T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOTERAPOTİK P-TER-BUTİL KALİKS[4] AREN TÜREVLERİNİN İNSAN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDEKİ ANTİKANSER ETKİSİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

Emine GÖK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı

Temmuz-2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NANOTERAPOTİK P-TER-BUTİL KALİKS[4] AREN TÜREVLERİNİN İNSAN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDEKİ ANTİKANSER ETKİSİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASININ İNCELENMESİ

Emine GÖK

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI
Yardımcı Danışman: Prof.Dr. Şeref ERTUL

2019,74 Sayfa

Jüri
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI
Doç.Dr. Esra MALTAŞ ÇAGIL
Dr. Öğr. Üyesi Mukaddes CAN

Sağlıklı hücrelere zarar vermeden yalnızca kanser hücrelerini hedef alan yeni tedavi stratejileri geliştirmek son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Bir supramolekül olan kaliksaren (p-tert-bütilkaliks[4]aren) bu konuda oldukça umut vadeden bir adaydır ve yalnızca kanser hücrelerini hedef alan tedaviler için yeniden modifiye edilebilmektedir. Kaliksaren, kâse ya da koni şekilli sentetik supramoleküler makrosiklikler grubudur, metilen köprüleriyle bağlı fenol birimleri ve bir aldehitten oluşmaktadır.

Farklı fonksiyonel gruplar ile türevlendirilen 5.11.17.23-Tetra-tert-bütil-25,27-bis(2.3.4-aminometil-piridinamido)-26,28-dihidroksikliks[4]aren, uygun prosedürlerle sentezlendi. Sentezlenen bileşiklerin yapısı, ^{1}H-NMR ve FT-IR analizleri yapılarak ile karakterize edildi.

Bu çalışmada, farklı fonksiyonel gruplarla türevlendirilmiş olan p-ter-bütilkaliks[4]aren'in metastatik meme kanser hücre hattı olan MDA-MB-231 üzerinde antikanser etkisine bakıldı ve kontrol olarak sağlıklı meme hücresi MCF-10A kullanıldı. Hücreler 24 saat inkübasyon yapıldıktan sonra, p-ter-bütilkaliks[4]aren'in farklı dozları ile muamele edildi. Hücrelerin zamana ve doza bağlı sitotoksisite analizleri XTT ve Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) metodları ile incelendi. Hücrelerin morfolojik analizi DAPI ve Phalloidin boyası ile konfokal mikroskopi analizi ile yapıldı. P-ter-bütilkaliks[4]aren türevlerinim meme kanseri hücreleri üzerindeki hücre ölüm mekanizmasını anlamak için flow sitometri analizi yapıldı.

Bu çalışmada, kaliksarenin, metastatik meme kanseri hücrelerine karşı 3. pozisyonda ve 4.pozisyonda piridinyum grubunun modifikasyonu ile 3.pozisyonda 25 ila 60 μM konsantrasyona aralığında, 4.pozisyonda ise 25 ila 100 μM konsantrasyon aralığında etkin bir tercihli sitotoksisite gösterdiğini göstermektedir.

Bu çalışmada bildirilen sonuçlar, p-ter-butilkaliks[4]aren türevlerinin MCF-10A hücreleri ile karşılaştırıldığında, MDA-MB-231 metastatik meme kanserine tümöre tercihli in vitro sitotoksik etkilerinin, güvenli kanser tedavisi için umut verici bir yaklaşım sunduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Kaliksaren, Pasif Hedeflendirme, Sitotoksisite, RTCA

ABSTRACT

MASTER OF SCIENCE THESIS

INVESTIGATION OF THE MOLECULAR MECHANISM OF ANTICANCER EFFECT OF NANOTHERAPEUTICS P-TERT-BUTYL-CALİX[4]ARENE DERİVATİVES İN HUMAN BREAST CANCER CELLS

Emine GÖK

Advisor: Asst. Prof.Dr. Pembegül UYAR ARPACI
Co-Advisor: Prof.Dr. Şeref ERTUL

2019, 74 Pages

Jury
Asst. Prof.Dr. Pembegül UYAR ARPACI
Co-Advisor: Assoc. Prof.Dr Esra MALTAŞ ÇAĞIL
Asst. Prof.Dr. Mukaddes CAN

The search for new potent anticancer drugs that can only target cancer cells, rather than affecting normal tissues is very much commendable. Supramolecular Calixarene (p-tert-butylcalix[4]arene) is a highly promising candidate in this regard and could be modified to enhance preferential cytotoxicity for targeted therapy. Calixarenes are a family of bowl or cone shaped synthetic supramolecular macrocycles, composed of phenol units linked by methylene bridges through and an aldehyde.

5.11.17.23-Tetra-tert-butyl-25,27-bis(2,3,4-aminomethyl-pyridinamido)-2,6,28-dihydroxycycles [4] arene, which is derivatized with different functional groups, was synthesized by suitable procedures. The structure of the synthesized compounds was characterized by 1 H-NMR and FT-IR analyzes.

The effect of p-tert-butylcalix [4] aren derived from different functional groups on the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231 and the healthy breast cell MCF-10A was examined. After 24 hours of incubation the cells were treated with different doses of p-tert-butyl-calix [4] aren. Cytotoxicity analyzes of cells time and dose depended were examined by XTT and Real Time Cell Analysis (RTCA) methods. Morphological analysis of the cells was done by confocal microscopy analysis with DAPI and phalloidin staining. Flow cytometry analysis was performed to understand the mechanism of cell death on p-tert-butylkalyx [4] arene derivatives of breast cancer cells.

In this study, calixarene shows an effective preferential cytotoxicity against metastatic breast cancer cells in the range of 25 to 60 µM concentration in position 3 and in the range of 25 to 100 µM concentration in position 3 by modification of the pyridinium group in position 3 and position 4.

The results reported in this study demonstrated that tumor-preferential in-vitro cytotoxicity of p-tert-butylcalix[4]arene against MDA-MB-231 metastatic breast cancer over MCF-10A cells present a promising approach for efficient and safe cancer therapy.

Keywords: Calixaren, Passive Targeting, Cytotoxicity, RTCA

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında beni yönlendiren ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgilerinden yararlandığım, bana bildiği her şeyi öğretmeye çalışan, maddi ve manevi her zorlukta yanımda olarak bana destek olan, bilgi donanımı ve insani ve ahlaki yönüyle kendisini örnek edindiğim sevgili danışmanım Doktor Öğretim Üyesi Pembegül Uyar ARPACI hocama,

Tezime katkılarından dolayı yardımcı danışmanım sayın Doç.Dr. Şeref ERTUL hocama,

Laboratuar çalışması sırasında desteklerini esirgemeyen Sayın Öğr. Gör. Dr. Emine YAVUZ hocama ve Öğr. Gör. Dr. Zeynep Betül SARI'ya

Tezimde kullandığım maddeleri hazırlayan Sayın Öğr. Gör. Dr.Fatih ÖZCAN'a

Laboratuarda deney aşamasında bana yardımcı olan yüksek lisans öğrencileri Esin ŞİRİN, Kübra ÇİNİ, Noora OMAR, Züheir NAZAR'a, doktora öğrencisi Hatice Esra AKGÜL'e,

Tez yazım aşamasında destek olan ve tezimin daha güzel olmasına katkıda bulunan doktora öğrencisi Hüseyin DÖNMEZ'e,

Laboratuar alt yapısını kullandığımız İLTEK'e ve orada çalışan tüm iltek personeline teşekkür ederim.

Bu tezi; emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim, bana her koşulda güvenen ve yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini her zaman hissettiğim sevgili annem Tülay GÖK'e, babam Mustafa GÖK'e ve ablalarım Aynur GÖK ve Ümmügülsüm GÖK'e ithaf ediyorum.

Emine GÖK
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iii**

ABSTRACT ..... **iv**

ÖNSÖZ ..... **v**

İÇİNDEKİLER ..... **vi**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **viii**

1. GİRİŞ VE KAYNAK ARAŞTIRMALARI **1**

1.1.Meme kanseri 2
1.1.1.Meme kanseri metastazı 3
1.1.2.Üçlü negatif meme kanseri (TNBC) 5
1.1.3.Meme kanseri risk faktörleri 6
1.1.4. Meme Kanserinin Histopatolojisi, Sınıflandırılması 8
1.1.5.Meme kanseri tedavisi 12
1.2.Supramoleküler Kimya 13
1.2.1.Kaliksarenler 15
1.2.1.1. Kaliksarenlerin biyolojik alanda uygulamaları 17
1.2.1.1.1.DNA Çip Teknolojisi / Biyoalgılama Teknolojisinde Kaliksaren Uygulamaları 18
1.2.1.1.2. Biyoteknolojide kaliksaren uygulamaları 19
1.2.1.1.3. Biyolojide kaliksaren uygulamaları 20
1.2.1.1.4.İlaç keşfinde kaliksaren uygulamaları 20
1.3.Kaliksarenlerin kanser tedavisindeki uygulamaları 21
1.4. Kaliksaren esaslı antikanser ajanların etki mekanizmaları 22
1.5.Hücre ölüm mekanizmaları 24
1.5.1.Apoptoz 24
1.5.2.Apoptoz mekanizmaları 25
1.5.3.Otofaji 27

2. MATERYAL VE YÖNTEM **30**

2.1. p-tert-bütilkaliks[4]aren Diamit Türevlerinin sentezi 30
2.2.Hücre Kültürü 32
2.3. Hücrelerin sayımı ve ekimi 33
2.4. Hücre Canlılık Analizleri 33
2.4.1.MCF-10A VE MDA-MB-231 Hücrelerinin Canlılık Analizi 33
2.4.2. MCF-10A VE MDA-MB-231 Hücrelerinin Gerçek Zamanlı (xCELLigence) Analizi 34
2.4.3. MCF-10A VE MDA-MB-231 Hücrelerinin Trypan Blue İle Canlılık Analizi 34
2.4.4. MCF-10A VE MDA-MB-231 Hücrelerinin Konfokal Mikroskop Analizi 35
2.4.5. MCF-10A VE MDA-MB-231 Hücrelerinin Flow Sitometri Analizi 35

3.ARAŞTIRMA BULGULARI **37**

3.1. 2-AMP 3-AMP 4-AMP'nin Yapı, Karekterizasyon ve Analiz Sonuçları 37
3.1.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP Maddelerinin FT-IR Analizi Sonuçları 37
3.1.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin ^{1}H-NMR Spektrum Sonuçları 38
3.2. Hücre kültürleri 40
3.3.Hücre proliferasyonu ve canlılık analizlerinin optimize edilmesi 40
3.4. XTT sonuçlarının inverd mikroskop altında morfolojilerinin incelenmesi 48
3.5. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin Gerçek Zamanlı (xCELLigence) Sitotoksisite Analizinin optimizasyonu 52
3.6.Gerçek zamanlı xCELLigence sonuçlarının inverd mikroskopta incelenmesi 54
3.7. 3-AMP ve 4-AMP'nin meme kanseri hücreleri üzerinde anti kanser etkisinin incelenmesi 55
3.8. 3-AMP ve 4-AMP'nin meme kanseri hücreleri üzerinde morfolojik etkisinin konfokal mikroskop ile incelenmesi 58
3.9. Hücrelerinin Flow Sitometri Analizi ile hücre ölümlerinin belirlenmesi 60

4. TARTIŞMA 65

5. SONUÇLAR 72
6. ÖNERİLER 74

KAYNAKLAR 75

ÖZ GEÇMİŞ 85

SİMGELER VE KISALTMALAR

2-AMP	2-Aminometilpridin p-tert-bütilkaliks[4]aren
3-AMP	3-Aminometilpridin p-tert-bütilkaliks[4]aren
4-AMP	4-Aminometilpridin p-tert-bütilkaliks[4]aren
ALDH1	Aldehit Dehidrojenaz 1
BC	Meme Kanseri
CHCl3	Kloroform
CSC	Kanser Kök Hücreleri
DCIS	Duktal Karsinoma İn Situ
DAPI	4'6-Diamino-2-Fenilindol, Dihidroklorür
ER	Östrojen Reseptörü
FBS	Fetal Sığır serumu
FT-IR	Fourier transform infrared spektroskopi
HGF	Karaciğer Büyüme Faktörü
HER-2	İnsan Epidermal Büyüme Reseptörü-2
IDC	İnfiltre Edici Duktal Karsinoma
Ic50	Yarı-maksimum İnhibe edici Konsantrasyon
LCIS	Lobüler Karsinoma in Situ
MMP	Matriks Metalloproteinazlar
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MET	Mezenkimal-epitelyal Geçiş
MaSC	Normal Meme Kök Hücreleri
mL	Mililitre
nM	Nanometre
PR	Progesteron Reseptörü
PBS	Fosfat Buffer Salin
P53	Tümör Baskılayıcı Gen
PDGF	Trombosit Türevli Büyüme Faktörü
PI3K	Fosfotidilinositol 3-Kinaz
TNBC	Üçlü Negatif Meme Kanseri
TGF-β	Tümör Büyüme Faktörü Beta
VEGF	Vasküler Epidermal Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ VE KAYNAK ARAŞTIRMALARI

Kanser, Yunanca bir kelime olan ‘Karkinos' kelimesinden türetilmiştir ve bir hekim olan Hipokrat tarafından karsinom tümörlerini tanımlamak için kullanılmıştır. Kanser, vücudun belirli bir bölgesinde yer alan normal hücrelerin kontrolden çıkarak anormal derecede çoğalmaya başlaması ile ortaya çıkan bir hastalıktır.(Sudhakar, 2009)

Kanser kardiyovasküler hastalıklar sonrası dünya çapında meydana gelen ölümlerin önde gelen en önemli ikinci nedenidir. Amerika Birleşik Devletleri'nde erkeklerin yarısı ve kadınların üçte biri yaşamları boyunca kansere yakalanma riski taşımaktadır.(Sudhakar, 2009). Kanser nedeni ile ölümlerde ilk sırada Akciğer (1,3 milyon ölüm), sonra Mide (803,000 ölüm), Kolorektal (639.000 ölüm),Karaciğer (610.000 ölüm),Meme (519.000 ölüm) kanseri yer almaktadır. Tüm kanser ölümlerinin % 70'inden fazlası, düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir.

Dünya çapında kanserden ölümlerin, 2030 yılında tahmini 11,5 milyon ölümle birlikte artmaya devam etmesi öngörülmektedir.(WHO, 2004). Bunlar arasında meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve ölüm oranları açısından kadınlar arasında ikinci sırada yer almaktadır. Hem insidans hem de ölüm oranı ile ilgili olarak, yeni meme kanseri tanısı almış vaka sayısı yılda bir milyondan fazladır.(Zhang ve ark., 2017)

Meme kanserinden ölümlerin çoğunluğu primer tümörün kendisinden kaynaklanmaz, kanser hücrelerinin vücuttaki diğer organlara metastazı sonucu gerçekleşmektedir.(Weigelt ve ark., 2005) Meme kanseri giderek prognostik önemi olan ayrı moleküler alt tipler olarak sınıflandırılabilen heterojen bir hastalık olarak kabul edilmektedir.

Kemoterapideki ilerlemeler, hastalık nüksü ve ölüm riskini önemli ölçüde azaltmış olsa da, meme kanserinin nüksetmesi klinik ortamda önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, bu zorluğun üstesinden gelmek için, meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek yeni ilaçların bulunması gerekmektedir.(Zhang ve ark., 2017). Bu amaçla, piyasaya daha güçlü antikanser ilaçlarını tanıtmak için antikanser ajanlarının tasarlanması üzerine araştırmalar halen devam etmektedir. Ancak, var olan tüm ve yeni yapılacak olan antikanser ilaçları kanser hücresine özgü olmaması gibi problemle karşı karşıyadır.

Bu nedenle, son otuz yılda yapılan çalışmalarda, hedeflenen kimyasal tedavi, nanoteknolojinin tanıtımı, kanser biyo-belirteçlerinin kullanımı ve kanser tedavisinde

fiziksel parametrelerin (örneğin pH, sıcaklık, ışık) araştırılması için yeni trendler geliştirilmiştir.(Joo ve ark., 2013a)

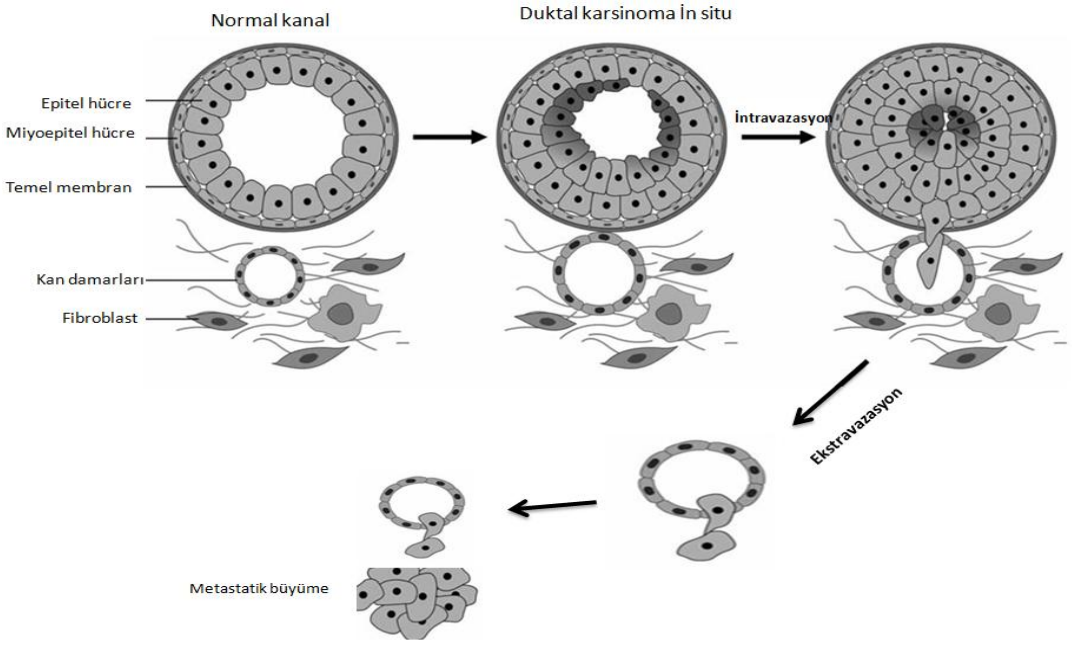
Aynı zamanda, daha etkili bir şekilde hedeflenen kemoterapi için polimer ilaçların ve nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu da kullanılmaktadır.(Wang ve ark., 2008b)

1.1.Meme kanseri

Meme kanseri (BC), genellikle meme kanallarının epitel hücrelerinde başlayan malign bir tümördür. (Custodio-Santos ve ark., 2017)

Meme kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlarda en sık görülen kanser olup, ikinci en yaygın kanser ölüm nedeni ve kadınlarda 45-55 yaş arası ölümlerin ana nedenidir. (Thakur ve ark., 2008). Bu hastalarda, meme kanserine bağlı ölümün % 90'ından fazlası primer tümörden değil, uzak bölgelerdeki metastazlarından kaynaklanmaktadır.(Gunasinghe ve ark., 2012)

Diğer kanser türlerinde de olduğu gibi meme kanseri de, onkogenlerin aktivasyonu veya tümör süpresör genlerinin aktifleştirilmesi gibi çoklu genetik değişikliklerle meydana gelmektedir. Geliştirilmiş tarama teknikleri meme kanserinin erken evrelerde tespit edilmesine yardımcı olmakla birlikte, ileri tedavi yöntemleri hasta sağ kalımını belirgin şekilde artırmaktadır. Ancak, tümör invazyonu ve metastaz ise hala meme kanseri ölümlerinin büyük çoğunluğuna neden olmaktadır.(Nho ve ark., 2015)



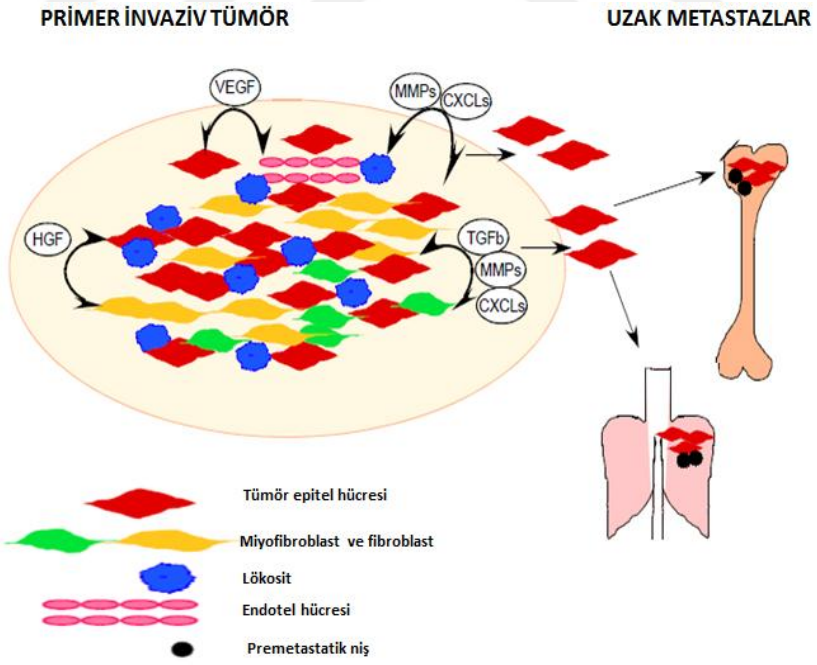
Şekil.1. Meme kanalının şematik gösterimi ve meme kanserinin ilerlemesi sırasında meydana gelen değişiklikler. (OLIVIA JANE SCULLY, 2012)

1.1.1.Meme kanseri metastazı

Metastaz; ard arda gelen birkaç basamağın sonucunda oluşan ve oldukça organize, rastlantısal olmayan ve organ seçici bir süreci temsil etmektedir.(Nicolson, 1993). Bu aşamalar arasında meme dokusuna ve dolaşım sistemine invazyonu ve vaskülatürde sağkalımı kolaylaştıran, uzak organ bölgelerinde kolonizasyonu sağlayan bir epitelyal-mezenşimal geçiş vardır, bunu ikinci olarak ekstravazasyon izler ve son olarak, proliferasyon ile daha büyük tümörlere doğru ilerleyen mikrometastatik lezyonların oluşumu vardır. (Custodio-Santos ve ark., 2017)

Tümör hücreleri, birincil tümör göçünden kaçmalarına ve çevre dokuları işgal etmelerine, damar sistemine girmelerine, dolaşmasına ve ikincil bölgelere ulaşmalarına, ekstravazasyona ve metastatik odaklara ulaşmalarına imkân veren bu avantajlı özellikleri elde ettikten sonra metastatik potansiyellerini yerine getirirler.(Deryugina ve Quigley, 2006)

Kanser ilerlediğinde veya metastatik evreye ulaştığında, tümör hücreleri, akciğerler, karaciğer ve beyin gibi uzak organlarda ya da kemik ve deriyi içeren iç organlarda yeni tümörler yayma ve oluşturma yeteneğine sahiptir.



Şekil.2. Stromal ve tümör epitelyal hücreleri arasındaki parakrin etkileşimleri örnekleri. Kemokinler, CXCL; MMP'ler, matriks metaloproteinazlar; HGF, hepatosit büyüme faktörü, TGF-b; VEGF, vasküler endotelyal büyüme faktörü. Tümör epitelyal ve stromal hücreler arasındaki etkileşimler, primer tümörden metastatik yayılımı destekler. Aynı zamanda, kemik iliği türevli hücreler de uzak metastaz alanlarında bir "ön metastatik niş" hazırlayarak büyümeyi destekler.(Hu ve Polyak, 2008)

Hedef organlardaki malign hücrelerin durdurulması ve büyümesi, tercihli bir dağıtım ve konumun var olması, 'organ tropizmi' adı verilen bir süreç sunar.(Custodio-Santos ve ark., 2017)

Organ tropizmi; meme kanseri hücrelerinin reseptör durumuna, dolaşım modeline, metastatik tropizmi düzenleyen ve kontrol eden tümör hücrelerinde bulunan genetik işaretler ve metastaz olacak organın mikro çevresi gibi faktörlere bağlıdır. (Spano ve Zollo, 2012; St Romain ve ark., 2012)

Merkezi sinir sistemi (MSS) metastazları, akciğer kanserinden sonra MSS'ye ikinci en sık metastaz nedeni olan ve hastaların % 15-25'inde görülen metastaz türüdür.(Saha ve ark., 2013) Beyin metastazları meme kanseri hücrelerinin reseptör durumuna göre değişir. Aslında, hem HER2-pozitif hem de üçlü negatif meme kanseri alt tipleri, hormon reseptörü pozitif hastalarla karşılaştırıldığında, merkezi sinir sistemi metastazlarının gelişimi ile daha fazla ilişkilidir ve beyin metastazı insidansı % 30-40 gibi yüksek değerlere ulaşır.(Kennecke ve ark., 2010; Witzel ve ark., 2016).

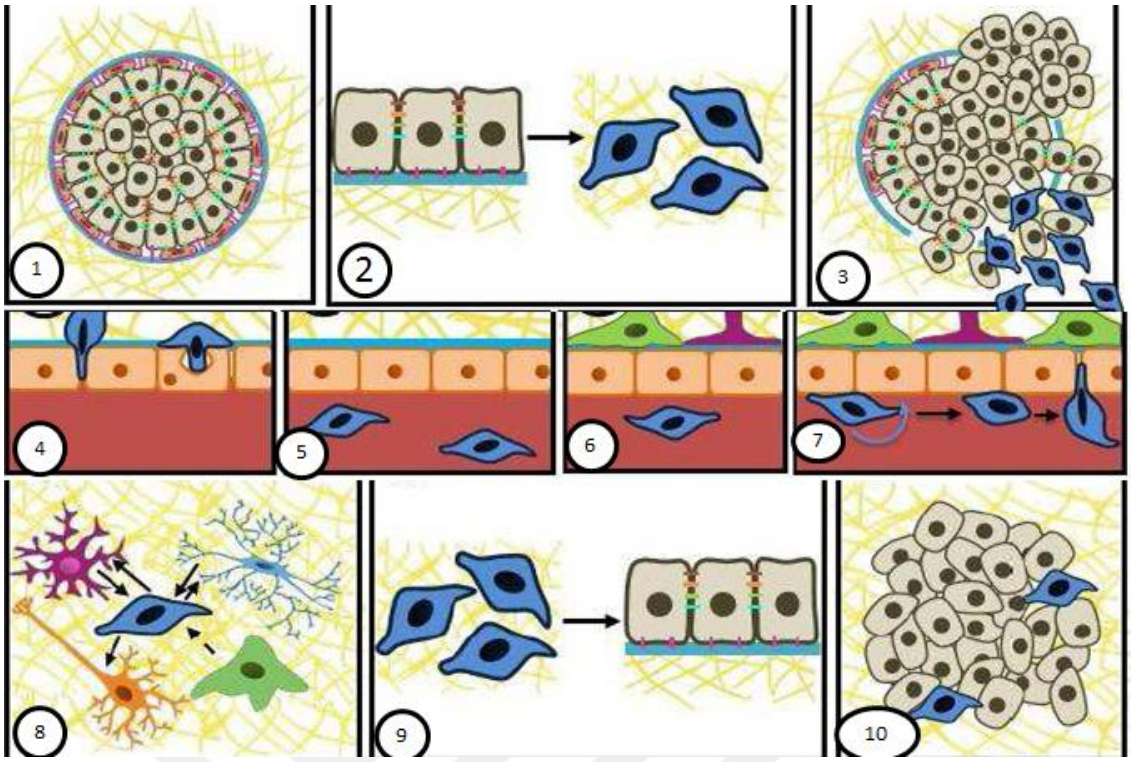
Ayrıca Smid ve ark. Beyin metastazının çoğunluğunun üçlü negatif meme kanserli hastalarda gözlendiğini ve bu hastaların Wnt/β-katenin sinyal yolunun yukarı doğru düzenlendiğini gösterdi.(Smid ve ark., 2008)

İkincil organ beyin olduğunda, meme kanseri hücrelerinin ekstravazasyonu, kan beyin bariyerini oluşturan tümör hücresi ve beyin mikrovasküler endoteli arasındaki etkileşimi gerektirir.(Wilhelm ve ark., 2014)

Kanser hücreleri beyne ulaştığında, bu ikincil organın mikro-çevresini oluşturan hücreler, hücre canlılığı ve tümör büyümesi için önemli destek sağlayan, metastatik hücreler tarafından proliferasyon ve kolonizasyonun desteklenmesinde önemli bir rol oynarlar. (şekil.3.) (Lorger, 2012)

Metastatik kaskatı tamamlamak için, meme kanseri hücreleri mezenkimal-epitelyal geçiş (MET) yoluyla epitelyal fenotiplerini yeniden oluştururlar ve iyi bir şekilde yerleşmiş beyin metastazları oluştururlar.(Gunasinghe ve ark., 2012)

Meme kanseri metastazının arkasındaki tüm mekanizmaları tanımlamak ve anlamak; beyindeki ilerlemeyi sınırlandırabilir ve metastatik süreç için terapötik müdahalede olası hedeflerin tüm aşamaları gerçekleştirilebilir.



Şekil.3. Meme kanserinin oluşumu ve beyin metastazının gerçekleşmesi. 1) Memede bulunan duktal kanallarda kanserin oluşması(Duktal Karsinoma in situ.) 2) Epitelyal-mezenşimal geçiş.3) Bölgesel göç.4) Damar içine geçiş 5) Damar içinde yaşam döngüsü.6) Damar içinde dolaşan hücrelerin beyne ulaşması.7) Damar içinde var olan hücrelerin beyne ulaştıktan sonra damar dışına çıkması.8) Beyin mikro çevresinde çoğalma.9) Mezenşimal-epitelyal geçiş.10) Beyin metastazının oluşumu.(Custodio-Santos ve ark., 2017)

1.1.2.Üçlü negatif meme kanseri (TNBC)

Üçlü negatif meme kanseri (TNBC) meme kanserinin yaklaşık % 15'ini oluşturmaktadır.(Kim ve ark., 2012) Son zamanlarda dikkat çekmesine ve sıklıkla tartışılmasına rağmen, TNBC yeni bir meme kanseri tipi değildir. Aslında, bu terim yakın zamanda, östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonu olmayan ve insan epidermal büyüme faktörü 2 reseptörü (HER2) proteinini aşırı ifade etmeyen bir meme kanseri alt tipini tarif etmek üzere yapılmıştır.

Dünya çapında her yıl yaklaşık 1 milyon meme kanseri vakası teşhis edilmektedir. Bunlardan yaklaşık 170.000 üçlü negatif (ER– / PR– / HER2–) fenotipe sahiptir. Bu TNBC vakalarının yaklaşık % 75'i "bazal benzeri" moleküler sınıflandırma grubuna girmektedir.(Anders ve Carey, 2009)

Mikroarray teknikleri meme kanserini; luminal A, luminal B, HER-2 ile zenginleştirilmiş ve "bazal benzeri" alt tip olarak çeşitli alt tiplere ayırmıştır (Şekil 1A ve 1B). Hem luminal A ve hem de B, hormon reseptörü ile ilişkili genlerin ekspresyonu

ile klinik olarak karakterize edilirken, hem HER-2 ile zenginleştirilmiş hem de "bazal benzeri" alt tiplerin östrojen reseptörü (ER) veya progesteron reseptörü (PgR) eksprese etme olasılığı daha azdır. Üstelik alt tiplerin klinik olarak en agresifi olan "bazal benzeri" alt tipi, tüm 3 belirteçler için (ER, PR ve HER2), negatiftir, dolayısıyla "üçlü negatif" fenotipik olarak sınıflandırılır.(Sørlie ve ark., 2001b; Sørlie ve ark., 2003b)

Bazal benzeri meme kanseri ve TNBC terimleri sıklıkla birbirinin yerine kullanılmasına rağmen, bunlar eş anlamlı değildir. TNBC, meme kanserinin ER, PR ve HER2'ye immünolojik olarak negatif olan immünofenotipini ifade eder. Bazal benzeri meme kanseri, cDNA mikro dizileriyle tanımlanmış olan tümörün moleküler fenotipini ifade eder. Bu TNBC'lerden yaklaşık % 75'i bazal benzeri tiptedir.(Roohi Ismail-Khan, 2010)

Meme kanserinin luminal alt tipleri yüksek miktarda lüminal sitokeratin eksprese eder ve luminal epitel hücrelerinin ve normal meme hücrelerinin genetik markırlarını ifade etmektedir.(Rakha ve ark., 2007; Sotiriou ve Pusztai, 2009)

1.1.3.Meme kanseri risk faktörleri

Ayrı bir moleküler ve patolojik profile ek olarak, üçlü negatif meme kanseri ile ilişkili epidemiyoloji ve risk faktörleri, özellikle endokrin duyarlı luminal meme tümörleri ile karşılaştırıldığında, farklılık göstermektedir. Farklı meme kanseri alt tipleri boyunca klinik işbirliğini ve dağılımları belirlemeyi amaçlayan, toplum temelli, vaka kontrol çalışması olan Carolina Meme Kanseri Çalışması, üçlü negatif meme kanseri ile ilişkili epidemiyolojik ve risk faktörlerini anlamamızı sağlamıştır.(Carey LA, 2007)

Yaş: Meme kanseri insidansı yaşla birlikte artar ve menopoza kadar her 10 yılda bir ikiye katlanır. Akciğer kanseri ile karşılaştırıldığında, meme kanseri insidansı genç yaşlarda daha yüksektir. Bazı ülkelerde ise menopozdan sonra yaş insidans eğrisinin sabit kaldığı görülmektedir.(K McPherson, 2000)

Coğrafi farklılık: Meme kanseri için yaş ve ölüm insidansı, ülkeler arasında değişmektedir. Uzak Doğu ve Batı ülkeleri arasındaki fark azalmasına rağmen, hala yaklaşık beş kat fark bulunmaktadır. Japonya'dan Hawaii'ye göç edenler üzerinde yapılan araştırmalar, göçmenlerdeki meme kanseri oranlarının, bir veya iki nesil içinde ev sahibi ülkedeki orana ulaştığını ve bu da çevresel faktörlerin genetik faktörlerden daha önemli olduğunu göstermektedir.(K McPherson, 2000)

Menopoz yaşı: Yaşamın erken evrelerinde başlayan veya geç menopoza giren kadınlarda meme kanseri gelişme riski artmaktadır. 55 yaşından sonra doğal olarak

menopoza giren kadınların, 45 yaşından önce menopoz geçiren kadınlara göre meme kanserine yakalanma olasılığı iki kat daha fazladır.(K McPherson, 2000)

İlk hamilelik yaşı: İlk çocuğunu 30 yaşından sonra doğuran kadınlarda meme kanseri riski, ilk çocuğunu 20 yaşından önce doğuran kadınların iki katıdır. En yüksek risk grubu, 35 yaşından sonra ilk çocuğu olan kişilerdir, bu kadınlar nullipar kadınlardan daha yüksek risk altındadır. İkinci bir çocuğun doğumunda erken yaş daha fazla meme kanseri riskini azaltmaktadır.(K McPherson, 2000)

Aile öyküsü: Batı ülkelerinde meme kanserinin yaklaşık % 10'u genetik yatkınlıktan kaynaklanmaktadır. Meme kanseri hassasiyeti genellikle sınırlı geçişi olan otozomal dominant olarak kalıtılır. Bunun anlamı, kalıtımın her iki cinsiyetten de geçebileceği ve bazı aile üyelerinin anormal genleri kanser geliştirmeden de iletebileceği anlamına gelmektedir.

Meme kanseri geninin ne kadar olabileceği henüz bilinmemektedir. 17 ve 13 numaralı kromozomların uzun kollarına yerleşmiş olan iki meme kanseri geni BRCA1 ve BRCA2 tanımlanmış ve yakın akrabalar arasında dört veya daha fazla meme kanserine sahip olan aileler için çok yüksek risk taşıyan önemli bir kısmı oluşturmuştur. Her iki gen de çok büyüktür ve mutasyonlar hemen her pozisyonda meydana gelebilir, böylece etkilenen bireyde veya ailede ilk kez mutasyonu saptamak için teknik olarak moleküler tarama talep edilir.

p53 ve PTEN'de meydana gelen kalıtsal mutasyonlar, yüksek bir meme kanseri riski taşıyan, ancak her ikisi de nadir görülen ailesel sendromlarla (Li-Fraumeni ve Cowden's) ilişkilidir. Bunlar, neredeyse, genel popülâsyon seviyesinin üzerinde belki de üç ya da dört kat daha yüksek hastalık riskini artıran diğer genlerdir.(K McPherson, 2000)

Radyasyon: İyonlaştırıcı radyasyon yaşamın ilerleyen dönemlerinde, özellikle de hızlı meme oluşumu sırasında maruz kalındığında meme kanseri riskini arttırır. Mamografik tarama, 50 yaşın üstündeki kadınlarda meme kanserinden ölüm oranında net bir azalma ile ilişkilidir.(K McPherson, 2000)

Yaşam tarzı: Meme kanseri insidansı ve popülâsyonlardaki diyetsel yağ alımı arasında yakın bir korelâsyon olmasına rağmen, yağ alımı ile meme kanseri arasındaki gerçek ilişki özellikle güçlü veya tutarlı görünmemektedir.

Obezite postmenopozal kadınlarda meme kanseri riskinde iki kat artışla ilişkiliyken, menopoz öncesi kadınlar arasında insidansın azalması ile ilişkilidir.

Bazı çalışmalar alkol tüketimi ile meme kanseri insidansı arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir, ancak bu ilişki tutarsızdır ve alkolden ziyade diğer diyet faktörleri ile ilgili olabilir.(K McPherson, 2000)

1.1.4. Meme Kanserinin Histopatolojisi, Sınıflandırılması

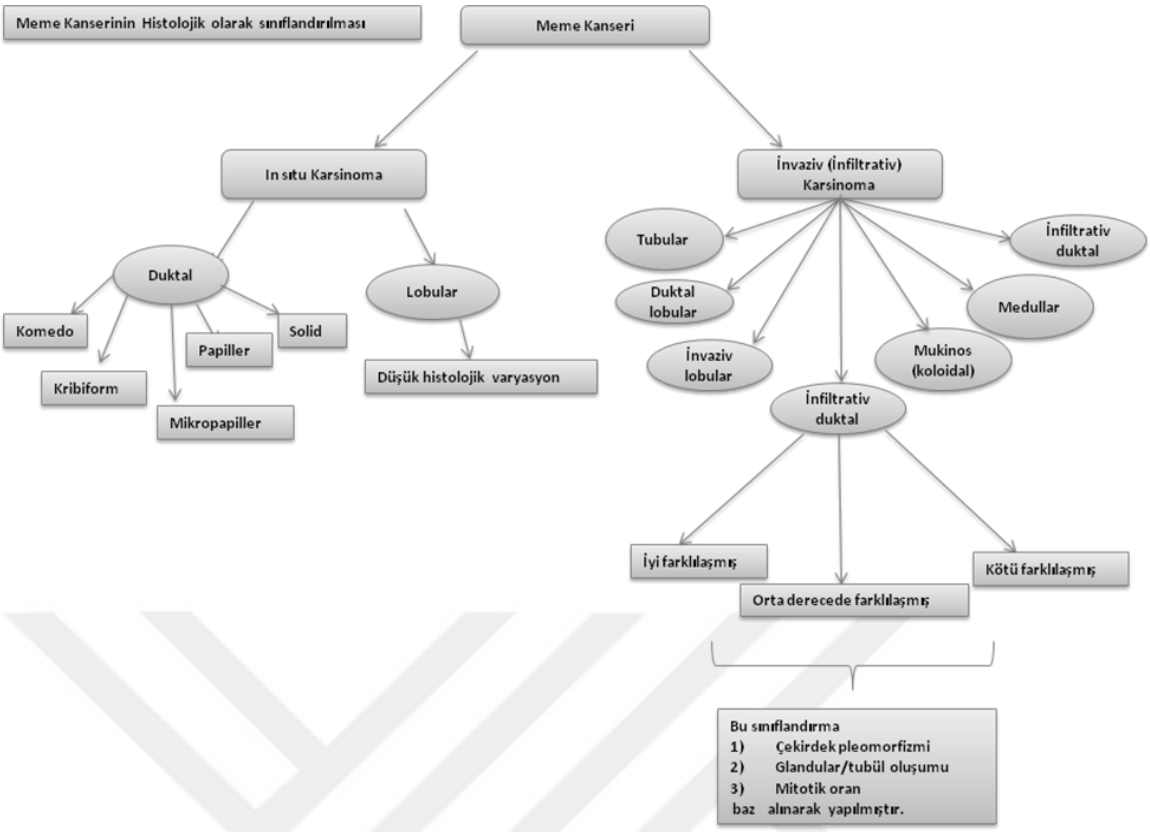
Meme kanseri, histolojik sınıflandırma bakımından in situ karsinoma ve invaziv karsinoma olarak kategorize edilir. Meme karsinomu ayrıca duktal veya lobüler olarak sınıflandırılır, büyüme modelleri ve sitolojik özellikler bu iki tip arasında ayrım yapmak için temel oluşturur.

Duktal karsinoma in situ (DCIS), lobüler karsinoma in situ (LCIS) tipinden çok daha yaygındır ve heterojen bir tümör grubunu kapsar.(şekil.4.)(Malhotra ve ark., 2014)

DCIS, geleneksel olarak, iyi bilinen beş alt tipin ortaya çıkmasına neden olan tümörün yapısal özelliklerine dayanarak alt sınıflara ayrılmıştır. Bu sınıflandırma şekli, yıllar boyunca değerli bir araç olarak kullanılmasına rağmen, kanıtlanmış bir prognostik önemi olan yeni moleküler belirteçler kullanmadan sadece histolojik ayırıma dayanmaktadır.

Sınıflandırmadaki bu eksiklikler, ER, PR, ErbB2 (Her2/neu) ve p53 gibi moleküler markırları içeren birkaç yeni sınıflandırma sisteminin ortaya çıkmasına yol açmıştır.(Malhotra ve ark., 2014).İnvaziv karsinomlar in situ karsinomlara benzer şekilde, histolojik alt tiplere ayrılan heterojen bir tümör grubunu oluşturur.

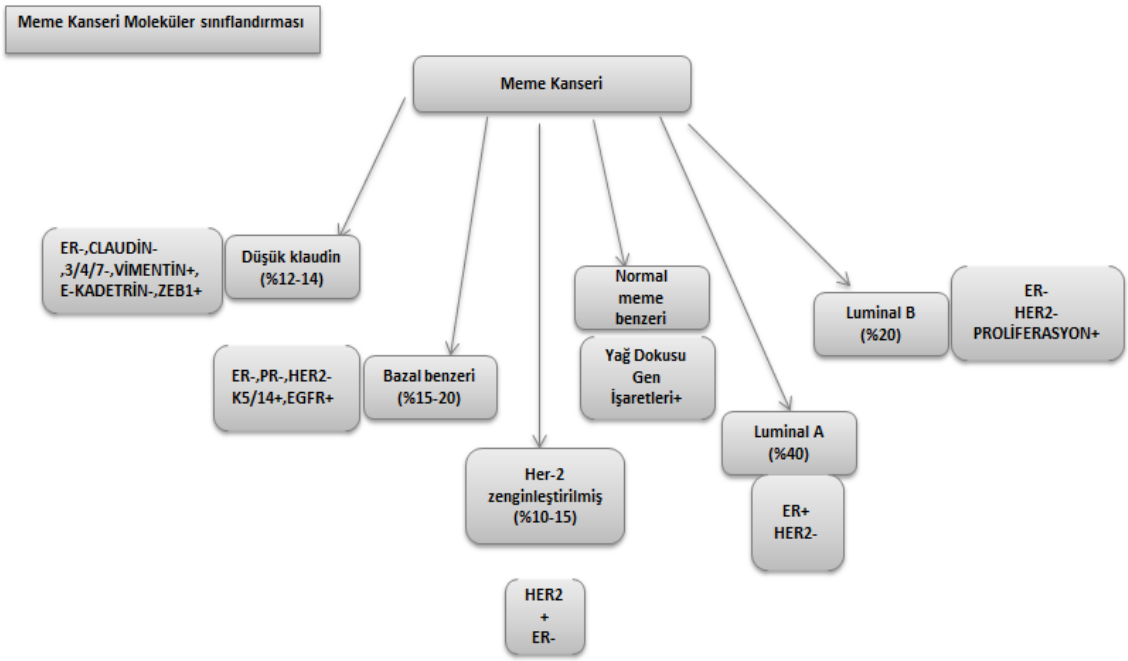
Majör invaziv tümör tipleri arasında infiltre edici duktal, invaziv lobular, duktal / lobüler, müsinöz (kolloid), tübüler, medüller ve papiller karsinomlar yer alır. Bunlar arasında infiltre edici duktal karsinom (IDC), tüm invaziv lezyonların % 70-80'ini oluşturan en yaygın subtiptir.(Li ve ark., 2005). IDC, çekirdek pleomorfizmi, glandüler/tübül oluşumu ve mitotik indeks seviyelerine göre iyi diferansiye (grade 1), orta derecede diferansiye (grade 2) veya kötü diferansiye (grade 3) olarak sınıflandırılır. (Malhotra ve ark., 2014)



Şekil.4. Meme kanseri alt tiplerinin histolojik sınıflandırması. Şu anda klinisyenler tarafından kullanılan bu şema, meme kanseri içinde bulunan heterojenliği, mimari özellikler ve büyüme modellerine göre sınıflandırmaktadır.(Malhotra ve ark., 2014)

Meme Kanseri Alt Tiplerinin Moleküler Sınıflandırılması: Meme kanseri sınıflandırması için mevcut modeller prognostik değere sahipken, sınıflandırma şemasında moleküler bir bileşenin olmaması, yeni hedefe yönelik tedavilere karşı cevabı öngörme yeteneğini sınırlamaktadır. Meme kanserinin moleküler alt tiplerinin yakın zamandaki tespiti bu konuya değinmeye başlamıştır. Son çalışmalar, daha sonra teyit edilen ve bazal benzeri, ErbB2 +, normal meme benzeri, lümen alt tip A ve luminal alt tip B olarak sınıflandırılan birkaç intrinsik moleküler alt tipi tanımlamıştır.(şekil.5.).(Perou ve ark., 2000; Sørlie ve ark., 2001a; Sørlie ve ark., 2003a)

Daha yakın zamanlarda, "klaudin düşük" olarak sınıflandırılan yeni bir alt tip de tanımlanmıştır.(Herschkowitz ve ark., 2007; Prat ve ark., 2010) Kanserin bu moleküler alt türleri mikrodizi tabanlı gen ekspresyon analizi ve tarafsız hiyerarşik kümeleme ile tanımlanmıştır. Bu moleküler sınıflandırma, ER + popülâsyonunu, hasta sağ kalımında farklılık gösteren birkaç alt tipe ayırmıştır.



Şekil.5. Meme kanserinin moleküler sınıflandırması. Bu sınıflandırma, tümör tümörlerinin mikrodizi analizi ile tanımlanan meme kanserinin intrinsik moleküler alt tiplerine dayanmaktadır.(Malhotra ve ark., 2014)

Meme Kanseri Alt Tiplerinin, Meme Kök Hücrelerinin ve Kanser Kök Hücrelerinin Fonksiyonel Sınıflandırılması: Meme kanserinin moleküler alt tiplerinin tanımlanması, meme kanseri anlayışımızdaki önemli ilerlemeyi gösterirken, diğer bir yoğun araştırma alanı da meme kanseri kök hücrelerinin (CSC) var olduğu şeklindedir.(Visvader, 2009). Her ne kadar kanser kök hücre kavramı yakın zamana kadar var olmasa da, bazı ortak malignitelerde tümör başlatıcı hücreler olarak kanser kök hücrelerinin izolasyonu ve karakterizasyonu nedeniyle geç dönemlere dikkat çekmiştir.

Kanser kök hücre teorisi basitçe, bir tümör içinde, tümör hücrelerinin kalan kütlesinin düşük tümörojenik potansiyele sahip olmasına rağmen, tümörün başlatılmasından ve ilerlemesinden sorumlu olan küçük bir hücre alt kümesinin bulunduğunu belirtir.(Malhotra ve ark., 2014)

Kanser kök hücrelerinin köken aldığı hücre hala belirsizdir ancak, kanser kök hücrelerinin ya kök hücre hiyerarşisindeki normal hücrelerden kaynaklandığını ya da ortak bir normal kök hücreden kaynaklandığını ileri süren iki geçerli hipotez vardır. Bu araştırma alanın hızlı büyümesi sayesinde, kanser kök hücrelerinin uygun izolasyon ve tanımlama yöntemleri konusunda bir karışıklık vardır. Özellikle kök ve kararlı olmayan progenitör hücreler arasında ayrım yapmak için kesin bir belirteç yoktur. Özellikle,

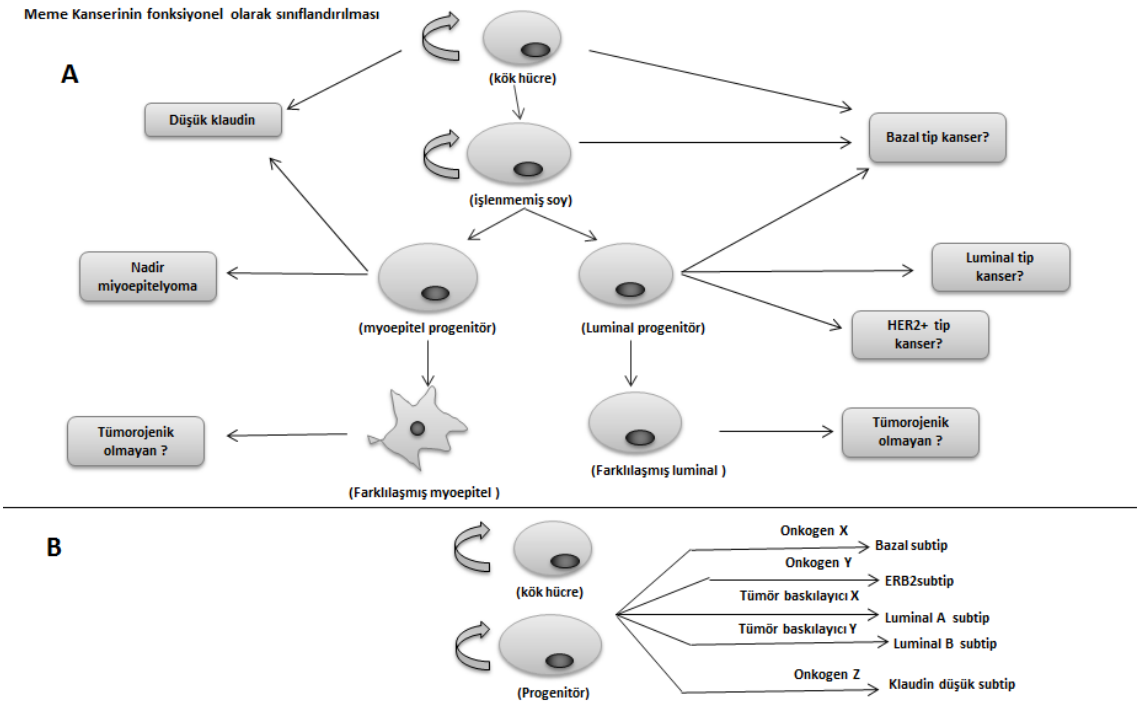
normal meme kök hücrelerini (MaSC) tanımlamak için kullanılan işaretleyiciler, kanser kök hücrelerini tanımlamak için kullanılanlarla aynıdır. Hem normal hem de kanser kök hücrelerinin etkili bir şekilde tanımlanması ve izole edilmesi için rapor edilen çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

Meme kök hücrelerinin varlığı ilk olarak 1990'ların sonlarında Kordon ve Smith tarafından gösterilmiş ve daha sonra tek hücrelerden meme bezi gelişimi ile kesin olarak kanıtlanmışken, 2003'e kadar meme kanseri kök hücrelerinin varlığı açıkça tanımlanmamıştır. (Al-Hajj ve ark., 2003; Shackleton ve ark., 2006; Stingl ve ark., 2006; Ginestier ve ark., 2007; Zhao ve ark., 2010)

Kanser kök hücrelerinin tanımlanması için hücre yüzey belirteçlerinin kullanılması, canlı kanser kök hücrelerini akış sitometrisi yoluyla izole etme kabiliyetine dayanmaktadır. (şekil.4.)Son zamanlarda, araştırmacılar hem normal hem de kanser kök hücrelerinin bir markeri olarak bir hücre içi enzim olan aldehit dehidrojenaz 1'i (ALDH1) tanımlamışlardır. Bir hücre geçirgen flüoresan substratı, canlı hücrelerde ALDH aktivitesinin ölçülmesini sağlar, bu işaretleyicinin kanser kök hücrelerini tanımlamak ve izole etmek için kullanımını kolaylaştırır. Bir floresan substrat bazlı "ALDEFLUOR" testinin, yetişkin doku kök hücrelerini, hematopoetik sistem(Storms ve ark., 1999; Hess ve ark., 2004) merkezi sinir sistemi(Malhotra ve ark., 2014) ve meme bezi dâhil olmak üzere çeşitli doku tiplerinden etkili bir şekilde izole ettiği gösterilmiştir.(Chute ve ark., 2006)

Ginster ve arkadaşları ALDH1 markerini $CD44^{+}/CD24^{-}/lin^{-}$ marker seti ile karşılaştırdılar; iki markör arasında yaklaşık % 20'lik çakışmayı rapor ettiler ve her iki markörü gösteren hücrelerin artmış tümörojenik potansiyel taşıdığını gösterdiler.(Malhotra ve ark., 2014)

Dahası, tümörleri üretebilen $CD44^{+}/CD24^{-}/lin^{-}$ popülâsyonundaki hücrelerin de ALDEFLUOR-pozitif olduğunu gösterdiler. CD44/CD24'ün kullanımına ek olarak, meme kök hücrelerini izole etmek için başka birçok hücre yüzey markeri kullanılmıştır.



Şekil.6. Meme kanserinin fonksiyonel sınıflandırması. Bu şema, meme kanserini tümör başlatıcı hücrelere dayanarak sınıflandırır. Şu anda iki önerilen hipotez var: (A) ya meme kanserinde görülen heterojenlik, memeli kök hücre hiyerarşisi içinde çeşitli düzeylerde farklı meme sapı / progenitör hücrelerinden ya da (B) meme kanseri heterojenliği, çeşitli kanser türlerine yol açan çeşitli onkogenler tarafından dönüştürülen tek bir meme gövdesi / progenitör hücresinin sonucudur.(Malhotra ve ark., 2014)

1.1.5. Meme kanseri tedavisi

Kanser terapisi, mevcut herhangi bir kanserin küçülmesi için kemoterapi verilmesi, ameliyatın ardından mümkünse tümörlerin çıkarılması, ardından daha fazla kemoterapi ve radyasyon uygulanması gibi müdahaleci işlemleri içermektedir. Kemoterapi ve radyasyonun amacı, kanser hücrelerin, en azından yetişkinlerde sağlıklı hücrelere göre çok daha hızlı büyümeleri nedeniyle, bu ilaçların ve yöntemlerin etkilerine daha duyarlı olduğu için tümör hücrelerini öldürmektir.

Son 25 yılda kemoterapiyi geliştirmek için yapılan araştırma çalışmaları, hastanın hayatta kalmasında bir iyileşmeye yol açmıştır, ancak hala geliştirmeye ihtiyaç vardır. Mevcut araştırma alanları, alternatif dozlama yollarına izin vermek için taşıyıcıların geliştirilmesini, tümör büyümesini besleyen kan damarları gibi yeni terapötik hedefleri ve aktivitelerinde daha spesifik olan hedefe yönelik terapötikleri içermektedir.

Klinik araştırmalar, hastaların yeni tedavi seçeneklerine açık olduğunu ve bu yeni kemoterapötiklerin amacının, kanser hastaları için hayatta kalma süresini ve yaşam kalitesini arttırmak olduğunu göstermiştir. Her durumda, tedavinin etkinliği, tedavinin,

mümkün olduğu kadar az sayıda sağlıklı hücreyi etkilerken, kanser hücrelerini hedefleme ve öldürme kabiliyeti ile doğrudan ilişkilidir.(Brannon-Peppas ve Blanchette, 2012). Bu açıdan kemoterapinin, kanser tedavisinde önemli bir yer tuttuğu ve çeşitli kanser türlerinin tedavisi ve gerilemesi yönündeki önemi göz ardı edilmemelidir.(Chabner ve Roberts Jr, 2005) Adjuvan veya neoadjuvan ve eşzamanlı kemoterapiler genellikle cerrahi ve radyoterapi ile birlikte kullanılır.(Yousaf ve ark., 2015)

Bununla birlikte, kanser kemoterapisinin etkinliğini sınırlayan önemli bir dezavantaj, kullanılan ilaçların seçici olmayan doğasıdır. Uygulanan ilaçlar ya da ajanlar sadece kanser hücrelerini değil, aynı zamanda normal sağlıklı hücreleri de hedefler.(Agur ve ark., 1988)

Antikanser ilaçların kanserli ve sağlıklı hücreler arasında farklılaşma yeteneği, genellikle, tümör hücrelerinin normal hücrelerle karşılaştırıldığında daha yüksek bir büyüme hızına sahip olduğu varsayımına dayanır. Sonuç olarak, kemik iliği, mide-bağırsak mukozası, kıl folikülleri ve deri gibi sağlıklı dokular, başlangıç kemoterapisiyle bile kemoterapötik etkiden doğrudan etkilenir. Bu yan etkiler, tedavi sırasında ve sonrasında çeşitli komplikasyonlara neden olur.(Livshits ve ark., 2014; Makin, 2014)

Piyasaya daha güçlü antikanser ilaçları tanıtmak amacıyla antikanser ajanlarının tasarlanması üzerine araştırmalar halen devam etmektedir. Bununla birlikte, tüm mevcut ve tasarlanacak olan antikanser ilaçları aynı seçicilik dışı problemle karşı karşıyadır.

Bu nedenle, son otuz yıldan itibaren hedeflenen kemoterapi için nanoteknolojinin tanıtımı, kanser biyobelirteçlerinin kullanımı ve fiziksel parametrelerin (ör. PH, sıcaklık, ışık) araştırılması gibi yeni trendler geliştirilmiştir.(Joo ve ark., 2013b) Benzer şekilde, daha etkili bir şekilde hedeflenen kemoterapi için polimer ilaçların ve nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu da kullanılmaktadır.(Wang ve ark., 2008a)

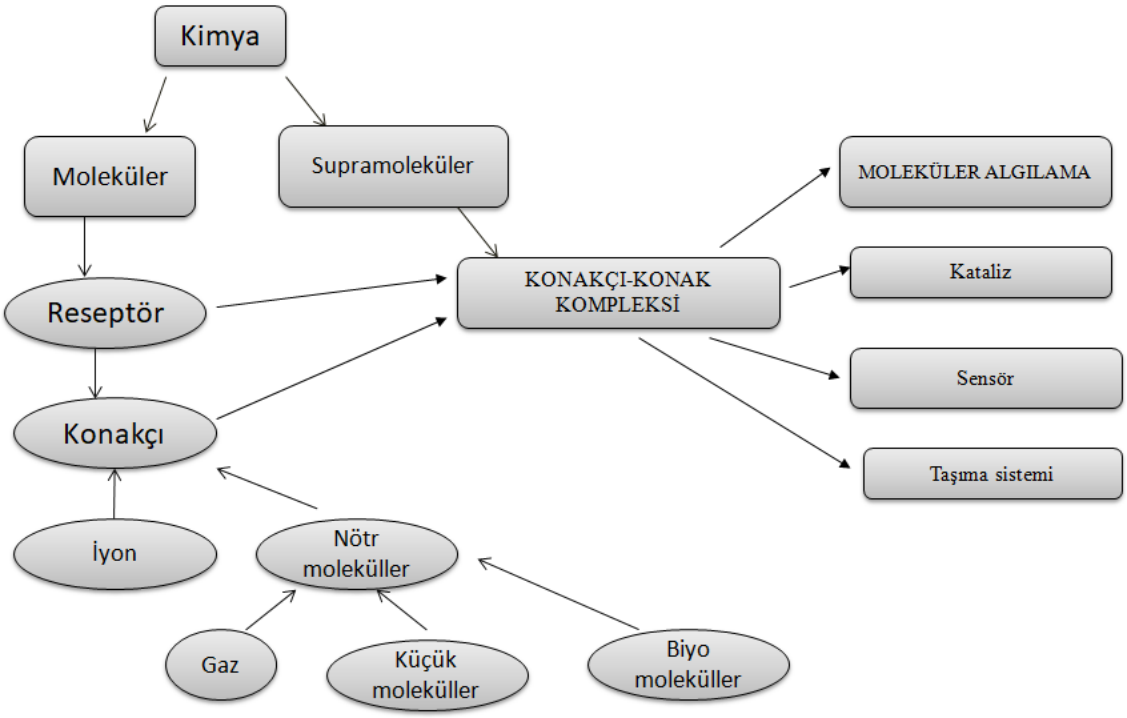
1.2. Supramoleküler Kimya

Supramoleküler kimya, son yıllarda kimya, fizik ve biyoloji arasında bilimsel bir alan olarak gelişmektedir. Supramoleküler kimya kavramı ve terimi Lehn ve ark. Tarafından 1978'de tanımlanmıştır. (Lehn, 1979).Kimyanın bu alanı, moleküller arası kuvvetler tarafından bir arada tutulan iki veya daha fazla kimyasal türün bir araya gelmesinden kaynaklanan daha yüksek karmaşıklığa sahip düzenli varlıklara dayanan "molekül ötesi kimya" olarak tanımlanmaktadır.(Lehn, 1988)

Moleküler kimyanın çalışma alanını moleküller oluştururken, süper moleküler kimya genellikle "moleküler reseptör" ve "substrat" olarak adlandırılan supramoleküler türlerle ilgilenmektedir.(.Şekil.7.) Substratlar esas olarak katyonlar, anyonlar, nötr organik moleküller ve hatta gazlar dahil olmak üzere herhangi bir madde olabilirken, reseptör molekülleri, kovalent olmayan bağlanma etkileşimleri oluşturarak substratlarla birlikte serbest moleküler büyüklüğe, şekle ve mimariye sahip olmalıdır. (Phlip, 1996)

Makrosiklik bileşikler, çoğu durumda çeşitli substratlar için molekül içi boşluklar içerir ve böylece reseptörler olarak daha sık hale gelen çok sayıda dal, köprü ve bağlantıya sahip olur. Bu makrosiklik bileşikler arasında; taç eterleri, siklodekstrinler ve kaliksarenler en yoğun şekilde araştırılmaktadır. Supramoleküler kimyadaki yeni keşifler, kimya alanında tasarım ve kontrol gücü uygulamaları için yeni yollar ve araçlar sağlamaktadır. (Phlip, 1996)

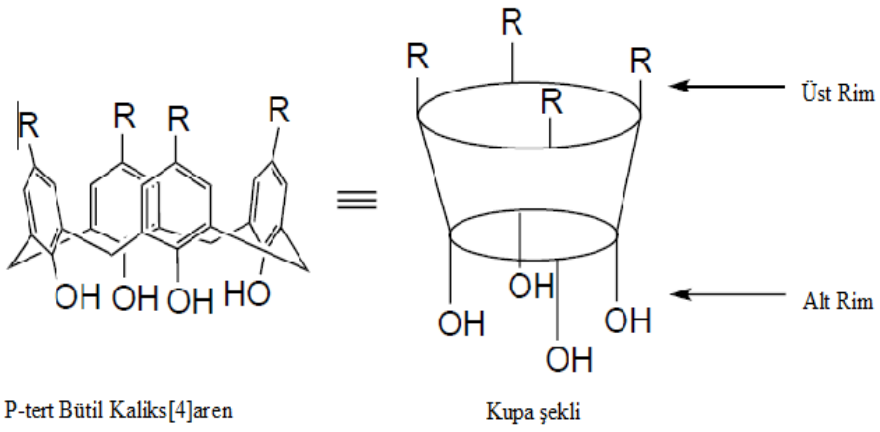
Reseptörler, öz-montaj süreci boyunca taşıma ajanları, enzim modelleri ve genişletilmiş diziler oluşturulabilir. Bu oluşturulan yapılar, biyolojik sistemleri taklit etmektedir ve ayrıca bu yapılar nanoteknoloji olmak üzere yeni çıkan birçok bilimsel alanların uygulamalarında kullanılmaktadır.(Prins Leonard ve ark., 2001)



Şekil. 7. Molekülden supramoleküler kimyaya.(Phlip, 1996)

1.2.1. Kaliksarenler

Kaliksarenler 1978'de Gutsche tarafından konakçı moleküller ile karmaşık bileşikler oluşturabilen kupa veya taç benzeri şekiller olarak tarif edilmiştir.(şekil.8.) Günümüze kadar, kaliksarenler; moleküler algılamada son derece popüler platformlar olmuştur ve bunlar supramoleküler kimyada büyük bir etkiye sahip olmuşlardır. Daha önceki çalışmalar, farklı şekil ve boyutlardaki boşlukların çeşitliliğini sağlamak için hem üst hem de alt çerçevedeki kaliksarenlerin fonksiyonlandırılmasına odaklanmıştır. Bu kaliksarenler en çok metal katyonlarda reseptör yetenekleri için incelenmiştir. Daha yakın zamanlarda, daha büyük nötr organik moleküllerin, katyonların, anyonların bağlı olduğu, karbonhidratlar ve kendinden montajlı kapsüller oluşturmak için kaliksarenler kullanılmıştır.

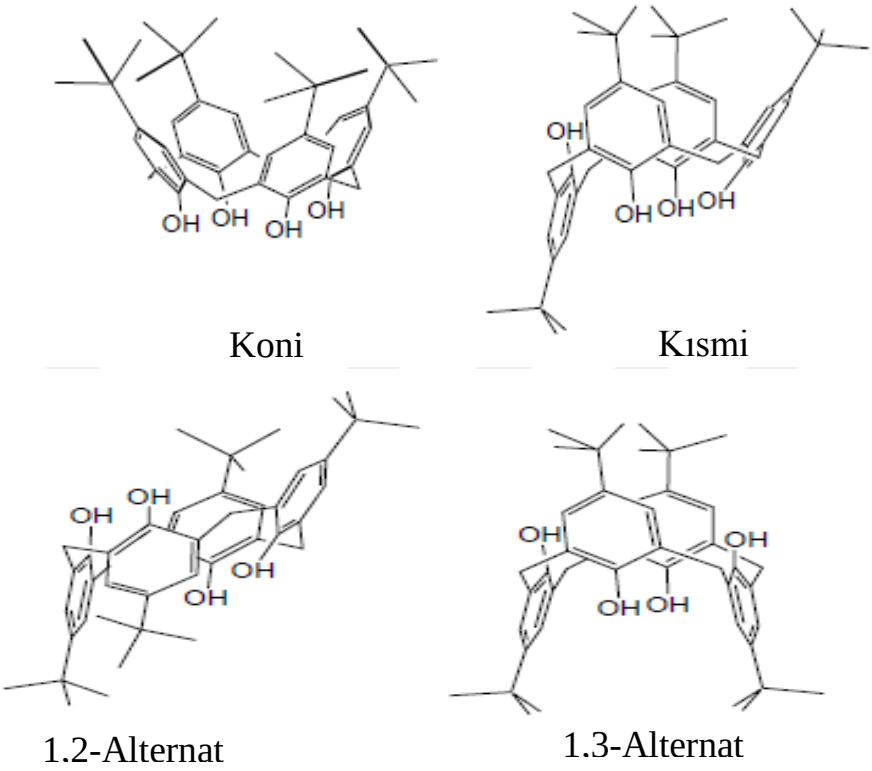


Şekil.8. P-tert-bütil kaliks[4]arenin kupa şeklinin gösterimi.(Yousaf ve ark., 2015)

Kaliks[n]arenler (n, bir moleküldeki aromatik halkaların sayısını ifade eder), p-alkil fenol ve formaldehitin baz-katalize kondansasyonundan türetilen makrosiklik bileşiklerdir. Siklik tetra-, heksa- ve oktamer-seçici olarak t-butil-fenolden büyük miktarlarda ve verimde elde edilmesini sağlayan uygun prosedürler geliştirilmiştir.(Shinkai, 1993)

Kaliks[4]arenler siklik tetramerlerdir; fenol halkalarının yönelimi bakımından farklı olan koni, kısmi koni, 1,2-alternat ve 1,3-alternat olarak adlandırılan dört aşırı uyumu benimserler. (şekil.9) Bu konformasyonel izomerler, farklı boyutlarda ve farklı şekillerde eşsiz boşluklar sağlar. Ayrıca, üç boyutlu konformasyonlar, ticari mevcudiyet

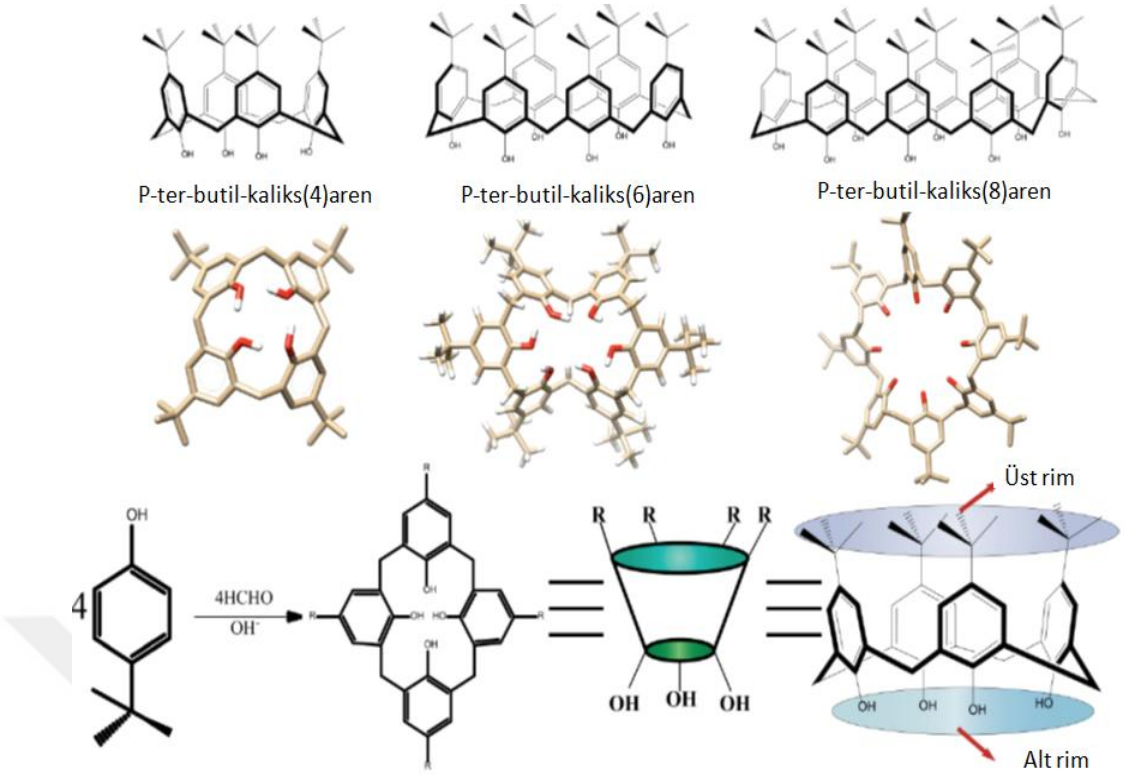
ve katı yapılar, kaliksarenleri sentetik olarak detaylı çalışma için en uygun hale getirir.(Shinkai, 1993)



Şekil.9. Kaliks[4]arenin dört kararlı uyumunun gösterimi.(Shinkai, 1993)

'Kaliksarenler' benzen birimlerinden oluşan siklik oligomerlerdir ve siklodekstrinlerin glikoz ünitelerinden oluştuğu ve dolayısıyla yeni bir konakçı molekül sınıfı olarak faydalı olacağı tahmin edilmiştir. Kaliksarenlerin katı halde birkaç küçük molekül içerebilmesine rağmen, çözeltide kaliksarenlerin inklüzyon özellikleri için sadece birkaç örnek vardır.(Shinkai ve ark., 1989) Bu, çeşitli konukçu-konuk-tipi çözelti kompleksleri oluşturabilen siklodekstrinlere keskin bir tezat oluşturmaktadır. Aradaki fark, kaliksarenlerin zayıf çözünürlüğünden kaynaklanır: yani, birkaç organik çözücüde az miktarda çözünür ve suda çözünmezler.(Shinkai ve ark., 1989)

Kaliksarenler bazen taç eterleri ve siklo dekstrinleri takip eden makrosiklik moleküllerin "üçüncü jenerasyonu" olarak adlandırılır.(Şekil.10) (Shinkai, 1993)



Şekil.10. P-tert-butilkaliks [n] arenlerin yapısal olarak gösterilmesi.(Shinkai, 1993)

1.2.1.1. Kaliksarenlerin biyolojik alanda uygulamaları

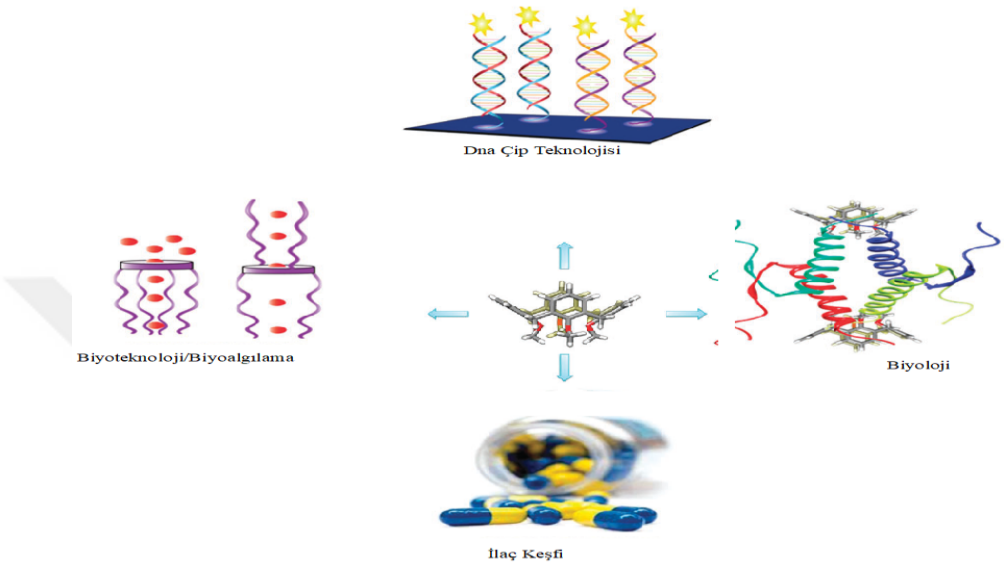
Eşsiz üç boyutlu yüzeyleri ile kaliksarenler, siklodekstrinler, kriptanlar ve taç eterleri ile birlikte en iyi bilinen konakçı moleküllerden biridir. Potansiyel yapı blokları arasında moleküler iskeletin üst veya alt kenarı boyunca kullanılabilirliği ve kolay işlevselleştirilmesiyle, sentez ve moleküler tanıma, algılama ve kendinden kurulum, kataliz, nanoteknoloji ve ilaç keşfi için supramoleküler platformlar olarak uygulamalarda önemli reseptörler haline gelmiştir.(Peczuh ve Hamilton, 2000)

Biyolojik bileşikler ile seçici komplekslerin tanınması ve oluşumu, işlevselleştirilmiş kaliksarenlerin özellikle ilgi çekici uygulamalarıdır. Aynı şekilde protein yüzeyinin tanınması, bir kaliksaren çekirdeğe bağlı çeşitli siklik peptidler kullanılarak ve fonksiyonel grup ve bağlayıcı protein yüzeylerinde tamamlayıcı geometrinin öneminin ortaya konulmasıyla çalışılmıştır. (Peczuh ve Hamilton, 2000),(Coleman ve ark., 2007)

Suda çözünebilen kaliksarenlerin biyomoleküller için reseptör olarak geliştirilmesi, potansiyel tıbbi uygulamaları açısından önemli hale gelmiştir.(Sansone ve ark., 1999; Guo ve ark., 2008)

Son zamanlarda, yapılan çalışmalar biyolojik sistemlerde kaliksarenlerin kullanımına odaklanmıştır ve kaliksarenlerin birçok alanda kullanılmasına olanak

sağlamıştır. Kaliksarenlerin biyolojik kullanım alanları arasında; enzim taklitleri, proteinlerin yüzey tanıma aracıları olarak, manyetik rezonans görüntüleme ajanları için platformlar olarak, gen transfeksiyon vektörleri olarak ve katı lipit nanopartikülleri ve antimikrobiyaller, DNA çip teknolojisi ve biyoalgılama, biyoteknoloji ve biyoloji ve ilaç keşfindeki uygulamaları gibi birçok alanı kapsar.(Şekil.11.)(Cornforth J ve ark., 1955)



Şekil.11..Kaliks[n]aren(n:4.6.8)'lerin çeşitli uygulama alanları(Cornforth J ve ark., 1955)

1.2.1.1.1. DNA Çip Teknolojisi / Biyoalgılama Teknolojisinde Kaliksaren Uygulamaları

Kaliks [4] taç-5 türevlerindeki taç eterlerinin tek-çiftli elektronlarının metal katyonları ve amonyum iyonları gibi katyonik substratları kolaylıkla yakalayabileceği iyi bilinmektedir.(Yamamoto ve Shinkai, 1994; Li ve ark., 2000).

Proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin temel yapı taşları olan amino asitler, spor amonyum iyonları ve dolayısıyla kaliks[4]taç-5 türevleri için çekici hedeflerdir.(Ogoshi ve ark., 2008) Proteinlerde çoklu amino fonksiyonlarının varlığından dolayı, proteinlerin kaliksarenlerle kompleksleşmesinin olanakları ‘’protein mikro dizi’’adı verilen yeni bir uygulama sınıfına yol açmıştır. Protein mikro dizilerinin üretilmesinde önemli faktörlerden birisi de proteinleri, aktivitelerini kaybetmeden katı bir fazda hareketsiz kılmaktır. Proteinleri işlevsel tutmak için; proteinlerin katlanmış yapısal bütünlüğünü koruyacak şekilde hareketsiz kılmak gerekir.

Son zamanlarda, H. Kim ve ark. alanin aminotransferaz antijeninin tespit edilmesini 0.05 ng ml^{-1}'lik tespit limitiyle bildirmiştir.(Amiri ve ark., 2010).

Bununla birlikte, 2003 yılında Y. Lee ve T. Kim, katı matriksler üzerinde yakalama proteinlerinin etkili immobilizasyonuna izin veren ve protein-protein etkileşimlerinin yüksek verimli analizini mümkün kılan iki işlevli bir birleşme özelliğine sahip olan kaliks-taç türevleri ile kaplanmış oldukça hassas bir mikro dizi protein çipi geliştirdi.(Lee ve ark., 2003; Oh ve ark., 2005).

Kaliks[4]taç-5 SAM'ları, proteinlerin tekrarlanabilir yoğunluklu hareketsizleştirilmesi için mükemmel bir platform sağlar. Ancak, altın elektrot üzerindeki yalıtım etkisini azaltmak için, redoks molekülleri, hareketsiz kılma işlemi sırasında proteinlerin arasına yerleştirilmiştir. Redoks moleküllerinin kullanımı, gelişmiş bir tespit limitine giren yalıtım etkisini önemli ölçüde azaltmıştır. Bununla birlikte, redoks molekülleri elektrot yüzeyinde sabitlenmediğinden yalıtım etkisinin tamamen ortadan kaldırılması sağlanmadı. Bu nedenle, iki veya daha fazla çeşitli substratın karışık kendinden monte edilmiş tekli katmanları oluşturulabilirse, kaliksarenlerin SAM'lerinin uygulamaları daha önemli olacaktır.(Nimse ve Kim, 2013)

Bu şekilde kaliksaren esaslı moleküllerin amino asitlerle kompleksler oluşturma yeteneği, birçok çalışmanın ana konusu olmaktadır.

1.2.1.1.2. Biyoteknolojide kaliksaren uygulamaları

Biyolojik moleküllerin sentetik bileşiklerle son derece spesifik olarak tanınması, hem akademik hem de uygulamalı araştırmalarda hızlı büyüyen ve zorlu bir alandır(Ludwig, 2005). Kaliksarenlerin kullanımı, son yirmi yılda, biyokimyasal tanıma ve amino asitler, peptitler, proteinler, lektinler, nükleotitler, nükleositler, sakkaritler ve steroidler gibi biyoaktif moleküllerin ayrılması için güçlü bir araç olarak artan bir ilgi çekmiştir.(Shimojo ve ark., 2007)

2003 yılında, Shahgaldian ve ark. dört karbonhidratın (glukoz, fruktoz, mannoz ve maltoz), paraododanoil-kaliksaren bazlı katı lipit nano tanecikleri üzerindeki kriyoprotektif etkisini bildirmişlerdir. Foton korelasyon spektroskopisi verileri, dört karbohidratın, donma-kurutma işleminden sonra süspansiyonların yeniden oluşturulmasına izin veren iyi bir kriyoprotektanlar olarak etki ettiğini göstermektedir.(Shahgaldian ve ark., 2003)

2005 yılında Oshima ve arkadaşları, bir kaliks [6] aren karboksilik asit türevinin, organik ortamda ekstraksiyonunu teşvik ederek sitokrom C gibi katyonik proteinler için yüksek bir afinite sergilediğini bildirmiştir. Aynı grup, protein ekstraksiyon ajanları olarak birkaç kaliks[4,6,8]arenleri de araştırmıştır ve p-tertoktilkaliks[6]aren ve p-tert-oktilkaliks[8] areninin karboksilik asit türevlerinin büyük boşluklarının, p-

tertoktilkaliks[4]aren kıyasla proteinler için yüksek özütleme kapasiteleri sergilediğini ortaya çıkarmıştır.(Oshima ve ark., 2005)

1.2.1.1.3. Biyolojide kaliksaren uygulamaları

Kaliksarenler, peptidler ve protein yüzeyleri gibi biyolojik hedefler için verimli çok değerlikli platformlar olarak tarif edilmiştir.(Baldini ve ark., 2007; Martos ve ark., 2008; Wei ve ark., 2018)

Ungaro ve grubu, nötral, katyonik ve anyonik konuk moleküllerin tanınması için kaliksaren türevlerinin sentezi ve uygulanması üzerine çeşitli makaleler yayınlamışlardır.(Sansone ve ark., 1998; Sansone ve ark., 1999)

Daha yeni bir çalışmada, Ungaro ve ark. Guanidinium kaliks[4]aren türevlerinin hücre transfeksiyon aktivitesi fenomenini tanımlamıştır. (Bagnacani ve ark., 2012)

Kaliks[4]arenin guanidinyum gruplarının bağlanması, bu iskeleye dayanan sentetik vektörlerin hücre transfeksiyon kabiliyetini önemli ölçüde arttırma ve transfeksiyon aktivitesini gözlemlemek için toksisite katyonik gruplarını azaltma olasılığını ve bunun yerine başka ilacın kullanılma olasılığını açıkladı. Amonyum kısımları kesinlikle zararlıdır, ancak bunlardan bazıları, kaliks [4] aren türevlerinin üst kenarına bağlandığında etkili olduğu bildirilmiştir.(Brites ve ark., 2011)

1.2.1.1.4. İlaç keşfinde kaliksaren uygulamaları

Madde toksisitesinin güçlü ilaç moleküllerinin keşfine ve geliştirilmesine bir engel olduğu iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, çoğu kaliksaren türevleri hayvan modellerinde düşük toksik etki göstermiş veya hiç toksik etki göstermemiştir. (Rodik ve ark., 2009b)

Kaliksarenler antiviral, antibakteriyel, antifungal, anti tüberküloz ve antikanser aktiviteleri göstermektedir. (Hwang ve ark., 1998; Fujimoto ve ark., 2000; Menger ve ark., 2004; B. Shah ve ark., 2015)

2007 yılında Krien ve ark. N-Asetil-D-glukozamin ikameli kaliks[4]aren türevli NK (doğal öldürücü) hücrelerin aracılık ettiği anti tümör bağışıklık yanıtını uyardığını bildirmiştir.(Křenek ve ark., 2007)

Fosfonat grupları ve makrosiklik yapı, kaliksaren bileşiklerin aktiviteleri için gereklidir. Moleküler modelleme çalışmaları, fosfonat kalıntılarının fosfotirozin bağlanma boşluğunun girişi etrafında yer almasıyla birlikte, kaliksarenlerin aktif bölgeyi inhibe eden benzer bir bağlanma modunu ortaya çıkarmıştır. Bu, enzim-inhibitör etkileşiminin mekanizmasının anlaşılması için bir moleküler temel sağlar ve YopH'nin kaliksaren inhibitörlerinin geliştirilmesi için yararlı olabilir.

1.3. Kaliksarenlerin kanser tedavisindeki uygulamaları

Bazı biyomedikal uygulamalara sahip olduğu keşfedilen makro moleküller ilaç gibi davranır ve ilaç dağıtım sistemlerinde büyük potansiyel gösterir. Sentetik makro moleküller arasında, taç eter, siklodekstrin, kaliksarenler ve bunların türevleri büyük önem taşımaktadır. Onların eşsiz fizikokimyasal özelliklerine ek olarak, birçok konakçı türünü kapsülleyen ana bilgisayarlar olarak da görev alırlar.(Yousaf ve ark., 2015)

Kaliks[n]arenlerin 1978'de keşfedilmesinden bu yana, kaliksarenlerin antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antikanser aktivitelerini doğrulamak için çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir.(de Fatima ve ark., 2009; Rodik ve ark., 2009a)

Kaliksarenlerin kanser hücreleri için yüksek bağlama yetenekleri, azaltılmış sistemik toksisiteleri ve temel yapı iskelelerinde çeşitli farklı fonksiyonel grupların hızlı bir şekilde kurulmasını sağlama kolaylığı, gelişmiş hidrofilisiteleri ve ilaç molekülleri ile inklüzyon kompleksleri oluşturma yetenekleri, onları kanser terapötiklerinin geliştirilmesi için güçlü adaylar olmasını sağlar.

Gerçekten de, antikanser özelliklerini kanıtlayan çeşitli bilimsel raporlar vardır. Dahası, antikanser özelliklerini kanıtlayan çeşitli bilimsel raporlar vardır.

1.3.1. Antikanser ilaçlar olarak kaliksarenler

Kaliksaren temelli bileşiklerin antikanser aktivitesi, çeşitli araştırma grupları tarafından araştırılmıştır.

Coleman ve arkadaşları kaliks[4]aren dihidrofosfonik asit ve çeşitli türevleri (tert-bütilkaliks[4]aren dihidroksifosfonik asit (tBuC4diP), paraoktanoil-kaliks [4] aren dihidroksifosfonik asit (C8C4dP)) sentezlemiş ve farklı tümör hücre dizilerinde (lösemik, melanom, insan hepatoma ve hepatosellüler karsinom hücreleri) antikanser etkisini araştırmışlardır. (Karakurt ve ark., 2016)

Baggetto ve arkadaşları, çeşitli tümör hücreleri (MU2, MU2F, HT1080, SP6.5,1PC227, Jurkat, MEWO, HL-60, Huh7, Hep-G2, MEWO, DLM.1) üzerinde kaliks[4]aren türevlerinin etkisini incelemiş ve bu bileşiklerin standart antikanser ilaçlar ile aktivitesini karşılaştırmışlardır (Yousaf ve ark., 2015). Bu işlevselleştirilmiş kaliks[4]aren türevlerinin, özellikle lenfoblastik lösemi ve melanom hücre hatlarında güçlü anti-kanser ajanları olduğunu keşfettiler. Benzer şekilde, Nasuhi Pur ve Dilmaghani dört platin merkeziyle fonksiyonel hale getirilen kaliks[4]arenini

sentezlemişlerdir ve bunun prospektif bir antikanser ajanı olduğunu bildirmişlerdir.(Yousaf ve ark., 2015)

Kaliksaren bazlı kanser teşhisinde erken aşamalarda birkaç kanser türüne karşı umut verici ve etkili bir stratejidir. Örneğin, hepatoselüler karsinomda, insan servikal kanseri onkoprotein-1 erken evrede aşırı eksprese edilir ve α-fetoprotein analizi ve hepatik ultrasonografi gibi geleneksel yöntemler ile zayıf hassasiyet ve düşük spesifiklik nedeniyle küçük tümörler tespit edilemez. Öte yandan, 2 mm'lik altın elektrot yüzeyinde hareketsizleştirilen kaliksaren ile HCCR-1, 1000 kat seyreltilmiş serumda tespit edilebilir ve HCC hastalarından sağlıklı kişileri bu serum miktarı ile ayırt edebilir.(Karakurt ve ark., 2016)

Sitotoksik etkilerinin yanı sıra, kaliksarenlerin hücre göçünü ve proliferasyonunu inhibe ettiği kanıtlanmıştır. Viola ve arkadaşları, Consoli ve arkadaşları tarafından tarif edilen bir prosedür kullanılarak bir N-asetil-D-glukosamin grubu (bileşik A) taşıyan bir ureidokaliks[8]arenini sentezlemiştir.(Consoli ve ark., 2003; Consoli ve ark., 2004; Viola ve ark., 2010)

Meme ve çocukluk çağı kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde, pürin ve pirimidin konsantrasyonları değiştirilir ve dört bazın konsantrasyonunun belirlenmesi, kanser teşhisinde önemli bir yere sahiptir. Azokaliks[4]aren, yüksek duyarlılığı, düşük seviyelerde tespit edilebilmesi, iyi stabilitesi ve mükemmel tekrarlanabilirliği ile daha önce sözü edilen kanser türlerinin erken evre teşhisi için iyi bir aday olarak gösterilmektedir.

1.4. Kaliksaren esaslı antikanser ajanların etki mekanizmaları

1.4.1. Anjiyogenez antagonistleri

Tümör hücrelerinin hayatta kalması yeterli miktarda besine, oksijene ve kan damarları yoluyla hücresel atıkların atılmasına bağlıdır. Bu nedenle, tümör içinde yeni kan damarlarının varlığı büyümeleri için gereklidir. Trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), PDGF reseptörü ile etkileşerek anjiyogenezde önemli bir rol oynar. Sentezlenen kaliksaren türevleri, PDGF'nin reseptörüyle olan etkileşimini keserek, reseptörün fosforilasyonunu önler, dolayısıyla anti-anjiyojenik ajanlar olarak işlev görür.(Zhou ve ark., 2006)

Endotel hücrelerinin proliferasyonunu kullanan in vitro bir çalışmada, Dings ve arkadaşları ayrıca, kaliksarenlerin üst kenarında tert-bütil, izopentil, izobutil ve propil

grupları ile alt kenarında tetra-âmin, metil ve diguanidino gruplarına sahip olan kaliksarenlerin güçlü anjiyogenez inhibitörleri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Daha sonra, in vivo çalışmalar, bu bileşiklerin polikatyon-modifiye edilmiş bir üyesinin MA-148 yumurtalık kanseri hücreleri ve B16 fare melanoma hücrelerine karşı daha iyi bir etkinliğe sahip olduğunu gösterdi.(Dings ve ark., 2006; Dings ve ark., 2013)

Kaliks [4] aren türevleri yapılan çalışmalarda anlamlı sitotoksisite göstermiş ve fosforilasyon yoluyla yeni kan damarlarının oluşumunu önleyerek, insan glioblastomunda trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörünü inhibe ederek tümör büyümesini ve anjiyogenezini inhibe etmiştir(Sebti ve Hamilton, 2001).

1.4.2. Enzim inhibisyonu

Enzim inhibisyonu, bazı kemoterapötik ilaçlar için ortak bir etki şeklidir. Bu konuda çeşitli kaliksaren türevleri çalışılmış ve güçlü enzim inhibitörleri olarak hareket ettiği bildirilmiştir. Örneğin, Cherenok ve arkadaşları fosforik, aminofosfonik ve metilen bisfosfonik asit kalıntıları ile birleştirilmiş kaliks[4]arenler üzerinde çalışmış ve alkalin fosfataz ve tirozin fosfataz gibi bazı fosfatazların aktif inhibitörleri olarak bulmuşlardır.(Yousaf ve ark., 2015)

Salvio ve ark. Bir hidroksipropil pnitrofenil fosfatın yanı sıra dirilonükleosit mono fosfatlarının 3',5' parçalanmasını katalize edebilen bir koni-kaliks [4] arenin üst kenarında yer alan bir bağlanmış Cu2 + ve bir guanidinyum grubunu birleştiren bir katalizörü rapor etmiştir. Cacciapaglia ve ark. aynı zamanda Zn^{2+} ve Cu^{+2} iyonları ile fonksiyonel hale getirilen kaliks[4]arenlerin RNA gibi ribonükleotidlerde fosfodiester hidrolizini katalizleyebileceğini de göstermiştir.(Cacciapaglia ve ark., 2006; Salvio ve ark., 2015)

1.4.3. Onkogenlerin baskılanması ve tümör supresör genlerinin upregülasyonu.

Kanser etiyolojisinde önemli bir gen, tümör baskılayıcı (p53) genidir. Kalıtsal bir bozukluk olan Li-Fraumeni sendromu mutasyona uğramış p53 tümör baskılayıcı proteininden kaynaklanır. Li-Fraumeni p53 mutantının transkripsiyonel aktivitesinin, oligomer formasyonunun stabilizasyonu yoluyla imidazolkaliks[6]aren kısmı tarafından geliştirildiği bulunmuştur.(Kamada ve ark., 2010)

Pelizzaro-Rocha ve ark, AXL ve Mer tirozin kinaz reseptörlerini aşırı ifade eden bir pankreatik karsinoma hücre hattında, kaliksarenlerin etkisini ve mekanizmasını araştırmıştır.(Pelizzaro-Rocha ve ark., 2013b) Herhangi bir modifikasyon yapılmayan kaliks[6]arenin, yaygın olarak kullanılan antikanser ilacı olan 5-florourasilden daha etkili olduğu bulunmuştur. Bu bileşik, bu iki reseptörün sinyal transdüksiyonunu başarılı bir şekilde ortadan kaldırmış ve rapamisin yolunun fosfatidilinositit 3-kinaz hedefini inhibe etmiştir.

Kaliks[6]arenin, bu iki reseptörün degradasyonunu uyararak Mer ve AXL seviyelerini düşürdüğü düşünülmektedir. Bununla birlikte, üst kenardaki kaliks[6]arenin hidrofobik modifikasyonu, antikanser potansiyelini ortadan kaldırmıştır.

1.4.4. Doğuştan bağışıklık modülasyonu

Bazı antikanser ilaçlar, fotodinamik tedavi ile sağladığı başarılarda olduğu gibi, konakçı bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine karşı savaşma kabiliyetini uyararak veya güçlendirerek çalışır. Benzer şekilde, antikor temelli kemoterapötik ilaçlar, kanser hücrelerinin çoğalmasını, hayatta kalmasını, farklılaşmasını ve göçünü arttıran konakçı bağışıklık bileşenlerini veya reseptörlerini güçlü bir şekilde hedefler. Bu tür ilaçların örnekleri arasında rituximab, trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab ozogamicin, kalicheamicin, ibritumomab tiuxetan ve tositumomab bulunur.(Schrama ve ark., 2006)

Bu açıdan bakıldığında, kaliksarenler de faydalı bulunmuştur. Daha ileri araştırmalar, glikokaliks[8]arenlerin, çizik yara modelinde sıçan C6 glioma hücrelerinin göçünü ve çoğalmasını inhibe ettiğini göstermiştir.(Viola ve ark., 2010)

Geraci ve arkadaşları, kaliksarenlerin immünoterapötik antikanser aktivitesini araştırmışlardır. Onlar, insan epitelyal karsinomlarla ilişkili MUC-1 proteininin aşırı ekspresyonuna odaklandılar. Özellikle, modifiye edilmiş kaliks[4] aren ve kaliks[8] aren platformları Toll-benzeri reseptör-2 ligandları ile yeni antikanser aşıları olarak geliştirilmiştir.(Geraci ve ark., 2013)

1.5. Hücre ölüm mekanizmaları

1.5.1. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk olarak 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından morfolojik olarak farklı bir hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır. Apoptoz, "kaspaz" adı verilen bir sistein proteaz grubunun ve başlatıcı uyaranın hücre ölümüne bağlandığı

karmaşık bir olaylar dizisinin aktivasyonunu içeren, koordineli ve çoğunlukla enerjiye bağımlı bir süreçtir. Apoptoz, bağışıklık reaksiyonlarında olduğu gibi veya hücreler zararlı maddeler tarafından hasar gördüğünde bir savunma mekanizması olarak da ortaya çıkar.(Elmore ve NIEHS, 2007)

Kanser kemoterapisinde kullanılan radyasyon veya ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarı ile sonuçlanır, bu da p53'e bağlı bir yoldan apoptotik ölüme yol açabilir. Bazı hücreler, ligand bağlanması ve protein çapraz bağlanması yoluyla apoptoza yol açabilen Fas veya TNF reseptörlerini eksprese eder. Diğer hücreler, bir hormon veya büyüme faktörü gibi bir sağkalım faktörü tarafından bloke edilmesi gereken bir ölüm yoluna sahiptir.(Hirsch ve ark., 1997; Zeiss, 2003)

Işık ve elektron mikroskobu apoptoz sırasında meydana gelen çeşitli morfolojik değişiklikleri tanımlamıştır.(Elmore ve NIEHS, 2007) Apoptozun erken sürecinde, hücre büzülmesi ışık mikroskobu ile görülebilir.(Kerr ve ark., 1972) Büzülme ile birlikte hücreler daha küçülür, sitoplâzma yoğun ve organeller daha sıkı bir şekilde paketlenmiştir. Piknosis, kromatin yoğunlaşmasının bir sonucudur ve bu, apoptozun en karakteristik özelliğidir. Hematoksilen ve eozin boyası ile yapılan histolojik incelemede, apoptoz tek hücreler veya küçük hücre kümelerini içerir.

Apoptotik hücre, koyu eozinofilik sitoplâzma ve yoğun mor nükleer kromatin fragmanları ile yuvarlak veya oval bir kitle halinde görünür. Geniş plazma zarı kabarması, ardından karyokinez ve hücre parçalarının apoptotik cisimlere ayrılması ve ardından "tomurcuklanma" adı verilen bir süreçtir. Apoptotik cisimler, bir çekirdek fragmanı olan veya olmayan sıkı bir şekilde paketlenmiş organelleri olan sitoplâzmadan oluşur. Organel bütünlüğü hala korunur ve bütün bunlar sağlam bir plazma membranı içine alınır. Bu cisimler daha sonra makrofajlar, parankimal hücreler veya neoplastik hücreler ve fagolizozomlar tarafından fagositoz olurlar.

1.5.2. Apoptoz mekanizmaları

Apoptoz mekanizmaları, enerji bağımlı bir moleküler olaylar dizisini içeren, son derece karmaşık bir olaydır.(şekil.3.) Bugüne kadar yapılan araştırmalar dışsal (ölüm reseptör yolu) ve intrinsik (mitokondriyal yol) olarak adlandırılan iki ana apoptotik yol olduğunu göstermektedir.

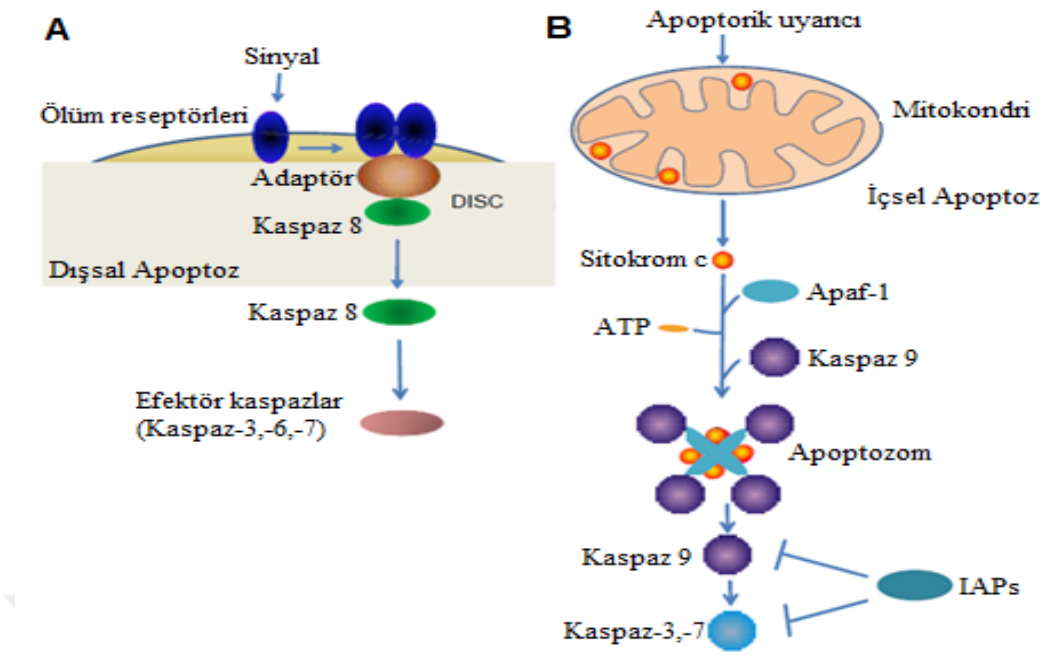
Ölüm Reseptör Aracılı Apoptoz (Ekstrinsik Apoptoz): Apoptozu başlatan ekstrinsik sinyal yolları transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içerir. Bunlar, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen süper familyasının üyeleri olan ölüm reseptörlerini içerir.(Elmore ve NIEHS, 2007). TNF reseptör familyasının üyeleri, benzer sinoz

bakımından zengin hücre dışı bölgeleri paylaşırlar ve "ölüm domeini" olarak adlandırılan yaklaşık 80 aminoasitten oluşan bir sitoplazmik alana sahiptirler.(Ashkenazi ve Dixit, 1998) Bu ölüm domaini, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyalizasyon yollarına iletilmesinde kritik bir rol oynar. Bugüne kadar, en iyi karakterize edilmiş ligandlar ve bunlara karşılık gelen ölüm reseptörleri arasında FasL / FasR, TNF-a / TNFR1, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4 ve Apo2L / DR5 bulunur. Apoptosisin ekstrinsik fazını tanımlayan olaylar dizisi en iyi FasL / FasR ve TNF-α / TNFR1 modelleriyle karakterize edilir. Bu modellerde, reseptörlerin kümelenmesi ve homolog trimerik ligand ile bağlanma vardır.

Mitokondri Aracılı Apoptoz (İnstrinsik Apoptoz): Apoptozu başlatan intrinsik sinyal yolları, hücre içindeki hedefler üzerinde doğrudan etki eden ve mitokondriyal olarak başlatılan olayların hücre içi sinyaller üreten reseptör-aracılı olmayan uyaranlar dizisini içerir. İçsel yolu başlatan uyaranlar, pozitif veya negatif bir şekilde etki edebilecek hücre içi sinyaller üretir. Negatif sinyaller, ölüm programlarının bastırılmasındaki başarısızlığa yol açabilecek bazı büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinlerin yokluğunu içerir, böylece apoptoz tetiklenir.

Bu apoptotik mitokondriyal olayların kontrolü ve düzenlenmesi, Bcl-2 protein ailesinin üyeleri aracılığıyla gerçekleşir.(Cory ve Adams, 2002) Tümör baskılayıcı protein p53, Bcl-2 protein ailesinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir, ancak kesin mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. (Schuler and Green, 2001).

Bcl-2 protein ailesi, mitokondriyal membran geçirgenliğini yönetir ve proapoptotik veya antiapoptotik olabilir. Bazı anti-apoptotik proteinler arasında Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG ve bazı pro-apoptotik proteinler arasında Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad , Bim, Bik ve Blk proteinleri bulunmaktadır. Bu proteinler, hücrenin apoptozise bağlı olup olmadığını veya işlemi iptal edip etmediğini belirleyebildikleri için özel bir öneme sahiptir. Bcl-2 protein ailesinin ana etki mekanizmasının, mitokondriyal membran geçirgenliğinin değiştirilmesi yoluyla mitokondriden sitokrom c salınımının düzenlenmesi olduğu düşünülmektedir.



Şekil 1.1. Dışsal (A) ve içsel (B) apoptoz yolakları. Her iki mekanizma da kaspaz aktivasyonuna yol açar.(Li ve Sheng, 2012)

1.5.3. Otofaji

Çok hücreli organizmaların gelişimi hücre büyümesi, hücre bölünmesi ve hücre ölümü arasında önemli bir dengeyi gerektirir. Bu hücresel programların koordinasyonu, uygun organ ve vücut büyüklüğünü sağlar ve hücre bölünmesinin ve ölümünün arasındaki dengenin bozulması, anormal hücre büyümesinin ortaya çıkması ile sonuçlanabilir.(Baehrecke, 2005). Büyüme sinyallerine hücresel yanıt, hücre ve hücre dışı matriks arasındaki etkileşimler, metabolik oran, beslenme durumu ve besin alımı dahil olmak üzere diğer faktörler de anormal hücre büyümesi sırasında değişebilir.(Baehrecke, 2005)

Hücrelerde morfoloji, yer ve lizozomlara bağımlılık temelinde üç hücre ölümü tanımlanmıştır. Tip 1 programlanmış hücre ölümü (veya apoptoz) çekirdek ve sitoplâzmanın yoğunlaşması, kromatin ile çekirdek arasındaki ilişki, DNA fragmantasyonu, membran kabarcıklanması ve ölümcül hücrenin bir fagosit tarafından lizozomal olarak parçalanması ile tanımlanır. Tip 2 (otofajik) hücre ölümü, otofajik vakuoller ve kendi kendine yıkım için kullanılan hücrede otofagolizozomların varlığı ile apoptozdan ayrılır ve bu işlem fagositozdan bağımsızdır.

Tip 3 hücre ölümü, sitoplâzmada organellerin şişmesi ve lizozomdan bağımsız olarak "boş alanların" oluşmasını içerir ve nekroz ile benzerlik gösterir. Sitoplâzmanın bileşenlerinin büyük ölçekli bozunması için iki genel mekanizma kullanılır; kısa ömürlü

düzenleyici proteinler, ubikuitin proteazom sistemi tarafından yok edilir ve uzun ömürlü yapılar ve proteinler, otofaji yoluyla lizozomlar tarafından yok edilir.(Klionsky ve Emr, 2000)

"Otofajik hücre ölümü" terimi, apoptozdan morfolojik olarak ayrı olan ve hücresel otofajinin aşırı düzeylerinden kaynaklandığı varsayılan bir programlanmış hücre ölümünü tanımlar.(Schweichel, 1973.)

Apoptotik hücre ölümü kaspaz bağımlı olduğu ve internükleozomal DNA bölünmesiyle karakterize edilirken, kaspaz aktivasyonu ve DNA fragmantasyonu otofajik hücre ölümlerinde çok geç meydana gelir (Şekil 3). Nekrozun aksine, hem apoptotik hem de otofajik hücre ölümleri bir doku inflamatuar yanıtının eksikliği ile karakterize edilir.

Açlık, sitoplâzmada bulunan bileşenlerin otofaji ile parçalanmasını tetikler. Bu, sitoplazmik yükün, bozunmaya yönelik lizozoma taşınmasını sağlayan, otofagozomlar olarak da bilinen çift membranlı otofajik vakuollerin oluşmasını içerir.(Klionsky ve Emr, 2000)

Otofaji, sınıf I ve sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) sinyal yolakları tarafından düzenlenir.(Baehrecke, 2005) Son çalışmalar, sınıf I PI3K yolunun birçok bileşeninin hayvan hücrelerinde otofajinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiştir.(Baehrecke, 2005)

Sınıf I PI3K, insülin reseptörü ve insülin reseptör substrat proteinleri tarafından aktive edilen ve böylece beslenmeye elverişli bir bağlantı sağlayan bir otofajinin negatif bir regülâtörüdür. Sınıf I PI3K'nın aktivasyonu, otofajinin bir negatif regülatörü olan Akt/protein kinaz B'yi (PKB) çalıştıran ve aktive eden plazma membran lipitlerinin fosforilasyonuna yol açar.

Tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homologu (PTEN), fosfatların lipitler üzerinde birikmesini ve Akt/PKB'nin aktivasyonunu önleyerek otofajiyi olumlu yönde düzenler. Sınıf I PI3K sinyal yolunun hücresel homeostazın sürdürülmesinde; homeostaz protein sentezi, besin alımı, hücre döngüsü, apoptoz inhibisyonu ve otofaji dahil olmak üzere çeşitli süreçlerin düzenlenmesini içeren karmaşık bir rolü vardır.(Cantley, 2002; Ogier-Denis ve Codogno, 2003) Birçok çalışma PI3K ve Akt sinyalinin hücre sağ kalımını sağladığını göstermiştir.

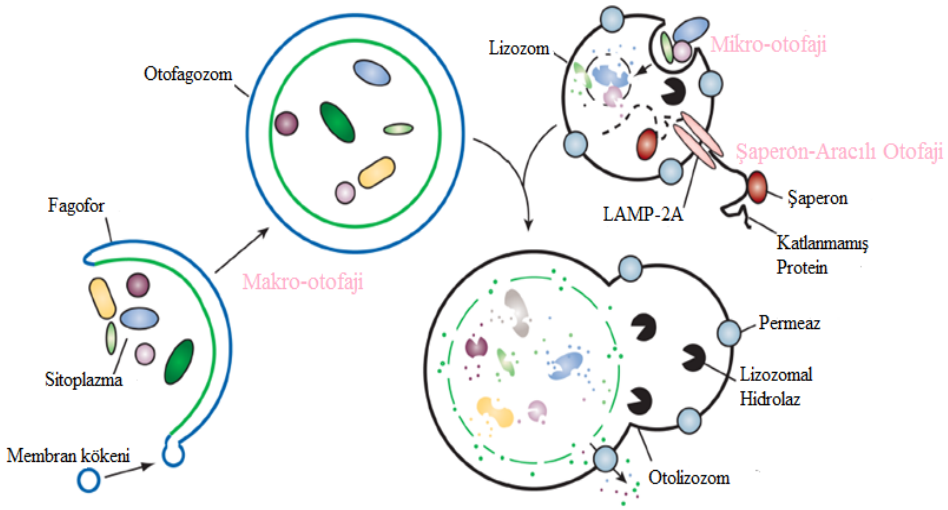
Son çalışmalar, apoptoz ile otofajik hücre ölümü de dahil olmak üzere diğer hücre ölüm şekilleri arasında bir ilişki olduğunu belirlemiştir. Hücre dışı ölüm

ligandlarına maruz kalan hücreler, tümör nekroz faktörü ve Fas ligandı dahil olmak üzere ölüm reseptörü aracılı apoptoza uğrar.(Jäättelä ve Tschopp, 2003)

Bu ligandlar, FADD ve TRADD ve reseptör-etkileşimli protein RIP de dahil olmak üzere adaptör proteinlerini toplayan trimerik ölüm alıcıları tarafından bağlanır. Bağdaştırıcı proteinler daha sonra aktif hale getirildikleri ve apoptosis başlattıkları bu ölüm reseptör sinyalleme kompleksine prokaspaz-8 ve prokaspaz -10 eklediler. Kaspaz-8 ve kaspaz-10 ya kaspaz-3 gibi efektör kaspazları doğrudan aktive eder veya BCL2 aile üyelerini, sitokrom c salımını ve apoptozomun oluşumunu ve aktivasyonunu içeren mitokondriyal apoptoz yolunu aktive eder.(Shi, 2002)

Ölüm reseptör sinyallemesi kaspazdan bağımsız hücre ölümünü de aktive edebilir ve ölmekte olan hücreler vakuollü, nekroz benzeri morfolojiye sahiptir.(Baehrecke, 2005) Bu kaspaz bağımlı hücre ölümlerinin birçoğu, bu tip hücre ölümlerini fizyolojik olmayan nekrozdan ayıran spesifik gen işlevlerine bağlıdır ve bu, bu tür ölmekte olan hücrelerde otofajinin olup olmadığını araştırmamıza neden olmuştur.

Önemli olarak, otofajik yapıların oluşumu ve hücre ölümünün indüksiyonu, Atg7 ve Atg6 otofaji genlerinin susturulmasıyla engellenebilir. Benzer şekilde, BCL2 ailesi üyelerinin BAX ve BAK'sinin fonksiyonundan yoksun farelerden elde edilen embriyonik fibroblastlar, apoptozise dirençlidir, ancak Atg5 ve Atg6 fonksiyonunu gerektiren otofajik hücre ölümü ile ölmektedirler.(Shimizu ve ark., 2004)



Şekil.1.2. Otofaji çeşitlerinin şematik gösterimi.(Mizushima ve ark., 2008)

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. p-tert-bütilkaliks[4]aren Diamit Türevlerinin sentezi

İlk basamakta oluşmuş olan 2.13 g (2.5 mmol) Diester bileşiği CH_2Cl_2 : CH_3OH (45 ml/45 ml) içinde çözdürüldü. Üzerine 15 mmol (1.62 g) ilave edildi. Bu işlem sonrası oluşan reaksiyon 3 gün oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Elde edilen reaksiyon ITK'den takip edilerek başlangıç maddelerinin ürüne dönüşümü gözlenildi. Ayrıca reaksiyonda 1751 cm^{-1} olan ester karbonil bandının **2-AMP** için 1676 cm^{-1}, **3-AMP** 1681 cm^{-1} **4-AMP** için 1638 cm^{-1} amid karbonil bandına dönüşümü FT-IR spektroskopisi ile tespit edildi. Reaksiyon sonunda oluşan çözücü evaparasyon ile uzaklaştırıldı ve geriye kalan katı parçacık 250 ml $CHCl_3$ ile çözdürüldü. Çözdürülen katı parçacık huni yardımıyla saf su ile yıkandı, yıkama sonunda organik faz kuru magnezyum sülfat ile kurutuldu ve süzüldü. Süzüntü evaparatör ile yoğunlaştırılıp, yavaşça CH_3OH damlatılarak kristallenmeye bırakıldı. İşlem sonrasında kristaller süzülerek alındı. (Sayin ve ark., 2011; Ozcan ve ark., 2015). Çalışmada kullanılan *p-tert*-bütilkaliks[4]aren diamit türevleri Tablo.2.1.'de gösterildiği gibi tanımlandı.

Tablo.2.1. p-tert-bütilkaliks[4]aren diamit türevleri

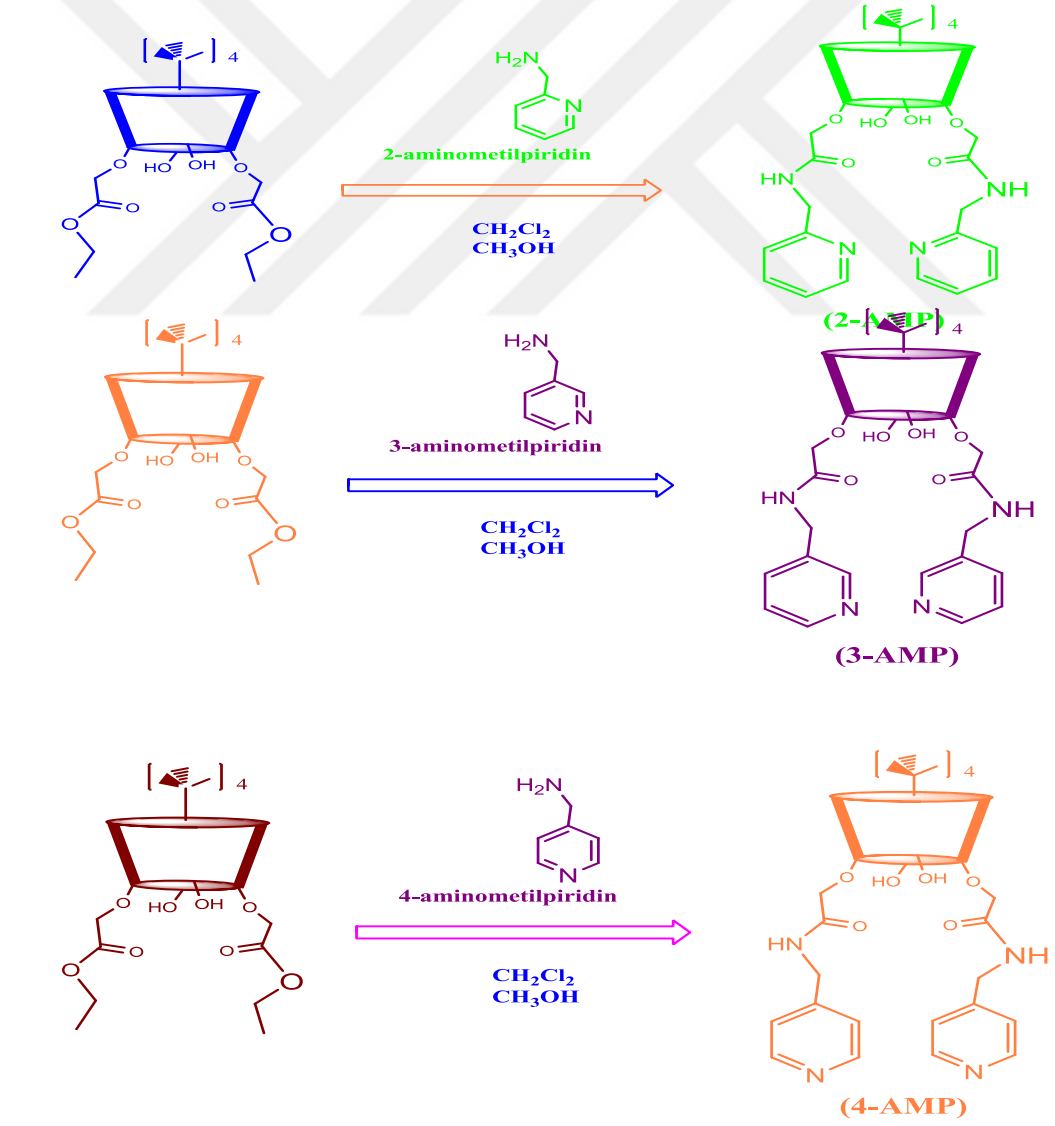
KISALTMA	TÜREVLER
2-AMP	2-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren
3-AMP	3-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren
4AMP	4-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren

2-AMP (**2-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren)**; Verim: 1.48 g, (% 65.0), E.n : 259-262 IR :1663 cm^{-1} (C=N) ν_{max} (ATR): 3454, 3358, 1676 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz $CDCl_3$): δ 0.98 (18H, s, tBu), 1.22(18H, s, tBu), 3.31 (4H, d, *J*= 13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.02 (4H, d, *J* =13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.50–4.55 (8H, m, OCH_2, $Ar–CH_2–NH$), 6.85 (4H, s, ArH), 7.00 (4H, s, ArH), 7.06–7.10 (2H, m, PyH), 7.18 (2H, s, OH), 7.61 (2H, d, *J*=7.8 Hz, PyH), 8.45 (2H, d, *J*=4.5 Hz, PyH), 8.62 (2H, d, PyH), 9.21(2H, t, NH). Anal. Hesapl. $C_{60}H_{72}O_6N_4$: C, 76.24; H, 7.68; N, 5.93. Bulunan; C, 76.28; H, 7.70; N, 5.88% (M_A: 944.56 g/mol).

3-AMP (**3-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren)**; Verim: 1.5 g, (% 65.8) , E.n : 239-242 IR :1668 cm^{-1}(C=N) ν_{max} (ATR): 3454, 3358, 1681 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz $CDCl_3$): δ 0.98 (18H, s, tBu), 1.22(18H, s, tBu), 3.27 (4H, d, *J*=13.3 Hz, $ArCH_2Ar$),

3.90 (4H, d, *J*=13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.46–4.49 (8H, m, OCH_2, $Ar–CH_2–NH$), 6.85 (4H, s, ArH), 7.00 (4H, s, ArH), 7.06–7.10 (2H, m, PyH), 7.18 (2H, s, OH), 7.61 (2H, d, *J*= 7.8 Hz, PyH), 8.45 (2H, d, *J*=4.5 Hz, PyH), 8.62 (2H, d, PyH), 9.21(2H, t, NH). Anal. Hesapl. $C_{60}H_{72}O_6N_4$: C, 76.23; H, 7.68; N, 5.93. Bulunan: C, 76.31; H, 7.74; N, 5.83%.

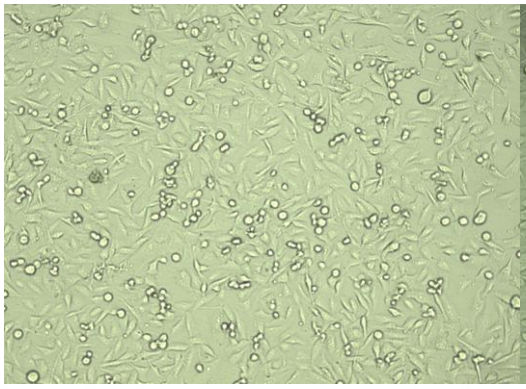
4-AMP (4-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren); Verim: 1.72 g, (% 75.5) , E.n : 239-242 IR :1609 cm^{-1} (C=N) ν_{max} (ATR): 3454, 3358, 1638 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz $CDCl_3$): δ 1.0 (18H, s, tBu), 1.27 (18H, s, tBu), 3.38 (4H, d, *J*=13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 3.55 (4H, sAr–CH_2–NH), 3.86 (4H, d, *J*=13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.80 (4H, s, OCH_2), 6.85 (4H, s, ArH), 6.88 (4H, s, ArH), 7.05 (2H, m, PyH), 7.26 (2H, d, *J*= 7.8 Hz, PyH), 7.48 (2H, s, OH), 7.54 (2H, d, *J*= 7.8 Hz, PyH), 9.33 (2H, t, NH). Anal. Hesapl. $C_{60}H_{72}O_6N_4$:C, 76.23; H, 7.68; N, 5.93. Bulunan: C, 76.31; H, 7.74; N, 5.83%.



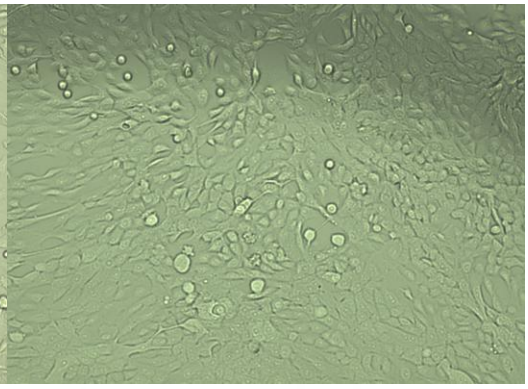
Şekil 2.1. 2-3-4-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren Diamit Türevlerinin Sentezi.

2.2. Hücre Kültürü

Meme adenokarsinoma hücre hattı olan MDA-MB-231 hücre hattı ve tümörojenik olmayan sağlıklı meme hücre hattı MCF-10A ATCC (American Type Culture Collectıon)'den temin edildi.



Şekil 2.2. MDA-MB-231 hücre hattının inverted mikroskopta 10X objektif görüntüsü



Şekil 2.3. MCF-10A hücre hattının inverted mikroskopta 10X objektif görüntüsü

Dondurulmuş olan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Süpernatant atılarak MDA-MB-231 hücreleri % 10 fetal bovine serum (FBS; Biowest-Amerika), 1mg/ml antibiyotik olan gentamisin (VWR, Avusturya) içeren RPMI-1640 (Biochrom-Merck, Almanya) kültür medyumunda T-25 kültür flasklarına eklenerek 37^{o} C 'de %5 CO_2 bulunan etüvde inkübasyona bırakıldı. MCF-10A hücreleri ise %5 donör horse serum (Biowest, Amerika) % 1 antibiyotik (Penisilin-Streptomisin; Biochrom-Merck, Almanya) ve 100 µM Epidermal büyüme faktörü (Sigma; Almanya), 500 µM İnsülin (Sigma; Almanya), 250 µM Hidrokortizon içeren DMEM-F12 (Merck, Almanya) besiyerinde T-25 kültür flasklarına eklenerek 37^{o} C 'de % 5'lik CO_2 bulunan etüvde inkübasyona bırakıldı.

Hücreler %70-80 doluluğa ulaştığında pasaj işlemi uygulandı. Bunun için hücre kültür kabının içindeki besiyeri çekilerek hücreler HANKS solüsyonu (Hanks' salt solution Biochrom-Merck, Almanya) ile yıkandı. Hücre kültür kabına tripsin-EDTA (Biochrom-Merck, Almanya;) eklenerek hücreler kültür kabının yüzeyinden kalkana kadar 37 °C % 5'lik CO_2'li etüvde bekletildi. Hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadığı inverd mikroskopta kontrol edildi. Tripsin etkisini inaktive etmek için kültür kabına tripsinin iki katı kadar besiyeri eklendi. Elde edilen hücre solüsyonu 15 ml'lik tüplere aktarıldı. 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak belirli oranda

pellet, besiyeri ile çözdürüldü ve kültür kabına aktarılarak 37 °C'de, % 5'lik CO_2'li etüvde inkübe edildi.

2.3. Hücrelerin sayımı ve ekimi

Ekimi yapılacak olan hücreler öncelikle inverd mikroskopta incelendi. % 80-85 doluluğa ulaşan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak flaskları HANKS solüsyonu ile yıkandı. Sonrasında tripsin-EDTA eklenerek 37 °C'de, % 5'lik CO_2 bulunan etüvde hücreler yüzeyden kalkana kadar bekletildi. Tripsinin aktivitesini durdurmak için tripsinin 2 katı kadar besiyeri eklendi. İyice pipetaj yapılarak 15 ml'lik tüplere aktarıldı. 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre süspansiyonu thoma lamına alındı ve canlı hücreler ışık mikroskobu altında (10x büyütme) sayımı yapıldı. Toplam, canlı ve ölü hücre sayısı aşağıdaki formül uygulanarak hesaplandı:

1 ml'deki hücre sayısı= sayılan bölgelerin ortalaması x dilüsyon katsayısı x 10^4

MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri 96 kuyucuklu plakalara hücre yoğunluğu enaz $1x10^5$ olacak şekilde ekimleri yapıldı. Daha sonra plakalar 37 °C'de, % 5'lik CO_2'de etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

2.4. Hücre Canlılık Analizleri

2.4.1.MCF-10A VE MDA-MB-231 Hücrelerinin Canlılık Analizi

Sitotoksisite analizleri, metabolik yolaklarda veya hücrenin yapısal bütünlüğünde hücre ölümüyle doğrudan ilişkili olmayan veya ilişkisi olabilecek ilaca bağlı değişimleri ölçer iken canlılık (sağ kalım) deneyleri, hücre geri kazanımı veya hücre ölümü olabilen bu tür metabolik karışıklığın son sonucunu ölçer. Bileşiklerin hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisini takip etmek için XTT testi, trypan mavisi testi gibi boya dışlama tekniği gibi birçok teknik kullanılmaktadır. (P.uyar, 2011)

Bu deneyde hücrelerin canlılık testi XTT analizi ile gerçekleştirildi. Bunun için MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri kültür medyumu içinde 96 kuyucuklu plakalara ekildi ve 24 saat boyunca 37 °C'de, % 5'lik CO_2'de etüvde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra hücreler farklı dozlardaki etken madde içeren 50 µl besiyeri ile muamele edildi ve 24 saat boyunca 37 °C'de, % 5'lik CO_2'de etüvde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra her kuyucuğa 50 µl XTT solüsyonu eklendi ve 5 saat 37 °C'de, % 5'lik CO_2'de etüvde inkübe edildi. Süre sonunda plakalar mikro-plaka okuyucu ELISA (Epoch Biotek, Amerika) cihazında 460-650 nm dalga boylarında okutularak absorbansları ölçüldü.

2.4.2. MCF-10A VE MDA-MB-231 Hücrelerinin Gerçek Zamanlı (xCELLigence) Analizi

Gerçek zamanlı xCELLigence hücre analiz sistemi, elektriksel iç direnci kullanılarak hücrelerin çoğalmasını, morfoloji değişimini, hücre göçünü ve hücre invazyonu gibi hücrelerin fenotipik değişikliklerini ölçerek hücre hareketlerinin izlenmesine izin verir.

Bunun için hücre yoğunlukları MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri için e-plakadaki her kuyucuğa enaz $1x10^5$ olacak şekilde ekildi. Hücreler 24 saat boyunca 37 °C'de, % 5'lik CO_2 etüv içerisinde xCELLigence (Acea, Amerika) cihazında inkübasyona bırakıldı ve hücrelerin çoğalma grafiği cihaza bağlı olan bilgisayar ekranından izlendi. Süre sonunda Cell İndex'i (CI) 1'e ulaşan hücrelerin üzerine kendi besiyeri ile çözdürülerek istenilen konsantrasyonları hazırlanan 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP maddeleri e-plakada her doza uygun kuyucuklara 50 µl eklenerek cihazda gerçek zamanlı olarak analizi değerlendirildi. Bu şekilde maddelerin zamana ve doza bağlı etkisi incelendi.

2.4.3. MCF-10A VE MDA-MB-231 Hücrelerinin Trypan Blue İle Canlılık Analizi

Boya dışlama tekniği, hücre canlılığını takip eden diğer test türüdür. Bu teknik, Tripan mavisi kullanılan özel bir boyadır. (P.uyar, 2011)

Bunun için hücreler 6 kuyucuklu plakalara MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri enaz $1x10^5$ olacak şekilde ekildi. Hücreler 24 saat boyunca 37 °C'de, % 5'lik CO_2 etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hücre kuyucuklarının üzerine istenilen konsantrasyonlarda 1 ml 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP maddeleri eklendi. Plaka 37 °C'de, % 5'lik CO_2 etüv içerisinde 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardaki besiyeri atılarak kuyucuklar HANKS ile yıkandı. Tripsin-EDTA eklenerek hücreler kuyucuklardan kaldırıldı. Hücre süspansiyonu 15 ml'lik tüplere aktarıldı. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet 100 µl besiyer ile çözdürüldü. Üzerine 100 µl trypan blue (Sigma; Almanya), eklenerek karıştırıldı ve 1,5 ml'lik ependorfa aktarıldı. Hücre iyice süspanse edildi ve 10 µl thoma lamına eklendi. Canlı hücrelerin ışık mikroskobu altında (10x büyütme) sayımı yapıldı. Toplam, canlı ve ölü hücre sayısı aşağıdaki formül uygulanarak hesaplandı:

1 ml'deki hücre sayısı= sayılan bölgelerin ortalaması x dilüsyon katsayısı x 10^4

2.4.4. MCF-10A VE MDA-MB-231 Hücrelerinin Konfokal Mikroskop Analizi

MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP maddeleri eklendikten sonra hücrelerin büyümesi ve morfoloji değişikliklerini incelemek için, hücre iskeletleri (cytoskelet) ve hücre çekirdekleri (nucleus) boyanarak lazer taramalı konfokal mikroskopta (Nikon A1R-A1; İngiltere) incelendi. MDA-MB-231 hücreleri ise $1x10^5$ olacak şekilde MCF-10A hücreleri 24 kuyucuklu plakaya $3x10^5$ olacak şekilde ekildi. Hücreler 24 saat boyunca 37 °C'de, % 5'lik CO_2 etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücre kuyucuklarının üzerine istenilen konsantrasyonlarda 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP maddeleri eklendi ve 24 saat inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyeri çekilerek kuyucuklar PBS ile yıkandı. PBS tamponu uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklar % 4 paraformaldehit çözeltisiyle oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve uzaklaştırılan paraformaldehit sonrasında kuyucuklar PBS tamponu ile tekrar yıkandı. Sonrasında PBS ile seyreltilen % 0,5 Triton X-100 solüsyonu eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. % 0,5 Triton X-100 solüsyonunu uzaklaştırılarak, kuyucuklar PBS ile yıkandı. PBS ile seyreltilen phalloidin kuyucuklara eklendi ve 30 dakika oda ısısında bekletildi. Süre sonunda phalloidin uzaklaştırılarak kuyucuklar PBS ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından PBS ile seyreltilen DAPI (4'6-Diamino-2-Fenilindol, Dihidroklorür) boyası da kuyucuklar üzerine eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Sonrasında DAPI uzaklaştırıldı ve kuyucuklar PBS ile yıkandı. Hücreler mikroskopta incelendi ve 488 nm ve 635 nm dalga boylarında görüntüleri alındı.

2.4.5. MCF-10A VE MDA-MB-231 Hücrelerinin Flow Sitometri Analizi

Kanser tedavisinde en yaygın kullanılan ilkelerden biri, kanser hücrelerinin apoptosis tarafından ölmesine neden olmaktadır. Apoptoz, hücrelerin çeşitli fizyolojik ve patolojik şartlar altında nasıl öldüğünü açıklamak için kullanılan terimdir. Apoptoz, morfolojik değişikliklerle sonuçlanan hücre ölümünün genetik olarak programlanmış mekanizması olarak tanımlanır ve plazma membranının kabarcıklaşması, hücrenin büzülmesi, sitoplâzmanın ve çekirdeğin yoğunlaşması ve hücresel fragmentasyonun zar apoptotik cisimlere dönüşmesi ile karakterize edilir.(P.uyar, 2011)

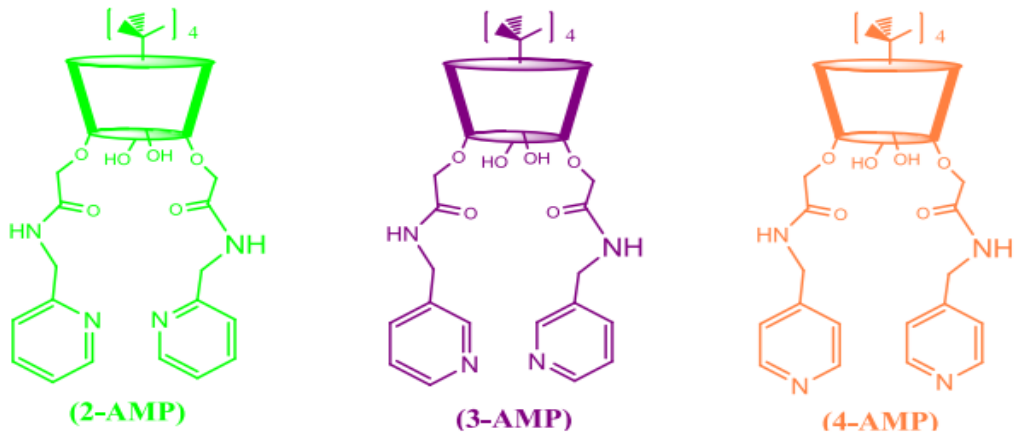
Hücrelerin apoptoz analizi Annexin-V metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için MDA-MB-231 hücreleri, hücre yoğunluğu $1x10^5$ olacak şekilde T-25 hücre kültür flasklarına ekildi. 24 saat boyunca 37 °C'de, % 5'lik CO_2 etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücre kültür flasklarının üzerine istenilen konsantrasyonlarda 3-AMP ve 4-AMP maddeleri eklendi ve 24 saat inkübasyon yapıldı.

Süre sonunda T-25 hücre kültür kabındaki besiyer uzaklaştırıldı ve hücreler tripsin-EDTA eklenerek kaldırıldı. Hücreler falkon tüpüne aktarıldı ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak hücreler soğuk PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırılarak 100 µl Bağlama tamponu (1x) eklenerek hücreler süspanse hale getirildi. Tampon ilavesinden sonra hücrelerin üzerine önce 5 µl Annexin-V eklendi, sonra 5 µl 7-AAD eklendi. Hücreler hafifçe vortekslenerek 15 dakika karanlıkta oda ısısında bekletildi. Her tüpe 400 µl bağlama tamponu eklenilerek flow sitometri (BD FACSAria-III; Amerika) cihazında analizi yapıldı.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. 2-AMP 3-AMP 4-AMP'nin Yapı, Karekterizasyon ve Analiz Sonuçları

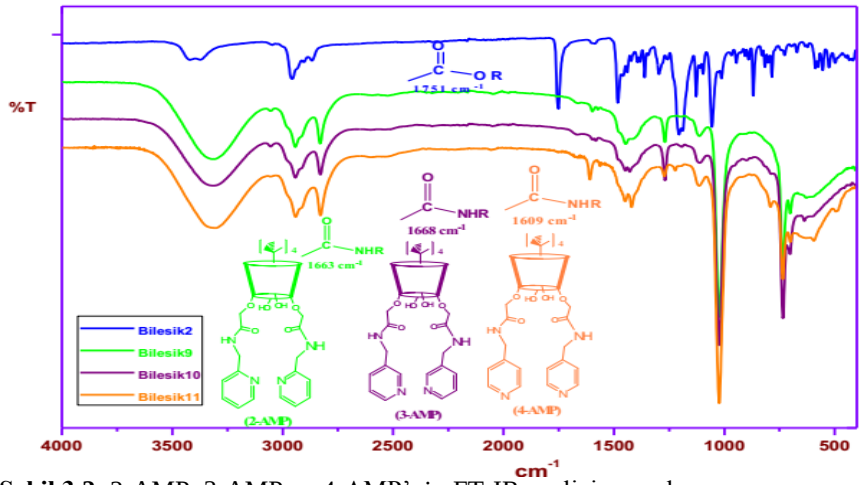
İlk basamakta oluşmuş olan 2.13 g (2.5 mmol) Diester bileşiği CH_2Cl_2 : CH_3OH (45 ml/45 ml) içinde çözdürüldü. Üzerine 15 mmol (1.62 g) ilave edildi. Bu işlem sonrası oluşan reaksiyon 3 gün oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Elde edilen reaksiyon ITK'den takip edilerek başlangıç maddelerinin ürüne dönüşümü gözlenildi.



Şekil 3.1. 2-Aminometilpridin, 3-Aminometilpridin, 4-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]arenin diamid türevleri

3.1.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP Maddelerinin FT-IR Analizi Sonuçları

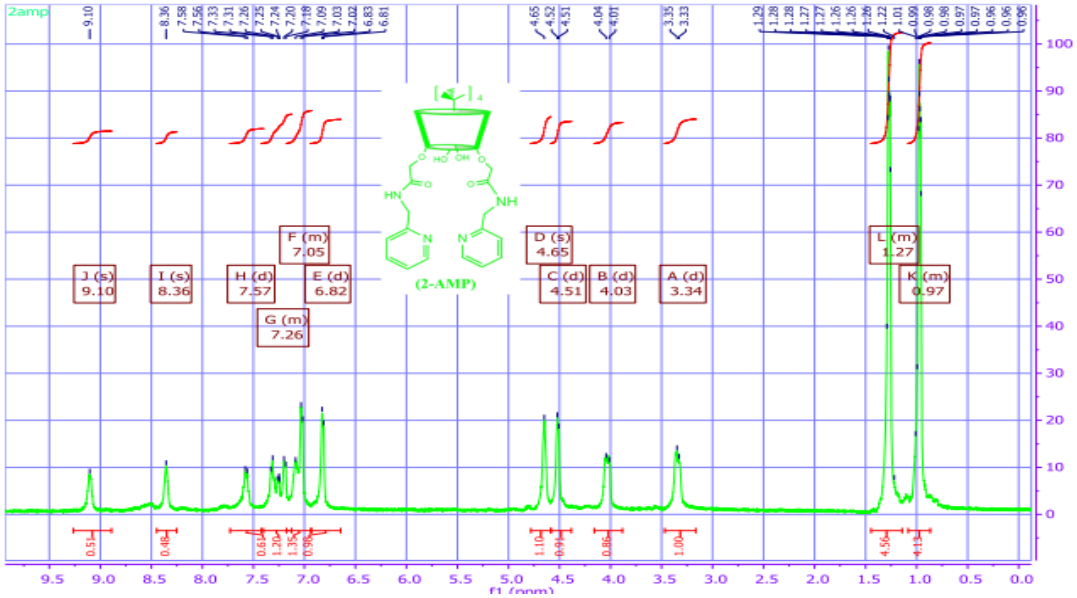
Oluşturulan reaksiyonda 1751 cm^{-1} olan ester karbonil bandının **2-AMP** için 1676 cm^{-1}, **3-AMP** 1681 cm^{-1} **4-AMP** için 1638 cm^{-1} amid karbonil bandına dönüşümü FT-IR spektroskopisi ile tespit edildi.



Şekil 3.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin FT-IR analizi sonuçları

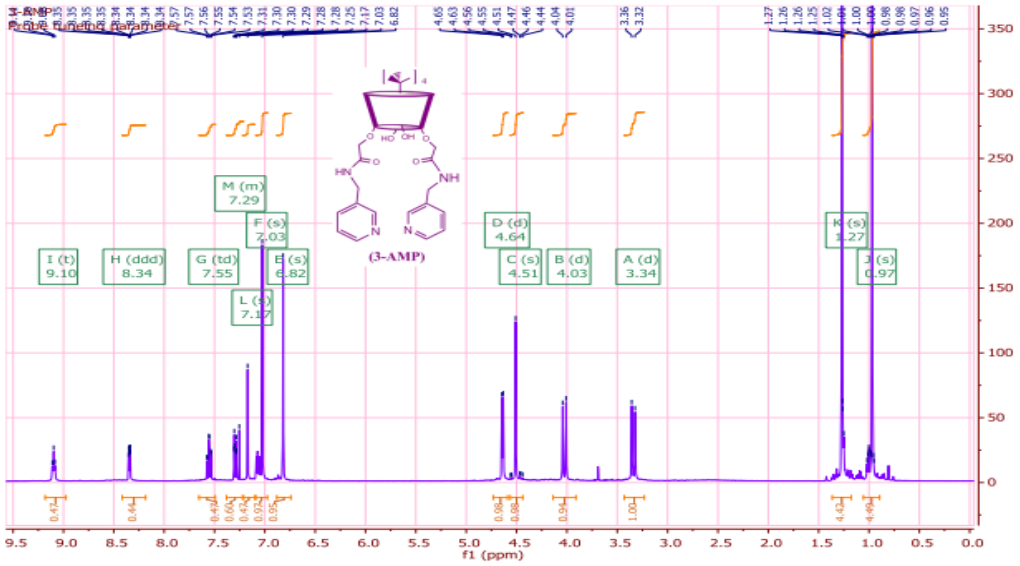
3.1.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin ^{1}H-NMR Spektrum Sonuçları

2-AMP (**2-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren)**; Verim: 1.48 g, (% 65.0), E.n : 259-262 IR :1663 cm^{-1} (C=N) ν_{max} (ATR): 3454, 3358, 1676 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz $CDCl_3$): δ 0.98 (18H, s, tBu), 1.22(18H, s, tBu), 3.31 (4H, d, *J*= 13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.02 (4H, d, *J* =13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.50–4.55 (8H, m, OCH_2, Ar–CH_2–NH), 6.85 (4H, s, ArH), 7.00 (4H, s, ArH), 7.06–7.10 (2H, m, PyH), 7.18 (2H, s, OH), 7.61 (2H, d, *J*=7.8 Hz, PyH), 8.45 (2H, d, *J*=4.5 Hz, PyH), 8.62 (2H, d, PyH), 9.21(2H, t, NH). Anal. Hesapl. $C_{60}H_{72}O_6N_4$: C, 76.24; H, 7.68; N, 5.93. Bulunan; C, 76.28; H, 7.70; N, 5.88% (M_A: 944.56 g/mol).



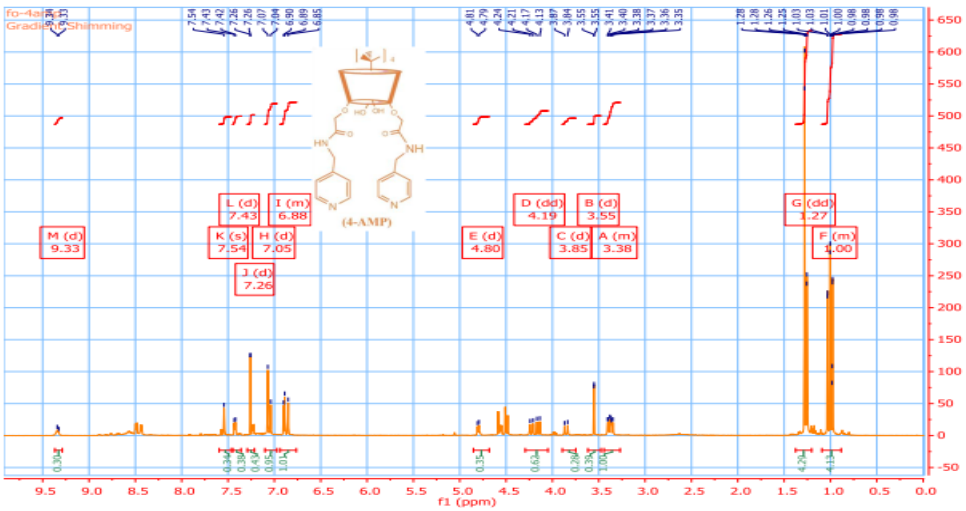
Şekil 3.3 2-AMP **(**2-Aminometilpridin)'nin ^{1}H-NMR spektrum sonuçları

3-AMP (**3-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren)**; Verim: 1.5 g, (% 65.8) , E.n : 239-242 IR :1668 cm^{-1}(C=N) ν_{max} (ATR): 3454, 3358, 1681 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz $CDCl_3$): δ 0.98 (18H, s, tBu), 1.22(18H, s, tBu), 3.27 (4H, d, *J*=13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 3.90 (4H, d, *J*=13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.46–4.49 (8H, m, OCH_2, Ar–CH_2–NH), 6.85 (4H, s, ArH), 7.00 (4H, s, ArH), 7.06–7.10 (2H, m, PyH), 7.18 (2H, s, OH), 7.61 (2H, d, *J*= 7.8 Hz, PyH), 8.45 (2H, d, *J*=4.5 Hz, PyH), 8.62 (2H, d, PyH), 9.21(2H, t, NH). Anal. Hesapl. $C_{60}H_{72}O_6N_4$: C, 76.23; H, 7.68; N, 5.93. Bulunan: C, 76.31; H, 7.74; N, 5.83%.



Şekil 3.4 3-AMP **(**3-Aminometilpridin)'nin ^{1}H-NMR spektrum sonuçları

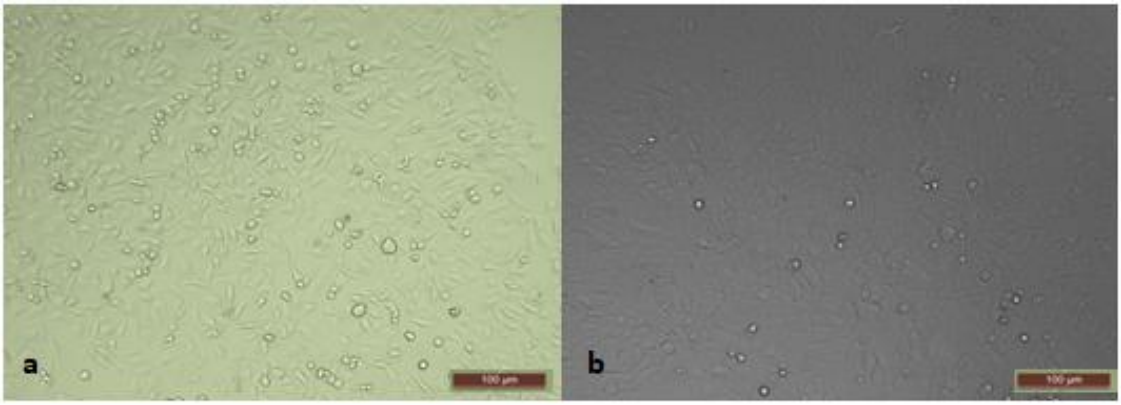
4-AMP (4-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren); Verim: 1.72 g, (% 75.5) , E.n : 239-242 IR :1609 cm^{-1} (C=N) νmax (ATR): 3454, 3358, 1638 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz $CDCl_3$): δ 1.0 (18H, s, tBu), 1.27 (18H, s, tBu), 3.38 (4H, d, *J*=13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 3.55 (4H, sAr–CH_2–NH), 3.86 (4H, d, *J*=13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.80 (4H, s, OCH_2), 6.85 (4H, s, ArH), 6.88 (4H, s, ArH), 7.05 (2H, m, PyH), 7.26 (2H, d, *J*= 7.8 Hz, PyH), 7.48 (2H, s, OH), 7.54 (2H, d, *J*= 7.8 Hz, PyH), 9.33 (2H, t, NH). Anal. Hesapl. $C_{60}H_{72}O_6N_4$:C, 76.23; H, 7.68; N, 5.93. Bulunan: C, 76.31; H, 7.74; N, 5.83%.



Şekil 3.5 4-AMP **(**4-Aminometilpridin)'nin ^{1}H-NMR spektrum sonuçları

3.2. Hücre kültürleri

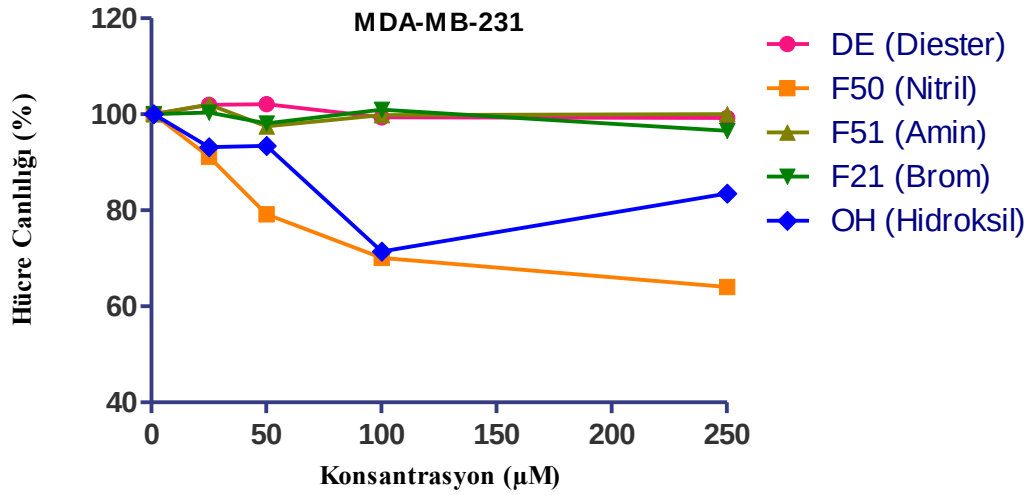
MCF-10A ve MDA-MB-231 hücrelerinin kültür işlemleri ATCC'de tanımlandığı gibi yapıldı.



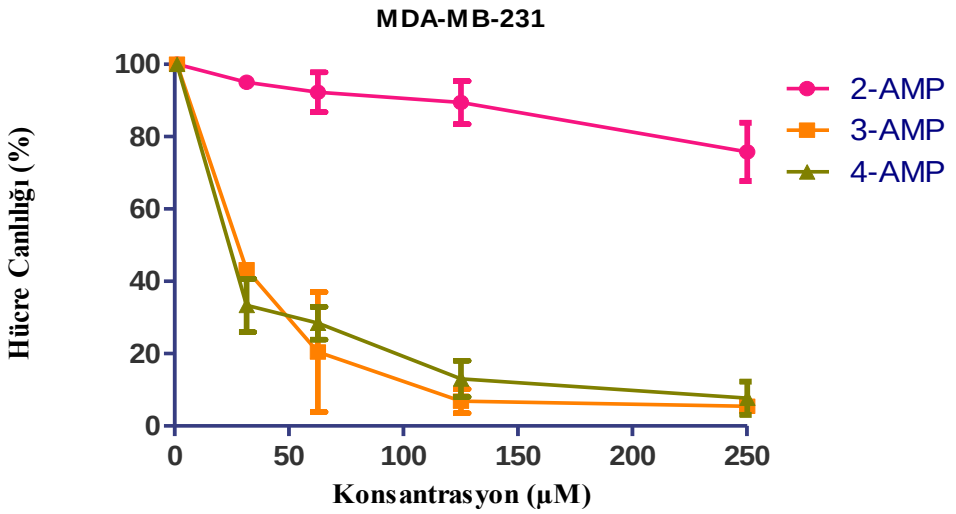
Şekil 3.6. a) Metastatik meme kanseri kökenli MDA-MB-231 hücre hattı (10X). (b) Sağlıklı insan meme hücresi kökenli MCF-10A hücre hattı (10X).

3.3.Hücre proliferasyonu ve canlılık analizlerinin optimize edilmesi

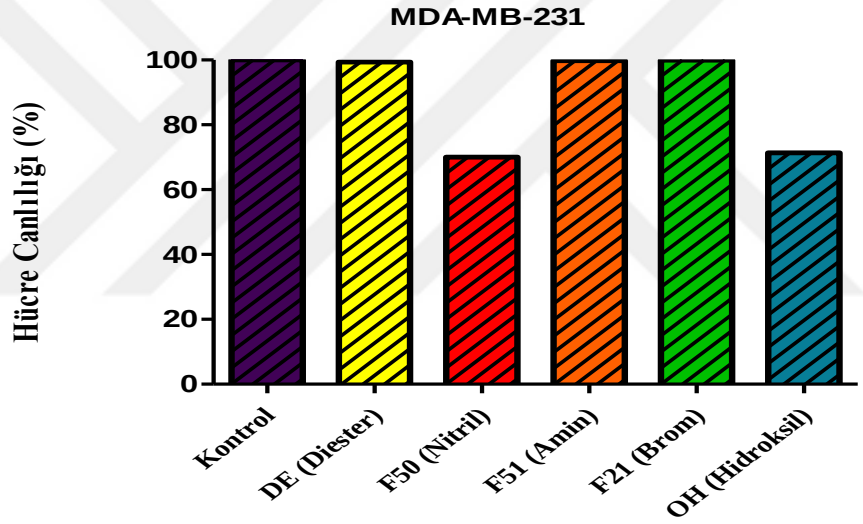
Her iki hücre hattının da canlılık analizleri için XTT metodu kullanıldı. DE (Diester), F50(Nitril (-CN)), F51 (Amin (-NH_2)), Karboksilik asit (-COOH) ve F21(Alkil Bromür (-Br)) ve pirindinyum grubu ile fonksiyonlandırılarak hazırlanan p-tert-butil-kaliks(4)aren türevlerinin 25 µM 50 µM 100 µM ve 250 µM dozları maddelerin optimizasyonu için kullanıldı ve canlılık testi gerçekleştirildi.(Şekil 3.7. ve Şekil.3.8.)



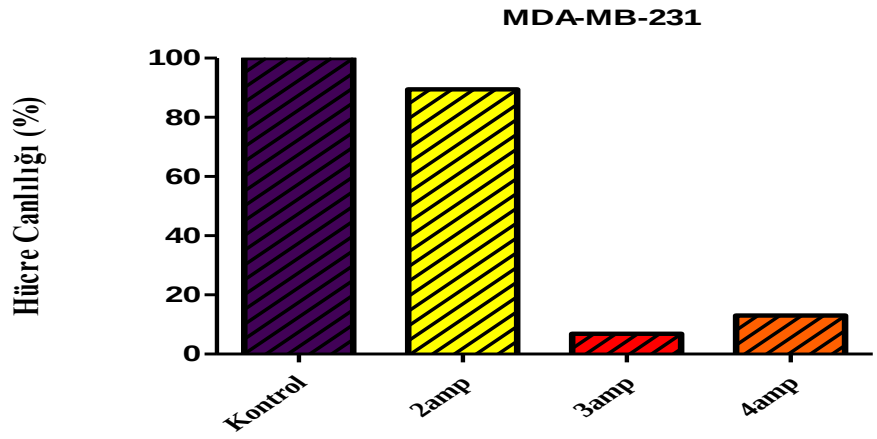
Şekil 3.7. MDA-MB-231 hücrelerinin Nitril (-CN), Amin (-NH_2), Karboksilik asit (-COOH) ve Alkil Bromür (-Br) maddeleri ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen XTT analiz sonuçları.



Şekil 3.8. MDA-MB-231 hücrelerinin pirindinyum grubu ile fonksiyonlandırılan 2-AMP, 3-AMP, 4-AMP maddeleri ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen XTT analiz sonuçları.



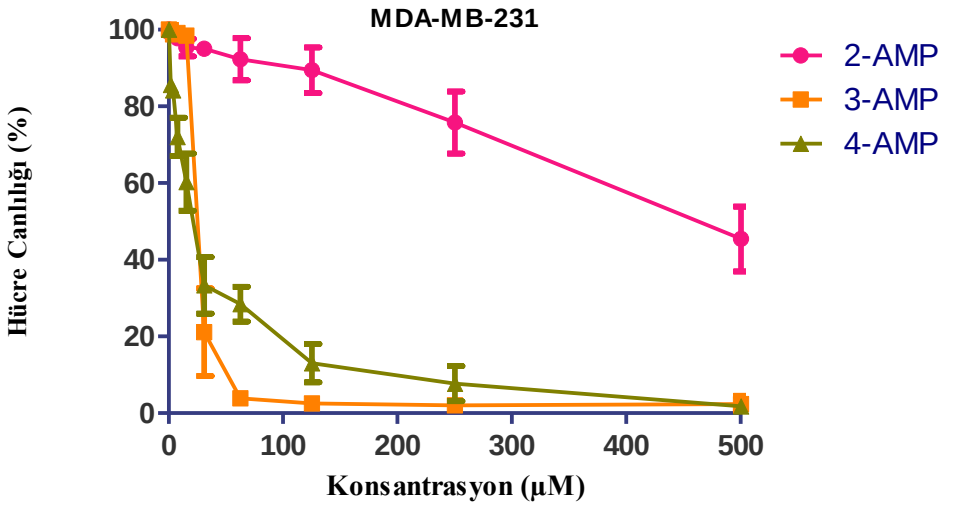
Şekil 3.9. MDA-MB-231 hücrelerinin Nitril (-CN), Amin ($-NH_2$), Karboksilik asit (-COOH) ve Alkil Bromür (-Br) maddelerinin 100 µM doz konsantrasyonu ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen XTT analiz sonuçları.



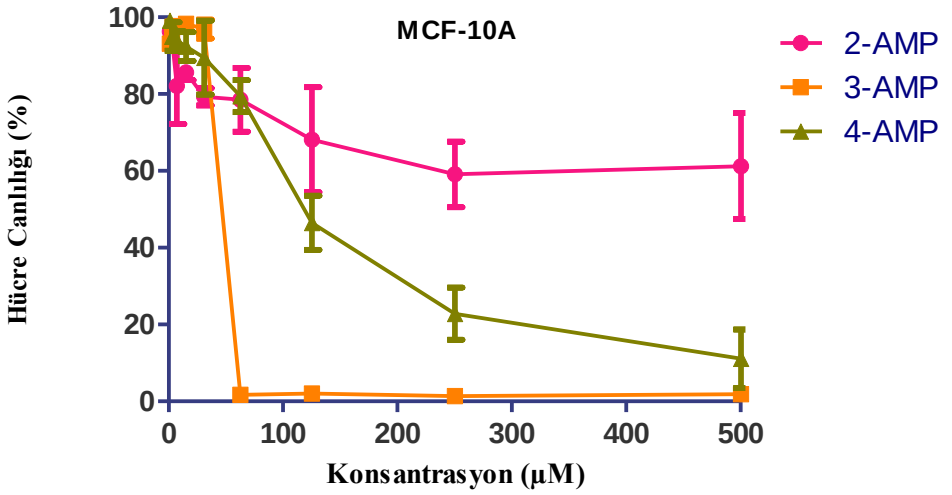
Şekil 3.10. MDA-MB-231 hücrelerinin pirindinyum grubu ile fonksiyonlandırılan 2-AMP, 3-AMP, 4-AMP maddelerinin 100 µM doz konsantrasyonu ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen XTT analiz sonuçları.

Elde edilen XTT sonuçlarına göre Nitril (-CN), Amin (-NH_2), Karboksilik asit (-COOH) ve Alkil Bromür (-Br) Diester (DE) ile fonksiyonlandırılmış kaliksaren grubunda hücre canlılığı tüm dozlarda %50'nin altına düşmemiştir ve sitotoksik etki gözlenmemiştir.

Pirindinyum grubu ile fonksiyonlandırılan 2-AMP, 3-AMP, 4-AMP maddelerinde ise özellikle 3-amp ve 4-amp'nin düşük dozlarında hücre ölümü gözlenmiştir. Bu nedenle daha sonraki çalışmalar için piridinyum grubu ile fonksiyonlandırılan 2-AMP, 3-AMP, 4-AMP maddelerinin 500 µM dozu seri dilüsyon yapılarak kullanıldı.(Şekil 3.10.ve şekil 3.11.)



Şekil 3.10. MDA-MB-231 hücrelerinin 2-AMP, 3-AMP, 4-AMP maddeleri ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen XTT analiz sonuçları.



Şekil 3.11. MCF-10A hücrelerinin 2-AMP, 3-AMP, 4-AMP maddeleri ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen XTT analiz sonuçları.

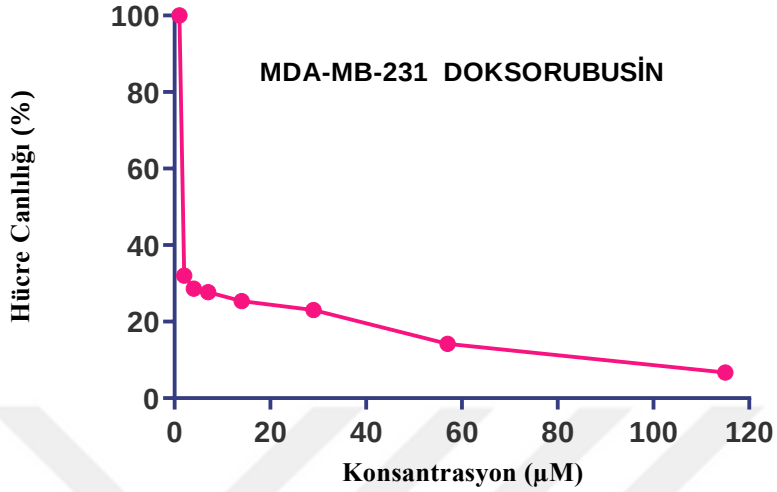
Elde edilen XTT sonuçlarına göre MDA-MB-231 hücrelerinde 3-amp ve 4-amp'nin düşük dozlarında bile hücre canlılığı belirgin derecede düşmüş, fakat 2-amp'nin en yüksek dozunda bile canlılık %50'nin altına düşmemiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde 3-AMP'de hücre canlılığını %50'nin altına düşüren dozu 28 µM iken 4-amp'de ise hücre canlılığını %50'nin altına düşüren dozu 21 µM olarak bulunmuştur. Şekil.3.10'da gösterildiği gibi MDA-MB-231 hücrelerinde kaliksarenlerin artan konsantrasyonları ile birlikte hücre büyümesinde doza bağlı azalış elde edilmiştir.

MCF-10A hücrelerinde ise 2-AMP'nin en yüksek dozunda bile canlılık %50'nin altına düşmemiştir. 3-amp'de hücre canlılığını %50'nin altına düşüren dozu 59.4 µM iken 4-AMP'de ise hücre canlılığını %50'nin altına düşüren dozu 119 µM olarak bulunmuştur. Bu belirtilen sonuçlar karşılaştırıldığında MDA-MB-231 hücrelerinde en etkili madde 4-AMP iken MCF-10A hücrelerinde ise 3-AMP ve 4-AMP'dir.(Tablo.3.2.1)

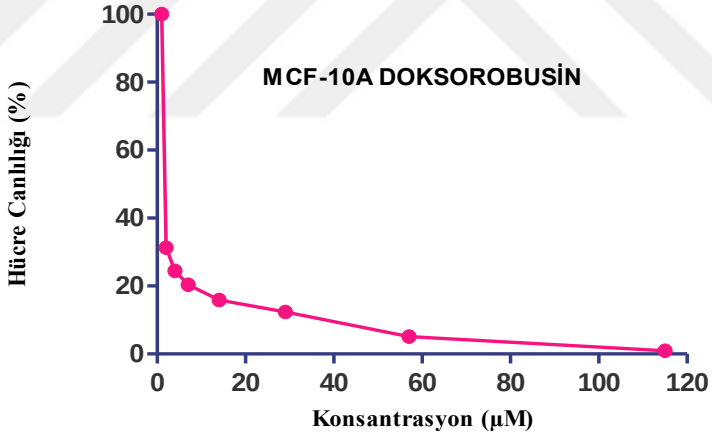
Tablo.3.2.1. MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin Ic50 değerlerinin karşılaştırılması.

IC_{50} Değerleri	Kontrol	2-AMP	3AMP	4-AMP
MDA-231	**100**	**>500**	**28**	**21,08**
MCF-10A	**100**	**>500**	**59.4**	**119**

Çalışmamıza pozitif kontrol olarak Doksorubusin maddesi dahil edildi ve doksorubusin maddesinin 460 µM dozu seyreltilerek MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde kullanıldı. (Şekil 3.11. ve Şekil 3.12)



Şekil 3.11. MDA-MB-231 hücresinin doksorubusin maddesi ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen XTT analiz sonuçları.

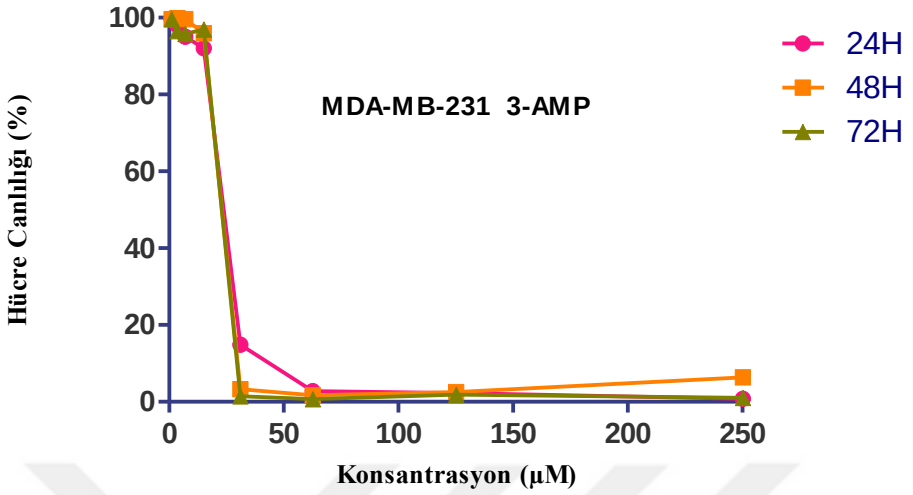


Şekil 3.12. MDA-MB-231 hücresinin doksorubusin meddesi ile 24 saat muamelesi sonucunda elde edilen XTT analiz sonuçları.

Pozitif kontrol olarak kullanılan doksorubusinin hem MDA-MB-231 hem de MCF-10A hücrelerinde en düşük doz olan 1.79 µM dozunda bile hücreleri öldürdüğü gözlenmiştir. Her iki hücrede de 1.79 µM olan en düşük dozda IC_{50} değeri % 32 idi. Bu sonuçlara bakıldığında doksorubusinin kanserli hücreleri etkili bir şekilde öldürürken sağlıklı hücrelere karşı da çok toksik etkisi olduğu görülmektedir.

3-AMP ve 4-AMP'nin MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde zamana bağlı etkisini göstermek için hücreler, 3-AMP ve 4-AMP'nin farklı dilüsyonları ile 24-48-72

saat zaman dilimlerinde muamele edildi ve zamana bağlı sitotoksik etkisine bakıldı. (Şekil.3.13)

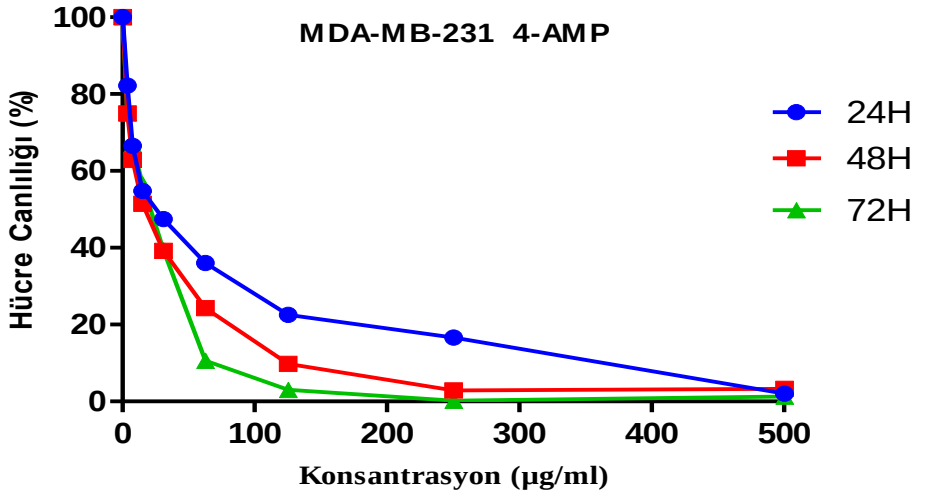


Şekil 3.13. 3-amp'nin farklı dilüsyonlarının MDA-MB-231 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muamele edildikten sonraki XTT analiz sonuçları.

Tablo.3.2.2. 4-amp'nin farklı dilüsyonlarının MDA-MB-231 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muamele edildikten sonraki Ic50 sonuçları.

3-AMP	Kontrol	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
MDA-231	100	28.78	31	36

3-AMP'nin MDA-MB-231 hücrelerinde zamana bağlı etkisine bakıldığında 24 saatlik IC_{50} değeri 48 ve 72 saatlik IC_{50} değerinden daha düşük bulunmuştur. Fakat 24-48-72 saat dilimleri arasında benzer sonuçlar elde edilmiş ve çok anlamlı bir fark bulunmamıştır.

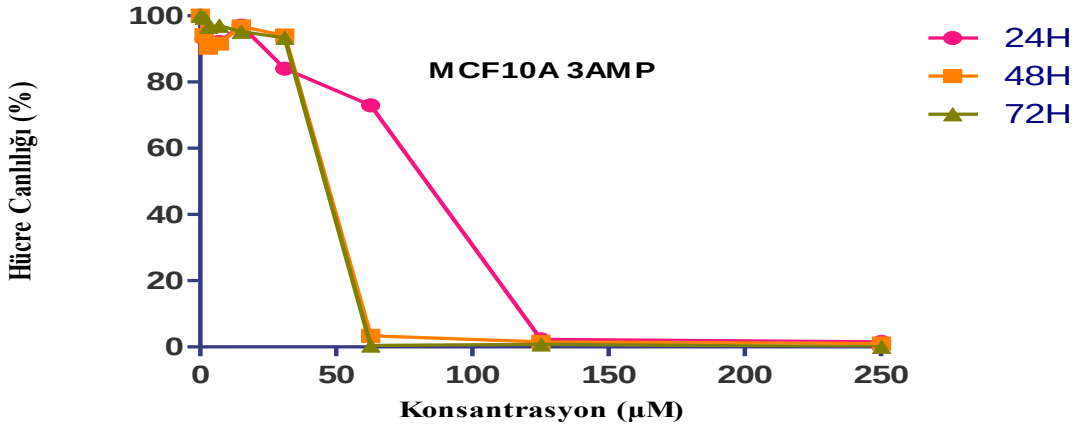


Şekil 3.13. 4-amp'nin farklı dilüsyonlarının MDA-MB-231 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muamele edildikten sonraki XTT analiz sonuçları.

Tablo.3.2.2. 4-AMP'nin farklı dilüsyonlarının MDA-MB-231 hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muamele edildikten sonraki IC_{50} sonuçları.

4-AMP	Kontrol	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
MDA-231	100	24,28	15,18	15,18

4-AMP'nin MDA-MB-231 hücrelerinde zamana bağlı etkisine bakıldığında 48 ve 72 saatlik muamelelerde Ic50 değeri aynı bulunmuş ve 24 saatlik muamele sonrasında ise IC_{50} değeri 48 ve 72 saatlere göre daha yüksek bulunmuştur. Fakat 24 saatlik inkübasyon sonucu bulunan bu değer 48 ve 72 saatlik değerler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.



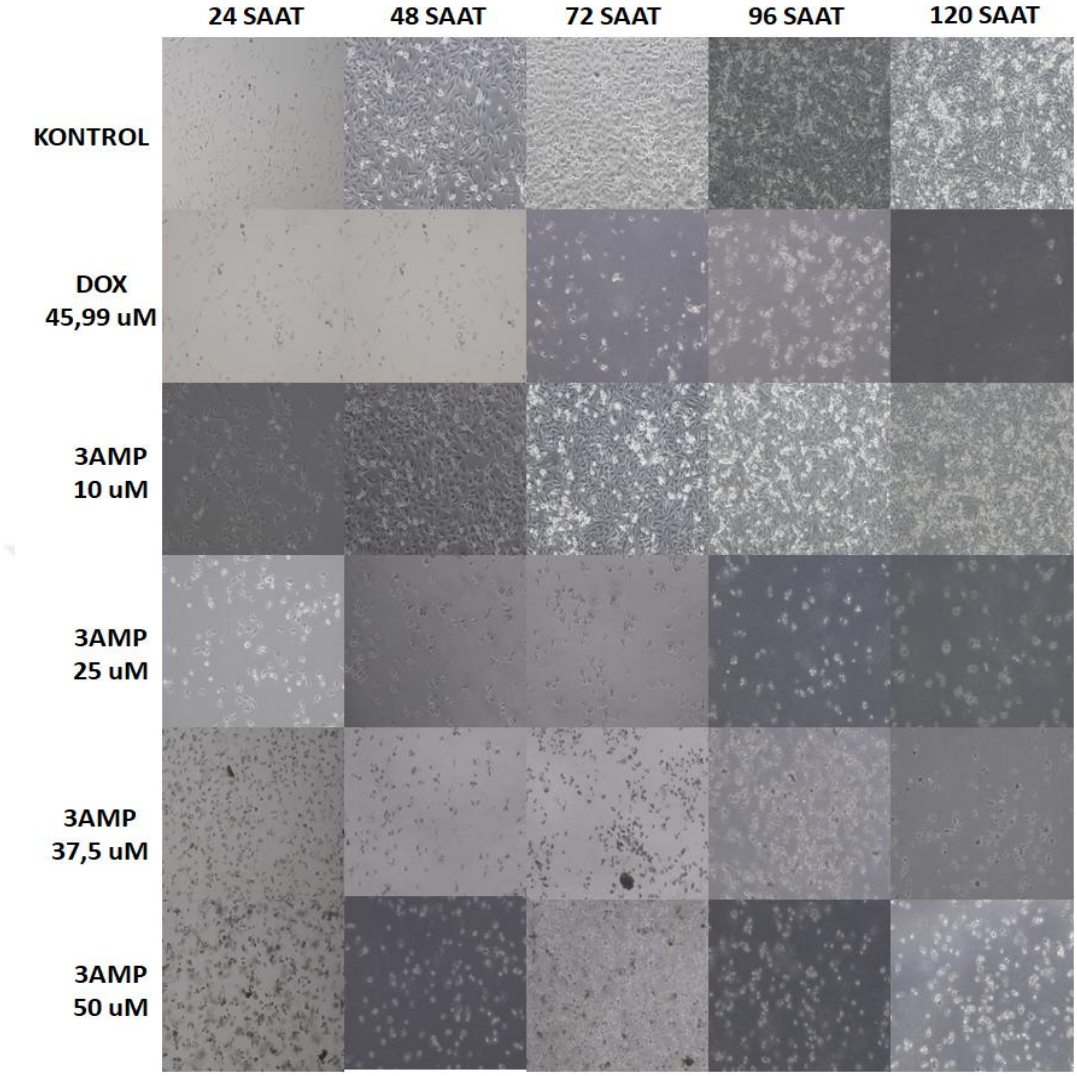
Şekil.3.14. 3-amp'nin farklı dilüsyonlarının MCF-10A hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muamele edildikten sonraki IC_{50} sonuçları

Tablo.3.2.2. 3-amp'nin farklı dilüsyonlarının MCF-10A hücreleri üzerinde 24-48-72 saat muamele edildikten sonraki IC_{50} sonuçları

3-AMP	Kontrol	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
MCF-10A	100	69.4	51.41	59.73

3-AMP'nin MCF-10A hücrelerinde zamana bağlı etkisine bakıldığında 24 saatlik Ic50 değeri 48 ve 72 saatlik IC_{50} değerinden daha yüksek bulunmuştur. Fakat 24-48-72 saat dilimleri arasında benzer sonuçlar elde edilmiş ve çok anlamlı bir fark bulunmamıştır.

3.4. XTT sonuçlarının inverd mikroskop altında morfolojilerinin incelenmesi

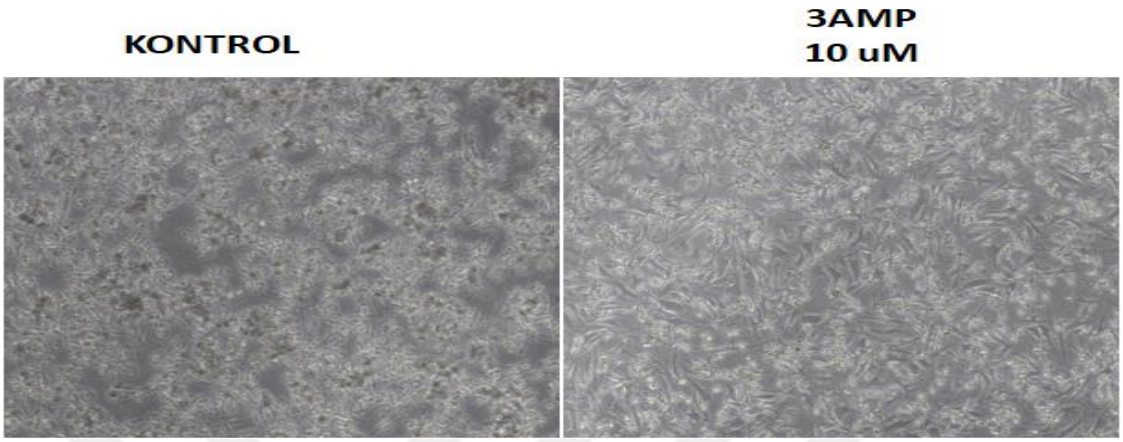


Şekil.14. MDA-MB-231 hücrelerinin 3-amp'nin farklı konsantrasyonlarında 120 saat boyunca muamelesinin inverd mikroskop altında morfolojilerinin incelenmesi.

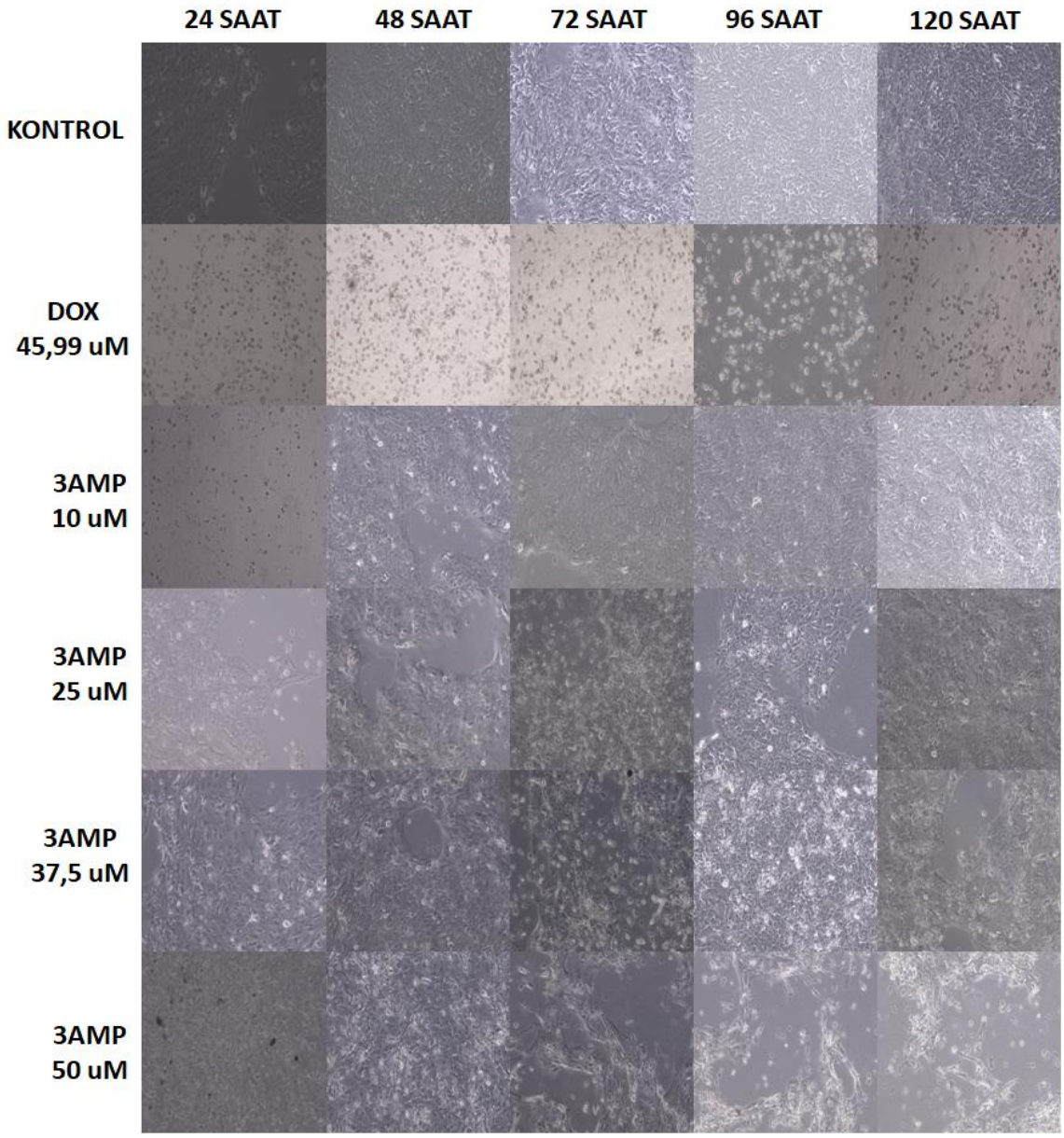
MDA-MB-231 hücreleri $1x10^5$ hücre yoğunluğunda 6 kuyucuklu plakalara ekilerek 24 saat inkübe edildi. Sonrasında 3-AMP'nin faklı konsantrasyonları ile muamele edildi ve 120 saat boyunca inverd mikroskop altında morfolojileri incelendi.(Şekil.14) . Analiz sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinde ilk 24 saatte 3-AMP'nin 25 µM ve daha yüksek dozları hücreleri tamamen öldürmüştür ve sonraki günlerde de aynı sonuçlar elde edilmiştir. 3-AMP'nin 10 µM dozunda ise 120 saat boyunca MDA-MB-231 hücrelerinde ölüm gözlenmemiştir. Bu nedenle hücreler 3-AMP'nin 10 µM dozunda daha uzun sürede sitotoksik etkisinin olup olmadığını anlamak için hücreler 240 saat boyunca maddeye maruz bırakıldı. 240 saat sonunda hücrelerde herhangi bir değişim gözlenmedi. Bu

sonuçlara bakarak 3-AMP ‘nin 10 µM dozunun MDA-MB-231 hücrelerini öldürmek için yeterli olmadığı anlaşıldı. (Şekil.15).

Aynı zamanda 3-AMP 25 µM dozu ve daha yüksek dozları ise ilk 24 saatte hızlı cevap vererek hücreleri öldürmektedir.

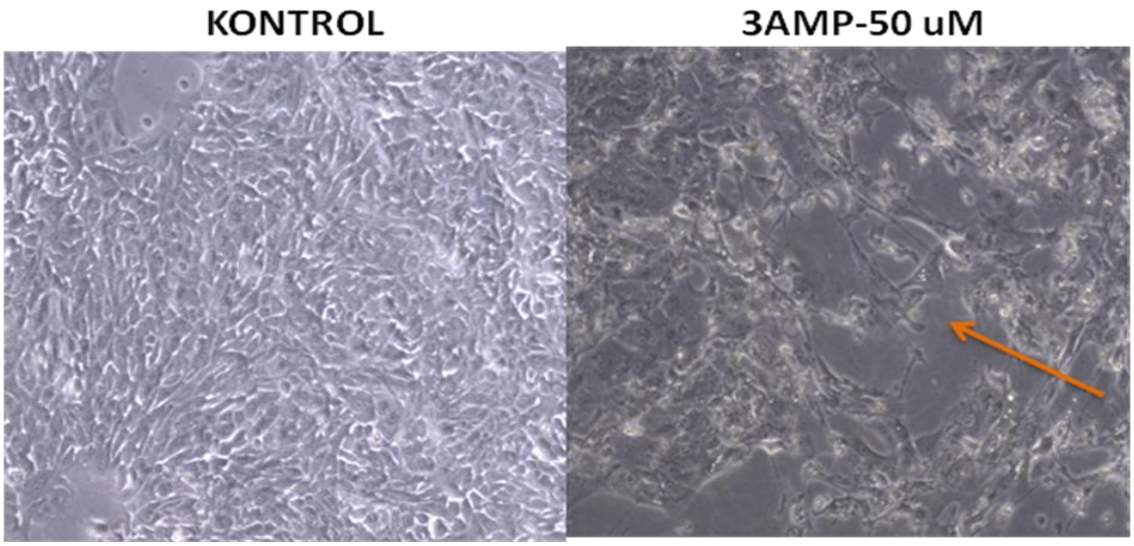


Şekil.14. MDA-MB-231 hücrelerinin 3-AMP’nin 10 µM dozunun 240 saat boyunca muamelesinden sonra inverd mikroskop altında morfolojilerinin incelenmesi.



Şekil.16. MCF-10A hücrelerinin 3-amp'nin farklı konsantrasyonlarında 120 saat boyunca muamele edilmesinden sonra inverd mikroskop altında morfolojilerinin incelenmesi

MCF-10A hücreleri $3x10^5$ hücre yoğunluğunda 6 kuyucuklu plakalara ekilerek 24 saat inkübe edildi. Sonrasında 3-AMP'nin farklı konsantrasyonları ile muamele edildi ve 120 saat boyunca inverd mikroskop altında morfolojileri incelendi.(Şekil.16). İlk 24 saatte MCF-10A hücreleri üzerinde 3-AMP'nin tüm dozlarında herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemiştir. Ancak 3-AMP'nin 50 µM dozunda 72. saatte hücreler yer yer uzamış ve yuvarlaklaşmış görünümdeydi (Şekil.17) fakat diğer dozlarda herhangi bir değişim gözlenmedi. MCF-10A hücreleri üzerinde 50 µM dozu haricinde çalışılan dozların hiçbiri 240 saat boyunca sitotoksik etki göstermemiştir.



Şekil.17. MCF-10A hücrelerinin 3-amp'nin 50 µM 72 saat boyunca muamelesinden sonra inverd mikroskop altında morfolojilerinin incelenmesi.

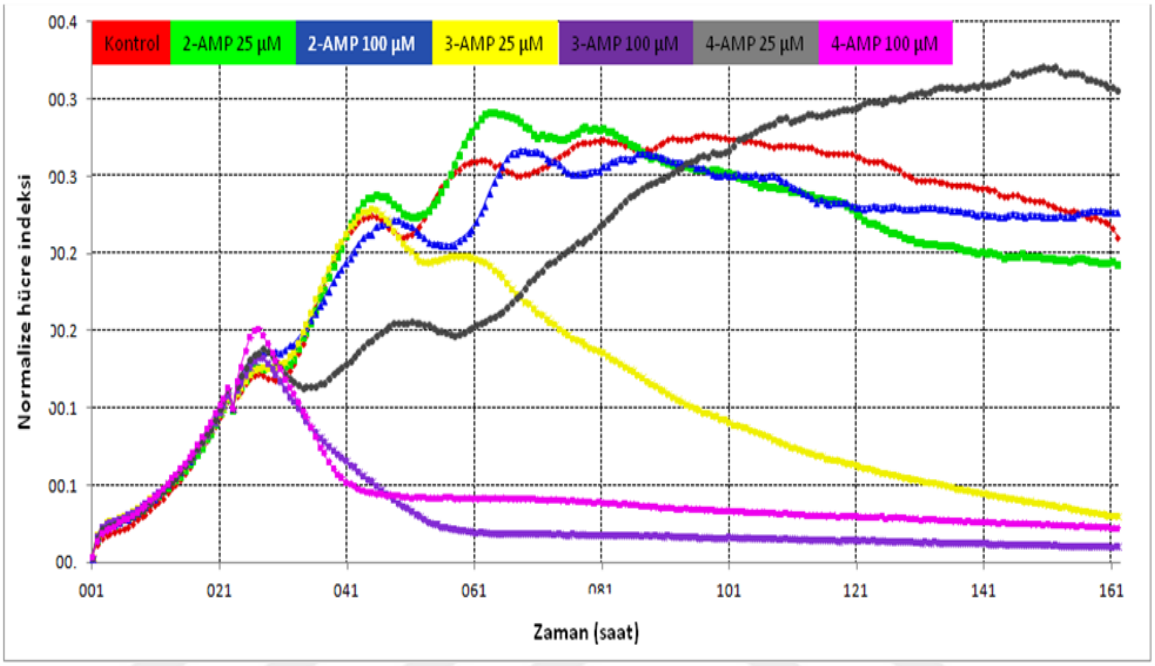
240 saat sonra plakadan 3-AMP 37.5 µM ve 50 µM dozlarına ait kuyucuklardan madde uzaklaştırılarak üzerine besiyer eklendi ve hücre davranışı inverd mikroskop altında incelendi. Hücreler 24 saatten sonra yavaş yavaş kendini toparlamaya başladı ve yaklaşık 1 hafta sonunda eski hallerine geri döndüler.(şekil.18). MCF-10A hücreleri üzerinde 3-amp'nin 10 µM-25 µM ve 37.5 µM dozlarında ise 240 saat boyunca herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemiştir.



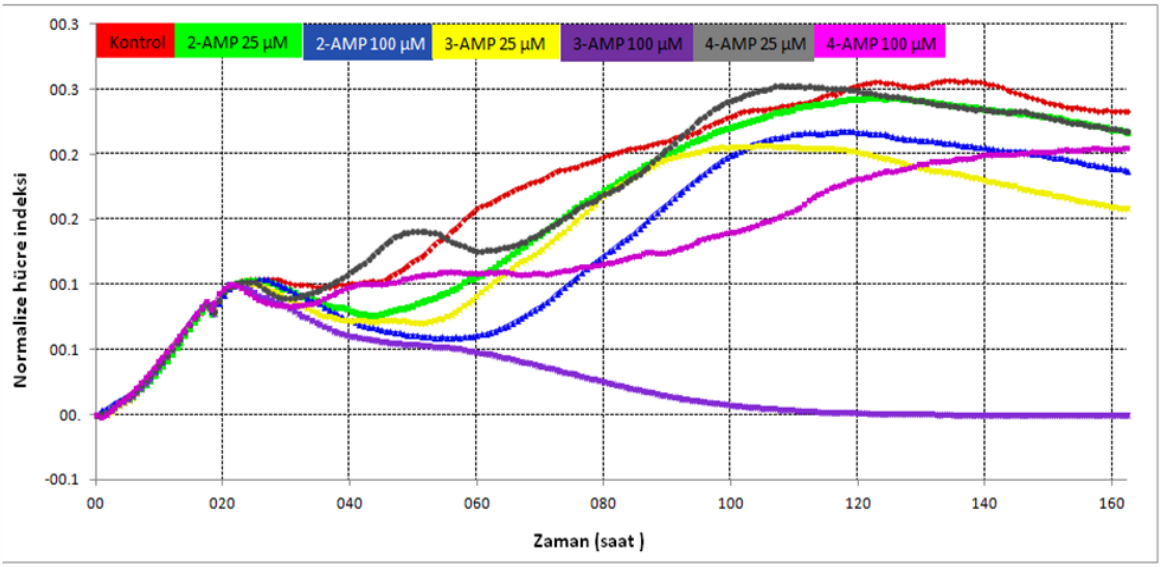
Şekil.18. MCF-10A hücrelerinin 37,5 µM ve 50 µM kuyucuklarından madde uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin morfolojilerinin inverd mikroskop görüntüleri.

3.5. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin Gerçek Zamanlı (xCELLigence) Sitotoksisite Analizinin optimizasyonu

Her iki hücrenin de gerçek zamanlı hücre analizi için 2-AMP,3-AMP ve 4-AMP maddelerinin optimizasyon deneme dozu olarak 25 µM ve 100 µM dozları çalışıldı. (Şekil.3.14. ve Şekil.3.15.)



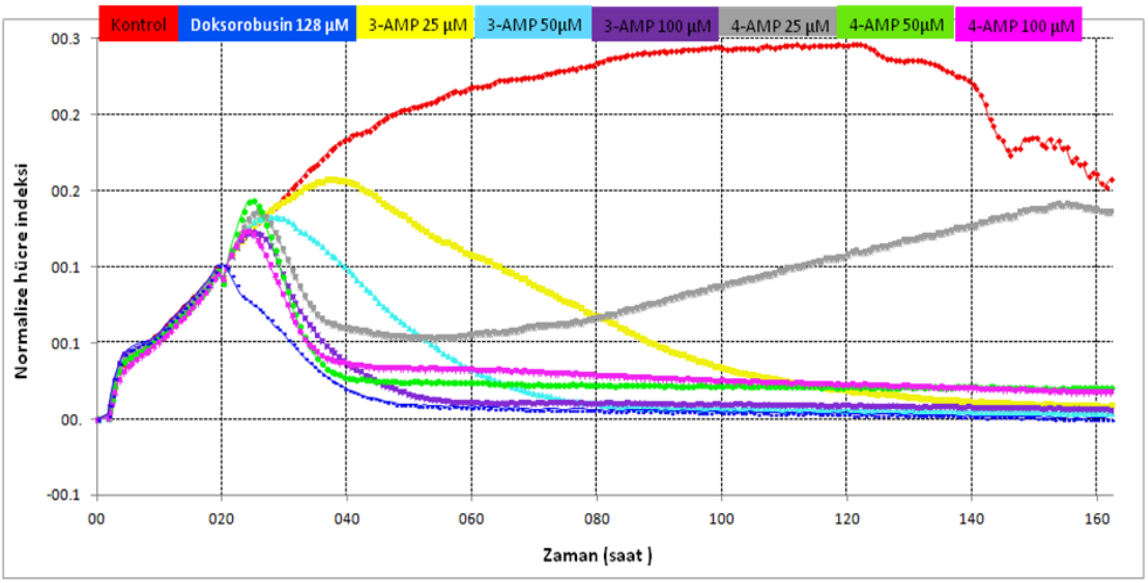
Şekil 3.14. 16 kuyucuklu e-plakada MDA-MB-231 hücrelerinin 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP maddeleri ile gerçek zamanlı xCELLigence grafiği ile analiz sonuçları.



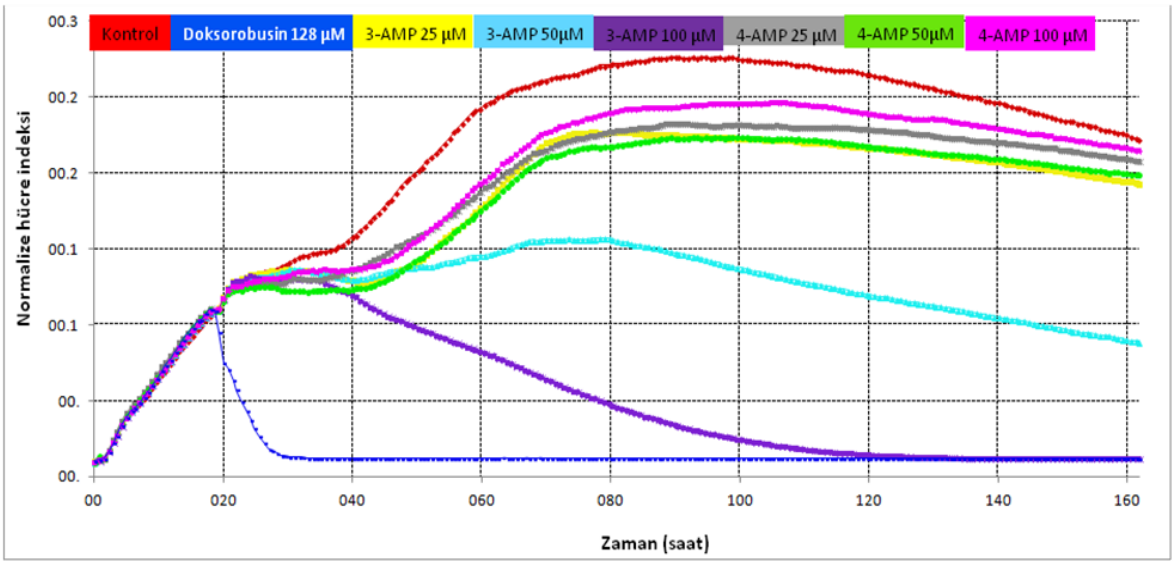
Şekil 3.15. 16 kuyucuklu e-plakada MCF-10A hücrelerinin 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP maddeleri ile gerçek zamanlı xCELLigence grafiği ile analiz sonuçları.

Gerçek zamanlı xCELLigence sonuçlarına göre 2-AMP 25-100 µM dozları her iki hücre hattında da sitotoksik etki göstermemiştir. 3-AMP'de MDA-MB-231 hücrelerinde doza bağlı ölüm gözlenmiştir. 4-AMP'nin 100 µM dozu MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etki göstermiştir ve 25 µM dozu ise antimitotik etki göstermiştir. MCF-10A hücrelerinde ise sadece 3-AMP'nin 100 µM dozunda sitotoksik etki göstermiştir.

Daha sonraki deneylerde 2-amp'nin sitotoksik etkisi bulunmadığı için 3-AMP ve 4-AMP'nin 25-50-100 µM dozları çalışılmıştır. (Şekil.3.16. ve Şekil.3.17.)



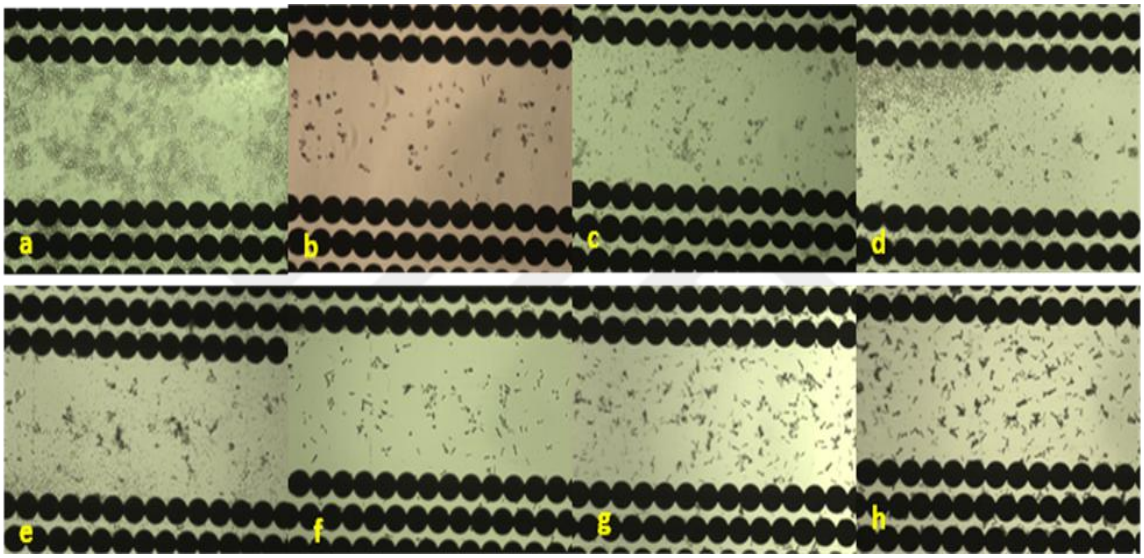
Şekil 3.16. 16 kuyucuklu e-plakada MDA-MB-231 hücrelerinin 3-AMP ve 4-AMP ve doksorubusin maddeleri ile gerçek zamanlı xCELLigence grafiği ile analiz sonuçları.



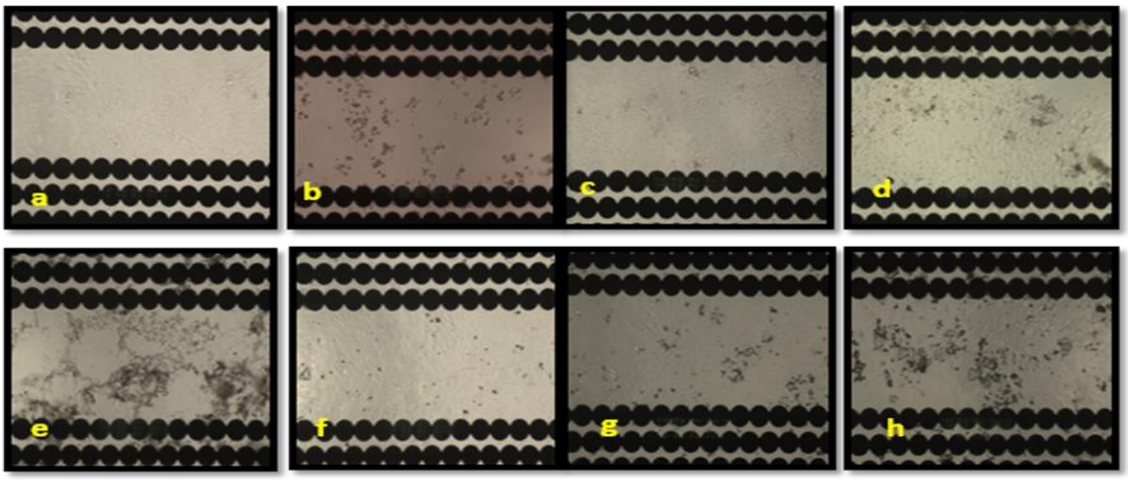
Şekil 3.17. 16 kuyucuklu e-plakada MCF-10A hücrelerinin 3-AMP ve 4-AMP ve doksorubusin maddeleri ile gerçek zamanlı xCELLigence grafiği ile analiz sonuçları.

Bu deney sonuçlarına bakarak MDA-MB-231 hücrelerinde 3-AMP'nin çalışılan dozları doza bağlı sitotoksik etki göstermiştir. 4-AMP'nin ise çalışılan 50 µM ve 100 µM dozları doza bağlı sitotoksik etki gösterirken 25 µM dozu antimitotik etki gösterdiği bulunmuştur. MCF-10A hücrelerinde ise çalışılan 3- AMP ve 4- AMP'nin 25-50-100 µM dozlarından sadece 3- AMP'nin 100 µM dozu sitotoksik etki göstermiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan doksorubusin-70 µM dozu her iki hücre için de en etkili madde olmuştur.

3.6.Gerçek zamanlı xCELLigence sonuçlarının inverd mikroskopta incelenmesi



Şekil 3.18. 16 kuyucuklu e-plakada $10x10^4$ MDA-MB-231 hücresinin 3-AMP ve 4-AMP ve doxorobucin ile gerçek zamanlı xCELLigence sonrası inverd mikroskop görüntüleri; a) Hücre kontrol, b) doxorobucin 70 µM, c) 3-AMP 25 µM, d) 3-AMP 50 µM, e) 3-AMP 100 µM f) 4-AMP 25 µM, g) 4-AMP 50 µM h) 4-AMP 100 µM.

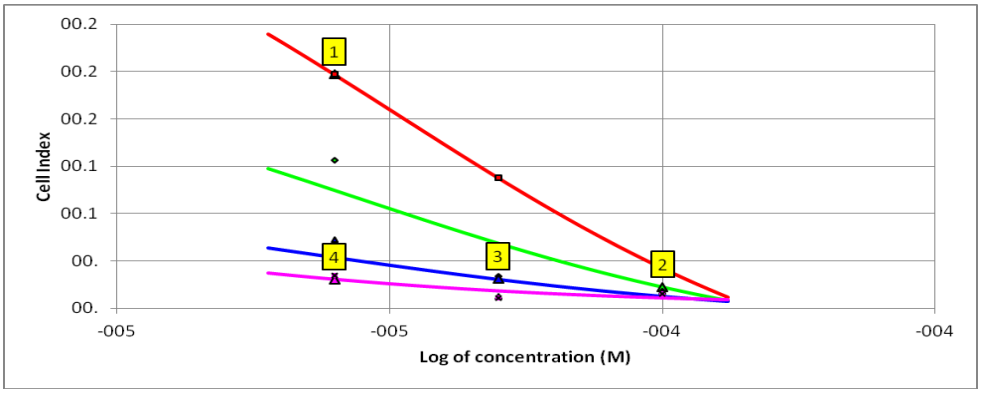


Şekil 3.19. 16 kuyucuklu e-plakada 30x10^4 MCF-10A hücresinin 3-AMP ve 4-AMP ve doxorobucin ile gerçek zamanlı xCELLigence sonrası inverd mikroskop görüntüleri; a) Hücre kontrol, b) doxorobucin 70 µM, c) 3-AMP 25 µM, d) 3-AMP 50 µM, e) 3-AMP 100 µM f) 4-AMP 25 µM, g) 4-AMP 50 µM h) 4-AMP 100 µM.

3.7. 3-AMP ve 4-AMP'nin meme kanseri hücreleri üzerinde anti kanser etkisinin incelenmesi

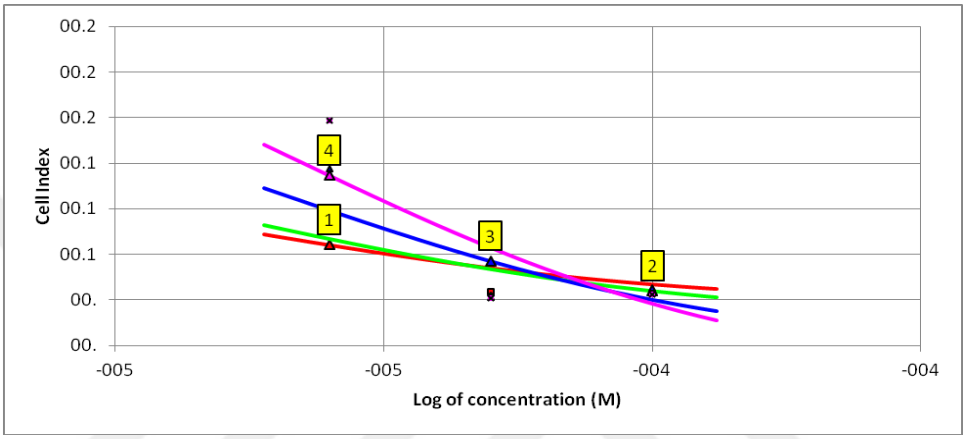
xCELLigence analiz sistemi kullanılarak MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerine 160 saat boyunca 3-amp ve 4-amp'nin 25-50-100 µM dozları uygulanmış ve meme kanseri hücreleri üzerindeki antikanser etkisine bakılmıştır. Sonuçlar normalize hücre indeksi-konsantrasyon grafiğinde gösterilmiştir.

Tablo.3.2.3. 16 kuyucuklu e-plakada 1x10^5 MDA-MB-231 hücresinin 3-AMP ile gerçek zamanlı xCELLigence'deki farklı saatlerdeki IC_{50}değerleri grafikleri.



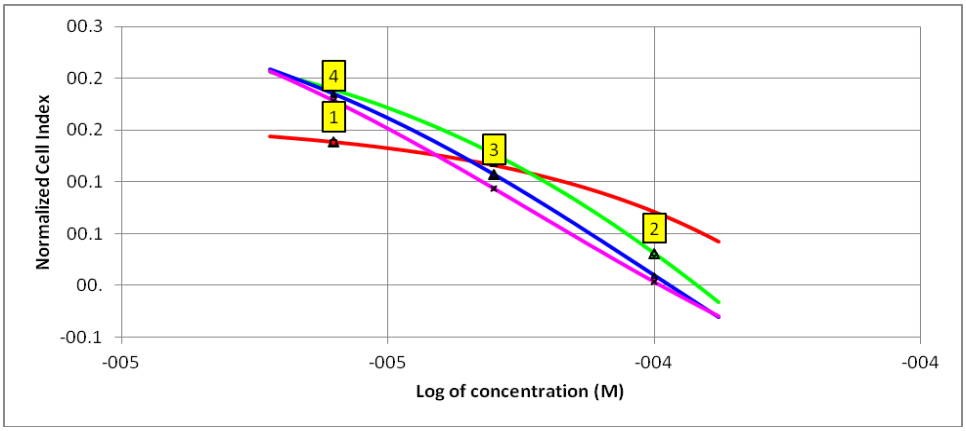
Eğim	Zaman	Konsantrasyon
[1]	24.saat IC_{50}	32.9 µM
[2]	48.saat IC_{50}	27.4 µM
[3]	72.saat IC_{50}	21.9 µM
[4]	96.saat IC_{50}	7.39 µM

Tablo.3.2.4 16 kuyucuklu e-plakada $1x10^5$ MDA-MB-231 hücresinin 4-AMP ile gerçek zamanlı xCELLigence'deki farklı saatlerdeki IC50 değerleri grafikleri.



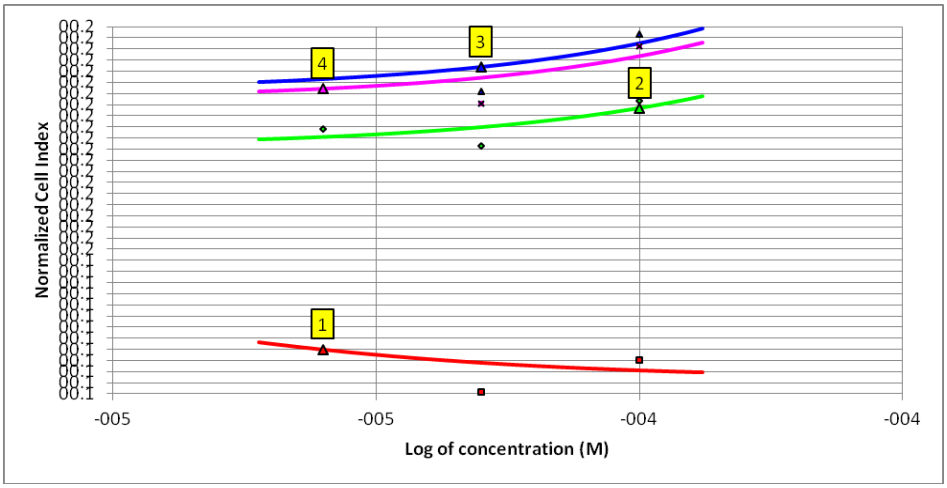
Eğim	Zaman	Konsantrasyon
[1]	24.saat IC_{50}	15.7 µM
[2]	48.saat IC_{50}	17.3µM
[3]	72.saat IC_{50}	20.6 µM
[4]	96.saat IC_{50}	22.4 µM

Tablo.3.2.5 16 kuyucuklu e-plakada $3x10^5$ MCF-10A hücresinin 3-AMP ile gerçek zamanlı xCELLigence'deki farklı saatlerdeki IC_{50} değerleri grafikleri.



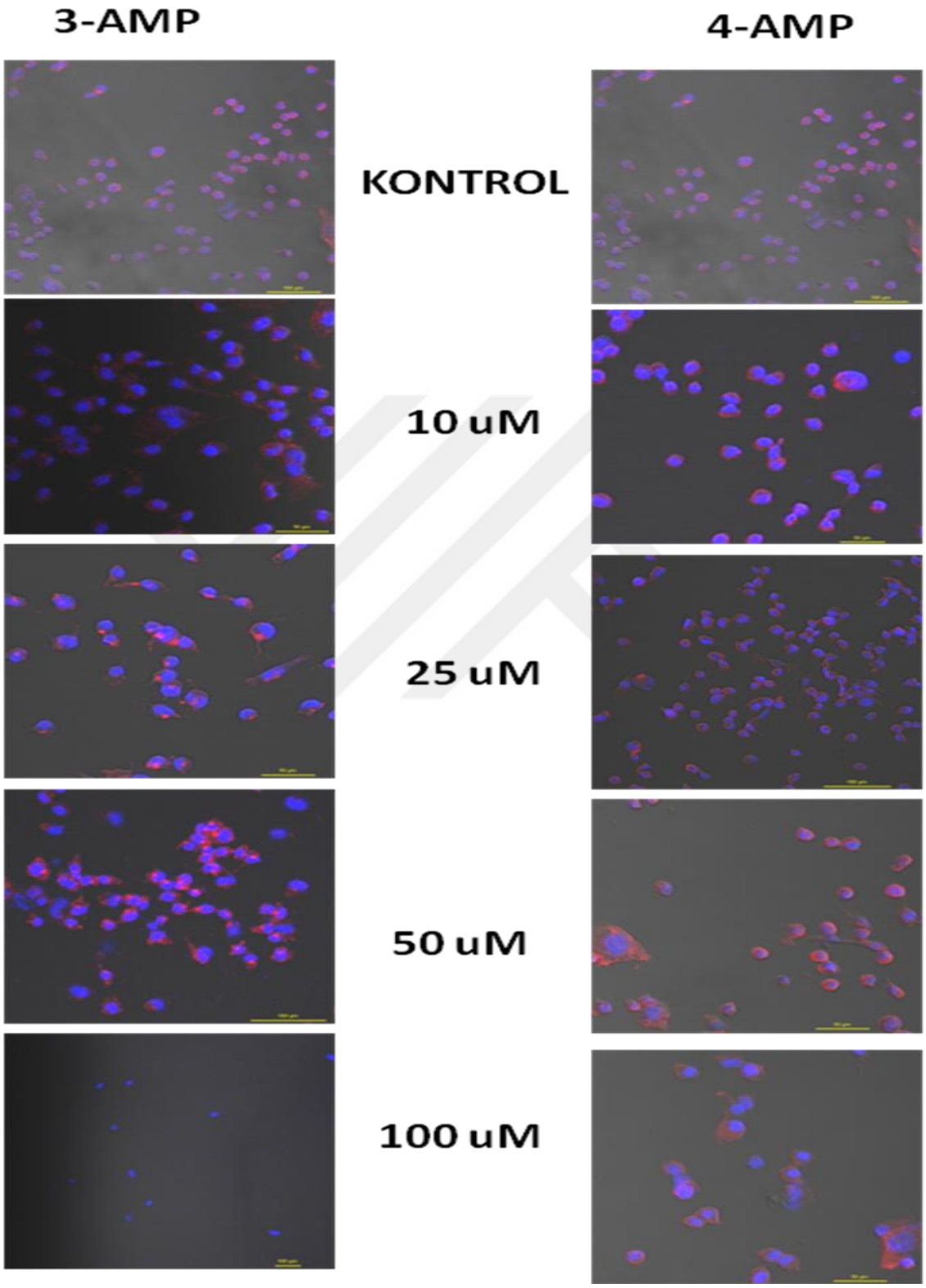
Eğim	Zaman	Konsantrasyon
[1]	24.saat IC_{50}	-
[2]	48.saat IC_{50}	225 µM
[3]	72.saat IC_{50}	100 µM
[4]	96.saat IC_{50}	59,9 µM

Tablo.3.2.6 16 kuyucuklu e-plakada $3x10^5$ MCF-10A hücresinin 4-AMP ile gerçek zamanlı xCELLigence'deki farklı saatlerdeki IC_{50} değerleri grafikleri.

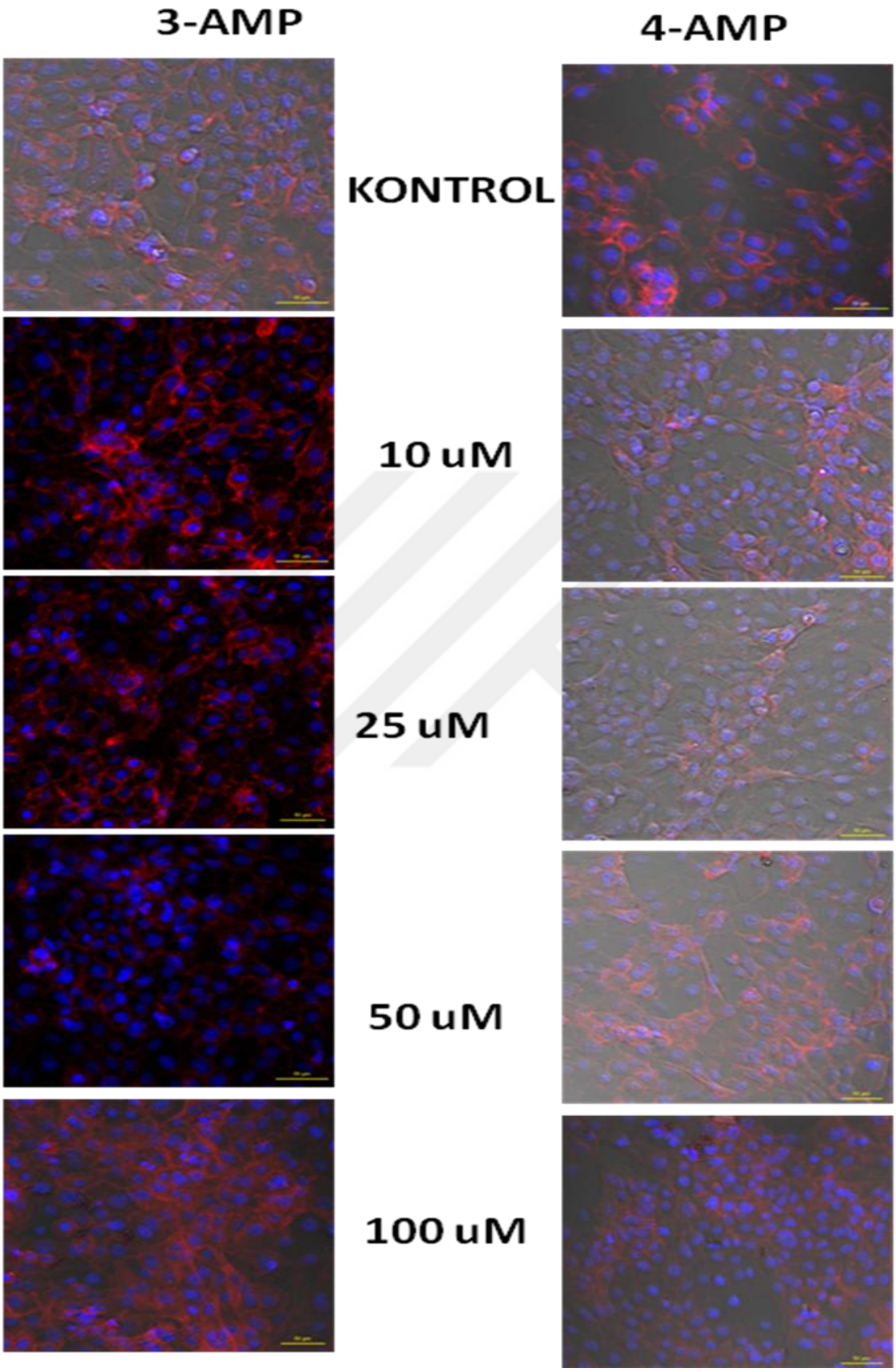


Eğim	Zaman	Konsantrasyon
[1]	24.saat IC_{50}	5.62 µM
[2]	48.saat IC_{50}	-
[3]	72.saat IC_{50}	-
[4]	96.saat IC_{50}	-

3.8. 3-AMP ve 4-AMP'nin meme kanseri hücreleri üzerinde morfolojik etkisinin konfokal mikroskop ile incelenmesi



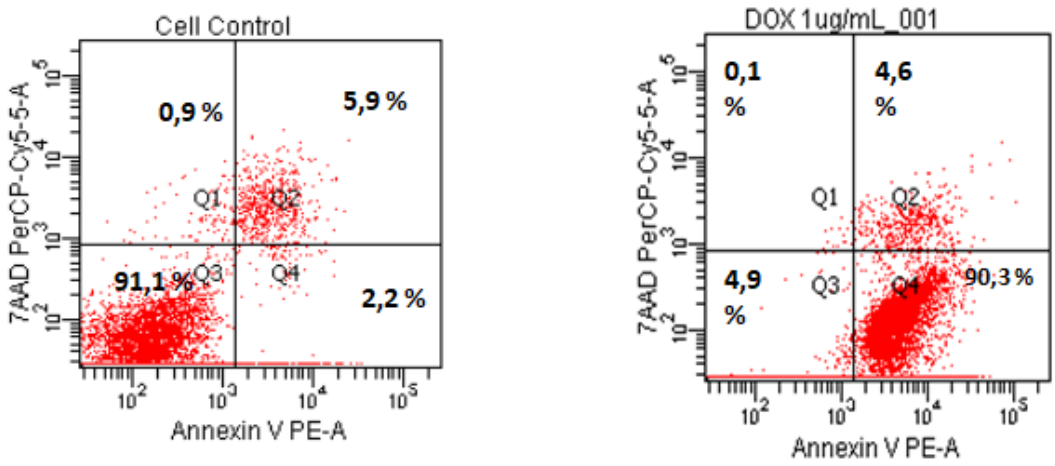
Şekil.3.18. MDA-MB-231 hücrelerinin 3-amp ve 4-amp'nin farklı konsantrasyonları ile muamelesinden sonra konfokal mikroskop ile morfolojilerinin incelenmesi.



Şekil.3.19. MCF-10A hücrelerinin 3-AMP'nin farklı konsantrasyonları ile muamelesinden sonra konfokal mikroskop ile morfolojilerinin incelenmesi.

3.9. Hücrelerinin Flow Sitometri Analizi ile hücre ölümlerinin belirlenmesi

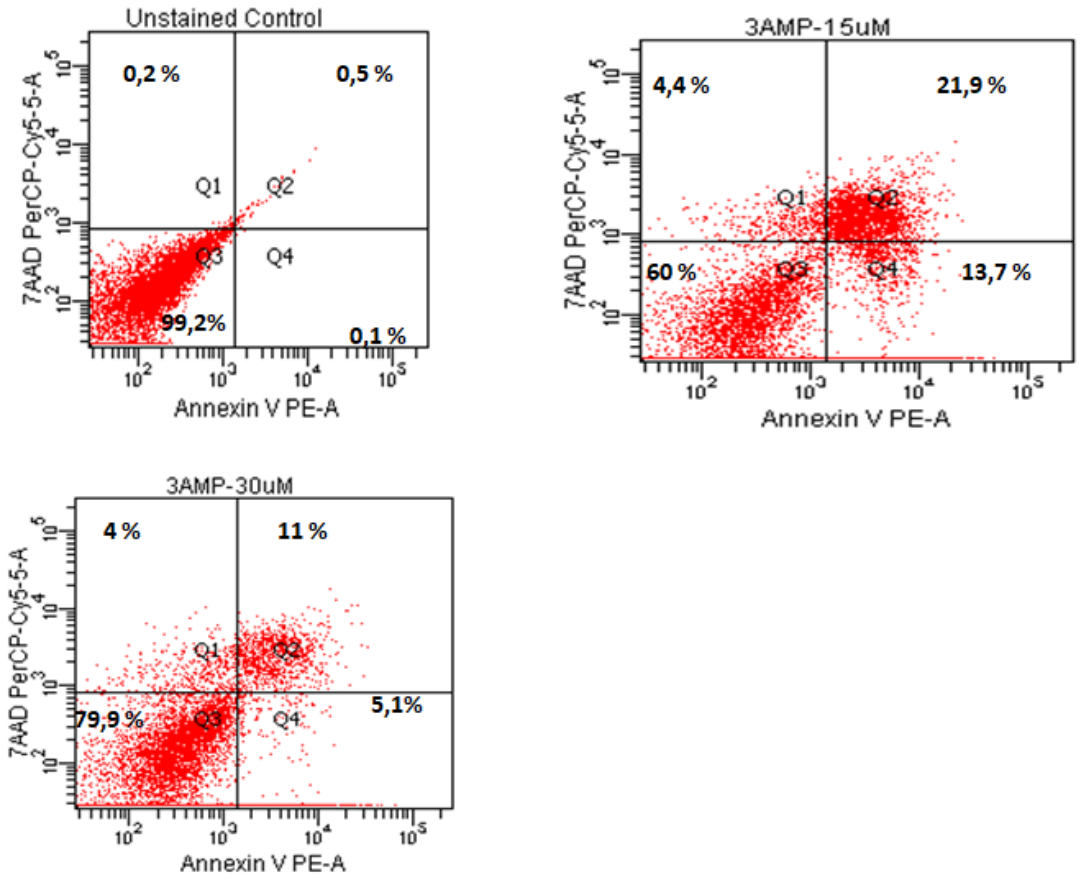
Çalışmamızda kullanılan hücrelerin apoptoz analizi Annexin-V metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Bu yöntemin analizinde Annexin-V ve 7-AAD ile muamele edilen hücrelerin ışık ile temas ettiği anda verdiği sinyallere göre Q1,Q2,Q3,Q4 olarak adlandırılan 4 bölge oluşmaktadır. 7-AAD boyası canlı hücrelerin belirlenmesinde kullanılırken, Annexin-V boyası da hücrelerin ölümünün belirlenmesinde kullanılmaktadır.



Şekil.3.20. MDA-MB-231 hücrelerinin Annexin-V metodu ile analizi. Hücre kontrolü ve doksorubusin maddesinin flow sitometri ile analiz sonuçları

Şekil.3.20'de gösterildiği gibi hücre kontrolünün Q3 kadranında yer alan ve her iki floresan boyanın olduğu bölgede hücre canlılık oranı %91,1 iken Q1 bölgesinde bulunan canlılık oranı %0,9 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında hücrelerin büyük bir kısmının kullanılan boyalarla etkileşime girmediği ve canlılıklarını devam ettirdiği gözlenmiştir.

Doksorubusin maddesi birçok çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan ve kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi kanıtlanmış bir maddedir. Çalışmamızda kullandığımız doksorubusinin en düşük dozu olan 1 ug/ml dozunda bile hücrelerinin büyük çoğunluğunu apoptoza gittiği görülmüştür. Burada Q4 kadranında apoptotik hücre ölüm popülâsyonu oranı %90,3'tür.

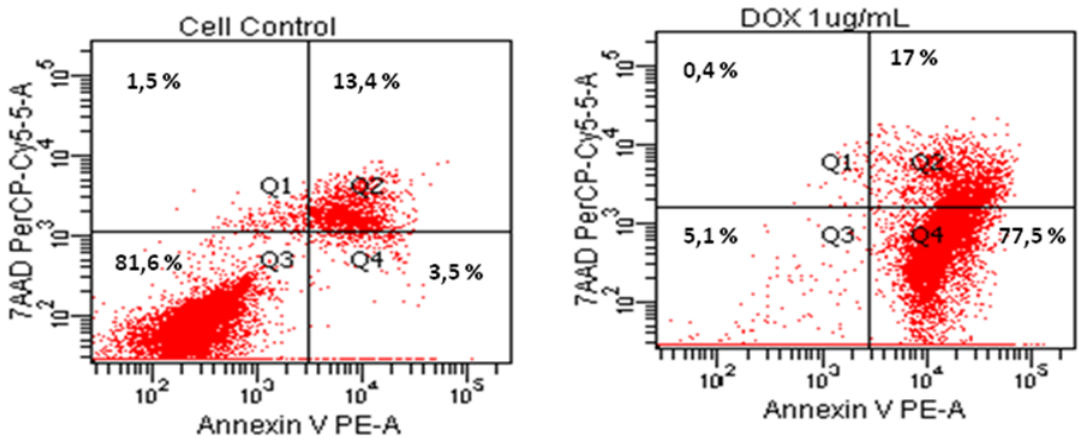


Şekil.3.21. 3-AMP'nin MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki etkisinde, boyama yapılmadan (unstained) ve 15 µM ve 30 µM konsantrasyonunda hücre ölüm mekanizmalarının flow sitometri yöntemiyle analizi grafiği.

Şekil 3.21'de gösterilen grafiğe göre, MDA-MB-231 hücrelerine karşı floresan özellik gösterip göstermediğini belirlemek için unstained grafiğinde 3-AMP'nin hem Annexin V hem de 7-AAD ile boyama işlemi yapılmadan hücrelerin ölüm mekanizmalarını inceledik. Bu grafiğe göre Q_3 bölgesinde hücre popülasyonu % 99,2 idi ve hücrelerin diğer bölgelere geçiş yapmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında hücrelerin ölüm mekanizmasını incelemek için kullandığımız maddelerin floresan özellik vermediğini gösterdik.

Grafiklerde artan konsantrasyonlara bağlı olarak hücre popülâsyonlarında değişimler meydana gelmiştir. 15 µM'lık konsantrasyon grafiğinde canlı hücre popülasyonu % 60 iken hücrelerin apoptoza uğradıkları popülasyon yüzdesini gösteren Q_4 kadranı oranı % 13.7 olarak belirlenirken, geç apoptoza ya da nekrotik ölüme gittiğini gösteren Q_3 kadranındaki oran % 21.9 olarak bulunmuştur. 30 µM'lık konsantrasyon grafiğinde canlı hücre popülasyonu % 79.9 iken hücrelerin apoptoza

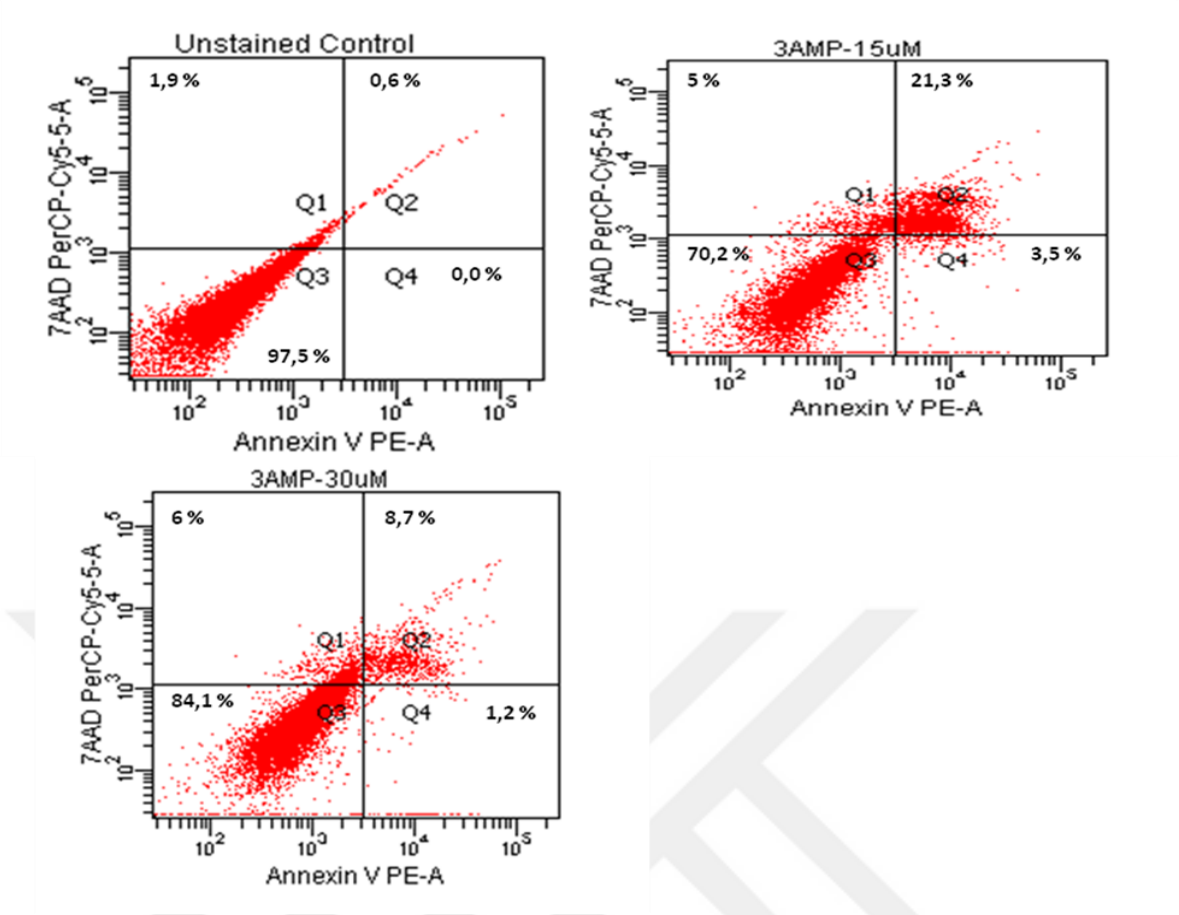
uğradıkları popülasyon yüzdesini gösteren Q_4 kadranı oranı % 5.1 olarak belirlenirken, geç apoptoza ya da nekrotik ölüme gittiğini gösteren Q_3 kadranındaki oran % 11 olarak bulunmuştur. Dozlar arasındaki sonuçların tutarsızlıklarının deneysel bir sorun olabileceği düşünülmüş ve hücrelerin maddelerle muamele edilme sürelerin yeniden optimize edilmesine karar verildi.



Şekil.3.22. MCF-10A hücrelerinin Annexin-V metodu ile analizi. Hücre kontrolü ve doksorubusin maddesinin flow sitometri ile analiz sonuçları.

Şekil.3.22'de gösterildiği gibi hücre kontrolünün Q3 kadranında yer alan ve her iki floresan boyanın olduğu bölgede hücre canlılık oranı %81.6 iken Q1 bölgesinde bulunan canlılık oranı % 1.5 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında hücrelerin büyük bir kısmının kullanılan boyalarla etkileşime girmediği ve hücre canlılığını devam ettirdiği gözlenmiştir.

Doksorubusin maddesi ise birçok çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan ve kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi kanıtlanmış olan bir maddedir. Çalışmamızda kullandığımız doksorubusinin en düşük dozu olan 1 µg/ml dozunda bile hücrelerinin büyük çoğunluğunun apoptoza gittiği görülmüştür. Burada Q_4 kadranında apoptotik hücre ölüm popülâsyonu oranı %77.5'tür.



Şekil.3.23. 3-AMP'nin MCF-10A hücreleri üzerindeki etkisinde, boyama yapılmadan (unstained) ve 15 µM ve 30 µM konsantrasyonunda hücre ölüm mekanizmalarının flow sitometri yöntemiyle analizi grafiği.

Şekil 3.23'de gösterilen grafiğe göre, MCF-10A hücrelerine karşı floresan özellik gösterip göstermediğini belirlemek için unstained grafiğinde 3-AMP'nin hem Annexin V hem de 7-AAD ile boyama işlemi yapılmadan hücrelerin ölüm mekanizmalarını inceledik. Bu grafiğe göre Q_3 bölgesinde hücre popülasyonu % 97.5 idi ve hücrelerin diğer bölgelere geçiş yapmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında hücrelerin ölüm mekanizmasını incelemek için kullandığımız maddelerin floresan özellik vermediğini göstermiş olduk.

Grafiklerde artan konsantrasyonlara bağlı olarak hücre popülâsyonlarında değişimler meydana gelmiştir. 15 µM'lık konsantrasyon grafiğinde canlı hücre popülasyonu % 70.2 iken hücrelerin apoptoza uğradıkları popülasyon yüzdesini gösteren Q_4 kadranı oranı % 3.5 olarak belirlenirken, geç apoptoza ya da nekrotik ölüme gittiğini gösteren Q_3 kadranındaki oran % 21.3 olarak bulunmuştur. 30 µM'lık konsantrasyon grafiğinde canlı hücre popülasyonu % 84.2 iken hücrelerin apoptoza uğradıkları

popülasyon yüzdesini gösteren Q_4 kadranı oranı % 1.2 olarak belirlenirken, geç apoptoza ya da nekrotik ölüme gittiğini gösteren Q_3 kadranındaki oran % 5.2 olarak bulunmuştur. Dozlar arasındaki sonuçların tutarsızlıklarının deneysel bir sorun olabileceği düşünülmüş ve hücrelerin maddelerle muamele edilme sürelerin yeniden optimize edilmesine karar verilmiştir.

4. TARTIŞMA

Kanser kardiyovasküler hastalıklar sonrası dünya çapında meydana gelen ölümlerin önde gelen en önemli ikinci nedenidir (Sudhakar, 2009). Kanser nedeni ile ölümlerde ilk sırada Akciğer (1,3 milyon ölüm), sonra Mide (803,000 ölüm), Kolorektal (639.000 ölüm), Karaciğer (610.000 ölüm), Meme (519.000 ölüm) kanseri yer almaktadır. Meme kanseri kadınlarda görülen yaygın bir hastalıktır ve görülme sıklığı dünya çapında artmaktadır (Cleator ve ark., 2007). Kemoterapi, kanser tedavisinde önemli bir yere sahiptir ve çeşitli kanser türlerinin tedavisi açısından önemi göz ardı edilmemelidir (Yousaf ve ark., 2015).

Kemoterapideki ilerlemeler, hastalığın tekrar etmesi ve ölüm riskini önemli ölçüde azaltmış olsa da, meme kanserinin nüksetmesi klinikte önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, bu zorluğun üstesinden gelmek için, meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek yeni ilaçların bulunması gerekmektedir (Zhang ve ark., 2017).

Makro moleküllerin, bazı biyomedikal uygulamalara sahip olduğu, ilaç gibi davrandığı ve ilaç dağıtım sistemlerinde büyük potansiyel gösterdiği keşfedildi. Sentetik makro moleküller arasında, taç eter, siklodekstrin ve kaliksarenler ve bunların türevleri büyük öneme sahiptir. Kaliksaren ve türevlerinin, antiviral, antibakteriyel, antifungal ve antikanser aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte literatürde kaliksaren bazlı antikanser ajanlar için çalışmalar hala yetersizdir. (Yousaf ve ark., 2015).

Bu çalışmada DE (Diester), F50 (Nitril (-CN)), F51 (Amin (-NH_2)), Karboksilik asit (-COOH), F21 (Alkil Bromür (-Br)) ve pirindinyum grubu ile fonksiyonlandırılarak hazırlanan p-ter-butil-kaliks(4)aren türevlerinin metastatik meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücreleri üzerine antikanser etkisi araştırıldı ve kontrol hücresi olarak MCF-10A hücre hattı kullanıldı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre kontrol grubu ile kıyaslandığında metastatik meme kanseri hücrelerinde özellikle piridinyum grubu ile fonksiyonlandırılan kaliks[4]aren türevlerinin tercihli bir sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. Çalışmamıza dahil edilen diğer fonksiyonel grupların hiçbirinde ise metastatik meme kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etki gözlenmedi. Pirindinyum grubu ile fonksiyonlandırılan kaliks[4]aren türevlerinden 3-AMP ve 4-AMP'nin metastatik meme kanseri hücrelerinde IC_{50} değerleri sırasıyla 28 μM ve 21.08 μM olarak bulundu. Kontrol hücresinde ise IC_{50} değerleri sırasıyla 59.4 μM ve 119 μM olarak bulundu. Pozitif kontrol olarak kullanılan doksorubusinin MDA-MB-231 hücreleri ve MCF-10A hücrelerinde IC_{50} değeri 1.79 μM olarak bulundu. Bu sonuçlara

bakıldığında doksorubusin kanser hücresi üzerinde güçlü bir anti-proliferatif etki gösterirken, sağlıklı hücrelerde de düşük dozlarda dahi hücre canlılığını yüksek oranda düşürmüştür. Pozitif kontrol ile kıyaslandığında pirindinyum grubu ile fonksiyonlandırılan kaliks[4]aren türevlerinden 3- AMP 28 µM-60 µM doz Aralığında, 4- AMP ise 21 µM-119 µM doz aralığında sağlıklı hücrelere zarar vermeden yalnızca metastatik meme kanseri hücrelerine karşı güçlü anti-proliferatif etki göstermiştir. Bu sonuçlar, 3-AMP ve 4-AMP'nin, sağlıklı hücrelere karşı sitotoksik etki göstermeden sadece kanserli hücrelere karşı pasif hedefleme ile anti kanser ajanı olarak kullanılması yönünden uygun bir aday olduğunu göstermektedir.

Literatürde farklı fonksiyonel gruplarla türevlendirilen kaliks[n]aren türevlerinin, farklı hücre hatları üzerinde anti kanser etkisi üzerine sınırlı çalışma bulunmaktadır, fakat metastatik meme kanseri hücreleri üzerine etkisi hakkında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Benzer şekilde MCF-10A hücreleri üzerinde de yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızın literatürdeki çalışmalardan farklı olarak pirindinyum grubu ile fonksiyonlandırılan kaliks[4]aren türevlerinin ilk kez metastatik meme kanseri hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkisinin çalışılması ve kontrol hücresi olarak sağlıklı meme hücre hattı olan MCF-10A'nın kullanılması bakımından oldukça önemlidir.

Santo ve ark. (2015), kaliks-Benz ve kaliks –Pyr, kaliks-NP, kaliks-NP_2 ve kaliks-NH_2 türevlerini sentezlemişler ve insan kanseri LNCaP (prostat), MCF-7 (meme), U87 (glioblastoma) hücreleri ve NHDF (fibroblast) hücrelerine karşı anti-proliferatif etkilerini değerlendirmişlerdir. Kaliks-NH_2'nin tüm hücre hatlarında güçlü bir anti-proliferatif etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise Kaliks-NH_2 metastatik meme kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermez iken, kaliks –piridinyum güçlü bir anti-proliferatif etki göstermiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında özellikle kaliks –piridinyum ve kaliks-NH_2 grubunun farklı meme kanseri hücre hatları üzerinde farklı sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Baggetto ve arkadaşları, kaliks[4]aren türevlerini sentezlemişler ve çeşitli tümör hücreleri (MU2, MU2F, HT1080, SP6.5, 1PC227, Jurkat, MEWO, Hl-60, Huh7, Hep-G2, MEWO, DLM.1) üzerindeki etkisini incelemişler ve bu bileşiklerin aktivitesini standart antikanser ilaçları ile karşılaştırmıştır. Bu fonksiyonelleştirilmiş kaliks[4]aren türevlerinin, özellikle lenfoblastik lösemi ve melanom hücre hatlarında güçlü antikanser ajanları olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da piridinyum grubu ile fonksiyonelleştirilen kaliksaren türevlerinin insan metastatik meme kanseri hücreleri

üzerinde pasif hedeflendirme yaparak sağlıklı hücrelere zarar vermeden seçici anti-proliferatif etki gösterdiğini ve güvenilir bir anti-kanser ajan olarak kullanılabileceğini belirledik.

(Pelizzaro-Rocha ve ark., 2013a) yaptığı çalışmada kaliks[4]aren, kaliks[6]aren, kaliks[8]aren maddelerinin ter-bütil takılmış kuyruklu ve ter-bütil takılmamış kuyruksuz yapıları çalışılmıştır. Altı fenolik ünite içeren ter-bütil takılmamış kuyruksuz CLX6, pankreas hücrelerinin canlılığını doza bağımlı bir şekilde azalttığını rapor etmişlerdir. 24 saat CLX6 ile muamele edilmiş Pankreas hücreleri için belirlenen IC_{50} değeri 17.9 μM olduğunu fakat diğer maddelerde ise canlılığı azaltan aktivite gözlenmediğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise p-ter-bütil takılmış kuyruklu kaliks[4]aren'ler piridinyum grubu ile fonksiyonlandırılarak metastatik meme kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi incelendi ve kontrol grubu olarak sağlıklı meme hücre hattı MCF-10A kullanıldı. piridinyum grubu ile fonksiyonlandırılan kaliks[4]aren türevlerinden 3-AMP ve 4- AMP kontrol grubu ile kıyasladığında düşük doz aralığında sağlıklı hücreleri öldürmeden sadece metastatik meme kanseri hücrelerini öldürdüğünü belirledik. Bu çalışma da ayrıca fonksiyonel grup takılmasıyla birlikte kaliks[4]aren'lerin meme kanseri hücrelerinde anti kanser etkiye sahip olduğunu gösterdik.

(Ruud P.M.Dings, 2013) yaptığı çalışmada sitotoksik ve anti-tümör özelliklerine sahip dört kaliksaren bileşiğini sekiz farklı hücre tipinde HUVEC, fibroblastlar, fare endotel hücreleri (2H11) ve insan yμMurtalık karsinomu (MA148) ve akciğer adenokarsinomu (A549) ve murin SCH meme karsinomu, fibrosarkom (FSaII) ve melanom (B16F10) hücre hatlarında çalışmışlardır. PTX013 ve PTX015'in test edilen çeşitli hücre tiplerinde sitotoksisitenin indüklenmesinde en etkili madde olduklarını bulmuşlar, fakat genel olarak en yüksek sitotoksik etki gösteren maddenin PTX013 olduğunu bildirmişlerdir.

(Viola ve ark., 2010) yaptığı çalışmada N-asetil-D-glukosamin kalıntısı taşıyan bir ureido-kaliks[8]aren sentezlemişler (bileşik 1) ve bu bileşik 1'in anti-proliferatif etkisi, şeker parçaları (bileşik 2), çoklu ureido grupları (bileşik 3) veya her ikisinden (bileşik 4) yoksun olan ilgili bileşiklerle daha ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Kaliks[8]aren iskelesi tarafından GlcNAc kalıntıları yoluyla hücre göçüne müdahale etmek için özel olarak tasarlanan bileşik 1, aynı zamanda glioma hücre çoğalmasını önleyebildiğini ve bu etkinin çoklu ureido gruplarının varlığına dayandığını ve büyüme faktörleri ile bunların sinyalleşmesini engellediğini rapor etmişlerdir.

(Arunasree, 2010) yaptığı çalışmada karvakrol'ün insan metastatik meme kanseri hücresi hattı MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisini değerlendirmişlerdir. Artan karvakrol konsantrasyonları ile birlikte hücrelerin büyümesinde doza bağlı bir azalma gözlendiğini, MDA-MB 231 hücreleri için karvakrol'ün IC_{50} değerini 48 saatte 100 µM olduğunu rapor etmişlerdir. Pozitif kontrol olarak, kurkµMini çalışmaya dahil etmişler ve kurkµMinin IC_{50}'i 30 µM olduğunu bildirmişlerdir. Bu deney sonucunda, MDA-MB-231 hücrelerine karşı anti-proliferatif bir ajan olarak karvakrol'ün kullanılabileceğini, ancak pozitif kontrol olarak kullanılan kurkµMine kıyasla 3 kat daha az etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da piridinyum grubu ile fonksiyonlandırılan kaliks[4]aren türevlerinden 3-Amp ve 4-Amp'nin metastatik meme kanseri hücrelerinde 24 saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 28 µM ve 21.08 µM olarak belirledik. Kontrol hücresinde ise 24 saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 59.4 µM ve 119 µM olarak bulundu. Pozitif kontrol olarak kullanılan doksorubusinin MDA-MB-231 hücreleri ve MCF-10A hücrelerinde IC_{50} değeri 1.79 µM olarak bulundu. Elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında piridinyum grubu ile fonksiyonlandırılan kaliks[4]aren türevlerinden 3- AMP ve 4- AMP'nin daha kısa sürede ve daha düşük dozlarda kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiğini bulduk. Sonuçlarımız doksorubusin ile kıyaslandığında meme kanseri hücrelerine karşı piridinyum grubu ile fonksiyonlandırılan kaliks[4]aren türevlerinden 3- AMP ve 4- AMP'nin daha az etkili olduğunu gösteriyor gibi görünse de kontrol grubu ile kıyaslandığında 3- AMP ve 4- AMP'nin doksorubisine kıyasla belirli doz aralıklarında sağlıklı hücrelere zarar vermeden yalnızca kanser hücrelerini öldürdüğünü belirledik. Elde ettiğimiz bu sonuçlarda 3- AMP ve 4- AMP'nin güvenilir bir anti kanser ajan olarak kullanılabileceğini gösterdik.

Çalışmamızda piridinyum grubu ile türevlendirilen p-ter-bütil-kaliks[4]arenlerin hücrelerin yüzeye tutunması, çoğalması üzerindeki etkilerini değerlendirmek ve IC_{50} değerlerini hesaplamak için xCELLigence sistemi kullanılmıştır. Bu sistem XTT, MTT gibi canlılık deneylerinin aksine elektriksel iç direnci ölçerek hücresel fenotipik değişikliklerin sürekli ve gerçek zamanlı olarak izlenmesini sağlar (Biosciences, 2013). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular MDA-MB-231 hücreleri üzerinde 4- AMP'nin 25 µM dozu anti-mitotik etkiye sahip olduğunu 50 ve 100 µM dozları sitoskeletal etkiye sahip olduğunu gösterdi. Kontrol grubu olarak çalıştığımız MCF-10A hücrelerinde ise 4- AMP'nin yaklaşık 160 saat süren analizi boyunca hücrelerde herhangi bir ölüm gözlenmemiştir. 3- AMP'nin 25 µM-50 ve 100 µM dozları MDA-MB-231 hücreleri

üzerinde sitoskeletal etki göstermiştir. MCF-10A hücrelerinde ise 3- AMP'nin 25 µM ve 50 µM dozlarında yaklaşık 160 saatlik analiz boyunca hücrelerde herhangi bir ölüm gözlenmez iken 100 µM dozunda DNA hasarı etkisi göstermiştir.

(Ardito ve ark., 2017) bir izoflavon olan genisteinin; hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek için 20, 50 ve 100 µM dozları 24, 48 ve 72 saat boyunca 3 dil karsinom hücre hatları (PE/CA-PJ15, PE/CA-PJ49, HSC-3) üzerinde çalışmışlardır. Ayrıca, her zaman noktasında 20 ila 50 µM arasındaki konsantrasyonlarla muamele edilen tüm dil kanseri hücreleri için yüksek öneme sahip kuvvetli bir proliferasyon azalması elde etmişlerdir. Tüm hücre hatlarında ortalama olarak 24 saatte yaklaşık 46 µM ve 48 saatte yaklaşık 40 µM IC_{50} değerleri bulmuşlardır. Bununla birlikte, kullanılan her bir hücre hattında 72 saatte uyµMsuz IC_{50} değerleri elde etmişlerdir. Bunun nedeni olarak ise hücre hattının genistein ile tedaviye karşı diğerlerine göre daha yüksek direnç göstermesi şeklinde yorµMlamışlardır.

(Birdal Bilir, 2013) yaptığı çalışmada TNBC'nin etkin tedavisinde Wnt yolu inhibitörlerinin potansiyel etkilerini araştırmışlardır. Bunun için meme kanseri hücre hatlarında (BT-549, MDA-MB-231, HCC-1143, MCF-7 ve HCC-1937) Wnt sinyal yolağını hedefleyen 5 farklı bileşiğin (iCRT-3, iCRT-5, iCRT-14, IWP-4, XAV-939), xCELLigence sistemi kullanarak hücre proliferasyonu üzerinde inhibe edici etkisine bakmışlardır. xCELLigence sistemi sonuçlarına bakıldığında tüm TNBC hücre hatlarında proliferasyonu inhibe etmek için test edilen bileşikler arasında en etkili bileşiğin iCRT-3 olduğunu bulmuşlardır.

(Topcul ve ark., 2018) yaptığı çalışmada poli (ADP-riboz) polimeraz inhibitörünün (PARP) tek başına ve nab-paklitaksel ile kombinasyonu ile birlikte in vitro sitotoksik etkisi, insan üçlü negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 ve insan luminal A meme kanseri hücre hattı MCF ‑ 7 üzerinde değerlendirildi. Bu çalışmada kullanılan PARP inhibitör konsantrasyonları için 50, 75 ve 100 µM ve nab-paklitaksel konsantrasyonları için 5.8, 11.72 ve 17.59 µM olarak belirlenmiştir. XCELLigence sisteminden elde edilen CI (hücre indeksi) değerleri, hem PARP'ın tek başına kullanımında hem de nab-paklitaksel ile kombinasyon halinde kullanımının, hem MDA-MB-231 hem de MCF-7 hücre hatları üzerinde belirgin anti-proliferatif etkilere sahip olduğunu gösterdi. Sonuçlar, MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 50 µM konsantrasyonundaki PARP inhibitörünün sitostatik etkiye sahip olduğunu, 75 ve 100 µM konsantrasyonlarındaki PARP inhibitörünün ise DNA'ya zarar veren etkisi olduğunu göstermiştir. MCF ‑ 7 hücre hattı üzerinde ise 50 µM konsantrasyondaki

PARP inhibitörü anti‑ mitotik bir etkiye sahip iken, 75 μM konsantrasyondaki PARP inhibitörü DNA'ya zarar veren bir etkiye sahipti ve 100 μM konsantrasyondaki PARP inhibitörü, sito-skeletal etki gösterdiğini bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da piridinyum grubu ile türevlendirilen p-ter-bütil-kaliks[4]aren türevlerinden 3- AMP ve 4- AMP'nin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde benzer etkileri olduğu belirlenmiştir.

Literatürde metastatik meme kanseri hücreleri üzerinde piridinyum grubu ile fonksiyonlandırılan p-ter-bütil-kaliks[4]aren türevlerinin antikanser etkisini XCELLigence sisteminden yararlanılarak gerçek zamanlı analizini içeren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan bakıldığında bizim çalışmamız literatürde yapılan ilk çalışmadır ve elde ettiğimiz bulgular piridinyum grubu ile fonksiyonlandırılan p-ter-bütil-kaliks[4]aren türevlerinin gerçek zamanlı analizi ile birlikte sağlıklı hücrelere zarar vermeden yalnızca kanser hücrelerini hedef alan güçlü bir anti kanser ajanı olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda hücrelerin ölüm karakterlerini belirlemek için flow sitometri yöntemi kullanıldı. Çalışmamızda kullanılan piridinyum grubu ile fonksiyonlandırılan p-ter-bütil-kaliks[4]aren türevlerinden 3-AMP'nin 15 μM dozunda hücrelerin geç apoptoza ya da nekroza gittiği ölüm oranı % 22 iken erken apoptotik ölüm oranı % 13.7 olarak bulundu. 3-AMP'nin 30 μM dozunda da hücrelerin geç apoptoza ya da nekroza gittiği ölüm oranı % 11 iken erken apoptotik ölüm oranı % 5 olarak bulundu. Benzer sonuçlar 4-AMP ile muamele edilen hücrelerde de alındı. Elde edilen sonuçlara bakıldığında maddelerin hücreleri kısa sürede öldürdüğü için madde ile muamele edilme sürelerinin daha kısa tutularak apoptotik hücrelerin belirlenmesi gerektiğine karar verildi.

(Arunasree, 2010) yaptığı çalışmada karvokrolun hücre ölüm karakterini belirlemek için Annexin-V kullanarak flow sitometri metodu kullanılmıştır. Annexin-V metodu ve yapılan diğer çalışmalarla birlikte (mitokondriyal membran potansiyeli, sitokrom c salınımı gb) karvokrolun MDA-MB-231 hücreleri üzerinde doza bağlı olarak apoptotik hücrelerin oranında artış olduğunu göstermişlerdir ve karvokrolun MDA-MB-231 hücrelerini mitokondriyal aracılı apoptoza götürdüğünü rapor etmişlerdir.

(Zhong ve ark., 2019) yaptığı çalışmada MCF-7, T47D ve SK-BR-3 hücrelerinde apoptoz üzerinde TPA'nın etkisini belirlemek için Annexin-V metodu kullanılmıştır. Kullanılan 3 hücre hattında da apoptotik hücrelerin yüzdesinde önemli artış belirlenmiştir. TPA tarafından indüklenen apoptozu doğrulamak için Bcl-2/Bax

ekspresyon seviyelerine bakılmış ve elde edilen sonuçlar mitokondriyal aracılı apoptoz boyunca apoptozu indüklediğini göstermişlerdir.

(Pelizzaro-Rocha ve ark., 2013a) yaptığı çalışmada kuyruksuz kaliks[6]arenlerin pankreas kanseri hücrelerinde otofajik hücre ölümünü indükleyip indüklemediğini incelemişlerdir. Yapılan analizler sonucu elde edilen veriler apoptozun pankreas hücrelerinde CLX6'nın neden olduğu hücre ölümüne çok az katkısı olduğunu veya hiç bir katkısı olmadığını açıkça göstermektedir, ancak otofajinin pankreas hücre ölümünü yönlendirmede önemli bir süreç olduğunu göstermişlerdir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada DE (Diester), F50(Nitril (-CN)), F51 (Amin (-NH_2)), Karboksilik asit (-COOH), F21(Alkil Bromür (-Br)) ve piridinyum grubu ile fonksiyonlandırılarak hazırlanan p-ter-bütil-kaliks(4)aren türevlerinin metastatik meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücreleri üzerine antikanser etkisi araştırıldı ve kontrol hücresi olarak MCF-10A hücre hattı kullanıldı.

Çalışmamızın sonuçlarına göre özelikle piridinyum grubu ile fonksiyonlandırılarak hazırlanan p-ter-butil-kaliks(4)aren türevlerinden 3-AMP v 4-AMP maddelerinin metastatik meme kanseri hücrelerinde canlı hücre miktarını önemli derece de düşürürken sağlıklı hücrelerde sitotoksik etkisi gözlenmemiştir. Özellikle 4-AMP metastatik meme kanseri hücreleri üzerinde 21 μM-119 μM arasında tercihli sitotoksik etki gösterirken, 3- AMP 28 μM-60 μM arasında sitotoksik etki göstermiştir. Pozitif kontrol olarak kullandığımız doksorubusinin hem kanser hücrelerin de hem de sağlıklı meme hücrelerinde IC_{50} değeri 1.79 μM olarak bulundu. Bu sonuçlar pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında 3- AMP ve 4- AMP maddeleri belirtilen doz aralığında yalnızca kanser hücrelerini hedef alarak sağlıklı hücrelere zarar vermeden pasif bir şekilde hedeflendirilmiş anti-proliferatif etki gösterdiği bulundu.

Çalışmamızda piridinyum grubu ile türevlendirilen p-ter-bütil-kaliks[4]arenlerin hücrelerin yüzeye tutunması, çoğalması üzerindeki etkilerini değerlendirmek ve IC_{50} değerlerini hesaplamak için xCELLigence sistemi kullanılmıştır. Xcelligence sisteminde her iki hücre hattı üzerinde de 3- AMP ve 4- AMP'nin 25 μM-50 μM-100 μM dozları çalışıldı. 4-AMP'nin MDA-MB-231 hücrelerini madde eklendikten yaklaşık 6-8 saat sonra öldürmeye başladığı gözlenmiş buna karşılık sağlıklı meme kanseri hücre hattı olan MCF-10A üzerinde yaklaşık 160 saat süren analiz boyunca çalışılan tüm dozların konsantrasyon-zaman eğrilerinde herhangi bir düşüş gözlenmemiştir. 3- AMP de ise MDA-MB-231 hücrelerinde doza ve zamana bağlı sitotoksik etki gözlenmiş ve kullanılan dozların konsantrasyon-zaman eğrilerinde doza ve zamana bağlı olarak düşüş saptanmıştır. 3-Amp'nin MCF-10A üzerinde 25 μM ve 50 μM dozlarında yaklaşık 160 saat süren analiz boyunca MCF-10A hücrelerinin konsantrasyon-zaman eğrilerinde herhangi bir düşüş gözlenmez iken 100 μM dozunda DNA hasarı etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmamızda hücrelerin ölüm karakterlerini belirlemek için flow sitometri yöntemi kullanıldı. Çalışmamızda kullanılan piridinyum grubu ile fonksiyonlandırılan p-ter-bütil-kaliks[4]aren türevlerinden 3- AMP'nin 15 μM dozunda hücrelerin geç

apoptoza ya da nekroza gittiği ölüm oranı % 22 iken erken apoptotik ölüm oranı % 13.7 olarak bulundu. 3- AMP'nin 30 μM dozunda da hücrelerin geç apoptoza ya da nekroza gittiği ölüm oranı % 11 iken erken apoptotik ölüm oranı % 5 olarak bulundu. Benzer sonuçlar 4- AMP ile muamele edilen hücrelerde de alındı. Elde edilen sonuçlara bakıldığında düşük doz ve yüksek doz arasında ki tutarsızlıkların hücrelerin maddelerle muamele edilme sürelerinin uzun olmasından kaynaklanabileceğini düşündürdü ve bu yüzden sürelerin yeniden değerlendirilmesine karar verildi.

Literatürde farklı fonksiyonel gruplarla türevlendirilen kaliks[n]aren türevlerinin, farklı hücre hatları üzerinde anti kanser etkisi üzerine sınırlı çalışma bulunmaktadır, fakat metastatik meme kanseri hücreleri üzerine etkisi hakkında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Benzer şekilde MCF-10A hücreleri üzerinde de yapılan bir çalışma bulunmamaktadır.

Bizim çalışmamızın literatürdeki çalışmalardan farkı piridinyum grubu ile fonksiyonlandırılan kaliks[4]aren türevlerinin ilk kez metastatik meme kanseri hücreleri üzerinde anti-proliferatif etkisinin çalışılmasıdır. Bu fonksiyonel grup ile türevlendirilen kaliksarenlerden 3- AMP ve 4- AMP'nin belirli doz aralıklarında yalnızca kanser hücrelerini pasif hedeflendirme ile sağlıklı hücrelere zarar vermeden öldürdüğünü yaptığımız çalışma ile biz ortaya çıkardık. Bu bakımdan çalışmamız literatürdeki ilk çalışmadır ve sadece kanser hücrelerini hedef alan anti kanser ajan geliştirmek için çok önemli bir adım olmuştur.

6. ÖNERİLER

Kanser kardiyovasküler hastalıklar sonrası dünya çapında meydana gelen ölümlerin önde gelen en önemli ikinci nedenidir. Kanser nedeni ile ölümlerde ilk sırada Akciğer (1,3 milyon ölüm), sonra Mide (803,000 ölüm), Kolorektal (639.000 ölüm), Karaciğer (610.000 ölüm), Meme (519.000 ölüm) kanseri yer almaktadır.

Kemoterapideki ilerlemeler, hastalık nüksü ve ölüm riskini önemli ölçüde azaltmış olsa da, meme kanserinin nüksetmesi klinikte önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, bu zorluğun üstesinden gelmek için, meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek yeni ilaçların bulunması gerekmektedir. (Zhang ve ark., 2017).

Bu amaçla, piyasaya daha güçlü antikanser ilaçlarını tanıtmak için antikanser ajanlarının tasarlanması üzerine araştırmalar halen devam etmektedir. Ancak, var olan tüm ve yeni yapılacak olan antikanser ilaçları kanser hücresine özgü olmaması gibi problemle karşı karşıya kalmaktadır.

Bizim çalışmamızda da supramoleküler kimya da sıklıkla kullanılan fonksiyonlandırılmış kaliksaren türevlerinin metastatik meme kanseri hücrelerine karşı sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini öldürerek düşük dozda etkin bir antikanser ajanı olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlarımız klinikte hala sorun olmaya devam eden antikanser ilaçlarının kanser hücresine özgü olmaması gibi problemlere karşı alternatif bir anti kanser ajanı olarak kullanılma potansiyelinin oldukça yüksek olduğunu göstermiştir. Sonuçlarımız yeni ilaç tasarlamaya yönelik çalışmalara ve terapötik stratejiler geliştirilebilmesine yönelik çalışmalara katkı sağlayacaktır. Elde edilen çalışma bulguları, hem literatür için hem de yeni bir ilaç tasarlayabilme potansiyeli açısından özgün değerlere sahiptir.

KAYNAKLAR

Agur, Z., Arnon, R. ve Schechter, B., 1988, Reduction of cytotoxicity to normal tissues by new regimens of cell-cycle phase-specific drugs, *Mathematical Biosciences*, 92 (1), 1-15.

Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. ve Clarke, M. F., 2003, Prospective identification of tμMorigenic breast cancer cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (7), 3983-3988.

Amiri, A., Choi, E. Y. ve Kim, H. J., 2010, Development and molecular recognition of Calixcrownchip as an electrochemical ALT immunosensor, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 66 (1), 185-194.

Anders, C. K. ve Carey, L. A., 2009, Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer, *Clin Breast Cancer*, 9 Suppl 2, S73-81.

Ardito, F., Pellegrino, M. R., Perrone, D., Troiano, G., Cocco, A. ve Muzio, L. L., 2017, In vitro study on anti-cancer properties of genistein in tongue cancer.

Arunasree, K. M., 2010, Anti-proliferative effects of carvacrol on a hμMan metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231, *Phytomedicine*, 17 (8-9), 581-588.

Ashkenazi, A. ve Dixit, V. M., 1998, Death Receptors: Signaling and Modulation, *Science*, 281 (5381), 1305.

B. Shah, R., Valand, N., Sutariya, P. ve K. Menon, S., 2015, Design, synthesis and characterization of quinoline–pyrimidine linked calix[4]arene scaffolds as anti-malarial agents, p.

Baehrecke, E. H., 2005, Autophagy: dual roles in life and death?, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 505.

Bagnacani, V., Franceschi, V., Fantuzzi, L., Casnati, A., Donofrio, G., Sansone, F. ve Ungaro, R., 2012, Lower Rim Guanidinocalix[4]arenes: Macrocyclic Nonviral Vectors for Cell Transfection, *Bioconjugate Chemistry*, 23 (5), 993-1002.

Baldini, L., Casnati, A., Sansone, F. ve Ungaro, R., 2007, Calixarene-based multivalent ligands, *Chem Soc Rev*, 36 (2), 254-266.

Biosciences, A., 2013, Compound-Mediated-Cytotoxicity-Using-xCELLigence-to-Optimize-Endpoint-Viability-and-Cytotoxicity-Assays.

Birdal Bilir, O. K., and Carlos S Moreno, 2013, Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells, *Translasyonel Tıp Dergisi*.

Brannon-Peppas, L. ve Blanchette, J. O., 2012, Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 206-212.

Brites, C. D. S., Lima, P. P., Silva, N. J. O., Millán, A., Amaral, V. S., Palacio, F. ve Carlos, L. D., 2011, Lanthanide-based lμMinescent molecular thermometers, *New Journal of Chemistry*, 35 (6), 1177.

Cacciapaglia, R., Casnati, A., Mandolini, L., Reinhoudt, D. N., Salvio, R., Sartori, A. ve Ungaro, R., 2006, Catalysis of Diribonucleoside Monophosphate Cleavage by Water Soluble Copper(II) Complexes of Calix[4]arene Based Nitrogen Ligands, *Journal of the American Chemical Society*, 128 (37), 12322-12330.

Cantley, L. C., 2002, The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway, *Science*, 296 (5573), 1655.

Carey LA, P. C., Livasy CA, et al, 2007, 1–1 Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study, *Breast Diseases: A Year Book Quarterly*, 18 (1), 26.

Chabner, B. A. ve Roberts Jr, T. G., 2005, Chemotherapy and the war on cancer, *Nature Reviews Cancer*, 5, 65.

Chute, J. P., Muramoto, G. G., Whitesides, J., Colvin, M., Safi, R., Chao, N. J. ve McDonnell, D. P., 2006, Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of hμMan hematopoietic stem cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (31), 11707-11712.

Cleator, S., Heller, W. ve Coombes, R. C., 2007, Triple-negative breast cancer: therapeutic options, *The Lancet Oncology*, 8 (3), 235-244.

Coleman, A. W., Perret, F., Moussa, A., Dupin, M., Guo, Y. ve Perron, H., 2007, Calix[n]arenes as Protein Sensors, In: Creative Chemical Sensor Systems, Eds: Schrader, T., *Berlin, Heidelberg*: Springer Berlin Heidelberg, p. 31-88.

Consoli, G. M. L., Cunsolo, F., Geraci, C., Mecca, T. ve Neri, P., 2003, Calix[8]arene-based glycoconjugates as multivalent carbohydrate-presenting systems, *Tetrahedron Letters*, 44 (40), 7467-7470.

Consoli, G. M. L., Cunsolo, F., Geraci, C. ve Sgarlata, V., 2004, Synthesis and Lectin Binding Ability of Glycosamino Acid−Calixarenes Exposing GlcNAc Clusters, *Organic Letters*, 6 (23), 4163-4166.

Cornforth J, W., Hart P, D. A., Nicholls G, A., Rees R. J, W. ve Stock J, A., 1955, ANTITUBERCULOUS EFFECTS OF CERTAIN SURFACE-ACTIVE POLYOXYETHYLENE ETHERS, *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 10 (1), 73-86.

Cory, S. ve Adams, J. M., 2002, The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nature Reviews Cancer*, 2, 647.

Custodio-Santos, T., Videira, M. ve Brito, M. A., 2017, Brain metastasization of breast cancer, *Biochim Biophys Acta*, 1868 (1), 132-147.

de Fatima, A., Fernandes, S. A. ve Sabino, A. A., 2009, Calixarenes as New Platforms for Drug Design, *Current Drug Discovery Technologies*, 6 (2), 151-170.

Deryugina, E. I. ve Quigley, J. P., 2006, Matrix metalloproteinases and tμMor metastasis, *Cancer Metastasis Rev*, 25 (1), 9-34.

Dings, R. P., Chen, X., Hellebrekers, D. M., van Eijk, L. I., Zhang, Y., Hoye, T. R., Griffioen, A. W. ve Mayo, K. H., 2006, Design of nonpeptidic topomimetics of antiangiogenic proteins with antitμMor activities, *J Natl Cancer Inst*, 98 (13), 932-936.

Dings, R. P. M., Levine, J. I., Brown, S. G., Astorgues-Xerri, L., MacDonald, J. R., Hoye, T. R., Raymond, E. ve Mayo, K. H., 2013, Polycationic calixarene PTX013, a potent cytotoxic agent against tμMors and drug resistant cancer, *Investigational New Drugs*, 31 (5), 1142-1150.

Elmore, S. ve NIEHS, L. o. E. P., Research Triangle Park, North Carolina 27709, USA, 2007, <Apoptosis-A Review of Programmed Cell Death.pdf>.

Fujimoto, K., Miyata, T. ve Aoyama, Y., 2000, Saccharide-Directed Cell Recognition and Molecular Delivery Using Macrocyclic Saccharide Clusters: Masking of Hydrophobicity to Enhance the Saccharide Specificity, *Journal of the American Chemical Society*, 122 (14), 3558-3559.

Geraci, C., Consoli, G. M., Granata, G., Galante, E., Palmigiano, A., Pappalardo, M., Di PμMa, S. D. ve Spadaro, A., 2013, First self-adjuvant multicomponent potential vaccine candidates by tethering of four or eight MUC1 antigenic immunodominant PDTRP units on a calixarene platform: synthesis and biological evaluation, *Bioconjug Chem*, 24 (10), 1710-1720.

Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., BirnbaμM, D., Wicha, M. S. ve Dontu, G., 2007, ALDH1 is a marker of normal and malignant hμMan mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome, *Cell stem cell*, 1 (5), 555-567.

Gunasinghe, N. P., Wells, A., Thompson, E. W. ve Hugo, H. J., 2012, Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer, *Cancer Metastasis Rev*, 31 (3-4), 469-478.

Guo, D.-S., Wang, K. ve Liu, Y., 2008, Selective binding behaviors of p-sulfonatocalixarenes in aqueous solution, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 62 (1), 1-21.

Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K. E., Jones, L. P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S., Backlund, M. G., Yin, Y., Khramtsov, A. I., Bastein, R., Quackenbush, J., Glazer, R. I., Brown, P. H., Green, J. E., Kopelovich, L., Furth, P. A., Palazzo, J. P., Olopade, O. I., Bernard, P. S., Churchill, G. A., Van Dyke, T. ve Perou, C. M., 2007, Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and hμMan breast tμMors, *Genome Biology*, 8 (5), R76-R76.

Hess, D. A., Meyerrose, T. E., Wirthlin, L., Craft, T. P., Herrbrich, P. E., Creer, M. H. ve Nolta, J. A., 2004, Functional characterization of highly purified hμMan hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity, *Blood*, 104 (6), 1648.

Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M. ve Kroemer, G., 1997, The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death, *Oncogene*, 15, 1573.

Hu, M. ve Polyak, K., 2008, Molecular characterisation of the tμMour microenvironment in breast cancer, *Eur J Cancer*, 44 (18), 2760-2765.

Hwang, J.-P., Tsai, S.-J., Yang, C.-H., Liu, K.-M. ve Lirng, J.-F., 1998, Hoarding Behavior in Dementia: A Preliminary Report, *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, 6 (4), 285-289.

Jäättelä, M. ve Tschopp, J., 2003, Caspase-independent cell death in T lymphocytes, *Nature Immunology*, 4, 416.

Joo, W. D., Visintin, I. ve Mor, G., 2013a, Targeted cancer therapy--are the days of systemic chemotherapy nμMbered?, *Maturitas*, 76 (4), 308-314.

Joo, W. D., Visintin, I. ve Mor, G., 2013b, Targeted cancer therapy – Are the days of systemic chemotherapy nμMbered?, *Maturitas*, 76 (4), 308-314.

K McPherson, C. S. v. J. D., 2000, Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics.

Kamada, R., Yoshino, W., Nomura, T., ChμMan, Y., Imagawa, T., Suzuki, T. ve Sakaguchi, K., 2010, Enhancement of transcriptional activity of mutant p53 tμMor suppressor protein through stabilization of tetramer formation by calix[6]arene derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20 (15), 4412-4415.

Karakurt, S., F. Kellici, T., Mavromoustakos, T., G. Tzakos, A. ve Yilmaz, M., 2016, Calixarenes in Lipase Biocatalysis and Cancer Therapy, *Current Organic Chemistry*, 20 (10), 1043-1057.

Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M. C., Voduc, D., Speers, C. H., Nielsen, T. O. ve Gelmon, K., 2010, Metastatic behavior of breast cancer subtypes, *J Clin Oncol*, 28 (20), 3271-3277.

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. ve Currie, A. R., 1972, Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics, *British Journal of Cancer*, 26 (4), 239-257.

Kim, J. E., Ahn, H. J., Ahn, J. H., Yoon, D. H., Kim, S. B., Jung, K. H., Gong, G. Y., Kim, M. J., Son, B. H. ve Ahn, S. H., 2012, Impact of triple-negative breast cancer phenotype on prognosis in patients with stage I breast cancer, *J Breast Cancer*, 15 (2), 197-202.

Klionsky, D. J. ve Emr, S. D., 2000, Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation, *Science (New York, N.Y.)*, 290 (5497), 1717-1721.

Křenek, K., Kuldová, M., Hulíková, K., Stibor, I., Lhoták, P., Dudič, M., Budka, J., Pelantová, H., Bezouška, K., Fišerová, A. ve Křen, V., 2007, RETRACTED: N-Acetyl-d-glucosamine substituted calix[4]arenes as stimulators of NK cell-mediated antitμMor immune response, *Carbohydrate Research*, 342 (12), 1781-1792.

Lee, Y., Lee Eun, K., Cho Yong, W., Matsui, T., Kang, I.-C., Kim, T.-S. ve Han Moon, H., 2003, ProteoChip: A highly sensitive protein microarray prepared by a novel method of protein immobilization for application of protein-protein interaction studies, *PROTEOMICS*, 3 (12), 2289-2304.

Lehn, J.-M., 1988, Supramolecular Chemistry—Scope and Perspectives Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture), *Angewandte Chemie International Edition in English*, 27 (1), 89-112.

Lehn, J. M., 1979, CRYPTATES: INCLUSION COMPLEXES OF MACROPOLYCYCLIC RECEPTOR MOLECULES, In: Chemistry for the Welfare of Mankind, Eds: Tsuruta, T., Tamaru, K., Tamai, Y., Takahashi, N., Kitano, Y. ve Echigoya, E.: Pergamon, p. 871-892.

Li, C. I., Uribe, D. J. ve Daling, J. R., 2005, Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer, *Br J Cancer*, 93 (9), 1046-1052.

Li, J.-S., Chen, Y.-Y. ve Lu, X.-R., 2000, Syntheses of Novel Tripodal Calix[n]cryptands (n = 4, 6) and Their Extraction Abilities toward Cations, *European Journal of Organic Chemistry*, 2000 (3), 485-490.

Li, Z. ve Sheng, M., 2012, Caspases in synaptic plasticity, *Molecular Brain*, 5 (1), 15.

Livshits, Z., Rao, R. B. ve Smith, S. W., 2014, An Approach to Chemotherapy-Associated Toxicity, *Emergency Medicine Clinics of North America*, 32 (1), 167-203.

Lorger, M., 2012, TμMor microenvironment in the brain, *Cancers (Basel)*, 4 (1), 218-243.

Ludwig, R., 2005, Calixarenes for Biochemical Recognition and Separation, *Microchimica Acta*, 152 (1), 1-19.

Makin, G., 2014, Principles of chemotherapy, *Paediatrics and Child Health*, 24 (4), 161-165.

Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. ve Band, V., 2014, Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers, *Cancer Biology & Therapy*, 10 (10), 955-960.

Martos, V., Castreño, P., Valero, J. ve de Mendoza, J., 2008, Binding to protein surfaces by supramolecular multivalent scaffolds, *Current Opinion in Chemical Biology*, 12 (6), 698-706.

Menger, F. M., Bian, J., Sizova, E., Martinson, D. E. ve Seredyuk, V. A., 2004, Bolaforms with Fourteen Galactose Units: A Proposed Site-Directed Cohesion of Cancer Cells, *Organic Letters*, 6 (2), 261-264.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. ve Klionsky, D. J., 2008, Autophagy fights disease through cellular self-digestion, *Nature*, 451, 1069.

Nho, K. J., Chun, J. M., Lee, A. Y. ve Kim, H. K., 2015, Anti-metastatic effects of RheμM PalmatμM L. extract in hμMan MDA-MB-231 breast cancer cells, *Environ Toxicol Pharmacol*, 40 (1), 30-38.

Nicolson, G. L., 1993, Paracrine and autocrine growth mechanisms in tμMor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis, *Cancer and Metastasis Reviews*, 12 (3), 325-343.

Nimse, S. B. ve Kim, T., 2013, Biological applications of functionalized calixarenes, *Chem Soc Rev*, 42 (1), 366-386.

Ogier-Denis, E. ve Codogno, P., 2003, Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1603 (2), 113-128.

Ogoshi, T., Kanai, S., Fujinami, S., Yamagishi, T.-a. ve Nakamoto, Y., 2008, para-Bridged Symmetrical Pillar[5]arenes: Their Lewis Acid Catalyzed Synthesis and Host–Guest Property, *Journal of the American Chemical Society*, 130 (15), 5022-5023.

Oh, S. W., Moon, J. D., Lim, H. J., Park, S. Y., Kim, T., Park, J., Han, M. H., Snyder, M. ve Choi, E. Y., 2005, Calixarene derivative as a tool for highly sensitive detection and oriented immobilization of proteins in a microarray format through noncovalent molecular interaction, *The FASEB Journal*, 19 (10), 1335-1337.

OLIVIA JANE SCULLY, B.-H. B., GEORGE YIP and YINGNAN YU, 2012, <Breast Cancer Metastasis.pdf>.

Oshima, T., Higuchi, H., Ohto, K., Inoue, K. ve Goto, M., 2005, Selective Extraction and Recovery of Cytochrome c by Liquid−Liquid Extraction Using a Calix[6]arene Carboxylic Acid Derivative, *Langmuir*, 21 (16), 7280-7284.

Ozcan, F., Bayrakcı, M. ve Ertul, Ş., 2015, Synthesis and Preparation of Novel Magnetite Nanoparticles Containing Calix[4]arenes With Different Chelating Group Towards UraniμM Anions, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 52 (8), 599-608.

P.uyar, 2011, <Pembegül Hoca TEz.pdf>.

Peczuh, M. W. ve Hamilton, A. D., 2000, Peptide and Protein Recognition by Designed Molecules, *Chemical Reviews*, 100 (7), 2479-2494.

Pelizzaro-Rocha, K. J., de Jesus, M. B., Ruela-de-Sousa, R. R., Nakamura, C. V., Reis, F. S., de Fatima, A. ve Ferreira-Halder, C. V., 2013a, Calix[6]arene bypasses hμMan pancreatic cancer aggressiveness: downregulation of receptor tyrosine kinases and induction of cell death by reticulμM stress and autophagy, *Biochim Biophys Acta*, 1833 (12), 2856-2865.

Pelizzaro-Rocha, K. J., de Jesus, M. B., Ruela-de-Sousa, R. R., Nakamura, C. V., Reis, F. S., de Fátima, A. ve Ferreira-Halder, C. V., 2013b, Calix[6]arene bypasses hμMan pancreatic cancer aggressiveness: Downregulation of receptor tyrosine kinases and induction of cell death by reticulμM stress and autophagy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833 (12), 2856-2865.

Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A.-L., Brown, P. O. ve Botstein, D., 2000, Molecular portraits of hμMan breast tμMours, *Nature*, 406, 747.

Phlip, D., 1996, Supramolecular chemistry: Concepts and perspectives. By J.-M. Lehn, VCH, Weinheim 1995, x, 271 pp., softcover, DM 58.00, ISBN 3-527-2931 1-6, *Advanced Materials*, 8 (10), 866-868.

Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., He, X. ve Perou, C. M., 2010, Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer, *Breast Cancer Research : BCR*, 12 (5), R68-R68.

Prins Leonard, J., Reinhoudt David, N. ve Timmerman, P., 2001, Noncovalent Synthesis Using Hydrogen Bonding, *Angewandte Chemie International Edition*, 40 (13), 2382-2426.

Rakha, E. A., El-Sayed, M. E., Green, A. R., Lee, A. H., Robertson, J. F. ve Ellis, I. O., 2007, Prognostic markers in triple-negative breast cancer, *Cancer*, 109 (1), 25-32.

Rodik, R. V., Boyko, V. I. ve Kalchenko, V. I., 2009a, Calixarenes in Bio-Medical Researches, *Current Medicinal Chemistry*, 16 (13), 1630-1655.

Rodik, R. V., Boyko, V. I. ve Kalchenko, V. I., 2009b, Calixarenes in bio-medical researches, *Curr Med Chem*, 16 (13), 1630-1655.

Roohi Ismail-Khan, M., and Marilyn M. Bui, MD, PhD, 2010, <A Review of Triple-Negative Breast Cancer.pdf>.

Ruud P.M.Dings, J. I. L., Susan G.Brown, Lucile Astorgues-Xerri, John R. Macdonald, Thomas R.Hoye, Eric Raymond, Kevin H.Mayo, 2013, Polycationic calixarene PTX013, a potent cytotoxic agent against tμMors and drug resistant cancer.

Saha, A., Ghosh, S. K., Roy, C., Choudhury, K. B., Chakrabarty, B. ve Sarkar, R., 2013, Demographic and clinical profile of patients with brain metastases: A retrospective study, *Asian J Neurosurg*, 8 (3), 157-161.

Salvio, R., Volpi, S., Cacciapaglia, R., Casnati, A., Mandolini, L. ve Sansone, F., 2015, Ribonuclease Activity of an Artificial Catalyst That Combines a Ligated CuII Ion and a GuanidiniμM Group at the Upper Rim of a cone-Calix[4]arene Platform, *The Journal of Organic Chemistry*, 80 (11), 5887-5893.

Sansone, F., Barboso, S., Casnati, A., Fabbi, M., Pochini, A., Ugozzoli, F. ve Ungaro, R., 1998, Synthesis and Structure of Chiral Cone Calix[4]arenes Functionalized at the Upper Rim with L-Alanine Units, *European Journal of Organic Chemistry*, 1998 (5), 897-905.

Sansone, F., Barboso, S., Casnati, A., Sciotto, D. ve Ungaro, R., 1999, A new chiral rigid cone water soluble peptidocalix[4]arene and its inclusion complexes with α-amino acids and aromatic ammoniμM cations, *Tetrahedron Letters*, 40 (25), 4741-4744.

Sayin, S., Ozcan, F. ve Yilmaz, M., 2011, Preparation and Application of Calix[4]arene Derivatives Bearing PyridiniμM Units-Grafted Magnetite Nanoparticles for Removal of Dichromate and Arsenate Anions, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 48 (5), 365-372.

Schrama, D., Reisfeld, R. A. ve Becker, J. C., 2006, Antibody targeted drugs as cancer therapeutics, *Nat Rev Drug Discov*, 5 (2), 147-159.

Schweichel, J.-U., and Merker, H.-J. , 1973. , The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. , Teratology. 7:253–266.

Sebti, S. M. ve Hamilton, A. D., 2001, Design of growth factor antagonists with antiangiogenic and antitμMor properties, *Oncogene*, 19, 6566.

Shackleton, M., Vaillant, F., Simpson, K. J., Stingl, J., Smyth, G. K., Asselin-Labat, M.-L., Wu, L., Lindeman, G. J. ve Visvader, J. E., 2006, Generation of a functional mammary gland from a single stem cell, *Nature*, 439, 84.

Shahgaldian, P., Gualbert, J., Aïssa, K. s. ve Coleman, A. W., 2003, A study of the freeze-drying conditions of calixarene based solid lipid nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55 (2), 181-184.

Shi, Y., 2002, Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis, *Molecular Cell*, 9 (3), 459-470.

Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B. ve Tsujimoto, Y., 2004, Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes, *Nature Cell Biology*, 6, 1221.

Shimojo, K., Oshima, T., Naganawa, H. ve Goto, M., 2007, Calixarene-Assisted Protein Refolding via Liquid−Liquid Extraction, *Biomacromolecules*, 8 (10), 3061-3066.

Shinkai, S., Araki, K., Shibata, J., Tsugawa, D. ve Manabe, O., 1989, Diazo-Coupling Reactions with Calix[4]arene. pKa Determination with Chromophoric Azocalix[4]arenes, *Chemistry Letters*, 18 (6), 931-934.

Shinkai, S., 1993, Calixarenes - the third generation of supramolecules, *Tetrahedron*, 49 (40), 8933-8968.

Smid, M., Wang, Y., Zhang, Y., Sieuwerts, A. M., Yu, J., Klijn, J. G., Foekens, J. A. ve Martens, J. W., 2008, Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse, *Cancer Res*, 68 (9), 3108-3114.

Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E. ve Børresen-Dale, A.-L., 2001a, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tμMor subclasses with clinical implications, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (19), 10869-10874.

Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E. ve Børresen-Dale, A.-L., 2001b, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tμMor subclasses with clinical implications, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (19), 10869.

Sørlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lønning, P. E., Brown, P. O., Børresen-Dale, A.-L. ve Botstein, D., 2003a, Repeated observation of breast tμMor subtypes in independent gene expression data sets, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (14), 8418-8423.

Sørlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lønning, P. E., Brown, P. O., Børresen-Dale, A.-L. ve Botstein, D., 2003b, Repeated observation of breast tμMor subtypes in independent gene expression data sets, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (14), 8418.

Sotiriou, C. ve Pusztai, L., 2009, Gene-Expression Signatures in Breast Cancer, *New England Journal of Medicine*, 360 (8), 790-800.

Spano, D. ve Zollo, M., 2012, TμMor microenvironment: a main actor in the metastasis process, *Clin Exp Metastasis*, 29 (4), 381-395.

St Romain, P., Madan, R., Tawfik, O. W., Damjanov, I. ve Fan, F., 2012, Organotropism and prognostic marker discordance in distant metastases of breast carcinoma: fact or fiction? A clinicopathologic analysis, *HμM Pathol*, 43 (3), 398-404.

Stingl, J., Eirew, P., Ricketson, I., Shackleton, M., Vaillant, F., Choi, D., Li, H. I. ve Eaves, C. J., 2006, Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells, *Nature*, 439, 993.

Storms, R. W., Trujillo, A. P., Springer, J. B., Shah, L., Colvin, O. M., Ludeman, S. M. ve Smith, C., 1999, Isolation of primitive hμMan hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (16), 9118-9123.

Sudhakar, A., 2009, History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods, *J Cancer Sci Ther*, 1 (2), 1-4.

Thakur, A., Sun, Y., Bollig, A., Wu, J., Biliran, H., Banerjee, S., Sarkar, F. H. ve Liao, D. J., 2008, Anti-invasive and antimetastatic activities of ribosomal protein S6 kinase 4 in breast cancer cells, *Clin Cancer Res*, 14 (14), 4427-4436.

Topcul, M., Ceti, N. I., Ozbas Turan, S. ve Kolusayin Ozar, M. O., 2018, In vitro cytotoxic effect of PARP inhibitor alone and in combination with nabpaclitaxel on triplenegative and lμMinal A breast cancer cells, *Oncol Rep*, 40 (1), 527-535.

Viola, S., Merlo, S., Consoli, G. M. L., Drago, F., Geraci, C. ve Sortino, M. A., 2010, Modulation of C6 Glioma Cell Proliferation by Ureido-Calix[8]arenes, *Pharmacology*, 86 (3), 182-188.

Visvader, J. E., 2009, Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tμMorigenesis, *Genes & Development*, 23 (22), 2563-2577.

Wang, Y.-C., Liu, X.-Q., Sun, T.-M., Xiong, M.-H. ve Wang, J., 2008a, Functionalized micelles from block copolymer of polyphosphoester and poly(ε-caprolactone) for receptor-mediated drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 128 (1), 32-40.

Wang, Y. C., Liu, X. Q., Sun, T. M., Xiong, M. H. ve Wang, J., 2008b, Functionalized micelles from block copolymer of polyphosphoester and poly(epsilon-caprolactone) for receptor-mediated drug delivery, *J Control Release*, 128 (1), 32-40.

Wei, C., Zhao, R., Shen, Z., Chang, D. ve Shi, L., 2018, Two catalytic protocols for Achmatowicz rearrangement using cyclic diacyl peroxides as oxidants, *Organic & Biomolecular Chemistry*.

Weigelt, B., Peterse, J. L. ve van 't Veer, L. J., 2005, Breast cancer metastasis: markers and models, *Nat Rev Cancer*, 5 (8), 591-602.

WHO, 2004, <fact_sheet_cancers_en.pdf>.

Wilhelm, I., Fazakas, C., Molnar, J., Hasko, J., Vegh, A. G., Cervenak, L., Nagyoszi, P., Nyul-Toth, A., Farkas, A. E., Bauer, H., Guillemin, G. J., Bauer, H. C., Varo, G. ve Krizbai, I. A., 2014, Role of Rho/ROCK signaling in the interaction of

melanoma cells with the blood-brain barrier, *Pigment Cell Melanoma Res*, 27 (1), 113-123.

Witzel, I., Oliveira-Ferrer, L., Pantel, K., Muller, V. ve Wikman, H., 2016, Breast cancer brain metastases: biology and new clinical perspectives, *Breast Cancer Res*, 18 (1), 8.

Yamamoto, H. ve Shinkai, S., 1994, Molecular Design of Calix[4]arene-Based SodiμM-Selective Electrodes Which Show Remarkably High 105.0–105.3 SodiμM/PotassiμM Selectivity, *Chemistry Letters*, 23 (6), 1115-1118.

Yousaf, A., Hamid, S. A., Bunnori, N. M. ve Ishola, A. A., 2015, Applications of calixarenes in cancer chemotherapy: facts and perspectives, *Drug Des Devel Ther*, 9, 2831-2838.

Zeiss, C. J., 2003, The Apoptosis-Necrosis ContinuμM: Insights from Genetically Altered Mice, *Veterinary Pathology*, 40 (5), 481-495.

Zhang, A., Sheng, Y. ve Zou, M., 2017, Antiproliferative activity of Alisol B in MDA-MB-231 cells is mediated by apoptosis, dysregulation of mitochondrial functions, cell cycle arrest and generation of reactive oxygen species, *Biomed Pharmacother*, 87, 110-117.

Zhao, X., Malhotra, G. K., Lele, S. M., Lele, M. S., West, W. W., Eudy, J. D., Band, H. ve Band, V., 2010, Telomerase-immortalized hμMan mammary stem/progenitor cells with ability to self-renew and differentiate, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (32), 14146-14151.

Zhong, C., Mai, Y., Gao, H., Zhou, W. ve Zhou, D., 2019, Mitochondrial targeting of TR3 is involved in TPA induced apoptosis in breast cancer cells, *Gene*, 693, 61-68.

Zhou, H., Wang, D. A., Baldini, L., Ennis, E., Jain, R., Carie, A., Sebti, S. M. ve Hamilton, A. D., 2006, Structure-activity studies on a library of potent calix[4]arene-based PDGF antagonists that inhibit PDGF-stimulated PDGFR tyrosine phosphorylation, *Org Biomol Chem*, 4 (12), 2376-2386.

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Emine GÖK
Uyruğu : TC
DoğuM Yeri ve Tarihi : Adana/18.11.1989
Telefon : 0507 428 68 13
Faks : -
e-mail : gokemine89@gmail.com

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Adana labaratuar sağlık meslek lisesi-Merkez-ADANA	2007
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi-Selçuklu-KONYA	2016
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi-Selçuklu-KONYA	
Doktora	:	-	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2009-2013	Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Laborant
2013-2017	Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Laborant
2017-	Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji ve Araştırma Uygulama Merkezi (İLTEK-ARGE)	Biyoloğ

UZMANLIK ALANI

- HÜCRE KÜLTÜRÜ
- 3 BOYUTLU HÜCRE KÜLTÜRÜ
- DLS ANALİZİ
- BET ANALİZİ
- KONFOKAL MİKROSKOP
- FLOW SİTOMETRİ ANALİZİ
- X-CELLIGENCE SİSTEMİ
- ELISA OKUYUCU

YABANCI DİLLER

- İngilizce

YAYINLAR

1. Pembegül Uyar Arpacı, Fatih Özcan , **Emine Gök[1]**, Şeref Ertul **'**Improved Anticancer Efficacy of p-tert-butylcalix[4]arene through Surface Modifications 7th International Conference Nanomaterials: Applications and Properties '2017 (NAP-2017), Ruta Hotel, Zatoka, Odesa Region-Ukraine, 2017, *(Sözlü SunμM)*

2. **Emine Gök**, Fatih Özcan, Şeref Ertul, Pembegül Uyar Arpacı, 'Investigation of Cytotoxic Activity of MDA-MB-231 Cancer Line of 2-3-4 Amp Created by Modification of Calixarene Surface, 6. Ulusal Moleküler biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Adana-Turkey, 2017 *(Sözlü SunμM)*

3. Pembegül Uyar Arpacı, Fatih Özcan, **Emine Gök[1]**, Şeref Ertul , 'Biomedical Applications of Electrospun *p-tert*-butylcalix[4]arene Nanofibers, 5th International BAU Drug Design Congress : Novel Methods and Emerging Targets in Drug Discovery & Patented Drug Development, Bahcesehir University School of Medicine, Istanbul-Turkey, 2017 *(Poster SunμM-En iyi poster 3. ödülü)*

4. Pembegül Uyar Arpacı, Fatih Özcan , **Emine Gök[1]**, Şeref Ertul , 'Biomedical Applications of Electrospun *p-tert*-butylcalix[4]arene Nanofibers, 5th International BAU Drug Design Congress : Novel Methods and Emerging Targets in Drug Discovery & Patented Drug Development, Bahcesehir University School of Medicine, Istanbul-Turkey, 2017 *(Sözlü SunμM)*

5. **Emine Gök,** Fatih Özcan , Şeref Ertul, Pembegül Uyar Arpacı, 'Real-time Cell Analysis of the Inhibitory Effect of Calixarene on Adhesion and Proliferation of Breast Cancer Cells, 5th International BAU Drug Design Congress : Novel Methods and Emerging Targets in Drug Discovery & Patented Drug Development, Bahcesehir University School of Medicine, Istanbul-Turkey, 2017 *(Sözlü SunμM)*

6. **Emine Gök,** Fatih Özcan , Şeref Ertul, Pembegül Uyar Arpacı, 'Real-time Cell Analysis of the Inhibitory Effect of Calixarene on Adhesion and Proliferation of Breast Cancer Cells, 5th International BAU Drug Design Congress : Novel Methods and Emerging Targets in Drug Discovery &

Patented Drug Development, Bahcesehir University School of Medicine, Istanbul-Turkey, 2017 *(Poster SunμM)*

7. **Emine Gök**, Fatih Özcan, Şeref Ertul, Pembegül Uyar Arpacı, 'Real Time Cell Analysis on Anticancer Activity of Calixarene, 4th International Turk-Pak Conference on Chemical Sciences (ITPCCS 2017), Konya-Turkey, 2017, *(Poster SunμM)*

8. Pembegül Uyar Arpacı, Fatih Özcan, **Emine Gök,** Şeref Ertul, 'Nanobiomedical Applications of Electrospun *p-tert*-butylcalix[4]arene Nanofibers-3D Cell Culture Model, 4th International Turk-Pak Conference on Chemical Sciences (ITPCCS 2017), Konya-Turkey, 2017, *(Sözlü SunμM)*

9. **Emine Gök**, Fatih Özcan, Pembegül Uyar Arpacı, 'Investigation of Cytotoxic Activity of MetylpyridiniμM Functionalized *p-tert*-butylcalix[4]arene Diamide on Metastatic Breast Cancer Cells, 7th Internatıonal Molecular Bıology and Bıotecnology Congress,Konya-Turkey, 2018, *(Poster SunμM)*