



T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**4-(SÜBSTİTÜE)-3,4-DİHİDROPİRİMİDİNON BİLEŞİKLERİNİN
İNSAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRESİ VE *Drosophila*
melanogaster'DE SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK, APOPTOTİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

MEHMET FİDAN

ARALIK

**4-(SÜBSTİTÜE)-3,4-DİHİDROİRİMİDİNON BİLEŞİKLERİNİN İNSAN
AKCİĞER KANSERİ HÜCRESİ VE *Drosophila melanogaster*'DE
SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK, APOPTOTİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Mehmet FİDAN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman

Prof. Dr. Arif AYAR

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2023

Doktora Tezi Kabul ve Onay Sayfası

Mehmet FİDAN tarafından hazırlanan “4-(Sübstitüe)-3,4-Dihidropirimidinon Bileşiklerinin İnsan Akciğer Kanseri Hücresi ve *Drosophila melanogaster*’de Sitotoksik, Genotoksik, Apoptotik Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Arif AYAR

Biyoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan: Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

Biyoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Doç. Dr. Burak YAZGAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Doç. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Doç. Dr. Aliye GEDİZ ERTÜRK

Organik Kimya Anabilim Dalı, Ordu Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 26/12/2023

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Ümit YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Mehmet FİDAN

26/12/2023

4-(SÜBSTİTÜE)-3,4-DİHİDROPIRİMİDİNON BİLEŞİKLERİNİN İNSAN AKCİĞER
KANSERİ HÜCRESİ VE *Drosophila melanogaster*'de SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK,
APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)

Mehmet FİDAN

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2023

ÖZET

Bu çalışma ile, yeni sentez edilmiş 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinon türevlerinin (PMe, PPh ve PNO₂) olası sitotoksik, genotoksik ve antikanserojenik etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bileşiklerin olası etkileri A549 insan akciğer kanser hücre hattı ve MRC-5 insan sağlıklı akciğer hücre hattında ve *Drosophila melanogaster*'de araştırılmıştır. Çalışmada bileşiklerin sitotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla WST-8 test yöntemi, genotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla ise *Drosophila* kanat somatik mutasyon rekombinasyon testi (SMART) kullanılmıştır. Bileşiklerin, ısı şoku protein genlerinin, antioksidan genlerinin ve apoptotik yolda etkili olan genlerin ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. Araştırmanın sonuçlarına göre, bileşiklerin A549 akciğer kanseri hücre hattında 50 ve 100µM konsantrasyonlarında sitotoksik etkiye sahip olduğu, sağlıklı akciğer hücre hattında (MRC-5) ise sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir. SMART sonucunda ise her üç DHPM türevinin de sadece çok yüksek dozlarda genotoksik etki gösterdiği fakat larvalar üzerinde önemli bir toksik etki göstermediği belirlenmiştir. Bileşiklerin A549 hücre hattında apoptotik etkileri incelendiğinde, her üç bileşiğin de BAX ve CASP3 geninin, antioksidan mekanizmayla ilgili genlerden SOD1, CAT ve GSS genlerinin ekspresyon seviyelerini artırdığı, ısı şoku protein genlerinden HSP27 gen ifadesini azalttığı gözlemlenmiştir. Bileşiklerin *D. melanogaster*'de *in vivo* şartlarda apoptotik gen ifade düzeylerine etkisi incelendiğinde; PMe bileşiğinin DEBCL geninin ekspresyon düzeyini kontrol grubuna göre artırdığı, PPh ve PNO₂ bileşiğinin DEBCL geninin ekspresyon seviyesini azalttığı, tüm üç bileşiğin ise BUFFY geninin ekspresyon düzeyini artırdığı görülmüştür. DEBCL/BUFFY oranına bakıldığında her üç bileşiğin de sağlıklı *D. melanogaster* bireylerinde antiapoptotik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte tüm bileşiklerin *D. melanogaster* kaspazları olan DRICE geninin ekspresyon düzeyini kontrol grubuna göre artırdığı, DRONC geninin ekspresyon düzeyini sadece PMe bileşiğinin artırıp PPh ve PNO₂ bileşiğinin ise gen ekspresyon seviyesini azalttığı tespit edilmiştir. Özellikle PMe bileşiğinin *D. melanogaster* ısı şoku proteinleri HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90 genlerinin ve SOD, CAT, GR ve GST genlerinin ekspresyon düzeylerini artırdığı belirlenmiştir.

Sayfa Adedi : 156
Anahtar Kelimeler : Dihidropirimidinon, A549, *D. melanogaster*, HSP, Antioksidan
Danışman : Prof. Dr. Arif AYAR

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC, GENOTOXIC, APOPTOTIC EFFECTS OF
4-(SUBSTITUTED)-3,4-DIHYDROPYRIMIDINONE COMPOUNDS ON HUMAN
LUNG CANCER CELL AND *Drosophila melanogaster*

(Ph. D. Thesis)

Mehmet FİDAN

AMASYA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2023

ABSTRACT

This study aimed to determine the possible cytotoxic, genotoxic and anticarcinogenic activities of newly synthesized 4-(Substituted)-3,4-dihydropyrimidinone derivatives (PMe, PPh and PNO₂). For this purpose, the possible effects of the compounds were investigated in the A549 human lung cancer cell line, MRC-5 human healthy lung cell line and *Drosophila melanogaster*. In the study, the WST-8 test method was used to evaluate the cytotoxic effects of the compounds, and the *Drosophila* wing somatic mutation recombination test (SMART) was used to evaluate the genotoxic effects. Expression levels of compounds, heat shock protein genes, antioxidant genes and genes effective in the apoptotic pathway were determined by RT-PCR method. According to the results of the research, it was determined that the compounds had a cytotoxic effect at 50 and 100µM concentrations on the A549 lung cancer cell line, but did not show a cytotoxic effect on the healthy lung cell line (MRC-5). As a result of SMART, it was determined that all three DHPM derivatives showed genotoxic effects only at very high doses, but did not show a significant toxic effect on the larvae. When the apoptotic effects of the compounds were examined on the A549 cell line, it was observed that all three compounds increased the expression levels of BAX and CASP3 genes, SOD1, CAT and GSS genes, which are genes related to the antioxidant mechanism, and decreased HSP27 gene expression, which is a heat shock protein gene. When the effects of compounds on apoptotic gene expression levels in *D. melanogaster* in vivo conditions were examined; It was observed that PMe compound increased the expression level of the DEBCL gene compared to the control group, PPh and PNO₂ compound decreased the expression level of the DEBCL gene, and all three compounds increased the expression level of the BUFFY gene. Considering the DEBCL/BUFFY ratio, it was determined that all three compounds showed antiapoptotic effects in healthy *D. melanogaster* individuals. However, it was determined that all compounds increased the expression level of the DRICE gene, which is a *D. melanogaster* caspase, compared to the control group, only the PMe compound increased the expression level of the DRONC gene, and the PPh and PNO₂ compounds decreased the gene expression level. In particular, it was determined that PMe compound increased the expression levels of *D. melanogaster* heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70 and HSP90 genes and SOD, CAT, GR and GST genes.

Number of pages : 156
Key Words : Dihydropyrimidinone, A549, *D. melanogaster*, HSP, Antioxidant
Supervisor : Prof. Dr. Arif AYAR

ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince beni destekleyen, yönlendiren ve tüm aşamalarında bana zaman ayırarak yardımını esirgemeyen saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Arif AYAR'a teşekkürü bir borç bilirim. Doktora tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Tuba YILDIRIM ve Doç. Dr. Burak YAZGAN hocalarıma katkı, öneri ve eleştirilerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım. Deney aşamalarında ve tez yazımında bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan Dr. Öğr. Gör. Seda MESCI hocama da ayrıca teşekkür ederim. Doktora eğitimim boyunca eğitimime katkıda bulunan Amasya Üniversitesi Öğretim üyeleri hocalarıma ve tez jürilerim Doç. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK'a ve Doç. Dr. Aliye Gediz ERTÜRK'e teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca tez dönemi boyunca benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevdiğim eşime ve çocuklarıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Hücre döngüsü ve kanser.....	6
2.1.2. Antioksidanlar ve kanser	9
2.1.3. HSP'ler ve kanser	13
2.1.4. Apoptoz ve kanser	19
2.2. Akciğer Kanseri ve A549 Hücre Hattı	26
2.3. <i>Drosophila melanogaster</i>	30
2.3.1. Genetik Toksikoloji	32
2.3.2. <i>D. melanogaster</i> somatik mutasyon ve rekombinasyon testi	34
2.3.3. <i>D. melanogaster</i> ve antioksidanlar	36
2.3.4. <i>D. melanogaster</i> ve Hsp'ler	40
2.3.5. <i>D. melanogaster</i> ve apoptoz	42
2.4. Dihidropirimidinonlar ve Kullanım Alanları	46

Sayfa

3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	48
3.1. Materyal	48
3.1.1. 4-(sübstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlar	48
3.1.2. Hücre Kültürü çalışmalarında kullanılan ekipman ve kimyasallar	48
3.1.3. <i>Drosophila melanogaster</i> hatları	50
3.1.4. SMART çalışmalarında kullanılan ekipman ve kimyasallar	53
3.1.5. Gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılan ekipman ve kimyasallar	53
3.2. Yöntem.....	56
3.2.1. Çalışmada kullanılan bileşiklerin sentezi.....	56
3.2.2. Hücre kültürü çalışmaları.....	59
3.2.3. WST-8 protokolü	60
3.2.3.1. WST-8 Testinden elde edilen bulguların istatistiksel analizi	61
3.2.4. <i>Drosophila</i> somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART).....	61
3.2.4.1. SMART ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi	70
3.2.5. <i>Drosophila</i> doku homojenizasyonu	70
3.2.6. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri (RT-PCR)	71
4. BULGULAR.....	75
4.1. <i>İn vitro</i> sitotoksisite testlerinden elde edilen bulgular	75
4.1.1. WST-8 testinden elde edilen bulgular.....	75
4.2. <i>İn vivo Drosophila melanogaster</i> 'de yapılan testlerden elde edilen bulgular	82
4.2.1. Larval mortalite testinden elde edilen bulgular	82
4.2.2. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testinden elde edilen bulgular.....	84
4.3. Real Time PCR analizlerinden elde edilen bulgular.....	90
4.3.1. <i>İn vitro</i> A549 hücre hattı PCR bulguları.....	91
4.3.2. <i>İn vivo D. melanogaster</i> PCR bulguları.....	99

	Sayfa
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	108
KAYNAKLAR	131
ÖZGEÇMİŞ	156



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Isı şoku protein ailelerinin sınıflandırılması.....	15
Çizelge 2.2. Pro-apoptotik araçlar.....	21
Çizelge 2.3. Anti-apoptotik araçlar	22
Çizelge 2.4. <i>Drosophila melanogaster</i> Hsp'lerin işlevleri	41
Çizelge 3.1. Sentezlenen maddelerin molekül adları ve kültesi.....	48
Çizelge 3.2. Kullanılan ekipman marka ve kullanım amaçları (SMART).....	49
Çizelge 3.3. Kullanılan ekipman marka ve kullanım amaçları.....	50
Çizelge 3.4. Kullanılan reaktif ve besiyerlerinin marka ve kullanım amaçları	53
Çizelge 3.5. A549 Hücre hattı için kullanılan primer dizileri, referanslar ve ürün uzunlukları.....	54
Çizelge 3.6. <i>D. melanogaster</i> için kullanılan primer dizileri, referanslar ve ürün uzunlukları.....	55
Çizelge 3.7. Faure solüsyonunun içeriği.....	67
Çizelge 4.1. Bileşiklerin A549 hücre hattında WST-8 absorbands ölçümleri.....	76
Çizelge 4.2. Bileşiklerin MRC-5 hücre hattında WST-8 absorbands ölçümleri.....	76
Çizelge 4.3. A549 hücre hattında PPh bileşiğinin uygulanması sonucu elde edilen istatistiksel veriler.....	77
Çizelge 4.4. A549 hücre hattında PMe bileşiğinin uygulanması sonucu elde edilen istatistiksel veriler.....	77
Çizelge 4.5. A549 hücre hattında PNO ₂ bileşiğinin uygulanması sonucu elde edilen istatistiksel veriler.....	78
Çizelge 4.6. MRC-5 hücre hattında PPh bileşiğinin uygulanması sonucu elde edilen istatistiksel veriler.....	78
Çizelge 4.7. MRC-5 hücre hattında PMe bileşiğinin uygulanması sonucu elde edilen istatistiksel veriler.....	79
Çizelge 4.8. MRC-5 hücre hattında PNO ₂ bileşiğinin uygulanması sonucu elde edilen istatistiksel veriler.....	79

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.9. A549 hücre hattında PMe, PPh, PNO ₂ bileşiklerinin uygulanması sonucu elde edilen verilerin istatistiksel açıdan karşılaştırılması.....	80
Çizelge 4.10. Farklı konsantrasyonlarda 4-(Süstitüe)-3,4-Dihidropirimidinonlara maruz kalmış trans-heterezigot larvaların hayatta kalış ve mortalite oranları.....	83
Çizelge 4.11. PMe uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular.....	87
Çizelge 4.12. PPh uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular.....	88
Çizelge 4.13. PNO ₂ uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular.....	90
Çizelge 4.14. A549 hücre hattından izole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı.....	91
Çizelge 4.15. <i>D. melanogaster</i> bireylerinden elde edilen izole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı.....	91

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1.Kanserin ayırt edici özellikleri.....	4
Şekil 2.2. 2020 yılında dünyada en fazla görülen kanser vakaları.....	5
Şekil 2.3. 2020 yılında dünyada en fazla ölüme neden olan kanser çeşitleri.....	6
Şekil 2.4. Hücre döngüsünün ilerlemesi ve düzenlenmesinde görevli mekanizmalar.....	7
Şekil 2.5. Antioksidanlar ve kanser ilişkisi.....	11
Şekil 2.6. HSP'lerin protein şekillenmesindeki görevi.....	13
Şekil 2.7. Çeşitli kanser tipleri ile ilgili HSP'ler.....	16
Şekil 2.8. Hücre ölüm yollarının HSP'ler tarafından düzenlenmesi.....	18
Şekil 2.9. Apoptotik hücre ölümü.....	20
Şekil 2.10. Memeli hücresinde intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar.....	23
Şekil 2.11. Stres ve DNA hasarı sonrası p53 tarafından başlatılan apoptozis mekanizması.....	24
Şekil 2.12. Apoptozda meydana gelen bozukluklar ve kanser gelişimi.....	25
Şekil 2.13. Akciğer kanseri çeşitleri.....	27
Şekil 2.14. A549 hücre hatları.....	30
Şekil 2.15. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in kullanıldığı çalışma alanları.....	31
Şekil 2.16. <i>Drosophila</i> Somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin kullanım alanları.....	35
Şekil 2.17. <i>Drosophila</i> ve memelilerde apoptoz.....	44
Şekil 2.18. <i>Drosophila</i> 'da mitokondriyal hücre ölüm yolu.....	45
Şekil 2.19. Organizmadaki pirimidin bazları.....	47
Şekil 2.20. Dihidropirimidinonların kimyasal yapısı.....	47
Şekil 3.1. PPh sentezine ait şematik gösterim.....	56

Şekil	Sayfa
Şekil 3.2. PMe sentezine ait şematik gösterim.....	57
Şekil 3.3. PNO ₂ sentezine ait şematik gösterim.....	58
Şekil 3.4. <i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik gösterimi.....	62
Şekil 3.5. SMART ile tespit edilen delesyon, nokta mutasyonu ve rekombinasyonların moleküler mekanizmaları.....	63
Şekil 4.1. Bileşiklerin A-549 ve MRC-5 hücre hatlarında WST-8 analizleri	81
Şekil 4.2. Bileşiklerin A549 hücre hattında BAX genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	92
Şekil 4.3. Bileşiklerin A549 hücre hattında BCL2 genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	92
Şekil 4.4. Bileşiklerin A549 hücre hattında CASP3 genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	93
Şekil 4.5. Bileşiklerin A549 hücre hattında CASP9 genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	93
Şekil 4.6. Bileşiklerin A549 hücre hattında HSP27 genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	94
Şekil 4.7. Bileşiklerin A549 hücre hattında HSP60 genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	94
Şekil 4.8. Bileşiklerin A549 hücre hattında HSP70 genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	95
Şekil 4.9. Bileşiklerin A549 hücre hattında HSP90 genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	95
Şekil 4.10. Bileşiklerin A549 hücre hattında SOD1 genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	96
Şekil 4.11. Bileşiklerin A549 hücre hattında SOD2 genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	96
Şekil 4.12. Bileşiklerin A549 hücre hattında CAT genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	97
Şekil 4.13. Bileşiklerin A549 hücre hattında GSS genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	97

Şekil	Sayfa
Şekil 4.14. A549 hücre hattının gen bölgelerine ait erime eğrisi analizi	98
Şekil 4.15. Bileşiklerin <i>D. melanogaster</i> bireylerinde DEBCL genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	99
Şekil 4.16. Bileşiklerin <i>D. melanogaster</i> bireylerinde BUFFY genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	100
Şekil 4.17. Bileşiklerin <i>D. melanogaster</i> bireylerinde DRICE genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	100
Şekil 4.18. Bileşiklerin <i>D. melanogaster</i> bireylerinde DRONC genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	101
Şekil 4.19. Bileşiklerin <i>D. melanogaster</i> bireylerinde HSP27 genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	101
Şekil 4.20. Bileşiklerin <i>D. melanogaster</i> bireylerinde HSP60 genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	102
Şekil 4.21. Bileşiklerin <i>D. melanogaster</i> bireylerinde HSP70 genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	102
Şekil 4.22. Bileşiklerin <i>D. melanogaster</i> bireylerinde HSP90 genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	103
Şekil 4.23. Bileşiklerin <i>D. melanogaster</i> bireylerinde SOD genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	103
Şekil 4.24. Bileşiklerin <i>D. melanogaster</i> bireylerinde CAT genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	104
Şekil 4.25. Bileşiklerin <i>D. melanogaster</i> bireylerinde GR genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	104
Şekil 4.26. Bileşiklerin <i>D. melanogaster</i> bireylerinde GST genine ait mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.....	105
Şekil 4.27. Bileşiklerin A549 hücre hattında BAX/BCL2 oranı üzerine etkisi.....	105
Şekil 4.28. Bileşiklerin <i>D. melanogaster</i> 'de DEBCL/BUFFY oranı üzerine etkisi.....	106
Şekil 4.29. <i>D. melanogaster</i> bireylerinden elde edilen hücre hattının gen bölgelerine ait erime eğrisi analizi	106

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. <i>D. melanogaster</i> 'in Oregon R soyu (yabanıl tip) standart yaşam koşulları, erkek ve dişi bireyleri.....	49
Resim 3.2. <i>D. melanogaster</i> hayat döngüsü.....	51
Resim 3.3. Hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı laboratuvar.....	52
Resim 3.4. Hücre kültürü çalışmasında kullanılan ekipmanlar ve akciğer A549 hücre hattı.....	59
Resim 3.5. WST-8 Çalışması.....	60
Resim 3.6. <i>D. melanogaster</i> 'de farklı kanat morfolojileri.....	63
Resim 3.7. Çalışmada kullanılan bileşiklerin DMSO'da çözülmesi.....	65
Resim 3.8. Çalışmada kullanılan maddelerin larvalara uygulanması.....	66
Resim 3.9. Normal ve serrat kanat fenotiplerine ait sektörler.....	68
Resim 3.10. Çeşitli kanat benek tipleri.....	68
Resim 3.11. <i>Drosophila</i> doku homojenizasyon aşamaları.....	70
Resim 3.12. RNA miktarının tespit edilmesinde kullanılan ekipmanlar.....	72
Resim 4.1. Larval mortalite testi sonucu elde edilen ergin bireyler.....	84
Resim 4.2. Normal genetik özelliğe sahip bireylerdeki kanat kılları.....	84
Resim 4.3. Küçük tek tip <i>mwh</i> mutant klon.....	85
Resim 4.4. Büyük tek tip <i>mwh</i> mutant klon.....	85
Resim 4.5. Büyük tek tip <i>flr3</i> mutant klon.....	85
Resim 4.6. <i>flr3</i> ve <i>mwh</i> mutant klonları birlikte taşıyan ikiz klon.....	86

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda listelenmiştir.

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
cm ²	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
°C	Derece
dk	Dakika
%	Yüzde
M	Molar
g	Gram
H ₂ O	Su
Ho	Orijinal (null) hipotez
Ha	Alternatif hipotez
kB	Kilobaz
mL	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
μ g	Mikrogram
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometre
NH ₂	Amin

Kısaltmalar**Açıklama**

BAD	BCL2 İlişkili Hücre Ölümü Antagonisti
BAX	BCL2 İlişkili X
BCL2	B Hücreli Lenfoma 2
BdS	Serratlık geni
BrdU	5-bromo-2-deoksiüridin
CASP	Kaspaz
CAT	Katalaz
CDK	Sikline Bağımlı Kinaz
CKI	Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü
cDNA	Komplementer Deoksiribo Nükleik asit
CHEK	Kontrol Noktası Kinazı
CIP	Kinaz etkileşimli protein
CYCS	Sitokrom C
DHPM	Dihidroprimidon
dH ₂ O	Distile su
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
EMS	Etil metansülfonat
ER	Endoplazmik retikulum
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GP	Glutasyon peroksidaz

Kısaltmalar	Açıklama
GR	Glutasyon redüktaz
GSS	Glutasyon sentetaz
GST	Glutasyon transferaz
HER	İnsan epidermal reseptör
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HSF	Isı Şok Faktörü
HSP	Isı Şok Protein
IARC	Uluslararası kanser araştırma enstitüsü
JNK	c-Jun N-Terminal Kinaz
KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
KİF	Klon indüksiyon frekansı
KIP	Kinaz inhibitör protein
KKD	Kardeş kromatid değişimi
LD ₅₀	Lethal doz 50
MCR	Çok bileşenli reaksiyon
MDR	Çoklu ilaç direnci
MEM	Minimum Esansiyel Medyum
MN	Mikronükleus testi
MRC-5	Normal akciğer epitel hücresi
<i>mwh</i>	Çoklu kanat kıllığı geni
PMe	Metil 4-([1,1'-bifenil]-4-il)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat

Kısaltmalar	Açıklama
PPh	Etil 4-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-okso-6-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat
PNO ₂	Etil 4-([1,1'-bifenil]-4-il)-6-(4-nitrofenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat
PTSA	p-toluensülfonik asit
P53 (TP53)	Tümör Protein 53
RB	Retinablastom
RNA	Ribo nükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RNS	Reaktif nitrojen türleri
SCGE	Tek hücre jel elektroforezi
SDB	Standart <i>Drosophila</i> besiyeri
SE	Standart hata
SMART	Somatik Mutasyon Rekombinasyon Testi
SOD	Süper oksit dismutaz
TM3	Dengeleyici kromozom
TNF	Tümör nekrozis faktör
XIAP	X'e bağlı apoptoz inhibitörü
WHO	Dünya sağlık örgütü
WST	2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfopenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu

1. GİRİŞ

Kanser, uzun yıllardır Türkiye’de ve dünya genelinde en önemli ölüm nedenleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya çapında kanser insidansının son otuz yılda iki katından daha çok arttığı bilinmektedir. Dünya çapında 2020 yılında 19 milyon 292 bin 789 kişiye kanser tanısı konulurken, 9 milyon 958 bin 133 kişi kanser sebebiyle yaşamını kaybetmiştir. Elde edilen bu rakamlar dünya çapında meydana gelen tüm insan ölümlerinin yaklaşık olarak altıda birine karşılık gelmektedir (WHO, 2020). Kanser hastalığının bu şekilde çoğalması, bu hastalığın tespiti ve tedavisi için yapılan çalışmaların artmasına neden olmuştur (Wan, Lang, Wang ve Ma, 2016).

Canlı hücreler içerisindeki DNA materyali yaşam boyunca çeşitli mutajenik etkilere maruz kalmaktadır. Genellikle canlı vücudu bu tür mutajenlerin etkisinden korumak için çalışma da replikasyon sırasında ortaya çıkan bazı hatalar DNA dizisinde küçük farklılıklara sebep olarak gen işleyişini bozabilmektedir. Bazı durumlarda ortaya çıkan bu mutasyonlar baskılanamaz ve mutasyona uğrayan bu hücreler klonlar oluşturacak şekilde çoğalabilirler. Bu durum kanser dediğimiz vakaların ortaya çıkmasına neden olur (Futreal ve diğerleri, 2001).

Kanser hücrelerinin en yaygın özelliği, normal hücrelerinkinden farklı olarak değişmiş hücre bölünmesi yollarıdır. Bu, kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelere kıyasla farklı özellikler kazanması gerçeğinden kaynaklanmaktadır. Sağlıklı hücrelerin kanser hücrelerine geçiş nedenleri; kalıtsal mutasyonlar, Ultraviyole ışık, X ışınları, kimyasal maddeler, tütün ürünleri, virüsler ve çevresel faktörler şeklinde sıralanabilir. Bununla birlikte genellikle kanser oluşumu için birden fazla faktörün birlikte etkili olduğu da bilinmektedir (Lapa ve diğerleri, 2017).

Kanser hücrelerinin diğer hücrelerden farklı olarak çoğalma hızının fazla olması, yoğunluğa bağlı olarak inhibisyon görülmemesi, telomeraz aktivitesinin fazla olması, metastaz ve invazyon özelliklerinden dolayı vücudun diğer kısımlarına yayılabilmesi gibi özelliklere sahip olması kanserle mücadeleyi zorlaştıran diğer özelliklerdir (Vogelstein ve diğerleri, 2013). Kanser tedavisinde en fazla kullanılan tedavi yöntemleri kemoterapi ve

radoterapidir. Günümüzde sıklıkla kullanılan kemoterapi ve radyoterapi hastalıkla mücadele etmede tam olarak çözüm olmamasının yanı sıra sağlıklı hücrelere zarar vermesi yönünden de dezavantajlıdır (Sulli, Lam ve Panda, 2019).

Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) verilerine göre, Dünya’da 2020 yılında en fazla görülen kanser çeşitleri meme, akciğer, rektum, kolon, prostat, mide, cilt kanserleri olarak bildirilmiştir (WHO, 2020).

Akciğer kanseri dünya sağlık örgütünden elde edilen veriler dikkate alındığında dünya çapında insidansı ve mortalitesi en fazla olan kanser çeşitlerinden biridir (Cruz, Tanoue ve Matthey, 2011). Akciğer kanseri tümörleri iki geniş histolojik gruba ayrılır. Bunlar KHAD (Küçük Hücreli Akciğer Kanseri) ve KHDAK (Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri) şeklindedir. Bunlarda KHDAK daha büyük bir grubu (%80-%85) temsil eder. KHDAK’nin ise %40 adenokarsinom, %25-30 arası ise squamoz hücreli karsinom, %10-15 ise büyük hücreli karsinomlardır (Rami-Porta ve diğerleri, 2014; Chansky ve diğerleri, 2017).

Kanser tedavi planlamasında kullanılan kimyasal maddelerin araştırılması, alternatif yeni etken maddelerin belirlenmesi ya da dizaynı oldukça önemlidir. Dihidropirimidinonlar ve türevleri, yağ asidi taşıyıcılarının inhibitörleri, α_{1a} -antagonistleri ve nöropeptid Y antagonistleri, antihipertansif, antiviral, antitümör, antibakteriyel, antifungal, antienflamatuar ve mitotik kinesin inhibisyonu gibi aktivitelerinden dolayı farmakolojik olarak oldukça fazla öneme sahip bileşiklerdir (Van Zandt ve diğerleri, 2005). Bununla birlikte bu maddelerden çeşitli yollarla elde edilebilecek yeni sentez maddelerin sitotoksik, genotoksik ve antikanserojenik etkinliğinin de belirlenmesi oldukça önemlidir.

Bu çalışmada yeni sentez edilmiş 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonların kanser tedavilerinde kullanılma potansiyeli ilk defa araştırılacak olup, sitotoksik etkilerinin akciğer karsinomu hücrelerinde (A549), genotoksik veya antigenotoksik etkilerinin ise *Drosophila melanogaster* (meyve sineği)’de araştırılması planlanmıştır.

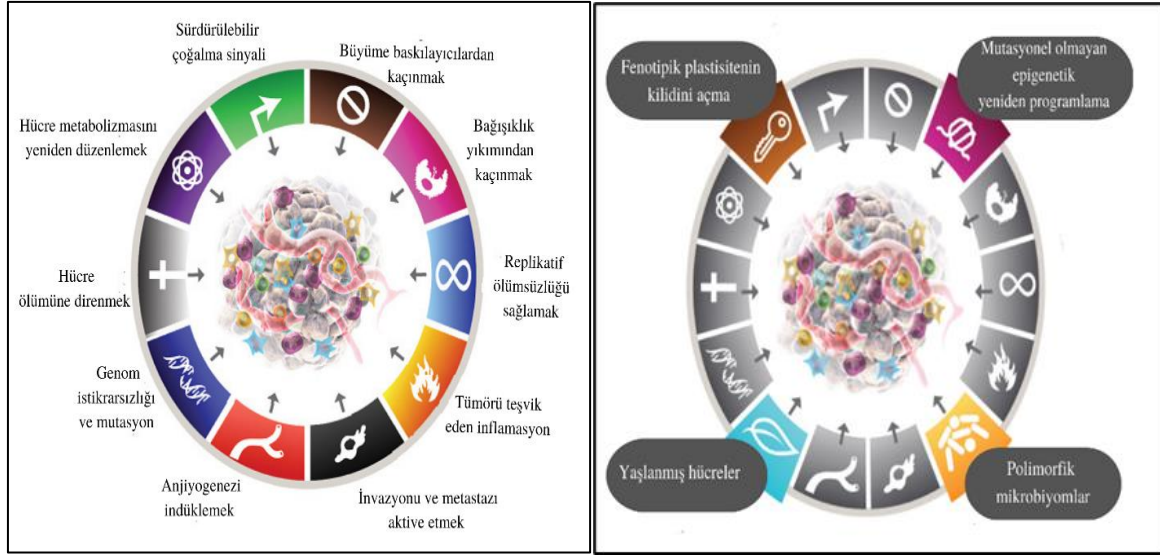
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, fizyolojik büyümeyi ve çoğalmayı kontrol etmek için güvenlik görevi gören tümör baskılayıcı genler gibi birçok genin fonksiyon kaybıyla birlikte spesifik onkojenik yolların aktivasyonu ile yönlendirilen çok basamaklı bir hastalıktır. Kanser hücreleri, hücreSEL büyümeyi, apoptozu ve metabolik yollardaki değişiklikleri yönlendiren sinyallerdeki kusurlardan kaynaklanan sınırsız çoğalma ile karakterize edilir. HücreSEL düzeyde, kanser hücrelerinin hiperproliferatif durumu, esas olarak, reseptör sinyal kaskadlarının aşağı akışında işlev gören ve %25 oranında serbest bırakılan protoonkogenler tarafından indüklenen büyüme sinyallerinin aktivasyonuna bağlıdır (Mirzoyan ve diğerleri, 2019).

Çok hücreli bir organizmanın büyümesi ve çoğalması belirli yollarla gerçekleşir. Bu rutin süreçlerin belirli, düzenli ve değişmez kuralları vardır. Ama bazı hücreler bu kuralları yıkar ve hücreyi kendi kurallarıyla yönetir. Normal koşullarda hücre herhangi bir hücreSEL bozukluğu fark ettiğinde apoptoz mekanizmasını tetikler ve kendini öldürür. Ancak hücre kansere dönüştüğünde apoptoz mekanizmasını bloke eder ve “ölüm sinyallerine” yanıt vermez. Büyüyen hücreler tümör haline gelir ve bu tümör tüm vücudun homeostazisini etkiler. İşte bu duruma veya hastalığa kanser denir (Witsch, Sela ve Yarden, 2010).

Kanserli hücreleri diğer sağlıklı hücrelerden ayıran çok fazla özellik bulunmaktadır. Kanser hücrelerinin diğer hücrelerden farklı özellikleri dikkate alındığında Hanahan ve Weinberg’e göre, insan tümörlerinin gelişimi sürecinde kazandığı altı özellik bulunduğu ifade edilmiştir. Fakat yapılan çalışmalar sonucunda bu özelliklerin sayısı 10’ çıkarılmıştır (Hanahan, 2022). Bunlar; proliferatif sinyalleme, büyüme baskılayıcılarından kaçınmak, hücre ölümüne karşı direnmek, replikatif ölümsüzlüğü sağlamak, anjiyogenezi indüklemek, metastaz ve invazyonu aktive etmek, bağışıklık yıkımından kaçınmak, genom istikrarsızlığı ve mutasyon, tümörü teşvik eden inflamasyon ve hücre metabolizmasını yeniden düzenlemek şeklinde gösterilmiştir (Şekil 2.1) (Hanahan, 2022).



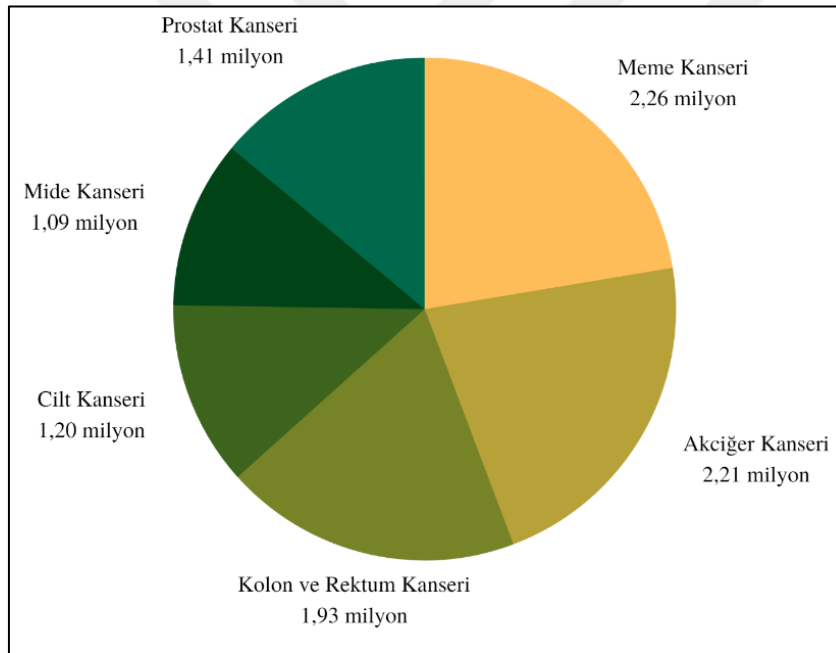
Şekil 2.1. Kanser ayırt edici özellikleri (Hanahan, 2022)

Sağlıklı hücrelerden kanser hücrelerine geçişe neden olan fiziki etkenler arasında, radyasyon, tütün ürünleri, ısı, güneş ışınları ve mekanik etkiler bulunmaktadır. İyonize radyasyon gibi ışınlamalar vücutta bulunan önemli biyolojik makromoleküllere direkt olarak etki edebilecek yeterli enerjiye sahiptirler. Bu sayede biyolojik makromoleküllerden elektron ayrılabilir ya da bunları pozitif yükü yükleyebilirler. Bu durum DNA’da tek ve çift zincir kırılmalarına ve baz ya da şeker omurgada modifikasyonlara sebep olur (Yokuş ve Çakır, 2012). Genellikle normal hücrelerin çoğalmasında rol oynayan proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlara anormallikler eşlik eder. Zamanla, hücredeki mutasyonların sayısı artar. DNA mutasyonlarındaki hatalar, onları onaran genlerde mutasyonlar oluşmaya başladığı için telafi edilemez. Bunun sonucu olarak mutasyonlar ve anormallikler birlikte büyümeye başlar (Cairns, 1975). Hücrede meydana gelen anormallikler, hücre bölündükten sonra yeni hücrelere aktarılır. Bazı hücreler mutasyonlardan öldüğü için, yeni hücreler daha hızlı değiştirilir. Bu hızla büyüyen hücreler istilacı hale gelir ve vücudun başka yerlerinde hücre metastazı yaparak orada bir tümör oluşturur (Petitjean ve diğerleri, 2007).

Hücrelerin büyümelerini ve çoğalmalarını engellemek için görevli olan farklı tümör baskılayıcı genler bulunmaktadır. Bu genlerden ikisi RB (retinoblastoma) ve TP53 proteinlerini kodlamaktadır. Bu iki tümör baskılayıcı protein, hücrelerin sayısının artması, yaşlanma, apoptoz programlamalarını yöneten anahtar tamamlayıcılar ve hücre düzenleyici merkezi kontrol düğmeleri olarak çalışmaktadırlar. RB, genel olarak hücre dışı kaynaklı

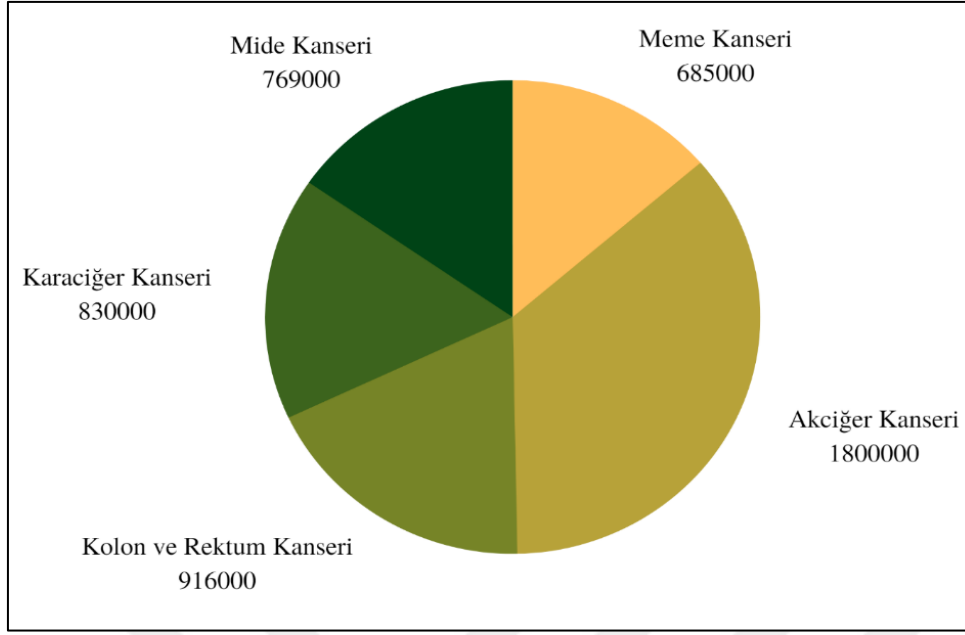
büyümeyle inhibe eden sinyalleri iletirken; TP53, hücre içi işletim sistemleri ile stres sensörlerinden bilgi almaktadır. Genomda büyük bir hasar ortaya çıkarsa veya optimum koşullar sağlanmazsa TP53 proteini, şartlar normale dönene kadar hücre döngüsünün ilerlemesini durdurabilmektedir. Eğer ortaya çıkan hasarlar onarılamaz durumda ise, yine TP53 proteini apoptozu tetikleyebilmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyon, tümör oluşumuna sebep olmaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012).

Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) verilerine göre, Dünya’da 2020 yılında en fazla görülen kanser çeşitleri prostat, mide, kolon, akciğer, rektum, prostat, mide ve cilt kanserleri olarak bildirilmiştir (Şekil 2.2) (WHO, 2020).



Şekil 2.2. 2020 yılında dünyada en fazla görülen kanser vakaları (WHO, 2020)

Dünyada en çok ölüme yol açan kanser çeşitleri ise akciğer, meme, kolon ve rektum, karaciğer ve mide kanseridir (Şekil 2.3) (WHO, 2020). Türkiye’de ise 2020 yılında en fazla görülen kanser çeşitleri akciğer, meme, kolon, prostat, tiroid, mide, mesane, pankreas, kan ve lenf olarak bildirilmiştir (WHO, 2021). 2020 yılında Türkiye’de; 233 bin yeni kanser vakasının ve kansere bağlı 126 bin ölümün meydana geldiği bildirilmiştir (Sung ve diğerleri, 2021).



Şekil 2.3. 2020 yılında dünyada en fazla ölüme neden olan kanser çeşitleri (WHO, 2020)

Dünya Sağlık Örgütünden elde edilen verilere göre, yeni kanser vakalarında kadınlarda en önde meme kanseri yer alırken, erkeklerde ise ilk sırada akciğer kanseri yer almaktadır. Ölümle sonuçlanan kanser vakalarında ise kadınlarda ilk sırada meme, daha sonra sırasıyla akciğer ve kolon kanseri yer alırken; erkeklerde ilk sırada akciğer kanseri, daha sonra sırasıyla karaciğer ve kolon kanseri gelmektedir (Sung ve diğerleri, 2021). IARC tarafından (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı), kanser vakalarındaki rakamların artarak devam etmesi halinde, Dünya’da yeni kanser sayılarının 2040 yılına kadar 30,2 milyona ulaşabileceği bildirilmiştir (WHO, 2021).

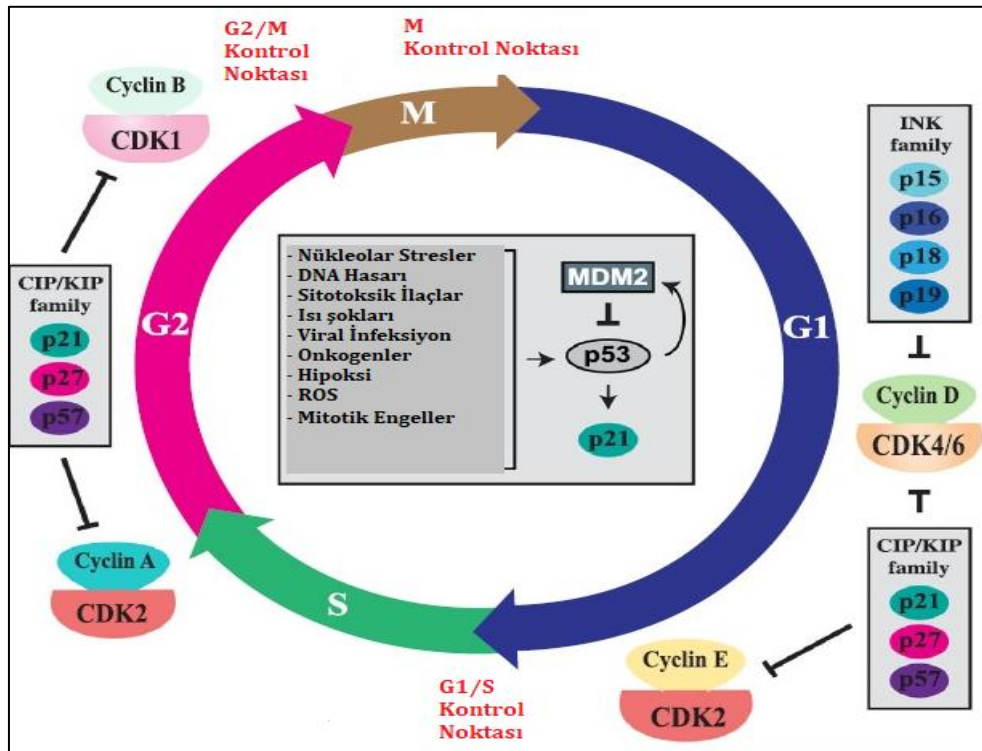
2.1.1. Hücre döngüsü ve kanser

Tek hücreli ve çok hücreli ökaryotlarda, hücre bölünmesi, bir hücrenin hücre döngüsüne girmesine izin verilmeden ve bölünmek üzere ilerlemeden önce hiçbir hata yapılmamasını sağlamak için karmaşık bir düzenleyici mekanizmalar, kontroller ve dengeler ağı tarafından kontrol edilir (Matthews, Bertoli ve Bruin, 2022).

Hücre döngüsünün, büyüme fazı 1 (G1), DNA replikasyonu veya sentez fazı (S), büyüme fazı 2 (G2) ve mitotik faz (M) olacak şekilde birbirini takip eden dört ardışık aşaması vardır (Şekil 4). Bu farklı fazlar boyunca ilerleme, aktiviteleri ortak siklinler tarafından pozitif olarak düzenlenen sikline bağımlı kinazlar (CDK'ler) ve negatif olarak düzenlenen sikline

bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI'ler) tarafından yönlendirilir. Uygun hücre bölünmesi, hücre döngüsünün ana olaylarının sırasını, bütünlüğünü ve aslına uygunluğunu izleyen hücre döngüsü kontrol noktaları tarafından da kontrol edilir (Lee ve Nurse, 1987). Ayrıca, mitojenik ve antimitojenik sinyalleri entegre eden çok sayıda düzenleyici yol, hücre döngüsünün kontrolünde yer alır (Morrison, 2012). Bu döngü, interfaz sırasında hücresel içeriğin kopyalanmasına ve bunun mitozda genetik olarak özdeş iki yavru hücreye ayrılmasına izin verir.

Hücre döngüsünü oluşturan karmaşık düzenleyici öğeler ağının genomik DNA'nın zamanında ve doğru şekilde kopyalanması ve ayrıştırılması gibi tek bir amacı vardır (Matthews, Bertoli ve de Bruin, 2022). Hücre döngüsünü denetleyen mekanizmalar, evrimsel süreç içinde canlı organizmaların tamamında oldukça iyi korunmuşlardır. Siklinler ve onların katalitik ortakları olan siklin bağımlı kinazlar (CDK'ler), hücre döngüsünün farklı fazları arasındaki geçişi kontrol eder. CDK/siklin aktivitesi, CDK ile etkileşime giren protein/kinaz inhibitör protein (CIP/KIP) ailesi ve kinaz inhibitörü (INK) ailesini içeren CDK inhibitörleri (CKI'ler) tarafından düzenlenir (Şekil 2.4), (Bury, Le Calvé, Ferbeyre, Blank ve Lessard, 2021).



Şekil 2.4. Hücre döngüsünün ilerlemesi ve düzenlenmesinde görevli mekanizmalar (Bury ve diğerleri, 2021)

Hücre döngüsü, siklin bağımlı kinazlar (CDK'ler) ve kinaz aktivitesini ve substrat özgüllüğünü zamanında kontrol eden, siklinler olarak bilinen düzenleyici alt birimler tarafından düzenlenir. Çoklu CDK-siklin kompleksleri hücre döngüsünün ilerlemesinde, üç interfaz CDK'sı (CDK2, CDK4 ve CDK6), bir mitotik CDK (CDK1) ve dört farklı sınıf (A-, B-, D- ve E-tipi) siklinden oluşur (Şekil 4). CDK'lerin aktivitesi, iki farklı sikline bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) ailesi tarafından negatif olarak düzenlenir: yapısal olarak ilişkili dört protein ($p16^{\text{INK4A}}$, $p15^{\text{INK4B}}$, $p18^{\text{INK4C}}$ ve $p19^{\text{INK4D}}$) içeren kinaz inhibitörü (INK) ailesi ve üç proteinden ($p21^{\text{Cip1}}$, $p27^{\text{Kip1}}$ ve $p57^{\text{Kip2}}$) oluşan CDK etkileşimli protein/kinaz inhibitör protein (CIP/KIP) ailesi. CDK4 ve CDK6'yı spesifik olarak etkisiz hale getiren INK ailesinin üyelerinin aksine, CIP/KIP proteinleri, hücre döngüsünü yönlendiren tüm CDK'ları bağlayabilir (Şekil 4). DNA hasarı, sitotoksik ilaçlar, viral enfeksiyon gibi bir dizi hücrel stres uyarısına yanıt olarak, aktivasyonu MDM2 geni tarafından düzenlenen bir tümör baskılayıcı gen olan p53, p21'in indüklenmesi yoluyla hücre döngüsünde önemli bir rol almaktadır (Şekil 4). Düzensiz CDK aktivitesinin çeşitli kanserlerde ve yaşlanmayla ilişkili hastalıklarda yaygın olduğu göz önüne alındığında, son 20 yılda birkaç küçük molekülü kinaz inhibitörleri geliştirilmiştir. Bu inhibitörler şu anda iki sınıfa ayrılmıştır. Birinci sınıf daha geniş gen ailesini hedefleyenler; çoklu CDK'lerin birinci (flavopiridol ve roscovitine) ve ikinci nesil (dinaciclib ve AT7519) inhibitörleri, ikinci sınıf ise CDK4/6 seçici olanlar; palbociclib, ribociclib ve abemaciclib gibi üçüncü nesil inhibitörlerdir (Şekil 2.4).

Hücre döngüsünde meydana gelen bozukluklar, kanseri karakterize eden anormal hücre çoğalmasının temelini oluşturur ve genomik kararsızlığı teşvik eder (Williams ve Stoeber 2012). Kanser, genel olarak hücre döngüsünün bir hastalığı olarak da kabul edilmektedir, bu sebeple hücre döngüsü bozulmasının tümör gelişimi sırasında en fazla görülen değişikliklerden biri olması şaşırtıcı değildir (Park ve Lee, 2003). Normal şartlar altında büyümeyi denetleyen mekanizmalar homeostazı sağlamayı amaçlamaktadır. Sağlıklı somatik hücreler, yalnızca büyüme sinyallerini aldıklarında çoğalırken, kanserli hücreler ise bu sinyallere gereksinim olmaksızın kontrolsüz bir şekilde sayısını artırabilmektedir. Mutasyonlar veya mutasyonların sebep olduğu bozukluklar sonucunda kontrolsüz hücre bölünmesi tetiklenmektedir (Williams ve Stoeber, 2012). Hücre döngüsünün denetiminde ortaya çıkan bu bozukluklar ile tümör oluşumu arasındaki bağlantı, insan tümörlerinin moleküler analizlerini içeren çok sayıda çalışma sonucunda ortaya konulmuştur. Memeli hücrelerinde çok sayıda farklı molekül hücre döngüsünün kontrolünde rol almaktadır. Bu moleküllerin oluşturduğu kompleksler, döngünün başlatılmasını, devam etmesini ve sona

ermesini sağlamaktadır (Park ve Lee, 2003). Dolayısıyla hücre döngüsünü denetleyen molekül ve mekanizmalar tümör oluşumunu direkt olarak etkileyebilmektedir.

2.1.2. Antioksidanlar ve kanser

Oksidasyon biyolojik olarak enerji üreten bir reaksiyon olmasına rağmen, oksidatif stres hücre için zararlı bir etkiye sahiptir. Çünkü serbest radikaller, peroksitler hücresel yapılara zarar vererek çeşitli rahatsızlıklara yol açar. DNA hasarı, kanserin gelişiminden ve ilerlemesinden birinci derece sorumludur. Ayrıca, süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, glutatyon S-transferaz gibi çeşitli enzimler antioksidan görevi görür ve oksidatif stresi etkiler. Bu enzimlerdeki polimorfizmlerin DNA hasarı ve ardından kansere yatkınlık riski ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Asaduzzaman Khan, Tania, Zhang ve Chen, 2010).

Oksidatif stres, DNA hasarının indüklenmesi nedeniyle karsinogenez ve hücre içi sinyal iletimi üzerindeki etkileri üzerinde önemli bir rol oynar (Frederiks, Bosch, Hoebe, van Marle ve Langbein, 2010). Reaktif oksijen türleri (ROS) tüm DNA hasarı biçimlerini (modifikasyonlar, sarmal kırılması ve DNA-protein çapraz bağları) indükler (Hussain ve diğerleri, 2000).

Doğrudan veya dolaylı olarak, bu kimyasal oksijen türleri geçici veya kalıcı olarak nükleik asitlere, lipidlere ve proteinlere zarar verir. Bu hücresel makromoleküllerdeki oksidatif hasar, kanser (Mayne, 2003) dahil olmak üzere birçok hastalığın oluşumu sürecinde rol oynamaktadır. Vücut kendini korumak için glutatyon, E vitamini ve C vitamini gibi çoklu antioksidan türlerinin yanı sıra süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon S-transferaz (GST) gibi enzimlerin karmaşık sistemlerini korur (Bagchi ve Puri, 1998). Bu bileşenler veya enzimler, zararlı oksidatif hasarı önlemek için çoklu biyokimyasal reaksiyonlarda yer alır. Kuşkusuz, bu enzimlerin genetik polimorfizmleri ve farklı ekspresyon seviyeleri, bireyin DNA hasarına ve kanser riskine duyarlılığı ile ilişkilidir (Asaduzzaman Khan, Tania, Zhang ve Chen, 2010).

Prooksidan /antioksidan oranındaki değişim organizmanın oksidatif stres durumunu ortaya koymaktadır. Bu orandaki prooksidanlar lehine meydana gelen değişim oksidatif stresin ortaya çıktığını göstermektedir. Oksidan karsinogenler, karsinogenezisde önemlidirler.

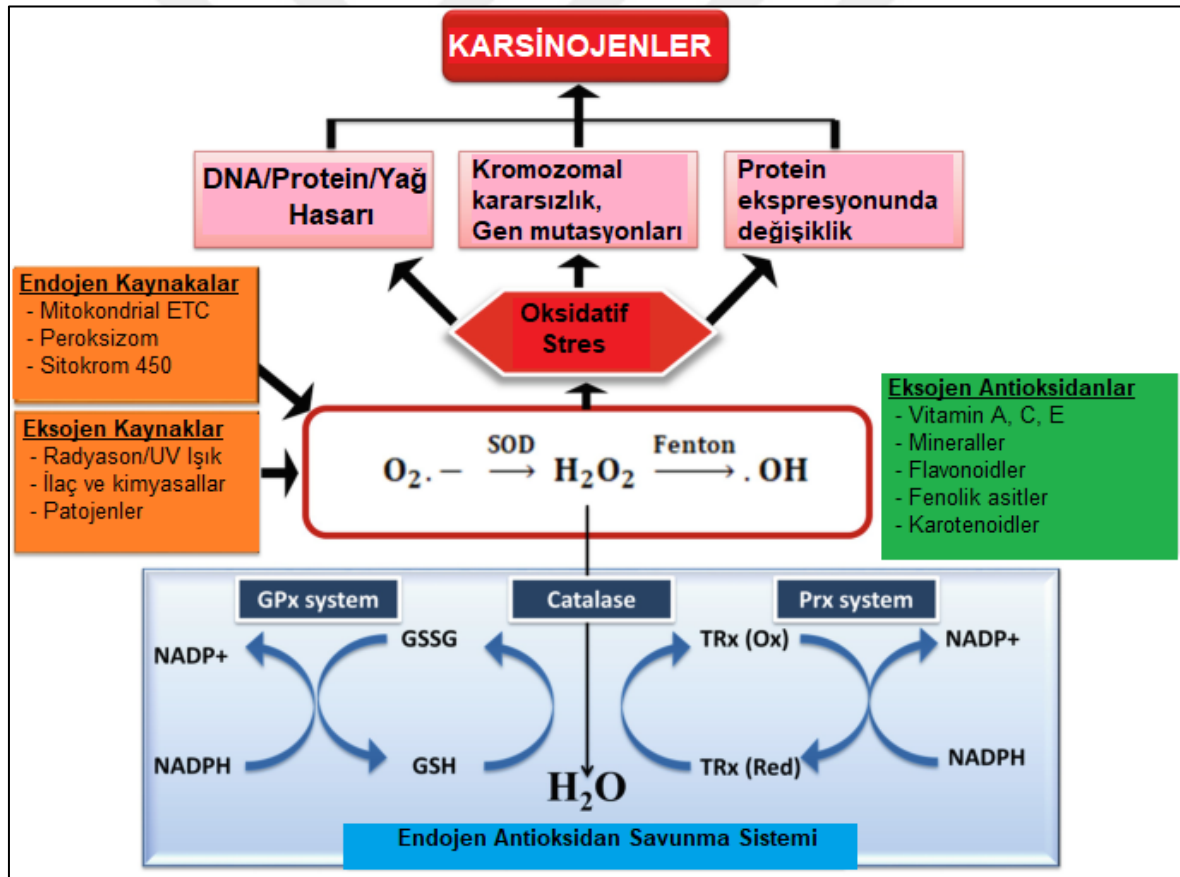
Organizmanın çevresinde çok miktarda bulunabileceği gibi dokularda da dönüşüm yoluyla ortaya çıkmaktadırlar. Oksidanlar kanserin başlamasına, ilerlemesine ve gelişimine yol açmaktadırlar. Vücudumuzda bu radikallerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlara ‘antioksidan savunma sistemleri’ adı verilmektedir (Altan, Dinçel ve Koca, 2006).

Antioksidan savunma sistemleri arasında bulunan katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon oksidatif hasara karşı vücudu korumaktadırlar (Franco, Schoneveld, Georgakilas ve Panayiotidis, 2008). Antioksidanlar, hücreleri, dokuları serbest radikal hasarından koruyan veya serbest radikallerin etkisini nötralize eden moleküllerdir. Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanların etkisini nötralize eder (Memişoğulları 2005).

1. Temizleme etkisi: Enzimler tarafından yapılan bu etki hücre ve dokulara zararlı etkileri olan oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklindedir.
2. Baskılama etkisi: Flavonoid ve vitaminler tarafından yapılan bu etki oksidanlara hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklindedir.
3. Onarma etkisi
4. Zincir koparma etkisi: E vitamini, hemoglobin, seruloplazmin tarafından yapılan bu etki oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklindedir.

Serbest radikaller, canlı organizmalarda DNA'ya, lipidlere, proteinlere zarar veren çok zararlı radikallerdir. Endojen radikal kaynakları mitokondriyal elektron taşınması, fagositoz, araşidonik asit metabolizması ve enzim reaksiyonlarıdır. Radyasyon, sigara dumanı, ozon, UV ışığı, kimyasallar, ilaçlar ve metaller radikallerin eksojen kaynaklarıdır. Serbest radikaller, antioksidan savunma adı verilen organizma savunması ile zararsız olabilir. Bazen radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki denge bozulabilir. Bu sırada radikaller dokulara zarar verir ve oksidatif stres dokulara zarar verir. Oksidatif stres ile kanser, ateroskleroz, hipertansiyon, astım, diabetes mellitus, Alzheimer, Parkinson ve romatoid artrit gibi birçok hastalık meydana gelir. Vücudumuzda doğal olarak yer alan antioksidanlar ve dışarıdan çeşitli yollar ile alınan antioksidanlarla bu rahatsızlıkların önüne geçilmesi ve tedavilerinin yapılmasına dair çok sayıda çalışma mevcuttur. Eksojen antioksidanlardan olan E, C ve A vitaminleri, flavonlar, likopen, eser elementler, tiol bileşiklerinin giderek önemi atmaktadır (Kasapçopur ve Birdane, 2014).

Endojen veya eksojen faktörler tarafından üretilen ROS, DNA, proteinler ve lipitlere zarar verebilir, bu da bazı anahtar genlerdeki mutasyonlar yoluyla normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine yol açabilir (Sammar, Abu-Farich, Rayan, Falah ve Rayan, 2019). Kanser gelişimi ve ilerlemesi aynı zamanda dengesiz bir redoks dengesinden, endojen ROS üretiminden, DNA hasarından, hücre apoptozunun önlenmesinden ve doğuştan gelen hücre savunma sisteminden de kaynaklanabilir ve sonuç olarak daha yüksek hücre sağkalımına yol açar (Galaris, Skiada ve Barbouti, 2008; Jambunathan, Bangarusamy; Padma ve Sundaravadivelu, 2014; Sammar ve diğerleri, 2019). Gelişen bu durum nedeniyle, antioksidanlar, kanser hücrelerinin gelişimini ve çoğalmasını önlemek veya inhibe etmek için terapötik ajanlar olarak aşırı hücre içi ROS üretimini hedefler (Fuchs Tarlovsky, 2013; Sammar ve diğerleri, 2019) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Antioksidanlar ve kanser ilişkisi (Wahabi, Perwez ve Rizvi, 2022)

Kanserin ileri bir aşamaya ilerlemesini önlemek için önerilen yollar arasında, doğal olarak oluşan ajanlar veya sentetik ajanlar kullanarak oksidatif stresi azaltarak kanserin ilerlemesini önlemek ve kanser riskini azaltmak çok ilginçtir (Bennett, Rojas ve Seefeldt, 2012). Aşırı

ROS üretimi, nükleik asitlere, proteinlere veya lipitlere zarar veren karsinogenez ile ilişkilendirilmiştir. Karsinogenez sırasında DNA zincir kırılmaları ve anormal DNA bağlarının oluşumu gözlemlenmiştir (Klaunig ve Kamendulis, 2004; Bennett ve diğerleri, 2012). Kanseri önleme veya tedavi etme çabaları, araştırmacıları oksidatif stres ile karsinogenez süreci arasındaki bağlantıyı tanımlamaya ve olası kimyasal inhibitör bileşikler ve antioksidan aktiviteye sahip bileşikler araştırmaya yöneltmiştir (Khan, Afaq ve Mukhtar, 2008; Bennett ve diğerleri, 2012). Antioksidanlar, serbest radikaller üreten antikanser ilaçlarla onkojenik değişikliklere karşı koruma sağlar. Antioksidanlar, radyasyon ve kemoterapinin ağırlı yan etkilerini azaltmakta ve böylece antioksidanların faydalı etkilerini desteklemektedir (Borek, 2004).

Antioksidanlar, tedavi esnasında ve bazı kanserlerin tedavisinde sağlıklı hücrelerin korunmasında adjuvan olarak çalışırlar. Yapılan deneysel çalışmalar, antioksidanların kanser hücrelerini apoptoz yoluyla seçici olarak etkisizleştirdiğini, tümör anjiyogenezini ve metastatik büyümeyi inhibe ettiğini ve normal hücrelerde apoptozu önlediğini göstermektedir (Borek, 2004). Kalıtsal tümör baskılayıcı genlerdeki (örn. p53 veya PTEN) eksiklikler nedeniyle kanser geliştirme riski yüksek olan kişilerde, antioksidan tedavi, tümör gelişimini geciktirmede ve hatta önlemede etkili olabilir (Fuchs-Tarlovsky, 2013).

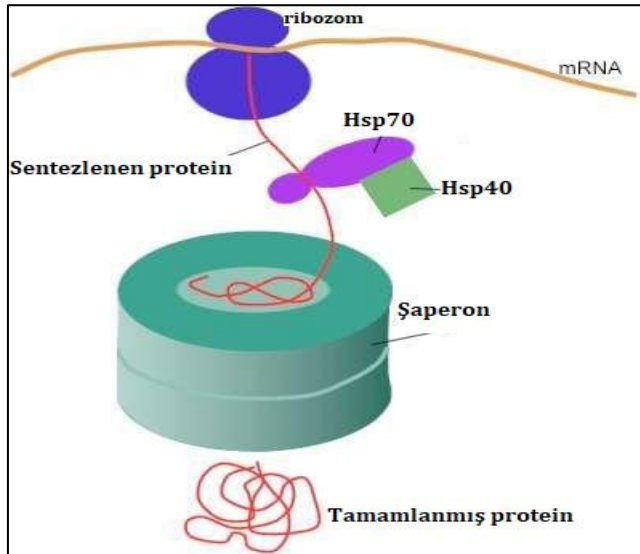
Hipoksi, vücutta oksijen radikallerin meydana gelmesine ve bunun sonucunda oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır. Hipoksi ayrıca kanser tedavisi için kullanılan antikanser ilaçların etkinliği üzerine etki ederek çoklu ilaç direnci (MDR)'ni tetikleyebilmektedir (Wang ve diğerleri, 2017). Ek olarak hipoksi, MDR'nin ortak bir mekanizması olan hücre içi kemoterapötik ajanları pompalayan ABCB1 ve ABCG2'nin ekspresyonunu indükleyebilir (Badowska-Kozakiewicz, Liszcz, Sobol, Patera ve Badowska, 2017). Bu nedenle, oksidatif stresi hedeflemek, kanserde MDR'nin üstesinden gelmek için umut verici bir strateji olarak kabul edilir (Ye ve diğerleri, 2019).

Antioksidanlar, serbest radikalleri söndürme yetenekleri sayesinde çeşitli insan hastalıklarında yararları açısından en çok araştırılan konulardandır. Bununla birlikte son yıllarda literatürün önemli bir kısmı, antioksidanların kansere karşı yararlı veya zararlı etkilerine ilişkin tartışmalara vurgu yapmıştır. Antioksidanların kanser hastalarında kullanımının yanı sıra antioksidan takviyelerinin gelişigüzel reçetelenmesi konusunda dikkatli olunması önerilmiştir. Yapılan çalışmalar ile antioksidan takviyeleri yerine en uygun

antioksidan kaynağı olarak bitki kaynaklı gıdalara güvenmenin daha gerçekçi olacağı belirtilmiştir. Aynı zamanda, kanseri önlemede yeni antioksidanların geliştirilmesindeki fırsatları tespit etmeye yönelik araştırmaları engelleyebilecek antioksidan takviyelerine karşı aşırı bir tutuma sahip olunmaması da bilim insanları tarafından vurgulanmıştır (Wahabi ve diğerleri, 2022).

2.1.3. HSP'ler ve kanser

Genetik kodun fonksiyonel proteinlere dönüşmesi için yeni sentezlenen polipeptitlerin doğru bir şekilde katlanması gerekir. Şaperonlar olarak da adlandırılan HSP'ler protein olgunlaşmasının bu aşamasında çok önemlidir. Polipeptitlerin ribozom çıkış tüneline çıkmasına ve doğru şekilde katlanmalarına yardımcı olurlar (Şekil 2.6). Proteinin hücre içinde yanlış katlanmasının birçok ciddi hastalığa sebep olduğu tespit edilmiştir. Örneğin Parkinson hastalığı, hücredeki proteinlerin yanlış katlanmasından kaynaklanan hastalıklardan biridir. Bu riskler nedeniyle hücreler, uygun protein katlanması için özel bir moleküler şaperon sistemi geliştirmiştir (Young, Agashe, Siegers ve Hartl, 2004). Şaperon ve HSP adları genel olarak aynı anlamda kullanılırsa da şaperon proteinler gibi aktivite göstermeyen bazı HSP'ler ve tam tersi olarak HSP ailesine dahil olmayan bazı şaperonlar da söz konusudur (Thomas ve diğerleri, 2005).



Şekil 2.6. HSP'lerin protein şekillenmesindeki görevi (Sarkar ve Roy, 2017)

Isı şok proteinleri ilk defa 1962 yılında tanımlanmıştır. Hücrelerin yüksek ısıya (42-46°C) maruz kalmasıyla üretiminde artış meydana gelen bir protein grubudur (Aufricht, 2005). Hsp üretiminde artışa ısı faktörü dışında yol açan başka faktörlerde söz konusudur. Bunlardan bazıları açlık, hipoksi, arsenik, eser metaller, enfeksiyon, inflamasyon, etanol, arsenik, ultraviyole ışık gibi birçok toksin, nitrojensizlik (bitkilerde) ve dehidratasyondur. Bu nedenle HSP'lere "stres proteinleri" ismi de verilmekte ve strese karşı verilen cevabın bir komponenti olarak da görülmektedirler (Aufricht, 2005; Morimoto ve Santoro, 1998; Petrof, Ciancio ve Chang, 2004). HSP'ler ilk defa *Drosophila melanogaster*'in tükürük salgısında, ısı şokuna maruz kalmış sentezi artan polipeptidler olarak Ferruccio Ritossa tarafından tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma aynı zamanda hücrenin strese karşı bir cevap ürettiğini gösteren ilk çalışmadır (Aufricht, 2005).

Biyolojik düzeyde hemen hemen her canlıda bulunan HSP'ler normal hücre fonksiyonlarında oldukça önemlidir. Bu fonksiyonlardan birisi de hücre döngüsünün devamlılığıdır. HSP'ler tarafından gerçekleşen korunma, apoptoz mekanizmasının baskılanmasını da içermekte fakat bu durumun tam olarak nasıl gerçekleştiği bilinmemektedir. HSP'lerin temel olarak hücrede gerçekleşen birçok önemli olayda rolleri bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak sitoproteksiyon, nörodejeneratif bozukluklar, sinyal iletimi ve kanser immünolojisi verilebilir (Öztürk, Kahveci, Özlük ve Yılmazlar, 2009).

Isı şoku proteinleri bulaşıcı, otoimmün ve kalp hastalıkları gibi çeşitli patolojik durumda rol oynar. Karsinogenez üzerindeki etkileri, apoptoz, hücre yaşlanması, immün aktivasyon ve metastatik gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi antikanser mekanizmaların baskılanması gibi mekanizmalar yoluyla elde edilir. Isı şoku protein inhibitörleri, kansere özgü proteinleri hedef almaları ve otonomik büyümeyi engellemeleri nedeniyle kanser tedavisinde önemli bir yer tutmaya başlamıştır (Öncel, 2012).

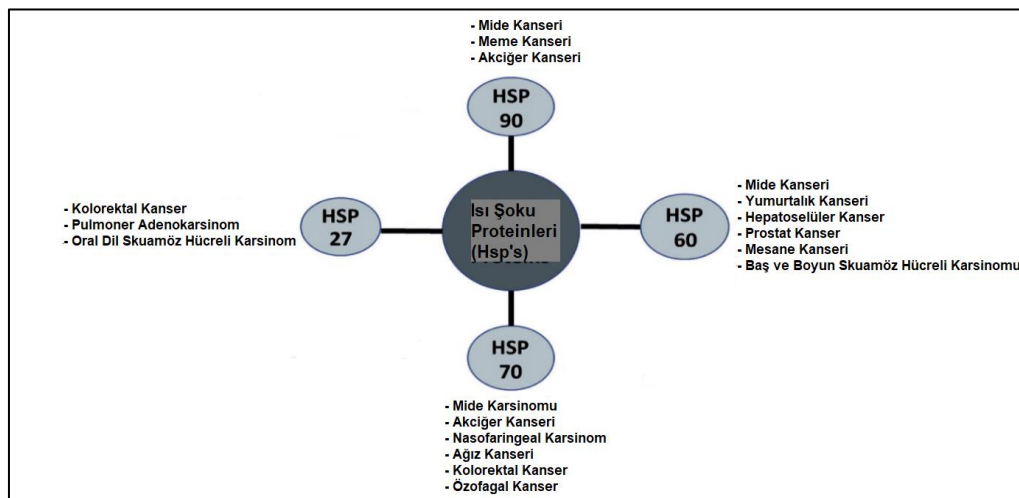
Çizelge 2.1. Isı şoku protein ailelerinin sınıflandırılması (Ikwegbue, Masamba, Oyino ve Kappo, 2017)

HSP	Lokalizasyon	İşlev
HSP 10	Mitokondri	Endometriyal kanserde biyobelirteç görevi görür ve protein katlanmasına yardımcı olur.
HSP27	Sitosol, Endoplazmik retikulum ve çekirdek	Denatüre proteinlerin yeniden katlanmasını kolaylaştırır (şaperon aktivitesi) ve kanser gibi birçok hücrel hastalıkta biyobelirteç görevi görür.
HSP 40	Sitozol	HSP70'e protein katlanmasında yardımcı olur (HSP70'in koşaperonu).
HSP 60	Sitoplazma ve mitokondri	Protein katlanmasına yardımcı olur, hetero-oligomerik kompleksin oluşumu yoluyla protein agregasyonunu ve katlanan proteinlerin toplanmasını önler.
HSP 70	Sitoplazma ve çekirdek	Protein katlanmasına, yeniden katlanmasına ve bozulmasına yardımcı olur. Ayrıca sinyal iletimini kolaylaştırır ve miyozin katlanmasının yanı sıra kanser ve sarkomer oluşumunda önemli roller oynar.
HSP 90	Sitoplazma	Protein katlanmasına, yeniden katlanmasına ve bozulmasına yardımcı olur. Ayrıca sinyal iletimini kolaylaştırır ve miyozin katlanmasının yanı sıra kanser ve sarkomer oluşumunda önemli roller oynar.
HSP 100	Sitoplazma	Toplanmış veya yanlış katlanmış proteinleri yeniden katlamak için diğer HSP'lerle kompleksler oluşturur.
HSP 110	Sitosol ve çekirdek	Bağışıklık yanıtına yardımcı olur ve protein yeniden katlanmasını ve stres altında hücre hayatta kalmasını desteklemek için HSP70 ile kompleksler oluşturur.

HSP proteinlerin moleküler ağırlıkları 7 ile 110 kDa arasında değişiklik göstermektedir. Bulundukları konumlar intraselüler, ekstraselüler, plazma membranı gibi hücrenin farklı departmanları olabilmektedir. HSP proteinlerinin isimlendirmesi de molekül ağırlıklarına göre yapılmıştır. Bilinen önemli HSP'ler: HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP27 ve HSP10 şeklindedir (Çizelge 2.1) (Ikwegbue ve diğerleri, 2017).

HSP70 ve HSP90 içlerinde NF-kB, p53, v-Src, Raf1, Akt ve steroid hormon reseptörleri bulunan çok sayıda sinyal iletim yolunda transkripsiyon faktörleri, sinyal molekülleri ve kinazları regüle ederek etki etmektedirler (Pratt ve Toft, 2003). Tümör hücreleri malign olmayan kök hücrelerine nazaran aşırı miktarda Hsp üretmektedirler. Bu gözlem tümör hücrelerinin daha çok HSP'ye ihtiyaç duydukları gerçeğini gündeme getirmiştir (Jäättelä, 1999). Kanser hücreleri çok miktarda bozuk protein üretimini engelleyerek kendi ömürlerini uzatmak için bu şaperonlara ihtiyaç duymaktadır.

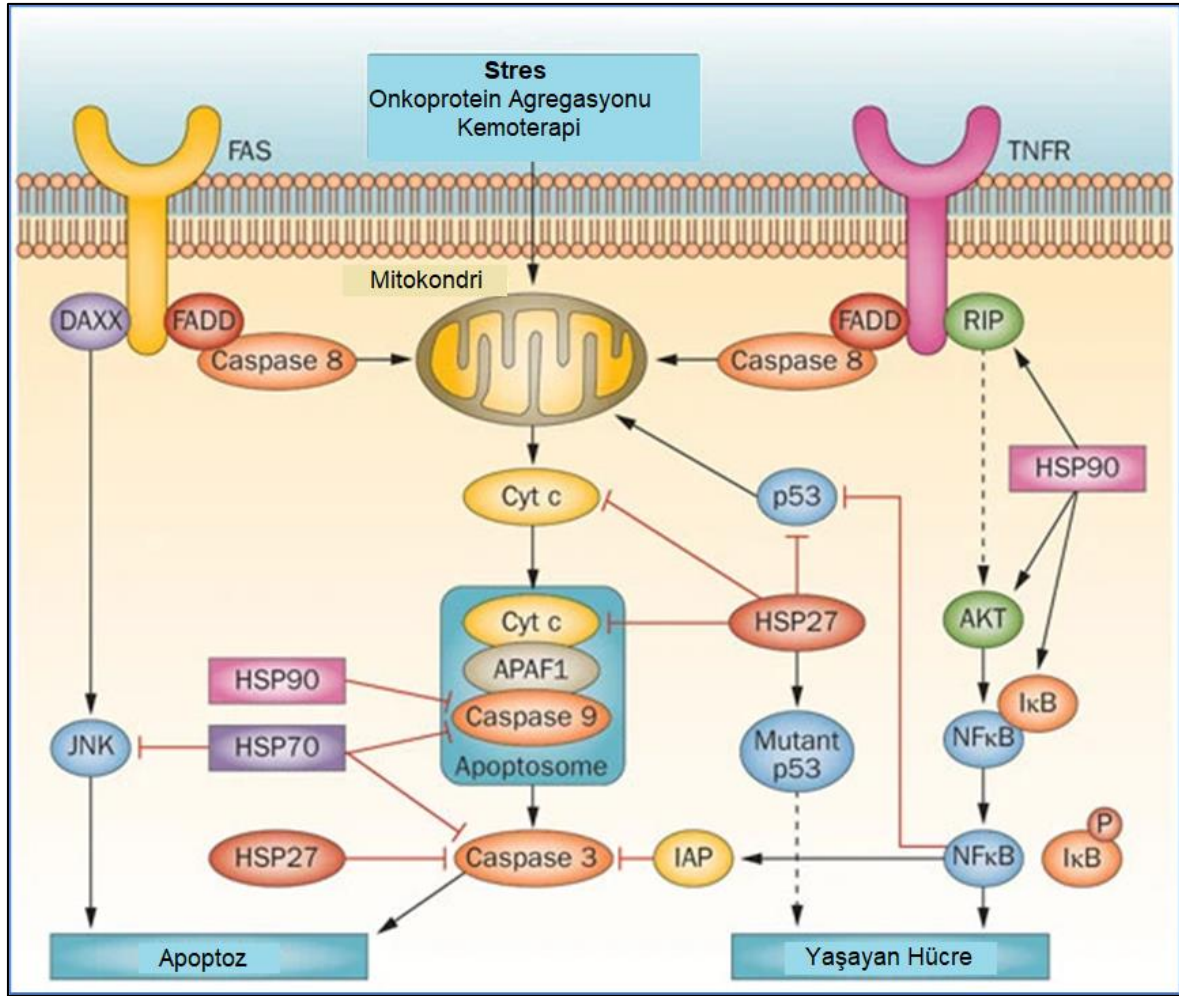
HSP'ler ile ilgili önemli bir nokta da, tümör hücrelerinin yüzeyinde hücreyi doğal katil hücrelere hedef noktası haline getiren HSP72'lerin bulunmasıdır (Westerheide ve Morimoto, 2005). Tümör hücreleri kullanılarak elde edilen ve içerisinde HSP'nin de yer aldığı bazı moleküllerin, canlıdaki immün cevabı artırması mantığına dayanarak pasif kanser aşılı üretilmiştir (Wang, Mao, Teng ve Cao, 2006). Kanserli doku cerrahi olarak çıkarıldıktan sonra kanserli dokuda üretilen peptitleri içeren HSP 24 saat içerisinde işlenerek saflaştırılır ve ardından bu HSP-peptit kompleksi doku alınan kişiye geri enjekte edilir. Kişinin enjeksiyon bölgesindeki antijen sunan hücreler, bu HSP-peptit kompleksini alır ve bunu T hücrelerine sunar. Bu sayede T hücreleri kanserli dokuyu normal dokudan ayırabilir ve vücutta kalan kanser hücrelerini tespit edip yok edebilir. Bu sayede akciğer kanseri, melanom, fibrosarkom, kolon kanseri, hepatom, skuamöz hücreli karsinom, lenfoma ve prostat kanserine karşı başarılı sonuçlar alındığı saptanmıştır (Wang ve diğerleri, 2006). HSP'lerin ayrıca bir dizi anahtar apoptotik faktörü modüle ettiği bilinmektedir. Bu proteinlerin yüksek ekspresyonu, meme, prostat, kolorektal, akciğer, yumurtalık, mide, ağız ve yemek borusu kanseri gibi bir dizi kanserde rapor edilmiştir (Şekil 2.7). Çeşitli kanserler üzerinde, HSP'lerin kanserlerde ümit verici bir özellik olduğunu düşündüren çok sayıda araştırma yapılmıştır. Çeşitli tümörlerdeki ekspresyon profilleri, kanserli hücrelerin çoğalmasına, istilasına, metastazına ve ölümüne yardımcı olduklarını açıklar. Hastalıklı bireylerin serumlarındaki ısı şoku proteinlerinin ve bunlara özgü antikörlerin düzeylerinin saptanması, kanser teşhisinde önemli bir rol oynayabilir. Ayrıca HSP'lerin inhibisyonu, kanserde başarılı terapötik sonuçlara yol açmıştır. Birkaç kanser formunun tedavisi için yeni bir anti-kanser tedavisi olarak hizmet etmiştir (Saini ve Sharma, 2018).



Şekil 2.7. Çeşitli kanser tipleri ile ilgili HSP'ler (Saini ve Sharma, 2018)

HSP90 hücrel proteostazın merkezi düzenleyicisi olarak konumlandırılan, protein kinazlar, transkripsiyon faktörleri ve E3 ubiquitin ligazları dahil olmak üzere çok sayıda substratın olgunlaşmasında yer alan moleküler bir şaperondur. HSP90'ın merkezi hücrel yolları düzenlemedeki önemi nedeniyle, kanser ve nörodejenerasyon gibi hastalıklarda HSP90 mekanizmasının farmakolojik inhibisyonuna yönelik stratejiler geliştirilmektedir (Biebl ve Buchner, 2019). HSP90 hücre büyüme yolundaki birçok reseptörün, protein kinazların ve transkripsiyon faktörlerinin hassas doğasını stabilize etmek için önemlidir. Büyüme sinyalleri, aktif bir konformasyon elde etmek için HSP'yi tetikleyebilir. Dönüşüm sırasında (örneğin, mutasyon), HSP90 ihtiyacı artar. Örneğin; HSP90, HER2'yi etkinleştirir ve stabilize eder. Bunun alt kademe proteinleri (protein kinaz A, c-Src, Raf-1) hücre büyümesi ve bakımında önemli bir rol oynar (Şekil 2.8). HSP90'ları kimyasal inhibitörlerle hedeflemek, reseptör proteinlerinin bozulmasına, G1 tutuklamasının neden olduğu tümör büyümesinin inhibisyonuna ve apoptozun aktivasyonuna yol açar. Bu bulgular, HSP90'ın büyüme sinyalinin önemli bir bileşeni olduğunu göstermektedir (Sherman ve Multhoff, 2007). HSP90'ın kanser hücreesindeki diğer bir işlevi, mutant proteinleri stabilize ederek kümelenmelerini sağlamaktır. Ek olarak, HSP90'ı tamponlayan mutant proteinler de tümör gelişimine katkıda bulunabilir (Sherman ve Multhoff, 2007). HSP90, ısı şokuna karşı duyarsız olması ve düzenleyici proteinlerin işlevinde yetkin olması nedeniyle fenotip ve çevre arasında itici bir rol oynar. HSP90 inhibe edildiğinde hipoksi ve glikoz yoksunluğu belirlenir. Birçok türde HSP90'ın etkisizleştirilmesi, geçici yeni fenotiplerle sonuçlanır (Sherman ve Multhoff, 2007).

Uzun yıllar boyunca HSP60, hücre içi bir şaperon olarak biliniyordu, ancak son araştırmalar onun sadece mitokondride değil, sitozolde de bulunduğunu gösteriyor. Bu şaperon, tümör hücrelerinin veya normal hücrelerin zarında da bulunur. Burada, yüksek miktarlarda HSP60'ın varlığı, dendritik hücrelerin aktivasyonu ve antitümör T hücre yanıtı için önemlidir, çünkü bunlar bağışıklık sistemi için bir tehlike sinyalidir (Thomas ve diğerleri, 2005). HSP60'lar, büyüyen bazı tümör hücreleri için bile gerekli olabilir. Bu proteinin tümördeki yüksek oranı, 1) apoptozda hayatta kalma yeteneği, 2) replikatif yaşlanmanın bozulması, 3) kontrolsüz proliferasyon, 4) neoplastik transformasyon ile ilişkilidir. Ayrıca in vitro çalışmalar, HSP60 eksikliğinin osteosarkom büyümesini baskıladığını göstermiştir (Thomas ve diğerleri, 2005).



Şekil 2.8. Hücre ölüm yollarının Hsp'ler tarafından düzenlenmesi (Ischia ve So, 2013)

70-kDa ısı şoku proteinleri (HSP70'ler), çok çeşitli hücrel protein katlama ve yeniden modelleme süreçlerinde hareket eden her yerde bulunan moleküler şaperonlardır. Sentezden bozunmaya kadar proteinlerin yaşamının neredeyse tüm aşamalarında işlev görürler ve bu nedenle, insan sağlığı için doğrudan etkileri olan protein homeostazını korumak için çok önemlidirler. HSP70 şaperonları yeni sentezlenen proteinlerin katlanması, polipeptitlerin mitokondri, kloroplastlar ve endoplazmik retikulum (ER) translokasyonu, protein komplekslerinin parçalanması ve protein aktivitesinin düzenlenmesi dahil olmak üzere hücrel temizlik faaliyetleri gibi geniş bir yelpazede işlev görmektedirler. Ayrıca HSP70'ler, yanlış katlanmış denatüre proteinlerin toplanmasını önler ve yeniden katlanmasını teşvik eder, kümelenmiş proteinleri çözündürür ve anormal proteinleri ve protein kümelerini temizlemek için hücrel bozunma mekanizmalarında görev alır. Bu nedenle, HSP70'ler, hücreleri çok çeşitli proteotoksik streslerin zararlı etkilerinden koruyan koruyucu şaperonlar olarak işlev görür (Rosenzweig, Nillegoda, Mayer ve Bukau, 2019).

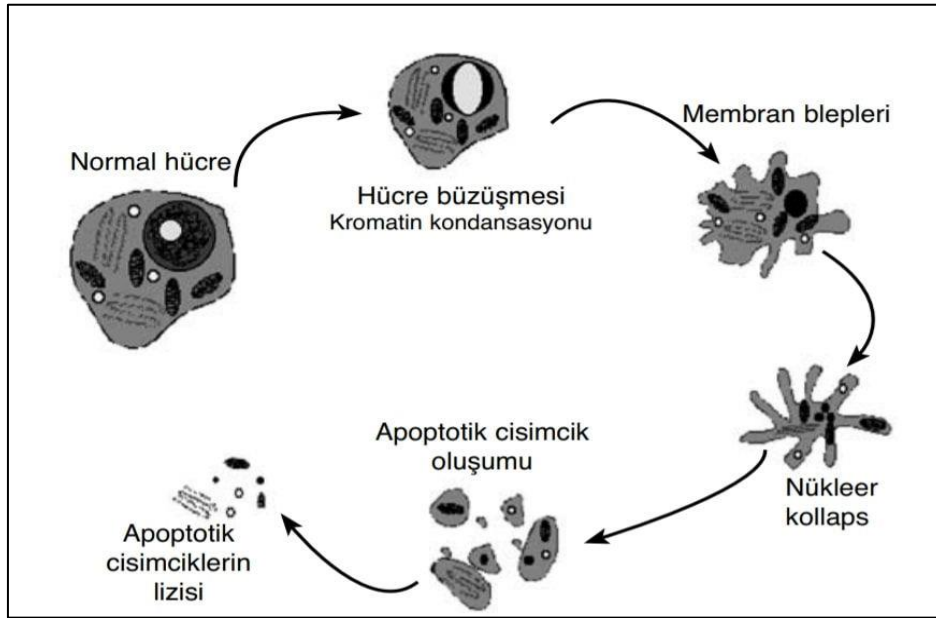
Isı şoku proteini (HSP27), bir protein şaperon ve bir antioksidan görevi gören ve apoptoz ve aktin hücre iskeletinin yeniden şekillenmesinin inhibisyonunda rol oynayan çok boyutlu bir proteindir. HSP27, küçük moleküler ağırlıklı ısı şok proteini (HSP) ailesine (12–43 kDa) aittir. HSP27 ve küçük HSP ailesinin diğer üyeleri, omurgalı göz merceği α -kristalin ile aynı olan korunmuş bir c-terminal alanını, α -kristalin alanını paylaşmaktadır. Hsp27 başlangıçta ısı şokuna yanıt olarak, hasarlı proteinlerin uygun şekilde yeniden katlanmasını kolaylaştıran bir protein şaperonu olarak karakterize edilmiştir. HSP27 ile ilgili devam eden araştırmalar proteinin ısı şoku dışındaki oksidatif stres ve kimyasal stres gibi hücrel stres koşullarına yanıt verdiğini ortaya çıkarmıştır. Oksidatif stres sırasında HSP27, hücre içi glutatyon seviyelerini yükselterek ve hücre içi demir seviyelerini düşürerek reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerini düşüren bir antioksidan görevi görür. Protein hem mitokondriyal bağımlı hem de bağımsız apoptoz yolları ile etkileşime girerek kimyasal stres koşulları altında bir anti-apoptotik ajan olarak işlev görmektedir (Vidyasagar, Wilson ve Djamali, 2012). HSP27 kanser hücrelerinde çok sayıda artmaktadır ve tümör oluşumunda da majör rol oynamaktadırlar. HSP27'nin yüksek miktarda ifade edilmesi apoptozu engellemektedir (Sherman ve Multhoff, 2007).

2.1.4. Apoptoz ve kanser

Apoptoz, DNA'sı hasar görmüş, biyolojik olarak görevini tamamlamış, yapısal elemanları zarar görmüş dokuları ve hücreleri olumsuz olarak etkilemeyecek biçimde ortadan kaldırılmasını gerçekleştiren ve genler aracılığı ile kontrol altında tutulan, gerçekleşmesi için enerjiye ihtiyaç duyulan programlı bir hücre ölümüdür (Dinçel ve Kul, 2016). “Apoptozis, Yunanca’da “ağaç yapraklarının dökülmesi” anlamına gelmektedir. 1972 yılında Kerr tarafından “mitozun karşıt anlamı” olarak tanımlanmıştır (Canpolat, 2016). Embriyonik dönemden başlayarak yaşam boyunca immun sistem, gastrointestinal ve deri gibi birçok doku mitoz hücre ölümü ve apoptozis arasındaki mükemmel bir denge ile sağlanmaktadır (Dinçel ve Kul, 2016).

Hücrede, apoptoz sinyali alındıktan sonra bir takım biyokimyasal ve morfolojik değişimler gözlenmektedir. Öncelikle hücre küçülmeye başlar ve hücre iskeleti dağılıp çekirdek zarı erir ve DNA parçalara ayrılır (Güleş ve Eren, 2008). Tüm süreçlerin sonunda hücre çok sayıda ve farklı boyutlarda apoptotik cisimciklere ayrılır. Apoptoz sonucunda ortaya çıkan bu cisimler makrofajlar ya da parankimal hücreler vasıtasıyla fagositoza uğrayarak ya da

epitel yüzeylerden dökülerek vücuttan uzaklaştırılır. Son basamak olarak, fagositozu gerçekleştiren hücrenin lizozomu tarafından apoptotik cisimciklerle birlikte çekirdek ve sitoplazma kalıntıları otoliz ile sindirilerek ortadan kaldırılır. (Öniz, 2004) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Apoptotik hücre ölümü (Gültekin, Karaoğlu ve Küçükateş, 2008)

Son araştırmalar apoptozu düzenleyen birçok pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteini ortaya çıkarmış olsa da apoptotik yolların moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır ve bu konudaki araştırmalar halen devam etmektedir. Bununla ilgili mekanizmaların açığa çıkartılması, yalnızca apoptozun fizyolojik işlevi hakkında bilgi sağlamakla kalmaz, aynı zamanda apoptozun kanser, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklardaki patofizyolojik işlevini ve bu tür hastalıklarda çeşitli terapötik ajanların keşfini de ortaya çıkarır (Celepli, Bigat, Celepli ve Karagin, 2020). Bir hücrenin apoptoz ile hayatta kalması veya ölmesi, hücre içinde ve çevresinde proapoptotik (stres veya ölüm) sinyaller (Çizelge 2.2) ile anti-apoptotik (mitojenik veya hayatta kalma) sinyaller (Çizelge 2.3) arasındaki denge tarafından belirlenir. Oksijen yoksunluğu, ısı stresi, kimyasal ajanlar, radyasyon, enfeksiyöz ajanlar, genetik bozukluklar, beslenme dengesizlikleri, anafilaksi gibi immünolojik reaksiyonlar ve diğer şiddetli hücre stresi türleri yoluyla oluşacak hücre hasarları, pro-apoptotik yolları başlatır. Apoptozun düzensizliği, hücre büyümesi ve hücre ölümü arasındaki dengeyi etkileyerek organ fonksiyon bozukluğuna ve kanser gibi hastalıklara neden olabilir (O'Brien ve Kirby, 2008).

Çizelge 2.2. Pro-apoptotik araçlar (O'Brien ve Kirby, 2008)

Ajan	Mekanizma
Dış Yol	
TRAIL	Ligand, TNF- α reseptörüne bağlanır.
TNF- α	TNF- α reseptörüne bağlanır; sfingomyelinin seramiden parçalanması
FasL	Fas reseptörüne bağlanır; sfingomyelinin seramide parçalanması
DISC	Kaspaz-8,-10'un aktivasyonu; c-FLIP'i devreye sokar MOMP'yi artırmak için tBid'i ayırır.
TRADD, FADD	Prokaspaz-8, -10'u devreye sokar.
TWEAK	Pro-apoptotik reseptöre bağlanan ligand
NGF	Pro-apoptotik reseptöre bağlanan ligand
İçsel mitokondriyal yol	
Bcl-2 ailesi proteinleri Grup II, III	Çevreden ve hücre içinden çeşitli ölüm uyarılarına aracılık eder; Bcl-2, Bcl-xL'yi devre dışı bırakır, Bax/Bak tetikler.
BH3-only	Bcl-2'yi bağlar ve inhibe eder; Bax/Bak'ı devre dışı bırakabilir.
Bim	Bcl-2'yi bağlar ve inhibe eder.
Bmf	Bcl-2'yi bağlar ve inhibe eder.
Bik, Bad	Kaspaz-8 ile tBid oluşturmak üzere bölünür, bu da Bax'ta kanal oluşumunu tetikleyen mitokondriyal zara girmesine izin vermek için konformasyonel değişikliğe neden olur; ayrıca Bcl-2'yi etkisiz hale getirebilir.
Bid	MOMP'yi artırmak için Bax'ı etkinleştirir.
PUMA, NOXA	Mitokondriyal hasar veya değişiklikler, sitokrom c salınımına ve kalsiyumun ER tükenmesine ve kaspaz 12 aktivasyonuna neden olur.
BH1, 2, 3 etki alanı	
Bax, Bak	
Mitokondriyal maddeler	
AIF	Kaspazdan bağımsız kromatin yoğunlaşmasını ve DNA fragmentasyonunu indükler.
Endo G	DNA'yı parçalar; kaspazdan bağımsız
Smac/DIABLO, HtrA2/Omi	IAP'leri bağlar ve nötralize eder.
Prokaspaz-2,-3,-9	Kaspaz kaskadını başlatır.
Sitokrom c	Mitokondriyal membran potansiyelinde azalmaya neden olabilir; apoptozom oluşturmak için prokaspaz-9 ve Apaf-1 ile bağlanır.
Endoplazmik Retikulum yolu	
Kaspaz (efektör)	TRAF2'nin ayrışması ve kaspaz-12'nin aktivasyonu; sitokrom c salınımı
-3, -6, -7	
Alternatif maddeler	
Granzim B	Efektör ve aktivatör kaspazları aktive eder.
Seramit	Bcl-2'yi inhibe eden mitokondriyal zar üzerinde birikir; sitokrom c salınımına neden olur; kaspaz-9 ve efektör kaspazları aktive eder; Bax'ı etkinleştirir; katepsinleri serbest bırakır.
p53	Bcl-2'nin transkripsiyonunu baskılar; insülin büyüme faktörü bağlayıcı protein-3 olan Bax'ın üretimini indükler; Fas reseptörünü upregüle eder.
Katepsin D	Prokaspaz-3,-9'u etkinleştirir; Mitokondriden sitokrom c salınımı
c-Abl tirozin kinaz	

TRAIL, tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand; FasL, Fas ligandı; DISC, ölüme neden olan sinyal kompleksi; c-FLIP, FLICE benzeri inhibe edici protein; MOMP, mitokondriyal dış zar geçirgenliği; FADD, Fas ile ilişkili ölüm alanı; TRADD, TNFR1 ile ilişkili ölüm alanı; TWEAK, apoptozun TNF benzeri WEAK indükleyicisi; NGF, sinir büyüme faktörü; Bcl-2, B hücreli lenfoma 2; BH3, Bcl-homoloji-3; tBid, Bid, Bax, Bcl-2 ile ilişkili protein x; Bak, Bcl-2 ile ilişkili protein k; Apaf-1, apoptosis aktive edici faktör-1 – prokaspaz 9'u aktive eder; AIF, apoptozu tetikleyen faktör; Endo G, endonükleaz G; Apoptoz proteinlerinin inhibitörü olan IAP'ler; Smac/DIABLO, kaspazların ikinci mitokondriyal türevli aktivatörü – Low pI; apoptoz bağlayıcı proteinin direktör inhibitörü; TRAF2, TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2.

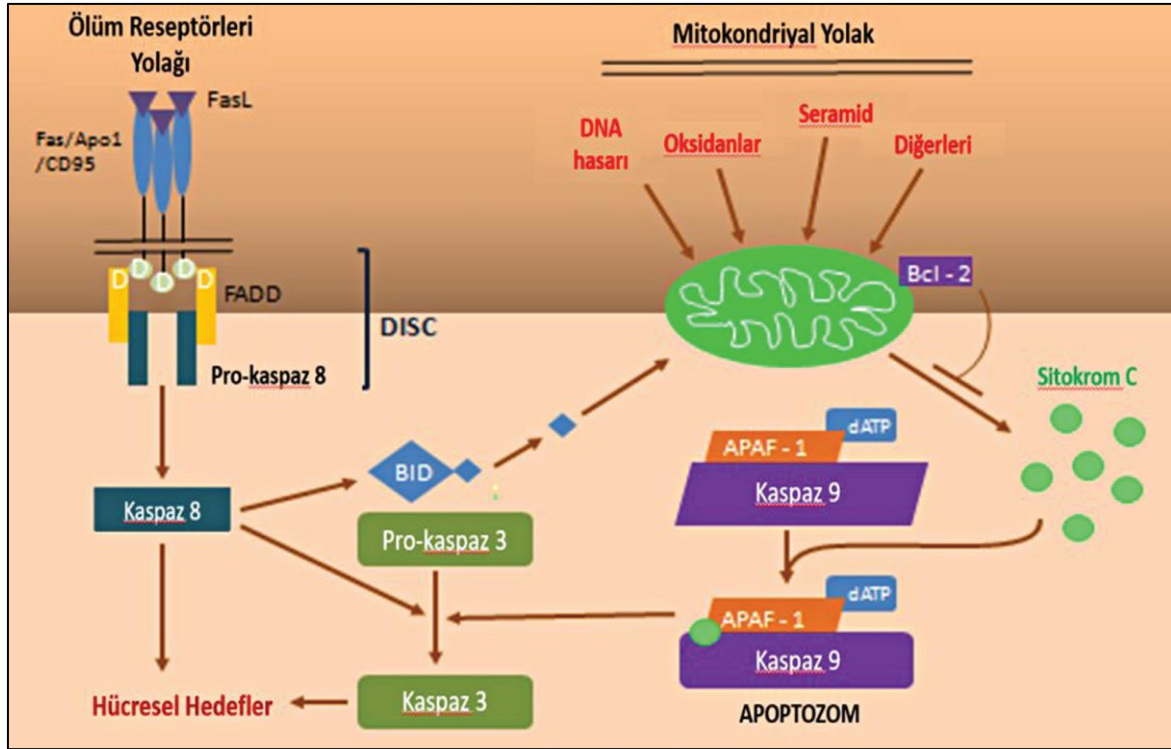
Çizelge 2.3. Anti-apoptotik araçlar (O'Brien ve Kirby, 2008)

Ajan	Mekanizma
İçsel yol Bcl-2 (Grup I), Bcl-xL	Mitokondriyal geçirgenliği kontrol eder. Bax, Bak, granzim B, p53'ü inhibe eder.
Dış yol c-FLIP NF-kB	Kaspaz-8'in çeşitli ölüm reseptörlerine bağlanmasını önler. Anti-apoptotik araçları c-FLIP, IAP'leri yukarı doğru düzenler; büyümeyi hızlandırır, anti-apoptotik gen düzenleyici p65'i aktive eder.
Alternatif yollar IAP Survivin XIAP	Bcl-2'yi taklit eder; kaspaz-9 aktivitesini inhibe eder. Hücre döngüsü mitozunu düzenler; kaspaz-3,-7'yi inhibe eder. Kaspaz-3,-7,-9'u inhibe eder; NF-kB'yi etkinleştirir.
Sitokin reseptörleri JAK, STAT	Sitokin reseptörü etkileşimi, NF-kB'nin aktivasyonu yoluyla hayatta kalma geni üretimini indükler.
MAPK	Çekirdeğe yer değiştirir; anti-apoptotik faktörlerin genetik üretimini indükler.
PKR CDKs, siklinler, CDK inhibitörler	Protein başlatma faktörü 2 alfa ve Ikb kinaz kompleksinin fosforilasyonu; apoptozu geciktirir. Hücre döngüsünü kontrol eder.

Bcl-2, B hücreli lenfoma 2; Bcl-xL, Bcl-2 ile ilişkili protein xL; Bax, Bcl-2 ile ilişkili protein x; Bak, Bcl-2 ile ilişkili protein k; c-FLIP, FLICE benzeri inhibe edici protein; NF-kB, nükleer faktör-kB; Ikb, inhibitör-kB; Apoptoz proteinlerinin inhibitörü olan IAP'ler; XIAP, apoptoz proteininin X'e bağlı inhibitörü; JAK, Janus kinaz; STAT, sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri; MAPK, mitojenle aktive olan protein kinaz; PKR, protein kinaz R; CDK, siklinden bağımsız kinaz.

Patolojik ve fizyolojik apoptozda 5 farklı yol kullanılmaktadır. Bu beş farklı yolun en iyi bilineni, metabolizma ve hipoksik stres tarafından tetiklenen intrinsik yoldur ve ölüm araçları olarak bilinen Fas-L veya tümör nekroz faktörü- α gibi dış uyaranlardır (Şekil 2.10). İç ve dış yolak dışındaki yollar; DNA hasarı üzerine p53 tarafından aktive edilen kaspaz 2'ye bağlı yol, kaspazın doğrudan aktive edildiği granzim B yolu ve DNA parçalanmasını başlatan granzim A yoludur (Grilo ve Mantalaris, 2019).

İntrinsik apoptoz; Genotoksik hasardan kaynaklanan uyaranlar, hücrel organeller veya sinyal platformları, mitokondriyal hasar, aşırı mutajenik uyarı, onkogen kaynaklı hücre ölümü ve büyüme faktörü gibi bazı uyaranların yoksunluğu ile aktive olur. Bu uyaranlar, içsel yolun temel düzenleyici proteini olan BCL-2 proteinlerinin karmaşık bir şekilde düzenlenmesini sağlar. Apoptoz modülasyonunda; belirli organeller, özellikle iyonlar, moleküller, genler, proteinler ve mitokondri yer alır. Hücre içi kalsiyum seviyelerinde bir artış ve pH'ta bir düşüş apoptozu uyarır (Singh, Letai ve Sarosiek, 2019).

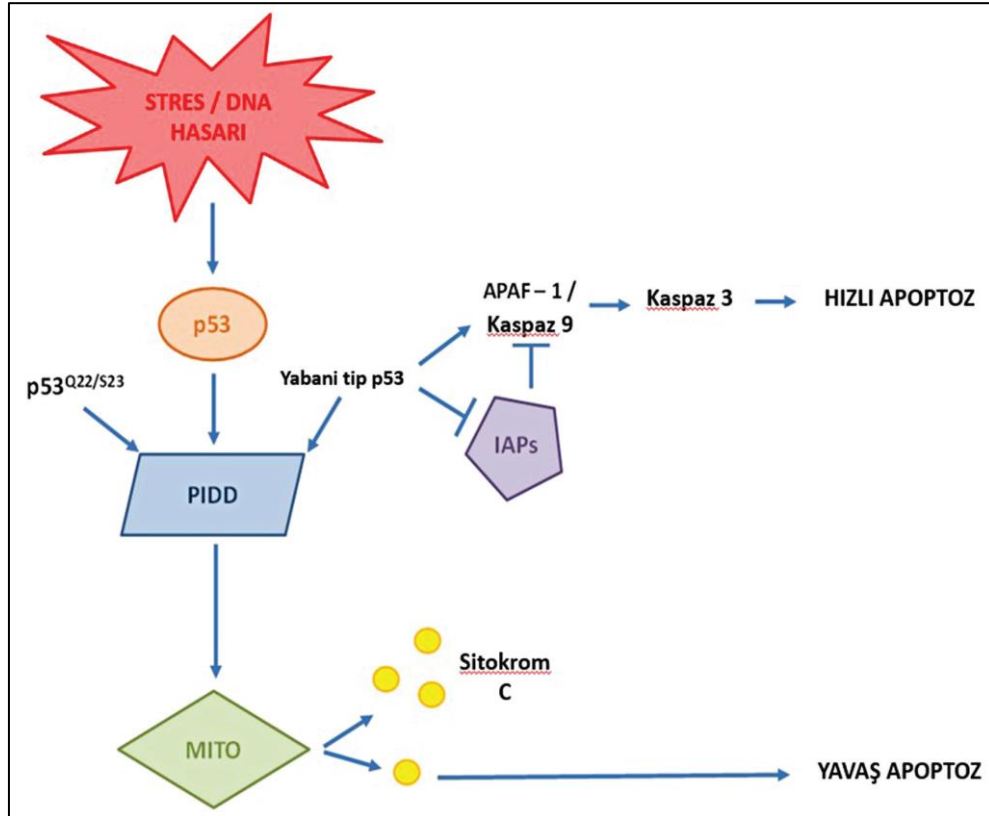


Şekil 2.10. Memeli hücresinde intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar (Grilo ve Mantalaris, 2019).

İntrinsik apoptoz, mitokondriden sitozole hareket eden adaptör protein Apaf-1 ve sitokrom C'nin salınmasıyla inaktif prokaspaz-9'un kaspaz-9'a dönüştürülmesiyle başlar; Ekstrinsik apoptoz, inaktif kaspaz-8'in aktif kaspaz-8'e dönüştürülmesiyle başlatılır ve FasL ve TNF- α , hücre zarı üzerinde sırasıyla Fas ve TNF reseptörlerine bağlanır (Şekil 2.6). İçsel yolda oluşan aktive kaspaz-9 ve dışsal yolda aktive olan kaspaz-8 sırasıyla önce kaspaz-3'ü, sonra kaspaz 6'yı ve sonra 7'yi aktive eder (Elmore, 2007).

Apoptozis mekanizmasında görev alan proteinler; interleukin dönüştürücü enzim, benzeri proteinler ise, Fas, Fas-ligand, BCL-2 ve p53'tür. İntrasellüler asidifikasyon direkt ya da indirekt yolla ICE-benzer proteazları aktive ederek apoptozisi aktive etmektedir. Tüm apoptotik yollar p53-aracılı transkripsiyon akışı ve ICE-benzer proteazların aktivasyonu ile ilişkilidir. Fas ve FasL tümör nekrozis ailesinin transmembran proteinlerindendir. FasL, Fas'a bağlandığında apoptozis başlatılır (Şekil 2.6). Fas/FasL immün yanıtın bitirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Fas ekspresyonun miktarı apoptozis direncinde önemli rol oynamaktadır. Fas aracılı apoptozisin gerçekleşmesi için ICE ailesinde yer alan proteazların aktive edilmesi gerekmektedir. BCL-2'nin aşırı miktarda üretimi ICE-benzer protein aktivasyonunu inhibe etmektedir (Pfeffer ve Singh, 2018).

Hücrelerde p53, DNA'ya bağlanır ve p21'i uyarır. p21, sikline bağımlı kinaz 2 ile kompleks oluşturduğunda hücreler bölünemez (Şekil 2.11). p53 geni mutasyona uğrarsa protein DNA'ya düzgün bir şekilde bağlanamaz, bu nedenle p21 üretiminde sorun olduğu için hücre çoğalmasını durduracak bir sinyal yoktur. Sonuç olarak, hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya devam eder (Darcy, 2019).



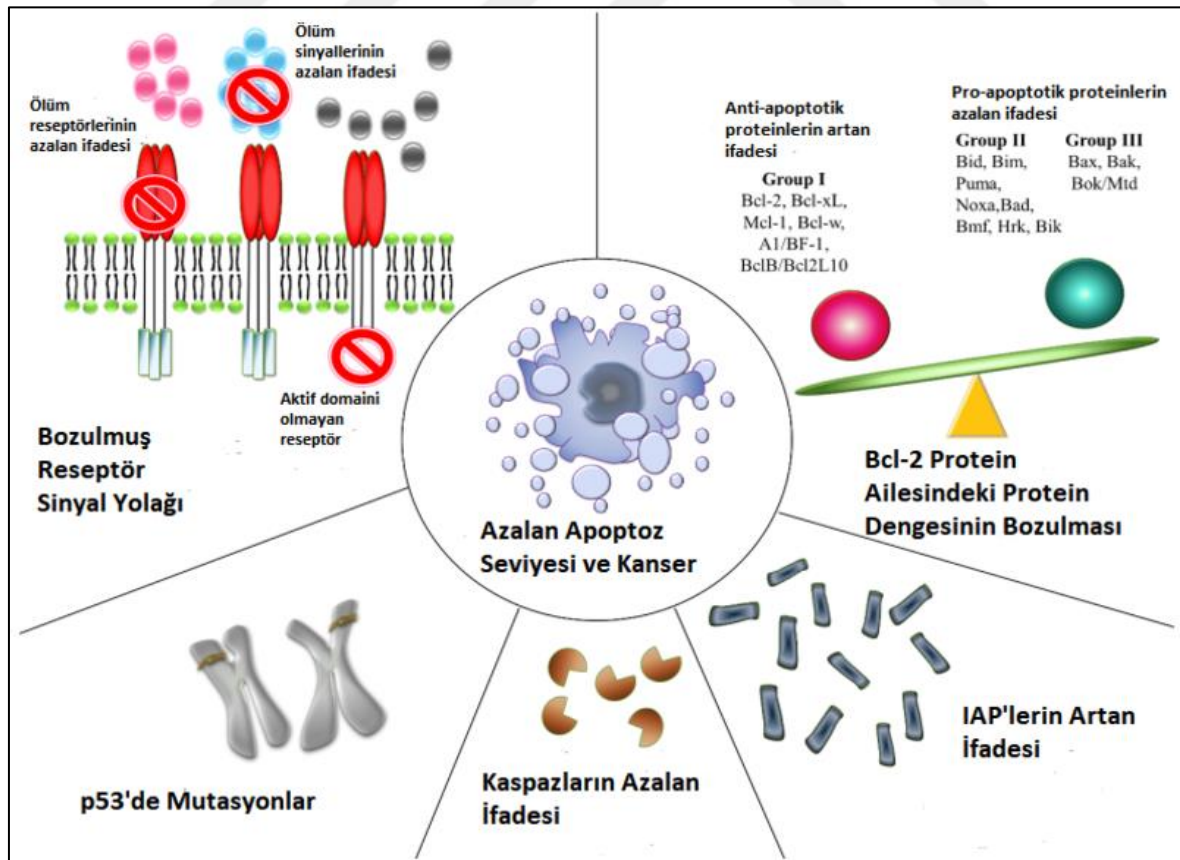
Şekil 2.11. Stres ve DNA hasarı sonrası p53 protein tarafından aktive edilen apoptozis mekanizması (D'arcy, 2019).

Kanserin hücre proliferasyonunda meydana gelen artış ve apoptozda meydana gelen azalmaya bağlı olarak geliştiği yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Meng, Lee ve Kaufmann, 2006). Hücre ölümü inhibe olduğunda hasarlı hücreler ortadan kalkmamakta ve birikmekte, bu durum dokuda hasara yol açabilmektedir. Kemoterapi ile yapılan etkin tedavinin sonucunda hücreler apoptoz sürecine girmektedirler (Scott ve Gregory, 2000). Çok sayıda antikanser ilaç, tümör hücre DNA sentez aşamalarına ve hücre bölünmesine etki ederek apoptoz indüksiyonuna neden olarak etki etmektedir. İlaç ile gerçekleştirilen tedavi işlemlerinden sonra hücrelerin apoptoza karşı duyarlılığının farklılaşmasının, edinilmiş ilaç direncinde önemli bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Elde edilen bu veriler ışığında,

kanserde ilaç ile yapılan tedavinin en önemli amaçlarından birinin, neoplastik hücrelerde apoptozu hızlandırmak olduğu düşünülmektedir (Kaya, Çalışkan ve Yönden, 2012).

Apoptoz ve karsinogenez, normal bir hücrenin habis bir hücreye dönüştüğü bir dizi genetik değişikliğin sonucu olarak görülebilirken, hücre ölümünden kaçınma, bir hücrede bu habis dönüşüme neden olan temel değişikliklerden biridir (Hanahan ve Weinberg, 2000). 1970'li yılların başında, Kerr ve arkadaşları apoptozun temel işlevinin habis hücrelerin eliminasyonu, hiperplazi ve tümörün ilerlemesi ile ilişkilendirmiştir (Kerr, 1972). Bu sebeple, apoptoz meydana gelen azalma veya apoptoz direnci, karsinogenezde hayati bir rol oynamaktadır. Kötü huylu bir hücrenin apoptoz veya apoptoz direncinde azalma ortaya çıkmasının birçok yolu vardır. Genel olarak, apoptozdan kaçmanın meydana geldiği mekanizmalar şu şekilde sınıflandırılabilir:

- 1) Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin bozulmuş dengesi,
- 2) Azalmış kaspaz fonksiyonu ve
- 3) Bozulmuş ölüm reseptörü sinyali (Şekil 2.12) (Wong, 2011).



Şekil 2.12. Apoptozda meydana gelen bozukluklar ve kanser gelişimi

2.2. Akciğer Kanseri ve A549 Hücre Hattı

Dünya çapında akciğer kanseri, kansere bağlı ölümlerin en yaygın nedenidir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHKDAK) için moleküler hedefli tedaviler ve immünoterapiler, son yirmi yılda sonuçları önemli ölçüde iyileştirmiştir. Bununla birlikte, ilerlemiş NSCLC'lerin büyük çoğunluğu mevcut tedavilere dirençli hale gelir ve sonunda ilerler (Wang, Herbst ve Boshoff, 2021).

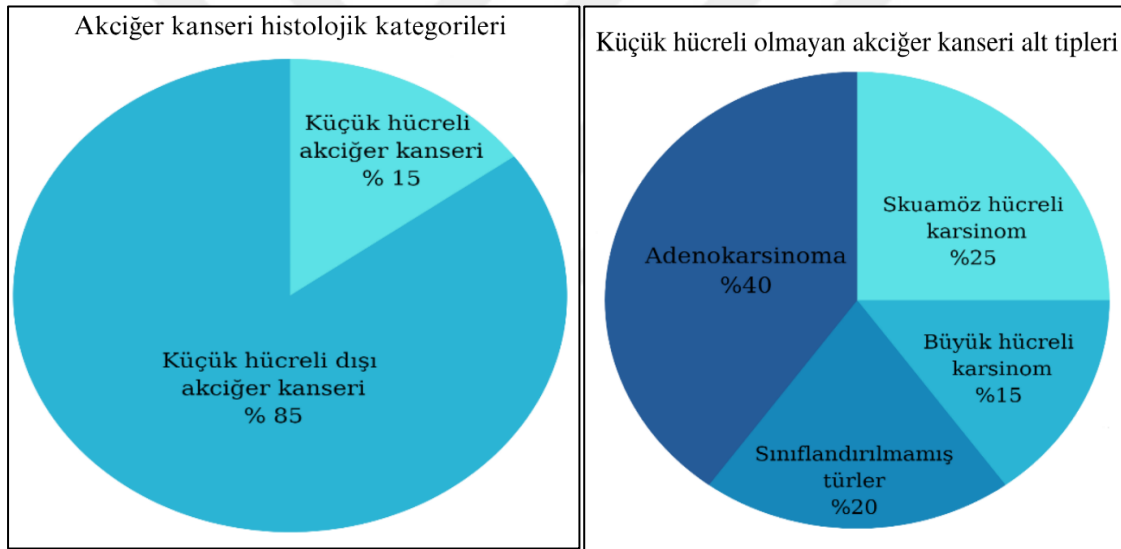
Akciğer kanseri, sağlıklı, normal yapıdaki akciğer hücrelerinin mutasyona uğraması veya hatalı kopyalaması, gereksiz ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve bir kitle oluşturmaya başlar. Anormal hücrelerin tümöre dönüşme süreci birçok nedene bağlıdır, ancak çoğunlukla çevresel faktörlerle ilişkilidir. Bu faktörler arasında tütün mamullerinin kullanımı en büyük faktör olarak kabul edilmektedir. Akciğer kanseri, tütün ürünlerine maruz kalma, radyasyona maruz kalma, önceki akciğer hastalığı, stres, zararlı ve zehirli gazların solunması ve diyet karsinogenlerine maruz kalma gibi diğer çevresel faktörlerden kaynaklanır. Ayrıca akciğer kanseri nedenleri arasında cinsiyet, yaşlanma ve kalıtsal genetik geçiş gibi doğal olaylar da yer almaktadır (Aydiner, Ece ve Topuz, 2010; Krist ve diğerleri, 2021).

Akciğer kanseri, kötü prognozlu, 5 yıllık hayatta kalım oranı %20,5 olan (Krist ve diğerleri, 2021) ve kanser nedenli ölümlerin en sık ortaya çıktığı kanser türüdür. Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %90'ı sigara ve tütün ürünlerinin kullanımından kaynaklanmaktadır. Bunlara ek olarak, akciğer kanserine karşı çok sayıda kalıtsal ve edinilmiş yatkınlık mekanizmaları ortaya konulmuştur. Akciğer kanseri için tedavi seçenekleri arasında kemoterapi, radyasyon tedavisi, ameliyat ve hedefe yönelik tedavi bulunur. Terapötik modalite önerileri, kanserin türü ve evresi dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır. Son 25 yılda yapılan çalışmalara rağmen, akciğer kanseri olan hastalar için prognoz hala yetersizdir. Mevcut standart tedavilere yanıtlar, en lokalize kanserler dışında zayıftır (Lemjabbar-Alaoui, Hassan, Yang ve Buchanan, 2015).

2017'deki kanser istatistikleri tahminlerine göre, akciğer kanseri dünya çapında kanser ölümlerinin yüzde %25'ni oluşturmaktadır (yaklaşık 155.870 kişi) (Al-Sukhni, Aronson, ve Gallinger, 2008). Bu sayı 2016 yılında ülkemizin orta aralığında olup, ölüm oranları cinsiyete göre farklılık göstermektedir. Erkeklerde morbidite ve mortalite daha yüksekken, akciğer kanseri mortalitesi erkeklerde %2,2 ve kadınlarda %8,9'dur. Ancak cinsiyete göre

akciğer kanseri insidans istatistikleri göstermektedir ki; önümüzdeki yıllarda akciğer kanseri vakaları kadınlarda erkeklerden daha yaygın hale gelecek (ACS, 2013).

Akciğer kanseri iki ana gruba ayrılır: küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) (Cruz, Tanoue ve Matthay, 2011). KHAK hücreleri nöroendokrin hücrelerden kaynaklandığı düşünülen proliferasyon hızı yüksek ve hücre ölüm mekanizmalarına karşı direnç gösteren hücrelerdir (Waqar ve Morgensztern, 2017; Park ve diğerleri, 2011). KHDAK kendi arasında yaklaşık %40'ını oluşturan adenokarsinom, %30'unu oluşturan skuamöz hücreli karsinom, %15'ünü oluşturan büyük hücreli karsinoma ayrılırken daha az yaygın olan diğer türler adenoskuamöz karsinom ve sarkomatoid karsinomdur (Schabath ve Cote, 2019) (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Akciğer kanseri çeşitleri

Adenokarsinom, akciğer kanserler türleri arasında %40'lık oran ile en fazla görülen histolojik akciğer kanseri çeşididir. Akciğer kanseri erkeklerde, kadınlara kıyasla daha fazla görülmekle beraber kadınlarda, nispeten genç hastalarda ve daha önce hiç sigara içmeyen kişilerde görülmektedir (Kuhn ve diğerleri 2018). Adenokarsinomlu bireylerde genellikle beyin metastazı görülmektedir. Hastalığın en önemli semptomları arasında ise baş ağrısı, kusma, görme alanı eksikliği ve nöbetler yer almaktadır (Clark ve Alsubait 2021). Genellikle periferik akciğer dokusunda görülen ve histolojik olarak glandüler farklılaşma veya münin üretimi ile karakterizedirler. Histolojik inceleme sırasında çoğu adenokarsinomun heterojen

bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu yapı mikropapiller, papiller, asiner, lepid ve katı yapıya sahiptir (Davidson, Gazdar ve Clarke, 2013).

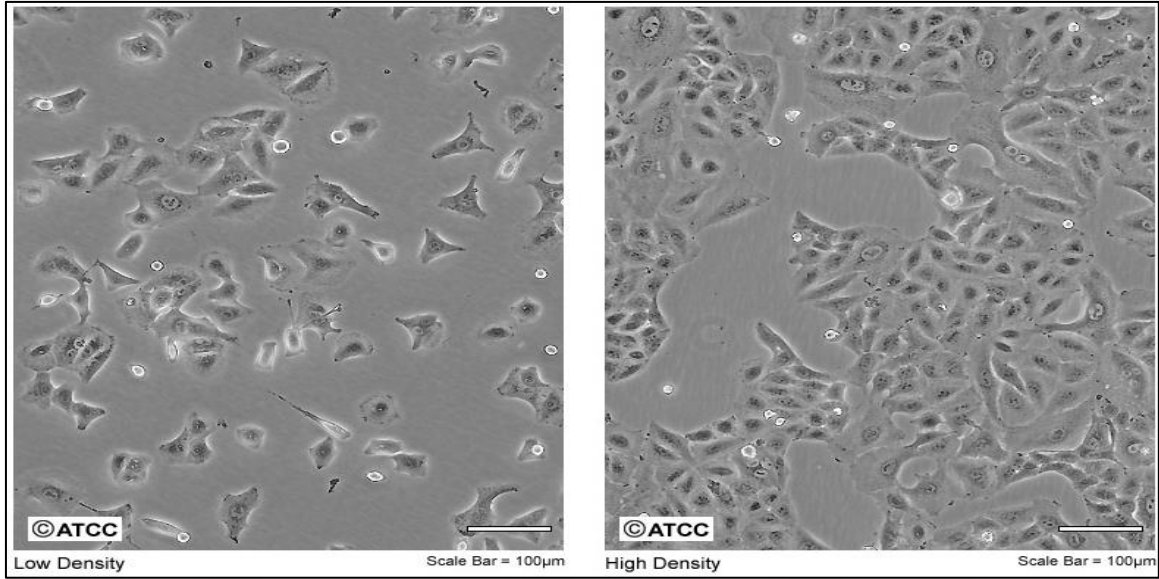
KHDAK'de evre, histoloji, genetik değişiklikler ve hastanın durumuna bağlı olarak tedavi yaklaşımları genellikle cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi, tek başına veya kombine modalitede moleküler hedefli tedaviyi içermektedir. KHDAK'nin erken evrelerinde tıbbi olarak uygun hastalarda küratif amaçlı cerrahi rezeksiyon önerilmektedir. Adjuvan platin bazlı kemoterapi, 5 yılda mutlak ölüm riskinde %5,4'lük bir azalma ile evre II-IIIa hastalığı için tavsiye edilirken, nüks oranları yüksektir ve nispeten yüksek toksisite oranı vardır (Pignon ve diğerleri, 2008). Tedaviden önce, özellikle evre IIB ve evre IIIa hastalığı için multidisipliner tartışma önerilmektedir. Şimdiye kadar, moleküler olarak hedeflenen tedaviler, erken evre hastalarda genel bir sağkalım yararı göstermemiştir (Alexander, Kim ve Cheng, 2020).

Pulmoner sistemi etkileyen tüm kanser türleri içinde KHADK karsinomu, tüm tümörlerin yaklaşık %80-85'ini oluşturur. Geçtiğimiz birkaç on yılda sitogenetik ve ileri moleküler teknikler, akciğer kanserinin genomik yapısını tanımlamaya yardımcı olmuş ve bu süreçte, ilerlemiş KHADK'lı hastaların klinik yönetimi ve tedavisinde devrim yaratmıştır (Suster ve Mino-Kenudson, 2020). KHADK'lar, adenokarsinomları, skuamöz hücreli kanserler ve büyük hücreli kanserler gibi çoklu kanser türlerini kapsar (Relli, Trerotola, Guerra ve Alberti, 2019). KHDAK'nın karsinogenezi, hücre farklılaşması, büyümesi, göçü, istilas ve apoptozda görevli gen mutasyonları birikiminin neden olduğu çok basamaklı bir süreçtir (Zhou ve diğerleri, 2015).

KHDAK, kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavilere az duyarlıdır. İlerlemesi ve metastazı, anjiyogenez ile yakından ilişkilidir. Erken evre KHDAK tedavisinde, ilerleme kaydedilmesine rağmen, ileri evre KHDAK'nın sağ kalım oranının çok düşük olduğu bilinmektedir (Chen, Feng ve Chen, 2012; Qian ve diğerleri, 2016). Son çalışmalar, EGFR mutasyonlu KHDAK'nin, hücresel düzeyde oldukça heterojen olduğunu ve çoklu moleküler mekanizmalar yoluyla dirençli tümörlerin klonal genişlemesini kolaylaştırdığını göstermektedir. Akciğer kanseri, akciğer kanseri taramasının yanı sıra cerrahi, tıbbi ve radyasyon onkolojik tedavilerindeki ilerlemelere rağmen, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve dünya çapında kanser ölümlerinin en yaygın nedeni olmaya devam etmektedir.

Akciğer kanserli hastalar arasında adenokarsinomlu hasta sayısının zaman içinde sürekli artış göstermesi, bu hasta grubu üzerinde yapılan çalışmalarında giderek artmasını sağlamıştır (Hirsch ve diğerleri, 2008). Yapılan çok sayıda araştırmada akciğer adenokarsinomunun histopatolojik büyüme paternlerinin hastaların hayatta kalma oranı ile korele olduğunu gösterilmiştir (Motoi ve diğerleri, 2008). Sigara içmeyen kişilerde görülen en yaygın akciğer kanseri alt tipidir. Akciğer adenokarsinomu genel olarak akciğer çevresinde oluşurken birçok durumda skarlarda veya kronik inflamasyon alanlarında bulunabilir. Akciğer adenokarsinomu genellikle mukozal bezlerden gelişir ve tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %40'ını temsil eder (Myers ve Wallen, 2020). EGFR mutasyonları keşfedildiğinden beri, 5-6 ana odak noktası, hedefe yönelik tedavi ile ilişkili akciğer adenokarsinomlarının moleküler patogenezi ve prediktif faktörleri üzerinde çalışılmaktadır (Shim, Lee, Park ve Kim, 2011). Daha önceleri skuamöz hücreli karsinom en yaygın histolojik tip olarak bilinirken, daha sonra yerini adenokarsinoma bırakmıştır. KHDAK olgularının %30'unu skuamöz hücreli karsinoma oluşturmaktadır. Skuamöz hücreli kanser, kadınlara oranla erkeklerde daha fazla görülmektedir. Skuamöz hücreli kanserin sigarayla ilişkisi, yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak %90 olarak gösterilmiştir (Yılmazbayhan ve Özlük, 2010; Krinsky ve diğerleri, 2016). Diğer karsinom türlerine göre ise uzak organ metastazlarının daha az olduğu tespit edilmiştir (Canpolat, Cemil, Eskioğlu ve Han, 2009).

Küçük hücreli karsinom hücreleri ilk olarak 1971'de Japonya'da yetiştirildi. Küçük hücreli olmayan bir karsinom hücre dizisi olan A549 hücre dizisi, ilk olarak 1972'de 58 yaşındaki beyaz bir adamdan adenokarsinoma akciğer dokusundan biyopsi alındı ve 1976'da D.J. Giard ve arkadaşları tarafından kültürlendi (Gazdar, Girard, Lockwood, Lam ve Minna, 2010). A549 hücre hattı, hipotriploid alveolar bazal epitel hücreleridir (Şekil 2.14). Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu olarak sınıflandırılan bu adenokarsinom hücre dizisi, genellikle daha az agresiftir ve küçük hücreli akciğer kanserinden daha yavaş yayılır. Ayrıca küçük hücreli akciğer kanserinden daha yaygın olduğu gösterilmiştir. A549 hücreleri tüm akciğer kanseri vakalarının %88'inde görülebilen hücrelerdir (Gazdar ve diğerleri, 2010).



Şekil 2.14. A549 hücre hatları (<https://www.atcc.org/products/ccl-185>)

A549 hücreleri tek tabakalı kültürü yapılırken ortama yapışır ve sitoplazmik çıkıntıları olan yassı hücreler olarak büyürler. A549 hücreleri, özellikle tip II akciğer epitel hücre modeli olarak, *in vitro* ve *in vivo* ilaç metabolizması çalışmalarında ve transfeksiyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Cooper, Barnet, Kao ve Scolyer, 2018); Foster, Oster, Mayer, Avery ve Audus, 1998).

2.3. *Drosophila melanogaster*

Model organizmalar, biyolojik araştırmaların ve süreçlerin daha iyi bir şekilde anlaşılabilmesi için çalışmalarda kullanılan canlılardır. Bu tür organizmaların laboratuvar ortamlarında çoğaltılması ve beslenmesi diğer farklı organizmalara göre nispeten daha kolay olmasından ve çalışılması zor olan farklı organizmaların biyolojik süreçlerini anlamada kilit rol oynamaktadırlar. Latince adı *Drosophila melanogaster* olan ve halk arasında meyve sineği ya da sirke sineği olarak bilinen bu organizma, biyolojik araştırmalarda özellikle moleküler genetik, gelişim biyolojisi, popülasyon genetiği, nörofarmakolojik, kanser ve genetik toksikoloji gibi birçok araştırma alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 2.15).

Saldırganlık ile ilgili çalışmalarda sinekler kullanılmaktadır.	<i>Drosophila melanogaster</i> Fizyoloji ve TIP alanında 10 Nobel ödülü alan bilim adamının çalışmasına konu olmuştur.	Öğrenme ile ilgili ilk genler <i>Drosophila</i> 'da keşfedilmiştir.
Yer kaplamazlar ve ekonomik olarak yetiştirilebilirler.		Kök hücre çalışmalarında kullanılır.
İnsan hastalık genlerinin yaklaşık % 75 meyve sinekleri ile benzerlik taşır		<i>Drosophila</i> uyku ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır.
Yaşlanma ile ilgili araştırmalarda kullanılmaktadır.		Kanser, epilepsi ve alzheimer hastalıkları ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır.
Beslenme ile ilgili çalışmalarda özellikle diyet ile ilgili araştırmalarda kullanılmaktadır.		<i>Drosophila</i> kısa ömürlüdür ve çok hızlı bir üreme kapasitesine sahiptir.
İlk jet lang genleri <i>Drosophila</i> 'da bulunmuştur.	1947'de uzaya ilk ulaşan ve güvenli bir şekilde dönen ilk organizma <i>Drosophila melanogaster</i> 'dir.	Bağımlılık ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır.

Şekil 2.15. *Drosophila melanogaster*'in kullanıldığı çalışma alanları

D. melanogaster'in ilk olarak tanımlanması Johann Wilhem Meigen tarafından 1830 yılında yapılmıştır. İlk kez 1910 yılında Amerikalı zooloji ve genetik uzmanı Thomas Hunt Morgan tarafından kullanılmıştır. DNA diziliminin tamamı 2001 yılında açıklanan *D. melanogaster*'in 14.000 gen ve 165 milyon baz çiftine sahip olduğu tespit edilmiştir (Keller, 2007).

D. melanogaster 100 yılı aşkın süredir model organizma olarak tercih edilmektedir. Bu böceğin model organizma olarak kullanılmasının birçok nedeni vardır;

- İnsan gen dizilimleri ile olan ortak özellikleri bu organizmayı insanlardaki birçok hastalıklara karşı ilaç üretilmesi ve geliştirilmesi konularındaki aktif olarak kullanılan bir canlı materyal haline getirmiştir.

- *D. melanogaster*' in fenotip özellikleri mikroskop altında (göz rengi, vücut rengi, kıl tipi) çok çeşitli mutasyonlar ve varyasyonlar olsa dahi incelenen ve gözlemlenebilen bir organizmadır (Keller, 2007).

- Laboratuvar koşullarında yetiştirilmesi ve beslenme şartları maliyeti düşüktür.
- Genom sekansı çıkartılmış ve insan vücudundaki hastalıklara neden olabilecek genlerin %60' ından fazlası bu tür ile homoloji gösterdiği tespit edilmiştir.
- Kanseri gibi hastalıklarda homologlarının olduğu ve insan hücre döngü yollarının birbirine benzediği bilinmektedir (Prokop, 2016).

2.3.1. Genetik toksikoloji

Toksikolojinin bir dalı olan genetik toksikoloji, organizmanın normal biyolojik aktivitesi sırasında veya fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerin etkisi altında hücrelerin DNA molekülünde meydana gelen değişiklikleri inceleyen ve çok önemli bir etkiye sahip bir bilim dalıdır ve çeşitli faktörlerin neden olduğu genetik hasarın değerlendirilmesinde oldukça önemli bir yeri vardır (Choy, 2001; Young, 2002). Genetik toksisite veya genotoksisite; genel olarak çekirdekte, kromozomlarda ve DNA yapısında meydana gelen DNA yapısal değişiklikleri, DNA kırılmaları, gen mutasyonları, kromozomal anormallikler, klastojenite, anöploid gibi sorunları içeren genel bir terimdir. Genotoksisite, genotoksik maddelerin DNA veya genom replikasyonundan sorumlu enzimlerle etkileşerek mutasyonlara yol açması veya DNA'da değişikliğe neden olması anlamına gelmektedir (Zeiger, 2004). Maddeler veya mutajenler doğrudan DNA üzerinde veya dolaylı olarak genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak etki ederler. DNA hasarı ile ilişkili anahtar moleküller ve yollardaki kusurlar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, kısırlık ve bazı genetik ve çok faktörlü hastalıklara yol açan etkilerini gösterir (Mateuca, Lombaert, Aka, Decordier, ve Kirsch-Volders, 2006). Genotoksisite ve kanserojenlik arasındaki ilişki birçok çalışmada araştırılmış ve birçok insan kanserojen bileşiğin genotoksik olduğu bulunmuştur. Şu anda, genotoksik testler sahadaki kuruluşlarda kullanılmaya başlandı. Bu sonuca, bazı kimyasalların mutajenik aktiviteleri ile kanserojen potansiyelleri arasında bir bağlantı olduğu gerçeği rehberlik etmiştir (Mavournin, Blakey, Cimino, Salamone ve Heddle, 1990; Vural, 2005).

1927'de Müller'in çalışmasıyla başlayan genetik toksikolojinin ortaya çıkmasıyla, X ışınlarının *Drosophila*'daki mutasyon sayısını normal hızın 15.000 katı kadar arttırdığı

bulundu. Günümüzde teknolojik gelişmelerin analiz ve risk alma yöntemlerindeki artışa bağlı olarak en önemli araştırma dallarından biri haline gelmiştir (Çavaş, 2004).

Bir genotoksisite testinin sahip olması gereken temel özellikleri şöyle sıralayabiliriz;

- Kolay uygulanabilir olması,
- Genetik sorunları tespit etmede etkin olması,
- Hızlı sonuç vermesi,
- Ekonomik olması,
- Az sayıda örneğin yeterli olması.

Genetik toksikoloji testlerinin ana hedefi DNA molekülü olduğundan, her organizmanın sonuçları insanlarda sağlık sorunlarını tahmin etmek için de kullanılabilir. Bu bağlamda, bir canlı türünde DNA hasarına neden olduğu bilinen bir kimyasalın diğer türlerde de benzer etkilere neden olabileceği söylenebilir. Günümüzde genotoksik etkileri tespit etmek için böcekler, mikroorganizmalar, bitkiler ve omurgalılar üzerinde test edilebilen 200'den fazla kısa süreli test yöntemi bulunmaktadır. Bu testler, genetik materyaldeki hasarı farklı mekanizmalar aracılığıyla doğrudan veya dolaylı olarak tespit etmek için geliştirilmiş in vitro ve in vivo testlerden oluşmaktadır (Vural, 2005). Bu test yöntemlerinden biri olan in vitro mutajenite testinde, genotoksik etkisi araştırılan bir maddenin belirli konsantrasyonlarda çeşitli test hayvanlarından veya insanlardan alınan dokulara uygulanmasıdır. Bu testlerin in vivo testlerden farkı, test edilen kimyasalın canlı bir organizmaya değil, dış ortamda ondan alınan bir dokuya uygulanmasıdır. Genetik toksikolojinin temel amacı mutajenleri genotoksik testlerle tespit etmek, bu maddelerin insanlardaki risklerini belirlemek ve gereksiz yere bu maddelere maruz kalmaktan kaçınmaktır.

Genel olarak tarama için kısa süreli mutajenite testleri kullanılırken, insanlarda riski belirlemek için memeli testleri kullanılmaktadır (Young, 2002). İnsan kanında birçok farklı hücre tipi bulunmasına karşın, çekirdekli lenfositler sıklıkla DNA veya kromozom çalışmalarında kullanılmaktadır. Periferik kan kültürü yöntemi olarak ifade edilen bu yöntem, istenilen sayıda hücrenin çok kısa sürede çalışılabilmesi, kültür süresinin kısa olması ve elde edilen kromozom preparasyonlarının elde edilenlere göre daha kaliteli olması

nedeniyle avantajlıdır (Rooney ve Czepulkowski 1986; Öztaş, 2000; Başaran, 2003). Periferik kan kültür yöntemi, günümüzde öncelikli olarak tıbbi genetik (Chu, Snyder ve Econs, 2006) olmak üzere onkoloji (Eisenthal, Barbarsteyn, Gitstein ve Lifschitz-Mercer, 2006), genetik toksikoloji (Rodeiro ve diğerleri, 2006), biyokimya (Bukowska, 2004), hematoloji (Saigo, Hashimoto, Kumagai ve Sugimoto, 1999) , immünoloji ve parazitoloji (França-Botelho, Honório-França, França, Aparecida Gomes ve Costa-Cruz, 2006) gibi pek çok tıp ve biyoloji ile ilgili alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Birçok çalışma sonucunda bileşiklerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde tek bir testin yeterli olmadığı, bu nedenle bileşiklerin genotoksik veya mutajenik etkilerinin belirlenmesi için seri test sisteminin kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır (Virginia, 1992). Yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılan genotoksisite testleri, Allium testi (Levan, 1938), Salmonella testi (Ames, McCann ve Yamasaki, 1975), mikronükleus testi (MN) (Mac Gregor ve diğerleri, 1987), kardeş kromatid değişimi testi (KKD) (Latt ve diğerleri, 1981), tek hücre jel elektroforezi (SCGE) (Fairbairn, Olive ve O'Neill, 1995) ve somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) (Graf ve diğerleri, 1984) sıralanabilir.

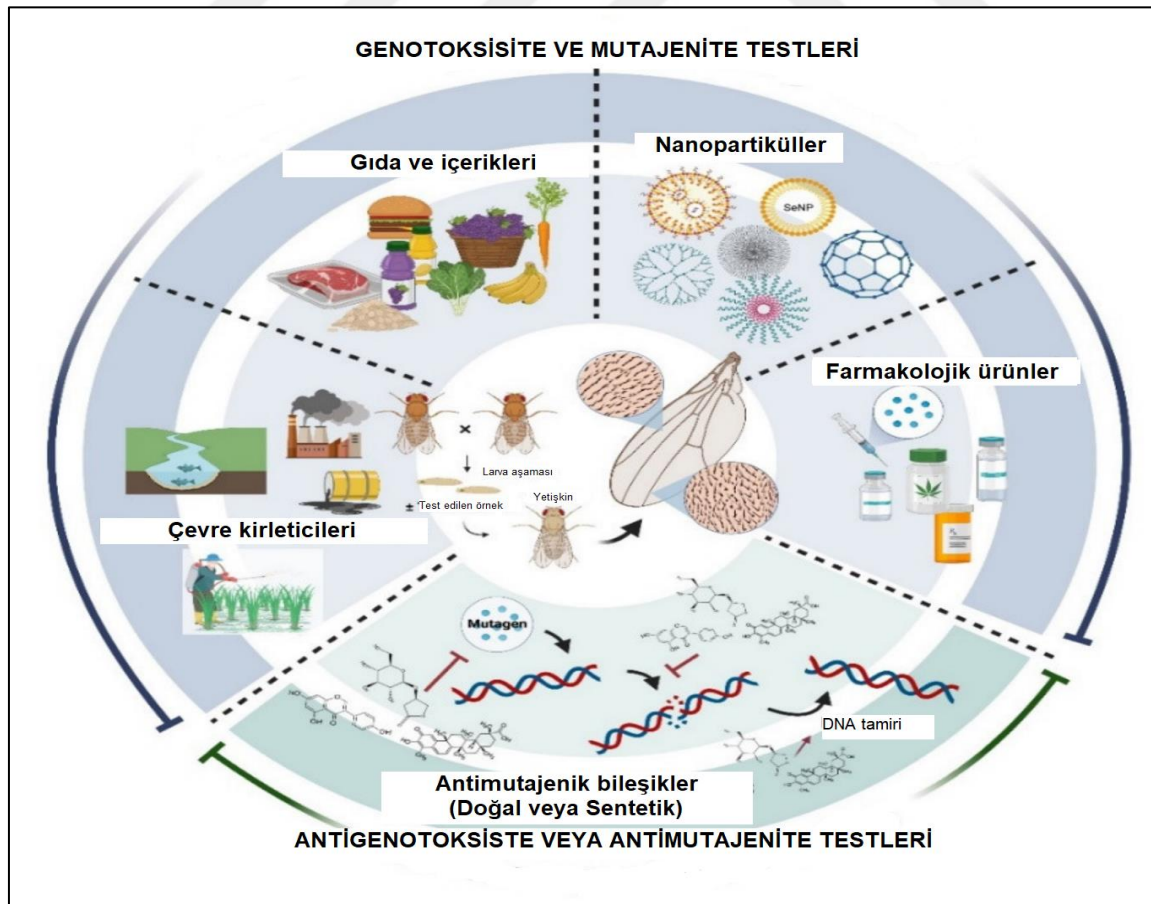
2.3.2. *Drosophila melanogaster* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi

İn vivo mutajenik test yönteminde, mutajenik etkileri test edilecek madde, test hayvanlarına belirli konsantrasyonlarda ve farklı yollardan enjekte edilir. Bu deneylerde kullanılan hayvanlar genellikle böcekler ve memelilerdir. Böceklerde en sık kullanılan genotoksisite testi *Drosophila melanogaster* somatik mutasyon ve rekombinasyon (SMART) testidir. Son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlayan SMART, kimyasalların mutajenik ve rekombinasyon aktivitelerini belirlemek için oldukça uygun ve verimli bir in vivo test sistemidir (Graf ve diğerleri, 1984).

SMART'ın uygulanan diğer test yöntemlerine göre avantajı, mitotik rekombinasyon ve ortaya çıkan mutasyonların fenotip üzerindeki etkisini gösterebilmesidir. Transheterozigot sineklerde marker genlerin varlığı ve kullanılması, bu özelliklerin genotoksik deneyde gözlemlenmesi, çalışmanın bir yöntem olarak basit ve ucuz bir yol olduğunu göstermektedir. *Drosophila* somatik hücrelerinde mutasyonları ve kanserojen etkileri ölçmek diğer organizmalara göre daha kolaydır. F1 neslindeki mutajenik etki gözlemlenerek, kimyasal maddelerin vücudu ne ölçüde etkilediğini belirlemek mümkündür.

Drosophila melanogaster ile yapılan bu in vivo test yöntemi, mikroorganizmal in vitro ve memeli genotoksikite test sistemleri arasındaki boşluğu doldurabilir (Frey ve Würzler 1996). SMART, translokasyonlar, mitotik rekombinasyon, nokta mutasyonları, kromozom kayıpları, delesyonlar ve ayrılmama gibi belirli kromozomal anormalliklerin geniş bir genetik sonuçlarına izin verir (Graf ve diğerleri, 1984; Graf, Abraham ve Guzman-Rincon, 1998). İki tür SMART vardır, kanat benek testi ve göz mutasyon testi. Her ikisi de embriyonik gelişimin erken evrelerinde hücre gruplarının (hayali disk) ayrılmasına dayanır. Sinek larva gelişimi sırasında yetişkin sineğin vücut yapısına farklılaşana kadar mitotik olarak çoğalırlar (Graf ve diğerleri, 1998).

SMART veya *Drosophila* kanat benek testi gıda ve ilaç güvenliği, nanoparçacıklar, pestisit ve herbisit ve çevre güvenliğini kapsayan insan tehlike değerlendirmesinde çok fazla sayıda uygulama alanına sahiptir. Ayrıca SMART, ilgili ajanların anti-mutajenite özelliklerini test etmek için de uygulanır (Şekil 2.16) (Pitchakarn, Inthachai, Karinchai ve Temviriyankul, 2021).



Şekil 2.16. *Drosophila* Somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin kullanım alanları

Yapılan birçok çalışma ile, *Drosophila* gibi memeli olmayan model organizmalar karmaşık genetik manipölasyonlara yatkınlıkları ve deneysel izlenebilirlikleri sayesinde, tümör hücrelerinin hücre plastisitesini ve yeni mikro ortamlara adaptasyonlarını yönlendiren gen ekspresyonunun karmaşık koreografisini anlamak için çok yararlı oldukları kanıtlanmıştır (Sharpe, Morgan, Nisbet, Campbell ve Casali, 2023).

2.3.3. *D. melanogaster* ve antioksidanlar

Antioksidanlar, hücrelere zarar vermeden önce "reaktif oksijen türlerini" (ROS) veya serbest radikalleri nötralize ettikleri veya yok ettikleri için bugün hayatımızın önemli bir parçası haline gelmiştir. ROS tarafından indüklenen oksidasyon, hücre zarı parçalanması, zar proteini hasarı ve DNA mutasyonları ile sonuçlanır, bu da yaşlanmaya neden olur ve ayrıca damar sertliği, kanser, diyabet, karaciğer hasarı, koroner kalp hastalıkları iltihaplanma, artrit ve cilt hasarları gibi birçok hastalığın gelişimini başlatır veya çoğaltır (Dontha, 2016).

Antioksidanlar, serbest oksijen radikallerine bağlanan ve bu radikallerin sağlıklı hücrelere zarar vermesini engelleyen kimyasal bileşiklerdir. Normal oksijen kullanımıyla (Tiwari, 2004) vücut tarafından sürekli olarak serbest radikaller üretilir. Oksijen yaşam için vazgeçilmez bir elementtir. Hücreler enerji üretmek için oksijen kullandığında, mitokondri tarafından serbest radikaller üretilir. Bu yan ürünler genellikle ROS'un yanı sıra hücresel redoks işleminden kaynaklanan reaktif nitrojen türleridir (RNS). Serbest radikallerin lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler için özel bir afinitesi vardır (Sivanandham, 2011).

Serbest radikal, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, bağımsız olarak var olabilen kimyasal bir türdür. Serbest radikaller, radikal olmayanlardan daha az kararlıdır ve moleküllerle gelişigüzel reaksiyona girebilir. Radikaller oluşuktan sonra, başka bir radikalle veya başka bir radikal olmayan molekülle çeşitli etkileşimlerle reaksiyona girebilirler. İki radikal eşleşmemiş elektronlarıyla çarpıştığında, bir kovalent bağ oluşturur (Halliwell, Zentella, Gomez ve Kershenobich, 1997).

ROS ortamına ve konsantrasyonuna bağlı olarak biyolojik sistemlerde hem zararlı hem de faydalıdır (Lopaczynski ve Zeisel, 2011). Yüksek konsantrasyonlarda ROS, lipitler ve zarlar,

proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere hücre yapılarında hasara aracılık eder; “oksidatif stres” olarak bilinir (Poli, Leonarduzzi, Biasi ve Chiarotto, 2004).

Oksidatif stres, ROS olarak isimlendirilen serbest radikallerin ve reaktif metabolitlerin üretimi ile bunların antioksidanlar olarak isimlendirilen koruyucu mekanizmalar tarafından ortadan kaldırılması arasındaki bir dengesizlik olarak tanımlanır. Bu dengesizlik, önemli biyomoleküllerin ve hücrelerin zarar görmesine yol açarak, tüm organizma üzerinde potansiyel bir etkiye sahiptir (Duracková, 2010). ROS'un zararlı etkileri, vücutta bulunan örneğin enzimler gibi antioksidanların etkisiyle dengelenir (Halliwell ve Gutteridge, 2015). ROS'tan kaynaklanan oksidatif hasara karşı koymak için hücrenin antioksidan savunma sisteminin varlığına rağmen, oksidatif hasar yaşam döngüsü boyunca birikir ve kardiyovasküler hastalık, kanser, nörodejeneratif bozukluklar ve diğer kronik durumlar gibi hastalıklar, yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Rahman, 2003).

Bir antioksidan, başka bir molekülün oksidasyonunu inhibe edebilen bir moleküldür. Serbest radikalleri beslemek için kendi elektronlarını feda ederek serbest radikal reaksiyon zincirini kırar, kendileri serbest radikal olmaz.

Antioksidanlar, ROS'un saldırısına karşı hücreleri savunmanın doğal yoludur. Vücudumuz, antioksidan özellikleri nedeniyle çeşitli besin maddelerini doğal olarak dolaştırır ve bu yıkıcı zincir reaksiyonlarını kontrol etmek için antioksidan enzimler üretir. Örneğin, C vitamini, E vitamini, karotenler ve lipoik asit. Oksidatif stres, vücuttaki serbest radikallerin sayısının antioksidan savunmamızı aştığı durum olarak tanımlanır. Ayrıca kromozomun telomer uzunluğunu da azaltırlar. Oksidasyon reaksiyonları yaşam için önemlidir, ancak hücrelere de zarar verirler. Bu nedenle, bitkiler ve hayvanlar, glutatyon (GSH), C vitamini ve E vitamini gibi çoklu antioksidan türlerinin yanı sıra katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve çeşitli peroksidazlar gibi enzimlerin karmaşık sistemlerini korurlar. Düşük antioksidan seviyeleri veya antioksidan enzimlerin inhibisyonu, oksidatif strese neden olur ve hücrelere zarar verir veya öldürür (Dontha, 2016).

Toksitenin olası bir mekanizması olarak oksidatif stres, son yıllarda toksikolojik çalışmalarda ana odak haline gelmiştir. Organizmalar serbest radikallere karşı savunma mekanizması geliştirmektedir. Bu savunma mekanizması enzim sistemlerini (süperoksit

dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GPX) ve enzim olmayan bileşikleri (glutatyon) içermektedir.

Oksijenli solunum yapan bütün organizmalarda makromoleküllere olumsuz etkileri olan serbest radikaller, normal metabolizma boyunca sürekli olarak üretilmeye devam etmektedir. (Missirlis, Phillips ve Jäckle, 2001). Antioksidan enzimleri serbest radikal türevlerini temizleyen enzimlerdir (Mockett, Orr, Rahmandar, Sohal ve Sohal, 2001). Antioksidan enzimler yaşamımızda günlük olarak ortaya çıkan serbest radikal ürünlerine karşı koymak için yeterlidirler. Bu enzimler stresli koşullar için güçlü bir savunma mekanizması oluşturdıkları için ayrıca stres enzimleri olarak da tanımlanırlar (Sohal, Arnold ve Orr, 1990).

In vivo antioksidan çalışmalarının çoğu, maliyetli, zaman alan ve etik sorunlar ve genetik manipülasyon araçlarının mevcudiyeti ile sınırlı olan kemirgen modelleri kullanılarak yapılmıştır (Panchal ve Tiwari, 2017). Bununla birlikte, bu sorunlar, neredeyse tüm biyolojik süreçleri incelemek için yaygın olarak kullanılan köklü bir genetik model organizma olan meyve sineği *D. melanogaster* için neredeyse yok denecek kadar azdır (Piper ve Partridge, 2018). Sıklıkla insan hastalıklarını modellemek için ve potansiyel ilaçların yüksek verimli taraması ve hastalık terapötiklerinin geliştirilmesi amacıyla *In vivo* bir araç olarak tercih edilmiştir (Staats, Lüersen, Wagner ve Rimbach, 2018). Bununla birlikte, *Drosophila*'nın antioksidatif araştırmalarda kullanımı, fare modellerini kullananlara kıyasla çok daha az rapor edilmiştir.

Memeliler gibi, *Drosophila* da reaktif oksijen türevleri (ROS) kaynaklı oksidatif hasarı önlemek için üç defans hattından oluşan endojen bir sisteme sahiptir. (Bayliak, Abrat, Storey, Storey ve Lushchak, 2019; Caroch, Morales ve Ferreira, 2018). İlk sıra, enzimatik reaksiyonlarla ROS'u temizleyen başlıca süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon-S-transferaz (GST) olmak üzere antioksidan enzimlerden oluşur (Luo, Mills, le Cessie, Noordam ve van Heemst, 2020).

Drosophila melanogaster, antioksidan enzim sistemlerinden SOD, katalaz, glutatyon (GSH) ve glutatyon redüktaza (GR) sahip iken glutatyon peroksidaz enzimine sahip değildir. Bu enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikallerini hidrojen perokside dönüştürür iken, katalaz ve GSH peroksidaz, hidrojen peroksidi suya dönüştürerek görev

yaparlar. GR redüktaz enzimi ise okside glutatyonu redükte forma dönüştürmektedir (Özata, 2006).

SOD ve katalaz, *Drosophila*'daki birincil enzimatik savunmayı oluşturur (Mockett, Bayne, Kwong, Orr ve Sohal, 2003). Katalaz, *Drosophila*'da tek bir gen tarafından kodlanırken (Mackay ve Bewley 1989), O_2 'nin H_2O_2 'ye dismutasyonunu katalize eden enzim olan SOD, iki gen tarafından kodlanan iki biçimde bulunur. Sitosolik form, CuZnSOD, aktif bölgede bakır ve çinko iyonlarına sahiptir. Mitokondriyal form, MnSOD, aktif bölgede bir mangan iyonuna sahiptir (Halliwell ve Gutteridge, 2015). O_2 'nin SOD-aracılı dismutasyon yoluyla kusurlu bir şekilde uzaklaştırılmasına rağmen, bu enzimler *Drosophila*'da hayatta kalmayı sağlamak için yeterli koruma sağlar (Phillips, Parkes ve Hilliker, 2000).

Memeli hücrelerinde, glutatyon redüktaz (GR), GSSG'nin 2GSH'ye indirgenmesini katalize eder. *Drosophila*'da GR mevcut değildir. Bunun yerine GSSG, tioredoksin sistemi tarafından tekrar GSH'ye indirgenir. Bu oranın toksisiteye doğru kayma potansiyeline rağmen, memelilerde yüksek glutatyon redüktaz aktivitesi ve *Drosophila*'daki tioredoksin sistemi bir miktar salgı ile birleştğinde, hücreler için toksik olmayan bir GSSG: GSH oranı sağlar (Forman, Zhang ve Rinna, 2009).

GSH:GSSG çiftinin redoks potansiyeli, hem toplam GSH ve GSSG miktarına hem de bunların nispi oranlarına bağlıdır (Rebrin ve Sohal 2008). GSH: GSSG oranı, bir hücredeki oksidatif stres düzeyinin bir ölçüsü olarak yaygın olarak kullanılır ve oksidatif strese bir artışa işaret eden bir azalma söz konusudur (Rebrin ve Sohal 2008). Tiyol grubu (-SH), GSH'nin güçlü indirgeme özelliklerinden sorumludur. Ek olarak, GSH yüksek elektron verme yeteneğine sahiptir (Nygren, Ristoff, Carlsson, Möller ve Larsson, 2005) ve *Drosophila*'da peroksiredoksin ve katalaz tarafından katalize edilen bir reaksiyon olan H_2O_2 'nin H_2O 'ye nötralizasyonunda yer alır (Radyuk, Klichko, Spinola, Sohal ve Orr, 2001). Glutatyon transferazlar (GST'ler), detoksifikasyon sürecinde glutatyonun ksenobiyotik bileşiklere konjugasyonunu katalize eden her yerde bulunan anahtar enzimlerdir. GST'lerin, koku ve tatma moleküllerini modifiye ederek ve kemosensör sistemi koruyarak böcek kemo-tepitinin sinyal sonlandırılmasında ikili bir rol oynadığı öne sürülmüştür. *Drosophila melanogaster*'de tanımlanan 40 GST arasında Delta ve Epsilon grupları böceğe özgüdür. GST'ler Delta ve Epsilon, detoksifikasyona hizmet etmek üzere evrimleşmiş olabilir ve insektisit direnci ile ilişkilendirilmiştir (Gonzalez ve diğerleri, 2018).

Drosophila GST'ler, hücresel lokalizasyonlarına göre 2 gruba ayrılan oldukça çeşitli bir protein süper ailesinin üyeleridir: mikrozomal veya sitosolik (Toba ve Aigaki, 2000). "Sitosolik sınıf" altı GST alt sınıfına ayrılır: Delta, Epsilon, Omega, Sigma, Theta ve Zeta (Enayati, Ranson ve Hemingway, 2005). Bunlar arasında böceğe özgü Delta ve Epsilon alt sınıfları, en fazla üye sayısını içermektedir. Delta GST'ler, 3R kromozomu üzerinde büyük bir kümede lokalizedir.

2.3.4. *D. melanogaster* ve HSP'ler

Hsp'ler, denatüre proteinlere bağlanma yetenekleri, diğer proteinlerin katlanmış yapısını değiştirme yetenekleri ve ısı ve oksidatif stres gibi protein denatürasyonuna neden olan streslere yanıt olarak ekspresyonlarının indüklenmesi ile tanımlanır (Morimoto, 2008). HSP'ler, proteinin yeniden katlanmasına veya bozulmasına aracılık ederek proteotoksisteye karşı koyar ve stres direncini destekler. HSP'lerin bu işlevleri, yaşam süresini destekleme ve çeşitli sistemlerde yaşlanmaya bağlı arızaları önleme yeteneklerinin altında olabilir (Lithgow ve Walker, 2002; Morrow ve Tanguay, 2003). Küresel protein hasarına yanıt olarak rollerine ek olarak, HSP'ler ayrıca daha spesifik hedeflere sahiptir ve protein döngüsü, hücresel yaşlanma, kanser ve apoptoz/programlanmış hücre ölümü gibi yaşlanma fenotiplerinde merkezi olan yolların düzenlenmesinde yer alırlar (Morimoto ve Cuervo, 2009; Tower, 2009) ve bu tür yolların spesifik modülasyonu da HSP'lerin yaşlanma ve yaşam süresi üzerindeki etkilerinin altında olabilir. HSP'lerin ifadesi yaşam süresiyle ilişkili olup bu özelliği ile *Drosophila* ve diğer hayvanlarda yaşlanmanın en iyi bilinen biyobelirteçleri olarak kullanılmalarına neden olmuştur (Johnson, 2006; Tower, 2009).

HSP'ler *Drosophila*'da keşfedilmelerinden bu yana, ısı şoku proteinlerinin hem stres direncini hem de yaşam süresini düzenlediği gösterilmiştir. Yaşlanma, artan oksidatif stres ve anormal (yanlış katlanmış) proteinlerin birikmesi ile karakterize edilir ve bu stresler, transkripsiyon faktörü HSF aracılığıyla HSP gen ekspresyonunu indükler. Ek olarak, Hsp'lerin bir alt kümesi, JNK sinyal yolu ve transkripsiyon faktörü Foxo yoluyla oksidatif stres tarafından indüklenir. HSP'ler, proteinin yeniden katlanmasını ve dönüşümünü kolaylaştırarak ve apoptozun inhibisyonu dahil diğer mekanizmalar yoluyla anormal proteinlerin toksisitesine karşı koyar. HSP'ler, yaşlanma sırasında dokuya özgü modellerde yukarı doğru düzenlenir ve ekspresyonları, yaşam süresiyle ilişkilidir ve bazen bunu tahmin eder, bu da onları yaşlanmanın ideal biyobelirteçleri yapar. *Drosophila*'da gen fonksiyonunu

deneysel olarak manipüle etmek ve sağlık durumunu test etmek için mevcut olan araçlar, HSP'lerin yaşlanmadaki rolünü daha fazla incelemek için benzersiz bir fırsat sunar.

HSP'ler geleneksel olarak moleküler ağırlıklarına ve sekans korumalarına dayalı olarak ailelere ayrılır (Tang, Chang, Hayer-Hartl ve Hartl, 2007). Bunlar HSP90/100 ailesi, HSP70 ailesi, HSP60 ailesi, HSP40 ailesi ve küçük HSP'dir (sHsps). HSP70 ailesinin yapısal olarak ifade edilen üyelerine HSC70'ler denir. HSP'ler genellikle etkileşimler ve işlevler için özgüllüğü belirleyen kofaktörler (ko-şaperonlar) ile işlev görür. *D. melanogaster*'de bulunan HSP'ler ve fonksiyonları Çizelge 2.4'de verilmiştir (Morrow ve Tanguay, 2003).

Çizelge 2.4. *Drosophila melanogaster* HSP'lerin işlevleri

HSP sınıfları	<i>Drosophila</i> 'daki genler	Fonksiyonları
sHSP	HSP22, HSP23, HSP26, HSP27, HSP67BA, HSP67BB, HSP67BC, L2EFL, CG14207, CG4461, CG7409, CG13133	Isı toleransı
HSP 60	HSP 60, HSP 60B, HSP64	Spermatid bireyselleştirme sürecinde yer alır, Gelişmekte olan protein katlanması
HSP 70	HSP 70, HSP 68, HSC-1, HSC-2, HSC-3, HSC-4, HSC-5	Gelişmekte olan protein katlanması
HSP90/100	HSP83	Isı toleransı, Uygun sentrozom fonksiyonunun sağlanması, Klatrin aracılı endositoz, Sinyal iletim yollarının ve mikrotübül efektörlerinin bakımı, Morfolojik evrim kondansatörü

Drosophila'da HSP90/100 ailesinin HSP83 (veya HSP90) olarak adlandırılan ve bazen HSP70 ve HSP40 ailelerinin üyeleriyle kompleksler halinde işlev gören bir üyesi vardır. *Drosophila* ve memelilerde yapılan çalışmalar, bu şaperon komplekslerinin, p53 ve HSF gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini ve ayrıca fosfatazlar, protein kinazlar ve steroid hormon reseptörleri ve telomeraz gibi diğer enzim kompleksleri dahil olmak üzere sinyal yolu bileşenlerini düzenlediğini ortaya koymaktadır (Morrow ve Tanguay, 2003). HSP90 ayrıca sentrozom gibi karmaşık yapıların birleştirilmesinde ve spermin bireyselleştirilmesi gibi gelişimsel süreçlerde yer alır.

Sinek genomu, ayırt edici özellikler gösterdikleri için dördü daha kapsamlı olarak incelenen 12 küçük HSP'yi kodlar (Michaud, Marin ve Tanguay, 1997; Michaud, Morrow, Marchand ve Tanguay, 2002). HSP22 mitokondri matriksinde yer alırken, HSP23 ve HSP26 sitoplazmiktir ve HSP27 çekirdekte bulunur (Michaud ve diğerleri, 1997; Michaud ve

diğerleri, 2002; Morrow, Inaguma, Kato ve Tanguay, 2000). Isı şoku gibi çevresel streslere maruz kalmanın ardından, bu dört ana küçük HSP koordineli olarak yukarı regüle edilir.

Drosophila'da yapılan son çalışmalar (Raut ve diğerleri, 2017), birkaç HSP geninin hayati gelişimsel işlevlere sahip olabileceğini ortaya koymuştur. Test edilen 95 HSP geni arasında, 42'sinin her yerde bulunan gen yıkımı, sinek gelişimindeki temel rollerini gösteren F1 ölümcüllüğü ile sonuçlanmıştır.

2.3.5. *D. melanogaster* ve apoptoz

Drosophila melanogaster insan kanserinin moleküler ve genetik temellerini incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Gonzales, 2013). Kanser ve insan hastalıkları için bir model olarak *Drosophila*'nın birçok yönü, farklı çalışmalarda kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmiştir (Yamamura, Ooshio ve Sonoshita, 2021).

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, nematodlar, sinekler ve memelilerde yoğun bir şekilde araştırılmış olan yüksek düzeyde korunmuş bir hücresel süreçtir. Genetik koruma, yüksek verimli genetik ekranlar için fizibilite, zamansal ve mekânsal olarak düzenlenen apoptotik tepkilerin tanımlanması, *Drosophila melanogaster*'i apoptoz çalışması için harika bir model yapmaktadır (Xu ve diğerleri, 2009).

Drosophila'da apoptozun düzenlenmesi omurgalılara benzer şekilde hem hücre içinden hem de çevresinden kaynaklanan çok çeşitli uyaranları içerecek şekilde oldukça esnektir. Bu uyaranlar, birçok farklı gelişimsel sinyalin yanı sıra DNA hasarı, katlanmamış proteinler, ER-stresi, reaktif oksijen türleri ve hücre spesifikasyonundaki veya hücre farklılaşmasındaki kusurlar gibi çeşitli hücresel stres veya yaralanma biçimlerini içerir (Steller, 2008).

Programlı hücre ölümü, *Drosophila*'daki çoğu gelişim aşamasında vazgeçilmez roller oynar. En erken apoptoz, embriyonik evrede başlar ve daha sonra yaygın ve belirgin hale gelir (Xu ve diğerleri, 2009).

Omurgalılara benzer şekilde, *Drosophila*'da apoptozun düzenlenmesi oldukça esnektir ve hem hücre içinden hem de çevresinden kaynaklanan çok çeşitli uyaranları içerir (Steller, 2008). Şaşırtıcı olmayan bir şekilde *Drosophila*, Apaf-1, kaspaz-9 ve sitokrom c ortologları

dahil olmak üzere tüm kanonik apoptozom proteinlerini içerir ve bunları memeliler için tarif edilene benzer bir şekilde kullanıyor gibi görünmektedir.

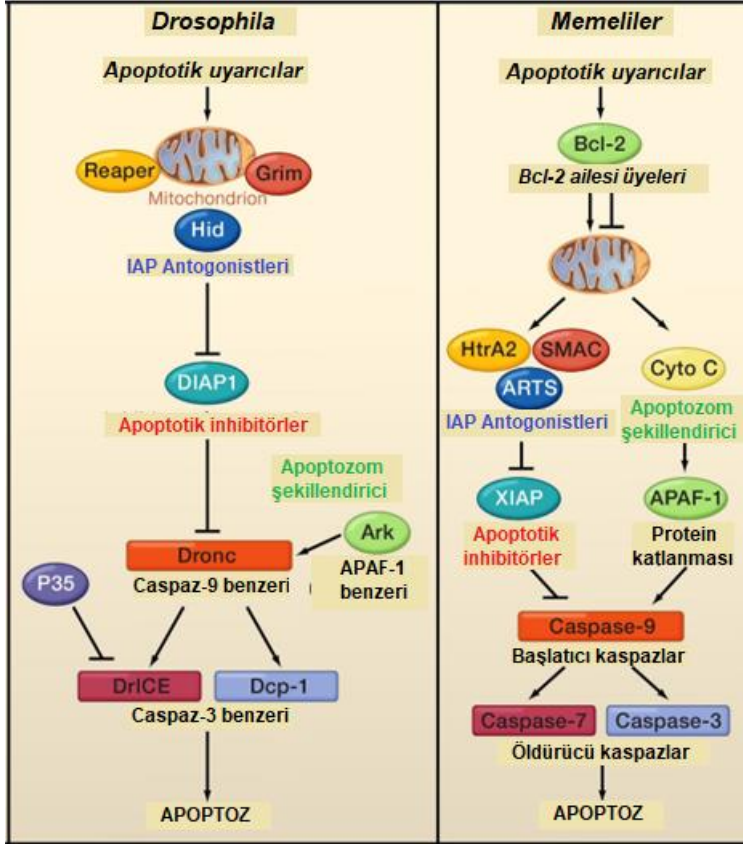
Drosophila'da apoptotik sürecin çekirdek efektörleri aynı zamanda kaspazlardır. Sinek genomunda tanımlanmış yedi tane gen vardır: Dronc (Nc olarak da adlandırılır), Dredd, Strica, DrICE, Dcp-1, Decay ve Damm (Fraser ve Evan, 1997; Song, McCall ve Steller, 1997; Harvey ve diğerleri, 2001). Dronc, Dredd ve Strica, başlatıcı kaspazları olarak sınıflandırılırken, diğer dördü efektör kaspaz olarak sınıflandırılır.

Kaspaz inhibitörlerinin önemli ailesi, kaspazlara bağlanabilen ve kaspazları inhibe edebilen apoptoz proteinlerinin (IAP'ler) inhibitörüdür. IAP'ler orijinal olarak böcek virüslerinde keşfedilmiştir, ancak ilgili proteinlerin bir ailesi daha sonra hem böceklerde hem de memelilerde tanımlanmıştır. IAP'ler, kaspazlara doğrudan bağlanabilen ve kaspazları inhibe edebilen en az bir BIR (baculovirus inhibitör tekrar) alanının varlığı ile karakterize edilir (Salvesen ve Duckett 2002; Vaux ve Silke, 2005).

Drosophila'da Diap1, uygunsuz kaspaz aktivasyonunu ve her yerde bulunan apoptozu önlemek için kesinlikle gereklidir (Goyal, McCall, Agapite, Hartwig ve Steller, 2000). Ayrıca Diap1, hem canlı hücrelerde bozulma için kaspaz 9 ortoloğu Dronc'u hedeflemek hem de apoptotik altında kendi kendine konjugasyonu ve Diap1 bozunmasını desteklemek için bir E3-ubikuitin ligaz işlev görür. Memeli XIAP, *Drosophila* Diap1 ile kaspazlara, Reaper ailesi proteinlerine bağlanma yeteneği ve apoptotik uyaranlara yanıt olarak otomatik her yerde bulunma ve proteazom aracılı degradasyona uğrama yeteneği dahil olmak üzere birçok özelliği paylaşır (Şekil 2.17), (Yang, Fang, Jensen, Weissman ve Ashwell, 2000).

Drosophila'da birçok farklı sinyal yolu, IAP antagonistleri Reaper, Hid ve Grim (RHG) ve apoptozom proteinleri Ark (Apaf-1 homologu) ve Dronc'u (kaspaz-9 homologu) düzenler. Bu bir yandan DIAP1'in ubikuitin aracılı bozunmasına ve kaspazların derepresyonuna neden olurken, diğer yandan Dronc'un (kaspaz-9 homolog) Ark ile ilişki kurmasını sağlayarak aktif apoptozomlar yaratır ve efektör kaspazlar DrICE ve aktivasyonunu sağlar. Dcp1. Her iki yol da verimli kaspaz aktivasyonu için gereklidir ve "gaz" ve "fren" ile bir araba sürmeye benzer şekilde koordineli olarak düzenlenir. Bununla birlikte, in vivo apoptozun verimli bir şekilde indüklenmesi için "frenlerin" kaldırılması gereklidir ve genellikle bunu başlatır. P35

proteini, spesifik olarak Dcp-1 ve DrICE aktivitesini inhibe edebilir (Şekil 2.17) (Fuchs ve Steller, 2011).

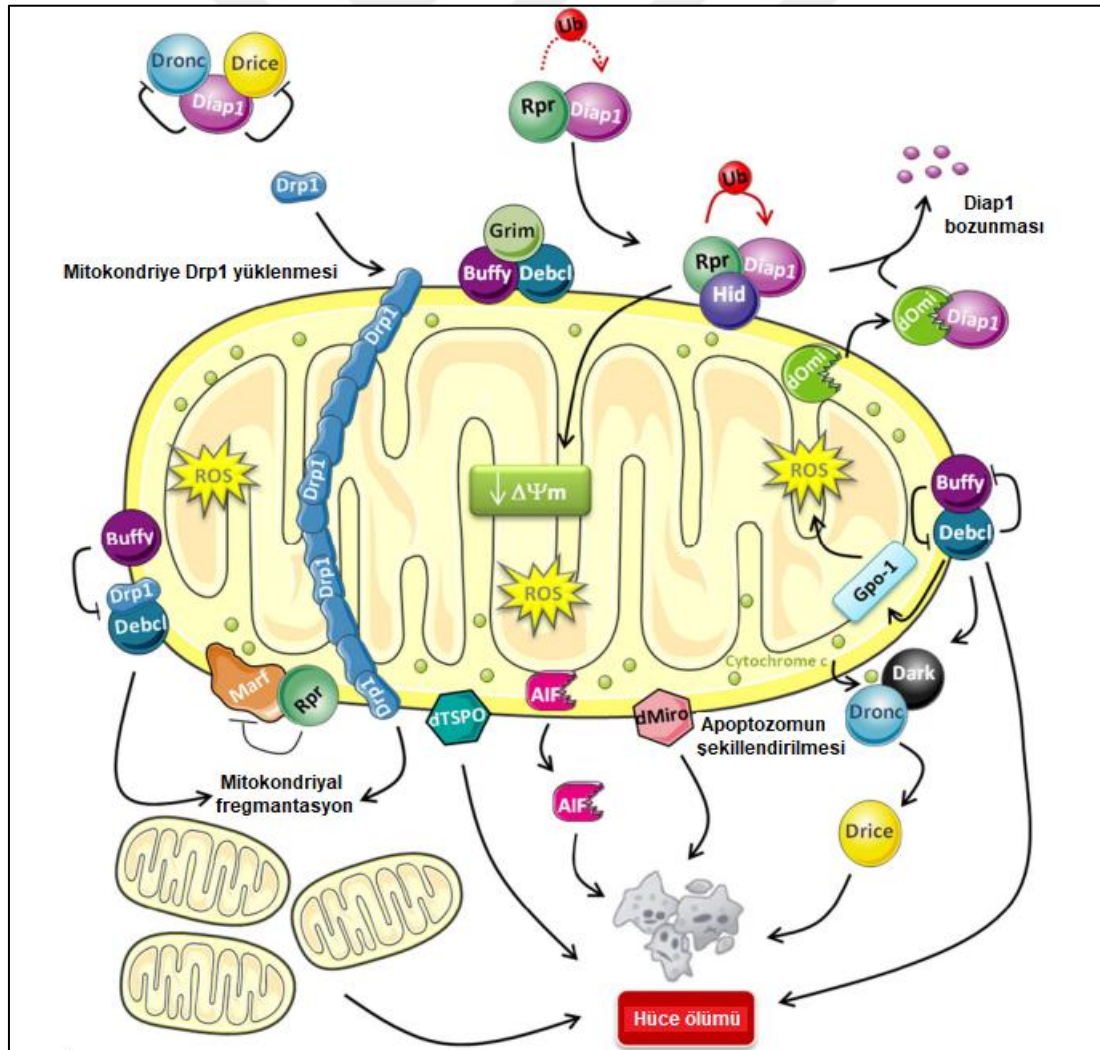


Şekil 2.17. *Drosophila* ve memelilerde apoptoz (Fuchs ve Steller, 2011)

Memelilerde, proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 aile üyeleri arasındaki denge, sitokrom c ve IAP antagonistlerinin mitokondriden salınmasını düzenleyerek apoptozla bağlantı kilit bir faktördür. Sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanması, kaspaz-9'u toplayan ve aktive eden apoptozom düzeneğini destekler. IAP antagonistleri, kaspazları, hem başlatıcı hem de efektör kaspazları hedefleyen X'e bağlı apoptoz inhibitörü (XIAP) olmak üzere IAP'lerin inhibisyonundan kurtarır. XIAP antagonisti ARTS, mitokondriyal dış zarda lokalizedir ve mitokondriyal zarlar arası boşluktan salınan sitokrom c, Smac ve diğer proteinlerin salınmasından önce etki eder (Şekil 2.17) (Fuchs ve Steller, 2011).

Ayrıca *Drosophila*'da mitokondriyal ölüm yolağı da apoptozda görev alır (Şekil 18). Bu yolak şu şekilde gerçekleşir; Öncelikle apoptotik bir uyarana yanıt olarak, mitokondriden dOmi/HtrA2 salınır. Sitozole girdikten sonra, Diap1'i parçalayarak bozar. AIF ayrıca mitokondriden salınır ve hücre ölümü indüksiyonunda yer alır. Mitokondriyal dTSPO ve

dMiro proteinleri, mitokondriyal dış zarda lokalizedir ve ayrıca hücre ölüm programında yer alırlar. Sitokrom c, apoptotik uyarılara yanıt olarak mitokondriyal yüzeye maruz kalır. Bu maruz kalma, mitokondri yakınında bir apoptozom oluşumunu teşvik edecektir. Debcl ve Buffy, stres kaynaklı hücre ölümünde rol oynar. Gpo-1, ROS birikimini artırarak Debcl kaynaklı hücre ölümüne katılır. Debcl ve Buffy, Grim ile etkileşime girer, ancak bu etkileşimin biyolojik önemi bilinmemektedir. Rpr, Diap1 bozulmasını indüklemeye yeteneğini artıran apoptotik uyarılara yanıt olarak mitokondriye alınır. Rpr ayrıca mitokondriyal membran potansiyelini de değiştirebilir. Ek olarak Rpr, pro-füzyon proteini Marf1 inhibe ederek mitokondriyal parçalanmayı teşvik eder. Debcl ayrıca pro-füzyon proteini Drp1 ile etkileşime girerek bir mitokondriyal parçalanmayı tetikler. Bu mitokondriyal parçalanma, verimli hücre ölümü için gereklidir (Şekil 2.18), (Claiver, Rincheval-Arnold, Colin, Mignotte ve Guénal, 2016).



Şekil 2.18. *Drosophila*'da mitokondriyal hücre ölüm yolu

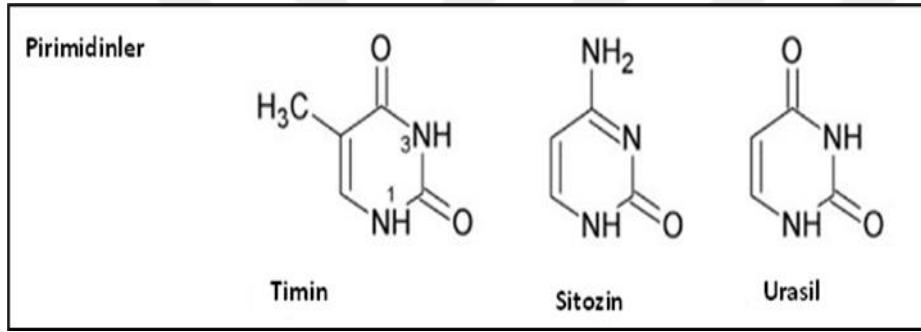
2.4. Dihidropirimidinonlar ve Kullanım Alanları

Heterosiklik kimya, modern yayınların yaklaşık üçte birini oluşturan organik kimyanın önemli bir dalıdır (Karelsen, Katritzky, Szafran, ve Zerner, 1989). Heterosiklik bileşikler biyolojik sistemimizde hayati bir role sahiptir. Farmakolojik olarak aktif birçok molekülün, doğal ürünün ve nükleik asidin ayrılmaz bir parçasıdır. DNA ve RNA'nın baz çifti (guanin, sitozin, adenin ve timin) ayrıca pürin, pirimidin vb. gibi heterosiklik bileşiklerden oluşur. Heterosiklik bileşikler antitümör, antibiyotik, antiinflamatuvar, antidepresan gibi çok çeşitli ilaç adaylarında bulunur, ayrıca sıtmaya karşı, anti-HIV, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antidiyabetik, herbisidal, fungisidal ve insektisidal ajanlar olarak kullanılır (Soni ve diğerleri, 2014). Bazı doğal olarak oluşan ve birçok hastalığa karşı iyi bir biyolojik aktiviteye sahip olan bazı moleküller keşfedilmiştir, örneğin kinin antimalaryal ilaç olarak kullanılır, vinblastin ve vinkristin de antikanser maddesi olarak kullanılır (Kaur, Chaudhary, Kumar, Gupta ve Rawal, 2017).

Pirimidin, en önemli heterosiklik kısımdır. pirimidin türevleri tıbbi kimyada çeşitli terapötik uygulamalara sahiptir. Aktivitelerinin beklenen bir nedeni, nükleik asitler, DNA ve RNA'nın temel yapı taşları olan timin, sitozin ve urasil içinde bir pirimidin bazının varlığıdır (Sondhi ve diğerleri, 2005). Pirimidin içeren çok sayıda kimyasal bileşik sentezlenmiştir. Antihipertansif, antikanser, antimikrobiyal, antihiperglisemik, antiaritmik, antiinflamatuvar, analjezik, antibakteriyel, anti-HIV, antitüberküler aktivite açısından değerlendirilmiştir. Çok çeşitli terapötik özellikler nedeniyle, bilim adamları yeni dihidropirimidin molekülleri geliştirmeye yönelmişlerdir (Kaur ve diğerleri, 2017).

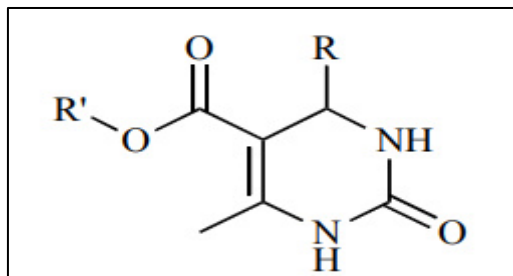
Dihidropirimidinonlar (DHPM) çok bileşenli reaksiyonlar (BR) yardımıyla sentezlenir. BR, üç veya daha fazla başlangıç malzemesinin istenen ürünü vermek üzere reaksiyona girdiği, teorik olarak yararlı özel organik reaksiyon türleridir (Dömling, 2000). Kombine sentez yolları genellikle zaman, hız, verim ve yeniden üretilebilirlik açısından sürekli veya atipik yaklaşımlara göre avantajlar gösterir. Organik reaksiyonlar arasında, ikiden fazla başlangıç malzemesi içeren BR'nin kompleks bir ürün oluşturmaya izin verilir. Bu nedenle, ilaç keşfi için çeşitlilik odaklı ve karmaşıklık yaratan sentez için üstün bir araç oluştururlar (Beck, Magnin-Lachaux, Herdtweck ve Domling, 2001).

Heterosiklik sentez için yaygın olarak kullanılan çok bileşenli reaksiyon, Biginelli reaksiyonu ve Hantzsch dihidropiridin sentezi (Armstrong, Combs, Tempest, Brown ve Keating, 1996). İlk defa Pietro Biginelli tarafından 1891 yılında bulunan Biginelli tepkimesi üç bileşeni içeren bir siklokondenzasyon tepkimesidir (Biginelli, 1893). Bu tepkime asidik bir ortamda aldehit, üre/tiyoüre ve uygun bir karbonil bileşiğin siklokondenzasyonu ile meydana gelir. Tepkime sonrası Biginelli bileşikleri olarak da isimlendirilen dihidropirimidin (DHPM) türevleri oluşur (Şekil 2.19). Pirimidinler ve türevleri insanın hayati fonksiyonlarında önemli bir rol oynar. Pirimidin iskeleti bir dizi doğal bileşiğin (B1 vitamini, nükleik asitler), kemoterapötik ilaçların (Flurouracil) ve sentetik ilaçların (Barbituratlar) bileşenidir. Pirimidin türevlerinin biyolojik önemi, bu bileşiklerin sentezlerine ait ilginin önemli ölçüde artışına neden olmuştur.



Şekil 2.19. Organizmadaki pirimidin bazıları

Dihidropirimidinon, pozisyon 1 ve 3'te azota sahip altı üyeli heterosiklik bir bileşiktir (Şekil 2.20). Dihidropirimidinonlar, aril aldehit, etil asetoasetat ve üre'den Biginelli reaksiyonu olarak bilinen BR ile sentezlenir. Sitozin hem DNA hem de RNA'da bulunur (RNA'da urasil ve DNA'da timin). Dihidropirimidinonların çok çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca kalsiyum kanal modülatörü ve tümörden etkilenen organlarda immünoresan ajanlar üzerindeki potansiyelleriyle de bilinirler (Shahim ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.20. Dihidropirimidinonların kimyasal yapısı

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. 4-(süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlar

Çalışmada *in vivo* ve *in vitro* ortamda etkisini araştırmak amacıyla kullanılacak olan 4-(süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonların sentez aşamaları Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Aliye Gediz Ertürk tarafından gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan bileşiklerin madde kodu, bileşiğe bağlı radikal gruplar ile molekül kütleleri (Çizelge 3.1)'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1. Sentezlenen maddelerin molekül adları ve kütlesi

Madde No	Molekül adı	Molekül kütlesi
1	PMe Metil 4-([1,1'-bifenil]-4-il)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat	322,364 g/mol
2	PPh Etil 4-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-okso-6-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat	398,462 g/mol
3	PNO₂ Etil4-([1,1'-bifenil]-4-il)-6-(4-nitrofenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat	443,459 g/mol

3.1.2. Hücre Kültürü çalışmalarında kullanılan ekipman ve kimyasallar

Çalışmalarımızın gerçekleştirildiği laboratuvar şartları Resim 3.1'de kullanılan ekipmanların model ve kullanım amaçları ise Çizelge 3.2'de verilmiştir.



Resim 3.1. Hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı laboratuvar

Çizelge 3.2. Kullanılan ekipman marka ve kullanım amaçları

Ekipman Türü	Marka	Kullanım amacı
CO ₂ İnkibator	Memmert	Hücrelerin çoğaltımı
Laminar Akımlı Kabin	Thermo	Hücre kültürü çalışmaları
İnvert Mikroskop	Leica	Hücre kültürü çalışmaları
Real Time PCR cihazı	Thermo	Gen ifadesinin belirlenmesi
Azot Tankı	Thermo	Hücrelerin uzun süre stoklanması
Mikroplaka okuyucu	Thermo	MTT, RNA ve protein miktar ölçümü
Santrifüj cihazı	Hettich	Hücre kültürü çalışmaları
-80 derin dondurucu	Thermo	Hücrelerin stoklanması
Hassas terazi	Shimadzu	Besiyeri bileşenlerinin tartımı
Otoklav	Nüve	Malzemelerin steril edilmesi
Thermal cycler	Techne Prime	cDNA sentezi
Vorteks	IKA	Hücre kültürü aşamaları
Pipetör	Thermo	Hücre kültürü aşamaları
Mikro pipetler	Thermo	Hücre kültürü, MTT, RNA izolasyonu
Thoma lamı	İsolab	Hücrelerin mikroskopla sayımı
Işık mikroskobu	Olympus	Hücrelerin sayımı
Plate (96, 6)	TPP	MTT ve RNA izolasyonu
Flask	TPP	Hücrelerin büyümesi ve çoğaltımı
Buzdolabı (-20, +4)	Arçelik	Malzemelerin saklanması

Çalışmada kullanılan reaktif ve besiyerlerinin marka ve kullanım amaçları Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kullanılan reaktif ve besiyerlerinin marka ve kullanım amaçları

Ekipman Türü	Marka	Kullanım amacı
RPMI-1640	Sigma	Hücre besiyeri
DMEM/F12	Sigma	Hücre besiyeri
Penicillin streptomycine	Sigma	Hücre besiyeri
FBS (Fetal Bovine Serum)	Sigma	Hücre besiyeri
PBS (phosphate Buffer Saline)	Sigma	Hücre pasajlanması
Sodyum Bikarbonat	Sigma	Hücre besiyeri hazırlanmasında
Horse serum	Sigma	Hücre kültürü DMEM/F12 besiyeri serumu
DMSO	Sigma	Reaksiyonun durdurulması
Trypan Blue	Sigma	Hücre sayımı
Absolute Etanol (1)	Sigma	1) İzolasyon çalışmalarında
Etanol (2) % 70		2) Sterilizasyon işlerinde
B-mercaptoethanol	Amresco	RNA izolasyonu çalışmalarında
WST-8 -Methoxy-5-methylphenazinium methyl sulphate	Sigma	Sitotoksikite testlerinde kullanılır

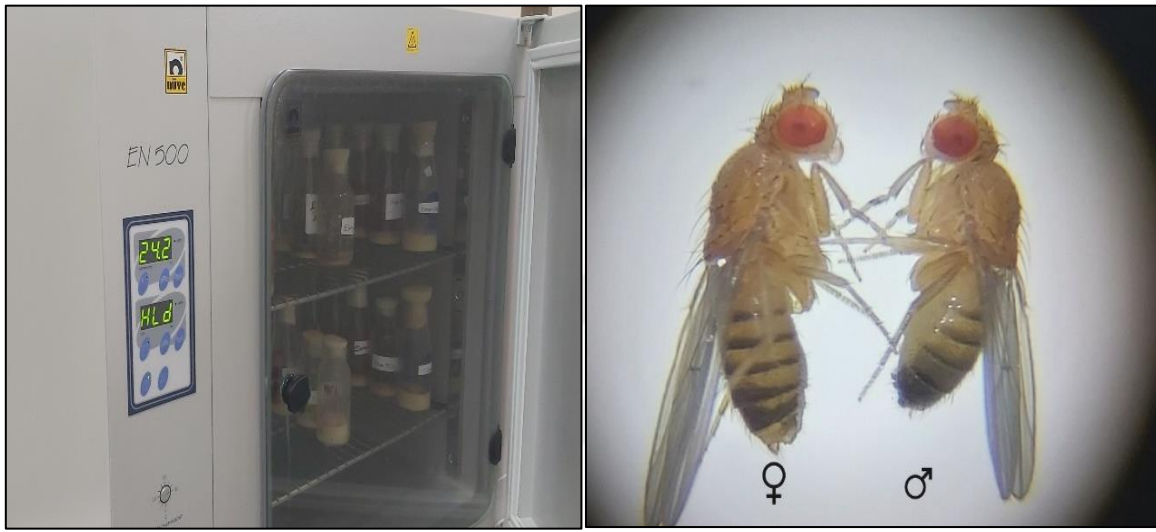
3.1.3. *Drosophila melanogaster* hatları

Çalışmamızın ilk bölümünde dihidroprimidinonların olası genotoksik etkileri SMART ile *Drosophila melanogaster*’de araştırılmıştır.

D. melanogaster, meyve sineği olarak bilinen Diptera takımına ait yabani tip bir sinek türüdür. *D. melanogaster* yaşam döngüsü yumurta, larva, pupa ve yetişkin evreleri olarak dört aşamaya ayrılır (Arbeitman ve diğerleri, 2002). *D. melanogaster*’in yumurta aşamasından yetişkin evresine kadar olan yaşam döngüsü, 25°C’de yaklaşık 10 gün sürer (Ong, Yung, Cai, Bay ve Baeg, 2015). Genomunun bilinmesi nedeniyle son yıllarda birçok çalışmada model canlı olarak kullanılmaktadır. Bu görüş, *Drosophila* genomunun dizilimi ve insan hastalık genlerinin %60’nın meyve sineğinde homologlara sahip olduğunun keşfedilmesiyle güçlendi. Bu böcek kimyasal komplekslerin ve biyolojik ajanların toksikolojik ve oksidatif etkilerinin belirlenmesinde de sıklıkla kullanılmaktadır (Calap-Quintana, González-Fernández, Sebastiá-Ortega, Llorens ve Moltó, 2017).

Çalışmamızda, *in vivo* testler için *D. melanogaster*'in *mwh* ve *flr³* soyları kullanılmıştır. Bu hatlar Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyolojik Aktivite Laboratuvarı'nda 8 yıldır kendileştirilerek çoğaltılmaya devam etmektedir (Resim 3.2). Standart Lewis besin ortamında (Lewis and Bacher 1968), *Drosophila* için ideal yaşama koşullarında ($25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve %60 bağıl nem) kültüre alınmıştır. Normal metabolik aktiviteye sahip bu türlerin genetik yapısı aşağıdaki gibidir (Lindsley ve Zimm, 1992).

- *mwh* / *mwh*
- *flr³* / In (3LR)TM3, BdS

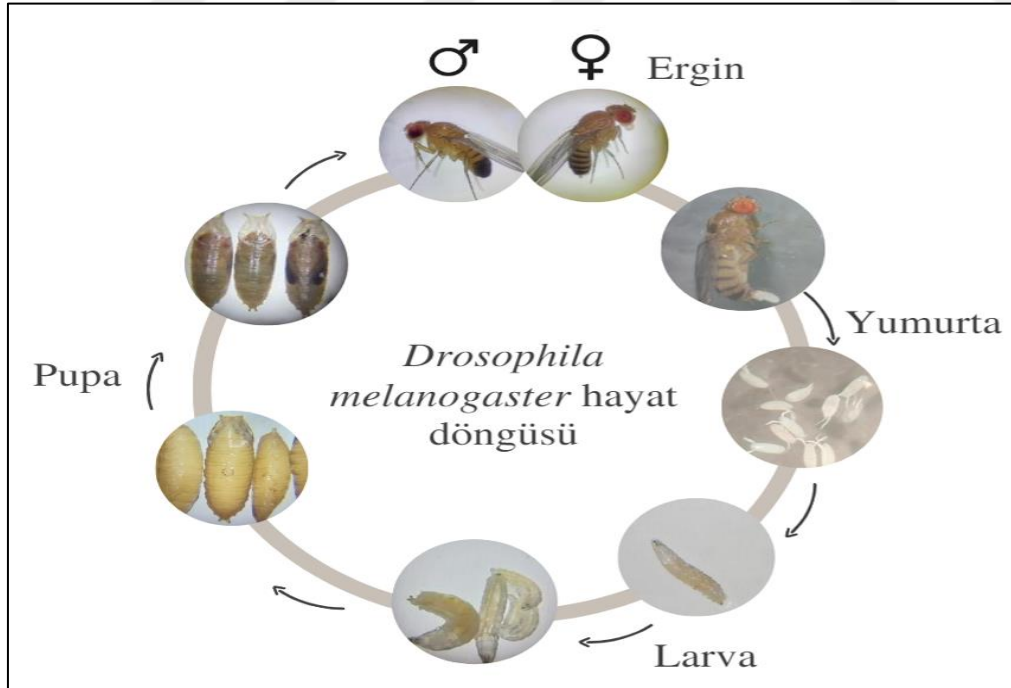


Resim 3.2. *D. melanogaster*'in Oregon R soyu (yabanıl tip) standart yaşam koşulları, erkek ve dişi bireyleri (orijinal)

D. melanogaster, diploid kromozom sayısına sahiptir ve dört çift kromozom taşımaktadır. Bu dört çift kromozomdan üç çifti otozomal kromozom, bir çifti ise cinsiyet kromozomlarıdır (Uysal, Şişman ve Aşkın, 2006). Kültüre alınan bireyler besin üzerlerine yumurta bıraktıktan 1 gün sonra yumurtalar açılmaya başlar ve larvalar mevcut besin üzerinden beslenmeye başlarlar. Beslenen larvalar üçüncü evreye ulaştıktan sonra yaşama ortamlarında kuru bir yer bularak pupa evresine geçmektedir (Wurgler ve Vogel, 1986). Pupa içerisinde imajinal disklerden kanat, göz bacak gibi metamorfoz geçirerek gelişir (Ashburner, 1989).

Drosophila yaşam döngüsü kısadır ve bu nedenle genetik, biyokimyasal ve moleküler analizler için çok sayıda birey yetiştirmek kolaydır. *Drosophila melanogaster* laboratuvarında genellikle 25 veya 18°C'de kültürlenir; özellikle belirtilmediği sürece 25°C için tüm süreci

sağlıyoruz. Nesil süresi, döllenmiş yumurtadan kapalı yetiştikine kadar kabaca 10 gündür ve maksimum yaşam süresi, kültür koşullarına bağlı olarak 60 ila 80 gün arasında değişir. *Drosophila* holometabol bir böcektir ve yaşam döngüsü dört aşamaya ayrılabilir: embriyo, larva, pupa ve yetiştin. Dişiler günde yaklaşık 100 embriyo bırakır ve embriyogenez sadece 24 saat sürer. Birinci dönem larva, besiyerinin yüzeyinde hemen beslenmeye başlar ve iki tüy dökümünden geçer. İkinci dönem larvaları besiyeri ortamının içine girer ve üçüncü dönem larvası olgunlaştığında, kültür ortamını terk eder ve 24-48 saat pupalaşmak için bir yer arayarak şişenin duvarlarında dolaşır. Pupaşma sırasında, larvadan yetiştikine tam bir vücut metamorfozu gerçekleşir; larva dokularının çoğu bozulur ve yetiştin organları, hayali diskler olan farklılaşmamış bir hücre kesesinden gelişir. *Drosophila*'da, karın hariç tüm yetiştin vücudunu yeniden oluşturan 10 çift hayali disk ve üreme organını oluşturan genital disk vardır. Abdominal epidermis, bir grup özelleşmiş hayali hücre olan histoblastlardan oluşur. Hayali diskler, yetiştin yapılarının morfogenezinde doğrudan yer alan birçok genin rolünü çözmek için yaygın olarak kullanılan hücresel bölgeleri oluşturur. Son olarak, yumurtanın döllenmesinden sonra 9 ila 10 gün arasında yetiştin ortaya çıkar (Fernández-Moreno, Kaguni ve Garesse, 2007) (Resim 3.3).



Resim 3.3. *Drosophila melanogaster* hayat döngüsü (orijinal)

3.1.4. SMART çalışmalarında kullanılan ekipman ve kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan 4 (süstitüe)-3,4-dihidropirimidinon bileşiklerinin olası genotoksik ve antijenotoksik etkisini araştırdığımız SMART çalışmasında kullandığımız kimyasal maddeler, Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Kullanılan ekipman marka ve kullanım amaçları

Test tekniği	Kimyasal madde	Firma adı
SMART	<i>Drosophila</i> besiyeri	Carolina Bio. Supp
	Agar agar	Merck
	Dietil eter	Merck
	Propionik asit	Merck
	Gliserol	Merck
	Kloral hidrat	Merck
	Arap zamkı	Sigma
	Etil metansülfonat	Sigma
	Sodyum hidroksit	Merck
	Entellan	Merck

3.1.5. Gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılan ekipman ve kimyasallar

Çizelge 3.5. ve Çizelge 3.6’da verilen çalışmada kullanılan primerler Invitrogen ve Oligomer firması tarafından HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) saflıkta sentezlenmiş ve 100 µM olacak şekilde nükleaz içermeyen H₂O’da (Sigma-Aldrich) stok solüsyonlar şeklinde hazırlanmıştır. Stok çözeltiden 1/10 seyreltme yapılarak 10 µM’lık primer stoğu elde edilmiş ve çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.5. A549 Hücre hattı için kullanılan primer dizileri, referanslar ve ürün uzunlukları

Primer adı	Dizisi (5'-3')	Aksesyon numarası	Ürün uzunluğu	°C
GAPDH F	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA	NM_001357943.2	127	55
GAPDH R	GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT			
BAX F	TCATGGGCTGGACATTGGAC	NM_001291428.1	114	59
BAX R	GAGACAGGGACATCAGTCGC			
BCL2α F	ATCTGGGCCACAAGTGAAGTC	NM_000633.2	209	59
BCL2α R	TTCGACGTTTTGCCTGAAGAC			
CASPS 3 F	GGCGCTCTGGTTTTCTGTTAAT	NM_001354777.1	239	59
CASPS 3 R	CGACATCTGTACCAGACCGA			
CASPS 9 F	AGGCCCATATGATCGAGGA	NM_001229.5	193	60
CASPS 9 R	TCGACAACCTTTGCTGCTTGC			
HSP90 α F	GCGCTAGCAGGAGATGGTTA	NM_005348.3	103	60
HSP90 α R	TTTCTGTGCCTACGTGTGCT			
HSP27 F	ATGGCGTGGTGGAGATCACC	NM_001540.5	347	60
HSP27 R	CAAAAGAACACACAGGTGGC			
HSP70 F	AAGGAGACAGCCGAAAGTGT	L12723.2	212	57
HSP70 R	CTTGTTTCTCTTCTAAGCGAGG			
HSP 60 F	GACGACCTGTCTCGCCG	NM_002156.5	258	60
HSP 60 R	GGACTTCCCCAACTCTGCTC			
SOD 1 F	ACAAAGATGGTGTGGCCGAT	NM_000454.5	162	59
SOD 1 R	AACGACTTCCAGCGTTTCCT			
SOD 2 F	GCCCTGGAACCTCACATCAA	NM_001322816.2	133	60
SOD 2 R	CAGCCTGGAACCTACCCTTG			
CAT F	AGTGATCGGGGATTCCAGA	NM_001752.4	159	60
CAT R	AAGTCTCGCCGCATCTTCAA			
GSS F	AAGGCGAACTAGTGTGGGA	NM_000178.4	176	59
GSS R	AGAGCGTGAATGGGGCATAG			

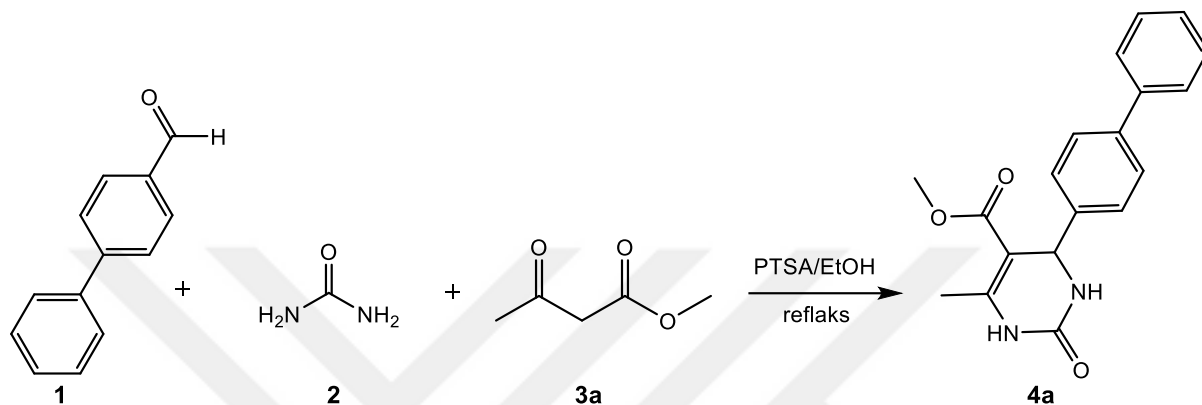
Çizelge 3.6. *D. melanogaster* için kullanılan primer dizileri, referanslar ve ürün uzunlukları

Primer adı	Dizisi (5'-3')	Aksesyon numarası	Ürün uzunluğu	°C
DEBCL F-BAX	TTTTCGCTCCAGCATCACCT	NM_176098.3	266	59
DEBCL R-BAX	ATGCGCCTGCAGAGATAGTC			
BUFFY F-BCL-2	ATACTGGGCTCCACCTCCAT	NM_078978.2	176	60
BUFFY R-BCL-2	GCTCCCAAAAGCAAGCTCAC			
DRICE F-CAS 3	TGTCGGCCCACCCTTATCTA	NM_079827.3	113	60
DRICE R-CAS 3	TGGACGACCATGACACACAG			
DRONC F-CAS 9	ATTGGAATGCCGAAGAGGCA	NM_079293.4	152	60
DRONC R- CAS 9	TTGCCATTGAGATCCTGCGT			
HSP 27 F (VARIANT B)	ACAAGAACAGGCGCAACACT	NM_001300072.1	174	60
HSP 27 R (VARIANT B)	CCAACAAAAGCCGGTTTACCC			
HSP 60A F (ISOFORM A)	TCGGAAGCGTTCGCTTAACT	NM_078560.3	97	60
HSP 60A R (ISOFORM A)	TAATGGAGGAGCGAGCAAGC			
HSP 70 F (Hsc-70-4 V-A)	ATCGAAGGTGCGGCAGATTA	NM_079632.6	187	60
HSP 70 R (Hsc-70-4 V-A)	ACGATTACCCTGGTCGTTGG			
HSP 90 F (Hsp 83 V-B)	GCGCACTTTTCGACCGTATC	NM_001274433.1	111	60
HSP 90 R (Hsp 83 V-B)	CGACCCGAAGTGAAGTCTC			
SOD F	ACACGAGCTGAGCAAGTCAA	NM_057387.5	105	59
SOD R	CAGTGGCCGACATCGGAATA			
CAT F	GAAGTGGCCGTACAAGGTGA	XM_002042583.2	120	60
CAT R	CATTCTGGGGACCGTTGAA			
GR F(thioredoxin reductase-1)	AGCCGCTACAATACACGCTT	NM_078527.3	72	60
GR R(thioredoxin reductase-1)	AACGGCGGGTAGTGAATGTT			
GST F	ACCAGAGCATTTTCGATGGCT	NM_001274111.1	138	59
GST R	ACGAGACGAATTGTTTCGCTAC			

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmada kullanılan bileşiklerin sentezi

Metil 4-([1,1'-bifenil]-4-il)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat'ın (4a) sentezi

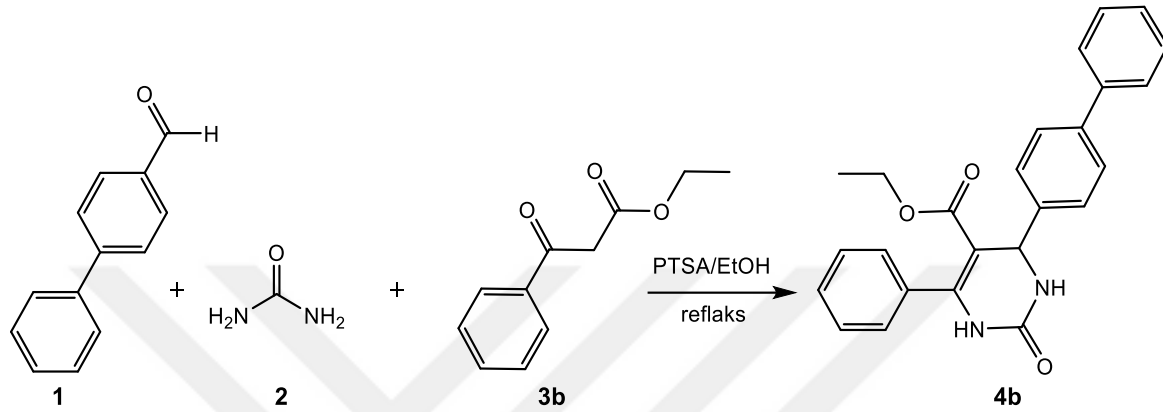


Şekil 3.1. Metil 4-([1,1'-bifenil]-4-il)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat'ın (4a) sentezine ait şematik gösterim

25mL'lik yuvarlak dipli bir balonda etanol (10 mL) içerisinde 1 mmol (182 mg) bifenil-4-karboksaldehit (**1**); 1,5 mmol (90 mg) üre (**2**); 1,2 mmol (139 mg) metil asetoasetat (**3a**); 0,30 mmol (52 mg) p-toluensülfonik asit (PTSA) karıştırıldı. Karışım 20 saat geri soğutucu altında kaynatıldı ve reaksiyonun ilerleyişi ince tabaka kromatografisi ile etil asetat:Hekzan (3:1) çözücü sisteminde takip edildi. Çözelti oda sıcaklığına geldikten sonra, çözücü evapore edilerek uzaklaştırıldı. Elde edilen katılar sırasıyla toluenle ve suyla yıkandı. Katılar 40 °C'de vakumda kurutulduktan sonra etil asetat:hekzan karışımından kristallendirildi. **Verim:** %87 (279 mg); **E.N:** 260-261 °C; **Rf:** 0,40 (Etil asetat:Hekzan 3:1); **FT-IR (ATR) v (cm⁻¹):** 3240 N-H gerilme, 3109 aromatik = C-H gerilme, 2947 alifatik C-H gerilmesi, 1712 ester C=O gerilme, 1682 amit C=O gerilme, 1558-1427 alken C=C gerilme, 1334 C-N gerilme, 1265 ve 1180 C-O-C gerilme, 1088 monosüstitüe benzen düzlem içi eğilme, 849 ve 764 p-disüstitüe benzen eğilme, 725 ve 655 monosüstitüe benzen düzlem dışı eğilme; **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm)** 9,28 (s, 1H, **NH**); 7,82 (s, 1H, **NH**); 7,63 (t, *J*: 7,1 Hz; 4H; C₆H₅ halkasındaki =**CH**); 7,46 (t, *J*: 7,5 Hz; 2H; C₆H₄ halkasındaki =**CH**); 7,35 (dd, *J*: 15,1; 7,6 Hz; 3H; C₆H₅ ve C₆H₄ halkalarındaki =**CH**); 5,20 (d; *J*: 3,1 Hz; 1H; pirimidin halkasındaki **CH**); 3,56 (s, 3H, O**CH**₃); 2,28 (s, 3H, pirimidin-**CH**₃); **APT-¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm)** 166,35 (O-**C**=O); 152,71 (N-**C**=O);

149,25; 144,22; 140,32; 139,75; 129,38 (2C); 127,87 (2C); 127,32 (2C); 127,26; 127,10 (2C); 99,43 (-C=C); 53,96 (-CH); 51,32 (CH₃O); 18,33 (CH₃); **LC/MS-TOF**: C₁₉H₁₈N₂O₃ için hesaplanan (M + H)⁺ = 323,1390; bulunan (M + H)⁺ = 323,1381.

Etil 4-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-okso-6-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat'ın (4b) sentezi

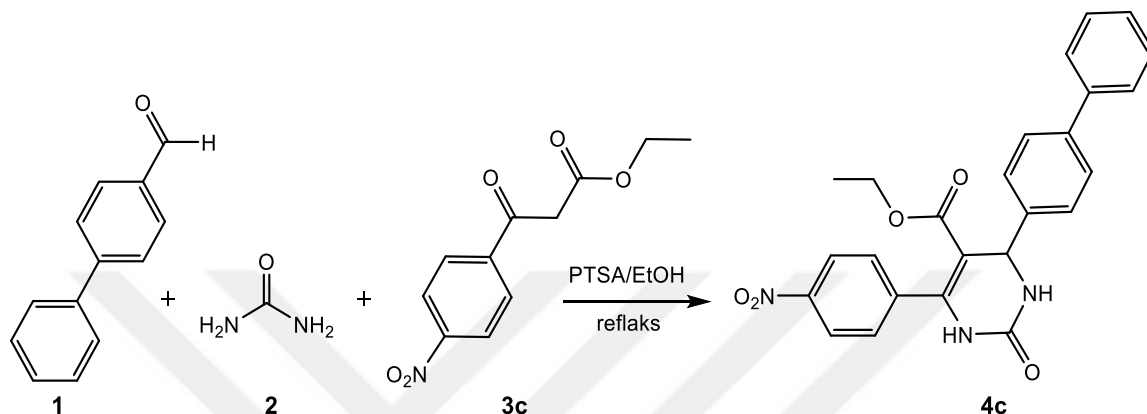


Şekil 3.2. Etil 4-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-okso-6-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat'ın (4b) sentezine ait şematik gösterim

25mL'lik yuvarlak dipli bir balonda etanol (10 mL) içerisinde 1 mmol (182 mg) bifenil-4-karboksaldehit (**1**); 1,5 mmol (90 mg) üre (**2**); 1,2 mmol (240 mg) etil benzoilasetat (**3b**); 0,30 mmol (52 mg) p-toluensülfonik asit (PTSA) karıştırıldı. Karışım 13 saat geri soğutucu altında kaynatıldı ve reaksiyonun ilerleyişi ince tabaka kromatografisi ile etil asetat:Hekzan (3:1) çözücü sisteminde takip edildi. Çözelti oda sıcaklığına geldikten sonra, çözücü evaporare edilerek uzaklaştırıldı. Elde edilen katılar sırasıyla toluenle ve suyla yıkandı. Katılar 40 °C'de vakumda kurutulduktan sonra etil asetat:hekzan karışımından kristallendirildi. **Verim**: %70 (279 mg); **E.N**: 204-205 °C; **Rf**: 0,26 (Etil asetat:Hekzan 3:1); **FT-IR (ATR) v (cm⁻¹)**: 3287 N-H gerilme, 3062 aromatik = C-H gerilme, 2978, 2862 alifatik C-H gerilmeleri, 1712 ester C=O gerilme, 1658 amit C=O gerilme, 1597-1435 alken C=C gerilme, 1334 C-N gerilme, 1242 ve 1188 C-O-C gerilme, 1118 ve 1080 monosüstitüe benzen düzlem içi eğilme, 848 ve 756 p-disüstitüe benzen eğilme, 694 ve 632 monosüstitüe benzen düzlem dışı eğilme; **¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ, ppm)** 9,37 (s, 1H, NH); 7,92 (s, 1H, NH); 7,68 (t, J: 7,1 Hz, 4H, C₆H₅ halkasındaki =CH); 7,48 (t, J: 7,5 Hz, 4H, C₆H₅ halkalarındaki =CH); 7,45-7,36 (m, 4H, C₆H₄ halkasındaki =CH); 7,34 (dd, J: 7,7; 1,6 Hz; 2H; C₆H₅ halkalarındaki =CH); 5,29 (d, J: 3,3 Hz, 1H, pirimidin halkasındaki CH); 3,74 (q, J: 7,1 Hz; 2H; OCH₂); 0,74 (t, J: 7,1 Hz; 3H; OCH₂CH₃); **APT-¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆, δ, ppm)** 165,65 (O-C=O); 152,65 (N-C=O); 149,58; 144,03; 140,34;

139,83; 135,53; 129,42 (2C); 128,85 (2C); 128,22 (2C); 127,91 (3C); 127,40 (3C); 127,13 (2C); 100,74 ($\underline{\text{C}}=\text{C}$); 59,61 ($-\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 54,30 ($\underline{\text{C}}\text{H}$); 13,85 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$); **LC/MS-TOF**: $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ için hesaplanan $(\text{M} + \text{H})^+ = 399,1703$; bulunan $(\text{M} + \text{H})^+ = 399,1682$.

Etil 4-([1,1'-bifenil]-4-il)-6-(4-nitrofenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin 5 karboksilat'ın (4c) sentezi



Şekil 3.3. Etil 4-([1,1'-bifenil]-4-il)-6-(4-nitrofenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat'ın (4c) sentezine ait şematik gösterim

25mL'lik yuvarlak dipli bir balonda etanol (10 mL) içerisinde 1 mmol (182 mg) biphenil-4-karboksaldehit (1); 1,5 mmol (90 mg) üre (2); 1,2 mmol (294 mg) etil 4-nitrobenzoilasetat (3c); 0,30 mmol (52 mg) p-toluensülfonik asit (PTSA) karıştırıldı. Karışım 26 saat geri soğutucu altında kaynatıldı ve reaksiyonun ilerleyişi ince tabaka kromatografisi ile etil asetat:Hekzan (3:1) çözücü sisteminde takip edildi. Çözelti oda sıcaklığına geldikten sonra, çözücü evapore edilerek uzaklaştırıldı. Elde edilen katılar sırasıyla tolüenle ve suyla yıkandı. Katılar 40 °C'de vakumda kurutulduktan sonra etil asetat:hekzan karışımından kristallendirildi. **Verim**: %50 (222 mg); **E.N**: 181-182 °C; **Rf**: 0.59 (Etil asetat:Hekzan 3:1); **FT-IR (ATR) v (cm⁻¹)**: 3201 N-H gerilme, 3078 aromatik = C-H gerilme, 2981, 2898 alifatik C-H gerilmeleri, 1686 ester C=O gerilme, 1655 amit C=O gerilme, 1597-1458 alken C=C gerilme, 1346 C-N gerilme, 1242 ve 1188 C-O-C gerilme, 1118 ve 1088 monosüstitüe benzen düzlem içi eğilme, 852 ve 756 p-disüstitüe benzen eğilme, 694 ve 663 monosüstitüe benzen düzlem dışı eğilme; **¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm)** 9,61 (s, 1H, NH); 8,28 (d, *J*: 8,2 Hz; 2H; p-O₂N-C₆H₄ halkasındaki =CH); 8,01 (s, 1H, NH); 7,68 (dd, *J*: 17,6; 6,85 Hz; 6H; C₆H₅ ve p-O₂N-C₆H₄ halkalarındaki =CH); 7,50 (d, *J*: 7,5 Hz; 2H; C₆H₄ halkasındaki =CH); 7,47 (d, *J*: 7,5 Hz; 2H; C₆H₄ halkasındaki =CH); 7,38 (t, *J*: 7,1 Hz; 1H; C₆H₅ halkasındaki =CH); 5,33 (s, 1H, pirimidin halkasındaki CH); 3,75 (q, *J*: 6,7 Hz;

2H; OCH₂); 0,75 (t, J: 6,9 Hz; 3H; OCH₂CH₃); **APT-¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm)** 164,93 (O-C=O); 152,27 (N-C=O); 148,05; 147,57; 143,77; 142,23; 140,28; 140,00; 139,55 (2C); 129,43 (2C); 127,94 (2C); 127,47; 127,46 (2C); 127,13 (2C); 123,43 (2C); 101,63 (-C=C); 59,98 (-OCH₂); 54,44 (CH); 13,82 (CH₃); **LC/MS-TOF:** C₂₅H₂₁N₃O₅ için hesaplanan (M + H)⁺ = 444,1554; bulunan (M + H)⁺ = 444,1553.

3.2.2. Hücre kültürü çalışmaları

Bu çalışmada, Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Kimya Bölümünden temin edilen A549 (akciğer kanseri) hücre hattı (Resim 3.3) kullanılmıştır. Hücre hatları 0,2g/100mL sodyum bikarbonat, %10'luk hücre hattına uygun FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren hücre hattına uygun besiyeri kullanılarak 25 veya 75'lik flasklarda, %5 CO₂ ve 37°C sıcaklıktaki etüvde 24 saat inkübasyona bırakılarak üretilmiştir. Hücreler %80 doygunluğa ulaşıncaya kadar büyütüldükten sonra fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Hücrelerin pasajlanmasında 1X Tripsin-EDTA kullanılmıştır. Hücrelerin morfolojisini görüntülemek amacıyla ters mikroskop (Leica/ DM IL LED) kullanılmıştır (Resim 3.4).



Resim 3.4. Hücre kültürü çalışmasında kullanılan ekipmanlar ve Akciğer A549 hücre hattı

Bileşikler DMSO içinde çözülerek, 50 mM stok çözelti hazırlanmış ve ışık görmeyecek şekilde karanlıkta +4 °C’de saklanmıştır. Çalışmada farklı dozlarda 6 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M bileşikler hazırlanarak kullanılmıştır. Hücrelere uygulanan tüm dozların DMSO oranı %0,1’in altında olmasına dikkat edilmiştir.

3.2.3. WST-8 test protokolü

WST-8 testi, hücre canlılığı ve proliferasyonunu ölçmede kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. WST-8’e dayanan CCK-8 deney kitinde, hücre içine rahatça girip elektron taşıma görevi yapan mediatörlerle birlikte heterosiklik organik yapıdaki renksiz, hücre membranını geçemeyen, negatif yüklü WST-8 tetrazolyum tuzu (2-(2- metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu) kullanılır. WST-8 tetrazolyum tuzu, hücresel dehidrojenazlar tarafından mediatörler aracılığıyla elektron alarak suda çözünebilen turuncu formazan ürününe indirgenir. Bu olay yalnızca aktif mitokondri varlığında görülür. Dolayısıyla canlı olmayan hücreler renk reaksiyonuna neden olamazken, canlı hücreler kültür ortamını turuncuya dönüştürür. Spektrofotometrik yöntemlerle absorbans ölçümü yapılarak ortamdaki canlı hücre sayısı hesaplanır (Tokur ve Aksoy, 2017). Her konsantrasyon, üç kuyu için üç kez test edildi (Resim 3.5).



Resim 3.5. WST-8 Çalışması

Uygulanan işlem basamakları aşağıda belirtildiği şekildedir.

- Hücreler 96 kuyulu iki ayrı plakaya, her kuyuda 100 μ L medyum ve 1500 hücre olacak şekilde ekildikten sonra 24 saat süreyle 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona kaldırıldı.

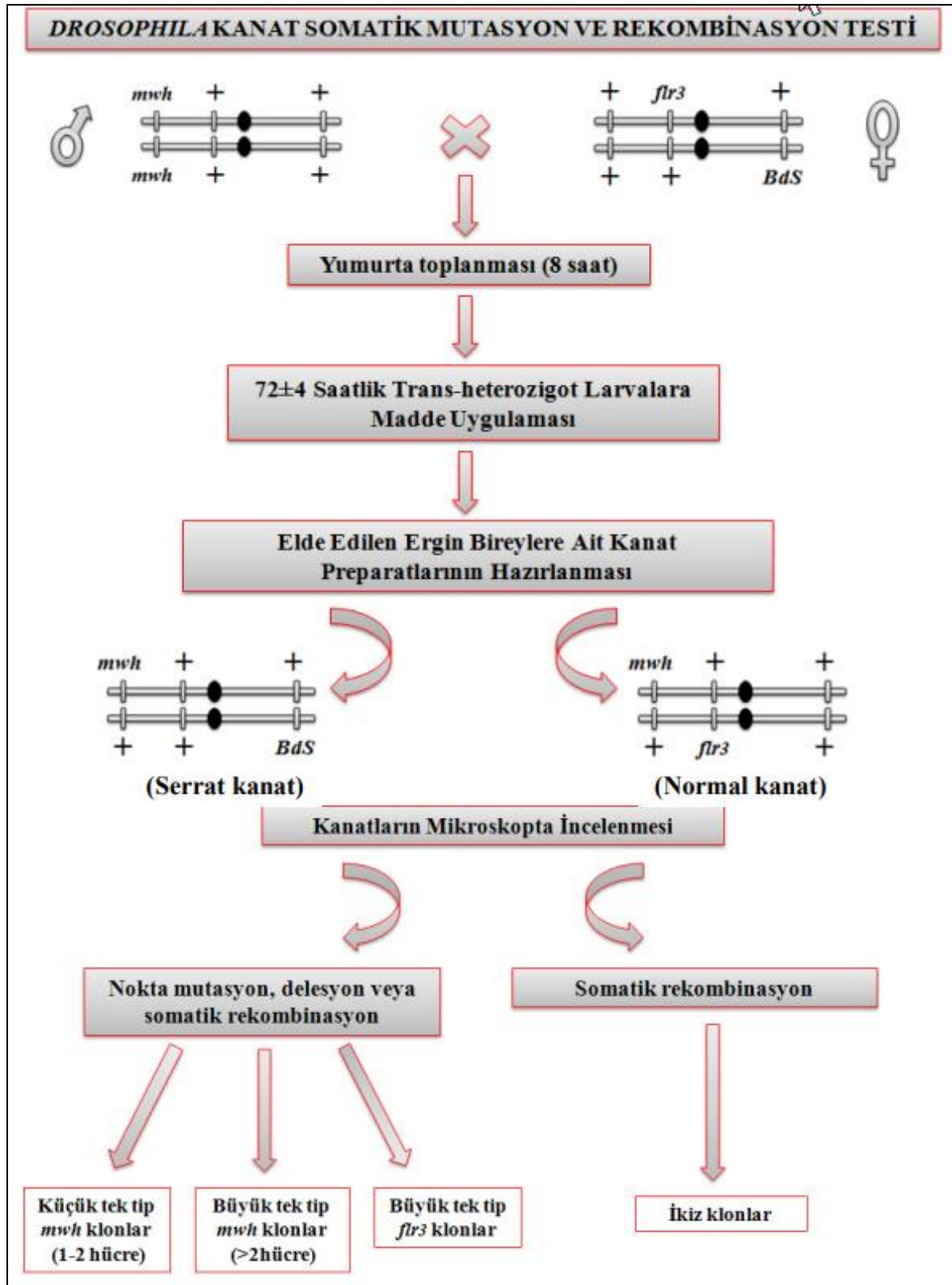
- İnkübasyon sonrası medyum değiştirildi ve ilaç uygulanmayan kontrol grubu, %1 ve %10 DMSO içeren kontrol grubu, artan konsantrasyonlarda (6, 12.5, 25, 50 ve 100 μ M) PMe, PPh, PNO₂ içeren deney grubundan 3'er tekrar olacak şekilde uygulama yapıldı.
- 24 ve 48 saatlik inkübasyon periyotlarından sonra kuyulardaki medyum atıldı. Her kuyuya 100 μ L taze medyum ve 10 μ L CCK-8 solüsyonu eklendi. Plaka, çalkalayıcıya 5 dakika konduktan sonra 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde 4 saatlik inkübasyona kaldırıldı.
- Mikropilaka kullanılarak 450 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü.

3.2.3.1. WST-8 Testinden elde edilen bulguların istatistiksel analizi

Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS sürüm 25.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tablolarda sürekli değişkenler Ort $\pm$ SS olarak sunulmuştur. Çalışmanın sürekli verileri normallik varsayımları açısından incelendiğinde, Hem Shapiro-Wilk değerleri $p < 0.05$ olması hem de Skewness ve Kurtosis değerlerinin standart hatalarına bölümlerinden elde edilen değerlerin $\pm 1,96$ eşik değer aralığında olmamasından dolayı normal dağılım göstermediği belirlenmiştir. Bu nedenler gruplar arası karşılaştırmalar için Kruskal Wallis H testi uygulanmıştır. Gruplar arasında anlamlı fark çıkması durumunda, anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için Post-Hoc testi yapılmıştır. Varyansın homojen dağılmaması nedeniyle Games-Howell Post-Hoc testi seçilmiştir (Games, 1971). $p < 0.05$ istatistikçe anlamlı kabul edilmiştir.

3.2.4. *Drosophila* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

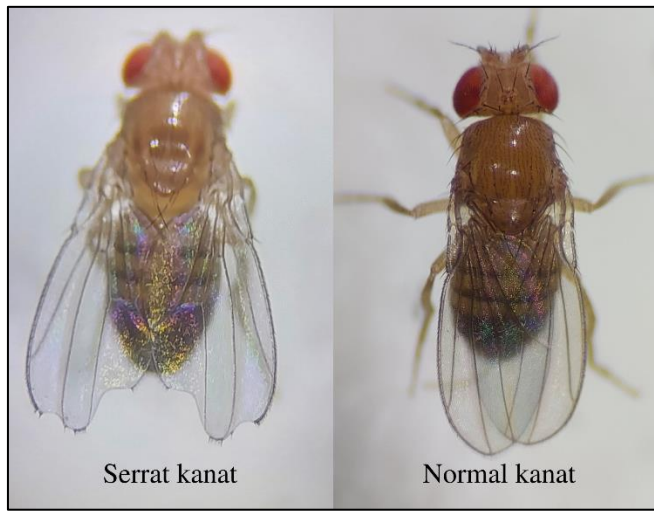
Bu çalışmada, bileşiklerin genotoksik ya da antigenotoksik etkinliğinin belirlenmesi için, önemli genotoksisite testlerinden biri olan *D. melanogaster*'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ya da diğer adıyla kanat benek testi kullanılmıştır. Şekil 3.4'de SMART şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.4. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik gösterimi (Ayar, 2013).

Kanat benek testi için fenotipte gözlemlenebilen iki uygun işaret geni kullanılmaktadır. Bu belirleyici genlerden *flare* (*flr³*, 3-38,8) geni, kanatlardaki normal düz ve uzun kıllar yerine,

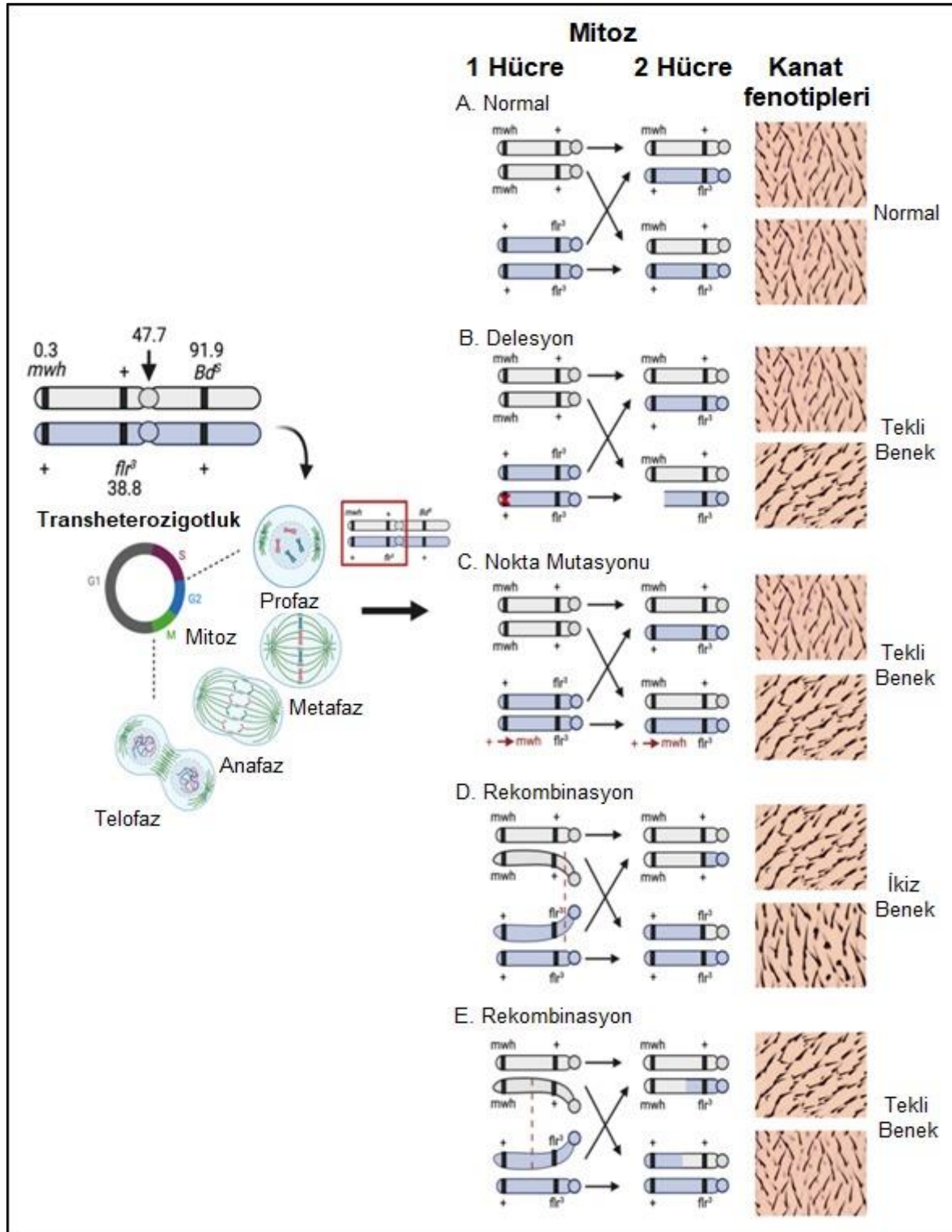
körelmiş, nokta şeklinde kıl oluşturmaktadır. *flr³* geni homozigot halde iken embriyonik evrede letal etki göstermektedir. Dolayısıyla ergin bireyler oluşamamaktadır. Hem bireyleri *flr³* geninin embriyonik letal etkisinden korumak, hem de rekombinasyonu baskılamak amacıyla dengeleyici TM3 kromozomu kullanılmaktadır. Diğer bir belirleyici gen olan *mwh* (multiple wing hair=çoklu kanat kılları, 3-0,3) geni, kanat kıllarının aynı hücreden üç veya daha fazla sayıda çıkması şeklinde kendini fenotipte ifade etmektedir. Normal kanatların kenarları düzgün bir şekilde iken, *BdS* genini taşıyan bireylerde kanat kenarları düzgün olmayıp testere dişi şeklinde bir morfolojiye sahiptir (Graf ve Würgler, 1986) (Resim 3.6).



Resim 3.6. *Drosophila melanogaster*'de farklı kanat morfolojileri (orijinal)

İşaretleyici olarak kullanılan *mwh*, *flr³* ve *BdS* genleri *Drosophila*'nın en büyük kromozomu olan üçüncü kromozom üzerinde yer almaktadır. Belirleyici genler arasındaki mesafenin uzak olması, rekombinasyon ve mutasyonların büyük aralıkta incelenmesi açısından avantaj sağlamaktadır. Dengeleyici-heterozigot bireylerde çok sayıdaki inversiyonlar sebebi ile rekombinasyonlar engellenmiştir (Schaik ve Graf, 1991). Kanat kıllarında beklenen somatik mutasyonu tespit etmek amacı ile kanatlar ayrılarak mikroskop altında incelenmiştir. Böylece, mutasyon ya da mitotik rekombinasyon sonucu heterozigotluğun kaybedilmesi ile ortaya çıkan mutant hücre klonları araştırılmıştır. Mutant hücre klonları farklı benek gruplarına ayrılarak kaydedilmiştir. Tekli benekler *mwh* veya *flr³* fenotipinde iken, ikiz benekler *mwh* ve *flr³* fenotiplerini birlikte taşımaktadır. Ayrıca, somatik hücrelerde genetik değişikliğin indüksiyon zamanı ve beneklerin büyüklüğü arasında pozitif bir ilişkinin olduğu belirtilmektedir. Eğer mutasyon, hücre bölünmesinin fazla olduğu erken dönemde meydana gelirse, bu mutant hücreden köken alan hücreler daha çok ve daha büyük benekler içerecektir

(Guzman-Rincon ve Graf, 1995). İstatistik analizlerde kanat beneklerinin içerik ve büyüklüğüne göre sınıflandırılması (küçük tekli benek, büyük tekli benek ve ikiz benek) ile oluşturulan veriler kullanılmaktadır (Şekil 3.5).



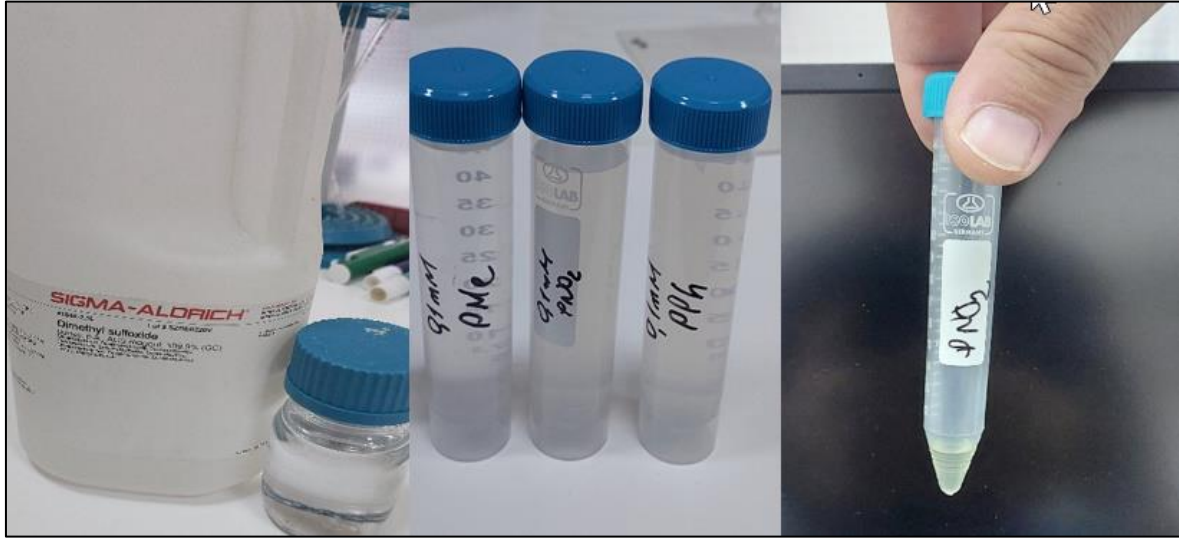
Şekil 3.5. SMART ile tespit edilen delesyon, nokta mutasyonu ve rekombinasyonların moleküler mekanizmaları (Pitchakarn ve diğerleri, 2021).

Çaprazlama için birey seçimi

Trans-heterozigot larvaların elde etmek amacıyla flare dişiler 4'er saat aralıklarla virgin iken toplanmış ve yeni bir besin ortamına aktarılmıştır. Yeterli virgin dişi birey toplanıldıktan sonra testlerin yapılacağı trans-heterozigot larvaların elde edilebilmesi için her şişede 40 *mwh* erkek, 40 *flr3* dişi olacak şekilde çaprazlamalar yapılmıştır. Oogenezin gerçekleşmesi için erkek ve dişi sinekler en az bir gün süre ile aynı ortamda bırakılmıştır. Uygulama yapılacak olan larvaların aynı yaşta olabilmesi için oogenezi gerçekleştirmiş olan bireylerin 8 saat boyunca yeni bir besin ortamına alınarak bu süre boyunca yumurta bırakmaları sağlanmıştır. Aynı bireyler yumurta toplama işlemi için tekrar tekrar kullanılmıştır.

4-(Süstitüe)-3,4-Dihidropirimidinon bileşiklerinin hazırlanması ve deney gruplarına uygulanması

Çalışmamızda kullandığımız dihidropirimidinon bileşiklerinin suda çözünürlüğünün az olması nedeni ile DMSO'da çözülmüştür (Resim 3.7).



Resim 3.7. Çalışmada kullanılan bileşiklerin DMSO'da çözülmesi (orijinal)

Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun in vivo çalışmalar için kullanılan *Drosophila*'ya zarar vermesini engellemek amacıyla ön çalışmalar yapılmıştır. In vivo çalışmalar için çözücü olarak kullanılan DMSO oranı %0,5 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda öncelikli olarak dihidropirimidinon bileşiklerin *D. melanogaster* larvaları üzerindeki LD50 (bir popülasyondaki bireylerin yarısını 24 saatte öldüren doz) dozları tespit edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (1mM, 2,5mM, 5mM, 10mM) hazırlanan dihidropirimidinon çözeltilerinden 5mL alınarak içerisinde 1,5gr hazır *Drosophila* besini bulunan kültür tüplerine 100'er larva konulmuş ve larvalardan ergine dönüşebilen bireyler sayılmıştır (Resim 3.8).



Resim 3.8. Çalışmada kullanılan maddelerin larvalara uygulanması

Her bir deney 3'er kez aynı koşullarda tekrarlanmıştır. Sonuçta dihidropirimidinon bileşiklerin *D. melanogaster* larvalarında LD50 dozu yaklaşık olarak 10mM olarak tespit edilmiştir. SMART uygulamalarında LD50 dozundan daha düşük olan 1mM, 2,5mM, 5mM ve 10mM konsantrasyonlar kullanılmıştır. Bu amaçla dihidropirimidinon 1mM, 2,5mM, 5mM ve 10mM çözeltileri hazırlanmış ve yukarıda anlatıldığı şekilde 72±4 saatlik larvalara uygulama yapılmıştır. Ayrıca hem pozitif etil metansülfonat (EMS) hem de negatif (distile su) kontrol, DMSO gruplarına ait deney setleri hazırlanmıştır.

Ergin bireylerin toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması

Uygulama ortamında dihidropirimidinonlara maruz bırakılan larvalardan pupa evresinden sonra ergin erginler günlük olarak eter anestezisi altında toplanmış ve kanat örnekleri hazırlamak üzere 4°C'de buzdolabında saklanmıştır. Bu bireyler daha sonra kanat morfolojilerine göre iki gruba ayrıldı: normal kanat (trans-heterozigot *mwh/flr3*) ve serrat kanat (dengeli heterozigot *mwh/TM3*, BdS). Normal bir fenotipe (*mwh/flr3*) sahip kanatlar hem mutasyon hem de rekombinasyondan kaynaklanan mutant klonlar içerirken, serrat

kanatlar (*mwh/TM3*, BdS), dengeleyici kromozomun rekombinasyonu baskılaması nedeniyle sadece mutasyon sonucu oluşan klonları içermektedir (Zordan, Osti, Pesce ve Costa, 1994). Bu sebeple, her iki fenotipteki kanatların da preparatları ayrı ayrı hazırlanarak değerlendirilmiştir.

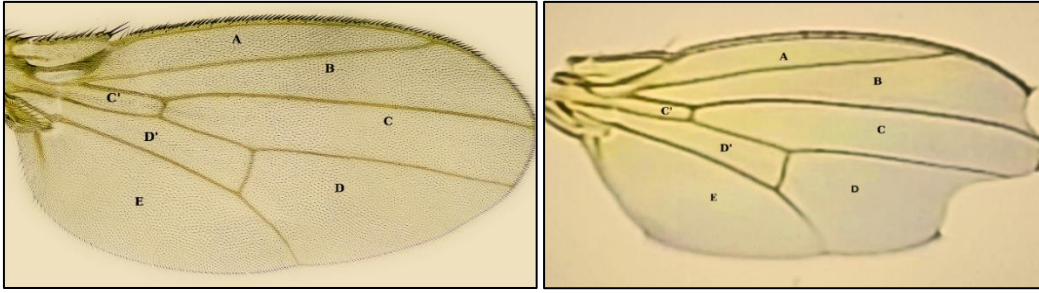
Kanat preparatlarını hazırlamak için (Negishi, Negishi, Ryo, Kando ve Hayatsu, 1988) ve Schaik ve Graf, 1991 çalışmalarında kullandıkları “Faure solüsyonu” hazırlanmıştır (Çizelge 3.7). Kanat preparatlarını hazırlamak için çukur lam kullanılmıştır. İlk olarak, lam üzerine birkaç damla faure solüsyonundan konulmuştur. Distile sudaki her sinek faure solüsyonu damlatılmış çukur lama konulur. Binoküler mikroskop altında kanatlara ve kanat kıllarına zarar vermeyecek şekilde ince uçlu pens ile kanatlar dikkatlice gövdeden ayrılmıştır. Yeterli sayıda bireyin kanadı sinek vücutlarından ayrıldıktan sonra aynı bireye ait kanatlar lam üzerine uygun aralıklarla yerleştirilmiştir. Lam üzerine yeterince kanat çifti (96 adet) tespit edildikten sonra preparatların kuruması için tozsuz bir ortamda bir gün süre ile bekletilmiştir. Preparatlar kurutulduktan sonra lamlara bir iki damla entellan damlatılarak hava kabarcığı kalmayacak şekilde üzeri lamel (24x60mm) ile kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan numuneler, ışık mikroskobu altında kanat tüylerini görünmez kılan safsızlıkları gidermek için musluk suyunda yıkanmıştır.

Çizelge 3.7. Faure solüsyonunun içeriği

MADDE	MADDE MİKTARI
Gam arabik	30g
Gliserol	20mL
Kloral hidrat	50mg
Distile su	50mL

Kanat preparatlarının mikroskobik analizi

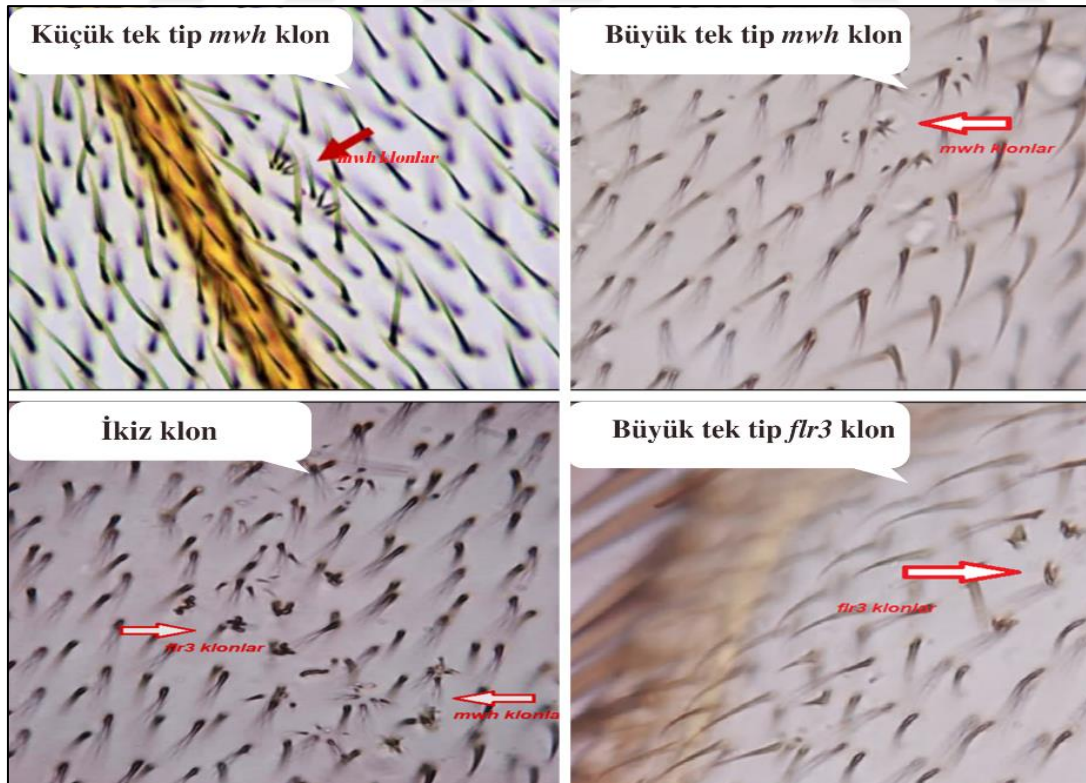
Steril bir şekilde hazırlanmış olan kanat preparatları 10X40 büyütmede ışık mikroskobunda incelenmiştir. Kanatların incelenmesi esnasında, kolaylık olması açısından kanatlar Şekil 3.9'daki gibi A, B, C, C₁, D, D₁ ve E sektörlerine ayrılmıştır.



Resim 3.9. Normal ve serrat kanat fenotiplerine ait sektörler (10x10) (orijinal)

Kanatlarda mutant klon olup olmadığını araştırmak için, hem dorsal hem de ventral yüzeydeki hücre tabakaları ayrı ayrı incelenmiştir. Kanat yüzeyindeki her bir sektör mikroskop altında ayrı ayrı taranarak *mwh* ve/veya *flr3* mutant klonlar tespit edilmiştir. Sayımda kayıtları tutulan mutant klonlar aşağıdaki gibidir (Resim 3.10);

- Küçük tek tip klon (1-2 *mwh* hücre)
- Büyük tek tip klon (≥ 3 *mwh* veya ≥ 4 *flr3* hücre)
- İkiz klon (*mwh* ve *flr3* hücrelerin ikisini de yan yana içeren klonlar)



Resim 3.10. Çeşitli kanat benek tipleri (10x40) (orijinal)

Bu sınıflandırmanın biyolojik önemi Graf ve diğerleri, 1984 tarafından gösterilmiştir. Küçük olarak sınıflandırılan klonlar yalnızca *mwh* hücrelerinden oluşur. Varyasyonla oluşan ve *flr*³ gibi görünen hücreleri mutantlardan ayırmak için sayıma sadece >4 *flr*³ hücreleri dahil edildi (Graf ve diğerleri, 1984). Büyük tek tip klonlar ise üç veya daha fazla *mwh* veya *flr*³ mutant hücresinden oluşur. *mwh* ve *flr*³ hücreleri aynı klon içinde dağıldığında ikiz klonlar oluşur. İkiz klonlar ayrıca *mwh* ve *flr*³ hücreleri iki ayrı klon olarak bir arada bulunduğu ortaya çıkar. Bununla birlikte, bitişik *mwh* ve *flr*³ klonları arasındaki yabancı tip trikomların sayısı üçü geçmezse, bunlar aynı klon içinde değerlendirilerek ve ikiz klonlar olarak adlandırılmıştır.

Klon indüksiyon frekansının hesaplanması

Kronik uygulamalarda, hücrede ve hücre bölünmesinde ortaya çıkan indüksiyon frekansını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır (Szabad, Soos, Polgar ve Hejja, 1983).

$$f = \frac{n}{NC} \times 10^5$$

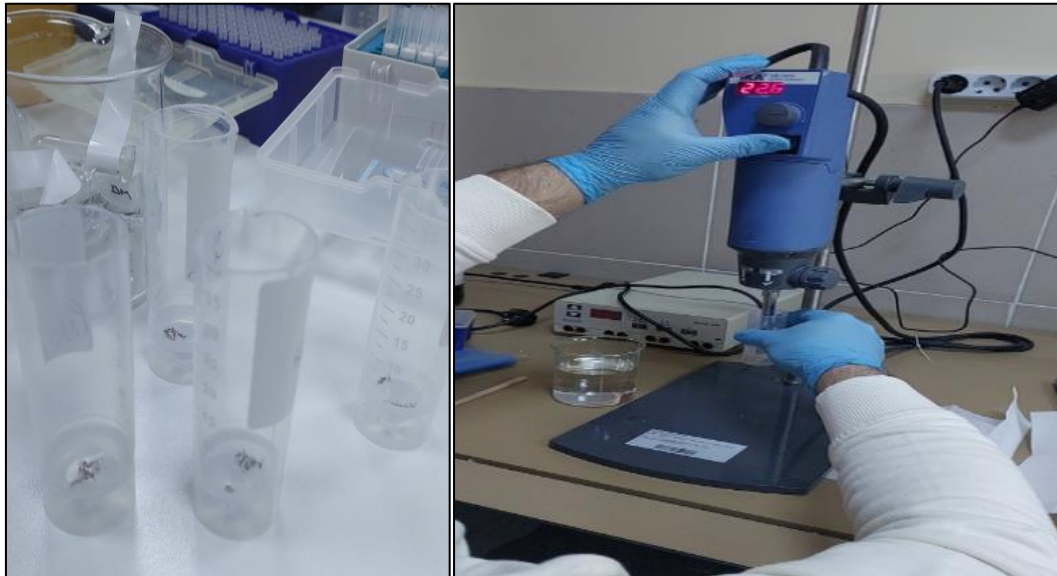
Denkleme göre, sadece *mwh* klonları dikkate alındığında, denklemdeki "f" *mwh* klonlarının ortalama indüksiyon frekansını, "n" gözlemlenen toplam *mwh* klon sayısını, "N" analiz edilen kanat sayısını ve "C" bir kanatta incelenen hücrelerin sayısını temsil etmektedir. Önceki çalışmalara göre kanattaki hücre sayısı 24.400 olduğu bildirilmiştir (Würgler ve Vogel, 1986). Çaprazlamadan elde edilen transheterozigot larvalardan gelişen bireylerin normal ve serrat kanatlı olmak üzere iki farklı fenotipi gözlenir. Serrat kanatlı bireylerde dengeleyici kromozomun varlığı, bu kromozom üzerinde yer alan baskın mutant gen Serrate (Ser) tarafından tespit edilebilmektedir. Dengeli kromozom (TM3) rekombinasyonu baskıladığından, bu fenotipe sahip bireylerde gözlenen mutant klonlar, yalnızca mutasyonun sonucudur. Böylece çalışmada kullanılan maddenin mutajenik ve/veya rekombinojenik etkisi, serrat kanatlı bireylerden elde edilen veriler ile normal kanatlılardan elde edilen veriler karşılaştırılarak ayrı ayrı belirlenebilir (Vogel, 1992; Frei ve Würgler, 1996).

3.2.4.1. SMART ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi

SMART çalışması sonucunda elde edilen sonuçların istatistiksel analizi Microsta bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değerlendirme yapılırken orijinal hipotez (Ho)'de uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı varsayılmıştır. Alternatif hipotez (Ha)'de ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan m kat daha yüksek olduğunu varsaymıştır. Orijinal ve alternatif hipotez hesaplamalarından elde edilen sonuçlar pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) ve negatif (-) olarak raporlanmıştır (Selby ve Olsen 1981; Frei ve Würzler 1988).

3.2.5. *Drosophila* doku homejenizasyonu

Uygulama ortamında çalışmada kullanılan bileşiklere (PPh, PMe, PNO₂) maruz bırakılan larvalardan, pupa evresinden sonra elde edilen erginler günlük olarak CO₂ anestezisi altında toplanmış ve alınan örnekler %1.15'lik potasyum klorür ile ultrasonik homojenizatörde soğuk homejenizasyon tamponunda (%1,15 potasyum klorür, 25 mM di potasyum hidrojen fosfat, 5 mM etilendiamin tetra asetik asit, 2 mM fenil metil sülfonil, 2 mM ditiotreitol, pH 7.4) +4°C'de ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktların analiz işlemi gerçekleştirilinceye kadar -80°C'de saklanmıştır (Resim 3.11).



Resim 3.11. *Drosophila* doku homejenizasyon aşamaları

3.2.6. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri (RT-PCR)

Bileşiklerin anti-karsinojenik etkileri; apoptotik hücre ölümü sinyal yollarında önemli rol oynayan (A549 hücre hattında; BAX, BCL2, CASP3, CASP9, SOD1, SOD2, CAT, GSS, HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90, *D. melanogaster*'de; DEBCL, BUFFY, DRICE, DRONC, SOD, CAT, GR, GST, HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90 genlerinin mRNA düzeyleri RT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. GAPDH geni ise housekeeping kontrol geni olarak kullanılmıştır.

Total RNA izolasyonu

A549 (akciğer kanseri) hücreleri 24 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra 6'lı plakalara 2×10^6 hücre sayımı yapılarak ekilmiştir. WST-8 sonuçlarına göre sitotoksik dozu 50 μ M olarak belirlenen bileşiklerin uygulandığı hücreler 24. saatin sonunda 1X PBS ile yıkanmıştır ve 1X tripsin EDTA ile kaldırılmıştır. Gen ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla kontrol ve doz gruplarında mRNA miktarı kitle önerilen yöntemle uygun olarak çalışılmıştır.

Protokole göre;

- Süspanse edilen hücreler (2×10^6 hücre) bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış, 250 x g'de 5 dakika santrifüj ile pellet elde edilmiş ve supernatantı atılmıştır. 600 μ L β -mercaptoethanol'lü Lysis Buffer eklenmiş ve homojen bir karışım görülene kadar 15 saniye vortekslenmiştir.
- % 100'lük 360 μ L etanol eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır.
- Tüp içindeki karışımdan 700 μ L alınarak RNA saflaştırma kolonuna (Thermo Fisher Scientific / GeneJET) aktarılmış ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon yeni steril 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Yıkama tamponu-1'den 700 μ L kolonun içene aktarılmış ve kolon içeren tüp 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Yıkama tamponu -2'den kolona 600 μ L eklenmiş ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

- Yıkama tamponu-2'den kolona 250 µL eklenmiş ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonda biriken sıvı atılmış ve kolon steril yeni bir 1,5 mL' lik tüpe aktarılmıştır.
- Son olarak 50 µL nükleaz içermeyen H₂O eklenmiş ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpte toplanan sıvı RT-PCR çalışmaları için -20°C'de saklanmıştır.

Hücre hatlarından izole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı nanodrop cihazı yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesi işleminde öncelikle uygun konsantrasyonlarda (ng/µL) sulandırılan RNA örnekleri 260 ve 280 nm'de ölçülmüştür (Resim 3.12). RNA konsantrasyonu (µg/mL) = [OD (Optik yoğunluk) 260 x sulandırma oranı x 40 (µg/mL)] formülü aracılığıyla hesaplanmıştır.



Resim 3.12. RNA miktarının tespit edilmesinde kullanılan ekipmanlar

cDNA (komplementer zincir) sentezi

İzole edilen total RNA'ların komplementer zincirleri, oligo d(T) primeri ve revers transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak, “Thermo Fisher Scientific; cDNA sentez kiti (K1622)” ile sentezlenerek cDNA'ya dönüştürülmüştür (Techne Prime/Thermal Cycler). cDNA sentezi 1. aşama için; 65 °C'de 5 dakika bekletilmiştir. 2. aşama için; 42 °C'de 1 saat ve inkübasyon sonrası enzimi inhibe etmek için 70 °C'de 5 dakika bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PCR yapmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Protokole göre;

- Herbir örnek 100 ng total RNA olacak şekilde hesaplanarak uygun hacimde kullanılmıştır.
- Oligo (dT)18 primerlerinden her bir tüpe 1 µL eklenmiş ve toplam hacim 12 µL olacak şekilde nükleaz içermeyen H₂O ile tamamlanarak 3-5 saniye santrifüjlenmiştir.
- 5X Reaksiyon tamponun'dan 4 µL, RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)'den 1 µL, 10 mM dNTP karışımından 2 µL ve RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL) enziminden 2 µL eklenmiştir.
- Toplam hacim 20 µL olacak şekilde santrifüj edilerek bileşenler çöktürülmüştür.
- Karışım PZR cihazında; 42 °C'de 1 saat ve inkübasyon sonrası enzimi inhibe etmek için 70 °C'de 5 dakika bekletilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri -20 °C'de saklanmıştır.

PZR çalışmalarında BAX, BCL2, CASP3, CASP9, DEBCL, BUFFY, DRICE, DRONC, SOD1, SOD2, CAT, GSS, SOD, GR, GST, HSP27, HSP60, HSP70, HSP90 genlerine ait spesifik primerlerin bağlanma sıcaklıklarının tespiti için sıcaklık optimizasyon denemeleri yapılmıştır. Bu bağlamda toplam hacim 20 µL olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. Her bir gen için aynı karışım ve aynı PZR programı uygulanmıştır.

Gerçek zamanlı PZR (RT-PCR)

CBI veri tabanı aracılığı ile genlerin dizileri belirlenmiştir. Çizelge 3.5 ve 3.6'da belirtilen aksesyon numaraları doğrultusunda NCBI primer blast programı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) yardımıyla gerçek zamanlı PZR için gerekli olan primerler tasarlanmıştır. Syber Green Master Mix (2x) 5 µL, Forward primer (10 mM) 1 µL, Reverse primer (10mM) 1 µL, cDNA 2 µL ve nükleaz içermeyen H₂O 1 Ml olacak şekilde hazırlandıktan sonra Piko Real 96 (Thermo Fisher Scientific) cihazı kullanılarak ve amplifikasyon program uygulanarak mRNA ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Tüm örnekler iki tekrarlı olarak çalışılmıştır. Gerçek zamanlı PZR sonrasında erime eğrisi (melt curve) analizi yapılarak primerlerin özgünlüğü test edilmiştir.

RT-PCR analizinde Ct (cycle threshold) değeri, floresan sinyal miktarının tespit edilebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değeri) geçen döngü sayısının belirlemesi açısından önemlidir. Ct değeri ne kadar küçük olursa gen ifadesi o kadar erken döngüde başlamaktadır. Gen ifadesinin belirlenmesi için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerinin hesaplanması gerekmektedir. Hesaplamalar aşağıda belirtilen işlem basamakları ile gerçekleştirilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001).

Referans gen için ΔCT değeri hesaplanmıştır.

$$\Delta CT = Ct (\text{hedef gen}) - Ct (\text{referans gen})$$

Her primer grubu için $\Delta\Delta CT$ değeri hesaplanmıştır.

$$\Delta\Delta CT = \Delta Ct (\text{hedef gen}) - \Delta Ct (\text{referans gen})$$

Genlerin ifadelerinin upregüle (yukarı doğru regülasyon) veya downregüle (aşağı doğru regülasyon) olup olmadığı $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin hesaplanmasıyla elde edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu araştırmada yeni sentez edilmiş 4-(Sübstitüe)-3,4-dihidropirimidinonların kanser tedavilerinde kullanılıp kullanılamayacağının tespiti için, sitotoksik etkileri akciğer karsinomu hücrelerinde (A549) *in vitro*, genotoksik etkilerinin ise *Drosophila melanogaster* (meyve sineği)'de *in vivo* olarak belirlenmeye çalışılmıştır.

4.1. *In Vitro* Sitotoksisite Testlerinden Elde Edilen Bulgular

Akciğer A549 hücre hatlarında, dihidropirimidinon bileşiklerinin bileşiklerin sitotoksik dozu (1,56-100 μ M) WST-8 testi (van Meerloo ve diğerleri, 2011) ile belirlenmiştir.

4.1.1. WST-8 yönteminden elde edilen bulgular

Dihidropirimidinon bileşiklerinin, Akciğer A549 hücre hatları üzerindeki olası sitotoksik etkisini tespit etmek amacı ile WST-8 testi protokolü uygulanmıştır. Çalışmada kontrol grubu olarak DMSO kullanılıp istatistiksel karşılaştırmaları materyal metod kısmında anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Çalışmamızda A549 hücre hattında en yüksek doz olarak 100 μ M kullanılmıştır. PPh bileşiğinin *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 50 μ M konsantrasyonda, PMe bileşiği en iyi etkiyi 100 μ M konsantrasyonda, PNO₂ bileşiği ise en iyi etkiyi 50 μ M konsantrasyonda göstermiştir (Çizelge 4.1). MRC-5 hücre hattında; PPh bileşiğinin *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 50 μ M konsantrasyonda, PMe bileşiği en iyi etkiyi 12,5 μ M konsantrasyonda konsantrasyonda, PNO₂ bileşiği ise en iyi etkiyi 6 μ M konsantrasyonda göstermiştir (Çizelge 4.2) (Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. Bileşiklerin A549 hücre hattında WST-8 absorbands ölçümleri

	PPh	PMe	PNO ₂
(-) kontrol	1,1231	1,1245	1,1245
(+) kontrol (%10 DMSO)	0,2090	0,2090	0,2090
100 µM	0,6860	0,7675	0,9315
50 µM	0,6710	1,0005	0,9305
25 µM	0,7485	0,9890	1,0165
12,5 µM	1,0500	0,9755	1,1060
6 µM	1,0615	1,0810	1,0855
DMSO (%1 DMSO)	1,2310	1,2310	1,2310

Çizelge 4.2. Bileşiklerin MRC-5 hücre hattında WST-8 absorbands ölçümleri

	PPh	PMe	PNO ₂
(-) kontrol	0,5810	0,5810	0,5810
(+)kontrol (%10 DMSO)	0,1735	0,1735	0,1735
100 µM	0,6395	0,5405	0,5220
50 µM	0,6555	0,5195	0,5005
25 µM	0,5910	0,5300	0,5555
12,5 µM	0,5270	0,5470	0,5515
6 µM	0,4625	0,5265	0,5560
DMSO (%1 DMSO)	0,5385	0,5385	0,5385

PPh, PMe, PNO₂ bileşikleri arasındaki en büyük farklılık heterohalkalı yapıdan kaynaklanmaktadır. Heterohalkalı yapılar seçici bağlanmaya sebep olan enerji düzeyine sahip olmaları nedeniyle biyolojik aktivite özellikleri daha yüksek orana sahip moleküllerdir.

Çalışmamızda bileşiklerin olası sitotoksik etkilerini tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen WST-8 testi sonucu elde edilen bulguların istatistiksel analizi aşağıdaki gibi yapılmıştır (Çizelge 4.3-4.8).

A549 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi araştırılan PPh bileşiğinin uygulama grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır (KV:15,794, p:0,007). Çizelge 4.3 incelendiğinde en düşük ortalama absorbands değerinin 50µM uygulaması sonucu elde edildiği görülmektedir. Yapılan Games- Howell Post-hoc analizi sonucuna göre negatif kontrol ile 12,5µM, 25µM,

50 μ M ve 100 μ M uygulamaları arasında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır .

Çizelge 4.3. A549 hücre hattında PPh bileşiğinin uygulanması sonucu elde edilen istatistiksel veriler

Grup No	Deney Grupları	Ort. $\pm$ SS	KV	p	Post-Hoc
(1)	Negatif kontrol	1,12 $\pm$ 0,010			
(2)	100 μ M	0,69 $\pm$ 0,012			1-2***
(3)	50 μ M	0,67 $\pm$ 0,029	15,794	0,007	1-3**
(4)	25 μ M	0,74 $\pm$ 0,018			1-4***
(5)	12,5 μ M	1,05 $\pm$ 0,011			1-5**
(6)	6 μ M	1,06 $\pm$ 0,022			

Ort.: Ortalama, KV: Kruskal Wallis H test, Post-Hoc=Games-Howell, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$: Gruplar arasındaki farklar anlamlıdır, SS: Standart sapma

A549 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi araştırılan PMe bileşiğinin uygulama grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır (KV:14.319, $p:0,014$). Çizelge 4.4 incelendiğinde en düşük ortalama absorbans değerinin 100 μ M uygulaması sonucu elde edildiği görülmektedir. Yapılan Games- Howell Post-hoc analizi sonucuna göre negatif kontrol ile 50 μ M ve 100 μ M uygulamaları arasında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır.

Çizelge 4.4. A549 hücre hattında PMe bileşiğinin uygulanması sonucu elde edilen istatistiksel veriler

Grup No	Deney Grupları	Ort $\pm$ SS	KV	p	Post-Hoc
(1)	Negatif kontrol	1,12 $\pm$ 0,010			
(2)	100 μ M	0,77 $\pm$ 0,068			
(3)	50 μ M	1,00 $\pm$ 0,028			1-2*
(4)	25 μ M	0,99 $\pm$ 0,047	14,319	0,014*	1-3*
(5)	12,5 μ M	0,98 $\pm$ 0,050			
(6)	6 μ M	1,08 $\pm$ 0,045			

Ort.: Ortalama, KV: Kruskal Wallis H test, Post-Hoc=Games-Howell, * $p<0.05$: Gruplar arasındaki farklar anlamlıdır, SS: Standart sapma

A549 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi araştırılan PNO₂ bileşiğinin uygulama grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır (KV:15,924, $p:0,007$). Çizelge 4.5 incelendiğinde en düşük ortalama absorbans değerinin 50 μ M uygulaması sonucu elde edildiği görülmektedir.

Yapılan Games- Howell Post-hoc analizi sonucuna göre negatif kontrol ile 6 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M ve 50 μ M uygulamaları arasında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır.

Çizelge 4.5. A549 hücre hattında PNO₂ bileşiğinin uygulanması sonucu elde edilen istatistiksel veriler

Grup No	Deney Grupları	Ort $\pm$ SS	KV	p	Post-Hoc
(1)	Negatif kontrol	1,12 $\pm$ 0,010			
(2)	100 μ M	0,93 $\pm$ 0,059			1-3**
(3)	50 μ M	0,93 $\pm$ 0,020	15,924	0,007	1-4***
(4)	25 μ M	1,01 $\pm$ 0,085			1-6*
(5)	12,5 μ M	1,10 $\pm$ 0,009			
(6)	6 μ M	1,09 $\pm$ 0,005			

Ort.: Ortalama, KV: Kruskal Wallis H test, Post-Hoc=Games-Howell, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$: Gruplar arasındaki farklar anlamlıdır, SS: Standart sapma

MRC-5 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi araştırılan PPh bileşiğinin uygulama grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır (KV:15,724, $p:0,008$). Çizelge 4.6 incelendiğinde en yüksek ortalama absorbans değerinin 50 μ M uygulaması sonucu elde edildiği görülmektedir. Yapılan Games- Howell Post-hoc analizi sonucuna göre negatif kontrol ile 6 μ M ve 100 μ M arasında ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır.

Çizelge 4.6. MRC-5 hücre hattında PPh bileşiğinin uygulanması sonucu elde edilen istatistiksel veriler

Grup No	Deney Grupları	Ort $\pm$ SS	KV	p	Post-Hoc
(1)	Negatif kontrol	0,58 $\pm$ 0,010			
(2)	100 μ M	0,64 $\pm$ 0,005			
(3)	50 μ M	0,66 $\pm$ 0,025	15,724	0,008	1-2*
(4)	25 μ M	0,59 $\pm$ 0,034			1-6*
(5)	12,5 μ M	0,53 $\pm$ 0,020			
(6)	6 μ M	0,46 $\pm$ 0,026			

Ort.: Ortalama, KV: Kruskal Wallis H test, Post-Hoc=Games-Howell, * $p<0,05$: Gruplar arasındaki farklar anlamlıdır, SS: Standart sapma

MRC-5 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi araştırılan PMe bileşiğinin uygulama grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır (KV:7,690, $p:0,174$). Çizelge 4.7 incelendiğinde en yüksek ortalama absorbans değerinin 12,5 μ M uygulaması sonucu elde edildiği

görülmektedir. Yapılan Games- Howell Post-hoc analizi sonucuna göre negatif kontrol ile 50 μ M arasında ($p<0,05$), istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır.

Çizelge 4.7. MRC-5 hücre hattında PMe bileşiğinin uygulanması sonucu elde edilen istatistiksel veriler

Grup No	Deney Grupları	Ort $\pm$ SS	KV	p	Post-Hoc
(1)	Negatif kontrol	0,58 $\pm$ 0,010			
(2)	100 μ M	0,54 $\pm$ 0,002			
(3)	50 μ M	0,52 $\pm$ 0,001	7,690	0,174	1-3*
(4)	25 μ M	0,53 $\pm$ 0,015			
(5)	12,5 μ M	0,55 $\pm$ 0,045			
(6)	6 μ M	0,53 $\pm$ 0,026			

Ort.: Ortalama, KV: Kruskal Wallis H test, Post-Hoc=Games-Howell, * $p<0,05$: Gruplar arasındaki farklar anlamlıdır, SS: Standart sapma

MRC-5 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi araştırılan PNO₂ bileşiğinin uygulama grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır (KV:5,889, $p:0,317$). Çizelge 4.8 incelendiğinde en yüksek ortalama absorbands değerinin 6 μ M uygulaması sonucu elde edildiği görülmektedir. Yapılan Games- Howell Post-hoc analizi sonucuna göre negatif kontrol ile 100 μ M arasında ($p<0,05$), istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır.

Çizelge 4.8. MRC-5 hücre hattında PNO₂ bileşiğinin uygulanması sonucu elde edilen istatistiksel veriler

Grup No	Deney Grupları	Ort $\pm$ SS	KV	p	Post-Hoc
(1)	Negatif kontrol	0,58 $\pm$ 0,010			
(2)	100 μ M	0,52 $\pm$ 0,002			
(3)	50 μ M	0,50 $\pm$ 0,071	5,889	0,317	1-2*
(4)	25 μ M	0,55 $\pm$ 0,039			
(5)	12,5 μ M	0,55 $\pm$ 0,016			
(6)	6 μ M	0,56 $\pm$ 0,040			

Ort.: Ortalama, KV: Kruskal Wallis H test, Post-Hoc=Games-Howell, * $p<0,05$: Gruplar arasındaki farklar anlamlıdır, SS: Standart sapma

Çalışmada ayrıca A549 hücre hattına uygulanan maddelerin (PPh, PMe, PNO₂) olası sitotoksik etkilerinin kendi aralarında istatistiksel açıdan karşılaştırılması yapılmıştır. 6 μ M doz uygulaması sonucunda gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır (KV: 1,422, $p:0,491$). 12,5 μ M uygulaması sonucunda gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır (KV:7,200, $p:0,027$). Yapılan Games- Howell Post-hoc analizi sonucuna PPh

uygulaması ile PNO₂ arasında istatistiki açıdan anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). 25 μ M uygulaması sonucunda gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (KV:5,600, $p:0,061$). Yapılan Games- Howell Post-hoc analizi sonucuna göre PPh ile PNO₂ ve PPh ile PMe arasında istatistiki açıdan fark saptanmıştır ($p<0,05$). 50 μ M uygulaması sonucunda ise gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı fark saptanmıştır (KV: 7,200, $p: 0,027$). Yapılan Games- Howell Post-hoc analizi sonucuna göre PPh ile PNO₂ ve PPh ile PMe arasında istatistiki açıdan anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). 100 μ M uygulaması sonucunda ise gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı fark saptanmıştır (KV: 7,200, $p:0,027$). Yapılan Games- Howell Post-hoc analizi sonucuna göre PPh ile PNO₂ arasında istatistiki açıdan anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$) (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. A549 hücre hattında PMe, PPh, PNO₂ bileşiklerinin uygulanması sonucu elde edilen verilerin istatistiksel açıdan karşılaştırılması

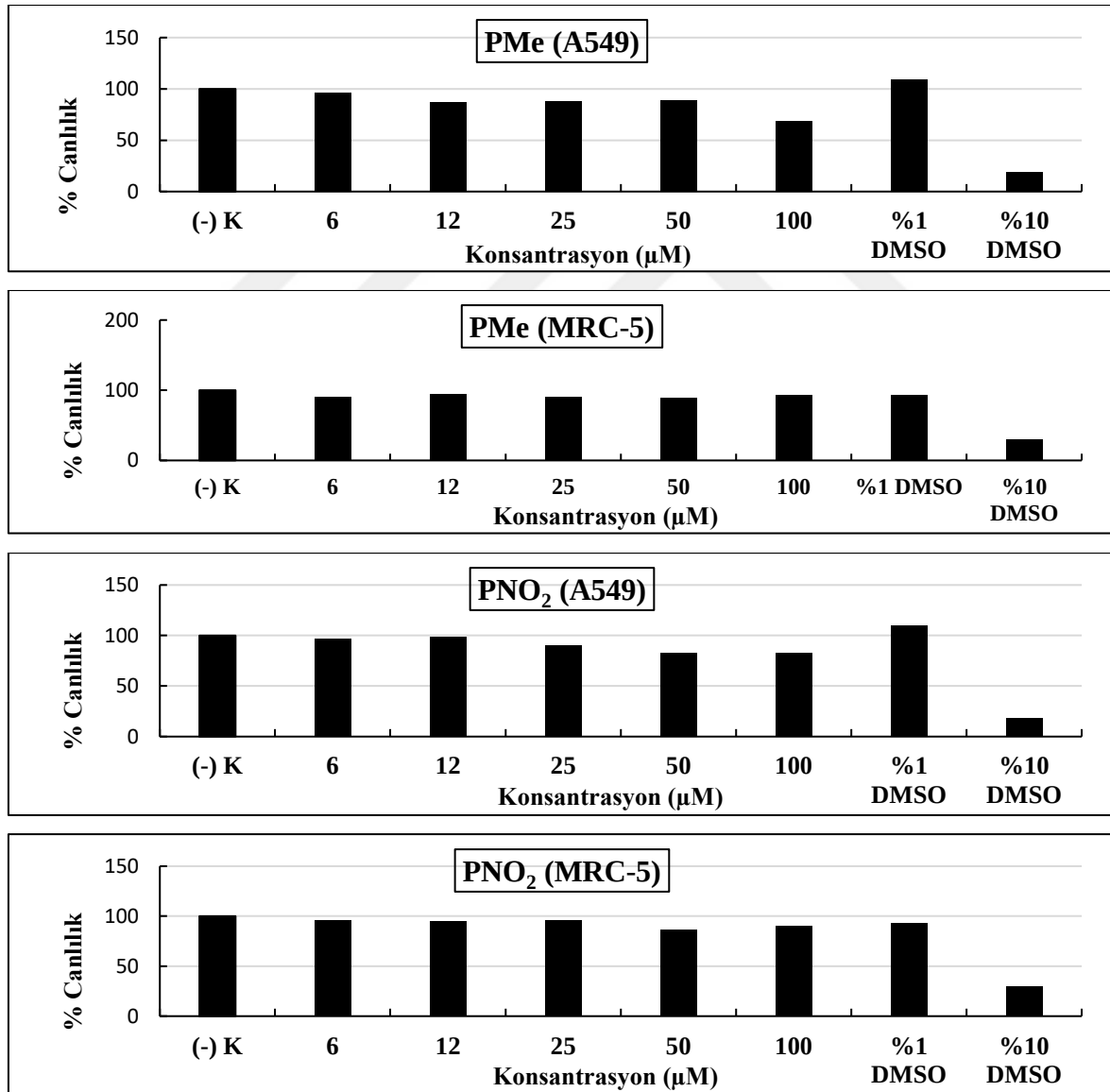
Uygulama dozları	Deney grupları	Ort. $\pm$ SS	KV	p	Post-Hoc
100μM	(1) PPh	0,69 $\pm$ 0,012	7,200	0,027	1-2*
	(2) PNO ₂	0,93 $\pm$ 0,059			
	(3) PMe	0,77 $\pm$ 0,068			
50μM	(1) PPh	0,67 $\pm$ 0,029	7,200	0,027	1-2***
	(2) PNO ₂	0,93 $\pm$ 0,020			1-3***
	(3) PMe	1,00 $\pm$ 0,028			
25μM	(1) PPh	0,75 $\pm$ 0,018	5,600	0,061	1-2***
	(2) PNO ₂	1,01 $\pm$ 0,009			1-3***
	(3) PMe	0,99 $\pm$ 0,047			
12,5μM	(1) PPh	1,05 $\pm$ 0,011	7,200	0,027	1-2**
	(2) PNO ₂	1,11 $\pm$ 0,009			
	(3) PMe	0,98 $\pm$ 0,049			
6μM	(1) PPh	1,06 $\pm$ 0,023	1,422	0,491	-
	(2) PNO ₂	1,09 $\pm$ 0,006			
	(3) PMe	1,08 $\pm$ 0,045			

Ort.: Ortalama, KV: Kruskal Wallis H test, Post-Hoc=Games-Howell, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$: Gruplar arasındaki farklar anlamlıdır, SS: Standart sapma

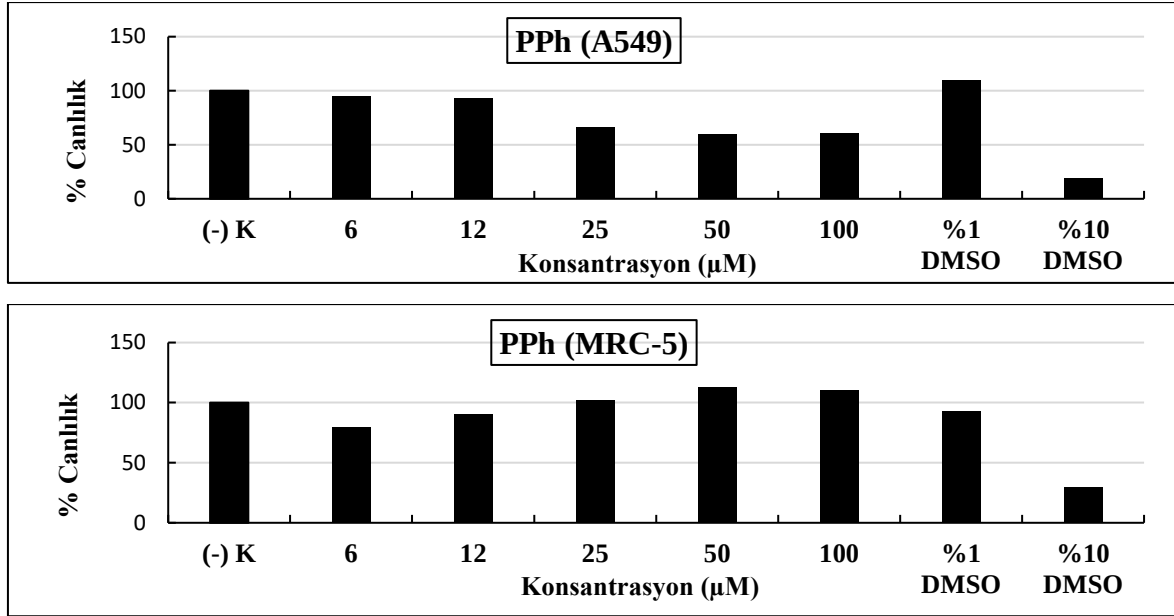
Yüzde canlılık aktivite değerlerine bakıldığında A549 hücre hattında bileşiklerin % canlılık aktiviteleri 60-98 arasında belirlenmiştir. Bu nedenle PPh, PMe, PNO₂ bileşiklerin A549 hücresinde antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir (Çizelge 4.1 ve 4.2) (Şekil 4.1). Bileşikler arasında karşılaştırılma yapıldığında; PPh % canlılık aktivitesi 59,6,

PMe'in % canlılık aktivitesi en etkili dozda (100 μ M) 68,25, PNO₂ canlılık aktivitesi ise 82,7 olarak tespit edilmiştir. PPh bileşiğinin PMe ve PNO₂ bileşiğine oranla A549 hücrelerinde daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1).

Bileşiklerin MRC-5 hattında % canlılık aktiviteleri ise 100-80 arasında belirtilmiştir. Bileşikler arasında karşılaştırma yapıldığında PPh'nin % canlılık aktivitesi 79,6 PMe'nin canlılık aktivitesi 89,4 PNO₂ bileşiğinin canlılık aktivitesi ise 86,1 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler bileşiklerin sağlıklı akciğer hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olmadığını göstermiştir. (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Bileşiklerin A-549 ve MRC-5 hücre hatlarında WST-8 analizleri



Şekil 4.1. (devamı)

4.2. *Drosophila melanogaster*'de Yapılan Testlerden Elde Edilen Bulgular

4.2.1. Trans-heterozigot larvalar için hayatta kalış oranlarının (larval mortalite) belirlenmesi

Çalışmalarımızda ilk olarak 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonların *D. melanogaster* larvaları üzerindeki LD50 dozları belirlenmiştir. Bu amaçla Bölüm 3'te anlatıldığı gibi her dihidropirimidinon için ayrı ayrı deney setleri oluşturulmuş ve farklı konsantrasyonlarda (1mM, 2,5mM, 5mM, 10mM ve 25mM) hazırlanan çözeltileri *Drosophila* larvalarına uygulanmıştır. Sonuçta *D. melanogaster*'in 72±4 saatlik trans-heterozigot larvalarında tüm dihidropirimidinonlar için LD50 dozu yaklaşık olarak 25mM olarak tespit edilmiştir.

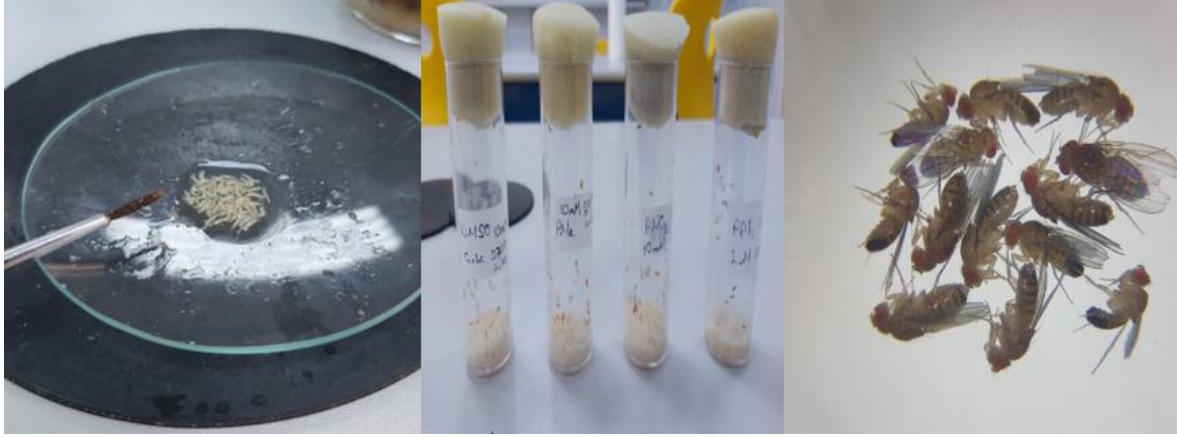
Hem larvalar için hayatta kalış oranının belirlenmesinde hem de SMART uygulamalarında LD50 dozundan daha düşük olan 4 farklı uygulama dozu (1mM, 2,5mM, 5mM ve 10mM) kullanılmıştır. Çalışmalarımızda, genotoksik etkileri araştırılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonların dışında, negatif kontrol grubu için 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonların çözücüsü olan DMSO, distile su, pozitif kontrol grubu için de mutajenik etkisi iyi bilinen etil metansülfonat (EMS) kullanılmıştır. Deneylerimize başlarken, öncelikle *D. melanogaster*'in ♂*mwh* ve ♀*flr*³ mutant soylarına ait bireylerin

çaprazlanmaları ile elde edilen trans-heterozigot larvalar kullanılarak onlar için hayatta kalış oranları (larval mortalite) belirlenmiştir. Bu amaçla 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonların (PPh, PMe, PNO₂) farklı konsantrasyonlarını (1mM, 2,5mM, 5mM ve 10mM) içeren uygulama gruplarına ve pozitif kontrol grubu olarak seçilen etil metansülfonat (EMS) içeren besiyerlerine 100'er larva konulmuştur. Bu larvalardan erginleşebilen ve ölen bireyler sayılmış ve distile su kontrol grubundan elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.10) (Resim 4.1).

Çizelge 4.10. Farklı konsantrasyonlarda 4-(Süstitüe)-3,4-Dihidropirimidinonlara maruz kalmış trans-heterezigot larvaların hayatta kalış ve mortalite oranları

Uygulama Grupları	Konsantrasyon (mM)	Larva sayısı	Mortalite Oranı (%)	Hayatta Kalış Oranı (%)
DMSO (%0,5)	-	100	15	85
Kontrol (Distile su)	-	100	7	93
EMS	1	100	21	79
PPP	1	100	7	93
	2,5	100	27	83
	5	100	20	80
	10	100	22	78
	25	100	45	55
PMe	1	100	12	88
	2,5	100	38	82
	5	100	43	77
	10	100	42	68
	25	100	50	50
PNO ₂	1	100	9	91
	2,5	100	13	87
	5	100	25	75
	10	100	32	68
	25	100	46	54

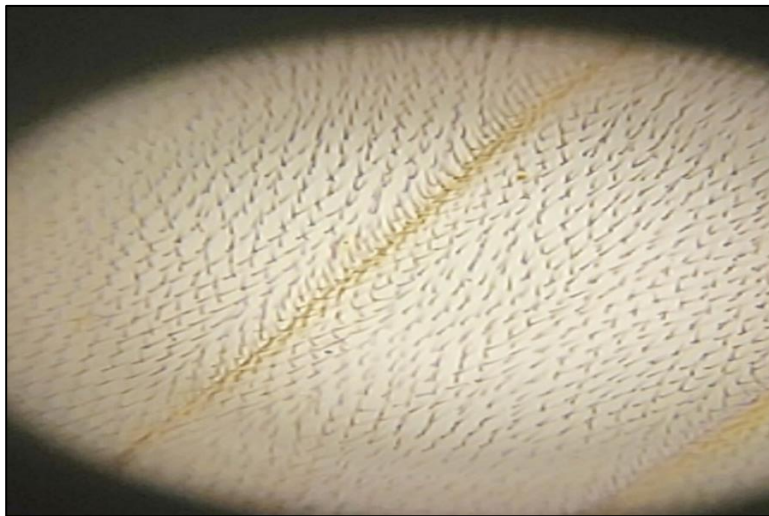
Elde edilen veriler incelendiği zaman, çözücü olarak kullanılan %0,5 oranında DMSO içeren besiyerinde bulunan larvalarda yaşam yüzdesi %85 iken, distile su kullanılarak hazırlanan negatif kontrol grubunda hayatta kalan larva sayısı %87'dir. 1mM EMS kullanılarak hazırlanan pozitif kontrol grubunda bu oran %69'dur.



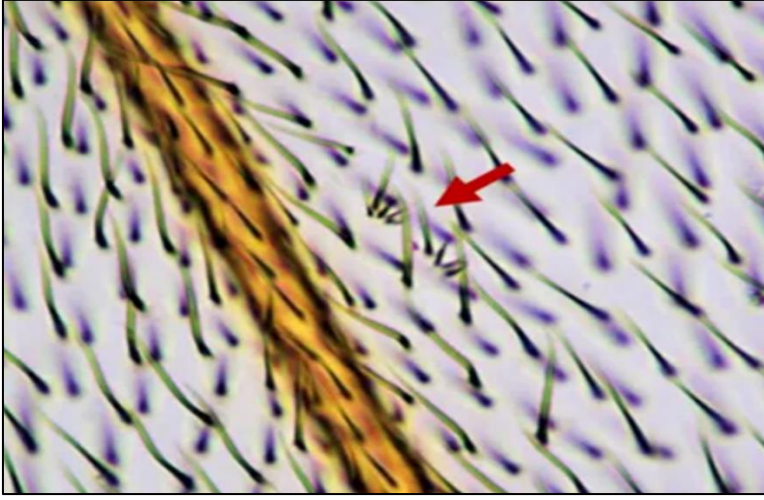
Resim 4.1. Larval mortalite testi sonucu elde edilen ergin bireyler

4.2.2. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile elde edilen bulgular

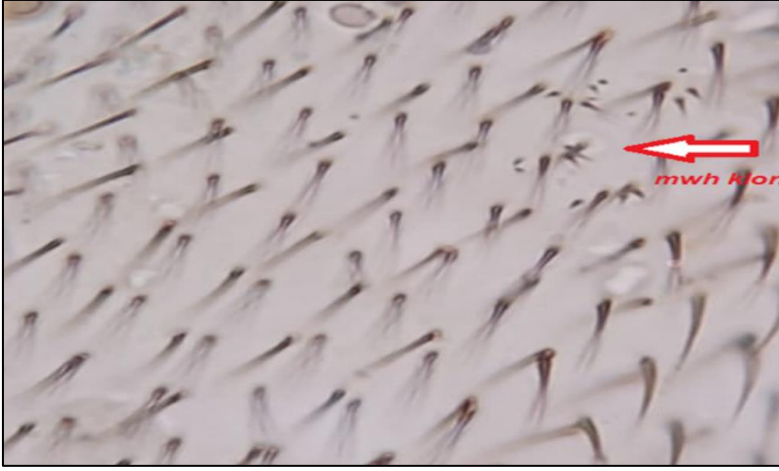
Somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin yapılabilmesi için, farklı konsantrasyonlarda 3 farklı dihidroprimidinon uygulaması sonucunda ergin bireylerden elde edilen normal (*mwh/flr3*) ve serrat kanat (*mwh/TM3*) fenotipine ait kanat preparatları ışık mikroskopunda 400X büyütme ile incelenmiştir. Gözlenen kanat benekleri sınıflandırılarak sayılmış ve kontrol grubundan elde edilen verilerle karşılaştırılmak üzere çizelgeler oluşturularak kaydedilmiştir (Çizelge 4.2-4.5). Ayrıca incelenen preparatlarda, herhangi bir benek tipini taşımayan (Resim 4.2) yabancı tip kanat ile tüm dihidroprimidinonlar için gözlediğimiz, küçük tek tip (Resim 4.3), büyük tek tip (Resim 4.4 ve Resim 4.5) ve ikiz benekleri (Resim 4.6) taşıyan kanatlara ait fotoğraflar çekilmiştir.



Resim 4.2. Normal genetik özelliğe sahip bireylerdeki kanat kılları (10x40)



Resim 4.3. Küçük tek tip *mwh* mutant klon (10x40)



Resim 4.4. Büyük tek tip *mwh* mutant klon (10x40)



Resim 4.5. Büyük tek tip *flr3* mutant klon (10x40)



Resim 4.6. *flr3* ve *mwh* mutant klonları birlikte taşıyan ikiz klon (10x40)

- PMe uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular

Çalışmamızda genotoksik etkilerini araştırdığımız maddelerden birincisi Metil 4-([1,1'-bifenil]-4-il)-6-metil-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (PMe)'tir. SMART ile elde edilen bulgular incelendiğinde, farklı konsantrasyonlarda (1mM, 2,5mM, 5mM ve 10mM) PMe uygulaması sonucunda oluşan küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon tiplerinin tümünde sayısal olarak artış gözlemlendiği ancak bu artışların istatistiksel olarak önemsiz (i) olduğu görülmektedir ($p>0,05$). DMSO kontrol grubunun normal kanat fenotipinde küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam *mwh* ve toplam klon frekansları sırasıyla 0,14; 0,03; 0,04; 0,16 ve 0,2 iken bu oranlar en yüksek PMe uygulama grubunda (10mM) sırasıyla 0,14; 0,03; 0,00; 0,19 ve 0,19 olarak belirlenmiştir. Serrat kanat fenotipinde ise küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon frekansları sırasıyla 0,14; 0,01; 0,16 ve 0,16 iken 10mM PMe uygulama grubunda bu oranların 0,16; 0,01; 0,21 ve 0,21'e yükseldiği belirlenmiştir. Ancak klon sayısındaki bu artışların istatistiksel olarak hiçbir uygulama grubunda pozitif değer kazanmadığı negatif (-) ya da önemsiz sonuç (i) verdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.11). Çizelge 4.11'de KİF değerleri incelendiğinde normal kanat fenotipinde 10mM uygulama grubu hariç (0,77) diğer tüm uygulama gruplarında kontrol grubuna göre düşüş olduğu ve bu değerlerin 0,25; 0,41; 0,51 olduğu bulunmuştur. Serrat kanat fenotipinde ise KİF değerleri 0,30; 0,40; 0,67 ve 0,87 olarak bulunmuştur. Sadece son iki uygulama grubu olan 5 ve 10mM uygulama gruplarında kontrol grubu (0,61) KİF değerine göre artış göstermiştir. Ancak bu artış istatistiksel olarak $p>0,05$ düzeyinde önemsizdir. PMe uygulaması sonucu normal kanat ve serrat kanatlarda meydana gelen tüm klonlardan elde edilen veriler incelendiği zaman, bu maddenin konsantrasyon artışına bağlı

olarak toksik etkili olduğu (Şekil 4.1- 4.4, Çizelge 4.10) ancak genotoksik etki göstermediği (Çizelge 4.11) anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.11. P_{Me} uygulaması sonucunda *Drosophila* kanat benek testi ile elde edilen bulgular

Dozlar (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1–2 hücre) (m = 2)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) (m = 5)			İkiz klon (m = 5)			Toplam mwh klon (m = 2)			Toplam klon (m = 2)			(KİF) (10 ⁵ hücre)
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
Normal Kanat (<i>mwh/flr</i> ³)																	
Distile su	80	12	(0,15)		2	(0,03)		1	(0,01)		14	(0,13)		15	(0,19)		0,71
DMSO	80	11	(0,14)	-	2	(0,03)	i	2	(0,03)	i	13	(0,16)	i	16	(0,2)	i	0,67
1 EMS	80	123	(1,54)	+	49	(0,61)	+	13	(0,17)	+	172	(2,16)	+	185	(2,31)	+	8,81
1	80	4	(0,05)	-	1	(0,01)	i	0	(0,00)	i	5	(0,06)	-	5	(0,06)	-	0,25
2,5	80	7	(0,09)	-	1	(0,01)	i	1	(0,01)	i	8	(0,1)	-	9	(0,11)	-	0,41
5	80	8	(0,10)	-	2	(0,03)	i	1	(0,01)	i	10	(0,13)	-	11	(0,14)	-	0,51
10	80	13	(0,14)	i	2	(0,03)	i	0	(0,00)	i	15	(0,19)	i	15	(0,19)	i	0,77
Serrat Kanat (<i>mwh/TM3</i>)																	
Distile su	80	10	(0,13)		0	(0,00)					10	(0,13)		10	(0,13)		0,51
DMSO	80	11	(0,14)	i	1	(0,01)	i				12	(0,16)	i	12	(0,16)	i	0,61
1 EMS	80	148	(1,85)	+	43	(0,54)	+				191	(2,39)	+	191	(2,39)	+	9,79
1	80	6	(0,08)	-	0	(0,00)	i		*		6	(0,08)	-	6	(0,08)	-	0,30
2,5	80	8	(0,10)	-	0	(0,00)	i				8	(0,10)	-	8	(0,10)	-	0,40
5	80	12	(0,15)	i	1	(0,01)	i				13	(0,16)	i	13	(0,16)	i	0,67
10	80	16	(0,20)	i	1	(0,01)	i				17	(0,21)	i	17	(0,21)	i	0,87
KİF: Klon indüksiyon frekansı, No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würgler 1995), +: pozitif; -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü : TM3 dengeleyici kromozomunun varlığında flr ³ mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: α=β=0,05																	

• PPh uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular

Çalışmamızda genotoksik etkilerini araştırdığımız maddelerden ikincisi Etil 4-([1,1'-bifenil]-4-il)-2-okso-6-fenil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilat (PPh)'tır. SMART ile elde edilen bulgular incelendiğinde, farklı PPh uygulaması sonucunda oluşan küçük tek tip, büyük tek tip, toplam mwh ve toplam klon tiplerinin tümünde sayısal olarak artış gözlemlendi ancak bu artışların istatistiksel olarak önemsiz (i) olduğu görülmektedir (p>0,05). DMSO kontrol grubunun normal kanat fenotipinde küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam mwh ve toplam klon frekansları sırasıyla 0,11; 0,04; 0,03; 0,16 ve 0,18 iken bu oranlar en yüksek

PPh uygulama grubunda (10mM) sırasıyla 0,14; 0,03; 0,00; 0,24 ve 0,24 olarak belirlenmiştir. Serrat kanat fenotipinde ise küçük tek tip, büyük tek tip, toplam mwh ve toplam klon frekansları sırasıyla 0,14; 0,04; 0,18 ve 0,18 iken 10mM PPh uygulama grubunda bu oranların 0,29; 0,01; 0,3 ve 0,3'e yükseldiği belirlenmiştir. Ancak klon sayısındaki bu artışların istatistiksel olarak hiçbir uygulama grubunda pozitif değer kazanmadığı negatif (-) ya da önemsiz sonuç (i) verdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.12). Serrat kanat fenotipinde ise sadece son iki uygulama grubu olan 5 ve 10mM uygulama gruplarında elde edilen KİF değerlerinde kontrol grubuna göre artış görülmüştür. Ancak bu artış istatistiksel olarak $p>0,05$ düzeyinde önemsizdir. PPh uygulaması sonucu normal kanat ve serrat kanatlarda meydana gelen tüm klonlardan elde edilen veriler incelendiği zaman, bu maddenin konsantrasyon artışına bağlı olarak toksik etkili olduğu (Şekil 4.1-4.4 ve Çizelge 4.10) ancak genotoksik etki göstermediği (Çizelge 4.12) anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.12. PPh uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular

Dozlar (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1–2 hücre) (m = 2)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) (m = 5)			İkiz klon (m = 5)			Toplam mwh klon (m = 2)			Toplam klon (m = 2)			(KİF) (10 ⁵ hücre)
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
Normal Kanat (<i>mwh/flr</i> ³)																	
Distile su	80	12	(0,15)		2	(0,03)		1	(0,01)		14	(0,13)		15	(0,19)		0,71
DMSO	80	9	(0,11)		3	(0,04)		2	(0,03)		12	(0,16)		14	(0,18)		0,61
1 EMS	80	149	(1,86)	+	43	(0,54)	+	19	(0,24)	+	192	(2,16)	+	211	(2,31)	+	9,83
1	80	6	(0,08)	-	1	(0,01)	i	1	(0,00)	i	7	(0,09)	-	8	(0,1)	-	0,36
2,5	80	7	(0,09)	-	1	(0,01)	i	1	(0,01)	i	8	(0,1)	-	9	(0,11)	-	0,41
5	80	12	(0,10)	-	2	(0,03)	i	1	(0,01)	i	14	(0,13)	-	15	(0,14)	-	0,71
10	80	17	(0,14)	i	2	(0,03)	i	0	(0,00)	i	19	(0,24)	i	19	(0,24)	i	0,97
Serrat Kanat (<i>mwh/TM3</i>)																	
Distile su	80	13	(0,16)		0	(0,00)					13	(0,16)		13	(0,16)		0,67
DMSO	80	11	(0,14)	i	3	(0,04)	i				14	(0,18)	i	14	(0,18)	i	0,71
1 EMS	80	148	(1,85)	+	30	(0,38)	+				178	(2,22)	+	178	(2,22)	+	9,11
1	80	9	(0,11)	-	0	(0,00)	i			*	9	(0,11)	-	9	(0,11)	-	0,46
2,5	80	13	(0,16)	i	0	(0,00)	i				13	(0,16)	-	13	(0,16)	-	0,67
5	80	20	(0,25)	i	1	(0,01)	i				21	(0,26)	i	21	(0,26)	i	1,08
10	80	21	(0,26)	i	1	(0,01)	i				22	(0,27)	i	22	(0,27)	i	1,12
KİF: Klon indüksiyon frekansı, No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würzler 1995), +: pozitif; -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü *: TM3 dengeleyici kromozomunun varlığında <i>flr</i> ³ mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: α=β=0,05																	

- PNO₂ uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular

Çalışmamızda genotoksik etkilerini araştırdığımız maddelerden üçüncüsü ise Etil4-([1,1'-bifenil]-4-il)-6-(4-nitrofenil)-2-okso-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-karboksilatıdır. SMART ile elde edilen bulgular incelendiğinde, farklı konsantrasyonlarda (1mM, 2,5mM, 5mM ve 10mM) PNO₂ uygulaması sonucunda oluşan küçük tek tip, büyük tek tip, toplam mwh ve toplam klon tiplerinin tümünde sayısal olarak artış gözlemlendi ancak bu artışların istatistiksel olarak önemsiz (i) olduğu görülmektedir ($p>0,05$). DMSO kontrol grubunun normal kanat fenotipinde küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam mwh ve toplam klon frekansları sırasıyla 0,15; 0,03; 0,04; 0,18 ve 0,21 iken bu oranlar en yüksek PPh uygulama grubunda (10mM) sırasıyla 0,25; 0,04; 0,00; 0,29 ve 0,29 olarak belirlenmiştir. Serrat kanat fenotipinde ise küçük tek tip, büyük tek tip, toplam mwh ve toplam klon frekansları sırasıyla 0,14; 0,01; 0,16 ve 0,16 iken 10mM PPh uygulama grubunda bu oranların 0,24; 0,04; 0,28 ve 0,28'e yükseldiği belirlenmiştir. Ancak klon sayısındaki bu artışların istatistiksel olarak hiçbir uygulama grubunda pozitif değer kazanmadığı negatif (-) ya da önemsiz sonuç (i) verdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.13). Çizelge 4.13'te KİF değerleri incelendiğinde normal kanat fenotipinde yalnızca 5 ve 10mM uygulama gruplarında kontrol grubuna göre artış olduğu ve bu değerlerin 0,77; 1,18 olduğu bulunmuştur. Serrat kanat fenotipinde de KİF değerleri sadece son iki uygulama grubu olan 5 ve 10mM uygulama gruplarında 0,92 ve 1,12 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler kontrol grubu için 0,61 olan KİF değerine göre artış göstermiştir. Ancak bu artış istatistiksel olarak $p>0,05$ düzeyinde önemsizdir. PPhe uygulaması sonucu normal kanat ve serrat kanatlarda meydana gelen tüm klonlardan elde edilen veriler incelendiği zaman, bu maddenin konsantrasyon artışına bağlı olarak toksik etkili olduğu (Şekil 4.1- 4.4 ve Çizelge 4.10) ancak genotoksik etki göstermediği (Çizelge 4.13) anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.13. PNO₂ uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular

Dozlar (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1–2 hücre) (m = 2)			Büyük tek tip klon (≥2 hücre) (m = 5)			İkiz klon (m = 5)			Toplam mwh klon (m = 2)			Toplam klon (m = 2)			(KİF) (10 ⁵ hücre)
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
Normal Kanat (<i>mwh/flr</i> ³)																	
Distile su	80	12	(0,15)		2	(0,03)		1	(0,01)		14	(0,13)		15	(0,19)		0,71
DMSO	80	12	(0,15)		2	(0,03)		3	(0,04)		14	(0,18)		17	(0,21)		0,71
1 EMS	80	119	(1,49)	+	37	(0,46)	+	22	(0,28)	+	156	1,95	+	178	(2,23)	+	7,99
1	80	5	(0,06)	-	1	(0,01)	i	0	(0,00)	i	6	(0,08)	-	6	(0,08)	-	0,31
2,5	80	8	(0,1)	-	2	(0,03)	i	1	(0,01)	i	10	(0,1)	-	11	(0,11)	-	0,51
5	80	13	(0,16)	-	2	(0,03)	i	1	(0,01)	i	15	(0,19)	-	16	(0,2)	-	0,77
10	80	20	(0,25)	i	3	(0,04)	i	0	(0,00)	i	23	(0,29)	i	23	(0,29)	i	1,18
Serrat Kanat (<i>mwh/TM3</i>)																	
Distile su	80	11	(0,14)		0	(0,00)					11	(0,14)		11	(0,14)		0,56
DMSO	80	11	(0,14)	i	1	(0,01)	i				12	(0,16)	i	12	(0,16)	i	0,61
1 EMS	80	159	(1,99)	+	28	(0,36)	+				187	(2,34)	+	187	(2,34)	+	9,58
1	80	9	(0,11)	-	0	(0,00)	i			*	9	(0,11)	-	9	(0,11)	-	0,46
2,5	80	12	(0,16)	i	0	(0,00)	i				12	(0,16)	-	12	(0,16)	-	0,61
5	80	17	(0,21)	i	1	(0,01)	i				18	(0,22)	i	18	(0,22)	i	0,92
10	80	19	(0,24)	i	3	(0,04)	i				22	(0,27)	i	22	(0,27)	i	1,12

KİF: Klon indüksiyon frekansı, No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würzler 1995), +: pozitif; -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü *: TM3 dengeleyici kromozomunun varlığında *flr*³ mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: α=β=0,05

4.3. Real Time PCR Analizlerinden Elde Edilen Bulgular

WST-8 testi sonucunda elde edilen veriler dikkate alındığında A549 hücrelerinde 50 µM, *D. melanogaster* bireylerinde ise 25mM konsantrasyon uygulanarak qRT-PCR analizleri çalışılmıştır. Hücre hatlarından izole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı nanodrop cihazı yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesi işleminde öncelikle uygun konsantrasyonlarda (ng/µL) sulandırılan RNA örnekleri 260 ve 280 nm'de ölçülmüştür. RNA konsantrasyonu (µg/mL) = [OD (Optik yoğunluk) 260 x sulandırma oranı x 40 (µg/mL)] formülü aracılığıyla hesaplanmıştır. A260/A280 $\cong$ 2.0 RNA örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir (Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15, Şekil 4.29).

Çizelge 4.14. A549 hücre hattından izole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı

Bileşikler	ng/ μ L	A260/280
Kontrol (Besiyesi)	174.7	1.907
DMSO	180.2	1.902
PPH	183.8	1.897
PMe	143.3	1.770
PNO₂	670.2	1.904

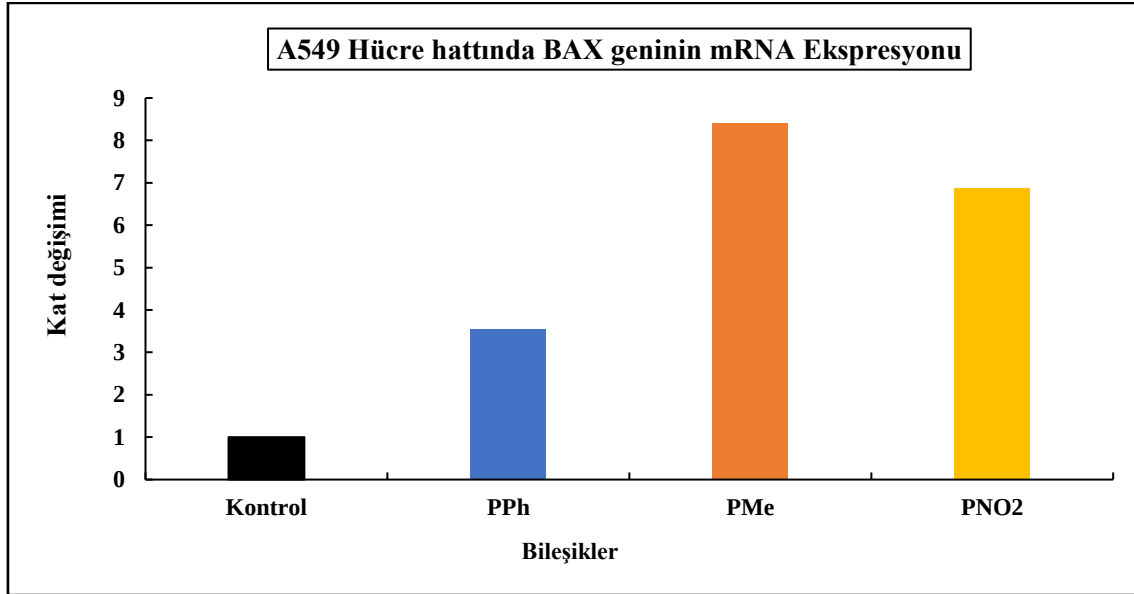
Çizelge 4.15. *Drosophila melanogaster* bireylerinden izole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı

Bileşikler	ng/ μ L	A260/280
H₂O	103.9	2.064
DMSO	164.8	2.152
PMe	112.5	2.074
PNO₂	122.3	2.036
PPH	198.2	2.102

İzole edilen tek zincirli total RNA'lar 100 ng olacak şekilde hesaplanarak oligo d(T) primeri ve revers transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak (Thermo Fisher; cDNA sentez kiti (K1622)) bu yöntem ile cDNA'ya dönüştürülmüştür.

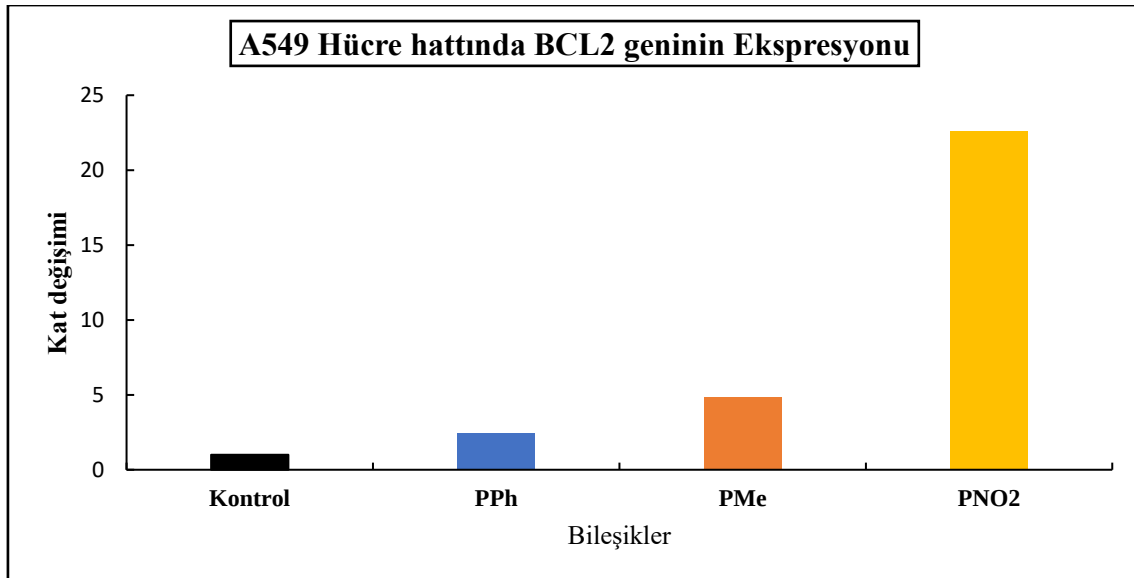
4.3.1. *In vitro* A549 hücre hattı PCR bulguları

A549 hücre hattında apoptotik gen ifadeleri için; BAX, BCL2, CASP3, CASP9 antioksidan gen ifadeleri için; SOD1, SOD2, CAT, GSS, ısı şoku protein ifadeleri için; HSP27, HSP60, HSP70, HSP90 mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. Bileşiklere ait mRNA gen ifadesindeki kat (fold) artışı ve azalışı Microsoft Excel programı yardımı ile hesaplanmıştır. Çalışmada 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonların A549 hücre hattında mRNA ekspresyon düzeyine etkisi apoptotik, antiokidan ve ısı şoku protein genlerinde ayrı ayrı çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PMe bileşiği uygulanan A549 hücresinde BAX gen ifadesinde kontrol grubuna göre 8,39 kat artış gözlenirken, PNO₂ uygulanan hücrelerde gen ifadesinde 7, PPh uygulanan hücrelerde ise 4 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



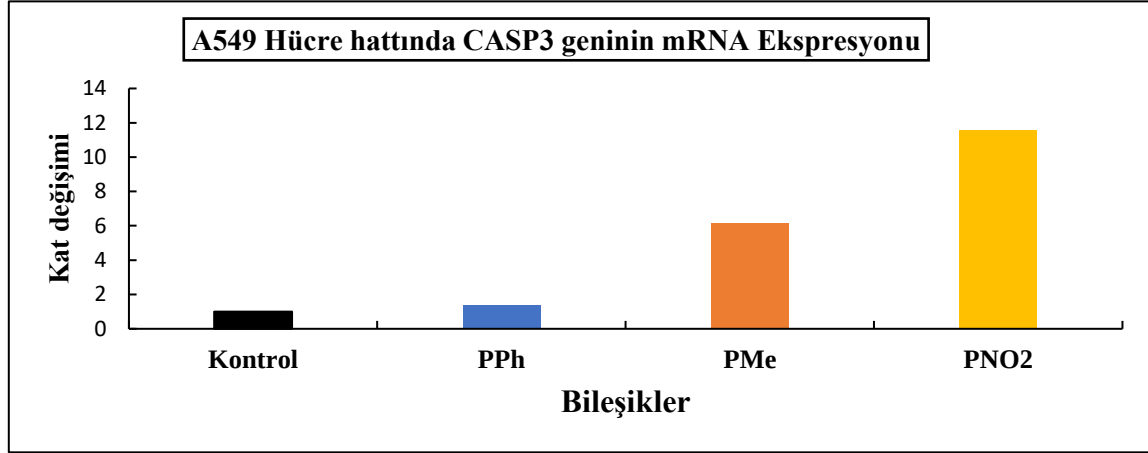
Şekil 4.2. Bileşiklerin A549 hücre hattında BAX genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PMe bileşiği BCL2 gen ifadesinde 4,8; PPh bileşiği 2,4; PNO₂ bileşiği ise 22,6 kat artışı neden olmuştur (Şekil 4.3). Bileşiklerin apoptotik yolda etkili proapoptotik (BAX) ve antiapoptotik (BCL2) gen oranları (BAX/BCL2) üzerine etkisi incelendiğinde PMe:1,75; PPh:1,7; PNO₂:0,309 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2 ve 4.3).



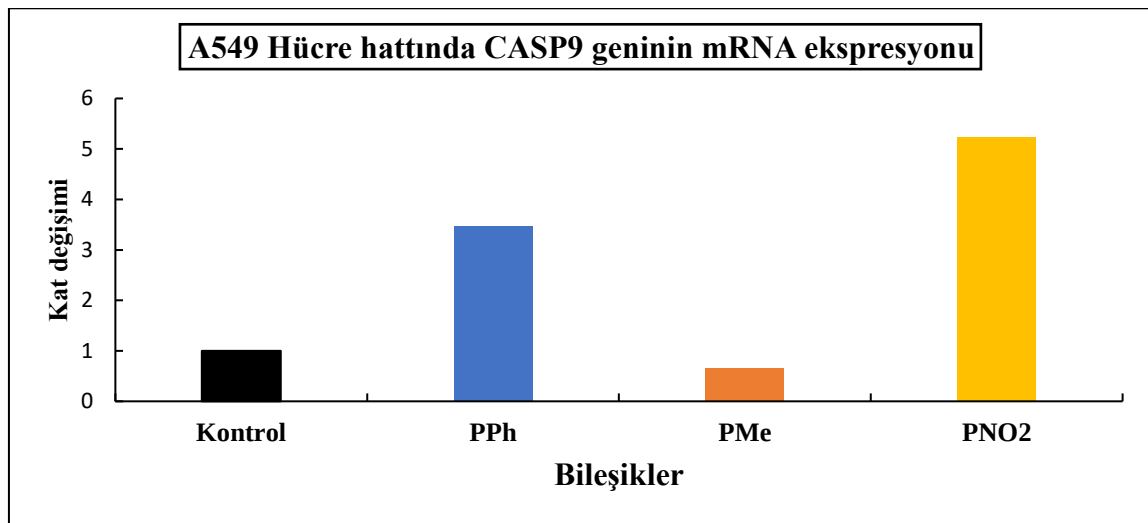
Şekil 4.3. Bileşiklerin A549 hücre hattında BCL2 genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PPh bileşiği uygulanan A549 hücrelerinde CASP3 gen ifadesinde kontrol grubuna göre 1 kat artış gözlenirken, PMe uygulanan hücrelerde gen ifadesinde 6, PNO₂ uygulanan hücrelerde ise 12 kat artış gözlenmiştir (Şekil 4.4).



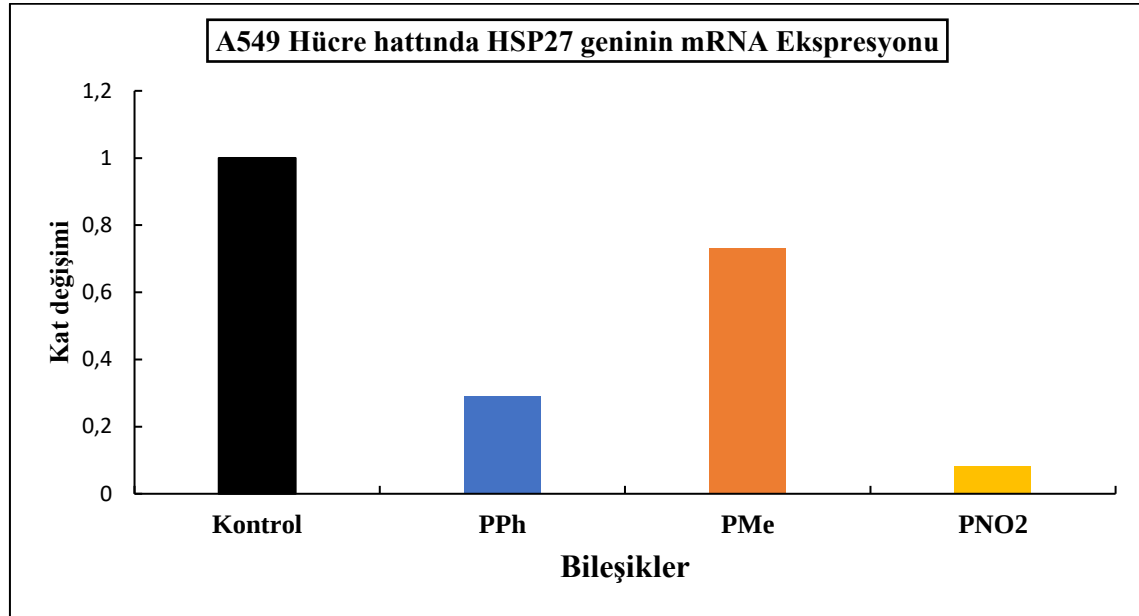
Şekil 4.4. Bileşiklerin A549 hücre hattında CASP3 genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PPh bileşiği uygulanan A549 hücrelerinde CASP9 gen ifadesinde kontrol grubuna göre 3 kat artış gözlenirken, PNO₂ uygulanan hücrelerde ise 5 kat artış gözlenmiştir. PMe uygulanan hücrelerde ise artış tespit edilememiştir. (Şekil 4.5).



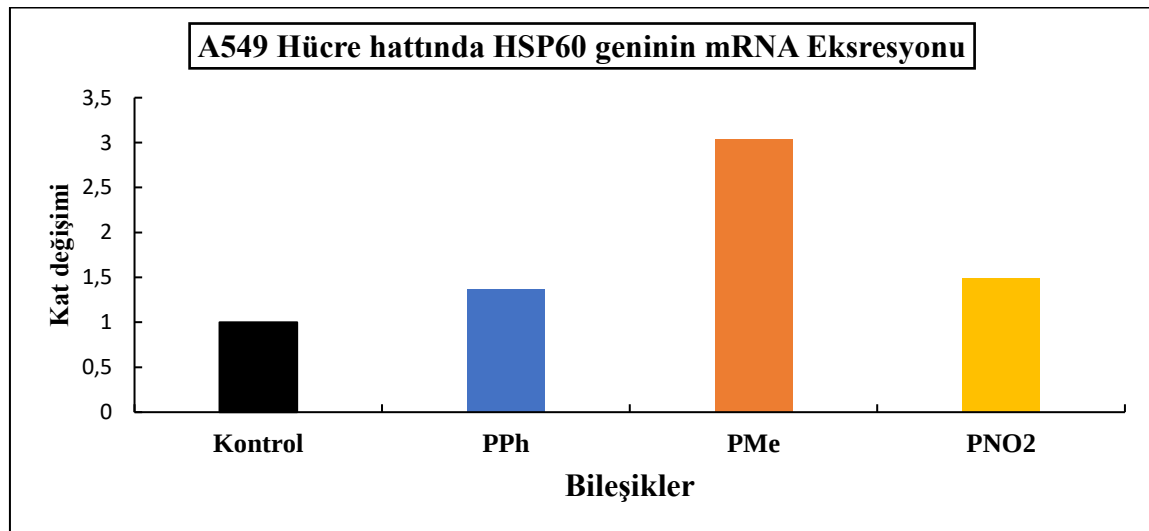
Şekil 4.5. Bileşiklerin A549 hücre hattında CASP9 genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PNO₂ bileşiği uygulanan A549 hücresinde HSP27 gen ifadesinde kontrol grubuna göre 12,5 kat, PPh uygulanan hücrelerde ise 3 kat, PMe uygulanan hücrelerde ise 1,4 azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



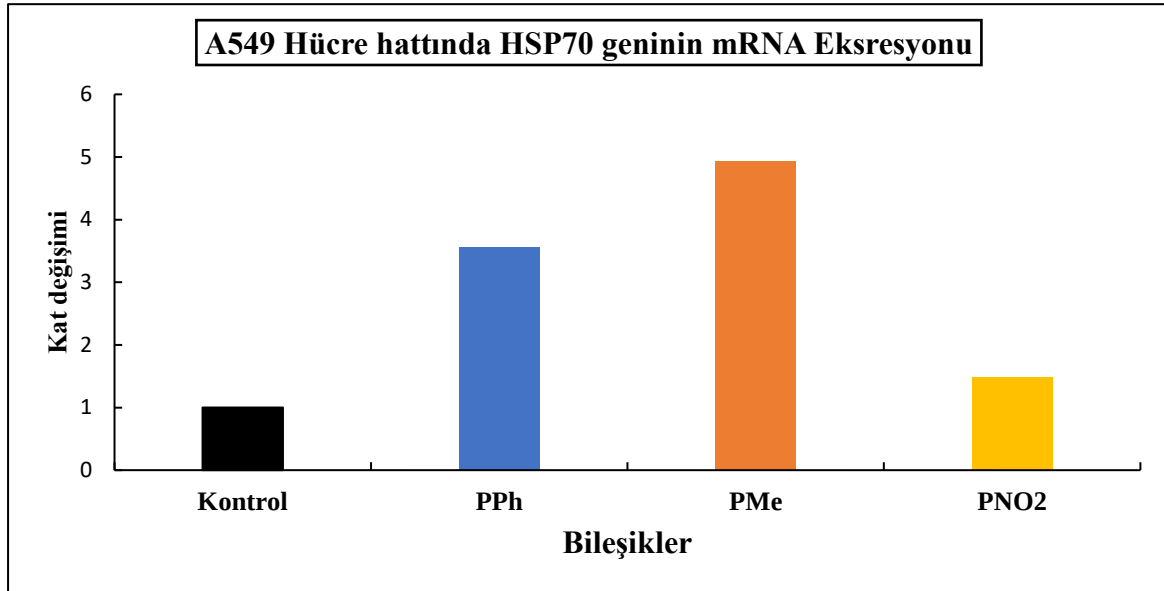
Şekil 4.6. Bileşiklerin A549 hücre hattında HSP27 genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PMe bileşiği uygulanan A549 hücresinde HSP60 gen ifadesinde kontrol grubuna göre 3 kat, PPh bileşiği 1,4 ve PNO₂ bileşiği ise 1,5 kat artışa neden olmuştur (Şekil 4.7).



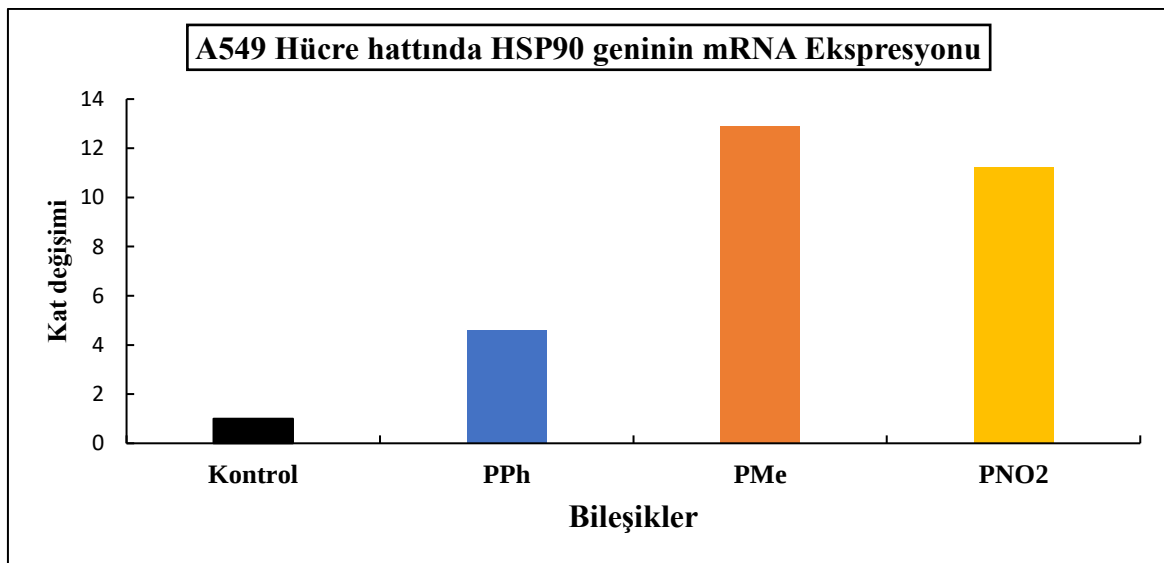
Şekil 4.7. Bileşiklerin A549 hücre hattında HSP60 genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PMe bileşiği uygulanan A549 hücrelerinde HSP70 gen ifadesinde kontrol grubuna göre 4,9, PPh bileşiği 3,5 ve PNO₂ bileşiği ise 1,5 kat artışa neden olmuştur (Şekil 4.8).



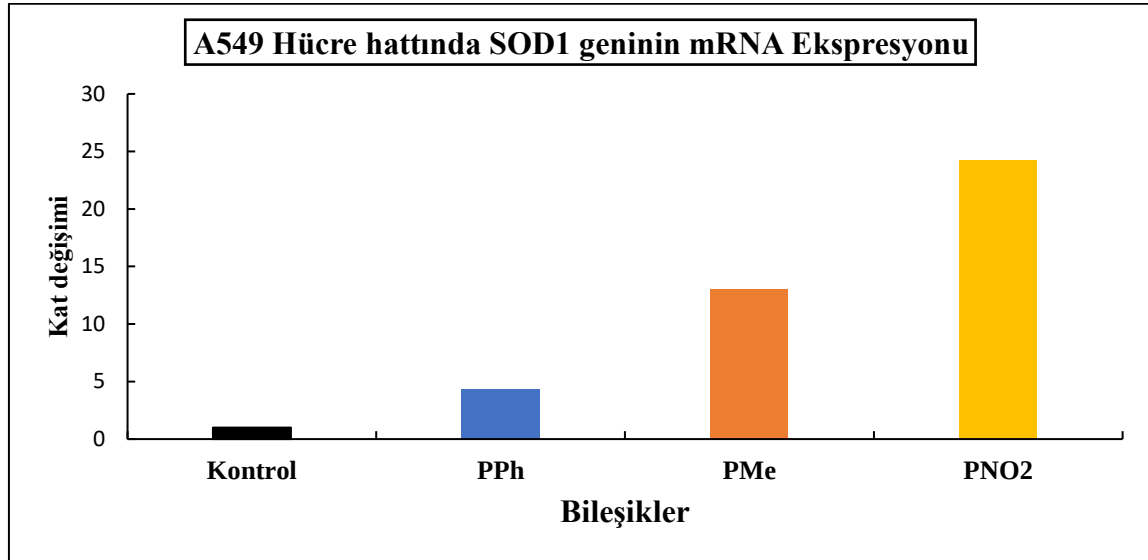
Şekil 4.8. Bileşiklerin A549 hücre hattında HSP70 genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PMe bileşiği uygulanan A549 hücrelerinde HSP90 gen ifadesinde kontrol grubuna göre 12,9 kat, PPh bileşiği 4,6 kat ve PNO₂ bileşiği ise 11,2 kat artışa neden olmuştur (Şekil 4.9).



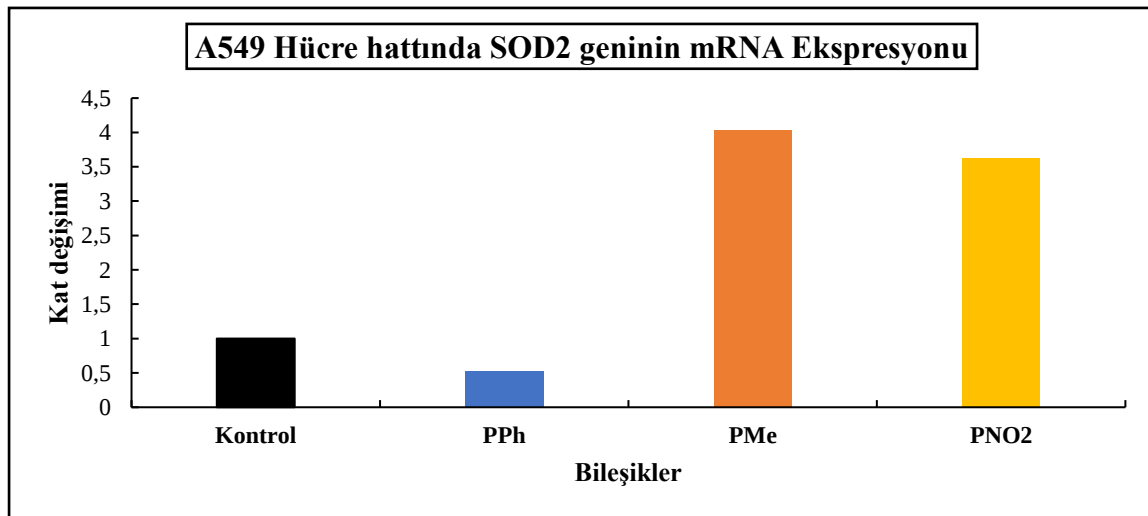
Şekil 4.9. Bileşiklerin A549 hücre hattında HSP90 genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan, PPh bileşiği uygulanan A549 hücrelerinde SOD1 gen ifadesini kontrol grubuna göre 4,3 PMe uygulanan hücrelerde 13, PNO₂ uygulanan hücrelerde ise 24 kat artırmıştır (Şekil 4.10).



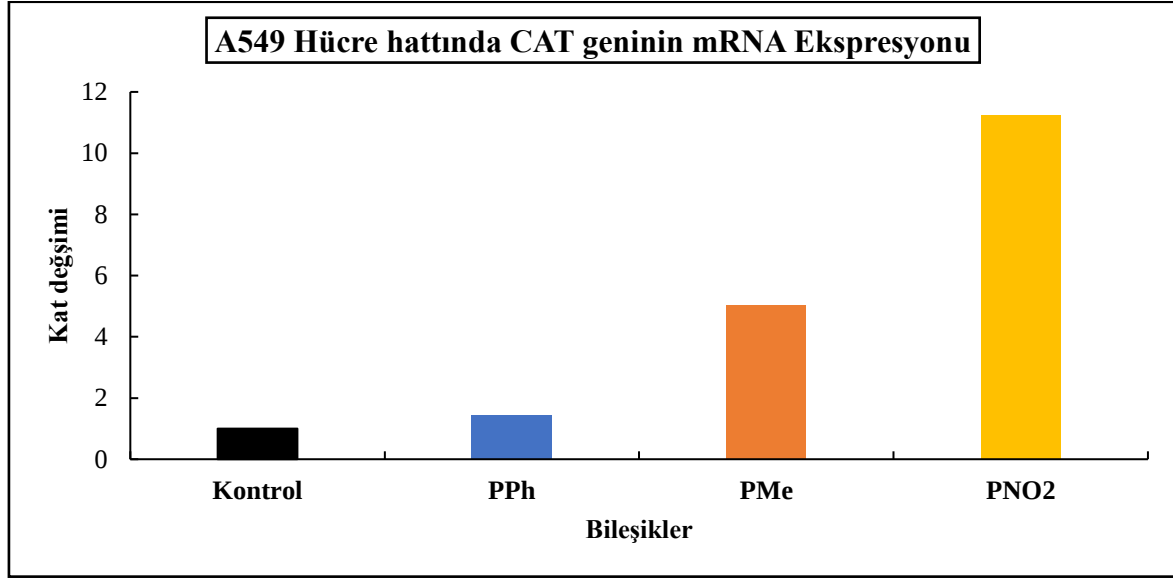
Şekil 4.10. Bileşiklerin A549 hücre hattında SOD1 genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan, PNO₂ bileşiği uygulanan A549 hücrelerinde SOD2 gen ifadesinde kontrol grubuna göre 3,6 kat PMe uygulanan hücrelerde 4 kat artmış meydana gelmiştir. PPh bileşiği SOD2 gen ifadesinde kontrol grubuna göre 2 kat azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.11).



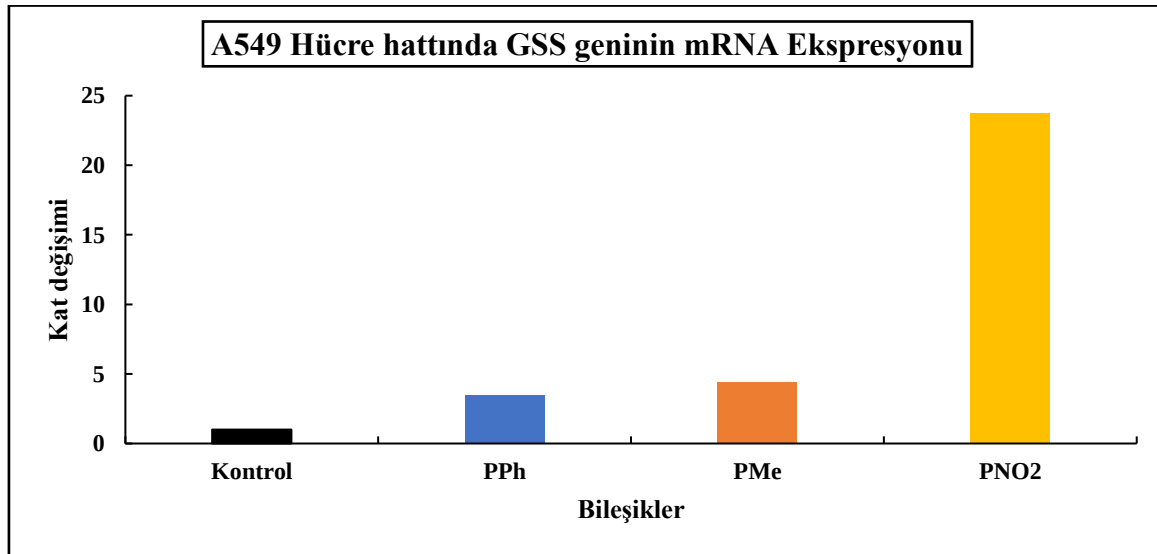
Şekil 4.11. Bileşiklerin A549 hücre hattında SOD2 genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan, PPh bileşiği uygulanan A549 hücresinde CAT gen ifadesi kontrol grubuna göre 1,4 kat, PMe uygulanan hücrelerde 4 kat ve PNO₂ uygulanan hücrelerde ise 11 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 4.12).

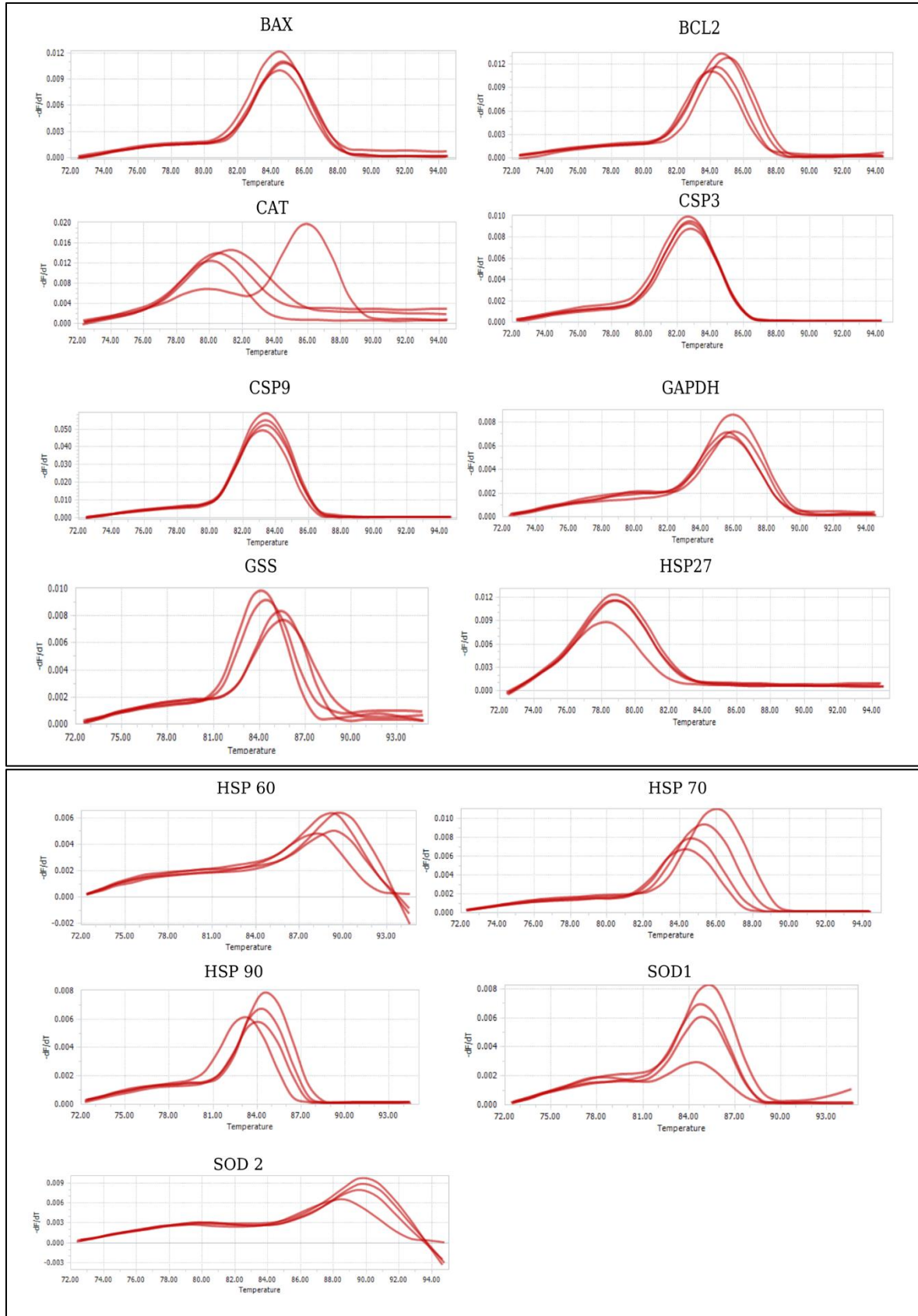


Şekil 4.12. Bileşiklerin A549 hücre hattında CAT genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan, PPh bileşiği uygulanan A549 hücresinde GSS gen ifadesi kontrol grubuna göre 3,5 kat, PMe uygulanan hücrelerde 4,4 kat ve PNO₂ uygulanan hücrelerde ise 24 kat artmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Bileşiklerin A549 hücre hattında GSS genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi



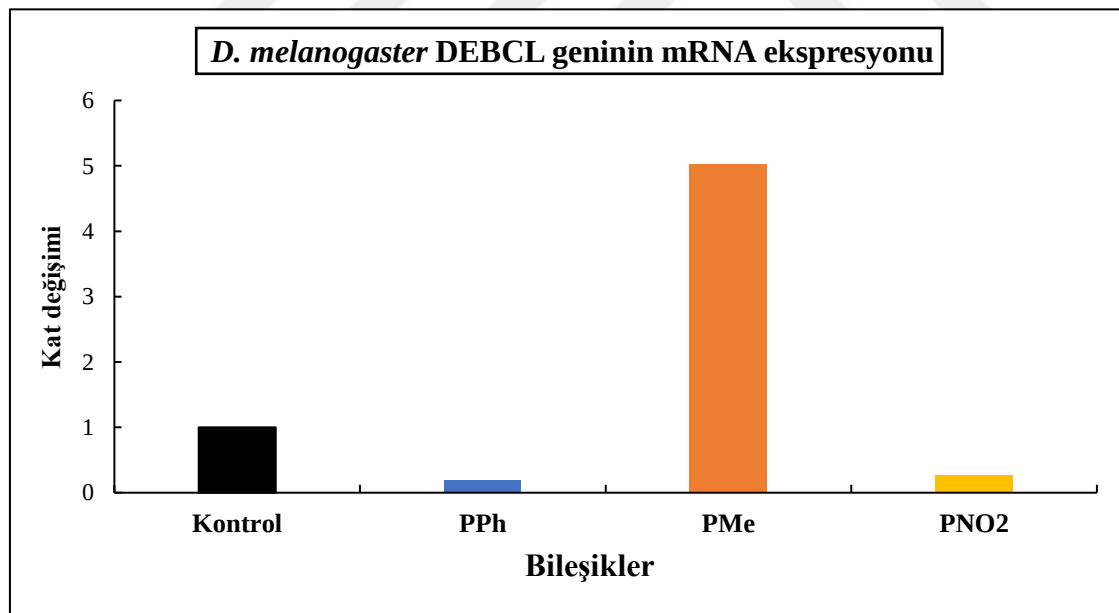
Şekil 4.14. A549 hücre hattının gen bölgelerine ait erime eğrisi grafikleri

4.3.2. In vivo *D. melanogaster* PCR bulguları

Drosophila melanogaster ve A549 hücre hatlarında, heterohalkalı bileşiklerin apoptotik gen ifadeleri, antioksidan gen ifadeleri, ısı şoku protein ifadeleri üzerine etkisi ayrı ayrı çalışılmıştır.

D. melanogaster'de apoptotik gen ifadeleri için; DEBCL, BUFFY, DRICE, DRONC, antioksidan gen ifadeleri için; SOD, CAT, GR, GST, ısı şoku protein ifadeleri için; HSP27, HSP60, HSP70, HSP90 genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. *D. melanogaster* bireylerinde apoptotik genlerin gerçek zamanlı RT-PCR sonuçları analiz edildiğinde;

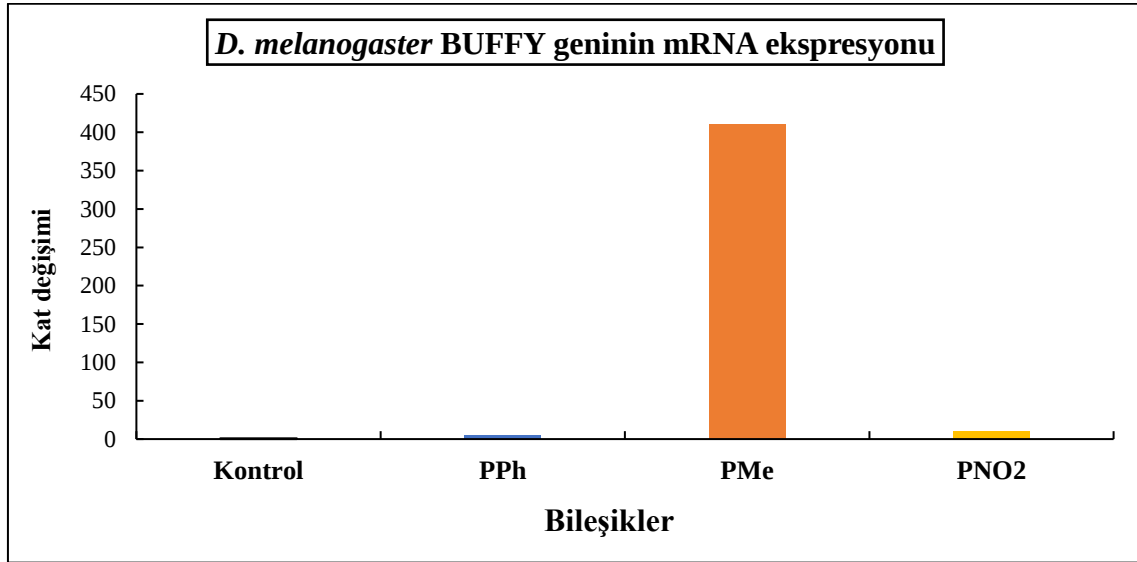
Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PMe bileşiği *D. melanogaster*'de DEBCL gen ifadesini kontrol grubuna kıyasla 5 kat arttırırken, PPh 5 ve PNO₂ ise 4 kat azaltmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Bileşiklerin *D. melanogaster* DEBCL genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

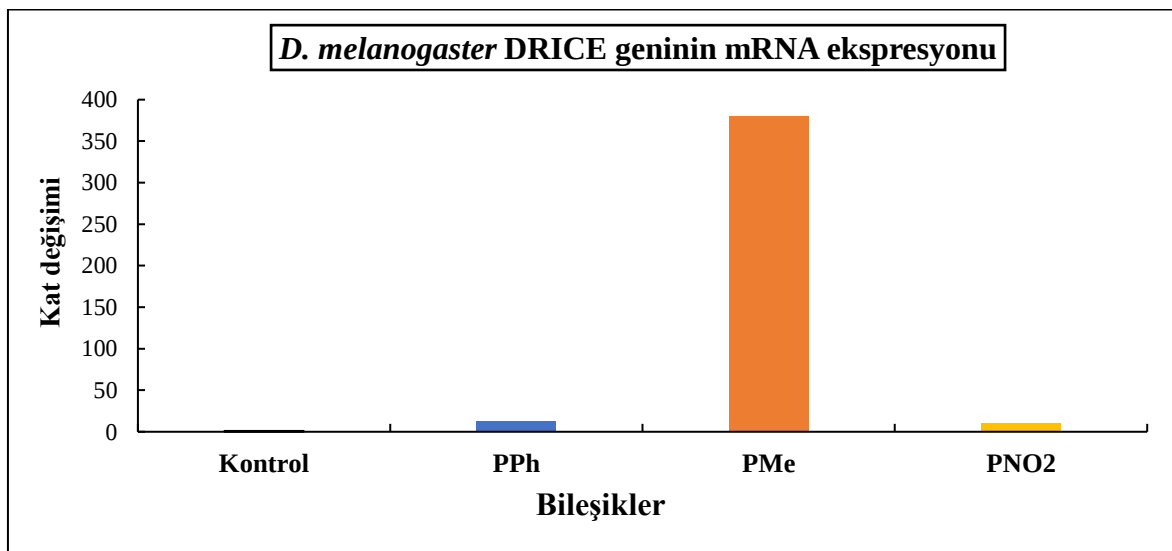
Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PMe bileşiği uygulanan *D. melanogaster* bireylerinde BUFFY gen ifadesi kontrol grubuna göre 410 kat, PPh uygulanan bireylerde 4,8 kat PNO₂ uygulanan bireylerde ise 9,98 kat artmıştır (Şekil 4.16). Çalışmada

kullanılan bileşiklerin apoptotik yolda etkili olan genlerden proapoptotik (DEBCL) ve antiapoptotik (BUFFY) gen oranlarına DEBCL/BUFFY etkisi incelendiğinde PMe: 0,012; PPh: 0,039; PNO₂ : 0,026 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.15 ve 4.16).



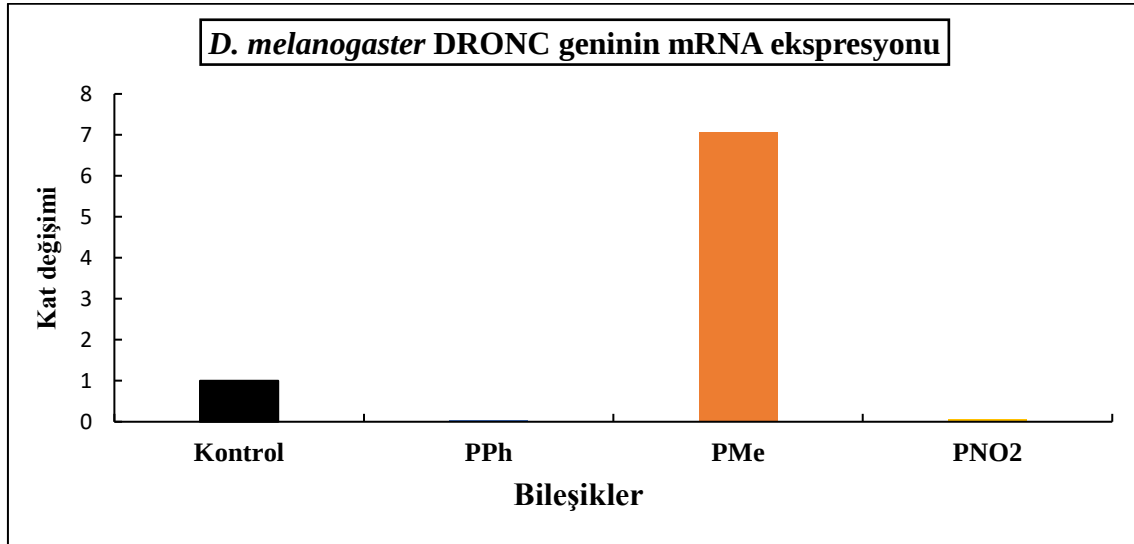
Şekil 4.16. Bileşiklerin *D. melanogaster* BUFFY genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PMe bileşiği DRICE gen ifadesini kontrol grubuna göre 380 kat, PPh 13 kat ve PNO₂ ise 11 kat arttırmıştır (Şekil 4.17).



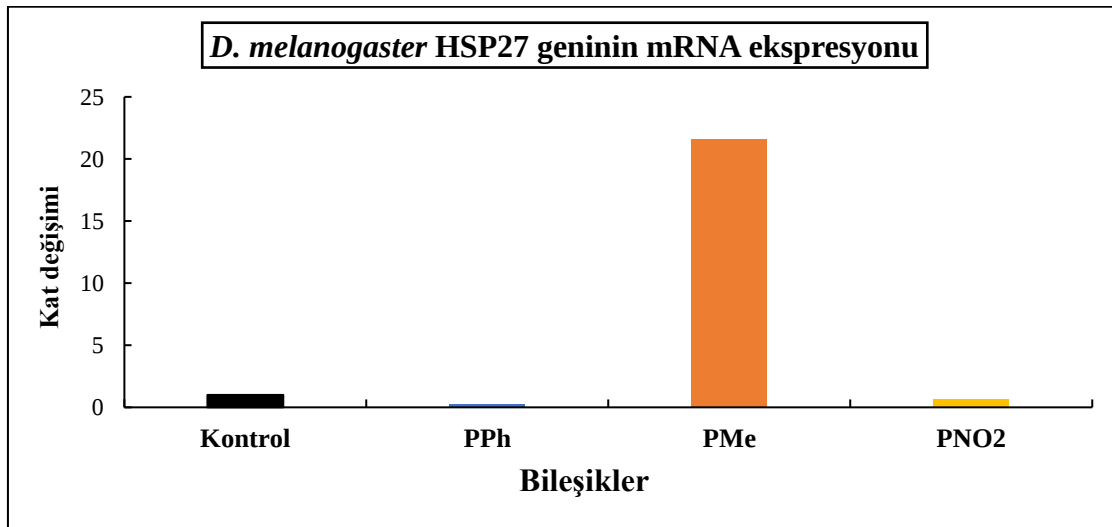
Şekil 4.17. Bileşiklerin *D. melanogaster* DRICE genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PMe bileşiği DRONC gen ifadesini kontrol grubuna göre 7 kat artırırken, PPh 33 kat ve PNO₂ ise 16,6 kat azaltmıştır (Şekil 4.18).



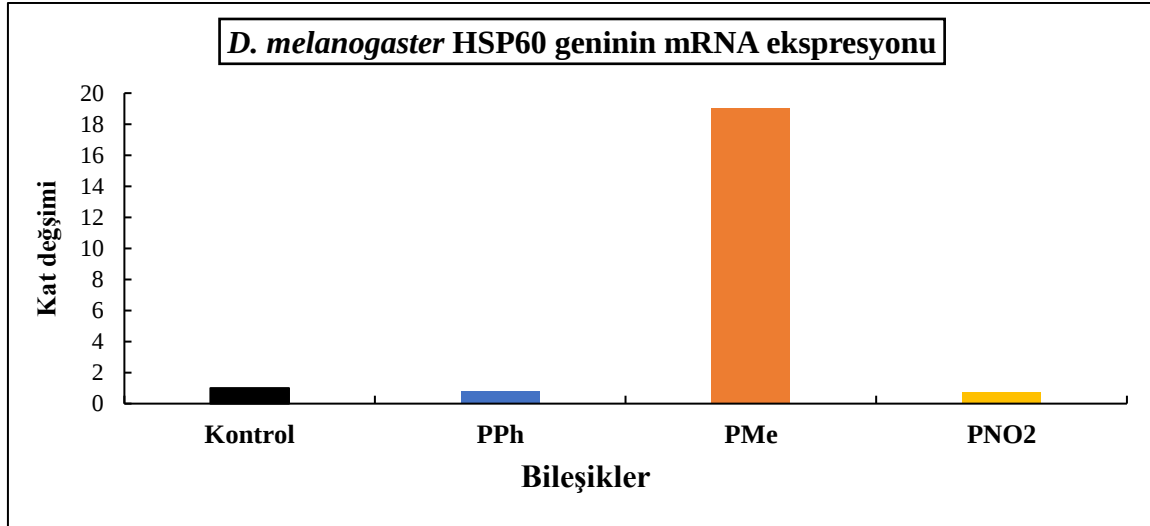
Şekil 4.18. Bileşiklerin *D. melanogaster* DRONC genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PPh bileşiği uygulanan *D. melanogaster* HSP27 gen ifadesinde 5 kat PNO₂ uygulanan bireylerde ise 1,5 kat azalma tespit edilmiştir. PMe uygulanan *D. melanogaster* bireylerinde ise gen ifadesinde 21 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 4.19).



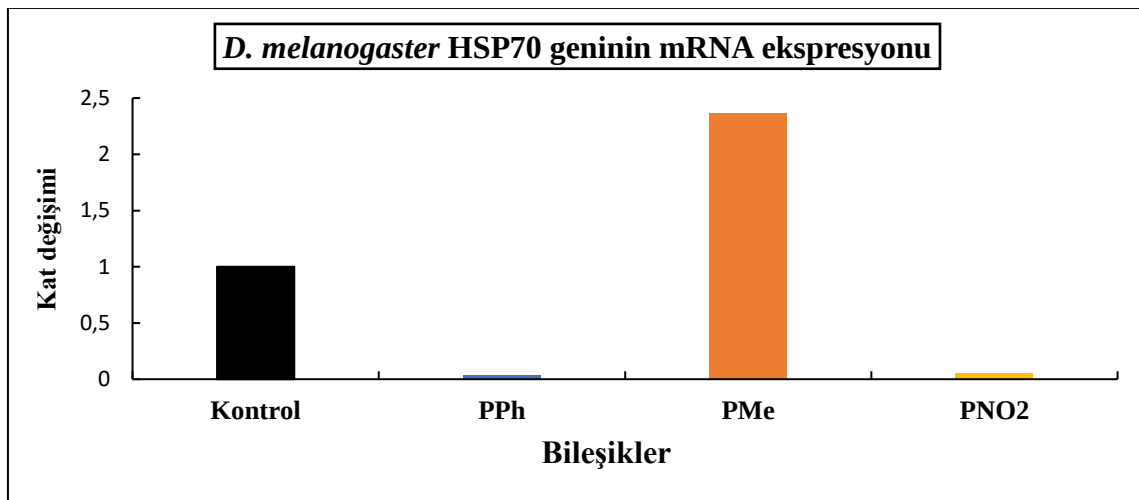
Şekil 4.19. Bileşiklerin *D. melanogaster* HSP27 genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PPh bileşiği uygulanan *D. melanogaster* HSP60 gen ifadesinde 1,25 kat, PNO₂ uygulanan bireylerde ise 1,4 kat azalma tespit edilmiştir. PMe uygulanan *D. melanogaster* bireylerinin gen ifadesinde ise 19 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 4.20).



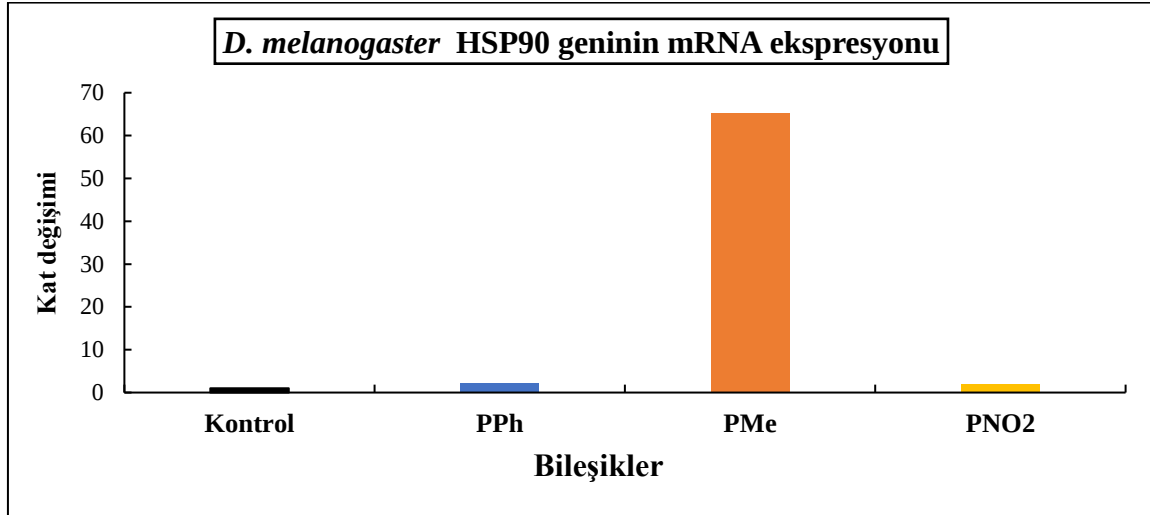
Şekil 4.20. Bileşiklerin *D. melanogaster* HSP60 genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PPh bileşiği uygulanan *D. melanogaster* HSP70 gen ifadesinde kontrol grubuna göre 33 kat, PNO₂ ise 20 kat azaltmıştır. PMe uygulanan bireylerde ise gen ifadesinde kontrol grubuna göre 2,4 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 4.21).



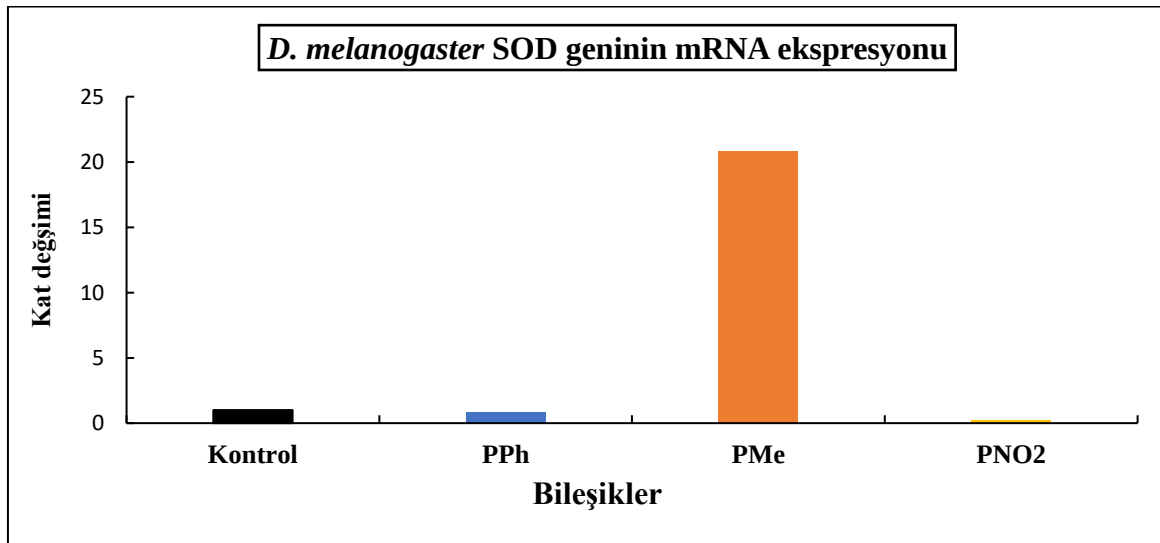
Şekil 4.21. Bileşiklerin *D. melanogaster* HSP70 genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PMe uygulanan *D. melanogaster* HSP90 gen ifadesinde kontrol grubuna göre 65 kat, PNO₂ ve PPh uygulanan bireylerde ise 2 kat artış tespit edilmiştir (Şekil 4.22).



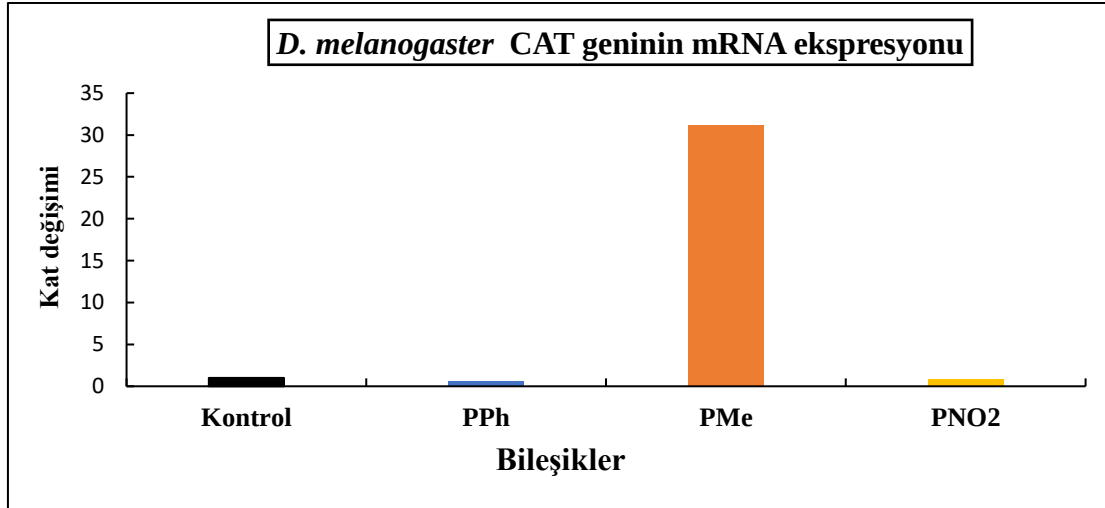
Şekil 4.22. Bileşiklerin *D. melanogaster* HSP90 genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PMe bileşiği uygulanan *D. melanogaster* SOD gen ifadesinde kontrol grubuna göre 20 kat artış gözlenirken, PPh uygulanan bireylerde 1 kat, PNO₂ uygulanan bireylerde ise 5 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.23).



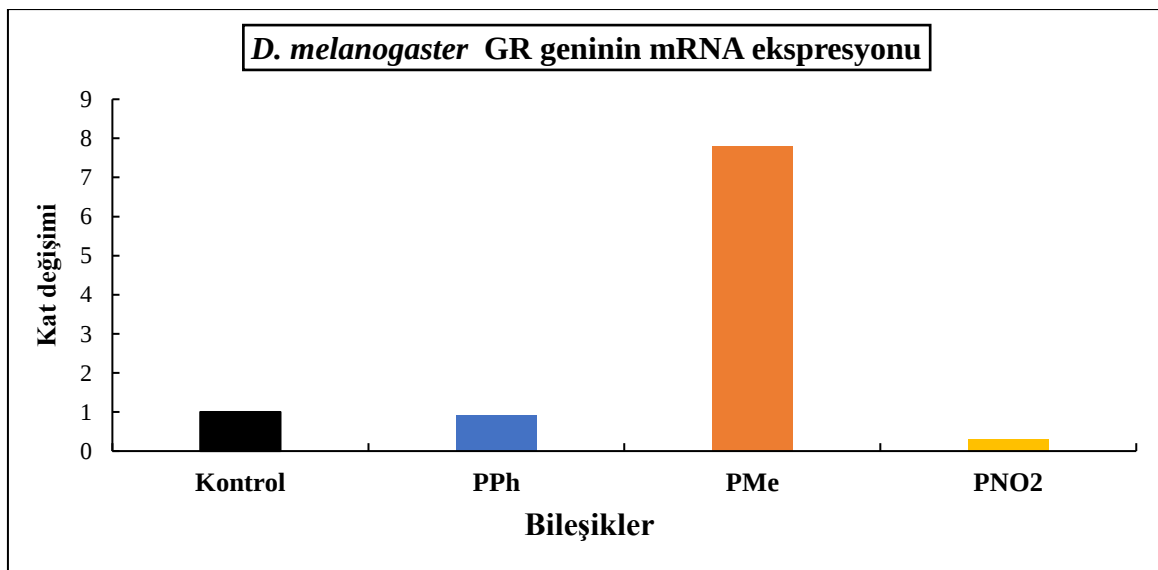
Şekil 4.23. Bileşiklerin *D. melanogaster* SOD genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PMe bileşiği uygulanan *D. melanogaster* CAT gen ifadesinde kontrol grubuna göre 31 kat artış gözlenirken, PPh uygulanan bireylerde 2 kat PNO₂ uygulanan bireylerde ise 1 kat azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.24).



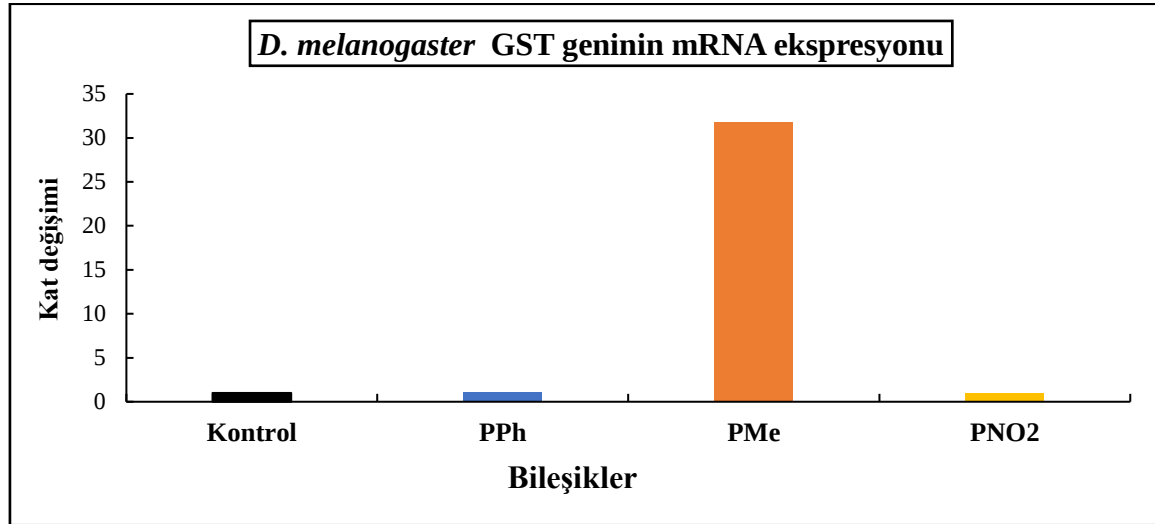
Şekil 4.24. Bileşiklerin *D. melanogaster* CAT genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PMe bileşiği uygulanan *D. melanogaster* GR gen ifadesinde kontrol grubuna göre 8 kat artış gözlenirken, PNO₂ uygulanan bireylerde 3 kat azalma PPh uygulanan bireylerde ise kontrol grubuna yakın değerler elde edilmiştir (Şekil 4.25).



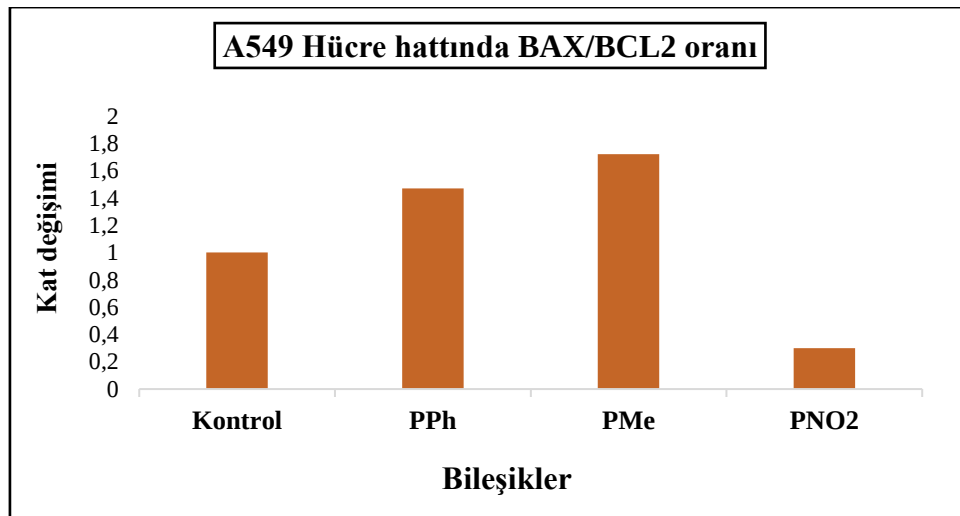
Şekil 4.25. Bileşiklerin *D. melanogaster* GR genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmada kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinonlardan PMe bileşiği uygulanan *D. melanogaster* GST gen ifadesinde kontrol grubuna göre 32 kat artış gözlenirken, PPh ve PNO₂ uygulanan bireylerde ise kontrol grubuna benzer değerler elde edilmiştir (Şekil 4.26).



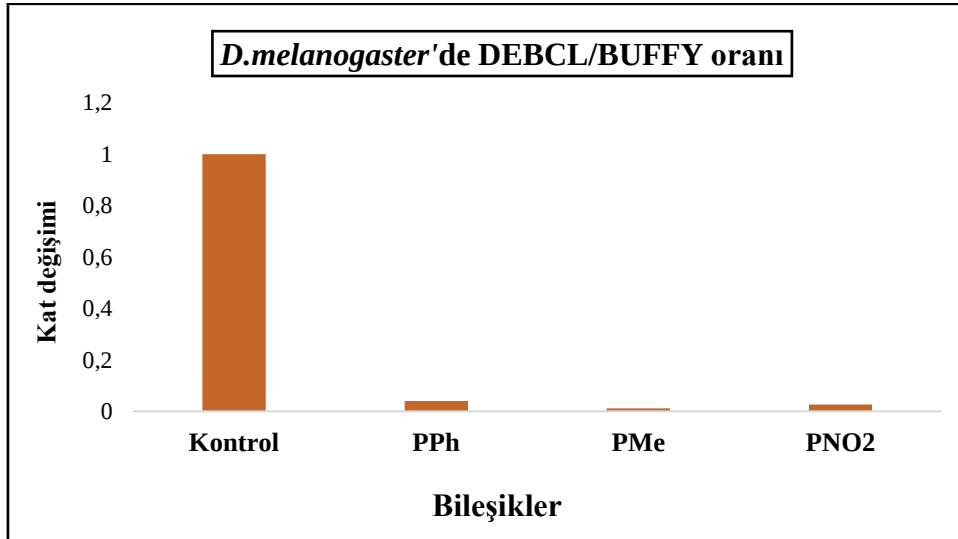
Şekil 4.26. Bileşiklerin *D. melanogaster* GST genine ait mRNA ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmamızda ayrıca A549 hücre hattında apoptotik genlerden BAX, BCL2 ve *Drosophila melanogaster*'de apoptotik genlerden DEBCL, BUFFY genlerinin oranları hesaplanmıştır. A549 hücre hattında kullanılan kimyasalların BAX/BCL2 oranı üzerine etkisi incelendiğinde özellikle PPh ve PMe maddelerinin proapoptotik etki gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.27).

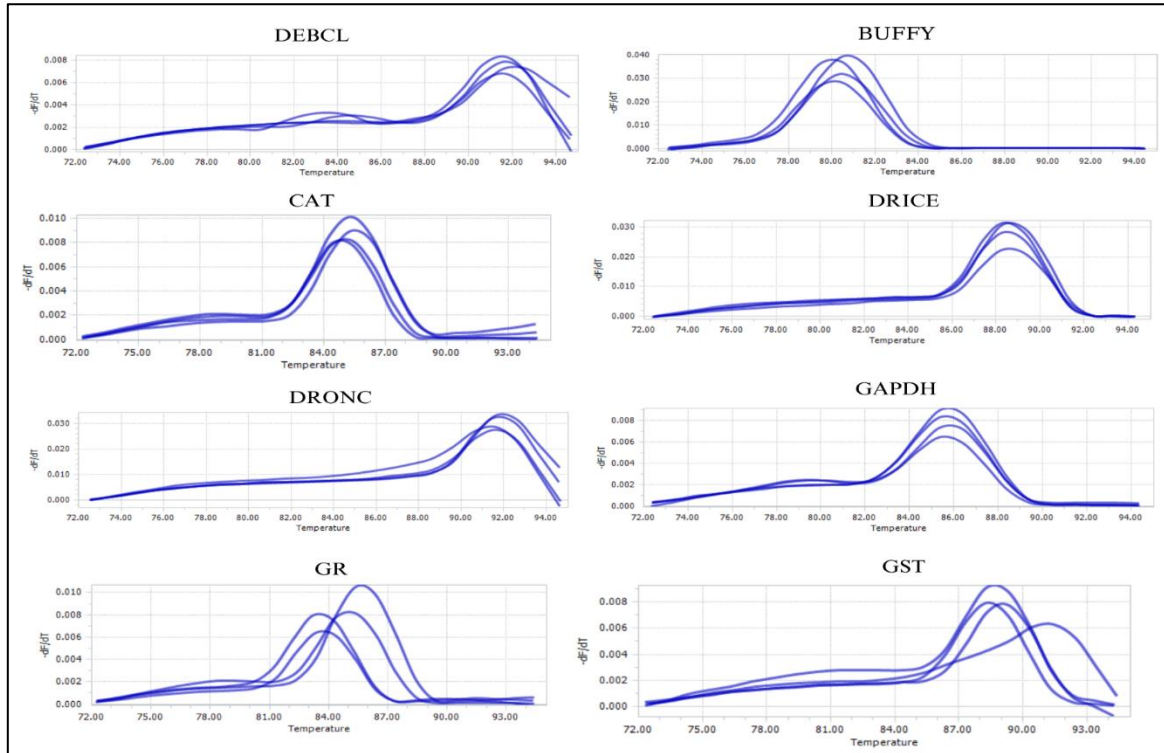


Şekil 4.27. Bileşiklerin A549 hücre hattında BAX/BCL2 oranı üzerine etkisi

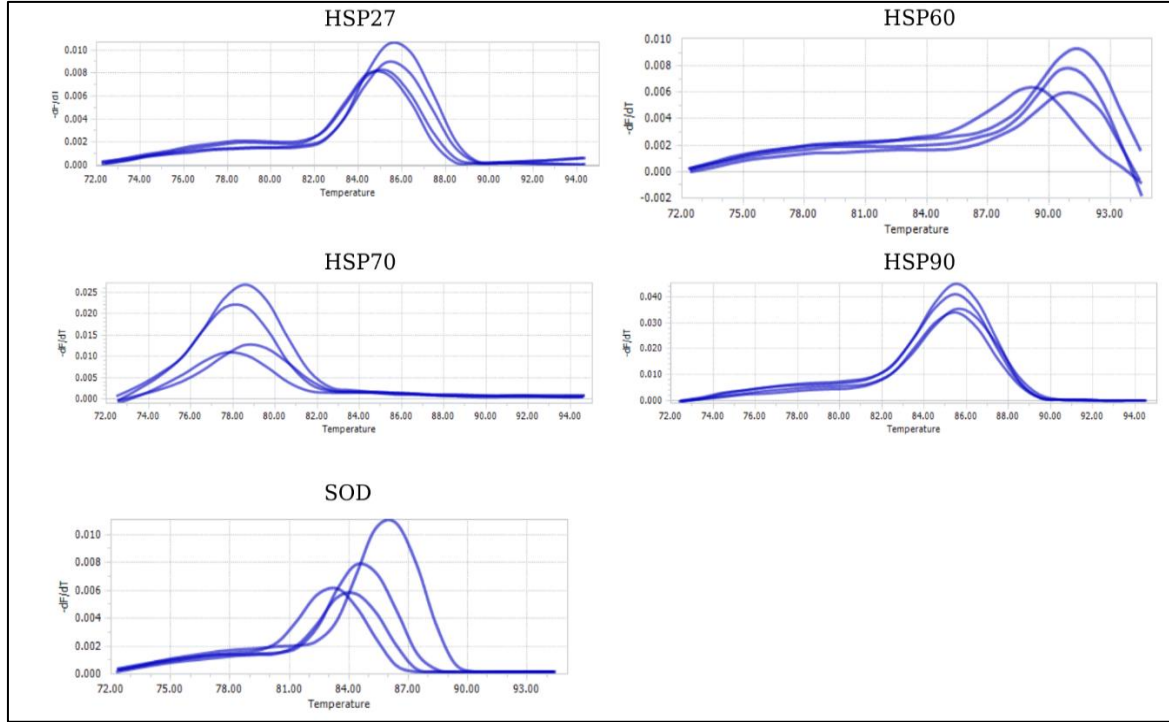
Ayrıca *D. melanogaster*'de de apoptotik genlerden DEBCL/BUFFY oranı hesaplanmıştır. A549 hücre hattında proapoptotik etki gösteren BAX genine benzer işleve sahip olan DEBCL geninin, antiapoptotik etki gösteren BCL2 genine benzer işleve sahip BUFFY genine oranı incelendiğinde bileşiklerin üçünün de (PPh, PMe, PNO₂) antiapoptotik etki gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Bileşiklerin *D. melanogaster*'de DEBCL/BUFFY oranı üzerine etkisi



Şekil 4.29. *D. melanogaster* bireylerinden elde edilen hücre hattının gen bölgelerine ait erime eğrisi grafikleri



Şekil 4.29. (devamı)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser kaynaklı ölümlerin başında akciğer kanseri gelmektedir. Bunun en önemli nedeni, erken teşhisin zorluğu ve tam bir tedavi yönteminin bulunamamasıdır. Bundan dolayı akciğer kanseri başta olmak üzere tüm kanser çeşitleri için daha etkili tedavi seçeneklerinin bulunmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Gao ve diğerleri, 2019).

Bu çalışmada yeni sentez edilmiş 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinon bileşiklerinin sitotoksik, apoptotik, antiapoptotik, genotoksik ve antioksidan etkileri akciğer karsinomu hücrelerinde (A549) *in vitro*, *Drosophila melanogaster*'de ise *in vivo* olarak araştırılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız maddeler materyal metod kısmında anlatıldığı gibi pirimidinlerden türevlendirilmiştir. Pirimidinler, nükleotitler, nükleik asitler, vitaminler, pterinler ve antibiyotikler gibi birçok doğal bileşikteki yapısal bileşenlerdir. Tüm organizmalarda, pirimidin nükleotidleri, polisakkarit ve fosfolipid sentezi için şekerlerin aktivasyonu ve ayrıca proteinlerin ve lipidlerin glikozilasyonu gibi hücre metabolizmasının yanı sıra nükleik asitlerde temel işlevlere hizmet ederler. Urasil, sitozin, timin, üridin, sitidin ve timidin ribonükleositleri ile bunlara karşılık gelen deoksinükleozitler başlıca pirimidinlerdir. Sentetik pirimidin analogları, antimetabolitler olarak işlev görür; metabolik yollara, RNA ve DNA sentezine seçici müdahale yoluyla enfeksiyon, virüs, tümör ve otoimmün hastalıklarla savaşabilirler (Löffler ve Zameitat, 2013). Ayrıca bu analoglar doğal pirimidin bazlarına benzerlikleri ile değişik makro yapılarla ve reseptörlerle etkileşime geçebilirler. Bu nedenle yeni ilaç adayı olabilecek aktif moleküllerin sentezinde sentetik pirimidinler ve türevleri oldukça önemli bir yere sahiptirler.

Pirimidin türevlerinden dihidropirimidinlerin, klinikte önemli yeri olan kalsiyum kanalı blokerlerinden dihidropiridinlere benzemesinden dolayı son yıllarda bu bileşiklere olan ilgi oldukça artmıştır. Bu bileşiklerin farklı yapıda sentezleri ve bunların biyolojik aktiviteleri üzerine de literatürde birçok çalışma bulunmaktadır (Peters, Lindenmaier, Haefeli ve Weiss, 2006; Tcherniuk, van Lis, Kozielski ve Skoufias, 2010; Duan ve diğerleri, 2015). Bu araştırmalar ile bizim çalışmamızda da olduğu gibi Biginelli reaksiyonun özüne bağlı kalınarak sadece reaktanlar ve bazı şartlar değiştirilerek çok farklı dihidropirimidin bileşikleri elde edilmiştir. Örneğin yapılan bir çalışmada substitue N-3 atomu bulunduran

bir dihidropirimidin bileşiğinin ve bunun çeşitli türevlerinin uzun ömürlü antihipertansif aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte karbon atomlarının C2-N3 veya C5-C6 konumlarından türevlerinin yapılmasıyla elde edilen bitişik halka sistemleri içeren bileşiklerinin kalsiyum kanal blokörü etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Yılmaz, 2016). Bizim çalışmamız sonucunda ise 4-(Süstitüe)-3,4-dihidropirimidinon bileşiklerimizden PPh ve PMe bileşiklerinin A549 hücre hattı üzerinde apoptotik, PPh, PMe, ve PNO₂ bileşiklerinin HSP27 gen ifadesini azaltıcı ve antioksidan etkinliklerinin olduğu belirlenmiştir. *D. melanogaster*'de ise çalışmada kullanılan bileşiklerin tamamı antiapoptotik etki göstererek DEBCL/BUFFY oranının azalmasını sağlamıştır (Şekil 4.28).

Bileşiklerden PMe, apoptotik yolda görev alan DRONC ve DRICE gen ifadesini oldukça fazla artırmıştır. Bileşiklerden PMe'nin ısı şoku protein (HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90) genlerinin ve antioksidan (SOD, CAT, GR ve GST) genlerin ekspresyon düzeyini artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2-4.26).

Yakın zamanlarda çeşitli sağlık sorunlarının tedavisinde dihidropirimidin ve 3,4-dihidropirimidin-2-on bileşiklerinin kullanılmaya başlanması bu bileşiklerin sentezini önemli hale getirmiştir. Bu bileşiklerin birçoğu Biginelli ve Hantzsch reaksiyonu temel olarak alınıp reaktanlar ve katalizörlerde değişiklikler yapılarak sentezlenebilmektedir. Ancak geliştirilen yöntemlerin çeşitli sorunlara sahip olması bu konuda yeni araştırmaların yapılması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır (Joule ve Mills, 2000). Dihidropiridin ve 3,4-dihidropirimidin-2-on gibi benzer maddelerle yapılan çalışmalarda bileşiklerin antiviral, antitümör, antibakteriyel, antienflamatuvar, antihipertansif aktivitelerinden ötürü farmakolojik öneme sahip oldukları vurgulanmıştır. Bu bileşiklerin kalsiyum iyonu kanalı blokörü, insan α 1a adrenerjik reseptörleri seçici inhibitörü, platelet aktive edici faktör inhibitörü ve etkili HIV gp 120 CD 4 inhibitörü olarak etki gösterdikleri belirlenmiştir (Kappe, 2000).

Farklı yapılarda sentezlenmiş başka dihidropirimidinon bileşiklerinin antikanser aktiviteleri ile ilgili olarak literatürde yapılan farklı çalışmalar da vardır (Kappe, Shishkin, Uray ve Verdino, 2000). Örneğin; 1999'da Mayer ve diğerleri, monastrolün antikanser özellikleri ve hücre bölünmesi üzerindeki etki mekanizması üzerine bir çalışma yayınlamışlardır (Mayer ve diğerleri, 1999). Bu çalışmada kullanılan Monastrol, etil-asetoasetat, 3-hidroksibenzaldehit ve tiyoüreden başlayarak Biginelli kondensasyon reaksiyonunda elde

edilen bir moleküldür (Kappe ve diğerleri, 2000). Monastrolün, hücre bölünmesi sırasında iğ iplikciğinin oluşumunda yer alan bir protein olan kinesin Eg5'in motor aktivitesini inhibe ederek mitozu kesintiye uğrattığı tespit edilmiştir (Mayer ve diğerleri, 1999; Prokopcová ve diğerleri, 2010). Bu keşif sayesinde monastrolün yapısı, potansiyel antikanser etkileri olan benzer türevlerin sentezi için ilham kaynağı olmuştur. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz sitotoksik etkinin benzer nedenlerle olabileceği kanaatindeyiz. Örneğin bileşiklerimizden PPh, PNO₂ ve PMe A549 hücre hatlarında özellikle 50 ve 100µM konsantrasyonunda yüksek sitotoksik aktivite göstermiştir. MRC-5 hücre hattında ise bileşiklerin sitotoksik aktivitesine rastlanmamıştır (Şekil 4.2-4.5).

Russowsky ve diğerleri (2006) tarafından yapılan başka bir çalışmada, 11 monastrol analogu sentezlenmiş ve monastrole kıyasla malign hücre hatları UACC'ye karşı daha büyük bir sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte yeni antikanser ajanları keşfetmek için Kaan ve arkadaşları, Eg5 proteininin farklı monastrol türevleri tarafından inhibisyonunu araştırmışlardır. Sonuçta Florastrolün, enzimin allosterik bölgesi ile etkileşim kuran flor atomlarının varlığı nedeniyle monastrole kıyasla daha iyi bir inhibitör olduğunu kanıtlamışlardır (Kaan ve diğerleri, 2010).

Bazı çalışmalar ise monastrol molekülleri için centrin (Svetlik, Veizerová, Mayer ve Catarinella, 2010), kalsiyum kanalları (Çalışkan ve Akbaş, 2011) ve topoizomerez I (González-Olvera ve diğerleri, 2016) gibi başka olası hedef yollar olabileceğini göstermiştir. Peters, Lindenmaier, Haefeli ve Weiss (2006), tarafından yapılan çalışmada da monastrol ile inkübasyondan sonra LS180 hücrelerinde mRNA ekspresyonu ile ölçüldüğü üzere *in vitro* Pgp'yi indüklediği tespit edilmiştir.

Wright ve diğerleri, (2008) tarafından yapılan çalışmada ise, meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu engelleyen DHPM-peptoid sentezlenmiştir. İncelenen DHPM-peptoid, kanserli hücrelerde (meme, akciğer, kolon, rahim ağzı kanseri) aktivite ve regülasyonu arttıran HSP 70 proteini ile etkileşim kurmuştur. Çalışma, DHPM-peptoid'in doğrudan HSP 70 üzerinde etki ederek hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve böylece kanserli hücrelerin büyümesini durdurduğunu göstermiştir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90 ile çalışılmıştır. PMe, PPh ve PNO₂ bileşikleri A549 hücre hattında HSP27 gen ekspresyon seviyesini inhibe ederek proliferasyonu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bileşiklerin HSP60, HSP70 ve HSP90 genlerinin ekspresyon seviyesini artırdığı tespit

edilmiştir. *Drosophila melanogaster*'de ise çalışmada kullanılan bileşiklerden PMe'nin, HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90 genlerinin ekspresyon seviyesini artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6-4.9 ; 4.18-4.22).

Prashantha Kumar, Sankar, Nasir ve Chandrashekar, (2009) tarafından yapılan çalışmada, sinnamoil-, piridin-4-il- veya furan-2-il-grupları ile süstitüe edilmiş bazı Biginelli ürünlerinin sentezini, bunların *in vitro* sitotoksik aktivitelerini ele almışlardır. Sonuçta MCF-7 habis hücre hatlarında test edilen türevlerin, önemli sitotoksik aktivite sergilediği ve kanserli hücrelerin büyümesini yaklaşık %70 oranında önlediği belirlenmiştir.

In vitro çalışmalara ek olarak, Bhat, l-Dhfy, Al-Omar, (2016) tarafından yapılan çalışmada, farelerde DHP-5 adı verilen bir DHPM türevinin antitümör aktivitesini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, günlük 50 mg/kg doz kullanarak 14 gün sonra intraperitoneal olarak tedavi edilen hayvanlarda LOVO tümörlerinin (kolon kanseri ksenogreftleri) büyümesinde azalma gözlemlenmiştir. Biz de çalışmamızda *in vivo* testler için *D. melanogaster* model organizmasını kullandık. Sonuçta etkisini incelediğimiz bileşiklerin *Drosophila*'da genotoksik etki göstermeyip antioksidan ve antiapoptotik anlamda olumlu etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan bileşiklerin apoptotik genler üzerine etkisi incelendiğinde; PMe bileşiğinin pro-apoptotik bir gen olan DEBCL'nin ekspresyon seviyesini kontrol grubuna göre artırdığı, PPh ve PNO₂ bileşiklerinin ise DEBCL geninin ekspresyon seviyesini kontrol grubuna göre azalttığı gözlenmiştir. PMe, PPh ve PNO₂ bileşiklerinin anti-apoptotik bir gen olan BUFFY'nin ekspresyon seviyesi üzerine etkisi incelendiğinde tüm bileşiklerin kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesini artırdığı gözlenmiştir. Bileşiklerin DRICE geni ekspresyon seviyesi üzerine etkisi incelendiğinde, tüm bileşiklerin kontrol grubuna göre artış gösterdiği gözlenmiştir. Apoptotik genlerden DRONC geninin kullanılan bileşiklere karşı ekspresyon seviyeleri incelendiğinde PMe bileşiği kontrol grubuna göre artış gösterirken PPh ve PNO₂ bileşikleri ise kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesini azaltmıştır (Şekil 4.15-4.18).

Antioksidan genlerden SOD'un çalışmada kullanılan bileşiklere karşı ekspresyon seviyesi incelendiğinde PMe bileşiği ekspresyon seviyesini artırırken, PPh ve PNO₂ bileşikleri ise kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesini azaltmıştır. CAT ve GR geninin de benzer şekilde PMe bileşiği ekspresyon seviyesini artırırken, PPh ve PNO₂ bileşikleri ise kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesini azaltmıştır. Bileşiklerin GST'nin ekspresyon seviyesi

incelendiğinde PMe bileşiğinin GST gen ekspresyon seviyesini artırdığı PPh ve PNO₂ bileşiklerinin ise kontrol grubu ile benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.23-4.26).

Dihidropirimidinonlar (DHPM'ler), antioksidan (Yang, Zeng, Wu, Hou ve Tao, 2020), antimikrobiyal (Vijesh ve diğerleri, 2011), antitümöral (Manetti ve diğerleri, 2007) gibi güçlü farmakolojik özellikleri ve HIV-1,4 (Mugnaini ve diğerleri, 2007) ve lipoksijenaz (Rioux ve Castonguay 1998) aktivitesini inhibe etmeleriyle iyi bilinirler. Ayrıca HepG2 ve HeLa hücre hatlarına (Soumyanarayanan, 2012), insan poliooma virüsü (HPyV) ve Hsp90 C-terminal inhibitörlerine (Terracciano ve diğerleri, 2016) karşı yeteneklerini gösterdikleri kanıtlanmıştır.

DHPM bileşikleri, spesifik olarak Eg5 motor iğ proteinini inhibe eder ve hücrelerin mitotik ilerlemesini kısıtlar ve bu nedenle antikanser ilaçları olarak kullanılabilirler (Chin ve Herbst, 2006). Matos, Masson, Simeoni ve Homem-de-Mello, (2018), DHPM ve türevlerinin akciğer, meme, prostat ve kolorektal kanser gibi birçok kanser hücre dizileri üzerinde test edildiğini bildirmişlerdir.

Ragab, Abou-Seri, Abdel-Aziz, Alfayomy ve Aboelmagd, (2017), U251 (glioblastoma multiforme) ve OVCAR-03'ün (yumurtalık kanseri), IC₅₀ 10 mg/mL'de hücre büyümesini etkileyen DHPM türevlerine karşı daha duyarlı olduğunu bildirmiştir.

de Vasconcelos ve diğerleri, (2012) tarafından yapılan bir çalışmada çözücü olarak etanolde Biginelli sentezinin bir promotörü olarak sitrik asit veya tartarik asit kullanılarak DHPM'ler hazırlanmıştır. Ayrıca 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürme deneyi ve tiyobarbitürik asit-reaktif türler testi ile sentezlenen bileşiklerin antioksidan kapasiteleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda sentez edilen iki bileşik antioksidan aktivite sergilemiştir, ayrıca 200 ve 300 uM konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonunu azaltmışlardır. Çalışmamızın antioksidan genlerle yapılan ölçümlerden elde edilen veriler incelendiğinde tüm bileşiklerin dört farklı gende de ekspresyon seviyesini artırdığını göstermiştir. SOD1, CAT ve GSS genlerinde PMe, PPh ve PNO₂ bileşiklerinin gen ekspresyon seviyesini artırdığı tespit edilmiştir. SOD2 geninde ise PMe ve PNO₂ bileşiklerinin ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre artırdığı, PPh bileşiğinin ise azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.10-4.13).

Antioksidan etkinlik kapsamında yapılan başka bir çalışmada ise; Stefani ve diğerleri, (2006) Biginelli reaksiyonu için etkili ve basit bir sentetik protokol olan NH_4Cl mevcudiyetinde ultrason ışıması altında, iyi verim ve kısa reaksiyon süresi ile birkaç yeni dihidropirimidin bileşiği hazırlamışlardır. Sentezlenen bileşiklerin tümü bir miktar antioksidan aktivite göstermiştir. Analog bileşiklerden bazılarının Fe ve EDTA ile indüklenen lipid peroksidasyonuna karşı güçlü bir etki sergilerken, bazı bileşiklerin ise ROS seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir.

Kumar, Javed, Khan ve Amir, (2008) tarafından yapılan benzer bir çalışmada 1,3,4-okzadiazol bileşikleri içeren 1,4-Dihidropirimidin-2-on bileşiklerinin anti-H6V, antikonvulsan, antimikrobiyal, antibakteriyel, antifungal ve antienflamatuar etkinliklerinden dolayı farmakolojik öneme sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin bir kısmının ise prostaglandindeki siklohidrojenaz enzimlerini inhibe ettikleri gözlenmiştir.

Literatürde Dihidropirimidinon bileşiklerinin antimikrobiyal özellikleri ile ilgili çalışmalar da oldukça fazladır. Bu alandaki ilk çalışma 2006 yılında Chhillar ve diğerleri tarafından yapılmış ve dietil 4- (4-metoksifenil)-2,6-dimetil-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilatın disk difüzyon deneyleri sonucunda *Aspergillus fumigatus*'a karşı önemli aktivite gösterdiği belirlenmiştir. 2008'de Duguay ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada, amfoterisin B'yi kontrol olarak kullanarak, diğer DHPM'lerin *A. niger*, *A. flavus*, *C. albicans* ve *S. cerevisiae* suşları üzerindeki inhibitör etkisini doğrulanmıştır.

Kim ve diğerleri (2012) tarafından yapılan çalışmada *in vitro* modelde HIV-1 virüsünün replikasyonunu başarıyla inhibe ettikten sonra DHPM'lerin antiviral potansiyelini gösterilmiştir. Bu aktivite, deniz alkaloidleri batzelladin A ve B'nin HIV gp-12'nin CD4 hücrelerine bağlanmasını inhibe ettiğini gösterdikten sonra önerilmiştir. Bu bileşikler, DHPM türevlerine benzer pirimidin halkalarına sahiptir (Patil ve diğerleri, 1995).

Kim ve diğerleri (2012) yaptıkları başka bir çalışmada otuz dört DHPMa türevini sentezlemişler ve insan immün yetmezlik virüsüne (HIV-1 virüsü) karşı antiviral aktivitelerini test etmişlerdir. Test edilen bileşikler, mükemmel inhibe edici özellikler göstermişler ve yalnızca 90 nM'lik bir konsantrasyonda, hücrelerde HIV-1 replikasyonunun azalmasını %50 oranında etkilemişlerdir. Sentezlenen türevlerin, standart ilaç nevirapine kıyasla daha iyi antiviral aktivite gösterdiği vurgulanmıştır.

Manos-Turvey ve diğerkleri, (2016) tarafından gerçekleştirilen yakın tarihli bir çalışma, onerilen iki farklı etki mekanizmasıyla dihidropirimidinonların ve tiyonların polyomavirus BK ve JC'ye karşı aktivitesini göstermişlerdir. İlk mekanizma hücresel şaperon Hsp70'i inhibe etmek, ikincisi ise virüs replikasyonu için gerekli olan T antijeninin ATPaz aktivitesini inhibe etmek şeklindeyir.

DHPM, indol, tiyadiazol ve Schiff bazlarının biyolojik özelliklerinden esinlenerek, Akhaja ve Raval, (2011) belirtilen tüm farmakoforlarla moleküllerin sentezini ve *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv türüne karşı antitüberküloz aktivitelerini sunmuşlardır. Ayrıca bu bileşiklerin, insan patojenleri *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. typhi*, *S. aureus*, *S. Pyogenus* ve *B. subtilis*'e karşı antibakteriyel aktivite ve *C. albicans*, *A. Niger* ve *A. clavatus* mantarlarına karşı antifungal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir.

Sıtma etkeni Plasmodium cinsinin *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* ve *P. malariae* gibi dört farklı türünün tümü bulaşıcı ve öldürücüdür (Pinichpongse ve diğerkleri, 1982). Sıtmaya karşı etkili bir aşı olmayıp mevcut ilaçlar ilaç direnciyle karşı karşıyadır (Vasconcelos, 2013). Chiang ve diğerkleri, (2009) *P. falciparum*'a karşı 157 Biginelli eklentisini değerkendirdiği çalışma sonucunda Hsp70'in ATPaz inaktivasyonu tarafından inhibe edildiği bir etki mekanizması ortaya çıkarılmış ve sonuçta umut vadeden yedi sıtma nleyici DHPM bileşiği önerilmiştir.

Benzer bir deneysel metodolojiye sahip başka bir çalışmada, *Leishmania donovani*'ye karşı Monastrol'n antiparaziter aktivitesi hamster deneklerinde değerkendirilmiş ve belirgin bir toksisite olmaksızın, her iki dozda da parazit yükünde önemli azalma gözlemlenmişlerdir (Kaur, Sundar ve Singh, 2010). Başka bir çalışmada, *L. donovani* amastigotları ile intrakardiyal olarak enfekte edilmiş *Mesocricetus auratus* hamsterleri kullanılarak *in vivo* antileishmanial aktivite değerkendirilmiştir. Sonuçta 4–floro-fenil–6–metil–2–tioks–1,2,3,4 tetrahidropirimidin–5–karboksilik asit etil ester bileşiğinin leishmanial proliferasyon üzerinde güçlü bir inhibitör etki göstermiştir (Singh ve diğerkleri, 2009).

Antimikrobiyal etkinlikler dışında dihidroprimidononların kalsiyum kanal modülatörü olarak kullanımı ile ilgili olarak yapılan çalışmalardan birinde Zorkun ve ark. kalsiyum kanallarının 4–aril–3,4–dihidropirimidin–2(1H)–tiyon türevleri tarafından bloke edildiğini göstermiştir (Zorkun, Saraç, elebi ve Erol, 2006). Putatunda ve diğerkleri, (2012), N1- alkil

ikamesi olan veya olmayan DHPM'lerle aynı aktiviteyi değerlendirerek, bu ikamenin kalsiyum kanalı inhibisyonunu ortadan kaldırdığını ortaya koymuşlardır. Singh ve diğerleri, (2009), sentezledikleri çeşitli DHPM türevlerinin domuz karotid arterlerindeki düz kasları gevşetme kapasitelerine dayalı olarak kalsiyum kanalı modülatörleri olarak değerlendirmiş ancak bu bileşiklerin etkileri nifedipinden daha az etkili olmuştur (Singh, Arora, Poremsky, Lowery ve Moreland, 2009).

Yarım, Saraç, Kılıç ve Erol, (2003) 25 farklı DHPM türevini izole rat ilea ve kuzu karotid arterleri üzerinde yapılan çalışmalarda değerlendirmiştir. Elde ettikleri sonuçlardan, 25 bileşikten 24'ünün, kalsiyum kanalı blokajıyla ilişkili vazorelaksasyonu indüklediği ve antispazmodik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Biginelli'nin ürünlerinin anti-inflamatuar etkinliğinin incelenmesi, yayınlanmış birçok çalışmanın konusudur (de Fatima ve diğerleri, 2015). Mokale, Shinde, Elgire, Sangshetti ve Shinde, (2010), yaptıkları çalışmada, bir dizi tiokso Biginelli bileşiği sentezlenmiş ve bunların anti-enflamatuar aktiviteleri test edilmiştir. Elde edilen türevler, ödem üzerinde en büyük inhibisyonu göstermişler ve bir referans ilaç olarak diklofenak ile karşılaştırıldığında, yeni antienflamatuar ajanlar için umut verici adaylar olduklarını kanıtlamışlardır.

DHPM'lerin anti-enflamatuar etkisi, TNFa (Mansouri, Movahedian, Rostami, Fassihi, 2012), interlökin (Mansouri ve diğerleri, 2012), prostaglandin, iNOS (Khanina, Silinietse, Ozol, Dubur ve Kimenis, 1979), hiyalüronidaz (Atwal ve diğerleri, 1978) ve COX-2 (Mansouri ve diğerleri, 2012) dahil olmak üzere kimyasal araçların ekspresyonunun inhibe edilmesini içermektedir. Geçici reseptör potansiyel ankirin 1 (TRPA1) antagonizminin, hayvan modellerinde inflamasyona bağlı ağrı algısını azalttığı ve 4-fenil-2-tiokso-1,2,3,4-tetrahidro-indeno[1,2-d]pirimidin türevinin, güçlü bir TRPA1 antagonisti olabileceği vurgulanmıştır (Bossert ve Vater, 1989).

Epoksit hidrolaz enzimini inhibe etmek, kan basıncını ve vasküler inflamasyonu normalleştirmek için bir stratejidir. Buna dayanarak, Rezaee ve ark. birkaç DHPM sentezlemişler ve test ettikleri tüm bileşiklerin bu enzimi inhibe ettiğini belirlemişlerdir (Rezaee ve diğerleri, 2016).

Biyolojik sistemlerdeki Reaktif Oksijen Türleri (ROS) aktivitesi, özellikle tümörlerde hücrel proliferasyonda önemli bir role sahip olan lipid peroksidasyonuna neden olabilir (Gonzalez, 1992). Buna göre, antitümöral özelliklere sahip birçok DHPM ayrıca antioksidan etki göstermektedir (da Silva ve diğerleri, 2012).

Stefani ve diğerleri, (2006), DHPM'nin antioksidan potansiyelini inceleyen ilk kişiler arasındaydılar ve Albino Vistar sıçanlarının karaciğer hücrelerinde FeCl_2 ve EDTA tarafından *in vitro* indüklenen lipid peroksidasyonunu incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, özellikle $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3$, $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_5$, $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$, $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5$ türevlerinin lipid peroksidasyonuna karşı güçlü aktivite sergilediği ve karaciğer oksidasyonu seviyesini azalttığı tespit edilmiştir.

Mansouri ve diğerleri, (2012), üç farklı metodoloji kullanarak 3,4-dihidro-2(1H)-pirimidinon türevlerinin antioksidan aktivitesini test etmişlerdir. Bu metodlar, DPPH serbest radikallerinin ortadan kaldırılması (Gangwar ve Kasana, 2012), potansiyelin azaltılması (Mansouri ve diğerleri, 2012), ve hidrojen peroksitin ortadan kaldırılması (Mansouri ve diğerleri, 2012), testlerini içermektedir. Sonuçta, farklı testlerin her birinde pozitif sonuçlar elde edilmiş, sonucunda tüm bileşikler kontrole (gallik asit) kıyasla zayıf bir aktivite göstermiştir.

Çalışmamızda *in vivo* testler için kullanılan *Drosophila melanogaster* farklı kanser çalışmalarında da kullanılmıştır.

The Cancer Genome Atlas'tan alınan hastalardan alınan veriler kullanılarak *Drosophila melanogaster*'de multigenik kolon kanseri modelleri oluşturulmuştur. İlginç bir şekilde, bu modellerin sonuçları insan kanserlerinin önemli özelliklerini taklit etmiştir. Elde edilen sonuçlar kanserle ilgili kimyasalların farklı türevlerini bulmak için *Drosophila melanogaster*'in araştırmalarda kullanılabileceğini göstermektedir (Bangi, Murgia, Teague, Sansom ve Cagan, 2016). Bağırsak insan patofizyolojisini karakterize etmek için *Drosophila* modellerini kullanan çalışmalar, kolorektal tümör oluşumunun altında yatan mekanizmaların bu türler arasında yüksek oranda korunduğunu ortaya çıkarmıştır (Christofi ve Apidianakis, 2013).

Drosophila melanogaster, 100 yılı aşkın bir süredir genetik analiz ile hücre ve gelişim biyolojisi araştırmalarının temel taşı olmuştur. Son on yılda *Drosophila*, insan hastalıklarının modellenmesinde ve küçük molekül inhibitörleri için taramalarda kullanımıyla translasyonel araştırmalara damgasını vurmaktadır. Özellikle, kanser gelişiminin modellenmesinde ve kanser önleyici terapötiklerin belirlenmesinde kullanımı artış göstermektedir. *Drosophila* sisteminin anti-kanser ilaç taramasında kullanılmasının başlıca avantajları, sinekler ve memeliler arasındaki kanser genlerinin/yollarının korunması, *in vivo* olarak kanser önleyici etkiler için kimyasalların hızlı fenotipik taramasına uygun olmasıdır. Ayrıca verim ve uygun maliyetli bir şekilde ve *in vivo* olarak tümörleri spesifik olarak hedefleyebilen ilaçların belirlenmesinde kullanımı da sineğin önemli avantajları arasındadır (Richardson, Willoughby ve Humbert, 2015).

Mevcut ilaç keşif hattı, klinik denemelere ulaşan veya klinik olarak onaylanmış kanser karşıtı ilaçları keşfetmede yalnızca başarısız olmuştur (Munos, 2009; Ocana, Pandiella, Siu ve Tannock, 2011). Bu zayıf başarının olası nedeni, kanserin yalnızca tümördeki çoklu genetik ve/veya epigenetik değişikliklere değil, aynı zamanda tümör ve mikroçevresi arasındaki olumlu etkileşimlere de dayanan karmaşık bir hastalık olmasıdır (Hanahan ve Weinberg, 2011; Stratton, 2011). Ayrıca, tek bir hedefe odaklanan *in vitro* hücre dizisi modelleri, insan hastalık durumunu yeterince taklit edememektedir (Caponigro ve Sellers, 2011). Bu nedenle, insan tümörlerinin multigenik doğasını yansıtan daha karmaşık klinik öncesi modeller gereklidir. Sirke sineği *D.melanogaster*, sinyal yollarının evrimsel olarak korunması, düşük genetik fazlalığı, genetik manipüle edilebilirliği, kısa yaşam döngüsü ve ucuz ve kolay bakımı nedeniyle insan kanserini modellemek için birçok avantaj sağlamaktadır (Brumby ve Richardson, 2005; Kasai ve Çağan, 2010; Rudrapatna ve Cagan, 2012; Gonzalez, 2013).

Terapötik ilaç keşfi, potansiyel yeni ilaçların tanımlanmasına izin veren bir prosedür olan kimyasal tarama gerektirir. Sekanslama, otomasyon ve minyatürleştirmenin yaygınlaşması, Yüksek Verimli Taramayı (HTS) erken aşamada ilaç keşfine en çok katkıda bulunan kuruluş haline getirdi. HTS, belirli bir proteine afinite veya bir bozukluğun biyolojik aktivite özelliği için bir afinite bulmak için kimyasalların rastgele taranmasından oluşur. *In vitro* olarak tanımlandıktan sonra bileşiklerin *in vivo* olarak doğrulanması gerekir. Yüksek verimli tahliller, her zaman mevcut olmayan bir hastalığın derinlemesine anlaşılmasını varsayarak, belirli bir hedefin varlığına bağlıdır. Bir hastalık sürecinin altında yatan mekanizmalar

hakkındaki bilgiler iyi tanımlanmadığında fenotip taraması uygun bir seçenektir. Daha fizyolojik bir ortamın bir ilacın farmakokinetiğini ve toksikolojik etkilerini daha iyi tanımladığı hücrelerde, dokularda veya bütün hayvanlarda fenotip üzerindeki etkileri için küçük moleküllerin tarandığı bir süreçtir. Genetik araçların büyük ölçüde bulunabilmesi ve düşük bakım maliyeti, meyve sineğini, kanser de dahil olmak üzere insan hastalıklarını incelemek için ideal bir model haline getirmiştir (Mirzoyan ve diğerleri, 2019).

Drosophila'da merkezi sinir sistemi, böbrek ve metabolizmayı etkileyen çeşitli bozukluklar için ve ayrıca tiroid kanseri, çoklu endokrin neoplazi tip 2A ve 2B (MEN2) için (Vidal ve ark., 2005) başarılı bir şekilde kimyasal taramalar yapılmıştır (Whitworth, Wes ve Pallanck, 2006 ; Gasque, Conway, Huang, Rao ve Vosshall, 2013 ; Hofherr, Wagner, Watnick ve Kottgen, 2016) .

Kanser önleyici ilaçların radyasyonla birleşik etkisi *Drosophila* larvalarında araştırılmış ve insan kanser hücrelerinde gözlemlenenlere benzer bulgular elde edilmiştir (Edwards ve diğerleri, 2011). Ayrıca, transgenik sineklerde modellenen hastaya özgü tümörlerden oluşan *Drosophila* mutantları, kişiselleştirilmiş tıp için çok umut vericidir.

D. melanogaster insan kanserinin moleküler ve genetik temellerini incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Gonzales, 2013). Tarihsel olarak *Drosophila* ile yapılan araştırmalar, BMP, Hedgehog, Hippo, JAK/STAT, Notch, Ras, TGF β ve Wnt dahil olmak üzere kanserde kilit rol oynayan birçok yolun etki mekanizmalarının belirlenmesine yardımcı olmuştur. Aynı mutasyon için heterozigot olan bir hayvanda mutasyonların homozigot klonlarının üretilmesini mümkün kılan MARCM (Lee ve Luo, 1999) gibi yeni tekniklerin geliştirilmesi (Perrimon, 1998), kanser hastalarının somatik hücrelerinde gözlemlenen heterozigotluk kaybını taklit eden yeni modellerin üretilmesini sağlamıştır. O zamandan beri, çok sayıda çok isabetli kanser modeli tanımlanmış ve hastalığın farklı yönlerini incelemek için kullanılmıştır (Sharpe, Morgan, Nisbet, Campbell ve Casali, 2023).

Bazı çalışmalarda *Drosophila* trakeal ve omurgalı akciğer gelişimi arasındaki benzerlikleri vurgulanmıştır (Roeder, Isermann, Kallsen, Uliczka ve Wagner, 2012; Behr, 2010; Andrew ve Ewald, 2010). *Drosophila* trakeal sistemi, sineğe oksijen sağlayan, geniş ölçüde dallanmış boru şeklinde bir ağdır. Hem omurgalı akciğeri hem de *Drosophila* trakeal sistemleri, büyük birincil tüplerde başlayan ve terminal dallarda son bulan, azalan çaplı segmentlere dallanan

birbirine bağılı bir boru şeklindeki hiyerarşiden oluşur. *Drosophila* trakeal gelişimi sırasında dallanma süreci büyük ölçüde fibroblast büyüme faktörü (FGF) sinyallemesine bağlıdır. Trakeal hücreler, dallanmayı başlatmak için FGF ligand Branchless'ın lokalize varlığına yanıt veren FGF reseptör homologu Breathless'ı (Btl) ifade etmektedir. Omurgalı akciğer gelişimi de hava yolu dallanması sırasında benzer bir şekilde FGF sinyaline dayanmaktadır (Park, Miranda, Lebeche, Hashimoto ve Cardoso, 1998; Bellusci ve diğerleri, 1997).

Son zamanlarda, fonksiyonel ve anatomik olarak omurgalı hava yollarıyla karşılaştırılabilir kabul edilmiş yeni bir *Drosophila* akciğer kanseri modeli geliştirilmiştir (Andrew ve Ewald, 2010; Levine ve Cagan, 2016). Hem *Drosophila* hem de memeli organizmalarda hava yolları, komşu hücrelerin salgıladığı Bnl/FGF'lerce birbirine bağlanmış dallardan oluşmaktadır (Ghabrial, Luschnig, Metzstein ve Krasnow, 2003; Grifoni, Frolid ve Pession, 2013). İkili bir sistem kullanarak, *Ras*^{V12}, PI3K/AKT sinyalinin negatif bir düzenleyicisi olan *PTEN*'i aşağı doğru baskılayıp trakeal hücrelerde spesifik olarak ektopik olarak eksprese edilmesi sağlanmıştır (Hafen, 2004; Ortega-Molina ve Serrano, 2013). Sonuç olarak, trakeal dalların hücreleri aşırı çoğalarak hayvanları öldüren tümörler oluşturulmuştur (Levine ve Cagan, 2016). Bu model, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan kimyasal bileşikler için bir taramada başarıyla kullanılmış ve bu çalışma hücre aşırı çoğalmasını azaltabilen ve trakeal fizyolojik fonksiyonları iyileştirebilen birkaç bileşiğin tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır (Levine ve Cagan, 2016). Bu çalışma ile kanserle ilgili kimyasal taramalar için meyve sineği modellerinin kullanımının güçlü potansiyeli daha da vurgulanmıştır.

Tüm bunlarla birlikte, genotoksisite ve mutajenite tayininde kullanılan bir test sistemi olan SMART ile çalışmamızda kullanılan 4-(Süstitüe)-3,4-Dihidropirimidinonların genotoksik ve antigenotoksik etkileri tespit edilmiştir. Literatürde SMART ile farklı maddelerin *Drosophila melanogaster* üzerinde meydana getirebileceği olası genotoksik etkileri araştırılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Turna, 2022; Çetinkaya ve Yurtsever, 2021; Kızılet ve Uysal, 2022; Kurşun, Yalçın, Güneş, Tagorti ve Kaya, 2022 ; Fidan ve Ayar, 2021; Ayar ve Uysal, 2013).

Schlatter ve diğerleri, (1992) koruyucu katkı maddelerinden potasyum sorbat, sodyum sorbat ve 4,5-epoksi-2-heksenoik asitin olası genotoksik etkilerini somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile araştırdıkları çalışma sonucunda, sadece 4,5-epoksi-2-heksenoik

asitin zayıf genotoksik etkiye sahip olduğunu, potasyum sorbat ve sodyum sorbatın ise genotoksik etki göstermediğini tespit etmişlerdir.

Sarıkaya ve Solak (2003) *Drosophila*'da SMART ile benzoik asidin olası genotoksik etkilerini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda, bu maddenin tüm dozlarda (50, 75 ve 100mM) *Drosophila*'da mutasyona sebep olduğu, ayrıca yaşam süresini kontrole göre önemli ölçüde kısalttığını bildirilmiştir.

Ayar ve Uysal, (2013) tarafından yapılan çalışmada *D. melanogaster* larvaları, farklı konsantrasyonlarda (100mM, 150mM, 200mM, 250mM) parabenlerle kronik olarak beslenmiştir. Bu parabenlerin *D. melanogaster* ergin bireylerinde olası genotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada larvalardan gelişen ergin bireylerin kanat preparatları mikroskop altında incelenmiştir. Elde edilen verilerde tüm paraben gruplarının yüksek konsantrasyonlar da dahil olmak üzere genotoksik etki göstermediği ancak artan konsantrasyona bağlı olarak toksik etki gösterip larvalarda yaşama yüzdesini azalttığı ve ergin bireylerde çeşitli malformasyonlara neden oldukları tespit edilmiştir.

Ayrıca çalışmamızda olduğu gibi literatürde *D. melanogaster* ve memeli hücre hattının birlikte kullanıldığı farklı çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin; Naves ve diğerleri, (2021) tarafından yapılan çalışmada yılan zehrinden elde edilen miyotoksik bir madde olan PLA2 BthTX-I'nın etkisi *D. melanogaster*'de *in vivo*, insan göbek damarı endotel hücreleri (HUVEC) ve prostat kanser hücreleri (DU-145)'de *in vitro* etkisi değerlendirilmiştir. SMART'ta kullanılan farklı PLA2 BthTX-I konsantrasyonları, negatif kontrol (su) ile karşılaştırıldığında hayatta kalma oranında azalma olmadığını ($p > 0.05$) göstermiştir. BthTX-I, en yüksek konsantrasyonda (ST çapraz) rekombinojenik etki göstermiştir. HB çaprazında BthTX-I, 53,75 µg/mL yüksek oranda mutajenik ve 107,5 µg/mL ağırlıklı olarak rekombinojenik olarak orta konsantrasyonlarda mutant beneklerin sayısında artış gözlenmiştir. *in vitro* çalışmada ise her iki hücre hattında da hücre canlılığında azalma tespit edilmiştir. Çalışmada yapılan Comet tahlili, HUVEC ve DU-145 hücrelerinde, tüm BthTX-I konsantrasyonlarının DNA hasarının artışı desteklediğini göstermiştir.

Ata (2020) yaptığı bir çalışmada; ülkemizde tarçın elması olarak bilinen *Annona muricata* bitkisinin, antikanser ve biyolojik aktivitesi MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında, BCL-2, BAD, AKT1 ve H-prune genlerinin ifade seviyeleri; *D. melanogaster*'de ise PN,

BUFFY, CG15530 ve AKT1 genlerinin ifade seviyeleri, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlemiştir. Sonuçta gen ifade analizinde; H-prune ve AKT1 genlerin ifadelerinde azalma, *D. melanogaster* CG15530 proapoptotik genin ifadesinde ise artış olduğu gözlenmiş ve *In vivo*, *in vitro* ve biyoinformatik analizler sonucunda *Annona muricata* bitki ekstraktının meme kanserine karşı etkili potansiyel bir ilaç adayı olabileceği vurgulanmıştır.

In vivo ve *in vitro* tasarlanan başka bir çalışmada; probiyotik özellikteki *Lactobacillus plantarum* sekonder metabolitinin insan meme kanseri MCF-7 hücre hattı ve *D. melanogaster* üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada MCF-7 hücre hattında; RRAS-2, TP53, BCL-2, APAF-1, CASP-3, FADD, CASP-7, BOK genleri ve *D. melanogaster*'de RAS64B P53, BUFFY, DARK, DECAY, FADD, DRICE, DEBCL genlerinin ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile belirlenmiştir. Metabolit uygulaması sonucu insan meme kanseri hücre hattında ve meyve sineğinde antiapoptotik BCL-2 ve BUFFY genlerinin ekspresyonlarında azalma görülmüştür. Aynı zamanda *D. melanogaster*'de DECAY, FADD, RAS64B apoptotik genlerinde ekspresyon artışı saptanmıştır (Şentürk, 2018).

Karadeniz, Kaya, Savaş ve Topcuoğlu, (2015) iki farklı fungusit ile yaptıkları çalışma ile hem *D. melanogaster*'de hem de insan böbrek (HEK293) hücreleri üzerinde mutajenik ve rekombinejenik etki değerlendirilmiştir. Her iki fungusitin de *Drosophila*'nın kanat hücreleri üzerinde test edilen en yüksek konsantrasyonda rekombinojenik olduğunu göstermektedir. Ayrıca, hiçbir mantar ilacının HEK293 hücrelerinin çoğalma hızını etkilemediği, buna karşın yüksek konsantrasyonlarda her iki fungusitin de hücre ölümünü artırdığı tespit edilmiştir.

El Hefny ve diğerleri, (2017)'nin araştırmalarında gıda katkı maddesi olarak kullanılan sodyum sülfat, borik asit ve benzoik asidin sitotoksik etkinlikleri karaciğer kanseri (HepG2), kolon kanseri (HCT-116), akciğer kanseri (A-459) ve normal akciğer (Wi38) hücrelerinde, genotoksik etkinlikleri ise *D. melanogaster*'de SMART ile değerlendirilmiştir. 100 mM konsantrasyonlardaki bu bileşikler, tümör indüksiyonunu indüklemiş ve SMART sonucunda negatif kontrole kıyasla benek sayısında artış oluşturmuşlardır. Ayrıca, farklı konsantrasyonlarda (75, 150, 300 ve 600µg/ml) incelenen dört hücre hattında da hücrelerin canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir.

Başka bir çalışmada, Efthimiou ve diğerleri, (2022) üç yeni kompozit malzemenin insan lenfosit hücreleri ve *D. melanogaster*'de genotoksik potansiyelini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada kompozit nanomalzemelerin hiçbirisi genotoksik aktivite göstermezken tüm kompozit nanomalzemeler sitotoksik potansiyel etki göstermiştir.

Fernández-Bedmar, Anter ve Alonso ve Moraga, (2018) domates ve likopenin genotoksik ve hidrojen peroksite karşı antigenotoksis etkisini *Drosophila* SMART testi ile değerlendirmişlerdir. Ayrıca kemopreventif ve sitotoksik aktivite, HL60 *in vitro* modeli kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma sonucunda domates ve likopenin genotoksik etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Domates ve likopen, lösemi hücrelerinde düşük seviyede önemli klastojenik aktiviteye neden olmalarına rağmen, internükleozomal DNA parçalanmasını indüklediği gözlenmiştir. Sitotoksisite testlerinde ise domates ve likopenin en düşük konsantrasyonlarda olumsuz bir etkisinin olmadığı ancak yüksek konsantrasyonlarda domatesin sitotoksik etki gösterdiği fakat likopenin göstermediği gözlenmiştir.

Suttisansanee ve diğerleri, (2021) tarafından yapılan çalışmada *Ficus dubia* (FD) bitkisinin genotoksitesi ve biyolojik aktiviteleri *D. melanogaster* ve farklı kanser hücre hatlarında incelenmiştir. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında sonuçlar, tüm FD ekstraktlarının *in vivo* genotoksiteden yoksun olduğunu göstermiştir. FD etanolik kök ekstresi (REt30), gelecekteki muhtemel yeni bir antidiyabetik ilaç olarak ağırlıklı olarak anti- α -glukosidaz olmak üzere sağlığı geliştirici özelliklere sahip olabileceği tespit edilmiştir. Ekstrakt ayrıca, mevcut tercih edilen ilaç olan sisplatinle kıyasla A549 ve SKOV3 kanser hücrelerine karşı spesifik olarak hücre büyümesini inhibe edici etki sergilemiştir. *Drosophila melanogaster* ile yapılan testte ise negatif kontrol ile karşılaştırıldığında FD ekstraktlarının tüm konsantrasyonlarda toksisiteyi indüklediği gözlenmiştir.

Başka bir çalışmada *Galianthe thalictroides* bitkisinin genotoksik etkisi SMART, sitotoksik etkileri ise MTT test yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. *Drosophila melanogaster* SMART testi ile elde edilen sonuçlarda sulu ekstraktın genotoksik aktivitesine rastlanmamıştır. Etanol ile elde edilen ekstraktın ise ST soyundan gelenler için genotoksik değil, HB soyundan gelenler için genotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte bitkiden elde edilen indol monoterpen alkaloid 1'in insan hepatoma hücreleri için (MTT) yüksek bir sitotoksikite gösterdiği tespit edilmiştir (Fernandes ve diğerleri, 2013).

Yapılan başka bir çalışmada ise farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 20 mM) oleanolik asidin insan meme hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri ve *D. melanogaster* larvaları üzerine öldürücü etkisi araştırılmıştır. Sonuçta; oleanolik asidin *D. melanogaster* üzerinde CG15530, AKT-1, DR-PN gen ifade düzeyleri kontrol grubuna göre uygulanan bütün konsantrasyonlarda anlamlı olarak belirlenmiştir. Ancak DR-Buffy gen ifade düzeyinde kontrol grubuna göre herhangi bir anlamlılık görülmemiştir. MCF-7 hücre hatlarında ise BAD, BCL-2, H-prune ve AKT-1 gen ifade düzeyi sonuçlarında ise H-prune ve BCL-2 genlerinde anlamlılık tespit edilmiştir (Köksal, 2021).

Ayrıca çalışmamızda kullanılan gen bölgeleri ile ilgili olarak literatür taraması yapılmış ve farklı kanser hücre hatlarında, çalışmamızda kullanılan gen bölgelerine benzer şekilde çalışmaların olduğu görülmüştür. Bunlardan bazıları aşağıdaki gibidir;

Yazgan ve diğerleri, (2021) tarafından yapılan çalışmada PhTAD eklenilmiş dihidropirol bileşiklerinin, meme kanseri (MCF-7) hücrelerinde apoptotik proteinlerin ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. MCF-7 hücrelerinde BAX, BCL-2 ve CAS-3 proteinlerinin seviyesi ölçülmüştür. Sonuçlar incelendiğinde çalışmada kullanılan sekiz bileşiğin BAX seviyesini artırırken, iki bileşiğin BAX seviyesini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca yedi bileşiğin, BCL2'yi yukarı regüle ederken, iki bileşiğin ise BCL2'yi aşağı regüle ettiği iki bileşiğin ise BAX/BCL2 oranını artırdığı belirlenmiştir.

Mesci, Gül ve Yıldırım, (2022) tarafından yapılan çalışmada pirolidin türevi bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda (25-100 uM) DLD-1 (insan kolon kanseri) ve CCD18CO (normal kolon fibroblast) hücre hatları üzerindeki etkileri MTT ve RTCA test teknikleri ile araştırılmıştır. Sonuçta, bileşiklerin birçoğunun hücre proliferasyonunu inhibe edip antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir.

Mesci, (2020) tarafından yapılan çalışmada heterosiklik bileşiklerin çoklu ilaç direnci (MDR) ve MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde apoptotik sinyal yolları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, tüm bileşiklerin MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde p53, BAX ve CASP3 gen ekspresyonunda önemli bir artış göstererek hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan bileşiklerin ısı şoku proteinleri (HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90α) üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bileşiklerin, ısı şoku proteinlerinin gen ekspresyonunu azaltma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı

çalışmada bileşiklerin endoplazmik retikulum stres genlerinin (GRP78 ve GRP94) ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bileşiklerin bu genlerin ekspresyonunu azaltmadaki etkisi belirlenememiştir. Bileşiklerin gen ekspresyonları incelendiğinde SM-1 ve SM-2 etkili sonuçlar vermiş ve bileşiklerin benzer özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

Akşahin (2020), on altı farklı PhTAD türevi dihidropirol bileşiğinin sitotoksik aktivitesini ve bunların iki farklı hücre hattında hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışmada MCF-7 ve MCF-12A hücre hatları kullanılmıştır. Bileşiklerin sitotoksik etkileri ve IC50 değerleri MTT yöntemiyle, hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri ise gerçek zamanlı hücre analizi (RTCA) sistemi ile belirlenmiştir. Ayrıca apoptotik hücre ölüm proteinleri olan P53, BAX, BCL2, PARP ve HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90α ile Endoplazmik Retikulum (ER) stresinde temel düzenleyici proteinler olan GRP78 ve GRP94'ün gen ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile incelenmiştir. Sonuçlar incelendikten sonra MCF-7 hücre hattı üzerinde farklı dozlarda (1.56-100 uM) kullanılan bileşiklerin hem MTT hem de RTCA yöntemleri ile orta ve güçlü sitotoksik ve antiproliferatif etkilere sahip olduğu bulundu. Ayrıca bu bileşiklerin birçoğunun p53 gen ekspresyonu üzerindeki etkisini azalttığı bulundu. Ancak bu bileşiklerin önemli bir kısmının BAX/BCL2 oranını artırarak ve PARP1 geninin ekspresyon düzeyini azaltarak p53'ten bağımsız olarak apoptozu indüklediği sonucuna varıldı. Bizim çalışmamızda kullandığımız bileşiklerin bazılarında da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız yeni sentez edilmiş 4-(Süstitüe)-3,4-Dihidropirimidinon bileşiklerinin *in vivo* ve *in vitro* etkileri ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

In vivo etkileri değerlendirmek amacıyla önemli bir model organizma olan *Drosophila melanogaster* kullanılmıştır. Bileşiklerin *D. melanogaster* üzerindeki etkisi larval mortalite ve somatik mutasyon ve rekombinasyon testleri ile değerlendirilmiştir.

Larval mortalite sonucu elde edilen sonuçlar incelendiğinde bileşiklerden her üç bileşiğinde (PPh, PMe ve PNO₂) konsantrasyon artışına bağlı olarak mortalite oranlarının arttığı fakat bu oranların en yüksek konsantrasyonda bile %50'yi aşmadığı görülmüştür (Çizelge 4.10). Bileşiklerin olası genotoksik etkisini değerlendirmek amacıyla *Drosophila* kanat benek testi (SMART) gerçekleştirilmiştir. *D. melanogaster* trans-heterezigot larvalarına PMe uygulaması sonucu elde edilen kanat benek testi verileri incelendiğinde normal kanatlarda

konsantrasyon artışına bağlı olarak klon sayısında artış gözlenmiştir. Fakat bu artış pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p>0.05$ düzeyinde önemsizdir. Negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise düşük konsantrasyonlarda (1, 2,5 ve 5) daha az sayıda klon tespit edilirken en yüksek konsantrasyonda ise (10mM) yakın değerler elde edilmiştir. Serrat kanat tipinde elde edilen veriler incelendiğinde de uygulanan PMe'nin konsantrasyon artışına bağlı olarak klon sayısında da artış gözlenmiştir. Bu artış negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiki olarak $p>0.05$ düzeyinde önemsiz bulunmuştur. Sonuç olarak PMe bileşiğinin *D. melanogaster* bireylerinde genotoksik etkiye sahip olduğu fakat toksik bir etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.11).

D. melanogaster trans-heterezigot larvalarına PPh uygulaması sonucu elde edilen kanat benek testi verileri incelendiğinde normal kanatlarda konsantrasyon artışına bağlı olarak klon sayısında artış gözlenmiştir. Fakat bu artış negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak $p>0,05$ düzeyinde önemsiz bulunmuştur. Serrat kanat tipinde elde edilen veriler incelendiğinde ise 5 ve 10mM PPh uygulamasının negatif kontrol grubuna göre klon sayısında artışa neden olduğu fakat bu artışın istatistiki olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir. Diğer düşük dozda uygulamalarda ise negatif kontrol grubundan daha düşük değerler elde edilmiştir (Çizelge 4.12).

D. melanogaster trans-heterezigot larvalarına PNO₂ uygulaması sonucu elde edilen kanat benek testi verileri incelendiğinde, normal kanatlarda konsantrasyon artışına bağlı olarak klon sayısında artış gözlenmiştir. Bu artış negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artışın istatistiki olarak $p>0,05$ düzeyinde önemsiz bulunmuştur. Serrat kanat tipinde de konsantrasyon artışına bağlı olarak klon sayısında artış tespit edilmiştir. Bu artış negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak $p>0,05$ düzeyinde önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.13).

Sonuç olarak 3 farklı dihidroprimidinon bileşiğinin de *D. melanogaster* bireylerinde özellikle yüksek konsantrasyonlarda toksik bir etkiye sahip olabileceği görülmüştür.

Tez çalışmamda; A549 (akciğer kanseri), MRC-5 (normal meme epiteli) hücre hatlarında, 4-(Süstitüe)-3,4-Dihidropirimidinonların sitotoksik dozu ve IC50 değeri WST-8 yöntemiyle tespit edilmiştir. PMe, PPh ve PNO₂ bileşiklerin sitotoksik aktivite çalışmaları neticesinde; A549 hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığı, hücre çoğalmasını önlediği ve

hücre büyümesini baskıladığı tespit edilmiştir. MRC-5 hücre hatlarında ise hücre çoğalmasını önlemediği ve hücre büyümesini baskılamadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.1-4.2).

PPh uygulamasının A549 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde 12,5µM, 25µM, 50µM ve 100µM konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bu değer negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. PPh bileşiğinin MRC-5 sağlıklı akciğer hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi incelendiğinde en yüksek etkiyi 100µM konsantrasyonda yaptığı ve bu değer negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.3 ve 4.6).

A549 hücre hattı ile yapılan test sonucunda PMe bileşiğinin 6µM, 25µM ve 50µM konsantrasyonlarda uygulamasının negatif kontrole göre sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu değer negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. PMe bileşiğinin sağlıklı akciğer kanser hücre hattında (MRC-5) yapılan uygulaması sonucunda ise en yüksek etkiye 12,5µM uygulamasında rastlanmıştır. Fakat bu değer negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak $p > 0,05$ düzeyinde önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.4 ve 4.7).

PNO₂ uygulamasının A549 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, en yüksek etkiyi 6µM, 25µM ve 50µM konsantrasyonlarında gerçekleştirdiği gözlenmiştir. Bu değer negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. PNO₂ bileşiğinin MRC-5 hücre hattı üzerine etkisi incelendiğinde en yüksek etkiye 6µM konsantrasyonda gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat bu değer negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak $p > 0,05$ düzeyinde önemsiz olduğu görülmüştür (Çizelge 4.5 ve 4.8).

Her üç bileşiğinde A549 hücre hattında sitotoksik aktivitesi karşılaştırıldığında 12,5µM, 25µM, 50µM ve 100 µM konsantrasyonlarında PPh bileşiğinin PMe ve PNO₂ bileşiklerine göre istatistiksel olarak daha yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9; $p < 0,05$). MRC-5 hücre hattında ise bileşiklerin sitotoksik bir aktiviteye sahip olmadığı gözlenmiştir. Bu sonucun kanser tedavisinde, hedefe yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında oldukça önemli olduğunu düşünüyoruz.

Tez çalışmamda; 4-(Süstitüe)-3,4-Dihidropirimidinon bileşiklerinin olası genotoksik etkilerinin belirlenmesi için de SMART yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde distile su ve DMSO negatif grupları haricinde genotoksitesi iyi bilinen EMS pozitif kontrol grubu ile farklı konsantrasyonda (1, 2, 5 ve 10mM) uygulama grupları oluşturulmuştur. Bileşikler 10mM konsantrasyondan sonra larval gelişimde toksik etki gösterdiği için uygulama gruplarında tüm bileşiklerde yukarıda belirtilen dozlar kullanılmıştır. Bileşiklerden PMe özellikle *mwh/flr3* genotipli normal bireylerde, 10mM konsatrasyonda DMSO kontrol grubuna göre küçük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon sayıları bakımından göre artış göstermiştir (Çizelge 4.11). 10^5 hücre başına düşen klon indüksiyon frekansı ise (KİF) 2.0'dan yüksek ise, bu genotoksik aktivitenin bir işareti olarak kabul edilmektedir (Graf et al. 1994). *mwh/flr3* genotipli normal bireylerde en yüksek KİF değeri 10 μ M PMe bileşiği uygulama grubunda 0.77, *mwh/TM3* genotipine sahip serrat kanatlı bireylerde ise 10 μ M PMe uygulama grubunda 0.87 olarak bulunmuştur. Bu bulgular PMe bileşiğinin mutajenik etkiye sahip olmadığını, ancak zayıf rekombinojenik etkili olduğunu göstermektedir.

Bileşiklerden PPh özellikle *mwh/flr3* genotipli normal bireylerde, 10mM konsantrasyonda DMSO kontrol grubuna göre küçük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon sayıları bakımından göre artış göstermiştir (Çizelge 4.12). *mwh/flr3* genotipli normal bireylerde en yüksek KİF değeri 10 μ M PPh bileşiği uygulama grubunda 0.97, *mwh/TM3* genotipine sahip serrat kanatlı bireylerde ise 10 μ M PPh uygulama grubunda 1.22 olarak bulunmuştur. Bu bulgular PMe bileşiğinin mutajenik etkiye sahip olmadığını, ancak zayıf rekombinojenik etkili olduğunu göstermektedir.

Bileşiklerden PNO₂ özellikle *mwh/flr3* genotipli normal bireylerde, 10mM konsantrasyonda DMSO kontrol grubuna göre küçük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon sayıları bakımından göre artış göstermiştir (Çizelge 4.13). *mwh/flr3* genotipli normal bireylerde en yüksek KİF değeri 10 μ M PNO₂ bileşiği uygulama grubunda 1.18, *mwh/TM3* genotipine sahip serrat kanatlı bireylerde ise 10 μ M PNO₂ uygulama grubunda 1.12 olarak bulunmuştur. Bu bulgular PMe bileşiğinin mutajenik etkiye sahip olmadığını, ancak zayıf rekombinojenik etkili olduğunu göstermektedir.

Tez çalışmamda; apoptotik hücre ölümü ve ilişkili sinyal yollarında önemli rol oynayan genlerin (DEBCL, BUFFY, DRICE ve DRONC), ısı şok proteinlerine ait genlerin (HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90) ve antioksidan genlerinin (SOD, CAT, GR ve GST) mRNA

düzeyleri qPCR yöntemiyle belirlenmiştir. *Drosophila melanogaster* hücrelerinde DEBCL gen ifadesinde bileşiklerden sadece PMe bileşiğinin gen ifadesinin artışına neden olduğu, diğer bileşiklerin ise gen ifadesinde artışa neden olmadığı gözlenmiştir. Bileşiklerin antiapoptotik etkiye sahip olan BUFFY gen ifadesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bileşiklerin DEBCL/BUFFY gen ifadesine etkisi karşılaştırıldığında hücrenin hayatta kalması yönünde etkisinin olduğu gözlenmiştir. Bileşiklerin apoptotik etkiye sahip olan DRICE gen ifadesinde anlamlı artış göstererek hücreyi ölüme sürüklediği tespit edilmiştir. Apoptotik yolak ile ilgili olan ve memelilerde bulunan kaspaz 9 geninin homoloğu olan DRONC gen ifadesinde PMe bileşiğinin artışa neden olduğu, diğer bileşiklerin ise artışa neden olmadığı tespit edilmiştir. Bileşiklerin ısı şok proteinlerinin gen ifade düzeyleri incelendiğinde PMe bileşiğinin HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90 gen ifadesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bileşiklerden PMe antioksidan genlerinin (SOD1, SOD2, CAT ve GSS) ifadelerinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.15-4.27).

Tez çalışmamda; apoptotik hücre ölümü ve ilişkili sinyal yollarında önemli rol oynayan (BCL2, BAX, CASP3 ve CASP9) genlerinin, ısı şok protein (HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90) ve antioksidan genlerinin (SOD1, SOD2, CAT ve GSS) mRNA düzeyleri qPCR yöntemiyle belirlenmiştir. A549 hücrelerinde PMe, PPh ve PNO₂ bileşiklerinin BAX gen ifadesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Bileşikler apoptotik yolda etkili olan diğer gen BCL2 gen ifadesinde de kontrol grubuna göre artışa neden olmuştur (Şekil 4.3). Bileşiklerin BAX/BCL2 oranı üzerine etkisi incelendiğinde PPh ve PMe'nin apoptotik etkiye neden olduğu, PNO₂ bileşiğinin ise antiapoptotik etki gösterdiği gözlenmiştir.

Apoptototik yolda etkili olan efektör kaspazlardan birisi olan CASP3 gen ifadesinde de kullanılan bileşiklerin tamamı kontrol grubuna göre artışa neden olmuştur (Şekil 4.4). Apoptotik yolda etkili olan başlatıcı kaspazlardan biri olan CASP9 gen ifadesine bileşiklerin etkisi incelendiğinde PPh ve PNO₂ bileşiklerinin gen ifadesinde anlamlı artışa neden olduğu ve hücreyi ölüme sürüklediği, PMe bileşiğinin ise CASP9 gen ifadesinde artışa neden olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Ayrıca bileşiklerin ısı şoku proteinlerinden sadece HSP27'de gen ifadesini azaltma potansiyeline sahip olduğu diğer ısı şok proteinlerinde ise (HSP60, HSP70 ve HSP90) gen ifadelerini azaltma da etkileri tespit edilememiştir (Şekil 4.6-4.9). Bileşiklerin antioksidan genlerinin (SOD1, CAT ve GSS) ifadelerinde anlamlı artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bileşiklerden PPh, SOD2 geninin

ifadesinde artışa neden olmadığı fakat PMe ve PNO₂ bileşiklerinin ise SOD2 geninin ifadesinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10-4.13).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- Kullanılan bileşiklerin olası genotoksik etkilerinin incelendiği SMART sonucunda üç bileşiğinde yüksek dozlarda genotoksik etkiye sahip olduğu fakat toksik etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir.
- Bileşiklerin sitotoksik etkilerinin araştırıldığı WST-8 testi sonucunda, bileşiklerin A549 akciğer kanser hücre hattında sitotoksik etkisinin olduğu, MRC-5 sağlıklı akciğer hücre hattında ise sitotoksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.
- Bileşiklerin A549 hücre hattında apoptotik etkileri incelendiğinde, BAX geninin ekspresyon seviyesini artırdığı tespit edilmiştir. Bileşiklerden PPh ve PMe'nin BAX/BCL2 oranını artırdığı ve hücreyi apoptoza sürüklediği tespit edilmiştir.
- Apoptoz mekanizmasında görev alan efektör kaspazlardan, CASP3 geninin ekspresyon seviyesi incelendiğinde, tüm bileşiklerin gen ekspresyon seviyesini artırdığı tespit edilmiştir. Bileşiklerden PPh ve PNO₂ başlatıcı kaspazlardan olan CASP9 geninin ekspresyon seviyesini artırdığı tespit edilmiştir.
- Bileşiklerin ısı şoku protein gen ifadelerine etkisi incelendiğinde, tüm bileşiklerin HSP27 gen ifadesini azalttığı tespit edilmiştir.
- Bileşiklerin antioksidan gen ifadesine etkisi incelendiğinde, tüm bileşiklerin (SOD1, CAT ve GSS) antioksidan gen ifadesini artırdığı tespit edilmiştir. PMe ve PNO₂ bileşiklerinin SOD2 gen ifadesini artırdığı tespit edilmiştir.
- Bileşiklerin *D. melanogaster* bireylerinde apoptotik gen ifade düzeylerine etkisi incelendiğinde PMe bileşiğinin insanlardaki BAX genine benzer görevleri olan DEBCL geninin ekspresyon düzeyini kontrol grubuna göre artırdığı, PPh ve PNO₂ bileşiğinin ise DEBCL geninin ekspresyon seviyesini azalttığı tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan bileşiklerin apoptotik yolda etkili olan ve insanlardaki BCL2 genine benzer görevleri olan BUFFY geninin ekspresyon düzeyini etkisi

incelendiğinde, tüm bileşiklerin BUFFY geninin ekspresyon seviyesini artırdığı gözlenmiştir. Bileşiklerin DEBCL/BUFFY oranına etkisi incelendiğinde, her üç bileşiğinde sağlıklı *D. melanogaster* bireylerinde antiapoptotik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

- Bileşiklerin DRICE geninin ekspresyon düzeyine etkisi incelendiğinde tüm bileşiklerin kontrol grubuna göre gen ekspresyon düzeyini artırdığı tespit edilmiştir. Bileşiklerin DRONC geninin ekspresyon düzeyine etkisi incelendiğinde ise sadece PMe bileşiğinin gen ekspresyon düzeyinde artışa neden olduğu PPh ve PNO₂ bileşiğinin ise gen ekspresyon seviyesini azalttığı tespit edilmiştir.
- Bileşiklerin ısı şoku proteinleri gen ekspresyon düzeylerine etkisi incelendiğinde ise PMe bileşiğinin HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90 genlerinin ifade düzeyini artırdığı tespit edilmiştir.
- Bileşiklerin antioksidan gen (SOD, CAT, GR ve GST) ifade düzeylerine etkisi incelendiğinde PMe bileşiğinin tüm genlerin ekspresyon düzeyini artırdığı tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Akkoç, S. (2020). HeLa ve Beas-2B Hücre Hatlarına Karşı Benzimidazolyum Tuzlarının İn Vitro Sitotoksik Aktivite Çalışmaları. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 10 (2), 505-513 .
- Alexander, M., Kim, S. Y. and Cheng, H. (2020). Update 2020: management of non-small cell lung cancer. *Lung*, 198, 897-907.
- Al-Sukhni, W., Aronson, M. and Gallinger, S. (2008)., “Hereditary colorectal cancer syndromes: familial adenomatous polyposis and lynch syndrome”, *Surgical Clinics of North America*., 88(4):819–844.
- Altan, N., Dinçel, A. and Koca, C. (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi*, 31(2), 51-6.
- American Cancer Society. Cancer facts & figures, (2013). Atlanta (GA): *American Cancer Society; e-book*.
- Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.;*(Netherlands), 31.
- Andrew, D. J. and Ewald, A. J. (2010). Morphogenesis of epithelial tubes: Insights into tube formation, elongation, and elaboration. *Developmental Biology*, 341 (1), 34–55.
- Arbeitman, M. N., Furlong, E. E., Imam, F., Johnson, E., Null, et al. (2002). Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 297(5590), 2270-2275.
- Armstrong, R. W., Combs, A. P., Tempest, P. A., Brown, S. D. and Keating, T. A. (1996). Multiple-component condensation strategies for combinatorial library synthesis. *Accounts of Chemical Research*, 29(3), 123-131.
- Asaduzzaman Khan, M., Tania, M., Zhang, D. Z. and Chen, H. C. (2010). Antioxidant enzymes and cancer. *Chinese Journal of Cancer Research*, 22(2), 87-92
- Ashburner, A. (1989). *Drosophila: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor” Cold Spring Harbor Laboratory Press*.1331 pp. New York.
- Ata, (2020). *Annona Muricata* Bitki Ekstraktının Meme Kanseri Hücre Hattında ve *Drosophila melanogaster* Model Organizma Üzerindeki Etkisinin Moleküler Düzeyde Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı, 46-66.
- Atwal, K. S., Rovnyak, G. C., Kimball, S. D., Floyd, D. M., Moreland, S., et al. (1990). Dihydropyrimidine calcium channel blockers. II. 3-Substituted-4-aryl-1, 4-dihydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid esters as potent mimics of dihydropyridines. *Journal of medicinal chemistry*, 33(9), 2629-2635.

- Aufricht, C. (2005). Heat-shock protein 70: molecular supertool?. *Pediatric Nephrology*, 20, 707-713.
- Ayar, A. (2013). Bazı Parabenlerin Genotoksik Etkilerinin in vivo ve in vitro Şartlarda Kısa Süreli Test Teknikleri ile Belirlenmesi. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum.
- Ayar, A. and Uysal, H. (2013). Genotoxic and safety assessment of 2 parabens in somatic cells of in vivo *Drosophila melanogaster*. *Turkish Journal of Biology*, 37(6), 683-688.
- Aydiner, A., Ece, T. ve Topuz, E. (2010). Akciğer Kanseri Tanı-Tedavi-Takip, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.
- Badowska-Kozakiewicz, A., Liszcz, A., Sobol, M. and Patera, J. (2017). Retrospective evaluation of histopathological examinations in invasive ductal breast cancer of no special type: an analysis of 691 patients. *Archives of Medical Science*, 13(6), 1408-1415.
- Bagchi, K. and Puri, S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease: A review. *EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal*, 4 (2), 350-360, 1998.
- Bangi, E., Murgia, C., Teague, A.G., Sansom, O.J., and Cagan, R.L. (2016). Functional exploration of colorectal cancer genomes using *Drosophila*. *Nature Communications* 7, 13615.
- Başaran, N. (2003). Tıbbi Genetik Ders Kitabı, Nobel & Güneş Tıp Kitap Evi, 465 s, Bursa.
- Bayliak, M. M., Abrat, O. B., Storey, J. M., Storey, K. B. and Lushchak, V. I. (2019). Interplay between diet-induced obesity and oxidative stress: comparison between *Drosophila* and mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 228, 18-28.
- Beck, B., Magnin-Lachaux, M., Herdtweck, E. and Domling, A. (2001). A novel three- € component butenolide synthesis, *Organic Letters*. 3 (2001) 2875e2878.
- Behr, M. (2010). Molecular aspects of respiratory and vascular tube development. *Respiratory physiology & neurobiology*, 173, S33-S36.
- Bellusci, S., Furuta, Y., Rush, M. G., Henderson, R., Winnier, G. et al. (1997). Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development*, 124(1), 53-63.
- Bennett, L. L., Rojas, S. and Seefeldt, T. (2012). Role of antioxidants in the prevention of cancer. *Journal of Experimental & Clinical Medicine*, 4(4), 215-222.
- Bhat, M. A., Al-Dhfyan, A. and Al-Omar, M. A. (2016). Targeting cancer stem cells with novel 4-(4-substituted phenyl)-5-(3, 4, 5-trimethoxy/3, 4-dimethoxy)-benzoyl-3, 4-dihydropyrimidine-2 (1 H)-one/thiones. *Molecules*, 21(12), 1746.

- Biebl, M. M. and Buchner, J. (2019). Structure, function, and regulation of the Hsp90 machinery. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11(9), a034017.
- Biginelli, P. (1893). Aldehyde-urea derivatives of aceto-and oxaloacetic acids. *Gazzetta Chimica Italiana*, 23(1), 360-413.
- Borek, C. (2004). Dietary antioxidants and human cancer. *Integrative cancer therapies*, 3(4), 333-341.
- Bossert, F. and Vater, W. (1989). 1, 4-Dihydropyridines—a basis for developing new drugs. *Medicinal research reviews*, 9(3), 291-324.
- Brumby, A. M. and Richardson, H. E. (2003). scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *The EMBO journal*, 22(21), 5769-5779.
- Bukowska, B. (2004). Effects of 2,4-D and its metabolite 2,4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology*, 135 (4), 435- 441.
- Bury, M., Le Calvé, B., Ferbeyre, G., Blank, V. and Lessard, F. (2021). New insights into CDK regulators: novel opportunities for cancer therapy. *Trends in cell biology*, 31(5), 331-344.
- Cairns, J. (1975). Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, 255(5505), 197- 200.
- Caliskan, N. and Akbas, E. (2011). The inhibition effect of some pyrimidine derivatives on austenitic stainless steel in acidic media, *Materials Chemistry and Physics*, 126-983.
- Calap-Quintana, P., González-Fernández, J., Sebastiá-Ortega, N., Llorens, J. V. and Moltó, M. D. (2017). *Drosophila melanogaster* models of metal-related human diseases and metal toxicity. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1456.
- Canpolat, F. (2016). Hücre Siklüsü ve Apoptoz. *Güncel Dermatoloji Dergisi*, 1(1), 11-17.
- Canpolat, F., Cemil, B. Ç., Eskioglu, F. and Han, Ü. (2009). A case with squamous cell lung cancer with skin metastasis. *Türkiye Klinikleri Dermatoloji Dergisi*, 19(2), 118-121.
- Caponigro, G. and Sellers, W.R. (2011). Advances in the preclinical testing of cancer therapeutic hypotheses. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10: 179–187.
- Carocho, M., Morales, P. and Ferreira, I. C. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 107-120.
- Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P. ve Karagin, P. H. (2020). Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 24, 103-11.

- Chansky, K., Detterbeck, F. C., Nicholson, A. G., Rusch, V. W., Vallières, E., et al. (2017). The IASLC lung cancer staging project: external validation of the revision of the TNM stage groupings in the eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(7), 1109-1121.
- Chen, Y. T., Feng, B. and Chen, L. B. (2012). Update of research on drug resistance in small cell lung cancer chemotherapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(8), 3577-3581.
- Chhillar, A. K., Arya, P., Mukherjee, C., Kumar, P., Yadav, Y., et al. (2006). Microwave-assisted synthesis of antimicrobial dihydropyridines and tetrahydropyrimidin-2-ones: Novel compounds against aspergillosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(4), 973-981.
- Chiang, A. N., Valderramos, J. C., Balachandran, R., Chovatiya, R. J., Mead, B. P., et al. (2009). Select pyrimidinones inhibit the propagation of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(4), 1527-1533.
- Chin, G. M. and Herbst, R. (2006). Induction of apoptosis by monastrol, an inhibitor of the mitotic kinesin Eg5, is independent of the spindle checkpoint. *Molecular cancer therapeutics*, 5(10), 2580-2591.
- Choy, W. N. (2001). Regulatory genetic toxicology tests. In *Genetic toxicology and cancer risk assessment* (pp. 107-128). CRC Press.
- Christofi, T. and Apidianakis, Y. (2013). Ras-oncogenic *Drosophila* hindgut but not midgut cells use an inflammation-like program to disseminate to distant sites. *Gut microbes* 4, 54-59.
- Chu, K., Snyder, R. and Econs, M. J. (2006). Disease status in autosomal dominant osteopetrosis type 2 is determined by osteoclastic properties. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(7), 1089-1097.
- Clark, S. B. and Alsubait, S. (2021). Non small cell lung cancer. StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA.
- Clavier, A., Rincheval-Arnold, A., Colin, J., Mignotte, B. and Guénal, I. (2016). Apoptosis in *Drosophila*: which role for mitochondria? *Apoptosis*, 21(3), 239-251.
- Cooper, W., Barnet, M., Kao, S. and Scolyer, R. (2018). Biomarkers that predict response to immunotherapy - no magic bullet. *Cancer Forum*, 42(1), 92-101
- Cruz, C. S. D., Tanoue, L. T. and Matthay, R. A. (2011). Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine*, 32(4), 605-644.
- Çavaş, T., (2004). Endüstriyel atıkların genotoksik etkilerinin mikronukleus testi ve agnor analiz teknikleri kullanılarak in-situ ve laboratuvar koşulları altında araştırılması. Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.

- Çetinkaya, A. Y. and Yurtsever, S. (2021). Somatic mutations and recombination test in *Drosophila melanogaster* used for investigating the genotoxicity of some food additives. *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences*, 5(1), 65-73.
- D'arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582-592.
- da Silva, D. L., Reis, F. S., Muniz, D. R., Ruiz, A. L. T., de Carvalho, J. E., et al. (2012). Free radical scavenging and antiproliferative properties of Biginelli adducts. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(8), 2645-2650.
- de Fatima, A., Braga, T. C., Neto, L. D. S., Terra, B. S., Oliveira, B. G., et al. (2015). A mini-review on Biginelli adducts with notable pharmacological properties. *Journal of advanced research*, 6(3), 363-373.
- de Vasconcelos, A., Oliveira, P. S., Ritter, M., Freitag, R. A., Romano, R. L., et al. (2012). Antioxidant capacity and environmentally friendly synthesis of dihydropyrimidin-(2H)-ones promoted by naturally occurring organic acids. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 26(4), 155-161.
- Dinçel, G. Ç. ve Kul, O. (2016). Patolojik apoptozis ve tanı yöntemleri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1), 86-108.
- Dömling, A. (2000). The discovery of new isocyanide-based multi-component reactions. *Current opinion in chemical biology*, 4(3), 318-323.
- Dontha, S. (2016). A review on antioxidant methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(2), 14-32.
- Duan, L., Wang, T. Q., Bian, W., Liu, W., Sun, Y. and Yang, B. S. (2015). Centrin: Another target of monastrol, an inhibitor of mitotic spindle. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 137, 1086-1091.
- Ďuračková, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological research*, 59(4).
- Duguay, D. R., Zamora, M. T., Blacquiere, J. M., Appoh, F. E., Vogels, C. M., et al. (2008). Synthesis, characterization and antifungal testing of 3, 4-dihydropyrimidin-2 (1H)-(thio) ones containing boronic acids and boronate esters. *Central European Journal of Chemistry*, 6, 562-568.
- Edwards, A., Gladstone, M., Yoon, P., Raben, D., Frederick, B., et al. (2011). Combinatorial effect of maytansinol and radiation in *Drosophila* and human cancer cells. *Disease Models & Mechanisms*, 4, 496-503.
- Efthimiou, I., Vlastos, D., Ioannidou, C., Tsilimigka, F., Drosopoulou, E., et al. (2022). Model sistemler olarak insan lenfositleri ve meyve sineği *Drosophila melanogaster* kullanılarak üç yeni kompozit nanomalzemenin genotoksik

potansiyelinin değerlendirilmesi. *Kimya Mühendisliği Dergisi Gelişmeleri*, 9, 100230.

- Eisenthal, A., Barbarsteyn, E., Gitstein, G. and Lifschitz-Mercer, B. (2006). Inhibition of lymphokine-activated killer cells generation in vitro by soluble factors released from mixed human tumor and peripheral blood mononuclear adherent cells culture. *Cancer investigation*, 24(1), 28-34.
- El Hefny, I. M., Walaa, A. A. D., Diab, A. A., Hozayen, W. G. and Al-Senosy, N. K. K. (2017). Carcinogenic and cytotoxic effect of some food additives on *Drosophila melanogaster* and human cell lines. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology*, 9(2), 39-50.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Enayati, A. A., Ranson, H. and Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect molecular biology*, 14(1), 3-8.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L. and O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339(1), 37-59.
- Fernandes, L. M., Garcez, W. S., Mantovani, M. S., Figueiredo, P. O., Fernandes, C. A., et al. (2013). Assessment of the in vitro and in vivo genotoxicity of extracts and indole monoterpene alkaloid from the roots of *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae). *Food and chemical toxicology*, 59, 405-411.
- Fernández-Bedmar, Z., Anter, J. and Alonso Moraga, A. (2018). Anti/genotoxic, longevity inductive, cytotoxic, and clastogenic-related bioactivities of tomato and lycopene. *Environmental and molecular mutagenesis*, 59(5), 427-437.
- Fidan, M. and Ayar, A. (2021). Modulatory effects of white tea (*Camellia sinensis* L.) on genotoxicity in streptozotocin and cyclophosphamide-treated. *Drosophila melanogaster*. *Progress in Nutrition*, 23(3).
- Forman, H. J., Zhang, H. and Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 1-12.
- Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L. and Audus, K. L. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental cell research*, 243(2), 359-366.
- Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A. G. and Panayiotidis, M. I. (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer letters*, 266(1), 6-11.
- França-Botelho, A. C., Honório-França, A. C., França, E. L., Aparecida Gomes, M. and Costa-Cruz, J. M. (2006). Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by human colostral leukocytes. *Acta Paediatrica*, 95(4), 438-443.

- Fraser, A. G. and Evan, G. I. (1997). Identification of a *Drosophila melanogaster* ICE/CED-3-related protease, drICE. *The EMBO journal*, 16(10), 2805-2813.
- Frederiks, W. M., Bosch, K. S., Hoeben, K. A., van Marle, J. and Langbein, S. (2010). Renal cell carcinoma and oxidative stress: the lack of peroxisomes. *Acta histochemica*, 112(4), 364-371.
- Frei, H. and Würigler, F. E. (1996). Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, 11(4), 315-325.
- Frei, H. and Würigler, F. E. (1988) "Statistical methods to decide whether mutagenic testdata from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results", *Mutation Research*, 203, 297-308.
- Fuchs, Y. and Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147(4), 742-758.
- Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., Wooster, R. and Stratton, M. R. (2001). Cancer and genomics. *Nature*, 409(6822), 850-852.
- Galaris, D., Skiada, V. and Barbouti, A. (2008). Redox signaling and cancer: the role of "labile" iron. *Cancer letters*, 266(1), 21–29.
- Games, P.A. (1971). Multiple comparisons of means. *American Educational Research Journal*, 8, 531-564.
- Gangwar, N. and Kasana, V. K. (2012). 3, 4-Dihydropyrimidin-2 (1 H)-one derivatives: organocatalysed microwave assisted synthesis and evaluation of their antioxidant activity. *Medicinal Chemistry Research*, 21, 4506-4511.
- Gasque, G., Conway, S., Huang, J., Rao, Y. and Vosshall, L. B. (2013). Small molecule drug screening in *Drosophila* identifies the 5HT2A receptor as a feeding modulation target. *Scientific reports*, 3(1), 1-8.
- Gao, Z., Zhang, D., Duan, Y., Yan, L., Fan, Y., Fang, Z., & Liu, Z. (2019). A five-gene signature predicts overall survival of patients with papillary renal cell carcinoma. *PLoS One*, 14(3), e0211491.
- Gazdar, A. F., Girard, L., Lockwood, W. W., Lam, W. L. and Minna, J. D. (2010). Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(17),1310-1321.
- Ghabrial, A., Luschnig, S., Metzstein, M. M., and Krasnow, M. A. (2003). Branching morphogenesis of the *Drosophila* tracheal system. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 623–647.
- Gonzalez, C. (2013). *Drosophila melanogaster*: a model and a tool to investigate malignancy and identify new therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 13(3), 172-183.

- Gonzalez, D., Fraichard, S., Grassein, P., Delarue, P., Senet, P., et al. (2018). Characterization of a *Drosophila* glutathione transferase involved in isothiocyanate detoxification. *Insect biochemistry and molecular biology*, 95, 33-43.
- González-Olvera, R., Román-Rodríguez, V., Negrón-Silva, G. E., Espinoza-Vázquez, A., Rodríguez-Gómez, F. J., et al. (2016). Multicomponent synthesis and evaluation of new 1, 2, 3-triazole derivatives of dihydropyrimidinones as acidic corrosion inhibitors for steel. *Molecules*, 21(2), 250.
- Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartweg, E. and Steller, H. (2000). Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *The EMBO journal*, 19(4), 589-597.
- Graf, U. and Würgler, F. E. (1986). Investigation of coffee in *Drosophila* genotoxicity tests. *Food and chemical toxicology*, 24(8), 835-842.
- Graf, U., Abraham, S. K., Guzmán-Rincón, J. and Würgler, F. E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1-2), 203-209.
- Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., et al. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental mutagenesis*, 6(2), 153-188.
- Grifoni, D., Frolidi, F., and Pession, A. (2013). Connecting epithelial polarity, proliferation and cancer in *Drosophila*: the many faces of lgl loss of function. *International Journal of Developmental Biology*, 57(9-10), 677-687.
- Grilo, A. L. and Mantalaris, A. (2019). Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology advances*, 37(3), 459-475.
- Guzmán-Rincón, J. and Graf, U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. *Environmental Science Research*, 50, 169-182.
- Güleş Ö. ve Eren Ü. (2008) Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2) 73-78.
- Gültekin, N., Karaoğlu, K. ve Küçükateş, E. (2008), Hücrede Apoptoz ve Sağkalım Mekanizmalarının Keşfedilmesi ve Yeni Potansiyel Tedavi Stratejeleri, *Türk Kardiyoloji Derneği* 36(2): 120-130.
- Günay, E., Celik, S., Sarinc-Ulasli, S., Özyürek, A., Hazman, Ö., et al. (2016). Comparison of the anti-inflammatory effects of proanthocyanidin, quercetin, and damnacanthol on benzo (a) pyrene exposed A549 alveolar cell line. *Inflammation*, 39, 744-751.
- Hafen, E. (2004). Cancer, type 2 diabetes, and ageing: news from flies and worms. *Swiss Medical Weekly*, 134, 981 711-719.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.

- Halliwell, B., Zentella, A., Gomez, E. O. and Kershenobich, D. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition reviews*, 55(1), S44.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Harvey, N. L., Daish, T., Mills, K., Dorstyn, L., Quinn, L. M., et al. (2001). Characterization of the *Drosophila* Caspase, DAMM. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 25342-25350.
- Hirsch, F. R., Herbst, R. S., Olsen, C., Chansky, K., Crowley, J., et al. (2008). Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 26(20), 3351.
- Hofherr, A., Wagner, C.J., Watnick, T., and Kottgen, M. (2016). Targeted rescue of a polycystic kidney disease mutation by lysosomal inhibition. *Kidney International*, 89, 949-955.
- Hussain, S. P., Amstad, P., Raja, K., Ambs, S., Nagashima, M. et al. (2000). Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer research*, 60(13), 3333-3337.
- Ikwegbue, P. C., Masamba, P., Oyinloye, B. E. and Kappo, A. P. (2017). Roles of heat shock proteins in apoptosis, oxidative stress, human inflammatory diseases, and cancer. *Pharmaceuticals*, 11(1), 2.
- Ischia, J. and So, A. I. (2013). The role of heat shock proteins in bladder cancer. *Nature Reviews Urology*, 10(7), 386-395.
- İnternet: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (Son erişim tarihi: 20.02.2023).
- İnternet: <https://www.atcc.org/products/ccl-185> (Son Erişim tarihi: 21.11.2022).
- Jäättelä, M. (1999). Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Experimental cell research*, 248(1), 30-43.
- Jambunathan, S., Bangarusamy, D., Padma, P. R. and Sundaravadivelu, S. (2014). Cytotoxic activity of the methanolic extract of leaves and rhizomes of *Curcuma amada* Roxb against breast cancer cell lines. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7, S405-S409.
- Johnson, T. E. (2006). Recent results: biomarkers of aging. *Experimental gerontology*, 41(12), 1243-1246.

- Joule, A.J. and Mills, K. (2000). "Heterocyclic Chemistry", Blackwell Science, London.
- Kaan, H. Y. K., Ulaganathan, V., Rath, O., Prokopcova, H., Dallinger, D., et al. (2010). Structural basis for inhibition of Eg5 by dihydropyrimidines: stereoselectivity of antimetabolic inhibitors enastron, dimethylenastron and fluorastrol. *Journal of medicinal chemistry*, 53(15), 5676-5683.
- Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Desai, A., Maddox, P., Salmon, E. D., et al. (1999). Investigating the inhibition of bipolar spindle formation by monastrol, a small molecule kinesin inhibitor. In *Molecular Biology Of The Cell* (Vol. 10, Pp. 128a-128a). Publ Office, 9650 Rockville Pike, Bethesda, Md 20814 Usa: American Society for Cell Biology.
- Kappe, C. O. (2000). Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type—a literature survey. *European journal of medicinal chemistry*, 35(12), 1043-1052.
- Kappe, C. O., Shishkin, O. V., Uray, G. and Verdino, P. (2000). X-ray structure, conformational analysis, enantioseparation, and determination of absolute configuration of the mitotic kinesin Eg5 inhibitor monastrol. *Tetrahedron*, 56(13), 1859-1862.
- Karadeniz, A., Kaya, B., Savaş, B. and Topcuoğlu, Ş. F. (2015). Effects Of Two Fungicides, Cyprodinil And Fludiox-Onil, On Genotoxicity In *Drosophila* Smart Assay and On Proliferation and Viability Of Hek293 Cells From The Perspective Of Carcinogenesis. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(5 B), 1920-1925.
- Kasai, Y. and Cagan, R. (2010). *Drosophila* as a tool for personalized medicine: a primer. *Personalized medicine*, 7(6), 621-632.
- Kasapçopur Özel, G. S. and Birdane, Y. O. (2014). Antioxidants . *Kocatepe Veterinary Journal* , 7 (2) , 41-52 .
- Kaur, J., Sundar, S. and Singh, N. (2010). Molecular docking, structure–activity relationship and biological evaluation of the anticancer drug monastrol as a pteridine reductase inhibitor in a clinical isolate of *Leishmania donovani*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(8), 1742-1748.
- Kaur, R., Chaudhary, S., Kumar, K., Gupta, M. K. and Rawal, R. K. (2017). Recent synthetic and medicinal perspectives of dihydropyrimidinones: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 132, 108-134.
- Kaya, C., Çalışkan, Y. ve Yönden, Z. (2012). Apoptozis. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 3(11), 26-37.
- Keller, A. (2007). *Drosophila melanogaster's* history as a human commensal. *Current biology*, 17(3), R77-R81.
- Kerr, A. (1972). Biological control of crown gall: seed inoculation. *Journal of Applied Bacteriology*, 35(3), 493-497.

- Kerr, J.F. and Harmon, B.V. (1991). Apoptozun tanımı ve insidansı: tarihsel bir bakış açısı. Apoptoz: hücre ölümünün moleküler temeli. Düzenleyen: Tomei L.D., Cope, F.O. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 3: 5-29.
- Khan, N., Afaq, F. and Mukhtar, H. (2008). Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxidants & redox signaling*, 10(3), 475-510.
- Khanina, E. L., Silinietse, G. O., Ozol, Y. Y., Dubur, G. Y. and Kimenis, A. A. (1979). Synthesis And Pharmacological Studies Of Some 1, 2, 3, 4-Tetrahydropyrimidine-5-Carboxylic Acid Derivatives. *Chemischer Informationsdienst*, 10(15).
- Kızılet, H. and Uysal, H. (2022). Genoprotective role of purslane methanol extract against somatic mutations induced by bifenthrin, a third generation prethyroid insecticide. *Journal of Agricultural Sciences*, 28(4), 583-591.
- Kim, J., Park, C., Ok, T., So, W., Jo, M., et al. (2012). Discovery of 3, 4-dihydropyrimidin-2 (1H)-ones with inhibitory activity against HIV-1 replication. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(5), 2119-2124.
- Klaunig, J. E. and Kamendulis, L. M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 44, 239-267.
- Krimsky, W., Muganlinskaya, N., Sarkar, S., Vulchi, M., Patel, P., et al. (2016). The changing anatomic position of squamous cell carcinoma of the lung—a new conundrum. *Journal of community hospital internal medicine perspectives*, 6(6), 33299.
- Krist, A. H., Davidson, K. W., Mangione, C. M., Barry, M. J., Cabana, M., et al. (2021). Screening for lung cancer: US preventive services task force recommendation statement. *JAMA*, 325(10), 962-970.
- Kuhn, E., Morbini, P., Cancellieri, A., Damiani, S., Cavazza, A., et al. (2018). Adenocarcinoma classification: patterns and prognosis. *Pathologica-Journal of the Italian Society of Anatomic Pathology and Diagnostic Cytopathology*, 110(1), 5-11.
- Kumar, H., Javed, S. A., Khan, S. A. and Amir, M. (2008). 1, 3, 4-Oxadiazole/thiadiazole and 1, 2, 4-triazole derivatives of biphenyl-4-yloxy acetic acid: synthesis and preliminary evaluation of biological properties. *European journal of medicinal chemistry*, 43(12), 2688-2698.
- Kurşun, A.Y., Yalçın, B., Güneş, M., Tagorti, G. and Kaya, B. (2022). *Drosophila melanogaster*'in somatik hücrelerinde kobalt nanopartiküllerinin indüklediği genotoksositeye karşı resveratrol'ün antigenotoksik etkisi. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(2), 50-55.
- Lapa, M. R., Kırbaş, O. K., Bozkurt, B., Taşlı, P. N., Avcı, M. K. ve diğerleri (2017). *Vaccinium myrtillus* kaynaklı Eksozomların İnsan Akciğer Karsinomu (A549 hücre hattı) Üzerine Sitotoksik Etkilerinin MTT testi ile Araştırılması. *Uluslararası*

Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu/İstanbul Üniversitesi, Biotechnoloji and Genetic Engineering Club (IUGEN)/Vezneciler, İstanbul/03-05 Mart.

- Latt, S. A., Allen, J., Bloom, S. E., Carrano, A., Falke, E., et al. (1981). Sister-chromatid exchanges: a report of the GENE-TOX program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 87(1), 17-62.
- Lee, M.G. and Nurse, P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature*, 327, 31–35.
- Lee, T. and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron*, 22(3), 451-461.
- Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U., Yang, Y. W. and Buchanan, P. (2015). "Lung cancer, Biology and treatment options." *Biochim Biophys Acta*, 1856(2), 189-210.
- Levan, A. (1938). A triploid asynaptic *Allium amplexans* from California. *Nature*, 142(3585), 118-118.
- Levine, B. D. and Cagan, R. L. (2016). *Drosophila* lung cancer models identify trametinib plus statin as candidate therapeutic. *Cell Reports*. 14 (6), 1477–1487.
- Lewis, E. B. and Bacher, F. (1968). Method of feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila Information Service* , 43(193), 193.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G. (1992). The genome of. *Drosophila melanogaster*, 1100.
- Lithgow, G. J. and Walker, G. A. (2002). Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan. *Mechanisms of ageing and development*, 123(7), 765-771.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real- time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Luo, J., Mills, K., le Cessie, S., Noordam, R. and van Heemst, D. (2020). Ageing, age-related diseases and oxidative stress: what to do next? *Ageing research reviews*, 57, 100982.
- Mackay, W. J. and G. C. Bewley (1989). "The genetics of catalase in *Drosophila melanogaster*. Isolation and characterisation of acatalasemic mutants." *Genetics* 122(3): 643-652.
- MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, B. H., Ramel, C., et al. (1987). Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 189(2), 103-112.
- Manetti, F., Santucci, A., Locatelli, G. A., Maga, G., Spreafico, A., et al. (2007). Identification of a novel pyrazolo [3, 4-d] pyrimidine able to inhibit cell proliferation of a human osteogenic sarcoma in vitro and in a xenograft model in mice. *Journal of medicinal chemistry*, 50(23), 5579-5588.

- Manos-Turvey, A., Al-Ashtal, H. A., Needham, P. G., Hartline, C. B., Prichard, M. N., et al. (2016). Dihydropyrimidinones and-thiones with improved activity against human polyomavirus family members. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 26(20), 5087-5091.
- Mansouri, M., Movahedian, A., Rostami, M. and Fassihi, A. (2012). Synthesis and antioxidant evaluation of 4-(furan-2-yl)-6-methyl-2-thioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate esters. *Research in pharmaceutical sciences*, 7(4), 257.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I. and Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88(11), 1515-1531.
- Matos, L. H. S., Masson, F. T., Simeoni, L. A. and Homem-de-Mello, M. (2018). Biological activity of dihydropyrimidinone (DHPM) derivatives: A systematic review. *European journal of medicinal chemistry*, 143, 1779-1789.
- Matthews, H. K., Bertoli, C. and de Bruin, R. A. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74-88.
- Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 239(1), 29-80.
- Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.Z. et al. (1999). "Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen", *Science*, 286,971-974.
- Mayne, S. T. (2003). Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *The Journal of nutrition*, 133(3), 933S-940S.
- Memişoğulları, R. (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Duzce medical journal*, 7(3), 30-39.
- Meng, X. W., Lee, S. H. and Kaufmann, S. H. (2006). Apoptosis in the treatment of cancer: a promise kept? *Current opinion in cell biology*, 18(6), 668-676.
- Mesci, (2020). İzindol Türevli Bileşiklerin İnsan Meme ve Kolon Kanseri Hücrelerinde Çoklu İlaç Direncine ve Apoptotik Sinyal Yolaklarına Etkilerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Amasya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 91-97.
- Mesci, S. , Gül, M. and Yıldırım, T. (2022). Antiproliferative Activity of Pyrrolidine Derivatives compound in Colon Cancer Cells . *Hitit Medical Journal* , 4 (1) , 1-5 .
- Michaud, S., Marin, R. and Tanguay, R. M. (1997). Regulation of heat shock gene induction and expression during *Drosophila* development. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 53, 104-113.

- Michaud, S., Morrow, G., Marchand, J. and Tanguay, R. M. (2002). *Drosophila* small heat shock proteins: cell and organelle-specific chaperones? *Small Stress Proteins*, 79-101.
- Mirzoyan, Z., Sollazzo, M., Allocca, M., Valenza, A. M., Grifoni, D. et al. (2019). *Drosophila melanogaster*: A model organism to study cancer. *Frontiers in genetics*, 10, 51.
- Missirlis, F., Phillips, J. P. and Jäckle, H. (2001). Cooperative action of antioxidant defense systems in *Drosophila*. *Current Biology*, 11(16), 1272-1277.
- Mockett, R. J., Orr, W. C., Rahmandar, J. J., Sohal, B. H. and Sohal, R. S. (2001). Antioxidant status and stress resistance in long- and short-lived lines of *Drosophila melanogaster*. *Experimental gerontology*, 36(3), 441-463.
- Mockett, R. J., Bayne, A. C. V., Kwong, L. K., Orr, W. C. and Sohal, R. S. (2003). Ectopic expression of catalase in *Drosophila* mitochondria increases stress resistance but not longevity. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(2), 207-217.
- Mokale, S. N., Shinde, S. S., Elgire, R. D., Sangshetti, J. N. and Shinde, D. B. (2010). Synthesis and anti-inflammatory activity of some 3-(4, 6-disubstituted-2-thioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydropyrimidin-5-yl) propanoic acid derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(15), 4424-4426.
- Morimoto, R. I. (2008). Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes & development*, 22(11), 1427-1438.
- Morimoto, R. I. and Cuervo, A. M. (2009). Protein homeostasis and aging: taking care of proteins from the cradle to the grave. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 64(2), 167-170.
- Morimoto, R. I. and Santoro, M. G. (1998). Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature biotechnology*, 16(9), 833-838.
- Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(11), a011254.
- Morrow, G. and Tanguay, R. M. (2003). Heat shock proteins and aging in *Drosophila melanogaster*. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 14, No. 5, pp. 291-299). Academic Press.
- Morrow, G., Inaguma, Y., Kato, K. and Tanguay, R. M. (2000). The small heat shock protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster* is a mitochondrial protein displaying oligomeric organization. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31204-31210.
- Motoi, N., Szoke, J., Riely, G. J., Seshan, V. E., Kris, M. G., et al. (2008). Lung adenocarcinoma: modification of the 2004 WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlations between papillary and micropapillary

- adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. *The American journal of surgical pathology*, 32(6), 810-827.
- Mugnaini, C., Alongi, M., Togninelli, A., Gevariya, H., Brizzi, A., et al. (2007). *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 6580–6595.
- Munos, B. (2009). Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nature Reviews Drug Discovery* 8: 959–968.
- Myers, D. J. and Wallen, J. M. (2020). Cancer, lung adenocarcinoma. *Treasure Island: StatPearls*.
- Nakajima, Y. I. and Kuranaga, E. (2017). Caspase-dependent non-apoptotic processes in development. *Cell Death & Differentiation*, 24(8), 1422-1430.
- Naves, M. P. C., de Moraes, C. R., de Freitas, V., Ribeiro, D. L., Lopes, D. S., et al. (2021). Mutagenic and genotoxic activities of Phospholipase A2 Bothropstoxin-I from Bothrops jararacussu in *Drosophila melanogaster* and human cell lines. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 1602-1610.
- Negishi, T., Negishi, K., Ryo, H., Kando, S. and Hayatsu, S. (1988) “The genotoxicity of N4-aminocytidine in the *Drosophila* wing spot test”, *Mutagenesis*, 3(1), 11-13.
- Nygren, J., Ristoff, E., Carlsson, K., Möller, L. and Larsson, A. (2005). Oxidative DNA damage in cultured fibroblasts from patients with hereditary glutathione synthetase deficiency. *Free radical research*, 39(6), 595-601.
- O'Brien, M. A. and Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of veterinary emergency and critical care*, 18(6), 572-585.
- Ocana, A., Pandiella, A., Siu, L.L. and Tannock, I.F. (2011). Preclinical development of molecular-targeted agents for cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 8: 200–209.
- Ong, C., Yung, L. Y. L., Cai, Y., Bay, B. H. and Baeg, G. H. (2015). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, 9(3), 396-403
- Ortega-Molina, A. and Serrano, M. (2013). PTEN in cancer, metabolism, and aging. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(4), 184-189.
- Öncel, M. (2012). Isı şok proteinleri ve kanser. *European Journal of Basic Medical Sciences*, 2(1), 16-23.
- Öniz, H., (2004), Apoptoz: Ölmeye Yatmak. *SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi* 14(1):1-20.
- Özata, L. (2006). Bazı tekstil boyaalarının *Drosophila melanogaster* üzerine toksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 67-72.

- Öztaş, H. (2000). Hücre Biyolojisi (Sitoloji), *Bakanlar Media*, 275 s, Erzurum.
- Öztürk, E., Kahveci, N., Özlük, K. ve Yılmazlar, T. (2009). Isı şok proteinleri. *Turkish Journal of Surgery/Ulusal Cerrahi Dergisi*, 25(4).
- Panchal, K. and Tiwari, A. K. (2017). *Drosophila melanogaster* “a potential model organism” for identification of pharmacological properties of plants/plant-derived components. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 1331-1345.
- Park, K. S., Liang, M. C., Raiser, D. M., Zamponi, R., Roach, R. R., et al. (2011). Characterization of the cell of origin for small cell lung cancer. *Cell cycle*, 10(16), 2806-2815.
- Park, M.T. and Lee, S.J. (2003). Cell cycle and cancer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36(1), 60-5.
- Park, W. Y., Miranda, B., Lebeche, D., Hashimoto, G., and Cardoso, W. V. (1998). FGF-10 is a chemotactic factor for distal epithelial buds during lung development. *Developmental Biology*, 201 (2), 125–134.
- Perrimon, N. (1998). New advances in *Drosophila* provide opportunities to study gene functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 9716-9717.
- Peters, T., Lindenmaier, H., Haefeli, W. E. and Weiss, J. (2006). Interaction of the mitotic kinesin Eg5 inhibitor monastrol with P-glycoprotein. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 372,291-299.
- Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S. V., et al. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation*, 28(6),622-629.
- Petrof, E. O., Ciancio, M. J. and Chang, E. B. (2004). Role and regulation of intestinal epithelial heat shock proteins in health and disease. *Chinese journal of digestive diseases*, 5(2), 45-50.
- Pfeffer, C. M. and Singh, A. T. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448.
- Phillips, J. P., Parkes, T. L. and Hilliker, A. J. (2000). Targeted neuronal gene expression and longevity in *Drosophila*. *Experimental gerontology*, 35(9-10), 1157-1164.
- Pignon J.P., Tribodet H, Scagliotti, G.V., Douillard, J.Y., Shepherd, F.A., et al. (2008) Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group, *Journal of Clinical Oncology*, 26(21):3552–3559
- Pinichpongse, S., Doberstyn, E. B., Cullen, J. R., Yisunsri, L., Thongsombun, Y., et al. (1982). An evaluation of five regimens for the outpatient therapy of *falciparum malaria* in Thailand 1980-81. *Bulletin of the World Health Organization*, 60(6), 907.

- Piper, M. D. and Partridge, L. (2018). *Drosophila* as a model for ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1864(9), 2707-2717.
- Pitchakarn, P., Inthachai, W., Karinchai, J. and Temviriyankul, P. (2021). Human Hazard Assessment Using *Drosophila* Wing Spot Test as an Alternative In Vivo Model for Genotoxicity Testing—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9932.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F. and Chiarotto, E. (2004). Oxidative stress and cell signalling. *Current Medicinal Chemistry*. 11(9):1163-82.
- Prashantha, Kumar, B.R., Sankar, G., Nasir, Baig, R.B. and Chandrashekar, S. (2009). Novel Biginelli dihydropyrimidines with potential anticancer activity: A parallel synthesis and CoMSIA study. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44:4192–8.
- Pratt, W. B. and Toft, D. O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Experimental biology and medicine*, 228(2), 111-133.
- Prokop, A. (2016). Fruit flies in biological research. *Biological Sciences Review*, 28(2), 2-5.
- Prokopcová, H., Dallinger, D., Uray, G., Kaan, H. Y. K., Ulaganathan, V., et al. (2010). Structure–activity relationships and molecular docking of novel dihydropyrimidine-based mitotic Eg5 inhibitors. *ChemMedChem*, 5(10), 1760-1769.
- Putatunda, S., Chakraborty, S., Ghosh, S., Nandi, P., Chakraborty, S., et al. (2012). Regioselective N1-alkylation of 3, 4-dihydropyrimidine-2 (1H)-ones: Screening of their biological activities against Ca²⁺-ATPase. *European journal of medicinal chemistry*, 54, 223-231.
- Qian, X., Liu, J., Sun, Y., Wang, M., Lei, H., et al. (2016). Circulating cell-free DNA has a high degree of specificity to detect exon 19 deletions and the single-point substitution mutation L858R in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(20), 29154.
- Radyuk, S. N., Klichko, V. I., Spinola, B., Sohal, R. S. and Orr, W. C. (2001). The peroxiredoxin gene family in *Drosophila melanogaster*. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(9), 1090-1100.
- Rahman, K. (2003). Garlic and a ging: New insights into an old remedy, *Ageing Research Reviews*, 2(1):39-56.
- Ragab, F. A., Abou-Seri, S. M., Abdel-Aziz, S. A., Alfayomy, A. M. and Aboelmagd, M. (2017). Design, synthesis and anticancer activity of new monastrol analogues bearing 1, 3, 4-oxadiazole moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 138, 140-151.
- Rami-Porta, R., Bolejack, V., Giroux, D. J., Chansky, K., Crowley, J., et al. (2014). The IASLC lung cancer staging project: the new database to inform the eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(11), 1618-1624.

- Raut, S., Mallik, B., Parichha, A., Amrutha, V., Sahi, C., et al. (2017). RNAi-mediated reverse genetic screen identified *Drosophila* chaperones regulating eye and neuromuscular junction morphology. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(7), 2023-2038.
- Rebrin, I. and Sohal, R. S. (2008). Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Advanced drug delivery reviews*, 60(13-14), 1545-1552.
- Relli, V., Trerotola, M., Guerra, E. and Alberti, S. (2019). Abandoning the notion of non-small cell lung cancer. *Trends in molecular medicine*, 25(7), 585-594.
- Rezaee, E., Hedayati, M., Rad, L. H., Shahhosseini, S., Faizi, M. et al. (2016). Novel soluble epoxide hydrolase inhibitors with a dihydropyrimidinone scaffold: Design, synthesis and biological evaluation. *MedChemComm*, 7(11), 2128-2135.
- Richardson, H. E., Willoughby, L. and Humbert, P. O. (2015). Screening for anti-cancer drugs in *Drosophila*. *eLS*, 1-14.
- Rioux, N. and Castonguay, A. (1998). Inhibitors of lipoxygenase: a new class of cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis*, 19(8), 1393-1400.
- Rodeiro, I., Cancino, L., González, J. E., Morffi, J., Garrido, G., et al. (2006). Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. *Food and chemical toxicology*, 44(10), 1707-1713.
- Roeder, T., Isermann, K., Kallsen, K., Uliczka, K. and Wagner, C. (2012). A *Drosophila* asthma model—what the fly tells us about inflammatory diseases of the lung. *Recent Advances on Model Hosts*, 37-47.
- Rooney, D. E. and Czepulkowski, B. H. (Eds.). (1986). *Human cytogenetics: a practical approach* (Vol. 16). Oxford University Press.
- Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P. and Bukau, B. (2019). The Hsp70 chaperone network. *Nature reviews molecular cell biology*, 20(11), 665-680.
- Russowsky, D., Canto, R.F.S., Sanches, S.A.A., D'Oca, M.G.M., de Fátima, Â., et al. (2006). Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: Monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues. *Bioorganic Chemistry*, 34:173– 82.
- Saigo, K., Hashimoto, M., Kumagai, S. and Sugimoto, T. (1999). Detection of hematopoietic stem cells by flow cytometry, hematology analyzer or in vitro culture method. *Rinsho byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 124-130.
- Saini, J. and Sharma, P. K. (2018). Clinical, prognostic and therapeutic significance of heat shock proteins in cancer. *Current drug targets*, 19(13), 1478-1490.
- Salvesen, G. S. and Duckett, C. S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(6), 401-410.

- Samis, H.V., Rubenstein, B.J., Zajac, L.A. and Hargen. S.M. (1981). Temporal organization and aging in *Drosophila melanogaster*, *Experimental Gerontoloji*, 16, 109-117.
- Sammar, M., Abu-Farich, B., Rayan, I., Falah, M. and Rayan, A. (2019). Correlation between cytotoxicity in cancer cells and free radical-scavenging activity: In vitro evaluation of 57 medicinal and edible plant extracts. *Oncology Letters*, 18(6), 6563-6571.
- Sarikaya, R. and Çakır, Ş. (2005). Genotoxicity of food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20, 424-430.
- Sarikaya, R. ve Solak, K. (2003). Benzoik asitin *Drosophila melanogaster*' de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile genotoksitesinin araştırılması. *Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 23 (3), 19-32.
- Sarkar, S. and Roy, S. (2017). A mini review on heat shock proteins (HSPs): special emphasis on heat shock protein70 (HSP70). *BN Seal Journal of Science*, 9(1), 130-9.
- Schabath, M. B. and Cote, M. L. (2019). Cancer progress and priorities: lung cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 28(10), 1563-1579.
- Schlatter, J., Würgler, F.E., Kranzlin, R., Maier, P., Holliger, E. et al. (1992). The potential genotoxicity of sorbates: Effects on cell cycle in vitro in V79 cells and somatic mutations in *Drosophila*. *Food and Chemical Toxicology*, 30 (10), 843-851.
- Scott, H. and Gregory, J. G. (2000). Apoptosis in cancer: Cause and cure. *BioEssays*, 22(11), 1007-1017.
- Selby, P.B. and Olsen, W.H. (1981) "Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate in mice indicate positive, negative or inconclusive result", *Mutation Research*, 203, 297-308.
- Shamim, S., Khan, K. M., Salar, U., Ali, F., Lodhi, M. A., et al. (2018). 5-Acetyl-6-methyl-4-aryl-3, 4-dihydropyrimidin-2 (1H)-ones: As potent urease inhibitors; synthesis, in vitro screening, and molecular modeling study. *Bioorganic chemistry*, 76, 37-52.
- Sharpe, J. L., Morgan, J., Nisbet, N., Campbell, K. and Casali, A. (2023). Modelling Cancer Metastasis in *Drosophila melanogaster*. *Cells*, 12(5), 677.
- Sherman, M. and Multhoff, G. (2007). Heat shock proteins in cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* Oct;1113:192-201.
- Shim, H. S., Lee, D. H., Park, E. J. and Kim, S. H. (2011). Histopathologic characteristics of lung adenocarcinomas with epidermal growth factor receptor mutations in the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society lung adenocarcinoma classification. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 135(10), 1329-1334.

- Singh, K., Arora, D., Poremsky, E., Lowery, J. and Moreland, R. S. (2009). N1-Alkylated 3, 4-dihydropyrimidine-2 (1H)-ones: Convenient one-pot selective synthesis and evaluation of their calcium channel blocking activity. *European journal of medicinal chemistry*, 44(5), 1997-2001.
- Singh, N., Kaur, J., Kumar, P., Gupta, S., Singh, N., et al. (2009). An orally effective dihydropyrimidone (DHPM) analogue induces apoptosis-like cell death in clinical isolates of *Leishmania donovani* overexpressing pteridine reductase 1. *Parasitology research*, 105, 1317-1325.
- Singh, R., Letai, A. and Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(3), 175-193.
- Sivanandham, V. (2011). Free radicals in health and diseases-a mini review. *Pharmacologyonline*, 1(1), 1062.
- Sohal, R. S., Arnold, L. and Orr, W. C. (1990). Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺ in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of ageing and development*, 56(3), 223-235.
- Sondhi, S. M., Goyal, R. N., Lahoti, A. M., Singh, N., Shukla, R., et al. (2005). Synthesis and biological evaluation of 2-thiopyrimidine derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(9), 3185-3195.
- Song, Z., McCall, K. and Steller, H. (1997). DCP-1, a *Drosophila* cell death protease essential for development. *Science*, 275(5299), 536-540.
- Soni, R., Singh, G., Kaur, R., Kaur, G., Gill, R.K., et al. (2014). Chemistry & biology interface, *Chemistry & Biology*. 4.163e175.
- Soumyanarayanan, U., Bhat, V. G., Kar, S. S. and Mathew, J. A. (2012). Monastrol mimic Biginelli dihydropyrimidinone derivatives: synthesis, cytotoxicity screening against HepG2 and HeLa cell lines and molecular modeling study. *Organic and medicinal chemistry letters*, 2, 1-11.
- Staats, S., Lüersen, K., Wagner, A. E. and Rimbach, G. (2018). *Drosophila melanogaster* as a versatile model organism in food and nutrition research. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(15), 3737-3753.
- Stefani, H. A., Oliveira, C. B., Almeida, R. B., Pereira, C. M., Braga, R. C., et al. (2006). Dihydropyrimidin-(2H)-ones obtained by ultrasound irradiation: a new class of potential antioxidant agents. *European journal of medicinal chemistry*, 41(4), 513-518.
- Steller, H. (2008). Regulation of apoptosis in *Drosophila*. *Cell Death & Differentiation*, 15(7), 1132-1138.

- Stratton, M. R. (2011). Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *science*, 331(6024), 1553-1558.
- Sulli, G., Lam, M. T. Y. and Panda, S. (2019). Interplay between circadian clock and cancer: new frontiers for cancer treatment. *Trends in cancer*, 5(8), 475-494.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., et al. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249.
- Suster, D. I. and Mino-Kenudson, M. (2020). Molecular pathology of primary non-small cell lung cancer. *Archives of Medical Research*, 784-798.
- Suttisansanee, U., Pitchakarn, P., Ting, P., Inthachai, W., Thiyajai, P., et al. (2021). Health-promoting bioactivity and in vivo genotoxicity evaluation of a hemiepiphyte fig, *Ficus dubia*. *Food Science & Nutrition*, 9(4), 2269-2279.
- Svetlik, J., Veizerová, L., Mayer, T.U. and Catarinella, M. (2010). Monastrol analogs: A synthesis of pyrazolopyridine, benzopyranopyrazolopyridine, and oxygen-bridged azolopyrimidine derivatives and their biological screening, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 4073-4076.
- Şentürk, M. (2018). *Lactobacillus plantarum* suşunun sekonder metabolitleri ve biyoaktivitelerinin moleküler düzeyde araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 36-46.
- Şuekinci Yılmaz, A. (2016). Dihidropirimidin-2-on bileşiklerinin sentez yöntemleri. Doktora tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 9-12.
- Tang, Y.C., Chang, H.C., Hayer-Hartl, M. and Hartl, F.U. (2007). SnapShot: molecular chaperones, Part II. *Cell* 128, 412.
- Taşkonak, B. (2021). Hiperisin Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinde Etkilerinin Araştırılması. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 5-7.
- Tcherniuk, S., van Lis, R., Kozielski, F. and Skoufias, D. A. (2010). Mutations in the human kinesin Eg5 that confer resistance to monastrol and S-trityl-L-cysteine in tumor derived cell lines. *Biochemical pharmacology*, 79(6), 864-872.
- Temel, M. K. (2015). Sitotoksik kemoterapötiklerin yirminci yüzyıldaki gelişimi. *Turkish Journal of Oncology/Türk Onkoloji Dergisi*, 30(1).
- Teracciano, S., Chini, M. G., Vaccaro, M. C., Strocchia, M., Foglia, A., et al. (2016). Identification of the key structural elements of a dihydropyrimidinone core driving toward more potent Hsp90 C-terminal inhibitors. *Chemical Communications*, 52(87), 12857-12860.

- Thomas, X., Campos, L., Mounier, C., Cornillon, J., Flandrin, P., et al. (2005). Expression of heat-shock proteins is associated with major adverse prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leukemia research*, 29(9), 1049-1058.
- Tiwari, A. K. (2004). Antioxidants: new-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Current science*, 1092-1102.
- Toba, G. and Aigaki, T. (2000). Disruption of the microsomal glutathione S-transferase-like gene reduces life span of *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 253(2), 179-187.
- Tokur, O. ve Aksoy, A. (2017). In vitro sitotoksosite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.
- Tower J. (2009). Hsps and aging. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20:216–22.
- Turna Demir, F. (2022). Trimetilolpropan triakrilat'ın potansiyel toksik, genotoksik ve mutajenik etkilerinin *Drosophila melanogaster* kullanılarak araştırılması.
- Ulasli, S. S., Celik, S., Gunay, E., Ozdemir, M., Hazman, O., et al. (2013). Anticancer effects of thymoquinone, caffeic acid phenethyl ester and resveratrol on A549 non-small cell lung cancer cells exposed to benzo (a) pyrene. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(10), 6159-6164.
- Ulusal Kanser Kontrol Planı. T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. http://www.iccpportal.org/sites/default/files/plans/Ulusal_Kanser_Kontrol_Plani_2013_2018.pdf 8.3.2016.
- Uysal, H., Şişman, T. ve Aşkın, H. (2006). *Drosophila* Biyolojisi ve Çaprazlama Yöntemleri. Erzurum, Türkiye, Atatürk Üniversitesi Yayınları, 53 pp.
- van Schaik, N. and Graf, U. (1991). Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressants in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 260(1), 99-104.
- Van Zandt, M. C., Jones, M. L., Gunn, D. E., Geraci, L. S., Jones, J. H., et al. (2005). Discovery of 3-[(4, 5, 7-trifluorobenzothiazol-2-yl) methyl] indole-N-acetic acid (lidorestat) and congeners as highly potent and selective inhibitors of aldose reductase for treatment of chronic diabetic complications. *Journal of medicinal chemistry*, 48(9), 3141-3152.
- Vasconcelos, P. F. D. C. (2003). Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 275-293.
- Vaux, D. L. and Silke, J. (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(4), 287-297.
- Vidal, M., Wells, S., Ryan, A. and Cagan, R. (2005). ZD6474 suppresses oncogenic RET isoforms in a *Drosophila* model for type 2 multiple endocrine neoplasia syndromes and papillary thyroid carcinoma. *Cancer research*, 65(9), 3538-3541.

- Vidyasagar, A., Wilson, N. A. and Djamali, A. (2012). Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis & tissue repair*, 5, 1-7.
- Vijesh, A. M., Isloor, A. M., Peethambar, S. K., Shivananda, K. N., Arulmoli, T., et al. (2011). Hantzsch reaction: synthesis and characterization of some new 1, 4-dihydropyridine derivatives as potent antimicrobial and antioxidant agents. *European journal of medicinal chemistry*, 46(11), 5591-5597.
- Virginia, S. H. (1992). The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 277(2), 91-138.
- Vogel, E. W. (1992). Tests for recombinagens in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 284(1), 159-175.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz Jr, L. A., et al. (2013). Cancer genome landscapes. *Science*, 339(6127), 1546-1558.
- Vural, N. (2005). "Toksikoloji", Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 115-129.
- Wahabi, K., Perwez, A. and Rizvi, M. A. (2022). Antioxidant in Cancer: Preventer, Promoter or an Achilles Heel. In *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Therapeutic Aspects* (pp. 1-16). Singapore: Springer Singapore.
- Wan, B., Lang, J., Wang, P. and Ma, C. M. (2016). Treatment optimization with concurrent SBRT and intracavitary brachytherapy for locally advanced cervical cancer. *Journal of applied clinical medical physics*, 17(1), 70-79.
- Wang, H. H., Mao, C. Y., Teng, L. S. and Cao, J. (2006). Recent advances in heat shock protein-based cancer vaccines. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT*, 5(1), 22-27.
- Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., et al. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9(5), 521.
- Wang, M., Herbst, R. S. and Boshoff, C. (2021). Toward personalized treatment approaches for non-small-cell lung cancer. *Nature medicine*, 27(8), 1345-1356.
- Waqar, S. N. and Morgensztern, D. (2017). Treatment advances in small cell lung cancer (SCLC). *Pharmacology & therapeutics*, 180, 16-23.
- Westerheide, S. D. and Morimoto, R. I. (2005). Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33097-33100.
- Whitworth, A. J., Wes, P. D. and Pallanck, L. J. (2006). *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson's disease. *Drug discovery today*, 11(3-4), 119-126.

- WHO, (2021). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Global Cancer Observatory (İnternette) 2021. Erişim 15.08.2021, <https://gco.iarc.fr/today/home>
- WHO, (2021). World Health Organization, IARC-The International Agency for Research on Cancer, Cancer Today. (<https://gco.iarc.fr/today/home>).
- Williams, G. H. and Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. *The Journal of pathology*, 226(2), 352-364.
- Witsch, E., Sela, M. and Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)* 25, 85–101.
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 30(1), 1-14.
- World Health Organization. (2020). WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. *World Health Organization*. pp 160.
- Wright, C. M., Chovatiya, R. J., Jameson, N.E., Turner, D. M., Zhu, G., et al. (2008). Pyrimidinone-peptoid hybrid molecules with distinct effects on molecular chaperone function and cell proliferation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16:3291–301.
- Wurgler, F.E and Vogel, E.W. (1986).” In vivo mutagenicity testint using somatic cells of *Drosophila melanogaster* in Chemical Mutagens, Principles and Medhods for their detection” Würgler FE and Vogel EW(editors). Vol.10., *Plenum Press*, 1-73.pp., New York.
- Xu, D., Woodfield, S. E., Lee, T. V., Fan, Y., Antonio, C., et al. (2009). Genetic control of programmed cell death (apoptosis) in *Drosophila*. *Fly*, 3(1), 78-90.
- Yamamura, R., Ooshio, T. and Sonoshita, M. (2021). Tiny *Drosophila* makes giant strides in cancer research. *Cancer Science*, 112 (2), 505–514.
- Yang, L., Zeng, Y., Wu, H., Zhou, C. and Tao, L. (2020). An antioxidant self-healing hydrogel for 3D cell cultures. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(7), 1383-1388.
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M., and Ashwell, J. D. (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*, 288(5467), 874-877.
- Yarım, M., Saraç, S., Kılıç, F. S. and Erol, K. (2003). Synthesis and in vitro calcium antagonist activity of 4-aryl-7, 7-dimethyl-1, 7, 7-trimethyl-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8-octahydroquinazoline-2, 5-dione derivatives. *Il Farmaco*, 58(1), 17-24.
- Yazgan, B., Mesci, S., Aksahin, M., Ayar, A., Gül, M., et al. (2021). Phtad-Substituted Dihydropyrrole Compounds Regulate Apoptotic Cell Death İn Mcf-7 Cells. *Erzincan University Journal Of Science And Technology*, 14(2), 737-750.
- Ye, Q., Liu, K., Shen, Q., Li, Q., Hao, J., et al. (2019). Reversal of Multidrug Resistance in Cancer by Multi-Functional Flavonoids. *Front Oncol*, 9, 487.

- Yılmazbayhan, D. ve Özlük, Y. (2010). Küçük Hücre Dışı Akciğer Karsinomlarında Patoloji.
- Yokuş, B. ve Çakır, Ü. D. (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1 (2): 7-18.
- Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K. and Hartl, F. U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(10), 781-791.
- Young, R. R. (2002). Genetic toxicology: web resources. *Journal of Toxicology*, 173 (1-2), 103- 121.
- Zeiger, E. (2004). History and rationale of genetic toxicity testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and molecular mutagenesis*, 44(5), 363-371.
- Zhou, C., Wu, Y. L., Chen, G., Liu, X., Zhu, Y., et al. (2015). Beyond: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, phase III study of first-line carboplatin/paclitaxel plus bevacizumab or placebo in Chinese patients with advanced or recurrent nonsquamous non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(19), 2197-2204.
- Zordan, M., Osti, M., Pesce, M. and Costa, R. (1994). Chloral hydrate is recombinogenic in the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 322(2), 111-116.
- Zorkun, I. S., Saraç, S., Çelebi, S., and Erol, K. (2006). Synthesis of 4-aryl-3, 4-dihydropyrimidin-2 (1H)-thione derivatives as potential calcium channel blockers. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(24), 8582-8589.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Mehmet FİDAN

Yabancı Dili

İngilizce

Bilimsel Faaliyetler (Yayınlar, Bildiriler, Katıldığı Projeler)

Yayınlar

- Fidan, M., & Ayar, A. (2023). A Toxicity Study On Daphnia Magna And Artemia Salina: Are Paper Cups Safe? *International Journal Of Science Letters*, 5(1), 330-344.
- Fidan, M., & Ayar, A. (2023). Investigation of effect of probiotic use on organism behaviours in *Drosophila melanogaster*. *Sabuncuoglu Serefeddin Health Sciences*, 4(3), 1-13.
- Fidan, M., & Ayar, A. (2021). Modulatory effects of white tea (*Camellia sinensis* L.) on genotoxicity in streptozotocin and cyclophosphamide-treated *Drosophila melanogaster*. *Progress in Nutrition*, 23(3).
- Fidan, M., & Ayar, A. (2021). An investigation of the toxic effects of water samples collected from 3 different regions of antarctica on *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Science Letters*, 3(2), 97-108.
- Ayar, A., Çolak, D. A., Uysal, H., & Fidan, M. (2021). Lifespan in *Drosophila melanogaster* Feeding with White Tea. *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 14(2), 582-594.
- Fidan, M., & Ayar, A. (2021). Comparison of The Effects of Different Forms of Green Tea on Fecundity in *Drosophila Melanogaster*. *Sabuncuoglu Serefeddin Health Sciences*, 3(2), 26-40.
- Fidan, M. (2021). The Effect Of Stress On Learning in Male And Female Individuals in *Drosophila melanogaster* in T And Y Maze Models. *Sabuncuoglu Serefeddin Health Sciences*, 3(3), 1-14.
- Fidan, M., Ayar, A., Konar, V. (2020). Effects of Perga (Bee bread) on Metamorphosis, Mortality, and Fecundity in *Drosophila melanogaster*. *Sabuncuoglu Serefeddin Health Sciences*, 2(2), 1-15.
- Fidan, M., & Ayar, A. (2020). An *in vivo* Study On *Drosophila melanogaster*, *Artemia salina*, And *Daphnia magna*: Is Activated Carbon Used As A Food Additive Reliable? *International Journal Of Science Letters*, 2(2), 79-91.