

T. C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNDOLİN-2-ON TÜREVLERİNİN KANSER HÜCRE DÖNGÜSÜ VE
ÖLÜMÜNE ETKİSİ

İZEL NERMİN BAŞLILAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T. C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNDOLİN-2-ON TÜREVLERİNİN KANSER HÜCRE
DÖNGÜSÜ VE ÖLÜMÜNE ETKİSİ

İZEL NERMİN BAŞLILAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

GEBZE

2023

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**EFFECT OF INDOLIN-2-ONE DERIVATIVES ON
CANCER CELL CYCLE AND DEATH**

İZEL NERMİN BAŞLILAR
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

GEBZE
2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/02/2023 tarih ve 2023/11 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 17/02/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan İzel Nermin Başlılar'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Can Murathan ERİŞTİ

ÜYE

: Doç. Dr. Nagehan Ersoy TUNALI

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Malignant Mezotelyoma (MM) genelde akciğer ve karın zarının yüzey serozal hücrelerinden kaynaklanmakla beraber, perikardın serozal yüzeylerinden veya tunika vajinalisten de gelişebilen agresif bir kanser türüdür. MM'nin cerrahi, kemoterapi veya radyasyon ile tedavisi ise nadiren iyileştiricidir. Bilindiği üzere, kanser hücrelerinde apoptotik sinyallere duyarsızlık olduğu için apoptozun ve/veya diğer hücre ölümü yollarının indüklenmesi kanser tedavisindeki önemli yaklaşımlardan bir tanesidir. Literatür kapsamında, toksisitede azalmayla birlikte azalmış ilaç direnci hedeflenerek; farklı fonksiyonel grupların eklendiği indolin-2-on türevi maddelerin; terapötik etkilerinin artacağı ve kanser hücrelerini ölüme götüreceği hipotezi doğrultusunda; orjinal olarak sentezlenmiş olan indolin-2-on türevlerinin sağlıklı Mezotelyum ve MM hücrelerinde hücre döngüsüne ve apoptoza etkisi analiz edilmiştir. Bu projede, Akış sitometrisi-PI boyama, AO/EB ve DAPI/PI floresan boyama ve western blot analizleriyle, tüm türevlerden üçünün her iki MM hücre hattında hücre döngüsünü S fazında durdurduğu ve konsantrasyona bağlı olarak apoptoza yol açtığı belirlenmiştir. Böylece türevlerin anti-kanser potansiyelleri *in vitro* sistemde gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Malignant Mezotelyoma, Apoptoz, İndol Türevleri, Hücre Ölümü, Hücre Döngüsü.

SUMMARY

Malignant Mesothelioma (MM) is an aggressive type of cancer that usually arises from the surface serosal cells of the lung and peritoneum but can also develop from the serosal surfaces of the pericardium or tunica vaginalis. Treatment of MM with surgery, chemotherapy or radiation is rarely curative. As it is known, induction of apoptosis and/or other cell death pathways is one of the important approaches in cancer treatment since cancer cells are insensitive to apoptotic signals. Within the scope of the literature, by targeting decreased drug resistance with decrease in toxicity; indolin-2-one derivatives to which different functional groups are added; In this study, the effects of originally synthesized indolin-2-one derivatives on the cell cycle and apoptosis in healthy mesothelium and MM cells were analyzed in line with hypothesis that their therapeutic effects would increase and lead to death of cancer cells. In this project, PI staining with flow cytometry, AO/EB and DAPI/PI fluorescent staining and western blot analysis showed that among all derivatives three of lead to the S phase arrest and concentration dependent apoptosis in both MM cell lines. Thus, anti-cancer potentials of derivatives have been demonstrated in the *in vitro* system.

Keywords: Malignant Mesothelioma, Apoptosis, Indole Derivatives, Cell Death, Cell Cycle.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana destek veren, hep daha iyisi olabilmem için emek gösteren ve tez çalışmamı yapabilme olanağı sağlayan danışmanım Prof. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU'na,

Laboratuvar çalışmalarımın başından beri desteğini ve bilgisini esirgemeyen Arş. Gör. Gülseren TURHAL'a ve KASİAL'deki laboratuvar arkadaşlarım Büşra DEMİRKAN, Dayk MURATOĞLU ve Nimet Şule YÜNCÜ'ye,

Süreç boyunca desteğini esirgemeyen canım aileme, dedem Ali ERGENÇ'e kardeşlerim Aras, Melis ve Kaya'ya,

Sevgisini ve desteğini hep hissettirmiş olan tüm hocalarıma teşekkürlerimi en derin duygularıyla sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. KANSER	3
2.1. Malignant Mezotelyoma	5
2.1.1. Tanı ve Tedavi Yöntemleri	7
3. HÜCRE DÖNGÜSÜ	8
4. APOPTOZ	11
4.1. Apoptozun Düzenlenmesinde BCL-2 Protein Ailesinin Rolü	12
4.2. Kaspazlar	14
4.3. Apoptozun Ekstrinsik (Dışsal) ve İntrinsik (İçsel) Yol ile Gerçekleşme Mekanizması	15
4.4. PARP ve p53 Proteinlerinin Apoptozdaki Rolü	19
5. İNDOLİN-2-ON TÜREVİ MADDELER	21
6. MATERYAL & METOD	24
6.1. Hücre Kültürü Uygulamaları	24
6.2. İndolin-2-on Türevlerinin Uygulamaları	24
6.3. Hücre Döngüsü Analizleri	25
6.3.1. Hücre Döngüsünün PI boyama ile Akım Sitometrisinde Değerlendirilmesi	25
6.3.2. Hücre Döngüsü Protein Analizleri	26

6.3.2.1. Protein İzolasyonu	26
6.3.2.2. SDS-PAGE ve Western Blotlama	26
6.3.2.3. İmmün Belirleme	27
6.3.2.4. Stripleme	28
6.3.2.5. Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar	28
6.4. Hücre Ölümünün Morfolojik olarak Floresan Boyama ile Belirlenmesi	30
6.4.1. AO/EB Uygulamaları	30
6.4.2. DAPI/PI Uygulamaları	30
6.4.3. Apoptotik Protein Analizleri	31
7. BULGULAR	32
7.1. İndolin-2-on Türevlerinin Hücre Döngüsünü S fazında Tutuklaması	32
7.2. İndolin-2-on Türevlerinin Konsantrasyon Bağımlı Olarak Apoptoza Etkisi	35
8. TARTIŞMA ve SONUÇ	43
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	50
EKLER	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
AIF	: Apoptozu indükleyen faktör
AO / EB	: Akridin turuncusu / Etidyum bromür
BAD	: Bcl-2 ile ilişkili ölüm promotörü
BİD	: BH3 etkileşimli etki alanı ölüm agonisti
BİM	: Bcl-2 benzeri protein 11
BMF	: Bcl-2 değıştiren faktör
CAD	: Kaspaz ile aktive olan DNAaz
CAK	: CDK aktive edici kinaz
CARD	: Kaspaz alım alanı
CDK	: Sikline Bağımlı Kinaz
CKI	: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü
CTLA4	: Sitotoksik T lenfosit ilişkili protein 4
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DED	: Ölüm efektör alanı
DISC	: Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
ECM	: Hücre Dışı Matris
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ENDO-G	: Endonükleaz G
FADD	: Fas ile ilişkili protein ve ölüm alanı
HMGB1	: Yüksek mobiliteli grup 1
HRK	: Harakiri protein
MM	: Malign Mezotelyoma
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
NOXA	: Phorbol-12 miristat-13-asetat kaynaklı protein 1

PARP	: Poli-ADP riboz polimeraz
PI	: Propidyum iyodür
PIDD	: P53 ile indüklenen ölüm alanı proteini
PUMA	: Apoptozun p53 yukarı regüle edilmiş modülatörü
RB1	: Retinoblastoma protein 1
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SMAC	: Kaspazların ikinci mitokondri türevli aktivatörü
SV40	: Simian virüsü 40
TP53	: Tümör protein p53
t-Bid	: Kesilmiş Bid protein
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TGF β	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptörü
TRAIL	: TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Kanserin gelişmesinde çevrenin ve genlerin rolü.	3
2.2: Kanserin evrimsel süreci.	4
2.3: Kanserin ayırt edici özelliklerinin terapötik hedeflenmesi.	5
2.4: Asbest fiberlerinin mezotelyal hücrelere etkisi.	5
2.5: Asbest indüklemeli karsinogenezin muhtemel mekanizması.	6
3.1: Hücre döngüsünün mekanizması.	9
4.1: Apoptozun Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığı ile düzenlenmesi.	13
4.2: Ölüm reseptörlerinin yapısı.	16
4.3: Apoptozun dışsal (ekstrinsik) yolağı.	17
4.4: Apoptozun içsel (instrinsik) yolağı.	18
4.5: Ekstrinsik ve instrinsik yolağın kesişim şeması.	19
5.1: İndol-2-on türevlerinin kimyasal yapısı.	23
7.1: SPC111 hücrelerinde, hücre döngüsü profilinin değerlendirilmesi.	33
7.2: SPC212 hücrelerinde, hücre döngüsü profilinin değerlendirilmesi.	34
7.3: MeT-5A, SPC111 ve SPC212 hücrelerinde hücre ölümünün morfolojik değerlendirilmesi.	37
7.4: MeT-5A, SPC111 ve SPC212 hücrelerinde hücre ölümünün istatistiksel değerlendirilmesi.	39
7.5: SPC111 ve SPC212 hücrelerinde hücre ölümünün DAPI/PI floresan boyama ile morfolojik değerlendirilmesi.	40
7.6: SPC111 ve SPC212 hücrelerinde hücre döngüsü ve ölümüyle ilgili protein seviyelerinin değerlendirilmesi.	41
7.7: SPC111 ve SPC212 hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranının istatistiksel grafiğı.	42

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa</u>
4.1: Apoptozun indüklenme/baskılanma mekanizması.	11
6.1: SDS-PAGE jelinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları.	27
6.2: Tampon ve solüsyonların hazırlanması.	29

1.GİRİŞ

Malignant Mezotelyoma (MM), akciğer zarı ve karın zarı yüzeyini saran mezotel doku hücreleri kaynaklı bir hastalıktır. Akciğer zarı mezotelyomalarının yaklaşık %70 ila %90'ı kanserojen mineral liflere, özellikle asbeste maruz kalma ile ilişkilendirilmiştir [Hiriart vd., 2019]. MM'nin ancak ileri evrelerde farkedilmesinin nedeni, başta anatomik konumu olmak üzere, spesifik biyobelirteçlerin olmaması ve radyolojik tanı araçlarının yetersizliğidir [Sekido, 2013].

Heterosiklik bileşikler insan vücudunun çeşitli biyolojik süreçlerinde önemli bir rol oynar ve birçoğu çeşitli, kimyasal ve biyolojik özellikleri dolayısıyla klinikte kullanımdadır. Bunlar arasında indol, önemli farmakolojik olarak aktif moleküllerden biridir. Literatür verilerinin de desteklediği gibi, çeşitli kanser hücre hatlarında sitotoksik etki göstermelerinin ve hücre döngüsü tutuklanmasını indüklemelerinin yanı sıra programlı hücre ölümü olan apoptozu indükledikleri bildirilmiştir. İndollerin kanser hücrelerindeki uygulamalarına ilişkin çeşitli çalışmalara ve kimyasal reaktivitesine dayanarak indol, etkin sonuçlar veren yeni ilaç adayları elde etmek amacıyla modifiye edilmiştir.

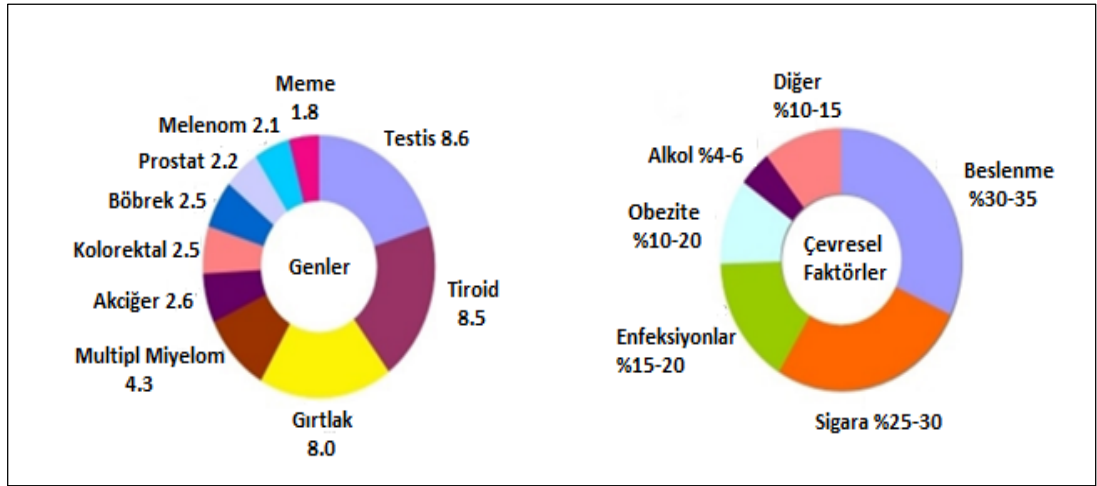
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında son yıllarda insidansı artmış olan Malignant Mezotelyoma hücrelerinde dört farklı indolin-2-on türevlerinin anti-kanserojen potansiyelinin hücre döngüsü ve apoptoz mekanizmalarına etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda (i) Orijinal olarak sentezlenen indolin-2-on türevlerinin anti-kanser etkinliğine dair kalitatif ve kantitatif verilerin sağlanması; (ii) MM hücrelerinde etkinliğinin belirlenmesine ilaveten diğer kanser hücrelerindeki uygulama potansiyeline öngörü sağlanması; (iii) Ulaşılan sonuçlarla kinaz inhibitörü ve heterosiklik indolin-2-on sınıfı ilaçların etkinliğine dair literatüre katkıda bulunulması; (iv) Toksisitede azalma ve azalmış ilaç direnci hedeflenerek, yüksek potansiyel ve etkinliğe sahip hedefli indol bazlı diğer moleküllerin tasarlanıp sentezlenmesi için ön verilerin sağlanması hedeflenmiştir.

Bu kapsamda dört indol türevi maddenin iki farklı kanser hücresinde hücre döngüsü üzerine etkileri akış sitometrisi ve ilgili hücre döngüsü proteinlerinin analizleriyle belirlendikten sonra hücre ölümüne neden olup olmadığının morfolojik analizinin iki farklı boyama yapılarak nitel ve nicel olarak analiz edilmesi ve apoptozdaki anahtar proteinlere etkilerinin değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir.

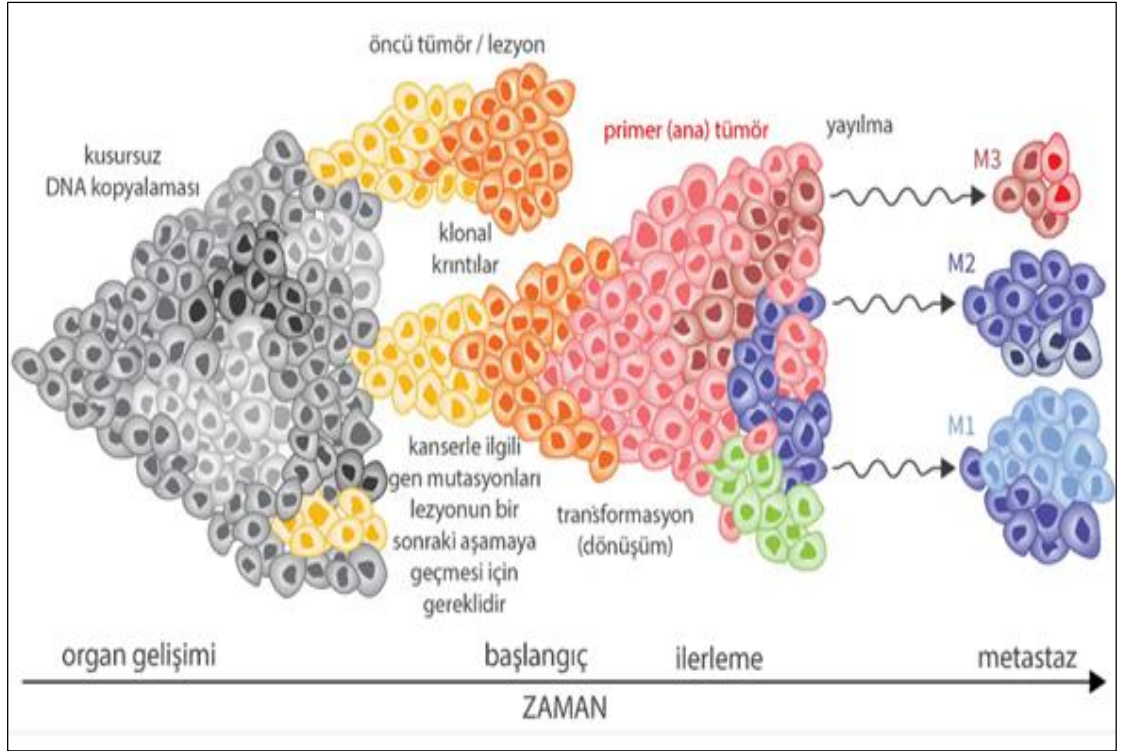
2. KANSER

Kanser, DNA hasarıyla kontrolsüz hücre büyümesi veya anormal hücre bölünmesiyle oluşan multifaktöriyel bir hastalıktır. Kanserlerin %10-15' inin kalıtımla ilişkili olduğu düşünülürken, kalan vakaların %85-90'ının çevre ve yaşam tarzından kaynaklandığı belirtilmiş ve Şekil 2.1'de gösterilmiştir [Kaleli vd., 2018].



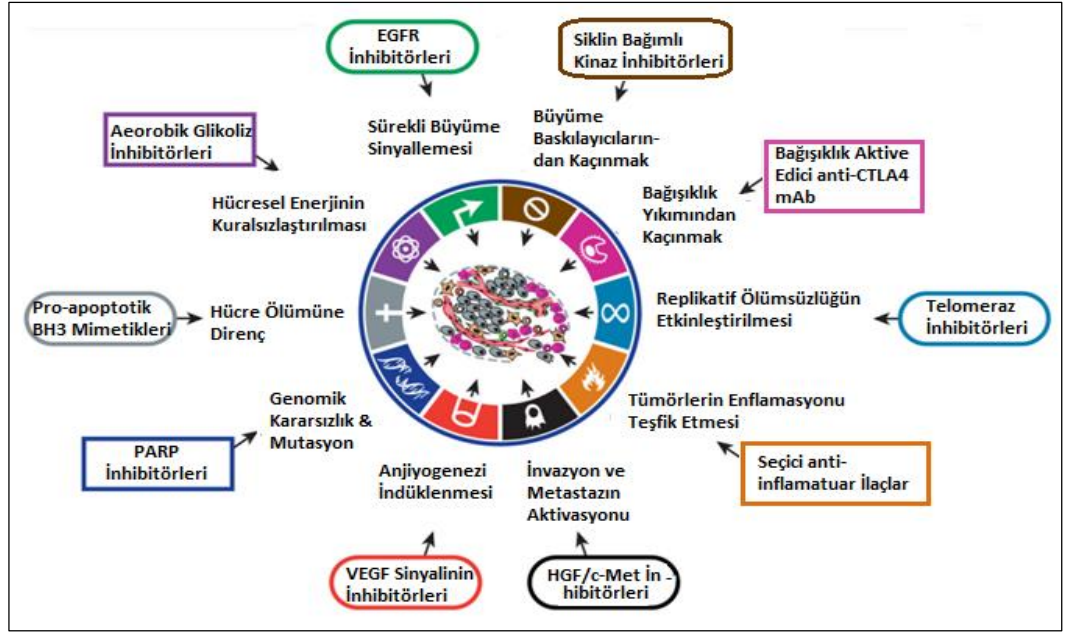
Şekil 2.1: Kanser gelişmesinde çevrenin ve genlerin rolü.

Çoğu kanser vakasında metastaz görülmektedir ve ölüm çoğu zaman dokunun kendisinden kaynaklanmak yerine sekonder olarak gelişen metabolik değişiklikler sonucunda gerçekleşmektedir (Şekil 2.2). Bu değişikliklerin akabinde çoğu hastada kanser kaşeksisi (kilo ve kas kaybına neden olan sendrom) nedeni ile düşük sağkalım ve tedavi cevabı görülmektedir [Erdamar vd., 2014], [Web 1, 2022].



Şekil 2.2: Kanserin evrimsel süreci.

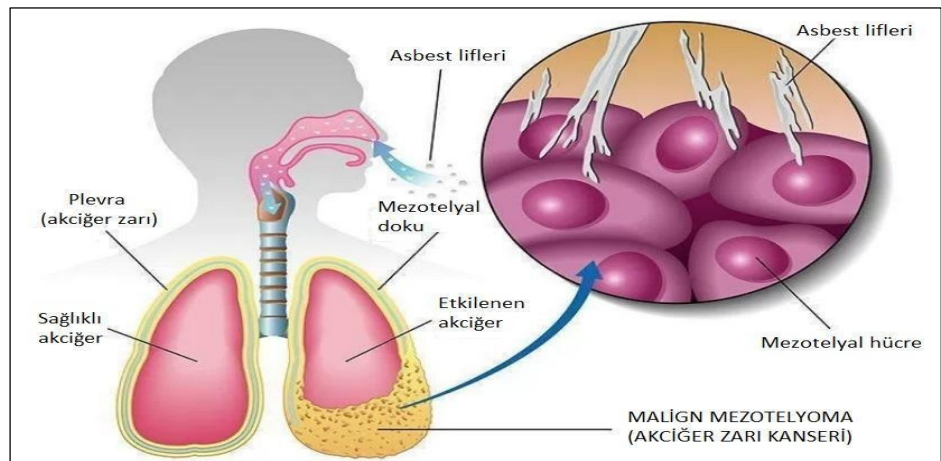
Kanser hücreleri, büyüme sinyallerinin deregülasyonu sonucu sürekli proliferatif özellikte olma, invazyon özellikleri ile kan ve lenf yolunu kullanarak uzak dokulara kaçıp metastaz yapabilme, immün yıkımdan kaçma ve hatta baskılayabilme gibi özelliklere ilaveten anjiyogenez yolu ile kan damarları oluşturup besin ve oksijen ihtiyaçlarını karşılayabilir, apoptoza karşı direnç gösterebilir ve tümörlerin enflamasyon oluşturması sonucunda serbest oksijen radikalleri üreterek DNA hasarında artışa sebep olabilmektedirler. Bu özelliklerin her biri esas alınarak tasarlanıp uygulanan hedefe yönelik tedaviler Şekil 2.3'te özetlenmektedir [Hanahan ve Weinberg., 2011].



Şekil 2.3: Kanser ayırt edici özelliklerinin terapötik hedeflenmesi.

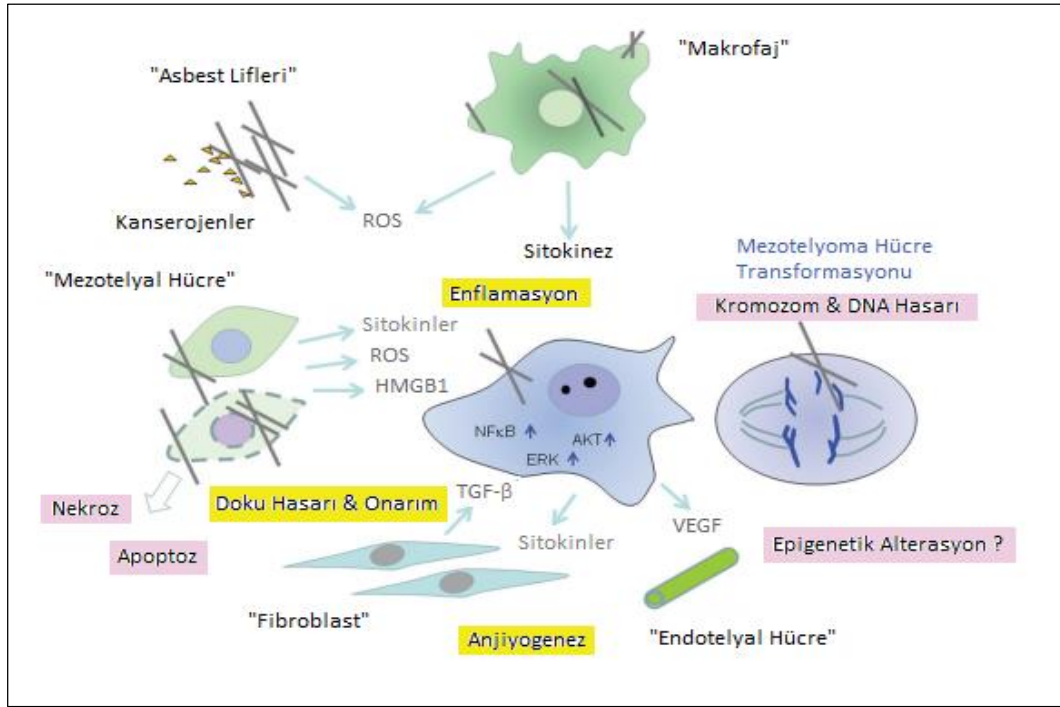
2.1. Malignant Mezotelyoma

Akciğer zarının primer tümörleri nadir olmakla birlikte MM en yaygın olanıdır ve asbest maruziyeti ile ilişkili agresif bir kanser türüdür (Şekil 2.4). 2021 Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırması, MM'nin dört ana histolojik alt tipini tanımlamıştır. Bunlar; epiteloid, sarkomatoid, bifazik ve desmoplastiktir [Onagi vd., 2021], [Web 2, 2022].



Şekil 2.4: Asbest fiberlerinin mezotelyal hücrelere etkisi.

Asbest ve erionit gibi doğal minerallerin dışında yoğun radyasyona maruz kalma, simian virüsü 40 (SV40), karbon nanotüpleri (CNT's), nanopartiküller, silikon karbid ve floro-edenit gibi bileşikler de MM riskini arttırmaktadır. Şekil 2.5'te asbeste bağlı karsinogenezin muhtemel mekanizması gösterilmektedir [Hiriart vd., 2019], [Sekido., 2013].



Şekil 2.5: Asbest indüklemeli karsinogenezin muhtemel mekanizması. ROS (Reaktif oksijen türevleri), HMGB1 (yüksek mobiliteli grup 1), TGF-β (Dönüştürücü büyüme faktörü β).

MM gelişiminde genetik risk faktörlerinin rolüne ilişkin bilgiler son yıllarda artmaktadır. Hem düşük hem de yüksek riskli genetik faktörlerin tanımlanmasıyla birlikte, asbest vb. kanserojenlere maruz kalmadan tek başına genetik faktörlerin MM'yi indüklediği henüz gösterilmemiştir [Betti vd., 2019].

2.1.1. Tanı ve Tedavi Yöntemleri

Biyopsi örneklerindeki histolojik bulguların klinik ve radyolojik özelliklerle korelasyon göstermesi önem taşımaktadır. Kalretinin, WT-1, D2-40 (podoplanin) ve vesitokeratin 5/6 spesifik tanısal mezotelyal belirteçlerdendir. Primer epitelyoidin % 70'inde ve sarkomatoid plevral mezotelyomaların % 90 ila % 100'ünde p16 delesyonu tespit edilmiştir. Bu homozigot gen delesyonunun varlığı şimdiye kadar mezotelyomanın en iyi göstergesi olmuştur. Bugüne kadar, bu delesyon herhangi bir iyi huylu mezotelyal lezyonda bildirilmemiştir [Arif ve Husain., 2015].

MM'nin ancak ileri evrelerde farkedilmesinin nedeni, başta anatomik konumu olmak üzere, spesifik biyobelirteçlerin olmaması ve radyolojik tanı araçlarının yetersizliğidir [Sekido., 2013]. Hastalığın tedavisinde imatinib, etoposid, fluorourasil, paklitaksel gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçlar bazı yan etkilere sebep olması ve sağlıklı dokuyu negatif etkilemesinden kaynaklı tedavinin etkinliğini ve verimini sınırlamaktadır. Bu nedenle var olan tedavilere ek olarak, yan etkisi az, hedefe yönelik ve çok hedefli tasarlanmış antikanser ilaçlara ihtiyaç vardır [Verma., 2007].

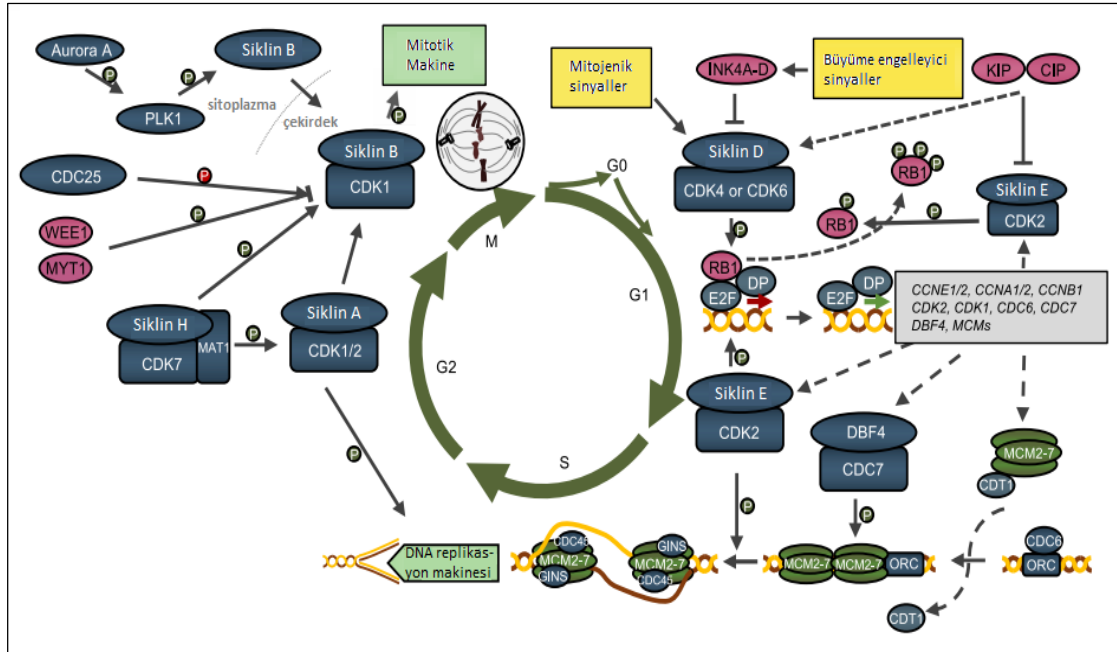
Cerrahi, kemoterapi veya radyasyon ile MM tedavisi nadiren yanıt vermektedir. Cerrahi yöntemlerin çoğunlukla riskli olmasının yanı sıra kemoterapi veya radyasyon tedavisi ile elde edilen sonuçlar, destekleyici tedaviye kıyasla sağkalımda anlamlı bir iyileşme göstermemektedir. Ayrıca, mezotelyoma hastalarında değişik derecelerde başarı gösteren bir dizi immünoterapi tedavi stratejisi de test edilmektedir [Lemjabbar-Alaoui vd., 2015].

3. HÜCRE DÖNGÜSÜ

Hücre döngüsü, G1 fazı, S fazı (sentez), G2 fazı ve M fazı (mitoz ve sitokinez) olarak bilinen dört aşamadan oluşur. G1 fazındaki hücrede mitojenik sinyallerin etkisi ile D- tipi siklinler yukarı regüle olurken katalitik partnerleri CDK4 veya CDK6'yı bağlayıp aktif bir kompleks haline getirirler. INK4 inhibitör ailesi (p16INK4A, p15INKB, p18INK4C, p19INK4D) siklin D-CDK4/6 kinazın aktivitesi ile negatif düzenlenir. KIP/CIP proteinleri (p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2}) stabil siklin D-CDK4/6 komplekslerinin oluşmasını sağlar ve buna ek olarak CDK2 VE CDK1'i barındıran komplekslerin inhibitörü olarak çalışırlar. Siklin D-CDK4/6 kinazlar retinoblastoma proteini (RB1)'i foforile ederler. Fosforillenmiş RB1, transkripsiyon faktörü olan E2F'i bağlar ve aktivitesini bastırır veya inaktive eder. Eğer RB1 siklin D-CDK4/6 tarafından kısmi inaktive edilirse E2F'ler salınmış olur. E2F, CDK2'yi bağlamak ve aktive etmekten sorumlu iki E-tipi siklini (E1 ve E2) hedefler. RB'in fosforilasyonu siklin E-CDK2 tarafından gerçekleştirilir ve bu yolla E2F transkripsiyonel programı gerçekleştirilerek hücrenin S fazına girmesi için gerekli olan protein sentezi sağlanır. G1 fazı süresince, DNA replikasyon orijini üzerinde ORC1-6, CDT1, CDC6 VE MCM2-7 DNA helikazından oluşan replikasyon öncesi kompleksler oluşur. S fazı başlangıcında, DBF4-CDC7 ve siklin E CDK2 tarafından bir dizi fosforilasyon ile DNA replikasyonu tetiklenir. Bu fosforilasyonlarla CDC45 MCM2-7-GINS (CMG) kompleksi oluşur ve DNA helikazın aktivasyonu sağlanır. DNA replikasyon orijinlerinin ateşlenmesi görevi siklin E-CDK2'den, siklin A-CDK2'ye geçer. Siklin A, aynı zamanda G2/M evresinde CDK1 ve CDK2'nin aktivasyonunu sağlayabilir ama bu evrenin geçişi sürecinde en önemli işlevi siklin B-CDK1'in aktivasyonudur. PLK1 tarafından fosforile edilen siklin B mitoz başlangıcında çekirdekte birikir. Ayrıca, hücre bölünmesi ve mitotik ilerleme ile ilgili birçok proteinin fosforilasyonu siklin B-CDK1 tarafından sağlanır.

CDK aktive edici kinaz (CAK), hücre döngüsü içindeki CDK'lerin aktivasyonunu sağlayan bir komplekstir ve katalitik alt birim siklin H ve kompleksi stabilize eden MAT1 halka proteininden oluşur. Ayrıca, transkripsiyon faktörü TFIIH'nin bir üyesi olarak işlev görür. Bu kompleks içinde, CDK7, RNA polimeraz II'nin C terminal alanını

fosforile eder. Hücre döngüsünün genel işleyişi, Şekil 3.1’de gösterilmektedir [Suski vd., 2021].



Şekil 3.1: Hücre döngüsünün mekanizması.

Hücre döngüsünün düzenleyicilerini kodlayan proto-onkogenler mutasyonla onkogen haline gelirler ve ilerleyen aşamalarda kanserin oluşumuna neden olurlar. Tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu hücrenin kontrolsüz büyümesini engelleyebilen bu negatif düzenleyici molekülleri kodlar. En önemli tümör baskılayıcı gen proteinleri Rb, p53 ve p21’dir. Ortak işlev olarak belirli olaylar tamamlanmadan hücre döngüsünün ilerlemesine engel olurlar. Ancak bu negatif düzenleyicilerde bir mutasyon gerçekleşmesi durumunda bu işlevlerini kaybederler. Örneğin, G1 kontrol noktasında birçok görevi olan p53, mutasyona uğramış haliyle insan tümör hücrelerinin neredeyse yarısından fazlasında tanımlanmıştır. Mutasyonlu p53 genine sahip bir hücre genomik DNA hatalarını tespit edemez. Ayrıca, kısmen işlevsel olduğunda ise mutasyonları tanımlasa bile bu onarım için gerekli DNA onarım enzimlerinin aktive olarak işlev görmesini sağlayamayabilir. Bu durumda DNA onarılamaz ve bu nedenle p53’ün apoptozu tetiklemesi sonucunda hücrenin kontrollü ölümünün sağlanması beklenir. Ancak, kanser hücrelerindeki mutant p53 formu apoptozu tetikleyememektedir. Bunun yanı sıra, mutant p53, p21 üretimini tetikleme

yeteneğini kaybettiği için yeterli p21 seviyesi sağlanamayacaktır. Yeterli p21 seviyeleri olmadan, CDK aktivasyonu üzerinde etkili bir blok yoktur. Özetle, bu önemli mutasyonlar kısaltılmış bir hücre döngüsüne ve tümörleşmeye neden olabilirler [Suski vd., 2021].

4. APOPTOZ

Programlanmış hücre ölümü (PCD), hücre içi uyarılara yanıt olarak programlanıp yönetilen, düzenlenmiş hücre ölümü mekanizmasıdır. Temel olarak apoptoz, otofaji ve nekroptoz gibi (programlanmış nekroz) mekanizmalarını içerir. Bu programlanmış ölüm yolları, malign hücrelerin progresyonunu ve yayılmasını engelleyen birer doğal savunma sistemi olarak çalışırlar [Su vd., 2015].

Bu programlı hücre ölüm çeşitlerinden apoptozun oluşumu sırasında hücrede bir dizi biyokimyasal ve morfolojik değişiklik gözlenir. Bu ana morfolojik değişiklikler, hücre büzülmesi, membran kabarcıklaşması, nükleer kromatinin yoğunlaşması, kromozomal DNA'nın internükleozomal bölgelerden bölünmesi ve çekirdeğin parçalanmasını içerir. Hücre membranının kabarcıklaşmasının sonucu olarak, zara bağlı apoptotik cisimler salınır. Normal şartlarda plazma zarının iç yüzünde yer alan fosfatidilserin, fagositler tarafından yutulmalarını kolaylaştıran bir tanıma sinyali sağlamaları için dış yüzeye transloke olur. Böylece apoptotik hücre parçaları hızlı ve verimli bir şekilde enflamasyona neden olmadan yok edilir [Burlacu., 2003].

Hücrede apoptozun gerçekleşip gerçekleşmeyeceği bir dizi sinyalin değişim dengesine bağlıdır. Bu indüksiyon/baskılama mekanizmasını etkileyen genler Tablo 4.1'de verilmiştir [Edlich., 2018].

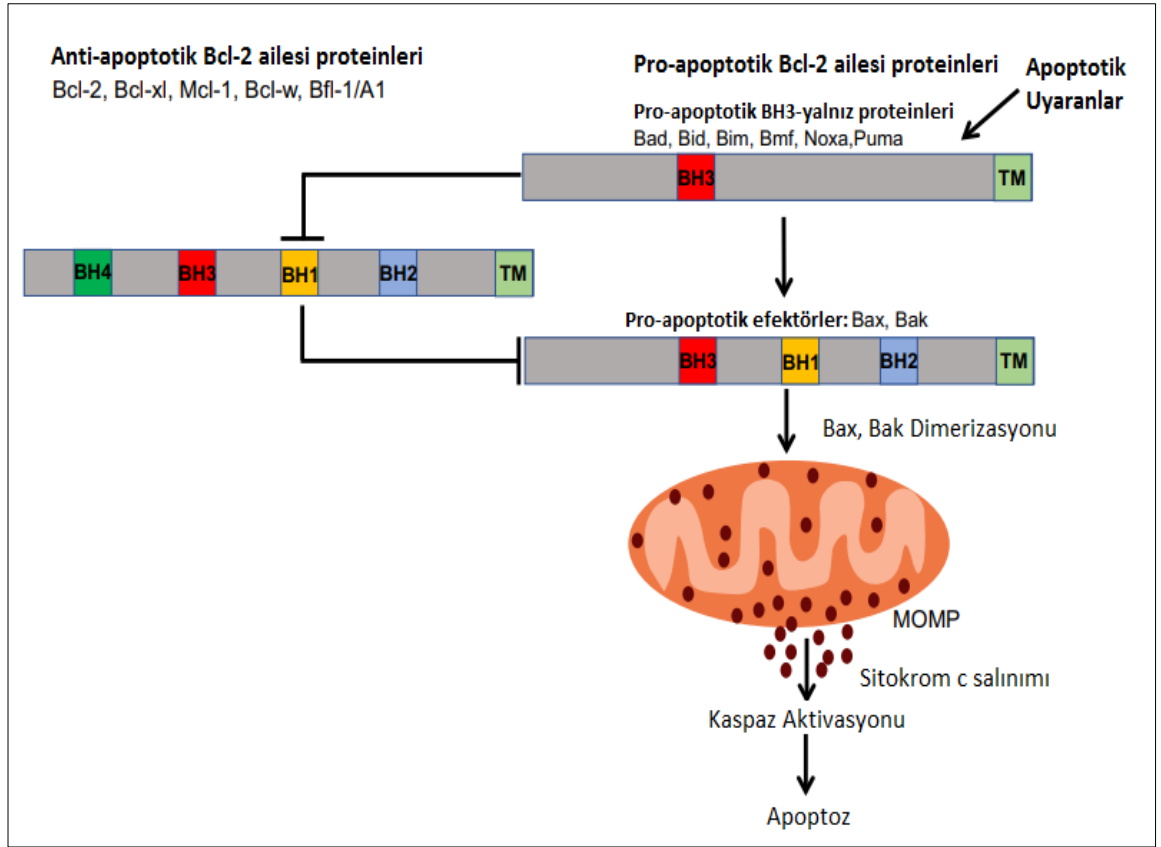
Tablo 4.1: Apoptozun indüklenme/baskılanma mekanizması.

Apoptozisi Baskılayan Genler	Apoptozisi İndükleyen Genler
Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-w, bcl-xl, mcl-1, A1, brag, bfl-1	Bcl-2 grubundan; Bax, Bad, Bak, Bcl-Xs, bad, bik, Hrk 1
c-abl geni	c-myc
ras onkogeni	P53, P21
çözünebilir fas	Fas (CD95/APO-1)
p35	İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)
A20	LOH (MTS1/CDK41)

4.1. Apoptozun Düzenlenmesinde BCL-2 Protein Ailesinin Rolü

Apoptoz, dışsal olarak bilinen ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği yol ya da içsel olarak bilinen mitokondriyal yol aracılığıyla indüklenebilir. İçsel yol, büyüme faktörlerinin eksikliği, kemoterapötik ajanlar, radyasyon, hipoksi ve onkogen aktivasyonu gibi hücrel stresler tarafından tetiklenir.

Bu yollar, Bcl-2 homoloji (BH) alanları adı verilen spesifik homoloji bölgelerinin varlığı ile karakterize edilen Bcl-2 ailesi proteinlerinin üyeleri tarafından düzenlenir [Basu., 2021]. Bcl-2 protein ailesi üç alt gruba ayrılabilir. Anti-apoptotik grup, Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-W, Bcl-B, Bcl2A1 ve Mcl-1 olarak sıralanabilir. Bu proteinler dört Bcl-2 homoloji alanına (BH1, BH2, BH3 ve BH4) sahiptir. Ayrıca Bcl2A1 dışında tüm diğer üyeler zar ötesi alanlara sahiptir ve tipik olarak hücrel, çekirdek veya mitokondriyal membranlarla ilişkilidir. İkinci alt grup, Bax, Bak ve Bok'tan oluşur ve bu grup BH4 alanından yoksundur. Son olarak, üçüncü alt grup ise sadece BH3 alanına sahiptir ve Bik, Bim, Bad, Bid, Bmf, Hrk, PUMA ve NOXA'dan oluşur. Bu sadece-BH3 domaini içeren pro-apoptotik üyeler ölüm sinyali ile doğrudan Bax ve Bak ile etkileşime girerler ve membran üzerinde homooligomerizasyonlarını sağlayarak MOMP'a (mitokondriyal dış zarın geçirgenliği) neden olurlar. Anti-apoptotikler ise mitokondri üzerinde Bax-Bax yer değişimi ve aktivasyonunu engellemek adına BH3 domenlerine bağlanırlar. Bcl-2 ailesi üyelerince apoptozun düzenlenme mekanizması Şekil 4.1'de gösterilmektedir [Grilo ve Mantalaris., 2019].



Şekil 4.1: Apoptozun Bcl-2 ailesi proteinleri aracılığı ile düzenlenmesi.

Bcl-2 ailesi üyelerinin pro ve anti apoptotik proteinleri, bir ölüm sinyali olmadığında işlevleri için önemli ipuçları sağlayan farklı hücre içi bölmelere yerleşirler. Antiapoptotik üyeler başlangıçta özellikle mitokondri, endoplazmik retikulum ve nükleer zarlarda bulunan integral zar proteinleri iken proapoptotik proteinlerin büyük çoğunluğu sitozolde lokalize olmuş haldedir. Ancak bir ölüm sinyalini takiben, pro-apoptotik proteinler olarak işlev görmelerini sağlayan konformasyonel değişikliğe uğrarlar ve bu değişiklik mitokondri dış zarını hedefleyerek entegre olmalarını sağlar. Bcl-2 proteinleri apoptozu düzenlerken belli mekanizmalar kullanır. Örneğin, Bcl-2 ailesi üyelerinin aktif ve inaktif formda bulunması, homodimer ve heterodimer oluşturabilme kabiliyetleri ile sağlanır. Translokasyon olarak bilinen mekanizma ile pro-apoptotik Bax proteinin aktif hale gelmesi için dimerizasyonunun yanında translokasyon da gerekir. Apoptotik sinyallerin varlığında, normalde sitoplazmada bulunan Bax, homodimer oluşturur ve

mitokondriye transloke olur. Böylelikle, Bax- Bax homodimeri, mitokondriyal protein haline gelir.

Diğer yandan, normalde hayatta kalım sinyallerinin etkisi ve AKT/PKB sinyal yolu ile fosforile halde tutulan Bad proteini bir ölüm sinyalinin ortaya çıkmasıyla, kalsiyum bağımlı fosfataz enzimi tarafından defosforile hale getirilir. Böylelikle defosforile Bad mitokondri zarında bulunan anti-apoptotik Bcl-xl/Bcl-2 heterodimerine katılarak apoptozun gerçekleşmesini destekler. Bu mekanizma fosforilasyon olarak bilinir.

Yalnızca BH3 alanı içeren, uzun ve esnek halkaya sahip Bid proteini ise sitoplazmada bulunur. Fas ligandı, Fas reseptörüne bağlandığında kaspaz-8 aktivasyonu sağlanır ve Bid proteini p15 karboksi terminal fragmentini oluşturacak şekilde kaspaz-8 tarafından proteolitik olarak bölünür. Böylelikle, kesik p15 (tBid) mitokondri membranına yerleşir ve buradaki proteinlerle etkileşerek apoptozisin gerçekleşmesini sağlar. Bu mekanizma ise proteolitik bölünme olarak bilinir. Apoptozun gerçekleşmesi üzerindeki bu önemli etkilerinden dolayı Bcl-2 proteinleri kanser terapilerinin bir hedefidir [Burlacu., 2003].

4.2. Kaspazlar

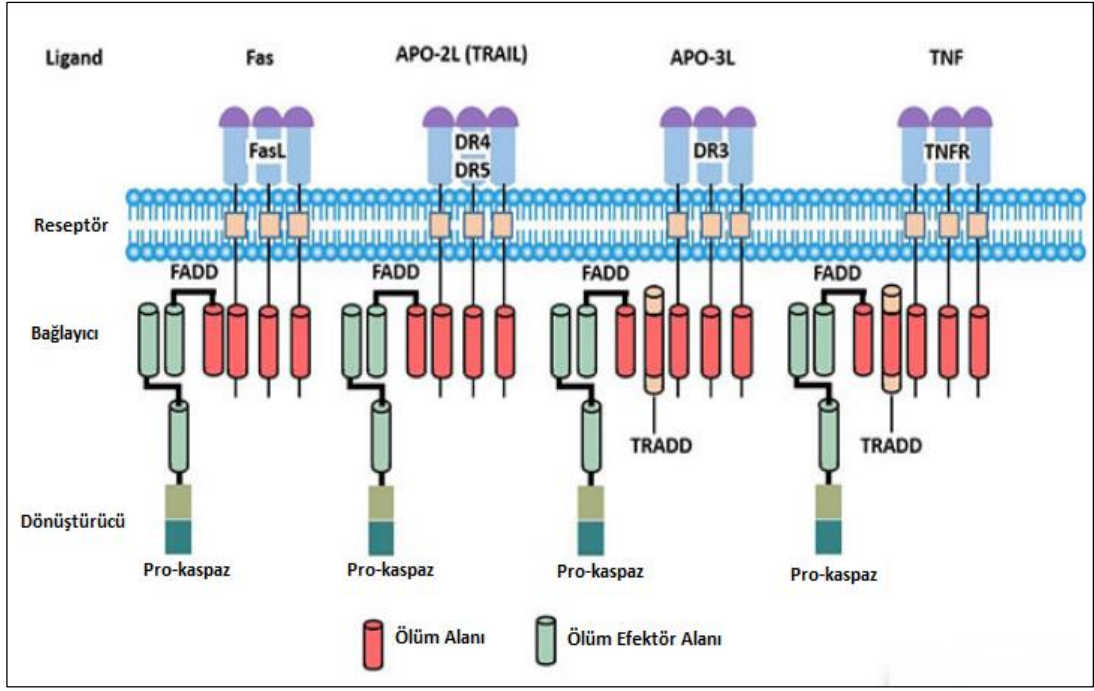
Kaspazlar (sistein bağımlı aspartat spesifik proteazlar), substratlarındaki aspartat kalıntılarından proteolitik kırılmalar ile aktifleşme özelliğine sahip bir proteaz ailesidir. Bu parçalanma sonucu büyük ve küçük alt birimler serbest kalır ve aktif tetramerik enzimi oluşturur. Kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5 ve kaspaz-11 inflamasyonun düzenlenmesinde işlev gören inflamatuvar kaspazlar olarak bilinir iken, kaspaz-14 keratinosit farklılaşması ile ilişkilidir. Kaspazların geri kalanı, apikal ve öldürücü alt familyaları olarak gruplandırılabilir ve apoptozda önemli roller oynarlar. Kaspazlar, hücrelerde zimojen (prokaspaz) formunda bulunur. Öldürücü (efektör) kaspazlar olarak bilinen kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7, kaspaz-8 veya kaspaz-9 aktivasyon kaskadının aşağı akışında bulunur ve içsel ve dışsal apoptoz yollarının birleştiği bir noktayı temsil eder. Efektör kaspazlar bir kez aktive olduğunda, çok çeşitli hücrel proteinlerin proteolitik bölünmesinden sorumludur [Zhang vd., 2003].

Başlatıcı kaspazlar ise DED (ölüm efektör alanı) ve CARD (kaspaz alım alanı) denilen protein-protein etkileşimini sağlayan uzun prodomenlere sahiptirler. Efektör kaspazlar kısa prodomenler içerirler ve aktivasyonları başlatıcı kaspazlarca sağlanır. Özetle, hücre ölümü ile sonuçlanan protein yıkımını katalizleyen kaspazlar apoptozu aktive eden birçok faktör tarafından doğrudan ve dolaylı olarak aktive edilirler [Valmiki ve Ramos., 2009].

4.3. Apoptozun Ekstrinsik (Dışsal) ve İnstrinsik (İçsel) Yol ile Gerçekleşme Mekanizması

Apoptoz, İnstrinsik (Mitokondriyal) yol ve Ekstrinsik (dışsal) olarak bilinen iki yolla gerçekleşir. Dışsal apoptotik yolak, hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen spesifik ölüm reseptörleri aracılığı ile dış uyaranlar tarafından gerçekleştirilir. Bunlar, Fas reseptörleri (Fas reseptörü), DR4/DR5, tümör nekroz faktörü reseptörleri (TNF-R) ve TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand reseptörleri (TRAIL-R) olarak bilinen reseptörlerdir. Hücre yüzeyindeki bu ölüm reseptörleri kendilerine spesifik ligandlar ile etkileşir ve aktive olurlar. Böylelikle Fas ile ilişkili ölüm alanı (FADD) ve tümör nekroz faktörle ilişkili ölüm alanı (TRADD) adaptör proteinleri ile birleşirler. Böylelikle ölümü-indükleyen sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Daha sonra, inaktif pro-kaspazın uzun ve kısa kollarını birbirinden ayırarak aktif kaspaz-8'in oluşmasını sağlarlar.

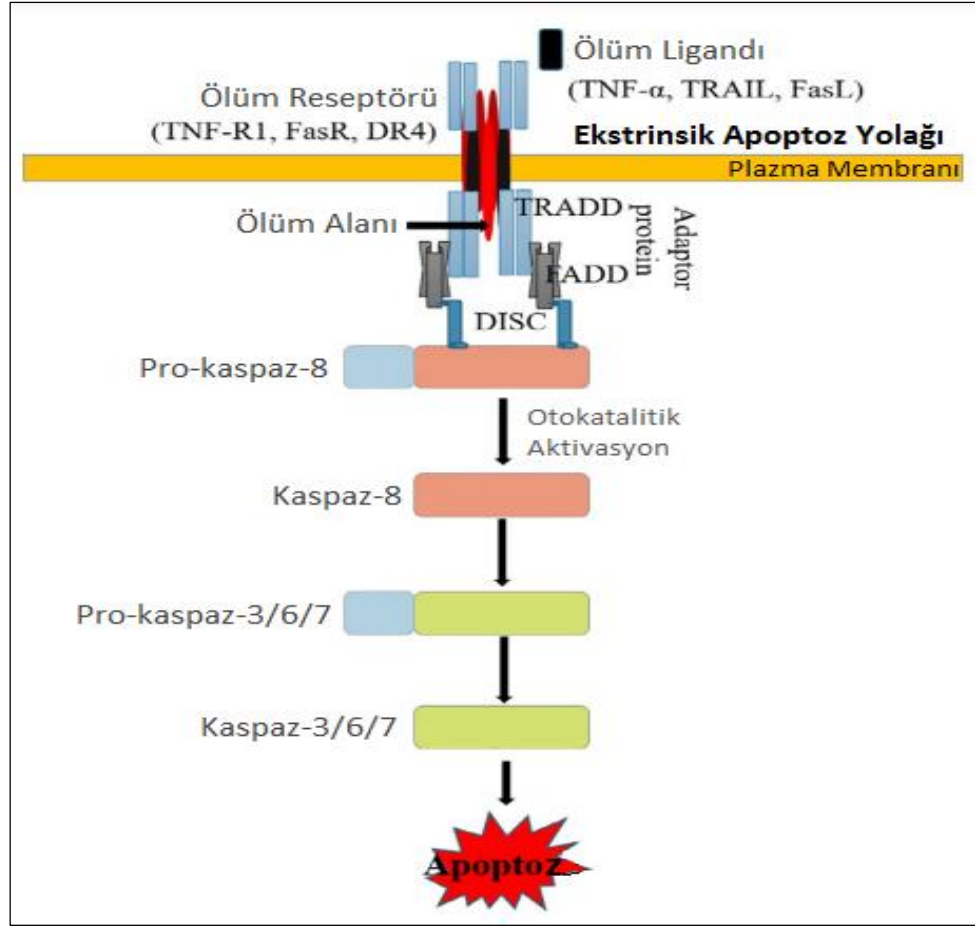
Bugüne kadar en iyi karakterize edilen ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleri CD95/FasR, TNF- α /TNF-R1, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5'tir (Şekil 4.2). TNF reseptör ailesi, sisteinden zengin hücre dışı alanların ve ölüm sinyalini hücrenin dışından içine ileten ve apoptozu gerçekleştiren bir sitoplazmik alanın (ölüm alanı) varlığı ile karakterize edilir. Ölüm reseptörlerinin yapısı Şekil 4.2'de gösterilmiştir. [Kashyap vd., 2021], [Web 3, 2022].



Şekil 4.2: Ölüm reseptörlerinin yapısı.

Kaspaz-8'in, kaspaz-3'ü aktifleştirmesi iki yolla gerçekleşir. İlk olarak kaspaz-8, prokaspaz-3'ü direkt olarak parçalayıp aktif hale getirebilir. Kaspaz-3, DNA fragmentasyon faktörü (DFF 45)'i, DNAaz aktivitesi olan DFF 40 oligomerine dönüştürür. Böylelikle DFF 40 çekirdekte apoptotik kromatin kondenzasyonunu gerçekleştirir.

Diğer bir yol da ise, mitokondriden sitokrom-c salınımını sağlamak için kaspaz-8, Bcl-2 proteinini Bid ve tBid'e (terminal kısmı) ayırır. Bid ve tBid'in mitokondriye transloke olmasıyla mitokondriyal porlar açılmış olur ve apoptozom adı verilen kompleks oluşur. Apoptozom kompleksi; sitokrom-c, apoptotik proteaz aktive edici faktör (APAF-1) ve prokaspaz-9'un aynı alanlarının bir araya gelmesi ve ATP' nin katılması ile oluşur. Böylelikle kaspaz-9 aktifleşmiş olur. Kaspaz-9'un kaspaz-3'ü aktifleştirmesi ile devam eden süreç yeniden DNA fragmentasyonu ile sonuçlanır. DNA fragmentasyonunun oluşması proteolitik kaspaz aktivasyonun bir sonucu olarak kaspazla aktive olan DNAaz (CAD) inhibitörü olan ICAD'in inaktive edilip CAD'ın aktive olmasıyla sağlanır. Serbest kalan CAD, DNA'yı parçalar. Dışsal yolak Şekil 4.3'te gösterilmektedir [Ichim ve Tait., 2016].

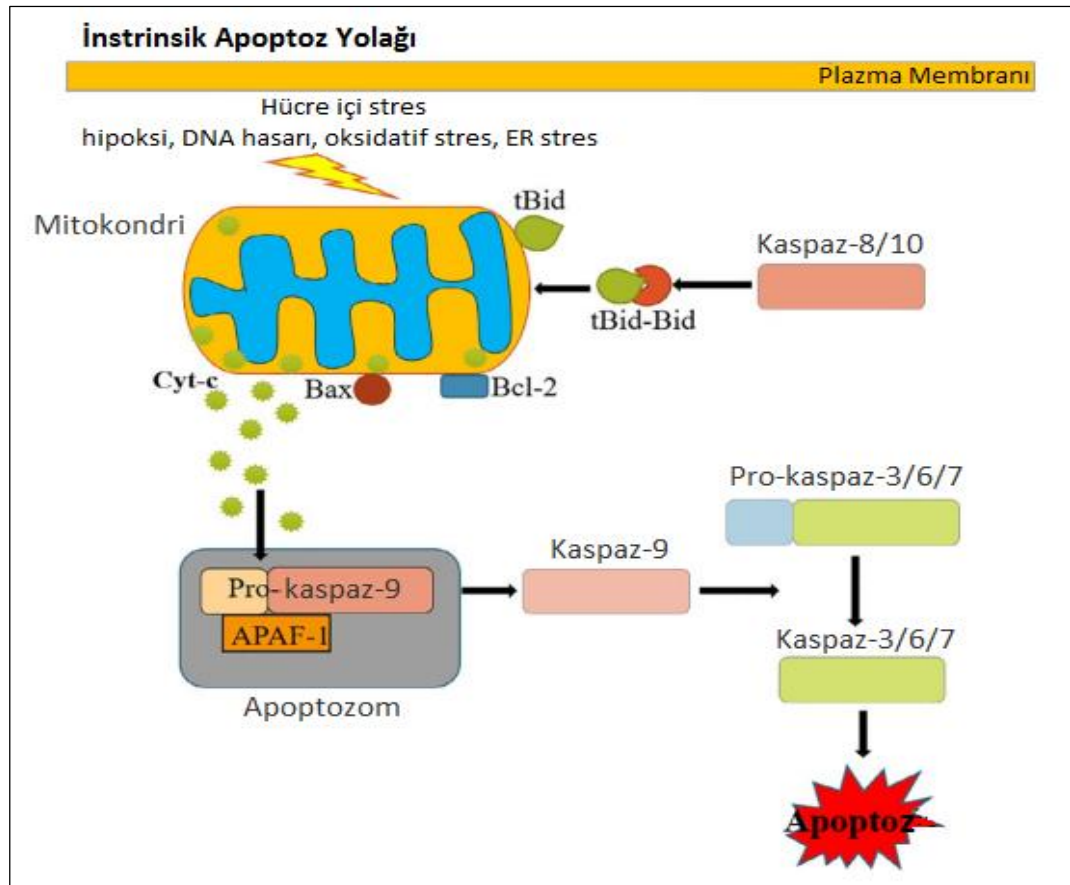


Şekil 4.3: Apoptozun dışsal (ekstrinsik) yolağı.

Yukarıda da bahsedildiği gibi iç uyaranlar metabolik veya hipoksik stresler ve ayrıca endoplazmik retikulum stresi tarafından tetiklenmektedir. Hücre içi sinyaller ile apoptotik uyaranların alınması sonucu pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ve kaspazların aktivasyonu gerçekleşir. Pro-apoptotik Bid proteini, Bax ve Bak proteinlerinin aktifleşmesini sağlarken, anti-apoptotik Bcl-2'yi inaktive eder. Aktifleşen bu iki protein, mitokondri membranında por oluşumunu sağlayarak membran potansiyelini değiştirir ve mitokondri dış zar geçirgenliğine (MOMP) yol açar. Böylelikle açılan porlardan sitokrom-c ile birlikte Ca^{++} , Smac, AIF ve Endo-G salınımı gerçekleşir [Kashyap vd., 2021].

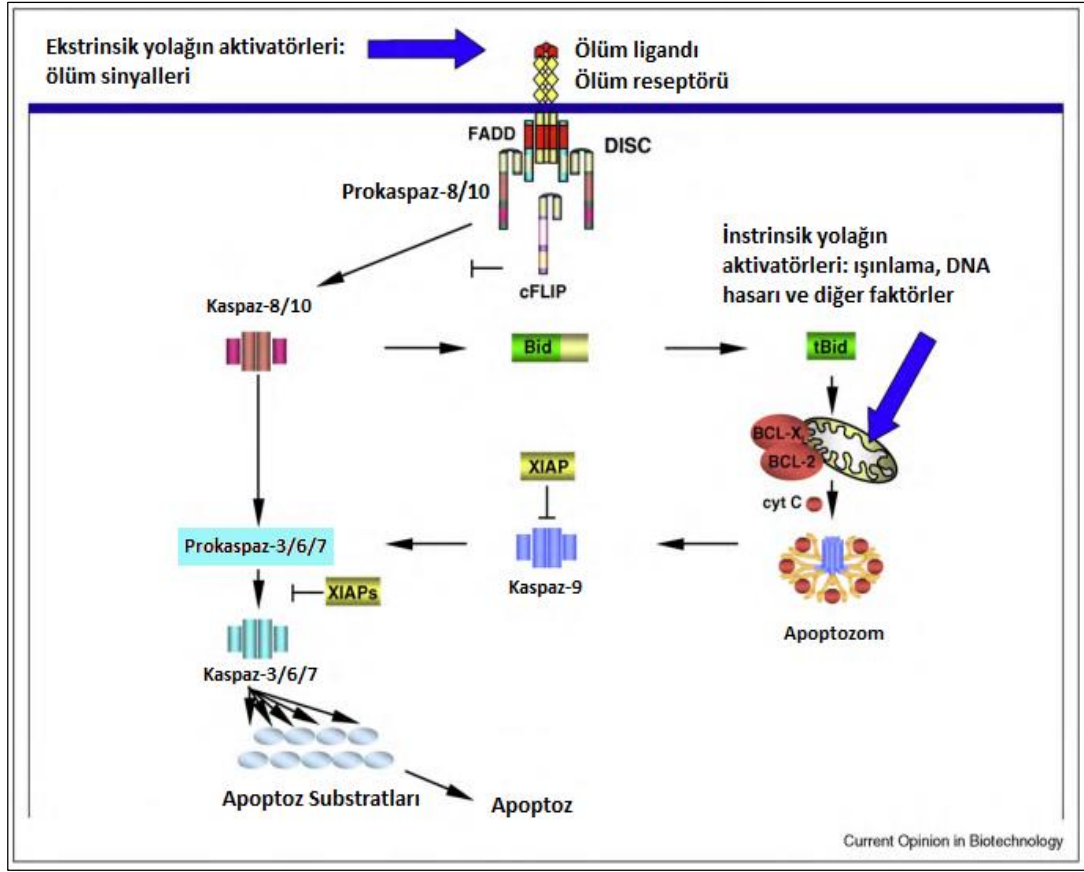
SMAC apoptotik faktör inhibitörleri (IAF) olarak bilinen proteinleri inaktive eder ve AIF'lerin çekirdeğe transloke olması ve parçalanması sağlanarak apoptoz hızlandırılır. ENDO-G ise DNA'nın parçalanmasını sağlar. Apoptozom kompleksinin oluşumu ve kaspaz-9'un kesilerek aktifleşmesini takiben gerçekleşen süreç dışsal

yolakla aynı devam eder. Apoptozun içsel yolağı Şekil 4.4'te gösterilmektedir [Jeng., 2018], [Kashyap vd., 2021].



Şekil 4.4: Apoptozun içsel (instrinsik) yolağı.

Dışsal ve içsel yolağın kesişim noktası nihai hedef olan MOMP'un tetiklenmesini sağlamak amacıyla BH3 etkileşimli ölüm agonisti (BİD) proteininin kaspaz-8 tarafından bölünmesidir. Böylelikle MOMP'u etkileyecek aktif ve kesilmiş BİD (t-Bid) formu oluşturulur. Apoptozun bu iki yolağının kesişimi Şekil 4.5'te gösterilmektedir [Ichim ve Tait., 2016], [Lavrik., 2010].



Şekil 4.5: Ekstrinsik ve instrinsik yolağın kesişim şeması.

4.4. PARP ve p53 Proteinlerinin Apoptozdaki Rolü

DNA hasarına sepep olan ajanlar p53'ün MDM2 bağlama alanında kritik bir serin kalıntısını fosforile edebilen kinazların (ATM ve DNA PK gibi) aktivasyonunu indükler. p53 fosforile edildiğinde ise artık MDM2'ye bağlanamaz ve p53'ün MDM2 aracılı inhibisyonunu engellenmiş olur. p53, hücrede DNA hasarı olduğunda hücrenin hasarı onarabilmesi için hücre döngüsünü durdurur veya çoğu durumda hücreyi apoptoza yönlendirir. Bax, NOXA, PUMA ve p53AIP1 gibi mitokondriye lokalize olan proteinlerin p53 aracılı indüksiyonu, sitokrom c salınımını ve Apaf-1/kaspaz-9 apoptozomunun aktivasyonunu tetikler. Ayrıca p53, Fas ve DR5 (Ölüm Reseptörü 5) gibi ölüm reseptörlerinin ve DR aracılı apoptotik sinyalleşmeye katılması muhtemel olan PIDD ifadesini de indükler. p53 ile indüklenen apoptozun diğer potansiyel araçları, ağırlıklı olarak Golgi aygıtına ve endoplazmik retikuluma lokalize olan PMP22/gas3 protein ailesinin bir üyesi olan PMP-22 (PERP) ile ilgili p53 apoptoz

efektörünü içerir. Böylelikle p53, DNA hasarı durumunda hücre döngüsünün regülasyonunu sağlar [Dlamini vd., 2004].

Poli-ADP riboz polimerazlar (PARP) DNA onarımı, transkripsiyon, replikasyon ve metabolizmada aktif rol oynayan proteinlerdir. DNA bağlayan N terminal uç, modifikasyondan sorumlu merkezi bölge ve C terminal katalitik bölgeden oluşurlar. Özellikle hücre içi NAD⁺/ATP seviyesi apoptoz veya nekrozu aktive etme kararının belirlenme sürecinde önemlidir. Apoptotik kaspaz-3'ün etkisi ile PARP, DEVD motifinden 24 kDa'luk N terminal ve 89 kDa' luk katalitik alanı içeren C terminale bölünür. C terminal alan katalitik alanı koruduğu için bazal enzimatik aktivitesi devam eder. Ancak, bölünme sonucu PARP hasar tanıma fonksiyonunu kaybeder ve DNA hasarına karşı inaktif hale geçer. Böylelikle, NAD⁺ tüketiminin önüne geçilir. *In vivo* bölünmede kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin hedefi olan PARP' lar, kaspazlarca kesilmeleri için potansiyel kesim motiflerine sahiptirler.

Özetle, PARP ya onarım sürecinde rol almak üzere poli (ADP)-riboz sentezi gerçekleştirir ya da kaspaz aktivasyonu ile bölünen PARP'ın inaktivasyonu sağlanarak apoptoz desteklenir [Soldani ve Scovassi, 2002].

5. İNDOLİN-2-ON TÜREVİ MADDELER

Kinazlar çok çeşitli sinyal yollarını aktive ederek proliferasyon, farklılaşma, yer değiştirme, anjiyogenez ve metabolizma gibi çok sayıda hücresel işlevi düzenleyen enzimlerdir. Kanserli dokularda aşırı eksprese edildikleri ve çoğunlukla düzensiz oldukları gösterilmiştir. Bu nedenle, küçük moleküller kullanarak kinaz aktivitesinin modüle edilmesi, kanser tedavisi için stratejik bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. [Dhokne vd., 2021].

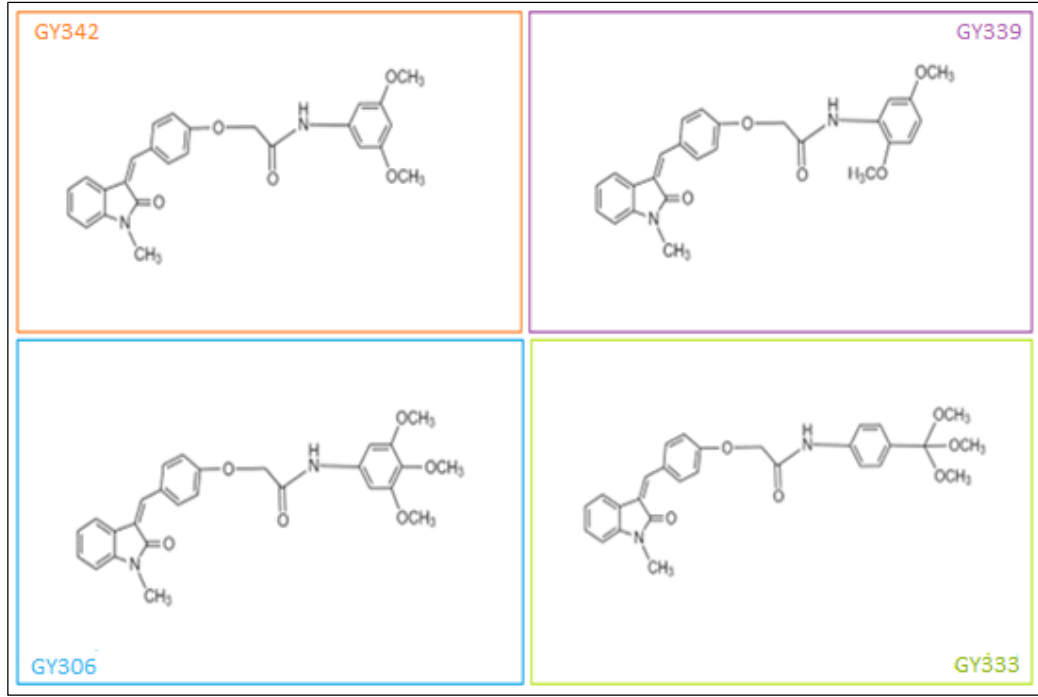
İndoller, yapısal olarak beş üyeli bir pirol halkasına kaynaşmış halde bulunan altı üyeli benzen halkasından oluşurlar. İndol ve türevleri anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-viral ve anti-kanser aktiviteleri dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik özelliklere sahip heterosiklik bileşiklerdir [Sachdeva vd., 2020]. Aynı zamanda, kanser hücrelerinde çeşitli hedefler üzerinde hareket kabiliyetleriyle ilaca dirençli kanserlere karşı olumlu bir potansiyele sahiptir. Semaxanib, Sunitinib, Vinorelbine ve Vinblastine gibi bazı indol içeren bileşikler, ilaca dirençli kanser tedavisi dahil birçok kanser türü için klinikte kullanıma sahiptir [Jia vd., 2020]. Pfizer tarafından Sutent olarak pazarlanan Sunitinib ise böbrek hücreli karsinom ve imatinib dirençli gastrointestinal stromal tümör (GIST) için FDA tarafından onaylanmış küçük molekül, çok hedefli reseptör tirozin kinaz (RTK) inhibitörüdür ve VEGFR, PDGFR, FLT3 ve c-Kit molekülleri üzerinde aktiftir [Goodman vd., 2007].

Pirol süstitüe indolin-on türevi maddenin çeşitli kanser hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdiği ve G2 / M fazında hücre döngüsü tutuklamasını indüklediği, hem CDK1 (Cdc2) hem de siklin B1 protein seviyelerini azalttığı gösterilmiştir [Xiong vd., 2010]. Daha önce, bir seri indolin-2-on türevi tasarlanarak sentezlenmiş ve güçlü anti-proliferatif etkiye sahip Pak1 inhibitörü keşfedilerek apoptoza etkisi değerlendirilmiş ve bu ajanın doza bağımlı bir şekilde İnsan Meme Adenokarsinoma (MDA-MB-231) hücrelerinde apoptozu indüklediği ve pro-apoptotik protein olan Bax'ın ekspresyonunu yukarı düzenlerken, anti-apoptotik protein olan Bcl-2 proteinlerini aşağı regüle ettiği gözlemlenmiştir. Ek olarak kaspaz-8 ve kaspaz-3'ün kesimide belirlenmiştir [Yao vd., 2020].

Diğer bir çalışmada, 6-metoksikarbonil indolin-on'dan türevlendirilmiş antitümör aktiviteye sahip daha güçlü bir çoklu kinaz inhibitörü sentezlenmiştir. Bu yeni maddenin, İnsan Kolon Kanseri (HT-29), İnsan Karaciğer Kanseri (HepG2) ve İnsan Mide Kanseri (MKN74) hücrelerinin koloni oluşumunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği saptanmıştır [Qin vd., 2020]. Ayrıca başka bir çalışmada, bifenil metilen indolinon türevleri Prostat Kanseri (DU-145) hücrelerinde uygulanmış ve membran kabarcıklanması gibi morfolojik değişikliklerle birlikte apoptotik parçacıkların oluşumu saptanarak, maddelerin doza bağlı şekilde apoptozu indükledikleri gösterilmiştir [Donthiboina vd., 2019]. Benzer şekilde, spiro-dihidroksitiopiran-indolinon türevi yeni maddeler sentezlenmiş ve Akciğer Kanseri (A549) hücrelerinde denenmiştir. Türevler arasında üstün ve karşılaştırılabilir anti-tümör aktivitesi saptanmıştır. Moleküler mekanizma çalışması ile orta düzeyde MDM2 inhibe edici aktivite sergilediği ortaya çıkarılmış ve önemli ölçüde G0/G1 fazında hücre döngüsü tutuklanmasını ve kanser hücresi apoptozunu indüklediği gösterilmiştir [Liu vd., 2019].

Ayrıca bu sonuçları doğrulayan farklı bir makalede, kullanılan indolin-on türevi maddelerin İnsan Kolorektal Karsinoma (HCT-116) hücrelerinde p53-MDM2 etkileşimini azalttığı görülmüştür. Bileşiklerin bu etkileşimi bozma kabiliyetini p53 artışının eşlik ettiği MDM2 protein ekspresyon seviyelerinde anlamlı düşüş ile desteklenmiştir [Ribeiro vd., 2017].

Bu tez çalışmasında Şekil 5.1'de kimyasal yapıları gösterilen, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Laboratuvarında Prof. Dr. Sultan Baytaş ve ekibi tarafından sentezlenmiş olan indolin-2-on türevlerinin kanser hücre döngüsü ve ölümüne etkileri incelenmiştir.



Şekil 5.1: İndol-2-on türevlerinin kimyasal yapısı. (A) GY342; R= 3,5-dimetoksifenil, GY339; R= 2,5-dimetoksifenil, GY306; R= 3,4,5-trimetoksifenil, GY333; R= ter-butil.

Projemiz kapsamında GY342, GY339, GY306 ve GY333 kodlu dört indolin-2-on türevi, SPC111 ve SPC212 MM ve Mezotelyal MeT-5A hücrelerinde uygulanarak hücre canlılığını %50 baskılayan konsantrasyonları Büşra Demirkan'ın tez çalışması kapsamında değerlendirilmiştir. Elde edilen IC₅₀ değerleri baz alınarak bu dört türevin hücre döngüsü ve apoptoza etkileri; PI boyama ile akış sitometri, AO/EB ve DAPI/PI floresan boyama ve bu proseslerdeki anahtar proteinlerin aktivasyon, ifade ve kesim seviyelerindeki değişiklikler incelenerek belirlenmiştir.

6. MATERİYAL & METOD

6.1. Hücre Kültürü Uygulamaları

Bu tez çalışmasında, hücre modeli olarak Malignant Mezotelyoma (SPC111 ve SPC212) ve kanser olmayan Mezotelyum (MeT-5A) hücre hatları kullanılmıştır. SPC212 ve SPC111 hücreleri %15 FBS (10270106, Gibco), %1 penicillin-streptomycin (15140122, Gibco), 1,2 gram sodyum bikarbonat (S8875, Sigma Aldrich) içeren 1 litrelik DMEM/F-12 (D8900, Sigma Aldrich) besiyerinde 37°C de %5 CO₂'li ortamda büyütülmüştür. SPC212 hücre hattı, asbeste maruz kalma öyküsü bilinen 47 yaşındaki bir kadın hastanın plevral boşluğundan elde edilmiş tümördür. SPC111 hücre hattı ise asbeste maruz kalma öyküsü bilinen 55 yaşındaki bir erkek hastanın plevral efüzyonundan (sıvı birikimi) elde edilmiş tümördür. MM hücre hatları ECACC'den temin edilmiştir (SPC111, 11120716; SPC212, 11120717). Kanser olmayan bireylerin plevral sıvılarından izole edilmiş olan MeT-5A hücreleri (CRL-9444) ATCC'den temin edilmiştir. Bu hücreler ise %1 penicillin-streptomycin, sodyum bikarbonat, %10 FBS, L-Glutamin, hidrokortizon (H0888, Sigma Aldrich), HEPES (H0891, Sigma Aldrich), EGF (E9644, Sigma Aldrich), insülin (I6634, Sigma Aldrich) içeren M199 (M5017, Sigma Aldrich) besiyerinde 37°C de %5 CO₂'li ortamda büyütülmüştür.

6.2. İndolin-2-on Türevlerinin Uygulamaları

Çalışmada kullanılan dört adet indolin-2-on türevi madde DMSO (116743.1000, Merck) ile çözülmüştür. Kontrol grubundaki hücrelere herhangi bir madde uygulaması yapılmazken, tedavi gruplarına farklı konsantrasyonlarda tekrarlı olacak şekilde madde uygulaması yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak 25 µM konsantrasyonda Sisplatin (193760010, Acros Organics) uygulanmıştır. Kullanılan indolin-2-on türevi dört bileşik Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Laboratuvarında Prof. Dr. Sultan Baytaş ve ekibi tarafından sentezlenmiştir.

6.3. Hücre Döngüsü Analizleri

Bu bölümde uygulanan maddelerin hücre döngüsü üzerine etkileri PI boyama ile Akış sitometrisi yöntemiyle ölçümlendirilmiştir. Uygulanan maddelerin hücre döngüsünün hangi evresine, hangi konsantrasyon uygulamada nasıl bir etki gösterdiği saptanarak konsantrasyona bağlı olarak karşılaştırılmış ve önceki canlılık deneyleri ve IC₅₀ değerleri ile tutarlılığı değerlendirilmiştir.

6.3.1. Hücre Döngüsünün PI boyama ile Akım Sitometrisinde Değerlendirilmesi

Petrilere ekilen hücrelerin 24 saat 37°C' de inkübe edilmesinin ardından serumsuz besiyeri ile 24 saat inkübe edilmiştir. Akabinde, sentezlenen maddelerin belirli konsantrasyonlarda uygulamaları yapıp tekrar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında, hücreler tripsin ile kaldırılıp toplanarak 3000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Akabinde, süpernatant atılarak hücre pelleti PBS' te çözülmüştür. Tekrar 3000 rpm' de santrifüj yapılmış, süpernatant atılmış ve pellet %70'lik etanolde (70616185001, Tekkim) çözülerek fiksasyon işlemi yapılmıştır. Örnekler önce yarım saat +4 °C' de bekletilmiş sonra -20 °C'ye alınmıştır. Fikse edilen hücrelerden etanol uzaklaştırılıp PBS ile yıkandıktan sonra çalışma solüsyonu (PI, %10'luk Triton x-100(25200056, Thermo), RNAaz (10109142001, Sigma) enzimi) eklenerek vortexlenir ve tekrar santrifüj edilip süpernatantı uzaklaştırılmış örnekler PBS'te çözüldükten sonra BD-Accuri C6 cihazında analizleri sağlanmıştır. Sonuçların istatistiksel analizleri Two-Way ANOVA ile GraphPad Prism 7 programı kullanılarak yapılmıştır.

6.3.2. Hücre Döngüsü Protein Analizleri

6.3.2.1. Protein İzolasyonu

Petrilere ekilen SPC212 hücreleri (1.2×10^6 hücre/petri) 24 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir ve hücrelere belirlenen konsantrasyonlarda türevler uygulandıktan 24 saat sonra numuneler soğuk PBS (fosfat tamponlu salin) ile kazınarak toplanmıştır. Santrifüj ile çöktürülen hücrelerin üst fazı atılmış ve %1'lik taze fosfataz (1862495, Thermo Fisher Scientific) inhibitörü içeren lizis tamponu eklenerek şırınga yardımı ile parçalanmıştır. Hücre karışımı ependorflara alınıp $+4^\circ\text{C}$ 'de 14000 g/ref'te 10 dk santrifüj edildikten sonra, elde edilen üst faz alınıp yüklenecek protein konsantrasyonunun belirlenmesi adına lizatlardan bir miktar ayrıldıktan sonra geri kalan kısmı -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Ayrılan lizatlar bikinkoninik asit (BCA) testi yapılmak üzere Pierce BCA protein assay kiti (23227, Thermo-Fisher Scientific) kullanılarak firmanın yönergesindeki bileşim oranına uygun hazırlanmış BCA karışımı eklendikten sonra 562 nm'de absorbans değerleri Varioskan Flash (Thermo-Fisher Scientific) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Saptanan absorbans değerlerini kullanarak standart grafikleri çizilmiş ve elde edilen doğrusal grafiğin formülü ile R^2 değeri bulunmuştur. Protein lizatlarının konsantrasyonları $\mu\text{g/ml}$ cinsinden hesaplanmıştır.

6.3.2.2. SDS-PAGE ve Western Blotlama

Uygulanan maddelerin apoptotik hücre yolağında görev alan önemli proteinlere olan etkisini saptamak amacıyla, total protein 5X yükleme boyası ile karıştırılarak 100°C 'de 5 dakika kaynatıldıktan sonra kuyulara yüklenmiştir. Bantlar halinde ayrılacak örneklerin moleküler ağırlıklarını belirlemek adına jele marker (26619, Thermo-Fisher Scientific) yüklemesi de yapılmıştır. 1X'lik elektroforez tamponu tanka eklendikten sonra protein yüklü jelde tanka yerleştirilmiştir. %12-15 SDS-PAGE ile ayrılması için elektroforez işlemi yapılarak örnekler jeldeki ilk fazın

sonuna gelene dek yürütülmüştür. Aynı hizaya gelen proteinlerin güç seviyesi arttırılarak bantların tam olarak ayrılması sağlanmıştır.

Bantların ayrılmasının akabinde, transfer işlemi ile örnekler Amersham Hybond P 0.45 PVDF (GE10600023, GE Healthcare) membrana aktarılmıştır. Transfer işlemi ise 1X transfer tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir. Transferden alınan membran, TBS-T'de %5 (w/v) yağsız süt tozu içinde 1 saat bloke edilmiştir. Jelin hazırlanması sırasında kullanılan miktarlar Tablo 6.1'de verilmiştir.

Tablo 6.1: SDS-PAGE jelinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları.

1 jel için	Ayrılma Jeli	Yığılma Jeli
1.5M pH;8,8 Tris HCl (0-7102, Sigma Aldrich)	0.375 M	-
0.5M pH;6,8 Tris HCl	-	0.375 M
%40 Akrilamid/ Bisakrilamid (A4989, Applichem)	%10	%4.5
%10 SDS (194831, MP)	%0.10	%0.10
TEMED (T7024, Sigma Aldrich)	%0.10	%0.10
APS (A2941, Applichem)	%0.05	%0.05

6.3.2.3. İmmün Belirleme

Gece boyunca +4'te birincil antikor ile muamele edilen membran, inkübasyon sonunda 1X TBS-T ile 3 kez yıkandıktan sonra %5'lik yağsız süt tozu (A0830, Applichem) içerisinde belirlenen dilüsyonlarda hazırlanmış birincil antikora uygun yaban turpu peroksidaz (HRP)-konjuge sekonder (ikincil) antikor ile 1-2 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Sekonder antikor uygulamasından sonra 1X TBS-T ile 3 kez yıkanan membran, ECL plus western blotting substrate kiti (32132, Thermo-Fisher Scientific) ile firma yönergesi dikkate alınarak muamele edilmiş ve ChemiDoc XRS+ (BioRad) ile görüntülenmiştir. Her bir proteine ait bant yoğunlukları Siklofilin B proteini ile normalize edilmiş ve istatistiksel analizler Two-Way ANOVA ile GraphPad Prism 7 programı kullanılarak yapılmıştır. Hücre döngüsü anahtar proteinlerinin analizleri için, p21 (2947, Cell Signalling Technology), p27 (3686, Cell

Signaling Technology) ile sekonder antikör olarak anti-rabbit (7074, Cell Signalling Technology) ve anti-mouse (7076, Cell Signalling Technology) ile yürütme kontrolü Siklofilin B (PA1-027A, Thermo-Fisher Scientific) kullanılmıştır.

6.3.2.4. Stripleme

Daha önce bağlanmış antikoru uzaklaştırıp birbirine yakın moleküler ağırlıktaki proteinleri ve bir proteinin aktivasyon ve ifade edilmesine olan etkisini görüntüleyebilmek için stripleme işlemi yapılmıştır. 30 dakika 42 °C’de ve 120 rpm’de stripleme tamponu ile çalkalanan membranların 3 kez 1X TBS- T ile yıkama yapılmıştır. Daha önce transfer işleminden sonra yapıldığı gibi %5 lik yağsız süt tozu içeren 1X TBS- T karışımı içinde 1 saat boyunca 100 rpm’de çalkalanarak bloklama yapılmıştır. Ardından tekrar 3 kez 1X TBS- T ile yıkanan membranlar istenilen birincil antikör ile muamele edilmiştir.

6.3.2.5. Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar

Tüm deneyler için tampon ve solüsyonlar steril stoklar ve otoklavlanmış dd H₂O kullanılarak taze hazırlanmış ve Tablo 6.2’de kullanılan miktarlar gösterilmiştir.

Tablo 6.2 Tampon ve solüsyonların hazırlanması.

Tampon ve Solüsyonlar	İçerik	Final Konsantrasyon
Hücre Lizis Tamponu	Gliserol (G5516, Sigma Aldrich)	%10
	MgCl ₂ (M4880, Sigma Aldrich)	1 mM
	NaCl (S3014, Sigma Aldrich)	150 mM
	Tris (pH:8.8)	20 mM
	Triton X-100 (T8787, Sigma Aldrich)	%1
4X Protein Yükleme Boyası	BME	%20
	Bromofenol Mavisi (B0126, Sigma Aldrich)	%0.4
	Gliserol	%40
	SDS (194831, MP)	%8
	Tris-HCl, pH 6.8	200 mM
SDS Yürütme Tamponu (5X)	Glisin (808822, MP)	0.95 M
	SDS	0.5 %
	Tris-Base (T1503, Sigma Aldrich)	125mM
TBS (10 X)	NaCl	1.5 M
	Tris-HCl (pH 7.4)	200 mM
TBS-T	TBS(10X)	%10
	Tween-20 (A4979, Applichem)	%0,10
Transfer Tamponu (10X)	Glisin	2.5 M
	Tris-Base	250 mM
Transfer Tamponu (1X)	Metanol (32213, Sigma Aldrich)	%20
	Transfer Buffer (10x)	% 10
%5'lik Bloklama Solüsyonu	Yağsız Süt Tozu (A0830, Applichem)	0.05
Stripleme Tamponu	BME	100 mM
	SDS	0,02
	Tris-HCl, pH 6.7 (0-7102, Sigma Aldrich)	62.5 mM

6.4. Hücre Ölümünün Morfolojik olarak Floresan Boyama ile Belirlenmesi

Hücre ölümünün değerlendirilmesinde floresan boyama ve protein analizleri gerçekleştirilmiştir.

6.4.1. AO/EB Uygulamaları

MeT-5A, SPC212 ve SPC111 hücreleri belirlenen sayılarda 100 µl RPMI ile 96 kuyucuklu petrilere iki replika olacak şekilde ekilmiştir. Maddelerin belirlenen konsantrasyonları ve çözücü kontrol ile 24 saat inkübasyonundan sonra, final konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde PBS içinde çözünmüş AO/EB (Akridin Turuncusu: 235474 Sigma Aldrich / Etidyum Bromür: E7637, Sigma Aldrich) ikili boya karışımından her kuyu için 6 µl olacak şekilde eklenmiş ve 20-25 saniye bekletildikten sonra besiyeri çekilip uzaklaştırılmıştır. Son olarak floresan mikroskop (ZOE™, BioRad) kullanılarak örnekler 20X büyütmede FITC ve Texas Kırmızısı filtresi kullanılarak analiz edilmiş ve görüntüler apoptotik ve nekrotik hücreleri belirlemek için karşılaştırılmıştır. Sonuçların istatistiksel analizleri Two-Way ANOVA ile GraphPad Prism 7 programı kullanılarak yapılmıştır.

6.4.2. DAPI/PI Uygulamaları

Madde uygulaması ardından 24 saat inkübe edilen hücreler son konsantrasyonu 25 µg/ml olacak şekilde PBS ile seyreltilmiş PI (P4170, Sigma Aldrich) boyası ile kuyulardaki besiyeri çekildikten sonra muamele edilmiştir. 10 dakika karanlıkta inkübasyon sonrası PI hücrelerden uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Fiksasyon işlemi için sırasıyla, %4'lük konsantrasyonda Formaldehit (7041, JT Baker) eklendikten sonra 5 dakika inkübasyon sağlanmış ve formaldehitte uzaklaştırıldıktan sonra tekrar PBS ile yıkanmıştır. Boyamanın son adımı olarak, nihai konsantrasyonu 1 µg/ml olacak şekilde PBS ile seyreltilerek hazırlanan DAPI (4083, Cell Signaling Technology) boyası kuyulara eklenmiş ve karanlıkta 10 dakika inkübasyonun akabinde uzaklaştırılmış ve kuyular PBS ile yıkanmıştır. Son aşama olan görüntüleme için ZOE

Fluorescent Cell İmager (Bio-Rad) cihazında texas kırmızısı ve mavi filtreler kullanılmıştır. Örneklerin 20X objektif ayarlı görüntüleri, cihazın 4 kat yakınlaştırma ayarı kullanılarak kaydedilmiştir. (Kullanılan hücreler, ekimi yapılan hücre sayısı, uygulanan maddeler ve inkübasyon süresi AO/EB boyama ile benzer şekilde gerçekleştirilmiştir).

6.4.3. Apoptotik Protein Analizleri

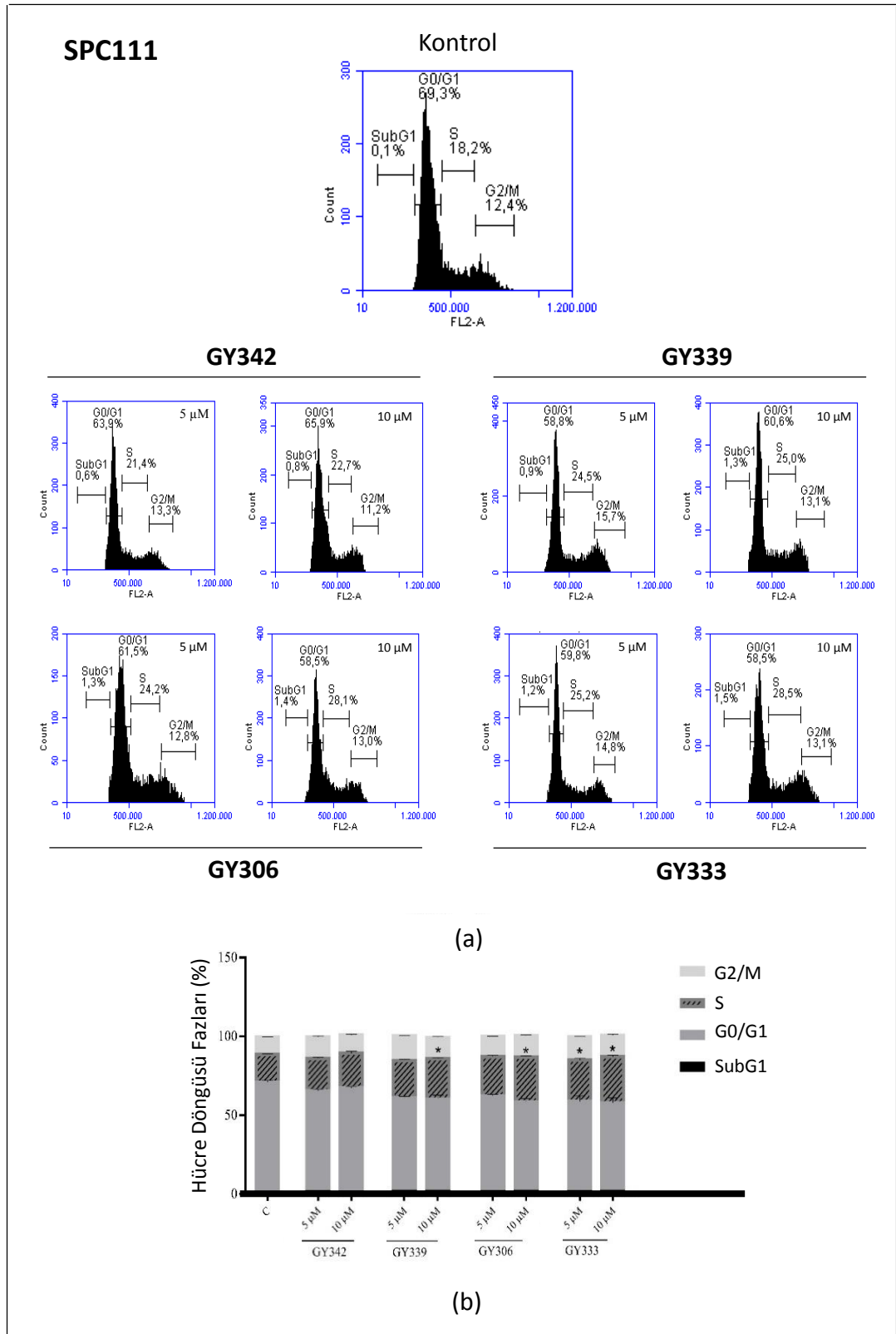
Apoptotik proteinlerin analizleri hücre döngüsü protein analizleri başlığı altında verildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Apoptoz aktivasyonunu gösteren anahtar proteinlerin analizleri için, PARP (9532, Cell Signalling Technology), Bax (5023S, Cell Signaling Technology), Bcl-2 (9286S, Cell Signaling Technology), kaspaz 3 (CST, 14220) proteinleri incelenmiştir.

7.BULGULAR

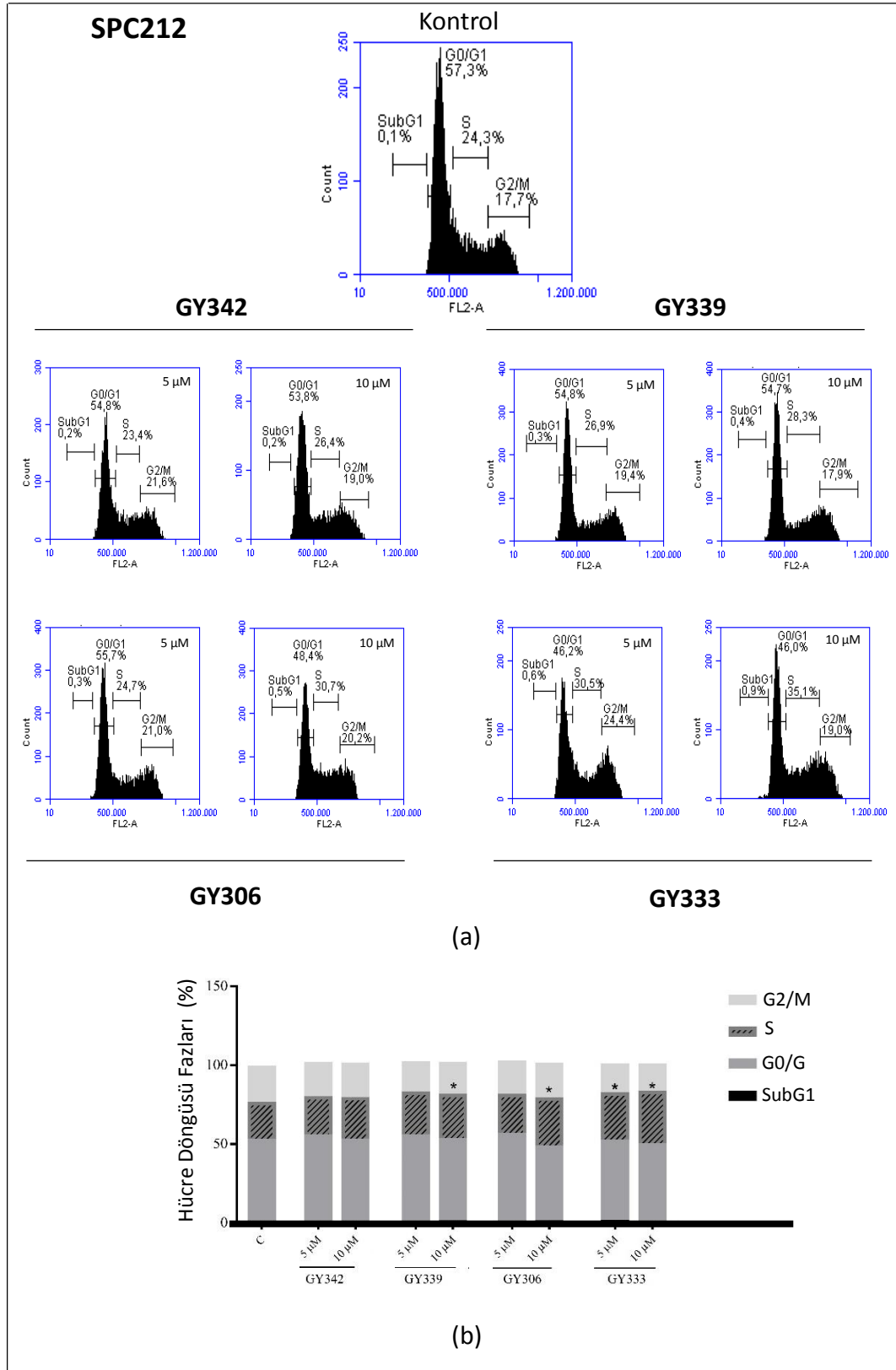
7.1. İndolin-2-on Türevlerinin Hücre Döngüsünü S fazında Tutuklaması

IC₅₀ değerleri baz alınarak dört indolin-2-on türevinin SPC111 ve SPC2212 hücrelerinin döngüsü üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda (0-10 µM) uygulanan örneklerde PI boyama yapılarak akış sitometrisinde incelenmiştir.

Bulgularımız, her iki MM hücre hattında üç indolin-2-on türevlerinin konsantrasyona bağlı olarak hücre döngüsünün S fazında tutuklandığını göstermektedir. Hücrelere GY342'nin uygulanması sonucu kullanılan konsantrasyon aralığında tutuklanma tespit edilmezken, GY339 ve GY306 uygulanması sonucu hücrelerde 10 µM, GY333'te ise 5 µM konsantrasyonda S fazında tutuklandığı belirlenmiştir ve hücre döngüsünün fazlarındaki % oranlarını gösteren bar grafikleriyle birlikte Şekil 7.1 ve Şekil 7.2'de gösterilmiştir.



Şekil 7.1: SPC111 hücrelerinde, hücre döngüsü profilinin değerlendirilmesi. SPC111 (a) hücre hattının hücre döngüsü profili ve grafiksel analizi (b), 5 μM ve 10 μM konsantrasyonlarda PI boyama ve akış sitometrisi ile incelendi. % Hücre grafiği, en az üç bağımsız deney (n = 3) kullanılarak çizilmiştir (*p<0,01).



Şekil 7.2: SPC212 hücrelerinde, hücre döngüsü profilinin değerlendirilmesi. SPC212 (a) hücre hattının hücre döngüsü profili ve grafiksel analizi (b) 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda PI boyama ve akış sitometrisi ile incelendi. % Hücre grafiği, en az üç bağımsız deney (n = 3) kullanılarak çizilmiştir (*p<0,01).

Hücre döngüsünün analizinin takibinde hücre döngüsünde bir hasar durumunda aktive olan ve döngünün ilerlemesini durduran kontrol noktası proteinlerinden p21 ve p27 ifadeleri incelenmiştir. Şekil 7.6 gözlemlendiği gibi protein ifadelerinde konsantrasyona bağlı artış gözlemlenmiştir. Bu bulgu, histogramdan elde edilen sonuçları desteklemektedir. Görüldüğü üzere GY342 uygulanan hücrelerde kontrolle karşılaştırıldığında p21/p27 seviyesinde anlamlı artış 20 μ M konsantrasyondan itibaren başlarken; her iki hücrede GY339 ve GY306'da 10 μ M; GY333'de ise 5 μ M konsantrasyondan itibaren gözlemlenmektedir.

7.2. İndolin-2-on Türevlerinin Konsantrasyon Bağımlı Olarak Apoptoza Etkisi

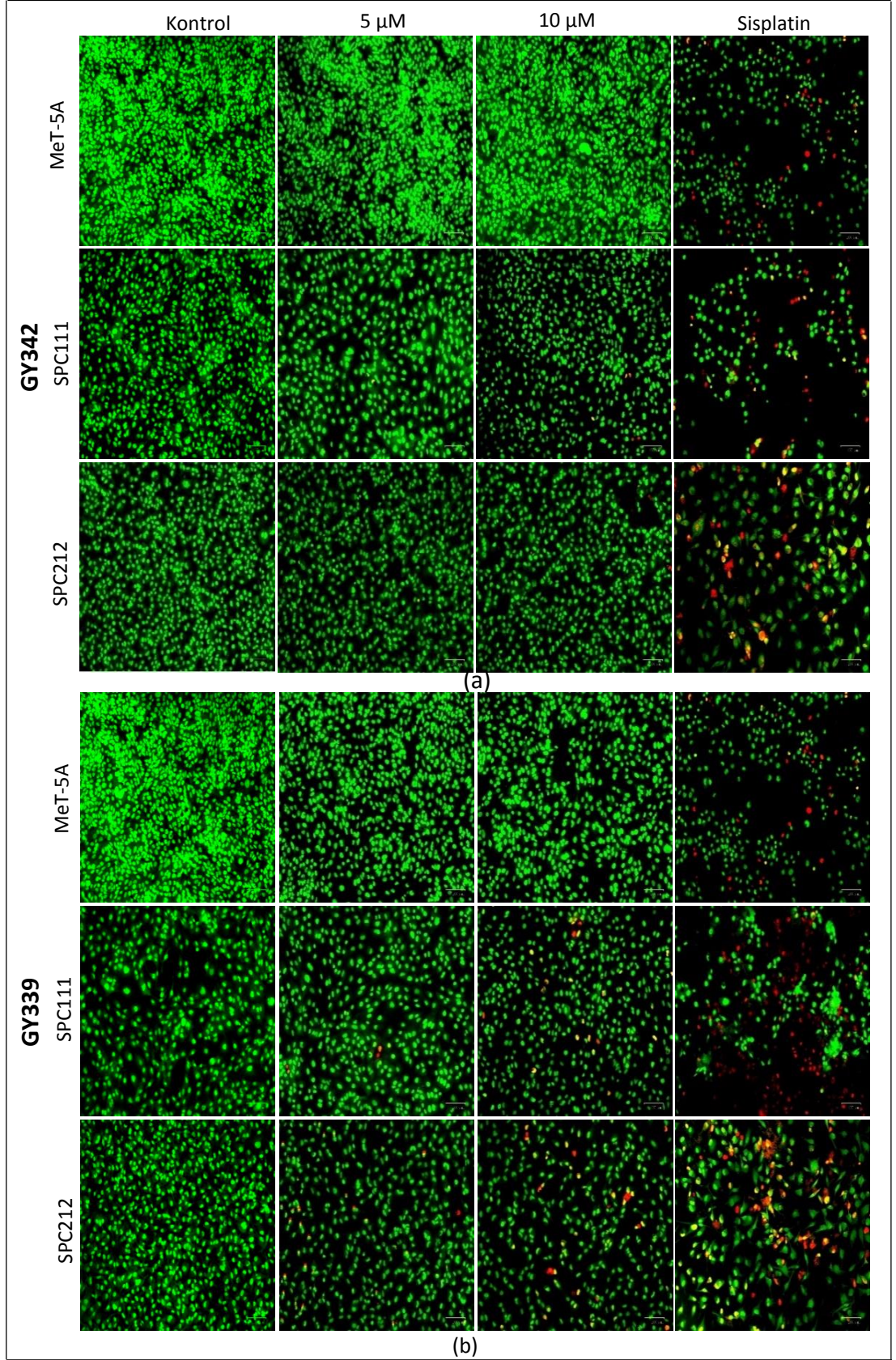
Türevlerin hücre döngüsüne etkileri belirlendikten sonra hücre ölümüne etkilerini araştırmak için ilk olarak iki farklı çiftli boyama yöntemi (AO/EB ve DAPI/PI) yöntemi kullanılmıştır.

Bilindiği gibi Akridin turuncusu/Etidyum Bromür ikili floresan boyama hücre ölümü modunun apoptoz veya nekroz yoluyla ayırt edilmesini sağlayan bir değerlendirme yöntemidir. Bu yöntemde canlı ve apoptotik olmayan hücrelerin çekirdekleri tekdüze yeşil boyanır. Erken apoptotik hücreler, yoğunlaşmış kromatin ve parçalanmış çekirdekleri nedeniyle çekirdeklerinde parlak yeşil noktalara sahip olarak görünür. Geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin membranı kusurlu olduğu için EtBr ile kırmızı boyanır. Ancak geç apoptotik hücreler yoğunlaştırılmış ve parçalanmış çekirdek morfolojisi gösterirken, nekrotik hücrelerde yoğun kromatin yoktur ve canlı hücrelere benzeyen nükleer bir morfoloji gösterirler [Sufi vd., 2017].

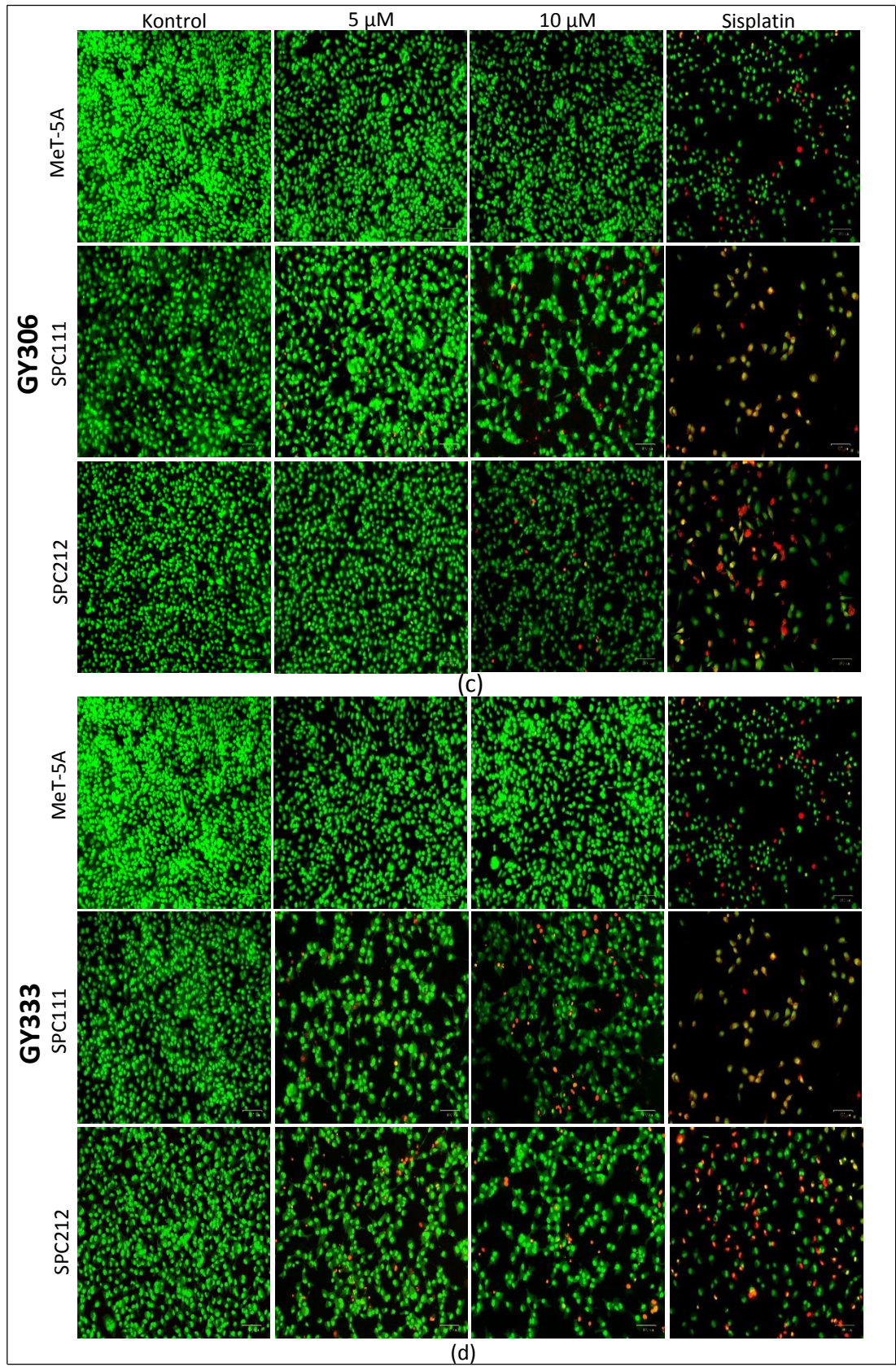
SPC111, SPC212 ve MeT-5A hücrelerine dört farklı indolin-2-on türevi (0-20 μ M) konsantrasyon aralığında eklenerek, 24 saat inkübasyon sonunda boyanarak incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak 25 μ M Sisplatin uygulaması yapılmıştır. MeT-5A hücrelerine yapılan uygulamalarda her türev için uygulanan konsantrasyon aralığında hücre sayısında kontrole göre anlamlı olmasa da azalma gözlemlenmektedir.

Buna karşın türevler kanser hücrelerinde aynı konsantrasyonlarda daha etkin olmuştur. Her iki MM'lı hücre hattında GY342 uygulanan hücrelerde hücre sayısında azalma gözlenirse de anlamlı azalma 10 µM'ın üstündeki konsantrasyonlardadır. GY339 ve GY306 uygulanan hücreler için 10 µM konsantrasyondan başlayarak ölü hücre oranında artış gözlemlenirken, GY333 uygulamasıyla elde edilen bu artış 5 µM konsantrasyon itibariyle belirlenmiş ve şekil 7.3 ve 7.4'te gösterilmiştir.

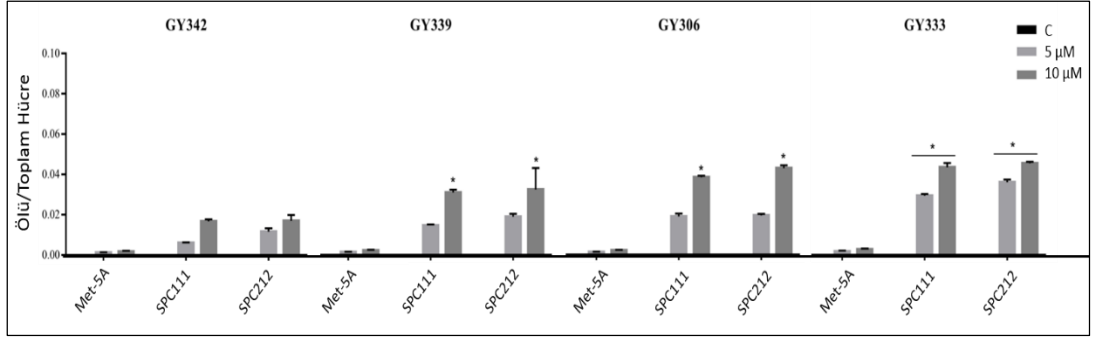
10 µM konsantrasyon baz alınarak türevlerin birbirine göre etkinliği karşılaştırıldığında GY342 numaralı türev kullanılan konsantrasyon aralığında anlamlı değerde etkin olmazken her iki hücrede GY339 ve GY306'nın ondan daha etkin olduğu, GY333'ün ise hücreleri öldürmede etkinliğinin diğerlerinden daha fazla olduğu anlamlı olarakta belirtilmiştir (şekil 7.3 ve şekil 7.4).



Şekil 7.3: MeT-5A, SPC111 ve SPC212 hücrelerinde hücre ölümünün morfolojik değerlendirilmesi. AO/EB ile değerlendirilen hücrelerde, canlı hücre sayısı azalırken; apoptotik ve nekrotik hücreler artış göstermektedir (a,b,c,d). Ölçek çubuğu:100 μ m.

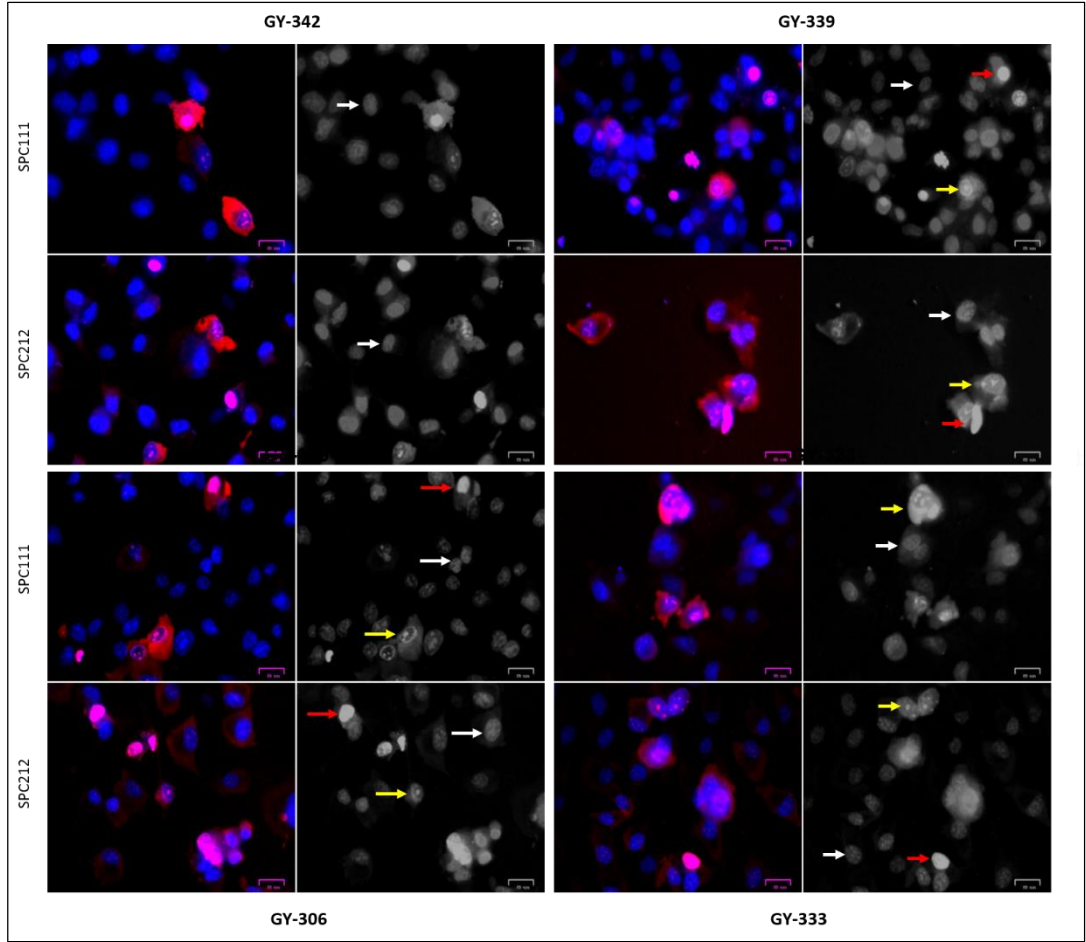


Şekil 7.3: Devam



Şekil 7.4: MeT-5A, SPC111 ve SPC212 hücrelerinde hücre ölümünün istatistiksel değerlendirilmesi. Hücreler, dört indolin-2-on türevi ve Sisplatin'in (25 µM) ardışık konsantrasyonları ile 24 saat boyunca muamele edildi. AO/EB ile değerlendirilen hücrelerde, canlı hücre sayısı azalırken; apoptotik ve nekrotik hücreler artış göstermektedir. Sayımlar Image J yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Temsili sonuçlar Met-5A için iki, SPC111 ve SPC212 için üç bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir (n= 3, *p<0,01).

Bu deneylerin takibin de, benzer sistem ile işlev gören DAPI/PI boyası kullanılarak da maddenin hücre ölümüne etkisi incelenmiştir. Sayılan hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekilerek 24 saatte türevlerin 10 µM konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Bu deneylerde, DAPI canlı hücreleri boyarken PI boyası sadece nekroz ve apoptoz geçiren ölü hücreleri boyamaktadır. Bilindiği gibi apoptotik hücre ölümü apoptotik cisimler, kromatin yoğunlaşması ve nükleer membran kabarması gibi morfolojik belirteçlerle karakterize edilmektedir [Zheng vd., 2019]. DAPI ve PI çift boyaması, uygulanan dört indolin-2-on türevinin 10 µM konsantrasyonda bu kanser hücrelerinde apoptoza yol açtığını göstermektedir. Bu deneyde boyanan kanser hücreleri sadece morfolojik olarak gösterilmektedir. Gözlenen apoptotik cisimcikler ve kromatin kondenzasyonu gibi apoptozu işaret eden belirteçler de nitel olarak AO/EB sonuçlarını desteklemektedir (Şekil 7.5).

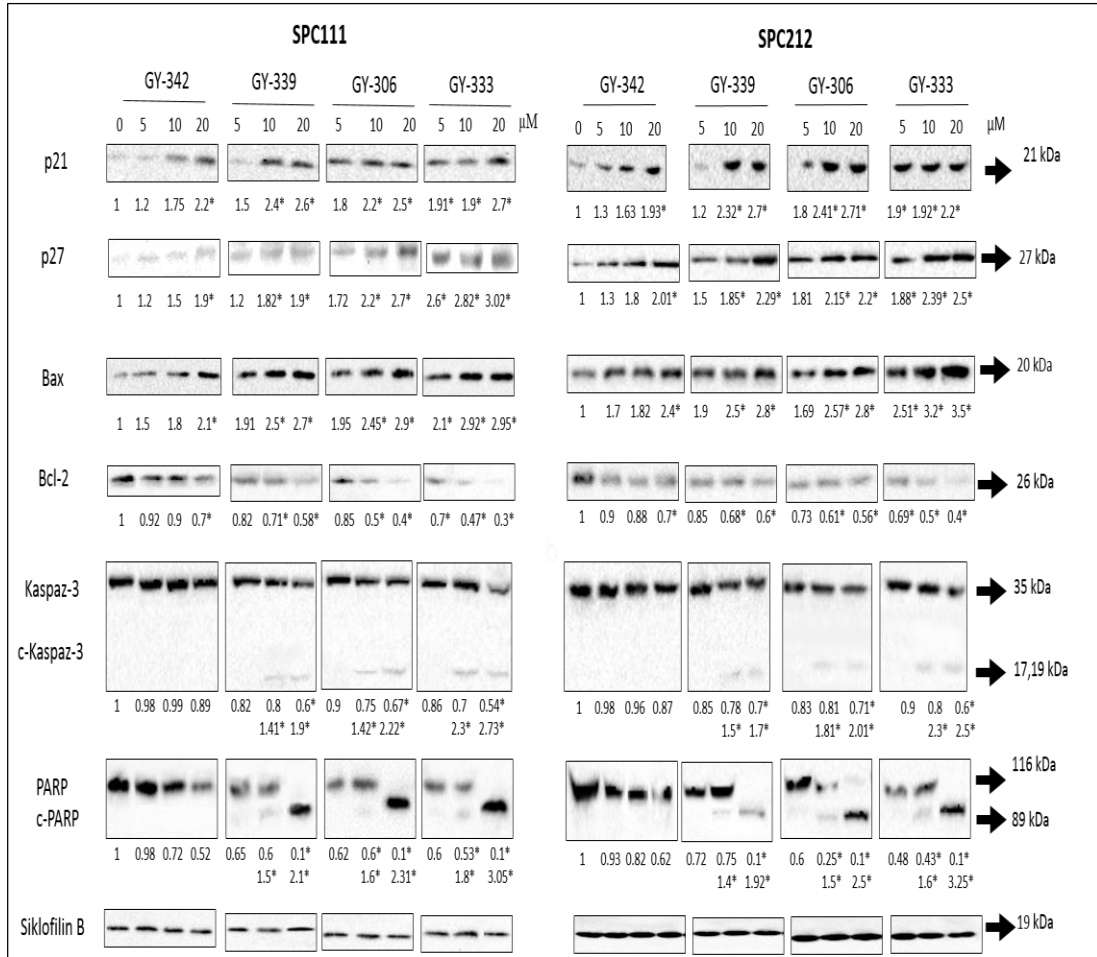


Şekil 7.5: SPC111 ve SPC212 hücrelerinde hücre ölümünün DAPI/PI floresan boyama ile morfolojik değerlendirilmesi. Türevlerin 10 μ M konsantrasyonları uygulanmıştır. Görüntüler 20X büyütme kullanılarak alınmıştır. Normal (hasarsız) hücreler beyaz; geç apoptotik hücreler sarı ve nekrotik hücreler kırmızı okla gösterilmiştir. Ölçek çubuğu 25 μ m'ı göstermektedir.

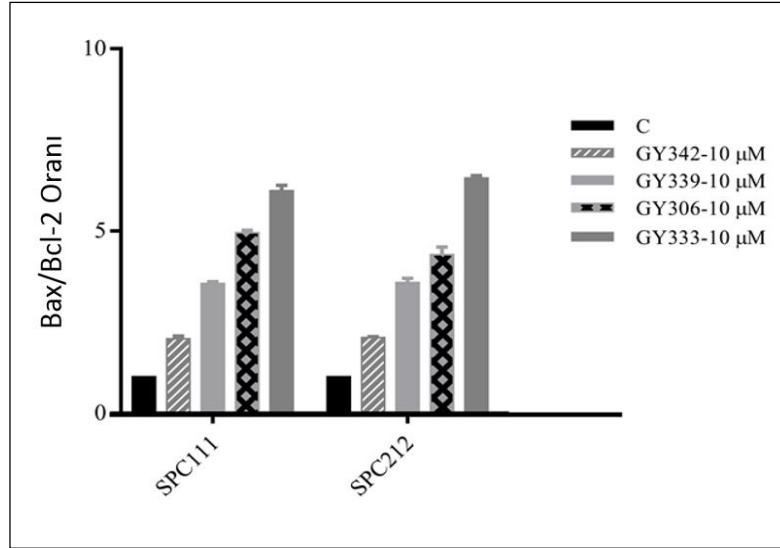
Bu deneylerin takibinde madde uygulaması yapılan hücrelerde apoptotik yollarda rol alan anahtar proteinlerin analizleri gerçekleştirildi. Dört farklı türev farklı konsantrasyonlarda SPC111 ve SPC212 hücrelerine uygulanarak protein analizleri 6.3.2'de bahsedildiği gibi western blot yardımıyla analiz edildi. Apoptozda pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin seviyesi hücrelerin ölümünü ya da hayatta kalımını belirler. Bu kapsamda indolin-2-on türevlerinin MM hücrelerine uygulanmalarının takibinde Bax ve Bcl-2 seviyeleri değerlendirilmiştir.

Bulgularımız GY342 uygulanan hücrelerde 20 μ M'da, GY339 ve GY306 uygulanan hücrelerde 10 μ M ve GY333 uygulanan hücrelerde 5 μ M'dan itibaren Bax seviyesi yükselirken Bcl-2 seviyesinde düşüş gerçekleştiğini ve 10 μ M konsantrasyon

baz alınarak Bax/Bcl-2 oranındaki artışın karşılaştırıldığı grafikte de türevlerin uygulanmasının apoptozu tetiklediğini göstermektedir (Şekil 7.6 ve Şekil 7.7).



Şekil 7.6: SPC111 ve SPC212 hücrelerinde hücre döngüsü ve ölümüyle ilgili protein seviyelerinin değerlendirilmesi. 5 µM, 10 µM ve 20 µM konsantrasyonlarda uygulanan dört türevin SPC111 ve SPC212 hücrelerinde p21, p27, Bax, Bcl-2, kaspaz-3 ve PARP proteinlerinin değişimini göstermektedir (n=3, *p < 0.01).



Şekil 7.7: SPC111 ve SPC212 hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranının istatistiksel grafiği. SPC111 ve SPC212 hücreleri için 10 µM ortak konsantrasyonda Bax/Bcl-2 oranındaki artış gösterilmektedir.

Bu anlamlı sonuçlar daha ileri evrelerin varlığın da analiz etmek için kaspaz-3 ve PARP seviyelerinin değerlendirilmesiyle sağlamlaştırılmıştır. PARP ve Kaspaz 3 seviyeleri incelendiğinde Şekil 7.6'da gösterildiği gibi GY342 uygulanan hücrelerde PARP miktarında azalma gözlenirken bu azalma anlamlı bulunmamıştır ve bu hücrelerde kaspaz 3 kesimi tespit edilmemiştir. Buna karşın diğer üç türevde 10 µM konsantrasyondan itibaren PARP ve Kaspaz 3 kesimi gözlenmiş ve değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

8. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde, MM tedavisinde henüz etkin bir terapi bulunmamaktadır. Bu nedenle, alternatif stratejilerin ve/veya daha etkin ilaçların geliştirilmesi önem taşımaktadır. İndoller başta anti-kanser aktiviteleri olmak üzere geniş farmakolojik özelliklere sahip heterosiklik moleküllerdir. İndollerin, farklı kanser türlerinde anti-proliferatif ve anti-kanserojen etkiye sahip olduğu *in vitro* ve *in vivo* olarak çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [Morigi vd., 2019]. Literatür bilgilerimiz doğrultusunda, indollerin Malign Mezotelyoma hücre hatlarında etkisine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buradan yola çıkarak gerçekleştirdiğimiz projemiz kapsamında; orijinal olarak sentezlenmiş dört farklı indolin-2-on türevinin MM hücre canlılığını doza bağımlı olarak düşürdüğünü belirledik. Diğer bir tez çalışması kapsamında elde edilmiş olan hücre canlılığını %50 baskılayan konsantrasyonlar ve seçicilik indeksi değerleri baz alınarak bu tezde dört türevin hücre döngüsü ve apoptoza etkisinin belirlenmesini amaçladık. Bu çalışmada önce akış sitometri ile hücre döngüsü analizleri yapılmış, dört türevden üçünde kullanılan konsantrasyon aralığında her iki MM hücresinin S fazında tutuklanmasına neden olduğu belirlenmiştir. Bu tutuklanma kullanılan dozlarda GY342 maddesi uygulandığında izlenmezken GY339 ve GY306'da 10 µM konsantrasyondan itibaren ve GY333'te 5 µM dan itibaren gözlenmiştir. Bunlara ilaveten siklin bağımlı kinaz inhibitörleri p21 ve p27 protein ifadelerinde konsantrasyona bağlı olarak gerçekleşen artış bu sonuçları desteklemiştir. Farklı bir çalışmada A549 hücrelerinde indol yan zinciri taşıyan PDE4/tubilin inhibitörü trimetoksifenil benzodoksazol türevlerinden 4r kodlu ajanın G2/M ve S fazında konsantrasyona bağlı tutuklama yaptığı ve G0/G1 fazındaki hücre oranında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir [Liu vd., 2021]. Tübiline bağlanan moleküllerin özelliği, sonunda apoptoza neden olan mitotik tutuklanmadır [Carlson., 2008]. Daha önce imidazo-tiyadiazol bağlı indolin-on türevleri ile yapılan bir çalışmada, bu ajanların mikrotübül ağını bozarak apoptozu indüklediği ve tübilin polimerizasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [Rao vd., 2018]. Ayrıca başka bir çalışmada bifenil metilen indolinon türevlerinin apoptozu indüklediği ve yine tübilin polimerizasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [Donthiboina vd., 2019]. Bu sonuçlar akış sitometri yöntemi ile S

fazında saptanan bu tutuklanmayı türevlerimizin mikrotübülleri etkileyerek gerçekleştirebileceği konusunu düşündürmektedir. Bu doğrultuda ilgili proteinlerin detaylı analizi, türevlerin tübülün polimerizasyonu üzerine etkilerinin incelenmesi ve hücre döngüsünü tutuklayan fazdaki diğer anahtar proteinlerinin değerlendirmesinden elde edilecek sonuçlar bu öngörünün doğrulanması konusunda ışık tutacaktır.

İndolin-on türevlerinin farklı hücrelerde apoptotik etkileri olduğuna dair farklı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, Benzylidene-indolinon türevleri HuH7 ve HepG2 hücrelerinde PARP kesimine ve kaspaz-3 aktivasyonuna neden olmaktadır [Ho vd., 2014]; ayrıca ICA isimli indolün SW480 hücrelerinde Siklin D1 ekspresyonunu azaltırken hücrelerin G1 fazında birikmesini ve hücrelerde apoptozun oluşmasını sağladığı saptanmıştır [Sufi vd., 2017]. Ek olarak, orjinal sentezlenmiş farklı indol türevlerinin HCT116 kolon kanseri hücrelerinde Bcl-2 seviyesini azaltarak Bax seviyesini arttırdığı belirtilmiştir [Song vd., 2016].

Hücre döngüsü analizlerinin takibinde, hücre ölümünün AO/EB ve DAPI/PI florasan boyama kullanılarak yapılan morfolojik analiz çalışmaları, kanser hücrelerinin ajanlarımızca indüklenmeleri sonucu hücre sayısında konsantrasyon bağımlı azalmaya neden oldukları gözlenmiştir. GY342 uygulanan hücrelerde hücre sayısında azalmanın yanısıra apoptotik morfoloji 10 μ M üzerindeki konsantrasyonda başladığı belirlenmiştir. GY339, GY306 moleküllerinde ise bu durum 10 μ M ve GY333'de 5 μ M konsantrasyonlarda belirlenmiştir. Her iki kanser hücresinde Bax seviyesinde konsantrasyona bağımlı artış belirlenirken anti-apoptotik protein Bcl-2 seviyesinde paralel olarak düşüş gözlemlenmiştir. Bax/ Bcl-2 oranı değerleri uygulama yapılmamış kontrol hücre grubuna göre artış göstermektedir. Bu veriler hücrelerde apoptozun başlatıldığını işaret etmektedir. Benzer bir çalışmada MDA-MB-231 hücrelerinde, ZMF-005 indol türevinin Bax protein ifadesini konsantrasyona bağlı arttırdığı, Bcl-2 proteinin seviyesini azalttığı ve hücrelerde kaspaz-8 ve 3'ün kesimine neden olduğu belirtilmiştir [Yao vd., 2020]. Bir diğer araştırmada tübülün inhibitörü olarak sentezlenmiş indol içerikli başka bir türevin (M-24), MCF-7 hücrelerinde zamana bağlı olarak Bcl-2 ve PARP seviyelerinin aşağı regülasyonu görülürken, Bax proteinin artışı ile p53'ün yukarı regülasyonu gözlenmiştir [Zuo vd., 2017]. Türevlerin

uygulamaları sonucunda elde ettiğimiz Bax/Bcl-2 oranındaki artış bu sonuçlarla benzerlik göstermekte ve konsantrasyon bağımlı olarak apoptozu tetiklediklerini işaret etmektedir. Kaspaz 3 ve PARP kesimleride apoptozun ileri evrelerinin gerçekleştiğini işaret etmektedir. Morfololojik ve protein düzeyindeki analizlerimizle de desteklenen bu bulgular, ajanların konsantrasyona bağlı olarak her iki kanser hücresinde de apoptoza neden olduğunu ortaya koymaktadır.

MM tedavisinde doğal kaynaklı ve sentez olmak üzere çeşitli birçok ilaç kullanılmaktadır. Bunların başında indol bazlı ajanlar gerek hedefe yönelik gerekse destek tedavi olarak kombinasyonlarla sıklıkla kullanılmakta ve antikanser etkinlikleri üzerine çalışmalar yürütülmektedir. Çalışmamızda indolin-2-on türevi dört ajanın MM üzerindeki antikanser etkisini araştırmak amacıyla yola çıkarak hücre döngüsü, ölümü ve bu olaylardaki anahtar protein seviyeleri üzerine etkisini değerlendirdik. Sonuçlar, ajanların konsantrasyona bağlı MM hücrelerinin p21 ve p27 proteinlerini kullanarak hücre döngüsünün durdurulduğu; daha sonra henüz incelenmemiş olsa da muhtemelen p53 aracılığı ile Bax seviyesinin yükseltilmesi ve Bcl-2'nin aşağı çekilmesiyle apoptozu başlattığı, Kaspaz 3 ve PARP kesimi ile ise apoptozun nihayetlendirildiğini göstermektedir. Elde ettiğimiz olumlu bulgularla bu ajanların etki mekanizmaları üzerine daha detaylı analizleri gerçekleştirmeyi hedeflemekteyiz.

KAYNAKLAR

Arif Q., Husain A. N., (2015), "Malignant mesothelioma diagnosis", Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 139(8), 978-980.

Basu A., (2021), "The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy", Pharmacology & therapeutics, 107943.

Betti M., Aspesi A., Sculco M., Matullo G., Magnani C., Dianzani I., (2019), "Genetic predisposition for malignant mesothelioma: A concise review", Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 781, 1-10.

Burlacu A., (2003), "Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins", Journal of cellular and molecular medicine, 7(3), 249-257.

Carlson R. O., (2008), "New tubulin targeting agents currently in clinical development", Expert opinion on investigational drugs, 17(5), 707-722.

Dhokne P., Sakla A. P., Shankaraiah N., (2021), "Structural insights of oxindole based kinase inhibitors as anticancer agents: Recent advances", European Journal of Medicinal Chemistry, 216, 113334.

Dlamini Z., Mbita Z., Zungu M., (2004), "Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis", Pharmacology & Therapeutics, 101(1), 1-15.

Donthiboina K., Anchi P., Ramya P. S., Karri S., Srinivasulu G., Godugu C., Kamal, A., (2019), "Synthesis of substituted biphenyl methylene indolinones as apoptosis inducers and tubulin polymerization inhibitors", Bioorganic Chemistry, 86, 210-223.

Edlich F., (2018), "BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns", Biochemical and biophysical research communications, 500(1), 26-34.

Erdamar H., Kazanci F. H., Gok S., (2014), "Biochemical changes in cancer. Journal of Clinical and Analytical Medicine", (5), 430-438.

Goodman V. L., Rock E. P., Dagher R., Ramchandani R. P., Abraham S., Gobburu, J. V., Pazdur R., (2007), "Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma", Clinical Cancer Research, 13(5), 1367-1373.

Grilo A. L., Mantalaris A., (2019), "Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective" Biotechnology advances, 37(3), 459-475.

Hanahan D., Weinberg R. A., (2011), "Hallmarks of cancer: the next generation", *Cell*, 144(5), 646-674.

Hiriart E., Deepe R., Wessels, A., (2019), "Mesothelium and malignant mesothelioma", *Journal of developmental biology*, 7(2), 7.

Ho H. K., Chua B. T., Wong W., Lim K. S., Teo V., Ong H. T., Ullrich A., (2014), "Benzylidene-indolinones are effective as multi-targeted kinase inhibitor therapeutics against hepatocellular carcinoma", *Molecular oncology*, 8(7), 1266-1277.

Ichim G., Tait S. W., (2016), "A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process", *Nature Reviews Cancer*, 16(8), 539-548.

Jeng P. S., Inoue-Yamauchi A., Hsieh J. J., Cheng E. H., (2018), "BH3-dependent and independent activation of BAX and BAK in mitochondrial apoptosis", *Current opinion in physiology*, 3, 71-81.

Jia Y., Wen X., Gong Y., Wang X., (2020), "Current scenario of indole derivatives with potential anti-drug-resistant cancer activity", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112359.

Kaleli S., Deveci A., Eskiler G. G., (2018), "Which environment makes cancer? ", In *International Symposium on Environment and Morality*, (4), 6.

Kashyap D., Garg V. K., Goel N., (2021), "Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis", *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 125, 73-120.

Lavrik I. N., (2010), "Systems biology of apoptosis signaling networks", *Current opinion in biotechnology*, 21(4), 551-555.

Lemjabbar-Alaoui H., Hassan O. U., Yang Y. W., Buchanan P., (2015), "Lung cancer: Biology and treatment options", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1856(2), 189-210.

Liu J., Ye W., Xu J. P., Wang H. T., Li X. F., Wang W. Y., Zhou Z. Z., (2021), "Discovery of novel trimethoxyphenylbenzo [d] oxazoles as dual tubulin/PDE4 inhibitors capable of inducing apoptosis at G2/M phase arrest in glioma and lung cancer cells", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 224, 113700.

Liu W., Chen S., Zhang F., He S., Wang S., Sheng C., (2019), "Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Antitumor Spiro-dihydrothiopyran-oxindole Derivatives", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26404.

Morigi R., Locatelli A., Leoni A., Rambaldi M., Bortolozzi R., Mattiuzzo E., Viola G., (2019), "Synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation of substituted 3-(5-

imidazo [2, 1-b] thiazolylmethylene)-2-indolinones as new potent anticancer agents”, *European journal of medicinal chemistry*, 166, 514-530.

Onagi H., Hayashi T., Saito T., Kishikawa S., Takamochi K., Suzuki K., (2021), “Malignant pleural mesothelioma showing rare morphology indistinguishable from myxofibrosarcoma concomitant with EGFR-mutated lung adenocarcinoma: A case report”, *International journal of surgery case reports*, 85, 106237.

Qin M., Tian Y., Han X., Cao Q., Zheng S., Liu C., Wu X., Liu L., Meng Y., Wang X., Zhang H., Hou Y., (2020), “Structural modifications of indolinones bearing a pyrrole moiety and discovery of a multi-kinase inhibitor with potent antitumor activity”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 115486.

Rao M. N., Nagaraju B., Kovvuri J., Polepalli S., Alavala S., Vishnuvardhan M. V. P. S., Kamal A., (2018), “Synthesis of imidazo-thiadiazole linked indolinone conjugates and evaluated their microtubule network disrupting and apoptosis inducing ability”, *Bioorganic Chemistry*, 76, 420-436.

Ribeiro C., Nunes R., Amaral J., Gonçalves L., Rodrigues C., Moreira R., Santos M., (2017), “Spirotriazoline oxindoles: A novel chemical scaffold with in vitro anticancer properties”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 494-509.

Sachdeva H., Mathur J., Guleria A., (2020), “Indole derivatives as potential anticancer agents: A review”, *Journal of the Chilean Chemical Society*, 65(3), 4900-4907.

Sekido Y., (2013), “Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma”, *Carcinogenesis*, 34(7), 1413-1419.

Soldani C., Scovassi, A. I., (2002), “Poly (ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update”, *Apoptosis*, 7(4), 321-328.

Song Z., Chen C. P., Liu J., Wen X., Sun H., Yuan H. (2016), “Design, synthesis, and biological evaluation of (2E)-(2-oxo-1, 2-dihydro-3H-indol-3-ylidene) acetate derivatives as anti-proliferative agents through ROS-induced cell apoptosis”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 124, 809-819.

Su Z., Yang Z., Xu Y., Chen Y., Yu Q., (2015), “MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis”, *Oncotarget*, 6(11), 8474.

Sufi S. A., Adigopula L. N., Syed S. B., Mukherjee V., Coumar M. S., Rao H. S. P., Rajagopalan R., (2017), “In-silico and in-vitro anti-cancer potential of a curcumin analogue (1E, 6E)-1, 7-di (1H-indol-3-yl) hepta-1, 6-diene-3, 5-dione”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 85, 389-398.

Suski J. M., Braun M., Strmiska V., Sicinski P., (2021), “Targeting cell-cycle machinery in cancer” *Cancer cell*, 39(6), 759-778.

Valmiki M. G., Ramos J. W., (2009), "Death effector domain-containing proteins", Cellular and Molecular Life Sciences, 66(5), 814-830.

Verma R. P., (2007), "Cytotoxicity of heterocyclic compounds against various cancer cells: a quantitative structure–activity relationship study", Bioactive Heterocycles III, 53-86.

Xiong X., Zhang Y., Gao X., Dong Z., Li L., Ji C., Mei C., (2010), "B5, a novel pyrrole-substituted indolinone, exerts potent antitumor efficacy through G2/M cell cycle arrest", Investigational new drugs, 28(1), 26-34.

Yao D., Ruhan A., Jiang J., Huang J., Wang J., Han W., (2020), "Design, synthesis and biological evaluation of 2-indolinone derivatives as PAK1 inhibitors in MDA-MB-231 cells", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 30(17), 127355.

Zhang J. H., Zhang Y., Herman B., (2003), "Caspases, apoptosis and aging", Ageing research reviews, 2(4), 357-366.

Zheng Y., Zhang J., Zhang R., Luo Z., Wang C., Shi S., (2019), "Gold nano particles synthesized from Magnolia officinalis and anticancer activity in A549 lung cancer cells", Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 47(1), 3101-3109.

Zuo D., Jiang X., Han M., Shen J., Lang B., Guan Q., Wu Y., (2017), "Methyl 5-[(1H-indol-3-yl) selanyl]-1H-benzoimidazol-2-ylcarbamate (M-24), a novel tubulin inhibitor, causes G2/M arrest and cell apoptosis by disrupting tubulin polymerization in human cervical and breast cancer cells", Toxicology in vitro, 42, 139-149.

Web 1, (2022), <https://www.drozdogan.com/kanser-in-tedavi-ve-direnc-gelistirmesi-nedir-cozum-arayislari-nelerdir/>, (Erişim Tarihi: 17/03/2022).

Web 2, (2022), <https://www.drozdogan.com/malign-mezotelyoma-icin-immunoterapi-ve-hedef-yonelik-tedavi-calismalari-umut-oldu/>, (Erişim Tarihi: 15/03/2022).

Web 3, (2022), <https://www.cusabio.com/c-20948.html>, (Erişim Tarihi: 19/03/2022).

ÖZGEÇMİŞ

İzel Nermin Başlılar, 2014 yılında başladığı Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 2019 yılında tamamlayarak, yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda başlamıştır.

EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Poster Sunumları

Başlılar İ.N., Butt N., Turhal G., Nacak Baytaş S., Demiroglu Zergeroğlu A., (2022), “İndolin-2-on Türevlerinin Malign Mezotelyoma Hücreleri Üzerindeki Apoptotik ve Sitostatik Etkileri”, Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu ve Tanıtım Günleri, Kocaeli/ Türkiye, 1-2 Haziran.