

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**ALDEHİT FONKSİYONEL GRUBU İÇEREN YENİ NESİL
BENZOTİYOFEN TÜREVLERİNİN ANTİ-KARSİNOJENİK VE
ANTİ-İNFLAMATUAR AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HALE AYŞE KARAMAN

DENİZLİ, KASIM-2023

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**ALDEHİT FONKSİYONEL GRUBU İÇEREN YENİ NESİL
BENZOTİYOFEN TÜREVLERİNİN ANTİ-KARSİNOJENİK VE
ANTİ-İNFLAMATUAR AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HALE AYŞE KARAMAN

DENİZLİ, KASIM-2023

**Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
tarafından 2022FEBE057 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Hale Ayşe KARAMAN

ÖZET

**ALDEHİT FONKSİYONEL GRUBU İÇEREN YENİ NESİL
BENZOTİYOFEN TÜREVLERİNİN ANTİ-KARSİNOJENİK VE
ANTİ-İNFLAMATUAR AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
HALE AYŞE KARAMAN
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ŞEVKİ ARSLAN)

DENİZLİ, KASIM - 2023

Kanser, fizyolojik özelliklerini kaybetmiş, DNA hasarlı yani mutasyonlu hücrelerin, kontrolsüz bir şekilde çoğalmasdır. Kanser birçok çeşidi vardır ve bugüne kadarki birçok ilerlemeye rağmen, tedaviye direnç mevcut bir tehdit olmaktadır ve çoğu durumda nüksetmeye yol açmaktadır. Tiyofen içeren heterosiklik bileşiklerin ise kansere özgü proteinleri hedef aldığı, önemli sinyal yollarının inhibisyonuna veya aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Kükürt heterosiklik ailesi, fizikokimyasal özellikler gösteren oldukça kararlı aromatik bileşikler içermektedir. Son yıllarda, yürütülen çalışmalar ile tiyofen içeren heterosiklik bileşikler antikanser, antioksidan, antifungal, antibakteriyel, antiparazit gibi özellikleri nedeniyle sağlık alanında büyük önem taşımaktadır. Benzotiyofen en iyi bilinen heteroaromatik yapılar arasındadır ve türevleri ise ortaya çıkan farmakolojik özellikleri sebebiyle kanser araştırmalarında popüler hale gelmiştir. Raloksifen ve Tamoksifen tedavi amacıyla ilaç olarak kullanılan Benzotiyofen türevlerine örnek oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında Aldehit fonksiyonel grubu içeren yeni nesil Benzotiyofen türevlerinin İnsan Akciğer Kanseri (A549), İnsan Serviks Kanseri (HeLa), İnsan Kolorektal Kanseri (CaCo-2), İnsan Meme Kanseri (MDA-MB-231) hücre hatlarında sitotoksik, anti-karsinojenik ve anti-inflamatuar aktiviteleri belirlenmiştir. Sentezlenen Q18, Q19, Q20 bileşikler Caco-2, MDA, HeLa hücre hatlarında önemli apoptotik etkiye sahipken Q21 bileşiğinin çalışmada kullanılan hücrelere karşı sitotoksik etkisi olmadığı saptanmıştır. mRNA düzeyleri Gerçek Zamanlı PZR yöntemi ile kantite edilerek elde edilen sonuçlarda Q18, Q19, Q20 bileşikler HeLa ve MDA hücre hattında apoptoz ile ilişkili genleri (BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, CASP9) indüklediği saptanmıştır. Ayrıca kullanılan bileşiklerin tümü proinflamatuar genlerin (COX-2, iNOS, IL-6, TNF- α) ekspresyon seviyelerini yüksek oranda inhibe ettiği saptanmıştır. Çalışma sonucu belirtilen benzotiyofen türevlerinin apoptoz indüksiyonuna sebep olduğu ve sitotoksik etki gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Sonuçta, bu tez çalışması için sentezlenen benzotiyofen türevlerinin kanser tedavisinde ve anti-inflamatuar olarak kullanılma potansiyeli olabileceğini göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Benzotiyofen, Anti-karsinojenik, Sitotoksikite, Apoptoz, Anti-inflamatuar

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTI-CARCINOGENIC AND ANTI- INFLAMMATORY ACTIVITIES OF NEW GENERATION BENZOTHIOPHENE DERIVATIVES CONTAINING ALDEHYDE FUNCTIONAL GROUP

MSC THESIS

HALE AYSE KARAMAN

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. ŞEVKİ ARSLAN)

DENİZLİ, NOVEMBER 2023

Cancer is the uncontrolled proliferation of cells with DNA damage, that is, mutations, that have lost their physiological properties. There are many types of cancer, and despite many advances to date, resistance to treatment remains a current threat, leading to recurrence in many cases. It is known that thiophene-containing heterocyclic compounds target cancer-specific proteins, causing inhibition or activation of important signaling pathways. The sulfur heterocyclic family includes highly stable aromatic compounds that exhibit physicochemical properties. In recent years, with the studies carried out, heterocyclic compounds containing thiophene have great importance in the field of health due to their properties such as anticancer, antioxidant, antifungal, antibacterial and antiparasitic. Benzothiophene is among the best-known heteroaromatic structures, and its derivatives have become popular in cancer research due to their emerging pharmacological properties. Raloxifene and Tamoxifen are examples of benzothiophene derivatives used as drugs for therapeutic purposes. In this thesis study, new generation Benzothiophene derivatives containing Aldehyde functional group have cytotoxic, anti- and anti-toxic effects on Human Lung Cancer (A549), Human Cervix Cancer (HeLa), Human Colorectal Cancer (Caco-2), Human Breast Cancer (MDA-MB-231) cell lines. Carcinogenic and anti-inflammatory activities have been determined. While the synthesized Q18, Q19, Q20 compounds had a significant apoptotic effect on Caco-2, MDA, HeLa cell lines, it was determined that the Q21 compound had no cytotoxic effect against the cells used in the study. In the results obtained by quantifying mRNA levels with the Real-Time PCR method, it was determined that compounds Q18, Q19, Q20 induced apoptosis-related genes (BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, CASP9) in HeLa and MDA cell lines. In addition, all of the compounds used were found to highly inhibit the expression levels of pro-inflammatory genes (COX-2, iNOS, IL-6, TNF- α). As a result of the study, it was revealed that the mentioned benzothiophene derivatives caused apoptosis induction and had cytotoxic effects. As a result, it has been shown that the benzothiophene derivatives synthesized for this thesis study may have the potential to be used in cancer treatment and as anti-inflammatory.

KEYWORDS: Benzothiophene, Anti-carcinogenic, Cytotoxicity, Apoptosis, Anti-inflammatory

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Kanser.....	2
1.2 Benzotiyofen ve Türevleri.....	8
1.3 Apoptoz	12
1.4 İnflamasyon	13
1.5 Tezin Amacı.....	13
2. MATERYAL VE METOT.....	15
2.1 Malzemeler	15
2.1.1 Kullanılan Kimyasallar.....	15
2.1.2 Kullanılan Cihazlar.....	15
2.1.3 Kullanılan Primerler	15
2.2 Yöntemler	16
2.2.1 Benzotiyofen Türevlerinin Sentezi.....	16
2.2.1.1 2-Hidroksi-4-((2-(metiltiyo)fenil)etinin)benzaldehit (4) Sentezi	17
2.2.1.2 Trimetil((2-(metiltiyo)fenil)etinin)silan (2) Sentezi	17
2.2.1.3 (2-Etinilfenil)(metil)sülfan (3) Sentezi	18
2.2.1.4 2-Hidroksi-4-((2-(metiltiyo)fenil)etinin)benzaldehit (4) Sentezi	18
2.2.2 2-(Aril/Alkil-oksi)-4-((2-(metiltiyo)fenil)etinin)benzaldehit (5, 6 ve 7) Türevlerinin Sentezi Genel Prosedür A:.....	19
2.2.2.1 2-(Benziloksi)-4-((2-(metiltiyo)fenil)etinin)benzaldehit (5) Sentezi	19
2.2.2.2 4-((2-(Metiltiyo)fenil)etinin)-2-(3-fenilpropoksi)benzaldehit (6) Sentezi.....	20
2.2.2.3 2-Hidroksi-4-((2-(metiltiyo)fenil)etinin)benzaldehit (7) Sentezi	20
2.2.3 Elektrofilik Halkalaşma tepkimesi ile 3-iyodobenzotiyofen (9, 10 ve 11) türevlerinin Genel Sentez Prosedür B:.....	20
2.2.3.1 2-Hidroksi-4-(3-iyodobenzo[b]tiyofen-2-il)benzaldehit (9) Sentezi	21
2.2.3.2 2-(Benziloksi)-4-(3-iyodobenzo[b]tiyofen-2-il)benzaldehit (Q18) Sentezi	21
2.2.3.3 2-(Desiloksi)-4-(3-iyodobenzo[b]tiyofen-2-il)benzaldehit (Q21) Sentezi	22

2.2.3.4	4-(3-İyodobenzo[b]tiyofen-2-il)-2-(3-fenilpropoksi)benzaldehit (Q22) Sentezi.....	23
2.2.4	2-(Benziloksi)-4-(3-(feniletinil)benzo[b]tiyofen-2-il)benzaldehit (Q19).....	23
2.2.5	Q20 ve Q23 türevlerinin Sentezi.....	24
2.2.5.1	2-(Hegziloksi)-4-(3-iyodobenzo[b]tiyofen-2-il)benzaldehit (Q20)	24
2.2.5.2	4-(3-İyodobenzo[b]tiyofen-2-il)-2-(4-fenilbütoksi)benzaldehit (Q23)	25
2.2.6	Memeli Hücre Kültürü Yöntemi ve Sitotoksitenin Belirlenmesi.....	25
2.2.7	Hücre Sayımı ve Stoklanması	26
2.2.8	MTT Yöntemi ile Hücre Canlılık Testi	27
2.2.9	Apoptoz Analizleri	27
2.2.10	İnflamatuar Analizleri	28
2.2.1	cDNA Sentezi Yöntemi	29
2.2.2	Total RNA İzolasyon Yöntemi	29
2.2.3	Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi.....	30
2.2.4	Real Time PCR (qRT-PCR) Tespit Edilmesi	30
2.2.5	İstatistik Analizi	32
3.	BULGULAR.....	33
3.1	Hücre Kültürü ve Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi	33
3.2	Apoptotik Aktivitenin Belirlenmesi.....	64
3.2.1	Annexin V/FITC ve PI Boyaması ile Apoptozun Belirlenmesi.....	64
3.3	Apoptoz Yolağı İle İlişkili Genlerin mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Belirlenmesi	69
3.4	Anti-inflamatuar aktivitenin belirlenmesi	82
3.4.1	İnflamatuar Yolağı İle İlişkili Genlerin mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Belirlenmesi	89
4.	TARTIŞMA.....	93
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	100
6.	KAYNAKLAR	102
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	106

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Kanser hücresinin ayırt edici özellikleri. (Hanahan ve diğ. 2022)	3
Şekil 1.2. Globocan 2020 tahmini yeni vaka sayısı ve kanser türlerine göre dağılımı (Globocan, 2020).	6
Şekil 1.3. Benzotiyofen bileşiği. Benzen halkasının (2) tiyofen halkasına (1) 4,5-pozisyonlarında bağlandığı bir bisiklik (3) bileşiktir.	10
Şekil 1.4. Apoptozun Ekstrinsik ve İntrinsik Yolakları (Ghobrial ve diğ. 2005).	12
Şekil 2.1. Benzotiyofen türevinin sentezlenmesi.	16
Şekil 3.1. Q18 Bileşiğinin HEK293 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi.....	34
Şekil 3.2. Q19 Bileşiğinin HEK293 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi.....	35
Şekil 3.3. Q20 Bileşiğinin HEK293 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi.....	36
Şekil 3.4. Q21 Bileşiğinin HEK293 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi.....	37
Şekil 3.5. Q22 Bileşiğinin HEK293 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi.....	38
Şekil 3.6. Q23 Bileşiğinin HEK293 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi.....	39
Şekil 3.7. Q18 Bileşiğinin A549 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi	40
Şekil 3.8. Q19 Bileşiğinin A549	41
Şekil 3.9. Q20 Bileşiğinin A549	42
Şekil 3.10. Q21 Bileşiğinin A549 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi	43
Şekil 3.11. Q22 Bileşiğinin A549.....	44
Şekil 3.12. Q23 Bileşiğinin A549.....	45
Şekil 3.13. Q18 Bileşiğinin Caco-2	46
Şekil 3.14. Q19 Bileşiğinin Caco-2	47
Şekil 3.15. Q20 Bileşiğinin Caco-2 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi	48
Şekil 3.16. Q21 Bileşiğinin Caco-2	49
Şekil 3.17. Q22 Bileşiğinin Caco-2	50
Şekil 3.18. Q23 Bileşiğinin Caco-2 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi	51
Şekil 3.19. Q18 Bileşiğinin HeLa.....	52
Şekil 3.20. Q19 Bileşiğinin HeLa Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi	53
Şekil 3.21. Q20 Bileşiğinin HeLa Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi	54
Şekil 3.22. Q21 Bileşiğinin HeLa Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi	55
Şekil 3.23. Q22 Bileşiğinin HeLa.....	56
Şekil 3.24. Q23 Bileşiğinin HeLa Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi	57
Şekil 3.25. Q18 Bileşiğinin MDA-MB-231 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi	58
Şekil 3.26. Q19 Bileşiğinin MDA-MB-231 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi	59
Şekil 3.27. Q20 Bileşiğinin MDA-MB-231 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi	60
Şekil 3.28. Q21 Bileşiğinin MDA-MB-231 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi	61
Şekil 3.29. Q22 Bileşiğinin MDA-MB-231 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi	62

Şekil 3.30. Q23 Bileşiğinin MDA-MB-231 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi	63
Şekil 3.31. Caco-2 hücrelerinde canlı, ölü, erken ve geç apoptotik hücre dağılımları	65
Şekil 3.32. A549 hücrelerinde canlı, ölü, erken ve geç apoptotik hücre dağılımları	66
Şekil 3.33. HeLa hücrelerinde canlı, ölü, erken ve geç apoptotik hücre dağılımları	67
Şekil 3.34. MDA-MB-231 hücrelerinde canlı, ölü, erken ve geç apoptotik hücre dağılımları.....	68
Şekil 3.35. Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü.....	69
Şekil 3.36. Q18 Bileşiğinin Caco-2 hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri.	70
Şekil 3.37. Q19 Bileşiğinin Caco-2 hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri.	71
Şekil 3.38. Q20 Bileşiğinin Caco-2 hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri.	72
Şekil 3.39. Q18 Bileşiğinin A549 hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri.	73
Şekil 3.40. Q18 Bileşiğinin HeLa hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri.	74
Şekil 3.41. Q19 Bileşiğinin HeLa hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri.	75
Şekil 3.42. Q20 Bileşiğinin HeLa hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri.	76
Şekil 3.43. Q22 Bileşiğinin HeLa hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri.	77
Şekil 3.44. Q23 Bileşiğinin HeLa hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri.	78
Şekil 3.45. Q18 Bileşiğinin MDA-MB-231 hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri.	79
Şekil 3.46. Q19 Bileşiğinin MDA-MB-231 hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri.	80
Şekil 3.47. Q20 Bileşiğinin MDA-MB-231 hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri.	81
Şekil 3.48. Q18 Bileşiğinin RAW264.7 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi .	82
Şekil 3.49. Q19 Bileşiğinin RAW264.7 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi .	83
Şekil 3.50. Q20 Bileşiğinin RAW264.7 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi .	84
Şekil 3.51. Q21 Bileşiğinin RAW264.7 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi .	85
Şekil 3.52. Q22 Bileşiğinin RAW264.7 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi .	86
Şekil 3.53. Q23 Bileşiğinin RAW264.7 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi .	87
Şekil 3.54. RAW264.7 Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü.	88
Şekil 3.55. RAW264.7 hücre hattında inflamatuvar ile ilişkili olan <i>Cox-2</i> geni mRNA ekspresyon seviyesindeki değişim.	89
Şekil 3.56. RAW264.7 hücre hattında inflamatuvar ile ilişkili olan <i>iNOS</i> geni mRNA ekspresyon seviyesindeki değişim.	90
Şekil 3.57. RAW264.7 hücre hattında inflamatuvar ile ilişkili olan	91
Şekil 3.58. RAW264.7 hücre hattında inflamatuvar ile ilişkili olan	92

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Proje kapsamında mRNA seviyelerine bakılacak proteinlerin primer dizileri	16
Tablo 2.2. İnflamatuar analizinde seçilen genler için tanımlanan primer dizileri.	29
Tablo 2.3. Apoptoz ilişkili genlerin primer dizileri.	31
Tablo 3.1. Bileşiklerin EC50 değerleri (μM)	64
Tablo 3.2. Anti-inflamatuar aktivitenin belirlenmesi için seçilen toksik etki göstermeyen konsantrasyonlar	88

SEMBOL LİSTESİ

°C: Celcius derecesi

M: Molarite

EC50: Etkili konsantrasyon

mg: Miligram

mL: Mililitre

mM: Milimolar

µg: Mikrogram

µL: Mikrolitre

µM: Mikromolar

dH₂O: Distile su

rpm: Dakikadaki devir sayısı

PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

DMSO: Dimetilsulfoksit FBS: Fetal sığır serumu

DMEM: Dulbecco Modifiye Eagle Medyum

RPMI : Roswell Park Memorial Enstitü

cDNA: Komplementer DNA

dNTP: 2'-deoksinükleozid 5'-trifosfat

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asid

SERM: Seçili Ösrojen Reseptör Modülatörü

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

mRNA: mesajcı RNA

qRT-PZR: Gerçek zamanlı kantitatif polimer zincir reaksiyonu

RNA: Ribonükleik asit

DNA: Deoksiribonükleik asit

CO₂: Karbondioksit

DSÖ: Dünya sağlık örgütü

IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

FDA: ABD Gıda ve İlaç Dairesi

TAM: Tamoksifen

NCI: Ulusal Kanser Enstitüsü

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

LPO: Lipid Peroksidasyonu

ÖNSÖZ

“Aldehit fonksiyonel grubu içeren yeni nesil benzotiyofen türevlerinin anti-karsinojenik ve anti-inflamatuar aktivitelerinin belirlenmesi” tezi Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Anabilim Dalı’nda, Prof. Dr. Şevki ARSLAN’ın danışmanlığı altında Moleküler Biyokimya Laboratuvarı’nda deneyleri gerçekleştirilmiş olup yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Tiyofen içeren heterosiklik bileşiklerin, kansere özgü proteinleri hedef aldığı, önemli sinyal yollarının inhibisyonuna veya aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Son yıllarda, yürütülen çalışmalar ile tiyofen içeren heterosiklik bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Heteroaromatik bileşikler antikanser, antioksidan, antifungal, antibakteriyel gibi özellikleri nedeniyle sağlıkta büyük önem taşımaktadır. Heteroaromatik yapılar arasında benzotiyofen türevleri, ortaya çıkan farmakolojik özellikleri ile son yıllarda kanser araştırmaları ve ilaç geliştirme çalışmalarında önem kazanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim boyunca zamanını, bilgisini ve tecrübelerini aktaran, maddi-manevi desteklerini esirgemeyen ve bu çalışmanın yürütülmesini sağlayan değerli tez danışmanım Prof. Dr. Şevki ARSLAN’a;

Yüksek lisans tez savunmamda bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN’a ve Doç. Dr. Can YILMAZ’a;

Projeye maddi imkanlarını sunan, Pamukkale Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne;

Ayrıca tezimde sentezlenen organik türevler TÜBİTAK 121C436 nolu proje kapsamında sentezlenmiştir. TÜBİTAK’a teşekkürlerimi sunarım.

Aynı çalışma ortamını paylaştığım, desteklerini esirgemeyen Dr. Doğukan MUTLU’ya, Amine Hafis ABDELSALAM’a, Shayesteh POORHOSEIN’e, Kübra KOCABIYIK’a, Sibel ZEYBEK’e ve diğer sevgili laboratuvar arkadaşlarıma;

Bana destek olan ve beni motive eden canım ev arkadaşım Gülnar ASHYROVA’ya;

Son olarak, bana inanan, sevgisini ve maddi-manevi desteklerini esirgemeyen, eğitim hayatım süresince yanımda olan aileme; annem Emine KARAMAN’a ve babam Abdullah KARAMAN’a ve canım ablam Hilal KARAMAN’a, kardeşlerim Feyza Güner KARAMAN’a ve İbrahim KARAMAN’a şükranlarımı sunuyorum.

Hale Ayşe KARAMAN

1. GİRİŞ

Hücre metabolizması, yaşam ve ölüm kararlarını etkilemektedir. Metabolik düzenleme anlaşılması güç bir şekilde kanserin gelişimiyle bağlantılı olmaktadır. Bunun nedeni, aslında hücrenin çoğalması için besinlerin varlığı ile sıkı bir şekilde düzenlenmesinden kaynaklanmaktadır. Vücut hücrelerimizde var olan bütün hücreler oksijene ve besin maddelerine ihtiyaç duymaktadır. Mitojenik sinyal yolları, hücre içine alınan besini ve DNA, RNA, proteinlerin ve lipidlerin sentezini teşvik etmektedir. Bununla birlikte, besin alımı, yalnızca enerji sağlamak için gerekli olmamakla birlikte, hücrelerimiz proteinleri, zarları ve bunun gibi bileşenleri, zarar görmüş organelleri devamlı geri dönüştürebilmektedir. Ayrıca bileşenleri, yeni durumlara uyumlamak için yeniden yapılandırıp bu süreçte yeni yapı taşlarına ihtiyaç duymaktadır. Hücre çoğalmasını ve hızlı bir şekilde büyümesini sağlamak için kanser hücrelerine bol miktarda besin kaynağı gerekmektedir (Muñoz-Pinedo ve diğ. 2012).

Neredeyse tüm kanserler, dönüştürülmüş hücrelerin kalıtım materyalindeki anormalliklerinden kaynaklanmaktadır. Bu anormallikler, tütün dumanı, radyasyon, kimyasallar veya enfeksiyöz ajanlar gibi kanserojen etkilere kaynaklı olabilmektedir. Kanser oluşumunu etkileyen diğer genetik anormallikler, DNA replikasyonundaki meydana gelen hasarlar sebebi ile rastgele oluşabilmektedir veya kalıtsal kaynaklı olmaktadır. Bu nedenle insanın doğumundan itibaren tüm hücrelerde bulunabilmektedir (Sarankar ve diğ. 2010). Bazı kanserler hızlı hücre çoğalmasını desteklerken, bazıları ise hücrelerin bölünmesine ve daha yavaş gelişmesine neden olmaktadır (Rajagopal ve diğ. 2023).

Kanserin tedavisi için yeni ve hedef odaklı kemoterapötik ajanlar geliştirilmekte ve araştırılmaktadır. Kükürt içeren heterosiklikler arasında benzotiyofen ve türevleri bazı klinik ilaçlar, farklı hastalık çeşitlerini tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Benzotiyofen ve türevleri, anti-mikrobiyal, anti-kanser, anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-tüberküler ve anti-diyabetik etkileri vardır ve aktif bileşiklerle yapısal benzerlikleri sebebi ile ilaç tasarımında yeni ve güçlü

moleküller geliştirmek için potansiyel ajan olarak görölmektedir. Bu da benzotiyofenlerin kapsamlı olarak araştırılmasına yol açmaktadır. Benzotiyofenin geniş biyolojik aktivitesi sayesinde, yapı aktivite ilişkileri (SAR) bilim insanları arasında popüler ve araştırılmaya açık önemli moleküllerden biri olmaktadır Ayrıca çok sayıda benzotiyofen türevi bazlı klinik ilaçlar, farklı hastalık çeşitlerini tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. (Keri ve diğ., 2017). Heterosiklik yapıdaki benzotiyofen türevi bileşiklerden biri olan raloksifen, meme kanseri gibi tedavilerde farmasötik olarak kullanılmaktadır. (Er ve diğ. 2022) Tüm bunlar, benzotiyofen türevlerinin kanser ilacı geliştirilmesi ve araştırmalarında antikanser olarak kullanılmasını önemli kılmaktadır (Keri ve diğ., 2017).

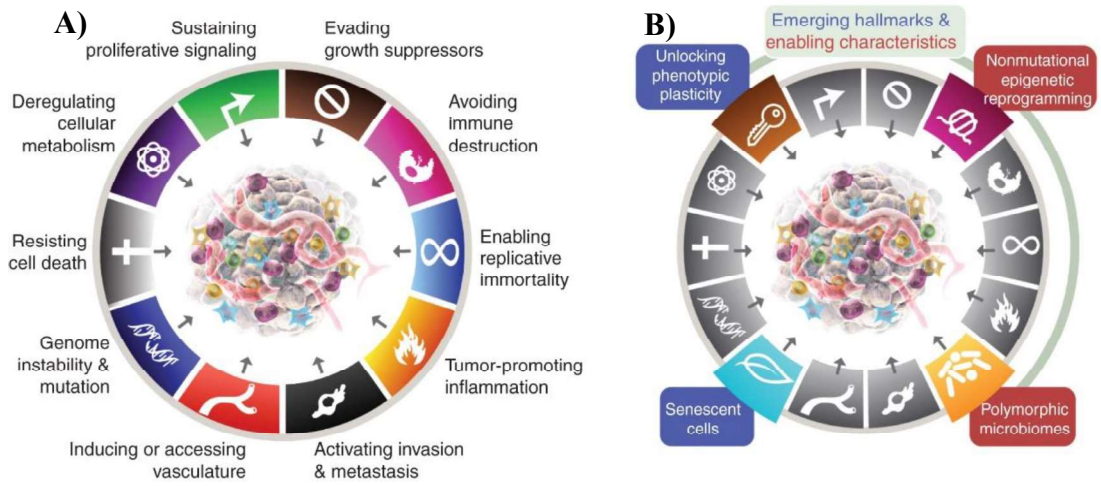
1.1 Kanser

Kanser, çeşitli iç ve çevresel faktörlerden etkilenen karmaşık etkileşimleri içeren heterojen bir hastalıktır. DNA, RNA, proteinler ve metabolitlerin yanı sıra bunların etkileşimleri kanserin tüm aşamalarında meydana gelen değişikliklerle ilgili olmaktadır. (Huang ve diğ. 2021) Kanser, potansiyel olarak anormal hücre proliferasyonu ile ilgili bir durumdur. Bazı vücut hücrelerinin kontrolden çıkarak diğeri vücut bölgelerine yayılabilen (metastaz) özelliğine sahiptir. Kanser, insan vücudunu oluşturan milyarlarca hücrelerden herhangi birinde ve hemen hemen vücudun her yerinde başlayabilmektedir. (Rajagopal ve diğ. 2023)

Kanser, dönüştürölmüş hücrelerin kalıtım materyalindeki anormalliklerinden kaynaklanmakta olup bu anormallikler tütün dumanı, radyasyon, kimyasallar gibi kanserojen etkilere kaynaklı olabilmektedir (Rajagopal ve diğ. 2023). Karsinojen etkiler ve konakçı genomu arasındaki karmaşık etkileşimler, hücrelerden bazılarının bilinen bir kanserojene maruz kaldıktan sonra kanser geliştirdiği nedenini açıklayabilmektedir. Bu alanda yapılan araştırmalar geliştikçe, farklı kanser türleri için daha spesifik tedaviler bulunmaktadır. Spesifik olarak tespit edilebilir moleküler anormallikler belirli tümörler üzerinde etki gösteren ve normal hücrelere zarar vermeyen veya en az zararı veren hedefe yönelik tedavi ilaçlarının geliştirilmesinde önemli bir aşama olarak kaydedilmektedir. Bugüne kadarki birçok ilerlemeye rağmen, tedaviye direnç her zaman mevcut olup tehdit oluşurmaya devam

etmektedir ve çoğu durumda kanser hastalığının tekrarına yol açmaktadır. Kanseri anlamak, kaydedilen her yeni aşamayla birlikte, kanser hücrelerini önlemek için geliştirilmiş seçenekler (hastalığın tedavi sürecinde yan etkilerini azaltırken) mümkün hale gelmektedir (Sarankar ve diğ. 2010).

Kanser hücrelerin kalıtım materyalindeki anormalliklerinden kaynaklanmaktadır (Rajagopal ve diğ. 2023). Kanser hücrelerini diğer sağlıklı hücrelerden ayıran belli başlı özellikleri mevcuttur. Bu özellikler kanserin ayırt edici özellikleri olup sekiz ayırt edici özelliği şunlardır; (1) proliferatif sinyali sürdürmek, (2) büyüme baskılayıcılardan kaçınmak, (3) hücre ölümüne direnmek, (4) replikatif ölümsüzlüğü sağlamak, (5) damar sistemini indüklemek/erişmek, (6) istilayı ve metastazı aktive etmek, (7) hücresel metabolizmayı yeniden programlamak ve (8) bağışıklık tahribatını önlemek için edinilmiş yetenekleri içermektedir (Şekil 1, A) (Hanahan ve diğ. 2022).



Şekil 1.1. Kanser hücrelerinin ayırt edici özellikleri. (Hanahan ve diğ. 2022)

Bu ayırt edici özellikler kendi başlarına kanser patogenezinin karmaşıklıklarını, yani gelişen preneoplastik hücrelerin tümör gelişimi ve habis progresyonu sırasında, anormal fenotipik yetenekleri geliştirmesine ve kazanmasına izin veren kesin moleküler ve hücresel mekanizmaları ele almakta başarısız olmaktadır. Kanser hücrelerinin, hücresel metabolizmanın serbestleştirilmesi ve bağışıklık yıkımından kaçınması özellikleri "gelişmekte olan işaretler" olarak belirtilen ancak şimdi, diğer altı özellik gibi, kanserin temel özellikleri olarak kabul edilebilmekte ve mevcut tasvire bu şekilde dahil edilmektedir. Kanser hücrelerinin

bu işlevsel özellikleri için araçlar sağlayan neoplazinin anormal durumu sonucunda "etkinleştirici özellikler" olarak tasvir edilen başka bir kavram ortaya çıkmaktadır. Bu iki etkinleştiren süreç; genom kararsızlığı ve tümörü teşvik eden iltihaplanma olmaktadır. Etkinleştirici özellikler, ayırt edici özelliklerin elde edildiği moleküler ve hücrel mekanizmalara yansımaktadır. (Şekil 1. B, Hanahan ve diğ. 2022).

Kanser, hastalığın ilerlemesi boyunca hasta olan insanları kanserin türü, kanserin evresi veya boyutu etkilemektedir. Kanser, her yaştan insanı (fetüsleri bile) etkileyebilir hatta yaygın kanser türleri için yaşa bağlı olarak artma riski var olmaktadır. Kanser, hücrelerin agresif (anormal olarak büyümesi ve bölünmesi), invaziv (komşu dokuları istila edip ve yok etmesi) ve metastatik (vücudun diğer bölgelerine yayılımı) olduğu bir durumdur. Kanserlerin bu üç özelliği, hücrelerin büyümelerini kendi kendine sınırlayan, istila etmeyen ve metastaz yapmayan (bazı iyi huylu tümör tipleri habis olma yeteneğine sahip olsa da) iyi huylu tümörlerden ayırmaktadır. Ölümlerin yaklaşık %13'üne kanser sebep olmaktadır (Sarankar ve diğ. 2010).

Kanser, keşfinden bu yana ölüm nedenleri arasında kalp damar hastalıklarından sonra ikinci sırada gelmektedir. (Keri ve diğ. 2017, Globocan 2020) Çoğu anti-tümör ilacın, uygulanmalarını sınırlayan ciddi yan etkileri mevcuttur. Örneğin paklitaksel, kanser tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, aşırı duyarlılık, hematolojik toksisite, nörotoksisite ve kas toksisitesi gibi etkileri sebebiyle uygulanan tedaviyi sınırlandırmaktadır. Yeni ilaçların ortaya çıkması ile bu sorunun hafifletilmesi beklenmektedir (Keri ve diğ. 2017).

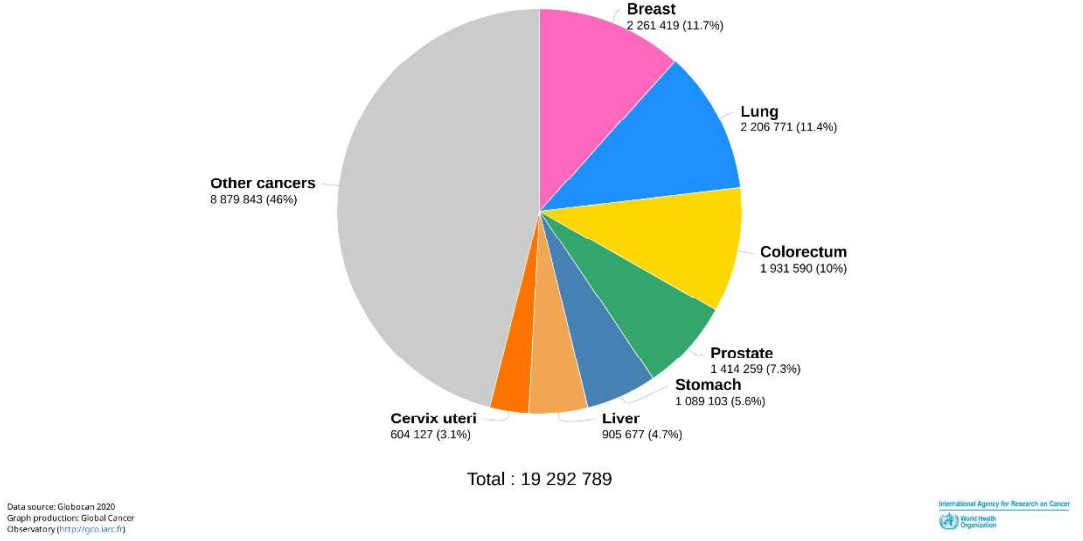
Kanser hastalığı nedeniyle ölüm oranı dünya genelinde de ülkemizdeki ölüm oranına yakındır. Ülkemizde kanser hastalıkları sebebiyle ölüm oranı %29'dur. Meme kanseri yaş, yaşam tarzı ve genetik kalıtım gibi çeşitli faktörlerin rol oynadığı heterojen bir hastalıktır. (Algo ve diğ. 2018, Bai ve diğ. 2021) Ülkelerin birçoğunda meme kanseri, en sık görülen kadın kanseri ve kadınlarda en sık kanserden ölüm nedeni olmaktadır (Özmen ve diğ. 2009, Seçginli, 2011). Kadınlarda görülme sıklığı en çok olan kanser türü meme kanseridir. Türkiye'de de kadınlarda hem en sık görülen hem de en sık ölüme neden olan meme kanseridir (Hatipoğlu, 2007). DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) ve IARC (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı)'ın raporlarında yer verdiği; dünya çapında meme kanseri insidansı ortalama yıllık %0,5

oranında artmakta ve her sene dünyada bir milyon kadında meme kanseri gelişmektedir, 370 bin kadının ise ölüm sebebi olmaktadır. Avrupa ülkelerinde yaklaşık her yıl 340 bin, Amerika'da 184 bin yeni meme kanseri olgusu ile karşılaşmakta olup dünyada %20 oranı ile akciğer kanserinden sonra ikinci sırada kanser ölümlerine neden olmaktadır (DSÖ; IARC, 2013).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ; IARC, 2008) raporuna göre, tüm dünyada kanser türleri arasında akciğer kanseri erkeklerde ise en sık karşılaşılan ve ölüme neden olan birinci, kadınlarda ise ikinci kanser türüdür ve her yıl yaklaşık 1,3 milyon ölüme neden olmaktadır. Türkiye'de, akciğer kanserinden ölüm oranı kesin olarak bilinmemekle beraber, her yıl tütün ile ilgili hastalıklardan 35 bin kişinin kaybedildiği düşünüldüğünde, yaklaşık 25 bin kişinin akciğer kanserinden öldüğü tahmin edilmektedir (T.C. Halk Sağlığı Kurumu Raporları, Globocan 2020)

Erkeklerde akciğer kanserinden sonra, ikinci sıklıkla görülen kanser prostat kanseridir. Dünya çapında prostat kanserinin sıklıkla görüldüğü bölgeler sırasıyla Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa Akdeniz ülkeleri iken Çin ve Japonya gibi Asya ülkelerinde daha düşük düzeylerde görülmektedir. İstatistiklere göre prostat kanserinin sıklıkla görüldüğü ABD'de yılda 360 binden fazla prostat kanseri tanısı konmaktadır ve yaklaşık 44 binden fazla ölüm meydana gelmektedir (Clinton ve diğ. 1998). Kolon kanseri hem kadınlarda hem de erkeklerde sıklıkla görülen kanser tipidir. Tüm kanser hastalıkları arasında görülme oranları sırasıyla Akciğer, %24-28; meme, %20-24 ve prostat kanserleri %12-15 civarında seyretmektedir (Hatipoğlu, 2007). Kanserli hastaların tedavisinde sıklıkla cerrahi operasyonlar ve devamında kemoterapik ilaçlar kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemleri nadiren başarılı olsa da bazı agresif kanser türlerine karşı yetersiz kalmaktadır. Aslında, günümüzde cerrahi tedavi sadece hastalık organda sınırlı iken sağlanabilmektedir. Metastazın oluşması kanserle mücadelede karşılaşılan diğer önemli bir problem olmaktadır. Kanserle mücadele yapılırken metastaz önlenibilirse kanserin türüne göre değişmekle birlikte tedavi başarısı da artmaktadır (Rajagopal ve diğ. 2023). Globocan (2012) verilerine göre, tahminen 2008'de sırasıyla 12,7 milyon kanser vakası ve 7,6 milyon ölüm ile karşılaştırıldığında 2012'de 14,1 milyon yeni kanser vakası ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm meydana gelmektedir. (Şekil 1.2., Globocan 2020).

Estimated number of new cases in 2020, World, both sexes, all ages



Şekil 1.2. Globocan 2020 tahmini yeni vaka sayısı ve kanser türlerine göre dağılımı (Globocan, 2020).

Kanser, hücrenin anormal bölünmesi ve metastazı ile karakterize küresel bir sağlık sorunu olmaktadır (Semiz ve diğ. 2023). İnsanlar, yüzden fazla farklı kanser türünden etkilenmektedir. Lösemi gibi bazı kanser türleri görünür tümörler üretirken, meme kanseri gibi diğer kanser türleri tümör üretmez. Meme kanseri, meme hücrelerinde başlayan bir kanser türü olarak tanımlanır. Meme kanserinin tipi, memedeki hangi hücrelerin kansere dönüştüğü ile belirlenir. Memede, kanserin başlayabileceği çok sayıda yer vardır. Göğüsler öncelikle lobüller, kanallar ve bağ dokusundan oluşur. Süt, memeden meme ucuna kadar olan kanallardan geçer. Lifli ve yağlı dokudan oluşan bağ dokusu her şeyi bir arada tutar. Genellikle kanallar veya lobüller, meme kanserinin geliştiği yerlerdir. Kan ve lenfatik damarlar, meme kanserinin metastazına sebep olan iki yoludur. Metastaz, kanserin diğer vücut bölgelerine yayılmasını ifade eder. Geçen yıl kanser, 10 milyondan fazla ölümle, dünya çapında önde gelen ve ABD'de en yaygın ikinci ölüm nedenidir (Rajagopal ve diğ. 2023).

Bu kanser türleri içinde meme kanserini tedavi etmek için uzun bir süredir Benzotiyofen içerikli Tamoksifen (TAM) gibi ilaçlar kullanılmaktadır. (Rajagopal ve diğ. 2023) Ticari markası Evista olan meme kanseri tedavisinde kullanılan heterosiklik yapıda olan Raloksifen ise, benzer biyolojik özelliklere sahip ve popüler

anti-kanser ilacı olan TAM'dan daha az yan etkiye sahiptir. Bu nedenle, sentetik ve tıbbi kimyagerler, onlarca yıldır kükürt atomları içeren yeni organik bileşikler ve yeni ilaç adayları potansiyellerini bulmak için yeni türevlerin antimikrobiyal ve antioksidan kapasitelerini de çalışmaktadır. (Rajagopal ve diğ. 2023)

Yaygın olarak kullanılan antikanser terapötikleri, bitkilerden; irinotekan, vinkristin, etoposid ve paklitaksel, bakterilerden, aktinomisin D ve mitomisin C ve ayrıca deniz kaynaklı bleomisin gibi doğal kaynaklardan elde edilmektedir. Bu bileşiklerden bazıları hala kanser tedavisinin temel dayanağıdır ve gelecekte çok önemli bir rol oynayacağı öngörülmektedir. Bunların arasında kamptotesin ve taksol şüphesiz en başarılı iki terapötiktir ve her ikisi de 1950 ile 1960'lar arasında Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (NCI) doğal ürünlerin terapötik değerlerini keşfetmek için başlattığı bir kampanyada tanımlanmıştır. (Huang ve diğ. 2021)

Genel olarak, kanser hastalarında sağkalım oranı 1960'larda %39 olurken 1990'larda sağkalım oranı %60'a ulaşmıştır. Sağkalım oranlarında görülen bu artış, kombine tedavi yaklaşımının bir sonucu olmaktadır (Tozkoparan ve diğ. 2007). Son yüzyıla kadar yeryüzünde doğa ile iç içe varlığını sürdüren insanoğlu, hastalıklara karşı şifayı yine doğada aramaktadır. Hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkiler genel olarak kokulu olduklarından dolayı tıbbi ve aromatik bitkiler olarak anılırlar. Bitkisel yağlar, yüksek E vitamini, çoklu doymamış yağ asitleri ve içerdiği fenolik bileşiklerden dolayı zengin antioksidan özelliklere sahiptir ve bağışıklık sistemini güçlendirerek hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Çok yönlü kullanım alanına sahip olan bitkisel yağlar ise, birer besin maddesi olmalarının yanında ilaç sektörü için de önemli bir hammadde kaynağı olmaktadır. Şimdiye kadar bitkisel yağlarda uçuculukları farklı olan çok sayıda uçucu bileşik tanımlanmıştır. N-heterosiklik bileşikler, O-heterosiklik bileşikler, S (Kükürt) içeren bileşikler, aldehitler, alkoller, esterler ve uçucu fenolik bileşikler en yaygın olanlarıdır. Kısa zincirli aldehitler, bir dizi C₆ ila C₁₂'lu aldehitler önemli aroma katkı maddeleri olarak tanımlanmaktadır (İşbilir ve diğ. 2023).

1.2 Benzotiyofen ve Türevleri

Yüzyılı aşkın bir süredir, heterosiklik bileşikler tıbbi kimyada ve diğer alanlarda da önemli rol oynamakta ve sentetik organik kimyada merkezi bir konuma sahip olmaktadır. Çok sayıda bileşik biyolojik olarak önemli, kükürt içeren büyük bir heterosiklik sınıfına ait olmaktadır. Heteroatom içeren heterosiklik bileşikler, potansiyelleri bilinen doğal ve sentezlenmiş moleküllere benzerliklerinden dolayı çeşitli biyolojik ve farmakolojik aktiviteler sergilemektedir (Keri ve diğ. 2017). Heterosiklikler, yaşamın süreçlerinde yoğun bir şekilde yer almaktadır. Heterosiklik yapıları ile DNA, RNA, proteinler ve koenzimler, temel biyolojik makromoleküllerin klasik örnekleri olmaktadır. İlaç etkisinin biyomoleküler açıdan, geniş biyoyumluluğu, heterosikliklerin endojen molekülleri taklit etme yeteneği ve sonuç olarak biyolojik varlıklarla etkileşim haline girme konusunda çok yönlü kabiliyeti doğrulanmaktadır. Bu özellikler, önemli gruplardan biri haline gelen heterosiklik kimyada, yeni ilaçların geliştirilmesi için bu alan bilim camiasını yoğun bir şekilde ilgilendirmektedir. (Martorana ve diğ. 2015; Romagnoli ve diğ. 2021)

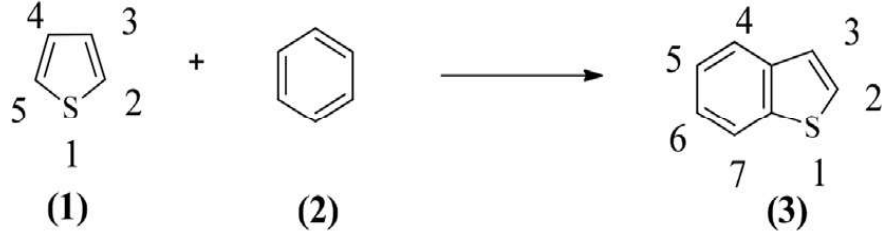
Tiyofen, heterosiklik yapı iskelesi oluşturmaktadır. Benzotiyofen iskelesi de tiyofen gibi heterosiklik ve ilaç keşfinde ayrıcalıklı yapılardan biridir çünkü anti-mikrobiyal, anti-kanser, anti-enflamatuar, anti-oksidan, anti-tüberküler, anti-diyabetik, anti-konvülsan gibi pek çok etkisi bulunan çeşitli biyolojik aktiviteler sergilemesi sebebiyle dikkat çekmektedir. (Keri ve diğ. 2017). Hem doğada yaygın olarak bulunan hem de sentezlenmiş heterosiklik türevlerin birçok yaşam süreci için gerekli olduğu kimyasal, farmakolojik ve biyolojik özelliklerinin çeşitliliği nedeniyle tıbbi kimyada önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir (Mansour ve diğ. 2011; Perin ve diğ. 2020). Uzun zamandan beri araştırılan, yeni heterosiklik yapıların tasarımı, sentezi ve biyolojik değerlendirmesine odaklanılmasındaki sebep kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda çok çeşitli insan kanser hücre hatlarında test edilen moleküllerin birçoğu, kansere karşı olağanüstü anti-proliferatif aktiviteler göstermektedir (Chengfeng ve diğ. 2021).

İndoller, pirazoller, benzotiyofenler ve karbazoller gibi heteroaromatik bileşikler, üstün özellikleri nedeniyle sağlıkta ve yeni malzemelerin geliştirilmesinde

büyük önem taşımaktadır. Yıllardır antikanser, antioksidan, antifungal, antibakteriyel, antiparazit gibi ilaçlarda ve topoizomera inhibitörleri, potasyum kanal açıcılar, L1210 hücre seçiciler gibi uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Heteroaromatik yapılar arasında en iyi bilinen benzotiyofen türevleridir ve meme kanseri ve postmenopozal osteoporoz tedavisinde kullanılan raloksifen gibi farmasötik olarak kullanılırlar. (Er ve diğ. 2022)

Doğada heterosiklik bileşikler geniş bir dağılıma sahiptir ve laboratuvarlarda sentezlenen birçok heterosiklik yapıda bileşik klinik etmen olarak başarıyla kullanılmaktadır. Organik bileşikte heterosiklik yapının varlığı, farmasötik ve kimyasal araştırmalara ilgi uyandırmaktadır. Sülfür heterosiklikleri arasında, bazı biyoaktif moleküllerin önemli bir farmakoforu olarak bilinen ve bu nedenle büyük ilgi gören benzotiyofen, benzersiz bir heterosiklik bileşiktir (Romagnoli ve diğ. 2021). Heteroaromatik bileşikler, biyolojik ve farmakolojik özelliklerinden dolayı yeni ilaç adaylarının keşfi ve geliştirilmesinde çok önemli rollere sahip olmaktadır. Yıllardır anti-paraziter, anti-bakteriyel, anti-kanser, anti-fungal, antiinflamatuvar ve antioksidan ilaçlar olarak kullanılmaktadırlar. Benzotiyofenler ve tiyofenler, heteroaromatik bileşiklerin iyi bilinen adaylarıdır ve benzotiyofen türeviden olan Raloksifene, Zileuton, Sertakonazol gibi bileşikler farmasötik olarak kullanılmaktadırlar. (Algso ve diğ. 2018)

Doğada yararlı biyolojik aktivitelere sahip doğal ürünler de bulunmaktadır (Keri ve diğ. 2017). Benzotiyofen, moleküler formülü C_8H_6S olan aromatik bir organik bileşik, linyit katranı gibi petrol tortularının bir bileşenidir ve doğal olarak oluşmaktadır (Sarankar ve diğ. 2010). Benzotiyofen iskelesi, kahve çekirdeklerinde ve tıbbi kimyada çeşitli uygulamalara sahip olan türevlerinde de bulunmakta ve endüstride olduğu kadar akademide de büyük ilgi görmektedir. Çok çeşitli aktiviteleri vardır; anti-inflamatuar, analjezikler, anti-fungal, antidepresan, anti-anjiyojenik, östrojen reseptör modüle edici, anti-mitotik, enzim inhibitörleri, antikanser, kinazlar inhibe edici, anti-tüberküloz, anti-malaryal, anti-diyabetik, anti-hiperglisemik ve pestisitler gibi biyolojik/farmakolojik özellikleri ile geniş biyolojik aktiviteler sergilemektedir (Keri ve diğ. 2017).



Şekil 1.3. Benzotiyofen bileşiği. Benzen halkasının (2) tiyofen halkasına (1) 4,5-pozisyonlarında bağlandığı bir bisiklik (3) bileşiktir.

Tiyofenler ve benzotiyofenler gibi kaynaşmış türevler, organik kimyada ve tıbbi kimyada oldukça ayrıcalıklı yapılar olmakta ve değerli yapı taşları olarak sınıflandırılmaktadır. Son zamanlarda benzotiyofenler nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de ilaç olarak kullanılma potansiyele sahip olmaktadır (Mansour ve diğ. 2011, Perin ve diğ. 2020). Öte yandan, benzotiyofenler, tıbbi kimya ve malzeme biliminde çeşitli uygulamalara sahip bileşiklerdir ve akademide yer aldığı kadar endüstride de büyük ilgi görmektedir. Sertakonazol nitrat ve benosiklidin gibi ticari olarak temin edilebilen birkaç ilaç da benzotiyofen iskele yapısını içermektedir (Mohareb ve diğ. 2016).

Benzotiyofen, araştırmalarda daha büyük, genellikle biyoaktif yapıların sentezi için bir başlangıç malzemesi olarak kullanım alanı bulmaktadır. Raloksifen, zileuton ve sertakonazol gibi farmasötik ilaçların kimyasal yapılarında bulunur. Aromatikliği onu nispeten kararlı kılar, ancak bir heterosiklik olarak işlevselleştirmeye izin veren reaktif bölgelere sahiptir (Sarankar ve diğ. 2010).

Raloksifen, osteoporoz tedavisi için geliştirilen, meme kanseri önleyici bir maddedir ve tamoksifen gibi östrojenin uterus ağırlığı üzerindeki uyarıcı etkilerini antagonize eden, DNA ile reaksiyona girmesi ve etil parçasının olmaması nedeniyle ve postmenopozal kadının uterusu üzerinde hiçbir yan etkisi olmayıp kanserojen olmadığı kanıtlandığı için meme kanseri tedavisinde kullanılan ve genel olarak anti-östrojen olarak sınıflandırılan bir benzotiyofen türevidir (Algso ve diğ. 2018, Bai ve diğ. 2021, Sato ve Glasebrook 1994). Ayrıca Benzotiyofenler antitümör, antihipertansif, antimikrobiyal ajan olarak da kullanılmaktadır. Bu nedenle benzotiyofen türevlerinin sentezi ve yeni özelliklerin keşfedilmesi yeni kullanım alanlarında uygulanması için büyük önem taşımaktadır (Er ve diğ. 2022).

Tamoksifen (TAM) gibi endokrin tedaviler, östrojenin reseptöre bağlanmasını bloke ederek veya aromataz katalizi altında östrojen sentezini önleyerek meme kanserini tedavi etmek için uzun süredir kullanılmaktadır. Seçici bir östrojen reseptör modülatörü (SERM) olan Tamoksifen, Rajagopal ve arkadaşlarının yapmış olduğu *İn vitro* ve *in vivo* teknikler kullanılarak elde edilen analizlerde, meme kanserini tedavi etmek için bir ilaç olarak optimize edilebilmektedir. Gelecekte, bu çalışma, yaygın olarak araştırılmakta olan benzotiyofen türevlerinde yenilikçi yapısal modifikasyonlar yoluyla daha fazla benzotiyofen türevi elde etmek için güvenilir bir kaynak olmaktadır (Rajagopal ve diğ. 2023).

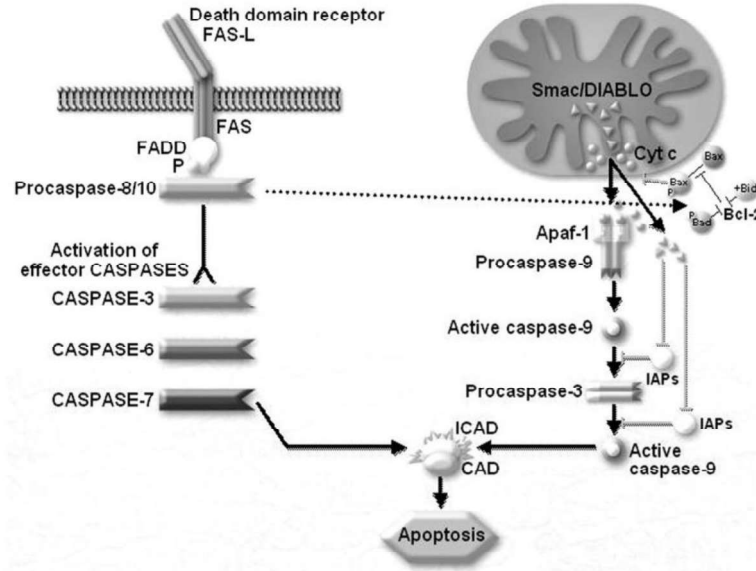
Piyasada kullanılan bazı benzotiyofen türevleri arasında raloksifen, zileuton, sertakonazol, benosiklidin ve mobam ilaçları bulunmaktadır. Raloksifen, osteoporozun önlenmesi ve tedavisi için postmenopozal kadınlarda ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Meme ve rahimde güçlü östrojen antagonisti özellikleri sergilerken kemik dokuları ve serum lipidleri üzerinde östrojen agonisti benzeri etkiler sergileyen seçici östrojen reseptör modülatörleri (SERM'ler) olarak bilinen bir bileşik sınıfını temsil etmektedirler. Zileuton, astım tedavisi için kullanılan bir benzotiyofen türevidir. Sertakonazol, mantar önleyici bir ilaç olup bazı cilt enfeksiyonlarında da tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Benosiklidin, psikoaktif bir ilaç olup güçlü bir dopamin geri alım inhibitörü ve bir psikostimülan (uyarıcı) olarak etki etmektedir. Naftalinin bir benzotiyofen analogu olan Mobam, koruyucu etkileri olduğu için bitkiler üzerinde kullanılmaktadır. Bu nedenle, bu iskele ile ilişkili çok çeşitli biyolojik ve farmakolojik etkiler, benzotiyofen halka sisteminin ilaç keşfinde ayrıcalıklı bir yapı olarak görülmesine neden olmaktadır. Bu durumda bu yapıya ilgi çok fazla olmakla birlikte artan araştırmalarla benzotiyofen içerikli tıbbi ürünler hızla gelişmektedir (Keri ve diğ. 2017).

Sonuç olarak, dünya çapındaki büyük ilaç şirketleri, ilaç keşfi için doğal ürünlere yönelik çabalarını azaltmış, hatta ortadan kaldırmış ve bunun yerine öncelikle kimyasal olarak sentezlenmiş bileşiklere veya biyolojilere güvenmektedir. Son zamanlarda kanser tedavisi ve yenilikçi teknolojilerdeki bilginin hızla artması, ilaç keşfindeki etkinliği artırma, doğal ürünlerin doğrudan hedeflerini ortaya çıkarma ve çok yönlü farmakolojik etkilerin karmaşıklığını çözme konusundaki engelleri

aşabilmeyi mümkün hale getirmektedir. Tüm bunlar, antikanser ilaç keşfini canlandırmaya yönelik bir çabayı ve teknolojik ilerlemeyi vurgulamaktadır (Sarankar ve diğ. 2010).

1.3 Apoptoz

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, hücrelerin proliferasyonunu kontrol etmek veya DNA’da meydana gelen hasara yanıt olarak hücreyi ölüme maruz bırakmak zorunda kılan bir mekanizmadır. Apoptozun anlaşılması, kanser hücrelerinde ölümü indükleyebilen veya sitotoksik etkiler ve radyasyon tedavisine duyarlı hale getirilebilen yeni hedefli tedavi yöntemleri için temel sağlamaktadır. Bu yeni ajanlar, tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen dışsal yolağı ve antisens oligonükleotitleri gibi içsel Bcl-2 yolağını hedeflemektedir. p53 yolağı gibi birçok yolak ve protein, apoptoz mekanizmasını kontrol etmektedir. Bu yolaklar, tümör hücrelerinde tercih olarak değiştirilebildiğinden, normal dokuyu koruyan tümörlerde seçici bir etki potansiyeli olmaktadır (Ghobrial ve diğ. 2005).



Şekil 1.4. Apoptozun Ekstrinsik ve İntrinsik Yolakları (Ghobrial ve diğ. 2005).

Apoptoz ekstrinsik (sitoplazmik) ve intrinsik (mitokondriyel) iki ana yolla gerçekleşmektedir. Her iki yol da düzenleyici ve yapısal molekülleri parçalayan ve hücrenin ölümüyle sonuçlanan kaspazların aktivasyonunu içeren nihai bir ortak yolda birleşir (Ghobrial ve diğ. 2005).

1.4 İnflamasyon

İnflamasyon, vücudun iç ve dış faktörlere verdiği tepkilerden biridir ve yanıt olarak gelen uyarınları ortadan kaldırmakta ve doku fizyolojisini düzenlemektedir. Bu yanıtların uzun bir süre devamının olması kronik inflamasyona neden olabilmekte ve başta kanser olmak üzere birçok hastalıkla sonuçlanmaktadır. Yapılan çalışmalar, kronik enfeksiyon, inflamasyon ve kanser arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir (Yıldırım, 2019).

İnflamasyon ve kanser arasındaki ilişkinin altında yatan mekanizmada ana yolak olan kinurenin ve aşağı akış metabolitlerine triptofan metabolizmasının enzimleri ve bileşiklerini içeren, tümörün başlamasını ve büyümesini etkileyen inflamasyon aracılığı tarafından indüklenen bağışıklık sistemidir (Stone ve diğ. 2023). İnflamasyon esnasında birkaç hücre türü etkilenmektedir. İnflamatuar yanıtın önemli mekanizmalarından biri, hücre tiplerinin anormal dağılımına veya miktarına yol açan apoptoz regülasyonunun dengesizliğini içermektedir (Ze ve diğ. 2023). Akciğer kanseri hastalarında sistemik inflamasyonun rolü bilinmektedir (Özönder ve diğ. 2023). Sonuçta, özellikle dahil olan çeşitli hücre tipleri bağlamında apoptoz ve inflamasyon arasındaki ilişkiyi açıklığa kavuşturmak çok önemli olmaktadır. Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, çok hücreli organizmalarda hücre homeostazı, yaralanma onarımı, immün tolerans ve inflamasyon için gerekli olmaktadır. Apoptoz gerçekleştiğinde, apoptotik hücreler özel fagositler (makrofajlar ve olgunlaşmamış dendritik hücreler) veya diğer hücreler (endotelial ve mezenkimal hücreler gibi) tarafından temizlenmektedir. Apoptoz mekanizması, proinflamatuvar sitokin genlerinin transkripsiyonunu inhibe etmektedir (Ze ve diğ. 2023).

1.5 Tezin Amacı

Kanser, fizyolojik özelliklerini kaybetmiş ve DNA hasarlı yani mutasyonlu hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıdır. Kanser birçok çeşidi vardır ve yok edilmesi zor olmaktadır. Tiyofen içeren heterosiklik bileşiklerin ise kansere özgü proteinleri hedef aldığı, önemli sinyal yollarının inhibisyonuna veya aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Kükürt heterosiklik ailesi, fizikokimyasal özellikler gösteren oldukça kararlı aromatik bileşikler içermektedir. Son yıllarda, yürütülen çalışmalar

ile tiyofen içeren heterosiklik bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Benzotiyofen ve türevleri ise ortaya çıkan farmakolojik özellikleri sebebiyle kanser araştırmalarında popüler hale gelmektedir (Somaya ve diğ. 2021). Bu tez çalışmasında Aldehit fonksiyonel grubu içeren yeni nesil Benzotiyofen türevlerinin sitotoksik, anti-karsinojenik ve anti-inflamatuar aktivitelerinin farklı kanser hücre hatlarında çeşitli aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.



2. MATERYAL VE METOT

2.1 Malzemeler

2.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Etanol (%99,8 Sigma 51976), Dimetil sülfoksit (DMSO, Carlo Erba 445106), Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS, Biowest L0616), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma D1145), RPMI-1640 (Sigma R8758), Penisilin (Capricorn PS-B), Tripsin-EDTA (Sigma T3924), L-glutamin (Gibco 25030081), Fetal Sığır Serum (FBS, Biowest S1810), Tripan Blue (Biological Industries 2041813).

2.1.2 Kullanılan Cihazlar

Etüv (Nüve EN055), CO₂ İnkübatörü (Nüve EC160), Biyogüvenlik Kabini (Nüve MN 120), Santrifüj (Zentrifugen Mikro 200R), Mini Santrifüj (Zentrifugen EBA20), Otoklav (Nüve OT40L), -80°C Derin Dondurucu (Nüve DF490), Akış Sitometri Cihazı (Beckman Counter Cytoflex), Vorteks (Dragon Lab MX-F), Spektrofotometre (Epoch, BioTek), Hassas Terazı (Denver Instrument SI-234), Işık Mikroskobu (Olympus CX21), Saf Su Cihazı (New Human Power I S-UV), Take 3 NanoDrop Aparatı (Epoch, BioTek).

2.1.3 Kullanılan Primerler

Bu tez çalışmasında İnsan Akciğer Kanseri hücre hattı (A549), İnsan Serviks Kanseri hücre hattı (HeLa), İnsan Kolarektal Kanseri hücre hattı (Caco-2) ve İnsan Meme Kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) yapılan apoptotik etki çalışmaları ardından GAPDH, BAX, Bcl-2, Casp3 Casp8, Casp9 genleri ve antiinflamatuvar çalışmaları ardından iNOS, COX-2 mRNA düzeylerinin nasıl değiştiğini belirlemek amacıyla proteinlerin GenBank/EMBL veri bankaları taranarak seçilen genler için uygun primer dizileri belirlenmiştir. Primer dizileri Sentebiolab firmasına 100 nmol

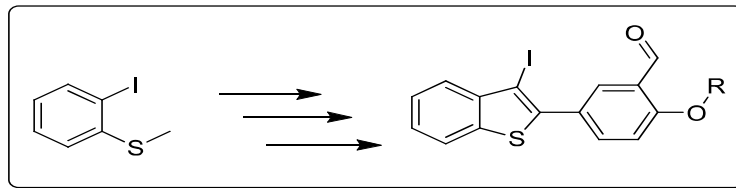
skalada sentezlettirilmiş ve 20°C’de saklanmıştır. Kullanılan primerler Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Proje kapsamında mRNA seviyelerine bakılacak proteinlerin primer dizileri

Gen	Forward Primer	Revers Primer
GAPDH (Human)	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
BAX	TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG	TGTGTCCACGGCGGCAATCATC
BCL-2	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT	GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
CASP3	GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG	GCATCGACATCTGTACCAGACC
CASP8	AGAAGAGGGGTCATCCTGGGAGA	TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC
CASP9	GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT	CAACGTACCAGGAGCCACTCTT
GAPDH	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG
COX-2	CGGTGAAACTCTGGCTAGACAG	GCAAACCGTAGATGCTCAGGGA
iNOS	GCTCTACACCTCCAATGTGACC	CTGCCGAGATTTGAGCCTCATG

2.2 Yöntemler

2.2.1 Benzotiyofen Türevlerinin Sentezi

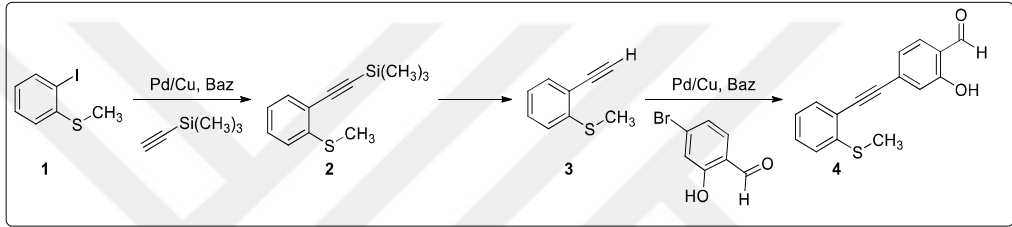


Şekil 2.1. Benzotiyofen türevinin sentezlenmesi.

Şekil 2.1.’de gösterildiği gibi yeni nesil benzo tiyofen türevlerinin sentezini için 5-bromo-2-hidroksibenzaldehyt ile trimetilsilil asetilen reaksiyona sokularak terminal alkil türevi sentezlenmiştir. Daha sonra Sentezlenen bu terminal alkil ile 2-iyodo tiyoanisol Pd katalizörlüğünde Sonogashira kenetlenme tepkimesi ile hedeflenen 2-hidroksi-5-((2-(metiltiyo)fenil)etinil)benzaldehyt en yüksek verimler ile sentezlenmiştir. Elektrofilik Halkalaşma tepkimesi ile yapasında halojen bulunduran 2-hidroksi-5-(3-iyodobenzo[b]tiyofen-2-il) benzaldehyt türevi sentezlenmiş olup

spektroskopik yöntemler kullanılarak yapısal karakterizasyonu yapılmıştır. Yapısında asidik hidrojen, formil grubu ve iyot bulundurması yönüyle türevlendirilmesi kolay olan 2-hidroksi-5-(3-iyodobenzo[b]tiyofen-2-il) benzaldehit türevi Dimetilformamit, Kloroform, Diklorometan gibi çözücüler kullanılarak Na_2CO_3 , K_2CO_3 , Cs_2CO_3 gibi karbonat tuzları katalizörlüğünde tasarlanan Benzotiyofen türevinin alkol ucundan türevlendirilmiştir. Sentezlenen bu yeni türevler ve Spektroskopik yöntemler ile yapısal karakterizasyonları elde edilmiştir.

2.2.1.1 2-Hidroksi-4-((2-(metiltiyo)fenil)etinil)benzaldehit (4) Sentezi



2.2.1.2 Trimetil((2-(metiltiyo)fenil)etinil)silan (2) Sentezi

2-İyodotiyoanisol (1) (3.9984 mmol, 1000 mg), THF (8 mL), etiniltrimetilsilan (4.798 mmol, 490 mg), trietilamin (2 mL), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0.1985 mmol, 140 mg) argon gazı altında CuI (0.1596 mmol, 30 mg) karışım oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. Reaksiyon karışımına saf su (30 mL) ilave edildi. DKM (3x30 mL) ile ekstrakte edildi. Organik faz, susuz MgSO_4 ile kurutuldu. Çözücü filtre edildi ve düşük vakum altında uzaklaştırıldı. Elde edilen karışım flaş kolon kromatografisi kullanılarak hekzan ile hedeflenen ürün elde edildi. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) 7.4-7.42 (m, 1H), 7.24-7.28 (m, 1H), 7.02-7.12 (m, 2H), 0.28 (s, 9H), 2.46 (s, 3H), ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 142.2, 132.7, 129.1, 124.1, 123.9, 121.1, 102.3, 101.4, 15.0, 0.13.

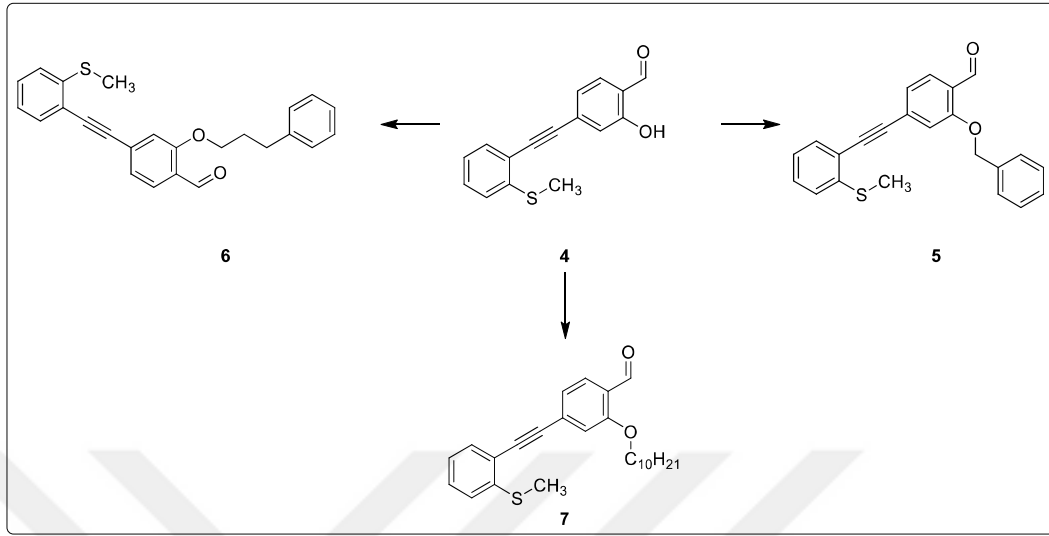
2.2.1.3 (2-Etinilfenil)(metil)sülfan (3) Sentezi

Trimetil((2-(metiltiyo)fenil)etinin)silan (2) (2640 mg, 11.97 mmol), metanol (60 mL) ve THF'den (20 mL) karıştırıldı, K₂CO₃'e (3300 mg, 23.95 mmol) eklendi. Karışım, oda sıcaklığında 3 saat karıştırıldı. Reaksiyon karışımı, EtOAc ile ekstrakte edildi. Organik faz susuz MgSO₄ ile kurutuldu. Çözücü filtre edildi ve düşük vakum altında uzaklaştırıldı. Elde edilen karışım flaş kolon kromatografisi kullanılarak hekzan ile hedeflenen ürün elde edildi. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.41 (m, 1H), 7.20-7.25 (m, 1H), 7.10-7.13 (m, 1H), 6.9-7.05 (m, 1H), 3.46 (s, 1H), 2.42 (s, 3H), ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 142.0, 133.1, 129.3, 124.2, 124.1, 120.1, 83.7, 81.0, 60.3

2.2.1.4 2-Hidroksi-4-((2-(metiltiyo)fenil)etinin)benzaldehit (4) Sentezi

4-Bromo-2-hidroksibenzaldehit (2406 mg, 11.9676 mmol) 1,4-dioksan (10 mL) ile argon gazı altında çözündürülür. PdCl₂(PhCN)₂ (0.718 mmol, 275 mg) CuI (0.718 mmol, 136 mg) karışım oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra (2-Etinilfenil)(metil)sülfan (3) (1480 mg, 9.97 mmol) ile diisopropilamin (53.85 mmol, 5450 mg) ile argon altında çözündürüldü sonra (*t*-But)₃P (1.3164 mmol, 211 mg) eklendi ve damla damla hazırlanan diğer karışıma aktarıldı. Final karışım 12 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon karışımına saf su (10 mL) ilave edilerek DKM (3x30 mL) ile ekstrakte edildi. Organik faz, susuz MgSO₄ ile kutuldu. Çözücü filtre edildi ve düşük vakum altında uzaklaştırıldı. Elde edilen karışım flaş kolon kromatografisi kullanılarak hekzan/etil asetat (20/1, V/V) oran ile hedeflenen ürün elde edildi.

2.2.2 2-(Aril/Alkil-oksi)-4-((2-(metiltiyo)fenil)etinin)benzaldehit (5, 6 ve 7) Türevlerinin Sentezi Genel Prosedür A:



2-Hidroksi-4-((2-(metiltiyo)fenil)etinin)benzaldehit (4) (1 mmol) ile DMF (5 mL) oda sıcaklığında argon gazı altında çözündürülür. K_2CO_3 (1 mmol) ve aril/alkil-Bromür (1.2 mmol) sırasıyla eklenir. Karışım oda sıcaklığında 24 saat karıştırılır. İnce tabaka kromatografisi ile kontrol edildi ve karışıma 10 mL tuzlu su eklenir ve 30 mL Etil asetat eklenir. Organik faz tuzlu su 2X10 mL ile yıkanır. Organik faz, susuz $MgSO_4$ ile kutuldu. Çözücü filtre edildi ve düşük vakum altında uzaklaştırıldı. Elde edilen karışım flaş kolon kromatografisi kullanılarak hekzan/etil asetat (20/1, V/V) oran ile hedeflenen ürün elde edilir.

2.2.2.1 2-(Benziloksi)-4-((2-(metiltiyo)fenil)etinin)benzaldehit (5) Sentezi

2-Hidroksi-4-((2-(metiltiyo)fenil)etinin)benzaldehit (4) (100 mg, 0.3726 mmol) ile DMF (5 mL) oda sıcaklığında argon gazı altında çözündürülür. K_2CO_3 (52 mg, 0.3726 mmol) ve (bromometil)benzen (77 mg, 0.4471) deneyde kullanıldı. ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 10.51 (s, 1H), 8.05 (d J = 2.2 Hz, 1H), 7.71 (dd J = 8.6; 2.2 Hz, 1H), 7.46-7.38 (m, 5H), 7.36 (d J = 4.5 Hz, 1H), 7.29 (td J = 7.5;1.3 Hz, 1H), 7.16 (d J = 8 Hz, 1H), 7.10 (td J = 7.5;1 Hz, 1H), 5.21 (s, 2H), 2.49 (s, 3H). ^{13}C NMR (125MHz, $CDCl_3$) δ 189.0, 160.8, 141.8, 138.8, 135.7, 132.3, 131.9, 128.9, 128.7, 128.5, 127.4, 125.1, 124.3, 124.1, 121.1, 116.3, 113.3, 94.4, 86.7, 70.7, 15.1.

2.2.2.2 4-((2-(Metiltiyo)fenil)etininil)-2-(3-fenilpropoksi)benzaldehit (6)

Sentezi

2-Hidroksi-4-((2-(metiltiyo)fenil)etininil)benzaldehit (4) (100 mg, 0.3726 mmol) ile DMF (5 mL) oda sıcaklığında argon gazı altında çözündürülür. K_2CO_3 (52 mg, 0.3726 mmol) ve 1-fenil-3-bromopropan (90 mg, 0.4471) deneyde kullanıldı. ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 10.4 (s, 1H), 8.03 (d $J= 2.2$ Hz, 1H), 7.68 (dd $J= ;6.9; 2.2$ Hz, 1H), 7.31-7.26 (m, 3H), 7.23-7.13 (m, 4H), 7.09 (td $J= 7.5;1$ Hz, 1H), 6.89 (d $J= 8.7$ Hz, 1H), 4.07 (t $J= 6.1$ Hz, 2H), 2.82 (t $J= 7.5$ Hz, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.23-2.13 (m, 2H). ^{13}C NMR (125MHz, $CDCl_3$) δ 189.1, 161.2, 141.8, 141.1, 138.9, 132.3, 131.8, 128.9, 128.7, 128.6, 126.3, 124.8, 124.4, 124.1, 121.2, 115.9, 112.8, 94.7, 86.7, 67.8, 32.3, 30.7, 15.2.

2.2.2.3 2-Hidroksi-4-((2-(metiltiyo)fenil)etininil)benzaldehit (7) Sentezi

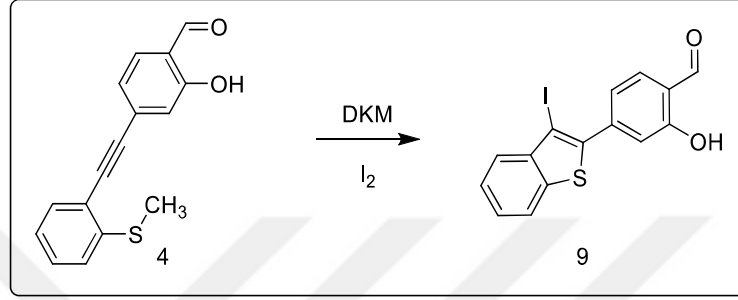
2-Hidroksi-4-((2-(metiltiyo)fenil)etininil)benzaldehit (4) (100 mg, 0.3726 mmol) ile DMF (5 mL) oda sıcaklığında argon gazı altında çözündürülür. K_2CO_3 (52 mg, 0.3726 mmol) ve 1-bromodecane (99 mg, 0.4471) deneyde kullanıldı. ^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 10.48 (s, 1H), 8.04 (d $J= 2.2$ Hz, 1H), 7.72 (dd $J= 8.6;2.2$ Hz, 1H), 7.29 (td $J= 7.9;1.4$ Hz, 1H), 7.17 (d $J= 7.9$ Hz, 1H), 7.11 (td $J= 7.5;1$ Hz, 1H), 6.98 (d $J= 8.7$ Hz, 1H), 4.14-4.06 (m, 2H), 2.51 (s, 3H), 1.90-1.81 (m, 2H), 2.52-2.44 (m, 2H), 1.40-1.35 (m, 12H), 0.89 (t $J= 6.7$ Hz, 3H).

2.2.3 Elektrofilik Halkalaşma tepkimesi ile 3-iyodobenzotiyofen (9, 10 ve 11) türevlerinin Genel Sentez Prosedür B:

2-Ariletininil tiyoanisol (4, 6 ve 7) (1 mmol) DKM (20 mL) ile argon gazı altında oda sıcaklığında çözündürüldü. Üzerine moleküler iyot (2 mmol) eklendi ve oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. $Na_2S_2O_3$ doygun çözeltisi (20 mL) nötrale edildi. DKM (3X60 mL) ile su fazı yıkandı Organik faz, susuz $MgSO_4$ ile kutuldu. Çözücü filtre edildi ve düşük vakum altında uzaklaştırıldı. Elde edilen karışım flaş kolon

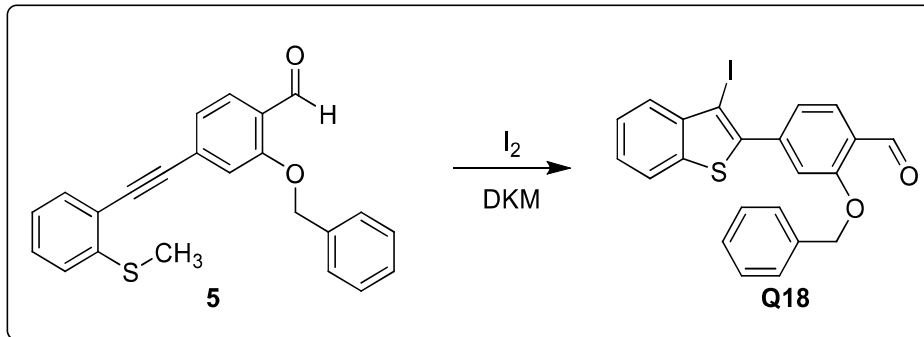
kromatografisi kullanılarak hekzan/etil asetat (10/1, V/V) oran ile hedeflenen ürün elde edildi.

2.2.3.1 2-Hidroksi-4-(3-iyodobenzo[b]tiyofen-2-il)benzaldehit (9) Sentezi



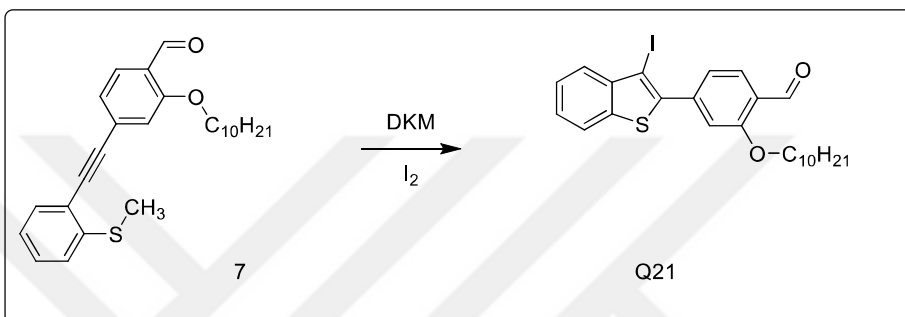
2-Hidroksi-4-((2-(metiltiyo)fenil)etinin)benzaldehit (4) (780 mg, 2.907 mmol) DKM (20 mL) I₂ (1476 mg, 5.8137 mmol) kullanıldı hedeflenen ürün Genel Sentez Prosedür B uygulanarak %72 verim ile elde edildi. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 11.20 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 7.90-7.79 (m, 4H), 7.50 (td *J*= 8.2;1.1 Hz, 1H), 7.42 (td *J*= 8.2;1.2 Hz, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 196.3 161.9, 141.6, 140.1, 138.7, 138.4, 135.1, 126.5, 126.3, 125.7, 122.1, 120.3 (2C), 118.1, 80.0.

2.2.3.2 2-(Benziloksi)-4-(3-iyodobenzo[b]tiyofen-2-il)benzaldehit (Q18) Sentezi

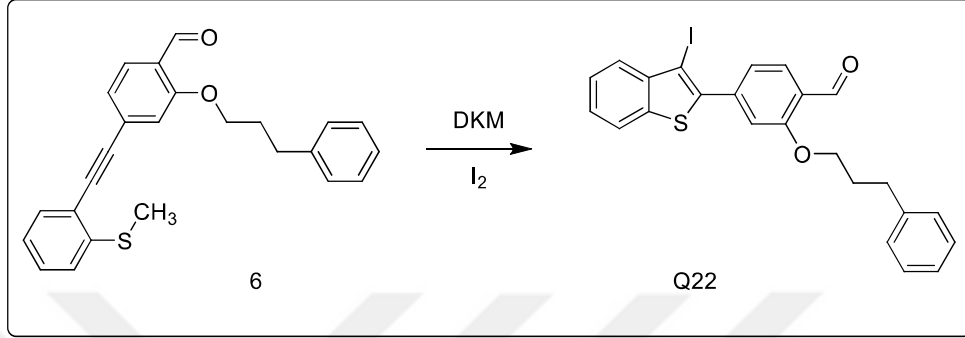


2-(Benziloksi)-4-((2-(metiltiyo)fenil)etinin)benzaldehit (5) (697 mg, 1.9388 mmol) DKM (20 mL), I₂ (984 mg, 3.8777 mmol) kullanıldı. Hedeflenen ürün %78 verim ile elde edillir. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.61 (s, 1H), 8.19 (d *J*= 2.4 Hz,

Reaction scheme showing the conversion of compound 7 to compound Q21. Compound 7 is 2-(4-((2-methylphenyl)ethynyl)benzoyloxy)-2-methylpropane-1-thiol. The reaction involves treatment with $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{MgBr}$ in DMF, followed by I_2 , yielding compound Q21.

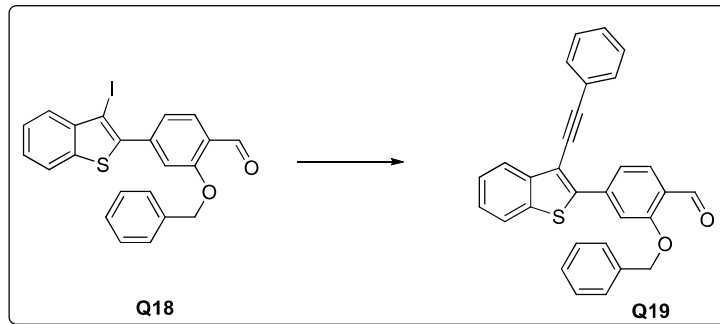


2.2.3.4 4-(3-İyodobenzo[b]tiyofen-2-il)-2-(3-fenilpropoksi)benzaldehit (Q22) Sentezi



4-((2-(Metiltiyo)fenil)etnil)-2-(3-fenilpropoksi)benzaldehit (6) (650 mg, 1.7096 mmol) DKM (20 mL) I₂ (868 mg, 3.4192 mmol) kullanıldı hedeflenen ürün Genel Sentez Prosedür B uygulanarak %72 verim ile elde edildi. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.56 (s, 1H), 8.18-8.17 (d, 1H), 7.88-7.85 (m, 1H), 7.83-7.78 (m, 2H), 7.50-7.46 (t, 1H), 7.42-7.38 (t, 1H), 7.35-7.31 (m, 2H), 7.24-7.22 (m, 3H), 7.06-7.04 (d, 1H), 4.16-4.13 (t, 2H), 2.76-2.72 (t, 2H), 1.92-1.86 (m, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 189.3, 161.8, 142.0, 141.9, 140.9, 139.0, 137.4, 130.1, 128.6, 128.6, 127.2, 126.4, 126.1, 125.8, 125.7, 124.8, 122.3, 112.8, 79.9, 68.8, 35.7, 27.9.

2.2.4 2-(Benziloksi)-4-(3-(feniletinil)benzo[b]tiyofen-2-il)benzaldehit (Q19)



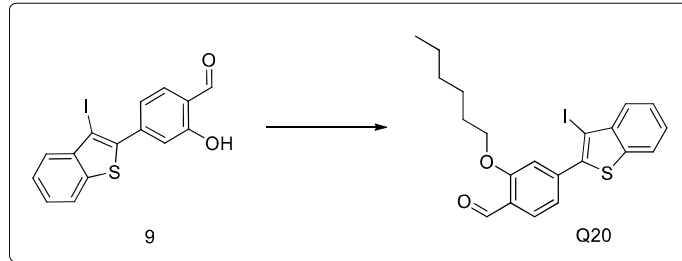
2-(Benziloksi)-4-(3-iyodobenzo[b]tiyofen-2-il)benzaldehit (Q18) (329 mg, 0.7 mmol), fenil asetilen (76mg, 0.75 mmol) inert argon gazı altında, DMF (7 mL)

ve Et₃N (3 mL) ile çözündürülür. Pd(PPh₃)₂Cl₂ (24 mg, 0.035 mmol) ve CuI (7 mg, 0.035 mmol) eklenerek oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. Karışım tuzlu su ve etil asetat ile ekstrakte edildi. Organik faz, susuz MgSO₄ ile kutuldu. Çözücü filtre edildi ve düşük vakum altında uzaklaştırıldı. Elde edilen karışım flaş kolon kromatografisi kullanılarak hekzan/etil asetat (10/1, V/V) oran ile hedeflenen ürün elde edildi.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.62 (s, 1H), 8.73-8.73 (d, 1H), 8.17-14 (m, 1H), 8.03-8.01 (d, 1H), 7.79 7.77 (d, 1H), 7.69-7.67 (d, 2H), 7.49-7.38 (m, 10H), 7.11-7.09 (d, 1H), 5.22 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 189.3, 161.2, 144.5, 141.1, 137.4, 136.0, 135.5, 131.9, 129.0, 128.7, 128.6, 128.3, 128.3, 127.5, 127.2, 125.6, 125.2, 125.2, 123.5, 123.3, 122.3, 113.6, 113.5, 95.7, 84.0, 70.8.

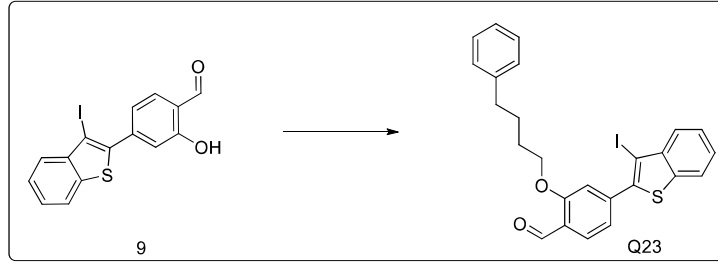
2.2.5 Q20 ve Q23 türevlerinin Sentezi

2.2.5.1 2-(Hegziloksi)-4-(3-iyodobenzo[b]tiyofen-2-il)benzaldehit (Q20)



2-Hidroksi-4-(3-iyodobenzo[b]tiyofen-2-il)benzaldehit (9) (100 mg, 0.263 mmol), hegzil bromür (0.3 mmol, 49 mg), K₂CO₃ (0.263 mmol, 36 mg) ve DMF (5 mL) reaksiyonda kullanıldı. Genel prosedür A kullanılarak %90 verimle hedeflenen ürün elde edildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.56 (s, 1H), 8.18-8.17 (d, 1H), 7.88-7.85 (m, 1H), 7.83-7.78 (m, 2H), 7.50-7.46 (t, 1H), 7.42-7.38 (t, 1H), 7.35-7.31 (m, 2H), 7.24-7.22 (m, 3H), 7.06-7.04 (d, 1H), 4.16-4.13 (t, 2H), 2.76-2.72 (t, 2H), 1.97-1.86 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 189.3, 161.8, 142.0, 141.9, 140.9, 139.0, 137.4, 130.1, 128.6, 128.6, 127.2, 126.4, 126.1, 125.8, 125.7, 124.8, 122.3, 112.8, 79.9, 68.8, 35.7, 28.8, 27.9.

2.2.5.2 4-(3-İyodobenzo[b]tiyofen-2-il)-2-(4-fenilbütoksi)benzaldehit (Q23)



2-Hidroksi-4-(3-iyodobenzo[b]tiyofen-2-il)benzaldehit (9) (100 mg, 0.263 mmol), 1-fenil-4-bromo bütan (0.3 mmol, 49 mg), K₂CO₃ (0.263 mmol, 36 mg) ve DMF (5 mL) reaksiyonda kullanıldı. Genel prosedür A kullanılarak %75 verimle hedeflenen ürün elde edildi. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.56 (s, 1H), 8.18-8.17 (d, 1H), 7.88-7.85 (m, 1H), 7.83-7.78 (m, 2H), 7.50-7.46 (m, 1H), 7.42-7.38 (m, 1H), 7.35-7.31 (m, 2H), 7.24-7.22 (m, 3H), 7.06-7.04 (d, 1H), 4.16-4.13 (m, 2H), 2.76-2.72 (m, 2H), 1.97-1.86 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 189.3, 161.8, 142.0, 141.9, 140.9, 139.0, 137.4, 130.1, 128.6, 128.6, 127.2, 126.4, 126.1, 125.8, 125.7, 124.8, 122.3, 112.8, 79.9, 68.8, 35.7, 28.8, 27.9.

2.2.6 Memeli Hücre Kültürü Yöntemi ve Sitotoksitenin Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında İnsan Akciğer Kanseri (A549) hücre hattı, İnsan Kolarektal Kanseri (CaCo-2) hücre hattı, İnsan Meme Kanseri (MDA-MB-231) hücre hattı, İnsan Serviks Kanseri (HeLa) hücre hattı ve kontrol olarak İnsan Sağlıklı Embriyonik Böbrek hücre hattı (HEK293) gibi farklı hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler %10 Fetal Sığır Serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin karışımı içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ve RPMI-1640 besiyeri (%10 FBS, %1 penisilin ve streptomisin karışımı içeren) besi ortamı içerisinde 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem koşullarında inkübatör içinde kültürlenmiştir. 100 mm'lik steril kültür plakalarında kültürlenmiş kanser hücre hatları (konfluent en az %80 yoğunlukta) 2-3 günde bir pasajlama işlemi yapılmıştır. Hücre besiyeri ortamdan uzaklaştırılır ve 1ml PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkama işlemi yapılmıştır, kalan besiyeri uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücreler %0,25'lik Tripsin-EDTA (1mL) eklenmiştir

ve enzimin aktif çalıştığı 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem koşullarında 3-4 dakika inkübe edilmiştir. Tripsin-EDTA inhibe etmek için (en az 2 katı) 2 mL besiyeri eklenerek hücreler 15 mL'lik falkon tüplere toplanıp hücre süspansiyonu 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra 1 mL taze besiyeri ile pelet çözülmüştür. Hücreler yeni 100 mm'lik steril kültür plakalara taze besiyeri (yaklaşık 10 mL) eklenip hücre ekimi yapıldıktan sonra 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılması sağlanmıştır. (Sahin ve diğ. 2021)

2.2.7 Hücre Sayımı ve Stoklanması

Kültür plakalarındaki konfluent hücreler en az %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra besiyeri uzaklaştırılmıştır. 1ml PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkama işlemi yapılmış, kalan besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler tripsinin aktivite gösterdiği 37°C'de 3-4 dakika inkübe edilmiştir. %0,25'lik Tripsin-EDTA inhibe etmek için (hacminin en az iki katı) 2 mL besiyeri ile inhibe edilmiştir. Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirildikten sonra bir falkon tüpe aktarılmıştır. Hücre süspansiyonu 2000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1 mL taze besiyerinde çözülmüştür. Hücreler toplandıktan sonra 1:1 oranında %0,4'lük tripan mavi boyası ile süspanse edilmiştir. Tripan mavi boyası ile ölü hücrelerin hücre membranını boyayarak canlı hücre sayısının hesaplaması invert mikroskop (OxionInverso, Euromex, Hollanda) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımı hesaplamak için aşağıda verilen formül kullanılmıştır.

$$\text{Sayılan hücre sayısı} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 10.000 = \text{Toplam hücre sayısı}$$

Hücrelerin stoklanması için ise hücreler 1 mL taze besiyeri ile çözüldükten sonra stoğun %70'i (700 µL) hücre süspansiyonu, %20'si FBS (200 µL), %10'u DMSO (100 µL) olacak şekilde karyoviyal tüpe aktarılmıştır ve -80°C'de saklanmıştır.

2.2.8 MTT Yöntemi ile Hücre Canlılık Testi

Hücre pasajlama aşamasındayken besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve 1 mL PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkama işlemi yapılmış, kalan besiyeri uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücreler %0,25'lik Tripsin-EDTA (1mL) eklenmiş ve enzimin aktif çalıştığı 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem koşullarında 3-4 dakika inkübe edilmiştir. Tripsin-EDTA inhibe etmek için (en az 2 katı) 2 mL besiyeri eklenerek hücreler 15 mL'lik falkon tüplere toplanıp hücre süspansiyonu 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra 1 mL taze besiyeri ile pelet çözölmüştür. Konsantrasyonları hazırlanan benzotiyofen türevlerinin sitotoksikite analizleri için pelet çözöldükten sonra 96 kuyucuklu plakalara, her kuyucuğa 10³ hücre olacak şekilde (son hacim 100µl) ekim yapılmıştır ve 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak DMSO kullanılmıştır. 24 saat inkübasyondan sonra belirlenen konsantrasyonlar (15,6; 31,25; 62,5;125;250 µg/mL) son hacim 200µl olacak şekilde uygulanmıştır. 24 saat inkübe edildikten sonra MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipenyltetrazolium bromide] ile hücre canlılığı analiz edilmiştir. Besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra her kuyuya 100 µL taze besiyeri ve 10 µl MTT (0,5 mg/mL) solüsyonu uygulanmıştır. 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatörde 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından MTT solüsyonu uzaklaştırılmış ve her kuyu için 50 µL DMSO eklenmiştir. Metabolik aktivite sonucunda oluşan formazan kristellerinin DMSO içinde çözülmesi ile sonunda oluşan renk 590 nm dalga boyunda Epoch Mikroplaka (BioTek, ABD) okuyucuda absorbans değerleri ölçölmüştür. Elde edilen hücre canlılığı yüzdesi, logaritmik, üstel hesaplama yapılarak yarisını öldüren konsantrasyon (EC₅₀) değerleri GraphPad v.9 programı ile hesaplanmıştır. Bu bağlamda hiç benzotiyofen türevleri ile muamele edilmeyen negatif kontrol grubu, benzotiyofen ile muamele edilen gruplar ile karşılaştırılarak farklı dozlardaki benzotiyofen türevlerinin hücre canlılığına olan etkisi saptanmıştır (Sahin ve diğ. 2021).

2.2.9 Apoptoz Analizleri

Apoptoz analiz sonuçları için Benzotiyofen türevlerinin uygulandığı A549, Caco-2, MDA-MB-231, HeLa hücre hatlarında sitotoksik aktivitesi sonucunda EC₅₀ değer dozları hesaplanmıştır. Apoptozun belirlenmesi için Elabscience markasının

Annexin-V/FITC/PI Apoptoz Kiti kullanılarak Akış Sitometri cihazında ölçüm yapılmıştır. Hücreler, 6 kuyucuklu plakalarda, her kuyucuğa 3×10^4 hücre olacak şekilde, (son hacim 3000 μ L) ekimi yapılmıştır ve 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra eski besiyeri uzaklaştırılıp yeni besiyeri eklenmiştir. Sitotoksikite deneylerinde belirlenen hücre hatları üzerinde sitotoksik aktiviteye sahip benzotiyofen türevlerinin EC50 değer dozları yeni besiyeri içerisinde uygulama yapılacaktır (son hacim 3000 μ L) ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 1 mL besiyeri ependorfa alınmış ve kalan besiyeri uzaklaştırılmıştır, 300 μ L Tripsin-EDTA ile 2-3 dakika inkübe edildikten sonra en az 2 katı kadar besiyeri (EC50 değer dozu muamele edilmiş önceden ependorfa alınan 1 mL) eklenerek hücreler ependorfa alınmıştır. 2000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 500 μ L PBS eklenip 2000 rpm’de 5 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası pelet üzerine (örnek başına) 100 μ L 1X Binding Buffer ve 2,5 μ L Annexin V-FITC ve 2,5 μ L Propidium İyodür (PI) eklenerek up & down edilmiş ve 15-20 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre sonunda 400 μ L 1X Binding Buffer her bir örneğe ilave ederek karıştırılır. BECKMAN Cytoflex Akış Sitometri cihazında, CytoExpert programı kullanılarak canlı hücre, apoptotik hücre ve nekrotik hücre yüzdeleri hesaplanmıştır ve apoptoz analizi yapılmıştır. Her hücre için negatif kontrol DMSO, pozitif kontrol olarak Pax (Paklitaksel) kullanılmıştır.

2.2.10 İnflamatuar Analizleri

Belirlenen hücre hatlarında inflamasyon oluşturmak amacıyla Lipopolisakkarit (LPS) kullanıldı. Bu kapsamda, belirlenen hücreler %10 FBS ve 100 μ g/ml penisilin ve 100 μ g/mL streptomisin antibiyotikler ile desteklenmiş DMEM besiyerinde, 96 kuyucuklu kültür plakasına 1×10^5 (yoğunluğunda) hücre ekildi ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından fenol kırmızısı içermeyen besiyeri içerisinde 1 μ g/mL konsantrasyonunda LPS ve 1 saat sonra farklı konsantrasyonlarda bileşikler uygulanmıştır.

Tablo 2.2.’de verilen inflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini saptamak için mRNA düzeyleri Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile kantite edilmiştir.

Bu amaçla, Total RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Gerçek zamanlı PZR işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.2. İnflamatuar analizinde seçilen genler için tanımlanan primer dizileri.

Gen	Forward Primer	Revers Primer
GAPDH	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG
COX-2	CGGTGAAACTCTGGCTAGACAG	GCAAACCGTAGATGCTCAGGGA
iNOS	GCTCTACACCTCCAATGTGACC	CTGCCGAGATTTGAGCCTCATG

2.2.1 cDNA Sentezi Yöntemi

Komplementer DNA (cDNA) sentezi için önceden izole edilen total RNA örnekleri OnceScript Plus cDNA Sentez Kiti (abm, Canada) ve prosedürüne göre kullanılarak sentezlenmiştir ve cDNA'lar -20C°'de saklanmıştır.

2.2.2 Total RNA İzolasyon Yöntemi

Apoptoz yollarında görev alan aday genlerin (Bax, Bcl-2, Casp3, Casp8 ve Casp9) gen ekspresyon seviyelerinin total RNA izolasyonu, innuPREP RNA Mini Kiti (AnalitikJena, Almanya) izolasyon kiti kullanılarak, protokolün öngördüğü metot ile yapılmıştır. 6 kuyucuklu plakalara 10⁴ hücre ekildikten sonra Q18, Q19, Q20, Q21, Q22 ve Q23 maddelerinin en etkin dozları (EC50) uygulanmıştır. 24 saat 37 °C, %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra PBS tamponu ile yıkanıp ardından 400 µL Lysis buffer ile hücreler epondorfa toplanmıştır. 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hücrelerin lizis aşamasından sonra mavi halkalı filtre D kolonuna yüklenerek 11.000'de 2 dakika santrifüj edilip ardından Filtre D atılmıştır ve 400 µl'lik lizatın üzerine 400 µl %75'lük etanol eklenerek up-down yapılmıştır. Mor halkalı filtre R kolonuna yüklenip 11.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Alt tüp değiştirildikten sonra filtre R kolonuna etanol içeren yıkama solüsyonu (HS) 500µl eklenmiştir ve 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon tekrar (LS) yıkama solüsyonu ile

mumamele edildikten sonra 40µl RNase-free su ile elüsyon yapılmıştır. Total RNA izolasyonu Epoch Mikroplaka Okuyuculu Spektroskopi cihazı ile Take-3 nanodrop aparatı kullanılarak 260/280 nm'de ölçülmüştür. RNA'lar miktarları belirlendikten sonra -80°C'de saklanmıştır.

2.2.3 Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi

İzole edilen RNA örneklerinin görüntüsü elde edilmesi amacıyla 1X Tris Asetik Asit EDTA (40 mM Tris, 20 mM Asetik Asit, 1 mM EDTA, pH:8.0) tamponu kullanılmıştır. 0,4 gr agar tartılarak 40 ml TAE (Tris asetik asit EDTA) içerisinde mikrodalga ile ısıtılarak çözülmüştür. 0,75µl EtrBr (0,625 mg/ml) eklenmiştir. Hazırlanan jel, elektroforez tankına dökülerek donması beklenir. Elektroforez tankına 1X TAE eklendikten sonra örnekler jel üzerindeki kuyucuklara yüklenip 90 Volt, 45 dakika, 500 mA'de yürütülür. Örnek miktarları ve marker (abm 1kb plus Opti-DNA Marker) kuyulara yüklenip RNA görüntüsü elde edilmiştir.

2.2.4 Real Time PCR (qRT-PCR) Tespit Edilmesi

Tablo 2.3.'de verilen apoptozla ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini saptamak için mRNA düzeyleri Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile kantite edilmiştir. Bu amaçla, Total RNA izolasyonu Analytik Jena markasının innuPREP RNA Mini Kit'i kullanılarak üretici firmanın önerdiği prosedür uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 1×10^6 hücreye benzoitofen türevi bileşiklerden uygulanmış ve elde edilen RNA'lar -80°C muhafaza edilmiştir. %1'lik agoroz jel elektroforezinde 18S ve 28S bantlarının sonucuna göre izole edilen RNA'nın kalitesi belirlenmiştir. Epoch Mikroplaka Spektrofotometre yardımıyla RNA miktarı 260/280 nm ölçüldü ve cDNA sentezi sırasında 5 µg RNA kullanılmıştır.

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi abm markasının OneScript cDNA Sentez Kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği prosedür uygulanmıştır. Sentezlenen cDNA'lar, Gerçek zamanlı PZR yapmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir. Bu çalışmada Sentezlenen benzoitofen türevi bileşiklerin, belirtilen

proteinlerin gen ifadeleri düzeylerine etkisini saptamak için, GenBank/EMBL veri bankaları taranarak seçilen genler için uygun primer dizileri saptanmıştır. Gerçek zamanlı PZR işlemi “SyberGreen I” kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği talimatlara göre gerçekleştirilmiştir. (5 µl cDNA -1/10 kez seyreltilmiş-, 15 µl “SyberGreen I”, primer, Taq polimeraz ve steril su içeren karışımın karıştırılarak PZR cihazının içerisine konulacaktır). Her gen için bu ön optimizasyon yapılarak uygun koşullar belirlenmiştir.

Tablo 2.3. Apoptoz ilişkili genlerin primer dizileri.

Gen	Forward Primer	Revers Primer
GAPDH (Human)	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
BAX	TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG	TGTGTCCACGGCGGCAATCATC
BCL-2	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT	GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
CASP3	GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG	GCATCGACATCTGTACCAGACC
CASP8	AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA	TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC
CASP9	GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT	CAACGTACCAGGAGCCACTCTT

cDNA eldesi sonrası elde edilen örnekler KiloGreen 2X qPCRMasterMix kiti (abm, Canada) ve StepOnePlus™ Real-Time PZR cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. PCR analizi için 2,5ul cDNA (1:1 oranında seyreltilmiş), 7,5 µl (ABM markasının 2X qPCR mastermix boyası, primerler ve RNase-free su karışımı) toplam hacim 10 µl olacak şekilde karıştırılıp analiz gerçekleştirilmiştir. Kantitatif Real Time PCR değerlendirilmesinde gen ekspresyonu housekeeping geni GAPDH’e göre hesaplanmıştır. Tüm örnekler duplike olarak çalışılmıştır. Amplikasyon sonucunda Ct (threshold) değerleri çalışılan 7 gen (Apoptoz yolağındaki ilişkili genler GAPDH, BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, CASP9) için mRNA düzeyinde ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Apoptoz yolları ile ilişkili olan genler Tablo 2.3.’te verilmiştir. Hedef genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri $\Delta\Delta C_t$ metoduna göre belirlenmiştir. (Tablo 2.3.)

2.2.5 İstatistik Analizi

Tüm deneyler en az üç kez tekrar edilmiştir. Veriler, GraphPad v.9 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak gösterilmiş ve farklar one-way ANOVA, two-way ANOVA, student-t testi kullanılarak ölçülmüştür. İstatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



3. BULGULAR

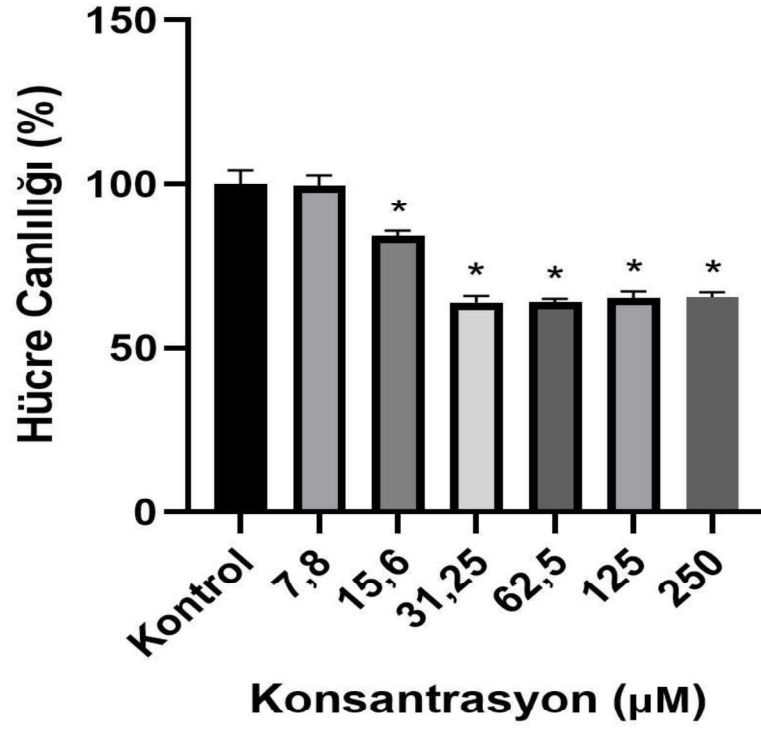
Bu çalışmada İnsan Akciğer (A549), Serviks (HeLa), Kolarektal (CaCo-2) ve Meme (MDA-MB-231) kanseri hücre hatları ile İnsan Sağlıklı Embriyonik Böbrek (HEK293) hücre hattı, %10 Fetal Sığır Serumı (FBS) ve %1 Penisilin/Streptomisin karışımı içeren DMEM veya RPMI besi ortamında 37 °C'de, %95 nem koşullarında ve %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. %80 yoğunluğa ulaştıklarında çalışmalarda kullanılmak üzere yaklaşık 1x10⁶ hücre, %20 FBS ve %10 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren besiyeri ile -80°C dondurucuda stoklanmıştır.

3.1 Hücre Kültürü ve Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi

A549, MDA-MB-231, Caco-2 ve HeLa hücre hatları ile HEK293 hücre hatları sırasıyla 37°C'de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde ve %10 Fetal sığır serumu (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin karışımı içeren RPMI veya DMEM besiyerinde çoğaltılmıştır. İnkübe edilen hücreler yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştıklarında çalışmalarda kullanılmak üzere 96 kuyucuklu plakalara ekilerek 24 saat uygulama yapılmıştır. Kontrol grubuna bileşiklerin test edildiği hacimce aynı oranda (v/v) çözücü (DMSO) uygulanmıştır.

Çalışmada yer alan benzotiyofen türevleri (Q18, Q19, Q20, Q21, Q22, Q23), %100 DMSO (Dimetil sülfoksit) içerisinde çözülerek farklı konsantrasyonlarda (15,6; 31,25; 62,5; 125; 250 µM) uygulanmıştır. Bileşiklerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) hücre canlılık testi yapılarak elde edilmiştir (Şekil 3.1-30). Test sonucu absorbands değerlerine göre yarı maksimal efektif doz (EC50) değerleri hesaplanmıştır. (Tablo 3.1.)

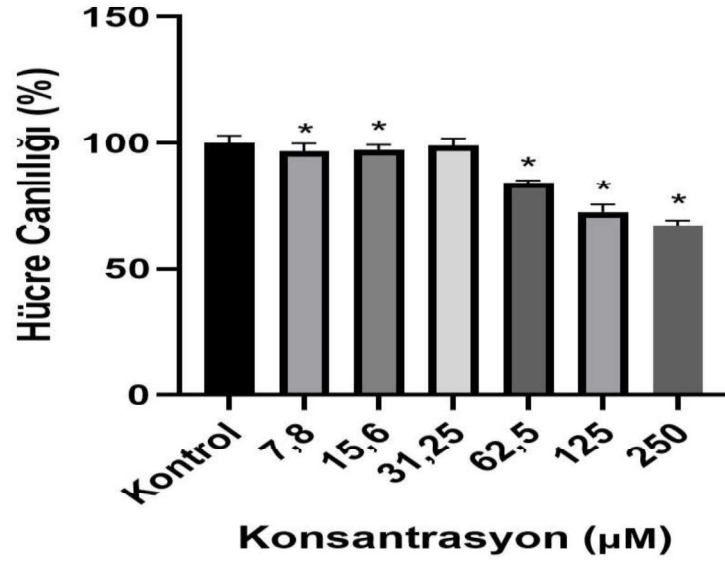
Q18 bileşiminin Sağlıklı İnsan Embriyonik Böbrek (HEK293) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Q18 Bileşiminin HEK293 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

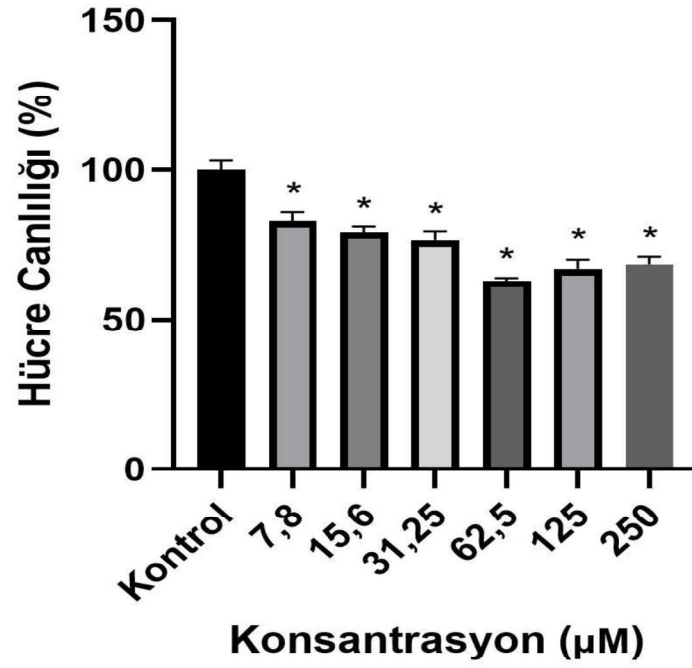
Q19 bileşiminin Sağlıklı İnsan Embriyonik Böbrek (HEK293) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Q19 Bileşiminin HEK293 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

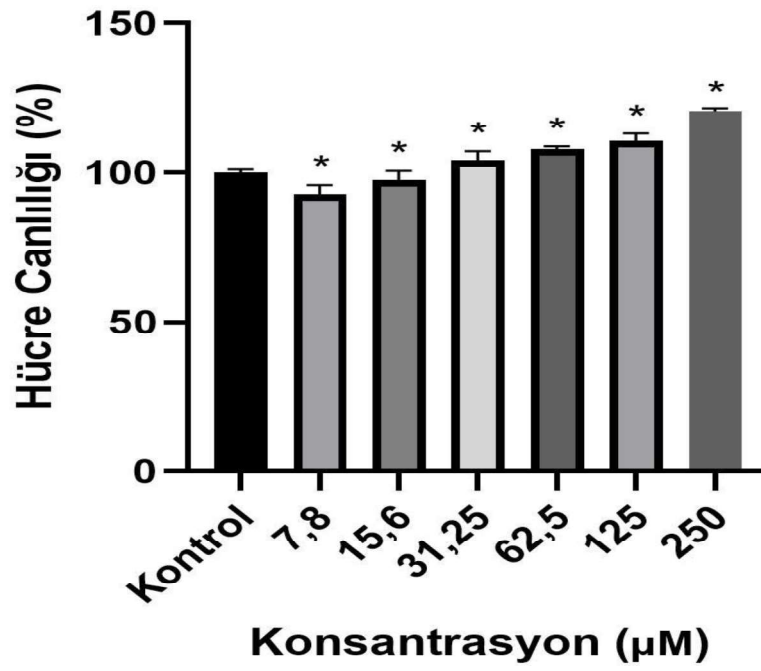
Q20 bileşiminin Sağlıklı İnsan Embriyonik Böbrek (HEK293) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Q20 Bileşiminin HEK293 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

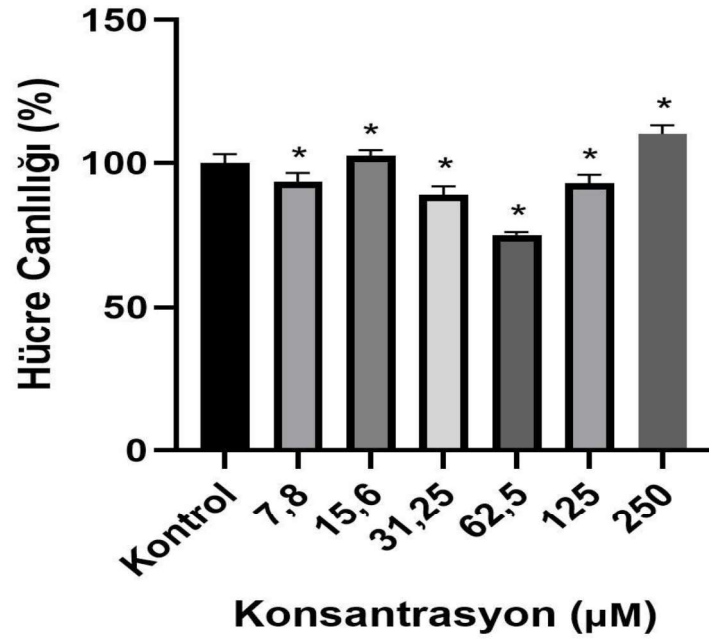
Q21 bileşiminin Sağlıklı İnsan Embriyonik Böbrek (HEK293) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Q21 Bileşiminin HEK293 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

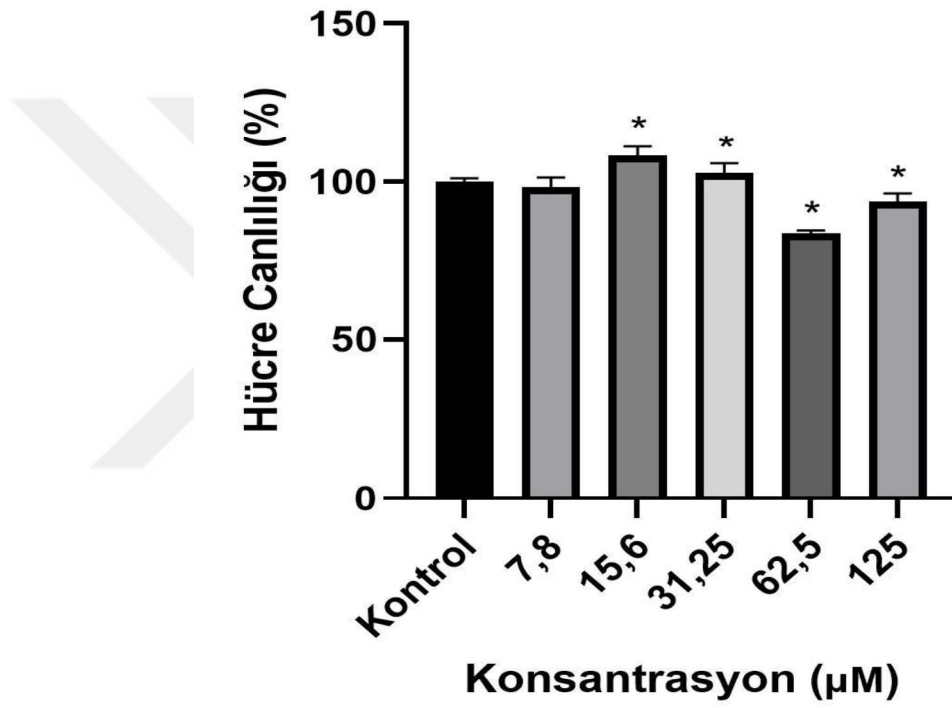
Q22 bileşiminin Sağlıklı İnsan Embriyonik Böbrek (HEK293) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Q22 Bileşiminin HEK293 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

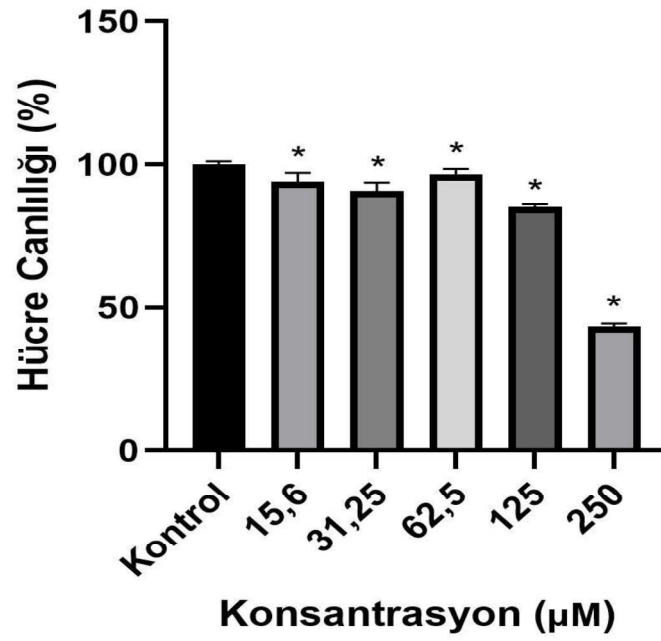
Q23 bileşiminin Sağlıklı İnsan Embriyonik Böbrek (HEK293) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Q23 Bileşiminin HEK293 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

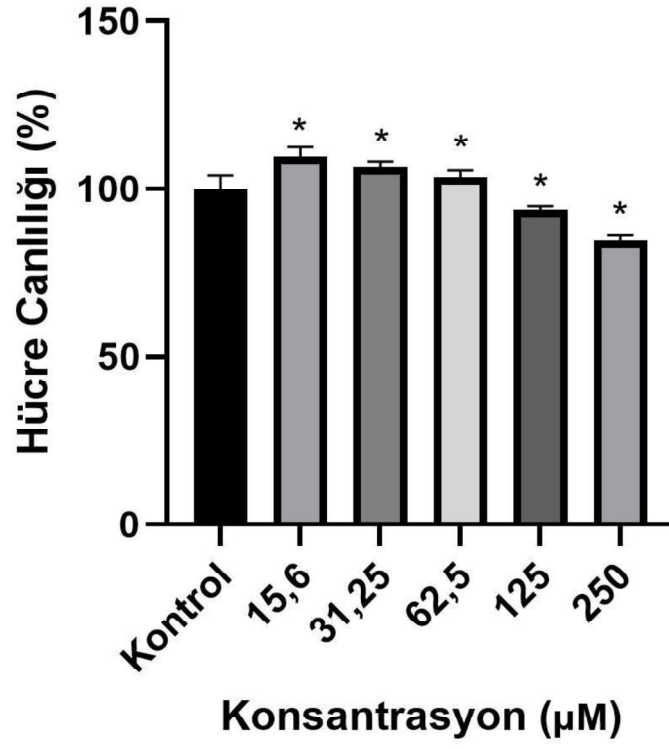
Q18 bileşiminin İnsan Akciğer Kanseri (A549) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre Q18 bileşiminin etkili olduğu ($EC_{50}=233,8 \mu M$) ve sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Q18 Bileşiminin A549 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

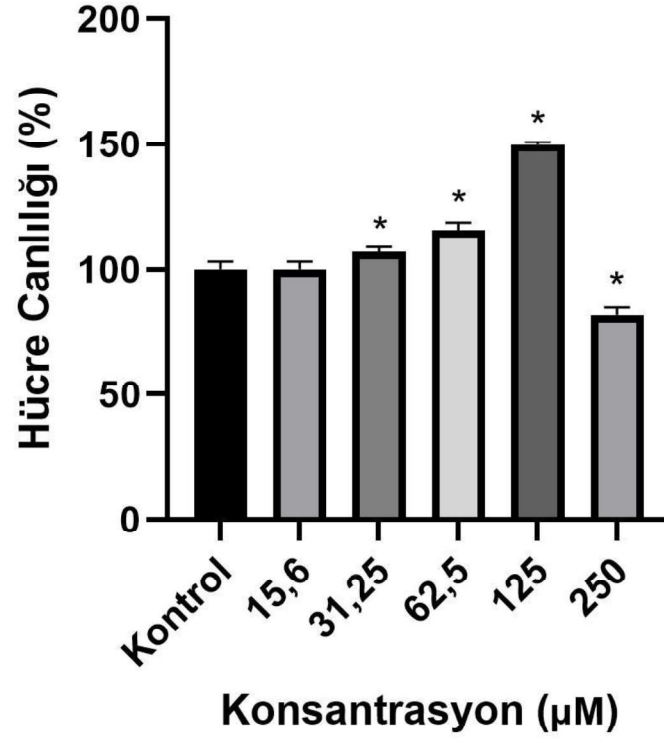
Q19 bileşığının İnsan Akciğer Kanseri (A549) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Q19 Bileşığının A549 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

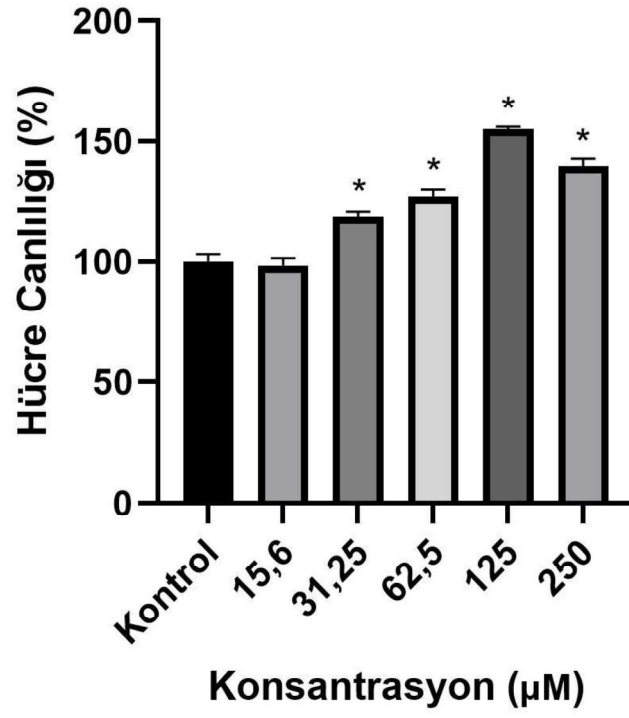
Q20 bileşiminin İnsan Akciğer Kanseri (A549) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. Q20 Bileşiminin A549 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

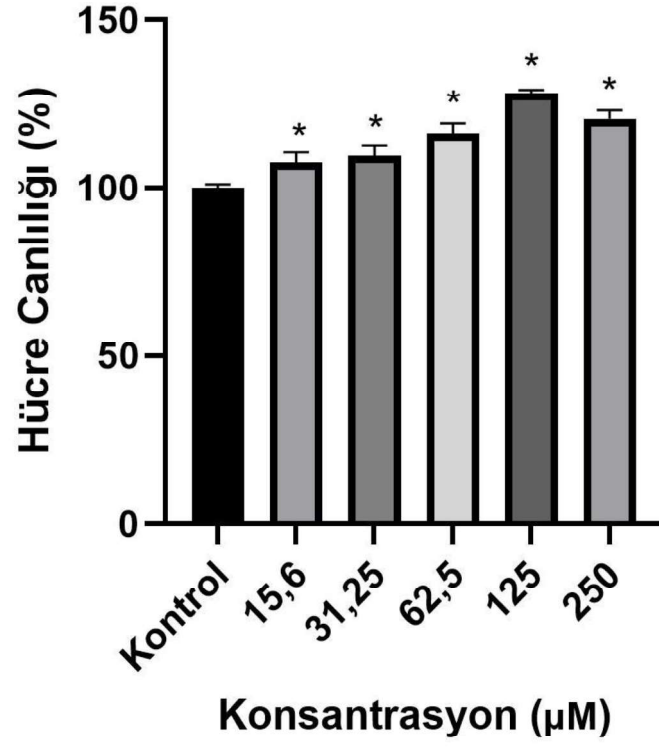
Q21 bileşığının İnsan Akciğer Kanseri (A549) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. Q21 Bileşığının A549 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

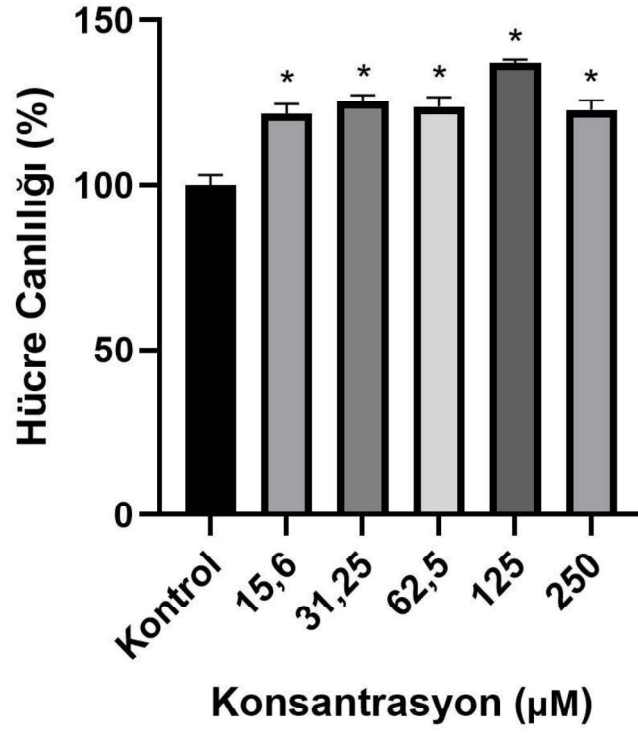
Q22 bileşiminin İnsan Akciğer Kanseri (A549) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. Q22 Bileşiminin A549 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

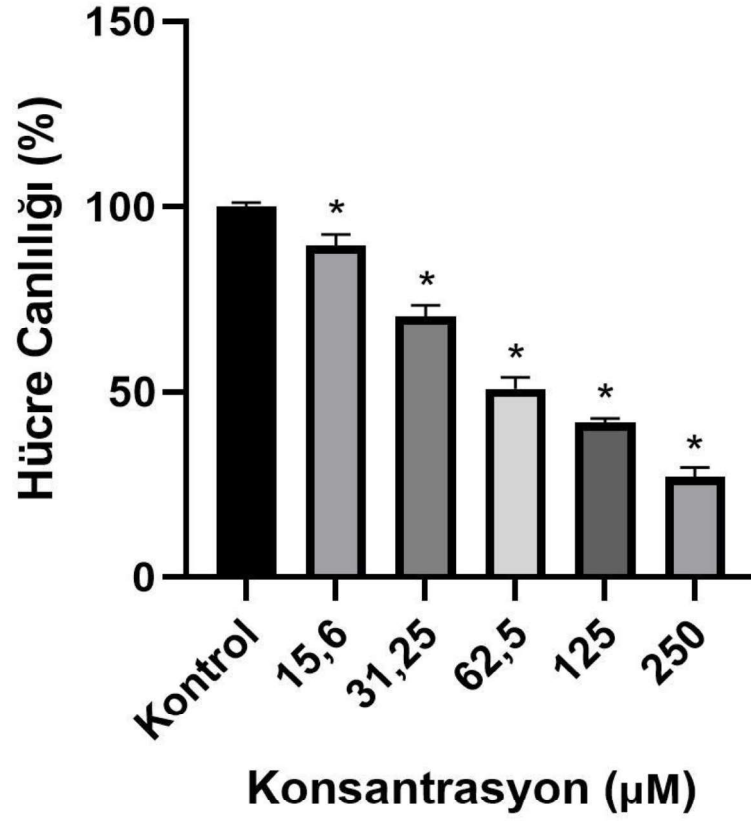
Q23 bileşığının İnsan Akciğer Kanseri (A549) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. Q23 Bileşığının A549 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

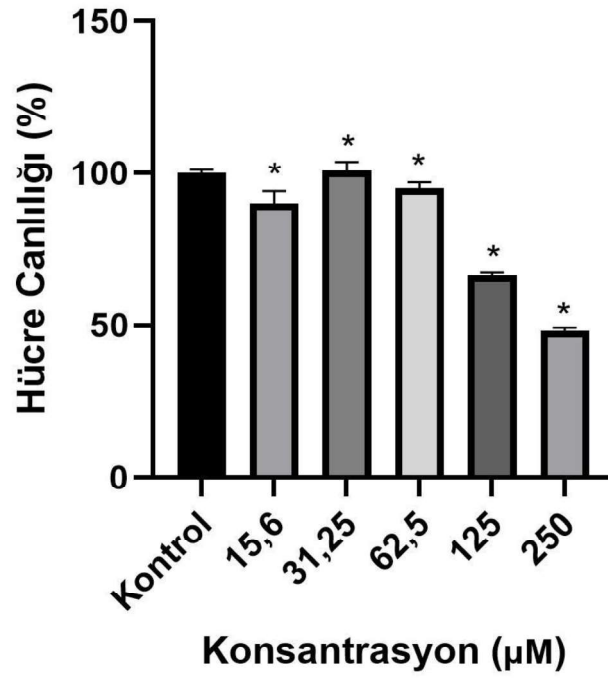
Q18 bileşiminin İnsan Kolorektal Kanseri (Caco-2) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre Q18 bileşiminin etkili olduğu ($EC_{50}=78,18 \mu M$) ve sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. Q18 Bileşiminin Caco-2 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p<0,05$.

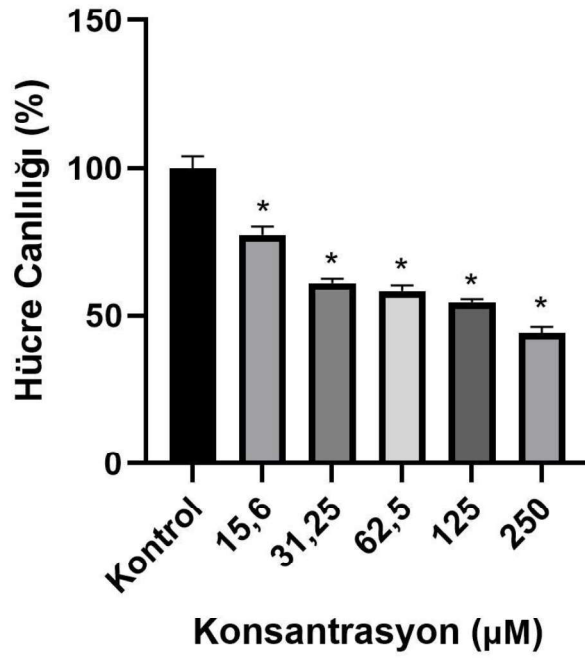
Q19 bileşiğinin İnsan Kolorektal Kanseri (Caco-2) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre Q19 bileşiğinin etkili olduğu (EC50=229,75 μ M) ve sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (şekil 3.14.).



şekil 3.14. Q19 Bileşiğinin Caco-2 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

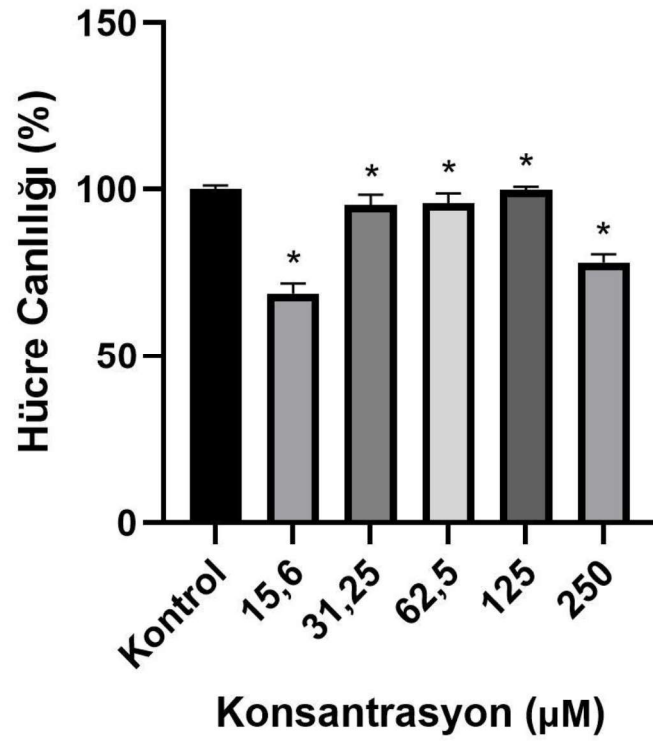
Q20 bileşiminin İnsan Kolorektal Kanseri (Caco-2) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre Q20 bileşiminin etkili olduğu ($EC_{50}=207,51 \mu M$) ve sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3.15.).



Şekil 3.15. Q20 Bileşiminin Caco-2 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p<0,05$.

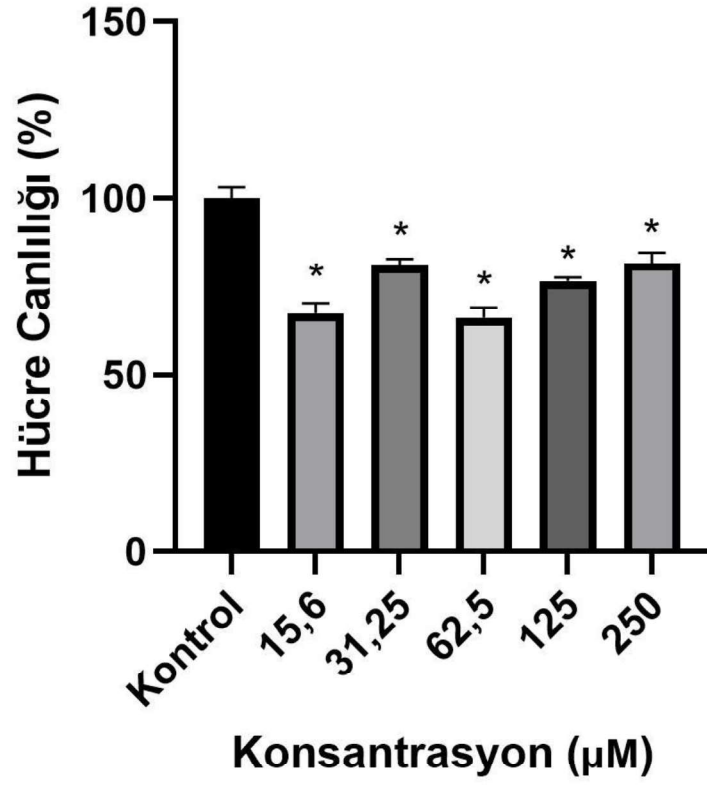
Q21 bileşığının İnsan Kolorektal Kanseri (Caco-2) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.16.).



Şekil 3.16. Q21 Bileşığının Caco-2 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

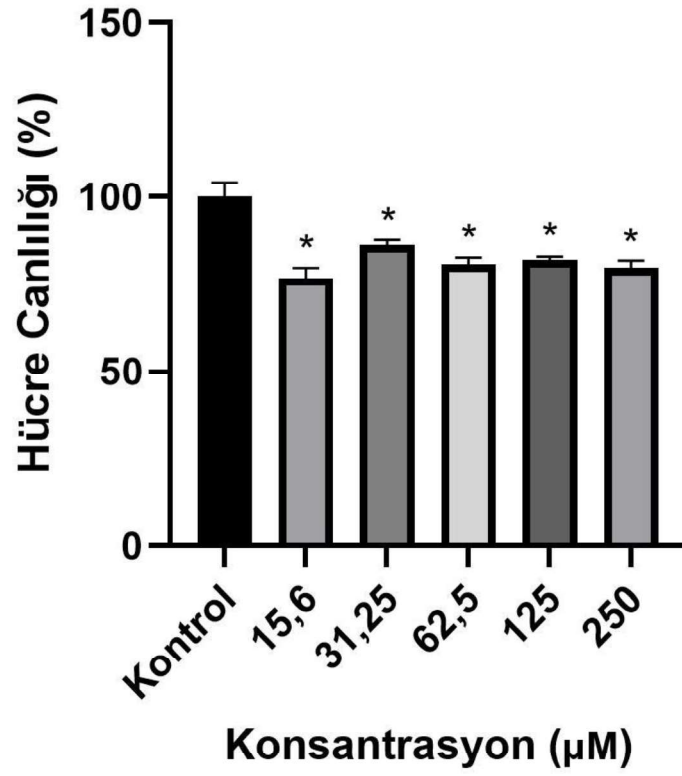
Q22 bileşiminin İnsan Kolorektal Kanseri (Caco-2) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.17.).



Şekil 3.17. Q22 Bileşiminin Caco-2 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

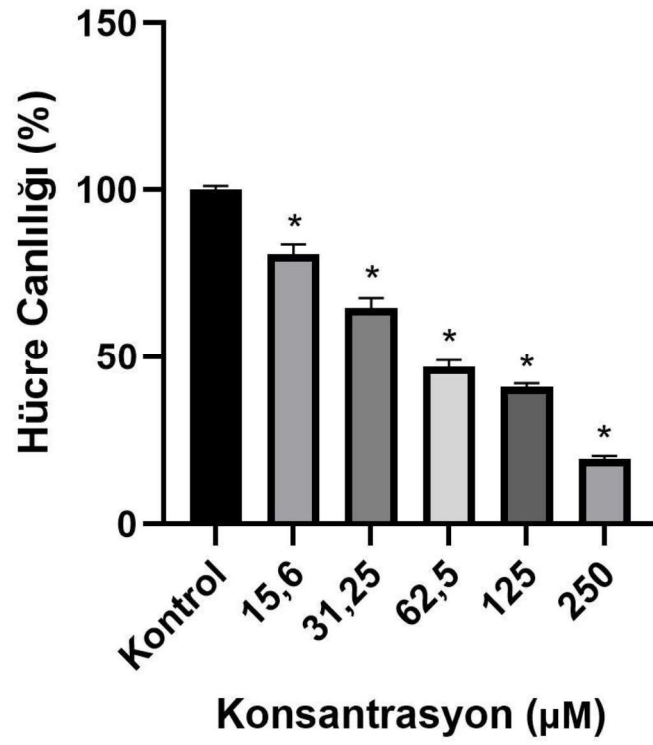
Q23 bileşığının İnsan Kolorektal Kanseri (Caco-2) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.18.).



Şekil 3.18. Q23 Bileşığının Caco-2 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

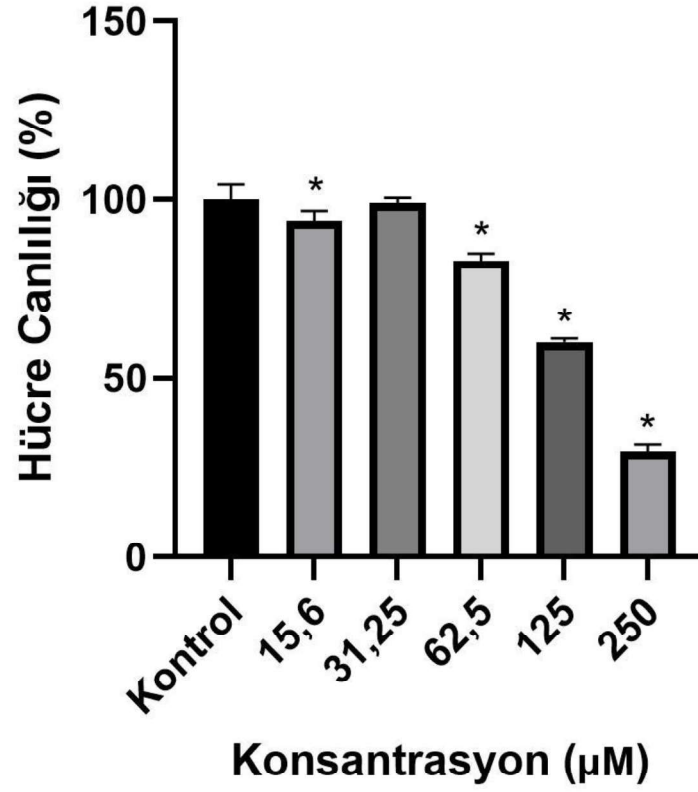
Q18 bileşiminin İnsan Serviks Kanseri (HeLa) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre Q18 bileşiminin etkili olduğu ($EC_{50}=63,57 \mu M$) ve sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3.19.).



Şekil 3.19. Q18 Bileşiminin HeLa Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p<0,05$.

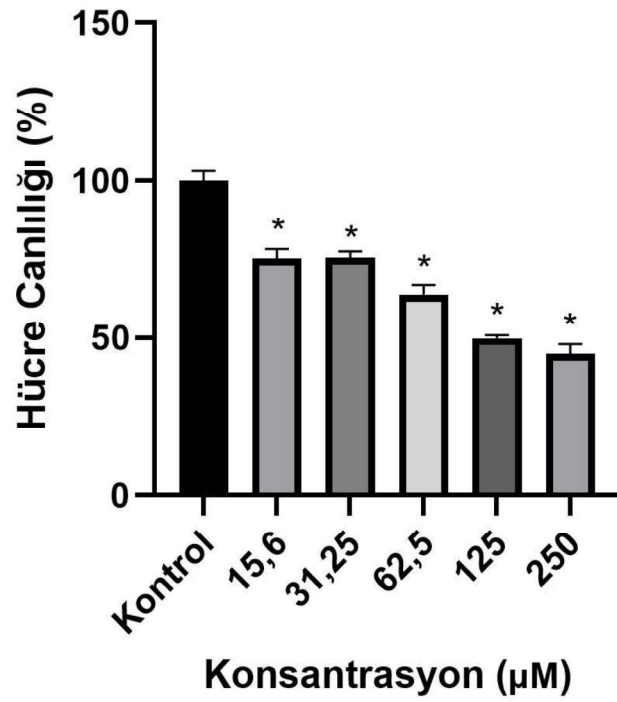
Q19 bileşiğinin İnsan Serviks Kanseri (HeLa) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre Q19 bileşiğinin etkili olduğu (EC50=156,92 μ M) ve sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (şekil 3.20.).



şekil 3.20. Q19 Bileşiğinin HeLa Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

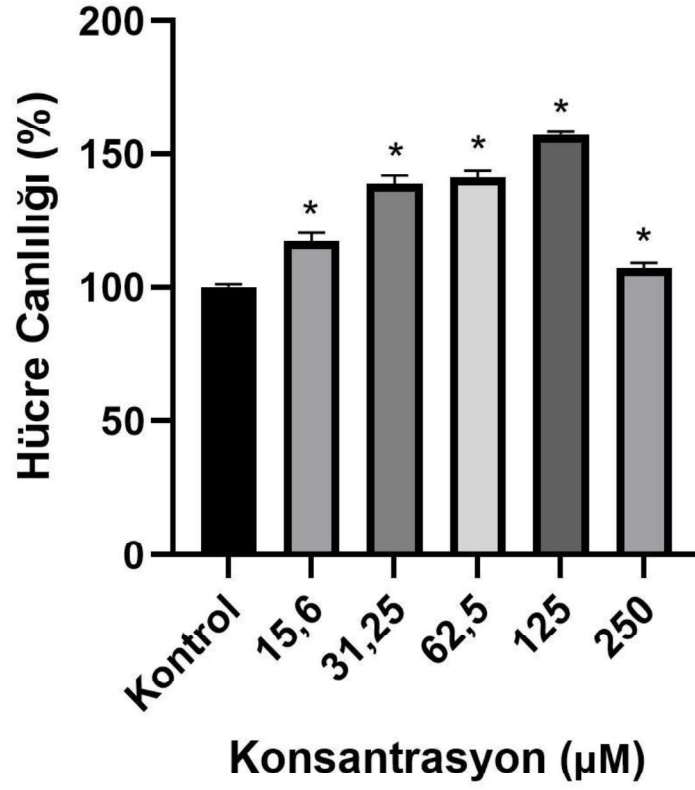
Q20 bileşiğinin İnsan Serviks Kanseri (HeLa) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre Q20 bileşiğinin etkili olduğu (EC50=139,54 μ M) ve sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (şekil 3.21.).



şekil 3.21. Q20 Bileşiğinin HeLa Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

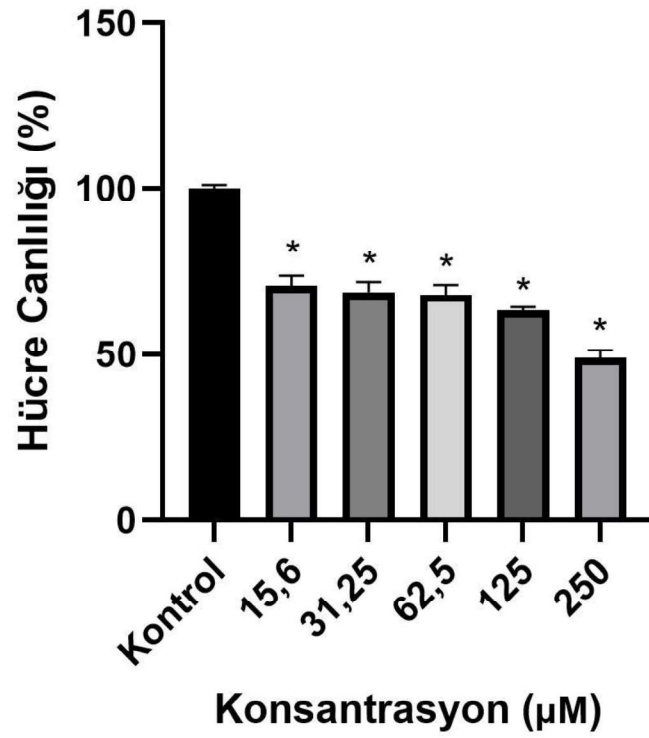
Q21 bileşığının İnsan Serviks Kanseri Hücre Hattı (HeLa) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.22.).



Şekil 3.22. Q21 Bileşığının HeLa Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

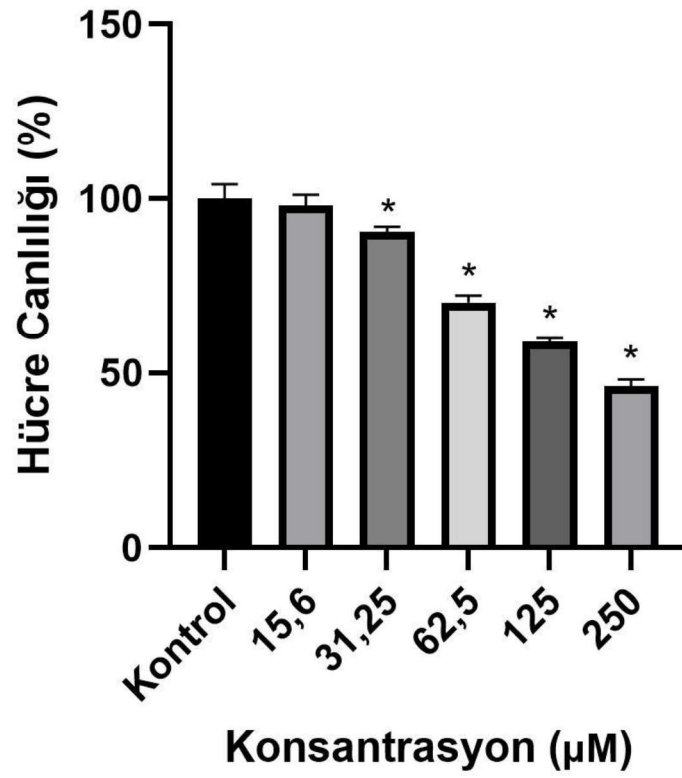
Q22 bileşiminin İnsan Serviks Kanseri (HeLa) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre Q22 bileşiminin etkili olduğu ($EC_{50}=244,73 \mu M$) ve sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3.23.).



Şekil 3.23. Q22 Bileşiminin HeLa Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

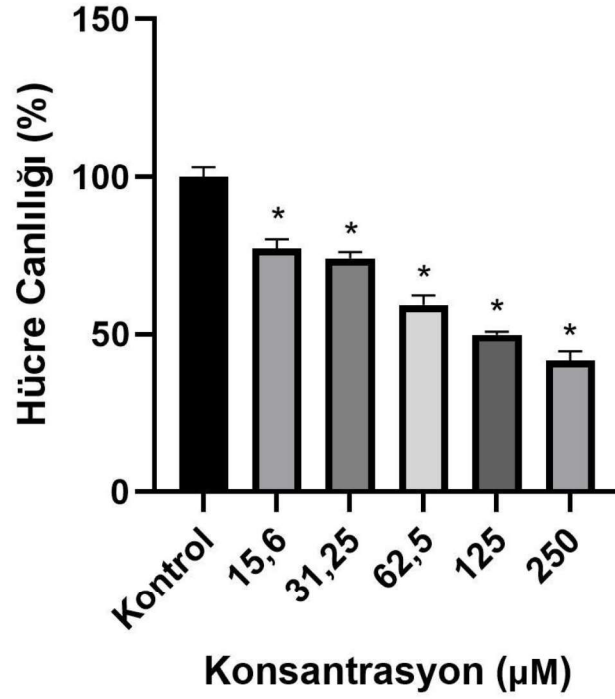
Q23 bileşiminin İnsan Serviks Kanseri (HeLa) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre Q23 bileşiminin etkili olduğu ($EC_{50}=177,93 \mu M$) ve sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3.24.).



Şekil 3.24. Q23 Bileşiminin HeLa Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

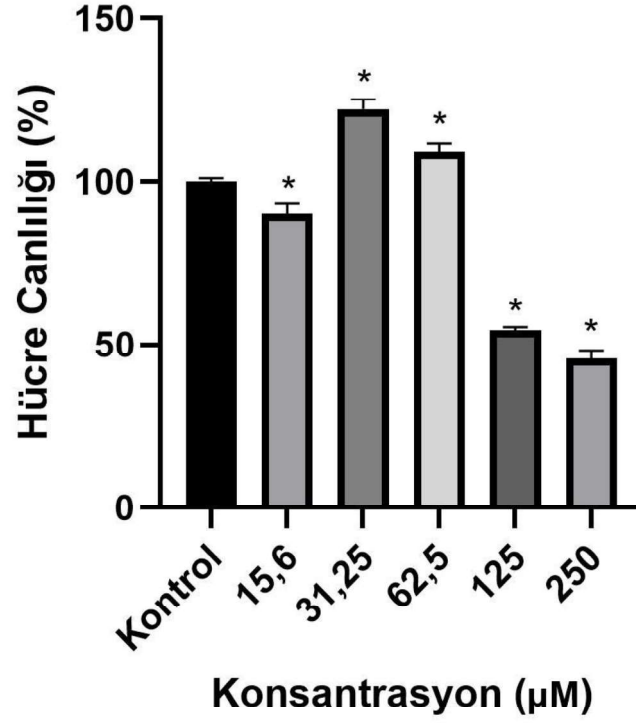
Q18 bileşiminin İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı (MDA-MB-231) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre Q18 bileşiminin etkili olduğu ($EC_{50}=132,52 \mu M$) ve sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3. 25.).



Şekil 3.25. Q18 Bileşiminin MDA-MB-231 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

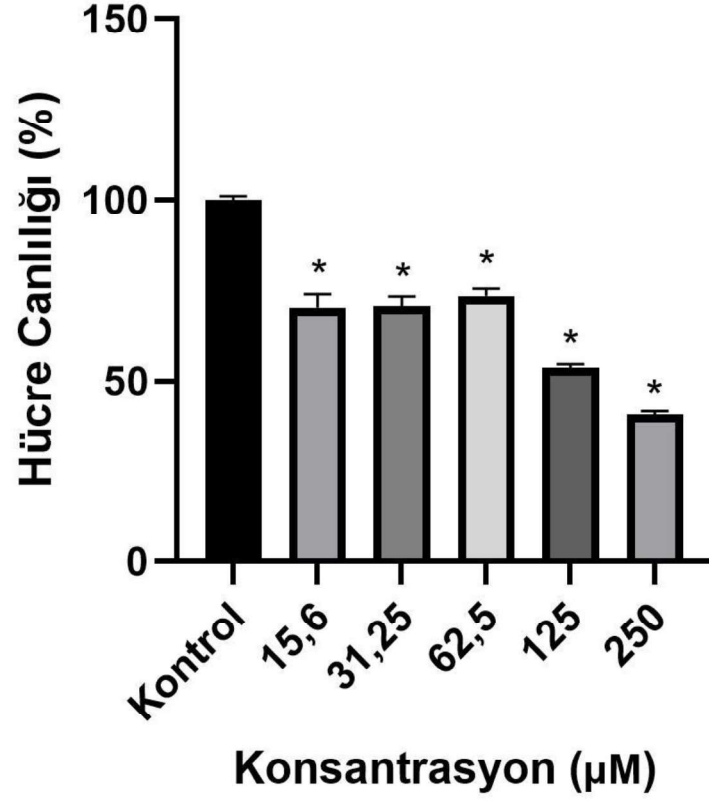
Q19 bileşiminin İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı (MDA-MB-231) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre Q19 bileşiminin etkili olduğu ($EC_{50}=140,54 \mu M$) ve sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3. 26.).



Şekil 3.26. Q19 Bileşiminin MDA-MB-231 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

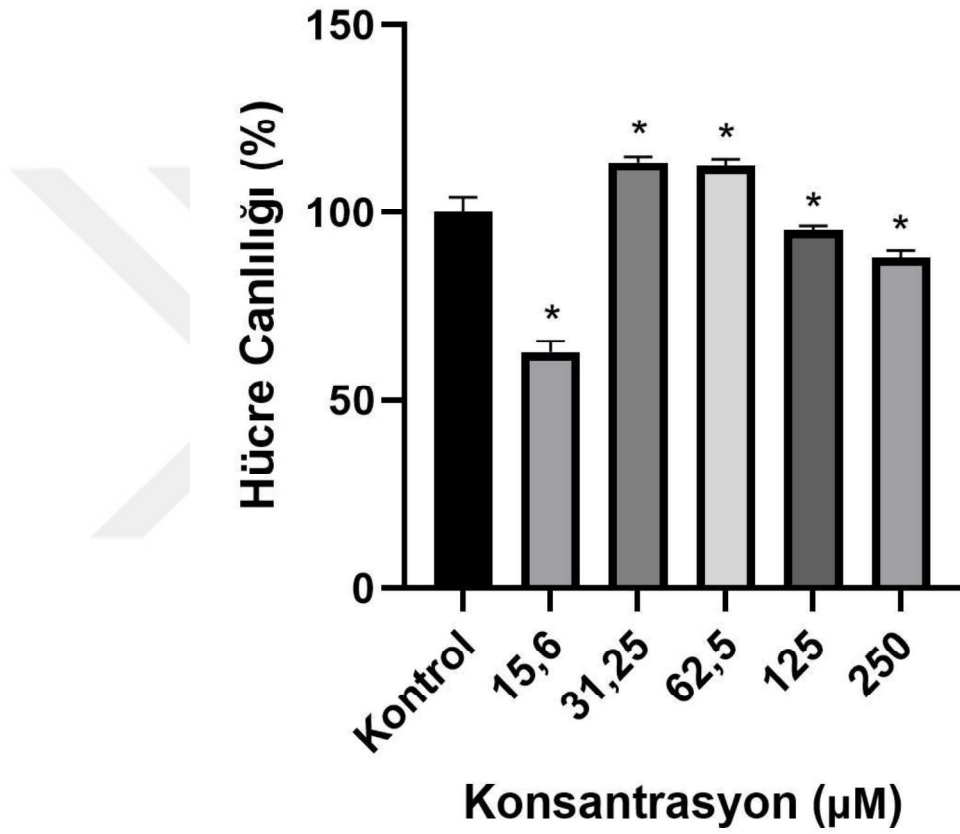
Q20 bileşığının İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı (MDA-MB-231) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre Q20 bileşığının etkili olduğu (EC50=185 μ M) ve sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3.27.).



Şekil 3.27. Q20 Bileşığının MDA-MB-231 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

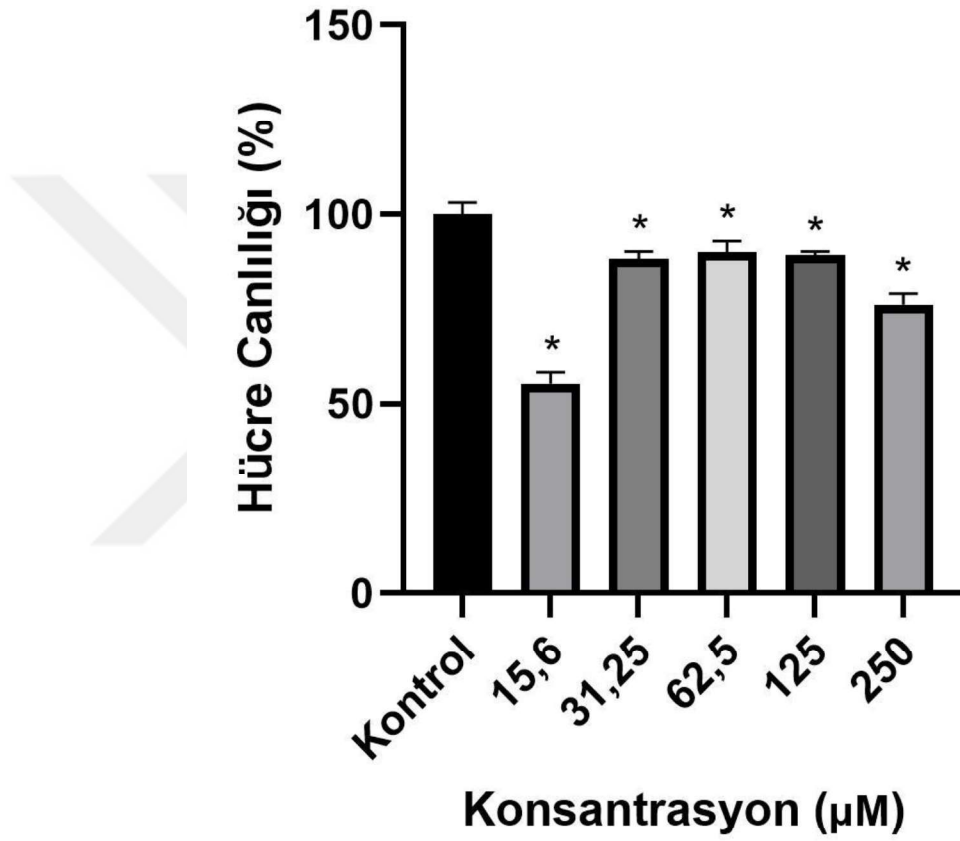
Q21 bileşığının İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı (MDA-MB-231) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3..28.).



Şekil 3.28. Q21 Bileşığının MDA-MB-231 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

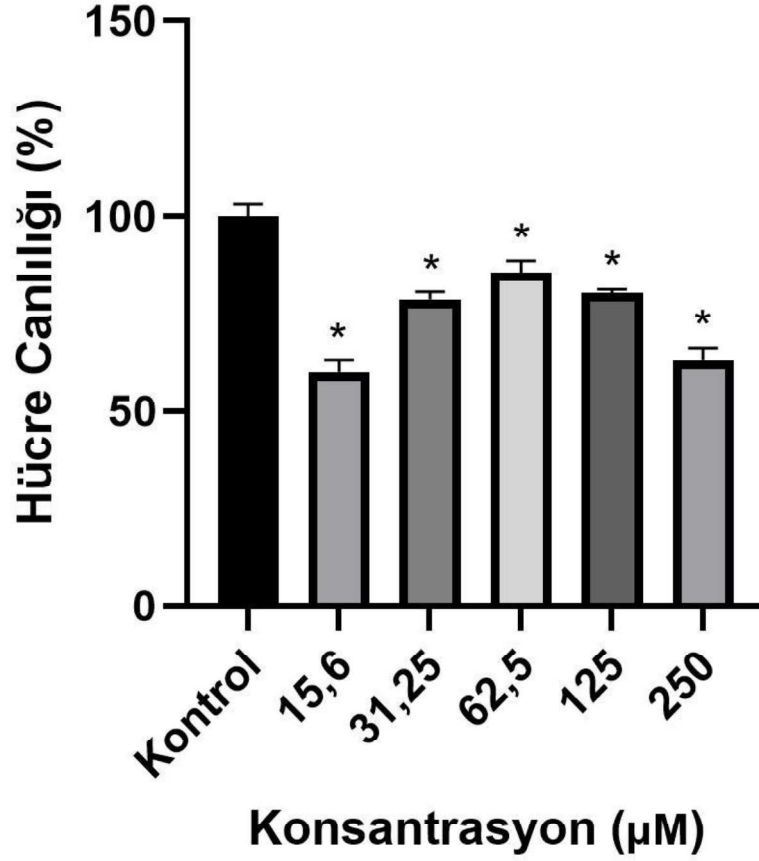
Q22 bileşiminin İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı (MDA-MB-231) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3. 29.).



Şekil 3.29. Q22 Bileşiminin MDA-MB-231 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q23 bileşiminin İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı (MDA-MB-231) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır (Şekil 3.30.).



Şekil 3.30. Q23 Bileşiminin MDA-MB-231 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Bileşiklerin uygun dozları analizlerden hemen önce taze olarak hazırlandı. DMSO'nun nihai konsantrasyonları, hücre büyümesini engellemedi. Çözücünün (DMSO) bu hücre hatlarının büyümesi üzerindeki etkisi, tüm deneylerde, bileşik uygulanmayan kontrol hücrelerinin her deneyde kullanılan maksimum DMSO konsantrasyonuna maruz bırakılmasıyla değerlendirilmiştir. Üstel olarak büyüyen hücreler MTT testi sonucu Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre ile elde edilen absorbans değerleri, kontrol grubu 100 kabul edilerek ve yarı maksimal efektif dozları (EC50) GraphPad Prism v9. uygulaması kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Bileşiklerin EC50 değerleri (µM)

Bileşikler/Hücreler	Q18	Q19	Q20	Q21	Q22	Q23
Hela	63,57	156,92	139,54	*	244,73	177,93
A549	233,8	*	*	*	*	*
Caco-2	78,18	229,75	207,51	*	*	*
MDA-MB-231	132,52	140,54	185	*	*	*
HEK293	*	*	*	*	*	*

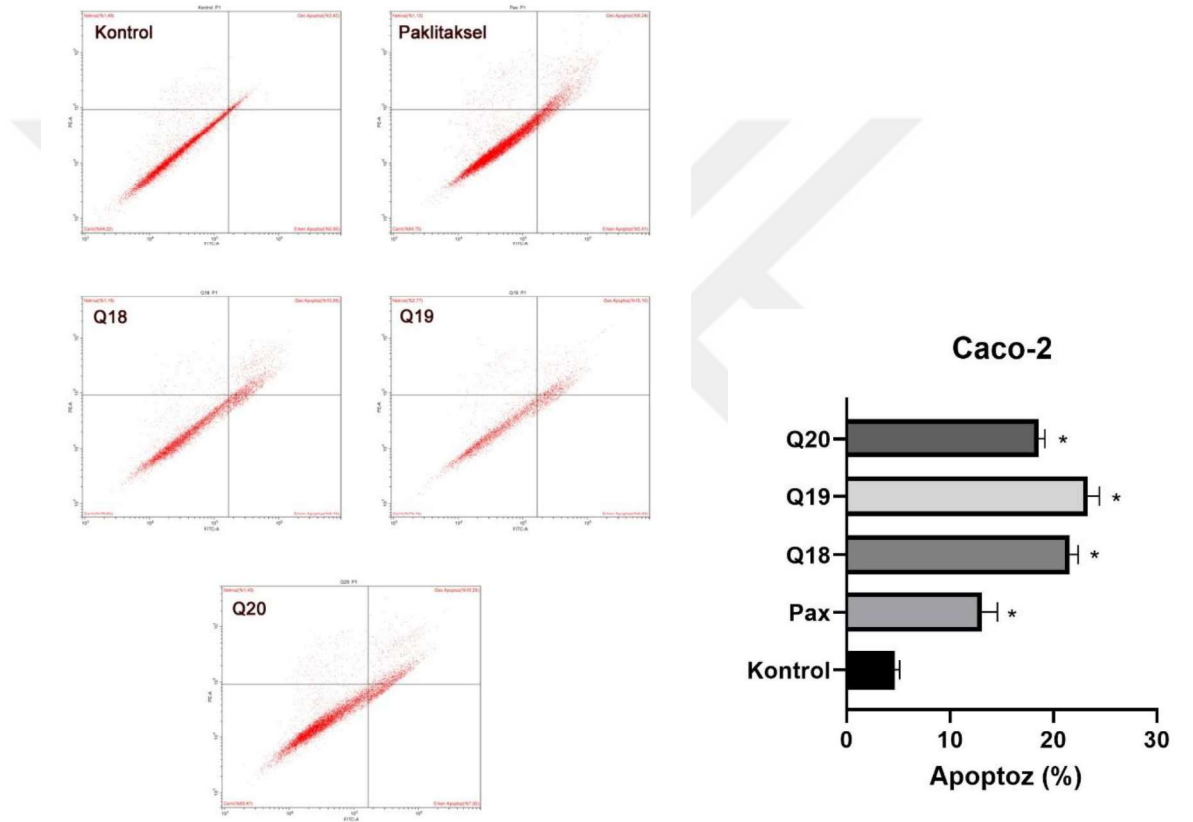
*: Toksik etki tespit edilememiştir.

3.2 Apoptotik Aktivitenin Belirlenmesi

3.2.1 Annexin V/FITC ve PI Boyaması ile Apoptozun Belirlenmesi

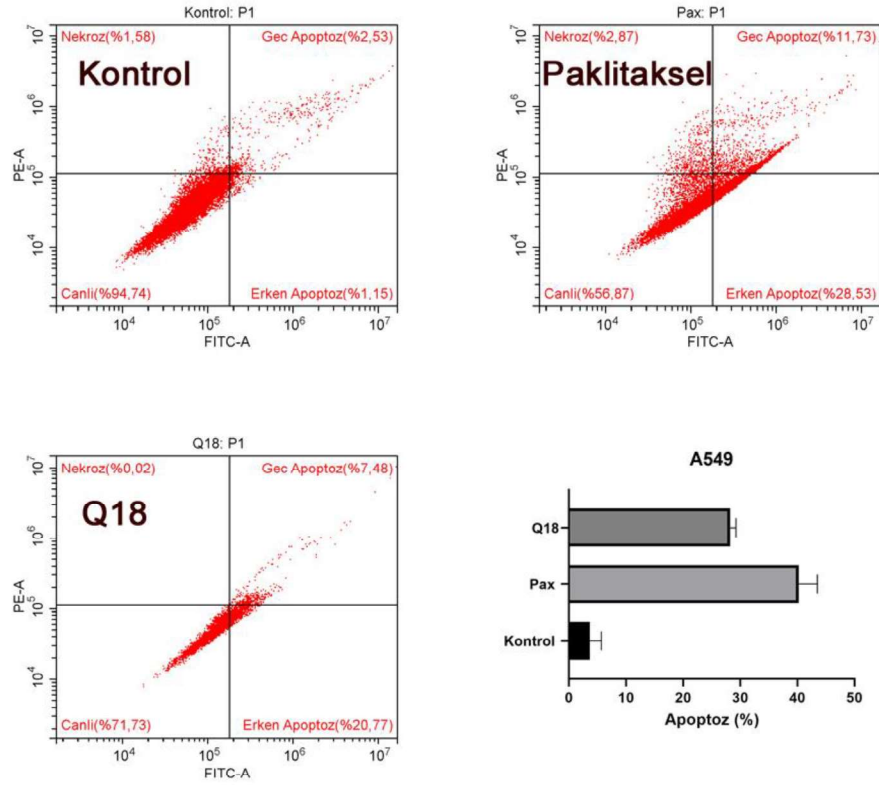
Hücre kültürü çalışmalarında sitotoksik aktivitesi incelenen ve EC50 dozları belirlenen benzo[tiyofen] türevlerinin apoptoz üzerindeki etkileri 6 kuyucuklu plakalara ekilen (her kuyucukta 30×10^4 hücre olacak şekilde) kanser hücre hatlarında çalışılmıştır. Bu doğrultuda hücreler ilgili bileşiklerle 24 saat muamele edilerek, bileşiklerin hücre ölüm mekanizması üzerindeki etkileri insan kolorektal kanseri (Caco-2) hücre hattında Elabscience firmasının Apoptoz Belirleme Kiti (E-CK-A211) kullanılarak belirlenmiştir ve üretici firmanın talimatları doğrultusunda Akış Sitometri cihazında test edilmiştir.

Şekil 3.31’de Caco-2 hücre hattı üzerine Kontrol, Pozitif kontrol (Paklitaksel), Q18, Q19 ve Q20 bileşiklerinin EC50 dozlarının 24 saat uygulama sonrası bileşiklerin Akış Sitometri Cihazı kullanılarak elde edilen sonucuna göre canlı, ölü, erken ve geç apoptotik hücre dağılımları (solda) % apoptoz grafiği (sağda) verilmiştir. Yapılan analizler sonucunda canlı hücre, apoptotik hücre ve nekrotik hücre yüzdeleri belirlenmiştir. Apoptoz analizlerinde pozitif kontrol olarak 20 µg/mL Paklitaksel (Pax) kullanılmıştır. (Şekil 3.31).



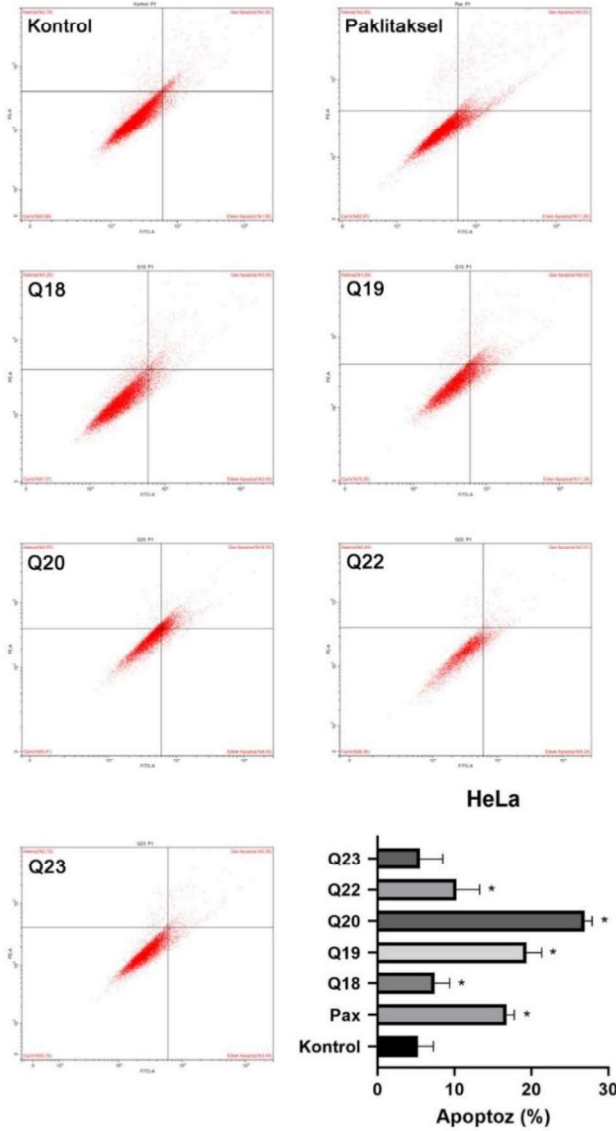
Şekil 3.31. Caco-2 hücrelerinde canlı, ölü, erken ve geç apoptotik hücre dağılımları

Şekil 3.32’de A549 hücre hattı üzerine Kontrol, Pozitif kontrol (Paklitaksel) ve Q18 bileşiğinin EC50 dozu 24 saat uygulama sonrası bileşiklerin Akış Sitometri Cihazı kullanılarak elde edilen sonucuna göre canlı, ölü, erken ve geç apoptotik hücre dağılımları ve % apoptoz grafiği verilmiştir. Yapılan analizler sonucunda canlı hücre, apoptotik hücre ve nekrotik hücre yüzdeleri belirlenmiştir. Apoptoz analizlerinde pozitif kontrol olarak 20 µg/mL Paklitaksel (Pax) kullanılmıştır. (Şekil 3.32).



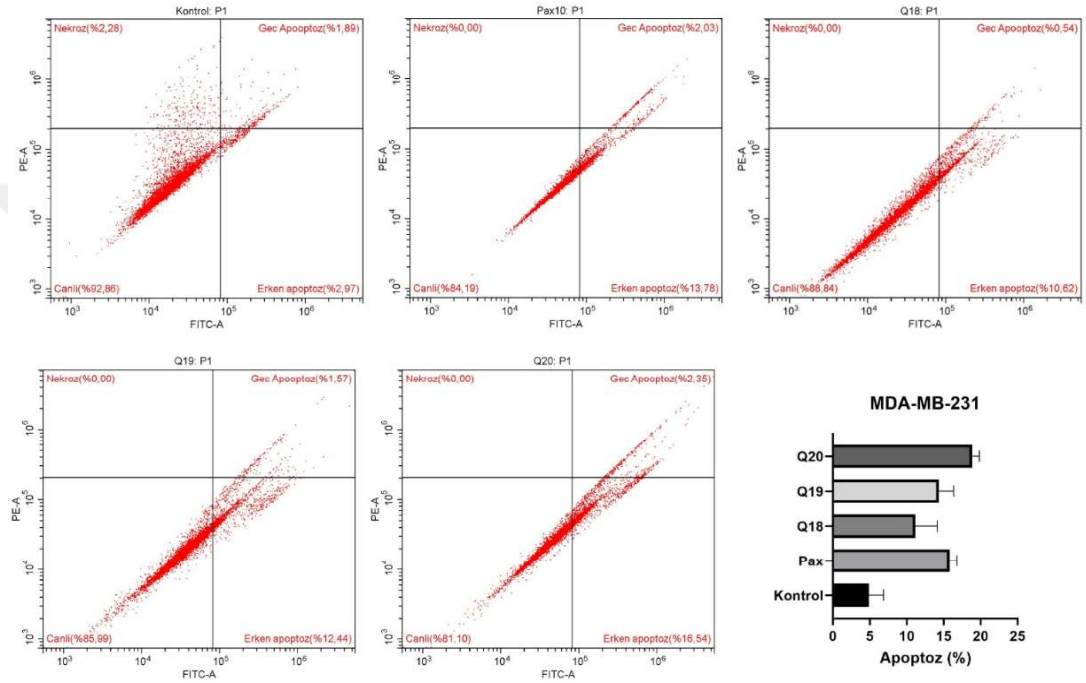
Şekil 3.32. A549 hücrelerinde canlı, ölü, erken ve geç apoptotik hücre dağılımları

Şekil 3.33’da HeLa hücre hattı üzerine Kontrol, Pozitif kontrol (Paklitaksel), Q18, Q19, Q20, Q22 ve Q23 bileşiklerinin EC50 dozu 24 saat uygulama sonrası bileşiklerin Akış Sitometri Cihazı kullanılarak elde edilen sonucuna göre canlı, ölü, erken ve geç apoptotik hücre dağılımları ve % apoptoz grafiği verilmiştir. Yapılan analizler sonucunda canlı hücre, apoptotik hücre ve nekrotik hücre yüzdeleri belirlenmiştir. Apoptoz analizlerinde pozitif kontrol olarak 20 µg/mL Paklitaksel (Pax) kullanılmıştır. (Şekil 3.33).



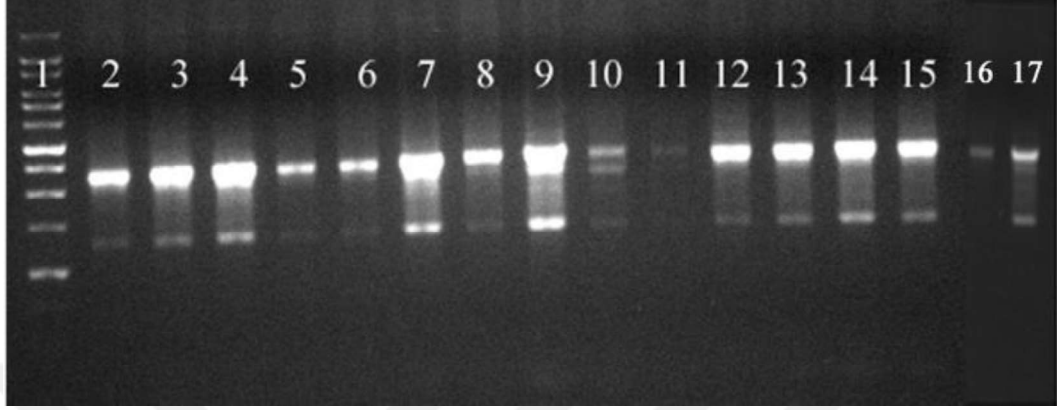
Şekil 3.33. HeLa hücrelerinde canlı, ölü, erken ve geç apoptotik hücre dağılımları

Şekil 3.34’da MDA-MB-231 hücre hattı üzerine Kontrol, Pozitif kontrol (Paklitaksel), Q18, Q19 ve Q20 bileşiklerinin EC50 dozu 24 saat uygulama sonrası bileşiklerin Akış Sitometri Cihazı kullanılarak elde edilen sonucuna göre canlı, ölü, erken ve geç apoptotik hücre dağılımları ve % apoptoz grafiği verilmiştir. Yapılan analizler sonucunda canlı hücre, apoptotik hücre ve nekrotik hücre yüzdeleri belirlenmiştir. Apoptoz analizlerinde pozitif kontrol olarak 20 µg/mL Paklitaksel (Pax) kullanılmıştır. (Şekil 3.34).



Şekil 3.34. MDA-MB-231 hücrelerinde canlı, ölü, erken ve geç apoptotik hücre dağılımları

Bu tez çalışmasında EC50 dozları belirlenen bileşikleri ilgili hücrelere uygulayarak apoptoz genleri için izole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Elde edilen 18S-28S rRNA bant görüntüleri Şekil 3.41'de görüntülenmiştir.

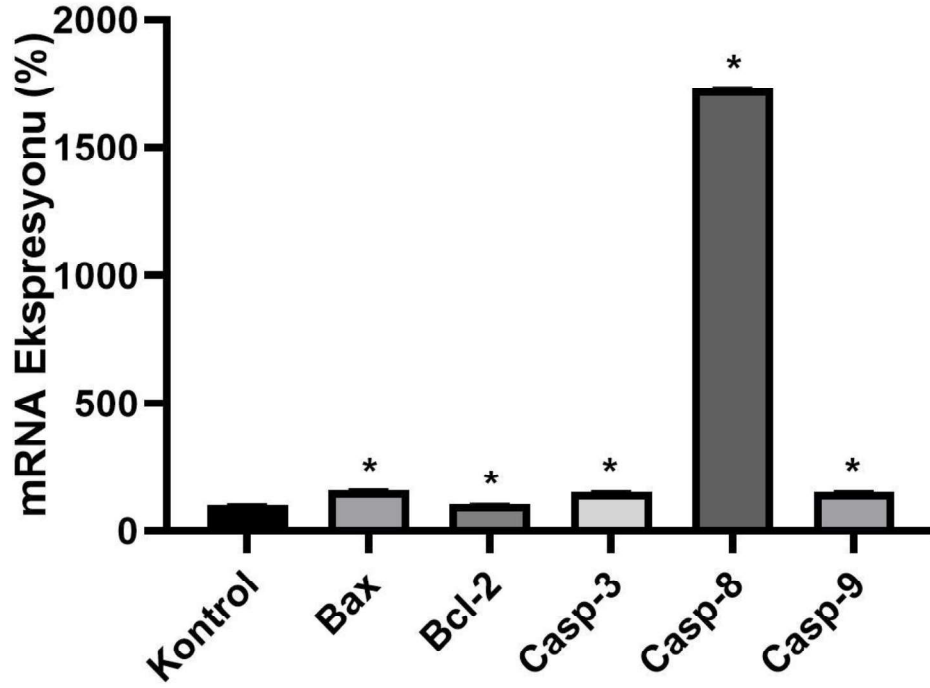


Şekil 3.35. Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü. 1. 1 kb opti-DNA marker, 2. HeLa Kontrol, 3. HeLa Q18, 4. HeLa Q19, 5. HeLa Q20, 6. HeLa Q22, 7. HeLa Q23, 8. Caco-2 Kontrol, 9. Caco-2 Q18, 10. Caco-2 Q19, 11. Caco-2 Q20, 12. MDA-MB-231 Kontrol, 13. MDA-MB-231 Q18, 14. MDA-MB-231 Q19, 15. MDA-MB-231 Q20, 16. A549 Kontrol, 17. A549 Q18.

3.3 Apoptoz Yolağı İle İlişkili Genlerin mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Belirlenmesi

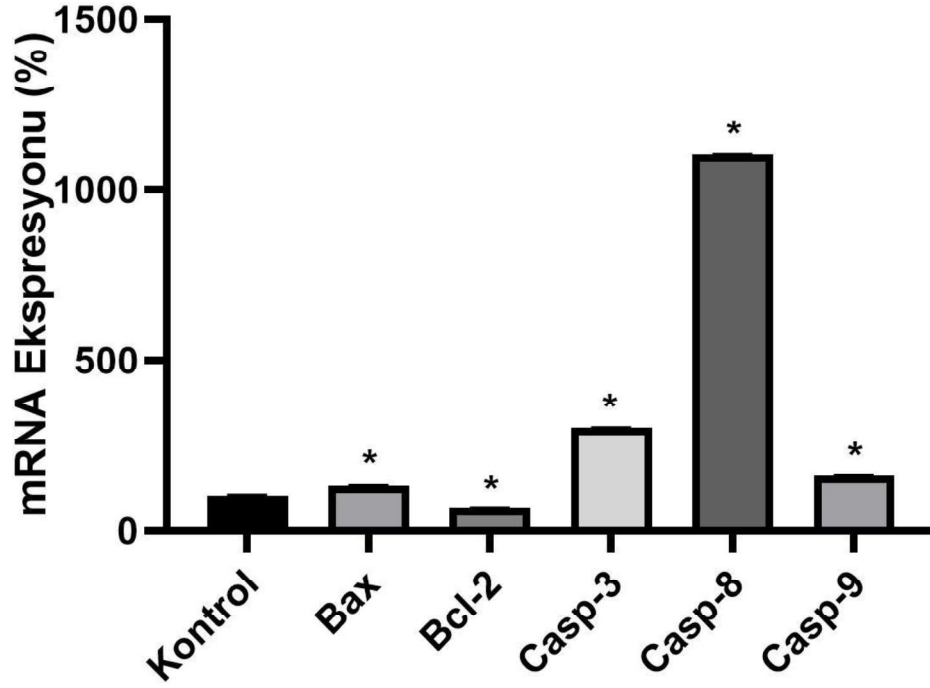
Caco-2, MDA-MB-231, HeLa ve A549 hücre hatlarında sitotoksikite çalışmalarında belirtilen etkili dozlarda Q18, Q19, Q20, Q22 ve Q23 bileşiklerinin 24 saat uygulanması sonucu apoptoz yollarında belirtilen genlerin ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. İzole edilen total RNA'nın cDNA sentezi yapılmıştır ve apoptoz yollarında görev alan ve bu tez çalışması için seçilen 7 genin (GAPDH, BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, CASP9) özgül primerler ile WizPure qPCR Master (SYBR) kiti kullanılarak mRNA düzeyinde ekspresyon analizi yapılmıştır. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

Q18 bileşiği, EC50 dozunun Caco-2 hücre hattında 24 saat uygulaması sonrası apoptoz yolağı ile ilişkili *Bcl-2* gen ekspresyonu %4,61 artış gösterirken, *Bax*, *Casp3*, *Casp8*, *Casp9* genler sırasıyla 1.58, 1.51, 17.32, 1.52 kat artış göstermiştir. Kontrol geni olarak GAPDH kullanılmıştır (Şekil 3.36)



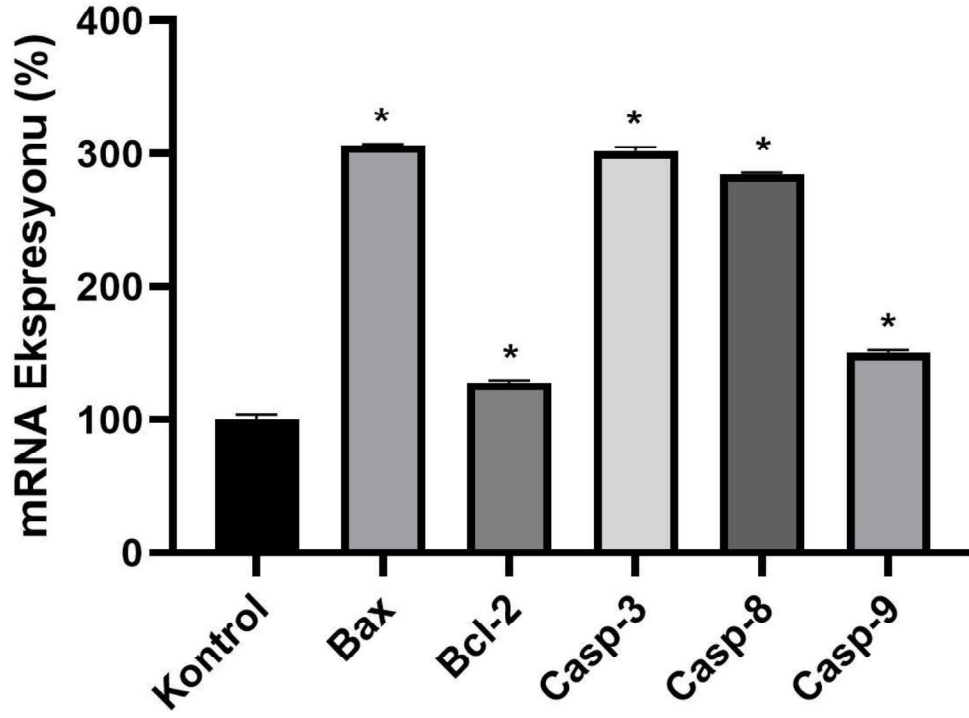
Şekil 3.36. Q18 Bileşiğinin Caco-2 hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q19 bileşiği, EC50 dozunun Caco-2 hücre hattında 24 saat uygulaması sonrası apoptoz yolağı ile ilişkili *Bcl-2* gen ekspresyonu %34,71 azalış gösterirken, *Bax*, *Casp3*, *Casp8*, *Casp9* genler sırasıyla 1.30, 3.01, 11.04, 1.60 kat artış göstermiştir. Kontrol geni olarak GAPDH kullanılmıştır (Şekil 3.37).



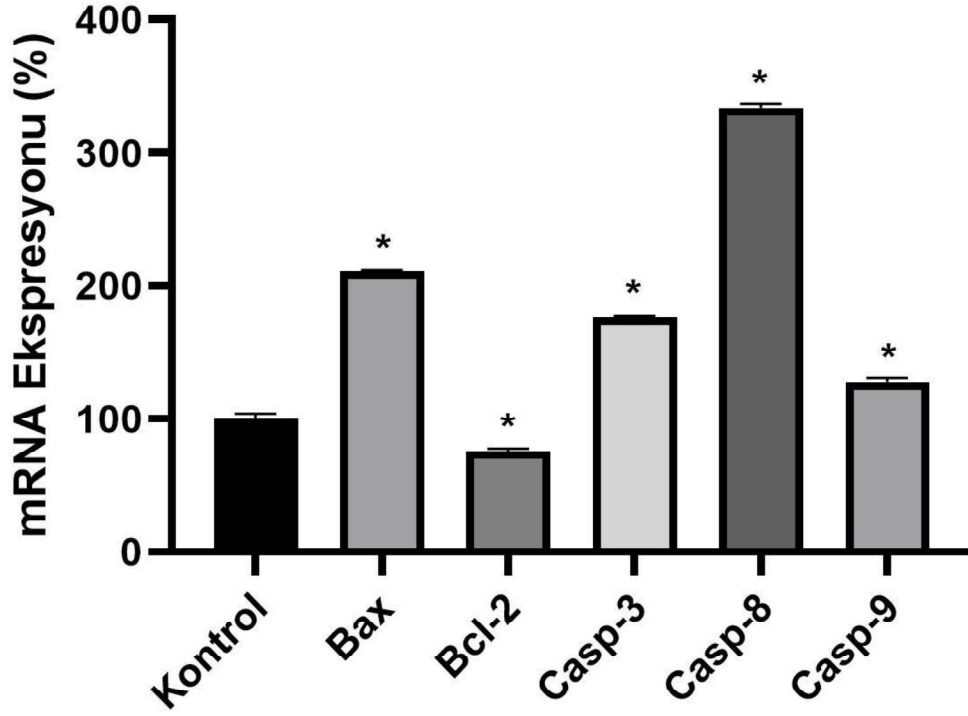
Şekil 3.37. Q19 Bileşiğinin Caco-2 hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q20 bileşigi, EC50 dozunun Caco-2 hücre hattında 24 saat uygulaması sonrası apoptoz yolağı ile ilişkili *Bcl-2* gen ekspresyonu %27,46 artış gösterirken, *Bax*, *Casp3*, *Casp8*, *Casp9* genler sırasıyla 3.06, 3.02, 2.84, 1.50 kat artış göstermiştir. Kontrol geni olarak GAPDH kullanılmıştır (Şekil3.38).



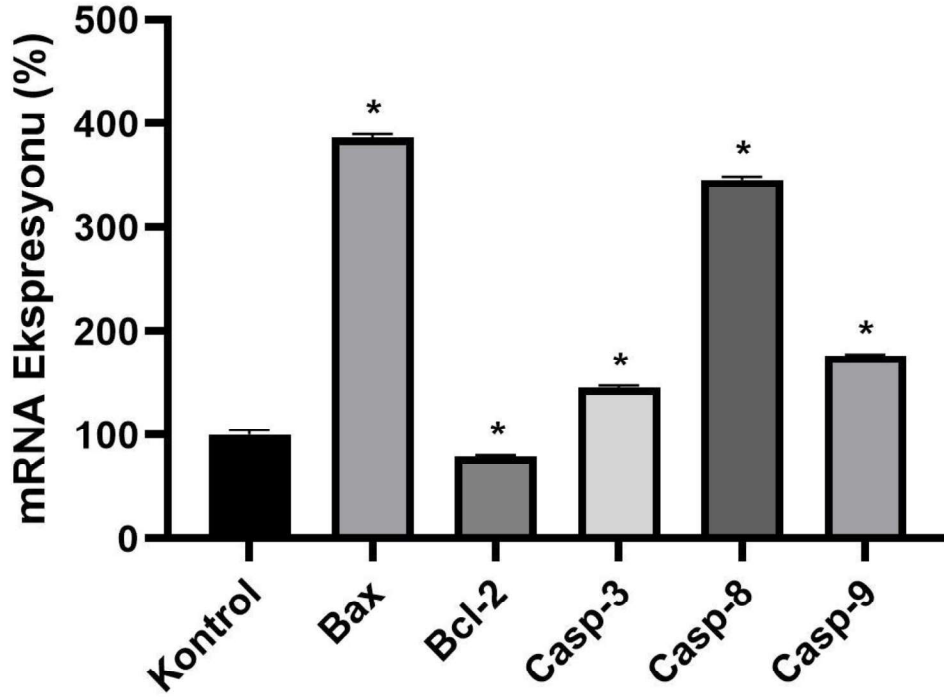
Şekil 3.38. Q20 Bileşiginin Caco-2 hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q18 bileşigi, EC50 dozunun A549 hücre hattında 24 saat uygulaması sonrası apoptoz yolağı ile ilişkili *Bcl-2* gen ekspresyonu %24,21 azalış gösterirken, *Bax*, *Casp3*, *Casp8*, *Casp9* genler sırasıyla 2.10, 1.76, 3.34, 1.27 kat artış göstermiştir. Kontrol geni olarak GAPDH kullanılmıştır (Şekil3.39).



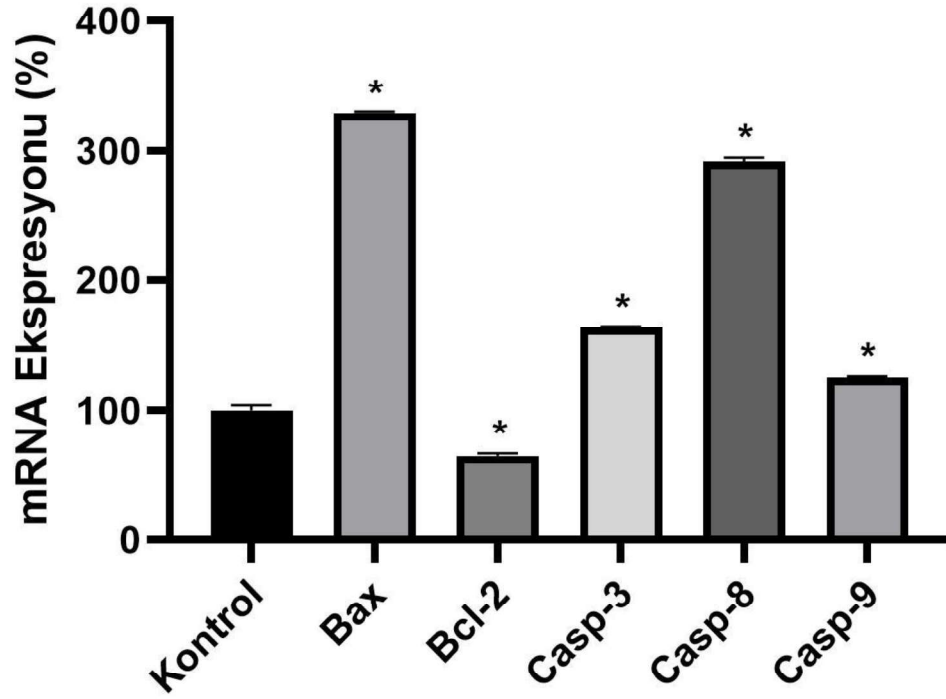
Şekil 3.39. Q18 Bileşiginin A549 hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q18 bileşigi, EC50 dozunun HeLa hücre hattında 24 saat uygulaması sonrası apoptoz yolağı ile ilişkili *Bcl-2* gen ekspresyonu %20,17 azalış gösterirken, *Bax*, *Casp3*, *Casp8*, *Casp9* genler sırasıyla 3.86, 1.45, 3.45, 1.76 kat artış göstermiştir. Kontrol geni olarak GAPDH kullanılmıştır (Şekil3.40).



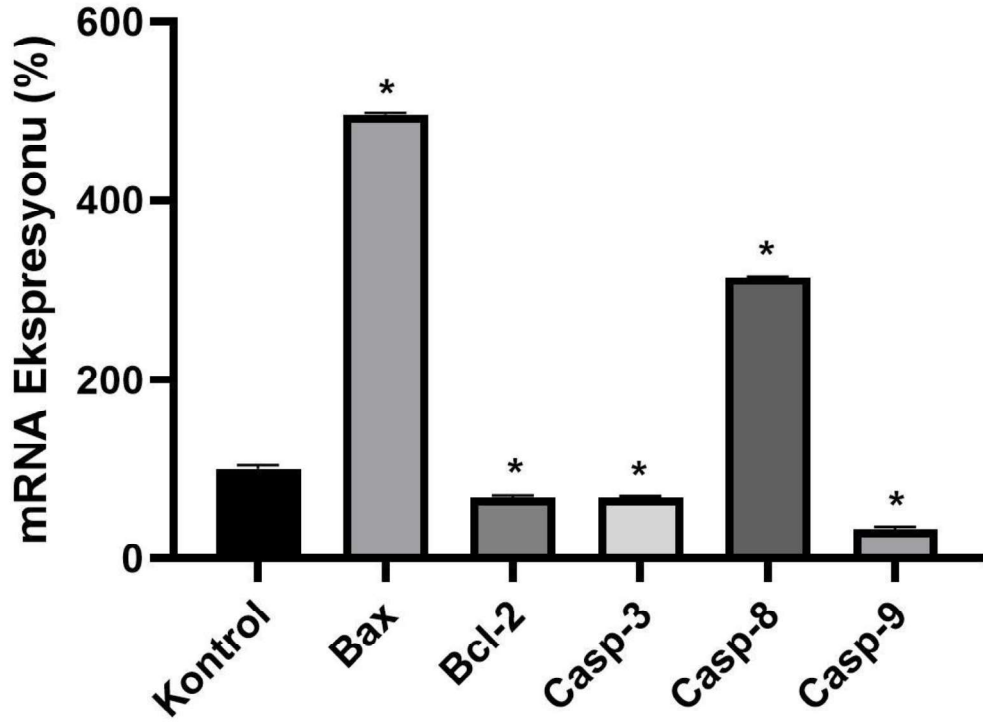
Şekil 3.40. Q18 Bileşiginin HeLa hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q19 bileşigi, EC50 dozunun HeLa hücre hattında 24 saat uygulaması sonrası apoptoz yolağı ile ilişkili *Bcl-2* gen ekspresyonu %35,16 azalış gösterirken, *Bax*, *Casp3*, *Casp8*, *Casp9* genler sırasıyla 3.29, 1.63, 2.91, 1.24 kat artış göstermiştir. Kontrol geni olarak GAPDH kullanılmıştır (Şekil3.41).



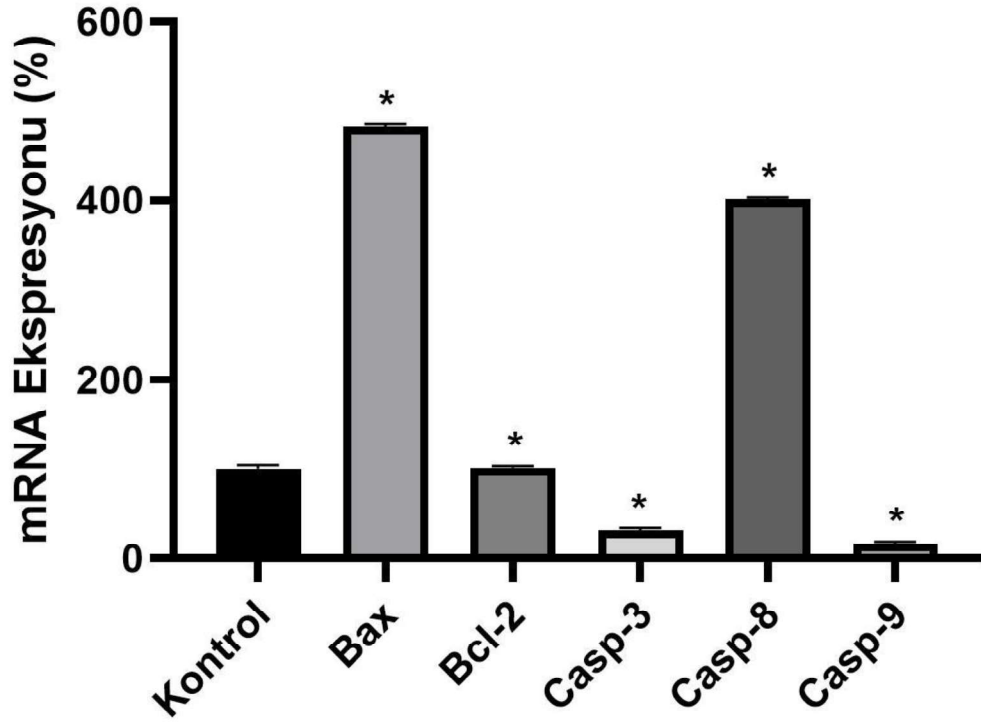
Şekil 3.41. Q19 Bileşiginin HeLa hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q20 bileşigi, EC50 dozunun HeLa hücre hattında 24 saat uygulaması sonrası apoptoz yolağı ile ilişkili *Bcl-2* gen ekspresyonu %31,46 azalış gösterirken, genler sırasıyla *Bax* 4.95 kat artarken, *Casp3* 1.46 kat azalmıştır, *Casp8* 3.14 kat artmıştır, *Casp9* 3.09 kat azalış göstermiştir. Kontrol geni olarak GAPDH kullanılmıştır (Şekil3.42).



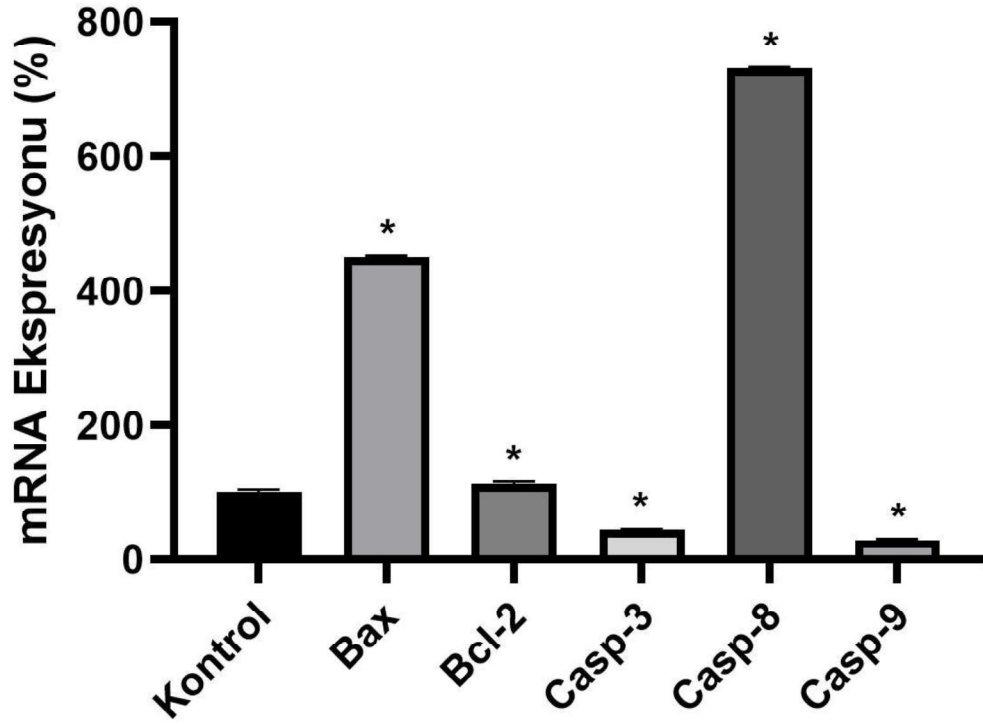
Şekil 3.42. Q20 Bileşiğinin HeLa hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q22 bileşigi, EC50 dozunun HeLa hücre hattında 24 saat uygulaması sonrası apoptoz yolağı ile ilişkili *Bcl-2* gen ekspresyonu %1,05 artış gösterirken, genler sırasıyla *Bax* 4.82 kat artarken, *Casp3* 3.18 kat azalmıştır, *Casp8* 4.01 kat artmıştır, *Casp9* 6 kat azalış göstermiştir. Kontrol geni olarak GAPDH kullanılmıştır (Şekil3.43).



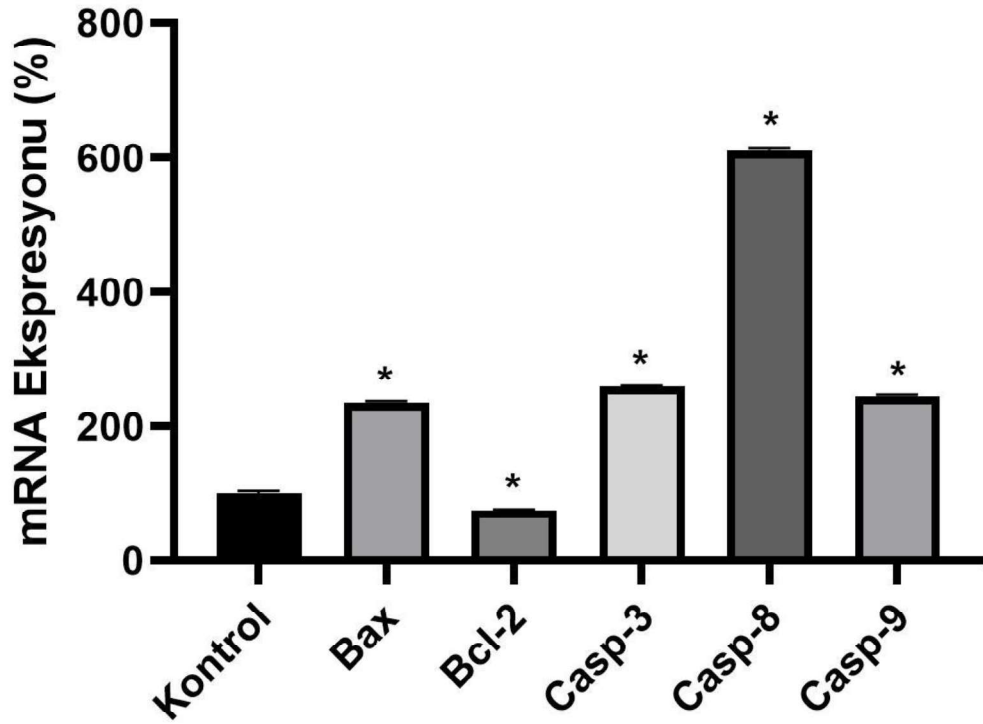
Şekil 3.43. Q22 Bileşiğinin HeLa hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q23 bileşigi, EC50 dozunun HeLa hücre hattında 24 saat uygulaması sonrası apoptoz yolağı ile ilişkili *Bcl-2* gen ekspresyonu %12,90 artış gösterirken, diğer genler sırasıyla *Bax* 4.50 kat artmıştır, *Casp3* 2.25 kat azalmıştır, *Casp8* 7.31 kat artmıştır, *Casp9* 3.47 kat azalış göstermiştir. Kontrol geni olarak GAPDH kullanılmıştır (Şekil3.44).



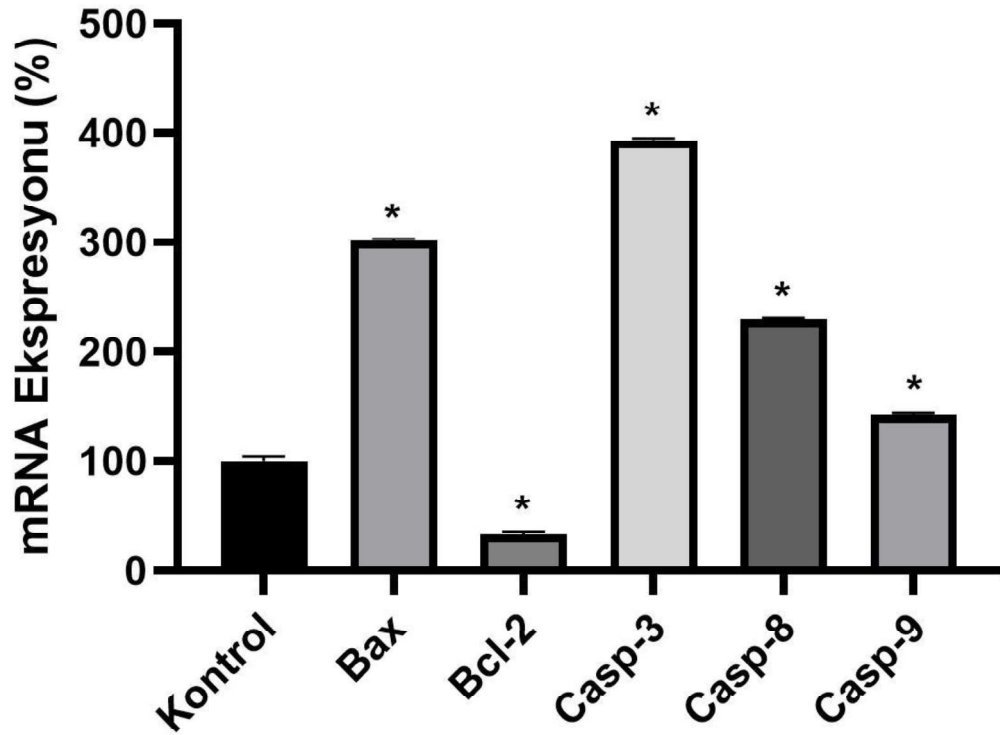
Şekil 3.44. Q23 Bileşiğinin HeLa hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q18 bileşigi, EC50 dozunun MDA-MB-231 hücre hattında 24 saat uygulaması sonrası apoptoz yolağı ile ilişkili *Bcl-2* gen ekspresyonu %24,21 azalış gösterirken, *Bax*, *Casp3*, *Casp8*, *Casp9* genler sırasıyla 2.36, 2.59, 6.10, 2.45 kat artış göstermiştir. Kontrol geni olarak GAPDH kullanılmıştır (Şekil3.45).



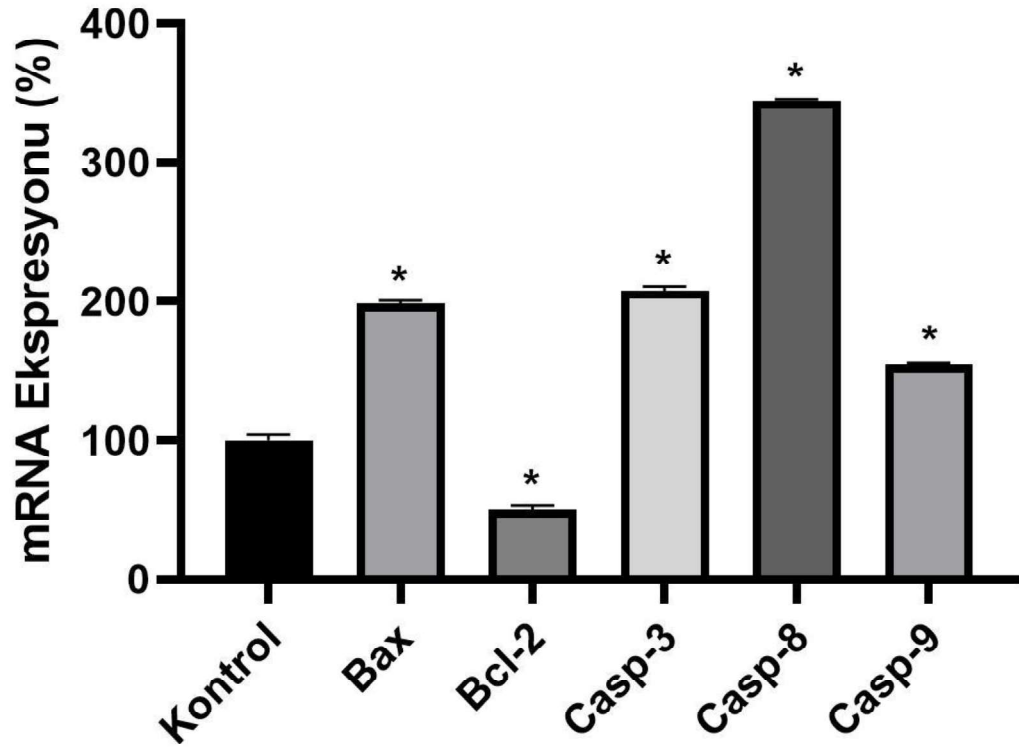
Şekil 3.45. Q18 Bileşiğinin MDA-MB-231 hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q19 bileşigi, EC50 dozunun MDA-MB-231 hücre hattında 24 saat uygulaması sonrası apoptoz yolağı ile ilişkili *Bcl-2* gen ekspresyonu %67,01 azalış gösterirken, *Bax*, *Casp3*, *Casp8*, *Casp9* genler sırasıyla 3.01, 3.93, 2.29, 1.41 kat artış göstermiştir. Kontrol geni olarak GAPDH kullanılmıştır (Şekil3.46).



Şekil 3.46. Q19 Bileşiğinin MDA-MB-231 hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q20 bileşiği, EC50 dozunun MDA-MB-231 hücre hattında 24 saat uygulaması sonrası apoptoz yolağı ile ilişkili *Bcl-2* gen ekspresyonu %50 azalış gösterirken, *Bax*, *Casp3*, *Casp8*, *Casp9* genler sırasıyla 1.98, 2.07, 3.44, 1.54 kat artış göstermiştir. Kontrol geni olarak GAPDH kullanılmıştır (Şekil3.47).

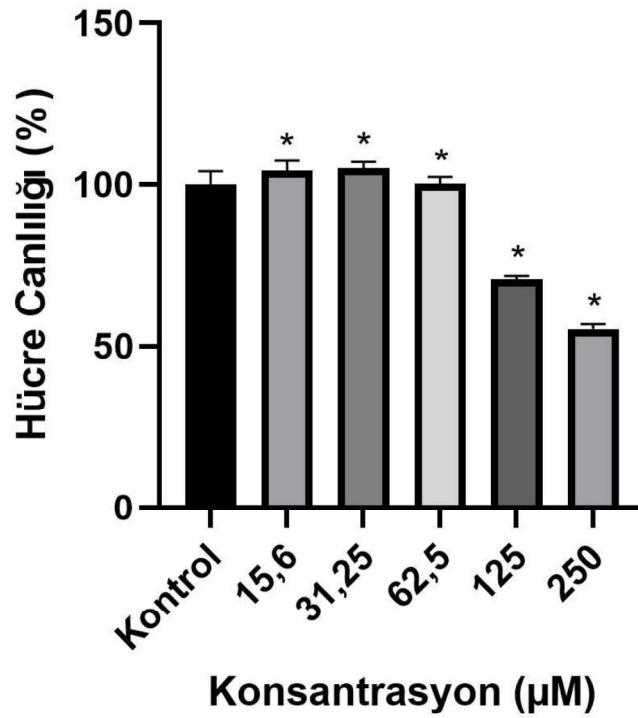


Şekil 3.47. Q20 Bileşiğinin MDA-MB-231 hücre hattında apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

3.4 Anti-inflamatuar aktivitenin belirlenmesi

Anti-inflamatuar testi için toksik olmayan en yüksek dozu bulmak amacıyla RAW264.7 makrofaj hücre hattı üzerine MTT testi yapılmıştır. (Şekil 3.31-36) Seçilen değerlerin (Tablo 3.2.) daha sonra inflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini saptamak için mRNA düzeyleri, Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile kantite edilmiştir. Bu amaçla, Total RNA izolasyonu ve cDNA sentez edilmiştir.

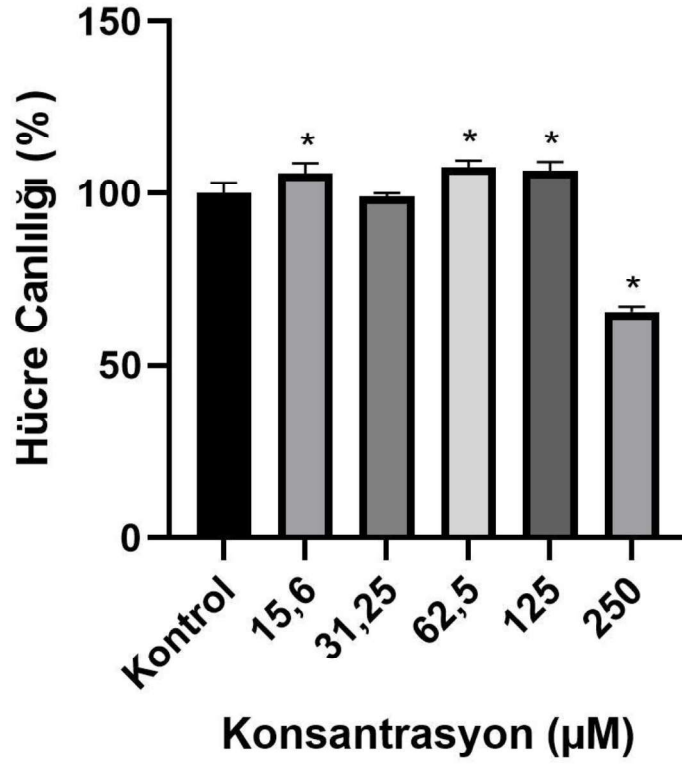
Q18 bileşiğinin Makrofaj Hücre Hattı (RAW264.7) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır. Antiinflamatuar testi için toksik olmayan en yüksek dozu 62,5 μ M bulunmuştur (Şekil 3.48).



Şekil 3.48. Q18 Bileşiğinin RAW264.7 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

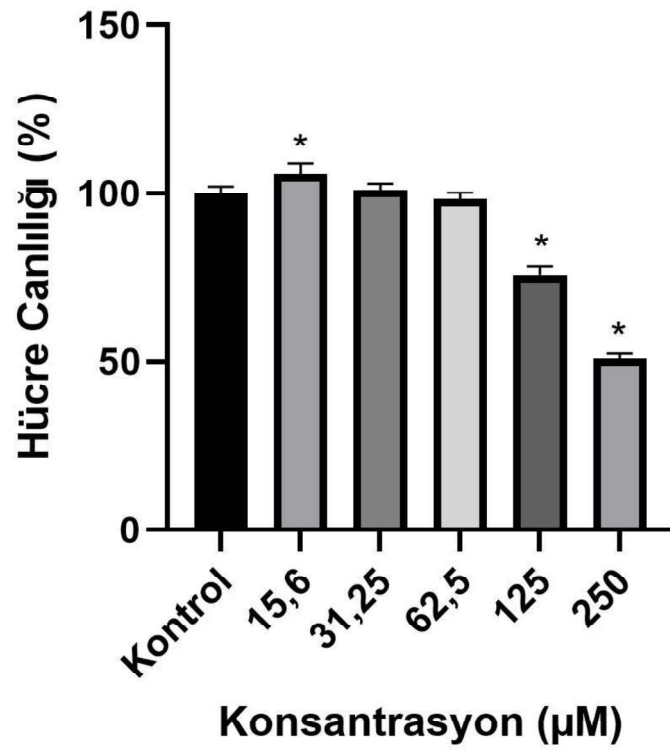
Q19 bileşiminin Makrofaj Hücre Hattı (RAW264.7) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır. Antiinflamatuvar testi için toksik olmayan en yüksek dozu 125 μ M bulunmuştur (Şekil 3.49).



Şekil 3.49. Q19 Bileşiminin RAW264.7 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

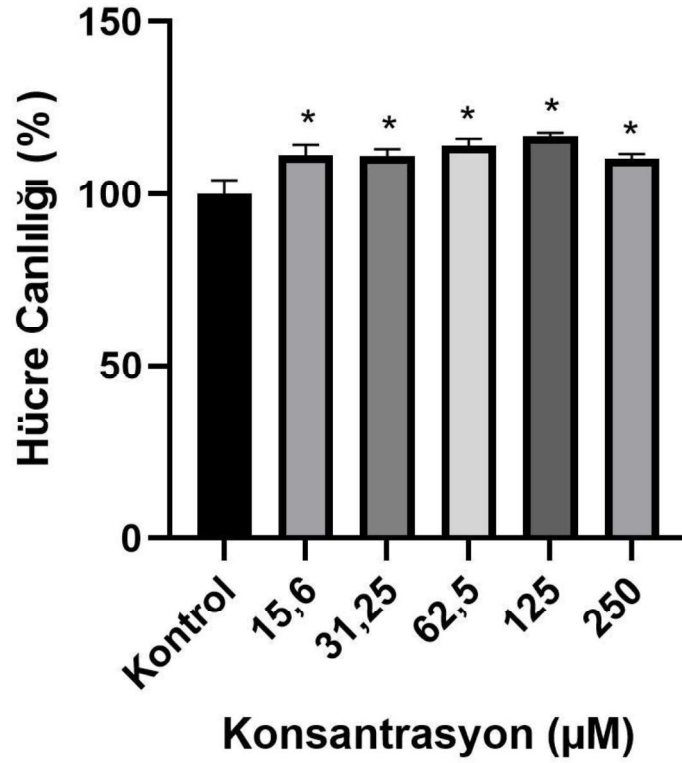
Q20 bileşığının Makrofaj Hücre Hattı (RAW264.7) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır. Antiinflamatuvar testi için toksik olmayan en yüksek dozu 62,5 μ M bulunmuştur (Şekil 3.50).



Şekil 3.50. Q20 Bileşığının RAW264.7 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

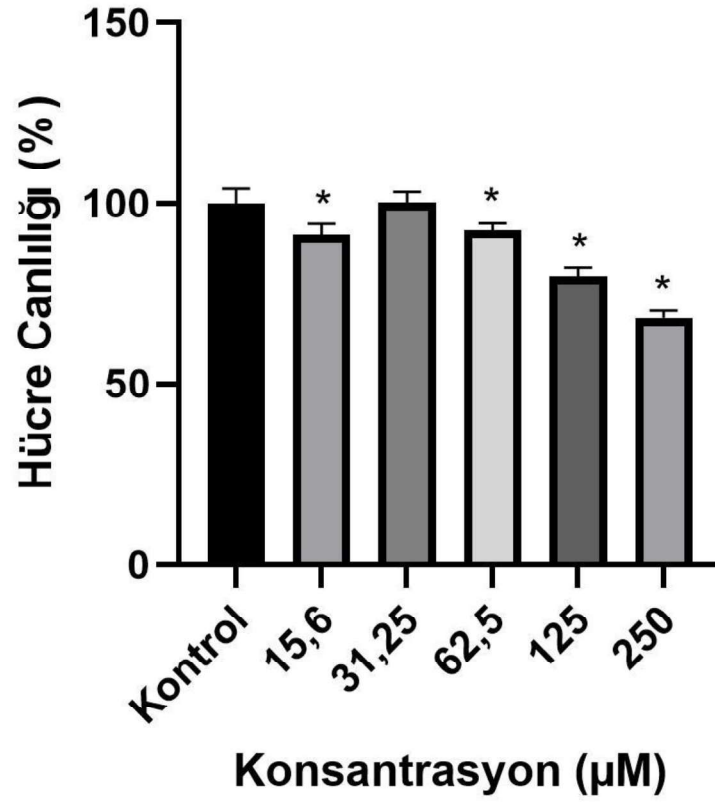
Q21 bileşiminin Makrofaj Hücre Hattı (RAW264.7) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır. Antiinflamatuvar testi için toksik olmayan en yüksek dozu 125 μ M bulunmuştur (Şekil 3.51).



Şekil 3.51. Q21 Bileşiminin RAW264.7 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

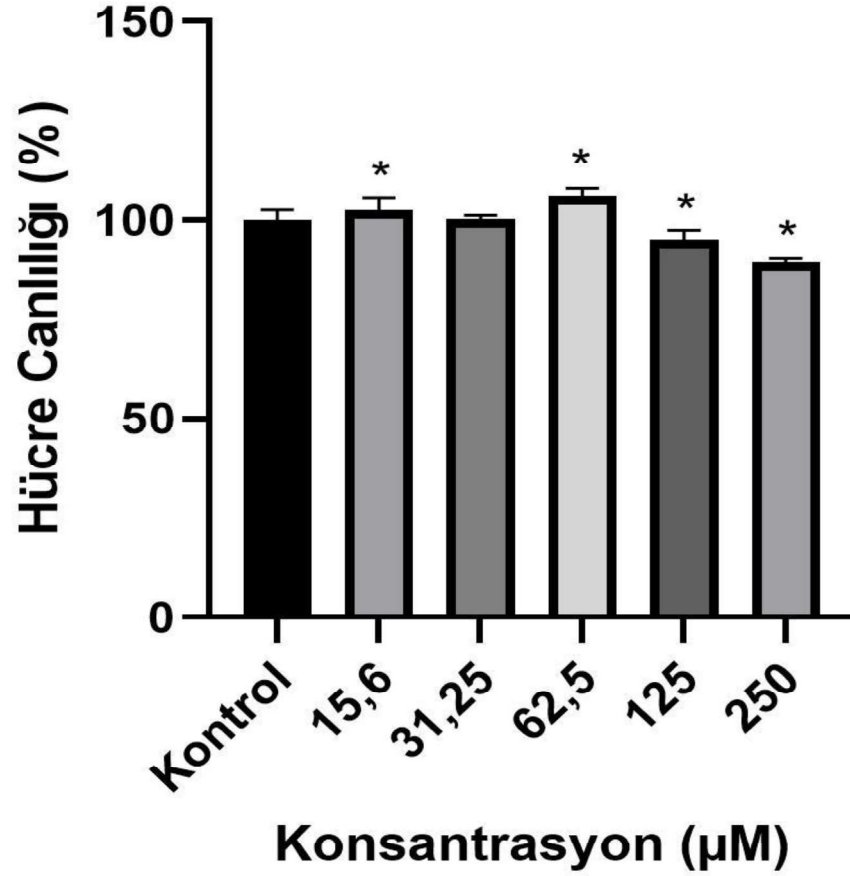
Q22 bileşiminin Makrofaj Hücre Hattı (RAW264.7) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır. Antiinflamatuvar testi için toksik olmayan en yüksek dozu 62,5 μ M bulunmuştur (Şekil 3.52).



Şekil 3.52. Q22 Bileşiminin RAW264.7 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q23 bileşığının Makrofaj Hücre Hattı (RAW264.7) hücre hattı üzerine 24 saat uygulamanın ardından elde edilen sonuçlara göre önemli bir sitotoksik aktivitesi bulunamamıştır. Antiinflamatuvar testi için toksik olmayan en yüksek dozu 125 μ M bulunmuştur (Şekil 3.53).



Şekil 3.53. Q23 Bileşığının RAW264.7 Hücre Hattı Canlılığı Üzerine Etkisi

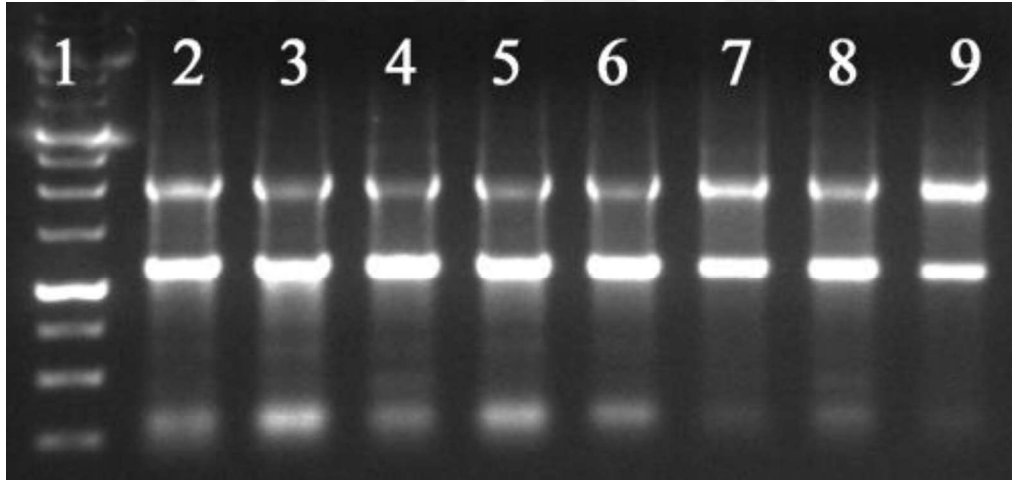
*: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Antiinflamatuvar etkilerinin belirlenmesi için mürin makrofaj (RAW264.7) hücre hattı tercih edilmiştir ve sitotoksisite çalışmalarında toksik olmayan en yüksek doz seçilmesi amacıyla öncelikle her bileşik, RAW264.7 hücre hattı üzerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanmış ve MTT testi ile dozlar belirlenmiştir. (Tablo 3.2.)

Tablo 3.2. Anti-inflamatuvar aktivitenin belirlenmesi için seçilen toksik etki göstermeyen konsantrasyonlar

Bileşik/Doz (μ M)	Q18	Q19	Q20	Q21	Q22	Q23
Seçilen Doz	62,5	125	62,5	125	62,5	125

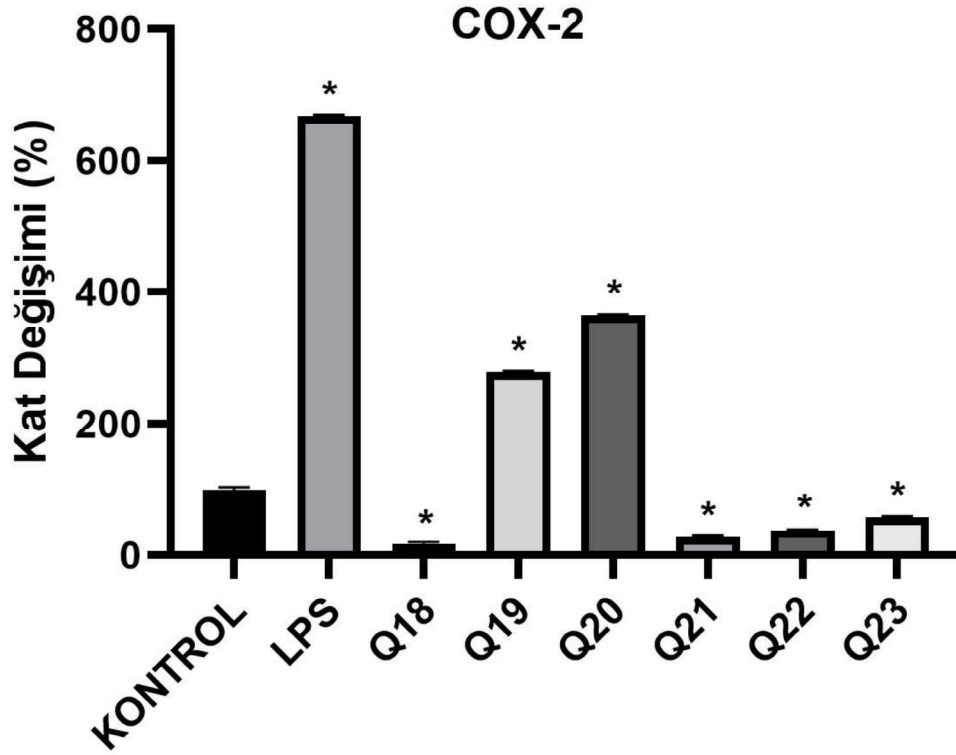
Bu tez çalışmasında antiinflamatuvar testi için dozları belirlenen bileşikleri ilgili hücrelere LPS uygulayarak proinflamatuvar genleri için izole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Elde edilen 18S-28S rRNA bant görüntüleri Şekil 3.54'de görüntülenmiştir.



Şekil 3.54. RAW264.7 Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü. **1.** 1 kb opti-DNA marker, **2.** RAW264.7 Kontrol, **3.** RAW264.7 LPS, **4.** RAW264.7 Q18, **5.** RAW264.7 Q19, **6.** RAW264.7 Q20, **7.** RAW264.7 Q21, **8.** RAW264.7 Q22, **9.** RAW264.7 Q23

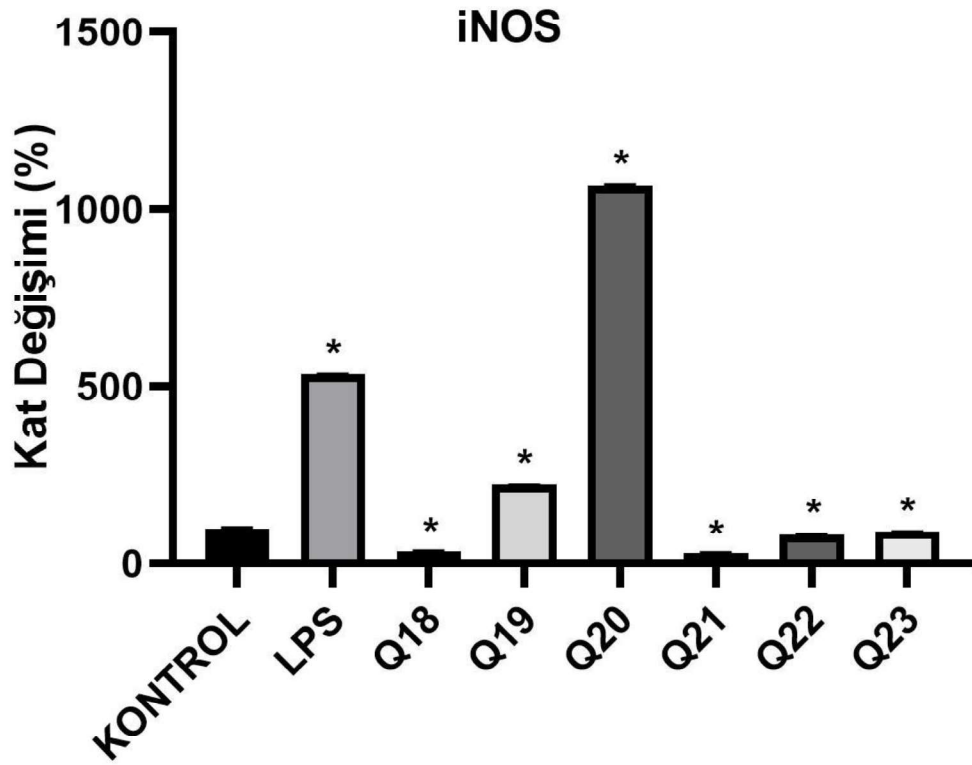
3.4.1 İnflamatuvar Yolağı İle İlişkili Genlerin mRNA Düzeyinde Ekspresyonlarının Belirlenmesi

RAW264.7 hücre hattında inflamatuvar yolağı ile ilişkili *Cox-2*, *Tnf- α* , *iNOS*, *IL-6* genlerin ekspresyonu gösterilmiştir (Şekil3.55-58). Q18, Q19, Q20, Q21, Q22, Q23 bileşiklerinin belirlenen dozları 24 saat uygulaması sonrası negatif kontrol grubuna göre, pro-inflamatuvar geni olan *Cox-2* geni ekspresyon seviyesi önemli derecede artarken (6,68 kat), Q18 (62,5 μ M), Q19 (125 μ M), Q20 (62,5 μ M), Q21 (125 μ M), Q22 (62,5 μ M), Q23 (125 μ M) bileşikleri *Cox-2* gen ekspresyon seviyesini pozitif kontrol grubuna göre sırasıyla %97,39; %58,39; %45,28; %95,90; %94,22; %91,25 düşürmüştür.



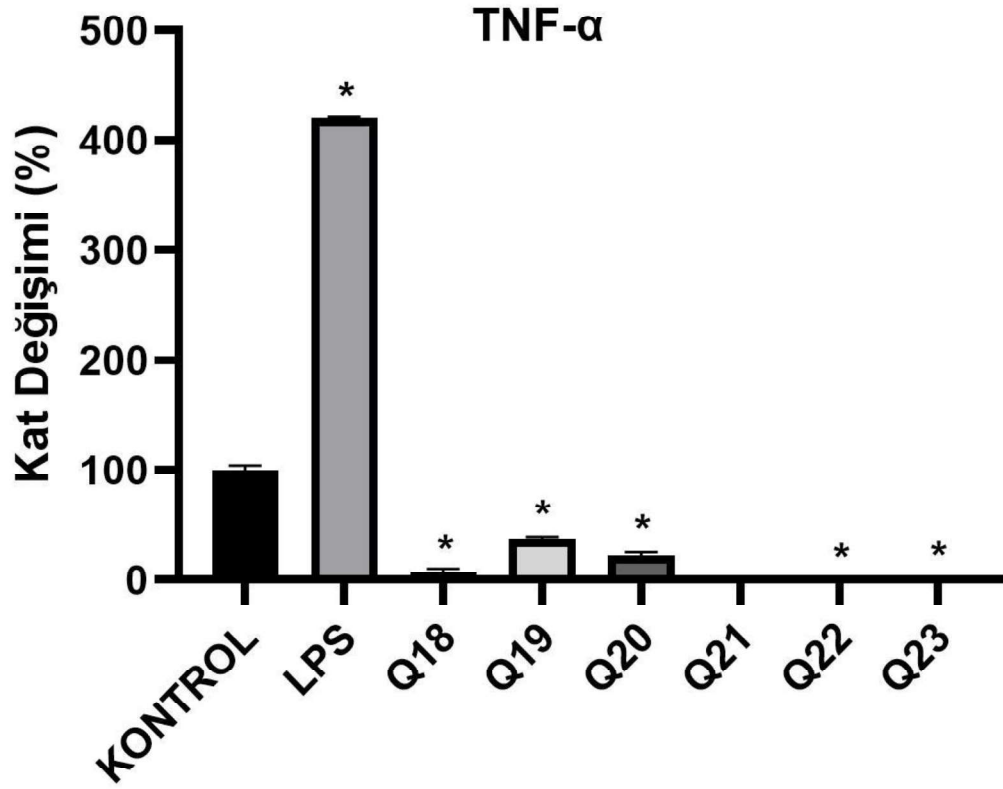
Şekil 3.55. RAW264.7 hücre hattında inflamatuvar ile ilişkili olan *Cox-2* geni mRNA ekspresyon seviyesindeki değişim. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q18, Q19, Q20, Q21, Q22, Q23 bileşiklerinin belirlenen dozları 24 saat uygulaması sonrası negatif kontrol grubuna göre, pro-inflamatuar geni olan *iNOS* geni ekspresyon seviyesi önemli derecede artarken (5,33 kat), Q18 (62,5 μ M), Q19 (125 μ M), Q20 (62,5 μ M), Q21 (125 μ M), Q22 (62,5 μ M), Q23 (125 μ M) bileşikleri *iNOS* gen ekspresyon seviyesini pozitif kontrol grubuna göre sırasıyla Q18 bileşiği %93,23; Q19 bileşiği %58,10 azaltmıştır; Q20 bileşiği %100 arttırmıştır; Q21 bileşiği %94,26; Q22 bileşiği %84,61; Q23 bileşiği %82,86 düşürmüştür.



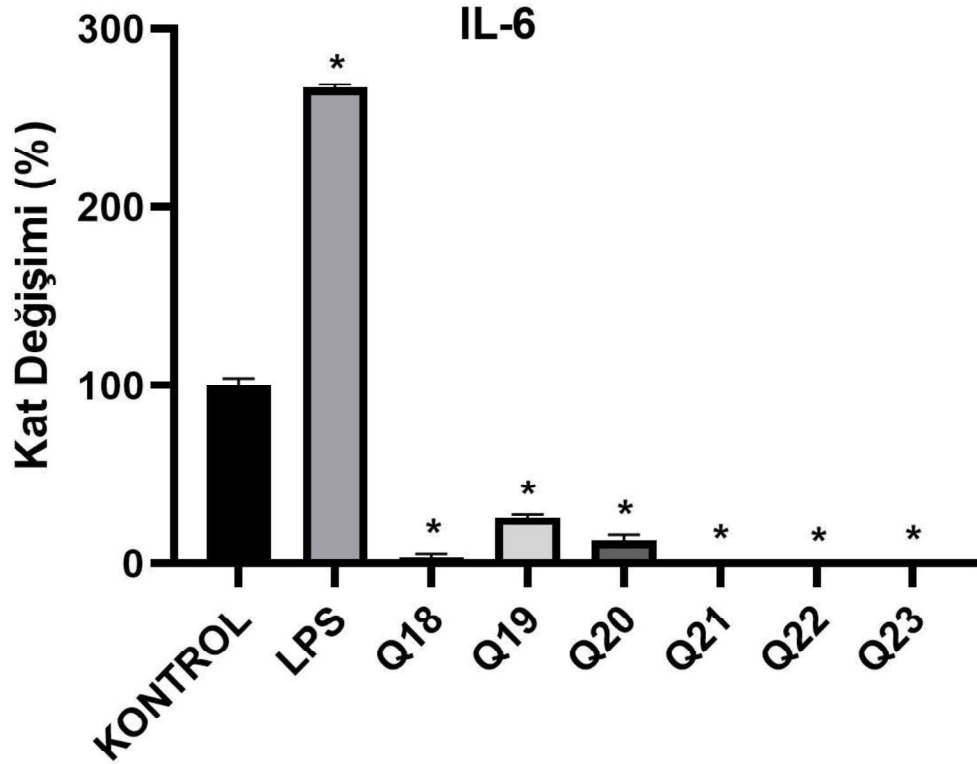
Şekil 3.56. RAW264.7 hücre hattında inflammatuar ile ilişkili olan *iNOS* geni mRNA ekspresyon seviyesindeki değişim. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q18, Q19, Q20, Q21, Q22, Q23 bileşiklerinin belirlenen dozları 24 saat uygulaması sonrası negatif kontrol grubuna göre, pro-inflamatuar geni olan *TNF-α* geni ekspresyon seviyesi önemli derecede artarken (4,19 kat), Q18 (62,5 µM), Q19 (125 µM), Q20 (62,5 µM), Q21 (125 µM), Q22 (62,5 µM), Q23 (125 µM) bileşikleri *TNF-α* gen ekspresyon seviyesini pozitif kontrol grubuna göre sırasıyla %98,27; %91,13; %94,63; %99,84; %99,65; %99,86 düşürmüştür.



Şekil 3.57. RAW264.7 hücre hattında inflammatuar ile ilişkili olan *TNF-α* geni mRNA ekspresyon seviyesindeki değişim. *: Kontrol grubundan farklı, $p < 0,05$.

Q18, Q19, Q20, Q21, Q22, Q23 bileşiklerinin belirlenen dozları 24 saat uygulaması sonrası negatif kontrol grubuna göre, pro-inflamatuar geni olan *IL-6* geni ekspresyon seviyesi önemli derecede artarken (2,66 kat), Q18 (62,5 µM), Q19 (125 µM), Q20 (62,5 µM), Q21 (125 µM), Q22 (62,5 µM), Q23 (125 µM) bileşikleri *IL-6* gen ekspresyon seviyesini pozitif kontrol grubuna göre sırasıyla %98,69; %90,32; %95,09; %99,93; %99,72; %99,90 düşürmüştür.



Şekil 3.58. RAW264.7 hücre hattında inflammatuar ile ilişkili olan *TNF-α* geni mRNA ekspresyon seviyesindeki değişim. *: Kontrol grubundan farklı, p<0,05.

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında kullanılan benzotiyofen türevlerinin (Q18, Q19, Q20, Q21, Q22 ve Q23) anti-kanser aktivitelerini belirlemek üzere bu tezde çalışılan A549, HeLa, MDA-MB-231, Caco-2 kanser hücre hatlarında ve kontrol hücresi olarak kullanılan HEK293 hücre hattı üzerinde hücre canlılık testi (MTT) ile sitotoksik etkileri belirlenmiş, apoptotik analizleri yapılmıştır. Ayrıca inflamatuvar analizi öncesi benzotiyofen türevi bileşikler, RAW264.7 Mürin Makrofaj hücre hattı üzerine uygulama yapılarak sitotoksik analizi elde edilmiştir.

Sitotoksikite analizinde elde edilen sonuçlar incelendiğinde A549 Akciğer Kanseri hücre hattında Benzotiyofen türevi Q18 bileşiği sitotoksik etki gösterirken (Tablo 3.1), Q19, Q20, Q21, Q22 ve Q23 türevlerinde önemli bir sitotoksik etki göstermedikleri saptanmıştır (Şekil 3.7-12).

Caco-2 Kolorektal Kanseri hücre hattında Q18, Q19 ve Q20 bileşikleri sitotoksik etki gösterirken (Tablo3.1), Q21, Q22 ve Q23 türevlerinde önemli sitotoksik etki gözlenmemiştir (Şekil 3.13-18).

HeLa hücre hattında Q18, Q19, Q20, Q22 ve Q23 bileşikleri sitotoksik etki gösterirken (Tablo3.1), Q21 türevinde önemli sitotoksik etki gözlenmemiştir (3.19-24).

MDA-MB-231 hücre hattında Q18, Q19, Q20 bileşiği sitotoksik etki gösterirken (Tablo3.1), Q21, Q22 ve Q23 türevlerinde önemli sitotoksik etki gözlenmemiştir (Şekil3.25-30).

RAW264.7 hücre hattında Q18, Q19, Q20, Q21, Q22 ve Q23 bileşiklerinde kayda değer sitotoksik etki gözlenmemiş olup antiinflamatuvar analizi için toksik etki gözlenmeyen konsantrasyonları belirlenmiştir (Tablo 3.2).

Apoptotik analizinde önceden elde edilen EC50 değer dozu uygulanan hücreler akış sitometri cihazında ölçülüp sonuçlar incelendiğinde Caco-2 hücre hattında belirlenen apoptoz yüzdesi Kontrolde %4.30, Pozitif Kontrolde (Paklitaksel) %14.15 ve benzotiyofen türevi olan; Q18 bileşiğinde %22.18, Q19 bileşiğinde %24.13, Q20 bileşiğinde %18.10 olarak belirlenmiştir.

Apoptotik analizi sonuçları incelendiğinde A549 hücre hattında belirlenen apoptoz yüzdesi Kontrolde %3.68, Pozitif Kontrolde (Paklitaksel) %28.53 ve benzotiyofen türevi olan; Q18 bileşiğinde %8.25 olarak belirlenmiştir.

HeLa hücre hattında belirlenen apoptoz yüzdesi Kontrolde %5.25, Pozitif Kontrolde (Paklitaksel) %16,79 ve benzotiyofen türevi olan; Q18 bileşiğinde %7.38, Q19 bileşiğinde %19.36, Q20 bileşiğinde %26.92, Q22 bileşiğinde %10.25, Q23 bileşiğinde %5.49 olarak belirlenmiştir.

MDA-MB-231 hücre hattında belirlenen apoptoz yüzdesi Kontrolde %4.86, Pozitif Kontrolde (Paklitaksel) %15.81 ve benzotiyofen türevi olan; Q18 bileşiğinde %11.16, Q19 bileşiğinde %14.01, Q20 bileşiğinde %18.89 olarak belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında PCR analizi ile apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde Caco-2 hücre hattında belirlenen EC50 dozu uygulanan Q19 bileşiğinde apoptoz ilişkili Bcl-2 geni ekspresyon seviyesi %34,71 düşmekteyken, Q18 ve Q20 bileşiklerinin Bcl-2 geni ekspresyon seviyeleri sırasıyla %4,61 ve %27,46 artmıştır. Diğer apoptoz ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri ise Caco-2 hücre hattında Q18, Q19, Q20 bileşikleri sırasıyla Bax geni için (1,58; 1,30; 3,06) kat artmış, Casp3(1,51; 3,01; 3,02) kat artmış, Casp8(17,32; 11,04; 2,84) kat artmış, Casp9 (1,52; 1,60; 1,50) kat artış göstermektedir.

PCR analizi ile apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde A549 hücre hattında belirlenen EC50 dozu uygulanan Q18 bileşiğinde apoptoz ilişkili Bcl-2 geni ekspresyon seviyesi %24,21 düşmekteyken Q18 bileşiğinin diğer apoptoz ilişkili gen ekspresyon seviyeleri ise Bax geni için (2,10), Casp3(1,76), Casp8(3,34), Casp9 (1,27) kat artış göstermektedir.

PCR analizi ile apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde HeLa hücre hattında belirlenen EC50 dozu uygulanan Q18, Q19, Q20 bileşiklerinde apoptoz ilişkili Bcl-2 geni ekspresyon seviyeleri sırasıyla %20,17; %35,16; %31,46 düşmekteyken, Q22 ve Q23 bileşiklerinin Bcl-2 geni ekspresyon seviyeleri sırasıyla %1,05 ve %12,90 artmıştır. Diğer apoptoz ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri ise HeLa hücre hattında Q18, Q19, Q20, Q22, Q23 bileşikleri sırasıyla Bax geni için (3,86; 3,29; 4,95; 4,82; 4,50) kat artmış, Casp3(1,45; 1,63) kat artmış; (1,46; 3,18; 2,25) kat azalmış, Casp8(1,76; 1,24) kat artmış; (3,09; 6; 3,47) kat azalış göstermektedir.

Bu tez çalışmasında PCR analizi ile apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde MDA-MB-231 hücre hattında belirlenen EC50 dozu uygulanan Q18, Q19 ve Q20 bileşiklerinde apoptoz ilişkili Bcl-2 geni ekspresyon seviyesi sırasıyla (%24,21; %67,01; %50) düşmekteyken, Q18, Q19 ve Q20 bileşiklerinin diğer apoptoz ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri ise MDA-MB-231 hücre hattında Q18, Q19, Q20 bileşikleri sırasıyla Bax geni için (2,36; 3,01; 1,98) kat artmış, Casp3(2,59; 3,93; 2,07) kat artmış, Casp8(6,10; 2,29; 3,44) kat artmış, Casp9 (2,45; 1,41; 1,54) kat artış göstermektedir.

Bu tez çalışmasında antiinflamatuvar testi için RAW264.7 hücre hattında Q18, Q19, Q20, Q21, Q22, Q23 bileşiklerinin belirlenen dozları uygulanmış, RNA izolasyonu sonucu cDNA ve PCR çalışması yapılmıştır. PCR analizi ile inflamatuvar ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde bileşikler sırasıyla Cox-2 geni için (%97,39; %58,39; %45,28; %95,90; %94,22, %91,25) azalmış, iNOS (%93,23; %58,10; %100; %94,26; %84,61; %82,86) azalmış, TNF- α (%98,27; %91,13; %94,63; %99,84; %99,65; %99,86) azalmış, IL-6 (%98,69; %90,32; %95,09; %99,93; %99,72; %99,90) azalış göstermektedir

Penthala ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapmış olduğu çalışmada benzotiyofen-akrilonitril hibridinin anti-kanser aktivitesini incelemek üzere Kolon kanseri (HCT-116, HT29, COLO205), Meme kanseri (MCF-7, MDA-MB-231), Akciğer kanseri (A549), Prostat kanseri (PC3, DU145), Ovaryum kanseri (OVCAR) hücre hatlarında sitotoksik etkilerini araştırmış ve elde ettikleri sonuçlara göre 5, 6 ve 13 bileşiklerinde, genel olarak 10-100 nM aralığındaki EC50 değerleri hücre büyümesinde önemli bir inhibisyona neden olduğunu bulmuşlardır (Penthala ve diğ. 2013).

Kamel ve diğerleri 2013 yılında yaptıkları çalışmada 4,5,6,7-tetrahidro-1-benzotiyofen türevleri (3a, 4, 6e, 7a, 9c, 15, 16b), test edilen bileşiklerin çoğu meme adenokarsinomuna (MCF-7), küçük hücreli olmayan akciğer kanserine (NCI-H460) ve insan glioblastoması (SF-268) üç kanser hücresi hattında yüksek önleyici etkiler sergilediğini göstermişlerdir (Kamel ve diğ. 2013).

Tantawy ve diğerlerinin çalışmasında benzotiyofen türevleri HepG2, HCT116 ve MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi test edilen tüm kanser hücresi hatlarının hücre proliferasyonunu artıran bileşik 3 hariç, test edilen tüm yeni

bileşikler için HepG2 hücrelerinin hücre canlılığında doza bağımlı önemli bir düşüş belirlemişlerdir. Bileşik 7 en düşük EC50 değerine (8.7 μ M) sahipken, onu bileşik 14, bileşik 17 ve bileşik 12a takip etti, 24 saatte EC50 değerleri sırasıyla 16.8 μ M, 19.01 μ M, 26.2 μ M bulmuşlardır. Öte yandan bileşik 8, IC50 değeri <35 μ M ile HepG2 hücreleri üzerinde zayıf sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Ek olarak, bu sinestetik steroid türevi, sikline bağımlı kinaz-2 ve anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyon seviyelerinin inhibisyonu yoluyla hepatoselüler karsinom hücrelerinin apoptozunu destekler (Tantawy ve diğ. 2023).

2020'de Zarei ve arkadaşları benzo[b]tiyofen-diaril üre türevleri (17 a-g), HT-29 ve A549 kanser hücre hatlarında antiproliferatif aktiviteleri araştırılmıştır. Sonuçlara göre 17b, 17d ve 17f türevleri, iki hücre hatlarında antiproliferatif aktiviteler gösterdiği bulunmuştur ve pozitif kontrol olarak sorafenib kullanılmıştır. HT-29 ve A549 hücre hatlarında 17d bileşiği, sırasıyla, 5.91 ve 14.64 μ M IC50 değerleri saptanmıştır. Ayrıca Propidyum iyodür (PI) boyamaya ile yapılan hücre döngüsü ve apoptoz deneyleri sonucunda 17d bileşiği, HT-29 hücre hatları üzerinde apoptotik etki gösterdiği ve G0/G1 fazında hücre döngüsünün durmasını neden olduğunu gözlemlemişlerdir (Zarei ve diğ. 2020).

Rajagopal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre bir benzotiyofen türevi olan BT_ER_15f bileşiği, göğüs kanserine karşı güçlü etki sergiliyor ve gelecekteki araştırmalar için fayda sağlamıştır. Farmakokinetik çalışmaları, BT_ER_15f ligandının meme kanserine karşı en iyi ilaç adayı olabileceğini ortaya koymuşlardır. (Rajagopal ve diğ. 2023)

Martorana ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmada, iskelelerinde bir kükürt atomu içeren ve uygun yan zincirlerle işlevselleştirilen bazı bileşikler, mükemmel in vitro ve in vivo anti-proliferatif aktivitede, çok düşük toksisite ve yüksek verimlilik sergilemektedir (Martorana ve diğ. 2015).

Romeo ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada çeşitli benzotiyofen türevlerinin, Caco-2 (İnsan Kolarektal kanseri) ve HCT-116 (İnsan Kolon kanseri) hücre hatlarında etkili olduğunu göstermişlerdir (Romeo ve diğ. 2021)

Somaya ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmada elde edilen bulgular, tiyofen türevlerinin birçok tümör hücre dizisine karşı etkili olduğunu ve küçük hücreli dışı

akciğer kanseri hücre hattı (A549) ile kolorektal kanser hücre hattına (CT26) karşı önemli antitümör etkileri olduğunu göstermişlerdir. 2-iyodobenzamidin (BZ02), diğer benzamidlerle karşılaştırıldığında A549 hücre hattına ($IC_{50} = 6,10 \mu M$) karşı gelişmiş inhibitör aktivite sergilediğini bulmuşlardır. Bileşik 2'deki iyodürün bromit (yani BZ03) ile değiştirilmesi, inhibitör aktiviteyi büyük ölçüde azaltmış olduğunu bulmuşlardır. Ek olarak benzamidin (BZ02) benzilamin'e (yani BZA06) indirgenmesi $30 \mu M$ 'lik bir IC_{50} değeriyle sonuçlanmıştır. Benzilaminin (BZA09, $IC_{50} = 2,73 \mu M$) karşılık gelen benzamiddin (BZ05, $IC_{50} = 9,49 \mu M$) daha güçlü olduğu da bulunmuştur. Üre türevleri arasında halkayla deaktive edilmiş bileşikler UD13 ve UD19, halkayla aktive edilen türevler UD14-UD16 ve UD18'den ($IC_{50} > 50 \mu M$) önemli ölçüde daha yüksek antiproliferatif aktivite (sırasıyla $IC_{50} = 12.19$ ve $7.2 \mu M$) göstermiştir. Ayrıca bileşik UD12'deki fenil grubundan daha yüksek esnekliğe sahip benzil grubunu taşıyan BU17 bileşiği, UD12 bileşiği için $IC_{50} > 50 \mu M$ 'ye karşılık $9.00 \mu M$ 'lik bir IC_{50} değeriyle hücre canlılığı üzerinde güçlü bir etki sergilediğini bulmuşlardır. A549 hücre hattında benzotiyofen türevi bileşiğin güçlü etkilerini göstermişlerdir (Somaya ve diğ. 2021)

Bai ve diğerlerinin gerçekleştirdiği çalışmaya göre 19d olarak adlandırılan bileşik (sırasıyla $IC_{50} = 1.31 \mu M$ ve $10.3 \mu M$), hem meme kanseri hücre hattı (MCF-7) hem de endometriyal kanser hücre hattı (Ishikawa) hücrelerine karşı etkili antikanser ajan olarak tanımlandı. MCF-7 hücrelerinde apoptoz indüksiyonunun ortaya çıkarılması doza bağımlı bir şekilde izlendi. $1 \mu M$, $5 \mu M$ ve $10 \mu M$ 'de bileşik 19d'nin apoptoz oranları sırasıyla %11.7, %21.3 ve %32.4 idi (Bai ve diğ. 2021).

Tantawy ve diğerlerinin çalışmasında bazı steroid türevleri, G1'den S'ye ilerlemeyi bloke ederek hücre döngüsü analizini kontrol eden CDK2'nin önemli ölçüde aşağı regülasyonu ile hem dışsal hem de içsel apoptozda yer alan ana genleri indükleyebildiğinden, sonuçlarımız önceki yayınlarla uyumlu bulunmuştur ve mekanik olarak, içsel apoptotik sinyal yolağı, kaspaz kaskad yolunu aktive etmeye yol açan sitokrom C ve Bax ekspresyon seviyelerini aktive ettiğini bulmuşlardır (Tantawy ve diğ. 2023).

Haridevamuthu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada benzotiyofen türevleri gırtlak (HEp-2), meme (MCF7), mide (AGS), and osteosarcoma BP, BN, EP, EN bileşikleri, HEp2, osteosarkom (MG63) kanser hücre hattı HEp2 hücrelerine karşı

BP ve EP analoglarının IC₅₀ değerleri yaklaşık $27,02 \pm 1,23 \mu\text{M}$ ($\sim 5,18 \mu\text{g/mL}$) ve $35,26 \pm 2,15 \mu\text{M}$ ($\sim 7,8 \mu\text{g/mL}$) idi; $4,7 \pm 4,31 \mu\text{M}$; $\sim 86,45 \mu\text{g/mL}$). BP ve EP analogları, HEp2 hücre proliferasyonunu inhibe etmede bu çalışmada kullanılan diğer kanser hücrelerine göre daha etkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca yapılan apoptoz çalışmasında bileşikler, 1(3-hidroksibenzo[b]tiyofen-2-il) etanon (BP) ve 1-(3-hidroksibenzo[b]tiyofen-2-il) propan-1-on hidrat (EP), gırtlak kanseri HEp2 hücrelerine karşı potansiyel sitotoksik aktivite göstermiştir. BAX/BCL-2 oranındaki artış ile apoptoz indüksiyonunun inhibitör etki modu olduğu tahmin edilmiştir. BP ve EP analogları, aynı zamanda apoptozu gösteren Sub-G1 fazındaki hücreleri durdurmaya neden olduğu görülmüştür. Apoptoz aktivasyonunun mekanizmasını ortaya çıkarmak için izole edilen toplam RNA, BCL-2 (B hücreli lenfoma-2), BAX (Bcl-2 ilişkili X-protein), CASP3 (Kaspaz-3) ve CASP9 (Kaspaz-9) ekspresyon seviyelerini belirlemek için kontrol geni GAPDH kullanılarak qPCR gerçekleştirmişlerdir. BAX/BCL-2 oranındaki artışla birlikte apoptoz indüksiyonunun, inhibitör etki modu olduğu apoptozu göstermişlerdir (Haridevamuthu ve diğ. 2023)

Tantawy ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmada, HepG2 üzerine bileşik 7'nin muamelesiyle apoptozda kıvrılan majör genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisini incelemek için qPCR oluşturmuşlardır. Bileşik 7'nin, Bax (FC = 4.294 ± 0.048), P53 (FC = 4.00 ± 0.54), Kaspaz-3 (FC = 4.57 ± 0.46), Kaspaz-8 (FC = 2.251 ± 0.39), Kaspaz-9 (FC = 7.45 ± 0.71), işlenmemiş kontrolle karşılaştırıldığında, BCL2'yi (FC = $0,175 \pm 0,007$) ve CDK2'yi (FC = $0,451 \pm 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı şekilde aşağı regüle edebilmiştir. Bileşik 7 ile tedavi edilen hücrelerde etkili konsantrasyona sahip Bcl-2 geni, Bax ve P53 genlerinin ekspresyon seviyelerinde önemli bir yükselmenin yanı sıra kaspaz-3'ü aktive eden kaspaz-9'un aktivite seviyelerinde istatistiksel olarak bir artış ve kaspaz-3'ün ekspresyon seviyesinde önemli bir azalma görmüşlerdir (Tantawy ve diğ. 2023)

Bir diğer çalışmada, BMPT adı verilen ve 0,29 orta düzey ilaç puanına sahip yeni bir tiyofen türevinin biyolojik özellikleri test edildi. BMPT, LnCap, HepG2 ve Caco-2 kanser hücre çizgileri için sırasıyla $138.573 \mu\text{M}$, $185.931 \mu\text{M}$ ve $108.657 \mu\text{M}$ EC₅₀ değerleriyle seçici sitotoksikite gösterdi, ancak HEK293 kontrol hücre hattı

üzerinde göstermedi. Kaspaz3, kaspaz8, kaspaz9 ve Bax için artan ifadeler tespit edildi; ancak kanser hücre hatlarında Bcl-2 ekspresyonlarının azaldığı görüldü. BMPT, HepG2'deki toplam tiyol içeriğini ve toplam GST aktivitelerini sırasıyla %47 ve %40 azalttı ve GSTP1-1, GSTA1-1 ve GSTM2-2 için moleküler yerleştirme destekli inhibitör modeller sırasıyla karışık, rekabetçi ve rekabetçi değildi. GST aktiviteleri üzerindeki seçici inhibisyonu ile ilişkili olarak BMPT'nin, özellikle kaspaz 3, Bcl-2 ve Bax ifadelerindeki değişikliklere bağlı olarak önemli apoptotik etkiye sahip olduğu öne sürülmektedir (Yılmaz ve diğ. 2022).

Cruz ve diğ. Yaptığı çalışmada bileşik 8, ışıkla indüklenen makrofajlar üzerinde in vitro anti-inflamatuar aktivite analizlerinde salisilik asitten daha iyi bir yanıt veren bir tiyofen türevidir. Etkisi doza bağımlı olduğu görülmüştür (50 ve 100 µg/mL). Kimyasal yapısında çeşitli aromatik halkaların varlığını ve TNF-a ve IL-6 gibi proinflamatuar gen ekspresyonunun azaltılmasını içeren olası bir etki mekanizması görülmüştür (Cruz ve diğ. 2021)

Datura metel L'nin yapraklarından bir vetispiran tipi, dmetelisprosid A (1) ve bilinen iki megastigmane seskiterpenoid, sitosit A (2) ve stafilionosid D (3) ile birlikte oluşan yeni bir seskiterpenoid glikozit izole edilmiş. Tüm izolatlar, in vitro olarak RAW 7901.2 hücrelerinde SGC-7, Hepg231, HeLa, MCF-264 ve MDA-MB-7 kanser hücre hatlarına karşı sitotoksosite ve nitrik okside (NO) karşı anti-inflamatuar aktivite açısından değerlendirildi. Bileşik 1 ve 2, SGC-7901 ve IC'li HeLa hücrelerine karşı belirgin sitotoksosite sergiledi 21.43 ila 29.51 µm aralığındaki değerlerde her üç bileşik de IC ile NO üretimine karşı potansiyel etkiler göstermiş ve sırasıyla 31.10, 34.25 ve 44.31 µm değerleri bulunmuştur (Guo ve diğ. 2021).

Bu tez çalışmasında sentezlenen benzotiyofen ve türevlerinin, literatüre dayalı yaptığımız çalışmalar sonucu benzer sitotoksosite ve apoptotik etkiye sahip oldukları ve ayrıca antiinflamatuar etkisinin olduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser, fizyolojik özellikleri kaybolmuş DNA hasarlı yani mutasyonlu hücrelerin, kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıdır (Somaya ve diğ., 2021). Kanser, hücrede çeşitli metabolik değişikliklerle oluşan bir hastalık olup dünyada önemli ölüm nedenlerinden biri olmaktadır. Her yıl dünyadaki ölümlerin büyük bir oranından sorumlu olan kanser yüzünden yedi milyondan fazla insan ölmektedir (Globocan 2020). Günümüzde kanser tedavisi için kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, gen terapi ve cerrahi müdahaleler gibi çeşitli tedavi stratejileri mevcut bulunmaktadır. Kemoterapi, çeşitli kanser tedavileri için yaygın yöntem olarak kullanılmaktadır. Var olan kemoterapötik ajanlar, apoptozun indüksiyonuyla etkisini ortaya koymaktadır. Apoptoz, hücre zarının fosfolipid kaybı, DNA'nın oligonükleozomal kısımlara enzimatik bölünmesi ve sonuç olarak hücrelerin membrana bağlı apoptotik cisimlere bölünerek karakterize edilen iyi organize edilmiş bir hücre ölümüdür. Hücrelerin apoptoz geçirdiği başlıca iki yol vardır; biri dışsal ve diğeri içsel yollardır. Kanser hücrelerinin, hayatta kalma gereksinimlerine göre bu yollardan birini veya her ikisini birden ortak bir şekilde düzenlediği ve yaygın kemoterapötik ilaçların çoğuna karşı dirençli hale geldiği iyi bilinmektedir.

Benzotiyofen içerikli heterosiklik bileşiklerin ise kansere özgü proteinleri hedef aldığı, önemli sinyal yollarının inhibisyonuna veya aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Kükürt heterosiklik ailesi, fizikokimyasal özellikler gösteren oldukça kararlı aromatik bileşikler içerir. Son yıllarda, yürütülen çalışmalar ile tiyofen ve benzotiyofen içeren heterosiklik bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Benzotiyofen ve türevleri ise ortaya çıkan terapötik özellikleri sebebiyle kanser araştırmalarında oldukça ilgi çekici hale gelmiştir.

Tez dönemi boyunca, literatür taramaları gerçekleştirilmiş olup, sitotoksikite testleri yapılmış, yarı maksimal efektif dozları (EC50) belirlenen bileşiklerin apoptoz analizleri akış sitometri cihazında belirlenmiştir. Apoptoz ve inflammatuar ile ilişkili genlerin cDNA-PCR ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler, Gerçek Zamanlı PZR cihazı ile çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda aldehit fonksiyonel grubu içeren yeni nesil benzotiyofen türevleri anti-karsinogenik etkilerinin ortaya çıkarılması için insan akciğer kanseri hücre hattı (A549), insan serviks kanseri hücre hattı (HeLa), insan kolorektal kanseri hücre hattı (Caco-2) ve insan meme kanseri

hücre hattı (MDA-MB-231) kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır ve EC50 konsantrasyonları belirlenmiştir. Apoptoz ile ilişkili genlerin (BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, CASP9) ve inflamatuvar ile ilgili genlerin (Cox-2, iNOS, TNF- α , IL-6) mRNA ekspresyon seviyelerine olan etkileri bulunmuştur. Sonuç olarak bu tez çalışmasında sentezlenen benzotiyofen ve türevlerinin sitotoksik etkiye sahip olduğu ve apoptoz indüksiyonuna neden olduğu ve antiinflamatuvar etkiye sahip olduğu açıkça ortaya koyulmuştur.

Bu sonuçlar ışığında benzotiyofen ve türevlerinin gelecekte kanser çalışmalarına ve antiinflamatuvar çalışmalarına katkı sağlayacağı ve ileri çalışmalarının yapılması gerektiği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Algso, M.A.S., Kivrak, A., Konus, M., Kurt-Kızıldoğan, A., “Synthesis and biological evaluation of novel benzothiophene derivatives.” *J. Chem. Sci.*, 130, 119, (2018).

Martorana, A., Gentile, C., Perricone, U., Piccionello, A.P., Bartolotta, R., Terenzi, A., Pace, A., Mingoia, F., Almerico, A.M., Lauria, A., “Synthesis, antiproliferative activity, and in silico insights of new 3-benzoylamino-benzo[b]thiophene derivatives”, *Eur. J. Med. Chem.*, 90, 537-46 (2015).

Bai, C., Ren, S., Wu, S., Zhu, M., Luo, G., Xiang, H., “Design and synthesis of novel benzothiophene analogs as selective estrogen receptor covalent antagonists against breast cancer”, *Eur. J. Med. Chem.*, 221, 113543, (2021).

Cruz, R.M.D., Mendonça-Junior, F.J.B., Mélo, N.B., Scotti, L., Araújo, R.S.A., Almeida, R.N., Moura, R.O., “Thiophene-Based Compounds with Potential Anti-Inflammatory Activity”, *Pharmaceuticals*, 14(7) 692, (2021).

Er, Ö.F., Kivrak, H., Özok, Ö., Çelik, S., Kivrak, A., “A novel electrochemical sensor for monitoring ovarian cancer tumor protein CA 125 on benzothiophene derivative based electrodes”, *J. Electroanal. Chem.*, 904(18), 115854, (2022).

Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A., “Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy”, *C.A. Cancer J. Clin.*, 55(3), 178-194, (2005).

Globocan, *Global cancer observatory*. (2020)

Guo, R., Liu, Y., Pan, J., Guan, W., Yang, B.Y., Kuang, H.X., “A new sesquiterpenoid with cytotoxic and anti-inflammatory activity from the leaves of *Datura metel* L”, *Nat. Prod. Res.*, 35(4), 607-613, (2021).

Hanahan, D., “Hallmarks of Cancer: New Dimensions”, *Cancer Discov.*, 12(1), 31-46, (2022).

Haridevamuthu, B., Manjunathan, T., Wilson Alphonse, C.R., Kumar, R.S., Thanigaivel, S., Chandra Kishore, S., Sundaram, V., Gopinath, P., Arockiaraj, J., Bellucci, S., “Functionalized Sulfur-Containing Heterocyclic Analogs Induce Sub-G1 Arrest and Apoptotic Cell Death of Laryngeal Carcinoma In Vitro”, *Molecules*, 28(4), 1856, (2023).

Hatipoğlu, A. A., “Kanserde Erken Tanı ve Tarama Problemleri”, *Türkiye’de Kanser Kontrolü*, Sağlık Bakanlığı yayın, Ankara: Onur Matbaacılık, (707), 381-388 (2007).

Huang, M., Lu, J.J., Ding, J., "Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future", *Nat. Prod. Bioprospect*, 11(1), 5-13, (2021).

İşbilir, G., Gökmen, A. Ş. C. I., İsmail, A. L., & ÖZDEMİR, E., "Bitkisel Yağların Tıbbi ve Aromatik Kullanımı", *Intjos*, 1(1), 93 - 111 (2023).

Kamel, M.M., El-Ansary, A.K., Milad, Y.R., "Design, synthesis, and cytotoxicity of pyridine, pyrazole, and thiazole derivatives derived from N-alkyl-4,5,6,7-tetrahydro-1-benzothiophene." *Chem. Heterocycl. Comp.*, 49, 392–403, (2013).

Keri, R.S., Chand, K., Budagumpi, S., Somappa, S.B., Patil, S.A., Nagaraja, B.M., "An overview of benzo[b]thiophene-based medicinal chemistry", *Eur. J. Med. Chem.*, 138, 1002-1033, (2017).

Mansour S. Al-Said, Mahmoud S. Bashandy, Saleh I. Al-qasoumi, Mostafa M. Ghorab, "Anti-breast cancer activity of some novel 1,2-dihydropyridine, thiophene and thiazole derivatives", *Eur. J. Med. Chem.*, 46(1), 137-141, (2011).

Muñoz-Pinedo, C., El Mjiyad, N., Ricci, J.E., "Cancer metabolism: current perspectives and future directions", *Cell Death Dis.*, 3(1), e248, (2012).

Özmen, V., Fidaner, C., Aksaz, E., Bayol, Ü., Dede, İ., Göker, E., Güllüoğlu, B., Işıkdoğan, A., Topal, U., Uhri, M., Utkan, Z., Zengin, N., Tuncer, M., "Türkiye’de Meme Kanseri Erken Tanı Ve Tarama Programlarının Hazırlanması, Sağlık Bakanlığı Meme Kanseri Erken Tanı Ve Tarama Alt Kurulu Raporu". *Meme Sağlığı Dergisi*, 5(3), 125 – 134, (2009).

Özönder, Ü. İ., Topçu, A., "The Relationship Between Depression and Inflammation Markers in Patients with Metastatic Lung Cancer", *Namık Kemal Med. J.*, 11(1), 72-79, (2023).

Penthala, N. R., Sonar, V. N., Horn, J., Leggas, M., Yadlapalli, J. S. K. B., Crooks, P. A., "Synthesis and evaluation of a series of benzothiophene acrylonitrile analogs as anticancer agents." *Med. Chem. Comm.*, 4(7), 1073-1078. (2023).

Perin, N., Rep., V, Sović, I., Juričić, Š., Selgrad, D., Klobučar, M., Pržulj, N., Gupta, C.L., Malod-Dognin, N., Pavelić, S.K., Hranjec, M., "Antiproliferative activity and mode of action analysis of novel amino and amido substituted phenantrene and naphtho[2,1-b]thiophene derivatives", *Eur. J. Med. Chem.*, 185, 111833, (2020).

Mohareb, R. M., "Synthesis and structure elucidation of some novel thiophene and benzothiophene derivatives as cytotoxic agents", *Acta Pharm.* 66, 53–68. (2016).

Rajagopal, K., Kalusalingam, A., Bharathidasan, A.R., Sivaprakash, A., Shanmugam, K., Sundaramoorthy, M., Byran, G., "In Silico Drug Design of Anti-Breast Cancer Agents.", *Molecules*, 28, 4175, (2023).

Romagnoli, R., Preti, D., Hamel, E., Bortolozzi, R., Viola, G., Brancale, A., Ferla, S., Morciano, G., Pinton, P., “Concise synthesis and biological evaluation of 2-Aryl-3-Anilinobenzo[b]thiophene derivatives as potent apoptosis-inducing agents”, *Bioorg. Chem.*, 97, 103665, (2021).

Sahin, C., Mutlu, D., Nasirli, F., Mahmoudi, G., Zubkov, I.F., Arslan, S., Dogan, N.M., “New iridium bis-terpyridine complexes: synthesis, characterization, antibiofilm and anticancer potentials”, *Biometals*, 34, 701-713, (2021).

Sarankar, S., Tomar, K. , Bajaj, J. , Mehta, P., Pathak, A.K. , Tailang, M., “QSAR Stuy of Novel Benzothiophene Derivatives as Potent Anticancer Agent”, *Int. J. Adv. Pharm. Sci.*, 1, 309-318. (2010).

Sato, M., Glasebrook, A.L., Bryant, H.U., “Raloxifene: A selective estrogen receptor modulator.,” *J. Bone Miner. Metab.*, 12(2), 9–20, (1994).

Seçginli, S., “Meme Kanseri Taraması: Son Yenilikler Neler?”, *TAF Prev. Med. Bul.*, 10(2), 193-200, (2011).

Semiz, G., Mutlu, D., Günal B, Semiz, A., Arslan, Ş., “The anticancer effect of *Salvia pisdica* essential oil through promotion intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in human cancer cell lines”, *J. Herb. Med.*, 39, 100664, (2023).

Somaya, A., Abdel-Rahman, Wafa, E. I., Ebeid, K., Geary, S. M., Naguib, Y. W., El-Damasy, A. K., Salem, A. K., “Thiophene Derivative-Loaded Nanoparticles Mediate Anticancer Activity Through the Inhibition of Kinases and Microtubule Assembly.”, *Adv. Ther.*, 4(7), 2100058, (2021).

Stone, T.W., Williams, R.O., “Interactions of IDO and the Kynurenine Pathway with Cell Transduction Systems and Metabolism at the Inflammation–Cancer Interface.”, *Cancers*, 15(11), 2895, (2023).

Tantawy, M.A., Shalby, A.B., Barnawi, I.O., Kattan, S.W., Abd-Rabou, A.A., “Elmegeed GA. Anti-cancer activity, and molecular docking of novel hybrid heterocyclic steroids revealed promising anti-hepatocellular carcinoma agent: Implication of cyclin dependent kinase-2 pathway”, *Steroids*, 193, 109187, 0039-128X, (2023).

Tozkoparan, B., Aytaç S. P., “Kanser Kemoterapisinde Terapötik Hedef Olarak Glutatyon S-Transferazlar”, Hacettepe Üniversitesi, *J. Fac. Pharm.*, 27(2) , 139-164, (2007).

Xanthis, V., Mantso, T., Dimtsi, A., Pappa, A., Fadoulglou, V.E., “Human Aldehyde Dehydrogenases: A Superfamily of Similar Yet Different Proteins Highly Related to Cancer”, *Cancers*, 15, 4419, (2023).

Yıldırım, İ., “Kanser Gelişiminde İnflamasyonun Rolü”, *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi - C Yaşam Bilimleri Ve Biyoteknoloji kısıltması*, 8(1), 121- 140, (2019).

Yılmaz, C., Pirdawid, A. O., Fidan-Babat, C., Konuş, M., Cetin, D., Kıvrak, A., Algso, M.A.S., Arslna, Ş., Mutlu, D., Otur, Ç., Kızıldoğan, A. K., “A Thiophene Derivative, 2-Bromo-5-(2-(methylthio)phenyl)thiophene, Has Effective Anticancer Potential with Other Biological Properties.” *Chemistryselect*, 7(15), (2022).

Zarei, O., Azimian, F., Hamzeh-Mivehroud, M., Design, synthesis, and biological evaluation of novel benzo[b]thiophene-diaryl urea derivatives as potential anticancer agents., *Med. Chem. Res.*, 29, 1438–1448 (2020).

Fu, Z., Zhao, P. Y., Yang, X. P., Li, H., Hu, S. D., Xu, Y. X., Du, X. H., “Cannabidiol regulates apoptosis and autophagy in inflammation and cancer: A review.”, *Front. Pharmacol.*, 14, (2023).