

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

**YENİ BENZOTİYOFEN-TİMOL VE İNDOL-TİMOL HİBRİD
TÜREVLERİNİN ANTI-KARSİNOJENİK ÖZELLİKLERİNİN
AYDINLATILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİBEL ZEYBEK

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2022

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



**YENİ BENZOTİYOFEN-TİMOL VE İNDOL-TİMOL HİBRİD
TÜREVLERİNİN ANTI-KARSİNOJENİK ÖZELLİKLERİNİN
AYDINLATILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİBEL ZEYBEK

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2022

Bu tez alışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2021FEBE24 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.

SİBEL ZEYBEK

ÖZET

**YENİ BENZOTİYOFEN-TİMOL VE İNDOL-TİMOL HİBRİD
TÜREVLERİNİN ANTI-KARSİNOJENİK ÖZELLİKLERİNİN
AYDINLATILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
SİBEL ZEYBEK
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ŞEVKİ ARSLAN)

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2022

Bilindiği üzere, doğada var olan timol ve heterosiklikler, çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesi için en önemli kaynaklardır ve araştırmaların da çıkış noktalarını oluşturmaktadırlar. Özellikle kanser gibi tedavisi zor olan hastalıklarda gerek ana tedavi gerekse ana tedavinin yardımcıları olarak, çeşitli etken maddelerin kullanımı popülerleşmektedir. Timol (2-izopropil-5-metilfenol), Lamiaceae familyasına (*Thymus*, *Ocimum*, *Origanum* ve *Monarda*) ait bitkilerden izole edilen monoterpen fenoldür. Timol ve türevleri önemli biyolojik etkilerinden dolayı geniş bir literatüre sahiptir. Timol, antikanser, antifungal, antibakteriyel, antioksidan gibi biyolojik aktivitelere sahiptir. Benzotiyofen ve indol türevleri ise son yıllarda sahip oldukları farmakolojik etkilerden dolayı üzerinde yapılan çalışmaların oldukça arttığı önemli bir heterosiklik bileşik grublarıdır. Bu çalışma kapsamında yeni sentezlenen beş adet benzotiyofen-timol ve indol-timol hibrid moleküllerinin sitotoksik ve anti-karsinojenik etkilerinin insan akciğer karsinoma (A549), insan prostat karsinoma (LNCaP), insan kolorektal adenokarsinom (Caco-2) ve insan meme adenokarsinoma (MCF-7) gibi farklı kanser hücreleri üzerinde araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda farklı kanser hücrelerinde etkin dozları (EC₅₀) iki türev için (AŞ1 ve AŞ7) hesaplanmış ve sitotoksik etkileri ortaya konulmuştur. Bu iki aktif türevin apoptoz ile ilişkili genlerin (*BAX*, *BCL-2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*) mRNA seviyelerine olan etkileri qRT-PZR ile belirlenmiştir. *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genlerinin mRNA seviyesinde değişimler kontrole göre kıyasla önemli ölçüde artış gösterirken, *BCL-2* mRNA seviyesinde ise azalış saptanmıştır. İmage sitometre sonuçları apoptozun bu iki madde uygulanması sonucunda indüklendiğini göstermiştir. Tüm bunların ışığında, yeni benzotiyofen-timol (AŞ1) ve indol-timol türevinin (AŞ7) iki farklı mekanizma kullanarak apoptoz indüksiyonuna neden olduğu ve sitotoksik etki gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Tüm bu sonuçlar, bu iki türevin kanser tedavisinde kullanılma potansiyeli olabileceğini göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Timol, Anti-karsinojenik, Sitotoksisite, Apoptoz, Benzotiyofen, İndol

ABSTRACT

ELUCIDATION OF ANTI-CARCINOGENIC PROPERTIES OF NOVEL BENZOTHIOPHENE-THYMOL AND INDOLE-TYHMOL HYBRID DERIVATIVES

MSC THESIS

SİBEL ZEYBEK

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. ŞEVKİ ARSLAN)

DENİZLİ, AUGUST 2022

It is well known that, thymol and heterocycles existing in nature are the most important sources for the prevention and treatment of various diseases and these are the starting point of many researches. The usage of pure compounds have become more popular in treatment of hardly curable diseases such as cancer as a main treatment or as apart of many treatment. Thymol (2-isopropyl-5-methylphenol) is a monoterpene isolated from plants of the Lamiaceae family (*Thymus*, *Ocimum*, *Origanum* and *Monarda*). Thymol and its derivatives have been studied widely due to their significant biological effects. It has biological activities such as, anticancer, antifungal, antibacterial and antioxidant activities. Benzothiophene and indole derivatives are an important group of heterocyclic compounds that have received great deal of attention in recent years due to their pharmacological activities. The cytotoxic and anti-carcinogenic effects of newly synthesized five different benzothiophene-thymol and indole-thymol hybrid molecules on human lung carcinoma (A549), human prostate carcinoma (LNCaP), human colorectal adenocarcinoma (Caco-2), and human breast adenocarcinoma (MCF-7) on various cancer cells were investigated in this study. In this context, the effective doses (EC_{50}) in different cancer cells were calculated for two derivatives (AŞ1 and AŞ7) and their cytotoxic effects were evaluated. The effects of these two active derivatives on apoptosis-related genes' (*BAX*, *BCL-2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*) mRNA levels were determined by qRT-PCR. While, the mRNA levels of *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genes increased significantly compared to control, a decrease in *BCL-2* mRNA level was detected. Image cytometry results showed that apoptosis was induced as a result of the administration of these two derivatives. In the light of all these results, it has been revealed that the new benzothiophene-thymol (AŞ1) and indole-thymol derivative (AŞ7) cause apoptosis induction by using two different mechanisms and exert cytotoxic effects. All these results showed that these two derivatives may have the potential to be used in cancer treatment.

KEYWORDS: Thymol, Anti-carcinogenic, Cytotoxicity, Benzothiophene, Indole, Apoptosis

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	viii
SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Kanser	3
1.2 Doğal Bileşikler	6
1.2.1 Benzotiyofen	7
1.2.2 İndol.....	8
1.2.3 Timol	9
1.2.3.1 Timol ve Türevlerine İlişkin Literatür Bildirilişi	10
1.3 Apoptoz.....	16
1.4 Tezin Amacı	17
2. YÖNTEM	19
2.1 Materyal	19
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	19
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Primerler	19
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	20
2.2 Metot.....	21
2.2.1 1-izopropil-4-metil-2-(prop-2-in-1-iloksi) benzen sentezi	21
2.2.2 Genel sentez yöntemi	22
2.2.3 3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi)prop-1-in-1-il)-2-fenil-1H-inden sentezi(AŞ-1).....	22
2.2.4 1-(3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi) prop-1-in-1-il)-1H-inden-2-il) naftalen sentezi	23
2.2.5 3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi)prop-1-in-1-il)-2-pentil-1H-inden sentezi	24
2.2.6 3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi)prop-1-in-1-il)-1-metil-2-fenil-1H-indol sentezi.....	24
2.2.7 2-(2,5-dimetilfenil)-3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi)prop-1-in-1-il)-1H-inden sentezi	25
2.2.8 Hücre Kültürü	26
2.2.9 Hücre Stoklama.....	26
2.2.10 Hücre Sayımı.....	27
2.2.11 MTT ile Hücre Canlılık Testi	27
2.3 Apoptoz Analizi.....	28
2.4 mRNA Düzeyinde Gen Ekspresyonunun Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) ile Tespit Edilmesi.....	28
2.4.1 Total RNA izolasyonu.....	28

2.4.2	Agaroz jel elektroforez	29
2.4.3	cDNA Sentezi	30
2.4.4	Real Time PCR (qRT-PCR) analizi	31
2.4.5	İstatistik Analiz	31
3.	BULGULAR.....	32
3.1	Sitotoksisite Analizi.....	32
3.2	Apoptoz Analizi.....	47
3.3	Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi	53
3.4	mRNA Düzeyinde Ekspresyon Analizi(qRT-PZR).....	54
4.	TARTIŞMA.....	58
5.	SONUÇ VE ÖNERİ	66
6.	KAYNAKÇA	68
7.	EKLER	77
	EK A. İzole edilen yeni benzotiyofen-timol hibrid türevlerinin NMR spektrum görüntüleri.....	77
8.	ÖZGEÇMİŞ.....	84

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Kanserin temel özellikleri	4
Şekil 1.2: Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık enstitüsü verilerine göre 2022'de kanser türlerinin vaka-ölüm dağılım grafiği	5
Şekil 1.3: Benzotiyofen yapısı	7
Şekil 1.4: Benzotiyofen ve türevleri.....	8
Şekil 1.5: İndol halkası	9
Şekil 1.6: Timol kimyasal yapısı.....	10
Şekil 1.7: Timol'ün yükseltgenerek benzokinona dönüşmesi	10
Şekil 1.8: Timolden mentol ve türevlerinin elde edilmesi.....	11
Şekil 1.9: Timol benzofeniltiyöüre yapısı	12
Şekil 1.10: P-amino azobenzenin timol	12
Şekil 1.11: Dimerik yapıda timol ve karvakrol.....	13
Şekil 1.12: Timol'ün antikanser etki mekanizması	16
Şekil 1.13: Apoptoz mekanizması.....	17
Şekil 2.1: izopropil-4-metil-2-(prop-2-in-1-iloksi) benzen sentezi.....	21
Şekil 2.2: Genel sentez yöntemi.....	22
Şekil 2.3: 3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi) prop-1-in-1-il)-2-fenil-1H-inden sentezi	23
Şekil 2.4: 1-(3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi) prop-1-in-1-il)-1H-inden-2-il) naftalen sentezi	23
Şekil 2.5: 3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi)prop-1-in-1-il)-2-pentil-1H-inden sentezi	24
Şekil 2.6: 3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi)prop-1-in-1-il)-1-metil-2-fenil-1H- indol sentezi.....	25
Şekil 2.7: 2-(2,5-dimetilfenil)-3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi)prop-1-in-1-il)- 1H-inden sentezi	25
Şekil 3.1: Caco-2 hücre hattı üzerinde AŞ1 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	32
Şekil 3.2: Huvec hücre hattı üzerinde AŞ1 maddesinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	33
Şekil 3.3: A549 hücre hattı üzerinde AŞ1 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	34
Şekil 3.4: MCF-7 hücre hattı üzerinde AŞ1 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	35
Şekil 3.5: Caco-2 hücre hattı üzerinde AŞ2 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	35
Şekil 3.6: Huvec hücre hattı üzerinde AŞ2 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	36
Şekil 3.7: LNCaP hücre hattı üzerinde AŞ2 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	37
Şekil 3.8: MCF-7 hücre hattı üzerinde AŞ2 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	37
Şekil 3.9: Caco-2 hücre hattı üzerinde AŞ5 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	38

Şekil 3.10: Huvec hücre hattı üzerinde AŞ5 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	39
Şekil 3.11: LNCaP hücre hattı üzerinde AŞ5 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	39
Şekil 3.12: MCF-7 hücre hattı üzerinde AŞ5 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	40
Şekil 3.13: Caco-2 hücre hattı üzerinde AŞ6 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	41
Şekil 3.14: Huvec hücre hattı üzerinde AŞ6 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	42
Şekil 3.15: LNCaP hücre hattı üzerinde AŞ6 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	43
Şekil 3.16: MCF-7 hücre hattı üzerinde AŞ6 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	43
Şekil 3.17: Caco-2 hücre hattı üzerinde AŞ7 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	44
Şekil 3.18: Huvec hücre hattı üzerinde AŞ7 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	45
Şekil 3.19: A549 hücre hattı üzerinde AŞ7 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	46
Şekil 3.20: LNCaP hücre hattı üzerinde AŞ7 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	46
Şekil 3.21: AŞ1 bileşiğinin 1: Caco-2, 2: A549, 3: MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptoz analizi görüntüsü	47
Şekil 3.22: AŞ7 bileşiğinin 1: Caco-2, 2: A549, 3: LNCaP hücreleri üzerindeki apoptoz analizi görüntüsü	48
Şekil 3.23: Caco-2 hücre hattı üzerinde AŞ1 bileşiğinin yüzde (%) canlı, ölü, apoptotik etkisi	49
Şekil 3.24: A549 hücre hattı üzerinde AŞ1 bileşiğinin yüzde (%) canlı, ölü, apoptotik etkisi	50
Şekil 3.25: MCF-7 hücre hattı üzerinde AŞ1 bileşiğinin yüzde (%) canlı, ölü, apoptotik etkisi	50
Şekil 3.26: Caco-2 hücre hattı üzerinde AŞ7 bileşiğinin yüzde (%) canlı, ölü, apoptotik etkisi	51
Şekil 3.27: A549 hücre hattı üzerinde AŞ7 bileşiğinin yüzde (%) canlı, ölü, apoptotik etkisi	52
Şekil 3.28: LNCaP hücre hattı üzerinde AŞ7 bileşiğinin yüzde (%) canlı, ölü, apoptotik etkisi	53
Şekil 3.29: RNA örneklerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü.....	53
Şekil 3.30: AŞ1 bileşiğinin Caco-2 hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili <i>BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, CASP9</i> genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi	54
Şekil 3.31: AŞ1 bileşiğinin A549 hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili <i>BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, CASP9</i> genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi	55
Şekil 3.32: AŞ1 bileşiğinin MCF-7 hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili <i>BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, CASP9</i> genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi	55

Şekil 3.33: AŞ7 bileşiğinin Caco-2 hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili <i>BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, CASP9</i> genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi	56
Şekil 3.34: AŞ7 bileşiğinin A549 hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili <i>BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, CASP9</i> genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi	57
Şekil 3.35: AŞ7 bileşiğinin LNCap hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili <i>BAX, BCL-2, CASP3, CASP8, CASP9</i> genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi	57
Şekil 4.1: Yeni benzotiyofen-timol ve indol-timol hibrid moleküllerinin apoptoz indüksiyonundaki kullandığı yolaklar	63
Şekil A. 1: AŞ1 bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu.	77
Şekil A. 2: AŞ1 bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu.	78
Şekil A. 3: AŞ2 bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu.	78
Şekil A. 4: AŞ2 bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu.	79
Şekil A. 5: AŞ5 bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu.	79
Şekil A. 6: AŞ5 bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu.	80
Şekil A. 7: AŞ6 bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu.	80
Şekil A. 8: AŞ6 bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu.	81
Şekil A. 9: AŞ7 bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu.	82
Şekil A. 10: AŞ7 bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu.	82
Şekil A. 11: AŞ14 bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu.....	83
Şekil A. 12: AŞ14 bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu.	83

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Cinsiyete göre tahmini yeni kanser vaka sayıları ve ölüm yüzdeleri	6
Tablo 2.1: Proje kapsamında mRNA seviyelerine bakılacak proteinlerin primer dizileri ve bağlanma sıcaklıkları	20
Tablo 2.2: RNA ve Marker Konsantrasyonları	29
Tablo 2.3: Total RNA-cDNA Denatürasyon Ortamı	30
Tablo 2.4: Total RNA-cDNA Reaksiyon Ortamı.....	30
Tablo 2.5: Apoptoz yolağındaki ilişkili genler	31
Tablo 4.1: Timol'ün farklı deneysel modellerde MCF-7 kanser hücrendeki etkileri.	60
Tablo 4.2: Timol'ün farklı deneysel modellerde Caco-2 kanser hücrendeki etkileri.	60
Tablo 4.3: Timol'ün farklı deneysel modellerde A549 kanser hücrendeki etkileri.	61
Tablo 4.4: Timol-indol hibrid molekülünün LNCaP kanser hücrendeki etkileri.	61

SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ

- °C:** Celcius derecesi
M: Molaritre
EC₅₀: Etkili konsantrasyon
mg: Miligram
ml: Mililitre
mM: Milimolar
µg: Mikrogram
µl: Mikrolitre
µM: Mikromolar
dH₂O: Distile su
rpm: Dakikadaki devir sayısı
SDS: Sodyum dodesil sülfat
BSA: Bovine serum albumin
BCIP: 5-bromo-4-kloro-indol-fosfat
ATCC: Amerika tipi kültür koleksiyonu
RIPA: Radyo-immünopresipitasyon deneyi
PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PAGE: Poliakrilamid jel elektroforezi
ALP: Alkalen Fosfataz
TEMED: Tetrametilendiamin
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
EtBr: Etidyum bromür
µmol: Mikromol
V: Volt
SDB: Sample dilution buffer
PVDF: Polivinilidin diflorür
mA: miliamper

H₂O₂: hidrojen peroksit

TBST: Tris Buffer Saline Tween-20

nm: Nanometre

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

Dk: Dakika

mRNA: mesajcı RNA

NaCl: Sodyum Klorür

qRT-PZR: Gerçek zamanlı kantitatif polimer zincir reaksiyonu

RNA: Ribonükleik asit

DNA: Deoksiribonükleik asit TAE: Tris-Asetik asit-EDTA

CO₂: Karbondioksit

GAPDH: gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz

DSÖ: Dünya sağlık örgütü

NCI: Ulusal kanser enstitüsü

ÖNSÖZ

‘Yeni Benzotiyofen-Timol ve İndol-timol hibrid moleküllerin anti-karsinojenik özelliklerinin aydınlatılması’ çalışması Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Ana Bilim Dalında, Prof. Dr. Şevki ARSLAN’ın danışmanlığı altında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yeni benzotiyofen-timol ve indol-timol hibrid moleküllerinin anti-karsinojenik etki mekanizmaları farklı kanser hücre hatlarında tüm detayları ile ilk defa ortaya konulmuştur. Daha sonraki çalışmalar ile bu maddeler tek başına ya da nanopartikül formunda çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanım açısından potansiyeli yüksek olup ekonomik açıdan avantaj sağlanması hedeflenmektedir. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda, önerilen proje konusu ve sonucunda çıkacak yeni projeler hem ulusal ve hem de evrensel katma değere sahip projeler olacaktır.

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca bilgi, tecrübelerini ve maddi-manevi desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Şevki ARSLAN’a ve kıymetli jüri hocalarım Doç. Dr. Metin KONUŞ’ ve Dr. Öğr. Üyesi Gürçay Kıvanç AKSOY’a,

Projenin maddi desteğini sağlayan Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne,

Aynı laboratuvar ortamını paylaştığım sevgili laboratuvar arkadaşlarım; Amine Hafis ABDELSALAM, Shayesteh POORHOSEİN, Kübra KOCABIYIK, Hale Ayşe KARAMAN, Elena Daniela HUTANU, Yezdan SORKUN’a

Zor zamanlarımda yanımda olan en büyük motivasyon kaynağım Tübitak MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü’ndeki laboratuvar arkadaşlarım Furkan ŞAHİN, Kübra BİLGİÇ, Özge AKSOY’a

Ve tüm eğitim hayatım boyunca hem sevgisini hem de desteğini her daim hissettiğim canım annem Havane ZEYBEK’e, canım babam Ergün ZEYBEK’e ve kardeşim Mustafa ZEYBEK’e içtenlikle teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Kanser, DNA hasarı sonucunda hücrelerin kontrolsüz bir biçimde büyümesi, proliferasyonu ve yayılmasıdır. Gelişen teknolojiye rağmen kansere yönelik konvansiyonel tedavi yöntemlerinin (kemoterapi, radyoterapi, cerrahi) kullanımı devam etmektedir. Bu tedavi yöntemleri insan sağlığı üzerinde başka hastalıklara sebep olabilecek birçok yan etki oluşturmaktadır. Bunların aksine toksik etkisi azaltılmış yeni ilaç adayı moleküllerin araştırılması ve etkilerinin ortaya konulması gerekmektedir.

Doğal ürünler birçok spesifik özellikleri taşıyan iskele yapıları ve çeşitliliği ile karakterize edilmektedir (Atanasov ve diğ. 2021). İlaç endüstrisinde, ilaç öncüsü olarak doğal bileşikler birçok hastalığın tedavisine katkı sağlamaya hala devam etmektedir. Bu yüzden yeni doğal ürünlerin çok hedefli etken maddelerinin tespit edilmesi son derece önemlidir. Yeni izole bileşiklerin saf elde edilebilmesi ve türevlenebilir bir yapıya sahip olması gerekmektedir. Hızla ilerleyen teknoloji, bitkisel kaynaklardan elde edilen yeni ürünlerin keşfini, sentezini kolaylaştırmakta ve izole edilen etken maddelerin verimini arttırmaktadır. (Özok 2021).

Lamiaceae familyasına ait kekikten elde edilen Timol (2-isopropyl-5-methylphenol) kekiğe karakteristik kokusunu veren monoterpen fenoldür. Birçok bitki türünden izole edilmiş aynı zamanda yüksek miktarlarda organik sentezi yapılabilen timol oldukça farklı biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Timol ve timol'den sentezlenen türevlerinin anti-mikrobiyal, anti-fungal, anti-inflamatuar, anti-diabetik ve anti-karsinojenik gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir (Marchese ve diğ. 2016; Yu ve diğ. 2016; Li ve diğ. 2017; Islam ve diğ. 2019; Oskouei ve diğ. 2019).

Timol'un sahip olduğu anti-karsinojenik etki apoptoz mekanizması dahil birçok farklı yolağın metabolik aktivasyonundan kaynaklandığı gösterilmiştir (Islam ve diğ. 2019).

Hetereosiklik bileşiklerden olan benzotiyofen farmakolojik özelliklerinden dolayı birçok farklı ilacın sentezlenmesi için kök bileşik olarak görev alırlar. Benzotiyofen ve türevleri anti-inflamatuar, anti-viral, anti-mikrobiyal anti-karsinojenik gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir (Makino ve diğ. 1999; Dit ve diğ. 2007; Guerrero ve diğ. 2009; Amr ve diğ. 2019).

İndol ise bilim insanları tarafından en değer gören hetereosiklik bir bileşik olup hem insan vücudun da hem de bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Lakhdar ve diğ.2006). Yapılan alışmalar indol ve türevlerinin antikanser, anti-inflamatuar, anti-oksidan özelliklerini rapor edilmiştir (Dadashpour ve Emami. 2018; Singh ve diğ. 2016; Pedada ve diğ. 2016; Estevão ve diğ. 2010).

Son yıllarda doğal ürünlerle organik kimyasal bileşenlerin kimyasal reaksiyonlar ile birleştirildiği yeni hibrid moleküllerin sentezi hız kazanmıştır. Bu kapsamda doğal ürünlerin sayısı kısıtlı olduğundan yeni hibritlerin geliştirilmesiyle biyolojik aktivitesi çok daha yüksek moleküller elde edilebilmektedir (Tietze ve diğ. 2003). Paklitaksel ve alfa-tokoferol hibrid molekölü ile glisiretinik asit ve dihidrozingeron moleküllerinin birleştirilmesi ile oluşturulan hibrid moleküller bunun en iyi örnekleridir (Decker 2011).

Bu yüksek lisans tezi kapsamında yeni benzotiyofen-timol (Aş1, Aş2, Aş5) ve indol-timol hibrid moleküllerimiz (Aş6, Aş7) farklı kanser hücre hatlarında sitotoksik ve anti-karsinojenik etkileri araştırılması amaçlanmıştır. Sitotoksik etki gösteren moleküllerin hücreyi hangi yolak ile apoptoza indüklediği ve apoptoz da görev alan genlerin (*BAX*, *BCL-2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*) ekspresyon seviyelerindeki değişimler bu çalışma kapsamında ortaya konulmuştur. Yeni hibrid moleküllerin anti-karsinojenik etkisi farklı kanser hücre hatlarında tüm detayları ile ilk defa belirlenmiştir.

1.1 Kanser

Çağın en korkulan hastalıklarından biri olan kanser, oldukça hızlı biçimde yayılabilen, dış etkenlere karşı kişiyi çok daha hassas hale getirebilen, belirti verme ya da hasta tarafından belirtilerin anlaşılması konusunda oldukça karmaşık olan, dolayısıyla teşhis ve tedaviye geç kalınabilen ve ölümlü sonuçlanabilen bir hastalık türüdür. En basit ve kısa tanımıyla, vücuttaki hücrelerin kontrol edilemez bir biçimde çoğalmalarına kanser adı verilmektedir. Hızlı çoğalmaları nedeni ile başladıkları bölgeyi bir süre sonra istila eden ve hatta sonrasında metastaz yaparak tüm bölgelere yayılabilen bu hücrelerin, oluşmaya başladıktan sonra en kısa sürede tespit edilmeleri ve çeşitli tedaviler ile yok edilmeleri hayati önem taşımaktadır (Atıcı 2007; Kutluk ve Kars 2001).

Kanser konusunda en erken çalışmalar Hipokrat tarafından M.Ö. 460-377 yılları arasında yapılmıştır ve bu hastalık için organizmanın şifa bulmayan yeni yapılanmaları tanımlaması yapılmıştır. Galen tarafından M.S. 2.yüzyılda vücut üzerinde ülserleşen ve yengece benzeyen yapılara ilk kez “kanser” adı verilmiştir (Atıcı 2007). Kimi yorumcular, yengeç ısırmasıyla oluşan ağrıya benzer bir ağrı oluşturması sebebi ile bu hastalığa kanser adının verildiğini belirtmektedirler (Atıcı 2007).

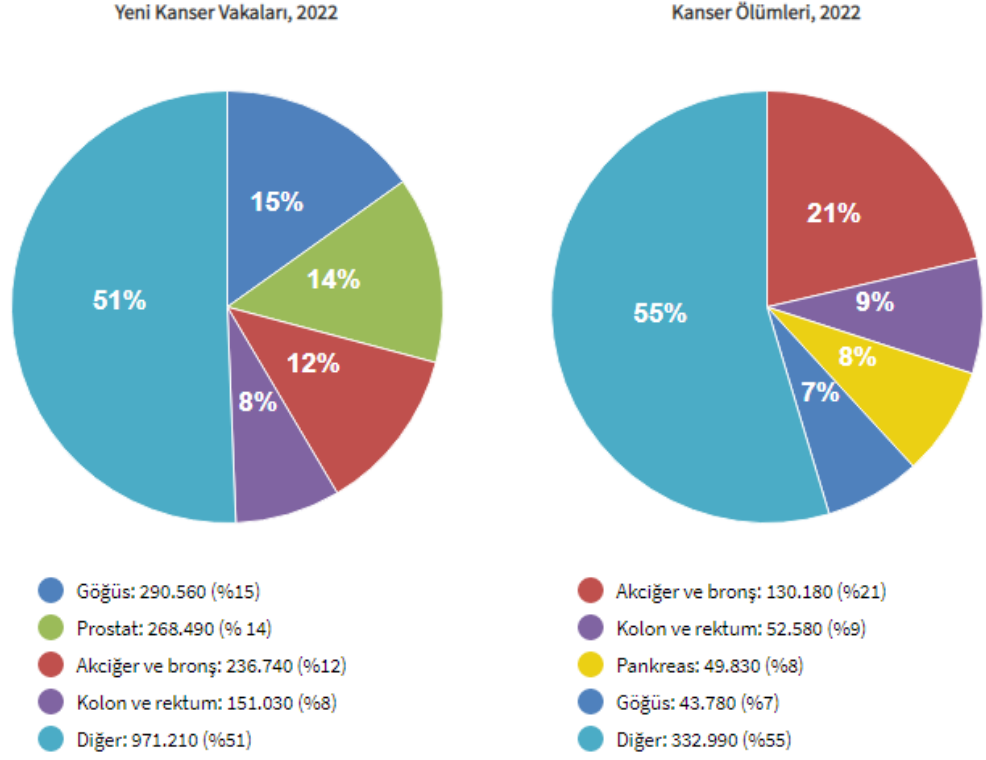
Kanser hücrelerinin normal hücrelerden ayırt edilmesi 2011 yılında altı temel özelliğe içerirken, 2022 yılında eklenen 2 temel özellikle birlikte Hallmark şeması güncellenerek 8 temel özelliği içermektedir. Bunlar; hücrenin sınırsız proliferasyon kazanması, büyüme faktörlerinin baskılanması, apoptoza karşı direnç, anjiyogenez, bağışıklık sisteminden kaçma, hücre metabolizmasını değiştirme, sınırsız telomeraz aktivitesi, doku invazyonu ve metastaz’dır (Hanahan ve Weinberg 2011) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1: Kanserin temel özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2022).

Kanserin bilinen 100’den fazla türü bulunmaktadır ve vücudun her yerinde görülebilmektedir. Tedavi seçenekleri belirlenirken hastanın yaşı, sahip olduğu kanserin türü, evresi, kişinin genel sağlık durumu gibi unsurlar göz önünde bulundurulmaktadır. Tedaviler hem kanserin yok edilmesi hem de çeşitli semptomların ortadan kaldırılması amaçlarına dayanmaktadır. Pek çok hastada çeşitli tedavi süreçleri birbirlerini izleyen süreçler halinde ya da birden fazlası bir arada olacak biçimde uygulanmaktadır. On yıllardır kansere yönelik tedavi yöntemleri arasında kemoterapi (kimyasal), radyoterapi (ışın tedavisi), cerrahi işlemler gibi konvansiyonel yöntemler kullanılmaktadır. Bu tedaviler kanserli hücreler dışında normal hücreler üzerinde de toksik etki yarattığı bilinse de hala kullanılmaya devam edilmektedir. Birçok yan etkisi toplum üzerinde farklı hastalıklara zemin hazırlamaktadır. Bir başka yaklaşım olan hedefe yönelik ilaçlar ise son 15 yılda kanser tedavi sürecini değiştirmiş olsa da tam anlamıyla optimal dozu belirleyebilme gibi bir sorunla karşılaşmaktadır. (Gerber 2008)





Dünya Sağlık Örgütü’nün (DSÖ) son verilerine göre kanser, 2020’de yaklaşık 10 milyon ölümü veya yaklaşık altı ölümden birine neden olmuştur. Ulusal sağlık enstitüsü (NCI) verilerine göre en yaygın kanser türleri arasında Meme Kanseri, Prostat, akciğer ve kolorektal kanseri yer almaktadır. Neredeyse tüm vakaların %50’sini bu kanser türleri oluşturmaktadır (Şekil 1.2).



Şekil 1. 2: Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık enstitüsü verilerine göre 2022'de kanser türlerinin vaka-ölüm dağılım grafiği (National Cancer Institute 2022).

Amerikan Kanser Derneği yapılan son araştırmalara göre 2022 tahmini yeni kanser vaka sayılarının ve ölüm oranlarının en son verileri Tablo 1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. 1: Cinsiyete göre tahmini yeni kanser vaka sayıları ve ölüm yüzdeleri

Estimated New Cases						
			Males	Females		
Prostate	248,530	26%			Breast	281,550 30%
Lung & bronchus	119,100	12%			Lung & bronchus	116,660 13%
Colon & rectum	79,520	8%			Colon & rectum	69,980 8%
Urinary bladder	64,280	7%			Uterine corpus	66,570 7%
Melanoma of the skin	62,260	6%			Melanoma of the skin	43,850 5%
Kidney & renal pelvis	48,780	5%			Non-Hodgkin lymphoma	35,930 4%
Non-Hodgkin lymphoma	45,630	5%			Thyroid	32,130 3%
Oral cavity & pharynx	38,800	4%			Pancreas	28,480 3%
Leukemia	35,530	4%			Kidney & renal pelvis	27,300 3%
Pancreas	31,950	3%			Leukemia	25,560 3%
All Sites	970,250	100%			All Sites	927,910 100%
Estimated Deaths						
			Males	Females		
Lung & bronchus	69,410	22%			Lung & bronchus	62,470 22%
Prostate	34,130	11%			Breast	43,600 15%
Colon & rectum	28,520	9%			Colon & rectum	24,460 8%
Pancreas	25,270	8%			Pancreas	22,950 8%
Liver & intrahepatic bile duct	20,300	6%			Ovary	22,950 5%
Leukemia	13,900	4%			Uterine corpus	12,940 4%
Esophagus	12,410	4%			Liver & intrahepatic bile duct	9,930 3%
Urinary bladder	12,260	4%			Leukemia	9,760 3%
Non-Hodgkin lymphoma	12,170	4%			Non-Hodgkin lymphoma	8,550 3%
Brain & other nervous system	10,500	3%			Brain & other nervous system	8,100 3%
All Sites	319,420	100%			All Sites	289,150 100%

1.2 Doğal Bileşikler

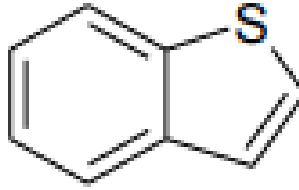
Tarihsel olarak yeni ilaçların çok büyük kısmı doğal bileşiklerden (sekonder metabolitler) ve doğal bileşiklerin türevlerinden oluşmaktadır (Li ve Vederas 2009). 200 yıl önce afyon bitkisinden (*Papaver somniferum*) ilk saf bileşik olan morfin sentezlendi ve bitkilerden elde edilen ilaçların saflaştırılabileceği, belirli dozlarda çalışılabileceği bir dönem başladı.

Doğal bileşikler günümüze kadar değerini korumuş ve hala yeni ilaçların keşfi ve formülasyonların geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bugün hala

aktif olarak kullanılan ilaçlara; salisilik asit, morfin, digitoksin, kinin, pilokarpin, vinkristin, paklitaksel, artemisinin örnek olarak verilebilir (Sneader 2005).

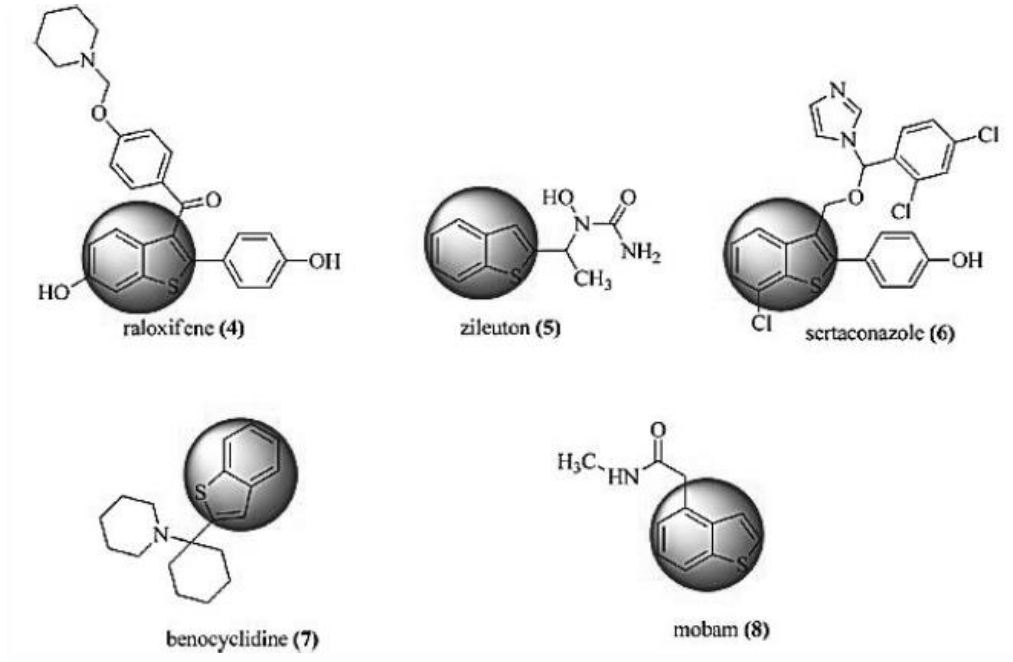
1.2.1 Benzotiyofen

Yeni doğal bileşiklerin tanımlanması, karakterizasyonu ve saflaştırılma çalışmalarının geliştirilmesi başta kanser olmak üzere insan sağlığı açısından birçok hastalığa çare olmaktadır. Doğal olarak, benzotiyofen, linyit katranı gibi petrolle ilgili tortuların bir bileşeni olarak bulunmaktadır. (Boberg ve diğ. 1992). C_8H_6S formülüyle gösterilen benzotiyofen, özellikle ilaç üretimi konusunda en fazla tercih edilen ve üzerinde çalışılan bileşiklerden biridir (Şekil 1.3). Bu moleküller ve bunlardan elde edilen çeşitli türevler organik yapılarından dolayı çoğunlukla kararlı yapıdadırlar. Bu yapıları ve yüksek iletkenlikleri, ayrıca kimya biliminde pek çok malzeme için kullanılabilirliklerini arttırmaktadır (Çetin 2018).



Şekil 1. 3: Benzotiyofen yapısı

Benzotiyofen ve türevleri, ilaç tasarımının yeni güçlü adayları olduğundan odak noktasındadır. Yapılan çalışmalarda benzotiyofen türevlerinin anti-kanser (Sweidan ve diğ. 2015; Martorana ve diğ. 2015), anti-fungal (Jagtap ve Agasimundin 2015), anti-inflamatuar (Fakhr ve diğ. 2009) gibi birçok biyolojik özelliğe sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Raloksifen, benosiklidin, sertakonazol, zileuton ve mobam gibi benzotiyofen türevlerinin örnekleri Şekil 1.4'te verilmiştir (Pirdawid 2019).

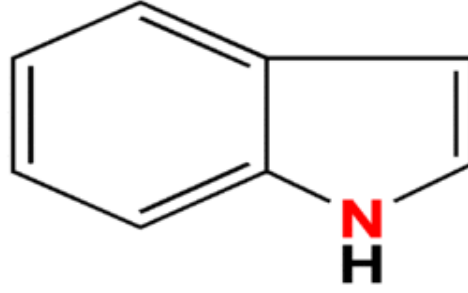


Şekil 1.4: Benzotiyofen ve türevleri (Pirdawid 2019).

1.2.2 İndol

Kimyasal olarak indol, bir benzen ve pirol halkasının birleşmesiyle oluşan heterosiklik bir bileşiktir. (Ahmad ve diğ. 2011). İndol türevi bileşikler ise bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda bulunan geniş bir kitleye sahiptir. Besinlerden brokoli, karnabahar, kabak, turunçgiller de indol türevi barındırır. Ek olarak vücudumuz da melatonin hormonu da yapısında indol halkası taşıyan hormondur.

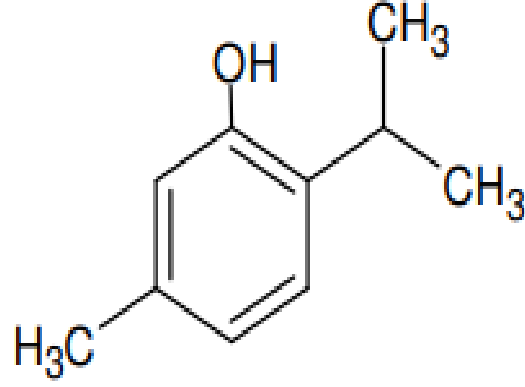
İndoller bilim açısından en önemli heterosiklik bileşiklerden biridir. İndol ve türevlerinin antioksidan aktiviteleriyle ilgili son gelişmeler bu bileşiklerin önemini ortaya koymaktadır. Yapılan bilimsel çalışmalar doğrultusunda antioksidan moleküllerin kanser gelişimini engelleyebileceğini ve kanser hücresi büyümesinde etkili olan oksidatif stresi de önleyebilirler. (Poeggeler ve diğ. 1999). Bu kapsamda indol içeren bileşiklerin farmakolojik ve terapötik aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar önem arz etmektedir. Örneğin; sumatriptan(anti-migren), vilazodone(anti-depresan), zafirlukast (astım) gibi ilaçlar indol yapılıdır. Şekil 1.5'te indol halkası gösterilmiştir.



Şekil 1.5:İndol halkası (Zhang ve diğ. 2015).

1.2.3 Timol

Bir fenol türü olan timol, bitkilerde doğal olarak bulunan ve günümüzde özellikle farmakolojide kullanılan en yaygın bileşikler arasındadır. Doğada var olan hallerinin yanı sıra özel koşullarda üretilerek etki mekanizmalarının geliştirilmesi de mümkündür. Timol (5-methyl-2-isopropylphenol) aromatik halka yapısındadır ve pek çok farklı bitki türünde bulunabilmektedir (Şekil 1.6). Ancak doğal kaynağı *Thymus vulgaris L.* bitkisidir ve en yaygın olarak Lamiaceae (*Thymus*, *Ocimum*, *Origanum* ve *Monarda*) ailesi bitkilerindeki uçucu yağlardan kolaylıkla izole edilebilmektedir. Su da çözünürlüğü azdır ve bu uçucu yağlar, gıda endüstrisinde tatlandırıcı ve koruyucu özellikleri nedeniyle aromaterapide ve geleneksel tıpta baş ağrısı, öksürük ve ishal tedavisi için eski çağlardan günümüze kadar hala kullanılmaktadır (Marchese ve diğ. 2016; Gupta 2021).

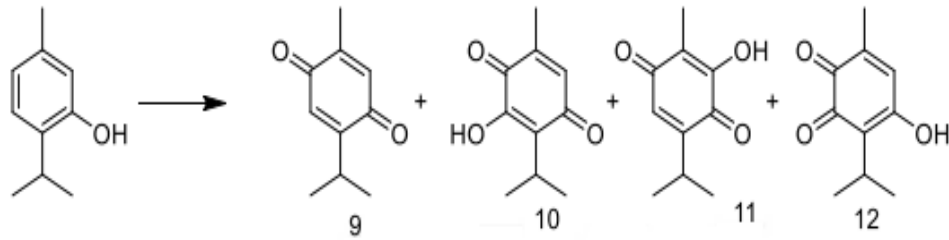


Şekil 1.6: Timol kimyasal yapısı (Gupta 2021).

Timoldeki fenolik grup, serbest radikalleri nötralize eder ve endojen antioksidanları artırarak serbest radikallerin zararlarından organizmayı korumaktadır (Wojdylo ve diğ.2007; Nagoor ve diğ. 2017).

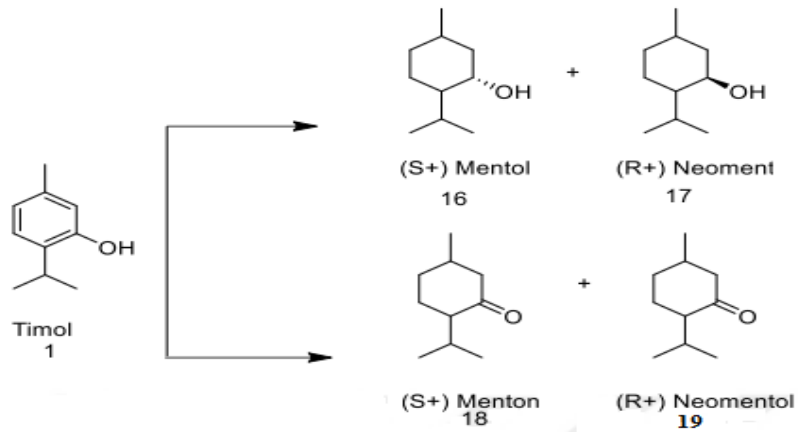
1.2.3.1 Timol ve Türevlerine İlişkin Literatür Bildirilişi

Timol'ün yapısında bulunan hidroksil grubu, bu molekülün diğer fenollerde olduğu gibi çeşitli yükseltgenme tepkimelerinde bulunabilmesine olanak yaratmaktadır (Öner ve Bircan Yıldırım 2018). Timol'ün, yükseltgenme tepkimesi sonrasında benzokinon izomerlerine dönüşmesi aşağıdaki şekilde gösterilmekte ve yükseltgenmeyle ilgili özelliklerinden dolayı biyoloji uygulamalarında önemli bir yerdedir (Soliman ve diğ. 2020) (Şekil 1.7).



Şekil 1.7: Timol'ün yükseltgenerek benzokinona dönüşmesi (Demirci 2020).

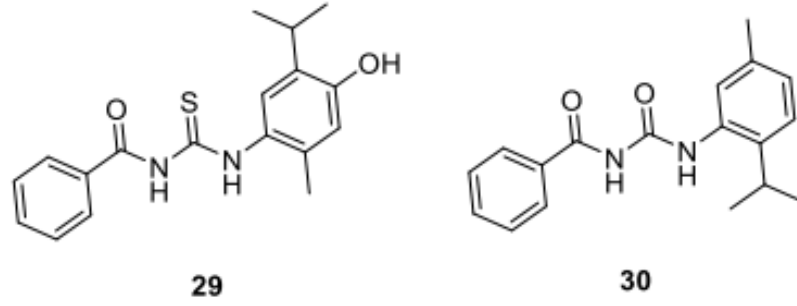
Timollerin en önemli özelliklerinden bir diğeri, onların organik olarak sentezlenebilmesi ve yine organik olarak türevlerinin de elde edilebilmesidir. Bunun en bilindik olanı ise kuşkusuz mentoldür. Organik olarak sentezlendiğinde mentolün oluşumu için sekiz farklı basamağa ihtiyaç varken, tepkimeye hidrojenlendirme müdahalesi yapıldığında bu basamakları yok etmek ve tek basamakta mentol eldesi sağlamak mümkündür. Yine doğal olarak ortaya çıkan diğeri bileşikler, neomentol, menton ve neomentondur. Bunlar ayrıca farklı timol türevlerinin oluşturulmasında başlangıç molekülleri olarak da kullanılabilirler (Gupta 2021) (Şekil 1.8).



Şekil 1.8: Timolden mentol ve türevlerinin elde edilmesi (Demirci 2020).

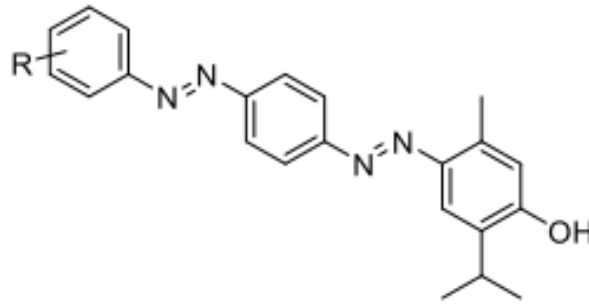
Timol'ün hibritlenmesi ve bunların gösterdiği biyolojik özelliklerin araştırılması konusunda son yıllarda pek çok çalışma yapılmaya başlanmıştır ve bu çalışmalar sayesinde Timol türevlerinin ne kadar geniş bir kümeye sahip olabilecekleri görülmüştür.

Örneğin Pete ve diğ. (2012) yılında Timol ve üre türevlerinden oluşturdukları bileşiğin etkilerini araştırmışlar ve bunun zehirli bir yapıya sahip olduğunu, böcekler üzerinde öldürücü bir etkisi olduğunu tespit etmişlerdir (Şekil 1.9).



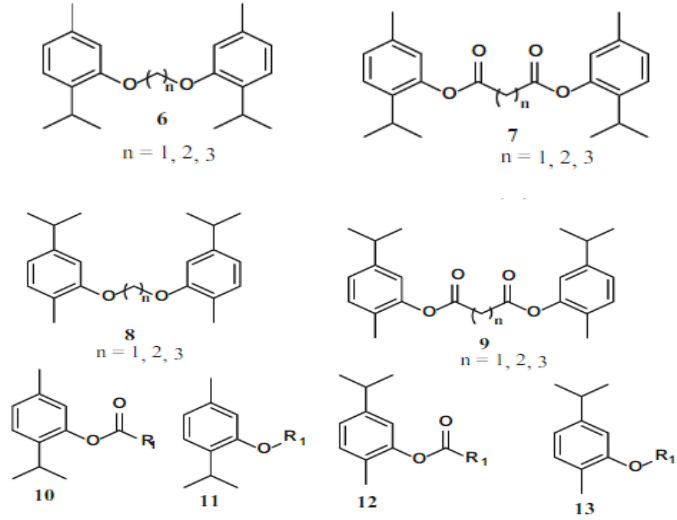
Şekil 1.9: Timol benzofeniltioüre yapısı (Pete ve diğ. 2012).

Piste ve diğ. (2012) farklı ikame edilmiş aromatik aminlerden p-amino azobenzenin timol kısmı ile sentezi ve antimikrobiyal aktivitesinin sistematik olarak araştırmışlar, P-amino Azobenzenin Timol'ün güçlü bir antioksidan olduğunu, yüksek biyolojik aktivite gösterdiğini ve *B. subtilis*, *S. Aureus*, *E.coli* bakterilerine karşı antibakteriyel özellik gösterdiğini tespit etmişlerdir (Şekil 1.10).



Şekil 1.10: P-amino azobenzenin timol (Piste ve diğ.2012).

Bir başka çalışma ise Rajput ve arkadaşları tarafından 2017 yılında hazırlanmış ve bu çalışmada araştırmacılar dimerik Timol türevlerinin antibakteriyel özelliklerini incelemişlerdir. Araştırmacılar bu türevlerin kozmetik ve kanser alanlarında da kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Rajput ve diğ. 2017) (Şekil 1.11).



Şekil 1. 11: Dimerik yapıda timol ve karvakrol (Rajput ve diğ.2017).

Abedi ve arkadaşları tarafından 2016 yılında hazırlanan çalışmada sıçanlar üzerinde radyasyonun yıkıcı etkilerinin Timol ile azaltılıp azaltılamayacağı incelenmiş ve 15 Gy dozunda radyasyon öncesinde 50 mg/kg Timol verilerek ve sıçanların tükürük bezlerinin sintigrafisi uygulama öncesi ve sonrasında alınmıştır. Çalışma sonunda, Timol'ün, radyasyonun neden olabileceği işlev bozukluklarını önemli oranda engellediği, kanser oluşumuna karşı önemli bir bariyer oluşturduğu tespit edilmiştir (Abedi ve diğ. 2016).

Archana ve arkadaşları, 2011 yılında hamsterler üzerinde Timol'ün kanser önleyici özelliğini incelemiştir. Akciğer fibroblast hücreleri özelinde hazırlanan çalışmada, 3 Gy gama ışınımına maruz bırakılmadan önce 1 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda timol (0-100 µg/mL) ile tedavi edilmiş olan hamsterlere, radyasyonun neden olduğu sitogenetik hasarı ve genotoksik etkileri değerlendirmek için tahliller yapılmıştır. Çalışmada Timol'ün radyasyona bağlı çöküşü baskıladığı tespit edilmiştir (Archana ve diğ. 2017).

Chang ve diğ. (2011) doğal Timol'ün sitozolik Ca²⁺ konsantrasyonlarının MG63 insan osteosarkom hücrelerindeki canlılık üzerindeki etkisini incelemiştir. Çalışma kapsamında Ca²⁺ ölçümü için floresan boya kullanılmıştır. 200–1,000 µmol/l konsantrasyonlu timolün, konsantrasyona bağlı olarak etki ettiği tespit edilmiştir. Timol kaynaklı Ca²⁺ girişi nifedipin, ekonazol, SK&F96365 ve protein kinaz C

modulatorleri tarafından inhibe edilmiştir. Timol, Endoplazmik retikulumdan fosfolipaz C'ye bağımlı Ca^{2+} salımını ve protein kinaz C'ye duyarlı depo tarafından işletilen Ca^{2+} kanalları yoluyla Ca^{2+} girişini indükleyerek Ca^{2+} artışına neden olmuştur. Ayrıca timol (200 ve 400 $\mu\text{mol/l}$) de reaktif oksijen türlerinin seviyelerini artırmıştır.

Calò ve diğ. (2014) cildi dolaylı (UVA) ve doğrudan (UVB) ultraviyole radyasyon yan etkilerinden korumak için doğal bileşiklerin araştırılması amacıyla hazırladıkları çalışmada, *T. vulgaris L.*'den elde edilen kuru bir ekstraktın ve onun ana sentetik bileşiği Timolün (yaklaşık %60) oksidatif ve genotoksik UVA ve UVB hasarına karşı koruyucu etkisi incelenmiştir. Hücreler, serumsuz ortamda, timol (1 $\mu\text{g/mL}$) veya *T. vulgaris L.* (1.82 $\mu\text{g/mL}$) ile 1 saat süreyle ön işleme tabi tutulmuştur. Ardından hücreler, farklı UVA (8-24 J/cm^2) veya UVB dozlarına (0.016-0.72 J/cm^2) maruz kalmış, UV'ye maruz kaldıktan hemen sonra hücre içi redoks durumu, reaktif oksijen türleri kantifikasyonu değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, Timol'ün UVA ve UVB ışınlanmış hücrelerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu inhibe ettiği ve DNA hasarını azalttığı tespit edilmiştir.

İnci Gül ve diğ. (2016) timolün Mannich bazları sentezlenmiş, bileşiklerin karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) inhibitör etkileri hCA I ve hCA II'ye karşı değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında tüm bileşiklerin, hCA I ve hCA II'yi orta derecede inhibe ettiği görülmüştür. Ardından, bileşiklerin dört insan oral skuamöz hücreli karsinom hücre hattına karşı sitotoksitesi ile üç normal oral hücreye karşı olanlarla karşılaştırılmış, Bileşik 2, 3, 4, 5 ve 6 için tümör özgüllük değerleri yaklaşık 2 veya biraz daha fazla, bileşik 2'nin, normal hücrelere kıyasla 16 ila 32 kat daha düşük konsantrasyonlarda OSCC hücre hatlarına karşı sitostatik aktivite gösterdiği görülmüştür. Çalışma neticesinde araştırmacılar, bileşik 2'nin daha ileri araştırmalar için sitotoksiteyi artıran ilaç adayı olarak kabul edilebileceğini belirtmişlerdir.

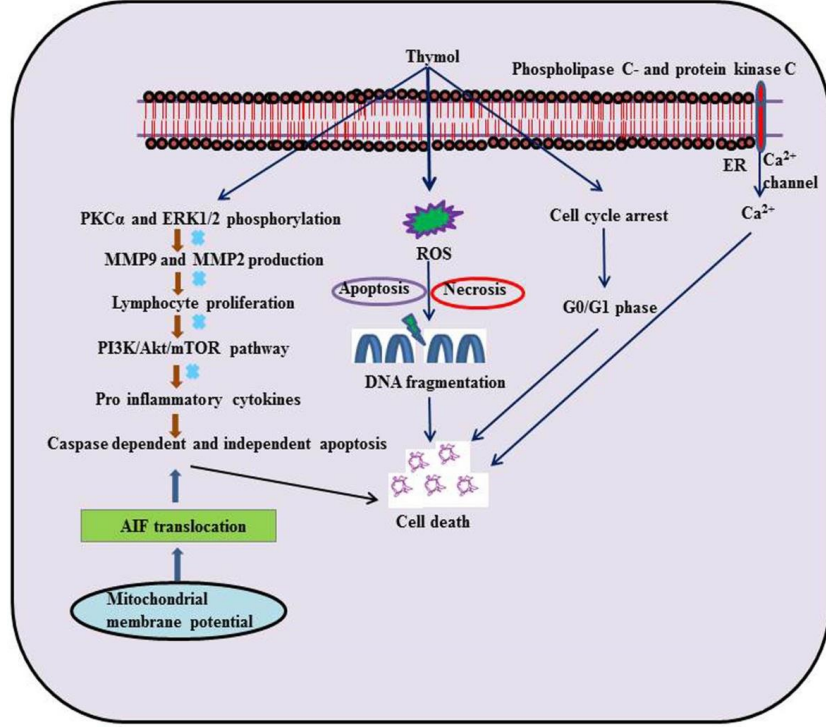
Bir başka çalışma 2017 tarihinde Lee ve diğ. (2017) hazırlanmış ve yayınlanmıştır. Çalışmalarında, estetik görünümü oldukça kötü olabilen ve bireylerin hayat kalitesini olumsuz etkileyebilen melanositlerin renklerinin açılabilmesi için çeşitli bileşiklerin kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır. İn vitro yapılan deneylerde, Melasolv™ (3,4,5-trimetoksisinnamat timol ester) türevinin etkileri incelenmiştir. Çalışma kapsamında yapılan deneylerde, Melasolv'un önemli beyazlatma etkinliğine sahip olduğu görülmüştür. Olumlu sonuçların ardından

Melasolv insan derisi üzerinde de denenmiştir. Bu çalışma, araştırmacılar tarafından türetilmiş olan bu bileşimin, pigment bozukluklarını tedavi etmek için depigmenter bir ajan olarak ve ayrıca beyazlatma etkinliğini arttırmak için kozmetiklerde aktif bir bileşen olarak kullanılabileceği olasılığını ortaya koymuştur.

Brotzman ve diğ. (2019) yaptığı bir çalışmada timolün alkil 4-Oksobutanoat olan yedi türevini sentezlediler ve melanin biyosentezindeki önemli bir enzim olan tirozinaz üzerindeki etkilerini ortaya koymuşlardır. Alkil zincirinde üç ve dört karbon içeren esterlerin 102.3–212.3 uM arasında değişen IC₅₀ değerleri ile en iyi tirozinaz inhibitör aktivitesini içeren sonuçları ortaya koymuşlardır.

Timolün insan mide karsinomu (AGS) hücrelerinde, apoptozu indüklediğini, hücre içi reaktif oksijen türleri üretimini arttırdığını, hücre döngüsü G1 fazında etkilediğini, mitokondriyal membran (MMP) deformasyonu sonucu sitokrom c salınımını indüklediğini ve proapoptotik mitokondriyal proteinleri (Bax, Casp8, PARP) aktive etmek gibi farklı birçok etki mekanizması yoluyla antikanser aktivite mekanizmaları ortaya çıkarılmıştır (Kang ve diğ. 2016).

Yapılan çalışmalar ışığında timol'ün sahip olduğu antikanser etki mekanizması Nagoor ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. Buna göre timol hücre içinde apoptoz ve nekrozu uyararak hücre döngüsünü düzenleyen ve Ca⁺⁺ girişini regüle ederek antikanser etki göstermektedir (Nagoor ve diğ.2017) (Şekil 1.12).



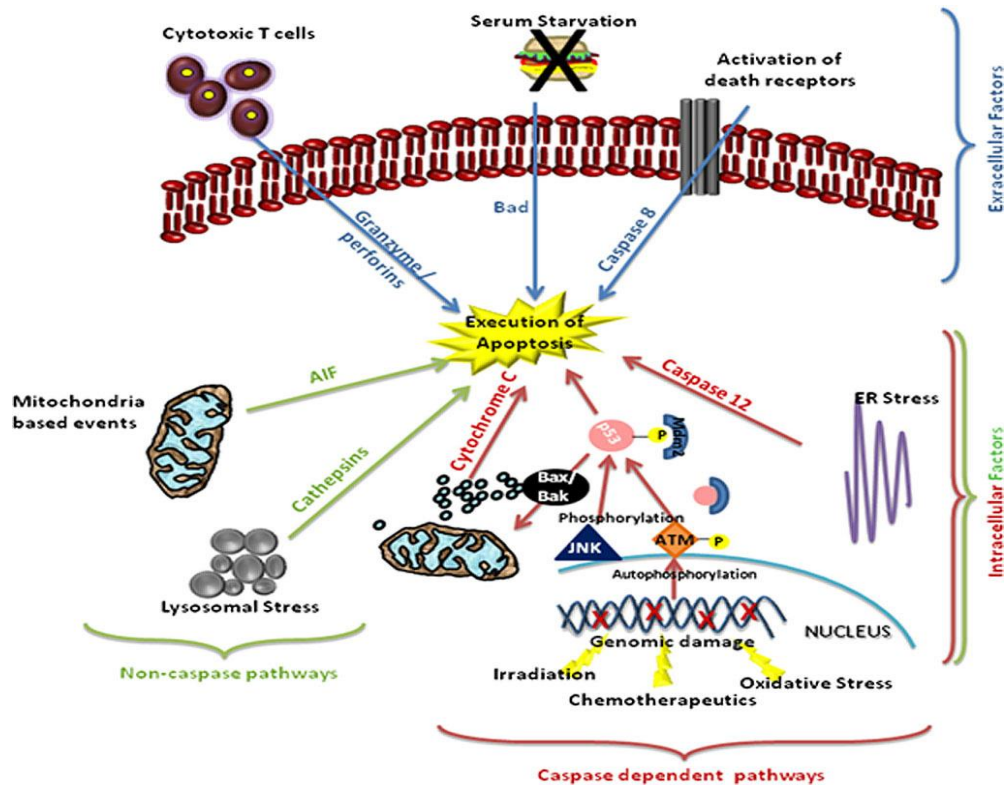
Şekil 1. 12: Timol'ün antikanser etki mekanizması (Nagoor ve diğ.2017).

1.3 Apoptoz

Timol'ün en önemli mekanizması apoptozu indüklemesidir. Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, hasarlı hücreleri yok ederek hücre içi homeostatik dengeyi sağlayan mekanizmadır. (King ve Cidlowski 1995). Mitoz (yapım) ve apoptoz (yıkım) arasındaki bu denge genomik bütünlüğün korunması için büyük öneme sahiptir (Clarke ve Allan 2009). Eğer apoptoz organizmada doğru gerçekleşemezse AIDS, nörodejeneratif bozukluklar, diyabet, hepatit C, kanser, otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığa neden olabilir.

Apoptoz, intrinsik (mitokondriyal iç yolak) ve ekstrinsik (dış yolak) gibi iki farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Apoptozun başlaması ile birlikte hücre içi kaspazlar (proteazlar) aktifleşir ve hasara uğramış hücreler diğer hücrelerden ayrılarak küçülmeye, nükleer membran erimeye başlar. Son olarak nükleer membran çevresinde kromatinler yoğunlaşır ve apoptotik hücreler makrofajlar ile vücuttan uzaklaştırılır. Bu süreç enerjiye bağlı olarak gerçekleşmektedir. Apoptoz yollarının çoğu aydınlatılmasına rağmen hala moleküler etkileri tam açıklanamamıştır.

Apoptotik süreç, kanser başta olmak üzere birçok hastalıkta kritik öneme sahiptir (Elmore 2007) (Şekil 1.13).



Şekil 1. 13: Apoptoz mekanizması (Ulukaya ve diğ. 2011).

1.4 Tezin Amacı

Kimyasallar, virüsler, etkenler, stres ve tanımlanmamış diğer çevresel faktörlerden dolayı DNA molekülünde mutasyon adı verilen değişimler meydana gelmekte ve bunların sonucunda değişik kanser türleri oluşabilmektedir. Erken teşhis ve tedavideki gelişmelererağmen, kanser hala ölüm nedeni olarak ilk sıralardaki yerini yıllardan beri korumaktadır. Dünyada ve de Türkiye’de pek çok kanser hastası kimyasal tedavi, ışın tedavisi gibi konvansiyonel tedavileri kullanmaktadır. Yan etkisi azaltılmış, etkili ilaç moleküllerin aranması çalışmaları hali hazırda devam etmektedir. Bu maddeleri ararken yan etkilerin azaltılması için doğal geleneksel yaklaşımların araştırılması, etkilerinin ortaya konulması ve daha az yan etkiye sahip çok hedefli etken maddelerin tespit edilmesi son derece önemlidir. Çalışmamız da kekikten izole edilen timolün, benzotiyofen ve indol gibi hetereosiklik bileşikler ile kombinasyonu ile oluşturulmuş yeni hibrid moleküllerin anti-karsinojenik etki

mekanizmaları farklı kanser hücre hatlarında tüm detayları ile ilk defa ortaya konulacaktır. Lamiaceae familyasına ait kekikten elde edilen Timol (2-isopropyl-5methylphenol) antibakteriyel, antifungal, anti-karsinojenik özellikleri çok iyi bilinen bir monoterpen fenoldür. Benzotiyofen ve indol türevleri ise son yıllarda sahip oldukları farmakolojik etkilerden dolayı üzerinde yapılan çalışmaların oldukça arttığı önemli bir heterosiklik bileşik grubudur. Önerilen çalışmanın amacı sentezlenen timol-benzotiyofen ve timol-indol türevlerinin sitotoksik ve apoptotik etkilerinin en yaygın kanser türlerinde belirlenmesidir. Bu sayede bu maddelerin etkinlikleri ve daha sağlıklı, güvenilir ve bilimsel kullanımı için veri sağlanmış olacaktır. Ayrıca, yapılacak ileri ki çalışmalar ile bu maddelerin tek başına ya da nanopartiküller kullanılarak hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyeli yüksek bir hal alarak ekonomik çıktılarının üretilmesi sağlanabilecektir. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda, önerilen proje konusu ve sonucunda çıkacak yeni projeler hem ulusal ve hem de evrensel katma değere sahip projeler olacaktır.

2. YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Agaroz (Sigma, A9539), Etidyum bromür (EtBr, Bio Basic; D0197), 1kb Plus Opti-DNA Marker (Abm #catG248), Sodyum Klorür (NaCl) (Merck, 1.06400), Dulbecco Modifiye Eagle Medyum (DMEM, Sigma, D5796), Fetal sığır serumu (FBS, Gibco, 10270), Penisilin (Sigma, P4333), Tripsin-EDTA (Gibco, 25200), cDNA Sentez Kiti (Abm, G236), Kilogreen qPZR Kiti (Abm, mastermix-KS), innuPREP RNA İzolasyon Kiti (analytikjena, 845-KS-2040010), BCA Protein Test kiti (Biovision, K813-2500)

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Primerler

Çalışmamızda İnsan akciğer karsinoma epiteli (A549), insan prostat karsinoma epiteli (LnCap), insan kolorektal adenokarsinom epiteli (Caco-2) ve insan meme adenokarsinoma epiteli (MCF-7) yapılan apoptotik etkileri çalışmaları ardından *BAX*, *BCL-2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genlerinin mRNA düzeylerinin nasıl değiştiğinin belirlenmesi amacıyla proteinlerin GenBank/EMBL veri bankaları taranarak seçilen genler için uygun primer dizileri belirlenmiştir.

Primer dizileri Sentebiolab firmasına 100 nmol skalada sentezlettilererek -20°C’de saklanmıştır. Kullanılan primerler Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2. 1: Proje kapsamında mRNA seviyelerine bakılacak proteinlerin primer dizileri ve bağlanma sıcaklıkları

Gen	PrimerSequence (5' 3')	AnnealingTemperature (°C)
BaxF	AGAGGATGATTGCCGCCGT	57.5
BaxR	CAACCACCCTGGTCTTGGATC	
Bcl-2F	TGCACCTGACGCCCTTCAC	62.5
Bcl-2R	AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG	
Caspase3F	GCA GCA AAC CTC AGG GAA AC	61
Caspase3R	TGTCGG CAT ACT GTT TCA GCA	
Caspase8F	TCTGGAGCATCTGCTGTCTG	60.5
Caspase8R	CCTGCCTGGTGTCTGAAGTT	
Caspase9F	GGCTGTCTACGGCACAGATGGA	59.2
Caspase9R	CTGGCTCGGGGTTACTGCCAG	
β –actinR	TCCTCCTGAGCGCAAGTACTC	59
β –actinF	CTGCTTGCTGATCCACATCTG	

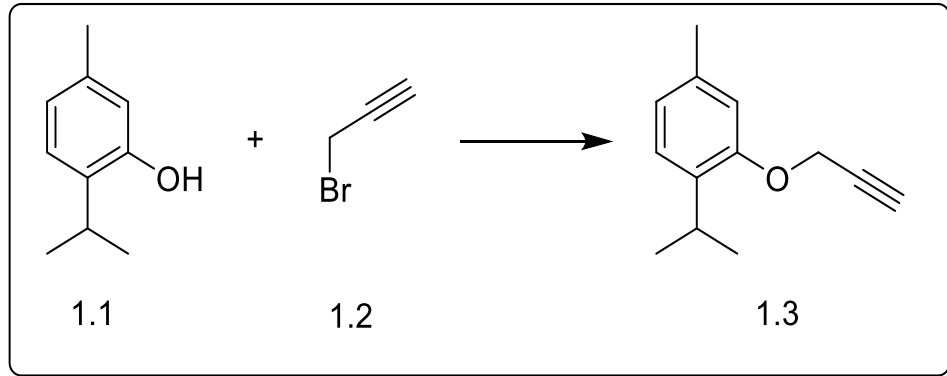
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Laminarflow kabini (Nüve MN120 Incubator), MajorScience MP-30V Güç kaynağı, Spektrofotometre(BiotekEpochmicroplate), Floresan mikroskop(Olympus BX53F), Floresan hücre sayacı (Arthur), -80 derin dondurucu(Nüve), Agaroz jel elektroforezi aparatı (Thermo, EC320), Mini-P25 Plate Santrifüj, Elektrikli Pipet Pompası(İSOLAB), Pzr cihazı, Gerçek zamanlı PZR cihazı(StepOnePlus™,) Soğutmalı Santrifüj, Otoklav, Biotek Take3 mikro RNA/DNA ölçüm cihazı, Etüv(Nüve EN055 inkübatör), Jel görüntüleme cihazı (gelLite), pH metre, Su banyosu, Vorteks (DragonLab), Otomatik mikropipet(İSOLAB), Deiyonize su cihazı, Mikrodalga fırın, Hassas terazi

2.2 Metot

2.2.1 1-izopropil-4-metil-2-(prop-2-in-1-iloksi) benzen sentezi

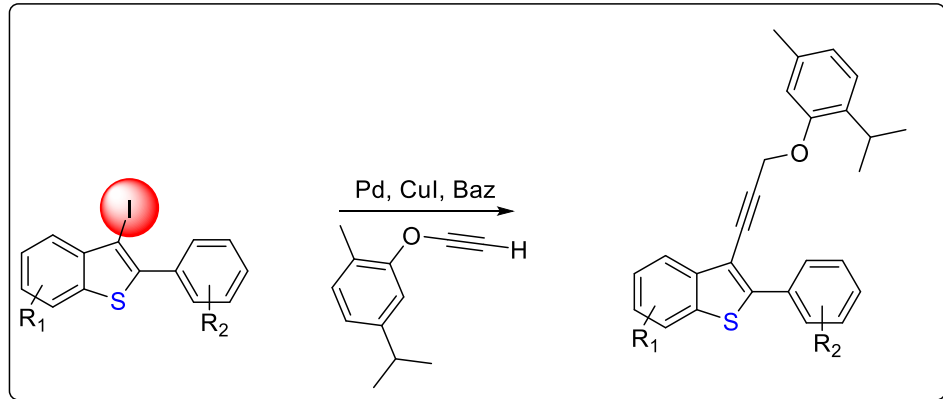
Timol (3 g, 19,97 mol) Dimetilformamid (15 mL) içerisinde oda sıcaklığında argon gazı altında çözüldü. Daha sonra karışıma potasyum karbonat (2.756 g, 19.97 mol) ve proparjil bromür (2.851 g, 23.26 mol) damla damla eklendi ve reaksiyon karışımı oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Reaksiyon karışımı üzerine Etil asetat (50 mL) ilave edildi. Organik faz doygun tuzlu su (3x20 mL) ile yıkandı ve kuru magnezyum sülfat ile kurutularak filtre edildikten sonra evaporatörde çözücü konsantre edildi. Saflaştırma işlemi kolon kromatografisisilica jel içerisinde hekzan/ Etilasetate (100/1) kullanılarak saflaştırıldı. Hedeflenen ürün % 93 verim ile türevlerin ana maddesi (AŞ-14) elde edildi (Şekil 2.1)



Şekil 2. 1:izopropil-4-metil-2-(prop-2-in-1-iloksi) benzen sentezi (AŞ-14)

2.2.2 Genel sentez yöntemi

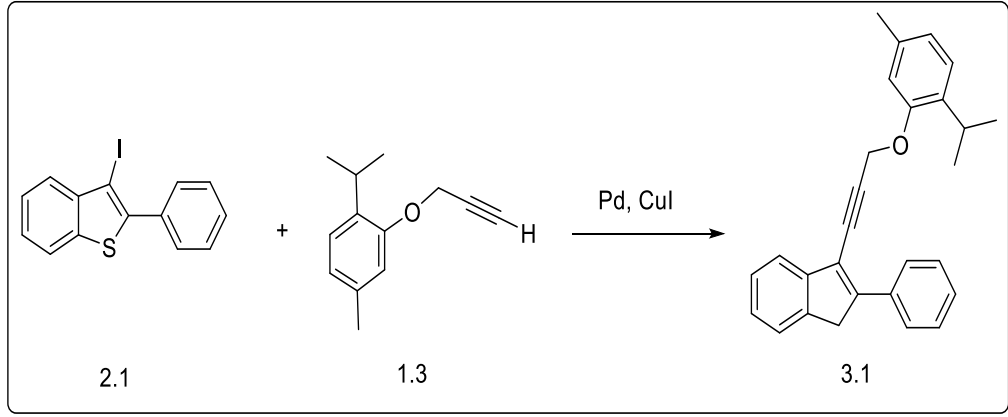
3-İyodo benzotiyofen (1 kat) Et₃N (10 mL) ve THF (5mL) içerisinde argon inert ortamında karıştırıldı. Daha sonra birincil alkin (1.2 kat), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (%2), CuI (%1) eklendi ve geri soğutucu düzeneği yardımıyla 90 °C de 24 saat bekletilerek tepkime gerçekleştirildi. Tepkime ince tabaka kromatografisi (İTK) ile kontrol edildi. Başlangıç maddeleri tamamen bittikten sonra, 50 ml Etilasetat eklendi ve tuzlu su (30 mL x 3) ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Organik faz MgSO₄ kurutuldu, filtre edildikten sonra ve düşük vakum altında organik çözücü uzaklaştırıldı. Kolon kromatografisi yöntemi ile ürün izole edildi (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Genel sentez yöntemi

2.2.3 3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi)prop-1-in-1-il)-2-fenil-1H-inden sentezi(AŞ-1)

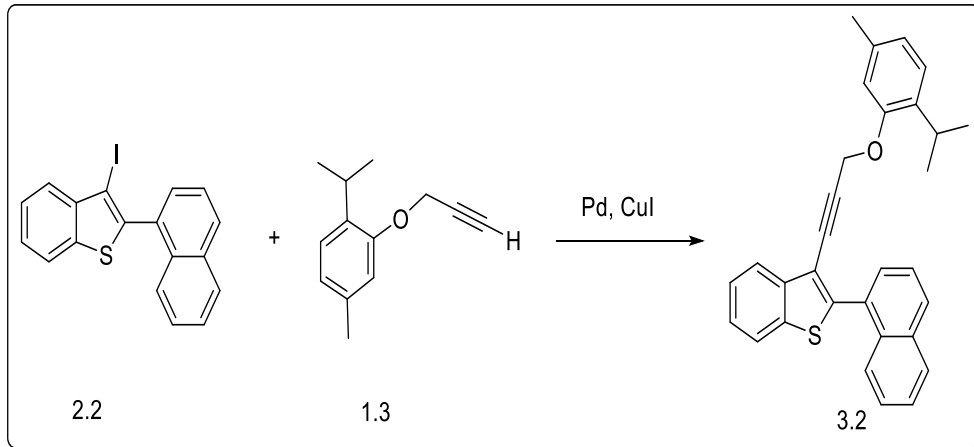
3-metil-2-fenilbenzo[b]tiyofen(2.1) (0.14mmol, 50 mg), 1-izopropil-4-metil-2-(prop-2-in-1-iloksi)benzen (1.3) (0.17mmol, 34 mg), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.007mmol, 5 mg), CuI (0.0028 mmol, 1 mg), THF (5 mL) ve Et₃N (10mL) tepkimede kullanıldı ve Hekzan/Etilasetat (100/1) çözücü sistemi kullanılarak,%72 verim ile timol-benzotiyofen türevi (AŞ-1) elde edildi (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3: 3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi) prop-1-in-1-il)-2-fenil-1H-inden sentezi

2.2.4 1-(3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi) prop-1-in-1-il)-1H-inden-2-il) naftalen sentezi

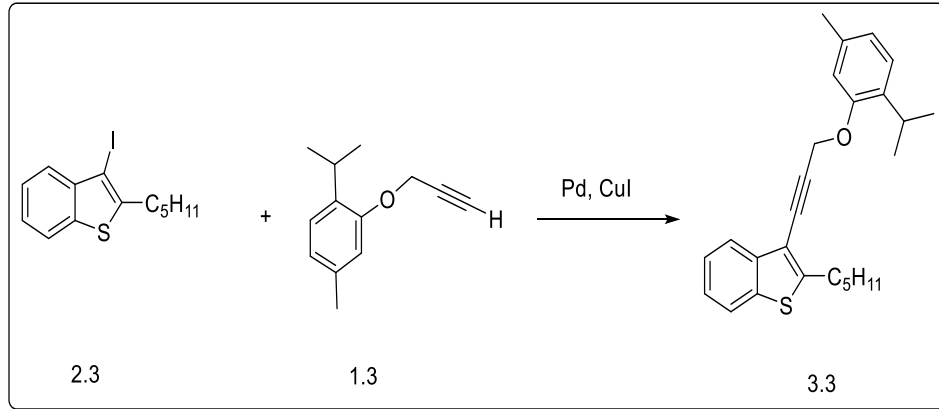
3-iyodo-2-(naftalen-1-il) benzo[b]tiyofen(2.2) (0.12mmol, 50 mg), 1-izopropil-4-metil-2-(prop-2-in-1-iloksi)benzen (1.3) (0.15 mmol, 30 mg), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.006mmol, 4 mg), CuI (0.0022mmol, 1 mg), THF (5 mL) ve Et₃N (10 mL) tepkimede kullanıldı ve Hekzan/Etilasetat (100/1) çözücü sistemi kullanılarak,%70 verim ile timol-benzotiyofen türevi (AŞ-2) elde edildi (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4: 1-(3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi) prop-1-in-1-il)-1H-inden-2-il) naftalen sentezi

2.2.5 3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi)prop-1-in-1-il)-2-pentil-1H-inden sentezi

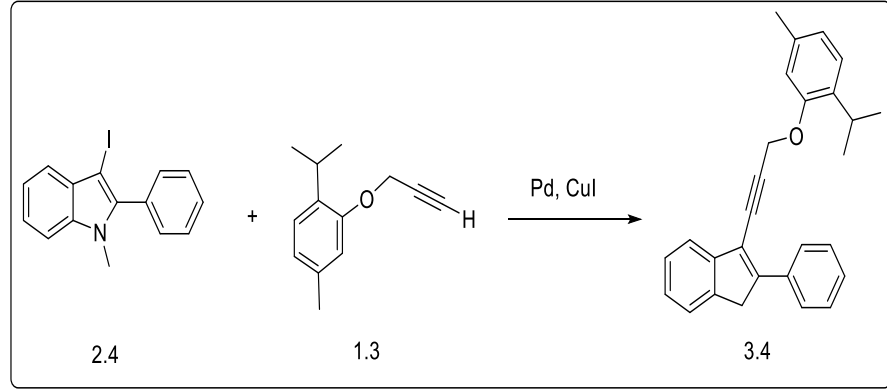
3-iyodo-2-pentilbenzo[b]tiyofen(2.3) (0.30 mmol, 100 mg), 1-izopropil-4-metil-2-(prop-2-in-1-iloksi)benzen (1.3) (0.36 mmol, 68 mg), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.0035mmol, 10 mg), CuI (0.006mmol, 2 mg), THF (5 mL) ve Et₃N (10 mL) tepkimede kullanıldı ve Hekzan/Etilasetat (100/1) çözücü sistemi kullanılarak,%73 verim ile timol-benzotiyofen türevi (AŞ-5) elde edildi (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5: 3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi)prop-1-in-1-il)-2-pentil-1H-inden sentezi

2.2.6 3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi)prop-1-in-1-il)-1-metil-2-fenil-1H-indol sentezi

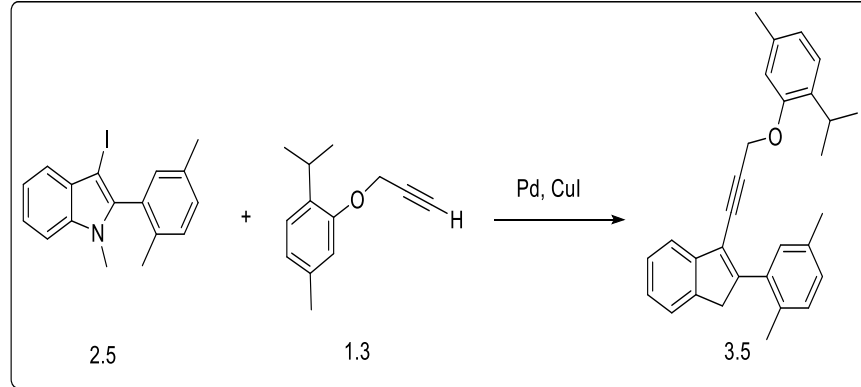
3-iyodo-1-metil-2-fenil-1H-indol (2.4) (0.30 mmol, 100 mg), 1-izopropil-4-metil-2-(prop-2-in-1-iloksi) benzen (1.3) (0.37mmol, 68 mg), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.0035 mmol, 10 mg), CuI (0.006 mmol, 2 mg), THF (5 mL) ve Et₃N (10 mL) tepkimede kullanıldı ve Hekzan/Etilasetat (100/1) çözücü sistemi kullanılarak,%69 verim ile timol-indol türevi (AŞ-6) elde edildi (Şekil 2.6).



Şekil 2. 6: 3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi)prop-1-in-1-il)-1-metil-2-fenil-1H-indol sentezi

2.2.7 2-(2,5-dimetilfenil)-3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi)prop-1-in-1-il)-1H-inden sentezi

2-(2,5-dimetilfenil)-3-iyodo-1-metil-1H-indol (2.5) (0.39 mmol, 150 mg), 1-izopropil-4-metil-2-(prop-2-in-1-iloksi) benzen (1.3) (0.48mmol, 90 mg), PdCl₂(PPh₃)₂ (0.0019mmol, 15 mg), CuI (0.0078 mmol, 3 mg), THF (5 mL) ve Et₃N (10 mL) tepkimede kullanıldı ve Hekzan/Etilasetat (100/1) çözücü sistemi kullanılarak % 67 verim ile timol-indol türevi (AŞ-7) elde edildi (Şekil 2.7).



Şekil 2. 7: 2-(2,5-dimetilfenil)-3-(3-(2-izopropil-5-metilfenoksi)prop-1-in-1-il)-1H-inden sentezi

2.2.8 Hücre Kültürü

Çalışmamızda İnsan akciğer karsinoma (A549), insan prostat karsinoma (LnCap), insan kolorektal adenokarsinom (Caco-2) ve insan meme adenokarsinoma (MCF-7) ve kontrol kanserli olmayan insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) gibi farklı hücre hatları kullanıldı. Hücreler %10 Fetal, %1 penisilin ve streptomisin, sığır serumu (FBS) 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 kültürlendi. 100mm'lik kültür plakalarındaki kültürlenmiş kanser hücre hatları (konfluent en az %80) 2-3 günde pasajlama işlemi yapıldı. Hücre besiyeri ortamdan uzaklaştırılır ve 1ml PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) kalan serumdan uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler tripsin-EDTA (1mL) eklendi ve enzimin aktif çalıştığı 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem koşullarında 2-3 dakika inkübe edildi. Tripsin- EDTA inhibe etmek için (en az 2 katı) 2 mL besiyeri eklenerek hücreler 15 mL falkon tüplere toplandı. Hücre süspansiyonu 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra 1 mL taze besiyeri ile pelet çözüldü. 100mm'lik plakalara taze besiyeri yaklaşık 10 mL eklendi ve hücre ekimi yapıldıktan sonra 37 °C, %5 CO₂ içeren inkübatörde büyümeye bırakıldı.

2.2.9 Hücre Stoklama

Kültür plakalarındaki hücreler en az %80 konflüente ulaştıktan sonra besiyeri uzaklaştırıldı. PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkanarak kalan serumdan uzaklaştırıldı. Hücreler tripsinin aktivite gösterdiği 37°C'de 2-3 dakika inkübe edilmiştir. Hücreler tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeriyle inhibe edilmiştir. Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirildikten sonra bir falkon tüpe aktarılmıştır. Hücre süspansiyonu 2000rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1 ml besiyerinde çözdükten sonra %70 (700µL) hücre süspansiyonu, %20 FBS (200µL), %10 DMSO (100µL) olacak şekilde kriyoviale ilave edildi ve -80°C'de saklandı.

2.2.10 Hücre Sayımı

Hücreler toplandıktan sonra 1:1 oranında %0,4'lük tripan mavi boyası ile süspanse edildi. Tripan mavi boyası ile ölü hücrelerin hücre membranını boyayarak canlı hücre sayısının hesaplaması invert mikroskop (OxionInverso, Euromex, Hollanda) kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre sayımı hesaplamak için aşağıda verilen formül kullanılmıştır.

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

2.2.11 MTT ile Hücre Canlılık Testi

Konsantrasyonları hazırlanan benzotiyofen-timol ve indol-timol türevlerinin sitotoksosite analizleri için hücreler tripsin-EDTA ile kaldırıldıktan sonra 96 kuyucuklu plakalara, her kuyucuğa 10^3 hücre olacak şekilde (son hacim $100\mu\text{l}$) ekim yapıldı ve $37\text{ }^\circ\text{C}$, %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Negatif kontrol olarak DMSO (0.75 % den az) kullanıldı. 24 saat inkübasyondan sonra belirlenen konsantrasyonlar ($3.125\text{-}250\mu\text{g/mL}$) son hacim $200\mu\text{l}$ olacak şekilde uygulandı. 24 saat inkübe edildikten sonra MTT ile hücre canlılığı analiz edildi. Besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra her kuyuya $100\mu\text{L}$ taze besiyeri ve $10\mu\text{l}$ MTT (0.5mg/mL) solüsyonu uygulandı. $37\text{ }^\circ\text{C}$, %5 CO_2 içeren inkübatörde 4 saat boyunca inkübe edildi. Ardından MTT solüsyonu uzaklaştırıldı ve her kuyu için $50\mu\text{L}$ DMSO eklendi. 590 nm dalga boyunda EpochMikroplaka okuyucu ile (BioTek, ABD) ölçüldü ve EC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Bu bağlamda hiç timol ve türevleri ile muamele edilmeyen negatif kontrol grubu, benzotiyofen-timol ve indol-timol ile muamele edilen gruplar ile karşılaştırılarak değişik dozlardaki timol ve türevlerinin hücre canlılığına olan etkisi saptanmıştır.

2.3 Apoptoz Analizi

AŞ1 ve AŞ7 bileşiğinin uygulandığı A549, Caco-2, MCF-7, LNCaP hücrelerindeki sitotoksik aktivitesi sonucunda EC₅₀ değerleri hesaplandı. Ardından 6 kuyulu plakalara 3x10⁴ hücre ekildi ve 37°C’de %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübasyona bırakıldı. Bileşiklerin hesaplanan EC₅₀ dozları uygulandı. 37 °C, %5 CO₂, %95 nem içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyerleri uzaklaştırıldı ve PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) yıkanarak kalan serumdan uzaklaştırıldı. Tripsin-EDTA ile 2-3 dakika inkübe edildikten sonra en az 2 katı kadar besiyeri eklenerek hücreler epondorfa alındı. 2000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Apoptoz tayini için FITC Annexin V Apoptoz Kiti (BioLegend, ABD) kullanıldı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 5 µL FITC Annexin V ve 10 µL Propidium İyodür (PI) eklendi ve 15 dakika karanlıkta oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Ardından her tüpe 400 µL Annexin V BindingBuffer eklendi ve örnekler slayta yüklenerek Arthur Floresans Hücre Analiz Sistemi (NanoEntek, ABD) kullanılarak analiz edildi. Her hücre için negatif kontrol DMSO, pozitif kontrol olarak H₂O₂ (Hidrojen peroksit) kullanılmıştır.

2.4 mRNA Düzeyinde Gen Ekspresyonunun Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) ile Tespit Edilmesi

2.4.1 Total RNA izolasyonu

Apoptoza yolaklarında 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 AŞ1 VE AŞ7 maddelerin en etkin dozları (EC₅₀) uygulandı. 24 saat 37 °C, %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra PBS tamponu ile yıkandı. Ardından 400 µL Lysisbuffer ile hücreler epondorfa toplandı. 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücrelerin lizis aşamasından sonra mavi halkalı filtre D kolonuna yüklenerek 11.000’de 2 dakika santrifüj edildi. Filtre D atıldı ve 400 µl’liklizatın üzerine 400 µl %75’lük etanol eklenerek up-down yapıldı ve mor halkalı filtre R kolonuna yüklendi.

11.000 rmp'de 2 dakika santrifüj edildi. Alt tüp değiştirildikten sonra filtre R kolonuna etanol içeren yıkama solüsyonu (HS) 500µl eklendi ve 11.000 rmp'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon tekrar (LS) yıkama solüsyonu ile mumamele edildikten sonra 40µlRnase-free su ile elüsyon yapıldı. Total RNA izolasyonu EpochMikroplaka Okuyuculu Spektroskopi cihazı ile Take-3 aparatı kullanılarak 260/280 nm'de ölçülmüştür. RNA miktarı belirlendikten sonra -80C'de saklandı.

2.4.2 Agaroz jel elektroforez

İzole edilen RNA örneklerinin belirlenmesi için 1X Tris Asetik Asit EDTA (40 mM Tris, 20 mM Asetik Asit, 1 mM EDTA, pH:8.0) tamponu kullanıldı. 0,4 gr agar tartılarak 40 ml TAE (Tris asetik asit EDTA) içerisinde mikrodalga ile ısıtılarak çözüldü. 0,75µl EtrBr (0,625 mg/ml) eklendi. Hazırlanan jel, elektroforez tankına dökülerek donması beklenmiştir. Elektroforez tankına 1X TAE eklendikten sonra örnekler jele yüklenip 90 Volt, 45 dakika, 500 mA'de yürütülmüştür. Kuyulara yüklenen örnek miktarları ve marker (abm 1kb plus Opti-DNA Marker) Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2. 2: RNA ve Marker Konsantrasyonları

RNA	Marker
5 µl RNA örneği	6 µl DNA Marker
2 µl 6x yürütme boyası	2 µl 6x yürütme boyası
1 µl dH ₂ O	2 µl dH ₂ O
Toplam 8 µl kuyulara yüklenir	Toplam 5 µl kuyulara yüklenir

2.4.3 cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA örnekleri OnceScript Plus cDNA Sentez Kiti (abm, Canada) kullanılarak sentezlenmiştir. Total RNA örnekleri Tablo 2.3’de gösterildiği gibi reaksiyon kurulmuştur.

Tablo 2.3: Total RNA-cDNA Denatürasyon Ortamı

Bileşenler	Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
RNA template	3µl	2,5µg/ml
Oligo(dT)	1µl	0.5 µM
dNTP Karışımı	1µl	500µM
RNAaz içermeyen su	9.5 µl	14.5µl

Total reaksiyon 14.5 tamamlandıktan sonra ilk aşama cDNA denatürasyonu için 65°C 5 dakika inkübe edildikten sonra 1 dakika buz üzerinde inkübe edildi.

Tablo 2.4: Total RNA-cDNA Reaksiyon Ortamı

Bileşenler	Miktar (µl)	Son Konsantrasyon
5X RT Tamponu	4µl	1X
Ribonükleaz İnhibitörü (40U/µl)	0.5µl	20U/rxn
ReverseTranskriptaz Enzimi (200U/µl)	1µl	200U/rxn

Yukarıdaki karışım hazırlandıktan sonra her bir örnek için 5.5µl eklendi ve toplam reaksiyon 20µl tamamlandı. 50°C 60 dakika ve ardından enzim aktivasyonunun inhibisyonu için 85°C 5 dakika inkübe edildi. cDNA örnekleri -20 derecede saklandı.

2.4.4 Real Time PCR (qRT-PCR) analizi

cDNA eldesi sonrası elde edilen örnekler KiloGreen 2X qPCRMasterMix kiti (abm,Canada) ve StepOnePlus™ Real-Time PZR cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Kantitatif Real Time PCR değerlendirilmesinde gen ekspresyonu housekeeping gen olan GAPDH göre hesaplanmıştır. Tüm örnekler duplike olarak çalışıldı. Amplikasyon sonucunda Ct (threshold) değerleri çalışılan 6 gen için mRNA düzeyinde ekspresyon değişimleri analiz edilmiştir. Apoptoz yolları ile ilişkili olan genler Tablo 2.5’de verilmiştir. Hedef genlerin mRNA ekspresyon seviyeleri $\Delta\Delta Ct$ metoduna göre belirlenmiştir.

Tablo 2.5: Apoptoz yolağındaki ilişkili genler

<i>CASP3</i>	<i>CASP8</i>
<i>BAX</i>	<i>CASP9</i>
<i>BCL-2</i>	

2.4.5 İstatistik Analiz

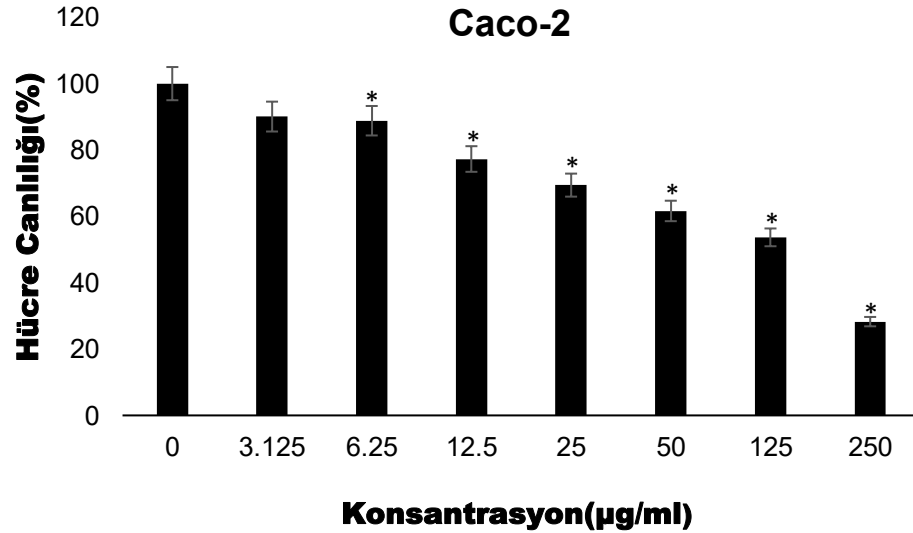
Tüm deneyler en az üç kez tekrar edildi. Veriler, *SPSS 20.0* programı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak gösterildi ve farklar one-way ANOVA, two-way ANOVA, student-t testi kullanılarak ölçüldü. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ 'te kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1 Sitotoksisite Analizi

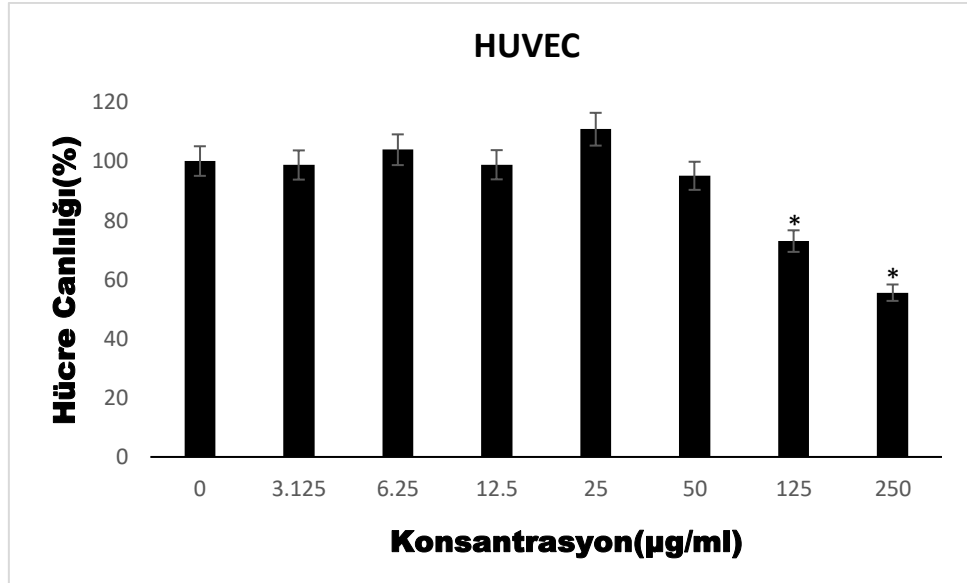
Yeni benzotiyofen-timol ve indol-timol hibrid moleküllerinin Caco-2, A549, MCF-7, LNCaP hücre hatlarında belirlenen doz aralıklarının da (3.125-250 µg/ml) ve 24 saat diliminde hücre canlılığı incelenmiştir. Kontrol hücre hattı olarak kanserli olmayan Huvec kullanılmıştır.

Caco-2 hücre hattına uygulanan AŞ1 bileşiği sonrası Şekil 3.1’de görüldüğü gibi hücre canlılığı konsantrasyona bağlı olarak azalma görülmüştür. AŞ1’in 50µg/ml konsantrasyondan sonra hücre canlılığı %50’ye yaklaşmıştır. AŞ1 bileşiği ile muamele edilen Caco-2 hücre hattında hücre canlılığı analizinde etken maddenin uygulanan hücre hattına olan %50’lik bir etkiyi ifade eden EC₅₀ değeri; 111,38µg/ml olarak hesaplanmıştır.



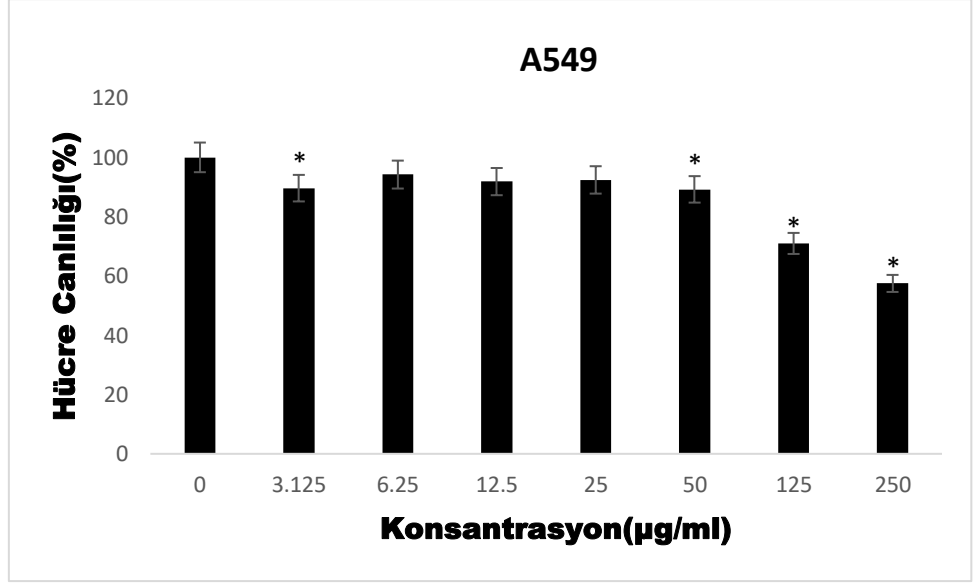
Şekil 3. 1: Caco-2 hücre hattı üzerinde AŞ1 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün ± SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

Huvec hücre hattına 24 saat boyunca uygulanan AŞ1 bileşiği, düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerinde çok daha yavaş sitotoksik etki göstermiştir. Yüksek konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı %50'ye yaklaşmıştır. AŞ1 bileşiği ile muamele edilen Huvec hücre hattında hücre canlılığı analizinde EC₅₀ değeri 244,187 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.2).



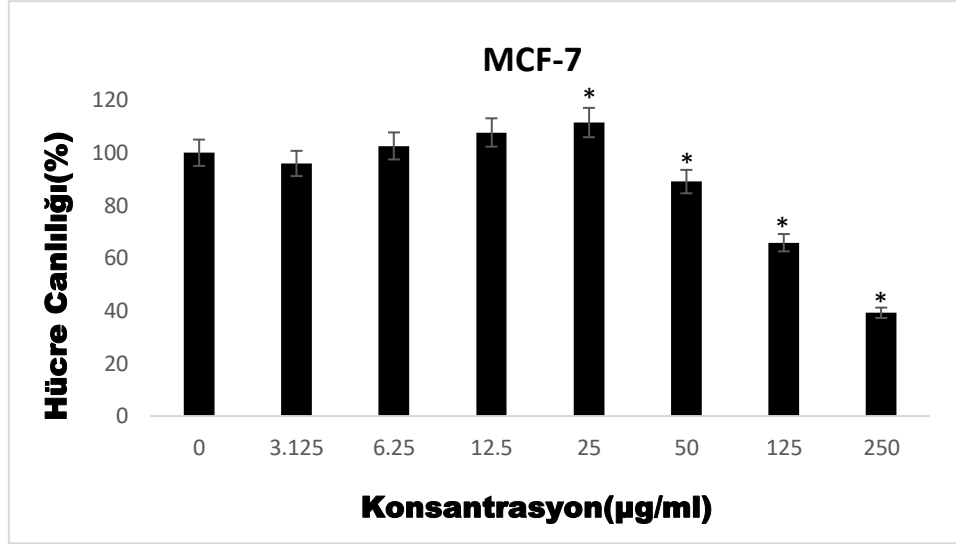
Şekil 3. 2: Huvec hücre hattı üzerinde AŞ1 maddesinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Şekil 3.3'de görüldüğü üzere A549 hücre hattına uygulanan AŞ1'in hücre canlılığı üzerinde yüksek konsantrasyona bağlı bir azalma saptanmıştır. 24 saat boyunca AŞ1 ile muamele edilen A549 hücre hattında hücre canlılığı analizinde EC₅₀ değeri; 321,16µg/ml olarak hesaplanmıştır.



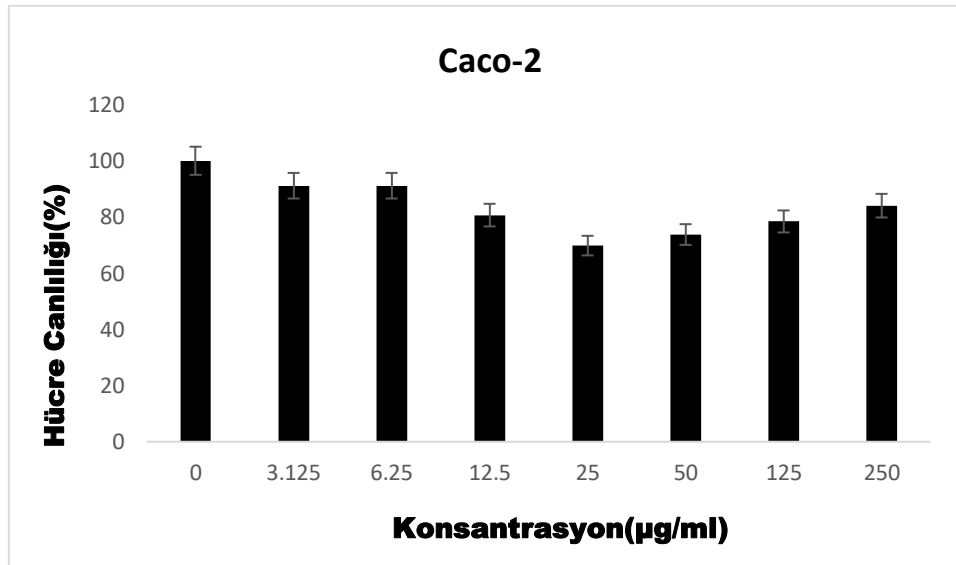
Şekil 3. 3: A549 hücre hattı üzerinde AŞ1 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Şekil 3.4’de görüldüğü üzere Mcf-7 hücre hattı üzerinde yüksek doz uygulanan gruplarda hücre canlılığı, düşük dozlara kıyasla ciddi bir düşüş göstermiştir. AŞ1 bileşiği ile muamele edilen Caco-2 hücre hattında hücre canlılığı analizinde EC_{50} değeri 123,84 µg/ml olarak hesaplanmıştır.



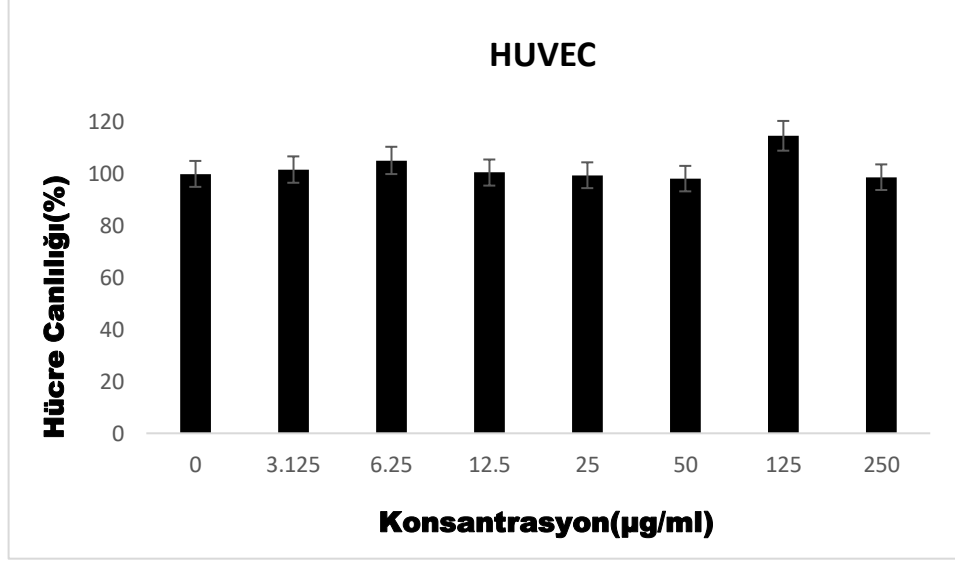
Şekil 3. 4: MCF-7 hücre hattı üzerinde AŞ1 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

Şekil 3.5’de görüldüğü üzere AŞ2 bileşiği ile muamele edilen Caco-2 hücre hattında hücre canlılığı %70’den fazladır.



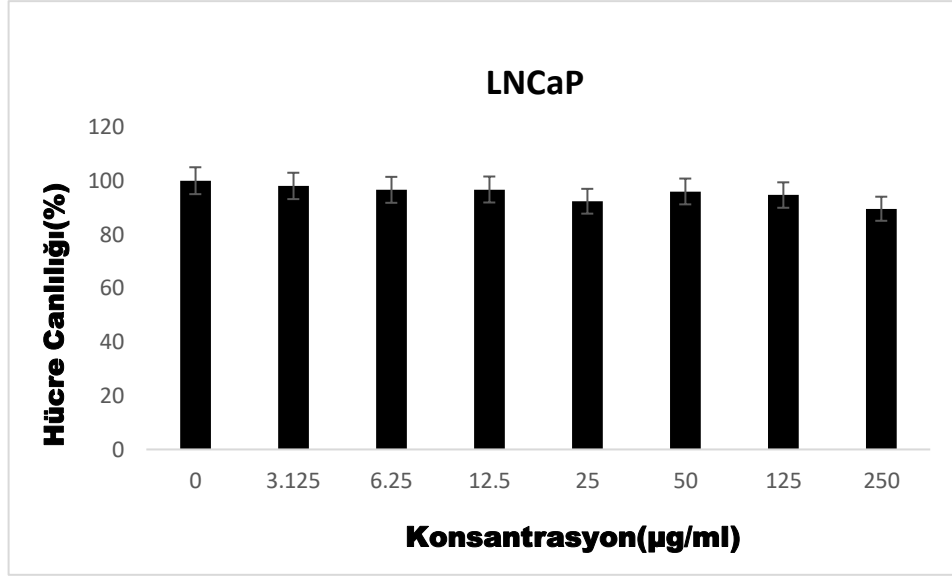
Şekil 3. 5: Caco-2 hücre hattı üzerinde AŞ2 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

Şekil 3.6’da görüldüğü üzere AŞ2 bileşiği ile muamele edilen Huvec hücre hattında sitotoksik etkisi çok düşüktür. AŞ2 bileşiği normal hücreler üzerinde toksik etki göstermemiştir.



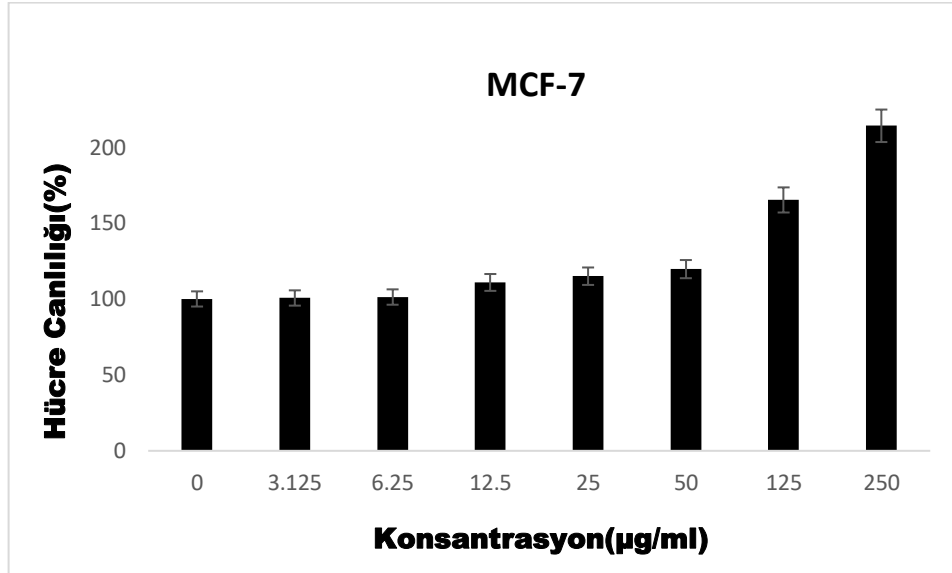
Şekil 3. 6: Huvec hücre hattı üzerinde AŞ2 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Şekil 3.7’de görüldüğü üzere AŞ2 bileşiği ile muamele edilen LNCaP hücresi üzerinde sitotoksik etkisi çok düşüktür. Yüksek konsantrasyonda dahi hücre canlılığı %80’nin üzerindedir.



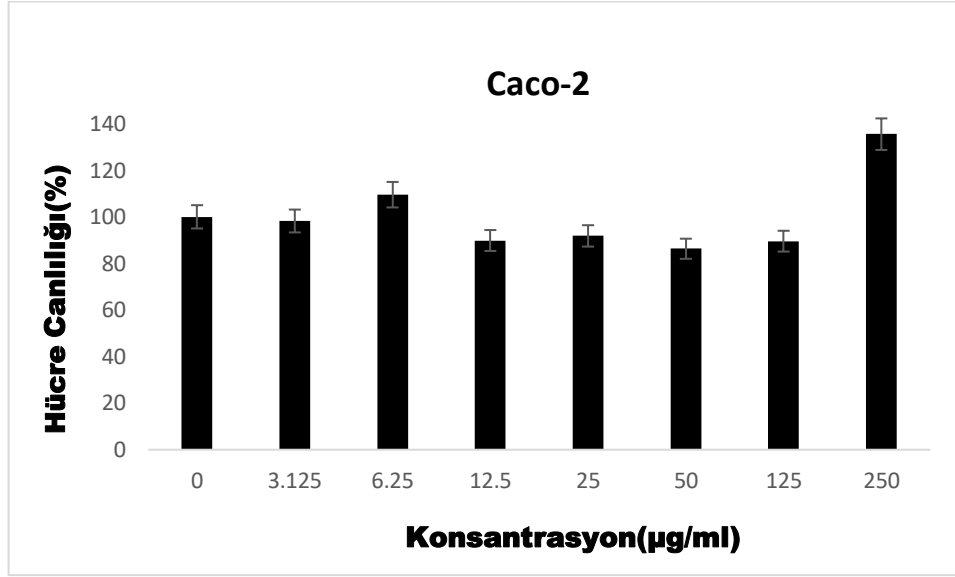
Şekil 3. 7: LNCaP hücre hattı üzerinde AŞ2 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

MCF-7 hücre hattına 24 saat boyunca uygulanan AŞ2 bileşiğinin hücre canlılığı üzerinde etkisi konsantrasyona bağlı olarak proliferasyon göstermiştir (Şekil 3.8).



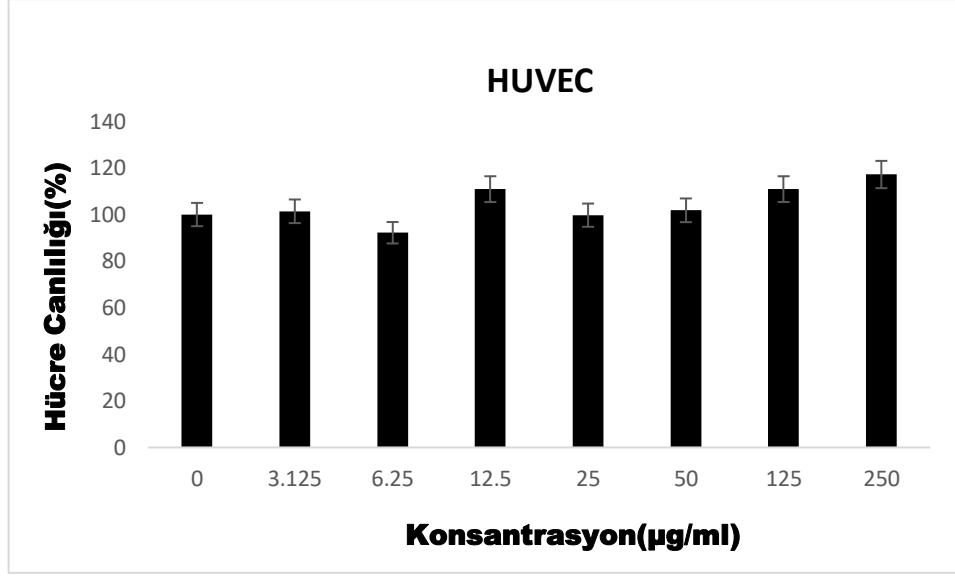
Şekil 3. 8: MCF-7 hücre hattı üzerinde AŞ2 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Şekil 3.9’da görüldüğü üzere AŞ5 bileşiği ile muamele edilen Caco-2 hücresi üzerinde sitotoksik etkisi çok düşüktür. Konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı %85’in üzerindedir.



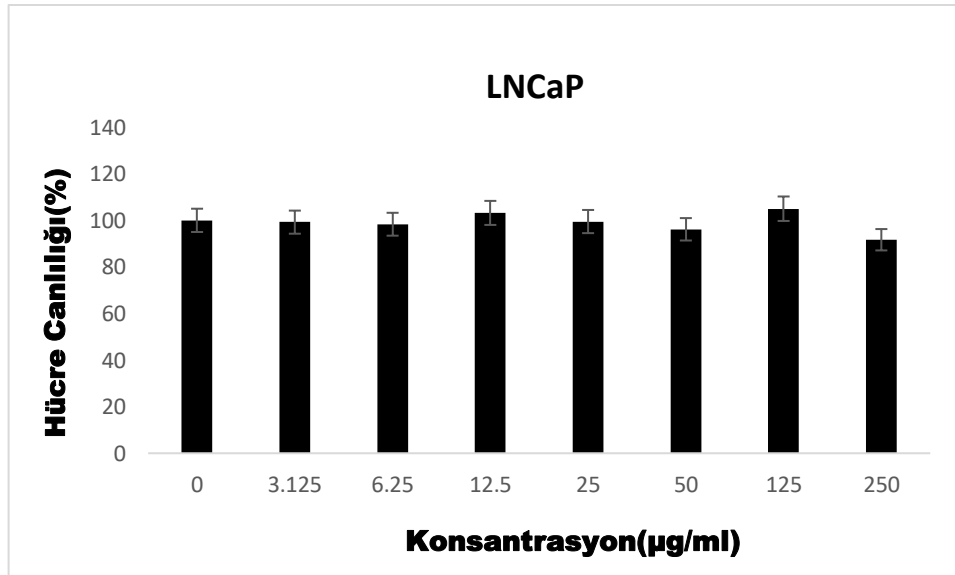
Şekil 3. 9: Caco-2 hücre hattı üzerinde AŞ5 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Şekil 3.10’da görüldüğü üzere AŞ5 bileşiği ile muamele edilen Huvec hücre hattında sitotoksik etkisi çok düşüktür. AŞ5 bileşiği normal hücreler üzerinde toksik etki göstermemiştir.



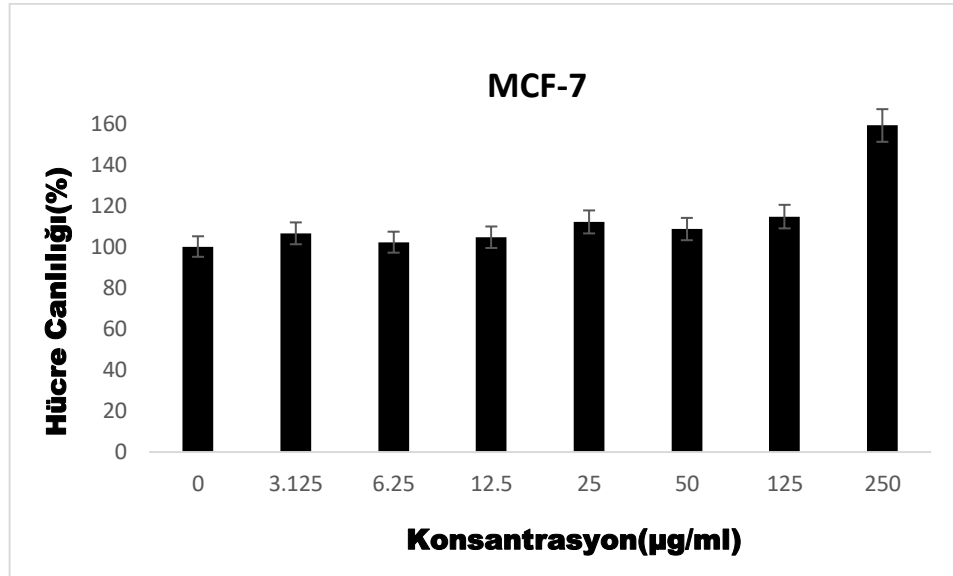
Şekil 3. 10: Huvec hücre hattı üzerinde AŞ5 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Şekil 3.11’de görüldüğü üzere AŞ5 bileşiği ile muamele edilen LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisi çok düşüktür. Yüksek konsantrasyonda bile hücre canlılığı %90’nın üzerindedir.



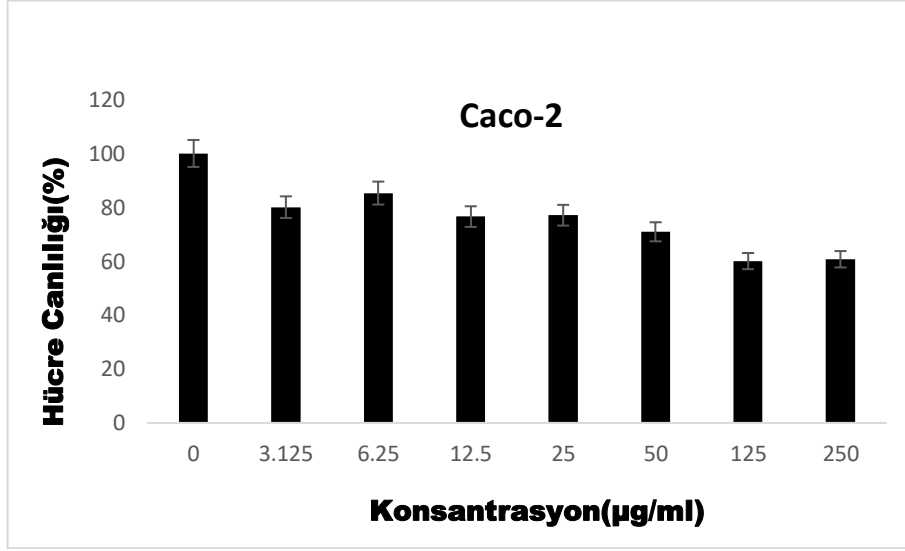
Şekil 3. 11: LNCaP hücre hattı üzerinde AŞ5 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

MCF-7 hücre hattına uygulanan AŞ5 bileşiği sonrası Şekil 3.12’de görüldüğü gibi hücre canlılığı konsantrasyona bağlı olarak proliferasyon göstermiştir.



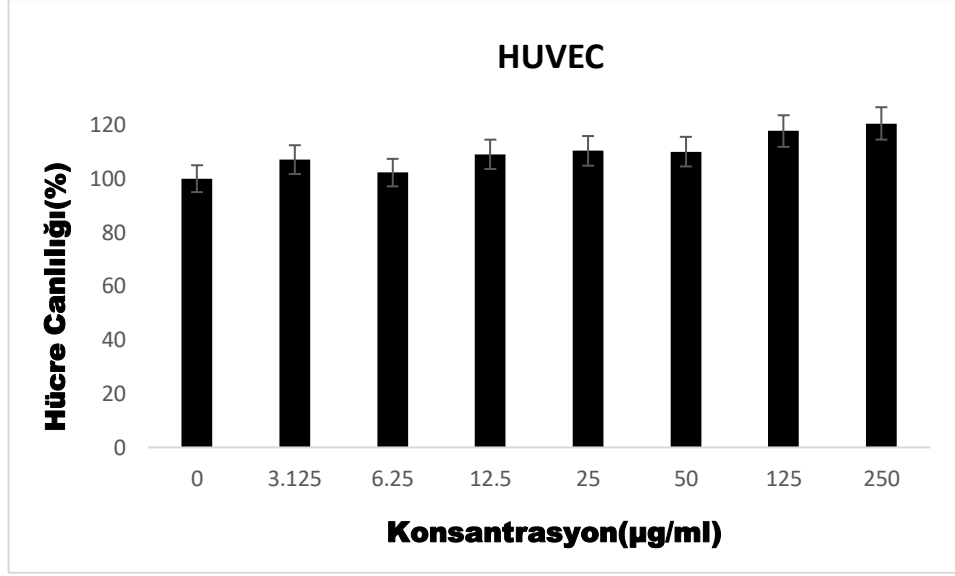
Şekil 3. 12: MCF-7 hücre hattı üzerinde AŞ5 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Şekil 3.13’de görüldüğü üzere AŞ6 bileşiği ile muamele edilen Caco-2 hücre hattında hücre canlılığı %60’dan fazladır.



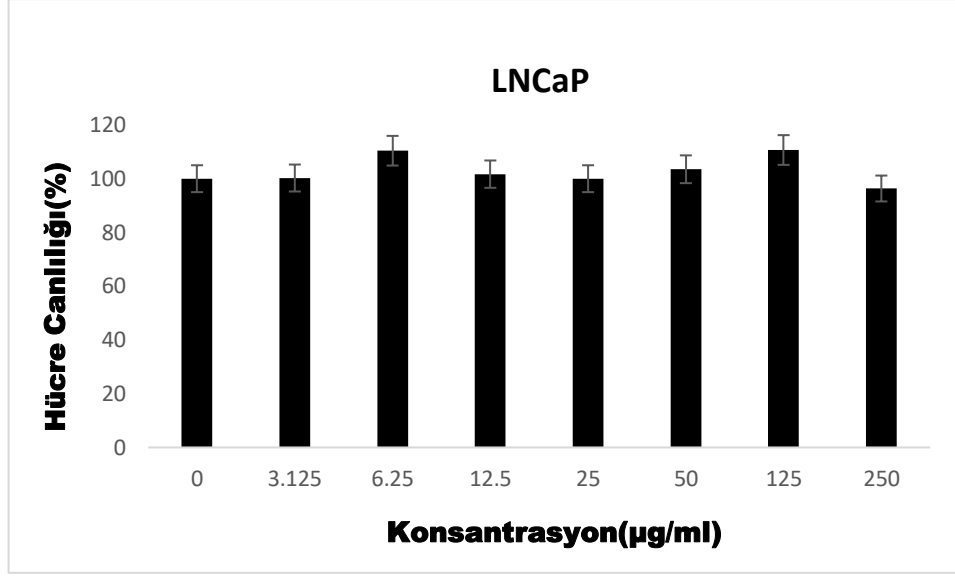
Şekil 3. 13: Caco-2 hücre hattı üzerinde AŞ6 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

Şekil 3.14’de görüldüğü üzere AŞ6 bileşiği ile muamele edilen Huvec hücre hattında sitotoksik etkisi çok düşüktür. AŞ6 bileşiği normal hücreler üzerinde toksik etki göstermemiştir.



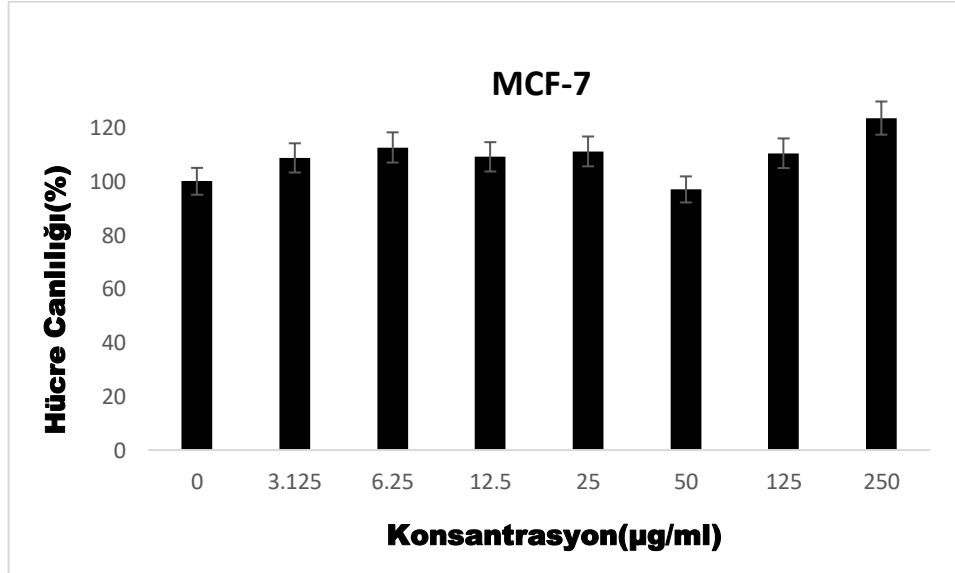
Şekil 3. 14: Huvec hücre hattı üzerinde AŞ6 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Şekil 3.15’de görüldüğü üzere AŞ6 bileşiği ile muamele edilen LNCaP hücre hattında sitotoksik etkisi çok düşüktür. Yüksek konsantrasyonda bile hücre canlılığı %95’in üzerindedir.



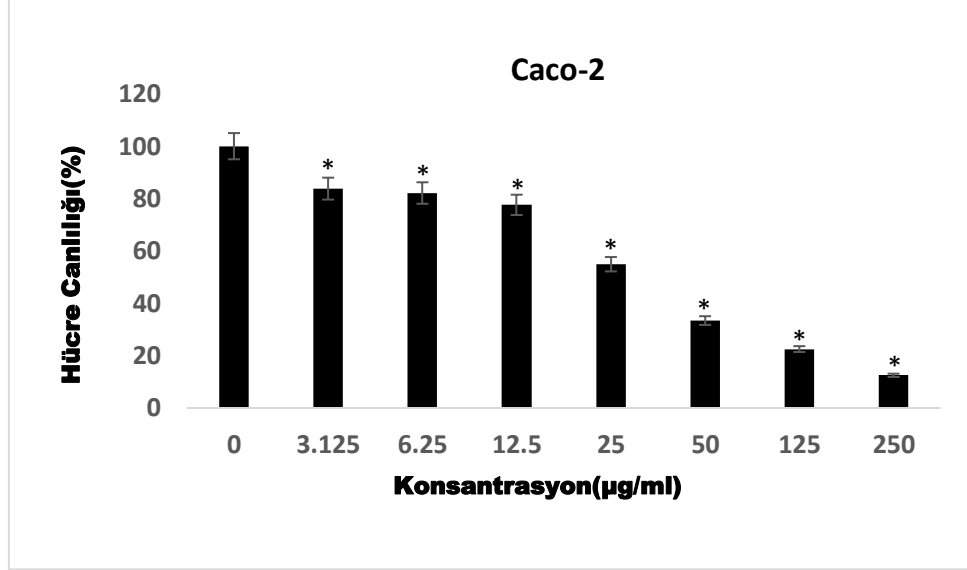
Şekil 3. 15: LNCaP hücre hattı üzerinde AŞ6 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

MCF-7 hücre hattına uygulanan AŞ6 bileşiği sonrası Şekil 3.16’da görüldüğü gibi hücre canlılığı düşük konsantrasyon da dahi proliferasyon göstermiştir.



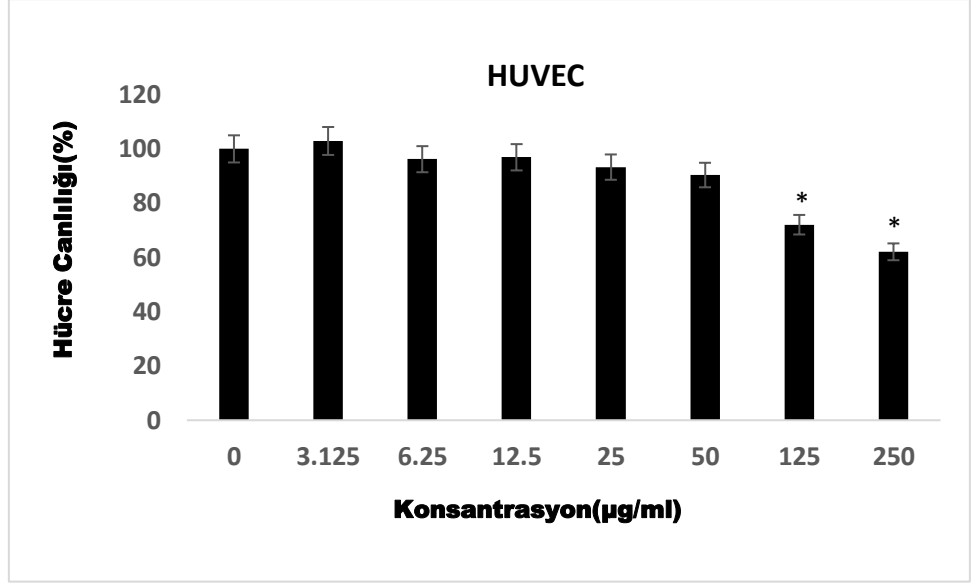
Şekil 3. 16: MCF-7 hücre hattı üzerinde AŞ6 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Caco-2 hücre hattına uygulanan AŞ7 bileşiği sonrası Şekil 3.17’de görüldüğü gibi düşük konsantrasyonlarda dahi hücre canlılığı azalmıştır. AŞ7 bileşiği ile muamele edilen Caco-2 hücre hattında hücre canlılığı analizinde EC₅₀ değeri; 32,60µg/ml olarak hesaplanmıştır.



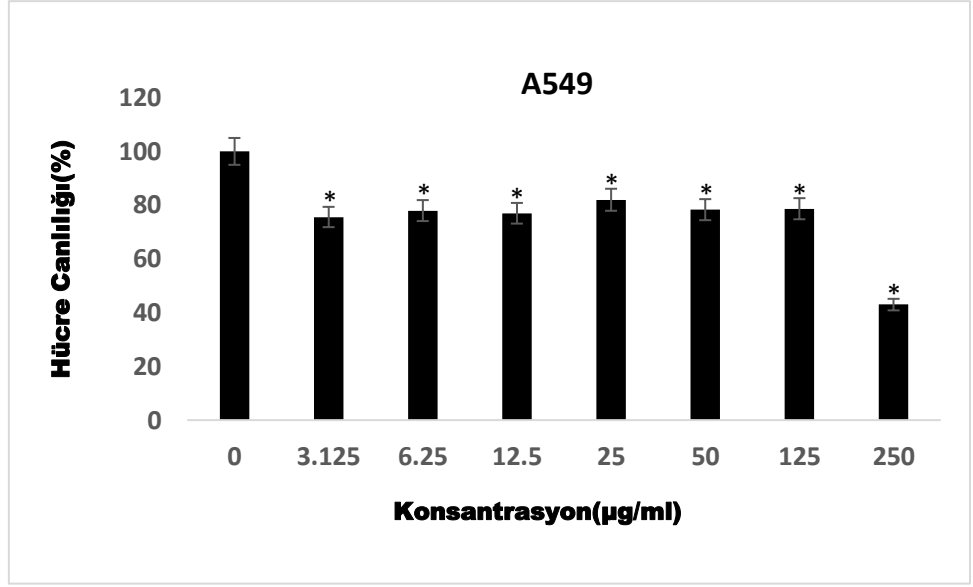
Şekil 3. 17: Caco-2 hücre hattı üzerinde AŞ7 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

Şekil 3.18’de görüldüğü üzere Huvec hücre hattına uygulanan AŞ7’in, hücre canlılığı üzerinde konsantrasyona bağlı bir azalış göstermiştir. 24 saat boyunca AŞ7 bileşiği ile muamele edilen Huvec hücre hattı hücre canlılığı analizinde EC₅₀ değeri; 339,3µg/ml olarak hesaplanmıştır.



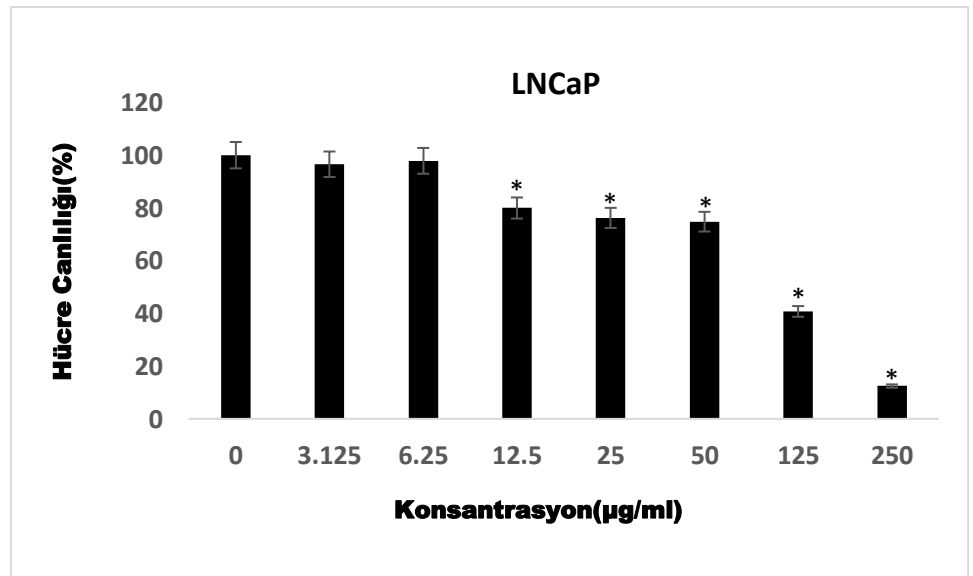
Şekil 3. 18: Huvec hücre hattı üzerinde AŞ7 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Şekil 3.19'da görüldüğü üzere A549 hücre hattına uygulanan AŞ7'in hücre canlılığı üzerinde yüksek konsantrasyona bağlı %50'ye yaklaşmıştır. 24 saat boyunca AŞ7 ile muamele edilen A549 hücre hattında hücre canlılığı analizinde EC_{50} değeri; 181,56µg/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3. 19: A549 hücre hattı üzerinde AŞ7 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

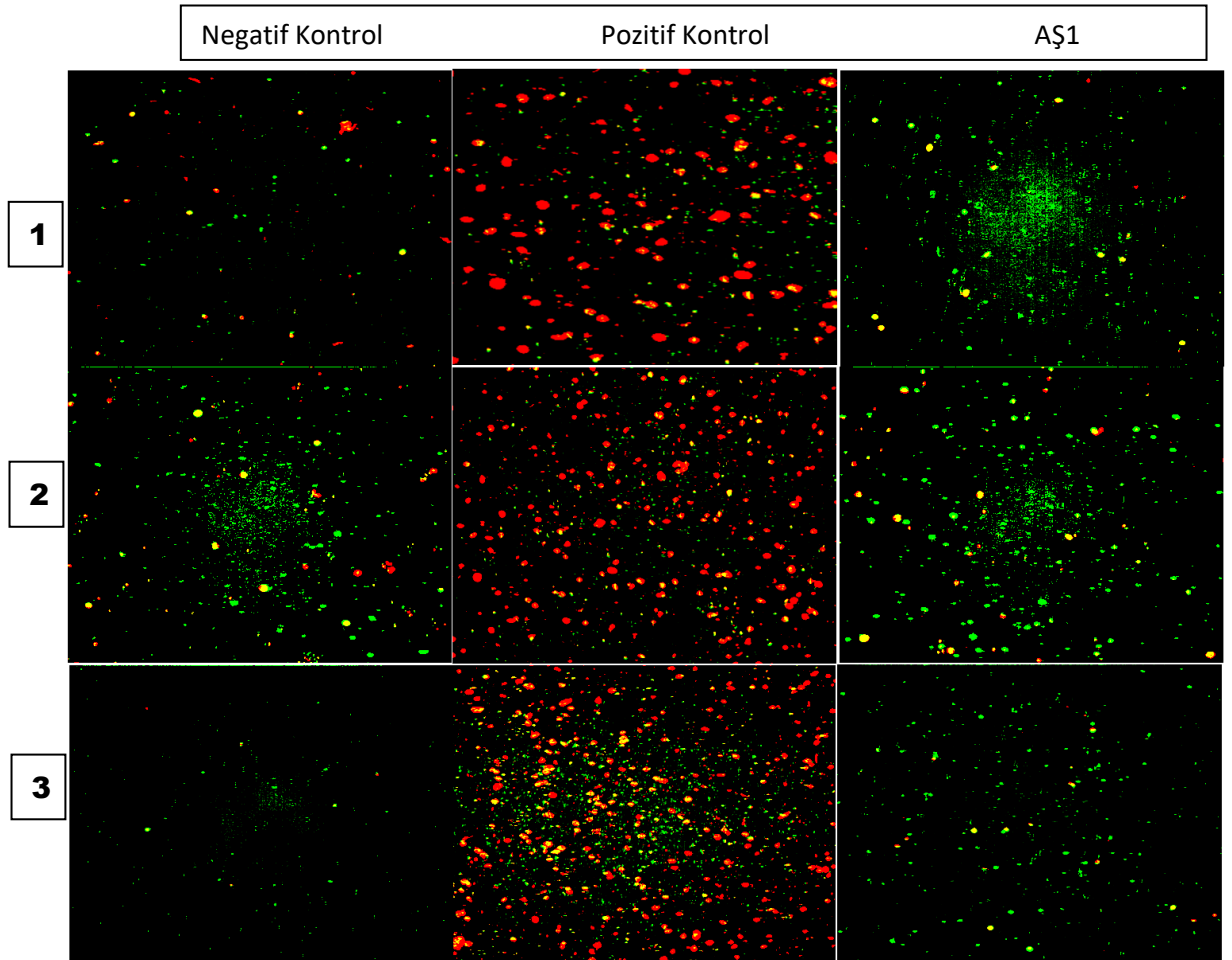
Şekil 3.20’de görüldüğü üzere konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığın üzerinde azalma saptanmıştır. 24 saat boyunca AŞ7 ile muamele edilen LNCaP hücre hattında hücre canlılığı analizinde EC₅₀ değeri; 89,28µg/ml olarak hesaplanmıştır.



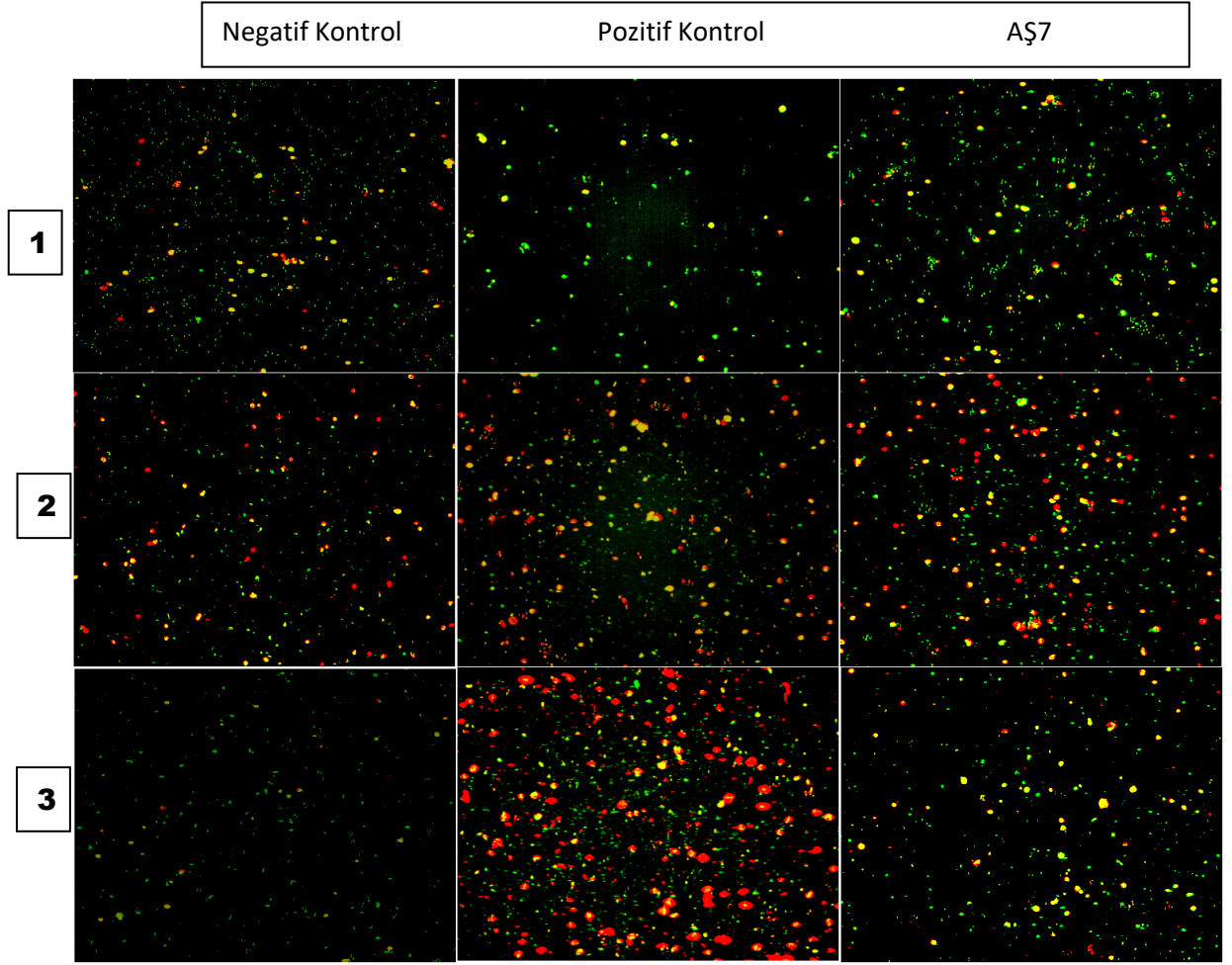
Şekil 3. 20: LNCaP hücre hattı üzerinde AŞ7 bileşiğinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Hücre canlılığı, MTT testi ile 24 saat boyunca analiz edildi. Sonuçlar 3 farklı çalışmanın duplike ölçümünün \pm SD değerleridir. Kontrol değerleri (0µg/ml) %100 alınmıştır. *: Kontrol grubundan farklı (p<0.05).

3.2 Apoptoz Analizi

Apoptotik değerlendirmeler için Caco-2, A549, MCF-7, LNCaP hücreleri 6 kuyulu plakalara 3×10^4 hücre ekilmiş, hücrelerinin çoğalması ve yapışması için 24 saat 37°C 'de %5 CO_2 içeren nemli ortamda inkübe edilmiştir. AŞ7 ve AŞ1 bileşiklerinin hesaplanan EC_{50} dozları farklı kanser hücre hatlarına uygulanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol DMSO, pozitif kontrol olarak Hidrojen peroksit (H_2O_2) son konsatrasyon $250\mu\text{m}$ olacak şekilde kullanılmıştır. Pozitif kontrol olan H_2O_2 'nin hücreler için apoptotik hücre ölümüne sebep olduğu bilinmektedir. Farklı kanser hücrelerinde sitotoksik aktivitesi güçlü olan AŞ1 ve AŞ7 hibridlerinin hücre ölümünde apoptozun iki ana yolağını; ekstrinsik (dış yolak) hem de intrinsik (mitokondriyal iç yolak) kullanarak apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur.

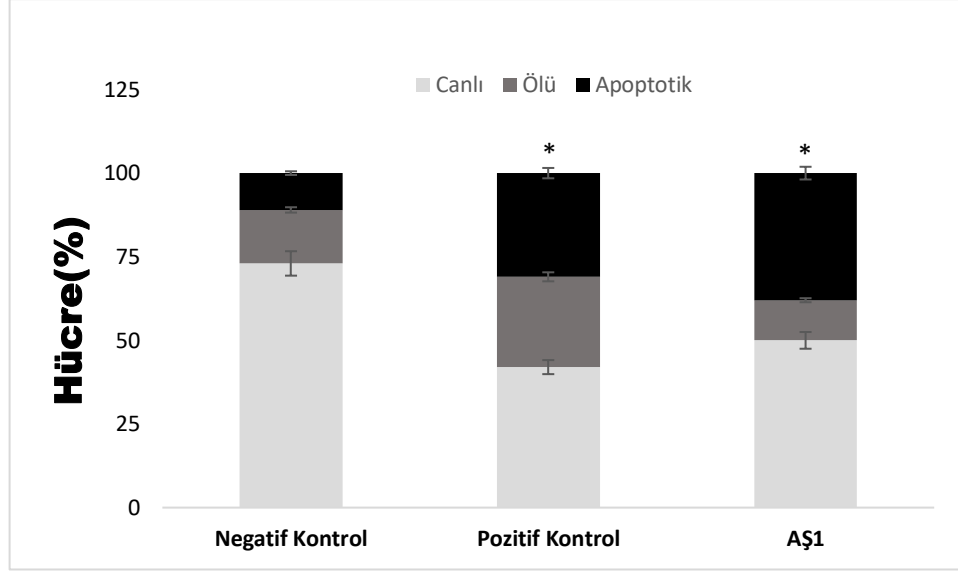


Şekil 3. 21: AŞ1 bileşiğinin 1: Caco-2, 2: A549, 3: MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptoz analizi görüntüsü. Annexin V-FITC (yeşil renk) ve Propidium Iodide (kırmızı renk) ile boyanmasıyla Arthur™ Görüntü Tabanlı Sitometre cihazı ile analiz edilmiştir.



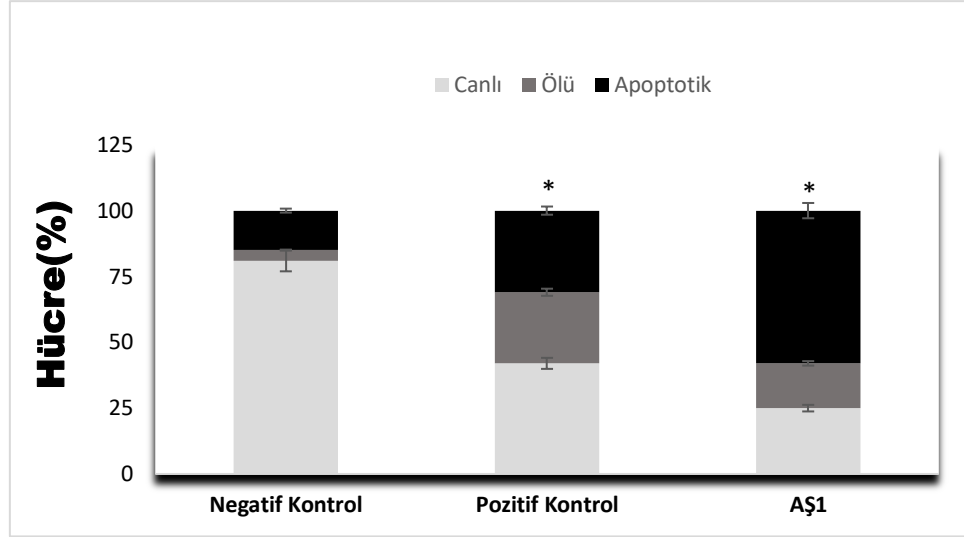
Şekil 3. 22: AŞ7 bileşiğinin 1: Caco-2, 2: A549, 3: LNCaP hücreleri üzerindeki apoptoz analizi görüntüsü. Annexin V-FITC (yeşil renk) ve Propidium Iodide (kırmızı renk) ile boyanmasıyla Arthur™ Görüntü Tabanlı Sitometre cihazı ile analiz edilmiştir.

Şekil 3.23’de gösterildiği gibi, 24 saat uygulamanın ardından Caco-2 hücre popülasyonlarından AŞ1 bileşiği uygulanan grubun %50’si canlı ve %12’si ölü, %38’i apoptotik olarak hesaplanmıştır. AŞ1 ile muamele edilen Caco-2 hücre hattında apoptotik hücre popülasyonunun oranı kontrole göre 3.45 kat artmıştır.



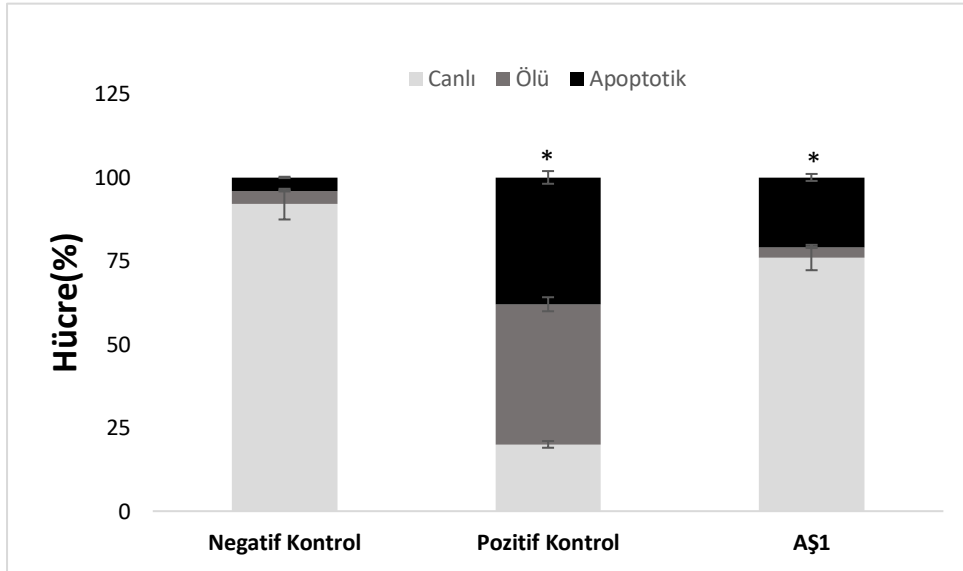
Şekil 3. 23: Caco-2 hücre hattı üzerinde AŞ1 bileşiğinin yüzde (%) canlı, ölü, apoptotik etkisi. Negatif kontrol (DMSO), pozitif kontrol olarak (H_2O_2) kullanılmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Şekil 3.24’de gösterildiği gibi, 24 saat uygulamanın ardından A549 hücre popülasyonlarından AŞ1 bileşiği uygulanan grubun %25’i canlı ve %17’si ölü, %58’i apoptotik olarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucun da AŞ1 bileşiği A549 hücre hattı üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkiye sahiptir. AŞ1 ile muamele edilen A549 hücre hattında apoptotik hücre popülasyonunun oranı kontrole göre 3.86 kat artış göstermiştir.



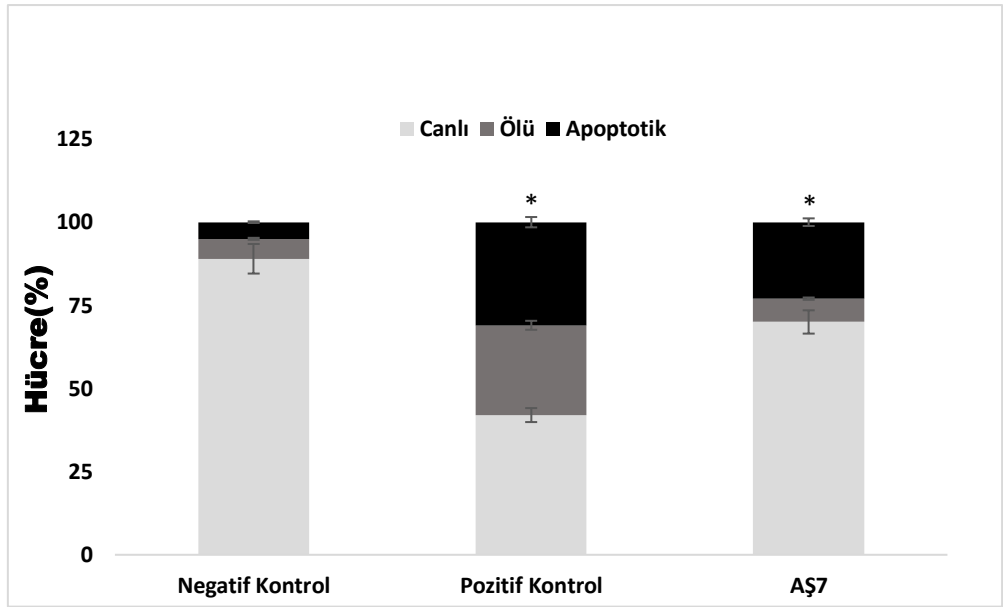
Şekil 3. 24: A549 hücre hattı üzerinde AŞ1 bileşiğinin yüzde (%) canlı, ölü, apoptotik etkisi. Negatif kontrol (DMSO), pozitif kontrol olarak (H_2O_2) kullanılmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

MCF-7 hücre popülasyonuna 24 saat AŞ1 bileşiği uygulanan grupta Şekil 3.25'de görüldüğü gibi %76'sı canlı ve %3'ü ölü, %21'i apoptotik olarak hesaplanmıştır. AŞ1 ile muamele edilen MCF-7 hücre hattında apoptotik hücre popülasyonunun oranı kontrole göre 5.25 kat artış göstermiştir.



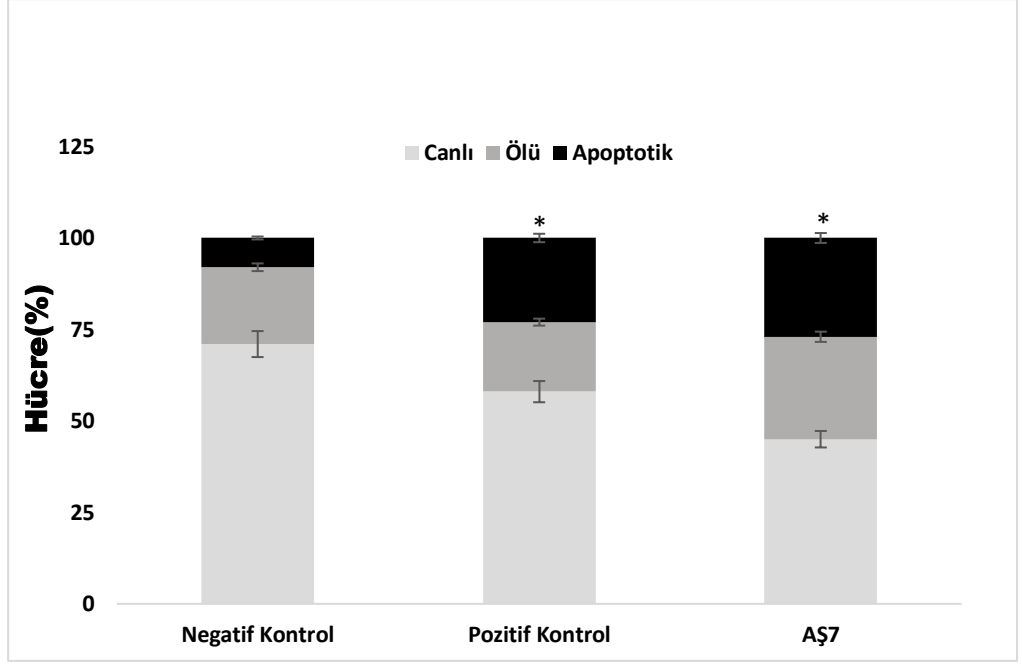
Şekil 3. 25: MCF-7 hücre hattı üzerinde AŞ1 bileşiğinin yüzde (%) canlı, ölü, apoptotik etkisi. Negatif kontrol (DMSO), pozitif kontrol olarak (H_2O_2) kullanılmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

Caco-2 hücre popülasyonuna AŞ7 bileşiğinin 24 saat uygulanması sonucu Şekil 3.26’da görüldüğü üzere %70’i canlı, %7’si ölü ve %23’ü apoptotik ölüme neden olduğu hesaplanmıştır. AŞ7 ile muamele edilen Caco-2 hücre hattında apoptotik hücre popülasyonunun oranı kontrole göre 4.6 kat artış göstermiştir.



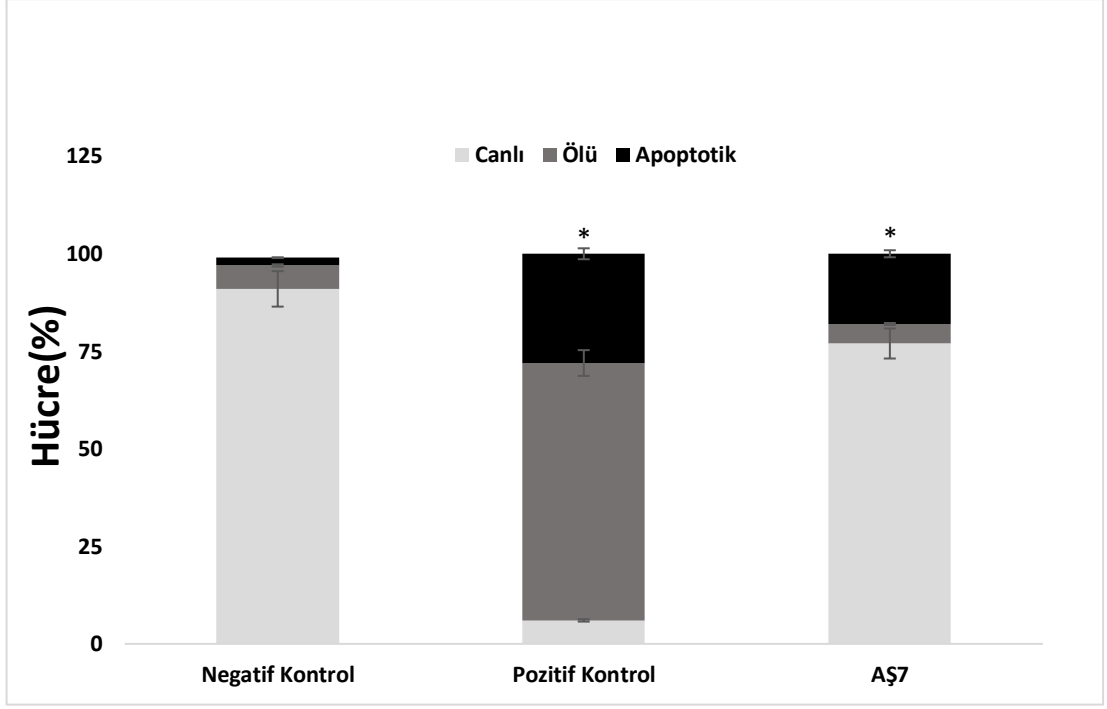
Şekil 3. 26: Caco-2 hücre hattı üzerinde AŞ7 bileşiğinin yüzde (%) canlı, ölü, apoptotik etkisi. Negatif kontrol (DMSO), pozitif kontrol olarak (H_2O_2) kullanılmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

24 saatlik AŞ7 bileşiği uygulanan A549 hücre popülasyonunda Şekil 3.27’de görüldüğü üzere %45’i canlı, %28’si ölü ve %27’si apoptotik ölüme neden olduğu hesaplanmıştır. AŞ7 ile muamele edilen A549 hücre hattında apoptotik hücre popülasyonunun oranı kontrole göre 3.3 kat artış göstermiştir.



Şekil 3. 27: A549 hücre hattı üzerinde AŞ7 bileşiğinin yüzde (%) canlı, ölü, apoptotik etkisi. Negatif kontrol (DMSO), pozitif kontrol olarak (H_2O_2) kullanılmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p < 0.05$).

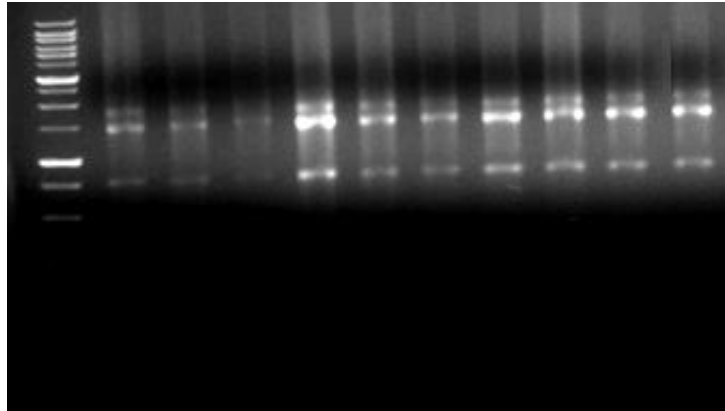
Şekil 3.28'de gösterildiği gibi, 24 saat uygulamanın ardından LNCaP hücre popülasyonlarından AŞ7 bileşiği uygulanan grubun %77'si canlı ve %5'i ölü, %18'i apoptotik olarak hesaplanmıştır. AŞ7 ile muamele edilen LNCaP hücre hattında apoptotik hücre popülasyonunun oranı kontrole göre 9 kat artış göstermiştir.



Şekil 3. 28: LNCaP hücre hattı üzerinde AŞ7 bileşiğinin yüzde (%) canlı, ölü, apoptotik etkisi. Negatif kontrol (DMSO), pozitif kontrol olarak (H_2O_2) kullanılmıştır. *: Kontrol grubundan farklı ($p<0.05$).

3.3 Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

AŞ1 ve AŞ7 ile muamele edilmiş kanser hücre hatlarından izole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jel ile görüntülenmiştir. 18S rRNA ve 28S rRNA bantları Şekil 3.29'da gösterilmiştir. Elde edilen RNA örnekleri $-80^{\circ}C$ 'de saklanmıştır.

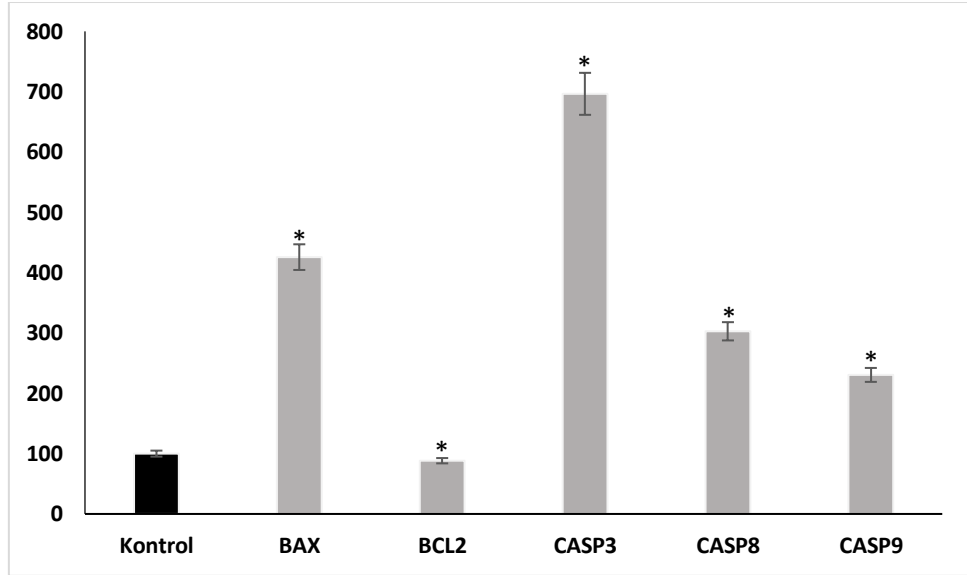


Şekil 3. 29: RNA örneklerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü. **M:** 1kb Plus Opti-DNA Marker (Abm #catG248). Soldan sağa **1.** Kontrol 1; **2.**AŞ1 Caco-2; **3.** AŞ7 Caco-2; Kontrol 2; **4.** Kontrol 2; **5.** AŞ1 A549; **6.** AŞ7 A549; **7.** Kontrol 3; **8.** AŞ1 MCF-7; **9.** Kontrol 4; **10.** AŞ7 Lncap

3.4 mRNA Düzeyinde Ekspresyon Analizi(qRT-PZR)

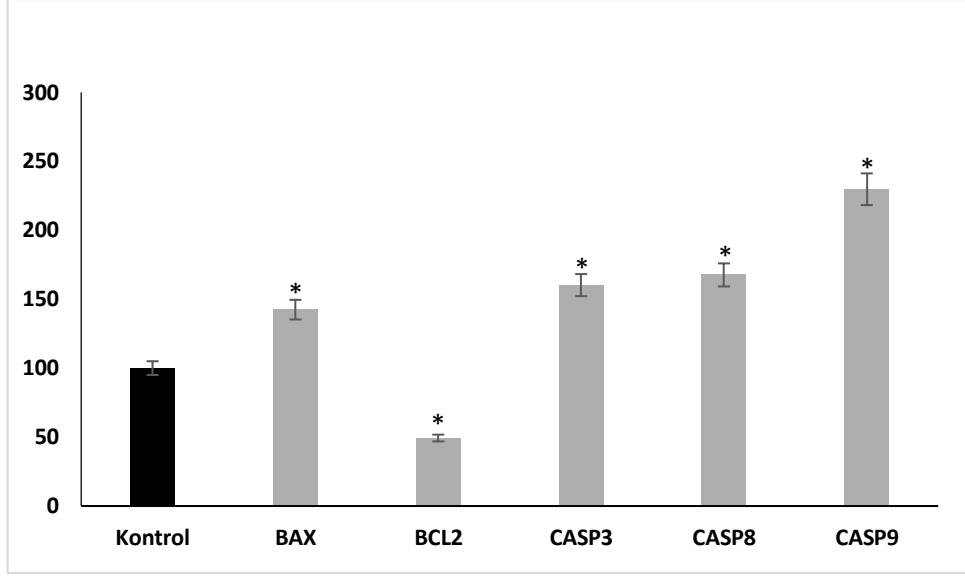
İzole edilen total RNA izolasyonu sonrası cDNA sentezi yapılmış ve apoptoz yollarında görev alan aday genlere (*BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *CASP8* ve *CASP9*) spesifik primerler ile Kilogreen 2X qPZR Master Mix kiti kullanılarak mRNA düzeyinde ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

Şekil 3.30'da görüldüğü üzere AŞ1 bileşiğinin Caco-2 hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genleri sırasıyla 4.26, 6.96, 3.02, 2.31 kat mRNA ekspresyon seviyesinde artış gösterirken, *BCL-2* ise %12 azalış göstermiştir.



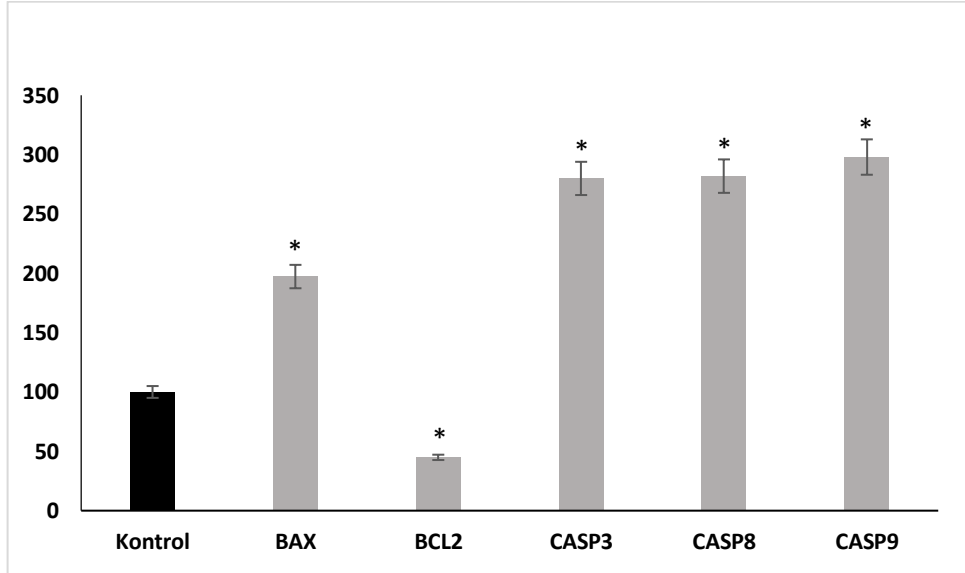
Şekil 3. 30: AŞ1 bileşiğinin Caco-2 hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili *BAX*, *BCL-2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. Sonuçlar *GAPDH* ile normalize edilmiştir. İstatistik analizleri *SPSS 20* One-way ANOVA ile analiz edilmiştir. *: Kontrol grubundan farklı(p<0.05).

AŞ1 bileşiğinin A549 hücre hattında Şekil 3.31'de görüldüğü üzere apoptoz yolağı ile ilişkili *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genleri kontrole göre kıyasla sırasıyla 1.42, 1.60, 1.68, 2.30 kat mRNA ekspresyon seviyesinde artış gösterirken, *BCL-2* ise %51 azalış göstermiştir.



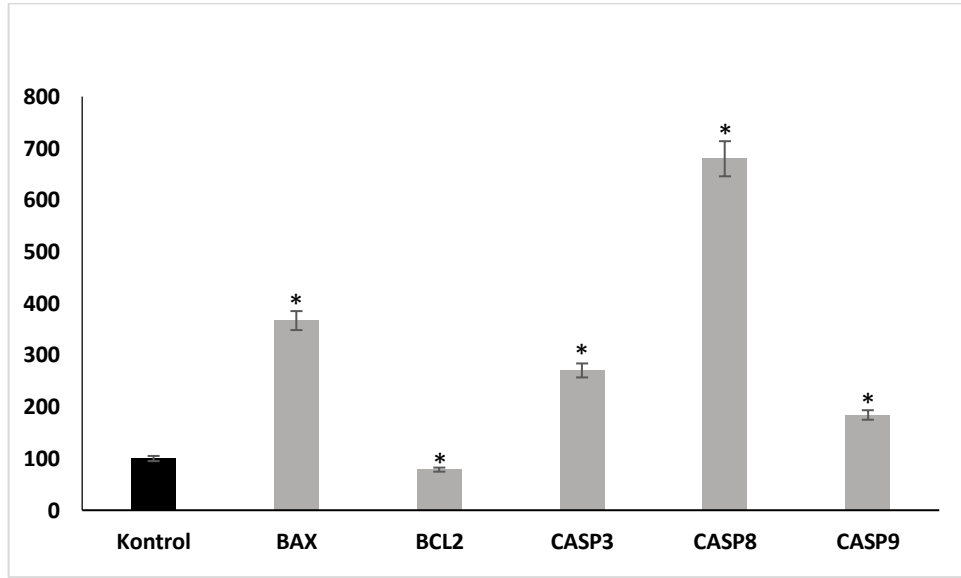
Şekil 3. 31: AŞ1 bileşiğinin A549 hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili *BAX*, *BCL-2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. Sonuçlar *GAPDH* ile normalize edilmiştir. İstatistik analizleri *SPSS 20* One-way ANOVA ile analiz edilmiştir. *: Kontrol grubundan farklı(p<0.05).

Şekil 3.32’de görüldüğü üzere AŞ1 bileşiğinin MCF-7 hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genleri sırasıyla 1.97, 2.80, 2.82 2.98 kat mRNA ekspresyon seviyesinde artış gösterirken, *BCL-2* ise %55 azalış göstermiştir.



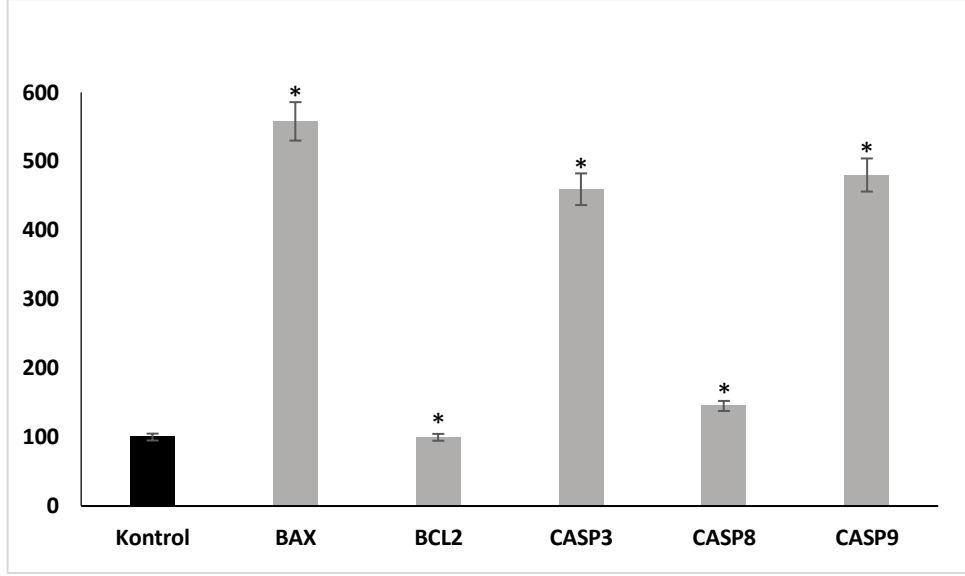
Şekil 3. 32: AŞ1 bileşiğinin MCF-7 hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili *BAX*, *BCL-2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. Sonuçlar *GAPDH* ile normalize edilmiştir. İstatistik analizleri *SPSS 20* One-way ANOVA ile analiz edilmiştir. *: Kontrol grubundan farklı(p<0.05).

Şekil 3.33’de görüldüğü üzere AŞ7 bileşiğinin Caco-2 hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genleri sırasıyla 3.67, 2.70, 6.80, 1.85 kat mRNA ekspresyon seviyesinde artış gösterirken, *BCL-2* ise %21 azalış göstermiştir.



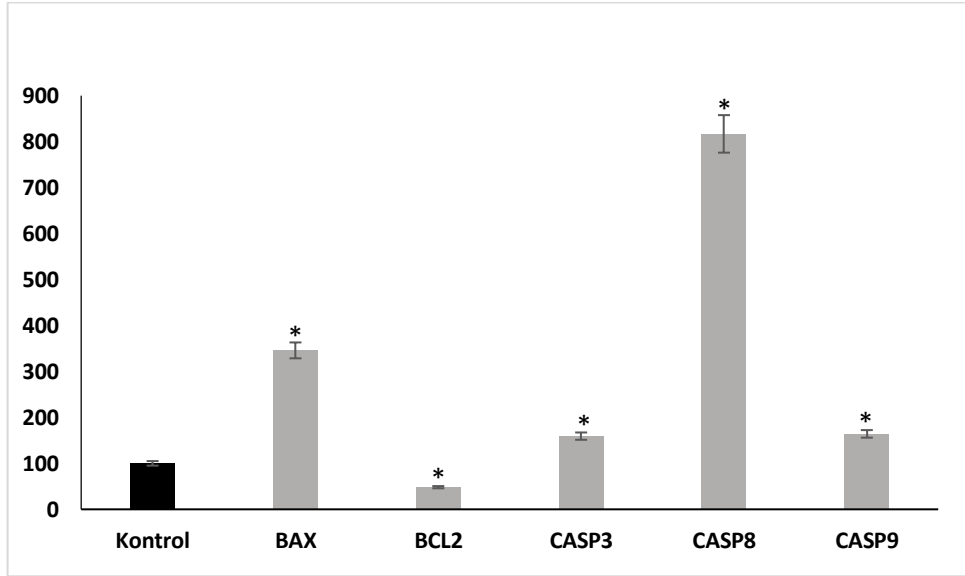
Şekil 3. 33: AŞ7 bileşiğinin Caco-2 hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili *BAX*, *BCL-2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. Sonuçlar *GAPDH* ile normalize edilmiştir. İstatistik analizleri *SPSS 20* One-way ANOVA ile analiz edilmiştir. *: Kontrol grubundan farklı(p<0.05).

AŞ7 bileşiğinin A549 hücre hattında Şekil 3.34’de görüldüğü üzere apoptoz yolağı ile ilişkili *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genleri sırasıyla 5.58, 4.59, 1.46, 4.81 kat mRNA ekspresyon seviyesinde artış gösterirken, *BCL-2* mRNA ekspresyon seviyesi %4,41 azalmıştır.



Şekil 3. 34: AŞ7 bileşiğinin A549 hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili *BAX*, *BCL-2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. Sonuçlar *GAPDH* ile normalize edilmiştir. İstatistik analizleri *SPSS 20* One-way ANOVA ile analiz edilmiştir. *: Kontrol grubundan farklı($p < 0.05$).

AŞ7 bileşiğinin LNCap hücre hattında Şekil 3.35’de görüldüğü üzere apoptoz yolağı ile ilişkili *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genleri sırasıyla 3.46, 1.59, 8.17, 1.64 kat mRNA ekspresyon seviyesinde artış gösterirken, *BCL-2* ise %52 azalmıştır.



Şekil 3. 35: AŞ7 bileşiğinin LNCap hücre hattında apoptoz yolağı ile ilişkili *BAX*, *BCL-2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine etkisi. Kontrol değerleri %100 alınmıştır. Sonuçlar *GAPDH* ile normalize edilmiştir. İstatistik analizleri *SPSS 20* One-way ANOVA ile analiz edilmiştir. *: Kontrol grubundan farklı($p < 0.05$).

4. TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre dünya çapında kanser, her 6 ölümden 1'ine neden olan ve morbidite, mortaliteye yol açan bir halk sağlığı sorunudur.

Dünyada ve Türkiye'de pek çok kanser hastası kimyasal tedavi, ışın tedavisi, cerrahi gibi konvansiyonel tedavileri kullanmaktadır. Kanser hücrelerinin moleküler heterojenliği, ilaç direnci, yüksek maliyet gibi sorunlar hastalığın tedavisini zorlaştırmaktadır (Bouhittit ve diğ., 2021). Yan etkisi azaltılmış, etkili ilaç moleküllerin aranması çalışmaları hali hazırda devam etmektedir. Bu maddeleri ararken yan etkilerin azaltılması için doğal geleneksel yaklaşımların araştırılması, etkilerinin ortaya konulması ve daha az yan etkiye sahip çok hedefli etken maddelerin tespit edilmesi son derece önemlidir. Klinik olarak nitelikli yeni antikanser ilaç adaylarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Farmasötik yapıdaki timol iskelesi, başta kanser olmak üzere birçok farklı alanda büyük önem arz etmektedir. Timol, C-6, C-4 ve C-1 konumlarında yapısal modifikasyonları güçlü ilaç adaylarının geliştirilmesini olanak sağlamaktadır. Heterosiklik yapıya sahip benzotiyofen ve indol ise çoğu ilaç yapısında yer alan biyolojik aktivitesi yüksek moleküllerdir. Bu iki molekülün timol ile kombine edilmesi daha yüksek biyolojik aktiviteye sahip hibridlerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalar timol ve türevlerinin; antioksidan, antibakteriyel, antimalaryal, antikanser gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduklarını ortaya koymuştur. (Marchese ve diğ. 2016; Yu ve diğ. 2016; Li ve diğ. 2017; Islam ve diğ. 2019; Oskouei ve diğ. 2019).

Çalışmamız da yeni benzotiyofen-timol ve indol-timol hibrid yapıları ilk defa sentezlenmiştir. Sentezlenen türevlerin anti-karsinojenik mekanizmasına ilişkin insan akciğer karsinoma (A549), insan prostat karsinoma (LnCaP), insan kolorektal adenokarsinom (Caco-2) ve insan meme adenokarsinoma (MCF-7) ve kanserli olmayan insan umbilikal ven endotel hücresi (Huvec) gibi farklı kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksik etkilerine göre AŞ1 hibrid molekülümüzün Caco-2'de EC₅₀ değeri 111,38 µg/mL, A549'da 321,16 µg/mL, MCF-7'de 123,84 µg/mL olarak bulunmuştur. AŞ7 hibrid molekülümüzün Caco-2'de EC₅₀ değeri 32,6 µg/mL, A549'da EC₅₀ değeri 181,56 µg/mL ve LNCaP'da 89,28

$\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır. AŞ1 ve AŞ7 hibrid türevlerimizin Caco-2, A549, MCF-7, LnCaP hücre hatlarına karşı daha yüksek sitotoksik aktivite sergilemiştir. Literatür ile kıyaslandığında Caco-2 hücresinde AŞ1 ve AŞ7 bileşiği düşük konsantrasyonda sitotoksik aktivite gösterirken, A549 hücresinde daha yüksek konsantrasyonda sitotoksik etki sergilemiştir. LNCaP hücre hattında ise ilk kez EC_{50} konsantrasyonu belirlenmiştir. Ayrıca indol-timol molekülü, benzotiyofen-timol molekülüne göre daha güçlü sitotoksik bir ajandır. MCF-7 hücre hattında uygulanan AŞ2, AŞ5 ve AŞ6 türevleri hücre proliferasyonunu önemli ölçüde arttırmıştır ve bu sebeple yeni benzotiyofen-timol ve indol-timol türevlerinin yara iyileşmesi için fibroblast hücreleri üzerindeki çalışmalarda güçlü bir ajan olabileceğini ortaya koyduk. AŞ2, AŞ5 ve AŞ6 türevleri ise farklı kanser hücreleri üzerinde düşük sitotoksik etki göstermiştir. Lipinski kurallarına göre artan hidrojen sayısı, moleküler ağırlık gibi özelliklerin farklılığı ilaç etkileşimleri için önem arz etmektedir. AŞ2'nin AŞ1 türevi ile yapısal olarak karşılaştırıldığında bir benzen halkasının fazlalığı molekülün sitotoksik etkinliğini düşürebilir. AŞ5 ve AŞ6 türevlerinde ise karbon ve hidrojen sayısının artışı molekülün kararlılığını ve sitotoksik etkisini azaltabilir. Timol'ün farklı deneysel modellerde farklı kanser hücreleri üzerinde hücre canlılığını azalttığı, sitotoksik aktiviteyi arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca yeni benzotiyofen-timol ve indol-timol türevleri farklı kanser hücrelerinde apoptoza neden olmaktadır (Tablo 4.1) (Tablo 4.2) (Tablo 4.3) (Tablo 4.4).

Tablo 4. 1: Timol'ün farklı deneysel modellerde MCF-7 kanser hücresindeki etkileri.

Doz	Bileşen	Hücre	Hedef	Referans
IC ₅₀ : 304.81 µg/ml	<i>Thymus lanceolatus</i> Elde edilen timol	MCF-7	Hücre canlılığını ↓ Sitotoksik etki ↑	Khadir ve diğ., 2016
IC ₅₀ : 6.24-8.42 uM	<i>Eupatorium fortunei</i> yeni timol ve izotimol türevleri	MCF-7	Hücre canlılığını ↓ Sitotoksik etki ↑	Yu ve diğ., 2020
IC ₅₀ : 1.1µM	1,2,3-triazol içeren timol-1,3,4-oksadiazol türevleri	MCF-7	Hücre canlılığını ↓ Sitotoksik etki ↑	Almaki ve diğ., 2021
EC ₅₀ :123,84 µg/ml	AŞ1	MCF-7	Hücre canlılığı ↓ Sitotoksik etki ↑ Apoptoz ↑	

Tablo 4. 2: Timol'ün farklı deneysel modellerde Caco-2 kanser hücresindeki etkileri.

Doz	Bileşen	Hücre	Hedef	Referans
IC ₅₀ : 293.53 uM	<i>Thymus lanceolatus</i> elde edilen timol	Caco-2	Hücre canlılığını ↓ Sitotoksik etki ↑	Khadir ve diğ., 2016
EC ₅₀ :111,38µg/ml	AŞ1	Caco-2	Hücre canlılığı ↓ Sitotoksik etki ↑ Apoptoz ↑	
EC ₅₀ :32,60µg/ml	AŞ7	Caco-2	Hücre canlılığı ↓ Sitotoksik etki ↑ Apoptoz ↑	

Tablo 4. 3: Timol'ün farklı deneysel modellerde A549 kanser hücresindeki etkileri.

Doz	Bileşen	Hücre	Hedef	Referans
IC ₅₀ : 8.78-9.84 uM	<i>Eupatorium fortunei</i> elde edilen yeni timol ve izotimol türevleri	A549	Hücre canlılığını ↓ Sitotoksik etki ↑	Yu ve diğ., 2020
EC ₅₀ :321,16µg/ml	AŞ1	A549	Hücre canlılığı ↓ Sitotoksik etki ↑ Apoptoz ↑	
EC ₅₀ :181,56µg/ml	AŞ7	A549	Hücre canlılığı ↓ Sitotoksik etki ↑ Apoptoz ↑	

Tablo 4.4: Timol-indol hibrid molekülünün LNCaP kanser hücresindeki etkileri.

Doz	Bileşen	Hücre	Hedef
EC ₅₀ :89,28µg/ml	AŞ7	LNCaP	Hücre canlılığı ↓ Sitotoksik etki ↑ Apoptoz ↑

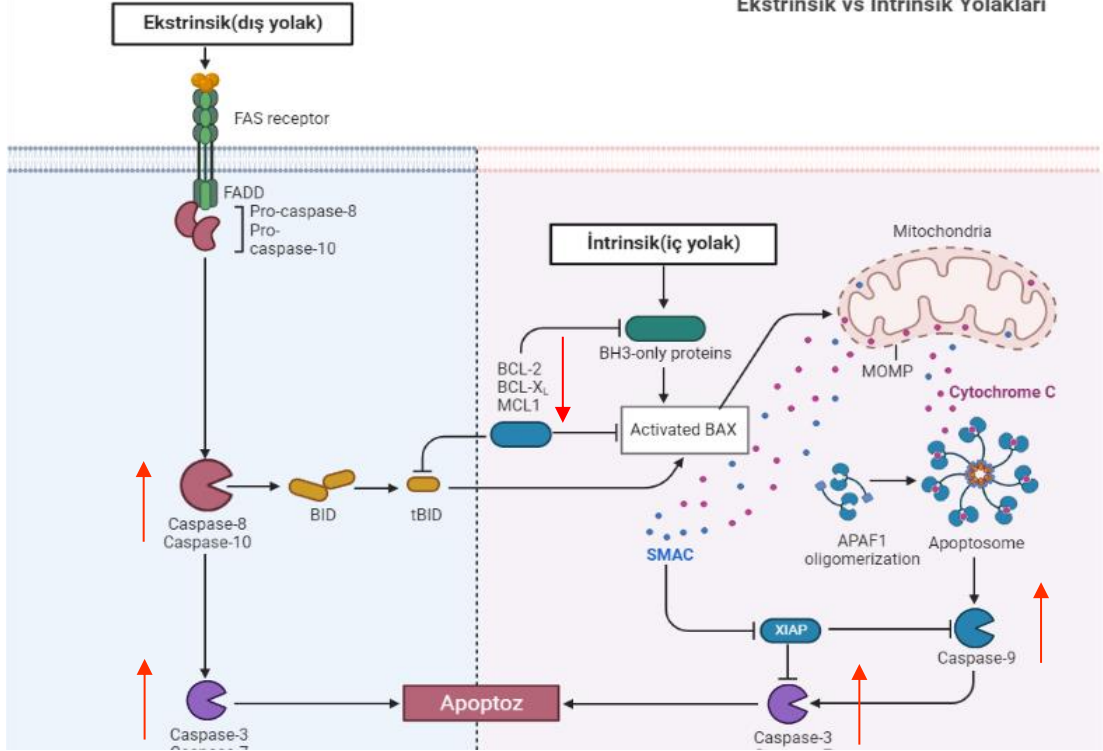
Kemoterapötik ajanların en önemli mekanizması apoptozdur. Apoptoz, intrinsik (mitokondriyal iç yolak) ve ekstrinsik (dış yolak) olan iki farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Sitotoksik testinin ardından belirlenen etkili dozlar (EC₅₀) ile Annexin V FITC-PI ile apoptoz deneyi gerçekleştirdik. Hibrid moleküllerimiz farklı kanser hücrelerini apoptoza indüklediğini ve sitotoksik aktivite gösterdiğini ortaya çıkardık.

Çalışmamızın 3. Kısımında ise hibrid moleküllerimizin kanser hücrelerini hangi mekanizma ile apoptoza indüklediğini inceledik. Kaspaz ailesi(sistein-aspartik-proteazlar), anti-apoptotik özelliğe sahip *BCL-2*, pro-apoptotik etki gösteren *BAX*, apoptotik süreçte önemli roller üstlenirler. Bu genlerin ekspresyon seviyelerine olan etkileri housekeeping gen olan *GAPDH* ile kıyaslanarak hesaplanmıştır. Apoptoz ile ilişkili genlerin analizleri sonucunda AŞ1 hibrid molekülümüzün Caco-2’de apoptoz yolağı ile ilişkili; *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genlerinin kontrole göre kıyasla sırasıyla 4.26, 6.96, 3.02, 2.31 kat mRNA ekspresyon seviyesinde artış gösterirken, *BCL-2* geni ise %12 azalış göstermiştir. A549’da *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genleri kontrole göre kıyasla sırasıyla 1.42, 1.60, 1.68, 2.30 kat mRNA ekspresyon seviyesinde artış gösterirken, *BCL-2* geni ise %51 azalış göstermiştir. MCF-7’de *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genleri kontrole göre kıyasla sırasıyla 1.97, 2.80, 2.82 2.98 kat mRNA ekspresyon seviyesinde artış gösterirken, *BCL-2* geni ise %55 azalış göstermiştir. AŞ7 hibrid molekülünde ise Caco-2’de *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genlerinin kontrole göre kıyasla sırasıyla 3.67, 2.70, 6.80, 1.85 kat mRNA ekspresyon seviyesinde artış gösterirken, *BCL-2* geni ise %21 azalış göstermiştir.

A549’da *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genleri kontrole göre kıyasla sırasıyla 5.58, 4.59, 1.46, 4.81 kat mRNA ekspresyon seviyesinde artış gösterirken, *BCL-2* geni ise mRNA ekspresyon seviyesi %4.41 azalış göstermiştir. LNCaP hücre hattında ise *BAX*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9* genleri kontrole göre kıyasla sırasıyla 3.46, 1.59, 8.17, 1.64 kat mRNA ekspresyon seviyesinde artış gösterirken, *BCL-2* geni ise %52 azalmıştır. Anti-apoptotik gen olan *BCL-2* azalması ve pro-apoptotik genlerin artışı kanser hücrelerinin apoptoza yöneldiğini göstermektedir. Apoptozun iki ana mekanizması; ekstrinsik (dış yolak) ve intrinsik (mitokondriyal iç yolak) olduğu bilinmektedir. İki farklı yolakta kaspaz-3 enziminin aktivasyonuna neden olan farklı kaspaz ailesi enzimlerini gerektirmektedir. AŞ1 ve AŞ7 hibridlerinin anti-apoptotik *BCL-2* azalmasına ve pro-apoptotik genlerin artışına sebep olmaktadır. Ayrıca dış yolakta görev alan *CASP8* geninin aktivasyonuna neden olmaktadır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre AŞ1 ve AŞ7 bileşiklerinin neden olduğu hücre ölümünde apoptozun iki ana yolakta; ekstrinsik (dış yolak) hem de intrinsik (mitokondriyal iç yolak) rol oynadığı göstermiştir (Şekil 4.1).

Apoptoz

Ekstrinsik vs İntrinsik Yolakları



Şekil 4.1: Yeni benzotiyofen-timol ve indol-timol hibrid moleküllerinin apoptoz indüksiyonundaki kullandığı yollar

Çalışmamızın özgünlüğü ve yeniliği timol ve türevlerinin apoptoz indüksiyonuna neden olduğunu ve sitotoksik etkiye sahip olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Sonuçlarımız, normal hücreler için toksik olmayan ve kanser hücrelerini yok eden hibridlerimizin farmakolojik açıdan önemini vurgulamaktadır. Sonuç olarak yeni timol hibrid moleküllerinin anti-karsinojenik etkileri ilk defa ortaya çıkarılmış ve yeni ilaç potansiyeline sahip aday moleküllerin ön çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Mastelic ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada insan servikal karsinom hücrelerinde (HeLa) timolün (0.1-100 mM) antioksidan bağımlı bir antiproliferatif etki gösterdiği bir çalışma yürütmüşlerdir (Mastelic ve diğ. 2008).

Satooka ve Kubo'nun 2012 yürüttüğü bir çalışmada timol, B16-F10 melanom hücreleri üzerinde 400 Mm IC₅₀ değeri ile sitotoksikite gösterdiği ve oksidatif stresi tetiklediğini ortaya koymuşlardır. Timolün antioksidan etkileri, reaktif oksijen türleri ve kinon oksit türevleri üreten kararlı bir fenoksi radikal ara

ürünü oluşturur. Sonuç olarak yüksek dozlarda timol toksisitesinin birincil mekanizmasının, antioksidanla ilişkili radikallerin oluşumundan kaynaklandığı göstermişlerdir (Satooka ve Kubo. 2012).

Li ve arkadaşlarının 2017'de insan mesane kanseri hücreleri ile (T24, SW780, J82) yaptığı çalışma da farklı konsantrasyonlar da timolün 0, 25, 50, 100, 150 μM konsantrasyonlarında 24 saat inkübasyonu sonrasında doza ve zamana bağlı hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığını ve G2/M fazında hücre döngüsü durmasını indükleyebildiğini ortaya koymuşlardır. Apoptoz ile ilişkili proteinlerin western-blot analizi yapıldığında ise Bcl-2 ailesi proteinlerinin aşağı regülasyonu, sitokrom c ve Smac/DIABLO'nun mitokondriden sitozole salınması, timolün insan mesane kanseri hücrelerinde intrinsik yol aracılığıyla apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu kanıtlamışlardır (Li ve diğ. 2017).

2021'deki güncel bir araştırma da Almaki ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonucu 1,2,3-triazol içeren timol-1,3,4-oksadiazol türevlerinin MCF-7, CT-116 ve HepG2 kanser hatları üzerinde sırasıyla 1.1 μM , 2.6 μM , 1.4 μM IC_{50} değerleriyle sitotoksik aktivite gösterdiğini ve bileşiklerin 1.95-4.24 μM IC_{50} değerlerinde timidilat sentaz inhibisyonu göstererek antikanser özellikleri açıklamışlardır (Almaki ve diğ., 2021). Zhang ve arkadaşları yeni timol türevleri ile yaptıkları çalışmalar sonucu MCF-7, NCI-H460 ve HeLa kanser hücrelerine 7.45 ila 28.63 μM arasında değişen IC_{50} değerleriyle in vitro sitotoksik aktivite gösterdiği kanıtlamışlardır (Zhang ve diğ. 2015).

Timol ve türevlerinin antikanser mekanizmasına ilişkin güncel bir çalışma da timol bazlı 1,2,3-triazol hibritlerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücrelerinde DNA sentezinin bozulmasına ve hücre büyümesinin durmasına neden olan timidilat sentazı inhibe etme potansiyeline sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Alam ve diğ. 2021).

Lee ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada C6 glioma hücre hattında timol, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. C6 glioma hücreleri 30 μM timol ile muamele edildikten sonra matris metalopeptidaz (MMP)9 ve MMP-2'nin üretimini azaldığını, (ERK)1/2, protein kinaz Ca (PKCa)

sinyallerinin ise fosforilasyonları etkilemiştir. Bu sinyal yollarını beyin kanserinin ilerlemesinde önemli ana yollarlardır (Lee ve diğ. 2016).

Jaafari ve arkadaşlarının MCF-7 hücre hattında timolün (0,05-1,25 µM) hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurduğunu, farklı bir çalışmada ise MCF-7 hücre hattında timolün 304,81 µg/ml IC₅₀ değerinde sitotoksik etki gösterdiği ve hücre proliferasyonunu azalttığını kanıtlamışlardır (Jaafari ve diğ., 2012; Khadir ve diğ., 2016; Nagoor ve diğ. 2017).

T. lanceolatus özütünden elde edilen timolün Caco-2 hücre hattında 293.53 µM IC₅₀ değerinde hücre canlılığını azalttığını gösterilmiştir (Nagoor ve diğ. 2017; Khadir ve diğ. 2016).

Bouhtit ve arkadaşlarının 2021’de yayınladığı çalışmada karvakrol ve timol kombinasyonu ile AML (akut miyeloid lösemi) apoptozu indüklediğini, oksidatif ve retiküler stres yollarını aktifleştirdiğini gözlemlediler (Bouhtit ve diğ. 2021).

Yu ve arkadaşları *Eupatorium fortunei* yeni 4 türev sentezledi ve 4 farklı kanser hücre hattında (MCF-7, HeLa, A549 ve HepG2) sitotoksik etkileri MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyumbromür) yöntemiyle gerçekleştirmişlerdir. 2 yeni timol türevi ve izotimol türevi MCF-7 hücre hattında 6.24-8.42 µM, HeLa hücre hattında 6.65-7.47 µM, A549’da 8.78-9.84 µM ve HepG2 hücre hattında 9.23-11,96 µM IC₅₀ değerleriyle sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Yu ve diğ. 2020).

5. SONUÇ VE ÖNERİ

Yüzyıllardan beri bitkiler tıbbi tedavilerde kullanılmaktadır. Timol (2-izopropil-5-metilfenol), esas olarak *Thymus* türlerinden ekstrakte edilen doğal bir fenolik monoterpenoiddir. Doğal biyolojik aktiviteye sahip monotermen sınıfı olan timol ve modifikasyonları tıbbi uygulamalarda büyük bir literatürü kapsamaktadır. Yapılan çalışmalar timol ve türevlerinin; anti-inflamatuar, antibakteriyel, antimalaryal, antikanser gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduklarını ortaya koymuştur.

Çalışmamız da benzotiyofen-timol ve indol-timol hibrid moleküller ilk defa sentezlenmiştir. Yeni timol hibrid moleküllerinin anti-karsinojenik etkilerinin ortaya çıkarılması için insan akciğer karsinoma (A549), insan prostat karsinoma (LNCaP), insan kolorektal adenokarsinom (Caco-2) ve insan meme adenokarsinoma (MCF-7) gibi farklı kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmış ve EC₅₀ konsantrasyonları belirlenmiştir. Apoptoz ile ilişkili genlerin (*BAX*, *BCL-2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*) mRNA ekspresyonları seviyelerine olan etkileri bulunmuştur. Bu sonuçlar benzotiyofen-timol ve indol-timol hibridlerinin sitotoksik etkiye sahip olduğu ve apoptoz indüksiyonuna neden olduğu açıkça ortaya koymuştur.

Normal hücreler için toksik olmayan ve kanser hücrelerini yok eden hibridlerimiz farmakolojik açıdan önemlidir. İndol-timol hibridinin, benzotiyofen-timole göre daha güçlü sitotoksik ajan olduğunu göstermiştir.

Tüm veriler ilk kez araştırılması nedeniyle özgün bir değer taşımaktadır. Bu kapsamda, ileri çalışmalar ile bu maddelerin tek başına ya da nanopartiküller kullanılarak hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyeli yüksek bir hal olarak ekonomik çıktılarının üretilmesi sağlanabilecektir. Ayrıca moleküllerin farklı kanser hücreleri üzerindeki etkisi, hücre döngüsünü hangi fazda etkilediği araştırılabilir ve ayrıca klinikte kullanılan kemoteröpatik ajanlarla olan sinerjik etkisi araştırılabilir. Moleküllerin docking ve *in vivo* çalışmaları gerçekleştirilebilir. İleri düzey toksisite çalışmaları yürütülebilir.

Yeni benzotiyofen-timol ve indol-timol türevleri, klinik olarak nitelikli antikanser ilaçlarının geliştirilebilmesi için ileri ki çalışmalara rehber olacaktır. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda, önerilen proje konusu ve sonucunda çıkacak yeni projeler hem ulusal ve hem de evrensel katma değere sahip projeler olacaktır.

6. KAYNAKÇA

Abedi, S. M., Yarmand, F., Motallebnejad, M., Seyedmajidi, M., Moslemi, D., Bijani, A., & Hosseinimehr, S. J., “Radioprotective effect of thymol against salivary glands dysfunction induced by ionizing radiation in rats”, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 15(4), 861, (2016).

Ahmad, A., Sakr, W. A., & Rahman, K. W., “Role of nuclear factor-kappa B signaling in anticancer properties of indole compounds”, *Journal of Experimental & Clinical Medicine*, 3(2), 55-62, (2011).

Alam, M. M., Malebari, A. M., Syed, N., Neamatallah, T., Almalki, A. S., Elhenawy, A. A., ... & Alsharif, M. A., “Design, synthesis and molecular docking studies of thymol based 1, 2, 3-triazole hybrids as thymidylate synthase inhibitors and apoptosis inducers against breast cancer cells”, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 38, 116136, (2021).

Almalki, A. S., Nazreen, S., Malebari, A. M., Ali, N. M., Elhenawy, A. A., Alghamdi, A. A., ... & Alam, M. M., “Synthesis and Biological Evaluation of 1, 2, 3-Triazole Tethered Thymol-1,3,4-Oxadiazole Derivatives as Anticancer and Antimicrobial Agents”, *Pharmaceuticals*, 14(9), 866, (2021).

Amr, A. E. G. E., Ibrahim, A. A., El-Shehry, M. F., Hosni, H. M., Fayed, A. A., & Elsayed, E. A., “In vitro and in vivo anti-breast cancer activities of some newly synthesized 5-(thiophen-2-yl) thieno- [2, 3-d] pyrimidin-4-one candidates”, *Molecules*, 24(12), 2255, (2019).

Archana, P. R., Nageshwar Rao, B., & Satish Rao, B. S., “Modulation of gamma ray-induced genotoxic effect by thymol, a monoterpene phenol derivative of cymene”, *Integrative Cancer Therapies*, 10(4), 374-383, (2011).

Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T., “Natural products in drug discovery: advances and opportunities”, *Nature reviews Drug discovery*, 20(3), 200-216, (2021).

Atıcı, E., “Tıp tarihinde kanser ve lösemi”, *Türk Onkoloji Dergisi*, 22(4), 197-204, (2007).

Boberg, F., Bruns, W., Kaller, R., & Mußhoff, D., “Schwefelverbindungen des erdöls xvii. 1 dibenzothiophene mit einem verzweigten C3-C5-alkylrest”, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 72(1-4), 33-47, (1992).

Bouhtit, F., Najjar, M., Moussa Agha, D., Melki, R., Najimi, M., Sadki, K., ... & Merimi, M., “New anti-leukemic effect of carvacrol and thymol combination through synergistic induction of different cell death pathways”, *Molecules*, 26(2), 410, (2021).

Brotzman, N., Xu, Y., Graybill, A., Cocolas, A., Ressler, A., Seeram, N. P., ... & Henry, G. E., "Synthesis and tyrosinase inhibitory activities of 4-oxobutanoate derivatives of carvacrol and thymol", *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 29(1), 56-58, (2019).

Calò, R., Visone, C. M., & Marabini, L., "Thymol and Thymus Vulgaris L. activity against UVA- and UVB-induced damage in NCTC 2544 cell line", *Mutation Research/genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 791, 30-37, (2015).

Chang, H. T., Hsu, S. S., Chou, C. T., Cheng, J. S., Wang, J. L., Lin, K. L., ... & Jan, C. R., "Effect of thymol on Ca²⁺ homeostasis and viability in MG63 human osteosarcoma cells", *Pharmacology*, 88(3-4), 201-212, (2011).

Clarke, P. R., & Allan, L. A., "Cell-cycle control in the face of damage—a matter of life or death", *Trends in cell biology*, 19(3), 89-98, (2009).

Çetin, D., "İlaç Olma Potansiyeli Taşıyan 2,3-Daril-Benzotiyofen Türevlerinin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi ve GST- α İzozimine Etkilerinin Araştırılması", (Yüksek Lisans Tezi), T.C. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, *Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı*, (2018).

Decker, M., "Hybrid molecules incorporating natural products: applications in cancer therapy, neurodegenerative disorders and beyond." *Current Medicinal Chemistry* 18.10,1464-1475, (2011).

dit Chabert, J. F., Marquez, B., Neville, L., Joucla, L., Broussous, S., Bouhours, P., ... & Lemaire, M., "Synthesis and evaluation of new arylbenzo [b] thiophene and diarylthiophene derivatives as inhibitors of the NorA multidrug transporter of Staphylococcus aureus", *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(13), 4482-4497, (2007).

Dadashpour, S., & Emami, S., "Indole in the target-based design of anticancer agents: A versatile scaffold with diverse mechanisms", *European journal of medicinal chemistry*, 150, 9-29, (2018).

Elmore, S., "Apoptosis: a review of programmed cell death", *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516, (2007).

Estevão, M. S., Carvalho, L. C., Ribeiro, D., Couto, D., Freitas, M., Gomes, A., ... & Marques, M. M. B., "Antioxidant activity of unexplored indole derivatives: synthesis and screening", *European journal of medicinal chemistry*, 45(11), 4869-4878, (2010).

Fakhr, I. M., Radwan, M. A., El-Batran, S., Abd El-Salam, O. M., & El-Shenawy, S. M., "Synthesis and pharmacological evaluation of 2-substituted benzo [b] thiophenes as anti-inflammatory and analgesic agents", *European journal of medicinal chemistry*, 44(4), 1718-1725, (2009).

Gerber, David E. "Targeted therapies: a new generation of cancer treatments." *American family physician* 77.3, 311-319, (2008).

Guerrero, M. D., Aquino, M., Bruno, I., Riccio, R., Terencio, M. C., & Payá, M., "Anti-inflammatory and analgesic activity of a novel inhibitor of microsomal prostaglandin E synthase-1 expression", *European journal of pharmacology*, 620(1-3), 112-119, (2009).

Gupta, R., "A Theoretical Study of 5-methyl-2-isopropylphenol (Thymol) by DFT", (2021).

Hanahan, D., Weinberg, R. A., "Hallmarks of Cancer: The Next Generation", *Cell*, 144 (5), 646 –674, (2022).

Inci Gul, H., Yamali, C., Tugce Yasa, A., Unluer, E., Sakagami, H., Tanc, M., & Supuran, C. T., "Carbonic anhydrase inhibition and cytotoxicity studies of Mannich base derivatives of thymol", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 1375-1380, (2016).

Islam, M. T., "Andrographolide, an up-coming multi-edged plant-derived sword in cancers", *Asian J. Ethnopharmacol. Med. Foods*, 2, 1-3, (2016).

Islam, M. T., Khalipha, A. B., Bagchi, R., Mondal, M., Smrity, S. Z., Uddin, S. J., ... & Rouf, R., "Anticancer activity of Thymol: A literature-based review and docking study with Emphasis on its anticancer mechanisms", *IUBMB life*, 71(1), 9-19, (2019).

Islam, Md Torequl., "Andrographolide, an up-coming multi-edged plant-derived sword in cancers", *Asian J. Ethnopharmacol. Med. Foods* 2, 1-3, (2016).

Jaafari, A., Tilaoui, M., Mouse, H. A., M'bark, L. A., Aboufatima, R., Chait, A., ... & Zyad, A., "Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 534-540, (2012).

Jagtap, V. A., & Agasimundin, Y. S., "Synthesis and preliminary evaluation of some 2-amino-N'-[substituted]-4, 5, 6, 7-tetrahydro-1-benzothiophene-3-carbohydrazide as antimicrobial agents", *J. Pharm. Res*, 9(1), 10-14, (2015).

Jump, S. M., Kung, J., Staub, R., Kinseth, M. A., Cram, E. J., Yudina, L. N., ... & Firestone, G. L., "N-Alkoxy derivatization of indole-3-carbinol increases the efficacy of the G1 cell cycle arrest and of I3C-specific regulation of cell cycle gene transcription and activity in human breast cancer cells", *Biochemical pharmacology*, 75(3), 713-724, (2008).

Kang, S. H., Kim, Y. S., Kim, E. K., Hwang, J. W., Jeong, J. H., Dong, X., ... & Park, P. J., "Anticancer effect of thymol on AGS human gastric carcinoma cells", *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(1), 28-37, (2016).

Kaur, R., Darokar, M. P., Chattopadhyay, S. K., Krishna, V., & Ahmad, A., "Synthesis of halogenated derivatives of thymol and their antimicrobial activities", *Medicinal Chemistry Research*, 23(5), 2212-2217, (2014).

Khadir, A., Sobeh, M., Gad, H. A., Benbelaid, F., Bendahou, M., Peixoto, H., ... & Wink, M., "Chemical composition and biological activity of the essential oil from *Thymus lanceolatus*", *Zeitschrift für Naturforschung C*, 71(5-6), 155-163, (2016).

King, K. L., & Cidlowski, J. A., "Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death", *Journal of cellular biochemistry*, 58(2), 175-180, (1995).

Kutluk, T., Kars, A., "Kanser Konusunda Genel Bilgiler", T.C. *Sağlık Bakanlığı Kanser ve Savaş Daire Başkanlığı Yayınları*, (2001).

Lakhdar, S., Westermaier, M., Terrier, F., Goumont, R., Boubaker, T., Ofial, A. R., & Mayr, H., "Nucleophilic reactivities of indoles", *The Journal of organic chemistry*, 71(24), 9088-9095, (2006).

Lee, J. H., Lee, E. S., Bae, I. H., Hwang, J. A., Kim, S. H., Kim, D. Y., ... & Lee, C. S., "Antimelanogenic efficacy of Melasolv (3, 4, 5-trimethoxycinnamate thymol ester) in melanocytes and three-dimensional human skin equivalent", *Skin Pharmacology and Physiology*, 30(4), 190-196, (2017).

Lee, K. P., Kim, J. E., Park, W. H., & Hong, H., "Regulation of C6 glioma cell migration by thymol", *Oncology letters*, 11(4), 2619-2624, (2016).

Li, J. W. H., & Vederas, J. C., "Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?", *Science*, 325(5937), 161-165, (2009).

Li, Y., Wen, J. M., Du, C. J., Hu, S. M., Chen, J. X., Zhang, S. G., ... & Ding, K. F., "Thymol inhibits bladder cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis", *Biochemical and biophysical research communications*, 491(2), 530-536, (2017).

Makino, M., Azuma, M., Wakamatsu, S. I., Suruga, Y., Izumo, S., Yokoyama, M. M., & Baba, M., “Marked suppression of T cells by a benzothiophene derivative in patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis”, *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(3), 316-322, (1999).

Calò, R., Cornaghi, L., Arnaboldi, F., Donetti, E., & Marabini, L., “Evaluation of protective effect of thymol and thymus vulgaris leaf extract on UVB-induced damage in an ex-vivo human skin tissue model”, *In Congress of the European societies of toxicology (Eurotox)*, (Vol. 229, pp. S242-S242) Elsevier, (2014).

Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., ... & Nabavi, S. M., “Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature”, *Food chemistry*, 210, 402-414, (2016).

Martorana, A., Gentile, C., Perricone, U., Piccionello, A. P., Bartolotta, R., Terenzi, A., ... & Lauria, A., “Synthesis, antiproliferative activity, and in silico insights of new 3-benzoylamino-benzo [b] thiophene derivatives’2, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 90, 537-546, (2015).

Mastelic, J., Jerkovic, I., Blažević, I., Poljak-Blaži, M., Borović, S., Ivančić-Baće, I., ... & Müller, N., “Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives”, *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(11), 3989-3996, (2008).

Nagoor Meeran, M. F., Javed, H., Al Tae, H., Azimullah, S., & Ojha, S. K., “Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development” *Frontiers in pharmacology*, 8, 380, (2017).

Nagoor, M., Mohamed, Fi., Hayate, J., Hasan, A.T., Sheikh, A., and Shreesh K. Ojha., "Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development", *Frontiers in pharmacology* 8,380, (2017).

National Cancer Institute., Cancer Stat Facts: Common Cancer Sites, (12Temmuz2022), (<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/common.html>), (2022).

Oskouei, B. G., Abbaspour-Ravasjani, S., Musavinejad, S. J., Salehzadeh, S. A., Abdolhosseinzadeh, A., Ghahremanzadeh, K., & Shokouhi, B., “In vivo evaluation of anti-hyperglycemic, anti-hyperlipidemic and anti-oxidant status of liver and kidney of thymol in STZ-induced diabetic rats”, *Drug Research*, 69(01), 46-52, (2019).

Öner, S., & Yıldırım, Y. B., “Farklı Esansiyel Yağların Vakum Paketlenmiş ve Soğukta Depolanmış Karidesler Üzerinde Duyusal ve Kimyasal Etkileri”, (2018).

Özok, Ö., “Artemisinin-benzotiyofen türevlerinin sentezi, antimikrobiyal, antioksidan etkinliği ve sitotoksikite aktivitelerinin belirlenmesi”, (Doktora Tezi), T.C. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı*, (2021).

Pedada, S. R., Yarla, N. S., Tambade, P. J., Dhananjaya, B. L., Bishayee, A., Arunasree, K. M., ... & Rangaiah, G., “Synthesis of new secretory phospholipase A2-inhibitory indole containing isoxazole derivatives as anti-inflammatory and anticancer agents”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112, 289-297, (2016).

Pete, U. D., Zade, C. M., Bhosale, J. D., Tupe, S. G., Chaudhary, P. M., Dikundwar, A. G., & Bendre, R. S., “Hybrid molecules of carvacrol and benzoyl urea/thiourea with potential applications in agriculture and medicine”, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(17), 5550-5554, (2012).

Pete, U. D., Zade, C. M., Bhosale, J. D., Tupe, S. G., Chaudhary, P. M., Dikundwar, A. G., & Bendre, R. S., “Hybrid molecules of carvacrol and benzoyl urea/thiourea with potential applications in agriculture and medicine”, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(17), 5550-5554, (2012).

Pirdawid, A.O., “Determination of Antioxidant Capacities of Some Benzothiophene Derivatives and Their Inhibition Models on GSTP1-1 Isozyme”, (M.Sc. Thesis), T.C. Van Yüzüncü Yıl University, *Institute of Natural and Applied Sciences, Department of Molecular Biology and Genetics*, (2019)

Piste, M. R. S. P., Indalkar, D. P., Dnyandev, N. Z., & Pankaj, S. M., “Synthesis and antimicrobial activity of substituted P-amino azobenzene with thymol moiety: a green protocol”, *International Journal of Chemistry Research*, 3(2), 25-29, (2012).

Poeggeler, B., Pappolla, M. A., Hardeland, R., Rassoulpour, A., Hodgkins, P. S., Guidetti, P., & Schwarcz, R., “Indole-3-propionate: a potent hydroxyl radical scavenger in rat brain”, *Brain research*, 815(2), 382-388, (1999).

Rajput, J. D., Bagul, S. D., Pete, U. D., Zade, C. M., Padhye, S. B., & Bendre, R. S., “Perspectives on medicinal properties of natural phenolic monoterpenoids and their hybrids”, *Molecular Diversity*, 22(1), 225-245, (2018).

Satooka, H., & Kubo, I., ‘‘Effects of thymol on B16-F10 melanoma cells’’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2746-2752, (2012).

Shen, A. Y., Huang, M. H., Liao, L. F., & Wang, T. S., ‘‘Thymol analogues with antioxidant and L-type calcium current inhibitory activity’’, *Drug development research*, 64(4), 195-202, (2005).

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A., ‘‘Cancer statistics, 2022’’, CA: *a cancer journal for clinicians*, (2022).

Singh Sidhu, J., Singla, R., & Jaitak, V., ‘‘Indole derivatives as anticancer agents for breast cancer therapy: a review’’, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 16(2), 160-173, (2016).

Sneader, W., ‘‘Drug discovery: a history’’, *John Wiley & Sons*, (2005).

Soliman, R. M., Salam, R. A. A., Eid, B. G., Khayyat, A., Neamatallah, T., Mesbah, M. K., & Hadad, G. M., ‘‘Stability study of thymoquinone, carvacrol and thymol using HPLC-UV and LC-ESI-MS’’, *Acta Pharmaceutica*, 70(3), 325-342, (2020).

Sweidan, K., Engelmann, J., Abu Rayyan, W., Sabbah, D., Abu Zarga, M., Al-Qirim, T., ... & Shattat, G., ‘‘Synthesis and preliminary biological evaluation of new heterocyclic carboxamide models’’, *Letters in Drug Design & Discovery*, 12(5), 417-429, (2015).

Tietze, L. F., Bell, H. P., & Chandrasekhar, S., ‘‘Natural product hybrids as new leads for drug discovery’’, *Angewandte Chemie International Edition*, 42(34), 3996-4028, (2003).

Ulukaya, E., Acilan, C., & Yilmaz, Y., ‘‘Apoptosis: why and how does it occur in biology?’’, *Cell biochemistry and function*, 29(6), 468-480, (2011).

Yu, Y. M., Chao, T. Y., Chang, W. C., Chang, M. J., & Lee, M. F., ‘‘Thymol reduces oxidative stress, aortic intimal thickening, and inflammation-related gene expression in hyperlipidemic rabbits’’, *journal of food and drug analysis*, 24(3), 556-563, (2016).

Yu, Y., Liu, Y., Shi, R., Zhang, D., Li, C., & Shi, J., ‘‘New thymol and isothymol derivatives from *Eupatorium fortunei* and their cytotoxic effects’’, *Bioorganic Chemistry*, 98, 103644, (2020).

Zhang, M. Z., Chen, Q., & Yang, G. F., ‘‘A review on recent developments of indole-containing antiviral agents’’, *European journal of medicinal chemistry*, 89, 421-441, (2015).

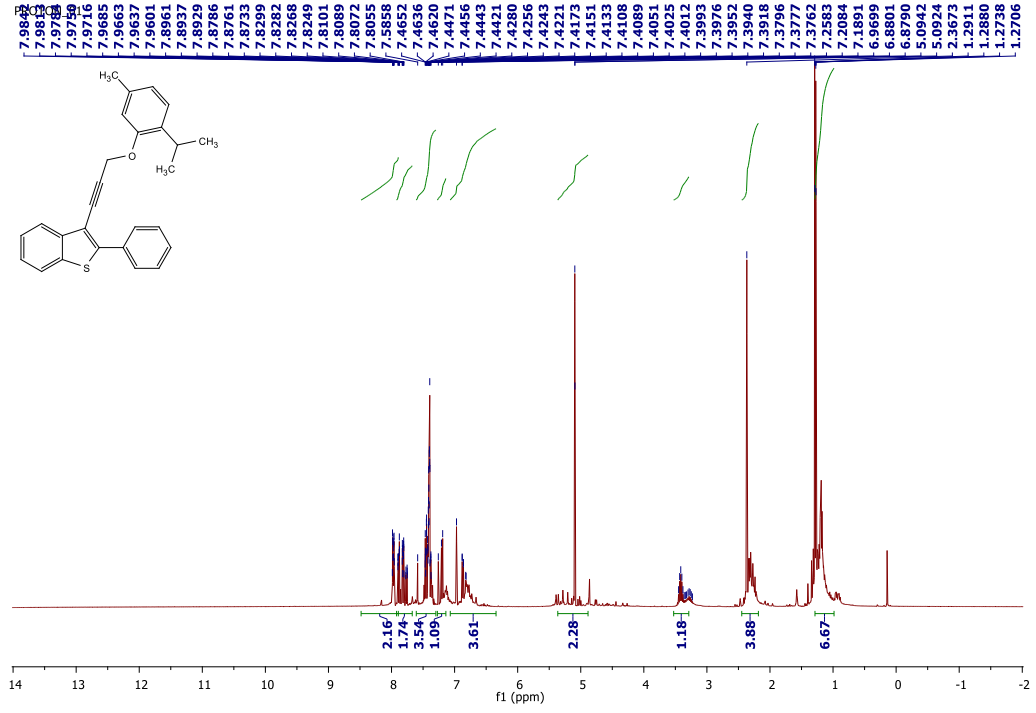
Zhang, Mei, et al., "Thymol derivatives with antibacterial and cytotoxic activity from the aerial parts of *Ageratina adenophora*." *RSC Advances* 11.10, 5755-5761 (2021).

Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R, "Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs", *Food chemistry*, 105(3), 940-949, (2007).

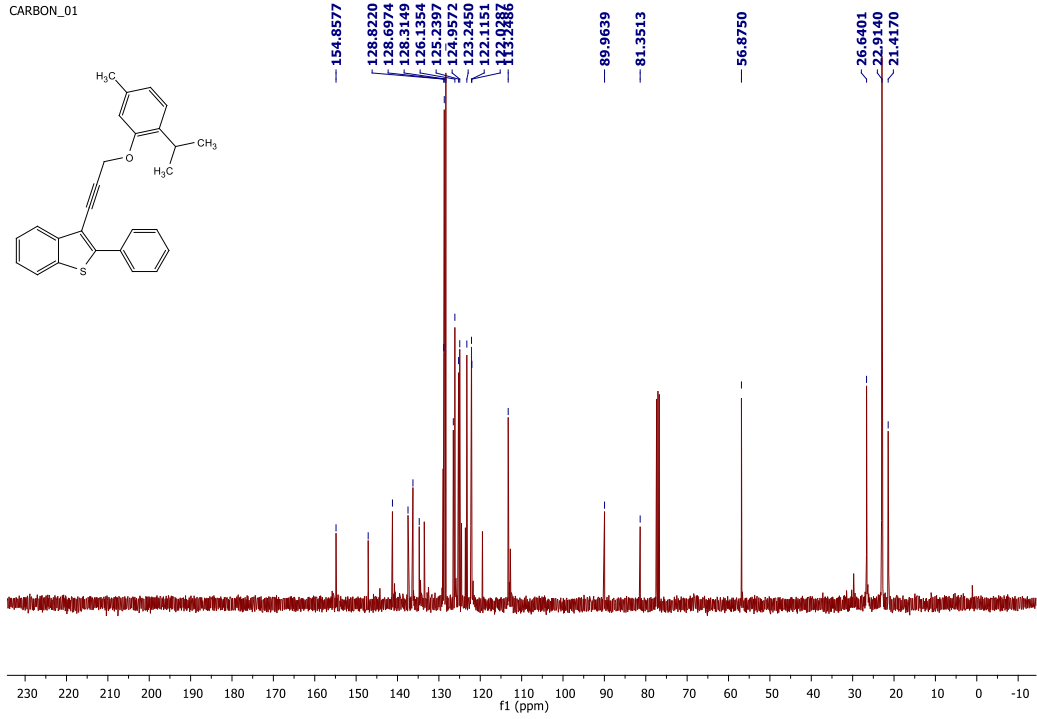
EKLER

7. EKLER

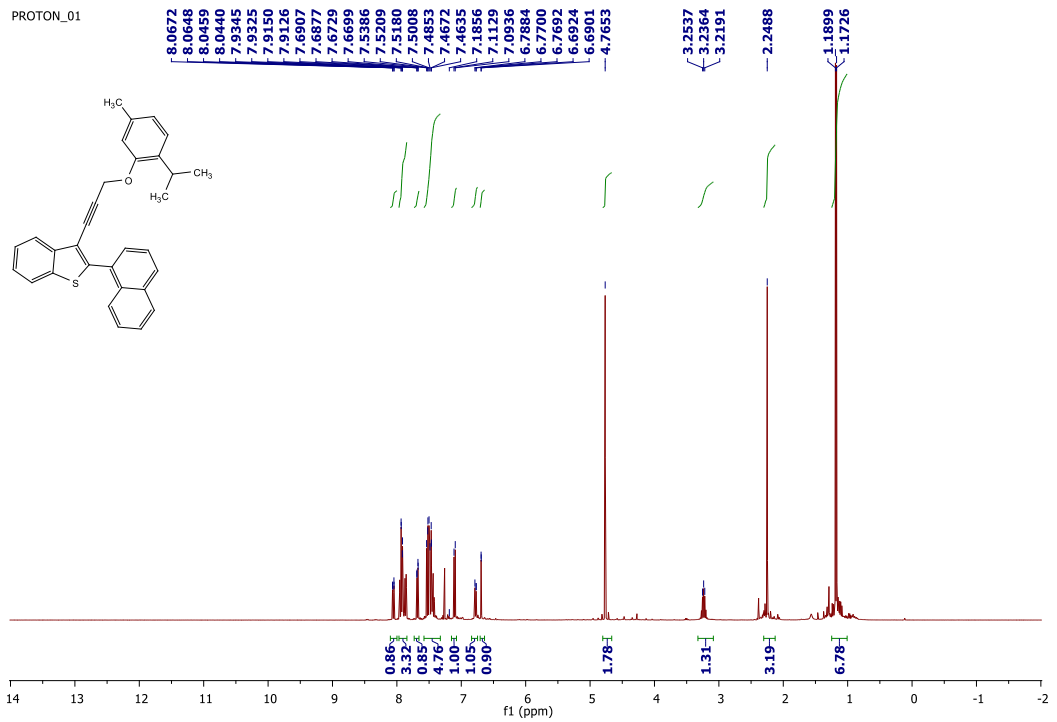
EK A. İzole edilen yeni benzotiyofen-timol hibrid türevlerinin NMR spektrum görüntüleri



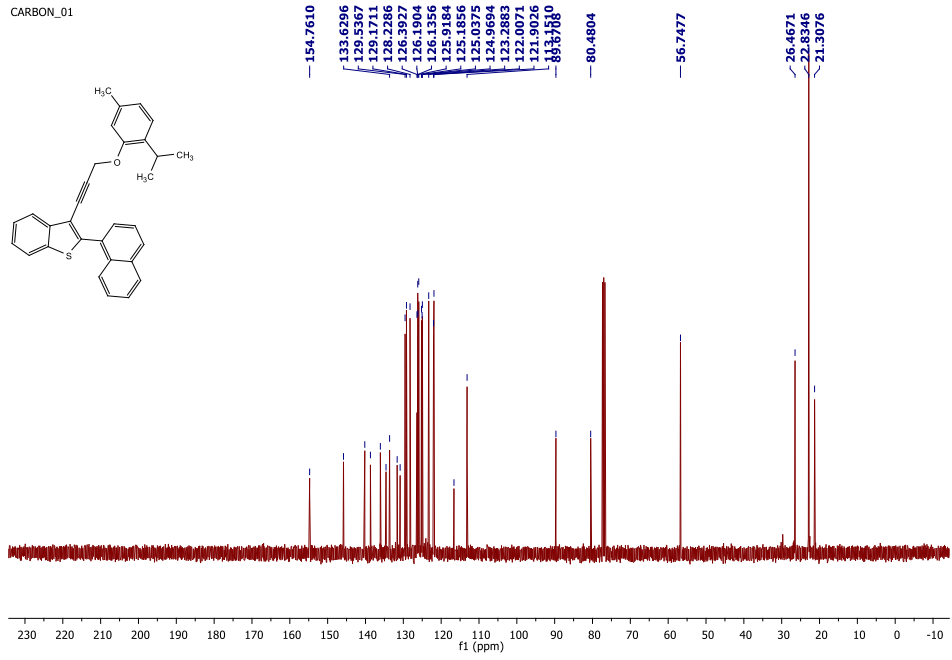
Şekil A. 1: AŞ1 bileşiğinin ¹H NMR spektrumu.



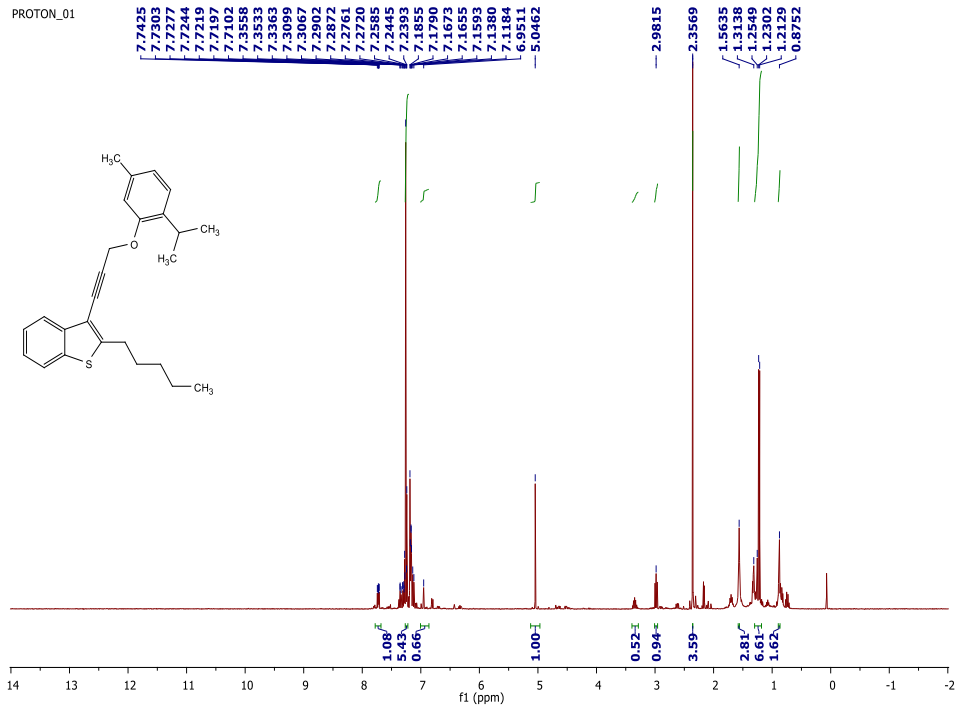
Şekil A. 2: AŞ1 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu.



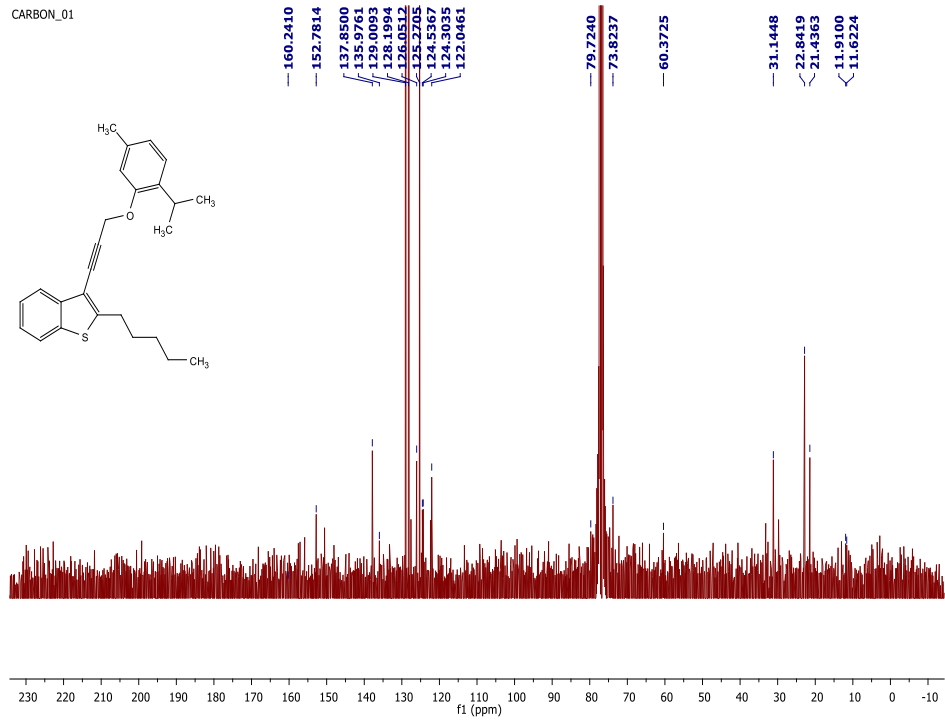
Şekil A. 3: AŞ2 bileşiğinin ^1H NMR spektrumu.



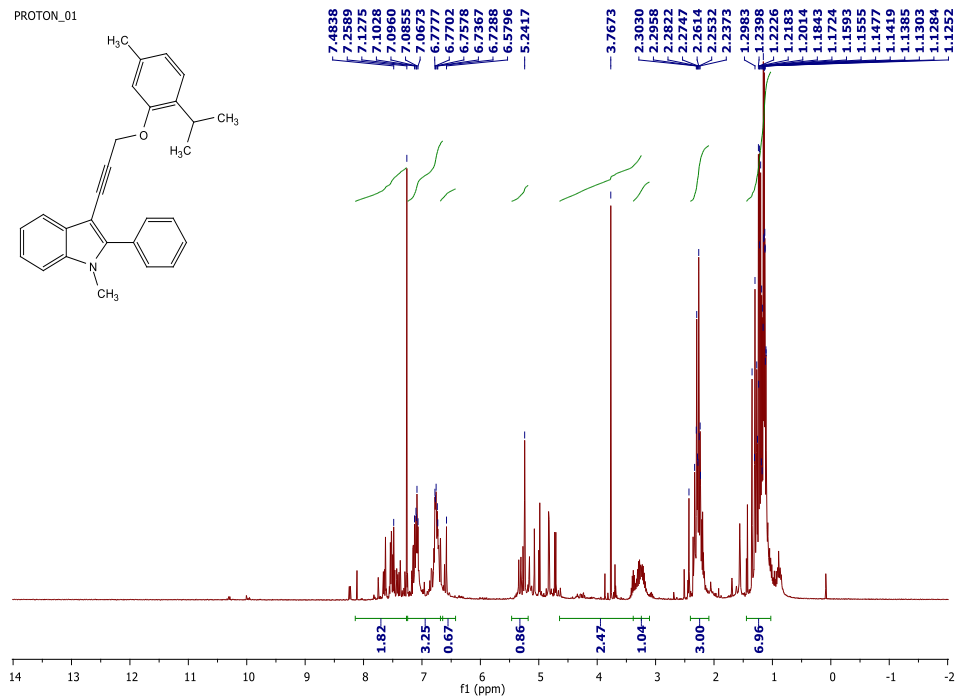
Şekil A. 4: AŞ2 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu.



Şekil A. 5: AŞ5 bileşiğinin ^1H NMR spektrumu.

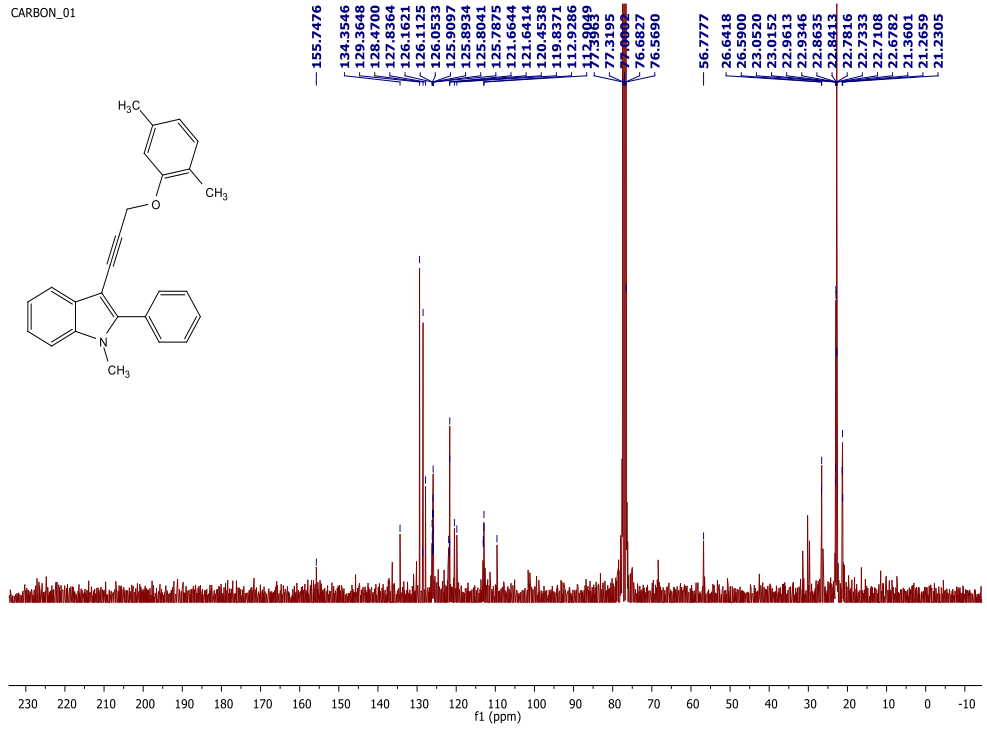


Şekil A. 6: AŞ5 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu.

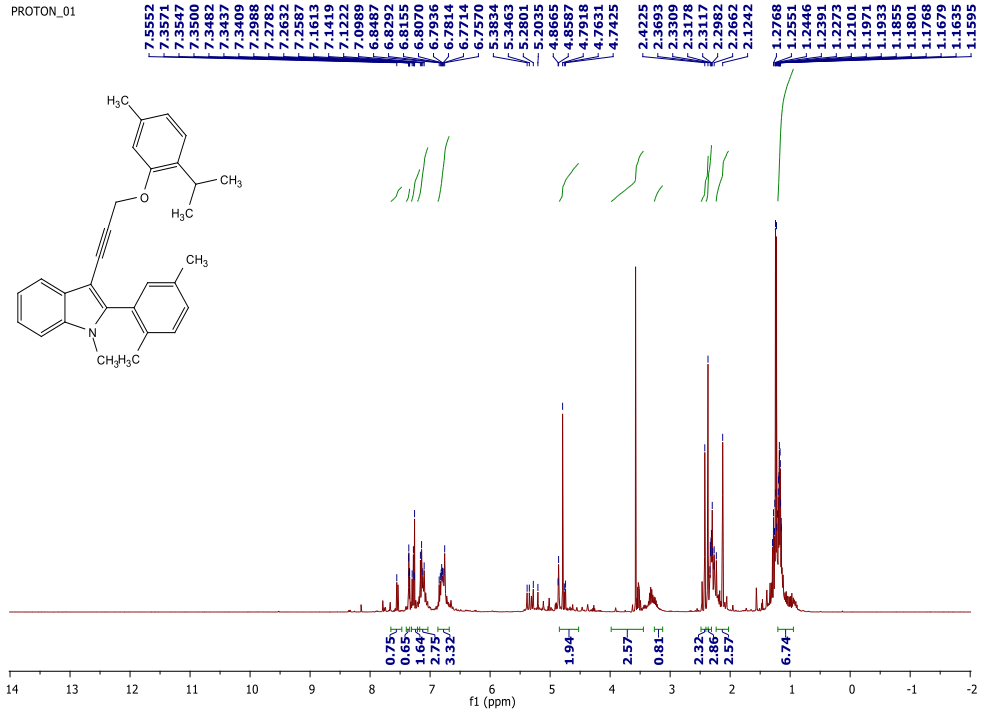


Şekil A. 7: AŞ6 bileşiğinin ^1H NMR spektrumu.

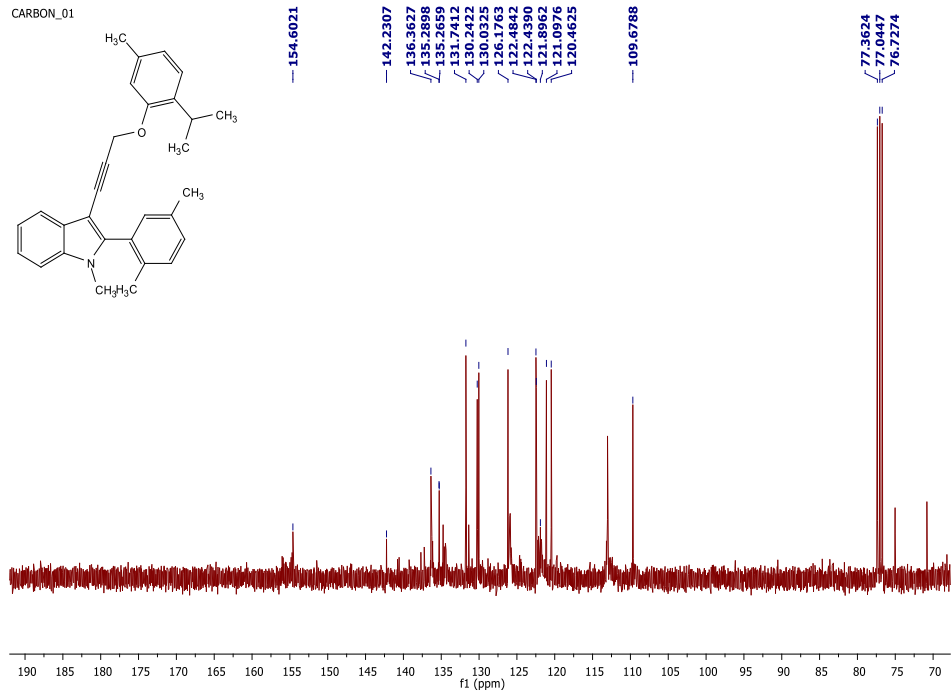
CARBON_01



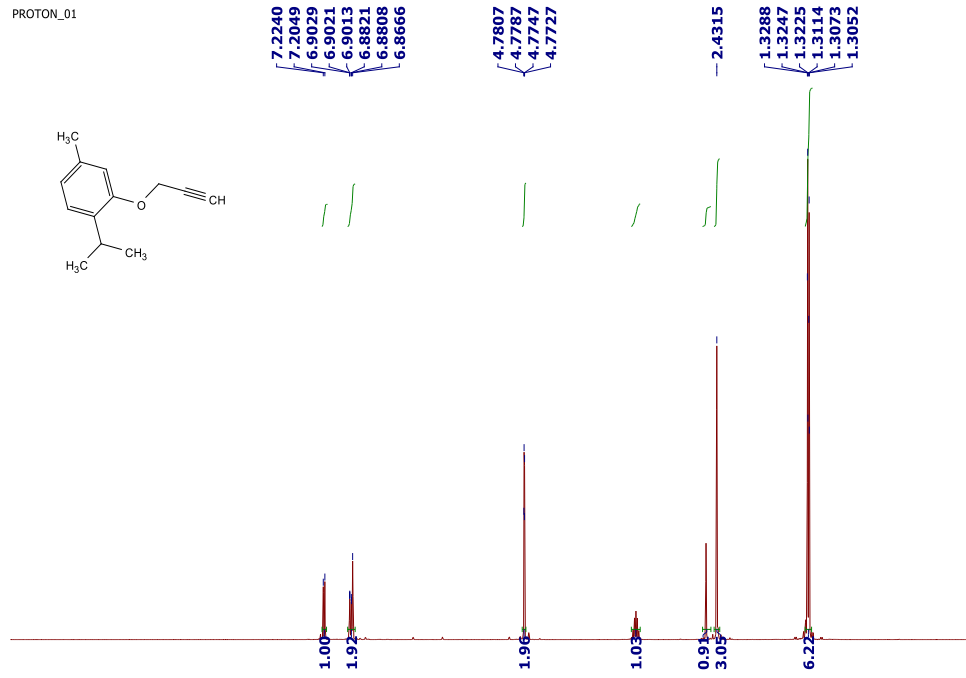
Şekil A. 8: AŞ6 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu.



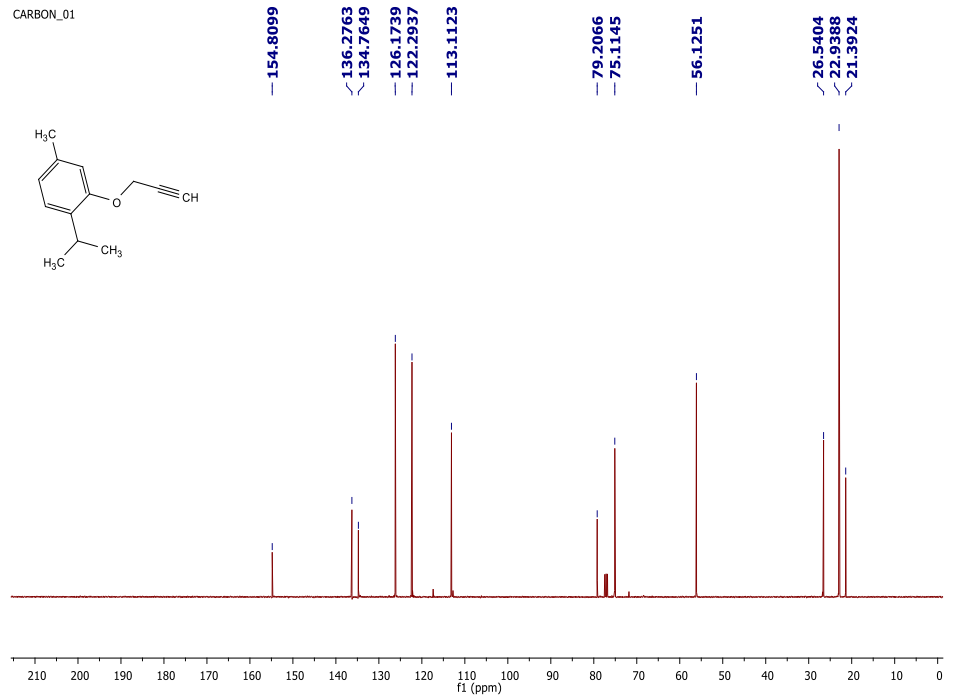
Şekil A. 9: AŞ7 bileşiğinin ^1H NMR spektrumu.



Şekil A. 10: AŞ7 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu.



Şekil A. 11: AŞ14 bileşiğinin ^1H NMR spektrumu.



Şekil A. 12: AŞ14 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu.