

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI



**YENİ SENTEZLENEN FLAVONOİD TÜREVİ BİLEŞİKLERİN, AKCİĞER
ADENOKARSİNOMA HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Deniz GÜCENMEZ

Danışman

Prof. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

HATAY-2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**YENİ SENTEZLENEN FLAVONOİD TÜREVİ BİLEŞİKLERİN, AKCİĞER
ADENOKARSİNOMA HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ APOPTOTİK ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Deniz GÜCENMEZ

Danışman

Prof. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından

21.YL.040 nolu proje olarak desteklenmiştir

HATAY-2024

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde tecrübelerini ve bilgisini içtenlik ile paylaşan ve her daim yanımda olacak olan sonsuz minnet borçlu olduğum sevgili tez danışmanım, Sayın Hocam Prof. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK'e sonsuz saygımı, teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda değerli katkılarda bulunan Zehra İLÇE KAYA'ya teşekkürü borç bilirim. Akademik düşünce ve akademik ahlak konusunda sevgili tez danışmanım ile beraber bana yeni bakış açıları kazandıran Doç. Dr. Menderes Yusuf TERZİ ve Doç. Dr. Gülay GÜLBOL DURAN'a saygılarımı ve şükranlarımı sunarım. Eğitimim sürecinde bana sevecenlik ve sıcakkanlılık ile yaklaşan Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyokimya ve Genetik bölümünün tüm değerli hocalarıma saygı ve sevgilerimi sunarım. Ayrıca eğitimim boyunca benim yanımda olan ve çok kıymetli duygularını bağışlayan Fatma Çağla GÜZEL'e çok teşekkür ederim. Eğitim sürecimde manevi ve maddi olarak destekleyen ve her daim arkamda olduklarını bildiğim anneme, babama ve kardeşime en derin minnet, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kanser	3
2.2Apoptozis	6
2.2.1 Kaspaz Proteinleri ve Hücresel Yıkımın Başlangıcı.....	7
2.2.2 Apoptozun Ekstrinsik Yolağı.....	9
2.2.3 Apoptozun İntersik Yolağı.....	10
2.2.4 p53 proteini	13
2.2.5 p53'ün Aktivasyonu ve Fonksiyonu	13
2.2.6 p53 ve Hücre Döngüsü.....	14
2.2.7 p53 ve Apoptoz	14
2.2.8 P53 ve kanser	16
2.3 Flavonoidler	18
2.3.1 Flavonoidler ve Kanser	20
2.3.2 Tektorigenin	20
2.3.3. Yeni Sentezlenen Flavonoid Türevi Bileşik: 5Y2	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1 Çalışmamızda Kullanılan Kimyasallar ve Materyaller	23
3.2 Çalışmada Kullanılan Flavonoidlerin Hazırlanması	24
3.3 Hücre Kültürü.....	25
3.4 Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi (MTT).....	25

3.5 RNA izolasyonu	26
3.6 cDNA dönüşümü.....	27
3.7 Real Time PCR ile Gen Ekspresyon Analizi	28
4 BULGULAR	30
4.1 MTT Hücre Canlılık Deneyi	30
4.3 qRT-PCR Gen Ekspresyon Analizleri	33
5 TARTIŞMA	42
6. SONUÇ.....	46
7. KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	51



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	İnsan Hücrelerinde Apoptoz.....	7
Şekil 2.2	Kaspaz Aktif Proteinler.....	8
Şekil 2.3	Ekstrinsik Apoptoz yolağı.....	10
Şekil 2.4	Apoptozun İntrinsik Yolu.....	12
Şekil 2.5	p53 yolağı.....	15
Şekil 2.6	p53 ve p21 Proteinleri Üzerinden Hücre Döngüsü Kontrolü.....	16
Şekil 2.7	Flavonoid Anasınıfları ve Molekül Yapıları.....	19
Şekil 2.8	Tektorigenin Maddesinin Moleküler Yapısı.....	21
Şekil 2.9	5Y-2 Bileşiğinin Moleküler Yapısı.....	22
Şekil 4.1	A549 ve 5Y-2 MTT Hücre canlılık Sonuçları.....	30
Şekil 4.2	A549 ve Tektorigenin MTT Sonuçları	31
Şekil 4.3	Beas-2b ve 5Y-2 MTT Sonuçları	32
Şekil 4.4	Beas-2b ve Tektorigenin MTT Sonuçları	33
Şekil 4.5	5Y-2 Maruziyetli A549 Hücrelerinde Apoptotik Gen Ekspresyonları.....	34
Şekil 4.6	5Y-2 Maruziyetli A549 Hücrelerinde Hücre Siklusu İlişkili Gen Ekspresyonları.....	35
Şekil 4.7	5Y-2 Maruziyetli A549 Hücrelerinde Gen Ekspresyonları.....	35
Şekil 4.8	Tektorigenin Maruziyetli A549 Hücrelerinde Apoptotik Gen Ekspresyonları.....	36
Şekil 4.9	Tektorigenin Maruziyetli A549 Hücrelerinde Hücre Siklusu İlişkili Gen Ekspresyonları.....	37
Şekil 4.10	Tektorigenin Maruziyetli A549 Hücrelerinde Gen Ekspresyonları.....	37

Şekil 4.11	5Y-2 Maruziyetli Beas-2b Hücrelerinde Apoptotik Gen Ekspresyonları...38
Şekil 4.12	5Y-2 Maruziyetli Beas-2b Hücrelerinde Hücre Siklusu İlişkili Gen Ekspresyonları.....39
Şekil 4.13	5Y-2 Maruziyetli Beas-2b Hücrelerinde Gen Ekspresyonları.....39
Şekil 4.14	Tektorigenin Maruziyetli Beas-2b Hücrelerinde Apoptotik Gen Ekspresyonları.....40
Şekil 4.15	Tektorigenin Maruziyetli Beas-2b Hücrelerinde Hücre Siklusu İlişkili Gen Ekspresyonları.....41
Şekil 4.16	Tektorigenin Maruziyetli Beas-2b Hücrelerinde Gen Ekspresyonları.....41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Materyaller ve Kimyasallar.....	23
Çizelge 3.2	cDNA Dönüşüm ve Bileşenleri Döngüsü.....	28
Çizelge 3.3	Real-time PCR için gerekli bileşenler.....	28
Çizelge 3.4	Real-time PCR için gerekli döngü koşulları.....	29
Çizelge 3.5	Melt-Curve Analizi için gerekli veriler.....	29
Çizelge 3.6	Çalışmada kullanılan primer çiftleri.....	29
Çizelge 4.1	A549 ve 5Y-2 Maddesinin MTT Bulguları.....	30
Çizelge 4.2	A549 ve Tektorigenin Maddesinin MTT Bulguları.....	31
Çizelge 4.3	Beas-2b ve 5Y-2 Maddesinin MTT Bulguları.....	32
Çizelge 4.4	Beas-2b ve Tektorigenin Maddesinin MTT Bulguları.....	33

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Apaf-1:	Apoptoz Aktive Edici Faktör-1
ATM:	Ataksia Telangiektasia Mutated Kinaz
Bcl-2:	B-Cell Lymphoma 2
CAD:	Kaspaz İlişkili Deoksiribonükleaz
Ced-3:	Cell Death Protein 3
DD:	Ölüm Domaini
DISC:	Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	Dimethyl Sulfoxide
FADD:	Fas İlişkili Ölüm Domaini
ICAD:	Kaspaz-İlişkili Deoksiribonükleaz İnhibitörü
KASPAZ:	Sistein-Aspartat Spesifik Proteaz
KHAK:	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHOAK:	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
MTT:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
p21:	Protein 21
p53:	Protein 53
PBS:	Fosfat-Buffer-Saline
qRT-PCR:	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TEK:	Tektorigenin
TGF-α:	Transforming Growth Factor Alpha
TNF:	Tümör Nekroz Faktör

ÖZET

Yeni Sentezlenen Flavonoid Türevi Bileşiklerin, Akciğer Adenokarsinoma Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkileri

Kanser dünyamızda ve ülkemizde ölümlerin başlıca nedeni olarak görülmektedir. Kanser, genomik ve epigenetik mekanizmaların bozulması sonucu ortaya çıkar. Genomik fonksiyon bozuklukları mutasyonların bir sonucu olarak gelişir. Bu mutasyonlar sonucunda sağlıklı hücrelerde sınırsız hücre bölünmesi ve apoptozun önlenmesi gözlenir. Akciğer kanseri de diğer kanserler gibi tedavisi zor ve ölüm oranı yüksek bir kanser türüdür. Kemoterapötik potansiyel özelliklere sahip kimyasal maddelerin araştırılması, kanserle mücadelede kemoterapötiklerin yan etkilerini göz ardı edebilecek maddelerin araştırılması kanserle mücadelede büyük önem taşımaktadır. Flavonoidler, antikarsinojenik, hepatokoruyucu ve antioksidan özellikleri olduğu bilinen bitkiler tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. Flavonoidlerin kanser üzerindeki etkileri in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir. Flavonoidlerin yapısına eklenen kimyasal yan gruplar flavonoidlerin etkinliğini arttırabilmektedir.

Bu tezin amacı kanser üzerine etkileri olduğu bilinen bir flavonoid olan tektorigenin ve yeni sentezlenen flavonoid türevi bir bileşik olan 5Y-2'nin apoptoz ve hücre döngüsü üzerindeki etki mekanizmalarını araştırmaktır. Bu çalışmada; A549 ve Beas-2b Hücreleri çeşitli konsantrasyonlarda (0-100µM) 5Y-2 ve tektorigenin maddesine maruz bırakıldı ve uygun konsantrasyonları MTT ile belirlendi. Gen ifadelerinin analizi qRT-PCR kullanılarak yapıldı. Çalışmamızda tektorigenin 'in 10 µM ve 25 µM konsantrasyonlarında A549 hücre hattı üzerinde proapoptotik etki gösterdiği gösterilmiştir. 10 µM ve 25µM'nin Beas-2b hücre hattında pro-apoptotik etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir. Ancak 5Y-2 maddesinin 10µM ve 25µM konsantrasyonlarda A549 hücre hattında pro-apoptotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. 5Y-2 maddesinin Beas-2b hücre hattında 10µM ve 25µM konsantrasyonlarında pro-apoptotik etkiye sahip olmadığı ve hücreleri proliferasyona yönelttiğini göstermiştir.

Sonuç olarak 5Y-2 maddesine yeni kimyasal yan gruplar eklenerek farklı bileşikler elde edilmesini ve bu bileşiklerin biyolojik araştırılmasının yapılmasını önerdik.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Flavonoidler, Apoptoz, Hücre Döngüsü

ABSTRACT

Apoptotic Effects of Newly Synthesized Flavonoid Derived Compounds on Lung Adenocarcinoma Cells

Cancer is seen as the main cause of deaths in our world and in our country. Cancer occurs through disruption of genomic and epigenetic mechanisms. Genomic dysfunction develops as a result of mutations. As a result of these mutations, unbounded cell division and avoid from apoptosis are observed in healthy cells. Lung cancer, like other cancers, is a type of cancer that is difficult to treat and has a high mortality rate. It is of great importance in the effort against cancer that we are in search of chemical substances with chemotherapeutic potential properties, and that the search for substances that can ignore the side effects of chemotherapeutics is important in the try against cancer. Flavonoids are secondary metabolites produced by plants with known anticarcinogenic, hepato-protective and anti-oxidant properties. The effects of flavonoids on cancer are shown by in-vitro and in-vivo studies. Chemical side groups added to the structure of flavonoids can increase the effectiveness of flavonoids.

The aim of this thesis is to investigate the effect mechanisms of tectorigenin, a flavonoid known to have effects on cancer, and 5Y-2, a newly synthesized flavonoid-derived compound, on apoptosis and cell cycle. In this study; A549 and Beas-2b Cells were exposed to various concentrations (0-100 μ M) of tectorigenin and 5Y-2 substance and their appropriate concentrations were determined by MTT. Analysis of gene expressions was performed using qRT-PCR. As a result, in our study, it was shown that tectorigenin had a pro-apoptotic effect on the A549 cell line at concentrations of 10 μ M and 25 μ M. It has been shown that 10 μ M and 25 μ M have no pro-apoptotic effect in Beas-2b cell line. However, 5Y-2 substance has been shown to have a pro-apoptotic effect in the A549 cell line at concentrations of 10 μ M and 25 μ M. It has been shown that 5Y-2 substance has a pro-apoptotic effect at 10 μ M and 25 μ M concentrations in the Beas-2b cell line.

As a result, we proposed to obtain different compounds by adding new chemical side groups to 5Y-2 and to conduct biological studies of these compounds.

Key Words: Cancer, Flavonoids, Apoptosis, Cell Cycle

1.GİRİŞ

Kanser geçmişten günümüze kadar uzanan bulaşıcı olmayan hastalıklar sınıfından olup en çok ölümlle sonuçlanan bir hastalıktır. (Hajdu 2011). Ülkemizde bulaşıcı olmayan hastalıklardan meydana gelen ölümlerde ise ilk sırada kalp-damar hastalıkları yer alırken ikinci sırayı kanser almaktadır. Akciğer kanseri hem dünyada hem de ülkemizde en yaygın görülen kanser çeşididir. Klinik olarak iki alt gruba ayrılan akciğer kanserinde en ölümcül seyreden alt grup küçük hücreli akciğer kanseridir (Hajdu 2011; Yin ve ark. 2021). Bütün akciğer kanseri vakalarının %15 kadarını küçük hücreli akciğer kanseri izlemektedir. Paydının geri kalan %85'lik kısmı ise büyük hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve diğer küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri almaktadır (Kroemer ve ark. 2008; Hajdu 2011; Yin ve ark. 2021). Kanser ile tedavide kemoterapi, radyo-terapi ve cerrahi rezeksiyon en sık kullanılan yöntemlerdir. Özellikle kemoterapinin hastalar üzerinde ciddi yan etkiler gözlenmektedir. Kanser ile mücadele kullanılan kemoterapinin yan etkilerini azaltacak veya kemoterapötik olarak kullanılabilecek ve yan etkileri daha az olan yeni terapötiklerin arayışı halen sürmektedir. Flavonoidler, anti-kanserojen etkileri olduğu bilinen ve bitkilerden sentezlenen sekonder metabolitlerdir. Çeşitli flavonoidlerin kanser üzerinde etkileri terapötik veya adjuvan amaçlı kullanım alanları halen araştırılma konusudur (Kroemer and Pouyssegur 2008). Flavonoidler anti-oksidan, hepato-koruyucu, anti-inflamatuar ve anti-kanserojen özellikleri olduğu bilindiğinden kemoterapötik olarak kullanım amaçları araştırılmakta ve bulgular bir umut ışığı olmaktadır (Ma ve ark. 2018; Ciumarnean ve ark. 2020; Moqbel ve ark. 2020) Tektorigenin kanser hücrelerinde pro-apoptotik ve anti-inflamatuar etkiler gösteren ve halen araştırılma konusu olan bir flavonoidtir. (Ciumarnean ve ark. 2020) Flavonoidlerde dahil olmak üzere sekonder metabolitler ve çoğu maddenin yapısında meydana getirilen yapısal değişiklikler maddenin etkinliğini arttırabilir veya anlamlı şekilde değiştirebilir. Flavonoidlerin omurgasında yapılan metil, flor, brom eklenmeleri flavonoidlerin etkinliğini daha düşük dozlarda aynı etkinlikte sonuç verdiği bilinmektedir (Teles ve ark. 2018; Zhou ve ark. 2023). Özellikle kemoterapötik potansiyel etkinliği araştırılmak istenen maddelerde istenen en temel özellik kanserleşmiş hücre üzerinde toksik etkiler gösterirken aynı toksik etkinliği sağlıklı hücreler üzerinde göstermemesidir.

Apoptoz; DNA kontrolünde hücreölümünün meydana gelmesi olayıdır (Wong 2011). Kanserli hücreler bu kontrollü bölünme mekanizmalarından kaçarak hücreler mitokondriyal yolak üzerinden kontrollü ölüm mekanizmasını geçirirler (Laubach ve ark. 2019; Koo ve ark. 2022). Kaspaz proteinler ve mitokondriyal permeabilite gerekliliği için olan proteinler bir hücrenin apoptoza gitmesi esnasında en kritik aşamalarda görev alan iki ana protein ailesi grubudur. Kimyasal yapılarında değişiklik yapıldıktan sonra bazı flavonoidlerin kanserli hücrelerin apoptozunu teşvik ederken sağlıklı hücreler üzerinde toksik etki yaratmadığı gösterilmiştir (Wade ve ark. 2013; Wang ve ark. 2023).

Biz bu çalışmamızda yeni sentezlenen flavonoid türevi bileşik olan 5Y-2 maddesinin insan akciğer adenokarsinoma hücreleri üzerinde apoptozis ve hücre siklusu üzerine olan etkilerini gen ekspresyon seviyelerinde araştırmayı amaçladık. 5Y-2 maddesinin apoptoz ve hücre siklusuna olan etkilerini kıyaslamak için daha iyi çalışılmış bir izoflavon olan tektorigenin maddesini kullandık. Her iki madde hem kanser grubunda hem de sağlıklı hücre grubunda çalışıldı. 5Y-2 ve Tektorigenin maddelerinin akciğer adenokarsinoma ve sağlıklı akciğer hücreleri üzerine olan apoptotik etkileri araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

M.Ö 460-370 yılları arasında yaşamış “tıbbın babası” olarak bilinen Yunan tıp doktoru Hipokrat ilk kez kanseri karkinos olarak tanımlamıştır (Hajdu 2011). Yunanca kökenli bu kelime yengeç anlamına gelmektedir. Günümüz tıbbında ise karşımıza çıkan kelime olan onkoloji yunanca “oncos” yani şişlik demektir (Hajdu 2011). Bir kanser hücresinin sağlıklı hücrelerden ayıran çeşitli farklılıklar vardır. Bu farklılıklar sonucu kanserli hücreler sağlıklı hücrelerden ayırt edilebilen davranışlar sergilerler (Hajdu 2011; Yin ve ark. 2021). Kanser hücrelerde mutasyonların birikmesi ile oluşan genomik kararsızlık ve diğer metabolik yolların bozulması sonucu hücrenin apoptozdan kaçması, kontrolsüz şekilde bölünmesi, dokulara invaze olması ve metastaz yapması ile karşılaşılan duruma denir. Bu durumdaki hücrelere kanserli hücre denir. Dokulara ve hatta organizmanın bütününe zarar verir (Kroemer and Pouyssegur 2008).

Bir kanser hücresi sağlıklı bir hücreden farklı olarak sınırsız bölünebilme potansiyeline sahiptir ve bölünme temelli ölümsüzdür (Kroemer and Pouyssegur 2008; de Magalhaes ve ark. 2018). Bölünme temelli ölümsüzlüğü kazanmasının sebebi telomeraz enzim aktivitesindeki artıştır. Sonuna kadar farklılaşmış ve bölünebilen bir hücre en fazla 50-60 defa bölünebilir. Bu hücresel sınırlama Hayflick limiti olarak bilinir. Kök hücreler ve bölünemeyen hücreler Hayflick limitine uygun hücre tipleri değildir (de Magalhaes and Passos 2018). Hayflick limitini dolduran hücreler replikatif yaşlanma sergilerler. Bu yaşlanma sonucunda hücre senesens denilen sessizleşme yoluna gidebilir veya apoptoz denilen programlanmış hücre ölüm yoluna giderek ortadan kaldırılır (Rasnick 2000; de Magalhaes and Passos 2018).

Replikatif yaşlanma apoptotik ölümü beraberinde getirir. Apoptotik hücre ölümü ekstrinsik (dış etkenlere dayalı) ya da intrinsik (içten gelen faktörlere dayalı) olabilir. Kanser hücreleri apoptotik sinyallerden kaçarak hücresel ölüme direnç göstermektedirler (Rasnick 2000).

Sağlıklı hücreler bölünebilmek için çeşitli büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar, bu bölünme faktörleri sıklıkla endokrin (kan yolu) yolla gelen sinyallerdir (Rasnick 2000; Reyna-Jeldes ve ark. 2021). Bununla beraber hücreler birbirleri ile parakrin (yakın hücreler

ile), jukstraktrin (bitişik hücre) yolları ile birbirlerine büyüme faktörleri salgılayarak hücrel bölünmelerini tetikleyebilir (Reyna-Jeldes ve ark. 2021; Weiss ve ark. 2022). Bazı hücreler otokrin yol ile kendi kendini uyarak bölünmesini teşvik eder fakat bunu kök hücreler ya da embriyonik hücreler yaparlar (Weiss ve ark. 2022). Kanseri hücreleri genellikle herhangi bir çevresel büyüme faktörüne gerek duymadan otokrin yolla kendini bölünmeye sevk edecek kabiliyete sahiptir (Derynck ve ark. 2021; Weiss ve ark. 2022).

Bir hücre Hayflick limitine ulaştığında veya bölünmemesi gereken durumlar meydana geldiğinde hücre içi sinyalizasyonda bulunan bölünme baskılayıcı faktörler devreye girerek hücre döngüsünü belirli noktalarda durdurur (Derynck ve ark. 2021). Bunlar büyüme baskılayıcı faktörler olarak adlandırılırlar. Büyüme baskılayıcı faktörler organizmanın bütünü koruyan işleyişi sağlayan en önemli faktörlerdir (Liu ve ark. 2015). Bir hücrede büyüme baskılayıcı faktörler artış gösteriyorsa hücre kendini onarmaya çalışır fakat kanser hücresi büyüme baskılayıcı faktörlerden kaçış gösterir. Bu sayede hücre siklusu durdurulamaz. Dahası hücre siklusunu durdurmaya yönelik gelen faktörler askıya alınır veya inhibe edilir. Bu sayede kanserli bir hücrenin hem bölünme temelli ölümsüzlüğüne yol açılır hem de apoptotik yollar ile ölüm baskılanır (Liu ve ark. 2015). Hücre kontrolsüz şekilde bölünmeye devam ettikçe sayı artar ve kütleli artış meydana gelir. Bölünme sistemi bozulan ve apoptozdan kaçan bu hücreli topluluğun adı tümördür.

Aslında tümörler damardan sızıp başka dokulara yayılınca (invaze olmak) ve dokuları işgal edince kanser adını alırlar. Tümör hücrelerinin bulunduğu ortamdan endotelyumu aşarak damara sızması olayına intravazasyon denir (Hisada ve ark. 2017). Damara sızan kanser hücrelerin yine endotelyumu aşarak başka dokulara yerleşmesi olayına ise ekstrasvazasyon denir (Hisada and Mackman 2017). Organizmanın immün sistemi bu tümör hücrelerini tanıyarak yok ederler (Hisada and Mackman 2017). Dolaşımda sayısı artan tümör hücreleri L-selektin ve P-selektin yapışma moleküllerini sentezleyerek dolaşımdaki plateletlere yapışır ve bu sayede immün sistem hücrelerinden kaçış gösterirler (Hisada and Mackman 2017). İmmün sistemin hücrelerinden kaçan tümör hücreleri farklı bir dokuya taşınırlar ve buraya yerleşirler. Bu olaya metastaz denmektedir. Tümör hücreleri artık yeni bir dokuya taşınmıştır (Wei ve ark. 2019). Tümörlerin oluşup damara sızma sürecinde ve yeni dokulara yerleşerek orada gelişmesi aşamalarından tekrardan damara sızmasına kadar olan süreçlerde en önemli aşama genellikle hipoksi ile indüklenerek meydana gelen anjiyogenez (damar oluşumu) safhasıdır (Gkoutela ve ark. 2019; Wei ve ark. 2019).

Kanserleşen tümör hücreleri kapiller ve kan sızdıran damarlar oluşturur. Anjiyogenezi teşvikleyen en önemli unsurlar hücrenin hipoksi (oksijen kıtlığı) aşamasında olmasıdır (Dudley ve ark. 2023). Kanser hücreleri çok hızlı bölünen ve kan damarının uğramadığı hücrelerdir. Hızlı bölünen kanser hücreleri glikozu da çok hızlı tüketmektedir (Nowak-Sliwiska ve ark. 2018; Paredes ve ark. 2021). Kan damarı uğramadığı için hücreye oksijen ve glikoz girişi kısıtlıdır. Hipoksik koşullara maruz kalan hücre yeniden damarlanmaya başlayarak hem besin ve gaz alışverişi yapar hem de damara ekstrasvaziyonun önü açılmış olur (Paredes ve ark. 2021).

Glikoz ve oksijen kıtlığı, hücredeki genomik kararsızlıklar ve DNA hasarları ile beraberinde gelen biyokimyasal değişiklikler hücrenin enerji metabolizmasını da değiştirir. Normal şartlarda oksijenli solunum yolunu tercih eden hücre, kanserleşmeye başladığında glikoliz yolağını aktif tutarak oksijenli solunumdan kaçır (Liu ve ark. 2017).

Kanserleşme sürecinde kanser hücresi ve kanserin bulunup yerleştiği doku tohum ve toprak hipotezi ile rahatlıkla açıklanabilir (Liu ve ark. 2017). Bu hipotezde bir hücre genetik ve epigenetik olarak kanserleşmeye yatkın ise tohum olarak ifade edilir. Bu tohumu yeşertecek ve ona elverişli bir ortam sağlayacak olan doku ise toprak olarak açıklanabilir. Bu sebeple herhangi bir organda başlayan tümörleşme farklı bir organa sıçrayabilir ve orada gelişebilir. Bu sebeple kanser hücreleri olduğu dokunun yakınlarını değil de daha farklı uzak dokuları istila edebilir (Liu ve ark. 2017).

Akciğer kanseri, dünyada ve ülkemizde hem kadınlarda hem de erkeklerde görülen ve dünya çapında bir yılda yaklaşık 1,6 milyon insanın yaşamını kaybetmesi ile sonuçlanan kansere bağlı ölümlerden ilk sırada yer alan bir hastalıktır (Vecchiarelli ve ark. 2018; Li ve ark. 2019; Broderick 2020). Akciğer kanserleri klinikte iki alt grup olarak incelenmektedir. Bunlardan ilk grup, küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olarak bilinir. İkinci grup ise küçük hücreli olmayan akciğer kanseridir (KHOAK) (Vecchiarelli and Bennati 2018).

Her iki baskın tip için sigara ve tütün kullanımı yakından ilişkilendirilmiştir (Herbst ve ark. 2018). Akciğer kanseri tanısı konulan kişilerin ~%10-15'ini KHAK oluştururken, KHOAK bu tanıların ~%80-85'ini oluşturur (Hou ve ark. 2010; Remark ve ark. 2015; Sibille ve ark. 2015). KHOAK, alt tiplerinin farklılıkları zor ayırt edilebilmesine rağmen histolojik olarak 4 gruba ayrılan heterojen bir hücre popülasyonu içerir. Bu grubun ~%50'si adenokarsinom (ADK), ~%40'ı skuamöz hücreli karsinom (SHK), ~%10 büyük hücreli

karsinom (BHK) ve geri kalanı adlandıramamış alt tiplerdir (Chen, Fillmore, ve ark. 2014; Remark ve ark. 2015). KHOAK için 5 yıllık hayatta kalma oranı %20'nin altında olup hastalığın tedavisi için çeşitli yöntemler geliştirilmektedir (Elias ve ark. 2017; Sun ve ark. 2020). KHOAK tedavi yöntemlerinin başında kemoterapi ve radyoterapi gelmektedir. Fakat bu tedavi metotlarının maddiyatı ve kişiye verdiği zararlar göz önünde bulundurulduğunda kanser ile mücadelede yeni arayışlar içinde olmak kaçınılmazdır (Sun and Benet 2020).

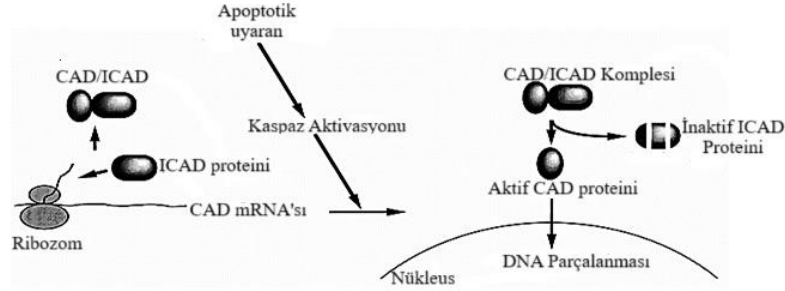
Kanser ile mücadele yöntemlerinden biri olan kemoterapi uygulamaları tedavi gören kişinin bünyesinde kaçınılmaz zararlar oluşturmaktadır. Kemoterapinin etkilerini azaltan veya kemoterapötikler ile aynı etki gösteren fakat daha düşük dozlarda kullanılması arzu edilen yeni arayışların başında flavonoid adı verilen ve bitkilerin sekonder metaboliti olan bileşiklerin etkileri hızla araştırılmaya başlanmıştır. Bu maddelerin kanser hücrelerine daha fazla etki göstermesi ve aynı zamanda sağlıklı hücrelerde yarattığı tahribatın daha az olması flavonoidlerin araştırılma konusunda önemli bir yol açmıştır. İn-vitro, İn-vivo yapılan çalışmalar sonucunda flavonoidlerin kanser hücrelerinde hücre siklusunun durdurulması, kanser ile gelen yangının azaltılması ve kanser hücreleri apoptoza itmesi flavonoidlerin araştırılma sahasını genişletmiştir.

2.2 Apoptozis

Yunancada, uzağa ayrılma anlamına gelen *apo* ve düşme anlamına gelen *ptoz* kelimelerinin birleşiminden meydana gelir. Apoptosis 'in tam manası ise ağaçların yapraklarını dökmesi anlamını taşır (Duque-Parra 2005).

Apoptozis, biyolojik görevlerini tamamlamış hücrelerin, aynı zamanda organizmanın bütünlüğüne tehdit unsuru olmaya başlayan hücrelerin güvenli bir şekilde (çevre hücrelere zarar vermeden) ortadan kaldırılmalarını sağlayan genetik programlanmış ölüm mekanizmasıdır (Duque-Parra 2005). Apoptoz mekanizmaları *Caenorhabditis elegans* adı verilen bir nematod 'ta incelenmeye başlanmıştır. Bu yolla görev alan genlerin insandaki apoptotik genler ile homolog olduğu gösterilmiştir (Cohen 1997). *C.elegans*'ın gelişimini incelerken 1090 hücrenin 131'inin yok olduğu görülmüş ve gelişimin evrelerindeki apoptoz çalışmalarında apoptozun düzenlenmesinde anahtar rol oynayan 3 gen (Ced-3, Ced-4, Ced-9) tanımlanmıştır (Cohen 1997; Elmore 2007). Ardından bu genlerin insanlarda diğer yüksek omurgalılar dahil olmak üzere çoğu canlıda homologuna rastlanmıştır. Apoptoz, normal doku yenilenmesi, organ küçülmesi ve zarar görmüş hücrelerin yok edilmesi haricinde

yıkımı hem de nuklear DNA yıkımından sorumlu hücre ölüm proteinleridir. Kaspazlar apoptoz ve inflamasyonda görev alan korunmuş bir proteaz ailesini oluşturur. İnsanlarda 14 ayrı kaspaz bulunur ve üç ayrı grupta incelenir (Fan ve ark. 2005). Kaspaz proteinlerinin aktivasyonu sonucu Nükleaz enzimleri de aktifleşir bu süreç şekil 2.2’ de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Kaspaz aktif proteinler. Kaspaz aktivasyonunda görevli proteinler ve kaspaz aktivasyonu sonrası DNA parçalanmasını başlatan yolak. CAD (caspase-activated deoxyribonuclease), ICAD (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease/kaspaz-ilişikli deoksiribonükleaz inhibitörü).

- Başlatıcı kaspazlar:** kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-10 hücre ölüm için diğer kaspazların aktivasyonlarından sorumlu kaspaz ailesi proteinleridir. N-uçlarında bir protein etkileşim bölgesine sahiptirler ve efektör kaspazlarda bulunan glutamat-X-aspartat sekansını kesmektedirler. Çoğu proteaz gibi kaspazlar da hücre içinde prokaspaz adında inaktif zimojenler halinde bulunurlar (Kesavardhana ve ark. 2020).
- Efektör (Etkili) kaspazlar:** kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-6 proteinleri aktive olduktan sonra hücre ölüm kaçınılmazdır. Etkili kaspazlar enflamatuvar kaspazların aktivasyonunu başlatarak hücre ölüm gerçekleştirirler (Van Opend Bosch ve ark. 2019). DEXD aspartat-glutamat-X-aspartat tetrapeptidini tanırlar ve apoptoz sırasında hücredeki hedeflerini kesmekle yükümlüdür (Van Opend Bosch and Lamkanfi 2019).
- Enflamatuvar kaspazlar:** kaspaz-4, kaspaz-5, kaspaz-1, kaspaz-11, kaspaz-12, kaspaz-13, kaspaz-14 hücre ölümde görevli kaspazlardır. N-uçlarında bir kaspaz bağlanma bölgesi olan CARD'ı taşırlar ve substratlarını X'in hidrofobik bir rezidü olduğu X-glutamat-histidin-aspartat aminoasit sekansından sonra keserler (Beroske ve ark. 2021). Kaspaz ailesi proteinlerin substratları, hücre siklusu ve sitoskelet proteinleri, Nükleik asit metabolizmasına katılan proteinler ve transkripsiyon

faktörleri, sinyal iletiminde rol alan proteinler ve sitokin öncülleridir (Larsen ve ark. 2017).

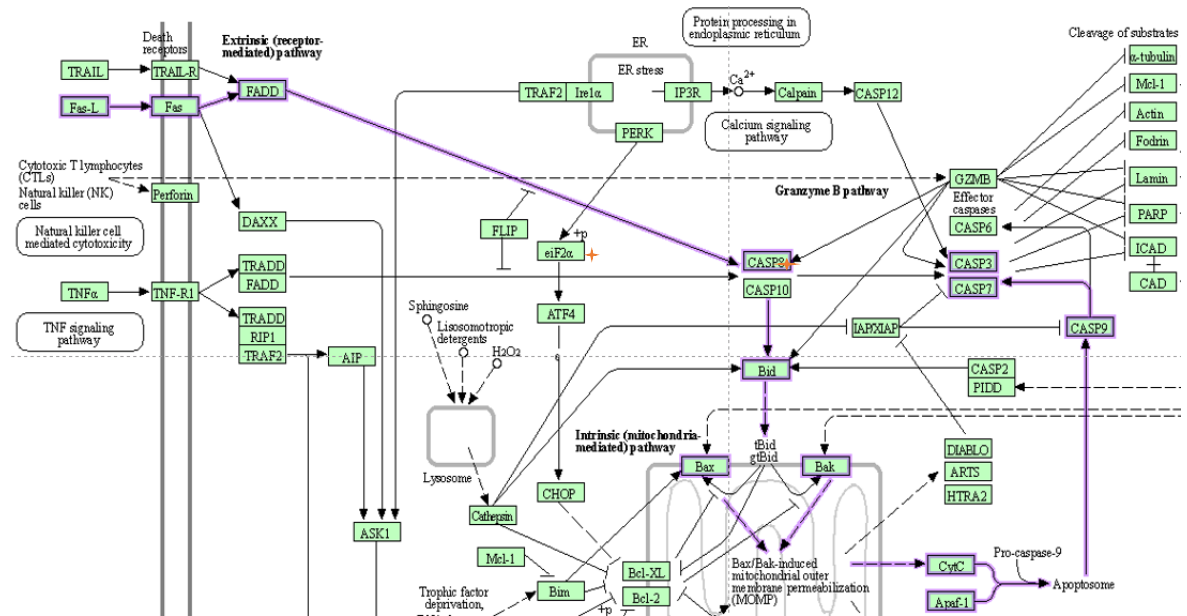
2.2.2 Apoptozun Ekstrinsik Yolağı

Dıştan gelen uyarıların tetiklediği apoptoz yolağı, TNF, FAS-L ve TRAIL ölüm ligandlarının bir başka hücrenin zarında bulunan kendi reseptörlerine bağlanmalarını takiben tetiklenmektedir (Matson ve ark. 2020).

Ligantlar reseptöre bağlandıktan sonra reseptörlerin sitoplazmik ucunda bulunan DD etkileşim bölgeleri adaptör protein FADD (FAS Associated Death Domain/Fas ilişkili ölüm domaini) ile prokaspaz-8 proteinlerini bir araya getirerek DISC'i oluşturur (Matson and Yang 2020). (DISC: Death-inducing signaling complex). Ölüm ligantları hücreyi uyardığında, kaskatlar sonucu aktifleşen kaspaz-3, sitozolde bulunan ICAD (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease/kaspaz-ilişkili deoksiribonükleaz inhibitörü)'ı inaktifleştirir (Matson and Yang 2020). Bu nedenle, İnaktifleşen ICAD, normal haldeyken bağlı olduğu CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) dan ayrılır. Sitozolde serbest kalan CAD, nükleusa girerek kromatin yoğunlaşması ve DNA kırıklarının oluşmasına böylece hücrenin apoptoza gitmesine neden olur (Matson and Yang 2020; Tan ve ark. 2021).

Şekil 2.3' gösterilen apoptozun ekstrinsik yolağı dışarıdan gelen ölüm sinyalleri ile uyarılan ve hücrel ölümü mitokondria destekli getiren süreçtir. Dışarıdan gelen sinyaller sonucu oluşan apoptoz yolu tıpkı diğer hücre içi sinyalizasyon yolları gibi fosforilasyon kaskadlarına dayalıdır. Dıştan gelen uyarıların tetiklediği apoptoz yolağı, TNF, FAS-L veya TRAIL ölüm ligandlarının bir başka hücrenin zarında bulunan kendi reseptörlerine bağlanmalarını takiben tetiklenmektedir (Tan ve ark. 2021). Uyarılar reseptöre bağlandıktan sonra reseptörlerin sitoplazmik ucunda bulunan DD etkileşim bölgeleri adaptör protein FADD ile prokaspaz-8 proteinlerini bir araya getirir ve DISC oluşumu tamamlanır. Kaspaz-8 DISC içerisinde aktive edilir. Belirli kesilim yerlerinden kırılmasından sonra aktif enzim olarak iki adet p20 ve iki adet p10 alt birimlerinin bir araya gelmesi sonucu tam aktif hale gelir. Aktif kaspaz-8 ise öncelikle prokaspaz-3,-6,-7'nin de p20 ve p10 alt birimlerine kesilmesinin ve aktifleşmesinin sağlandığı kaskatı başlatır (Laubach ve ark. 2019). Apoptozu tetikleyen bu mekanizmaları yanında DISC'in çalışmasına apoptozu önleme göreviyle bağlanan FLIP proteinleri de mevcuttur. FLIP'in bağlanması prokaspaz-8'in DISC kompleksinde aktif formunu almasını engeller. Bu şekilde ölüm reseptörleri

aracılığıyla tetiklenen hücre ölümü engellenmiş olur (Mor ve ark. 2002; Laubach ve ark. 2019). Aktif kaspaz-8'in önemli hedefleri arasında BID proteini yer almaktadır. BID'nin kesilimi sonrasında tBID'in mitokondrinin dış zarına yerleştiği ve BH3 bölgesi aracılığıyla anti-apoptotik BCL-2 ve BCL-X proteinlerinin denetleyici görevlerini inhibe edip mitokondrinin dış zarında BAK/BAX kanallarının oluşmasını sağladığı gösterilmiştir. Bu aşamada oluşan kanallardan sitokrom c salımı gerçekleşir ve böylece dıştan gelen apoptoz uyarı yolağı mitokondri merkezli içten gelen apoptoz uyarı yolağına bağlanır (Mor ve ark. 2002). Kaspaz -3,-6,-7 kendi hedef proteinlerini spesifik kesim dizilerinden tanıyıp enzimatik makaslama görevi görürler (Mor ve ark. 2002).



Şekil 2.3 Ekstrinsik Apoptoz yolağı. FAS veya TRAIL ligandları hücre yüzey reseptörlerine bağlandığında FADD (Fas ilişkili ölüm domaini) aktive eder ve hücre içerisinde kaspaz proteinleri aktive eden bir fosforilasyon şelalesi başlar. kaskatlar sonucu aktifleşen kaspaz-3, sitozolde bulunan ICAD (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease/kaspaz-ilişkili deoksiribonükleaz inhibitörü)'ı inaktifleştirir. Bu nedenle, İnaktifleşen ICAD, normal haldeyken bağlı olduğu CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) dan ayrılır. Sitozolde serbest kalan CAD, nükleusa girerek kromatin yoğunlaşması ve DNA kırıklarının oluşmasına böylece hücrenin apoptoza gitmesine neden olur (KEGG, Pathway, 2023).

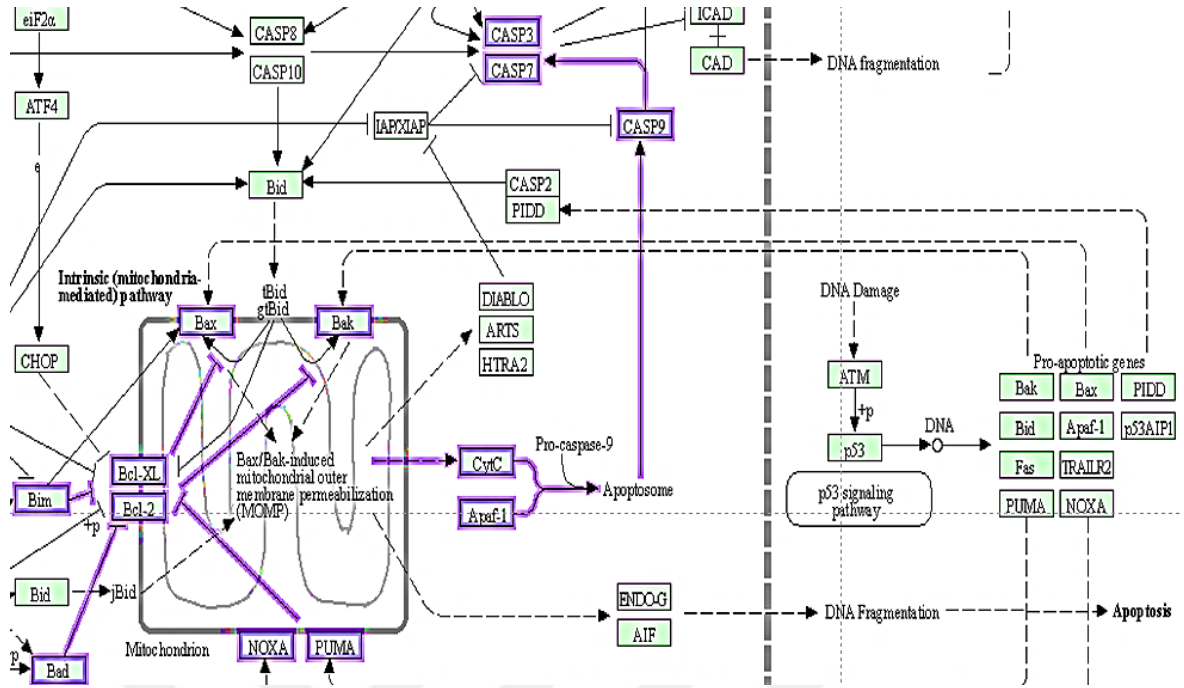
2.2.3 Apoptozun İntrinsik Yolağı

Radyasyon, UV ışın, Hücre içi reaktif oksijen türlerinde artış, ATP/ADP ve NADPH azalması, hipoksi koşulların meydana gelmesi Ca^{++} iyonlarında artış, DNA hasarı gibi olaylar sonrası apoptoz mitokondrium yolundan ilerler (Mor ve ark. 2002; Imao ve ark. 2013). Bu yol apoptozun intrinsik yoludur. Aslında ekstrinsik yolak ve intrinsik yolak birbirileri ile bağımsız yollar değildir. Her iki yolakta kaspaz proteinlerine bağlıdır. DNA hasarı, metabolik stres gibi sinyaller tespit edildiğinde içten gelen uyarıların tetiklediği

apoptoz yolağında BCL (B Cell Lenfoma) ailesi üyelerinin düzenlediği ayrı bir ileti kaskadı devreye girer (Imao and Nagata 2013). Apoptozun intriksik yolu Şekil 2.4'te gösterildiği gibi mitokondriyum destekli bir yıkım sürecidir. Apoptozun ekstrinsik yolu da mitokondriden desteklidir, fakat FAS, TRAIL, TNF gibi dışarıdan gelen ölüm sinyalleri ile değil de kaspaz aktivasyonları, bozulan mitokondri permabilizasyonu gibi faktörler sonucu ölüm reseptörleri uyarılmadan gelen hücrelölümdür.

Bu sinyallerin yokluğunda BCL ailesi üyelerinden BCL-2 ve BCL-XL gibi anti-apoptotik proteinler pro-apoptotik üyeler olan BAK ve BAX'ın aktivasyonunu engeller. Belirtilen olaylar ardından mitokondriyum permabilitesi bozulur (Imao and Nagata 2013). Mitokondri dışı zarının permeabilizasyonu sonucunda sitokrom c ve Smac/DIABLO (SMACs; Second mitochondria-derived activator of caspase) uyarıcıları sitoplazmaya salınır ve sitokrom c apoptozom adı verilen komplekslerin oluşmasında görev almaktadır (Mor ve ark. 2002; Imao and Nagata 2013; Tan ve ark. 2021).

Mitokondri zarından salınan sitokrom-c, APAF-1 proteinine bağlanarak nükleotit değişimini ve APAF-1'in oligomerizasyonunu tetiklemektedir. Sitokrom-c adı verilen protein sitozole geçerek Apaf-1 (Apoptoz aktive edici faktör-1) ile birleşir ve yedili bir çark oluşturur (Mor ve ark. 2002; Lindholm ve ark. 2004; Imao and Nagata 2013). Daha sonra bu komplekse prokaspaz-9 bağlanır ve kaspaz-9'un otokatalik aktivasyonu gerçekleşir. Aktif kaspaz-9 ise yolağın altındaki hedef proteinler olan efektör kaspazları kesilimlerini sağlamaktadır. Bu sinyal yolağında kaspaz-3'ün aktivasyonu sonrasında geri dönüş mümkün değildir (Chen, Xu, ve ark. 2014).



Şekil 2.4 Apoptozun İntrensik Yolu. Hüresel stres ve diğer çevresel etkenler pro-apoptotik proteinlerin sitozoldeki miktarını artırır. Ardından mitokondrinin permeabilitesini bozular ve mitokondriden sitozole sitokrom-c salınır. Sitokrom-c sitozolde APAF-1 ve kaspaz-9 ile birleşerek apoptozom kompleksini oluşturur. Bu kompleks sitozolde kaspaz aktivasyonuna başlar ve hüresel ölüm başlatılır (KEGG, Pathway, 2023).

Mitokondriyal apoptotik proteinler pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Anti-apoptotik proteinler BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, A1 proteinleridir. Pro-apoptotik proteinler ise BAX, BAK, PUMA, NOXA, BIM, BAD, BID, BMF proteinleridir (Imao and Nagata 2013; Chen, Xu, ve ark. 2014). Apoptotik veya patolojik bir uyarın gelmediği sürece BCL-2, BCL-X gibi anti-apoptotik proteinler BAX, BAK gibi pro-apoptotik proteinlere bağlanarak apoptoza engel olurlar. Kanser hücrelerinde ise DNA hasarına verilen tepkiler farklıdır. Bu hücrelerde DNA hasarı tespit edilse dahi hücre döngü blokları veya hücre intihar mekanizmaları doğru çalışmamaktadır (Chen, Xu, ve ark. 2014). p53 proteini hücre döngüsünde görevli ve DNA hasarının tamir edilemeyecek olduğu durumlarda BAX ve PUMA gibi pro-apoptotik proteinlerin ifadesini arttırarak hücrenin intihara sürüklenmesini kolaylaştırır.

Ancak kanserli hücrelerde hücre döngüsünde görevli p53 proteini mutasyona uğramıştır veya ikinci kopyası yok olmuştur. Bu sayede apoptoz mekanizması aktifleştirilemediği için hücre kontrollü ölüme gidemez (Chen, Xu, ve ark. 2014).

2.2.4 p53 proteini

Tümör baskılayıcı protein olan p53, mitotik iği iplik hasarı, DNA hasarı, hipoksi durumu ve onkogenler tarafından yüksek düzeyde aktive edilebilen kısa ömürlü bir transkripsiyon faktörüdür (Chen, Xu, ve ark. 2014). Günümüzde p53'ün çok fonksiyonlu bir protein olduğu hücre döngüsünün durdurulması, apoptoz, farklılaşma ve yaşlanma gibi birçok biyolojik işlemde görev alındığı bilinmektedir. Memeli hücrelerinde G1 kontrol noktasında beklemede p53 proteinin faaliyeti etkili olur. DNA hasarı olduğu zaman, bu hasar hızlıca p53 üretimini artırır. Bu artan p53 seviyesi de hücrenin G1 evresinde kalarak S evresine geçmesini önleyen sinyalleri oluşturur. İnsan kanserlerinde p53 proteini kodlayan gen mutasyona uğramıştır (Wang ve ark. 2023). Mutasyon sonucu ortaya çıkan p53 fonksiyon kaybı, oluşan DNA hasarına rağmen siklusun G1 de durmasını sağlayamaz. Şekil 2.6' da mutant p53 proteininin hücre siklusunu durdurmada başarısız olduğu yol gösterilmiştir. Bunun sonucu hasarlı DNA tamir edilmeden replike olur ve yavru hücrelere geçer. Hasarlı DNA'nın bu kalıtımı mutasyon frekansının daha da artmasına ve hücre genomun dayanıksızlığına neden olur. P53 proteininin stabilizasyonu DNA hasarına ya da c-MYC gibi onkogenlerin uygunsuz aktivasyonlarına cevap olarak gerçekleşir p53 apoptozu veya hücre döngüsünü kontrol eden genleri koordine eden bir kontrol noktası gibi çalışır (Kanapathipillai 2018). p53'te görülen fonksiyon bozuklukları sonucunda kanserleşme gerçekleşmektedir. p53 geni insanda 17p13.1 kromozom bölgesinde lokalize olup 393 aminoasitten oluşan bir protein kodlanmaktadır. Protein yapısal ve fonksiyonel olarak farklı 5 bölge içerir. 1-63. aminoasitlerin oluşturduğu N-terminal aktivasyon domaini (TAD) p53 ile sıkı ilişki içerisinde olan MDM2 proteininin de bağlanma bölgesini oluşturmaktadır (Kanapathipillai 2018).

2.2.5 p53'ün Aktivasyonu ve Fonksiyonu

p53 proteini yaklaşık 20 dakikalık yarı ömre sahip olduğundan hücrede normal koşullarda düşük seviyededir. Hipoksi, DNA hasarı, oksidatif stres gibi birçok koşulda aktifleşebilmektedir. p53 aktifleştikten sonra kendisinin transkripsiyonunu da tetikler ve transkripsiyon faktörü rolü artar (Kanapathipillai 2018; Sabapathy ve ark. 2019). p53'ün DNA kırıkları sonucunda aktive edilebilmesinin en kalıcı mekanizması başka bir proteinin DNA kırıklarını tanıyarak aktif hale gelmesi ve daha sonra da p53 ile ilişkiye geçerek onu aktifleştirmesidir. İyonize radyasyon sonucu meydana gelen DNA çift kırıklarında ilk olarak Ataksia telangiektasia mutated kinaz (ATM) uyarılır. ATM, ikinci kinaz (chk2) olan Chk2'yi

fosforilleyerek aktifleştirir. ATM ve Chk2 her ikisi de p53'ün N-terminal bölgesinden fosforilleyerek aktifleştirir (Kanapathipillai 2018; Sabapathy and Lane 2019). DNA hasarına ek olarak hipoksi p53 protein seviyesinin yükselmesine ve p53 aktivasyonuna sebep olabilir. p53'ün organizmada kanser gelişimine karşı rol oynadığı bilinmektedir. Birçok tümör çoğalmaya başlayıp belirli ölçülere ulaştığında kan desteğine ihtiyaç duyduğundan anjiyogenetik faktörlere ihtiyaç duyar (Kanapathipillai 2018). Hipoksi sonucunda p53 aktivitesi indüklenerek bu gibi hücrelerde apoptoz tetiklenebilir. p53 tarafından düzenlenen bir gen olan Trombospondin'in gen ürünü bu gibi tümörlerin kan desteğini azaltan bir antianjiyogenik faktör olarak çalışır ve böylece tümör gelişimi p53 tarafından trombospondin gen ekspresyonunu tetikleyerek engellenmiş olur (Sabapathy and Lane 2019; Liebl ve ark. 2021).

2.2.6 p53 ve Hücre Döngüsü

DNA hasarının bazı formlarına cevap olarak p53 ve p21 geninin transkripsiyonunu aktive eder Şekil 2.5. p21, Cdk4-6/SiklinD, Cdk2/SiklinE ve Cdk2/SiklinA'ya bağlanarak bu kompleksleri inhibe eder. Hücre döngüsünün kontrol noktalarını oluşturan bu siklin bağımlı kinazların inhibisyonu ile hücre döngüsü durdurulur. p21 yalnızca hücre döngüsünü durdurmakla kalmaz aynı zamanda DNA replikasyonu için gerekli proliferasyonu tetikleyici hücre nükleer antijeni (PHNA) kompleksine bağlanıp DNA polimerazı engelleyerek DNA sentezini de durdurmaktadır (Koo ve ark. 2022). p53'ün G1/S geçişindeki kontrolüne ek olarak G2/M noktasını da kontrol ettiği belirlenmiştir (Koo ve ark. 2022). Böylece p53, DNA replikasyonunu engelleme yeteneği ile hasarlı DNA'nın yavru hücrelere aktarılmasını engelleyerek ve DNA sentezi sırasında oluşan hasarların mitoz girirmeden tamir edilip hasarlı DNA'ya sahip hücrelerin oluşmasını engelleyerek koruyuculuk görevini yerine getirmektedir (Engeland 2022).

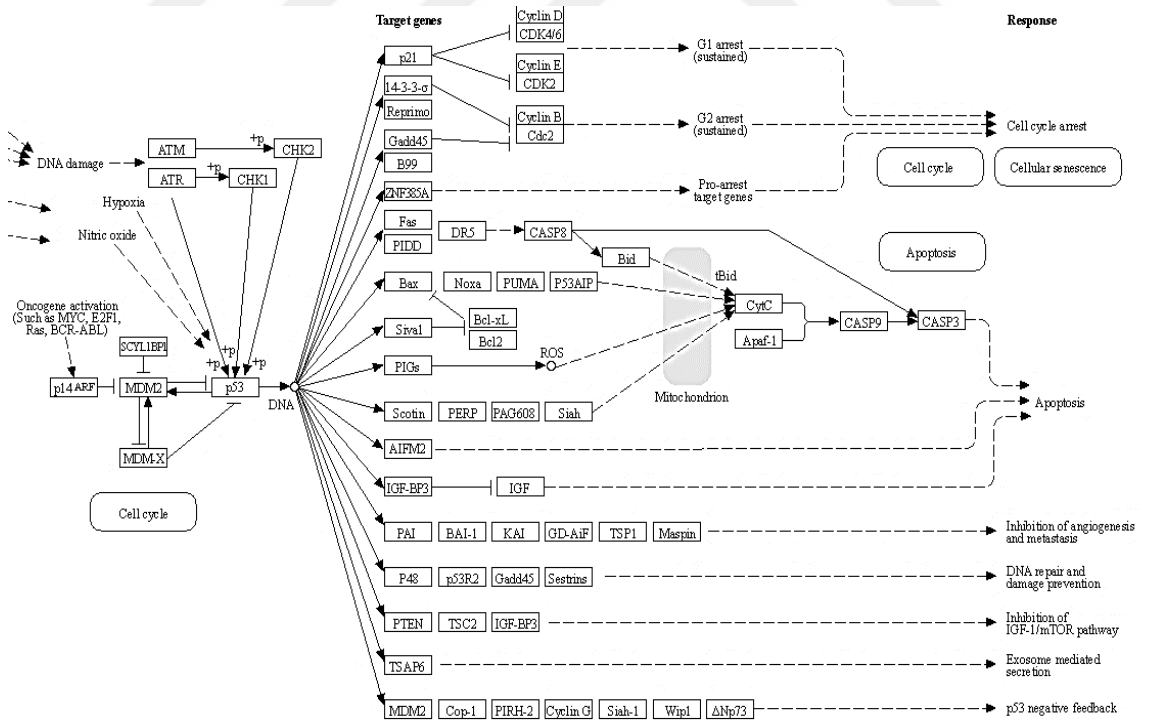
2.2.7 p53 ve Apoptoz

Hücrede DNA hasarı meydana geldiği zaman DNA kırıklarını tanıyarak aktifleşen ilk kinaz DNA-bağımlı protein kinazdır (Engeland 2022). DNA kırıklarının meydana geldiği tek iplikli DNA koluna bağlanan DNA bağımlı protein kinaz aktif hale geçer ve p53'ü fosforlar. Fosforlanarak aktifleşen p53 hedef genlerinden biri olan p21waf/Cip1'in transkripsiyonunu aktive ederek ekspresyon düzeyini artırır. Böylece hücre içinde p21 konsantrasyonunun artışı hücre döngüsünün G1'de durmasına neden olur. Duraksama

esnasında hücrenin genomik DNA'sında meydana gelen hasarın onarılması için vakit kazanılır. Bu aşamada GADD45 çok önemli bir proteindir (Chen 2016).

Hücredeki DNA hasarı düzeltilirse p53 aktivasyonu azalacak ve p53'ün hücre döngüsündeki baskısı ortadan kalkacaktır (Ye ve ark. 2017). Ancak meydana gelen DNA hasarı çok ağırsa ve onarılması mümkün olmuyorsa hücre döngüsüne devam edilmesine izin verilmeyeceğinden hücre apoptoza yönlendirilir. Bu aşamada p53, hedef genlerinden olan pro-apoptotik BAX'ın transkripsiyonunu aktive eder.

Bax'ın konsantrasyonunun hücre içinde artması normalde mitokondri porlarında dimerler halinde bulunan ve mitokondride sitokrom C salınımını engelleyen Bcl-2'nin Bax ile heterodimer oluşturmaya neden olur (Ye ve ark. 2017; Engeland 2022). Mitokondriden sitokrom-C salınımını engelleyen Bcl-2 dimerleri yerine Bax-Bcl-2 heterodimerlerinin oluşmasıyla mitokondri porları kapatılamaz ve sitokrom-C mitokondriden salınır (Wang ve ark. 2023). Sitokrom C sitoplazmaya geçer ve Apaf-1'e bağlanarak Kaspaz-9'un da katıldığı apoptozomların oluşumu sonucunda kaspazlar aktif hale geçerek apoptozun başlaması için gereken sinyal oluşur ve hücrenin programlı hücre ölümü gerçekleşir (Wang ve ark. 2023).



Şekil 2.5 p53 yolağı. tümör supressor protein olan p53 bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre döngüsünü p21 ile durduran ve hücreyi apoptoza götüren yolların kilit proteindir (KEGG, Pathway, 2023).

Serbest olan BAX/BAK mitokondri permeabilizasyonu yoluyla Smac/DIABLO ve sitokrom c salımını tetikler. Sitokrom c apoptozomlarda kaspaz-9'u aktive ederken Smac/DIABLO IAP'ları (Inhibitor of Apoptosis) antagonize ederek kaspazların serbest kalmasını sağlar. Serbest kalan kaspazların aktivasyonunda hücreleri ölüme götürür (Wade ve ark. 2013; Barabutis ve ark. 2018). Ancak kanserli hücrelerde hücre döngüsünde görevli p53 proteini mutasyona uğramıştır veya ikinci kopyası yok olmuştur. Bu sayede apoptoz mekanizması aktifleştirilemediği için hücre kontrollü ölüme gidemez (Barabutis ve ark. 2018). Tüm kanserlerin neredeyse %50'sinde p53 mutasyonu görülür. Bazı p53 mutasyonları ise hücrenin onkogenik özellikler kazanmasına neden olmaktadır. Bu mutasyonlar daha çok nokta mutasyon olup yaklaşık %86 kayıp, %10 anlamsız, %4 sessiz mutasyon olarak dağılım göstermektedir. p53, bu tür nokta mutasyonlar ile çeşitli şekillerde inaktif olmakta ve aktivasyonu engellenmektedir. Çoğunlukla mutasyonlar p53'ün DNA bağlanma domaininde görülmektedir. Bu tür mutasyonlar p53 aktive edilse bile hedef genlerin aktivasyonunun önlenmesiyle fonksiyonunu yerine getirememesini sağlayarak etki göstermektedir. Bazı mutasyonlar ise doğrudan fosforlanma bölgesinde meydana gelmekte bu durumda p53'ün fosforillenmesine engel olarak proteinin aktivasyonunun önlenmesine neden olmaktadır (Wade ve ark. 2013; Ye ve ark. 2017; Barabutis ve ark. 2018).

Genetik değişimler ile p53 aktivitesinin indirgenmesi bir bütüncül bakış açısı sağlamaktadır. Bu modele göre p53 geninin kaybı pankreatik neoplasmların son evresinde görülmektedir. p53 mutasyonları meme kanserinde özellikle 2 cm'den küçük ve erken evre olan T1 tümörlerinde nadir görülmekte olup 5 cm'den büyük T3 tümörlerinde sık görülmektedir (Barabutis ve ark. 2018). Bununla beraber karsinogenezin geç dönemde görülen p53 mutasyonları mesane, hepatokarsinoma ve prostat kanserlerinde de bilinmektedir. Tüm bu bulgular p53 mutasyonlarının birçok kanser tipinde görülmekte olduğu ve mutasyon zamanlamasının farklı tip hücrelerde ve süreçlerde belirleyici olduğunu göstermiştir (Barabutis ve ark. 2018). p53 mutasyonlarının öncelikli olarak malign olmayan öncü hücresel değişimlere neden olduğunu ve kanser risk faktörlerinin bu şekilde arttığını belirlenmiştir (Wade ve ark. 2013; Ye ve ark. 2017).

2.3 Flavonoidler

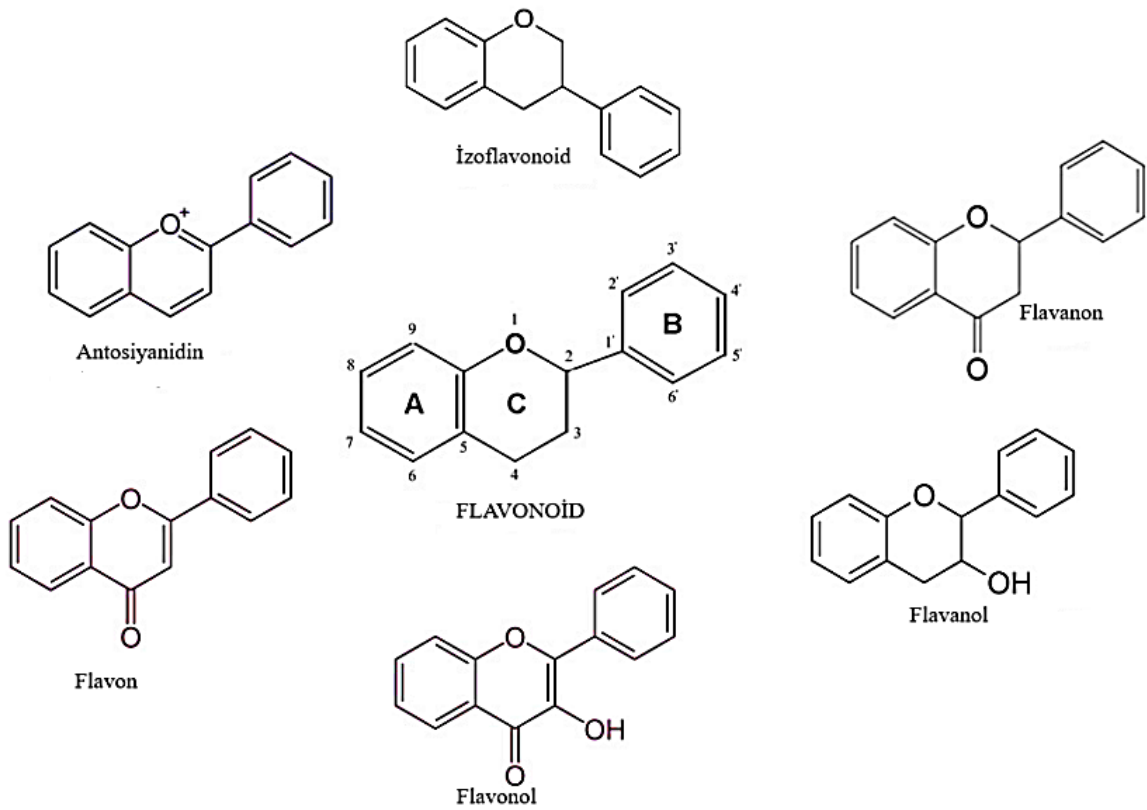
Kanser ile mücadelede kemoterapinin bilinen yan etkileri göz önüne alındığında, bu yan etkilerin daha az olacağı ve kemoterapi kadar kuvvetli yeni bileşikler arayışı içine girilmiştir. Yeni bileşikler arasında en göze çarpan kimyasal gruplardan biri, bitki hücrelerini mikroorganizmalara, böceklerle ve UV ışınlarına karşı savunmada önemli bir rol alan polifenollerin bir alt sınıfı olan flavonoidlerdir. Flavonoidler, başlıca sebze ve meyvelerde bulunan aynı zamanda bitkilerde çok çeşitli görevler alan aktif sekonder metabolitlerdir. Flavonoidler beş alt gruba ayrılan poli-fenolik bileşiklerdir (Ciumarnean ve ark. 2020). Bu beş grup, flavonlar, flavanlar, flavonoller, kateşinler ve antosiyanidinlerdir ve şekil 2.7' bu bileşiklerin kimyasal yapısı gösterilmiştir. (Teles ve ark. 2018; Ciumarnean ve ark. 2020). Diyet sonucu alınan sebze ve meyvelerdeki bu bileşiklerin etkileri araştırıldığında antioksidan, anti-inflamatuar, kardiyο koruyucu, apoptoz ve otofaji indükleyici gibi pek çok etkileri ortaya çıkarılmıştır (Fan ve ark. 2022).

Flavonoidler bitkilerin yaprak çiçek ve meyvelerinin parlak renkler kazanması ve bitkinin bu bölümlerinin kırmızı, mavi, sarı, turuncu vs. renklere sahip olmasına etki gösterirler. Ayrıca flavonoid grupları kırmızı şarapta, tıbbi ve aromatik bitkilerde, kahve ve çay gibi bitkilerde de bulunur. Flavonoidler genellikle glikozillenmiş halde bitkide bulunurlar (Fan ve ark. 2022; Slika ve ark. 2022). Flavonoidler için en yaygın glikozillenme birimi yani glikosidik birim glikozdur, bunun yanında glukoramnoz, galaktoz, arabinoz ve ramnoz daha az bulunan diğer örnekler arasında gösterilebilir. Bu şekerlerin β -bağı genellikle pankreatik enzimler tarafından hidrolize edilmeye karşı dirençlidirler (Slika ve ark. 2022).

Aslında flavonoidler, bitki biyokimyasında ve fizyolojisinde antioksidan etki gösteren ve enzim inhibitörleri olarak görev alırlar. Bununla beraber bitkinin toksik maddelerinin öncülleri olarak bulunabilirler. Flavonoid bileşikleri bitkide sekonder metabolit olarak kullanıldığından ve çoklu heterosiklik olduğundan elektron taşıyıcılığı, enerji transferinde aracı moleküller büyüme düzenleyicileri vs. pek çok evrede görev alırlar (Slika ve ark. 2022).

Flavonoidler bitkideki bu fonksiyonlarının haricinde bitkinin azot fiksasyonuna da katılırlar. Bitkilerin yapısında bu denli bulunan ve bitkilerin neredeyse bütün kısımlarında bulunan bu polifenolik bileşiklerin diğer canlı grupları üzerindeki etkileri araştırılma

konusudur. Bitkilerin dünyada memelilerden bakterilere kadar bütün canlılar ile ilişkisi vardır. Gerek av-avcı ilişkileri gerekse mutualist yaşam sonucu bitkiler pek çok canlı tarafında tüketilmekte veya aynı habitatta ilişkili yaşam kurmaktadır. İnsanlar bitkiler ile geçmişten günümüze iç içedir. Bitkilerin yapılarında bulunan flavonoidlerin insan hücreleri üzerine olan etkileri hatta insan kanserlerine olan etkileri merak edilmektedir ve araştırma konusu olmaktadır. Özellikle yakın zamanlarda flavonoidlerin hepato-koruyucu anti-oksidan ve anti-kanserojen etkileri çalışmalar sonucu aydınlatılmaktadır. Kanser ile mücadelede kemoterapiye yardımcı maddeler arasında flavonoidler başı çekmektedir.



Şekil 2.7 Flavonoid Anasınıfları ve Molekül Yapıları. Ana flavonoid omurga yapısı 3 hetero halkadan oluşmaktadır. Bu flavonoid omurgadan kökenlenen flavonoidlerin alt grupları gösterilmiştir. (Kopustinskiene ve ark. 2020).

2008'den günümüze kadar yapılan çalışmalar ile flavonoidlerin anti-inflamatuar, antioksidan, antialerjik ve hepato-koruyucu özelliklere sahip oldukları gösterilmiştir. Bu nedenle flavonoidler daha çok araştırma konusu olmuştur ve bu özelliklerine ek olarak flavonoidlerin antitrombotik, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antikanser ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu özelliklere sahip oldukları düşünülmektedir (Kopustinskiene ve ark. 2020; Fan ve ark. 2022; Slika ve ark. 2022).

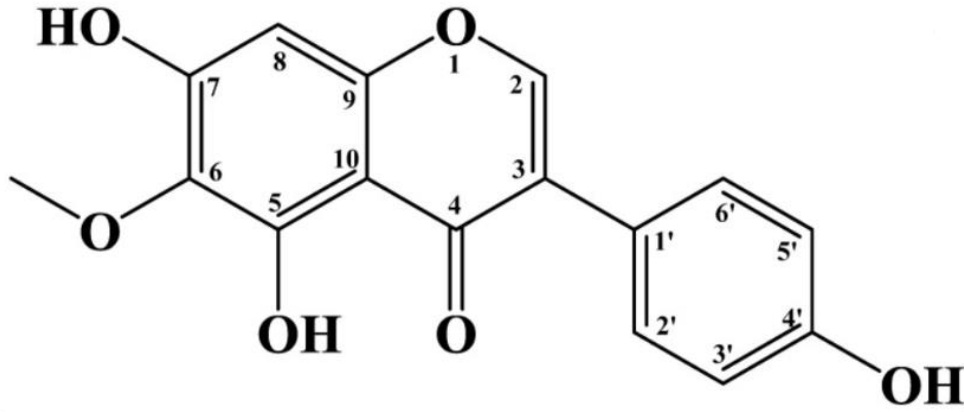
2.3.1 Flavonoidler ve Kanser

Kanser hücre hattındaki sitotoksiste çalışmaları, temel olarak normal hücreleri etkilemeyen kanser hücrelerinde toksisiteye sebep olan flavonoid bileşiklerinin güçlü antikanser etkilerini göstermiştir. Yapılan çalışmalar ile flavonoidlerin bir alt grubu olan flavonlar hücre bölünmesini potansiyel inhibitörü olarak görev almışlardır. İn-vitro ve in-vivo çalışmalar sonucunda flavonoidlerin kanser hücrelerinde kontrolsüz hücre siklusunu inhibe ettikleri ve normal hücrelere ciddi şekilde az etki ettikleri gösterilmiştir. Pek çok kanser türünde yapılan çalışmalar sonucunda flavonoidlerin kanser ile mücadelede aday bileşikler olduğu gösterilmiştir. Hücre kültürü ve deney hayvanları çalışmaları kemoterapiye ek olarak flavonoidlerin kanser hücrelerinde apoptotik ve bölünme durdurucu etkileri gösterilmiştir (Ciumarnean ve ark. 2020; Slika ve ark. 2022).

Birçok bileşikte olduğu gibi flavonoidlerin de yapısında meydana getirilen moleküler değişiklikler bu metabolitlerin etkilerini çeşitli şekilde arttırabilir. Flavonoidlerin yapısında glikozil grupları bulunduğu suda çözünürlüğü fazladır. Fakat moleküler değişiklikler ile yeniden sentezlenen flavonoidler yağda çözünür hale getirilerek hücre hedeflemesi kolaylaştırılabilir. Benzer şekilde flavonoidlerin yapılarına eklenen yan gruplar veya dimerleştirme sonucunda biyolojik aktiviteleri arttırılabilir. 2009 yılında Mohammed tarafından yapılan çalışmada biri krizin ve kersetin moleküllerinin antioksidan etkileri arasındaki fark aranmıştır. Kersetin, krizin molekülünden farklı olarak B halkasında iki, C halkasında ise bir tane olmak üzere toplam üç tane hidroksil grubu bulundurur ve krizin kersetine göre 20 kat daha etkili bir antioksidandır (Kopustinskiene ve ark. 2020; Fan ve ark. 2022).

2.3.2 Tektorigenin

Üç adet hidroksil grubuna sahip bir metoksi izoflavon olan tektorigenin Şekil 2.8, kimyasal olarak adı 5,7-dihidroksi-3-(4-hidroksifenil)-6-metoksi-4H-kromen-4-on olarak belirtilir (Rong ve ark. 2023). Moleküler ağırlığı 300,26 gr/mol olarak bildirilmiştir (Rong ve ark. 2023). Tektorigenin biyoaktif bir moleküldür ve birçok bitkide bulunur. En sık ve bol miktarda rastlanılan bitkiler arasında zambakgillerden böğürtlen zambağı olarak bilinen *Belamcandae* ailesinden *Belamcanda chinensis*, (Leopar çiçeği) ve çok yıllık rizomatöz bitki olan mavi spuria da (*Iris spuria*) rastlanmıştır.



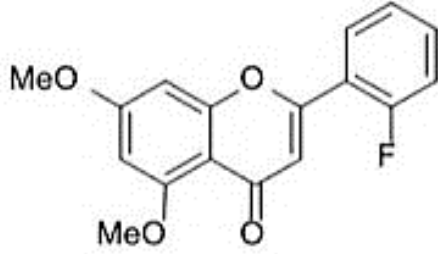
Şekil 2.8 Tektorigenin maddesinin moleküler yapısı. Hidroksil gruplarınca zengin bir izoflavon olan tektorigenin maddesinin moleküler yapısı gösterilmiştir. (Zhou ve ark. 2023).

Tektorigenin izoflavonunun hücre içi sinyalizasyonda etki ettiği gösterilmiştir. Hücre içerisinde $PPAR\gamma/NF-\kappa B$, yoluna etki ederek hepato-koruyucu etkileri, $PI3K/AKT$, yolu üzerinden anti-inflamatuvar özellikleri olduğu bilinmektedir (Zhou ve ark. 2023). Benzer şekilde hücre içi sinyalizasyonda $TLR4/NF-\kappa B$, $IKK\beta/NF-\kappa B/JNK$, yolaklarına etkiyerek anti-diyabetik ve anti-obezite etkilerinin var olduğu ve solunum sistemini koruyucu özellikleri bildirilmiştir (Zhou ve ark. 2023). ERK/JNK , yolağı üzerinden nöro-koruyucu etkileri ve $MAPK/JNK/AP-1$, $AKT/MAPK$, $TGF-\beta1/Smad$ hücresel sinyal yolları üzerinden kemik-koruyucu, anti-apoptotik ve kardiyo-serebrovasküler sistemi koruyucu etkinlikleri bilinen bir izoflavondur (Yeh ve ark. 2020; Rong ve ark. 2023; Zhou ve ark. 2023).

Belamcandae rizomlarından elde edilen tektorigenin ekstraktının insan akciğer kanseri hücre hattında inhibitör etkileri izlenmiştir (Moqbel ve ark. 2020). Deney hayvanlarında akciğer karsinomu tetiklenmiş farelere sub-kutanöz yolla verilen tektorigenin (30mg/kg) tümör hacminde %30.8'lik bir inhibisyona yol açmıştır (Wang ve ark. 2013; Ma ve ark. 2018; Zhou ve ark. 2023).

2.3.3. Yeni Sentezlenen Flavonoid Türevi Bileşik: 5Y2

5Y2 bileşiği Şekil 2.9’ da gösterildiği gibi flavon omurgadaki B halkasının 6 nolu karbonundan florlanarak sentezlenmiş olup, 300,29g/mol molekül ağırlığına sahiptir.



5Y-2

Şekil 2.9 5Y-2 Bileşiğinin Moleküler Yapısı. Bir flavonoid türevi olan 5y-2 bileşiğinin moleküler yapısı. Flavonoid ana omurga B halkasının 6. Karbonundan florlanarak elde edilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Çalışmamızda Kullanılan Kimyasallar ve Materyaller

Çalışmamızda kullanılan cihaz ve kimyasallar çizelge 3.1’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Materyal ve Kimyasallar

Cihaz Adı	MARKASI
Biyogüvenlik Kabini	Thermo, HeraSafe KS Class II
Karbondioksit İnkübatörü	Thermo, HeraCell 150i
Hassas Terazı	Ohaus, Pioneer PA214C
Işık Mikroskobu	Novel, N-120
İnverted Mikroskop	Nikon, Eclipse TS100
pH Metre	Hanna Instruments, HI 2211
Microfuge 20R	Beckman Coulter
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Universal 320R
Spektrofotometre, Elisa Reeder	Thermo, Multiskan GO
Su Banyosu	Stuart, SWBD
Ultrasonik Homojenizatör	Elmasonic S 40
-20°C Derin Dondurucu	Bosch
+4°C Derin Dondurucu	Bosch
Soğutmalı Santrifüj	Sigma, 3-30K
Manyetik Karıştırıcı-Isıtıcı	Heidolph, MR Hei-Stveard
-80°C Derin Dondurucu	Daihan, SimpleFreez U500
Saf Su Cihazı	Merck, Millipore Direct-Q® 3UV
Vorteks	Vorteks VELS Scientfica, Classic
Kuru Blok Isıtıcı	WiseTherm® HB-96D
µDrop Plate	Thermo Scientific, N12301
Kimyasallar	Markası
Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (1X) (DMEM)	Gibco
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco
Hank’s Balanced Salt Solution (1X) (HBSS)	Gibco
Trypsin/EDTA (1X)	Gibco
Tectorigenin	Sigma Aldrich
Penicilin/Streptomycin (10.000 Units/mL penicilin) (10.000 µg/mL streptomycin)	Gibco
Tripan Mavisi Boyası (% 0,4)	Gibco
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma
Genejet RNA Purification kit	Thermo Scientific (K0731)
cDNA Dönüşüm Kiti	GoTaq® qPCR Master Mix (A6020)
qRT-PCR Kiti	Ampliqon III (A323402)
A549 Hücre Hattı	ATCC, American Type Culture Collection
Beas-2b Hücre Hattı	ATCC, American Type Culture Collection

3.2 Çalışmada Kullanılan Flavonoidlerin Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan tektorigenin izoflavon bileşiği ticari olarak satın alınmıştır (sigmaaldrich, katalog numarası 548-77-6). Kullanılacak konsantrasyonlar için öncelikle 1000 μM 'lık ana stok hazırlanmıştır. Ana stoktan dilüsyonlar yapılarak ara stoklar (10-25-50-75-100 μM) hazırlanmıştır. 1000 μM 'lık ana stok için 3 mg tektorigenin hassas terazide tartılmıştır. 200 μL DMSO (dimetil-sülfoksit) ile iyice çözündürüldükten sonra 9,8 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) serumsuz vasat kullanılarak DMSO oranı %0,2 ye indirilmiş ve 1000 μM 'lık ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ana stoktan dilüsyonlar yapılarak ara stoklar (10-25-50-75-100 μM) hazırlanmıştır. 1000 μM 'lık ana stoktan 1:10 dilüsyon yapılarak 100 μM 'lık ara stok elde edilmiştir. Ana stoktan 750 μL hacminde alınan stok çözelti 9,25 mL serumsuz DMEM ile karıştırılarak 75 μM 'lık ara stok oluşturulmuştur. 1000 μM 'lık ana stoktan 500 μL hacminde alınan stok çözelti 9,50 mL serumsuz DMEM vasatı ile karıştırılarak 50 μM 'lık ara stok oluşturulmuştur. 1000 μM 'lık ana stoktan 250 μL hacminde alınan stok çözelti 9,75 mL serumsuz DMEM vasatı ile karıştırılarak 25 μM 'lık ara stok oluşturulmuştur. 1000 μM 'lık ana stoktan 100 μL hacminde alınan stok çözelti 9,9 mL serumsuz DMEM vasatı ile birleştirilerek 10 μM 'lık ara stok çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltiler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 günden fazla saklanmamıştır.

5Y-2 bileşiği, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında, flavonoid iskeletin B halkasının 6. karbonundan florlanarak yeni sentezlenmiş ve çalışmamızda kullanılmıştır. 5Y-2'nin moleküler ağırlığı 300,29 g/mol değerindedir. 1000 μM 'lık ara stok oluşturmak için 3 mg bileşik 10 mL serumsuz DMEM vasatında hazırlanmıştır. 1000 μM 'lık ana stok için 3 mg 5Y-2 hassas terazide tartılmıştır. 200 μL DMSO ile iyice çözündürüldükten sonra 9,8 mL DMEM serumsuz vasat kullanılarak DMSO oranı %0,2 ye indirilmiş ve 1000 μM 'lık ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. 1000 μM 'lık ana stoktan 1:10 dilüsyon yapılarak 100 μM 'lık ara stok elde edilmiştir. Ana stoktan 750 μL hacminde alınan stok çözelti 9,25 mL serumsuz DMEM ile karıştırılarak 75 μM 'lık ara stok oluşturulmuştur. 1000 μM 'lık ana stoktan 500 μL hacminde alınan stok çözelti 9,50 mL serumsuz DMEM vasatı ile karıştırılarak 50 μM 'lık ara stok oluşturulmuştur. 1000 μM 'lık ana stoktan 250 μL hacminde alınan stok çözelti 9,75 mL serumsuz DMEM vasatı ile karıştırılarak 25 μM 'lık ara stok oluşturulmuştur. 1000 μM 'lık ana stoktan 100 μL

hacminde alınan stok çözelti 9,9 mL serumsuz DMEM vasatı ile birleştirilerek 10 µM'lık ara stok çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltiler +4°C'de 30 günden fazla saklanmamıştır.

3.3 Hücre Kültürü

Tez çalışmalarımız Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı Hücre Kültürü Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Deneylerde Akciğer Adenokarsinom (A549) hücre hattı ve sağlıklı akciğer (Beas-2b) hücre hatları kullanılmıştır. Her iki hücre hattı da %10 fetal sıgır serumu (FCS), 0.2 mM glutamin, 100 µg/ml streptomisin 100 IU/ml penisilin içeren DMEM vasatında 37°C, %5 CO₂ ve 1 atm basınç altında 25 ve 75 cm²'lik steril flasklar içerisinde kültüre edilmiştir. Kültür vasatı haftada iki kez değiştirildi hücreler yeterli sayıya ulaştıklarında deneylerde kullanılmak üzere 75 cm²'lik kültür kapları ve 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ve 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekim yapılmıştır. Hücreler 96 kuyucuklu kültür kaplarına maruziyet-konsantrasyon saptanma çalışmalarında kullanılmak üzere 3x10⁶ hücre/mL olacak şekilde her kuyuya 100 µL olarak ekildi. Kuyucuklarda bulunan hücreler konfluense ulaştınca kuyucuklar 2 kere PBS (fosfat-buffer-saline) ile yıkandı ve besiyeri serumsuz DMEM ile değiştirilerek hücreler 24 saat serum aç bırakıldı. Aynı şekilde 6 kuyucuklu kültür kaplarına 3x10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler konfluense ulaştınca 2 kere PBS ile yıkandı ardından serumsuz DMEM ile 24 saat serum aç bırakıldı. Bu aşamada 6 kuyucuklu kültür kaplarında bulunan hücreler MTT çalışması sonrası karar verilen konsantrasyonlarda maruziyet yapılması üzere hazırlandı.

3.4 Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi (MTT)

Çalışmada yeni sentezlenen flavonoid türevi molekül olan 5Y-2 ve tektorigenin izoflavonunun maruziyet konsantrasyonları ve süreleri MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi ile belirlenmiştir. Hücre canlılığının tespiti için yapılan analizler en az üç tekrarlı yapılmıştır.

MTT boyası sarı renkli tetrazolyum tuzu içerir. Dehidrogenaz enzimi hücrenin mitokondriyal aktivitesinde ve hücrenel yaşamda görevlidir. Hücrenel aktivitenin arttığı durumlarda dehidrogenaz enzim aktivitesi de artar. Dehidrogenaz enzimi sarı tetrazolyum tuzunu indirgeyerek mor renkli formazan adı verilen kristallere dönüştürür. Bu mor renkli formazan kristalleri suda çözünmezler. DMSO'da çözünürler. DMSO'da çözülen kristaller

çözünme işleminin ardından bir mikropate okuyucu ile spektrofotometrik olarak ölçüm alınarak yapılmıştır. Ölçüm 490 nm dalga boyunda alınarak kaydedilmiştir.

MTT analizi aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Hücreler 96 kuyucuklu steril kültür kaplarına alınmıştır. Konfluense ulaşan hücreler 2 kere PBS ile yıkandıktan sonra serumsuz DMEM eklenmiştir ve 24 saat beklenilerek seruma aç bırakılmıştır.
2. Kaplar 24 saat sonra aspire edilmiş. Belirlenen çalışma konsantrasyonları ara stok çözeltileri 96 kuyucuklu kaplara 200 µL olacak şekilde eklenmiştir.
3. Çalışmada tektorigenin için belirlenen konsantrasyon aralığı (0-10-25-50-75-100µM/24 saat) olarak belirlenmiştir. Çalışmada 5Y-2 için belirlenen konsantrasyon aralığı (0-10-25-50-75-100µM/24 saat) olarak belirlenmiştir.
4. Maruziyet süresi sonunda kuyucuklar 100 µL PBS ile 1 kere yıkanmıştır.
5. Kuyucuklar 1mg/mL olacak şekilde 200 µL MTT solüsyonu eklenmiştir.
6. Hücreler 2 saat MTT çözeltisi ile 37°C’de inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyon ardından kuyucuklarda bulunan MTT solüsyonu aspire edilmiştir.
8. MTT ile inkübasyon sonucu oluşan formazan kristalleri 200 µL DMSO’da çözdürülmüştür ve hızlı bir şekilde 490 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır. Spektral ölçümü almak için Thermo Scientific Multiscan Go kullanılmıştır.
9. Her test 3 kez tekrar edilmiştir. Tekrar testleri farklı günlerde yapılmıştır.

3.5 RNA izolasyonu

Hücreler 6 kuyucuklu steril kaplara ekildikten sonra konfluense ulaşması için beklendi ve besiyeri aspire edilerek 2 kere PBS ile yıkandı. Hücrelere serumsuz besiyeri eklenerek 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından Serumsuz vasat aspire edildi ve 2 kere PBS ile yıkanan hücrelere MTT ile belirlediğimiz konsantrasyonlardan 2 mL eklendi. Bu konsantrasyonlar tektorigenin için 10 ve 25 µM’lık konsantrasyonlar ve 24 saattir. 5Y-2 maddesi için MTT ile belirlenen konsantrasyon-zaman 10-25µM/24 saattir. Her iki grup içinde etken madde içermeyen kuyucuklar kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Maruziyet sonrası kuyucuklarda bulunan besiyeri aspire edilmiştir. Ardından hücreler tripsin ile kaldırılıp santrifüj ile 525 g’ de 5 dakika boyunca hücre pelleti elde edilmiştir. Sıvı faz uzaklaştırılmıştır ve hücre pelletinden RNA izolasyonuna hızlıca

başlanmıştır. Hücrelerden RNA izolasyonu için genejet RNA Purification kit, Thermo Scientific (Katolog numarası K0731) kullanılmıştır.

RNA izolasyonunda gerçekleştirilen basamaklar aşağıda belirtilmiştir.

1. Hücre pelletinin üzerine 600 µL lizis buffer eklenmiştir ve 10 saniye boyunca vortekslenmiştir.
2. Vorteks işleminin ardından 360 µL %100 etil alkol eklenmiştir ve 5 saniye boyunca vortekslenmiştir.
3. Lizat kit ile beraber gelen kolona aktarılmıştır ve 12000 g' de 1 dk santrifüj edilmiştir.
4. Ardından kolon 700 µL kit ile beraber gelen wash buffer 1 ile yıkandı. Birinci yıkama işlemi sonrasında 600 µL wash buffer 2 ile 2. Yıkama işlemi yapılmıştır.
5. 250 µL wash buffer 2 ile 3. Yıkama işlemi yapıldıktan sonra 50 µL nükleaz free su kolonun merkezine eklenmiştir ve elüsyon için 1 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. 12000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra elde edilen RNA'nın saflık ve konsantrasyon ölçme işlemleri Multiscan GO reeder ile yapılmıştır.

Elde edilen RNA'ların saflığı Multiscan GO cihazı ve µDrop (Thermo Scientific, Katalog Numarası; N12391) yardımı ile $(Abs_{260}-Abs_{320}) / (Abs_{280}-Abs_{320})$ formülü kullanılarak yapılmıştır ve saflık sonuçları 2.0-2.1 arasındadır. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları Multiscan GO cihazı ve µDrop yardımı ile $(Abs_{260}-Abs_{320}) * 40 * (10/0.51)$ formülü kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar 500 ug/mL den az değildir. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları nükleazsız su eklenerek eşitlenmiştir. Ardından cDNA dönüşümü gerçekleştirilmiştir.

3.6 cDNA dönüşümü

Nükleazsız su ile sulandırılarak konsantrasyonu eşitlenen RNA izolatlarından cDNA oluşturmak için oneScript ABM cDNA synthesis kiti (katalog numarası, G236) kullandık. Reaksiyona giren maddelerin hacim ve konsantrasyonlar çizelge 3.2' de gösterilmiştir. RNA izolatlarından cDNA dönüşümü için thermal cycler (Biorad) cihazı kullanılarak ısı döngülerine tabi tutulmuştur. Reaksiyonun gerçekleştirildiği ısı döngüler çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2: cDNA Dönüşüm Döngüsü ve Bileşenleri. cDNA dönüşümü için gerekli olan döngü sıcaklıkları ve süreleri verilmiştir. cDNA Dönüşümü Bileşenleri. cDNA dönüşümü için gerekli olan bileşenlerin isimleri, hacimleri ve konsantrasyonları verilmiştir.

BİLEŞENLER	HACİM	FİNAL KONSANTRASYON
5X RT Buffer	4 µL	1 ^x
dNTP	1 µL	1 ^x
Oligo dT	1 µL	1 ^x
Total RNA	5 µL	0,02 µg/reaksiyon
Nükleazsız su	8 µL	-
OneScript Plus RTase	1 µL	1 ^x
DÖNGÜ ADI	SICAKLIK	SÜRE
Sentez	55 °C	15 dakika
Denetürasyon	85 °C	5 dakika
Soğutma	4 °C	15 dakika

3.7 Real Time PCR ile Gen Ekspresyon Analizi

cDNA dönüşümünün ardından örnekler GoTaq® qPCR Master Mix (katalog numarası, A6020) kiti ile gen ekspresyon analizleri sağlandı. Örneklerin gen ekspresyonu yapılırken housekeeping gen olarak β -aktin geni kullanıldı. Reaksiyonda kullanılan bileşenlerin adları, hacimleri ve konsantrasyonları çizelge3.3'te verilmiştir. Reaksiyonun döngü koşulları ve deteksiyon aşamaları çizelge3.4'te verilmiştir. Melting eğrileri için döngü koşulları ise çizelge 3.5' te verilmiştir.

Çizelge 3.3 Real-time PCR için gerekli bileşenler. Real-time PCR için gerekli bileşenlerin adları, hacimleri ve final konsantrasyonları verilmiştir.

BİLEŞENLERİN ADLARI	HACİM	FİNAL KONSANTRASYON
GoTaq qPCR master mix	10 µL	1x
İleri primer	1 µL	0,5 µM
Geri primer	1 µL	0,5 µM
cDNA	2 µL	0,05 µM
Nükleazsız Su	6 µL	-

Çizelge 3.4 Real-time PCR için gerekli döngü koşulları Real-time PCR için gerekli döngü koşullarının süre sıcaklıkları verilmiştir. Işıma aşaması “*” ile belirtilen safhada kaydedilmiştir.

ADIMLAR	DÖNGÜ SAYISI	SICAKLIK	SÜRE
Aktivasyon	1	95 °C	2 Dakika
Denatürasyon	40	95°C	15 Saniye
Uzama ve Sonlanma*		60°C	1 Dakika

Çizelge 3.5: Melt-Curve Analizi için gerekli veriler. Melt-curve saptamak için gerekli koşullar verilmiştir.

SICAKLIK	MOD	SÜRE	ÖLÇÜM ARALIĞI (°C/s)
95 °C	Yok	10 Saniye	4,40
60 °C	Yok	1 Dakika	2,20
95°C	Sürekli	Sürekli	0,11

Çalışmamızda kullanılan primer dizileri çizelge 3.6 da gösterilmiştir. Housekeeping gen olarak B-aktin geni seçilmiştir.

Çizelge 3.6 Çalışmada kullanılan Primer Çiftleri

Gen Adı	Primer Dizileri	Kaynak
B-aktin	Forward: GTTGCTATCCAGGCTGTG Revers: TGATCTTGATCTTCATTGTG	(Phisfer ve ark. 2012)
BCL-2	Forward: TGCGGCCTCTGTTTGATTTC Revers: GGGCCAAACTGAGCAGAGTCT	(Wei ve ark. 2021)
BAX	Forward: CCAAGGTGCCGGAAGTGA Revers: CCCGGAGGAAGTCCAATGT	(Wei ve ark. 2021)
CAS-3	Forward: CATGGAAGCGAATCAATGGACT Revers: CTGTACCAGACCGAGATGTCA	(Wei ve ark. 2021)
CAS-8	Forward: TTTCTGCCTACAGGGTCATGC Revers: GCTGCTTCTCTCTTTGCTGAA	(Wang ve ark. 2018)
P53	Forward: CAGCACATGACGGAGGTTGT Revers: TCATCCAAATACTCCACACGC	(Yang ve ark. 2018)
P21	Forward: TGTCCGTCAGAACCCATGC Revers: TGTCCGTCAGAACCCATGC	(Meng ve ark. 2018)
c-MYC	Forward: GTCAAGAGGCGAACACACAAC Revers: TTGGACGGACAGGATGTATGC	(Liu ve ark. 2019)

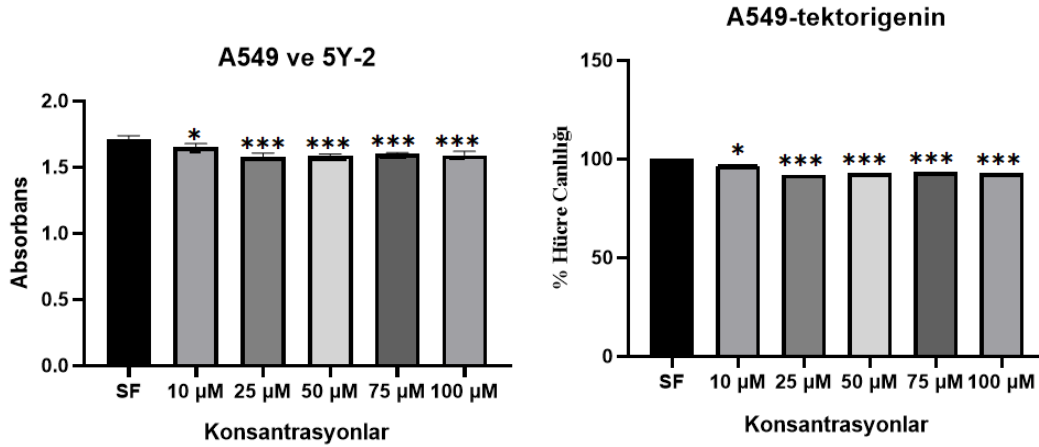
4 BULGULAR

4.1 MTT Hücre Canlılık Deneyi

MTT Hücre canlılık çalışmamızda 24 saat boyunca 5Y-2 ve tektorigenin bileşiklerine maruz bırakılan A549 hücrelerinden ve Beas-2b hücrelerinden elde edilen sonuçlar spektral ölçüm alınarak değerlendirilmiştir. 5Y-2' ye (0-100 μ M), 24 saat maruz bırakılan A549 hücrelerinde tüm konsantrasyonlarda bir azalma gözlenmiştir. IC₅₀ değeri ise Graphpad prism 8.0 programı kullanılarak p<0,05 değeri ile hesaplanmıştır. Uygun konsantrasyonlar 10 ve 25 μ M konsantrasyonlarıdır (Çizelge 4.1, şekil 4.1), (p<0,05).

Çizelge 4.1 5Y-2 (10-100 μ M/24h) maruziyetli A549 Hücrelerinin MTT sonuçları. Hücre canlılık deneyinin absorbans değerleri ve % hücre canlılık oranları gösterilmiştir. Her deney birbirinden bağımsız zaman ve günlerde yapılmıştır. Deneyler üç kere tekrar edilmiştir.

A549 5Y-2	SF	10 μ M	25 μ M	50 μ M	75 μ M	100 μ M
1. tekrar	1,74	1,68	1,57	1,58	1,59	1,59
2. tekrar	1,69	1,65	1,55	1,59	1,61	1,56
3. tekrar	1,71	1,63	1,61	1,6	1,6	1,62
ortalama	1,71	1,65	1,57	1,59	1,6	1,59
Hücre canlılık	100	96,49	92,02	92,80	93,38	92,80

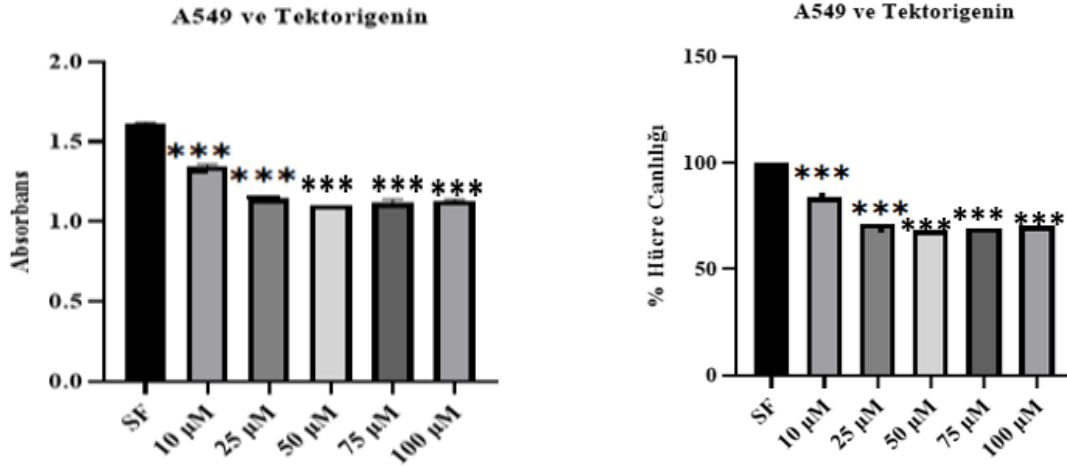


Şekil 4.1 5Y-2 maddesinin A549 hücrelerine 24 saatlik maruziyet sonrası elde edilen MTT sonuçları. Her deney birbirinden bağımsız zaman ve günlerde yapılmıştır. Deneyler üç kere tekrar edilmiştir (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Tektorigenin (0-100 μM) maddesine, maruz bırakılan A549 hücrelerinde 24 saat süre sonunda bütün konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalma gözlenirken, 10 ve 25 μM konsantrasyonları IC_{50} değerinde bulunmuştur (Çizelge 4.2, şekil 4.2), ($p<0,05$).

Çizelge 4.2 Tektorigenin (10-100 $\mu\text{M}/24\text{h}$) maruziyetli A549 Hücrelerinin MTT sonuçları. Hücre canlılık deneyinin absorbans değerleri ve % hücre canlılık oranları gösterilmiştir. Her deney birbirinden bağımsız zaman ve günlerde yapılmıştır. Deneyler üç kere tekrar edilmiştir.

A549- Tektorigenin	SF	10 μM	25 μM	50 μM	75 μM	100 μM
1. tekrar	1,61	1,34	1,15	1,1	1,1	1,14
2. tekrar	1,62	1,34	1,14	1,1	1,11	1,13
3. tekrar	1,6	1,36	1,14	1,1	1,14	1,12
ortalama	1,61	1,34	1,14	1,1	1,11	1,13
Hücre canlılık	100	83,64	71,01	68,32	69,35	70,18

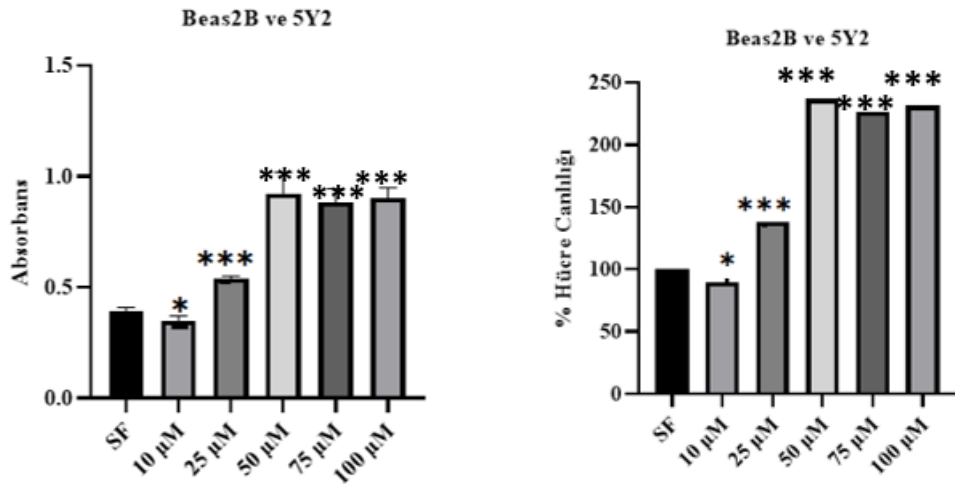


Şekil 4.2 Tektorigenin maddesinin A549 hücrelerine 24 saatlik maruziyet sonrası elde edilen MTT sonuçları. Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve 3 tekrarlı çalışmıştır (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

5Y-2'ye (0-100 μ M), maruz bırakılan Beas-2b hücrelerinde 24 saat süre sonunda 10 μ M konsantrasyonundaki hücre canlılığında azalma gözlenirken, diğer konsantrasyonlarda hücre canlılığında artış gözlenmiştir. (Çizelge 4.3, şekil 4.3), (* p <0,05, ** p <0,05, *** p <0,001).

Çizelge 4.3 5Y-2 (10-100 μ M/24h) maruziyetli Beas-2b Hücrelerinin MTT bulguları. Hücre canlılık deneyinin absorbans değerleri ve % hücre canlılık oranları gösterilmiştir. Her deney birbirinden bağımsız zaman ve günlerde yapılmıştır. Deneyler üç kere tekrar edilmiştir (* p <0,05, ** p <0,05, *** p <0,001).

BEAS2B- 5Y2	SF	10 μ M	25 μ M	50 μ M	75 μ M	100 μ M
1.TEKRAR	0,39	0,35	0,55	0,83	0,89	0,86
2.TEKRAR	0,41	0,33	0,54	0,92	0,94	0,95
3.TEKRAR	0,37	0,37	0,53	1,02	0,82	0,9
ORTALAMA	0,39	0,35	0,54	0,92	0,88	0,90
HÜCRE CANLILIK	100	89,74	138,46	236,75	226,49	231,62



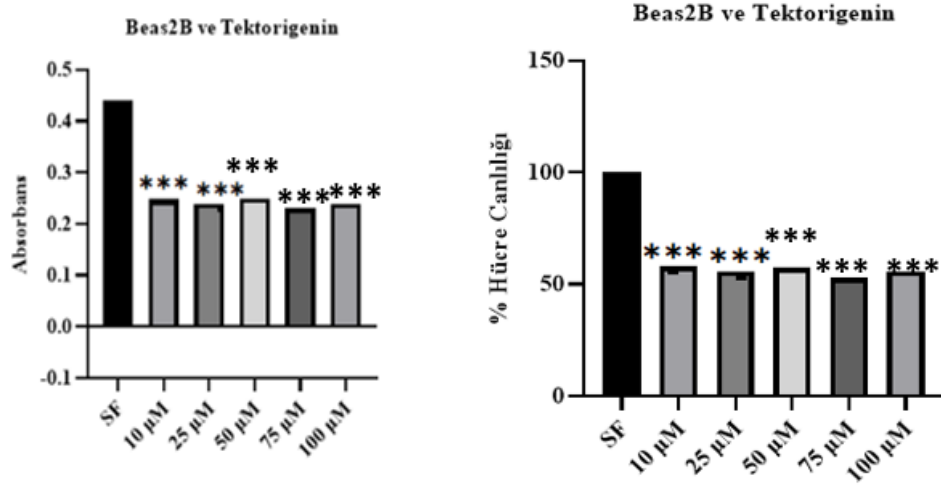
Şekil 4.3 5Y-2 maddesinin Beas-2b hücrelerine 24 saatlik maruziyet sonrası elde edilen MTT sonuçları. Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve 3 tekrarlı çalışmıştır (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001).

Beas-2b hücre hattı ve 5Y-2 maddesi için 0-100 μ M arası uygulanan 24 saatlik maruziyet sonucunda 10 μ M konsantrasyonlarındaki 5Y-2 anlamlı bir azalma göstermiştir (Şekil 4.4), (p <0,05). Konsantrasyon artışına bağlı olarak Beas-2b hücre hattında 25-50-75-100 μ M konsantrasyonlarının 24 saatlik maruziyeti sonucunda anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.4), (p <0,05).

Tektorigenin (0-100 μ M) maddesine maruz bırakılan Beas-2b hücrelerinde 24 saat süre sonunda bütün konsantrasyonlardaki hücre canlılığında bir azalma gözlenirken, 10 ve 25 μ M'lık konsantrasyonlar IC_{50} değerinde bulunmuştur (Çizelge 4.4, şekil 4.4), (p <0,05).

Çizelge 4.4 Tektorigenin (0-100 µM/24h) maruziyetli Beas-2b Hücrelerinin MTT sonuçları. Hücre canlılık deneyinin absorbans değerleri ve % hücre canlılık oranları gösterilmiştir. Her deney birbirinden bağımsız zaman ve günlerde yapılmıştır. Deneyler üç kere tekrar edilmiştir (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

BEAS2-TEKTORİGENİN	SF	10 µM	25 µM	50 µM	75 µM	100 µM
1.TEKRAR	0,44	0,27	0,26	0,25	0,24	0,22
2.TEKRAR	0,42	0,23	0,22	0,25	0,23	0,28
3.TEKRAR	0,47	0,27	0,26	0,26	0,23	0,24
ORTALAMA	0,44	0,25	0,24	0,25	0,23	0,24
HÜCRE CANLILIK	100	57,89	55,63	57,14	52,63	55,63



Şekil 4.4 Tektorigenin maddesinin Beas-2b hücrelerine 24 saatlik maruziyet sonrası elde edilen MTT sonuçları. Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve 3 tekrarlı çalışmıştır (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

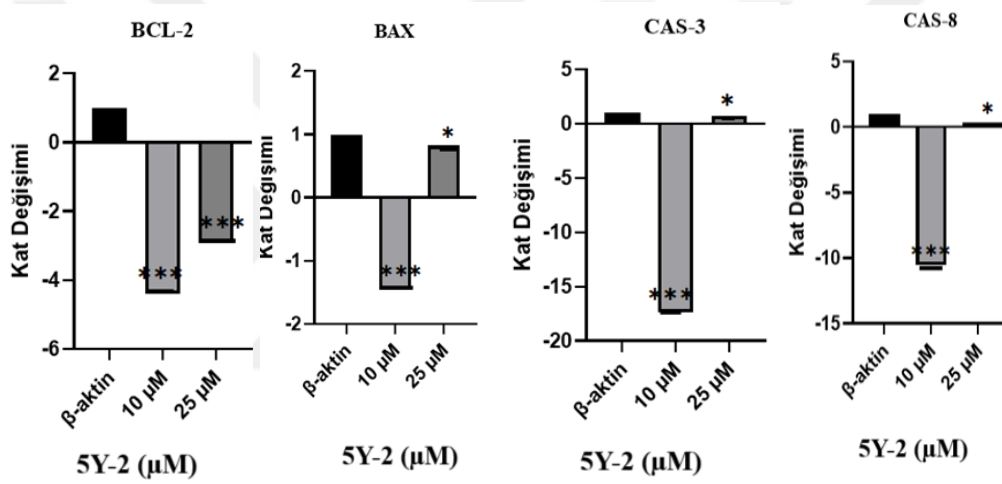
4.3 qRT-PCR Gen Ekspresyon Analizleri

MTT bulgularına göre gen ekspresyon analizleri hedef maddelerimizin konsantrasyonları ve süreleri belirlenmiş olup hem A549 hem de Beas-2b hücreleri için, her iki madde için de 10 µM ve 25 µM konsantrasyonları kullanılmıştır.

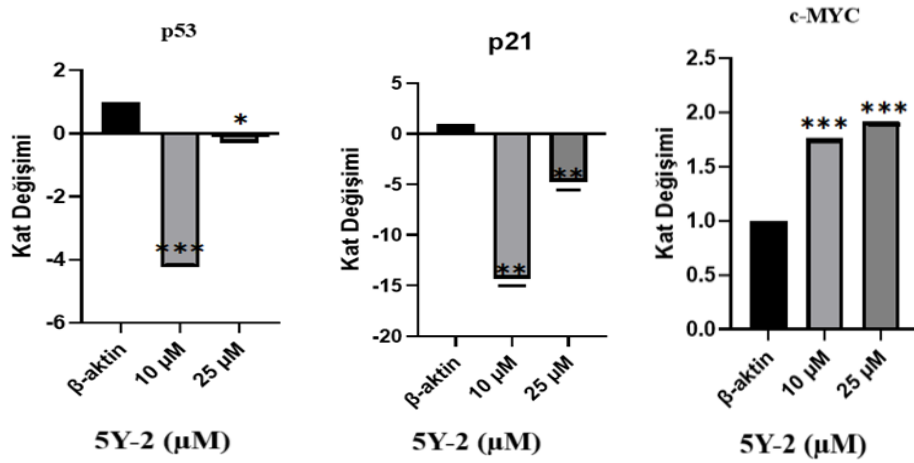
Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, her örnek duplike olarak çalışılmıştır. Deney sonuçları kat değişimi (Fold-change) olarak verilmiştir. Deney gruplarının PCR reaksiyonu sonucu saptanan ct değerlerinin kat değişim grafikleri çizelgeler ile verilmiştir.

5Y-2 maddesinin A549 hücrelerine 24 saatlik maruziyeti sonucu elde edilen gen ekspresyon analizleri Graphpad prism 8.0 kullanılarak istatistiksel analizleri

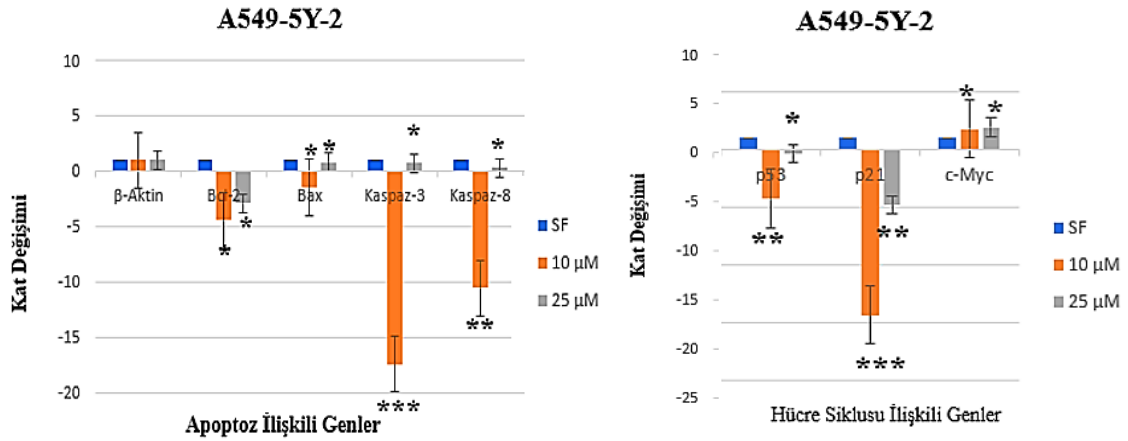
gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7) ($p<0.05$). Yaşam proteini olan ve hücrenin apoptosis regülasyonunda rol alan Bcl-2 gen ekspresyon seviyesi 10 μM ve 25 μM konsantrasyonlarında azalmıştır. Pro-apoptotik gen ailelerinden olan Bax ve kaspaz-3/8 gen ekspresyon seviyeleri de azalma göstermiştir (Şekil 4.5) ($p<0.05$). Yaşam geni olarak bilinen ve hücre döngüsünün kontrol proteini olan p53 ve p53 ile çok yakından ilişkilendirilen hücre siklusunun bekçisi olarak bilinen p21 gen ekspresyon seviyelerinde azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.6) ($p<0.05$). Bununla birlikte hücre bölünmesini teşvik eden bir proto-onkogen olarak anılan c-Myc gen ekspresyon seviyesi artış göstermiştir. (Şekil 4.7) ($p<0.05$).



Şekil 4.5. 5Y-2 maddesinin A549 hücrelerinde apoptoz ilişkili genlerdeki kat değişimleri gösterilmiştir. Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve 3 tekrarlı çalışmıştır (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

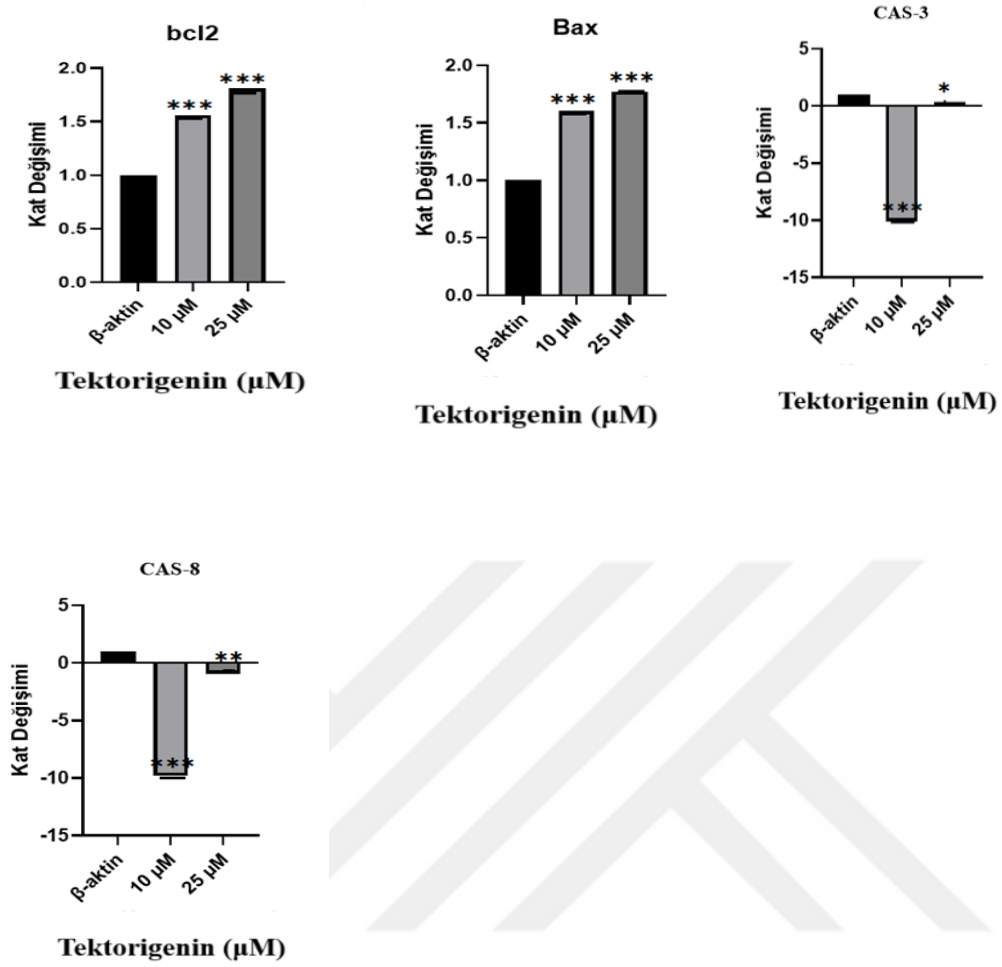


Şekil 4.6. 5Y-2 maddesinin A549 hücrelerinde hücre siklusu ilişkili genlerdeki kat değişimleri gösterilmiştir. Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve 3 tekrarlı çalışmıştır (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

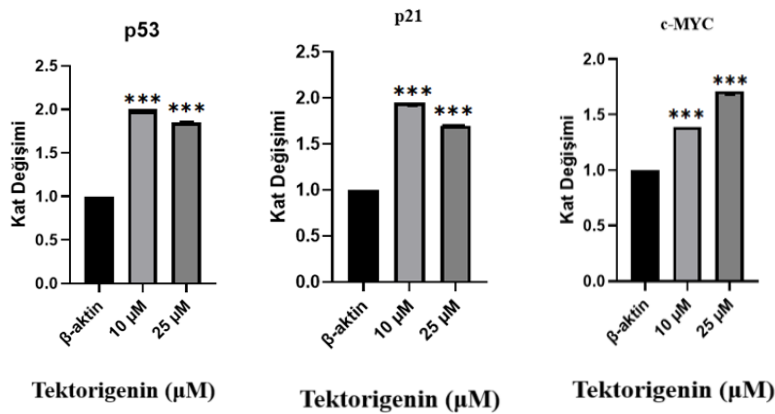


Şekil 4.7 5Y-2 maddesinin A549 hücrelerinde gen ekspresyonu üzerine olan etkileri kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplanmıştır (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

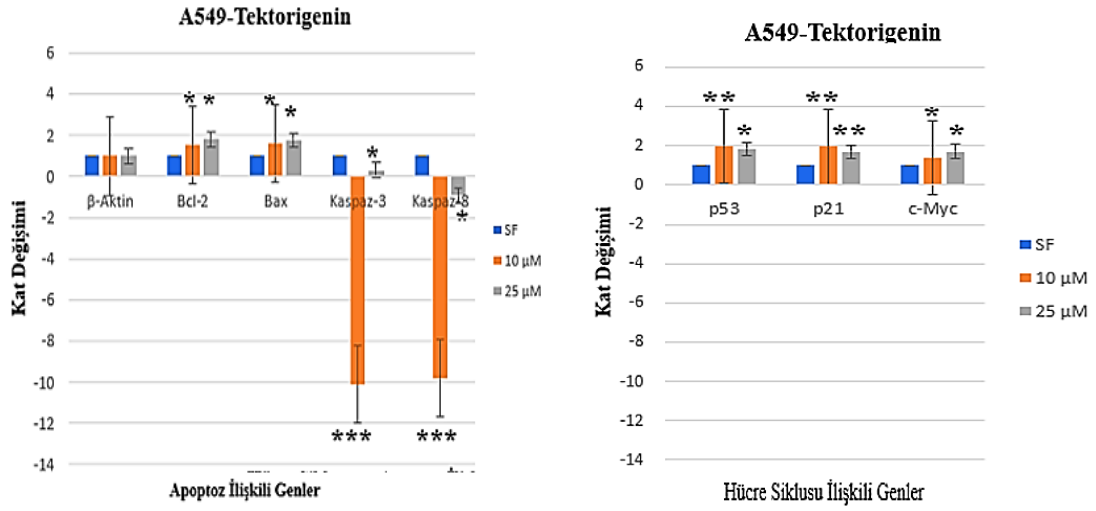
Tektorigenin maddesinin A549 hücrelerine 24 saatlik maruziyeti sonrasında elde edilen gen ekspresyon analizleri Graphpad prism 8.0 ile gerçekleştirilmiştir. 10 µM ve 25 µM konsantrasyonlarındaki Bcl-2, Bax seviyelerinde artış gözlenirken kaspaz-3 ve kaspaz-8 gen ekspresyon seviyelerinde azalma gözlenmiştir. (Şekil 4.8) ($p<0.05$). hücre siklusu ilişkili genlerden p53, p21 ve c-myc ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelmiştir (Şekil 4.9) ($p<0.05$). Hem apoptoz ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi hem de hücre siklusu ilişkili gen ekspresyon değişimleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Tektorigenin maddesinin A549 hücrelerinde apoptoz ilişkili genlerdeki kat değişimleri gösterilmiştir. Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve 3 tekrarlı çalışmıştır (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

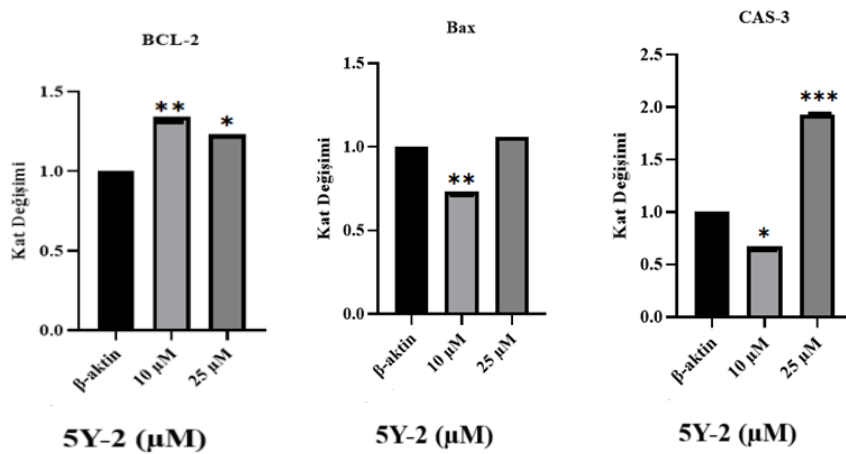


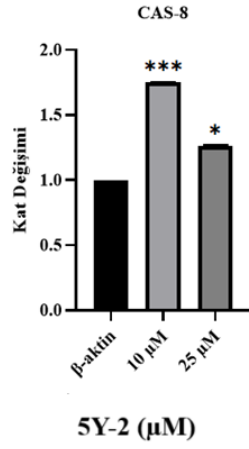
Şekil 4.9 Tektorigenin maddesinin A549 hücrelerinde hücre siklusu ilişkili genlerdeki kat değişimleri gösterilmiştir. Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve 3 tekrarlı çalışmıştır (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).



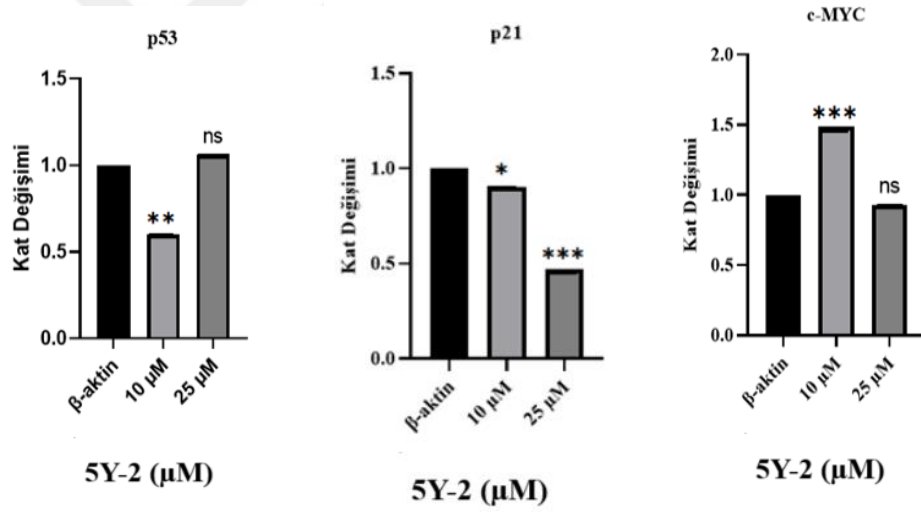
Şekil 4.10 Tektorigenin maddesinin A549 hücrelerinde gen ekspresyonu üzerine olan etkileri, kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplanmıştır (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

5Y-2 maddesinin Beas-2b hücrelerine 24 saatlik maruziyeti sonrasında elde edilen gen ekspresyon analizleri Graphpad prism 8.0 ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13) (* $p<0.05$). 10 µM konsantrasyondaki Bcl-2 seviyeleri artarken, Bax ve kaspaz ekspresyon seviyeleri azalmıştır. Fakat 25 µM konsantrasyondaki Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 seviyelerinde artma meydana gelmiştir (Şekil 4.11) (* $p<0.05$). Bununla beraber hücre siklusu ilişkili genlerin 10 µM konsantrasyonundaki p53 seviyesi azalırken p21 ve c-Myc seviyelerinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.12) (* $p<0.05$). Hem apoptoz ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi hem de hücre siklusu ilişkili gen ekspresyon değişimleri şekil 4.13'te gösterilmiştir.

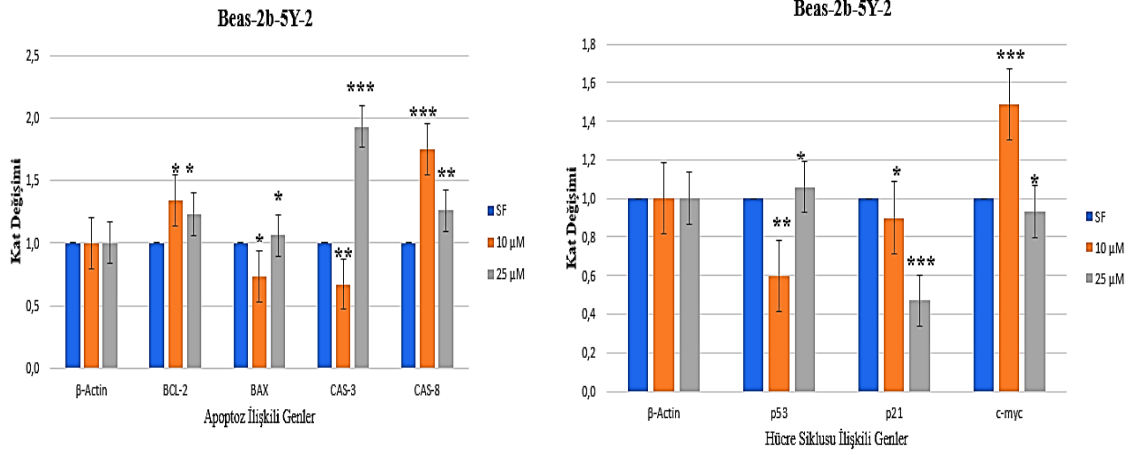




Şekil 4.11. 5Y-2 maddesinin Beas-2b hücrelerinde apoptoz ilişkili genlerdeki kat değişimleri gösterilmiştir. Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve 3 tekrarlı çalışmıştır (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

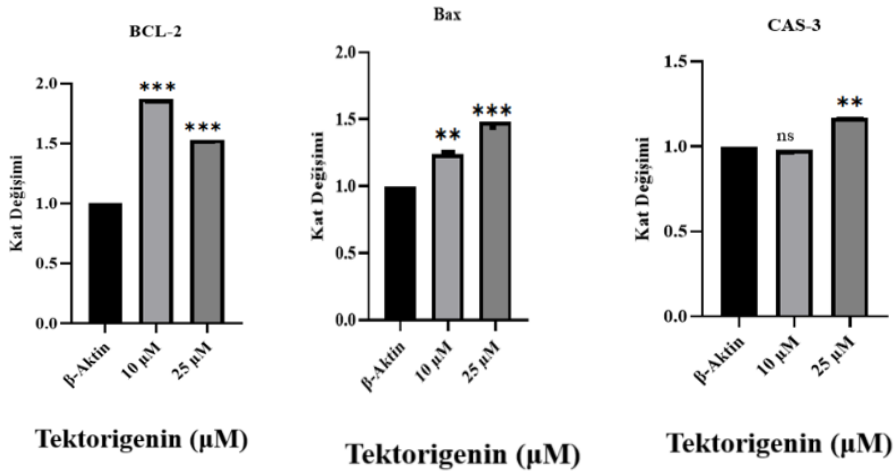


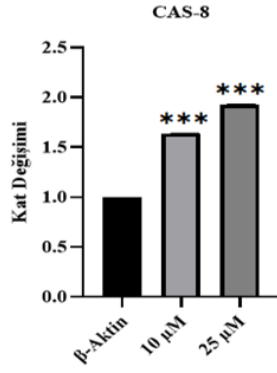
Şekil 4.12. 5Y-2 maddesinin Beas-2b hücrelerinde hücre siklusu ilişkili genlerdeki kat değişimleri gösterilmiştir. Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve 3 tekrarlı çalışmıştır (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).



Şekil 4.13 5Y-2 maddesinin Beas-2b hücrelerinde gen ekspresyonu üzerine olan etkileri, kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ile hesaplanmıştır (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

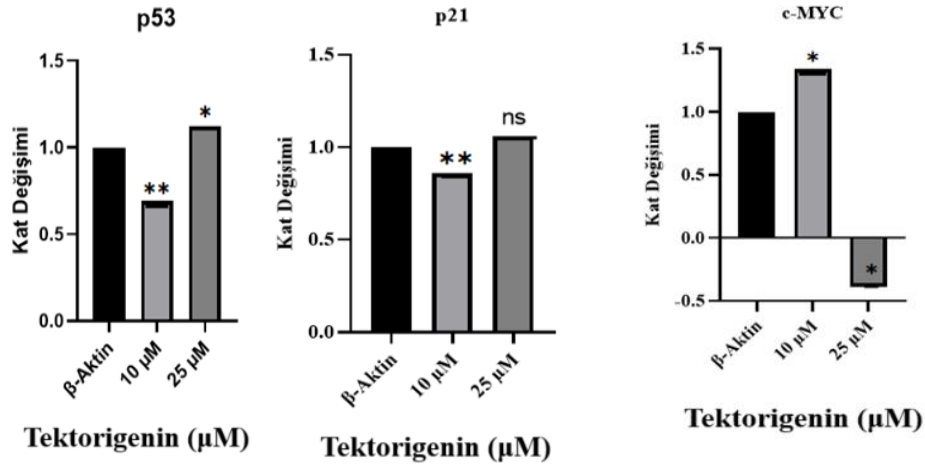
Tektorigenin maddesinin beas-2b hücrelerine 24 saatlik maruziyeti sonucunda apoptoz ilişkili genler olan Bcl-2, Bax ve kaspaz-3/8 seviyelerinde artma meydana geldiği gözlenmiştir (çizelge 4.14) ($p<0.05$). Bununla beraber hücre siklusunun kontrolünde yer alan p53 ve p21 seviyeleri artarken c-myc gen ekspresyon seviyeleri azalmıştır (çizelge 4.15) ($p<0.05$). Hem apoptoz ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerindeki kat değişimi hem de hücre siklusu ilişkili gen ekspresyon değişimleri Şekil 4.16’da gösterilmiştir.



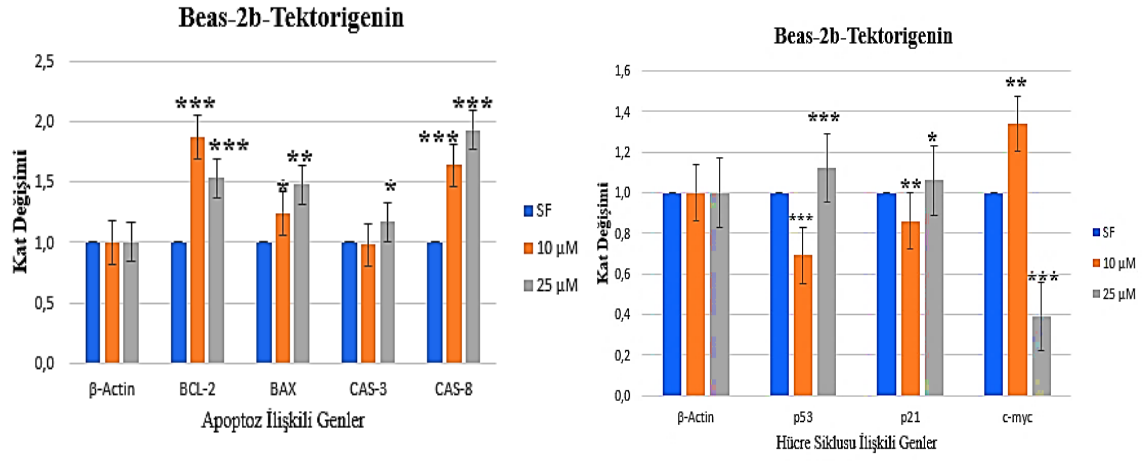


Tektorigenin (μM)

Şekil 4.14. Tektorigenin maddesinin Beas-2b hücrelerinde apoptoz ilişkili genlerdeki kat değişimleri gösterilmiştir. Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve 3 tekrarlı çalışmıştır (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Şekil 4.15. Tektorigenin maddesinin Beas-2b hücrelerinde hücre siklusu ilişkili genlerdeki kat değişimleri gösterilmiştir. Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve 3 tekrarlı çalışmıştır (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Şekil 4.16 Tektorigenin maddesinin Beas-2b hücrelerinde gen ekspresyonu üzerine olan etkileri, kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplanmıştır (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). Her deney birbirinden bağımsız günlerde ve üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

5 TARTIŞMA

Akciğer kanseri, dünyada ve ülkemizde hem kadınlarda hem de erkeklerde görülen ve dünya çapında bir yılda yaklaşık 1,6 milyon insanın yaşamını kaybetmesi ile sonuçlanan kansere bağlı ölümlerden ilk sırada yer alan bir hastalıktır (Chen, Fillmore, ve ark. 2014). Apoptozis, biyolojik görevlerini tamamlamış hücrelerin, aynı zamanda organizmanın bütünlüğüne tehdit unsuru olmaya başlayan hücrelerin güvenli bir şekilde ortadan kaldırılmalarını sağlayan genetik programlanmış ölüm mekanizmasıdır (Fan ve ark. 2005). Hücre Döngüsü, sonuna kadar farklılaşmış sağlıklı bir hücrenin 50-60 defa bölünme periyodunu içeren ve hücrenin DNA kontrolünde gerçekleştirdiği bir olaydır. Bir kanser hücresi programlı hücre ölümünden kaçır (Chen 2016). Aynı zamanda hücre döngüsünün kontrol mekanizmalarından da sıyrılarak sınırsız bölünebilme potansiyeli kazanır. Kanser ile mücadelede kullanılan kimyasallarda en çok aranan özellikler malign hücrelere spesifikite, göz ardı edilebilen yan etkiler ve daha düşük dozlardır. Flavonoidler bitkilerin yaprak çiçek ve meyvelerinin parlak renkler kazanması ve bitkinin bu bölümlerinin kırmızı, mavi, sarı, turuncu vs. renklere sahip olmasına etki gösterirler (Fan ve ark. 2022). Ayrıca flavonoid grupları kırmızı şarapta, tıbbi ve aromatik bitkilerde, kahve ve çay gibi bitkilerde de bulunur. Flavonoidler genellikle glikozillenmiş halde bitkide bulunurlar (Kopustinskiene ve ark. 2020). Aslında flavonoidler, bitki biyokimyasında ve fizyolojisinde antioksidan etki gösteren ve enzim inhibitörleri olarak görev alırlar. Bununla beraber bitkinin toksik maddelerinin öncülleri olarak bulunabilirler. Flavonoid bileşikleri bitkide sekonder metabolit olarak kullanıldığından ve çoklu heterosiklik olduğundan elektron taşıyıcılığı, enerji transferinde aracı moleküller büyüme düzenleyicileri vs. pek çok evrede görev alırlar (Ciumarnean ve ark. 2020). Kanser hücre hattındaki sitotoksikite çalışmaları, temel olarak normal hücreleri etkilemeyen kanser hücrelerinde toksisiteye sebep olan flavonoid bileşiklerinin güçlü antikanser etkilerini göstermiştir. Yapılan çalışmalar ile flavonoidlerin bir alt grubu olan flavonlar hücre bölünmesini potansiyel inhibitörü olarak görev almışlardır. İn-vitro ve in-vivo çalışmalar sonucunda flavonoidlerin kanser hücrelerinde kontrolsüz hücre siklusunu inhibe ettikleri ve normal hücrelere ciddi şekilde az etki ettikleri gösterilmiştir. Pek çok kanser türünde yapılan çalışmalar sonucunda flavonoidlerin kanser ile mücadelede aday bileşikler olduğu gösterilmiştir. Hücre kültürü ve deney hayvanları çalışmaları kemoterapiye ek olarak flavonoidlerin kanser hücrelerinde apoptotik ve bölünme durdurucu etkileri

gösterilmiştir. Tektorigenin biyoaktif bir moleküldür ve birçok bitkide bulunur. Tektorigenin izoflavonunun hücre içi sinyalizasyonda etki ettiği gösterilmiştir. Hücre içerisinde PPAR γ /NF- κ B, yoluna etki ederek hepato-koruyucu etkileri, PI3K/AKT, yolu üzerinden anti-inflamatuvar özellikleri olduğu bilinmektedir (Moqbel ve ark. 2020). *Belamcandae* rizomlarından elde edilen tektorigenin ekstraktının insan akciğer kanseri hücre hattında inhibitör etkileri izlenmiştir. Kanser ile mücadelede aranan potansiyel terapötik maddelerde istenen özellikler düşük dozlarda etkili olma, göz ardı edilebilen yan etkiler ve malign hücrelere spesifitedir. Maddelerin kimyasal yapılarında meydana getirilen değişiklikler sonucunda daha düşük dozlarda daha etkili olabilme, azalan yan etkiler ve sağlıklı hücrelere zarar vermeden malign hücreye spesifikklik gibi aranılan özellikler meydana getirebilir. 5Y2 maddesi flavon omurgadaki B halkasının 6 nolu karbonundan florlanarak sentezlenmiş bir flavonoid türevi bileşiktir. 5Y-2 maddesinin etkileri araştırılmamıştır.

Biz çalışmamızda yeni sentezlenen flavonoid türevi bileşik olan 5Y-2 maddesinin ve tektorigenin izoflavonunun insan akciğer kanser hücre hattında ve sağlıklı insan akciğer hücre hattında apoptotik etkilerini ile hücre siklusu üzerine olan etkilerini ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimleri yönüyle inceledik. Bizim çalışmamızda yeni sentezlenen flavonoid türevi bileşik olan 5Y-2 maddesinin ve tektorigenin izoflavonunun insan akciğer kanser hücre hattı olan A549 hücreleri ve sağlıklı insan akciğer hücre hattı olan Beas-2b hücreleri üzerinde apoptotik etkilerini (Bcl-2, Bax, Kaspaz-3, Kaspaz-8) ve hücre siklusu üzerine (p53, p21, c-Myc) olan etkilerini gen ekspresyonu yönüyle inceledik. Bu amaçla; 5Y-2 ve tektorigenin maddelerine maruz bırakılan hücrelerimizden elde edilen MTT sonuçları değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonrasında 5Y-2 ve tektorigenin maddelerinin A549 ve Beas-2b hücrelerinde IC₅₀ konsantrasyonu ve zamanı hesaplanmıştır. Yapılan analizler sonucunda belirlenen konsantrasyon/zaman her iki hücre hattı içinde 10 μ M ve 25 μ M ve 24 saat olarak bulunmuştur. Sonuçlarımız A549 hücreleri ve tektorigenin maddesi ile yapılan çalışmaların literatürde yapılan çalışmalar ile paralel olduğunu göstermiştir (Amin ve ark. 2015). Her iki hücre hattı içinde kontrol grubu olarak serumsuz besiyeri içeren SF kullanılmıştır (Zhang ve ark. 2016).

5Y-2 Maddesi yeni sentezlenmiş flavonoid türevi bir bileşiktir. Çalışmamızda A549 ve Beas-2b Hücre hatları için uygun konsantrasyon/zaman aralıkları MTT hücre canlılık deneyleri ile belirlenmiştir.

Flavonoid türevi bileşiklere maruz bırakılan hücrelerden elde edilen gen ekspresyon bulgularımıza göre mitokondri permabilizasyonunda görevli ve apoptozun kontrolü gibi hücre kaderini belirleyen protein ailesinden olan Bax ve Bcl-2 genlerinin ekspresyonunu inceledik. İn vitro çalışmalarda anti-apoptotik Bcl-2 geninin azalması ve pro-apoptotik Bax gen ekspresyonunun artması beklenmektedir (Lin ve ark. 2021; Rashidi ve ark. 2024). Çalışmamızda beklenenin aksine, 5Y-2 ve tektorigenin maddelerine maruz bırakılan A549 hücrelerinde hem bcl-2 hem de Bax mRNA seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Moradi ve arkadaşlarının (Moradi ve ark. 2022) prostat kanser hücre hattında gerçekleştirdiği bir çalışmada, bizim çalışmamıza benzer olarak hem anti apoptotik bcl-2 geninin hem de proapoptotik Bax geni mRNA düzeylerinde artış gözlenmiştir. Bununla beraber aynı çalışmada kaspaz-3,8 seviyelerinde de artış meydana gelerek apoptozun tetiklendiği gözlenmiştir (Moradi ve ark. 2022). Kaspaz proteinleri aktif olduktan sonra hücre apoptoza gitmektedir. Çalışmamızda tektorigenin maddesi A549 hücrelerinde Bcl-2 ve Bax gen ekspresyon seviyelerinde artma ve kaspaz-3/8 seviyelerinde azalma meydana getirirken, Beas-2b hücre grubunda kaspaz seviyelerinin artmasına neden olmuş ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir.

5Y-2 maddesine maruz bırakılan A549 hücrelerinde Bcl-2 ve Bax ve Kaspaz3/8 azalırken, Beas-2b hücrelerinde Bcl-2 gen ekspresyon seviyesi artmaktadır. Bununla beraber pro-apoptotik Bax ve Kaspaz-3 azalmıştır. 5Y-2 maddesine maruz bırakılan Beas-2b hücrelerinde azalan pro-apoptotik gen ekspresyonları seviyeleri ile beraber p53 ve p21 gen ekspresyon seviyelerinde de azalma gözlenmiştir. Hücre canlılığının arttığı MTT analizleri ile gösterilen 5Y-2 maruziyetli Beas-2b hücrelerinde c-Myc gen ekspresyon seviyesi artmıştır.

p53 bir yaşam genidir (Sabapathy and Lane 2019). Bcl-2 genin azalması p53'ü aktive ederek hücre siklusunun durmasını sağlar (Fu ve ark. 2017; Rahman ve ark. 2021). p21, p53 ile ilişkilendirilen ve hücre siklusunun kontrolünde kritik rol oynayan bir genidir (Chen 2016).

5Y-2 maddesine maruz bırakılan A549 hücrelerinde p53 ve p21 ekspresyon seviyeleri azalırken Beas-2b hücre grubunda p53 ve p21 mRNA seviyelerinde de bir azalma gözlenmiştir. Tektorigenine maruz bırakılan A549 hücrelerinde p53 ve p21 seviyeleri artarken Beas-2b hücreleri tektorigenin maruziyeti sonucunda p53 ve p21 seviyelerinde azalma gözlemlendi.

c-Myc bir proto-onkogendir (Gao ve ark. 2023). Kanser hücrelerinde mutanttır ve hücreyi sürekli bölünmeye teşvik eder (Dang 2012; Dhanasekaran ve ark. 2022). Hem 5Y-2 maddesine hem de tektorigenine maruz bırakılan A549 ve Beas-2b hücrelerinde c-Myc seviyeleri artış göstermiştir. Flavonoidler ile yapılan çalışmalarda c-myc seviyelerinin artış gösterdiği bilinmektedir (Chen ve ark. 2018).

Tektorigenin izoflavonunun kanser hücrelerinde seçiciliği bilinmektedir (Amin ve ark. 2015). Tektorigenin kanser hücrelerinde apoptozu indükler (Yao ve ark. 2020). İzoflavon olan tektorigenin kanser hücrelerinde hücre siklusunu durdurur (Tomonaga ve ark. 1994). Tektorigenin sağlıklı hücrelere toksik etkinliği azdır (Rong ve ark. 2023).

Çalışmamızda, yeni sentezlenen ve etkileri bilinmeyen 5Y-2 maddesinin hücre canlılığı üzerine olan etkilerini ve hücreler üzerindeki apoptotik etkilerini araştırdık. 5Y-2 maddesi kanser hücrelerinde apoptozu etkilemediği ve hücre proliferasyonunu arttırdığını gen ekspresyonu düzeyinde gösterdik. Bununla beraber kanser olmayan hücrelerin proliferasyonunu arttırdığını gözlemledik.

5Y-2 molekülünün apoptotik etkilerini araştırdığımız bu çalışma sonunda 5Y2 molekülünün apoptotik etkileri olmadığını izoflavon tektorigeninin ise apoptotik etkileri olduğunu gözlememizden dolayı bu bileşiğe, yeni kimyasal yan gruplar eklenerek farklı moleküller elde edilip, bu moleküllerin hücreler üzerindeki etkilerinin araştırılmasını öneriyoruz.

6. SONUÇ

Sonuç olarak etkileri bilinen bir izoflavon olan tektorigenin ve yeni sentezlenmiş bir flavonoid türevi bileşik olan etkileri henüz araştırılmamış 5Y-2 maddesinin akciğer adenokarsinoma hücreleri ve sağlıklı akciğer hücreleri üzerinde olan apoptotik ve hücre siklusu etkilerini inceledik. 24 saatlik 10µM ve 25µM konsantrasyonlarında akciğer adenokarsinoma hücrelerinde apoptozun 5Y-2 tarafından indüklenmediği belirlendi. Tektorigenin akciğer adenokarsinoma hücrelerinde apoptozu indükledi. 5Y-2 bileşiği akciğer adenokarsinoma hücreleri üzerinde hücre siklusunu anlamlı ölçüde değiştirmede. Fakat 5Y-2 bileşiğinin sağlıklı akciğer hücreleri üzerindeki etkisi hem MTT sonucunda hem de qRT-PCR sonucunda hücre proliferasyonunda anlamlı ölçüde artış meydana getirdi ve apoptozu indükleyemedi. 5Y-2 bileşiği hem akciğer adenokarsinoma hücrelerinde hem de sağlıklı akciğer hücrelerinde apoptotik genler olan Bcl-2, Bax- Cas-3 ve Cas-8 mRNA düzeylerinde azalma gösterdi. Fakat 5Y-2 bileşiği Akciğer adenokarsinoma hücreleri üzerinde hücre bölünmesine ilişkin genlerde değişiklik meydana getirmedi. Bununla beraber 5Y-2 maddesi sağlıklı akciğer hücrelerini proliferasyona yönelttiği gözlemlendi.

7. KAYNAKLAR

1. Amin A., Mokhdomi T. A., Bukhari S., Wani S. H., Wafai A. H., Lone G. N., Qadri A., Qadri R. A. 2015. Tectorigenin ablates the inflammation-induced epithelial-mesenchymal transition in a co-culture model of human lung carcinoma. *Pharmacol Rep* 67:382-387.
2. Barabutis N., Schally A. V., Siejka A. 2018. P53, GHRH, inflammation and cancer. *EBioMedicine* 37:557-562.
3. Beroske L., Van den Wyngaert T., Stroobants S., Van der Veken P., Elvas F. 2021. Molecular Imaging of Apoptosis: The Case of Caspase-3 Radiotracers. *Int J Mol Sci* 22.
4. Broderick S. R. 2020. Adjuvant and Neoadjuvant Immunotherapy in Non-small Cell Lung Cancer. *Thorac Surg Clin* 30:215-220.
5. Chen J. 2016. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6:a026104.
6. Chen K. C., Hsu W. H., Ho J. Y., Lin C. W., Chu C. Y., Kandaswami C. C., Lee M. T., Cheng C. H. 2018. Flavonoids Luteolin and Quercetin Inhibit RPS19 and contributes to metastasis of cancer cells through c-Myc reduction. *J Food Drug Anal* 26:1180-1191.
7. Chen Q., Xu J., Li L., Li H., Mao S., Zhang F., Zen K., Zhang C. Y., Zhang Q. 2014. MicroRNA-23a/b and microRNA-27a/b suppress Apaf-1 protein and alleviate hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Cell Death Dis* 5:e1132.
8. Chen Z., Fillmore C. M., Hammerman P. S., Kim C. F., Wong K. K. 2014. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer* 14:535-546.
9. Ciumarneau L., Milaciu M. V., Runcan O., Vesa S. C., Rachisan A. L., Negrean V., Perne M. G., Donca V. I., Alexescu T. G., Para I., ve ark. 2020. The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases. *Molecules* 25.
10. Cohen G. M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1):1-16.
11. Dang C. V. 2012. MYC on the path to cancer. *Cell* 149:22-35.
12. de Magalhaes J. P., Passos J. F. 2018. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech Ageing Dev* 170:2-9.
13. Derynck R., Turley S. J., Akhurst R. J. 2021. TGFbeta biology in cancer progression and immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 18:9-34.
14. Dhanasekaran R., Deutzmann A., Mahauad-Fernandez W. D., Hansen A. S., Gouw A. M., Felsher D. W. 2022. The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nat Rev Clin Oncol* 19:23-36.
15. Dudley A. C., Griffioen A. W. 2023. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis* 26:313-347.
16. Duque-Parra J. E. 2005. Note on the origin and history of the term "apoptosis". *Anat Rec B New Anat* 283:2-4.
17. Elias R., Morales J., Presley C. 2017. Checkpoint Inhibitors for Non-Small Cell Lung Cancer Among Older Adults. *Curr Oncol Rep* 19:62.
18. Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516.
19. Engeland K. 2022. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ* 29:946-960.
20. Fan T. J., Han L. H., Cong R. S., Liang J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37:719-727.
21. Fan X., Fan Z., Yang Z., Huang T., Tong Y., Yang D., Mao X., Yang M. 2022. Flavonoids-Natural Gifts to Promote Health and Longevity. *Int J Mol Sci* 23.
22. Fu S., Yang Y., Liu D., Luo Y., Ye X., Liu Y., Chen X., Wang S., Wu H., Wang Y., ve ark. 2017. Flavonoids and Tannins from Smilax china L. Rhizome Induce Apoptosis Via Mitochondrial Pathway and MDM2-p53 Signaling in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Am J Chin Med* 45:369-384.
23. Gao F. Y., Li X. T., Xu K., Wang R. T., Guan X. X. 2023. c-MYC mediates the crosstalk between breast cancer cells and tumor microenvironment. *Cell Commun Signal* 21:28.
24. Gkoutela S., Castro-Giner F., Szczerba B. M., Vetter M., Landin J., Scherrer R., Krol I., Scheidmann M. C., Beisel C., Stirnimann C. U., ve ark. 2019. Circulating Tumor Cell Clustering Shapes DNA Methylation to Enable Metastasis Seeding. *Cell* 176:98-112 e114.
25. Hajdu S. I. 2011. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer* 117:1097-1102.

26. Herbst R. S., Morgensztern D., Boshoff C. 2018. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* 553:446-454.
27. Hisada Y., Mackman N. 2017. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. *Blood* 130:1499-1506.
28. Hou J., Aerts J., den Hamer B., van Ijcken W., den Bakker M., Riegman P., van der Leest C., van der Spek P., Foekens J. A., Hoogsteden H. C., et al. 2010. Gene expression-based classification of non-small cell lung carcinomas and survival prediction. *PLoS One* 5:e10312.
29. Imao T., Nagata S. 2013. Apaf-1- and Caspase-8-independent apoptosis. *Cell Death Differ* 20:343-352.
30. Jeong S. Y., Seol D. W. 2008. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep* 41:11-22.
31. Kanapathipillai M. 2018. Treating p53 Mutant Aggregation-Associated Cancer. *Cancers (Basel)* 10.
32. Kesavardhana S., Malireddi R. K. S., Kanneganti T. D. 2020. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. *Annu Rev Immunol* 38:567-595.
33. Koo N., Sharma A. K., Narayan S. 2022. Therapeutics Targeting p53-MDM2 Interaction to Induce Cancer Cell Death. *Int J Mol Sci* 23.
34. Kopustinskiene D. M., Jakstas V., Savickas A., Bernatoniene J. 2020. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients* 12.
35. Kroemer G., Pouyssegur J. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13:472-482.
36. Larsen B. D., Sorensen C. S. 2017. The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *FEBS J* 284:1160-1170.
37. Laubach V., Kaufmann R., Bernd A., Kippenberger S., Zoller N. 2019. Extrinsic or Intrinsic Apoptosis by Curcumin and Light: Still a Mystery. *Int J Mol Sci* 20.
38. Li C., Zhang L., Meng G., Wang Q., Lv X., Zhang J., Li J. 2019. Circular RNAs: pivotal molecular regulators and novel diagnostic and prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 145:2875-2889.
39. Liebl M. C., Hofmann T. G. 2021. The Role of p53 Signaling in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 13.
40. Lin Y., Lu Q., Chen C., Wang B., Guo L., Xie J., Chen C., Huang L., Dong L. 2021. A synthetic chalcone derivative, compound 39, alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Eur J Pharmacol* 891:173730.
41. Lindholm D., Arumae U. 2004. Cell differentiation: reciprocal regulation of Apaf-1 and the inhibitor of apoptosis proteins. *J Cell Biol* 167:193-195.
42. Liu Q., Zhang H., Jiang X., Qian C., Liu Z., Luo D. 2017. Factors involved in cancer metastasis: a better understanding to "seed and soil" hypothesis. *Mol Cancer* 16:176.
43. Liu Y., Hu X., Han C., Wang L., Zhang X., He X., Lu X. 2015. Targeting tumor suppressor genes for cancer therapy. *Bioessays* 37:1277-1286.
44. Ma C., Xu K., Meng J., Ran J., Adel Abdo Moqbel S., Liu A., Yan S., Wu L. 2018. Tectorigenin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis via suppression of NF-kappaB signalling and decreases bone loss in ovariectomized C57BL/6. *J Cell Mol Med* 22:5121-5131.
45. Matson D. R., Yang D. T. 2020. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome: An Overview. *Arch Pathol Lab Med* 144:245-251.
46. Moqbel S. A. A., Xu K., Chen Z., Xu L., He Y., Wu Z., Ma C., Ran J., Wu L., Xiong Y. 2020. Tectorigenin Alleviates Inflammation, Apoptosis, and Ossification in Rat Tendon-Derived Stem Cells via Modulating NF-Kappa B and MAPK Pathways. *Front Cell Dev Biol* 8:568894.
47. Mor G., Straszewski S., Kamsteeg M. 2002. The Fas/FasL system in reproduction: survival and apoptosis. *ScientificWorldJournal* 2:1828-1842.
48. Moradi A., Abdihaji M., Kouchaksaraie S. B., Alkinani T. A., Mahmoudi A., Davoudi A., Dashtimiani W., Ghezeljeh S. M., Aghajani S., Ghasemian R., et al. 2022. Synthesize of Bi(2)O(3)/Gln-TSC nanoparticles and evaluation of their toxicity on prostate cancer cells and expression of CASP8, BAX, and Bcl-2 genes. *Sci Rep* 12:21245.
49. Morana O., Wood W., Gregory C. D. 2022. The Apoptosis Paradox in Cancer. *Int J Mol Sci* 23.
50. Nowak-Sliwinska P., Alitalo K., Allen E., Anisimov A., Aplin A. C., Auerbach R., Augustin H. G., Bates D. O., van Beijnum J. R., Bender R. H. F., et al. 2018. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis* 21:425-532.
51. Paredes F., Williams H. C., San Martin A. 2021. Metabolic adaptation in hypoxia and cancer. *Cancer Lett* 502:133-142.

52. Rahman N., Khan H., Zia A., Khan A., Fakhri S., Aschner M., Gul K., Saso L. 2021. Bcl-2 Modulation in p53 Signaling Pathway by Flavonoids: A Potential Strategy towards the Treatment of Cancer. *Int J Mol Sci* 22.
53. Rashidi R., Montazeri A., Soukhtanloo M., Ghasemian S., Amiri M. S., Hasanpour M., Einafshar E., Ghorbani A. 2024. Moraea sisyrinchium inhibits proliferation, cell cycle, and migration of cancerous cells, and decreases angiogenesis in chick chorioallantoic membrane. *Iran J Basic Med Sci* 27:57-65.
54. Rasnick D. 2000. Auto-catalysed progression of aneuploidy explains the Hayflick limit of cultured cells, carcinogen-induced tumours in mice, and the age distribution of human cancer. *Biochem J* 348 Pt 3:497-506.
55. Remark R., Becker C., Gomez J. E., Damotte D., Dieu-Nosjean M. C., Sautes-Fridman C., Fridman W. H., Powell C. A., Altorki N. K., Merad M., et al. 2015. The non-small cell lung cancer immune contexture. A major determinant of tumor characteristics and patient outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 191:377-390.
56. Reyna-Jeldes M., Diaz-Munoz M., Madariaga J. A., Coddou C., Vazquez-Cuevas F. G. 2021. Autocrine and paracrine purinergic signaling in the most lethal types of cancer. *Purinergic Signal* 17:345-370.
57. Rong J., Fu F., Han C., Wu Y., Xia Q., Du D. 2023. Tectorigenin: A Review of Its Sources, Pharmacology, Toxicity, and Pharmacokinetics. *Molecules* 28.
58. Sabapathy K., Lane D. P. 2019. Understanding p53 functions through p53 antibodies. *J Mol Cell Biol* 11:317-329.
59. Sibille A., Paulus A., Martin M., Bourhaba M., Barthelemy N., Radermecker M., Corhay J. L., Louis R., Duysinx B. 2015. [Management of Non-Small Cell Lung Cancer]. *Rev Med Liege* 70:432-441.
60. Slika H., Mansour H., Wehbe N., Nasser S. A., Iratni R., Nasrallah G., Shaito A., Ghaddar T., Kobeissy F., Eid A. H. 2022. Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. *Biomed Pharmacother* 146:112442.
61. Sun A., Benet L. Z. 2020. Late-Stage Failures of Monoclonal Antibody Drugs: A Retrospective Case Study Analysis. *Pharmacology* 105:145-163.
62. Tan S., Liu X., Chen L., Wu X., Tao L., Pan X., Tan S., Liu H., Jiang J., Wu B. 2021. Fas/FasL mediates NF-kappaBp65/PUMA-modulated hepatocytes apoptosis via autophagy to drive liver fibrosis. *Cell Death Dis* 12:474.
63. Teles Y. C. F., Souza M. S. R., Souza M. F. V. 2018. Sulphated Flavonoids: Biosynthesis, Structures, and Biological Activities. *Molecules* 23.
64. Tomonaga T., Hayashi H., Taira M., Isono K., Kojima I. 1994. Signaling pathway other than phosphatidylinositol turnover is responsible for constant expression of c-myc gene in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem Mol Biol Int* 33:429-437.
65. Van Opdenbosch N., Lamkanfi M. 2019. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity* 50:1352-1364.
66. Vecchiarelli S., Bennati C. 2018. Oncogene addicted non-small-cell lung cancer: current standard and hot topics. *Future Oncol* 14:3-17.
67. Wade M., Li Y. C., Wahl G. M. 2013. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 13:83-96.
68. Wang H., Guo M., Wei H., Chen Y. 2023. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther* 8:92.
69. Wang Q., Cheng X. L., Zhang D. Y., Gao X. J., Zhou L., Qin X. Y., Xie G. Y., Liu K., Qin Y., Liu B. L., et al. 2013. Tectorigenin Attenuates Palmitate-Induced Endothelial Insulin Resistance via Targeting ROS-Associated Inflammation and IRS-1 Pathway. *PLoS One* 8:e66417.
70. Wei C., Yang C., Wang S., Shi D., Zhang C., Lin X., Liu Q., Dou R., Xiong B. 2019. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis. *Mol Cancer* 18:64.
71. Weiss F., Lauffenburger D., Friedl P. 2022. Towards targeting of shared mechanisms of cancer metastasis and therapy resistance. *Nat Rev Cancer* 22:157-173.
72. Wong R. S. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 30:87.
73. Xu X., Lai Y., Hua Z. C. 2019. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep* 39.

74. Yao X., Li K., Liang C., Zhou Z., Wang J., Wang S., Liu L., Yu C. L., Song Z. B., Bao Y. L., ve ark. 2020. Tectorigenin enhances PDX1 expression and protects pancreatic beta-cells by activating ERK and reducing ER stress. *J Biol Chem* 295:12975-12992.
75. Ye K., Wei Q., Gong Z., Huang Y., Liu H., Li Y., Peng X. 2017. Effect of norcantharidin on the proliferation, apoptosis, and cell cycle of human mesangial cells. *Ren Fail* 39:458-464.
76. Yeh L. T., Hsu L. S., Chung Y. H., Chen C. J. 2020. Tectorigenin Inhibits Glioblastoma Proliferation by G0/G1 Cell Cycle Arrest. *Medicina (Kaunas)* 56.
77. Yin W., Wang J., Jiang L., James Kang Y. 2021. Cancer and stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 246:1791-1801.
78. Zhang R., Piao M. J., Oh M. C., Park J. E., Shilnikova K., Moon Y. J., Kim D. H., Jung U., Kim I. G., Hyun J. W. 2016. Protective Effect of an Isoflavone, Tectorigenin, Against Oxidative Stress-induced Cell Death via Catalase Activation. *J Cancer Prev* 21:257-263.
79. Zhou L., Yan K., Xing S., Cheng J. 2023. Tectorigenin alleviates the apoptosis and inflammation in spinal cord injury cell model through inhibiting insulin-like growth factor-binding protein 6. *Open Med (Wars)* 18:20230680.



ÖZGEÇMİŞ

İskenderun Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi/ Elektrik-Elektronik Teknolojisi/Endüstriyel Bakım Onarım Bölümü'nden mezun oldu. 2020 yılında Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Lisans bölümünden *Adrenokortikal Tümörlerde miRNA ve Epigenetik Çalışmaların Araştırılması* adlı tez ile mezun oldu. 2020 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyokimya ve Genetik (TIP) Anabilim Dalı'nda yüksek lisansına başladı.

