



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**YENİ SENTEZLENMİŞ SENTETİK İNDOL TÜREVİ  
KİMYASALIN KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSER  
(KHDAK) HÜCRELERİNE ETKİSİNİN *İN VİTRO*  
ARAŞTIRILMASI**

**Kübra GAYRET**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

**ANKARA  
2024**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ SENTEZLENMİŞ SENTETİK İNDOL TÜREVİ  
KİMYASALIN KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSER  
(KHDAK) HÜCRELERİNE ETKİSİNİN *İN VİTRO*  
ARAŞTIRILMASI

Kübra GAYRET

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

ANKARA

2024

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Yeni Sentezlenmiş Sentetik İndol Türevi Kimyasalın Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDÖK) Hücrelerine Etkisinin İn Vitro Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Kübra GAYRET

Tarih: 09/07/2024

İmza:

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında

Kübra GAYRET tarafından hazırlanan

“Yeni Sentezlenmiş Sentetik İndol Türevi Kimyasalın Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) Hücrelerine Etkisinin İn Vitro Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09/07/2024

İmza

Prof. Dr. Hasibe VERDİ  
Başkent Üniversitesi  
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU  
Ankara Üniversitesi  
Raportör

İmza

Doç. Dr. Tülin ÖZKAN  
Ankara Üniversitesi  
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### **Yeni Sentezlenmiş Sentetik İndol Türevi Kimyasalın Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) Hücrelerine Etkisinin İn Vitro Araştırılması**

Akciğer kanseri (AK), teşhis edilen kanserler arasında en yüksek ölüm oranıyla ilişkilendirilen ve hasta sağ kalımı diğer kanserlere oranla yıllar içinde düşük seyretmeye devam eden katı tümörlerle karakterize kanserdir. Bu kanser yıllar içerisinde hem birey hem devletlere maddi anlamda yüksek maliyetlere sebep olan tanı ve tedavi süreçleriyle ilişkilidir ve hastaların kolayca ulaşım temin edebilmesi açısından yerli ilaçların geliştirilmesi elzemdir. Konvansiyonel tedavi yöntemlerinin yanında hedefe yönelik tedaviler kişinin sağlıklı hücre ve dokularının korunmasını ve kanserli hücre ve dokuların çeşitli yol ve yolların tetiklenmesiyle öldürülmesini amaçlanmıştır.

İndoller ve türevlerinin hem doğal olarak bulunan hem de sentetik olarak elde edilebilen indol iskeleti içeren maddeler olduğu ve antidiyabetik, antikanser, antimikrobiyal, anti-HIV, antiviral, antiinflamatuvar, antioksidan, antikolinesteraz, antitüberküloz ve antimalaryal açılardan etkili oldukları bilinmektedir. Kansere karşı indol türevlerinin altta yatan antikanser mekanizmaları arasında apoptozis indüksiyonu ve mikrotübül, protein kinaz, histon deasetilaz ve DNA topoizomerazın baskılanması yer almaktadır.

Bu tez çalışmasında Ankara Üniversitesi bünyesinde sentezlenmiş bir indol türevi olan Madde 10'un sağlıklı akciğer hücre hattı BEAS-2B ve kanserli akciğer hücre hatları A549, H1299 üzerindeki etkilerinin in vitro araştırılması yapılmıştır. Bu amaçla Madde 10'un AK'ye karşı olan antiproliferatif, apoptotik, EMT, metastaz ve ayrıca köklülük üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Antiproliferatif etkisi hücre canlılığı testi olan MTT yöntemi ve proliferasyon belirteci olan Ki-67 geninin ifadesi ile, apoptotik açıdan etkisi BAX, BCL-2 genlerinin ifade analizleri, EMT baskılayıcılığı üzerine olan etkisi açıdan E-kaderin, N-kaderin genlerinin ifade analizleri, köklülük kontrolü açısından ise CD44, CD24, OCT4, SOX2 genlerinin ifade analizleri için RT-qPCR yöntemi kullanılarak bakılmıştır. Apoptoz tayini için Annexin-V (PE)-7AAD ile boyamasının akım sitometrik tayini, hücre canlılığı için MTT deneyi ve anti-metastatik açıdan hücre göçü için yara iyileşme testleri kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma, daha önce AK üzerinde uygulanmamış olan indol türevi Madde 10'un AK üzerinde etkinliğinin araştırıldığı ilk çalışma olması ve yapılan denemeler sonucunda ilk kez hücre canlılığını düşürdüğü, apoptozu indüklediği, proliferasyon hızını düşürdüğü ve hücre göçünü baskıladığı görülerek literatüre bu açılardan önemli katkılar sunulmuştur. Ayrıca Madde 10'un AK'ye karşı yeni bir ilaç olma potansiyeli, çalışmayı önemli kılan bir diğer noktadır.

**Anahtar kelimeler:** Akciğer kanseri, antikanser, hücre ölümü, indol türevi, KHDAK

## SUMMARY

### ***In Vitro* Investigation of the Effect of New Synthesis Synthetic Indole Derivative Chemical on Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cells**

Lung cancer (LC) is a cancer characterized by solid tumors that is associated with the highest mortality rate among diagnosed cancers and patient survival continues to be low over the years compared to other cancers. This cancer is associated with diagnostic and therapeutic processes that cause high financial costs to both individuals and governments over the years, and it is essential to develop indigenous medicines that are easily accessible and available to patients. In addition to conventional treatment methods, targeted therapies aim to protect healthy cells and tissues and kill cancerous cells and tissues by triggering various pathways.

Indoles and their derivatives are known to be both naturally occurring and synthetically available substances containing indole skeleton and are known to be effective in antidiabetic, anticancer, antimicrobial, anti-HIV, antiviral, anti-inflammatory, antioxidant, anticholinesterase, antituberculosis and antimalarial aspects. The underlying anticancer mechanisms of indole derivatives against cancer include induction of apoptosis and suppression of microtubule, protein kinase, histone deacetylase and DNA topoisomerase.

In this thesis, the effects of Substance 10, an indole derivative synthesized at Ankara University, on healthy lung cell line BEAS-2B and cancerous lung cell lines A549, H1299 were investigated *in vitro*. For this purpose, the antiproliferative, apoptotic, EMT, metastasis and stemness effects of Substance 10 against LC were investigated. Antiproliferative effect was evaluated by MTT method which is a cell viability test and expression of Ki-67 gene which is a proliferation marker, apoptotic effect was evaluated by expression analysis of BAX, BCL-2 genes, expression analysis of E-cadherin, N-cadherin genes for its effect on EMT suppressor, and expression analysis of CD44, CD24, OCT4, SOX2 genes for rooting control by RT-qPCR method. Apoptosis was investigated by flow cytometric determination of staining with Annexin-V (PE)-7AAD for apoptosis determination, MTT assay for cell viability and wound healing tests for cell migration in terms of anti-metastatic. The study is the first study to investigate the efficacy of indole derivative Substance 10 on LC, which has not been applied on LC before, and as a result of the experiments performed, it was observed that it decreased cell viability, induced apoptosis, decreased proliferation rate and suppressed cell migration for the first time and made important contributions to the literature in these respects. In addition, the potential of Substance 10 as a new drug against LC is another important point that makes this study important.

**Keywords:** Anticancer, cell death, indole derivative, lung cancer, NSCLC

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Etik Beyan                                                                     | ii        |
| Kabul ve Onay                                                                  | iii       |
| Özet                                                                           | iv        |
| Summary                                                                        | v         |
| İçindekiler                                                                    | vi        |
| Önsöz                                                                          | vii       |
| Simgeler ve Kısaltmalar                                                        | viii      |
| Şekiller                                                                       | x         |
| Çizelgeler                                                                     | xii       |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                                | <b>1</b>  |
| 1.1. Akciğer Kanseri                                                           | 1         |
| 1.2. Akciğer Kanseri Sınıflandırılması                                         | 7         |
| 1.3. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri                                           | 10        |
| 1.4. Akciğer Kanseri Tedavisi                                                  | 11        |
| 1.5. Hücre Hatları                                                             | 14        |
| 1.6. İndoller ve Türevleri                                                     | 14        |
| 1.7. İndol Türevleri ve Antikanser Etkileri                                    | 15        |
| 1.8. İndol Türevi Madde 10                                                     | 18        |
| 1.9. Tezin Amacı                                                               | 19        |
| <b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                                      | <b>20</b> |
| 2.1. Çalışmada Kullanılan Yöntemler                                            | 20        |
| 2.1.1. Hücre Hatlarının Temini                                                 | 20        |
| 2.1.2. Akciğer Hücre Hatları Kültürü ve Pasajlanması                           | 20        |
| 2.1.3. Hücre Canlılığının MTT Deneyi ile Belirlenmesi                          | 24        |
| 2.1.4. Hücre Göçü Değerlendirmesi için Yara İyileşme Testi                     | 24        |
| 2.1.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)         | 25        |
| 2.1.6. Akım Sitometri ile Hücre Apoptoz Tayini                                 | 26        |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                             | <b>27</b> |
| 3.1. MTT Deneyi Bulguları                                                      | 27        |
| 3.2. Hücre Göçü Değerlendirmesi için Yara İyileşme Testi Bulguları             | 27        |
| 3.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Bulguları | 33        |
| 3.4. Akım Sitometri ile Hücre Apoptoz Tayini Bulguları                         | 42        |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                             | <b>44</b> |
| <b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>                                                    | <b>48</b> |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                               | <b>50</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                | <b>56</b> |

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

Tezimde desteğini her zaman omzumda hissettiğim, bilim aşkını gözlerinden kalbime akıtan, bu yolda yürürken karşılaştığım her zorlukta yükümü hafifleten, elinden gelenin de fazlasıyla yardımda bulunmaktan çekinmeyen, bu yolda kendime olan inancımı perçinleyen değerli danışmanım Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans dönemim boyunca hiçbir sorumu cevapsız bırakmayan, desteğini esirgemeyen, tanıdığım en ince düşünceli kişi olan Doç. Dr. Tülin ÖZKAN'a çok teşekkür ederim.

Gerek tezim gerek eğitimim dahil olmak üzere hayatım boyunca çizdiğim yolda yürüyebilmem için her türlü desteği, sabrı ve imkanı sunan bu yolda attığım adımlarda gözlerindeki ışıltıyla yolumu aydınlatan sevgili aileme sonsuz sevgi ve destekleri için teşekkür ederim.

Yüksek lisans dönemimde 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında bursiyerleri olarak verdikleri destek için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tezimin kapsamı dahilinde çalışabilmem ve tezimi tamamlayabilmem adına destek sağlayan Prof. Dr. Hakan GÖKER ve ekibine Madde 10'un sentezi için, Dr. Öğr. Üyesi Süreyya BOZKURT'a hücre hatlarının temini için ve Doç. Dr. Derya GÖKMEN'e istatistiksel teşekkür ederim.

Seçilmiş kardeşlerim olan dostlarım ve yol arkadaşlarıma her zaman omzuma omuz oldukları ve her daim yanımda bulunup desteklerini esirgemedikleri için teşekkür ederim.

Olabildiklerince yanımda olup zamanlarını ayıran manevi destekte bulunan her gün birbirimizden yeni şeyler öğrendiğimiz anabilim dalımız içerisindeki öğrenci arkadaşlarıma ve ayrıca Gülüzar Gülnur İTEZ'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.



## SİMGELER VE KISALTMALAR

|        |                                             |
|--------|---------------------------------------------|
| 7AAD   | 7-Aminoactinomycin D                        |
| ABCG5  | ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi G Üyesi 5    |
| AK     | Akciğer Kanseri                             |
| ALK    | Anaplastik Lenfoma Kinaz                    |
| AR-GE  | Araştırma Geliştirme                        |
| BAX    | Bcl-2-ilişkili X Protein                    |
| BB     | Bağlayıcı Tampon                            |
| BCL-2  | B-Hücreli Lenfoma Geni-2                    |
| BT     | Bilgisayarlı Tomografi                      |
| CD24   | Başkalaşım Kümesi 24                        |
| CD44   | Başkalaşım Kümesi 44                        |
| CD45   | Başkalaşım Kümesi 45                        |
| CD133  | Başkalaşım Kümesi 133/Prominin-1            |
| CREB   | Siklik AMP-Tepki Elementi Bağlayıcı Protein |
| CREBBP | CREB Bağlayıcı Protein                      |
| CSC    | Kanser Kök Hücreli                          |
| CTC    | Dolaşan Tümör Hücreleri                     |
| CTL    | Sitotoksik T Lenfositleri                   |
| CTLA-4 | Sitotoksik T-Lenfosit İlişkili Protein 4    |
| DEPC   | Diethylpyrocarbonate                        |
| DNA    | Deoksiriboz Nükleik Asit                    |
| EBUS   | Endobronşiyal Ultrason                      |
| EGFR   | Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü          |
| EMT    | Epitelyal-Mezenkimal Geçiş                  |
| EPCAM  | Epitel Hücre Adezyon Molekülü               |
| F      | Flor                                        |
| FBS    | Fetal Sığır Serum                           |
| FDA    | Gıda ve İlaç İdaresi                        |
| HCV    | Hepatit C virüsü                            |
| HIV    | İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü                |
| HPV    | İnsan Papilloma Virüsü                      |
| ICI    | İmmün Kontrol Noktası İnhibitörleri         |
| KHAK   | Küçük Hücreli Akciğer Kanseri               |

|              |                                                                       |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------|
| KHDAK        | Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri                                    |
| KHOAK        | Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri                                 |
| KOAH         | Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı                                   |
| KRAS         | Kirsten Sıçan Sarkomu Viral Onkogen Homologu                          |
| MAPK         | Mitojen Aktif Protein Kinaz                                           |
| MET          | Mezenkimal Epitelyal Geçiş                                            |
| mTOR         | Rapamisinin Memeli Hedefi                                             |
| MTT          | Metiltiazol Difenil Tetrazolyum                                       |
| MRI          | Manyetik Rezonans Görüntüleme                                         |
| OCT4         | Oktamer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 4                            |
| PET-CT       | Florodeoksiglukoz Pozitron Emisyon Tomografisi-Bilgisayarlı Tomografi |
| PD1          | Hücre Ölümü Proteini 1                                                |
| PD-L1        | Hücre Ölümü Proteini Ligandı 1                                        |
| PI3K         | Fosfotidilinozitol-3-Kinaz                                            |
| PTEN         | Fosfataz ve Tensin Homologu                                           |
| RB           | Retinoblastoma                                                        |
| RB1          | Retinoblastoma                                                        |
| RBL1         | Retinoblastoma Transkripsiyonel Korpresör Benzeri 1                   |
| RBL2         | Retinoblastoma Transkripsiyonel Korpresör Benzeri 2                   |
| Rn           | Radon                                                                 |
| RNA          | Riboz Nükleik Asit                                                    |
| ROS          | Reaktif Oksijen Türlerinin                                            |
| RPMI 1640    | Roswell Park Memorial Institute 1640                                  |
| RT-qPCR      | Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu                 |
| SOX2         | Cinsiyet Belirleyici Bölge Y-box 2                                    |
| TIL          | Tümöre İnfiltr eden Lenfositler                                       |
| TGF- $\beta$ | Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta                                       |
| TP53/p53     | Tümör Protein 53                                                      |
| Treg         | Regülatör T Hücreleri                                                 |
| WHO          | Dünya Sağlık Örgütü                                                   |

## ŞEKİLLER

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. KHDAK'de hedefe yönelik tedavi direnci                                                                     | 3  |
| Şekil 1.2. Kanserde invazyon yolları                                                                                  | 4  |
| Şekil 1.3. EMT ve MET geçişleri                                                                                       | 5  |
| Şekil 1.4. Akciğer kanseri sınıflandırılması                                                                          | 9  |
| Şekil 1.5. FDA tarafından KHDAK'a karşı ilaç onayı alan moleküller                                                    | 13 |
| Şekil 1.6. Azot atomu üzerindeki serbest elektron sayesinde nükleofilik yer değiştirme kolaylıkla meydana gelir.      | 15 |
| Şekil 1.7. İndol türevlerinin kanser hücrelerini indüklediği ölüm yolları                                             | 16 |
| Şekil 1.8. İndol türevlerinin apoptozis ve hücre döngüsü blokajını indüklemesi                                        | 17 |
| Şekil 1.9. Doğanç vd. (2024)'nın sentezlemiş olduğu indol türevi Madde 10'un kimyasal yapısı                          | 18 |
| Şekil 3.1. Akciğer hücrelerinde farklı dozlarda Madde 10 ile 48 saat boyunca muamelenin MTT sonuçları                 | 27 |
| Şekil 3.2. Sırasıyla 0-24-48 saat kontrol grubu A549 hücre hattının yara iyileşmesi testi görselleri                  | 28 |
| Şekil 3.3. Sırasıyla 0-24-48 saat 50 µM Madde 10 uygulama grubu A549 hücre hattının yara iyileşmesi testi görselleri  | 29 |
| Şekil 3.4. Sırasıyla 0-24-48 saat kontrol grubu H1299 hücre hattının yara iyileşmesi testi görselleri                 | 30 |
| Şekil 3.5. Sırasıyla 0-24-48 saat 50 µM Madde 10 uygulama grubu H1299 hücre hattının yara iyileşmesi testi görselleri | 31 |
| Şekil 3.6. A549 hücre hattının yara iyileşmesi testi hücresiz alan-doz grafiği                                        | 32 |
| Şekil 3.7. H1299 hücre hattının yara iyileşmesi testi hücresiz alan-doz grafiği                                       | 32 |
| Şekil 3.8. Ki-67 geni relatif ekspresyon/zaman grafiği                                                                | 34 |
| Şekil 3.9. BAX geni relatif ekspresyon/zaman grafiği                                                                  | 35 |
| Şekil 3.10. BCL2 geni relatif ekspresyon/zaman grafiği                                                                | 36 |
| Şekil 3.11. CD24 geni relatif ekspresyon/zaman grafiği                                                                | 37 |
| Şekil 3.12. CD44 geni relatif ekspresyon/zaman grafiği                                                                | 38 |
| Şekil 3.13. OCT4 geni relatif ekspresyon/zaman grafiği                                                                | 39 |
| Şekil 3.14. SOX2 geni relatif ekspresyon/zaman grafiği                                                                | 40 |
| Şekil 3.15. N-kaderin geni relatif ekspresyon/zaman grafiği                                                           | 41 |

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 3.16.</b> 48 saat Madde 10 uygulanan A549 ve H1299 hücre hatlarında apoptoz tayini için Annexin-V (PE konjuge)-7AAD grafiği | 42 |
| <b>Şekil 3.17.</b> A549 hücre hattında apoptoz tayini için Annexin-V (PE konjuge)-7AAD boyaması sonucu                               | 43 |
| <b>Şekil 3.18.</b> H1299 hücre hattında apoptoz tayini için Annexin-V (PE konjuge)-7AAD boyaması sonucu                              | 43 |



## ÇİZELGELER

**Çizelge 1.1.** EMT hücreleri ve CSC'lerin ortak özellikleri (Liu vd., 2015)

7



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Akciğer Kanseri

Akciğer karsinomu (pulmoner karsinoma) epitelyal hücrelerden köken alan akciğer dokularında kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize edilen kötü huylu bir akciğer tümörüdür (Kanwal, Ding & Cao, 2017). Teşhis edilen kanserler arasında en yüksek ölüm oranı ve hasta sağ kalımı sergileyen katı kitlelerle karakterize kanserdir (Siegel vd., 2023). Öztürk (2022)'e göre, Türkiye'de erkeklerde en sık görülen kanser türü akciğer kanseri (tüm kanserlerin içinde %55) iken kadınlarda akciğer kanseri 5. sırada yer almaktadır (tüm kanserlerin içinde %10.9). 5 yıllık sağkalım oranı %20 gibi düşük bir seviyededir (Coleman vd., 2011). Genellikle 65 yaş üstü ve erkeklerde yaygın görülse de son yıllarda kadınlarda da akciğer kanseri görülme sıklığında artış söz konusudur ve 45 yaş altı hasta sayısında da artış gerçekleşmektedir. Çok merkezli (25 merkezli) bir çalışmada 703 hastanın (%77,7 erkek) verileri incelenmiş KHDAK tanısının ortalama yaşı 63,3 artı eksi 12,5 yıl olarak bulunmuştur (Aksel vd., 2019).

Hastalık teşhis edildiğinde ileri evrelere gelmiş olmaktadır. Türkiye'de akciğer kanseri tanı ve evrelemesi güncel uluslararası kılavuzlara ve tekniklere uygun olarak yapılmaktadır. Pulmoner lezyonların görüntülenmesi için; kontrastlı bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve florodeoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi-bilgisayarlı tomografi (PET-CT) dahil olmak üzere fonksiyonel görüntüleme çalışmaları ile değerlendirilir. BT, PET-CT, MRI ve transtorasik veya transbronşiyal doku biyopsileri dahil olmak üzere çeşitli invaziv ve invazif olmayan yöntemler kullanılarak entegre bir yaklaşımla yapılır. Şüpheli lezyonların lokasyonuna bağlı olarak bronkoskopi, endobronşiyal ultrason (EBUS), endoskopik ultrason, ultrason veya BT kılavuzluğunda biyopsilerle doku elde edilir (Cangır vd., 2022). Bütün bu yöntemler yalnızca tanı ve evreleme aşamasında dahi bireye ve devlete ciddi ekonomik külfet yaratmaktadır.

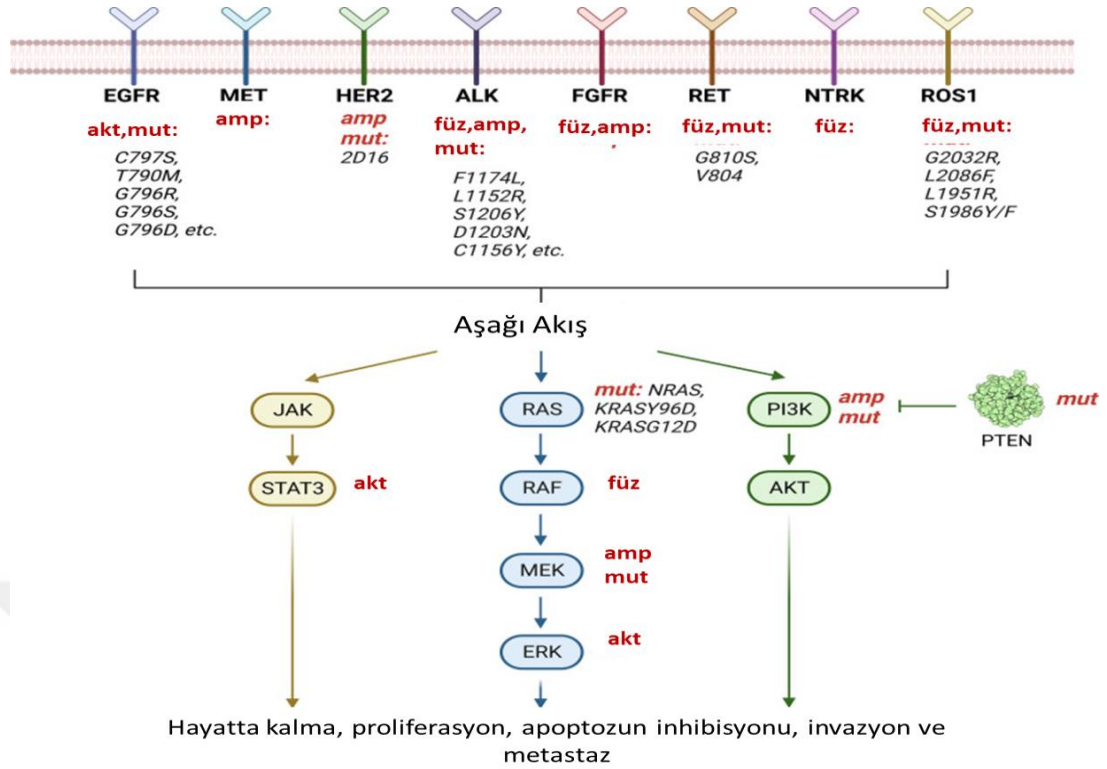
Çiçin vd. (2018), 2018 yılı Astrazeneca destekli Akciğer Kanseri Derneği, Akciğer Sağlığı ve Yoğun Bakım Derneği, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Türk Tıbbi Onkoloji Derneği, Türkiye Kanser Enstitüsü ve Türkiye Solunum Araştırmaları Derneği ortak raporuna göre akciğer kanserinin yıllık toplam maliyeti 8,8 milyar TL'dir. Bu sebeple AK tanı ve tedavi geliştirilmesi yüksek önem arz eden hastalıklar arasında sayılmakta, yıllar

içerisinde hem birey hem devletlere maddi yük yaratan, yüksek maliyetli tanı ve tedavi süreçleriyle ilişkilendirilmektedir (Yabroff vd., 2021).

Yerli kaynaklarla tedavi sürecinin yürütülmesi gerek kendi tedavisini üreten toplum ve devlet ekonomisi açısından ve gerekse hizmetin hastaya ulaşılabilirliği ve hasta refahı açısından önem arz etmektedir. Zira kanser araştırmaları, AR-GE, yerli ilaç üretimi konularında yeniliklere gitmekte, gelecek hedeflerimize bu gayeleri almaktayız. İlaça ulaşım, ilaç maaliyeti, tedavi açılarından dünya pazarında söz sahibi olabilecek bir konumda bulunmamakta ve dışa bağımlılığı azaltmak için çabalamaktayız (<https://onikinciplan.sbb.gov.tr/>). Bu amaçlar doğrultusunda bu çalışmada; Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda sentezlenen indol türevi Madde 10'un AK tedavisi üzerindeki etkisinin *in vitro* incelenmesi amaçlanmaktadır.

AK çeşitli sinyal yollarının dahil olduğu normal hücre fonksiyonlarının bozulmasıyla ilişkilidir. Bu prosurvival onkogenlerin aktivasyonlarını, proapoptotik genlerin inaktivasyonu gibi süreçler içermektedir (Abolfathi vd., 2023; Alam vd., 2023).

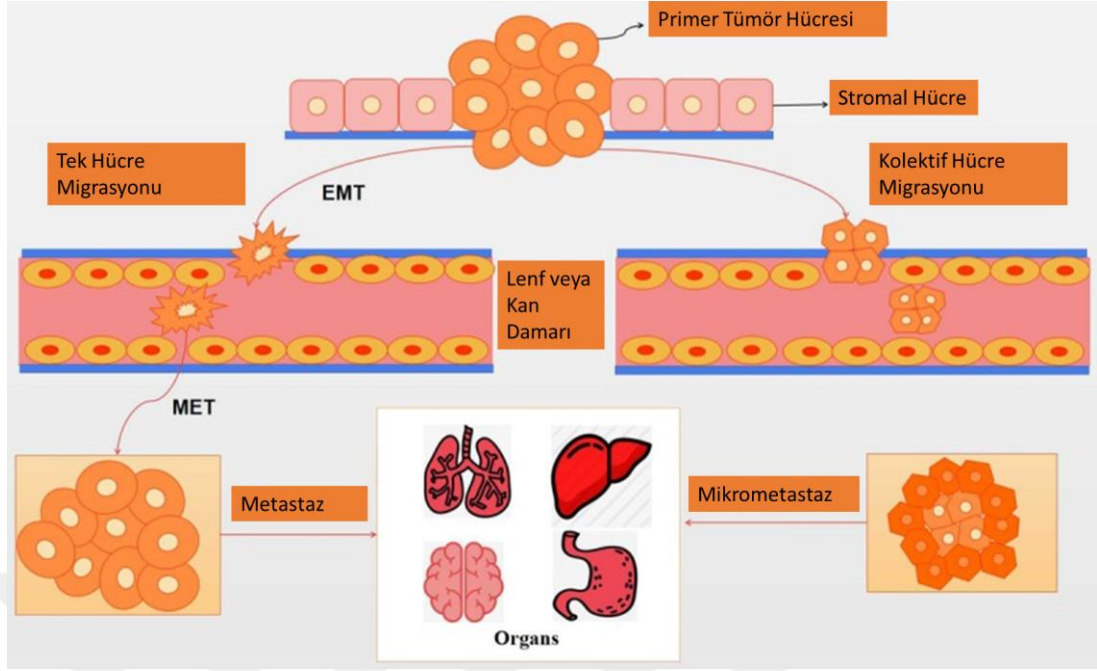
AK'de hücre çoğalması, apoptoz ve yaşlanmada önemli rol alan RAS/RAF/MEK/ERK sinyal yolağı (Ritt vd., 2016); kanserin gelişimi ve agresifliğiyle ilişkilendirilen PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı (Iksen vd., 2021); hücre çoğalması, farklılaşma, inflamasyon ve apoptozla ilişkili genlerin düzenlenebildiği JAK-STAT sinyal yolağı (Hu vd., 2021); hücrelerin ROS ve elektrofilik strese korunmasını sağlayan NRF2-KEAP1-ARE sinyal yolağı (Camiña vd., 2022); kanser hücrelerine karşı immün cevabın baskılanmasında T hücre aktivasyonunun engellemesiyle ilişkili olan PD-1/PD-L1 sinyal yolağı (Ghosh vd., 2021) dikkat çeken yollar arasındadır.



**Şekil 1.1.** KHDAC'de hedefe yönelik tedavi direnci. Yukarıdaki sekiz hedef, gen mutasyonu (mut), aktivasyon (akt), amplifikasyon (amp) veya füzyon (füz) yoluyla ilaç direnci oluşturur. Mutasyona uğramış hedefler siyah renkle işaretlenmiştir. (Xiang vd., 2024'ten modifiye edilmiştir.)

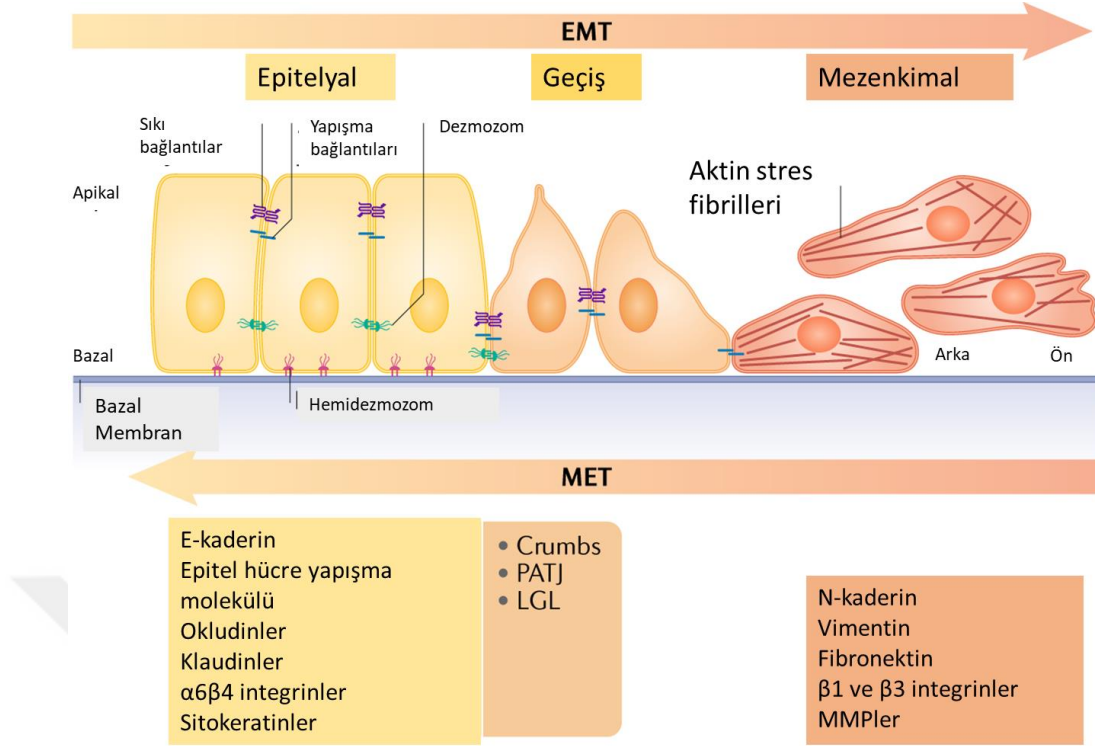
Yolaklarda kanserin lehine ilerlemeler ilaç direnci, kanserin agresifleşmesi ve yayılması konusunda destek sağlar (Şekil 1.1). Bir PI3K inhibitörü olan PTEN'deki mutasyonlar da tümör ilerlemesine yol açmaktadır.





**Şekil 1.2.** Kanserde invazyon yolları (Yang vd., 2019'dan modifiye edilmiştir.)

Yang vd. (2019) belirttiği şekliyle kanserde hücre invazyonu metastaz veya mikrometastazla sonuçlanan iki yoldan ilerleyebilmektedir (Şekil 1.2.). Kanser hücreleri bulundukları alandan tek hücre migrasyonu yoluyla önce EMT yönünde aktifleşip mezenkimal karakter kazanarak göç yapar ve yerleşeceği dokuda EMT'nin tersine mezenkimal epitelyal geçiş (MET) yönünde aktivasyonla tekrar epitelyal karakter kazanarak göçü tamamlar ve metastaz yaptığı dokuya yerleşerek burada çoğalmaya başlar. Tek hücre migrasyonu dışında çoklu hücre göçüyle ilişkili olan kolektif hücre migrasyonunda çoklu hücre grubu tümörden ayrılarak dolaşıma katılarak göçe başlar. Bu göçe lider bir hücrenin öncülük ettiği belirtilmektedir. Kolektif hücre grubu mikrometastaz ile ulaştığı dokuya yerleşerek göçünü tamamlar ve ilgili dokuda çoğalmaya başlar. Akciğer kanseri de metastatik indeksi yüksek olan ve özellikle %15 oranında beyine metastaz yapabilen bir kanser olması sebebiyle EMT ve MET değerlendirilmesi için ilişkili genler olan E-kaderin, N-kaderin gen ifadeleri ile hücre göçü için yara iyileşme testinin tezin kapsamında incelenmesi uygun görülmüştür. EMT-MET ve kaderinler arası ilişki Şekil 1.3'te görülebilmektedir.



**Şekil 1.3.** EMT ve MET geçişleri (Dongre & Weinberg, 2019'dan modifiye edilmiştir.)

Loh vd. (2019) derlediği üzere, kanser hücrelerinde E-Kaderin azalması EMT ilişkili genlerin aktivasyonu ve metastatik yayılımı ilişkilendirilebilmektedir. E-Kaderin, KHDAC hastalarında EMT ve tümör invazyonu belirteçlerinden biri olarak kullanılmıştır ve epitelyal karakterin korunmasında görev alır. N-Kaderin ise E-Kaderin'in aksine mezenkimal karakterin yüksekliğiyle ve kanser hücreleri için metastaz ve invazyon potansiyelinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Kanser kök hücresi (CSC) teorisi, tümörün başlamasından ve sürdürülmesinden sorumlu olan farklılaşmamış hücrelerin belirli bir popülasyonunun varlığını varsayar. CSC'ler düşük proliferasyon hızı, rejenerasyon, yavaş hücre döngüsü, antiapoptotik genlerin yüksek ifadesi, DNA onarımı, yüksek farklılaşma ve sınırsız çoğalma kapasitesi gibi karakteristik özelliklere sahiptir ve bu özellikler itibarıyla embriyonik kök hücrelerle benzeşmektedirler (Sterlacci vd., 2014). Akciğer kanserinde köklülük belirteci olan CD24, CD44, SOX2, OCT4, CD133, ABCG5, EPCAM gibi genlerinin ifade edildiği bilinmektedir ve kanserde köklülük metastaz, tedaviye direnç, immün baskılama, rekürrens için önemli kriterler olan proliferasyon ve rejenerasyon gibi önemli durumlarla ilişkilidir (Ahmad ve Amiji, 2017; Eun vd., 2017; Loh vd., 2019; Mudra vd., 2021; Shen vd., 2016).

Yukarıda bahsedilen akciğer kanserinde köklülükle ilişkilendirilen belirteçlerden kısaca bahsedecek olursak (Sterlacci vd., 2014):

- Beş transmembranlı bir glikoprotein olan CD133 (prominin-1), başlangıçta insan kök hücreleri ve tümöral karşılıkları için spesifik bir belirteç olarak tanımlanmıştır.
- Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4 (OCT4), hipofize özgü pozitif transkripsiyon faktörü 1, Oktamer transkripsiyon faktörü proteinleri 1 ve 2, *Caenorhabditis elegans*'tan nöral Unc (koordine edilmemiş protein)-86 transkripsiyon faktörü (POU) ailesine aittir. İfadesi normalde gelişmekte olan embriyonun pluripotent hücreleriyle sınırlıdır, ancak OCT4 aynı zamanda CSC özelliklerinin ve direnç özelliklerinin korunmasında da önemli bir rol oynar.
- Bir diğer transkripsiyonel faktör olan cinsiyet belirleyici bölge Y-box 2 (SOX2) de kök hücrelerin karakteristik özelliklerine ulaşmak için önemli sinyaller sağlar.
- Hücre yüzeyi ekstraselüler matris reseptörü olan CD44, yaygın olarak bir CSC belirteci olarak da kullanılır. CD44, ifade edildiği hücre tipine (embriyonik, progenitör, kanser) bağlı olarak birden fazla sinyalleme işlevine (çoğalma, apoptoz, sağkalım, göç, farklılaşma) sahip olabilir.
- CD24, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinde görev alan bir hücre yüzey protein molekülüdür ve bu sayede hücre adezyonu ve metastazında rol oynar.
- Epitel hücre adezyon molekülü (EpCAM) aynı zamanda çok sayıda katı tümörde kanseri ilerleten hücrelerin ve normal progenitör ve kök hücrelerin imzasının bir parçası olarak bildirilmiştir.
- ABCG5 proteini, sterollerin dışarı atılmasında rol oynayan ve dolayısıyla kanser hücrelerinde antikanser ajanların azalması nedeniyle direnç gelişiminde rol oynayan ATP bağlayıcı kaset (ABC) alt ailesinin bir üyesidir.

EMT ve CSC birçok yönden benzerlik göstermektedir (Çizelge 1.1). EMT ve CSC'lerin kanser biyolojisinde birleştiğini görülmektedir (Liu vd., 2015; Sterlacci vd., 2014). Çalışmalar, EMT hücrelerinin (örneğin, E-kadherin ekspresyonunu kaybeden epitel hücreleri) kök hücre özelliklerini kazandığını, kök hücre durumunun korunmasının sürekli EMT indükleyici sinyallere bağlı olduğunu ve kök hücre olma durumunda rol oynayan sinyal yollarının da güçlü EMT indükleyicileri olarak hareket ettiğini göstermektedir. Bu sebeple ifadesi incelenecek olan genlerin analizleriyle kanser hücrelerinin köklülüğü ve göç potansiyeliyle ilgili güçlü ilişki olduğu düşünülmüştür.

**Çizelge 1.1.** EMT hücreleri ve CSC'lerin ortak özellikleri (Liu vd., 2015)

|                                              | <b>EMT Hücreleri</b> | <b>CSC'ler</b> |
|----------------------------------------------|----------------------|----------------|
| <b>Tümörlerdeki fonksiyonlar</b>             |                      |                |
| Metastaz                                     | +                    | +              |
| Kemorezistans                                | +                    | +              |
| Radyodirenç                                  | +                    | +              |
| Hedefe yönelik tedavi direnci                | +                    | +              |
| Yayılma                                      | -                    | - veya +       |
| <b>İlgili Düzenleme Mekanizmaları</b>        |                      |                |
| TGF- $\beta$ yolağı                          | +                    | +              |
| Notch sinyali                                | +                    | +              |
| Wnt/ $\beta$ -katenin yolağı                 | +                    | +              |
| Hedgehog (Hh) sinyali                        | +                    | +              |
| MikroRNA'lar                                 | +                    | +              |
| <b>Tümör Mikroçevresinin Etkileri</b>        |                      |                |
| Hipoksi                                      | +                    | +              |
| Enflamasyon                                  | +                    | +              |
| <b>CTC'lerdeki Belirteçler ve Özellikler</b> | +                    | +              |
| <b>Bağışıklıktan Kaçınma</b>                 | +                    | +              |

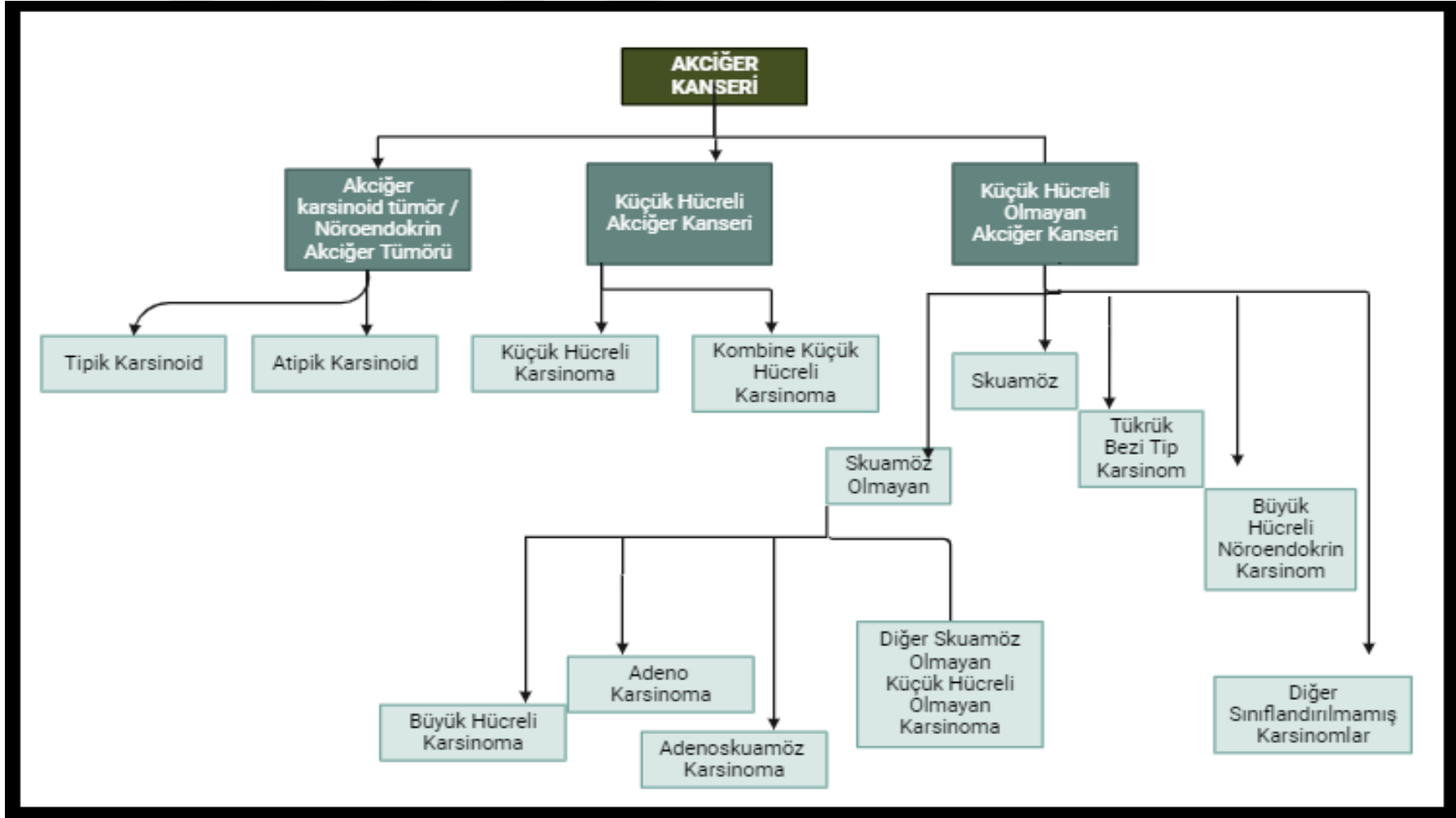
Kısaltmalar: CSC, kanser kök hücresi; EMT, epitelial-mezenkimal geçiş; TGF- $\beta$ , dönüştürücü büyüme faktörü  $\beta$ ; CTC'ler, dolaşan tümör hücreleri

## 1.2. Akciğer Kanseri Sınıflandırılması

Duma vd. (2019) bahsettiği şekilde AK vakalarının yaklaşık olarak %85'i küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) kalan kısmı da küçük hücreli akciğer kanseriyle (KHAK) ilişkilendirilmiştir. KHDAK, 3 ana alt tipe ayrılmaktadır; adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom. Adenokarsinom KHDAK'ın en yaygın alt tipi olarak tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık yarısından sorumludur. Skuamöz hücreli karsinom tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %25-30'una denk gelirken büyük hücreli karsinom %5-10 civarından sorumludur. 2015 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre detaylı Şekil 1.4'de gösterilmiştir (Saman vd., 2022).

Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK), tüm akciğer kanserlerinin %15'ini oluşturan agresif bir kanserdir ve hızlı metastaz, yüksek proliferasyon kapasitesi gösterir. Yaygın olarak beyin, lenf nodları, karaciğer, adrenal bezler, kemikler ve akciğerin başka bölgelerine metastaz yapar. Kromozomal yeniden düzenlenmeler ve fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar yaygındır. TP53 ve RB1'in fonksiyonel inaktivasyonu neredeyse tüm vakalarda görülür. MYC ailesi genlerinin (MYC, MYCL ve MYCN) amplifikasyonu, RB ailesi üyeleri p107 ve p130 (sırasıyla RBL1 ve RBL2 tarafından kodlanan) tümör baskılayıcı PTEN ve NOTCH reseptörleri ve kromatin düzenleyici CREBBP'te meydana gelen fonksiyon kaybı mutasyonlarıyla heterotipik mutasyonlar içeren alt kümeler halinde bulunur (Rudin vd., 2021).

KHAK'ın immün fenotipinde, diğer akciğer kanseri türleriyle karşılaştırıldığında belirgin bir immünsüpresyon, CD45 + T hücreleri, regülatör T hücreleri (Treg), Sitotoksik T lenfositleri (CTL'ler) ve TIL'ler gibi çoklu bağışıklık hücreleri bulunur (Li ve ark, 2023). Birinci basamak terapide PD-1/PD-L1 inhibitörlerinin eklenmesi %10'luk bir ortalama sağkalım başarısı göstermiştir (Fachinetti, Maio & Tiseo., 2020). Kesin ve belirgin bir başarı göstermemekle birlikte CTLA-4 ve PD-1 inhibitörleri bazlı terapiler (ICI: Immune checkpoint Inhibitors, immün kontrol noktası inhibitörleri) kemoterapiyle kombine halde genel sağkalımı arttırabilir, genel durumu iyileştirebilir ancak daha büyük gruplarda test edilmeden yan etkilerin güvenle göz ardı edilemeyeceğinden bahsedilebilir (Li vd., 2023).



Şekil 1.4. Akciğer kanseri sınıflandırılması (Saman vd. 2020'den modifiye edilmiştir.)

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (Küçük Hücreli Olmayan AK), tüm akciğer kanserlerinin %85'inden sorumludur (Chen vd., 2022). KRAS, epidermal büyüme faktörü (EGFR), anaplastik lenfoma kinaz (ALK) mutasyonları yaygın olarak görülenler arasındadır (Zappa vd., 2016). EGFR mutasyonları kontrolsüz hücre bölünmeleriyle ilişkilendirilmiştir ve sigara içmeyen kadınların yaklaşık %12'sinde tespit edilmiştir (Pao vd., 2004). KRAS KHDAK'ta mutasyonlarıyla yaygın olarak karşılaşılan bir onkogendir. KRAS mutasyonları genellikle EGFR ile ALK genlerinin yabanıl tip olduğu şekillerde görülmektedir (Zappa vd., 2016). Inamura vd. (2009) belirttiğine göre ALK mutasyonları hiç sigara içmeyenler arasında ve adenokarsinom hastalarında daha sık görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan kanserli hücre hatlarında KRAS açısından mutantlardır (Mao vd., 2022). Onkogenik KRAS mutasyonlarının %80'inden fazlası, glisin kalıntısının farklı amino asitlerle ikame edildiği kodon 12'de meydana gelir ve bu da KRAS mutant tümörlerinin genomik heterojenliğine yol açar. KRAS glisin-sistein mutasyonu (G12C), küçük hücreli dışı akciğer kanserindeki KRAS mutasyonlarının yaklaşık %44'ünü oluşturur; mutant KRAS G12C, akciğer adenokarsinomu olan tüm hastaların yaklaşık %13'ünde mevcuttur (Veluswamy vd., 2021).

### **1.3. Akciğer Kanseri Risk Faktörleri**

Tütün kullanımı ve/veya maruziyeti, KOAH, amfizem gibi akciğer ile ilişkili hastalıklar, onkovirüsler, asbest, radyasyon, radon, hava kirliliği maruziyeti, yerli biyokütle yakıtlarının kullanımı sonucu açığa çıkan kirleticiler, diyetle alınan besinlerin sağlıklı beslenmeyle ilişkili olması ve genetik olarak kansere yatkınlık AK için risk faktörleri olarak sıralanabilmektedir (Barta vd., 2019; Schabath vd., 2019). Risk faktörleri arasında AK'yle en yüksek ilişki tütün kullanımıyla kurulmuştur. Kadınlar için akciğer kanseri kaynaklı ölümlerin %55'i, erkekler için ise akciğer kanserinden ölümlerin %70'inden fazlası sigara kullanımına atfedilmektedir (O'Keeffe vd., 2018). Büyük yüzdeyle tütün ürünleri kullanımına ve pasif içiciliğe bağlı gelişen akciğer kanseri için uygun zemin ülkemizde mevcuttur. 13-19 yaş arası nargile kullanımının yaklaşık %27, 15 yaşın üzerinde bireylerin 1/3'ünün ise sigara bağımlısı olduğu ülkemizde akciğer kanserine bağlı ölüm oranı tüm kanserlere bağlı ölüm oranının çeyreğini oluşturmaktadır (Cangır vd., 2022).

Aile öyküsü de akciğer kanseri için önemlidir ve hiç sigara kullanmayan hastanın akciğer kanseri tanısı alması fenomenini açıklamaya katkıda bulunabilir. Ancak mevcut veriler, özellikle ikizler üzerinde yapılan genetik araştırmalar, genetik faktörlerin ve çevresel etmenlerin ortaklaşa kanser gelişimi ve ilerlemesinde etkili olduğunu göstermektedir

(Kanwal, Ding & Cao., 2017). Ayrıca X ışınları, gama ışınları, alfa parçacıkları, beta parçacıkları ve nötronlar gibi yüksek enerjili radyasyon DNA'ya zarar verebilir ve kansere neden olabilir. Bu radyasyon türleri, nükleer santrallerdeki kazalarda ve atom silahlarının yapılması, test edilmesi veya kullanılması sırasında açığa çıkabilir (Russ vd., 2022). WHO tarafından tanımlanan 19 çevresel karsinojenden biri olan ve Uranyum-238'in radyoaktif bozunması sonucunda oluşan Radon (Rn) (Li vd., 2020; Zablotska vd., 2022), X ışınları, gama ışınları ve beta parçacıkları (Russ vd., 2022) radyasyon kaynaklı akciğer kanserine neden olabilir. Hava kirliliği (Berg vd., 2023), 33 skuamöz hücreli karsinom, 17 adenokarsinom, lepidik yayımlı 10 adenokarsinom, 10 oligometastaz ve 10 neoplastik olmayan akciğer örneklerinin dahil edildiği referans çalışmada gösterildiği üzere HPV virüsü gibi onko virüsler (Robinson vd., 2016), KOAH (Durham vd., 2015), beslenme (Schabath vd., 2019), ağır metal maruziyeti (Lee vd., 2022), cinsiyet ve yaş faktörleri akciğer kanseri için risk faktörlerini tanımlamaktadır.

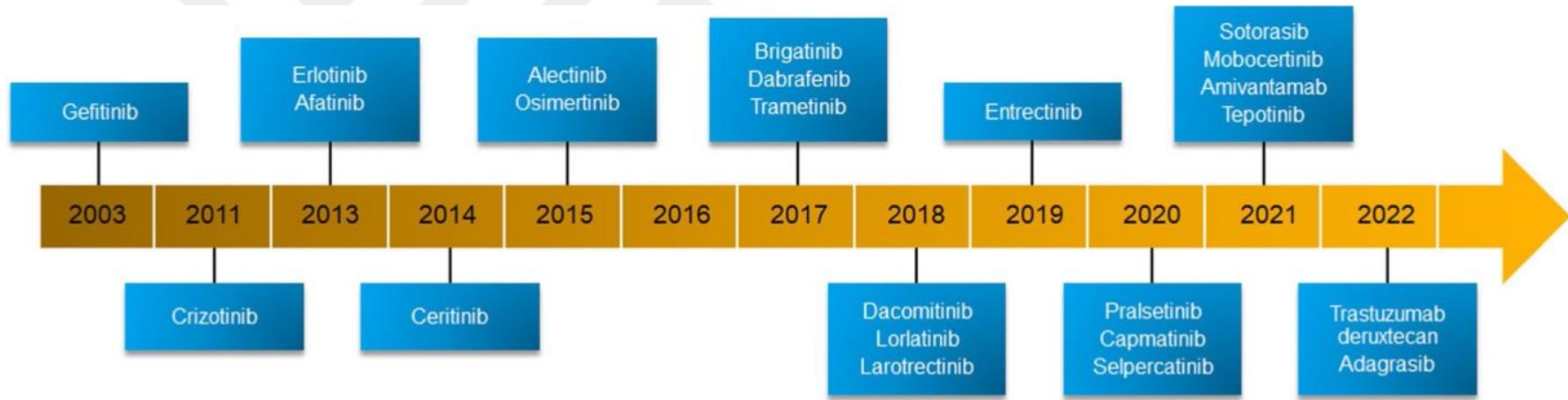
#### **1.4. Akciğer Kanseri Tedavisi**

Akciğer kanserinin tedavisinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapi hastanın durumuna göre planlanarak tercih edilmektedir (Alduais vd., 2023). Cerrahi operasyon planlanan hastalarda kanser evrelemesi II ve ilerisi ise kemoterapiyle birlikte tedavi önerisi yapılmaktadır. Kemoterapi, kanser hücrelerinin büyüüp bölünmesini engelleyerek kanser hastalarının ortalama sağkalımlarının artmasına yardımcı olan tedavi yöntemidir. Radyoterapi hastanın sahip olduğu koşullar ve kanser evresi göz önüne alınarak hasta sağkalımı ve hayat kalitesi açısından avantaj sağlayacak veya direkt olarak tedavi olmasına aracılık edebilecek bir yöntemdir (Alduais vd., 2023; Vinod & Hau, 2020). Hedefe yönelik tedaviler sağlıklı doku ve hücreler zarar görmeden kanserli hücre ve dokuları onlara özgü belirteçleri hedefleyerek tedavi etmeyi amaçlar. Hedefe yönelik tedavide epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) mutasyonlarıyla karakterize olması sebebiyle EGFR inhibitörleri olan Afatinib (GILOTRIF), entrectinib (ROZLYTREK) gibi ilaçlar, KHDAK hastalarında yaygın olarak görülen KRAS G12C mutasyonunu hedefleyen Sotorasib (LUMAKRAS) örnek olarak verilebilir (Alduais vd., 2023; Harðardottir vd., 2022). İmmünoterapi kişinin sahip olduğu immün sistemin kansere karşı aktif olarak savaşmasını sağlamak amacıyla tercih edilmektedir. Örneğin programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD1) ve ligandı (PD-L1) yolunu inhibe ederek antitümör bağışıklığı destekleyen Atezolizumab (TECENTRIQ), nivolumab (OPDIVO) ve pembrolizumab (KEYTRUDA) gibi Amerika FDA (Food and Drug Administration) onaylı



KHDAK için kullanılabilen ilaçlar mevcuttur (Alduais vd., 2023; Li vd., 2023). İlaç onaylarının süreci Şekil 1.5’de gösterilmiştir.





FDA timeline drugs approval

Şekil 1.5. FDA tarafından KHDAC'a karşı ilaç onayı alan moleküller (Friedlaender vd., 2024'ten alınmıştır.)

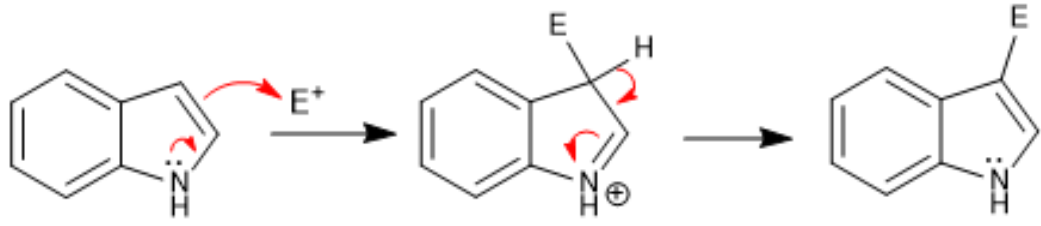
## 1.5. Hücre Hatları

BEAS-2B sağlıklı bronşiyal epitelyal hücrelerin hücre serisi halidir ve bu tez için sağlıklı kontrol olarak kullanılması amaçlanmaktadır. Epitelyal benzeri morfolojiye sahiptir ve yapışan hücrelerdir.

A549 ve H1299 KHDAAK hücre serileridir. Yapışan hücrelerdir ve epitelyal morfolojiye sahiplerdir. A549 daha çok epitelyal karaktere sahipken H1299 daha çok mezenkimal karaktere sahiptir (Huang vd., 2021). A549 adenokarsinom olarak subtiplenirken H1299 büyük hücreli karsinom olarak yer almaktadır (Foster vd.,1998; Mao vd., 2022). NCI-H1299 (ATCCno.CRL-5803), p53 delesyonu, EGFR yabanıl tip, KRAS mutant iken A549 (ATCC CCL-185), p53 yabanıl tip, EGFR yabanıl tip, KRAS mutant olarak tanımlanmaktadır (Mao vd., 2022).

## 1.6. İndoller ve Türevleri

İndol türevleri, indol halkası içeren; doğal ve sentetik olarak elde edilebilen heterosiklik moleküllerdir. Örneğin triptofan aminoasidi bir indoldür. İndol türevleri ise aynı indoller gibi hem doğal hem sentetik olarak elde edilebilmektedirler ve indol iskeletine sahiptirler. Doğal bir indol türevi olan serotonin örnek olarak verilebilir (Colella vd., 2020). Doğada birçok bileşiğin yapısında ve bol miktarda bulundukları için iyi araştırılan ve tanımlanan indoller ve türevleri sentetik olarak taklit edilerek biyolojik olayların istenildiği şekilde yönlendirilmesi sağlanabilmektedir (Kaushik vd., 2013). İndol türevleri, antidiyabetik, antikanser, antimikrobiyal, anti-HIV, antiviral, antiinflamatuvar, antioksidan, antikolinesteraz, antitüberküloz ve antimalaryal etkiler de dahil olmak üzere çok sayıda faydalı biyolojik özellik gösterir ve bu özellikler, indol içeren türevleri, yeni tedavi edici ajanların geliştirilmesinde önemli bileşikler haline getirir (Kumar & Ritika, 2020; Sachdeva vd., 2020). Ayrıca Benzen halkasına benzer şekilde,  $\pi$ -elektronlarının aşırı delokalizasyonu nedeniyle indol üzerinde elektrofilik yer değiştirme kolaylıkla meydana gelir (Lakhdar vd., 2006). Bu sayede indol bileşikleri rahatlıkla türevlenebilir (Şekil 1.6). İndol iskelet; antimikrobiyal, antikanser ajanlar, antihipertansifler, anti-proliferatif ajanlar ve antiinflamatuvar ajanlar gibi tıbbi ilaçların geliştirilmesinde mükemmel bir iskele olarak, türevlendirilebilir bir esnekliğe sahiptir ve kimyasal yapısı sayesinde ilaç geliştirmede ideal bir ajandır (Dorababu., 2020).



**Şekil 1.6.** Azot atomu üzerindeki serbest elektron sayesinde nükleofilik yer değiştirme kolaylıkla meydana gelir.

İndol bileşikleri:

- Basit indol bileşikleri
- Karbolin bileşikleri
- Semiterpenoid indol bileşikleri
- Bisindol bileşikleri
- Karbazol bileşikleri gibi farklı başlıklarda incelenebilir (Zhu vd., 2021).

Aşağıdaki başlıklarda detaylandırılacak olan etkilerinin haricinde indol türevleri çeşitli mekanizmalar yoluyla diyabetik hastalıklar için bir umut kaynağı ve güncel bir araştırma konusudur. Özellikle diyabet hastalığı için çoğunlukla tercih edilen indol içerikli bitki ekstraktlarının kullanımı indol türevlerini iyi bir diyabet ilacı adayı yapmaktadır (Hu vd., 2022).

İndol türevlerinin antiviral etkinliği Hepatit C virüsü (HCV) üzerinde oldukça düşük sitotoksositeye ve yüksek başarıya sahip bir ajan olarak gösterilmiştir (Andreev vd., 2015).

### 1.7. İndol Türevleri ve Antikanser Etkileri

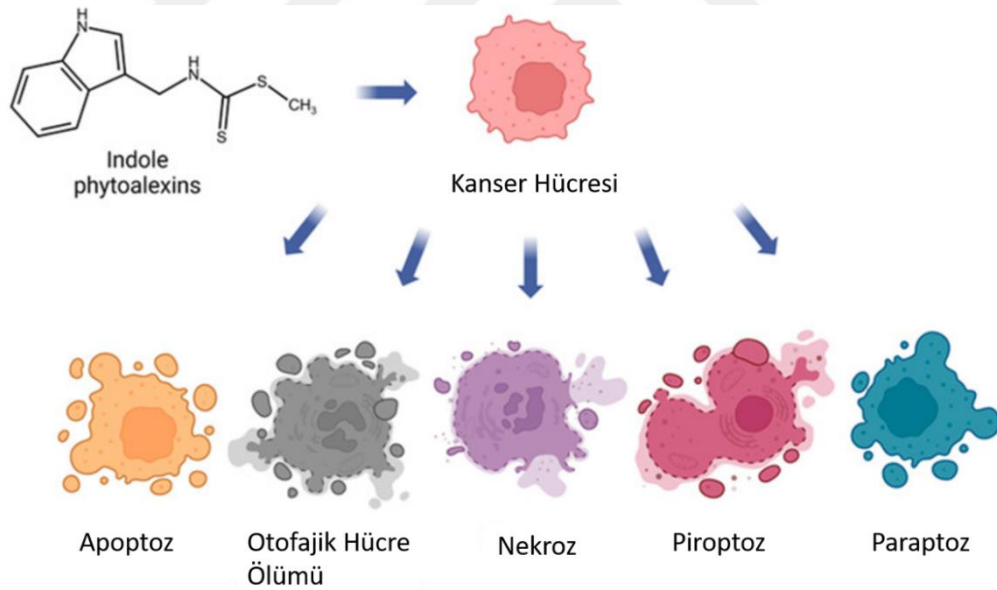
Bazı sentetik indol türevleri topoizomeras inhibitörü görevi yaparak süper sarmal hale gelen DNA'nın gevşemesine/çözülmesine engel olmasıyla antikanser etki göstermesinin yanı sıra hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu indükleyebilir, mitokondriyal membran potansiyelini azaltabilir ve hücrelerin apoptozuna yol açabilir (Li vd., 2020).

Ayrıca çeşitli kinaz inhibitörleri, aromataz inhibitörleri, tübülün polimeraz inhibitörleri, çeşitli büyüme reseptörlerinin inhibitörleri gibi hücre büyüme, gelişme ve proliferasyonunu destekleyen yol ve yolların baskılanması ve hücreyi apoptoza, hücre

ölümüne gönderecek olan kaspaz aktivasyonu ve antiapoptotik genlerin inhibisyonu gibi yol ve yolaklarda aktivasyon gösteren indol ve türevlerinin her geçen gün ilaç olma potansiyellerini destekleyen çalışmaların artışı ve akabinde ilaç onaylarının verilmesi indol ve indol türevlerinin antikanser etkinliklerini kanıtlamaktadır (Dhiman vd., 2022).

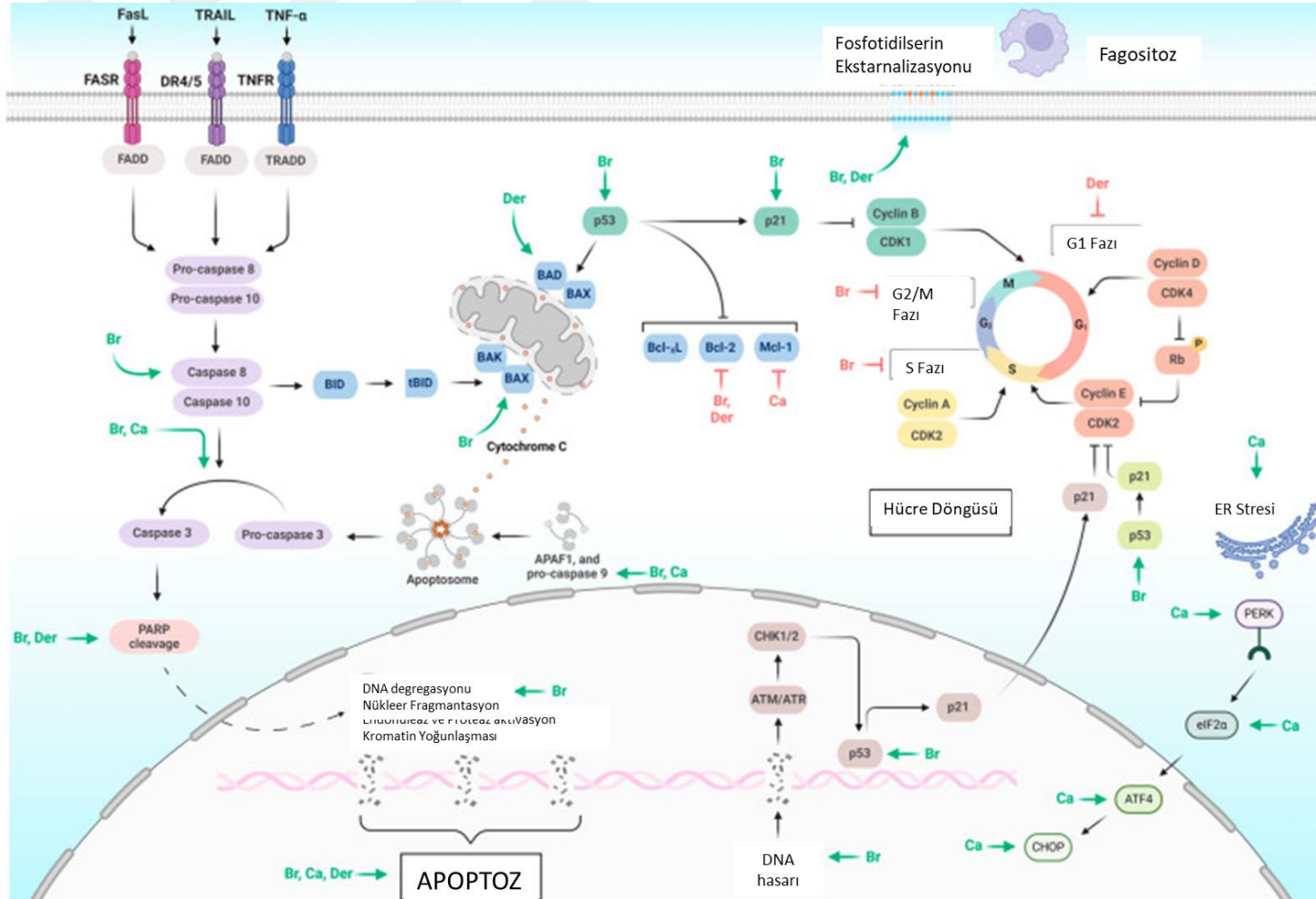
İndol alkaloidleri, PI3K/Akt/mTOR, MAPK, Beclin-1 ve ROS dahil olmak üzere çeşitli sinyal yollarının aktivitesini modüle ederek otofajiyi düzenler. Evodiamine, fascaplysin, harmol gibi örnekler otofajiyi ilişkili yolların düzenlenmesinde görev yapan bazı indol alkaloidleri olarak belirtilebilir (Luo vd., 2022). Kanser karşı indol türevlerinin altta yatan antikanser mekanizmaları arasında apoptoz indüksiyonu ve mikrotübül, protein kinaz, histon deasetilaz ve DNA topoizomerazin baskılanması yer alır (Dhuguru & Skouta, 2020).

İndol türevleri kanser hücrelerini çok çeşitli ölüm yollarına indükleyebilirler (Şekil 1.7).



**Şekil 1.7.** İndol türevlerinin kanser hücrelerini indüklediği ölüm yolları (Zigová vd., 2024'ten modifiye edilmiştir.)

Zigová vd. (2024) belirttiği üzere doğal indol türevlerinden Brassinin ve Camalexin'in yanı sıra sentetik indol türevlerinin de doğal türevlerine benzer yol ve yolaklardan antikanser etkisi bulunmaktadır (Şekil 1.8).



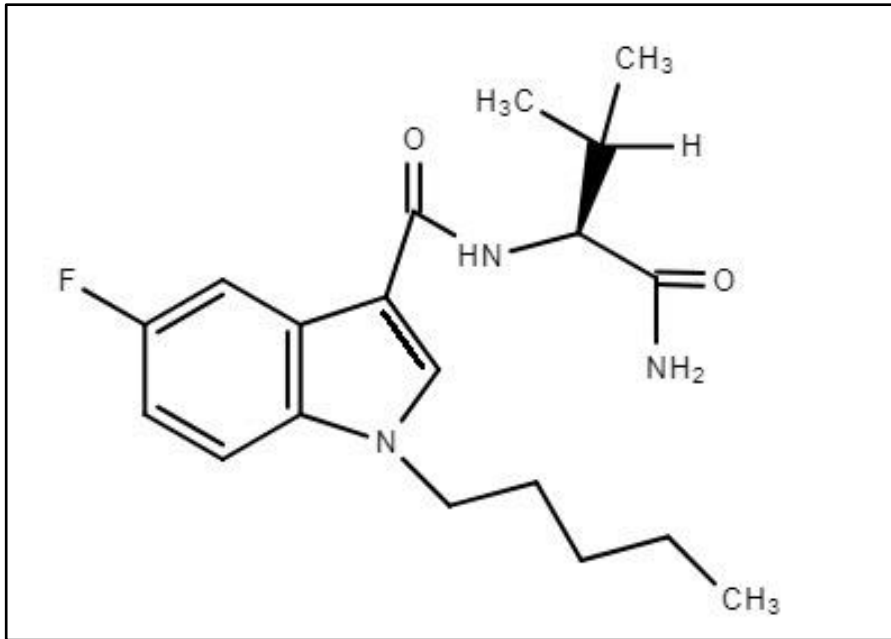
**Şekil 1.8.** İndol türevlerinin apoptozis ve hücre döngüsü blokajını indüklemesi (Zigová vd., 2024'ten modifiye edilmiştir.) (Br, Brassinin; Ca, Camalexin, Der, İndol Türevleri (Derivatives))

Şekilden incelenebileceği üzere özellikle kimyasal yapı bakımından Madde 10 ile benzer olan Brassinin ve çeşitli sentetik indol türevleri, BAX ifadesinin arttırılması, BCL-2 ifadesinin azaltılması, kazpazların aktive edilmesi, apoptozom kompleksinin kurulmasının indüklenmesi, fosfotidilserin eksternalizasyonu gibi hücreyi ölüme götürecek yollarda ve p53 aracılı ve hücre döngüsü kontrol noktaları aracılı hücre döngüsünün durdurulması gibi antiproliferatif etkileri bulunmaktadır.

Pro-apoptotik bir belirteç olan BAX ve anti-apoptotik bir belirteç olan BCL-2 indol türevi Madde 10'un hücreleri apoptoza götüreme potansiyelini araştırmak amacıyla seçilmiştir.

Tez çalışmasında Doğanç vd. (2024)'nın sentezleyerek yayınladığı indol türevlerinden Madde 10'un AK'de antiproliferatif, apoptotik, hücre göç potansiyeli ve kanser kök hücre karakteri üzerindeki olası etkilerini görebilmek amacıyla epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) için E-Kaderin, N-Kaderin gen ifade düzeyleri ve hücre göçü için yara iyileşme testi; apoptoz için BAX, BCL-2 ve akım sitometride Annexin V (PE)-7AAD boyaması; köklülük için OCT4, SOX2, CD44 ve CD24 gen ifade düzeyleri; antiproliferatif etki için Ki-67 gen ifadeleri düzeyleri ve MTT deneyi ile hücre canlılığı düzeyi araştırılmıştır.

### 1.8. İndol Türevi Madde 10



Şekil 1.9. Doğanç vd. (2024)'nın sentezlemiş olduğu indol türevi Madde 10'un kimyasal yapısı

Tezimizde Doğanç vd. (2024)'nın sentezlemiş olduğu indol türevi Madde 10 (Şekil 1.9) BEAS-2B, A549 ve H1299 hücre hatları üzerinde kullanılmıştır. Madde 10, indol halkasına ilaven flor (F), pentil, metil gibi grupları içeren indol türevi bir kimyasaldır.

### 1.9. Tezin Amacı

Bu çalışmada Madde 10'un AK üzerine etkilerinin in vitro araştırılması amaçlanmıştır. **Yeni sentezlenmiş olan indol türevi Madde 10'un AK üzerinde ilk kez** antiproliferatif, apoptotik, anti-metastatik, EMT baskılayıcı ve köklülük üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

Çalışma daha önce AK üzerinde uygulanmamış olan indol türevi Madde 10'un BEAS-2B sağlıklı akciğer, A549 ve H1299 kanserli akciğer hücre hatları üzerinde etkinliğinin araştırılacağı ilk çalışma olma niteliği taşımaktadır. Yeni sentezlenmiş bir ilaç adayı molekülün ilk kez AK hücreleri üzerindeki antiproliferatif, apoptotik, anti-metastatik, EMT baskılayıcı ve köklülük üzerindeki etkilerinin araştırılacak olması özgünlüğünü oluşturmaktadır. Projenin sonuçları agresif bir kanser türüne karşı ilaç geliştirilmesi konusunda literatüre katkı sunması ve bir ilaç adayı önermesi açısından değerlidir.

Madde 10 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Hakan GÖKER ve ekibi tarafından sentezlenmiş olup 12. Kalkınma Planı'nın İlaç ve Tıbbi Cihaz başlığı altında amaç, politika ve tedbirler kısmında yer alan ilgili maddeler kapsamında ilaç olma potansiyelinin değerlendirilmesi açısından önemli katkılar sağladığı düşünülmektedir.



## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

Bu tez çalışmasında hücre kültürü, hücre canlılığı testi olan MTT deneyi, gen ifadesi için RT-qPCR yöntemi, apoptoz tayini için akım sitometrik tayin ve hücre göçü için yara iyileşme testleri kullanılmıştır.

#### 2.1.1. Hücre Hatlarının Temini

Hücre hatları Dr. Süreyya BOZKURT tarafından laboratuvarımıza hibe edilmiştir.

#### 2.1.2. Akciğer Hücre Hatları Kültürü, Dondurulması, Çözülmesi ve Pasajlanması

Her hücre kendi ihtiyacına uygun besiyerinde kültürlenir. Besiyerleri hücrenin ihtiyacına göre vitamin, mineral, serum vb. içerecek şekilde bazal besiyerine eklemeler yapılarak hazırlanır. Bu tezde kullanılan BEAS-2B sağlıklı akciğer, A549 ve H1299 kanserli akciğer hücre hatlarının kültürü 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde, %10 Fetal Sığır Serum (FBS), %1 L-glutamin ile %1 Streptomisin-Penisilin içeren RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) içerisinde kültürleri yapılmıştır. Hücreler düzenli olarak mikroskop altında incelenir. Deneylerden önceki günlerde veya pasajlanma yoğunluğuna gelene kadar 2-3 gün aralıklarla beslenmeleri tercih edilir. Hücreleri beslemek için laminar flow kabin içerisinde var olan besiyerine ekleme yapılabilir veya yapışan hücrelerde uygulanabileceği şekliyle üzerinden eski besiyerinin tamamı veya bir kısmı çekilerek yeni besiyeri koyulabilir.

Hücreler uzun süreli saklanabilmesi amacıyla uygun dondurma solüsyonu (laboratuvarımızda %90 besiyeri %10 DMSO (dimetil sülfoksit) ile hazırlanır) içerisinde dondurularak saklanırlar. Hücre kültürünü başlatmak için dondurulmuş olan hücre stoklarından alınarak hızlı bir şekilde çözülmesi sağlanmalıdır. Su banyosu, elde ısıtma gibi seçeneklerden uygun olanı tercih edilebilmektedir. Hücre stoğu dışarıya alınmadan önce hızlı hareket etmek ve hücrelerin DMSO içeren dondurma solüsyonuna çözüldükten sonraki maruz kalma süresini azaltmak amacıyla laminar akış kabin içerisinde gerekli hazırlıkların

tamamlanması uygundur. Besiyeri, hücre kültürüne uygun flask, çözündürme sonrası santrifüj için kullanılacak falkon tüp ve gerekli diğer ürünler olan pastör pipet, mikropipet, pipet ucu, atık kabı gibi malzemeler kabin içerisine alınır. Flask, falkon hücreye göre etiketlenir. Santrifüj falkona uygun olacak şekilde ayarlanır.

- Hazırlıklar tamamlanır.
- Dondurma tüpündeki hücre dışarı alınarak buz çözüne kadar hızla ısınması sağlanır.
- Falkon tüp içerisine yaklaşık 3ml kadar besiyeri alınır.
- Çözünen hücre bekletilmeden dikkatle pipetle çekilerek yavaşça falkon tüp içerisindeki besiyerine alınır.
- Falkon tüpün kapağı kapatılarak santrifüje alınır. 1500rpm'de 3dk santrifüjlenir.
- Bu sırada hücre kültür flaskı içerisine (T25 flask için 6ml, T75 flask için 15ml civarı tercih edilebilir) besiyeri alınır.
- Santrifüjü biten hücre laminar akış kabini içerisine alınır ve pellete dikkat edilerek süpernatantı uzaklaştırılır.
- Pellet dikkatli bir şekilde yaklaşık 1 ml besiyerinde nazıkçe pipetlenerek çözülür ve hücre kültür flaskına alınır.
- Ters mikroskopta yoğunlukları ve morfolojileri kontrol edilir.
- Flask CO<sub>2</sub> inkübatöre kaldırılır. 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> düzeyinde nemli bir ortamda inkübe edilir.
- Laminar akış kabini içerisindeki malzemeler temizlenir ve atıklar dikkatle uzaklaştırılır.

Hücrelerin flaskta %70-80 konfluent durumuna göre 3-5 günde bir pasajları gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin overpopüle olmamasına dikkat edilerek pasajlama yapılır. Overpopüle olan hücreler yeterli alan ve besin bulamayarak fizyolojik değişikliklere gidebilirler. Kültürün sağlıklı devamlılığı ve deneylerin tekrarlanabilirliği açısından overpopülasyondan kaçınılır. Yapışan hücrelerin pasajlanması için flasktan ve birbirlerinden ayrılmasını sağlayacak Tripsin-EDTA gibi bir madde kullanılır. Tripsin-EDTA besiyeri içerisindeki serum sayesinde inhibe edilebilen bir proteazdır. Yapışan hücrelerde tüm besiyeri çekilerek atılır ve flask boyutuna uygun miktarda tabanın tamamını kaplayacak kadar (0,5-1,5 ml civarı, ihtiyaca ve Tripsin-EDTA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak) eklenerek kabın tabanına tüm hücrelere temas edecek şekilde yayılması sağlanır. Hücre kültür flaskı inkübatöre kaldırılır, 3-5 dk hücreler yüzmeye başlayana kadar kontrollü bir şekilde bekletilir. Bu aşama gözle de görülebilir. Mikroskop altında kontrol edilip hücrelerin yüzdüğü görüldüğü noktada daha fazla bekletilmeden laminar akış kabini içerisine alınır ve flask içerisine en az Tripsin-EDTA miktarınca besiyeri alınarak dikkatle pipetlenerek toplanıp falkon tüp içerisine alınarak kapağı dikkatle kapatıldıktan sonra kabinden çıkarılıp santrifüje alınır. 1500 rpm'de 3dk santrifüjlenir. Santrifüj sonrası kabin içerisinde pellete dikkat edilerek süpernatant uzaklaştır. Pellet büyüklüğüne uygun olacak miktarda besiyerinde çözülür. 1-3 ml gibi miktarlar tercih edilebilir. Hücre denemesi için veya kültür devamlılığı için bu adımda sayım yapılabilir. Yeni bir hücre kültür flaskı hücreye uygun olacak şekilde etiketlenerek içerisine hücre çözme kısmında belirtilen miktarlar kadar besiyeri alınır. İstenilen sayıda/miktarda hücre hücre kültür flaskı içerisine alınarak kapağı kapatılır ve hücrelerin besiyerinde dağılması sağlanır. Flask ters mikroskop altında incelenip inkübatöre kaldırılır.

Hücre sayımı, hücrelerin stoklanması, deneylerin planlanması gibi aşamalarda önem arz etmektedir. Hücreler kültür flasklarından uygun şekilde toplanıp santrifüjlendikten sonra süpernatantları uzaklaştırılır ve pelletleri ihtiyaca göre 1-3 ml besiyerinde pipetlenerek çözülür. Bu aşamada sayım için özel olarak kullanılan otomatik cihazlar veya manuel sayım için tasarlanmış lamalar kullanılabilir. Manuel sayım için özel olarak tasarlanmış olan lamaların kendi hacimsel alanlarına uygun olarak belirlenen katsayıları (sayım sonucu x dilüsyon faktörü x lam katsayısı) şeklinde sayım hesaplaması içerisinde kullanılır. Örneğin Neubauer, Improved Neubauer, Bürker, Thoma gibi çeşitli mantıklara dayanarak hücre sayımı için özelleştirilmiş lam çeşitleri bulunmaktadır. Bunların en yaygınlarından biri Thoma lamıdır. Thoma lamında sayım için aynı anda kullanılabilecek 2 odacık bulunmaktadır. Lamın üzeri bu odacıkları kapsayacak şekilde lamel ile kapatıldığında lam ve

lamel arası odacığın derinliği 0,1mm olur. Bu alana dilüe edilmiş hücre örneğinden 10µl alınır. Sayım alanı bir kenarı 0,05mm olan 25 adet kareyi içeren 16 büyük kareden oluşmaktadır. Bu mantığa dayanarak yapılan hesaplamalarda lamın katsayısı 10000 olarak kullanılır. Tüm alanda sayılan hücre miktarı x dilüsyon katsayısı x lam katsayısı üzerinden elimizdeki çözölmüş pelletin içerdığı hücre sayısına ulaşılır. Manuel bir sayım yöntemi olması sebebiyle lam alanına düşecek hücre sayısının çok fazla veya çok az olmamasına dikkat edecek şekilde pellet büyüklüğüne uygun olarak dilüsyon sağlanır ki sayım sonucu olabildiğince gerçeğe yakın olsun. Örneğin santrifüj sonrası süpernatantı atılan pellet 3ml besiyerinde çözölürse dilüsyon katsayısı 3 olacaktır. Bu prensiplere dikkat edilerek sayılan hücreler ihtiyaç kadarı kolayca hesaplanabilmektedir.

Hücreler kültürlerinin istenilen zamanlarda devam ettirilebilmesi, olası kontaminasyon durumunda kültür dışında temiz stokların olması gibi sebeplerle dondurularak stoklanmaktadır. Örneğin pasaj sayısı takip edilen hücreler erken pasajlarda stoklanarak kültürde hücre pasajı ilerlerken stokta istenildiği noktada alınıp daha erken pasajlardan kültürlenebilir. Hücrelerin çözümünde hızla çözölmesi gerektiğinden bahsetmişken burada tam tersi yavaş bir süreçten bahsetmekteyiz. Hücreler uygun dondurma solüsyonu olmadan ve hızla dondurulurlarsa içlerindeki su hızla kristallenerek hacmen genişler ve hücrelerimizi patlatır. Bu durumdan kaçınmak için dondurma solüsyonu içerisinde dakikada 1°C soğutularak dondurulur.

- Kültürdeki hücre laminar akış kabin içersine alınır ve pasajlamada pellet üzerinden süpernatantın uzaklaştırılmasına kadar aynı şekilde uygulamalar yapılır.
- Hücreler sayılır ve her bir dondurma tüpü (cryo vial) içersinde 1 ml dondurma solüsyonu içersinde 2-4 milyon hücre olacak şekilde pellet dikkatle çözölür ve fazla pipetlemekten kaçınılır. Dondurma solüsyonu kristallenmeyi önleyici gliserol, DMSO gibi maddelerden %10 içerecek şekilde kalanı inative serum veya hücreye uygun tam besiyeri ile tamamlanarak hazırlanır.
- Her bir dondurma tüpünde 1 ml hücreli dondurma solüsyonu olacak şekilde paylaşılır.
- Buz içeren izolasyon sağlayan bir kutuya alınarak dakikada 1°C donması sağlanacak şekilde 5 dk +4°C'de, 20dk -20°C'de, gece boyu -80°C'de tutularak(dondurma

protokolü dakikada 1°C soğumayı sağlayacak şekilde laboratuvar imkanlarının el verdiği haliyle modifiye edilebilir) sonrasında uzun süreli saklama için sıvı azot tankına alınır.

### **2.1.3. Hücre Canlılığının MTT Deneyi ile Belirlenmesi**

Madde 10'un hücre hatları üzerinde antiproliferatif etkinliğinin belirlenmesi amacıyla aşağıdaki protokol izlenmiştir.

Madde 10'un akciğer hücre hatları üzerindeki canlılığa olan etkisine karşılık gelen IC50 dozunu belirlemek amacıyla metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) deneyi seçilmiştir. MTT deneyinde, sağlıklı akciğer hücre hattı BEAS-2B ve kanseri akciğer hücre hatları A549 ile H1299 6x10<sup>3</sup> hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara 100 µl hücreli besiyeri karışımı içerisinde ekilmiştir.

Hücrelerin yapışması için bir gece beklenmiştir. Ertesi gün artan dozlarda (literatürde belirtilen değerler baz alınarak) indol türevi Madde 10 48 saat süreyle uygulanmıştır. Süre sonunda kuyu başı 10 µl MTT ajanı (MTT ajanı PBS'de 5 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır) eklenip 2 saat 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilmiştir. 2 saatin sonunda kuyu başı 100 µl MTT ajanı için çözücü solüsyonu eklenmiş ve bir gece 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde gece boyu inkübe edilip ertesi sabah spektrofotometre cihazında 550 ve 690 nm dalga boylarında okuması yapılmıştır.

### **2.1.4. Hücre Göçü Değerlendirmesi için Yara İyileşme Testi**

Kanser hücre hatlarının göç yeteneklerinin uygulanacak olan kimyasaldan etkilenme durumunu karşılaştırmak amacıyla MTT deneyi sonucu belirlenen konsantrasyonlarda uygulama yapılarak kanser hücre hatlarının aynı konsantrasyonlardaki Madde 10'a verdikleri tepki yara iyileşmesi açısından 0, 24 ve 48. saatlerde alınan fotoğraflardan hücrelerin göç ettikleri alanın tayini yapılarak karşılaştırma sağlanmıştır.

Kanser hücre hatları 12 kuyucuklu plaka üzerinde 5x10<sup>5</sup> hücre/kuyu olacak şekilde 1ml hücreli besiyeri karışımı olacak içerisinde ekilmiştir. Bir gece hücrelerin yapışması için beklendikten sonra kuyuların orta hatlarından 1000µl hacimli mikropipet ucuyla çizilmiştir. İşlem sonrası tüm besiyeri alınarak 900 µl taze besiyeri eklenmiştir. Madde 10'un 100 µl

olacak şekilde seçilen 50µM ve maksimum doz olan 100µM ve en yüksek dozdaki çözücü miktarına denk gelen çözücüyü içeren kontrol besiyeri ile uygulama yapılmış ve 48 saat 37°C’de, %5 CO<sub>2</sub>’li etüvde inkübasyona alınmıştır. 0, 24 ve 48. saatlerde kuyuların tam ortasından görseller alınmış ve hücresiz alan tayini Image J programı kullanılarak yapılmıştır.

### 2.1.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)

Kanserli hücre hatları Madde 10 ile muamele edildikten sonra daha önce belirtilen genlerin ifadelerini gerçek zamanlı kantitatif PCR (q-PCR) ile saptamak amacıyla örnekler toplanarak RNA izolasyonu yapılmıştır.

RNA izolasyonu amacıyla yapılan deneyde 12 kuyucuklu plakalara 5x10<sup>4</sup> hücre/kuyu üzerinden kontrol ve 50µM Madde 10 uygulama kuyuları 24 ve 48 saatlerde muamele süresi olacak şekilde ekim ve madde uygulaması yapılmıştır. RNA izolasyonu sırasında kültür ortamındaki hücreler 300 x g’de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant kısım atılmıştır. Pellet üzerine Trizol eklenip homojenize edilerek hücreler oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Her tüpe 300 µl kloroform eklenmiştir. Tüpler elle 15 sn. boyunca çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir.

12,000g.’de 4°C, 15 dk santrifüj edilip santrifüj sonrası alttaki faz kırmızı fenol-kloroform fazı, ara faz ve renksiz-akıcı üst faz olmak üzere 3 faz oluşmuştur. Üst fazda yer alan RNA, RNaz içermeyen önceden etiketlenen yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 0.5 ml izopropil alkol eklenip oda sıcaklığında 10dk inkübe edilip tüpler 12,000 x g’de 10 dk 4°C’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatlice atılıp, 1 ml %75’lik etanol eklenerek örnekler karıştırılmış ve 7,500 x g.de 5 dk 4°C’de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır.

RNA pelleti oda sıcaklığında bekletilerek havayla kurutulmuş, sonrasında RNA, pellet büyüklüğüne uygun olacak miktarda RNaz içermeyen 40-100µl DEPC’li su içinde çözülmüştür. Elde edilen RNA’ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotomede 260/280 nm’de belirlenmiştir.

İlk olarak hücrelerden izole edilen RNA örneklerinden 1000 ng kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Bu yöntemde cDNA sentez kiti (Biorad iScript cDNA Sentez Kiti

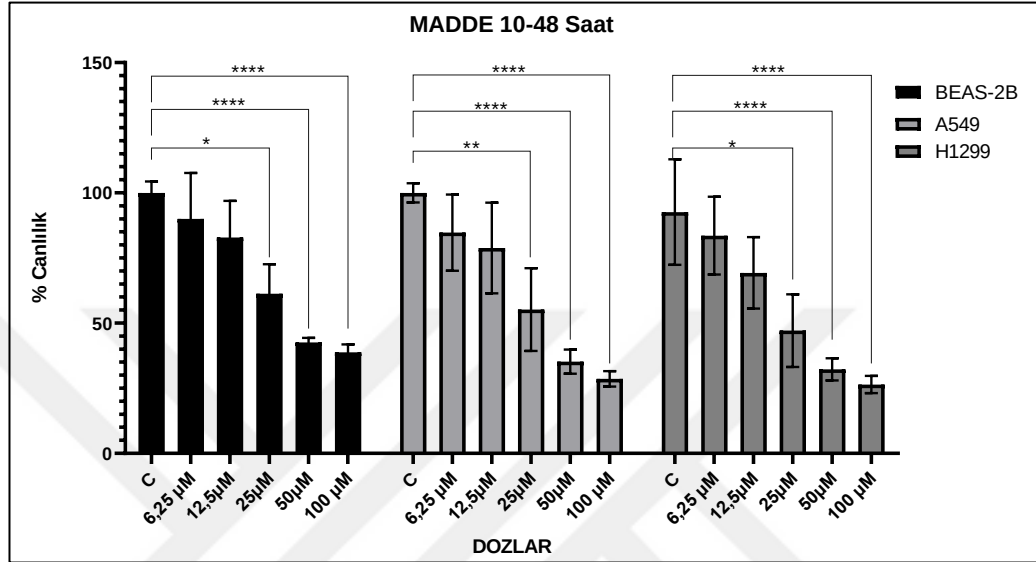
#1708890) ile sentezi sağlanmıştır. RT-qPCR için primerler, su, syber green (Biorad iTaq Universal SYBR Green Supermix #1725120) ve sentezlenen cDNA'lar kullanılmıştır.

#### **2.1.6. Akım Sitometri ile Hücre Apoptoz Tayini**

Akiđer hücre hatları ( $5 \times 10^4$  hücre/kuyu) 12 kuyulu plakalarda kültürlenmiştir. Bir gecelik inkübasyondan sonra besiyeri değiştirilip, hücreler 48 saat boyunca Madde 10'a maruz bırakılmıştır. Önceden yayınlanmış prosedüre uygun olarak Annexin-V-7AAD boyaması yapılmıştır (Duggan, 2021). Özetle, 48 saat sonra, toplanacak hücreler PBS ile yıkanır ve üreticinin talimatlarına göre Annexin-V (PE) ile boyanır. 100  $\mu$ L hücre süspansiyonuna 1X bağlayıcı tampon (binding buffer-BB) içinde 5  $\mu$ L Annexin-V (PE) eklenir ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilip aynı miktarda 7AAD eklenip yine oda sıcaklığında 5dk beklenir. Ardından, hücrelere 400  $\mu$ L 1X BB eklenir ve Accuri C6 Akım sitometrisi kullanılarak analiz edilir (Koç vd., 2018).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. MTT Deneyi Bulguları



**Şekil 3.1.** Akciğer hücrelerinde farklı dozlarda Madde 10 ile 48 saat boyunca muamelenin MTT sonuçları

İstatistiksel analizi Independent Samples Kruskal Wallis Test ile SPSS paket programı üzerinden yapılmıştır. \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001

Yukarıdaki şekilde sağlıklı ve kanserli akciğer hücrelerinde MTT denemesi yapılarak hücrelere 48 saat boyunca 6,25-100 µM doz aralığında Madde 10 uygulanıp canlılık üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Şekil 3.1).

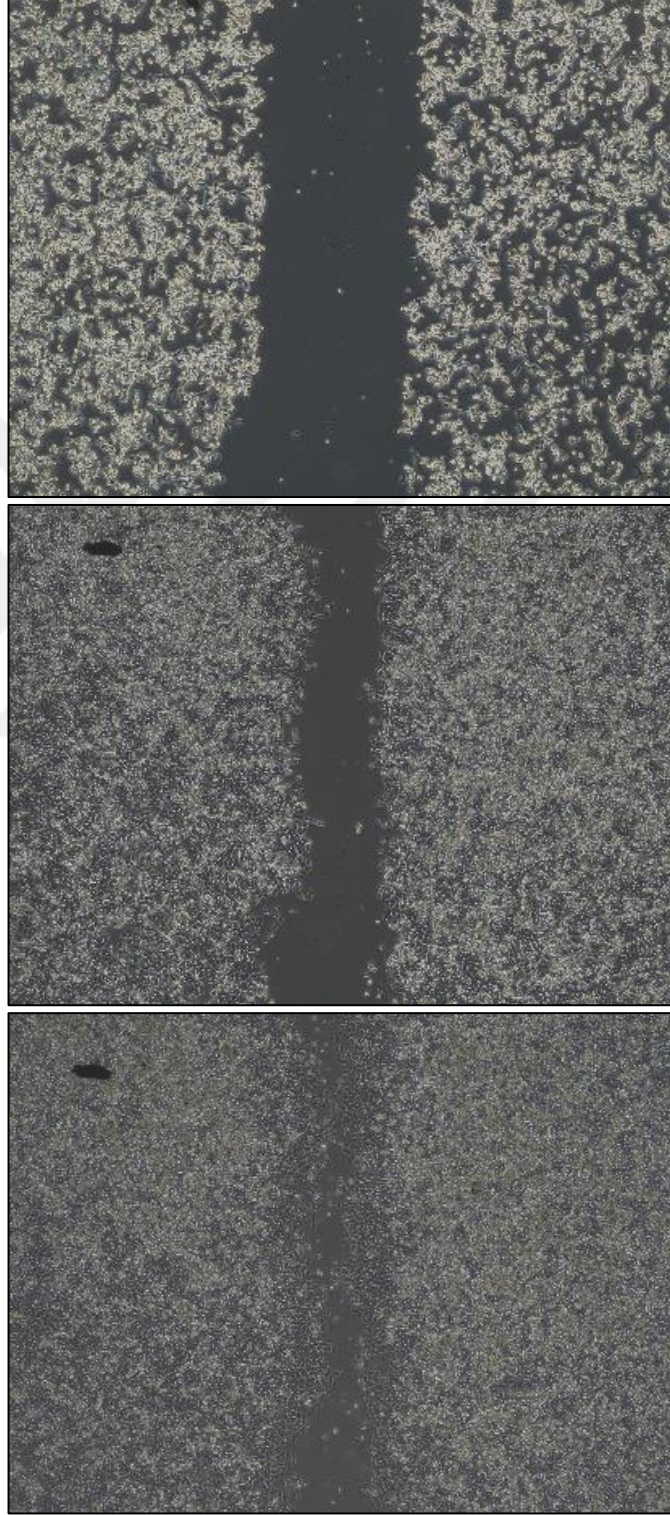
IC50 değerleri BEAS-2B, A549 ve H1299 hücre hatlarında sırasıyla 47,25 µM, 33,72 µM, 26,52 µM bulunmuş ve ileri uygulamalar için 50 µM dozu uygulama için seçilmiştir. Kanserli hücre hatları için IC50 değerlerine en yakın bir üst doz olan 50 µM ile daha büyük kuyularda daha çok hücre ekilerek planlanan diğer araştırma yöntemleri uygulanmıştır.

#### 3.2. Hücre Göçü Değerlendirmesi için Yara İyileşme Testi Bulguları

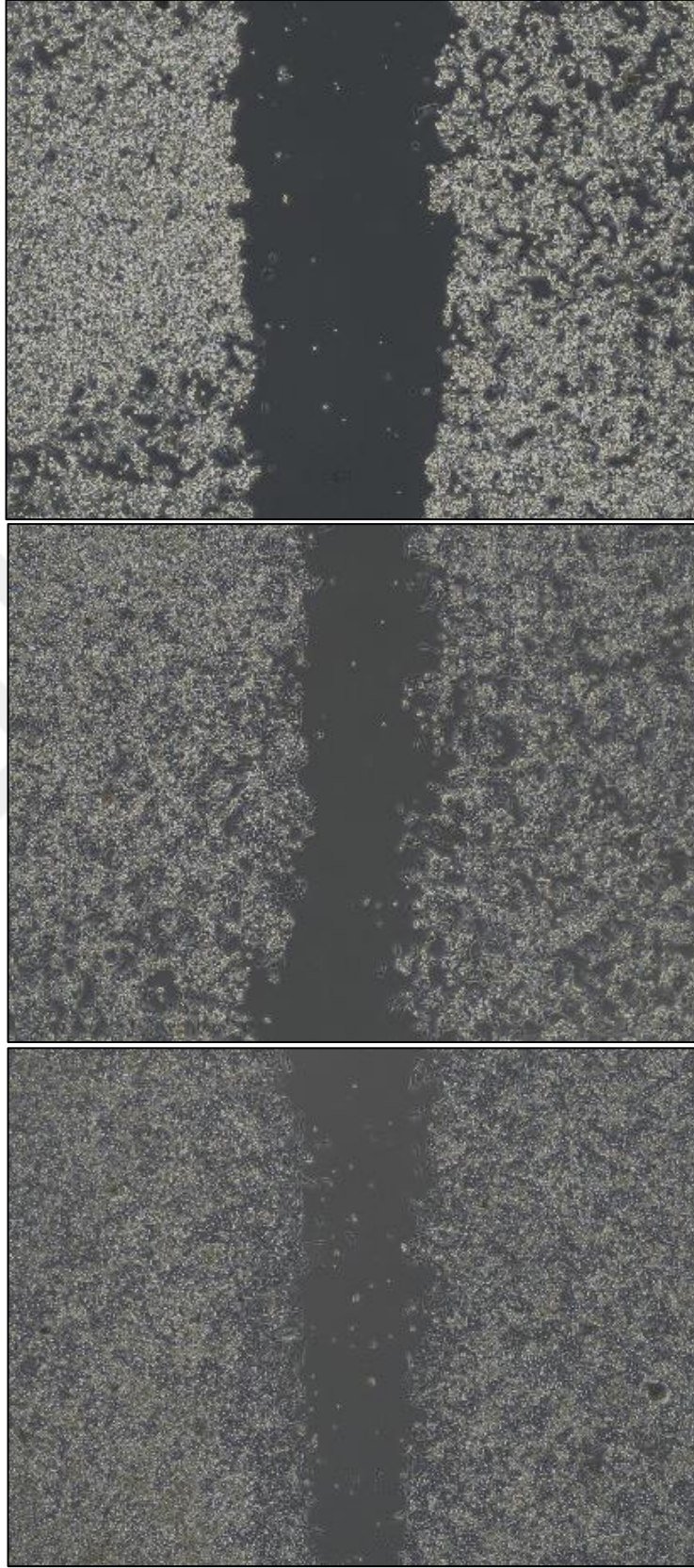
Kontrol ve deney grubu (50 µM Madde 10) 0, 24 ve 48. saatlerde fotoğraflanmıştır. Hücre göçünden geriye kalan hüresiz alan Image J analiz programında tayin edilmiştir.



İstatiksel analiz ise bu verilere göre yapılmış ve bar grafikleri hazırlanmıştır (Şekil 3.6., Şekil 3.7.). Hücre göçü değerlendirilmesi için alınan görseller Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5'te verilmiştir.

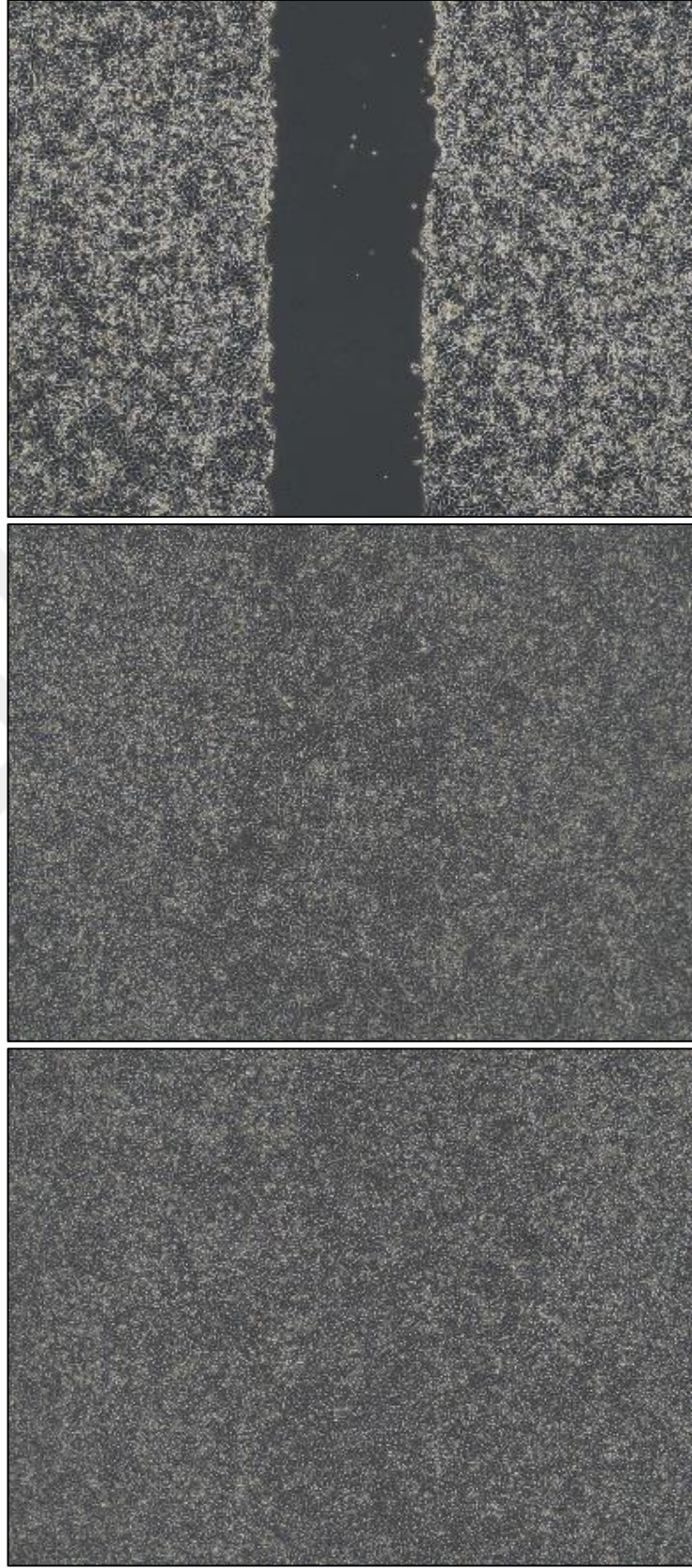


**Şekil 3.2.** Sırasıyla 0-24-48 saat kontrol grubu A549 hücre hattının yara iyileşmesi testi görselleri



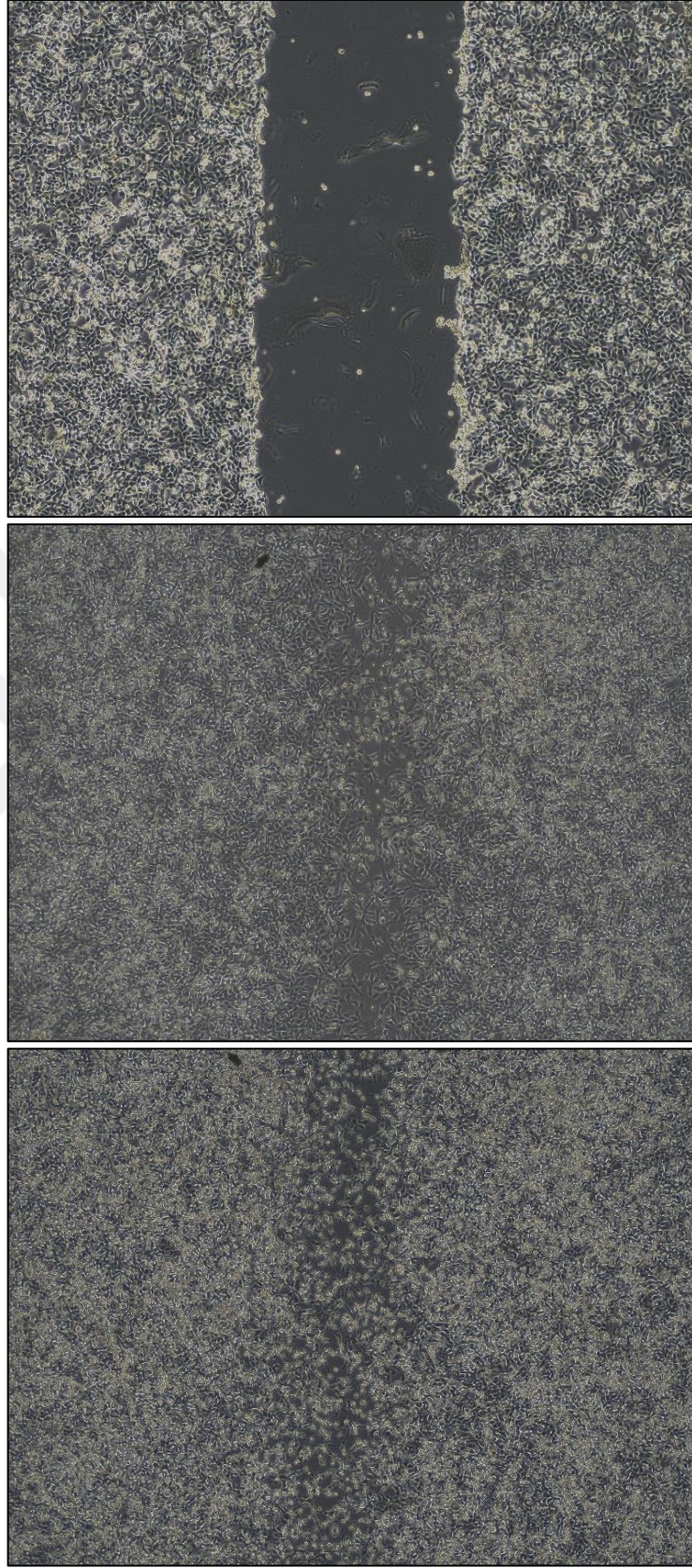
**Şekil 3.3.** Sırasıyla 0-24-48 saat 50  $\mu$ M Madde 10 uygulama grubu A549 hücre hattının yara iyileşmesi testi görselleri



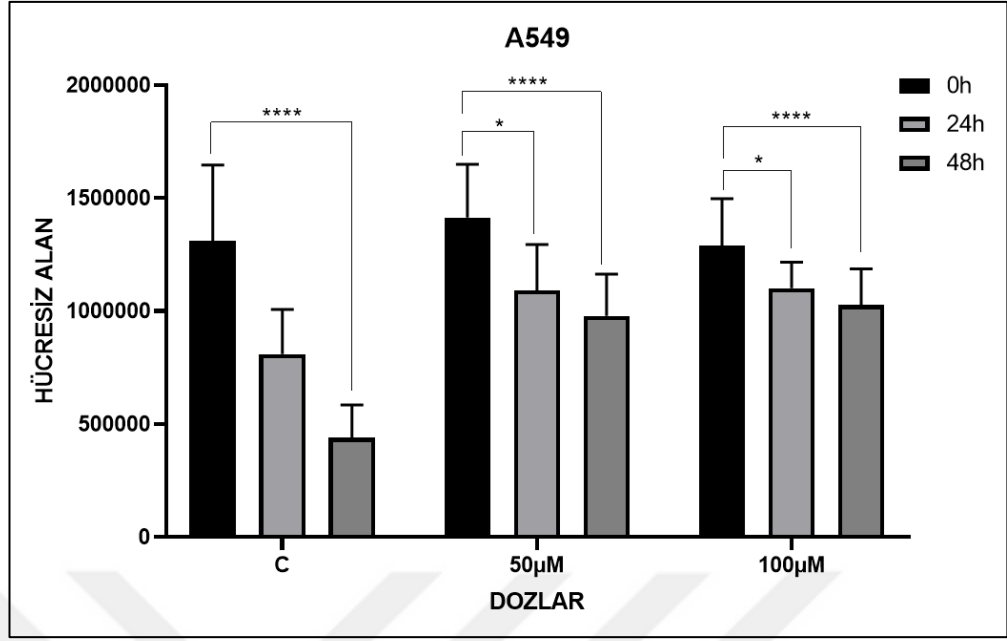


**Şekil 3.4.** Sırasıyla 0-24-48 saat kontrol grubu H1299 hücre hattının yara iyileşmesi testi görselleri



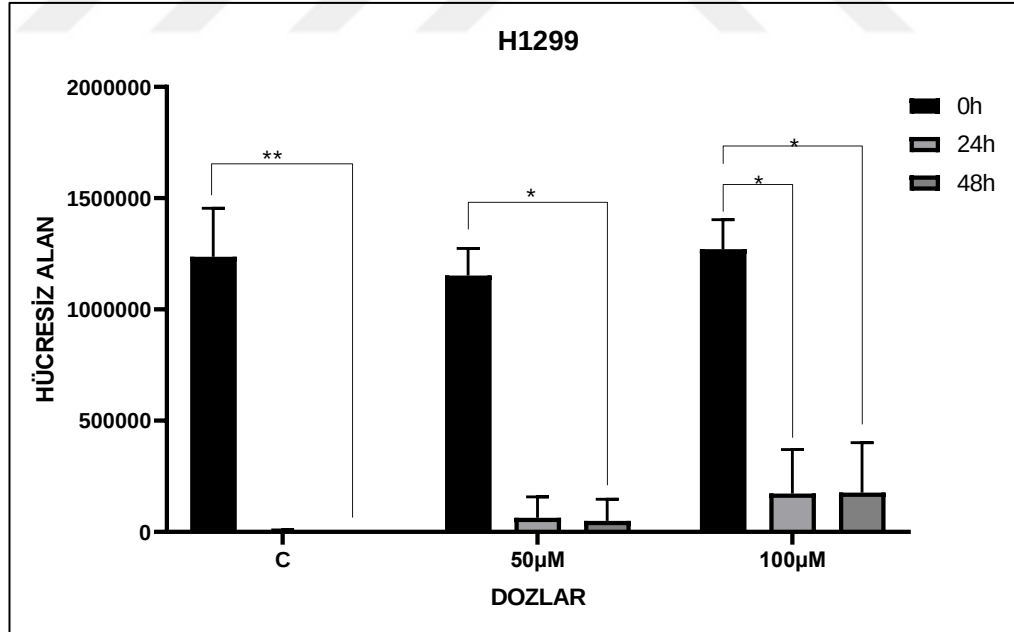


**Şekil 3.5.** Sırasıyla 0-24-48 saat 50  $\mu$ M Madde 10 uygulama grubu H1299 hücre hattının yara iyileşmesi testi görselleri



Şekil 3.6. A549 hücre hattının yara iyileşmesi testi hücre sız alan-doz grafiği

İstatistiksel analizi Related Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks yöntemiyle ile SPSS paket programı üzerinden yapılmıştır. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$



Şekil 3.7. H1299 hücre hattının yara iyileşmesi testi hücre sız alan-doz grafiği

İstatistiksel analizi Related Samples Friedman's Two-Way Analysis of Variance by Ranks yöntemiyle ile SPSS paket programı üzerinden yapılmıştır. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$

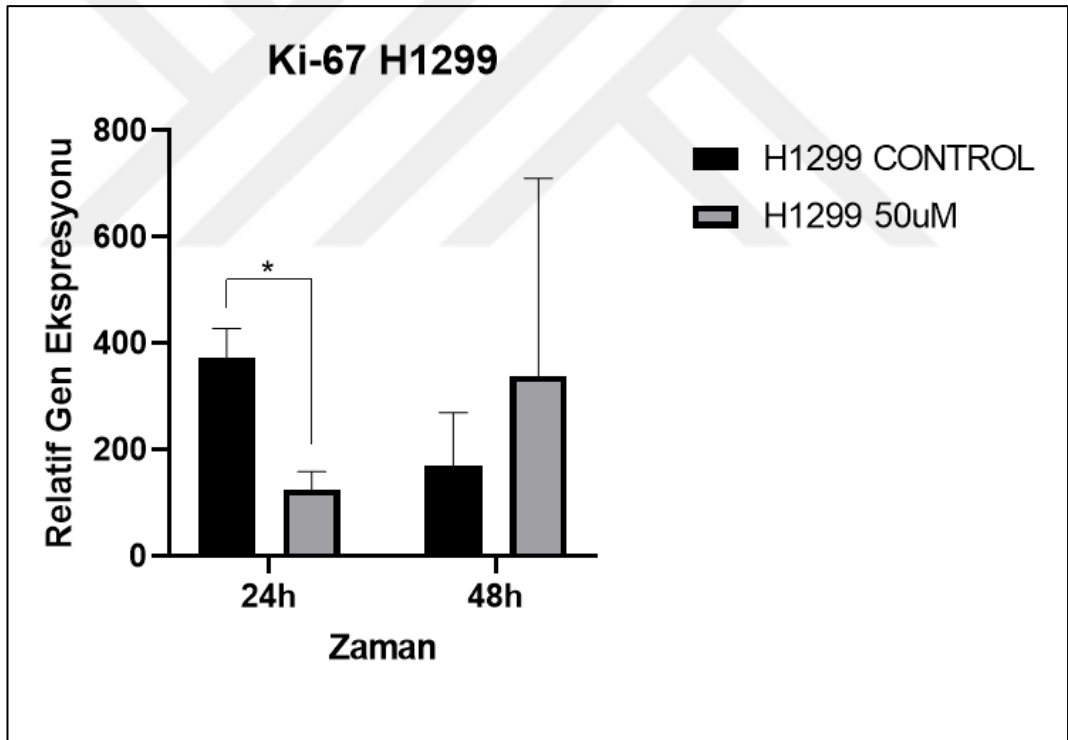
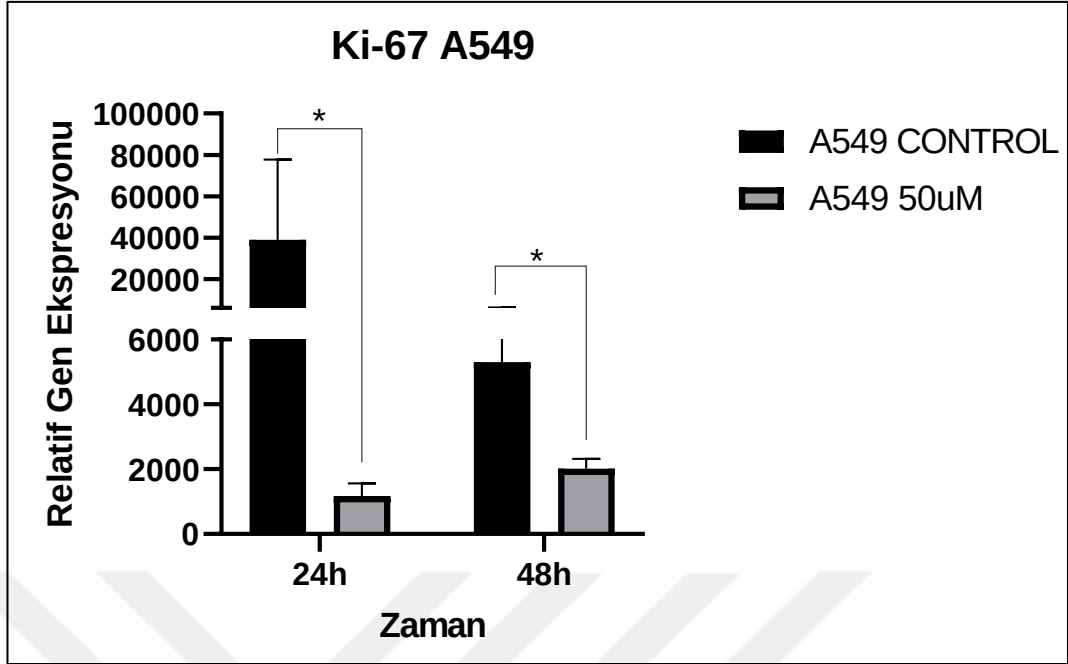
### **3.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)**

#### **Bulguları**

Bu çalışmada RT-qPCR yöntemi kullanılarak genlerin ifadesi kantitatif olarak analiz edilmiştir.

RT-qPCR çalışmamızda Ki-67, BAX, BCL-2, CD24, CD44, OCT4, SOX2, N-kaderin genleri ve referans gen GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) ekspresyon tayinleri yapıp referans gene göre relatif gen ekspresyon düzeyleri cinsinden analiz yapılmıştır. E-kaderin primeri optimize edilemediği için gen ifadesine bakılamamıştır.

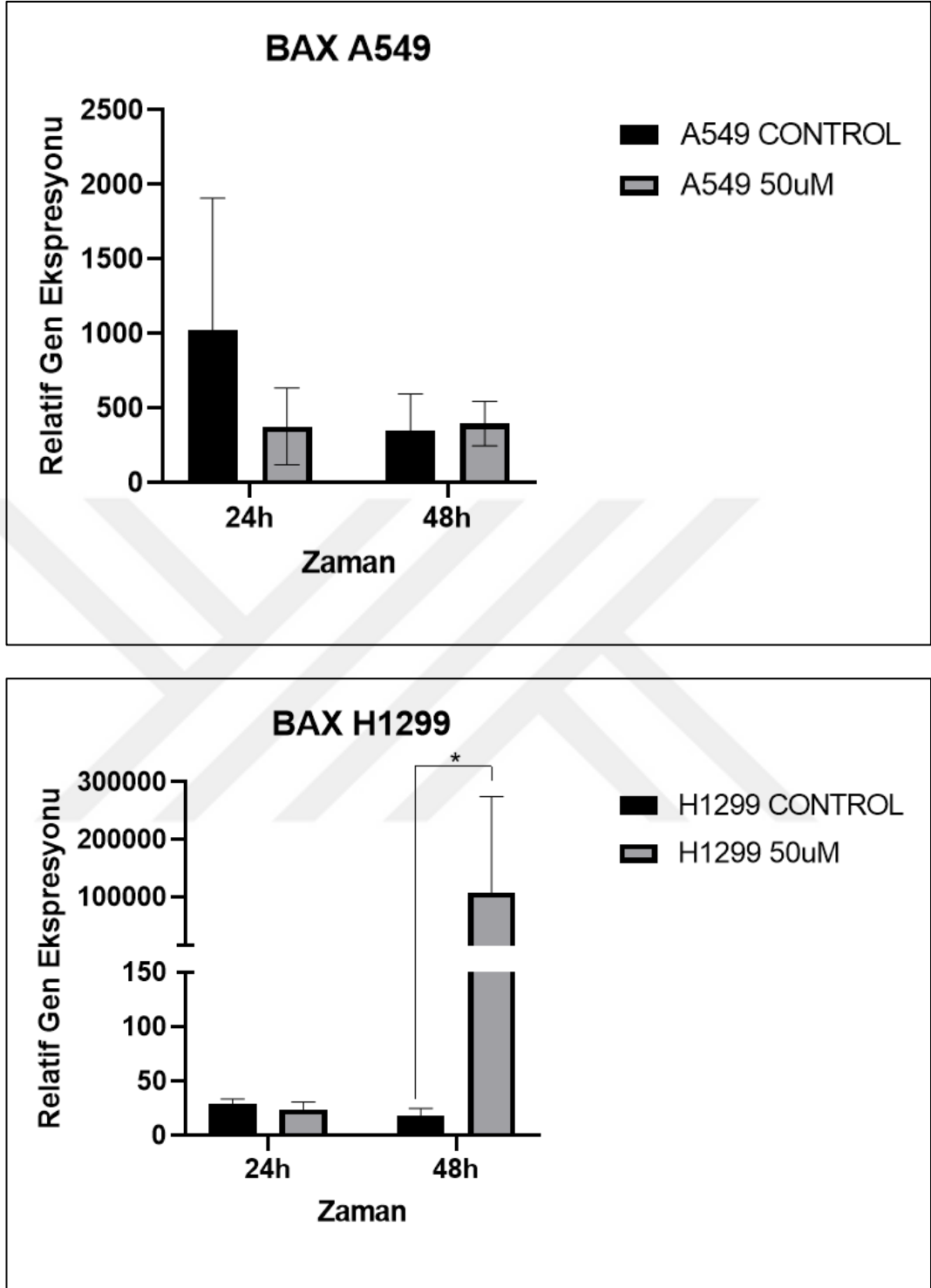
A549 ve H1299 hücre hatları için Ki-67 geni ifadesi (Şekil 3.8), BAX geni ifadesi (Şekil 3.9), BCL2 geni ifadesi (Şekil 3.10), CD24 geni ifadesi (Şekil 3.11), CD44 geni ifadesi (Şekil 3.12), OCT-4 geni ifadesi (Şekil 3.13), SOX2 geni ifadesi (Şekil 3.14), N-kaderin geni ifadesi (Şekil 3.15) relatif gen ekspresyonu/zaman şeklinde aşağıda şekillerle belirtilmiştir.



**Şekil 3.8.** Ki-67 geni relatif ekspresyon/zaman grafiği

İstatistiksel analizi Mann Whitney U Testi ile SPSS paket programı üzerinden yapılmıştır. \* $p < 0,05$

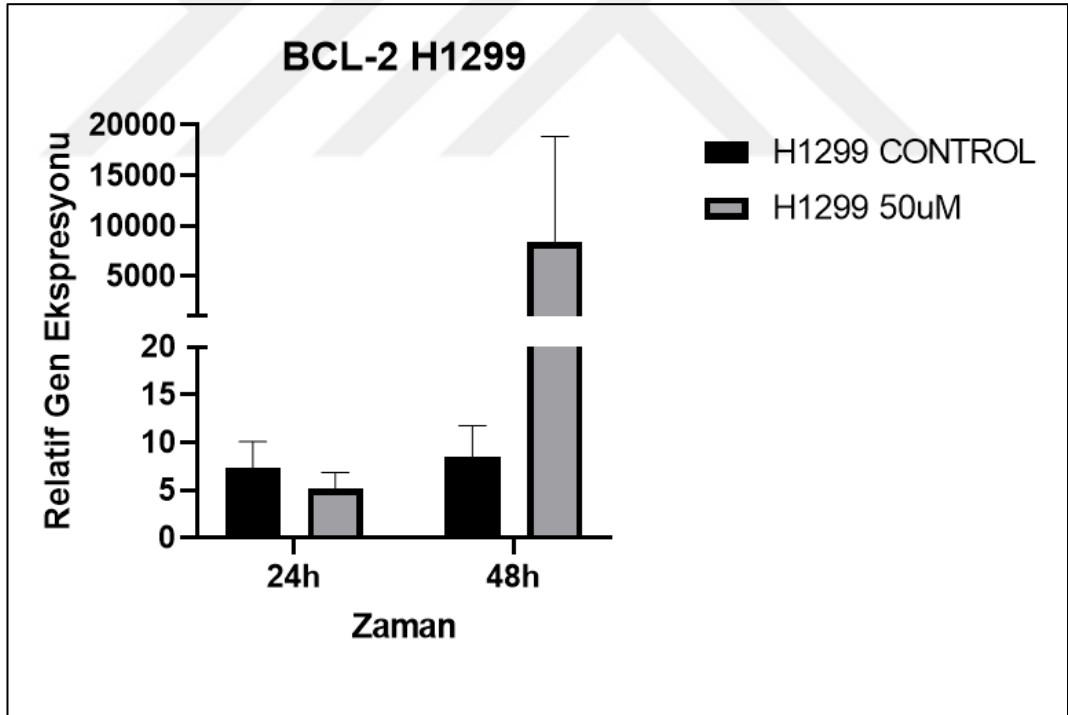
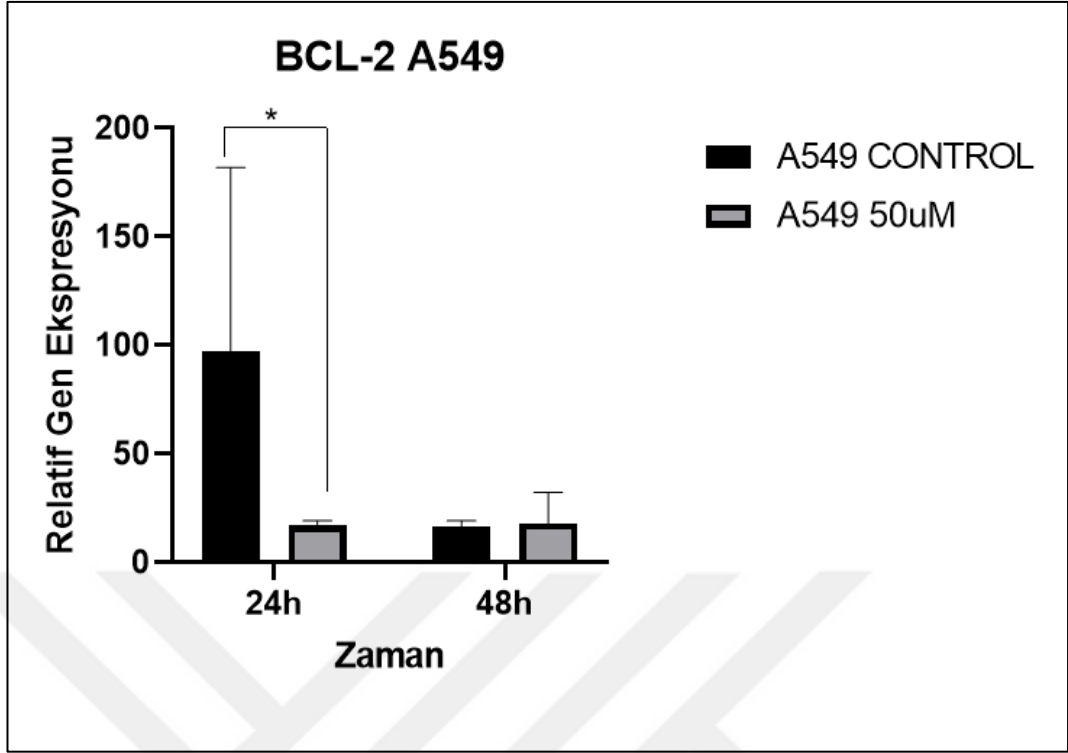
\*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$



Şekil 3.9. BAX geni relatif ekspresyon/zaman grafiği

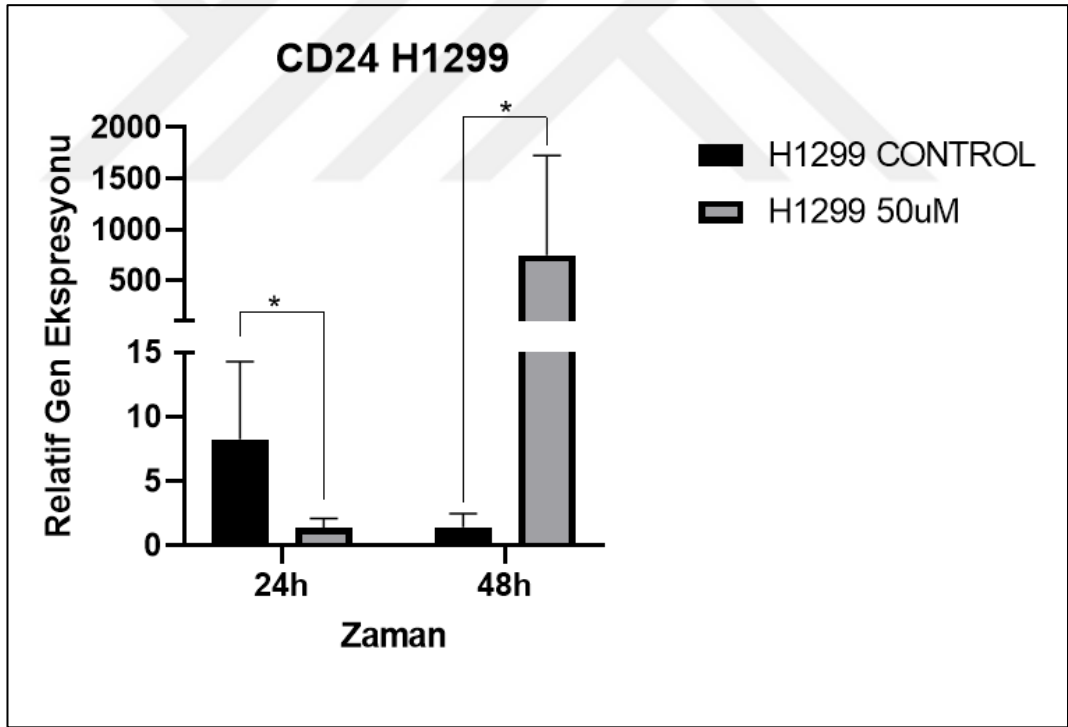
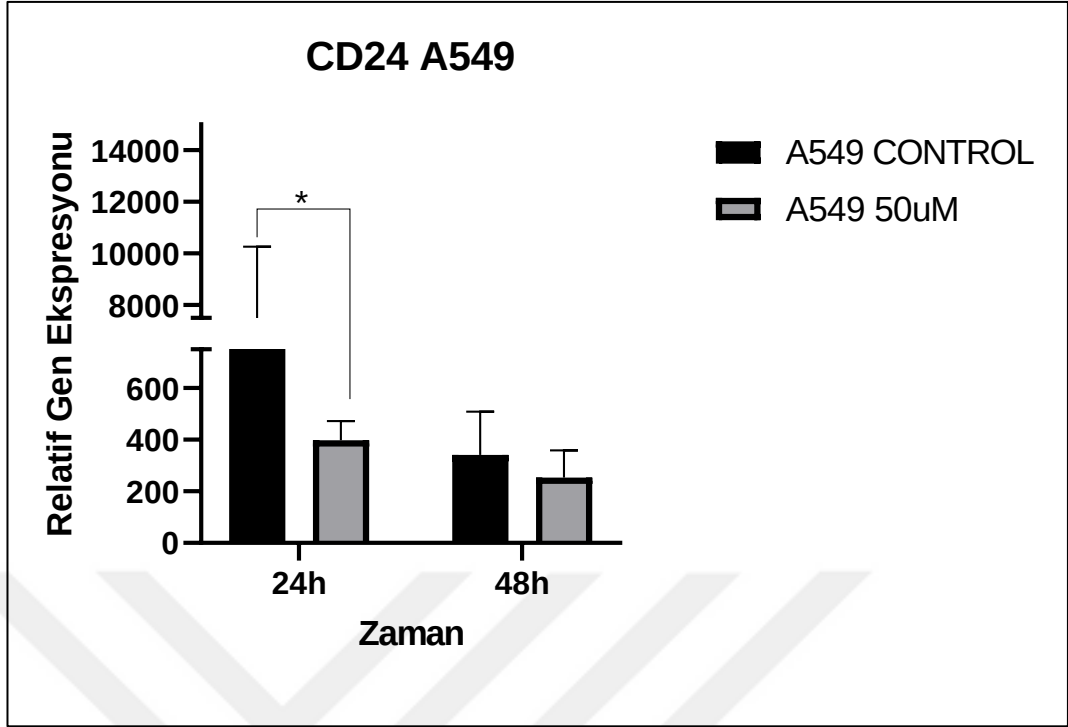
İstatistiksel analizi Mann Whitney U Testi ile SPSS paket programı üzerinden yapılmıştır. \*p<0,05  
\*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001





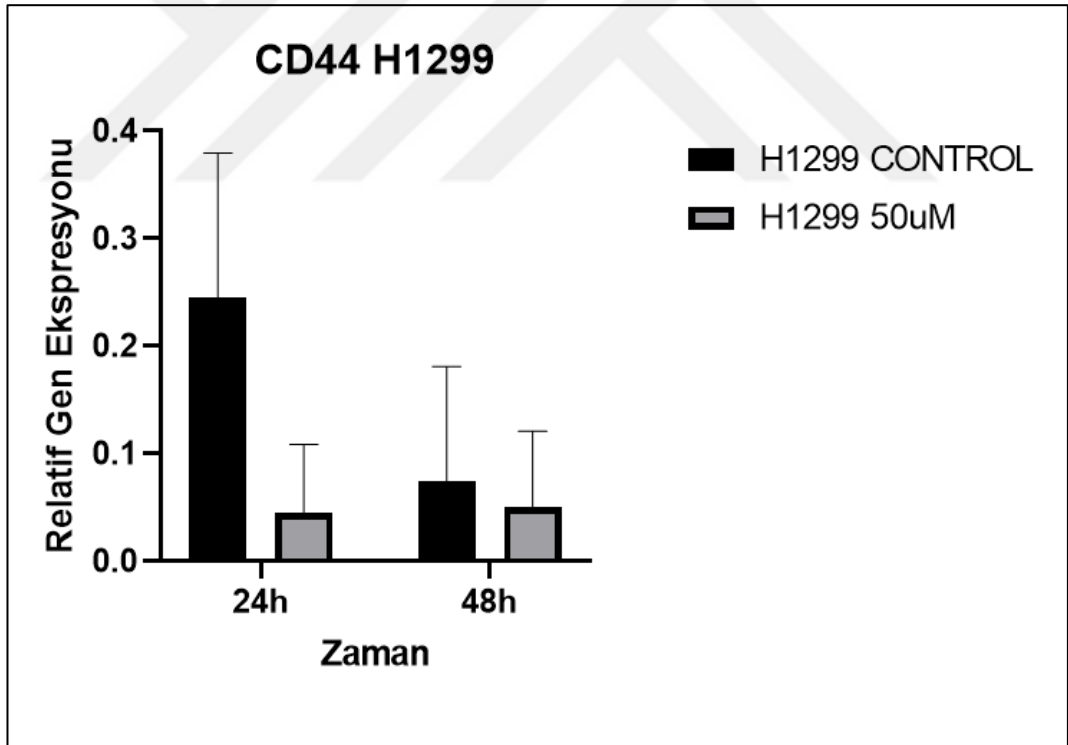
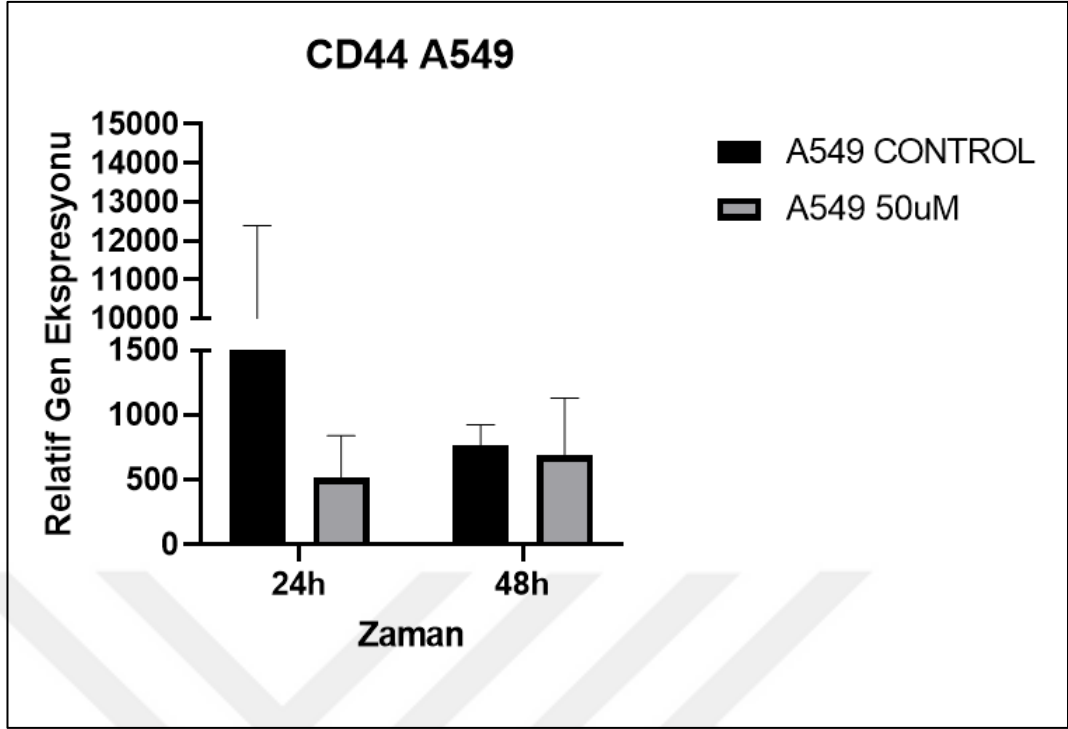
Şekil 3.10. BCL2 geni relatif ekspresyon/zaman grafiği

İstatistiksel analizi Mann Whitney U Testi ile SPSS paket programı üzerinden yapılmıştır. \* $p < 0,05$   
\*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$



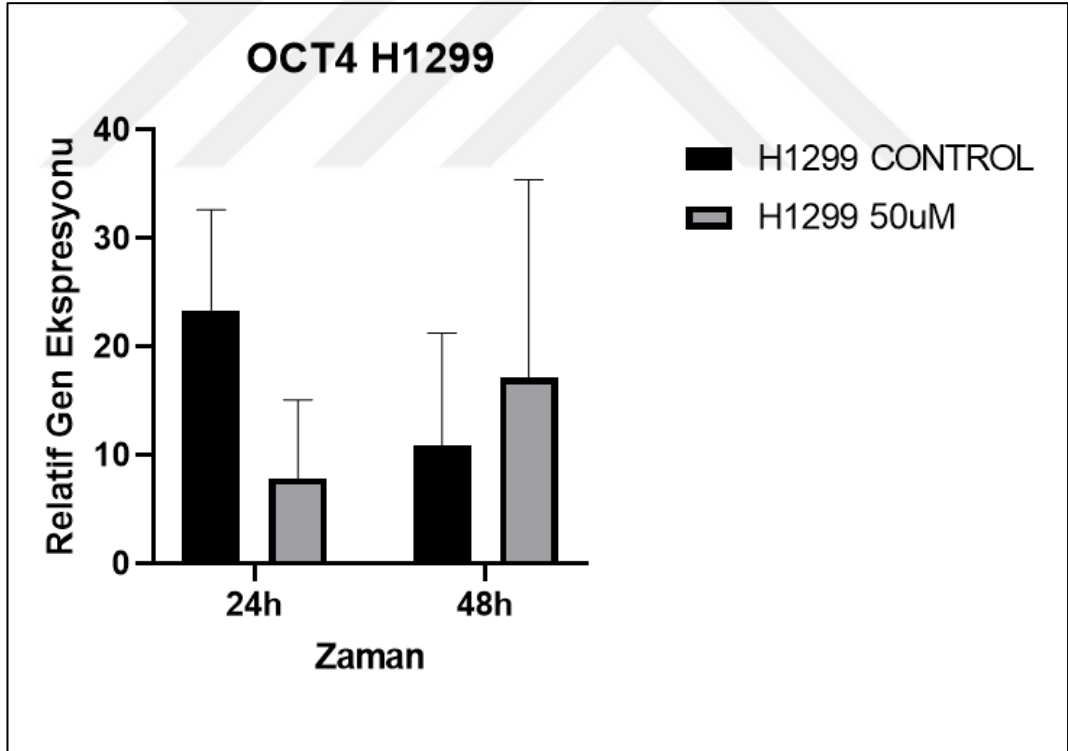
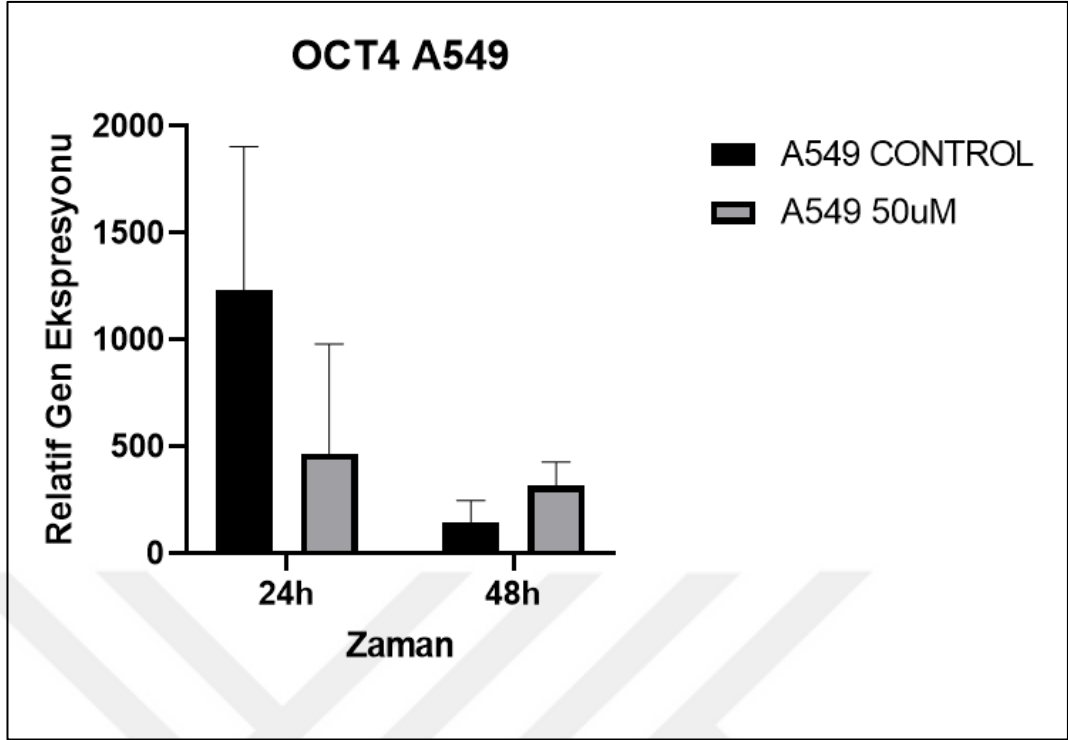
Şekil 3.11. CD24 geni relatif ekspresyon/zaman grafiği

İstatistiksel analizi Mann Whitney U Testi ile SPSS paket programı üzerinden yapılmıştır. \* $p < 0,05$   
\*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$



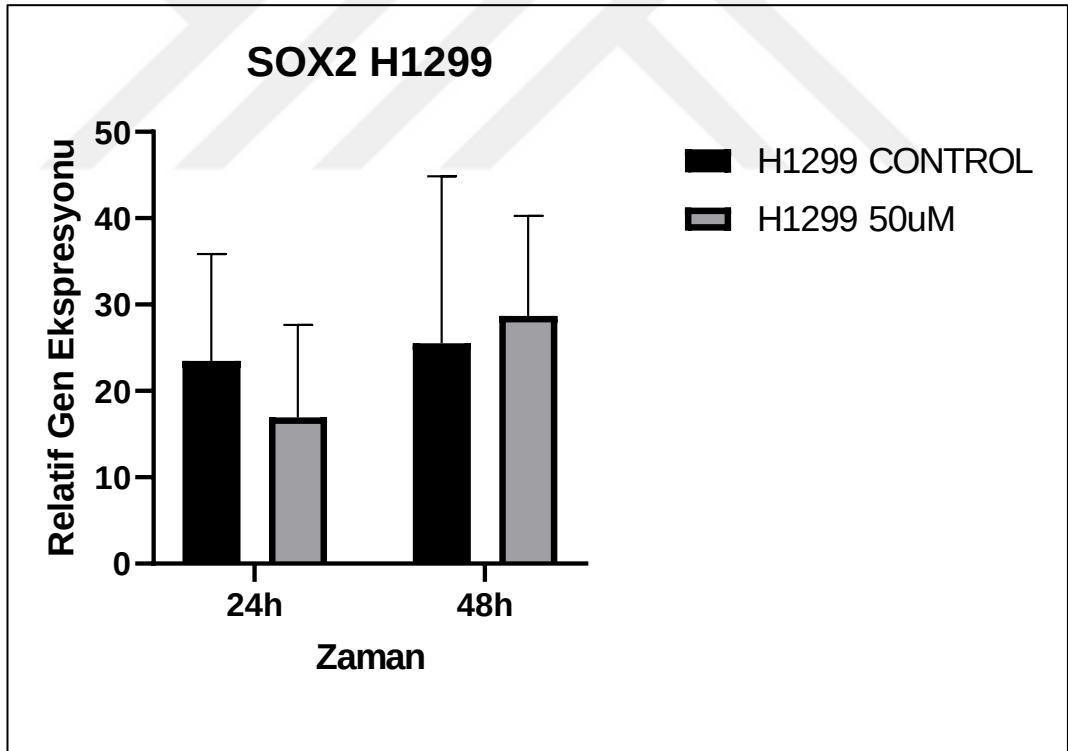
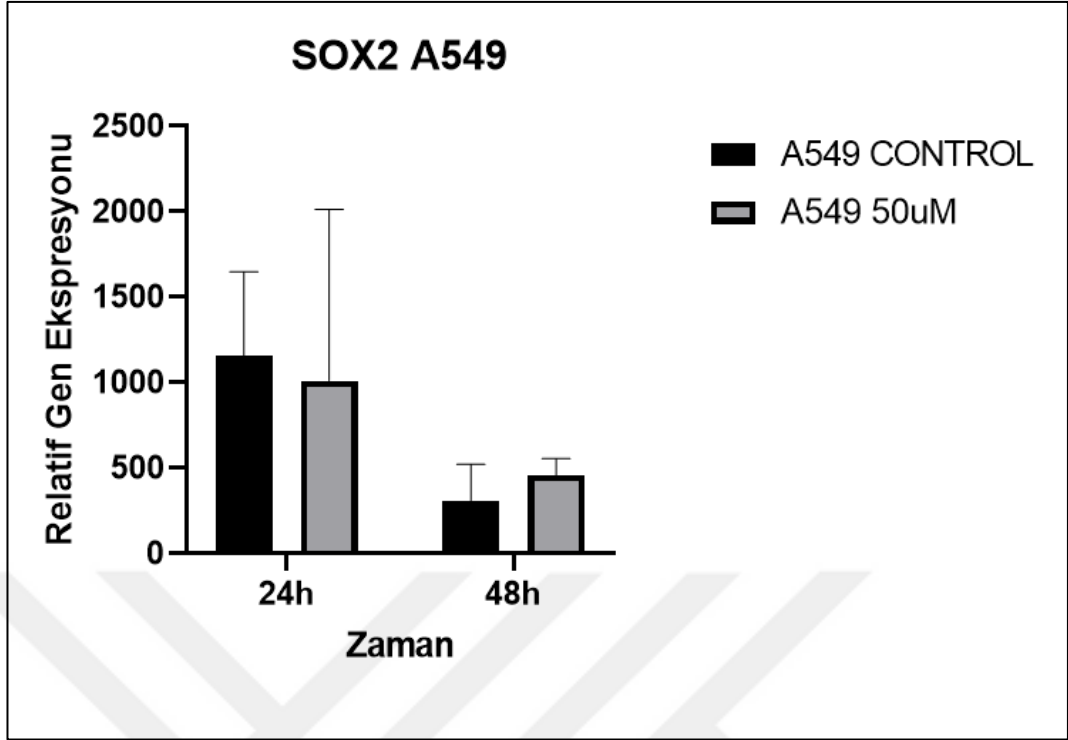
Şekil 3.12. CD44 geni relatif ekspresyon/zaman grafiği

İstatistiksel analizi Mann Whitney U Testi ile SPSS paket programı üzerinden yapılmıştır. \* $p < 0,05$   
\*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$



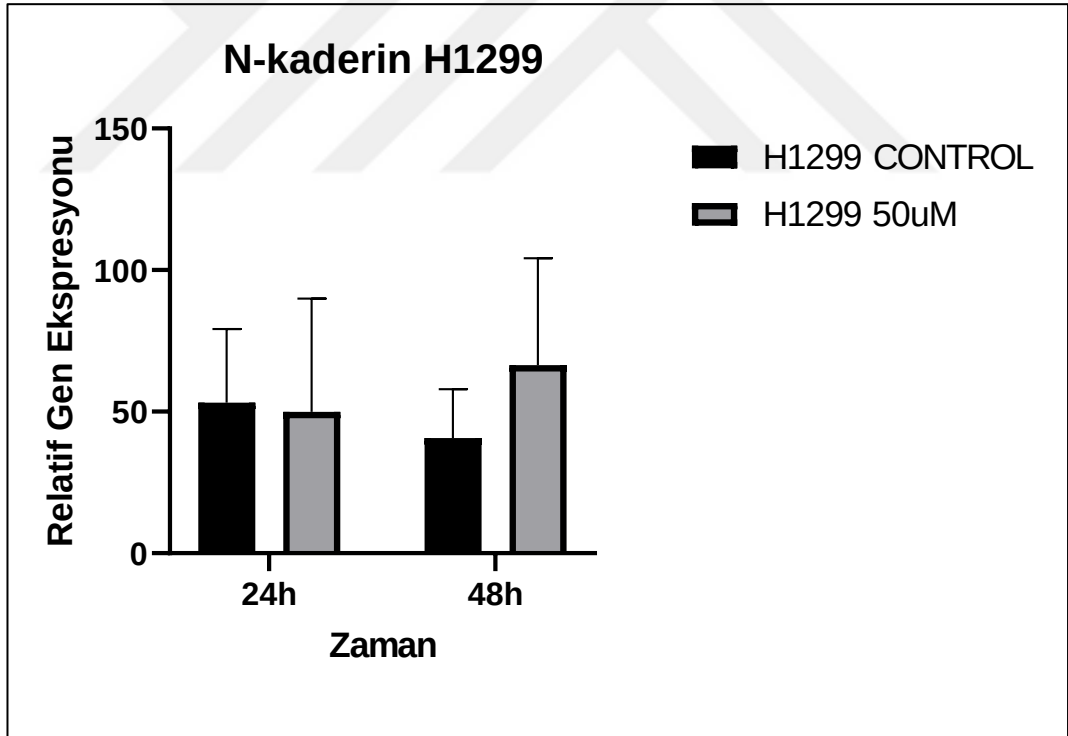
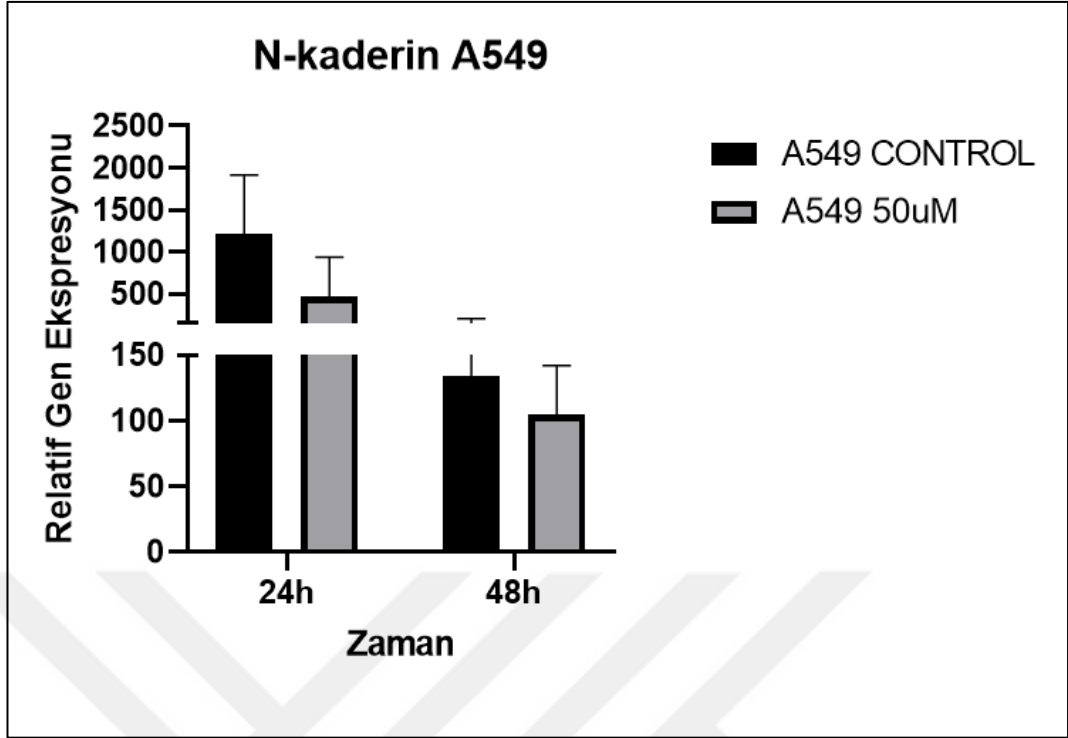
Şekil 3.13. OCT4 geni relatif ekspresyon/zaman grafiği

İstatistiksel analizi Mann Whitney U Testi ile SPSS paket programı üzerinden yapılmıştır. \* $p < 0,05$   
\*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$



Şekil 3.14. SOX2 geni relatif ekspresyon/zaman grafiği

İstatistiksel analizi Mann Whitney U Testi ile SPSS paket programı üzerinden yapılmıştır. \*p<0,05  
\*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001 \*\*\*\*p<0,0001

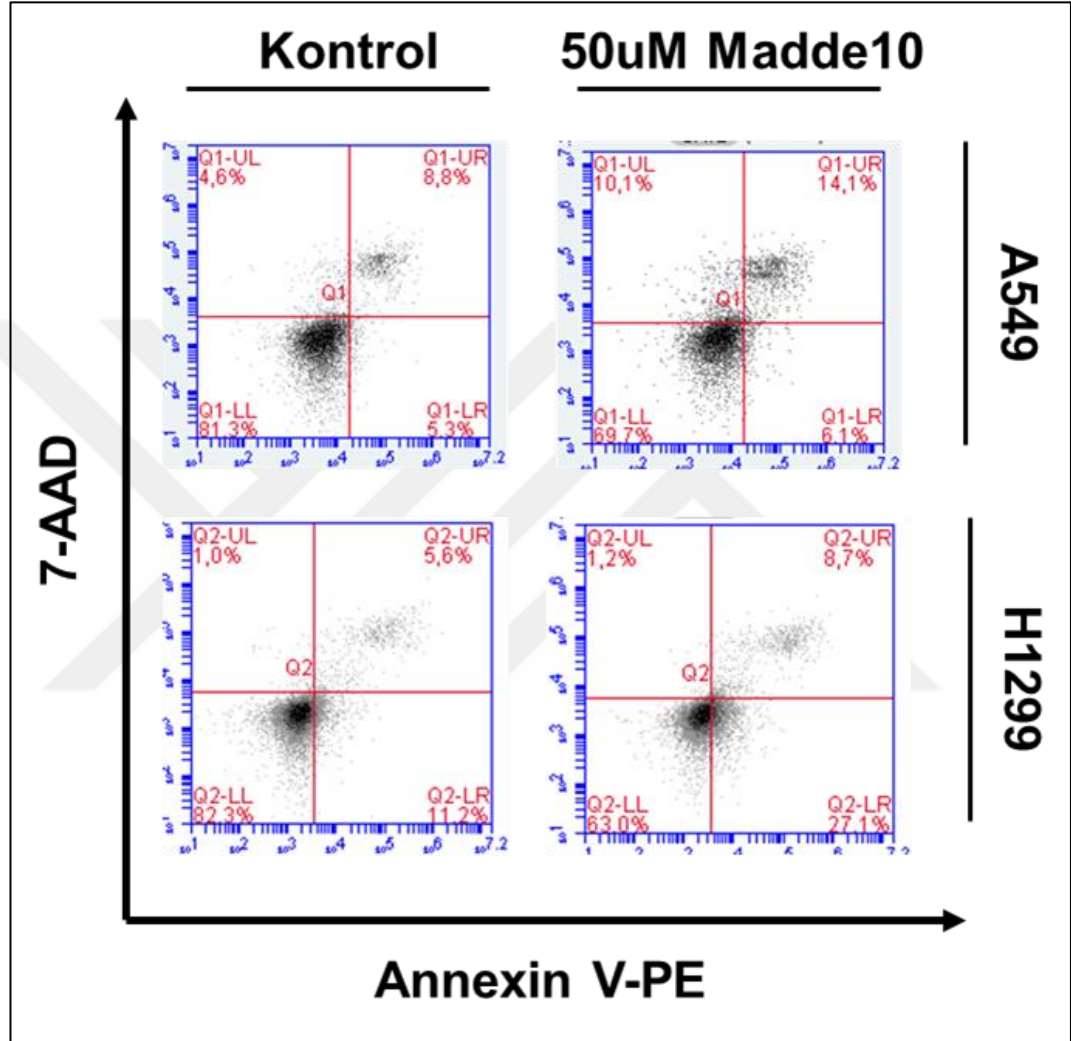


Şekil 3.15. N-kaderin geni relatif ekspresyon/zaman grafiği

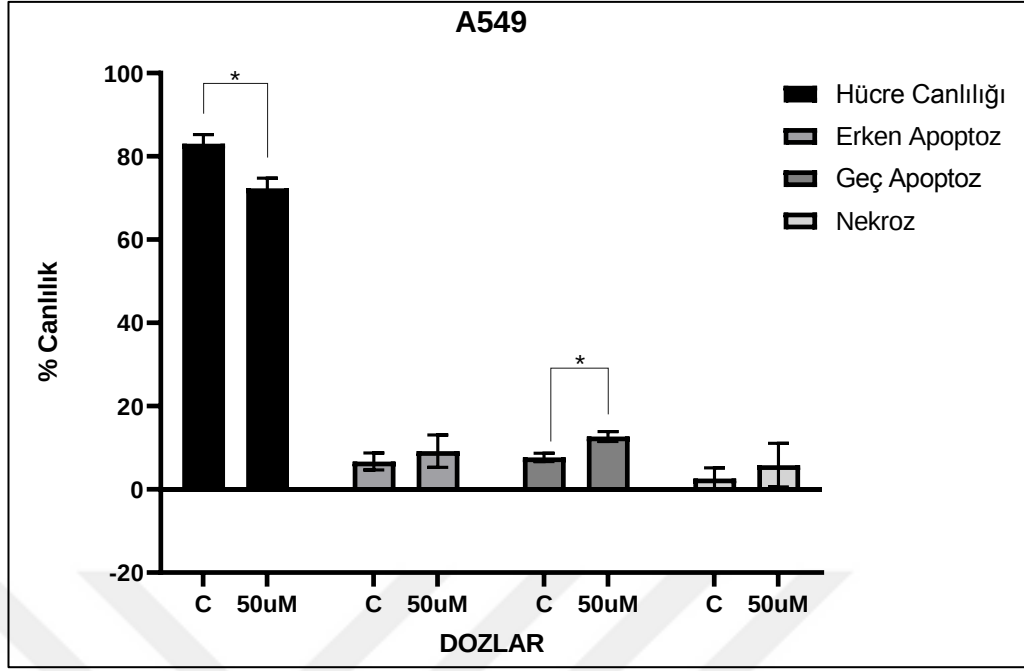
İstatistiksel analizi Mann Whitney U Testi ile SPSS paket programı üzerinden yapılmıştır. \* $p < 0,05$   
\*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$

### 3.4. Akım Sitometri ile Hücre Apoptoz Tayini Bulguları

Literatüre dayanılarak yapılan Annexin-V (PE konjuge)-7AAD boyaması ile akım sitometri ile apoptotik hücre tayini bulguları Şekil 3.16., Şekil 3.17. ve Şekil 3.18.'tedir.

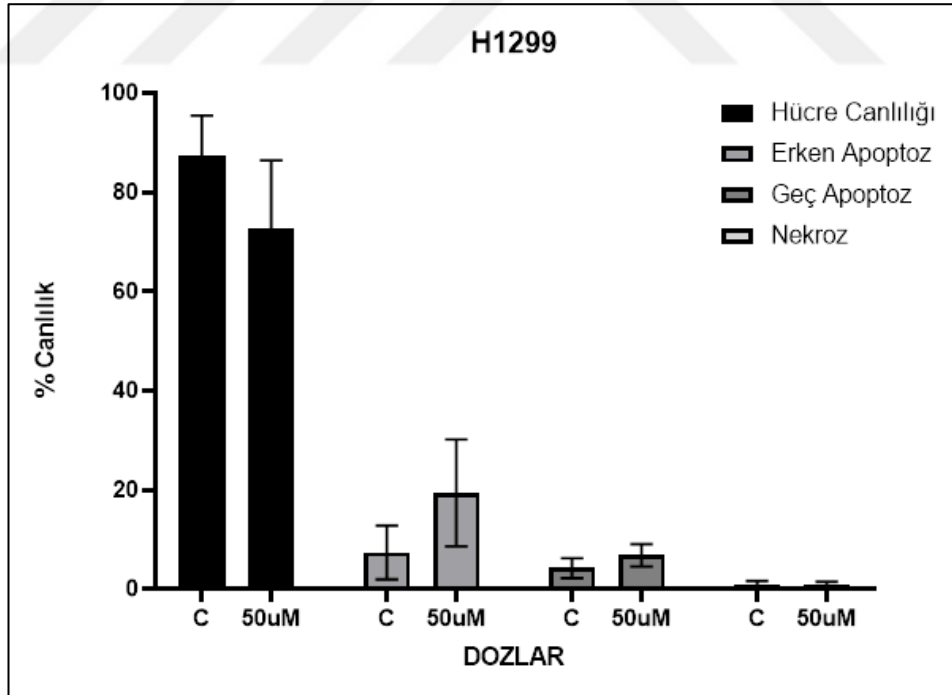


Şekil 3.16. 48 saat Madde 10 uygulanan A549 ve H1299 hücre hatlarında apoptoz tayini için Annexin-V (PE konjuge)-7AAD grafiği



**Şekil 3.17.** A549 hücre hattında apoptoz tayini için Annexin-V (PE konjuge)-7AAD boyaması sonucu

İstatistiksel analizi Mann Whitney U Testi ile SPSS paket programı üzerinden yapılmıştır. \* $p < 0,05$   
 \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$



**Şekil 3.18.** H1299 hücre hattında apoptoz tayini için Annexin-V (PE konjuge)-7AAD boyaması sonucu

İstatistiksel analizi Mann Whitney U Testi ile SPSS paket programı üzerinden yapılmıştır. \* $p < 0,05$   
 \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  \*\*\*\* $p < 0,0001$



## 4. TARTIŞMA

AK, insanların sosyal hayatın içinde aktif bulunması sebebiyle maruz kalınan risk faktörlerinin çeşitlenmesi ve çoğalması da göz önünde bulundurularak teşhisi sonrası en yüksek ölüm oranıyla ilişkilendirilen ve sağ kalımı diğer kanserlere oranla daha az olan katı tümörlerle karakterize bir kanserdir.

AK tedavisi, konvansiyonel yöntemlere eşlik eden ve son yıllarda Amerika FDA onaylı çeşitli ilaçların da bulunduğu hedefe yönelik tedavilerin kullanıldığı hem devletlere hem de bireylere yüksek maliyetlere sebep olan yöntemleri içerir (Alduais vd., 2023; Doğanç vd., 2024; Harðardottir vd., 2022; Li vd., 2020; Li vd., 2023). Tedavide yerli ve kolay ulaşılabilir ilaçların topluma kavuşturulması ve buna yönelik yapılan çalışmalar dışa bağımlılığın azaltılması konusunda da önemli adımlardandır. Bu tez çalışması kapsamında literatürce antikanser etkileri bilinen (Kumar & Ritika, 2020; Sachdeva vd., 2020) indol türevi kimyasallardan üniversitemiz bünyesinde sentezlenmiş (Doğanç vd., 2024) olan Madde 10'un **AK üzerinde etkilerinin ilk kez araştırılması literatüre katkı sağlamaktadır.**

Literatürle benzer şekilde antikanser etkilere ulaşılmıştır (Dhiman vd., 2022; Dorababu., 2020). Mevcut çalışma Madde 10'un AK üzerinde antikanser etkileri arasında;

- Apoptoz indükleyiciliği
- Hücre göçü baskılama yeteneği
- Kanser hücrelerine sağlıklı olanlara oranla daha çok sitotoksik etki gösterme
- Antiproliferatif etkileri araştırılmıştır.

MTT deneyinde BEAS-2B, A549 ve H1299 hücre hatlarında kontrol grubuna göre 25µM dozda istatistiksel olarak anlamlı farklılık ( $p<0,05$ ) vardır. Bu konsantrasyonda en yüksek anlamlılık derecesi A549 hücre hattına aittir. Fakat IC50 değerleri karşılaştırıldığında literatürle uyumlu olarak (Tokala vd., 2020) indol türevlerinin sitotoksik etkisi kanserli hücre hatlarında sağlıklı hücre hattına oranla yüksektir.

Hücre göçü için yara iyileşme testinde A549 hücre hattı kontrol grubunda 0. saat ile 48. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ( $p<0,05$ ) bulunmuştur fakat 0-24 ve 24-

48 saatlerindeki farklılık olsa da veri kümesi genişletildiği dahilinde istatistiksel olarak anlamlılığın görülebileceği yönünde yorumlama yapılabilir. 50µM ve 100 µM Madde 10 uygulanan gruplarda 0-24 ve 0-48 saatlerinde hücresiz alan büyüklükleri arası fark istatistiksel olarak anlamlı farklılık ( $p<0,05$ ) göstermektedir. Buradan yola çıkarak ilacın literatürle uyumlu olarak (Zhang vd., 2023) hücrelerin göçünü baskıladığı yorumu yapılabilmektedir.

Hücre göçü için yara iyileşme testinde H1299 hücre hattı kontrol grubunda 0. saat ile 48. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ( $p<0,05$ ) bulunmuştur. Fakat 0-24 ve 24-48 saatlerindeki hücresiz alan büyüklükleri arası farklılık olsa da veri kümesi genişletildiği dahilinde istatistiksel olarak anlamlılığın görülebileceği yönünde yorumlama yapılabilir. 50µM Madde 10 uygulanan grupta 0-48, 100 µM Madde 10 uygulanan grupta 0-24 ve 0-48 saatlerinde hücresiz alan büyüklükleri arası fark istatistiksel olarak anlamlılık ( $p<0,05$ ) göstermektedir. Uygulama yapılan grupların yapılmayan kontrol grubuna göre hücresiz alanları 24 ve 48 saatlerinde daha geniştir. Çünkü uygulama gruplarında hücresiz alan değerleri ölçülebilirken kontrol grubunun birçok tekrarında hücresiz alan 0 olarak ölçülmüştür. H1299'un A549'a göre daha hızlı bir şekilde kuyu tabanında konfluent olması literatürle de uyumluluk göstermektedir (Irshad vd., 2024; Mao vd., 2022). p53 delesyonu olan H1299'un migrasyonu p53 yabancıl tip olan A549'daki kadar yüksek anlamlılıkta baskılanamamıştır. Buradan yola çıkarak Madde 10'un literatürle uyumlu olarak (Zhang vd., 2022) hücrelerin göçünü baskıladığı yorumu yapılabilmektedir.

A549 hücre hattında apoptoz tayini için yapılan akım sitometri yönteminde kontrol ve 50µM Madde 10 uygulanan grup arasında hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bir şekilde düşerken geç apoptoz grubu istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bir şekilde artmıştır. Ayrıca erken apoptoz ve nekroz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülememiştir ( $p>0,05$ ). Buradan Madde 10'un 48 saat boyunca hücrelere uygulanmasının hücre canlılığını düşürürken hücreleri apoptoz yönüne indüklediği şeklinde çıkarım yapılabilmektedir. H1299 hücre hattında apoptoz tayini için yapılan akım sitometri yönteminde kontrol ve 50µM Madde 10 uygulanan grup arasında hücre canlılığı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülememiştir ( $p>0,05$ ). Fakat parametrik olmayan ortalama, medyan değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında farklılık olduğu yorumu yapılabilmektedir. Kontrol grubuna göre uygulama grubunda ortalama hücre canlılığı %14,6 azalırken erken ve geç apoptoz toplam %14,6 kadar artmıştır. Buradan Madde 10'un 48 saat boyunca hücrelere uygulanmasının hücre canlılığını düşürürken hücreleri apoptoz yönüne

indüklediği şeklinde yorum yapılabilse de tekrar sayıları artırılarak istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir. Madde 10'un literatürdeki benzerleri ile korele olarak (Dhuguru & Skouta, 2020; Doğanç vd., 2024; Zhang vd., 2023) apoptoz indükleyiciliği etkisinden bahsetmek mümkündür.

RT-qPCR sonuçlarında;

- Ki-67 gen ifadesi H1299 24 saatte ve A549 24 ve 48 saatlerde istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) olacak şekilde düşüş göstermiştir. H1299 48 saat sonucunda istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).
- Yalnızca H1299 48 saat sonucunda BAX geni ifadesi istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) şekilde artmıştır.
- Yalnızca A549 24 saat sonucunda BCL-2 gen ifadesi istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) olacak şekilde düşmüştür.
- 24 saatte A549 ve H1299 hücre hatlarında CD24 gen ifadesi istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bir şekilde azalırken 48 saat H1299'da istatistiksel olarak anlamlı fark ( $p<0,05$ ) oluşturacak şekilde artmıştır.
- CD44 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Veri seti genişletildiği takdirde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunabileceği düşünülmektedir.
- OCT4 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Veri seti genişletildiği takdirde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunabileceği düşünülmektedir.
- SOX2 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Veri seti genişletildiği takdirde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunabileceği düşünülmektedir.
- N-kaderin gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Veri seti genişletildiği takdirde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunabilir.

Bu sonuçlar üzerinden literatürle ve mevcut tezde yapılan diğer çalışmalarla korele olacak şekilde istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) sonuçlara ulaşılmış olsa anlamlılık bulunmayan gen ifadelerinde tekrar sayıları artırılarak literatürle uyumlu sonuçlar yakalanabileceği düşünülmektedir. Hali hazırda elimizdeki diğer deney sonuçlarının literatürle paralelliği göz önünde bulundurulduğunda (Dhiman vd., 2022; Dhuguru & Skouta,

2020; Doğanç vd., 2024; Dorababu, 2020; Tokala vd., 2020; Zhang vd., 2023) RT-qPCR ile bakılan ilgili gen ifadelerinin de bu paralelliği yakalayacağı yorumlanabilmektedir.

p53 delesyonu bulunan H1299'un 24 saatte CD24 oranı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşerken 48 saatte aynı şekilde yükselmesinin diğer köklülük belirteçleri olan CD44, OCT4 ve SOX2'den bağımsız olarak akciğer kanserinde ilaç direnci, immün baskılama, yüksek migrasyon kapasitesi gibi yollarla tedaviden kaçarak agresif bir seyir izlemesinin CD24 ifadesi ile sıkı bağlantılı olabileceği düşünülmüştür.

İndol türevi kimyasalların ilaç potansiyel etkileri arasında birçok başka yol ve yolak bulunmaktadır. Bütçe kısıtlılığı sebebiyle eğilemediğimiz antikanser etki alanları üzerine yeni araştırmaların planlanması ilaç potansiyelinin ortaya çıkarılması açısından önemlidir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

İndol türevi bir kimyasal olan ve ilaç potansiyeli taşıyan Madde 10'un AK kanseri üzerindeki etkinliği ilk kez araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında, indol türevi kimyasallardan olan Madde 10'un AK üzerindeki EMT baskılayıcı, apoptoz indükleyici, kanser köklülüğü, proliferasyon baskılayıcı özellikleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

- ✓ Sağlıklı ve kanserli akciğer hücre hatları üzerinde Madde 10'un antiproliferatif etki gösterdiği uygun konsantrasyonlar belirlenmiştir. Canlılık ve IC50 değerlerini saptamak amacıyla MTT analizi, proliferasyon hızı için Ki-67 gen ifadesi analizi yapılmıştır.
- ✓ Madde 10'un AK hücreleri üzerine sağlıklı akciğer hücrelerinden daha yüksek etkinlikte hücre canlılığını düşürdüğü MTT deneyleri sonucunda görülmüştür.
- ✓ İleriki denemeler için MTT deneyi sonucunda kanserli hücrelerin IC50 değerlerine yakın bir üst doz olan 50µM seçilmiş ve diğer deneyler için kurulan denemeler kontrol grubu ve 50µM Madde 10 uygulanmış deney grubu olarak devam edilmiştir.
- ✓ Yeni sentezlenmiş sentetik indol türevi Madde 10'un AK hücre hatlarında invazyon/metastazı baskılaması hedeflenmiştir ve hücre göçü için yara iyileşme testinde AK için hücre göçünü baskıladığı görülmüştür. Bu etki A549 hücre hattında H1299 hücre hattına oranla daha nettir.
- ✓ p53 delesyonu olan H1299'un migrasyonu p53 yabanıl tip olan A549'daki kadar yüksek anlamlılıkta baskılanamamıştır. Buradan yola çıkarak Madde 10'un literatürle uyumlu olarak A549 hücrelerinde hücrelerin göçünü baskıladığı yorumu yapılabilmektedir.
- ✓ Madde 10'un kanserli akciğer hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi Ki-67 gen ekspresyon analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda A549 hücre hattında ciddi farkla

proliferasyonun azaldığı görülmüştür. AK hücrelerinde ilk kez özellikle 48 saat sonuçlarında antiproliferatif etki net bir şekilde görülebilmektedir.

- ✓ Madde 10'un AK hücre hatları üzerindeki apoptoz indükleyici etkisi akım sitometri ile Annexin-V (PE)-7AAD boyamaları sonucunda kontrol grubuna oranla canlılığın düştüğü ve apoptotik hücrelerin sayısının arttığı görülmüştür ve Madde 10'un apoptozis yolu ile AK hücrelerini ölüme götürdüğü belirlenmiştir.
- ✓ CD24 gen ekspresyon analizi sonucunda deney grubunda kontrol grubuna oranla A549 hücre hattında 24. ve 48. saatte CD24 gen ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. H1299'da CD24 gen ekspresyonunda 24. saatte anlamlı azalma olmasına rağmen, agresif olan bu hücre serisinde 48. saatte CD24 gen ekspresyonun artışı kök hücre karakterindeki hücre popülasyonunun arttığı ve Madde 10 uygulanan bu hücrelerde direnç gelişimi olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.
- ✓ Öncelikle, Cisplatin gibi konvansiyonel ilaç ile kombine uygulamalar planlanmaktadır.
- ✓ EMT için E-kaderin, TWIST, SNAIL gibi genlerin gen ekspresyon analizleri eklenecektir.
- ✓ İstatistiksel olarak anlamlı değişim beklenen grupların analizlerinin tekrarları yapılacaktır.
- ✓ Literatürde belirtilen ve bizim de bahsetmiş olduğumuz mevcut tezde bütçe kısıtlılığı sebebiyle çalışma imkanı bulunulamayan indol türevlerinin diğer antikanser etkileri üzerinde yeni araştırmalar yapılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abolfathi, H.; Arabi, M.; Sheikhpour, M. A literature review of microRNA and gene signaling pathways involved in the apoptosis pathway of lung cancer. *Respir. Res.* 2023, 24, 55.
- Ahmad, G. & Amiji, M. M. (2017). Cancer stem cell-targeted therapeutics and delivery strategies. *Expert opinion on drug delivery*, 14(8), 997-1008.
- Alduais, Y., Zhang, H., Fan, F., Chen, J. & Chen, B. (2023). Non-small cell lung cancer (NSCLC): A review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Medicine*, 102(8), e32899.
- Aksel, Nimet, et al. (2019). "Regional distribution of genetic mutation in lung cancer in Turkey (REDIGMA)."
- Alam, M.; Hasan, G.M.; Eldin, S.M.; Adnan, M.; Riaz, M.B.; Islam, A.; Khan, I.; Hassan, M.I. Investigating regulated signaling pathways in therapeutic targeting of non-small cell lung carcinoma. *Biomed. Pharmacother.* 2023, 161, 114452.
- Barta, J. A., Powell, C. A. & Wisnivesky, J. P. (2019). Global Epidemiology of Lung Cancer. *Annals of global health*, 85(1), 8. <https://doi.org/10.5334/aogh.2419>
- Berg CD, Schiller JH, Boffetta P, Cai J, Connolly C, Kerpel-Fronius A, Kitts AB, Lam DCL, Mohan A, Myers R, Suri T, Tammemagi MC, Yang D, Lam S; International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) Early Detection and Screening Committee. Air Pollution and Lung Cancer: A Review by International Association for the Study of Lung Cancer Early Detection and Screening Committee. *J thorac oncol.* 2023 Oct;18(10):1277-1289. doi: 10.1016/j.jtho.2023.05.024. Epub 2023 Jun 3. PMID: 37277094.
- Camiña, N.; Penning, T.M. Genetic and epigenetic regulation of the NRF2-KEAP1 pathway in human lung cancer. *Br. J. cancer* 2022, 126, 1244–1252.
- Chen, P., Liu, Y., Wen, Y., & Zhou, C. (2022). Non-small cell lung cancer in China. *Cancer communications* (London, England), 42(10), 937–970. <https://doi.org/10.1002/cac2.12359>
- Colella, M., Degennaro, L. & Luisi, R. (2020). Continuous Flow Synthesis of Heterocycles: A Recent Update on the Flow Synthesis of Indoles. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(14), 3242. <https://doi.org/10.3390/molecules25143242>
- Coleman, M. P., et al. (2011). "Cancer survival in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden, and the UK, 1995–2007 (the International Cancer Benchmarking Partnership): an analysis of population-based cancer registry data." *The Lancet* 377.9760: 127-138.
- Cicin, I., Oksuz, E., Karadurmus, N. & Malhan, S. (2018). *Türkiye'de akciğer kanseri*.
- Dhiman, A., Sharma, R. & Singh, R. K. (2022). Target-based anticancer indole derivatives and insight into structure–activity relationship: A mechanistic review update (2018–2021). *Acta pharmaceutica Sinica B*, 12(7), 3006-3027.

- Dhuguru, J. and Skouta, R. (2020). Role of Indole Scaffolds as Pharmacophores in the Development of Anti-Lung Cancer Agents. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(7), 1615.
- Durham AL, Adcock IM. The relationship between COPD and lung cancer. *Lung cancer*. 2015 Nov;90(2):121-7. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.08.017. Epub 2015 Aug 29. PMID: 26363803; PMCID: PMC4718929.
- Doğanç, F., Ozkan, T., Farhangzad, N., Mavideniz, A., Celik, I., Sunguroğlu, A. & Göker, H. (2024). Synthesis of novel indol-3-acetamido analogues as potent anticancer agents, biological evaluation and molecular modeling studies. *Bioorganic Chemistry*, 107429.
- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(2), 69-84.
- Dorababu A. (2020). Indole - a promising pharmacophore in recent antiviral drug discovery. *RSC medicinal chemistry*, 11(12), 1335–1353. <https://doi.org/10.1039/d0md00288g>
- Duggan, P. J. (2021). The chemistry of cannabis and cannabinoids. *Australian journal of chemistry*, 74(6), 369-387.
- Duma, N., Santana-Davila, R. & Molina, J. R. (2019). Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo clinic proceedings*, 94(8), 1623–1640. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013>
- Eun, K., Ham, S. W. & Kim, H. (2017). Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB reports*, 50(3), 117.
- Facchinetti F, Di Maio M, Tiseo M. Adding PD-1/PD-L1 Inhibitors to Chemotherapy for the First-Line Treatment of Extensive Stage Small Cell Lung Cancer (SCLC): A Meta-Analysis of Randomized Trials. *Cancers* (Basel). 2020 Sep 16;12(9):2645. doi: 10.3390/cancers12092645. PMID: 32947924; PMCID: PMC7565587.
- Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L. & Audus, K. L. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research*, 243(2), 359-366.
- Friedlaender, A., Perol, M., Banna, G. L., Parikh, K., & Addeo, A. (2024). Oncogenic alterations in advanced NSCLC: a molecular super-highway. *Biomarker research*, 12(1), 24.
- Harðardóttir, H., Jonsson, S., Gunnarsson, O., Hilmarsdóttir, B., Asmundsson, J., Gudmundsdóttir, I., Saevarsdóttir, V. Y., Hansdóttir, S., Hannesson, P. & Gudbjartsson, T. (2022). *Laeknabladid*, 108(1), 17–29. <https://doi.org/10.17992/ibl.2022.01.671>
- Hu, X.; Li, J.; Fu, M.; Zhao, X.; Wang, W. The JAK/STAT signaling pathway: From bench to clinic. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021, 6, 402.
- Huang, H. J., Chetyrkina, M., Wong, C. W., Kraevaya, O. A., Zhilenkov, A. V., Voronov, I. I., Wang, P. H., Troshin, P. A. & Hsu, S. H. (2021). Identification of potential descriptors of water-soluble fullerene derivatives responsible for antitumor effects on lung cancer cells via QSAR



- analysis. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 812–825. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.012>
- Iksen; Pothongsrisit, S.; Pongrakhananon, V. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Lung Cancer: An Update Regarding Potential Drugs and Natural Products. *Molecules* 2021, 26, 4100.
- Inamura, K., Takeuchi, K., Togashi, Y., Hatano, S., Ninomiya, H., Motoi, N., Mun, M. Y., Sakao, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Soda, M., Choi, Y. L., Mano, H., & Ishikawa, Y. (2009). EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 22(4), 508–515. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.2>
- Irshad, R., Batool, F., Raj, N., Karim, S., Alkreathy, H. M., Manzoor, N., & Husain, M. (2024). Multi-targeted effects of D-carvone against non-small cell lung Cancer (NSCLC): A network pharmacology-based study. *Toxicology and applied pharmacology*, 116978.
- Kanwal M, Ding XJ, Cao Y. Familial risk for lung cancer. *Oncol lett.* 2017 Feb;13(2):535-542. doi: 10.3892/ol.2016.5518. PMID: 28356926; PMCID: PMC5351216.
- Kaushik, N. K., Kaushik, N., Attri, P., Kumar, N., Kim, C. H., Verma, A. K. & Choi, E. H. (2013). Biomedical importance of indoles. *Molecules* (Basel, Switzerland), 18(6), 6620–6662. <https://doi.org/10.3390/molecules18066620>
- Koc, A., Ozkan, T., Hekmatshoar, Y., Gurkan-Alp, A. S., Aktan, F., Buyukbingol, Z., Sunguroglu, A., Buyukbingol, E. & Karabay, A. Z. (2018). Apoptotic Effects of Some Tetrahydronaphthalene Derivatives on K562 Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell Line. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 17(14), 1924–1930. <https://doi.org/10.2174/1871521409666170412122811>
- Kumar, S. and Ritika. (2020). A brief review of the biological potential of indole derivatives. *Future journal of pharmaceutical sciences*, 6, 1-19.
- Lee, N. W., Wang, H. Y., Du, C. L., Yuan, T. H., Chen, C. Y., Yu, C. J., & Chan, C. C. (2022). Air-polluted environmental heavy metal exposure increase lung cancer incidence and mortality: A population-based longitudinal cohort study. *Science of the total environment*, 810, 152186.
- Li, A. L., Hao, Y., Wang, W. Y., Liu, Q. S., Sun, Y. & Gu, W. (2020). Design, synthesis, and anticancer evaluation of novel indole derivatives of ursolic acid as potential topoisomerase II inhibitors. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2876.
- Li, C., Wang, C., Yu, J., Fan, Y., et al. Residential Radon and Histological Types of Lung Cancer: A Meta-Analysis of Case–Control Studies. *Int J environ res public health*. 2020 Feb 24;17(4):1457. doi: 10.3390/ijerph17041457. PMID: 32102460; PMCID: PMC7068370.
- Li, Y., Yan, B. A. & He, S. (2023). Advances and challenges in the treatment of lung cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 169, 115891. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115891>

- Liu, X. and Fan, D. (2015). The epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: functional and mechanistic links. *Current pharmaceutical design*, 21(10), 1279-1291.
- Loh, C. Y., Chai, J. Y., Tang, T. F., Wong, W. F., Sethi, G., Shanmugam, M. K., Chong, P. P. & Looi, C. Y. (2019). The E-Cadherin and N- Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*, 8(10), 1118. <https://doi.org/10.3390/cells8101118>
- Luo, M. L., Huang, W., Zhu, H. P., Peng, C., Zhao, Q. & Han, B. (2022). Advances in indole-containing alkaloids as potential anticancer agents by regulating autophagy. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 149, 112827.
- Mao, C., Lei, G., Horbath, A. & Gan, B. (2022). Assessment of lipid peroxidation in irradiated cells. *In methods in cell biology* (Vol. 172, pp. 37-50). Academic Press.
- Mudra, S. E., Sadhukhan, P., Ugurlu, M. T., Alam, S., & Hoque, M. O. (2021). Therapeutic targeting of cancer stem cells in lung, head and neck, and bladder cancers. *Cancers*, 13(20), 5098.
- On İkinci Kalkınma Planı (<https://onikinciplan.sbb.gov.tr/>)
- O'Keefe LM, Taylor G, Huxley RR, Mitchell P, Woodward M, Peters SAE. Smoking as a risk factor for lung cancer in women and men: a systematic review and meta-analysis. *BMJ open*. 2018 Oct 3;8(10):e021611. doi:10.1136/bmjopen-2018-021611. PMID: 30287668; PMCID: PMC6194454.
- Akkaya, R. ve Akkaya, B. (2022) Türkiye Kanser İstatistikleri ve Kansere Yönelik Politikalar. *Sağlık bilimlerinde güncel tartışmalar 6* (ss. 470-491) Ankara: Bilgin Kültür Sanat Yayınevi
- Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., Singh, B., Heelan, R., Rusch, V., Fulton, L., Mardis, E., Kupfer, D., Wilson, R., Kris, M., & Varmus, H. (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 101(36), 13306–13311. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405220101>
- Robinson LA, Jaing CJ, Pierce Campbell C, Magliocco A, Xiong Y, Magliocco G, Thissen JB, Antonia S. Molecular evidence of viral DNA in non-small cell lung cancer and non-neoplastic lung. *Br J cancer*. 2016 Aug 9;115(4):497-504. doi: 10.1038/bjc.2016.213. Epub 2016 Jul 14. PMID: 27415011; PMCID: PMC4985355.
- Ritt, D.A.; Abreu-Blanco, M.T.; Bindu, L.; Durrant, D.E.; Zhou, M.; Specht, S.I.; Stephen, A.G.; Holderfield, M.; Morrison, D.K. Inhibition of Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Signaling by a Stress-Induced Phospho-Regulatory Circuit. *Mol. Cell* 2016, 64, 875–887.
- Rudin, Charles M., et al. "Small-cell lung cancer." *Nature reviews disease primers* 7.1 (2021): 3.
- Russ E, Davis CM, Slaven JE, Bradfield DT, Selwyn RG, Day RM. Comparison of the Medical Uses and Cellular Effects of High and Low Linear Energy Transfer Radiation. *Toxics*. 2022 Oct 21;10(10):628. doi: 10.3390/toxics10100628. PMID: 36287908; PMCID: PMC9609561.

- Sachdeva, H., Mathur, J. & Guleria, A. (2020). Indole derivatives as potential anticancer agents: A review. *Journal of the Chilean chemical society*, 65(3), 4900-4907.
- Saman, H., Raza, A., Patil, K., Uddin, S., & Crnogorac-Jurcevic, T. (2022). Non-invasive biomarkers for early lung cancer detection. *Cancers*, 14(23), 5782.
- Schabath, M. B. and Cote, M. L. (2019). Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 28(10), 1563–1579. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0221>
- Shen Y., Wang C., Chuang H., Hwang J., Chi W., Shu C., Ho C., Li W., Chen Y. CD44 and CD24 coordinate the reprogramming of nasopharyngeal carcinoma cells towards a cancer stem cell phenotype through STAT3 activation. *Oncotarget*. 2016; 7: 58351-58366. Retrieved from <https://www.oncotarget.com/article/11113/text/>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S. & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- Sterlacci, W., Savic, S., Fiegl, M., Obermann, E., & Tzankov, A. (2014). Putative stem cell markers in non–small-cell lung cancer: A Clinicopathologic characterization. *Journal of thoracic oncology*, 9(1), 41-49.
- Tokala, R., Sana, S., Lakshmi, U. J., Sankarana, P., Sigalapalli, D. K., Gadewal, N., Kode, J., & Shankaraiah, N. (2020). Design and synthesis of thiadiazolo-carboxamide bridged  $\beta$ -carboline-indole hybrids: DNA intercalative topo-II $\alpha$  inhibition with promising antiproliferative activity. *Bioorganic chemistry*, 105, 104357. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104357>
- Veluswamy, R., Mack, P. C., Houldsworth, J., Elkhoully, E., & Hirsch, F. R. (2021). KRAS G12C-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Biology, Developmental Therapeutics, and Molecular Testing. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 23(5), 507–520. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.02.002>
- Vinod, S. K. and Hau, E. (2020). Radiotherapy treatment for lung cancer: Current status and future directions. *Respirology*, 25, 61-71.
- Xiang, Y., Liu, X., Wang, Y., Zheng, D., Meng, Q., Jiang, L., ... & Wang, B. (2024). Mechanisms of resistance to targeted therapy and immunotherapy in non-small cell lung cancer: promising strategies to overcoming challenges. *Frontiers in Immunology*, 15, 1366260.
- Yang, Y., Zheng, H., Zhan, Y., & Fan, S. (2019). An emerging tumor invasion mechanism about the collective cell migration. *American journal of translational research*, 11(9), 5301–5312.
- Yabroff, K. R., Mariotto, A., Tangka, F., Zhao, J., Islami, F., Sung, H., Sherman, R. L., Henley, S. J., Jemal, A. & Ward, E. M. (2021). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, Part 2: Patient Economic Burden Associated With Cancer Care. *Journal of the national cancer institute*, 113(12), 1670–1682. <https://doi.org/10.1093/jnci/djab192>
- Zablotska LB, Richardson DB, Golden A, Pasqual E, Smith B, Rage E, Demers PA, Do M, Fenske N, Deffner V, Kreuzer M, Samet J, Bertke S, Kelly-Reif K, Schubauer-Berigan MK, Tomasek L,

Wiggins C, Laurier D, Apostoaei I, Thomas BA, Simon SL, Hoffman FO, Boice JD Jr, Dauer LT, Howard SC, Cohen SS, Mumma MT, Ellis ED, Eckerman KF, Leggett RW, Pawel DJ. The epidemiology of lung cancer following radiation exposure. *Int J radiat biol.* 2023;99(3):569-580. doi: 10.1080/09553002.2022.2110321. Epub 2022 Aug 22. PMID: 35947399; PMCID: PMC9943789.

Zappa, C., & Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational lung cancer research*, 5(3), 288.

Zhang, G., Tang, Z., Fan, S., Li, C., Li, Y., Liu, W., Long, X., Zhang, W., Zhang, Y., Li, Z., Wang, Z., Chen, D. & Ouyang, G. (2023). Synthesis and biological assessment of indole derivatives containing penta-heterocycles scaffold as novel anticancer agents towards A549 and K562 cells. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 38(1). <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2163393>

Zhang, L., Martin, G., Mohankumar, K., Hampton, J. T., Liu, W. R. & Safe, S. (2022). Resveratrol Binds Nuclear Receptor 4A1 (NR4A1) and Acts as an NR4A1 Antagonist In Lung Cancer Cells. *Molecular pharmacology*, 102(2), 80–91. <https://doi.org/10.1124/molpharm.121.000481>

Zigová, M., Michalková, R. & Mojžiš, J. (2024). Anticancer Potential of Indole Phytoalexins and Their Analogues. *Molecules*, 29(10), 2388.