzofuranlar birçok uygulama alanına sahip olan bisiklik halkalı yapılardır (Kamal ve ark. 2011). Farmakolojik, toksik ve psikolojik özelliklere sahip olan benzofuran türevlerinin birçok doğal üründe var olduğu bilinirken, bu bileşiklerden kimyasal tarım ilaçları, tıbbi ilaçlar, sedatifler, hipnotik, antiinflamatuar, optik parlatıcılar, antitümör ve kozmetik gibi birçok uygulama alanında faydalanılmaktadır (Kumar ve ark. 2006, Kamal ve ark. 2011). Benzofuran türevleri sentetik ilaç ve kozmetik alanında geniş bir kullanıma sahipken, birçok doğal benzofuran farmakolojik, toksik ve fizyolojik özelliklere sahiptir (Bogdal ve Warzala 2000). Benzofuranların dikkat çeken en önemli özelliklerinden bir tanesi de anti kanser aktivite göstermesidir (Khan ve ark. 2005).

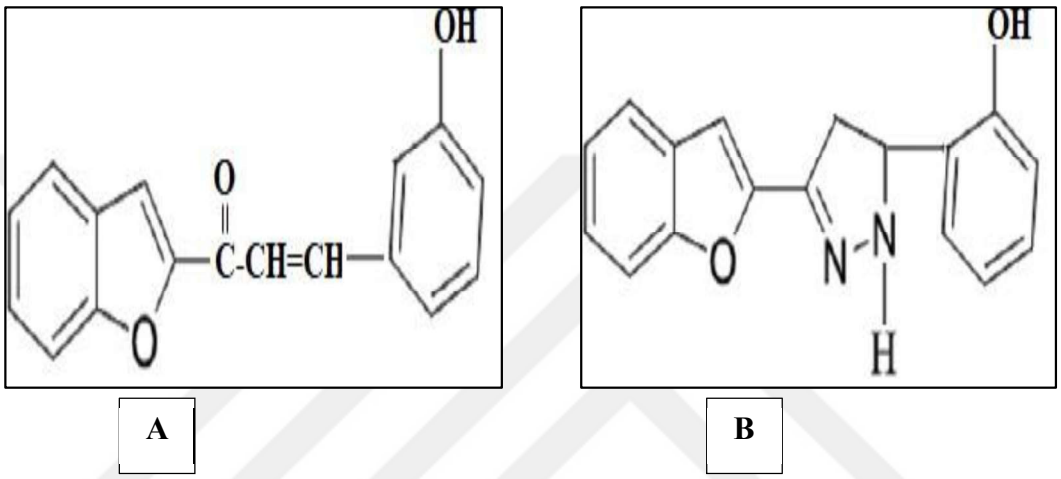


Şekil 2.9. Benzofuran halkası (Taşkın 2016).

2.7. Pirazolinler

Pirazolin, komşu iki azot atomu ile bir endosiklik çift bağ içeren beş üyeli heterosiklik bir halka olan bileşiklerdir (Shaaban ve ark. 2012). Pirazolinler sahip oldukları endosiklik bağ sebebi ile siklik hidrazinler olarak düşünülmektedirler (Alex ve Kumar 2014). Doğada yaygın olarak bulunan pirazolinler vitaminlerin, pigmentlerin, alkaloitlerin, hayvan ve bitki hücre bileşenlerinin yapısında yer almaktadırlar (Yusuf ve Jain 2014). Pirazolin türevlerinin antikanser, antimikobakteriyel, antimikrobiyal, antiamoebik, anti-inflamatuvar, antifungal, analjezik, antidepresan gibi çeşitli biyolojik aktiviteler gösterdiği raporlanmıştır (Kumar ve ark. 2009).

Tez çalışmamızda kullanılan benzofuran sübstitüe kalkon türevleri Coşkun ve ark. (2011) tarafından sentezleri ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiş olup 2008 senesinde 3-(Substitue Aryl)-1-(benzofuran-2- yl)-2-propenonlar ile 2-hydroxybenzaldehid (Kompleks 1) (Coşkun ve Ahmedzade 2008) ve 2011 yılında 3-(Substitue Aryl)-1-(benzofuran-2- yl)-2-propenonlar ile 2-pirazolin (Kompleks 2) yayınlanmıştır (Coşkun ve ark. 2011). Komplekslerin moleküler yapıları Şekil 2.10.'da görülmektedir.



Şekil 2.10. Tezde kullanılan komplekslerin kimyasal yapıları A) Kompleks 1 ve B) Kompleks 2 (Coşkun ve Ahmedzade 2008, Coşkun ve ark. 2011).

2.8. Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite

Çok hücreli organizmalara ait hücrelerin, laboratuvar koşullarında özel tasarlanmış kaplarda besin, ısı ve nem gibi ortam koşullarının kontrol altında tutularak kontaminasyondan arındırılmış şekilde büyütülmesi olayına hücre kültürü ismi verilmektedir (Zucco ve ark. 1998). Hücre kültürü; ilaç geliştirilmesi, kanser, aşı çalışmaları, in vitro sitotoksisite çalışmaları alanlarında çok sık tercih edilen bir yöntemdir (Gilbert ve Boutros, 2016). Bir maddenin sitotoksik etkiye sahip olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılan sitotoksisite araştırmaları, terim anlamı olarak hücre ölümüne neden olan anlamına gelmektedir. Sitotoksisite çalışmaları, uygulama kolaylığı, *in vivo* çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesinden dolayı hayvan deneylerine bir alternatif olarak doğmuştur (Riss ve Moravec, 2004). Sitotoksisite çalışmalarının önemli bir basamağı deneysel olarak biyolojik, kimyasal ve fiziksel faktörlere maruz bırakılan hücrelerin canlılıklarının belirlenmesidir (Niles ve

ark. 2007). Hücre canlılığının saptanabilmesi için çok sayıda farklı test mevcuttur. Uygulanan sitotoksisite çalışmasının tipi ne olursa olsun, çalışma sonunda canlı ve ölü hücre miktarının belirlenmesi oldukça önemlidir (Riss ve ark. 2006). Sitotoksisite testleri genellikle lüminesans ve kolorimetrik olan enzimatik yöntemlerdir (Crouch ve ark. 1993, Fan ve Wood 2007, Longo-Sorbello ve ark. 2006). *İn vitro* testlerin avantajları yanında dezavantajları da mevuttur.

Avantajları: Moleküler düzeyde çalışma fırsatı sunmasının yanı sıra hücrelerde meydana gelen değişimler kantitatif ve kalitatif olarak saptanabilir. Hücrenin içinde bulunduğu mevcut ortam koşulları değiştirilerek, hücrelerde meydana gelen değişiklikler gözlenebilir. Kullanılan hücre tipine göre hücrenin büyüme ve proliferasyon için ihtiyaç duyduğu koşullar daha kolay ve daha hızlı bir şekilde belirlenir. Farklı hücre tiplerinde test edilen farklı kimyasal maddeler ile meydana gelebilecek toksik etkiler daha kısa zamanda ve daha az bir maliyet harcanarak incelenebilmektedir.

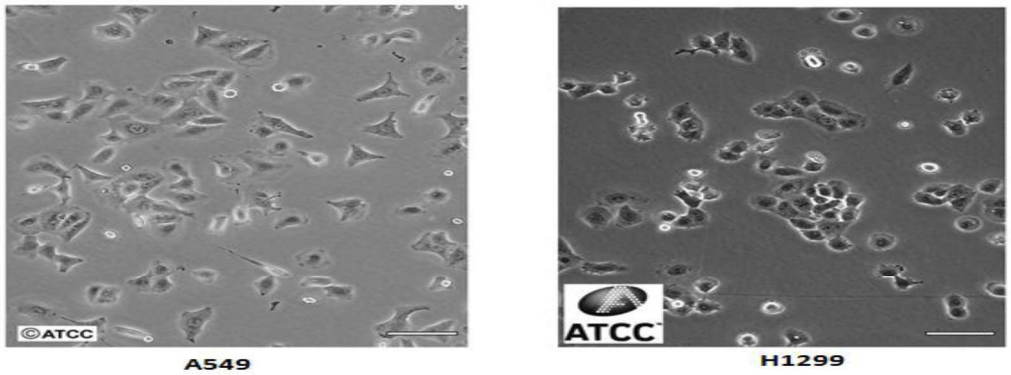
Dezavantajları: Türler arası farklılıklardan dolayı, birtakım hayvan hücre kültürleri ile insan hücreleri benzer cevaplar vermeyebilir. İnsan hepatositleri gibi kimi kültürlerin bulunmasının zor olmasının yanı sıra maliyeti de yüksek olabilmektedir. Bazı hücre çeşitleri klonal büyüme göstermedikleri için kültür ortamlarında kısa bir sürede canlılıklarını kaybedebilirler. Bu hücre kültürlerinin kronik toksisite çalışmalarında kullanılmaları olanaksızlaşır. Bazı hücreler yavaş çoğalmasının yanı sıra kısa bir sürede fenotipik değişiklikler gösterebilirler. Tek bir test yöntemi için tek bir hücre kullanılması, *in vitro* testlerin *in vivo* test sonuçlarını doğru bir şekilde yansıtmasını zorlaştırır.

Hücre kültüründe canlılığın tayin edilmesinde başvurulan sitotoksisite testlerinde, membranları bozulan hücrelerin içerisine alınan naftalin siyahı, tripan mavisi veya eritrosin gibi boya ve zar bütünlüğü bozulmamış sağlam hücrelerin içerisine alınan diasetil florasan, nötral kırmızı gibi boyalar kullanılarak morfolojik olarak görüntülenebilir (Tuncer ve Demirci 2011, Niles ve ark. 2007).

2.9. Tez Çalışmasında Kullanılan Hücre Soyları

A549 Hücre Soyu: ilk kez 1972 yılında Giard ve ark. tarafından elde edilen bu hücre soyu, adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücreleri olup, p53 pozitif epitelyal karakterli hücrelerdir. Kanserli akciğer doku kültürü Kafkasyalı 58 yaşında olan bir erkek bireyden alınmıştır (Giard ve ark. 1973). A549 hücreleri tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğaltılabilmektedir (O'Brien ve ark. 1987). A549 hücreleri elektrolitlerin ve suyun akciğer alveollerinden geçmesine izin vermektedir. Yüksek seviyede lesitin ve doymuş yağ asidi sentezlemesinden dolayı, zar fosfolipidlerinin korunmasını sağlamaktadır. Böylece hücre direnç kazanmaktadır. (Giard ve ark. 1973).

H1299 Hücre soyu: Lenf düğümünden türetilen insan küçük hücreli dışı bir akciğer karsinomu hücre dizisi olan H1299 hücre soyu araştırmalarında çok sıklıkla kullanılırken, bu hücre soyu NCI-H1299 veya CRL-5803 olarak da bilinir. H1299 hücre soyu p53 geni bulundurmamaları sebebiyle A549 kanser hücrelerinden farklılık gösterir (Anonim 1996, Anonim 2009). A549 ve H1299 akciğer hücre soyları şekil 2.11.'de verilmiştir.



Şekil 2.11. Deneyde kullanılan A549 ve H1299 akciğer kanseri hücre soylarının faz kontrast görüntüleri (Anonim 2019).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler

-Benzofuran sübstitüe kalkon türevleri, Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü
-Fetal sığır serumu (FBS), Gibco

-Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin), Gibco

-Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco

-Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Gibco

-Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Gibco

-0.05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco

-Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma

-Triton X-100, Sigma

-Adenozin 5'-trifosfat (ATP) Chemosensitivity Assay, Dcs Innovative Diagnostic Systeme, Hamburg, Almanya

-Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries

-Hoechst 33342 62249, Thermo Fisher Scientific, ABD

-Tris bazı BioShop, Kanada

- Trikloroasetik asit , Sigma, ABD

-Sülforodamin B , Santa Cruz, ABD

-Asetik asit 100063, Merck, Almanya

3.1.2. Sarf malzemeler

-25 cm^2 ve 75 $cm^{2'}$lik flask, Sunub

-6 kuyulu plate, Sunub

-96 kuyulu flat plate, Sunub

-96 kuyulu beyaz pleyt 3917, Corning, ABD

-5 ml ve 10 ml hacimlerinde enjektörler, Set inject

-10 µl'lik pipet uçları, Expell

-100 µl'lik pipet uçları, Expell

-200 µl'lik pipet uçları, Expell

-1000 µl'lik pipet uçları, Expell

-10 ml hacimli serolojik pipet, Sunub

-25 ml hacimli serolojik pipet, Sunub

-Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Non-pyrogenic

-Steril santrifüj tüpleri (15 ml), Sunub

-Steril santrifüj tüpleri (50 ml), Sunub

-Thoma lamı, Marienfeld, Almanya

-Kriyovial, Sarstedt, Almanya

-2 ml'lik cam pastör pipetler, ISOLAB, Almanya

3.1.3. Cihazlar

-Spektrofotometre EL800UV, BioTeK, USA

-Saf su cihazı Direct-Q® 3 UV, Merck, Almanya

-Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D

-Luminometre ($FL_{\times}$800 Mikroplate Floresans Okuyucu)

-CO_2 inkübatörü, Panasonic, Japonya

-Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye

-Steril kabin, ESCO, Singapur

-Multipipet cihazı, Multipette eppendorf, Hamburg, Almanya

-Inverted mikroskop, EUROMEX, Hollanda

-Aspiratör, Rocker 300, Tayvan

-Kuru hava sterilizatörü, Elektro-mag M 420, Türkiye

-Santrifüj, NF 800R, Türkiye

-10 µl, 100 µl ve 1000 µl'lik pipet seti, Orange Scientific

-0,5-5 ml pipet, Brand

-10 ml pipet, Eppendorf

-5-50 µl Transferpipet, Thermo Scientific

-Pipet boy, ISO fill

-20-200 µl Transferpipet, Brand, Almanya

3.2. Yöntem

3.2.1. Benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin (Kompleks 1 ve Kompleks 2 bileşikleri) hazırlanması

Benzofuran sübstitüe kalkon türevleri olan Kompleks 1 ve Kompleks 2 kimyasallarının stok çözeltileri 25 mM olacak şekilde DMSO ile çözülmeleri sağlandı. Daha sonra çözünmüş benzofuran sübstitüe kalkon türevleri 0,5 ml'lik tüplere 25'er µl olmak üzere alikotlanarak -20 ^{o}C'de muhafaza edildi. Gerekli seyreltmeler besiyeri ile yapılmıştır.

3.3. Hücre Kültürü

A549 ve H1299 insan akciğer kanseri hücre soyları kriyovialler içerisinde -80°C'de ki dolaplarda muhafaza edildi.

3.3.1. Hücre soylarının stoktan çıkartılması

A549 ve H1299 hücre soylarını prolifere edebilmek amacı ile -80 ^{o}C de saklanan kriyovialler içerisinde ki hücre soyları sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. A549 ve H1299 hücre süspansiyonları %1 penisilin-streptomisin, %10 FBS ve %1 L-glutamin içeren 5 ml RPMI ("Roswell Park Memorial Institute Medium'') besiyeri içerisine alındıktan sonra, falkon tüp içerisinde 800 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildikten sonra supernatant kısmı aspire edildi. Daha sonra hücre peleti üzerine 1 ml besiyeri eklenerek hücrelerin süspansiyon haline gelmesi sağlandı. Hücre süspansiyonu, 4 ml besiyeri içeren 25 cm^{2}'lik flasklara alınarak %5 CO_2 içeren, 37 ^{o}C'lik ortamda inkübe edildi.

3.3.2. Hücre soylarının pasajlanması

Deneylerde kullanılan hücre soyları, flask yüzeyini %80-90 oranında kapladıklarında yani konfulent olduklarında flask içerisinde bulunan besiyeri aspire edildi. Hücrelerin iyice serumdan arındırılması için, 25 cm^{2}'lik flask içerisine 2 ml 1X Fosfat Tuz Tampon Çözeltisi (PBS) (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeylerinin nazikçe yıkanması sağlandı ve PBS ortamdan aspire edildi. Aspirasyon işleminden sonra flask yüzeyine yapışmış olan hücrelerin yüzeyden uzaklaştırılması için 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı. Hücreler daha sonra 37 ^{o}C ve %5 CO_2'li özel şartlarda 4-5 dk

inkübasyona bırakıldı. Mikroskop ile hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi. Hücrelerin tamamı yüzeyden ayrıldıktan sonra, tripsin oranının inhibe edilebilmesi amacıyla en az iki katı kadar besiyeri eklendi. Hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarının Tripsin-EDTA'dan zarar görmelerinin önüne geçilmiş oldu.

Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15 ml'lik falkon tüp içerisine alınarak 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve daha sonra süpernatant aspire edildi. Hücre peleti 1 ml hücre besiyerinde çözündükten sonra 9 ml besiyeri eklendi ve 10 ml'lik hücre süspansiyonu 75 cm^2'lik flasklara alınarak 37 ^oC'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Hücre pasajlama yöntemiyle hücreler istenilen sayıya ulaşana kadar, hücrelerin proliferasyonu sağlandı.

3.3.3. Hücre soylarının stoklanması

Deneyde kullanılan hücreler flask yüzeyini kapladığında flask içerisindeki besiyeri aspirasyon işlemi ile ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılmaları için %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) ilave edildi. Hücreler 37 ^oC ve %5 CO_2'li ortamda 5 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. Mikroskop altında kontrol edilen flaskta hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlenince, flaska tripsin oranını inhibe edilebilmesi amacı ile yaklaşık iki katı besiyeri eklendi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, besiyeri içeren 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı. Ardından falkon tüp 800 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı aspire edildi. Pelet üzerine her kriyovial için karanlık ortamda 1,5 ml dondurucu medium (5 ml DMSO + 5 ml FBS + 40 ml DMEM) eklenerek hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine alınarak -80 ^oC'e kaldırıldı.

3.3.4. Kullanılan besiyerinin hazırlanması

A549 ve H1299 akciğer hücre soyları için kullanılan besiyeri ortamı için %10 Fetal Bovine Serum (Hyclone USA), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, Gibco) ve %1 L-glutamin (Gibco) içeren RPMI 1640 (Hyclone USA) besiyeri solüsyonu kullanıldı.

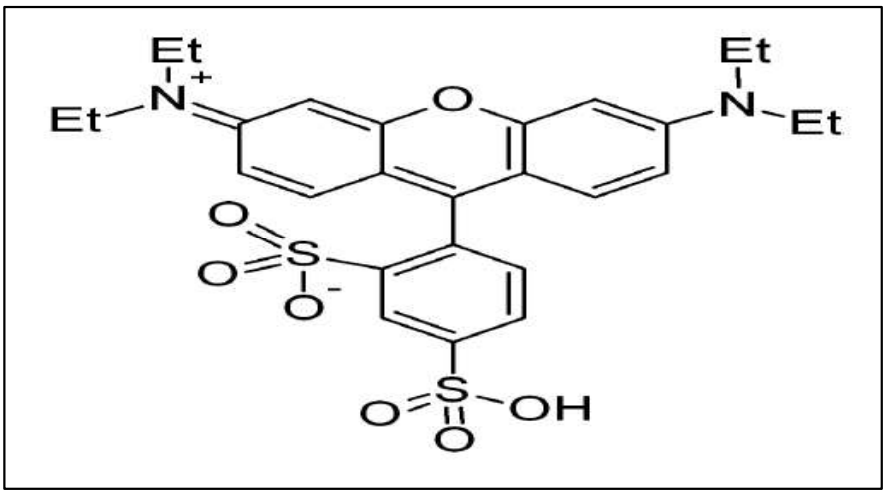
3.3.5. Hemositometre ile hücrelerin sayımı

Hücre sayımı için, tripsinizasyon işleminden sonra elde edilen hücre süspansiyonundan 10 µl 0,5 ml'lik tüpe alınarak üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi (Biological Industries) eklenerek boya ile hücre süspansiyonunun iyice karışması sağlandı. Hemositometre distile su ile iyice temizlendi. Karışımdan 10 µl thoma lamına alınarak mikroskopta beş alanda hücre sayımı gerçekleştirildi. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyeri içerisindeki hücre sayısı hesaplandı.

3.4. SRB (Sulforhodamine B) Canlılık Metodu

Sulforhodamine B metodu, triklorik asetik asit (TCA) ile fikse edilmiş aminoasitlere SRB boyasının (Şekil 3.1.) zayıf asidik ortam şartlarında bağlandıktan sonra zayıf bazik koşullarda ayrışması ile meydana gelen pembe rengin absorbansının 560 ve 580 nm'de ölçülmesine dayanan kolorimetrik bir hücre canlılık tayin testidir (Houghton ve ark. 2007).

Bu yöntem, Amerika'da referans merkez olarak kabul edilen Ulusal Kanser Enstitüsünün ("National Cancer Institute", NCI) de çalıştığı bir metod olduğundan dolayı anti-kanser ilaç çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir.



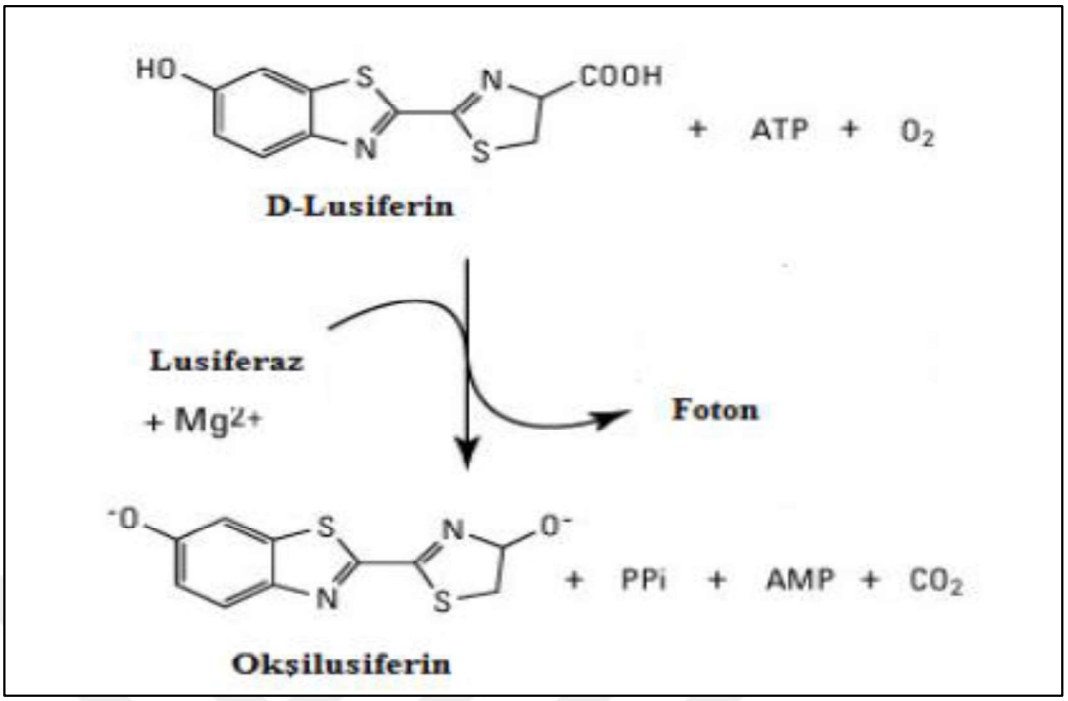
Şekil 3.1. Sulforhodamine B'nin kimyasal yapısı (Polat ve ark. 2011).

SRB testi için, Kompleks 1 ve Kompleks 2, 1,56-100 µM konsantrasyonlarındaki doz aralıkların da 3 tekrarlı ve 100 µl olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarına

uygulandı. A549, H1299 ve BEAS-2B hücreleri sayılarak 100 µl besiyeri içerisinde 5×10^3 h/kuyu olacak şekilde kuyulara eklendi. Daha sonra hücreler, 24, 48 ve 72 saat 37 ^{0}C, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda, 96-kuyulu pleytin her bir kuyusuna (son hacim 200 µl iken) 50 µl %50'lik TCA (w/v) eklendi ve $+4^0$ C'de 1 saat fikse (sabitlenme) edildi. Sonrasında, 96-kuyulu pleyt 5 kez distile su ile yıkandı ve pleytin kuruması beklendi. Pleyt kuruduktan sonra her bir kuyuya 50 µl SRB (%1 asetik asit v/v içerisinde %0,4 olacak şekilde hazırlandı) boyası eklendi ve yarım saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 96 kuyulu pleyt 5 kez %1 asetik asitle (v/v) ile yıkandı. Hücrelere bağlanan boyayı çözmek amacıyla 96-kuyulu pleytin her bir kuyusuna 100 µl, 10 mM Tris Bazı ilave edildi ve 564 nm'de absorbans okuması yapıldı.

3.5. ATP (adenozin trifosfat) Canlılık Metodu

ATP (Adenozin trifosfat) biyolojik sistemlerde enerji kaynağı olarak işlev yapan bir moleküdür. Metabolik olarak bütün canlı hücrelerde bulunur (Crouch ve ark. 1993). Hücre ölümünün gerçekleşmesinden itibaren, hücre ATP sentez kabiliyetini kaybeder ve endojen ATPazlar var olan ATP'yi hızlı bir biçimde yıkıma uğratırlar. Bundan dolayı intrasellüler ATP içeriği, hücre canlılığının ana göstergesi olarak belirtilmiş ve canlılık belirleme yöntemleri arasında kendisine yer bulmuştur. ATP biyolüminesans metodu, multipleytlerde yapılan canlılık testleri arasında en hassas, hızlı ve güvenilir yöntem olarak bilinmektedir (Lomakina ve ark. 2015, Riss ve ark. 2006). ATP biyolüminesans metodu prensip olarak, ateş böceklerinde görülen biyolüminesans tepkimesinin taklit edilmesine dayanır. Lusiferaz ile lusiferaz enziminin substratı olan lusiferin, bu metotta belirteç olarak kullanılır ve hücrelerde bulunan ATP vasıtasıyla lüminesans oluşumu elde edilir (Fan ve Wood 2007, Riss ve Moravec 2006). Monomerik bir enzim olan lusiferaz 61 kDa ağırlığındadır. Lusiferin ve ATP'yi birbirine bağlayan lusiferaz enzimi, lusiferil-AMP ara ürününün meydana gelmesini sağlar. Mg^{+2} iyonları varlığında lusiferil-AMP ara ürünü, oksijen ile tepkimeye girer ve oksitlenirek eksite enerji seviyesinde ki oksilusiferin bileşiğine dönüşür (Şekil 3.2.). Oksilusiferin ise kararlı enerji düzeyine ulaştığında fazla olan enerjisini foton olarak saçarak sarı ve yeşil renkte ışık meydana getirir. Bu ışık 560 nm dalga boyunda maksimum seviyede absorbans gösterir (Fan ve Wood 2007, Lomakina ve ark. 2015).



Şekil 3.2. ATP ve Mg^{+2} iyonları varlığında lüsiferin substratı ile lüsiferaz enziminin oksilüsiferine katalizlenerek luminesans sinyal (ışık) oluşturması (Anonim 2013).

ATP testi için, Kompleks 1 ve Kompleks 2, 1,56-100 µM konsantrasyonlarında 3 tekrarlı ve 100 µl olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. A549 ve H1299 hücreleri sayılarak 100 µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Hücreler daha sonra, 48 ve 72 saat 37 ^{0}C, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol (maksimum canlılık, tedavi edilmemiş hücre kontrolü) için 200 µl besiyeri içerisine 5×10^3 hücre ekildi. İnkübasyonun ardından her kuyudan 150 µl atılarak kuyulara 50 µl "5X hücre lizis tamponu" eklendi ve hücre içerisindeki ATP'nin hücre dışına çıkması sağlandı. Oda sıcaklığında 20 dakikalık bekleme süresi sonunda, kuyu içerisindeki karışımdan 50 µl alınarak, beyaz renkli 96-kuyulu pleytlere aktarıldı. Aktarılan hacmin üzerine, 50 µl lusiferin-lusiferaz karışımı pipetlendi. Ardından luminometre cihazında biyoluminesans ölçümü yapıldı. Bu şekilde benzofuran sübstitüe kalkon türevleri ile muamele edilen ile edilmeyen hücrelerin değerleri baz alınarak sitotoksik/sitostatik etkileri hakkında bilgi edinildi.

% Canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

(%) Canlılık hesabı = [100 × (Bileşik ile tedavi edilen hücre absorbansı – kör ortalama)/ (Kontrol hücre absorbansı – kör ortalama)] olarak hesaplanmaktadır.

3.6. Hoechst 33342, Propidiyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi

DNA'ya bağlanabilme yeteneğine sahip olan floresan boyalar sayesinde hücrenin kromatini dolayısı ile çekirdeği (nükleusu) görünür hale gelir. DNA'ya bağlanabilen Hoechst 33342, hücre membranından nüfuz edebilen bir boyadır. Canlı veya ölü (apoptotik/ nekrotik) hücrelerin nükeuslarını boyamak amacıyla kullanılır. Hoechst boyama metodu, kimyasal ajanlarla muamele edilmiş hücrelerin ölüm şekilleri hakkında nükleus morfolojisine bakılarak fikir sahibi olunmasına olanak sunmaktadır. Apoptotik hücrelerde; nükleusun normal hücrelere nazaran daha küçük olması beklenirken, nekrotik hücrelerde ise nükleusun normal hücrelere oranla daha büyük olması ayrıca daha az boya alması beklenir. PI yalnızca hasarlı hücre zarlarından geçebilen, geç apoptotik/sekonder nekrotik ya da primer nekrotik olan bütün ölü hücreleri boyayabilme özelliğine sahip bir floresan nükleik asit boyasıdır. Primer nekrozis (hücre hacminin artması ancak fragmente veya piknotik çekirdeklerin gözlenmemesi) toksik koşullar (hipertermi, iskemi, hipoksi gibi) altında meydana gelen klasik bir ölüm şekliyken, sekonder nekrozis ise apoptozisin geç safhasıdır ve piknotik nükleus ile karakterizedir. Apoptozise giden hücrelerin hücre kültürü ortamında membranları sağlam (erken apoptoziste) olmasına karşın daha sonra ki dönemlerde geç apoptozis/sekonder nekrozis gelişmesiyle hücrelerin membran bütünlükleri bozulmaktadır. Sekonder nekroz meydana gelene kadar hücreler PI gibi non-vital boyalar ile boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olsa bile membran intakt olduğu için bu boyalarla boyanamazlar. Yani Hoechst pozitif ve PI negatif boyanmaktadır. Sekonder nekroz meydana geldikten sonra ise hücreler membran bütünlüklerini kaybederler ve non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar, dolayısıyla da PI pozitif ve Hoechst pozitif boyanmaktadırlar (Ulukaya ve ark. 2011).

İkili boyama metodu için; A549 ve H1299 hücre soyları sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarında 100 µl içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı ve 1,56-100 µM benzofuran sübstitüe kalkon türevleri 100 µl içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol (kör) kuyularına 100 µl taze besiyeri eklendi. Hücreler daha sonra 48 ve 72 saat boyunca 37 °C'de %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin uygulanmasını takiben, kuyulardan besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine PBS içerisinde konsantrasyonları 1 mg/ml PI, 5 mg/ml Hoechst 33342 olacak şekilde hazırlanan ikili boyama çözeltisinden 30µl

pipetlenerek, karanlıkta 20 dakika boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Süreç sonunda bileşiklerin hücrelerde neden olduğu ölüm şekli floresan mikroskop altında incelenerek değerlendirilmeler de bulunuldu.

3.7. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi metodu için, A549 ve H1299 akciğer hücre soyları her bir kuyucukta $5x10^5$ hücre olacak şekilde 6 kuyulu pleytlere (2 tekrarlı) ekildi. Ertesi gün %90 doluluk oranına ulaşan kuyularda, bir yatay ve bir dikey olacak şekilde 10 µl mikropipet ucu ile yaralar oluşturuldu. Yara oluşturulurken yüzeyden kalkan hücreler, 1X PBS ile ortamdan uzaklaştırıldı. Kontrol grubuna hücre soylarına uyumlu olarak besiyerleri 1ml eklenirken, A549 hücreleri için Kompleksler 25 ve 50 µM dozlarında pipetlenirken H1299 hücreleri için 12,5 ve 25 µM dozlarında pipetlendi. Hemen ardından, yara oluşturulmuş hücrelerin 0. saat görüntüleri invert mikroskop altında çekilerek, pleytt 37^oC'de %5'lik CO_2'li inkübatöre kaldırıldı. Yara iyileşmesinin takibi 0, 5, 10, 15. ve 20. saatlerde hücre görüntüleri invert mikroskop altında alınarak yapıldı.

3.8. İstatistiksel Analiz

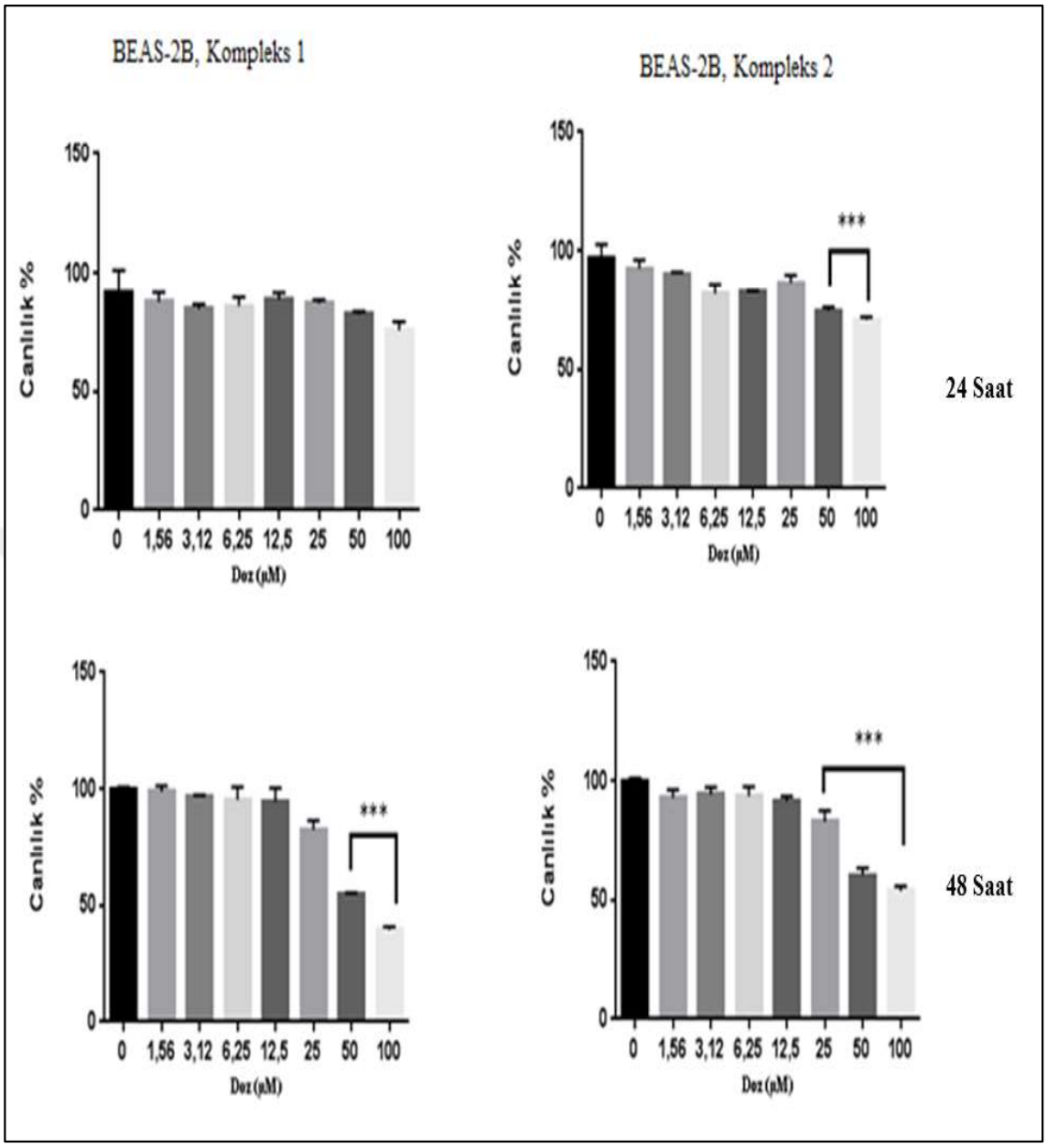
Çalışmamızda istatistiksel analiz sonuçlarının tümü GraphPad Prism 6 bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır. Yüzde (%) canlılık değerleri ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak hesaplanırken, en az 2 tekrarlı yapılan analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapmayla birlikte verilmiştir. İstatistiksel analizde anlamlı veriler $p<0,05$, $p<0,01$ ve $p<0,001$ değerlerine göre belirlenirken, IC_{50} ve IC_{70} değerleri ise Microsoft Excel yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. SRB Canlılık Testi Bulguları

Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin doz ve zamana bağlı olarak sitotoksik aktivitesini insan akciğer kanseri hücre soylarında (A549, H1299) ve sağlıklı insan akciğer hücre soyunda (BEAS-2B) belirleyebilmek amacı ile SRB canlılık testi uygulanmıştır. A549 ve H1299 hücre soylarına 24, 48 ve 72 saat boyunca Kompleks 1 ve Kompleks 2 uygulanırken, BEAS-2B hücre soyuna ise 24 ve 48 saat süresince Kompleks 1 ve Kompleks 2 uygulandı.

BEAS-2B sağlıklı akciğer hücrelerine uygulanan Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin canlılık yüzdeleri Şekil 4.1.'de verilmiştir. Kompleks 1'in 24 saatte hücre canlılığı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenirken, 48 saatte ise sadece 50 ve 100 μM dozlarında (yüksek konsantrasyonlarda) istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalma gözlendi ($p<0,001$, Şekil 4.1.). Kompleks 2 de 24 saatte 50 ve 100 μM dozlarında hücre canlılığında azalmalar gözlenirken, 48 saate ise 25, 50 ve 100 μM dozlarında azalma gözlenmiş ancak bu azalmaların %50'nin altına düşmediği belirlenmiştir ($p<0,001$, Şekil 4.1.).

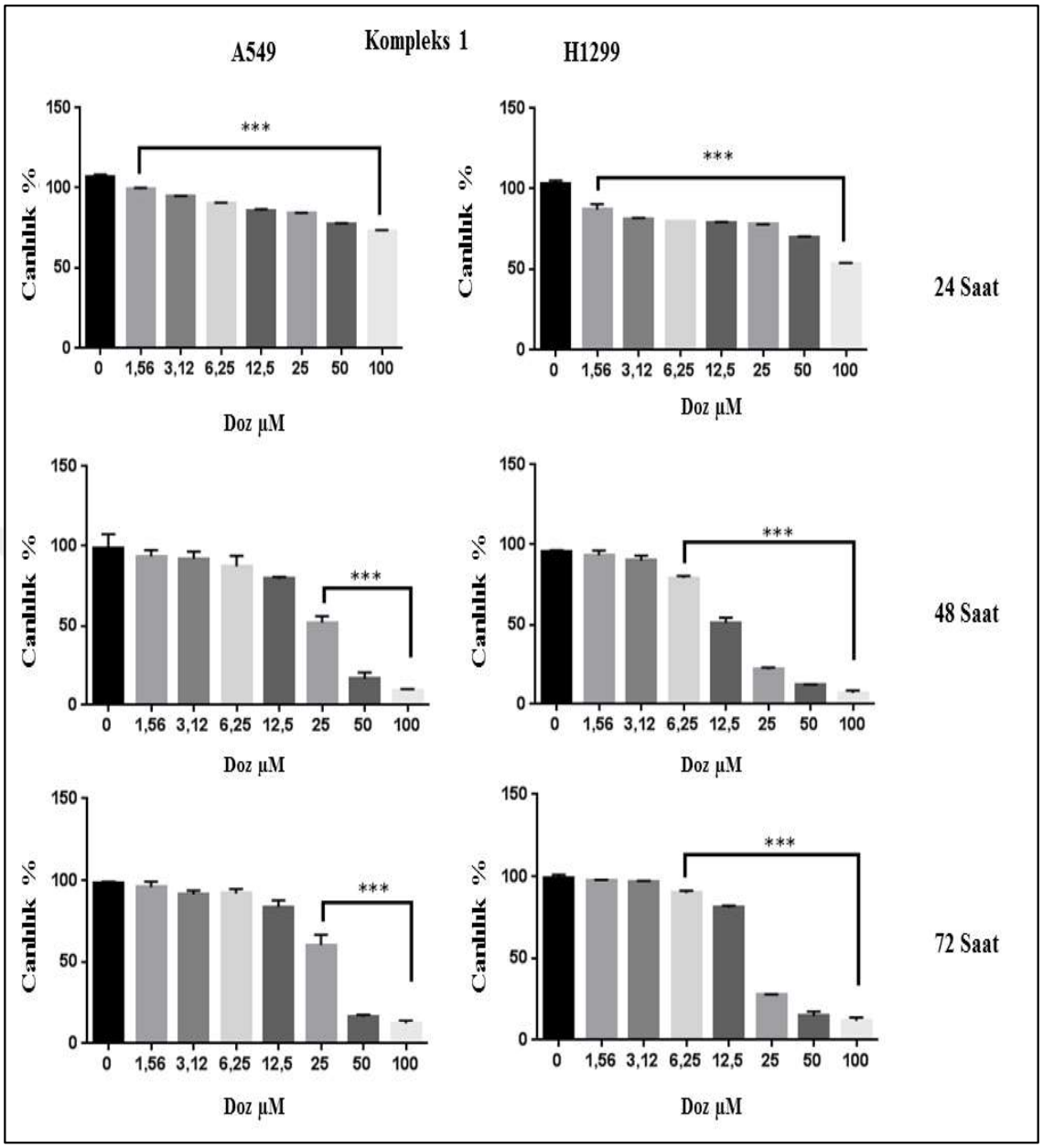


Şekil 4.1. Benzofuran sübstitüe kalkon türevileri (Kompleks 1 ve Kompleks 2) ile muamele edilen BEAS-2B hücresinin 24 ve 48 saat sonrası SRB testine göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını göstermektedir. ***Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,001$) ifade etmektedir.

Kompleks 1'in A549 hücreleri üzerine etkisi değerlendirildiğinde; 24 saatte 1,56 µM ve üzerindeki dozlarda, 48 ve 72. saatlerinde ise 25 µM ve üzerindeki dozlardan itibaren istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır ($p<0,001$, Şekil 4.2.). Kompleks 1'in 24 saatte uygulanan tüm dozlarda hücre canlılığını %20 inhibe ettiği belirlendi. 48 saat sonrasında ise Kompleks 1'in

sitotoksik aktivitesinin arttığı ve 25 μM ve üzeri dozlarda hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü gözlendi. Uygulama süresi uzadığında Kompleks 1'in 72 saat sonrasında çok daha etkili olduğu ve 50 ve 100 μM konsantrasyonlarında hücre canlılığını sırasıyla %85 ve %80 inhibe ettiği gözlendi.

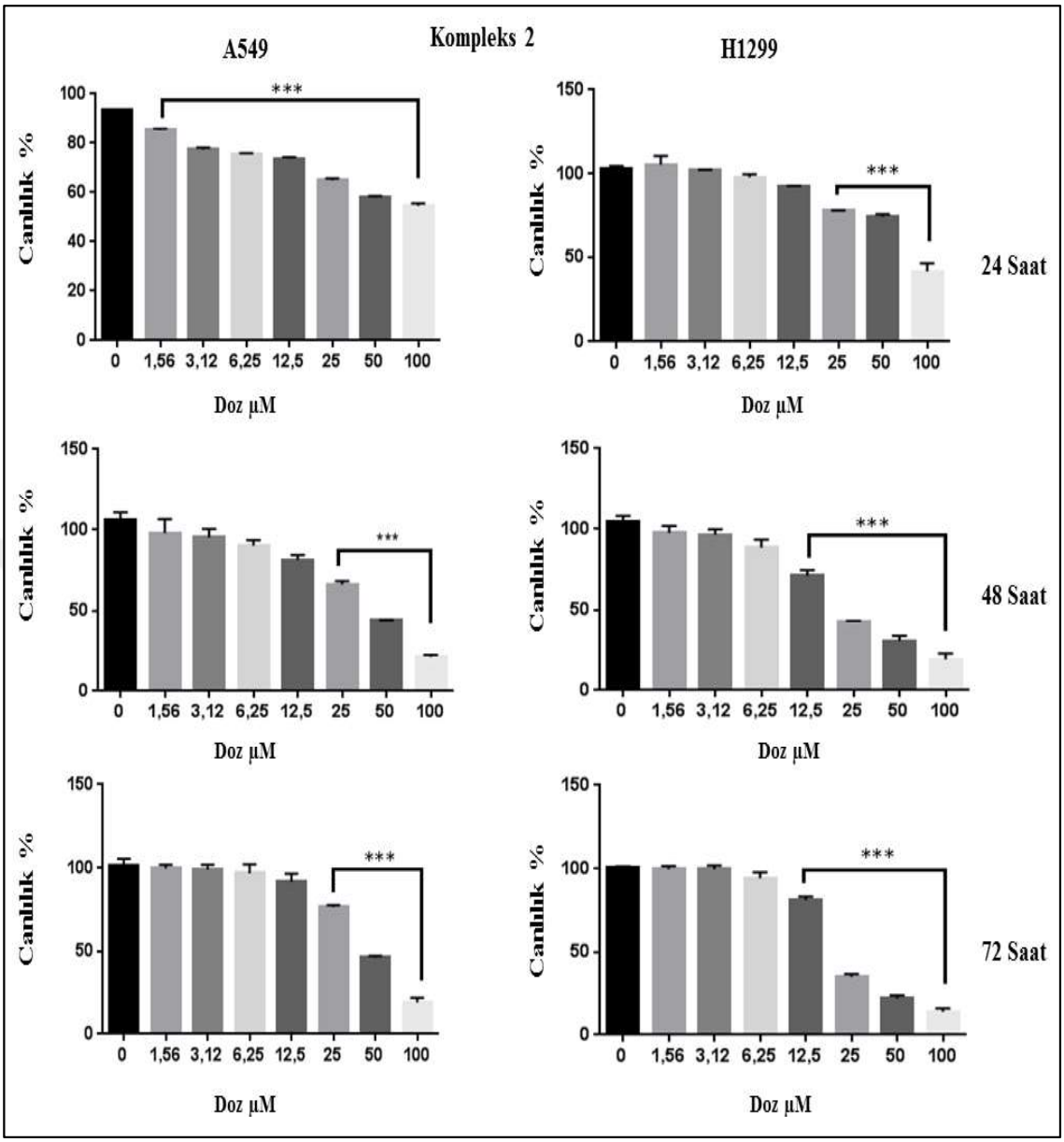
H1299 hücrelerinde Kompleks 1'in 24 saatte 1,56 μM ve üzerindeki dozlarda, 48 ve 72 saatlerinde ise 6,25 μM dozundan itibaren hücre canlılıklarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalmalara sebep olduğu gözlenmiştir ($p<0,001$, Şekil 4.2.). Kompleks 1'in 48 saat sonunda 25 μM dozundan itibaren hücre canlılığını %40'ın altına düşürdüğü 72 saat sonunda ise 25, 50, 100 μM dozlarında sırasıyla hücre canlılığını %70, %75 ve %80 inhibe ettiği gözlendi. Bu sonuçlar Kompleks 1'in A549 ve H1299 akciğer hücrelerinde zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını göstermektedir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Kompleks 1 ile muamele edilen A549 ve H1299 hücre soylarının 24, 48 ve 72 saat sonrası SRB testine göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını göstermektedir. ***Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0.001$) ifade etmektedir.

Kompleks 2'nin, A549 hücre soyu üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde; 24 saatte 1,56 μM ve üzeri dozlarında, 48 ve 72 saatlerinde ise 25 μM ve üzerindeki dozlarda istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı azalmalar saptandı ($p<0,001$, Şekil 4.3.). Kompleks 2'nin 24 saat sonunda 25 μM dozunda hücrelerin %20'sini inhibe ettiği gözlendi. 48 saat sonunda 50 μM dozunda hücre canlılığını %55 azalttığı saptanırken 72 saat sonunda 50 ve 100 μM dozlarında sırasıyla yaklaşık %60 ve %80 kadarını inhibe ettiği gözlendi.

H1299 hücrelerinde ise Kompleks 2' nin 24 saatte 25 μM ve üzerindeki dozlarda, 48 ve 72 saatlerinde ise 12,5 μM doz ve üzerindeki dozlarda istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole oranla anlamlı azalmalar gözlendi ($p<0,001$, Şekil 4.3.).
Alınan bu sonuçlara göre Kompleks 2' nin A549 ve H1299 akciğer hücrelerinde zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığını önemli bir şekilde azaltığı görülmüştür (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Kompleks 2 ile muamele edilen A549 ve H1299 hücre soylarının 24, 48 ve 72 saat sonrası SRB testine göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını göstermektedir. ***Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0.001$) ifade etmektedir.

SRB canlılık test sonuçlarına göre hesaplanan IC_{50} ve IC_{70} (IC_{50}: Hücrelerin %50'sini öldüren doz, IC_{70}: Hücrelerin %70'ini öldüren doz) değerleri sitotoksik verilerin değerlendirilmesinde önemli olan parametrelerdendir. IC_{50} değeri kontrol hücrelerine kıyasla kompleksler ile hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonken, IC_{70} ise kontrol hücrelerine kıyasla kompleksler ile hücrelerin %70'sini öldüren konsantrasyon değerlerini hesaplamak için kullanıldı.

Konsantrasyon ve zamana bağlı olarak Kompleks 1 ve 2'nin, akciğer (A549, H1299 ve BEAS-2B) hücre soylarında ki etkisi hesaplanan IC_{50} ve IC_{70} değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

IC_{50} değerleri incelendiğinde, en düşük IC_{50} değeri Kompleks 1 için H1299 hücrelerinde gözlenmiştir. H1299 için IC_{50} değerleri 24, 48 ve 72 saat için sırası ile 84,04 µM, 21,11 µM ve 14,45 µM olarak gözlenirken aynı zaman sürelerinde A549 için bu değerler 86,52 µM, 27,66 µM ve 17,07 µM olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1.).

Kompleks 2'in IC_{50} değerleri incelendiğinde ise en düşük IC_{50} değeri 24 saat için A549 hücre soyunda 83,44 µM olarak gözlenirken aynı sürede H1299 için bu değer 87,01 µM olarak hesaplanmıştır. Ancak 48 ve 72 saatler de ise H199 hücreleri üzerinde daha etlikili olduğu gözlenmiştir. 48 ve 72 saat için IC_{50} değerleri H1299 hücreleri için 21,87 ve 15,26 µM olarak saptanırken, aynı sürelerde A549 hücreleri için bu değerler 43,23 ve 23,44 µM olarak hesaplandı (Çizelge 4.1.). IC_{70} değerleri incelendiğinde, Kompleks 1 için (A549) 24, 48 ve 72 saat için sırası ile 40,20 µM, 17,05 µM ve 10,83 µM olarak gözlenirken aynı zaman sürelerinde H1299 için bu değerler 49,5 µM, 12,81 µM ve 10,09 µM olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1.). Kompleks 2 için IC_{70} değerleri incelendiğinde ise A549 hücre soyunda 48 ve 72 saat için 21,88 ve 11,23 µM olarak gözlenirken, aynı sürede H1299 için bu değer 12,99 ve 5,67 µM olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1.).

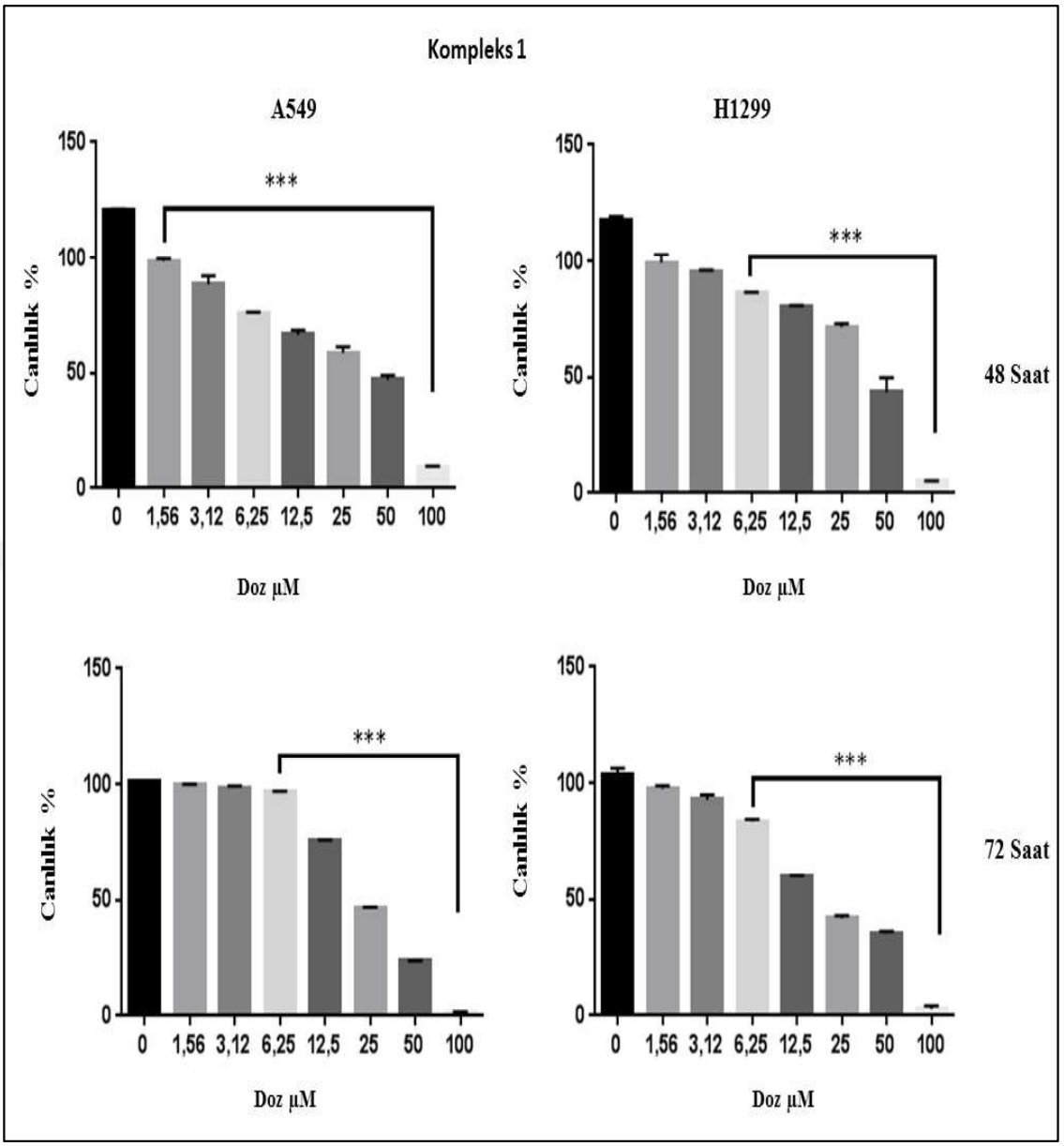
Çizelge 4.1. BEAS-2B, A549 ve H1299 hücre soylarının SRB canlılık testine göre hesaplanan IC_{50} ve IC_{70} değerleri.

A	Kompleks 1			B	Kompleks 2			
Doz (µM)	A549	H1299	BEAS-2B	Doz (µM)	A549	H1299	BEAS-2B	
IC_{50}	86,529 µM	84,046 µM	>100 µM	IC_{50}	83,446 µM	87,019 µM	>100 µM	24 Saat
	A549	H1299	BEAS-2B		A549	H1299	BEAS-2B	
IC_{50}	27,665 µM	21,112 µM	64,93 µM	IC_{50}	43,235 µM	21,875 µM	64,93 µM	48 Saat
	A549	H1299	BEAS-2B		A549	H1299	BEAS-2B	
IC_{50}	17,077 µM	14,453 µM	-	IC_{50}	23,445 µM	15,267 µM	-	72 Saat
	A549	H1299	BEAS-2B		A549	H1299	BEAS-2B	
IC_{70}	40,207 µM	49,5 µM	>100 µM	IC_{70}	17,672 µM	56,492 µM	>100 µM	24 Saat
	A549	H1299	BEAS-2B		A549	H1299	BEAS-2B	
IC_{70}	17,055 µM	12,810 µM	36,17 µM	IC_{70}	21,884 µM	12,998 µM	39,18 µM	48 Saat
	A549	H1299	BEAS-2B		A549	H1299	BEAS-2B	
IC_{70}	10,833 µM	10,091 µM	-	IC_{70}	11,230 µM	5,670 µM	-	72 Saat

4.2. ATP Canlılık Testi Bulguları

Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin doz ve zamana bağlı olarak A549 ve H1299 hücre soyları üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için SRB'den farklı olarak daha hassas olan ATP canlılık testi de uygulandı. A549 ve H1299 hücre soylarına 48 ve 72 saat ile Kompleks 1 ve Kompleks 2 uygulandığında alınan sonuçlar Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.' te verildi.

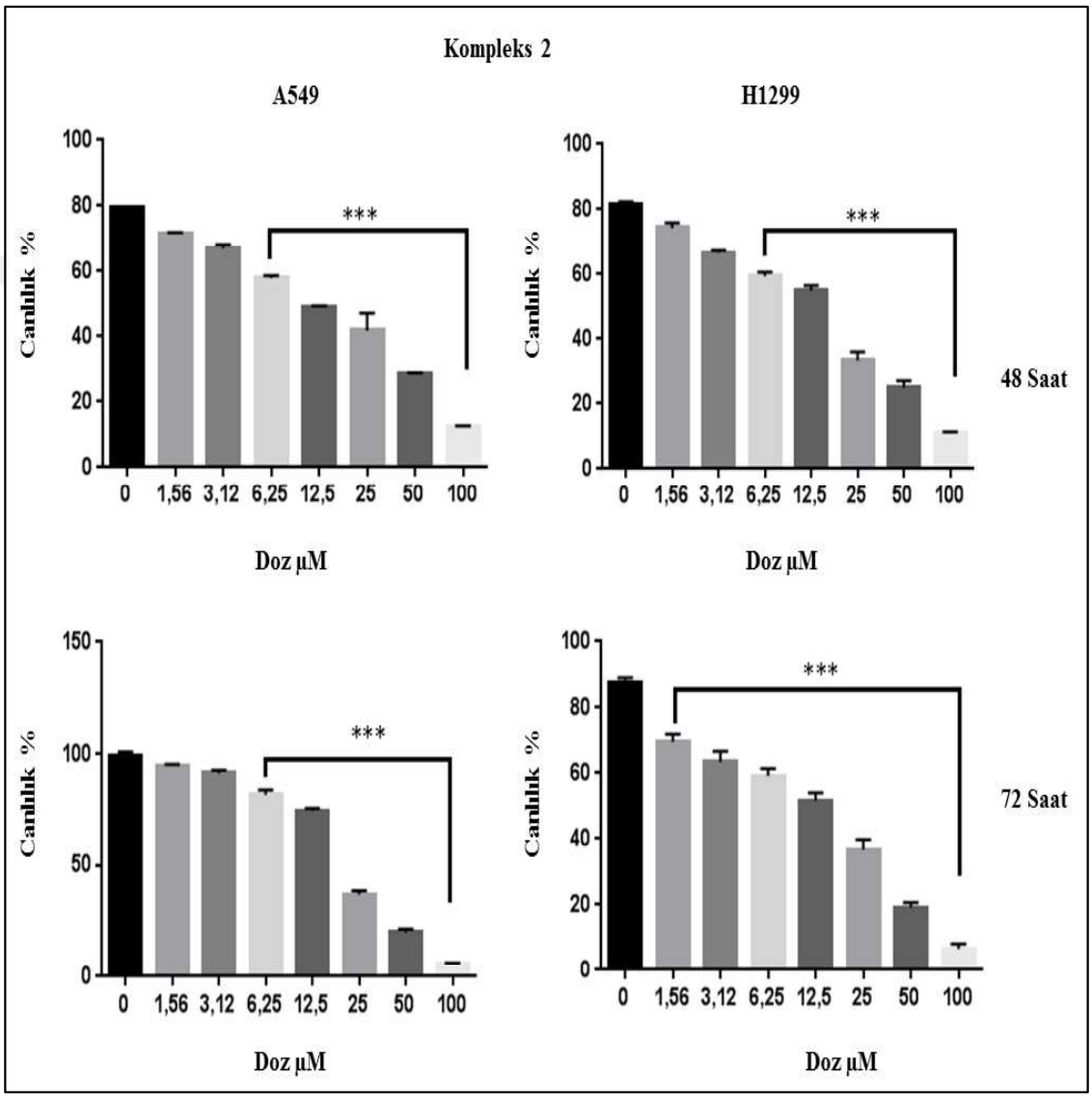
Kompleks 1'in A549 akciğer kanseri üzerine olan etkisi değerlendirildiğinde, 48 saatte 1,56 μM ve daha üst dozlarında; 72 saatte ise 6,25 μM ve üzerindeki dozlarında istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalma gözlendi ($p<0,001$, Şekil 4.4.). Kompleks 1, 48 saat sonunda 50 ve 100 μM dozlarında hücrelerin %50, %80; 72 saat sonunda ise %70, %85'ini inhibe ettiği gözlendi. H1299 hücrelerinde ise 48 ve 72 saatlerinde 6,25 μM ve üzerinde ki dozlarda hücre canlılığını kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi ($p<0,001$, Şekil 4.4.). Kompleks 1, 48 saat sonunda 50 ve 100 μM dozlarında hücrelerin %50, %75; 72 saat sonunda aynı dozlarda ise sırasıyla %70, %90'ını inhibe ettiği gözlendi.



Şekil 4.4. Kompleks 1 ile 48 ve 72 saaat süreyle muamele edilen A549 ve H1299 hücre soylarının ATP canlılık testi sonucuna göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir. ***Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,001$) ifade etmektedir.

Kompleks 2'nin A549 akciğer kanseri üzerinde ki etkisi değerlendirildiğinde, 48 ve 72 saatlik uygulamalar sonrasında 6,25 µM ve üzerindeki dozlarda istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole oranla anlamlı bir azalma olduğu gözlendi ($p<0,001$, Şekil 4.5.). Kompleks 2, 48 saat sonunda 50 ve 100 µM dozlarında hücrelerin yaklaşık olarak %70, %25; 72 saat sonunda ise %80, %90 inhibe ettiği gözlendi.

H1299 hücrelerinde ise, Kompleks 2'nin hücre canlılığını 48 saatte 6,25 µM dozlarında; 72 saatte ise 1,56 µM ve üzerindeki dozlarda istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı bir oranda hücre canlılığının inhibe olduğu saptandı ($p<0,001$, Şekil 4.5.). Kompleks 2, 48 saat sonunda 50 ve 100 µM dozlarında hücrelerin yaklaşık olarak %70, %80, 72 saat sonunda ise %80, %90'ını inhibe ettiği gözlendi.



Şekil 4.5. Kompleks 2 ile 48 ve 72 saaat süreyle muamele edilen A549 ve H1299 hücre soylarının ATP canlılık testi sonucuna göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız deneyin ortalamasını temsil etmektedir. ***Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p<0,001$) ifade etmektedir.

ATP canlılık testi sonuçlarına dayanarak sitotoksik verilerin değerlendirilmesinde IC_{50} ve IC_{70} değerleri hesaplandı ve Çizelge 4.2.'de doza ve zamana bağlı olarak Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin akciğer kanseri (A549 ve H1299) hücre soyları üzerindeki değerleri gösterilmiştir.

IC_{50} değerleri incelendiğinde, en düşük IC_{50} değeri Kompleks 1 için 48 saatte 19,33 µM ve 72 saatte ise 11,59 µM olarak H1299 hücre soyunda gözlenirken, A549 hücre soyunda ise 48 ve 72 saat sonunda bu değerler sırasıyla 19,65 µM ve 13,21 µM olarak hesaplandı (Çizelge 4.2.).

Kompleks 2 için IC_{50} değerleri hesaplandığında, 48 saatte en düşük IC_{50} değeri H1299 hücre soyunda 17,60 µM iken 72 saatte ise bu değer 12,36 µM olduğu hesaplanmıştır. A549 hücre soyu için ise 48 ve 72 saat IC_{50} değerleri sırası ile 18,08 µM ve 14,19 µM olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2.). Kompleks 1 ve Kompleks 2 ajanlarının H1299 hücre soyu üzerinde SRB'de olduğu gibi A549 hücre soyuna oranla daha etkili olduğu belirlendi.

Çizelge 4.2. A549 ve H1299 hücre soylarının ATP canlılık metoduna göre hesaplanan IC_{50} ve IC_{70} değerleri.

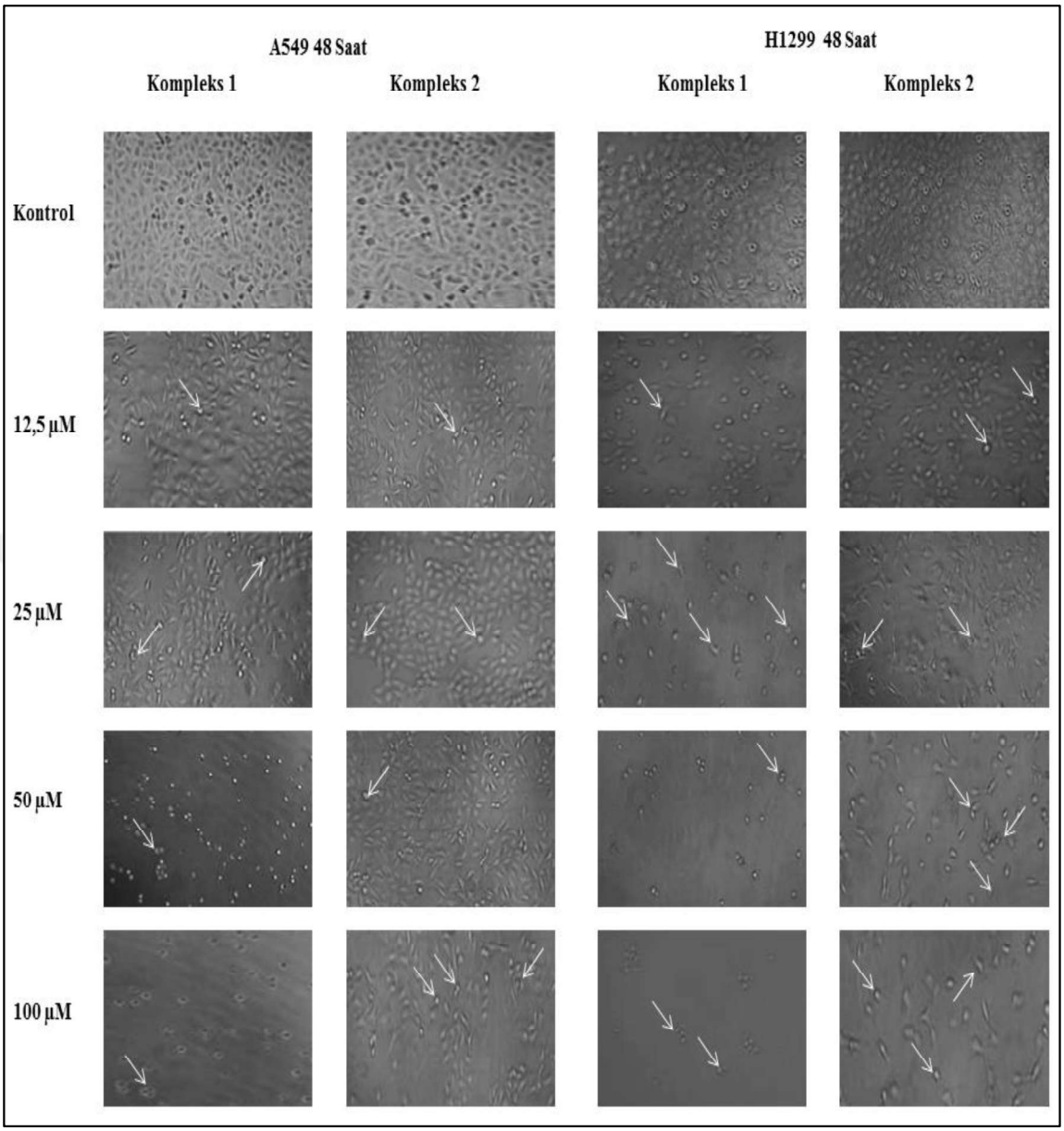
A	Kompleks 1		B	Kompleks 2		
Doz (µM)	A549	H1299	Doz (µM)	A549	H1299	
IC_{50}	19,656 µM	19,335 µM	IC_{50}	18,086 µM	17,605 µM	48 Saat
	A549	H1299		A549	H1299	
IC_{50}	13,217 µM	11,599 µM	IC_{50}	14,197 µM	12,362 µM	72 Saat
	A549	H1299		A549	H1299	
IC_{70}	5,626 µM	10,698 µM	IC_{70}	4,544 µM	2,340 µM	48 Saat
	A549	H1299		A549	H1299	
IC_{70}	6,994 µM	4,648 µM	IC_{70}	11,709 µM	3,554 µM	72 Saat

Benzofuran sübstitüe kalkon türevleri olan Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin doz ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkisi insan akciğer kanseri A549 ve H1299 hücre soylarında SRB ve ATP canlılık testleri ile belirlenmiş ve alınan sonuçlar birbiri ile örtüşmüştür. Ayrıca alınan sonuçlarda ATP verileri ile hesaplanan IC_{50} değerlerinin SRB'den daha düşük olduğu görülmektedir.

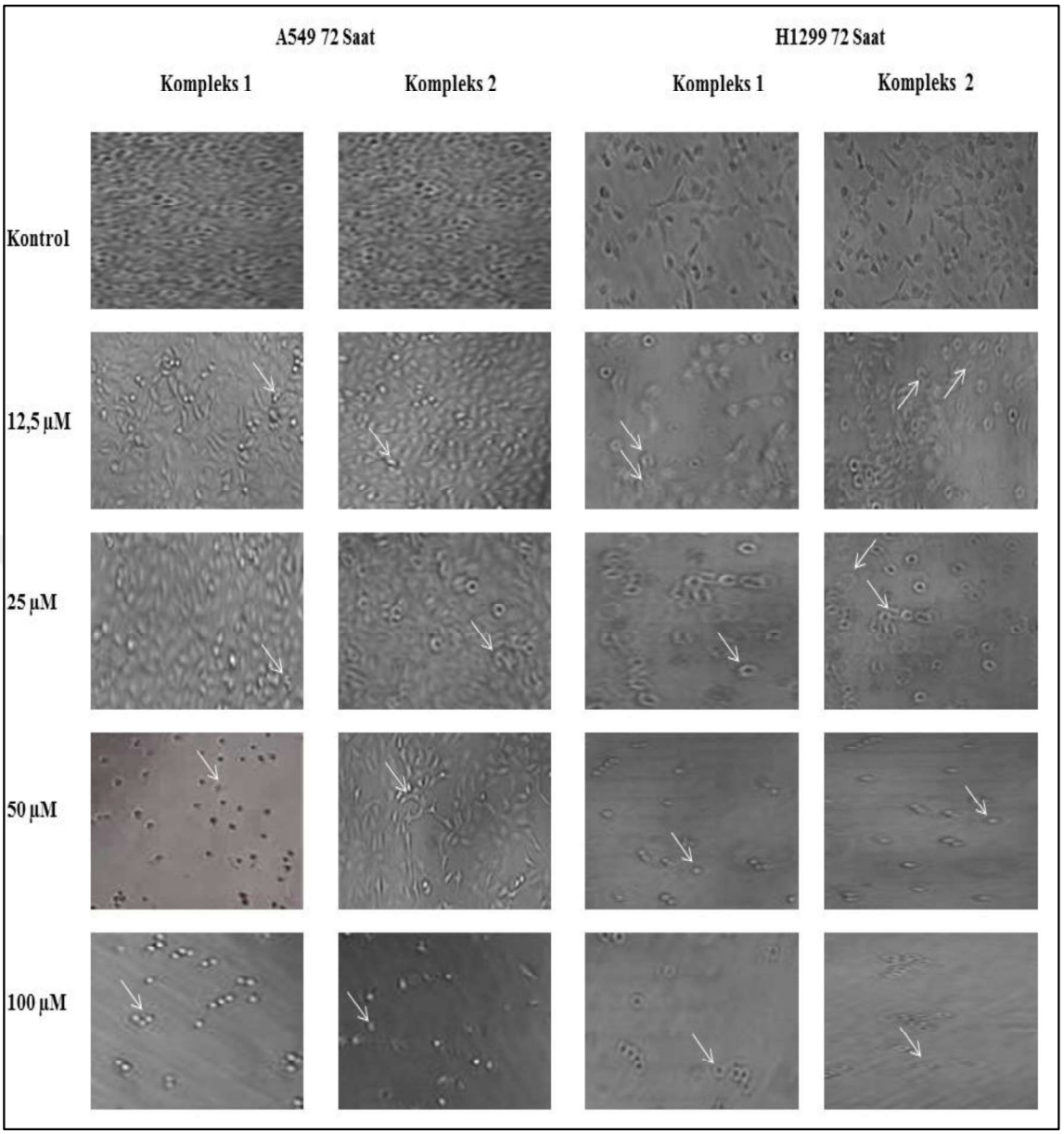
3.3. Faz/Kontrast Mikroskop ile Morfolojik Görüntü Bulguları

Benzofuran sübstitüe kalkon türevleri olan Kompleks 1 ve Kompleks 2 bileşiklerinin, doz (1,56-100 μM) ve zamana (48 ve 72 saat) bağlı olarak A549 ve H1299 hücreleri üzerinde yaptığı morfolojik değişiklikler faz/kontrast mikroskop görüntüleri çekilerek değerlendirildi. 48 saatlik (Şekil 4.6.) ve 72 saatlik veriler (Şekil 4.7.) ile elde edilen faz/kontrast mikroskop görüntüleri hücrelerin kullanılan komplekslerin dozuna bağlı olarak flask zemininden ayrıldığını göstermektedir. Bu durum ise hücrelerin öldüğüne işaret etmektedir.

Kalkon türevleri olan Kompleks 1 ve Kompleks 2'ye maruz kalan A549 ve H1299 hücrelerinde 12,5-100 μM konsantrasyonlarında, küçülme, tomurcuklanmalar (hücresel blebler), hücre yuvarlaklaşması ve apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi morfolojik değişimler ile birlikte hücrelerin yüzer hale gelmesi hücrelerin ölü olduğunu göstermektedir. Konsantrasyon arttıkça hücrelerin birbirinden ayrıldığı, morfolojilerinin küçüldüğü ve hücre sayılarının azaldığı gözlendi. Faz/kontrast mikroskop görüntüleri Kompleks 1 ve Kompleks 2 benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin, A549 ve H1299 hücre soyları üzerinde sitotoksik etki yaptığı morfolojik olarak da gözlemlendi (Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.).



Şekil 4.6. A549 ve H1299 hücrelerinde Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 48 saatlik muamele sonrasında ki faz/kontrast mikroskop görüntüleri. Oklar piknotik hücreleri göstermektedir.



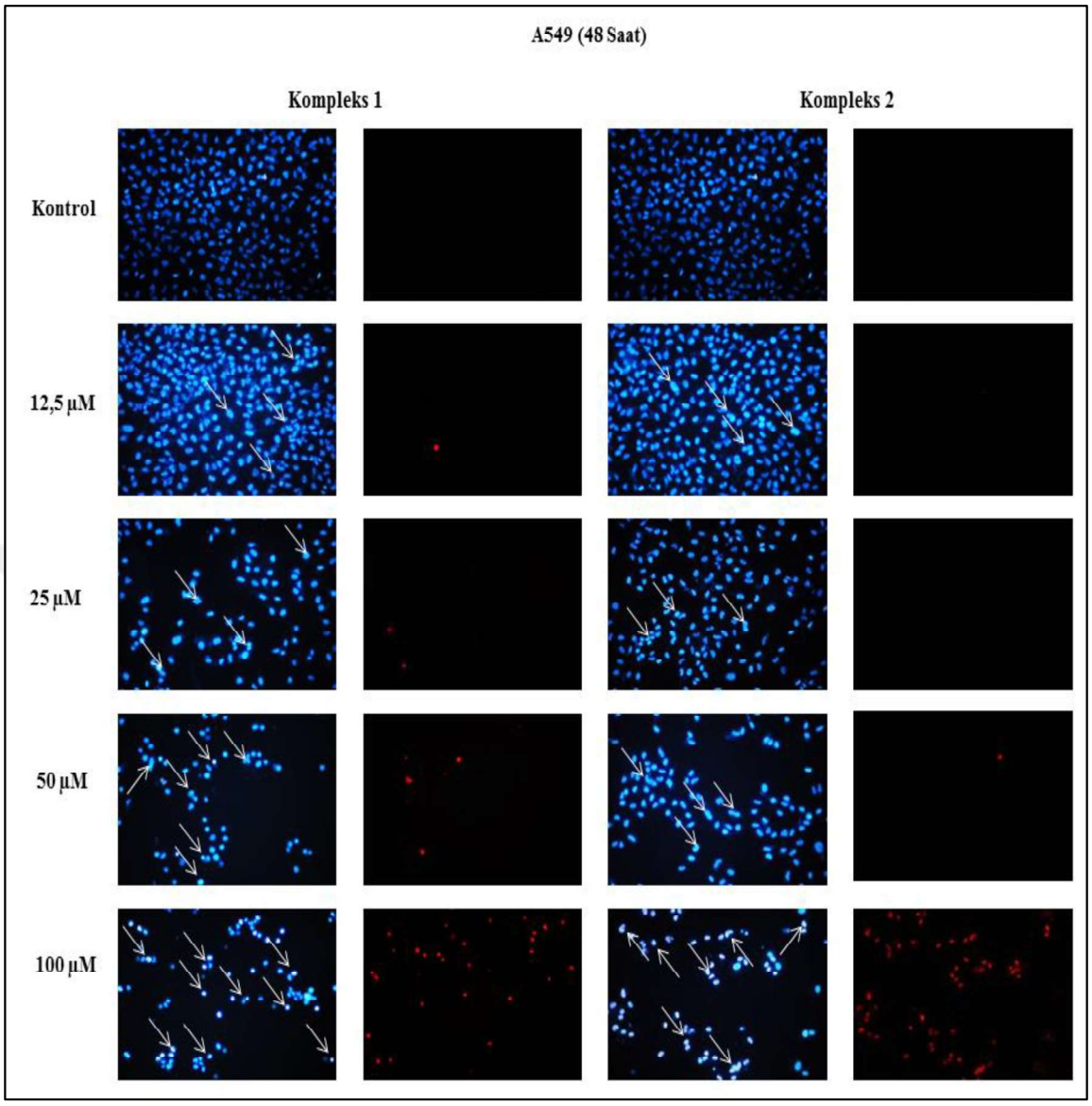
Şekil 4.7. A549 ve H1299 hücrelerinde Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 72 saatlik muamele sonrasında ki faz/kontrast mikroskop görüntüleri. Oklar piknotik hücreleri göstermektedir.

4.4. Hoechst 33342, Propidium İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi Bulguları

Sitotoksisite sonuçlarımızda Kompleks 1 ve Kompleks 2 bileşiklerinin hücreler üzerinde etkili olduğu belirlendikten sonra bu etkiden sorumlu olan mekanizmanın aydınlatılması amacıyla floresan boyama yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde kullanılan Hoechst 33342 boyası, dsDNA'ya bağlandığında mavi floresan görüntüsü meydana getiren bir nükleik asit boyasıdır. PI ise yalnızca membran hasarlı hücrelere girebilen ve

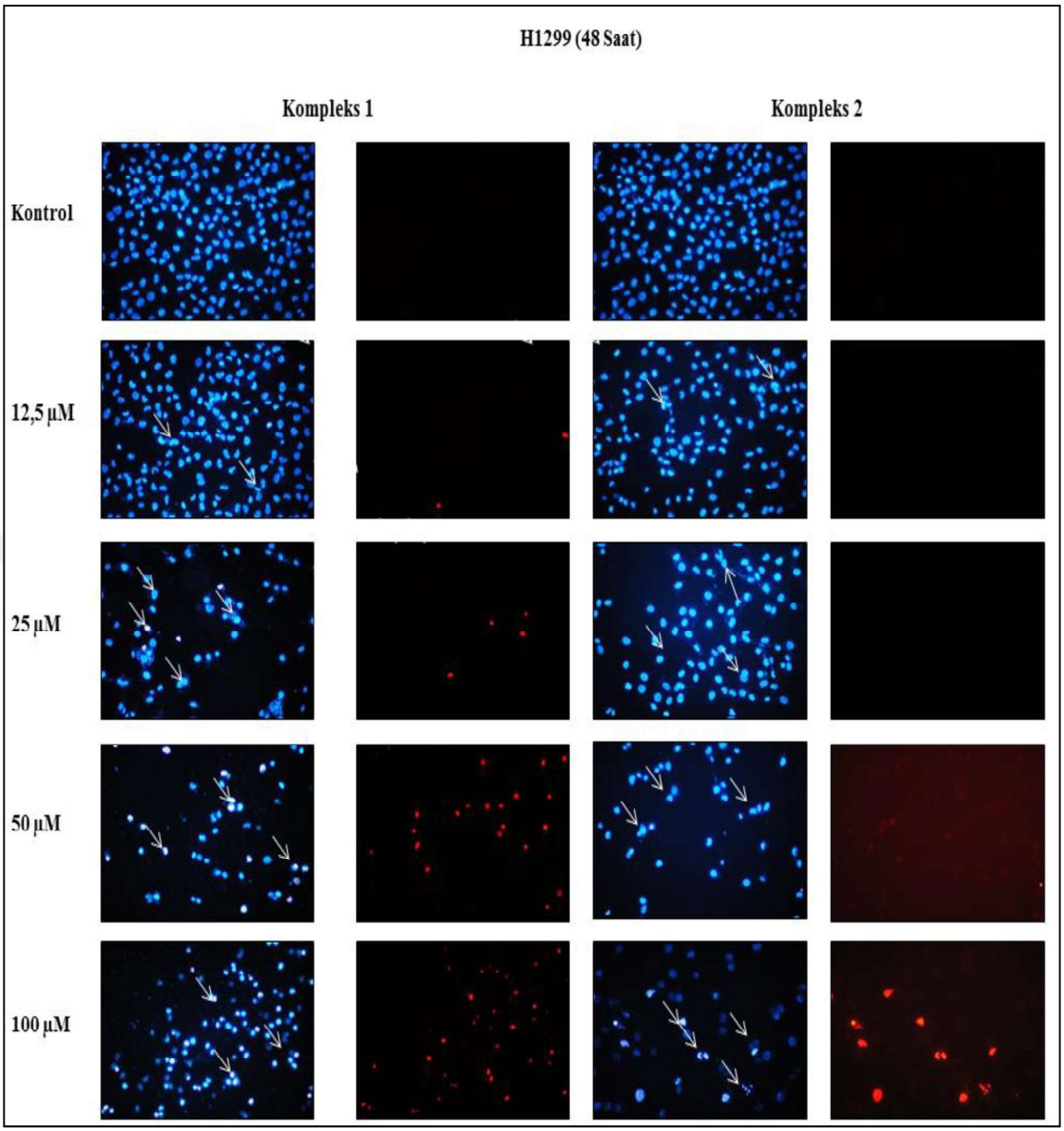
bu sayede tüm ölü hücreleri (geç apoptotik/sekonder nekrotik ya da primer nekrotik) boyayabilen kırmızı floresan görüntüsü oluşturan bir nükleik asit boyasıdır. Nükleus morfolojisi; apoptotik hücrelerde normal hücrelere oranla daha küçük olması aranırken, nekrotik hücrelerde ise nükleusun daha az boya alması ve daha büyük olması beklendi. Bu amaçla A549 ve H199 hücre soylarına Kompleks 1 ve Kompleks 2 bileşikleri 1,56-100 μM konsantrasyonları aralığında 48 ve 72 saat boyunca uygulandı. Uygulama süresi sonunda hücreler ikili boyama yöntemi uygulanarak floresan mikroskop görüntüleri üzerinden değerlendirmeler yapıldı.

Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin 48 saat uygulaması sonrasında A549 hücre soylarında 6,25-100 μM dozlarına bağlı olarak hücre yoğunluğunun kontrole oranla azaldığı gözlendi (Şekil 4.8.). Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin Hoechst 33342 (mavi) boyama sonuçları değerlendirildiğinde doz artışına paralel bir şekilde hücrelerde genellikle piknozis ve ayrıca bazı hücrelerde nükleer fragmentasyon gözlendi. PI (kırmızı) boyaması sonucunda her iki kompleks için de 100 μM dozunda yüksek bir oranda pozitif görüntü gözlendi. Hücre canlılığında görülen azalma, nükleotik fragmantasyonlar ve kromatin kondansasyonu ile birlikte PI pozitif görünmesi sonucunda sekonder apoptoz oluştuğu bulunmuştur.



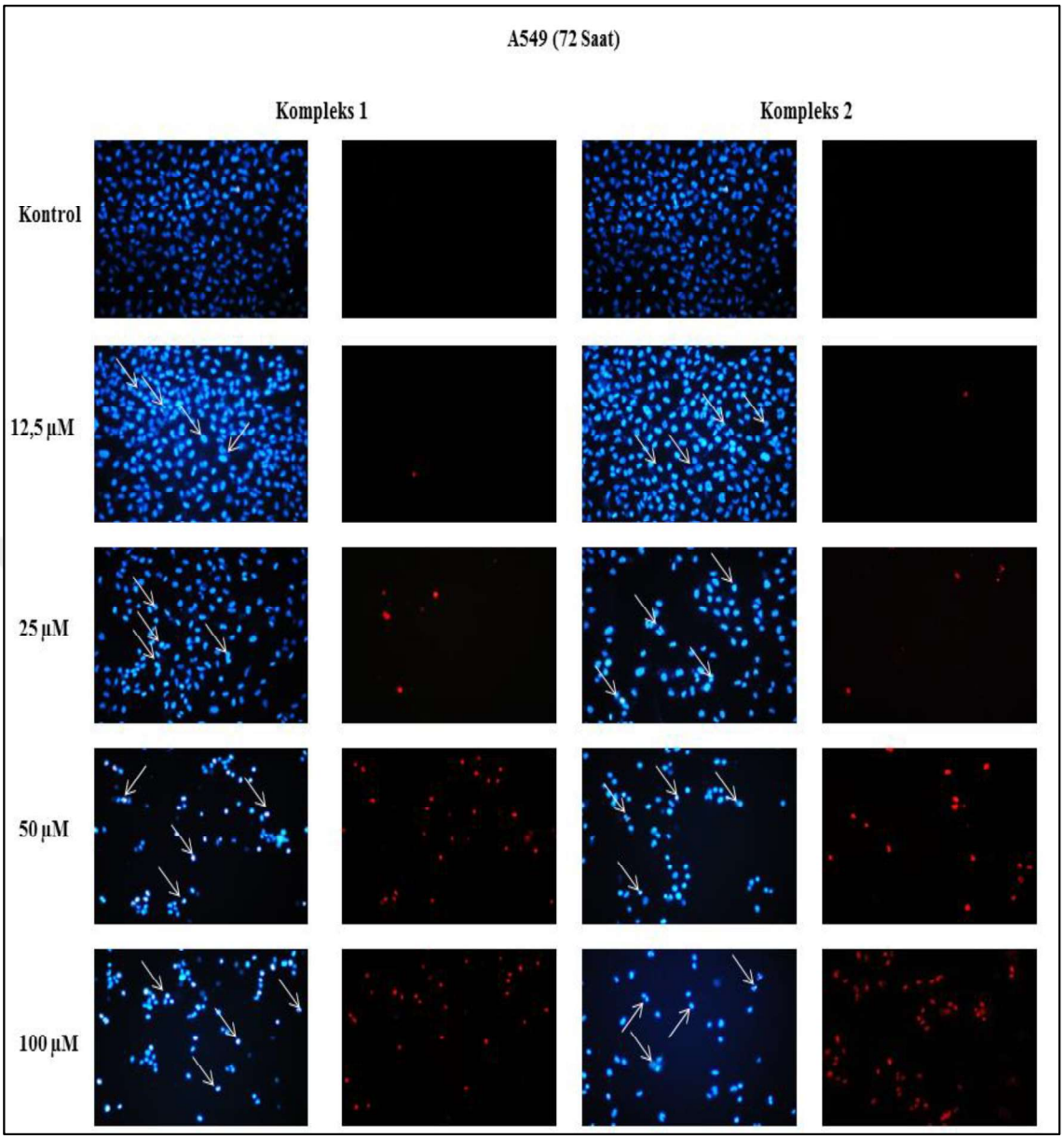
Şekil 4.8. A549 hücresinin Kompleks 1 ve Kompleks 2 bileşikleri ile 48 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. Oklar piknotik hücreleri göstermektedir.

H1299 hücre soylarında, Kompleks 1 ve Kompleks 2' nin 48 saat Hoechst 33342 (mavi) floresan boyama sonuçlarına göre hücre canlılığında doza bağlı bir şekilde kontrole kıyasla azalmaların meydana geldiği gözlendi (Şekil 4.9.). Her iki komplekste de Hoechst 33342 boyaması sonucunda hücrelerde 12,5- 100 µM dozlarında hücrelerin küçüldüğü saptanırken 50 ve 100 µM dozlarında piknotik nükleusların varlığı gözlenmiştir. Hücrelerde Kompleks 1 için 12,5 µM dozundan itibaren PI pozitifliği gözlense de, hücrelerde 50 ve 100 µM dozlarında her iki kompleks içinde daha yoğun bir PI pozitifliği gözlendi (Şekil 4.9.).



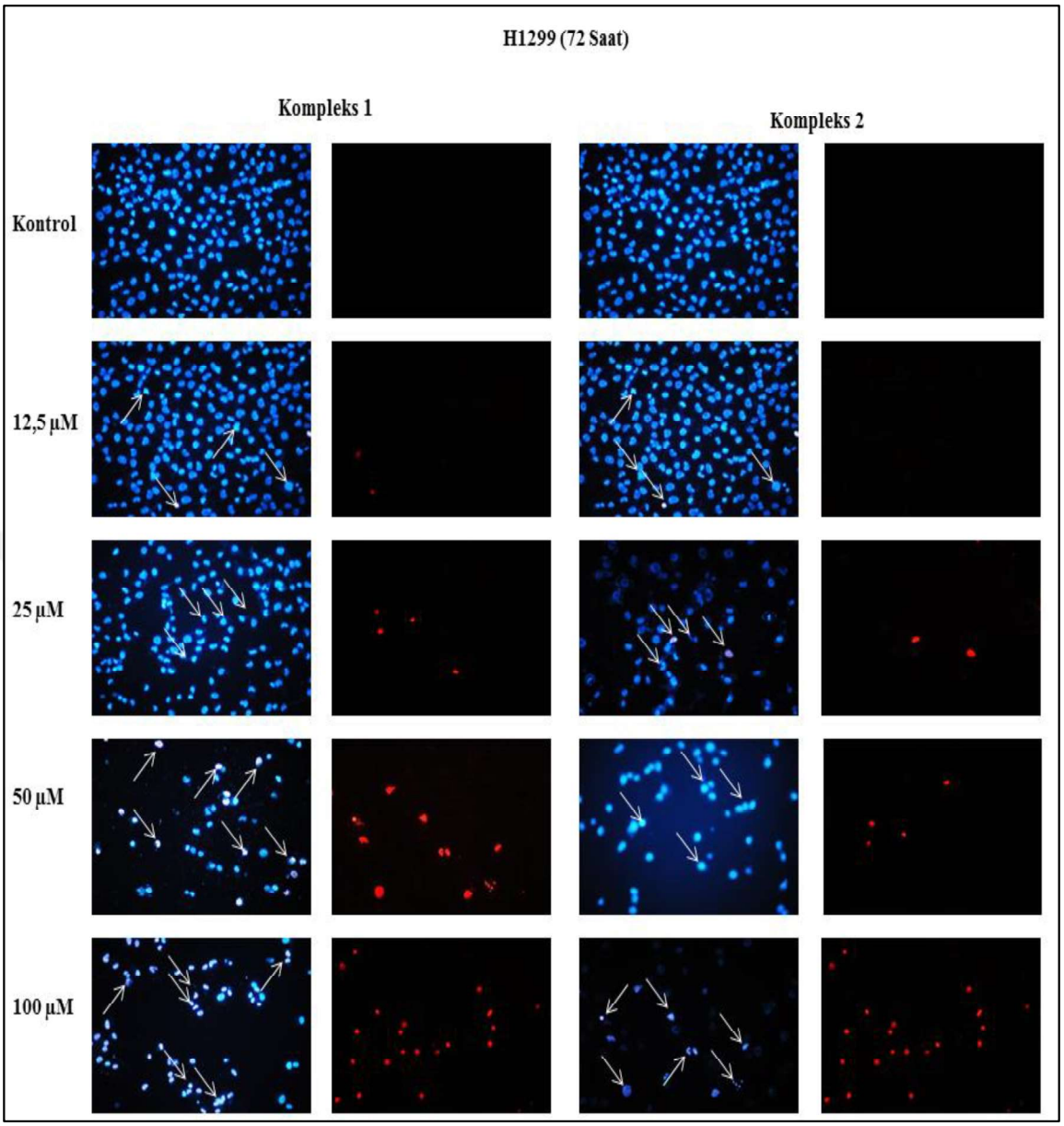
Şekil 4.9. H1299 hücresinin Kompleks 1 ve Kompleks 2 bileşikleri ile 48 saatlik muamelesi sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. Oklar piknotik hücreleri göstermektedir.

A549 hücre soyu Kompleks 1 ve Kompleks 2 kalkon türevleri ile 72 saat uygulaması sonrasında yapılan floresan boyama sonuçları değerlendirildiğinde; hücre yoğunluğunun doza bağlı bir şekilde kontrole göre azaldığı gözlendi (Şekil 4.10.). PI ve Hoechst 33342 floresan boyama sonuçları hücre canlılık test sonuçlarımızı doğruladı. Hoechst 33342 boyamasında, hücrelerde Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin 25-100 µM doz aralıklarında hücrelerde küçülmeler meydana gelirken, her iki komplekste de 25 µM dozundan itibaren PI pozitifliği mevcuttur (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. A549 hücresinin Kompleks 1 ve Kompleks 2 bileşikleri ile 72 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. Oklar piknotik hücreleri göstermektedir.

H1299 akciğer hücre soyunda Kompleks 1 ve Kompleks 2 kalkon türevlerinin 72 saat uygulaması sonrasında yapılan floresan boyaması sonucunda doza bağlı olarak kontrole göre hücre yoğunluklarında doza paralel olarak azalmalar gözlendi. Kompleks 1'in 50 µM dozunda PI pozitifliği daha yoğun olsa da her iki Komplekste de 25 µM dozundan itibaren PI pozitifliği gözlenmiştir (Şekil 4.11.).



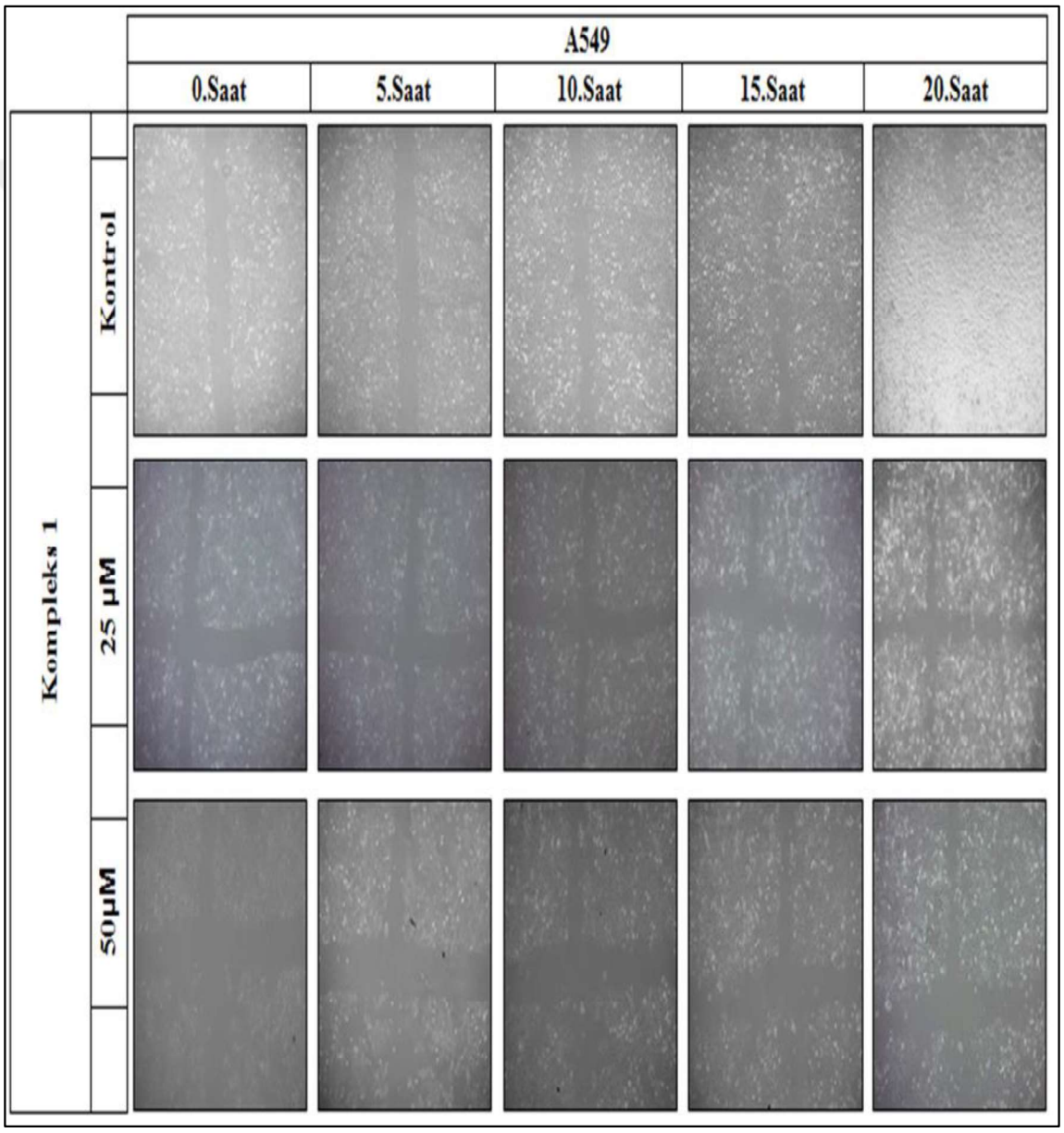
Şekil 4.11. H1299 hücresinin Kompleks 1 ve Kompleks 2 bileşikleri ile 72 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri. Oklar piknotik hücreleri göstermektedir.

4.5. Yara İyileşmesi (Migrasyon Yeteneği) Bulguları

A549 ve H1299 akciğer hücre soyları üzerinde Kompleks 1 ve Kompleks 2 kalkon türevlerinin göç etme yeteneği ve hızı üzerindeki etkisi için migrasyon analizi yapıldı. Yara iyileşmesi testinde A549 hücre soylarında benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin 25-50 µM dozlarında uygulanması sonrasında hücre görüntüleri alındı.

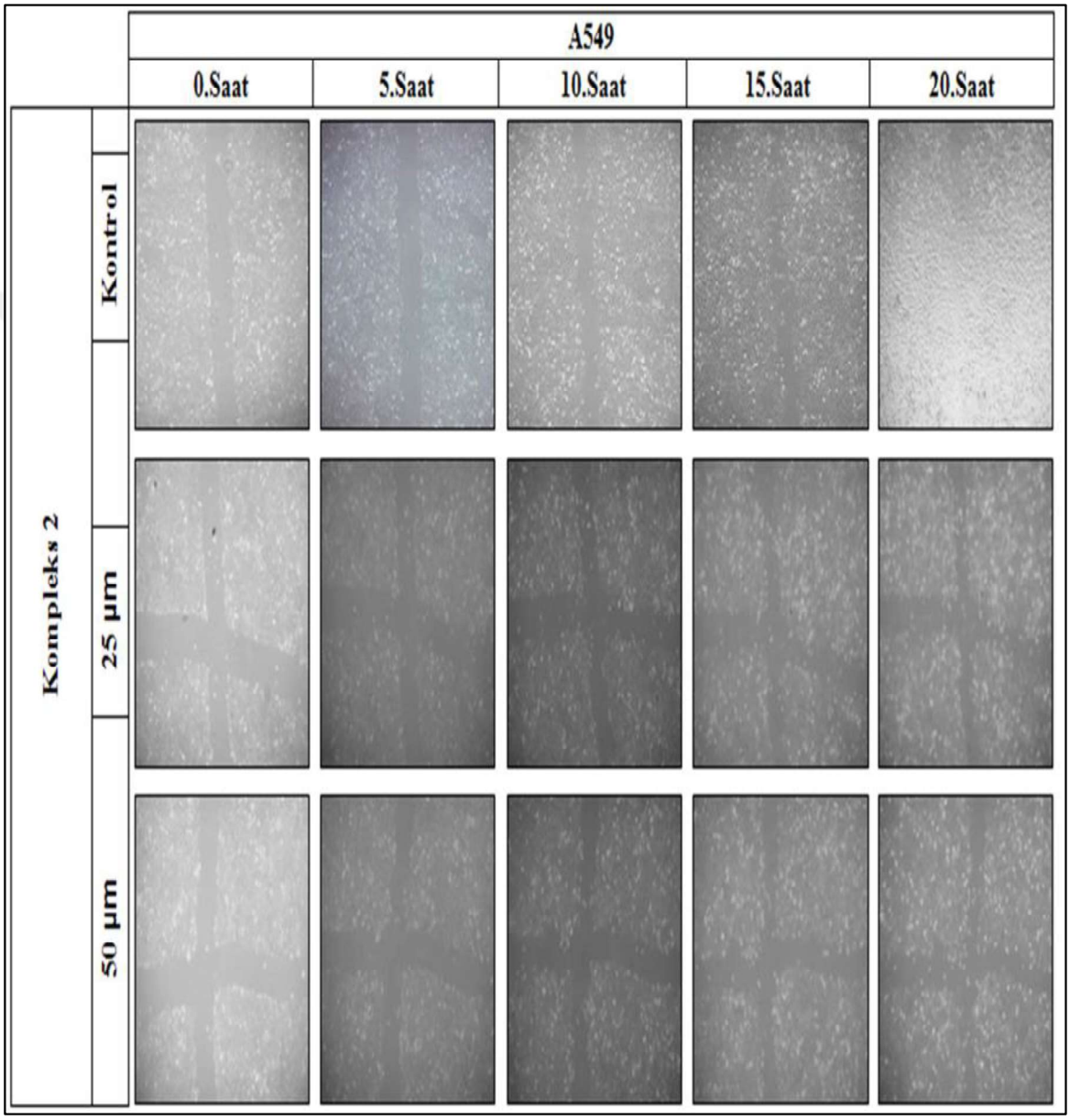
A549 hücre soyu Kompleks 1'in uygulandığı ilk an olan 0. saatten itibaren belirli periyotlarda devamlı gözlenerek tedavi uygulanmamış olan kontrol grubunda yara iyileşmesi tamamen gerçekleşinceye kadar fotoğraflama işlemi devam etti.

İncelenen hücre görüntülerinde, kontrol grubunda 10. saat itbariyle yaranın kapanmaya başladığı görüldü. Ancak 25 ve 50 µM dozlarında ise Kompleks 1'in uygulandığı hücrelerde herhangi bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.12.).



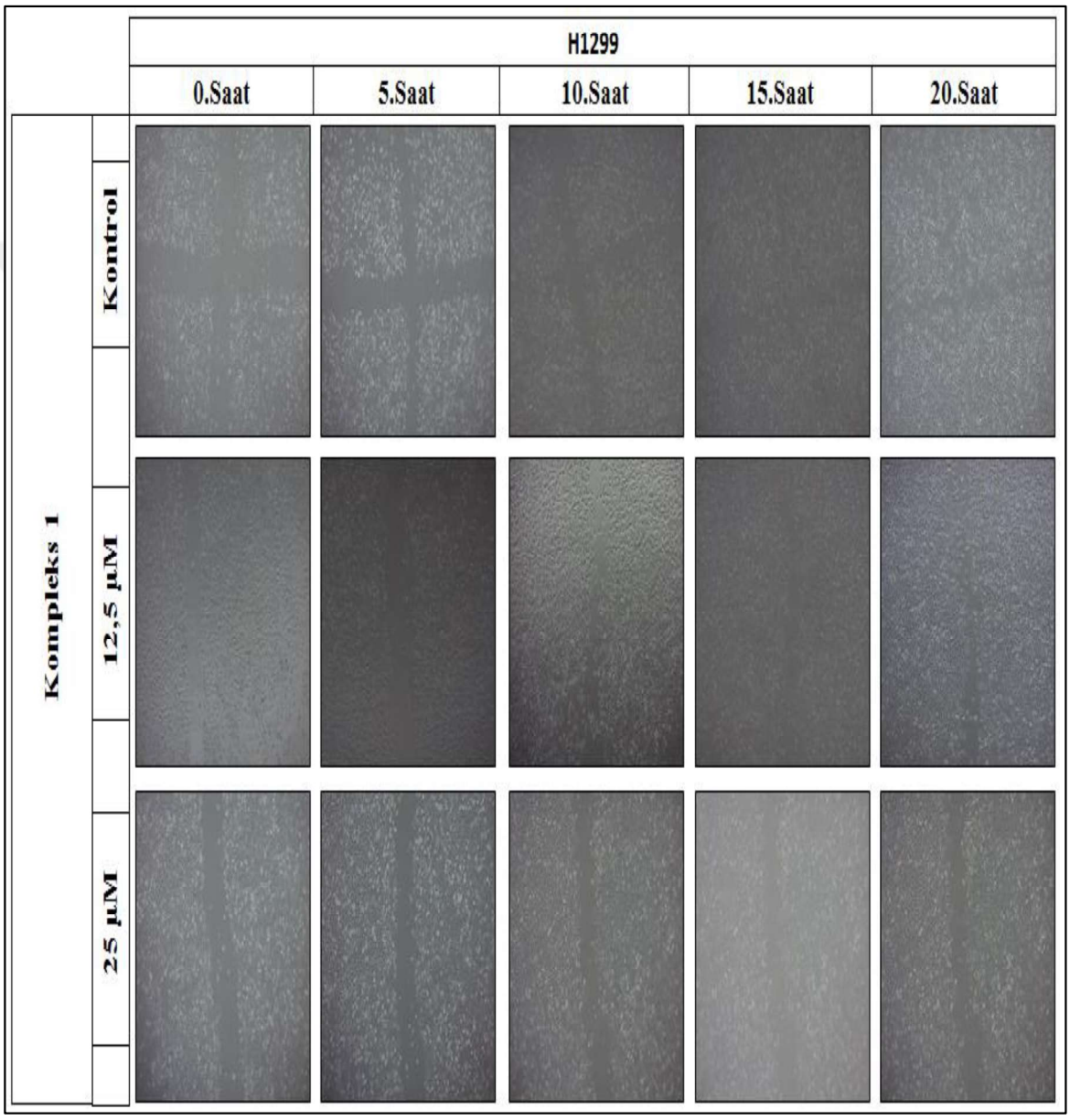
Şekil 4.12. Kompleks 1 uygulanan A549 akciğer hücre soyunun migrasyon yeteneği.

Kompleks 2 uygulanan A549 hücre soyu incelendiğinde, tedavi uygulanmamış olan kontrol grubunda yara iyileşmesi 10.saat itibariyle yaranın kapanmaya başladığı gözlenirken, 25 ve 50 µM dozlarında ise herhangi bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.13.).



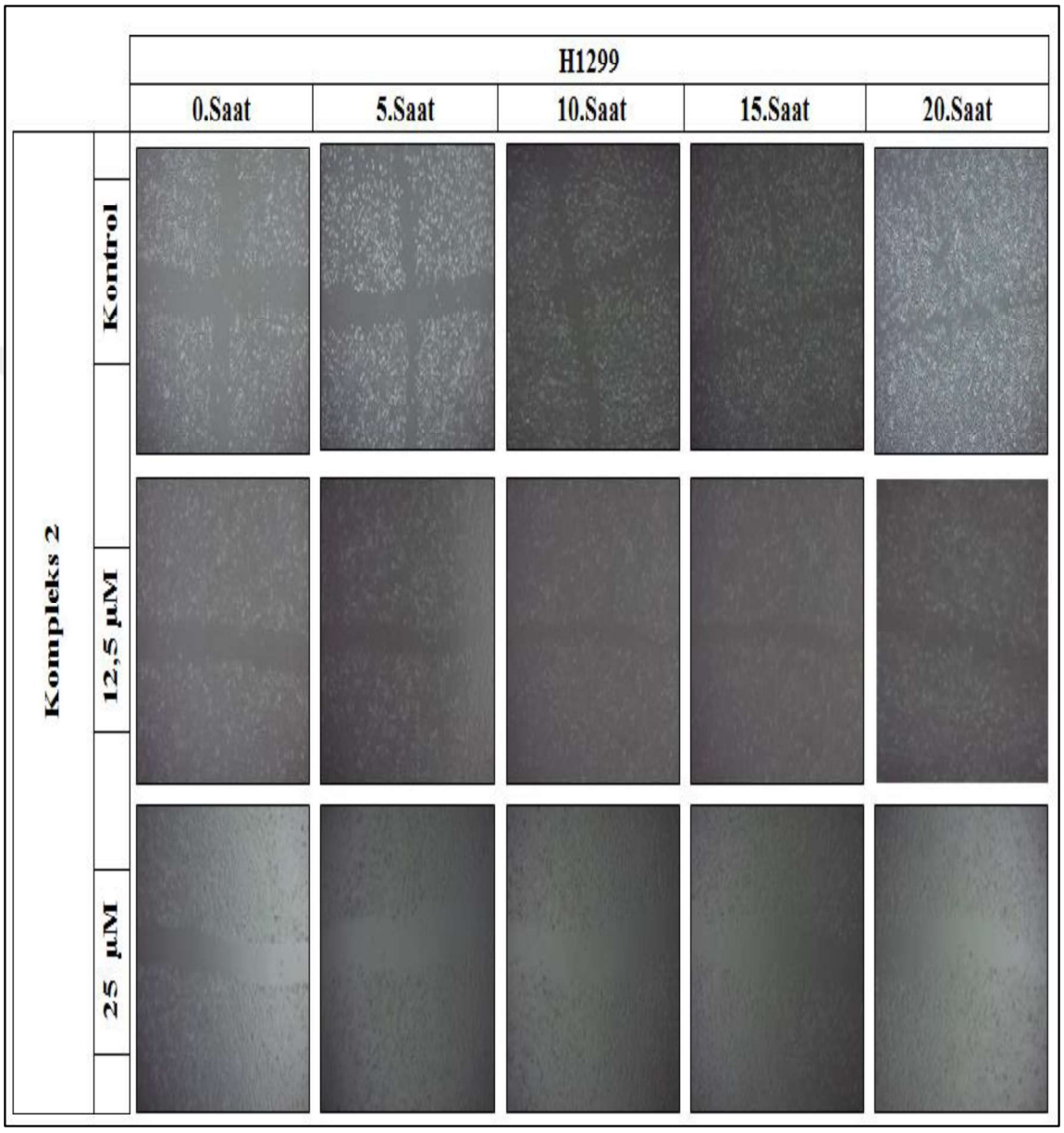
Şekil 4.13. Kompleks 2 uygulanan A549 akciğer hücre soyunun migrasyon yeteneği.

H1299 hücre soylarında benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin 12,5-25 µM dozlarında uygulanması sonrasında hücre görüntüleri alındı. İncelenen hücre görüntülerinde, kontrol grubunda 10. saatin sonunda yaranın belirgin bir şekilde kapanmaya başladığı gözlendi. Ancak 12,5 µM dozu uygulanan hücrelerde 15. saatte yara hafif kapanırken 25 µM dozunda bir değişiklik olmadı (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. Kompleks 1 uygulanan H1299 akciğer hücre soyunun migrasyon yeteneği.

İncelenen hücre görüntülerinde, kontrol grubunda 15. saat sürecinde yaranın kapanmaya başladığı gözlendi.12,5 ve 25 µM dozu uygulanan hücrelerde bir değişiklik olmadı (Şekil 4.15.).



Şekil 4.15. Kompleks 2 uygulanan H1299 akciğer hücre soyunun migrasyon yeteneği.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kardiovasküler hastalıklardan sonra dünya genelinde ikinci büyük hastalık olarak kanser gelmektedir. Dünya sağlık örgütü, 2025 yılına kadar 19 milyona ulaşacağını düşündüğü kanserin, 2030 senesine kadar 22 milyona, 2035 yılına gelindiğinde ise 24 milyona ulaşacağını öngörmektedir (Anonim 2015d).

Her yıl milyonlarca insan önemli bir sağlık problemi olan kanserden dolayı hayatını kaybetmektedir. Kanser hücreleri, ilaç tedavilerine direnç geliştirebilmenin yanı sıra bağışıklık sisteminden kaçma yeteneğine sahiptir. Bunun yanı sıra kanser hücreleri birçok faktör sayesinde beslenmeleri ile kontrolsüz proliferasyonlarını sağlayarak tedavilerin nihai amacına ulaşmasını engellemektedir. Kanser tedavisinde moleküler hedeflere yönelik geliştirilmiş ilaçlar ve birçok kemoterapötik ilaç kullanılmaktadır. Lakin bu ilaçlar hala beklenilen oranda tedaviye cevap verememektedir. Bundan dolayı bilimsel tedavilerin yanı sıra, geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılan bitkisel ya da diğer doğal kaynaklı ürünlerin kullanılması da kanser tedavisinde giderek önem kazanmaktadır (Sezgin, 2010). Genellikle hücre proliferasyon inhibitörü olarak anılan flavonoid bileşikleri, yapılan birçok çalışma verilerine göre kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etki göstermiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, flavonoid bileşikleri içeren diyetler ile beslenmenin, kansere yakalanma riskini düşürdüğüne yönelik önemli sonuçların varlığını göstermektedir (Rossi ve ark 2012, Sghaiera ve ark 2011). Flavonoidlerin, kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri farklı mekanizmalar ile anlatılmıştır. Bu bileşikler hücre döngüsünün durdurması, apopitozisi indüklemesi yönüyle oldukça dikkat çekmektedir (Choi 2007, Sghaiera ve ark. 2011). Yapılan araştırmalarda antikarsinojen özellikleri ile oldukça dikkat çeken flavonoidlerin, kanser kök hücrelerini elemine etmesine dair çalışmaların literatürlere girmesi ile beraber bu bileşiklerin yeni antikanser ajan olabileceği görüşü önem kazanmaktadır (Sak ve Everaus 2015).

Yapılan literatür çalışmaları göz önünde bulundurularak bu tez çalışmasında, Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde sentezlenen ve karakterizasyonları yapılan, benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin (Kompleks 1 ve Kompleks 2) sitotoksik etkileri insan akciğer kanser (A549 ve H1299) ve sağlıklı akciğer (BEAS-2B) hücrelerinde araştırılmıştır.

Sharma ve ark. 2013 yılında bir grup β-iyonon türevli kalkon türevlerinin prostat (PC-3), meme (MCF-7), nöroblastom (IMR-32), serviks (Hela) ve karaciğer (Hep) hücreleri üzerinde ki sitotoksik aktivitesini değerlendirmiştir. Kalkon türevlerinin farklı hücre soyları üzerinde sitotoksik aktiviteler gösterdiğini bildirmişlerdir (Sharma ve ark. 2013). Yapılan bir başka çalışmada ise, Hussaini ve ark. (2016) 1, 2, 3- triazol bağlı pirazolin ve kalkon türevleri ile ilgili yaptığı çalışmada insan karaciğer (HepG2) ve prostat (DU145) kanseri hücre soyları üzerinde yaptığı çalışmada pirazolin ve kalkon türevlerinin her iki hücre soyu üzerinde yüksek sitotoksik etkiye sahip oldukarını belirtmişlerdir (Hussaini ve ark. 2016). Nakhjavania ve arkadaşının yaptığı çalışmada ise COX-1 ve/veya COX-2 seçiciliğine sahip olan 1,3-diarilprop-2-en-1-on yapısında ki birden fazla kalkon türevi sentezlenmiş ve bu kalkon türevlerinin A549, HepG2 ve MCF-7 gibi farklı hücre soylarında 72, 96 ve 168 saat sonunda sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Nakhjavania ve ark. 2014). Nakhjavania ve ark. yaptıkları bu çalışmada A549 kanser hücreleri için kalkon türevlerinin IC_{50} değeri 23.47 μM olurken, bizim kalkon türevlerimiz 72 saat sonucunda A549 kanser hücrelerinde Kompleks 1 için IC_{50} değeri 17,07 μM ve Kompleks 2 için ise bu değer 23,44 μM olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre aynı hücre soyu ve aynı süre sonunda kullanmış olduğumuz kalkon kompleksleri daha etkili sonuçlar vermiştir. Jovanovic ve ark. Rutenyum(II) kalkon komplekslerinin insan serviks (HeLa), melanom (FemX), meme (MDA-MB-231) ve akciğer (A549) kanser hücrelerinde anti kanser aktiviteye sahip olduklarını belirtmişlerdir. A549 hücrelerinde Rutenyum(II) kalkon komplekslerinin 48 saat sonrasında IC_{50} değerlerini Kompleks 1 için IC_{50}>100 μM ve Kompleks 2 için ise 41.80 μM olarak belirlemişlerdir (Jovanovic ve ark. 2016). Tez çalışmamızda kullandığımız komplekslerimiz ise aynı zaman ve aynı hücre soyu için Kompleks 1 için IC_{50} değeri 27,66 μM ve Kompleks 2 için ise 43,23 μM olarak hesaplanmıştır. Kalkon komplekslerimizin literatürde benzer komplekslere oranla daha yüksek bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Benzer şekilde Tseng ve ark. 3-

fenilkinolinilkolikon türevleri sentezleyerek antiproliferatif aktivitelerini XTT metodu ile değerlendirmişlerdir (Tseng ve ark. 2013). Kullandıkları birçok kalkon bileşiği H1299 kanser hücrelerinde A549 kanser hücrelerine göre çok daha etkili sonuçlar vererek bizim de yapmış olduğumuz sitotoksisite sonuçlarını desteklemektedir.

Özdemir ve ark. yeni antikanser ve antimikrobiyal ajanlar geliştirmek üzere 2-asetil-1-metilpirrolün 5- (aril) furfural türevleri ile yeni pirol bazlı kalkonlar tasarlayarak sentezini gerçekleştirmişlerdir ve MTT yöntemi ile bu bileşiklerin A549 insan akciğer, HepG2 insan hepatoselüler, C6 sıçan gliomu ve NIH/3T3 fare embriyonik fibroblast hücre soyları üzerindeki sitotoksik etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu kalkon türevlerinden Bileşik 1 yani 1- (1-metil-1 H-pirol-2-il) -3- (5- (4-nitrofenil) furan-2-il) prop-2-en-1-on ajanının, A549 kanser hücreleri için IC_{50} değeri 0.3 μg/mL ile IC_{50} değeri 19 μg/mL olan cisplatinden daha seçici antikanser aktivitesi göstererek güçlü bir antikanser ajan özelliği göstermiştir (Özdemir ve ark. 2017).

İdeal antikanser ajanların sağlıklı hücrelere karşı sitotoksik etkinlikleri sınırlıdır ve kanser hücrelerine seçici davranması beklenirken sağlıklı hücrelere ise zarar vermemesi istenir (Mao ve ark. 2016, Zhou ve ark. 2016). Bundan dolayı çalışmamızda bu kalkon türevlerinin seçiciliğini BEAS-2B sağlıklı akciğer hücre soylarına karşı etkilerini de test ettik. Kalkon türevi Kompleks 1'in BEAS-2B sağlıklı hücreler üzerinde 24 saat SRB canlılık metoduna göre hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmedi. 48 saatte ise 50 ve 100 μM gibi yüksek dozlarda hücre canlılığında istatistiksel bir azalmaya neden olduğu belirlendi ($p<0,001$). Kompleks 2 ise 24 saatte 50 ve 100 μM, 48 saatte ise 25, 50 ve 100 μM gibi yüksek konsantrasyonlarında istatistiksel olarak hücre canlılığı üzerinde kontrole oranla anlamlı bir azalmaya sebep olduğu gözlendi ($p<0,001$). Komplekslerin sağlıklı hücrelerde 25 μM ve daha düşük dozlarda ise hücre canlılığını azaltmadıkları gözlenirken kanser hücrelerinde bu dozlarda da etkili olduğu belirlenmiştir. Bu yüzden bu komplekslerin kanser tedavisinde kullanılabilecek birer ajan olabilme potansiyelleri oldukça yüksektir. Konsantrasyon ve zamana bağlı olarak Kompleks 1 ve 2'nin A549, H1299 ve BEAS-2B hücre soylarındaki etkisi hesaplanan IC_{50} değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Bu değerlere göre BEAS-2B her iki kompleks için de IC_{50} değeri 24 saat sonunda 100 μM'dan daha büyük bulunurken bu değer Kompleks 1 için A549 ve H1299 hücrelerinde sırasıyla 86,52 ve 84,04 μM olarak; Kompleks 2 için ise 83,44 ve 87,01 μM olarak gözlemlendi. 48 saat inkübasyon sonrası

BEAS-2B için IC_{50} değeri 64,93 μM A549 ve H1299 için (Kompleks1) 27,66 ve 21,11 μM olarak saptanırken; Kompleks 2 için BEAS-2B için IC_{50} değeri 64,93 μM A549 ve H1299 hücre soyu için 43,23 ve 21,87 μM olarak gözlemlendi. Bu sonuçlara göre BEAS-2B sağlıklı akciğer hücre soyları üzerinde Kompleks 1 ve 2 bileşiği 48 saatte yüksek dozlarda hücre canlılığında çok az bir istatistiksel azalmaya neden olduğu belirlendi.

ATP canlılık metodu SRB hücre canlılık metodu sonuçlarımızı doğrulamak amacı ile gerçekleştirildi. ATP canlılık metodu, metabolik aktiviteyi yani hücre içi ATP miktarını ölçmeye dayanan bir yöntemken, SRB metodu ise hücre içi protein miktarının ölçümüne dayanan iki farklı sitotoksisite testidir. Ayrıca SRB protein bağlayabilen anyonik bir boya olmasından dolayı SRB yönteminde bağlanan boya miktarı hücre kütlesi olarak kullanılabilir. ATP testinde hücre canlılığının, SRB metoduna göre çok daha düşmesinin sebebi SRB yönteminde hücreler ölmeye başlamış olsalar da hücresel proteinlerin yapılarında bozulmanın başlamamasından kaynaklanmaktadır. Bu farklılık kullanılan ilacın etki mekanizmasına bağlı olarak değişmektedir (Ulukaya ve ark. 2008). ATP canlılık metoduna göre kalkon türevi olan Kompleks 1 ve Kompleks 2, 48 ve 72 saatleri sonunda doza bağlı olarak A549 ve H1299 hücre soylarında hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü gözlenmiştir ($p<0,001$). ATP ve SRB testleri ile komplekslerin anti proliferatif etkileri doğrulanmış olmaktadır. ATP sonuçlarına göre IC_{50} değerleri hesaplandığında, her iki kompleksimizin de antikanser etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Wani ve ark. 2016 yılında kinazolinon kalkon türevinin kolon kanseri HCT-116 hücreleri üzerindeki etkisini araştırmış ve 6, 12, 24, 48 saatleri sonunda IC_{50} değerleri sırası ile 600, 140, 26 ve 16 μM olarak hesaplanırken bu kalkon türevinin mitokondriyal bağımlı apoptozisi indüklediğini bildirmişlerdir (Wani ve ark. 2016). Bir başka çalışmada ise 11 (2′-hidroksi-4′-alkoksi kalkon) kalkon türevinin PC-3, HF-6 (kolon), CaSki (servikal karsinom) ve MCF-7 insan kanser hücre soyları üzerindeki antiproliferatif aktiviteleri incelenmiş ve IC_{50} değerleri prostat (PC-3) hücre soyu dışında IC_{50} değerleri 50 μM'dan daha yüksek çıktığı bildirilmiştir (Marquina ve ark. 2019). Coşkun ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada, farklı yapıya sahip olan 10 adet kalkon türevinin sitotoksik etkisi akciğer (A549), meme (MCF-7) ve PC-3 kanseri hücre soyları üzerinde değerlendirilmişir. Aril-1-(7-etoksi-1-benzofuran-2-il)-2-

propenon kalkon türevinin A549, MCF-7 ve PC-3 kanser hücrelerinde 72 saat IC_{50} değerleri 9 μM, 2 μM ve 10 μM olarak hesaplanmış ve bu hücreler üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Coşkun ve ark. 2017). Aynı süre sonunda A549 hücrelerinde bizim komplekslerimiz için bu değerler Kompleks 1 için 13,21 μM ve Kompleks 2 için ise 14,19 μM olarak hesaplanmıştır. Coşkun ve ark. test etmiş oldukları kompleksler aynı süre zarfında ve aynı hücre soyunda bizim komplekslerimiz gibi güçlü bir antikanser aktivite gösterdiğini söyleyebiliriz. Bu yüzden bu komplekslerin kanser tedavisinde kullanılabilecek birer ajan olabilme potansiyelleri oldukça yüksektir.

Faz/kontrast mikroskop görüntüleri tezde kullanılan benzofuran sübstitüe kalkon türevi komplekslerinin doza paralel bir şekilde hücreler üzerinde küçülmeler, yuvarlaklaşmalar ve apoptotik cisimciklerin meydana gelmesi gibi morfolojik değişikliklerle hücrelerin ölü olduğunu göstermiştir. Eş zamanlı olarak 48 saat sonunda Hoechst 33342 ve PI boyaması gerçekleştirilen hücrelerde (Şekil 4.8.) A549 hücre soyunda kontrol grubuna kıyasla 100 μM dozunda Komplek 1 ve Kompleks 2 uygulanan dozlarda doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı yüksek oranda azalmış apoptotik cisimcikler ve piknotik hücreler gözlenmiştir. Bu dozda nükleotik fragmantasyonlar ve kromatin kondansasyonu ile birlikte yoğun bir PI pozitifliğinin gözlenmesi, hücrelerin geç apoptoz=sekonder nekroz sonucu öldürdüğünü göstermektedir. H1299 hücrelerinde 48 saat PI boyamasında ise her iki kalkon türevli kompleksin 100 ve 50 μM dozlarında yoğun bir PI pozitifliği gözlenirken ölüm modunun sekonder nekroz olabileceği 25 μM dozunda ise hücrelerin ölüm modunun PI boyanın negatif olması ile primer veya erken apoptoz olduğu söylenebilir (Şekil 4.9.). 72 saat floresans boyama sonuçlarına göre (Şekil 4.10.) her iki komplekste de 25 μM dozunda A549 hücrelerinin PI ile tamamen boyanamamasından dolayı hücre ölüm modunun apoptozis olabileceği buna karşın 50 ve 100 μM dozlarının PI pozitif boyanması bu dozlarda A549 hücre soyunun geç apoptoz/sekonder nekrozis yoluyla öldüğünü göstermektedir. H1299 hücre soyunda ise 50 ve 100 μM dozunda PI pozitif boyanması hücre ölüm modunun geç apoptoz=sekonder nekroz olabileceğine işaret etmektedir. 12,5 ve 25 μM dozlarında ise hücre ölüm modunun apoptoz olduğunu söylenebilir (Şekil 4.11.). Faz/kontrast mikroskop sonuçları, hücrelerin (A549, H1299) ölüm modunun apoptozisden daha çok

sekonder nekrozis=geç apoptoz olduğunu göstermektedir. Alınan sonuçlar Kompleks 1 ve Kompleks 2 kalkon türevlerinin hücrelerde apoptozisi indükleyerek hücre canlılık analizlerimizi desteklemiştir. Abou-Zied ve ark. yaptığı bir çalışmada, farklı 20 ksantin/kalkon türevli bileşiklerini PANC-1 (insan pankreas kanseri) hücre soyu üzerindeki sitotoksik aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Bu bileşiklerin IC_{50} değerleri ise 0.90 ile 1.41 μM arasında değişirken, en güçlü bileşik 11'in IC_{50} değeri 0.3 μM'dır. Bu bileşiğin hücre döngüsü üzerindeki etkisi, apoptotik ve sitotoksik etkisi kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve sonuç olarak 1,3-dimetil ksantin'in (bileşik 11) apoptozisi indüklediği ortaya konmuştur (Abou-Zied ve ark. 2019). Bir başka çalışmada ise Donga ve ark. aromatik bir keton olan kalkonun insan hepatik ve akciğer kanseri hücreleri üzeindeki çalışmasında bu kalkonun apoptozisi indüklediğini, kanser hücresi göçünü inhibe ettiğini bildirmiştir. (Donga ve ark. 2018). Pirazolin ve kalkon türevleri ile ilgili yapılan bir başka çalışmada ise, insan karaciğer (HepG2) ve prostat (DU145) kanser hücre soyları üzerinde pirazolin ve kalkon türevlerinin aktivitesi incelenmiştir. Her iki hücre soyu üzerinde yüksek sitotoksik etkiye sahip olan bu türevlerin ayrıca kaspaz 3 ve kaspaz 9'u aktifleştirerek apoptozu tetiklediği bildirilmiştir (Hüssaini ve ark. 2016).

Kanser hücrelerinin bulunduğu bölgeden vücudun farklı doku ve organlarına yayılması (metastaz), kanser sonucu meydana gelen ölümlerin %90 gibi yüksek bir oranından sorumludur. Bu olay damar oluşumu (anjiojenez), yayılma (invazyon) ve göç etme (migrasyon) gibi birbirleri ile bağlantılı çok basamaklı kompleks olaylar zinciri ile meydana gelmektedir (Hanahan ve Weinberg 2000, Poste ve Fidler 1980). Xu ve ark. 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada kalkon türevleri olan L2H17 ajanının CT26.WT (fare kolon kanser hücre soyu) hücrelerinde, hücre invazyonunu ve migrasyonununu inhibe ettiğini göstermişlerdir **(**Xu ve ark. 2015). Bir başka çalışmada Juan ve ark. 4-Maleamik Asit ve 4-Maleamid Peptid kalkon türevlerinin LNCaP ve PC-3 prostat kanser hücre soylarında hücre canlılığını, doz ve zamana paralel olarak azalttığını ve migrasyonun önlenmesinde bu kalkon türevlerinin etkinliğini ortaya koymuşlardır (Juan ve ark. 2010). Benzofuran sübstitüe kalkon türevi olan Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin hücre migrasyonu üzerindeki inhibitör etkisini değerlendiebilmek amacı ile tez çalışmamızda A549 ve H1299 hücre soyları kullanıldı. A549 hücre soyu Kompleks 1'in uygulandığı hücre görüntülerinde, kontrol grubunda 10. saat itbariyle yaranın kapanmaya başladığı görüldü. Ancak 25 ve 50 μM dozlarında ise Kompleks 1'in

uygulandığı hücrelerde herhangi bir değişiklik tespit edilmedi. Kompleks 2 uygulanan A549 hücre soyu incelendiğinde, tedavi uygulanmamış olan kontrol grubunda yara iyileşmesi 10. saat itibariyle yaranın kapanmaya başladığı gözlenirken, 25 ve 50µM dozlarında ise herhangi bir değişikli tespit edilmedi.

H1299 hücre soylarında benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin 12,5-25 µM dozlarında uygulanması sonrasında hücre görüntüleri incelendiğinde kontrol grubunda 10. saatin sonunda yaranın belirgin bir şekilde kapanmaya başladığı gözlendi. Ancak 12,5 µM dozu uygulanan hücrelerde 15. saatte yara hafif kapanırken 25 µM dozunda bir değişiklik olmadı. Sonuç olarak benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin bu hücre soyları üzerinde anti migrasyon aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

İn vitro tez çalışmamızdaki sonuçlar, sentez ve karekterizasyonu yapılmış olan benzofuran sübstitüe kalkon türevleri olan Kompleks 1 ve Kompleks 2 bileşiklerinin, A549 ve H1299 insan akciğer kanseri hücre soylarında sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Faz/kontrast mikroskop sonuçları, hücrelerin (A549, H1299) ölüm modunun apoptozisden daha çok sekonder nekrozis=geç apoptoz olduğunu gösterirken, yapılan yara iyileşmesi testi sonuçları ise benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin bu hücre soyları üzerinde anti migrasyon aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Elde edilen bu umut vaad edici sonuçlarla benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin ileri analizlerle (pre-klinik ve klinik) etkisinin değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abou-Zied, H.A., Youssif, B.G.M., Mohamed, M.F.A., Hayallah, A.M., Abdel-Aziz, M. 2019. EGFR inhibitors and apoptotic inducers: Design, synthesis, anticancer activity and docking studies of novel xanthine derivatives carrying chalcone moiety as hybrid molecules. *Bioorganic Chemistry,* 22(89): 102997.

Adams, J.M., Cory, S. 2001. Life or death decions by the Bcl-2 family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1): 61-6.

Addadi, Y., Moskovits, N., Granot, D., Lozano, G., Carmi, Y., Apte, R.N., Neeman, M., Oren, M. 2010. p53 status in stromal fibroblasts modulates tumor growth in an SDF1-dependent manner. *Cancer Res*earch, 70(23): 9650-9658.

Adrain, C., Martin, S.J. 2001. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochromeseas. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(6): 390-397.

Aggarwal, B.B., Shishodia, S. 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*, 71(10): 1397-1421.

Aherne, S. A., O'Brien, N.M. 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1): 75-81.

Akşit, H., Bildik, A. 2008. Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üni. Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 19(1): 55-63.

Alberg, A.J., Samet, J.M. 2003. Epidemiology of lung cancer. *Chest,* 123: 21-49.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. Molecular biology of the cell. Fourth edition, New York, 1314.

Alex, J.M., Kumar, R. 2014. 4,5-Dihydro-1H-pyrazole: an indispensable scaffold. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chem*istry, 29(3): 427-442.

Alkoçlu, A., Özkurt, S. 2000. Akciğer kanserini önleyici ilaç tedavisi. Editörler: Hastürk, S., Yüksel, M. Akciğer kanseri. Özlem Grafik Matbaacılık, İstanbul, s. 351–358.

Altınbaş, M. 2000. Onkoloji El Kitabı, Ankara, s: 18-30.

Anonim, 1996. NCI. Navy medical oncology branch cell line supplement. *Journal. Cell. Biochemistry*, 24, 1–291. PMID 8965489.

Anonim, 2003. IARC, Fruit and vegatables. Lyon, France.

Anonim 2006. Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu. Akciğer kanseri tanı ve tedavi rehberi. *Toraks Dergisi*, 7: 1-37.

Anonim, 2012a. National Cancer İnstitute, What you need to know about lung cancer. http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/lung (Erişim tarihi: 17.05.2019).

Anonim. 2012b. TUİK, Küresel yetişkin tütün araştırması. http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=13142 (Erişim tarihi: 13.11.2015.).

Anonim, 2013. http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=0F98C8F5-9570-BAFC-368A-C7F6FC73944E.

Anonim 2015c. kanser https://dogalbitkiselorganiksaglik.blogspot.com.tr/2015/10/kanser-hakknda-hersey.html (Erişim tarihi: 20.12.2019).

Anonim, 2015b. TUIK Ölüm Nedeni İstatistikleri. http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=21526

Anonim, 2015a. Türkiye Kanser İstatistikleri, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ankara, 2018.

Anonim, 2015d. WHO, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/Accessed- (Erişim Tarihi: 05.01.2015).

Anonim, 2016. http://www.dreamstime.com/stock-illustration-apoptosis-necrosis-difference-apoptotic-versus-necrotic-morphology-form-cell-death-structural-changes-cells-image- (Erişim tarihi: 20.07.2015).
Anonim, 2018. WHO, Cancer Fact sheet February. http://www.who.int/en/newsroom/fact-sheets/detail/cancer- (Erişim tarihi: 05.06.2018).
Anonim, 2019. ATCC, https://www.lgcstandardsatcc.org/~/media/Attachments/Micrographs/Cell/CCL-185.ashx (Erişim tarihi: 01.02.2019)
Bailey-Wilson, J.E., Amos, C.I., Pinney, S.M., Petersen, G.M., de Andrade, M., Wiest, J.S., Fain, P., Schwartz, A.G., You, M., Franklin, W., Klein, C., Gazdar, A., Rothschild, H., Mandal, D., Coons, T., Slusser, J., Lee, J., Gaba, C., Kupert, E., Perez, A., Zhou, X., Zeng, D., Liu, Q., Zhang, Q., Seminara, D., Minna, J., Anderson, M.W. 2004. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *American Journal of Human Genetics,* 75(3): 460-474.
Bauer, J. H., Helfand, S. L. 2006. New tricks of an old molecule: lifespan regulation by p53. *Aging cell*, 5(5): 437-440.
Béliveau, R., Gingras, D. 2007. Role of nutrition in preventing cancer. *Canadian Family Physician*, 53(11): 1905–1911.
Bindra, R.S., Glazer, P.M. 2005. Genetic instability and the tumor microenvironment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. *Mutation Research*, 6; 569(1-2): 75-85.
Blagosklonny, M. V. 2004. Antiangiogenic therapy and tumor progression. *Cancer Cell*, 5(1): 13–17.
Boffetta, P., Hashibe, M. 2006. Alcohol and cancer. *The lancet oncology,* 7(2): 149-56.
Bogdal, D., Warzala, M. 2000. Microwave- assisted preparation of benzo[b]furans under solventss phase-transfer catalytic conditions. *Tetrahedron,* 56(44): 8769-8773.
Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P., Lipton, S.A. 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences ABD.,* 92: 7162-7166.
Broers, J.L., Ramaekers, F.C. 1994. Differentiation markers for lung-cancer sub-types. A comparative study of their expression in vivo and in vitro. *International Journal of Cancer Supplement,* 8: 134-137.
Bouchardy, C., Benhamou, S., Jourenkova, N., Dayer, P., Hırvonen, A. 2001. Metabolic genetic polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Lung Cancer,* 32: 109-112.
Burlacu A. 2003. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 7: 249-257.
Cachot, J., Galgani, F., Vincet, F. 1998. cDNA cloning and expression analysis of flounder p53 tumour suppressor gene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*., 121: 235-242.
Castillo-Pichardo, L., Martinez-Montemayor, M.M., Martinez, J.E., Wall, K.M., Cubano, L.A., Dharmawardhane, S. 2009. Inhibition of mammary tumor growth and metastases to bone and liver by dietary grape polyphenols. *Clinical and Experimental Metastasis*, 26(6): 505-516.
Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radicals Biology and Medicine*, 29(3-4): 323-33.

Chee, J.L., Saidin, S., Lane, D.P., Leong, S.M., Noll, J.E., Neilsen, P.M., Phua, Y.T., Gabra, H., Lim, T.M. 2013. Wild-type and mutant p53 mediate cisplatin resistance through interaction and inhibition of active caspase-9. *Cell Cycle*, 12: 278–288.

Choi, E.J. 2007. Hesperetin induced G1-phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. *Nutrition and Cancer*, 59(1): 115-9.

Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. 2006. Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. *Cellular and molecular biology letters*, 11: 506-525.

Clark, W.H. 1991. Tumour progression and the nature of cancer. *British Journal of Cancer,* 64: 631-644.

Collins, K. K., Liu, Y., Schootman, M., Aft, R., Yan, Y., Dean, G. 2011. Effects of breast cancer surgery and surgical side effects on body image over time. *Breast cancer research and treatment*, 126(1): 167-176.

Cook, N.C., Samman, S. 1996. Flavonoids. chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7: 66–76.

Coşkun, D., 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.

Coşkun, D., Ahmedzade, M., Kırbağ, S. 2011. 3-(Substituted Aryl)-1-benzofuranyl-2-propenones: Antimicrobial properties of some chalcones-type compounds and their 2-Pyrazoline derivatives. *E-Journal of Chemistry,* 8(4): 1574-1581.

Coşkun, D., Erkisa, M., Ulukaya, E., Coşkun M. F., Arı, 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.

Coşkun G, Özgür H. 2011. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi,* 20: 145-158.

Cotter, T. G. 2009. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, 9(7): 501-507.

Cummings, M.C., Winterford, C.M., Walker, N.I. 1997. Apoptosis. *American Jounal of Surgical Pathology*, 21: 88-101.

Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J., Fletcher, J., 1993. The use of ATP bioluminescence as a measure cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 160(1): 81-8.

Cruz, C.S.D., Tanoue, L.T., Matthay, R.A. 2011. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine*, 32(4), 605-644.

Cryns, V., Yuan, J. 1998. Proteases to die for. *Genes& Development,* 12: 1551-1570.

Dalay, N. 2000. Kanser biyolojisi. İçinde: Klinik Onkoloji. Editörler: Topuz, E., Aydıner, A., Karadeniz, A.N. *Onkoloji Enstitüsü Yayınları*, İstanbul Üniversitesi.

Dalay, N. 2006. Kanser. İçinde: Hücre: Moleküler Yaklaşım, Editörler: Sakızlı, M., Atabey, N., Kalay, E. The Cell: A Moleculer Approach. Editors: Cooper, G.M., Hausman, R. E. 3. Baskı, İzmir, Tıp Kitabevi, s. 631-671.

Dash, P. 2007. Apoptosis. http:/www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/-(Erişim tarihi:12.05.2019).

Desdicioğlu, R. 2005. Ratlarda ovulasyon indüksiyonunu takiben spontan siklofosfamid ve radyoterapi etkisiyle oluşan apoptosis ve sifingozin -1- fosfat' ın siklofosfamid ve radyoterapi ile oluşan apoptosis üzerine etkisi. *Tıpta uzmanlık tezi*, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Isparta.

Dickens, L.S., Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Hughes, M.A., Robinson, G.L., Fairall, L., Schwabe, J.W., Cain, K., Macfarlane, M. 2012. A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediatingapoptotic cell death. *Molecular Cell,* 47: 291-305.

Doll, R., Peto, R. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute,* 66(6): 1192-1308.

Donga, N., Liu, X., Zhao, T., Wang, L., Li, H., Zhang, Z., Li, X., Bai, X. Zhang, Y., Yang, B. 2018. Apoptosis-inducing effects and growth inhibitory of a novel chalcone, in human hepatic cancer cells and lung cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy,* 105: 195-203.

Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V., Vandenabeele, P. 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*, 11: 1050-1062.

Elci, O.C., Akpinar-Elci, M. 2007. The trend of small cell lung cancer among young men. *Lung Cancer, 57*(1): 34-36.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology,* 35(4): 495–516.

Erdoğan, B.B. 2003. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis*. Akciğer Arşivi,* 4: 165-174.

Ersöz M. 2007. İnsan meme kanseri (MCF 7) ve fibroblast (L-929) hücre kültürlerinde poliakrilik asidin toksisitesinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi,* Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, İstanbul.

Evan, G., Harrington, E., Fanidi, A., Land, H., Amati, B., Bennett, M. 1994. The Role Of Apoptosis In Development, Tissue Homeostasis And Malignancy. *Biological Sciences,* 345(1313): 269-275.

Evan, G.I., Vousden, K.H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature,* 411: 342-348.

Fadeel, B., Gleiss, B., Hogstrand, K., Chandra, J., Wiedmer, T., Sims, P.J., Henter, J.I., Orrenius, S., Samali, A. 1999. Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266(2): 504-511.

Fan, F., Wood, K.V. 2007. Bioluminescent assays for high-throughput screening *Assay and Drug Developmend Technologies,* 5(1): 127-136.

Fong, K.M., Minna, J.D. 2002. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clinics in Chest Med*icine*,* 23(1): 83-101.

Fong, K.M., Sekido, Y., Gazdar, A.F., Minna, J.D. 2003. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax*, 58: 892–900.

Fong, K.W., Sekido, Y., Minna, J.D. 1999. Molecular pathogenesis of lung cancer. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 118: 1136-1152.

Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., Marques, M.P. 2006. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews*, 26(6), 747-766.

Fulda, S., Debatin, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34): 4798-4811.

Galluzzi, L., Kroemer, G. 2008. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 135: 1161–1163.

Garcia-Lafuente, A., Guillamon, E., Villares, A., Rostagno, M.A., Martinez, J.A. 2009. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Res*earch, 58: 537–552.
Gewis, A. 2003. Introduction to Apoptosis. *ApoReview*, 1-26. http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm
Gezegen, H. 2006. Bazı kalkon türevlerinin sentezi ve reaksiyonlarının araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Gaziosamanpaşa Üniversitesi, Tokat.
Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *Cancer J Clin*., 55: 178 –194.
Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Montagna, J. P., Biasi, S.D., Roat, E., Bertoncelli, L., Cooper, E.L., Cossarizza, A. 2011. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: 591356.
Giard, D.J, Aaronson, S.A, Todaro, G.J, Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P. 1973. In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 51(5): 1417–1423.
Gilbert, D.F., Boutros, M. 2016. A protocol for a high-throughput multiplex cell viability assay. *Methods Mol. Biol.,* 1470: 75-84.
Ginsberg, M.S. 2005. Epidemiology of lung cancer. *Seminars in roentgenology*, 40: 83-89.
Ginsberg, R.J., Rubinstein, L.V. 1995. Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. *The Annals of Thoracic Surgery,* 60: 613-622.
Golstein, P., Kroemer, G. 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences,* 32: 37–43.
Gorlova, O.Y., Weng, S.F., Zhang, Y., Amos, C.I., Spitz, M.R. 2007. Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. *International Journal of Cancer*, 121(1): 111-8.
Graves, E.E., Maity, A., Le, Q.T. 2010. The tumor microenvironmet in non-smal lung cancer. *Seminars in Radiation Oncol*ogy, 20(3): 156-163.
Groeger, A.M., Esposito, V., Mueller, M.R., Caputi, M., Kaiser, H.E., Giordano, A. 1997. Advances in the understanding of lung cancer. *Anticancer Research,* 17: 2519-2522.
Guicciardi, M.E., Gores, G.J. 2009. Life and death by death receptors. *FASEB J.* 23: 1625-1637.
Guha, N. 2009. Dietary flavonoids and the risk of breast cancer and childhood leukemia. *Doctor Theses*. California University, Berkeley.
Gürün, M.S., Süzer, Ö. 2005. Bitkisel İlaçlar: Süzer Farmakoloji. Editör: Süzer, Ö. Klinisyen Tıp Kitapevleri, İstanbul, s. 533-40.
Halilçolar, H., Tatar, D., Ertuğrul, G. 1999. Epidemiyoloji. Editörler: Akkoçlu, A., Öztürk, C. Akciğer kanseri multidisipliner yaklaşım. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, s. 17-22.
Halliwell, B., Aruoma, O.I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 281: 9-19.
Hanahan, D., Coussens, L.M. 2012. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21: 309–322.
Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell,* 100(1): 57-70.

Hanahan, D., Weinberg, R.A.2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144 (5): 646-74.
Harris J.R., Morrow, M., Banadonna, G. 1993. Cancer of the breast. *Principles and Practice of Oncology*. 4: 1264-1332.
Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, J.D. 2002. Flavonoid antioxidants. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
Hıkım, A.P.S., Wang, C., Leung, A.R., Swerdloff, R.S. 1995. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology,* 136: 2770-2775.
Hijova, E. 2006. Bioavailability of chalcones. *Bratislavske Lekarske Listy*, 107: 80-84.
Hodek, P., Trefıl, P., Stıborova, M. 2002. Flavonoids- Potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *J. Chemico-Biological Interactions*., 139: 1-21.
Holdenrieder, S., Stieber, P. 2004. Apoptotic markers in cancer. *Clinical Biochemistry*, 37: 605-617.
Hollstein, M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science,* 253: 49-53.
Horn, L., Lovly, C.M., Johnson, D.H. 2015. Neoplasms of the Lung. Editors: Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Jameson, J.L., Loscalzo, J. Harrison's Principles of Internal Medicine. 19th Edition ed. New York, McGraw-Hill Education, pp: 506-523.
Houghton, P., Fang, R., Techatanawat, I., Steventon, G., Hylands, P.J., Lee, C.C. 2007. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, 42: 377-387.
Hunter, A. M., LaCasse, E. C., Korneluk, R. G. 2007. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*, 12(9): 1543-1568.
Hussain, S.P, Harris, C.C. 2000. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogeneus carcinogens. *Mutation Research,* 462; 311–322.
Hüssaini, S.M. , Yedla, P. , Babu, K.S. , Shaik, T.B. , Chityal, G.K. , Kamal, A. 2016. 1, 2, 3-triazol bağlı pirazolin ve kalkon türevlerinin sentezi ve biyolojik değerlendirmesi. *Chem Biol Drug Des.,* 88 (1): 97-109.
İtil, O. 2000. Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi ve etyolojisi. Editör: Haydaroğlu, A. Akciğer kanserleri: Tanı ve tedavi. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, s. 15-34.
Jacobson, D.R. 1999. Ras mutations in lung cancer. Editors: Brambilla, C., Brambilla, E. Lung tumors fundamental biology and clinical management. New York, Marcel Dekker Inc, pp: 139-156.
Jovanovic, K.K., Gligorijevic, N., Gaur, R., Mishra, L., Radulovic, S. 2016. Anticancer activity of two ruthenium(II) -DMSO-chalcone complexes: Comparison of cytotoxic, pro-apoptotic and antimetastatic potential. *Journal of Buon*, 21(2): 482-490.
Juan, R., Claudia, A., Luis, V., Neira, G., Jose, D., Bianca, N., Michael, H., Radostina, G., Hans, B., Carsten, S., Klaus, J., Michael, L., Anja, R., 2010. New 4-Maleamic Acid and 4-Maleamide Peptidyl Chalcones as Potential Multitarget Drugs for Human Prostate Cancer. *Pharmaceutical Research,* 28(4): 907-919.
Kabir, Z., Bennett, K., Clancy, L. 2007. Lung cancer and urban air-pollution in Dublin: a temporal association? *Irish Medical Journal,* 100(2): 367-369.
Kamal, M., Shakya, K.A., Jawaid, T. 2011. Benzoforals: a New Profile Of Biological Activities. *International Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, 1(3).

Kandaş, Ö. 2004. Apoptozis, programlı hücre ölümü. *Ankara Üniversitesi dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, 5:1.

Keane, R.W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J.R., Krajewski, S., Reed, J.C., Dietrich, W. D. 2001. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *Journal of Neuropatholy and Experimental Neurology,* 60: 422-429.

Kefeli, U., Ustaalioğlu, B. B. Ö., Yıldırım, M. E., Erkol, B., Aydın, D., Şener, N.,.Açıkgöz, Ö.R. 2015. Akciğer kanserinde sağkalımı etkileyen klinikopatolojik özellikler. *Marmara Medical Journal*, 28(1): 21-26.

Kern, J.A., McLennan, G. 1998. Genetic and molecular changes of human lung cancer. Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders. Mc Graw-Hill Companies: New York, 2: 1695-9.

Khan, M.W., Alam, M.J., Rashid, M.A. and Chowdhury, R. 2005. A new Structural alternative in benzo [b] furans for antimicrobial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13: 4796-4805.

Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski|, M., Yuan, J., Kroemer, G. 2011. Cell death assays for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(3): 221-237.

Kibbelaar, R.E., Moolenaar, K.E., Michalides, R.J., Van Bodegom, P.C, Vanderschueren, R.G., Wagenaar, S.S., Dingemans, K.P., Bitter-Suermann, D., Dalesio, O., Van Zandwijk, N., Wolter J.M. 1991. Neural cell adhesion molecule expression, neuroendocrine differentiation, and prognosis in lung carcinoma. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology,* 27: 431–435.

Kim, B. T., Kwang-Joong, O., Chun, J. C., and Hwang, K. J. 2008. Synthesis of dihydroxylated chalcone derivatives with diverse substitution patterns and their radical scavenging ability toward DPPH free radicals. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 29:1125-1130.

Köktürk, N., Kırışoğlu, C.E ve Öztürk, C. 2003. Akciğer kanseri moleküler biyolojisi. *Eurasian Journal of Pulmonology,* 5(3): 127-138.

Kumar, A.D.B., Prakash, G.K., Kumaraswamy, M.N., Nandeshwarappa, B.P., Sherigara, B.S., Mahadevan, K.M., 2006. Microwave assisted facile synthesis of amino pyrimidines bearing benzofuran and investigation of their antimicrobial activity. *Indian Journal of Chermistry*, 45: 1699-1703.

Kumar, S., Bawa, S., Drabu, S., Kumar, R., Gupta, H. 2009. Biological activities of pyrazoline derivatives-a recent development. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 4: 154- 163.

Küçükaltun, S.S. 2007. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı'nda hava yolu epitel hücreleri, lenfosit, nötrofil ve makrofaj apoptozisi. *Uzmanlık tezi*, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Adana.

Kranenburg, O. 2005. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochimica et Biophysica Acta,* 1756: 81–82.

Lecture, G.F.F. 1996. Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. *Chest*, 109: 14-19.

Li, H., Fan, X., Houghton, J.M. 2007. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101: 805–815.

Li, J., Yuan, J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene,* 27: 6194-6206.

LoConte, N.K., Brewster, A.M., Kaur, J.S., Merrill, J.K., Alberg, A.J. 2018. Alcohol and cancer: a statement of the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology, 36*(1): 83-93.

Lomakina, G.Y, Modestoca, Y.A, Ugarova, N.N. 2015. Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry (Mosc),* 80(6): 701-713.
Longo-Sorbello, G.S.A, Saydam, G., Banerjee, D., Bertino, J.R. 2006. Cytotoxicity and cell growth assays. In "Cell biology: a laboratory handbook", Editor: Celis, J.E. Elseiver Academic Press, Burlington.
Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet,* 380: 2095-2128.
Lu, J., Ashwell, K.W., Waite, P. 2000. Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine*, 25: 1859-1866.
Lu, J.J., Dang, Y.Y., Huang, M., Xu, W.S., Chen, X.P., Wang, Y.T. 2012. Anti-cancer properties of terpenoids isolated from Rhizoma Curcumae–A review. *Journal of Ethnopharmacology,* 143(2): 406-411.
Lunardi, F., Guzela, M., Rodrigues, A.T., Correa, R., Eger-Mangrich, I., Steindel, M., Grisard, E.C., Assreuy, J., Calixto, J.B., Santos, A.R.S. 2003. Tripanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 47: 1449-1451.
Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Haber, D.A. 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non–small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine*, *350*(21): 2129-2139.
Mabry, M. 1998. Activating oncogenes in lung cancer: Biology of lung cancer. Editors: Kane, M.A., Bunn, P.A., Marcel Dekker Inc., New York, pp: 391-412.
Mahapatra, D.K., Bharti, S.K., Asati, V. 2015. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 98: 69-114.
Mao, S.W., Chen, H., Yu, L.F., Lv, F., Xing, Y.J., Liu, T., Xie, J., Tang, J., Yi, Z., Yang, F. 2016. Seçici antikanser olarak yeni Roman 3,4-seco safra asidi diamidleri çoğalma ve göç ajanları. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 122: 574-583.
Marquina, S., Maldonado-Santiago, M., Sánchez-Carranza, J.N., Antúnez-Mojica, M., González-Maya, L., Razo-Hernández, R.S., Alvarez, L. 2019. Design, synthesis and QSAR study of 2'-hydroxy-4'-alkoxy chalcone derivatives that exert cytotoxic activity by the mitochondrial apoptotic pathway. *Bioorganic&Medicinal Chemistry,* 27(1): 43-54.
McIlwain, D.R., Berger, T., Mak, T.W. 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5: 86-56.
Meiyanto, E., Hermawan, A., Anindyajati, A. 2012. Natural products for cancertargeted therapy: citrus flavonoids as potent chemopreventive agents. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention,* 13(2):427-436.
Messmer, U.K., Pfeilschifter, J. 2000. New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *BioEssays,* 22: 878-881.
Michalides, R.J.A.M. 1998. Deregulation of the cell cycle in lung cancer: Lung Biology in Health and Disease. Editors: Brambilla, C., Brambilla, E. MarcelDekker Inc., New York, pp: 211–225.
Mirabella, M., Giovanni, S.D., Silvestri, G., Tonali, P., Servidei, S. 2000. Apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies with mitochondrial DNA mutations: a potential pathogenic mechanism. *Brain,* 123: 93-104.
Mohamed, F. M., Mohamed, S. M., Shouman, A. S., Fathi, M. M., Abdelhamid, A. I. 2012. Synthesis and biological evaluation of a novel series of chalcones ıncorporated

pyrazole moiety as anticancer and antimicrobial agents. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* 168: 1153-1162.
Moll, U.M., Zaika, A. 2001. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 493: 65-9.
Monsuez, J.J., Charniot, J.C., Vignat, N., Artigou, J.Y. 2010. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *International journal of cardiology*, 144(1): 3-15.
Morton, J.P., Timpson, P., Karim, S.A., Ridgway, R.A., Athineos, D., Doyle, B. 2010. Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1): 246-251.
Motadi, L.R., Misso, N.L., Dlamini, Z., Bhoola, K.D. 2007. Molecular genetics and mechanisms of apoptosis in carcinomas of the lung and pleura: Therapeutic targets. *International Immunopharmacology,* 14: 1934–1947.
Mountain, C.F. 1997. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest*, 11: 1710.
Muller, P.A., Vousden, K.H. 2014. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell*, 25: 304-17.
Müsellim, B. 2007. Akciğer kanserinin epidemiyolojisi ve etiyolojisi. http://www.ctf.edu.tr/stek/pdfs/58/5809.pdf (Erişi Tarihi: 10.04.2018).
Myrdal, G., Gustafsson, G., Lambe, M., Horte, L.G., Stahle, E. 2001. Outcome after lung cancer surgery. Factors predicting early mortality and major morbidity. *Eurpean Journal of Cardiothoracic Surgery*, 20: 694-699.
Nakamura, K., Bossy-Wetzel, E., Burns, K., Fadel, M. P., Lozyk, M., Goping, S., Opas, M., Bleacly, R.C., Green, D.R., Michalak, M. 2000. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *The Journal of cell biology*, *150*: 731-740.
Nakhjavania, M., Zarghib, A., Shirazi, FH., 2014. Cytotoxicity of selected novel chalcone derivatives on human breast, lung and hepatic carcinoma cell lines. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research,* 13(3): 953-958.
Nikitovic, D., Kouvidi, K., Karamanos, N.K., Tzanakakis, G.N. 2013. The roles ofhyaluronan/RHAMM/CD44 and their respective interactions along the insidiouspathways of fibrosarcoma progression. *Biomedical Research International*, 2013: 929531.
Niles, A.L., Moravec, R.A., Hesselberth, P.E., Scurria, M.A., Daily, W.J., Riss, T.L. 2007. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Analytical Biochemistry,* 366: 197-206.
Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E. 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, 59(6): 365-378.
O'Brien, K.A.F, Smith, L.L, Cohen, G.M. 1987. Inability of A Human Lung Tumour Cell Line to Detect Chemically Induced Organ Toxicity to the Lung. *Toxicology in Vitro,* 1: 85-90.
Oliver, L., Vallette, F.M. 2005. The role of caspases in cell death and differentiation. *Drug Resistance Updates*, 8: 163-170.
Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.T., Zhou, T.T., Liu, B. Bao, J.K. 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45: 487-498.
Ozaki, T., Nakagawara, A. 2011. p53: The attractive tumor suppressor in the cancer research field. *Journal of Biomedicine and Biotechnology,* 1-13.

Öktem, S., Özhan, M.H., Özol, D. 2001. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2: 91-95.
Özdemir, A., Altıntop, M.D., Sever, B., Gençer, H.K., Kapkaç, H.A, Atlı, Ö., Baysal, M. 2017. A new series of pyrrole-based chalcones: synthesis and evaluation of antimicrobial activity, cytotoxicity, and genotoxicity. *Molecules*, 30: 22(12.).
Özen, M., Pepedil, F., Cengiz, M., Kılıçkap, S., Aksoy, S., Türker, A., Kars, A. 2012. Otuzbeş yaş altı genç hastalarda akciğer kanseri: tek merkez deneyimi. *Acta Oncologica Turcica, 45*(1): 1-4.
Özlü, T., Bülbül, Y. 2005. Sigara ve akciğer kanseri. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 53(2):200-209.
Özsu, S., Özlü T. 2013. Türkiye'de Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi. Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi, 1 (3): 7-11.
Palmarini, M., Fan, H. 2001. Retrovirus-induced ovine pulmonary adenocarcinoma, an animal model for lung cancer. *Journal of the National Cancer Institue*, 93: 1603-1614.
Palmer, A.M., Greengrass, P.M., Cavalla, D. 2000. The role of mitochondria in apoptosis. *Drug news & Perspectives*, 13: 378-384.
Pearson, F.G. 2002. Lung cancer. Editors: Pearson, F.G., Cooper, J.D., Deslauriers J., Ginsberg, R.J., Hiebert, C., Patterson, G.A., Urschel, H.C., Thoracic Surgery, 2nd edition, Churchill Livingstone, Philadelphia, pp: 772-924.
Polat, B.E. , Lin, S. , Mendenhall, J.D. , VanVeller, B. , Langer, R. , Blankschtein, D. 2011. An Experimental and molecular dynamics investigation into the amphiphilic nature of sulforhodamine B. *The Journal of Physical Chemistry B,* 115(6): 1394–1402.
Poste, G., Fidler, I.J. 1980. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, 283: 139-146.
Prives, C. 1998. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell*, 95: 1437–1443.
Radzikowska, E., Głaz, P., Roszkowski, K. 2002. Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival. Population-based study of 20 561 cases. *Annals of oncology, 13*: 1087-1093.
Ramos, S. 2007. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(7), 427-442.
Rao, R.V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L.M., Ellerby, H. M., Bredesen, D.E. 2001. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program mechanism of caspase activation. *Journal of Biological Chemistry*, *276*: 33869-33874.
Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(4): 519-534.
Riedl, S.J., Salvesen, G.S. 2007. The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biol*ogy, 8: 405-413.
Riss, T.L., Moravec, R.A. 2004. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies*, 2: 51- 62.
Riss, T.L., Moravec, R.A. 2006. Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. In "Cell Biology". Editors: Celis, J.E. Elseiver Academic Press, Burlington.
Riss, T.L., Moravec, R.A., O'brien, M.A., Hawkins, E.M., Niles, A. 2006. Homogeneous multiwell assays for measuring cell viability, cytotoxicity, and apoptosis.

In “Handbook Of Assay Development In Drug Discovery”. Editors: Minor, L.K. CRC Press, Florida, USA.

Rodenhuis, S., Van De Wetering, M.L., Mooi, W.J., Evers, S.G., Van Zandwijk, N., Bos, J.L. 1987. Mutational activation of the K-RAS oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *The New England Journal of Medicine*, 317: 929-935.

Roemer K. 1999. Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biological Chemistry*, 380: 879-87.

Rossi, M., Lugo, A., Lagiou, P., Zucchetto, A., Polesel, J., Serraino, D., Negri, E., Trichopoulos, D., La Vecchia, C. 2012. Proanthocyanidins and other flavonoids in relation to pancreatic cancer: a case-control study in Italy. *Annals of Oncology,* 23(6): 1488-93.

Ruano-Ravina, A., Figueiras, A., Barros-Dios, J.M. 2003. Lung cancer and related risk factors: an update of the literature. *Public Health*, 117: 149-156.

Rybka, M., Mercader, G.A., Castro, A.E. 2014. Predictive Qsar study of chalcone derivatives cytotoxicity activity against HT-29 human colon adenocarcinoma cell lines. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 132: 18-29.

Sak, K., Everaus, H. 2015. Role of flavonoids in future anticancer therapy byeliminating the cancer stem cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 10(3): 271-282.

Salvesen, G.S., Duckett, C.S. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Reviews*, 3: 401–410.

Sandal, T. 2002. Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *The Oncologist,* 7: 73-81.

Saraste, A., Pulkki, K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*earch, 45(3): 528-37.

Sato, T., Irie, S., Krajewski, S., Reed, J.C. 1994. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the rat Bcl2 protein. *Gene*, 140: 291-292.

Schottenfeld, D. 2000. Etiology and epidemiology of lung cancer. Editors: Pass, H., Mitchell, J., Johnson, D., Turrisi, A., Minna, J. Lung Cancer, Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2. Baskı, pp: 367-388.

Selwood, K. 2009. Side effects of chemotherapy. Cancer in children and young people. *Acute Nursing Care,* 35-71.

Sezgin, C. 2010. Kanserde bitkilerle tedavide örnek uygulamalar. Bitkilerle Tedavi Sempozyumu, 5-6 Haziran 2010, Zeytinburnu, İstanbul.

Sghaiera, M.B., Skandrani, I., Nasra, N., Francac, M.G.D., Chekir-Ghediraa, L., Ghediraa, K. 2011. Flavonoids and sesquiterpenes from Tecurium ramosissimum promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *AAPS,* 32: 336–348.

Shaaban, M.R., Mayhoub, A.S., Farag, A.M. 2012. Recent advances in the therapeutic applications of pyrazolines. *Expert Opinion on Therapeutic. Patents,* 22: 253-291.

Shapiro, C. L., ve Recht, A. 2001. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 344(26): 1997-2008.

Sharma, V., Chaudhary, A., Arora, S., Saxena, A.K., Ishar, M.P. 2013. β- Ionone derived chalcones as potent antiproliferative agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 69: 310-315.

Shields, T. W. 2000. Carcinoma of the lung: General Thoracic Surgery. Editors: Shields, T.W., Locicero, J., Ponn, R.B. Lippincott Williams and Wilkins Comp., Philadelphia, pp: 1215-1442.

Shigematsu, H., Takahashi, T., Nomura, M., Majmudar, K., Suzuki, M., Lee, H., Wistuba, I., Fong, K., Toyooka, S., Shimizu, N., Fujisawa, T., Minna, J.D, Gazdar, A.F. 2005. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Research,* 65(5): 1642-6.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. 2015. Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians,* 65(1): 5-29.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. 2017. Cancer statistics, 2017. *CA :A Cancer Journal for Clinicians, 67*: 7-30.

Sigerist, H.E. 1960. The historical development of the pathology and therapy of cancer. Editors: Marti-Ibanez F. On the history of medicine. New York, MD Publications Inc., pp: 59-65.

Smith, T.J., Yang, G.Y., Seril, D.N., Liao, J., Kim, S. 1998. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis*, 19: 703-706.

Solakoğlu Z. 2009. Apoptoz varlığı ya da yokluğu. Bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim Dergisi,* 22: 20-25.

Spencer, S., Cataldo, N.A., Jaffe, R.B. 1996. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 5: 314- 323.

Spierings, D.C., **de Vries, E.G**., **Vellenga, E**., **van den Heuve,l F.A**., **Koornstra, J.J**., **Wesseling, J**., **Hollema, H**., **de Jong, S. 2004.** Tissue distribution of the death ligand TRAİL and its receptors. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry,* 52: 821-831.

Spiro, S.G., Porter, J.C. 2002. Lung cancer-Where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *American Journal of Respiratory and Critical Care Med*icine, 166: 1166-1196.

Spivack, S.D., Fasco, M.J., Walker, V.E., Kaminsky, L.S. 1997. The molecular epidemiology of lung cancer. *Critical Reviews Toxicology,* 27: 319-365.

Stratton, M.R., Campbell, P.J., Futreal, P.A. 2009. The cancer genome. *Nature,* 458: 719–724.

Suh, Y. 2002. Cell signaling in aging and apoptosis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123: 881-890.

Sulu, E., Damadoğlu, E., Nergiz S., Ertuğrul. M., Saltürk C., Karabey, Ö.E, Yılmaz, A. 2007. Primer akciğer kanserinde tümör tipi ve cinsiyet dağılımı değişiyor mu? 2004 yılı sonuçlarının daha önceki yıllar ile karşılaştırılması. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi, 55*(1): 148.

Syam, S., Abdelwahab, SI., Al-Mamary, MA., Mohan, S., 2012. Synthesis of chalcones with anticancer activities. *Molecules,* 17: 6179-6195.

Taşkın, M. 2016. Benzofuran sübstitüe kalkonların sentezi. *Yüksek Lisans Tezi,* Adıyaman Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Adıyaman.

Testa, U., Castelli, G., Pelosi, E. 2018. Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel), 10*(8).

Thomas, L., Doyle, L. A., Edelman, M. J. 2005. Lung cancer in women: emerging differences in epidemiology, biology, and therapy. *Chest,* 128(1): 370-381.

Thun, M.J., Hannan, L.M., Adams-Campbell, L.L., Boffetta, P., Buring, J.E., Feskanich, D., Flanders, W.D., Jee, S.H., Katanoda, K., Kolonel, L.N., Lee, I.M.,

Marugame, T., Palmer, J.R., Riboli, E., Sobue, T., Avila-Tang, E., Wilkens, L.R., Samet, J.M. 2008. Lung Cancer Occurrence in Never-Smokers: An Analysis of 13 Cohorts and 22 Cancer Registry Studies. *PLoS Medicine*, 5(9): 185.

Torre, L. A., Trabert, B., DeSantis, C. E., Miller, K. D., Samimi, G., Runowicz, C. D., Siegel, R. L. 2018. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68: 284-296.

Tozkoparan, B., Aytaç, S.P. 2007. Kanser kemoterapisinde terapötik hedef olarak glutatyon s-transferazlar. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 27: 139-164.

Travis, W.D., Lubin, J., Ries, I., Devesa, S. 1996. United States lung carcinoma incidence trends: Declining for most histologic types among males, increasing among females. *Cancer,* 77: 2464-70.

Travis, W.D. 2011. Pathology of Lung Cancer. *Clinics in Chest Medicine,* 32: 669–692.

Tseng, C.H. , Chen, Y.L. , Hsu, C.Y. , Chen, T.C. , Cheng, C.M. , Tso, H.C. , Lu, Y.J. , Tzeng, C.C. 2013. Synthesis and antiproliferative evaluation of 3-phenylquinolinylchalcone derivatives against non-small cell lung cancers and breast cancers. *European Journal of Medicinal Chemistry,* 59: 274-82.

Tuncer, A.M. 2009. Kanserin Ülkemiz ve Dünyadaki Önemi, Hastalık Yükü ve Kanser Kontrol Politikaları. Türkiye'de Kanser Kontrolü, Ankara, T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı, s. 3-108.

Tuncer, S., Demirci, M. 2011. Materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniv. Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 141-149.

Ulukaya, E. 2001. Akciğer kanserleri, tanı ve tedavide temel ilkeler ve uygulamalar: hücre siklusu ve apoptozis. Editörler: Engin, K., Özyardımcı, N., Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul, Bölüm III.

Ulukaya, E. 2003. Apoptozis ders notları. http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf (Erişim tarihi:12.05.2019).

Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Yilmaztepe-Oral, A., Demirci, M. 2008. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology In Vitro*, 22: 232-239.

Ulukaya, E. 2010. Hücre siklusu ve apoptozis: Akciğer Kanserleri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar, İstanbul. http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf (Erişim tarihi: 12.09.2019).

Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. 2011. Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochemistry and Function*, 29: 468-480.

Vousden, K.H., Lu, X. 2002. Live or let die: the cells response to p53. *Nature Reviews Cancer*; 2: 594-604.

Wang, L., Lee, I.M., Zhang, S.M., Blumberg, J.B., Buring, J.E., Sesso, H.D. 2009. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *The American Journal of Clinical Nutrition,* 89(3): 905–912.

Wani, Z.A., Guru, S.K., Rao, A.V., Sharma, S., Mahajan, G., Behl, A., Kumar, A., Sharma, P.R., Kamal, A., Bhushan, S., 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.

Wei, L.P., Li, N., Wang, G., Su, K., Li, F., Chang, S., Tan, F.W., Lyu, Z.Y., Feng, X.S., Li, X., Chen, Y.H., Chen, H.D., Chen, S.H., Ren, J.S., Shi, J.F., Cui, H., Wu,

S.L., Dai, M., He, J. 2018. Alcohol consumption and the risk of lung cancer in males: a prospective cohort study. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi= Zhonghua liuxingbingxue zazhi,* 39: 909-913.
Wei, Q., Spitz, M.R. 1997. The role of DNA repair capacity in susceptibility to lung cancer: a review. *Cancer Metastasis Reviews*, 16(3-4): 295-307.
Weinberg, R.A. 2006. The biology of cancer. Garland Science, New York, USA, 960 pp. http://www.nhri.org.tw/NHRI_ADM/userfiles/file/1010510.pdf.
Wisnivesky, J.P., Halm, E. A. 2007. Sex differences in lung cancer survival: do tumors behave differently in elderly women? *Journal of clinical oncology, 25*: 1705-1712.
Witz, I.P., Levy-Nissenbaum, O. 2006. The tumor microenvironmet in post-PAGET era. *Cancer Letters*, 242: 1-10.
Wong, R.S. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1): 1.
Wyllie, A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature,* 284(5756): 555-556.
Xu, S., Chen, M., Chen, W., Hui, J., Ji, J., Hu, S., Zhou, J., Wang, Y., Liang, G. 2015. Chemopreventive effect of chalcone derivative, L2H17, in colon cancer development. *BMC Cancer*, 15: 870.
Yılmaz, E., Altunok, V. 2011. Kanser ve p53 geni. *Avkae,* 1:19-23.
Yılmaz, İ., 2005. Erişkin ratlarda deneysel varikosel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi. *Doktora tezi,* Taksim E.A. Hast., Üroloji Kliniği, İstanbul.
Yokota, J. 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis,* 21(3): 497-503.
Yokota, J., Kohno, T. 2004. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Science,* 95(3): 197-204.
Yusuf, M., Jain, P. 2014. Synthetic and biological studies of pyrazolines and related heterocyclic compounds. *Arabian Journal of Chemistry,* 7: 553-596.
Zeiss, C.J. 2003. The apoptosis-Necrosis Continuum: Insights From Genetically Altered Mice. *Veterinary Pathology*, 40: 481–495.
Zhang, H., Liu, J.J., Sun, J., Yang, XH., Zhao, TT., Lu, X. 2012. Design, synthesis and biological evaluation of novel chalconederivatives as antitubulin agents. *Bioorganic& Medicinal Chemistry,* 20(10): 3212-8.
Zhang, J.H., Zhang, Y., Herman, B. 2003. Caspases, apoptosis and aging. *Ageing Research Reviews*, 2: 357-366.
Zhou, H.Y., Dong, F.Q., Du, X.L., Zhou, Z.K., Huo, İ.K., Wang, W.H., Zhan, H.D., Dai, Y.F., Meng, J., Sui, Y.P. 2016. Biscoumarin ve dihidropiran türevlerinin antitümör aktiviteleri. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters,* 26: 3876-3880.
Zhu, M., Wang, J., Xie, J., Chen, L., Wei, X., Jiang, X., Bao, M., Qiu, Y., Chen, Q., Li, W., Jiang, C., Zhou, X., Jiang, L., Qiu, P., Wu, J. 2018. Design, synthesis, and evaluation of chalcone analogues incorporate α,β-Unsaturated ketone functionality as anti-lung cancer agents via evoking ROS to induce pyroptosis. *European Journal of Medicinal Chemistry,* 5(157): 1395-1405.
Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R. 2001. The machinery of programmed. *Pharmacology& Therapeutics,* 92(1): 57-70.
Zucco, F., Angelis, D.I., Stammati, A., 1998. Cellular Models for In Vitro Toxicity Testing. *Animal Cell Culture Technique*, 395-422.