

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**YENİ İNDOL-ARTESUNAT HİBRİT MOLEKÜLLERİNİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN VE FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN KAPSAMLI
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Doğan ÇETİN
Danışman: Prof. Dr. Metin KONUŞ

VAN – 2025

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**YENİ İNDOL-ARTESUNAT HİBRİT MOLEKÜLLERİNİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN VE FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN KAPSAMLI
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Doğan ÇETİN

Tez Savunma Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Abdulahad DOĞAN (Başkan)

Prof. Dr. Metin KONUŞ (Danışman)

Prof. Dr. Şevki ARSLAN (Üye)

Prof. Dr. Arif KIVRAK (Üye)

Doç. Dr. Can YILMAZ (Üye)

Bu çalışma Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FDK-
2022-9846 No'lu proje ile desteklenmiştir.

VAN – 2025

KABUL VE ONAY SAYFASI

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Metin KONUŞ danışmanlığında, Doğan ÇETİN tarafından sunulan “Yeni İndol-Artesunat Hibrit Moleküllerinin Biyolojik Aktivitelerinin ve Farmakolojik Özelliklerinin Kapsamlı Araştırılması” başlıklı bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 09/05/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Abdulahad DOĞAN

İmza:

Üye: Prof. Dr. Metin KONUŞ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Şevki ARSLAN

İmza:

Üye: Prof. Dr. Arif KIVRAK

İmza:

Üye: Doç. Dr. Can YILMAZ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun /.... /..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

.....

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

İmza

Doğan ÇETİN



ÖZET

YENİ İNDOL-ARTESUNAT HİBRİT MOLEKÜLLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN VE FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN KAPSAMLI ARAŞTIRILMASI

ÇETİN, Doğan

Doktora Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Metin KONUŞ

Mayıs 2025, 193 sayfa

Tüm dünyada en önemli ölüm nedenlerinden biri olan kanser hastalığının vakaları dünya çapında sürekli olarak artmaktadır. Bu sebeple kanser tedavisi için güçlü farmasötiklerin geliştirilmesine olan ihtiyaç da artmaktadır.

Bu çalışmada, indol halkası ve artesunat maddesinin birleştirilmesiyle elde edilen 11 adet indol-artesunat hibrit molekülünün biyolojik ve farmakolojik özellikleri kapsamlı bir şekilde araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda bileşiklerin antioksidan potansiyelleri beş farklı yöntemle (DPPH, ABTS, Galvinoksil, Fosfomolibden ve FRAP) test edildi. Bileşiklerin farklı kanser hücre hatlarında ve sağlıklı bir hücre hattındaki sitotoksik özellikleri MTT yöntemiyle belirlendi. Sitotoksik potansiyelleri belirlenen bileşiklerin, kanser hücreleri üzerindeki koloni oluşturma ve invazyon kapasiteleri, yara iyileştirme potansiyelleri ve apoptotik etkileri ile apoptotik yolaktaki genlerin mRNA ifadesin üzerindeki etkileri araştırıldı.

Çalışmanın sonucunda, fosfomolibden yöntemi hariç diğer antioksidan kapasite yöntemlerinde bileşiklerin antioksidan kapasite tespit edilmedi. MTT yöntemiyle sitotoksik özellikleri test edilen bileşiklerin sekizinin çeşitli hücre hatlarında etkili olduğu tespit edildi. Ishikawa hücre hattında D1 ve D6 bileşiklerinin EC₅₀ değerleri (20.22 µM ve 22.90 µM) pozitif kontrol olarak kullanılan paklitaksel maddesinin EC₅₀ değerine (19.3 µM) oldukça yakın değerdedi. HepG2 hücre hattında, D1 ve D2 bileşiklerinin EC₅₀ değerleri (5.43 µM, 5.63 µM) pozitif kontrol olarak kullanılan paklitaksel maddesinin EC₅₀ değerine (4.5 µM) oldukça yakın ve D3 bileşiği (2.75 µM) pozitif kontrolden daha iyi aktivite sergiledi. Koloni oluşturma potansiyelleri test edilen bileşiklerin; kontrol grubuna göre genel olarak %90'dan daha fazla koloni oluşumunu engellediği tespit edildi. İnvazyon özellikleri araştırılan D1 ve D2 bileşiklerinin HepG2, Ht-29 ve Panc-1 kanser hücre hatlarında invazyonu belirgin düzeyde inhibe ettiği tespit edildi. Yara iyileştirme yönteminde test edilen tüm maddelerin kontrol grubuna göre hücre göçünü engellediği görüldü. Hem Annexin-V/PI yöntemiyle hemde apoptotik yolaktaki genlerin mRNA ifadelerinin Real-Time PCR ile analizi sonucunda bileşiklerin apoptozu indüklediği tespit edildi.

Tüm bu sonuçlara bakıldığında, bu çalışmada kullanılan bir yada birden fazla bileşiğin daha ileri çalışmalarla kanser ilacı olma potansiyeli bulunmaktadır. Bu yüzden çalışmada kullanılan bileşiklerin *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda detaylı analizleri yapılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Antioksidan, Apoptoz, Artemisinin, Artesunat, İndol, Kanser



ABSTRACT

COMPREHENSIVE INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF NEW INDOLE-ARTESUNATE HYBRID MOLECULES

ÇETİN, Doğan

Ph.D. Thesis, Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Metin KONUŞ

May 2025, 193 pages

Cancer is one of the leading causes of death worldwide and its incidence is increasing worldwide. Therefore, the need for the development of powerful pharmaceuticals for cancer treatment is also increasing.

In this study, it was aimed to comprehensively investigate the biological and pharmacological properties of 11 indole-artesunate hybrid molecules obtained by combining the indole ring and artesunate substance. In this direction, the antioxidant potentials of the compounds were tested with five different methods (DPPH, ABTS, Galvinoxyl, Phosphomolybdenum and FRAP). The cytotoxic properties of the compounds in different cancer cell lines and a healthy cell line were determined by the MTT method. The colony formation and invasion capacities, wound healing potentials and apoptotic effects of the compounds with determined cytotoxic potentials on cancer cells and their effects on mRNA expression of genes in the apoptotic pathway were investigated.

As a result of the study, antioxidant capacities of compounds were not determined in other antioxidant capacity methods except phosphomolybdenum method. It was determined that eight of the compounds whose cytotoxic properties were tested with MTT method were effective in various cell lines. In Ishikawa cell line, EC₅₀ values of D1 and D6 compounds (20.22 µM and 22.90 µM) were very close to EC₅₀ value of paclitaxel substance (19.3 µM) used as positive control. In HepG2 cell line, EC₅₀ values of D1 and D2 compounds (5.43 µM, 5.63 µM) were very close to EC₅₀ value of paclitaxel substance (4.5 µM) used as positive control and D3 compound (2.75 µM) exhibited better activity than positive control. Colony formation potentials of compounds tested; It was determined that it generally prevented colony formation by more than 90% compared to the control group. It was tested that D1 and D2 compounds, whose invasion properties were investigated, significantly inhibited invasion in HepG2, Ht-29 and Panc-1 cancer cell lines. It was seen that all substances tested in the wound healing method inhibited cell migration compared to the control group. It was determined that the compounds induced apoptosis as a result of both the Annexin-V/PI method and the analysis of mRNA expressions of genes in the apoptotic pathway with Real-Time PCR.

Considering all these results, one or more compounds used in this study have the potential to become cancer drugs with further studies. Therefore, detailed analyses of the compounds used in the study should be performed in in vitro and in vivo applications.

Keywords: Antioxidant, Apoptosis, Artemisinin, Artesunate, Cancer, Indole



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında, her türlü ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Metin KONUŞ'a teşekkür ederim.

Hem yüksek lisans hem de doktora eğitimim boyunca manevi desteğinden dolayı Doç. Dr. Can YILMAZ'a, tezime bilimsel katkılarını esirgemeyen değerli doktora tez savunma jüri başkanı Prof. Dr. Abdulahad DOĞAN'a, sağladığı hücre kültürü laboratuvar imkanı için Prof. Dr. Şevki ARSLAN'a, bu tez çalışmasında test edilen bileşiklerin sentezini ve teminini sağlayan Prof. Dr. Arif KIVRAK ve Dr. Emrah KAVAK'a, maddi ve manevi desteğini esirgemeyip her zaman yanımda olan değerli aileme teşekkürü borç bilirim.

İlgileri, anlayışları ve manevi destekleriyle bana eğlenceli bir çalışma ortamı oluşturan Dr. Doğukan MUTLU, Amine Hafis ABDELSALAM, Hale Ayşe KARAMAN, Behiye Nur AKSOY, Shayesteh POORHOSEİN, Kübra KOCABIYIK ve Ayşenur TAŞDELEN'e ayrıca tez çalışmamda deneyleri dikkatle takip eden laboratuvarın çalışan stajyerleri İpek Su DEDE, Özge ÖZKAN, Sude Pınar HARKCI, Zehra KÖSE ve Elifnaz MEŞHUR'a teşekkür etmek isterim.

Bu çalışmayı FDK-2022-9846 No'lu proje ile destekleyen Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına (BAPB) ve 2211-Yurt İçi Doktora Bursu için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkürlerimi sunarım.

2025

Doğan ÇETİN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xix
EKLER DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Kanser.....	3
1.2 Hüresel Ölüm Süreçleri	7
1.2.1 Apoptoz.....	7
1.2.1.1 Apoptozun İçsel Yolu	9
1.2.1.2 Apoptozun Dışsal Yolu.....	10
1.2.2 Nekroz.....	11
1.3 Heterosiklik Bileşikler.....	13
1.3.1 İndoller.....	15
1.3.2 Artemisinin.....	17
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	21
2.1 Çalışmanın Amacı ve Önemi	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1 Materyal.....	25
3.2 Yöntem	29
3.2.1 DPPH Yöntemi	29
3.2.2 ABTS Yöntemi	30
3.2.3 Galvinoksil Yöntemi	30
3.2.4 Fosfomolibden Yöntemi	31
3.2.5 FRAP (Fe ³⁺ İyonu İndirgeme Gücü) Yöntemi	31
3.2.6 Hücre Kültürü	32
3.2.7 MTT Testi	33
3.2.8 Koloni Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi	33
3.2.9 İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi.....	34
3.2.10 Wound-Healing (Yara-İyileşme) Yöntemi ile Migrasyon Etkisinin Belirlenmesi	35
3.2.11 Apoptozun Belirlenmesi	35

3.2.12 Apoptozda Görev Alan Genlerin mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Belirlenmesi	36
3.2.12.1 Total RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini.....	36
3.2.12.2 Agaroz Jel Elektroforezi	37
3.2.12.3 cDNA Sentezi	38
3.2.12.4 Gerçek Zamanlı PZR Analizi	38
3.2.13 İstatistiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR Ve TARTIŞMA.....	41
4.1 Antioksidan Kapasite Sonuçları	41
4.1.1 DPPH Yöntemi	41
4.1.2 ABTS Yöntemi	45
4.1.3 Galvinoxil Yöntemi	49
4.1.4 Fosfomolibden Yöntemi	51
4.1.5 FRAP (Fe ³⁺ İyonu İndirgeme Gücü) Yöntemi	57
4.2 MTT Testi.....	61
4.2.1 Ishikawa	61
4.2.2 HepG2	62
4.2.3 HT-29.....	63
4.2.4 MDA-MB-231	64
4.2.5 Panc-1.....	65
4.2.6 HUVEC	66
4.3 Koloni Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi.....	69
4.3.1 Ishikawa	70
4.3.2 HepG2	71
4.3.3 HT-29.....	73
4.3.4 MDA-MB-231	74
4.3.5 Panc-1.....	76
4.4 İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi	78
4.4.1 HepG2	79
4.4.2 HT-29.....	80
4.4.3 Panc-1.....	80
4.5 Wound-Healing (Yara-İyileşme) Yöntemi ile Migrasyon Etkisinin Belirlenmesi.....	82
4.5.1 Ishikawa	83
4.5.2 HepG2	85
4.5.3 HT-29.....	87
4.5.4 MDA-MB-231	89
4.5.5 Panc-1.....	91
4.6 Apoptozun Belirlenmesi.....	95
4.6.1 Flow Sitometride Annexin-V/PI Yöntemi ile Apoptozun Belirlenmesi.....	95

4.6.1.1	Ishikawa.....	96
4.6.1.2	HepG2.....	97
4.6.1.3	HT-29.....	98
4.6.1.4	MDA-MB-231	99
4.6.1.5	Panc-1	100
4.6.2	Agaroz Jel Elektroforezi ile Total RNA'nın Görüntülenmesi	102
4.6.3	Apoptozda Görev Alan Genlerin Real-Time PCR ile Analizi	105
4.6.3.1	Ishikawa.....	105
4.6.3.2	HepG2.....	106
4.6.3.3	HT-29.....	108
4.6.3.4	MDA-MB-231	109
4.6.3.5	Panc-1	110
5.	SONUÇ.....	115
	KAYNAKLAR.....	119
	EKLER	131
	ÖZ GEÇMİŞ.....	191

ÇİZELGELER LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Tezde kullanılan kimyasalların marka ve kodları	25
Çizelge 3.2 Tezde kullanılan maddeler	26
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan ileri (F) ve geri (R) primer diziler.....	39
Çizelge 4.1 Ishikawa hücre hattında hesaplanan EC ₅₀ değerleri.....	62
Çizelge 4.2 HepG2 hücre hattında hesaplanan EC ₅₀ değerleri.....	63
Çizelge 4.3 HT-29 hücre hattında hesaplanan EC ₅₀ değerleri.....	64
Çizelge 4.4 MDA-MB-231 hücre hattında hesaplanan EC ₅₀ değerleri	65
Çizelge 4.5 Panc-1 hücre hattında hesaplanan EC ₅₀ değerleri	66
Çizelge 4.6 HUVEC hücre hattında hesaplanan EC ₅₀ değerleri.....	67
Çizelge 4.7 Test edilen bileşiklerini yapıları	67
Çizelge 4.8 Yara iyileştirme yöntemiyle migrasyon özellikleri test edilen bileşiklerin Ishikawa, HepG2, MDA-MB-231, HT-29 ve Panc-1 hücre hatlarında kontrol gruplarına göre yara kapatma yüzdeleri (%)	93
Çizelge 4.9 Annexin-V/PI yöntemiyle apoptotik özellikleri test edilen bileşiklerin Ishikawa, HepG2, MDA-MB-231, HT-29 ve Panc-1 hücre hatlarında kontrol gruplarına göre apoptotik yüzdeleri(%)	101



ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 2020 yılında Türkiye ve Dünyada tahmini kanser vaka ve ölüm oranları (Anonim, 2023a).....	1
Şekil 1.2 Ökaryotik hücre döngüsünün ve düzenlenmesinin düzenlenmesi (El-Aouar Filho vd., 2017).....	4
Şekil 1.3 Kanser in ayırt edici bazı özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011)	6
Şekil 1.4 Apoptozun içsel ve dışsal yolları (Bhosale vd., 2020)	10
Şekil 1.5 Nekrotik hücre ölümü (Nirmala ve Lopus, 2020)	12
Şekil 1.6 Heteroatom ve halka boyutuna göre çeşitli heterosiklik bileşikler	14
Şekil 1.7 Çeşitli indol içrikli doğal bileşikler ve ilaçlar	16
Şekil 1.8 Artemisinin ve türevleri	18
Şekil 1.9 Artemisinin etki mekanizmasının bir modeli (Yang vd., 2020).....	19
Şekil 4.1 DPPH yönteminde askorbik asidin standart eğrisi	42
Şekil 4.2 DPPH yönteminde troloksun standart eğrisi	42
Şekil 4.3 DPPH yönteminde D1, D2, D3 ve D4 maddelerinin standart eğrileri	43
Şekil 4.4 DPPH yönteminde D5, D6, D7 ve D8 maddelerinin standart eğrileri	43
Şekil 4.5 DPPH yönteminde D9, D10 ve D11 maddelerinin standart eğrileri	44
Şekil 4.6 DPPH testinde troloks ve test maddesinin mikro plakadaki görüntüsü	45
Şekil 4.7 ABTS yönteminde askorbik asidin standart eğrisi	46
Şekil 4.8 ABTS yönteminde troloksun standart eğrisi	46
Şekil 4.9 ABTS yönteminde D1, D2, D3 ve D4 maddelerinin standart eğrileri	47
Şekil 4.10 ABTS yönteminde D5, D6, D7 ve D8 maddelerinin standart eğrileri	47
Şekil 4.11 ABTS yönteminde D9, D10 ve D11 maddelerinin standart eğrileri	48
Şekil 4.12 Galvinoxil yönteminde askorbik asidin standart eğrisi.....	49
Şekil 4.13 Galvinoxil yönteminde troloksun standart eğrisi.....	49
Şekil 4.14 Galvinoxil yönteminde D1, D2, D3 ve D4 maddelerinin standart eğrileri...50	
Şekil 4.15 Galvinoxil yönteminde D5, D6, D7 ve D8 maddelerinin standart eğrileri...50	
Şekil 4.16 Galvinoxil yönteminde D5, D6, D7 ve D8 maddelerinin standart eğrileri...51	
Şekil 4.17 Fosfomolibden yönteminde askorbik asidin standart eğrisi	52
Şekil 4.18 Fosfomolibden yönteminde troloksun standart eğrisi	52

Şekil 4.19 Fosfomolibden yönteminde D1, D2, D3 ve D4 maddelerinin standart eğrileri.....	53
Şekil 4.20 Fosfomolibden yönteminde D5, D6, D7 ve D8 maddelerinin standart eğrileri.....	53
Şekil 4.21 Fosfomolibden yönteminde D9, D10 ve D11 maddelerinin standart eğrileri.....	54
Şekil 4.22 Fosfomolibden yönteminde troloks ve test maddesinin mikro plakadaki görüntüsü	54
Şekil 4.23 Fosfomolibden yönteminde test edilen bileşiklerin askorbik asit ve troloks standartlarıyla oransal olarak kıyaslanması	55
Şekil 4.24 FRAP yönteminde askorbik asidin standart eğrisi	57
Şekil 4.25 FRAP yönteminde troloksun standart eğrisi	57
Şekil 4.26 FRAP yönteminde D1, D2, D3 ve D4 maddelerinin standart eğrileri	58
Şekil 4.27 FRAP yönteminde D5, D6, D7 ve D8 maddelerinin standart eğrileri	58
Şekil 4.28 FRAP yönteminde D9, D10ve D11 maddelerinin standart eğrileri	59
Şekil 4.29 Test edilen bileşiklerin Ishikawa hücre hattında koloni oluşumuna etkisinin 6 kuyulu plaka kuyucuğunda görüntülenmesi	70
Şekil 4.30 Bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra koloni oluşumunun yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	71
Şekil 4.31 Test edilen bileşiklerin HepG2 hücre hattında koloni oluşumuna etkisinin 6 kuyulu plaka kuyucuğunda görüntülenmesi	72
Şekil 4.32 Bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra koloni oluşumunun yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	72
Şekil 4.33 Test edilen bileşiklerin HT-29 hücre hattında koloni oluşumuna etkisinin 6 kuyulu plaka kuyucuğunda görüntülenmesi	73
Şekil 4.34 Bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra koloni oluşumunun yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	74
Şekil 4.35 Test edilen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattında koloni oluşumuna etkisinin 6 kuyulu plaka kuyucuğunda görüntülenmesi	75

Şekil 4.36 Bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra koloni oluşumunun yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	76
Şekil 4.37 Test edilen bileşiklerin Panc-1 hücre hattında koloni oluşumuna etkisinin 6 kuyulu plaka kuyucuğunda görüntülenmesi	77
Şekil 4.38 Bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra koloni oluşumunun yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	77
Şekil 4.39 D1 ve D2 maddelerinin HepG2 hücre hattının invazyon kapasitesine etkisinin görüntülenmesi (a) ve yüzde sütun grafiği (b). *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	79
Şekil 4.40 D1 ve D2 maddelerinin HT-29 hücre hattının invazyon kapasitesine etkisinin görüntülenmesi (a) ve yüzde sütun grafiği (b). *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	80
Şekil 4.41 D1 ve D2 maddelerinin Panc-1 hücre hattının invazyon kapasitesine etkisinin görüntülenmesi (a) ve yüzde sütun grafiği (b). *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	81
Şekil 4.42 Test edilen bileşiklerin Ishikawa hücre hattındaki migrasyon etkilerinin görüntülenmesi	84
Şekil 4.43 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra Ishikawa hücre hattının migrasyonuna etkilerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	85
Şekil 4.44 Test edilen bileşiklerin HepG2 hücre hattındaki migrasyon etkilerinin görüntülenmesi	86
Şekil 4.45 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra HepG2 hücre hattının migrasyonuna etkilerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	87
Şekil 4.46 Test edilen bileşiklerin HT-29 hücre hattındaki migrasyon etkilerinin görüntülenmesi	88
Şekil 4.47 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra HT-29 hücre hattının migrasyonuna etkilerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	89

Şekil 4.48 Test edilen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattındaki migrasyon etkilerinin görüntülenmesi	90
Şekil 4.49 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra MDA-MB-231 hücre hattının migrasyonuna etkilerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p<0.05$)	91
Şekil 4.50 Test edilen bileşiklerin Panc-1 hücre hattındaki migrasyon etkilerinin görüntülenmesi	92
Şekil 4.51 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra Panc-1 hücre hattının migrasyonuna etkilerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p<0.05$)	92
Şekil 4.52 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra Ishikawa hücre hattı üzerindeki apoptotik özelliklerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p<0.05$)	97
Şekil 4.53 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra HepG2 hücre hattı üzerindeki apoptotik özelliklerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p<0.05$)	98
Şekil 4.54 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra HT-29 hücre hattı üzerindeki apoptotik özelliklerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p<0.05$)	99
Şekil 4.55 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki apoptotik özelliklerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p<0.05$)	100
Şekil 4.56 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra Panc-1 hücre hattı üzerindeki apoptotik özelliklerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p<0.05$)	101
Şekil 4.57 24 saatlik madde uygulamasından sonra Ishikawa hücre hattında elde edilen total RNA'ların %1 agaroz jelindeki görüntüsü	103
Şekil 4.58 24 saatlik madde uygulamasından sonra HepG2 hücre hattında elde edilen total RNA'ların %1 agaroz jelindeki görüntüsü	103
Şekil 4.59 24 saatlik madde uygulamasından sonra HT-29 hücre hattında elde edilen total RNA'ların %1 agaroz jelindeki görüntüsü	104

Şekil 4.60 24 saatlik madde uygulamasından sonra MDA-MB-231 hücre hattında elde edilen total RNA'ların %1 agaroz jelindeki görüntüsü	104
Şekil 4.61 24 saatlik madde uygulamasından sonra Panc-1 hücre hattında elde edilen total RNA'ların %1 agaroz jelindeki görüntüsü.....	105
Şekil 4.62 D1, D2, D6, D8 ve D9 bileşiklerinin EC ₅₀ dozlarının Ishikawa hücre hattına uygulanmasından sonra, apoptoz yollarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	106
Şekil 4.63 D1, D2, D3, D6, D7, D8 ve D9 bileşiklerinin EC ₅₀ dozlarının HepG2 hücre hattına uygulanmasından sonra, apoptoz yollarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	107
Şekil 4.64 D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin EC ₅₀ dozlarının HT-29 hücre hattına uygulanmasından sonra, apoptoz yollarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	109
Şekil 4.65 D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin EC ₅₀ dozlarının MDA-MB-231 hücre hattına uygulanmasından sonra, apoptoz yollarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	110
Şekil 4.66 D1, D2, D6, D8 ve D9 bileşiklerinin EC ₅₀ dozlarının Panc-1 hücre hattına uygulanmasından sonra, apoptoz yollarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)	111



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamalarıyla aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
±	Artı eksi
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Santigrat derece
Ca ²⁺	Kalsiyum iyonu
dH ₂ O	Distile Su
dk	Dakika
EtBr	Etidyum bromür
LOO [•]	Lipit peroksit radikali
mA	Miliamper
Mo (V)	Molibden (V)
Mo(VI)	Molibden (VI)
O ₂ [•]	Süperoksit anyonu
OH [•]	Hidroksil radikali
pH	Hidrojen iyon gücü (Asitlik-Bazlık Derecesi)
Kısaltmalar	Açıklama
Abs	Absorbans
ABTS	2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
ANOVA	Varyans Analizi (Analysis of Variance)
APAF-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ATP	Adenozin trifosfat
Bkz.	Bakınız

Cdc42	Hücre bölünmesi kontrol proteini 42
CDK	Siklin bağımlı protein kinaz
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
CMA	Şaperon aracılı otofaji
DHA	Dihidroartemisinin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
EC₅₀	Yarı maksimal etkili konsantrasyon
ECM	Ekstraselüler matriks (Extracellular Matrix)
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
FBS	Fetal Sığır Serumı
FDA	Gıda ve ilaç kurumu (Food and Drug Administration)
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
FRAP	Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (Ferric ion reducing antioxidant power)
GCO	Küresel Kanser Gözlem Evi (Global Cancer Observatory)
GLOBOCAN	Küresel kanser gözlem evi veritabanı (Global Cancer Observatory Database)
HAT	Hidrojen atomu transferi
HepG2	Karaciğer Hepatosellüler Karsinom Hücre Hattı (Liver Hepatocellular Carcinoma Cell Line)
HT-29	Kolorektal Karsinoma Hücre Hattı (Colorectal Carcinoma Cell Line)
HUVEC	İnsan Göbek Damarı Endotel Hücre Hattı (Human Umbilical Vein Endothelial Cell Line)
Ishikawa	Uterin Endometriyal Adenokarsinom Hücre Hattı (Uterine Endometrial Adenocarcinoma Cell Line)

IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry)
MDA-MB-231	Meme Duktal Adenokarsinoma Hücre Hattı (Breast Ductal Adenocarcinoma Cell Line)
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NCCD	Hücre ölümü adlandırma komitesi (Nomenclature Committee on Cell Death)
Panc-1	Pankreas Karsinoma Hücre Hattı (Pancreatic Carcinoma Cell Line)
PBS	Fosfat tamponu (Phosphate Buffered Saline)
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PI	Propidyum iyodür
PS	Fosfatidilserin
rpm	Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSA	Radikal süpürme aktivitesi
ROS	Reaktif oksijen türleri
SET	Tek elektron transferi
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
TNF	Tümör nekroz faktör
TPTZ	2,4,6- tripiridil s-triazin
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü



EKLER DİZİNİ

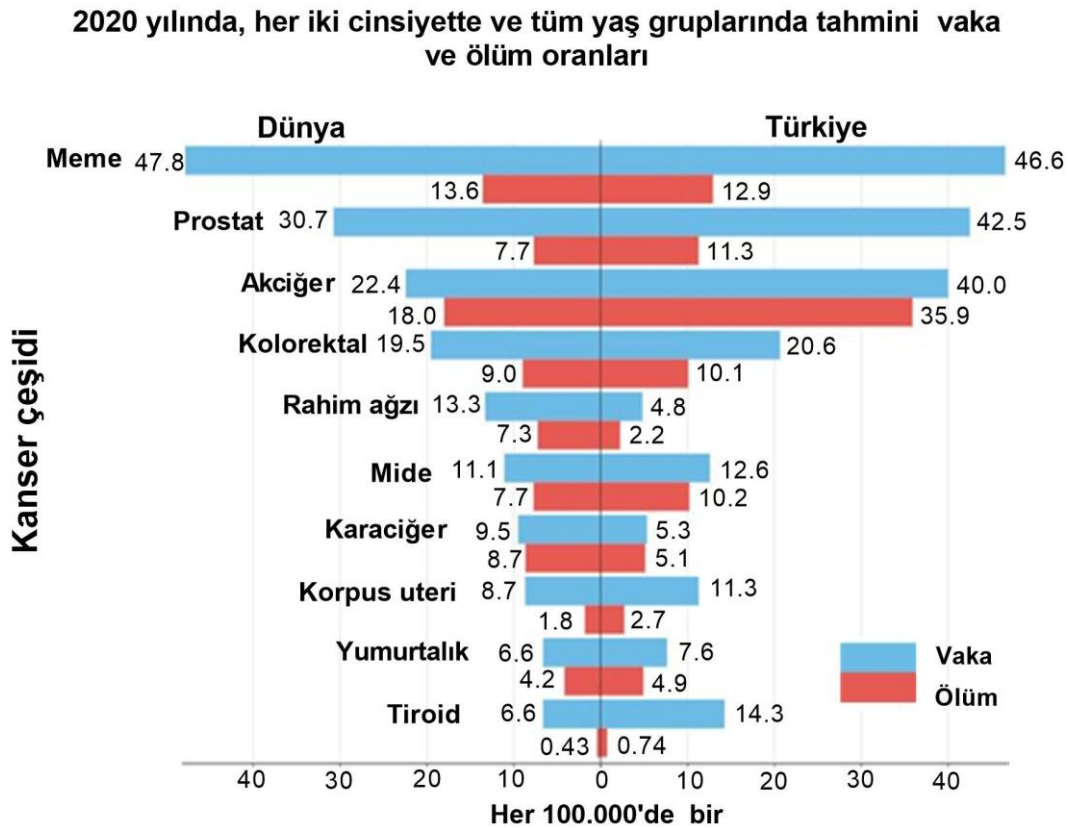
	Sayfa
Ek 1. Test edilen bileşiklerin Ishikawa hücre hattı üzerindeki etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi.....	131
Ek 2. Test edilen bileşiklerin HepG2 hücre hattı üzerindeki etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi.....	137
Ek 3. Test edilen bileşiklerin HT-29 hücre hattı üzerindeki etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi.....	143
Ek 4. Test edilen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki etkisinin sütun grafiki olarak gösterilmesi	149
Ek 5. Test edilen bileşiklerin Panc-1 hücre hattı üzerindeki etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi.....	155
Ek 6. Test edilen bileşiklerin HUVEC hücre hattı üzerindeki etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi.....	161
Ek 7. Test edilen bileşiklerin Ishikawa hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin Flow sitometri cihazı yardımıyla belirlenmesi	167
Ek 8. Test edilen bileşiklerin HepG2 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin Flow sitometri cihazı yardımıyla belirlenmesi	171
Ek 9. Test edilen bileşiklerin HT-29 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin Flow sitometri cihazı yardımıyla belirlenmesi	176
Ek 10. Test edilen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin Flow sitometri cihazı yardımıyla belirlenmesi	181
Ek 11. Test edilen bileşiklerin Panc-1 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin Flow sitometri cihazı yardımıyla belirlenmesi	186



1. GİRİŞ

Kanser, tüm dünyadaki en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Mevcut sıralamalar ve son trendler bu yüzyılda kanserin, çoğu ülkede kardiyovasküler hastalıkları geçebileceğini gösteriyor (Bray vd., 2021).

Küresel Kanser Gözlemevi (Global Cancer Observatory-GCO), dünyadaki kanser vakaları ve ölümlerine ilişkin tahminleri kaydeder. GLOBOCAN 2020, 185 ülkeden kanser vaka ve ölümlerle ilgili verileri görsel olarak içerir. GLOBOCAN verilerinin tablo ve grafik haline getirilmesi, farklı bölgelerdeki (Şekil 1.1) kanser vaka ve ölüm oranlarının birbiriyle görsel olarak kıyaslanan verilerine GCO (<https://gco.iarc.fr>) aracılığıyla ulaşılabilir (Ferlay vd., 2021; Chhikara ve Parang, 2023).



Şekil 1.1 2020 yılında Türkiye ve Dünyada tahmini kanser vaka ve ölüm oranları (Anonim, 2023a)

GLOBOCAN 2020'de dünya çapında, kansere bağlı tahmini 19.3 milyon vaka ve 10 milyon ölüm bildirilmiştir. En büyük vaka oranına sahip kanserler kadın meme (2.26 milyon vaka, %11.7), akciğer (2.21 milyon, %11.4), kolorektal (1.93 milyon, %10), prostat kanserleridir (1.41 milyon, %7.3), mide (1.1 milyon, %5.6), karaciğer (0.91 milyon, %4.7) ve rahim ağzı (0.6 milyon, %3.1) kanseri şeklindedir. En çok ölüm oranına sahip kanserler akciğer (1.8 milyon ölüm, %18), kolorektal (0.94 milyon ölüm, %9.4), karaciğer (0.83 milyon ölüm, %8.3), mide (0.77 milyon ölüm, %7.7) ve meme kanseri (0.69 milyon ölüm, %6.9) şeklindedir (Ferlay vd., 2021; Chhikara ve Parang, 2023).

Her yıl milyonlarca ölüme neden olan ve dünya çapında sürekli olarak artan kanser vakaları, farklı kanserlerin tedavisi için güçlü farmasötiklerin geliştirilmesine olan ihtiyacı doğurmaktadır (Chhikara ve Parang, 2023). Araştırmacılar tarafından her yıl antikanser aktiviteye sahip çok sayıda yeni bileşik keşfedilmektedir ve bu bileşiklerden bazıları yeni ilaç onayı almaktadır. 1981-2019 yılları arasında yeni ilaç onayı alan 247 ilaç molekülünden sadece 29 tanesinin doğal bir farmakofor içermeyen saf sentetik molekül olduğu bildirilmiştir (Newman ve Cragg, 2020; Dehelean vd., 2021). Bu durum doğal bileşiklerin ilaç kimyasındaki önemini göstermektedir.

Artemisia annua bitkisinden elde edilen Artemisinin molekülü, 1972 yılında Tu Youyou ve ekibinin sıtmayla mücadeleleri sırasında keşfedildi. Artemisinin molekülü keşfedildikten sonra sıtma mücadelesinde önemli bir rol üstlenmiştir. Tu Youyou 2015 yılında artemisinin keşfinden dolayı "Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü" ile ödüllendirilmiştir. Artemisinin ile yapılan çalışmalar artemisinin ve türevlerinin veya artemisinin hibrit moleküllerinin antimaleriyal harici birçok biyolojik özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Bkz. Bölüm 1.3.2 ve Bölüm 2).

Bu çalışmada, hetero atom yapılı ve birçok biyolojik özelliği rapor edilen indol halkası (Bkz. Bölüm 1.3.1) ve artesunat moleküllerinden oluşan hibrit moleküller kullanılacaktır.

1.1 Kanser

Tüm yaşayan canlıların anatomik ve fizyolojik birimine hücre denir. Çok hücreli canlılar hücre denen bu birimlerden oluşur. Hücreler canlılar için metabolizma, hemostaz, büyüme-gelişme, üreme, genetik bilginin gelecek nesillere aktarılması ve çevreye uyum gibi özellikleri yerine getirir. Vücudumuzda bulunan bu hücrelerin belirli bir yaşam süresi vardır ve zamanı geldiğinde belirli kontrol mekanizmaları eşliğinde hücre ölümü gerçekleşir. Hücre ölümü ve hücre çoğalması bir denge içerisinde. Hücreler hücre döngüsü denen bir olaylar zinciri içerisinde bölünür, büyür ve gelişirler (Dağdeviren, 2021; Diori Karidio ve Sanlier, 2021).

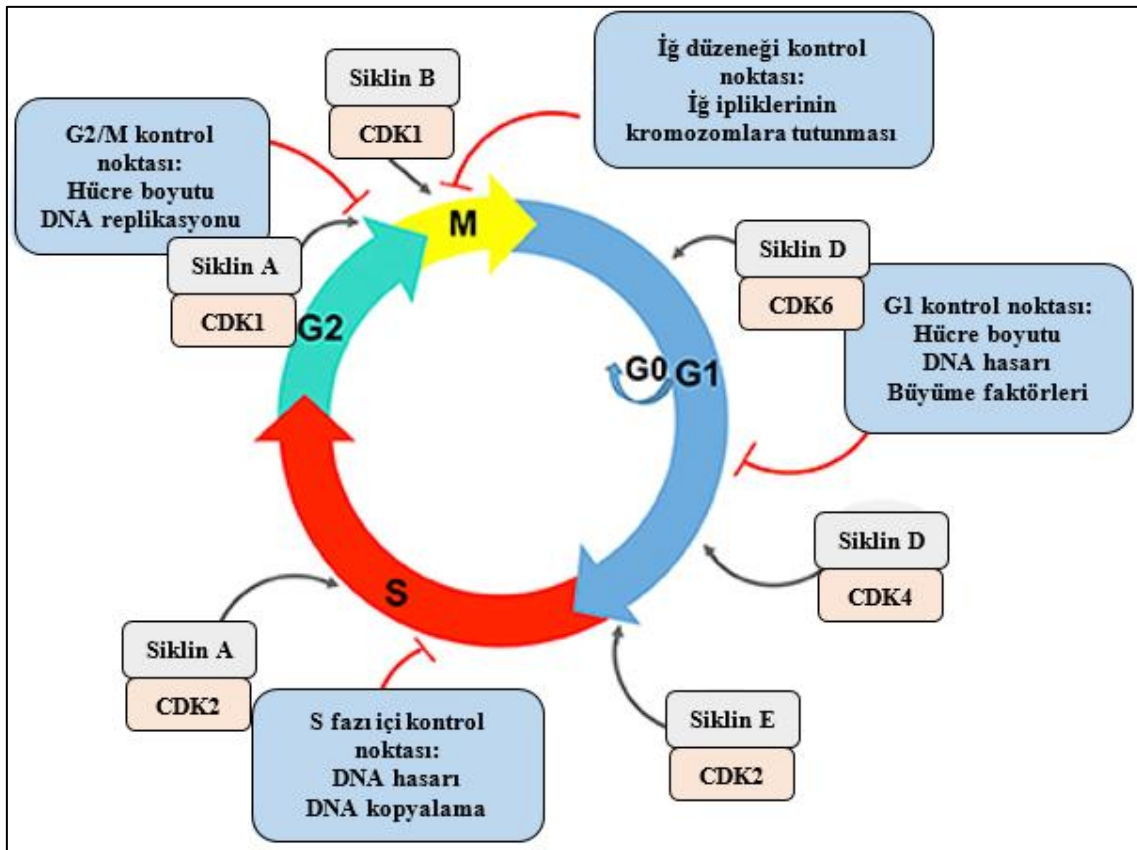
Hücre döngüsü, interfaz (G1, S ve G2) aşaması ve mitotik (profaz, metafaz, anafaz ve telofaz) aşamalarından oluşur. Hücre döngüsündeki temel amaç DNA replikasyonunun kesin bir doğruluk içerisinde gerçekleştirilmesi ve genetik materyalin yeni oluşan hücrelere eşit olarak dağılmasının sağlanmasıdır. Ayrıca mutasyona uğramış bir hücrenin genetik materyalinin yanlış kopyalanmasının engellenmesi veya DNA'nın hatalı kopyalanması durumu gibi genetik materyalde ortaya çıkan hataların yeni hücrelere aktarılmasının engellenmesi amacıyla, hücrelerin hücre döngüsüne girmesi ve hücre döngüsünün ilerlemesine izin verilmesi, karmaşık kontrol mekanizmaları tarafından kontrol edilir (Diori Karidio ve Sanlier, 2021; Matthews vd., 2022).

Hücre döngüsünün süresi hücreler arasında farklılık göstermekle birlikte dört (G1, S, G2 ve M) evreden oluşur. G1 evresinde hücre büyümesi, S evresinde DNA replikasyonu, G2 evresinde hücre bölünmeye hazırlanır ve M evresinde mitoz ve sitokinez gerçekleşir. Mitozdan sonra hücreler ya bölünmeye devam eder yada hücrenin dinlenme evresi olan G0 evresine girer (Şekil 1.2) (Yokuş ve Çakır, 2012).

Hücre döngüsünün ilerlemesi sikline bağımlı protein kinazlara (CDK) bağlı siklinlerden (A, B, D, E) oluşan kompleksler aracılığıyla kontrol edilir. Hücrenin G1 fazına girişinde D tipi siklinler CDK4 ve CDK6'yı aktive ederek gerçekleştirir. G1 fazından S fazına geçiş için siklin E, CDK2'yi aktive eder. Ayrıca CDK2, siklin A ile birleşerek hücrenin S fazı boyunca ilerlemesini sağlar. Siklin A, CDK1 ile etkileşerek hücrenin G2 fazından M fazına girişini tetikler. M fazının sürdürülmesinde Siklin B,

CDK1 ile etkileşerek gerçekleştirir (Şekil 1.2) (Lim ve Kaldis, 2013; Gomez ve Hergovich, 2016; El-Aouar Filho vd., 2017).

Hücre döngüsünün ilerlemesi, hücre döngüsü sürecinde bulunan kontrol noktaları aracılığıyla kontrol edilir. Hücre döngüsü kontrol noktaları; G1/S geçişi (G1 kontrol noktası), S faz ilerlemesi (S fazı içi kontrol noktası), G2/M geçişi (G2/M kontrol noktası) ve mitoz sırasında metafazdan anafaza geçişte bulunur (Şekil 1.2). Hücre döngüsü kontrol noktalarında döngü durarak DNA hasarı tamir edilir. Hasarın tamir edilemediği durumlarda hücre apoptoza girer (El-Aouar Filho vd., 2017).



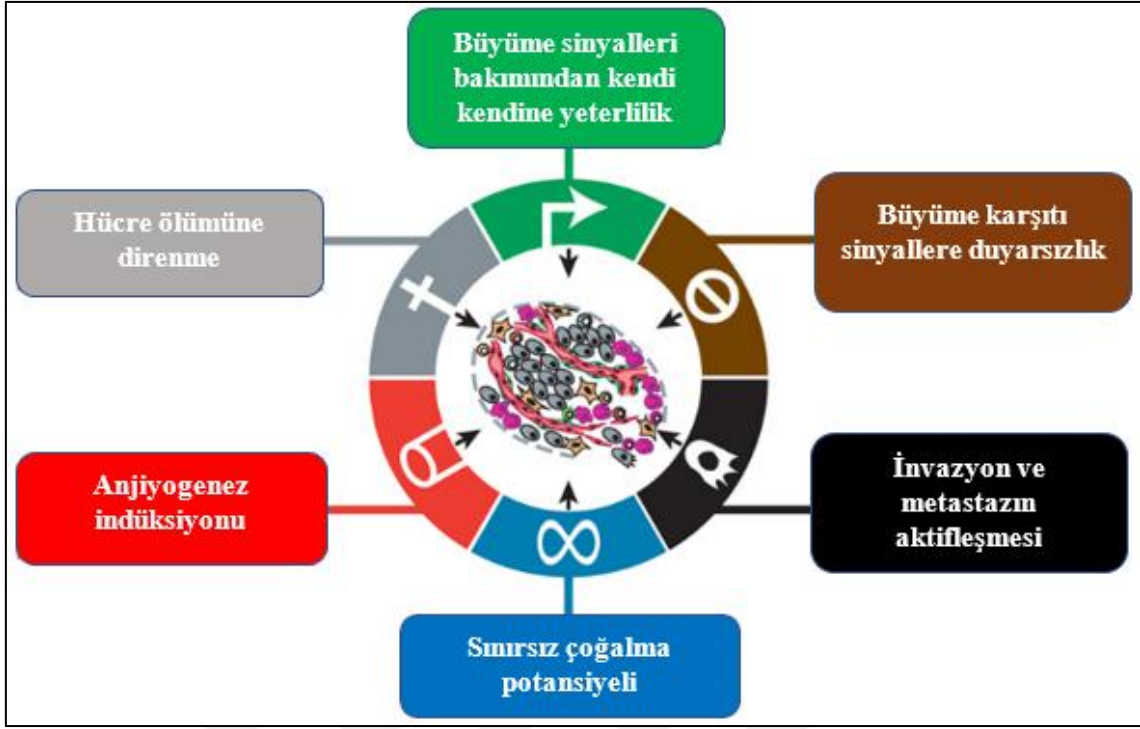
Şekil 1.2 Ökaryotik hücre döngüsünün ve düzenlenmesinin düzenlenmesi (El-Aouar Filho vd., 2017)

Hücre döngüsü sıkı bir kontrol mekanizması altında olmasına rağmen bazen kalıtsal ve/veya çevresel etmenler nedeniyle hücre bölünmesi kontrol eden genlerde ortaya çıkan mutasyonlar kontrolsüz hücre bölünmesine sebep olabilir. Bu hızlı büyüyen hücreler çoğalıp kümeleşerek dokularda tümör oluştururlar. Oluşan tümörler kanserli (kötü huylu) ya da kansersiz (iyi huylu) olabilirler. İyi huylu (benign) tümörler

yakın dokulara yayılıp onları işgal etmezler ve genellikle cerrahi olarak çıkarıldıkları zaman tekrar büyümeyizler. Kötü huylu (malign) tümörler yakın dokulara yayılır ve yeni tümörler oluşturarak onları istila ederler (Yokuş ve Çakır, 2012; Hakim vd., 2015; Hanahan, 2022).

Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesiyle sonuçlanan çok basamaklı sürece karsinogenez denir. Bu süreçte kanserleşen hücreler, çok hücreli bir organizmada homeostaz için gerekli olan hücre içi iş birliğini yöneten yasa ve kurallara uymazken aynı zamanda yeni özellikler kazanırlar. 2000 yılında Hanahan ve Weinberg, kanser hücrelerinde yaygın olarak bulunan altı hücresel değişikliği, kanserin ayırt edici özellikleri olarak adlandırdılar. Bu değişiklikler, büyüme sinyalleri bakımından kendi kendine yeterlilik, büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık, invazyon ve metastazın aktifleşmesi, sınırsız çoğalma potansiyeli, hücre ölümüne direnme ve anjiyogenez indüksiyonu şeklindedir (Şekil 1.3) (Hanahan ve Weinberg, 2011; Diori Karidio ve Sanlier, 2021).

O zamandan beri, bu kavram kanser biyologlarına ivme kazandırdı ve halen gelişmeye devam etmektedir. 2011 yılında kanserin ayırt edici özellikler listesine “enerji metabolizmasının yeniden programlanması” ve “bağışıklık yıkımından kaçınma” şeklinde iki potansiyel özellik daha eklendi (Hanahan ve Weinberg, 2011; Hanahan, 2022).



Şekil 1.3 Kanserin ayırt edici bazı özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011)

Kanser hücre döngüsü mekanizmalarının bozukluğunda ortaya çıktığından ve hücre döngüsü de genlerin kontrolünde olan bir süreç olduğundan dolayı kanser genlerle ilgili bir hastalıktır. Kanserle oluşumunda en önemli genler ise onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genleridir. Onkogenler, proto-onkogenlerin mutasyona uğramış halleridir. Kanser başlangıcında bulunan bu genler, hücrenin sürekli bölünmesini teşvik ederler. Proto-onkogenler, normal hücrelerde büyüme ve bölünmeden sorumludurlar ancak mutasyona uğradıklarında onkogenlere (RAS, Erk, MYC) dönüşebilirler ve olmaması gerektiği halde hücrelerin büyümesine ve hayatta kalmasına izin verirler. Tümör baskılayıcı genler (en bilineni TP53 genidir.), hücre büyümesini ve bölünmesini kontrol etmede rol oynarlar. DNA hasarı gerçekleştiğinde eğer tamir mekanizmaları başarısız olursa hücreyi apoptoza götürür. DNA tamir genleri, hasarlı DNA'nın düzeltilmesinde rol alırlar. Bu genlerin önemli bir diğer işlevi eğer hasar görmüş DNA tamir edilemezse hasarlı gene sahip hücreyi apoptotik veya nekrotik yolak ile yok edilmesini sağlamaktır. Bu genlerin işlevini kaybetmesi BRCA (meme kanseri) geninde olduğu gibi kanserleşmeye sebep olur (Yokuş ve Çakır, 2012; Baykara, 2016).

1.2 Hücresel Ölüm Süreçleri

Çok hücreli organizmalarda yaşamın devamı için mitozla yeni hücreler üretilir. Üretilen yeni hücreler ile hasar görmüş ve parçalanmış hücreler arasında hassas bir denge vardır. Bu denge hücre ölüm mekanizmalarıyla kontrol altında tutulur. Önceleri hücre ölümünün apoptoz (kontrollü hücre ölümü) ve nekroz (kontROLSÜZ hücre ölümü) süreçlerinden biriyle gerçekleştiği düşünülüyordu. Ancak son yıllardaki araştırmalar bu iki süreç haricinde farklı ölüm mekanizmalarını da ortaya çıkarmıştır (D'Arcy, 2019).

Hücre Ölümü Adlandırma Komitesi (Nomenclature Committee on Cell Death - NCCD) tarafından, hücre ölümünün morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel açılardan tanımlanması ve yorumlanması için kılavuzlar ilan etmektedirler. Bu komitenin yaptığı son güncellemeden sonra hücre ölümü alt tiplerine yenileri de eklenerek kapsam genişletilmiştir. Bunlar; içsel apoptoz, dışsal apoptoz, mitokondriyal geçirgenliğe bağlı nekroz, nekroptosis, ferroptosis, piroptosis, parthanatos, entotik hücre ölümü, NETotik hücre ölümü, lizozom bağımlı hücre ölümü, otofajiye bağımlı hücre ölümü, immünojenik hücre ölümü şeklindedir (Galluzzi vd., 2018).

1.2.1 Apoptoz

Apoptoz, programlı hücre ölümü veya hücre intiharı olarak da bilinen ve enerjiye bağımlı olan fizyolojik bir süreçtir. Apoptoz kelimesi ilk olarak 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü tipini tanımlamak için kullanılmıştır (Kerr vd., 1972; Dağdeviren, 2021).

Apoptozla ilgili yapılan çalışmalarda *Caenorhabditis elegans* nematodu kullanılmıştır. Bu organizmada bulunan ced-3, ced-4 ve ced-9 genleri apoptozla ilişkilidir. Bu genlerden ced-3 kaspaz ailesine, ced-4 geni Apaf-1'e ve ced-9 ise Bcl-2 karşılık geldiği bildirilmiştir (Dağdeviren, 2021).

Tüm çok hücreli organizmalarda, hücre büyümesi sıkı bir şekilde düzenlenmiştir. Apoptoz, hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki dengenin korunması için en önemli mekanizmalardan biridir. Apoptoza uğramış hücrelerde bir dizi iyi tanımlanmış morfolojik değişiklikler gözlemlenir. Bir hücreye apoptotik uyarı geldiğinde öncelikle yakınında bulunan hücrelerle olan bağlantısını koparır. Hücrelerin

hacmi azalarak b z   r, kromatin yo unla  r ve DNA 180-200 baz çiftinden olu  an parçalara (DNA'nın belirli uzunluktaki parçalara ayrılması, agaroz jel elektroforezinde karakteristik bir görüntü olu  turur.) ayrılır. Ancak organel bütünlüğü korunur. Hücre zarının i  yüzeyinde bulunan fosfotidil serin dış yüzeye taşınır. Hücre parçalanarak apoptotik cisimcikler olu  turur. Olu  an bu apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından fagosit  edilir. Böylelikle apoptoz sonucunda herhangi bir enflamasyon olu  maz (D'Arcy, 2019; Dağdeviren, 2021; Obeng, 2021).

Apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller ve sitokrom c, kaspaslar, p53 gibi proteinler ve mitokondri görev alır. Seramid, hücre zarında bulunan sfingolipidlerden türetilir ve apoptoz indüksiyonunda ikinci haberci olarak görev alır (Hannun ve Obeid, 1995). Kalsiyum apoptotik süreç boyunca kullanılır. Kalsiyumun proteaz, endonükleaz, transglutaminaz aktivasyonu, hücre iskeleti organizasyonu ve gen regülasyonunda görevleri vardır (Coşkun ve  zg r, 2011).

P53 bir tümör baskılayıcı gendir. DNA hasarında, hücre döngüsünü G1 safhasında durdurarak DNA tamiri için hücreye süre kazandırır. Eğer DNA hasarı büyükse ve tamir ger ekle mezse bazı apoptotik proteinlerin (Bax, Apaf-1, Fas, Bak, Bcl-10) miktarını arttırırken bazılarının miktarını düşürür (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-x) ve böylece apoptozu indükler (Dağdeviren, 2021; Obeng, 2021).

Sitokrom c, normalde mitokondrinin zarlar arası alanında bulunur. Sitokrom c'nin bu alandan sitozole geçmesi apoptozu başlatır. Bcl-2, sitokrom c'nin sitozole geçişini engellerken Bax, ise sitokrom c'nin sitozole geçmesini sa lar. Sitokrom c sitozole geçtiğinde Apaf-1 ve prokaspaz-9 moleküllerine ba lanarak apoptozom kompleksini olu  turur. Bu kompleks de kaspas kaskadını başlatır (Kaya vd., 2012; Celepli vd., 2020).

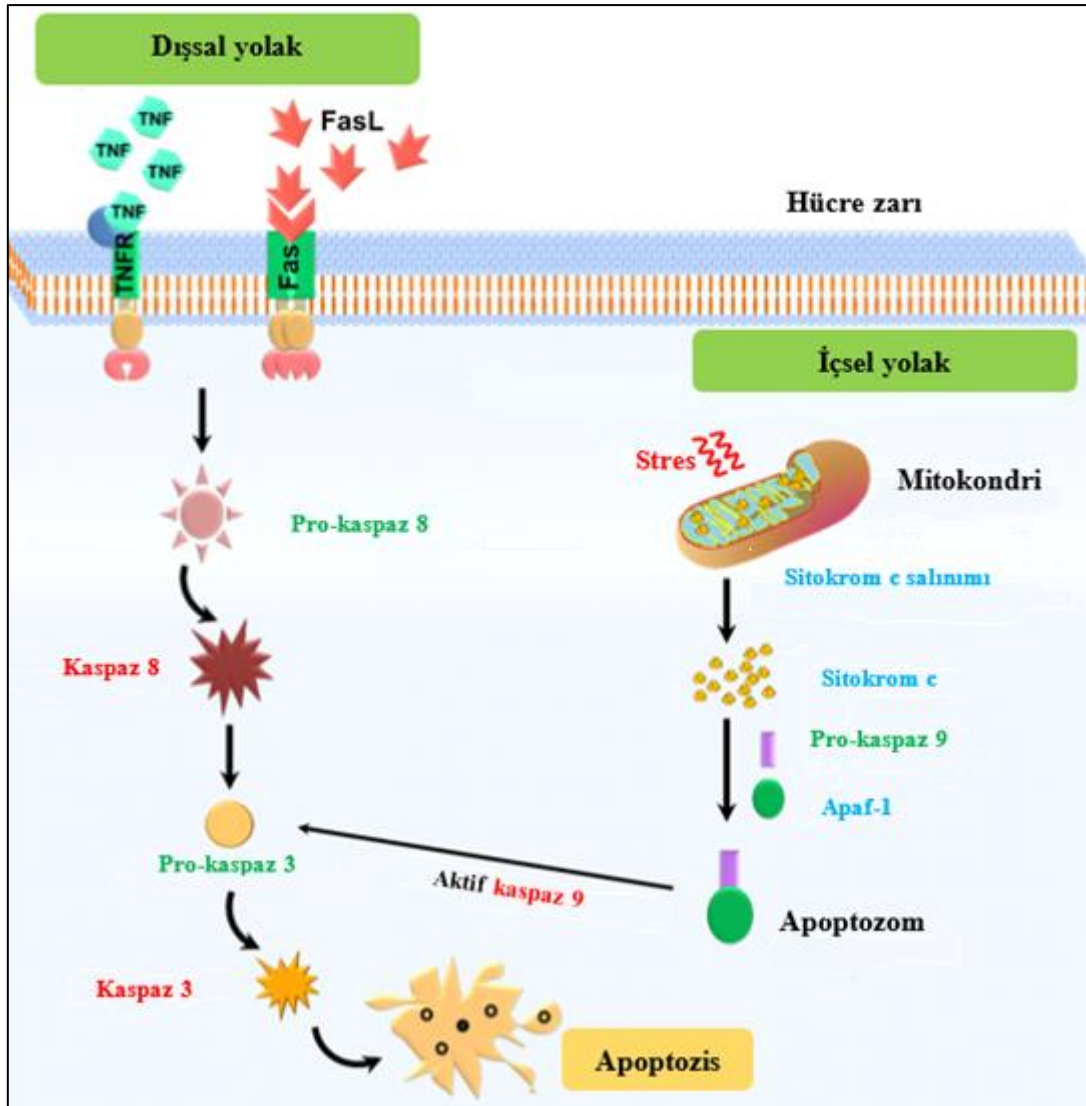
Bcl-2 ailesi, homodimer ve heterodimer yapılardan olu  ur ve hücrede apoptozun ba lamasında hayati rollere sahiptirler. Bcl-2 ailesinin apoptozla ilişkili 20'den fazla  yesi bulunur. Bu  yelerden bazıları pro-apoptotik diğerleri ise anti-apoptotik üyelerdir. Pro-apoptotikler, sitozolde yer alırlar ve hücreyi apoptozla götürmede pozitif etkiye sahiptirler. Pro-apoptotik üyelerin bazıları Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, Puma, Noxa  eklinindedir. Bu  yeler mitokondri membranının geçirgenliğini arttırarak sitokrom c'nin serbest bırakılmasında rol alırlar. Anti-apoptotik üyeler, endoplazmik

retikulumda, mitokondri dış membranında ve çekirdek zarında yer alırlar. Apoptozis indüksiyonunda negatif etkiye sahiptirler. Anti-apoptotik üyelerin bazıları, Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-w, BAG, Bcl-XS şeklindedir. Bu üyeler sitokrom c'ni serbest kalmasını önlemede görev alırlar (Elmore, 2007; Dağdeviren, 2021; Obeng, 2021).

Kaspazlar (cysteine-dependent aspartate-directed proteases-caspase), apoptotik yolakta etkili olan ve aspartik asitten sonraki peptit bağını kıran sistein proteazlarıdır. Normalde pro-kaspas olarak sentezlenirler ve hücre içerisinde inaktif durumdadırlar ancak birbirlerini aktifleştirerek apoptozun başlamasında ve gerçekleşmesinde rol alırlar. Apoptoziste etkili kaspazlar başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2, 8, 9 ve 10) ve efektör (cellat) kaspazlar (Kaspaz 3, 6 ve 7) olmak üzere genellikle ikiye ayrılır. Başlatıcı kaspazlar kendilerini aktifleştirebilir ve apoptotik süreçte ölüm sinyalinin verilmesinden sorumludurlar. Ancak hücrenin ölümünden efektör kaspazlar sorumludur. Kaspazlar, apoptozun hem içsel (intrinsik) yolundan hem de dışsal (ekstrinsik) yolundan sorumludurlar (Coşkun ve Özgür, 2011; Kaya vd., 2012; Güvenç ve Güvenç, 2017; Dağdeviren, 2021).

1.2.1.1 Apoptozun İçsel Yolu

Apoptozun içsel yolu, mitokondri içerisinde gerçekleşen bir dizi reaksiyonlar şeklinde gerçekleşir. Ayrıca apoptozun mitokondriyal yolu olarak da bilinir. DNA hasarı, oksidanlar, radyasyon, viral enfeksiyonlar, fazla Ca^{2+} , büyüme faktörleri yoksunluğu, toksinler gibi faktörler tarafından tetiklenebilir. Bu yolakta Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri merkezi düzenleyicidirler. Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alındıktan sonra pro-apoptotik proteinlerden olan Bid, anti-apoptotik Bcl-2'yi inhibe eder ve bunun sonucunda Bak ve Bax aktifleşir. Bak ve Bax proteinleri mitokondri membranında por oluşumunu sağlarlar. Mitokondri membranında geçirgenliğin artması sitokrom c'nin salınmasıyla sonuçlanır. Sitoplazmaya geçen sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1), dATP ve prokaspaz-9 ile birleşerek apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptozom içinde prokaspaz-9, kaspaz-9'a dönüşür. Kaspaz-9 ise prokaspaz-3'ü aktifleştirerek kaspaz-3'e çevirir (Şekil 1.4). Kaspaz-3'ün etkisiyle apoptotik hücre ölümü gerçekleşir (Coşkun ve Özgür, 2011; Pfeffer ve Singh, 2018; D'Arcy, 2019; Obeng, 2021).



Şekil 1.4 Apoptozun içsel ve dışsal yolları (Bhosale vd., 2020)

1.2.1.2 Apoptozun Dışsal Yolu

Apoptozun dışsal yolu, ölüm reseptörü yolu olarak da bilinir. Bu yolak doğal öldürücü (natural killer-NK) hücrelerin, aktive olmuş T hücrelerinin veya makrofajların ölüm reseptörüne bağlanmasıyla başlar.

Fas reseptörü ve tümör nekroz faktör (TNF) reseptörü hücre yüzeyine bağlı integral proteinleridir. Ölüm ligandları, tümör nekroz faktörü (TNF) ailesi ölüm reseptörlerine bağlanır. Bazı ölüm ligandları arasında Fas ligandı (Fas-L), TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TNF-related apoptosis-inducing ligand-TRAIL) ve

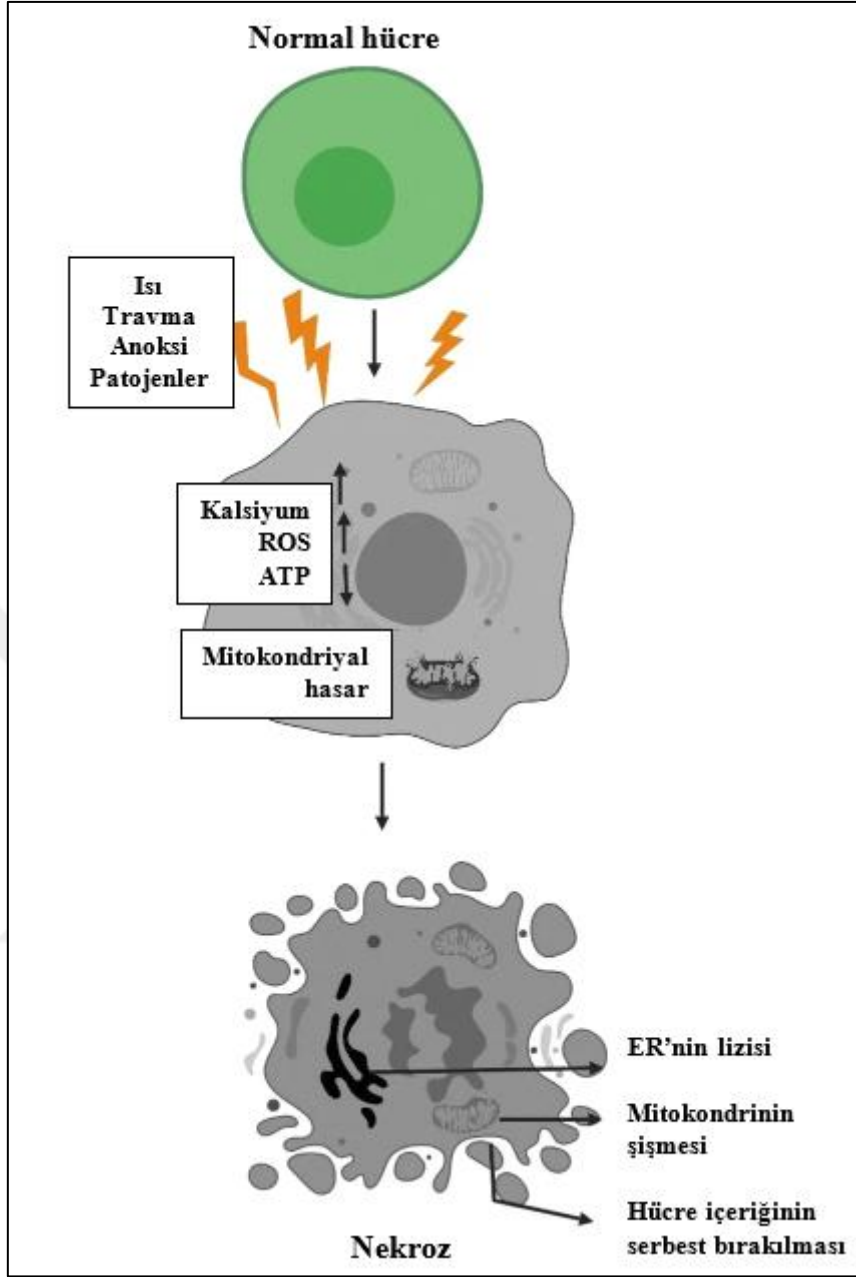
tümör nekroz faktörü (TNF) bulunur. Ölüm aktivatörleri olan Fas-L ve tümör nekroz faktör alfanın (TNF- α) bağlanması ile pro-kaspaz-8, kaspaz-8'e dönüşür ve böylelikle kaspaz kaskadı aktivasyonu başlamış olur (Şekil 1.4) (Pfeffer ve Singh, 2018; Celepli vd., 2020; Dağdeviren, 2021).

1.2.2 Nekroz

Nekroz, canlı vücudundaki patolojik değişikliklerin neden olduğu hücre ölümüdür. Ayrıca, hücre zarının parçalanmasıyla karakterize edilen, enflamatuvar bir hücre ölümü şekli olarak da sınıflandırılır. Nekrozun en yaygın nedeni hipoksi olmakla birlikte enfeksiyon, yüksek doz radyasyon yüksek basınç, arsenik, insektisitler, siyanür gibi toksik maddeler nekroza neden olabilir (Coşkun ve Özgür, 2011; Nirmala ve Lopus, 2020).

Nekrozda mitokondride reaktif oksijen türleri (ROS) artar, ATP üretimi azalır ve kalsiyum (Ca^{+2}) kanalları açılır (Şekil 1.5). Nekroz, bulunduğu dokuya ve morfolojisine göre çeşitli tiplerde olabilir. Bunlar; koagülasyon nekrozu, kangren nekroz, kazeöz nekroz, fibrinoid nekroz, erime nekrozu ve yağ nekrozu şeklindedir (Coşkun ve Özgür, 2011).

Nekroz sırasında hücre zarı bütünlüğü bozularak sitoplazmik bileşenler hücre dışına sızar. Apoptozdan farklı olarak sıralı sinyal iletim yollarını izlemez. Apoptozun aksine nekroz düzenlenmemiş bir hücre ölüm şeklidir. Ama yeni çalışmalar nekroz hücre ölüm şeklinin tamamen kontrolsüz olmadığını göstermektedir. Nekrozun kontrollü bir ölüm şekli olabileceğini ifade etmek amacıyla “nekroptoz” terimi kullanılmaktadır (Jung vd., 2020; Nirmala ve Lopus, 2020). Nekrozun, apoptoza benzer yönleri bulunmaktadır. Örneğin ısı, iyonlaştırıcı radyasyon, patojenler gibi stres koşulları hem apoptoza hem de nekroza neden olur. Bcl-2 gibi anti-apoptotik mekanizmalar hücreleri hem nekroza hem de apoptoza karşı koruyabilir. Bir hücrenin apoptoz ve nekroz geçişine karar veren mekanizma tam olarak belirlenememiş olsa da hücre içi yüksek ROS seviyeleri, kaspaz aktivitesinin inhibisyonu ve düşük ATP seviyelerinin nekrozu tetiklediği bilinmektedir (Vázquez-Nin vd., 2011; Nirmala ve Lopus, 2020).



Şekil 1.5 Nekrotik hücre ölümü (Nirmala ve Lopus, 2020)

Nekroz ve apoptoz arasındaki ayrım önemlidir. Morfolojik olarak bu iki hücre ölüm tipinde çeşitli farklılıklar bulunur. Nekrozda hücre şişmesi, membran kaybı, büyük vakuollerin oluşması, organel şekillerinin bozulması ve hücre lizisi ardından enflamasyon görülür. Apoptozda ise hücre büzülür, membran kaybı olmaz, organel parçalanması gerçekleşmez ve kromatin nükleer membranın çevresinde toplanarak yoğunlaşır. Sürecin sonunda membran ile kaplı apoptotik cisimcikler görülür ve enflamasyon görülmez (Vázquez-Nin vd., 2011; Celepli vd., 2020).

1.3 Heterosiklik Bileşikler

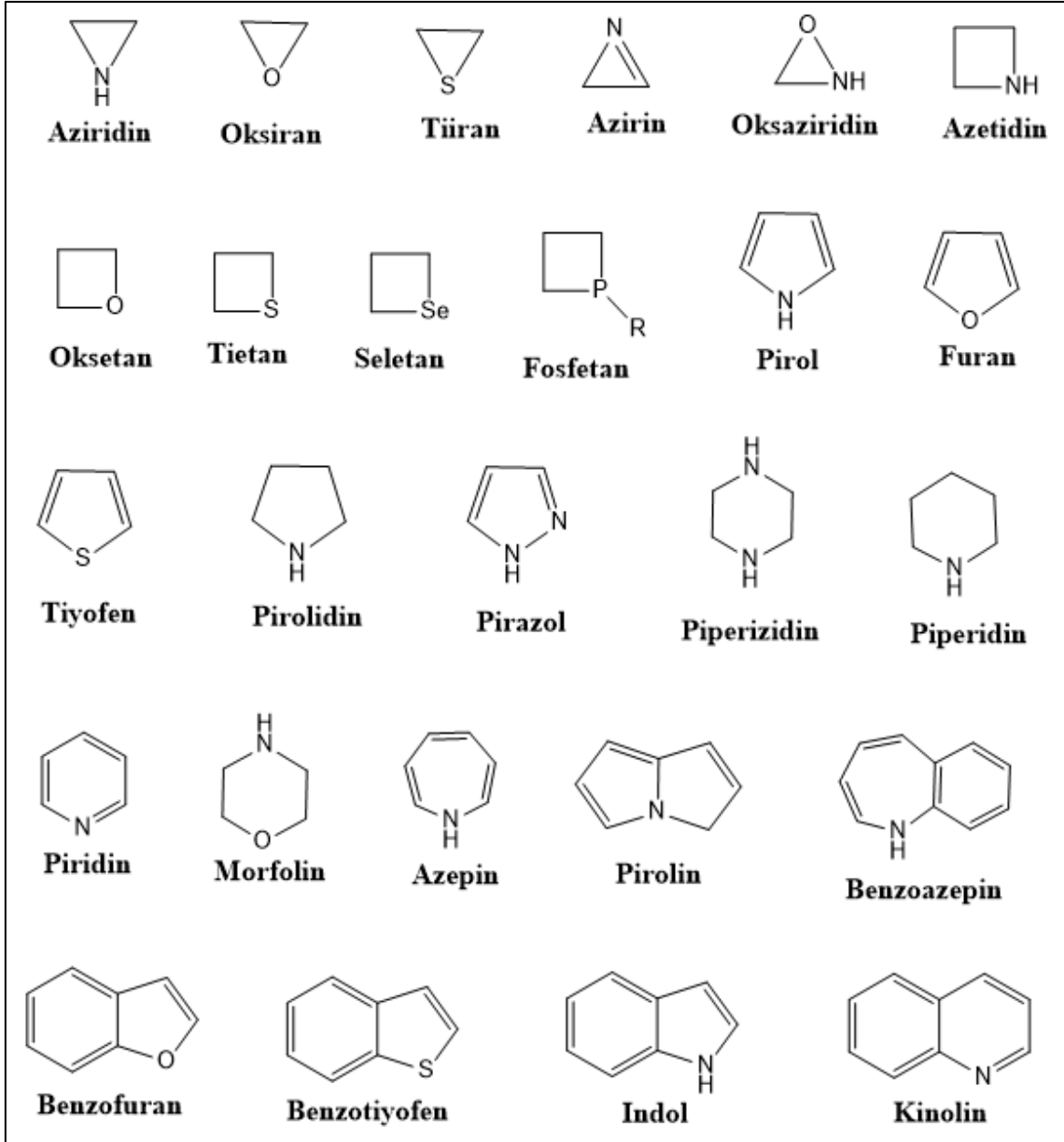
Heterosiklik bileşikler, farmasötik öneme sahip doğal kaynaklı bileşiklerin bir sınıfıdır (Ebenezer vd., 2022). Bu bileşiklerin “siklik” kısmı halkasal bir yapıyı temsil ederken “hetero” ön eki ise bu halkasal yapıda bulunan karbon harici atomu temsil eder (Arora vd., 2012).

Heterosiklik bileşiklerin yapıları, aromatik veya aromatik olmayan halkalardan oluşabilir. Halkasal yapıda bulunan karbon harici atomlara hetero-atom denir ve yapıda en az bir adet hetero-atom bulunur. Bu bileşiklerin yapısında en yaygın olarak oksijen, nitrojen ve kükürt bulunurken fosfor, demir, magnezyum, selenyum gibi atomları içeren heterosiklik halkalar da yaygındır (Ebenezer vd., 2022; Kabir ve Uzzaman, 2022).

Heterosikliklerin yapıları sadece karbon atomu bulunan siklik organik bileşiklerinkine benzerdir ancak hetero-atomların varlığı heterosikliklere tüm karbon halkası analoglarından oldukça farklı fiziksel ve kimyasal özellikler kazandırır (Qadir vd., 2022).

Heterosiklikler, zirai, tıbbi ve veterinerlik ilaçları dahil olmak üzere çok çeşitli kullanımları içerir. Bu tür bileşikler ayrıca dezenfektanlarda, antioksidanlarda, korozyon önleyicilerde, boyar maddelerde de kullanılır. Heterosiklikler şu anda çok çeşitli organik kimyasal maddelerin üretiminde kullanılmaktadır. Alkaloidler, morfin, vinblastin ve reserpin gibi çoğunlukla doğal kaynaklı çeşitli bileşikler ve sefalosporin, penisilin gibi çeşitli antibiyotikler heterosiklik bileşenleri içerir. Çok çeşitli kullanım alanları nedeniyle, heterosiklik bileşiklerin üretimi organik sentezde bir odak noktası haline gelmiştir (Sapra vd., 2020; Qadir vd., 2022).

Heterosiklik bileşikler genellikle halka boyutuna, tipine ve halkada bulunan hetero-atom sayısına göre (Şekil 1.6) sınıflandırılır (Ebenezer vd., 2022). En yaygın heterosiklikler, beş veya altı üyeli halkalara sahip olan ve azot (N), oksijen (O) veya kükürt (S) heteroatomları içerenlerdir. Bu heterosiklik bileşiklerin en yaygınları ise piridin, pirol, furan ve tiyofendir. Bir piridin molekülü beş karbon atomu ve bir azot atomu olmak üzere altı atomlu bir halka içerir. Pirol, furan ve tiyofen moleküllerinin her biri, sırasıyla dört karbon atomu ve bir azot, oksijen veya kükürt atomundan oluşan beş üyeli halkalar (Şekil 1.6) içerir (Arora vd., 2012).



Şekil 1.6 Heteroatom ve halka boyutuna göre çeşitli heterosiklik bileşikler

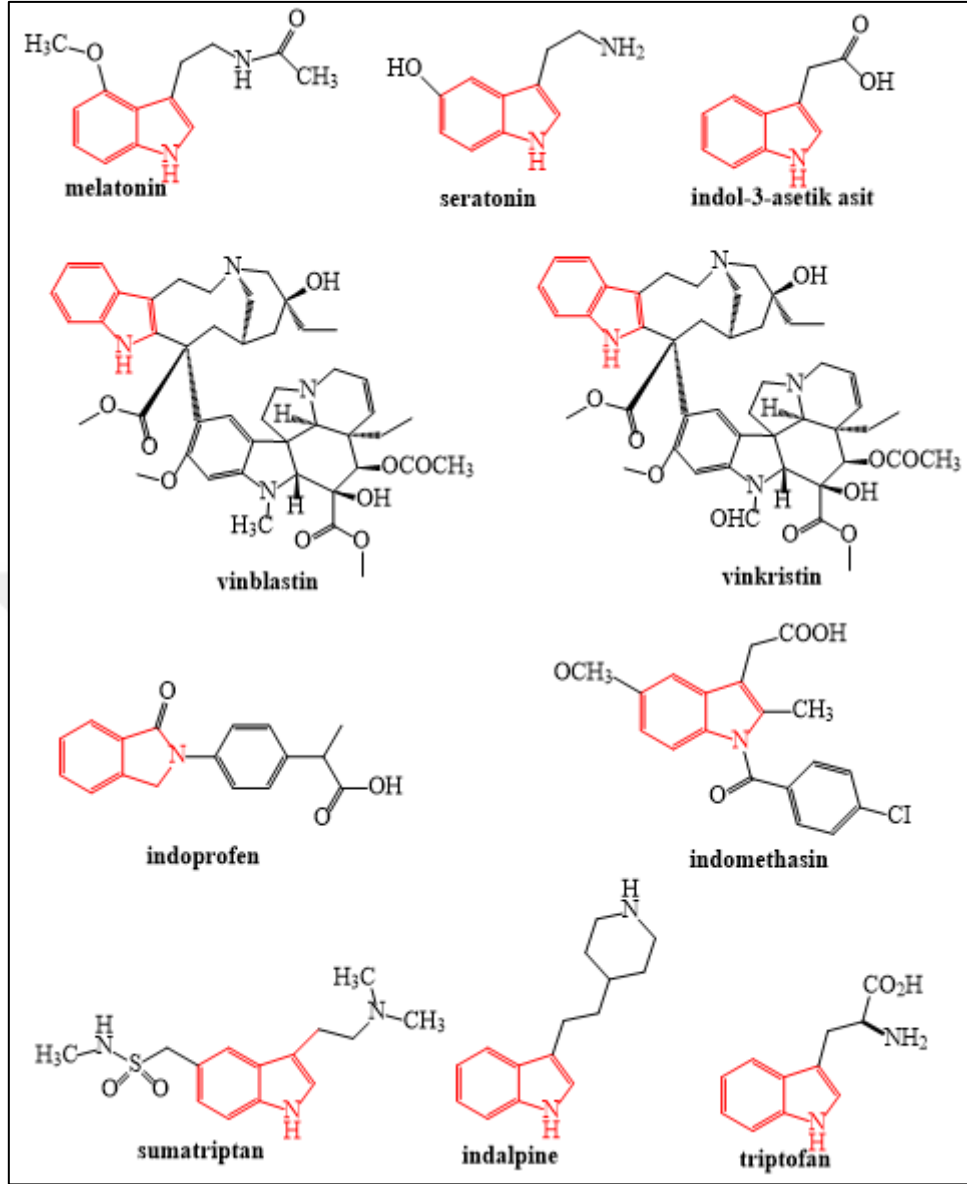
Farklı türde heterosiklik halka sistemleri arasında, nitrojen heterosiklik bileşikler doğada daha bol bulunur ve önemli terapötik öneme sahiptir. Vitaku vd. (2014) gerçekleştirilen ABD FDA onaylı ilaçların veri tabanı analizi, bildirilen küçük molekülü ilaçların %59'unun nitrojen heterosiklikleri içerdiğini göstermişlerdir (Vitaku vd., 2014).

1.3.1 İndoller

İndol, benzen halkasının pirol halkasının 2 ve 3 konumu ile kaynaştığı bir düzlemsel bir heterosiklik moleküldür (Bkz. Şekil 1.6). İndol ve türevleri, bir asırdan fazla bir süredir keşfedildi ve keşfedildiği süreden bu yana hakkında binlerce makale yazıldı. İndol adı Baeyer ve Knop tarafından 1866'da isatinin indirgenmesiyle elde edilen ürünlerin yapısal iskeletine verilmiş ve indolün yapısal formülü 1869'da aynı grup tarafından önerilmiştir (Kianmehr vd., 2013; Shafakat Ali vd., 2013).

Heterosiklik bileşiklerden olan indol, doğada meydana gelen çok sayıda bileşiğin ana maddesidir. Diyetle elde edilen dokuz temel amino asitten biri olan triptofan yapısında ve yüksek bitkilerde triptofanın parçalanmasıyla üretilen indol-3-asetik asitte indol bulunur. Merkezi sinir sisteminde, kardiyovasküler ve gastrointestinal sistemlerde görev alan ve önemli bir nörotransmitter olan serotonin (5-hidroksitritamin) yapısında ve serotonin yapısına benzerlik gösteren ve günlük ritmin düzenlenmesinden sorumlu melatonin hormonunun yapısında da indol (Şekil 1.7) bulunur (Kaushik vd., 2013; W. Hu vd., 2022).

Ayrıca indol yapısı içeren birçok ilaç molekülü de bulunmaktadır. Güçlü bir ateş düşürücü, ağrı kesici ve antienflamatuvar aktiviteye sahip steroidal olmayan bir antienflamatuvar ilaç olan indomethacin (Lucas, 2016) migren ağrıların tedavisinde kullanılan sumatriptan (Lipton vd., 2000), antidepresan olarak kullanılan indalpine (Naylor ve Martin, 1985), antienflamatuvar ilaç olarak kullanılan indoprofen (Kim vd., 2020), hücre döngüsünün metafazı sırasında inhibitör etkisi sayesinde antikanser ilaç olarak kullanılan vinkristin ve vinblastin (Kumar, 2016) gibi birçok indol içerikli ilaç bulunmaktadır (Şekil 1.7).



Şekil 1.7 Çeşitli indol içerikli doğal bileşikler ve ilaçlar

İndol türevlerinin sahip olduğu biyolojik ve farmakolojik özelliklerinden dolayı ilaç kimyasında en çok çalışılan moleküllerden biridir. Literatürde, indol yapısı içeren bileşiklerin; antibakteriyel (Hong vd., 2017), antikanser (Kryshchyshyn-Dylevych vd., 2021), antioksidan (Demurtas vd., 2019), antienflamatuvar (Altuntaş vd., 2020), antiviral (Xue vd., 2014), antidiyabetik (Vaddiraju vd., 2021), antidepresan (Kerzare vd., 2018), antihipertansif (Prado vd., 2022), analjezik (Sakr vd., 2021), anti astım (Nagarajan ve Thangam, 2021), antipsikotik (Bali vd., 2014) gibi çeşitli biyolojik özellikleri ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

1.3.2 Artemisinin

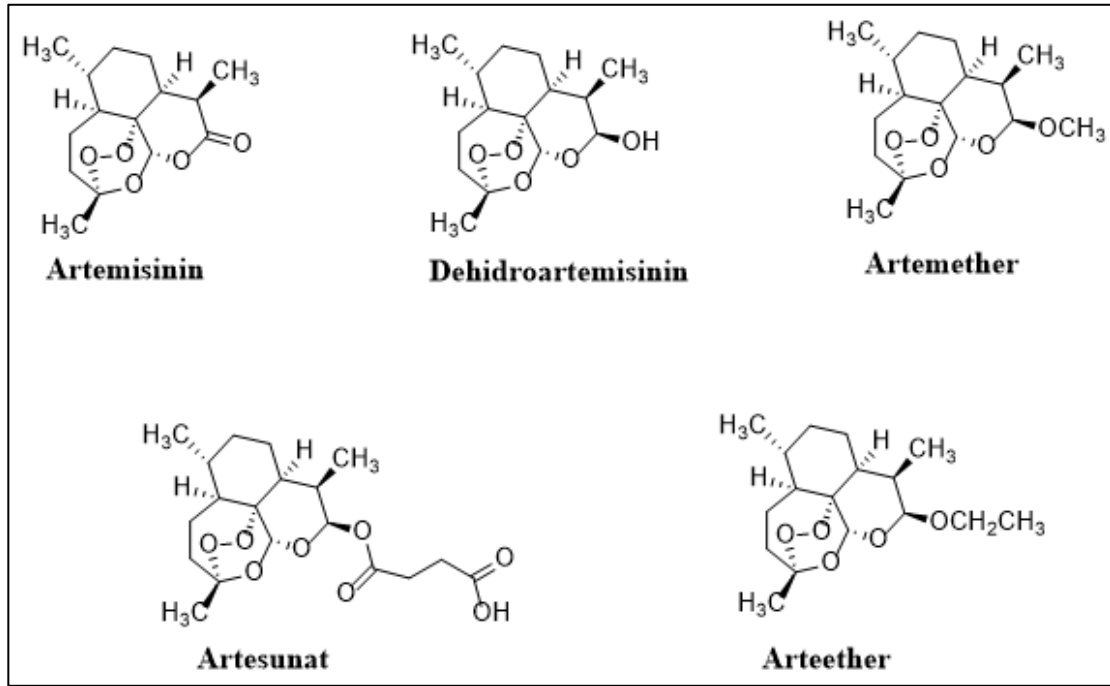
Artemisinin, yüzyıllardır titreme ve ateş tedavisinde kullanılan şifalı bitki olan tatlı pelin bitkisi *Artemisia annua* elde edilen ve $C_{15}H_{22}O_5$ formülüne sahip eşsiz bir peroksit köprüsü içeren seskiterpen bir laktondur (Efferth, 2018; Yang vd., 2020)

1960'larda *Plasmodium falciparum*'un klorokin'e karşı artan direnci karşı sebebiyle yeni sıtma ilaçları için acil ihtiyaç ortaya çıktı. Bu yüzden yeni sıtma önleyici ilaçlar arayışı başladı (Tu, 2011; Cheong vd., 2020). 1967'de Çin'de Project 523 ofisi önderliğinde ve Tu Youyou başkanlığında sıtmaya karşı ulusal bir proje oluşturuldu. Hem fitokimyasal hem de farmakolojik araştırmacılardan bu araştırma grubu sıtma tedavisi için Çin bitkisel materyallerinden olası sıtma önleyici aktivitelere sahip bileşenlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu üzerinde çalışmaya başladı. 2.000'den fazla Çin bitkisi üzerinde çalışmaya başlayan bu grup elde ettikleri bitki ekstraktlarının üzerinde çalıştıkları fare sıtma modeline karşı *Artemisia annua* ekstraktının literatür sonuçlarıyla çelişkili olmakla beraber sıtma parazitiine karşı etkisinin olduğunu gözlemlediler (Tu, 2011). Yaptıkları literatür incelemesi sonucunda 283-363 yılları arasında yaşamış bir simyacı ve şifalı bitki uzmanı olan Ge Hong tarafından yazılmış "A Handbook of Formulas for Emergencies" kitabında "2 litre suya batırılmış bir avuç qinghao (*Artemisia annua*), suyunu sıkın ve hepsini için" ibaresi Tu Youyou'nun dikkatini çekti (Tu, 2011; M. Li ve Liang, 2016). Böylelikle Tu Youyou ekstraksiyonda kullanılan ısıtma işleminin aktif bileşenleri bozabileceğini düşündü. Daha düşük sıcaklıklarda yaptıkları ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde ettikleri ekstraktların *Plasmodium berghei* ile enfekte farelerde ve *Plasmodium cynomolgi* ile enfekte maymunlarda parazite karşı %100 etkili olduğunu keşfettiler. Çalışmalara devam eden ekip 1972'de ekstraktın aktif bileşeni olarak moleküler ağırlığı 282 Da ve erime noktası 156–157 °C olan renksiz kristalli bir madde olarak Artemisinin (Şekil 1.8) bileşiğini tanımladılar (Tu, 2011).

Artemisinin keşfedildikten sonra sıtma tedavisinde çok başarılı sonuçlar vermiştir. Ayrıca düşük toksik özellik gösterdiği de rapor edilmiştir (Cheong vd., 2020).

Artemisinin yapısı nedeniyle hem yağda hem de suda zayıf çözünme özelliği gösterir. Dihidroartemisinin (DHA) elde edilmesi için araştırmacıları tarafından artemisinin karbonil grubunun uzaklaştırılmıştır. DHA üzerinde ek modifikasyonlarla,

suda çözünen artesunat ve yağda çözünen artemether ve arteether bileşikleri (Şekil 1.8) sentezlenmiştir (Peter vd., 2021). Bu yeni modifikasyonlar çözünürlüğü arttırmakla beraber antimalarial aktiviteyi de arttırmıştır (Hu vd., 2019; Yang vd., 2020).

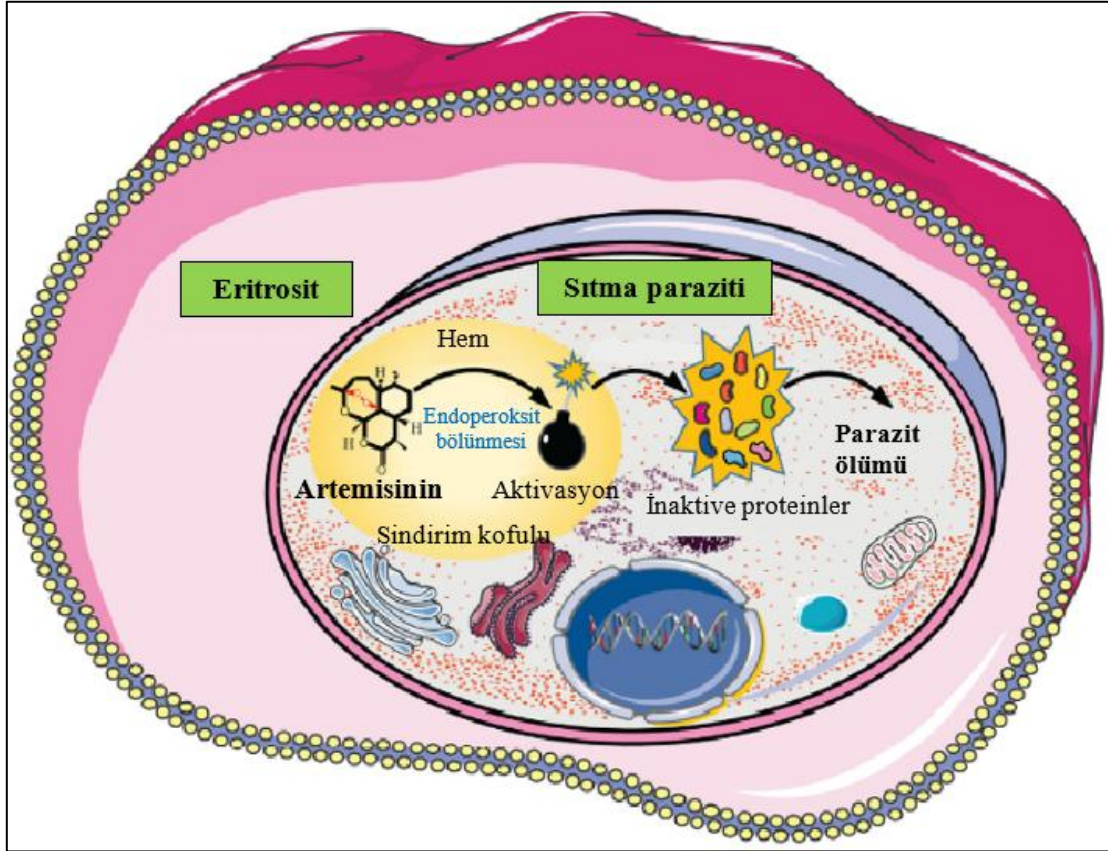


Şekil 1.8 Artemisinin ve türevleri

Artemisininlerin yeni türevleriyle beraber kullanımı da yaygınlaştı ve 2006 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından *Plasmodium falciparum* sıtmasının tedavisi için birinci basamak tedavi seçenekleri olarak artemisinin bazlı kombinasyon tedavilerinin benimsenmesini önerildi (White ve Nosten, 2007). Tu Youyou 2011 yılında artemisinin keşfi ve geliştirilmesindeki rolü nedeniyle prestijli "Lasker-DeBakey Klinik Tıbbi Araştırma Ödülü" ve 2015 yılında artemisinin ailesini keşfinden dolayı "Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü" ile ödüllendirildi (Liu vd., 2020).

Oldukça etkin antimalariyal özellik gösteren artemisininlerin etki mekanizması araştırmacıları meraklandıran bir konu olmuştur. Artemisininlerin aktivasyon mekanizması kesin olarak belirlenmiş olmasa da araştırmacıların büyük çabaları sayesinde yavaş yavaş ortaya çıkmaktadır (Ma vd., 2020). Artemisininlerin işlevi, artemisininlerin özel kimyasal yapısıyla doğrudan bağlantılıdır (Meshnick vd., 1993). Artemisininlerin önemli bir bileşeni olan endoperoksit köprüsünün eritrosit içerisinde parçalanabildiği ve bu özelliği kaybeden analogların antimalariyal aktiviteyi kaybettiği

görülmüştür. Peroksit köprüsünün parçalanması, hücresel metabolitlerin alkile olmasına ve karbon merkezli radikallerin oluşmasına neden olur. Böylelikle sıtma parazitlerinin ölmesini sağlar (Şekil 1.9) (Haynes vd., 2014; Yang vd., 2020).



Şekil 1.9 Artemisinin etki mekanizmasının bir modeli (Yang vd., 2020)

Artemisininlerin farmakolojik özellikleri sadece sıtma önleyici olmakla sınırlı değildir. Yapılan çalışmalar artemisinin ve türevlerinin antikanser (Mondal ve Chatterji, 2015), anti anjiyogenez (Tsui vd., 2019), antienflamatuvar (Ho vd., 2012), antimikrobiyal (Appalasamy vd., 2014) gibi çoklu farmakolojik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir.



2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

İlaçlara karşı direnç durumunu engellemek amacıyla aynı anda birden fazla ilacın birlikte kullanımı yaygın bir durumdur (Özenver ve Efferth, 2022; Talib vd., 2022). Örneğin bazı bakteri suşlarının bazı antibiyotiklere karşı gelişen bakteriyel direncinin üstesinden gelmek amacıyla farklı ilaç bileşenleri birlikte kullanılarak tedavi etkinliği arttırmaktadır (Liu vd., 2021).

Ancak kombine tedavilerde başarılar elde edilmiş olsa da bu stratejinin hala zayıf yönleri vardır. Örneğin çeşitli ilaçlar arasında farmakokinetik bilgi eksikliği, klinik gözlemler ile *in vitro* veriler arasında farklı ilaçların emilim ve dağılımıyla ilgili tutarsızlıklara yol açabilir. Bu nedenle, kombine terapilerindeki zorlukları çözmek için hibrit bileşiklerin kullanılması stratejik bir yaklaşımdır (Alkhzem vd., 2022).

Bir hibrit molekül, iki veya daha fazla bileşiğin bir kimyasal bağ ile birleştirildiği sentetik bir bileşiktir. Bu durum hibrit bir molekülün iki farklı farmakofor gibi davranabileceğini gösterir. Ayrıca hibrit moleküller köken aldığı bileşiklerin biyolojik özelliklerinden farklı özellik gösterme potansiyeline de sahiptirler. Hibrit moleküller sentezleme yoluyla, doğal veya sentetik aktif moleküllerin birleştirilerek daha az toksisite veya yan etkiye sahip yeni moleküllerin üretimini mümkündür (Meunier, 2008; Mohsin ve Ahmad, 2018). Hibrit moleküllerin sahip olduğu biyolojik ve farmakolojik potansiyellerinden dolayı bu moleküller, ilaç araştırmalarında önemli bir çalışma alanını oluşturmaktadır. Aşağıda hibrit moleküllerle ilgili yapılmış bazı çalışmalara değinilecektir.

Pokrovskaya vd. (2009) florokinolon (siprofloksasin) ve aminoglikozit (neomisin) antibiyotikleri içeren hibrit moleküller sentezlediler. Bu yeni molekülleri gram negatif ve gram pozitif bakterilere uygulayıp antibakteriyel aktiviteleri belirlediler. Hibrit moleküllerden çoğunun, ana yapı neomisinden daha güçlü olduğunu ve aminoglikozitlerle ilişkili dirençli türlerde etkili olduğunu gördüler. Hibrit moleküllerin bakteriyel protein sentezinin engellenmesinde neomisine yakın veya daha etkili oldukları ve florokinolon hedefleri olan DNA giraz ve topoizomera IV için siprofloksasinden 32 kat daha güçlü inhibitörler olduklarını belirttiler (Pokrovskaya vd., 2009).

Tian vd. (2016) antikanser özelliklerini test etmek için dört dizi dihidroartemisinin-kumarin hibrit molekülleri sentezlediler. Sentezledikleri bu bileşiklerin sitotoksik özelliklerini test etmek için MTT yöntemini kullanarak anoksik ve normoksik koşullar altında bileşiklerin MDA-MB-231, HCT-116, MRC-5 ve HT-29 hücre hatları üzerindeki aktivitelerini test ettiler. Bileşiklerin 0.05–125.40 μ M aralığında EC₅₀ orta derece sitotoksik aktivite sergilediklerini ve çoğu bileşiğin anoksik koşullar altında normoksik koşullardan 10 kat daha fazla sitotoksik aktivite sergilediğini gözlemlediler. Ayrıca tasarladıkları dört seriden birinin anoksik koşullar altında HT-29 hücre hattına karşı daha iyi aktivite sergilediğini belirttiler (Tian vd., 2016).

Hu vd. (2019) bir seri artemisinin-indol ve artemisinin-imidazol hibrit molekülleri sentezlediler. Ve bunları çeşitli kanser hücrelerine (A549, MCF-7, HepG-2, MDA-MB-231) hücre hatlarına uyguladılar. Test ettikleri bileşiklerin çoğunun, artemisinin'den daha yüksek antikanser aktiviteleri gösterdiğini ve bazı bileşiklerin (11a ve 11c), MCF-7'ye karşı sırasıyla EC₅₀ 6.78 μ M ve 5.25 μ M gibi güçlü sitotoksik özelliğe sahip olduğunu gösterdiler. Ayrıca çalışmada artemisinin-indol türevleri, artemisinin-imidazol türevlerinden daha iyi aktivite sergilemiştir (Hu vd., 2019).

Wang vd. (2019) çeşitli bağlayıcılar kullanarak bir dizi artemisinin-4-(arilamino) kinazolinin hibrit türevi sentezlediler. Sentezledikleri bileşikleri *in vivo* ve *in vitro* olarak kolorektal kanser için kullandılar. HCT116 hücre hattı üzerine uyguladıkları bileşiklerin hücre çoğalmasının önlenmesinde güçlü etkileri olduğunu gözlemlediler. Test ettikleri bileşiklerden en iyi aktiviteyi gösteren bileşiğin EC₅₀ değeri 0.1 μ M iken ana bileşiklerin EC₅₀ değerleri dihidroartemisinin ve gefitinib için sırasıyla 2.85 μ M ve 19.82 μ M olarak ölçtüler. Aynı bileşiğin *in vivo* anti-kolorektal kanser aktivitesini incelemek için HCT116 fare ksenograft modelini kullandılar. Model fareler üzerinde yaptıkları 18 günlük uygulamadan sonra farelerde kilo kaybı olmazken tümör dokusunun küçüldüğünü tespit ettiler (Wang vd., 2019).

Fröhlich vd. (2020) tamoksifen, östrojen ve artemisinin bazlı bir dizi hibrit molekül sentezlediler. Bu bileşikleri insan prostat kanseri (PC-3) ve meme kanseri (MCF-7) hücre hatlarına karşı *in vitro* olarak incelediler. Hibrit bileşiklerin çoğu, her iki kanser hücre hattına karşı güçlü bir antikanser aktivite sergiler. Ana bileşiklerin EC₅₀ değerleri; MCF-7 hücre hattında 4-hidroksitamoksifen 19.3 μ M, dehidroartemisinin 49.3 μ M, artesunik asit 32.0 μ M ve PC-3 hücre hattında 4-hidroksitamoksifen 81.5 μ M,

dehidroartemisinin 82.5 μM , artesunik asit 72.4 μM şeklinde belirtilmişti. Östrojen-artemisinin hibrit molekülleri en iyi aktiviteyi gösterdiler. Bu bileşiklerin en düşük EC_{50} değerleri prostat kanserinde 1.18 μM ile 1.07 μM ve meme kanserinde 2.08 μM gibi ana yapılardan oldukça düşük değerlerdi (Fröhlich vd., 2020).

2.1 Çalışmanın Amacı ve Önemi

Heterosiklik bileşikler, halkasal yapıda karbon harici oksijen, nitrojen, kükürt, fosfor, demir, magnezyum, selenyum gibi en az bir hetero atom içeren bileşiklerdir. Bu bileşikler doğal kaynaklı olabileceği gibi sentez yoluyla da üretilirler ve ilaç kimyasında yaygın olarak kullanılırlar.

Bu çalışmanın amacı hem doğal hem de sentetik olarak üretilen birçok bileşiğin yapısında bulunan indol halkası ve tatlı pelin otu (*artemisia annua*) bitkisinden izole edilen artemisininin bir türevi olan artesunat maddesinin birleştirilmesiyle elde edilen yeni sentezlenmiş indol-artesunat hibrit moleküllerinin biyolojik ve farmakolojik özelliklerinin kapsamlı bir şekilde araştırılmasıdır. Bu doğrultuda bileşiklerin antioksidan potansiyelleri beş farklı yöntemle (DPPH, ABTS, Galvinoxil, Fosfomolibden ve FRAP) test edilecektir. Sitotoksik özellikleri farklı kanser hücre hatlarında (Panc-1, MDA-MB-231, HT-29, HepG2 ve Ishikawa) ve sağlıklı bir hücre hattındaki (HUVEC) etkileri belirlenecektir. Sitotoksik potansiyelleri belirlenen bileşiklerin hücreler üzerindeki koloni oluşturma ve invazyon kapasiteleri, yara iyileştirme potansiyelleri ve apoptotik etkileri ile apoptotik yolaktaki genlerin mRNA ifadesindeki değişimler araştırılacaktır. Böylelikle yeni sentezlenmiş olan indol-artesunat hibrit moleküllerinin ilaç olma potansiyelleri önemli bir ölçüde araştırılacaktır. Daha sonraki yıllarda indol-artesunat hibrit moleküllerinin ilaç olarak kullanılması bu çalışmanın temel hedefidir.



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan kimyasalların satın alındığı firmalar ve bu kimyasalların kodları Çizelge 3.1'de gösterildi.

Biyolojik aktiviteleri test edilen organik moleküller Prof. Dr. Arif KIVRAK danışmanlığında Dr. Emrah KAVAK tarafından doktora tezi olarak 2022 yılında yapılmıştır. “Yeni Artemisinin-İndol Hibrit Moleküllerin Tasarımı, Sentezi ve İn Siliko Çalışmaları” isimli tez kapsamında elde edilen organik moleküllerin detaylı sentez yöntemi tezde verilmiştir. Ayrıca Spektroskopik yöntemler (NMR, MS) kullanılarak sentezlenen moleküllerin detaylı karakterizasyonu tez kapsamında yapılmıştır. Bu maddelerin açık formülleri, IUPAC adları ve çalışma kapsamında kullanılan kodları Çizelge 3.2’de belirtilmiştir.

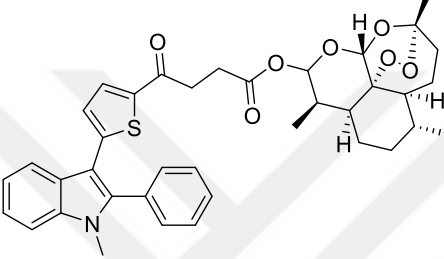
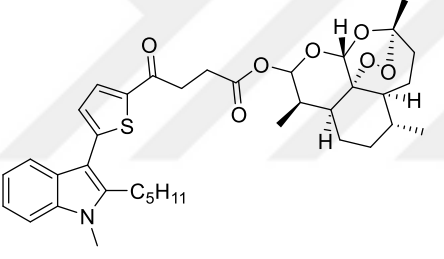
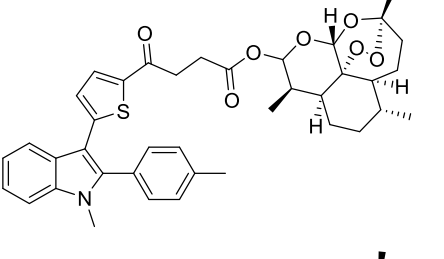
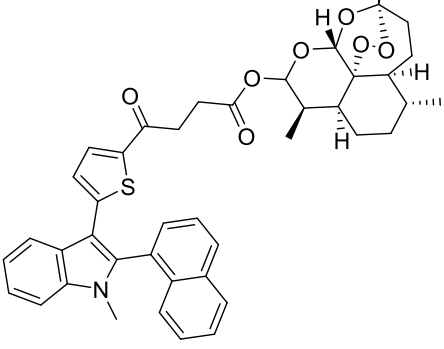
Çizelge 3.1 Tezde kullanılan kimyasalların marka ve kodları

Kimyasalın adı	Kimyasalın Marka ve Kodu
Askorbik asit	VWR-83568.180
Troloks	Acros Organics-218940010
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)	Sigma-Aldrich-D9132
2,2-azino bis (3-ethyl benzothiazolin-6- sülfonik asit) (ABTS)	Sigma-Aldrich-A3219
Potasyum persülfat	Sigma-Aldrich-216224
2,4,6- tripiridil s-triazin (TPTZ)	Alfa Aesar-3682-35-7
FeCl ₃	Sigma-Aldrich-451649
Amonyum molibdat	Sigma-Aldrich-A1343
Sodyum fosfat	Sigma-Aldrich-342483
Sülfirik asit	Sigma-Aldrich-339741
Saf etanol	Sigma-Aldrich-46139
Etanol (%99)	Sigma-Aldrich-51976
Kristal Viyole	Merck-548629
Metanol (%99,8	Sigma-Aldrich-322415
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Carlo Erba-445106
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-D1145
RPMI-1640	Sigma-R8758

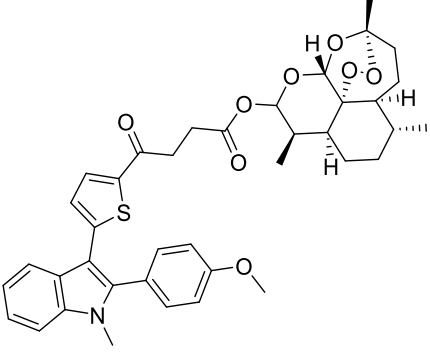
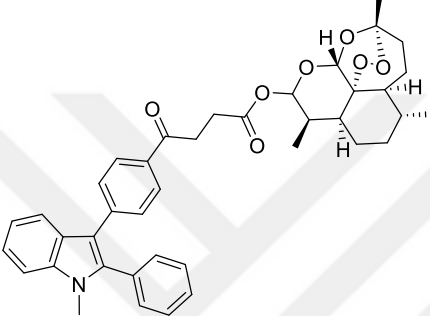
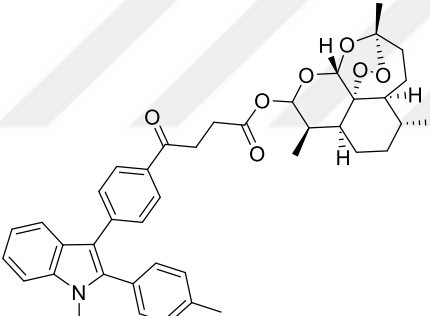
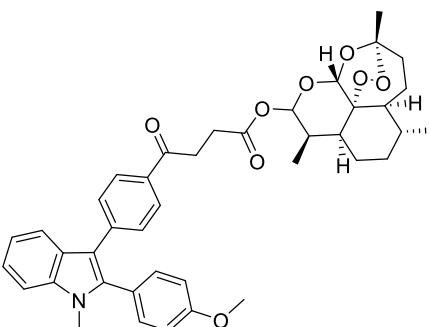
Çizelge 3.1 Tezde kullanılan kimyasalların marka ve kodları (devam)

Penisilin	Capricorn-PS-B
Tripsin-EDTA	Sigma-T3924
Fetal Sığır Serumı (FBS)	Biowest-S1810
Tripan Blue	Biological Industries-2041813

Çizelge 3.2 Tezde kullanılan maddeler

Madde kodu	Madde açık formülü ve IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) adı
D1	 (3R,5aS,6R,8aS,9R,12R,12aR)-3,6,9-trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-i]izokromen-10-il 4 -(5-(1-metil-2-fenil-1H-indol-3-il)tiyofen-2-il)-4-oksobütanoat
D2	 (3R,5aS,6R,8aS,9R,12R,12aR)-3,6,9-trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-i]izokromen-10-il 4 -(5-(1-metil-2-pentil-1H-indol-3-il)tiyofen-2-il)-4-oksobütanoat
D3	 (3R,5aS,6R,8aS,9R,12R,12aR)-3,6,9-trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-i]izokromen-10-il 4 -(5-(1-metil-2-(p-tolil)-1H-indol-3-il)tiyofen-2-il)-4-oksobütanoat
D4	 (3R,5aS,6R,8aS,9R,12R,12aR)-3,6,9-trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-i]izokromen-10-il 4 -(5-(1-metil-2-(naftalen-1-il)-1H-indol-3-il)tiyofen-2-il)-4-oksobütanoat

Çizelge 3.2 Tezde kullanılan maddeler(devam)

D5		(3R,5aS,6R,8aS,9R,12R,12aR)-3,6,9-trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-i]izokromen-10-il 4 -(5-(2-(4-metoksifenil)-1-metil-1H-indol-3-il)tiyofen-2-il)-4-oksobütanoat
D6		(3R,5aS,6R,8aS,9R,12R,12aR)-3,6,9-trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-i]izokromen-10-il 4 -(4-(1-metil-2-fenil-1H-indol-3-il)fenil)-4-oksobütanoat
D7		(3R,5aS,6R,8aS,9R,12R,12aR)-3,6,9-trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-i]izokromen-10-il 4 -(4-(1-metil-2-(p-tolil)-1H-indol-3-il)fenil)-4-oksobütanoat
D8		(3R,5aS,6R,8aS,9R,12R,12aR)-3,6,9-trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-i]izokromen-10-il 4 -(4-(2-(4-metoksifenil)-1-metil-1H-indol-3-il)fenil)-4-oksobütanoat

Çizelge 3.2 Tezde kullanılan maddeler(devam)

D9		(3R,5aS,6R,8aS,9R,12R,12aR)-3,6,9-trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-i]izokromen-10-il 4 -(4-(1-metil-2-(naftalen-1-il)-1H-indol-3-il)fenil)-4-oksobütanoat
D10		(3R,5aS,6R,8aS,9R,12R,12aR)-3,6,9-trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-i]izokromen-10-il 4 -(4-(1-metil-2-pentil-1H-indol-3-il)fenil)-4-oksobütanoat
D11		(3R,5aS,6R,8aS,9R,12R,12aR)-3,6,9-trimetildekahidro-12H-3,12-epoksi[1,2]dioksepino[4,3-i]izokromen-10-il 4 -(5-(5-bromo-1-metil-2-fenil-1H-indol-3-il)tiyofen-2-il)-4-oksobütanoat

3.2 Yöntem

3.2.1 DPPH Yöntemi

Blois (1958)'un DPPH yöntemi modifiye edilerek kullanıldı (Blois, 1958). DPPH• radikali antioksidanların radikal giderilmesindeki rollerinin belirlenmesinde en fazla kullanılan yöntemlerden birisidir. DPPH• radikalinin indirgenmeden önceki rengi mordur. Antioksidan maddeler tarafından DPPH• radikali DPPH-H formuna indirgendiğinde mor renkten sarı renge doğru bir renk değişimi olur. DPPH• radikali en yüksek absorbands değerini 517 nm'de verdiği için renk değişimi spektrofotometrede 517 nm'de ölçülür. Antioksidan maddenin radikal süpürme aktivitesi kısaca RSA olarak ifade edilir. Bu metotta, antioksidan madde arttıkça süpürülen radikal miktarının artmasına dolayısıyla RSA'nın artması prensibine dayanmaktadır.

DPPH metodu genel olarak aşağıda anlatıldığı gibi uygulandı. DPPH konsantrasyonu 400 µM olacak şekilde saf etanol ile hazırlandı. Tamamen çözünmesi için DPPH ultrasonikatör içerisinde 30 dakika bekletildi.

Test edilen maddelerin çözündürülmesi ve tüm seyreltmeler saf etanol ile yapıldı. Tüm maddeler için 16.7-266.7 µM konsantrasyon aralığı oluşturuldu. Standart olarak kullanılan troloks ve askorbik asit için ise 3.75-60 µM konsantrasyon aralığı oluşturuldu. Seyreltmelerde beş ayrı konsantrasyon olarak gerçekleştirildi. Her konsantrasyon ve kör (blank) için üçer örnek hazırlandı.

Kör (blank) ve her örnek son konsantrasyonu 100 µM DPPH olan 0.5 ml tüplerde ve karanlık ortamda 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örnekler 96 kuyulu mikropalakaya aktararak mikropalaka okuyucu ile 517 nm'de okuma yapıldı. %Radikal süpürme aktivitesi (%RSA) Eşitlik 1'de belirtildiği gibi hesaplandı.

$$\% \text{ RSA} = \frac{(\text{BlankAbs} - \text{ÖrnekAbs})}{\text{BlankAbs}} \times 100 \quad (1)$$

3.2.2 ABTS Yöntemi

Re'nin metodu (1999) modifiye edilerek kullanıldı (Re vd., 1999). Bu yöntem, ABTS'nin (2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)) oksidasyonu sonucu oluşan mavi/yeşil renkli ABTS^{•+} radikal çözeltisi üzerine, antioksidan bir maddenin eklenmesi sonucu radikalın indirgenmesi sonucu oluşan renk gideriminin 600–750 nm arasındaki dalga boylarında takip edilmesi ilkesine dayanmaktadır.

ABTS metodu genel olarak aşağıda anlatıldığı gibi uygulandı. ABTS çözeltisi, 2,45 mM potasyum persülfat ile 7 mM ABTS olacak şekilde saf su ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti, 12-16 saat kahverengi bir şişe içerisinde çalkalayıcıda bekletildi. Tüm seyreltmeler saf etanol ile yapıldı. Tüm maddeler için 25-400 µM ve standart olarak kullanılan troloks ve askorbik asit için 1.25-20 µM konsantrasyon aralığı oluşturuldu. Seyreltmelerde beş ayrı konsantrasyon oluşturuldu. Her konsantrasyon ve kör (blank) için üçer örnek hazırlandı.

Deneyden önce ABTS stok çözeltisinden absorbans değeri 734 nm'de 0.705 ± 0.005 olacak şekilde bir ara stok hazırlandı. Kör (blank) ve örnekler 0.5 ml tüplerde eşit oranda karıştırıldı ve karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örnekler 96 kuyulu mikropalakaya aktararak mikropalaka okuyucu ile 734 nm'de okuma yapıldı. %Radikal süpürme aktivitesi (%RSA) “Eş. 1”de belirtildiği gibi hesaplandı.

3.2.3 Galvinoksil Yöntemi

Shi ve Niki (1998) galvinoksil metodu optimize edilerek uygulandı (Shi ve Niki, 1998). Bu yöntemde 160 µM olacak şekilde galvinoksil solüsyonu hazırlandı. Test edilen maddeler, troloks ve askorbik asit ve galvinoksil radikali saf etanolde çözdürüldü. Seyreltmeler beş ayrı konsantrasyon olarak gerçekleştirildi. Her konsantrasyon ve kör için üçer örnek hazırlandı.

Tüm örnekler için 13.15-210.5 µM, troloks için 0.125-2 µM ve askorbik asit için 0.18-3 µM konsantrasyon aralığı oluşturuldu. Her tüpe farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış madde ve galvinoksil çözeltisi 19:1 oranında 0.5 ml tüpler içerisinde karıştırıldı. Tüpler 20 dakika karanlık ortamda inkübasyona alındı. İnkübasyondan sonra örnekler 96 kuyulu mikropalakaya aktararak mikropalaka okuyucu ile 428 nm'de okuma

yapıldı. Test edilen maddeler renkli (galvinoksil radikaline benzer renkte) oldukları için yanlış sonuçları engellemek amacıyla galvinoksil radikali kullanılmadan da deney gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans değerleri, galvinoksil radikali kullanılarak elde edilen absorbans değerlerinden çıkarıldı. Standart olarak troloks ve askorbik asit kullanıldı. % Radikal yakalama aktivitesi "Eş. 1"de belirtildiği gibi hesaplanarak örneklerin antioksidan potansiyelleri troloks ve askorbik asit ile karşılaştırıldı.

3.2.4 Fosfomolibden Yöntemi

Bu yöntemin temel prensibi antioksidan bileşikler tarafından Mo (VI)'nın Mo (V)'e indirgenmesiyle asidik ortamda yeşil renkli fosfat Mo (V) bileşiğinin oluşmasıdır (Prieto vd., 1999).

Bu metot için gerekli ayraç solüsyon 4 mM amonyum molibdat, 28 mM sodyum fosfat ve 0.6 M sülfürik asit içerecek şekilde distile su (dH₂O) ile hazırlandı. Tüm örnekler için 137.5-2200 µM, troloks için 125-2000 µM ve askorbik asit için 62.5-1000 µM konsantrasyon aralığı oluşturuldu. Her konsantrasyon ve kör için üçer örnek hazırlandı.

Her tüpe farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış madde ve fosfomolibden çözeltisi 1:10 oranında 0.5 ml tüpler içerisinde karıştırılarak ısı bloğunda (95°C) 90 dakika bekletildi. İnkübasyondan sonra örnekler 96 kuyulu mikropalakaya aktararak mikropalaka okuyucu ile 695 nm'de okuma yapıldı. Elde edilen değerler, standart olarak kullanılan troloks ve askorbik asit standartlarının farklı konsantrasyonlarında hazırlanan standart eğrileri kullanılarak askorbik asit eşdeğeri ve troloks eşdeğeri olarak ifade edildi.

3.2.5 FRAP (Fe³⁺ İyonu İndirgeme Gücü) Yöntemi

Benzie ve Strain (1996) metodu modifiye edilerek uygulandı (Benzie ve Strain, 1996).

Gerekli solüsyonlar;

- 0.3 M Asetat Tamponu (pH: 3.60)
- 0.01 M TPTZ Çözeltisi

- 0.02 M FeCl₃ Çözeltisi
- 0.04 M HCl Çözeltisi

TPTZ çözeltisi 0.04 M HCl ile FeCl₃ çözeltisi dH₂O ile hazırlandı. Sırasıyla, asetat tamponu, TPTZ ve FeCl₃ çözeltisi 10:1:1 oranında karıştırıldı ve 37 °C de 30 dakika inkübe edildi.

Tüm örnekler için 37.5-600 µM, troloks ve askorbik asit için 6.25-100 µM konsantrasyon aralığı oluşturuldu. Her konsantrasyon ve kör için üçer örnek hazırlandı. Madde ve FRAP çözeltisi 1:2 oranında 96 kuyulu mikrolaka içerisinde karıştırılarak ısı bloğunda (37°C) 4dakika bekletildi. İnkübasyondan sonra örnekler mikrolaka okuyucu ile 593 nm’de okuma yapıldı.

Test edilen maddeler renkli oldukları için yanlış sonuçları engellemek amacıyla FRAP reaktifi kullanılmadan da deney gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans değerleri, FRAP reaktifi kullanılarak elde edilen absorbans değerlerinden çıkarıldı. Elde edilen değerler standart olarak kullanılan troloks ve askorbik asit ile karşılaştırıldı.

3.2.6 Hücre Kültürü

Bu çalışmada pankreas (Panc-1), insan meme (MDA-MB-231), kolon (HT-29), karaciğer (HepG2), endometrial (Ishikawa) kanser hücre hatları ve sağlıklı endotel (HUVEC) hücre hattı kullanıldı. Bu hücre hatları 37°C’de %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde ve %1 penisilin/streptomisin, %10 fetal sığır serumu (FBS) karışımı içeren DMEM veya RPMI besiyerinde çoğaltıldı. Hücre yoğunluğu yaklaşık %80 ulaştığında, hücreler tripsin ile kaldırılarak steril bir tüpe alındı. Daha sonra tüpteki hücreler 2000 rpm de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen pellet 1 ml besiyeri ile çözüldü ve tripan mavisi ile 1:1 oranında boyanarak thoma lamı ile ışık mikroskobu (Olympus) altında sayım yapıldı. Hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra kullanılacak göre 6 kuyulu veya 24 kuyulu hücre kültür plakalarına ekim yapıldı.

Test edilen maddeler dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözüldü ve seyreltmeler DMSO ile yapıldı. Maddeler uygulanırken DMSO konsantrasyonu %0.5'i geçmeyecek şekilde uygulama yapıldı (Mutlu, 2022).

3.2.7 MTT Testi

İndol-artesunat türevlerinin hücreler üzerindeki sitotoksik özellikleri MTT testi kullanılarak belirlendi. Bu yöntemin temel mantığı canlı hücreler tarafından suda çözünen MTT boyasının suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürülmesi ve oluşan formazan kristallerinin çözündürülerek hücre canlılığının belirlenmesidir.

Yöntem aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi. 96 kuyulu mikro plakaya 10^3 hücre/kuyu ve 100 µl besiyeri olacak şekilde ekim yapıldı. Bu hücreler 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bırakıldı. 24 saatlik inkübasyondan sonra kültür, 200µl (besiyeri+madde) yeni besiyeri ile tazeleni ve arzu edilen bileşğin çeşitli konsantrasyonları ile muamele edilerek 24 saat inkübatörde bırakıldı. Kontrollere ise DMSO (madde çözücüsü) eklendi. 24 saatlik inkübasyondan sonra, besiyeri dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve üzerine 100 µl yeni besiyeri ile 10 µl MTT solüsyonu eklenerek 37°C'de 4 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonra plaka tabanında çökelmiş halde ortaya çıkan formazan kristallerini çözmek için besiyeri uzaklaştırılarak 50µl DMSO eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Formazan kristalleri çözüldükten sonra absorbans değerleri, bir mikropilaka okuyucu yardımıyla 590nm'de ölçüldü. Elde edilen absorbans değerlerine göre hücre canlılık yüzdesi ve EC₅₀ (ortamdaki hücrelerin yarısını öldüren madde konsantrasyonu) değeri hesaplandı. Her örnek için hesaplanan EC₅₀ değeri sonraki çalışmalar için kullanıldı (Mutlu, 2022).

3.2.8 Koloni Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi

MTT testiyle EC₅₀ değerleri belirlenen maddeler için koloni oluşturma kapasitesi belirlendi. Bunun için 6 kuyulu plakaya 10^3 hücre/kuyu ve 3 ml besiyeri olacak şekilde ekim yapıldı.

Hücreler 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bırakıldı. 24 saatlik inkübasyondan sonra bileşiklerin EC₅₀ dozları uygulandı. Bir gün sonra besiyeri uzaklaştırılarak taze besiyeri ile değiştirildi. Daha sonra her 2-3 günde bir besiyeri tazelenerek inverted mikroskop ile koloni gelişimi gözlemlendi. 1-2 hafta (hücrelerin gelişim hızlarına göre) sonra hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve metanol eklenip -20°C sıcaklıkta 10 dakika bırakılarak hücrelerin fikse olmaları sağlandı. Daha sonra metanol uzaklaştırılarak 0.4 mg/ml konsantrasyonda kristal viyole boyanması ile

boyandı. Boya uzaklaştırıldıktan sonra boyanan kolonilerin fotoğrafı çekilerek imageJ programıyla analiz yapılarak kontrol grubu ile karşılaştırıldı (Mutlu, 2022).

3.2.9 İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi

Sitotoksik etkiye sahip maddelerin, hücrelerin invazyon kapasitelerine etkilerini belirlemek için “trans-well matrigel invasion chamber” kapları kullanılarak 24 kuyucuklu hücre kültür plakaları içerisinde gerçekleştirildi. Kullanılan invazyon kuyucukları, 8µm çaplı porlar içeren membran bir tabaka ile örtülü ve bu membranın üzeri ise matrigel matrix ile kaplıdır. Bu matrix, bazal membranın in vitro koşullarında oluşmasını sağlar. Böylelikle bu invazyon kuyucukları, invaziv özelliğe sahip hücrelerin zarın diğer tarafına geçmesine izin verirken invaziv özelliğe sahip olmayan hücrelerin geçişini engelleyerek, hücrelerin invaziv özelliklerinin araştırılması için özel bir ortam oluşturur. Pank-1, HepG2 ve HT-29 hücrelerinin invazyon özellikleri araştırıldı.

Deneyden önce matrigel kuyucukları -20°C dolaptan çıkarılarak 24 kuyucuklu plakaya yerleştirildi. 0.5 ml matrigel kuyucuğunun içine ve 0.5 ml kuyucuğun yerleştirildiği bölmeye serumsuz besiyeri eklenerek 2 saat 37°C inkübasyona bırakıldıktan sonra ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı. Böylelikle invazyon kuyucukları hazırlanmış oldu. Daha sonra her invazyon kuyucuğunun alt bölmesine 750µl serum içeren besiyeri, üst kısmına ise 0.5 ml serumsuz besiyeri ile birlikte 10^4 hücre ekilerek ve üzerine test edilen bileşiklerin EC_{50} dozları uygulandıktan sonra 24 saat 37°C inkübasyona bırakıldı. Plakada 24 saat inkübasyondan sonra, besiyeri uzaklaştırıldı. İnvazyona uğramayıp matrigel membranın üst yüzeyinde kalmış olan hücrelerin temizlenmesi kulak pamuğu çubuğu yardımıyla yapıldı. İnvazyona uğrayıp membranın alt kısmına geçen hücreleri fiks etmek için 0.5 ml matrigel kuyucuğunun içine ve 0.5 ml kuyucuğun yerleştirildiği bölmeye metanol eklendi ve plaka -20°C de 10 dakika bekletildi. Daha sonra metanol uzaklaştırıldı ve 0.5 ml matrigel kuyucuğunun içine ve 0.5 ml kuyucuğun yerleştirildiği bölmeye kristal viyole boyası eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. İnvazyon kuyucuğundan boya uzaklaştırılıp fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra ışık mikroskopuyla fotoğrafı çekildi

(Jia vd., 2005). Daha sonra imageJ programı yardımıyla hücre sayımı yapıldı. % invazyon değerini hesaplamak için Eşitlik 2'deki formül kullanıldı.

$$\% \text{Invazyon} = \frac{\text{Matrigel matriks bazal membranındaki hücre sayısı}}{\text{Kontrol membranındaki hücre sayısı}} \times 100 \quad (2)$$

3.2.10 Wound-Healing (Yara-İyileşme) Yöntemi ile Migrasyon Etkisinin Belirlenmesi

MTT testiyle EC₅₀ değerleri belirlenen maddelerin migrasyon üzerine etkilerini belirlemek amacıyla Wound-healing (Yara-iyileşme) yöntemi kullanıldı. Bunun için 6 kuyulu plakaya 20-30x10³ hücre/kuyu (hücrelerin gelişim hızlarına göre) ve 3 ml besiyeri olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat bırakıldı. 24 saatlik inkübasyondan sonra hücrelerin bulunduğu kuyucukların her biri tam ortasından 200µl pipet ucu ile düzgünce bir çizgi çekildi. Daha sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkanarak kalan hücreler temizlendi.

Her kuyucuğa 3ml besiyeri eklendi ve 0 saat fotoğrafı çekilerek maddenin EC₅₀ dozu uygulandı. Kontrol grubuna ise madde çözücüsü (DMSO) eklendi. 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve taze besiyeri ile değiştirilerek 24 saat için fotoğraf çekildi. Hücrelerin gelişim hızlarına bağlı olarak 24 saatte bir fotoğraf çekilmeye devam edildi. Daha sonra kontrol grubu ile madde uygulanan grupların yara kapatma özellikleri çekilen fotoğrafların ImageJ programı ile analiz edilmesiyle hesaplandı (Mutlu, 2022).

3.2.11 Apoptozun Belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılan maddelerin apoptotik özellikleri, Annexin V-FITC/PI Apoptoz kiti (ABP Biosciences) yardımıyla ve üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

Bunun için 6 kuyulu plakaya 30x10³ hücre/kuyu ve 3 ml besiyeri olacak şekilde hücreler ekilerek 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra maddelerin EC₅₀ dozları uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırılarak hücreler Tripsin-EDTA kullanılarak kaldırıldı. Hücreler kaldırıldıktan sonra santrifüjde 2000 rpm'de 5 dakika

boyunca santrifüjlendi. Daha sonra üretici firmanın protokolünde belirtilen şekilde Anneksin V/PI boyası uygulandı. Flow sitometri cihazı (CytoFLEX, Beckman Coulter) kullanılarak canlı, apoptotik ve nekrotik hücrelerin yüzdeleri elde edildi.

3.2.12 Apoptozda Görev Alan Genlerin mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Test edilen bileşiklerin apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırmak için öncelikle total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonundan sonra elde edilen RNA'nın konsantrasyonuna ve saflığına bakıldı. Daha sonra agoroz jel elektroforezi kullanılarak 28S ve 18S bantlarının durumuna göre elde edilen RNA'ların kalitesine bakıldı. İzole edilen RNA'nın uygun kalitede olduğuna karar verildikten sonra komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirildi. Son olarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) işlemiyle apoptozla ilişkili genlerin ekspresyon seviyesi değerlendirildi.

3.2.12.1 Total RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

Kullanılan hücre hatlarında (Panc-1, MDA-MB-231, HT-29, HepG2 ve Ishikawa) total RNA izolasyonunu gerçekleştirmek için Analytik Jena markasının innuPREP RNA Mini Kiti kullanıldı. Bunun için 6 kuyulu plakaya 30×10^3 hücre/kuyu ve 3 ml besiyeri olacak şekilde hücreler ekilerek 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra MTT testinde elde edilen EC₅₀ dozları uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra besi yeri uzaklaştırıldı ve üretici firmanın önerdiği kit prosedürü uygulandı.

Öncelikle hücrelere kitte bulunan parçalama tamponu ile muamele edildi ve hücre kazıyıcı ile toplanarak steril bir tüpe alındıktan sonra 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra tüpteki parçalanmış hücre karışımı alıcı bir tüpe yerleştirilen D filtreli tüpe aktarılarak santrifüjde 11.000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.

Santrifüjden sonra alıcı tüpteki örnek üzerine +4°C'de bekletilen %70'lik etanolden 400 µl eklendi.

Ardından yeni bir alıcı tüpün içine yerleştirilen R filtreli tüpe aktararak 11.000xg'de 2 dakika santrifüj işlemi tekrarlandı.

Devamında R filtreli tüp yeni bir alıcı tüpe yerleştirilerek üzerine 500 µl HS yıkama solüsyonu eklendikten sonra 11.000xg'de 2dk santrifüj işlemi uygulandı.

Daha sonra filtreli tüp yeni bir alıcı tüpe alınarak üzerine 700 µl LS yıkama solüsyonu eklenerek 11.000xg'de 1 dk santrifüj işlemi uygulandı.

Ardından filtreli tüp yeni bir alıcı tüpe aktararak dk daha santrifüj işlemi uygulandı.

Daha sonra filtreli tüp, steril bir tüpe alınarak üzerine 40 µl RNaz içermeyen steril su eklendi ve 1 dk oda sıcaklığında bırakıldıktan sonra 11.000xg'de 1 dk santrifüj işlemi uygulandı. Elde edilen total RNA -20°C'de saklandı.

İzole edilen RNA'nın saflığını ve konsantrasyonunu belirlemek için Epoch Spektrofotometre (BioTek)'de Take 3 aparatı kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için Take3 aparatına 1 µl RNAaz içermeyen steril su eklenerek kör olarak kabul edildi ve örnekler aparata 1 µl olarak eklenerek 260/280 nm dalga boylarında ölçüm yapıp RNA miktarı ve kalitesi belirlendi.

3.2.12.2 Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen RNA'nın kalitesini belirlemek için agaroz jel elektroforezinde 28S ve 18S bantlarına bakıldı.

Bunun için %1'lik agaroz konsantrasyonu olacak şekilde agaroz tartılarak 1X Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu ile karıştırıldı. Agarozun iyice çözünmesi sağlamak için hazırlanan karışım mikrodalga fırında ısıtıldı. Çözelti biraz soğutulduktan sonra (~50°C) çözeltiye 0.75 µl etidyum bromür (EtBr) eklenip karıştırıldı. Daha sonra çözelti jel tablasına dökülerek tarak yerleştirildi ve jelin soğuyarak polimerleşmesi beklendi. Polimerleşen jel, örneklerin yükleneceği kuyucuklar tankın (-) kutbuna denk gelecek şekilde elektroforez tankına yerleştirildi Daha sonra jelin üzerini kaplayacak şekilde elektroforez tankına 1X TAE tamponu eklendi. Örnekler (5µl RNA, 2 µl 6x yükleme boyası ve 1 µl dH₂O) ve DNA marker (3µl DNA ladder, 1 µl 6x yükleme boyası ve 1 µl dH₂O) dikkatli bir şekilde kuyucuklara yüklendi.

Örnekler yüklendikten sonra sistem 900 volt, 500 mA'de 45 dk yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, gelLite jel görüntüleme cihazı (Clever Scientific) yardımıyla görüntülenerek fotoğraflandı.

3.2.12.3 cDNA Sentezi

Epoch Spektrofotometre (BioTek)'de belirlenen konsantrasyon değerleri kullanılarak cDNA sentezinde, her hücre hattı için eşit miktarda (0.5µg - 2µg) RNA kullanıldı. cDNA sentezlemek için ABM markasının OneScript cDNA Sentez Kiti kullanılarak firmanın önerdiği prosedür uygulandı.

Bunun için RNA örneği ile birlikte 1 µl dNTP ve 1 µl Oligo(dT) ve RNaz içermeyen steril su ile hacim 14.5 µl'ye tamamlandıktan sonra elde edilen karışım blok ısıtıcıda 65°C'de 5 dk bekletildi. Daha sonra, her örnek için 4µl 5X RT tamponu, 0.5µl RNase OFF Ribonükleaz inhibitör ve 1µl OneScript Plus RTaz olacak şekilde bir karışım hazırlandı. Hazırlanan bu karışım örneklerin üzerine dağıtılarak önce 50°C'de 60 dk ardından 85°C'de 5 dk bekletildi. Sentez işleminden sonra örnekler -20°C buzdolabına kaldırıldı.

3.2.12.4 Gerçek Zamanlı PZR Analizi

Gerçek zamanlı PZR, gen ekspresyon ürününün tayin edilmesinde kullanılan hassas bir tekniktir. Bu yöntemde hem aynı anda çok örnek çalışılabilir hem de reaksiyondan sonra agaroz jel elektroforezi gibi bir işleme ihtiyaç duyulmaz. Çünkü reaksiyon esnasında analiz yapılabilmektedir.

Bu çalışmada apoptozla ilişkili olan gen ifadelerini belirlemek için kullanılan primer dizileri GenBank/EMBL veri bankaları taranarak seçildi (Çizelge 3.3). Kullanılan tüm genlerin primer dizileri NCBI veri tabanında kontrol edildikten sonra Sentebiolab (Sentegen, Türkiye) tarafından sentezi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kontrol geni (house keeping) olarak GAPDH geni seçildi ve veriler GAPDH geni kullanılarak normalize edildi.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan ileri (F) ve geri (R) primer diziler

Gen	Primer Dizileri	Gen Numarası	Bank
GAPDH	F: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG R: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA	NM_002046	
P53	F: CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG R: GGATGGTGGTACAGTCAGAGC	NM_000546	
BAX	F: TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG R: TGTGTCCACGGCGGCAATCATC	NM_004324	
BCL2	F: ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT R: GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC	NM_000633	
CASP3	F: GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG R: GCATCGACATCTGTACCAGACC	NM_004346	
CASP8	F: AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA R: TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC	NM_001080125	
CASP9	F: GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT R: CAACGTACCAGGAGCCACTCTT	NM_001229	

Gerçek zamanlı PZR uygulaması için ABM markasının KiloGreen MasterMix kiti kullanılarak uygulama 96 kuyulu mikro plakalar içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon için her kuyucuğa 5µl KiloGreen floresan boya, 0.5µl ileri primer, 0.5µl geri primer, 1.5µl RNAaz içermeyen steril su içeren 7.5µl'lik karışım eklendikten sonra her kuyucuğun üzerine 1:1 oranında seyreltilmiş 2.5µl cDNA eklendi. Daha sonra mikro plakanın üzeri optik yapıştırıcı filmle kapatıldı ve plaka santrifüj kullanılarak kuyucukların kenarında kalan örnekler çöktüldü. Plaka PZR cihazına yerleştirildikten sonra cihaz, 95 °C'de 1.38 dk ve 95 °C'de 0.15 dk, 60 °C'de 0.30 dk, 72 °C'de 0.30 dk X 40 döngü ve 95 °C'de 0.15 dk, 60 °C'de 1 dk olacak şekilde ayarlandı. Analiz sonucunda mRNA ifadesi ile ilgili değişimler için $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanıldı.

3.2.13 İstatistiksel Analiz

Çalışmanın sonucunda elde edilen veriler; ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edildi. Kontrol ve doz grupları ya da farklı gruplar arasındaki farklar tek yönlü ANOVA veya iki yönlü ANOVA testlerinin ardından Dunett's post hoc testi kullanılarak araştırıldı. İstatistiksel hesaplamalar için GraphPad Prism v.9 paket programı kullanılarak $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Antioksidan Kapasite Sonuçları

Antioksidan deneyleri, toplam antioksidan kapasite adı verilen bir konsepte dayanır. Biyolojik bir numunedeki antioksidan kapasiteyi belirlemek için kullanılan test solüsyonunun içerisinde sönmölenen serbest radikal miktarı ölçölür (Sadeer vd., 2020). Antioksidan kapasite kullanılan oksidan kaynağına göre farklı sonuçlar gösterebilmektedir. Ayrıca hiçbir analiz yöntemi bir sistemdeki tüm radikal kaynaklarını veya tüm antioksidanların etki mekanizmasını tam olarak yansıtamamaktadır (Prior vd., 2005; Karadag vd., 2009). Bu yüzden, antioksidan kapasiteyi belirlemek için farklı antioksidan kapasite metotlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Birçok antioksidan kapasite yöntemi vardır (Francenia Santos-Sánchez vd., 2019; Shukla vd., 2021). Bu yöntemler genel olarak hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonu ve tek elektron transfer (SET) reaksiyonlarına dayalı olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır. SET tabanlı tahliller, antioksidanın indirgeme kapasitesini ölçerken, HAT tabanlı tahliller, hidrojen atomu bağışlama kapasitesini ölçer. Bazı yöntemler (DPPH, ABTS) ise her iki mekanizma birlikte gerçekleşebilir. Bu durumda baskın mekanizma, çözücü sistemiyle birlikte antioksidan maddenin yapı ve özelliklerine, çözücüdeki çözünme oranına bağılıdır (Karadag vd., 2009; Sadeer vd., 2020; Munteanu ve Apetrei, 2021).

Bu çalışmada, DPPH, ABTS, Galvinoksil, FRAP ve Fosfomolibden yöntemleri olmak üzere beş farklı antioksidan kapasite yöntemi kullanıldı. Galvinoksil ve FRAP yöntemleri SET tabanlı (Shukla vd., 2021; Munteanu ve Apetrei, 2022) tahliller iken DPPH, ABTS ve Fosfomolibden yöntemleri SET veya HAT tabanlı (Sadeer vd., 2020; Shukla vd., 2021) tahlillerdir.

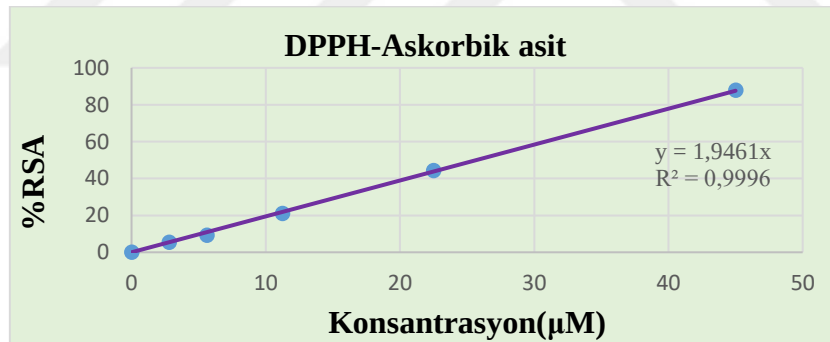
4.1.1 DPPH Yöntemi

DPPH yöntemi basit, uygulaması kolay, uygun maliyetli ve verimli bir antioksidan kapasite yöntemidir. Bu nedenler bileşiklerin, ekstraktların ve biyolojik karışımların antioksidan kapasite ölçümünde en yaygın kullanılan yöntemlerden

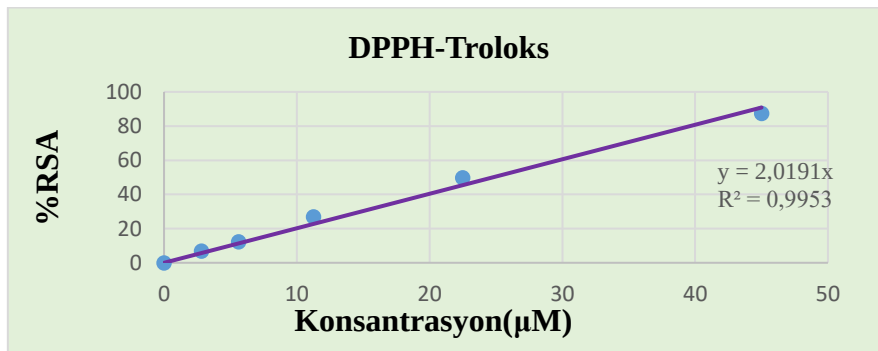
birisidir. DPPH• radikali dimerizasyona uğramadan kararlı hale geçmek için elektron veya hidrojen radikali alabilir. Başlangıçta mor renkte olan DPPH• radikali, bir antioksidan madde tarafından indirgendiği (DPPH-H) zaman sarımsı bir renk alır. DPPH• radikali en yüksek absorbans değerini 517 nm verdiği için bu yöntemdeki renk değişimi spektrofotometrede 517 nm’de ölçülür (Gulcin, 2020; Islam vd., 2020).

Bu yöntemde antioksidan aktivite DPPH• radikalini %50 azaltan antioksidan miktarını ifade eden EC₅₀ değeri olarak ifade edilir. EC₅₀ değerinin düşük olması radikalın yarısını süpürmek için daha az miktardan antioksidan madde kullanıldığını ifade eder. Bu yüzden, bu yöntemde antioksidan kapasitesi arttıkça EC₅₀ değeri düşer (Islam vd., 2020).

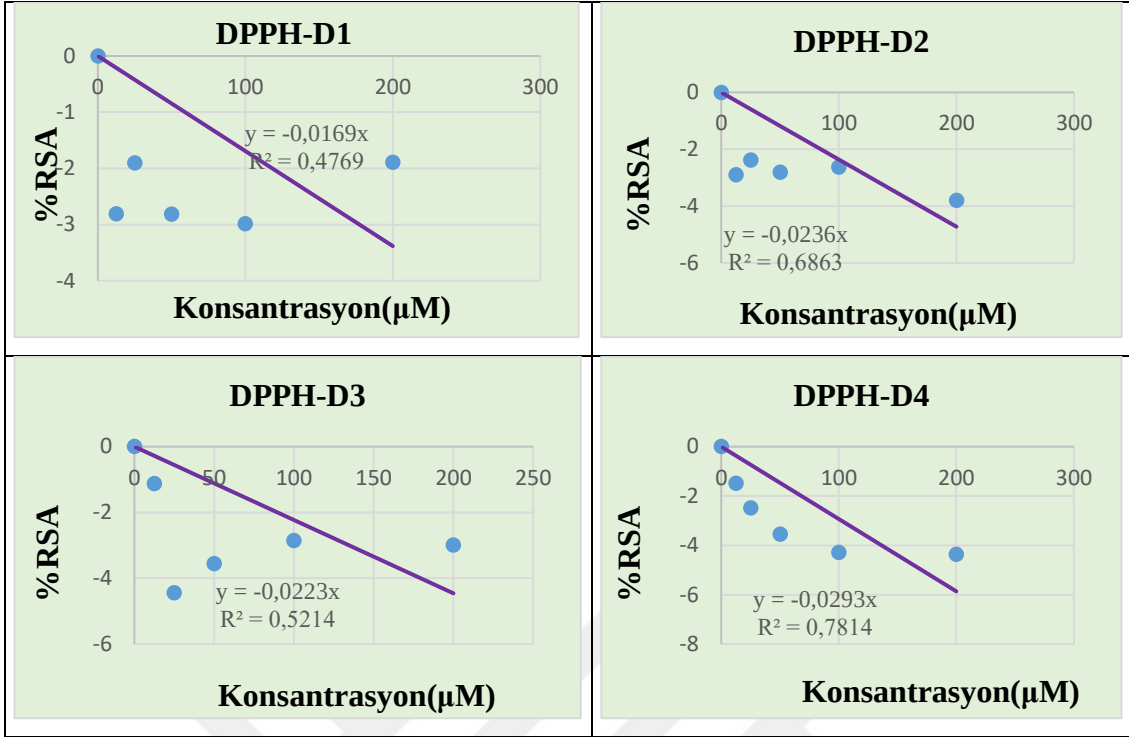
Bir maddenin antioksidan aktivitesini ifade etmek veya kullanılan yöntemin çalıştığını test etmek için aktivitesi bilinen standart maddeler kullanılır. Bu çalışmada standart madde olarak troloks ve askorbik asit kullanıldı. %RSA (% radikal radikal süpürme aktivitesi) ve son konsantrasyonlar kullanılarak elde edilen standart eğri grafikleri şekillerde (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5) görülmektedir.



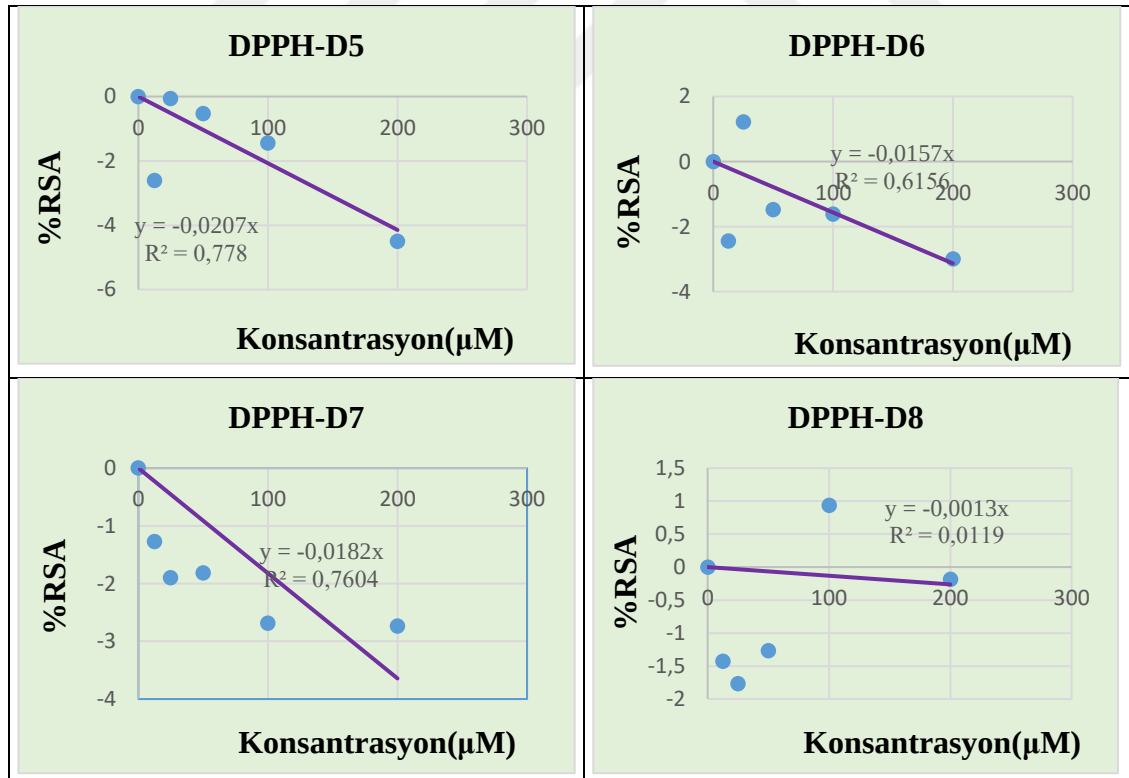
Şekil 4.1 DPPH yönteminde askorbik asidin standart eğrisi



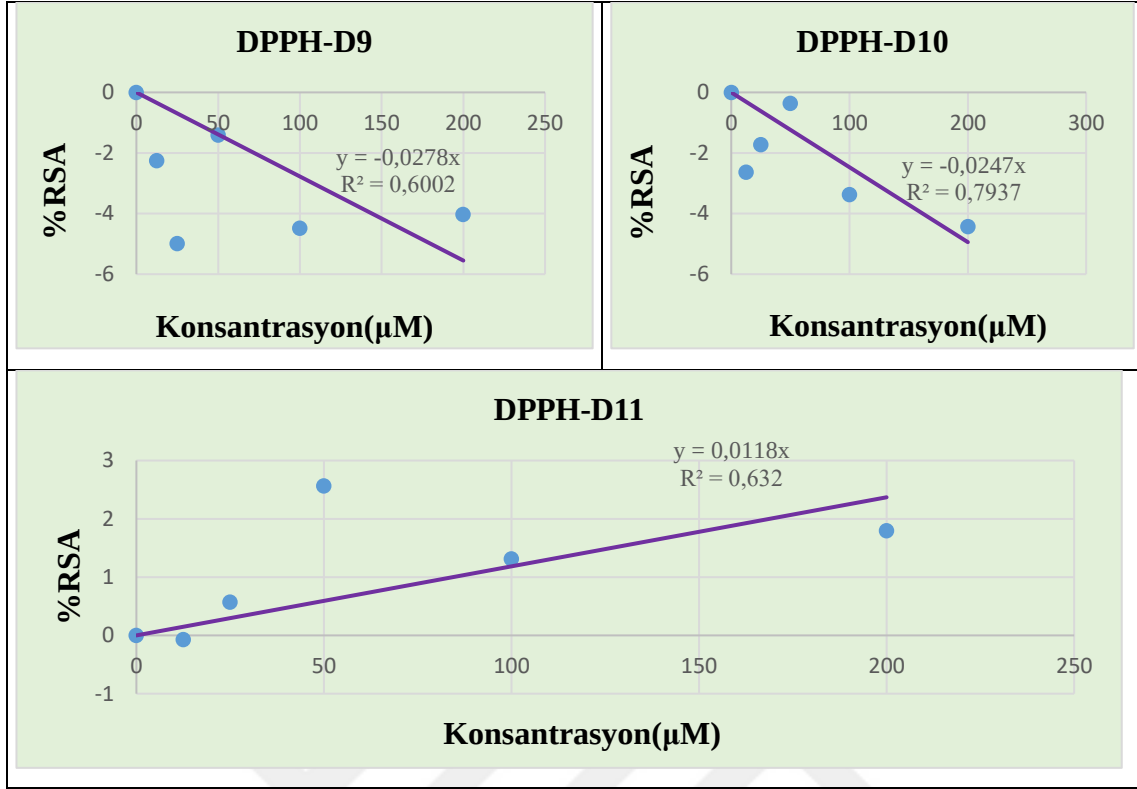
Şekil 4.2 DPPH yönteminde troloksun standart eğrisi



Şekil 4.3 DPPH yönteminde D1, D2, D3 ve D4 maddelerinin standart eğrileri

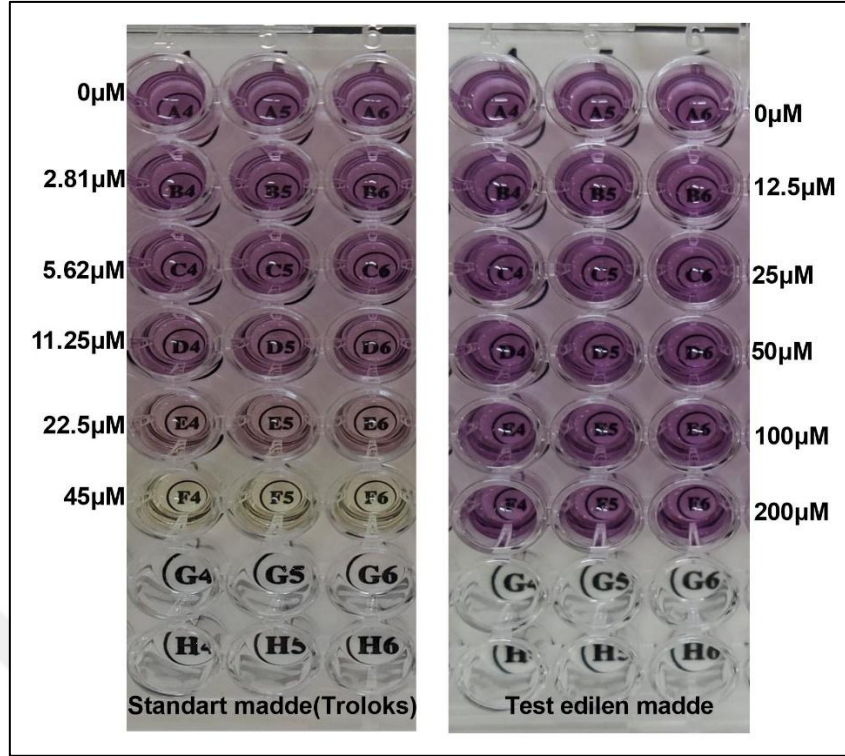


Şekil 4.4 DPPH yönteminde D5, D6, D7 ve D8 maddelerinin standart eğrileri



Şekil 4.5 DPPH yönteminde D9, D10 ve D11 maddelerinin standart eğrileri

Radikalin %50'sini süpüren antioksidan miktarı EC_{50} olarak ifade edildi. EC_{50} değerleri standart eğri grafiklerinden hesaplanarak bulundu. Standart madde olarak kullanılan askorbik asit ve troloksun EC_{50} değerleri sırasıyla 25.7 μM ve 24.6 μM olarak hesaplandı. Test edilen hiçbir madde DPPH• radikali ile etkileşime girmediğinden dolayı herhangi bir renk giderimi görülemedi (Şekil 4.6). Bundan dolayı bu yöntemde antioksidan kapasite gözlenemedi.



Şekil 4.6 DPPH testinde troloks ve test maddesinin mikro plakadaki görüntüsü

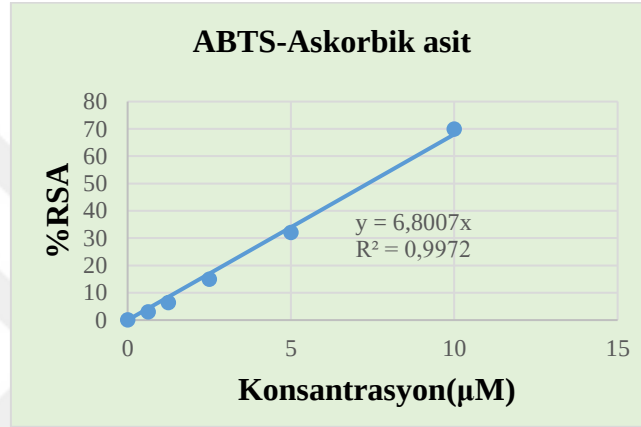
DPPH yönteminde antioksidan aktivite gözlemlenememesinin birkaç olası sebebi olabilir. DPPH• radikalının •Nitrojen merkezi, üç fenil tarafından sterik olarak engellenmesi kompleks bileşiklerin radikal merkezine ulaşmasını zorlaştırmaktadır (Sadeer vd., 2020). Ayrıca DPPH• radikalının temel etki mekanizması antioksidan bileşiklerden hidrojen alarak DPPH-H formuna geçmesi şeklindedir (Hogg vd., 1961; La vd., 2021). Test edilen bileşiklerde ise hidrojen verici bir grupların bulunmaması DPPH yönteminde sonuç alınamamasının en olası sebebini oluşturmaktadır.

4.1.2 ABTS Yöntemi

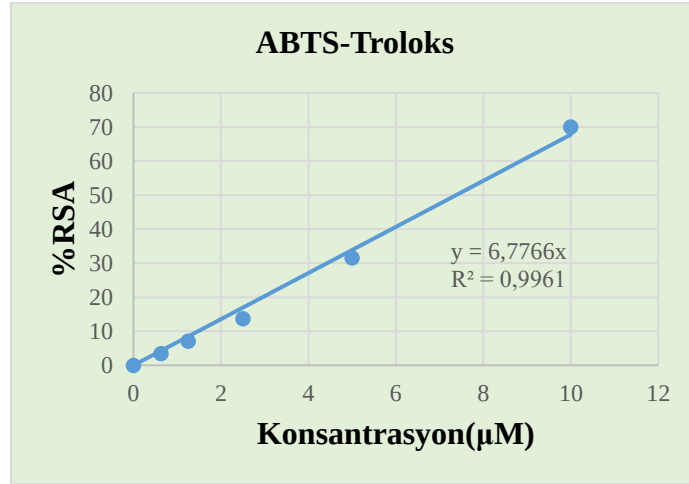
ABTS yöntemi antioksidan kapasite ölçümünde DPPH yöntemi gibi yaygın bir testtir. DPPH yönteminin aksine ABTS radikali suda ve organik çözücülerde çözüldüğü için hem hidrofilik hem de lipofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde kullanılabilir. ABTS tek başına radikallik formda değildir. O yüzden çalışmadan önce ABTS, amonyum veya potasyum persülfat ((NH₄)₂S₂O₃ / K₂S₂O₃) ile oksitlenip radikal katyonu (ABTS^{•+}) formuna çevrilir (Sadeer vd., 2020).

ABTS radikali mavi/yeşil renktedir ve 734 nm’de maksimum absorbans verir. ABTS^{•+} antioksidan bir madde tarafından indirgendiğinde renginde açılma meydana gelir. Ortaya çıkan renk değişiminin spektrofotometrede 734 nm’ de ölçülmesiyle bu yöntemde antioksidan kapasite belirlenir.

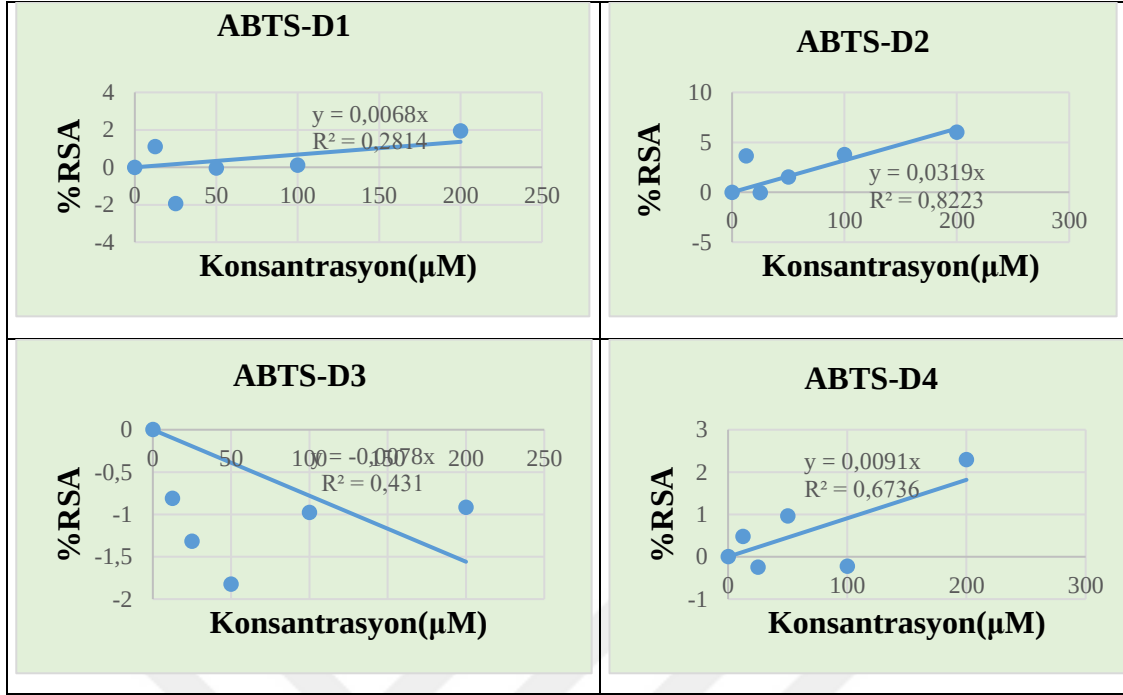
Sonuçlar DPPH yönteminde olduğu gibi %RSA ve son konsantrasyonlar kullanılarak elde edilen standart eğri grafikleri şeklinde (Şekil 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 ve 4.11) gösterildi.



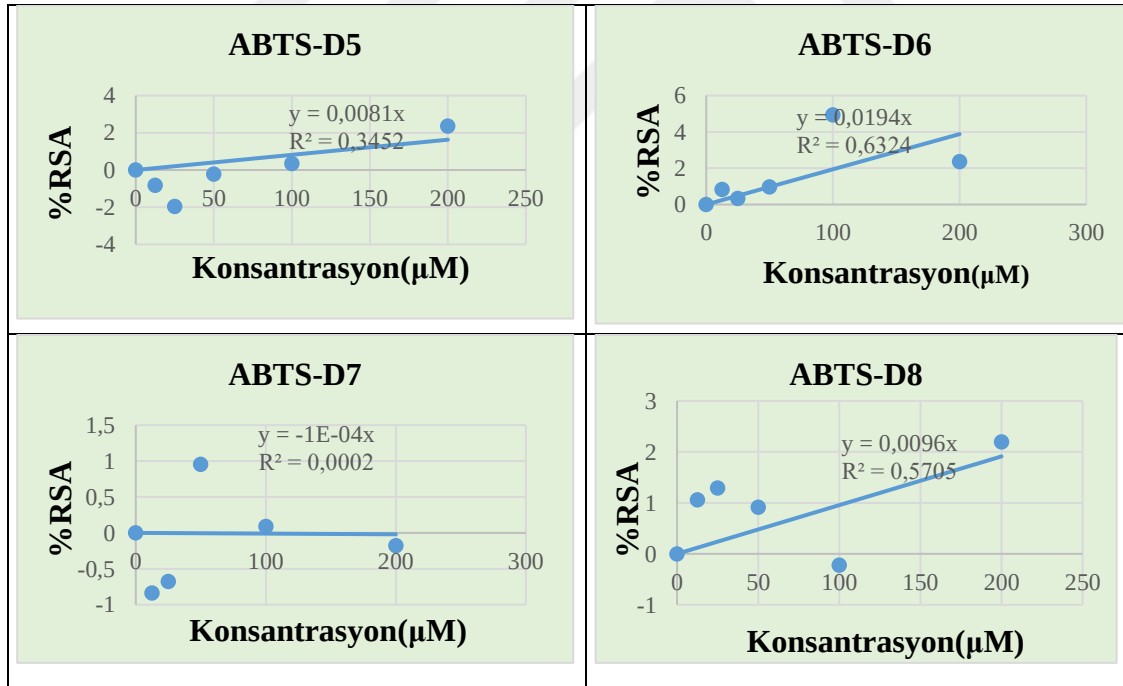
Şekil 4.7 ABTS yönteminde askorbik asidin standart eğrisi



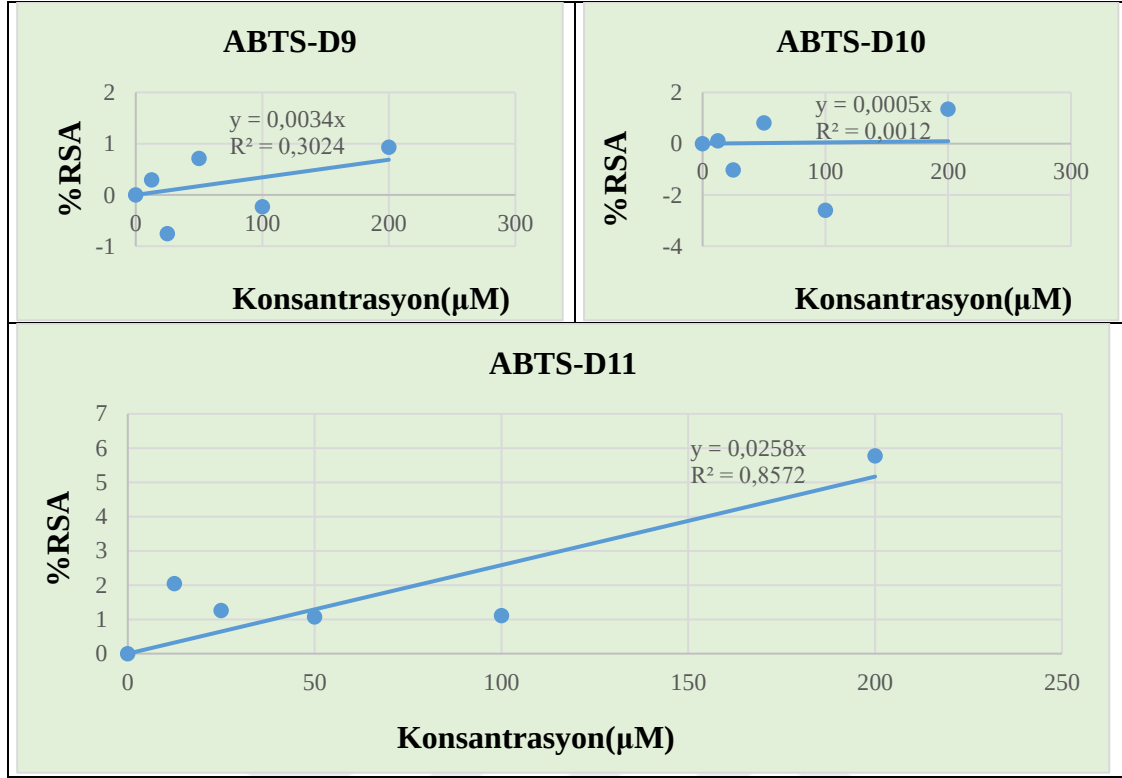
Şekil 4.8 ABTS yönteminde trolöksün standart eğrisi



Şekil 4.9 ABTS yönteminde D1, D2, D3 ve D4 maddelerinin standart eğrileri



Şekil 4.10 ABTS yönteminde D5, D6, D7 ve D8 maddelerinin standart eğrileri



Şekil 4.11 ABTS yönteminde D9, D10 ve D11 maddelerinin standart eğrileri

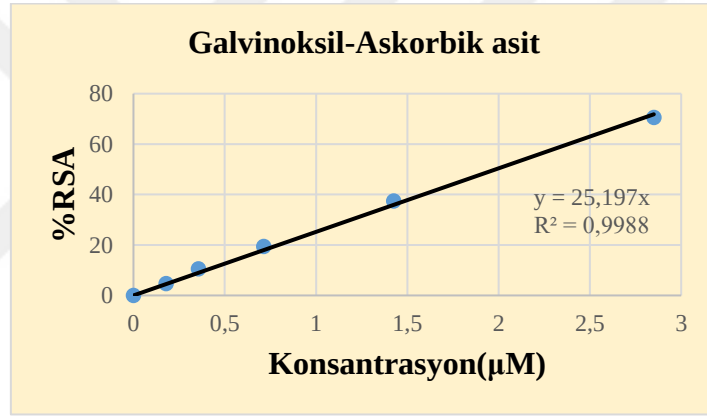
Standart madde olarak kullanılan askorbik asit ve troloksun EC_{50} değerleri grafik (Şekil 4.7, 4.8) denklemlerinden ($Y=50$ olduğu durumda X 'e karşılık gelen değer EC_{50} değerleri olarak kabul edildi) hesaplanarak sırasıyla $7.35 \mu M$ ve $7.38 \mu M$ olarak bulundu. Test edilen bileşiklerden en yüksek %RSA değeri D2 ve D11 maddelerinde görüldü. Ancak bu değerler (D2: 6 ve D11: 5.8) düşük olduğu için EC_{50} değerleri hesaplanamadı.

$ABTS^{++}$ radikal katyonunun nitrojen merkezi DPPH radikalinde olduğu gibi sterik bir engel içerir (Sadeer vd., 2020). Test edilen bileşiklerin kompleks yapılarından dolayı bu bileşiklerin radikal merkezine ulaşım elektron transferinde bulunması zorlaşmaktadır. Ayrıca troloks ve askorbik asit standartlarında bulunan hidrojen verici grupların (hidroksil grupları) test edilen bileşiklerde bulunmaması bu yöntemde antioksidan kapasite gözlemlenememesine neden olmuştur (Wołosiaak vd., 2022).

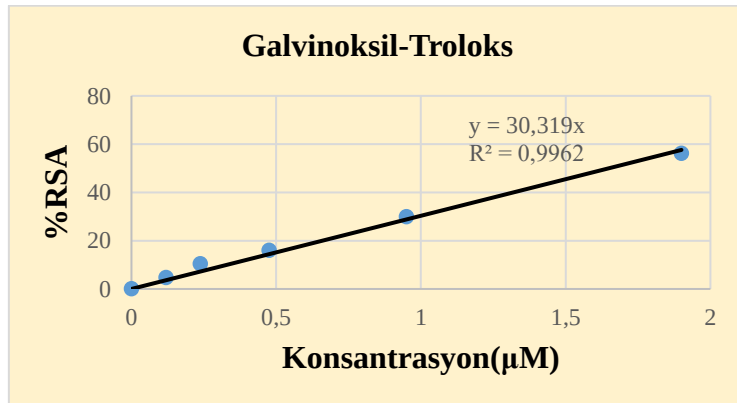
4.1.3 Galvinoksil Yöntemi

Galvinoksil yöntemi anti radikal aktiviteyi belirlemeye dayalı azot-merkezli DPPH ve ABTS testlerinden farklı olarak oksijen-merkezli galvinoksil radikalinin kullanımına dayanır. Bu yöntem, başlangıçta sarımsı renkte olan galvinoksil radikalinin antioksidan madde tarafından rengin ağartılmasına ve ortaya çıkan bu rengin 428 nm’de ölçülmesi prensibine dayanır. Ancak buradaki renk değişimi DPPH ve ABTS yöntemlerinde olduğu gibi çıplak gözle belirgin olarak görülmez (Sadeer vd., 2020; Munteanu ve Apetrei, 2022).

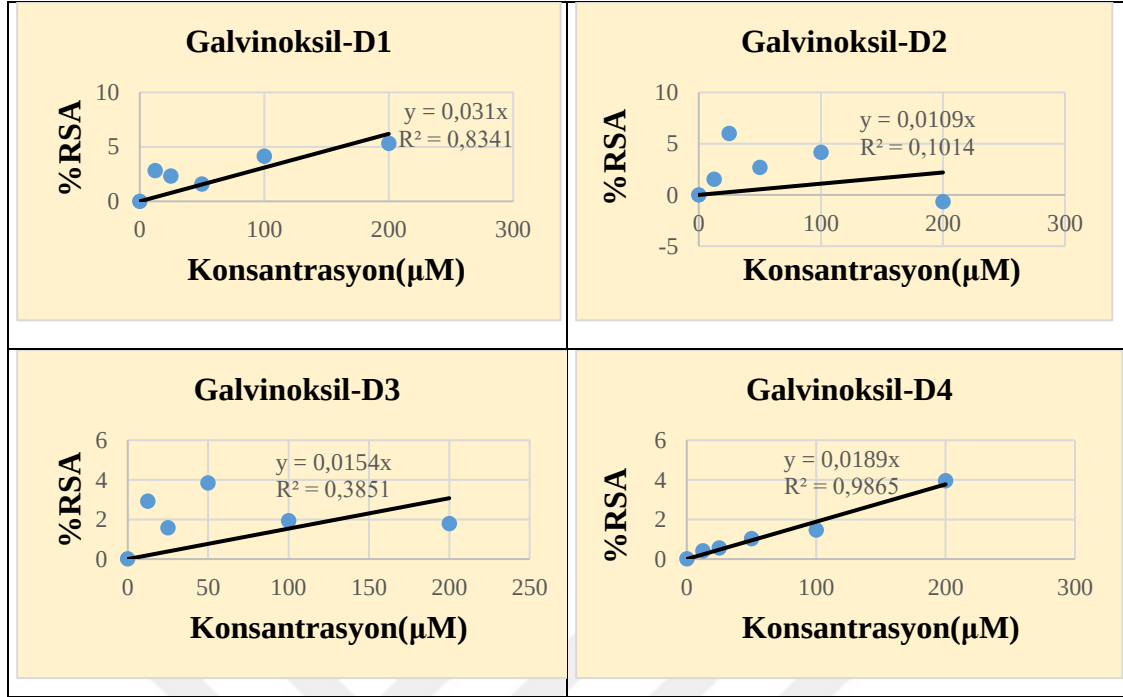
Testin sonucunda elde edilen değerler DPPH ve ABTS yöntemlerinde olduğu gibi standart eğri grafikleri şeklinde (Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.14 ve 4.16) gösterildi.



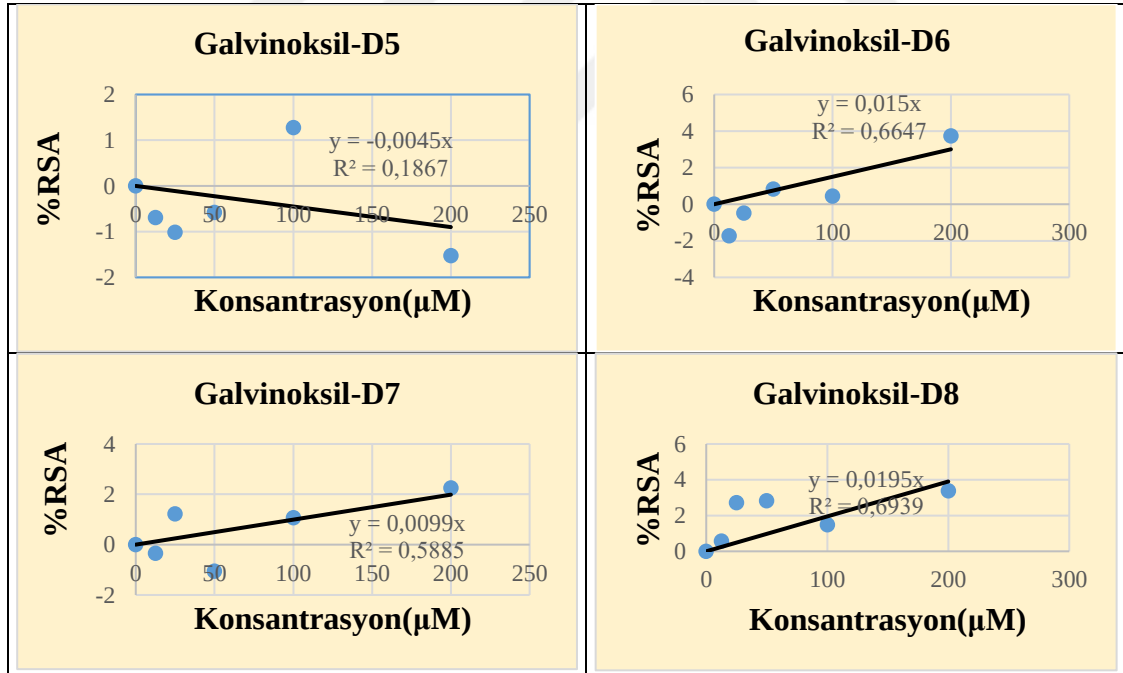
Şekil 4.12 Galvinoksil yönteminde askorbik asidin standart eğrisi



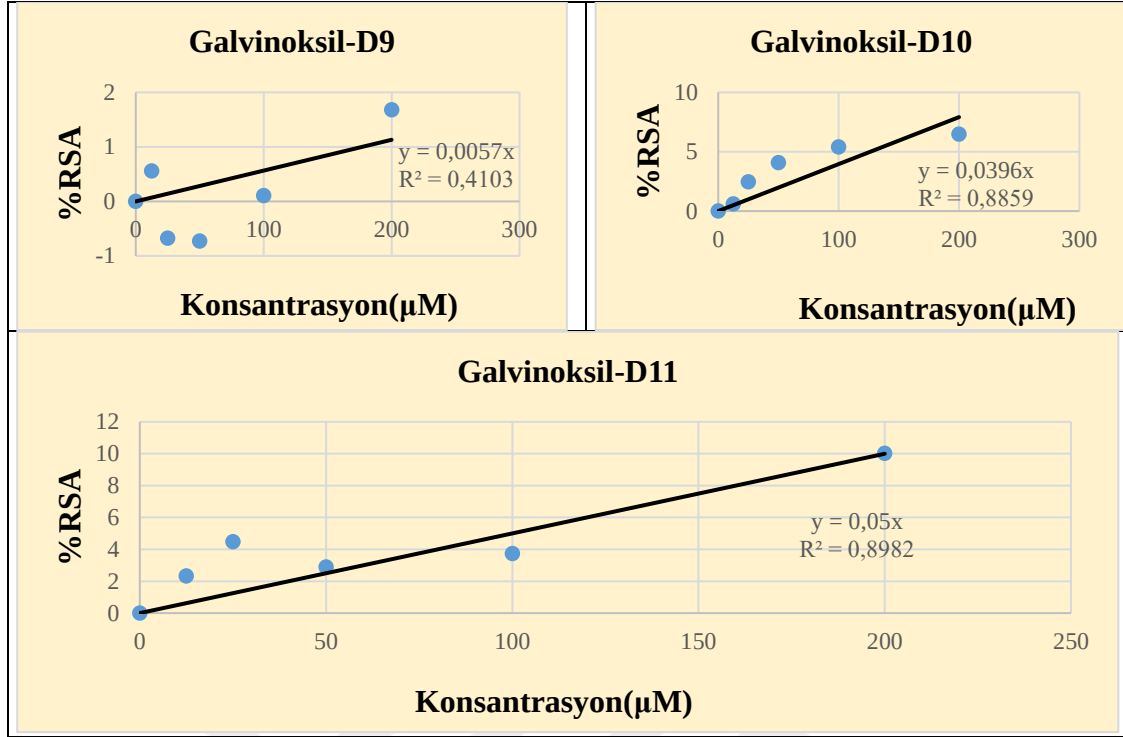
Şekil 4.13 Galvinoksil yönteminde troloksun standart eğrisi



Şekil 4.14 Galvinoxil yönteminde D1, D2, D3 ve D4 maddelerinin standart eğrileri



Şekil 4.15 Galvinoxil yönteminde D5, D6, D7 ve D8 maddelerinin standart eğrileri



Şekil 4.16 Galvinoxil yönteminde D5, D6, D7 ve D8 maddelerinin standart eğrileri

Standart madde olarak kullanılan askorbik asit (Şekil 4.12) ve troloksun (Şekil 4.13) EC_{50} değerleri standart eğri grafiklerinden hesaplanarak sırasıyla 1.98 μM ve 1.65 μM olarak hesaplandı. Test edilen bileşikler en yüksek %RSA değeri D10 ve D11 maddelerinde ve sırasıyla 6.5 ve 10 olarak hesaplandı. Diğer bileşikler Galvinoxil radikaliyle etkileşime girmediğinden yada zayıf etkileşim gösterdiğinden antioksidan kapasite tespit edilemedi.

Galvinoxil radikalının indirgenmesi, aktif bir hidroksil grubunun galvinoxil molekülüyle tepkimeye girmesi varsayımına dayanır (Shi ve Niki, 1998). Test edilen bileşiklerin hiçbirinde hidroksil grupları ya da hidrojen verici gruplar bulunmamaktadır. Bu durum galvinoxil yönteminde antioksidan aktivite tespit edilememesinin nedeni olabilir.

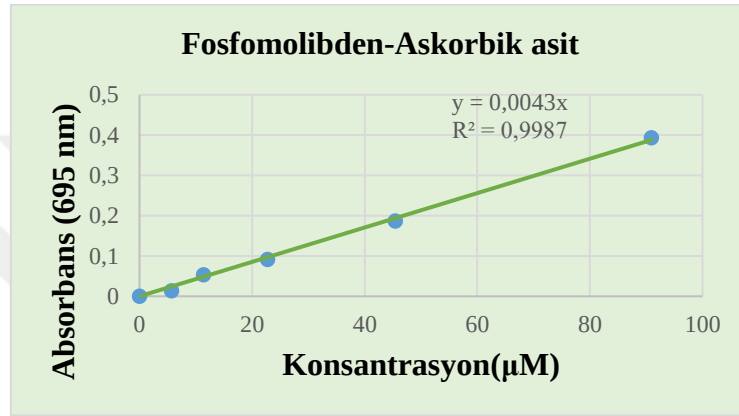
4.1.4 Fosfomolibden Yöntemi

Fosfomolibden yönteminin temel prensibi asidik ortamda bir antioksidan madde tarafından Mo^{6+} 'nın Mo^{5+} indirgenmesiyle ortaya çıkan yeşilimsi-mavi rengin 695 nm'de spektrofotometrede ölçülmesi prensibine dayanır. Ortaya çıkan renk değişimi

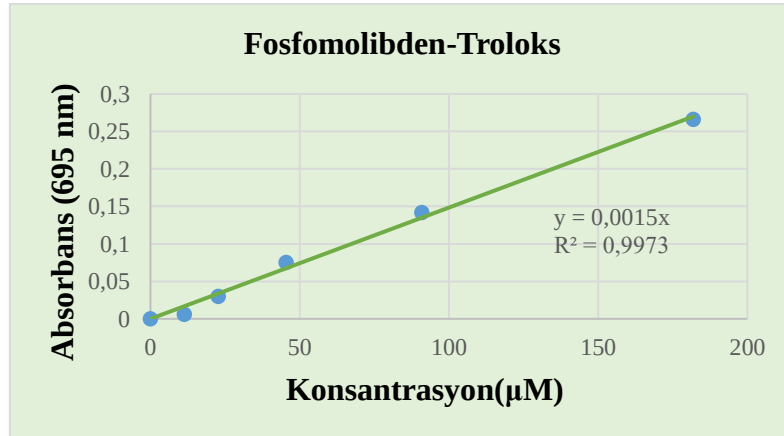
askorbik asit ve troloks gibi standart maddelerin eşdeğerleri olarak ifade edilir (Prieto vd., 1999; Sadeer vd., 2020).

Bu yöntemde test edilen maddenin indirgeme potansiyeli ortaya çıkan yeşilimsi-mavi renkle doğru orantılıdır. Dolayısıyla antioksidan potansiyel arttıkça ortaya çıkan renkte koyulaşma artmaktadır. Şekil 4.22’de bu durum açıkça görülmektedir.

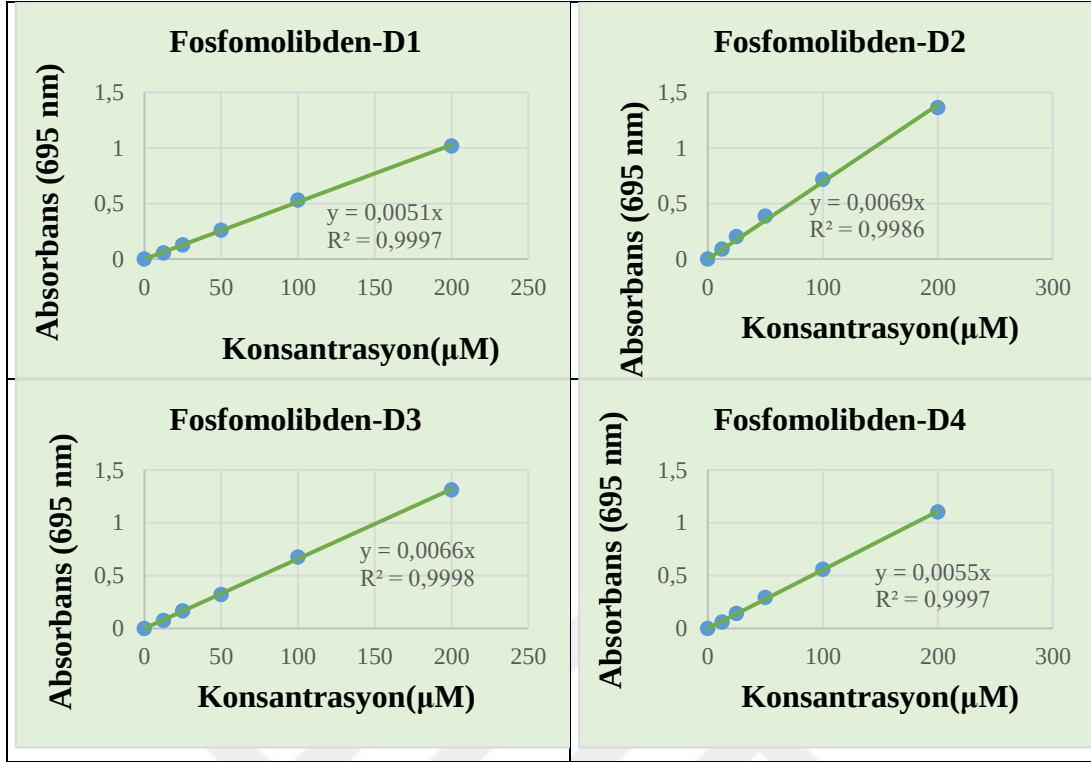
Sonuçlar 695 nm’de ölçülen absorbans değeri ve son konsantrasyon kullanılarak elde edilen standart eğri grafiklerinde (Şekil 4.17, 4.18, 4.18, 4.20 ve 4.21) gösterildi.



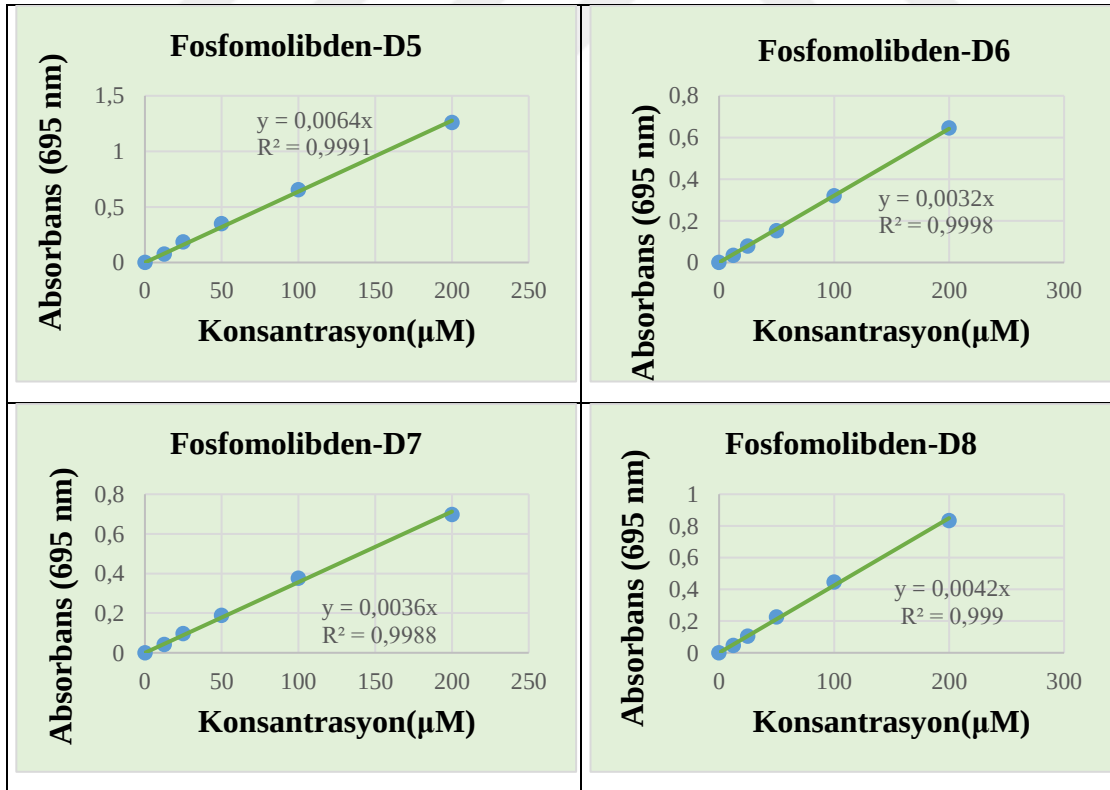
Şekil 4.17 Fosfomolibden yönteminde askorbik asidin standart eğrisi



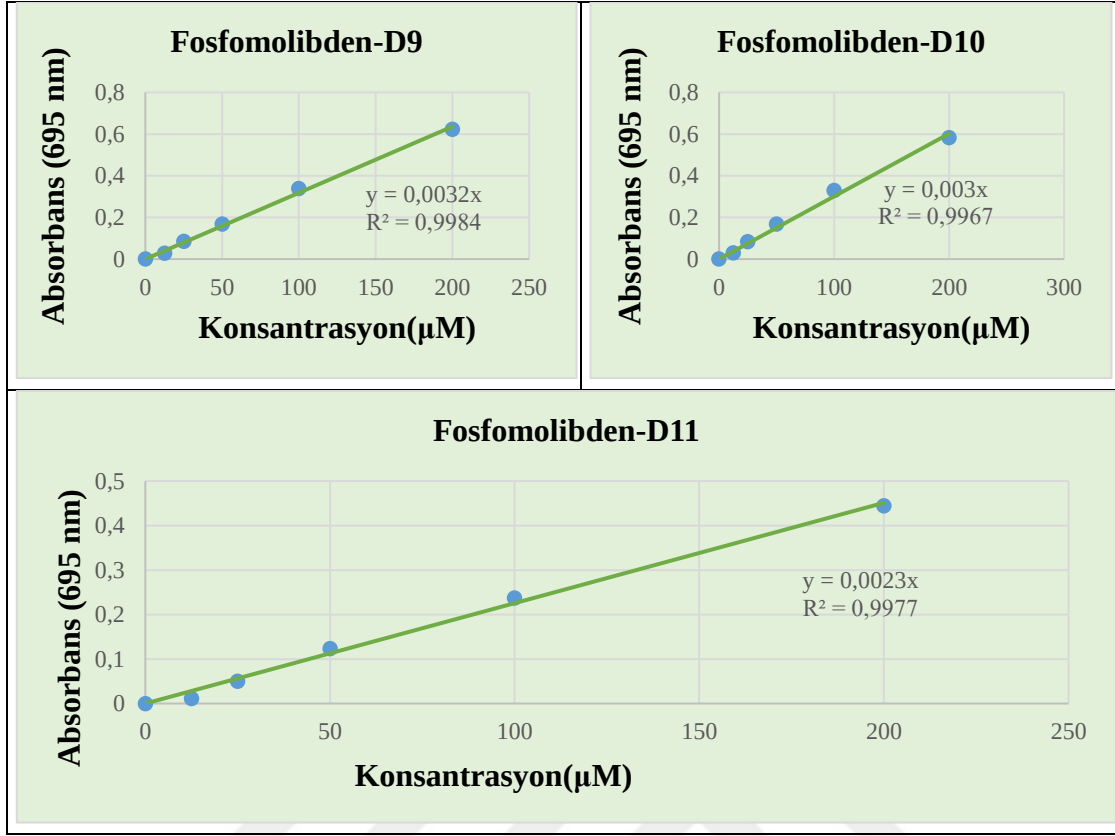
Şekil 4.18 Fosfomolibden yönteminde troloksun standart eğrisi



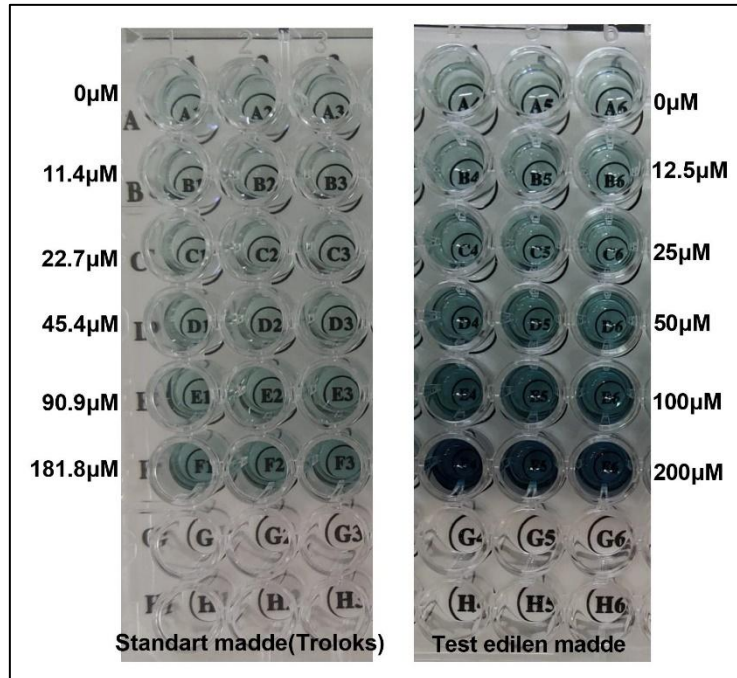
Şekil 4.19 Fosfomolibden yönteminde D1, D2, D3 ve D4 maddelerinin standart eğrileri



Şekil 4.20 Fosfomolibden yönteminde D5, D6, D7 ve D8 maddelerinin standart eğrileri

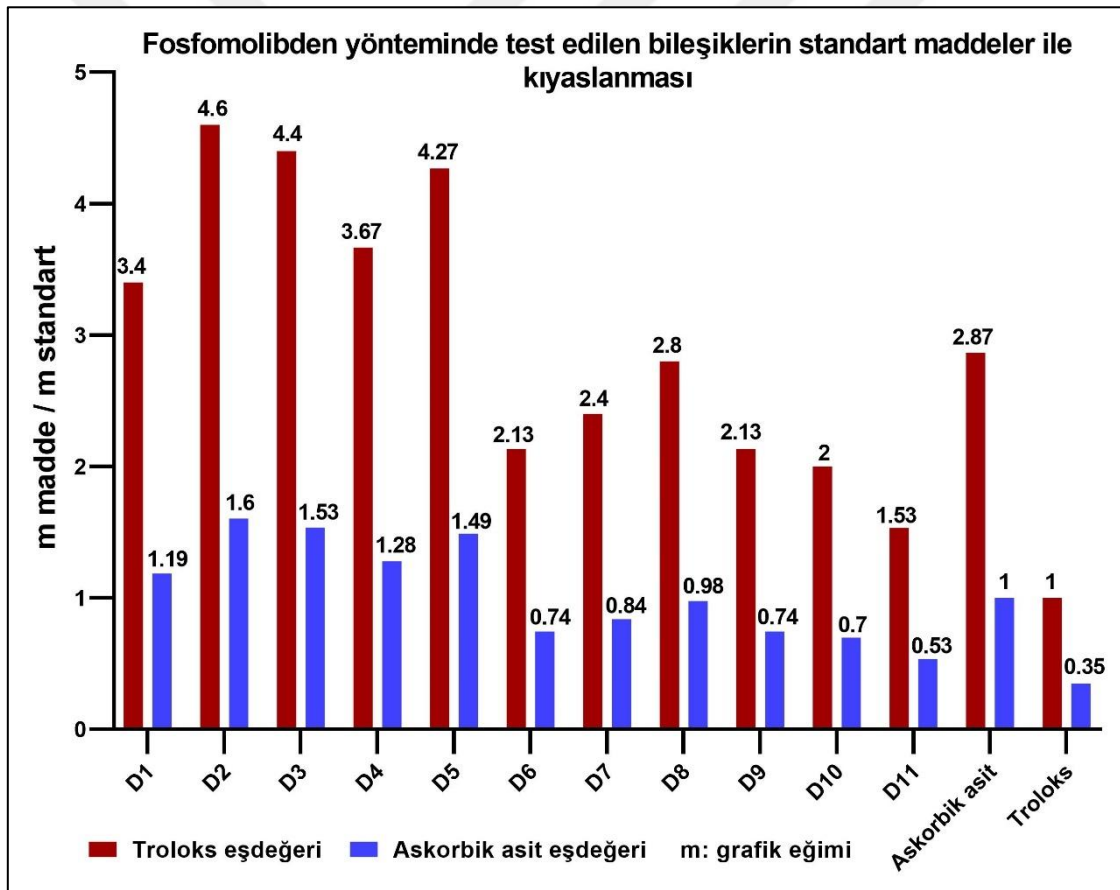


Şekil 4.21 Fosfomolibden yönteminde D9, D10 ve D11 maddelerinin standart eğrileri



Şekil 4.22 Fosfomolibden yönteminde troloks ve test maddesinin mikro plakadaki görüntüsü

Bu yöntemde absorbands değeri arttıkça antioksidan potansiyel artmaktadır. Bu durumda konsantrasyon değeri sabit (aynı konsantrasyonda) tutulan iki madde kıyaslandığında antioksidan aktivitesi yüksek olan maddenin absorbands değerinin daha yüksek olması gerekir. Bu durumu “ $Y=mX$ ” (Y: absorbands, m: eğim, X: konsantrasyon) grafik denkleminde ifade edebiliriz. “ $Y_1=m_1X_1$ ” ve “ $Y_2=m_2X_2$ ” denklemlerine sahip iki maddenin konsantrasyonlarını sabit tutup denklemleri birbirine böldüğümüzde $Y_1/Y_2 = m_1/m_2$ olur. “Y” değeri absorbandsı ifade ettiği için grafiklerin eğimlerini birbirlerine oranladığımızda antioksidan kapasiteyi de oranlamış oluruz. Bu durumda grafik eğimlerini kullanarak test edilen bileşiklerin antioksidan kapasitelerini standart maddelerle (askorbik asit ve troloks) kıyaslayabiliriz (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 Fosfomolibden yönteminde test edilen bileşiklerin askorbik asit ve troloks standartlarıyla oransal olarak kıyaslanması

Test edilen bileşiklerin troloks ve askorbik asit standartları ile oransal olarak karşılaştırılarak sütun grafiği olarak sunuldu (Şekil 4.23). Bu değerlere tüm bileşikler

troloks standardından daha yüksek aktivite sergiledi. D1, D2, D3, D4 ve D5 maddeleri ise hem troloks hem de askorbik asit standardından daha yüksek aktivite gösterdi. D1, D2, D3, D4 ve D5 maddeleri sırasıyla 3.4, 4.6, 4.4, 3.67 ve 4.27 kat troloks standardına ve 1.19, 1.6, 1.53, 1.28 ve 1.49 kat askorbik asit standardına eşdeğer aktivite sergilediği görüldü.

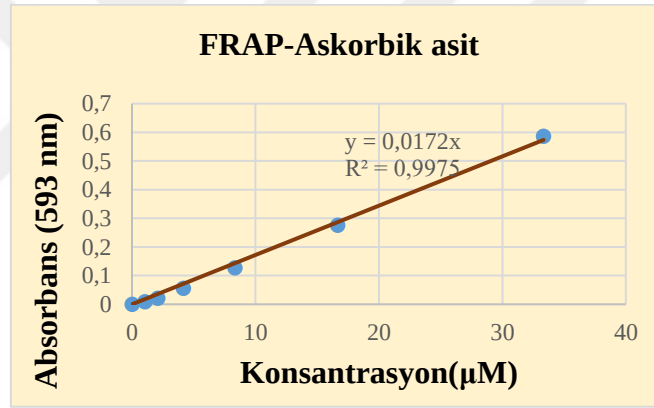
Test edilen bileşiklerin yapılarında bulunan Eter (R-O-R')(Ormazábal-Toledo vd., 2013)), Tiyofen (C₄H₄S)(Mlakić vd., 2022), Piyrol (C₄H₄N) (Yenice vd., 2017), Esterler (RCOOR')(Reddy ve Laali, 2015), Peroksit (R-O-O-R') (Chen vd., 2022) grupları elektron verme potansiyeline sahiptir. Test edilen bileşiklerin standartlardan daha yüksek indirgeme potansiyeline sahip olması elektron verme potansiyeline sahip bu gruplardan (Eter, Tiyofen, Piyrol, Esterler, Peroksit) ve fosfomolibden kompleksinde elektron alan molibdeniyum gruplarının kompleksin dış tarafında bulunmasından dolayı (Nagul vd., 2015) elektron alışverişini kolaylaştırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bileşiklerin standartlara (askorbik asit ve troloks) göre indirgeme potansiyelleri büyükten küçüğe doğru D2>D3>D5>D4>D1>D8>D7>D6=D9>D10>D11 şeklindedir (Şekil 4.23). Bileşiklerin yapılarına bakıldığında en yüksek aktivite gösteren bileşiklerin yapısında tiyofen bulunurken (D2>D3>D5>D4>D1) diğer bileşiklerin yapısında tiyofen grubu yerine fenil (D8>D7>D6=D9>D10>D11, D11 hariç) bulunmaktadır. Ayrıca D1-D6 (3.4-2.13), D4-D9 (3.67-2.13), D3-D7 (4.4-2.4) ve D5-D8 (4.27-2.8) bileşikleri arasındaki tek fark tiyofen grubunun yerine fenil grubunun bulunmasıdır. Bu durum bileşiklerin yapısında bulunan tiyofen köprüsünün bileşiklere, fenil köprüsünden daha yüksek indirgeme potansiyeli kazandırdığını açıkça göstermektedir (Mlakić vd., 2022). D1 ve D11 bileşiklerinin yapılarına bakıldığında, bu bileşiklerinin yapısal olarak tek farkı D11 bileşiğinde bulunan indol halkasının 5-konumunda bulunan brom molekülüdür. Brom (2.96), karbondan (2.55) daha fazla elektronegatifdir ve bağdaki elektronları kendine çekerek indol grubunun elektron yoğunluğunun azalmasına ve bunun sonucunda da elektron verme potansiyelinin düşmesine sebep olabileceği düşünülmektedir.

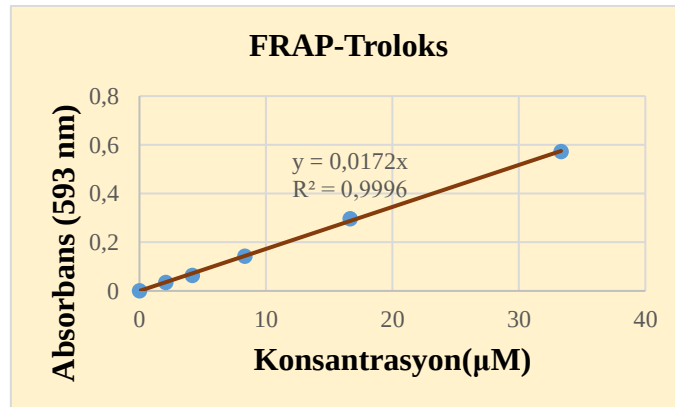
4.1.5 FRAP (Fe^{3+} İyonu İndirgeme Gücü) Yöntemi

FRAP yöntemi, ferrik iyon indirgeyici antioksidan güç (ferric ion reducing antioxidant power) kelimelerinin kısaltmasıdır. Bu yöntemin temel prensibi asidik koşullar (pH:3.6) altında elektron veren antioksidan madde etkisiyle ferrik-tripiridiltiazin (FeIII-TPTZ) kompleksinin, ferröz (FeII-TPTZ) kompleksine dönüşmesi sonucunda açığa çıkan koyu mavi rengin 593 nm’de ölçülmesi esasına dayanır. Absorbanstaki artış, test edilen numunenin toplam ferrik indirgeme gücü ile doğru orantılıdır (Karadag vd., 2009; Sadeer vd., 2020).

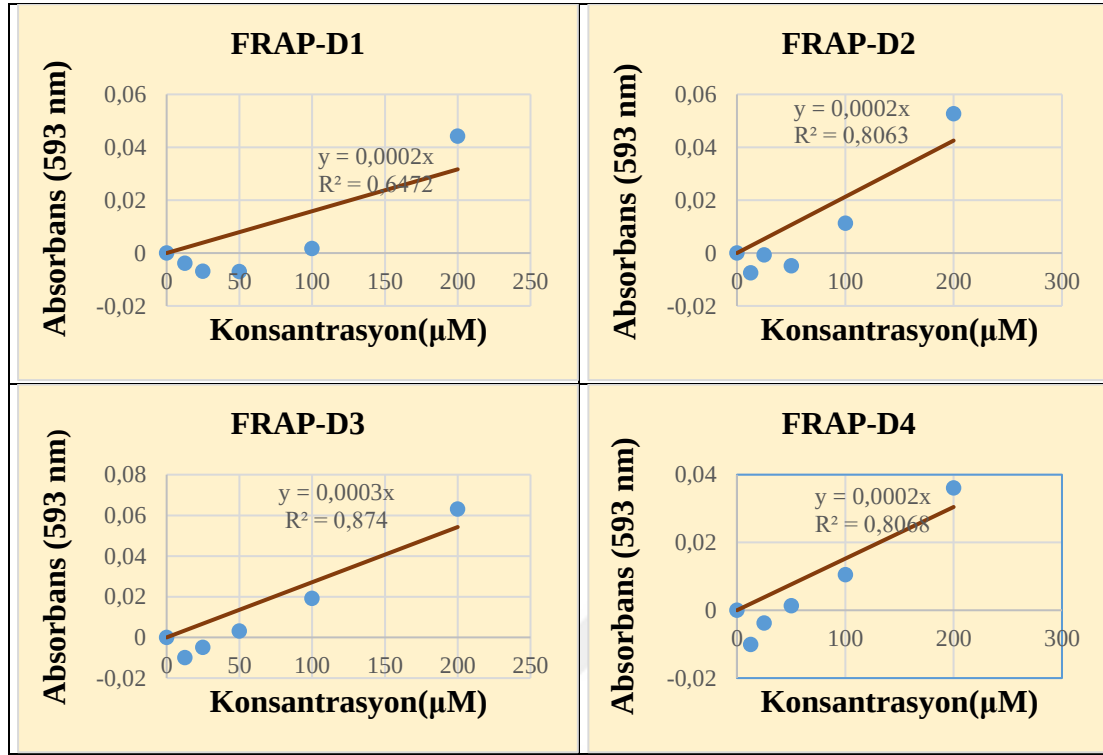
Sonuçlar fosfomolibden yöntemine benzer olarak, ölçülen absorbans değeri ve son konsantrasyon kullanılarak elde edilen standart eğri grafiklerinde (Şekil 4.24, 4.25, 4.26, 4.27 ve 4.28) gösterildi.



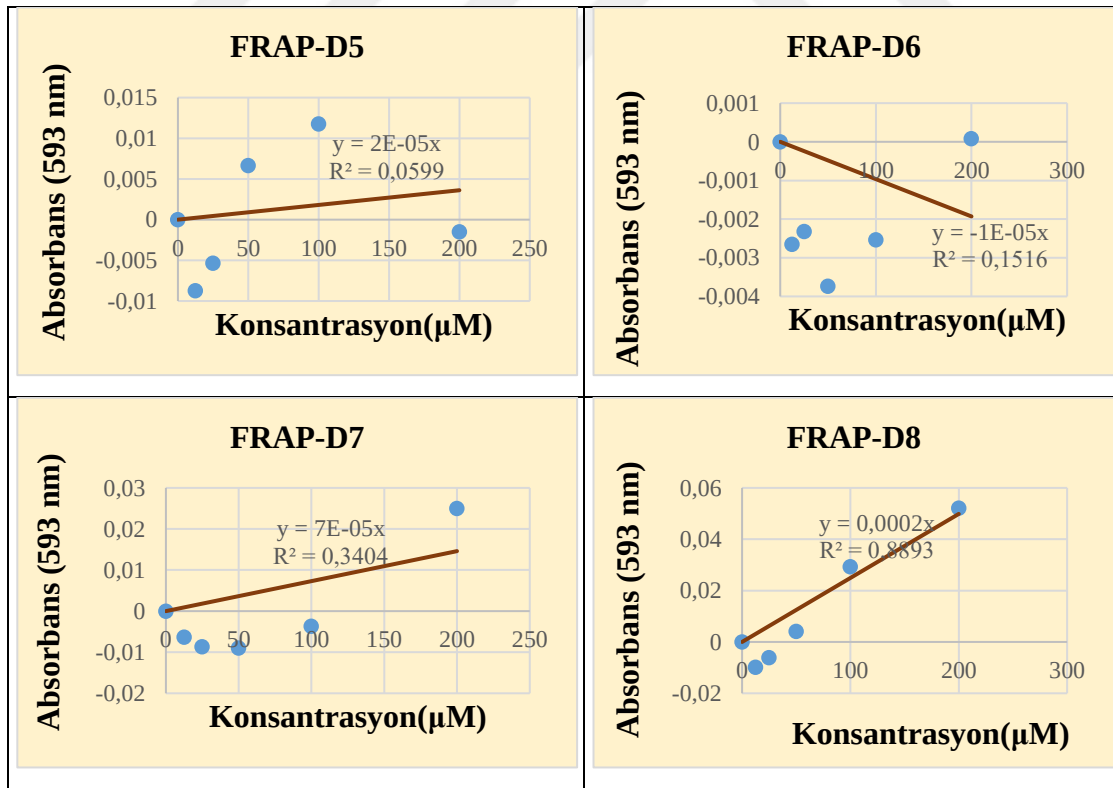
Şekil 4.24 FRAP yönteminde askorbik asidin standart eğrisi



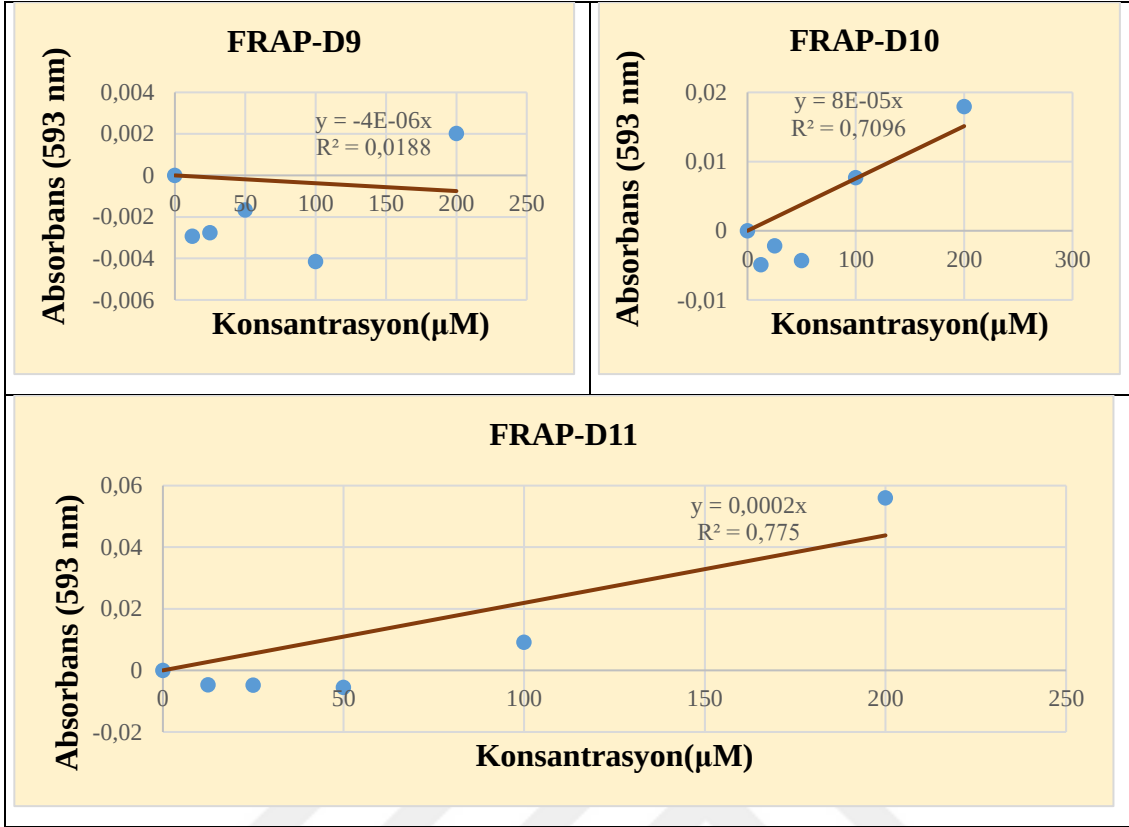
Şekil 4.25 FRAP yönteminde trolöksün standart eğrisi



Şekil 4.26 FRAP yönteminde D1, D2, D3 ve D4 maddelerinin standart eğrileri



Şekil 4.27 FRAP yönteminde D5, D6, D7 ve D8 maddelerinin standart eğrileri



Şekil 4.28 FRAP yönteminde D9, D10ve D11 maddelerinin standart eğrileri

Standart madde olarak kullanılan askorbik asit (Şekil 4.24) ve troloksun (Şekil 4.25) standart eğri grafiklerine bakıldığında her iki grafiğinde eğimlerinin (0.0172) aynı olduğu görülmektedir. Bu durum her iki standardın eşit indirgeme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir ve literatürle de uyumludur (Huang vd., 2005).

Test edilen bileşiklerden en yüksek indirgeme potansiyeli D3 örneğinde standartlara göre 0.017 kat olarak hesaplandı (hesaplamalar fosfomolibden yönteminde belirtildiği gibi yapıldı). Bu değere göre bileşiklerin ferrik (Fe^{3+}) demiri indirgeme potansiyelinin olmadığı yada çok düşük olduğu görülmektedir.

Bu yöntem de fosfomolibden yönteminde olduğu gibi test edilen bileşiklerin elektron verme potansiyellerini ölçer. FRAP yönteminde ferrik (Fe^{3+}) demirin ferröz (Fe^{2+}) demire indirgenmesi ile ortaya çıkan renk ve fosfomolibden yönteminde Mo^{6+} 'nın Mo^{5+} indirgenmesi ile ortaya çıkan renk ölçülür. Her iki yöntemde bileşiklerin elektron verme potansiyelini ölçtüğü halde fosfomolibden yönteminde test edilen bileşiklerin yüksek bir indirgeme potansiyeli (standartlara göre) elde edilirlen FRAP yönteminde indirgeme potansiyeli elde edilmedi.

Bu durumun birkaç olası sebebi olabilir. 1) Her iki yöntemin reaksiyon mekanizmaları birbirinden farklıdır ve bundan dolayı fosfomolibden kompleksini indirgeyebilen bilen bir bileşiğin FRAP reaktifini indirgeyemeyebilir. 2) Ayrıca her iki yöntemin reaksiyon koşulları birbirinden oldukça farklıdır. FRAP testi oda 37C° sıcaklıkta ve 3.6 pH değerinde gerçekleşirken fosfomolibden testi 95C° ve 0.6M sülfirik asitli ortamda gerçekleşir. 3) Fe³⁺-TPTZ kompleksinde Fe³⁺ iyonu dört piridin ve iki triazin molekülüyle çevrelenmektedir. Fosfomolibden yönteminde ise elektron alıcı molibdeniyum grupları (Mo⁶⁺) kompleksin dış tarafında bulunur. Bu durum kompleks yapılı büyük moleküllerin, fosfomolibden komplekse elektron vermesini kolaylaştırırken; Fe³⁺-TPTZ komplekse elektron aktarımını zorlaştırıyor olabilir. Ayrıca fosfomolibden testinin FRAP testi ile arasındaki korelasyonda tartışmalıdır (Sadeer vd., 2020).

Bu çalışmanın antioksidan sonuçlarında (ABTS, DPPH, Galvinoxil, FRAP ve Fosfomolibden yöntemleri) da görüldüğü tek bir yöntem tüm bileşiklerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için yeterli değildir (Olszowy-Tomczyk, 2021). O yüzden test edilecek bileşiklerin antioksidan kapasitesinin doğru bir şekilde ifade edilebilmesi için farklı reaksiyon mekanizmalarına sahip (HAT, SET) birden fazla yöntemin kullanılması daha sağlıklı sonuçların elde edilmesinde son derece önem arz etmektedir.

Antioksidan maddelerin insan sağlığındaki rolü önemli olmasına rağmen, kanser tedavisi konusundaki faydaları tartışmalıdır. Çünkü çoğu geleneksel ve yeni nesil antikanser ilaçlar, kanser hücrelerinde apoptozu indüklemek için oksidatif stres oluşturma prensibiyle etki ederler. Bu yüzden güçlü antioksidan etkiye sahip bir ilaç molekülü bu tedavi mekanizmasına müdahale ederek potansiyel olarak antikanser etkinliklerini azaltabilir (Trachootham vd., 2009; Gorrini vd., 2013).

ROS seviyesi ile kanser arasındaki karmaşık bağlantı, esas olarak ROS üretimi ile ROS temizlenmesi arasındaki hassas dengeye dayanır. Kanserın başlaması ve ilerlemesi, ROS seviyelerinde normalin üzerindeki artışlardan faydalanır. Bu nedenle, kanser hücreleri, normal hücrelerine kıyasla biraz daha yüksek olan ROS seviyelerinde gelişirler. Bu özellik, kanser hücrelerini, ROS üretimini daha da artıran dış uyaranlara karşı daha hassas hale getirir. Bu nedenlerden dolayı, yeni nesil yaklaşımlar antioksidan kapasiteye sahip ilaçlar geliştirmekten çok kanser hücrelerinin redoks dengesini bozmak

için reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırmaya yönelmektedir (Buytaert vd., 2007; Perillo vd., 2020).

Kısacası, antioksidanlar yan etkileri azaltmak için destekleyici tedavide faydalı olabilir, ancak antikanser ilaçların aktif farmakolojik profillerinde bulunmaları çoğunlukla ters etki yaratır. Bu yüzden test edilen bileşiklerin ABTS, DPPH, Galvinoksil ve FRAP yöntemlerinde antioksidan etki göstermemesi, bileşiklerin antikanser ilaç olma potansiyeline katkı sağlamaktadır.

4.2 MTT Testi

Tez çalışmasında test edilen bileşikler beş farklı konsantrasyonda (7.8, 15.6, 31.25, 62.5 ve 125 μ M) hazırlanarak Ishikawa, HepG2, HT-29, MDA-MB-231, Panc-1 ve HUVEC hücre hatlarında 24 saat uygulanarak hücre canlılığına olan etkileri MTT yöntemiyle araştırıldı. Yöntemin uygulama basamakları yöntem kısmında belirtilmiştir.

4.2.1 Ishikawa

Test edilen bileşikler 7.8, 15.6, 31.25, 62.5 ve 125 μ M konsantrasyonlarda Ishikawa hücre hattına 24 saat boyunca uygulandı. Hücre canlılığı MTT testiyle belirlendi. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edildi ve doz sonuçları bu değere göre hesaplandı. Uygulanan konsantrasyon ve hücre canlılığı kullanılarak sütun grafikleri (Ek 1) oluşturuldu. Hücrelerin %50'sini öldüren doz (EC_{50}) uygulanan konsantrasyon ve hücre canlılığı kullanılarak üstel grafik denkleminde ve/veya AAT Bioquest hesaplama sistemi (Anonim, 2023b) kullanılarak elde edildi. Hesaplanan EC_{50} değerleri Çizelge 4.1'de belirtildi.

Çizelge 4.1 Ishikawa hücre hattında hesaplanan EC₅₀ değerleri

Madde	EC ₅₀ değeri (μM)
D1	20.22
D2	30.57
D3	>125
D4	>125
D5	>125
D6	22.99
D7	>125
D8	66.97
D9	82.69
D10	>125
D11	>125
Paklitaksel	19.3

Test edilen on bir bileşiğin beşinde EC₅₀ değeri hesaplandı. En aktif bileşikler sırasıyla 20.22 μM ve 22.99 μM EC₅₀ değerlerine sahip D1 ve D6 bileşikleriydi (Çizelge 4.1).

4.2.2 HepG2

Test edilen bileşikler 7.8, 15.6, 31.25, 62.5 ve 125 μM konsantrasyonlarda HepG2 hücre hattına 24 saat boyunca uygulandı. Hücre canlılığı MTT testiyle belirlendi. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edildi ve doz sonuçları bu değere göre hesaplandı. Uygulanan konsantrasyon ve hücre canlılığı kullanılarak sütun grafikleri (Ek 2) oluşturuldu. EC₅₀ değerleri, uygulanan konsantrasyon ve hücre canlılığı kullanılarak üstel grafik denkleminde ve/veya AAT Bioquest hesaplama sistemi (Anonim, 2023b) kullanılarak elde edildi. Hesaplanan EC₅₀ değerleri Çizelge 4.2’de belirtildi.

Çizelge 4.2 HepG2 hücre hattında hesaplanan EC₅₀ değerleri

Madde	EC ₅₀ değeri (μM)
D1	5.43
D2	5.63
D3	2.75
D4	>125
D5	>125
D6	40.49
D7	32.66
D8	40.47
D9	67.06
D10	>125
D11	>125
Paklitaksel	4.5

Test edilen on bir bileşiğin yedisinde EC₅₀ değeri hesaplandı. En aktif bileşikler sırasıyla 5.43 μM, 5.63 μM ve 2.75 μM EC₅₀ değerlerine sahip D1, D2 ve D3 bileşikleriydi (Çizelge 4.2).

4.2.3 HT-29

Test edilen bileşikler 7.8, 15.6, 31.25, 62.5 ve 125 μM konsantrasyonlarda HT-29 hücre hattına 24 saat boyunca uygulandı. Hücre canlılığı MTT testiyle belirlendi. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edildi ve doz sonuçları bu değere göre hesaplandı. Uygulanan konsantrasyon ve hücre canlılığı kullanılarak sütun grafikleri (Ek 3) oluşturuldu. EC₅₀ değerleri, uygulanan konsantrasyon ve hücre canlılığı kullanılarak üstel grafik denkleminde ve/veya AAT Bioquest hesaplama sistemi (Anonim, 2023b) kullanılarak elde edildi. Hesaplanan EC₅₀ değerleri Çizelge 4.3’de belirtildi.

Çizelge 4.3 HT-29 hücre hattında hesaplanan EC₅₀ değerleri

Madde	EC ₅₀ değeri (μM)
D1	25.5
D2	19.7
D3	32.59
D4	>125
D5	>125
D6	23.6
D7	28.7
D8	52.9
D9	35.7
D10	59.8
D11	>125
Paklitaksel	1.4

Test edilen on bir bileşiğin sekizinde EC₅₀ değeri hesaplandı. En aktif bileşikler sırasıyla 25.5 μM, 19.7 μM ve 23.6 μM EC₅₀ değerlerine sahip D1, D2 ve D6 bileşikleriydi (Çizelge 4.3).

4.2.4 MDA-MB-231

Test edilen bileşikler 7.8, 15.6, 31.25, 62.5 ve 125 μM konsantrasyonlarda MDA-MB-231 hücre hattına 24 saat boyunca uygulandı. Hücre canlılığı MTT testiyle belirlendi. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edildi ve doz sonuçları bu değere göre hesaplandı. Uygulanan konsantrasyon ve hücre canlılığı kullanılarak sütun grafikleri (Ek 4) oluşturuldu. EC₅₀ değerleri, uygulanan konsantrasyon ve hücre canlılığı kullanılarak üstel grafik denkleminde ve/veya AAT Bioquest hesaplama sistemi (Anonim, 2023b) kullanılarak elde edildi. Hesaplanan EC₅₀ değerleri Çizelge 4.4’de belirtildi.

Çizelge 4.4 MDA-MB-231 hücre hattında hesaplanan EC₅₀ değerleri

Madde	EC ₅₀ değeri (μM)
D1	39.19
D2	71.21
D3	61.86
D4	>125
D5	>125
D6	41.47
D7	25.99
D8	69.61
D9	36.98
D10	62.78
D11	>125
Paklitaksel	14.3

Test edilen on bir bileşiğin sekizinde EC₅₀ değeri hesaplandı. En aktif bileşikler sırasıyla 39.19 μM, 25.99 μM ve 36.98 μM EC₅₀ değerlerine sahip D1, D7 ve D9 bileşikleriydi (Çizelge 4.5).

4.2.5 Panc-1

Test edilen bileşikler 7.8, 15.6, 31.25, 62.5 ve 125 μM konsantrasyonlarda Panc-1 hücre hattına 24 saat boyunca uygulandı. Hücre canlılığı MTT testiyle belirlendi. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edildi ve doz sonuçları bu değere göre hesaplandı. Uygulanan konsantrasyon ve hücre canlılığı kullanılarak sütun grafikleri (Ek 5) oluşturuldu. EC₅₀ değerleri, uygulanan konsantrasyon ve hücre canlılığı kullanılarak üstel grafik denkleminde ve/veya AAT Bioquest hesaplama sistemi (Anonim, 2023b) kullanılarak elde edildi. Hesaplanan EC₅₀ değerleri Çizelge 4.5’de belirtildi.

Çizelge 4.5 Panc-1 hücre hattında hesaplanan EC₅₀ değerleri

Madde	EC ₅₀ değeri (μM)
D1	64,43
D2	34,62
D3	>125
D4	>125
D5	>125
D6	74,52
D7	77,12
D8	>125
D9	76,88
D10	>125
D11	>125
Paklitaksel	9.3

Test edilen on bir bileşiğin beşinde EC₅₀ değeri hesaplandı. En aktif bileşikler sırasıyla 64.43 μM ve 34.62 μM EC₅₀ değerlerine sahip D1 ve D2 bileşikleriydi (Çizelge 4.5).

4.2.6 HUVEC

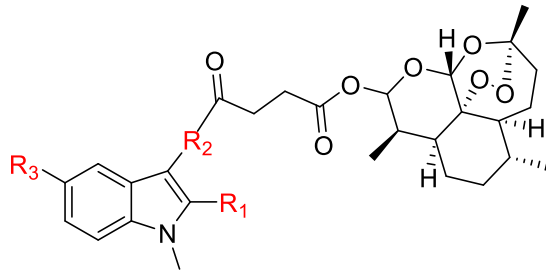
Test edilen bileşikler 7.8, 15.6, 31.25, 62.5 ve 125 μM konsantrasyonlarda HUVEC hücre hattına 24 saat boyunca uygulandı. Hücre canlılığı MTT testiyle belirlendi. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edildi ve doz sonuçları bu değere göre hesaplandı. Uygulanan konsantrasyon ve hücre canlılığı kullanılarak sütun grafikleri (Ek 6) oluşturuldu. EC₅₀ değerleri, uygulanan konsantrasyon ve hücre canlılığı kullanılarak üstel grafik denkleminde ve/veya AAT Bioquest hesaplama sistemi (Anonim, 2023b) kullanılarak elde edildi. Hesaplanan EC₅₀ değerleri Çizelge 4.6’de belirtildi.

Çizelge 4.6 HUVEC hücre hattında hesaplanan EC₅₀ değerleri

Madde	EC ₅₀ değeri (μM)
D1	>125
D2	>125
D3	>125
D4	>125
D5	>125
D6	>125
D7	>125
D8	>125
D9	>125
D10	>125
D11	>125
Paklitaksel	53.7

HUVEC hücre hattında, test edilen bileşiklerin hiçbirinde EC₅₀ değeri hesaplanamadı (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.7 Test edilen bileşiklerini yapıları



	R1	R2	R3
D1	Fenil	Tiyofen	H
D2	Pentil	Tiyofen	H
D3	Para-Tolil	Tiyofen	H
D4	Naftalin	Tiyofen	H
D5	Para-Metoksifenil	Tiyofen	H
D6	Fenil	Fenil	H
D7	Para-Tolil	Fenil	H
D8	Para-Metoksifenil	Fenil	H
D9	Naftalin	Fenil	H
D10	Pentil	Fenil	H
D11	Fenil	Tiyofen	Br

R: Değişken grup

Test edilen bileşiklerin yapıları Çizelge 4.7’de verildi. Bileşiklerin yapıları anlatılırken indol halkasının 2, 3 ve 5 konumlarındaki “değişken gruplar” belirtilerek anlatılacaktır. Ayrıca kullanılan tüm hücre hatlarında pozitif kontrol olarak “paklitaksel” kullanıldı.

Ishikawa hücre hattında en etkili bileşikler D1 ve D6 bileşikleriydi ve bu bileşiklerin EC₅₀ değerleri (20.22 µM ve 22.90 µM) pozitif kontrol olarak kullanılan paklitaksel maddesinin EC₅₀ değerine (19.3 µM) oldukça yakın değerdeydi (Çizelge 4.1). Bu bileşiklerden D1 bileşiğinde, indol halkasının 2 konumunda fenil ve 3 konumunda tiyofen bulunurken D6 bileşiğinin indol halkasının 2 ve 3 konumunda fenil grubu bulunmaktadır (Çizelge 4.7).

HepG2 hücre hattında en etkili bileşikler D1, D2 ve D3 bileşikleriydi. D1 ve D2 bileşiklerin EC₅₀ değerleri (5.43 µM, 5.63 µM) pozitif kontrol olarak kullanılan paklitaksel maddesinin EC₅₀ değerine (4.5 µM) oldukça yakın değerdeydi ve hatta D3 bileşiği (2.75 µM) pozitif kontrolden daha iyi aktivite sergiledi (Çizelge 4.2). D1 bileşiğinin indol halkasının 2 konumunda fenil ve 3 konumunda tiyofen, D2 bileşiğinin indol halkasının 2 konumunda pentil ve 3 konumunda tiyofen bulunurken D3 bileşiğinin indol halkasının 2 konumunda Para-Tolil ve 3 konumunda tiyofen grubu bulunmaktadır (Çizelge 4.7).

HT-29 hücre hattında en etkili bileşikler D1, D2 ve D6 bileşikleriydi. Bu bileşiklerin EC₅₀ değerleri sırasıyla 25.5 µM, 19.7µM ve 23.6 µM pozitif kontrol olarak kullanılan paklitaksel maddesinin EC₅₀ değeri ise 1.4 µM olarak tespit edildi (Çizelge 4.3). D1 bileşiğinin indol halkasının 2 konumunda fenil ve 3 konumunda tiyofen, D2 bileşiğinin indol halkasının 2 konumunda pentil ve 3 konumunda tiyofen bulunurken D6 bileşiğinin indol halkasının 2 ve 3 konumunda fenil grubu bulunmaktadır (Çizelge 4.7). MDA-MB-231 hücre hattında en etkili bileşikler D1, D7 ve D9 bileşikleriydi. Bu bileşiklerin EC₅₀ değerleri sırasıyla 39.19 µM, 25.99 µM ve 36.98 µM pozitif kontrol olarak kullanılan paklitaksel maddesinin EC₅₀ değeri ise 14.3 µM olarak tespit edildi (Çizelge 4.4). D1 bileşiğinin indol halkasının 2 konumunda fenil ve 3 konumunda tiyofen, D7 bileşiğinin indol halkasının 2 konumunda Para-Tolil ve 3 konumunda fenil bulunurken D9 bileşiğinin indol halkasının 2 naftalin ve 3 konumunda fenil grubu bulunmaktadır (Çizelge 4.7).

Panc-1 hücre hattında en etkili bileşikler D1 ve D2 bileşikleriydi ve bu bileşiklerin EC₅₀ değerleri EC₅₀ değerleri sırasıyla 64.43 µM ve 34.62 µM pozitif kontrol olarak kullanılan paklitaksel maddesinin EC₅₀ değeri ise 9.3 µM olarak tespit edildi (Çizelge 4.5). Bu bileşiklerden D1 bileşiğinde, indol halkasının 2 konumunda fenil ve 3 konumunda tiyofen bulunurken D2 bileşiğinin indol halkasının 2 konumunda pentil ve 3 konumunda tiyofen grubu bulunmaktadır (Çizelge 4.7).

Sağlıklı insan endotel (HUVEC) hücre hattında, test edilen bileşiklerin hiçbirinde EC₅₀ değeri tespit edilemezken pozitif kontrol olarak kullanılan paklitaksel maddesinin EC₅₀ değeri ise 53.7 µM olarak tespit edildi (Çizelge 4.6). Bu bulgu, kemoterapinin önemli bir sorunu olan sağlıklı hücre toksisitesinin azaltılması açısından umut vericidir.

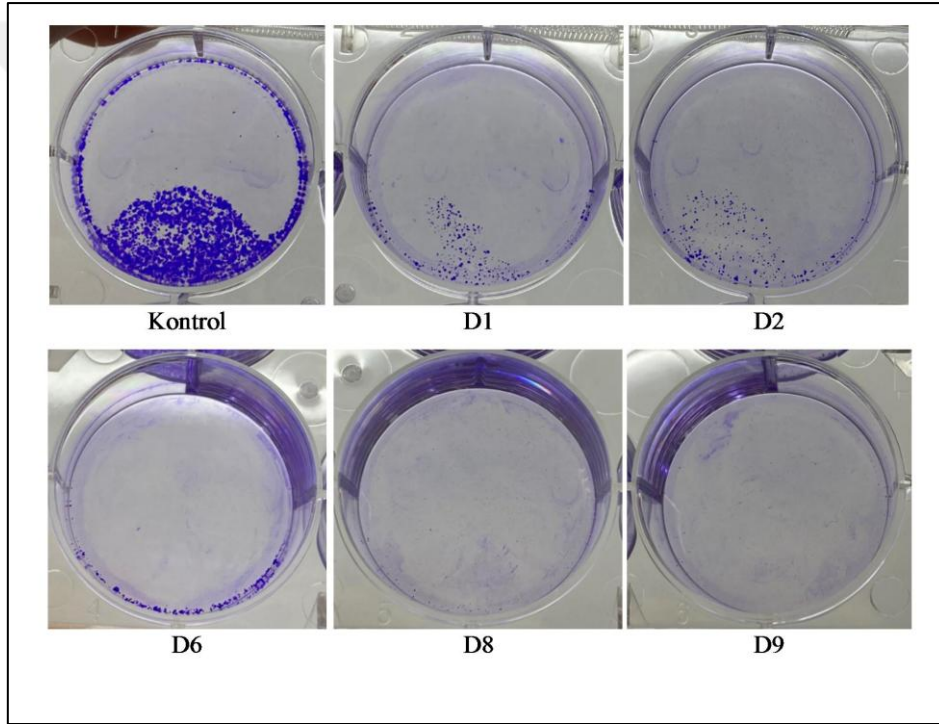
Test edilen bileşiklerin sekizinin çeşitli hücre hatlarında etkili olduğu tespit edildi (Çizelge 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5). Hücre hatlarına göre en etkili bileşikler; Ishikawa hücre hattında D1, HepG2 hücre hattında D3, MDA-MB-231 hücre hattında D7, Panc-1 ve HT-29 hücre hattında D2 bileşiği en iyi aktivite sergiledi. Bu durum bileşiklerin farklı hücre hatlarında farklı sitotoksik aktiviteye sahip olabileceğini göstermektedir (Mphahlele vd., 2018; Hu vd., 2019; Wang vd., 2022).

4.3 Koloni Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi

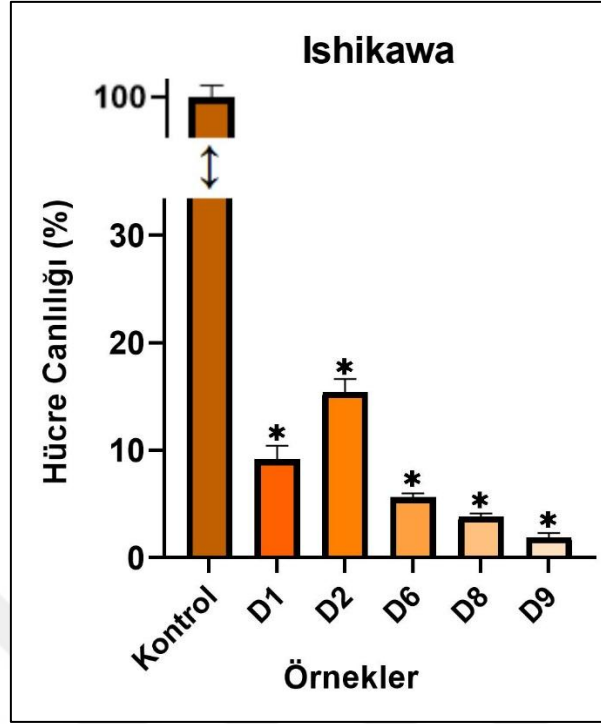
Koloni oluşturma testi, tek bir hücrenin koloniye (bir koloni en az 50 hücrenin bir araya gelerek oluşturduğu popülasyonu ifade eder) dönüşme potansiyelini ölçen bir in vitro hücre hayatta kalma testidir. Bu yöntem, iyonlaştırıcı radyasyon tedavisinden veya sitotoksik madde uygulanmasından sonra kalan kanser hücrelerinin koloni sayısı ve boyutunu test etmek kullanılır (Franken vd., 2006; Guzmán vd., 2014). Bu çalışmada MTT yöntemiyle sitotoksik özellikleri test edilen bileşiklerden EC₅₀ değeri tespit edilen bileşikler, koloni formasyon testi kullanılarak bu bileşiklerin hücrelerin koloni oluşturmaları üzerindeki etkileri araştırıldı. Testin uygulanışı yöntem kısmında belirtildi.

4.3.1 Ishikawa

MTT yöntemiyle sitotoksik aktiviteleri tespit edilen D1, D2, D6, D8 ve D9 bileşiklerinin etkili konsantrasyonları 6 kuyulu plakalarda 24 saat boyunca Ishikawa hücre hattına uygulandı. Testin sonunda hücreler boyanarak fotoğraflandı (Şekil 4.29). Daha sonra ImageJ programı yardımıyla koloni oluşumu hesaplanarak elde edilen değerler sütun grafiği (Şekil 4.30) olarak belirtildi. Bu değerlere göre D1, D2, D6, D8 ve D9 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 90.9, 84, 94.4, 96.2 ve 98.1 oranında koloni oluşumunu engelledi.



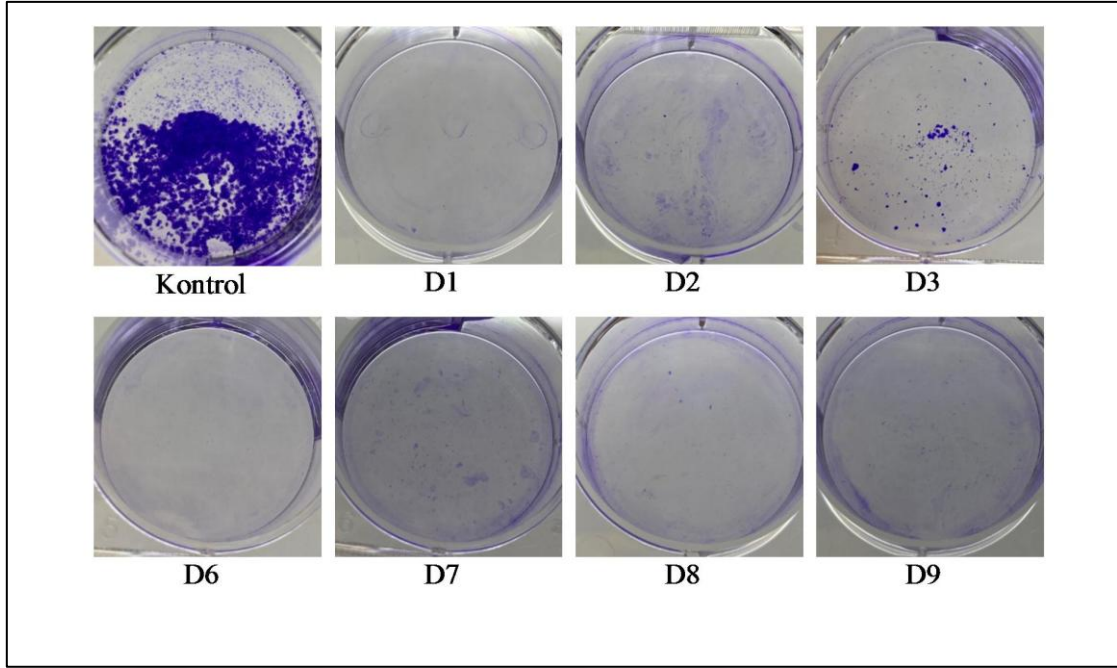
Şekil 4.29 Test edilen bileşiklerin Ishikawa hücre hattında koloni oluşumuna etkisinin 6 kuyulu plaka kuyucuğunda görüntülenmesi



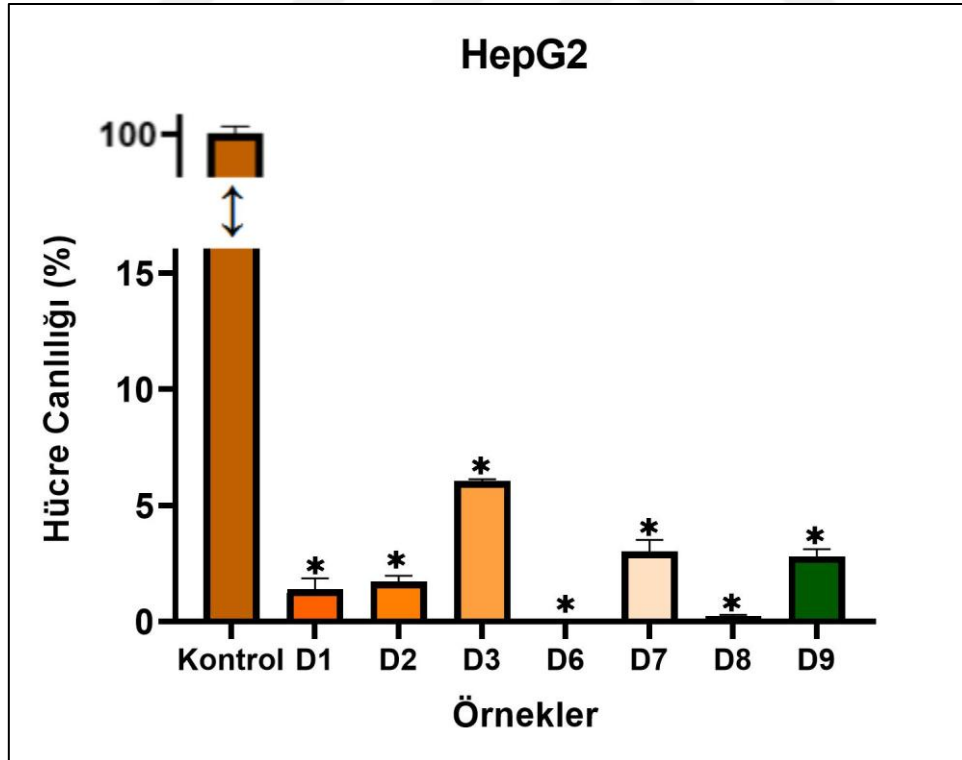
Şekil 4.30 Bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra koloni oluşumunun yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p<0.05$)

4.3.2 HepG2

MTT yöntemiyle sitotoksik aktiviteleri tespit edilen D1, D2, D3, D6, D7, D8 ve D9 bileşiklerinin etkili konsantrasyonları 6 kuyulu plakalarda 24 saat boyunca HepG2 hücre hattına uygulandı. Testin sonunda hücreler boyanarak fotoğraflandı (Şekil 4.31). Daha sonra ImageJ programı yardımıyla koloni oluşumu hesaplanarak elde edilen değerler sütun grafiği (Şekil 4.32) olarak belirtildi. Bu değerlere göre D1, D2, D3, D6, D7, D8 ve D9 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 98.6, 98.3, 93.8, 99.9, 96.7, 99.8 ve 97.2 oranında koloni oluşumunu engelledi.



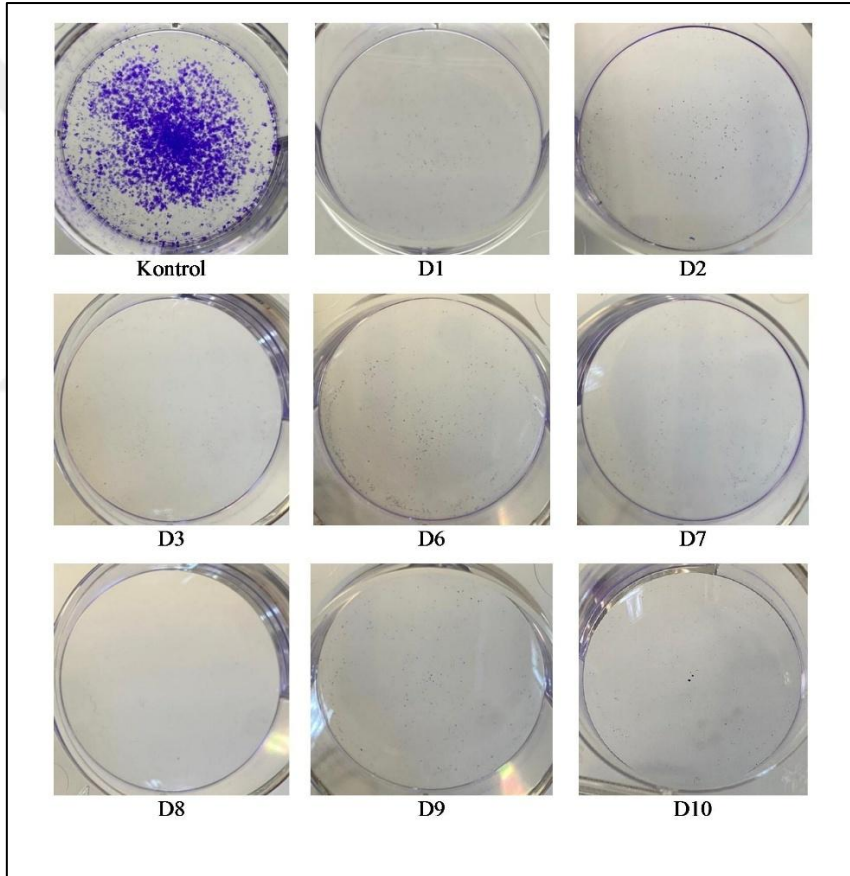
Şekil 4.31 Test edilen bileşiklerin HepG2 hücre hattında koloni oluşumuna etkisinin 6 kuyulu plaka kuyucuğunda görüntülenmesi



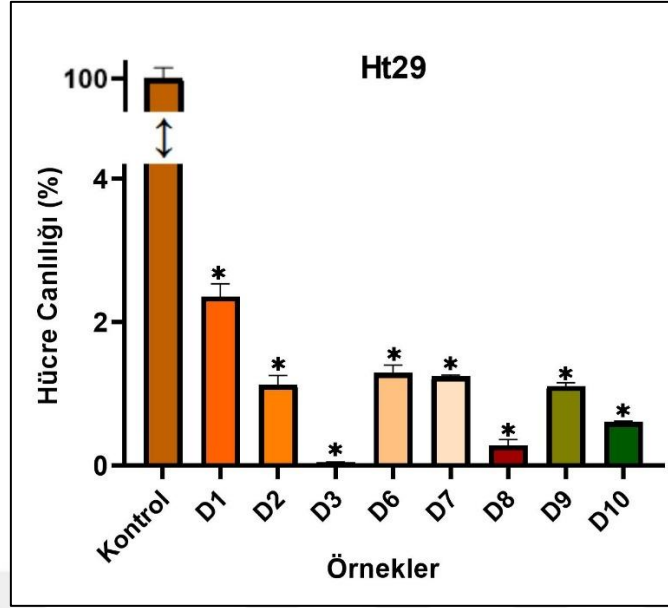
Şekil 4.32 Bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra koloni oluşumunun yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p < 0.05$)

4.3.3 HT-29

MTT yöntemiyle sitotoksik aktiviteleri tespit edilen D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin etkili konsantrasyonları 6 kuyulu plakalarda 24 saat boyunca HT-29 hücre hattına uygulandı. Testin sonunda hücreler boyanarak fotoğraflandı (Şekil 4.33). Daha sonra ImageJ programı yardımıyla koloni oluşumu hesaplanarak elde edilen değerler sütun grafiği (Şekil 4.34) olarak belirtildi. Bu değerlere göre D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşikler kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 97.6, 98.9, 99.9, 98.7, 98.9, 99.7, 98.9 ve 99.4 oranında koloni oluşumunu engelledi.



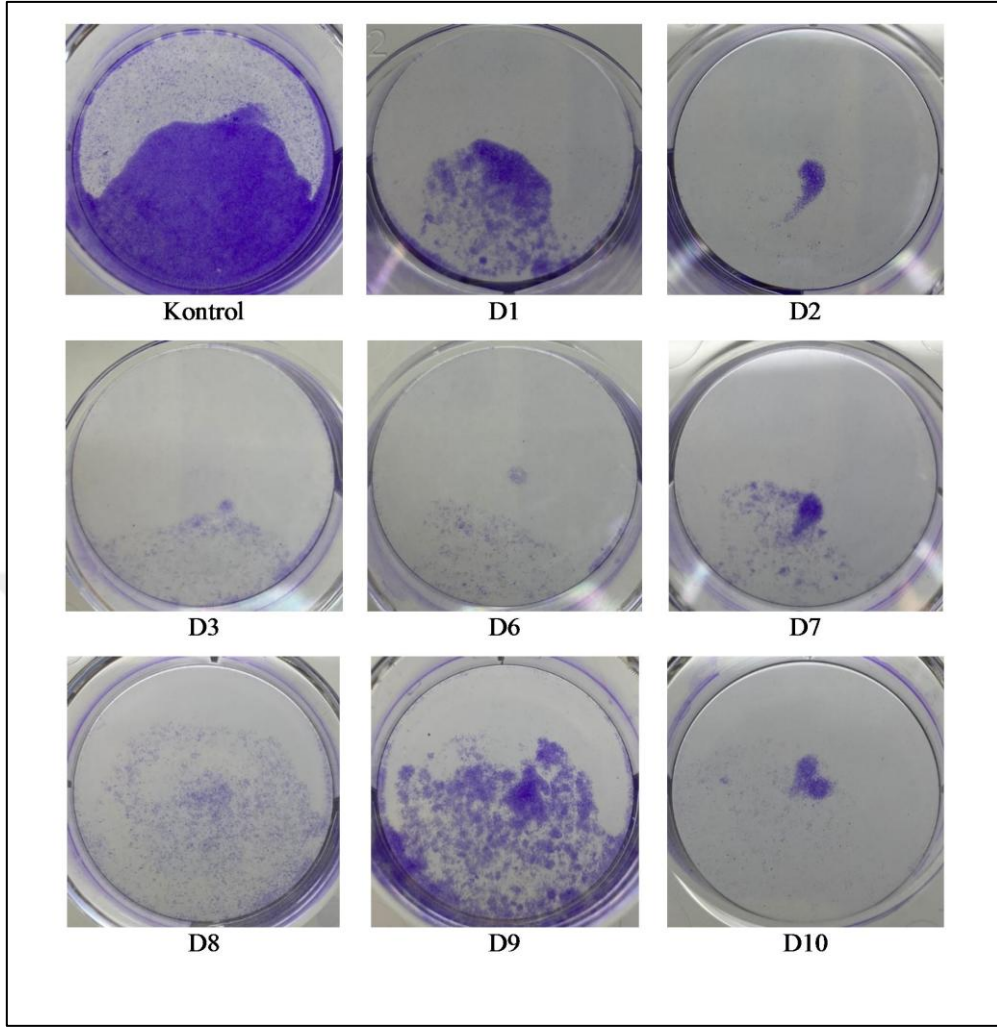
Şekil 4.33 Test edilen bileşiklerin HT-29 hücre hattında koloni oluşumuna etkisinin 6 kuyulu plaka kuyucuğunda görüntülenmesi



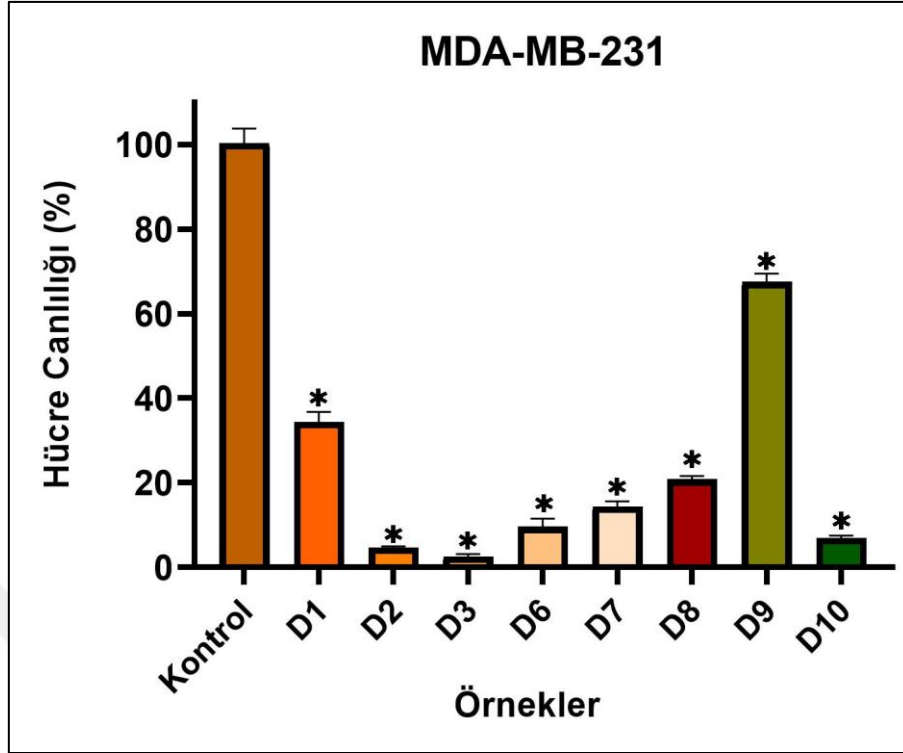
Şekil 4.34 Bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra koloni oluşumunun yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p < 0.05$)

4.3.4 MDA-MB-231

MTT yöntemiyle sitotoksik aktiviteleri tespit edilen D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin etkili konsantrasyonları 6 kuyulu plakalarda 24 saat boyunca MDA-MB-231 hücre hattına uygulandı. Testin sonunda hücreler boyanarak fotoğraflandı (Şekil 4.35). Daha sonra ImageJ programı yardımıyla koloni oluşumu hesaplanarak elde edilen değerler sütun grafiği (Şekil 4.36) olarak belirtildi. Bu değerlere göre D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 65.6, 95.3, 97.5, 90.3, 85.5, 78.8, 32.5 ve 93 oranında koloni oluşumunu engelledi.



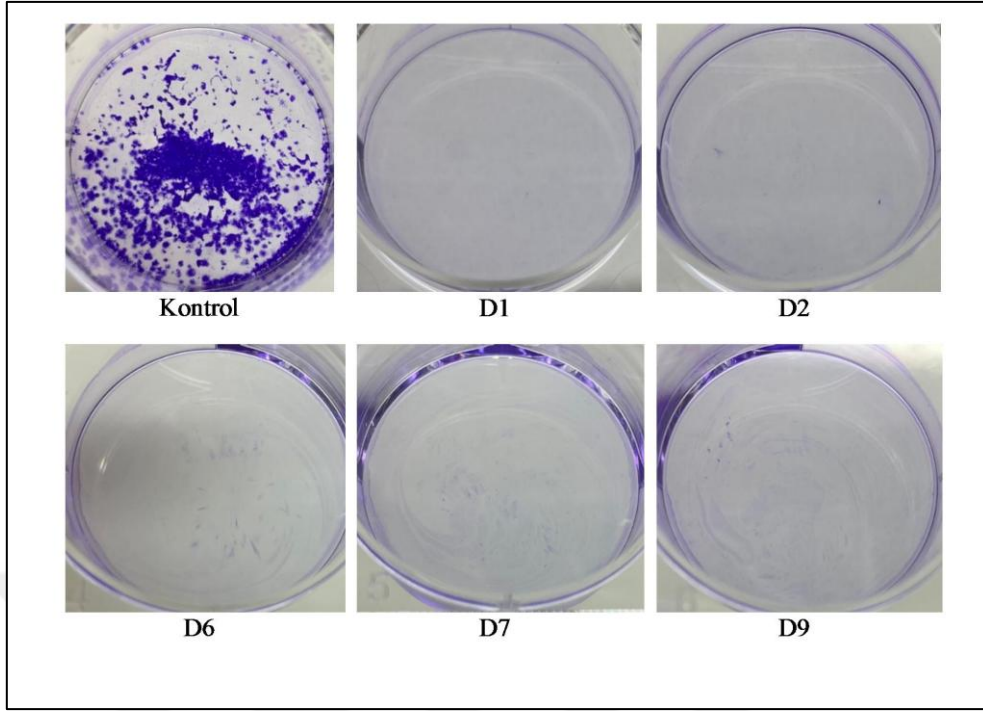
Şekil 4.35 Test edilen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattında koloni oluşumuna etkisinin 6 kuyulu plaka kuyucugunda görüntülenmesi



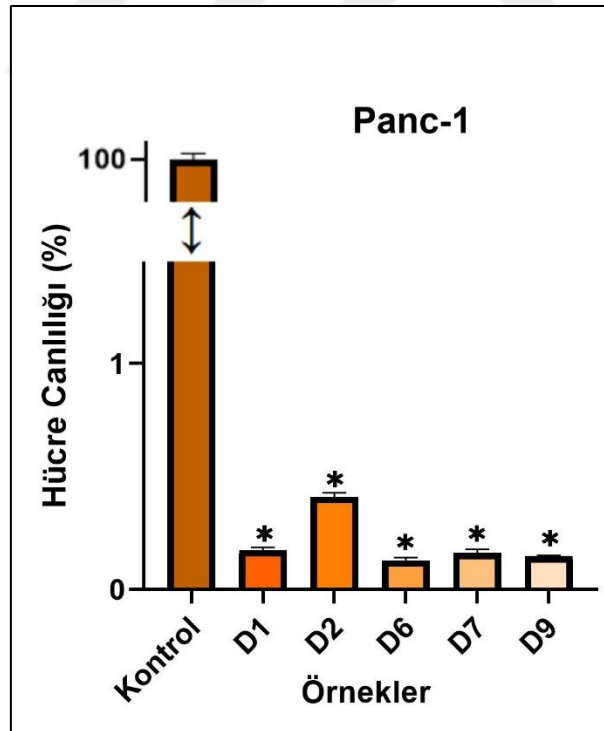
Şekil 4.36 Bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra koloni oluşumunun yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p < 0.05$)

4.3.5 Panc-1

MTT yöntemiyle sitotoksik aktiviteleri tespit edilen D1, D2, D6, D7 ve D9 bileşiklerinin etkili konsantrasyonları 6 kuyulu plakalarda 24 saat boyunca Panc-1 hücre hattına uygulandı. Testin sonunda hücreler boyanarak fotoğraflandı (Şekil 4.37). Daha sonra ImageJ programı yardımıyla koloni oluşumu hesaplanarak elde edilen değerler sütun grafiği (Şekil 4.38) olarak belirtildi. Bu değerlere göre D1, D2, D6, D7 ve D9 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 99.8, 99.6, 99.9, 99.8 ve 99.8 oranında koloni oluşumunu engelledi.



Şekil 4.37 Test edilen bileşiklerin Panc-1 hücre hattında koloni oluşumuna etkisinin 6 kuyulu plaka kuyucuğunda görüntülenmesi



Şekil 4.38 Bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra koloni oluşumunun yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p < 0.05$)

Çalışmanın sonucunda test edilen bileşiklerin; Ishikawa hücre hattında D1, D2, D6, D8 ve D9 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 90.9, 84, 94.4, 96.2 ve 98.1 oranında (Şekil 4.30), HepG2 hücre hattında D1, D2, D3, D6, D7, D8 ve D9 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 98.6, 98.3, 93.8, 99.9, 96.7, 99.8 ve 93.8 oranında (Şekil 4.32), HT-29 hücre hattında D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 97.6, 98.9, 99.9, 98.7, 98.9, 99.7, 98.9 ve 99.4 oranında (Şekil 4.34), MDA-MB-231 hücre hattında D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 65.6, 95.3, 97.5, 90.3, 85.5, 78.8, 32.5 ve 93 oranında (Şekil 4.36) ve Panc-1 hücre hattında D1, D2, D6, D7 ve D9 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 99.8, 99.6, 99.9, 99.8 ve 99.8 oranında (Şekil 4.38) koloni oluşumunu engellediği tespit edildi. Bu sonuçlar göre test edilen bileşiklerin kullanılan kanser hücrelerinde koloni oluşumunu etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir.

Literatürde, İndol-Artesunat hibrit molekülleriyle ilgili yapılmış koloni formasyon deneyi yapılmamakla birlikte bu hibrit molekülleri oluşturan indol türevleri (Qi vd., 2022; Oberhuber vd., 2023) ve Artesunat (Zhang vd., 2022) yapılarıyla ilgili çeşitli kanser hücre hatlarında yapılmış koloni formasyon çalışmalarında bu bileşiklerin kanser hücrelerinin koloni oluşumunun engellenmesinde etkili oldukları rapor edilmiştir.

4.4 İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi

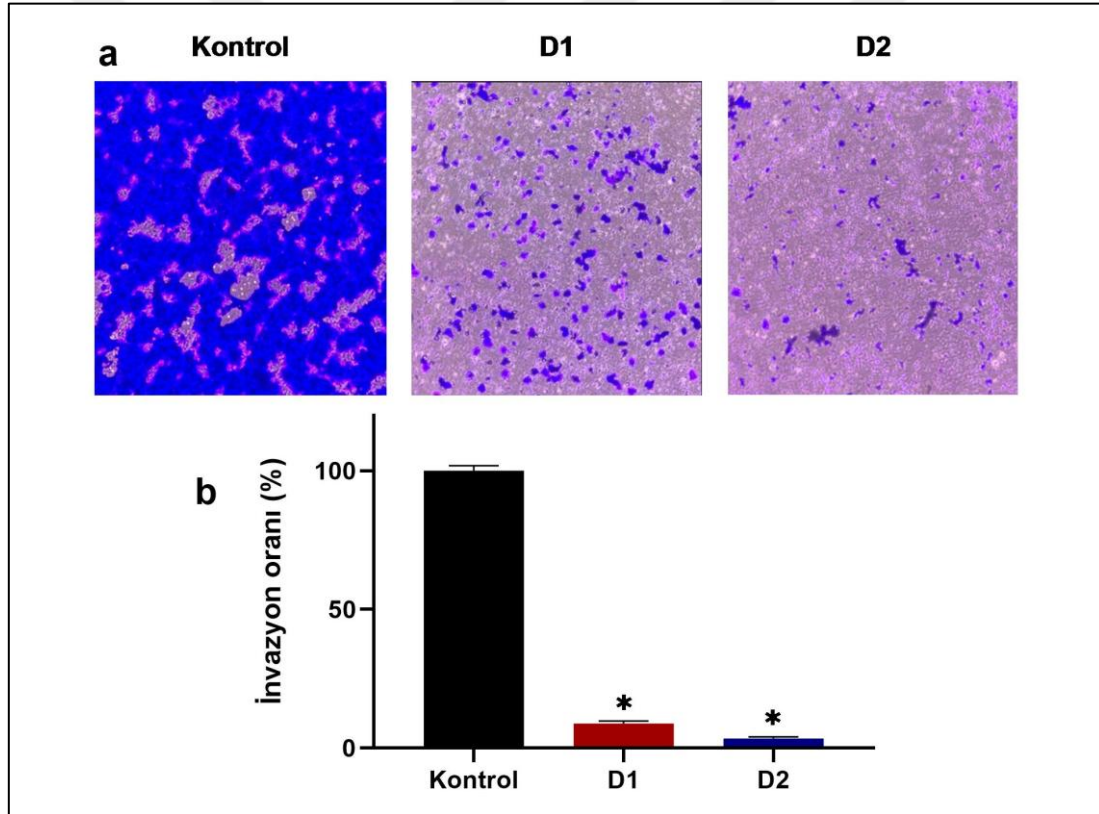
Matrijel, büyük miktarlarda hücre dışı matriks (ECM) proteinleri içeren ve Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) fare sarkomu tarafından üretilen jel benzeri bir maddedir. Bazal membran bileşenleri içeren bu jel hücre kültürü uygulamalarında kullanılmaktadır (Hayashi vd., 2004; Passaniti vd., 2022).

Matrijel invazyon testi, kanser hücrelerinin yeniden yapılandırılmış bazal membranı istila etme yeteneğini ölçmek için kullanılır. Bu testte tümör hücreleri hücre dışı matriksi taklit eden matrijele gömülür. Daha sonra hücreler, onları göç etmeye ve matrijeli bozmaya teşvik eden serum gibi bir kemoatraktana maruz bırakılır. Matrijeli delip gözenekli zarın diğer tarafına geçen hücreler boyanarak gözlemlenir (Aslan vd., 2021; Passaniti vd., 2022).

Bu çalışmada kullanılan bileşiklerden en etkili sitotoksik özelliğe sahip olan D1 ve D2 maddesinin HepG2, HT-29 ve Panc-1 hücre hatları üzerindeki invazyon kapasiteleri matrijel-invazyon testiyle araştırıldı. Testin uygulanışı yöntem kısmında belirtildi.

4.4.1 HepG2

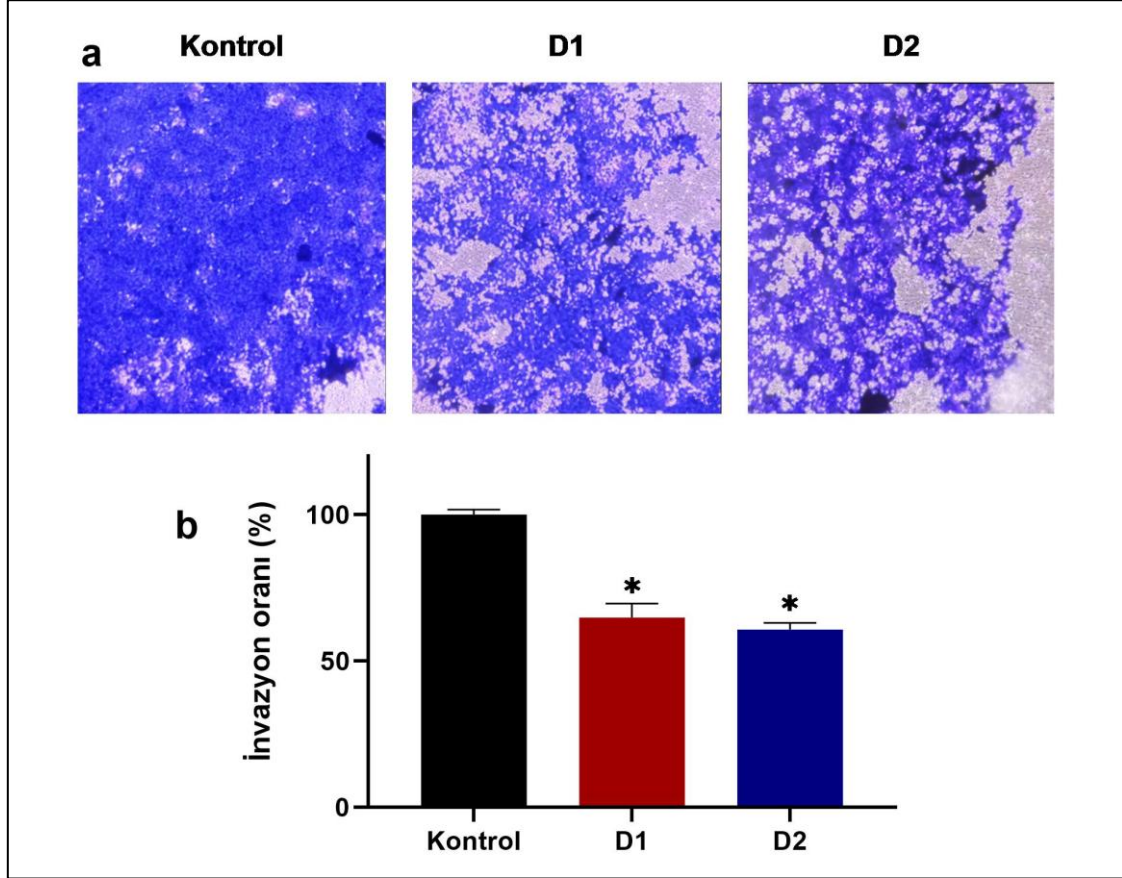
D1 ve D2 bileşikleri, HepG2 hücrelerine 24 saat uygulandıktan sonra kontrol grubuna göre invazyon kapasitesini sırasıyla yüzde 91.2 ve 96.6 oranında düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 4.39).



Şekil 4.39 D1 ve D2 maddelerinin HepG2 hücre hattının invazyon kapasitesine etkisinin görüntülenmesi (a) ve yüzde sütun grafiği (b). *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p<0.05$)

4.4.2 HT-29

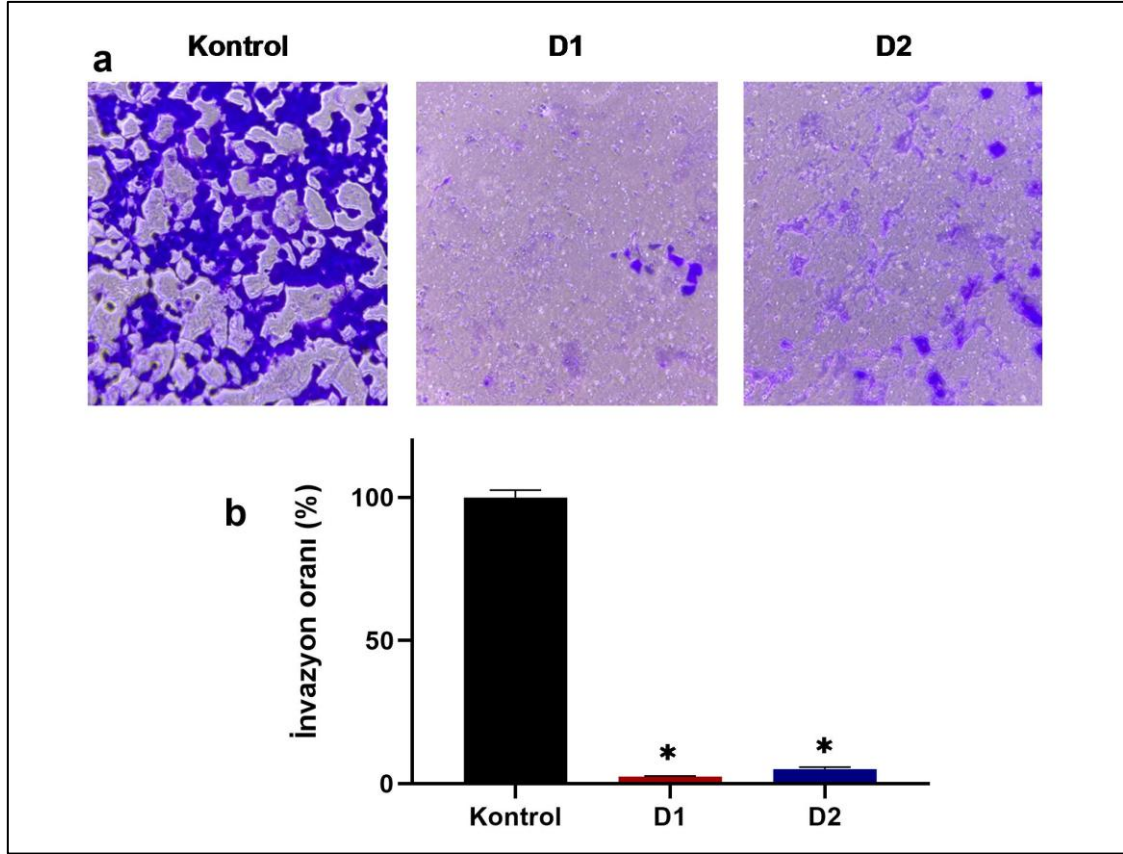
D1 ve D2 bileşiğinin HT-29 hücre hattına 24 saat uygulandıktan sonra kontrol grubuna göre invazyon kapasitesini sırasıyla yüzde 35.1 ve 39.2 oranında düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 4.40).



Şekil 4.40 D1 ve D2 maddelerinin HT-29 hücre hattının invazyon kapasitesine etkisinin görüntülenmesi (a) ve yüzde sütun grafiği (b). *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p < 0.05$)

4.4.3 Panc-1

D1 ve D2 bileşiğinin Panc-1 hücre hattına 24 saat uygulandıktan sonra kontrol grubuna göre invazyon kapasitesini sırasıyla yüzde 97.4 ve 94.8 oranında düşürdüğü gözlemlendi (Şekil 4.41).



Şekil 4.41 D1 ve D2 maddelerinin Panc-1 hücre hattının invazyon kapasitesine etkisinin görüntülenmesi (a) ve yüzde sütun grafiği (b). *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p < 0.05$)

Çalışmanın sonucunda test edilen bileşiklerin; HepG2 hücre hattında D1 ve D2 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 91.2 ve 96.6 oranında (Şekil 4.39), HT-29 hücre hattında D1 ve D2 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 35.1 ve 39.2 oranında (Şekil 4.40), Panc-1 hücre hattında D1 ve D2 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 97.4 ve 94.8 oranında (Şekil 4.41), invazyonu engellediği tespit edildi. Ancak test edilen bileşiklerin invazyon etki mekanizmalarıyla ilgili bir çalışma bu tez kapsamında gerçekleştirilmedi. Literatürde de indol-artesunat hibrit moleküllerinin invazyon mekanizmalarının tespitine yönelik çalışmaya rastlanmamıştır.

Literatürde indol, artemisinin ve artesunat moleküllerinin invazyon özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda ise hücre dışı matriks proteinlerinin parçalanmasından sorumlu proteolitik enzimler (metalloproteinaz) yada bu enzimlerin aktivitesini düzenleyen proteinler (TIMP2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2)), hücre-hücre

yapışmasını düzenleyen moleküllerin (E-kadherin, Cdc42); mRNA ve protein düzeyleri araştırılmıştır (Meng vd., 2000; Weifeng vd., 2011; Xiong ve Huang, 2021).

Weifeng vd. (2011) yaptıkları çalışmada *Artemisia annua* bitkisinden elde ettikleri Artemisinin molekülünü insan hepatosellüler karsinom (HCC) ve HepG2 hücre hatlarına farklı konsantrasyonlarda uygulamışlardır. Artemisininin 12µM konsantrasyondan daha yüksek konsantrasyonlarda migrasyon ve invazyon üzerinde inhibisyon etkisinin olduğunu ve inkübasyon zamanı (12 saat - 24 saat) arttıkça bu inhibisyon etkisinin dahada arttığını tespit etmişlerdir. Yapılan analizlerde Artemisininin TIMP2, Cdc42 ve E-kadherin aktivitesini arttırarak ve metalloproteinaz aktivitesini azaltarak invazyon üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir (Weifeng vd., 2011). Lian vd. (2016) yaptıkları çalışmada artesunatin glioma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini MTT yöntemiyle belirledikten sonra artesunatin glioma hücreleri üzerindeki invazyon özelliklerini matrigel invazyon chambers ile tespit etmişlerdir. Yaptıkları PCR analizinde de hücre adhezyonunda etkili olan claudin-1 geninin ekspresyonunda artış olduğunu belirlemişlerdir (Lian vd., 2016). Meng vd. (2000) yaptıkları çalışmada, indol-3-karbinolün (I3C) T47-D (bir meme kanseri hücre hattı) hücre hattındaki invazyon üzerindeki etkisini araştırmışlardır. I3C2'ün T47-D hücre hattında, PTEN (bir tümör baskılayıcı gen) ile E-cadherin (hücre-hücre adezyonunun düzenleyicisi) ekspresyonunun artmasını sağlayarak invazyonu baskıladığını ve benzer etkileri MCF-7 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarında da gösterdiğini raporlamışlardır (Meng vd., 2000).

4.5 Wound-Healing (Yara-İyileşme) Yöntemi ile Migrasyon Etkisinin Belirlenmesi

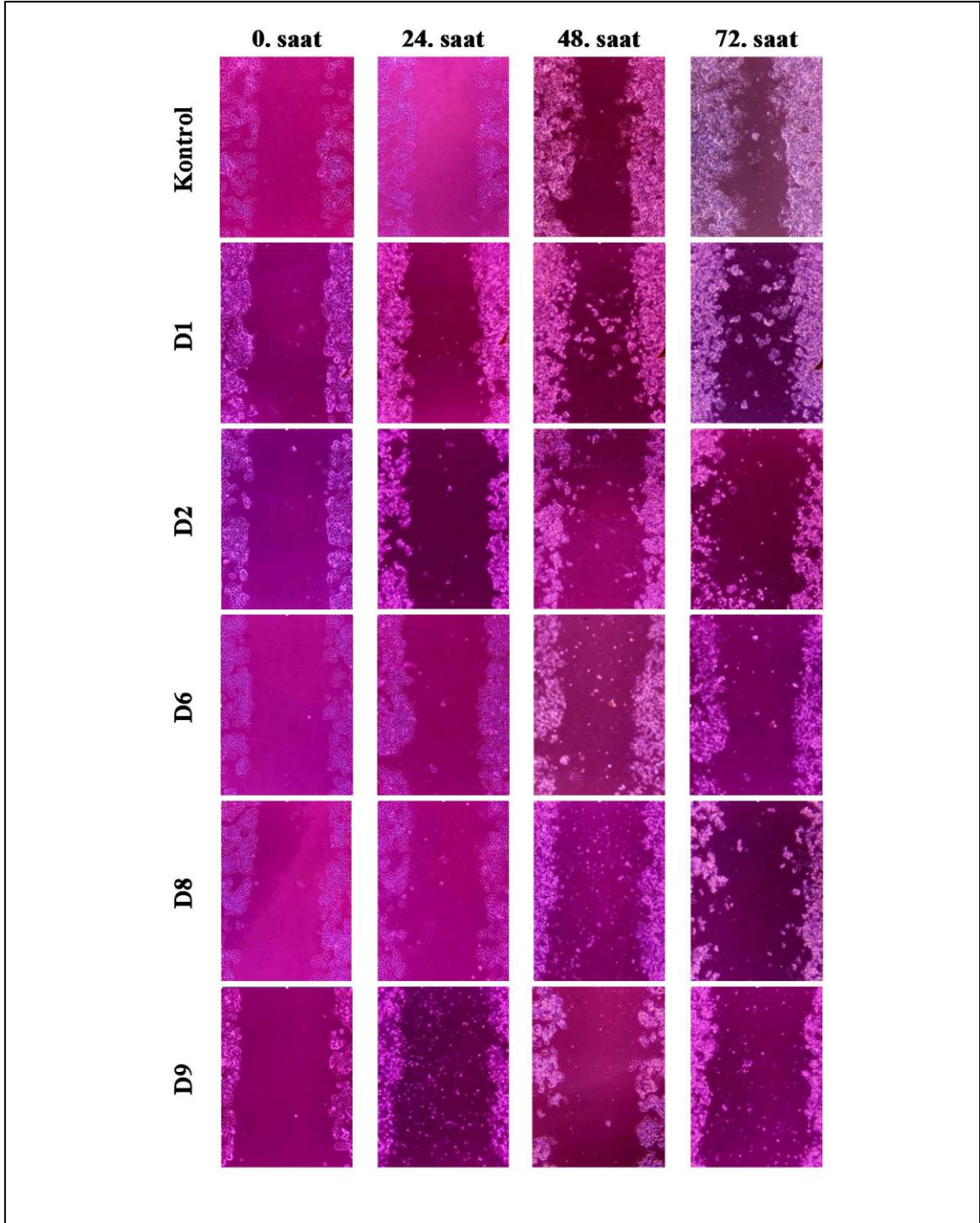
Wound-healing (yara iyileştirme) testi, hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimini in vitro incelemek için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem in vivo yara iyileşmesi sırasında gerçekleşen hücre göçünü taklit eder. Aynı zamanda bir çizik testi olarak da adlandırılır, çünkü bu testte hücre tabakasına bir çizik atılarak oluşturulan bu yaranın kapanması gözlemlenir (Rodriguez vd., 2005; Suarez-Arnedo vd., 2020).

Yara iyileştirme testi kullanılarak bir maddenin hücre göçüne etkisi in vitro olarak araştırılabilir. Bu yöntemin temel prensibi, hücre tabakasında yara açılarak bu yaranın belirli zamanlarda fotoğraflanarak ya da canlı olarak bir kamera sistemiyle görüntülenmesiyle test edilen bileşiğin hücre göçüne etkisinin araştırılmasıdır (Jonkman vd., 2014; Addis vd., 2020).

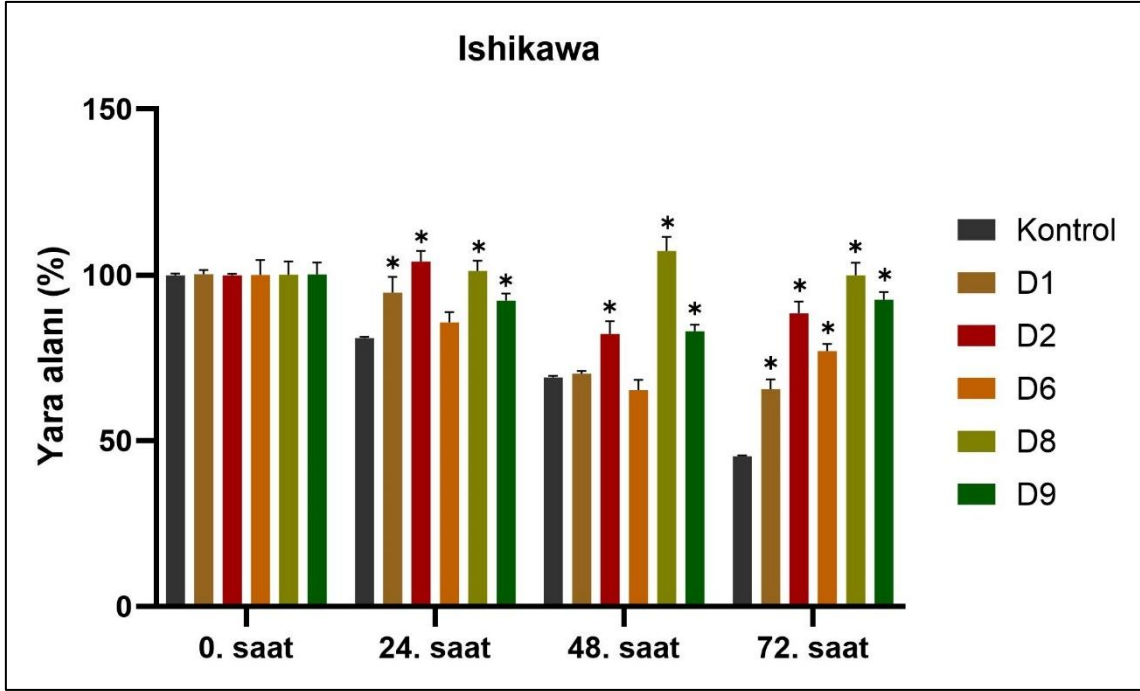
MTT yöntemiyle EC₅₀ değeri tespit edilen bileşiklerin hücrelerin migrasyonuna etkileri yara iyileştirme testi ile araştırıldı. Testin uygulanışı, yöntem kısmında belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

4.5.1 Ishikawa

D1, D2, D6, D8 ve D9 bileşiklerinin Ishikawa hücre hattında hücre göçüne olan etkileri 6 kuyulu plakalarda araştırıldı. Bu bileşikler ve kontrol 0., 24., 48. ve 72. saatteki görüntüleri fotoğraflanarak (Şekil 4.42) ImageJ uygulaması ile analiz edilerek hücre göçüne etkileri hesaplandı. Grupların 0. saatteki yara alanı yüzde 100 kabul edilerek yara kapatma özellikleri hesaplandı ve hesaplanan değerler sütun grafiği olarak gösterildi (Şekil 4.43). Grafiklerde kullanılan değerler (Şekil 4.43) yara alanını ifade etmektedir. %100'den grafiklerdeki değerler çıkarılarak yara kapatma oranları hesaplandı. Hesaplanan bu değerlere göre 72. saatte kontrol grubunun yara alanı %54.7 kapanırken D1, D2, D6, D8 ve D9 örneklerinde sırasıyla %34.4, %11.5, %22.9, %0.1 ve %7.5 oranında yara alanı kapandı. Bu değerlere göre bütün örneklerin kontrol grubuna göre hücre göçünü engellediği D8 örneğinin ise tamamen durdurduğu görülmektedir.



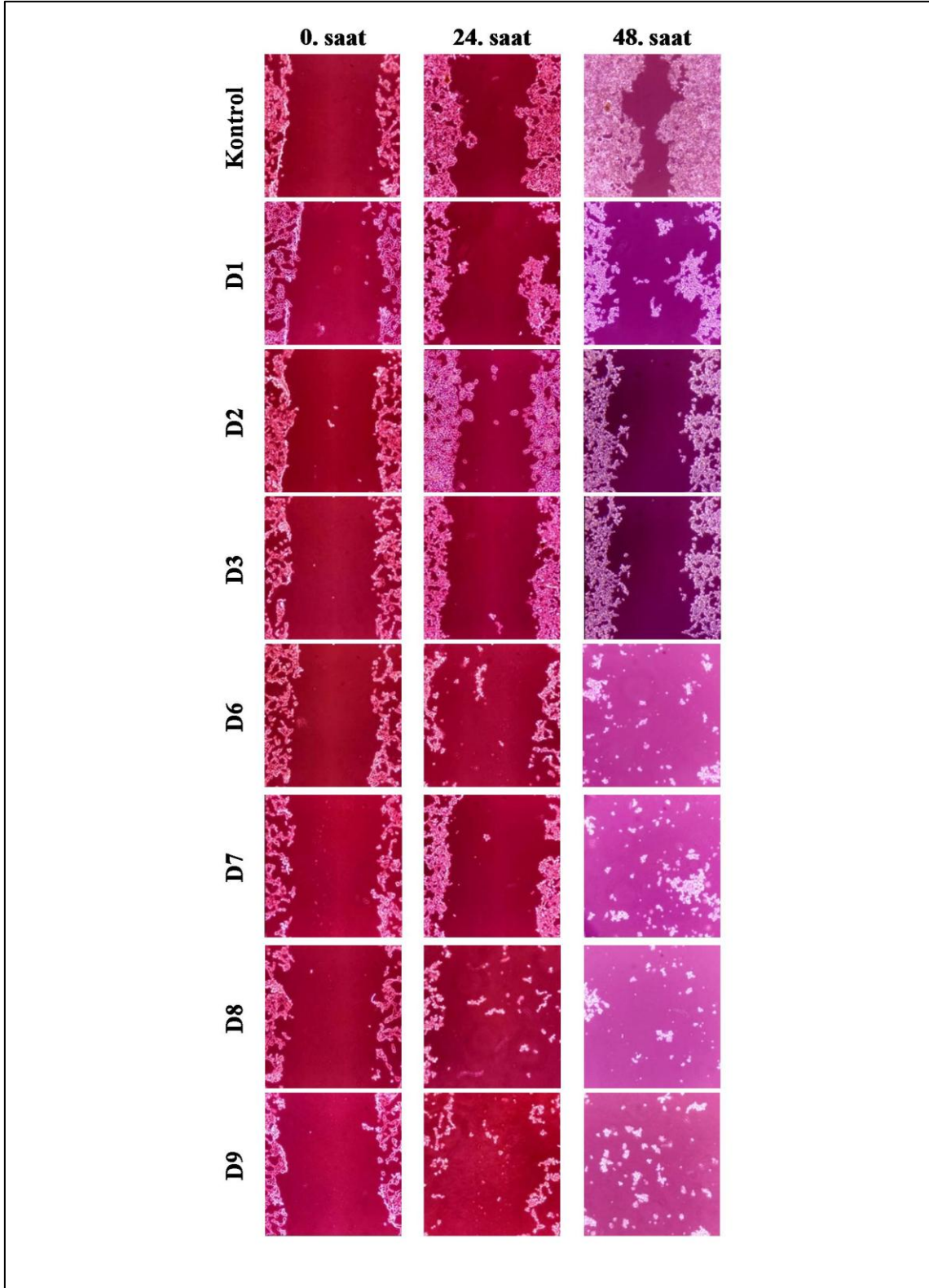
Şekil 4.42 Test edilen bileşiklerin Ishikawa hücre hattındaki migrasyon etkilerinin görüntülenmesi



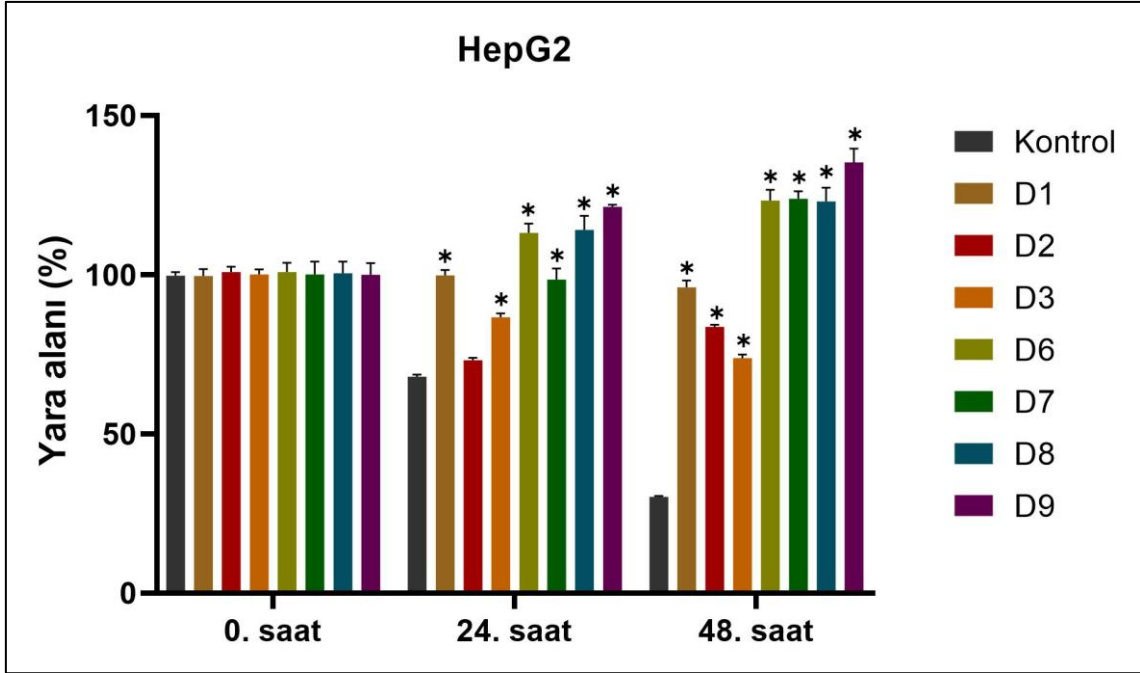
Şekil 4.43 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra Ishikawa hücre hattının migrasyonuna etkilerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi.
*Kontrol grubuna göre farklıdır ($p < 0.05$)

4.5.2 HepG2

D1, D2, D3, D6, D7, D8 ve D9 bileşiklerinin HepG2 hücre hattında hücre göçüne olan etkileri 6 kuyulu plakalarda araştırıldı. Bu bileşikler ve kontrol 0., 24. ve 48. saatteki görüntüleri fotoğraflanarak (Şekil 4.44) ImageJ uygulaması ile analiz edilerek hücre göçüne etkileri hesaplandı. Grupların 0. saatteki yara alanı yüzde 100 kabul edilerek yara kapatma özellikleri hesaplandı ve hesaplanan değerler sütun grafiği olarak gösterildi (Şekil 4.45). Yara kapatma oranı Ishikawa hücre hattında hesaplandığı gibi hesaplandı. Hesaplanan bu değerlere göre 48. saatte kontrol grubunun yara alanı %69.8 kapanırken D1, D2 ve D3 örneklerinde sırasıyla %4, %16.4 ve %26.2 oranında yara alanı kapandı. D6, D7, D8 ve D9 örneklerinde hücreler dağıldığı (Şekil 4.44) için yara kapanması gözlenmedi aksine yara alanı büyüdü. Bu sonuçlara göre bütün örneklerin kontrol grubuna göre hücre göçünü engellediği görülmektedir.



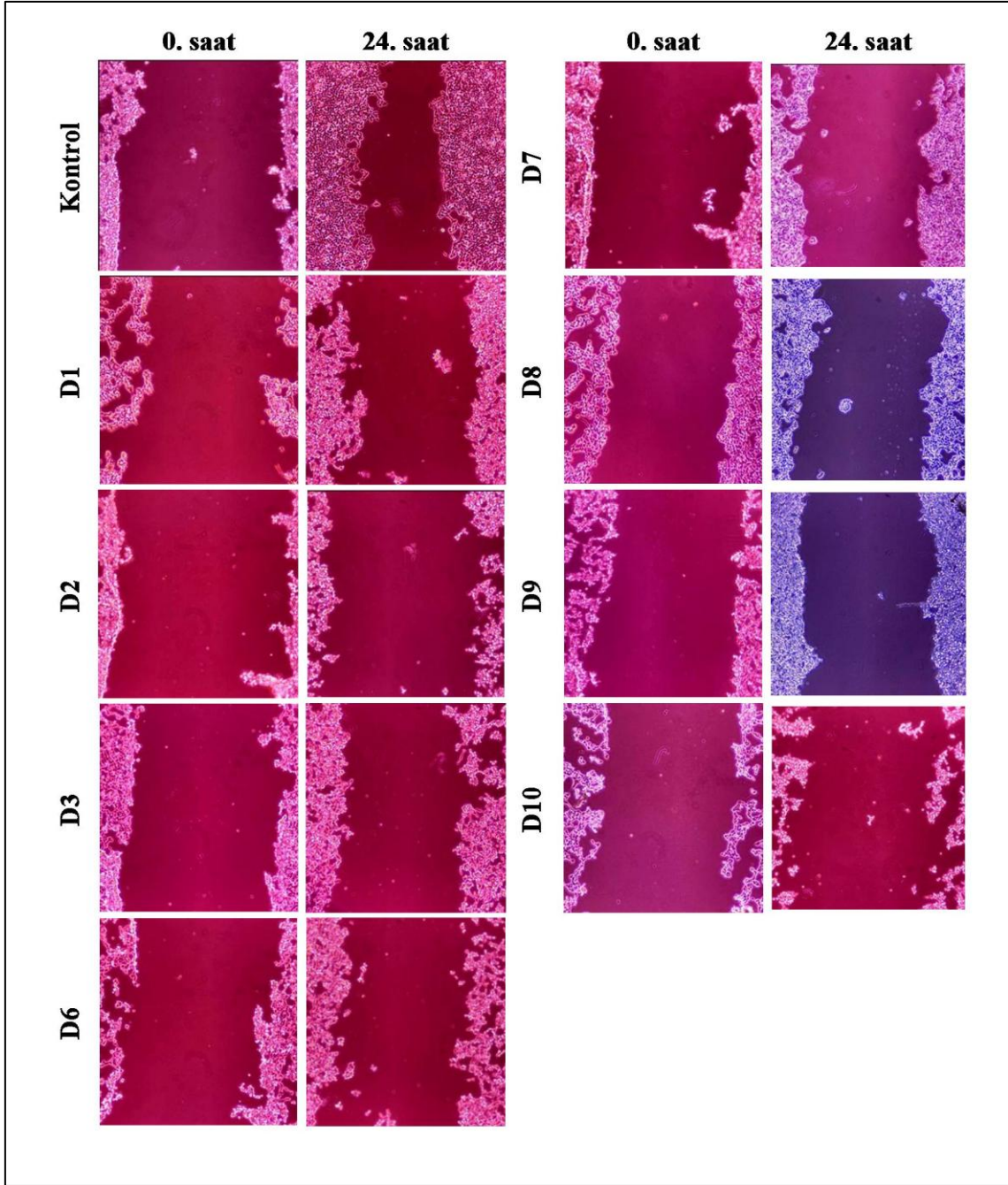
Şekil 4.44 Test edilen bileşiklerin HepG2 hücre hattındaki migrasyon etkilerinin görüntülenmesi



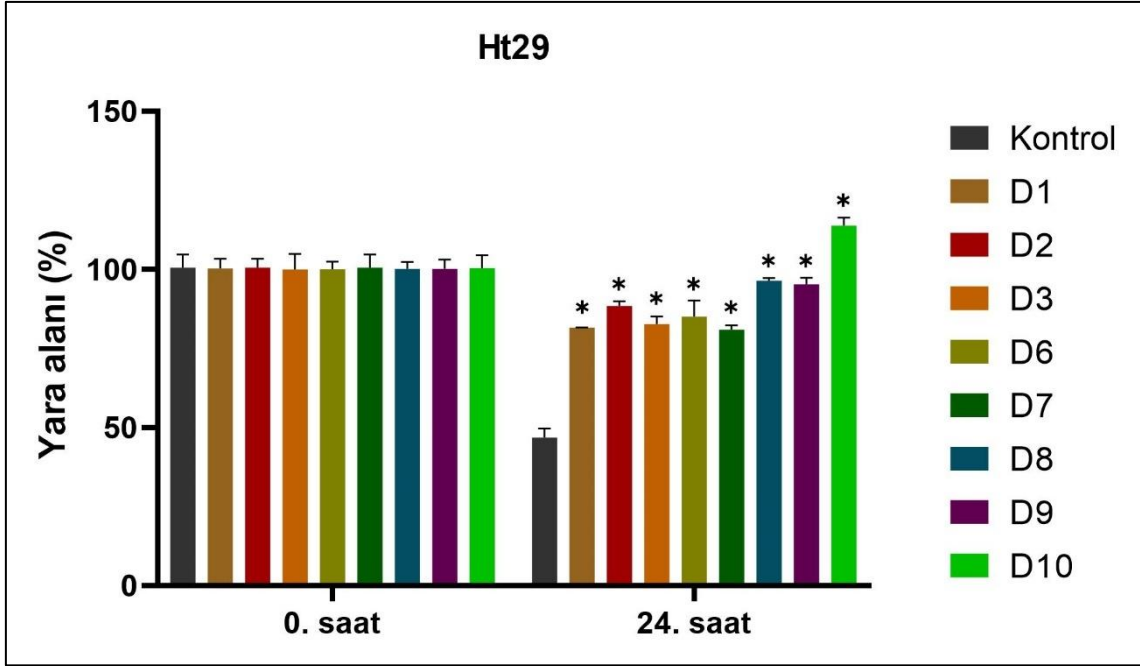
Şekil 4.45 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra HepG2 hücre hattının migrasyonuna etkilerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p < 0.05$)

4.5.3 HT-29

D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin HT-29 hücre hattında hücre göçüne olan etkileri 6 kuyulu plakalarda araştırıldı. Bu bileşikler ve kontrol 0. ve 24. saatteki görüntüleri fotoğraflanarak (Şekil 4.46) ImageJ uygulaması ile analiz edilerek hücre göçüne etkileri hesaplandı. Grupların 0. saatteki yara alanı yüzde 100 kabul edilerek yara kapatma özellikleri hesaplandı ve hesaplanan değerler sütun grafiği olarak gösterildi (Şekil 4.47). Yara kapatma oranı Ishikawa hücre hattında hesaplandığı gibi hesaplandı. Hesaplanan bu değerlere göre 24. saatte kontrol grubunun yara alanı %53.2 kapanırken D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 örneklerinde sırasıyla %18.4, %11.5, %17.3, %14.9, %19, %3.6, %4.7 ve %13.8 oranında yara alanı kapandı. Bu sonuçlara göre bütün örneklerin kontrol grubuna göre hücre göçünü engellediği ve D10 örneğinde yara alanının büyüdüğü görülmektedir.



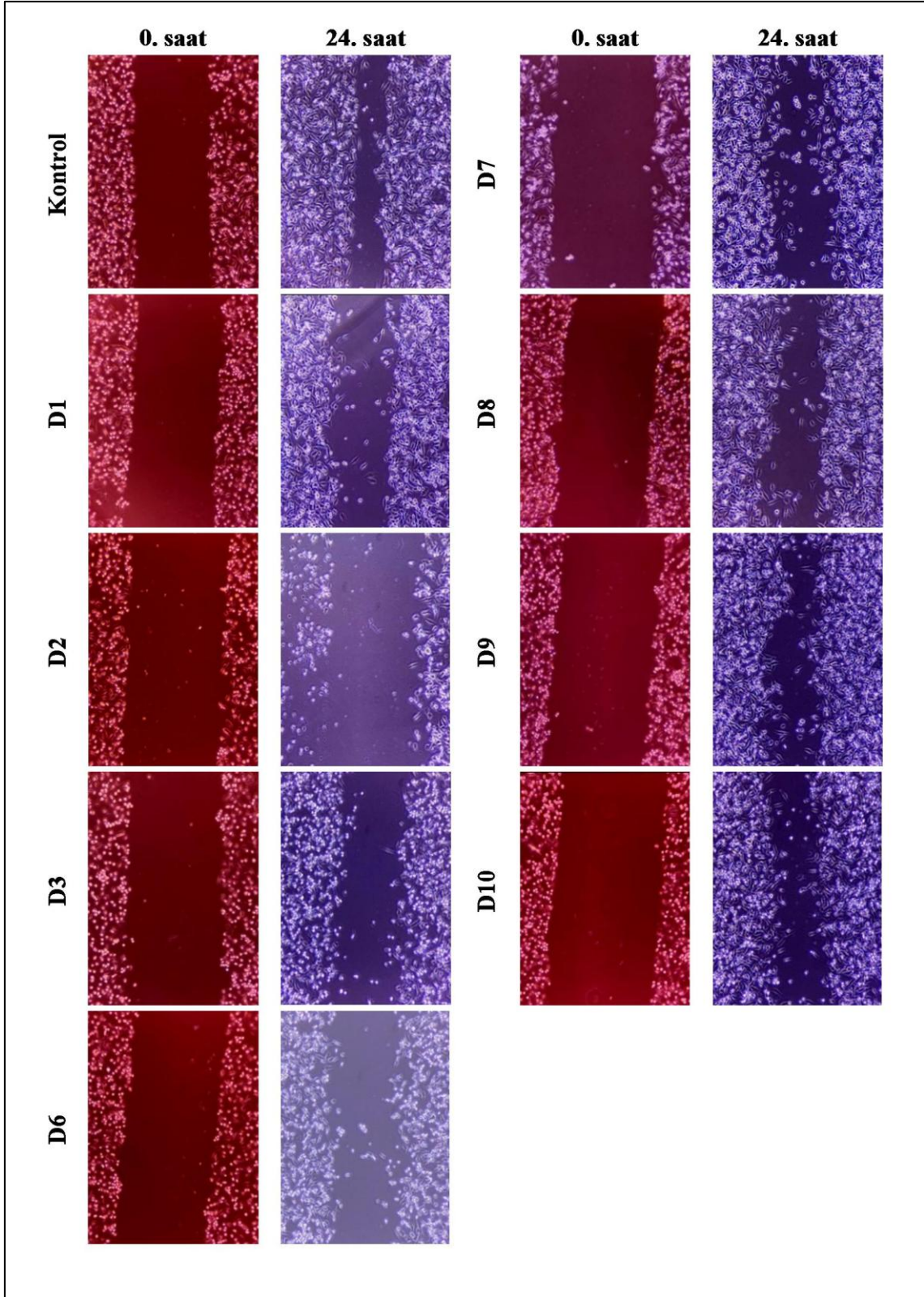
Şekil 4.46 Test edilen bileşiklerin HT-29 hücre hattındaki migrasyon etkilerinin görüntülenmesi



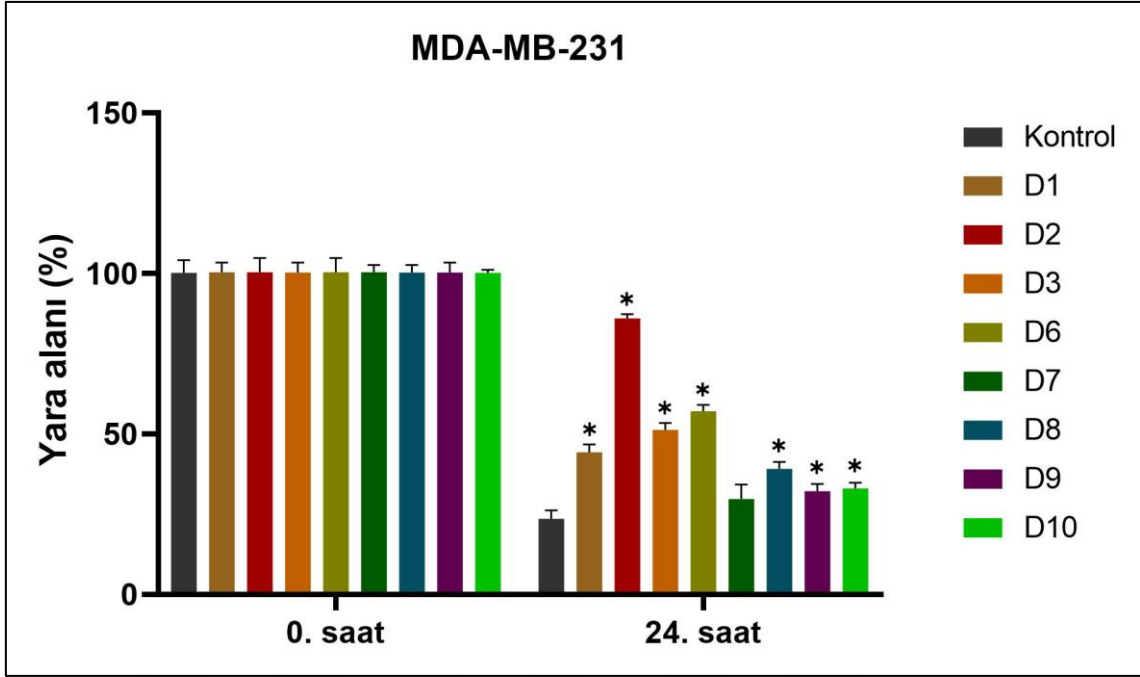
Şekil 4.47 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra HT-29 hücre hattının migrasyonuna etkilerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p < 0.05$)

4.5.4 MDA-MB-231

D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin MDA-MB-231 hücre hattında hücre göçüne olan etkileri 6 kuyulu plakalarda araştırıldı. Bu bileşikler ve kontrol 0. ve 24. saatteki görüntüleri fotoğraflanarak (Şekil 4.48) ImageJ uygulaması ile analiz edilerek hücre göçüne etkileri hesaplandı. Grupların 0. saatteki yara alanı yüzde 100 kabul edilerek yara kapatma özellikleri hesaplandı ve hesaplanan değerler sütun grafiği olarak gösterildi (Şekil 4.49). Yara kapatma oranı Ishikawa hücre hattında hesaplandığı gibi hesaplandı. Hesaplanan bu değerlere göre 24. saatte kontrol grubunun yara alanı %76.4 kapanırken D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 örneklerinde sırasıyla %55.6, %14, %48.8, %42.9, %70.3, %60.9, %67.8 ve %67 oranında yara alanı kapandı. Bu sonuçlara göre bütün örneklerin kontrol grubuna göre hücre göçünü engellediği görülmektedir.



Şekil 4.48 Test edilen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattındaki migrasyon etkilerinin görüntülenmesi

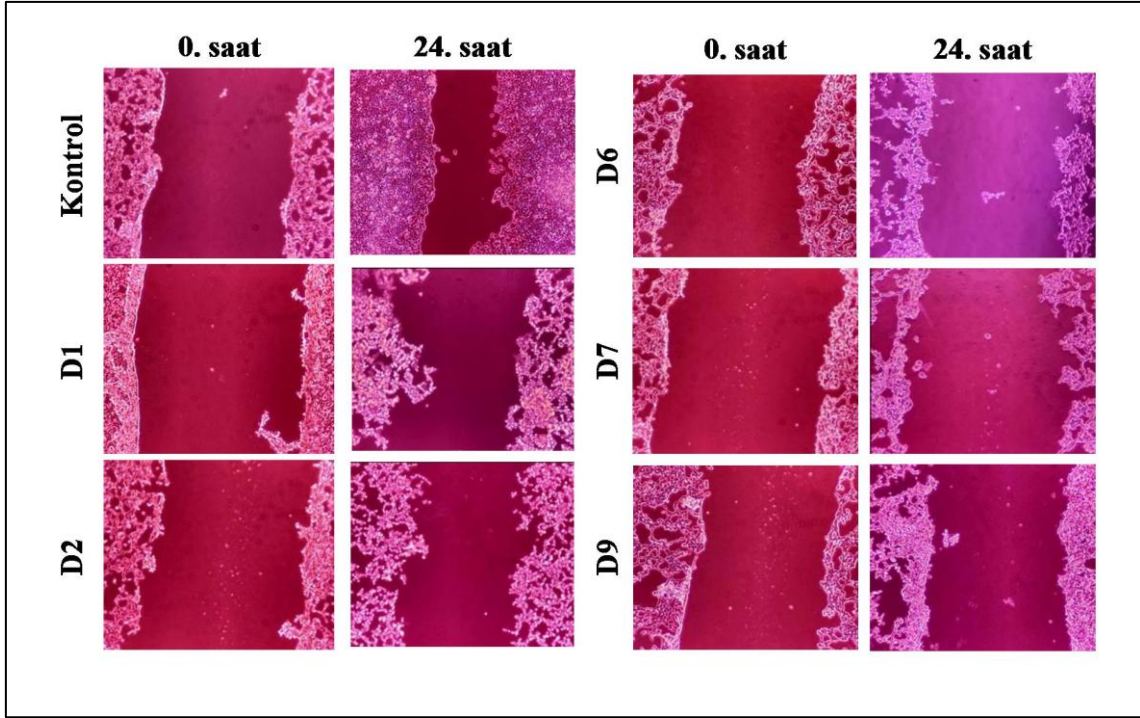


Şekil 4.49 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra MDA-MB-231 hücre hattının migrasyonuna etkilerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi.

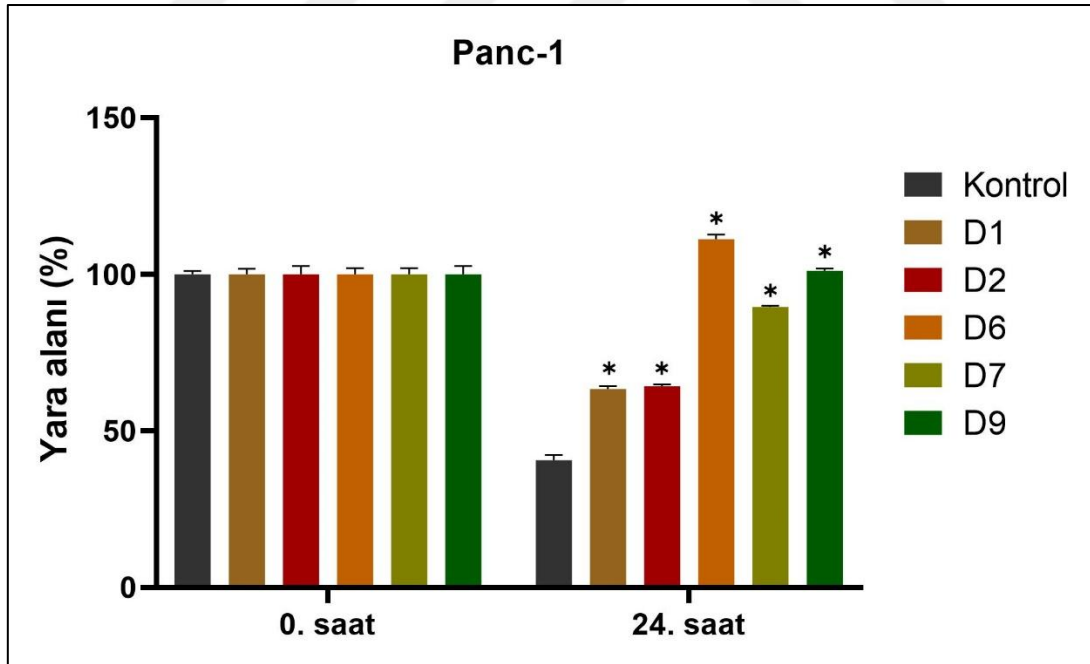
*Kontrol grubuna göre farklıdır ($p < 0.05$)

4.5.5 Panc-1

D1, D2, D6, D7 ve D9 bileşiklerinin Panc-1 hücre hattında hücre göçüne olan etkileri 6 kuyulu plakalarda araştırıldı. Bu bileşikler ve kontrol 0. ve 24. saatteki görüntüleri fotoğraflanarak (Şekil 4.50) ImageJ uygulaması ile analiz edilerek hücre göçüne etkileri hesaplandı. Grupların 0. saatteki yara alanı yüzde 100 kabul edilerek yara kapatma özellikleri hesaplandı ve hesaplanan değerler sütun grafiği olarak gösterildi (Şekil 4.51). Yara kapatma oranı Ishikawa hücre hattında hesaplandığı gibi hesaplandı. Hesaplanan bu değerlere göre 24. saatte kontrol grubunun yara alanı %59.4 kapanırken D1, D2, D6, D7 ve D9 örneklerinde sırasıyla %36.7, %35.8, %11.2, %10.4 ve %1 oranında yara alanı kapandı. Bu değerlere göre bütün örneklerin kontrol grubuna göre hücre göçünü engellediği D6 ve D9 örneklerinde ise yara alanının büyüdüğü hesaplandı.



Şekil 4.50 Test edilen bileşiklerin Panc-1 hücre hattındaki migrasyon etkilerinin görüntülenmesi



Şekil 4.51 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra Panc-1 hücre hattının migrasyonuna etkilerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p < 0.05$)

Çalışmanın sonucunda, test edilen bileşiklerin Ishikawa, HepG2, MDA-MB-231, HT-29 ve Panc-1 hücre hatlarındaki migrasyon özelliklerinin kontrol gruplarıyla kıyaslanması Çizelge 4.8’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre test edilen tüm bileşikler test edildikleri hücre hattında kontrol grubuna göre hücre göçünü engelledi (Çizelge 4.8). Ishikawa hücre hattında (72. saatte) D8 bileşiği hücre göçünü neredeyse tamamen (%-0.1) durdurdu. HepG2 hücre hattında kontrol %69.8 kapanırken D1 örneğinde %4 yara kapanma alanı gözlemlendi. D6, D7, D8 ve D9 örneklerinde ise 48. saatte hücreler dağıldığı için yara kapanma alanı hesaplanamadı. HT-29 hücre hattında(24. saatte) D8 ve D9 örneklerinde sırasıyla %3.6 ve %4.7 oranında yara kapanma oranı gözlemlenirken D10 örneğinde %13.8 oranında yara kapanma alanının büyüdüğü hesaplandı. MDA-MB-231 hücre hattında diğer kanser hücre hatlarına (Ishikawa, HepG2, HT-29 ve Panc-1) göre test edilen maddeler tarafından hücre göçününün daha az engellendiği gözlemlendi. MDA-MB-231 hücre hattında(24. saatte) kontrol grubunun yara kapanma alanı %76.4 iken en düşük yara kapanma oranı D2 (%14) örneğinde hesaplandı. Panc-1 hücre hattında (24. saatte) D1 örneğinde yara kapanma oranı neredeyse hiç kapanmadığı (%-0.1) gözlemlenirken D6 örneğinde %11.2 oranında yara kapanma alanının büyüdüğü hesaplandı.

Çizelge 4.8 Yara iyileştirme yöntemiyle migrasyon özellikleri test edilen bileşiklerin Ishikawa, HepG2, MDA-MB-231, HT-29 ve Panc-1 hücre hatlarında kontrol gruplarına göre yara kapatma yüzdeleri (%)

	Kontrol	D1	D2	D3	D6	D7	D8	D9	D10
Ishikawa	54.7	34.4*	11.5*	-	22.9	-	-0.1*	7.5*	-
HepG2	69.8	4*	16.4	26.2*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	-
HT-29	53.2	18.4*	11.5*	17.3*	14.9*	19*	3.6*	4.7*	-13.8*
MDA-MB-231	76.4	55.6*	14*	48.8*	42.9*	70.3	60.9*	67.8*	67*
Panc-1	59.4	36.7*	35.8*	-	11.2*	10.4*	-	-1*	-

N.D.: Belirlenemedi. -: Test edilmedi. *: Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05).

Yara iyileştirme yönteminde test edilen tüm maddelerin EC₅₀ dozları kullanıldı ama yara kapanma oranları hem hücre hatlarına hemde bu hücre hatlarında test edilen

maddelere göre çok çeşitlilik gösterdi. Bu durum bileşiklerin hücre göçünü engellemede farklı mekanizmalar aracılığıyla etki etmiş olabileceklerini göstermektedir. Ancak test edilen bileşiklerin hücre göçü etki mekanizmalarıyla ilgili bir çalışma bu tez kapsamında gerçekleştirilmedi. Literatürde de indol-artesunat hibrit moleküllerinin hücre göçü mekanizmalarının tespitine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürde indol, artemisinin ve artesunat moleküllerinin migrasyon özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalarda ise vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2 (VEGFR2) (Lu vd., 2022), metalloproteinase-9 (Subramanian vd., 2023), EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) (Salama vd., 2023), hücre-hücre yapışmasını düzenleyen moleküller (E-kadherin, vimentin) (Liang vd., 2019) gibi hücre migrasyonunda etkili olan genlerin mRNA ve protein düzeyleri araştırılmıştır.

Guo vd. (2014) yaptıkları çalışmada artemisininin yarı sentetik bir türevi olan dihidroartemisinin vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) aracılığıyla gerçekleşen endotel hücre göçü üzerindeki etkisini araştırdılar. Bu amaçla 20 µM dihidroartemisinin HUVEC hücre hattı hücrelerinin migrasyonu üzerindeki etkisini wound healing yöntemiyle ve Western blot analizi ile araştırdılar. Çalışmanın sonucunda dihidroartemisinin endotel hücre göçünü engellediğini wound healing yöntemi ve Western blot analizi ile doğruladılar (Guo vd., 2014). Subramanian vd. (2023) bir indol analogu olan indol kurkumin molekülünün hepatoselüler karsinom (HCC) hücrelerinin göçüne etkisini araştırdılar. Çalışmanın sonucunda indol kurkuminin doza bağımlı olarak hücre göçünü engellediği ve protein analizi ve *in siliko* kenetleme çalışmaları ile MMP-9 (metalloproteinase-9) aktivite seviyesini azalttığını tespit ettiler (Subramanian vd., 2023). Lu vd. (2022), FO8643 olarak tanımlanan yeni bir artemisinin türevinin HUH-7 (bir çeşit karaciğer kanseri hücre hattı) hücre hattında anti-anjiojenik aktivite ve hücre göçünü araştırdılar. FO8643 molekülünün yara iyileştirme tahlilinde hücre göçünü kısıtladığını saptadılar. SwissTargetPrediction ile VEGFR2, FO8643 için temel hedef olarak öngörüldü. FO8643, kinaz analizi, *in vitro* western blotlama ve *in siliko* çeşitli moleküler yerleştirme yaklaşımlarıyla VEGFR2'yi hedef aldığını raporladılar (Lu vd., 2022). Salama vd. (2023) yaptıkları çalışmada bir dizi indol-hidrazon bileşiği sentezleyerek meme kanseri (MCF-7) üzerindeki etkisini araştırdılar. Sentezledikleri bazı bileşiklerin kullandıkları standart ilaçtan (Staurosporine) daha iyi sitotoksik aktivite sergilediklerini tespit ettiler. Bileşik 5 olarak

tanımladıkları bileşiğin yara iyileştirme tahlilinde hücre göçünü engellediğini (%48.8) saptamışlardır. Bileşik 5'in etki mekanizması kinaz reseptörlerine karşı test edilmiş ve Fosfoinozitid 3-kinaz (PI3K- α , PI3K- β , PI3K- δ), CDK2 (Siklin Bağımlı Kinaz 2), AKT-1 (Protein Kinaz B) ve EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) kinazlarını inhibe ettiğini tespit etmişlerdir (Salama vd., 2023). Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT); bir epitel hücrenin bazal yüzeyi aracılığıyla bazal membran ile etkileşime geçerek epitelyal özelliklerini kaybedip gelişmiş göç kapasitesi özelliği göstererek mezenkimal fenotip kazanmasını sağlayan bir süreçtir. Bu süreçte hücreler hücre-hücre yapışkanlığını ve hücre polaritesini kaybettiği için migrasyon ve invazyon gibi hücre göçünde rol oynayan özellikler kazanırlar (Kalluri ve Weinberg, 2009; Xiong ve Huang, 2021). Liang vd. (2019) yaptıkları çalışmada EMT modeli oluşturulmuş SKOV3 (yumurtalık kanseri) hücre hattına artemisinin (20, 40 ve 80 μ M) uygulamışlardır. Uygulamanın sonucunda EMT sürecinin tersine dönerek hücre çoğalması, hücre göçü ve vimentin ekspresyonunda azalma görülürken hücre-hücre yapışmasından etkili olan E-kadherin ekspresyonunda artış tespit etmişlerdir (Liang vd., 2019).

4.6 Apoptozun Belirlenmesi

MTT yöntemiyle sitotoksik özellikleri belirlenen bileşiklerin; Ishikawa, HepG2, HT-29, MDA-MB-231 ve Panc-1 hücre hatları üzerindeki apoptotik etkileri Annexin-V/PI yöntemi kullanılarak Flow sitometri ile tespit edildi. Daha sonra apoptozla ilişkili genlerin ifade düzeyleri Real-Time PCR ile araştırıldı.

4.6.1 Flow Sitometride Annexin-V/PI Yöntemi ile Apoptozun Belirlenmesi

Normalde, sağlıklı hücrelerin iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin (PS) membran lipidi apoptoz durumunda hücrenin dış zarına geçer. Apoptozun erken döneminde gerçekleşen bu olayda hücrenin zar bütünlüğü korunur (Güleş ve Eren, 2008; Dikmen, 2016).

Flow sitometride annexin V/PI yöntemiyle apoptoz tayini, hücrelerin iç zarında bulunan fosfatidilserinlerin dış zara taşınmasını ve propidyum iyodür (PI) alımını

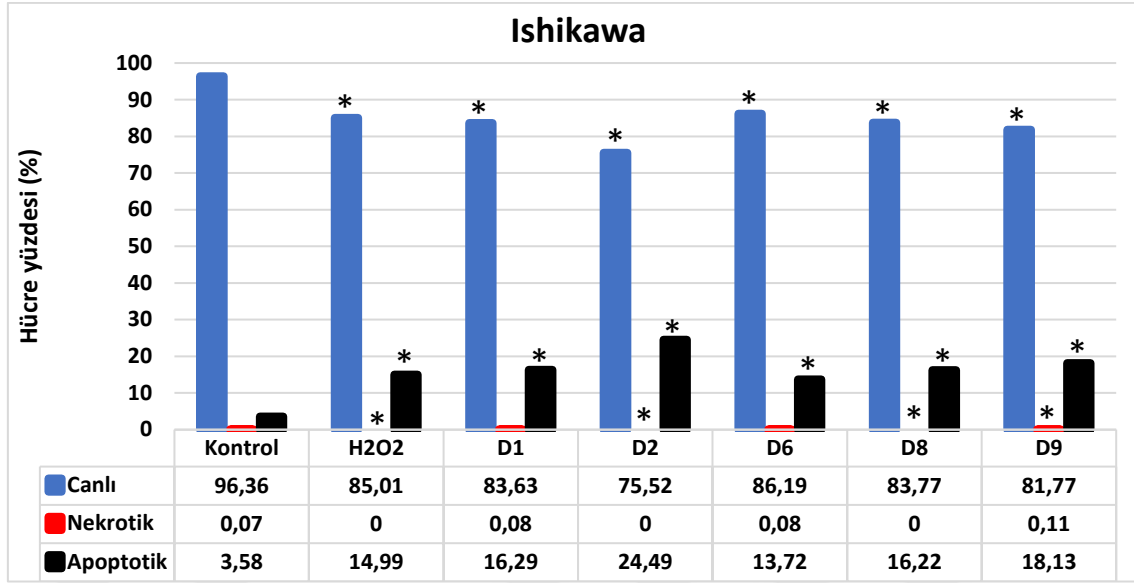
ölçerek apoptotik ve nekrotik hücrelerin ayırt edilmesini sağlayan yaygın bir yöntemdir (Crowley vd., 2016).

Annexin-V, hücrenin dış yüzeyine geçen fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir ve FITC (yeşil floresan) gibi bir floresan maddeyle işaretlendiğinde apoptotik hücreler görünür hale gelir. Propidyum iyodür (PI/ kırmızı floresan) ise membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin çekirdeklerine girerek DNA veya çift zincirli RNA ya bağlanarak membran yapısının bozulmuş hücrelerin tespit edilmesini sağlar. Annexin-V ve PI ile muamele edilmiş hücrelerin flow sitometride analiz edilmesiyle canlı (Annexin V- /PI-), nekrotik (Annexin V- /PI+), erken apoptotik (Annexin V+ /PI-) ve geç apoptotik (Annexin V+ /PI+) hücrelerin birbirlerinden ayırt edilmesi sağlanır (Güleş ve Eren, 2008; Dikmen, 2016).

Bu çalışmada Annexin V-FITC/PI Apoptoz kiti kullanılarak Flow sitometri cihazı ile test edilen bileşiklerin apoptotik özellikleri araştırıldı. Yöntem kısmında yöntemin uygulanışı belirtilmiştir.

4.6.1.1 Ishikawa

D1, D2, D6, D8 ve D9 bileşiklerinin EC₅₀ dozları ve pozitif kontrol olarak kullanılan H₂O₂'nin 200 µM konsantrasyonu, Ishikawa hücre hattına 24 saat uygulanarak bu bileşiklerin Ishikawa hücre hattındaki apoptotik etkileri flow sitometride Annexin-V/PI yöntemi kullanılarak araştırıldı. Bileşiklerin apoptotik etkileri canlı, nekrotik (ölü), apoptotik hücre yüzdeleri kullanılarak elde edilen yüzde sütun grafikleri (Şekil 4.52) yardımıyla değerlendirildi. Grafikteki verilere göre doz uygulanmış tüm örneklerin apoptotik yüzdelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı (p<0.05) olduğu görülmektedir (Şekil 4.52). Bu hücre hattında en etkili bileşikler, sırasıyla %24.49 ve %18.13 apoptotik oranıyla D2 ve D9 bileşikleri (Şekil 4.52) olduğu tespit edildi.

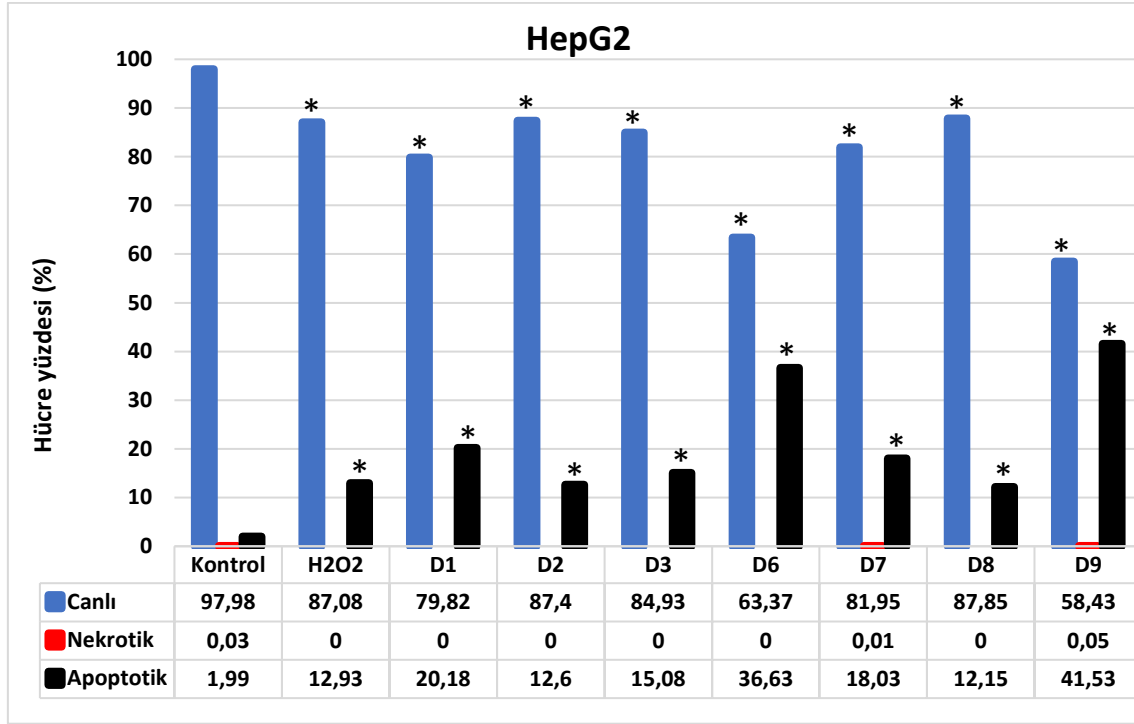


Şekil 4.52 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra Ishikawa hücre hattı üzerindeki apoptotik özelliklerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi.

*Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)

4.6.1.2 HepG2

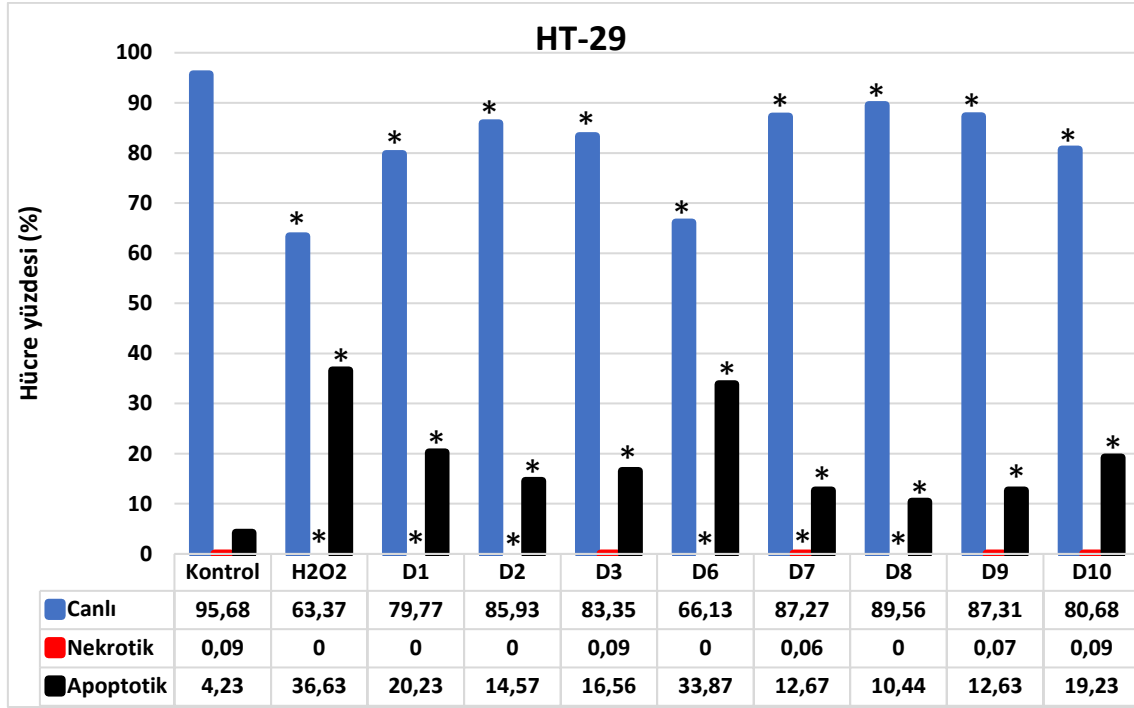
D1, D2, D3, D6, D7, D8 ve D9 bileşiklerinin EC₅₀ dozları ve pozitif kontrol olarak kullanılan H₂O₂'nin 200 µM konsantrasyonu, HepG2 hücre hattına 24 saat uygulanarak bu bileşiklerin HepG2 hücre hattındaki apoptotik etkileri flow sitometride Annexin-V/PI yöntemi kullanılarak araştırıldı. Bileşiklerin apoptotik etkileri canlı, nekrotik, apoptotik hücre yüzdeleri kullanılarak elde edilen yüzde sütun grafikleri (Şekil 4.53) yardımıyla değerlendirildi. Grafikteki verilere göre doz uygulanmış tüm örneklerin apoptotik yüzdelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı (p<0.05) olduğu görülmektedir (Şekil 4.53). Bu hücre hattında en etkili bileşikler, sırasıyla %41.53 ve %36.63 apoptotik oranıyla D9 ve D6 bileşikler olduğu tespit edildi.



Şekil 4.53 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra HepG2 hücre hattı üzerindeki apoptotik özelliklerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi.
*Kontrol grubuna göre farklıdır ($p < 0.05$)

4.6.1.3 HT-29

D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin EC_{50} dozları ve pozitif kontrol olarak kullanılan H_2O_2 'nin 200 μM konsantrasyonu, HT-29 hücre hattına 24 saat uygulanarak bu bileşiklerin HT-29 hücre hattındaki apoptotik etkileri flow sitometride Annexin-V/PI yöntemi kullanılarak araştırıldı. Bileşiklerin apoptotik etkileri canlı, nekrotik, apoptotik hücre yüzdeleri kullanılarak elde edilen yüzde sütun grafikleri (Şekil 4.54) yardımıyla değerlendirildi. Grafikteki verilere göre doz uygulanmış tüm örneklerin apoptotik yüzdelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p < 0.05$) olduğu görülmektedir (Şekil 4.54). Bu hücre hattında en etkili bileşikler, sırasıyla %33.87, %20.23 ve %19.23 apoptotik oranıyla D6, D1 ve D10 bileşikler olduğu tespit edildi.

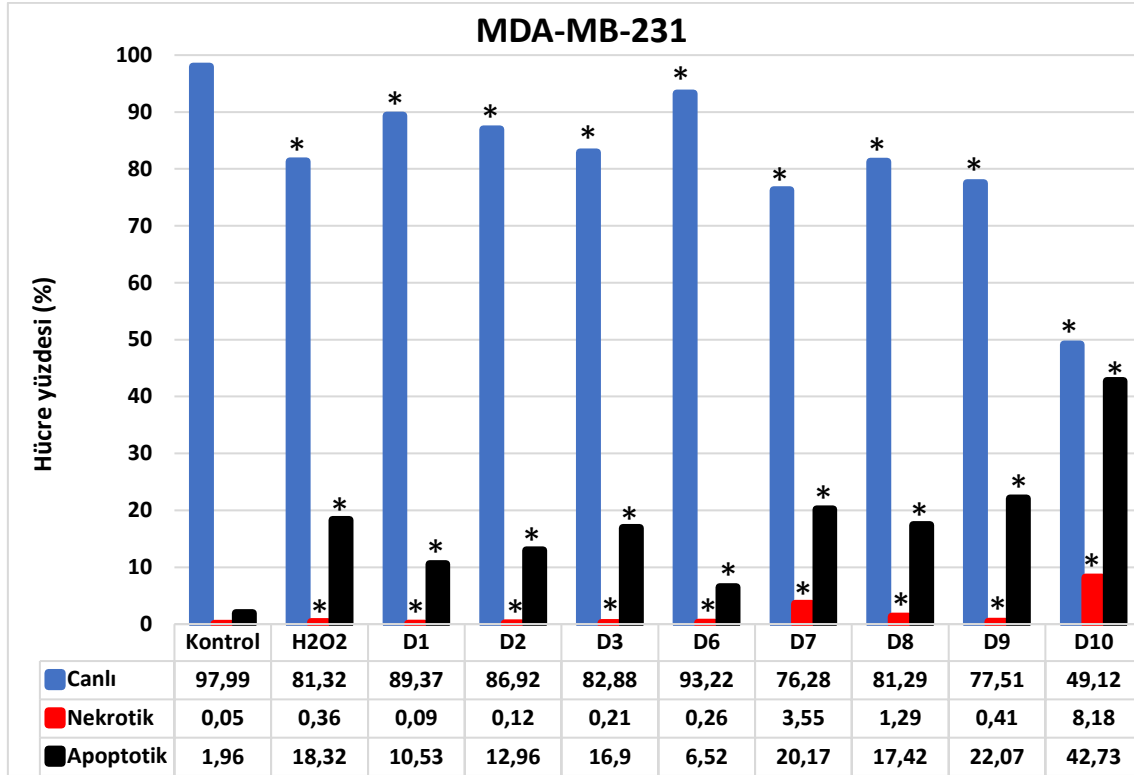


Şekil 4.54 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra HT-29 hücre hattı üzerindeki apoptotik özelliklerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi.

*Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)

4.6.1.4 MDA-MB-231

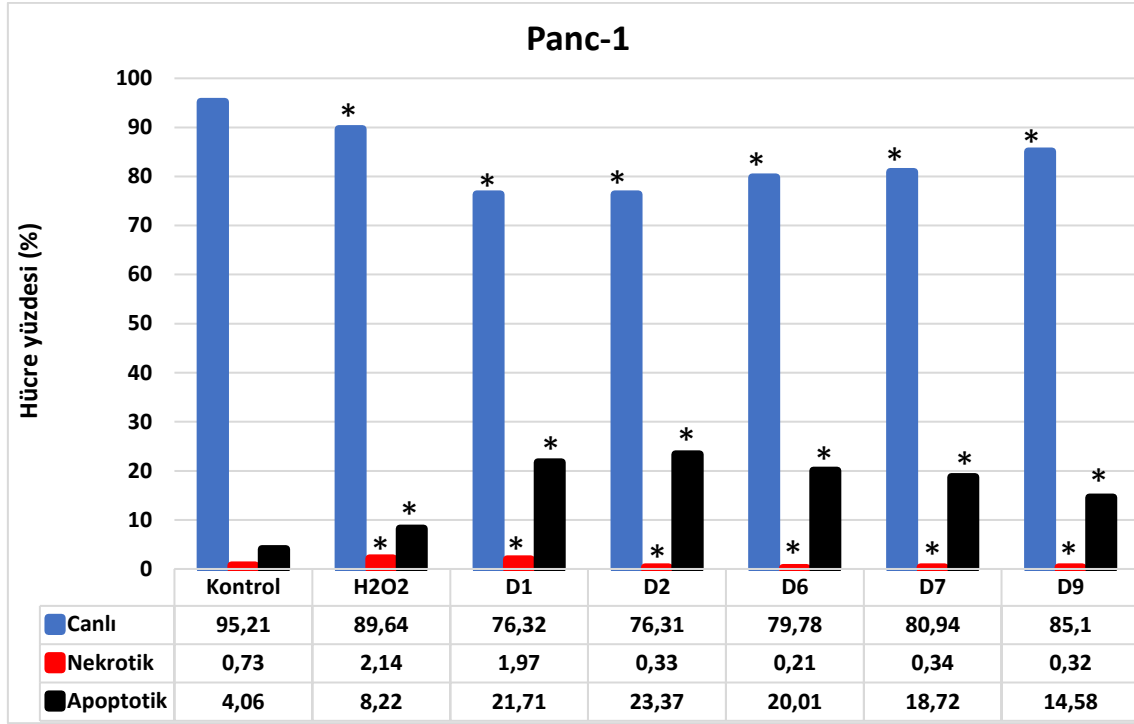
D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin EC₅₀ dozları ve pozitif kontrol olarak kullanılan H₂O₂'nin 200 µM konsantrasyonu, MDA-MB-231 hücre hattına 24 saat uygulanarak bu bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattındaki apoptotik etkileri flow sitometride Annexin-V/PI yöntemi kullanılarak araştırıldı. Bileşiklerin apoptotik etkileri canlı, nekrotik, apoptotik hücre yüzdeleri kullanılarak elde edilen yüzde sütun grafikleri (Şekil 4.55) yardımıyla değerlendirildi. Grafikteki verilere göre doz uygulanmış tüm örneklerin apoptotik yüzdelерinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı (p<0.05) olduğu görülmektedir (Şekil 4.55). Bu hücre hattında en etkili bileşikler, sırasıyla %42.73, %22.07 ve %20.17 apoptotik oranıyla D10, D9 ve D7 bileşikler olduğu tespit edildi.



Şekil 4.55 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki apoptotik özelliklerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p < 0.05$)

4.6.1.5 Panc-1

D1, D2, D6, D7 ve D9 bileşiklerinin EC_{50} dozları ve pozitif kontrol olarak kullanılan H_2O_2 'nin 200 μM konsantrasyonu, Panc-1 hücre hattına 24 saat uygulanarak bu bileşiklerin Panc-1 hücre hattındaki apoptotik etkileri flow sitometride Annexin-V/PI yöntemi kullanılarak araştırıldı. Bileşiklerin apoptotik etkileri canlı, nekrotik, apoptotik hücre yüzdeleri kullanılarak elde edilen yüzde sütun grafikleri (Şekil 4.55) yardımıyla değerlendirildi. Grafikteki verilere göre doz uygulanmış tüm örneklerin apoptotik yüzdelерinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p < 0.05$) olduğu görülmektedir (Şekil 4.55). Bu hücre hattında en etkili bileşikler, sırasıyla %23.37, %21.71 ve %20.01 apoptotik oranıyla D2, D1 ve D6 bileşikler olduğu tespit edildi.



Şekil 4.56 Test edilen bileşiklerin 24 saat uygulanmasından sonra Panc-1 hücre hattı üzerindeki apoptotik özelliklerinin yüzde sütun grafiği olarak gösterilmesi.

*Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)

Apoptoz analizi sonuçlarına göre en iyi apoptotik aktivite gösteren bileşiklerin pozitif kontrolle (H₂O₂) karşılaştırılması Çizelge 4.9’da özetlenmiştir.

Çizelge 4.9 Annexin-V/PI yöntemiyle apoptotik özellikleri test edilen bileşiklerin Ishikawa, HepG2, MDA-MB-231, HT-29 ve Panc-1 hücre hatlarında kontrol gruplarına göre apoptotik yüzdeleri(%)

	H ₂ O ₂	D1	D2	D3	D6	D7	D8	D9	D10
Ishikawa	14.99*	16.29*	24.49*	-	13.72*	-	16.22*	18.13*	-
HepG2	12.93*	20.18*	12.6*	15.08*	36.63*	18.03*	12.15*	41.53*	-
HT-29	36.63*	20.23*	14.57*	16.56*	33.87*	12.67*	10.44*	12.63*	19.23*
MDA-MB-231	18.32*	10.53*	12.96*	16.9*	6.52*	20.17*	17.42*	22.07*	42.73*
Panc-1	8.22*	21.71*	23.37*	-	20.01*	18.72*	-	14.58*	-

–: Test edilmedi. *: Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05).

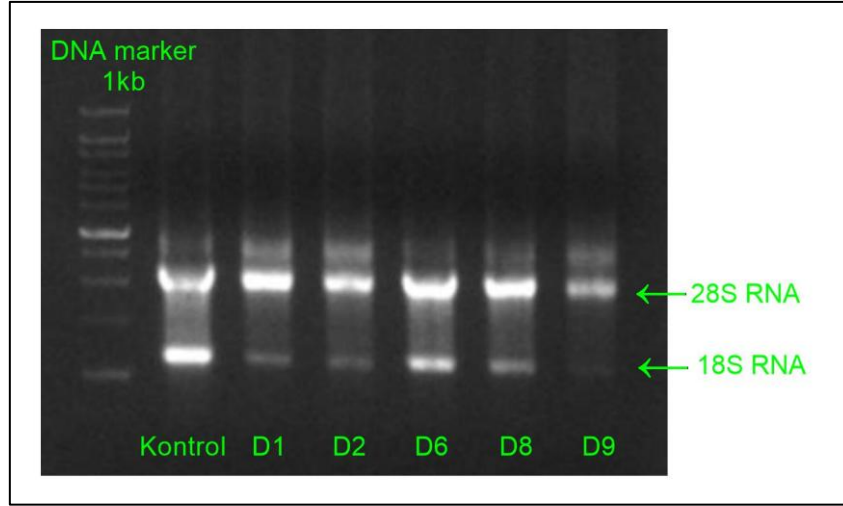
Ishikawa hücre hattında pozitif kontrolün apoptotik oranı %14.99 iken D2, D9, D1 ve D8 bileşikleri sırasıyla %24.49, %18.13, %16.21 ve %16.22 apoptotik oranıyla pozitif kontrolden daha iyi aktivite sergiledi. HepG2 hücre hattında pozitif

kontrolün apoptotik oranı %12.93 iken D9, D6, D1, D7 ve D3 bileşikleri bileşikleri sırasıyla %24.49, %18.13, %16.21 ve %15.08 apoptotik oranıyla pozitif kontrolden daha iyi aktivite sergiledi. HT-29 hücre hattında pozitif kontrolün apoptotik oranı %36.63 olarak hesaplandı. Test edilen bileşiklerden (D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10) hiçbiri pozitif kontrolden daha yüksek aktivite sergilemedi. En iyi apoptotik oran %33.87 ile D6 örneğinde görüldü. MDA-MB-231 hücre hattında pozitif kontrolün apoptotik oranı %18.32 iken D10, D9, ve D7 bileşikleri sırasıyla %42.73, %22.07 ve %20.17 apoptotik oranıyla pozitif kontrolden daha iyi aktivite sergiledi. Panc-1 hücre hattında pozitif kontrolün apoptotik oranı %8.22 iken D2, D1, D6, D7 ve D9 bileşikleri sırasıyla %23.37, %21.71, %20.07, %18.72 ve %14.58 apoptotik oranlarıyla bu hücre hattında test edilen tüm bileşikler pozitif kontrolden daha iyi aktivite sergiledi. Tüm sonuçlara bakıldığında, bileşiklerin apoptotik özelliklerinin hücre hatlarına göre oldukça farklılık gösterdiği ve pozitif kontrole göre en iyi aktiviteyi Panc-1 hücre hattında gösterirken HT-29 hücre hattında daha düşük aktivite gösterdikleri görüldü (Çizelge 4.9).

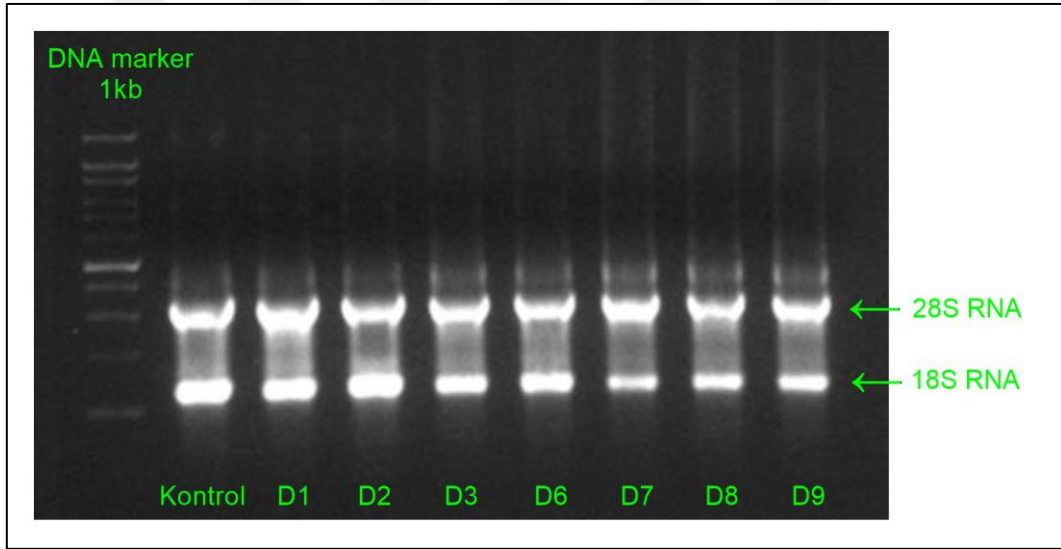
4.6.2 Agaroze Jel Elektroforezi ile Total RNA'nın Görüntülenmesi

Bu çalışmada MTT yöntemiyle sitotoksik özellikleri belirlenen bileşiklerin, Panc-1, MDA-MB-231, HT-29, HepG2 ve Ishikawa hücre hatlarındaki apoptotik özellikleri Flow sitometri kullanılarak Annexin-V/PI yöntemi ile araştırıldı. Daha sonra bu bileşiklerin apoptotik yolda görev alan (BAX, P53, BCL-2, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9) genlerinin mRNA ekspresyonlarındaki değişimleri Real-Time PCR ile incelenmesi amaçlandı.

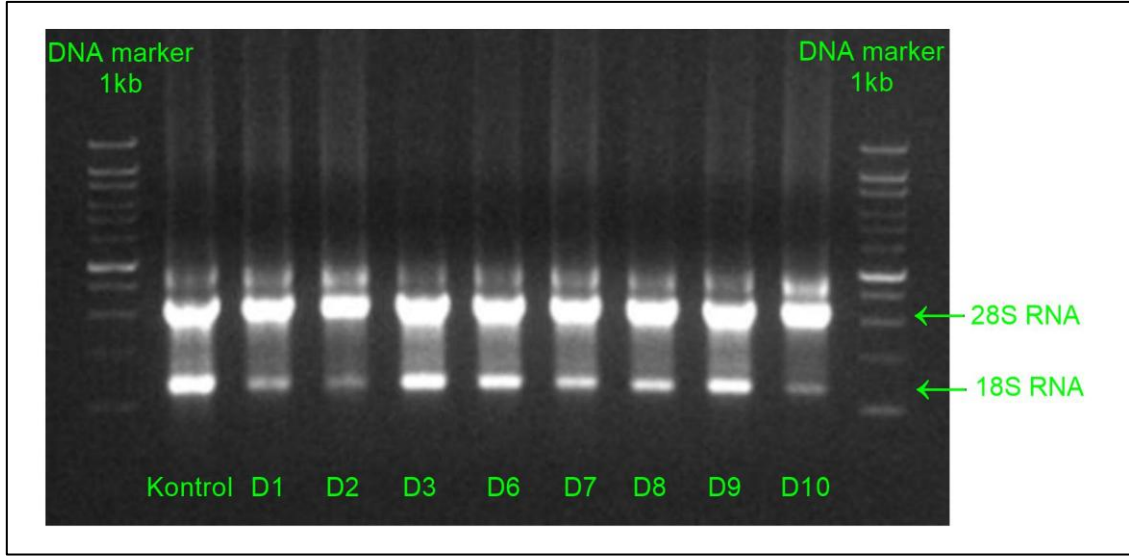
Bunun için hücre hatları, test edilen bileşiklerin MTT testinde elde edilen EC₅₀ dozlarına 24 saat boyunca maruz bırakıldı. Daha sonra total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Total RNA'nın kalitesi ve bütünlüğü agaroz jel elektroforezi kullanılarak değerlendirildi. Total RNA jelde yürütüldüğünde miktarsal olarak en fazla olan ribozomal RNA'nın 28S ve 18S bantlarının görüntülenmesi beklenir. Jel yürütme işleminden sonra jeller her hücre hattı için fotoğraflanarak 28S ve 18S bantları işaretlendi (Şekil 4.57, Şekil 4.58, Şekil 4.59, Şekil 4.60 ve Şekil 4.61).



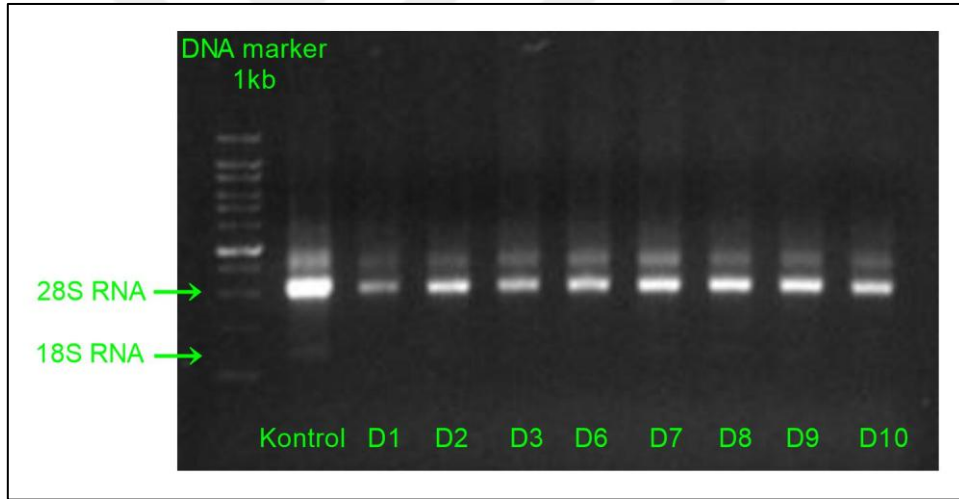
Şekil 4.57 24 saatlik madde uygulamasından sonra Ishikawa hücre hattında elde edilen total RNA'ların %1 agaroz jelindeki görüntüsü



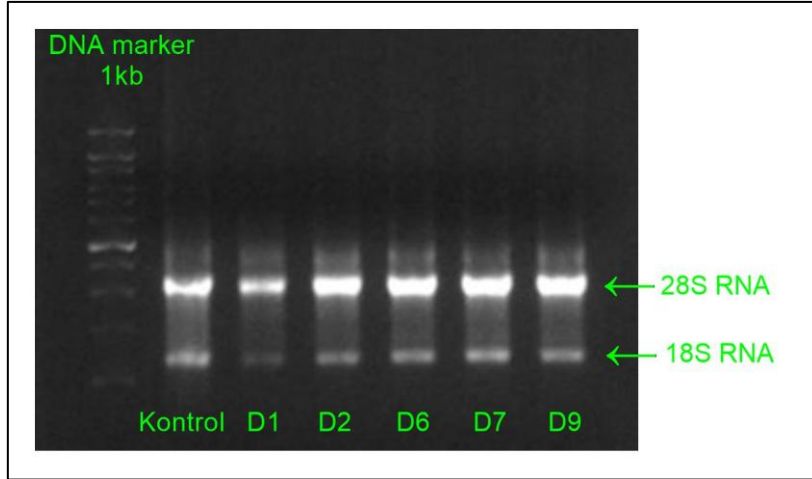
Şekil 4.58 24 saatlik madde uygulamasından sonra HepG2 hücre hattında elde edilen total RNA'ların %1 agaroz jelindeki görüntüsü



Şekil 4.59 24 saatlik madde uygulamasından sonra HT-29 hücre hattında elde edilen total RNA'ların %1 agaroz jelindeki görüntüsü



Şekil 4.60 24 saatlik madde uygulamasından sonra MDA-MB-231 hücre hattında elde edilen total RNA'ların %1 agaroz jelindeki görüntüsü



Şekil 4.61 24 saatlik madde uygulamasından sonra Panc-1 hücre hattında elde edilen total RNA'ların %1 agaroz jelindeki görüntüsü

4.6.3 Apoptozda Görev Alan Genlerin Real-Time PCR ile Analizi

MTT yöntemi ile EC_{50} değerleri tespit edilmiş bileşiklerin Panc-1, MDA-MB-231, HT-29, HepG2 ve Ishikawa hücre hatlarındaki apoptotik özellikleri, apoptotik yolda görev alan BAX, P53, Bcl-2, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genlerinin mRNA ekspresyonlarındaki değişimleri, Real-Time PCR ile araştırıldı. Deneyler, yöntem kısmında belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Deneylerin sonunda elde edilen ct (threshold cycle) değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile kontrol grubuna göre apoptotik yolda bulunan genlerin yüzde (%) mRNA ifadelerindeki değişimler hesaplandı. Hesaplanan bu değerler kullanılarak her hücre hattı için ayrı ayrı yüzde sütun grafikleri çizildi.

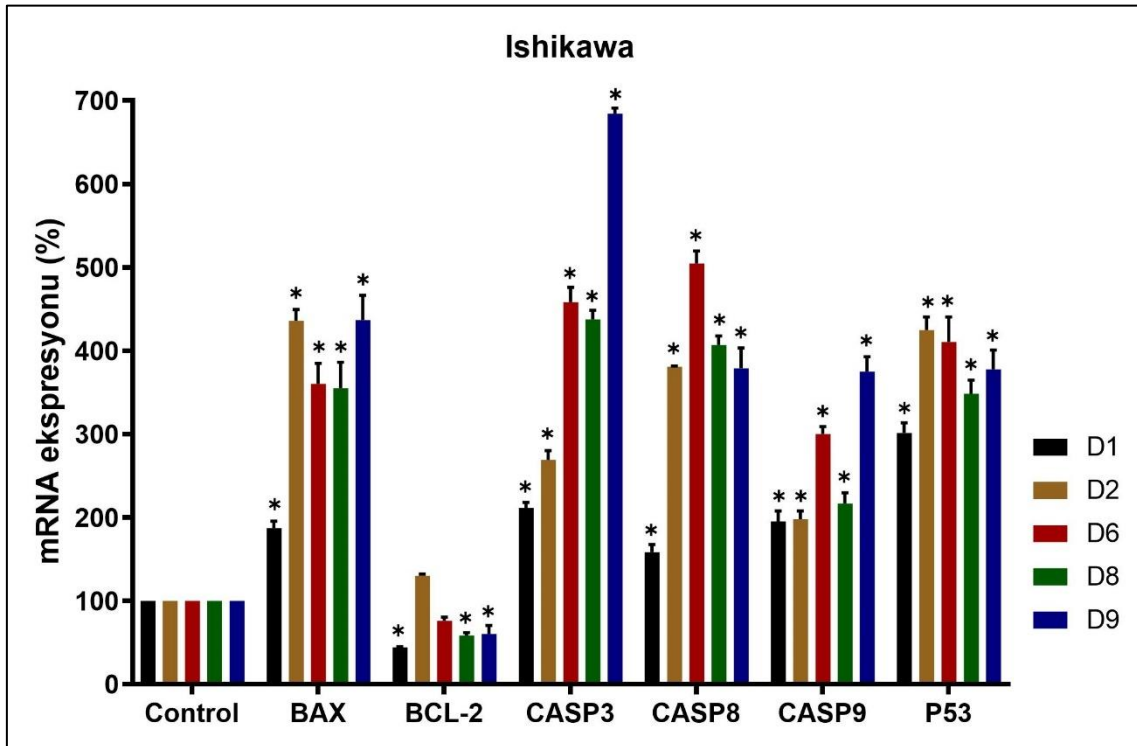
4.6.3.1 Ishikawa

D1, D2, D6, D8 ve D9 bileşiklerinin EC_{50} dozlarının Ishikawa hücre hattına 24 saat uygulanmasından sonra apoptotik yolda görev alan BAX, P53, BCL-2, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genlerinin mRNA ifadesine etkisinin kontrol grubuna göre değişimi yüzde sütun grafiği (Şekil 4.62) olarak gösterildi.

D1, D2, D6, D8 ve D9 bileşiklerinin EC_{50} dozları kontrol grubuna göre; BAX geninin ifadesinde sırasıyla %87.3, %336.1, %260.3, %255 ve %336.7, Caspase 3 geninin ifadesinde sırasıyla %111.4, %169.1, %358.1, %337.8 ve %584.5, Caspase 8

geninin ifadesinde sırasıyla %58.1, %280.6, %404.7, %307 ve %278.9, Caspase 9 geninin ifadesinde sırasıyla %95.4, %98, %200.1, %116.8 ve %274.9, P53 geninin ifadesinde sırasıyla %201.4, %324.8, %310.4, %248.4 ve %277.6 artış gösterdi ($p<0.05$).

D2 ve D6 bileşiklerinin EC₅₀ dozları BCL-2 genin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermezken D1, D8 ve D9 bileşikleri sırasıyla bu genin ifadesini %55.7, %41,7 ve %39.6 oranında azalttı ($p<0.05$).



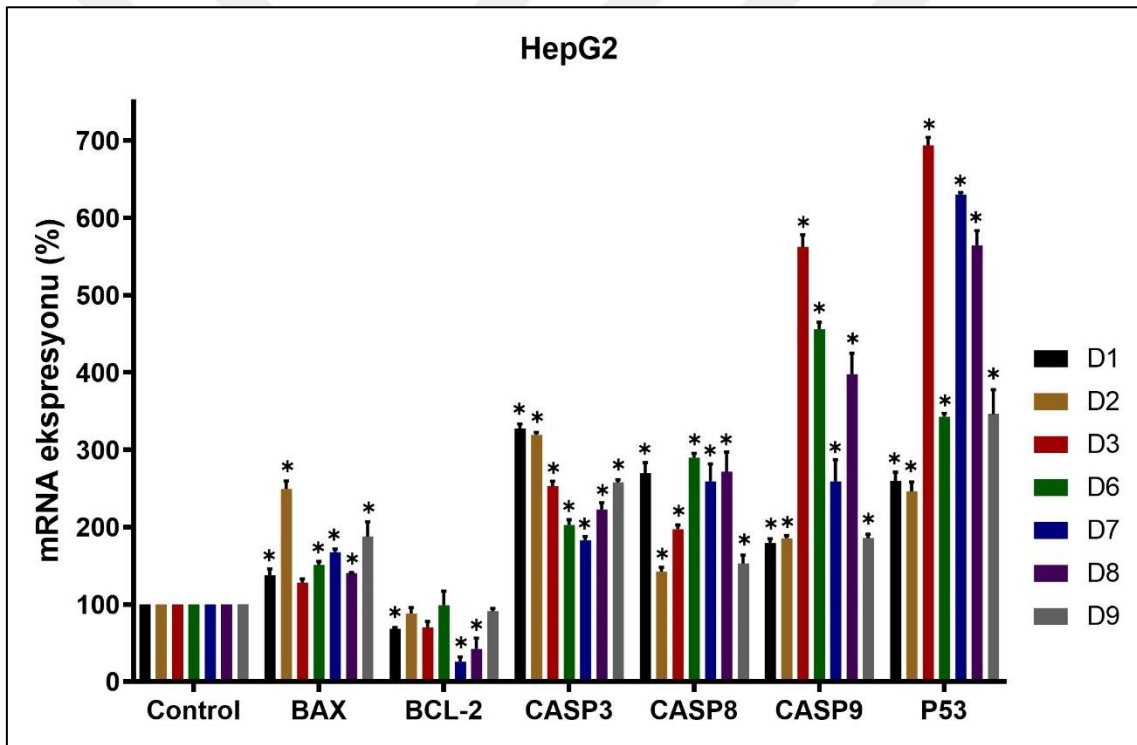
Şekil 4.62 D1, D2, D6, D8 ve D9 bileşiklerinin EC₅₀ dozlarının Ishikawa hücre hattına uygulanmasından sonra, apoptoz yollarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p<0.05$)

4.6.3.2 HepG2

D1, D2, D3, D6, D7, D8 ve D9 bileşiklerinin EC₅₀ dozlarının HepG2 hücre hattına 24 saat uygulanmasından sonra apoptotik yolda görev alan BAX, P53, BCL-2, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genlerinin mRNA ifadesine etkisinin kontrol grubuna göre değişimi yüzde sütun grafiği (Şekil 4.63) olarak gösterildi.

D1, D2, D3, D6, D7, D8 ve D9 bileşiklerinin EC₅₀ dozları kontrol grubuna göre; BAX geninin ifadesinde sırasıyla %37.7, %149.4, %27.9, %51.1, %67.5, %40.4 ve %87.7, Caspase 3 geninin ifadesinde sırasıyla %227.2, %219.3, %153.2, %102.8, %82.8, %122.8 ve %157.6, Caspase 8 geninin ifadesinde sırasıyla %169.6, %42.5, %97.3, %189.8, %159, %171.9 ve %52.6, Caspase 9 geninin ifadesinde sırasıyla %79.7, %85.3, %462.6, %356.3, %159.2, %297.7 ve %85.5, P53 geninin ifadesinde sırasıyla %160, %146.4, %594.1, %242.7, %530.2, %464.7 ve %246.1 artış gösterdi (p<0.05).

D2, D3, D6 ve D9 bileşiklerinin EC₅₀ dozları BCL-2 genin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermezken D1, D7 ve D8 bileşikler sırasıyla bu genin ifadesini %31.7, %73.9 ve %57.7 oranında azalttı (p<0.05).



Şekil 4.63 D1, D2, D3, D6, D7, D8 ve D9 bileşiklerinin EC₅₀ dozlarının HepG2 hücre hattına uygulanmasından sonra, apoptoz yolaklarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)

4.6.3.3 HT-29

D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin EC₅₀ dozlarının HT-29 hücre hattına 24 saat uygulanmasından sonra apoptotik yolda görev alan BAX, P53, BCL-2, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genlerinin mRNA ifadesine etkisinin kontrol grubuna göre değişimi yüzde sütun grafiği (Şekil 4.64) olarak gösterildi.

D1 ve D2 bileşiklerinin EC₅₀ dozları BAX geninin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermezken D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşikleri sırasıyla %63.9, %113.3, %71, %89.8, %79.9 ve %109.2 artış gösterdi ($p<0.05$).

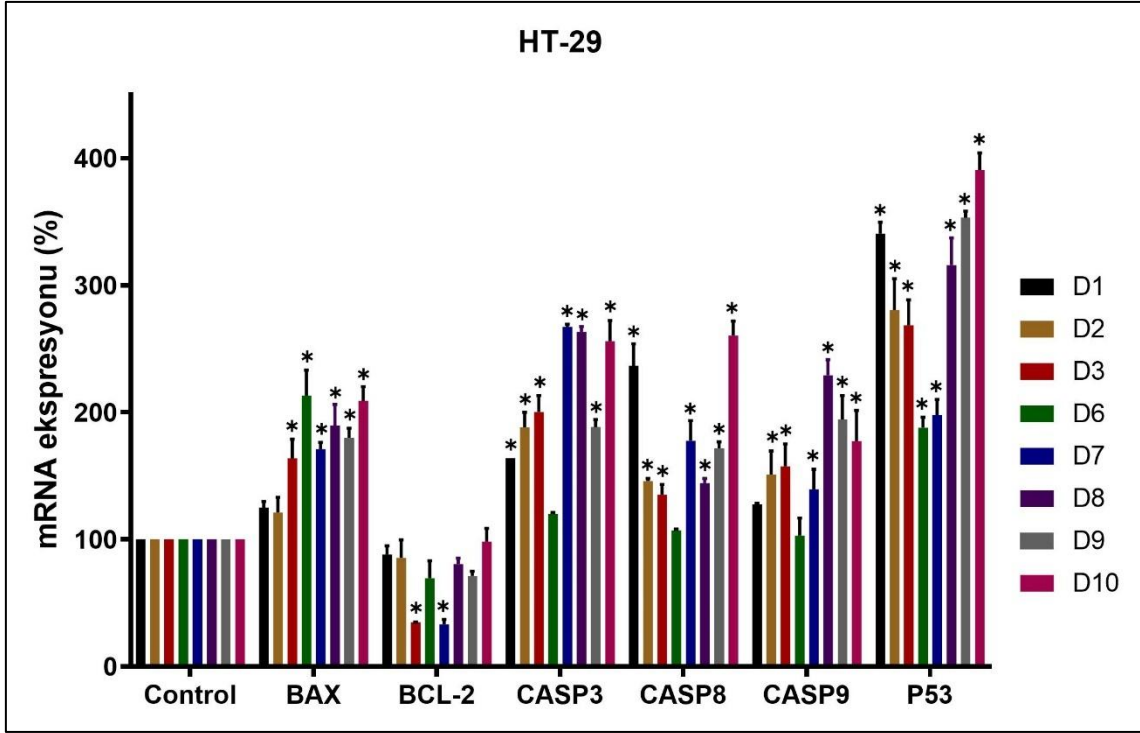
D6 bileşiğinin EC₅₀ dozu Caspase 3 geninin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermezken D1, D2, D3, D7, D8, D9 ve D10 bileşikleri sırasıyla %64.1, %88.1, %100.2, %167.3, %163.4, %88.4 ve %156.1 artış gösterdi ($p<0.05$).

D6 bileşiğinin EC₅₀ dozu Caspase 8 geninin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermezken D1, D2, D3, D7, D8, D9 ve D10 bileşikleri sırasıyla %136.7, %45.9, %35.3, %77.7, %44.4, %71.7 ve %160.6 artış gösterdi ($p<0.05$).

D1 ve D6 bileşiklerinin EC₅₀ dozu Caspase 9 geninin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermezken D2, D3, D7, D8, D9 ve D10 bileşikleri sırasıyla %51.1, %57.4, %39.7, %129.1, %94.3 ve %77.4 artış gösterdi ($p<0.05$).

D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin EC₅₀ dozları P53 geninin ifadesinde sırasıyla %240.6, %180.5, %168.7, %88, %98.1, %215.9, %253.1 ve %290.8 artış gösterdi ($p<0.05$).

D1, D2, D6, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin EC₅₀ dozları BCL-2 geninin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermezken D3 ve D7 bileşikleri sırasıyla bu genin ifadesini %65.1 ve %66.8 oranında azalttı ($p<0.05$).



Şekil 4.64 D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin EC₅₀ dozlarının HT-29 hücre hattına uygulanmasından sonra, apoptoz yollarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır (p<0.05)

4.6.3.4 MDA-MB-231

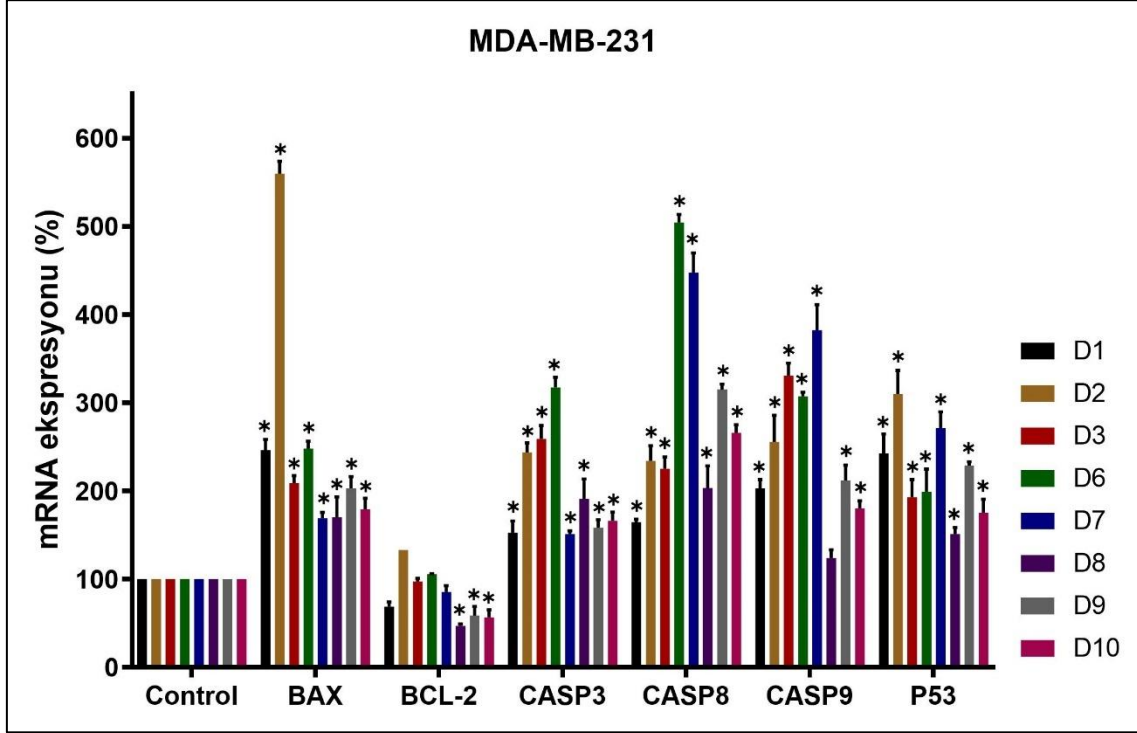
D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin EC₅₀ dozlarının MDA-MB-231 hücre hattına 24 saat uygulanmasından sonra apoptotik yolda görev alan BAX, P53, BCL-2, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genlerinin mRNA ifadesine etkisinin kontrol grubuna göre değişimi yüzde sütun grafiği (Şekil 4.65) olarak gösterildi.

D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin EC₅₀ dozları kontrol grubuna göre; BAX geninin ifadesinde sırasıyla %146.4, %459.9, %108.7, %148, %69.4, %70.1, %102.8 ve %79, Caspase 3 geninin ifadesinde sırasıyla %52.5, 144, 159.1, 217.2, 51.1, 91.1, 58.1 ve 66.3, Caspase 8 geninin ifadesinde sırasıyla %64.7, %134.1, %125.2, %404.1, %347.6, %103.5, %214.9, %165.8, P53 geninin ifadesinde sırasıyla %142.6, %209.8, %93, %99.2, %171.3, %51.1, %128.9 ve %75.6 artış gözlemlendi (p<0.05).

D8 bileşiğinin EC₅₀ dozu Caspase 9 genin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermezken D1, D2, D3, D6, D7, D9 ve D10 bileşikleri sırasıyla bu genin

ifadesini %102.9, %155.8, %230.6, %207.2, %282.3, %111.8 ve %80.3 artış gözlemlendi ($p<0.05$).

D1, D2, D3, D6 ve D7 bileşiklerinin EC_{50} dozları BCL-2 genin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermezken D8, D9 ve D10 bileşikler sırasıyla bu genin ifadesini %53, %41.2 ve %43.4 oranında azalttı ($p<0.05$).



Şekil 4.65 D1, D2, D3, D6, D7, D8, D9 ve D10 bileşiklerinin EC_{50} dozlarının MDA-MB-231 hücre hattına uygulanmasından sonra, apoptoz yollarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p<0.05$)

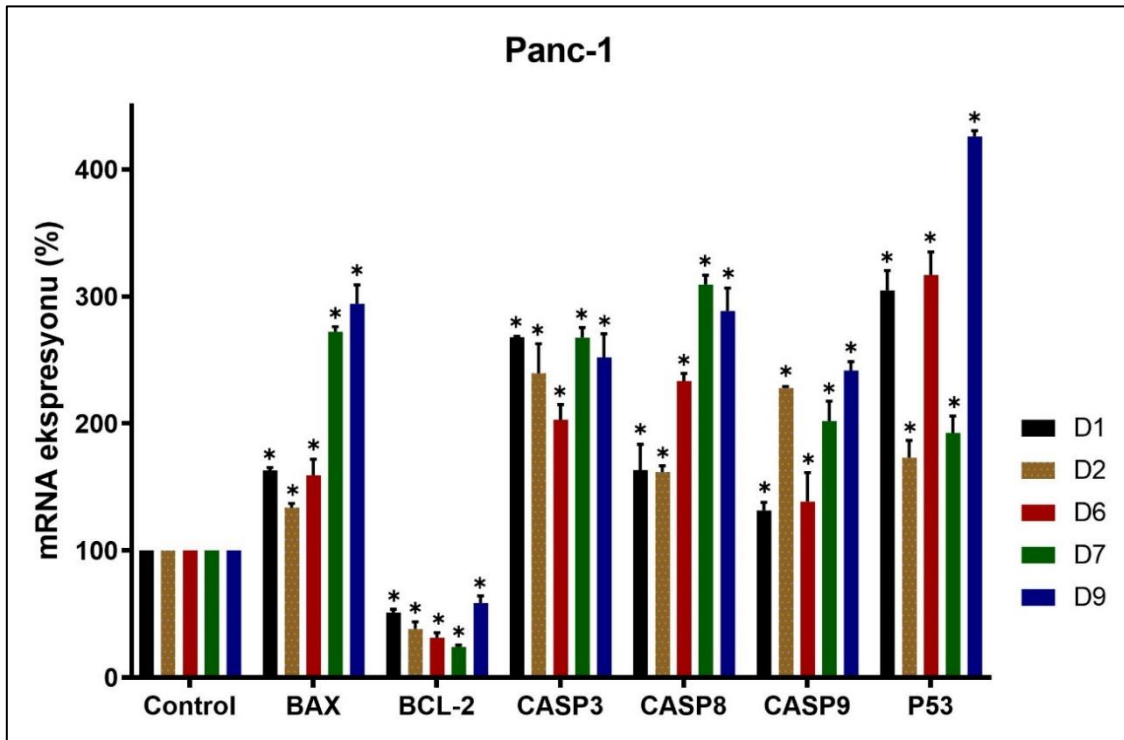
4.6.3.5 Panc-1

D1, D2, D6, D7 ve D9 bileşiklerinin EC_{50} dozlarının Panc-1 hücre hattına 24 saat uygulanmasından sonra apoptotik yolda görev alan BAX, P53, BCL-2, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genlerinin mRNA ifadesine etkisinin kontrol grubuna göre değişimi yüzde sütun grafiği (Şekil 4.66) olarak gösterildi.

D1, D2, D6, D7 ve D9 bileşiklerinin EC_{50} dozları kontrol grubuna göre; BAX geninin ifadesinde sırasıyla %63, %33.8, %59.3, %172.3 ve %194.4, Caspase 3 geninin

ifadesinde sırasıyla %167.9, %139.6, %103, %167.6 ve %151.9, Caspase 8 geninin ifadesinde sırasıyla %63.5, %61.9, %133.4, %209.4 ve %188.7, Caspase 9 geninin ifadesinde sırasıyla %31.6, %127.9, %38.6, %102 ve %141.6, P53 geninin ifadesinde sırasıyla %204.7, %73.2, %216.9, %92.7 ve %326.1 artış gözlemlendi ($p<0.05$).

D1, D2, D6, D7 ve D9 bileşiklerinin EC_{50} dozları BCL-2 genin ifadesini ise sırasıyla %48.8, %61.6, %68.6, %75.8 ve %41.2 oranında azalttı ($p<0.05$).



Şekil 4.66 D1, D2, D6, D8 ve D9 bileşiklerinin EC_{50} dozlarının Panc-1 hücre hattına uygulanmasından sonra, apoptoz yolaklarında görev alan BCL-2, BAX, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 ve P53 mRNA seviyelerine etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi. *Kontrol grubuna göre farklıdır ($p<0.05$)

Apoptoz sürecinde iki protein ailesinin çok önemli olduğu bilinmektedir. Bunlardan biri apoptozun karar vericisi olan Bcl-2 ailesi; diğeri ise apoptozun uygulayıcısı olan kaspaz ailesidir. Bcl-2 ailesi üyeleri, anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL) ve pro-apoptotik proteinleri (Bax, Bak, Bid, Bim ve Bad) içerir ve mitokondriyal homeostaziyi düzenleyerek mitokondriyal apoptotik yolun aktivasyonunu sıkı bir şekilde kontrol ederler (Mao vd., 2013). Apoptozis sürecinde antiapoptotik genlerin ifadeleri azalırken proapoptotik genlerin ve apoptozun uygulayıcısı olan kaspazların ifadeleri artar.

Apoptoz süreci beş farklı yolak aracılığıyla gerçekleşmekle beraber bu yolların en çok bilinenleri içsel (intrinsik) ve dışsal (ekstrinsik) yollardır (Grilo ve Mantalaris, 2019; Celepli vd., 2020). İçsel yolak mitokondri yolağı ve dışsal yolak ise ölüm reseptörü yolağı olarak da bilinmektedir.

Bu çalışmada test edilen bileşiklerin apoptotik özelliklerini araştırmak için apoptotik yolda görevli; BAX, P53, Bcl-2, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genlerinin mRNA ekspresyonlarındaki değişimleri, Real-Time PCR ile araştırıldı. BAX, Bcl-2, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genleri içsel ve dışsal apoptozda etkiliyken P53 geni ise DNA hasarı durumunda hücre döngüsünü G1 safhasında durdurarak DNA tamiri için hücreye süre kazandırmaktır. Hasar tamir edilmediğinde ise P53 antiapoptotik genlerin ifadeleri azalmasına ve proapoptotik genlerin ifadesinin artmasını sağlar. Bu durumda hücre apoptoza girdiğinde BAX, P53, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genlerinin mRNA ekspresyonlarının artması ve Bcl-2 ifadesinin azalması beklenir.

Çalışmanın apoptoz analizi sonuçlarını genel olarak özetlediğimizde; Ishikawa hücre hattında test edilen tüm maddeler BAX, P53, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genlerinin mRNA ekspresyonlarının arttırırken D1, D8 ve D9 bileşiklerinin, Bcl-2 ifadesini anlamlı olarak azalttığı görüldü (Şekil 4.62). HepG2 hücre hattında test edilen tüm maddeler BAX, P53, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genlerinin mRNA ekspresyonlarının arttırırken D1, D7 ve D8 bileşiklerinin, Bcl-2 ifadesini anlamlı olarak azalttığı görüldü (Şekil 4.63). HT-29 hücre hattında test edilen D3 ve D7 bileşiklerinin hem BAX, P53, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genlerinin mRNA ekspresyonlarının arttırırken hemde Bcl-2 ifadesini anlamlı olarak azalttığı görüldü (Şekil 4.64). MDA-MB-231 hücre hattında test edilen D8, D9 ve D10 bileşiklerinin hem BAX, P53, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 (D8 hariç) genlerinin mRNA ekspresyonlarının arttırırken hemde Bcl-2 ifadesini anlamlı olarak azalttığı görüldü (Şekil 4.65). En iyi apoptotik aktivite ise Panc-1 hücre hattında görüldü. Çünkü bu hücre hattında hücre hattında test edilen tüm bileşiklerin hem BAX, P53, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genlerinin mRNA ekspresyonlarının arttırdığı hemde Bcl-2 ifadesini anlamlı olarak azalttığı görüldü (Şekil 4.66).

Test edilen bileşiklerin Bcl-2 gen ifadesi azaltırken BAX, P53, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genlerinin ifadesini arttırması bu bileşiklerin apoptotik yolda etkili olabileceklerini göstermektedir. Apoptozun içsel ve dışsal yollarına

bakıldığında içsel yolaktaki başlatıcı kaspaz Caspase 9 iken dışsal yolaktaki başlatıcı kaspaz Caspase 8'dir (Şekil 2.7). Ancak analiz sonuçları her iki kaspazın ifadesinin arttığını göstermektedir. Bu durum, kullanılan bileşiklerin içsel ve dışsal apoptotik yolları birlikte aktifleştirdiğini yada başka bir mekanizmanın olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca Caspase 8 dışsal apoptozda etkili olmakla beraber içsel apoptozda da etkili olabilmektedir. Çünkü Caspase 8'in bir substratı olan "Bid" normalde sitozolde lokalizedir. Bid, Caspase 8 tarafından aktifleştirildiğinde mitokondriye geçerek sitokrom c salımını tetikler. Sitokrom c ise Apaf1 ile beraber prokaspaz 9'u aktifleştirir. Böylece apoptozun mitokondriyal yolu tetiklenmiş olur (Li vd., 1998; Luo vd., 1998; Celepli vd., 2020).

Literatürde de indol-artesunat hibrit moleküllerinin apoptoz mekanizmalarıyla ilgili bir çalışmaya rastlanmadığı için çalışmamızı literatür ile kıyaslayamıyoruz. Ancak indol ve artemisinin türevlerinin apoptotik mekanizmaları ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (Lee vd., 2010; Mao vd., 2013; Liew vd., 2014; Ontikatzte vd., 2014; Nyein vd., 2018; Zheng vd., 2021).

Mao vd. (2013) yaptıkları çalışmada insan meme kanseri (T-47D hücre hattı) hücrelerinde dihidroartemisinin kaynaklı apoptozu araştırdılar. Western blot analizi sonucunda Caspase 8, Caspase 9, Bid ve sitokrom c'nin doza bağımlı olarak arttığını ve Bcl-2'nin azaldığını tespit ettiler (Mao vd., 2013).

Nyein vd. (2018) izotiyosinat grubu içeren bir dizi artemisinin molekülü sentezlediler. Sentezledikleri bu bileşikleri glioblastoma (U87 hücre hattı) hücrelerine etkisini araştırdılar. Sentezledikleri bileşiklerden en iyi sitotoksik aktivite gösteren bileşiğin (IC₅₀: 7.41 µM / 24 saat, 7.35 µM / 72 saat) apoptotik etkisini araştırdılar. Bu bileşiğin Caspase 9, Bax ve sitokrom c proteinlerini arttırdığını ve Bcl-2 proteinini azalttığını western blot analiziyle tespit ettiler (Nyein vd., 2018).

Lee vd. (2010) AC-264 olarak adlandırdıkları bir indol türevini lösemi hücreleri (HL-60 hücre hattı) üzerindeki apoptotik özelliklerini incelediler. Çalışmanın sonucunda AC-26 maddesinin, HL-60 hücre hattında kaspaz-3'ü aktive ederek ve internükleozomal DNA fragmentasyonunu indükleyerek apoptotik hücre ölümü yoluyla anti-kanser etki gösterdiğini tespit ettiler (Lee vd., 2010).

Liew vd. (2014) *Nauclea subdita* bitkisinin kabuğundan izole ettikleri ve monoterpenoid bir indol alkaloidi olan subditin molekülünün insan prostat kanser

hücreleri (NCaP ve PC-3 hücre hatları) üzerindeki etkisini araştırdılar. Çalışmanın sonucunda subditin molekülünün; Caspase 3/7 ve Caspase 9 aktivitesini arttırırken Caspase 8 de aktivitesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı ve Bcl-2 ile Bcl-xl düzeyini düşürdüğünü tespit etmişlerdir (Liew vd., 2014).

İndol ve artemisinin türevlerinin apoptotik mekanizmaları ile ilgili yapılan çalışmalarda sonuçlar çeşitli olmakla birlikte genel olarak bu tür bileşiklerin mitokondri yolu üzerindeki etkilerinin olduğunu göstermektedir (Mao vd., 2013; Liew vd., 2014; Nyein vd., 2018).



5. SONUÇ

Kanser, çevresel veya kalıtsal faktörlere bağlı olarak hücre döngüsü mekanizmalarının bozulması sonucu vücudun çeşitli bölgelerindeki hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla oluşan bir hastalıktır. Tüm dünyada en önemli ölüm nedenlerinden biri olan kanser hastalığının vakaları dünya çapında sürekli olarak artmaktadır. Bu sebeple farklı kanserlerin tedavisi için güçlü farmasötiklerin geliştirilmesine olan ihtiyaç da artmaktadır.

Bu çalışmada, hem doğal hem de sentetik olarak üretilen birçok bileşiğin yapısında bulunan indol halkası ve tatlı pelin otu (*artemisia annua*) bitkisinden izole edilen artemisininin bir türevi olan artesunat maddesinin birleştirilmesiyle elde edilen 11 adet indol-artesunat hibrit molekülünün biyolojik ve farmakolojik özellikleri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır.

Bu doğrultuda bileşiklerin antioksidan potansiyelleri beş farklı yöntemle (DPPH, ABTS, Galvinoksil, Fosfomolibden ve FRAP) test edildi. Bileşiklerin farklı kanser hücre hatlarında (Panc-1, MDA-MB-231, HT-29, HepG2 ve Ishikawa) ve sağlıklı bir hücre hattındaki (HUVEC) sitotoksik özellikleri etkileri MTT yöntemiyle belirlendi. Sitotoksik potansiyelleri belirlenen bileşiklerin hücreler üzerindeki koloni oluşturma ve invazyon kapasiteleri, yara iyileştirme potansiyelleri ve apoptotik etkileri ile apoptotik yolaktaki genlerin mRNA ifadesindeki değişimler araştırıldı.

Çalışmanın sonucunda, fosfomolibden yöntemi hariç diğer antioksidan kapasite yöntemlerinde bileşiklerin antioksidan kapasiteleri tespit edilmedi.

MTT yöntemiyle sitotoksik özellikleri test edilen bileşiklerin sekizinin çeşitli hücre hatlarında etkili olduğu tespit edildi. Ishikawa hücre hattında en etkili bileşikler D1 ve D6 bileşikleriydi ve bu bileşiklerin EC₅₀ değerleri (20.22 μ M ve 22.90 μ M) pozitif kontrol olarak kullanılan paklitaksel maddesinin EC₅₀ değerine (19.3 μ M) oldukça yakın değerdaydı. HepG2 hücre hattında en etkili bileşikler D1, D2 ve D3 bileşikleriydi. D1 ve D2 bileşiklerin EC₅₀ değerleri (5.43 μ M, 5.63 μ M) pozitif kontrol olarak kullanılan paklitaksel maddesinin EC₅₀ değerine (4.5 μ M) oldukça yakın değerdaydı ve hatta D3 bileşiği (2.75 μ M) pozitif kontrolden daha iyi aktivite sergiledi. HT-29 hücre hattında en etkili bileşikler D1, D2 ve D6 bileşikleriydi. Bu bileşiklerin EC₅₀ değerleri sırasıyla 25.5 μ M, 19.7 μ M ve 23.6 μ M pozitif kontrol olarak kullanılan paklitaksel

maddesinin EC₅₀ değeri ise 1.4 µM olarak tespit edildi. MDA-MB-231 hücre hattında en etkili bileşikler D1, D7 ve D9 bileşikleriydi. Bu bileşiklerin EC₅₀ değerleri sırasıyla 39.19 µM, 25.99 µM ve 36.98 µM pozitif kontrol olarak kullanılan paklitaksel maddesinin EC₅₀ değeri ise 14.3 µM olarak tespit edildi. Panc-1 hücre hattında en etkili bileşikler D1 ve D2 bileşikleriydi ve bu bileşiklerin EC₅₀ değerleri EC₅₀ değerleri sırasıyla 64.43 µM ve 34.62 µM pozitif kontrol olarak kullanılan paklitaksel maddesinin EC₅₀ değeri ise 9.3 µM olarak tespit edildi. Sağlıklı insan endotel (HUVEC) hücre hattında, test edilen bileşiklerin hiçbirinde EC₅₀ değeri tespit edilemezken pozitif kontrol olarak kullanılan paklitaksel maddesinin EC₅₀ değeri ise 53.7 µM olarak tespit edildi.

Koloni oluşturma potansiyelleri test edilen bileşiklerin; kontrol grubuna göre Ishikawa hücre hattında yüzde 84, HepG2 hücre hattında yüzde 93.8, HT-29 hücre 97.6, MDA-MB-231 hücre hattında 32.5 ve Panc-1 hücre hattında yüzde 99.6 oranından daha fazla koloni oluşumunu engellediği tespit edildi.

İnvazyon özellikleri test edilen bileşiklerin; HepG2 hücre hattında D1 ve D2 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 91.2 ve 96.6 oranında, HT-29 hücre hattında D1 ve D2 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 35.1 ve 39.2 oranında ve Panc-1 hücre hattında D1 ve D2 bileşikleri kontrol grubuna göre sırasıyla yüzde 97.4 ve 94.8 oranında, invazyonu engellediği tespit edildi.

Yara iyileştirme yönteminde test edilen tüm maddelerin kontrol grubuna göre hücre göçünü engellediği ve bu sonucun hücre hattına göre farklılık gösterdiği tespit edildi.

Annexin-V/PI yöntemiyle apoptotik özellikleri test edilen bileşiklerin Ishikawa, HepG2, MDA-MB-231, HT-29 ve Panc-1 hücre hatlarında kontrol gruplarına göre apoptozu engellediği tespit edildi. Ishikawa, HepG2 ve Panc-1 hücre hatlarında test edilen bileşikler kullanılan pozitif kontrole (hidrojen peroksit) yakın yada daha yüksek aktivite sergiledi.

Bileşiklerin anti apoptotik özelliklerini araştırmak için ayrıca apoptotik yolda görevli; BAX, P53, Bcl-2, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase 9 genlerinin mRNA ekspresyonlarındaki değişimleri Real-Time PCR ile araştırıldı. En iyi aktivite Panc-1 hücre hattında tespit edildi. Bileşikler, diğer kanser hücre hatlarında (Ishikawa, HepG2, MDA-MB-231 ve HT-29) da genel olarak; BAX, P53, Caspase 3, Caspase 8 ve Caspase

9 genlerinin mRNA ekspresyonlarını arttırırken Bcl-2 geninin ifadesini düşürdüğü tespit edildi.

Sonuç olarak, bu çalışmada test edilen bileşiklerin düşük antioksidan aktivite ve güçlü sitotoksik aktivite sergilediği, test edilen kanser hücrelerinin invazyon, migrasyon ve koloni oluşturma kapasitesini engellediğini ayrıca apoptozu indüklediği tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlara bakıldığında, bu çalışmada kullanılan bir yada birden fazla bileşiğin daha ileri çalışmalarla kanser ilacı olma potansiyeli bulunmaktadır. Bu yüzden çalışmada kullanılan bileşiklerin *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda daha detaylı analizleri yapılmalıdır.





KAYNAKLAR

- Addis, R., Cruciani, S., Santaniello, S., Bellu, E., Sarais, G., Ventura, C., ... Pintore, G. (2020). Fibroblast proliferation and migration in wound healing by phytochemicals: evidence for a novel synergic outcome. *International Journal of Medical Sciences*, 17(8), 1030–1042. doi:10.7150/ijms.43986
- Alkhzem, A. H., Woodman, T. J., Blagbrough, I. S. (2022). Design and synthesis of hybrid compounds as novel drugs and medicines. *RSC Advances*, 12(30), 19470–19484. doi:10.1039/D2RA03281C
- Altuntaş, T. G., Baydar, A., Kiliç-Kurt, Z., Acar, C., Yilmaz-Sarialtin, S., Çoban, T. (2020). Novel piperazine substituted indole derivatives: Synthesis, anti-inflammatory and antioxidant activities and molecular docking. *Journal of Research in Pharmacy*, 24(3), 350–360. doi:10.35333/jrp.2020.157
- Anonim, (2023a). Uluslararası kanser araştırmaları ajansı: türkiye ve dünyada en fazla görülen kanser tipleri. Erişim tarihi: 22.02.2023. Erişim adresi: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars-2?v=2020>.
- Anonim, (2023b). Quest Graph™ IC50 calculator. AAT bioquest, Inc. Erişim Tarihi: 24.03.2023. Erişim adresi: <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>.
- Appalasamy, S., Lo, K. Y., Ch'ng, S. J., Nornadia, K., Othman, A. S., Chan, L.-K. (2014). Antimicrobial activity of artemisinin and precursor derived from in vitro plantlets of artemisia annua L. *BioMed Research International*, 2014, 1–6. doi:10.1155/2014/215872
- Arora, P., Arora, V., Lamba, H. S., Wadhwa, D. (2012). Importance of heterocyclic chemistry: a review. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 3(9), 2947–2954. doi:http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3(9).2947-54
- Aslan, M., Hsu, E.-C., Liu, S., Stoyanova, T. (2021). Quantifying the invasion and migration ability of cancer cells with a 3D Matrigel drop invasion assay. *Biology Methods and Protocols*, 6(1), 1–8. doi:10.1093/biomethods/bpab014
- Bali, A., Sen, U., Peshin, T. (2014). Synthesis, docking and pharmacological evaluation of novel indole based potential atypical antipsychotics. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 74, 477–490. doi:10.1016/j.ejmech.2013.09.020
- Baykara, O. (2016). Current modalities in treatment of cancer. *Balıkesir Health Sciences Journal*, 5(3), 154–165. doi:10.5505/bsbd.2016.93823
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the frap assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Bhosale, P. B., Ha, S. E., Vetrivel, P., Kim, H. H., Kim, J.-A., Park, K.-I., ... Kim, G. S. (2020). Flavonoid-induced apoptotic cell death in human cancer cells and its mechanisms. *Journal of Biomedical Translational Research*, 21(2), 50–58. doi:10.12729/jbtr.2020.21.2.050
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199–1200. doi:10.1038/1811199a0
- Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., Soerjomataram, I. (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, 127(16), 3029–3030. doi:10.1002/cncr.33587
- Buytaert, E., Dewaele, M., Agostinis, P. (2007). Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*

- (BBA) - *Reviews on Cancer*, 1776(1), 86–107. doi:10.1016/j.bbcan.2007.07.001
- Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P., Karagin, P. (2020). Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji*, 24(3), 103–111.
- Chen, S., Fan, W., Sun, Z., Zheng, E., Wang, L., Wu, Y., ... Ma, X. (2022). Acetyl group assisted rapid intramolecular recognition of hydrogen peroxide: A novel promising approach for efficient hydrogen peroxide probe. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 276, 121162. doi:10.1016/j.saa.2022.121162
- Cheong, D. H. J., Tan, D. W. S., Wong, F. W. S., Tran, T. (2020). Anti-malarial drug, artemisinin and its derivatives for the treatment of respiratory diseases. *Pharmacological Research*, 158(March), 104901. doi:10.1016/j.phrs.2020.104901
- Chhikara, B. S., Parang, K. (2023). Chemical biology LETTERS global cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters Chem. Biol. Lett.* Erişim adresi: <https://pubs.thesciencein.org/cbl>.
- Coşkun, G., Özgür, H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145–158.
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11), pdb.prot087288. doi:10.1101/pdb.prot087288
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. doi:10.1002/cbin.11137
- Dağdeviren, T. (2021). Programlı hücre ölümü; apoptoz. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 13(3), 120–135.
- Dehelean, C. A., Marcovici, I., Soica, C., Mioc, M., Coricovac, D., Iurciuc, S., ... Pinzaru, I. (2021). Plant-derived anticancer compounds as new perspectives in drug discovery and alternative therapy. *Molecules*, 26(4), 1–29. doi:10.3390/molecules26041109
- Demurtas, M., Baldisserotto, A., Lampronti, I., Moi, D., Balboni, G., Pacifico, S., ... Onnis, V. (2019). Indole derivatives as multifunctional drugs: Synthesis and evaluation of antioxidant, photoprotective and antiproliferative activity of indole hydrazones. *Bioorganic Chemistry*, 85(January), 568–576. doi:10.1016/j.bioorg.2019.02.007
- Dikmen, M. (2016). Aprepitantın insan glioblastoma U87MG hücreleri üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkileri. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(24530), 156–164. doi:10.12991/marupj.259893
- Diori Karidio, I., Sanlier, S. H. (2021, 1 Aralık). Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. doi:10.1186/s43046-021-00088-y
- Ebenezer, O., Jordaan, M. A., Carena, G., Bono, T., Shapi, M., Tuszynski, J. A. (2022). An overview of the biological evaluation of selected nitrogen-containing heterocycle medicinal chemistry compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8117. doi:10.3390/ijms23158117
- Efferth, T. (2018). Beyond malaria: The inhibition of viruses by artemisinin-type compounds. *Biotechnology Advances*, 36(6), 1730–1737. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.01.001
- El-Aouar Filho, R. A., Nicolas, A., De Paula Castro, T. L., Deplanche, M., De Carvalho

- Azevedo, V. A., Goossens, P. L., ... Berkova, N. (2017). Heterogeneous family of cyclomodulins: smart weapons that allow bacteria to hijack the eukaryotic cell cycle and promote infections. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7(MAY), 208. doi:10.3389/fcimb.2017.00208
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. doi:10.1080/01926230701320337
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149(4), 778–789. doi:10.1002/ijc.33588
- Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants*. doi:10.5772/intechopen.85270
- Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319. doi:10.1038/nprot.2006.339
- Fröhlich, T., Mai, C., Bogautdinov, R. P., Morozkina, S. N., Shavva, A. G., Friedrich, O., ... Tsogoeva, S. B. (2020). Synthesis of Tamoxifen-artemisinin and estrogen-artemisinin hybrids highly potent against breast and prostate cancer. *ChemMedChem*, 15(15), 1473–1479. doi:10.1002/cmdc.202000174
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
- Gomez, V., Hergovich, A. (2016). Cell-cycle control and dna-damage signaling in mammals. *Genome Stability* (Vol. 1, pp. 227–242). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-803309-8.00014-8
- Gorrini, C., Harris, I. S., Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(12), 931–947. doi:10.1038/nrd4002
- Grilo, A. L., Mantalaris, A. (2019). Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology Advances*, 37(3), 459–475. doi:10.1016/j.biotechadv.2019.02.012
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651–715. doi:10.1007/s00204-020-02689-3
- Güleş, Ö., Eren, Ü. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 73–78.
- Guo, L., Dong, F., Hou, Y., Cai, W., Zhou, X., Huang, A.-L., ... Liu, J. (2014). Dihydroartemisinin inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by a p38 mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(6), 1707–1712. doi:10.3892/etm.2014.1997
- Güvenç, D., Güvenç, T. (2017). Apoptotik hücre ölümü ve toksikolojik yanıtta önemi. *Animal Health Production and Hygiene*, 6(2), 499–504.
- Guzmán, C., Bagga, M., Kaur, A., Westermarck, J., Abankwa, D. (2014). ColonyArea: An ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. *PLoS ONE*, 9(3), 14–17. doi:10.1371/journal.pone.0092444
- Hakim, D. N., Pelly, T., Kulendran, M., Caris, J. A. (2015). Benign tumours of the bone: A review. *Journal of Bone Oncology*, 4(2), 37–41.

- doi:10.1016/j.jbo.2015.02.001
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hannun, Y. A., Obeid, L. M. (1995). Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(2), 73–77.
- Hayashi, Y., Emoto, T., Futaki, S., Sekiguchi, K. (2004). Establishment and characterization of a parietal endoderm-like cell line derived from engelbreth-holm-swarm tumor (EHSPEL), a possible resource for an engineered basement membrane matrix. *Matrix Biology*, 23(1), 47–62. doi:10.1016/j.matbio.2004.02.003
- Haynes, R., Cheu, K.-W., N'Da, D., Coghi, P., Monti, D. (2014). Considerations on the mechanism of action of artemisinin antimalarials: part 1 - The “carbon radical” and “heme” hypotheses. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 13(4), 217–277. doi:10.2174/1871526513666131129155708
- Ho, W. E., Cheng, C., Peh, H. Y., Xu, F., Tannenbaum, S. R., Ong, C. N., Wong, W. S. F. (2012). Anti-malarial drug artesunate ameliorates oxidative lung damage in experimental allergic asthma. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(3), 498–507. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.021
- Hogg, J. S., Lohmann, D. H., Russell, K. E. (1961). The kinetics of reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl with phenols. *Canadian Journal of Chemistry*, 39(8), 1588–1594. doi:10.1139/v61-202
- Hong, W., Li, J., Chang, Z., Tan, X., Yang, H., Ouyang, Y., ... Wang, H. (2017). Synthesis and biological evaluation of indole core-based derivatives with potent antibacterial activity against resistant bacterial pathogens. *The Journal of Antibiotics*, 70(7), 832–844. doi:10.1038/ja.2017.55
- Hu, W., Yan, G., Ding, Q., Cai, J., Zhang, Z., Zhao, Z., ... Zhu, Y. Z. (2022). Update of Indoles: Promising molecules for ameliorating metabolic diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 150, 112957. doi:10.1016/j.biopha.2022.112957
- Hu, Y., Li, N., Zhang, J., Wang, Y., Chen, L., Sun, J. (2019). Artemisinin-indole and artemisinin-imidazole hybrids: Synthesis, cytotoxic evaluation and reversal effects on multidrug resistance in MCF-7/ADR cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 29(9), 1138–1142. doi:10.1016/j.bmcl.2019.02.021
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. doi:10.1021/jf030723c
- Islam, M. K., Sostaric, T., Lim, L. Y., Hammer, K., Locher, C. (2020). Development and validation of an HPTLC–DPPH assay and its application to the analysis of honey. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 33(3), 301–311. doi:10.1007/s00764-020-00033-0
- Jia, X. Q., Zhong, N., Han, L. H., Wang, J. H., Yan, M., Meng, F. L., Zhang, S. Z. (2005). Effect of NS-398 on colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 11(3), 353–356. doi:10.3748/wjg.v11.i3.353
- Jonkman, J. E. N., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion & Migration*, 8(5), 440–451. doi:10.4161/cam.36224
- Jung, S., Jeong, H., Yu, S.-W. (2020). Autophagy as a decisive process for cell death.

- Experimental & Molecular Medicine*, 52(6), 921–930. doi:10.1038/s12276-020-0455-4
- Kabir, E., Uzzaman, M. (2022). A review on biological and medicinal impact of heterocyclic compounds. *Results in Chemistry*, 4, 100606. doi:10.1016/J.RECHEM.2022.100606
- Kalluri, R., Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428. doi:10.1172/JCI39104
- Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41–60. doi:10.1007/s12161-008-9067-7
- Kaushik, N., Kaushik, N., Attri, P., Kumar, N., Kim, C., Verma, A., Choi, E. (2013). Biomedical importance of indoles. *Molecules*, 18(6), 6620–6662. doi:10.3390/molecules18066620
- Kaya, C., Çalışkan, Y., Yönden, Z. (2012). Apoptosis. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 3(11), 26–37.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239–257.
- Kerzare, D. R., Menghani, S. S., Khedekar, P. B. (2018). Synthesis, characterization, antidepressant activity and docking studies of some novel indole bearing azetidinone derivatives. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 52(1), 110–121. doi:10.5530/ijper.52.1.13
- Kianmehr, E., Hashemi, H., Darvish, A. (2013). Palladium-catalyzed cyanoalkenylation of indoles. *Tetrahedron*, 69(25), 5193–5196. doi:10.1016/j.tet.2013.04.066
- Kim, H., Cho, S. C., Jeong, H., Lee, H., Jeong, M., Pyun, J., ... Kang, J. (2020). Indoprofen prevents muscle wasting in aged mice through activation of PDK1/AKT pathway. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 11(4), 1070–1088. doi:10.1002/jcsm.12558
- Kryshchychyn-Dylevych, A., Radko, L., Finiuk, N., Garazd, M., Kashchak, N., Posyniak, A., ... Lesyk, R. (2021). Synthesis of novel indole-thiazolidinone hybrid structures as promising scaffold with anticancer potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 50, 116453. doi:10.1016/j.bmc.2021.116453
- Kumar, A. (2016). Vincristine and vinblastine: a review. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Science*, 6(1), 22–30. www.tjprc.org.
- La, J., Kim, M.-J., Lee, J. (2021). Evaluation of solvent effects on the DPPH reactivity for determining the antioxidant activity in oil matrix. *Food Science and Biotechnology*, 30(3), 367–375. doi:10.1007/s10068-020-00874-9
- Lee, K., Kwon, O.-K., Xia, Y., Ahn, K.-S. (2010). Effect of AC-264, a novel indole derivative, on apoptosis in HL-60 cells. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31(12), 3777–3781. doi:10.5012/bkcs.2010.31.12.3777
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), 491–501. doi:10.1016/S0092-8674(00)81590-1
- Li, M., Liang, Y. (2016). Ge Hong and Zhou Hou Jiu Zu Fang (A handbook of formulas for emergencies). *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, 3(1), 1–2. doi:10.1016/j.jtcms.2016.09.001
- Lian, S., Shi, R., Huang, X., Hu, X., Song, B., Bai, Y., ... Wang, M. (2016). Artesunate attenuates glioma proliferation, migration and invasion by affecting cellular mechanical properties. *Oncology Reports*, 36(2), 984–990.

- doi:10.3892/or.2016.4847
- Liang, W., Liu, J., Wu, H., Qiao, X., Lu, X., Liu, Y., ... Ma, L. (2019). Artemisinin induced reversal of EMT affects the molecular biological activity of ovarian cancer SKOV3 cell lines. *Oncology Letters*, 18(3), 3407–3414. doi:10.3892/ol.2019.10608
- Liew, S. Y., Looi, C. Y., Paydar, M., Cheah, F. K., Leong, K. H., Wong, W. F., ... Awang, K. (2014). Subditine, a new monoterpenoid indole alkaloid from bark of *nauclea subdita* (korth.) steud. induces apoptosis in human prostate cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(2), e87286. doi:10.1371/journal.pone.0087286
- Lim, S., Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. *Development (Cambridge)*, 140(15), 3079–3093. doi:10.1242/dev.091744
- Lipton, R. B., Stewart, W. F., Cady, R., Hall, C., Quinn, S. O., Kuhn, T., ... Gutterman, D. (2000). Sumatriptan for the range of headaches in migraine sufferers : results of the spectrum study. *headache: The Journal of Head and Face Pain*, 40(10), 783–791. doi:https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2000.00143.x
- Liu, K., Zuo, H., Li, G., Yu, H., Hu, Y. (2020). Global research on artemisinin and its derivatives: Perspectives from patents. *Pharmacological Research*, 159(June), 105048. doi:10.1016/j.phrs.2020.105048
- Liu, Y., Tong, Z., Shi, J., Li, R., Upton, M., Wang, Z. (2021). Drug repurposing for next-generation combination therapies against multidrug-resistant bacteria. *Theranostics*, 11(10), 4910–4928. doi:10.7150/thno.56205
- Lu, X., Blatt, S., Dawood, M., Klauck, S. M., Fleischer, E., Kämmerer, P. W., Efferth, T. (2022). Novel artemisinin derivative FO8643 with anti-angiogenic activity inhibits growth and migration of cancer cells via VEGFR2 signaling. *European Journal of Pharmacology*, 930(June), 175158. doi:10.1016/j.ejphar.2022.175158
- Lucas, S. (2016). The pharmacology of indomethacin. *headache: The Journal of Head and Face Pain*, 56(2), 436–446. doi:10.1111/head.12769
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94(4), 481–490. doi:10.1016/S0092-8674(00)81589-5
- Ma, N., Zhang, Z., Liao, F., Jiang, T., Tu, Y. (2020). The birth of artemisinin. *Pharmacology and Therapeutics*, 216, 107658. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107658
- Mao, H., Gu, H., Qu, X., Sun, J., Song, B., Gao, W., ... Shao, Q. (2013). Involvement of the mitochondrial pathway and Bim/Bcl-2 balance in dihydroartemisinin-induced apoptosis in human breast cancer in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(1), 213–218. doi:10.3892/ijmm.2012.1176
- Matthews, H. K., Bertoli, C., de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74–88. doi:10.1038/s41580-021-00404-3
- Meng, Q., Goldberg, I. D., Rosen, E. M., Fan, S. (2000). Inhibitory effects of Indole-3-carbinol on invasion and migration in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 63(2), 147–152. doi:10.1023/A:1006495824158
- Meshnick, S. R., Yang, Y. Z., Lima, V., Kuypers, F., Kamchonwongpaisan, S., Yuthavong, Y. (1993). Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(5), 1108–1114. doi:10.1128/AAC.37.5.1108

- Meunier, B. (2008). Hybrid molecules with a dual mode of action: Dream or reality?. *Accounts of Chemical Research*, 41(1), 69–77. doi:10.1021/ar7000843
- Mlakić, M., Odak, I., Faraho, I., Bosnar, M., Banjanac, M., Lasić, Z., ... Škorić, I. (2022). Synthesis, photochemistry, computational study and potential application of new styryl-thiophene and naphtho-thiophene benzylamines. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 610. doi:10.3390/ijms24010610
- Mohsin, N. U. A., Ahmad, M. (2018). Hybrid organic molecules as antiinflammatory agents; a review of structural features and biological activity. *Turkish Journal of Chemistry*, 42(1), 1–20. doi:10.3906/kim-1706-58
- Mondal, A., Chatterji, U. (2015). Artemisinin represses telomerase subunits and induces apoptosis in hpv-39 infected human cervical cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(9), 1968–1981. doi:10.1002/jcb.25152
- Mphahlele, M., Mmonwa, M., Aro, A., McGaw, L., Choong, Y. (2018). Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel indole-aminoquinazoline hybrids for anticancer properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2232. doi:10.3390/ijms19082232
- Munteanu, I. G., Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. doi:10.3390/ijms22073380
- Munteanu, I. G., Apetrei, C. (2022). Assessment of the antioxidant activity of catechin in nutraceuticals: comparison between a newly developed electrochemical method and spectrophotometric methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8110. doi:10.3390/ijms23158110
- Mutlu, D. (2022). *Mantar polisakkaritlerinin izolasyonu, antikanser, antibiyofilm ve antienflamatuvar etkilerinin belirlenmesi*, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, Türkiye.
- Nagarajan, G., Thangam, E. B. (2021). Effect of H4R antagonist N-(2-Aminoethyl)-5-chloro-1H-indole-2-carboxamide (Compound A) in a mouse model of allergic asthma. *Immunological Investigations*, 50(2–3), 125–138. doi:10.1080/08820139.2020.1712415
- Nagul, E. A., McKelvie, I. D., Worsfold, P., Kolev, S. D. (2015). The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. *Analytica Chimica Acta*, 890, 60–82. doi:10.1016/j.aca.2015.07.030
- Naylor, G. J., Martin, B. (1985). A double-blind out-patient trial of indalpine vs mianserin. *British Journal of Psychiatry*, 147(3), 306–309. doi:10.1192/bjp.147.3.306
- Newman, D. J., Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01285
- Nirmala, J. G., Lopus, M. (2020). Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biology and Toxicology*, 36(2), 145–164. doi:10.1007/s10565-019-09496-2
- Nyein, C. M., Zhong, X., Lu, J., Luo, H., Wang, J., Rapposelli, S., ... He, X. (2018). Synthesis and anti-glioblastoma effects of artemisinin-isothiocyanate derivatives. *RSC Advances*, 8(71), 40974–40983. doi:10.1039/C8RA08162J
- Obeng, E. (2021). Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Brazilian Journal of Biology*, 81(4), 1133–1143. doi:10.1590/1519-6984.228437
- Oberhuber, N., Ghosh, H., Nitzsche, B., Dandawate, P., Höpfner, M., Schobert, R., Biersack, B. (2023). Synthesis and anticancer evaluation of new indole-based

- tyrphostin derivatives and their (p-cymene)dichloridoruthenium(II) complexes. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 854. doi:10.3390/ijms24010854
- Olszowy-Tomczyk, M. (2021). How to express the antioxidant properties of substances properly?. *Chemical Papers*, 75(12), 6157–6167. doi:10.1007/s11696-021-01799-1
- Ontikatzte, T., Rudner, J., Handrick, R., Belka, C., Jendrossek, V. (2014). dihydroartemisinin is a hypoxia-active anti-cancer drug in colorectal carcinoma cells. *Frontiers in Oncology*, 4(May), 1–12. doi:10.3389/fonc.2014.00116
- Ormazábal-Toledo, R., Contreras, R., Tapia, R. A., Campodónico, P. R. (2013). Specific nucleophile–electrophile interactions in nucleophilic aromatic substitutions. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11(14), 2302. doi:10.1039/c3ob27450k
- Özenver, N., Efferth, T. (2022). Cancer combination therapy with carnosic acid. *Biocell*, 46(6), 2151–2157. doi:10.32604/BIOCELL.2022.019937
- Passaniti, A., Kleinman, H. K., Martin, G. R. (2022). Matrigel: history/background, uses, and future applications. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 16(4), 621–626. doi:10.1007/s12079-021-00643-1
- Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., ... Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(2), 192–203. doi:10.1038/s12276-020-0384-2
- Peter, S., Jama, S., Alven, S., Aderibigbe, B. A. (2021). Artemisinin and derivatives-based hybrid compounds: promising therapeutics for the treatment of cancer and malaria. *Molecules*, 26(24), 7521. doi:10.3390/molecules26247521
- Pfeffer, C., Singh, A. (2018). Apoptosis: A target for anticancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 448. doi:10.3390/ijms19020448
- Pokrovskaya, V., Belakhov, V., Hainrichson, M., Yaron, S., Baasov, T. (2009). Design, synthesis, and evaluation of novel fluoroquinolone - Aminoglycoside hybrid antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(8), 2243–2254. doi:10.1021/jm900028n
- Prado, N. J., Ramirez, D., Mazzei, L., Parra, M., Casarotto, M., Calvo, J. P., ... Manucha, W. (2022). Anti-inflammatory, antioxidant, antihypertensive, and antiarrhythmic effect of indole-3-carbinol, a phytochemical derived from cruciferous vegetables. *Heliyon*, 8(2), e08989. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e08989
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin e. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337–341. doi:10.1006/abio.1999.4019
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. doi:10.1021/jf0502698
- Qadir, T., Amin, A., Sharma, P. K., Jeelani, I., Abe, H. (2022). A review on medicinally important heterocyclic compounds. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, 16(1), 187410452202280. doi:10.2174/18741045-v16-e2202280
- Qi, Y., Zhang, C., Wu, D., Zhang, Y., Zhao, Y., Li, W. (2022). Indole-3-carbinol stabilizes p53 to induce mir-34a, which targets Idha to block aerobic glycolysis in liver cancer cells. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1257. doi:10.3390/ph15101257
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999).

- Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Reddy, A. S., Laali, K. K. (2015). Reaction of allene esters with Selectfluor/TMSX (X = I, Br, Cl) and Selectfluor/NH₄ SCN: Competing oxidative/electrophilic dihalogenation and nucleophilic/conjugate addition. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 11, 1641–1648. doi:10.3762/bjoc.11.180
- Rodriguez, L. G., Wu, X., Guan, J. (2005). Wound-healing assay. *Cell Migration* (Vol. 294, pp. 023–030). Humana Press: New Jersey. doi:10.1385/1-59259-860-9:023
- Sadeer, N. B., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., Mahomoodally, M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 1–39. doi:10.3390/antiox9080709
- Sakr, A., Rezaq, S., Ibrahim, S. M., Soliman, E., Baraka, M. M., Romero, D. G., Kothayer, H. (2021). Design and synthesis of novel quinazolinones conjugated ibuprofen, indole acetamide, or thioacetohydrazide as selective COX-2 inhibitors: anti-inflammatory, analgesic and anticancer activities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 1810–1828. doi:10.1080/14756366.2021.1956912
- Salama, E. E., Youssef, M. F., Aboelmagd, A., Boraei, A. T. A., Nafie, M. S., Haukka, M., ... Sarhan, A. A. M. (2023). discovery of potent indolyl-hydrazones as kinase inhibitors for breast cancer: synthesis, x-ray single-crystal analysis, and in vitro and in vivo anti-cancer activity evaluation. *Pharmaceuticals*, 16(12), 1724. doi:10.3390/ph16121724
- Sapra, R., Patel, D., Meshram, D. (2020). A mini review: Recent developments of heterocyclic chemistry in some drug discovery scaffolds synthesis. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences*, 3(1), 71–78. doi:10.26655/JMCHEMSCI.2020.1.9
- Shafakat Ali, N., Dar, B., Pradhan, V., Farooqui, M. (2013). Chemistry and biology of indoles and indazoles: a mini-review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(12), 1792–1800. doi:10.2174/1389557511313120009
- Shi, H., Niki, E. (1998). Stoichiometric and kinetic studies on Ginkgo biloba extract and related antioxidants. *Lipids*, 33(4), 365–370. doi:10.1007/s11745-998-0216-8
- Shukla, R., Arya, G., Sathyanarayana, P. (2021). Antioxidant activity screening models and their mechanism: a review. *Plant Archives*, 21(no 1), 1024–1032. doi:10.51470/PLANTARCHIVES.2021.v21.no1.111
- Suarez-Arnedo, A., Figueroa, F. T., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C., Muñoz-Camargo, C. (2020). An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS ONE*, 15(7 July), 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0232565
- Subramanian, S., Pajaniradje, S., Tumdam, R., Hoda, M., Dasgupta, A., Rajagopalan, R. (2023). Indole curcumin combats metastatic HBV-positive hepatocellular carcinoma by inhibiting cell proliferation, migration, and matrix metalloproteinase-9 activity. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 19(2), 265. doi:10.4103/jcrt.jcrt_1256_21
- Talib, W. H., Awajan, D., Hamed, R. A., Azzam, A. O., Mahmod, A. I., AL-Yasari, I. H. (2022). Combination anticancer therapies using selected phytochemicals. *Molecules*, 27(17). doi:10.3390/molecules27175452

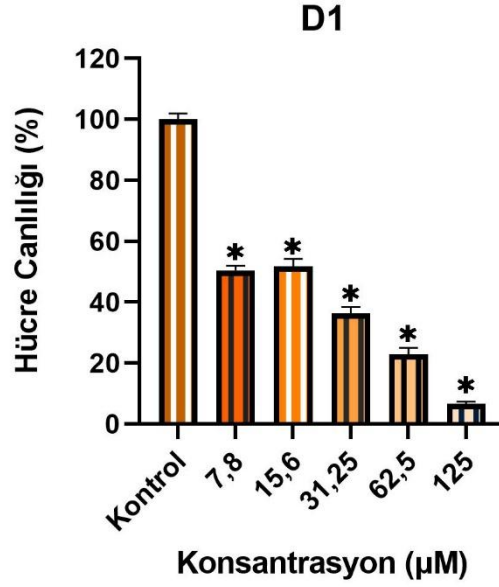
- Tian, Y., Liang, Z., Xu, H., Mou, Y., Guo, C. (2016). Design, synthesis and cytotoxicity of novel dihydroartemisinin-coumarin hybrids via click chemistry. *Molecules*, 21(6), 1–15. doi:10.3390/molecules21060758
- Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(7), 579–591. doi:10.1038/nrd2803
- Tsui, K. H., Wu, M. Y., Lin, L. Te, Wen, Z. H., Li, Y. H., Chu, P. Y., Li, C. J. (2019). Disruption of mitochondrial homeostasis with artemisinin unravels anti-angiogenesis effects via auto-paracrine mechanisms. *Theranostics*, 9(22), 6631–6645. doi:10.7150/thno.33353
- Tu, Y. (2011). The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine*, 17(10), 1217–1220. doi:10.1038/nm.2471
- Vaddiraju, N., Ajitha, M., Rajnarayana, K. (2021). Synthesis, characterization and evaluation of antidiabetic activity of novel pyrazoline fused indole derivatives. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33, 276–292. doi:10.9734/jpri/2021/v33i52B33627
- Vázquez-Nin, G. H., Escobar, M. L., Echeverría, O. M. (2011). Necrosis. In G. H. Vázquez-Nin ... F. G. Klinger (Ed.), *Cell Death in Mammalian Ovary* (pp. 111–121). Springer Netherlands: Dordrecht. doi:10.1007/978-94-007-1134-1_7
- Vitaku, E., Smith, D. T., Njardarson, J. T. (2014). Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(24), 10257–10274. doi:10.1021/jm501100b
- Wang, G., He, M., Liu, W., Fan, M., Li, Y., Peng, Z. (2022). Design, synthesis and biological evaluation of novel 2-phenyl-4,5,6,7-tetrahydro-1H-indole derivatives as potential anticancer agents and tubulin polymerization inhibitors. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(1), 103504. doi:10.1016/j.arabjc.2021.103504
- Wang, L. L., Kong, L., Liu, H., Zhang, Y., Zhang, L., Liu, X., ... Zuo, Z. (2019). Design and synthesis of novel artemisinin derivatives with potent activities against colorectal cancer in vitro and in vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 182. doi:10.1016/j.ejmech.2019.111665
- Weifeng, T., Feng, S., Xiangji, L., Changqing, S., Zhiquan, Q., Huazhong, Z., ... Wanyee, L. (2011). Artemisinin inhibits in vitro and in vivo invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells. *Phytomedicine*, 18(2–3), 158–162. doi:10.1016/j.phymed.2010.07.003
- White, N. J., Nosten, F. (2007). Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(6_Suppl), 181–192. doi:10.4269/ajtmh.2007.77.181
- Wołosiaś, R., Drużyńska, B., Derewiaka, D., Piecyk, M., Majewska, E., Ciecierska, M., ... Pakosz, P. (2022). Verification of the conditions for determination of antioxidant activity by abts and dpph assays—a practical approach. *Molecules*, 27(1). doi:10.3390/molecules27010050
- Xiong, Y., Huang, J. (2021). Anti-malarial drug: the emerging role of artemisinin and its derivatives in liver disease treatment. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 16(1), 1–19. doi:10.1186/s13020-021-00489-0
- Xue, S., Ma, L., Gao, R., Li, Y., Li, Z. (2014). Synthesis and antiviral activity of some novel indole-2-carboxylate derivatives. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(4), 313–321. doi:10.1016/j.apsb.2014.06.003

- Yang, J., He, Y., Li, Y., Zhang, X., Wong, Y.-K., Shen, S., ... Wang, J. (2020). Advances in the research on the targets of anti-malaria actions of artemisinin. *Pharmacology & Therapeutics*, 216, 107697. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107697
- Yenice, I., Basceken, S., Balci, M. (2017). Nucleophilic and electrophilic cyclization of N -alkyne-substituted pyrrole derivatives: Synthesis of pyrrolopyrazinone, pyrrolotriazinone, and pyrrolooxazinone moieties. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 13(Figure 1), 825–834. doi:10.3762/bjoc.13.83
- Yokuş, B., Çakır, D. Ü. (2012). Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(2), 7–18.
- Zhang, W., Ning, N., Huang, J. (2022). Artesunate suppresses the growth of lung cancer cells by downregulating the AKT/survivin signaling pathway. *BioMed Research International*, 2022, 1–10. doi:10.1155/2022/9170053
- Zheng, J., Li, X., Yang, W., Zhang, F. (2021). Dihydroartemisinin regulates apoptosis, migration, and invasion of ovarian cancer cells via mediating RECK. *Journal of Pharmacological Sciences*, 146(2), 71–81. doi:10.1016/j.jphs.2021.02.001

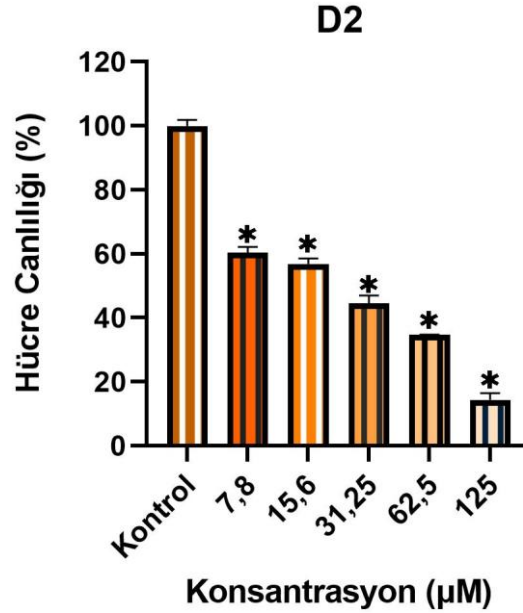


EKLER

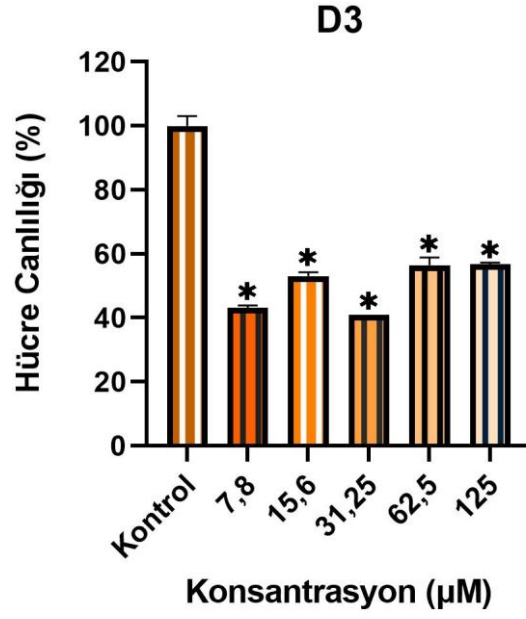
Ek 1. Test edilen bileşiklerin Ishikawa hücre hattı üzerindeki etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi



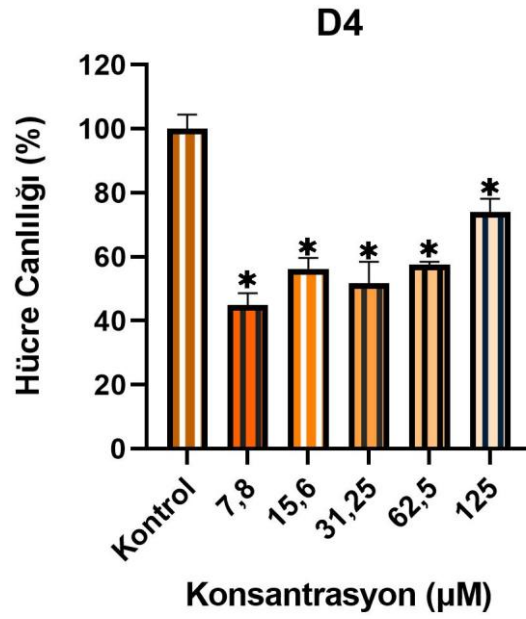
Farklı konsantrasyonlarda D1 maddesinin Ishikawa hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



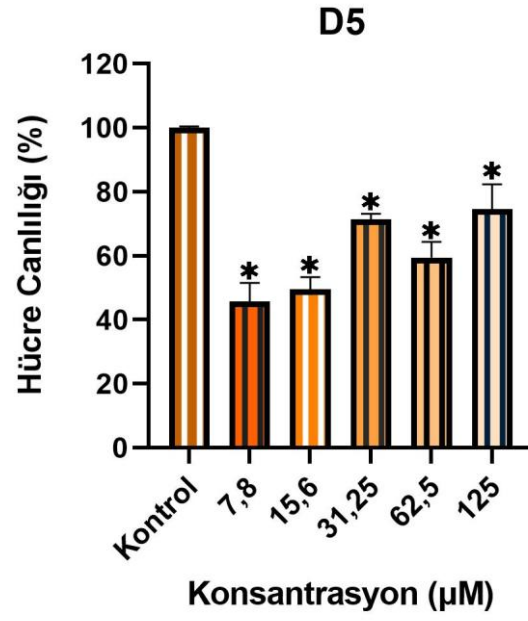
Farklı konsantrasyonlarda D2 maddesinin Ishikawa hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



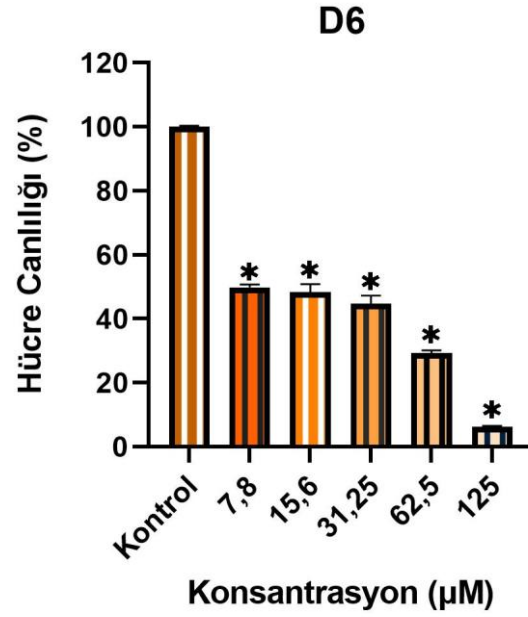
Farklı konsantrasyonlarda D3 maddesinin Ishikawa hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



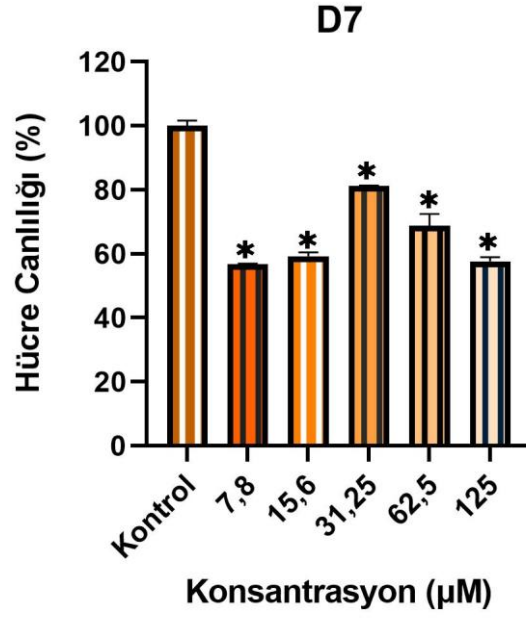
Farklı konsantrasyonlarda D4 maddesinin Ishikawa hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



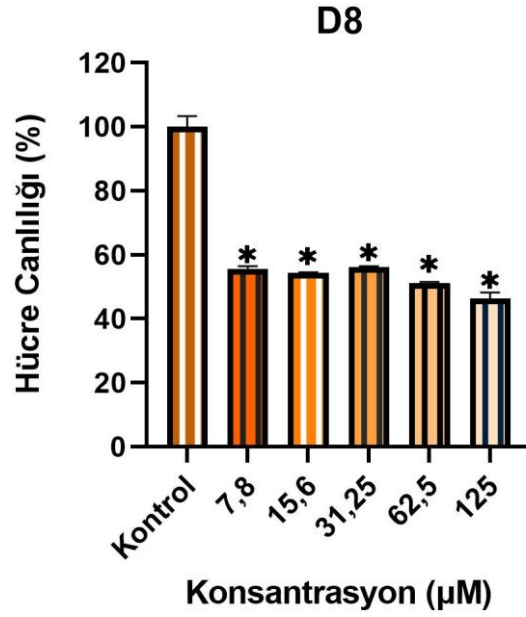
Farklı konsantrasyonlarda D5 maddesinin Ishikawa hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



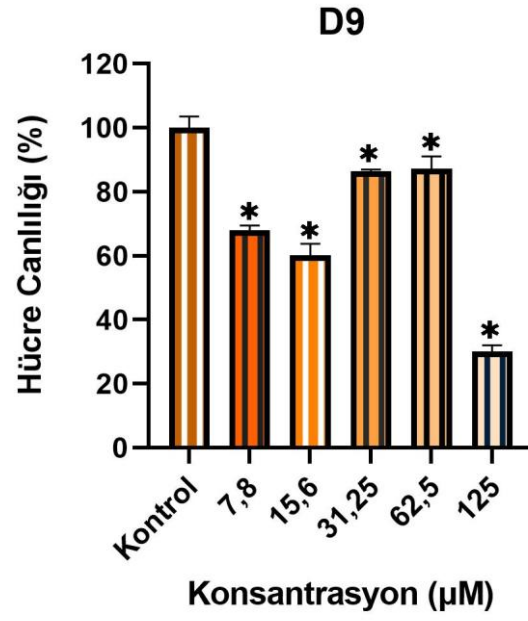
Farklı konsantrasyonlarda D6 maddesinin Ishikawa hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



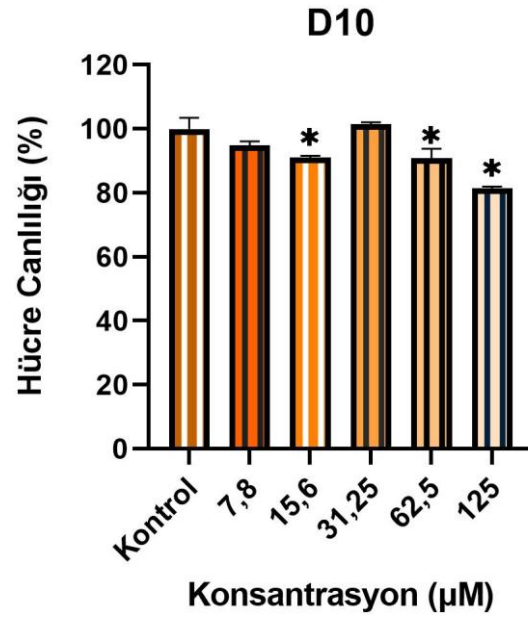
Farklı konsantrasyonlarda D7 maddesinin Ishikawa hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



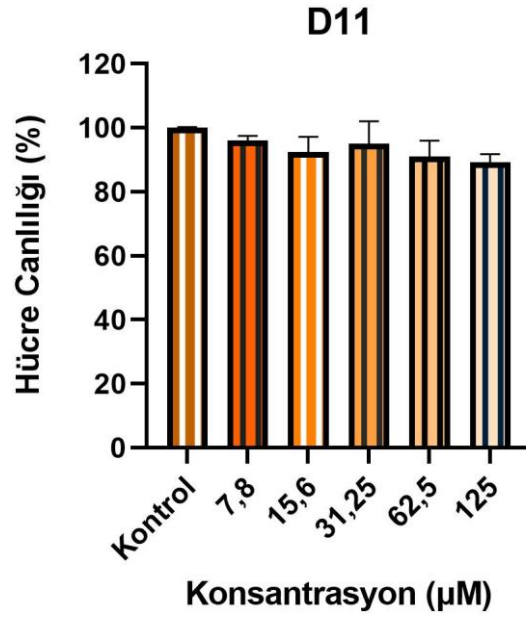
Farklı konsantrasyonlarda D8 maddesinin Ishikawa hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



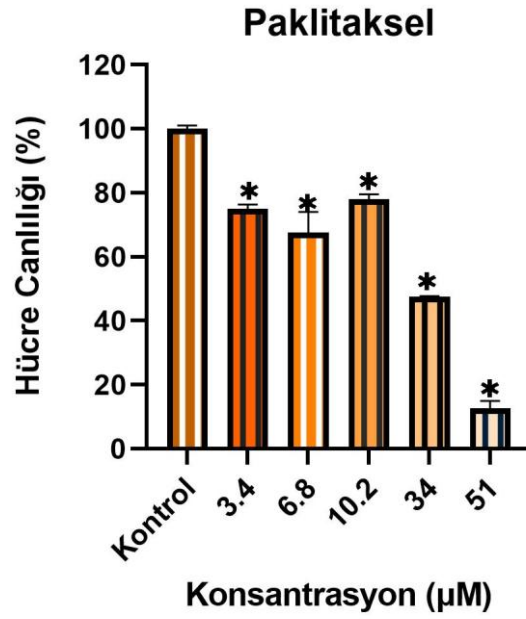
Farklı konsantrasyonlarda D9 maddesinin Ishikawa hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



Farklı konsantrasyonlarda D10 maddesinin Ishikawa hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

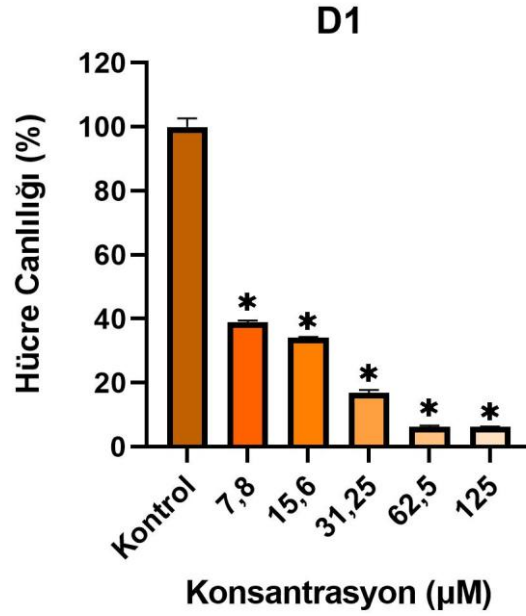


Farklı konsantrasyonlarda D11 maddesinin Ishikawa hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

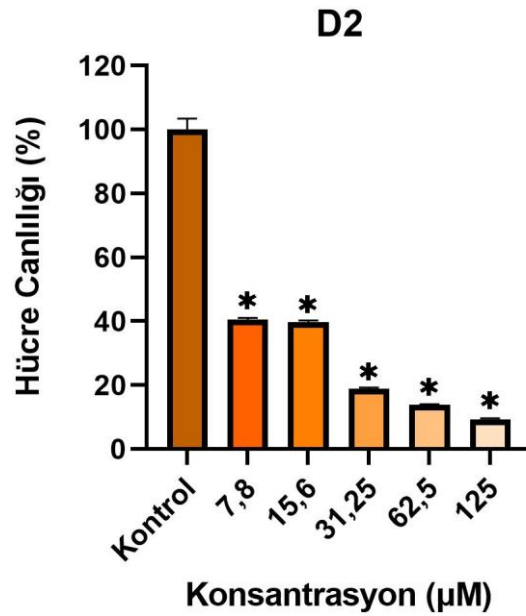


Farklı konsantrasyonlarda Paklitaksel maddesinin Ishikawa hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

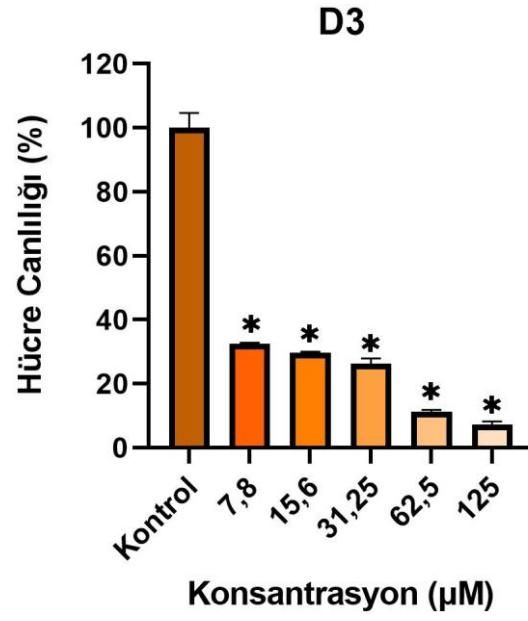
Ek 2. Test edilen bileşiklerin HepG2 hücre hattı üzerindeki etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi



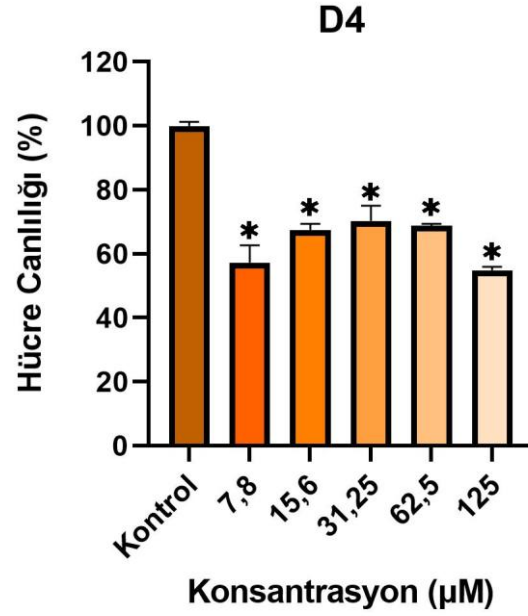
Farklı konsantrasyonlarda D1 maddesinin HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



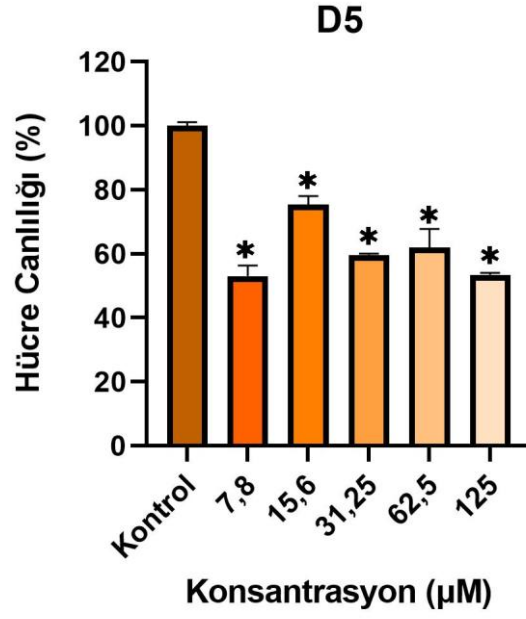
Farklı konsantrasyonlarda D2 maddesinin HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



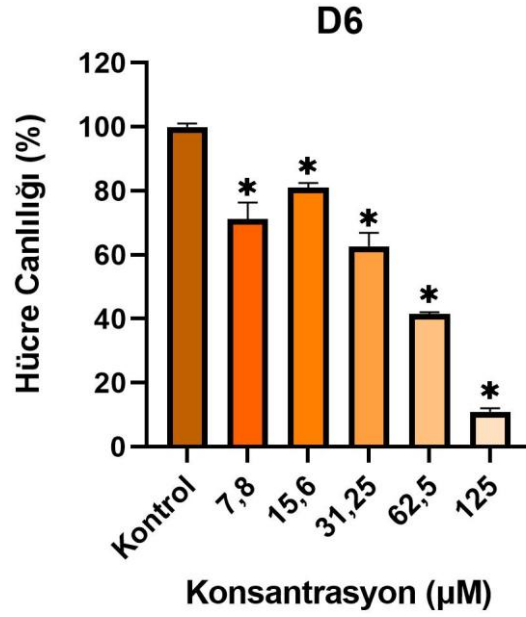
Farklı konsantrasyonlarda D3 maddesinin HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



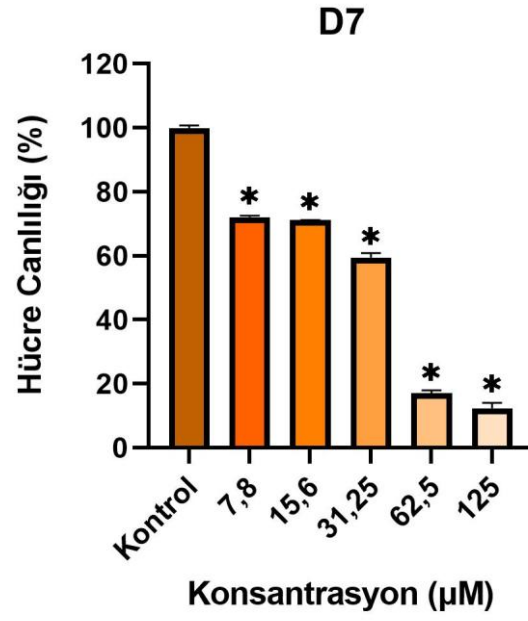
Farklı konsantrasyonlarda D4 maddesinin HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



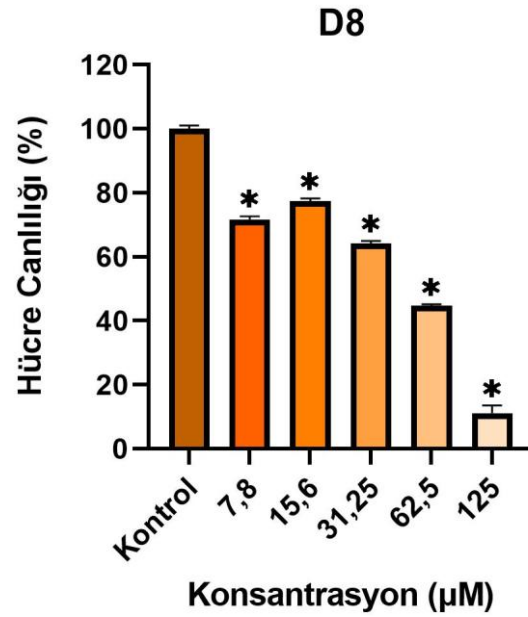
Farklı konsantrasyonlarda D5 maddesinin HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



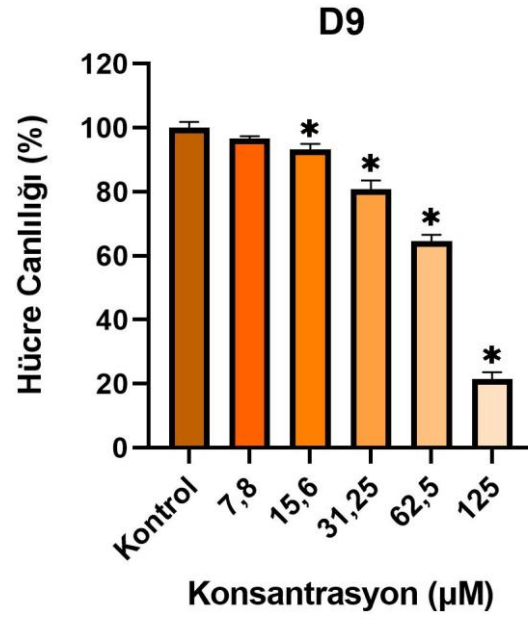
Farklı konsantrasyonlarda D6 maddesinin HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



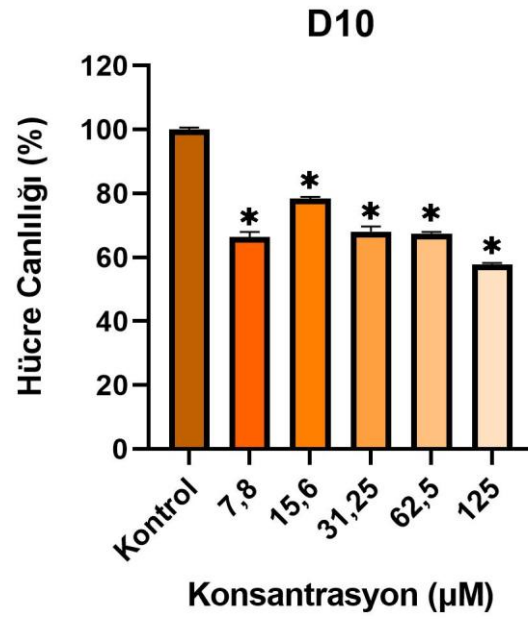
Farklı konsantrasyonlarda D7 maddesinin HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



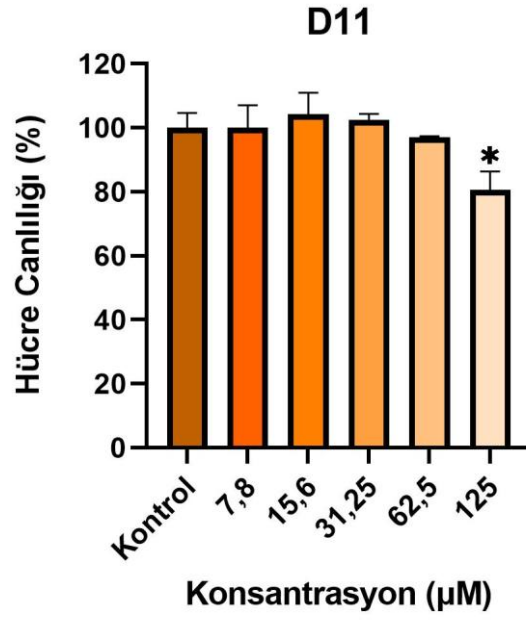
Farklı konsantrasyonlarda D8 maddesinin HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



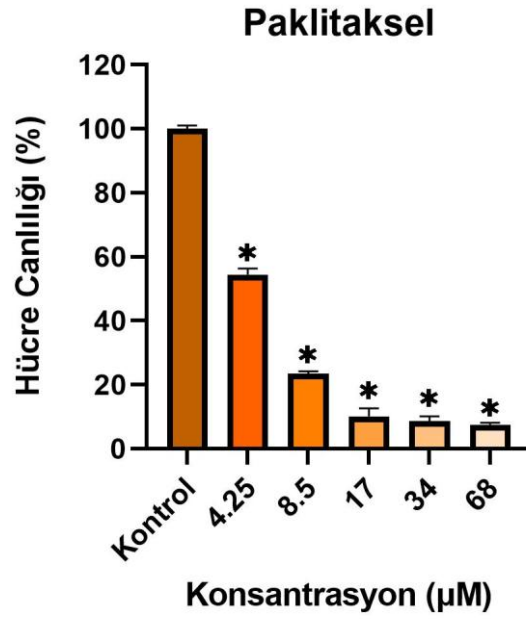
Farklı konsantrasyonlarda D9 maddesinin HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



Farklı konsantrasyonlarda D10 maddesinin HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

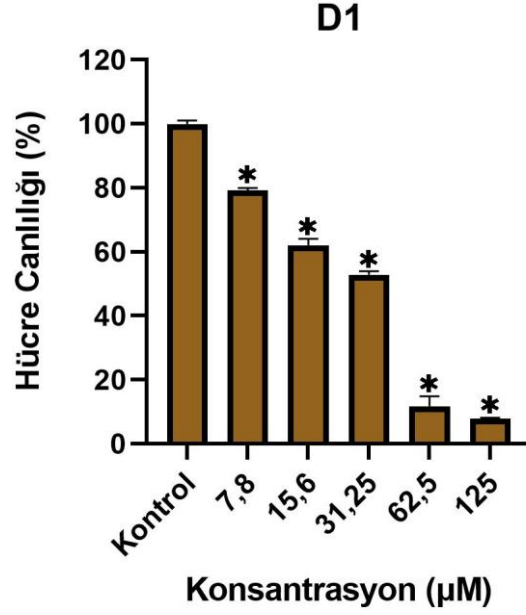


Farklı konsantrasyonlarda D11 maddesinin HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

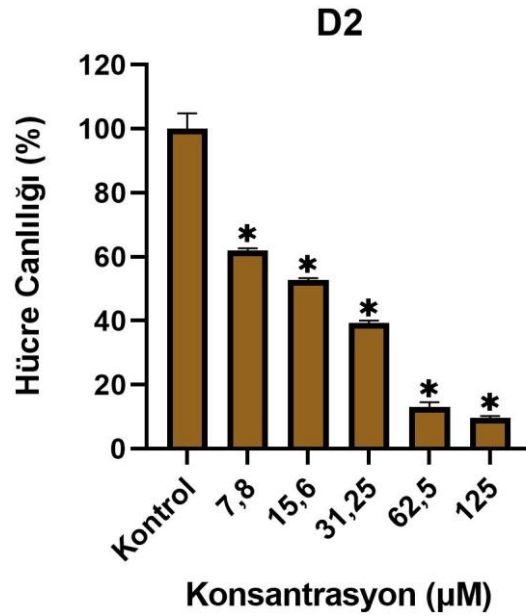


Farklı konsantrasyonlarda Paklitaksel maddesinin HepG2 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

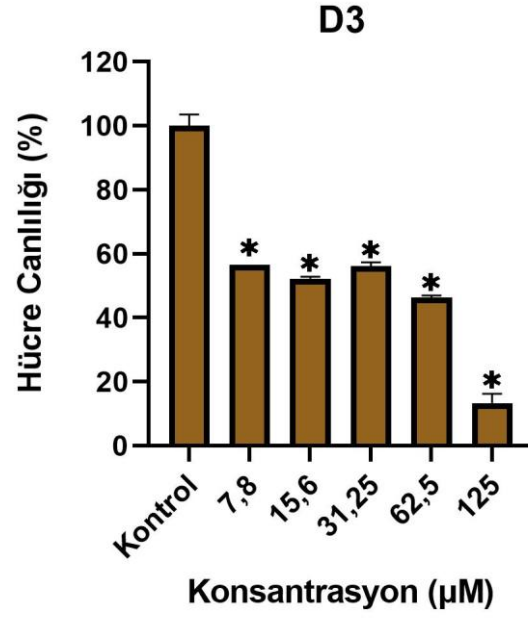
Ek 3. Test edilen bileşiklerin HT-29 hücre hattı üzerindeki etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi



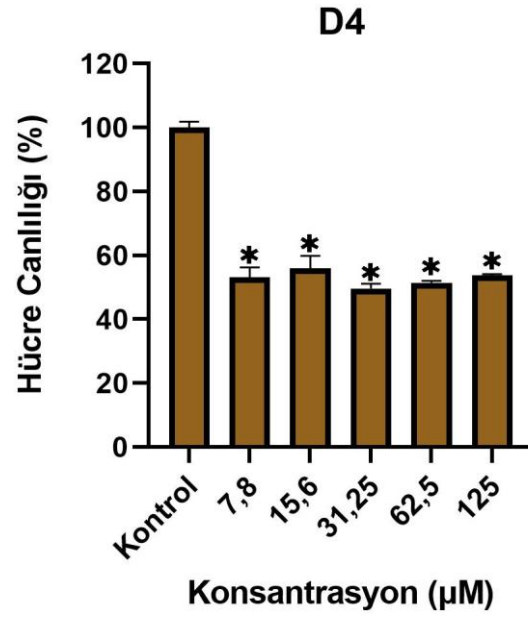
Farklı konsantrasyonlarda D1 maddesinin HT-29 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



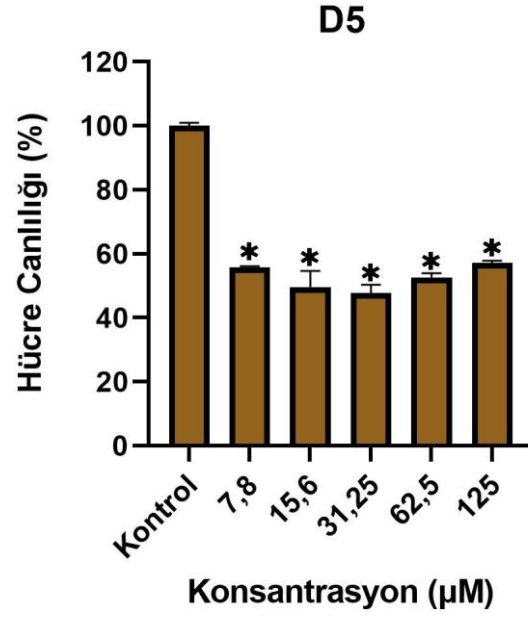
Farklı konsantrasyonlarda D2 maddesinin HT-29 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



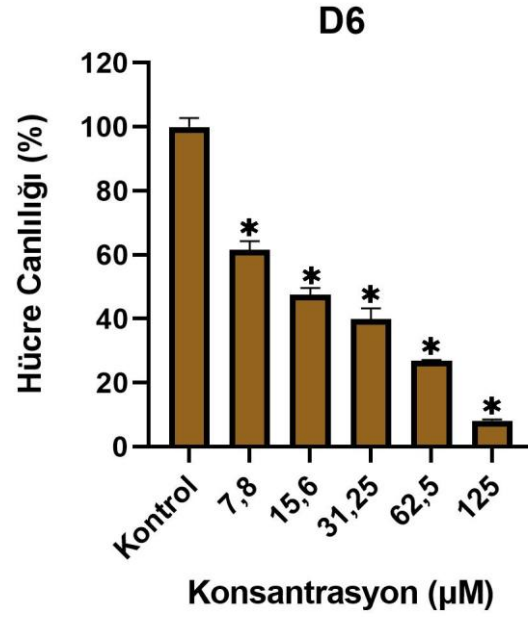
Farklı konsantrasyonlarda D3 maddesinin HT-29 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



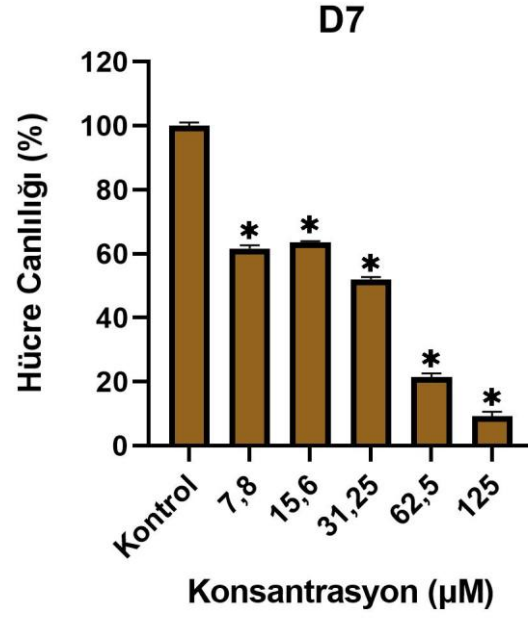
Farklı konsantrasyonlarda D4 maddesinin HT-29 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



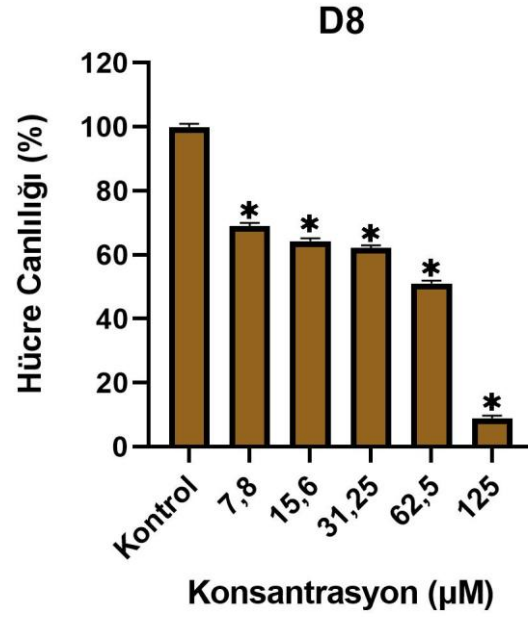
Farklı konsantrasyonlarda D5 maddesinin HT-29 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



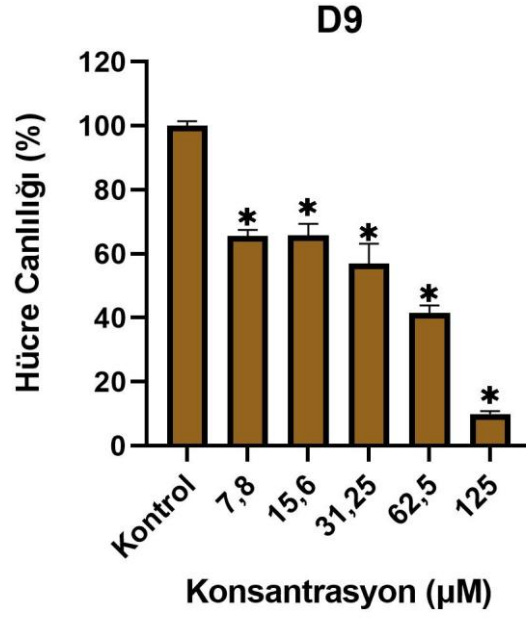
Farklı konsantrasyonlarda D6 maddesinin HT-29 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



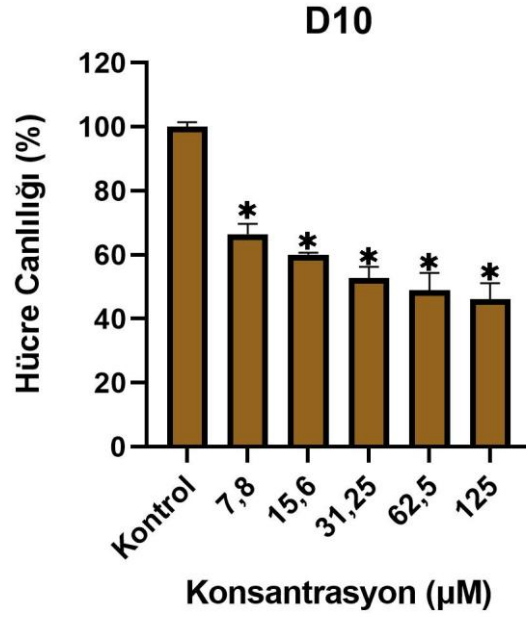
Farklı konsantrasyonlarda D7 maddesinin HT-29 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



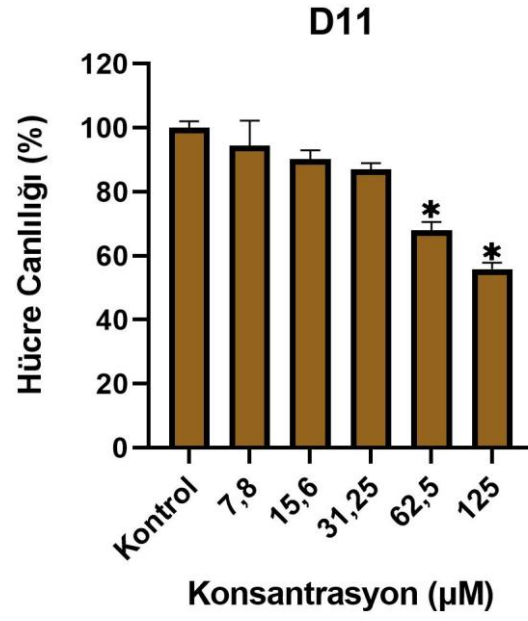
Farklı konsantrasyonlarda D8 maddesinin HT-29 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



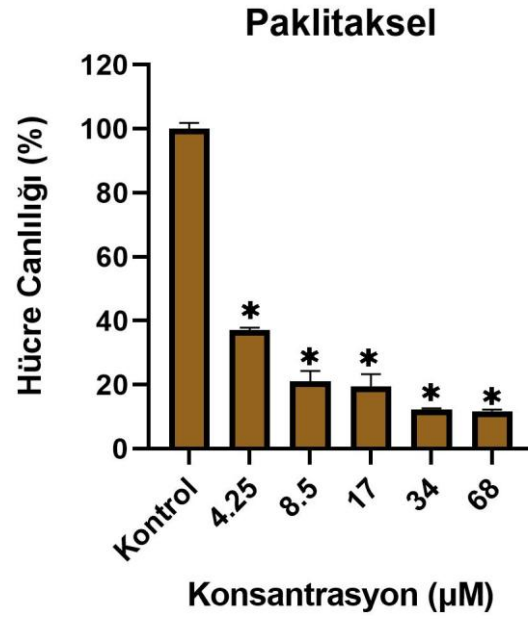
Farklı konsantrasyonlarda D9 maddesinin HT-29 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



Farklı konsantrasyonlarda D10 maddesinin HT-29 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

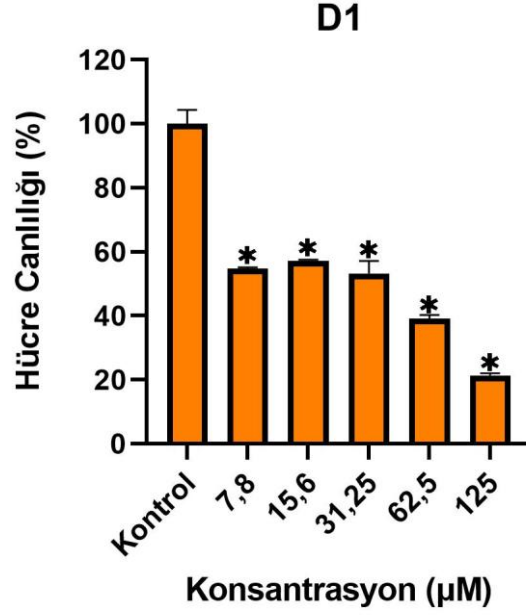


Farklı konsantrasyonlarda D11 maddesinin HT-29 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

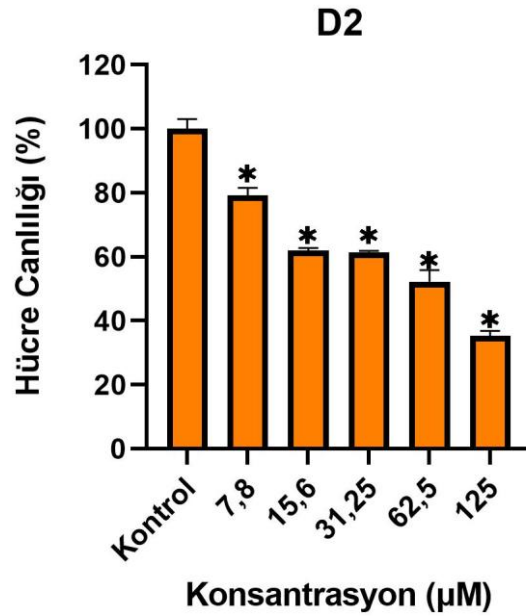


Farklı konsantrasyonlarda Paklitaksel maddesinin HT-29 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

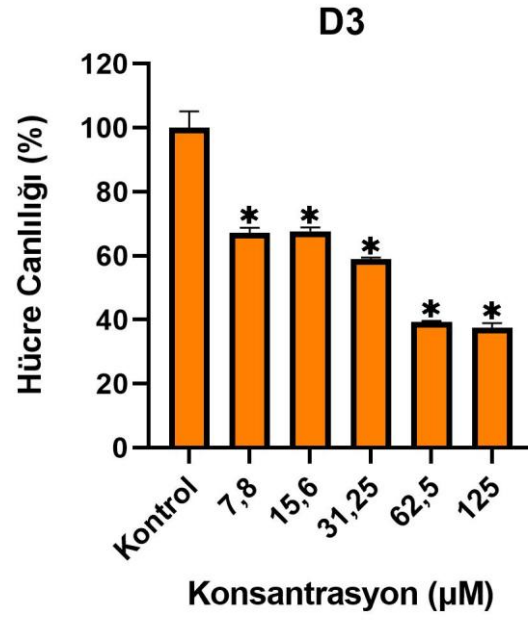
Ek 4. Test edilen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi



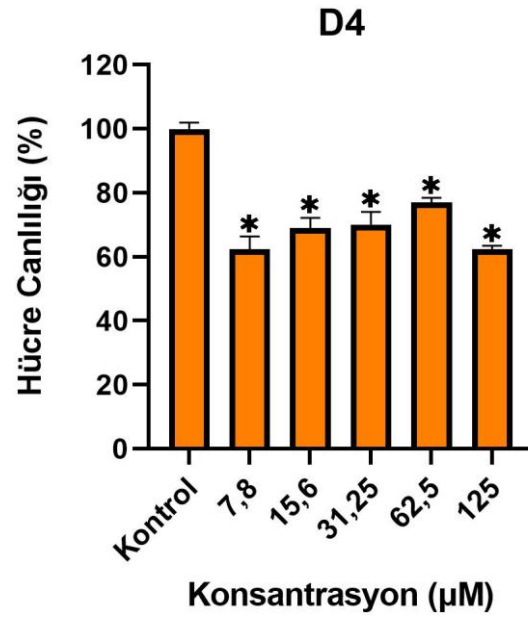
Farklı konsantrasyonlarda D1 maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



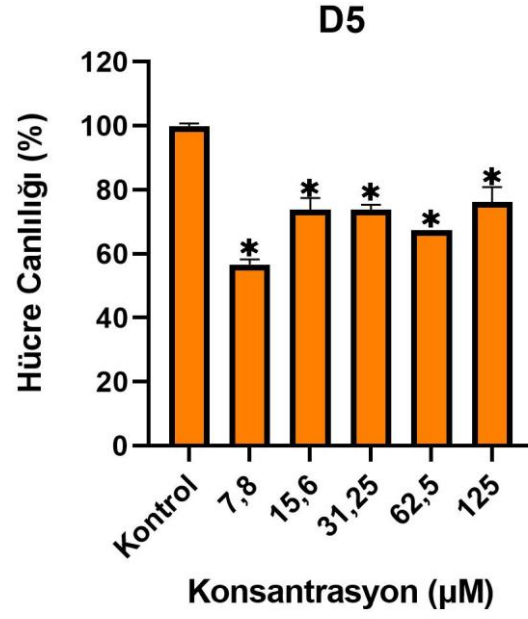
Farklı konsantrasyonlarda D2 maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



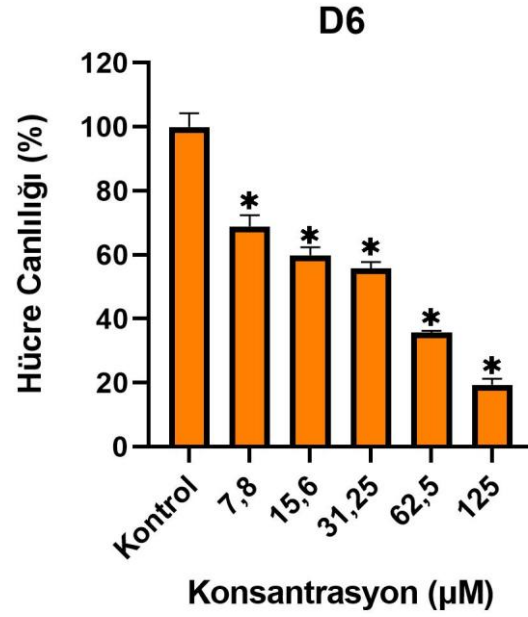
Farklı konsantrasyonlarda D3 maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



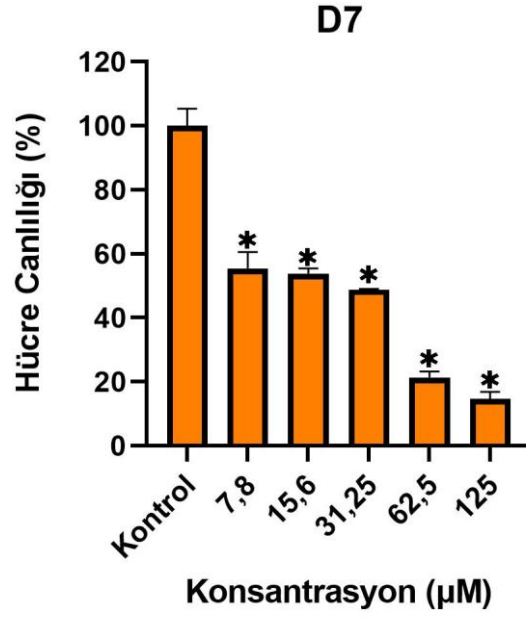
Farklı konsantrasyonlarda D4 maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



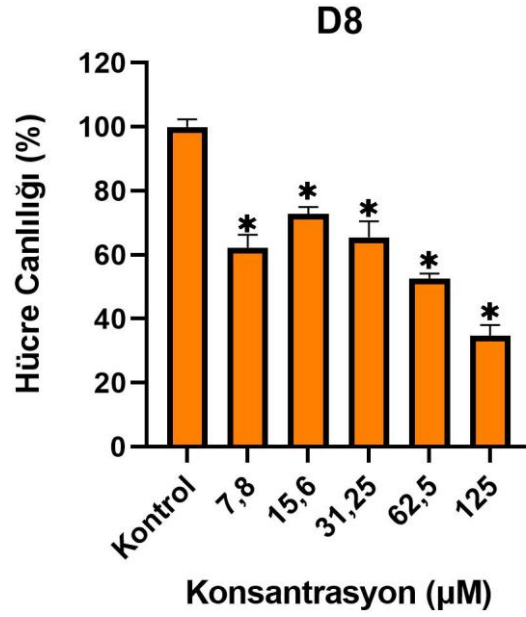
Farklı konsantrasyonlarda D5 maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



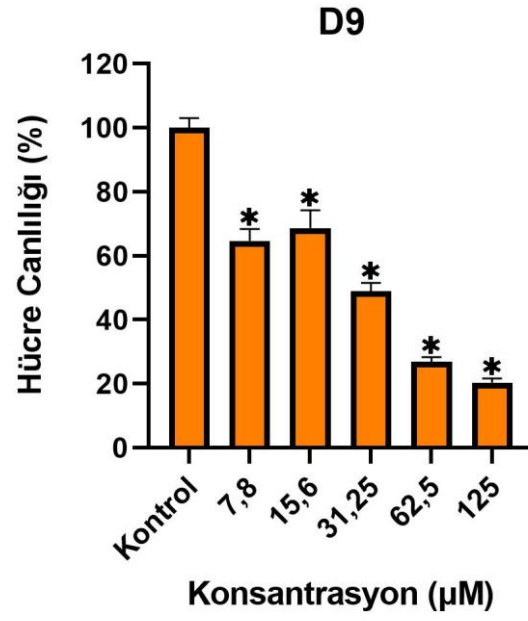
Farklı konsantrasyonlarda D6 maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



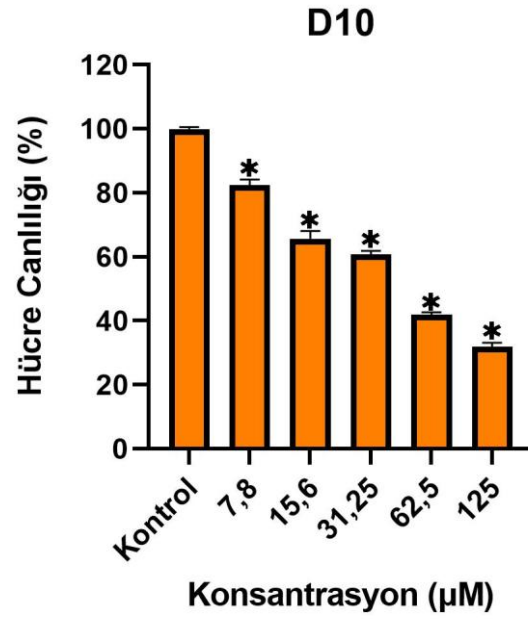
Farklı konsantrasyonlarda D7 maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



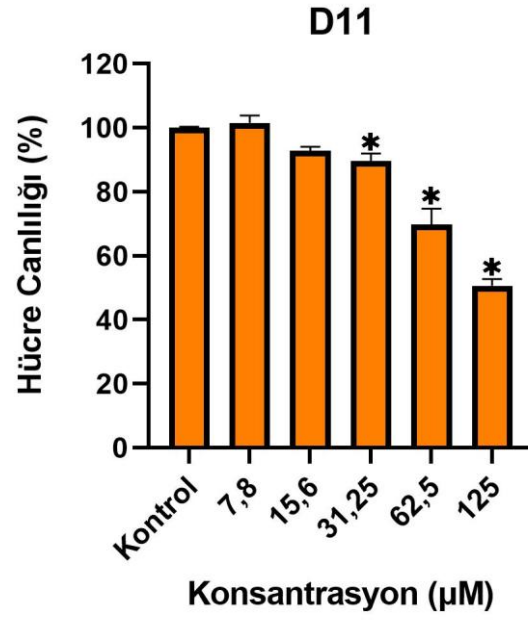
Farklı konsantrasyonlarda D8 maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



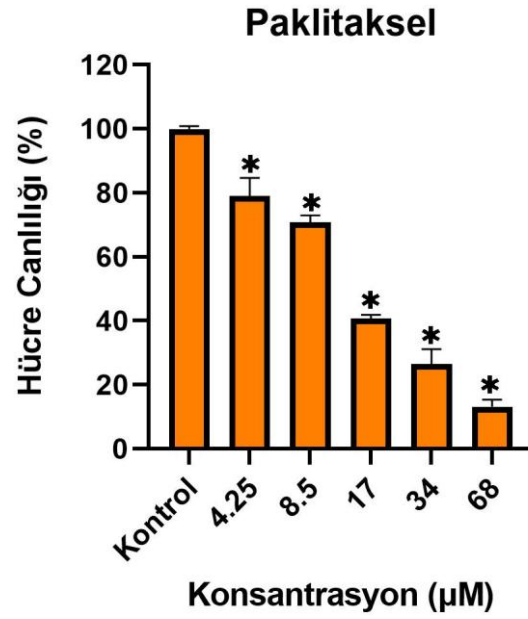
Farklı konsantrasyonlarda D9 maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



Farklı konsantrasyonlarda D10 maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

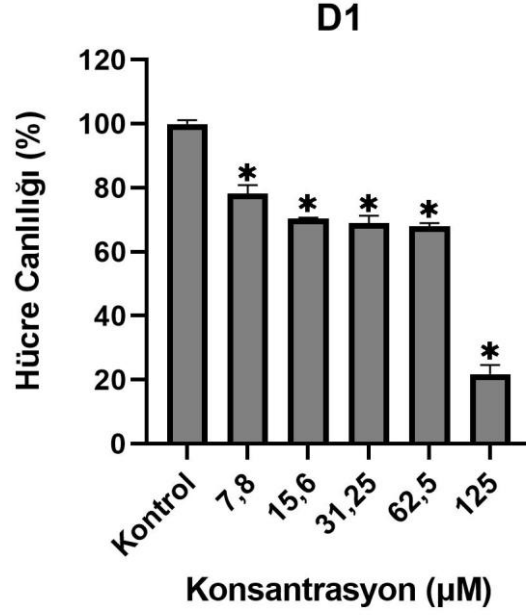


Farklı konsantrasyonlarda D11 maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).

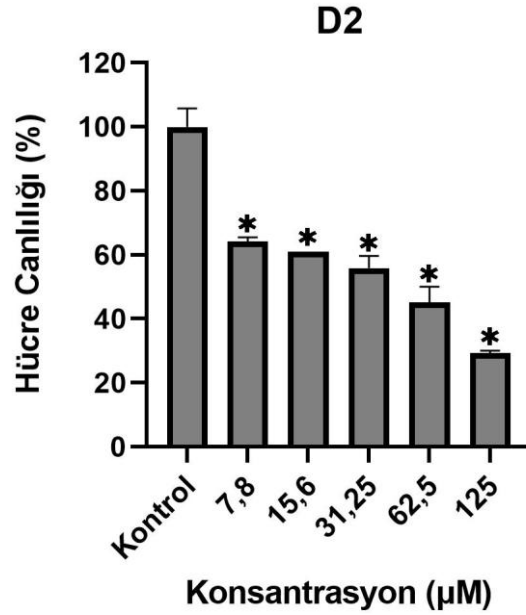


Farklı konsantrasyonlarda Paklitaksel maddesinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).

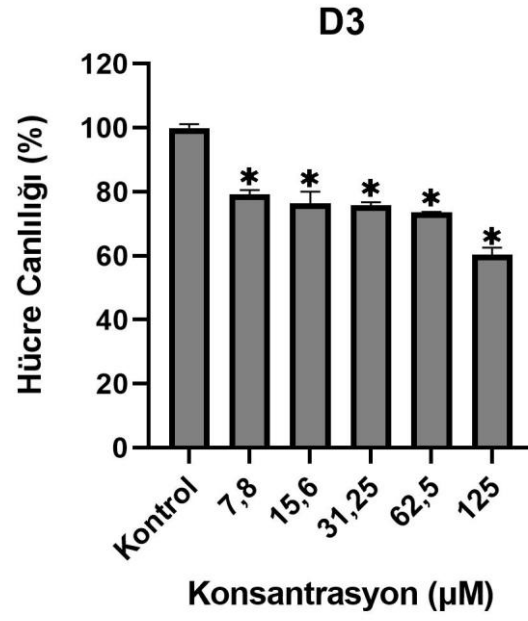
Ek 5. Test edilen bileşiklerin Panc-1 hücre hattı üzerindeki etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi



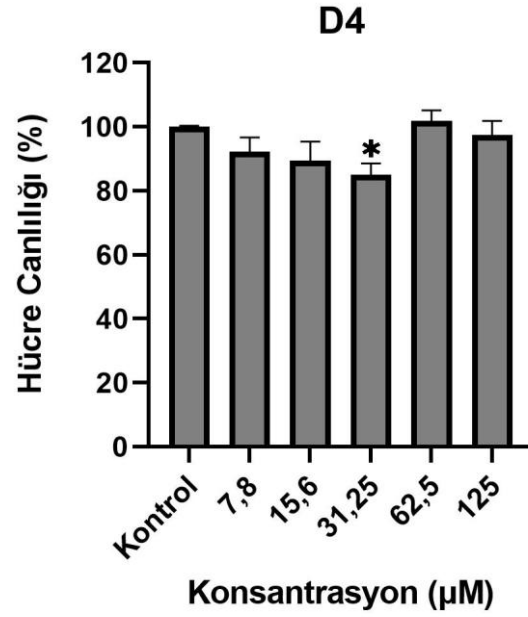
Farklı konsantrasyonlarda D1 maddesinin Panc-1 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



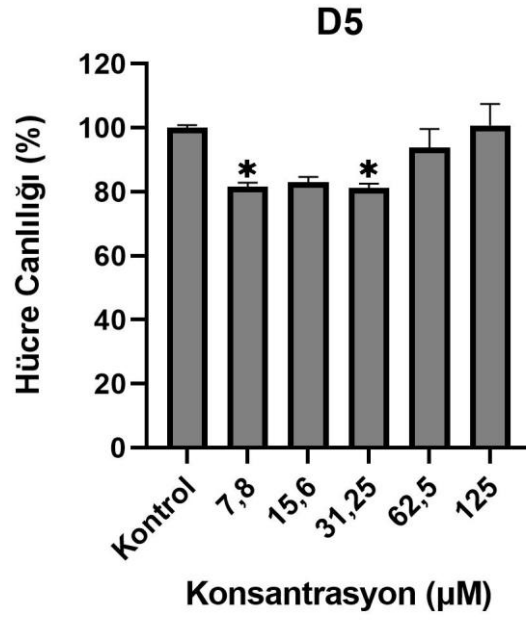
Farklı konsantrasyonlarda D2 maddesinin Panc-1 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



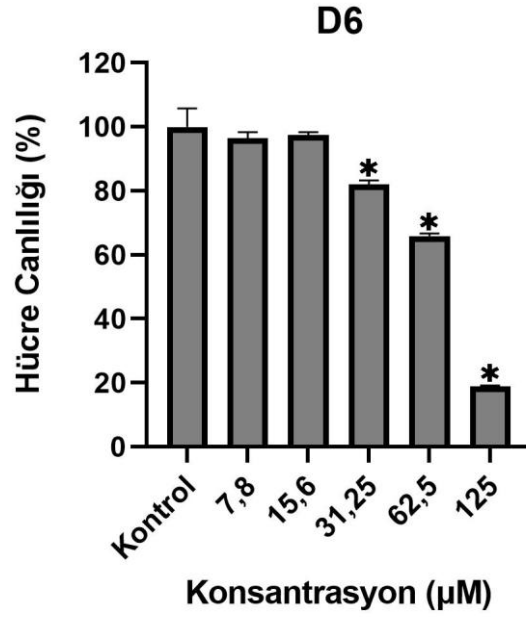
Farklı konsantrasyonlarda D3 maddesinin Panc-1 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



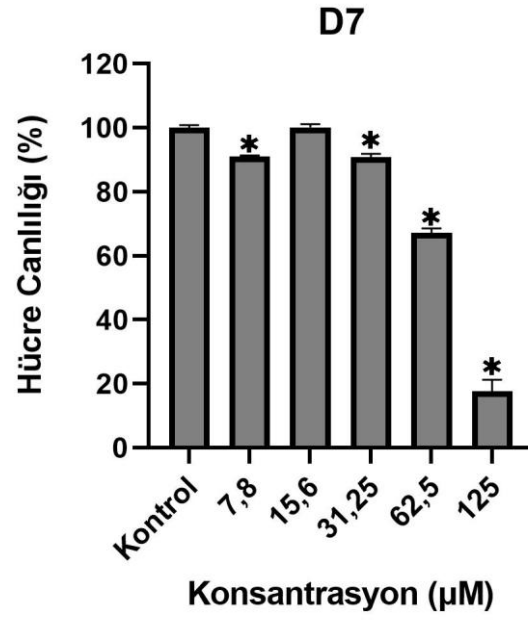
Farklı konsantrasyonlarda D4 maddesinin Panc-1 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



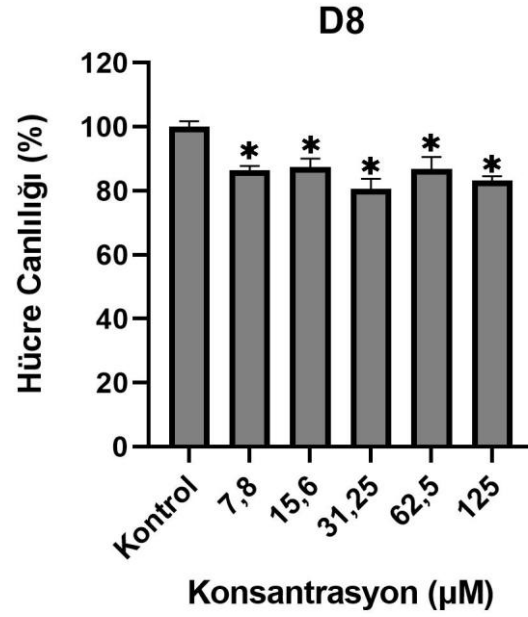
Farklı konsantrasyonlarda D5 maddesinin Panc-1 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



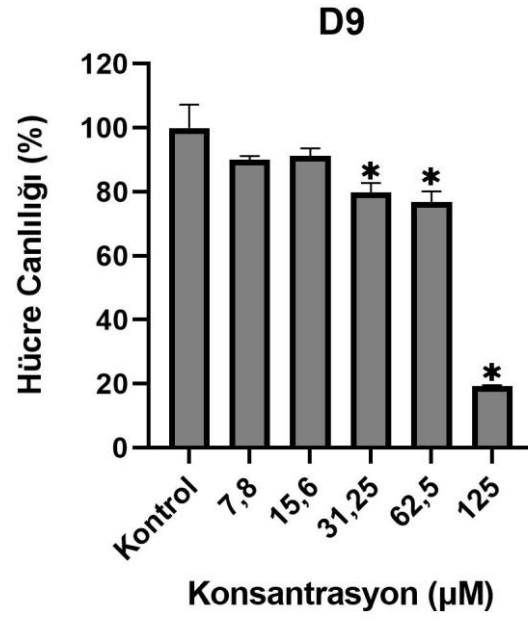
Farklı konsantrasyonlarda D6 maddesinin Panc-1 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



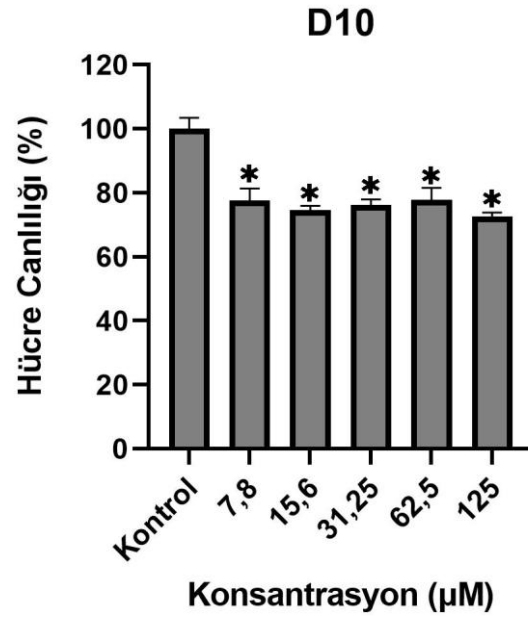
Farklı konsantrasyonlarda D7 maddesinin Panc-1 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



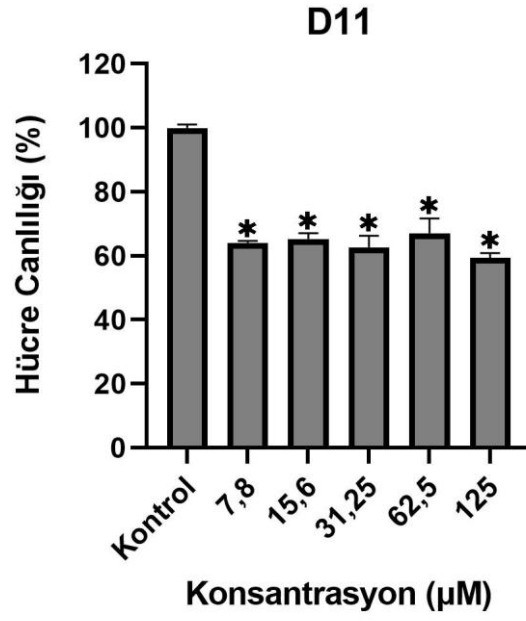
Farklı konsantrasyonlarda D8 maddesinin Panc-1 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



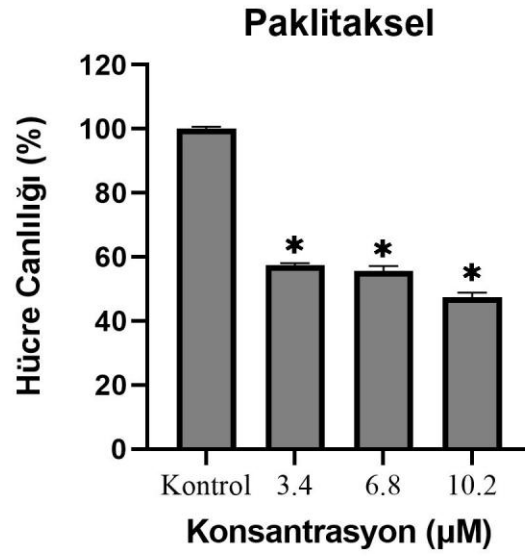
Farklı konsantrasyonlarda D9 maddesinin Panc-1 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



Farklı konsantrasyonlarda D10 maddesinin Panc-1 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

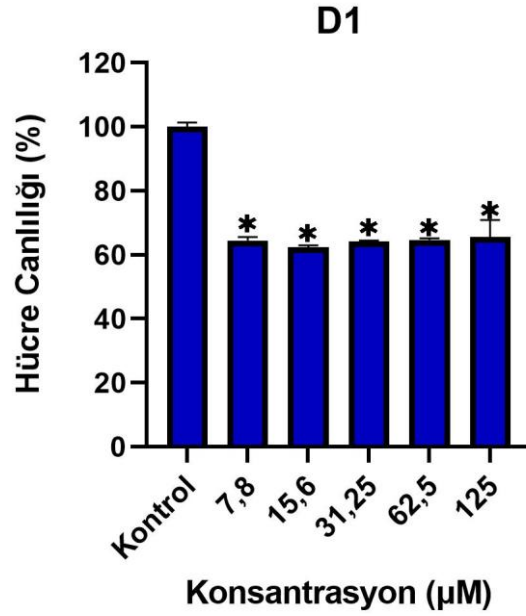


Farklı konsantrasyonlarda D11 maddesinin Panc-1 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

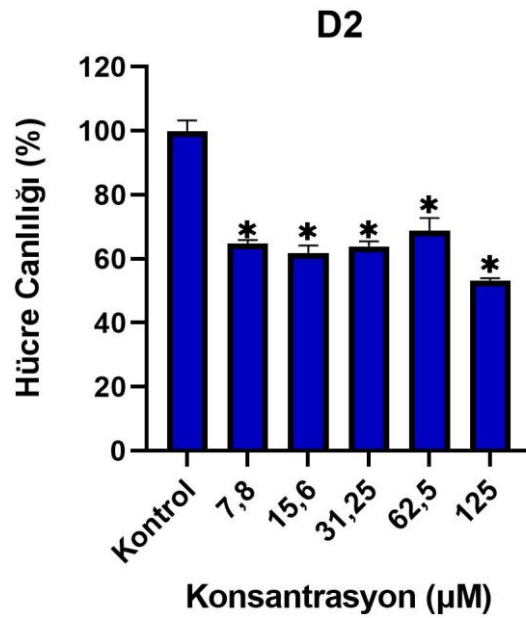


Farklı konsantrasyonlarda Paklitaksel maddesinin Panc-1 hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

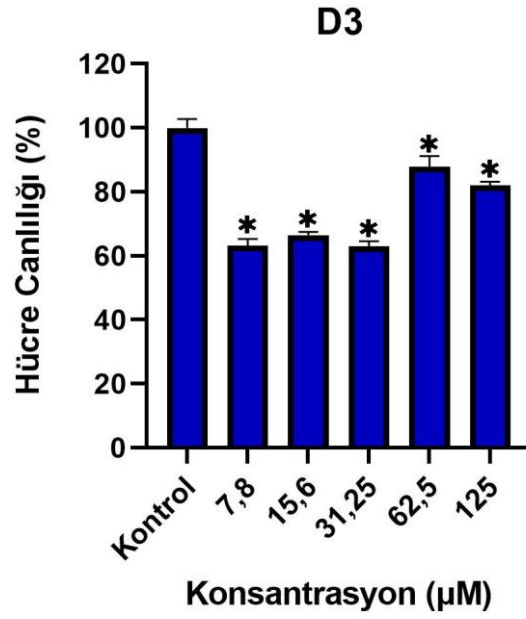
Ek 6. Test edilen bileşiklerin HUVEC hücre hattı üzerindeki etkisinin sütun grafiği olarak gösterilmesi



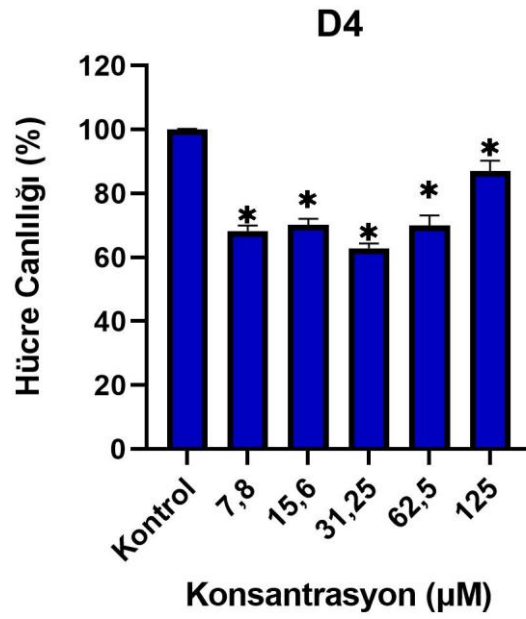
Farklı konsantrasyonlarda D1 maddesinin HUVEC hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



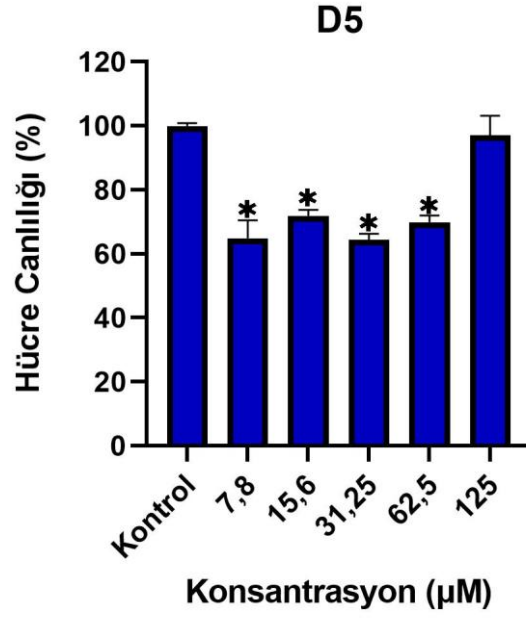
Farklı konsantrasyonlarda D2 maddesinin HUVEC hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).



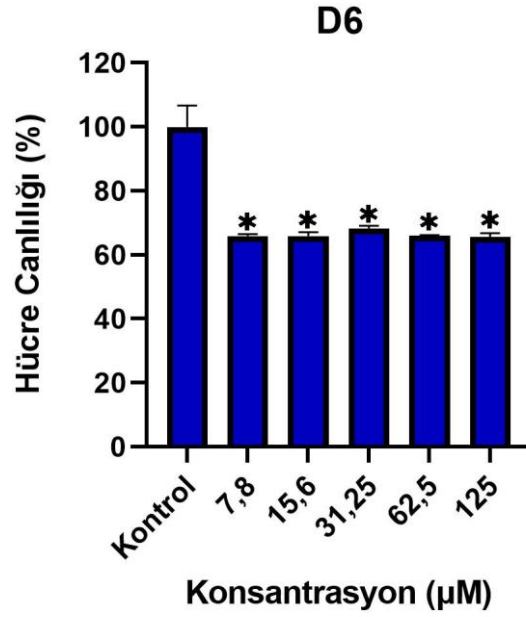
Farklı konsantrasyonlarda D3 maddesinin HUVEC hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



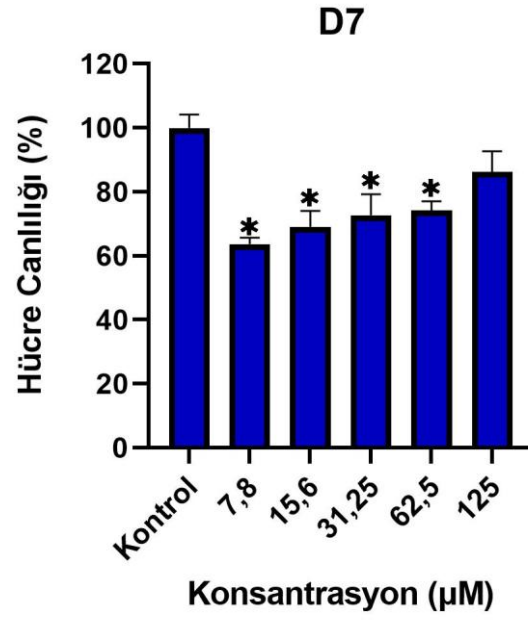
Farklı konsantrasyonlarda D4 maddesinin HUVEC hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



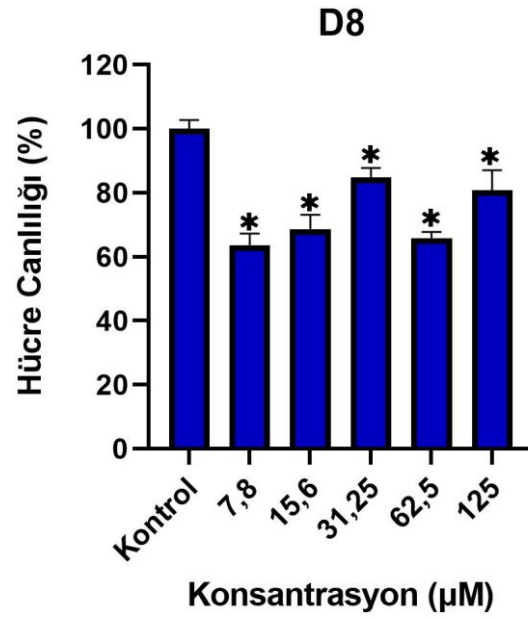
Farklı konsantrasyonlarda D5 maddesinin HUVEC hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



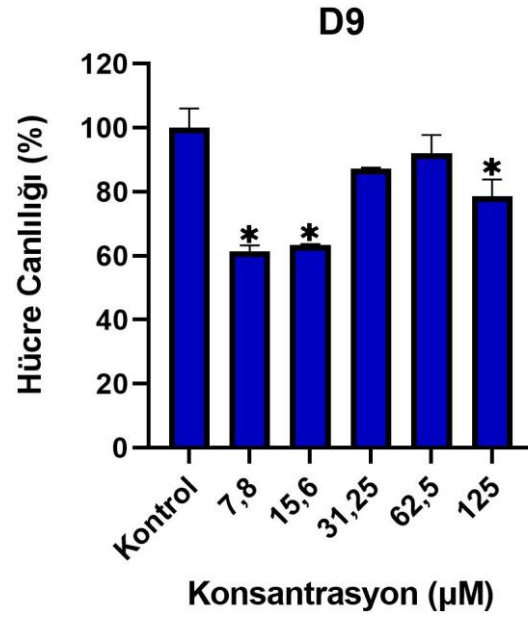
Farklı konsantrasyonlarda D6 maddesinin HUVEC hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



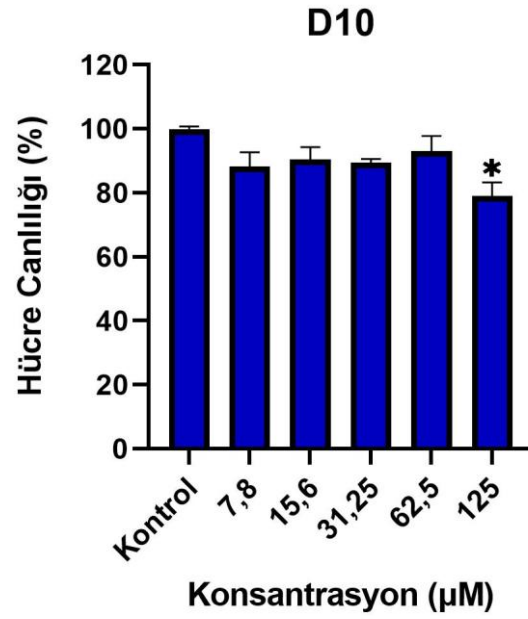
Farklı konsantrasyonlarda D7 maddesinin HUVEC hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



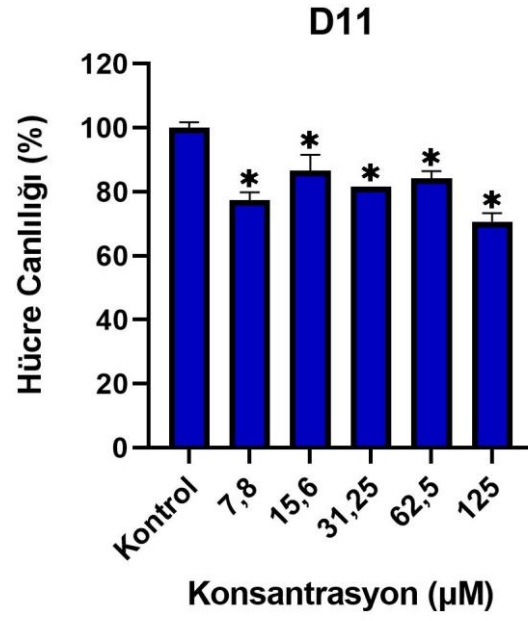
Farklı konsantrasyonlarda D8 maddesinin HUVEC hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



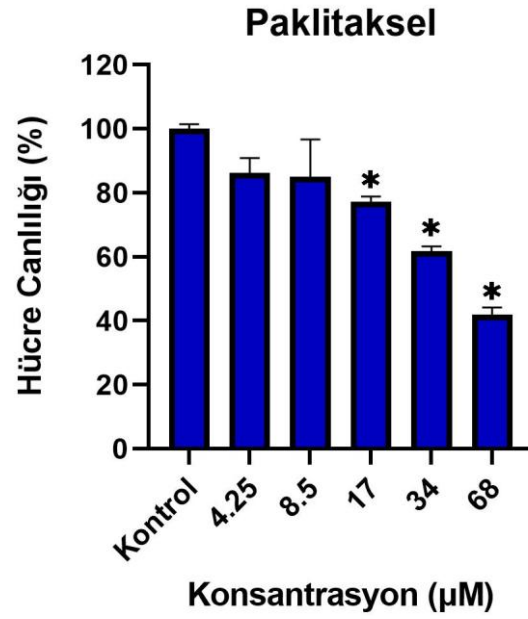
Farklı konsantrasyonlarda D9 maddesinin HUVEC hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).



Farklı konsantrasyonlarda D10 maddesinin HUVEC hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).

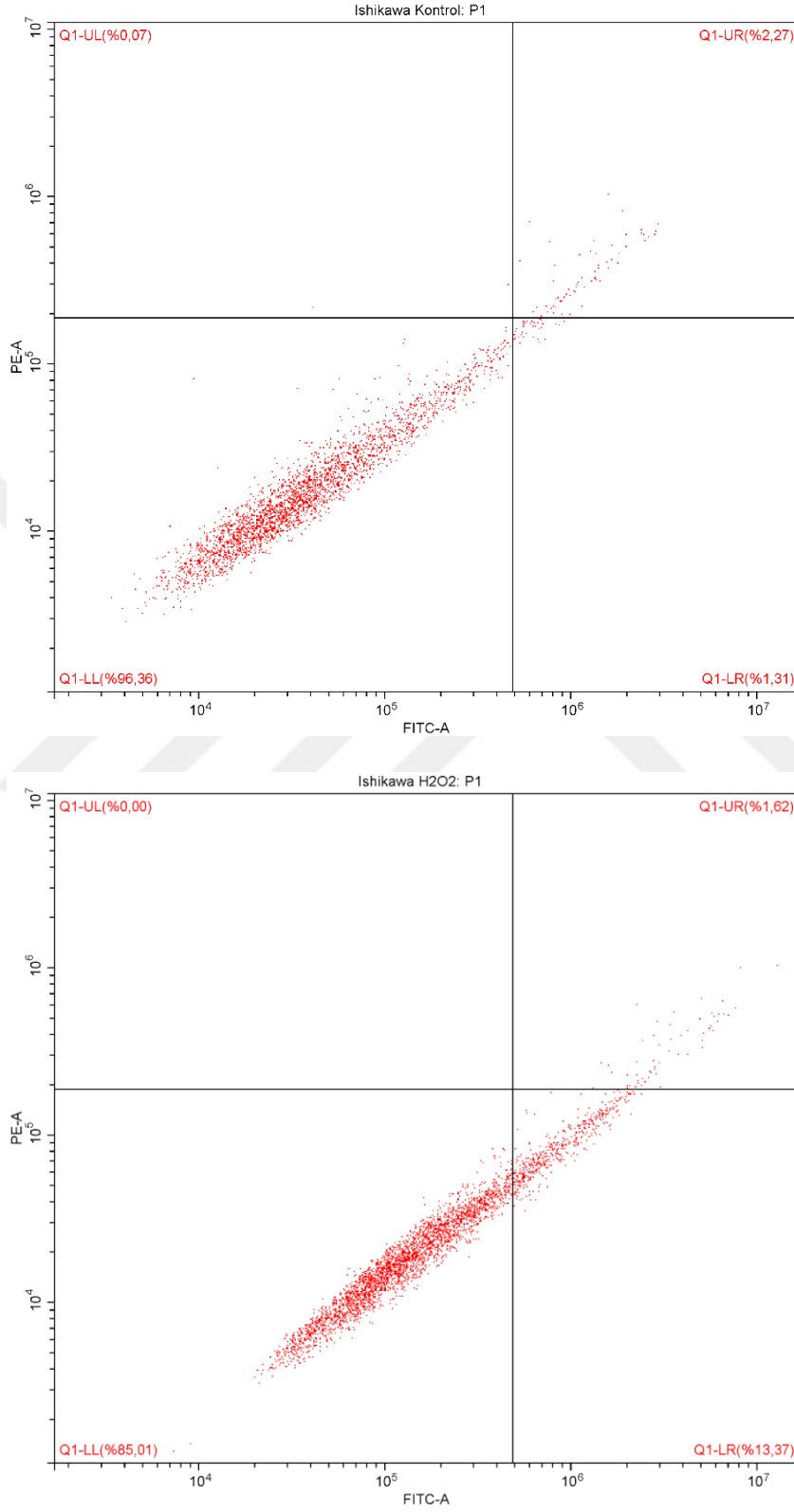


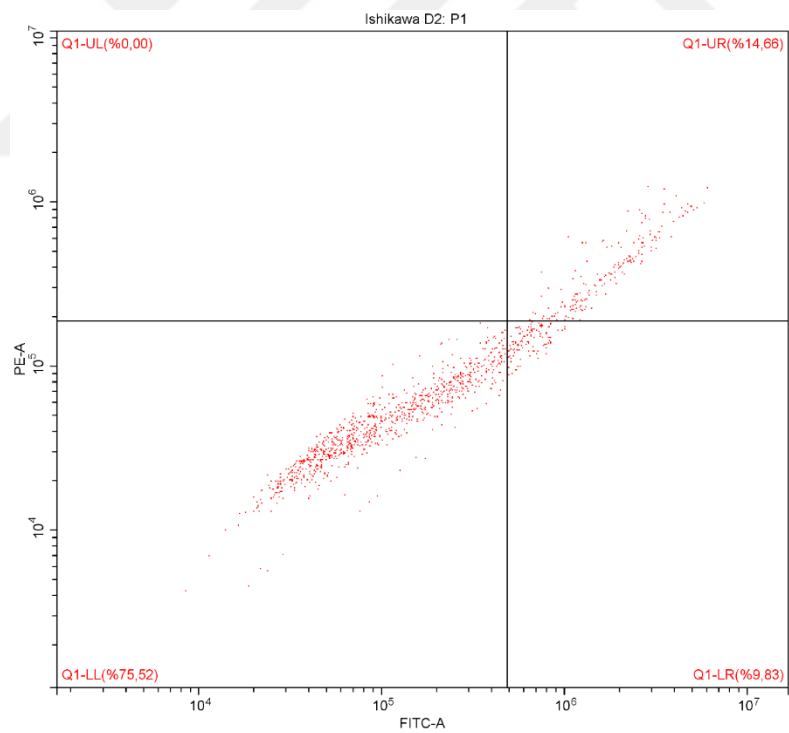
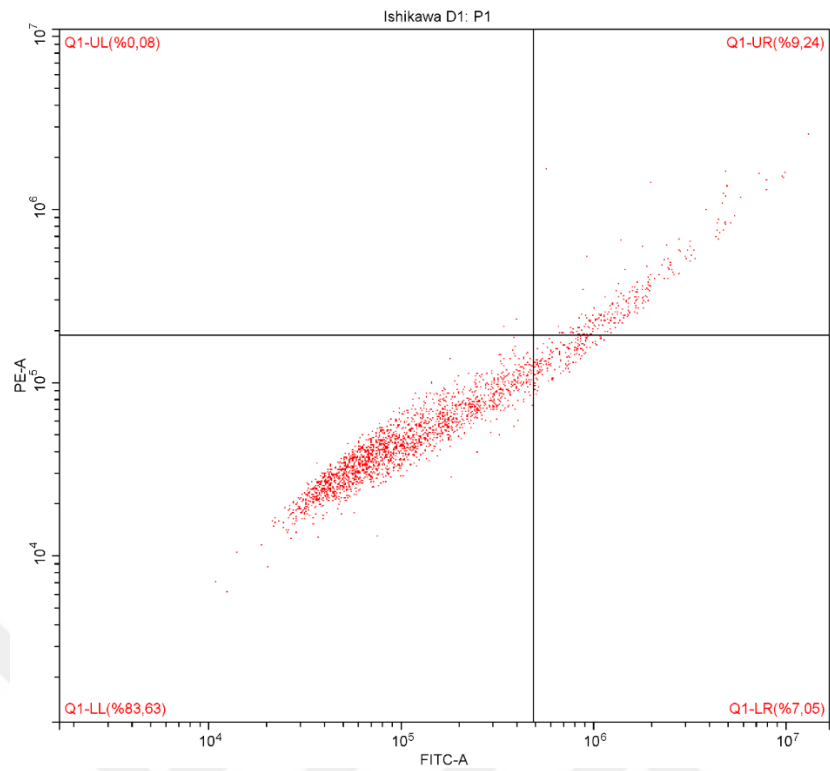
Farklı konsantrasyonlarda D11 maddesinin HUVEC hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

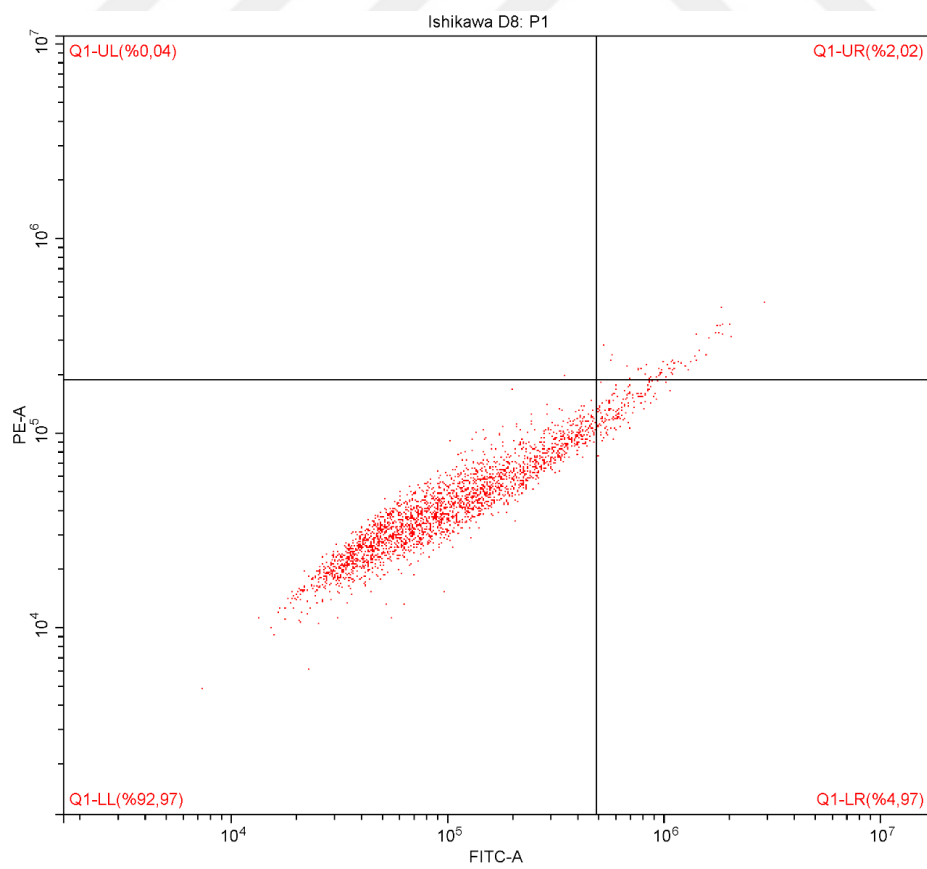
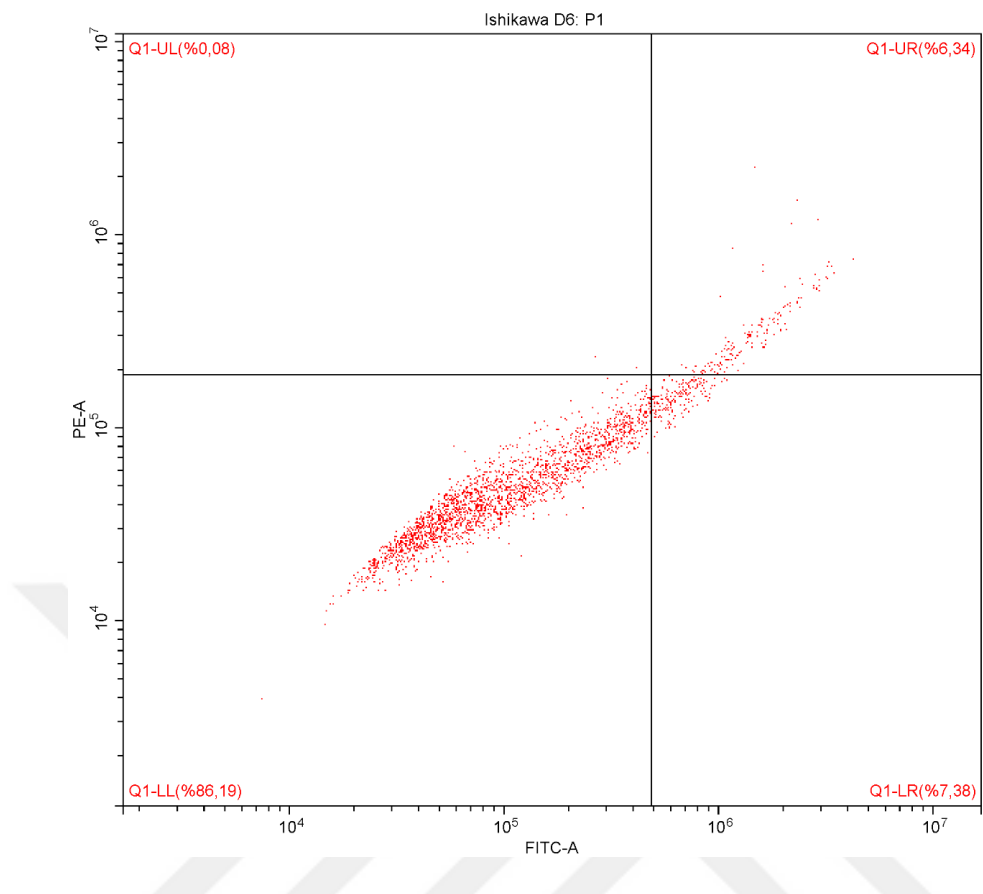


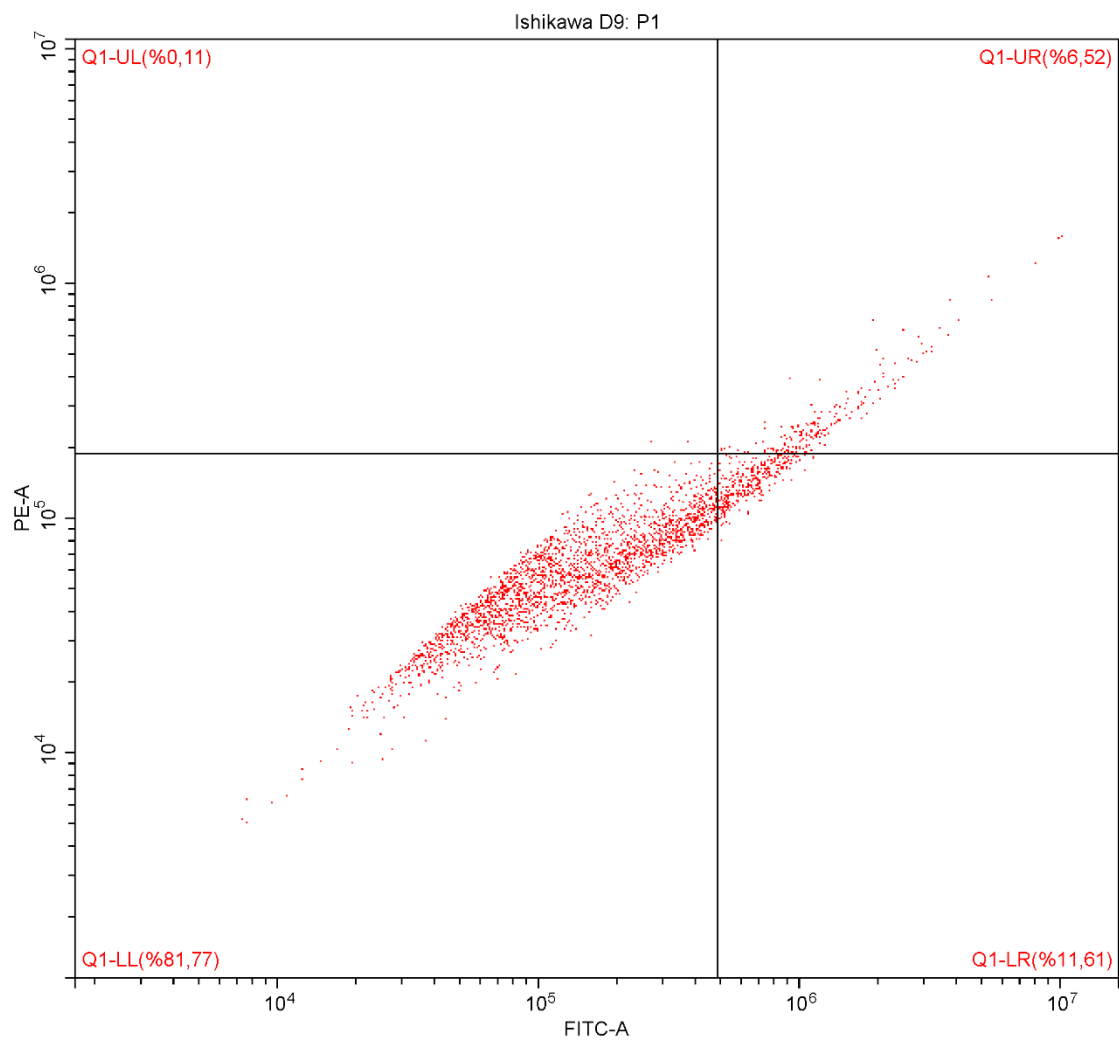
Farklı konsantrasyonlarda Paklitaksel maddesinin HUVEC hücre hattı üzerinde 24 saat uygulanması sonucu hücre canlılığına etkisi. *İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$).

Ek 7. Test edilen bileşiklerin **Ishikawa** hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin Flow sitometri cihazı yardımıyla belirlenmesi

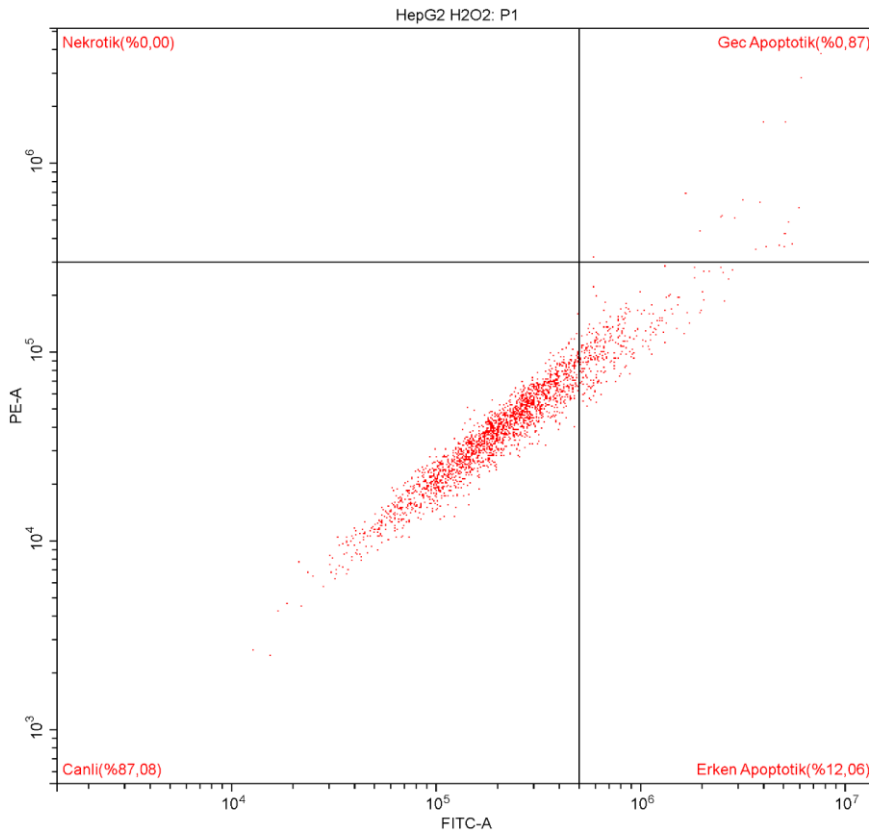
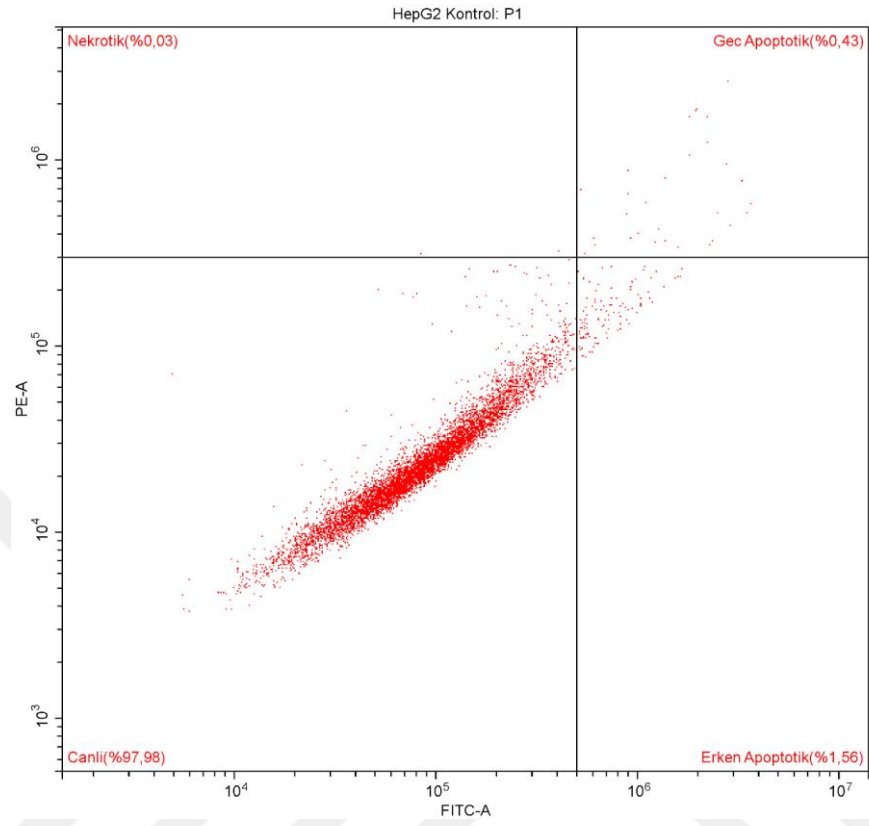


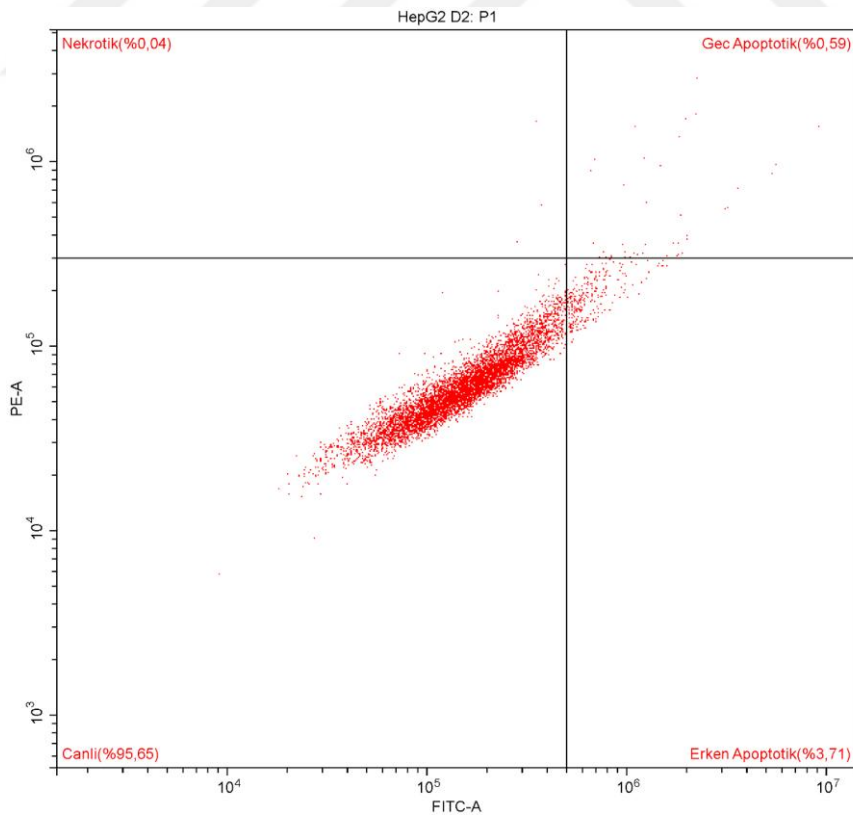
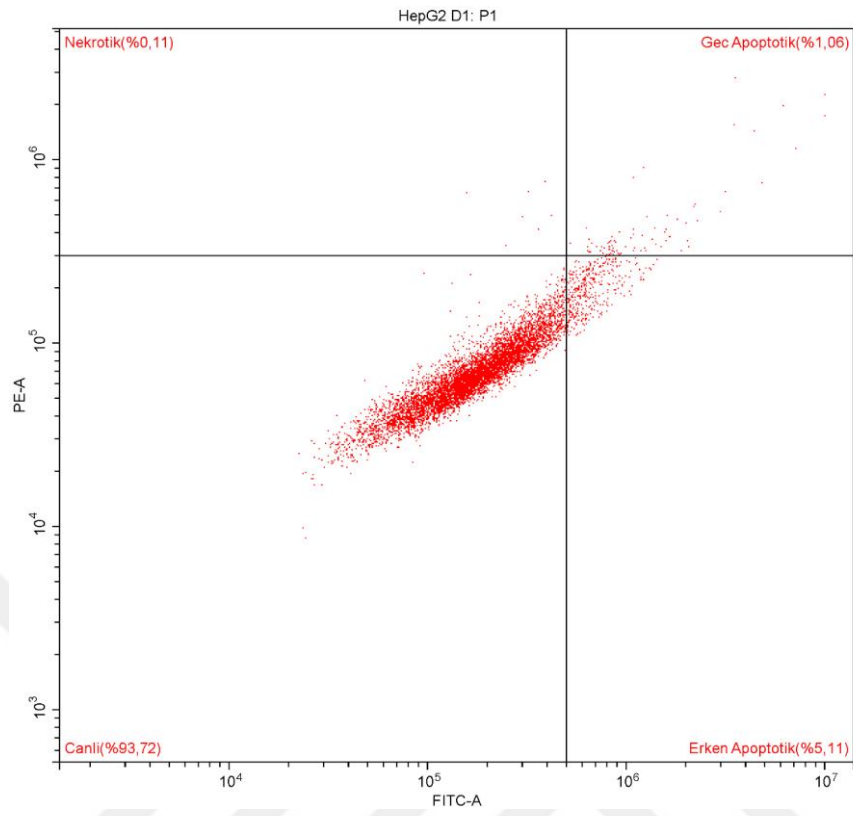


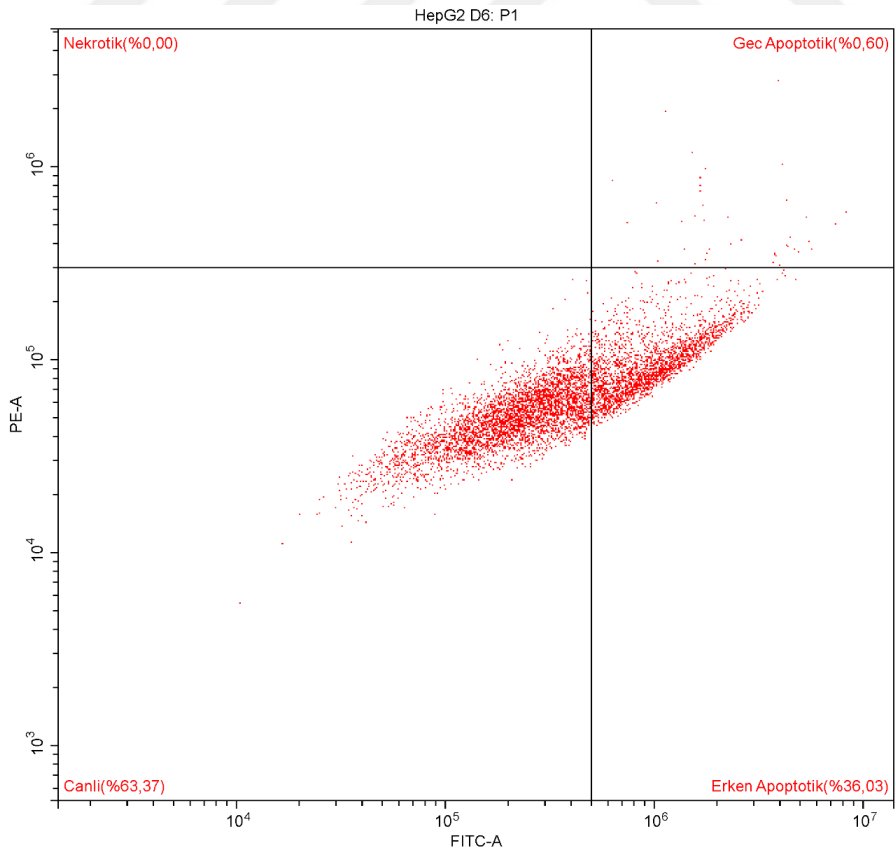
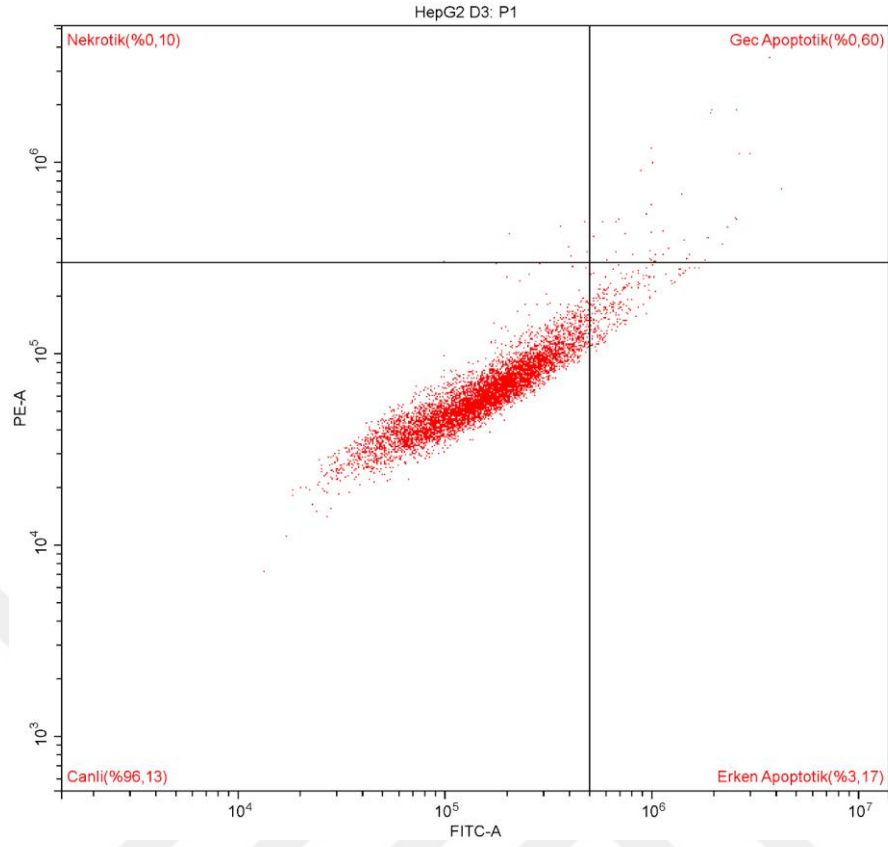


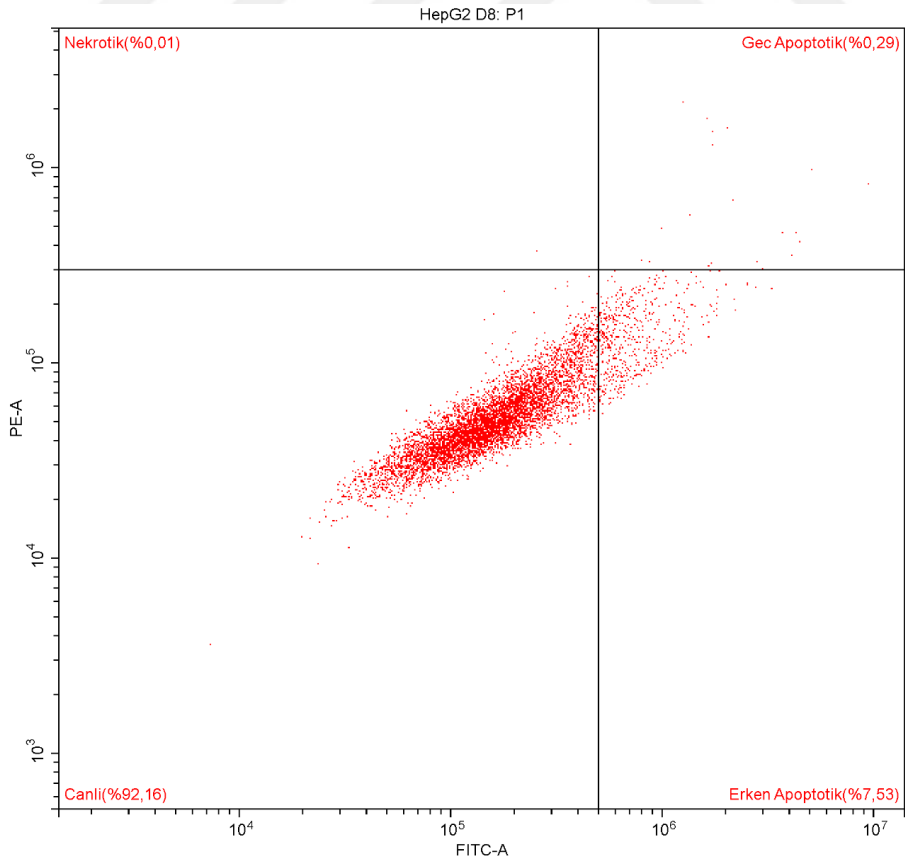
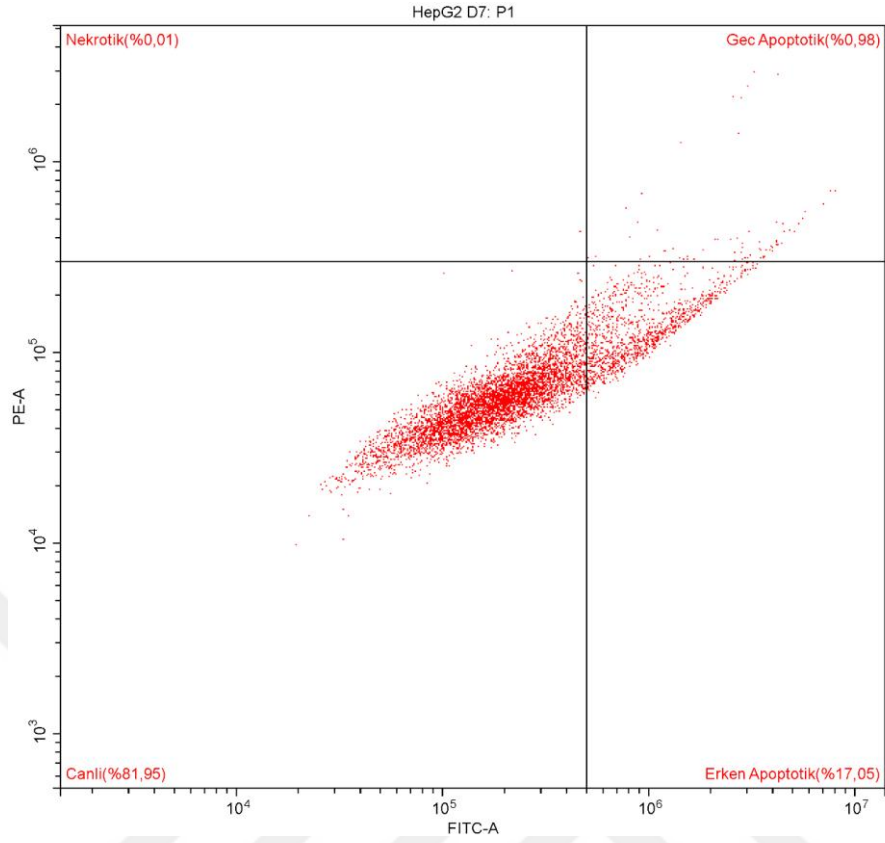


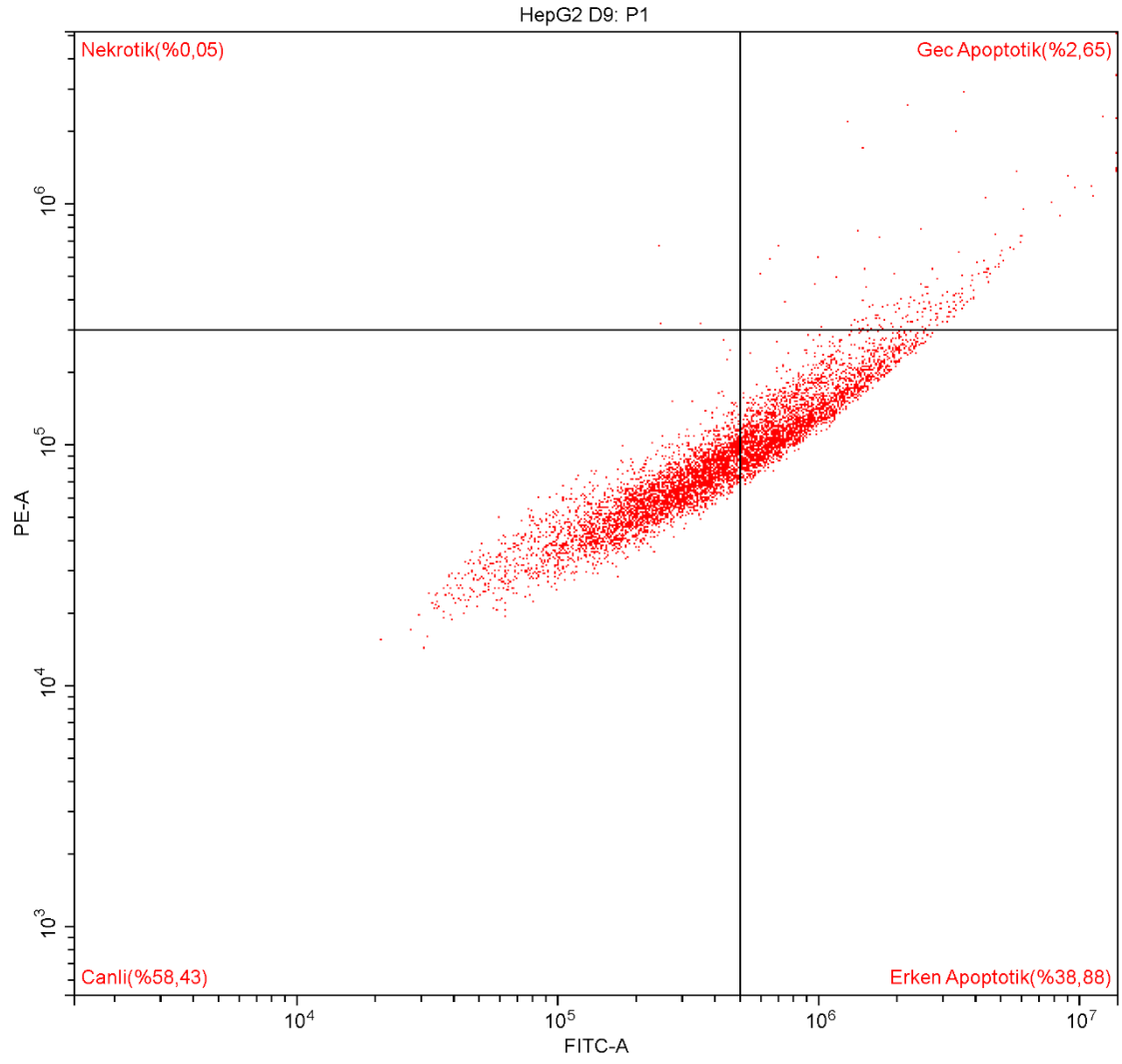
Ek 8. Test edilen bileşiklerin **HepG2** hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin Flow sitometri cihazı yardımıyla belirlenmesi



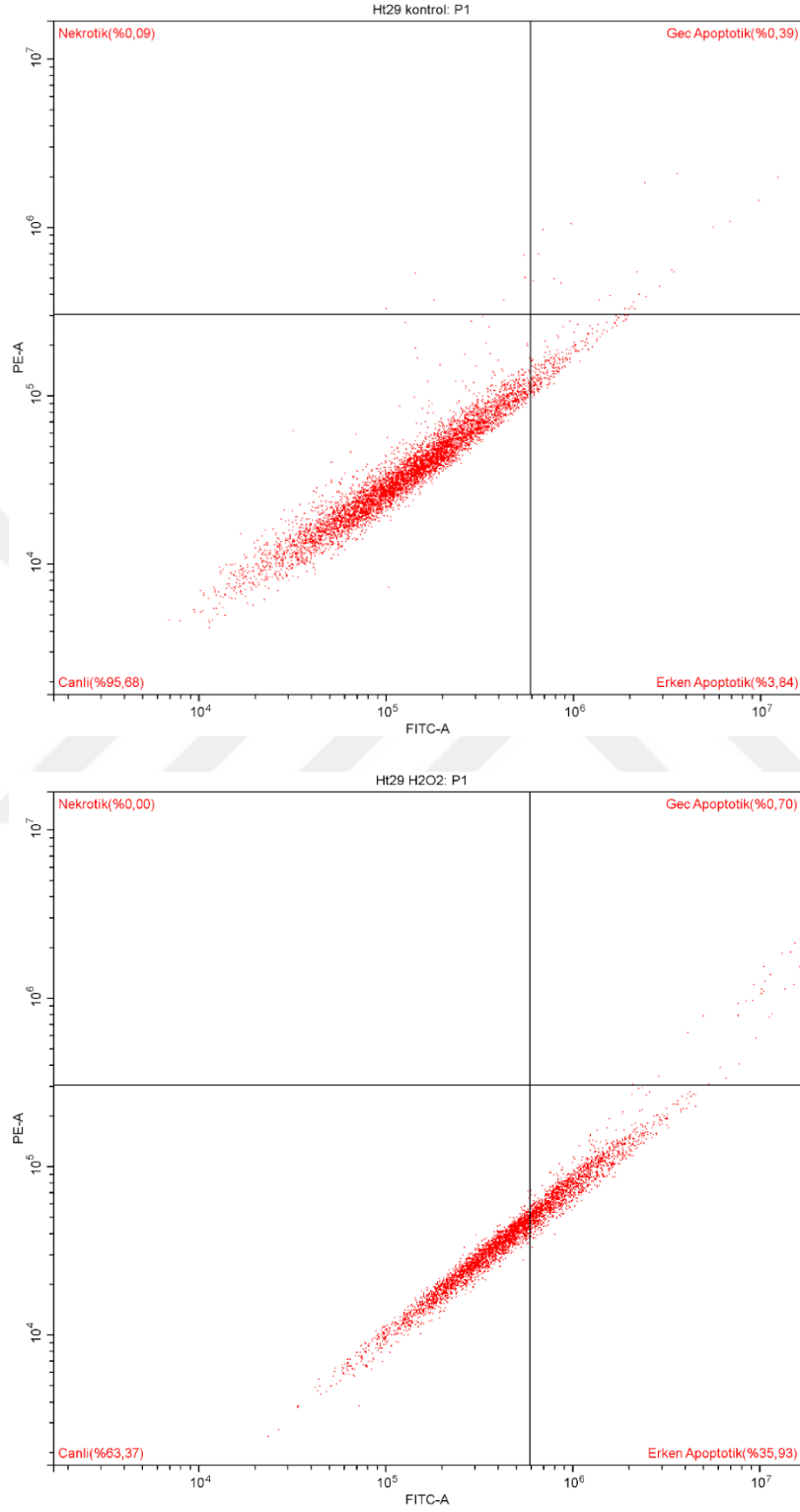


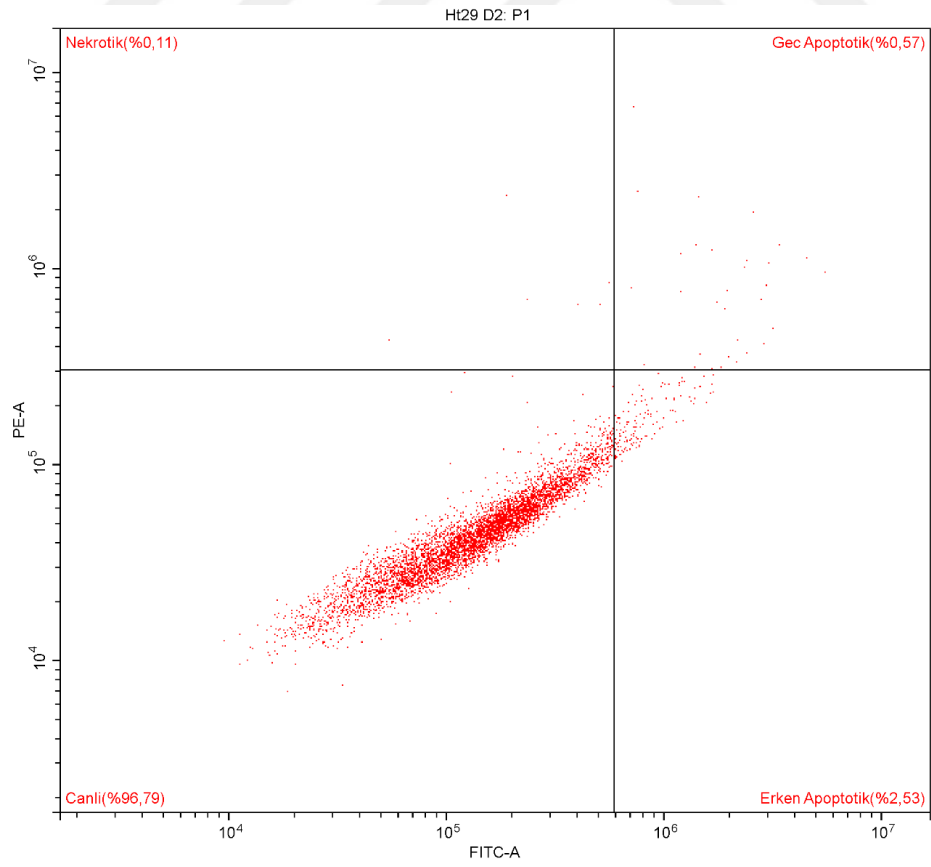
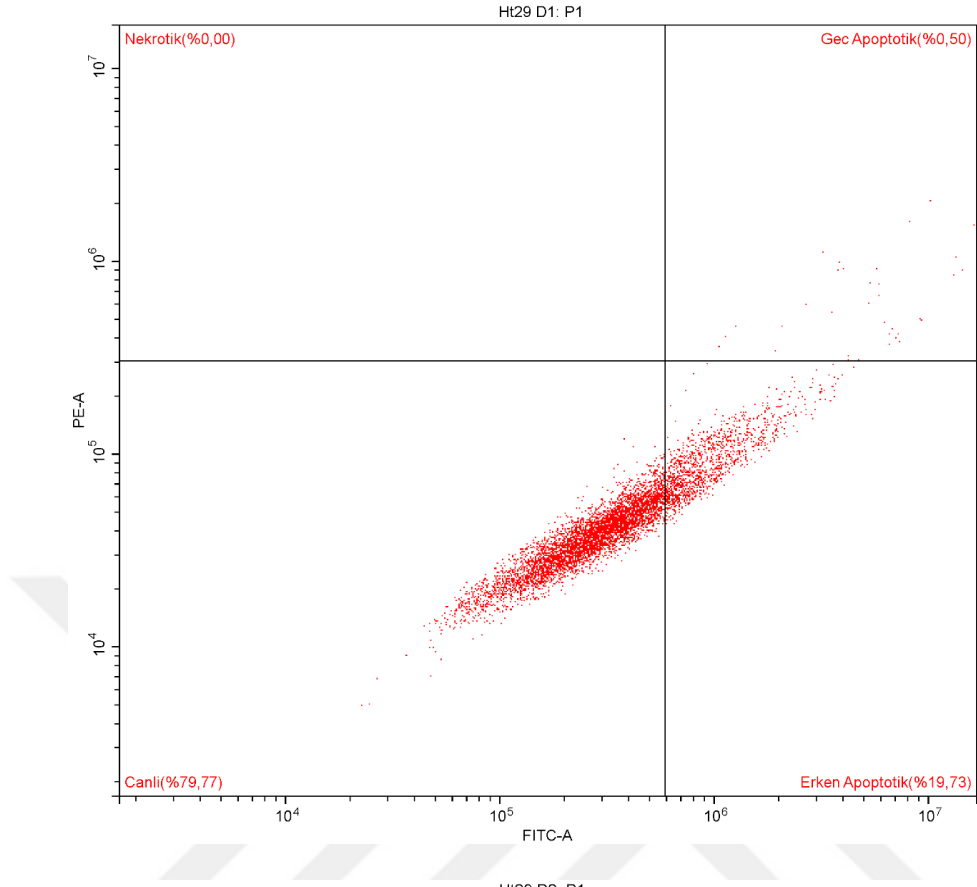


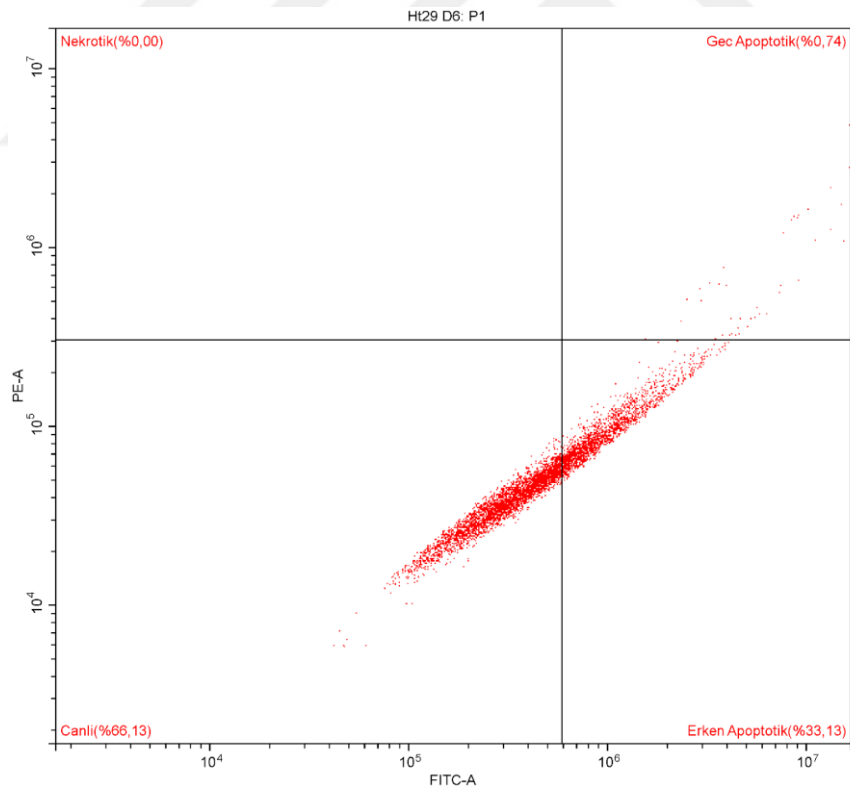
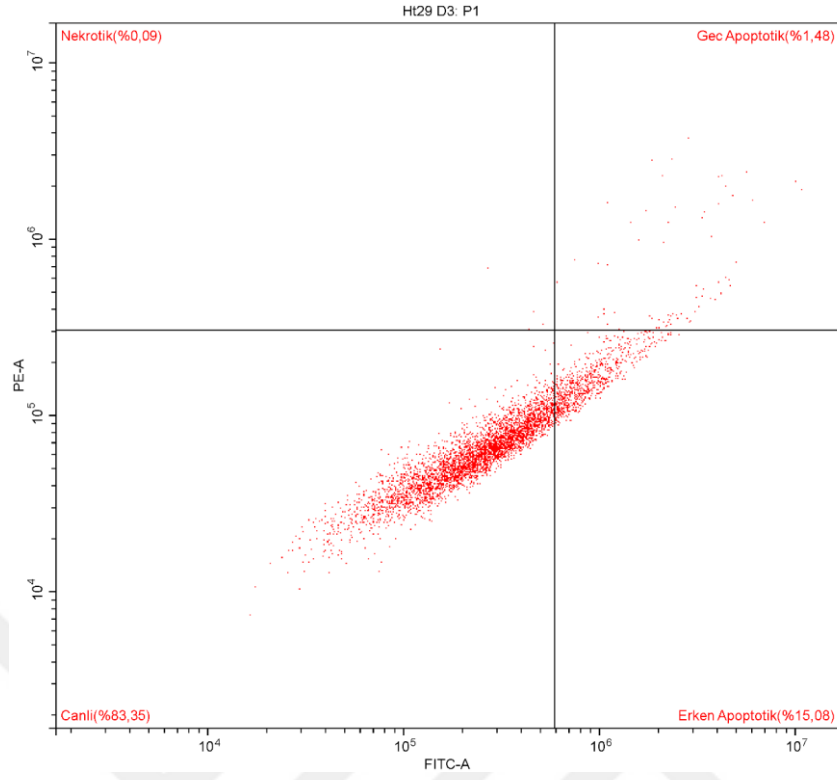


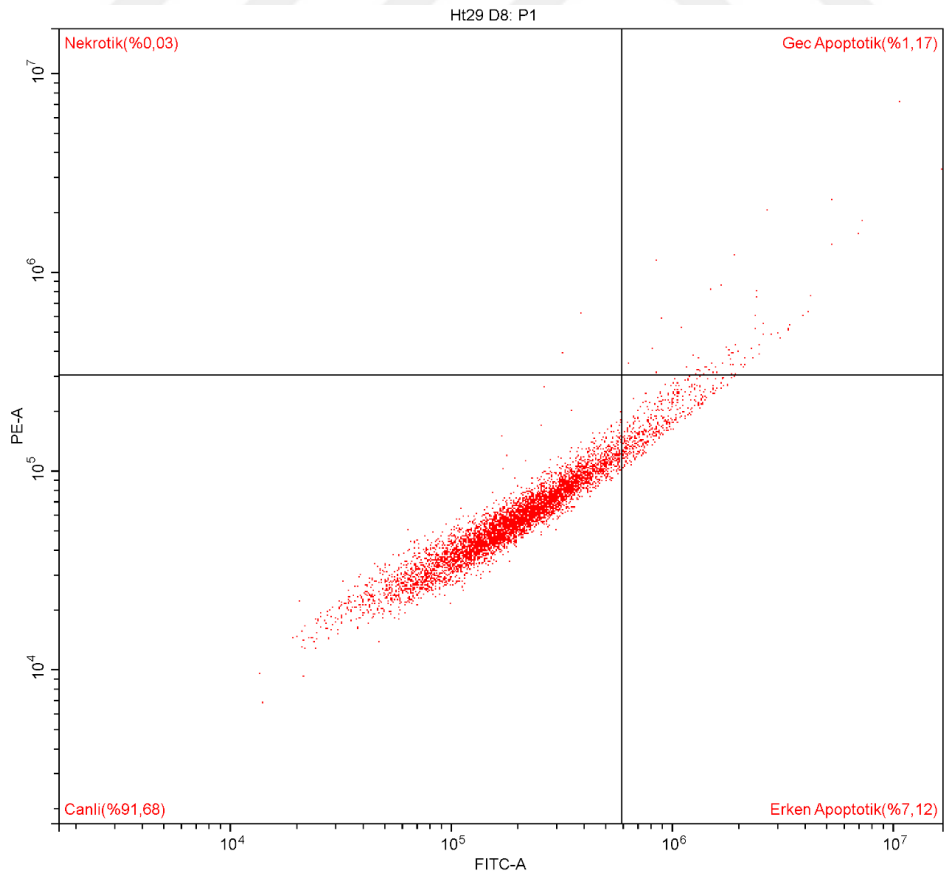
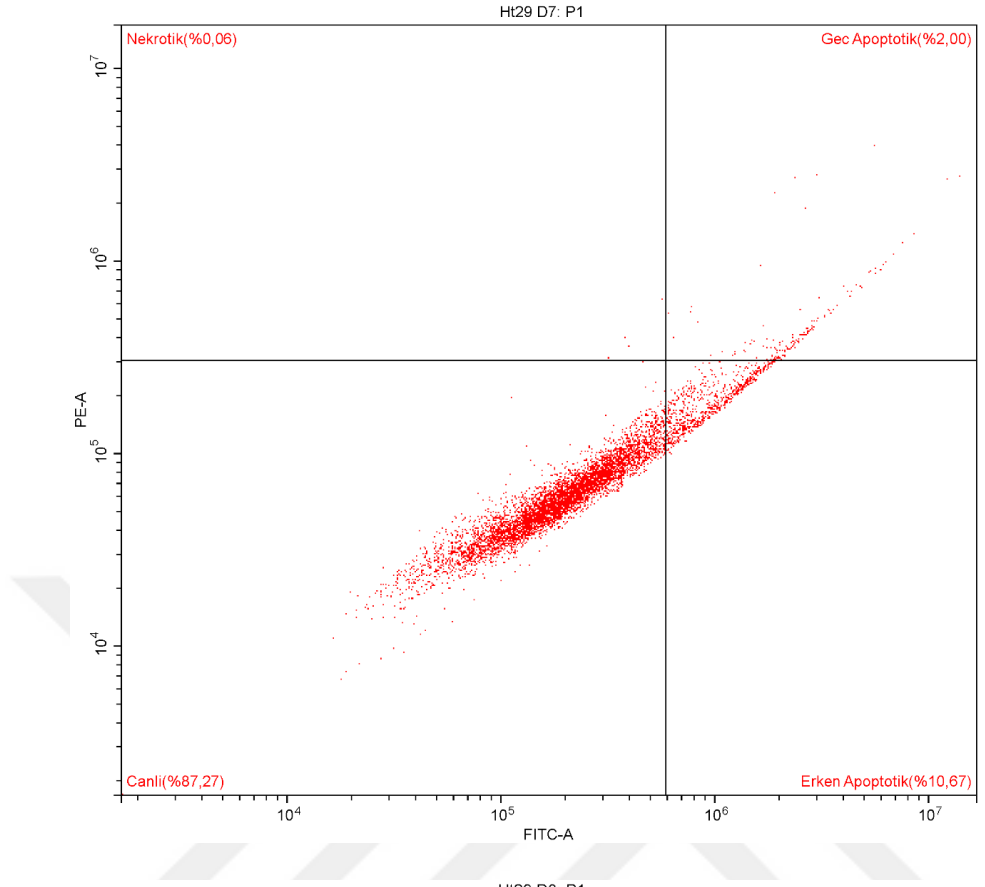


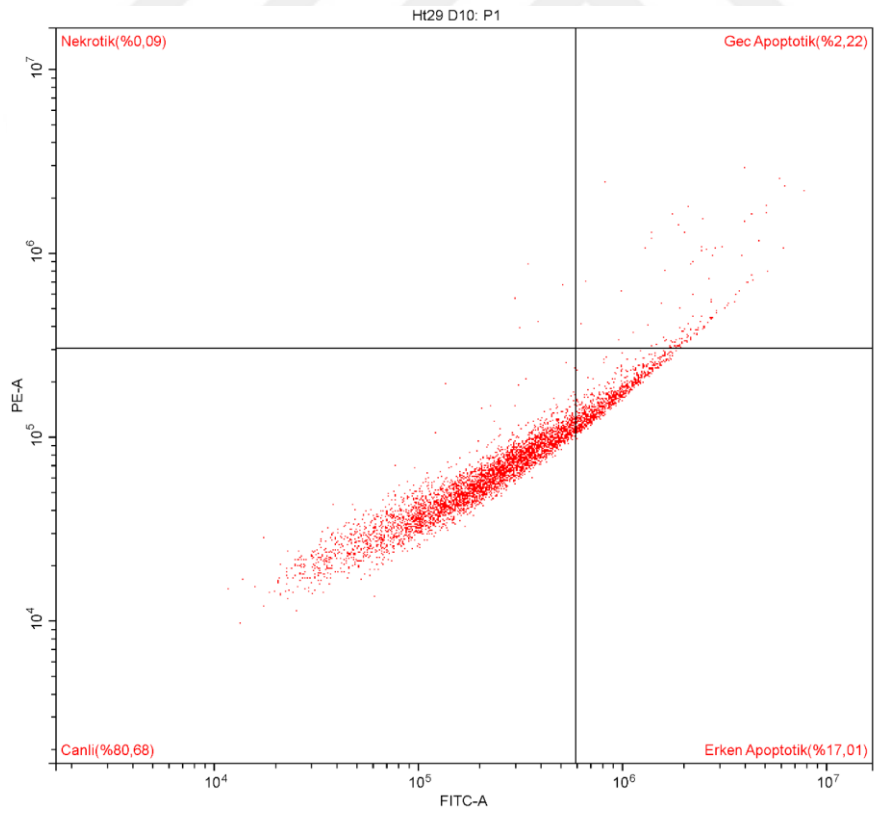
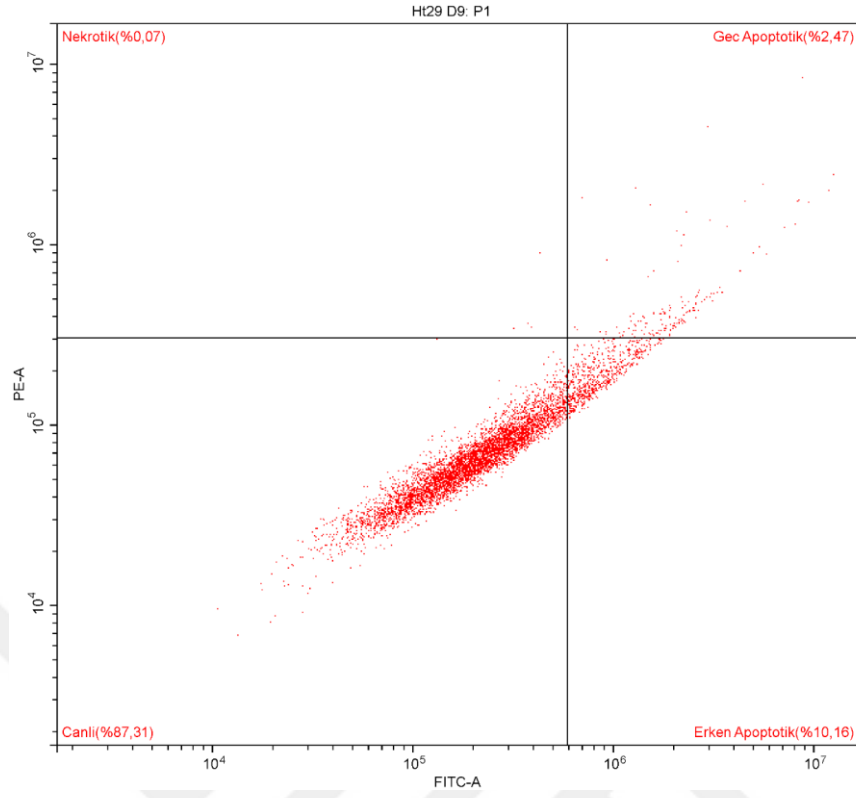
Ek 9. Test edilen bileşiklerin **HT-29** hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin Flow sitometri cihazı yardımıyla belirlenmesi



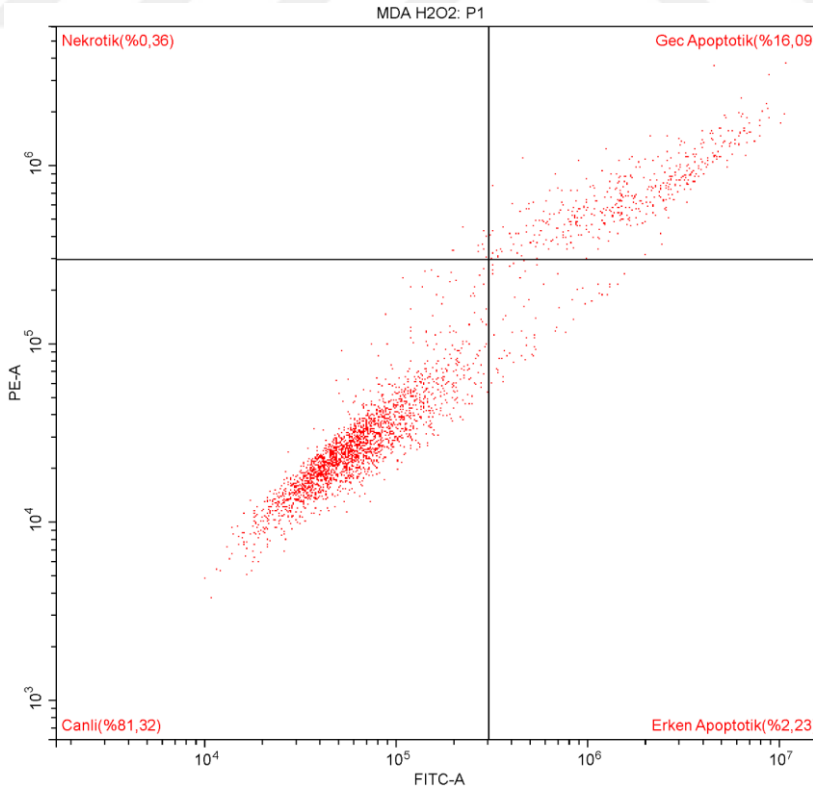
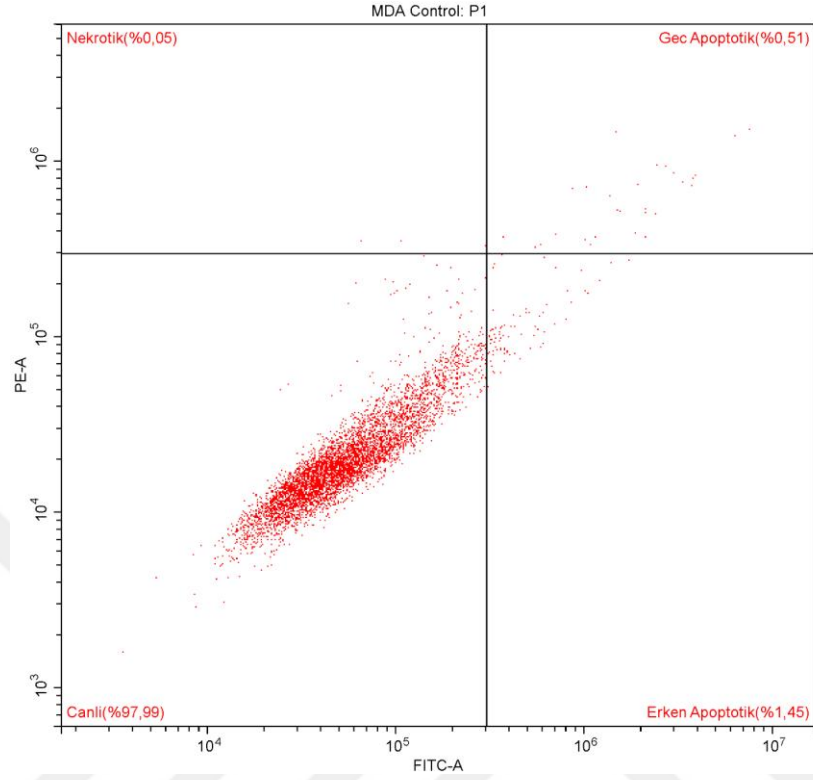


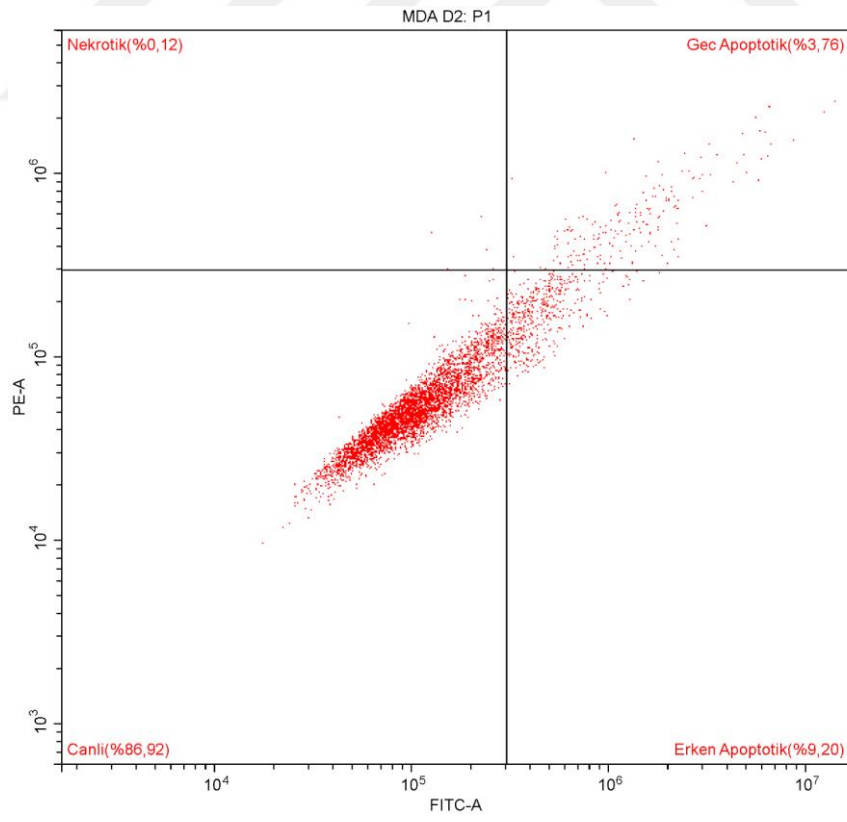
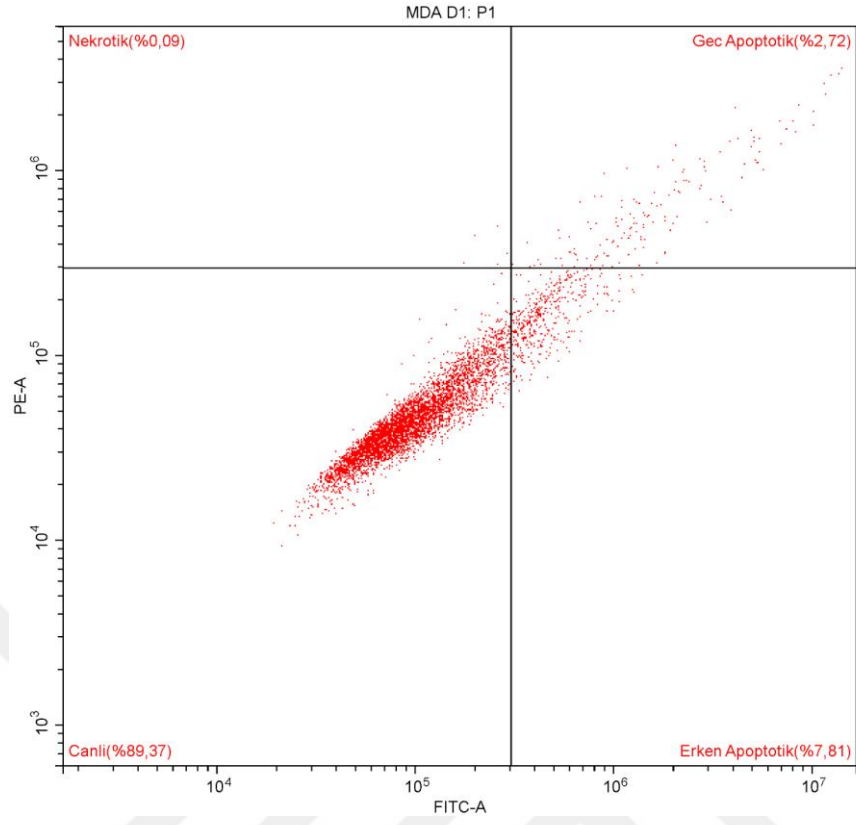


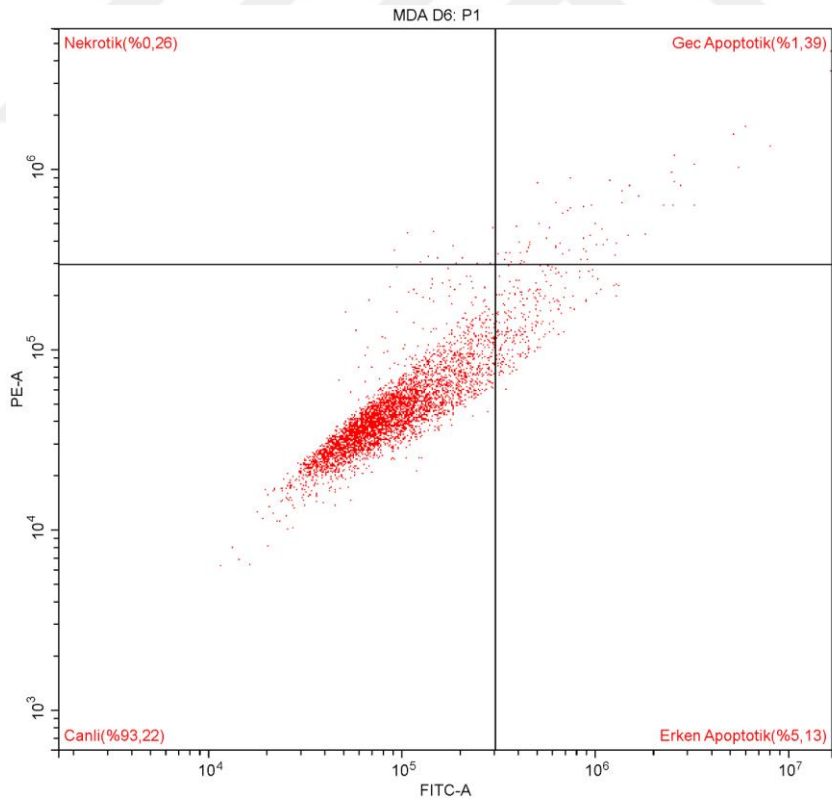
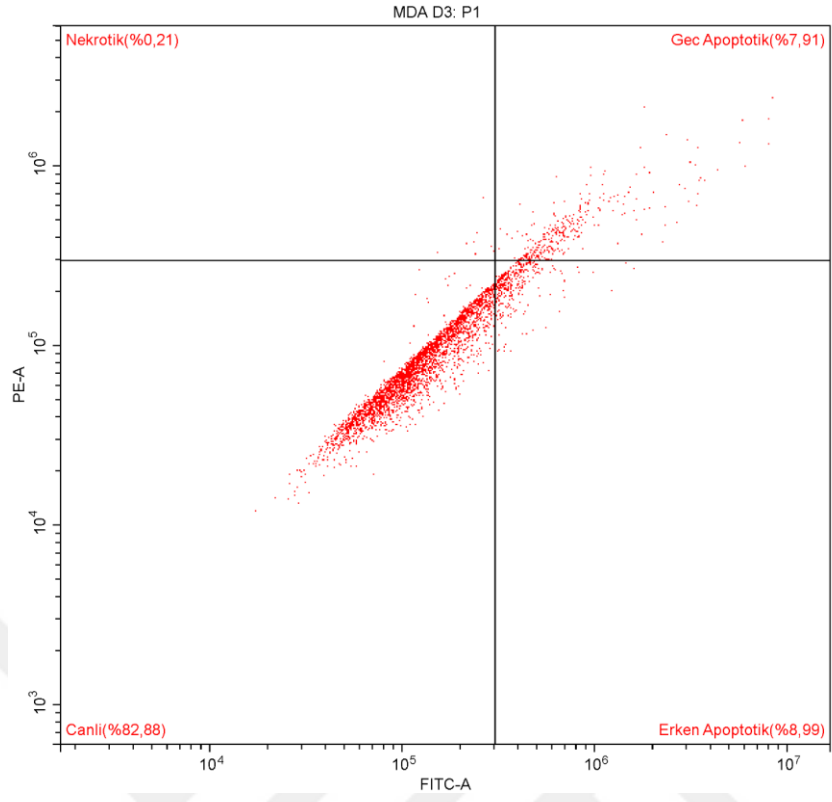


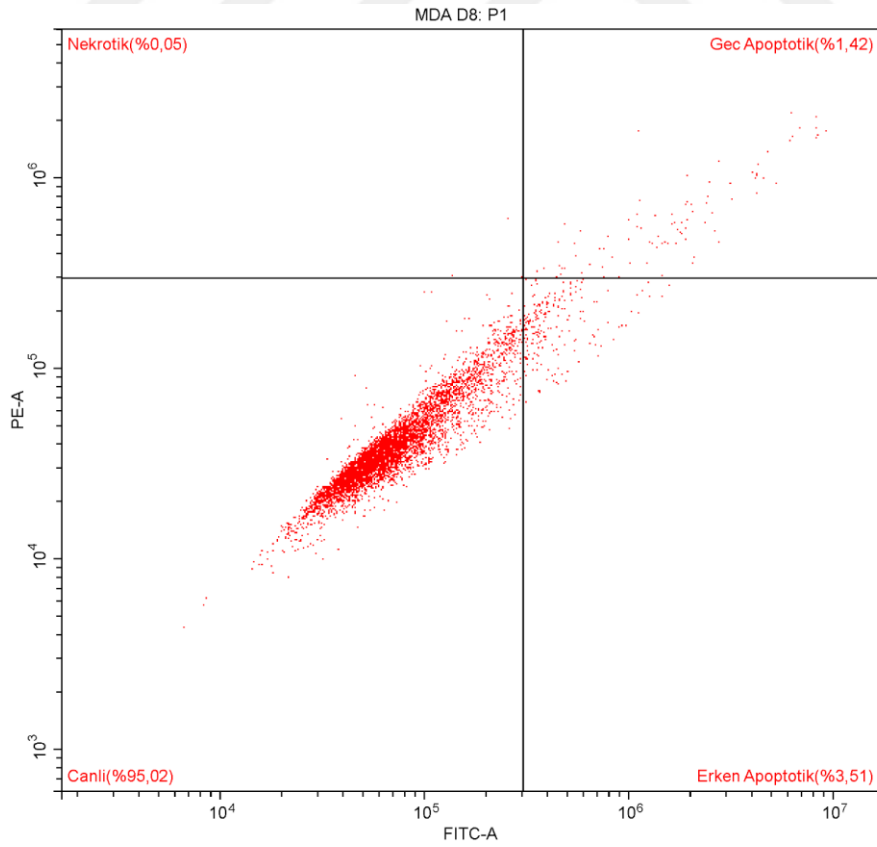
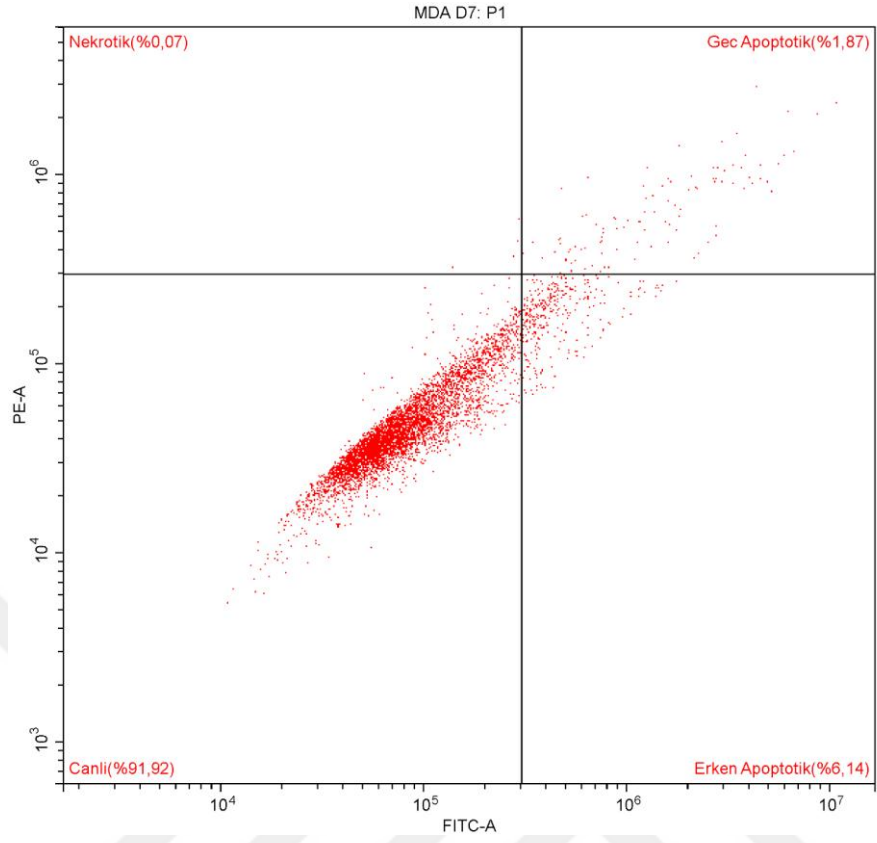


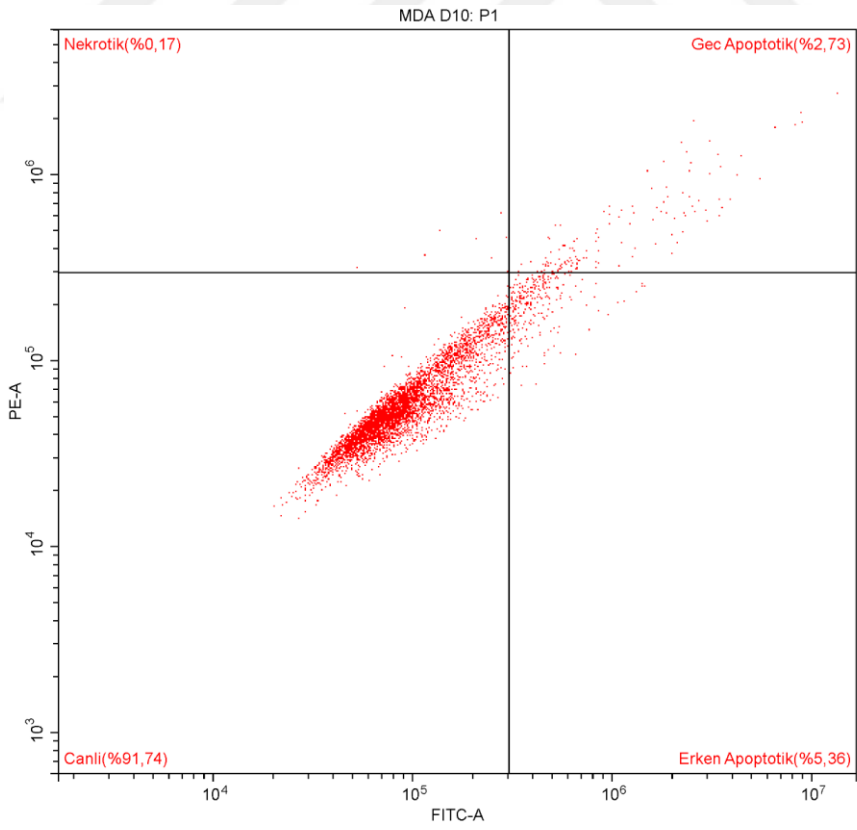
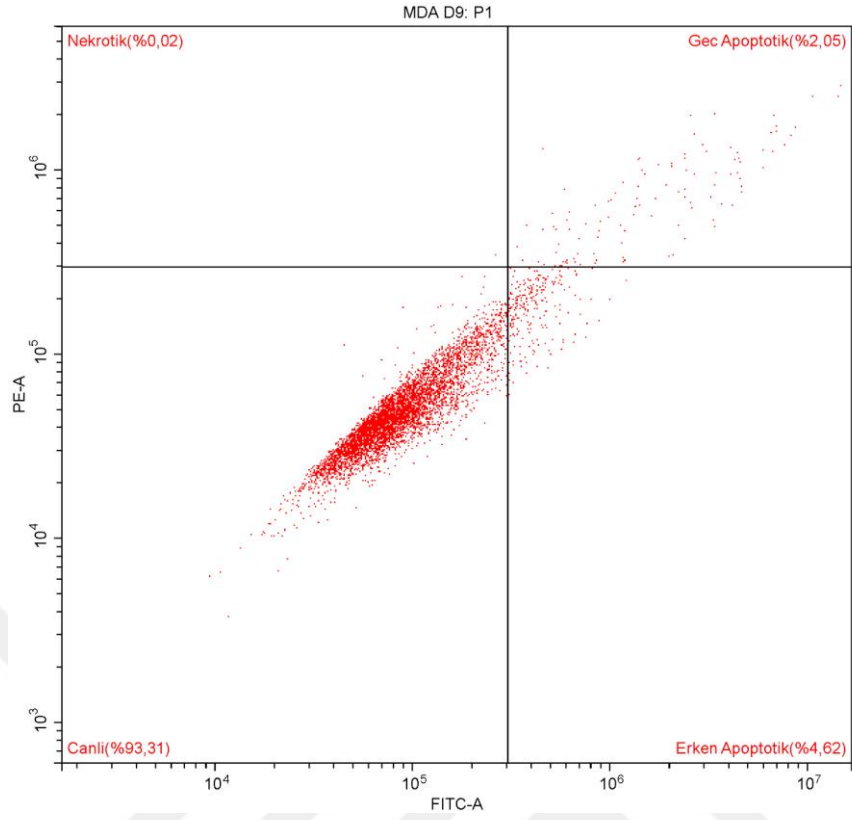
Ek 10. Test edilen bileşiklerin **MDA-MB-231** hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin Flow sitometri cihazı yardımıyla belirlenmesi



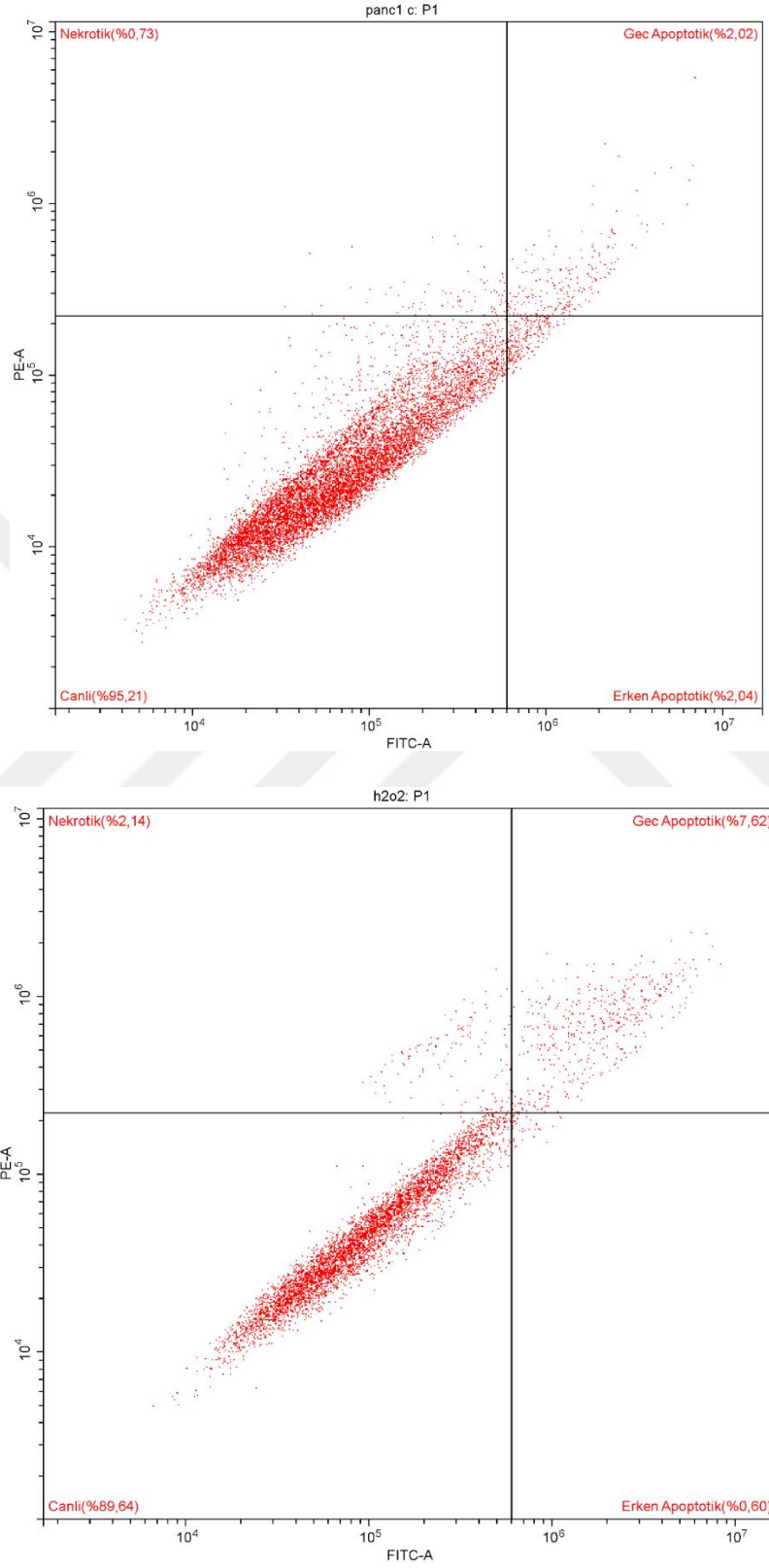


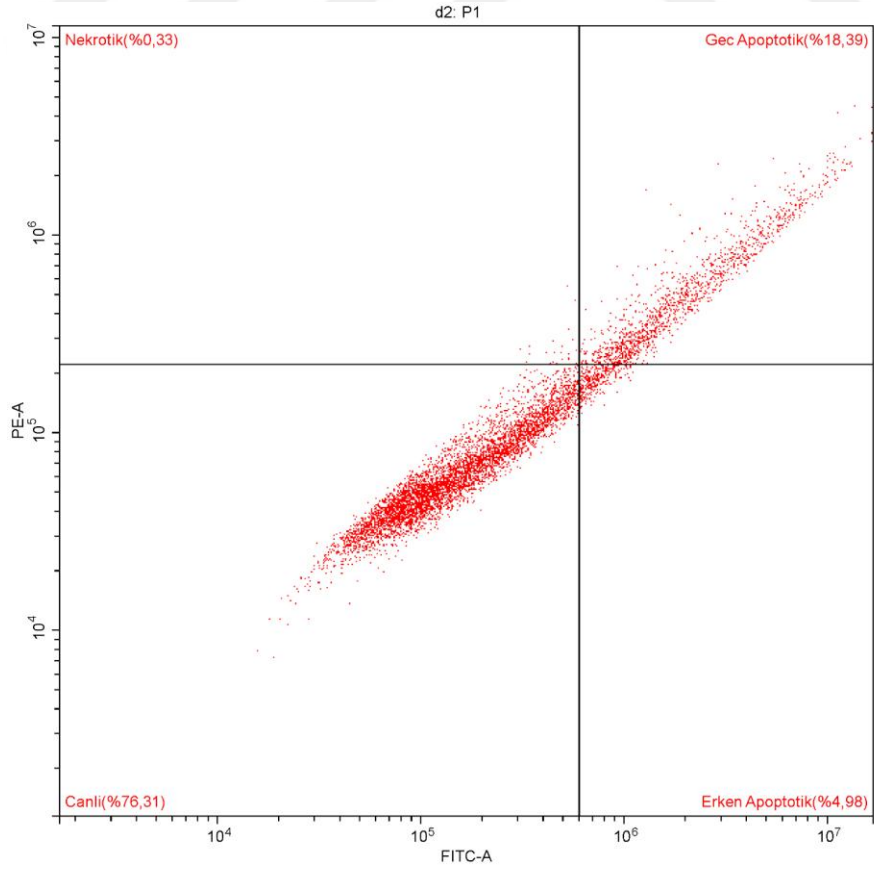
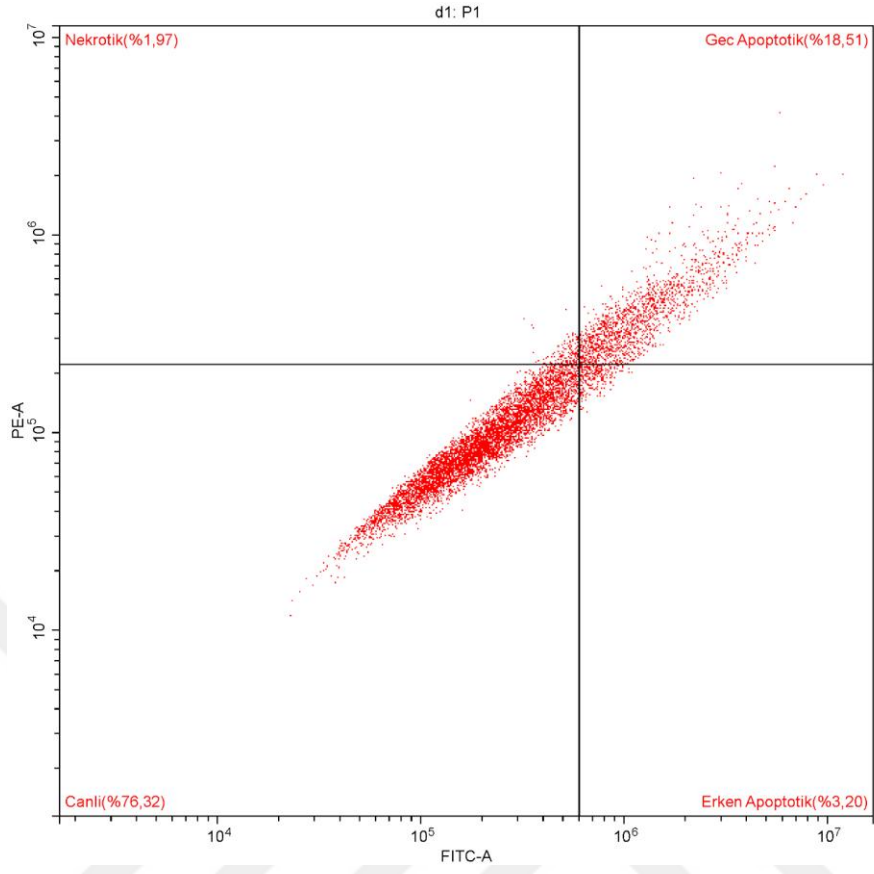


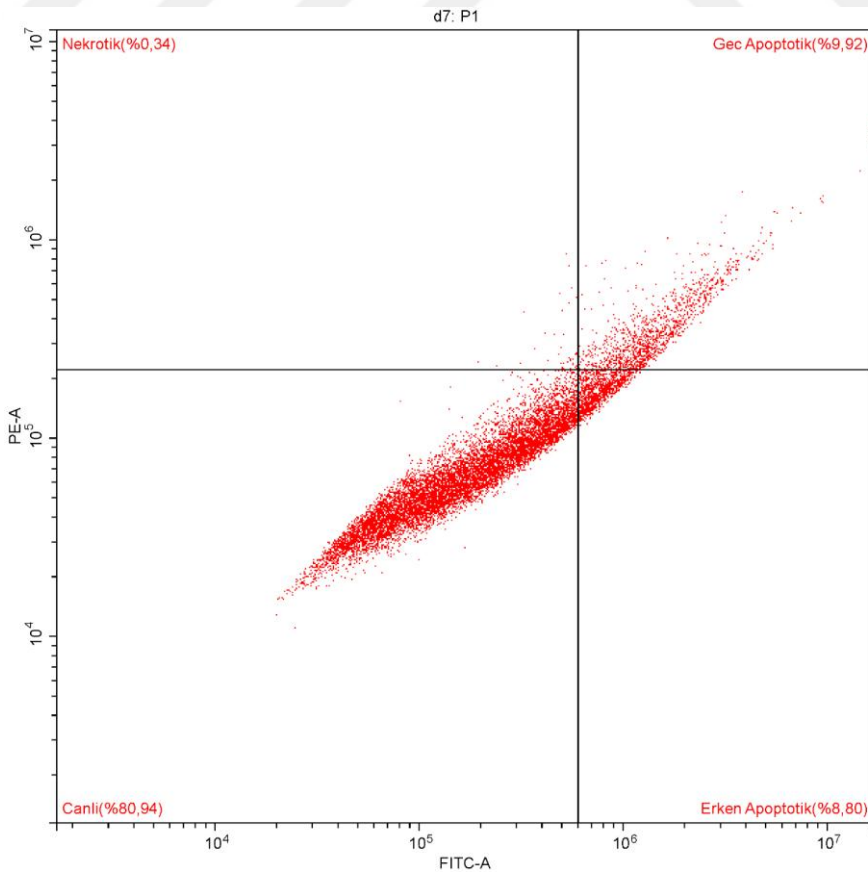
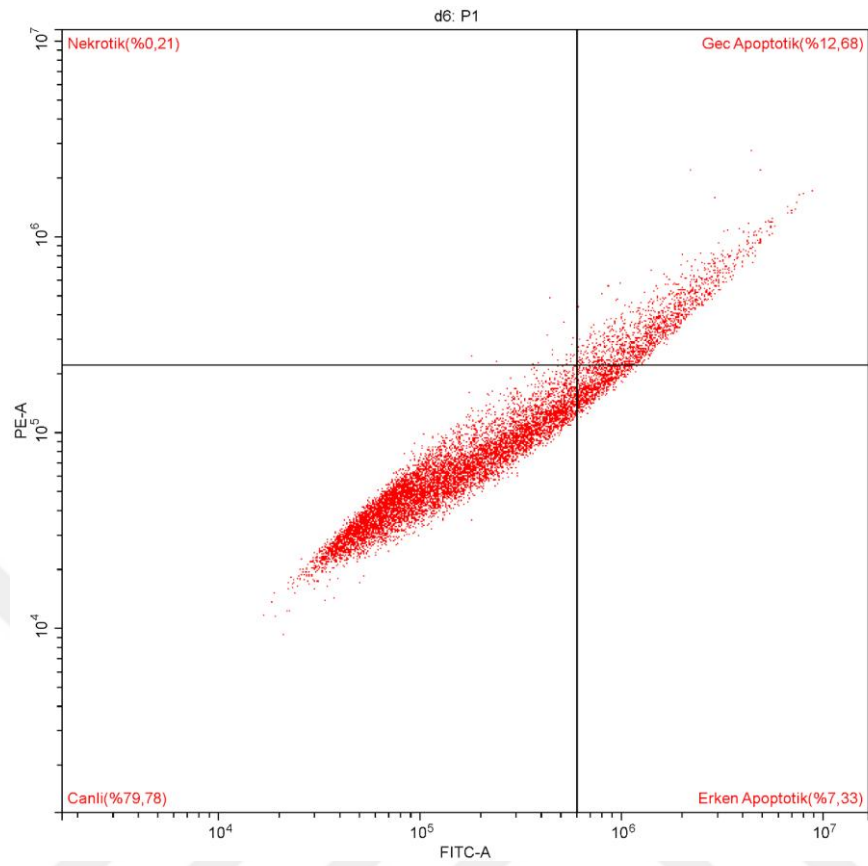


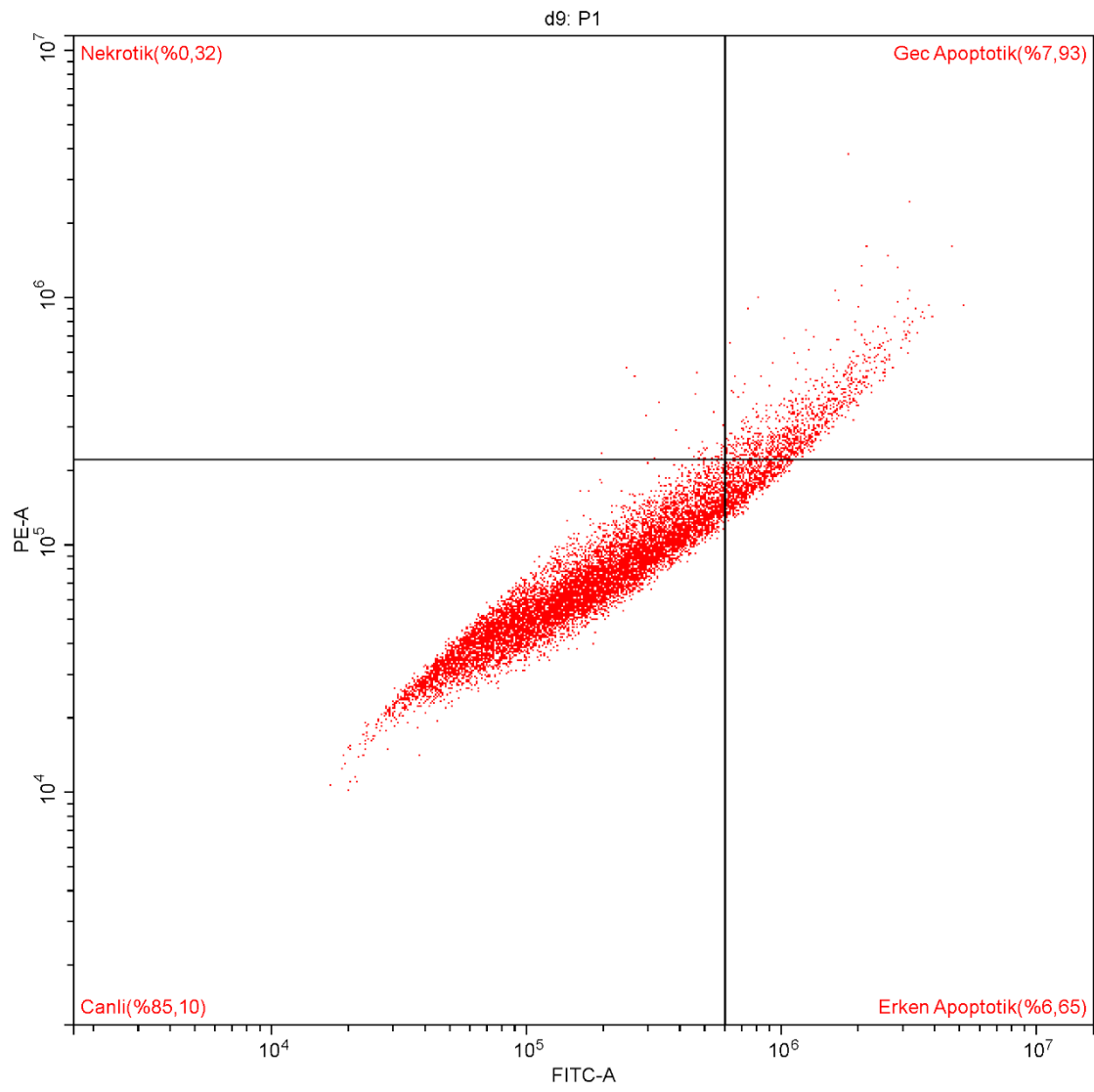


Ek 11. Test edilen bileşiklerin **Panc-1** hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisinin Flow sitometri cihazı yardımıyla belirlenmesi











ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Doğan ÇETİN

Eğitim Bilgileri

Lisans :
Üniversite : Bartın Üniversitesi
Fakülte : Fen Fakültesi
Bölüm : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı : 2016

Yüksek Lisans :
Üniversite : Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Enstitü : Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı : 2019

Akademik Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- Kızıllkan, N. D., Konuş, M., Rişvanlı, M. R., Yılmaz, C., Kara, H., Özgökçe, M. S., **Çetin, D.**, Atlıhan, R. (2025). Impact of beneficial microorganisms inoculated cotton plants on *spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*, 54(1), 1-12.
- Arslan, S., Abdelsalam, A. H., Kızıldoğan, A. K., Otur, Ç., Konuş, M., **Çetin, D.**, Okudan, E. Ş. (2025). Cytotoxicity, apoptotic, antioxidant and antimicrobial activity of *dictyota dichotoma* (hudson) JV lamouroux 1809 collected from Antalya Coast, Türkiye. *Biology Bulletin*, 52(1), 1-10.
- Çetin, D.**, Konuş, M., Yılmaz, C., Arslan, Ş., Abdelsalam, A., Hutanu, E. D., Kivrak, A. (2024). Determination of antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of newly synthesized 2-methoxyphenyl thiophene derivatives. *ChemistrySelect*, 9(47), e202404367.
- Özgökçe, M. S., Kuşoğlu, D., Konuş, M., Hilmi, K. A. R. A., Rişvanlı, M. R., **Çetin, D.** (2023). The effects of different Charleston pepper cultivars on the demographic parameters and the antioxidant levels of *Myzus persicae* (Sulzer, 1776)(Hemiptera: Aphididae). *Turkish Journal of Entomology*, 47(2), 133-147.
- Konus, M., Algso, M., Yilmaz, C., Khorsheed, B. A., Köroğlu, A., **Çetin, D.**, Kivrak, A. (2022). Synthesis of ethynyl-thiophene derivatives, antioxidant properties and adme analysis. *ChemistrySelect*, 7(12), e202200281.
- Konus, M., **Çetin, D.**, Kızıllkan, N. D., Yılmaz, C., Fidan, C., Algso, M., Arslan, S. (2022). Synthesis and biological activity of new indole based derivatives as potent anticancer, antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of Molecular Structure*, 1263, 133168.
- Yılmaz, C., Othman Pirdawid, A., Fidan Babat, C., Konuş, M., **Çetin, D.**, Kivrak, A., Kurt Kızıldoğan, A. (2022). A thiophene derivative, 2-Bromo-5-(2-(methylthio)

- phenyl) thiophene, has effective anticancer potential with other biological properties. *ChemistrySelect*, 7(15), e202200784.
- Yılmaz, C., Konuş, M., Fidan, C., Ergin, D., **Çetin, D.**, Dilek, Z., Elasan, E. (2021). Su kalitesi ve demleme şeklinin bitkisel çaylarda toplam antioksidan kapasite üzerine etkisi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 24(5), 921-929.
- Kurt-Kızıldoğan, A., Akarsu, N., Otur, Ç., Kivrak, A., Aslan-Ertas, N., Arslan, S., Mutlu D., Konuş M., Yılmaz Y., **Çetin, D.**, Topal. T., Şahin, N. (2022). A novel 4H-chromen-4-One derivative from marine *Streptomyces ovatisporus* S4702T as potential antibacterial and anti-cancer agent. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 22(2), 362-370.
- Kurt-Kızıldoğan, A., Otur, Ç., Yılmaz, C., Arslan, S., Mutlu, D., Kivrak, A., Algo M., Kayhan A., **Çetin, D.**, Konuş, M. (2021). Synthesis, cytotoxicity, antioxidant and antimicrobial activity of indole based novel small molecules. *Letters in Drug Design & Discovery*, 18(5), 461-470.
- Konus, M., **Çetin, D.**, Yılmaz, C., Arslan, S., Mutlu, D., Kurt-Kızıldoğan, A., Kivrak, A. (2020). Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel thiophene-based indole derivatives as potential antibacterial, gst inhibitor and apoptotic anticancer agents. *ChemistrySelect*, 5(19), 5809-5814.

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- Kadioğlu, K., Yılmaz, E., Tatli, H., Rümeysa, G. Ö. K., **Çetin, D.**, Konuş, M., Babat, C. F. (2023). Dondurarak depolamaya karşılık geleneksel depolama yönteminde nar ve portakal sularının toplam antioksidan kapasitelerindeki değişimler. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(1), 174-184.
- Konus, M., Yılmaz, C., **Çetin, D.** (2020). Yaygın ve yaygın olmayan sirke çeşitlerinin antioksidan kapasite düzeylerinin değerlendirmesi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 9(1), 60-67.
- Konus, M., Yılmaz, C., Özdoğan, N., **Çetin, D.**, Kızılkın, N. D., & Kayhan, A. (2019). Testing of reproducibility and consistency of commonly used five different antioxidant capacity methods on turnip juice. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(12), 2233-2238.

Yazılan ulusal/uluslararası kitaplardaki bölümler

- Çetin D.**, Yılmaz C., Konuş M., (2019). Serbest radikaller, antioksidanlar ve antioksidan kapasite ölçümü. Mehmet Dalkılıç (ed.), *Scientific developments* (1. ed., Vol. 1, pp. 127–141). Gece Kitaplığı Yayınevi: Ankara, Türkiye.
- Çetin D.**, Konuş M., Suiçmez M., (2022). Glutatyon s-transferazlar ve enzim inhibisyonu. Dayangaç A., Akgül H., Sevindik M.; (ed.), *Fen bilimleri & matematikte araştırma ve değerlendirmeler* (1. ed., Vol. 1, pp. 241–255), Gece Kitaplığı Yayınevi: Ankara, Türkiye.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

- Konuş M., Yılmaz C., Çetin D., (2019). Bazı sirke çeşitlerinin antioksidan özelliklerinin incelenmesi. **2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences**. PosterPresentation.Ankara/TURKEY.
- Konuş M., Yılmaz C., Çetin D., (2019). Yaygın olarak kullanılmayan bazı sirke çeşitlerinin antioksidan özelliklerinin incelenmesi. **2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences**. Poster Presentation. Ankara/Turkey.
- Konuş M., Çetin D., Mikroplastiklerin kaynakları ve sınıflandırılması, Sözlü Sunum, **8th International Azerbaijan Congress On Life, Engineering, Mathematical, And Applied Sciences**, Bakü/Azerbaycan
- Konuş M., Akbaş E.,Ergan E., Yılmaz C., Kızıllan N.D., Çetin D.,(2018). Reducing power properties of newly synthesized pyrimidine derivatives, **1nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences**. Oral Presentation. Ankara/Turkey.
- Konuş M., Akbaş E., Ergen E., Yılmaz C., Çetin D., Kızıllan N.D (2018). Determination of radical scavenging activities of novel pyrimidine analogues. **1nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences**. PosterPresentation. Ankara/Turkey.
- Konuş M., Karaağaç S.U., Yılmaz C., Kızıllan N.D., Çetin D., (2018). Optimization of reverse transcriptase-PCR conditions of CYP9A12 gene from *helicoverpa armigera* midgut tissues, **1nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences**. Poster Presentation. Ankara/Turkey
- Gök R., Kadioğlu K., Yılmaz E., Tatlı H., Fidan C., Çetin D., Konuş M., Yılmaz C., (2019). Geleneksel Saklama ile dondurarak saklamanın nar suyunun toplam antioksidan kapasitesi üzerine etkileri. **2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences**. PosterPresentation. Ankara/Turkey.



VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih 27/05/2025

Tez Başlığı: Yeni İndol-Artesunat Hibrit Moleküllerinin Biyolojik Aktivitelerinin ve Farmakolojik Özelliklerinin Kapsamlı Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışmamın, kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan toplam 164 (yüz altmış dört) sayfalık kısmına ilişkin, 27/05/2025 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre tezimin benzerlik oranı %11 (on bir) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

27/05/2025

Adı Soyadı: Doğan ÇETİN

Öğrenci No: 18910001337

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Statüsü: () Yüksek lisans (X) Doktora

DANIŞMAN

ENSTİTÜ ONAYI

UYGUNDUR

UYGUNDUR