T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ

YENİ PROTOFLAVON BAZLI HİBRİD BİLEŞİKLERİN MEME KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA SİTOTOKSİK/APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ELİF SEDEF DEVELİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Engin ULUKAYA

İSTANBUL-2019

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ

YENİ PROTOFLAVON BAZLI HİBRİD BİLEŞİKLERİN MEME KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA SİTOTOKSİK/APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ELİF SEDEF DEVELİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Engin ULUKAYA

İSTANBUL-2019

ÖZET

YENİ PROTOFLAVON BAZLI HİBRİD BİLEŞİKLERİN MEME KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA SİTOTOKSİK/APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Elif Sedef Develi
Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi
Prof. Dr. Engin Ulukaya

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen kanser olup, her yıl 2,1 milyon kadını etkilemektedir, kadınlarda kansere bağlı ölümlerde önde gelen nedenler arasındadır. 2018'de 627.000 kadının meme kanserinden öldüğü tahmin edilmektedir ki bu kadınlarda tüm kanser ölümlerinin yaklaşık % 15'idir. Tedavisinde yeni yaklaşımlara rağmen etkin bir başarı sağlanamamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında; dört yeni hibrid protoflavon bileşiğin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde anti-kanser etkileri incelenecektir. MCF-7 hücre hattı ERα -pozitif meme kanseri için temsili model olarak ve MDA-MB-231 hücre hattı üçlü negatif meme kanseri (TNBC) için model olarak kullanılacaktır.

Anahtar Kelimeler: Hibrid Protoflavon Bileşikler, Sitotoksisite, Apoptozis

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC/APOPTOTIC EFFECT OF NOVEL PROTOFLAVONE BASED HYBRİD COMPOUNDS IN HUMAN BREAST CANCER CELL LINES

Elif Sedef Develi
Cancer Biology and Pharmacology
Prof. Dr. Engin Ulukaya

Breast cancer is the most common cancer among women, affecting 2.1 million women each year and is one of the leading causes of cancer-related deaths in women. It is estimated that 627,000 women died of breast cancer in 2018, accounting for about 15% of all cancer deaths among women. Despite the new approaches in the treatment of effective success can not be achieved. Within the scope of this thesis; The anti-cancer effects of four novel hybrid protoflavone compounds on MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines will be examined. The MCF-7 cell line will be used as a representative model for ERα-positive breast cancer and as a model for the MDA-MB-231 cell line triple negative breast cancer (TNBC).

Keywords: Hybrid protoflavone compounds, Cytotoxicity, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Bugünlere gelmemi sağlayan, hayatım boyunca iyi-kötü bütün anlarımda yanımda olan maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen; yüksek lisans eğitimim sürecindeki her zorlu anımda ellerini omzumdan eksik etmeyen canım ailem, en büyük destekçilerim; annem Sibel DEVELİ, babam Ahmet DEVELİ, ağabeyim Mehmet Kubilay DEVELİ ve kız kardeşim Zeynep Şebnem DEVELİ' ye

Yüksek lisans süresince danışmanlığımı yapan, bilgi ve deneyimlerini cömertçe paylaşmaktan çekinmeyen ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA' ya

Tez çalışmalarıma birlikte başladığım ama birlikte bitiremediğim, bütün bilgi ve deneyimlerini en içtenlikle güler yüzle ve büyük bir sabırla bana aktaran, akademinin dışında fikirleriyle bana yol gösteren, yüksek lisans sürecinde kazandığım değerli insanlardan biri olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Selvi DURMUŞ ERİM' e

Tüm çalışmalarımda fikirlerinden ve deneyimlerinden yararlandığım, değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Burçin GÜNGÖR, Dr. Öğr. Üyesi Nazlıhan AZTOPAL ve Dr. Öğr. Üyesi Didem KARAKAŞ' a

Tez çalışmam boyunca moral ve desteklerini esirgemeyen, her konuda yardımcı olan ve birlikte çalışmaktan çok büyük keyif aldığım canım arkadaşlarım Merve ERKISA, Remzi Okan AKAR, Selin SELVİ' ye

SONSUZ TEŞEKKÜR EDERİM.

Elif Sedef DEVELİ

15/08/2019

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK
İÇ KAPAK
KABUL ONAY
ETİK BEYANI
ÖZET……..…...**ii**

ABSTRACT……...…..……**iii**

TEŞEKKÜR……...……..…**iv**

İÇİNDEKİLER…….……...**v**

ŞEKİL LİSTESİ ..…….……..……..…**vii**

TABLO LİSTESİ…….……..……**viii**

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ…….……..……..**ix**

GİRİŞ…….……..……**1**

2. GENEL BİLGİLER.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

2.1. KANSER .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

2.2. KANSER HÜCRELERİNİN ÖZELLİKLERİ.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

2.3. MEME KANSERİ.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

2.3.1. Tanım…….……**4**

2.3.2. Epidemiyoloji .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

2.3.3. Meme Kanseri Biyobelirteçleri .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

2.3.4. Meme Kanserinin Sınıflandırılması .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

2.3.4.1. Meme kanserinin moleküler alt tipleri……..……...……**5**

2.3.4.3. TNM evreleme sistemi…….……..……...……**6**

2.3.4.4. Tümör derecesi…….…….....**6**

2.4. MEME KANSERİNİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

2.5. MEME KANSERİNDE ÇOKLU İLAÇ DİRENCİ .Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.6. HÜCRE ÖLÜM MODELLERİ.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.6.1. Apoptozis .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.6.2. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
2.7. PROTOFLAVONLAR.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3. MATERYAL VE METOD..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.1. DOĞAL BİLEŞİKLERİN ELDESİ VE HAZIRLANMASI.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.1. Hücre Hatları .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.2. Besiyerinin Hazırlanması .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.3. Hücre Hatlarının Stoktan Çıkarılması .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.4. Hücre Hatlarının Pasajlanması .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.5. Hücre Hatlarının Stoklanması .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.6. Hemositometre İle Hücrelerin Sayımı.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.2.7. MTT (Metiltiazotetrazolyum) Canlılık Testi ....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.3. HÜCRE ÖLÜMÜNÜN BELİRLENMESİ .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.4. DNA KIRIKLARININ BELİRLENMESİ .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.5. OKSİDATİF STRES PARAMETRESİNİN BELİRLENMESİ .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.6. BCRP EKSPREYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4. BULGULAR..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.1. MTT CANLILIK TESTİ BULGULARI.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.2. HÜCRE ÖLÜM DETEKSİYONUN BULGULARI Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.3. DNA HASARININ BULGULARI .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.4. OKSİDATİF STRESİN (ROS/RNS) BULGULARI Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.5. BCRP Ekspresyon Seviyelerinin Bulguları.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
5. TARTIŞMA VE SONUÇ……...……. Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
KAYNAKÇA……...……43
ÖZGEÇMİŞ……...……..52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Tümör gelişimi basamakları: Normal hücrelerden metastaza kadar…….……2
Şekil 2: Farklı hücre ölüm tipleri (Bortner 2014'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır)……..……9
Şekil 3: Apoptozis sürecinde; reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu……..12
Şekil 4: Apoptotik ve nekrotik hücrelerin karşılaştırılması……..14
Şekil 5: MTT tepkimesi……..…..18
Şekil 6: MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde JT bileşiklerinin uygulaması sonrası hücre canlılığının doza bağlı olarak değişimi……..……..…….26
Şekil 7. MCF-7 hücrelerinin, Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları…….……28

Şekil 8. MDA-MB-231 hücrelerinin, Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları……..…….....29

Şekil 9. Protoflavon bazlı hibrid bileşikler ile hücre ölümü indüksiyonu…….30

Şekil 10. Protoflavon hibrid bileşikleri ile 24 saat tedavi sonrasında, MCF-7 kanseri hücrelerinde p-γH2AX grafiği……...…31

Şekil 11. Protoflavon hibrid bileşikleri ile 24 saat tedavi sonrasında, MDA-MB-231 kanseri hücrelerinde p-γH2AX grafiği…….……..32

Şekil 12. Protoflavon hibrid bileşikleri ile 24 saat tedavi sonrasında MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ROS değişim oranlarına ait grafik……..……..33

Şekil 13. Protoflavon hibrid bileşikleri ile 24 saat tedavi sonrasında MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde ROS değişim oranlarına ait grafik……...34

Şekil 14. Protoflavon hibrid bileşikleri ile 24 saat tedavi sonrasında MCF-7 meme kanseri hücrelerinde RNS değişim oranlarına ait grafik……35

Şekil 15. Protoflavon hibrid bileşikleri ile 24 saat tedavi sonrasında MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde RNS değişim oranlarına ait grafik……36

Şekil 16. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde akış sitometrisi ile değerlendirilen hibrid-protoflavonlar uygulamasından sonra nispi BCRP ifadesindeki değişiklikler……..37

Şekil 17. MCF-7 hücrelerinde hibrid protoflavon bileşikleri ve PTX tarafından indüklenen BCRP ifadesini gösteren histogramlar……..38

Şekil 18. MDA-MB-231 hücrelerinde hibrid protoflavon bileşikleri ve PTX tarafından indüklenen BCRP ifadesini gösteren histogramlar……39

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: İnsan meme kanseri moleküler alt ipleri ……..…….5-6

Tablo 2: Protoflavon hibrid bileşikler ve moleküler ağırlıkları……16

Tablo 3: MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının IC_{50} değerleri…….27

SİMGE ve KISALTMALAR LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikro

AIF	**:** Apoptozis İndükleyici Faktör
Apaf-1	**:** Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
ATM	**:** Ataksi-telanjiektazi mutasyon
DAMP	**:** Hasar ile ilişkili molekül (DamageAssociatedMoleculePattern)
DD	**:** Ölüm alanı (Death domain)
DISC	**:** Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DISC	**:** Ölüm indükleyici sinyal kompleksi (Deathinducingsignallingcomplex)
DMEM	**:** Dulbecco'sModifiedEagle'sMedium
DMSO	**:** Dimetilsülfoksit
DR	**:** Ölüm reseptörleri
ER	**:** Östrojen reseptörü
FADD	**:** Fas ilişkili ölüm alanı

FADD : Fas ilişkili ölüm alanı (Fas associateddeath domain)
FBS : Fetal sığır serumu (Fetalbovine serum)
HER2 : İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
MMP : Matriksmetalloproteinaz
MOMP : Mitokondri dış membranpermeabilizasyonu (mitochondrialoutermembranepermeabilization)
PI : Propidyum iyodür (Propdium iodide)
PR : Progesteron reseptörü
SDS : Sodyum dodesil sülfat
TNFR : Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü
TRADD : TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi proteini
TRAIL : Tnf-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand

GİRİŞ

Dünya genelinde toplam her yıl 14,1 milyon kanser vakası görülmekte ve bunlardan 8,2 milyon vaka kansere bağlı ölüm ile sonuçlanmaktadır. Benzer seyir devam ettiği takdirde 2030 yılında yıllık 22 milyon yeni vaka ortaya çıkması öngörülmektedir (Ferlay ve ark., 2017). Ülkemizde nedeni biline ölümler sıralamasında kanser en sık görülen ikinci ölüm nedenidir, birinci sırada ise kardiyovasküler hastalıklar yer almaktadır (TÜİK). Kanser sıklığı dünya genelinde hemen her ülkede yıllık %1-2 oranında bir artış göstermektedir. Çok az sayıda gelişmiş ülkede bu vakalardaki artış oranı kontrol altına alınmıştır. Kadınlar arasında en sık görülen kanser türü, meme kanseridir.

Meme kanserinin güncel tedavi yöntemlerine bakıldığında; ameliyat, radyoterapi, adjuvan kemoterapi ve/veya hormon terapilerini görmekteyiz fakat ileri evre meme kanserinin tedavisi için etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Birçok yeni ilaçların çıkmasına rağmen tedaviye yanıt hala tam olarak alınamamaktadır. Bu nedenle yeni tedavi seçeneklerinin ve yeni ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır.

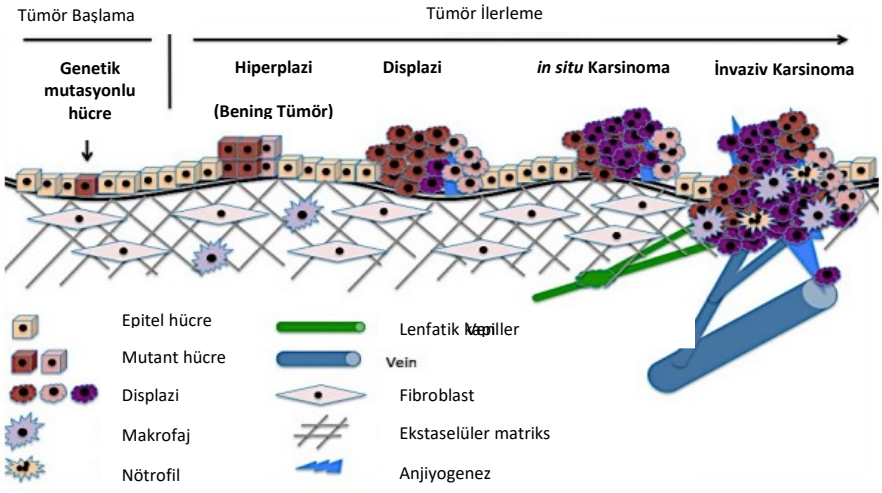
Ortak bir farmakolojik amaç için tasarlanan hibrid bileşikler, ilaç keşfi için giderek daha popüler bir strateji haline gelmiştir. Bununla birlikte, bu yaklaşım birçok kişi tarafından da tartışılmaktadır, çünkü her iki parçanın da bireysel hedeflerine seçiciliği, bir araya geldiklerinde etkilerinin azalacağı düşünülmektedir. Bir ATR inhibitörü (protoflavon) bir pro-oksidan (bir ferrosen veya bir kalkon) fragmanına bağlanarak dört yeni triazol bağlı hibrid bileşik hazırlandı.

Bu bilgiler doğrultusunda; bu tez çalışması kapsamında yeni sentez hibrid bileşiklerin meme kanseri hücre hatları olan MCF-7 ve MDA-MB-231 üzerine etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

Kanser, anormal ve kontrolsüz hücre proliferasyonu olarak tanımlanmaktadır. Kanser hücreleri sıklıkla çevre dokuya yayılır, kan veya lenfatik sistem yoluyla uzaktaki organlara metastaz yapar (Fidler, 1989; Rusciano ve Burger, 1992). Kanser hücreleri birçok doku ve organda ortaya çıkabilir (Baylin, 2006). Erken tanı ve tedavideki ilerlemelere rağmen, dünya genelinde kanser araştırma için en yüksek önceliğe sahip büyük bir sağlık sorunudur (Bray ve ark., 2012; Bertucci ve ark., 2012). Şekil 1'de gösterildiği gibi, kanser oluşumunun ilk adımı, genetik mutasyon olan "Başlama" aşamasıdır. Genetik mutasyon sürecine neden olan veya destekleyen "başlatıcılar"; hormonlar, kimyasallar, radyasyon, enfeksiyon ve hipoksidir (Weinberg, 1988; Nelson ve ark., 2004). Genetik mutasyonlar, RAS (Downward, 2003) ve MYC (Finver ve ark., 1988) gibi pro-onkojenik genlerde veya BRCA1, BRCA2 ve TP53 gibi tümör baskılayıcı genlerde gerçekleşebilir (Friedenson, 2007). Genel olarak, kanser gelişimi çoklu genetik bozulmaların birikmesini gerçekleşmektedir (Devileeve Cornelisse, 1994; Bieche ve Lidereau, 1995). Mutasyona uğramış hücreler uykuda kalabilir veya proliferatif hale gelebilir. Kanser oluşumunun ikinci basamağı olan "İlerleme" aşaması, hiperplazi (hücre sayısındaki artış), displazi (hücrelerde fenotipik değişiklikler), in situ karsinom (erken evre kanser) ve nihayetinde invaziv karsinoma (çevre dokulara yayılım) basamaklarından oluşmaktadır (Lodish ve ark., 2000). Bugüne kadar, kanser hücrelerinin anormal büyümelerini sürdürdükleri ve büyüme baskılayıcı mekanizmalarından kaçtıkları altı kanser özelliği tanımlanmıştır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bunlar proliferatif sinyalin sürdürülmesi, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, hücre ölümüne direnç gösterme, çoğaltıcı ölümsüzlüğü sağlama, anjiyojenezi indükleme ve aktive edilmiş istila ve metastazdır (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 1. Tümör gelişimi basamakları: Normal hücrelerden metastaza kadar

2.2. KANSER HÜCRELERİNİN ÖZELLİKLERİ

Bazı kanser türleri tek bir anormal hücreden köken alırken bazıları ise tümör dokusunda birden fazla hücrenin karsinojene maruz kalmasından kaynaklanmaktadır (Fialkow 1976). Normal hücrelerin bölünme sayısı sınırlıyken kanser hücrelerinin ise sınırsızdır, bu özellik ‘’immortalite’’ olarak adlandırılır. Sınırsız bölünme sayısının mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerdir. Telomerler her bir DNA sarmalının uc kısmında bulunan ve kromozomları koruyan parçalardır. Normal hücreler bölündükçe telomeraz enzimi de programlı bir şekilde gittikçe azalır ve buna bağlı olarak telomerler kısalır. Dolayısıyla tamamen farklılaşmış bir hücre siklusun G0 fazında durur (senesans) ve sonunda çoğalma kapasitesini yitirir. Oysa kanser hücrelerinde telomeraz enzimi etkinliğini sürdürür yani telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücreler sınırsız bölünme yeteneği kazanır (Shay ve ark. 2001). Meme kanserlerinin % 95 (99/104)’inde telomeraz aktivitesi bulmuşlardır (Bednarek ve ark., 1997). DNA tamirindeki saptanan eksiklikler genetik instabiliteye neden olur. Buna bağlı olarak kanser hücreleri proliferasyon kontrol mekanizmalarına daha az yanıt verir. Yabancı çevrede yaşama yeteneğine sahip klonlar oluştururlar ve böylece metastaz yaparlar. *in vitro* ortamda hücreler hücreler, bulundukları hücre kaplarına yapışırlar eğer yapışmazlarsa bölünemezler. Bu durum normal hücrelerde ise; çoğalıp üzerinde büyüdükleri hücre kaplarının tüm yüzeyini tek tabaka halinde (monolayer) doldurduklarında ortamda bölünmeleri için gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin elemanlarını (nütrientleri) içerse bile bölünemezler. *in vitro* ortamda kanser hücrelerinin bir özelliği de ortamda bulunan büyüme faktörlerinden ve nütrientlerden bağımsız olarak proliferasyonun devamlı artmasıdır. Kanser hücreleri, ekstrasellüler büyüme faktörlerinin gereksinimlerini azaltmaktadır, bu hücreler genellikle ekstraselüler matriks bileşenlerini parçalayacak proteazları yapısında

bulundurmaktadırlar ve normal dokulara yayılmaya izin vermektedir (Pietras ve Östman 2010). Kanser hücreleri, belirli boyuta geldiklerinde beslenmelerini sağlayabilmek için yeni kan damarı oluştururular; kan damarı oluşumunu indükleyen büyüme faktörleri bulundurmaktadır (Anjiyogenez) (Lowitz ve Casciato 2000, Cooper 2006).

2.3. MEME KANSERİ

2.3.1. Tanım

Meme kanseri, meme glandüler süt kanallarının veya meme lobüllerinin epitelyal hücrelerinden kaynaklanan malign bir tümördür (Benson ve ark., 2009). Meme karsinomu, tümörün bazal membran dışında büyümeye başlayıp başlamamasına bağlı olarak, invaziv olmayan (in situ karsinom) veya invaziv olarak sınıflandırılır. İnvaziv karsinomlar, mutasyona uğrayıp değişen hücrelerin etrafındaki bağ dokularına ve vücudun uzak organlarına metastaz yaptığı kanserlerdir.

2.3.2. Epidemiyoloji

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen kanser olup, her yıl 2,1 milyon kadını etkilemektedir, kadınlarda kansere bağlı ölümlerde önde gelen nedenler arasındadır. 2018'de 627.000 kadının meme kanserinden öldüğü tahmin edilmektedir ki bu kadınlarda tüm kanser ölümlerinin yaklaşık % 15'idir. Meme kanseri insidansı dünya çapında istikrarlı bir şekilde artmakta olup, Orta Afrika ve Doğu Asya'da 100.000'de 27 ile Kuzey Amerika'da 100.000'de 92 arasında değişen dünya bölgelerinde neredeyse dört kat değişmektedir (Ferlay ve ark., 2015) . Bu yaş dağılımı, diyet, yaşam tarzı, etnik köken, genetik geçmiş ve popülasyonlar arasındaki diğer meme kanseri risk faktörleri arasındaki farklılıklar nedeniyle olabilir.

2.3.3. Meme Kanseri Biyobelirteçleri

Tümör biyobelirteç, bir tümör tarafından üretilen veya bir tümöre yanıt olarak üretilen bir molekül olarak tanımlanır. Biyobelirteçler, meme de dahil olmak üzere vücuttaki herhangi bir dokudan tespit edilebilir (Mishra ve Verma, 2010). Prognostik, tanısal ve / veya prediktif olabilirler. Prognostik biyobelirteçler tedaviden bağımsız olarak doğal hastalık seyrini belirtirken, prediktif biyobelirteçler bir hastanın spesifik bir tedaviye yanıtını öngörür (Vivanco, 2010). Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) gibi hormon reseptörlerinin ekspresyon seviyeleri zayıf prognostik fakat güçlü prediktif biyobelirteçlerin iyi örnekleridir (Radhakrishna, 2015). Bununla birlikte, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2) aşırı ekspresyonu hem güçlü bir prognostik biyobelirteç hem de güçlü bir prediktif biyobelirteç için uygun bir örnek olabilir (Radhakrishna, 2015).

2.3.4. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Kesin prognozu belirlemek ve etkili bir tedavi planlamak için, meme kanserinin sınıflandırması çok önemlidir. Bu nedenle, meme kanserinde moleküler alt tiplerde dahil meme kanserinde en temel sınıflandırmalar, TNM evreleme sistemi ve derecesi belirtilecektir.

2.3.4.1. Meme kanserinin moleküler alt tipleri

Meme kanserinin tek tip bir hastalık olmadığı, tümör hücrelerinin moleküler ve genetik bilgilerle belirlenen farklı alt tipleri ile karakterize edilen heterojen bir hastalık olduğu bilinmektedir. Meme tümörleri, ER, PR, HER2 ve Ki-67 de dahil olmak üzere iyi bilinen dört biyobelirteç kullanılarak dört farklı alt tipte sınıflandırılabilir (Tablo 1) (Sorlie ve ark., 2001). Bu moleküler alt tip sınıflandırması genellikle prognoz ve terapötik stratejinin seçimi için önemlidir (Parker ve ark., 2009). Luminal A, ER-pozitif, PR-pozitif, HER2-negatif ve Ki-67 ekspresyonunun düşük olduğu ve aynı zamanda hormonal tedavi ile en iyi sonucu veren en yaygın alt tiptir (Cheang ve ark., 2009). Luminal B, luminal A'ya benzer fakat proliferasyona bağlı bir gen olan Ki-67'nin yüksek ekspresyonuna sahiptir ve bu alt tip, luminal A'dan daha agresiftir (Cheang ve ark., 2009; Heitz ve ark., 2009). Luminal B alt tipine sahip hastalar, HER2'nin ekspresyonuna bağlı olarak anti-HER2 antikoru Trastuzumab (Herceptin) ile tedavi ile kombinasyon halinde hormonal tedaviden faydalanabilirler (Senkus ve ark., 2013; Yersal ve Barutca, 2014). Bazal benzeri / üçlü negatif meme kanseri (TNBC), genellikle diğer meme kanseri alt tipleri ile karşılaştırıldığında agresif klinik seyir ve kötü prognoz ile karakterizedir (Heitz ve ark., 2009). ER ve HER2 gibi spesifik ilaç hedeflerin olmayışı nedeniyle, kemoterapi sistemik tedavi için hala birincil seçenektir (Senkus ve ark., 2013).

Tablo1. İnsan meme kanseri moleküler alt tipleri

Alt tipler	**Moleküler/genetik karakteristik**	**Prevalans %**	**Klinik Karakteristik**
Luminal A	ER+ ve/veya PR+, HER2- Düşük ki67	40	Yavaş büyüyen Daha az agresif Düşük nüks Yüksek hayatta kalma oranı Tüm alt tiplerin en iyi prognozu Endokrin tedaviye cevap verir
Luminal B	ER+ ve/veya PR+, HER2+ (veya HER2-, yüksek Ki67)	10-20	Yüksek proliferasyon oranı Luminal A'ya göre daha kötü prognoz Endokrin tedaviye cevap verir

HER2 zenginleştirilmiş	HER2+, ER+, PR-	10	Daha agresif bir şekilde büyümeye ve yayılmaya meyilli Kısa süreli sağkalım oranı Hedefli tedaviler mevcut
TNBC/ Bazal benzeri	ER-, PR- ve HER2-	15	Kötü prognoz Agresif büyüme ve yayılım Sistemik tedavi; Kemoterapi

2.3.4.2. TNM evreleme sistemi

American Joint Committee on Cancer (AJCC) tarafından belirtilen TNM evreleme sistemi, tümörün anatomik özelliklerine dayanarak tanımlanmıştır (Edge ve Compton, 2010). TNM sınıflandırması, tümör boyutu (T), lenf nodu tutulumunun (N) ve metastaz (M) varlığının veya yokluğunun bir kombinasyonunu ile yapılır. Bu sınıflandırma sistemi, sağkalım tahmini (prognoz), başlangıçtaki terapötik yaklaşımların seçimi ve terapötik sonuçların değerlendirilmesi için bir temel sağlar (Sobin, 2003).

2.3.4.3. Tümör derecesi

Tümör derecesi, tümör hücrelerini anormalliklerine dayanarak tümör dokularını mikroskopik olarak sınıflandırır. Bir tümörün ne kadar hızlı büyüyüp yayılacağının prognostik bir göstergesi olarak kullanılır (Elston ve Ellis,1991). Tümör derecesi, glandüler / tübüler formasyon, nükleer pleomorfizm (çekirdek ve nükleollerin büyüklüğü ve şeklindeki değişkenlik) ve mitotik (hücre bölünmesi) sayımı dikkate alarak tümörün potansiyel agresifliğini temsil eder. Bu, tümörü G1, G2 ve G3 olmak üzere üç farklı sınıfta sınıflandırır. Gl düşük dereceli ve iyi farklılaşmış, G2 orta derecede farklılaşmış ve G3 yüksek dereceli ve kötü farklılaşmış olduğunu göstermektedir (Elston, 1984).

2.4. MEME KANSERİNİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Meme kanseri gelişimine sebep olan mekanizmalar tam olarak belirlenememiştir. Çevresel karsinojenlere maruz kalma sonucunda oluşan mutasyonlar, germline mutasyonlarla kalıtılan genetik değişikliklerle tümör süpresör genlerin aktivasyonu ve proto onkogenlerin aktivasyonu ile apoptozis mekanizmalarının bozulması ve/veya kontrolsüz hücre proliferasyonunun sonucunda meme kanseri gelişiminin başladığı öne sürülmektedir. Büyüme faktörleri ve ilişkili reseptörlerde meydana gelebilecek çeşitli bozuklukların da kontrolsüz hücre çoğalmalarının da meme kanseri gelişiminde rolü olduğu bilinmektedir (Sainsbury ve ark. 1985, Richard ve ark. 1987, Brown ve ark. 1995).

Östrojen reseptörlerinin, östrojen uyarısı ile meme kanseri kanseri gelişiminde önemli rolü olduğu bilinmektedir. Östrogen (Er) fonksiyonlarını iki spesifik hücre reseptörü aracılığıyla gerçekleştirmektedir: Erα ve Erβ. Bu reseptörler, hormon bağımlı transktripsiyon düzenleyicilerdir. Er yolunun meme kanseri patofizyolojisinde kritik bir rolü vardır; Erα'nın fazla ekspresyonu, iyi anlaşılmış bir prognostik ve prediktif bir faktördür (Dotzlaw ve ark. 1999, Fugua ve ark. 1999, Speirs ve ark. 2000, Su ve ark. 2000). ERβ'nin; ERα ve dolayısıyla hücre proliferasyonu üzerinde inhibe edici etkileri olduğu gösterilmiştir. ERβ, özellikle izoform 2, normal meme bezinde ERα'dan daha yüksek seviyede eksprese edilir ancak ekspresyonu; meme kanseri hücrelerinde, özellikle ERα eksprese eden hücrelerde daha azdır (Park ve ark., 2003; Park ve ark., 2006).

Genetik değişiklikler germline mutasyonlar ile kalıtılır veya sonrada somatik mutasyonlarla kazanılır. Sonradan kazanılan mutasyonlar çevresel karsinojenlere maruz kalmayla ortaya çıkabilir. Bu çevresel karsinojenler fiziksel (asbest, iyonize radyasyon), kimyasal ve biyolojikdir (bazı bakteriler ve virüsler) (Danaei 2005). Meme kanseri genetik temelli çalışmalarda kanser gelişimi sürecinde birden fazla role sahip genlere yönelmiştir. Bu genler arasında; onkogenler (ras, c-myc genleri), tümör supresör genleri (p53, BRCA1, BRCA2, nm23), büyüme faktörü reseptör genleri (HER2), hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alan genler (telomeraz) ve apoptozisde rol alan genler (Bcl gen ailesi) sayılabilir. BRCA1 ve BRCA2 proteinleri genomik stabilitenin sağlanmasında, DNA hasarında hücresel cevap olarak transkripsiyonel düzenlemeye ve hücresel proliferasyon süreçlerine katkıda bulunurlar (Oesterreich ve ark.1999, Cui ve ark. 2000).

2.5. MEME KANSERİNDE ÇOKLU İLAÇ DİRENCİ

İlaç direncinin gelişmesi meme kanserinin etkin tedavisini sınırlayan önemli bir faktördür. Kemoterapi ve yeni moleküler hedefli tedaviler, kanser hastalarının tedavisine önemli bir katkıda bulunur. Kemoterapötik etkinlikteki ana sınırlamalar, bu maddelerin normal hücreler üzerindeki toksik etkilerinden ve dirençten (doğuştan gelen veya edinilen) terapötik maddelere karşı ortaya çıkar. Kombinasyon kemoterapisi, etkilerini farklı mekanizmalarla uygulayan ve / veya kimyasal olarak çok farklı olan ajanlarla muamele ederek direnci aşmak için tasarlanmıştır. Kanser hücre popülasyonları, mekanik ve yapısal olarak birbirine benzemeyen birden fazla ilaca dirençli (MDR) hale gelerek yanıt verebilir. Tümör kitlesi içinde ilkel kök hücre popülasyonlarının varlığı, tümörün kusurlu hasar tespiti, onarımı ve yüksek proliferasyon hızı ile ilişkili genomik dengesizlik nedeniyle geniş bir çeşitlilik üretme kabiliyeti ile birlikte birçok kanserin karakteristiğidir (Dean ve ark., 2005).

Doğal olarak mevcut olan veya üretilen dirençli ve MDR varyantları daha sonra, birden fazla kemoterapi döngüsü ile seçilebilir. Tabii ki birçok kemoterapötik ajan mutajeniktir, dolayısıyla kanser hücresi popülasyonunda dirençli mutantların sıklığını arttırır.

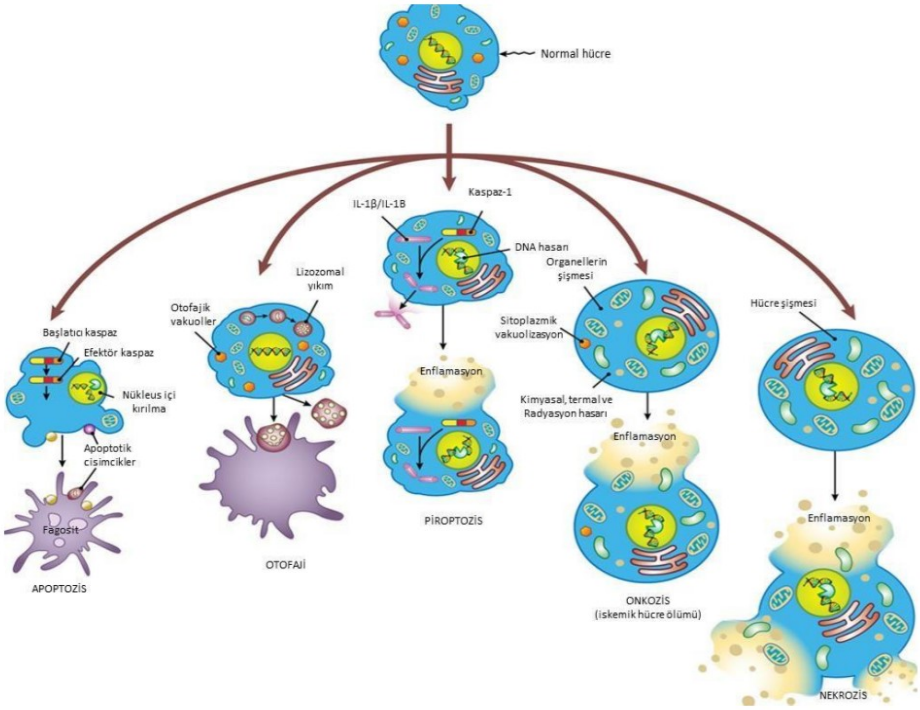
İlaç direncinin moleküler mekanizmaları arasında çoklu ilaç pompalarının (genellikle ATP bağlayıcı kaset [ABC] taşıyıcı aile üyeleri); MDR-1 gen ürünü P-glikoprotein (P-gp)/P-170 (ABCB1), meme kanseri direnç proteini (BCRP; ABCG2), ilaca dirençle ilişkili protein-1 (MRP-1; ABCC1) ve ilgili proteinlerin aşırı ekspresyonu bulunur. Aynı zamanda önemli diğer husus; pro- ve antiapoptotik proteinlerin nispi seviyeleridir; topoizomeraz II (antrasiklinler için), dihidrofolat redüktaz (metotreksat için), timidilat sentetaz (çeşitli antimetabolitler için) gibi hedef enzimlerin değiştirilmiş seviyeleri ve aktiviteleri; ve glutatyon-S-transferazlarda dahil olmak üzere değiştirilmiş ilaç degrade edici enzimlerdir (Dean ve ark., 2005). İlaç direnci ile ilgili başlıca zorluk, aynı hücre içinde farklı mekanizmalar ile geliştirilen ilaç direncinin, tümör içindeki farklı alt popülasyonlarda da farklı direnç mekanizmalarının geliştirilmesiyle çok faktörlü olabilmesidir (Heenan ve ark., 1997). Direnç ayrıca pH, oksijen stresi, tümör vaskülarizasyon derecesi, hücre dışı matris bileşimi, tümör yapısı ve benzeri gibi bireysel mikro ortamın çeşitli yönleri gibi fiziksel ve fizyolojik parametrelerle de ilişkili olabilir böylece tümör hücrelerinin hücresel ve moleküler biyolojisindeki bireysel değişiklikler gözlemlenen direnç fenotipini her zaman tam olarak ortaya koymayabilir. Bununla birlikte, (genellikle) hücre içi hedefe yeterli ilaç dozunun verilmesi, her zaman yeterli olmasa bile başarılı kemoterapinin bir parçasıdır.

2.6. HÜCRE ÖLÜM MODELLERİ

Çok hücreli organizmalarda; yeni hücrelerin oluşumu ve hücre ölümü arasında bir denge bulunmaktadır. Bu denge organizmanın gelişimi ve doku homeostazisinin sağlanması açısından önemlidir. Her gün yaklaşık olarak $1x10^{14}$ yeni hücre oluşturulurken milyarlarca hücre de ölmektedir bu durum sayesinde sabit denge sağlanmaktadır (Fischer ve Schulze-Osthoff 2005). Bu dengenin bozulması durumunda nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi patolojik durumlar tetiklenebilmektedir (Danial ve Korsmeyer 2004). Hücrelerin programlanmış hücre ölümü ‘’apoptozis’’ ve patolojik hücre ölümü ‘’nekrozis’’ gibi çeşitli hücre ölüm tipleriyle yok olmaktadır (Şekil 2).

1970'lere kadar bilinen tek hücre ölümü ‘’nekrozis’'di ve bu yüzden hücre ölümü fizyolojik olmayan zararlı bir olay gibi görülürdü. İlk kez İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında programlı hücre ölümü ‘’apoptozis’’ kavramının

ortaya çıkmasıyla, hücre ölümünün sadece nekrozisle gerçekleşmediği ve düşünüldüğü gibi her zaman anormal veya zararlı bir olay olmadığı ortaya çıkmıştır.



Şekil 2. Farklı hücre ölüm tipleri (Bortner 2014'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır)

2.6.1. Apoptozis

Programlı hücre ölümü ya da apoptozis, çok hücreli canlıların gelişim ve devamlılıklarında rolü olan fizyolojik bir olaydır. Gelişim boyunca çoğu hücre fazla miktarda meydana gelir ve apoptozis ile fazla hücrelerin ölümü gerçekleşir. Böylece pek çok organ ve dokunun şekillenmesi sağlanır (Meier ve ark., 2000). Apoptozisin çok hücreli organizmaların gelişiminde yer aldığına dair en belirgin örneklerinden bir tanesi, parmak arası mezenkimal dokuda meydana gelen kitlesel ölüm sonucunda parmakların serbest ve bağımsız bir halde şekillenmesidir (Zuzarte-Luis ve ark., 2002). Ayrıca, erişkin bir organizmanın hücrelerinde, homeostazı sürdürmek ve sabit sayılarını korumak amacıyla programlı hücre ölümü gerçekleşir. Gelişmekte olan lenfositlerin çoğu, çeşitli süreçlerle ölürler ve bu şekilde etkin ve işlevsel havuz sıkıca kontrol edilmekte, aynı zamanda lenfosit sayısı sabit tutulmaktadır (Rathmell ve ark., 2002). Apoptozisin; doku ve organ gelişiminde, homeostazinin sağlanmasında rolü bulunduğu gibi ayrıca, vücutta ihtiyaç duyulmayan, fonksiyonları bozulan, fazla üretilmiş, yaşlanmış, düzensiz gelişmiş veya DNA'sında hasar olan hücreler çevreye zarar vermeden programlı yani düzenli bir yol izleyerek ölürler. Hücrelerin içeriden

ve dışarıdan aldığı çeşitli sinyallere yanıt olarak aktifleşen bu fizyolojik mekanizma hücre tarafından kontrol edilebilen aktif bir süreçtir (Meier ve ark. 2000, Öktem ve ark. 2001, Ulukaya 2001). Çevreden gelen sinyallere cevap olarak hücreler öncelikle DNA hasarlarını onarmaya çalışır ve onarılamaması durumunda apoptozis sürecine girer. Böylece hasarların birikerek; hasarlı hücrelerin çoğalması engellenir, tümör oluşumu gibi anormal gelişimlerin önüne geçilir (Altunkaynak ve Özbek 2008).

Apoptozis hücre içi ya da dışından gelen bir uyaranın sebep olduğu genetik mekanizmanın harekete geçmesi ile gerçekleşmektedir. Hücre içi uyaranlar arasında sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, Tümör Nekrozis Faktör (TNF), tümör baskılayıcı bir gen olan p53'ün DNA hasarı ile aktive olması ve onkojenler bulunmaktadır. Hücre dışı uyaranlar ise; hücre ölüm proteinleri, tümör nekrozis faktör, koloni uyarıcı faktörler, nöron büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, interlökinler gibi maddelerin ortamdaki düzeylerinin değişmesi, radyasyon, ilaçlar ve virüslerdir. Hücre içi ve dışı uyaranların dışında apoptozisin uyaran ya da düzenlenmesini sağlayan bir çok gen bulunmaktadır (Öktem ve ark. 2001).

Apoptozis sürecindeki en önemli bileşenlerden olan Bcl-2 ailesi üyeleri; apoptozis düzenleyici faktörlerin önemli ve büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Bcl-2 proteinlerinin bazıları anti-apoptotiktir (Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-1) ve mitokondri, endoplazmik retikulum veya nüklear membranda bulunmaktadır, bazıları ise pro-apoptotiktir (Bax, Bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bid). Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler kendi aralarında homo ya da heterodimerler oluştururlar. Hücrenin kaderini pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin rölatif oranıdır. Pro-apoptotik proteinlerin fazla ekspresyonunda hücreler apoptozise daha yatkın, anti-apoptotik proteinlerin fazla ekspresyonunda ise hücreler apoptozise daha dirençli olmaktadır.

Pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri genellikle sitozolde bulunmaktadır ve hücresel hasar ve stresin algılayıcısı olarak görev yapmaktadırlar. Hücrede meydana gelen hücresel hasar sonucunda; anti-apoptotik proteinlerin bulunduğu mitokondri yüzeyine doğru yer değiştirmektedirler. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasında meydana gelen etkileşim, anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin normal işlevlerini bozar ve mitokondride porların oluşumuna, sitokrom c ve diğer pro-apoptotik moleküllerin zarlar arası bölgeden açığa çıkmasına neden olabilir (Fan ve ark. 2005, Dash 2007).

Kaspazlar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein içeren, sistein proteazlar olarak adlandırılan enzimlerdir ve bu enzimlerin aktivasyonları için zimojenlerin proteolitik kesiminin gerçekleşmesi

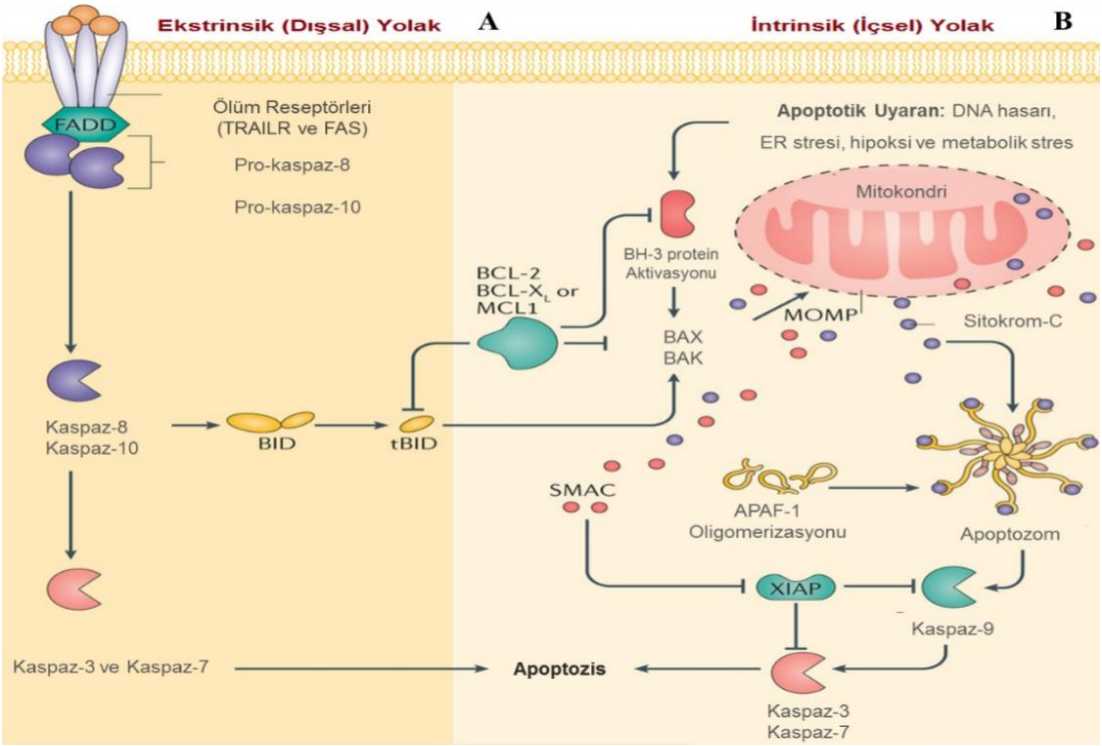
gerekmektedir. Kaspazların bazıları (2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, bazıları da (3, 6, 7) ilerletici (efektör) kaspazlar olarak bilinir. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir şelaleyi başlatırlar. Başlatıcı kaspazlar, ölüm sinyalini ilerletici kaspazlara iletirler, ilerletici kaspazların bazıları lamin, hücre içi iskelet ve çekirdek zarı proteinlerini parçalar.

Apoptozis dışsal ve içsel yolak olmak üzere iki yol ile gerçekleşir. Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ligandlarıyla bağlanması sonucunda dışsal (ekstrinsik)/sitoplazmik yolak aktifleşmektedir (Şekil 3A). Ölüm reseptörleri, apoptotik sinyalin iletimi için gerekli olan 80 amino asit uzunluğunda intraselüler ölüm domaini (Death Domain, DD) içerir. Reseptör ligand etkileşimi, Fas ile ilişkili ölüm domain proteini (Fas Associated Death Domain, FADD) gibi adaptör moleküllerin ve ardından kaspaz-8'in bağlanmasına yol açar ve ölüm indükleyici sinyal kompleksi (Death Inducing Signaling Complex, DISC) adı verilen kompleks oluşur. Bu durum kaspaz-8'in dimerizasyonuna ve aktivasyonuna yol açar. Kaspaz-8, kaspaz-3 ve kaspaz7'yi kırar ve aktifleştirir (Bodmer ve ark. 2000,Kischkel ve ark. 2001, Tait ve Green 2010, Dickens ve ark. 2012).

Kaspaz-8 ayrıca Bid'i de kırabilir. Kırılmış Bid (tBid) sonrasında mitokondriye geçer ve kaspaz 9 ve kaspaz 3 aktivasyonuna neden olacak sitokrom c salınımını uyarır (Tait ve Green 2010).

İçsel (intrinsik)/mitokondriyal yolak uyarıldığında ise; mitokondriden sitokrom-c salınımı sonucunda ölüm sinyaline sebep olur (Şekil 3B). Her iki yolağın ortak noktası; düzenleyici ve yapısal molekülleri kıran ve hücrenin ölümüne neden olan proteaz kaskadının aktivasyonudur (Ghobrial ve ark. 2005). İçsel yolağın en önemli olayı mitokondri dış membran permeabilizasyonudur (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP). Permeabilizasyon sonucunda; sitokrom c, mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/IAP bağlayıcı protein Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, apoptozis indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz D gibi mitokondri membran proteinleri sitozole salınır. Mitokondri iç membran yüzeyinden sitokrom c'nin sitozole salınması ile sitokrom c, sitoplazmik protein olan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1)'e bağlanır ve onu aktive eder, dATP/ATP'nin de ortamda bulunması ile Apaf-1/sitokrom c kompleksi heptamerik bir yapıya oligomerize olur. Bu yapının oluşması, prokaspaz 9'un Apaf-1 ile etkileşimini mümkün kılar ve apoptozom kompleksi oluşur.

Apoptozomun kompleksinin görevi, başlatıcı kaspaz olan kaspaz 9'u aktive etmektir. Aktif kaspaz 9, kaspaz-3'ü veya diğer ilerletici kazpazları aktive ederek kaspaz kaskadına aracılık eder.Ayrıca kaspaz aktivitesini inhibe eden ve aktiviteleri Smac veya Omi/HtrA2 gibi fonksiyonel analoglar ile engellenmiş birçok IAPs (apoptozis inhibitörleri) vardır. Ölen hücrelerde Smac ve Omi/HtrA2 (mitokondriyel proteinler, pro-apoptotik proteinler) mitokondriden salındığında IAPs inaktive olmakta ve böylece ilerletici kaspazların inhibisyonu engellenerek hücrelerin apoptozise gitmeleri sağlanır (Ulukaya 2003, Riedl ve Salvesen 2007, Li ve ark. 2008, Duprez ve ark. 2009).



Şekil 3. Apoptozis sürecinde; reseptör aracılı kaspaz aktivasyonu (A) ve mitokondri/sitokrom-C aracılı apoptozis (B) (Ichim ve Tait 2016'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır)

2.6.2. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar

1- Nekrozis genellikle bileşik hücre grupları etkilenirken, apoptozisde tek tek hücreler etkilenir (Holdenrieder ve Stieber 2004).

2- Nekroz fizyolojik olmayan uyaranlarla başlar, apoptozis hem fizyolojik hem de fizyolojik olmayan uyaranlarla başlayabilir (Wyllie 1980, Lu ve ark. 2000). Nekrozisin klasik nedenleri arasında ise hipertermi, oksidatif fosforilasyon-Krebs siklusu ya da glikolizisin inhibisyonu, otolizis, hipoksi ve çeşitli toksinler yer alır.

3- Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken "cell swelling", apoptotik hücre tam tersine küçülür "cell shrinkage".

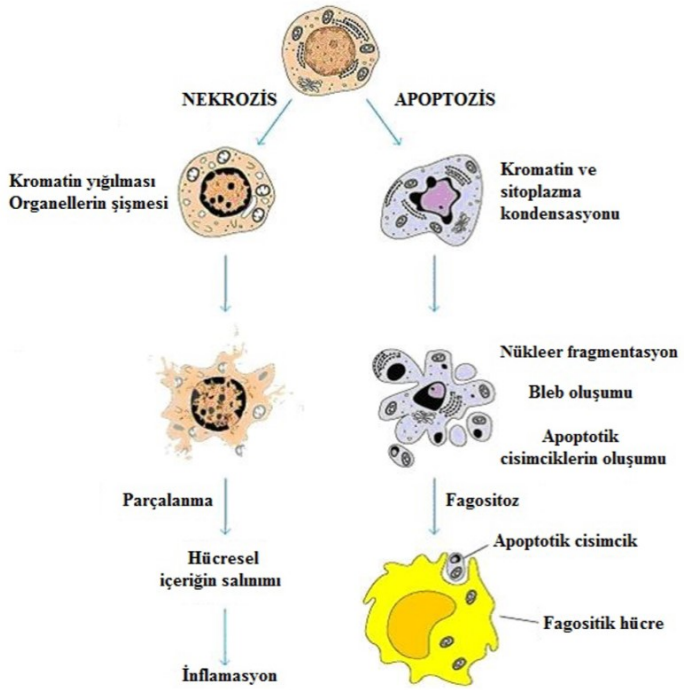
4- Nekrozise uğrayan hücre, çevreye yaydığı kemotaktik maddeler ile çağrılan makrofajlar tarafından fagosite edilir. Apoptozise uğrayan hücre ise çevreye kemotaktik madde yaymaz; yanında bulunan epitel hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile fagositoza uğrar (Wyllie 1980, Lu ve ark. 2000).

5- Nekrozis ile ölen bir hücrede kromatin yapısı hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir, apoptozisle ölen hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşma (kromatin kondensasyonu) gözlenir (Ulukaya 2010).

6- Hücre içi ATP seviyesine göre hücreler apoptozis veya nekroz ile ölürler. Eğer hücre ciddi olarak zarar görmüşse apoptozis için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir.

7- Nekroz sırasında DNA'nın rastgele sindirimi mevcuttur. Oysa apoptozisde DNA'nın, intranükleozomal bölgelerinden 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parcalanma mevcuttur. Bu da agaroz jel elektroforezde apoptozis icin karakteristik "ladder pattern" denen merdiven şeklinde kırılmalar meydana getirir (Wyllie 1980, Ulukaya 2003).

8- Nekrozdan farklı olarak apoptotik hücrede normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfotidilserin'in membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır. Membrandaki bu, apoptotik hücrenin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını ve fagosite edilmesini sağlar (Ulukaya 2003).



Şekil 4. Apoptotik ve nekrotik hücrelerin karşılaştırılması (Anonim 2007)

2.7. PROTOFLAVONLAR

Protoflavonlar, genellikle tipik olarak fern türlerinde (örn. Thelypteris ve Pseudophegopterys sp.) ortaya çıkan, aromatik olmayan bir B halkasına sahip nadir doğal flavonoidlerdir (Hunyadi ve ark., 2014). Bu bileşiklerin birçoğunun, *in vitro* ve *in vivo* deney sonuçlarına göre bazı kanser hücreleri üzerinde umut verici antitümör etkilerinin olduğu bulundu (Danko ve ark., 2012; Lin ve ark., 2005; Chen ve ark., 2013; Wang ve ark., 2012; Chang ve ark., 2008). Protoflavonoidlerin apoptozu indüklediği ve S ve G2 / M faz hücre döngüsü durdurduğu ve bunun oksidatif stresi indükleme yetenekleriyle yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chang ve ark., 2008; Chen ve ark., 2011). Apigenin protoflavon analoğu olan protoapigenonun, replikasyonun önemli bir bileşeni olan kontrol noktası kinaz 1'in (Chk-1) ataksi telanjiektazisinin ve Rad3 ile ilişkili proteinin (ATR) aracılı aktivasyonunun güçlü bir inhibitörü olması özellikle ilgi çekicidir (Wang ve ark., 2012). Ataksi-telanjiektazi mutasyonlu (ATM) kinaz ile birlikte, bu yol devam eden çeşitli klinik deneylerle çekici bir yeni antitümör hedefidir (Dillon ve ark., 2018; Sundar ve ark., 2017). ATR ve ATM, oksidatif stres tarafından indüklenen DNA hasarı üzerine aktive edilir ve bunlar, DNA onarım yollarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Yan ve ark., 2014). Protoflavonların kendileri zaten bu iki farmakolojik özelliğe katılırken, bu çalışmada bir protoflavonun (yani

ATR inhibitörü ve oksidatif stres indükleyicisinin) hibrid bileşiklerini ve oksidatif stresi indükleyebilen başka bir fragmanı hazırlayarak bu seçeneği daha fazla kullanmayı amaçladık. Bu amaçla, bir ferrosen ve üç trisübstitüe edilmiş kalkon seçildi; bu grupların her ikisi de redoks homeostazisini etkileyen antitümör ajanların ümit verici yapı taşları olarak hizmet edebilir (Patra ve Gasser, 2017; Santos ve ark., 2019). Bu nedenle amacımız, bu gibi potansiyel bir oksidan fragmanlarının eklenmesinin, bir protoflavonun antitümör aktivitesini daha da arttırıp arttırmadığını araştırmaktır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. DOĞAL BİLEŞİKLERİN ELDESİ VE HAZIRLANMASI

JT-161, JT-399, JT-400 ve JT-401 yeni protoflavon bazlı hibrid bileşikler; Attila Hunyadi (University of Szeged; Szeged, Macaristan) ve Antal Csampai (Eötvös Loránd University, Budapeşte, Macaristan) tarafından sentezlenmiştir.

Tablo 2. Protoflavon hibrid bileşikler ve moleküler ağırlıkları

Bileşikler	Moleküler Ağırlıkları
JT-161	681 g/mol
JT-399	618 g/mol
JT-400	664 g/mol
JT-401	618 g/mol

Tablo 2'de moleküler ağırlıkları ile birlikte verilen bileşikler, ana stokları 10mM olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlandı.

3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ

3.2.1. Hücre Hatları

Hücre hatları bilimsel çalışmalar için değerli kaynaklardır. Bu tez çalışmasında MCF-7 hücre hattı ERα -pozitif meme kanseri için temsili model olarak ve MDA-MB-231 hücre hattı üçlü negatif meme kanseri (TNBC) için model olarak kullanılmıştır, her iki hücre hattı da epitelyal fenotipe sahiptir. Hücre hatları sonsuz bir şekilde kültürlenebilir ve kolayca büyütülebilir; genotipik veya fenotipik olarak manipüle edilebilir. MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarına Belgrad Üniversitesi (Belgrad, Sırbistan), Nörobiyoloji Bölümü Başkanı Prof. Dr. Milica Pesic'ten temin edilmiştir.

3.2.2. Besiyerinin Hazırlanması

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattı, içerisinde %1 L-glutamin, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin bulunan DULBECCO´s MEM (DMEM) besiyeri ortamı kullanılarak kültüre edildi.

3.2.3. Hücre Hatlarının Stoktan Çıkarılması

Hücreleri çoğaltmak amacıyla -196° C'den çıkarılan kriyovialler 37° C'de sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Hücre süspansiyonu içerisinde 4 ml besiyeri bulunan 25 cm^2'lik flasklara alındı. Hücreler, 37° C'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Dondurma besiyerinde bulunan DMSO'yu ortamdan uzaklaştırmak için 24 saat sonra hücreler flask yüzeyine yapıştıktan sonra besiyeri değiştirildi ve hücreler 37° C'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı.

3.2.4. Hücre Hatlarının Pasajlanması

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri, flask yüzeyini %70-80 kapladığında (konfluent olduklarında) pasaj işlemi gerçekleştirildi. Öncelikle, flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X PBS (2 ml) ile hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. Bu yıkama işlemi ortam pH'ının düzenlenmesi ve ölü hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması için gerçekleştirildi. Flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları, enzimatik olarak 1,5 ml %0,25 Tripsin-EDTA ile muamele sonrası (37° C'de, %5 CO_2'li ortamda 3-4 dakika) sağlandı. Hücreler flask yüzeyinden ayrıldıktan sonra enzimin inhibisyonunu sağlamak amacıyla enzim ile aynı hacimde 1,5 ml besiyeri ile sulandırıldı ve 2000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda, süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 1 ml besiyeri ile süspanse hale getirilerek içerisinde 9 ml besiyeri bulunan 75 cm^2'lik flasklarda, 37° C'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı.

3.2.5. Hücre Hatlarının Stoklanması

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri konfluent duruma geldiklerinde, flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak hücreler 1X PBS (3-4 ml) yıkandı ve yukarıda belirtilen pasaj işlemi basamakları ile hücrelerin yüzeyden kalkması sağlandı. Santrifüj aşamasından sonra hücre peleti üzerine her bir kriyovial için yaklaşık olarak $2\text{-}3\times10^6$ hücreye karşılık gelecek şekilde ışığa hassas olan dondurucu besiyeri (% 10 DMSO içeren DMEM besiyeri) ilave edildi ve kriyovialler önce +4° C'de yarım saat bekletildi, ardından -20° C'de 2 saat bekletildikten sonra; -80° C'de gece boyu bekletildi. Ertesi gün hücreler -196° C'ye konuldu. Bu şekilde hücrelerin yavaş dondurulması gerçekleştirildi.

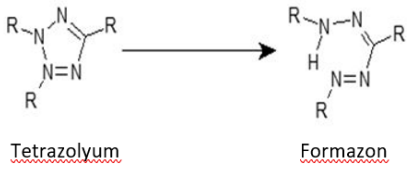
3.2.6. Hemositometre İle Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımı için; tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi eklendi ve homojen şekilde karışmaları sağlandı. Bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamı üzerinde beş farklı alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı, sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerinde bulunan hücre sayısı belirlendi.

3.2.7. MTT (Metiltiazotetrazolyum) Canlılık Testi

MTT metodu, ilk kez Mosmann ve ark. tarafından 1983 yılında belirlenmiştir. Hücre kültüründe büyütülen hücrelerdeki mitokondriyel dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Mossman 1983). Bu enzim aktivitesi canlı hücrelerde gözlenirken, ölü hücrelerde gözlenmemektedir. Ölü hücrelerde enzim aktivitesinin azaldığı veya kaybolduğu görülmektedir. Bu nedenle hücreler mitokondriyel dehidrogenaz enziminin değişime uğrattığı MTT maddesine (tetrazolyum (3-(4,5-dimetiltiyazol -2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) maruz bırakılırlar. MTT, sarı renkli suda çözünebilen tetrazolyum tuzu olup canlı hücreler tarafından alınır ve mitokondriyel süksinat dehidrogenaz enzimleri tarafından suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür (Şekil 3).

MTT, pozitif yüklü bir bileşik olup, ökaryot hücrelerin membranını kolaylıkla geçerek hücre içinde indirgenebilir ancak indirgenme sonucu oluşan formazan, suda çözünmez niteliktedir ve dolayısıyla kuyuda kristal şeklinde çökelmektedir. Sitotoksik bileşiklerin hücrelere zarar vermesi MTT tetrazolyumun formazana indirgenmesini azaltmaktadır. Sonuçta; canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mavi-mor renkte boyanmakta, ölü veya mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır. Daha sonra oluşan bu formazan kristalleri SDS (%10 sodyum dodesil sülfat + steril distile su + 0,01 N HCl) kullanılarak suda çözünür hale getirilir ve oluşturdukları renk şiddeti spektrofotometre ile ölçülür. Sonuç olarak bu deneyde; başlangıçta aynı sayıda ekilmiş ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerindeki renk şiddeti ile ilaca maruz bırakılmış hücrelerdeki renk şiddeti oranlanarak ilaca maruz bırakılmış hücrelerdeki canlılık oranı (yüzdesi) hesaplanmış olur.



Şekil 5. MTT tepkimesi

MTT ile yapılan canlılık testleri, üç aşamadan oluşmaktadır: Canlılık testinin ilk aşamasında hücreler belirli süre ile ilaç/bileşiğe maruz bırakılırlar. İkinci aşamada ortamdan uygulanan ilaç/bileşik uzaklaştırılarak tetrazolyum bileşiği eklenir ve ortalama 1-4 saat boyunca inkübe edilir. Bu inkübasyon sürecinde canlı hücreler ilgili bileşikleri indirgeyip formazana dönüştürürek renk değişimi gerçekleşir. Son aşamada ise renk değişimi spektrofotometrik olarak ölçülerek canlı/ölü hücre sayısı belirlenir (Mossman, 1983; Riss ve Moravec, 2004). Ölçüm sonucu oluşan sinyal miktarı, tetrazolyum tuzu konsantrasyonu, hücre tipi, canlı hücre sayısı ve metabolik kapasitesi gibi parametrelerle doğrudan ilişkilidir (Denizot ve Lang, 1986).

Çalışma için; hücrelerin hemositometre ile sayımı yapıldıktan sonra 100 µl besiyeri içerisinde MCF-7 hücre hattı için 2×10^3 ve MDA-MB-231 hücre hattı için 5×10^3 hücre olacak şekilde hazırlandı ve 96 kuyulu hücre kültür kaplarına ekim yapıldı. 24 saat geçtikten sonra, JT-161, JT-399, JT-400 ve JT-401 bileşiklerine 50, 100, 250, 500 ve 1000 nM dozlarında 72 saat süreyle maruz bırakıldı.

Tedavi süresinin sonunda, 8 ml besiyeri içine 2 ml MTT (1mg/ml) solüsyonunda eklendi. Her kuyuya 100 µl hazırlanan MTT solüsyonundan eklendi ve 37° C, %5 CO_2'li inkübatörde 4 saat inkübe edildi. Elde edilen formazon ürününe 200 µl dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek çözdürüldü. Mikroplate okuyucuda 540 nm'de okundu.

3.3. HÜCRE ÖLÜMÜNÜN BELİRLENMESİ

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür

hale getirilebilir. FITC-Anneksin-V komplesinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür (PI) eklenmektedir. Annexin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya olan propidium iodide (red fluorescence) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (FITCPI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine izin verir.

Bu ayrımı sağlamak amacıyla hücreler FITC-Anneksin V ve PI ile muamele edilerek fosfatidilserine bağlanma oranları flow sitometri ile tespit edilmiştir.

Çalışma için; hücreler tripsinizasyon işlemi sonucunda hemositometre ile sayımı yapıldıktan sonra; 6 kuyulu hücre ekim kaplarına kuyu başına MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattı için $1x10^5$ hücre olacak şekilde 1 ml besiyerinde ekimi yapıldı. Hücre ekimi gerçekleştirildikten sonra, hücrelerin kültür kaplarına yapışması için 24 saat 37° C, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. 24 saat geçtikten sonra, JT-161, JT-399, JT-400 ve JT-401 bileşiklerine 500 nM dozuna 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakıldı. Tedavi sürecinin sonunda ölü ve canlı hücreler toplanarak 2000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 1X PBS ile 1 kez yıkandı. Yıkama yapıldıktan sonra pelletin üzerine hazırlanan Anneksin V-PI solüsyonundan (1 µl Annexin V-FITC+ 1 µl PI+100 µl Buffer A) 100 µl eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 900 µl PBS eklendikten sonra örnekler CyFlow Space flow sitometresinde (Partec, Münster, Almanya) analiz edildi. Her örnekte 20,000 hücre tespit edildi; (AV-PI-), erken apoptotik (AV + PI-), geç apoptotik (AV + PI +) ve nekrotik (AV-PI +) hücrelerin yüzdeleri analiz edildi. Hücreler Summit yazılımı (Dako Colorado Inc., ABD) ile analiz edildi. İstatistiksel analiz için, Dunnett'in çoklu karşılaştırma testine sahip iki yönlü ANOVA, GraphPad Prism 6.0 yazılımı kullanılarak uygulandı. Farklılıklar, $p \leq 0.05$ olduğunda tedavi edilmeyen kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.4. DNA KIRIKLARININ BELİRLENMESİ

DNA molekülü sürekli olarak genotoksik strese yol açan çeşitli faktörlerin etkisi altındadır. DNA zincir kırıklarının oluşumasına neden olan endojen ve ekzojen kaynaklı pek çok fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler bulunmaktadır. DNA çift zincir kırıkları, hücrenin yaşamı boyunca sürekli olarak ortaya çıkabilen en tehlikeli hasarlardandır. Bu hasarların onarılması hücrenin sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için

önemlidir. Hasar tamir edilemediğinde; genomik kararsızlık, kanser gelişimi ve neoplastik transformasyona yol açan mutasyonların oluşumuna neden olabilmektedir (Podhorecka ve ark. 2010).

DNA tamirinin gerçekleştiği kromatinlerin yapısal ve işlevsel birimleri nükleozomlardır, her nükleozom 147 baz çiftinden oluşan DNA zinciri ve bu zincirin etrafında sarıldığı dört çekirdek histonundan her birinin iki kopyasından oluşur. H2A, H2B, H3 ve H4; nükleozom yapısını oluşturan dört çekirdek histon ailesidir. H2A histon protein ailesinin de H2A1, H2A2, H2AX ve H2AZ gibi varyantları bulunmaktadır. H2AX proteini önemli bir H2A tipidir ve hücre ve doku tipine bağlı olarak memeli H2A histon havuzunun %2-25'lik bir bölümünü oluşturur. **K**arboksil kuyruk kısmında korunmuş özel bir diziye sahip olduğu için H2AX proteini, ökaryotlarda önemli ölçüde korunmuş olan bir H2A histon tipidir. Diğer H2A histon ailesi üyeleri gibi, H2AX de fosforilasyon, asetilasyon ve ubikuitinasyona uğrayarak pek çok hücresel olayın düzenlenmesini sağlar. Hasarlı bölgelerde görev alan bu histon tipi, DNA hasar tamiri sürecinde anahtar bir rol oynadığı için, 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). H2AX, DNA hasarına yanıttan sorumlu sinyal yolağında görev almaktadır. Fosforile olmuş H2AX, gammaH2AX (γH2AX) adını alır ve DNA çift zincir kırıkları oluştuğunda görülebilir nükleer odaklar oluşturur. Histon H2A.X'in Ser 139 fosforilasyonu (γH2A.X), DNA hasarında önemli bir belirteçtir. DNA hasar düzeyi arttıkça, γH2A.X düzeyleri de artarak hasarlı bölgede birikmektedir. γH2A.X birikimi ise hücrelerdeki DNA hasar düzeyini belirlemede kullanılmaktadır. Bu yöntemin prensibi, Histon H2A.X'in total (Phospho-Histone H2A.X (Ser139)) ve fosforlanmış (Anti-Rabbit IgG (H+L), F(ab')2 Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) düzeylerini belirlemeye olanak veren iki farklı antikorun kullanımıyla total H2A.X ifadesine göre γH2A.X'in ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Çalışma için; 6 kuyulu hücre ekim kaplarına kuyu başına MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattı için $1x10^5$ hücre olacak şekilde 1 ml besiyerinde ekimi yapıldı. 24 saat geçtikten sonra, JT-161, JT-399, JT-400 ve JT-401 bileşiklerine 500 nM dozuna 24 saat süreyle maruz bırakıldı. Tedavi süresinin sonunda sadece canlı hücreler toplandı, 1 kez 1X PBS ile yıkama yapıldı. Hücreleri fikse etmek için pelletin üzerine 500 µl %4 paraformaldehit (PFA) eklendi ve hücreler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin üzerine 4.5 ml %100 metanol eklendi ve gece boyu -20° C'de inkübe edildi. Ertesi

gün; 2000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelere 1 ml %0,5 bovine serum albümin (BSA) eklendi ve vorteks yapıldı. 2000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine Phospho-Histone H2A.X primer antikor ve BSA (1:1000) 100 µl eklenerek, karanlıkta ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda; 1 ml BSA eklendi, vorteks yapıldı ve 2000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Pelletin üzerine Anti-Rabbit IgG (H+L), F(ab')2 Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) sekonder antikor ve BSA (1:1000) 100 µl eklenerek, karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda 1 ml 1X PSB ile yıkama yapıldı, 2000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra pelletin üzerine 1 ml 1X PBS eklendi. Örnekler CyFlow Space flow sitometresinde (Partec, Münster, Almanya) analiz edildi. Her örnek için en az 20.000 hücre toplanmış ve test edilmiştir.

3.5. OKSİDATİF STRES PARAMETRESİNİN BELİRLENMESİ

Organizmada serbest radikaller hem endojen hem de eksojen kaynaklı olabilir, hücrede ve çevrede sürekli olarak üretilir (Sen ve ark., 2010). Serbest radikaller oksijen ve nitrojen kaynaklı olabilir; oksijen kaynaklı serbest radikaller reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrojen kaynaklı olanlar reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak isimlendirilir (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Valko ve ark., 2007).

ROS (Reaktif oksijen türleri) normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH•)'dir. ROS, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. RNS (Reaktif nitrojen türleri); nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve nitrojen dioksit ($NO2^{\cdot}$) oluşturur. ROS ve RNS diğer nonradikal reaktif türlere kolay bir şekilde dönüşebilir. Hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen ($^1O_2$), hipokloröz asit (HOCl), nitrik asit (HNO_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve lipit peroksit (LOOH) ise oksidan olarak adlandırılırlar ve serbest radikaller arasında gösterilmezler. Bu oksidan türleri patolojik ve fizyolojik durumlar altında canlılar tarafından üretilir ve canlı organizmada kolaylıkla serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilirler (Fang ve ark., 2002; Pham-Huy ve ark., 2008; Valko ve ark., 2007).

Hücre içi organellerin membranlarında bulunan lipitler, serbest radikal hasarına karşı oldukça hassastır. Serbest radikaller, lipitler ile reaksiyona girdiğinde gerçekleşen lipit peroksidasyonu yüksek derecede zararlı etkilerine yol açabilir; hücrenin fonksiyonu için son derece zararlıdır. Hücre membranının, akışkanlığını ve geçirgenliğini bozarak hücre

membranına zarar verebilir. ROS ve RNS, DNA ile etkileşime geçerek oksidatif hasara yol açar. $OH^{\cdot}$ gibi serbest radikaller kolaylıkla DNA hasarına neden olabilir.

Meme kanseri hücrelerinde ROS ve RNS seviyelerini değerlendirmek için DHE (Dihidroethidyum, Life Technologies, D23107, ABD) ve DHR (Dihidrorodamin, Sigma-Aldrich, D1054, ABD) floresan boyaları kullanıldı. DHE floresansı, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit ile aktive edilir; hücre içi ROS seviyelerine karşılık gelir. DHR floresanı, peroksinitrit anyonlarıyla aktive edilir ve hücre içi RNS seviyelerine karşılık gelir.

Bu çalışma için; 6 kuyulu hücre ekim kaplarına kuyu başına MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattı için $1x10^5$ hücre olacak şekilde 1 ml besiyerinde ekimi yapıldı. 24 saat geçtikten sonra, JT-161, JT-399, JT-400 ve JT-401 bileşiklerine 1 µM dozuna 24 saat süreyle maruz bırakıldı. Tedavi süresinin sonunda; hücreler, tripsinizasyon ile toplandı ve karanlıkta 37 ° C'de 30 dakika boyunca 5 µM DHE ve DHR ile ortama yerleştirildi. Daha sonra hücreler, iki kez 1X PBS içerisinde yıkandı. 2000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra pelletin üzerine 1ml, 1X PBS eklendi. Örnekler CyFlow Space flow sitometresinde (Partec, Münster, Almanya) analiz edildi. Her örnek için en az 20.000 hücre toplanmış ve test edilmiştir.

3.6. BCRP EKSPREYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı ailesi, ekstra ve hücre içi membranlar boyunca çok çeşitli substratların (metabolik ürünler, ilaçlar, toksinler, endojen lipitler, peptitler, nükleotitler ve steroller dahil) geçişini sağlayan membran proteinlerini içerir. Bugüne kadar, çeşitli memeli dokularında sınıflandırılmış, lokalize edilmiş ve fonksiyonel olarak değerlendirilmiş 49 insan ABC taşıyıcısı bulunmuştur (Schinkel ve Jonker, 2003). ABC ailesinin ilaç akışı taşıyıcıları, aktif enerjiye bağlı bir mekanizma yoluyla hücreden dışarı pompalayarak hücre içi substrat ajan konsantrasyonunu sınırlayan zarara gömülmüş proteinlerdir. Bu proteinlerin birçoğu, çoklu ilaca direnç (MDR) fenomeni ile ilişkilendirilmiştir. Şimdiye kadar bilinen ABC ilaç akışı taşıyıcıları arasında; P-glikoproteini (ABCB1, MDR1), çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 1'i (MRP1, ABCC1) ve meme kanseri ilaç direnç proteini (BCRP, ABCG2, MXR, ABCP) ile ilişkili proteinlerdir. BCRP; ABCG gen alt ailesine aittir. BCRP geniş ve yüksek kapasiteli bir akış pompasıdır (Staud ve Petr, 2005)

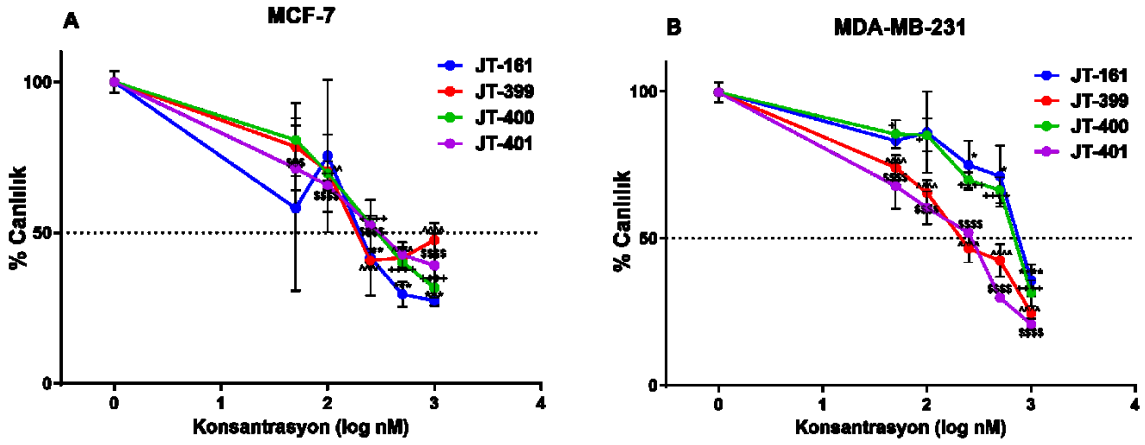
Bu çalışma için; 6 kuyulu hücre ekim kaplarına kuyu başına MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattı için $1x10^5$ hücre olacak şekilde 1 ml besiyerinde ekimi yapıldı. 24 saat geçtikten sonra, JT-161, JT-399, JT-400 ve JT-401 bileşiklerine 500 nM ve 30 nM PTX ile 72 saat

maruz bırakıldı. Tedavi süresinin sonunda; hücreler, tripsinizasyon ile toplandıktan sonra bir PBS ile yıkandı. Pelletin üzerine 2 µl PE Mouse Anti-Human CD338 (BD Biosciences, San Diego, ABD) BCRP antikorundan eklendi ve vorteks yapıldı. Antikorda; karanlıkta, oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 2 kez PBS ile yıkama yapıldı. 2000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra pelletin üzerine 1ml, 1X PBS eklendi. Örnekler CyFlow Space flow sitometresinde (Partec, Münster, Almanya) analiz edildi. Her örnek için en az 20.000 hücre toplanmış ve test edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MTT CANLILIK TESTİ BULGULARI

Protoflavon bazlı hibrid bileşiklerin farklı konsantrasyonlarının (50, 100, 250, 500 ve 1000 nM) MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkisini belirleyebilmek için MTT testi kullanıldı. 72 saat süre ile bileşiklerin uygulanmasını takiben her hücre canlılığının doza bağlı olarak anlamlı şekilde azaldığı gösterildi (Şekil 6). Kontrol hücrelerine kıyasla JT bileşikleri ile muamele sonrası hücrelerin %50 (IC50) ve %90'ını (IC90) öldüren konsantrasyonlar hesaplandığında, MCF-7 için en etkili bileşik JT-161; MDA-MB-231 için ise JT-401'dir (Tablo 3).



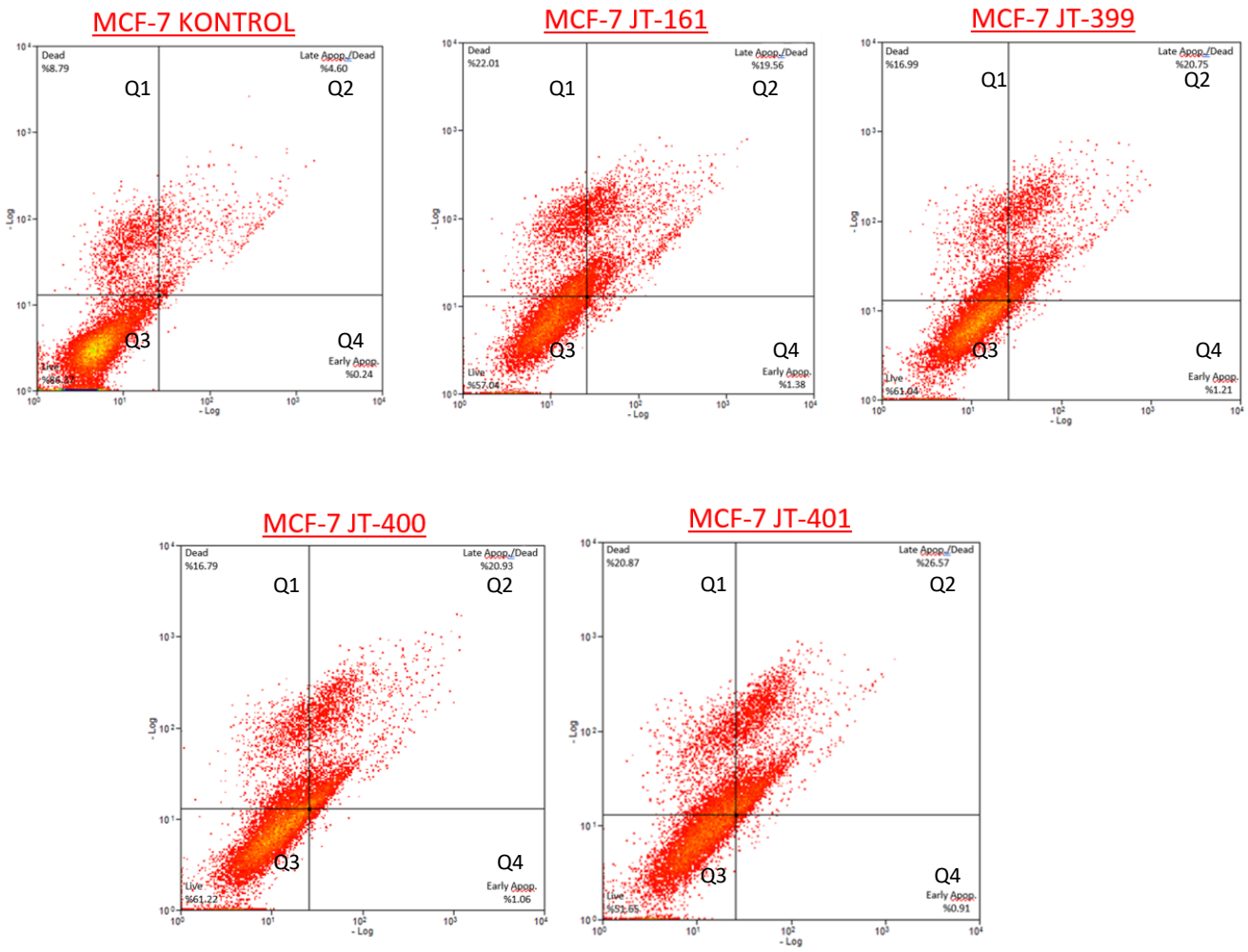
Şekil 6. (A) MCF-7 ve **(B)** MDA-MB-231 hücrelerinde JT bileşiklerinin uygulaması sonrası hücre canlılığının doza bağlı olarak değişimi. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$) ifade etmektedir. (JT-161 *, JT-399 ^, JT-400 +, JT-401 $)

Tablo 3. MCF-7 ve MDA-MB-231'in JT bileşikleri ile muamele sonrası IC_{50} değerleri

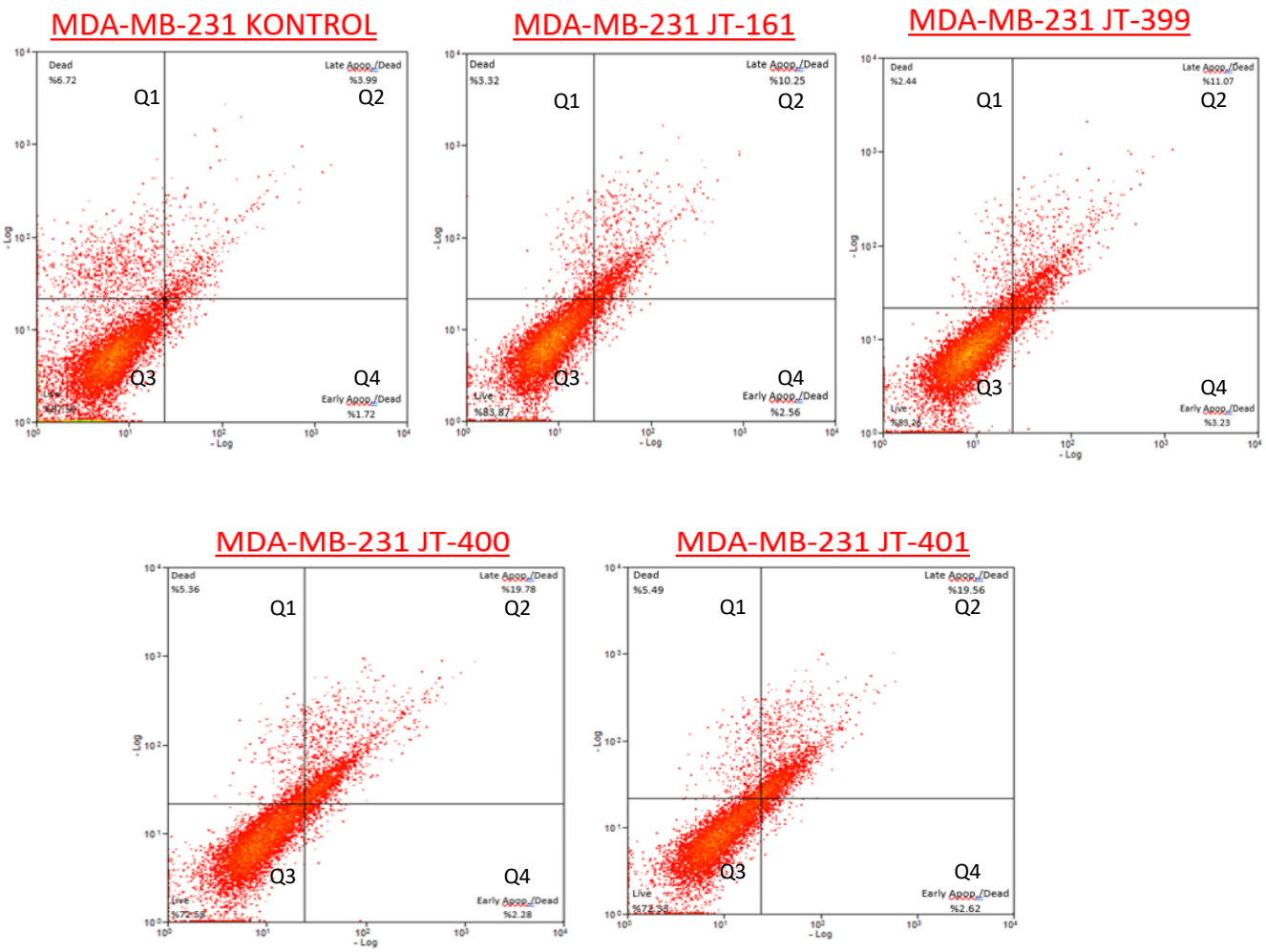
	IC_{50} (µM)			
	JT-161	JT-399	JT-400	JT-401
MCF-7	0.1948	0.3038	0.3029	0.3023
MDA-MB-231	0.7544	0.2425	0.6289	0.1926

4.2. HÜCRE ÖLÜM DETEKSİYONUN BULGULARI

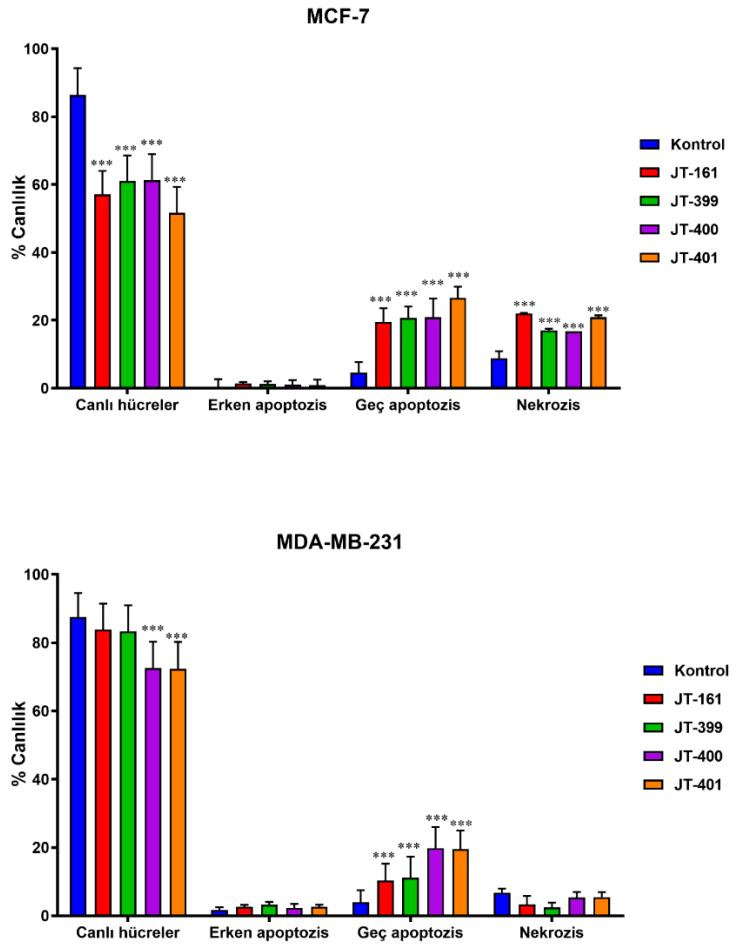
Apoptotik hücre ölüm mekanizmasının akım sitometrisinde Anneksin-V değerlendirilmesi sonucunda; protoflavon bazlı hibrid bileşiklerden JT-161, JT-399, JT-400 ve JT-401'in MCF-7 hücre hattında 72 saatlik tedavi sonrasında apoptotik oranı (Q2+Q4) sırasıyla %20.94, %21.96, %21.99 ve %27.48'dir. MDA-MB-231 hücre hattında ise JT-161, JT-399, JT-400 ve JT-401'in 72 saat tedavi sonrasında apoptotik oranı (Q2+Q4) sırasıyla %12.81, %14.3, %22.06 ve 22.18'dir. Her iki hücre hattındaki tüm tedavilerden sonra önemli apoptozis indüksiyonu (*** $p \leq 0.001$) gözlenirken, ikincil nekrozisdeki (*** $p \leq 0.001$) belirgin artış sadece MCF-7 hücrelerinde mevcuttur. MCF-7 hücre hattında tüm bileşiklerin uygulanmasından sonra hücrelerin canlılığı önemli ölçüde azaldı (*** $p < 0.001$), MDA-MB-231 hücre hattında ise sadece JT-400 ve JT-401 canlılığını azalttı (Şekil 8).



Şekil 7. MCF-7 hücrelerinin, protoflavon bazlı hibrid bileşikleri ile 500 nM dozunda Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları (Q1= Nekrozis, Q2= Geç Apoptozis, Q3= % Canlılık, Q4= Erken Apoptozis)



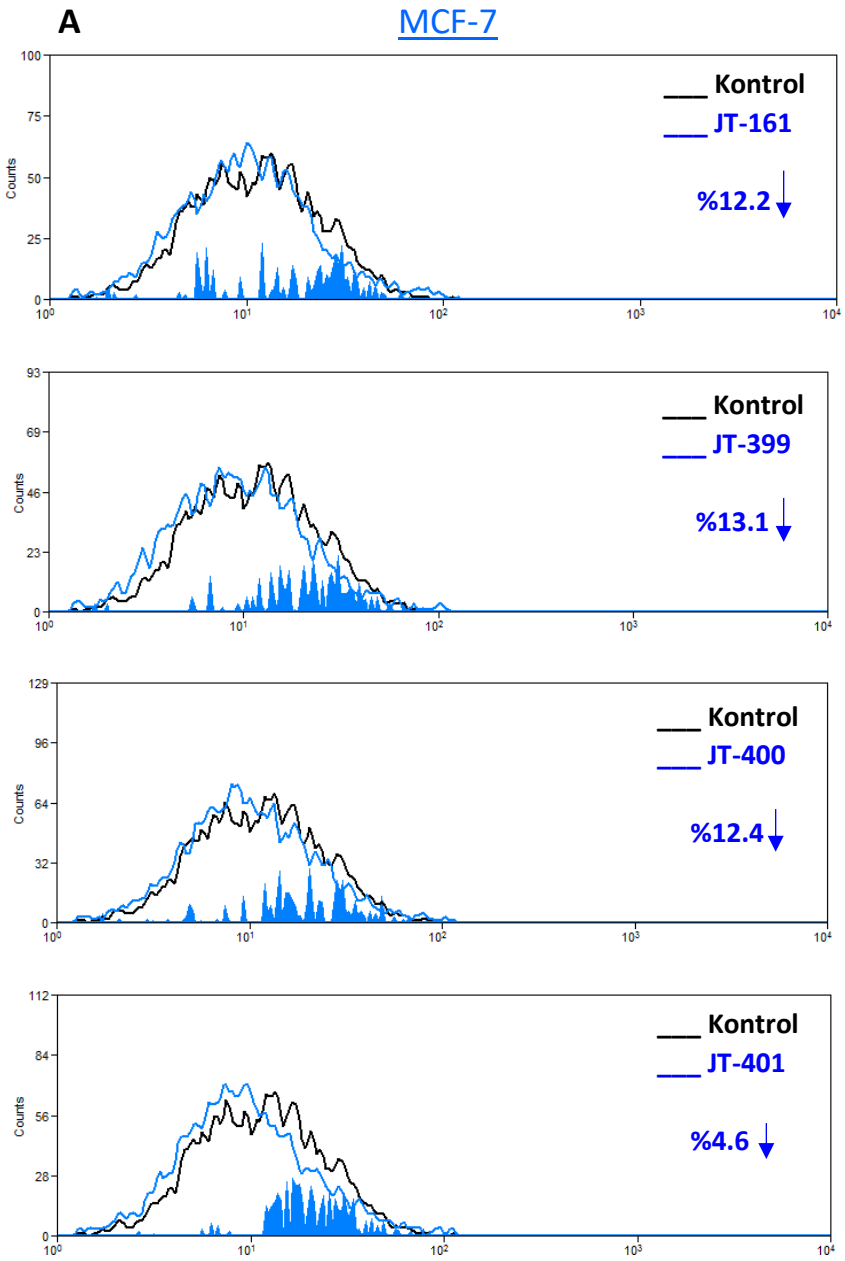
Şekil 8. MDA-MB-231 hücrelerinin, protoflavon bazlı hibrid bileşikleri ile 500 nM dozunda Anneksin-V değerlendirmesi ile elde edilen apoptotik yüzde değerlerinin 72 saatlik histogramları (Q1= Nekrozis, Q2= Geç Apoptozis, Q3= % Canlılık, Q4= Erken Apoptozis)



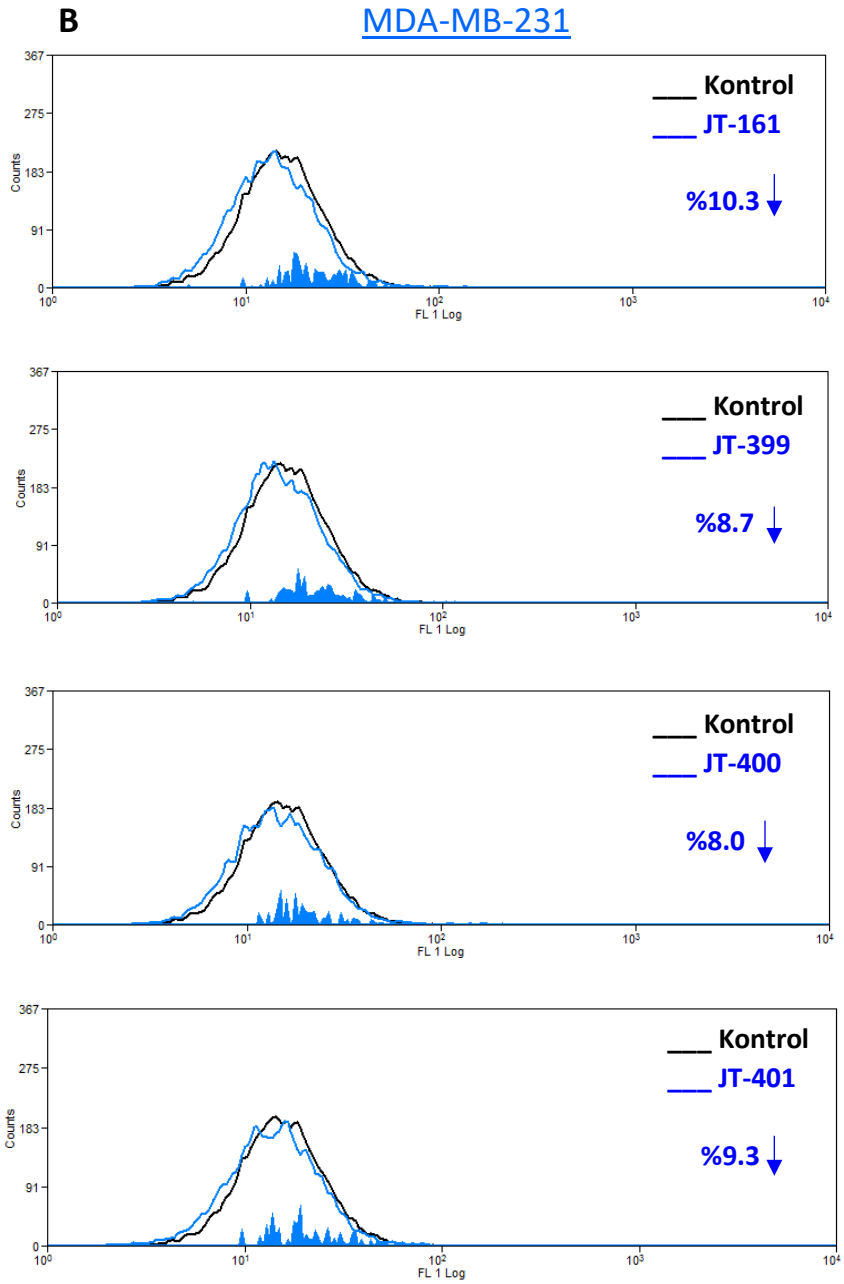
Şekil 9. Protoflavon bazlı hibrid bileşikler ile hücre ölümü indüksiyonu. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri, her bileşiğin 500 nM'si ile muamele edildi.

4.3. DNA HASARININ BULGULARI

γH2AX'nin ekspresyonu DNA çift zincir kırıklarının tespitinde hassas bir belirteçdir. Akım sitometrisinde p-γH2AX'nin değerlendirilmesi sonucu 24 saat sonra protoflavon bazlı hibrid bileşiklerin JT-161, JT-399, JT-400 ve JT-401 500 nM dozunda, kontrole kıyasla MCF-7 hücrelerinde sırasıyla DNA hasarını %12.2, %13.1, %12.3 ve %14.6 oranında azalttığı bulundu. Potoflavon bazlı hibrid bileşiklerin JT-161, JT-399, JT-400 ve JT-401, kontrole kıyasla MDA-MB-231 hücrelerinde ise sırasıyla DNA hasarını %10.3, %8.7, %8.0 ve %9.3 oranında azalttığı kaydedildi. Sonuç olarak protoflavon bazlı hibrid bileşiklerin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde DNA hasarına neden olmadığı, bu bileşiklerin DNA koruyucu etkisi olduğu bulundu.



Şekil 10. Protoflavon hibrid bileşiklerin (500 nM) ile 24 saat tedavi sonrasında, (A) MCF-7 kanseri hücrelerinde p-γH2AX grafiği.

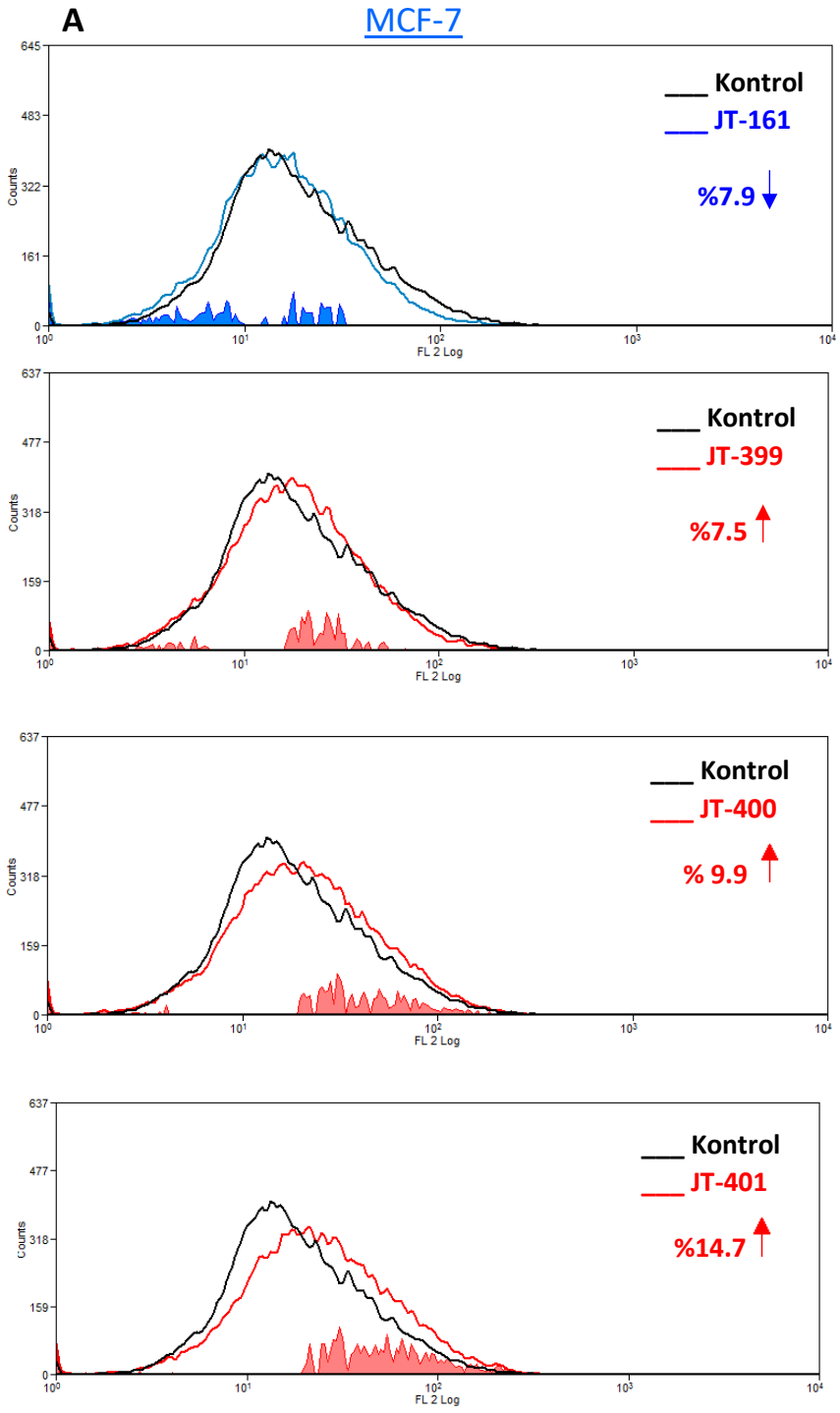


Şekil 11. Protoflavon hibrid bileşiklerin (500 nM) ile 24 saat tedavi sonrasında, (B) MDA-MB-231 kanseri hücrelerinde p-γH2AX grafiği.

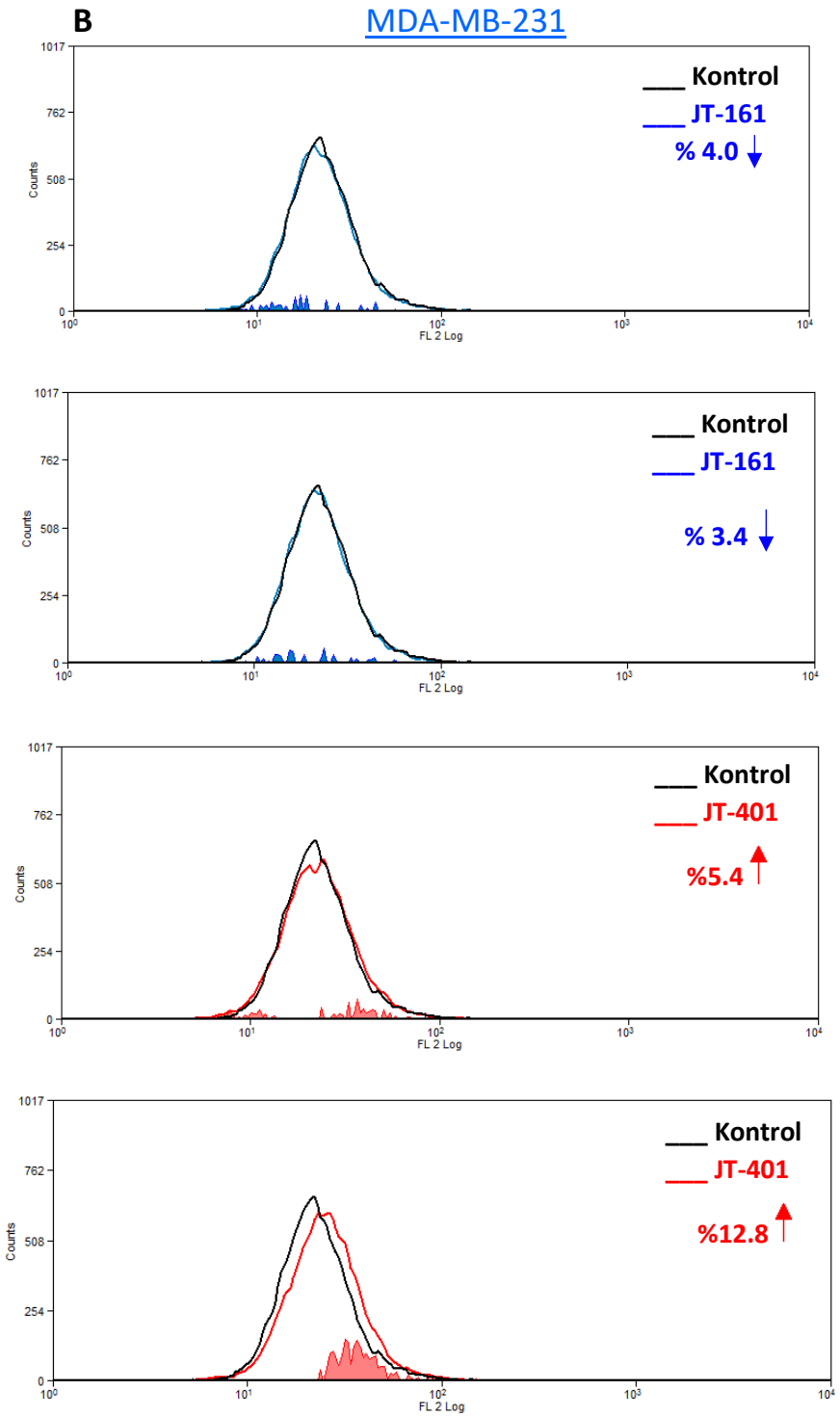
4.4. OKSİDATİF STRESİN (ROS/RNS) BULGULARI

DNA hasarının ROS/RNS kaynaklı olup olmadığını belirlemek için akım sitometrisinde ROS/RNS miktarı incelendi. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri protoflavon bazlı hibrid bileşiklere 24 saat süreyle 500 nM dozunda maruz bırakıldı. ROS miktarında; MCF-7 hücrelerinde JT-161 bileşiğinde %7.9 azalma, JT-399 bileşiğinde %7.5 artma, JT-400

bileşiğinde %9.9 artma, %14.7 artma belirlendi (Şekil 12). MDA-MB-231 hücrelerinde ki ROS miktarında ise; JT-161 bileşiğinde %4.0 azalma, JT-399 bileşiğinde %3.4 azalma, JT-400 bileşiğinde %5.4 artma, %12.8 artma belirlendi (Şekil 13).



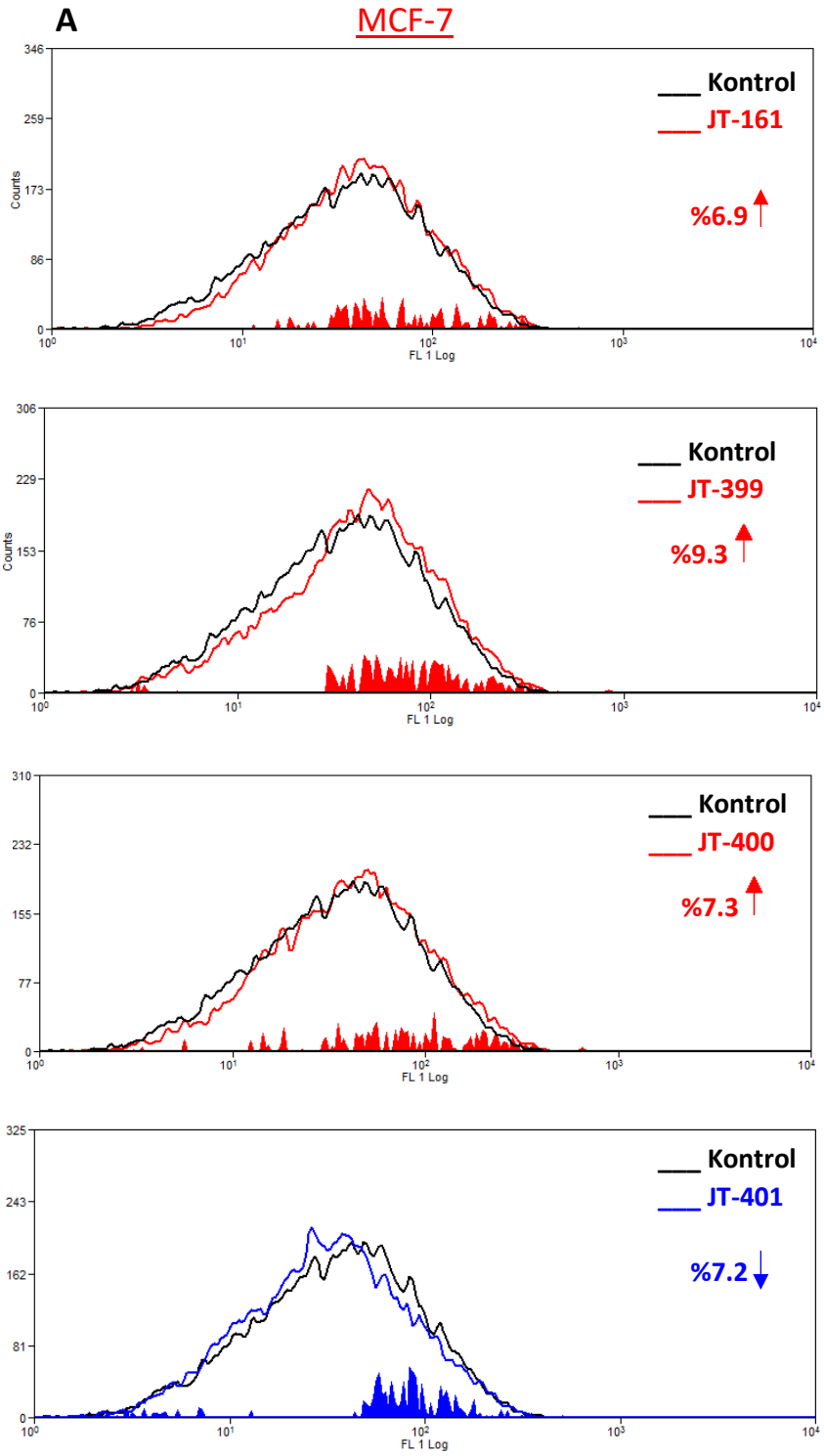
Şekil 12. Protoflavon hibrid bileşiklerin (500 nM) ile 24 saat tedavi sonrasında (A) MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ROS değişim oranlarına ait grafik.



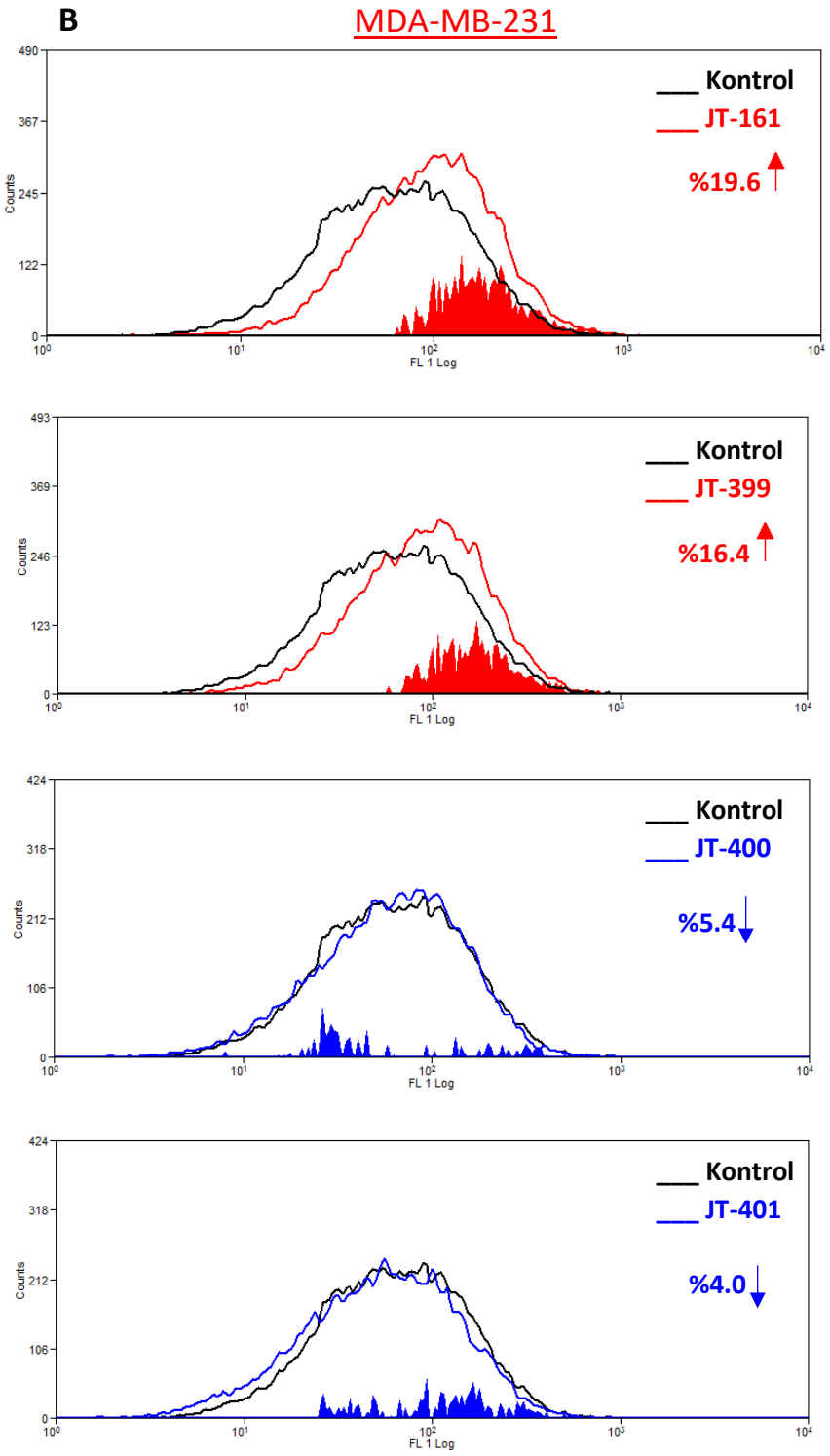
Şekil 13. Protoflavon hibrid bileşiklerin (500 nM) ile 24 saat tedavi sonrasında (B) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde ROS değişim oranlarına ait grafik.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri protoflavon bazlı hibrid bileşiklere 24 saat süreyle 500 nM dozunda maruz bırakıldı. RNS miktarında; MCF-7 hücrelerinde JT-161 bileşiğinde %6.9 artma, JT-399 bileşiğinde %9.3 artma, JT-400 bileşiğinde %7.3 artma, %7.2 azalma

belirlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde ki RNS miktarında ise; JT-161 bileşiğinde %19.6 artma, JT-399 bileşiğinde %16.4 artma, JT-400 bileşiğinde %5.4 azalma, %4.0 azalma belirlendi (Şekil 10).



Şekil 14. Protoflavon hibrid bileşiklerin (500 nM) ile 24 saat tedavi sonrasında (A) MCF-7 meme kanseri hücrelerinde RNS değişim oranlarına ait grafik.



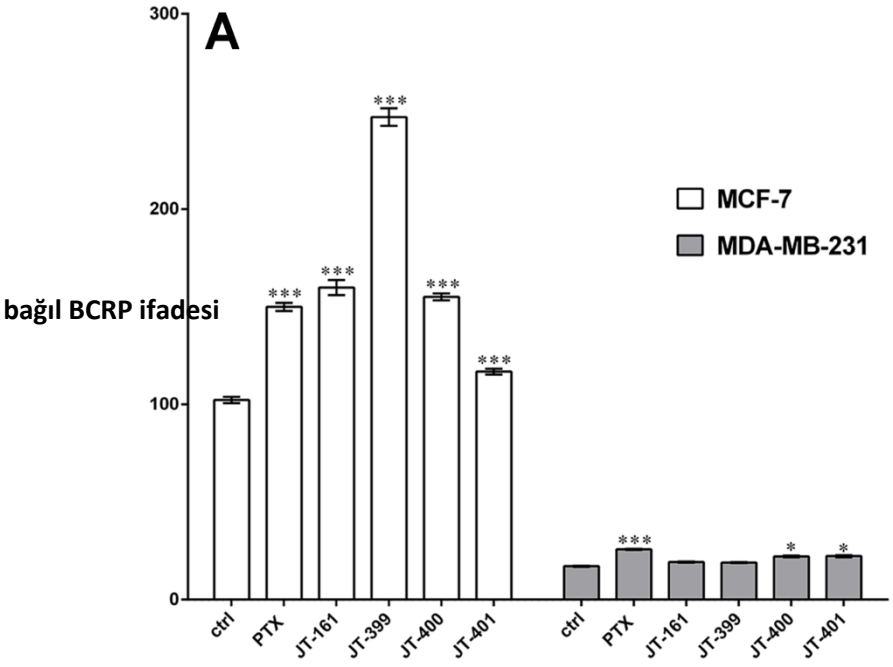
Şekil 15. Protoflavon hibrid bileşiklerin (500 nM) ile 24 saat tedavi sonrasında (B) MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde RNS değişim oranlarına ait grafik.

Elde edilen sonuçlar, antioksidan veya pro-oksidan aktivite gibi tek tip bir etki oluşumunu işaret etmese de, tüm bileşiklerin meme kanseri hücrelerinin redoks sistemine

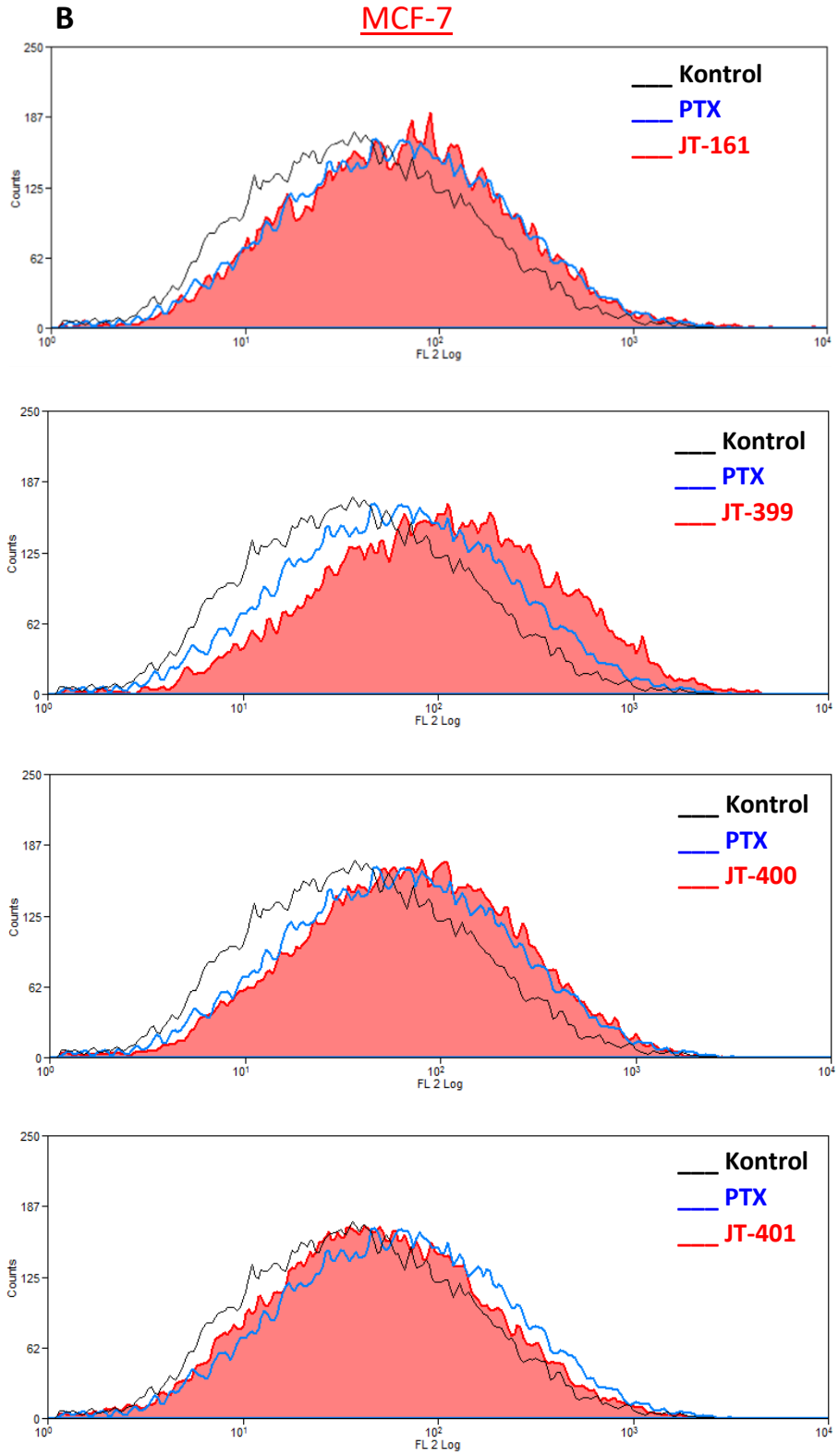
müdahale edebileceği açıktır. ROS seviyeleriyle ilgili olarak, JT-161, MCF-7 hücrelerinde süperoksit anyon seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır (*** $p \leq 0.001$). RNS seviyeleriyle ilgili olarak, JT-161, JT-399 ve JT-400, MCF-7 hücrelerinde RNS seviyelerini anlamlı şekilde arttırdı (*** $p \leq 0.001$). En belirgin etki, MDA-MB-231 hücrelerinde önemli bir oksidan aktivite sergileyen JT-161 ile gözlenmiştir (*** p-0.001).

4.5. BCRP Ekspresyon Seviyelerinin Bulguları

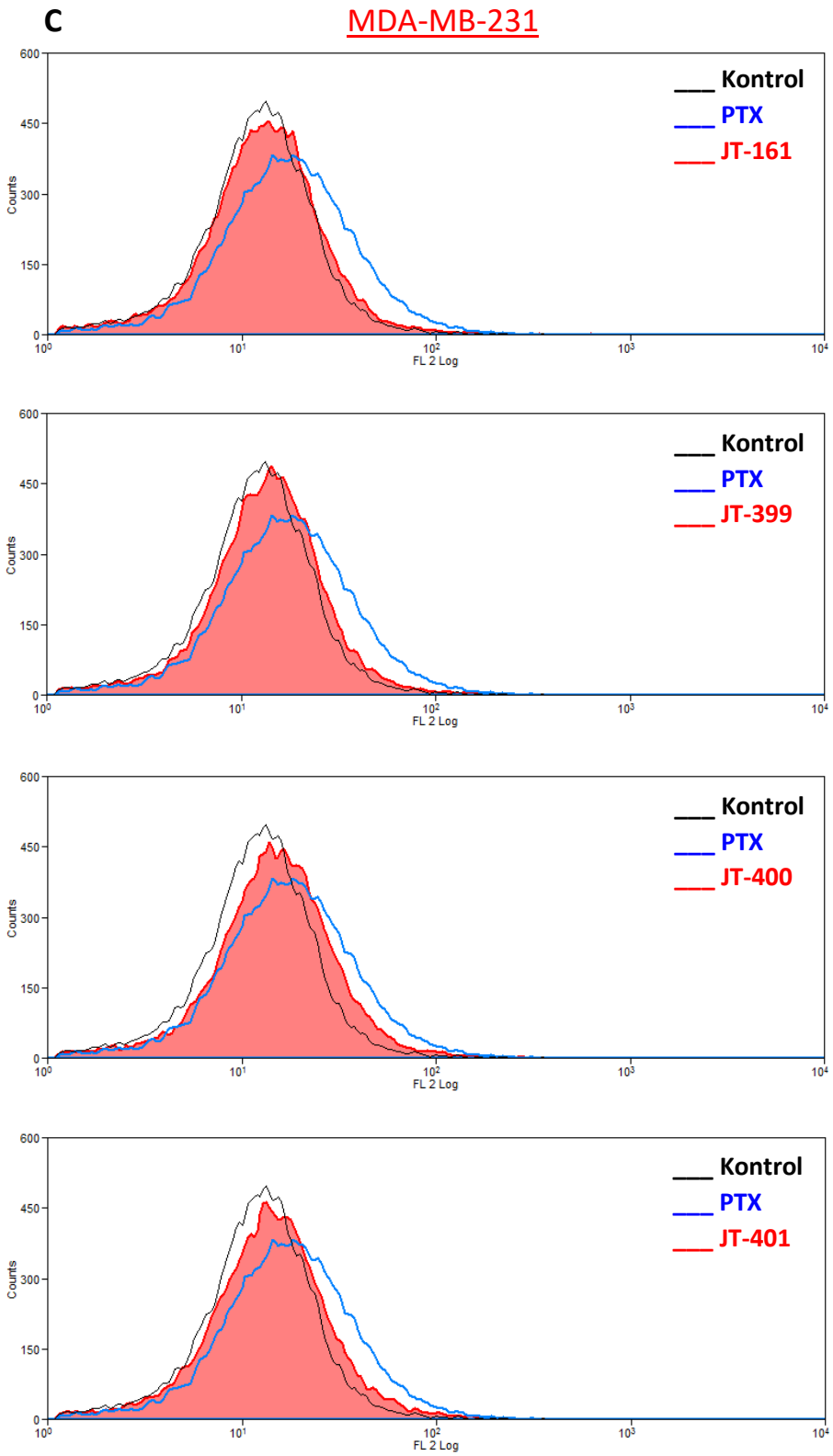
BCRP ekspresyonu MCF-7 hücreleri için karakteristiktir ve BCRP başlangıçta bu meme kanseri hücre hattında tanımlanmıştır. MDA-MB-231, 10 kattan daha düşük BCRP ifadesi gösterdi. Bununla birlikte, PTX, 72 saatlik tedaviden sonra her iki hücre hattında artışı indükleyebildi. Her ne kadar PTX BCRP için bir substrat olmasa da, önceki çalışmalar bu mikrotübül etkileşimli ajanın BCRP ifadesini artırabileceğini göstermiştir.



Şekil 16. Hibrid protoflavonların meme kanseri hücrelerinde BCRP ekspresyon düzeyi üzerine etkisi. **(A)** MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde akış sitometrisi ile değerlendirilen hibrid-protoflavonlar uygulamasından sonra nispi BCRP ifadesindeki değişiklikler



Şekil 17. Hibrid protoflavonların meme kanseri hücrelerinde BCRP ekspresyon düzeyi üzerine etkisi. **(B)** MCF-7 hücrelerinde hibrid protoflavon bileşikleri ve PTX tarafından indüklenen BCRP ifadesini gösteren histogramlar;



Şekil 18. Hibrid protoflavonların meme kanseri hücrelerinde BCRP ekspresyon düzeyi üzerine etkisi. **(C)** MDA-MB-231 hücrelerinde hibrid protoflavon bileşikleri ve PTX tarafından indüklenen BCRP ifadesini gösteren histogramlar.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya genelinde meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen kanser tipini oluşturmaktadır ve meme kanseri ile ilişkili ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır (DeSantis ve ark. 2013, Siegel ve ark. 2015). Günümüzde meme kanseri görülme sıklığına bakıldığında kanser tanısı koyulan her dört kadından biri meme kanseridir (Stewart ve ark. 2015). Kadınların yaşamları boyunca meme kanserine yakalanma ihtimalleri yaklaşık olarak % 12,5'dur (her 8 kadından biri) (American Cancer Society 2015). Bu oranların on yıl öncesiyle kıyaslaması yapıldığında neredeyse %50 daha az olduğu dikkate alınarak, bu şekilde devam ettiği sürece 2030 yılında bu rakamların ikiye katlanacağı öngörülmektedir. Sistemik kemoterapi yöntemleri çoğu başta başarı ile sonuçlansa da, tedaviye dirençli özel bir hücre alt grubunun tamamen elimine edilememesinden dolayı tedavi başarısız olmakta ve hastalık tekrar etmektedir (Chabner ve Roberts 2005, Li ve ark. 2008). Bu başarısız tedaviler neticesinde yeni ilaç adaylarının bulunması için çalışmalar yapılmaktadır.

Bu bilgiler doğrultusunda; bu tez çalışması kapsamında yeni sentez protoflavon hibrid bileşiklerin meme kanseri hücre hatları üzerine etkisi araştırılmıştır.

Protoflavon bazlı hibrid bileşiklerinin; MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki canlılıkları üzerindeki etkileri belirleyebilmek amacıyla MTT canlılık testi uygulandı. Bu MTT hücre canlılık testine göre, hücre hatlarındaki 50, 100, 250, 500 ve 1000 nM dozlarında canlılıkta doza bağlı olarak istatiksel açıdan anlamlı azalmalar belirlendi. Meme kanseri hücre hatlarında %50'sini öldüren değerler Tablo 3'de belirtilmiştir. %50 (IC50) ve %90'ını (IC90) öldüren konsantrasyonlara göre, MCF-7 için en etkili bileşik JT-161; MDA-MB-231 için ise JT-401 olarak belirlenmiştir. Literatürde yapılan diğer çalışmalarda ise; protoflavon türevlerinin etkinliği ve seçiciliği farklı hücre hatları arasında değişiklik göstermiştir. NCI-H460 (insan küçük hücreli akciğer kanseri), DLD1 (insan kolorektal karsinomu), U87 (insan gliomu), C6 (sıçan gliomu) ve MRC-5 (insan embriyonal bronş epiteli), HaCaT (normal insan keratinositleri) hücre hatları ile yapılan çalışmalarda nanomolar ve mikromolar düzeyinde güçlü sitotoksik etki bulunmuştur (Stankovic´ ve ark., 2015). Flavonoid türevleri ile yapılan anti-kanser aktivitesi üzerine yapılan bir diğer çalışmaya göre ise; üç kanser hücre hattı MCF-

7 (insan meme kanseri), HepG2 (insan hepatosellüler karsinomu) ve ES2 (insan fibroblast karsinomu)'de sırasıyla 24.948, 31.569 ve 6.923 µg/ml IC50 değeri belirlenmiştir (Batra ve Sharma, 2013, Liu ve ark., 2011).

Protoflavon bazlı hibrid bileşikleri tarafından tetiklenen hücre ölüm modunu belirlemek amacıyla apoptotik belirteçler araştırılmıştır. Akım sitometrisinde Anneksin-V değerlendirilmesi sonucunda; protoflavon bazlı hibrid bileşiklerden JT-161, JT-399, JT-400 ve JT-401'in MCF-7 hücre hattında 72 saatlik tedavi sonrasında apoptotik oranı (erken ve geç apoptozis) sırasıyla %20.94, %21.96, %21.99 ve %27.48'dir. MDA-MB-231 hücre hattında ise JT-161, JT-399, JT-400 ve JT-401'in 72 saat tedavi sonrasında apoptotik oranı (erken ve geç apoptozis) sırasıyla %12.81, %14.3, %22.06 ve 22.18'dir. Her iki hücre hattındaki tüm tedavilerden sonra önemli apoptozis indüksiyonu gözlenirken, ikincil nekrozisdeki belirgin artış sadece MCF-7 hücrelerinde mevcuttur. MCF-7 hücre hattında tüm bileşiklerin uygulanmasından sonra hücrelerin canlılığı önemli ölçüde azaldı, MDA-MB-231 hücre hattında ise sadece JT-400 ve JT-401 canlılığını azalttı. Yapılan çalışmalarda; flavonoid türevlerinin, SW480 (insan kolorektal karsinomu), HepG2 (insan hepatosellüler karsinomu), HeLa (insan epitelyal karsinomu) ve A549 (insan küçük hücreli akciğer kanseri) hücre hatlarında apoptozis indüksiyon aktivitesi üzerinde doza bağlı bir anti-proliferatif etkiye sahiptir. İncelenen dört insan kanserinin tedavisine yardımcı olma potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir (Wang ve Zhang, 2012).

DNA çift zincir kırıklarının tespiti için akım sitometrisinde p-γH2AX'nin değerlendirilmesi sonucu 24 saat sonra protoflavon bazlı hibrid bileşiklerine 500 nM dozunda maruz bırakıldığında kontrole kıyasla MCF-7 hücrelerinde sırasıyla DNA hasarını %12.2, %13.1, %12.3 ve %14.6 oranında azalttığı bulundu. MDA-MB-231 hücrelerinde ise sırasıyla DNA hasarını %10.3, %8.7, %8.0 ve %9.3 oranında azalttığı belirlendi. Bu bilgiler göz önüne alındığında bu bileşiklerin DNA çift kırıklarına sebep olmadığı aksine DNA koruyu etkisinin olduğu belirlenmiştir. Lösemik U937 hücrelerinde 22 flavonoidler ve ilgili bileşiklerin apoptotik aktivitesi, Monasterio ve ark. tarafından incelenmiştir. Flavonoidlerin, oligonükleozomal DNA parçalanması nedeniyle hücre canlılığının azalmasıyla belirlenen apoptotik hücre ölümünü indüklediğini bildirdiler (Monasterio ve ark., 2004).

Oksidatif stresin belirlemek amacıyla akım sitometrisinde ROS/RNS miktarı incelendi. Protoflavon bazlı hibrid bileşikler ile MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri 24 saat süreyle 500 nM dozunda maruz bırakıldı. ROS miktarında; MCF-7 hücrelerinde JT-161 bileşiğinde %7.9

azalma, JT-399 bileşiğinde %7.5 artma, JT-400 bileşiğinde %9.9 artma, %14.7 artma belirlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde ki ROS miktarında ise; JT-161 bileşiğinde %4.0 azalma, JT-399 bileşiğinde %3.4 azalma, JT-400 bileşiğinde %5.4 artma, %12.8 artma belirlendi. RNS miktarında; MCF-7 hücrelerinde JT-161 bileşiğinde %6.9 artma, JT-399 bileşiğinde %9.3 artma, JT-400 bileşiğinde %7.3 artma, %7.2 azalma belirlendi. MDA-MB-231 hücrelerinde ki RNS miktarında ise; JT-161 bileşiğinde %19.6 artma, JT-399 bileşiğinde %16.4 artma, JT-400 bileşiğinde %5.4 azalma, %4.0 azalma belirlendi. Stankovic´ ve ark. yaptığı çalışmada, U87 (insan gliomu) hücreleri flavonoid türevleri ile muamele edildiğinde ROS / RNS üretiminde saptanabilir bir değişiklik gözlenmedi, ancak her iki bileşik de U87-TxR (paklitaksel dirençli insan gliomu) hücrelerinde anlamlı şekilde arttı (Stankovic´ ve ark., 2015).

BCRP ekspresyonu MCF-7 hücreleri için karakteristiktir ve BCRP başlangıçta bu meme kanseri hücre hattında tanımlanmıştır. MDA-MB-231, 10 kattan daha düşük BCRP ifadesi gösterdi. PTX, 72 saatlik tedaviden sonra her iki hücre hattında artışı indükleyebilmiştir. Her ne kadar PTX BCRP için bir substrat olmasa da, önceki çalışmalar bu mikrotübül etkileşimli ajanın BCRP ifadesini artırabileceğini göstermiştir. Sonuçlarımız hibrid protoflavonların BCRP ekspresyonunu da artırabildiğini gösterdi. Bu nedenle, çoklu ilaca dirençli fenotip ile etkileşimlerinin daha fazla araştırılması gerekir.

Toparlamak gerekirse bu tez çalışması kapsamında; hibrid protoflavon bileşiklerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde anti-kanser etkisi araştırılmıştır. Hücre canlılığına bakıldığında bu bileşiklerin nanomolar düzeyinde etkisi gösterilmiştir. Her iki hücre hattındada apoptozis indüksiyonu gözlenirken, ikincil nekrozisdeki belirgin artış sadece MCF-7 hücrelerinde mevcuttur. Protoflavon bazlı hibrid bileşiklerin her iki hücre hattında da DNA hasarına neden olmadığı gösterilmiştir. Antioksidan veya pro-oksidan aktivite gibi tek tip bir etki oluşumunu gözlenmese de, tüm bileşiklerin meme kanseri hücrelerinin redoks sistemine etki edebileceği gözlenmektedir. Bu bileşikler MCF-7 hücre hattında; BCRP ekspresyon seviyesinde önemli artışa neden olmuştur. MDA-MB-231 hücre hattında da artış gözlenmiştir.

KAYNAKÇA

Altunkaynak, B.Z., Özbek, E. (2008). Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6(2): 93 -104.

Anonim, (2007). Difference between the Forms of Cell Necrosis and Apoptosis. http://www.google.com.tr/imgres?hl=tr&tbo=d&biw=1441&bih=687&tbm=isch&tbnid =WbJKrR5YCdQFkM:&imgrefurl=http://www.aibnsus.org/AcdamicEmblem.html&do cid=HdltBjUk0u7M&imgurl=http://www.aibnsus.org/images/Cell.jpg&w=620&h=597 &ei=g5rtUPT2F8Sm4gS7jYH4Cg&zoom=1&iact=rc&dur=198&sig=11758908542071 9919574&page=1&tbnh=139&tbnw=144&start=0&ndsp=24&ved=1t:429,r:10,s:0,i:11 4 &tx=12 6&ty=60-(Erişim tarihi:11 Mart 2016)

Baylin, S.B. and J.E. (2006). Ohm, Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*, 6(2): p. 107-16.

Bednarek A.K, Sahin A, Brenner A.J, Johnston D.A, Aldaz CM. (1997). Analysis of Telomerase activity levels in Breat Cancer. *Clinic Cancer Research*; 3(1): 11-6.

Benson, J.R., et al., (2009). Early breast cancer. *Lancet*, 373(9673): p. 1463-79.

Bertucci, F., P. Finetti, and D. Birnbaum, (2012). Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype. *Curr Mol Med*, 12(1): p. 96-110.

Bieche, I. and R. Lidereau, (1995). Genetic alterations in breast cancer. Genes Chromosomes Cancer, 14(4): p. 227-51.

Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo P. (2000). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nature.Cell Biology*. 2: 241-243.

Bray, F., et al., (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncology*, 13(8): p. 790-801.

Brown, L. F., Berse, B., Jackman, R. W., Tognazzi, K., Guidi, A. J., Dvorak, H. F., Senger, D. R., Connolly, J. L., Schnitt, S. J. (1995). Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Human pathology*, 26(1): 86-91.

Chabner, B. A., ve Roberts, T. G. (2005). Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, 5(1): 65-72.

Chang, H. L.; Su, J. H.; Yeh, Y. T.; Lee, Y. C.; Chen, H. M.; Wu, Y. C.; Yuan, S. S., (2008). Protoapigenone, a novel flavonoid, inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Lett*, 267 (1), 85-95.

Cheang, M.C., et al., (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 101(10): p. 736-50.

Chen, H. M.; Chang, F. R.; Hsieh, Y. C.; Cheng, Y. J.; Hsieh, K. C.; Tsai, L. M.; Lin, A. S.; Wu, Y. C.; Yuan, S. S., (2011). A novel synthetic protoapigenone analogue, WYC02-9, induces DNA damage and apoptosis in DU145 prostate cancer cells through generation of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, 50 (9), 1151-62.

Chen, Y.-J.; Kay, N.; Yang, J.-M.; Lin, C.-T.; Chang, H.-L.; Wu, Y.-C.; Fu, C.-F.; Chang, Y.; Lo, S.; Hou, M.-F.; Lee, Y.-C.; Hsieh, Y.-C.; Yuan, S.-S., (2013). Total synthetic protoapigenone WYC02 inhibits cervical cancer cell proliferation and tumour growth through PIK3 signalling pathway. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*., 113 (1), 8-18.

Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2006). Hücre Moleküler Yaklaşım. *İzmir Tıp Kitabevi,* İzmir, 714.

Cui, J., Hopper, J.L. (2000). Why are the majority of hereditary cases of earlyonset breast cancer sporadic? A simulation study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 9(8): 805-12.

Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., Ezzati, M. (2005). Comparative Risk Assessment collaborating group. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet*, 366(9499): 1784-1793.

Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points.*Cell*, 116(2): 205-219.

Danko, B.; Martins, A.; Chuang, D. W.; Wang, H. C.; Amaral, L.; Molnar, J.; Chang, F. R.; Wu, Y. C.; Hunyadi, A., (2012). In vitro cytotoxic activity of novel protoflavone analogs - selectivity towards a multidrug resistant cancer cell line. *Anticancer Res*., 32 (7), 2863-2870.

Dash, P., (2007). Apoptosis,.http:/www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/

Dean M, Fojo T, Bates S., (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* 5 (4): 275 -284.

Denizot F., Lang R., (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, 89, 271-277.

DeSantis, C., Ma, J., Bryan, L., ve Jemal, A. (2014). Breast cancer statistics, CA: A *Cancer Journal for Clinicians*, 64(1): 52-62.

Devilee, P. and C.J. Cornelisse, (1994). Somatic genetic changes in human breast cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1198(2-3): p. 113-30.

Dickens, L.S., Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Hughes, M.A., Robinson, G.L., Fairall, L., Schwabe, J.W., Cain, K., Macfarlane, M. (2012). A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediatingapoptotic cell death. *Molecular Cell* 47(2): 291-305.

Dillon, M. T.; Harrington, K. J., (2018). Targeting ATR for Cancer Therapy: ATR-Targeted Drug Candidates. In Targeting the DNA Damage Response for Anti-Cancer Therapy, Pollard, J.; Curtin, N., Eds. *Springer International Publishing: Cham*, pp 99-127.

dos Santos, M. B.; Bertholin Anselmo, D.; de Oliveira, J. G.; Jardim-Perassi, B. V.; Alves Monteiro, D.; Silva, G.; Gomes, E.; Lucia Fachin, A.; Marins, M.; de Campos Zuccari, D. A. P.; Octavio Regasini, L., (2019). Antiproliferative activity and p53 upregulation effects of chalcones on human breast cancer cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry,* 34 (1), 1093-1099

Dotzlaw, H., Leygue, E., Watson, P.H., Murphy, L.C. (1999). Estrogen receptor-beta messenger RNA expression in human breast tumor biopsies: relationship to steroid receptor status and regulation by progestins. *Canser Research* 59(3): 529-532.

Downward, J., (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3(1): p. 11-22.

Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V., Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*. 11(13): 1050-1062.

Edge, S.B. and Compton C.C., (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 17(6): p. 1471-4.

Elston, C.W. and I.O. Ellis, (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with longterm follow-up. *Histopathology*, 19(5): p. 403-10.

Elston, C.W., (1984). The assessment of histological differentiation in breast cancer. Aust N Z J *Surg*, 54(1): p. 11-5.

Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J. (2005). Caspase Family Proteases and Apoptosis. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 37: 719–727.

Fang YZ, Yang S, Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition. 18(10), 872-879.

Ferlay, J., et al., (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer, 136(5): p. E359-86.

Fialkow, P. J. (1976). Clonal origin of human tumors. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-*Reviews on Cancer,* 458(3): 283-321.

Fidler, I.J., (1989). Origin and biology of cancer metastasis. *Cytometry*, 10(6): p. 67380.

Finver, S.N., et al., (1988). Sequence analysis of the MYC oncogene involved in the (8;14)(q24;q11) chromosome translocation in a human leukemia T-cell line indicates that putative regulatory regions are not altered. *Proc Natl Acad Sci* U S A, 85(9): p. 3052-6.

Fischer, U., & Schulze-Osthoff, K. (2005). New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacological reviews*, 57(2): 187-215.

Frantisek S., Petr P., (2005). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), The *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 720–725.

Friedenson, B., (2007). The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC Cancer*, 7: p. 152.

Fugua, S. A., Schiff, R., Parra, I., Friedrichs, W.E., Su, J.L., Mckee, D.D., SlentzKesler,

Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. A *Cancer Journal for Clinicians* 55: 178 –194.

Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., Adjei, A.A. 2005.Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *Cancer J Clin*. 55: 178 –194.

Halliwell B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*. 31(4), 261-272.

Hanahan, D. and Weinberg R.A., (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): p. 646-74.

Heenan M., O'Driscoll L., Cleary I., Connolly L., Clynes M., (1997). Isolation from a human MDR lung cell line of multiple clonal subpopulations which exhibit signifi cantly different drug resistance. *Int. J. Cancer* 71 (5): 907 -915

Heitz, F., et al., (2009). Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *Eur J Cancer*, 45(16): p. 2792-8.

Holdenrieder, S., Stieber, P. (2004). Apoptotic markers in cancer. *Clinical Biochemistry*, 37: 605-617.

Hunyadi, A., Martins, A., Danko, B., Chang, F. R., Wu, Y.C., (2014). Protoflavones: a class of unusual flavonoids as promising novel anticancer agents. *Phytochem. Rev.* 13 (1), 69-77.

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

K., Moore, L.B., Willson, T.B., Moore, J.T. (1999). Expression of wild type estrogen receptor beta and variant isoforms in human breatst cancer. *Canser Research*, 59(21): 5425-5428.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4): 239.

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.

Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P. 2001. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J.Biol.Chem*. 276: 46639-46646.

Lee, K.S. (2006). The changes of estrogen receptor-beta variants expression in breast carcinogenesis: Decrease of estrogen receptor-beta2 expression is the key event in breast cancer development.J. *Surg. Oncol*., 93, 504–510. [CrossRef] [PubMed].

Li, J., Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27: 6194-6206.

Lin, A.-S.; Chang, F.-R.; Wu, C.-C.; Liaw, C.-C.; Wu, Y.-C., (2005). New cytotoxic flavonoids from Thelypteris torresiana. *Planta Med*., 71 (9), 867-870.

Liu PX, Gao J, Chen YJ, Long W, Shen X, Tang WS (2011). Anticancer activity of total flavonoids isolated from Xianhe Yanling Recipe. Chin *J Integr Med* 17(6):459–463.

Lodish H, B.A., Zipursky SL, et al., (2000). Molecular Cell Biology. 4th edition. Section 24.1*Tumor Cells and the Onset of Cancer.*

Lowitz, B.B. ve Casciato, D.A. (2000). Medical oncology & principles of cancer biology. *Cancer Biology and Oncogenes.Lippincott*.

Lu, J., Ashwell, K., Ken, W.S., Waite, P. (2000). Advances in spinal cord injury: *Role of Apoptosis.* Spine, 25: 1859-1866.

Meier, P., Finch, A., Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature*. 407(6805): 796-801.

Mishra, A. And Verma M., (2010). Cancer biomarkers: are we ready for the prime time? *Cancers* (Basel), 2(1): p. 190-208.

Monasterio A, Urdaci MC, Pinchuk IV et al. (2004). Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspaseand caspase-calpaindependent pathways. *Nutr cance*r 50:90–100.

Mossman T, (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.

Nelson, D.A., et al., (2004). Hypoxia and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis. *Genes Dev*, 18(17): p. 2095-107.

Oesterreich, S., Fuqua, S. A. W. (1999). Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 6: 405-419.

Öktem S., Özhan M.H, Özol D. (2001). Apoptozisin Önemi. Toraks Dergisi, 2: 91-95.

Park, B.-W.; Kim, K.-S.; Heo, M.-K.; Ko, S.-S.; Hong, S.W.; Yang, W.-I.; Kim, J.-H.; Kim, G.E.; Lee, K.S., (2003). Expression of estrogen receptor-beta in normal mammary and tumor tissues: Is it protective in breast carcinogenesis? *Breast Cancer Res. Treat*. 80, 79–85. [CrossRef] [PubMed].

Parker, J.S., (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. J Clin Oncol, 27(8): p. 1160-7.

Patra, M.; Gasser, G., (2017). The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nature Reviews Chemistry*, 1, 0066.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huyc C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci.* 4(2), 89-96.

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

Priya Batra, Anil K. Sharma, (2013). Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future Perspectives. *3 Biotech* 3:439–459.

Radhakrishna, S., (2015). Breast Diseases: *Imaging and Clinical Management*. p. 233240.

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.

Rathmell, J.C., Thompson, C.B. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*. 109(Suppl): S97-107.

Richard, J., Sainsbury, C., Needham, G., Farndon, J., Malcolm, A., & Harris, A. (1987). Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *The Lancet*, 329(8547): 1398-1402.

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

Riss TL, Moravec RA, (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Techn*, 2, 1, 51- 62.

Rusciano, D. and Burger M.M., (1992). Why do cancer cells metastasize into particular organs? *Bioessays*, 14(3): p. 185-94.

Sainsbury, J. R. C., Sherbet, G. V., Farndon, J. R., & Harris, A. L. (1985). Epidermal-growth-factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *The Lancet*, 325(8425): 364-366.

Schinkel, A. H., & Jonker, J. W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 3–29.

Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, et al. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *Int J Pharm Sci Res.* 3(1), 91-100.

Senkus, E., et al., (2013). Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 24 Suppl 6: p. vi7-23.

Shay, J. W., Zou, Y., Hiyama, E., & Wright, W. E. (2001). Telomerase and cancer. Human molecular genetics, 10(7): 677-685.

Siegel, R. L., Miller, K. D., ve Jemal, A. (2015). Cancer statistics, CA: A *Cancer Journal for Clinicians*, 65(1): 5-29.

Sobin, L.H., (2003). TNM: evolution and relation to other prognostic factors. *Semin Surg Oncol*, 21(1): p. 3-7.

Sorlie, T., et al., (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci* U S A, 98(19): p. 10869-74.

Speirs ,V., Kerin, M.J. (2000). Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer. *British Journal of Surgery*, 87: 405-409

Stankovic´ T., Dankó B., Martins A., Dragoj M., Stojkovic´ S., Isakovic´ A, Wang H., Wu Y., Hunyadi A., Pešic´M., (2015). *Cancer Chemother Pharmacol*, 76:555–565 DOI 10.1007/s00280-015-2821-9.

Stewart, B. W. K. P., Wild, C. P. (2015). World cancer report 2014. World.

Su, J.L., Mckee, D.D., Ellis, B., Kadwell, S.H., Wisely, G.B., Moore, L.B., Triantafillou, J.A., Kost, T.A. Fugua, S., Moore, J.T. (2000). Production and characterization of an estrogen receptor beta subtypespesific mouse monoclonal antibody. *Hybridoma*, 19: 481-487.

Sundar, R.; Brown, J. (2017). Ingles Russo, A.; Yap, T. A., Targeting ATR in cancer medicine. *Current problems in cancer*, 41 (4), 302-315.

Tait, S.W., Green, D.R. 2010.Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond.*Nat*. *Rev*. *Mol. Cell Biol*., 11: 621-632.

TÜİK. "Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2014". Erişim Adresi: http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18855 Erişim Tarihi: 16.01.2017.

Ulukaya, E. (2001). Akciğer Kanserleri, Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar: Hücre Siklusu ve Apoptozis. Ed: Engin, K., Özyardımcı, N., Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul, Bölüm III.

Ulukaya, E. (2003). Apoptozis ders notları. http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf- (Erişim tarihi:12 Mayıs 2015).

Ulukaya, E. (2010). Hücre siklusu ve apoptozis: Akciğer Kanserleri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar, İstanbul, http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf. (Erişim tarihi: 12.09.2015).

Valko M, Leibfritz D, Moncola J, et al. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39, 44-84.

Vivanco, M., (2010). Biomarkers in breast cancer. *Methods Mol Biol*, 593: p. 137-56.

Wang B, Zhang X (2012). Inhibitory effects of Broccolini leaf flavonoids on human cancer cells. *Scanning* 34(1):1–5

Wang, H.-C.; Lee, A. Y.-L.; Chou, W.-C.; Wu, C.-C.; Tseng, C.-N.; Liu, K. Y.-T.; Lin, W.-L.; Chang, F.-R.; Chuang, D.-W.; Hunyadi, A.; Wu, Y.-C., (2012). Inhibition of ATR-Dependent Signaling by Protoapigenone and Its Derivative Sensitizes Cancer Cells to Interstrand Cross-link–Generating Agents In Vitro and In Vivo. Mol Cancer Ther, 11 (7), 1443-1453.

Weinberg, R.A., (1988). Finding the anti-oncogene. *Sci Am*, 259(3): p. 44-51

Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284(5756): 555-6.

Yan, S.; Sorrell, M.; Berman, Z., (2014). Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress. *Cell Mol Life Sci*, 71 (20), 3951-3967.

Yersal, O. and S. Barutca, (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*, 5(3): p. 412-24.

Zuzarte-Luis, V., Hurle, J.M. (2002). Programmed cell death in the developing limb. *Int J Dev Biol*.46(7): 871-6.