HATİCE DİNÇER

# Kanser Büyolojisi ve Farmakolojisi

İSTANBUL-2021

**T.C.**
**İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ**
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

# NAFTAKİNON TÜREVLİ YENİ SENTEZ BİLEŞİKLERİN ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

**HATİCE DİNÇER**

**DANIŞMAN**
**PROF. DR. ENGİN ULUKAYA**

**KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ**

**İSTANBUL-2021**

**T.C.**
**İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ**
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

# NAFTAKİNON TÜREVLİ YENİ SENTEZ BİLEŞİKLERİN ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

**HATİCE DİNÇER**

**DANIŞMAN**
**PROF. DR. ENGİN ULUKAYA**

**KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ**

**İSTANBUL-2021**

İSÜ | İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL

# SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
# YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

**İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ**
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE,**

09/02/2021

**ÖĞRENCİ BİLGİLERİ**

| | |
|---|---|
| **Öğrenci Adı Soyadı** | : Hatice DİNGER |
| **Öğrenci No** | : 172254002 |
| **Anabilim Dalı** | : Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi |
| **Tez Danışmanı** | : Prof. Dr. Engin ULUKAYA |
| **Tez Başlığı** | : Nattokinon Türevli Yeni Sentez Bileşiklerin, Üçlü Negatif Meme Kanseri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi |

**TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Toplantı Tarihi** | : 09.02.2021 | **Saati** | : 11:00 |
| **Öğrenci Savunmaya** | : ☒ **GELDI** | | |

Enstitümüze kayıtlı yukarıda bilgileri bulunan öğrencinin Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca tezi bilimsel olarak incelenmiş ve adayın tez çalışmasını sunmasının ardından yapılan sözlü sınav sonunda adayın tez çalışmasıyla ilgili aşağıdaki karar,

☒ **OY BIRLIGI** ☐ **OY ÇOKLUGU**

☒ Yapılan savunma sınavında adayın başarılı bulunması sonucunda tez **KABUL,**

☐ Yapılan savunma sınavı sonucunda tezin **DÜZELTİLMESİ,** *(3 ay süre)*

☐ Yapılan savunma sınavının sonucunda tezin **REDDEDİLMESİ** kararı alınmıştır.

| Tez Sınavı Jürisi | Ünvanı, Adı Soyadı | Üniversite - Bölüm | İmza |
|---|---|---|---|
| Danışman Üye | Prof. Dr. Engin ULUKAYA | İstinye Ü. / Tıp F. | |
| Eş Danışman | | | |
| Üye | Dr. Öğr. Üyesi Didem KARAKAŞ ZEYBEK | İstinye Ü. / MBG | |
| Üye | Dr. Öğr. Üyesi Özlem SAĞLAM UCAR | Haliç Ü / MBG | |

**TEZ ONAYI**

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

| Anabilim Dalı Başkanı | Enstitü Müdürü |
|---|---|
| Prof. Dr. Engin ULUKAYA | [Unvanı, Adı Soyadı] |

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Prof. Dr. Engin ULUKAYA
(Danışman)

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

| | |
|---|---|
| Prof. Dr. Engin ULUKAYA | İstinye Üniversitesi |
| Dr. Ögrt. Üyesi Didem KARAKAŞ ZAYBEK | İstinye Üniversitesi |
| Dr. Öğrt. Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR | Haliç Üniversitesi |

## ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum, “ Naftakinon Türevli Yeni Sentez Bileşiklerin Üçlü Negatif Meme Kanseri Üzerine Etkisinin İncelenmesi ” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Hatice Dinçer (İmza)

# TEŞEKKÜR

Yüksek lisans hayatım boyunca danışmanlığımı yapmış olan, eğitimimi düzenli bir şekilde ilerletebilmem için büyük bir özveri gösteren ve çalışmalarım konusunda desteğini, bilgisini ve tecrübesini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bilime karşı heyecanını her an bana hissettirmiş çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Tüm yüksek lisans ve laboratuvar hayatım boyunca yaptığım çalışmalarda yol gösteren fikirleriyle beni en iyiye yönlendiren kendimi geliştirmemde çok büyük katkıları olan ve çalışmaktan çok büyük keyif aldığım çok değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Didem KARAKAŞ ZEYBEK'e, Dr. Öğr. Üyesi Nazlıhan AZTOPAL'a,

Çalışmalarımız boyunca bana her konuda destek olan, tecrübelerini benimle her zaman paylaşan, hatalarım konusunda da her zaman beni yönlendirip yol gösteren benden moral ve desteklerini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan çok büyük keyif aldığım ve bir çok kez bana iyi ki dedirten çok değerli çalışma arkadaşlarım Merve ERKISA GENEL'e Okan AKAR'a,

Laboratuvar hayatımdaki tüm çalışmalarda bana yardım etmekten asla çekinmeyen manevi desteklerini her zaman göstermiş olan birçok şeyi beraber öğrendiğimiz aynı zamanda yol göstererek birçok şeyi kendilerine öğretmeye çalıştığım ve ileride çok güzel bir geleceğin onları beklediğine inandığım Buse Meriç AÇAR ve İrem Nur ATEŞ'e

Her anımda yanımda olan umutsuzluğum karşısında beni her zaman cesaretlendirip her zaman bana güvenen, en önemlisi her zaman bana inanan, iyi ve kötü her anımda yüzümü güldürmeyi başaran en büyük destekçim ve hayat arkadaşım Talha Tarık KARATEKİN'e,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi deste benden esirgemeyen, her zaman arkamda duran, duruşuyla rol modelim olmuş, bana güçlü ve ayakları yere sağlam basan başı her zaman dik bir kadın olmayı öğreten çocukluk hayalim olan bilim insanı olmak konusunda her zaman beni desteklemiş sevgili ailem, canım annem Sultan DİNÇER'e teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....
ETİK BEYANI .....İİİ
TEŞEKKÜR..... İV
İÇİNDEKİLER .....V
TABLOLAR LİSTESİ.....Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....Xİİ
ÖZET .....XV
ABSTRACT..... XVİ
GİRİŞ .....1
1. GENEL BİLGİLER .....2
1.1. Kanser .....2
1.2. Meme Kanseri .....2
1.2.1. Meme Kanserinin Hormonal Mekanizması .....5
1.2.2. Meme Kanseri İstatistikleri .....6
1.2.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri .....7
1.2.4. Genetik Eğilim .....9
1.2.5. Meme Kanseri Moleküler Mekanizması .....10
1.2.5.1. Sinyal İletimi .....10
1.3. Üçlü Negatif Meme Kanseri .....13
1.3.1. Üçlü Negatif Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri .....15
1.4. Apoptoz .....16
1.4.1. Apoptoz Modülatörleri .....17
1.4.2. İçsel ve dışsal apoptotik yollar .....20
1.4.3. Kaspazlar .....23
1.4.4. Bcl-2 ailesi .....24
1.4.5. Apoptoz ve Karsinogenez .....26
1.5. Nekroz .....27
1.5.1. Nekroz ve Apoptoz .....30
1.6. Nekroptozis .....32

1.7. Epitelyal-Mezankimal Dönüşüm .....35
1.8. Naftakinon.....36
2. MATERYAL VE METOD.....38
2.1. Materyal .....38
2.1.1. Kimyasal maddeler .....38
2.1.2. Sarf malzemeler .....39
2.1.3. Cihazlar .....40
2.2. Metod .....41
2.2.1. İstanbul Üniversitesi' nin sentezlemiş olduğu naftakinon türevli bileşiklerin hazırlanması .....41
2.2.2. Hücre Kültürü .....41
2.2.2.1. Hücre Hattının Stoktan Çıkartılması .....41
2.2.2.2. Hücre Hattının Pasajlanması .....42
2.2.2.3. Hücre Hattının Stoklanması .....42
2.2.2.4. Besiyerinin Hazırlanması .....43
2.2.2.5. Hemositometre İle Hücrelerin Sayımı .....43
2.2.3. Sulforhodamine B (SRB) testi ile canlılığın belirlenmesi .....43
2.2.4. Akım Sitometrisi İle Anneksin V Analizi .....44
2.2.5. Akım Sitometrisi İle Kaspaz 3/7 Aktivasyon Analizi.....44
2.2.6. Akım Sitometrisi İle Mitokondri Membran Potansiyeli Analizi .....45
2.2.7. Akım Sitometrisi İle DNA Hasarı Analizi .....46
2.2.8. Akım sitometrisi ile bcl-2 analizi.....48
2.2.9. Akım Sitometrisi İle ROS Analizi .....49
2.2.10. Yara iyileşmesi.....50
2.2.11. Koloni Formasyonu.....50
2.2.12. Western blot analizi .....50
2.2.12.1. Protein Örneklerinin Hazırlanışı .....53
2.2.12.2. Proteinlerin Biçinkoninik asit (BCA) Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi .....53
2.2.12.3. Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması .....54
2.2.12.4. Proteinlerinin Belirlenmesi .....55
2.2.13. İstatistiksel analiz.....56

3. BULGULAR.....57
3.1. SRB Canlılık Testi Bulguları.....57
3.2. Akım Sitometrisi Bulguları.....59
3.2.1. Anneksin V Testi.....59
3.2.2. Kaspaz 3/7 Testi.....61
3.2.3. Mitopotential Testi.....63
3.2.4. Bcl-2 Testi.....65
3.2.5. ROS Testi.....67
3.2.6. H2AX DNA Hasarı Testi.....67
3.3. Yara İyileşmesi Bulguları.....68
3.4. Koloni Formasyonu Bulguları.....70
3.5. Western Blot Bulguları.....71
4. TARTIŞMA.....73
5. SONUÇ.....77
KAYNAKÇA.....78
TELİF HAKKI İZNİ.....92
İNTİHAL RAPORU.....93
ÖZGEÇMİŞ.....94

## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.Meme kanserinin moleküler alt tiplerinin sınıflandırılması ..... 4
Tablo 2. Apoptoz ve Nekroz arasndaki farklar (Türkçeleştirilerek alınmıştır. ..... 32
Tablo 3.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 μM) konsantrasyonunun 12 saat uygulanması sonucu anneksin-V değerlendirmesiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik yüzdelerinin tabloda gösterilmesi. ..... 60
Tablo 4.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 μM) konsantrasyonunun 24 saat uygulanması sonucu anneksin-V değerlendirmesiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik yüzdelerinin tabloda gösterilmesi. ..... 60
Tablo 5.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 μM) konsantrasyonunun 12 saat uygulanması sonucu kaspaz 3/7 değerlendirmesiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik yüzdelerinin tabloda gösterilmesi. ..... 62
Tablo 6.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 μM) konsantrasyonunun 24 saat uygulanması sonucu kaspaz 3/7 değerlendirmesiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik yüzdelerinin tabloda gösterilmesi. ..... 62
Tablo 7.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 μM) konsantrasyonunun 12 saat uygulanması sonucu.mitokondri membran potansiyeli değişimi değerlendirmesi sonucu alınan sonuçların tabloda gösterilmesi. ..... 64
Tablo 8.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 μM) konsantrasyonunun 12 saat uygulanması sonucu.mitokondri membran potansiyeli değişimi değerlendirmesi sonucu alınan sonuçların tabloda gösterilmesi. ..... 64
Tablo 9.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 μM) konsantrasyonunun 12 saat uygulanması sonucu Bcl-2 ifadesi ve fosforilasyonunun değerlendirmesi sonucu alınan sonuçların tabloda gösterilmesi..... 66
Tablo 10.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 μM) konsantrasyonunun 24 saat uygulanması sonucu Bcl-2 ifadesi ve fosforilasyonunun değerlendirmesi sonucu alınan sonuçların tabloda gösterilmesi..... 66

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.Meme kanseri alt tiplerinin gen ekspresyon profiline ve bu alt tipin hayatta kalma sonucuna göre sınıflandırılması. (A) Bir dendrogram 115 meme tümörünü Luminal A, Luminal B, ERBB + / HER2 ile zenginleştirilmiş, Bazal ve Normal benzeri alt tipler olarak 5 alt tipte sınıflandırır. Gri renkli numuneler hiçbir alt tipe karşılık gelmez. (B) Genel hayatta kalma olasılığı olarak temsil edilen farklı meme kanseri alt tiplerinin hayatta kalma analizi. ..... 3
Şekil 1.2. Meme anatomisi ..... 4
Şekil 1.3. Meme kanseri hormonal mekanizması ..... 6
Şekil 1.4 Meme kanseri risk faktörleri ..... 8
Şekil 1.5.HER2 yolu üzerinden sinyalleşme. Erb-B / HER büyüme faktörü reseptörleri ailesi ve bunların sinyal yolları. HER2'nin diğer aile üyeleriyle dimerleştiği gösterilmiştir. Terapötiklerin hedeflediği reseptörler ve heterodimerler belirtilmiştir ... 12
Şekil 1.6 Üçlü negatif meme kanseri ve üçlü negatif olmayan meme kanseri metastaz yüzdeleri ..... 14
Şekil 1.7 Apoptozun transmisyon elektron mikroskopu (TEM) ile görüntülenmesi. Oklar fragmente nükleusu göstermekteyken ok uçları apoptotik cisimleri göstermektedir ..... 17
Şekil 1.8 Apoptozu indükleyen hücre içi ve hücre dışı faktörler ..... 19
Şekil 1.9 İki ana apoptotik yol. İçsel ve dışsal yolak. ..... 21
Şekil 1.10 Efektör ve başlatıcı kaspazlar. ..... 24
Şekil 1.11 Anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri (Anvekar ve ark. 2011) .. 26
Şekil 1.12 Apoptoz ve karsinojenezden kaçınmaya katkıda bulunan mekanizmalar. .... 27
Şekil 1.13 Nekroz oluşum mekanizması. (türkçeleştirilerek alınmıştır ..... 30
Şekil 1.14 Nekroptozisin moleküler mekanizması. ..... 35
Şekil 1.15 Kinon molekülü ..... 36
Şekil 3.1. Doza bağlı ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin üçlü negatif meme kanseri hücre hattında canlılık üzerine etkisinin SRB testi ile gösterilmesi. MDA-MB-231üçlü negatif meme kanseri hücre hattında (A) ZP-2 (B) ZP-4 bileşiklerinin 0, 1.5, 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 μM dozlarında 48 saat uygulanması sonucu hücre canlılıkları ölçülmüştür. (****:p<0,0001) ..... 57

Şekil 3.2 ZP-2 ve ZP-4 ile 48 saat tedavi edilen MDA-MB-231 hücre hattının faz fotoğrafları ..... 58
Şekil 3.3. MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 μM) konsantrasyonunun uygulanması sonrası anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzdelerinin 12 ve 24 saatlik grafikleri. (a: sağlıklı hücreler; b: erken apoptotik hücreler; c: geç apoptotik hücreler; d: nekrotik hücreler). ..... 59
Şekil 3.4.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 μM) konsantrasyonunun uygulanması sonrası kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzdelerinin 12 ve 24 saatlik grafikleri (a: sağlıklı hücreler; b: kaspaz 3/7 aktif olan erken apoptotik hücreler; c: kaspaz 3/7 aktif olan geç apoptotik hücreler; d: kaspaz 3/7 aktif olmayan nekrotik hücreler)..... 61
Şekil 3.5.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 μM) konsantrasyonunun uygulanması sonrası sağlıklı mitokondri yüzdelerinin 12 ve 24 saatlik garfikleri (a: sağlıklı mitokondri ve sağlıklı hücreler; b: depolarize mitokondri ve sağlıklı hücreler; c: depolarize mitokondri ve ölü hücreler; d: ölü hücreler) ..... 63
Şekil 3.6 MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 μM) konsantrasyonunun uygulanması sonrası Bcl-2 ifadesinin ve fosforilasyonun ölçülmesiyle elde edilen değerlerin 12 ve 24 saatlik grafikleri. (a: düşük Bcl-2 ifadesi; b: fosforile Bcl-2; c: yüksek Bcl-2 ifadesi)..... 65
Şekil 3.7.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 μM) konsantrasyonunun uygulanması sonrası hücre içi ROS ölçümüyle elde edilen sonuçların 12 ve 24 saatlik garfikleri..... 67
Şekil 3.8 MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 μM) konsantrasyonunun uygulanması sonrası hücre içi DNA hasarı sonuçlarının 12 ve 24 saatlik grafikleri. ..... 68
Şekil 3.9.ZP-2 ve ZP-4 bileşikleri uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyon yeteneği. ..... 69
Şekil 3.10.ZP-2 ve ZP-4 bileşikleri uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 12-24-48 saatlik migrasyon değerleri grafiği. ..... 70
Şekil 3.11.MDA-MB-231 hücrelerinin ZP-2 ve ZP-4 bileşikleri uygulanması sonucu koloni oluşturma yeteneklerinin koloni formasyon testi ile ölçümü. ..... 71
Şekil 3.12.ZP-2 ve ZP-4 bileşikleri uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 12-24 saat sonrası protein ifade seviyelerinin western blot yöntemiyle belirlenmesi..... 72

Şekil 3.13 Western blot yöntemiyle belirlenen protein seviyelerinin GAPDH seviyelerine göre normalize edilerek oluşturulmuş analiz grafiği ..... 72

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

**7-AAD** : 7-Aminoaktinomisin D

**AIF** : Apoptozis indükleyici faktör (Apoptosis inducing factor)

**AKT** : Protein kinaz B

**AP1** : Aktivatör protein 1

**APAF-1** : Apoptotik proteaz aktive eden faktör

**APO-1** : Apoprotein 1

**AR** : Androjen reseptörü

**ASAP** : Atipik küçük asiner proliferasyon

**ATM** : Serin/ treonin kinaz

**ATP** : Adenozin Trifosfat

**BAX** : Bcl-2 ilişkili X protein

**BCA** : Biçinkoninik asit

**BH** : Bcl-2 homoloji bölgeleri

**BSA** : Sığır serum albümin

**CAD** : Kaspaz aktive edici DNaz

**CD95** : Farklılaşma kümesi 95

**CHEK2** : Kontrol noktası kinaz 2

**CK18** : Sitokeratin 18

**DAPK** : Ölüm ilişkili protein kinaz

**DD** : Ölüm alanı (Death domain)

**DHEA** : Dehidroepiandrosteron

**DISC** : Ölüm indükleyici sinyal kompleksi

**DMSO** : Dimetilsulfoksit

**DNA** : Deoksi ribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid)

**DNA-PK** : DNA bağımlı protein kinaz (DNA-dependent Protein Kinase)

**EDTA** : Etilen Diamin Tetraasetik Asit

**EGFR** : Epidermal büyüme faktör reseptörü (Epidermal growth factor receptor**)**

**ER** : Östrojen reseptörü (Estrogen receptor)

**FADD** : Fas ilişkili ölüm alanı (Fas associated death domain)

**FBS** : Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)

**FITC** : Fluoresin izotiyosiyanat

**GST** : Glutatyon S-transferaz

**GTP** : Guanozin trifosfat

**HER-2** : İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (Human epidermal growth factor receptor 2)

**HRT** : Hormon replasman tedavisi

**ICAD** : Kaspazla aktive edilmiş

**IGF** : İnsülin benzeri büyüme faktörü

**Kbp** : Klikobaz çifti

**kDa** : KiloDalton

**MAPK** : Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz

**MEK** : Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz

**MOMP** : Mitokondri dış membran permeabilizasyonu

**mTOR** : Rapamisin hedefi (Target of rapamycin)

**MTT** : Metilltiazoldifeniltetrazolyum bromür

**NAC** : N-asetil-L-sistein

**PARP** : Poli(ADP-riboz)polimeraz (Poly ADP-ribose polymerase)

**PBS** : Fosfat tuz tamponu (Phosphate buffered saline)

**PBS** : Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

**PI** : Propidyum iyodür (Propdium iodide)

**PI3K** : Fosfatidilinositol 3 Kinaz

**PS** : Fosfatidil serin (phosphatidylserine)

**PTEN** : Fosfataz ve tensin homolog proteini

**Rb** : Retinoblastoma

**RNA** : Ribo nükleik asit (Ribonucleic acid)

**ROCK1** : Rho ilişkili sarmal oluşturan kinaz 1

**ROS** : Reaktif oksijen türleri

**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute Medium

**SDS** : Sodyum dodesil sülfat (Sodium dodecyl sulfate)

**SDS-PAGE** : SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi

**SHBG** : Seks hormon bağlayıcı globülin

**SRB** : Sulforhodamine B

**STK11** : Serin / treonin kinaz 11

**TCA** **:** Trikloroasetik asit

**TdT** **:** Terminal deoksinükleotidil transferaz

**TNBC** **:** Üçlü negatif meme kanseri

**TNF** **:** Tümör nekrozis faktör

**TP53** **:** Tümör protein 53

**TRAIL** **:** TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand

**VEGF** **:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü

# ÖZET

Dinçer, H. (2021). Naftakinon Türevli Yeni Sentez Bileşiklerin Üçlü Negatif Meme Kanseri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans. İstanbul.

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanser türü ve kansere bağlı ölümlerde en yaygın ikinci kanser türüdür. Özellikle üçlü negatif meme kanseri, meme kanseri tipleri arasında en agresif ve çoğu ilaca karşı oldukça dirençli olan bir alt tipidir. Tedavi; ameliyat, radyasyon tedavisi, kemoterapi, hormon tedavisi ve / veya mümkün olduğunda hedefe yönelik tedavileri içerir. Üçlü negatif meme kanseri, meme kanseri alt tipleri arasında en agresif kanser türüdür, çünkü Luminal tiplerin (hormonal terapiden fayda görebilen) ve HER2 pozitif tipin (HER2 hedefli tedavilerden fayda sağlayabilen) aksine, hedefe yönelik bir tedaviden yoksundur. Bu nedenle, üçlü negatif meme kanseri tedavisi için yeni ilaç ve tedavi stratejilerinin araştırılmasına ek olarak, bu ilaç adaylarından etkilenen moleküler yolların açıklığa kavuşturulması da çok önemlidir. Naftokinon bileşikleri üzerine yapılan araştırmalar kanser tedavisinde oldukça ümit vericidir, klinik türevleri nedeniyle ilaç olarak kullanımı yaygınlaşmıştır. Naftokinon türevi ilaçlar, topoizomeraz II'yi inhibe ederek ve hücre içi ROS seviyelerini artırarak hücre ölümünü tetikler. Bu nedenle bu tezde, yeni sentezlenen naftokinon türevlerinin (ZP-2 ve ZP-4) üçlü negatif meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Yeni sentezlenen naftokinon türevi bileşiğin, üçlü negatif meme kanseri hücre dizilerinde hücre ölümünü tetiklediği bulunmuş, ancak mekanizmasal olarak farklılık gözlemlenmiştir. Üçlü negatif meme kanserinde ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin umut verici bir tedavi seçeneği olabileceği beklenmektedir, bu nedenle farklı kanser türlerini içeren in vitro ve in vivo deneylerin yapılmasının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Naftakinon, Apoptoz, Anti-kanser ilaç, Üçlü negatif meme kanseri

## ABSTRACT

Dinçer, H. (2021). Investigation of the Effects of New Synthesis Compounds with Naphthaquinone Derivatives on Triple Negative Breast Cancer. Istinye University, Institute of Health Science, Anabilim Dalının İngilizce Adı. Master Thesis. Istanbul.

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer among women and the second most common type of cancer deaths due to cancer. In particular, triple negative breast cancer is the most aggressive subtype of breast cancer and is highly resistant to most drugs. Treatment; It contains of surgery, radiation therapy, chemotherapy, hormone therapy and / or targeted therapies. Triple negative breast cancer is the most aggressive type of cancer among breast cancer subtypes, because unlike the Luminal types (which may benefit from hormonal therapy) and the HER2 positive type (which may benefit from HER2 targeted therapies), it lacks a targeted therapy.Therefore, in addition to researching new drug and treatment strategies for the treatment of triple negative breast cancer, it is also crucial to clarify the molecular pathways affected by these drug candidates. Studies on naphtoquinone compounds are very promising in cancer treatment, and their use as a medicine has become widespread due to their clinical derivatives. Naphtoquinone-derived drugs trigger cell death by inhibiting topoisomerase II and increasing intracellular ROS levels. Therefore, in this thesis, the cytotoxic effects of newly synthesized naphthoquinone derivatives (ZP-2 and ZP-4) on the triple negative breast cancer cell line (MDA-MB-231) were investigated. It was found that the newly synthesized naphtoquinone derivative compound induced cell death in triple negative breast cancer cell lines by different mechanisms.It is expected that the compounds ZP-2 and ZP-4 could be a promising treatment option in triple negative breast cancer, so it is concluded that in vitro and in vivo experiments involving different types of cancer are required.



Key Words: Naphthaquinone, Apoptosis, Anti-cancer drug, Triple negative breast cancer

# GİRİŞ

Meme kanseri, her yıl dünya çapında tahmini 1,38 milyon yeni vaka ve 458000 ölümle kadınlar arasında en yaygın görülen malignitedir ve meme kanserinin güvenilir moleküler biyobelirteçlerini ve ilaç hedeflerini belirlemek, başarılı tedavi için en büyük zorluktur. Ayrıca, meme kanseri vakalarının yaklaşık% 15'ini oluşturan üçlü negatif meme kanseri (TNBC), diğer tipler arasında tipik olarak yüksek metastatik ve ölüm oranı ile ayırt edilir. TNBC'li hastalar için tedavi seçenekleri sınırlıdır.

Kemoterapötiklerin kimyasal yapısına bağlı olarak, araştırmacılar daha etkili olan yeni bileşikleri sentezlemektedirler. Naftokinondan (bu bileşiklerden biri) türetilen ilaç adayları, farklı kanserler üzerindeki etkili etkileri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Jardim ve diğerleri, 2015; Wellington, 2015). Naftokinon türevi bileşiklerin sitotoksik aktivitesi, DNA topoizomeraz II'yi inhibe edici özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Kennedy ve diğerleri, 2011; Kumar ve diğerleri, 2017). Ayrıca kinon analogları sitokrom P450 redüktaz ile semikuinon gruplarına dönüştürülür; bu semikinonlar oksitlenir ve normal oksijen seviyeleri altında kinona geri dönüştürülür. Bu durumda $O^2$ azalır ve süperoksit radikal iyonları ($O^{2-}$) oluşturur. Hem süperoksit anyon hem de semikinon radikal anyonu, DNA ipliği kırılmalarına neden olduğu bilinen hidroksil radikalleri oluşturabilir (Tewey vd., 1984; Wellington, 2015). Farklı naftokinon türevi bileşiklerin kullanıldığı çeşitli çalışmalarda, bu bileşiklerin ROS artışıyla apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Karakaş ve diğerleri, 2019; Wang ve diğerleri, 2018).

Ayrıca yapılan çalışmalarda naftakinon bileşiklerinin kanser hücrelerinde hücre ölümünü arttırarak apoptoza neden oldukları gösterilmiştir. Bu çalışma, naftakinon türevli bileşiklerin, üçlü negatif meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi ve bu etkinin moleküler mekanizmalarının araştırılması amacıyla yapılmıştır.

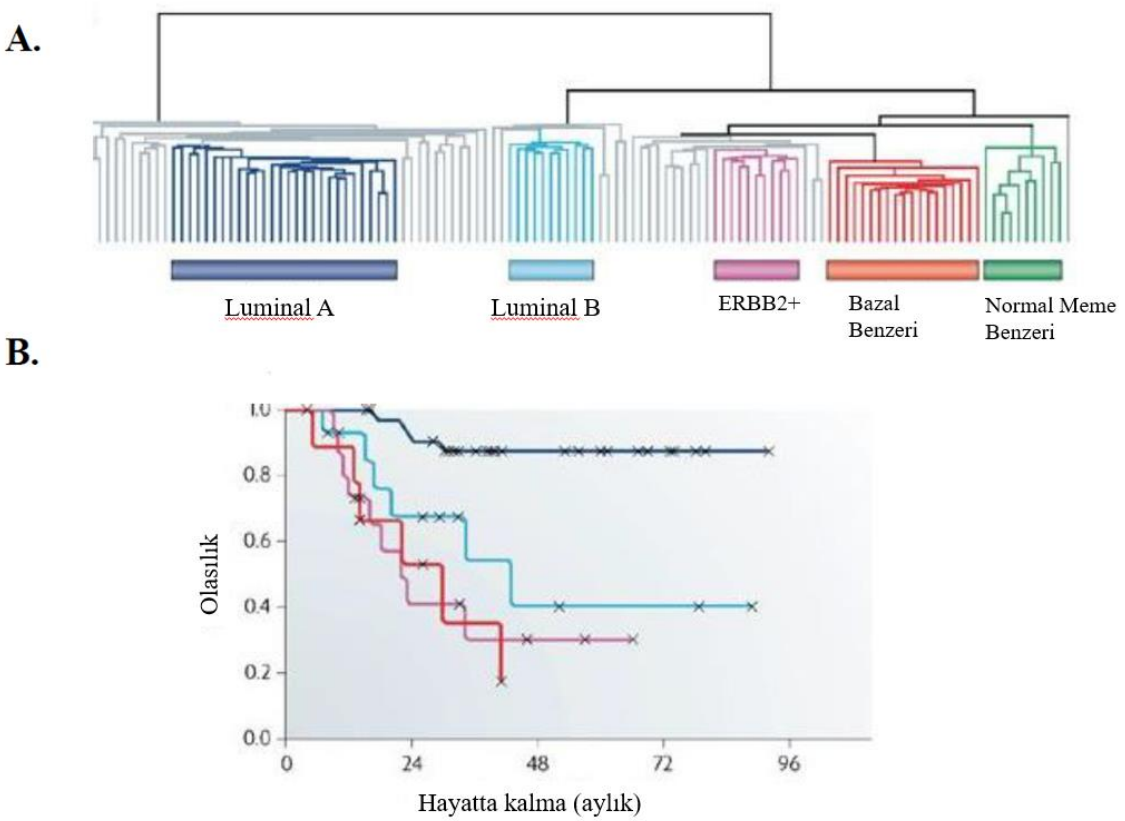
# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Kanser

Kanser, esas olarak ya genetik ya da çevresel temelli düzensizliğin ve / veya hücre döngüsünün yanlış düzenlenmesinin bir sonucudur (Hartley A-V ve ark.2020). Bir hücrenin kontrollü büyümesinden sorumlu çok sayıda etkili metabolik yol vardır; PI3K / mTOR sinyali, Wnt sinyali, MAPK sinyali, p53 sinyali, östrojen sinyali ve benzeri gibi (Sobočan M ve ark. 2020). Bu yollardan herhangi biriyle doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili olan gen ürünlerindeki anormallik, genomik istikrarsızlığa neden olabilir, mekanizmaları bozabilir, doku çevresinde artmış kan damarı oluşumuna neden olabilir Hücreler, uygun moleküler kontrol noktası kontrolleri olmadan bölünür ve vücut dokusu üzerinde tümörojenik bölgeler oluşturur. Bununla birlikte, tümörlerin kendisi genellikle ölümcül değildir, kanserli hücrelerin gerçek tehlikesi, aşırı moleküler özellikler kazanmaları ve diğer vücut dokularına yayılmak ve istila etmek için kendilerini geliştirmeleridir. Bu fenomen metastaz olarak adlandırılır ve kanser hücrelerinin metastatik aktivitesinin neden olduğu kanserdeki ölümlerin çoğunu oluşturur (Park H-A ve ark.2020).

## 1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kötü huylu tümördür ve moleküler düzeyde heterojen bir hastalıktır. Geçtiğimiz 10-15 yıl içinde, tedavi konseptleri bu heterojenliği hesaba katacak şekilde gelişti ve daha biyolojik olarak yönlendirilmiş tedavilere ve tedavinin olumsuz etkilerini azaltmak için yeni tedavilerin geliştirilmesine vurgu yapıldı. Erken meme kanseri- yani memede bulunan veya sadece koltuk altı lenf düğümlerine yayılmış kanser - tedavi edilebilir kabul edilir. Multimodal tedavinin ilerlemesi, hastaların% 70-80'inde iyileşme şansını artırmıştır. İlerlemil meme kanseri tedavi edilebilir bir hastalıktır ve tedavinin ana hedefleri, yaşam kalitesini (yani, kaliteye göre ayarlanmış yaşam beklentisini iyileştirmek) sürdürmek veya iyileştirmek için tedaviye bağlı düşük toksisite ile yaşam süresini uzatmak ve semptomları kontrol etmektir. Meme kanseri tedavisinin iki ana ayağı, bölgesel tedavi ve sistemik tedavidir; meme kanserinin histolojik ve moleküler özellikleri, tedavi kararlarını büyük ölçüde etkiler. Meme karsinogenezini yönlendiren moleküler değişiklikler çoktur ve tümörleri buna göre gruplandırmak için birkaç sınıflandırma geliştirilmiştir. (Şekil.1.1)




**Şekil 1.1.Meme kanseri alt tiplerinin gen ekspresyon profiline ve bu alt tipin hayatta kalma sonucuna göre sınıflandırılması. (A) Bir dendrogram 115 meme tümörünü Luminal A, Luminal B, ERBB + / HER2 ile zenginleştirilmiş, Bazal ve Normal benzeri alt tipler olarak 5 alt tipte sınıflandırır. Gri renkli numuneler hiçbir alt tipe karşılık gelmez. (B) Genel hayatta kalma olasılığı olarak temsil edilen farklı meme kanseri alt tiplerinin hayatta kalma analizi.**

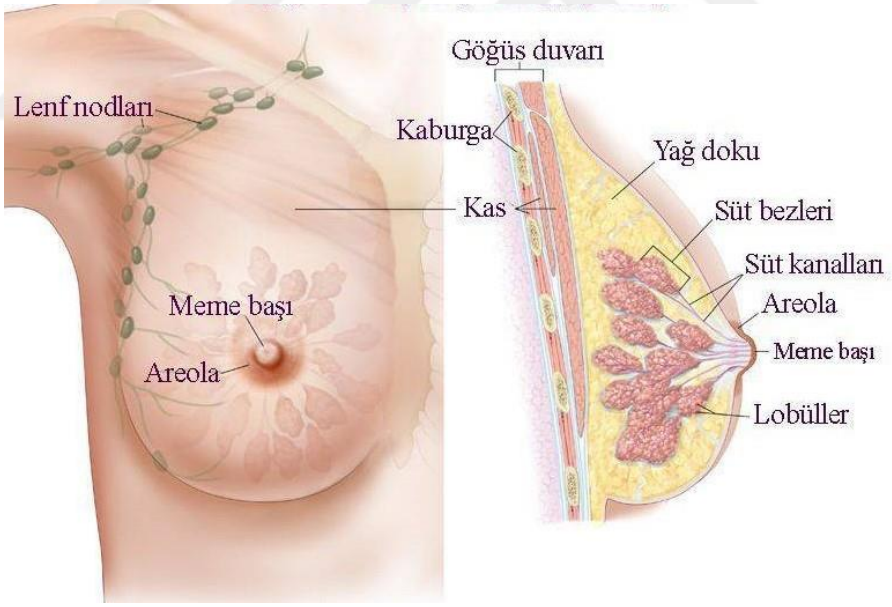
Luminal A alt tipi daha iyi prognoz gösterir, ardından Luminal B ve HER2 ile zenginleşir, buna karşın Bazal alt tip diğerlerine kıyasla en kötü genel sağkalıma sahiptir. Bu sınıflandırma, meme kanserinin klinik yönetimini tümör yüküne dayalı olmaktan biyoloji merkezli yaklaşımlara kaydırmıştır. Şu anda, klinik uygulama tipik olarak histolojik ve moleküler özellikler temelinde beş alt tip yer almaktadır (Tablo.1.1.). ER ve / veya progesteron reseptörü (PR) eksprese eden tümörler, hormon reseptörü pozitif meme kanserleri olarak kabul edilirken, ER, PR veya HER2 eksprese etmeyen tümörler, üçlü negatif meme kanseridir (TNBC).

**Tablo 1.Meme kanserinin moleküler alt tiplerinin sınıflandırılması**

| | |
|---|---|
| Luminal A | ER ve/veya PR(+) ve HER-2(-) Ki67<%14 |
| Luminal B | ER ve/veya PR(+) ve HER-2(-) Ki-67≥%14 |
| Bazal-benzeri | ER/PR/HER-2 (-) |
| HER-2 | ER/PR(-) ve HER-2(+) |
| Normal meme benzeri | Non-epitelial hücre gen ekspresyonu(+) |

Meme kanseri küresel bir sorun olduğu için, tanıya, multimodal tedaviye ve yeni ilaçlara erişimdeki dünya çapındaki eşitsizliklerin azaltılmasına büyük önem verilmelidir.

Meme kanseri memenin farklı bölgelerinde başlayabilir. Meme üç ana bölümden oluşur: lobüller, kanallar ve bağ dokusu. Lobüller süt üreten bezlerdir. (Şekil.1.2) Kanallar, sütü meme ucuna taşıyan tüplerdir. Bağ dokusu (lifli ve yağlı dokudan oluşur) her şeyi çevreler ve bir arada tutar. Çoğu meme kanseri kanallarda veya lobüllerde başlar.




**Şekil 1.2. Meme anatomisi (Anonim)**

.

En yaygın meme kanseri türleri:

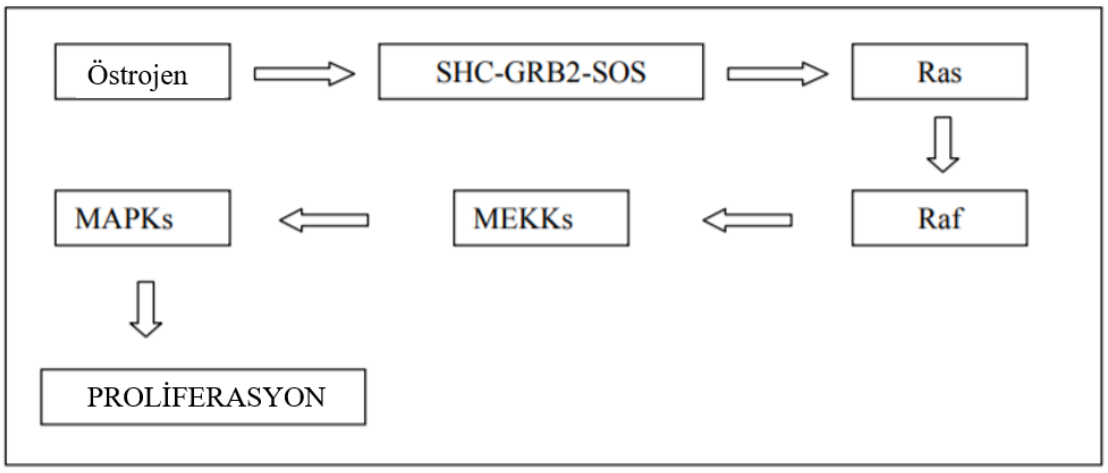
İnvazif duktal karsinom, kanser hücreleri kanalların dışında meme dokusunun diğer kısımlarına doğru büyür. İnvazif kanser hücreleri ayrıca vücudun diğer bölgelerine yayılabilir veya metastaz yapabilir. İnvazif lobüler karsinom, kanser hücreleri

lobüllerden yakındaki meme dokularına yayılır. Bu istilacı kanser hücreleri, vücudun diğer bölgelerine de yayılabilir. Paget hastalığı, dış ikon medüller, müsinöz ve inflamatuar meme kanseri gibi daha az yaygın olan birkaç meme kanseri türü daha vardır. Yerinde duktal karsinom (DCIS), meme kanserine yol açabilen bir meme hastalığıdır. Kanser hücreleri sadece kanalların iç yüzeyindedir ve memedeki diğer dokulara yayılmamıştır. Meme kanseri, kan damarları ve lenf damarları yoluyla memenin dışına yayılabilir.

### 1.2.1. Meme Kanserinin Hormonal Mekanizması

Meme kanseri hormona bağımlı malignitenin klasik bir modeli olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Cos 2006) (Yager ve Davidson 2006). Östrojen, normal meme bezinin büyümesinde ve farklılaşmasında önemli rol oynar. Vücuttaki yüksek östrojen seviyelerinin meme kanserinde bir risk faktörü olduğunu gösteren artan kanıtlar vardır. 1896'dan beri, klinik ve deneysel çalışmalar östrojenlerin aynı zamanda meme kanserojenleri olduğu ve östrojen uygulamasının tümör büyümesini artırırken östrojen yoksunluğu tümörleri azalttığı fikrini desteklemektedir (Cos 2006). 50 yaşın üzerindeki kişiler meme kanseri vakalarının% 76'sını oluşturmaktadır ve bu aynı zamanda ömür boyu östrojene maruz kalmanın meme kanserine neden olmada önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca meme kanserinin en çok menopoz dönemindeki kadınlarda görülmesinin bir diğer nedeni de menopoz sonrası periferik dokularda neredeyse% 100 östrojen sentezlendiği için menopozdaki kadınlarda meme bezindeki östrojen konsantrasyonunun yüksek olmasıdır (Yager ve Davidson 2006). Östrojen etkilerine hücre içi östrojen reseptörleri (ER) aracılık etmektedir. Östrojen için iki reseptör (ERα ve ERβ) tanımlanmıştır. ERα çoğunlukla uterusta ve meme bezinde bulunurken, ER central merkezi sinir, kardiyovasküler, bağışıklık sistemleri, kemik, böbrek ve akciğerlerde çalışır (Gustafsson 2000). ER bir transkripsiyon aktivatörüdür ve gen transkripsiyonunu aktive eden hedef genin Östrojen Cevap Elemanına bağlanır. Östrojen yoksa ER, çekirdek içindeki bir ısı şoku proteininin bağlanmasıyla inaktive edilir. Hormonun östrojen reseptörüne bağlanması, reseptörü inhibitör kompleksten serbest bırakır ve östrojen reseptörünün hedef gendeki yanıt elemanlarına bağlanmasına izin veren konformasyonel değişiklikleri tetikler (Moggs ve Orphanides 2001). Meme kanserinde östrojen, Src-RasERK yolunu aktive ederek hücre döngüsünün ilerlemesine yol açar. Ligand bağlanması üzerine, östrojen reseptörleri Src kinaz ve SHC (SH2

İçeren Protein) fosforilasyonunu indükler. Bu fosforilasyon, SHC-GRB2 (Büyüme Faktörü Reseptör Bağlama Proteini-2) -SOS kompleksinin oluşumuyla sonuçlanır. Bu kompleksin oluşumu, Şekil 1.3'de gösterildiği gibi Ras adaptör proteini, Raf, MAPK'ler, ERK-1 / 2'nin (Hücre Dışı Sinyal Düzenlemeli Kinazlar) aktivasyonuna yol açar. Aktive edilmiş MAPK'lar yer değiştirir ve gen transkripsiyonunu uyarır. MAPK'lar ayrıca ER'nin 167 serinine ek olarak ER'nin serin 118'ini fosforile edebilir ve her ikisi de transkripsiyonel verimliliği artırabilir (Estrogen Pathway). Bunlara ek olarak östrojen reseptörüne bağlanması vazodilatasyona neden olur ve apoptozu inhibe eder. Antiapoptotik rol, GPCR'lerin (G-proteinCoupled Reseptörler) ve antiapoptotik Bcl-2 üyelerini aktive eden Akt yolunun aktivasyonu ile elde edilir. Ek olarak, aktifleştirilmiş östrojen reseptörü, PI3K (Fosfatidillnosiol-3-Kinaz) ve Akt yolağının aktivasyonuna neden olur ve bu da Nitrik Oksit Sentazını (eNOS) aktive eder. Nitrik 8 Oksit Sentaz, vaskülatürde vazodilatasyona yol açabilen artmış Nitrik Oksit üretimine yol açar (Estrogen Pathway).




**Şekil 1.3. Meme kanseri hormonal mekanizması (Türkçeleştirilerek alınmıştır.) (Anonim)**

### 1.2.2. Meme Kanseri İstatistikleri

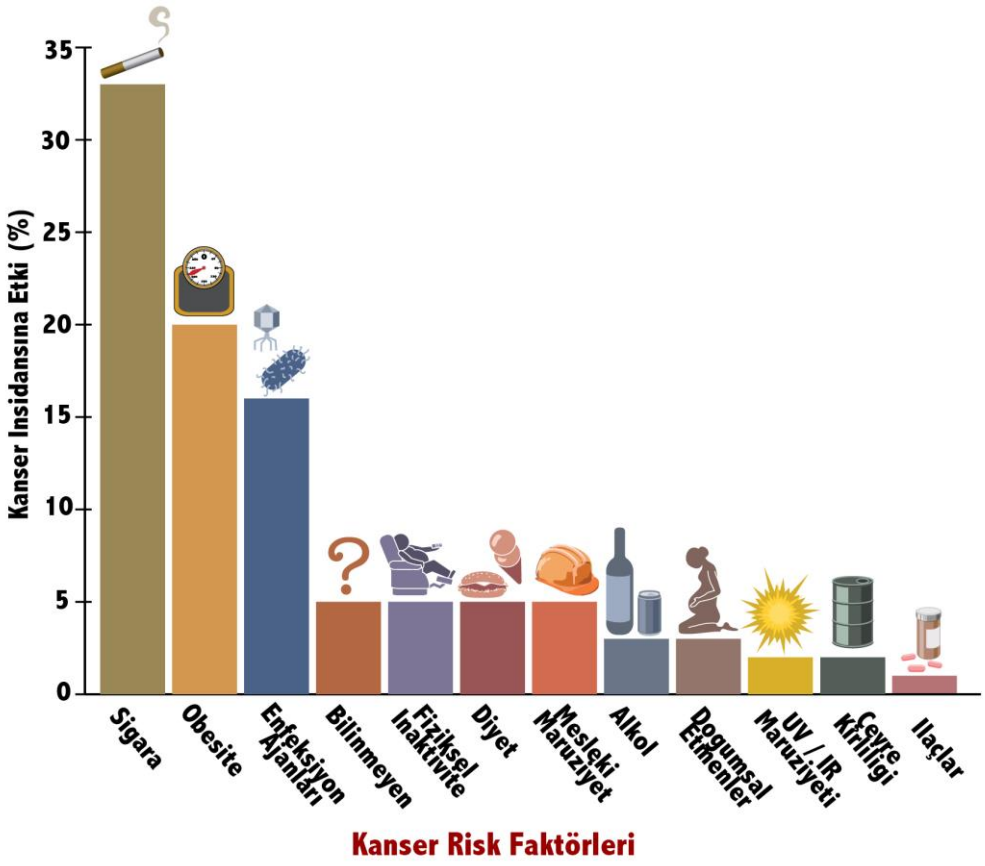
Kanser, tedavi ve önlemede kullanılan birçok yaklaşıma rağmen dünya çapında önemli bir ölüm nedeni olmaya devam etmektedir. Meme kanseri, kadınlarda akciğer kanserinden sonra en sık görülen kanser ve kanserden ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Her yıl, dünya çapında yaklaşık bir milyon kadına ve Amerika Birleşik Devletleri'nde 200.000 kadına meme kanseri teşhisi konmaktadır. Ayrıca, Amerikan Kanser Derneği'ne göre, meme kanseri Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık olarak 40.000 ölüme neden oluyor ve Dünya Meme Kanseri Konferansı'na göre ise

dünyada yaklaşık 400.000 kişi bu hastalıktan ölüyor. Prognoz ve hayatta kalma oranı, kanser türüne ve evrelemeye bağlı olarak değişir. Lokalize meme kanseri vücudun diğer bölgelerine yayılmadan yakalandığında% 97'nin üzerinde beş yıllık sağkalım oranı vardır. Hastalık lenf düğümlerine yayıldığında bu oran yaklaşık% 50'ye, uzak organ bölgelerine yayıldığında ise% 20'nin altına düşer. Meme kanseri hem erkeklerde hem de kadınlarda görülür, ancak erkek meme kanseri çok nadirdir. Erkek meme kanseri, tüm meme kanserlerinin% 0,6'sını oluşturur. Ayrıca erkeklerde meme kanseri, erkeklerdeki tüm malignitelerin% 1'den azını temsil etmektedir (Giordano, S.H.ve sark. 2004). 2003 yılında yaklaşık 1.300 yeni vaka teşhis edildi (Jemal, Ave ark. 2003). American Cancer Society'ye göre 2010 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde tahmin edilen yeni vakalar 1970 ve erkek meme kanseri ölümleri 390 idi. Erkek meme karsinomu çok nadir görüldüğü için bu hastalığın epidemiyolojisi, tedavisi ve prognozu ile ilgili mevcut bilgiler çok sınırlıdır.

### 1.2.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Her kadının meme kanseri riski, birkaç faktöre bağlı olarak daha yüksek veya daha düşük olabilir. Bu faktörler arasında aile öyküsü, adet görme yaşı, çocuk doğurma, menopoz sonrası hormonal kullanım, yüksek yağlı beslenme ve tütün kullanımı gibi çevresel faktörler yer almaktadır (Madigan ve ark. 1995). Diğer bazı risk faktörleri arasında ilk tam dönem gebelikte geç yaş, menopoz sonrası obezite, düşük fiziksel aktivite, ırk / etnik köken ve yaşamın erken dönemlerinde iyonlaştırıcı radyasyona yüksek dozda maruz kalma sayılabilir (Şekil 1.4). Kadınlar, erkeklerden çok daha fazla meme dokusuna sahip oldukları için meme kanseri riski daha yüksektir. Ayrıca östrojen, meme kanserinin gelişimini destekler.  Yakın akrabaları arasında meme kanseri olan kadınlarda meme kanseri riski daha yüksektir. Özellikle akrabalarda 50 yaşından önce meme kanseri varsa veya her iki memede kanser oluşmuşsa risk artar (Claus ve ark., 2003).Bununla birlikte, meme kanserine yakalanan kadınların çoğunun ailesinde hastalık öyküsü olmadığı da vurgulanmalıdır. Meme ve yumurtalık kanseri gelişme riskini mutasyona bağlı olarak% 30-40 artıran DNA onarım genlerindeki kalıtsal kusurlar gibi kalıtsal sendromların neden olduğu meme kanserlerinin yaklaşık% 5 ila% 10'u BRCA1, BRCA2 (Madigan ve ark. 1995) proteinin mutasyonu sonucu oluşur (Venkitaraman 2002). Orta yaşlı ve yaşlı kadınlarda meme kanseri riski genç kadınlara

göre daha yüksektir. Kadın yaşlandıkça risk artar, özellikle 40 yaşından sonra artar (Edwards ve ark. 2002).




**Şekil 1.4 Meme kanseri risk faktörleri (Anonim)**

50 yaşın üzerindeki kişiler meme kanseri vakalarının% 76'sını oluşturmaktadır. Erken yaşta ergenliğe ulaşan kadınların ve nispeten geç yaşta menopoza giren kadınların meme kanserine yakalanma olasılığı diğer kadınlara göre daha yüksektir. Sebebin östrojen üretiminden kaynaklandığına inanılıyor. Üreme yıllarında bir kadının vücudu yüksek düzeyde östrojen üretir. Erken yaşta ergenliğe ulaşan ve / veya geç yaşta menopoza giren kadınlar, geç ergenlik çağına veya erken menopoza sahip kadınlardan daha uzun yıllar yüksek östrojen düzeylerine maruz kalırlar (Henderson ve ark. 1988). Ayrıca, menopoz sonrası östrojen tedavisi veya kombine östrojen / progestin hormonu replasman tedavisi (HRT) uzun süre kullanmak, meme kanseri riskinde bir artışla ilişkilendirilebilir (Porch ve ark. 2002). Amerikan Kanser Derneği, 2010 yılında yapılan Gözetim ve Sağlık Politikası Araştırmasına göre, meme kanseri, Latin, Asyalı veya Afrikalı Amerikalı kadınlara göre beyaz kadınlarda daha sık teşhis edilmektedir. Ayrıca, daha az gelişmiş ülkelerde gelişmiş ülkelere göre daha yüksek meme kanseri insidans

oranları bildirilmektedir. Bunun en büyük nedeni, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler arasındaki yaşam tarzı değişiklikleri ile açıklanabilir. Özellikle, doğum örüntüleri ve emzirme farklılıkları, bir kadının küçük yaşta doğurmaya başladığı ve her çocuğu 1 ila 2 yıl boyunca emzirdiği daha gelişmekte olan ülkelere kıyasla gelişmemiş ülkelerde daha düşük meme kanseri insidansını açıklayabilir (Cuzick 2010). Çocuk sahibi olmak ve kadının ilk çocuğunun doğumundaki yaşı, meme kanserini etkileyen diğer hormonal faktörlerdir. Hiç çocuğu olmayan kadınlar, çocuğu olan kadınlardan daha fazla meme kanseri riski altındadır. Ayrıca 30-35 yaşından önce tamamlanan ilk gebeliğin meme kanseri riskini düşürdüğüne ve 30-35 yaşından sonraki ilk gebeliğin riski artırdığına dair tutarlı kanıtlar vardır (Helmrich ve ark. 1983). Ek olarak, bir gözden geçirme çalışması meme kanseri riskinin her emzirme yılı için% 4,3 oranında azaldığını göstermektedir (Collaborative Group 2002).

### 1.2.4. Genetik Eğilim

Meme kanserlerinin yaklaşık% 10'u kalıtsaldır ve aile geçmişiyle ilgilidir. Birinci dereceden bir akrabası olan meme kanseri olan bireyler, erken başlangıçlı meme kanseri (35 yaşından önce) (Collaborative Group 2001) gibi yüksek bir rölatif riske (RR) sahiptir. Bununla birlikte, ailede meme kanseri öyküsü, ailenin boyutu ve çevresel faktörler dahil olmak üzere farklı değişkenlerden oluşan 'düzensiz' bireysel meme kanseri riski ile ilişkilidir. Ailenin riskini belirlemek için aile öyküsü puanı gibi modeller geliştirilmiştir (Brewer ve ark. 2017). Proteinleri homolog onarım (Huenve ark. 2010) yoluyla DNA tamirine dahil olan iki yüksek penetranslı tümör baskılayıcı gen, BRCA1 (17q21) ve BRCA2 (13q13) mutasyonları, otozomal dominant bir kalıtım modeli (işlev kaybı> yanlış anlam) gösterir. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları, 80 yaşına göre sırasıyla% 72 ve% 69'luk ortalama kümülatif meme kanseri riski ile ilişkilidir (Kuchenbaecker 2017); BRCA2 mutasyonları barındıran erkeklerde göreceli meme kanseri riski% 6 26,27'dir. 2.000'den fazla BRCA gen değişikliği tanımlanmıştır (mutasyonlar ve büyük yeniden düzenlemeler), ancak yalnızca birkaç tanesi birbiriyle ilgisiz ailelerde tekrar bulunmuştur, örneğin, Aşkenazi Yahudi ailelerinde (BRCA1 185delAG veya BRCA2 6174delT) veya İzlandalı ailelerde (BRCA2 999del5) kurucu mutasyonlar . BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının prevalansı etnik gruplar arasında farklılık gösterir, ABD ülke çapında bir çalışmada Asya grubunda daha düşük (% 0,5) ve Aşkenazi grubunda (% 10,2) daha yüksektir (Daly 2016). Germline BRCA testi,

progresyonsuz sağkalımı (PFS) uzatan ve yaşam kalitesini artıran (Robson 2017), (Litton 2018) poli (ADPribose) polimeraz (PARP) inhibitörlerinin mevcudiyeti göz önüne alındığında, metastatik meme kanseri (Forbes ve ark. 2019) hastalarında yardımcı tanı olarak yapılacaktır HER2-negatif metastatik meme kanserinde BRCA mutasyon taşıyıcıları için hedeflenen tedavi (FDA 2018). DNA onarımında ve genomik bütünlüğün sürdürülmesinde rol oynayan genlerin germ hattı mutasyonları ile ilgili çeşitli sendromların, kalıtsal meme kanseri riskiyle daha az derecede bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Yeni nesil dizileme, BRCA1 ve BRCA2'nin ötesinde, kalıtsal meme kanseri riskini (Pasche 2008) (Crawford 2017) belirlemek için gen panellerinin taranmasını sağlamıştır ve ATM, CHEK2, PALB2, PTEN, STK11 ve TP53'ü içerir (Taylor 2018)

### 1.2.5. Meme Kanseri Moleküler Mekanizması

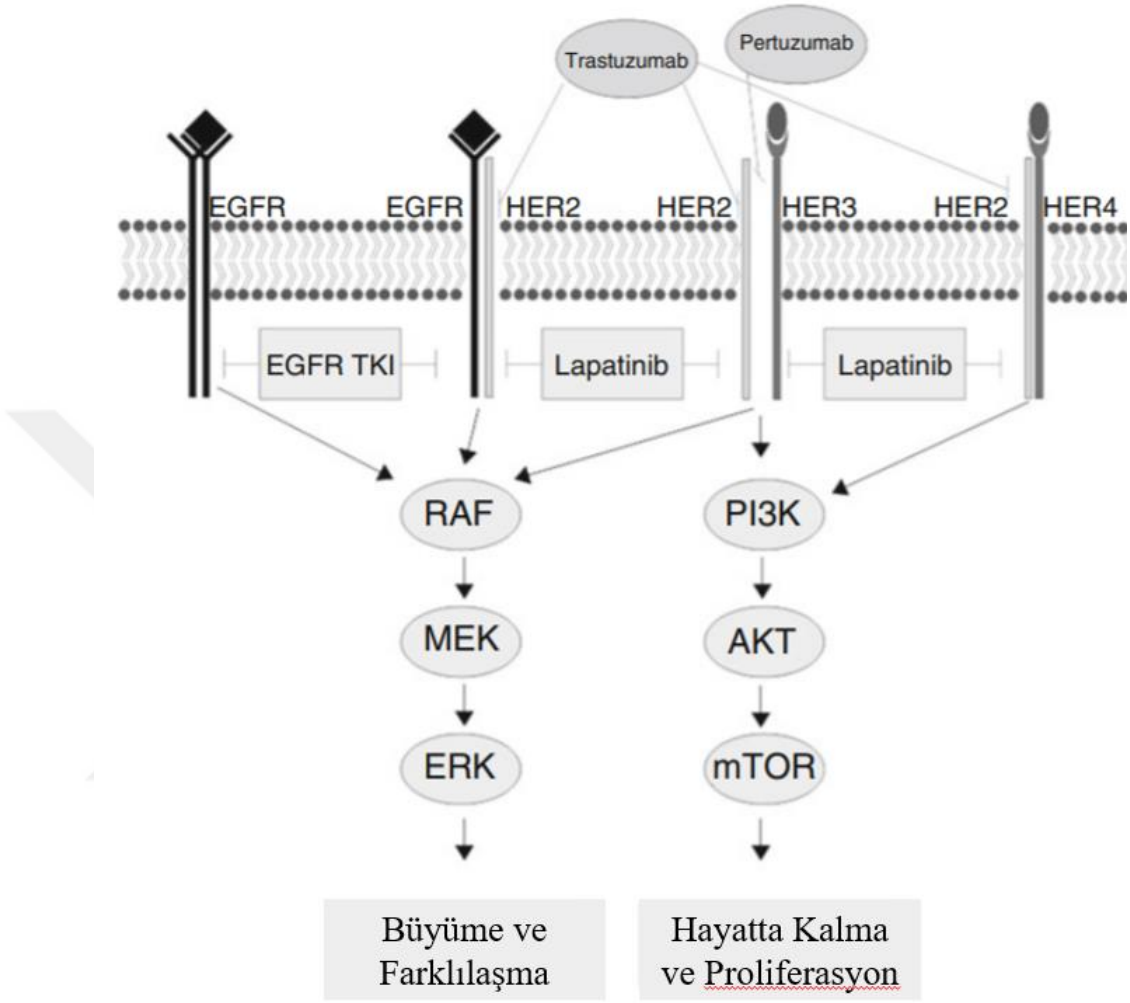
Kanserin temelindeki biyoloji hakkında üretilen bilginin büyük bir kısmının kökleri meme kanseri araştırmalarına dayanmaktadır. Kanser hücresindeki çeşitli sistemler bozulur ve bu da gözlenen kötü huylu fenotip ile sonuçlanır: sürekli büyüme, büyüme sinyallemesinde kendi kendine yeterlilik, apoptoza direnç, istila ve metastaz ve anormal anjiyogenez. Bu sistemler, mitojenik sinyaller, hücre döngüsü kontrol sistemleri, DNA onarım sistemleri ve epigenetik gen ekspresyon modifikasyon sistemleri için sinyal iletim yollarını içerir. (Schuur ve ark. 2015)

#### 1.2.5.1. Sinyal İletimi

Östrojen ve reseptörü, ilgili hücre tiplerinde gen ekspresyonu üzerinde çeşitli etkilere sahiptir. Klasik olarak östrojen, hücrenin çekirdeğindeki reseptörüne bağlanır ve daha sonra, östrojene yanıt veren genlerin promoterlerindeki östrojen yanıt öğeleri (ERE'ler) yoluyla DNA bağlanması ve transkripsiyon aktivasyonu için reseptörü etkinleştirir. ER ayrıca ERE'lerden bağımsız olarak gen ekspresyonunu aktive edebilir. Bunu, JUN ve AP-1 dahil olmak üzere diğer transkripsiyon faktörleri ile kompleksler oluşturarak yapar, bunlar daha sonra ovalbumin, IGF-1 ve CCND1 gibi genler için gen promoterlerindeki aynı kökenli bağlanma bölgeleri yoluyla transkripsiyonu uyarır. Gen ekspresyonunun transaktivasyonuna ek olarak, östrojen reseptörü, genomdan bağımsız bir şekilde mitojenik sinyallemede yer alan çeşitli yolları keser. Örneğin kanıtlar, zara bağlı ER'nin birkaç hücre tipinde östrojen tarafından MAP kinaz sinyal yolunun

aktivasyonuna aracılık edebileceğini göstermektedir (Hall ve ark. 2001). Aktifleştirilmiş östrojen reseptörü tarafından üretilen kesin etki sadece hücresel içeriğe değil, aynı zamanda reseptör tarafından bağlanan ligandın kimyasal yapısına da bağlıdır. İlk gözlemler, HER2'nin (ERB-B2) aşırı ekspresyonunun erken dönemde nükseden meme kanserleri için bir belirteç olduğunu, daha agresif bir seyir izlediğini ve genellikle ER negatif ($ER^-$) olduğunu ortaya koydu (Slamon 1987). Bu hastalar için etkili bir tedavi mevcut değildi. $HER2^+$ tümörleri genellikle o sırada mevcut olan geleneksel kemoterapötik rejimlere yanıt vermedi. Bu hastalar sıklıkla, hastalıklarını kontrol altına alacak bir tedavi bulma çabasıyla klinik deneylerde yaralandı. Translasyonel araştırma çabalarından, HER2 hücre dışı alanı olan trastuzumab'a yönelik insanlaştırılmış bir monoklonal antikor ortaya çıktı. O zamanlar terapötik olarak monoklonal antikorlarla sınırlı başarı elde edilmiş olmasına rağmen, standart adjuvan kemoterapiye trastuzumabın eklendiği denemeler başlatıldı. Bu çalışmaların sonuçları, HER2 pozitif hastalığı olan kadınlarda trastuzumab ile HER2'nin hedeflenmesinin, tek başına adjuvan kemoterapiye kıyasla hastalıksız sağkalımda iyileşmeler sağladığını açıkça göstermiştir (Slamon 2001). Kanserde çok sık olduğu gibi, hastalar tedaviye mükemmel bir yanıt alırlar, ancak aynı tedavi birkaç hafta, aylar veya yıllar sonra etkisiz hale gelir. HER2 sistemi de bu davranışı sergiler. IBC'de HER2 sinyallemesinin biyolojisinin daha fazla incelenmesi, direnç mekanizmalarına ilişkin içgörüler sağlamıştır (Şekil 1.5). Çalışmalar, HER2'nin sinyal vermek için kendisi veya diğer aile üyeleri ile dimerize olması gerektiğini göstermiştir (Thery 2014). Anti-HER2 ajanlarına karşı bir direnç formu, HER2 inhibitörlerinin varlığında sinyal transdüksiyonuna izin veren aile üyeleri EGFR (HER1) veya HER3 ile HER2'nin dimerizasyonuna dayanır. HER2'ye karşı ikinci bir monoklonal antikor olan pertuzumab, dimerizasyonu bloke eder ve aynı zamanda etkili bir IBC terapötikidir ve daha da önemlisi, terapötik etkiyi arttırmak için trastuzumab ile birlikte hareket edebilir (Baselga 2012). Bu sonuç, "kurtarma" sinyal iletimini bloke etmenin tedavi direncinin üstesinden gelebileceği ilkesini destekler. Büyüme faktörü reseptör sinyal yolakları konusundaki anlayışımızı genişletmek, bir dizi başka meme kanseri terapötiklerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR, HER1 olarak da bilinir) ve insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1 (IGF-1R) gibi diğer büyüme faktörü reseptörleri, ya monoklonal antikorlarla ya da küçük moleküllü ilaçlarla hedeflenmiştir. Bu sinyal yollarının aşağı akış bileşenleri de ilaç geliştirmede başarılı bir şekilde hedeflenmiştir. İmatinib ve sorafi

uç dahil bu sinyal bileşenlerini hedefleyen ilaçlar, meme kanseri terapötikleri olarak aktivite açısından test edilmektedir (Thery 2014).




**Şekil 1.5.HER2 yolu üzerinden sinyalleşme. Erb-B / HER büyüme faktörü reseptörleri ailesi ve bunların sinyal yolları. HER2'nin diğer aile üyeleriyle dimerleştiği gösterilmiştir. Terapötiklerin hedeflediği reseptörler ve heterodimerler belirtilmiştir (Schuur ve ark. 2015)**

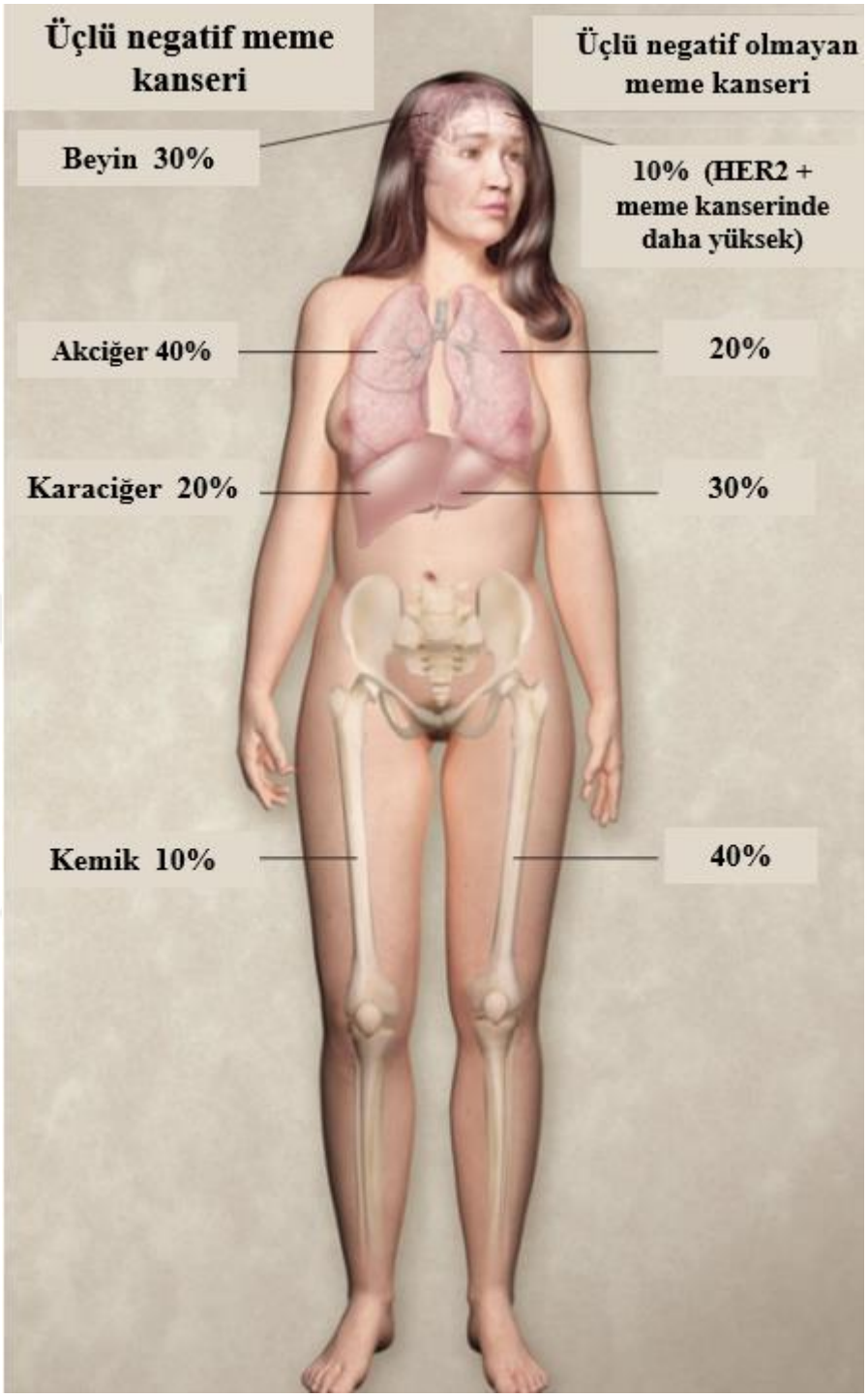
TP53, ATM, CCND1 ve CHEK2 dahil olmak üzere, meme kanseri onkogenezinde yer alan birkaç gen, hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi düzenlemede işlev görür. TP53, birçok farklı kanser türünde en sık mutasyona uğramış genlerden biri olan P53 tümör baskılayıcı proteinini kodlamaktadır. P53 proteini, DNA hasarı dahil olmak üzere çeşitli hücresel streslere yanıt olarak hedef genlerini düzenleyen ve böylece hücre döngüsünü durduran veya bağlama bağlı olarak yaşlanma, apoptoz, DNA onarımı veya metabolizma değişikliklerini indükleyen çok işlevli bir proteindir. CCND1, sikline bağlı kinazlar 4 ve 6 ile etkileşime girerek hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi

düzenleme işlevi gören siklin D1 proteinini kodlar. Siklin D1, tümör baskılayıcı protein RB tarafından düzenlenir. ATM geni, ultraviyole radyasyon gibi kaynaklardan DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen bir PI3 / PI4-kinaz ailesi proteinini kodlar. CHEK2 geni, bir hücre döngüsü kontrol noktası düzenleyicisi ve varsayılan tümör baskılayıcı olan bir proteini kodlar. Protein, DNA hasarı ve hücre döngüsü blokajı ile aktive edilir ve G1'de hücre döngüsü tutuklanmasına neden olmak için P53 ve diğer proteinlerle etkileşime girer. Meme kanseri biyolojisine ilişkin içgörüler bu genlerin incelenmesinden gelse de, bunların biyokimyasal doğası, sinyal iletim yollarından ziyade terapötiklerle hedeflenmenin daha zor olduğunu kanıtladı. (Schuur ve ark. 2015)

### 1.3. Üçlü Negatif Meme Kanseri

Üçlü negatif meme kanserleri, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2 ekspresyonu olmayan tümörler olarak tanımlanır. (Foulkes ve ark. 2010) Genetik düzeyde, üçlü negatif ve bazal benzeri kanserler oldukça heterojendir. Çok sayıda genetik bölgenin amplifikasyonu belgelenmiştir, ancak bu amplifiye bölgelerin her birinin prevalansı düşüktür. (Turner ve ark. 2010) Üçlü negatif ve bazal benzeri tümörler, tüm invaziv meme kanserlerinin yaklaşık% 15'ini oluşturur ve genellikle yüksek bir histolojik dereceye sahiptirler. (Rakha ve ark. 2008) Hem üçlü negatif hem de bazal benzeri meme kanseri, diğer ırksal veya etnik grupların genç kadınlarına göre genç siyahi ve Hispanik kadınlarda daha sık görülür. BRCA1, önemli bir meme kanserine yatkınlık genidir; Bu gende mutasyon taşıyan kadınlarda ortaya çıkan tümörlerin% 75'inden fazlası üçlü negatif fenotipe, bazal benzeri fenotipe veya her ikisine sahiptir. (Reis-Filho ve Tutt 2008) Çalışmalar, germ hattı BRCA1 mutasyonları olan kadınlarda meme kanserlerinin üçlü negatif ve yüksek dereceli olma olasılığının daha yüksek olduğunu göstermiştir. Gen ekspresyon çalışmaları bu fenomeni doğrulamıştır. (Ismail-Khan ve Bui 2010)

Ayrıca, tümörler yüksek dereceli olma eğilimindedir ve tekrarladığında beyin, karaciğer ve akciğerler gibi diğer organlara yayılır, böylece tipik olarak diğer meme kanseri türleri arasında yüksek metastatik ve ölüm oranı ile ayırt edilir (Şekil 1.6)




**Şekil 1.6 Üçlü negatif meme kanseri ve üçlü negatif olmayan meme kanseri metastaz yüzdeleri. (Türkçeleştirilerek alınmıştır.) (Foulkes ve ark. 2010)**

BRCA1 ile ilişkili meme kanserleri çoğunlukla bazal benzeri ve üçlü negatiftir ve sitokeratinler ve EGFR gibi bazal belirteçleri ifade eder.

BRCA1 metilasyonu ve lokalizasyonu, bir çalışmada alt tipler arasında benzer görünürken, BRCA1 mRNA, BBC'de eşleşen kontrollere göre daha düşüktü ve BRCA1'in aşağı düzenleyicisi olan ID4, BBC'de dokuz kat daha fazla ifade edildi. (Irvin ve Carey 2008) Nüfus temelli çalışmalarda, üçlü negatif fenotip, çalışmalar öngördüğü gibi lümen fenotiplerine kıyasla meme kanserine özgü sağkalımda azalma olduğunu gösterdi. Yaygın bir yanlış anlaşılmaya karşı, üçlü negatif meme kanseri kemoterapiye duyarlıdır.

Ters faz protein dizileri, DNA kopya sayıları ve ekzom dizilimi dahil olmak üzere farklı platformları birleştiren Kanser Genom Atlası (TCGA) Araştırma Ağı tarafından gerçekleştirilen analiz, TNBC'lerde genetik değişikliklerin çoğunlukla PI3K sinyallemesi ve DNA hasar onarımında yer alan genlerde meydana geldiğini ortaya koydu. Bu arada, DNA hasarı onarım mekanizmasının anormal düzenlenmesi sıklıkla RB1, TP53 ve BRCA1 genlerindeki işlev kaybı mutasyonları ile ilişkilidir ve bu nedenle bu tip TNBC, sisplatin gibi DNA'ya zarar veren ajanlara iyi yanıt verir (Hirshfield ve Ganesan 2014).

### 1.3.1. Üçlü Negatif Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

TNBC durumunda, kemoterapi yüksek toksisitesi ve yan etkilerinden bağımsız olarak temel tedavi olarak kalır. Neyse ki, TNBC'nin diğer meme kanseri alt tiplerine kıyasla kemoterapiye daha iyi yanıt verdiği gösterilmiştir (De Giorgi 2007). Ancak kemoterapinin başarısı birçok faktörle sınırlıdır. Özgünlüğünün olmaması, tedavi sırasında proliferatif normal hücreler de etkilendiği için hastalara bulantı, kanama ve saç dökülmesi gibi yan etkilere neden olur (Ramirez 2009). Dahası, kemoterapi sıklıkla kanser hücresi popülasyonunda hücresel heterojenliği daha da arttırır ve bunlardan bazıları tedavi süresince direnç geliştirebilir (Luqmani 2005). Nihayetinde, geleneksel kemoterapi, hızlı relaps ve saldırganlık nedeniyle TNBC'de sıklıkla kötü prognoz gösterir (Ismail-Khan ve Bui 2010). Şu anda, üçlü negatif meme kanseri için tercih edilen standart bir kemoterapi şekli yoktur ve diğer kanser alt tipleri için olduğu gibi tedavi seçilmelidir. Retrospektif analizler, dosetaksel veya paklitakselin antrasiklin içeren adjuvan rejimlere eklenmesinin ER-negatif ve HER2-negatif kanserlerin tedavisi için ER-pozitif, HER2-negatif kanserlerin tedavisine göre daha büyük fayda sağlayabileceğini düşündürmektedir. (Chacón ve Costanzo 2010) Vasküler endotelyal büyüme faktörünü (VEGF) hedefleyen antianjiyojenik tedavi, meme kanseri tedavisinde

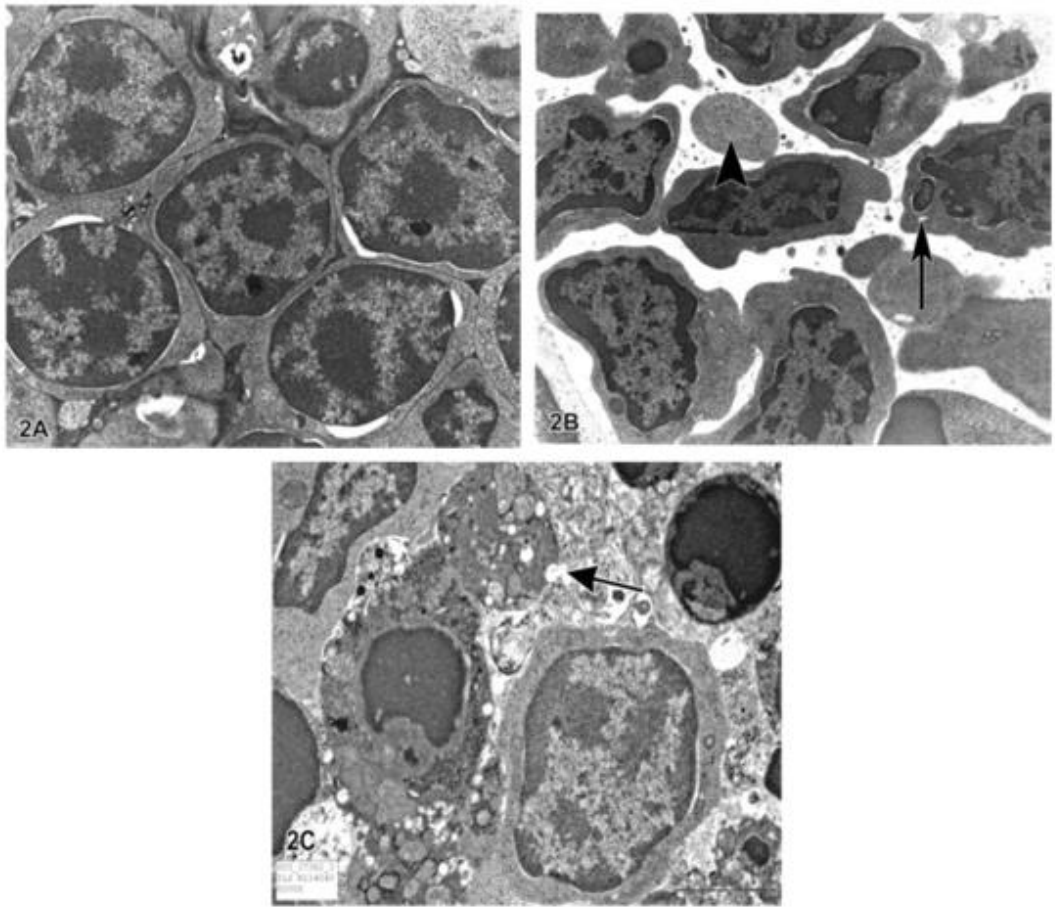
açıkça bir role sahiptir ve bazal benzeri alt tipte etkinliği olan hedefli bir terapi olabilir. Metastatik meme kanserinde anti-VEGF monoklonal antikor bevacizumab artı paklitakselin tek başına paklitaksel ile karşılaştırıldığı randomize bir faz III çalışmasında (ECOG 2100), kombinasyon progresyonsuz sağkalımı ikiye katladı. BBC hücre hatları EGFR inhibitörlerine lüminal hücre hatlarından daha duyarlıdır ve karboplatin ve setuksimab kombinasyonuna sinerji gösterir. (Irvin ve Carey 2008)

### 1.4. Apoptoz

Bir hücrenin temel amacı, yaşam boyu hayatta kalmaktır. Hücrelerin vücuttaki canlı ve ölüm hücreleri dengesini sağlamaları için ölüm mekanizması kadar çoğalma olaylarının anahtarını elinde tutmak hayati önem taşımaktadır. Hücresel ölüm mekanizmalarından biri olan programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, belirli veya gerekli koşullar altında herhangi bir hücrenin düzgün bir şekilde ölme süreci olarak tanımlanabilir. Apoptoz, bir organizmadaki hücre sayısını sabit tutan doğal homeostatik mekanizmanın bir parçasıdır ve dokunun, gelişme, büyüme veya yaşlanma sırasında hasar gören veya artık yönetilemeyen artan sayıda istenmeyen / gereksiz hücreyi ortadan kaldırmasına yardımcı olur (Elmore 2013) . Apoptoz, dokularda fonksiyonel olmayan hücrelerin birikmesini önlemek için herhangi bir ajan tarafından hasar görmüş, strese maruz kalmış veya uyarılmış hücrelere karşı bir savunma mekanizmasıdır. İstenmeyen hücrelerde apoptoza uygun şekilde aracılık edilmezse, mutasyonlar hücrelerde birikmeye devam edebilir ve sonunda kanser oluşumuna ve otoimmün hastalıklar, AIDS veya bazı nörodejeneratif bozukluklar gibi diğer hastalıklara yol açabilir. Uygun olmayan apoptoz ve artan veya azalan apoptoz oranı, organizmayı ölümcül bozukluklar geliştirme riskine sokar. AIDS, nörodejeneratif bozukluklar, insüline bağımlı diyabet, hepatit C enfeksiyonu, miyokardiyal enfarktüs ve ateroskleroz, uygun olmayan apoptoz veya artan apoptoz oranına sahip bozuklukların örnekleridir, oysa otoimmün hastalıklar ve kanser, apoptoz oranı azalmış bozukluklardır.( Ulukaya ve ark. 2011)

Birçok biyokimyasal olay ve bir dizi morfolojik değişiklik erken aşamada meydana gelir ve apoptoz sürecinin sonuna kadar artarak devam eder. Hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması veya nükleer farklılıklar gibi bazı değişiklikler mikroskobik tekniklerle gözlemlenebilir (Şekil1.7). Sitoplazmik filaman agregasyonu, nükleer yoğunlaşma, hücresel fragmantasyon (şekil ve plazma membran kabarcıklarını içeren

morfolojik olay kaskadı) nihayet apoptotik cisimlerin oluşumuyla sonuçlanır (Kiraz ve ark. 2016).




**Şekil 1.7 Apoptozun transmisyon elektron mikroskopu (TEM) ile görüntülenmesi. Oklar fragmente nükleusu göstermekteyken ok uçları apoptotik cisimleri göstermektedir (Susan, 2007).**

### 1.4.1. Apoptoz Modülatörleri

Çeşitli faktörler apoptozu tetikler, ancak başlıca faktörler şu şekilde sınıflandırılabilir:

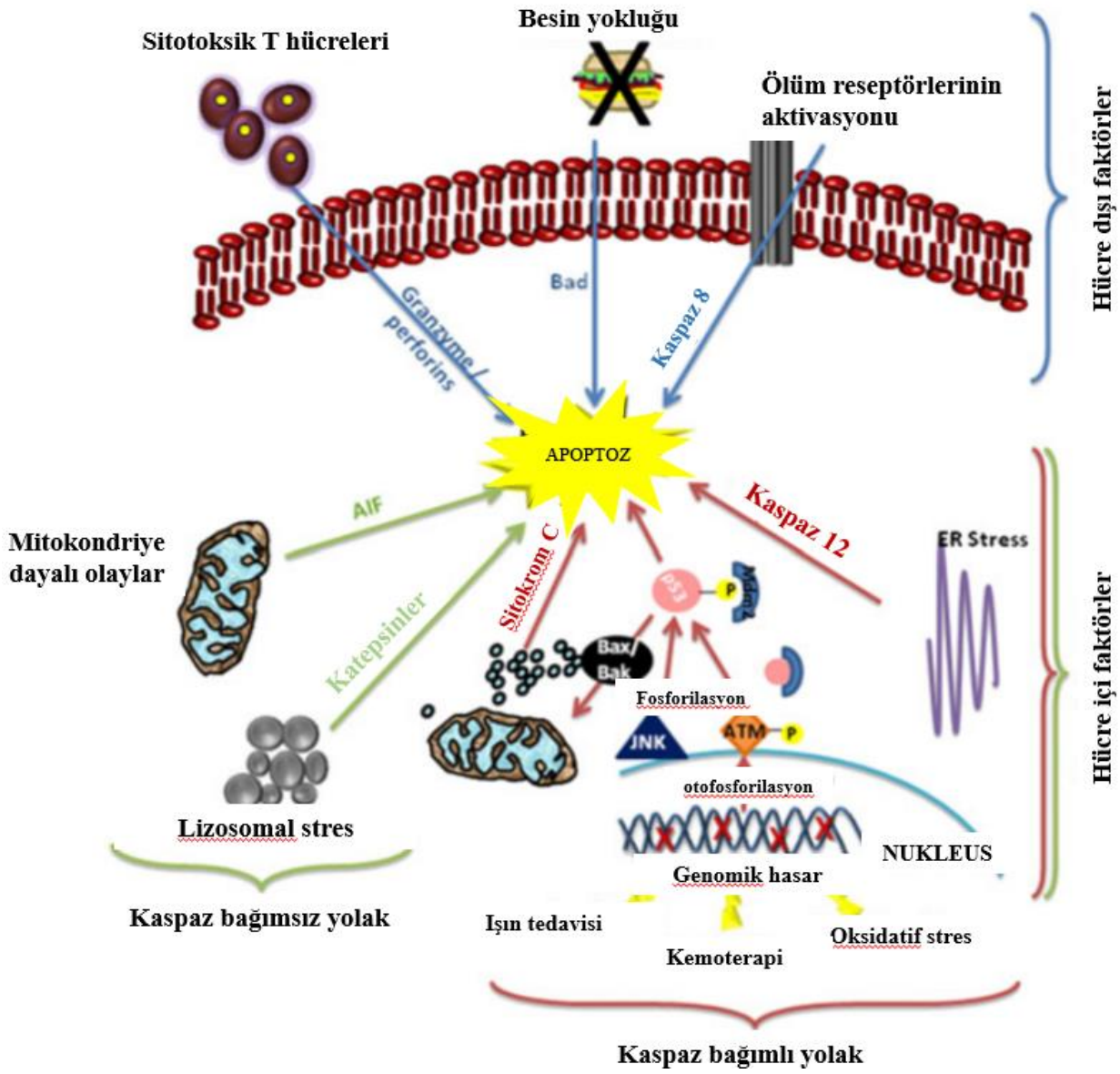
- hücre dışı faktörler
- hücre içi faktörler.

Hücre dışı faktörler, hücre yüzeyi ölüm reseptörleri veya granzim / perforin sistemi yoluyla etki eder.( Thiery ve ark. 2011) Hücre içi faktörler mitokondriyal

aktivasyona neden olur. Bununla birlikte, mitokondriyal aktivasyon da hücre dışı faktörler tarafından tetiklenir. Dolayısıyla, mitokondrinin apoptozda merkezi bir rolü vardır. Bu yolların bir özeti Şekil 1.6 'da verilmiştir. Hücre dışı faktörlere gelince, apoptoz ölüm reseptörlerinin, yani Fas (APO-1, CD95) ve TNF reseptör-1 (TNFR-1), DR-3'ün etkileşimi ile indüklenir. (TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1) ve DR-5 (TRAIL-R2), ligandları ile. Bu hücre yüzeyi reseptörleri, hücre zarında bulunur ve TNFR ailesinin üyeleridir. Ölüm reseptörlerinin ligandları oligomerizasyona ve dolayısıyla reseptörlerin aktivasyonuna neden olur. Reseptörlerin oligomerizasyonunu, spesifik adaptör proteinlerin (FADD, TRADD) reseptörlerine bağlanması izler ve bu da kaspaz sisteminin aktivasyonuna yol açar. Fas, lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, pulmoner hücrelerde ve hatta miyokard hücrelerinde bulunur. Ligand, Fas ligandı (FasL) olarak adlandırılır. FasL, TNF ailesinin bir üyesidir. Sitotoksik T lenfositlerinde ve doğal öldürücü hücrelerde bulunur. Ligandlarına bağlandıklarında ölüm uyarısı aldıklarında, Fas ve TNFR-1 bir dizi protein-protein etkileşimine maruz kalır. Öncelikle, doğal olarak kendilerine bağlanmış TNFR-1 ile ilişkili ölüm alanı (TRADD) ve Fas ilişkili ölüm alanı (FADD) ile etkileşimi başlatırlar. Ölüm alanları, pro'yu etkinleştirerek kaspazlar zincirini başlatır. -caspase-8. Kaspaz-8, oligomerizasyonun ardından otomatik aktivasyonla aktive edilir. Aktif kaspaz-8, apoptotik süreci iki şekilde yürütür:

- kaspaz-3'ün doğrudan bölünmesi ve aktivasyonu
- bir proapoptotik protein olan Bid'in bölünmesi.

Bölünmüş BID aktive olur ve sitozolden mitokondriye translokasyon yapar ve burada sitokrom c salımını indükler. TNFR-1 ve DR-3, FADD ve TRADD'yi adaptör proteinleri olarak kullanarak kaspaz-8'in aktivasyonuna neden olur. FADD (ancak TRADD değil) aynı zamanda hem DR-4 hem de DR-520 için bir adaptör molekülü olarak görünür ve bu sebeple ölüm reseptörleri için evrensel bir adaptör olarak önerilmiştir.




**Şekil 1.8 Apoptozu indükleyen hücre içi ve hücre dışı faktörler. (Türkçeleştirilerek alınmıştır )(Ulukaya ve ark. 2011)**

Apoptoz, hücre ölümü reseptörlerinin aktivasyonundan ayrı olarak, daha önce bahsedildiği gibi genotoksik ajanların neden olduğu DNA hasarına bir yanıt olarak p53'ün indüksiyonu ile başlatılır. İndüklenmiş p53, pro-apoptotik Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan Bax'ı aktive ederek apoptozu başlatır.79,80 Aslında, DNA hasarı ile Bcl-2 aile üyeleri arasında yakın bir bağlantı vardır (örneğin, bir pro-apoptotik üye olarak Bid ) .81,82 p53 ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzeyi ölüm reseptörlerini indükleyerek apoptozu başlatır. 80 Apoptoz, reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stres) neden olduğu mitokondri, plazma membranı veya genomdaki hasar sonucu da başlatılır. Büyüme faktörlerinin eksikliği de apoptozu indükler ve hücre dışı olarak hareket eden

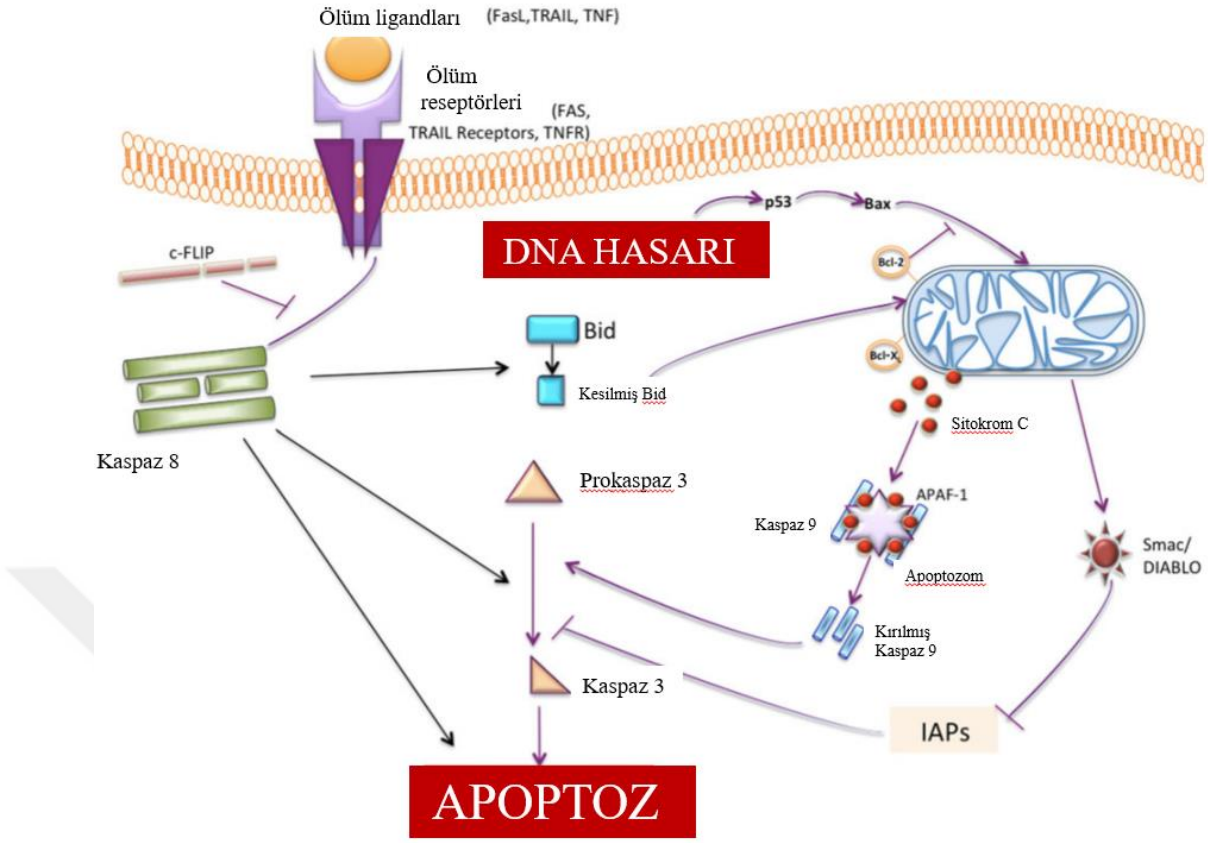
başka bir faktör olarak düşünülebilir. Kültürlenmiş hücrelerin serum açlığına maruz kaldıklarında apoptoza maruz kaldıkları gösterilmiştir.84 Bu mekanizma, apoptozu indükleyen bir nükleer protein olan p53'ün aktivasyonu ile sonuçlanır.84 Bcl'nin pro-apoptotik bir üyesi olan Bad fosforilasyon başarısızlığı -2 protein ailesi, sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınmasıyla apoptozu indükler. Apoptozu indükleyen diğer bir faktör, sitotoksik T lenfositlerden granzim B'nin salınmasına yanıt olarak hedef hücrelerde kaspaz sisteminin aktivasyonudur.(Şekil 1.8) (Ulukaya ve ark. 2011)

### 1.4.2. İçsel ve dışsal apoptotik yollar

Apoptoz iki farklı yolla uyarılabilir;

- esas olarak sitokrom c'nin mitokondriden salınması yoluyla ortaya çıkan ve farklı kaspazları aşağı akış sinyalleri olarak aktive eden içsel yol.
- fas ölüm reseptörü hücrenin dışından gelen bir sinyal tarafından aktive edildiğinde dışsal yol.

Farklı ara moleküllerin sinyal kaskadı ile aktive edildikten sonra, her iki yol da son kaspaz aktivasyon adımında buluşur ve genellikle farklı proteinlerin bölünmesine yol açar (Ghobrial ve ark. 2015) (Şekil 1.9).




**Şekil 1.9 İki ana apoptotik yol. İçsel ve dışsal yolak. (Türkçeleştirilerek alınmıştır.) (Kiraz ve ark. 2016)**

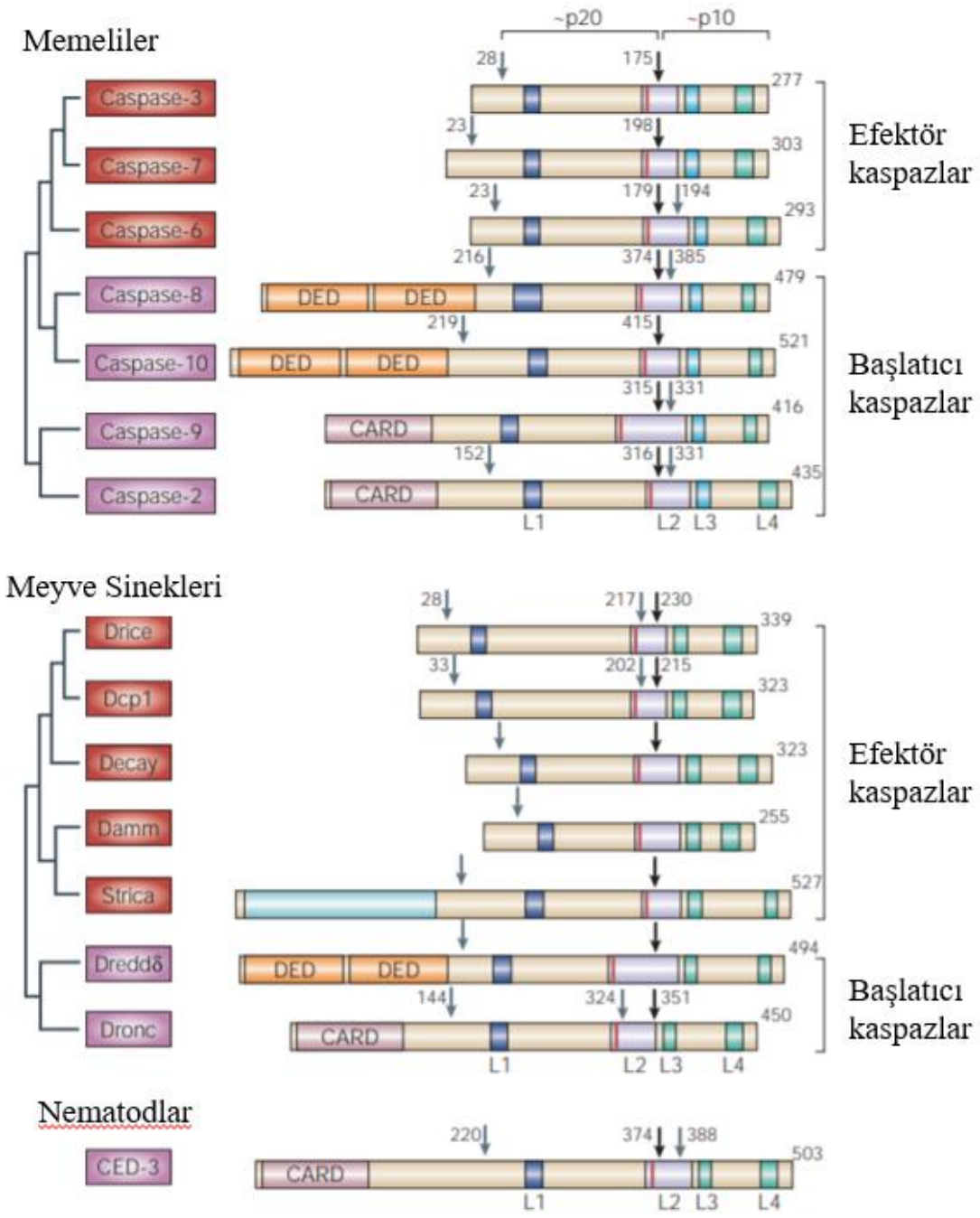
Dışsal yolla tetiklenen apoptoz, esas olarak tümör nekroz faktörü (TNF) gen süper ailesine ait olan zara bağlı ölüm reseptörleri aracılığıyla sinyal verilmesiyle sağlanır. İlk sinyal, ligandlar ile bu reseptörlerin ölüm domainlerinin ligasyonu ile sonuçlanan Fas ligandı / FasR, TNF / TNF R1, Apo2L / DR4 veya (TRAIL) R1 gibi hücre zarı ölüm reseptörleri arasındaki etkileşimler tarafından sağlanır (Locksley ve ark. 2011). Fas ligandının reseptörüne bağlanması, adaptör proteinin, Fas ile ilişkili ölüm domaininin (FADD) bağlanmasını indüklerken, TNF / tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) etkileşimi, pro-kaspaz-8 aktivasyonu ile sonuçlanan (TRADD) 'nin bağlanmasına neden olur. Pro-kaspaz-8, ölüme neden olan sinyalleşme kompleksi (DISC) yardımıyla otokatalitik olarak etkinleştirilir. Aktif kaspaz-8 ya Bid indükler, böylece içsel yol da bir dış sinyalle dahil olur ve aktive olur ya da kaspaz-3 ve kaspaz-7 ve apoptozun aktivasyon süreci, içsel uyaranların yaptığı gibi aynı nihai yolla sonlandırılır (Hsu ve ark. 1995; Wajant 2002). Bid, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyesidir ve apoptozun içsel ve dışsal yolları arasında ortak bir molekül sergiler. Kaspaz8, sitoplazmik Bid proteininin bölünmesine ve miristoilasyonuna neden olarak

mitokondri yoluyla hareketine yol açar. Daha sonra apoptozom oluşumu, Bak ve Bax molekülleri yoluyla sitokrom salınımı ile indüklenir (Sax ve ark. 2002). Apoptozun dışsal aktivasyonu da iki farklı yolla inhibe edilebilir. Biri FLICE benzeri inhibe edici proteinin (cFLIP) FADD ve pro-capase-8'e bağlanması ve bunların aktivitesini bloke etmesi, diğeri ise kaspaz-8 biyogenezinin ilk olarak T hücrelerinde tanımlanan Toso adlı bir protein tarafından inhibisyonudur (Hitoshi ve ark. 1998; Scaffidi ve ark. 1999).Bu aktivasyon cFLIP tarafından inhibe edilebilir. Kaspaz 8, apoptozu doğrudan indükleyebilir veya kaspaz 3 veya Bid'ı aktive ederek apoptoza yol açar. Öte yandan, Apoptozun içsel yolu, bir reseptör sinyallemesinden bağımsızdır ve mitokondri ile ilişkili uyaranlar, hücre içi bir sinyal oluşturur. Bu yolun iç aktivasyonu, hücrenin pozitif veya negatif bir şekilde apoptoza girmesine neden olur. İçsel yol DNA hasarı ile başlatılabilir. Bir yanıt olarak hücreler, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyesi Bax'ın aktivasyonu ile başlayan mitokondriyal yolla apoptozu tetikleyebilir. Bax'ın etkisini inhibe eden anti-apoptotik proteinler, Bcl-2 ve BclXL gibi mitokondri zarında bulunur. Salınan sitokrom c, APAF-1 kompleksi ve pro-kaspaz9, apoptozom adı verilen sitozolde toplanabilir. Bu kompleksin oluşumu, kaspaz 9'un aktivasyonunu takiben pro-kaspaz-3'ün apoptoz için son adım olan kaspaz 3'e dönüşümü ile sonuçlanacaktır. Apoptozun dışsal ve içsel yolları arasındaki karşılıklı konuşma, Bcl-2 ailesinin proapoptotik bir üyesi olan Bid tarafından düzenlenir. Bid bölünmesine, mitokondriden sitokrom c salımını serbest bırakarak apoptozu indükleyen kaspaz 8 aracılık eder. (Kiraz ve ark. 2016) DNA hasarı veya başka herhangi bir apoptoz uyarıcısı, temel olarak mitokondrinin trans-membran potansiyelinde değişikliklere neden olur ve bu da pro-apoptotik proteinlerin sitoplazmaya salınmasıyla sonuçlanır. Sitokrom c, Smad veya yüksek sıcaklık gereksinimi olan protein A2 (HtrA2) / Omi, mitokondriden salınan ve kaspaz protein kaskadının aktivasyonuna neden olan bir proapoptotik molekül grubudur (Chinnaiyan 1999; Du ve ark. 2000). Sitokrom c, Apaf-1 ile etkileşime girerek pro-kaspaz-9'u aktive eden apoptozom kompleksinin oluşumuyla sonuçlanır. Aktif kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktive ettikten sonra, son kaskad aktive olur ve çekirdek, nükleer membranın kırılmasıyla birlikte parçalanır (Hill ve ark. 2004). Bu aşama, kaspaz-3'ün kinazlar, DNA kontrol proteinleri, sitoskeletal proteinler veya endonükleaz inhibitörleri gibi farklı proteinleri klevaj ettiği apoptozun dışsal ve içsel yolakları için ilk olaydır. DNA yoğunlaşması, membran kabarması ve tüm morfolojik değişiklikler, hem içsel hem de dışsal tetik için ortak bir mekanizma olarak kaspazlar tarafından düzenlenir

(Thornberry ve Lazebnik 1998). Öte yandan, endonükleaz G veya AIF dahil mitokondri tarafından salınan başka bir molekül grubu da proapoptotik proteinlerdir, ancak daha sonraki aşamalarda sürece dahil olurlar. Bu moleküller çekirdek içine yerleştirilirler ve burada ilk olarak safha 1 olarak tanımlanan temel bir DNA fragmantasyonuna ve kromatin yoğunlaşmasına neden olurlar ve daha sonraki aşamada kaspaz-3 yardımıyla gelişmiş bir yoğuşma ve DNA fragmantasyonuna neden olurlar. (Susin ve ark. 2000). Tüm içsel apoptoz olayları, başlıca Bcl-2 ailesi proteinleri ve büyük ölçüde Bcl-2 ailesi proteinlerinin aktivasyonunda rol oynayan p53 tümör baskılayıcı protein tarafından kontrol edilir. Bcl-2 protein ailesinin üyeleri pro-apoptotik (Bax, Bak, Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad ve Blk) veya anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-X, ve BAG) ve ayrıca mitokondrinin zar bütünlüğünü belirler ve sitokrom c salımı sürecine dahil olur (Cory ve Adams 2002).

### 1.4.3. Kaspazlar

Kaspazlar, apoptotik yanıtın temel bileşenleridir. Kaspazlar sübstratlarında bir aspartat kalıntısından sonra parçalanan sistein proteazları olarak adlandırılırlar, hücreyi geri dönüşü olmayan bir şekilde ölmek üzere görevlendiren korunmuş bir enzim ailesidir. İlk kaspaz, interlökin-1β-dönüştürücü enzim (ICE; kaspaz-1 olarak da bilinir) insanlarda tanımlanmış olmasına rağmen, kaspazların apoptozdaki kritik rolü, vazgeçilmez genin ced-3 olduğu Caenorhabditis elegans nematod solucanı içinde keşfedilmiştir. (hücre ölümü anormalliği-3), memeli ICE'ye çok benzeyen bir sistein proteazı kodladığı bulunmuştur. O zamandan beri, en az 14 farklı memeli kaspazları tanımlandı, bunlardan 11'i insanlarda var. Kaspazlar ve homologları, nematoddan dipteran Drosophila melanogaster ve lepidoptera Spodoptera frugiperda'ya ve hatta maya Saccharomyces cerevisiae'ye kadar değişen türlerde bildirilmiştir. İlk memeli kaspazının (kaspaz-1 veya ICE), enflamatuar tepkinin önemli bir düzenleyicisi olarak tanımlanmasına rağmen, bilinen 14 memeli kaspazından en az 7'si apoptozda önemli rollere sahiptir. Apoptotik kaspazlar genellikle iki sınıfa ayrılır: memelilerde kaspaz-2, -8, -9 ve -10'u ve meyve sineklerinde Dronc ve Dredd'yi içeren başlatıcı kaspazları; ve memelilerde kaspaz-3, -6 ve -7'yi ve meyve sineklerinde Drice, Decay, Damm, Dcp1 ve Strica'yı içeren efektör kaspazları (Şekil 1.10). CED-3, nematodlardaki tek apoptotik kaspazdır ve hem başlatıcı hem de efektör kaspaz olarak işlev görür. (Riedl ve ark. 2004)




**Şekil 1.10 Efektör ve başlatıcı kaspazlar. ( Türkçeleştirilerek alınmıştır.) (Riedl ve ark. 2004)**

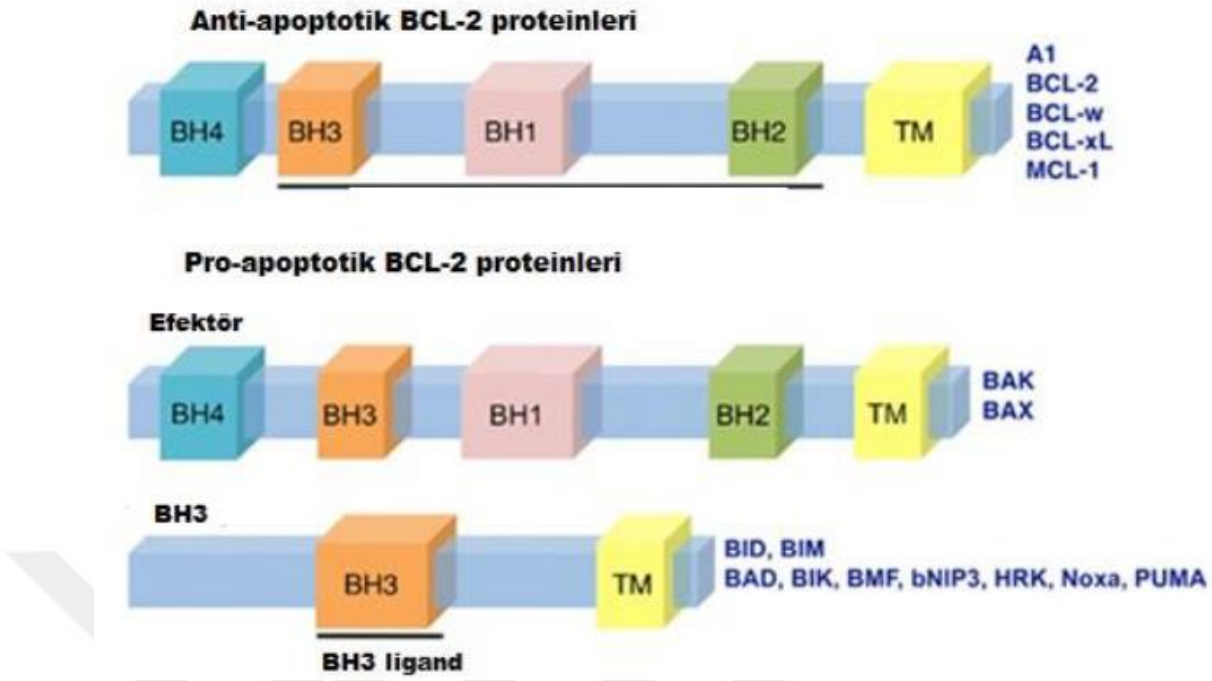
### 1.4.4. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ailesi, karşıt etkilere sahip iki grup protein içerir: apoptozu indükleyen pro-apoptotik grup ve apoptozu inhibe eden anti-apoptotik grup. Anti-apoptotik elemanlar için etki modu, sitokrom c'nin iç salımını engellemek ve dış mitokondriyal zar bütünlüğünü korumaktır. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeler arasındaki denge,

hayatta kalma veya ölme seçimini belirler ve varsayılan mod hayatta kalmaktır. Bcl-2 ailesinin iyi bilinen anti-apoptotik üyeleri arasında Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 bulunur ve pro-apoptotik üyeler arasında Bax, Bcl-xs, Bad, Bim, Bak, Bmf, Bok, Noxa ve Bid bulunur (Şekil 1.11). (Ulukaya ve ark. 2011) Temel olarak, Bcl-2 ailesinin tüm üyeleri tipik karakteristik işlevleri paylaşır;

- Bcl-2 ailesinin diğer üyeleriyle dimerize olurlar,
- proteinleri bağlayarak mitokondriyal homeostazın düzenlenmesine katkıda bulunurlar
- dış mitokondriyal membran gözenek oluşumuna katkıda bulunurlar (Pepper ve Bently 2000).

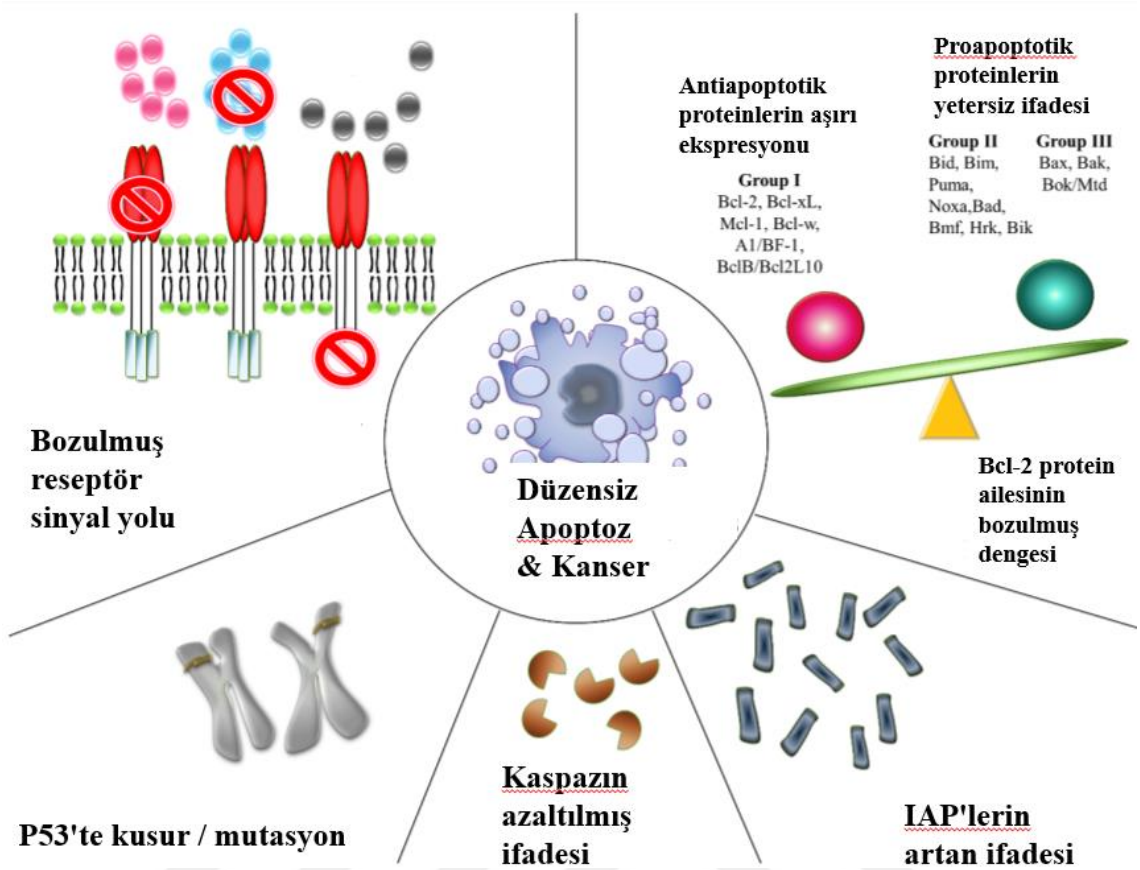
Sadece BH3 alt aile üyelerinin üyeleri, büyüme faktörü yoksunluğu ve DNA hasarı gibi stres koşulları altında aktive olur. Sadece aktif BH3 proteinleri, pro-apoptotik alt aile üyelerinin üyelerinin aktivasyonunu teşvik eden bağlanma yoluyla hayatta kalma yanlısı alt familyanın üyelerini inaktive eder. Aktif pro-apoptotik alt aile üyeleri Bak ve Bax, daha sonra dış mitokondriyal membranı geçirgen hale getirerek mitokondriden sitokrom c salınımı sağlar (Green ve Kroemer 2004). Birkaç insan habisliği tipinde, Bcl-2 ailesi genlerinin ekspresyon seviyeleri arasındaki denge bozulur ve denge, hayatta kalma yanlısı alt aile üyesi yönünde değişir. Bu durumda, kanser hücreleri apoptotik sinyallerden kaçabilir ve bu nedenle terapötik ajanlara karşı direnç geliştirebilir (Camisasca ve ark. 2009; Frenzel ve ark. 2009). Ek olarak, Bcl-2 aile üyeleri de terapötik potansiyelleri nedeniyle kanser tedavisinde değerlendirilir (Kang ve Reynolds 2009). Klinik çalışmalarda, çeşitli malignitelerde alternatif güçlü terapötik yaklaşımlar bulmak için Bcl-2'yi hedefleyen yalnızca BH3 mimetik ajanları araştırılmaktadır. (Lessene ve ark. 2008)




**Şekil 1.11 Anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri (Anvekar ve ark. 2011)**

### 1.4.5. Apoptoz ve Karsinogenez

Kanser, normal bir hücrenin kötü huylu bir hücreye dönüştüğü bir dizi genetik değişimin sonucu olarak görülebilirken, bu kötü huylu dönüşüme neden olan bir hücredeki temel değişikliklerden biri hücre ölümünden kaçmaktır (Hanahan ve Weinberg 2000). 1970'lerin başlarında, Kerr ve arkadaşları apoptozu potansiyel olarak kötü huylu hücrelerin, hiperplazinin ve tümör progresyonunun ortadan kaldırılmasına bağlamıştı (Kerr ve ark. 1972). Bu nedenle, azalmış apoptoz veya direnci, karsinojenezde hayati bir rol oynar. Kötü huylu bir hücrenin apoptoz veya apoptoz direncinde azalma sağlamasının birçok yolu vardır. Genel olarak, apoptozdan kaçınmanın meydana geldiği mekanizmalar genel olarak şu şekilde bölünebilir: 1) bozulmuş pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein dengesi, 2) azaltılmış kaspaz işlevi ve 3) bozulmuş ölüm reseptörü sinyallemesi. Şekil 1.12, apoptoz ve karsinojenezden kaçışa katkıda bulunan mekanizmaları özetlemektedir. (Wong 2011)




**Şekil 1.12 Apoptoz ve karsinojenezden kaçınmaya katkıda bulunan mekanizmalar. (Türkçeleştirilerek alınmıştır) (Wong 2011)**

## 1.5. Nekroz

Geri döndürülemez hücre hasarı ve patolojik süreçlere bağlı nihai hücre ölümü, nekroz olarak adlandırılır. Hücre organellerinin şişmesine, plazma membranının yırtılmasına ve sonunda hücrenin parçalanmasına ve hücre içi içeriğin çevre dokuya dökülmesine ve dolayısıyla doku hasarına neden olan kontrolsüz hücre ölümüdür. (Ruffolo ve ark. 1964) İçsel sinyallerden üretilen apoptoz olarak bilinen programlanmış hücre ölümünün aksine, nekroz, hücre dışından gelen aşırı derecede zararlı uyaran nedeniyle oluşur (Festjens ve ark. 2006).

Morfolojik olarak nekroz, "klasik" apoptozdan oldukça farklıdır. Nekroz sırasında hücreler önce şişer, ardından plazma zarı çöker ve hücreler hızla parçalanır. Nekroz sırasında hücre şişmesi, apoptoza zıt hücre ölümü için kullanılan "onkoz" (şişme anlamına gelen "onkoz" dan türetilmiştir) teriminde vurgulanmaktadır (Majno ve Joris 1995). Spesifik proteazların (kaspazlar) aktivasyonu ve oligonükleozomal DNA fragmantasyonu gibi apoptozun biyokimyasal özellikleri genellikle nekrotik hücrelerde

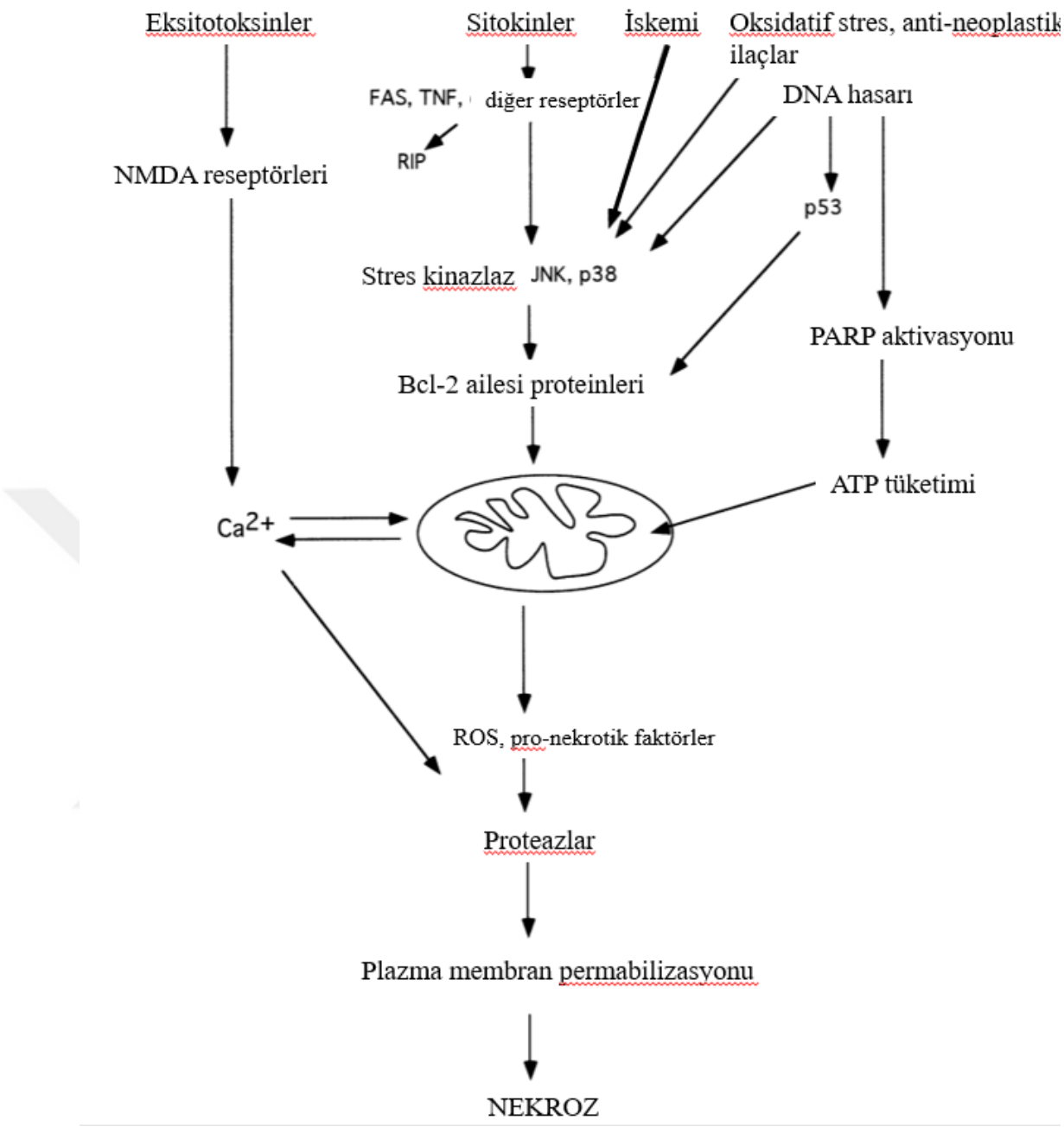
yoktur. Nekroza neden olabilecek ajanlar arasında çeşitli virüsler, bakteriler ve protozoalar bulunur. Nekroz, bakteriyel toksinler (Dong ve ark. 1997; Warny ve ark. 2000) ve tamamlayıcı (Shimizu ve ark. 2000), aktive edilmiş doğal katiller (Blom ve ark. 1999) ve peritoneal makrofajlar (Arantes ve ark. 2000) gibi immün savunma bileşenleri tarafından aktive edilebilir. Yetersiz sitokin salgısı, nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türleri (ROS) ile karakterize edilen patolojik durumlara, hücrelerin yoğun nekrotik ölümü de eşlik eder. Nekrotik koşulların klasik bir örneği, oksijen, glikoz ve diğer trofik faktörlerin şiddetli bir şekilde tükenmesine yol açan ve endotel hücrelerinin ve çevredeki dokuların çoğalmayan hücrelerinin (nöronlar, kardiyomiyositler, böbrek hücreleri, vb.) Kitlesel nekrotik ölümüne neden olan iskemidir.

Morfolojik olarak, nekrotik hücreler karakteristik olarak endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organellerin şişmesi, plazma zarının yırtılması ve hücre erimesi ile kendini gösterir (Ehlers ve ark. 1999). Bu değişiklikler, hücrelerin daha eozinofilik, camsı ve vakuolasyonlu olmasına neden olur. ATP tükenmesi veya azalmış sentez, yaralanmada gözlenen ilk biyokimyasal değişikliktir. ATP, oksijen varlığında mitokondride oksidatif fosforilasyon ile üretilir. Hipoksi veya kimyasal hasar ile ilişkili nekrozda, hücrelere oksijen tedariki eksikliği vardır ve bu da ATP üretiminin azalmasına yol açar. Bu ATP eksikliği, plazma zarındaki enerjiye bağımlı sodyum pompasının arızalanmasına, kalsiyum ve su akışına neden olarak hücre şişmesine ve endoplazmik retikulumdan ribozomların ayrılmasına neden olur. Artan sitozolik kalsiyum ve oksidatif stres, mitokondriyal hasara yol açar. Sitosolik kalsiyum ayrıca, her iki zarın (lizozomal zarlar dahil) ve proteinlerin parçalanmasına yol açan fosfolipazlar ve proteazlar dahil olmak üzere birkaç sitozolik enzimin aktivasyonuna yol açabilir.

Nekrotik ölüm, neredeyse her zaman bir enflamatuar yanıtla ilişkilidir. Nekrotik hücreler, yüksek mobilite grup kutu 1 proteini (HMGB1) ve hepatomdan türetilmiş büyüme faktörü (HDGF) gibi faktörleri serbest bırakır (Fratazzi ve ark. 1999) (Mayhew ve ark. 1999). Bu faktörler, inflammasomun çekirdek proteini olan düğüm benzeri reseptör protein 3 (NLRP3) tarafından algılanır. (Barkla ve Gibson 1999) Bu, iltihaplanma aktivasyonu ile sonuçlanır ve pro-enflamatuar sitokin IL1p'nin salınmasına neden olur. NLRP3 inflammasom aktivasyonu, esas olarak hasarlı hücrelerden salınan mitokondri tarafından üretilen ATP aracılığıyla tetiklenir. (Murdoch ve ark. 1999)

Nekroz tipik olarak kaspazların aktivasyonu ile ilişkili değildir ve hasara veya patolojiye yanıt olarak hücre ölümüne neden olduğu, ancak normal gelişim sırasında olmadığı görülmektedir.

Nekrozu tetiklemede rol oynayan birkaç reseptör vardır; bunların arasında TNF reseptörleri ve bu familyanın diğer reseptörleri (FAS, TRAIL), purinojenik reseptörler ve eksi reseptörleri (örneğin NMDA) bulunmaktadır (Şekil 1.13). Diğer bir önemli sensör DNA'dır: hasarı doğrudan (örneğin radyasyon veya antikanser ilaçları ile) veya dolaylı olarak oksidatif stres yoluyla (örneğin iskemi / reperfüzyon veya diğer ROS üreten tedaviler üzerine) indüklenebilir. Büyük DNA kırılmaları, PARP aktivasyonuna neden olabilir, substrat NAD'yi ve ardından ATP'yi tüketerek enerji eksikliğinden dolayı nekroza yol açabilir. (Proskuryakov ve ark. 2003)




**Şekil 1.13 Nekroz oluşum mekanizması. (Türkçeleştirilerek alınmıştır.) (Proskuryakov ve ark.2003)**

### 1.5.1. Nekroz ve Apoptoz

Apoptoz ve nekroz, hücre ölümünün iki farklı formudur ve Tablo 2'de bir karşılaştırma sunulmaktadır. Tablodan, nekrozun fizyolojik koşullar dışında meydana geldiği, fizyolojik ve patolojik koşullarda apoptozun meydana gelebileceği görülmektedir. Diğer bir deyişle, apoptoz hem sağlık hem de hastalık durumlarında gerçekleşebilir. Apoptoz farklı morfolojik özelliklere sahiptir. Örneğin nekrozda aşırı

sıvı geçişi hücrenin şişmesine sebep olurken apoptoz esnasında hücrenin küçülmesi gözlenir. Nekroz sırasında kromatinin yapısı normal hücrelerdekine aşağı yukarı benzerdir, ancak apoptoz esnasında kromatin agregasyonu ve nükleusun membran etrafında yoğunlaşması görülür. Nekrotik hücrelerde, hücre bütünlüğünün kaybı sonucunda hücre içi içerikler salınır. Bununla beraber, apoptotik hücrelerde zar bozulmaz ve düzensiz tomurcuklar gösterir, bunlara zar veziküller denir. Hücre zarına gömülü sfingomiyelinlerin hidrolizi ve kolesterol dışarı akmasının, zar kabarcıklanmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Nekrozda hücre içi içeriğin salınması, inflamatuar reaksiyonu uyarır; ancak apoptoz durumunda, apoptotik cisimler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagositozlanır, bu nedenle inflamatuar bir yanıt oluşmaz. (Ulukaya ve ark. 2011)

**Tablo 2. Apoptoz ve Nekroz arasndaki farklar (türkçeleştirilerek alınmıştır. (Ulukaya ve ark. 2011)**

| Karakteristikleri | Apoptoz | Nekroz |
|---|---|---|
| **Neden olan faktörler** | ➢ Orta seviye oksidatif stres<br>➢ Büyüme faktörlerinin eksikliği<br>➢ HIV<br>➢ Kemoterapi<br>➢ Radyasyon<br>➢ Ölüm reseptörlerinin uyarılması<br>➢ Sitotoksik T hücreleri | ➢ Aşırı oksidatif stres<br>➢ İskemi<br>➢ Hipertermi<br>➢ Hipoksi<br>➢ Yüksek doz toksik madde<br>➢ Kemoterapi |
| **Morfolojik özellikleri** | ➢ Kromatin kondenzasyonu<br>➢ Blebler içeren intakt hücre membranı<br>➢ Hücre büzülmesi<br>➢ Apoptotik body formasyonu | ➢ Kromatin topaklanması<br>➢ Membran hasarı<br>➢ Organellerin dağılması<br>➢ Hücre şişmesi<br>➢ Hücre parçalanması |
| **Biyokimyasal ve immünolojik özellikler** | ➢ ATP gereklidir<br>➢ Nükleozomlar arası DNA fragmentasyonu<br>➢ Agaroz jelde merdiven modeli görülür<br>➢ M30 antijeni salınır<br>➢ Enflamasyon görülmez | ➢ Bozulmuş iyon dengesi<br>➢ ATP gerekli değildir<br>➢ Agaroz jelde DNA sürüntü olarak görülür<br>➢ LDH ve M65 gibi hücre ölüm belirteçleri salınır<br>➢ Lizozomal enzimler salınır<br>➢ Enflamasyon görülür |

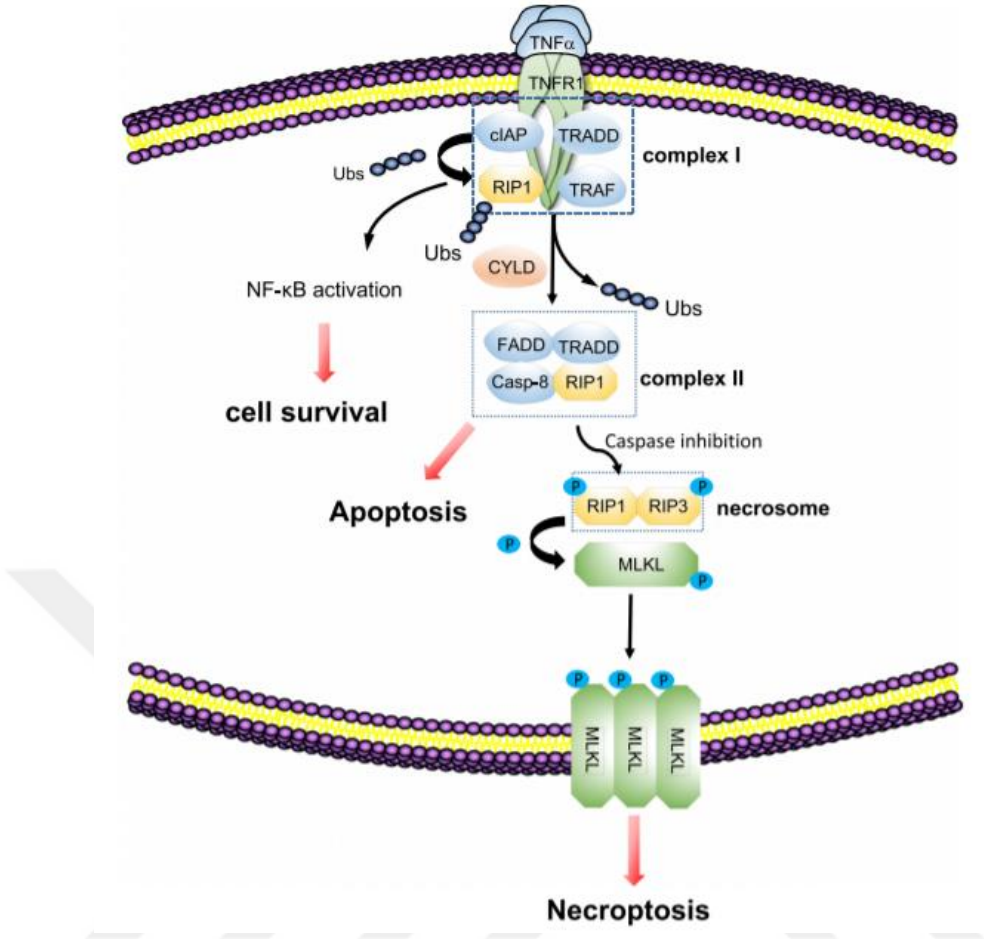
### 1.6. Nekroptozis

Nekroptoz, kaspazdan bağımsız bir şekilde düzenlenmiş bir nekrotik hücre ölümü modalitesidir ve esas olarak RIP1, RIP3 ve MLKL aracılık eder. Nekroptoz, apoptoz direncinin üstesinden gelen alternatif bir programlanmış hücre ölümü modu olarak hizmet eder ve kanser tedavisinde antitümör bağışıklığını tetikleyebilir ve güçlendirebilir. Nekroptozun kanserdeki rolü karmaşıktır. Nekroptotik yolun anahtar

düzenleyicilerinin ekspresyonu genellikle kanser hücrelerinde aşağı regüle edilir, bu da kanser hücrelerinin hayatta kalmak için nekroptozdan da kurtulabileceğini düşündürür; bununla birlikte, belirli kanser türlerinde, anahtar aracıların ifade düzeyi yükselir. Nekroptoz, tümör ilerlemesine karşı savunma yapabilen güçlü adaptif bağışıklık tepkileri ortaya çıkarabilir; bununla birlikte, toplanan enflamatuar yanıt ayrıca tümörijenezi ve kanser metastazını teşvik edebilir ve nekroptoz, bir immünosupresif tümör mikro ortamı oluşturabilir. Nekroptozun ayrıca kanserdeki antimetastatik rolünü gösteren kanıtlara rağmen onkojenez ve kanser metastazını desteklediği bildirilmektedir.( Gong ve ark 2019)

Teorik olarak, tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) süper ailesinin üyeleri, patern tanıma reseptörleri (PRR'ler), T hücre reseptörleri (TCR'ler) ve çoklu kemoterapötik ilaçlar dahil olmak üzere çok sayıda farklı uyaran, nekroptotik hücre ölüm yolunu aktive edebilir (Lalaoui ve ark. 2015). Hipoksi gibi çevresel stresler de nekroptozu ortaya çıkarabilir (Huang ve ark. 2013). Çeşitli uyaranlar arasında, TNFα / TNFR sinyal yolu bir prototip olarak kabul edilir ve en yoğun şekilde araştırılan yol olmuştur (Fulda 2013). Bu nedenle, nekroptozun başlaması, TNF sinyalleme yolunda meydana gelen olaylarla özetlenebilir. TNF'nin TNFR1'e bağlanması, TNFR1 trimerlerinde konformasyonel bir değişikliğe neden olarak, RIPK1, TRADD, cIAP1, cIAP2, TRAF2 ve TRAF5 dahil olmak üzere birden çok proteinin TNFR1 tarafından toplanmasına yol açar. Bu membrana bağlı multimerik protein kompleksi kompleks I (Vandenabeele ve ark. 2010) olarak adlandırılır ve bu kompleks içinde hücre kaderinin (Li ve ark. 2012) çok önemli bir düzenleyicisi olan RIPK1, cIAP1 / 2 tarafından poliübikitine edilir ve bu da kanonik NF'yi indükler. -κB (nükleer faktör kappa B) yolu (Fulda 2013), sitoprotektif genleri transaktive eder ve hücre sağkalımını kolaylaştırır (Vandenabeele ve ark. 2010). Dahası, ligand bağlı TNFR'nin hızlı içselleştirilmesi nedeniyle, kompleks I'deki proteinler ve bunların translasyon sonrası modifikasyonları sonuç olarak değişir (Fulda 2013). Örneğin, RIPK1, deübikitinaz silindromatozis tarafından deubikitine edilir, bu daha sonra NF-κB sinyallemesinin sürekli aktivasyonunu sınırlar (Wright ve ark. 2007) ve hücre ölüm yollarının aktivasyonuna doğru bir eğilime yol açar. Sonuç olarak, RIPK1, TRADD, kaspaz-8 ve FADD'den oluşan, kompleks II olarak bilinen ve aynı zamanda "Ripoptosome" (Tenev ve ark. 2011) olarak da anılan, sitoplazmik ölüm indükleyen sinyalleşme kompleksi oluşur ve

kaspaz-8 aktivasyonunu indükler (Hitomi ve ark. 2008) . Kompleks II, hem apoptotik hem de nekroptotik yolların aktivasyonunda rol oynar. Kompleks II'de, aktif kaspaz-8 hem RIPK1'i hem de RIPK3'ü ayırarak inaktivasyonuna neden olur ve proapoptotik kaspaz aktivasyon kaskadı başlatılarak sonuçta apoptoz yürütülmesine yol açar (wu ve ark. 2012). Bununla birlikte, farmasötik veya genetik müdahaleye bağlı olarak kaspaz-8'in inhibisyonunu takiben (Vandenabeele ve ark. 2010), RIP kinazların bölünmesi durur ve hücre ölümü yolu nekroptoza yönlendirilir. Hücre ölümü modu değiştirildikten sonra, RIPK1, N-terminalinde serin kalıntısının 161 (S161) otofosforilasyonu yoluyla fosforillenir ve bu nedenle aktive edilir (Degterev ve ark. 2008). Aktif RIP1, RIP homotipik etkileşim motifi (RHIM'ler) aracılığıyla RIPK3 ile etkileşime girerek, nekroptozda temel olarak RIPK1 ve RIPK3'ü içeren bir anahtar moleküler sinyalleşme platformu olan nekrozom kompleksi olarak adlandırılan heterodimerik bir amiloid yapısının oluşumuna yol açar (Li ve ark. 2012). Mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin (ROS) RIPK1 otofosforilasyonunu aktive ettiği, bu da RIPK3 görevlendirmesine yol açtığı ve ROS indüksiyonunun da nekrozomda RIPK3 gerektirdiği ve böylece nekroptozun etkili bir şekilde indüklendiği pozitif bir geri besleme devresi oluşturduğu bulunmuştur (Zhang ve ark. 2017). CYLD'nin, nekrozom birleşiminden sonra RIPK1'i deubikitine ederek nekrozom oluşumunu ve aktivasyonunu desteklediği bildirilmiştir (Moquin ve ark. 2013). Nekrozom oluşumu ve / veya aktivasyonu, RIPK1 inhibitörü nec-1, MLKL inhibitörü nekrosülfonamid (NSA) ve çoklu RIPK3 inhibitörleri (Zhang ve ark. 2016) tarafından bloke edilebilir. RIPK3, nekrozomlarda iyi karakterize edilmiş fonksiyonel substratı MLKL'yi fosforile eder. MLKL daha sonra oligomerize edilir ve plazma membranına yerleşir, böylece nekroptozun yürütülmesine yol açarak nekrotik plazma membran geçirgenliğine ve sonuçta hücrenin şişmesi ve hücre ve organel bütünlüğünün kaybı ile karakterize edilen hücre ölümüne neden olur (Murphy ve ark. 2013; Cai ve ark. 2014) (Şekil 1.14).




**Şekil 1.14 Nekroptozisin moleküler mekanizması (Gong ve ark. 2019).**

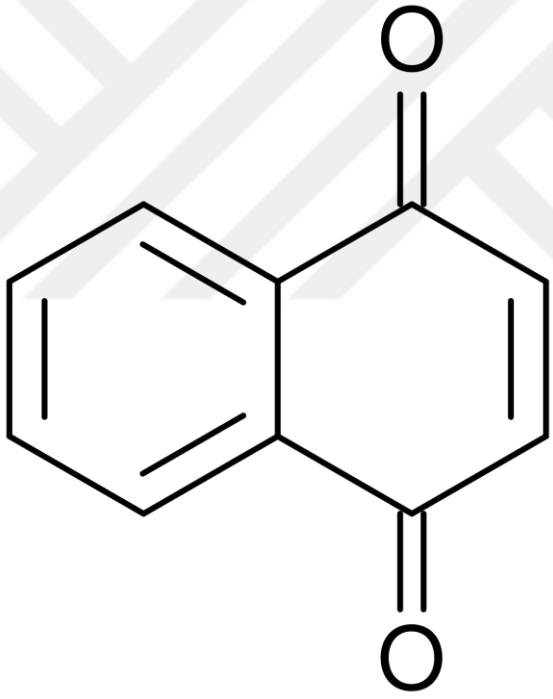
### 1.7. Epitelyal-Mezankimal Dönüşüm

Meme kanserlerinin% 95'inden fazlası epitel kökenlidir. Karsinom ilerlemesi sırasında, epitel hücreleri birincil tümörden ayrılır, çevredeki stromaya yapışır ve onu işgal eder, kan damarlarına intravazasyon yapar ve dışarı çıktıkları ve ikincil tümörlere yol açabilecekleri uzak dokulara ve organlara yayılır. EMT'ye giren epitel hücreleri, mezenkimal bir fenotip elde etmek için epitel hücre özelliklerini kaybeder ve göçmen ve istilacı hale gelir. Bu dönüşüm epitel-mezenkimal dönüşüm (EMT) olarak adlandırılır. Bu nedenle, EMT aşağıdakileri içeren hücresel ve moleküler değişikliklerle karakterizedir: yapışık bağlantılarda Ecadherin (CDH1), sıkı bağlantılarda okludinler (OCLN) ve klozinler (CLDN) ve desmoplakin ( DSP) desmozomlarda; epitelyal sitokeratinlerin aşağı regülasyonu (KRT8, KRT18 ve KRT19); mezenkimal proteinler vimentinin (VIM) ve bazı durumlarda alfa diş kası aktininin (ACTA2) yukarı regülasyonu; daha fazla iğ benzeri morfoloji elde etmek için hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi; dinamik aktin mikrofilaman ağlarını içeren artan hareketlilik ve

invazivlik; ve apoptoza karşı artan direnç. EMT'nin meme kanserinin ilerlemesindeki olası rolüne dair kanıtların çoğu, epitel hücre hatlarının in vitro kültürü çalışmalarından ortaya çıkmıştır. İnvaziv meme kanseri ve karsinosarkomlu hastalardan alınan dokuların mikrodizi temelli immünohistokimya profillerinin denetimsiz kümelenmesi bir EMT imzası göstermiştir. (Tomaskovic-Crook ve ark. 2009)

### 1.8. Naftakinon

Kinonlar, iki karbonil ve iki çift bağdan oluşan bir siklik altı üyeli konjuge düzlemsel sisteme sahip organik moleküllerdir. (Şekil1.15) Sistemin boyutuna, fonksiyonel grupların ve ikame edicilerin düzenine ve ilgili heteroatom olasılığına bağlı olarak birkaç tip kinon vardır. Bir kinon, stabil bir semikinon formundan geçerek tersine çevrilerek bir hidrokinona indirgenebilir (Viehe ve ark.1988).




**Şekil 1.15 Kinon molekülü (Anonim)**

Kinonların elektron taşıyıcıları olduğu bilinmektedir (örn. Ubikinon, K vitamini) ve birçok enzimatik süreç için gereklidir (Lenaz ve ark. 2004). Ortam koşullarına bağlı olarak anti- veya pro-oksidanlar olarak hareket edebilirler. Bu kimyasal çok yönlülük, onlara canlı organizmalar için gerekli olan farklı biyokimyasal süreçlerde önemli bir rol verir. Ayrıca, eksojen sentetik kinonların (veya doğal kaynaklardan izole edilmiş kinonların), oksidatif strese ve mikroplarda hücre ölümüne neden olmak üzere farklı

fizy-farmakolojik hedefleri inhibe ettiği gösterilmiştir (Silva ve ark. 2003). Genel olarak kinonlar apoptozu tetikleyebilir ve DNA interkalasyonu yoluyla topoizomeraz inhibitörleri olarak hareket edebilir. Toksisiteleri, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu yoluyla oksidatif stresin indüklenmesiyle de açıklanabilir. (Verma 2006)

# 2. MATERYAL VE METOD

## 2.1. Materyal

### 2.1.1. Kimyasal maddeler

%0,05 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco

10X Yürütme tamponu, BioRad

2X Laemmli Sample Buffer, Chemcruz

Amonyum persülfat, BioRad

Anti-E-Cadherin (24E10) antikoru, 3195, CST

Anti-GAPDH (14C10) antikoru, 2118, CST

Anti-N-Cadherin (D4R1H) XP antikoru, 13116, CST

Anti-Vimentin (D21H3) XP antikoru, 5741, CST

Asetik asit, Isolab

Bovine Serum Albumin, Sigma

Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma

ECL Prime W.B. Detection, Amersham

Fetal sığır serumu (FBS), Wisent Bioproducts

Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco

Glycine, Bioshop

Halt Protease Inhibitor Cocktail 100 X, Sigma

Hidroklorik asit, Tekkim

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo

Muse® Annexin V & Dead Cell Assay Kit, Merck Millipore

Muse® Caspase-3/7 Assay Kit, Merck Millipore

Muse® H2A.X Activation Dual Detection Kit, Merck Millipore

Muse® Mitopotential Assay Kit, Merck Millipore

Muse® Oxidative Stress Kit, Merck Millipore

Muse® PI3K Activation Dual Detection Kit, Merck Millipore

Naftakinon bileşiği, İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü

PageRuler Plus Prestained protein ladder, Thermo

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco

Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Sigma

PureLink™ RNA Mini Kit, Thermo

RIPA solüsyonu, Thermo

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Wisent Bioproducts

Sodyum klorür, Merck

Sulforhodamine B sodium salt, Chemcruz

TEMED, BioRad

TGX FastCast jel solüsyonları, BioRad

Trikoloroasetik asit, Sigma

Tripan mavisi (%0,5), Biological Industries

Trizma Base, Sigma

Tween-20, Sigma

### 2.1.2. Sarf malzemeler

0,5 ml, 1,5 ml ve 2 ml‘lik santrifüj tüpleri, Isolab

1000µl’lik pipet uçları, Isolab

10µl’lik pipet uçları, Isolab

2 ml‘lik cam pastör pipetler, Isolab

25$cm^2$, 75$cm^2$ ve 175$cm^2$’lik flask, Sunub

5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Genject

6 kuyulu plate, Sunub

96 kuyulu plate, Sunub

Hemasitometri lamı, Neubauer improved, Isolab

Kriyovial, ATS

Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab

Steril santrifüj tüpleri (15ml), Nest

Steril santrifüj tüpleri (50ml), Nest

Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Millex, Millipore

### 2.1.3. Cihazlar

10 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik pipet seti, Brand

200 µl çok kanallı pipet, Brand

-80°C buzdolabı, Panasonic, MDF-U5386S-PE.

Buzdolabı, Panasonic, MPR-721-PE

CO2 inkübatörü, Panasonic, MCO-230AIC-PE

Dikey elektroforez, Bio-Rad

Hassas terazi, KERN, ABJ-NM/ABS-N

Inverted mikroskop, Nikon, Eclipse Ts2

Jel görüntüleme sistemi, General Electric, ImageQuant LAS 500

Kuru sterilizatör, Panasonic, MOV-212-PE

Laminer hava kabini class II, Telstar, Biovanguard

Muse Cell Analyzer Cihazı, Merck

Orbital shaker, Lab companion

Otoklav, Nüve, OT90L

Pipetör, Isolab

Plate Reader-Spektrofotometre, BMG Labtech, Spectrostar

Santrifüj, Hitachi, CF16RN

Soğutmalı santrifüj, Hitachi, CT15RE

Transfer cihazı, BioRad, 10016505C

Vorteks, Scilogex, MX-F

## 2.2. Metod

### 2.2.1. İstanbul Üniversitesi' nin sentezlemiş olduğu naftakinon türevli bileşiklerin hazırlanması

İstanbul Üniversitesi Kimya Bölümü' nün sentezlemiş olduğu yeni naftakinon türevli bileşiklerin (ZP2 -ZP4) 50 mM stok konsantrasyonunda hazırlandı.

### 2.2.2. Hücre Kültürü

Laboratuvarımızda bulunan MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattı kriyovialler içerisinde -80°C dolapta muhafaza edildi.

Kullanılan hücre soylarının özellikleri aşağıda belirtilen şekildedir:

- İnsan meme kanseri hücre soyu
- Östrojen reseptörü (-)
- Epidermal growth factor (EGF) (+)
- Transforming growth factor alpha (TGF alpha) (+)
- E-kaderin (-)
- Kaspaz 2: (+), Kaspaz 3: (+)
- Yüksek oranda yayılabilir

#### 2.2.2.1. Hücre Hattının Stoktan Çıkartılması

Hücrelerin çoğalması için kriyovialler -80ºC den çıkarılarak sıcak su banyosu içerisinde hızlı bir şekilde çözdürüldü. Hücre süspansiyonu; %5 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin (Gibco)içeren 5ml RPMI (Gibco) besiyeri ortamına alındı. Falkon tüp 800 rpm'de 5 dk santrifüjledikten sonra süpernatant kısım aspire edilerek hücre peletine 1ml besiyeri ilave edildi ve hücreler süspansiyon hale getirildi. Falkon içerisine 4 ml besiyeri ilave edildi ve 5 ml'lik hücre süspansiyonu 25cm2'lik flasklara (Corning) alınarak 37ºC'de, %5 CO2 içeren inkübatörde inkübe edildi.

#### 2.2.2.2. Hücre Hattının Pasajlanması

Deneylerde kullanılan hücre soyları, flask yüzeyini bütünüyle kapladıklarında (konfluent olduklarında) flask içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan temizlenmesi için 25cm2'lik flask içerisine 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyleri yıkandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden kalkmaları için 0.5 ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) kullanıldı ve hücreler inkübatörde (37ºC'de, %5 CO2'li ortamda) 5dk tutuldu. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden kalkmış olan hücrelere, tripsinin solüsyonunun hücre membranına zarar vermemesi amacıyla tripsinin 10 katı olacak şekilde besiyeri ilave edildi.

Flaskta bulunan hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800rpm'e 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant aspire edilerek alınan hücre pelleti 1ml hücre besiyerinde çözdürüldü. Hemen sonra 9ml besiyeri ilave edildi ve 10 ml'lik hücre süspansiyonu 75cm2'lik flasklara aktarılarak 37ºC'de, %5 CO2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Böylece hücreler istenilen sayıya ulaşması için çoğalmaya bırakıldı.

#### 2.2.2.3. Hücre Hattının Stoklanması

Flasklardaki hücreler %70 ve üzeri yoğunlukta olduklarında besiyeri uzaklaştırılarak 1X PBS ile yıkama yapıldı. Adherent hücrelerin tutunmuş oldukları yüzeyden kalkmaları için hücreler %0.05 Tripsin-EDTA solüsyonuyla inkübatörde 5 dk inkübe edildi. Mikroskopla gözlem sonucu kalkmış olan hücrelerde tripsini inhibe etmek amacıyla tripsinin on katı besiyeri eklendi. Hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant aspire edilerek hücreler dondurucu medium (%5-10 DMSO + %10 FBS + %80 DMEM) içeriğine alınarak $1\times10^6$ hücre olacak şekilde her bir kriyovial içerisine aktarıldı. Ardından hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine 1ml olacak şekilde paylaştırılarak -80°C'ye saklanmak için kaldırıldı.

#### 2.2.2.4. Besiyerinin Hazırlanması

MDA-MB-231 hücreleri için RPMI 1640 (Gibco) içerisine %5 Fetal Bovine Serum (Gibco) ve %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, Gibco) eklenerek besiyeri hazırlandı.

#### 2.2.2.5. Hemositometre İle Hücrelerin Sayımı

Tripsinle kaldırılmış olan hücreleri süspanse hale getirdikten sonra 96 kuyulu plate alınarak bir kuyusunda 10 µl %0,5 tripan mavisi (Sigma) ile 10 µl hücre süspansiyonu karıştırıldı. Bu karışımdan 10 µl alınarak hemasitometri lamına aktarıldı ve lamda bulunan beş alanda hücre sayımı yapıldı. Sayım sonucu elde edilen değer sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerinde bulunan hücre sayısı tespit edildi.

### 2.2.3. Sulforhodamine B (SRB) testi ile canlılığın belirlenmesi

SRB metodu, Amerika'da bu konularda referans merkez olarak kabul edilen NCI (National Cancer Institute)'nün de kabul gören hücre canlılık metodudur. Yöntemin prensibi Sülforadamin B (SRB) molekülünün asidik ortamda proteinlere stokiyometrik olarak bağlanması prensibine dayanmaktadır (Vichai ve ark.,2006). Uygulamada hücreler, 2500-7500 arası değişen yoğunlukta, kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Ertesi gün kuyuya tutunmuş olan hücreler üzerine ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin farklı konsantrasyonları (1,562-3,125-6,25-12,5-25-50 µM) hazırlanarak uygulandı. Tedavi süresi sonunda hücreler %50 (w/v) soğuk TCA ile 60 dk in situ fikse edildi ve ardından %1 asetik asit içinde %0,4 (w/v) SRB ile boyandı. Boyama süresi sonunda hücrelere bağlanan SRB boyası, tamponlanmamış 10 mM Tris kullanarak çıkarılarak ve optik yoğunluk (absorbans) 530 nm'de "microplate" okuyucusunda (LUMIStar Omega, BMG Labtech, Almanya) ölçülerek değerlendirildi.

İlaç uygulanmamış kontrol grubu hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, ilaç uygulanmış hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Deney içerisinde her bir konsantrasyon birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlandı.

% Canlılık = [100 × (Kimyasal uygulanmış grubun absorbans ortalaması – Kör absorbans ortalaması) / (Kontrol grubunun absorbans ortalaması – Kör absorbans ortalaması)]

### 2.2.4. Akım Sitometrisi İle Anneksin V Analizi

Anneksin-V, PS için yüksek afinite ile $Ca^{2+}$ bağlayıcı bir proteindir ve FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücreleri görünür hale getirilebilmektedir. PS moleküllerinin $Ca^{2+}$ iyonu varlığında Anneksin-V-FITC komplesi ile bağlanması sonucu apoptotik hücre ölüm yüzdesi belirlenmektedir. Bu yöntemde ayrıca 7-Aminoaktinomisin D (7-AAD) boyası da kullanılmaktadır. Bu boya DNA için güçlü afiniteye sahip floresans özellikte bir kimyasal bileşiktir. İntakt (sağlam) hücre zarından kolayca geçemez, bu nedenle zar bütünlüğü bozulmuş hücrelerde (geç apoptotik; nekrotik) çift zincirli DNA'nın GC bakımından zengin bölgelerine bağlanmaktadır.

Boyaların hangi aşamadaki hücrelerle nasıl yanıt verdiği aşağıda özetlenmiştir;

**Non-apoptotik hücreler:** Anneksin V (-) ve 7- AAD (-)

**Erken apoptotik hücreler:** Anneksin V (+) ve 7- AAD (-)

**Geç apoptotik hücreler ve ölü hücreler:** Anneksin V (+) ve 7- AAD (+)

**Çok fazla nükleer debris:** Anneksin V (-) ve 7- AAD (+)

Muse Annexin V & Dead Cell Kiti, MDA-MB-231 hücreleri üzerinde denendi. $100\times10^3$/1 ml ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına ekim yapıldı. 24 saat boyunca 37ºC, %5 $CO_2$'li ortamda inkübe edildi. Devamında, hücreler ZP-2 ve ZP-4 IC90 dozları ile muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle 37ºC, %5 $CO_2$'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda kit bileşenleri oda sıcaklığına getirildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml'lik falkon tüplere toplandı ve negatif kontrol kuyularının süpernatantı uzaklaştırıldı. Hücreler tripsin ile kaldırıldı ve ilgili falkon tüplere toplandı ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Hemen ardından süpernatantlar uzaklaştırıldı ve 100 µl %1 FBS içeren besiyeri pelet üzerine eklendi ve pelet süspanse edildi. Etiketli ependorflara 100µl hücre süspansiyonu alındı. Bu ependorflara 100µl Muse™ Annexin V & Dead Cell solüsyonu eklendi. Orta hızda yaklaşık 5 saniye vorteks yapıldı. Karanlık ortamda 20 dk oda ısısında inkübasyon sonunda Muse™ Cell Analyzer cihazı kullanılarak ölçüm yapıldı.

### 2.2.5. Akım Sitometrisi İle Kaspaz 3/7 Aktivasyon Analizi

Kaspazlar, programlı hücre ölümü olan apoptoz sürecinde merkezi bir öneme sahip sistein proteazlardır (Riedl ve ark. 2004). Apoptotik sinyal boyunca etkili olan

efektör kaspazlardan: kaspaz 3/7 aktivasyonu membran integritesi ve hücre ölümü hakkında önemli bilgiler vermektedir.

Kaspaz 3/7 testi için MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1 ml içerisinde $100\times10^3$ olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, %5 $CO_2$'li ortamda inkübasyonu takiben ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 dozları ile muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle 37ºC, %5 $CO_2$'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0.5 ml %0.05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, %5 $CO_2$'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda mikroskopla incelendiğinde yüzeyden ayrıldığı gözlenen hücreler, tripsinin inhibe olması için on katı besiyeri ile muamele edildi. Böylelikle tripsinin hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra hücre membranına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve 1 ml'sinde $2\times10^4$- $5\times10^5$ hücre olacak şekilde hücre peleti sulandırıldı. Tedavi gruplarını içeren etiketli ependorflara hücre süspansiyonundan 50 µl eklendi. Daha sonra kaspaz 3/7 çalışma solüsyonundan her bir tedavi grubunu içeren ependorflara 5 µl konuldu. Kısa bir pipetaj işleminin ardından ependorflar kapakları açık bir şeklide 37ºC'de, %5 $CO_2$'li ortamda 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda ependorf içerisinde hücre süspansiyonlarına 150 µl DNA'ya bağlanabilen 7-AAD eklenerek kısa bir pipetaj gerçekleştirildi. Daha sonra oda sıcaklığından karanlık ortamda 5 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Muse cihazı kullanılarak kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirildi.

### 2.2.6. Akım Sitometrisi İle Mitokondri Membran Potansiyeli Analizi

Mitokondride meydana gelecek değişiklikler, hücre sağlığı ve stresi hakkında bilgi veren önemli belirteçlerdendir Mitokondri apoptoz sürecinde önemli bir role sahip olan regülatörlerden biridir. Apoptotik yolların kesiştiği bir kavşak noktası olan mitokondri aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması)

apoptotik süreçte geri dönüşümsüz noktayı gösterir (Finkel 2001). Bu yüzden apoptotik uyarıyı takiben, hücrelerde mitokondriyal bütünlüğün kaybı gözlemlenmektedir.

Mitokondri membran potansiyeli testi için MDA-MB-231 hücreleri başlangıç hücre sayısı $100\times10^3$ olacak şekilde ayarlanarak, 6 kuyulu hücre kültür kaplarına ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, %5 $CO_2$'li ortamda inkübasyonu takiben hücreler ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 dozları ile muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle 37ºC, %5 $CO_2$'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, %5 $CO_2$'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml'lik falkon tüplere toplandı 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Hemen ardından süpernatantlar uzaklaştırıldı ve %1 FBS içeren besiyeri ile hücre peletleri süspanse edildi. Ardından 95 µl çalışma solüsyonu eklendi pipetleme ile kısa süre karıştırıldıktan sonra hücreler 20 dk 37ºC'de, %5 $CO_2$'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinden sonra hücrelere 5 µl 7-AAD boyası eklenerek orta hızda yaklaşık 5 saniye vortekslendi. Örneklerin 5 dk oda sıcaklığında bekletilmesinin ardından Muse™ Cell Analyzer cihazı kullanılarak ölçüm yapıldı.

### 2.2.7. Akım Sitometrisi İle DNA Hasarı Analizi

DNA molekülü sürekli olarak genotoksik strese yol açan çeşitli faktörlerin etkisi altındadır. Endojen ve ekzojen kökenli pek çok fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktör DNA zincir kırıklarının oluşumuna neden olan şeker-fosfat omurgasında kırılmalara yol açar. Özellikle DNA çift zincir kırıkları, hücrenin yaşamı boyunca sürekli olarak ortaya çıkabilen en tehlikeli lezyon türleridir ve bunların etkili bir şekilde onarılması hücrenin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için son derece önemlidir. Çünkü tamir edilemeyen bu hasar; genomik kararsızlık, kanser gelişimi ve neoplastik transformasyona yol açan mutasyonların oluşumuna neden olabilmektedir (Kuo ve Yang 2008, Podhorecka ve ark. 2010).

Nükleozomlar, DNA tamirinin gerçekleştiği kromatinlerin yapısal ve işlevsel birimleridir. Her bir nükleozom 147 baz çiftinden oluşan DNA zinciri ve bu zincirin

etrafında sarıldığı dört çekirdek histonundan her birinin iki kopyasından oluşur. Nükleozom yapısını oluşturan dört çekirdek histon ailesi H2A, H2B, H3 ve H4'tür. H2A histon protein ailesinin de H2A1, H2A2, H2AX ve H2AZ gibi varyantları vardır. Önemli bir H2A tipi olan H2AX proteini, hücre ve doku tipine bağlı olarak memeli H2A histon havuzunun %2-25'lik bir bölümünü oluşturur. Ayrıca karboksil kuyruk kısmında tamamen korunmuş özel bir diziye sahip olduğundan H2AX proteini, ökaryotlarda önemli ölçüde korunmuş olan bir H2A histon tipidir. Diğer H2A histon ailesi üyeleri gibi, H2AX de fosforilasyon, asetilasyon ve ubikitinasyona uğrayarak pek çok hücresel olayın düzenlenmesini sağlar. Hasarlı bölgelerde görev alan bu histon tipi, DNA hasar tamiri sürecinde anahtar bir rol oynadığından dolayı, hücre bölünmesi ve büyümesi, immüno-reseptörlerin düzenlenmesi gibi pek çok hücresel olay, genomik kararsızlık ve DNA hasar tamiri ile ilgili sendromlarla yakından ilişkilidir (Kinner ve ark. 2008, Rakiman ve ark. 2008). Fosforile olmuş H2AX, gammaH2AX (γH2AX) adını alır ve DNA çift zincir kırıkları oluştuğunda görülebilir nükleer odaklar oluşturur. Bu nedenle γH2AX'nin ekspresyonu DNA çift zincir kırıklarının tespitinde hassas bir indikatör olarak son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. DNA tamiri gerçekleştikten sonra γ-H2AX, protein fosfataz 2A tarafından defosforile edilir ve böylece hücredeki γ-H2AX seviyesi düzenlenir. Bu nedenle γ-H2AX 'in de fosforilasyonu DNA tamir çalışmaları için de çok uygun bir parametre oluşturur.

γ-H2AX 'in fosforilasyonu belirlemek amacıyla Muse™ H2A.X Activation Dual Detection Kit kullanıldı. Bu amaçla öncelikle, MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına $100\times10^3$ olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, %5 $CO_2$'li ortamda inkübasyonu takiben, ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 dozları ile muamele edilerek 12 ve 24 saat, 37ºC, %5 $CO_2$'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyi yıkandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, %5 $CO_2$'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda örnekler 1X PBS ile yıkandı. Fiksasyon aşaması için kit içeriğindeki fiksatif kullanılarak örnekler buz üzerinde 5 dk fikse edildi. Daha sonra örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edilerek

supernatantlar atıldı ve hücreler permeabilizasyon için kit içerisindeki permeabilizasyon solüsyonu ile 5 dk buzda bekletildi. Sonrasında örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edilerek supernatant kısmı atıldı ve kit içerisindeki antikorlar ile hazırlanan çalışma solüsyonu ile 30 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi ve çalışma solüsyonu ile sulandırılıp DNA hasarının belirlenmesi üzerine Muse™ Cell Analyzer cihazıyla ölçüm yapılarak değerlendirildi.

### 2.2.8. Akım sitometrisi ile bcl-2 analizi

Bcl-2 ailesinin üyeleri anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler olmak üzere iki alt gruptan oluşmaktadır. Anti-apoptotik Bcl-2 proteini, mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol eden proteinleri düzenleyerek sitokrom c salınımının önlenmesinden sorumludur ve Bcl-2'nin anti-apoptotik fonksiyonu fosforilasyon düzeyinde düzenlenmekte olup özellikle Ser70 fosforilasyonunun apoptoz ve otofaji süreçlerinde önemli role sahip olduğu bilinmektedir (Murphy ve ark. 2000, Wei ve ark. 2008). Bu yöntemin prensibi, Bcl-2'nin total (anti-Bcl-2-PECy5) ve fosforlanmış (anti-phospho-Bcl-2 (Ser70)-Alexa Fluor®555) düzeylerini belirleyen iki farklı antikor kullanımı ile total Bcl-2 ifadesine göre Bcl-2 fosforilasyonunun ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bcl-2 aktivasyonunun belirlenmesi için, MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına $100\times10^3$ olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, %5 $CO_2$'li ortamda inkübasyonu takiben, ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 dozları ile muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle, 37ºC, %5 $CO_2$'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, %5 $CO_2$'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda örnekler 1X PBS ile yıkandı. Fiksasyon aşaması için kit içeriğindeki fiksatif kullanılarak örnekler buz üzerinde 5 dk fikse edildi. Daha sonra örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatantlar atılarak hücreler permeabilizasyon için kit içerisindeki permeabilizasyon solüsyonuyla 5 dk buz üzerinde bekletildi. Ardından örnekler 300 g'de 5 dk santrifüj edilerek supernatant kısmı atıldı ve kit içerisindeki

antikorlar ile hazırlanan çalışma solüsyonu ile 30 dk karanlıkda oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler 300 g'de 5 dk santrifüj edilerek çalışma solüsyonu ile sulandırıldı ve Bcl-2 aktivasyonunun belirlenmesi için Muse™ Cell Analyzer cihazı ile ölçüm yapılarak değerlendirildi.

### 2.2.9. Akım Sitometrisi İle ROS Analizi

ROS (Reaktif oksijen türleri) normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit ($H_2O_2$) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)'dir. ROS, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı serbest radikaller oluşabilir. ROS oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı ($pO_2$), ozon ($O_3$) ve azot dioksit ($NO_2^{\bullet}$), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar ve hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Kanser, alzheimer, sepsis, diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi çeşitli patofizyolojik hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (Dumont ve Beal 2011; Pelicano 2014).

Kullanılan Muse® Oksidatif Stres kiti de hücre içi süperoksit radikallerini saptayarak hücrelerde görülen oksidatif stres yüzdesi hakkında bilgi vermektedir. Kit içeriğindeki oksidatif stress solusyonuda hücrelerdeki ROS seviyesini saptamaktadır.
Oksidatif stres testi için, MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 6 kuyulu hücre kültür kaplarına $100\times10^3$ olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat 37ºC, %5 $CO_2$'li ortamda inkübasyonu takiben ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 dozları ile muamele edilerek 12 ve 24 saat süreyle, 37ºC, %5 $CO_2$'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süreleri sonunda öncelik olarak kitin bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1X PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37ºC'de, %5 $CO_2$'li ortamda 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, 15 ml'lik falkon tüplere toplandı ve 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücre pelleti ml'sinde

$1\times10^6$-$1\times10^7$ hücre olacak şekilde kit içeriğindeki oksidatif stres çalışma solüsyonu ile muamele edilerek kısa pipetleme ile karıştırıldı ve 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örneklerin ölçümü Muse™ Cell Analyzer cihazı ile gerçekleştirildi.

### 2.2.10. Yara iyileşmesi

Üçlü negatif meme kanseri hücre hattının yatay göç etme yeteneğinin tedavi ile değişimi, yara iyileşmesi deneyi ile değerlendirildi. Hücrelerin, 12 kuyucuklu kültür kaplarının içine %90 konfluensi sağlanacak şekilde ekim yapıldıktan sonra yara çizgileri, her bir kuyunun ortasında bir plastik pipet ucu (1 mm) kullanılarak oluşturuldu. Hücre artıklarının temizlenmesi ve yüzen hücrelerin uzaklaştırılması için kuyucuklar üç kez 1XPBS ile yıkandı ve sonrasında,12-24 saat süreyle ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC50 dozları uygulandı. Yara yüzeyine hücre göçü görüntüleri, belirtilen zaman noktalarında invert mikroskop altında incelenerek, görüntülendi.

### 2.2.11. Koloni Formasyonu

MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyu başına $1\times10^3$ hücre olacak şekilde ekildi. Ardından ZP-2 ve ZP-4 IC 90 dozlarında (48 saat) uygulamaları yapıldı ve hücreler 14 gün inkübe edildi. Süre sonunda koloniler kristal viole ile boyanarak ve fotoğraflandıktan sonra değerlendirildi.

### 2.2.12. Western blot analizi

Hücrelerden elde edilen bir protein karışımında hedef proteinin varlığını tespit etmek ve moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla kullanılan özel yöntemdir.

İmmünoblotlama olarak da adlandırılan bu tekniğin uygulanabilmesi için öncelikle hedef proteini tanıyarak ona bağlanabilen bir antikor mevcut olmalıdır. Western blotlama temel olarak dört aşamada gerçekleştirilir:

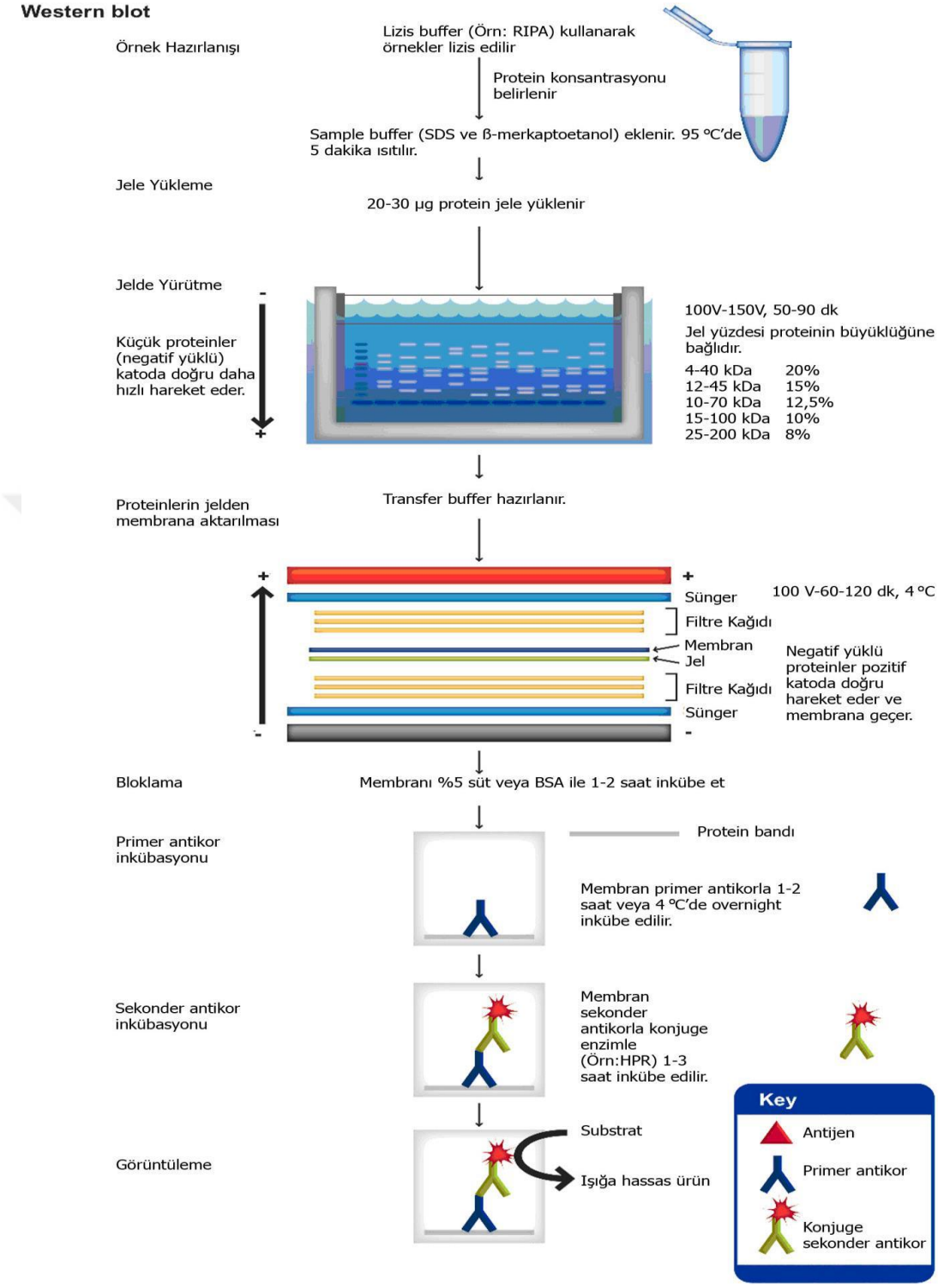
- Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle örnek karışımda bulunan proteinlerin jel üzerinde birbirlerinden ayrılmaları sağlanır.
- Jelde büyüklüklerine göre ayrılarak bantlar oluşturan protein molekülleri, elektrotransfer tekniği ile nitroselüloz membrana aktarılırlar.

- Membrana sırasıyla, hedef proteine özgü antikor, bu antikoru tanıyan ve yapısına enzim ilave edilmiş ikincil bir antikor ile muamele uygulanır.

- Son olarak söz konusu enzimin substratı ile muamelesi sonucunda meydana gelen ışık aracılığı ile hedef proteinin membran üzerinde görüntülenmesi sağlanır (Şekil 2.4).

Proteinlerin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılan SDS-PAGE yöntemi Western blot analizinin ilk aşamasını oluşturur. Western blot yönteminde toplayıcı jel ve ayırıcı jel olmak üzere iki farklı jel kullanılır. Toplayıcı jel hafif asidik (pH:6,8) olup düşük akrilamid konsantrasyona sahiptir ve bu sayede gözenekli jel oluşur. Ayırıcı jel baziktir (pH:8,8) ve yüksek poliakrilamid içeriği ile jel gözenekleri daha dardır. Proteinler bu sayede büyüklüklerine göre ayrılır ve büyük proteinlere kıyasla küçük proteinler daha kolay ve hızlı ilerler.

SDS-PAGE yöntemi ile ayrılmak istenilen proteinlerin yalnızca büyüklüklerine göre ayrımını sağlamak amacıyla önce ısı ile denatüre edilip sonrasında Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ile muamele edilmeleri gereklidir. Anyonik bir deterjan olan SDS, proteinlere bağlanarak onları negatif yüklü hale getirir ve lineer forma dönüşmelerini sağlar. SDS sayesinde negatif yük ile yüklenmiş olan proteinler elektroforez sırasında anoda göç ederler. Elektroforez işleminden sonra farklı büyüklükteki proteinler jel boyunca ilerlerken ayrılarak farklı protein bantları halinde yerleşirler. SDS-PAGE işleminden sonra jeldeki protein bantlarının görüntülenmesi için kemiluminesans prensibinden yararlanılır (Coşkun-Arı 2003, Mahmood ve Yang 2012).




**Şekil 2.4.** Western Blot Aşamalarının Şematik Gösterimi (Anonim 2010).

Protein örneklerinin hazırlanması için MDA-MB-231 hücreleri $3\times10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekim yapıldı. 24 saat 37ºC', %5 $CO_2$'li ortamda inkübasyonu takiben ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC 90 dozları ile muamele edilip 12 ve 24 saat süreyle, 37ºC, %5 $CO_2$'li ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda bir sonraki aşama olan protein izolasyonuna geçildi.

### 2.2.12.1. Protein Örneklerinin Hazırlanışı

3 ml lizis tamponu (RIPA lysis buffer, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) için 30 µl 200 mM PMSF (Santa Cruz, CA, USA), 30 µl 100 mM sodyum ortovanadat (Santa Cruz, CA, USA), 45 µl proteaz inhibitör kokteyl (Santa Cruz, CA, USA) eklendi. Solüsyon karanlıkta hazırlandı. Bu aşamada, ilaç uygulanan kuyuların süpernatantları, buz üzerinde tutulan falkon tüplere toplandı ve negatif kontrol kuyusunun süpernatantı uzaklaştırıldı. Kuyulara 1 ml soğuk PBS ilave edilip hücreler "scraper" (Corning) ile kaldırıldı ve ilgili falkon tüplere aktarıldı. Süspansiyon 4°C'de 1000 g'de 5 dk santrifüj (Hettich Zentrifugen, Almanya) edildi. Santrifüj sonrası tüplerden süpernatantlar uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 0,05 ml lizis tamponu pipetlendi. Örnkler, karanlıkta 45 dk buz üzerinde bekletildi ve bu esnada 10 dk bir sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Süre bitiminde solüsyonlar 1.5 ml'lik tüplere aktarıldı ve 4°C'de 13.000 g'de 15 dk santrifüj edildi (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Süpernatantları 0.5ml'lik tüplere toplandı ve protein miktarları ölçüldü.

### 2.2.12.2. Proteinlerin Biçinkoninik asit (BCA) Yöntemi ile Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Bicinchoninic Acid Kit (Sigma, St. Louis, MO)

Bovine Serum Albumin (BSA, Amresco, Solon, OH, USA) Standardı

BCA ile protein miktarlarını ölçebilmek için sığır serum albumin (BSA) proteininin değişik konsantrasyonları ultra saf $dH_2O$ ile hazırlanarak bir standart eğri grafiği çizildi. 1 ml'sinde 1, 0.8, 0.6, 0.4 ve 0.2 mg BSA bulunan standartlar hazırlandı.

### 2.2.11.2.3. BCA Ölçümünün Yapılması

BCA protein tayin yönteminde bakır sülfat, BCA solüsyonuna eklendiğinde oluşan kompleks elma yeşili bir renk alır. Bu solüsyon, protein solüsyonuna ilave

edildiğinde, proteinin peptit bağları ile etkileşir ve $Cu^{++}$ iyonları $Cu^{+}$ iyonlarına dönüşür. Neticesinde kompleksin rengini mora çevirir. Bu yöntem hızlı, hassas ve kesindir ancak deterjan ve organik solventlerle etkileşimlerine dikkat etmek gerekmektedir.

Ölçüm için Biçinkoninik Asit Kit ve 96 kuyuluk plate kullanıldı. Her bir kuyuya 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1 mg konsantrasyonlarda standart ve 5 µl konsantrasyonu bilinmeyen örnekler pipetlendi. Konsantrasyonu bilinmeyen örnekler üzerine 20 µl ultrasaf $dH_2O$ standartlar da son hacim 25 µl olacak şekilde ultrasaf $dH_2O$ eklenerek ölçüm yapıldı. Bu seyreltme katsayısı, hesaplamalarda dikkate alındı. Kuyuların üzerine 175 µl çalışma ayıracı pipetlendi ve plate 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Sonrasında oluşan renk şiddeti, spektrofotometde 570 nm'de okundu.

### 2.2.12.3. Western Blot Yöntemi ile Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarılması

MES SDS Running Buffer (Nu-PAGE, 20X, İnvitrogen, CA, USA): 30ml Running buffer, 570ml ultra saf H2O ile tamamlandı.

Nu-PAGE LDS Sample Buffer (4X, İnvitrogen, CA, USA)

Nu-PAGE Sample Reducing Agent (10X, İnvitrogen, CA, USA)

Nu-PAGE Antioksidant (İnvitrogen, CA, USA)

Kaleidoscope Prestained Standarts (Biorad, CA, USA)

%4-12 gradient, NuPAGE Bis-Tris Mini Gels, 1mm, 12 kuyucuk (İnvitrogen, CA, USA)

10X pH:7,6 TBS-T (Tris-Buffer Saline-Tween20): Tris base 24,23 g (Scharlau, Barcelona, Spain) NaCl (Merck, Darmstadt, Germany)

80,06 g ve 5 ml Tween20 (Dako, CA, USA) 1L ultra saf $H_2O$ ile çözüldü.

Chemiluminescent Detection Kit, Mouse (Amersham, Buckinghamshire, UK)

Phototope®-HRP Western Blot Detection System (Cell signalling, MA, USA)

### 2.2.11.3.2. Proteinlerin Yüklenmesi ve Jelde Yürütülmesi

Örnekler istenen hacimlerde toplam protein miktarı 20 µg (BCA yöntemiyle belirlenen) ve "sample buffer" ve "reducing agent" 1X olacak şekilde 0.5 ml'lik tüplere pipetlendi. Ardından tüpler 95ºC'de 5 dk bekletildi. Bu esnada jel, elektroforez tankına yerleştirildikten sonra SDS running buffer, doluluk sınırına kadar eklendi. Hazır jelde bulunan koruma sıvısı uzaklaştırıldıktan sonra 500 µl antioksidan eklendi. Marker (5 µl) ve örnekler kuyulara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklendi. Yükleme işlemi

sonunda 90 dk boyunca100V elektrik uygulanarak protein örnekleri jel içerisinde elektrik akımk yönünde yürütüldü.

Transfer işlemi için I-Blot jel transfer cihazına sırasıyla anot bakır (+), jel, filtre kâğıdı (ultra saf $H_2O$ ile ıslatılır), katot bakır (-) ve sünger yerleştirildi. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda 8 dk transfer işlemi gerçekleştirildi.

**2.2.12.4. Proteinlerinin Belirlenmesi**

Uygun protein için, TBS-T içerisinde %5'lik süt çözeltisi hazırlandı ve 60 dk oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Süre sonunda, 3 defa 5 dk TBS-T ile yıkama yapıldı.

Uygun birincil antikor 1:1000 olacak şekilde %5'lik BSA veya %5'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve 18 saat 4ºC'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dk TBS-T ile yıkama yapıldı.

İkincil antikor için, uygun Anti-Rabbit veya Anti-Mouse 1:2000 olacak şekilde %5'lik süt çözeltisi içerisinde hazırlandı ve çalkalayıcıda 60 dk inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 3 defa 5 dk TBS-T ile yıkama yapıldı.

Görüntüleme için; Lumiglo reagent A (20X, Cell Signaling, MA, USA) ve Peroksidaz reagent B (20X, Cell Signaling, MA, USA) iki kat seyreltilerek kullanıldı. Membranlar hazırlanan solüsyon ile 1 dk inkube edildikten sonra açığa çıkan kemiluminesans sinyal, ImageQuant LAS 500 chemiluminescence CCD camera cihazı kullanılarak görüntülendi. Bu şekilde nitroselüloz membran üzerine transfer edilmiş olan proteinlere bağlanan antikorlar görüntülendi.

Birincil ve ikincil antikorları membrandan uzaklaştırmak (Stripping) için üretici firmanın (Cell Signaling, MA, USA) Western blot yeniden işaretleme (reprobing) protokolü kullanıldı. Stripping solüsyonu hazırlamak için; 100 ml ultrasaf su içerisine 0,76 g Tris-base (Scharlau, Barcelona, Spain), 2 g SDS (Applichem, Darmstadt, Germany) ve 700 µl ß-merkaptoetanol (Merck, Schuchard, Germany) eklendi (1X, pH:6,8). Membran 4 kez 5 dk TBS-T ile yıkandıktan sonra stripping solüsyonu eklenerek 150-300 rpm, 37ºC'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 2 kez 5 dk TBS-T ile yıkama yapıldı ve membranda sinyal olup olmadığını kontrol etmek amacıyla görüntüleme yapıldı. Görüntüleme sonunda membranlarda sinyal yoksa 4 kez 5 dk TBS-T ile yıkama yapılarak bloklama aşamasına geçildi.

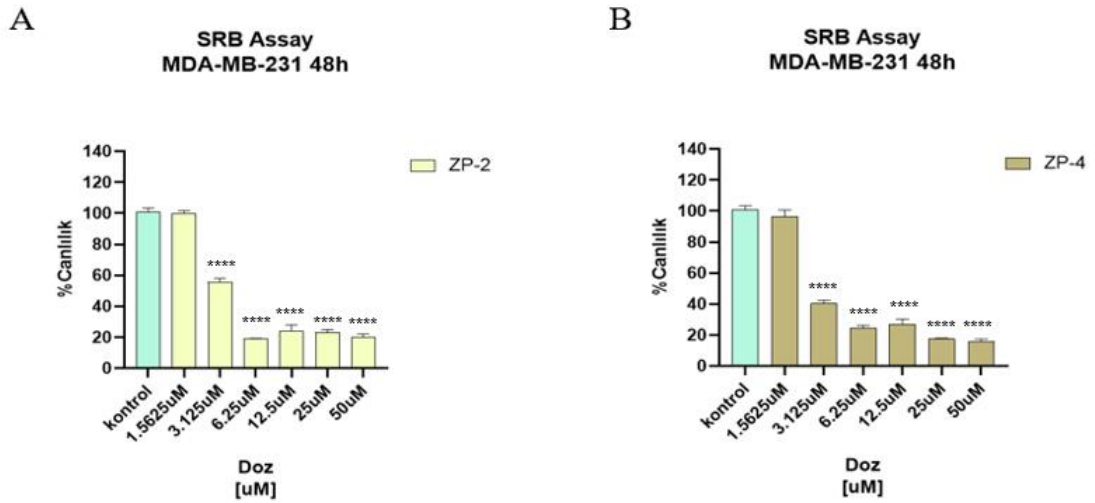
### 2.2.13. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler Graph Pad programı aracılığı ANOVA testi ile değerlendirildi. Deney verileri ZP-2 ve ZP-4 uygulanmış MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde yapılan SRB testi sonuçlarının üç tekranın ortalamasıdır. Verilerin analizi "Graph Pad Prism 6" istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. (Motulsky, 1999). Grupların karşılaştırılmasında two way ANOVA testi kullanılarak, Bonferroni doğrulama yöntemiyle de anlamlı değişiklikler p değeri $< 0.0001$ şeklinde bulunmuştur.

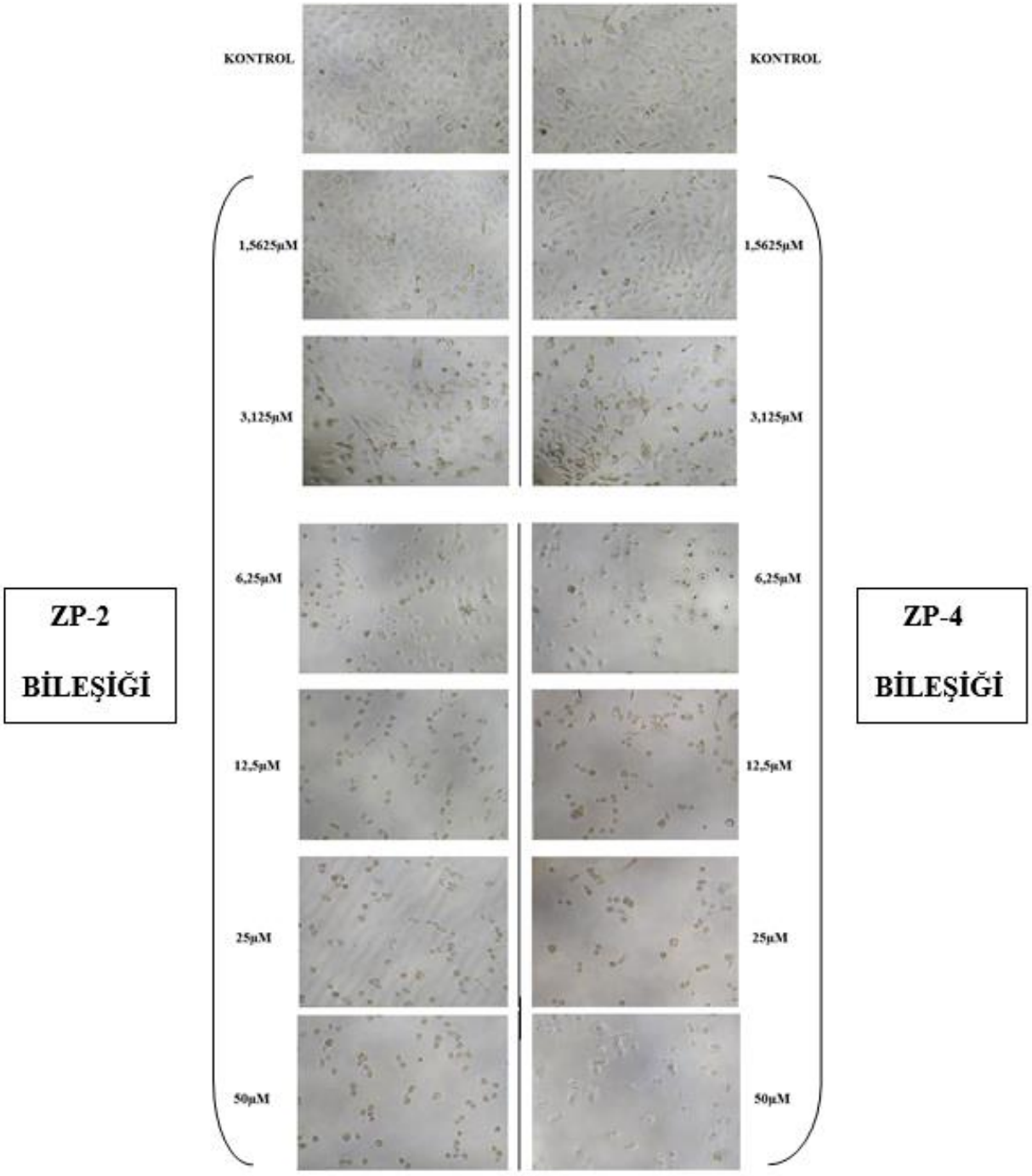
# 3. BULGULAR

## 3.1. SRB Canlılık Testi Bulguları

MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücrelerine 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda (1,5-50 µM) ZP-2 ve ZP-4 bileşikleri uygulanarak hücre canlılığı SRB testi ile belirlendi. SRB analizi sonucunda ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin uygulanan dozla ters orantılı olarak hücrelerin canlılık yüzdesinde hem istatistiksel hem de faz fotoğraflarıyla uyumlu bir şekilde anlamlı azalmaya neden olduğu belirlendi (Şekil 3.1.) (Şekil 3.2). Bu deneyde MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde %50 ve %90 'ının öldüren dozun belirlenmesi (IC50-IC90) amaçlandı. %50 canlılık sağlayan 2.45µM ve %10 canlılık sağlayan en yakın doz olan 50 µM seçilerek ileri analizlere devam edildi.




**Şekil 3.1. Doza bağlı ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin üçlü negatif meme kanseri hücre hattında canlılık üzerine etkisinin SRB testi ile gösterilmesi. MDA-MB-231üçlü negatif meme kanseri hücre hattında (A) ZP-2 (B) ZP-4 bileşiklerinin 0, 1.5, 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50 µM dozlarında 48 saat uygulanması sonucu hücre canlılıkları ölçülmüştür. (****:p<0,0001)**

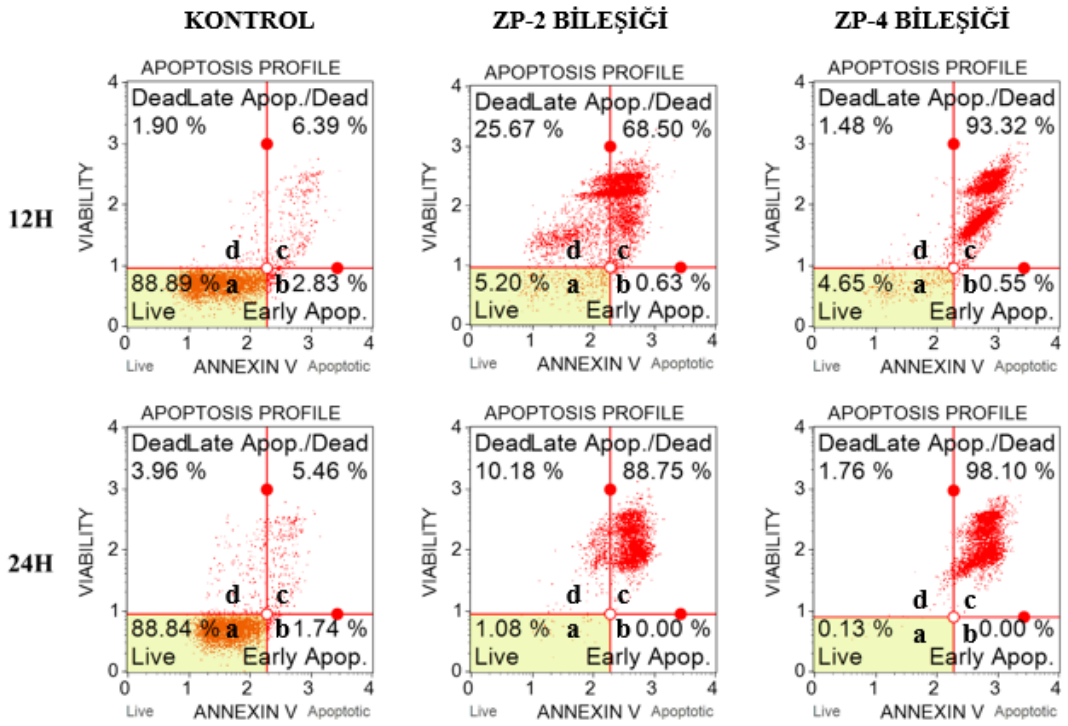



**Şekil 3.2 ZP-2 ve ZP-4 ile 48 saat tedavi edilen MDA-MB-231 hücre hattının faz fotoğrafları**

### 3.2. Akım Sitometrisi Bulguları

#### 3.2.1. Anneksin V Testi

ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 değerinin MDA-MB-231 hücre hattında neden olduğu hücre ölümü akım sitometrisinde Anneksin-V testiyle bakıldığında elde edilen sonuçlar Şekil 3.3., Tablo 3 ve 4'te gösterilmiştir. Anneksin V-FITC ve 7-AAD negatif alan sağlıklı hücreleri (a), Anneksin V-FITC pozitif ve 7-AAD negatif o bölge erken apoptotik hücreleri (b), Anneksin V-FITC ve 7-AAD pozitif olan alan geç apoptotik hücreleri (c) ve Anneksin V-FITC negatif ve 7-AAD pozitif olan alan nekrotik hücreleri (d) göstermektedir. MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 dozu zamana bağlı olarak apoptozu indüklediği tespit edilmiştir.




**Şekil 3.3. MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 µM) konsantrasyonunun uygulanması sonrası anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzdelerinin 12 ve 24 saatlik grafikleri. (a: sağlıklı hücreler; b: erken apoptotik hücreler; c: geç apoptotik hücreler; d: nekrotik hücreler).**

**Tablo 3.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 µM) konsantrasyonunun 12 saat uygulanması sonucu anneksin-V değerlendirmesiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik yüzdelerinin tabloda gösterilmesi.**

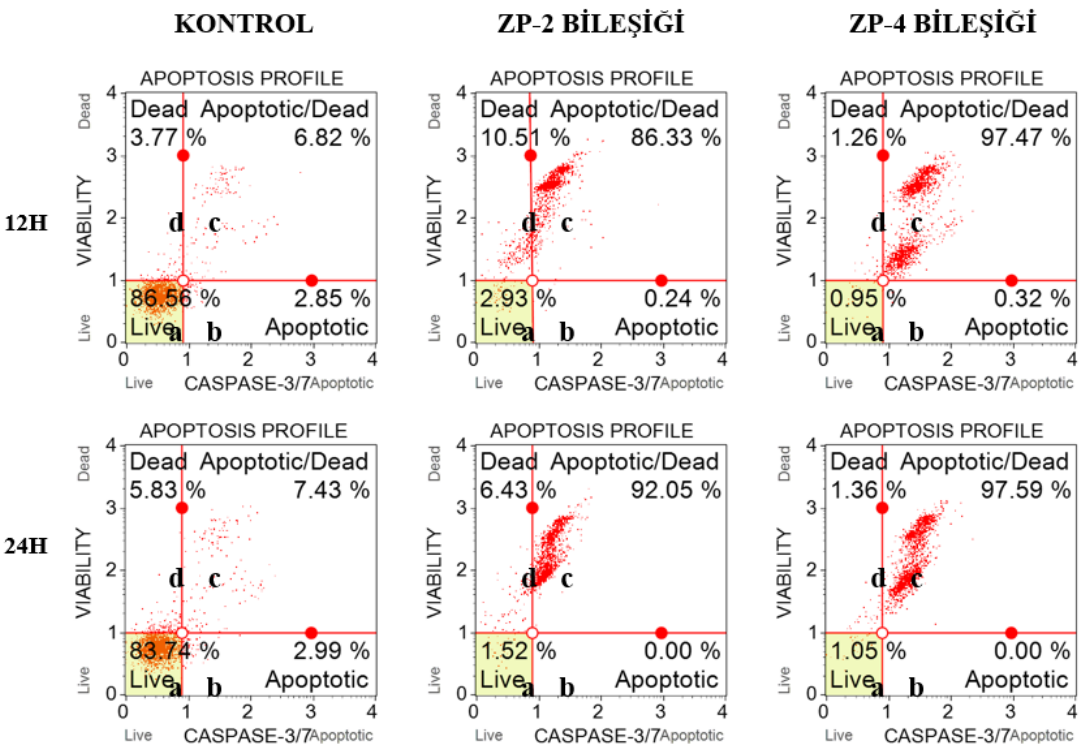
| Hücreler | Bileşik | Canlı popülasyon (a) | Erken apoptotik popülasyon (b) | Geç apoptotik popülasyon (c) | Nekrotik popülasyon (d) |
|---|---|---|---|---|---|
| MDA-MB-231 | Kontrol | %88,89 | %2,83 | %6,39 | %1,90 |
| | ZP-2 | %5,20 | %0,63 | %68,50 | %25,67 |
| | ZP-4 | %4,65 | %0,55 | %93,32 | %1,48 |

**Tablo 4.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 µM) konsantrasyonunun 24 saat uygulanması sonucu anneksin-V değerlendirmesiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik yüzdelerinin tabloda gösterilmesi.**

| Hücreler | Bileşik | Canlı popülasyon (a) | Erken apoptotik popülasyon (b) | Geç apoptotik popülasyon (c) | Nekrotik popülasyon (d) |
|---|---|---|---|---|---|
| MDA-MB-231 | Kontrol | %88,84 | %1,74 | %5,46 | %3,96 |
| | ZP-2 | %1,08 | %0,00 | %88,75 | %10,18 |
| | ZP-4 | %0,13 | %0,00 | %98,10 | %1,76 |

### 3.2.2. Kaspaz 3/7 Testi

Öncesinde yapılan SRB ve Anneksin-V deneyleri sonuçlarına göre ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 dozu MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saatte apoptoza sebep olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle apoptoz yolağının efektör kaspazlarından kaspaz 3/7 aktivasyonunun incelenmesi sonucuna varılmıştır. Akım sitometrisinde kaspaz 3/7 değerlendirilmesi sonucu alınan veriler Şekil 3.4, Tablo 5 ve 6'da gösterilmiştir. Kaspaz 3/7 ve 7-AAD negatif alan sağlıklı hücreleri (a), Kaspaz 3/7 aktivasyonu pozitif ve 7-AAD negatif alan erken apoptotik hücreleri (b), Kaspaz 3/7 aktivasyonu ve 7-AAD pozitif alan geç apoptotik hücreleri (c) ve Kaspaz 3/7 aktivasyonu negatif ve 7-AAD pozitif alannekrotik hücreleri (d) göstermektedir. ZP-2 ve ZP-4 bileşikleri uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde anneksin-V deneyiyle korele olarak zamana bağlı kaspaz 3/7 aktivasyonunda artış görülmektedir.




**Şekil 3.4.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 µM) konsantrasyonunun uygulanması sonrası kaspaz 3/7 değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzdelerinin 12 ve 24 saatlik grafikleri (a: sağlıklı hücreler; b: kaspaz 3/7 aktif olan erken apoptotik hücreler; c: kaspaz 3/7 aktif olan geç apoptotik hücreler; d: kaspaz 3/7 aktif olmayan nekrotik hücreler)**

**Tablo 5.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 µM) konsantrasyonunun 12 saat uygulanması sonucu kaspaz 3/7 değerlendirmesiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik yüzdelerinin tabloda gösterilmesi.**

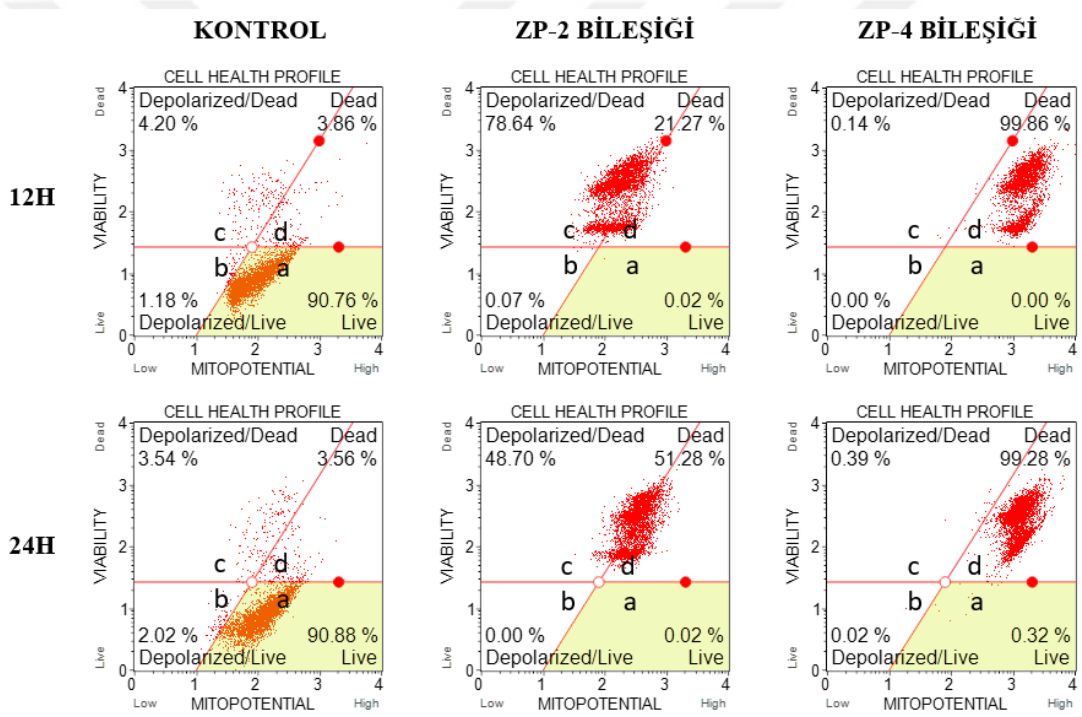
| Hücreler | Bileşik | Canlı popülasyon (a) | Erken apoptotik popülasyon (b) | Geç apoptotik popülasyon (c) | Nekrotik popülasyon (d) |
|---|---|---|---|---|---|
| MDA-MB-231 | Kontrol | %86,56 | %2,85 | %6,82 | %3,77 |
| | ZP-2 | %2,93 | %0,24 | %86,33 | %10,51 |
| | ZP-4 | %0,95 | %0,32 | %97,47 | %1,26 |

**Tablo 6.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 µM) konsantrasyonunun 24 saat uygulanması sonucu kaspaz 3/7 değerlendirmesiyle elde edilen apoptotik ve nekrotik yüzdelerinin tabloda gösterilmesi.**

| Hücreler | Bileşik | Canlı popülasyon (a) | Erken apoptotik popülasyon (b) | Geç apoptotik popülasyon (c) | Nekrotik popülasyon (d) |
|---|---|---|---|---|---|
| MDA-MB-231 | Kontrol | %83,74 | %2,99 | %7,43 | %5,83 |
| | ZP-2 | %1,52 | %0,00 | %92,05 | %6,43 |
| | ZP-4 | %1,05 | %0,00 | %97,59 | %1,36 |

### 3.2.3. Mitopotential Testi

Apoptotik süreçte mitokondri membran permeabilitesinde değişimler meydana gelebilmektedir. ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 dozu ile muamele edilmesi sonucu MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saatte akım sitometresiyle mitokondri membran potansiyeli analizleri Şekil 3.5, Tablo 7 ve 8' de gösterilmiştir. Grafiklerde sağlıklı hücreler (a), mitokondri membranı depolarize hâlde olan ve canlı hücreler (b), mitokondri membranı depolarize hâlde olan ölü hücreler (c) ve ölü hücreler (d) gösterilmektedir. MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 bileşiği mitokondri membranını depolarize ederek hücre ölümüne yol açarken ZP-4 bileşiği mitokondri membranını depolarize etmeden hücre ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir.




**Şekil 3.5.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 µM) konsantrasyonunun uygulanması sonrası sağlıklı mitokondri yüzdelerinin 12 ve 24 saatlik garfikleri (a: sağlıklı mitokondri ve sağlıklı hücreler; b: depolarize mitokondri ve sağlıklı hücreler; c: depolarize mitokondri ve ölü hücreler; d: ölü hücreler)**

**Tablo 7.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 µM) konsantrasyonunun 12 saat uygulanması sonucu.mitokondri membran potansiyeli değişimi değerlendirmesi sonucu alınan sonuçların tabloda gösterilmesi.**

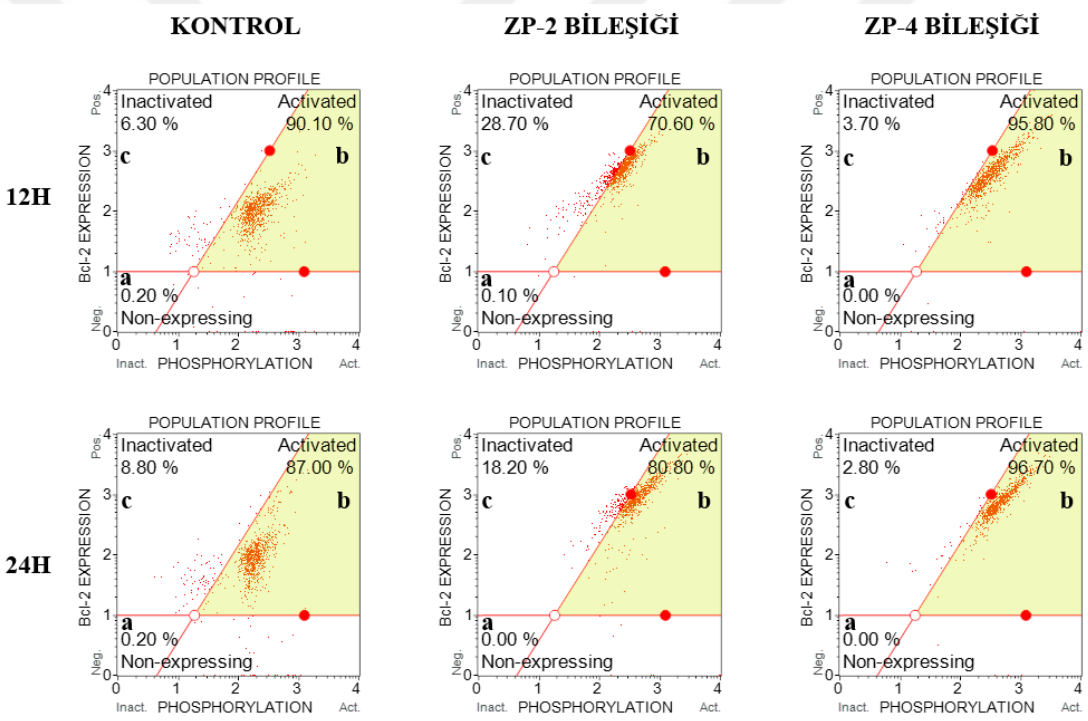
| Hücreler | Bileşik | Mitokondri sağlıklı / Canlı hücreler (a) | Mitokondri depolarize / Canlı hücreler (b) | Mitokondri depolarize/ Ölü hücreler (c) | Ölü hücreler (d) |
|---|---|---|---|---|---|
| MDA-MB-231 | Kontrol | %90,76 | %1,18 | %4,20 | %3,86 |
| | ZP-2 | %0,02 | %0,07 | %78,64 | %21,27 |
| | ZP-4 | %0,00 | %0,00 | %0,14 | %99,86 |

**Tablo 8.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 µM) konsantrasyonunun 12 saat uygulanması sonucu.mitokondri membran potansiyeli değişimi değerlendirmesi sonucu alınan sonuçların tabloda gösterilmesi.**

| Hücreler | Bileşik | Mitokondri sağlıklı / Canlı hücreler (a) | Mitokondri depolarize / Canlı hücreler (b) | Mitokondri depolarize/ Ölü hücreler (c) | Ölü hücreler (d) |
|---|---|---|---|---|---|
| MDA-MB-231 | Kontrol | %90,88 | %2,02 | %3,54 | %3,56 |
| | ZP-2 | %0,02 | %0,00 | %48,70 | %51,28 |
| | ZP-4 | %0,32 | %0,02 | %0,39 | %99,28 |

### 3.2.4. Bcl-2 Testi

Önemli bir anti-apoptotik protein Bcl-2 akım sitometrisiyle incelenmiştir. Yapılan deneyde hem Bcl-2'nin ifade seviyesindeki hem de fosforilasyon (Ser70) seviyesindeki değişim incelenmiştir. ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 dozu ile muamele edilmesi sonucu MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saatte akım sitometresi ile Bcl-2 değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar Şekil 3.6, Tablo 9 ve 10'da gösterilmiştir. Düşük Bcl-2 ifade seviyesi (a), fosforile Bcl-2 ifadesi (b) ve yüksek Bcl-2 ifade seviyesi (c) şeklinde gösterilmiştir. Deney sonucunda ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin MDA-MB-231 hücre hattında Bcl-2 ekspresyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir ancak fosforilasyonda herhangi belirgin bir farka rastlanmamıştır.




**Şekil 3.6 MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 µM) konsantrasyonunun uygulanması sonrası Bcl-2 ifadesinin ve fosforilasyonun ölçülmesiyle elde edilen değerlerin 12 ve 24 saatlik grafikleri. (a: düşük Bcl-2 ifadesi; b: fosforile Bcl-2; c: yüksek Bcl-2 ifadesi).**

**Tablo 9.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 µM) konsantrasyonunun 12 saat uygulanması sonucu Bcl-2 ifadesi ve fosforilasyonunun değerlendirmesi sonucu alınan sonuçların tabloda gösterilmesi.**

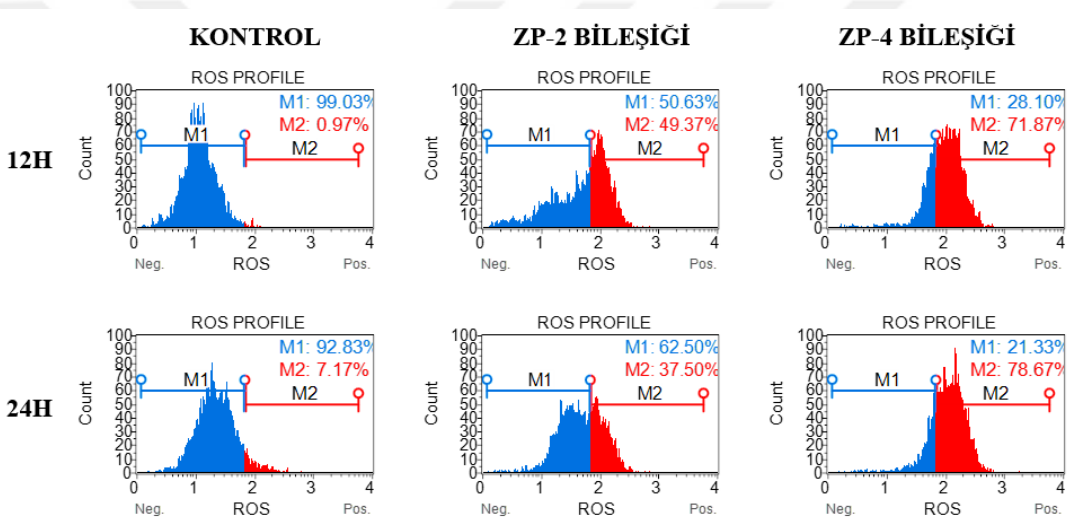
| Hücreler | Bileşik | Düşük Bcl-2 ifadesi (a) | Fosforile Bcl-2 (c) | Yüksek Bcl-2 ifadesi (d) |
|---|---|---|---|---|
| MDA-MB-231 | Kontrol | %0,20 | %90,10 | %6,30 |
| | ZP-2 | %0,10 | %70,60 | %28,70 |
| | ZP-4 | %0,00 | %95,80 | %3,70 |

**Tablo 10.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 µM) konsantrasyonunun 24 saat uygulanması sonucu Bcl-2 ifadesi ve fosforilasyonunun değerlendirmesi sonucu alınan sonuçların tabloda gösterilmesi.**

| Hücreler | Bileşik | Düşük Bcl-2 ifadesi (a) | Fosforile Bcl-2 (c) | Yüksek Bcl-2 ifadesi (d) |
|---|---|---|---|---|
| MDA-MB-231 | Kontrol | %0,20 | %87,00 | %8,80 |
| | ZP-2 | %0,00 | %80,80 | %18,20 |
| | ZP-4 | %0,00 | %96,70 | %2,80 |

### 3.2.5. ROS Testi

Naftakinon türevli bileşiklerin hücre içerisinde ROS seviyesini arttırdığı bilinmesinden dolayı akım sitometrisinde ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin MDA-MB-231 hücre hattında oluşturduğu ROS incelenmiştir. Akım sitometrisinde hücre içi ROS değerlendirilme sonuçları Şekil 3.6.'da gösterilmiştir. M1 düşük, M2 ise yüksek ROS seviyesini ifade etmektedir. Deney sonucunda ZP-2 ve ZP-4 bileşikleri MDA-MB-231 hücre hattında hücre içi ROS seviyesini arttırmaktadır. MDA-MB-231 hücrelerine 12 saat ZP-2 uygulaması sonrası ROS seviyesi %49,37 iken 24 saat uygulama sonucu %37,50 olarak ölçülmüştür. ZP-4 bileşiğinin 12 saat uygulanması sonucu ROS seviyesi %71,87 iken 24 saat uygulanması sonucu ise %78,67 olarak ölçülmüştür.

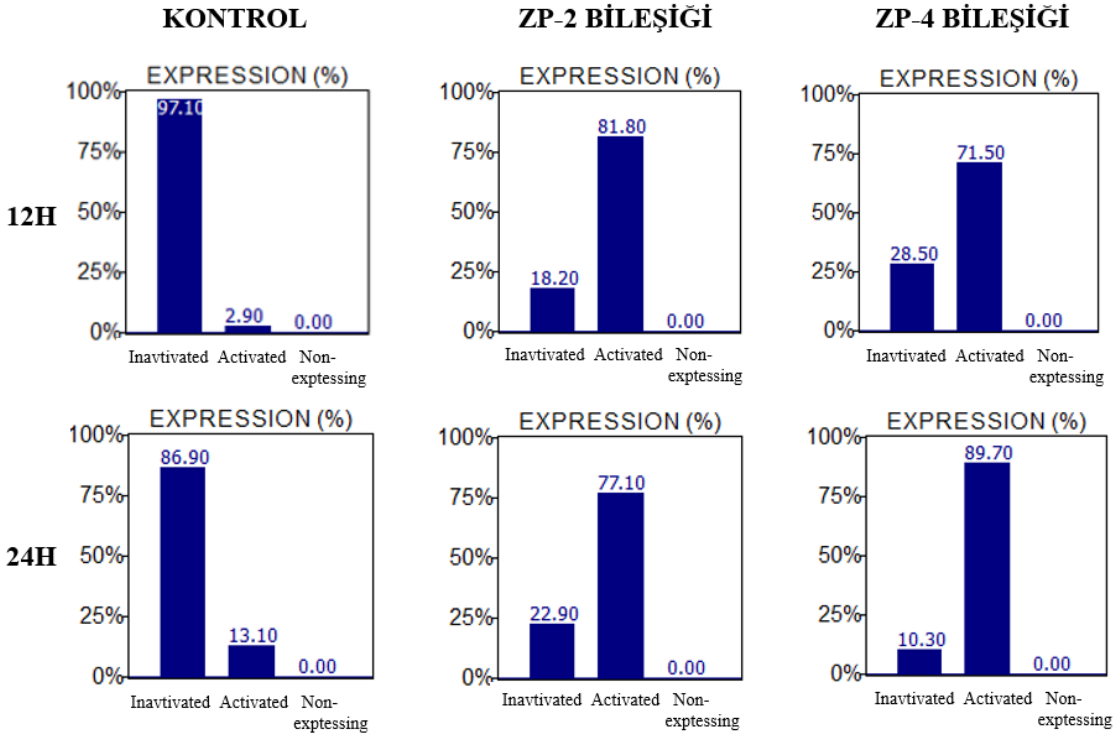



**Şekil 3.7.MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 µM) konsantrasyonunun uygulanması sonrası hücre içi ROS ölçümüyle elde edilen sonuçların 12 ve 24 saatlik garfikleri.**

### 3.2.6. H2AX DNA Hasarı Testi

Naftakinon türevli bileşiklerin doğrudan ve dolaylı (ROS kaynaklı) olarak DNA hasarına sebep olduğu bilinmektedir. DNA hasarının incelenmesi amacıyla akım sitometrisinde DNA hasarı belirteci Histon 2A.X fosforilasyonu incelenmiştir. Akım sitometrisinde hücre içi H2AX değerlendirilmesiyle elde dilen sonuçlar Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda 12 saat ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 dozu uygulaması sonrası MDA MB- 231 hücre hattında fosforile histon 2A.X değerleri sırasıyla %81,80, %71,50; 24 saat ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 dozu uygulanması

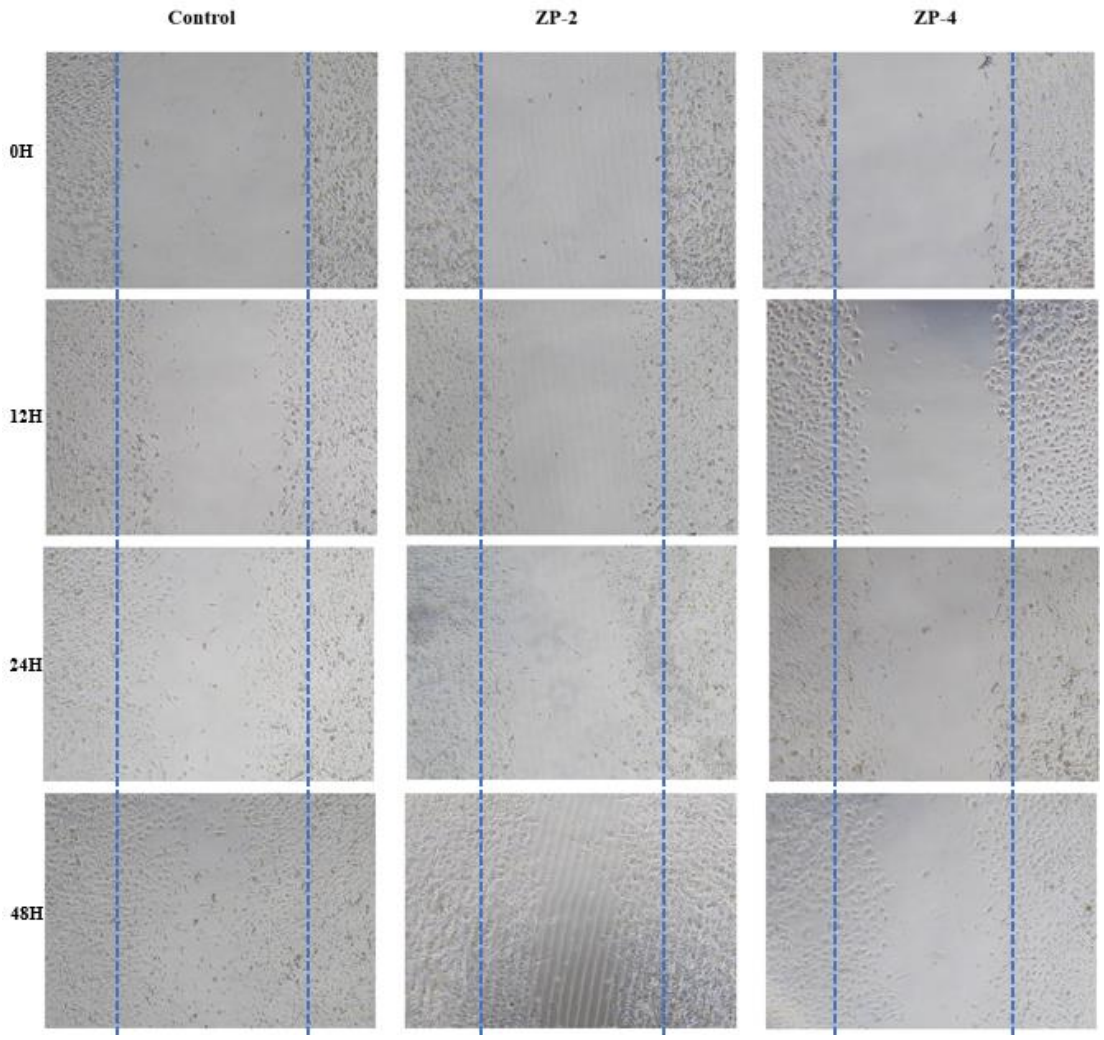
sonrası MDA-MB- 231 hücre hattında fosforile histan 2A.X değerleri sırasıyla %77,10, %89,70 olarak tespit edilmiştir. Sonuçlara göre MDA-MB-231 hücre hattında her iki bileşiğin IC90 dozunda DNA hasarına sebep olduğu ve zamana bağlı hasarın arttığı tespit edilmiştir.



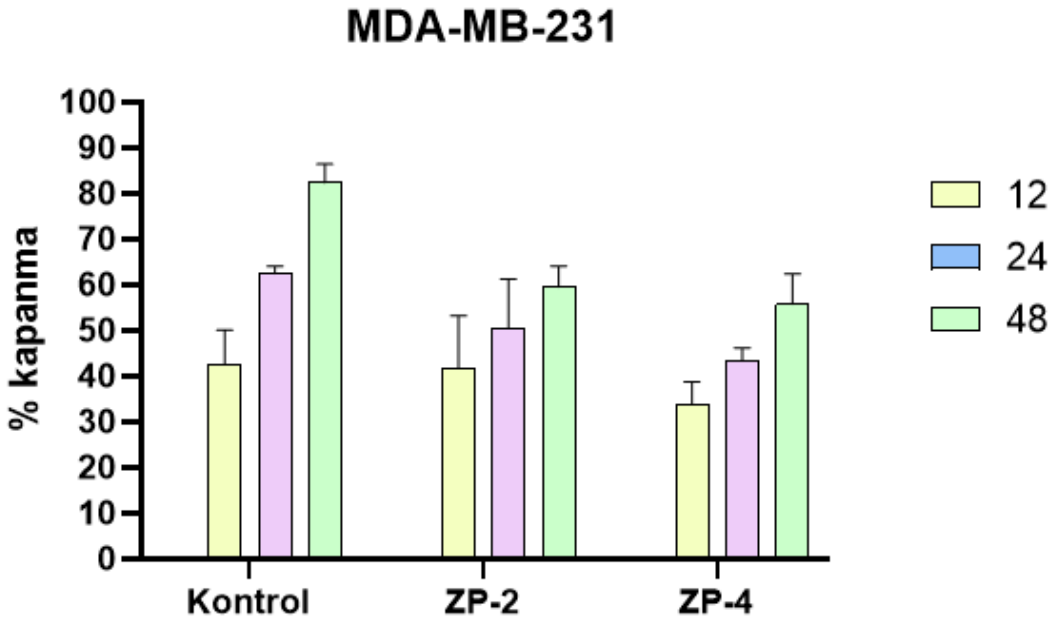

**Şekil 3.8 MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 (50 µM) konsantrasyonunun uygulanması sonrası hücre içi DNA hasarı sonuçlarının 12 ve 24 saatlik grafikleri.**

### 3.3. Yara İyileşmesi Bulguları

MDA-MB-231 hücre hattında, ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC50 dozunun metastatik sürece olan etkisini değerlendirmek amacıyla migrasyon testi gerçekleştirildi. MDA-MB-231 hücrelerinde ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC50 dozu uygulanması sonucunda bileşik uygulanmamış hücrelere kıyasla migrasyon yeteneklerinin azaldığı gözlemlenmiştir. (Şekil 3.9 ve 3.10).



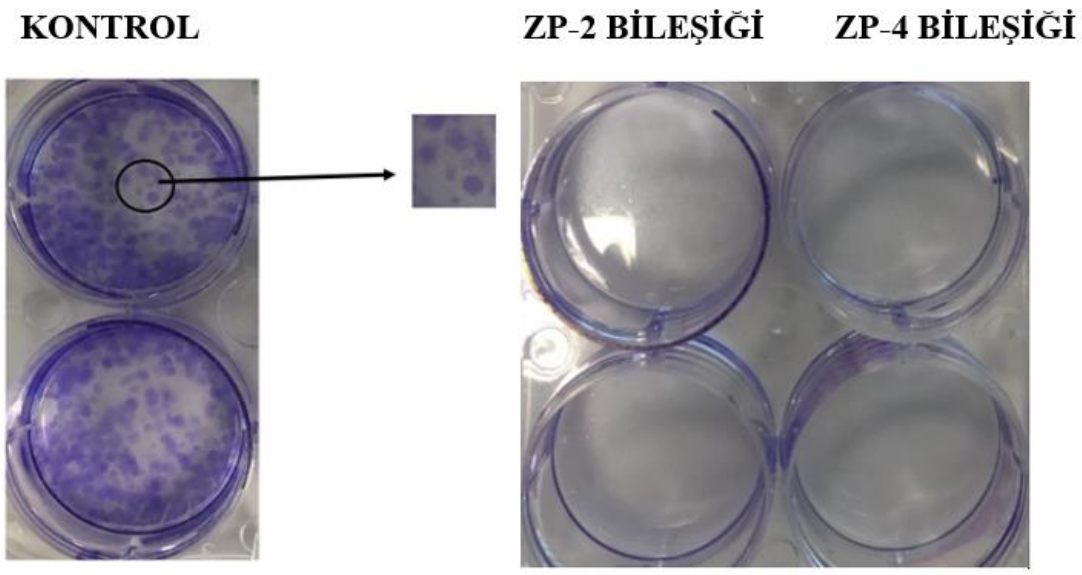

**Şekil 3.9.ZP-2 ve ZP-4 bileşikleri uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyon yeteneği.**




**Şekil 3.10.ZP-2 ve ZP-4 bileşikleri uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 12-24-48 saatlik migrasyon değerleri grafiği.**

### 3.4. Koloni Formasyonu Bulguları

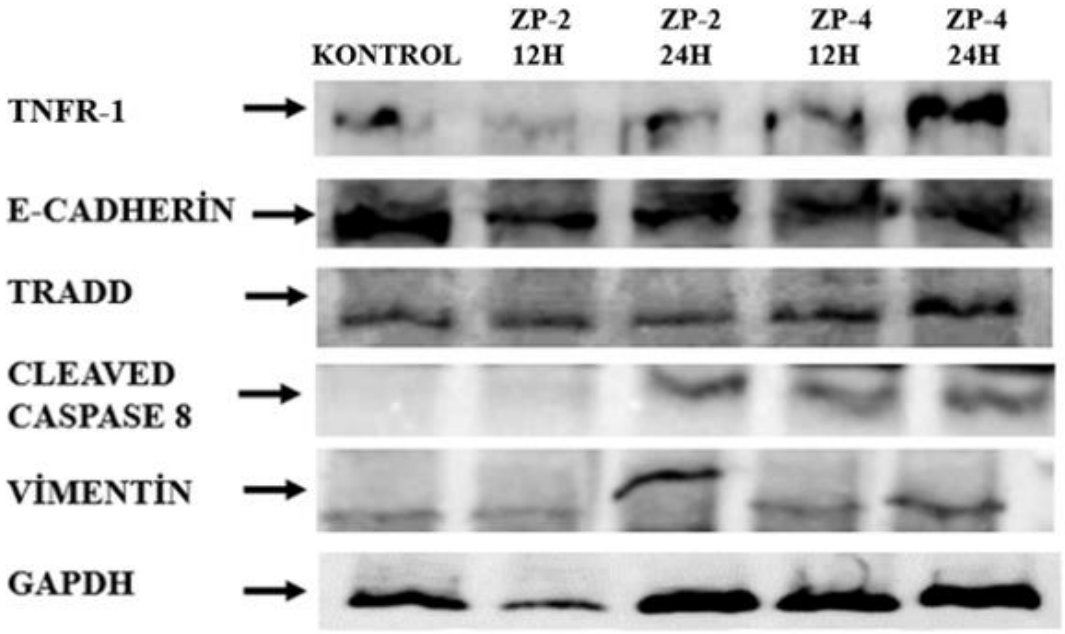
ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin koloni oluşturabilme yeteneği üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla koloni oluşturma testi (koloni formasyon testi) gerçekleştirilmiştir. ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 dozu uygulanarak MDA-MB-231 hücrelerinin koloni oluşturabilme yeteneklerinin önemli düzeyde baskılandığı gözlendi (Şekil 3.8).



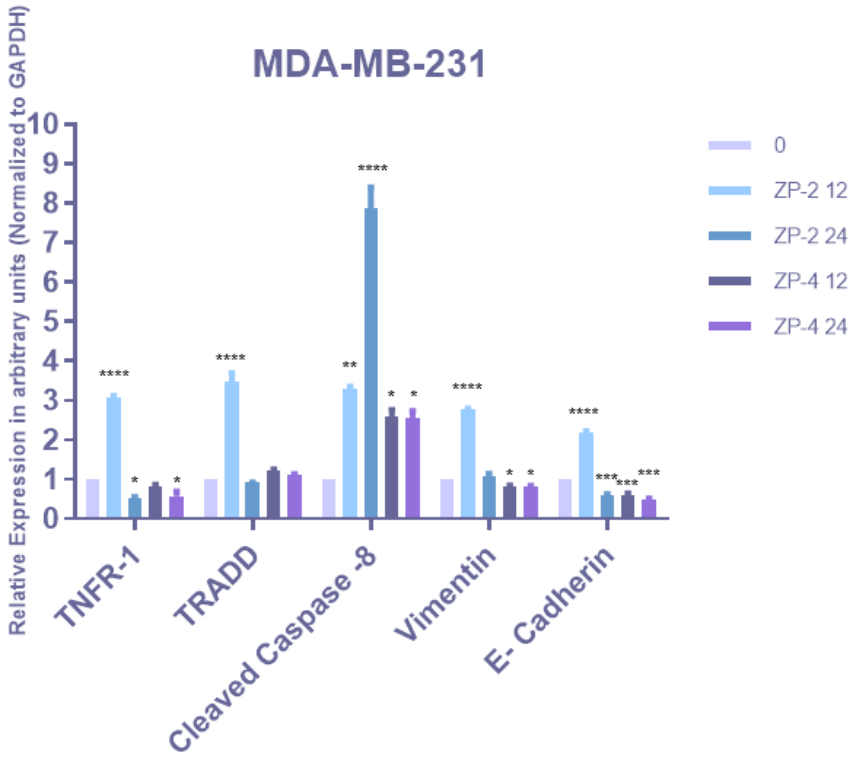

**Şekil 3.11.MDA-MB-231 hücrelerinin ZP-2 ve ZP-4 bileşikleri uygulanması sonucu koloni oluşturma yeteneklerinin koloni formasyon testi ile ölçümü.**

### 3.5. Western Blot Bulguları

MDA-MB-231 hücre hattında, ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 dozunun uygulanmasının ardından metastaz ve invazyonla ilişkili EMT'ye özgü E-kaderin ve Vimentin proteinlerinin hücredeki ifade düzeylerine bakılmıştır. Aynı zaman da ölüm reseptörlerinde TRADD ve FAS protein düzeylerine ve kırılmış Kaspaz 8 protein seviyesine bakılmıştır. Kontrol olarak ise GAPDH kullanılmıştır. MDA-MB-231 hücre hattında epitel karakter ile ilişkilendirilen E-kaderinin özellikle 12 saatlik ZP-2 uygulanması sonucu arttığı tespit edilmiştir. Mezenkimal karakter ile ilişkili Vimentin ise ZP-4 uygulaması sonrası MDA-MB-231 hücre hattında azaldığı tespit edilmiştir. ZP-2 ve ZP-4 uygulanması sonucu MDA-MB-231 hücre hattında hem 12 saatte hem de 24 saatte Kaspaz 8' in kırıldığı bulunmuştur. TRADD ve TNFR-1 protein seviyeleri ZP-4 bileşiği uygulanan MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saatte artmıştır. (Şekil 3.8).




**Şekil 3.12.ZP-2 ve ZP-4 bileşikleri uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinin 12-24 saat sonrası protein ifade seviyelerinin western blot yöntemiyle belirlenmesi.**




**Şekil 3.13 Western blot yöntemiyle belirlenen protein seviyelerinin GAPDH seviyelerine göre normalize edilerek oluşturulmuş analiz grafiği**

# 4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmalarında MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattında 1,4- naftakinon türevli yeni sentez bileşiklerin (ZP-2 ve ZP-4) sitotoksik aktivitesi incelenmiştir. Çalışmalar doğrultusunda kullanılan iki bileşiğinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Halen araştırmacılar tarafından diğer 1,4-naftakinon türevli bileşiklerin de anti-kanser özelliği çalışılmaktadır. Bu tesz çalışmasının en önemli özelliklerinden biri de çalışmada kullanılan bileşiklerin yeni sentezlenmiş olması ve bu sebeple daha önce hiçbir çalışma yapılmamış olmasıdır. Bu yönden ele alınacak olursa, yapılan çalışmalar ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu gösteren ilk çalışmalardır. Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri kanserdir ve her yıl milyonlarca insan kanserden yaşamını kaybetmektedir. Güncel olarak kanser tedavisinde, kemoterapide kullanılan 60'dan fazla sitotoksik ilaç bulunmaktadır. Tedavi sürecinde ve sonrasında karşılaşılan en önemli sorun ise kanser hücresinin bu ilaçlara karşı gösterdiği dirençtir. Moleküler düzeyde de kanser türleri arasında farklılık görülmektedir. Ayrıca salgıladıkları faktörlerle büyümelerini kontrol edebilirler bunun yanında immün sistemden de kaçabilirler (Jones ve ark., 2016; Shaffer ve ark., 2017). Bu nedenle, kemoterapi rejimlerinde bu direnç mekanizmalarını hedeflemek, araştırmacılar için önem taşımaktadır.1,4-naftakinon türevli ilaçların klinikte yer almasına rağmen yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı yeterince etkili olmaması araştırmacıları yeni 1,4-naftakinon türevli sentezlere yönlendirmiştir (Bhasin ve ark., 2013; Aziz, ve ark. 2008; Wang ve ark., 2019). Bu sebeple tez çalışmasında kullanılan ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin kanser tedavisinde umut verici bir ilaç olup olamayacağı araştırılmıştır. Sentez ve karakterizasyonu İstanbul Üniversitesi Kimya Bölümü tarafından yapılan ZP-2 ve ZP-4 bileşikleri SRB testiyle agresif bir meme kanseri türü olan üçlü negatif meme kanseri MDA-MB-231 hücre hattında farklı konsantrasyonlarda uygulanarak bileşikelrin hücre canlılığı üzerine etkileri gözlemlenmiştir. Her iki bileşiğinde sebep olduğu hücre ölümü incelendiğinden %50 canlılık sağlayan doz olan IC50 ve %10 canlılık sağlayan IC90 değeri hesaplanarak ileriki çalışmalar yapılmıştır. Aynı şekilde 1,4-naftakinon türevli bileşiklerle kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda IC50 değeri olarak 10 μM ve altı dozlar uygulanmıştır (Liu ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2018). SRB canlılık testiyle 48 saat

sonunda belirlenen IC50 ve IC90 değerleri ileriki çalışmalarda ölüm mekanizmasının araştırılması için 12 ve 24 saat süreyle MDA-MB-231 hücre hattına uygulanmıştır. Öncelikle hücre ölüm modunun belirlemek amacıyla Anneksin V/PI değerlendirmesi yapılmıştır. MDA MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattında zamana bağlı olarak apoptoz arttığı tespit edilmiştir. Hemen ardından apoptoz hakkında daha detaylı bilgiye sahip olmak amacıyla kaspaz 3/7 aktivasyonuna bakılmıştır. Anneksin V/PI değerlendirmesiyle uyumlu olarak MDA-MB-231 hücre hattında kaspaz 3/7 aktivasyonu zaman bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. ZP-4 bileşiği sonuçlarında ZP-2 bileşiğine kıyasla daha fazla kaspaz 3 ve 7'nin aktive olduğu tespit edilmiştir. Naftakinon türevli bileşiklerin en önemli etkilerinden birinin ROS artışı olduğu önceki bölümlerde de belirtilmişti. Bu sebeple yapılan ROS analizi sonucunda MDA-MB-231 hücre hattında ZP-4 bileşiğinin IC90 dozuyle 12 ve 24 saat muamele edilmesi sonrası ROS seviyesinin dramatik bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Buna karşılık ZP-2 bileşiğinin 12 saat sonucunda ROS artarken 24 saat sonunda ROS tekrardan azalmaktadır. 1,4-naftakinon türevli bileşiklerin çeşitli hücre hatlarında ROS'ları arttırdığı bulunmuştur (Ourique ve ark., 2016; McCall ve ark., 2017). Burada en önemli husus ROS seviyesinin belirlenmesi için kullanılan Muse kitinin reaktif oksijen türevlerinden yalnızca süperoksit seviyesini ölçebiliyor olmasıdır (Anonim, 2013). Naftakinon türevli bileşiklerin hücre içi ROS seviyesini arttırdığı ve yapılan bu deneyde MDA-MB-231 hücre hattında süperoksit seviyesinin artması ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin farklı doz ve/veya zamanlarda diğer ROS'ları da arttırmış olabileceğini düşündürmektedir. Süperoksitler ortaya çıkan ilk ROS'lardır ve süperoksitler hidrojen peroksite, hidroksi radikallerine ve/veya peroksinitrite dönüştürülebilirler (Abedinpour ve ark., 2013). Bu bilgiler doğrultusunda ZP-2 bileşiğinin, MDA-MB-231 hücre hattında 12 saatte görülen süperoksiti 24 saatte diğer ROS'lara dönüştürmüş olabileceğini düşündürmektedir. MDA MB-231 hücre hattında 12 ve 24 satte tespit edilen süperoksit seviyesi ZP-4 bileşiğinin ROS arttırıcı etkisinin bu hücre hattında ZP-2 bileşiğine kıyasla daha uzun sürdüğünü ve daha güçlü olduğunu göstermektedir. ROS'ların bağ yapma açısından yüksek afiniteye sahip olmasından dolayı DNA'ya bağlanarak DNA hasarına sebep olmakla birlikte hücre içi oksidatif stresi arttırarak homeostazı bozmaktadır. Yapılan çalışmaların sonucunda 1,4-naftakinon türevli bileşiklerin DNA hasarına sebep olduğu ve bu hasarın ROS artışı üzerinden olduğu tespit edilmiştir (Ourique ve ark., 2015, 2016; Sameni ve Hande, 2016; Chien ve ark.,

2019). Bu tez çalışmasında ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında zamana bağlı olarak DNA hasarını arttırdığı bulunmuştur. DNA hasarındaki bu artış ROS artışı ile uyumludur. ROS'lar DNA'daki nükleobazlara bağlanarak yapısını değiştirmekte, böylece DNA'da kırılmalar oluşturmaktadır (Cadet ve Douki, 2011; Cadet ve Wagner, 2013). Her iki bileşikle tedavi sonucunda, ROS ile korele olarak, DNA hasarında doza bağlı artış görülmektedir. Fakat bu uyum ZP-4 bileşinde olduğu kadar dramatik değildir. Bu durumun nedeni naftakinon türevli bileşiklerin DNA hasar mekanizmasının ROS'un dışında naftakinonlardan meydana gelen semikinonların da DNA'ya bağlanıp çift zincirli kırıklara sebep olmasıdır (Sinha ve Chignell, 1979; Wellington, 2015; Sameni ve Hande, 2016). ROS artışının tespit edilmesinin ardından mitokondri membran potansiyelindeki değişim incelenmiştir. ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC90 dozu uygulanması sonucu MDA-MB-231 hücre hattında 12 ve 24 saatlik tedavide mitokondri membran potansiyelinin yalnızca ZP-2 bileşiği uygulanması sonucu bozularak mitokondri membranlarında depolarizasyon gerçekleştiği belirlendi. ZP-4 bileşiğiyle tedavi sonucunda mitokondride herhangi bir mitokondri membran potansiyeli değişimi saptanmamıştır. Sonuçlar doğrultusunda ZP-2 bileşiği uygulanması sonucu artan ROS mitokondri kaynaklı olmasına karşılık ZP-4 bileşiği uygulanması sonucu artan ROS'un sitozol kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Sitozol kaynaklı ROS'un apoptozu ya da farklı hücre ölüm modlarını tetiklediği yapılan araştırmalarda tespit edilmiştir (Dawson ve Dawson, 1996; Gil ve ark., 2003; Chandra ve ark., 2000; Palit ve ark., 2015). Apoptozun içsel yolağında görev alan önemli bir anti-apoptotik protein olan bcl-2, serin 70 bölgesinden JNK tarafından fosforillendiğinde anti-apoptotik özelliği inaktive olduğundan dolayı pro-apoptotiklerle kurduğu heterodimerden ayrılır (Yamamoto ve ark., 1999; Deng ve ark., 2001; Wei ve ark., 2008). ROS artışına bağlı JNK artışı ve aktivasyonu bilinmektedir (Shen ve Liu, 2006; Chambers ve LoGrasso, 2011; Shi ve ark., 2014). MDA-MB-231 hücre hattında ZP-2 ve ZP-4 bileşikleri uygulanması sonucu zamana bağlı olarak bcl-2'nin fosforilasyonu ve ifade düzeyi arttığı tespit edilmiştir. ROS artışı göz önünde bulundurulduğunda bcl-2 fosforilasyonunun JNK bağımlı olduğu düşünülmektedir. Bcl-2 ifadesindeki artış apoptoza direnç şeklinde değerlendirilmesinşn yanı sıra hücredeki diğer anti- ve pro-apoptotik proteinlerin ifade düzeyleri de bu konuda önem teşkil etmektedir. Anti-apoptotiklerin azalması ve proapoptotiklerin artması sonucunda hücre bcl-2 ifadesini arttırmış olabilir. Ancak artmış serin 70 fosforilasyonu bcl-2'nin

inaktive olmasına neden olduğunu düşündürmektedir. Bunun yanında naftakinon türevli bileşikler topoizomeraz II enzimini inhibe ederek DNA'daki çift zincirli kırıkların onarımını engellemektedir (Chien ve ark., 2019; de Campos-Nebel ve ark., 2010; Nitiss ve ark., 2012; Kumar ve ark., 2017). Bu tez çalışmasında DNA hasarı tespiti için kullanılan metodv histon 2AX fosforilasyonunun ölçümüne dayanmaktadır. MDA-MB-231 hücre hattındaki ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin uygulamasının 12 ve 24 saat sonuçlarındaki fosforilasyonun artması DNA hasarını göstermektedir. MDA-MB-231 hücrelerinin ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin IC50 dozu ile muamelesi sonucunda koloni oluşturma ve migrasyon yetenekleri değerlendirildiğinde; her iki bileşiğinde MDA-MB-231 hücre hattında koloni oluşturma kapasitesini ve migrasyonu inhibe ettiği belirlendi. Kanserin en önemli sorunlardan birisi de EMT sonrası hareket kazanmaları ve metastaz yapabilmeleridir (Nieto ve ark., 2016). Bu tez çalışmasında kullanılan ZP-2 ve ZP-4 bileşiklerinin EMT üzerine etkisi western blot yöntemiyle incelenmiştir. Yapılan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında ZP-2 bileşiğinin epitelyal karaktere ait belirteç olan E-Kadherini arttırdığı belirlenmiştir. Böylelikle ZP2 bileşiğinin METi indüklediği, bu sebeple de metastazı engelleyebilme ihtimali olduğu düşünülmektedir. Mezenkimal karakter ile ilişkili Vimentin ise ZP-4 uygulaması sonrası MDA-MB-231 hücre hattında azaldığı tespit edilmiştir. Meme kanserinde EMT'nin kötü prognoz dirençli hücrelerin metastazı ile olan ilişkisi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. EMT sırasında epitel belirteçlerin (Ekaderin gibi) azalırken mezenkimal belirteçlerin arttığı tespit edilmiştir (Tomaskovic-Crook ve ark. 2009). ZP-2 ve ZP-4 ile tedavi edilmiş MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında kırılmış kaspaz 8'deki artış reseptör aktivasyonunu düşündürmektedir. TRADD ve TNFR-1 reseptörlerindeki artışla birlikte apoptozun ekstrinsik yolağını işaret etmektedir. Sonuç olarak ZP-2 ve ZP-4 bileşikleri MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki ölüm etkisini apoptozun ekstrinsik yolağını aktive ederek gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

# 5. SONUÇ

Bu tez çalışmasının sonuçlarından yola çıkılarak görülmüştür ki naftakinon türevli yeni sentezlenen ZP-2 ve ZP4 bileşikleri üçlü negatif meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) güçlü bir apoptotik etkiye neden olmaktadır. Aynı zamanda moleküler düzeyde hücrenin sağkalım ve ölüm süreçlerinde farklı moleküler hedefleri etkiledikleri tespit edilmiş olup yeni bir terapötik hedef olabileceği açıkça ortaya koymuştur. Bu tez çalışmasında yer almayan diğer kanser türlerinde de denemesi yapılarak olası kullanımı için etki alanı genişletilebileceği düşünülmüştür. Bir sonraki adım olarak bu bileşiklerin kliniğe uyarlanabilmesi amacıyla in vivo deneylerle farmakokinetik ve farmakodinamik etkilerinin araştırılması gerektiği kanısına varılmıştır.

# KAYNAKÇA


Abedinpour, P., Baron, V. T., Chrastina, A., Welsh, J., & Borgström, P. (2013). The combination of plumbagin with androgen withdrawal causes profound regression of prostate tumors in vivo. The Prostate, 73(5), 489–499

Anvekar, R. A., Asciolla, J. J., Missert, D. J., Chipuk, J. E. (2011). Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment. *Frontiers in Oncology*, 1(34).

Arantes R.M., Lourenssen S., Machado C.R., Blennerhassett M.G., (2000) Early damage of sympathetic neurons after co-culture with macrophages: a model of neuronal injury in vitro, NeuroReport 11 177–181.

Aziz, M. H., Dreckschmidt, N. E., & Verma, A. K. (2008). Plumbagin, a medicinal plant-derived naphthoquinone, is a novel inhibitor of the growth and invasion of hormone-refractory prostate cancer. Cancer Research, 68(21), 9024–9032.

Barkla D.H., Gibson P.R., (1999) The fate of epithelial cells in the human large intestine, Pathology 31 230–238.

Baselga J Et Al (2012) Pertuzumab Plus Trastuzumab Plus Docetaxel For Metastatic Breast Cancer. N Engl J Med 366(2):109–119

Bhasin, D., Chettiar, S. N., Etter, J. P., Mok, M., & Li, P.-K. (2013). Anticancer activity and SAR studies of substituted 1,4-naphthoquinones. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 21(15), 4662–4669.

Blom W.M., De Bont H.J., Meijerman I., Kuppen P.J., Mulder G.J., Nagelkerke J.F., (1999) Interleukin-2-activated natural killer cells can induce both apoptosis and necrosis in rat hepatocytes, Hepatology 29 785–792.

Brewer, H. R., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A. & Swerdlow, A. J. (2017) Family History And Risk Of Breast Cancer: An Analysis Accounting For Family Structure. Breast Cancer Res. Treat. 165, 193–200.

Cadet, J., & Wagner, J. R. (2013). DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 5(2), a012559–a012559.

Cadet, Jean, & Douki, T. (2011). Oxidatively Generated Damage to DNA by UVA Radiation in Cells and Human Skin. Journal of Investigative Dermatology, 131(5), 1005–1007.

Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang H-C, Choksi S, Liu J, Et Al. (2014) Plasma Membrane Translocation Of Trimerized MLKL Protein Is Required For TNF-Induced Necroptosis. Nat Cell Biol. 16(1):55.

Camisasca DR, Honorato J, Bernardo V, et al. (2009) Expression of Bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol.;45:225–33.

Chacón, R. D., & Costanzo, M. V. (2010). Triple-negative breast cancer. Breast Cancer Research, 12(S2). doi:10.1186/bcr2574

Chambers, J. W., & LoGrasso, P. V. (2011). Mitochondrial c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling Initiates Physiological Changes Resulting in Amplification of Reactive Oxygen Species Generation. Journal of Biological Chemistry, 286(18), 16052–16062.

Chien, C.-M., Yang, J.-C., Wu, P.-H., Wu, C.-Y., Chen, G.-Y., Wu, Y.-C., … Chiu, C.-C. (2019). Phytochemical naphtho[1,2-b] furan-4,5-dione induced topoisomerase II-mediated DNA damage response in human non-small-cell lung cancer. Phytomedicine, 54, 109–119.

Chinnaiyan AM. (1999) The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. Neoplasia.;1:5–15.

Claus, E.B., M. Stowe And D. Carter, (2003) “Family History Of Breast And Ovarian Cancer And The Risk Of Breast Carcinoma In Situ”, Breast Cancer Research And Treatment, 78, Pp. 7-15.

Collaborative Group On Hormonal Factors And Breast Cancer, (2002) “Breast Cancer And Breastfeeding: Collaborative Reanalysis Of Individual Data From 47 Epidemiological Studies In 30 Countries, Including 50302 Women With Breast Cancer And 96973 Women Without The Disease”, Lancet , 360, Pp. 187-195.

Collaborative Group On Hormonal Factors In Breast Cancer. (2001)Familial Breast Cancer: Collaborative Reanalysis Of Individual Data From 52 Epidemiological Studies Including 58 209 Women With Breast Cancer And 101 986 Women Without The Disease. Lancet 358, 1389–1399

Cory S, (2002) Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nat Rev Cancer.;2:647–56

Cos, S., A. González, C. Martínez-Campa, M.D. Mediavilla, C. Alonso-González And E.J. Sánchez-Barceló (2006) "Estrogen-Signaling Pathway: A Link Between Breast Cancer And Melatonin Oncostatic Actions", Cancer Detection And Prevention, 30, Pp. 118- 128.

Coşkun-Arı, F.F. (2003) Western Blotlama Yöntemi ile Protein Tespiti: Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı, Isparta Türkiye, 189-198.

Crawford, B. Et Al. (2017) Multi-Gene Panel Testing For Hereditary Cancer Predisposition In Unsolved High-Risk Breast And Ovarian Cancer Patients. Breast Cancer Res. Treat. 163, 383–390.

Cuzick, J. (2010) "Breast Cancer Prevention In The Developing World", Breast Cancer Research, 12, S9.

Da Silva M.N, Ferreira V.F., De Souza M.C., (2003) Um Panorama Atual Da Química E Da Farmacologia De Naftoquinonas, Com Ênfase Na B-Lapachona E Derivados, Quim. 407e416

Daly, M. B. Et Al. (2016). Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast And Ovarian, Version 2.2015. J. Natl Compr. Cancer Netw. 14, 153–162

Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (1996). Free radicals and neuronal cell death. Cell death and differentiation, 3(1), 71–78.

De Campos-Nebel, M., Larripa, I., & González-Cid, M. (2010). Topoisomerase II-Mediated DNA Damage Is Differently Repaired during the Cell Cycle by NonHomologous End Joining and Homologous Recombination. PLoS ONE, 5(9), e12541.

De Giorgi, U., et al., (2007) High-dose chemotherapy for triple negative breast cancer. Ann Oncol,. **18**(1): p. 202-3

Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Et Al. (2008) Identification Of RIP1 Kinase As A Specific Cellular Target Of Necrostatins. Nat Chem Biol. 4:313

Deng, X., Xiao, L., Lang, W., Gao, F., Ruvolo, P., & May, W. S. (2001). Novel Role for JNK as a Stress-activated Bcl2 Kinase. Journal of Biological Chemistry, 71 276(26), 23681–23688.

Dong Z., Saikumar P., Weinberg J.M., Venkatachalam M.A., (1997) Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death: involvement of serine but not cysteine proteases, Am. J. Pathol. 151 1205–1213.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. (2000) SMAC, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell.;102:33–42.

Dumont, M., Beal, M. F. (2011) Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5): 1014-1026.

Edwards, B.K., H.L. Howe, L.A. Ries, M.J. Thun, H.M. Rosenberg, R. Yancik, P.A. Wingo, A. Jemal And E.G. Feigal, (2002) "Annual Report To The Nation On The Status Of Cancer, 1973-1999, Featuring Implications Of Age And Aging On U.S. Cancer Burden", Cancer, 94 ,10, Pp. 2766-2792.

Ehlers S., Benini J., Kutsch S., Endres R., Rietschel E.T., Pfeffer K., (1999) Fatal granuloma necrosis without exacerbated mycobacterial growth in tumor necrosis factor receptor p55 gene-deficient mice intravenously infected with Mycobacterium avium, Infect, Immun. 67 3571–3579.

Elmore S. (2013) Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol.;35:495–516.

Erkisa, M., Karakas, D., & Ulukaya, E. (2019). Cancer Stem Cells: Root Of The Evil. *Critical Reviews*$^{tm}$ *In Oncogenesis*, *24*(1), 69–87.

Estrogen Pathway Erişim:18.01.2020, Http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=estrogen_pathway

FDA. FDA Approves Olaparib Germline BRCA-Mutated Metastatic Breast Cancer. Fda.Gov (2018) Https://Www.Fda.Gov/ Drugs/Resources-Information-Approved-Drugs/Fdaapproves-Olaparib-Germline-Brca-Mutated-Metastaticbreast-Cancer.

FDA. FDA Approves Talazoparib For Gbrcam HER2- Negative Locally Advanced Or Metastatic Breast Cancer. (2018). Fda.Gov Https://Www.Fda.Gov/Drugs/Drug-Approvalsand-Databases/Fda-Approves-Talazoparib-Gbrcam-Her2-Negative-Locally-Advanced-Or-Metastatic-Breast-Cancer.

Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. (2006) Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. Biochim Biophys Acta. Sep-Oct;1757(9-10):1371-87.

Finkel E. (2001) The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science*. 292: 624-626.

Forbes, C., Fayter, D., De Kock, S. & Quek, R. G. W. (2019) A Systematic Review Of International Guidelines And Recommendations For The Genetic Screening, Diagnosis, GENETIC COUNSELING And Treatment Of BRCA-Mutated Breast Cancer. Cancer Manag. Res. 2019, 2321–2337.

Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-Negative Breast Cancer. New England Journal of Medicine, 363(20), 1938–1948.

Fratazzi C., Arbeit R.D., Carini C., Balcewicz-Sablinska M.K., Keane J., Kornfeld J., Remold H.G., (1999) Macrophage apoptosis in mycobacterial infections, J. Leukocyte Biol. 66 763–764.

Frenzel A, Grespi F, Chmelewskij W, Villunger A. (2009) Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. Apoptosis.;14:584–96.

Fulda S. (2013) The Mechanism Of Necroptosis In Normal And Cancer Cells. Cancer Biol Ther.14:999–1004.

Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. (2005) Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. CA Cancer J Clin.;55:178–94.

Gil, J., Almeida, S., Oliveira, C. R., & Rego, A. C. (2003). Cytosolic and mitochondrial ROS in staurosporine-induced retinal cell apoptosis. Free Radical Biology and Medicine, 35(11), 1500–1514.

Giordano, S.H., D.S. Cohen And A.U. Buzdar (2004) "Breast Carcinoma In Men: A Population-Based Study", Cancer 101, 1 Pp. 51-57.

Gong, Y., Fan, Z., Luo, G., Yang, C., Huang, Q., Fan, K., … Liu, C. (2019). The Role Of Necroptosis In Cancer Biology And Therapy. Molecular Cancer, 18(1).

Green DR, Kroemer G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science.;305:626–9.

Gustafsson, J.A. (2000) "Novel Aspects Of Estrogen Action". Journal Of The Society For Gynecologic Investigation, 7,1, Pp. 8-9.

H.G. Viehe, R. Merenyi, Z. Janousek, (1988) Captodative Substituent Effects In Radical Chemistry, Pure Appl. Chem. 60 1635e1644.

Hall JM, Couse JF, Korach KS (2001) The Multifaceted Mechanisms Of Estradiol And Estrogen Receptor Signaling. J Biol Chem 276(40):36869–36872

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. Cell, 100:57-70

Hartley A-V, Lu T. (2020) Modulating The Modulators: Regulation Of Protein Arginine Methyltransferases By Post-Translational Modifications. Drug Discov Today. 3;

Helmrich, S.P., S. Shapiro, L. Rosenberg, D.W. Kaufman, D. Slone, C. Bain, O.S. Miettinen, P.D. Stolley, N.B. Rosenshein, R.C. Knapp, T. Leavitt, D. Schottenfeld, R.L. Engle And M. Levy, (1983) "Risk Factors For Breast Cancer". American Journal Of Epidemiology, 117, 1, Pp. 35-45.

Henderson, B.E., R.K. Ross And L. Bernstein, (1988) "Estrogens As A Cause Of Human Cancer: The Richard And Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture", Cancer Research, 48, Pp. 246–253.

Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. (2004) Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. Embo J.;23:2134–45.

Hirshfield, K.M. and S. Ganesan, (2014) Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and targeted therapy. Curr Opin Obstet Gynecol. **26**(1): p. 34-40.

Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Et Al. (2008) Identification Of A Molecular Signaling Network That Regulates A Cellular Necrotic Cell Death Pathway. Cell.;135(7):1311–23

Hitoshi Y, Lorens J, Kitada SI, et al. (1998) Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. Immunity.;8: 461–71.

Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. Cell.;81:495–50.

Huang C-Y, Kuo W-T, Huang Y-C, Lee T-C, Yu LCH. (2013) Resistance To Hypoxiainduced Necroptosis Is Conferred By Glycolytic Pyruvate Scavenging Of Mitochondrial Superoxide In Colorectal Cancer Cells. Cell Death Dis.4: E622

Huen, M. S. Y., Sy, S. M. H. & Chen, J. (2010) BRCA1 And Its Toolbox For The Maintenance Of Genome Integrity. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11, 138–148.

Irvin, W. J., & Carey, L. A. (2008). What is triple-negative breast cancer? European Journal of Cancer, 44(18), 2799–2805.

Ismail-Khan, R., & Bui, M. M. (2010). A Review of Triple-Negative Breast Cancer. Cancer Control, 17(3), 173–176.

Jardim, G. A. M., Guimarães, T. T., Pinto, M. Do C. F. R., Cavalcanti, B. C., De Farias, K. M., Pessoa, C., … Da Silva Júnior, E. N. (2015). Naphthoquinone-Based Chalcone Hybrids And Derivatives: Synthesis And Potent Activity Against Cancer Cell Lines. *Medchemcomm*, *6*(1), 120–130.

Jemal, A., T. Murray, A. Samuels, A. Ghafoor, E. Ward And M.J. Thun, (2003) "Cancer Statistics", A Cancer Journal For Clinicians, 53, Pp. 5–26.

Jones, V. S., Huang, R.-Y., Chen, L.-P., Chen, Z.-S., Fu, L., & Huang, R.-P. (2016). Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 1865(2), 255–265.

Kang MH, Reynolds CP. (2009) Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. Clin Cancer Res.;15: 126–1132.

Karaboz, İ., Kayar, E., Akar S. (2008) Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 06(2): 01-18.

Kennedy, S., Dicesare, J. C., & Sheaff, R. J. (2011). Topoisomerase I/II Inhibition By A Novel Naphthoquinone Containing A Modified Anthracycline Ring System. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, *408*(1), 94–98.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer.;26:239–57.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 26:239-257

Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. (2008) Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, 36: 5678-5694

Kuchenbaecker, K. B. Et Al. (2017) Risks Of Breast, Ovarian, And Contralateral Breast Cancer For BRCA1 And BRCA2 Mutation Carriers. JAMA 317, 2402.

Kumar, B. S., Ravi, K., Verma, A. K., Fatima, K., Hasanain, M., Singh, A., … Negi, A. S. (2017). Synthesis Of Pharmacologically Important Naphthoquinones And Anticancer Activity Of 2-Benzyllawsone Through DNA Topoisomerase-II Inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *25*(4), 1364–1373.

Kuo LJ, Yang LX. (2008) Gamma-H2AX-A novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*, 22: 305-310.

Lalaoui N, Lindqvist LM, Sandow JJ, Ekert PG. (2015) The Molecular Relationships Between Apoptosis, Autophagy And Necroptosis. Semin Cell Dev Biol.; 39:63–9

Lenaz G., Fato R., Baracca A., Genova M.L., (2004) Mitochondrial Quinone Reductases: Complex I, Methods Enzymol. 382 3e20.

Lessene G, Czabotar PE, Colman PM. (2008) Bcl-2 family antagonists for cancer therapy. Nat Rev Drug Discov.;7:989–1000.

Li J, Mcquade T, Siemer AB, Napetschnig J, Moriwaki K, Hsiao Y-S, Et Al. (2012) The RIP1/RIP3 Necrosome Forms A Functional Amyloid Signaling Complex Required For Programmed Necrosis. Cell.150(2):339–50.

Litton, J. K. Et Al. (2018) Talazoparib In Patients With Advanced Breast Cancer And A Germline BRCA Mutation. N. Engl. J. Med. 379, 753–763.

Liu, C., Shen, G. N., Luo, Y. H., Piao, X. J., Jiang, X. Y., Meng, L. Q., … Jin, C. H. (2018). Novel 1,4-naphthoquinone derivatives induce apoptosis via ROSmediated p38/MAPK, Akt and STAT3 signaling in human hepatoma Hep3B cells. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 96(November 2017), 9–19.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell.;104: 487–501.

Luqmani, Y.A., (2005) Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. Med Princ Pract,. **14 Suppl 1**: p. 35-48.

Madigan, M.P, R.G. Ziegler, J. Benichou, C. Byrne And R.N. Hoover, (1995) "Proportion Of Breast Cancer Cases In The United States Explained By Well-Established Risk Factors", Journal Of The National Cancer Institute, 87, 22, Pp. 1681–1685.

Mahmood, T., Yang, P. (2012) Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9): 429–434.

Majno G., Joris I., (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death, Am. J. Pathol. 146 3–15.

Moggs, J. And G. Orphanides, (2001) "Estrogen Receptors: Orchestrators Of Pleiotropic Cellular Responses", EMBO Reports, 2, 9, Pp. 775–781.

Moquin DM, Mcquade T, Chan FK-M. (2013) CYLD Deubiquitinates RIP1 In The Tnfα-Induced Necrosome To Facilitate Kinase Activation And Programmed Necrosis. Plos One. 8(10):E76841.

Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang JG, Alvarez-Diaz S, Et Al. (2013) The Pseudokinase MLKL Mediates Necroptosis Via A Molecular Switch Mechanism. Immunity. 39:443–53.

Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. Cell, 166(1), 21–45

Nitiss, J. L., Soans, E., Berk, J., Seth, A., Mishina, M., & Nitiss, K. C. (2012). Repair of Topoisomerase II-Mediated DNA Damage: Fixing DNA Damage Arising from a Protein Covalently Trapped on DNA.

Ourique, F., Kviecinski, M. R., Felipe, K. B., Correia, J. F. G., Farias, M. S., Castro, L. S. E. P. W., … Pedrosa, R. C. (2015). DNA Damage and Inhibition of Akt Pathway in MCF-7 Cells and Ehrlich Tumor in Mice Treated with 1,4-Naphthoquinones in Combination with Ascorbate. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015, 1–10.

Ourique, F., Kviecinski, M. R., Zirbel, G., Castro, L. S. E. P. W., Gomes Castro, A. J., Mena Barreto Silva, F. R., … Pedrosa, R. C. (2016). In vivo inhibition of tumor progression by 5 hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone) and 2-(4- hydroxyanilino)-1,4-naphthoquinone (Q7) in combination with ascorbate. Biochemical and Biophysical Research Communications, 477(4), 640–646.

Palit, S., Kar, S., Sharma, G., & Das, P. K. (2015). Hesperetin Induces Apoptosis in Breast Carcinoma by Triggering Accumulation of ROS and Activation of ASK1/JNK Pathway. Journal of Cellular Physiology, 230(8), 1729–1739

Park H-A, Brown SR, Kim Y.( 2020 )Cellular Mechanisms Of Circulating Tumor Cells During Breast Cancer Metastasis. Int J Mol Sci. 17;21(14).

Pasche, B. (2008) Recent Advances In Breast Cancer Genetics. Cancer Treat. Res. 141, 1–10.

Pelicano, H., Carney, D., Huang, P. (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, 7(2): 97-110.

Pepper C, Bently P. (2000) The role of the Bcl-2 family in the modulation of apoptosis. Symp Soc Exp Biol.;52:43–53.

Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. (2010) H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *Journal of Nucleic Acid*, 1-9.

Porch, J.V., I.M. Lee, N.R. Cook, K.M. Rexrode And J.E. Burin, (2002) “Estrogen-Progestin Replacement Therapy And Breast Cancer Risk: The Women's Health Study (United States)”, Cancer Causes Control, 13 ,9, Pp. 847-854.

Proskuryakov, S. Y. ., Konoplyannikov, A. G., & Gabai, V. L. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? Experimental Cell Research, 283(1), 1–16. doi:10.1016/s0014-4827(02)00027-7

Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. (2008) Basal-like breast cancer: a critical review. J Clin Oncol;26:2568-81

Rakiman I, Chinnadurai M, Baraneedharan U, FDP Solomon, Venkatachalam P. (2008) γ-H2AX assay: a technique to quantify DNA double strand breaks. *Tools & Techniques - Advanced* Biotechnology, 39-41.

Ramirez, L.Y., et al., (2009) Potential chemotherapy side effects: what do oncologists tell parents? Pediatr Blood Cancer,. **52**(4): p. 497-502.

Reis-Filho JS, Tutt AN. (2008) Triple negative tumours: a critical review. Histopathology;52:108-18.

Riedl, S. J., & Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 5(11), 897–907.

Riedl, S. J., Salvesen, G. S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 8(5): 405-413.

Robson, M. Et Al. (2017) Olaparib For Metastatic Breast Cancer In Patients With A Germline BRCA Mutation. N. Engl. J. Med. 377, 523–533.

Ruffolo Pr. The Pathogenesis Of Necrosis. I. (1964) Correlated Light And Electron Microscopic Observations Of The Myocardial Necrosis Induced By The Intravenous Injection Of Papain. Am J Pathol. Nov;45:741-56.

Sameni, S., & Hande, M. P. (2016). Plumbagin triggers DNA damage response, telomere dysfunction and genome instability of human breast cancer cells. Biomedicine & Pharmacotherapy, 82, 256–268.

Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS. (2002) BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. Nat Cell Biol.;4:842–9.

Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. (1999) The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. J Biol Chem.;274:1541–8.

Schuur, E. R., & Deandrade, J. P. (2015). Breast Cancer: Molecular Mechanisms, Diagnosis, And Treatment. International Manual Of Oncology Practice, 155–200.

Shaffer, S. M., Dunagin, M. C., Torborg, S. R., Torre, E. A., Emert, B., Krepler, C., … Raj, A. (2017). Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. Nature, 546(7658), 431–435

Shen, H.-M., & Liu, Z. (2006). JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. Free Radical Biology and Medicine, 40(6), 928–939.

Shi, Y., Nikulenkov, F., Zawacka-Pankau, J., Li, H., Gabdoulline, R., Xu, J., … Selivanova, G. (2014). ROS-dependent activation of JNK converts p53 into an efficient inhibitor of oncogenes leading to robust apoptosis. Cell Death & Differentiation, 21(4), 612–623.

Shimizu A., Masuda Y., Kitamura H., Ishizaki M., Ohashi R., Sugisaki Y., Yamanaka Y., (2000) Complement-mediated killing of mesangial cells in experimental glomerulonephritis: cell death by a combination of apoptosis and necrosis, Nephron 86 152–160.

Sinha, B. K., & Chignell, C. F. (1979). Binding mode of chemically activated semiquinone free radicals from quinone anticancer agents to DNA. ChemicoBiological Interactions, 28(2–3), 301–308. https://doi.org/10.1016/0009- 2797(79)90170-4

Slamon D Et Al (1987) Human Breast Cancer: Correlation Of Relapse And Survival With Amplifi - Cation Of The HER-2/Neu Oncogene. Science 235(4785):177–182

Slamon DJ Et Al (2001) Use Of Chemotherapy Plus A Monoclonal Antibody Against HER2 For Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. N Engl J Med 344(11):783–792

Sobočan M, Smolle MA, Schatz C, Haybaeck J. (2020) The İnterplay Of Tumor Stroma And Translational Factors İn Endometrial Cancer. Cancers. 27;12(8).

Susan, E. (2007). Apoptosis: A Reveiw of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 496–516.

Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, et al. (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. J Exp Med.;192:571–80.

T.M. Mayhew, R. Myklebust, A. Whybrow, R. Jenkins, (1999) Epithelial integrity, cell death and cell loss in mammalian small intestine, Histol. Histopathol. 14 257–267.

Taylor, A. Et Al. (2018) Consensus For Genes To Be Included On Cancer Panel Tests Offered By UK Genetics Services: Guidelines Of The UK Cancer Genetics Group. J. Med. Genet. 55, 372–377.

Tenev T, Bianchi K, Darding M, Broemer M, Langlais C, Wallberg F, Et Al. (2011) The Ripoptosome, A Signaling Platform That Assembles In Response To Genotoxic Stress And Loss Of Iaps. Mol Cell.;43(3):432–48

Tewey, K. M., Chen, G. L., Nelson, E. M., & Liu, L. F. (1984). Intercalative Antitumor Drugs Interfere With The Breakage-Reunion Reaction Of Mammalian DNA Topoisomerase II. *The Journal Of Biological Chemistry, 259*(14), 9182–9187.

Thery JC Et Al (2014) Resistance To Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2-Targeted Therapies. Eur J Cancer 50(5):892–901

Thiery J, Keefe D, Saffarian S, et al. (2011) Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. Blood; 115: 1582–1593.

Thornberry NA, Lazebnik Y. (1998) Caspases: enemies within. Science.;281:1312–6.

Tomaskovic-Crook, E., Thompson, E. W., & Thiery, J. P. (2009). Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. Breast Cancer Research, 11(6). doi:10.1186/bcr2416

Turner N, Lambros MB, Horlings HM, et al. (2010) Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. Oncogene;29:2013-23.

Ulukaya, E., Acilan, C., & Yilmaz, Y. (2011). Apoptosis: why and how does it occur in biology? Cell Biochemistry and Function, 29(6), 468–480. doi:10.1002/cbf.1774

Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden BT, Kroemer G. (2010) Molecular Mechanisms Of Necroptosis : An Ordered Cellular Explosion. Nat Publ Gr. 11(10):700–15

Venkitaraman, A.R. (2002 ) “Cancer Susceptibility And The Functions Of BRCA1 And BRCA2”, Cell, 108, 2, Pp. 171–182.

Verma R.P., (2006) Anti-Cancer Agents Med. Chem **6**, 489–499

W.J. Murdoch, C. Wilken, D.A. Young, (1999) Sequence of apoptosis and inflammatory necrosis within the formative ovulatory site of sheep follicles, J. Reprod. Fertil. 117 325–329

Wajant H. (2002) The Fas signaling pathway: more than a paradigm. Science.;296:1635–6.

Wang, Y., Luo, Y. H., Piao, X. J., Shen, G. N., Meng, L. Q., Zhang, Y., … Jin, C. H. (2019). Novel 1,4-Naphthoquinone Derivatives Induce Reactive Oxygen Species-Mediated Apoptosis In Liver Cancer Cells. *Molecular Medicine Reports*, *19*(3), 1654–1664.

Wang, Y., Luo, Y., Piao, X., Shen, G., Meng, L., Zhang, Y., … Jin, C. (2018). Novel 1,4-Naphthoquinone Derivatives Induce Reactive Oxygen Species-Mediated Apoptosis In Liver Cancer Cells. *Molecular Medicine Reports*, *19*(3), 1654–1664.

Warny M., Keates A.C., Keates S., Castagliuolo I., Zacks J.K., Aboudola S., Qamar A., Pothoulakis C., LaMont J.T., Kelly C.P., (2000) p38 MAP kinase activation by Clostridium difficile toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis, J. Clin. Invest. 105 1147–1156.

Wei, Y., Sinha, S. C., & Levine, B. (2008). Dual Role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. Autophagy, 4(7), 949–951.

Wellington, K. W. (2015). Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review. RSC Advances, 5(26), 20309–20338.

Wellington, K. W., Kolesnikova, N. I., Hlatshwayo, V., Saha, S. T., Kaur, M., & Motadi, L. R. (2019). Anticancer Activity, Apoptosis And A Structure–Activity Analysis Of A Series Of 1,4-Naphthoquinone-2,3-Bis-Sulfides. *Investigational New Drugs*.

Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 30(1), 87.

Wright A, Reiley WW, Chang M, Jin W, Lee AJ, Zhang M, Et Al. (2007) Regulation Of Early Wave Of Germ Cell Apoptosis And Spermatogenesis By Deubiquitinating Enzyme CYLD. Dev Cell.;13(5):705–16.

Wu W, Liu P, Li J. (2012) Necroptosis: An Emerging Form Of Programmed Cell Death. Crit Rev Oncol Hematol.;82:249–58.

Yager, J.D. And N.E. Davidson (2006) “Estrogen Carcinogenesis In Breast Cancer”, The New England Journal Of Medicine, 354, 3.

Zhang J, Yang Y, He W, Sun L. (2016) Necrosome Core Machinery: MLKL. Cell Mol Life Sci. 73(11–12):2153–63.

Zhang Y, Su SS, Zhao S, Yang Z, Zhong C-Q, Chen X, Et Al. (2017) RIP1 Autophosphorylation Is Promoted By Mitochondrial ROS And Is Essential For RIP3 Recruitment Into Necrosome. Nat Commun. 8(8):14329

Zhang, Q., Dong, J., Cui, J., Huang, G., Meng, Q., & Li, S. (2018). Cytotoxicity of Synthesized 1,4-Naphthoquinone Oxime Derivatives on Selected Human Cancer Cell Lines. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 66(6), 612–619.

**TELİF HAKKI İZNİ**

**İNTİHAL RAPORU**

10377115

ORIJINALLIK RAPORU

| %15 | %2 | %0 | %13 |
|---|---|---|---|
| BENZERLIK ENDEKSI | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCI ÖDEVLERI |

BIRINCIL KAYNAKLAR

| | | |
|---|---|---|
| 1 | Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)<br>Öğrenci Ödevi | %10 |
| 2 | Submitted to Kahramanmaraş Sütçü İmam University<br>Öğrenci Ödevi | %1 |
| 3 | readgur.com<br>İnternet Kaynağı | %1 |
| 4 | Submitted to Marmara University<br>Öğrenci Ödevi | %1 |
| 5 | www.yumpu.com<br>İnternet Kaynağı | %1 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Alıntıları çıkart | üzerinde | Eşleşmeleri çıkar | < %1 |
| Bibliyografyayı Çıkart | üzerinde | | |

# ÖZGEÇMİŞ

AD-SOYAD: Hatice DİNÇER

Doğum Tarihi ve Yeri: 10/08/1995 -Zurich

Eğitim:

| | | |
|---|---|---|
| Lisans | 2013-2017 | Haliç Üniversitesi-Moleküler Biyoloji ve Genetik |
| Yüksek Lisans | 2018-2021 | İstinye Üniversitesi-Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi |