

**BAZI ŞALKON TÜREVLERİNİN BİYOKİMYASAL
ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Mehmet Onur AKSOY

Eskişehir 2020

**BAZI ŞALKON TÜREVLERİNİN BİYOKİMYASALETKİ
MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Onur AKSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ocak 2020

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mehmet Onur AKSOY'un "Bazı Şalkon Türevlerinin Biyokimyasal Etki Mekanizmalarının Araştırılması" başlıklı tezi 14/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı

Üye (Tez Danışmanı) : Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Üye : Doç. Dr. Halide Edip TEME

Üye : Doç. Dr. Cansu ÖZBAYER

Prof. Dr. Nalan G

Enstitü Müdürü

ÖZET

BAZI ŞALKON TÜREVLERİNİN BİYOKİMYASAL ETKİ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Mehmet Onur AKSOY

Biyokimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2020

Danışman: Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre sadece 2018 yılında 18,1 milyon insana kanser teşhisi konulmuş ve 9,9 milyon insan kanser sebebiyle hayatını kaybetmiştir. Evrimsel teoriler, kanserin oluşum, gelişim ve türlerinin yanı sıra, hücre ve doku düzeylerinde anlamak ve etkili tedaviler geliştirebilmek için kritik öneme sahiptir. Hayvanlar kanser gelişimini önlemek için evrimsel süreçte hücrelerinin popülasyonunu azaltabilecek güçlü tümör baskılayıcı mekanizmalar geliştirmiş de olsalar bu mekanizmalar kendiliğinden kanser ile savaşmakta zorluk çekebilmektedirler. Kanserler de direnç geliştirerek mekanizmalara dirençli hastalığın yeniden dirilmesine yol açabilir. Kanser tedavisi için evrimleşen kanserle birlikte daha az toksik daha çok anti-kanser etkiye sahip ilaç ve ajanlara ihtiyaç sürekli artmaktadır.

Şalkonların, antinflatuar, antimikrobiyal, antifungal, antioksidan, sitotoksik, antitümör ve anti-kanser aktiviteleri dahil olmak üzere birçok faydalı özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Doğada gıda maddelerinde bulunması şalkonlara olan çalışmalarını arttırmıştır.

Bu çalışmamızda ilk defa sentezlenen şalkon türevlerinin MCF-7 (ER+), MDA-MB-231 (ER-) meme kanseri ve NIH/3T3, L-929 sağlıklı hücre hatlarında sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sağlıklı hücrelere duyarlı anti-kanser etkili bileşiklerin akım sitometrisinde apoptotik etkileri, RT-PCR'de gen ekspresyonları, E-Screen testi ile östrojenik etki mekanizmalarına bakılmış ve bileşiklerin ER bağlanma bölgesi Moleküler Docking ile gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Şalkonlar, Apoptoz, Meme kanseri, Anti-kanser, Hücre kültürü

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BIOCHEMICAL ACTION MECHANISMS OF SOME CHALCONE DERIVATIVES

Mehmet Onur AKSOY

Department of Biochemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January 2020

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

According to World Health Organization 18.1 million people were diagnosed with cancer in 2018 and 9.9 million people died because of it. Evolutionary theories are very critical to be able to understand the occurrence, development and types of cancer as well as developing effective treatments at cellular levels. Although animals have developed strong tumor suppressor mechanisms to decrease cancer cells population in the evolutionary process to prevent cancer development, they were not sufficient in combating cancer spontaneously since tumors can also develop resistant mechanisms. Nowadays with cancer evolving, the need for less toxic and more anticancer effective drugs and agents is constantly increasing.

In many studies chalcones have been reported to have many useful properties including anti-inflammatory, antimicrobial, antifungal, antioxidant, cytotoxic, antitumor and anti-cancer activities.

In this study, the cytotoxic effects of chalcone derivatives synthesized for the first time in MCF-7 (ER +), MDA-MB-231 (ER-) breast cancer cell lines and NIH / 3T3, L-929 healthy cell lines will be investigated. Furthermore the anticancer effect of compounds will be investigated by following apoptosis pathway using flow cytometry and measuring apoptotic genes expression using RT-PCR. E-screen test will also be performed to assess our compound's estrogenicity. After all, the binding sites of the compounds to estrogen receptor are shown by molecular docking.

Keywords: Chalcones, Apoptosis, Anticancer, Breast cancer, Cell culture

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımın tümünü beraber yürüttüğüm, bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, her zaman güler yüzü ve sabrıyla bana yol gösteren, bilimsel anlayışıma yön veren, geliştiren, her zaman desteğini hissettiğim ve her şeyden öte tanıdığım en iyi ve en güler yüzü insanlardan biri olan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ' ye

Yüksek lisans süreci boyunca bana destek olan beraber birçok şey öğrendiğimiz çalışma arkadaşlarım ve değerli dostlarım Ecz. Huda ALCHAIB ve Uzm. Kim. Oya BÜYÜKEMİR' e

Yüksek lisans hayatımda bana çok şey katan ve öğreten, sürekli yanımda olan ve desteğini esirgemeyen hocam ve arkadaşım Dr. Bio. Şennur GÖRGÜLÜ' ye

Çalışmalarımda desteklerini aldığım ve yanımda olduklarını her zaman hissettiğim değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Mehlika Dilek ALTINTOP, Sayın Doç. Dr. Leyla YURTTAŞ ve Sayın Araş. Gör. Dr. Belgin SEVER' e

Eğitimim süresince emeği geçen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım rehberlik eden değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR, Sayın Doç. Dr. Halide Edip TEMEL' e

Sadece tez çalışmalarımı değil hayatımın her anında yanımda olan, sevgilerini güvenlerini ve desteklerini her an hissettiğim aileme teşekkür ederim.

14/01/2020

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	4
2.1. Kanser ve Biyolojisi.....	4
2.2. Meme Kanseri.....	5
2.2.1. Meme kanseri tedavi yöntemleri	6
2.2.1.1. Ameliyat.....	6
2.2.1.2. Radyasyon tedavisi.....	6
2.2.1.4. Kemoterapi	7
2.3. Kanser ve Gen İlişkileri	8
2.3.1. Kanser genleri (Onkogenler)	9
2.3.1.1. Proto-onkogenler	9
2.3.1.2. Onkogenler.....	10
2.3.3. Meme kanserinde oluşumunda etkili olan onkogenler.....	12
2.3.3.1. Büyüme faktörü reseptörleri	12
2.3.3.1.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR).....	12
2.3.3.1.2. CerbB-2 (HER2/Neu)	13
2.3.3.2. Sinyal iletimi ile ilişkili nükleer onkogenler.....	13
2.3.3.2.1. c-Myc onkogeni.....	13
2.3.3.2.2. Ras/Raf/MEK/ERK	13
2.3.3.3. Siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve inhibitörleri	14

2.3.3.4. Steroid reseptörleri.....	15
2.3.3.4.1. Östrojen reseptörü (ER), Progesteron reseptörü (PR) 15	
2.3.3.4.2. Ppar γ Onkogeni	15
2.3.3. Meme kanserinde genetik ailesel yatkınlık genleri.....	15
2.3.3.1. BRCA1 ve BRCA2 genleri.....	16
2.4. Kanserde programlanmış hücre ölüm yolları	16
2.4.1. Apoptoz, nekroz ve otofaji	16
2.4.2. Apoptoz.....	17
2.4.2.1. Kaspazlar.....	18
2.4.2.2. P53 geni.....	19
2.4.2.3. İç reseptör ölüm yolu (Mitokondriyal yolak).....	19
2.4.2.3.1. Bcl-2 Ailesi	20
2.4.2.3.2. Bax ve Bak aktivasyonları	20
2.4.2.4. Dış reseptör ölüm yolu (Ekstrinsik yolak)	20
3.MATERYAL ve YÖNTEM	22
3.1. Materyaller	22
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve sarf malzemeler	22
3.1.2. Kullanılan cihazlar	25
3.2. Metodlar	27
3.2.1. Şalkon türevlerinin Genel Sentez Yöntemi	27
3.3. Kullanılan Maddelerin Hazırlanması	30
3.3.1. Sentezlenen bileşiklerin Hazırlanması.....	30
3.3.2. Sisplatinin Hazırlanması.....	30
3.3.3. Tamoksifenin Hazırlanması.....	31
3.4. Deneylerde Kullanılan Hücreler	31
3.4.1. İnsan meme karsinoma epitel hücre hattı (MCF-7)	31
3.4.2. İnsan meme adenokarsinoma epitel hücre hattı (MDA-MB-231).....	31
3.4.3. Normal fare fibroblast hücre hattı (L-929)	32
3.4.4. Normal fare embriyo fibroblast hücre hattı (NIH/3T3).....	32
3.5. Hücrelerin Kültüre edilmesi ve Deneye Hazırlık	32
3.5.1. Materyal Sterilizasyonu	32
3.5.2. Hücrelerin Stoklanması ve Pasajlanması	33
3.5.3. Hücre hatları sayımı	33
3.6. Sitotoksikite Belirleme Testleri.....	34

3.6.1. MTT yöntemi ile hücre sitotoksitelerinin belirlenmesi	34
3.6.2. Yöntemin uygulanması.....	34
3.6.3. İnhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	35
3.7. Akış Sitometrisi Cihazı ile yapılan deneyler	35
3.7.1. Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi	35
3.7.1.1. Yöntemin uygulanması.....	36
3.7.2. JC-1 boyama ile hücrelerin mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi.....	36
3.7.2.1. Yöntemin uygulanması.....	37
3.7.3. Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkilerin belirlenmesi.....	38
3.8. RT- PCR (Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) Yöntemi ile PPAR-, Bcl-2, Bax, CYD1, cMYC, ERK, pERK Genlerinin İfadelerinin (ekspresyon) Belirlenmesi	39
3.8.1. RNA izolasyonu.....	40
3.8.2. Komplementer DNA (c-DNA) sentezi.....	42
3.8.3. Supermix, Taqman prob ve primerlerin hazırlanması	42
3.8.4. Gerçek zamanlı kantitatif PCR analizi.....	43
3.9. E-Screen Metodu ile Östrojenik Aktivitenin Belirlenmesi.....	44
3.9.1. E-Screen analizi sırasında kullanılacak solüsyonların hazırlanması.....	45
3.9.2. E-Screen yönteminin uygulanışı.....	45
3.9.3. Optik densite değerlerinin belirlenmesi.....	48
3.10. In Silicio Moleküler Docking Çalışmaları.....	48
3.10.1. Moleküler docking yönteminin uygulanışı.....	49
4. SONUÇLAR VE BULGULAR.....	50
4.1. MTT Analizi Sonuçları.....	50
4.1.1. Tamoksifen, sisplatin ve sentezlenmiş şalkon türevli bileşiklerin MDA-MB-231 meme kanseri (östrojen negatif) hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri.....	50
4.1.2. Tamoksifen, sisplatin ve sentezlenmiş şalkon türevli bileşiklerin MCF-7 meme kanseri (östrojen reseptörü pozitif) hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri.....	51
4.1.3. Sentezlenmiş şalkon türevli bileşiklerin L-929 sağlıklı hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri.....	52
4.1.4. Sentezlenmiş şalkon türevli bileşiklerin NIH/3T3 sağlıklı hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri.....	53

4.1.5. MDA-MB-231 hücre hattının L-929 hücre hattına göre selektivite indeksi	54
4.1.6. MCF-7 hücre hattının L-929 hücre hattına göre selektivite indeksi.....	54
4.1.7. MDA-MB-231 hücre hattının NIH/3T3 hücre hattına göre selektivite indeksi	55
4.1.8. MCF-7 hücre hattının NIH/3T3 hücre hattına göre selektivite indeksi ..	55
4.2. Tamoksifen, Sisplatin ve Sentez Bileşiklerin, Akım Sitometrisi Yöntemleri ile MDA-MB-231 ve MCF- 7 Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkilerin Belirlenmesi.....	56
4.2.1. Akım sitometrisinde Annexin-V FITC-PI analizi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi.....	56
4.2.1.1. <i>MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 24. Saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi</i>	56
4.2.1.2. <i>MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 48. Saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi</i>	61
4.2.1.3. <i>MCF-7 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 24. Saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi</i>	66
4.2.1.4. <i>MCF-7 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 48. Saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi</i>	69
4.2.2. Akım sitometrisinde JC-1 analizi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi ...	74
4.2.2.1. <i>MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 24. Saatte oluşan mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi.....</i>	74
4.2.2.2. <i>MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 48. Saatte oluşan mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi.....</i>	78
4.2.2.4. <i>MCF-7 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 48. Saatte oluşan mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi.....</i>	86
4.2.3. Akım sitometrisinde kaspaz-3 analizi ile kaspaz aktivitesinin belirlenmesi.....	89
4.2.3.1. <i>MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 24. Saatte kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi.....</i>	89
4.2.3.2. <i>MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 48. Saatte kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi.....</i>	93

4.3. RT-PCR (Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi	
Sonuçları.....	98
4.4. E-Screen Analizi Sonuçları.....	99
4.5. Moleküler Docking Sonuçları.....	104
5. TARTIŞMA.....	106
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	118
KAYNAKÇA.....	119
EK-1.....	129
ÖZGEÇMİŞ.....	130

ÇİZELGELER DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1	Onkogenler.....	11
Çizelge 3.1.	Şalkon türevi bileşiklerinin verimleri ve erime noktaları.....	28
Çizelge 3.2	RT-PCR analizi primerleri.....	41
Çizelge 3.3.	RT-PCR bileşenleri.....	43
Çizelge 4.1.	Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerinin MDA-MB-231 hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC ₅₀ konsantrasyon değerleri.....	50
Çizelge 4.2.	Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerinin MCF-7 hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC ₅₀ konsantrasyon değerleri.....	51
Çizelge 4.3.	Sentez bileşiklerinin L-929 hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC ₅₀ konsantrasyon değerleri.....	52
Çizelge 4.4.	Ssentez bileşiklerinin NIH/3T3 hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC ₅₀ konsantrasyon değerleri.....	53
Çizelge 4.5	24. Saat IC ₅₀ değerlerine göre MDA-MB-231 hücre hatlarının L-929 hücrelerine göre selektivite indeksi. (Selektivite indeksi (S.I) =Sağlıklı hücre IC ₅₀ değeri / Kanserli hücre IC ₅₀ değeri).....	54
Çizelge 4.6.	24. Saat IC ₅₀ değerlerine göre MCF-7 hücre hatlarının L-929 hücrelerine göre selektivite indeksi. (Selektivite indeksi (S.I) =Sağlıklı hücre IC ₅₀ değeri / Kanserli hücre IC ₅₀ değeri).....	54
Çizelge 4.7.	24. Saat IC ₅₀ değerlerine göre MDA-MB-231 hücre hatlarının NIH/3T3 hücrelerine göre selektivite indeksi. (Selektivite indeksi (S.I) =Sağlıklı hücre IC ₅₀ değeri / Kanserli hücre IC ₅₀ değeri).....	55
Çizelge 4.8.	24. Saat IC ₅₀ değerlerine göre MCF-7 hücre hatlarının NIH/3T3 hücrelerine göre selektivite indeksi. (Selektivite indeksi (S.I) =Sağlıklı hücre IC ₅₀ değeri / Kanserli hücre IC ₅₀ değeri).....	55
Çizelge 4.9.	MDA-MB-231 hücre hatlarının 24. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	59
Çizelge 4.10.	Tamoksifen ve sisplatinin MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki 24. saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	59

Çizelge 4.11.	Sentez bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki 24. Saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	60
Çizelge 4.12.	MDA-MB-231 hücre hatlarının 48. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	64
Çizelge 4.13.	Tamoksifen ve sisplatinin MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki 48. saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	64
Çizelge 4.14.	Sentez bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki 48. Saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	64
Çizelge 4.15.	MCF-7 hücre hatlarının 24. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	68
Çizelge 4.16.	Tamoksifen ve sisplatinin MCF-7 hücre hatları üzerindeki 24. saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	68
Çizelge 4.17.	Sentez bileşiklerin MCF-7 hücre hatları üzerindeki 24. Saat % canlılık oranları, Annexin-V.....	69
Çizelge 4.18.	MCF-7 hücre hatlarının 48. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	72
Çizelge 4.19.	Tamoksifen ve sisplatinin MCF-7 hücre hatları üzerindeki 48. saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	72
Çizelge 4.20.	Sentez bileşiklerin MCF-7 hücre hatları üzerindeki 48. Saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC.....	72
Çizelge 4.21.	Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki 24. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite değerleri.....	77
Çizelge 4.22.	Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki 48. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite değerleri.....	81
Çizelge 4.23.	Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MCF-7 hücre hatları üzerindeki 24. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite değerleri.....	85
Çizelge 4.24.	Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MCF-7 hücre hatları üzerindeki 24. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite değerleri.....	88
Çizelge 4.25.	Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MDA-MB-231 üzerindeki kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları.....	92
Çizelge 4.26.	Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MDA-MB-231 üzerindeki kaspaz-3 48. Saatteki % aktivasyonları.....	96

Çizelge 4.27.	Bileşik ve pozitif kontrollerin, MTT ve Akım sitometrisi analizleri (Annexin-V, Q2: Erken apoptoz-Q4: Geç apoptoz), (JC-1, P2: Mitokondriyal aktivite), (Kaspaz-3, P4: Kaspaz-3 aktivasyonu gösteren).....	97
Çizelge 4.28.	MDA-MB-231 hücre hatlarındaki Ppar γ , Bcl-2, Bax, CYD1 c-MYC, ERK ve pERK genlerindeki kat değişimleri.....	98
Çizelge 4.29.	MCF-7 hücre hatlarındaki Ppar γ , Bcl-2, Bax, CYD1 c-MYC, ERK ve pERK genlerindeki kat değişimleri.....	98
Çizelge 4.30.	Tamoksifen, Bileşikler ve 17 β -östradiolün EC ₅₀ değerleri.....	102
Çizelge 4.31.	Bileşiklerin ve tamoksifenin bağıl östradiol eşdeğerlilik faktörü değerleri (EEF).....	102
Çizelge 4.32.	Bileşiklerin en yüksek, orta ve en düşük doz aralığındaki rölatif proliferatif etkileri (%RPE, %20'den küçük ise önemli bir östrojenik etkisi yok, %20-%80 aralığında ise kısmi agonist, %80'den büyük ise kimyasal tam agonist. N/A bölgelerinde ki değerler çok düşük olduğu için hesaplanamamıştır).....	103

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1	Şalkon türevli bileşiklerin sentez şeması (i) Ar-CHO, %40'luk NaOH çözeltisi, etanol, oda sıcaklığı, 24 saat..... 27
Şekil 3.2.	Sonuç bileşiklerinin sentez şeması..... 27
Şekil 3.3.	MTT molekülünün mitokondriyal redüktaz analiz sonunda formazan kristaline dönüşümü..... 34
Şekil 4.1.	Sisplatinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri.A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı ve kontrol B) Sisplatin IC ₅₀ ve IC _{50/2} analizleri..... 56
Şekil 4.2.	Sisplatinin ve Tamoksifenin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri..... 61
Şekil 4.3.	Sisplatinin ve tamoksifen MCF-7 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC ₅₀ ve IC _{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri..... 66
Şekil 4.4.	A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı ve kontrol..... 69
Şekil 4.5.	Tamoksifen, sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki mitokondriyal membran aktiviteleri..... 74
Şekil 4.6	Tamoksifen, sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki mitokondriyal membran aktiviteleri..... 78
Şekil 4.7.	Tamoksifen, sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin MCF-7 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki mitokondriyal membran aktiviteleri..... 82
Şekil 4.8	A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol B) Tamoksifen IC ₅₀ ve IC _{50/2} analizleri C) Sisplatin IC ₅₀ ve IC _{50/2} analizleri 86
Şekil 4.9.	Tamoksifen, sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki kaspaz-3 aktiviteleri..... 89
Şekil 4.10.	Tamoksifen, sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki kaspaz-3 aktiviteleri..... 93
Şekil 4.11.	17β-östradiol, tamoksifen, bileşik 3 ve 4'ün proliferatif etki grafikleri.. 99
Şekil 4.12.	Bileşik 5, 6, 7, 8, 9 ve 10'un proliferatif etki grafikleri..... 100

Şekil 4.13.	Bileşik 3, 4, 5, 6, 7 ve 8'in rölatif (bağıl) proliferasyon etki grafikleri...	101
Şekil 4.14.	Bileşik 9 ve 10'un rölatif(bağıl) proliferasyon etki grafikleri.....	102
Şekil 4.15.	3, 7, 9 ve 10 No'lu bileşiklerin 4-hidroksitamoksifen ile kıyasla östrojen reseptör α substrat bağlanma bölgesindeki docking pozları.....	104
Şekil 4.16.	3, 7, 9 ve 10 No'lu bileşiklerin 4-hidroksitamoksifen ile kıyasla östrojen reseptör α substrat bağlanma bölgesindeki docking etkileşimleri.....	105

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AB	: Deney tampon çözeltisi
ABL	: Abelson murin lösemi onkogeni
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
ANOVA	: Varyans analizi
ATCC	: Amerikan tip kültür koleksiyonu
ATM	: Mutant ataksi telanjiektazi geni
ATP	: Adenozin tirifostfat
A549	: İnsan akciğer kanseri
BAX	: Bcl-2 bağlı protein
BCR	: Kesme noktası küme proteini
BRCA1	: Meme kanseri tip 1 protein
BRCA2	: Meme kanseri tip 2 protein
CDK	: Siklin bağımlı kinazlar
CDKI	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
CYD-1	: Sitokinez defektif 1
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik
DRAM	: Düzenlenmiş otofaji modülatörü
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EC ₅₀	: Maksimumun yarısı kadar efektif konsantrasyon
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EEF	: Östradiol eşdeğerlik faktörü
ER	: Östrojen reseptörü
ERK	: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar
Er α	: Östrojen reseptörü alfa
ER β	: Östrojen reseptörü beta
E2	: Östradiol
FBS	: Fötal sığır serumu
GTP	: Guanozin tri fosfat
HepG2	: İnsan karaciğer kanser hücre hattı
HER1	: İnsan epidermal büyüme faktörü 1
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü 2

HER3	: İnsan epidermal büyüme faktörü 3
HER4	: İnsan epidermal büyüme faktörü 4
IAP	: Apoptoz protein inhibitörleri
IC ₅₀	: Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan doz
IC _{50/2}	: Maksimum inhibisyonun %25'sini oluşturan doz
L-929	: Sağlıklı fare fibroblastik hücre hattı
MAP	: Mitojenle aktifleşen kinazlar
MCF-7	: Östrojen reseptörü pozitif insan meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-231	: Östrojen reseptörü negatif insan meme kanseri hücre hattı
MiRNA	: Mikro reoksinibo nükleik asit
MOMP	: Mitokondriyal dış membran geçirgenliği
MTT	: Thiazolyl Blue Tetrazolyum Bromide
N-COR	: Nükleer reseptör koruyucusu
NIH/3T3	: Sağlıklı fare embriyo fibroblastik hücre
NTP	: Nükleotid tri fosfat
OD	: Optik densite
P53	: Protein 53
PBS	: Fosfat tuz tampon çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDB	: Protein veri bankası
PR	: Progesteron reseptörü
RNA	: Reoksinibo nükleik asit
RPE	: Rölatif proliferatif etki
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
RXR	: Retinoik X reseptörü
SERM	: Seçici östrojen modülatörü
SRB	: Sulforodamin B
SRC	: Steroid reseptörü koaktivatör
TCA	: Trikloroasetik asit
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNF-R	: Tümör nekroz faktör reseptörü
TNF α	: Tümör nekroz faktörü alfa
UV	: Ultra viole

WHO : Dünya sağlık örgütü
 $\Delta\Psi_m$: Mitokondriyal membran potansiyeli

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Bulaşıcı olmayan hastalıklar, günümüzde küresel ölümlerin büyük bölümünden sorumludur. Kanser, beklendiği gibi ölümle sonuçlanan hastalıklar içerisinde liderlik etmesinin yanı sıra, dünyada ki yaşam beklentisinin ve kalitesinin önünde ki en büyük engeldir. WHO (Dünya sağlık örgütü) 2015 verileri ve tahminlerine göre kanser, 70 yaş öncesi ölüm sebepleri içerisinde 172 ülkenin 91'inde birinci ya da ikinci sırada yer almakta ve 22 ülke içinde ise üçüncü ya da dördüncü sırada yer almaktadır. Ve yakın gelecekte kanserin dünyanın bütün ülkelerinde birinci sırada olması beklenmektedir. Haziran 2010'da yayımlanan (GLOBOCAN 2008) verilerine göre dünyada 21,7 milyon yeni kanser vakasına rastlanırken 7,6 milyon insan 2008 yılında hayatını kaybetmiştir. Yine Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre sadece 2018 yılında 18,1 insana kanser teşhisi konulmuş ve 9,9 milyon insan kanserden dolayı hayatını kaybetmiştir. Türkiye Sağlık bakanlığının araştırmalarına göre Türkiye'de kanser tüm ölümlerin %20'sini oluşturmaktadır. (Ilbawi ve Velazquez, 2008; Bray vd., 2018; Ferlay vd., 2010).

Şalkonların, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antifungal, antioksidan, sitotoksik, antitümör ve anti-kanser aktiviteleri dahil olmak üzere birçok faydalı özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda şalkon türevlerinin ksantin, oksidaz, aldoz, redüktaz, epoksit, hidrolaz, protein tirozin kinaz, kinon redüktaz dahil olmak üzere hücrel sistemlerde birçok enzimi inhibe ettiği öğrenilmiştir. Şalkonlar farmakolojik aktiviteleri ve doğada meyve, sebze, baharat, çay, soya gibi gıda maddelerinde bulduklarından dolayı çalışmaları artan bir konu olmuştur.

Şalkonlar (trans-1,3-diaril-2-propen-1-on) flavonoid ailesinin bir üyesidir. Kimyasal olarak, iki aromatik halkadan oluşan (A ve B halkası) α , β -doymamış ketonlardır. Ayrıca halkalar oldukça elektrofonik 3 karbonla birbirine bağlanır. Dolayısıyla bu α , β -doymamış karbonil sistemi doğrusal ya da neredeyse düzlemsel yapıya bürünür.

Şalkonlar ketoetilenik grubu içerirler ($-\text{CO} - \text{CH} = \text{CH}-$) ve her iki benzen halkasında konjuge çift bağa ve tamamen delokalize π -elektron sistemine sahiptir. Şalkonların terapötik değeri olan bileşiklerin preparasyonları için ara madde olarak kullanılmışlardır (Nowakowska, 2007).

Son zamanlarda, şalkonların metal ile yaptıkları kompleksleri, çeşitli metallere kenetleme / koordine etme özellikleri ve çeşitli anti-kanser hedefleri üzerinde modülatör etki göstermesi nedeniyle, biyoinorganik tıbbi kimyada büyük ilgi görmüştür. Geçmişte, şalkon iskele kullanılarak, umut verici anti-kanser aktivitesi gösteren birkaç güçlü ve daha az toksik koordineli kompleks geliştirilmiştir (Mahapatra vd., 2019).

Kanserin evrimsel yönlerden değerlendirilmesi ilk olarak 1979 yılında Peter Nowell tarafından gerçekleşti (Nowell, 1976). Evrimsel teoriler, kanserin oluşum, gelişim ve türlerinin yanı sıra, hücre ve doku düzeylerinde anlamak ve etkili tedaviler geliştirebilmek için kritik öneme sahiptir. Hayvanlar kanser gelişimini önlemek için evrimsel süreçte güçlü tümör baskılayıcı mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar başta çok hücreli canlıların hayatta kalmaları ve tür gelişiminin devamı için çok önemliyken, hayvanların sahip oldukları büyük bedenlerle ve artan yaşam süresiyle birlikte daha da önemli hale geldi. Dokularımızın gelişimi ve mimarisi, kanser baskılama ve sınırlama ihtiyacıyla birlikte evrimsel olarak kısıtlanma içine girmiştir. Birey içinde gelişen kanser aslında birçok açıdan türlerin ilerleyişini aydınlatan evrimsel süreçtir. Türler bir popülasyondaki bireylere etki eden mutasyon, seleksiyonla gelişmektedir. Mutasyon ve seleksiyonlar, kanser oluşumundan metastazlara kadar çok aşamalı bir sürecin ayrılmaz parçasıdır. Başta yaşlanma olmak üzere ve çeşitli kanserojen gibi faktörlerin, mutasyon ve seleksiyon süreçlerini etkileyerek kanser gelişimini arttırdığı gözlemlenmiştir. Bir kanser hücresi popülasyonunu azaltabilecek tedaviler olsa da maalesef, kanserler de bu tedavilere direnç geliştirerek tedaviye dirençli hastalığın yeniden dirilmesine yol açabilir (Crespi ve Summers, 2005).

Evrimsel süreçte organizmaların gelişebildiği kadar, hücresel düzeyde somatik hücreler de gelişmektedir. Doku bütünlüğünü bozan kansere yol açan somatik hücreler, organizmanın devamı için açıkça bir tehdit oluşturmaktadır. Kanserin, hayvanlarda gençlik döneminde nadiren görülmesinin sebebi uzun ömürlü ve evrimsel olarak gelişmiş olan çok hücreli organizmaların, güçlü tümör baskılayıcı mekanizmalarının gelişmiş olmasıdır. Bu mekanizmaların en önemlilerinden birisi ise hücre intiharını sağlayan apoptoz mekanizmasıdır. Hücrede meydana gelebilecek tümör durumlarında komşu hücrelerin korunması için geliştirilen bu mekanizma. Evrimsel olarak kansere karşı kullanabileceğimiz en önemli hedef yolaklarımızdan biridir (Lowe vd.,2004; Casás-Selves ve DeGregori, 2011).

Bu tez çalışmasının amacı, dünyanın ölümlü sonuçlanan hastalıklar sıralamasında kanserin en üst sırada olmasının yanı sıra, kanser türlerinin çeşitlilik göstererek daha spesifik ve komplike hal alarak tedavinin zor olması, yeni kanser ilaç tedavi yöntemlerine birer alternatif üretmektir. Bu amaç içerisinde yeni ve ilk defa sentezlenmiş olan şalkon türevli bileşiklerimizin meme kanserinde hem östrojen reseptörü pozitif hem negatif hücreler üzerinde apoptotik, sitotoksik ve anti kanser etkilerinin belirlenmesi eğer varsa bu etkilerin biyokimyasal mekanizmaların ayrılması yer almaktadır. Deneyler kapsamında östrojen pozitif hücre hattı olarak MCF-7, östrojen reseptörü negatif olarak MDA-MB-231 hücre hatları ve bileşiklerin sitotoksik değerlerini ve selektivitelerini ölçmek için ise L-929, NIH/3T3 hücre hatları kullanılacaktır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Kanser ve Biyolojisi

Kanser, normal hücreyi malign hücrelere dönüştüren çok basamaklı ve karışık bir süreçte oluşmaktadır (Boland ve Goel, 2005). Malign hücrelerin oluşumu kontrolsüz çoğalmaya neden olan onkogenlerin aktivasyonu veya amplifikasyonu ile birlikte normal hücrelerin kontrolünü sağlayan tümör baskılayıcı genlerin bazı sebepler ile inaktive olup görevlerini yerine getirememesi durumunda oluşmaktadır. Kanseri hücrelerin oluşmasında rol oynayan gen faktörlerinin üzerinde hem iç hem de dış faktörler rol oynayabilmektedir (Bertham, 2000).

İç faktörlere, proteinlerin kısmi ya da tam fonksiyon kayıpları, kromozomal kırılmalar ve tekrar düzenlenmeleri, bazı DNA bazlarının kimyasal yapı kararsızlığı, epigenetik değişiklikler, hormon seviyeleri, metabolik işlemlerle ve immün sistem değişiklikleri tarafından üretilen serbest radikaller dahil edilebilir. Bunlara ek olarak bakteriyel ya da viral enfeksiyonlar, iyonlaşma, UV radyasyonlar, kimyasal kanserojenlere maruz kalma ve sigara dış faktörler olarak sıralanabilir (Rieger, 2004; Bertham, 2000). Hem iç hem de dış faktörler genetik ve hücre sistemlerini değiştirerek kanser oluşumunu hızlandırır (American Cancer Society, 2010).

Kanser oluşumunda, aktive/inhibe edilmesi gereken beş ana yolak vardır. Bunlardan birincisi, büyüme simülatör sinyallerinin bağımsız gelişimi. İkinci olarak, büyüme baskılayıcı sinyallere karşı dayanıklı bir durum geliştirilmesi. Üçüncü; programlanmış hücre ölümüne karşı (Apoptoz) direnç gelişimi. Dördüncü; hücrenin sonsuz proliferasyonunun geliştirilmesi ve son olarak anjiyojenik potansiyel gelişimi (Bertham, 2000).

Hanahan ve Weinberg'e göre kanser hücrelerinin temel olarak altı ortak özelliği vardır. Sürekli proliferatif sinyalleşme, büyüme baskılayıcılarına duyarsızlık, invazyon ve metastazın aktivasyonu, tekrarlayan ölümsüzlüğün indüksiyonu, sürekli anjiyogenez ve apoptozdan kaçınmadır (Hanahan, Weinberg ve Francisco, 2000).

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda kanserin temel altı işaretine ek olarak malign hücrelerinin hücresel enerji deregülasyonu ve immün yıkımı tarafından kaçabilme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Ek işaretlerin ortaya çıkması kanser hücrelerinin yeni özellikler kazanmaya devam ettiğini ve daha da tehlikeli hale geldiklerini doğrulamıştır (Karp, 2002).

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda en sık olarak görülen ikinci kanserdir. Dünyada her yıl 1,5 milyondan fazla tanı konulan ve en çok menopoz evresindeki kadınlarda teşhis edilen, hayat etkileyip günlük yaşam standartlarını büyük ölçüde düşüren ölümle sonuçlanabilen bir neoplazm hastalığıdır (Nowakowska, 2007; Mahapatra vd., 2019).

Dünya çapında, sadece 2018 yılında meme kanseri teşhisi konulmuş 2,1 milyon kadın hasta bulunmaktadır. Neredeyse her 4 kadından 1 tanesi bu hastalığa yakalanmaktadır. Meme kanseri dünyada en çok öldüren ikinci kanser olmasına rağmen 185 ülkenin 154'ünde en çok rastlanan ve 100'den fazla ülkede, ölümle sonuçlanan kanser hastalıklarında birinci sırada bulunmaktadır (Bray vd., 2018; Kamińska vd., 2015; Barnard vd., 2015).

Nulliparite, erken yaşta menarş, geç yaşlarda menopoz ve ilk tam gebeliğin meme kanseri üzerinde etkili bir risk faktörü olduğu uzun yıllardır bilinen bir gerçektir (Barnard vd., 2015). Meme kanseri genellikle lobüllerde (Süt bezleri) ya da kanallarda (Sütü lobüllerden emmek için boşaltılan kanallar) da başlamaktadır. Ama nadiren de olsa memenin yağlı ve lifli bağ dokusunu içeren stromal dokuda da başlayabilmektedir. Malign meme kanseri hücreleri, kan dolaşımına girmeden önce, kendisine komşu sağlıklı hücreleri ve yakın olan lenf düğümlerini istila edebilmektedir. Özellikle akciğer ve kemikler meme kanseri için uygun metastatik bölgelerdir (Kaye, 2011).

Meme kanseri yaş, kilo (aşırı kilo veya obezite), sigara ve alkol kullanımı, uzun menstrüasyon öyküsü, oral kontraseptif kullanımı, menopoz sonrası hormon kullanımı, yaşlılıkta doğum gibi birçok faktör ile gelişebildiği gibi nulliparite, erken yaşta menarş, geç yaşlarda menopoz ve ilk tam gebeliğin meme kanseri üzerinde etkili bir risk faktörü olduğu uzun yıllardır bilinen bir gerçektir (Barnard vd., 2015; American Cancer Society, 2011).

Meme kanseri vakalarının %95'i kendiliğinden ortaya çıksa dahi aile öyküsü ve genetik yatkınlık, meme kanseri oluşum oranını etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda, kalıtsal BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları olan kadınların hayatları boyunca meme kanserine yakalanma ihtimallerinin %80 olduğu tespit edilmiştir (King vd., 2003; Foulkes vd., 2003; Serova vd., 1997).

2.2.1. Meme kanseri tedavi yöntemleri

Meme kanseri tedavi yöntemleri, tıpkı diğer kanser tiplerinde olduğu gibi ameliyat, radyo terapi, hormon tedavisi, hedefe yönelik tedavi ve kemoterapiyi içermektedir. Hangi tedavinin uygulanacağı, tümörün büyüklüğü, yeri, hangi evrede olduğu, hücre döngü hızı, hormonların ve reseptörlerin durumu, aksiller lenf nodu ve menapozal duruma göre ve tabii ki hastanın yaşı, genel sağlık durumu, hastanın da tercihine göre belirlenmektedir (American Cancer Society. 2010).

2.2.1.1. Ameliyat

Cerrahi müdahale kanser tedavisinin genellikle ilk tercihidir. Ameliyat tümörün büyüklüğüne, konumuna ve evresine göre belirlenmektedir. Göğüs koruyucu cerrahi olarak bilinen Lumpektomi, tümörün asgari zararlar bölgeden çıkartılmasıdır. Lumpektomi, tümör boyutunun 5 cm'den küçük olduğu durumlarda tercih edilir ve genellikle radyasyon kombinasyonu ile uygulanmaktadır. Bunların dışında bir diğer yöntem ise Mastektomi'dir. Mastektomi, tüm meme dokusunun cerrahi olarak çıkartılması için biraz daha büyük tümörlerin tedavisi için kullanılmaktadır (American Cancer Society. 2010; Veronesi vd., 2002).

2.2.1.2. Radyasyon tedavisi

Radyasyon Tedavisinin (Radyoterapi) temel çalışma prensibi, tümör hücrelerinin yüksek radyasyon enerjisi ile uyarılmasına dayanmaktadır. Tümörün boyutu eğer 5 cm'den büyükse küçülterek ameliyata hazırlamak ya da ameliyattan sonra kalan hücreleri öldürmek için kullanılabilir. Daha da önemlisi östrojen reseptörü (ER) pozitif meme kanserinde östrojen stimülasyonunu önleyebilmek için yumurtalıkların tahribinde kullanılmaktadır (Ayanian ve Guadagnoli, 1996). Radyoterapi, kanserli hücreleri doğrudan DNA yapılarına hasar vererek ya da hücre içinde serbest radikal üretilmesini sağlayarak malign hücreleri öldürür. Radyoterapinin bazı dokularda ve deride yan etkileri olabilmesi haricinde, oldukça etkili ve hedefe yönelik bir tedavi biçimidir. Yapılan çalışmalarda, radyoterapi uygulama sonrasında, hastalığın tekrarlama riskini %70 oranında azaltabildiği gözlemlenmiştir.

Meme kanseri hücrelerinin yaklaşık olarak %75'i artan östrojen reseptörü α (Er α) seviyelerini ifade etmektedir (Dowsett, 2001).

Bu gibi kanser vakalarında kanser hücrelerinin östrojen tarafından uyarılmasını önlemek için hormonal tedavi kullanılmaktadır. Östrojenin yoksunluğunu giderebilmek için, östrojen reseptörünün tamoksifen veya raloksifen içeren ilaçlar yoluyla bloke edilmesi ya da östrojen sentezinin anastroloz gibi aromataz inhibitörleri yoluyla baskılanmasıyla sağlanır. ER antagonisti olan tamoksifenin, meme kanseri riskini azalttığı ve hayatta kalma ihtimalini arttırdığı çalışmalarda gösterilmiştir (Vogel vd.,2006)

Yapılan çalışmalarda bir SERM olan tamoksifenin kemoterapik ilaçlarla kombinlenmesi, postmenopoz dönemindeki kadınlarda hastalığının tekrarlama riskini azalttığı gözlemlenmiştir. Seçici östrojen modülatörü (SERM) raloksifenin de invazif meme kanseri riskini %76 oranında azalttığını göstermiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda, tamoksifen ve raloksifen kıyaslandığında, raloksifenin daha az sitotoksositeye sahip olduğu saptanmıştır (Vogel vd., 2010; Cummings vd., 1999).

2.2.1.3. Hedef tedavi

Hedef terapi, meme kanseri tedavilerinin yan etkilerini en aza indirmek için monoklonal antikörlerin ve tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanılmasıyla olmaktadır. Trastuzumab (Herceptin), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) tirozin kinaz reseptörüne karşı hedeflenen ve istilacı meme kanserlerinin yaklaşık %25'inde aşırı eksprese edilen bir monoklonal antikördür (Nahta vd., 2006; Den Hollander vd., 2013). Herceptin'e benzer olan, lapatinib (Tykerb) ve bevacizumab (Avastin) Amerikan Kanser Topluluğu tarafından meme kanseri tedavisinde kullanılması onaylanmıştır.

2.2.1.4. Kemoterapi

Anti-kanser ilaçların kanser tedavisinde malign hücrelerin öldürülmesini sağladığı tedavi biçimine kemoterapi denir. Kemoterapinin genel amacı, tümör hücrelerinin öldürülmesi, aydınlatılması ve tekrarlamasını etmesini önlemektir.

Kanser türleri için kendisine özgü kemoterapik ilaçlar vardır. Meme kanseri tedavisinde en çok, antrasiklinler (doksorubisin, epirubisin), taksan (docetaxel, paclitaxel), mitosaktron, vinorelbin, gibi kemoterapik ilaçlar kullanılmaktadır (Glück, 2005).

Meme kanserinin ilerlemiş evrelerinde kemoterapötikler etkinlik açısından yeterli değildir. Metastazı önlemek ve malign hücrelerin ölüm oranını arttırmak için bifosfonatlar gibi ek ilaçlar tedavi sürecinde kullanılmaktadır (Maricic, 2006). Kemoterapötiklerin hastalara uygulanması oral veya intrevenöz yolla olmaktadır. Kemoterapi tedavisi belirli döngülerle yapılır ve iki döngü arasında ki süre kanser hücrelerinin bulunduğu yere, evresine göre belirlenmektedir. Anti-kanser ilaçlar ya tek başlarına (monoterapi) ya da yardımcı ajanlarla kombinlenerek (kemoterapi rejimi) verilmektedir. Kemoterapik kombinlerin uygulanması, anti-kanser ilaçların etkinliğini artırır. Kemoterapi meme kanserinde oldukça etkili bir tedavi yöntemidir. Meme kanseri hastalarının %60'ında tümörlerin büzülmesine ya da kaybolmasına neden olur. Geleneksel kemoterapötik ajanlar dışında adjuvan ve neoadjuvan kemoterapiler de kanser tedavisinin yararını arttırmak için kullanılır. Adjuvan kemoterapi, cerrahi müdahaleden sonra kalan hücrelerden kurtulmak için uygulanırken, neoadjuvan tedavi ise cerrahi olarak alınılmayan tümörlerin boyutlarını küçültmek için kullanılmaktadır (Spring vd., 2016).

2.3. Kanser ve Gen İlişkileri

Bir hücrenin kanser hücresine dönüşebilmesi için, tek bir gende ki mutasyon yeterli değildir, birden fazla gende, birden fazla mutasyon çok aşamalı olarak gerekmektedir. Gen aracılığı ile kanser oluşumuna aracı olan üç tip gen ailesi vardır. Bunlar onkogenler, tümör baskılayıcı genler, mikroRNA (miRNA) genleri olarak bilinirler. Mutasyona neden olan bu değişimler çoğunlukla somatiktir sadece sonra oluşacak hücrelere geçerken, kalıtsal olarak aktarılmazlar. Fakat oluşabilecek germ hattı mutasyonları, kalıtsal veya ailesel kanser yatkınlığına çevirebilmektedir.

Oluşmuş tümör hücreleri, genellikle transforme olmuş olan hücrelerin ikincil veya üçüncül genetik değişiklikleri sebebiyle ortaya çıkmış farklı bir sitogenetik yapıya sahip klonlardır. Bu heterojenite, tümörlerin teşhis ve tedavisinde oldukça katlı sağlayan bir durumdur. İlk klon ve alt klonların yanı sıra, tümörler, her biri farklı genetik değişikliklere ve farklılaşma durumlarına sahip bir hücre spektrumunu oluşturan progenitör kanser hücrelerini de içerebilir. Yeni oluşabilecek progenitör hücreler kemoterapi, radyoterapi gibi tedavi yöntemlerine direnç ve duyarlılık bakımından farklılık gösterebilirler. Bu sebeplerden dolayı kanserde ilk adımlar ve genetik mutasyonlar oldukça önemlidir. Bu

duruma örnek verecek olursak miyojenik lösemidir. ABL proto-onkogeni BCR genine aktaran karşılıklı t(9;22) kromozomal lokasyonu ile başlamıştır. Füzyon geni, arttırılmış tirozin kinaz aktivitesine sahip bir onkojenik ABL füzyon proteinini kodlar. Tüm lösemik hücreler bu kromozomal değişikliği taşır, bu yüzden aşırı tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonu imatinib ile füzyon proteininin çoğu hastada tam remisyona neden olur. Nüks gerçekleştiğinde, lösemik hücreler genellikle ABL'de ilaca dirençli hale getiren mutasyonlar taşır (Groffen vd., 1984; Croce, 2008; Shtivelman vd., 1985; Ottmann vd., 2002).

2.3.1. Kanser genleri (Onkogenler)

2.3.1.1. Proto-onkogenler

Proto-onkogenler, normal hücrelerin mutasyona uğradıklarında, kanser hücrelerine dönüşmelerini sağlayan gen grubudur. Proto-onkogenlerde meydana gelen bu mutasyonlar, doğa koşullarında oldukça baskındır ve proto-onkogenlerin mutasyona uğramış hallerine ise onkogen denilmektedir. Çoğunlukla bu gen grubu, hücre bölünmesini, büyümesini, siklusunu devam ettiren, farklılaşmasını önleyen ve hücre ölümünü durduran protein gruplarını kodlarlar. Bütün bu işlemler doku ve organ gelişiminde, onarılmasında en önemli olaylardandır. Proto-onkogenler ürettikleri proteinlerle, hücre bölünmesi, farklılaşması azalır ve hücre ölüm inhibisyonunu arttırmaktadır. Günümüzde 40'dan fazla insan proto-onkogeni bilinmektedir. Onkogenler, proto-onkogenlerin ekspresyon seviyelerinin veya aktivitelerinin artması durumunda ortaya çıkarlar. Bu artışı sağlayan genetik mekanizmalar;

Nokta mutasyonları, proto-onkogeni aktive eden, bir gen sekansındaki sadece bir veya birkaç nükleotidi ekleyerek ya da silerek değişime neden olur.

Gen amplifikasyonu, bir proto-onkogenin ekstra kromozomal kopyalarının gerçekleşmesi durumudur.

Kromozomal translokasyon, genin daha çok ekspresyona yol açan yeni bir kromozomal bölgeye taşınmasıdır.

Bu mutasyonların bazıları, retrovirüs adı verilen virüs tipi enfeksiyonlardan da kaynaklanabilmektedir. Radyasyon, sigara tüketimi gibi çevresel toksinler de proto-onkogenlerin mutasyonuna neden olabilmektedir (Weinstein ve Joe, 2006).

2.3.1.2. Onkogenler

Proto-onkogenler, mutasyona uğradıklarında ve kanseri tetiklerinde onkogen adını almaktadırlar. Onkogenler ilk olarak retrovirüslerle yapılan çalışmalarda, RNA tümör virüslerinin enfekte hayvan hücrelerinde DNA'ya ters-transkripsiyon yapmasıyla fark edildi (Mahalingam vd., 2002).

Onkogenlerin isimlendirilmesi, 3 harf ve kökeninin nereden geldiğine göre ön harf olarak yapılmaktadır. Eğer bir onkogen virüs kökenliyse -v, hücre veya kromozom kökenli ise -c eki almaktadır.

Onkogenler alt ürün sınıflandırılmasına göre altı gruba ayrılabilirler: transkripsiyon faktörleri, kromatin biçim değiştiriciler, büyüme faktörleri, büyüme faktörleri reseptörleri, sinyal dönüştürücüleri ve apoptoz düzenleyicileri.

Çizelge 2.1.: Onkogenler

Büyüme Faktörleri	V-Sis, INT2, KS3, HST
Büyüme faktörü reseptörleri	Tirozin kinazlar: integral membran proteinleri; EGFR, v-FMS, v-KIT, v-ROS, MET, TRK, NEU, RET Protein kinaz aktivitesi olmayan reseptörler; MAS
Sinyal dönüştürücüler	Sitoplazmik tirozin kinazlar; SRC, v-YES, v-FGR, v-FES, ABL Membran ilişkili G proteinleri; HRAS, KRAS, BRAF, GSP, GIP GTPaz değişim faktörleri (GEF); DBL, VAV Serin/Teronin kinazlar: Sitoplazmik v-MOS, v-RAF, PIM-1 Sitoplazmik düzenleyiciler; v-CRK
Transkripsiyon faktörleri	v-MYC, N-MYC, L-MYC, v-MYB, v-FOS, v-JUN, v-SKI, v-REL, v-ETS-1, v-ETS-2, v-ERB A1, v-ERB A2
Diğer Onkogenler	BCL-2, MDM2

2.3.2. Tümör baskılayıcı genler

Tümör baskılayıcı genler ilk olarak 1969 yılında Henry Harris ve arkadaşlarının yayımladığı makale sayesinde tanımlanabilmiştir (Harris vd., 1969).

Tümör baskılayıcı genler, hücre proliferasyonunu kontrol ederek, kanser hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde yayılmasını engelleyen genlerdir. Bu genlerde oluşabilecek herhangi bir değişim hücre patojenezinde önemli rol oynamaktadır. Tümör baskılayıcı genler, apoptozu tetikler, hücre döngüsünün devamını sağlayabilirler. En önemli görevlerinden birisi ise DNA replikasyon ve tamirinin doğru yapıldığını kontrol edebilmesidir. Tümör baskılayıcı genlerde oluşabilecek herhangi bir hasar durumunda büyüme kontrolü ortada kalkacağından kanser oluşumuna neden olurlar (Oyouni, 2017).

p53 ve ATM (Mutant-ataxia telegiectasia) en bilinen tümör baskılayıcı genlerdendir. Meme kanserinin %20-30'unda *p53* inaktivasyonu gözlenirken, ATM geninin meme kanserinde rastlanması %2-7 oranındadır.

2.3.3. Meme kanserinde oluşumunda etkili olan onkogenler

Meme kanseri hastalarında yapılan çalışmalarda, onkogenlerin doğrudan ailesel öyküye sahip meme kanserlerinde primer lezyonlarında etkili olmadığı gözlemlenmiştir. Bunun aksine tümör baskılayıcı genlerin ise uğradığı resesif değişimlerin primer lezyonlarda etkili olduğu anlaşılmıştır (Beckman vd., 1997).

Onkogenler içerisinde meme kanseri ve sağlıklı hücreleri için ayırıcı özelliğe sahip bazı onkogen grupları bulunmaktadır. Bu onkogenler ras, myc ve cerbB-2 (HER2/neu) olarak bilinmektedir (Klijin vd., 1992).

2.3.3.1. Büyüme faktörü reseptörleri

2.3.3.1.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)

EGFR ailesi tirozin kinaz aktivitesine sahip, EGFR, HER2, HER3 ve HER4'ten oluşan hücre membran reseptörü ailesidir. Bu ailenin üyeleri transfosforilasyon sonucu birbirini tetikleyerek heterodimer oluşturabilirler ve diğer protein gruplarının aktivasyonlarında rol oynayabilirler. Epidermal büyüme faktörünün (EGF) reseptöre bağlanmasıyla hücre içine girer böylece hem reseptörün hem de diğer hücre içinde bulunan substratların otofosforilasyonunu sağlayarak nükleus içerisinde ki transkripsiyon faktörlerinin aktive olmasını sağlarken, hücreyi bölünme yönünde uyarmaktadır. Hücre membranından başlayarak nükleusa kadar devam eden bu sinyal iletim mekanizması içerisinde bazı proto-onkogenler bulunmaktadır. Bu sinyal iletimi sırasında görev alan proto-onkogenlerin farklı kanser durumunda mitozu indüklediği bilinmektedir (Gelman, 1998; Klijin vd., 1992; Dickson ve Lippman, 1997).

Hormon ilişkili meme kanseri soyları karşılaştırıldığında östrojen reseptörü (ER) yokluğu ve yüksek oranda EGFR düzeyleri gözlemlenmiştir. Oluşan meme kanseri tümörlerinde yüksek EGFR düzeyleri östrojen reseptöründen bağımsız olarak kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermektedir. Meme kanserine yakalanmış olan hastaların yaklaşık olarak yarısında EGFR' nin aşırı üretimi saptanmıştır ve amplifikasyon oranı %0-14 arasında değişmekte olduğu gözlemlenmiştir (Klijin vd., 1992).

2.3.3.1.2. *CerbB-2 (HER2/Neu)*

HER2/Neu, p185 olarak da bilinen bu onkogen 17. Kromozomda q12 de bulunmaktadır. Bu genin protein ürünü hücre büyümesi ve farklılaşması gibi olaylarda rol almaktadır. HER2/Neu onkoproteini plazma membranına yerleşmiş EGRF benzeri bir membran reseptörüdür. HER2/Neu'nun HER1, HER3, HER4 ile arasındaki liganda bağlı bir heterodimerizasyon cerbB-2 sinyal yolağını aktifleştirmektedir. Bu genin amplifikasyonu veya proteinin aşırı eksprese edilmesi meme kanseri neoplastik hücrelerin %10-40 arasındaki değerde saptanmıştır. Bu onkogenin kopya sayılarının yüksek oluşu tümörün şiddeti ile doğrudan orantılıdır (Perren, 1991; Kurebayashi, 2001).

2.3.3.2. *Sinyal iletimi ile ilişkili nükleer onkogenler*

Farklı dokularda ki büyümeyi indükleyici steroidlerin ve büyüme faktörlerinin etkileri bu onkogenler tarafından sağlanmaktadır. Hücrelerin mitojenle etkileşimlerinden kısa süre sonra c-fos, c-myc, c-myb ve c-jun proto-onkogenleri indüklenir. İndüklenen bu onkogenler hücre proliferasyonunu sağlamaktadır. Progesteron ve östrojen ile c-myc, c-fos ve c-jun proto-onkogenlerin aktifleştirildikleri tespit edilmiştir (Van Der Burg vd., 1991).

2.3.3.2.1. *c-Myc onkogeni*

Kromozom 8p24 de bulunan bu gen, hücrenin proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz ile ilişkini genlerin transkripsiyonunu düzenlemekle görevlidir. Bu genin ürünü bir fosfoproteindir. Bu gende meydana gelecek bir amplifikasyon, hücre siklusunun bozulması ve p53 genine bağlı yoldan hücrenin apoptoz sürecine girmesini sağlar. Bu genin aşırı üretimi veya mutasyona uğraması meme kanserine neden olmaktadır (Liao ve Dickson, 2000).

2.3.3.2.2. *Ras/Raf/MEK/ERK*

Ras sinyal iletiminde önemli role sahip G proteinleri ailesinin bir üyesidir ve plazma membranındaki büyüme faktörü reseptörlerinin sitoplazmik bölgelerinde yerleşik durumdadırlar. GTP molekülü tarafından aktifleşirler ve protein kinazlar ile etkileşimleri sonucu hücrenin mitozunu aktifleştirirler. Ras'ın onkogenik bir özellik kazanması ancak

nokta mutasyonu veya gen ekspresyonunun artışı ile olmaktadır. Ras aktive olduğunda gerekli olan kaskadı başlatmaktadır. Aktive olan Ras, önce Raf (MAPKKK), MEK (MAPKK) ve son olarak Erk (MAPK) aktive ederek görevini yerine getirir. Bu sinyal yolağının oluşan tümörlerin %30'unda aktive olduğu saptanmıştır. Ras'ın inhibisyonu bu yolağın durdurulmasını sağlayacağından kanser oluşumunu durdurmakta önemli bir role sahiptir (Von Linting vd, 2000). Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar (ERK), mitojenle aktifleşen kinazlar (MAP) olarak da bilinirler. Buldukları yolak yaşama, proliferasyon, apoptoz ve embriyogenezde rol almaktadır (Crews, Alessandrini ve Erikson, 1992).

2.3.3.3. Siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve inhibitörleri

Siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve inhibitörleri (CDKI) hücre siklusunun her aşamasında önemli role sahip proteinlerdir. Hücre siklusunda görev alan siklinler ve siklin-CDK'ların aktive edici mutasyonları onkogen, CDK inhibitörleri ise tümör baskılayıcı gen fonksiyonu görevi taklit etmektedir. Yapılan çalışmalarda meme kanseri hücrelerinin siklin-D1 (PRAD1) ve siklin-E'nin %30 oranında ekspresyonuna rastlanmıştır. Meme kanserinde tespit edilmiş bu aileye ait bir diğer gen ise kromozom 9p21'de bulunan CDK-2'dir. CDK'nın aktifleşmesi hücrenin G0 fazını geçip doğrudan mitozu geçişini sağlamaktadır. CDK'lar siklinler tarafından düzenlenmektedir. SiklinD1 ve SiklinE ekspresyonlarında ki artışlar hücre siklusunun ve bunun kontrolünün bozulmasına sebebiyet vermektedir (Zukerberg vd., 1995; Keyomarsi vd., 1995).

CYD-1 (sitokinez defektif1) onkogeni birçok meme kanserinde yüksek oranda eksprese etmekte ve hücre proliferasyonunu arttırmaktadır. Bu genin hücre siklusunu düzenleyici bir rolü vardır. Lehn ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada CYD-1 geninin bunlara ek olarak yüksek seviyelerde eksprese olan meme kanserinde hücre göçleri ile de ilişkili olduğuna dair bilgiler toplanmıştır (Lehn vd., 2010).

2.3.3.4. Steroid reseptörleri

2.3.3.4.1. Östrojen reseptörü (ER), Progesteron reseptörü (PR)

Bu reseptörler ER ve PR gen regülasyonlarında rol oynamaktadırlar. ER ve PR doğrudan onkogen veya tümör baskılayıcı gen gruplarına dahil değildir. Fakat kanserin başlangıç ve ilerleme evrelerinde rol oynamaları sebebiyle kanser genleri olarak düşünülmektedirler. Meme kanseri hücrelerinde ER pozitif olduğu durumlarda PR' de pozitif bulunmaktadır. Hormon bağımlı meme kanseri durumlarında ER ve PR aktivasyonları normal durumlara göre oldukça fazladır. Ayrıca meme kanserinde %60'dan daha fazla oranda ER pozitif olmasına rağmen hastaların üçte biri endokrin tedaviye cevap verememektedir (Smith ve Toft, 1993).

2.3.3.4.2. Ppar γ Onkogeni

Bu gen, aktivasyonu steroid hormonun bağlanması ile düzenlenmiş olan 48 insan transkripsiyon faktörünü, tiroid hormonlarını, vitaminleri, lipid metabolitlerini ve ksenobiyotikleri içeren nükleer reseptör olarak da bilinen steroid hormon süper ailesinin üresidir (Chawla vd., 2001).

Ppar γ geninin, spesifik DNA sekanslarına bağlanması nükleer reseptör ailesinin bir diğer üresi olan retinoik X reseptörü (RXR) ile heterodimerizasyon gerektirmektedir. Agonist ligandların Ppar γ 'ya bağlanması steroid reseptörü koaktivatör (SRC) üyeleri de dahil olmak üzere, transkripsiyonel kofaktörleri çeken bir konformasyon değişikliğini tetiklemektedir. Ligand yokluğunda ise Ppar γ , nükleer reseptör koruyucusu (N-CoR) veya SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors) içeren transkripsiyonel korepresör kompleksleri alarak, bağlandığı genleri aktif olarak susturma yeteneğine sahiptir (McKenna ve O'Malley, 2002).

2.3.3. Meme kanserinde genetik ailesel yatkınlık genleri

Meme kanserine sebep olan birçok gen bulunmasına rağmen, ailesel yatkınlık sağlayan genler sebebiyle oluşan meme kanseri %5-10 oranında bir yer tutmaktadır. Kalıtsal yatkınlıkla ilgili genlerin araştırılmasında iki tip gen bulunmuştur. Bunların birincisi BRCA1 ve BRCA2'dir. Bu gen gruplarında meydana gelebilecek germ hücresi mutasyonlarında meme kanseri oluşma riski %50-80 arasında bulunmaktadır. Bun

genlerde meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon, ovaryum kanserinde %10, meme kanserinde ise %7 oranında dominant gen olarak sonraki nesillere aktarım göstermektedir (Polyak, 2002).

2.3.3.1. BRCA1 ve BRCA2 genleri

BRCA1 proteini 1863, BRCA2 proteini ise 3418 aminoasitten oluşan, hücre proliferasyonunu kontrol eden tümör baskılayıcı proteinler, DNA hasar tamiri eden proteinler, hücre siklusunu ve transkripsiyon düzenleyici proteinlerle bağlanarak iş gören protein gruplarıdır. BRCA1 ve BRCA2’de meydana gelebilen mutasyonlar, bu genlerin proteinlerinin inaktivasyonunu sağlayacağı için dolaylı yoldan tümör baskılayıcı ve diğer önemli proteinlerin de inaktivasyonunu sağlayacağı için hücreyi malign hücrelere çevirirler (Wooster vd., 1994).

Bu genlerin aktivasyonu doğrudan östrojen ile bağlantılıdır. BRCA1 geni mutasyona uğradığında genç yaşta dişilerde meme kanseri riski yükselmektedir, fakat kolon ve prostat kanseri için taşıdığı risk oranı daha düşüktür. BRCA2 geninde meydana gelebilecek bir mutasyon ise erkeklerde genç yaştaki meme kanseri riskini arttırmaktadır (Neuhausen ve Marshall, 1994).

2.4. Kanserde programlanmış hücre ölüm yolları

2.4.1. Apoptoz, nekroz ve otofaji

Apoptoz, fizyolojik veya patolojik olabilecek programlanmış veya organize bir hücre ölümüdür. Bu hücre ölümü şekli ile ilgili ek bilgiler bu bölümün kapsamı dışındadır. Bir hücre ölümü biçimi olarak nekroz, hemen hemen her zaman patolojik bir süreç ile ilişkilidir (Krishna, 2017; Petek vd., 2019).

Nekroz, apoptotik hücre ölümünün bir alternatifidir. Enerjiden bağımsız tam anlamıyla pasif olarak gerçekleşmektedir. Fakat apoptoz ise tamamen hücre kontrolünde olan ve enerji harcayarak gerçekleşen bir ölüm biçimidir. Onkoz, karyoliz ve hücre şişmesi, nekroza neden olan bir işlemi tanımlamak için kullanılırken, apoptoz, hücre küçülmesi, piyozoz ve karyoreksis ile hücre ölümüne yol açmaktadır. Bu nedenle “onkotik hücre ölümü” ve “onkotik nekroz” terimleri, hücre şişmesiyle eşlik eden hücre

ölümünü tanımlamanın alternatifleri olarak önerilmiştir (Majno ve Joris; 1995; Levin vd., 1999).

Apoptoz ve nekroz her ne kadar birbirinden morfolojik ve mekanizma olarak farklı olsalar dahi, benzerlik gösterdikleri çok fazla konu vardır. Bundan kaynaklı olarak “apoptoz-nekroz sürekliliği” denilmektedir (Zeiss, 2003).

Hücreler nekroz yolu ile öldüklerinde, mikroskobik ve makroskobik olmak üzere iki ana görünüm sergilerler. Mikroskobik nekroz, aynı zamanda koligatif nekroz olarak da bilinen sıvılaştırıcı nekrozdur. Ölü dokunun veya hücrenin kısmi ya da tam çözünmesi, viskoz bir kütleyle dönüşümü ile karakterize edilir. Mikroskobik nekrozun aksine, makroskobik nekroz pıhtılaştırıcıdır. Hücre ölümünden birkaç gün sonra normal nekrotik dokunun biçimce korunması ile tanımlanabilmektedir.

Otofaji bir çeşit programlı hücre ölümüdür, apoptozda olduğu gibi enerji harcayarak ve hücrenin isteği dahilinde gerçekleşmekte ve evrimsel olarak oldukça korunmuş katabolik bir işlemdir. Otofagozom adını alan sitoplazmanın bir kısmını ve/veya organelleri içeren çift katlı ya da daha fazla zarlara sahip veziküller ile morfolojik olarak karakterize edilmektedirler. Hücrenin otofajik ölümünde otofagozomlar, asidik hidrolazları içeren lizozomlar veya vakuoller ile birleşerek hücrenin kendi kendini yemesine/sindirmesine neden olmaktadır (Ohsumi, 2014).

2.4.2. Apoptoz

Apoptoz, kelime anlamı olarak Yunanca’ da ayrı düşme anlamına gelmektedir. Bunun esin kaynağı ağaçların yaprak dökmesidir. Ağaçların yaprak dökmesi tam anlamıyla kendi kontrollerinde, programlı bir hücre ölümü sayesinde gerçekleşmesidir. Yunanca’da, Apo; Ayrı, Ptosis; Düşme anlamına gelmektedir. Apoptozu ilk defa tanımlayan Avustralya’lı patolog J.F.K. Kerr’dir (Kerr vd., 1972).

Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz, hücrenin kendini kontrollü bir şekilde öldürme yeteneğidir. Apoptoz genetik olarak düzenlenmiş bir süreçtir ve birçok fizyolojik ve patolojik işlemin düzenlenmesinde rol oynar. Canlının gelişimi sırasında, ihtiyaç duyulmayan yapılar apoptoz ile giderilir. Yaşam boyunca apoptoz, yaşlı, enfekte olmuş, hasar görmüş veya mutasyona uğramış hücreler gibi yararsız veya potansiyel olarak

tehlikeli olan hücreleri elimine eder. Apoptozun düzensizleşmesi kansere yol açabilir. Apoptoz genel olarak hücre büzülmesi, hücre zarının kabarcıklaşması, hücre zarı bozulması, hücre parçalanması, iskeletin tekrar düzenlenmesi, kromatinlerin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonları ve parçalanması gibi morfolojik bozukluklara yol açan biyokimyasal olaylar içerir. Hücreler apoptotik sürece başladığında organelleri ve kendisi, makrofajlar veya komşu hücreler tarafından yok edilirler. Böylece inflamatuvar bir duruma sebep olmazlar. Apoptoz normal gelişim ve yaşlanma sırasında, dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar. Apoptoz ayrıca immün reaksiyonlarda olduğu gibi bir savunma mekanizması olarak veya hücrelerin hastalık veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde de ortaya çıkar (Jin ve El-Deiry, 2005; Norbury ve Hickson, 2001).

Radyasyon veya kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları, bazı hücrelerde p53 bağımlı bir yoldan apoptotik ölüme yol açabilecek DNA hasarına neden olur. Kortikosteroidler (örneğin timositler) gibi bazı hormonlar da apoptotik ölüme yol açabilirler. Bazı hücreler apoptoza yol açan, Fas veya TNF reseptörlerini eksprese edebilmek için ligand bağlama ve protein bağlama yollarına gidebilmektedir. Bazı hücreler ise büyüme faktörü, hormon gibi yaşam faktörleri ile bağlantılı ölüm yollarına sahiptir. Hücrenin ölümünün apoptoz veya nekrozdan kaynaklandığını ayırt edebilmemizi sağlayacak iki süreç vardır. Hücrelerin apoptoz veya nekroz ile ölüp ölmeyeceği, uyarıların tipi ve dereceleridir. Apoptozu indükleyen düşük dozlardaki ısı, radyasyon, hipoksi ve kemoterapötikler olabilir. Ancak yüksek dozlarda ki durumlar ise bu durum nekroz ile sonuçlanabilmektedir. Apoptozlar, uyarıların sonrasında Kaspazlar olarak adlandırılan sistein proteaz gruplarının aktivasyonları ile birlikte geri dönüşü olmayan kaskada girerek nihai ölüme bağlanırlar (Hirsch vd., 1997; Zeiss, 2003; Elmore, 2007).

2.4.2.1. Kaspazlar

Apoptozun gerçekleşmesinde en önemli faktörlerden biri hücre içi sistein proteazlar olan kaspazlardır. Aspartat kalıntılarından peptid bağlarını kırarlar. Memelilerde apoptotik süreçte rol alan kaspaz -2, -3, -6, -7, -8, -9 ve -10 tanımlanabilmektedir. Kaspazlar, bir prodomain, bir p20 büyük alt birimi ve bir p10 küçük alt birimi içeren inaktif zimojenler olarak üretilip, proteolitik bölünme ile aktive

edilmektedir. Aktif kaspazlar iki büyük, iki küçük alt grup içeren heterotetramerlerdir (Li ve Yuan, 2008).

Apoptozun iki tane sinyal yolağı vardır. Bunlardan birincisi dış yolak (extrinsic) olarak bilinen “Ölüm reseptörü yolağı”, ikincisi ise iç yolak (intrinsic) olarak bilinen aktivasyonunu kaspazların sağladığı “Mitokondriyal yolak” tır.

2.4.2.2. P53 geni

P53 geni öncelikle sitoplazmada ve çekirdekte olmak üzere iki p53 formu olabilir. Çekirdekte, esas olarak hedefleriyle etkileşime girerek, düzenlenmiş otofaji modülatörüne (DRAM) ve sestrin 1 / 2 DRAM'a zarar vererek otofajiyi sağlar. Bu, makrotofajiyi indükleyen bir lizozomal proteini kodlayan bir p53 hedef genidir ve p53 ile otofaji arasındaki doğrudan bağlantıyı gösteren, p53 kaynaklı hücre ölümünün bir efektörü olduğu bulunmuştur (Lui vd., 2010).

Ayrıca, hücre DNA hasarı oluştuğunda, hücre döngüsünü G1 fazında durdurma ve oluşan hasarın tamiri için gerekli süreyi sağlayabilme özelliğinde olan bir transkripsiyon faktörüdür. Eğer bu hasar geri dönüşü olmayacak bir durumda ise apoptoz sürecini başlatmak için Bax, Apaf-1 ve Fas üretimini artırıp, Bcl-2 ve Bcl-x1 inhibisyonunu sağlar (Vousden, 2002).

2.4.2.3. İç reseptör ölüm yolu (Mitokondriyal yolak)

Mitokondriyal ya da içsel yolak olarak bilinen bu yolak DNA hasarı ya da sitotoksik ilaçlar gibi etkenler sayesinde tetiklene bilmektedir. Mitokondriyal yolağın en önemli noktası mitokondriyal dış zar permeabilizasyonudur (MOMP). Bu durum sitokrom c (cyt c), ikinci mitokondriyal türevli kaspaz aktivatörü/ IAP bağlayıcı protein (Smac/DIABLO), Htr2/Omi, apoptoz indükleyici faktör ve endonükeaz D (EndoG) gibi mitokondriyal intermembran proteinlerinin sitozole salınımını sağlar. Sitozole salınım sonrasında sitokrom c, adaptör protein Apaf-1'e bağlanır. dATP/ATP'nin varlığında sitokrom c/Apaf-1 kompleks oligomerleri, çekirdeği 7 tane N-terminal CARD içeren heptamerik bir yapıya dönüşür. Oluşan bu kompleks Prokaspaz-9'un Apaf-1 kendi

CARD'ı ile, Apaf-1'in CARD'ı arasında etkileşime girmesini sağlar, bu durum Prokaspaz-9'un moleküllerini birbirine yakınlaştırmaktadır. Kaspaz-9 apoptozomda aktive olur ve apoptozun efektör kaspazları olan kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi aktive eder. Salınan Smac/DIABLO ve serin proteaz Htra/Omi, IAP aracılı kaspaz inhibisyonuna rağmen, kaspaz aktivasyonunu teşvik eder. AIF ve EndoG ise kaspazdan bağımsız hücre ölümünü indükler (Li ve Yuan, 2008; Riedl ve Salvesen, 2007; Susin vd., 1999).

2.4.2.3.1. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi apoptozun düzenlenmesinde önemli role sahip bir onkoprotein grubudur ve üç gruba ayrılmaktadır. Bcl-2 ailesi gen gruplarının proapoptotik ve antiapoptotik olması, bir hücrenin apoptoz sürecine girip giremeyeceğini belirlemektedir. Bu ailenin Anti-apoptotik üyeleri; Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1 ve Bcl-B'dir. Bu üyeler mitokondriyal dış membran ile ilişkilidir ve hücreyi apoptotik uyarıcılara karşı korur.

Proapoptotik üyeler ise kendi aralarında ikiye ayrılırlar. Bunlar Bak-benzeri Multidomainler (BH-1, BH-3) apoptotik proteinler (Bax, Bak, Bok) ve BH3- tek proteinleri (Bik, Bid, Bad, Puma, Noxa, Bim, Hrk, Bmf). Bu proteinler ise sitozolde lokalize olmuşlardır. Proapoptotik üyelerin bir diğer özelliği ise kaspazların öncü formlarıyla AIF ve sitokrom-c salınımını bloklayarak apoptozu inhibe ederler (Van Delft ve Huang, 2006).

2.4.2.3.2. Bax ve Bak aktivasyonları

Bax ve bak proteinlerinin, apoptotik olmayan hücrelerde aktif olmadığı ve MOMP'yi temelde indüklediği ve eksprese ettiği bilinmektedir. Bax ve Bak proteinleri mitokondriyal apoptoz için olmazsa olmazdır. (Kuwana ve Newmeyer 2003).

2.4.2.4. Dış reseptör ölüm yolu (Ekstrinsik yolak)

Dış reseptör ölüm yolu yani ekstrinsik apoptotik yol, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin ligandları ile birleşmesiyle aktive olur. Tüm ölüm reseptörleri, tümör nekroz faktörü reseptörü (TNF-R) süperaillesine aittir. Bu süper ailenin üyeleri, tip 1

transmembran proteinleridir ve ligand bağlanmasını tanımlayan benzer sistein bakımından zengin hücre dışı alanlar olarak karakterize edilirler. Ölüm reseptörleri, apoptotik sinyalin iletilmesi için gerekli olan “Ölüm alanı” (DD) adı verilen, hücre içi 80 aminoasit uzunluğunda bir bölge içermektedir. En çok çalışılmış olan ölüm reseptörleri, Fas (CD95 / Apo-1), TNFR-1, TRAIL-R1 (DR-4) ve TRAIL-R2 (DR5/Killer/TRICK2) ‘dir. Bu ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar ise (FasL, TNF- α , TRAIL) TNF süper ailesine ait yapısal olarak ilişkili proteinlerdir.

Bu ligandlar esas olarak tip II transmembran proteinleri olarak ifade edilirler. Gerektiğinde bu proteinler, proteolitik olarak parçalanabilir ve çözülebilirler. Ancak çözünebilen ligandların, apoptozu indükleme kapasitesi zara bağlı ligandlara kıyasla daha düşüktür (Guicciardi ve Gores, 2009).

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler

10, 200, 1000, 5000 µL'lik mikropipet uçları (Axygen, İngiltere),

15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya),

25 ve 75 cm²'lik hücre kültür flaskları (T25 ve T75 Flasklar; Greiner bio-one, Amerika)

2 mL'lik Ependorf tüp (Greiner bio-one, Amerika),

12 kuyulu 5 mL'lik rezervuarlar (Isolab, Almanya)

5 ve 10 mL'lik steril enjektör (Hayat, Türkiye),

5-10 ve 25 mL'lik tek kullanımlık serolojik pipet (Costar, Sigma-Aldrich, Almanya),

6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası (TPP, İsviçre),

Lamel (Isolab, Almanya),

Filtre (Sartorius stedim, Almanya);

Karyotüp (2 mL) (Greiner bio-one, Amerika),

Parafilm (Pechiney, Fransa),

pH indükatör kağıdı (Macherey- Nagel, Almanya),

Thoma lamı (Marienfeld, Almanya),

NIH/3T3 hücre hattı (ATCC,Amerika),

L-929 hücre hattı (ATCC, Amerika),

MDA-MB-231 hücre hattı (ATCC, Amerika),

MCF-7 hücre hattı (ATCC, Amerika),

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide %98, Alfa Aesar, Almanya),

Fosfat tamponu (PBS, Sigma-Aldrich, Almanya),

Dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma–Aldrich, Almanya),

Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma-Aldrich, Almanya),

Penisilin-streptomisin Solüsyonu (10.000 U/mL Penicillin / 10 mg/mL Streptomycin, PAN, Almanya),

İnsan epidermal büyüme fakötrü (rhEGF, Promega, Amerika),

Cis-Diamineplatium(II) dichloride (Sigma Aldrich, Amerika),

Tamoxifen (Sigma Aldrich, Amerika),

L-glutamin (Sigma-Aldrich, Almanya),

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, Almanya),

Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM; Sigma-Aldrich, Almanya),

Phenol Red free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, Almanya),

M3 Base Medium (Incell Corporation, Amerika),

Fetal Bovine Serum, Charcoal Stripped (Capricorn Scientific, Almanya)

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Sigma-Aldrich, Almanya),

Hepes Buffer (Pan Biotech, Almanya),

Mem Vitamin solution (Pan biotech, Almanya),

Sodyum pirüvat (Biochrom AG, Almanya),

Tripan mavisi (Biological Industries, İsrail)

Tripsin-EDTA Solüsyonu (Biochrom, Almanya),

Canlı Hücre Görüntüleme Solüsyonu (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Amerika),

Annexin V-FITC/PI Apoptoz Tayin Kiti 1 (BD Biosciences, Amerika),

PE Active Caspase-3 Tayin Kiti (BD Biosciences, Amerika),

MitoScreen (JC-1) Membran Potansiyeli Tayin Kit (BD Biosciences, Amerika),
4'-Aminoasetofenon (Sigma-Aldrich),
Aseton (Merck, Almanya),
4-(1*H*-1,2,4-Triazol-1-il)benzaldehit (Sigma-Aldrich, Almanya),
4-(1*H*-İmidazol-1-il)benzaldehit (Sigma-Aldrich, Almanya),
4-(2-Morfolinoetoksi)benzaldehit (Maybridge, İngiltere),
4-(4-Metilpiperazin-1-il)benzaldehit (Maybridge, İngiltere),
4-(4-Morfolino)benzaldehit (Sigma-Aldrich, Almanya),
4'-(Metilsülfonil)asetofenon (Sigma-Aldrich, Almanya),
4-(Piperidin-1-il)benzaldehit (Maybridge, İngiltere),
4-[2-(Dimetilamino)etoksi]benzaldehit (Maybridge, İngiltre),
4-[3-(Dimetilamino)propoksi]benzaldehit (Sigma-Aldrich, Almanya),
Absolü etanol (J.T. Baker, Hollanda),
Dimetil sülfoksit-*d*₆ (DMSO-*d*₆) (Merck, Almanya),
Sodyum hidroksit (Sigma-Aldrich, Almanya),
Etanol (Merck, Almanya),
Etilasetat (Sigma-Aldrich, Almanya),
3-Hidroksi-4-metoksibenzaldehit (Sigma-Aldrich, Almanya),
Kloroasetilklorür (Sigma-Aldrich, Almanya),
Kloroform (Merck, Almanya),
p-Toluensülfonil klorür (Sigma-Aldrich, Almanya),
Hidrazin hidrat (Sigma-Aldrich, Almanya),
Etil piperazinoasetat (Sigma-Aldrich, Almanya),

Metanol (Merck, Almanya),
Potasyum karbonat (Sigma-Aldrich, Almanya),
Petrol eteri (Sigma-Aldrich, Almanya),
Sodyum bikarbonat (Sigma-Aldrich, Almanya),
Trietilamin (Sigma-Aldrich, Almanya),

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Inverted mikroskop (Leica, Almanya),
Mulltimod Mikroplaka Okuyucu HTX Synergy AFL (ELISA Reader, BioTek, Amerika),
Mulltimod Mikroplaka Okuyucu Görüntüleme Sistemi (Cytation 5, BioTek, Amerika),
Akış sitometri cihazı (BD, FACS Aria I Cell Sorter, Amerika),
Stratagene Mx3005P RT PCR Isıl Döngü Cihazı (Agilent Technologies, Amerika),
Laminar Flow kabin (Mars Scanlaf, Labogene ApS, Danimarka),
HeraSafe KS Moleküler Biyoloji Laminar Kabin (Thermo, Kanada),
Masaüstü soğutmalı santrifüj (Hettich Lab Teknoloji, Almanya),
Derin dondurucu buzdolabı (Nuaire, Amerika),
Steril CO2 inkübatörü (Panasonic, Japonya),
Sterilizatör (Heraeus, Almanya),
Su banyosu (Nüve, Türkiye),
Sıvı azot tankı (Taylor Wharton, Amerika)
Hassas terazi (Mettler Toledo, Amerika),
Otoklav (Eryiğit A.Ş. Türkiye),
Orbital çalkalayıcı (Heidolph, Almanya)
Şarjlı pipetör (Starlab, Almanya),

Farklı hacimlerde otomatik mikropipetler (Thermo, FinnPet, Kanada),

Vorteks (Heidolph, Almanya),

Distile Su Cihazı (Sartorius Stedim, Almanya),

Ultrasonik Su Banyosu (BD, ProbeTecET, Amerika),

Mr. Frosty (Nalgene, Amerika),

Erime Derecesi Cihazı: MP90 digital melting point apparatus (Mettler Toledo, Columbus, Amerika),

¹H-NMR: Bruker 300 MHz FT-NMR Spektrometre (Bruker Bioscience, Billerica, MA, Amerika),

¹³C-NMR: Bruker 75 MHz FT-NMR Spektrometre (Bruker Bioscience, Billerica, MA, Amerika),

Kütle Spektrometresi (MS): Shimadzu LCMS-IT-TOF system (Shimadzu, Tokyo, Japan),

Elemental analiz cihazı (PerkinElmer, Amerika Birleşik Devletleri),

Erime derecesi tayin cihazı (Mettler-Toledo MP90, Amerika Birleşik Devletleri),

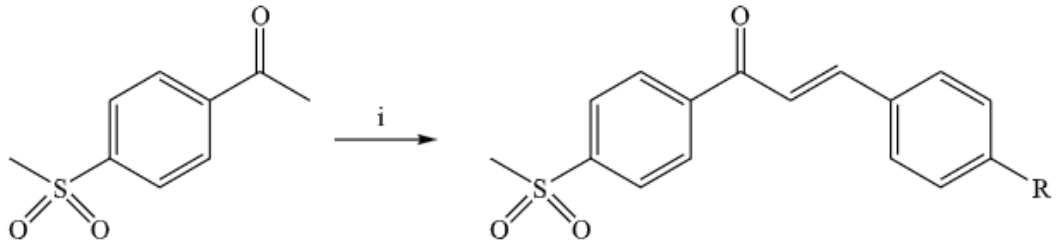
Hassas terazi (Mettler-Toledo, Amerika Birleşik Devletleri),

Magnetik tabanlı ısıtıcı karıştırıcı (Heidolph, Almanya),

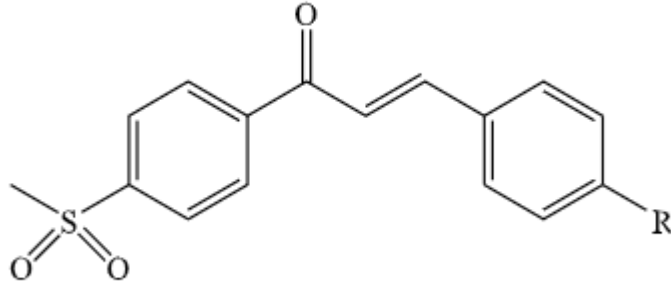
3.2. Metodlar

3.2.1. Şalkon Türevlerinin Genel Sentez Yöntemi

Eşdeğer miktar 4'-(metilsülfonil)asetofenon ve aromatik aldehit, %40'luk sodyum hidroksit çözeltisi varlığında etanol içinde 24 saat oda sıcaklığında karıştırılır ve buzdolabında 24 saat bekletilir. Karışım buzlu su içine dökülür. Çöken madde süzülerek alınır, su ile yıkanır ve kurutulur. Şekil 3.1'de gösterildiği gibi, Elde edilen madde uygun çözücü ile saflaştırılır.



Şekil 3.1. Şalkon türevli bileşiklerin sentez şeması (i) Ar-CHO, %40'luk NaOH çözeltisi, etanol, oda sıcaklığı, 24 saat



Şekil 3.2. Sonuç bileşiklerinin sentez şeması

Çizelge 3.1. Şalkon türevi bileşiklerinin verimleri ve erime noktaları

Bileşik	R	Verim (%)	Erime Noktası (°C)
3	Morfolinil	85	202-203
4	Piperidinil	79	245-246
5	4-Metilpiperazin-1-il	81	198-199
6	1H-İmidazol-1-il	87	209-210
7	1H-1,2,4-Triazol-1-il	86	230-231
8	2-(Dimetilamino)etoksi	83	212-214
9	3-(Dimetilamino)propoksi	80	194-197
10	2-Morfolinoetoksi	77	197-198

3.1.1.2. Şalkon Türevi Bileşiklere ait Spektroskopik Verilerin Değerlendirilmesi

1-(4-(Metilsülfonil)fenil)-3-(4-morfolinofenil)prop-2-en-1-on (3)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 3.28 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 3.32 (s, 3H), 3.73 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 6.99 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.31 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H).

Elementel analiz : C₂₀H₂₁NO₄S için

Hesaplanan : C, 64.67; H, 5.70; N, 3.77.

Bulunan : C, 64.64; H, 5.72; N, 3.78.

1-(4-(Metilsülfonil)fenil)-3-(4-(piperidin-1-il)fenil)prop-2-en-1-on (4)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1.57 (brs, 6H), 3.28-3.33 (m, 7H), 6.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.05 (t, *J* = 8.0 Hz, 8.8 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.62-7.69 (m, 2H), 7.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H).

Elementel analiz : C₂₁H₂₃NO₃S için

Hesaplanan : C, 68.27; H, 6.27; N, 3.79.

Bulunan : C, 68.28; H, 6.25; N, 3.81.

3-(4-(4-Metilpiperazin-1-il)fenil)-1-(4-(metilsülfonil)fenil)prop-2-en-1-on (5)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 2.21 (s, 3H), 2.43 (t, *J*= 4.98 Hz, 4H), 3.30 (s, 3H), 3.35 (t, *J*= 4.98 Hz, 4H), 6.98 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H), 7.71-7.72 (m, 2H), 7.74 (d, *J*= 8.8 Hz, 2H), 8.08 (d, *J*= 8.0 Hz, 2H), 8.31 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H).

Elementel analiz : C₂₁H₂₄N₂O₃S için

Hesaplanan : C, 65.60; H, 6.29; N, 7.29.

Bulunan : C, 65.63; H, 6.28; N, 7.27.

3-(4-(1H-İmidazol-1-il)fenil)-1-(4-(metilsülfonil)fenil)prop-2-en-1-on (6)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 3.34 (s, 3H), 7.19 (d, *J*= 7.6 Hz, 1H), 7.24 (d, *J*= 8.4 Hz, 1H), 7.33-7.73 (m, 9H), 7.84 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H).

Elementel analiz : C₁₉H₁₆N₂O₃S için

Hesaplanan : C, 64.76; H, 4.58; N, 7.95.

Bulunan : C, 64.74; H, 4.59; N, 7.96.

3-(4-(1H-1,2,4-Triazol-1-il)fenil)-1-(4-(metilsülfonil)fenil)prop-2-en-1-on (7)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 3.36 (s, 3H), 7.46-7.74 (m, 6H), 7.85 (d, *J*= 7.6 Hz, 2H), 8.06-8.14 (m, 2H), 8.98 (s, 1H), 9.10 (s, 1H).

Elementel analiz : C₁₈H₁₅N₃O₃S için

Hesaplanan : C, 61.18; H, 4.28; N, 11.89.

Bulunan : C, 61.15; H, 4.29; N, 11.91.

3-(4-(2-(Dimetilamino)etoksi)fenil)-1-(4-(metilsülfonil)fenil)prop-2-en-1-on (8)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 2.88 (s, 6H), 3.34 (s, 3H), 3.55 (t, *J*= 4.56 Hz, 4.80 Hz, 2H), 4.38 (t, *J*= 4.53 Hz, 4.83 Hz, 2H), 6.64 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H), 7.14-7.33 (m, 2H), 7.43-7.66 (m, 4H), 7.82 (d, *J*= 8.0 Hz, 2H).

Elementel analiz : C₂₀H₂₃NO₄S için

Hesaplanan : C, 64.32; H, 6.21; N, 3.75.

Bulunan : C, 64.34; H, 6.20; N, 3.73.

3-(4-(3-(Dimetilamino)propoksi)fenil)-1-(4-(metilsülfonil)fenil)prop-2-en-1-on (9)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 1.99-2.08 (m, 2H), 2.88 (s, 6H), 2.91-2.95 (m, 2H), 3.31 (s, 3H), 4.05-4.08 (m, 2H), 6.67 (d, *J*= 7.6 Hz, 2H), 7.22-7.24 (m, 2H), 7.47-7.75 (m, 4H), 7.84 (d, *J*= 8.0 Hz, 2H).

Elementel analiz : C₂₁H₂₅NO₄S için

Hesaplanan : C, 65.09; H, 6.50; N, 3.61.

Bulunan : C, 65.05; H, 6.52; N, 3.63.

3-(4-(2-Morfolinoetoksi)fenil)-1-(4-(metilsülfonil)fenil)prop-2-en-1-on (10)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 2.36-2.38 (m, 4H), 2.76 (t, *J*= 5.60, 6.00 Hz, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.56 (t, *J*= 4.80 Hz, 4H), 4.13 (t, *J*= 6.00 Hz, 2H), 6.69 (d, *J*= 7.6 Hz, 2H), 7.24 (d, *J*= 8.0 Hz, 2H), 7.47-7.73 (m, 4H), 7.84 (d, *J*= 8.0 Hz, 2H).

Elementel analiz : C₂₂H₂₅NO₅S için

Hesaplanan : C, 63.60; H, 6.06; N, 3.37.

Bulunan : C, 63.63; H, 6.04; N, 3.36.

3.3. Kullanılan Maddelerin Hazırlanması

3.3.1. Sentezlenen bileşiklerin Hazırlanması

Sentezlenen bileşikler kendi moleküler ağırlıklarına göre hesaplanıp ana stok konsantrasyonu 40 mg/mL olacak şekilde tartıldıktan sonra 500 µL DMSO içinde çözdürülüp ana stok olarak hazırlanmıştır. Bu ana stoklardan çalışmalarda kullanılmak için 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 ve 3.90625 µg/mL konsantrasyonları hazırlanmıştır. Konsantrasyonlarda en yüksek DMSO oranı %0,1 olarak şekilde ayarlanmıştır. Her analiz için bu adımlar tekrarlanıp taze ana stoklar elde edilmiştir.

3.3.2. Sisplatinin Hazırlanması

Toz halinde Acros Organics'ten alınan sisplatin, deneylerde pozitif kontrollerden biri olarak kullanılmıştır. Analizler için 20 mg tartılarak 500 µL DMSO içinde çözdürülerek ana stok olarak hazırlanmıştır. 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 ve 3.90625 µg/mL konsantrasyonları hazırlanmıştır. Konsantrasyonlarda en yüksek

DMSO oranı %0,1 olarak şekilde ayarlanmıştır. Her analiz için bu adımlar tekrarlanıp taze ana stoklar elde edilmiştir.

3.3.3. Tamoksifenin Hazırlanması

Toz halinde Acros Organics'ten alınan tamoksifen, deneylerde pozitif kontrollerden biri olarak kullanılmıştır. Analizler için 20 mg tartılarak 500 µL DMSO içinde çözdürülerek ana stok olarak hazırlanmıştır. 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 ve 3.90625 µg/mL konsantrasyonları hazırlanmıştır. Konsantrasyonlarda en yüksek DMSO oranı %0,1 olarak şekilde ayarlanmıştır. Her analiz için bu adımlar tekrarlanıp taze ana stoklar elde edilmiştir.

3.4. Deneylerde Kullanılan Hücreler

3.4.1. İnsan meme karsinoma epitel hücre hattı (MCF-7)

Çalışmalarda kullanılan MCF-7 hücre hattı American Type Collection (ATCC) kuruluşundan CRL-3435TM Ticari kodu ile satın alınmıştır. MCF-7 hücre hattı insan 69 yaşında Kafkasyalı bir kadından alınmış östrojen reseptörü pozitif bir hücre hattıdır. Hücreler tek tabakalı, yapışkan ve kültür flasklarında çoğalabilmektedir.

Hücre hatları ATCC'nin önerdiği şekilde, %10 fetal sığır serumu, %1 penisilin/streptomisin, içeren DMEM besiyerinde, %5 oranında CO₂ ve %92 bağıl nem içinde 37°C inkübatörde kültür ortamında çoğaltılmıştır. 2-3 günde bir besi yeri değiştirilerek yenilenmiştir.

3.4.2. İnsan meme adenokarsinoma epitel hücre hattı (MDA-MB-231)

Çalışmalarda kullanılan MDA-MB-231 hücre hattı American Type Collection (ATCC) kuruluşundan CRM-HTB-26TM ticari koduyla satın alınmıştır. MDA-MB-231 hücre hattı 51 yaşında Kafkasyalı bir kadından alınmış, östrojen reseptörü negatif olan bir hücre hattıdır. Hücreler tek tabakalı yapışkan ve kültür flasklarında çoğalabilmektedir.

Hücre hatları ATCC'nin önerdiği şekilde, %10 fetal sığır serumu, %1 penisilin/streptomisin, içeren DMEM besiyerinde, %5 oranında CO₂ ve %92 bağıl nem

içinde 37°C inkübatörde kültür ortamında çoğaltılmıştır. 2-3 günde bir besi yeri değiştirilerek yenilenmiştir.

3.4.3. Normal fare fibroblast hücre hattı (L-929)

Çalışmalarda kullanılan L-929 hücre hattı American Type Collection (ATCC) kuruluşundan CCL-1tm ticari koduyla alınmış sağlıklı hücre hattıdır. L-929 hücre hattı, 100 günlük erkek fareden alınmış, toksisite deneyleri için kullanılan bir hücre hattıdır.

Hücreler tek tabakalı yapışkan ve kültür flasklarında çoğalabilmektedir. Hücre hatları ATCC'nin önerdiği şekilde, %10 at serumu, %1 penisilin/streptomisin, içeren EMEM besiyerinde, %5 oranında CO₂ ve %92 bağıl nem içinde 37°C inkübatörde kültür ortamında çoğaltılmıştır. 2-3 günde bir besi yeri değiştirilerek yenilenmiştir.

3.4.4. Normal fare embriyo fibroblast hücre hattı (NIH/3T3)

Çalışmalarda kullanılan NIH/3T3 hücre hattı American Type Collection (ATCC) kuruluşundan CRL-1658tm ticari koduyla alınmış sağlıklı hücre hattıdır. NIH/3T3 hücre hattı, dişi fareden alınmış, toksisite deneyleri için kullanılan embriyo hücre hattıdır.

Hücreler tek tabakalı yapışkan ve kültür flasklarında çoğalabilmektedir. Hücre hatları ATCC'nin önerdiği şekilde, %10 at serumu, %1 penisilin/streptomisin, içeren EMEM besiyerinde, %5 oranında CO₂ ve %92 bağıl nem içinde 37°C inkübatörde kültür ortamında çoğaltılmıştır. 2-3 günde bir besi yeri değiştirilerek yenilenmiştir.

3.5. Hücrelerin Kültüre edilmesi ve Deneye Hazırlık

3.5.1. Materyal Sterilizasyonu

Deneyler steril ve tek kullanımlık malzemelerle yapılmıştır. Deneylerde kullanılan cam ve metal malzemeler alüminyum folyo ile tamamen sarılı olarak kuru hava sterilizatöründe 180°C de 2 saat, sıvı solüsyonlar için 121°C, 1.5 atmosferlik basınç

altında otoklavda 20 dakika arındırma işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Otoklavlanamayacak sıvılar ise 0,22 mikronluk filtreler ile steril edilmiştir.

3.5.2. Hücrelerin Stoklanması ve Pasajlanması

Çalışmalarda kullanılan MCF-7, MDA-MB-231, L-929 ve NIH/3T3 hücre hatları, ilgili besiyerleri içerisinde 100µl DMSO eklenerek 2mL hacimli viallere koyulmuş ve vialler Mr. Frosty içerisinde -86°C bir gece bekletildikten sonra sıvı azot tankına (-196°C) alınarak daha sonra kullanılmak üzere stok edilmiştir.

Çalışmada kullanılacak hücreler sıvı azot tankında alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek stok yapımı sırasında eklenen DMSO uzaklaştırılmıştır. Hücre hatları ilgili besi yerlerinde inkübatörde çoğaltılmıştır. Besi yerleri 2-3 günde düzenli olarak tazelenmiştir. Kültür flaskları %70 doluluk oranına ulaştığında alt kültüre alınarak çoğaltması sağlanmıştır.

3.5.3. Hücre hatları sayımı

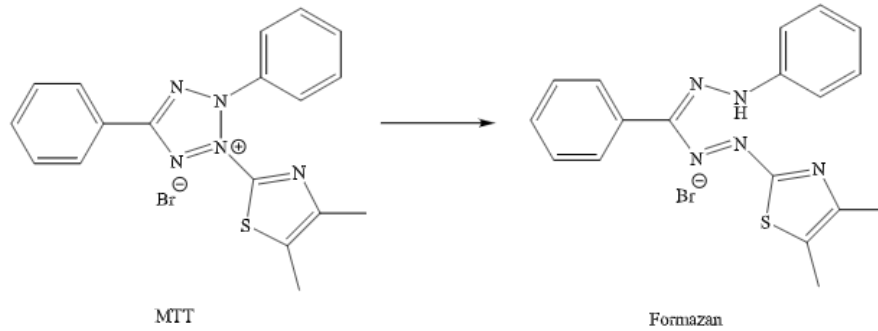
Deneyler için kültürü yapılan hücre hatları 1x PBS (phosphate saline buffer) ile ikişer kez yıkanmıştır. Kültür flasklarının boyutu ve hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak 0,5-1 mL Tripsin-EDTA solüsyonu eklenmiş ve inkübatörde bekletilerek hücrelerin flaskın yüzeyi ile olan bağlantısının kesilmesi beklenmiştir. Tripsin-EDTA inhibisyonunu sağlayabilmek için flasklara 5mL ilgili besi yeri eklenip, hücreler 15mL'lik falkon tüplere alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda, süpernatant dökülerek, kalan pellete 1 mL uygun besiyeri eklenerek pipetleme yardımıyla homojenize edilmiştir. Yapılan bütün deneylerden önce hücreler sayılarak hesaplanmıştır. Hücre sayımı için tripan mavisi solüsyonundan bire bir oranında karıştırılarak Thoma lamında sayım yapılmıştır. Sayım için aşağıda ki formül kullanılmıştır.

$$\text{Toplam hücre sayısı} = 16 \text{ büyük karedeki hücre sayısı} \times 10,000 \times \text{dilüsyon sayısı}$$

3.6. Sitotoksosite Belirleme Testleri

3.6.1. MTT yöntemi ile hücre sitotoksitelerinin belirlenmesi

Hücrelerin toksisite ve canlılığının belirlenmesi birçok test ile yapılabilmektedir. Çalışma sırasında MTT analizi yapılmıştır. MTT analizi ilk defa Mossman tarafından 1983 yılında yapılarak tanımlanmış bir analiz olmuştur. MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) sarı renkli ışımaya duyarlı bir boyadır. Çalışma prensibi sağlıklı hücrelerde mitokondriyal süksinik dehidrojenazın MTT tetrazolyum tuzunun formazan kristallerine dönüşmesine dayanmaktadır. Oluşan formazan kristalleri DMSO içerisinde çözdürülerek plaka okuyabilen spektrofotometride okutularak formazan kristali miktarı belirlenir. Mitokondri fonksiyonu bozulmuş olan hücreler ölü kabul edilerek, canlılık miktarı belirlenir (Mossman,1983).



Şekil 3.3. MTT molekülünün mitokondriyal redüktaz analiz sonunda formazan kristaline dönüşümü.

3.6.2. Yöntemin uygulanması

Deneylerde kullanılan sentez maddeler ve pozitif kontroller olan sisplatin, tamoksifenin *in vitro* sitotoksiteleri MTT analizi belirlenmiştir. Flasklarda inkübatör içerisinde kültüre edilen hücreler, 96 kuyucuklu plakalara, kuyucuk başı 5×10^3 sayıda olacak şekilde sayılıp 200 μ L besi yeri içerisinde kuyucuklara ekimi yapılmış ve 24 saatlik inkübasyona bırakılarak bir gece beklenmiştir. Bekleme sonunda hücrelerin besi yerleri

değiştirilerek üzerlerine 100 µL yeni besi konulmuştur. Hürelere vermeden önce laminar kabin içerisinde ayarlanan sentez madde ve pozitif kontrollerin konsantrasyonları 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 ve 3.90625 µg/mL olarak kuyucuklara 100 µL olarak uygulanmıştır. Plakalar inkübatörde 24-48 saat süresince bekletilerek okumaya hazır hale gelmiştir. Okuma yapma öncesinde 1xPBS içerisinde 5 mg/mL olacak şekilde MTT tozu eklenerek solüsyon hazırlanmıştır. Boya eklenen plakalar 2-4 saat süresince inkübatörde bekletilmiştir. Bekleme sonunda besiyeri uzaklaştırılarak, formazan kristallerinin çözülebilmesi için 100 µL DMSO eklenmiştir. Plakaların ışık görmesini engellemek için alüminyum folyo ile sarılarak oda sıcaklığında orbital çalkalayıcı ile süspanse edilmiştir. Plakalar işlem sonunda 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik mikropilaka okuyucuda okunmuştur.

3.6.3. İnhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi

Spektrofotometrinin sağlamış olduğu absorbans değerleri hücre canlılığı olarak kabul edilmektedir. Hesaplama işlemi aşağıda verildiği gibidir.

$$\% \text{ Canlılık} = \text{örneğin absorbans değeri} / \text{Kontrolün absorbans değeri} \times 100 \quad (3.1)$$

Hesaplama sonuçlarına göre hücre popülasyonun %50'sinin inhibisyonunu sağlayan konsantrasyon IC₅₀ ve %50 inhibisyonun yarısını sağlayan IC_{50/2} değerleri belirlenmiştir. Bulunan konsantrasyonlar apoptoz belirleme ve gen aktivasyon / inhibisyon deneylerinde kullanılmıştır.

3.7. Akış Sitometrisi Cihazı ile yapılan deneyler

3.7.1. Annexin V-FITC/PI yöntemi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi

Annexin V-FITC/PI yönteminin çalışma mekanizması, apoptotik hücrelerin, fosfodiesterlerinin ve DNA ya da RNA'larında meydana gelen bozulmalara/değişimlere dayanmaktadır. Sağlıklı hücrelerde fosfotidil serinler (PS), hücre membranının iç kısımlarında lokalize olmuş durumdadırlar. Bir hücrenin apoptotik sürece girmesi ile bu PS'ler iç membrandan dış membrana doğru mobilize olmaktadır. Bu yer değiştirme sırasında membranın bütünlüğü bozulmadığı için bu evreye erken apoptotik evde

denilmektedir. Propidyum iyodür (PI) ise membran bütünlüğü bozulmuş olan hücrelerin içine girip DNA ya da RNA ya bağlanarak kırmızı renkte floresan veren bir boyadır. Hücre zarında translokasyon meydana gelmemiş olan ve hücre membranında herhangi bir bozulma olmayan hücrelerin ise PI geçirgenliği yoktur. Yalnızca ölen ya da membranında hasarlı olan hücrelerin içine geçebilen PI, geç apoptoz veya nekroz aşamasında ki hücreleri görüntülemiş olur (Van England vd., 1998).

3.7.1.1. Yöntemin uygulanması

Deney prosedürü, kit üreticisinin belirlediği şekilde ilerlemiştir. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları 6 kuyucuklu plakalara, kuyucuk başına 3×10^5 sayıda 2mL besiyerinde ekilmiştir ve 24 saat inkübasyona bırakmıştır. İnkübasyon sonunda 2mL'lik besiyerleri değiştirilerek taze besiyerleri eklenmiştir. MTT sonucu belirlenen IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonları 2mL besiyerindeki hücrelere uygulanmıştır. 24 ve 48 saatlik etkilerini görebilmek için plakalar inkübasyona bırakmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler ortamlarıyla beraber toplanarak akış sitometrisi tüplerine (flow) konularak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Sonrasında soğuk 1xPBS ile iki kez yıkanarak santrifüj edilmiştir. Kitin içerisinde bulunan 10 x Assay Buffer (AB) distile su ile 1x olarak hazırlanmıştır. Her tüpe 100 μ L assay buffer eklenerek nazikçe pipetlenmiştir. Sonrasında 5 μ L Annexin V, 5 μ L PI eklenerek hücreler oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bekleme sonunda tüplere 400 μ L hazırlanmış olan 1x Assay buffer eklenerek akış sitometrisi cihazında okuması sağlanmış, erken/geç apoptotik ve nekrotik hücre miktarları pozitif kontrollere göre hesaplanmıştır.

3.7.2. JC-1 boyama ile hücrelerin mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi

Mitokondriyal solunum zincirindeki oksidasyon reaksiyonları sırasında bir enerji salınmaktadır ve bu salınan enerji mitokondriyal membran boyunca bir elektrokimyasal gradyan olarak depolanmaktadır. Bu elektrokimyasal gradyan, $\Delta\Psi_m$ olarak ifade edilmektedir. $\Delta\Psi_m$ 'nin çöktüğü durumlar genellikle erken apoptotik süreçte meydana gelmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda apoptozun ilk basamaklarından birisinin mitokondrinin depolarizasyonu olduğu bildirilmiş ve hatta sitokrom-C salınımı olmazsa

olmaz bir koşul olduğu iddia edilmiştir. $\Delta\Psi_m$ değişiklikleri sadece apoptotik değil nekrotik süreçte de meydana geldiği bilinmektedir.

Akış sitometrisi hemen tüm hücrelerde $\Delta\Psi_m$ analizinde tercih edilen bir tekniktir. Lipofilik ve katyonik florokromlar $\Delta\Psi_m$ problemleri olarak kullanılır; hücrelere penetre olur ve floresanı $\Delta\Psi_m$ 'yi yansıtmaktadır. JC-1 (5,5', 6,6'-tetrakloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolkarbosiyanin iyodid), $\Delta\Psi_m$ 'nin durumunu değerlendirmek için kullanılan lipofilik bir florokromdur. JC-1'in floresan emisyon spektrumu, JC-1 konsantrasyonuna bağlı olarak $\Delta\Psi_m$ 'nin durumuna göre belirlenmektedir. JC-1 agregat veya monomer şeklinde, her biri emisyon spektrumuna sahip farklı duruma sahiptir. Düşük boya konsantrasyonlarda agregatlar oluşmaktadır. JC-1'nin agregat ve monomer şeklinde her iki formu da akış sitometrisinde FL-1 (yeşil) kanalında ölçülen spektrumun en sonunda yeşil floresan şeklinde görülmektedir. Canlı hücreler JC-1 boyası ile inkübe edildiğinde, JC-1 hücrelerin plazma membranına monomerler olarak nüfuz eder. JC-1'in mitokondriye alınması $\Delta\Psi_m$ tarafından kontrol edilmektedir. Normal, sağlıklı mitokondrinin $\Delta\Psi_m$ 'si polarizedir ve JC-1 böyle mitokondri tarafından hızla alınmaktadır. Bu alım JC-1 boyasının konsantrasyonun gradyanını arttırmakta ve mitokondride agregat (J-agregatları) oluşumuna yol açmaktadır. Agregatlar, çoğu akım sitometrisine FL-2 (Kırmızı) kanalında ölçülür (Kuo vd., 2008; Reers vd., 1995)

3.7.2.1. Yöntemin uygulanması

Mitokondriyal membranın bütünlüğünün tespiti için kullanılan bu yöntem kit prosedürünün belirlediği şekilde ve MCF-7, MDA-MB-231 hücre hatları için yapılmıştır. 6 kuyucuklu plakalara 2 mL besi yeri içinde 3×10^5 sayıda ekilerek 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında besiyerleri tazelenerek MTT analizleri ile belirlenen IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozları 2mL içinde ki hücrelere uygulanarak 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonlar sonrasında hücreler kaldırılarak eski besiyerleriyle birlikte akış sitometri tüplerine aktarılmıştır. Hücreler oda sıcaklığında iki kez soğuk 1 x PBS ile yıkanarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant uzaklaştırılarak, kalan pellete kit içeriğinde bulunan Assay buffer (AB) içerisinde hazırlanan JC-1 boyasından her bir tüpüne 0.5 mL eklenerek nazikçe pipetlenmiştir. 15 dakika inkübatörde bekletilen hücreler, sonrasında önce 2'ser mL, daha sonra 1'er mL

çalışma solüsyonu ile 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj ile yıkanarak süpernatant uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrasında tüplere 0.5 mL çalışma solüsyonu eklenerek nazikçe pipetlenmiş ve akış sitometrisi cihazında analiz edilip, elde edilen sonuçlar pozitif kontrollere göre hesaplanmıştır.

3.7.3. Kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkilerin belirlenmesi

Prokaspaz 3, apoptoz sırasında bölünme ile aktive olan bir proenzimdir. Elde edilen enzim kaspaz 3 ve 7'nin bütün substratları (DEVDase) için ortak olan bir DEVD sekansının ikinci aspartatından sonra birkaç hedef proteini parçalayabilir. Aktifleşmiş olan kaspaz-3 apoptoz olayında ortak bir efektör olduğundan, akış sitometrisinde apoptotik hücrelerin saptanmasında önemli bir belirteçtir (Belloc vd., 2000).

3.7.3.1. Yöntemin uygulanması

Kaspaz-3 aktivitesini belirlemek için kullanılan yöntem, kit prosedürünün belirttiği şekilde MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında yapılmıştır. 6 kuyucuklu plakalara 2 mL besi yeri içinde 3×10^5 sayıda ekilerek 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında besiyerleri tazelenerek MTT analizleri ile belirlenen IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozları 2mL içinde ki hücrelere uygulanarak 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonlar sonrasında hücreler kaldırılarak eski besiyerleriyle birlikte akış sitometri tüplerine aktarılmıştır. Tüpler ikişer kez soğuk 1x PBS ile yıkanmış ve her yıkama sonrasında 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kit içeriğinde bulunan Cytotfix/Cytoperm solüsyonundan her tüpe 0.5 mL konularak 20 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Bekleme sonunda santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Distile su ile 1 x haline getirilen Perm/Wash tampon çözeltisinden tüplere 0.5 mL eklenerek 2 kez yıkanmıştır. Öncesinde 100 µL 1 x Perm/Wash solüsyonu içerisine 20 µL antibody eklenerek hazırlanmış olan çözeltiden tüplere eklenmiş ve hücreler 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücrelere 0,5 mL 1 x Perm/Wash tampon çözeltisi eklenerek akış sitometri cihazında kaspaz-3 aktivitesi analiz edilmiştir.

3.8. RT- PCR (Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) Yöntemi ile PPAR-, Bcl-2, Bax, CYD1, cMYC, ERK, pERK Genlerinin İfadelerinin (ekspresyon) Belirlenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), basitçe *in vitro* koşullarda belirlenmiş olan DNA parçasının enzimatik yollarla kopyalanması ve çoğaltılması yöntemidir. Bu teknik ilk defa 1985 yılında Kary Mullis tarafından uygulanmış ve geliştirilmiştir, kendisine 1993 yılı Nobel Kimya Ödülünü kazandırmıştır. Moleküler biyoloji teknikleri içerisinde en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bu teknikte seçilen DNA dizisi çoğaltılırken diğer diziler baskılanır. Böylece istenilen DNA dizisinin tanımlanması kolaylaşır. Çoğaltılacak olan hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA tamamlayıcısı olan şekilde tasarlanmış olan oligonükleotid primerler, sıcaklığa karşı Taq polimeraz enzimleri başlıca en önemli bileşenlerdir. PCR ürünlerinin analizi ile 3 çeşit bilgiye ulaşılabilmektedir.

1. Hedef DNA dizisinin varlığının ve taşıdığı varyasyonun belirlenmesi,
2. Başlangıç materyali olarak kullanılan DNA veya RNA miktarlarının belirlenmesi için çoğaltılmış PCR ürün miktarının belirlenebilmesi,
3. Dizi analizi.

Ayrıca PCR 3 temel basamaktan oluşmaktadır.

1. Denatürasyon (94°C-98°C / 15 saniye): DNA sarmalının yüksek sıcaklıklarda birbirinden ayrılması basamağı.
2. Annealing (hibridizasyon) (37°C-65°C / 30 saniye): Sentezlenen oligonükleotid primerlerin istenilen bölgeye bağlanması.
3. Ekstensiyon (uzama) (72°C / 1,5 saniye): Mg iyonları varlığında sıcaklığın yükselmesiyle Taq DNA polimeraz primerleri uzatır ve yeni DNA zinciri sentezlenir.

PCR ürün miktarı bu 3 basamağın tekrar sayısına bağlıdır. İlk Basamakta yüksek sıcaklıklara çıkma sebebi DNA'nın sarmal yapısını koruyan nükleotidler arası hidrojen bağlarının birbirinden kopması ve denatürasyona uğramasıdır. İkinci basamakta sıcaklık düşürülür, bu sayede Taq polimeraz enziminin DNA molekülünü tamamlayıcı primerleriyle (oligonükleotidler) birleşmesi sağlanır. Primerlerin bağlanması ile oluşan ikinci ipliğin oluşumu Taq polimerazın d-NTP (nükleotid trifosfatlar)'ler kullanılarak uzaması ile devam eder. Bu evre polimerizasyon evresidir. Primerler uzatılır ve

primerlerin arasında kalan bölge temizlenir. DNA tekrar denatüre edilir, yeni primerler bağlanır ve DNA sentezi tekrar devam eder. Her döngüde DNA fragmenti miktarı 2 katına çıkmaktadır. Ayrıca ortamda Mg^{++} iyonu kofaktör olarak görev yapmaktadır, eksikliğinde hatalı eşleşmeler olabilmektedir.

PCR analizlerinden önce primer tasarımı yapılmalıdır. Hedeflenen bölgenin çoğaltılması için oraya özgün primerler tasarlanmalıdır. Ortalama primerin boyutu 18-22 baz çiftinden oluşmaktadır. Düşük baz çiftine sahip primer özgünlüğü azaltırken, yüksek sayıda baz çiftinden oluşan primerlerin DNA'ya bağlanması zorlaşır.

Reverse-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR), hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin retro-virüsten izole edilen Reverse transkriptaz enzimi yardımı sayesinde komplementer DNA (cDNA) sentezinin gerçekleşmesi sonucu, gen ekspresyon analizlerinin yapıldığı bir yöntemdir.

PCR'nin 5 önemli bileşenler oluşmaktadır. Bunlar: Kalıp DNA, DNA polimerazlar, Primerler, dNTP karışımı, tamponlar ve Magnezyum.

3.8.1. RNA izolasyonu

PCR analizi öncesi yapılacak ilk adım RNA izolasyonudur. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları bu aşamada kullanılmıştır.

Kontrol grubu olarak tamoksifen veya sentezlenen bileşiklerin uygulanmadığı MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının flaskları seçilmiştir. Deney grubu olarak seçtiğimiz MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları gruplarına ise MTT analizi sonuçlarına göre belirlediğimiz IC_{50} dozları uygulanıp ardından 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. RNA izolasyonu kit protokolüne yapılmıştır.

Hücreler flasklardan önce Trypsin-EDTA yardımıyla tutundukları yüzeyden kaldırılmıştır, trypsinin inhibisyonunu besiyeri ekleyerek sağlanmıştır. Hücreler 15 mL'lik tüplere konularak santrifüj edilmiş süpernatant dökülmüştür. Sonrasında PBS ile yıkanmıştır.

Hücreler mikrosantrifüj tüplerine 1×10^5 olacak şekilde bölünmüştür. Tüpler 4°C 'de 2000 rpm'de santrifüj edilip süpernatant dökülmüş ve içerisinde $5 \mu\text{L}$ 'den fazla PBS kalmamasına dikkat edilmiştir.

100 μL Script RT-PCR numune hazırlama reaktifi (Sitoplazmik RNA'nın izolasyon ve stabilizasyonu için liziz tamponu) eklenmiştir. Ardından 30 saniye vortekslenmiştir.

15.000 rev'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve pellete dokunulmadan süpernatant dikkatlice toplanmıştır.

PCR analizi Bio-Rad'ın IQTM SYBR® Green Supremix veya IQTM süpermix'inde verilen talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. İşlemler için deney olarak kullandığımız hücre hatlarımıza uygun Housekeeping gen olan GAPDH seçilmiştir ve uygun primerler kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. RT-PCR analizi primerleri

Gen sembolü	Sekanslar	Primer	Ürün uzunluğu (bp)
Ppar-gamma	CACAAGAACAGATCCAGTGGTTGCAG	Forward	101
	AATAATAAGGTGGAGATGCAGGCTCC	Reverse	
Bcl-2	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC	Forward	196
	TGAGCAGAGTCTTCAGAGACAGCC	Reverse	
Bax	AGCAAACCTGGTGCTCAAGG	Forward	93
	GCTCAGGCAGGTGAATCG	Reverse	
CYD1	AATGACCCCGCACGATTT	Forward	134
	GATTGGAATGAACTTCACATCT	Reverse	
MYC	TCGGTGGTCTTCCCCTACC	Forward	358
	CTGCGTAGTTGTGCTGATGT	Reverse	
Mapk1 (ERK)	TGTGGAGCAGTATTACGACCC	Forward	134
	CTGGCTGGAATCTAGCAGTCT	Reverse	
pERK	CGGAACCAGACGATGAGACA	Forward	127
	ACATCCAAATCCCCTGCTT	Reverse	

Kendi hücre hatlarımızın analiz sonucunda etkin RNA miktarını görmek için sonuçlar değerlendirilmiş ve IScript RT-qPCR numune hazırlama reaktifi tarafından işlenebilecek maksimum hücre konsantrasyonunu belirlemek için hücre konsantrasyonun loğuna karşı Plot Ct değerleri olarak çizilmiştir.

3.8.2. Komplementer DNA (c-DNA) sentezi

RT-PCR analizi için MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarından izole edilen RNA'lardan hem kontrol grubu için hem de deney gruplarının analizleri için c-DNA sentezlenmiştir. c-DNA sentezleri kit protokolüne uygun yapılmıştır.

2 µL'lik nükleaz içermeyen (DNA/RNA Free) tüpler kullanılmıştır.

Deney grubu olarak ayrılan tüplerin içerisine 4µL, 5x IScript reaksiyon karışımı, 1 µL IScript reverse transkriptaz, 7.5 µL RNA templatı (1 µg RNA) ve 7.5 µL nükleaz içermeyen su (DNA/RNA Free water) eklenmiştir. Toplam hacim 20 µL'ye tamamlanmıştır.

Daha sonrasında örnekler PCR cihazına yerleştirilmiş ve 25°C'de 5 dakika, 42°C'de 30 dakika, 85°C'de 5 dakika ve 4°C'de sonsuz olarak termal profil oluşturulmuş ve PCR başlatılmıştır.

Analiz sonunda ise tüpler gerçek zamanlı kantitatif PCR' da kullanılmak üzere 20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.8.3. Supermix, Taqman prob ve primerlerin hazırlanması

Hazırlama ve sulandırma işlemleri supermix, Taqman prob ve primerlerin protokollerine göre yapılmıştır. Supermix hazırlanırken liyofilize pellet şeklinde olan tüpe 1 mL sulandırma çözeltisi eklenmiş ve vortekslenerek 2x supermix çözeltisi hazırlanmıştır. Kullanılana kadar -20°C'de saklanmıştır. RT-PCR sırasında ise ekte bulunan primerler final konsantrasyondan 0,5 uM (pmol/uL) olacak şekilde ayarlanarak çalışma tamamlanmıştır.

3.8.4. Gerçek zamanlı kantitatif PCR analizi

RT-PCR analizi Bio-RAD SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix kit kontrolüne göre gerçekleştirilmiştir. Buradaki SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, gerçek zamanlı herhangi bir PCR cihazında boya bazlı gerçek zamanlı PCR için optimize edilmiş, 2x konsantre, kullanıma hazır bir reaksiyon supermix'idir. Antikor aracılı sıcak başlangıç Sso7d füzyon polimeraz, dNTP'ler MgCl₂, SYBR® Green I boya, arttırıcılar, stabilizatörler ve pasif referans boyalarının bir karışımını içerir.

Çizelge 3.3. RT-PCR bileşenleri

Bileşen	20 µL reaksiyon başına hacim	Final konsantrasyon
SsoAdvanced™ Universal	10 µL	1x
SYBR® Green Supermix (2x)		
Forward ve Reverse Primerler	1 µL	0,5 uM (pmol/µL)
DNA template	7,5 µL	100 ng-100 fg
Nükleaz-Free H ₂ O	1,5 µL	-
Total reaksiyon hacmi	20 µL	-

SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix ve diğer dondurulmuş reaksiyon bileşenlerini oda sıcaklığına getirilir ve iyice karıştırılır, tüpün dibinde kalan çözeltileri toplamak için kısa süre santrifüjlenir, muhafaza edilirken ışıktan korunur ve buz üzerinde saklanır.

Çizelge 3.3.'teki bilgilere göre DNA şablonu hariç tüm gerekli bileşenleri eklenir, tüm qPCR reaksiyonları için (buz üzerinde veya oda sıcaklığında) yeterli reaksiyon karışımı hazırlanır.

Homojenliği sağlamak ve her bir qPCR tüpüne veya bir qPCR plakasının oyuklarına eşit kısımlar dağıtmak için reaksiyon karışımı iyice karıştırılır. Bütün bu işlemler sırasında iyi pipetleme gerekmektedir.

Tüplere veya kuyucuklara DNA numuneleri ve DNA-Free H₂O eklenmiştir.

Kuyucukların olduğu plaka veya tüpler optik olarak geçirgen bir filmle kapatılır ve reaksiyon bileşimlerinin karışmasını sağlamak için 30 saniye vortekslenir. Hava

kabarcığı kalmaması ve reaksiyon karışımını kap altından toplamak için tüpler ve plaka döndürülür.

qPCR tüplerini veya plakasını RT-PCR'a yükledikten sonra cihazın PCR protokolü başlatılır veri analizi yapılır.

3.9. E-Screen Metodu ile Östrojenik Aktivitenin Belirlenmesi

E-Screen testi, Soto ve arkadaşlarının geliştirdiği 1995 yılındaki makalelerinde detaylıca anlatılan, östrojene karşı aktif olan antagonist ya da agonisti olan bileşiklerin, östrojen reseptörü pozitif meme kanseri hücre hattı MCF-7'nin proliferasyon gösterip göstermediğini aydınlatan bir analizdir. Bu analizle östrojen kaynaklı meme kanseri artışı gözlemlenebilmektedir (Soto vd., 1995)

E-Screen analizinin temel çalışma prensibi, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde bulunan östrojen reseptörüne, test edilen bileşiklerin bağlanmasına dayalıdır. Bileşiklerin bağlanması östrojenik aktivite göstergesi olarak kabul edilmiştir. Soule ve arkadaşları tarafından yayımlanan makaleye göre MCF-7 hücre hücrelerinin yüksek oranda 17 β -estradiol reseptörü içerdiği saptanmıştır. Bu reseptörün ligandı ise östrojenik bir steroid hormon olan östradioldür (E2) (Brooks vd., 1973).

Soto ve arkadaşları E-Screen metodunu geliştirdiklerinde, analiz 24 kuyucuklu plakalarda yapılmaktaydı. Ama sonrasında yapılan çalışmalarda 24 ve 96 kuyucuklu plakalarda yapılan karşılaştırmalı deneylerde, önemli bir fark görülmemiştir (Rasmussen ve Nielsen, 2002).

Östrojenlerin ve ksenerojenlerin biyolojik etkileri, östrojen reseptörü tarafından hücrelere alınmaktadır. Östrojen reseptörleri (ER), büyük nükleer reseptör ailesine aittirler, bağlanma sonrasında ise hedeflenen genlerin transkripsiyonunu indüklerler.

Östrojen reseptörler form olarak iki izoforma sahiptirler. Bunlar ER α ve ER β ' dir.

ER α uterusu, östrojen reseptörü ligandının bağlandığı bölgelerde varlık göstermektedir. Meme kanseri vakalarında ekspresyonundaki artış bilinmektedir. ER β ise insan vücudunda hipotalamus merkezi, hipofiz bezi ve prostatta bulunmaktadır. Yine ER β 'nin meme kanseri durumlarında olduğu bilinmektedir.

3.9.1. E-Screen analizi sırasında kullanılacak solüsyonların hazırlanması

Analiz sırasında kullanılacak fenol-kırmızı içermeyen RPMI içerisine %10 aktif kömür-dekstran fetal sığır serumu %1 MEM-NEAA, %1 sodyum pirüvat, %1 L-Glutamin ve %1 HEPES eklenmiştir.

Trikloroasetik asit için, 25 g TCA 250 mL distile su içinde çözdürülmüştür.

Asetik asit için, 990 mL distile su içerisine 10 mL asetik asit eklenerek %1'lik asetik asit çözeltisi hazırlanmıştır.

Sulforadamin B boyası için, 1 g SRB, 250 mL %1'lik asetik çözeltisine eklenerek alüminyuma sarılarak hazırlanmıştır.

Tris-Baz çözeltisi için, 0,3028 g Tris-baz tartılarak 250 mL distile su içerisinde çözdürülmüştür. pH derecesi 10.7' ye göre ayarlanmıştır.

Anastok 17- β östradiol için, 5,4 mg tartılarak 5 mL etanol içerisinde çözdürülmüştür. Plakalara verilmeden önce besiyeri içerisinde dilüe edilerek ve doz aralığı belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak ise 10^{-10} kullanılmıştır (Uslu D.,2011).

3.9.2. E-Screen yönteminin uygulanışı

Soto ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemle beraber, Rasmussen ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem örnek olarak deneylere devam edilmiştir (Soto vd., 1995; Rasmussen ve Nielsen, 2002).

E-Screen analizi için 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 ve 3.90625 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları doz aralığı olarak belirlenip plakalara verilmiştir. Tamoksifenin östrojen reseptörü ile ilişkisi olduğu bilindiği için bileşiklerimiz 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 ile beraber plakalara uygulanmıştır.

Kültüre edilen MCF-7 hücreleri ikişer kez 1xPBS ile yıkılarak tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılmaya hazır hale getirilmiştir. Kaldıran hücreler 15 ml hacimli deney tüplerine konularak 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülüp. Hücre pelletine fenol-kırmızı içeren besi yeri konularak pipetlenmiştir.

Süspansiyon halinde ki hücreler sayılarak 96 kuyucuklu plakada kuyucuk başı 6×10^3 hücre olacak şekilde ekilip ve bir gece plakalar inkübasyona bırakılmışlardır.

Bir gecelik inkübasyonun sonunda hücreler doz verilmek üzere tekrar işleme alınmıştır.

96 kuyucuklu plakalardan, bir gün öncesinde konulmuş olan fenol-kırmızılı DMEM tamamen uzaklaştırılmıştır.

Sonrasında %1 MEM-NEAA, %1 sodyum pirüvat, %1 L-glutamin, %1 HEPES ve hazır alınan %10 aktif kömür-dekstran FBS eklenmiş fenol-kırmızı içermeyen RPMI kuyucuklara eklenerek devam edilmiştir.

Plakalarda 6 negatif (CD-RPMI, %1 etanol), 6 pozitif (CD-RPMI, 10^{-1} M Estradiol) kontrol için yer bırakılmıştır. Ve bu kuyucuklara uygulanmışlardır.

Test edilen bileşiklerin hem östrojenik hem de anti-östrojenik etkilerinin belirlenebilmesi için 8'er doz ve 3'er tekrarlı olarak plakalara uygulanmıştır.

Bileşiklerin östrojenik etkilerinin belirlenebilmesi için kuyucuklara 150 μ L fenol-kırmızı bulundurmeyen RPMI ile hazırlanmış besiyeri ve 50 μ L bileşiklerin belirlenen dozları verilmiştir.

Bileşiklerin anti-östrojenik etkilerinin belirlenmesi için ise kuyucuklara 100 μ L fenol-kırmızısız hazırlanmış besiyeri, 50 μ L belirlenmiş doz ve 50 μ L 10^{-10} M olarak hazırlanmış standart östradiol solüsyonu eklenmiştir.

Uygulamalar sonunda plakalar 144 saatlik inkübasyona bırakılmışlardır.

144 saatlik inkübasyon sonunda plakalardaki besiyerleri hücrelerden uzaklaştırmıştır.

Plakalar, ölü hücre kalıntılarının ortamdaki uzaklaştırılması için oda sıcaklığında bekletilmiş PBS ile 100 μ L kuyucuklara eklenerek yıkanmıştır.

Yıkama sonrası hücreleri yüzeye sabitlemek için buz üstünde devam edilmiştir. Kuyucuklara 100 μ L, %10'luk trikloroasetik asit (TCA) eklenerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika bekletilmiştir.

Bekleme sonrasında TCA'yı plaklardan uzaklaştırmak için 5 kere musluk suyu ile dikkatlice yıkanıp iyice kurtulmuştur.

Plakaların kuruduğundan emin olduktan sonra hürelere %1'lik asetik asit çözeltilisinde hazırlanan %4'lük SRB boyası eklenerek boyanmıştır.

Boyama sonrasında hürelere 20 dakika folyo ile sarılarak karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki fazla TCA boyasını uzaklaştırmak için plakalar boya ortamdan uzaklaşıncaya kadar %1'lik asetik asit ile yıkanıp, kurulanmıştır.

Plakalar tamamen kurduktan sonra 100 µL 10mM'lık 10.7 pH derecesine sahip Tris-Baz çözeltilisi eklenmiştir.

Çözelti eklenen plakalar 30 dakika bekletilip, boya tamamen çözüldükten sonra ise mikropilaka okuyucuda 492 nm' de OD (optik densite) değerleri için okutulmuştur.

3.9.3. Optik densite değerlerinin belirlenmesi

Tris-SRB çözeltisinin oluşturmuş olduğu absorbans değeri, kuyucuklardaki hücre sayısı ile direkt olarak ilişkilendirilmiştir. Proliferatif etki (PE), östradiol ve test edilen diğer bileşiklerinin analizinde ki en yüksek hücre sayısı ile oranlanmasıdır (Körner W vd., 1999)

$$\text{Proliferatif etki (PE)} = \text{maksimum hücre sayısı (test maddesi)} / \text{hücre sayısı (negatif kontrol)} \quad (3.2)$$

Östrojenik aktivite “Rölatif (bağıl) proliferatif etki (RPE)” ve “Östradiol eşdeğerlik faktörü (EEF)” hesaplanarak belirlenmektedir. RPE hesaplanırken östradiol ile test maddesi kıyaslanmaktadır. Bu hesaplama göre maddenin kısmi ya da tam agonist olduğu hesaplanmaktadır. Test maddesinin östrojenik aktivitesi hesaplanırken; RPE < %20 ise düşük östrojenik aktivite, %20 < RPE < %80 ise kısmi agonist, RPE > %80 ise tam kimyasal agonist olarak adlandırılmaktadır. EEF ise E2'nin EC₅₀ değeri ile test maddelerinin EC₅₀ değerleri arasındaki oran ile hesaplanabilmektedir (Vanparys vd., 2006).

$$\text{RPE\%} = [\text{PE (test maddesi)} - 1 / \text{PE (E2)} - 1] \times 100 \quad (3.3)$$

$$\text{EEF} = \text{EC}_{50}(\text{E2}) / \text{EC}_{50}(\text{test maddesi}) \quad (3.4)$$

3.10. In Silicio Moleküler Docking Çalışmaları

Moleküler Docking, prensip olarak hedef protein veya reseptör ligandlarının bağlanma potansiyellerini keşfetmemize yarayan bir yöntemdir. Küçük moleküllerin, X ışınları kristalografisi veya nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi kullanılarak yapısı belirlenebilmesinden dolayı, moleküler docking yöntemi yeni ilaç keşiflerinde kullanılan giderek yaygınlaşan güvenilir bir yöntem haline gelmiştir. Homolojik olarak modellenen hedefler, yapıları bilinmeyen proteinlere de bağlanma gösterip gösteremeyeceği bu yöntem ile mümkün olmuştur.

Moleküler Docking programları, ligand konformasyonlarının minimum enerjiye yakınsama sağlanana kadar tekrarlı bir şekilde değerlendirme sağladığı bir algoritmaya sahiptir. Son olarak, olası muhtemel pozisyonları sıralar. Ve bu pozisyonları elektrostatik

ve Van Der Waals bağ enerjilerinin toplamı olarak sıralayabilmek için afinite skorlama fonksiyonu ΔG (kcal/mol cinsinden U toplamı) kullanmaktadır (Pagalada vd., 2017).

3.10.1. Moleküler docking yönteminin uygulanışı

Yapılan deney sonuçlarına göre uygun bileşikler Schrödinger's Maestro moleküler docking programının "ligand hazırlama" modülünde Optimize Potansiyel Sıvı Simülasyonları (OPLS_2005) aracılığıyla fizyolojik pH'da enerji minimizasyonu ile hazırlanmıştır. Östrojen reseptör α 'nın, kompleks X-ışını kristal yapısı PDB sunucusundan alınmıştır (PDB Kod: 4Q50) (Fanning vd., 2016).

Seçili kodlu reseptör docking analizleri için Schrödinger yazılımının "protein hazırlama" modülünde optimize edilmiştir. Moleküler docking çalışmalarında, ligandların topolojilerinin tahmini için bu reseptörün substrat bağlanma bölgesinde Glide/XP docking protokolleri uygulanmıştır (Schrödinger Release 2016-2: Schrödinger, LLC, New York, NY, USA).

4. SONUÇLAR VE BULGULAR

4.1. MTT Analizi Sonuçları

4.1.1. Tamoksifen, sisplatin ve sentezlenmiş şalkon türevli bileşiklerin MDA-MB-231 meme kanseri (östrojen negatif) hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri

MDA-MB-231 hücre hatlarına tamoksifen, sisplatin ve sentezlenen bileşikler 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 ve 3.90625 µg/mL konsantrasyon aralığında uygulanarak, hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler MTT boyası ile boyanarak tekrar 3 saatlik inkübasyona bırakılmış ve ELISA Reader cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapılmıştır. Hesaplamalar kontrol canlılığını %100 kabul edilerek, her kuyucuk için ayrı ayrı yapılmıştır. Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin 24 ve 48 saatlik etkilerinin IC₅₀ ve IC_{50/2} değerleri Microsoft Excel programında grafiksel olarak hesaplanmıştır. Deneyler 3'er kuyucuklu ve tekrarlı olarak yapılmış, pozitif kontrol olarak tamoksifen ve sisplatin kullanılmıştır. Çizelge 4.1'de MTT analiz sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerinin MDA-MB-231 hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC₅₀ konsantrasyon değerleri.

Uygulanan bileşik ve pozitif kontroller	MDA-MB-231 hücre hattı 24. saat IC ₅₀ değerleri	MDA-MB-231 hücre hattı 48. saat IC ₅₀ değerleri
Tamoksifen	2,03±0,66 µg/mL	0,98±0,11 µg/mL
Sisplatin	29,53±1,49 µg/mL	15,33±1,57 µg/mL
Bileşik 3	21,33±0,57 µg/mL	19,33±1,15 µg/mL
Bileşik 4	56,66±4,16 µg/mL	12,33±2,3 µg/mL
Bileşik 5	19,66±3,51 µg/mL	27,33±2,51 µg/mL
Bileşik 6	198,33±12,58 µg/mL	4,7±0,28 µg/mL
Bileşik 7	292,5±3,53 µg/mL	<3,9 µg/mL
Bileşik 8	5,33±1,44 µg/mL	3,66±1,52 µg/mL
Bileşik 9	>500 µg/mL	>500 µg/mL
Bileşik 10	>500 µg/mL	>500 µg/mL

4.1.2. Tamoksifen, sisplatin ve sentezlenmiş şalkon türevli bileşiklerin MCF-7 meme kanseri (östrojen reseptörü pozitif) hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri

MCF-7 hücre hatlarına tamoksifen, sisplatin ve sentezlenen bileşikler 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 ve 3.90625 µg/mL konsantrasyon aralığında uygulanarak, hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler MTT boyası ile boyanarak tekrar 3 saatlik inkübasyona bırakılmış ve ELISA Reader cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapılmıştır. Hesaplamalar kontrol canlılığını %100 kabul edilerek, her kuyucuk için ayrı ayrı yapılmıştır. Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin 24 ve 48 saatlik etkilerinin IC₅₀ ve IC_{50/2} değerleri Microsoft Excel programında grafiksel olarak hesaplanmıştır. Deneyler 3'er kuyucuklu ve tekrarlı olarak yapılmış, pozitif kontrol olarak tamoksifen ve sisplatin kullanılmıştır. Çizelge 4.2. de MTT sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerinin MCF-7 hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC₅₀ konsantrasyon değerleri.

Uygulanan bileşik ve pozitif kontroller	MCF-7 hücre hattı 24. saat IC ₅₀ değerleri	MCF-7 hücre hattı 48. saat IC ₅₀ değerleri
Tamoksifen	5,12±0,82 µg/mL	<3,9 µg/mL
Sisplatin	11,41±1,15 µg/mL	<3,9 µg/mL
Bileşik 3	9,58±2,17 µg/mL	<3,9 µg/mL
Bileşik 4	60,57±2,5 µg/mL	<3,9 µg/mL
Bileşik 5	50,32±5,11 µg/mL	<3,9 µg/mL
Bileşik 6	>500 µg/mL	<3,9 µg/mL
Bileşik 7	12,67±2,88 µg/mL	<3,9 µg/mL
Bileşik 8	85,97±6,42 µg/mL	<3,9 µg/mL
Bileşik 9	4,13±0,63 µg/mL	<3,9 µg/mL
Bileşik 10	12,32±1,15 µg/mL	<3,9 µg/mL

4.1.3. Sentezlenmiş şalkon türevli bileşiklerin L-929 sağlıklı hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri

L-929 hücre hatlarına sentezlenen bileşikler 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, ve 3.90625 µg/mL konsantrasyon aralığında uygulanarak, hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler MTT boyası ile boyanarak tekrar 3 saatlik inkübasyona bırakılmış ve ELISA Reader cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapılmıştır. Hesaplamalar kontrol canlılığını %100 kabul edilerek, her kuyucuk için ayrı ayrı yapılmıştır. Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin 24 ve 48 saatlik etkilerinin IC₅₀ ve IC_{50/2} değerleri Microsoft Excel programında grafiksel olarak hesaplanmıştır. Deneyler 3'er kuyucuklu ve tekrarlı olarak yapılmış, pozitif kontrol olarak tamoksifen ve sisplatin kullanılmıştır. **Çizelge 4.3.**'de MTT sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Sentez bileşiklerinin L-929 hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC₅₀ konsantrasyon Değerleri.

Uygulanan bileşikler	L-929 hücre hattı 24. saat IC ₅₀ değerleri	L-929 hücre hattı 48. saat IC ₅₀ değerleri
Bileşik 3	196,66±2,88 µg/mL	53,66±3,51 µg/mL
Bileşik 4	>500 µg/mL	>500 µg/mL
Bileşik 5	207,5±10,6 µg/mL	187,66±3,05 µg/mL
Bileşik 6	>500 µg/mL	85,5±6,36 µg/mL
Bileşik 7	>500 µg/mL	>500 µg/mL
Bileşik 8	48,33±4,04 µg/mL	5,85±1,62 µg/mL
Bileşik 9	49,66±4,5 µg/mL	45,33±5,68 µg/mL
Bileşik 10	19,33±0,58 µg/mL	4,75±0,63 µg/mL

4.1.4. Sentezlenmiş şalkon türevli bileşiklerin NIH/3T3 sağlıklı hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri

NIH/3T3 hücre hatlarına sentezlenen bileşikler 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, ve 3.90625 µg/mL konsantrasyon aralığında uygulanarak, hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler MTT boyası ile boyanarak tekrar 3 saatlik inkübasyona bırakılmış ve ELISA Reader cihazında 540 nm dalga boyunda okuması yapılmıştır. Hesaplamalar kontrol canlılığını %100 kabul edilerek, her kuyucuk için ayrı ayrı yapılmıştır. Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin 24 ve 48 saatlik etkilerinin IC₅₀ ve IC_{50/2} değerleri Microsoft Excel programında grafiksel olarak hesaplanmıştır. Deneyler 3'er kuyucuklu ve tekrarlı olarak yapılmış, pozitif kontrol olarak tamoksifen ve sisplatin kullanılmıştır. **Çizelge 4.4'**de MTT sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Sentez bileşiklerinin NIH/3T3 hücre hattındaki 24. Ve 48. Saatlerdeki IC₅₀ konsantrasyon değerleri.

Uygulanan bileşikler	NIH/3T3 hücre hattı 24. saat IC ₅₀ değerleri	NIH/3T3 hücre hattı 48. saat IC ₅₀ değerleri
Bileşik 3	185±9,89 µg/mL	5,56±0,49 µg/mL
Bileşik 4	99,5±2,12 µg/mL	15,5±0,7 µg/mL
Bileşik 5	4,86±0,32 µg/mL	<3,9 µg/mL
Bileşik 6	<3,9 µg/mL	<3,9 µg/mL
Bileşik 7	407,5±17,67 µg/mL	5,83±0,28 µg/mL
Bileşik 8	6,16±0,75 µg/mL	14,33±0,57 µg/mL
Bileşik 9	42±4,24 µg/mL	6,75±0,35 µg/mL
Bileşik 10	115,5±6,36 µg/mL	<3,9 µg/mL

4.1.5. MDA-MB-231 hücre hattının L-929 hücre hattına göre selektivite indeksi

Bileşiklerin MTT analiz sonuçlarına göre selektivite indeksi belirlenmektedir. Bunu belirlemek için sağlıklı hücre ile yapılan deneyin IC₅₀ değeri, kanserli hücrenin IC₅₀ değerine bölünerek yapılır. Selektivite indeksi için 24. Saat IC₅₀ değerleri alınmıştır.

Çizelge 4.5. 24. Saat IC₅₀ değerlerine göre MDA-MB-231 hücre hatlarının L-929 hücrelerine göre Selektivite indeksi. (Selektivite indeksi (S.I) =Sağlıklı hücre IC₅₀ değeri / Kanserli hücre IC₅₀ değeri)

Hücreler	Bileşik 3 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 4 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 5 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 6 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 7 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 8 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 9 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 10 IC ₅₀ µg/mL
L-929	196,66	>500	207,5	>500	>500	48,33	49,66	19,33
MDA-MB-231	21,33	56,66	19,66	198,33	292,5	5,33	>500	>500
S.I.	9,21	>8,82	10,55	>2,52	>1,71	9,06	0,09	0,03

4.1.6. MCF-7 hücre hattının L-929 hücre hattına göre selektivite indeksi

Bileşiklerin MTT analiz sonuçlarına göre selektivite indeksi belirlenmektedir. Bunu belirlemek için sağlıklı hücre ile yapılan deneyin IC₅₀ değeri, kanserli hücrenin IC₅₀ değerine bölünerek yapılır. Selektivite indeksi için 24. Saat IC₅₀ değerleri alınmıştır.

Çizelge 4.6. 24. Saat IC₅₀ değerlerine göre MCF-7 hücre hatlarının L-929 hücrelerine göre selektivite indeksi. (Selektivite indeksi (S.I) =Sağlıklı hücre IC₅₀ değeri / Kanserli hücre IC₅₀ değeri)

Hücreler	Bileşik 3 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 4 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 5 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 6 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 7 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 8 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 9 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 10 IC ₅₀ µg/mL
L-929	196,66	>500	207,5	>500	>500	48,33	49,66	19,33
MCF-7	9,58	60,57	50,32	>500	12,67	85,97	4,13	12,32
S.I.	20,52	>8,25	4,12	>1	>39,46	0,56	12,02	1,56

4.1.7. MDA-MB-231 hücre hattının NIH/3T3 hücre hattına göre selektivite indeksi

Bileşiklerin MTT analiz sonuçlarına göre selektivite indeksi belirlenmektedir. Bunu belirlemek için sağlıklı hücre ile yapılan deneyin IC₅₀ değeri, kanserli hücrenin IC₅₀ değerine bölünerek yapılır. Selektivite indeksi için 24. Saat IC₅₀ değerleri alınmıştır.

Çizelge 4.7. 24. Saat IC₅₀ değerlerine göre MDA-MB-231 hücre hatlarının NIH/3T3 hücrelerine göre selektivite indeksi. (Selektivite indeksi (S.I) =Sağlıklı hücre IC₅₀ değeri / Kanserli hücre IC₅₀ değeri)

Hücreler	Bileşik 3 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 4 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 5 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 6 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 7 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 8 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 9 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 10 IC ₅₀ µg/mL
NIH/3T3	182	99,5	4,86	<3,9	407,5	6,16	42	115,5
MDA-MB-231	21,33	56,66	19,66	198,33	292,5	5,33	>500	>500
S.I.	8,53	1,75	0,24	<0,01	1,39	1,15	0,08	0,23

4.1.8. MCF-7 hücre hattının NIH/3T3 hücre hattına göre selektivite indeksi

Bileşiklerin MTT analiz sonuçlarına göre selektivite indeksi belirlenmektedir. Bunu belirlemek için sağlıklı hücre ile yapılan deneyin IC₅₀ değeri, kanserli hücrenin IC₅₀ değerine bölünerek yapılır. Selektivite indeksi için 24. Saat IC₅₀ değerleri alınmıştır.

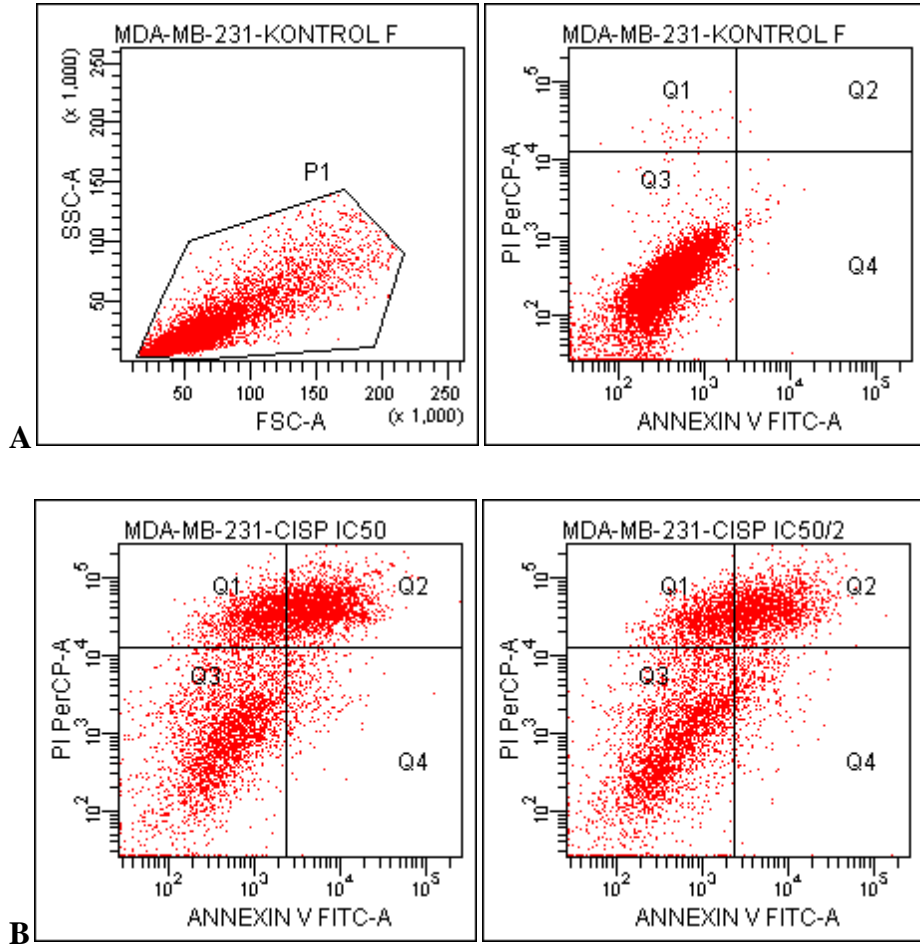
Çizelge 4.8. 24. Saat IC₅₀ değerlerine göre MCF-7 hücre hatlarının NIH/3T3 hücrelerine göre selektivite indeksi. (Selektivite indeksi (S.I) =Sağlıklı hücre IC₅₀ değeri / Kanserli hücre IC₅₀ değeri)

Hücreler	Bileşik 3 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 4 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 5 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 6 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 7 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 8 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 9 IC ₅₀ µg/mL	Bileşik 10 IC ₅₀ µg/mL
NIH/3T3	182	99,5	4,86	<3,9	407,5	6,16	42	115,5
MCF-7	9,58	60,57	50,32	>500	12,67	85,97	4,13	12,32
S.I.	18,99	1,64	0,09	<0	32,16	0,07	10,16	9,37

4.2. Tamoksifen, Sisplatin ve Sentez Bileşiklerin, Akım Sitometrisi Yöntemleri ile MDA-MB-231 ve MCF- 7 Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik Etkilerin Belirlenmesi

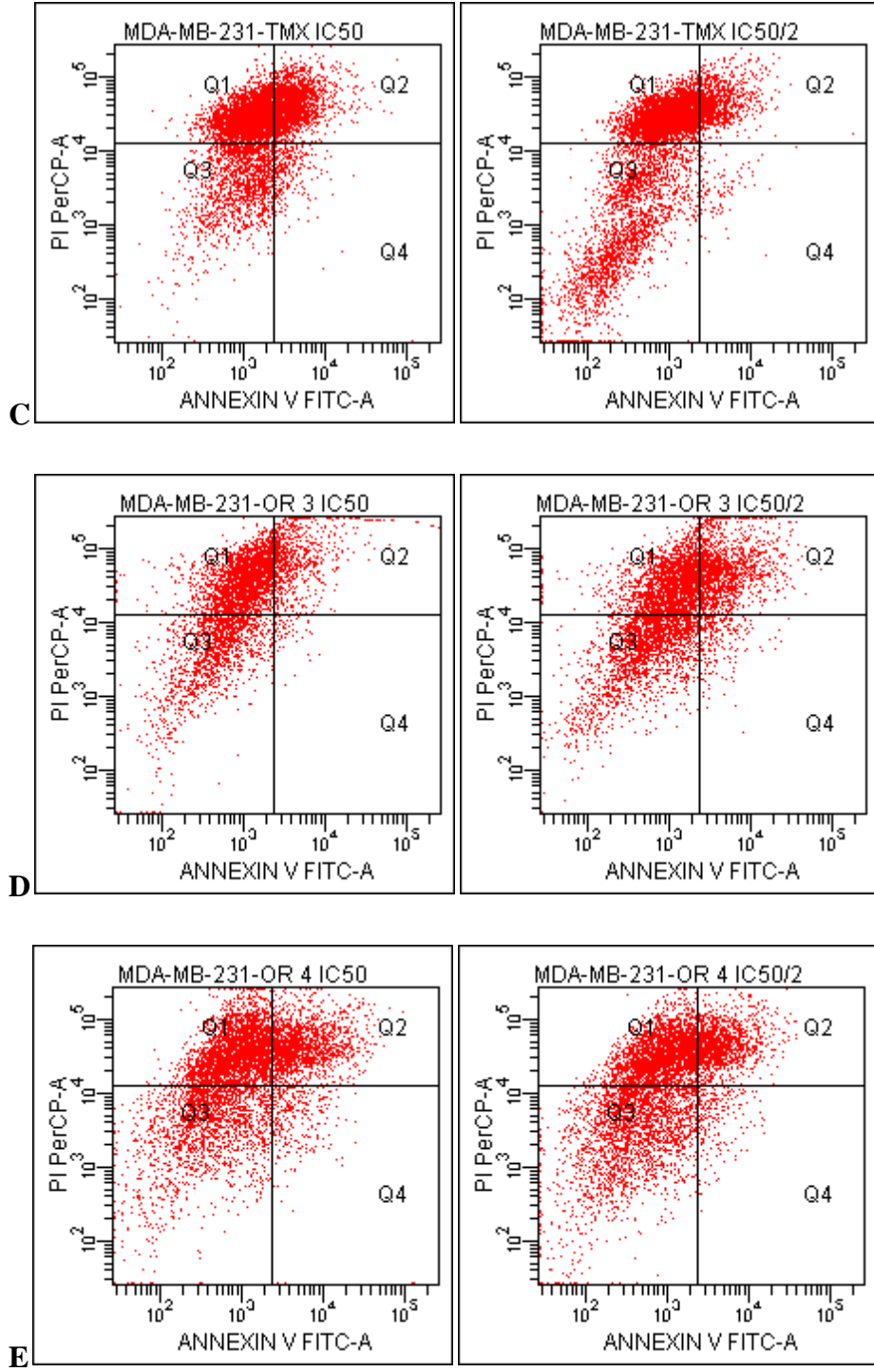
4.2.1. Akım sitometrisinde Annexin-V FITC-PI analizi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi

4.2.1.1. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 24. Saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi



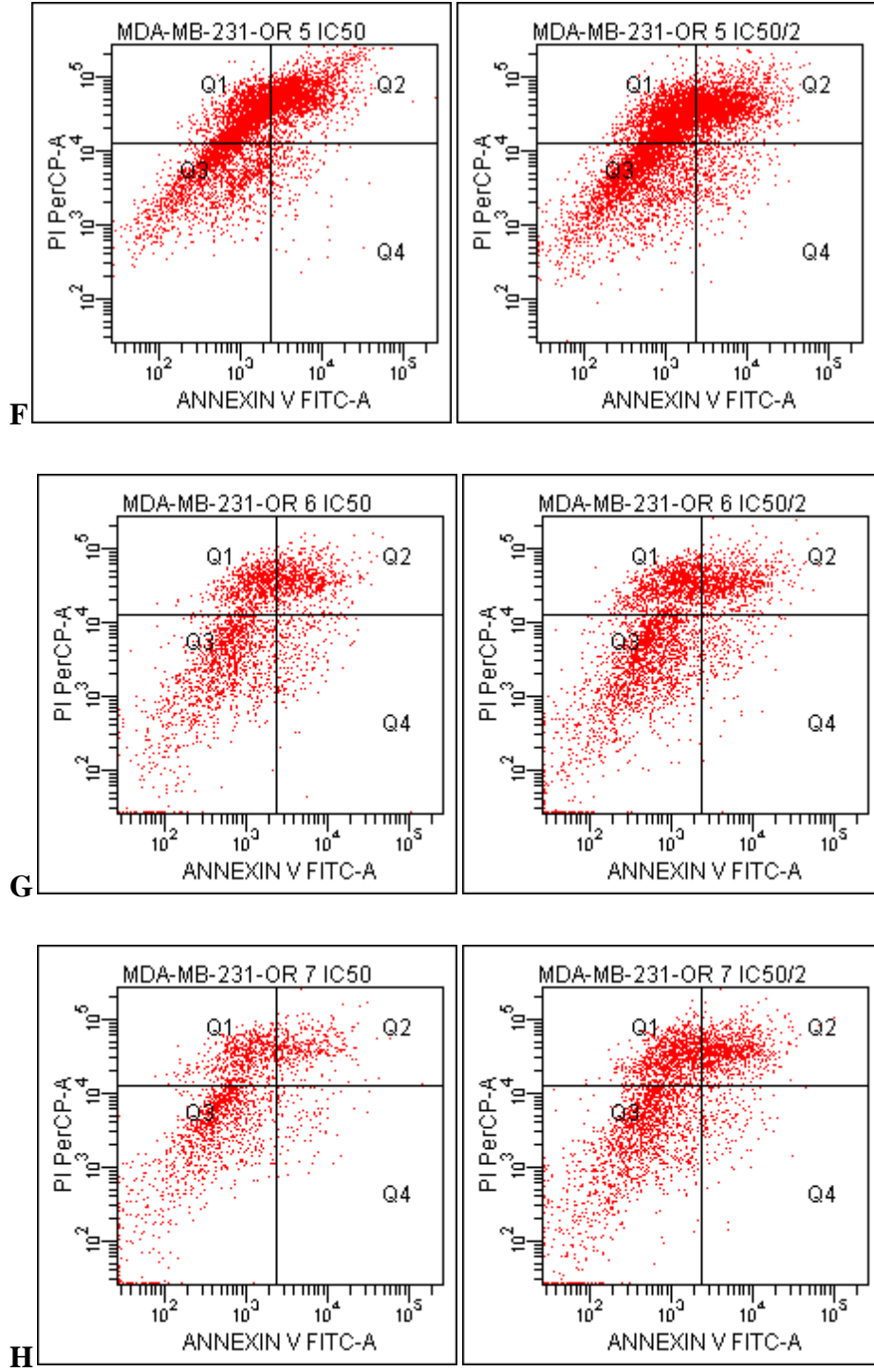
Şekil 4.1. Sisplatinin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının apoptotik etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı ve kontrol B) Sisplatin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

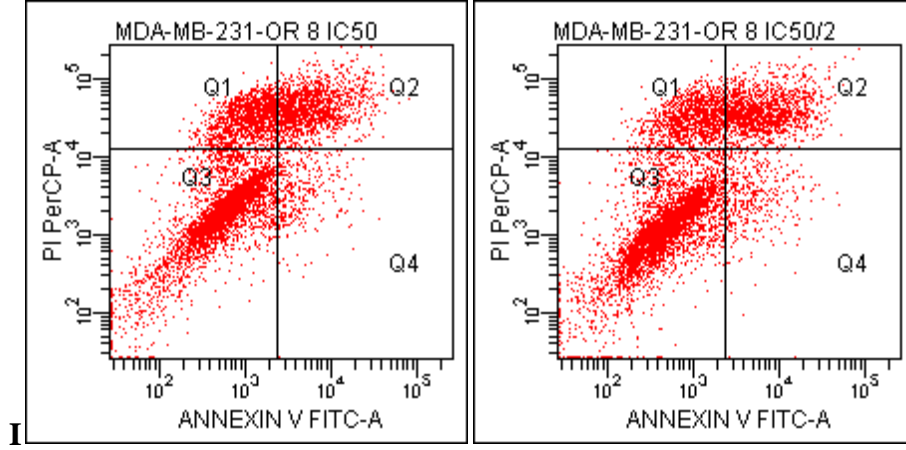


Şekil 4.1. C) Tamoksifenin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ apoptotik etkileri D) Bileşik 3'ün IC_{50} ve $IC_{50/2}$ apoptotik etkileri E) Bileşik 4'ün IC_{50} ve $IC_{50/2}$ apoptotik etkileri

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)



Şekil 4.1. F) Bileşik 5'in IC₅₀ ve IC_{50/2} apoptotik etkileri G) Bileşik 6'nın IC₅₀ ve IC_{50/2} apoptotik etkileri H) Bileşik 7'nin IC₅₀ ve IC_{50/2} apoptotik etkileri
(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)



Şekil 4.1. I) Bileşik 8'in IC₅₀ ve IC_{50/2} apoptotik etkileri

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

Çizelge 4.9. MDA-MB-231 hücre hatlarının 24. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

24. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	0,4	0,1	98,0	1,6

Çizelge 4.10. Tamoksifen ve sisplatinin MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki 24. saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

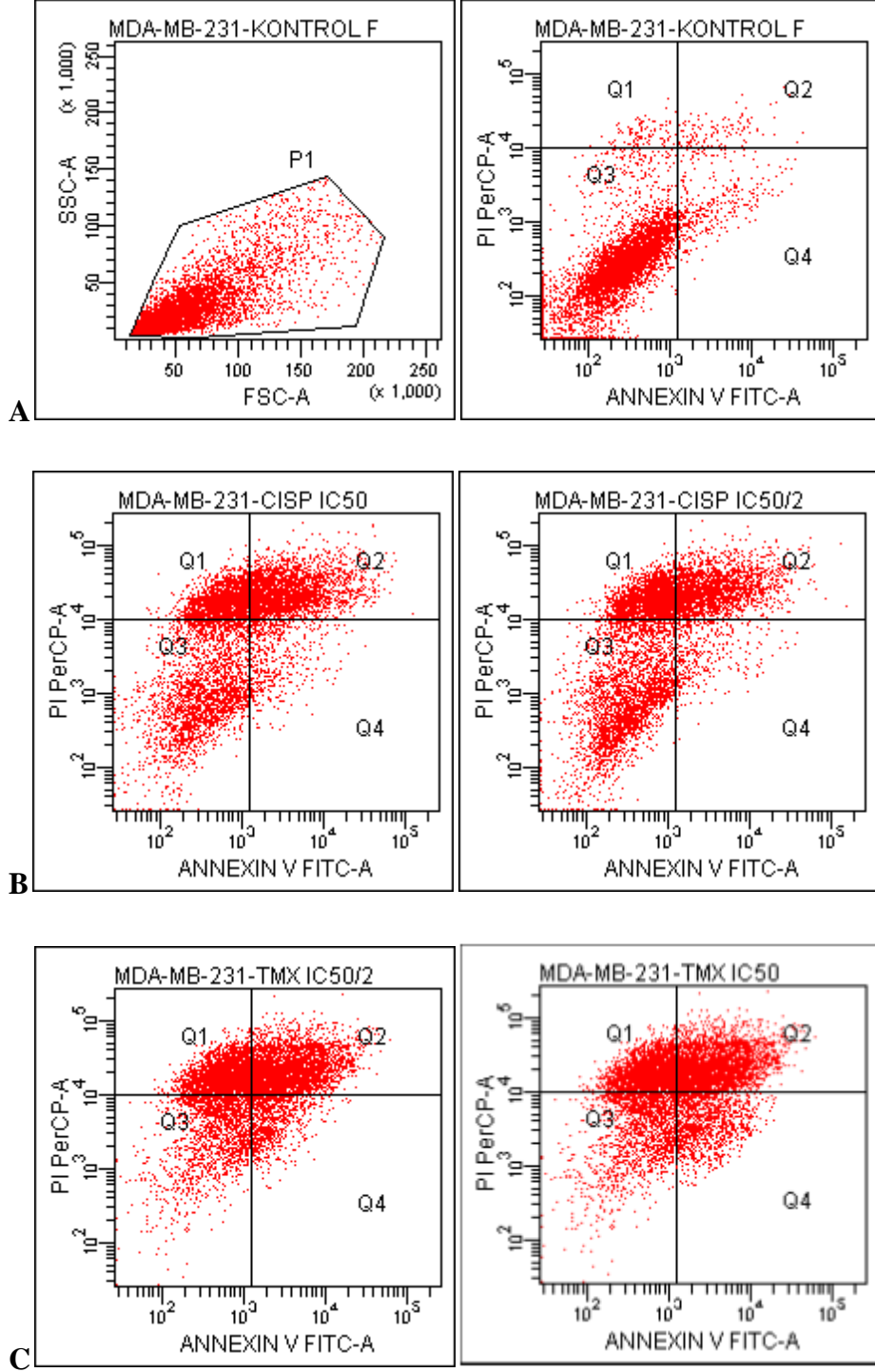
24. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Sisplatin IC ₅₀	14,0	23,4	58,2	4,4
Sisplatin IC _{50/2}	12,3	18,0	63,7	6,0
Tamoksifen IC ₅₀	42,2	23,6	30,8	3,3
Tamoksifen IC _{50/2}	38,9	11,1	47,8	2,2

Çizelge 4.11. *Sentez bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki 24. Saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC*

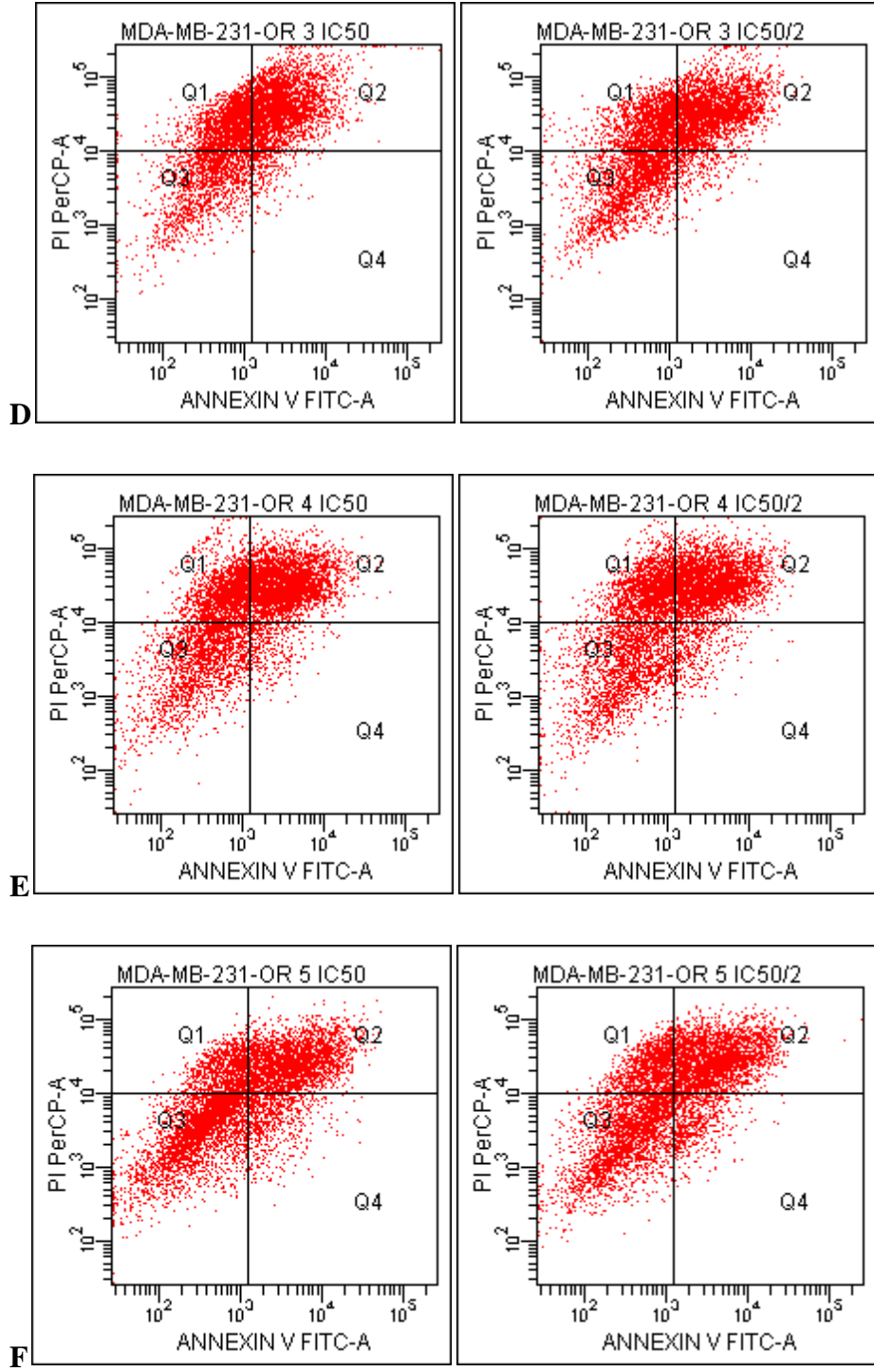
(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

24. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Bileşik 3 IC₅₀	34,1	27,0	37,4	1,5
Bileşik 3 IC_{50/2}	28,2	28,0	41,0	2,8
Bileşik 4 IC₅₀	38,0	20,4	38,1	3,5
Bileşik 4 IC_{50/2}	35,8	16,0	45,8	2,4
Bileşik 5 IC₅₀	24,1	34,4	39,4	2,0
Bileşik 5 IC_{50/2}	26,5	23,4	46,7	3,4
Bileşik 6 IC₅₀	17,1	11,7	67,9	3,3
Bileşik 6 IC_{50/2}	21,5	12,8	63,3	2,4
Bileşik 7 IC₅₀	25,8	7,3	65,7	1,2
Bileşik 7 IC_{50/2}	26,7	14,5	56,6	2,3
Bileşik 8 IC₅₀	13,6	16,0	65,7	4,7
Bileşik 8 IC_{50/2}	12,0	15,0	67,1	5,9

4.2.1.2. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 48. Saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi

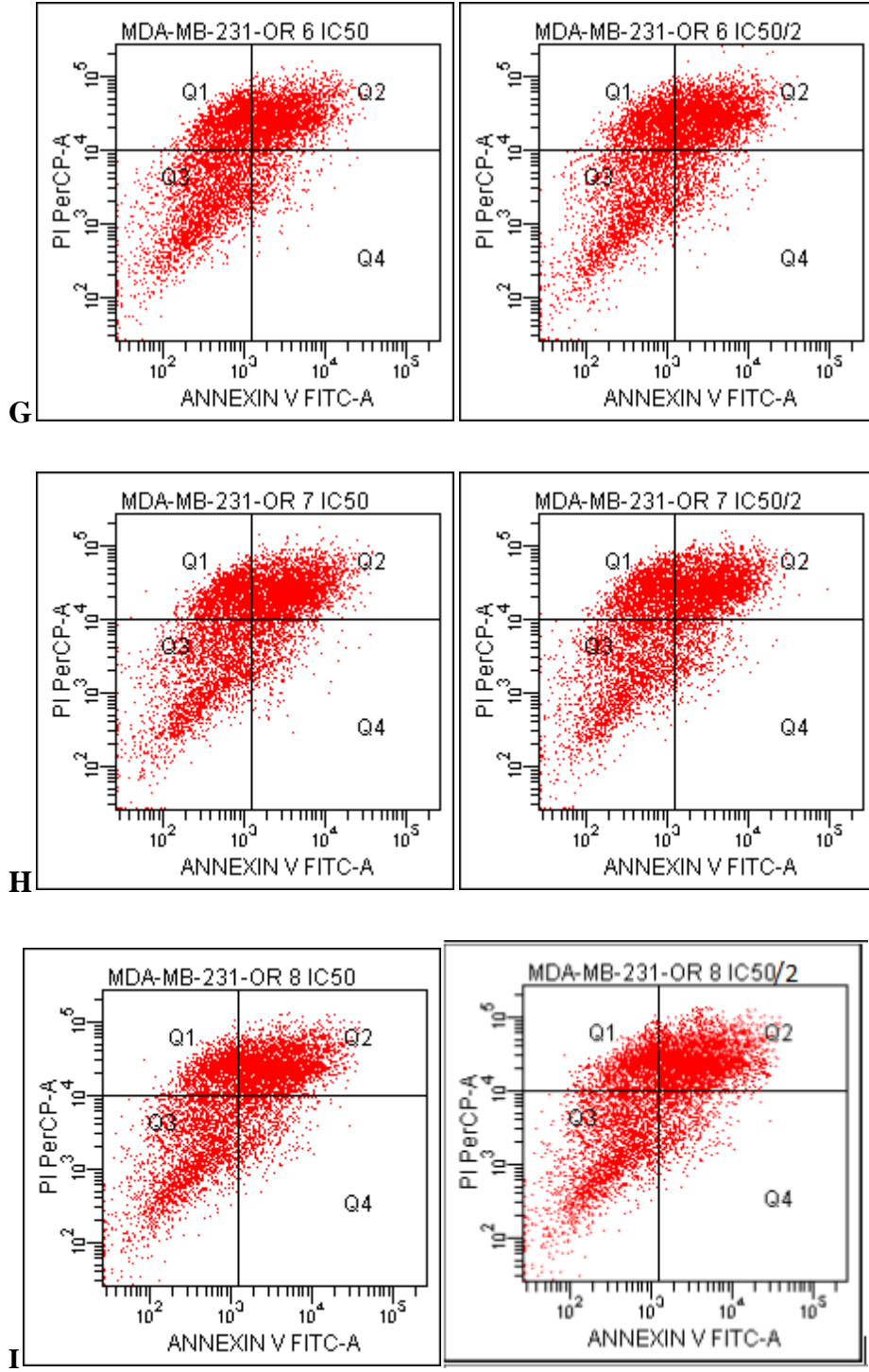


Şekil 4.2. Sisplatinin ve Tamoksifenin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki, IC₅₀ ve IC_{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı ve kontrol B) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri C) Tamoksifen IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri (Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)



Şekil 4.2. D) Bileşik 3'ün IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri E) Bileşik 4'ün IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri F) Bileşik 5'in IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)



Şekil 4.2. G) Bileşik 6'nin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri H) Bileşik 7'nin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri

I) Bileşik 8'in IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

Çizelge 4.12. MDA-MB-231 hücre hatlarının 48. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

48. Saat	Q1(%)	Q2	Q3	Q4
Kontrol	1,2	1,7	86,5	10,6

Çizelge 4.13. Tamoksifen ve sisplatinin MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki 48. saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

48. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Sisplatin IC ₅₀	19,7	28,3	46,0	5,9
Sisplatin IC _{50/2}	22,8	23,8	48,2	5,2
Tamoksifen IC ₅₀	23,7	15,4	48,9	12,0
Tamoksifen IC _{50/2}	25,2	34,1	31,3	9,3

Çizelge 4.14. Sentez bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki 48. Saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC (Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

48. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Bileşik 3 IC ₅₀	21,1	47,3	28,8	2,7
Bileşik 3 IC _{50/2}	20,3	41,2	35,5	2,9
Bileşik 4 IC ₅₀	23,5	38,0	34,4	4,0
Bileşik 4 IC _{50/2}	22,9	38,8	34,2	4,1
Bileşik 5 IC ₅₀	13,4	31,5	47,9	7,2
Bileşik 5 IC _{50/2}	14,2	35,2	43,8	6,8
Bileşik 6 IC ₅₀	18,2	32,9	44,3	4,6
Bileşik 6 IC _{50/2}	18,2	33,9	41,5	6,4
Bileşik 7 IC ₅₀	16,8	36,4	39,6	7,1
Bileşik 7 IC _{50/2}	18,1	34,6	41,6	5,6
Bileşik 8 IC ₅₀	15,1	38,1	39,2	7,6
Bileşik 8 IC _{50/2}	16,2	35,3	42,2	6,5

24. Saat analizinin sonuçlarında tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde, uygulanan IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonların 24. Saat sonunda erken ve geç apoptotik etkilerinin kontrol grubuna göre arttığı belirlenmiştir. 24. Saat sonunda yapılan analize göre kontrol grubunun erken apoptozu %1,6 geç apoptozu ise %1 olarak gözlemlenmiştir.

Sisplatinin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının 24. Saat sonunda ki analizi sonrasında sırasıyla, erken apoptozu %4,4 %6 geç apoptozu ise %23,4 %18 olarak gözlemlenmiştir.

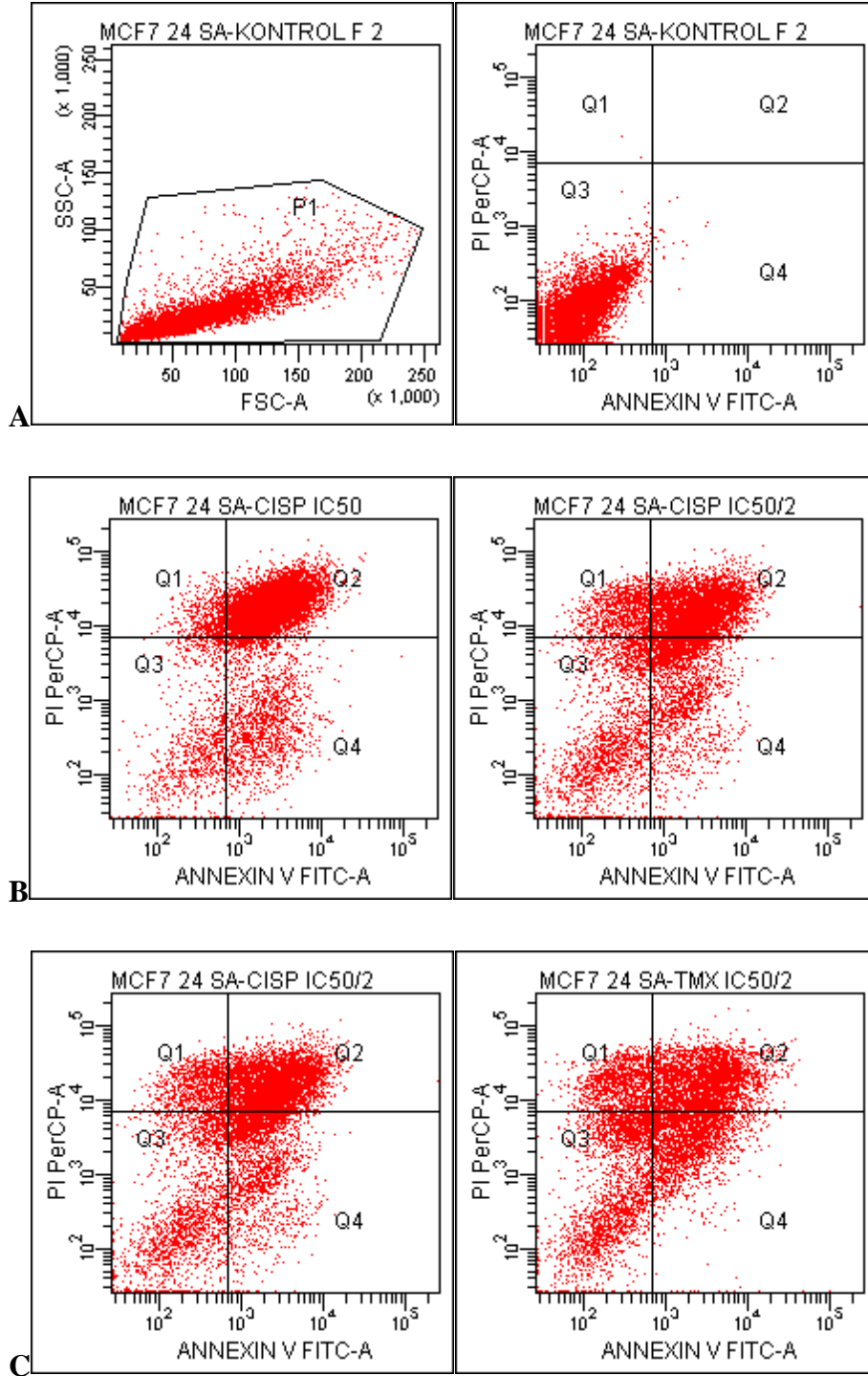
Tamoksifenin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının 24. Saat sonunda ki analizine göre ise sırasıyla erken apoptozu %3,3 %2,2 geç apoptozu ise %23,6 %11,1 olarak gözlemlenmiştir. Sentez bileşiklerin ise analiz sonuçları tablolarda gösterildiği gibidir.

48. Saat analizinin sonuçlarında tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde, uygulanan IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonların 48. Saat sonunda yapılan analize göre kontrol grubunun erken apoptozu %9,3 geç apoptozu ise %0,1 olarak gözlemlenmiştir.

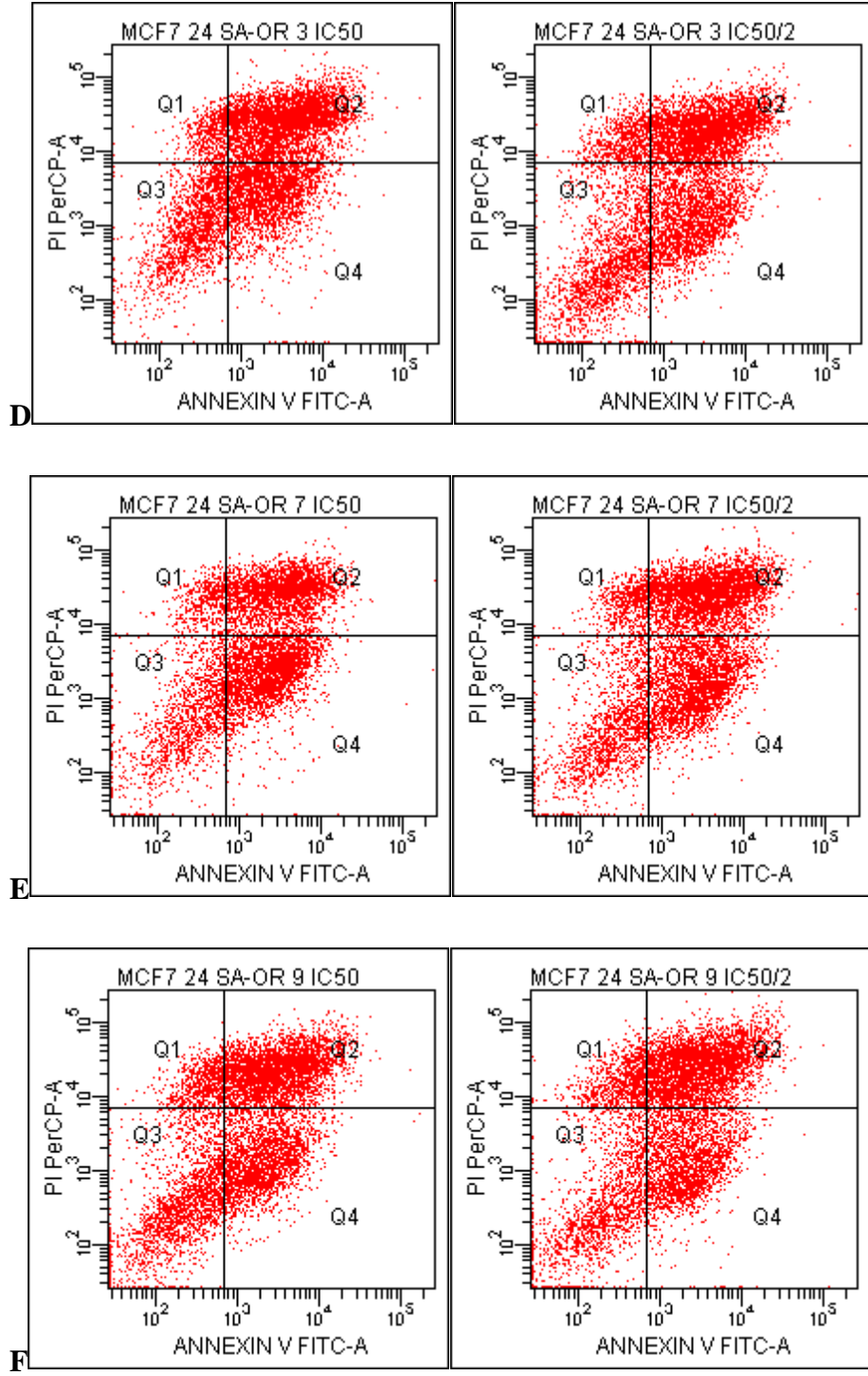
Sisplatinin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının 48. Saat sonunda ki analizi sonrasında sırasıyla, erken apoptozu %5,9 %5,2 geç apoptozu ise %28,3 %23,8 olarak gözlemlenmiştir.

Tamoksifenin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının 48. Saat sonunda ki analizine göre ise sırasıyla erken apoptozu %12 %9,3 geç apoptozu ise %15,4 %34,1 olarak gözlemlenmiştir. Sentez bileşiklerin ise analiz sonuçları tablolarda gösterildiği gibidir.

4.2.1.3. MCF-7 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 24. Saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi



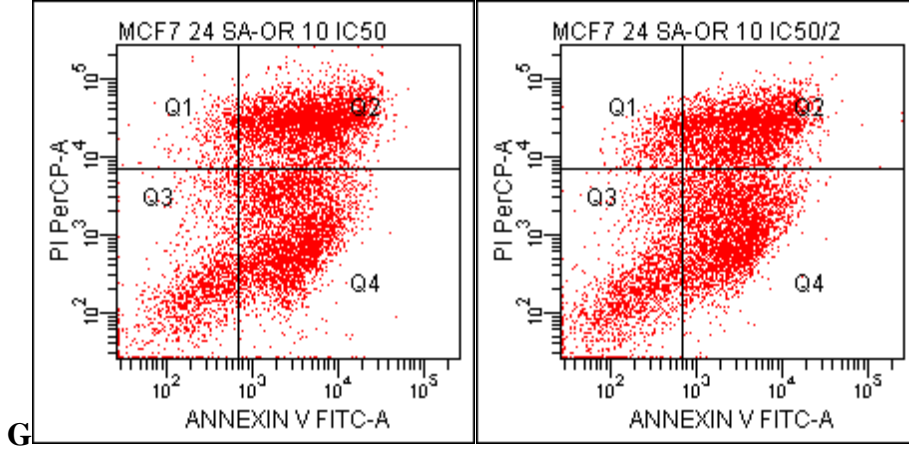
Şekil 4.3. Sisplatinin ve tamoksifen MCF-7 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki, IC₅₀ ve IC_{50/2} konsantrasyonlarının apoptotik etkileri. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı ve kontrol B) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri C) Tamoksifen IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri (Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)



Şekil 4.3. D) Bileşik 3'ün IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri E) Bileşik 7'nin IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri

F) Bileşik 9'un IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)



Şekil 4.3. G) Bileşik 10⁻⁵'un IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

Çizelge 4.15. MCF-7 hücre hatlarının 24. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

24. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Kontrol	0,0	0,0	99,6	0,3

Çizelge 4.16. Tamoksifen ve sisplatinin MCF-7 hücre hatları üzerindeki 24. saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC

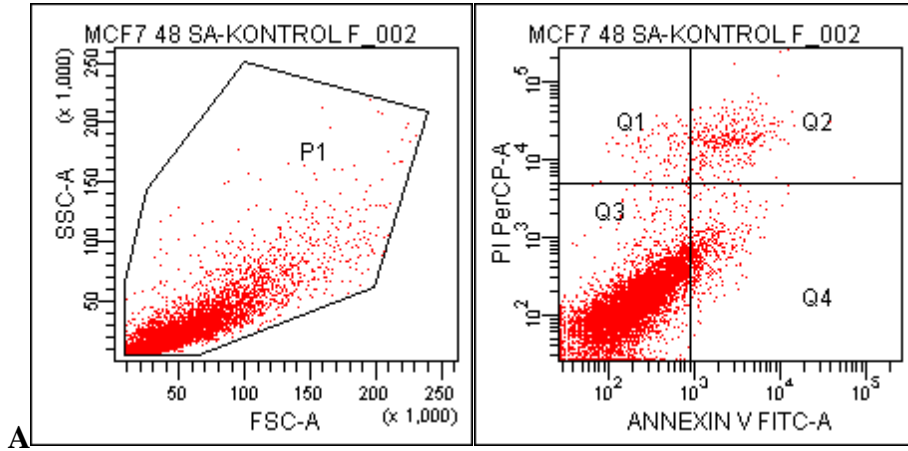
(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

24. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Sisplatin IC ₅₀	6,1	67,8	9,9	16,2
Sisplatin IC _{50/2}	12,0	44,9	20,6	22,4
Tamoksifen IC ₅₀	9,9	40,0	26,3	23,7
Tamoksifen IC _{50/2}	13,4	37,0	25,8	23,8

Çizelge 4.17. *Sentez bileşiklerin MCF-7 hücre hatları üzerindeki 24. Saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC (Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)*

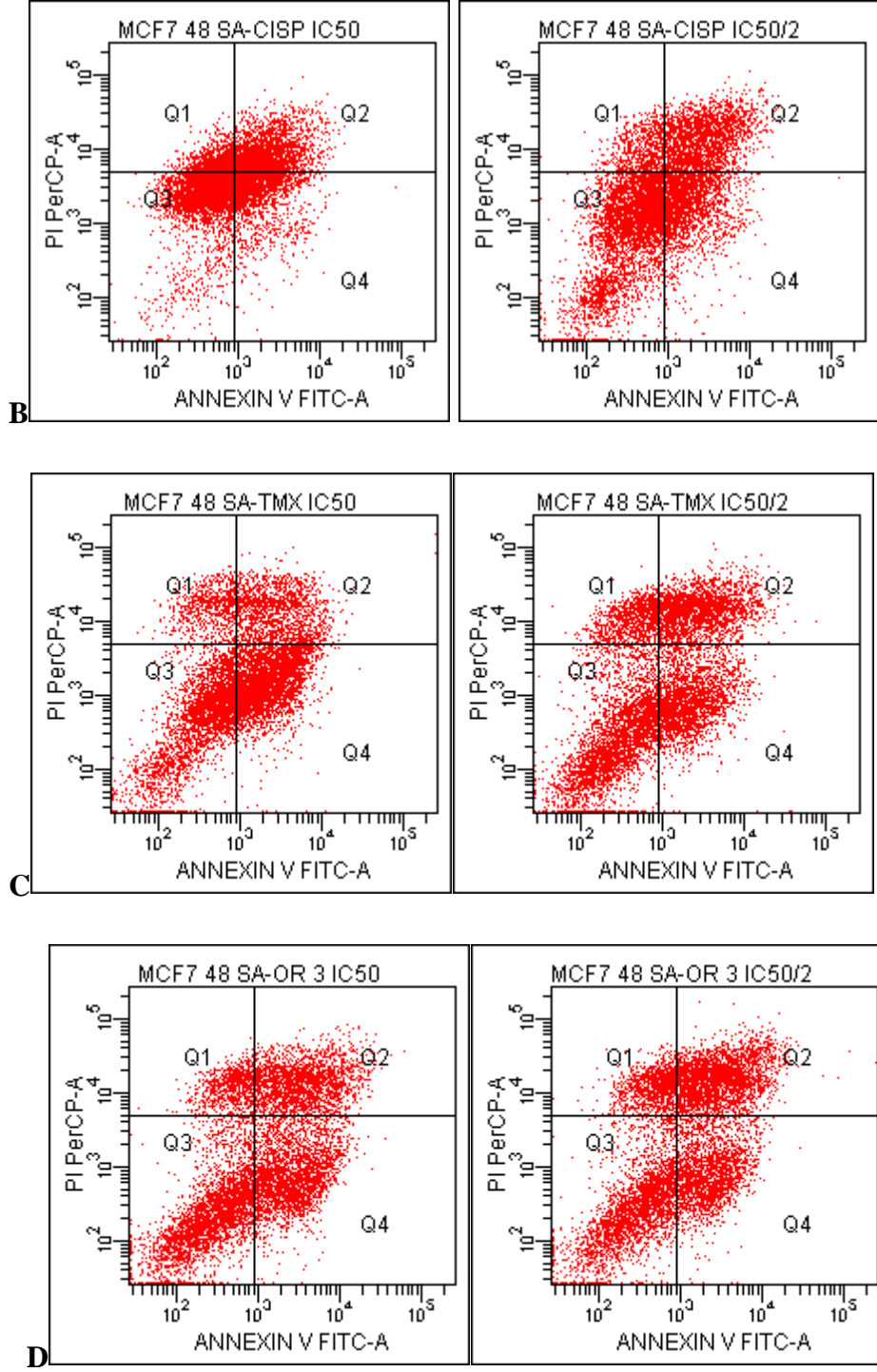
24. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Bileşik 3 IC ₅₀	6,0	48,7	20,7	24,5
Bileşik 3 IC _{50/2}	8,0	41,8	24,0	26,2
Bileşik 7 IC ₅₀	5,5	40,5	17,8	36,2
Bileşik 7 IC _{50/2}	7,0	42,9	18,4	31,7
Bileşik 9 IC ₅₀	8,2	42,0	24,1	25,7
Bileşik 9 IC _{50/2}	10,4	44,7	20,2	24,7
Bileşik 10 IC ₅₀	3,6	41,3	16,5	38,7
Bileşik 10 IC _{50/2}	5,3	36,9	20,7	37,1

4.2.1.4. MCF-7 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 48. Saatte oluşan apoptotik etkilerin belirlenmesi



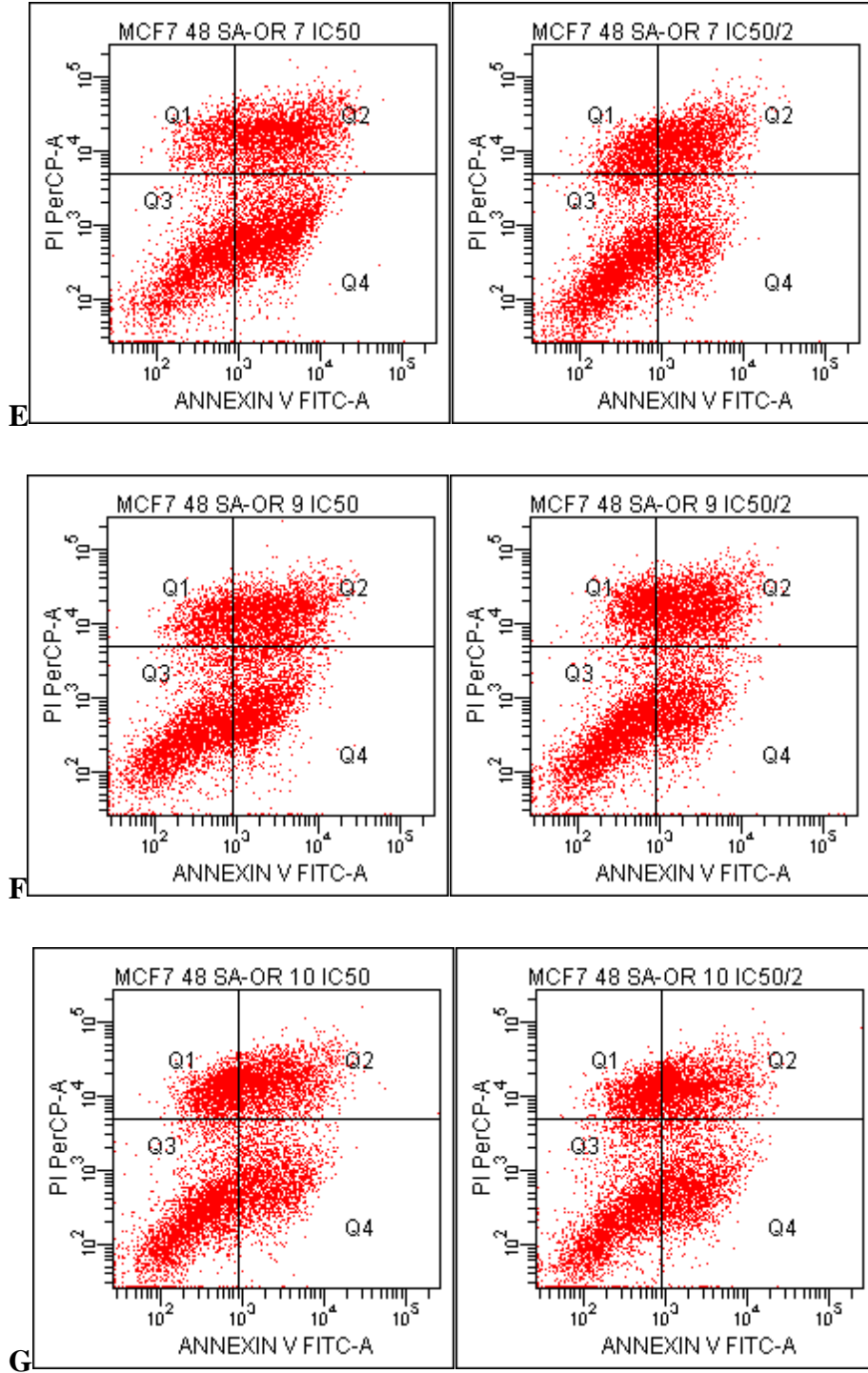
Şekil 4.4. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen ana kapı ve kontrol

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)



Şekil 4.4. B) Sisplatin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri C) Tamoksifen IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri D) Bileşik 3'ün IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)



Şekil 4.4. E) Sisplatin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri F) Bileşik IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri G) Bileşik 10'un IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

Çizelge 4.18. MCF-7 hücre hatlarının 48. Saatteki % canlılık oranları, Annexin-V FITC

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

48. Saat	Q1(%)	Q2	Q3	Q4
Kontrol	1,1	3,3	91,1	4,5

Çizelge 4.19. Tamoksifen ve sisplatinin MCF-7 hücre hatları üzerindeki 48. saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

48. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Sisplatin IC ₅₀	10,9	24,0	42,2	22,9
Sisplatin IC _{50/2}	7,6	23,2	45,9	23,4
Tamoksifen IC ₅₀	8,4	16,5	36,5	38,6
Tamoksifen IC _{50/2}	11,4	24,6	39,5	24,6

Çizelge 4.20. Sentez bileşiklerin MCF-7 hücre hatları üzerindeki 48. Saat % canlılık oranları, Annexin-V FITC

(Q1=Nekroz Q2=Geç apoptoz Q3=Canlılık Q4=Erken apoptoz)

48. Saat	Q1(%)	Q2(%)	Q3(%)	Q4(%)
Bileşik 3 IC ₅₀	8,8	24,1	37,6	29,5
Bileşik 3 IC _{50/2}	12,5	31,1	34,2	22,2
Bileşik 7 IC ₅₀	8,7	29,3	29,5	32,5
Bileşik 7 IC _{50/2}	13,1	24,6	438	18,5
Bileşik 9 IC ₅₀	10,0	26,3	39,2	24,4
Bileşik 9 IC _{50/2}	13,2	29,3	37,6	19,9
Bileşik 10 IC ₅₀	15,4	24,7	38,9	21,0
Bileşik 10 IC _{50/2}	16,0	23,5	38,5	22,0

24. Saat analizinin sonuçlarında tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MCF-7 hücre hatları üzerinde, uygulanan IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonların 24. Saat sonunda erken ve geç apoptotik etkilerinin kontrol grubuna göre arttığı belirlenmiştir. 24. Saat sonunda yapılan analize göre kontrol grubunun erken apoptozu %0,3 geç apoptozu ise %0 olarak gözlemlenmiştir.

Sisplatinin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının 24. Saat sonunda ki analizi sonrasında sırasıyla, erken apoptozu %16,2 %22,4 geç apoptozu ise %67,8 %44,9 olarak gözlemlenmiştir.

Tamoksifenin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının 24. Saat sonunda ki analizine göre ise sırasıyla erken apoptozu %23,7 %23,8 geç apoptozu ise %40 %37 olarak gözlemlenmiştir. Sentez bileşiklerin ise analiz sonuçları tablolarda gösterildiği gibidir.

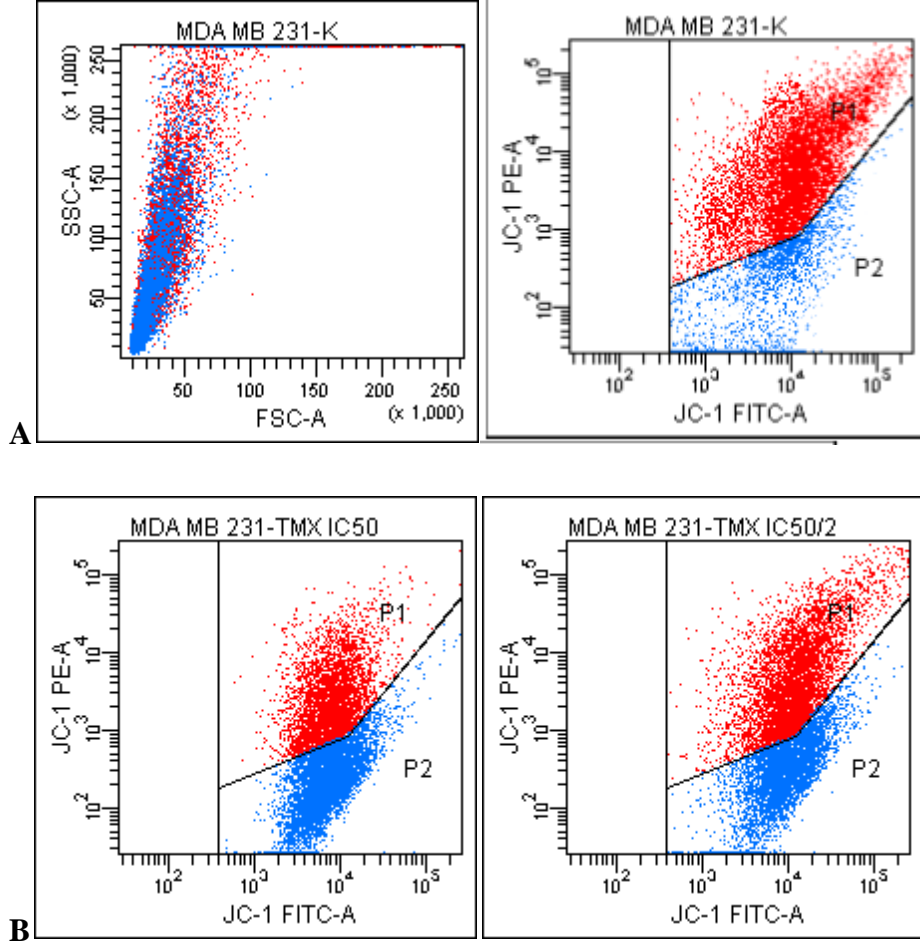
48. Saat analizinin sonuçlarında tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MCF-7 hücre hatları üzerinde, uygulanan IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonların 48. Saat sonunda yapılan analize göre kontrol grubunun erken apoptozu %9,3 geç apoptozu ise %0,1 olarak gözlemlenmiştir.

Sisplatinin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının 48. Saat sonunda ki analizi sonrasında sırasıyla, erken apoptozu %22,9 %23,4 geç apoptozu ise %24 %23,2 olarak gözlemlenmiştir.

Tamoksifenin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ konsantrasyonlarının 48. Saat sonunda ki analizine göre ise sırasıyla erken apoptozu %38,6 %24,6 geç apoptozu ise %16,5 %24,6 olarak gözlemlenmiştir. Sentez bileşiklerin ise analiz sonuçları tablolarda gösterildiği gibidir.

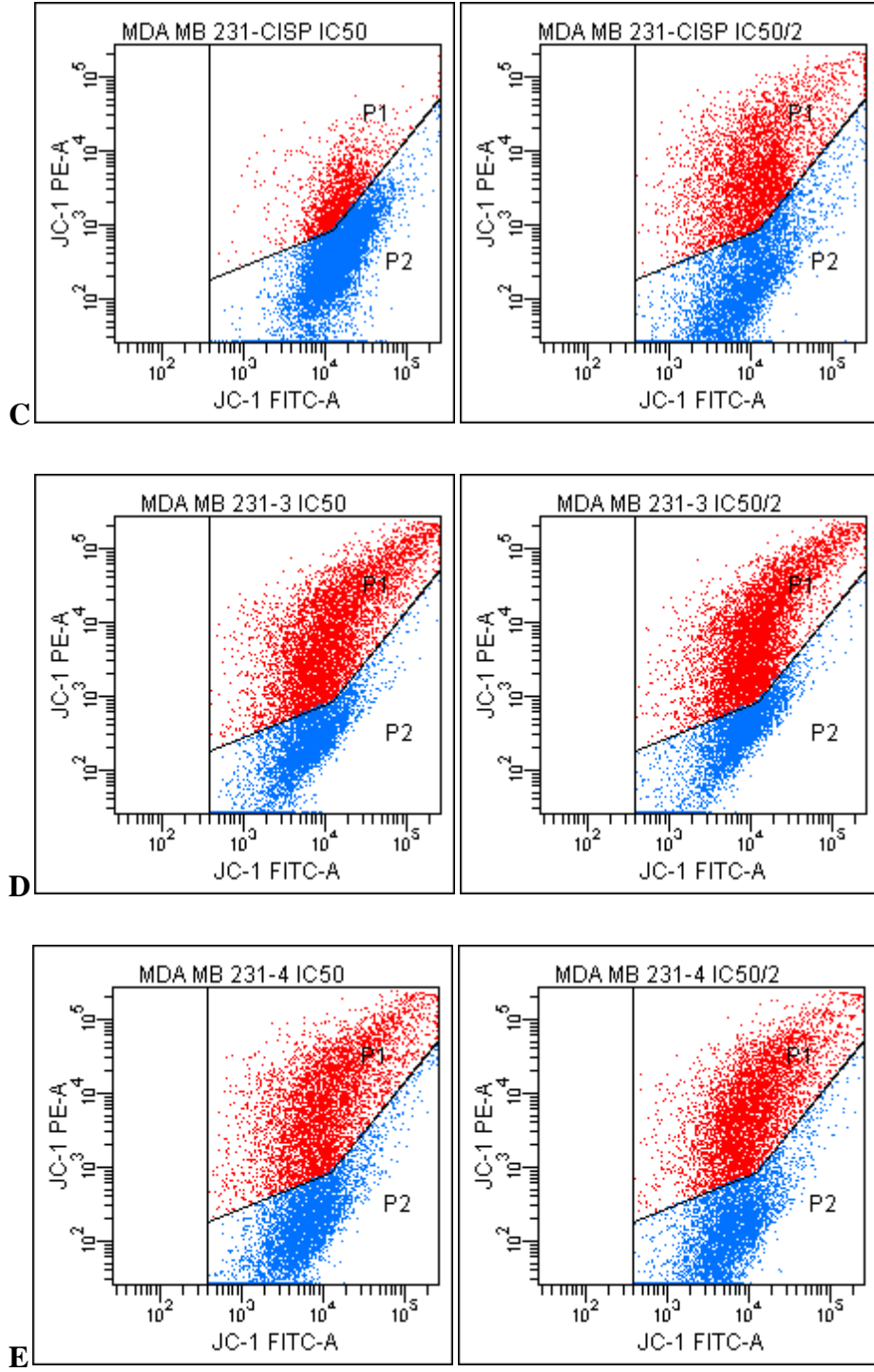
4.2.2. Akım sitometrisinde JC-1 analizi ile apoptotik etkilerin belirlenmesi

4.2.2.1. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 24. Saatte oluşan mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi



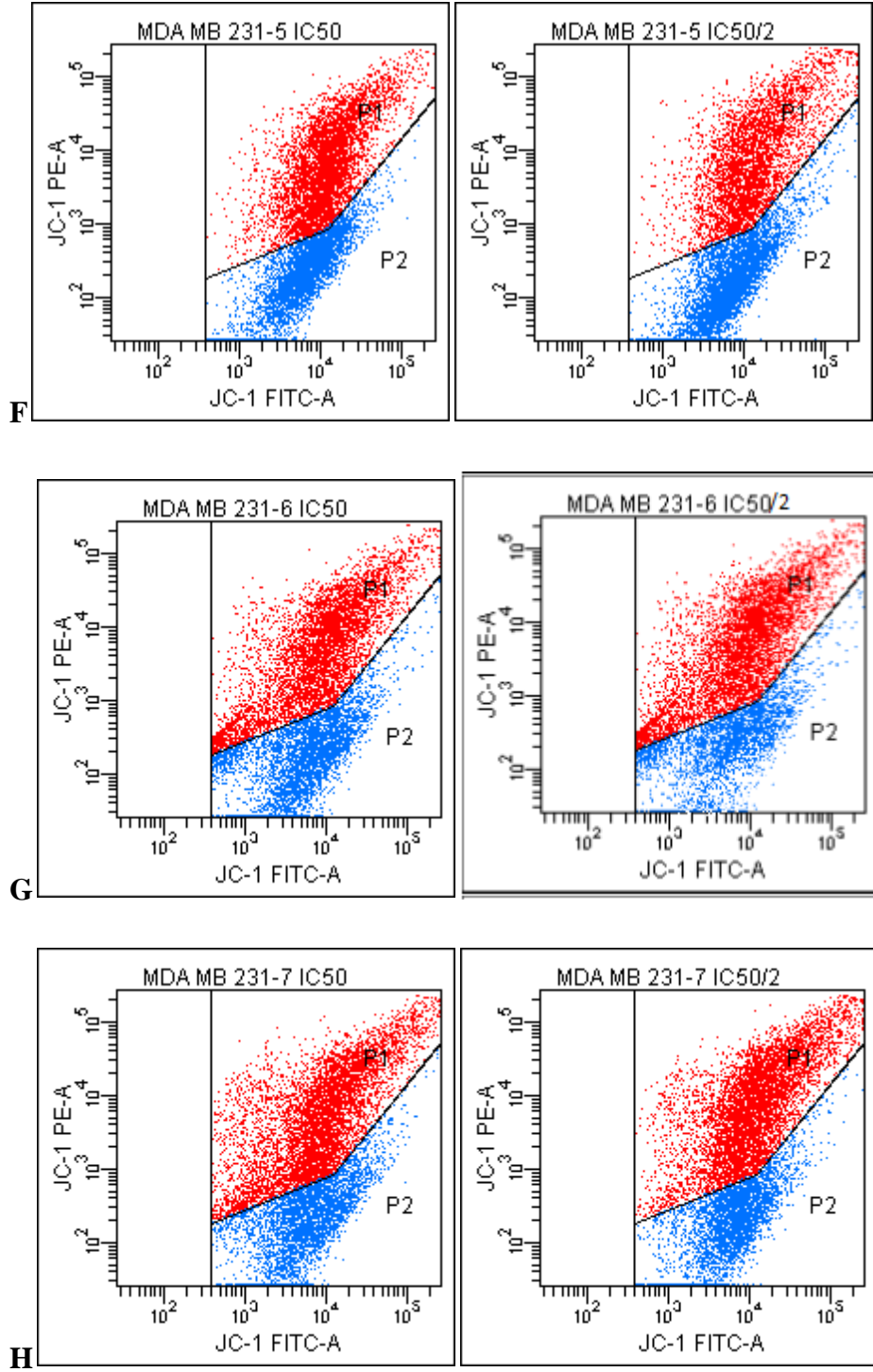
Şekil 4.5. Tamoksifen, sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki mitokondriyal membran aktiviteleri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol B) Tamoksifen IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri

(P1= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitokondriyal aktivite)



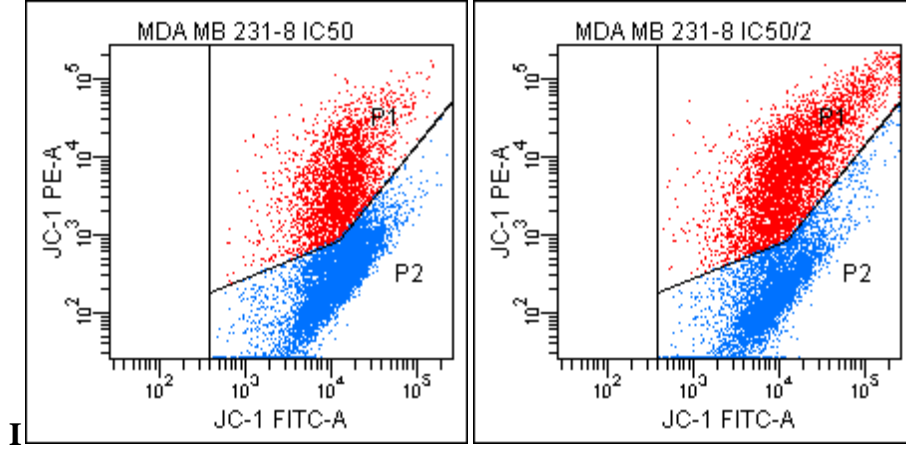
Şekil 4.5. C) Sisplatin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri D) Bileşik 3'ün IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri E) Bileşik 4'ün IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri

(P1= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitokondriyal aktivite)



Şekil 4.5. F) Bileşik 5'in IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri D) Bileşik 6'nın IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri E) Bileşik 7'nin IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri

(P1= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitokondriyal aktivite)



Şekil 4.5. F) Bileşik 8'in IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri

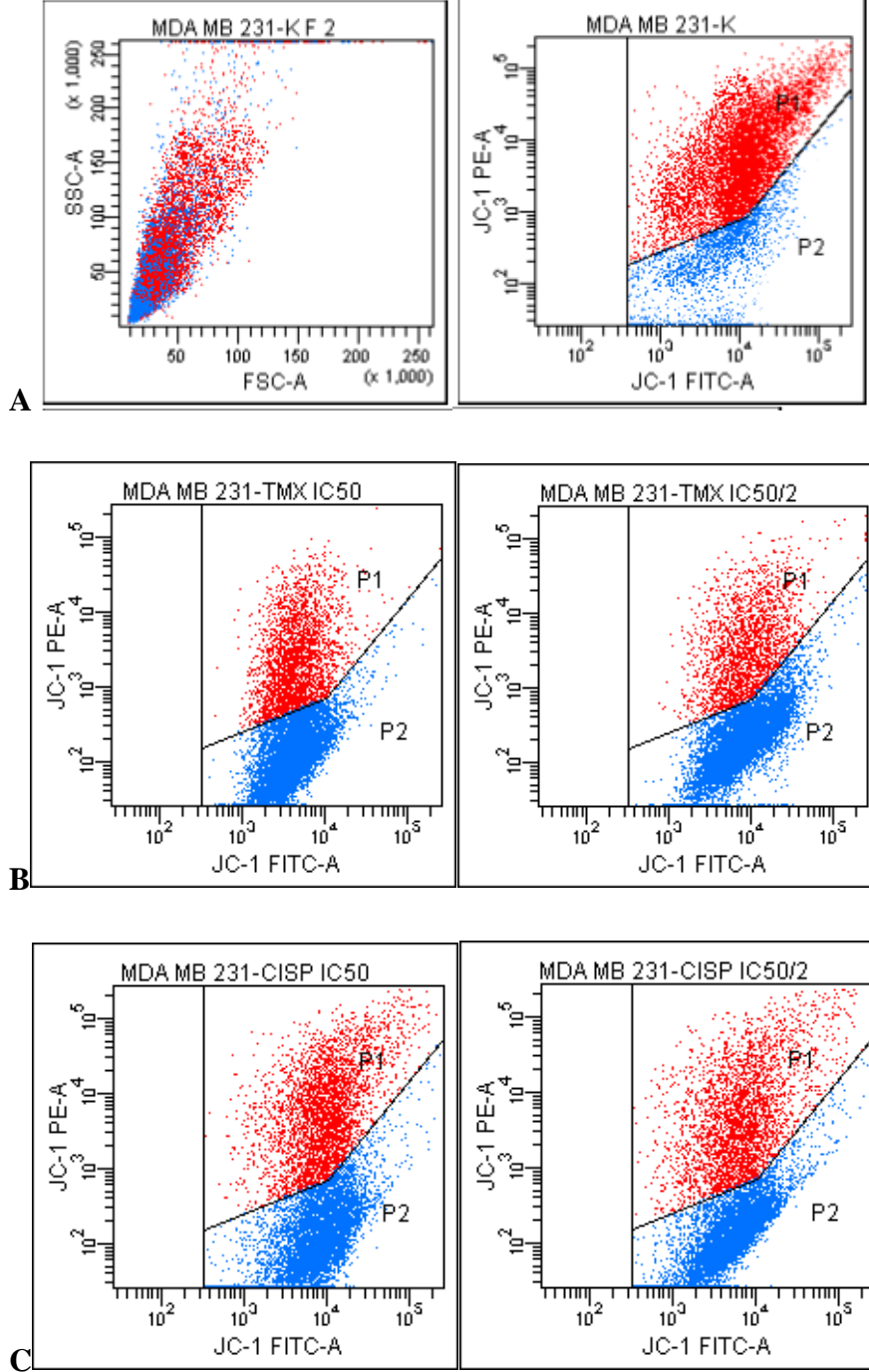
(P1= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitokondriyal aktivite)

Çizelge 4.21. Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki 24. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite değerleri

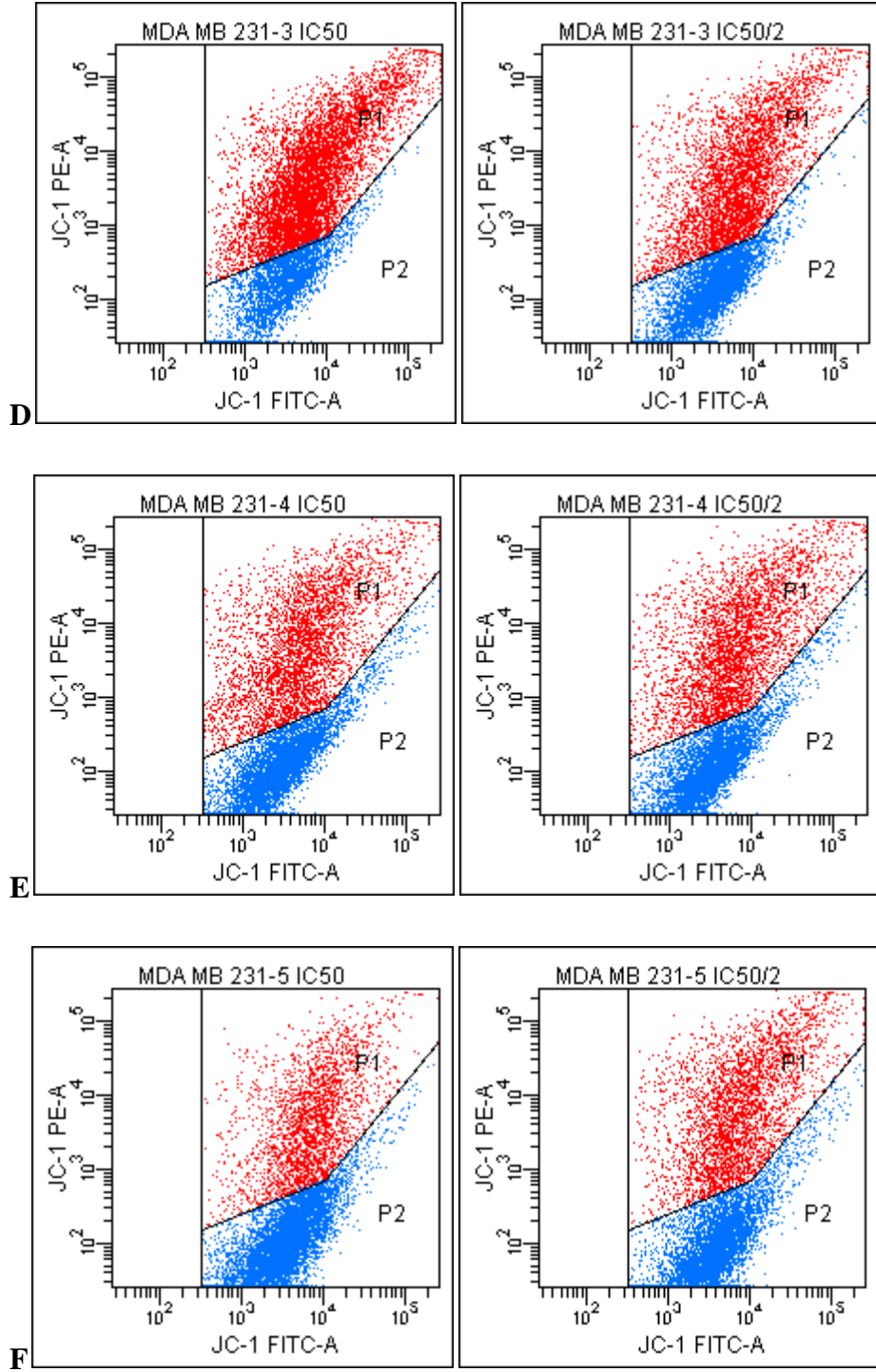
(P1= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitokondriyal aktivite)

24. Saat	P1(%)	P2(%)
Kontrol	92,5	7,7
Tamoksifen IC ₅₀	40,0	60,2
Tamoksifen IC _{50/2}	53,7	46,7
Sisplatin IC ₅₀	16,2	84,1
Sisplatin IC _{50/2}	41,3	57,9
Bileşik 3 IC ₅₀	61,9	38,0
Bileşik 3 IC _{50/2}	65,1	35,0
Bileşik 4 IC ₅₀	49,8	49,8
Bileşik 4 IC _{50/2}	49,4	50,0
Bileşik 5 IC ₅₀	53,3	46,6
Bileşik 5 IC _{50/2}	42,2	57,6
Bileşik 6 IC ₅₀	55,0	41,6
Bileşik 6 IC _{50/2}	63,5	35,2
Bileşik 7 IC ₅₀	60,7	38,2
Bileşik 7 IC _{50/2}	63,7	36,2
Bileşik 8 IC ₅₀	32,0	68,3
Bileşik 8 IC _{50/2}	52,4	47,7

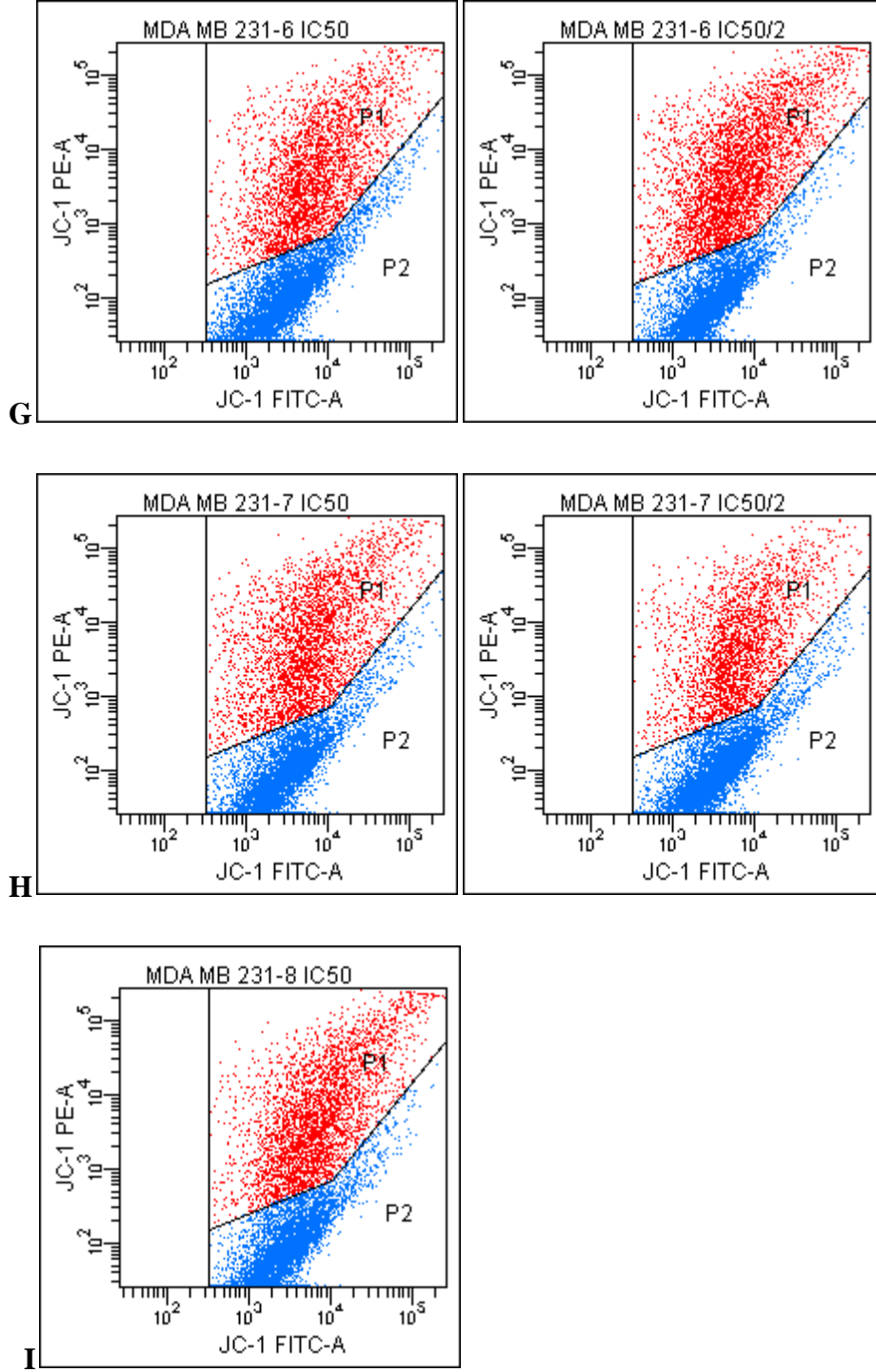
4.2.2.2. MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerinin uygulanması sonrası 48. Saatte oluşan mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi



Şekil 4.6. Tamoksifen, sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki mitokondriyal membran aktiviteleri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol B) Tamoksifen IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri (P1= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitokondriyal aktivite)



Şekil 4.6. D) Bileşik 3'ün IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri E) Bileşik 4'ün IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri F) Bileşik 5'in IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri (P1= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitokondriyal aktivite)



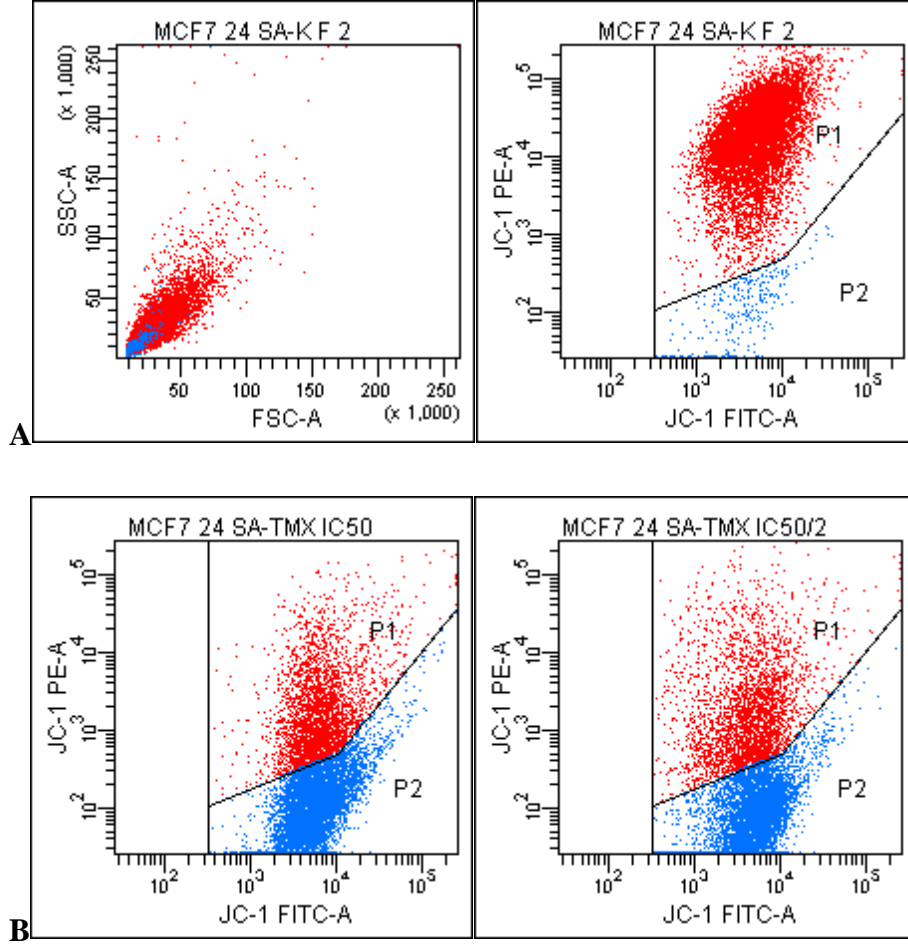
Şekil 4.6. G) Bileşik 6'nın IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri H) Bileşik 7'nin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri I) Bileşik 8'in IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri
(P1= Mitochondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitochondriyal aktivite)

Çizelge 4.22. Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki 48. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite değerleri

(P1= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitokondriyal aktivite)

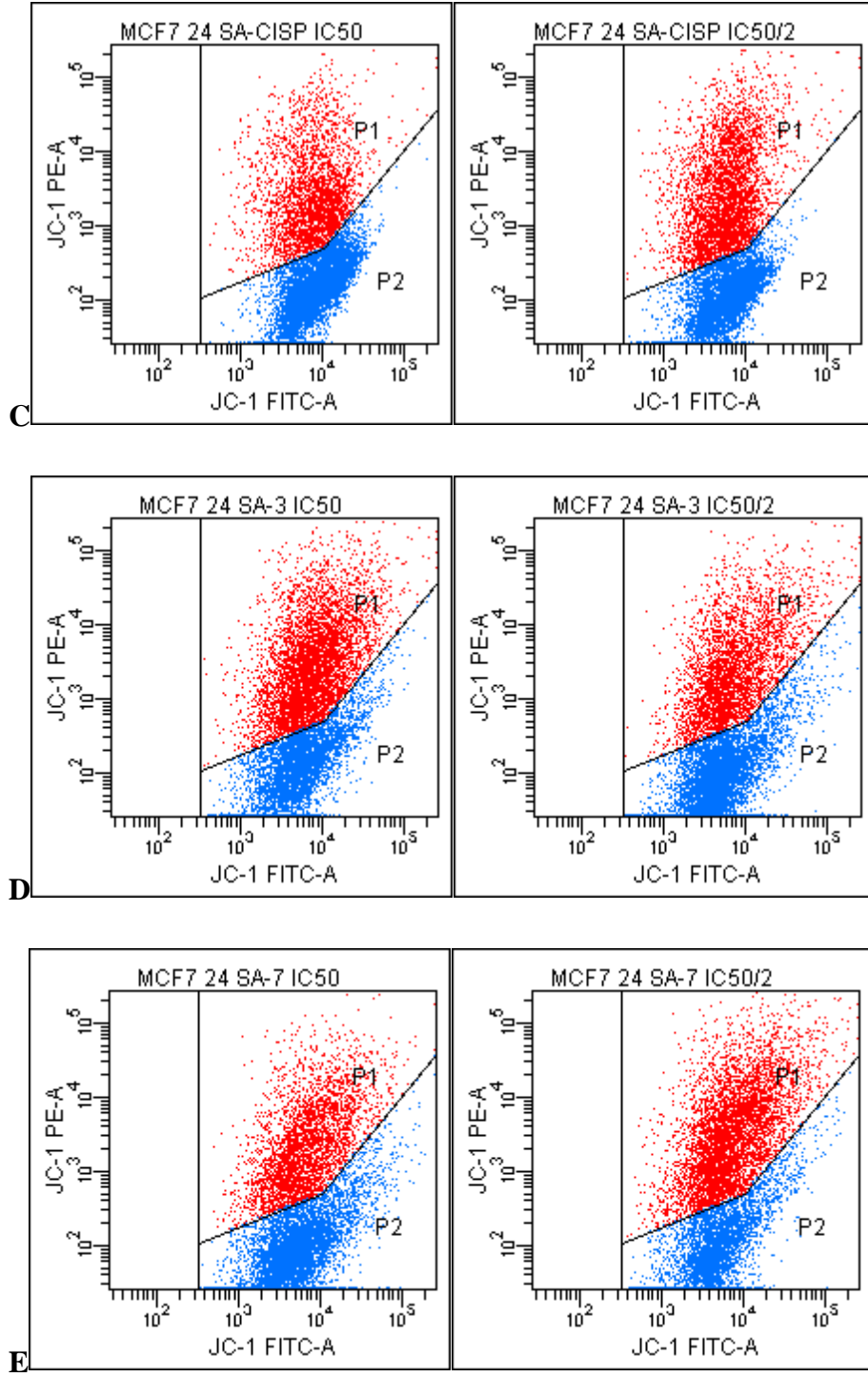
48. Saat	P1(%)	P2(%)
Kontrol	90,4	9,8
Tamoksifen IC₅₀	28,1	72,0
Tamoksifen IC_{50/2}	22,1	78,1
Sisplatin IC₅₀	35,1	64,9
Sisplatin IC_{50/2}	31,6	67,7
Bileşik 3 IC₅₀	68,1	31,3
Bileşik 3 IC_{50/2}	45,6	53,0
Bileşik 4 IC₅₀	36,6	61,1
Bileşik 4 IC_{50/2}	37,9	60,4
Bileşik 5 IC₅₀	25,1	73,6
Bileşik 5 IC_{50/2}	33,7	65,4
Bileşik 6 IC₅₀	31,7	65,1
Bileşik 6 IC_{50/2}	41,8	56,7
Bileşik 7 IC₅₀	33,4	65,2
Bileşik 7 IC_{50/2}	26,6	71,8
Bileşik 8 IC₅₀	36,6	61,9
Bileşik 8 IC_{50/2}	48,7	52,4

4.2.2.3. MCF-7 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerinin uygulanması sonrası 24. Saatte oluşan mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi



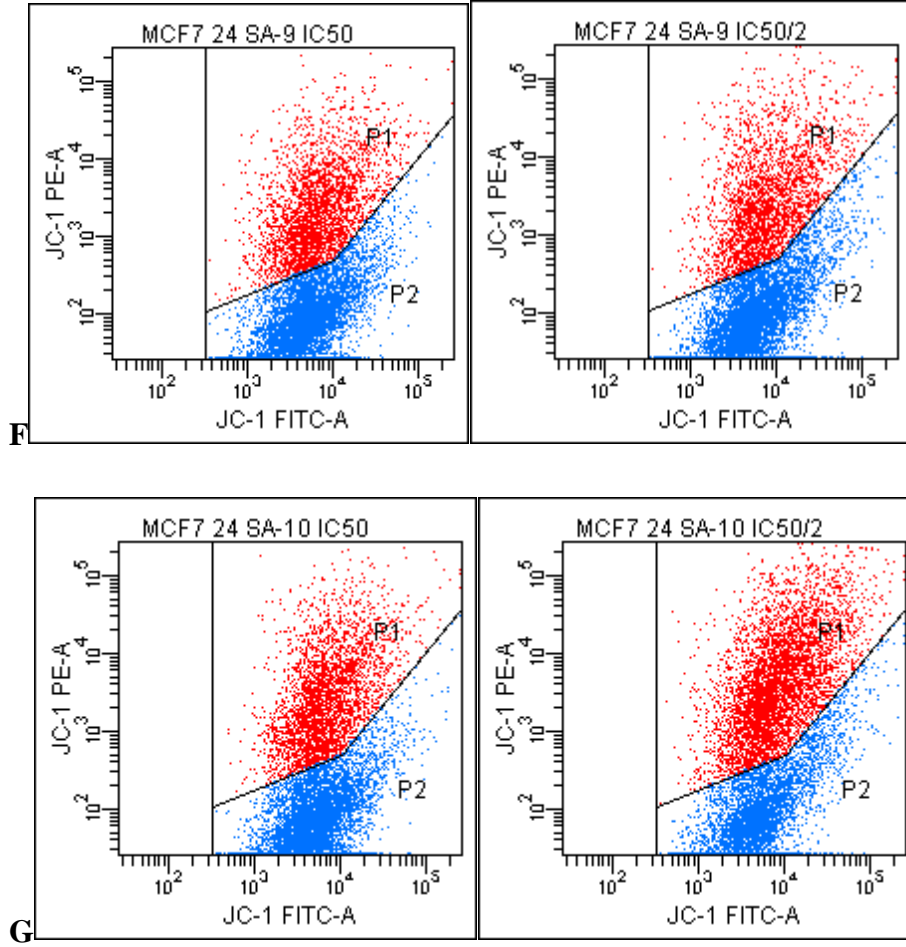
Şekil 4.7. Tamoksifen, sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin MCF-7 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki mitokondriyal membran aktiviteleri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol B) Tamoksifen IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri

(P1= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitokondriyal aktivite)



Şekil 4.7. C) Sisplatin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri D) Bileşik 3'ün IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri E) Bileşik 7'nin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri

(P1= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitokondriyal aktivite)



Şekil 4.7. F) Bileşik 9'un IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri G) Bileşik 10'un IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri

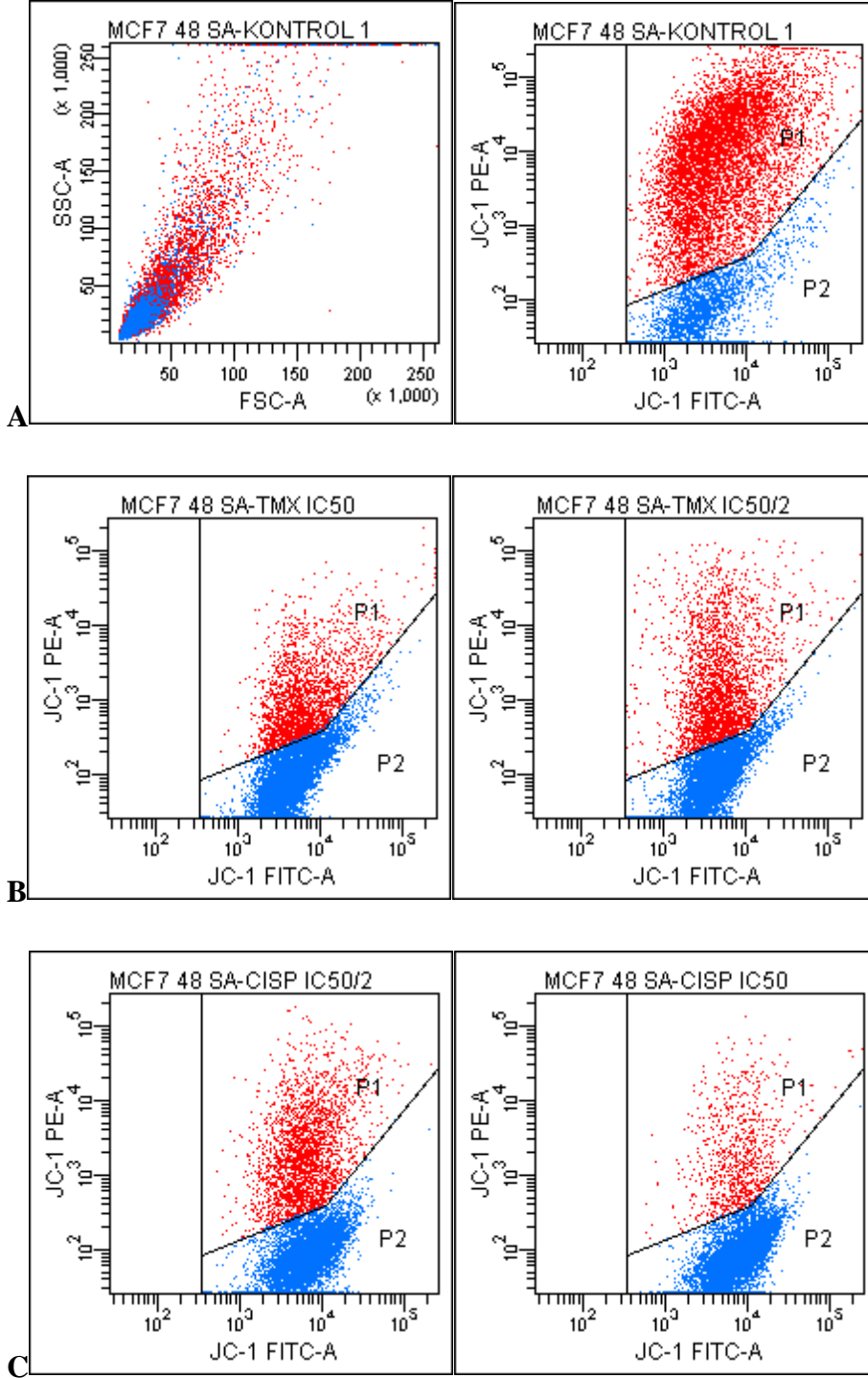
(P1= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitokondriyal aktivite)

Çizelge 4.23. Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MCF-7 hücre hatları üzerindeki 24. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite değerleri

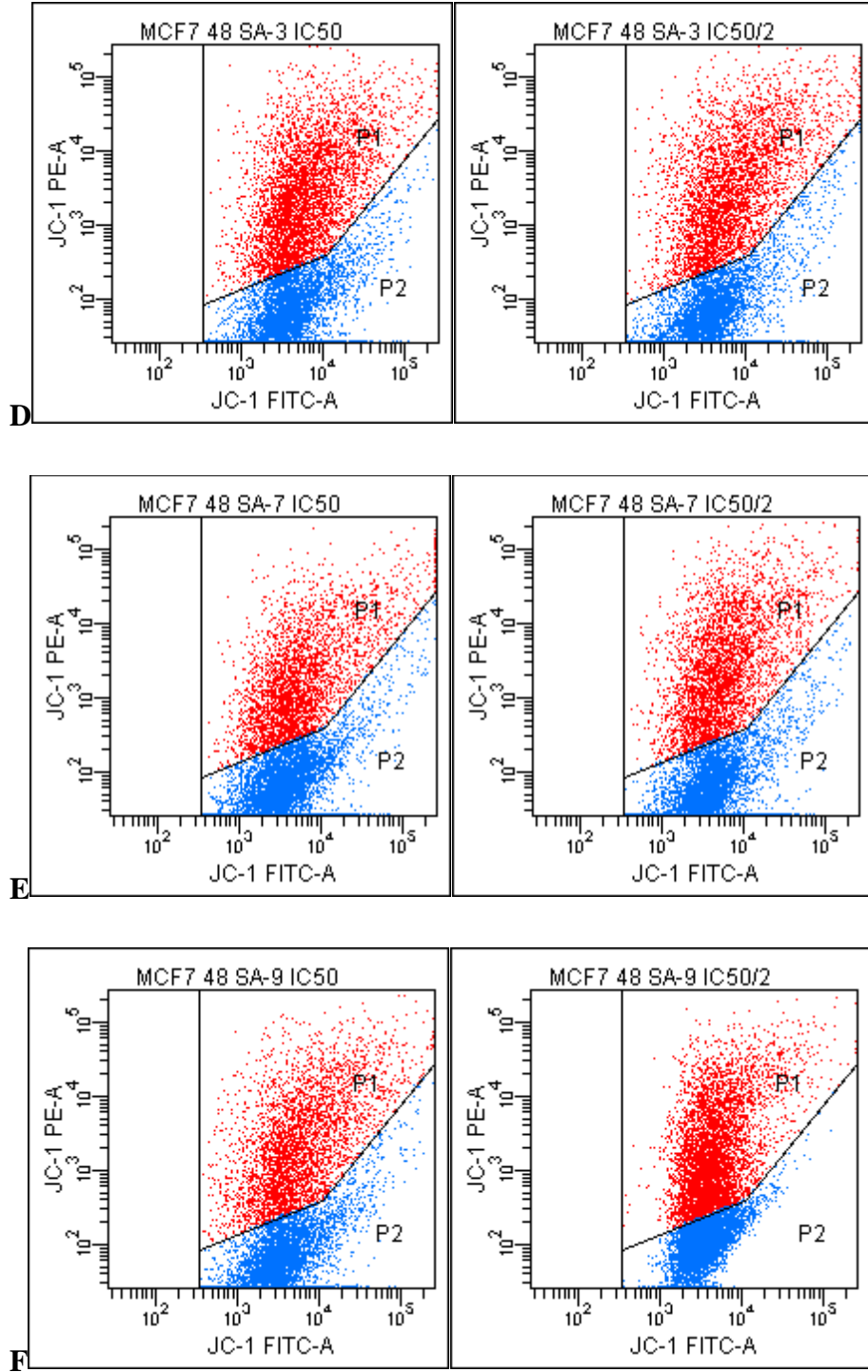
(P1= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitokondriyal aktivite)

24. Saat	P1(%)	P2(%)
Kontrol	92,6	7,4
Tamoksifen IC₅₀	31,3	68,9
Tamoksifen IC_{50/2}	31,4	68,2
Sisplatin IC₅₀	30,9	69,4
Sisplatin IC_{50/2}	42,0	58,1
Bileşik 3 IC₅₀	35,4	64,7
Bileşik 3 IC_{50/2}	53,8	46,5
Bileşik 7 IC₅₀	34,9	65,2
Bileşik 7 IC_{50/2}	54,9	45,2
Bileşik 9 IC₅₀	30,4	69,6
Bileşik 9 IC_{50/2}	28,3	71,8
Bileşik 10 IC₅₀	33,8	66,4
Bileşik 10 IC_{50/2}	50,0	50,1

4.2.2.4. MCF-7 hücre hattı üzerinde sisplatin, tamoksifen ve sentez maddelerin uygulanması sonrası 48. Saatte oluşan mitokondriyal membran aktivitesinin belirlenmesi

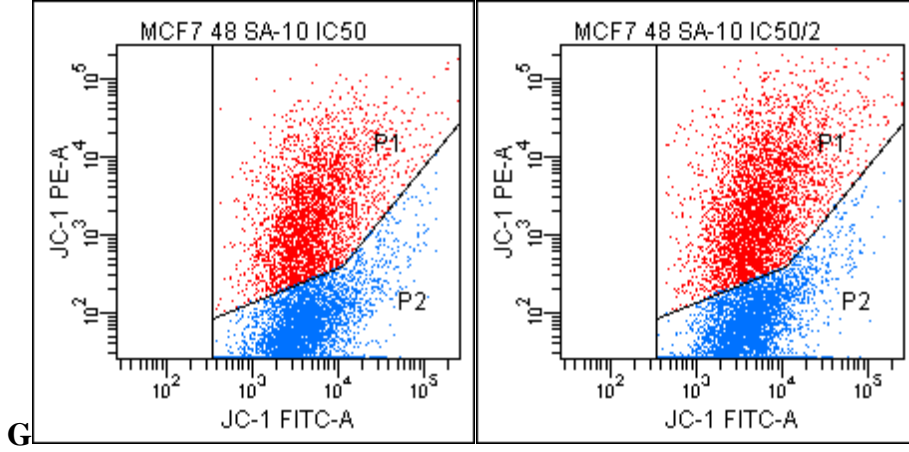


Şekil 4.8. A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol B) Tamoksifen IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri (P1= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitokondriyal aktivite)



Şekil 4.8. D) Bileşik 3'ün IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri E) Bileşik 7'nin IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri F) Bileşik 9'un IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri

(P1= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, P2= Mitokondriyal aktivite)



Şekil 4.8. D) Bileşik 10'un IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri

(**P1**= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, **P2**= Mitokondriyal aktivite)

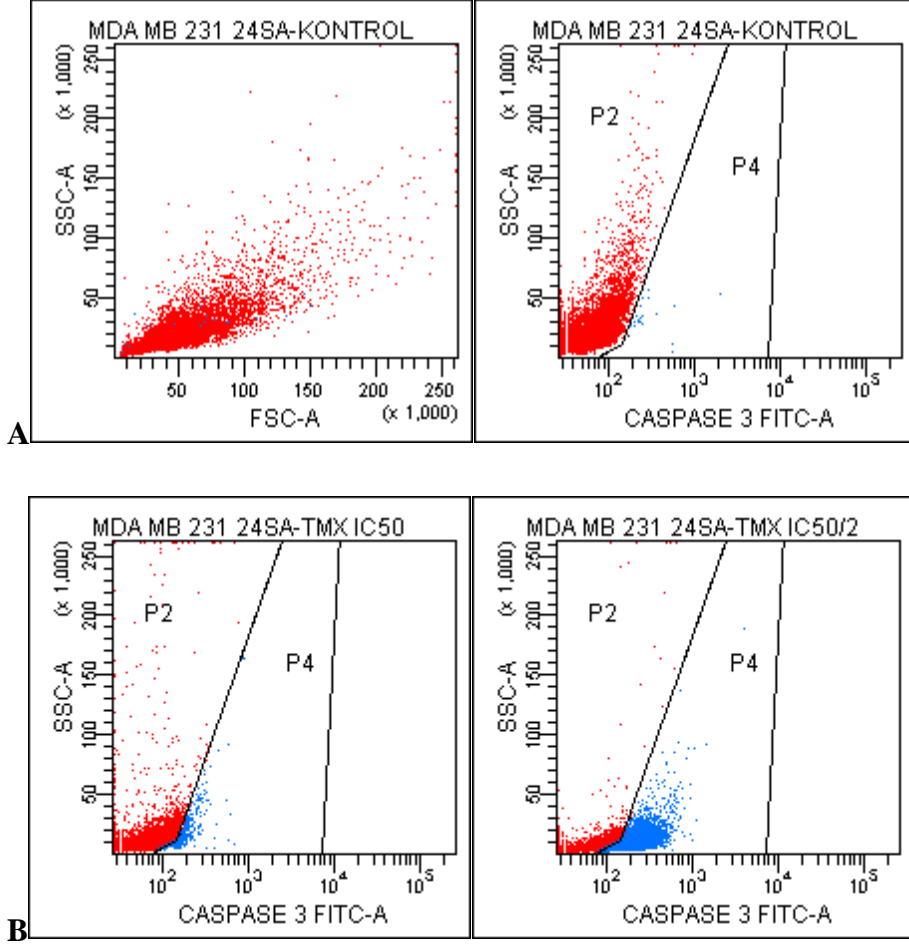
Çizelge 4.24. Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MCF-7 hücre hatları üzerindeki 24. Saat analizi sonrası % mitokondriyal aktivite değerleri

(**P1**= Mitokondriyal aktivite göstermeyen, **P2**= Mitokondriyal aktivite)

48. Saat	P1(%)	P2(%)
Kontrol	75,6	24,0
Tamoksifen IC_{50}	23,2	76,3
Tamoksifen $IC_{50/2}$	29,2	70,6
Sisplatin IC_{50}	26,5	73,6
Sisplatin $IC_{50/2}$	35,9	63,2
Bileşik 3 IC_{50}	38,7	59,0
Bileşik 3 $IC_{50/2}$	44,8	55,2
Bileşik 7 IC_{50}	33,1	66,1
Bileşik 7 $IC_{50/2}$	37,2	62,2
Bileşik 9 IC_{50}	35,9	63,2
Bileşik 9 $IC_{50/2}$	53,6	46,5
Bileşik 10 IC_{50}	32,3	67,2
Bileşik 10 $IC_{50/2}$	41,5	58,1

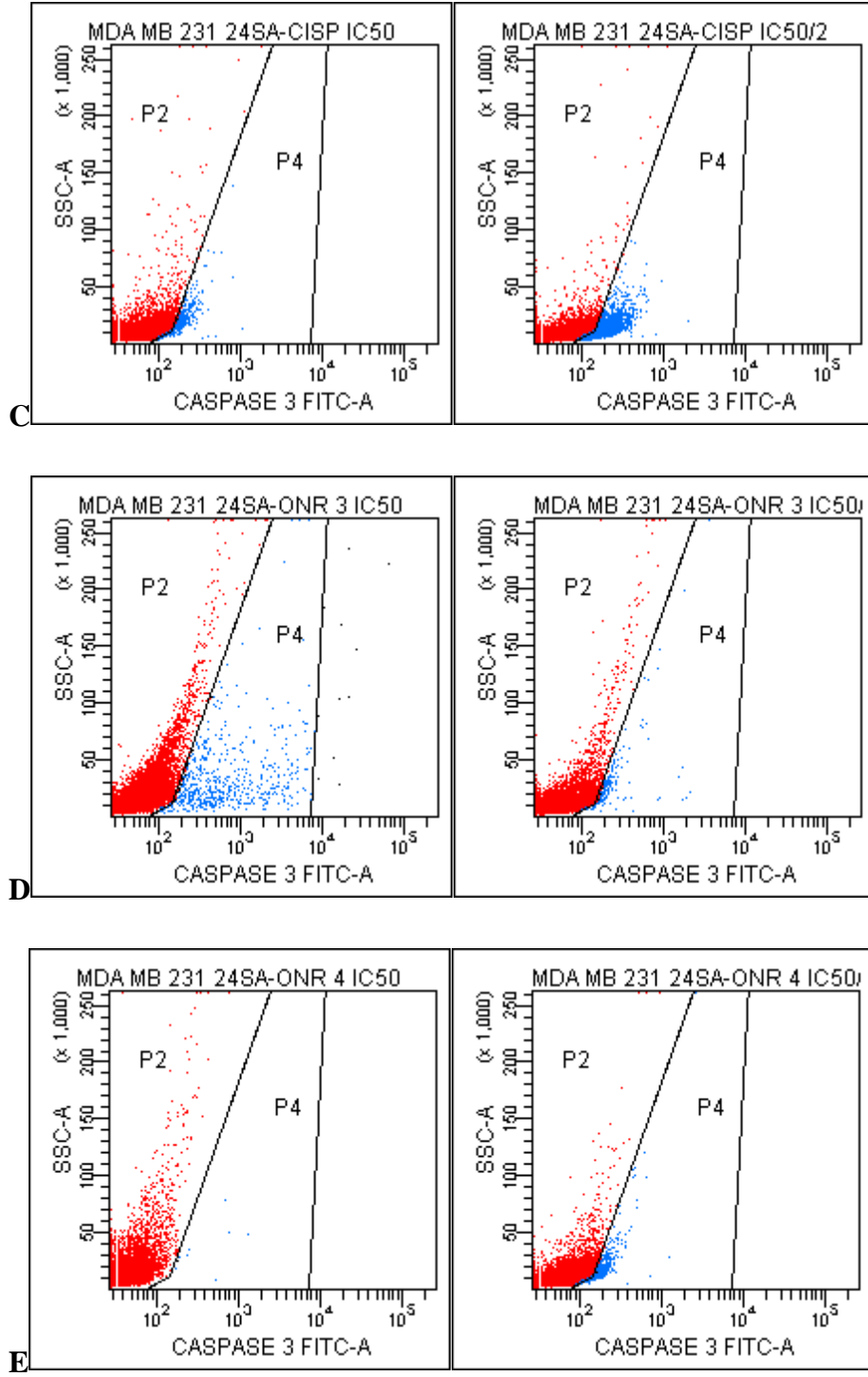
4.2.3. Akım sitometrisinde kaspaz-3 analizi ile kaspaz aktivitesinin belirlenmesi

4.2.3.1. MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 24. Saatte kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi



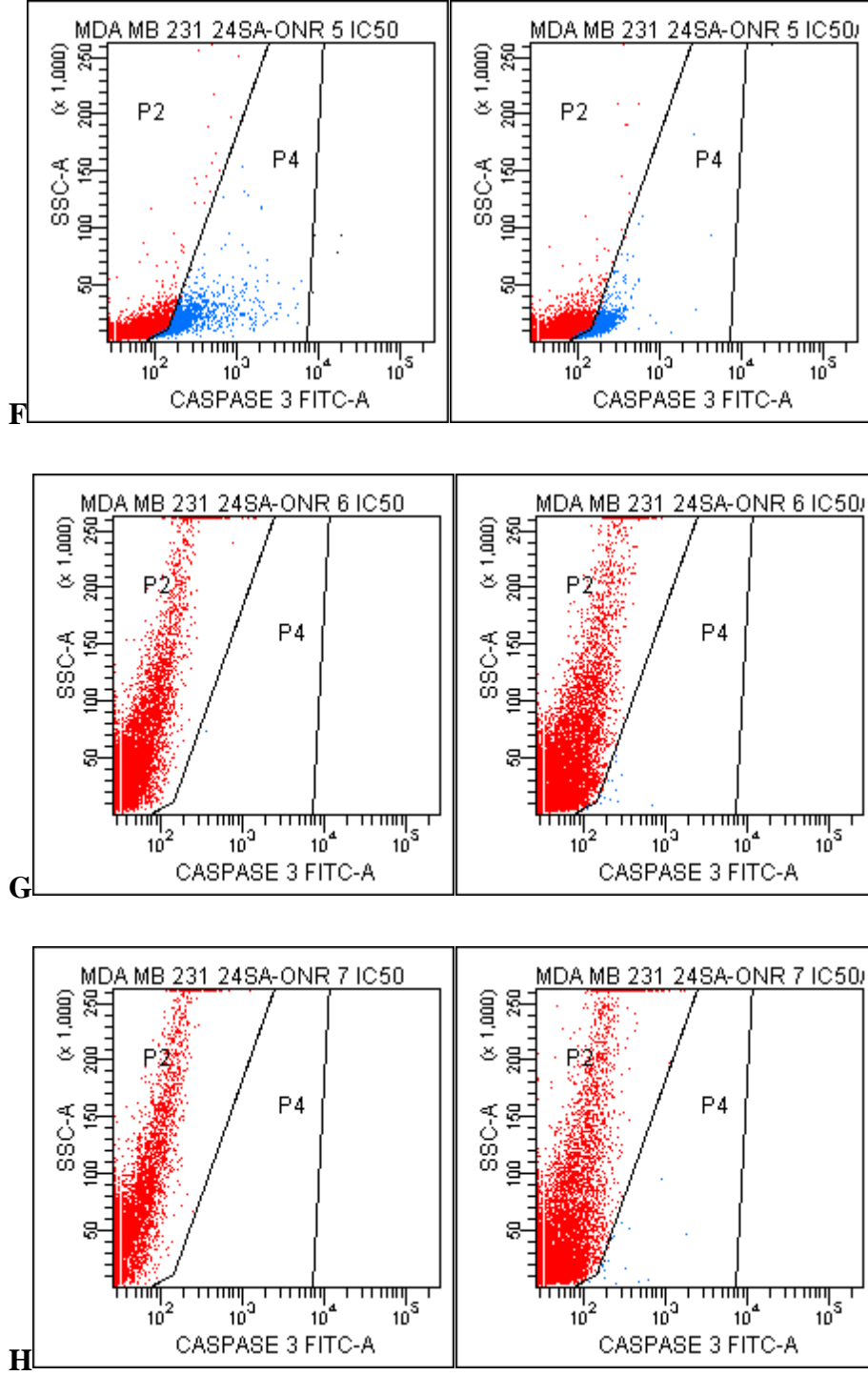
Şekil 4.9. Tamoksifen, sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 24. Saatteki kaspaz-3 aktiviteleri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol B) Tamoksifen IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri

(P2= Kaspaz-3 aktivasyonu göstermeyen, P4= Kaspaz-3 aktivasyonu gösteren)



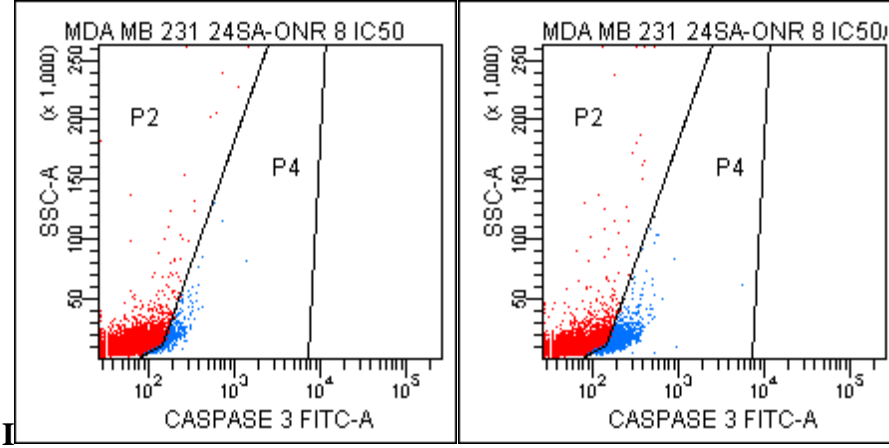
Şekil 4.9. C) Sisplatin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri D) Bileşik 3'ün IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri E) Bileşik 4'ün IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri

(P2= Kaspaz-3 aktivasyonu göstermeyen, P4= Kaspaz-3 aktivasyonu gösteren)



Şekil 4.9. F) Bileşik 5'in IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri G) Bileşik 6'nın IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri H) Bileşik 7'nin IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri

(P2= Kaspaz-3 aktivasyonu göstermeyen, P4= Kaspaz-3 aktivasyonu gösteren)



Şekil 4.9. 1) Bileşik 8'in IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri

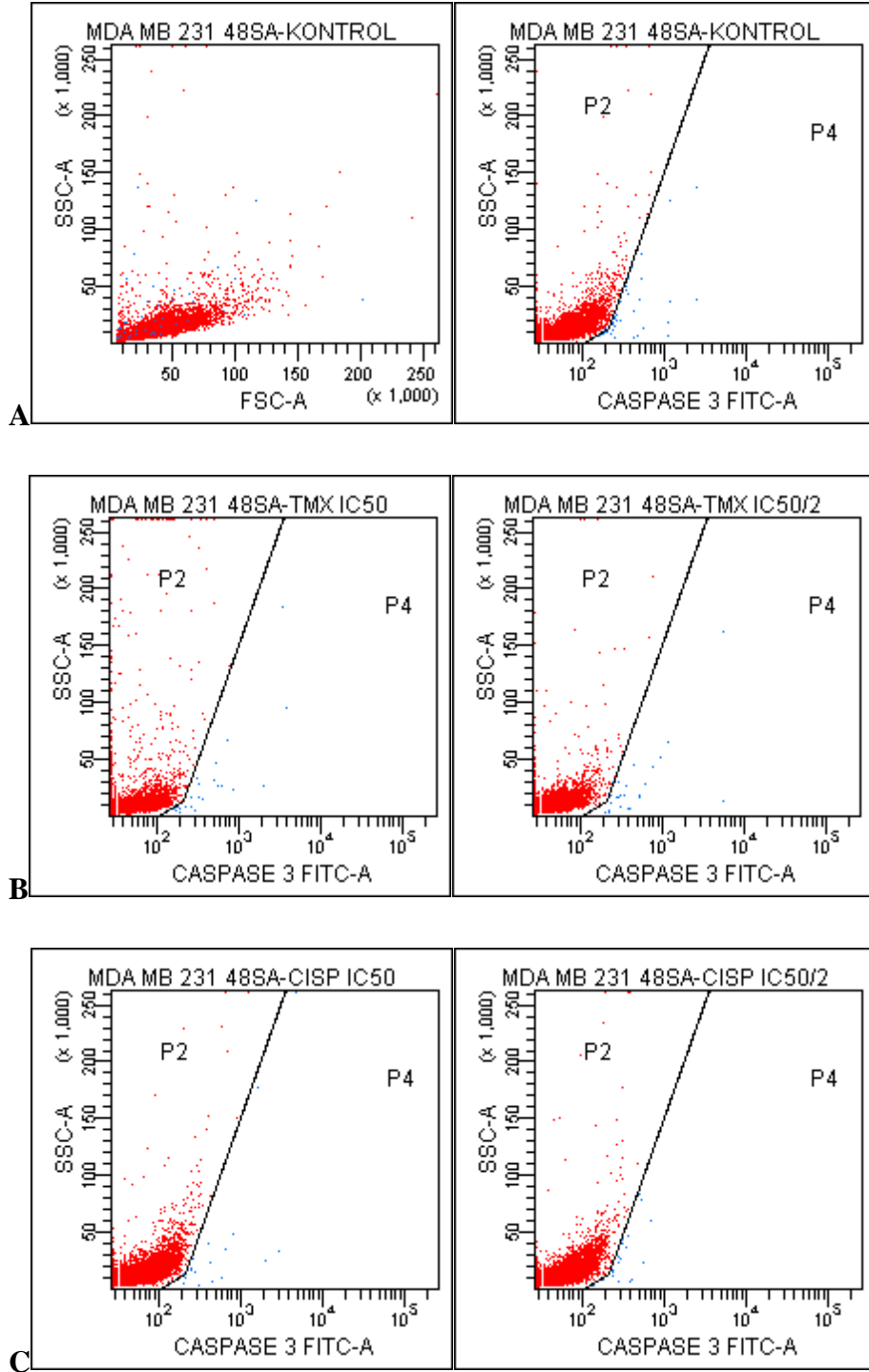
(P2= Kaspaz-3 aktivasyonu göstermeyen, P4= Kaspaz-3 aktivasyonu gösteren)

Çizelge 4.25. Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MDA-MB-231 üzerindeki kaspaz-3 24. Saatteki % aktivasyonları

(P2= Kaspaz-3 aktivasyonu göstermeyen, P4= Kaspaz-3 aktivasyonu gösteren)

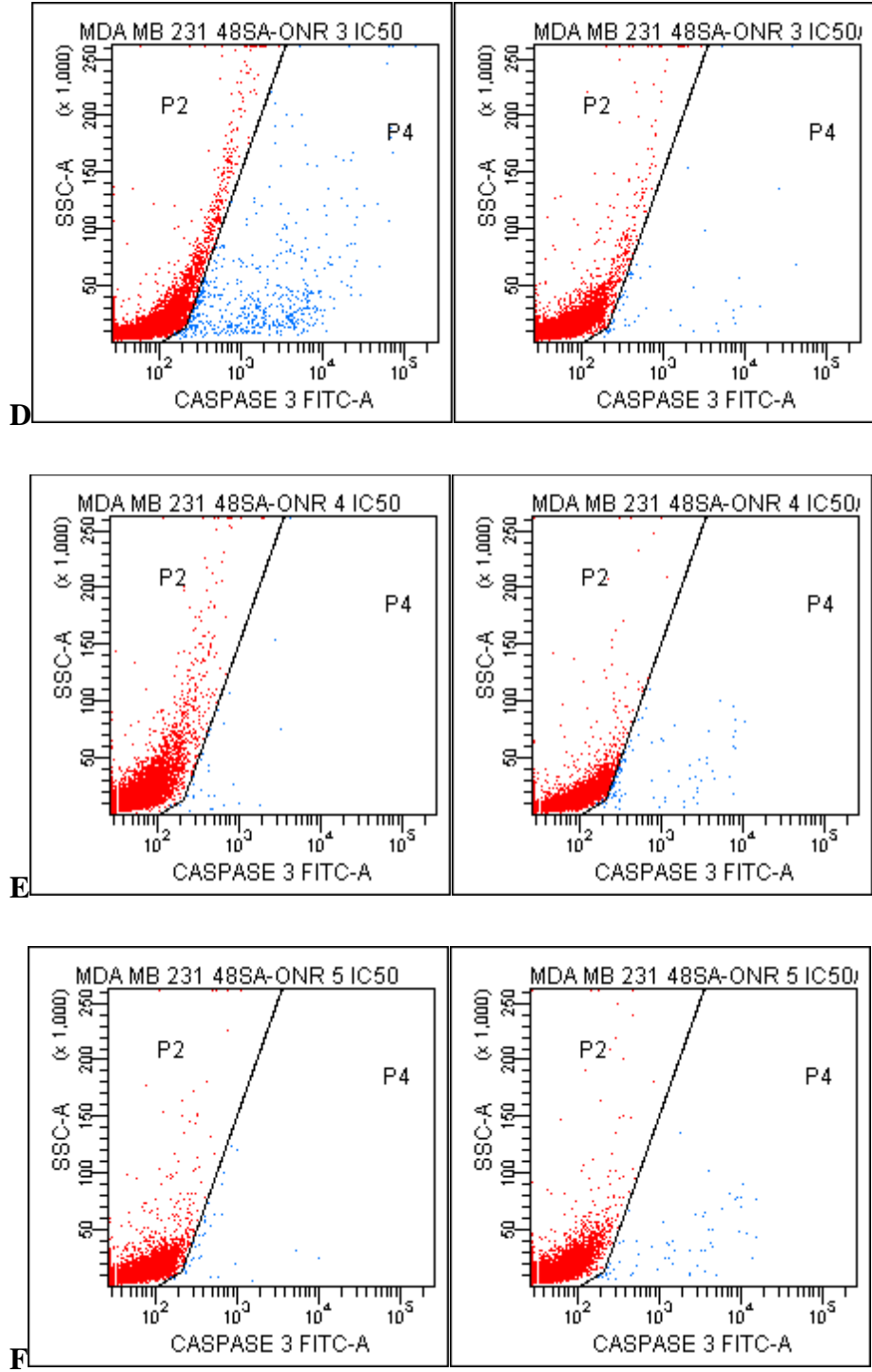
24. Saat	P2(%)	P4(%)
Kontrol	99,2	0,2
Tamoksifen IC₅₀	96,4	3,3
Tamoksifen IC_{50/2}	35,2	64,5
Sisplatin IC₅₀	96,0	3,4
Sisplatin IC_{50/2}	73,7	26,0
Bileşik 3 IC₅₀	94,0	5,6
Bileşik 3 IC_{50/2}	98,1	1,7
Bileşik 4 IC₅₀	99,9	0,1
Bileşik 4 IC_{50/2}	95,6	3,9
Bileşik 5 IC₅₀	83,6	15,6
Bileşik 5 IC_{50/2}	85,7	13,8
Bileşik 6 IC₅₀	100	0
Bileşik 6 IC_{50/2}	99,8	0,2
Bileşik 7 IC₅₀	100	0
Bileşik 7 IC_{50/2}	99,8	0,2
Bileşik 8 IC₅₀	95,5	4,1
Bileşik 8 IC_{50/2}	85,5	4,1

4.2.3.2. MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 48. Saatte kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi



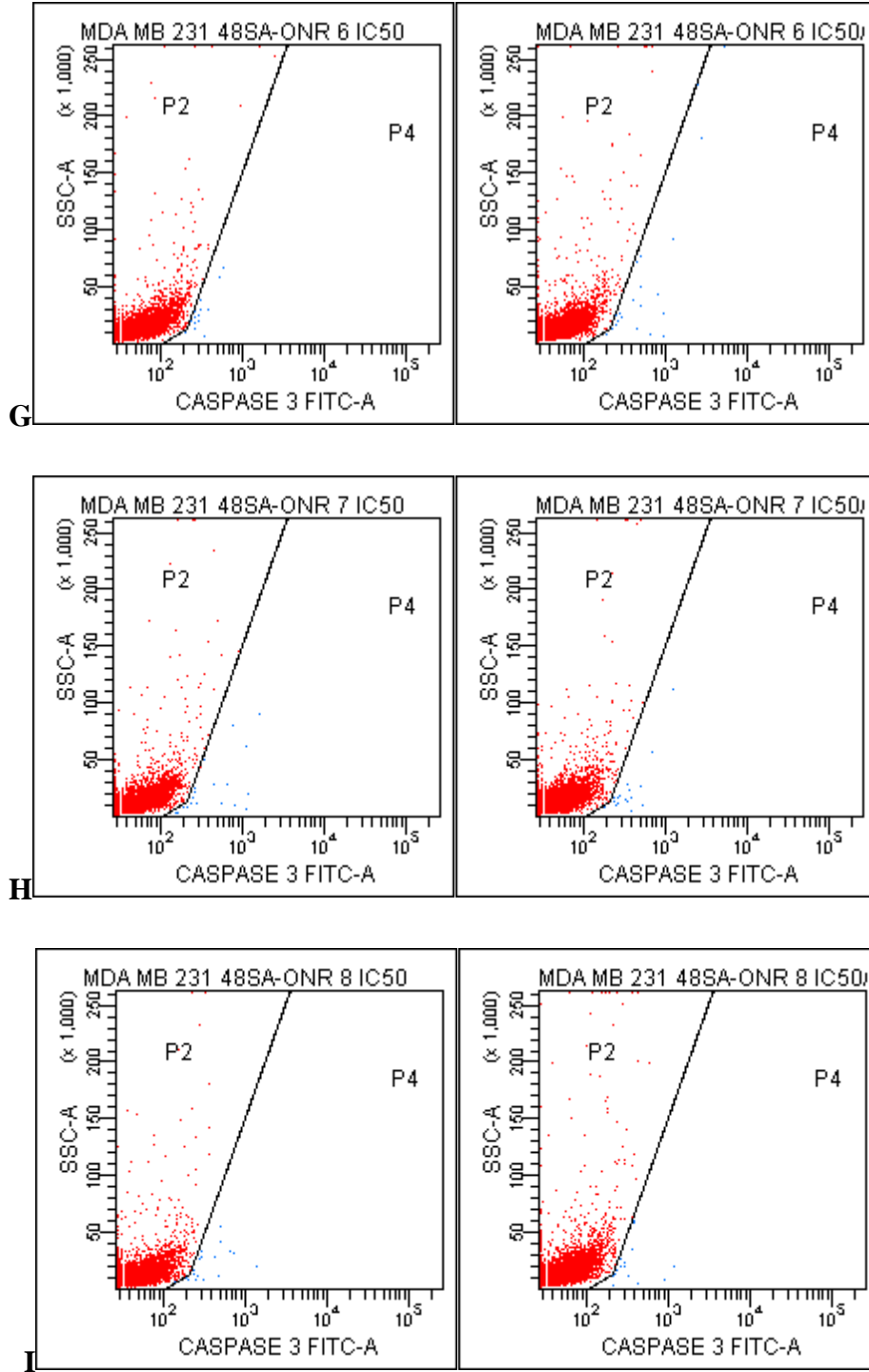
Şekil 4.10. Tamoksifen, sisplatin ve sentezlenen bileşiklerin MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde 48. Saatteki kaspaz-3 aktiviteleri A) Hücre popülasyonu içerisinde seçilen anakapı ve kontrol B) Tamoksifen IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri C) Sisplatin IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri

(P2= Kaspaz-3 aktivasyonu göstermeyen, P4= Kaspaz-3 aktivasyonu gösteren)



Şekil 4.10. D) Bileşik 3'ün IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri E) Bileşik 4'ün IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri F) Bileşik 5'in IC_{50} ve $IC_{50/2}$ analizleri

(P2= Kaspaz-3 aktivasyonu göstermeyen, P4= Kaspaz-3 aktivasyonu gösteren)



Şekil 4.10. G) Bileşik 6'nın IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri H) Bileşik 7'nin IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri I) Bileşik 8'in IC₅₀ ve IC_{50/2} analizleri
(P2= Kaspaz-3 aktivasyonu göstermeyen, P4= Kaspaz-3 aktivasyonu gösteren)

Çizelge 4.26. Tamoksifen, sisplatin ve sentez bileşiklerin MDA-MB-231 üzerindeki kaspaz-3 48. Saatteki %aktivasyonları

(P2= Kaspaz-3 aktivasyonu göstermeyen, P4= Kaspaz-3 aktivasyonu gösteren)

48. Saat	P2(%)	P4(%)
Kontrol	99,6	0,4
Tamoksifen IC₅₀	99,8	0,2
Tamoksifen IC_{50/2}	99,8	0,3
Sisplatin IC₅₀	99,8	0,2
Sisplatin IC_{50/2}	99,2	0,2
Bileşik 3 IC₅₀	99,4	5,6
Bileşik 3 IC_{50/2}	99,4	0,6
Bileşik 4 IC₅₀	99,9	0,1
Bileşik 4 IC_{50/2}	99,2	1,0
Bileşik 5 IC₅₀	99,6	0,4
Bileşik 5 IC_{50/2}	99,4	0,6
Bileşik 6 IC₅₀	99,9	0,2
Bileşik 6 IC_{50/2}	99,8	0,2
Bileşik 7 IC₅₀	99,8	0,2
Bileşik 7 IC_{50/2}	99,8	0,2
Bileşik 8 IC₅₀	99,8	0,2
Bileşik 8 IC_{50/2}	99,8	02

Çizelge 4.27. Bileşik ve pozitif kontrollerin, MTT ve Akım sitometrisi analizleri (Annexin-V, Q2: Erken apoptoz-Q4: Geç apoptoz), (JC-1, P2: Mitokondriyal aktivite), (Kaspaz-3, P4: Kaspaz-3 aktivasyonu gösteren)

Deneyler/bileşikler	Tamoksifen	Sisplatin	Bileşik 3	Bileşik 4	Bileşik 5	Bileşik 6	Bileşik 7	Bileşik 8	Bileşik 9	Bileşik 10
L-929 MTT IC ₅₀ 24.Saat	N/A	N/A	196,66±2,88 µg/mL	>500 µg/mL	207,5±10,6 µg/mL	>500 µg/mL	>500 µg/mL	48,33±4,04 µg/mL	49,66±4,5 µg/mL	19,33±0,58 µg/mL
L-929 MTT IC ₅₀ 48. Saat	N/A	N/A	53,66±3,51 µg/mL	>500 µg/mL	187,66±3,05 µg/mL	85,5±6,36 µg/mL	>500 µg/mL	5,85±1,62 µg/mL	45,33±5,68 µg/mL	4,75±0,63 µg/mL
NIH/3T3 MTT IC ₅₀ 24. Saat	N/A	N/A	185±9,89 µg/mL	99,5±2,12 µg/mL	4,86±0,32 µg/mL	<3,9 µg/mL	407,5±17,67 µg/mL	6,16±0,75 µg/mL	42±4,24 µg/mL	115,5±6,36 µg/mL
NIH/3T3 MTT IC ₅₀ 48. Saat	N/A	N/A	5,56±0,49 µg/mL	15,5±0,7 µg/mL	<3,9 µg/mL	<3,9 µg/mL	5,83±0,28 µg/mL	14,33±0,57 µg/mL	6,75±0,35 µg/mL	<3,9 µg/mL
MDA-MB-231 MTT IC ₅₀ 24. Saat	2,03±0,66 µg/MI	29,53±1,49 µg/mL	21,33±0,57 µg/mL	56,66±4,16 µg/mL	19,66±3,51 µg/mL	198,33±12,58 µg/mL	292,5±3,53 µg/mL	5,33±1,44 µg/mL	>500 µg/mL	>500 µg/mL
MDA-MB-231 MTT IC ₅₀ 48. Saat	0,98±0,11 µg/mL	15,33±1,57 µg/mL	19,33±1,15 µg/mL	12,33±2,3 µg/mL	27,33±2,51 µg/mL	4,7±0,28 µg/mL	<3,9 µg/mL	3,66±1,52 µg/mL	>500 µg/mL	>500 µg/mL
MCF-7 MTT IC ₅₀ 24. Saat	5,12±0,82 µg/mL	11,41±1,15 µg/mL	9,58±2,17 µg/mL	60,57±2,5 µg/mL	50,32±5,11 µg/mL	>500 µg/mL	12,67±2,88 µg/mL	85,97±6,42 µg/mL	4,13±0,63 µg/mL	12,32±1,15 µg/mL
MCF-7 MTT IC ₅₀ 48. Saat	<3,9 µg/mL	<3,9 µg/mL	<3,9 µg/mL	<3,9 µg/mL	<3,9 µg/mL	<3,9 µg/mL	<3,9 µg/mL	<3,9 µg/mL	<3,9 µg/mL	<3,9 µg/mL
MDA-MB-231 IC ₅₀ 24.Saat Annexin-V	Q2: %23,6 Q4: %3,3	Q2: %23,4 Q4: %4,4	Q2: %27 Q4: %1,5	Q2: %16 Q4: %2,4	Q2: %34,4 Q4: %2,0	Q2: %1,7 Q4: %3,3	Q2: %7,3 Q4: %1,2	Q2: %16,0 Q4: %4,7		
MDA-MB-231 IC ₅₀ 48.Saat Annexin-V	Q2: %15,4 Q4: %12,0	Q2: %28,3 Q4: %5,9	Q2: %47,3 Q4: %2,7	Q2: %38 Q4: %4	Q2: %31,5 Q4: %7,2	Q2: %32,9 Q4: %4,6	Q2: %36,4 Q4: %7,1	Q2: %38,1 Q4: %7,6		
MCF-7 24.Saat IC ₅₀ Annein-V	Q2: %40 Q4: %23,8	Q2: %67,8 Q4: %16,2	Q2: %48,7 Q4: %24,5				Q2: %40,5 Q4: %36,2		Q2: %42 Q4: %25,7	Q2: %41,3 Q4: %38,7
MCF-7 48.Saat IC ₅₀ Annein-V	Q2: %16,5 Q4: %38,6	Q2: %24 Q4: %22,9	Q2: %24,1 Q4: %29,5				Q2: %29,3 Q4: %32,5		Q2: %26,3 Q4: %24,4	Q2: %23,5 Q4: %22
MDA-MB-231 IC ₅₀ 24.Saat JC-1	P2: %60,2	P2: %84,1	P2: %38	P2: %49,8	P2: %46,6	P2: %41,6	P2: %38,2	P2: %68,3		
MDA-MB-231 IC ₅₀ 48.Saat JC-1	P2: %72	P2: %64,9	P2: %31,3	P2: %60,4	P2: %65,4	P2: %65,1	P2: %65,2	P2: %61,9		
MCF-7 IC ₅₀ 24.Saat JC-1	P2: %68,9	P2: %69,4	P2: %64,7				P2: %65,2		P2: %69,6	P2: %50,1
MCF-7 IC ₅₀ 48.Saat JC-1	P2: %76,3	P2: %73,6	P2: %59				P2: %66,1		P2: %63,2	P2: %67,2
MDA-MB-231 IC ₅₀ 24.Saat Kaspaz-3	P4: %3,3	P4: %3,4	P4: %5,6	P4: %0,1	P4: %15,6	P4: %0	P4: %0	P4: %4,1		
MDA-MB-231 IC ₅₀ 48.Saat Kaspaz-3	P4: %0,2	P4: %0,2	P4: %5,6	P4: %0,1	P4: %0,4	P4: %0,2	P4: %0,2	P4: %0,2		

4.3. RT-PCR (Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi Sonuçları

MDA-MB-231 östrojen reseptörü negatif ve MCF-7 östrojen reseptörü pozitif hücrelerinde eksprese edilen Ppar γ , Bcl-2, Bax, CYD1 c-MYC, ERK ve pERK genleri ile birlikte house keeping gen olarak GAPDH geni pozitif olarak kullanılarak RT-PCR analizi yapılmıştır. MDA-MB-231 hücre hattı için Bileşik 3 ve tamoksifen, MCF-7 hücre hattı için ise Bileşik 3, 7 ve tamoksifen seçilmiştir. MTT analizi sonucunda hesaplanan IC₅₀ değerleri doz olarak uygulanmıştır. Doz uygulaması sonrasında 24 saatlik inkübasyona bırakılmış ve ardından RT-PCR analizi yapılmıştır. Bu analizler sonucunda Kontrol değerleri 1 olarak kabul edilmiş ve buna göre bileşiklerin ve tamoksifenin Ppar γ , Bcl-2, Bax, CYD1 c-MYC, ERK ve pERK genlerinin ifade düzeyleri 1'in üzerinden kat değişimine göre hesaplanmıştır. 1 değerinin üzerindeki, over eksprese, altındakiler ise down eksprese olarak belirlenmiştir. Kontrole göre olan kat değişimleri **çizelge 4.28.** ve **4.29.**'de verilmiştir.

Çizelge 4.28. MDA-MB-231 hücre hatlarındaki Ppar γ , Bcl-2, Bax, CYD1 c-MYC, ERK ve pERK genlerindeki kat değişimleri.

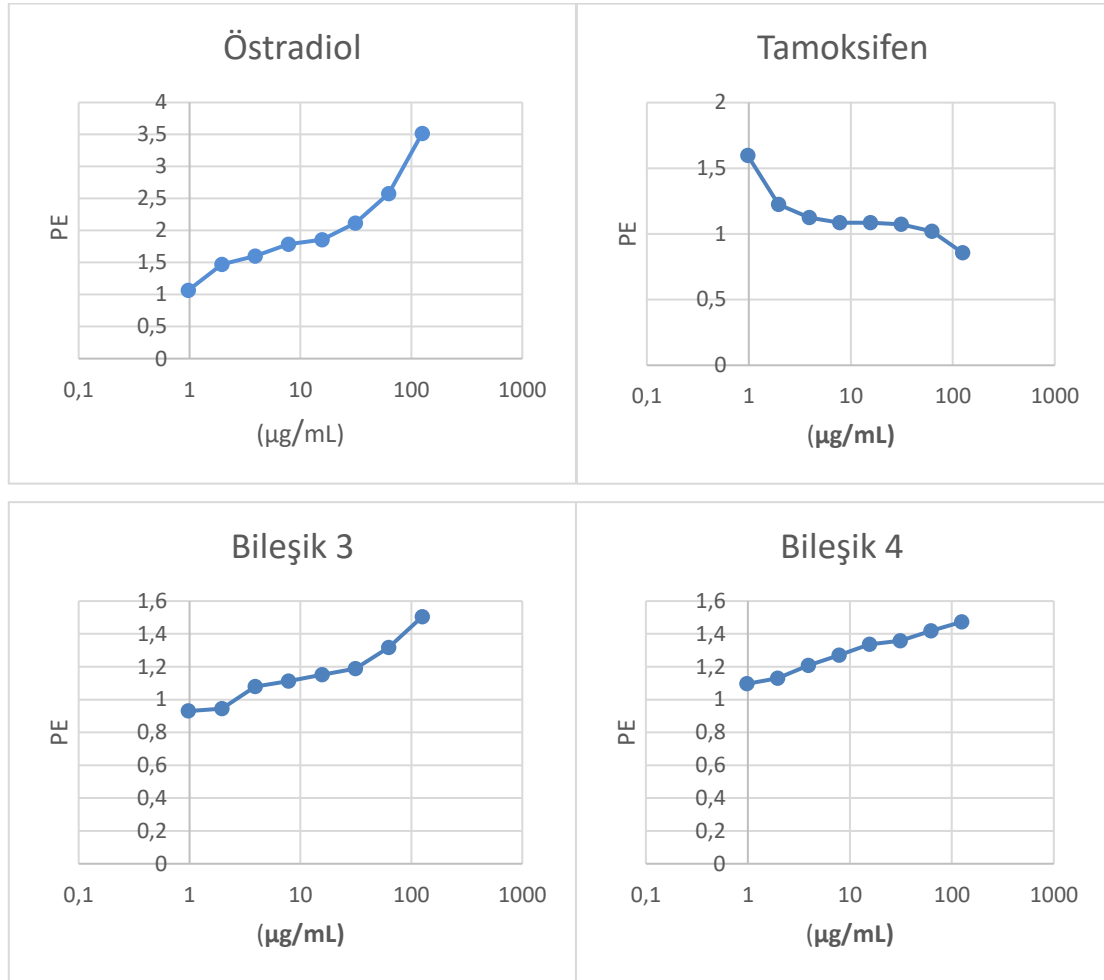
Bileşikler	CYD1	cMYC	ERK	BCL-2	BAX	pERK	PPAR γ
Kontrol	1	1	1	1	1	1	1
Tamoksifen	0,87661	1,61328	1,04608	0,96259	1,50004	1,70527	1,41421
Bileşik 3	0,61557	6,47554	0,9629	0,89503	3,27161	1,6358	1,55294

Çizelge 4.29. MCF-7 hücre hatlarındaki Ppar γ , Bcl-2, Bax, CYD1 c-MYC, ERK ve pERK genlerindeki kat değişimleri.

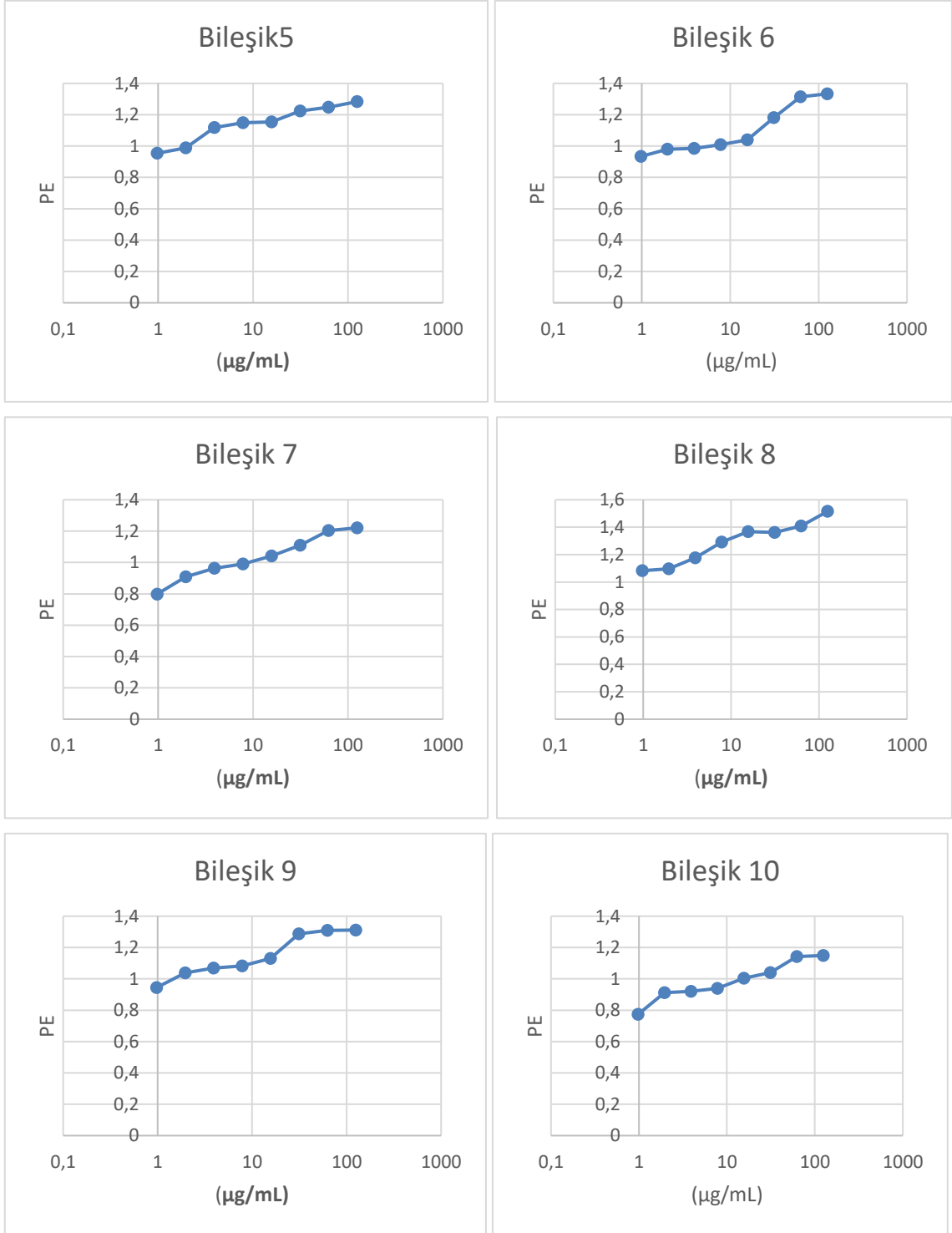
Bileşikler	CYD1	cMYC	ERK	BCL-2	BAX	pERK	PPAR γ
Kontrol	1	1	1	1	1	1	1
Tamoksifen	0,48297	2,95878	2,18102	12,2525	18,1891	2,96905	2,54912
Bileşik 3	0,63949	4,06992	3,35195	27,8576	57,0834	6,9644	3,5801
Bileşik 7	0,52668	4,27226	1,77769	9,25351	1,32674	2,37019	2,09943

4.4. E-Screen Analizi Sonuçları

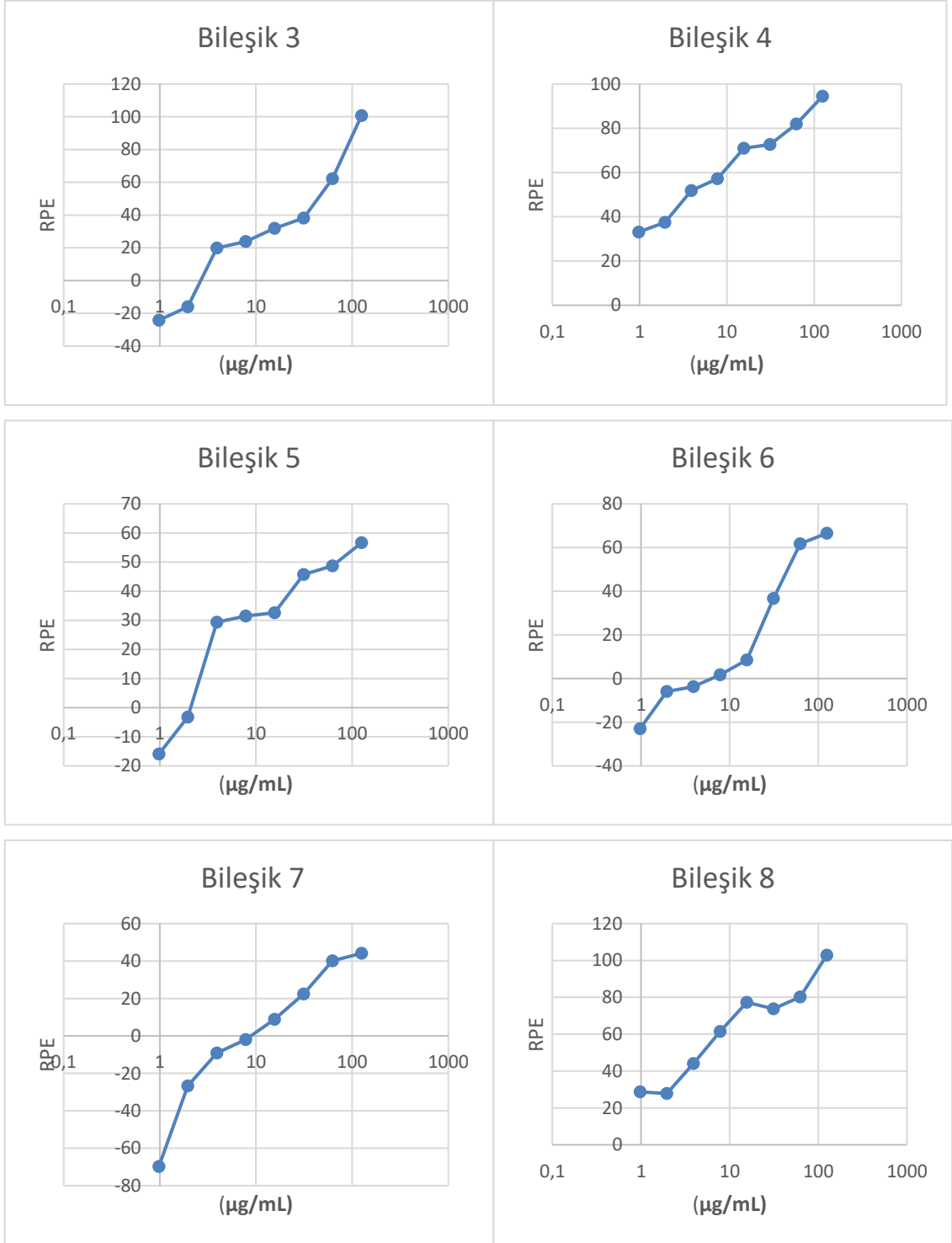
Östrojen tarama testinde 17β -östradiol (E2), bileşik 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10, önemli bir antiöstrojenik etkiye sahip olarak bilinen önemli bir seçici östrojen reseptörü modülü olarak bildiğimiz meme kanseri tedavisinde önemli bir ajan, meme kanseri dokularında antagonist olan tamoksifen test edilmiştir. Bütün maddeler ve E2 için 8 doz aralığı belirlenmiş ve uygulanmıştır.



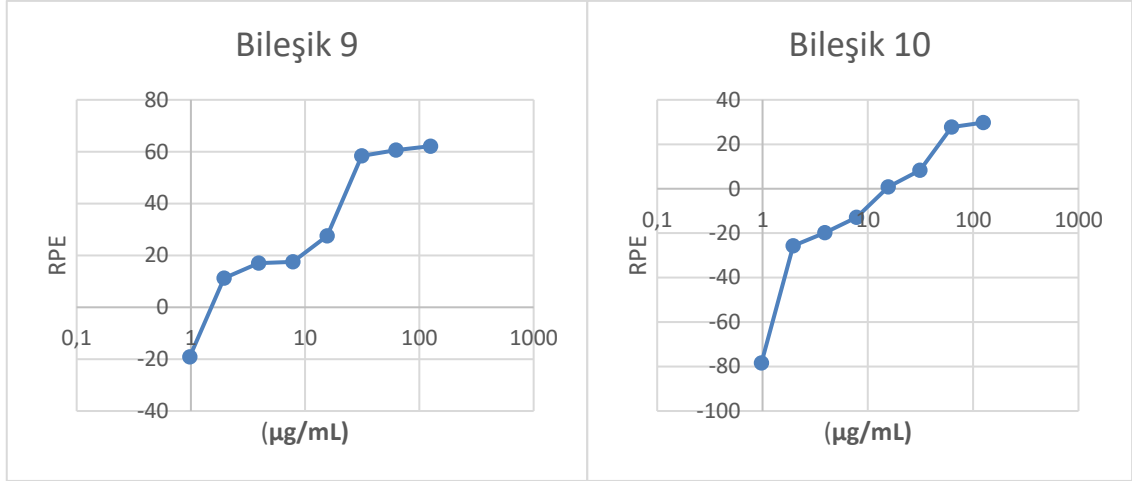
Şekil 4.11. 17β -östradiol, tamoksifen, bileşik 3 ve 4'ün proliferatif etki grafikleri



Şekil 4.12. Bileşik 5, 6, 7, 8, 9 ve 10'un proliferatif etki grafikleri



Şekil 4.13. Bileşik 3, 4, 5, 6, 7 ve 8'in rölatif (bağlı) proliferasyon etki grafikleri



Şekil 4.14. Bileşik 9 ve 10'un rölatif(bağıl) proliferasyon etki grafikleri

Çizelge 4.30. Tamoksifen, Bileşikler ve 17β-östradiolün EC₅₀ değerleri

Uygulanan bileşikler	EC ₅₀ değerleri
17β-Östradiol (E2)	81,65(µg/ml)
Tamoksifen	180,37(µg/ml)
Bileşik 3	101,44(µg/ml)
Bileşik 4	80,28(µg/ml)
Bileşik 5	109,26(µg/ml)
Bileşik 6	106,53(µg/ml)
Bileşik 7	103,45(µg/ml)
Bileşik 8	107,55(µg/ml)
Bileşik 9	107,63(µg/ml)
Bileşik 10	105,41(µg/ml)

Çizelge 4.31. Bileşiklerin ve tamoksifenin bağıl östradiol eşdeğerlilik faktörü değerleri (EEF)

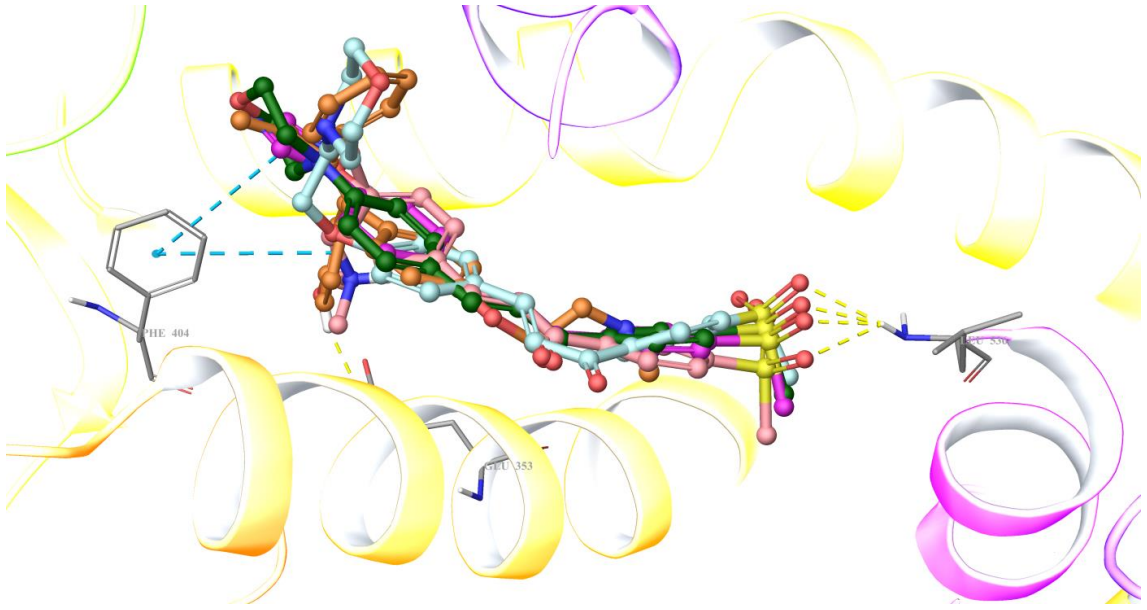
Bileşikler	EEF değerleri
Tamoksifen	0,45
Bileşik 3	0,8
Bileşik 4	1,01
Bileşik 5	0,74
Bileşik 6	0,76
Bileşik 7	0,78
Bileşik 8	0,75
Bileşik 9	0,75
Bileşik 10	0,77

Çizelge 4.32. *Bileşiklerin en yüksek, orta ve en düşük doz aralığındaki rölatif proliferatif etkileri (%RPE, %20'den küçük ise önemli bir östrojenik etkisi yok, %20-%80 aralığında ise kısmi agonist, %80'den büyük ise kimyasal tam agonist. N/A bölgelerinde ki değerler çok düşük olduğu için hesaplanamamıştır)*

Bileşikler	Dozlar (µg/mL)	RPE (%)
Tamoksifen	125 µg/mL	N/A
	15,63 µg/mL	18,21
	0,98 µg/mL	206,39
Bileşik 3	125 µg/mL	100,73
	15,63 µg/mL	31,97
	0,98 µg/mL	N/A
Bileşik 4	125 µg/mL	94,48
	15,63 µg/mL	70,93
	0,98 µg/mL	33,12
Bileşik 5	125 µg/mL	56,61
	15,63 µg/mL	32,55
	0,98 µg/mL	N/A
Bileşik 6	125 µg/mL	66,54
	15,63 µg/mL	8,52
	0,98 µg/mL	N/A
Bileşik 7	125 µg/mL	44,11
	15,63 µg/mL	8,91
	0,98 µg/mL	N/A
Bileşik 8	125 µg/mL	102,94
	15,63 µg/mL	73,78
	0,98 µg/mL	28,66
Bileşik 9	125 µg/mL	62,13
	15,63 µg/mL	27,51
	0,98 µg/mL	N/A
Bileşik 10	125 µg/mL	29,77
	15,63 µg/mL	0,77
	0,98 µg/mL	N/A

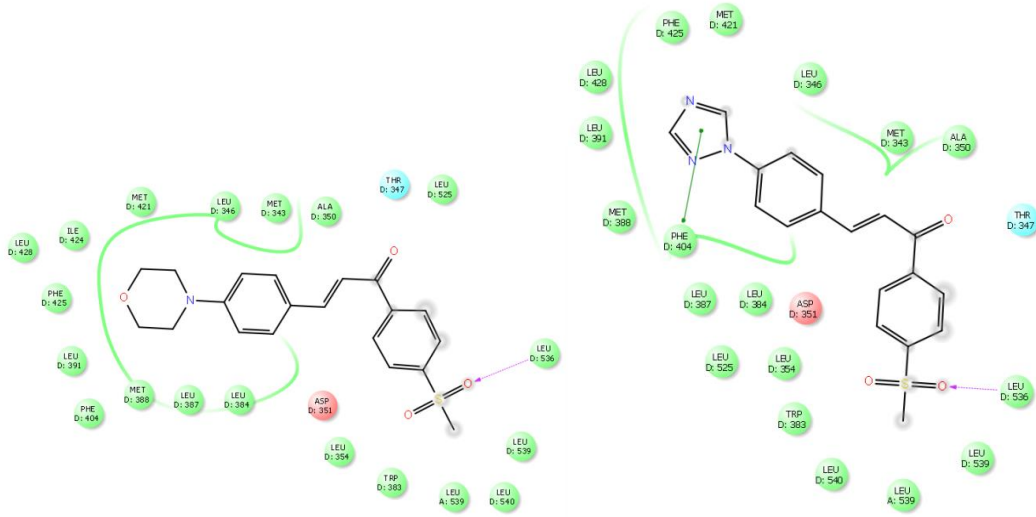
4.5. Moleküler Docking Sonuçları

In vitro enzim deneyleri sonucunda en iyi östrojen reseptör antagonist etki gösteren 3, 7, 9 ve 10 numaralı bileşikler için östrojen reseptör α substrat bağlanma bölgesinde moleküler docking çalışması yapılmıştır. Bu amaçla X-ışını kristal yapısı 4-hidroksitamoksifen ile kompleks halde olan Protein Veri Bankası (PDB) kodu 4Q50 olan reseptör seçilmiştir (Fanning vd., 2016). Bileşiklerin docking pozları 4-hidroksitamoksifen ile kıyaslanmıştır.



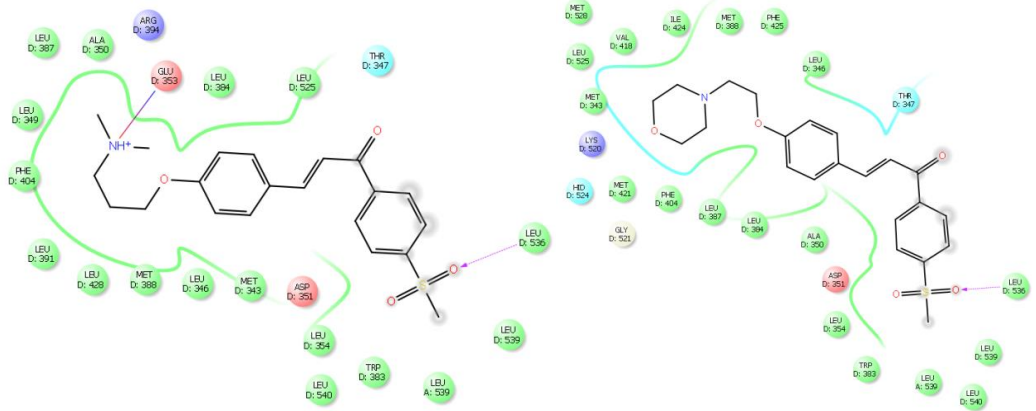
Şekil 4.15. 3, 7, 9 ve 10 No'lu bileşiklerin 4-hidroksitamoksifen ile kıyasla östrojen reseptör α substrat bağlanma bölgesindeki docking pozları

Moleküler docking sonuçlarına göre 3, 7, 9 ve 10 numaralı bileşiklerin hepsi östrojen reseptör α substrat bağlanma bölgesinde yüksek affinite göstermişlerdir. Bu bileşiklerin metilsülfonil sübstitüenti Leu536 ile hidrojen bağı yapmıştır. 7 No'lu bileşiğin triazol halkası Phe404 ile π - π etkileşimleri oluşturmuştur. 9 No'lu bileşikte yer alan dimetilamino grubu ise Glu353 ile tuz köprüsü oluşturmuştur. 3, 7, 9 ve 10 No'lu bileşiklerin 4-hidroksitamoksifen ile kıyasla docking etkileşimleri **Şekil 4.16'**da gösterilmiştir.



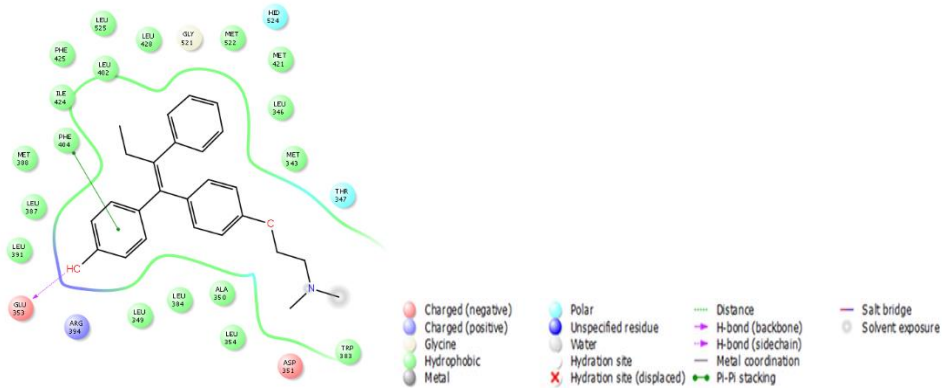
3

7



9

10



4-Hidroksitamoksifen

Şekil 4.16 3, 7, 9 ve 10 No'lu bileşiklerin 4-hidroksitamoksifen ile kıyasla östrojen reseptör α substrat bağlanma bölgesindeki docking etkileşimleri.

5. TARTIŞMA

Tamoksifen ve sisplatin, günümüzde en çok kullanılan kemoterapi ilaçlarındandır. Kemoterapi sürecinde bu ilaçların sağlamış olduğu yan etkiler hastanın tedaviye adaptasyonunu zorlamaktadır. Sisplatinin, bulantı-kusma, nefrotosisite ve genotoksisite gibi yan etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Tamoksifenin östrojen reseptörü antagonisti olması ile birlikte meme kanserinde en etkili ilaçlardan biri olmasına rağmen farmakolojik etkisinden dolayı, vajinal kanama, akıntı, pruritus vulva, gastrointestinal intolerans, baş ağrısı, sersemlik ve bazen görülen sıvı retansiyonu ile alopesi gibi yan etkileri görülmektedir. Bu yan etkilerin giderilmesi için kombin ilaçlar ile birlikte kullanılmaktadırlar. Kombin ilaçların alınması ve tedavi içerisinde yine diğer kombin ilaçların da yan etkilerinin sorun oluşturma ihtimallerini arttırmaktadır. Tedavi sürecini olumsuz etkileyen bu durumlar karşısında, kanserli hücrelere karşı daha spesifik, daha az toksik etkilere sahip ve yan etkilerinden arındırılmış yeni kemoterapik ilaçların evrimleştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında östrojen reseptörü negatif olan MDA-MB-231 insan meme kanseri ve östrojen reseptörü pozitif olan MCF-7 insan meme kanseri hücre hatları üzerinde tamoksifen ve sisplatinin pozitif kontrol olarak kullanılarak, bunlarla birlikte yeni sentezlediğimiz şalkon türevli bileşiklerin sitotoksik, apoptotik ve gen ekspresyon düzeylerinde etkileri değerlendirilmiştir. Tamoksifen, sisplatin bileşiklerimizin sitotoksik etkileri MTT yöntemiyle MDA-MB-231 (östrojen reseptörü negatif insan meme kanseri), MCF-7 (östrojen reseptörü pozitif insan meme kanseri), L929 (normal fare fibroblast) hücre hatları üzerinde sitotoksisiteleri ve IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Sağlıklı hücre hatlarında sitotoksisite IC₅₀ değeri yüksek, kanserli hücre hatlarında ise sitotoksisite IC₅₀ değerleri düşük olan bileşikler, akım sitometrisi yöntemleri olan Annexin-V FITC, JC-1, Caspase-3 Aktivasyon deneyleri ile apoptotik etkileri saptanmıştır. Yüksek apoptotik etkiye sahip olan bileşiklerin ise, apoptotik ve hücre proliferasyonunda rol oynayan genler üzerindeki ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

MDA-MB-231, MCF-7, L929 ve NIH/3T3 hücre hatlarımız üzerine tamoksifen, sisplatin ve sentezlenen yeni 8 şalkon türevli bileşiklerimiz MTT yöntemiyle zaman ve konsantrasyon dengeleri gözetilerek sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Konsantrasyon aralığı olarak 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.90625, 1.953, ve 0.9765 µg/mL belirlenmiştir. Bu belirlenen konsantrasyonlar plakalara uygulandıktan sonra 24

ve 48 saat sonundaki etkileri tespit edilmiştir. Her plaka için kontrol ve kör gruplar bırakılmış, kontrol %100 canlı olarak kabul edilip kör kuyucukların sayısal değerleri kontrol değerlerinden çıkartılmıştır. L-929 ve NIH/3T3 normal fare fibroblast hücre hattı yeni sentez bileşiklerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için kullanılmış ve bu hücre hatlarına zaten bilinen ilaçlar olan tamoksifen ve sisplatin uygulanılmamıştır. Deneyler 3'er tekrarlı olarak yapılmıştır.

MDA-MB-231 östrojen reseptörü negatif hücre hattı üzerinde yaptığımız MTT analizlerine göre Sisplatinin IC₅₀ değeri 24. Saatte 29,53±1,49 µg/mL, 48. Saatte ise 15,33±1,57 µg/mL olarak belirlenirken tamoksifenin IC₅₀ değeri 24. Saatte 2,03±0,66 µg/mL, 48. Saatte ise 0,98±0,11 µg/mL olarak belirlenmiştir. Sentez bileşiklerinin en aktifinin Bileşik 8 olduğu gözlemlenmiştir. Bileşik 8'in IC₅₀ değeri ise 24. Saatte 5,33±1,44 µg/mL, 48. Saatte ise 3,66±1,52 µg/mL olarak belirlenmiştir. 24. Saat sonunda yapılan MTT okuması ve verilerin ışığında IC₅₀ değerlerinin Bileşik 8'in pozitif kontrollerden biri olan sisplatinden daha düşük, tamoksifenden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. 48. Saat sonundaki analiz sonrasında ise IC₅₀ değerlerinin yine Bileşik 8'in sisplatinden düşük, tamoksifenden yüksek olduğu gözlemlenmiştir. 24. Saat sonundaki analizlerin ışığında Bileşik 3, 4, 5, 6, 7 anti-proliferatif etki göstermiş fakat sisplatin ve tamoksifen ile kıyaslandığında yüksek dozlarda IC₅₀ değerlerinde kalmışlardır. 48. Saat sonundaki analizlere göre ise en aktif tamoksifen olurken Bileşik 4, 6, 7, 8 sisplatinden daha düşük IC₅₀ değerine sahiptir. Bileşik 3 ve 5 zamana bağlı olarak düşük dozlarda anti-proliferatif etki göstermişlerdir. Bileşik 9 ve 10 ise doz aralığının en yükseği olan 500 µg/mL' den büyük olduğu gözlemlenmiştir.

MCF-7 östrojen reseptörü pozitif hücre hattı üzerinde yaptığımız MTT analizlerine göre Sisplatin IC₅₀ değeri 24. Saatte 11,41±1,15 µg/mL, 48. Saatte ise <3,9 µg/mL olarak belirlenmiştir. Tamoksifenin ise IC₅₀ değeri 24. Saatte 5,12±0,82 µg/mL, 48. Saatte <3,9 µg/mL olarak belirlenmiştir. Sentez bileşikler içerisinde en aktifinin Bileşik 9 olduğu gözlemlenmiştir. Bileşik 9'un IC₅₀ değerleri ise 24. Saatte 4,13±0,63 µg/mL, 48. Saatte ise <3,9 µg/mL olarak belirlenmiştir. 24. Saat sonundaki analizlere göre Bileşik 9, pozitif kontrol olan tamoksifen ve sisplatinden daha düşük IC₅₀ değerlerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bileşik 3'ün ise pozitif kontrollerden biri olan tamoksifenden daha yüksek, bir diğer pozitif kontrol olan sisplatinden ise daha düşük IC₅₀ değerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. 48. Saat sonundaki analizlerde ise bütün bileşik

ve pozitif kontrollerin IC₅₀ değerlerinin <3,9 µg/mL olduğu gözlemlenmiştir. 24. Saat sonundaki analizlere göre Bileşik 6 dışındaki bütün bileşikler anti-proliferatif etki göstermiştir. Bileşik 6 ise konsantrasyon aralığının en yükseği olan 500 µg/mL' den büyük olduğu gözlemlenmiştir. 48. Saat sonundaki okumada ise bütün bileşikler ve pozitif kontroller anti-proliferatif etki göstermişleridir.

Kanser hücrelerinde yapılan MTT testlerine göre östrojen reseptörü pozitif olan MCF-7 ve östrojen reseptörü negatif olan MDA-MB-231 hücre hatlarına göre sentez bileşikler içerisinde 3. Bileşik iki hücre hattında da yüksek aktiviteler gösterirken 5, 7, 8, 9, 10 numaralı bileşikler hücre tiplerine göre selektivite göstermişlerdir.

Sağlıklı hücreler üzerindeki sentez maddelerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla L929 normal fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Yapılan sitotoksikite testlerde 24. Saat sonundaki analizlere göre Bileşik 4, 6, 7 doz aralığının en büyük değeri olan >500 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bileşik 3, 5, 8, 9, 10'un 24. Saat sonunda yüksek dozlarda da olsa anti-proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. 48. Saat sonunda Bileşik 4 ve 7 maksimum doz aralığı olan 500 µg/mL'den büyük olarak belirlenmiştir. Zamana bağlı olarak diğer sentez bileşiklerin 24. Saatlerine göre düşük dozlarda toksik etki gösterdikleri gözlemlenmiştir.

MTT analizleri sonrası bütün bulgular göz önünde tutularak akım sitometrisinde apoptotik yöntemlerin belirlenmesi aşamasına geçilmiştir. Akım sitometrisi için MDA-MB-231 hücre hatlarında denenmek üzere pozitif kontroller Tamoksifen, Sisplatin, Bileşik 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 seçilmiştir. MCF-7 hücre hatları içinse pozitif kontroller Tamoksifen, Sisplatin, Bileşik 3, 7, 9 ve 10 seçilmiştir.

Akım sitometrisinde kullanılan bileşiklerin ve pozitif kontrollerin IC₅₀ ve IC_{50/2} dozları MTT analizlerinin sonuçlarından belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyonların 24 ve 48 saatlik etkileri akım sitometrisi cihazında Annexin-V FITC yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde yapılan IC₅₀ ve IC_{50/2} konsantrasyonlarının erken ve geç apoptoz belirleme analizlerinde **sisplatin** ve **tamoksifen** için 24 ve 48 saatlerde doz artışına bağlı olarak yüzdelerinin arttığı gözlemlenmiştir.

Bileşik 3 için; zamana bağlı olarak geç ve erken apoptozların arttığı görülmüştür. Geç apoptoz yüzdesinin 27,0'dan 47,3'e çıktığı, erken apoptoz yüzdesinin ise 1,5'den 2,5'e çıktığı görülmüştür. Doz bakımından analiz sonucunda ise zamana bağlı olarak geç apoptozun iki katı kadar arttığı erken apoptozun ise %0,1'lik bir artışa uğradığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçların ışığında geç apoptozun zamana bağlı olarak arttığını söyleyebiliriz.

Bileşik 4 için; zamana bağlı olarak geç ve erken apoptozların arttığı gözlemlenmiştir. Geç apoptoz yüzdesinin 20,4'ten 38'e çıktığı, erken apoptoz yüzdesinin ise 3,5'den 4'e çıktığı görülmüştür. Doz bakımından analiz sonucunda ise zamana bağlı olarak arttığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre bileşik 4'ün de yüksek veya düşük doz fark etmeksizin, zamana bağlı olarak erken ve geç apoptotik hücrelerin arttığını söyleyebiliriz.

Bileşik 5 için; zamana bağlı olarak toplam geç ve erken apoptoz oranının arttığı görülmüştür. Zamana bağlı olarak geç apoptoz yüzdesi 34,4'den 31,5'e gerilemiş olmasına rağmen, erken apoptoz yüzdesi 2,0'den 7,2'ye artmıştır. Düşük dozlarda ise zamana bağlı olarak geç apoptozda artış görülmüştür.

Bileşik 6 için; zamana bağlı olarak erken ve geç apoptotik yüzdelерinin arttığını söyleyebiliriz. Zaman ile orantılı olarak geç apoptoz yüzdesi 11,7'den, yaklaşık üç kat artarak 33,9'a artarken, erken apoptoz yüzdesi 3,3'den 4,6'ya çıkmıştır. Düşük dozda ki sonuçlar ise IC₅₀ analizi sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Bileşik 7 için; 24. Saatte geç apoptoz yüzdesinin 7,3 erken apoptoz yüzdesinin 1,2 olarak görünmesine rağmen zamana bağlı olarak geç apoptozun, 36,4'e yükseldiği, erken apoptozun ise 7,1'e yükseldiği gözlenmiştir. IC_{50/2} konsantrasyonlarındaki sonuçlara göre, yine zamana bağlı oranda artan geç ve apoptoz yüzdelерinde artış görülmektedir.

Bileşik 8 için; zamana bağlı olarak geç ve erken apoptozların arttığı gözlemlenmiştir. 24. Saat sonunda ki analize göre geç apoptoz yüzdesinin 16,0'dan 38,1'e, erken apoptoz yüzdesinin 4,7'den 7,6'ya çıktığı gözlemlenmiştir. Çizelge şekil

Sentez maddelerin MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde ki apoptotik etkilerinin sisplatin ve tamoksifenle kıyaslandığında 24. Saat IC₅₀ konsantrasyonlarında bileşik 3'ün geç apoptoz oranının sisplatinin 1,15, tamoksifenin 1,14 katı olduğu görülmüştür. Bileşik 5'in ise geç apoptozda sisplatinin 1,47, tamoksifenin ise 1,45 katı olduğu görülmüştür.

Erken apoptozda ise bileşik 8'in sahip olduğu yüzde değerin sisplatinin 1,06 tamoksifenin 1,42 katı olduğu görülmüştür. $IC_{50/2}$ dozunda ise en etkili bileşiğin, bileşik 3 olduğu gözlemlenmiştir. Bileşik 3'ün $IC_{50/2}$ dozunda geç apoptoz için sisplatinin 1,55 tamoksifenin 2,52 katı olduğu gözlemlenmiştir. Erken apoptoz için ise bileşik 8'in $IC_{50/2}$ dozu tamoksifenin 2,13 katı olurken hiçbir bileşiğin $IC_{50/2}$ dozu sisplatin yüzde değerini geçememiştir.

48. saat analizlerine göre IC_{50} dozlarında geç apoptozda en aktif bileşiğin bileşik 3 olduğu görülmüştür. Bileşik 3'ün geç apoptoz oranı, sisplatinin 1,67 tamoksifenin 3,07 katı olduğu görülmüştür. Erken apoptozda ise IC_{50} dozunda en etkili bileşiğin 8 numaralı olduğu gözlemlenmiştir. Bileşik 8 'in erken apoptozda yüzdesi sisplatinin 1,28 katı iken, hiçbir bileşik erken apoptozda tamoksifen yüzdesini (%12,0) geçememiştir. $IC_{50/2}$ dozlarına göre geç apoptozda en aktif olan bileşik 3 sisplatin değerinin 1,73 tamoksifen değerinin ise 1,20 katıdır. Erken apoptozda $IC_{50/2}$ dozlarına göre bileşik 5 sisplatinin 1,32 katı iken hiçbir bileşik $IC_{50/2}$ dozlarında tamoksifen yüzde değerini geçememiştir. 24 ve 48 saatlik Annexin-V FITC analizlerine göre zamana göre geç ve erken apoptoz yüzdelerinde artış gözlemlenmiştir.

MCF-7 hücre hatları üzerinde 24. Saat Annexin-V FITC analizlerinde **sisplatin** ve **tamoksifenin** toplam apoptoz yüzdesinin yüksek dozlarda arttığı gözlemlenmiştir. Sisplatin ve tamoksifen için zamana bağlı olarak geç apoptozun azaldığı ve erken apoptozun arttığı belirlenmiştir.

Bileşik 3 için; zamana bağlı olarak geç apoptoz yüzdesinin 48,7'den 24,1'e düştüğü erken apoptoz yüzdesinin ise 24,5'den 29,5'e çıktığı gözlemlenmiştir. $IC_{50/2}$ dozunda ise bileşik 3'ün geç ve erken apoptozda yüzdesinin düştüğü görülmüştür.

Bileşik 7 için; zamana bağlı olarak geç apoptoz yüzdesinin 40,5'den 29,3'e düştüğü erken apoptoz yüzdesinin 36,2'den 32,5'e gerilediği görülmüştür. $IC_{50/2}$ dozunda geç ve erken apoptoz yüzdesinin doz ve zamanla orantılı olarak düştüğü gözlemlenmiştir.

Bileşik 9 için; zamana bağlı olarak geç apoptoz yüzdesinin 42,0'dan 26,3'e erken apoptozun ise 25,7'den 24,4'e düştüğü gözlemlenmiştir. Zamana bağlı $IC_{50/2}$ dozunda ise geç ve erken apoptoz yüzdelerinin düştüğü gözlemlenmiştir.

Bileşik 10 için; zamana bağlı olarak geç apoptozun 41,3'den 24,7'ye erken apoptozun 38,7'den 21,0'a düştüğü gözlemlenmiştir. Zamana bağlı $IC_{50/2}$ dozunda ise geç ve erken apoptozun yüzde değerinin düştüğü gözlemlenmiştir.

Sentez maddelerin MCF-7 hücre hatları üzerinde ki apoptotik etkilerinin sisplatin ve tamoksifenle kıyaslandığında 24. Saat IC_{50} konsantrasyonlarında sisplatinin geç apoptoz yüzdesinin en yüksek olduğu bileşik 3'ün geç apoptoz oranının, tamoksifenin 1,21 katı olduğu görülmüştür. Erken apoptozda ise bileşik 10'un sahip olduğu yüzde değerinin sisplatinin 2,38 tamoksifenin 1,63 katı olduğu görülmüştür. $IC_{50/2}$ dozunda ise en etkili bileşiğin, bileşik 3'ün olduğu gözlemlenmiştir. Bileşik 3'ün $IC_{50/2}$ dozunda geç apoptoz için sisplatinin 1,55 tamoksifenin 2,52 katı olduğu gözlemlenmiştir. Erken apoptoz için ise bileşik 10'un $IC_{50/2}$ dozu tamoksifenin 1,55 katı sisplatinin ise 2,29 katı olduğu görülmüştür.

48. saat analizlerine göre IC_{50} dozlarında geç apoptozda en aktif bileşiğin bileşik 7 ve 9 olduğu görülmüştür. Bileşik 7 ve 9 yüzde olarak 29,3 değere sahipken geç apoptozda sisplatinin 1,22 tamoksifenin 1,77 katı değere sahiptir. Erken apoptozda ise IC_{50} dozunda en etkili bileşiğin 7 numaralı olduğu gözlemlenmiştir. Bileşik 7 'in erken apoptozda yüzdesi sisplatinin 1,41 katı iken, hiçbir bileşik erken apoptozda tamoksifen yüzdesini (%38,6) geçememiştir. $IC_{50/2}$ dozlarına göre geç apoptozda en aktif olan bileşik 3 sisplatin değerinin 1,34 tamoksifen değerinin ise 1,26 katıdır. $IC_{50/2}$ dozlarına göre erken apoptozda bileşik 3 en aktif olmasına rağmen (%22,2) hiçbir bileşik $IC_{50/2}$ dozlarında tamoksifen ve sisplatin yüzde değerini geçememiştir. 24 ve 48 saatlik Annexin-V FITC analizlerine göre zamana göre geç ve erken apoptoz yüzdelerinde düşüş gözlemlenmiştir. Bileşiklerin 24. Saatte,48. Saate kıyasla daha apoptotik sonuçlar verdiği görülmüştü.

Çalışmanın buradan sonraki aşaması akım sitometrisinde sisplatin, tamoksifen ve aktif olarak seçtiğimiz bileşiklerin MTT analizi sonrası belirlediğimiz IC_{50} ve $IC_{50/2}$ dozlarında 24. ve 48 saat sonlarında ölçüm yapılmak üzere MDA-MB-231 ve MCF-7 mitokondriyal membran potansiyeli testi olan JC-1 boyama yöntemi ile devam etmiştir.

MDA-MB-231 hücre hatları ile yaptığımız çalışmalarda tamoksifen, sisplatin ve sentez maddelerimiz kontrole göre mitokondriyal membran potansiyelinde artışa sebep olmuşlardır.

24. saat analizinin sonucuna göre tamoksifen, sisplatinin, bileşik 3, 6, 7 ve 8'in IC₅₀ dozundaki Mitokondriyal aktivite yüzdesinin IC_{50/2} dozlarına göre daha yüksek olduğu, dolayısıyla bu bileşiklerin doz ile paralellik gösterdiği görülmüştür. Bileşik 4 ve 5'in doza bağlı olmadığı görülmüştür. IC₅₀ dozlarında sisplatinin aktivasyon yüzdesi kontrole göre 10,92 kat tamoksifenin aktivasyon yüzdesi 7,81 kat yüksek çıkmıştır. IC₅₀ dozlarında en aktif bileşik 8 olduğu gözlemlenmiştir (%68,3). Bileşik 8'in gösterdiği mitokondriyal aktivite oranı tamoksifenin 1,13 katıdır. IC_{50/2} dozlarında ise sisplatin yüzde değerine (%57,9) en yakın olan bileşik 5'dir (%57,6).

48. saat analizine göre tamoksifen, bileşik 4, 5, 6 ve 7'nin zamana bağlı olarak mitokondriyal membran aktivite değerini zamana bağlı olarak arttırırken, sisplatinin aktivite değerleri düşmüştür. IC₅₀ ve IC_{50/2} dozlarında bileşik 4, 5, 6, 7 zamana bağlı aktivasyon yüzdelerinde artış olmuştur. IC₅₀ dozunda 5. Bileşik %73,6 aktivasyon göstermiştir. Bileşik 5, kontrolün 7,51 sisplatinin 1,13 ve tamoksifenin 1,02 katı değere sahiptir. IC_{50/2} konsantrasyonunda ise tamoksifen zamana bağlı artış göstererek kontrol yüzdesinin 7,96 katı aktivasyon göstermiştir.

MCF-7 hücre hatları ile yaptığımız çalışmalarda tamoksifen, sisplatin ve sentez maddelerimiz kontrole göre mitokondriyal membran potansiyelinde artışa sebep olmuşlardır.

24. saat analizinin sonucuna göre tamoksifenin ve bileşik 9'un doza bağlı olmadığı sisplatinin, bileşik 3, 7 ve 10'un IC₅₀ dozundaki Mitokondriyal aktivite yüzdesinin IC_{50/2} dozlarına göre daha yüksek olduğu, dolayısıyla bu bileşiklerin doz ile paralellik gösterdiği görülmüştür. IC₅₀ dozlarında sisplatinin aktivasyon yüzdesi kontrole göre 9,37 kat tamoksifenin aktivasyon yüzdesi 9,31 kat yüksek çıkmıştır. IC₅₀ ve IC_{50/2} dozlarında en aktif yüzdeye sahip bileşiğin, bileşik 9 olduğu gözlemlenmiştir (IC₅₀=%69,6 ve IC_{50/2}=%71,8). Bileşik 9'un gösterdiği mitokondriyal aktivite oranı tamoksifenin 1,01 katıyken, sisplatin ile eş değer çıkmıştır. IC_{50/2} dozlarında ise bileşik 9'un sisplatin yüzde değerinin 1,23 tamoksifenin 1,05 katıdır.

48. saat analizine göre tamoksifen, sisplatin, bileşik 3, 7, 9 ve 10 zamana bağlı olarak mitokondriyal membran aktivite değerini zamana bağlı olarak arttırırken, bileşik 9'un aktivite değerleri düşmüştür. IC₅₀ ve IC_{50/2} dozlarında bileşik 4, 5, 6, 7 zamana bağlı aktivasyon yüzdelerinde artış olmuştur. IC₅₀ dozunda pozitif kontroller tamoksifen ve

sisplatin en aktif bileşikler olmuşlardır. Pozitif kontrollere en yakın bileşik ise Bileşik 10 olmuştur (%67,2). Bileşik 10, kontrolün 2,8 katı değere sahiptir.

Çalışmamızın bu aşamasında MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarımızın apoptotik durumunu belirlemek için, mitokondriyal membran aktivitesi testi olan JC-1 boyama yönteminin ardından hem iç yolak hem dış yolak hem de endoplazmik retikulum yolağı üzerinden aktive olabilen kaspaz-3 analizini akım sitometrisi ile IC₅₀ ve IC_{50/2} dozlarımızı 24. Ve 48. Saatlerde ölçtük.

MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde yaptığımız 24. Saat sonrası analize göre tamoksifen, sisplatin, bileşik 3, 5 ve 8 bütün dozlarda kaspaz-3 aktivasyonu göstermiştir. IC₅₀ dozlarında aktivasyon göstermeyen ama IC_{50/2} dozlarında aktivasyon gösteren bileşik 4 ve iki dozunda da aynı sonucu veren bileşik 8, doz ile bağımsızdır. Tamoksifen ve sisplatin IC₅₀ dozunda aktivasyon vermesine rağmen IC_{50/2} dozlarında daha yüksek kaspaz-3 aktivitesi göstermişlerdir. Bileşik 6 ve 7 hiçbir kaspaz-3 aktivasyonu göstermeyen bileşikler olmuşlardır. Sentez bileşikler içerisinde, bileşik 5 en yüksek aktivasyonları dozdan bağımsız olarak vermiştir. IC₅₀ dozunda kontrolün 78, tamoksifenin 4,72, sisplatinin ise 4,87 katı yüzdeye sahiptir. IC_{50/2} konsantrasyonlarında ise en yüksek değer tamoksifen (%64,5) ve sisplatin (%26).

İlk defa sentezlenmiş olan şalkon türevli bileşiklerimizin MTT analizleri sonrasında anti kanser etkilerine göre akım sitometrisinde Annexin-V FITC, JC-1 mitokondriyal aktivasyon ve kaspaz-3 aktivitesi deneyleri sonrasında MDA-MB-231 hücre hattı için en etkili bileşiğin 3 numaralı, MCF-7 hücre hattı için yaptığımız deneylerde ise en aktif bileşiklerin bileşik 3 ve 7 olduğunu gözlemlemiş bulunmaktayız. Bu bileşiklerin normal hücre hatlarında zararının düşük olması ve apoptotik etkilerinin yüksek olması sebebi ile, deneylere RT-PCR yöntemi ile proliferasyon ve kanser ilişkili genlerinin ekspresyonlarını belirlemek amacıyla devam edilmiştir.

RT-PCR metodu ile Ppar γ , Bcl-2, Bax, CYD1 c-MYC, ERK ve pERK gen ifadelerine bakılmıştır.

Bax hücrenin sitozolünde yer alan, sitokrom-c ve AIF uyaran apoptozu indükleyen bir apoptotik proteindir. Bu genin ekspresyon göstermesi, hücrenin apoptoz yolağına gittiğini göstermektedir. Mitokondriyal yolak için Bax olmazsa olmaz bir proteindir (Kuwana ve Newmeyer, 2003).

Bcl-2 ise apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan bir onkogen ailesidir. Üç gruba ayrılmaktadır. Bu gen ailesinin proapoptotik ya da anti apoptotik olması hücrenin apoptoz sürecine geçip geçmeyeceğinin belirleyicisidir. Bu ailenin bir üyesi olan Bcl-2 geni mitokondriyal dış membranla ilgilidir ve hücreyi apoptotik uyarılara karşı koruyarak, sitokrom-c ve AIF salınımını durdurur (Van Delft ve Huang, 2006).

c-MYC geni, hücrenin proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu düzenlemekle görevli olan bir gen dir ve ürünü bir fosfoproteindir. Bu gende meydana gelecek bir amplifikasyon, hücre siklusunun bozulması ve p53 genine bağlı yoldan hücrenin apoptoz sürecine girmesini sağlar. Bu genin aşırı üretimi veya mutasyona uğraması meme kanserine neden olmaktadır (Liao ve Dickson, 2000).

CYD-1 (sitokinez defektif1) onkogeni birçok meme kanserinde yüksek oranda eksprese edilmesi, hücre proliferasyonunu arttırmaktadır. Bu genin hücre siklusunu düzenleyici bir rolü vardır. Lehn ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada CYD-1 geninin bunlara ek olarak yüksek seviyelerde eksprese olan meme kanserinde hücre göçleri ile de ilişkili olduğuna dair bilgiler toplanmıştır (Lehn vd. 2010).

Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar (ERK), mitojenle aktifleşen kinazlar (MAP) olarak da bilinirler. Buldukları yola yaşama, proliferasyon, apoptoz ve embriyogeneze rol almaktadır. Kanser vakalarının %30'unda bu yolağın aktive olduğu bilinmektedir (Crews, 1992).

Peroksizom proliferatör ile aktifleşen reseptörler (PPARs) alfa, beta ve gama olmak üzere üç tipi vardır. Bu genlerin hepsi birbirinden farklı görevleri vardır ve insan vücudunun farklı bölgelerinde eksprese edilirler. Yapılan çalışmalarda Ppar γ 'nın hücre farklılaşması ve apoptoz da önemli roller oynadığı belirlenmiştir. Ppar γ geninin meme kanseri dahil birçok kanser hücre hatlarında anti-proliferatif etkisi vardır. Ppar γ ligand aktivasyonunun, meme kanserinde apoptozu indüklediği, metastaz ve hücre göçünü inhibe ettiği görülmüştür (Woo vd., 2011).

MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde Bileşik 3 ve tamoksifenin RT-PCR analizinde Ppar γ , Bcl-2, Bax, CYD1 c-MYC, ERK, pERK ve house keeping GADPH genlerinin 24. Saat sonunda ekspresyon üzerinde ki etkilerine bakılmıştır. Kontrol 1 kabul edilerek ekspresyon düzeylerin kontrole göre kat değişimleri olarak hesaplanmıştır.

RT-PCR analizi sonrası **tamoksifenin** proapoptotik Bax proteinini 1,5 kat up-regüle ederken, anti-apoptotik gen olan Bcl-2'yi ise 1,03 kat down-regüle etmiştir. Meme kanserinde yüksek ekspresyona olduğunu bildiğimiz CYD-1 genini ise 1,14 kat down-regüle etmiştir. Aşırı ekspresyonunun meme kanseri sebeplerinden biri olan c-MYC genini ise 1,61 kat up-regüle etmiştir. Kanser vakalarının %30'unda aktif olarak saptanan ERK ve pERK genlerinin tamoksifen uygulamasından sonra sırasıyla 1,04;1,7 kat up-regülasyona uğradığı gözlemlenmiştir. Meme kanserinde anti-proliferatif etkisi ve apoptozu indüklediğini bildiğimiz Ppar γ genini 1,41 kat up-regüle etmiştir. Aşırı ekspresyonunun meme kanserine etken olduğunu bildiğimiz c-MYC geninin down-regüle olmasını bekliyorduk ama tamoksifenin bu etkisini gözlemleyemedik.

Bileşik 3'ün analiz sonrası proteinini proapoptotik Bax proteinini 3,27 kat up-regüle ederken, anti-apoptotik gen olan Bcl-2'yi ise 1,11 kat down-regüle etmiştir. Meme kanserinde yüksek ekspresyona olduğunu bildiğimiz CYD-1 genini ise 1,62 kat down-regüle etmiştir. Aşırı ekspresyonunun meme kanseri sebeplerinden biri olan c-MYC genini ise 6,47 kat up-regüle etmiştir. Kanser vakalarının %30'unda aktif olarak saptanan ERK ve pERK genlerinin tamoksifen uygulamasından sonra sırasıyla 1,03 kat down-regülasyona, 1,63 up-regülasyona uğradığı gözlemlenmiştir. Meme kanserinde anti-proliferatif etkisi ve apoptozu indüklediğini bildiğimiz Ppar γ genini 1,55 kat up-regüle etmiştir.

MCF-7 hücre hattı üzerinde Bileşik 3, 7 ve tamoksifenin RT-PCR analizinde Ppar γ , Bcl-2, Bax, CYD1 c-MYC, ERK, pERK ve house keeping GADPH genlerinin 24. Saat sonunda ekspresyon üzerinde ki etkilerine bakılmıştır. Kontrol 1 kabul edilerek ekspresyon düzeylerin kontrole göre kat değişimleri olarak hesaplanmıştır.

RT-PCR analizi sonrası MCF-7 hücre hattı üzerinde **tamoksifenin** proapoptotik Bax proteinini 18,18 kat, anti-apoptotik gen olan Bcl-2'yi ise 12,25 kat up-regüle etmiştir. Meme kanserinde yüksek ekspresyona olduğunu bildiğimiz CYD-1 genini ise 2,07 kat down-regüle etmiştir. Aşırı ekspresyonunun meme kanseri sebeplerinden biri olan c-MYC genini ise 2,95 kat up-regüle etmiştir. Kanser vakalarının %30'unda aktif olarak saptanan ERK ve pERK genlerinin tamoksifen uygulamasından sonra sırasıyla 2,18;2,96 kat up-regülasyona uğradığı gözlemlenmiştir. Meme kanserinde anti-proliferatif etkisi ve apoptozu indüklediğini bildiğimiz Ppar γ genini 2,54 kat up-regüle etmiştir.

Bileşik 3 için; analiz sonrası proteinini proapoptotik Bax proteinini 57,08 kat up-regüle ederken, anti-apoptotik gen olan Bcl-2'yi ise 27,85 kat up-regüle etmiştir. Meme kanserinde yüksek eksprese olduğunu bildiğimiz CYD-1 genini ise 1,56 kat down-regüle etmiştir. Aşırı ekspresyonunun meme kanseri sebeplerinden biri olan c-MYC genini ise 4,06 kat up-regüle etmiştir. Kanser vakalarının %30'unda aktif olarak saptanan ERK ve pERK genlerinin tamoksifen uygulamasından sonra sırasıyla 3,35;6,96 kat up-regülasyona, meme kanserinde anti-proliferatif etkisi ve apoptozu indüklediğini bildiğimiz Ppar γ genini 3,58 kat up-regüle etmiştir.

Bileşik 7 için; analiz sonrası proteinini proapoptotik Bax proteinini 10,26 kat up-regüle ederken, anti-apoptotik gen olan Bcl-2'yi ise 9,25 kat up-regüle etmiştir. Meme kanserinde yüksek eksprese olduğunu bildiğimiz CYD-1 genini ise 1,89 kat down-regüle etmiştir. Aşırı ekspresyonunun meme kanseri sebeplerinden biri olan c-MYC genini ise 4,27 kat up-regüle etmiştir. Kanser vakalarının %30'unda aktif olarak saptanan ERK ve pERK genlerinin tamoksifen uygulamasından sonra sırasıyla 1,77;2,37 kat up-regülasyona, meme kanserinde anti-proliferatif etkisi ve apoptozu indüklediğini bildiğimiz Ppar γ genini 2,09 kat up-regüle etmiştir.

Bütün bu çalışmalardan bağımsız olarak, sentezlenen sekiz yeni bileşimiz ve östrojen reseptörüne duyarlı, seçici östrojen reseptör modülü olan tamoksifen ile östrojen agonist/antagonist tarama testi olan e-screen testine geçilmiştir. Daha önceki çalışmalarda flavonoid ailesine ait olan şalkonların antiöstrojenik aktiviteler gösterdiği bilinmektedir. Östrojen bağımlı meme kanserinde östrojen reseptörü alfanın, bağlandığı ligand (E2) sonrasında kanser hastalarında metastazı arttırdığı, malign hücrelerin proliferasyonu arttırdığı bilinmektedir. Tamoksifenin meme kanserinde antagonist olmasına karşın, kemik, uterusta agonist olduğu bilinmektedir. Şalkon bileşiklerimizin analizi için antagonist olarak tamoksifenin bu özelliğinden faydalanılmıştır (Shiau vd.,1998)

EC₅₀ değerlerine göre standart olarak kullanılan 17 β -Östradiol 81,65 μ g/mL olarak, en yüksek EC₅₀ değerine sahip olan test maddesi **bileşik 5**, en düşük ise **bileşik 4** olarak hesaplanmıştır.

EEF değerlerine göre ise en düşük değer **bileşik 5**, en yüksek değere sahip ise **bileşik 4** hesaplanmıştır. Diğer bileşikler ise birbirine yakınlık göstermiştir.

%RPE hesaplamalarında bileşiklerimiz kendi IC₅₀ dozlarında antagonist etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Moleküler docking sonuçlarına göre 3, 7, 9 ve 10 numaralı bileşiklerin hepsi östrojen reseptör α substrat bağlanma bölgesinde yüksek affinite göstermişlerdir. Bu bileşiklerin metilsülfonil sübstitüenti Leu536 ile hidrojen bağı yapmıştır. Bileşik 7'nin triazol halkası Phe404 ile π - π etkileşimleri oluşturmuştur. 9 No'lu bileşikte yer alan dimetilamino grubu ise Glu353 ile tuz köprüsü oluşturmuştur. 3, 7, 9 ve 10 No'lu bileşiklerin 4-hidroksitamoksifen ile kıyasla docking etkileşimleri **Şekil 4.16**'da gösterilmiştir.

Bileşik 7'nin yapılan deneylerde gösterdiği yüksek aktivite sebebinin, bulundurduğu triazol yan grubu olduğunu düşünmekteyiz. Yadav ve arkadaşlarının 2017 yılında yayınladıkları makalede 1,2,3 triazol bulunduran ve yeni sentezledikleri şalkon türevli bileşikler MCF-7, A549, HepG2 ve MIA-PA-CA-2 kanser hücre hatlarında yüksek anti kanser etki göstermiştir (Yadav vd., 2017). Triazoller, aromatik beş üyesi bulunan heterosiklik yapıya sahip bileşiklerin en çok araştırılan sınıfıdır. Bunun sebeplerinden biride birçok biyolojik aktif molekülün sentezinde yapıtaşı olmalarıdır (Ammar vd.,2018).

Bileşik 3'ün ise gösterdiği yüksek aktivite sebebinin, yan grup olarak bağlı bulunan morfolinil olduğunu düşünmekteyiz. 2018 yılında Konakanchi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar morfofinil içerikli sentez bileşikleri yapılan deneylerde yüksek anti kanser etki göstermiştir. Ve sentezledikleri bileşiklerin patentini Amerika Birleşik Devletleri'nde almışlardır. Yaptıkları çalışmada anti kanser ajan olarak 7(morfofinil) -2-(N-Piperazinil) metil tiyeno [2,3-C] pridin türevi bileşik kullanmışlardır. Bu yeni keşfedilen bileşikler beyin, meme, akciğer, prostat ve çeşitli pankreatik kanser tedavilerinde yararlı olabileceği görülmüştür (Konakanchi vd., 2018).

Bu sebeplerden dolayı sentezlemiş olduğumuz bileşiklerden en iyi sonuçları aldığımız **Bileşik 3** ve en iyi ikinci sonuçları aldığımız **Bileşik 7**'nin birer anti kanser ajan olarak ilave deneylerle birlikte araştırmaya açık olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması için sentezlenen sekiz yeni şalkon türevlerinin hepsi özgün ve ilk defa sentezlenmiştir. Ve pozitif kontrol olarak iki bilinen anti-kanser etkiye sahip tamoksifen ve sisplatin kullanılmıştır. Sentezlenen bileşiklerimiz ve pozitif kontrolleri MDA-MB-231 (östrojen reseptörü negatif), MCF-7 (östrojen reseptörü pozitif) insan meme kanseri hücreleri ve L929 normal fare fibroblast hücre hatları üzerinde MTT analizi ile sitotoksiteleri belirlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattı için bileşik 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve pozitif kontrollerle, MCF-7 hücre hattı için ise bileşik 3, 7, 9, 10 ve pozitif kontroller ile devam edilmiştir. L-929 ve NIH/3T3 hücre hatları üzerinde ise sadece sağlıklı hücreye verilen zararı ve seçiciliği görebilmek için yalnızca MTT analizi yapılmıştır. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları üzerinde önemli sitotoksik gösterebilen maddelerimizi, apoptotik etkilerin belirlenebilmesi için akım sitometrisinde Annexin-V FITC, JC-1 mitokondriyal membran aktivitesi testi ve kaspaz-3 aktivitesinin gözlemlenmesi sağlanmıştır. Deneyler sonunda MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde yalnızca bileşik 3 ve MCF-7 hücre hattı üzerinde ise bileşik 3 ve 7 olarak seçilmiştir. Bileşik 7'nin erken apoptoz oranı ne kadar düşükse de L929 hücrelerinde toksisitesi yüksek çıkmıştır.

Östrojen reseptörü hem pozitif olan hem de negatif hücrelere baktığımızda en aktif bileşiğin Bileşik 3 olduğu görülmüştür. Bileşik 3'ün RT-PCR analizleri sonrasında da apoptozda hem iç hem de dış yolak da etkili olarak apoptozu indükleyen ve diğer bileşiklere göre daha az toksik olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan E-Screen analizlerinde de östrojen reseptörü antagonisti olduğu ve Moleküler docking çalışmalarında östrojen reseptörü alfa ile bağlanma bölgeleri gösterilmiştir.

Aktif çıkan bileşiklerimizin sağlıklı hücreler üzerinde yaptığımız MTT testlerinde düşük toksisite göstermeleri, bu maddelerin seçici özelliklere sahip olduğunu göstermesi ve yapılan akım sitometrisi deneylerinde apoptotik yolak üzerinde aktif rol oynayabilmeleri bu bileşiklerin bilimsel anlamda tedavi sürecine katkı yapabilecek aday ajanlar olduklarını göstermişlerdir. Sürekli evrim içerisinde olan, kanser ilaçlarına direnç kazanan malign hücrelere karşı kanser ilaçlarının da geliştirilmeye ihtiyacı vardır. Deneylerimizde en aktif sonuçlar veren bileşik 3'ün gelecekte biyokimyasal ve moleküler etki mekanizmalarının *in vivo*, *in vitro* ve *in situ* yöntemleriyle aydınlatılmasıyla, bileşiğin bir tedavi ajanı olarak geliştirilebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKÇA

American Cancer Society (2010) Cancer Facts and Figures. Atlanta: *American Cancer Society*.

American Cancer Society (2011) Cancer Facts and Figures Atlanta: *American Cancer Society*.

Ammar, Y. A., El-Sharief, A. M., Mohamed, Y. A., Mehany, A. B., & Ragab, A. (2018). Synthesis, Spectral Characterization and Pharmacological Evaluation of Novel Thiazole-oxindole Hybrid Compounds as Potential Anticancer. *Al-Azhar Bulletin of Science*, 29(2-A), 25-37.

Ayanian, J. Z., & Guadagnoli, E. (1996). Variations in breast cancer treatment by patient and provider characteristics. *Breast Cancer Research and Treatment*, 40(1), 65-74.

Barnard, M. E., Boeke, C. E., & Tamimi, R. M. (2015). Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochimica et Biophysica Acta Reviews on Cancer*, 1856(1), 73-85.

Beckmann, M. W., Niederacher, D., Schnürch, H. G., Gusterson, B. A., & Bender, H. G. (1997). Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of Molecular Medicine*, 75(6), 429-439.

Belloc, F., Belaud-Rotureau, M. A., Lavignolle, V., Bascans, E., Braz-Pereira, E., Durrieu, F., & Lacombe, F. (2000). Flow cytometry detection of caspase 3 activation in Preapoptotic Leukemic Cells. *Cytometry*, 40(2), 151–160.

Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), 167–223.

Boland, C. R., & Goel, A. (2005). Somatic evolution of cancer cells. In *Seminars in cancer biology* 15(6), 436-450.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.

- Brooks, S. C., Locke, E. R., & Soule, H. D. (1973). Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, 248(17), 6251-6253.
- Casás-Selves, M., & DeGregori, J. (2011). How Cancer Shapes Evolution and How Evolution Shapes Cancer. *Evolution: Education and Outreach*, 4(4), 624–634.
- Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M., & Mangelsdorf, D. J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*, 294(5548), 1866-1870.
- Crespi, B., & Summers, K. (2005). Evolutionary biology of cancer. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(10), 545–552.
- Crews, C. M., Alessandrini, A., & Erikson, R. L. (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*, 258(5081), 478-480.
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(5), 502–511.
- Cummings, S. R., Eckert, S., Krueger, K.A, Grady, D., Powles, T. J., Cauley, J.A, Norton, L. (1999). The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *Journal of the American Medical Association*, 281(23), 2189-97.
- Den Hollander, P., Savage, M. I., & Brown, P. H. (2013). Targeted Therapy for Breast Cancer Prevention. *Frontiers in Oncology*, 3, 250
- DicksonRB, Lippman (1997).ME.Cancer of the breast. In Cancer: Principles and Practice of Oncology. Fifth Edition, Ed: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Lippincott-Raven Publishers*, p:1541-1557.
- Dowsett, M. (2001). Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer. *Endocrine-related Cancer*, 8(3), 191-5
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.

- Fanning, S. W., Mayne, C. G., Dharmarajan, V., Carlson, K. E., Martin, T. A., Novick, S. J., ... & Tajkhorshid, E. (2016). Estrogen receptor alpha somatic mutations Y537S and D538G confer breast cancer endocrine resistance by stabilizing the activating function-2 binding conformation. *Elife*, 5, e12792.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2893-2917.
- Foulkes, W. D., Stefansson, I. M., Chappuis, P. O., Bégin, L. R., Goffin, J. R., Wong, N., & Akslen, L. A. (2003). Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 95(19), 1482-1485.
- Gelmann EP (1998). Oncogenes in human breast Cancer. In: *The Breast: Comprehensive management of benign and malignant Diseases. Vol I. Ed: Bland KI, Copeland EM. WB Saunders Company, USA*, p:499-517.
- Glück, S. (2005). Adjuvant chemotherapy for early breast cancer: optimal use of epirubicin, *The Oncologist*, 10, 780-791.
- Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C. R., & Grosveld, G. (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, 36(1), 93-99.
- Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*, 23(6), 1625-1637.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-74.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., Francisco, S. (2000). The Hallmarks of Cancer Review. *Cell*, 100, 57-70.
- Harris, H., Miller, O. J., Klein, G., Worst, P., & Tachibana, T. (1969). Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature*, 223(5204), 363.

- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S. A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., ... & Kroemer, G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, 15(13), 1573.
- Ilbawi, A. M., & Velazquez-Berumen, A. (2018). World Health Organization list of priority medical devices for cancer management to promote universal coverage. *Clinics in Laboratory Medicine*, 38(1), 151-160.
- Jin, Z., & El-Deiry, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 4(2), 147-171.
- Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P., & Starosławska, E. (2015). Breast cancer risk factors. *Przegląd Menopauzalny-Menopause Review*, 14(3), 196.
- Karp, G. (2002) Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments. 3rd Ed. NY: John Wiley & Sons, Inc. p672.
- Kaye, S. B. (2011). Women's Cancers. A. Keen, & E. Lennan (Eds.). Wiley-Blackwell.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239.
- Keyomarsi, K., Conte, J. D., Toyofuku, W., & Fox, M. P. (1995). Deregulation of cyclin E in breast cancer. *Oncogene*, 11(5), 941-950.
- King, M. C., Marks, J. H., & Mandell, J. B. (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 302(5645), 643-646.
- Klijn, J. G. M., Berns, P. M. J. J., Schmitz, P. I. M., & Foekens, J. A. (1992). The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocrine Reviews*, 13(1), 3-17.
- Konakanchi, D. P., Pula, S. R., Pilli, R. K., Maddula, L. V. V. P. K., Konduri, S. K. M., Ravi, J. R. R., ... & Nannapaneni, V. C. (2018). U.S. Patent No. 10,106,554. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- Korner W., Hanf V., Schuller W., Kempter C., Metzger J., Hagenmaier H (1999). Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *The Science of the Total Envir.*; 225, 33-48.
- Krishna, M. (2017). Patterns of necrosis in liver disease. *Clinical Liver Disease*, 10(2), 53.
- Kuo, C.-T., Hsu, M.-J., Chen, B.-C., Chen, C.-C., Teng, C.-M., Pan, S.-L., & Lin, C.-H. (2008). Denbinobin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells via Akt inactivation, Bad activation, and mitochondrial dysfunction. *Toxicology Letters*, 177(1), 48–58.
- Kurebayashi JJ. (2001). Biological and clinical significance of her2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer* 8(1):45-51.
- Kuwana, T., & Newmeyer, D. D. (2003). Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 691-699.
- Lehn, S., Tobin, N. P., Berglund, P., Nilsson, K., Sims, A. H., Jirström, K., ... & Landberg, G. (2010). Down-regulation of the oncogene cyclin D1 increases migratory capacity in breast cancer and is linked to unfavorable prognostic features. *The American Journal of Pathology*, 177(6), 2886-2897.
- Li, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48), 6194.
- Liao, D. J., & Dickson, R. B. (2000). c-Myc in breast cancer. *Endocrine-related Cancer*, 7(3), 143-164.
- Liu, B., Cheng, Y., Liu, Q., Bao, J. K., & Yang, J. M. (2010). Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(9), 1154.
- Lowe SW, Cepero E, Evan G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 18;432(7015):307–15.
- Mahalingam, S., Meanger, J., Foster, P. S., & Lidbury, B. A. (2002). The viral manipulation of the host cellular and immune environments to enhance propagation and survival: a focus on RNA viruses. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(3), 429-439.

- Mahapatra, D. K., Bharti, S. K., Asati, V., & Singh, S. K. (2019). Perspectives of medicinally privileged chalcone based metal coordination compounds for biomedical applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*.
- Majno, G., & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*, 146(1), 3.
- Maricic, M. (2006). The use of zoledronic acid in Paget's disease. *Current Osteoporosis Reports*, 4(1), 40-44.
- McKenna, N. J., & O'Malley, B. W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, 108(4), 465-474.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Nahta, R., Yu, D., Hung, M.-C., Hortobagyi, G. N., & Esteva, F. J. (2006). Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nature Oncology*, 3(5), 269-80.
- Neuhausen, S. L., & Marshall, C. J. (1994). Loss of heterozygosity in familial tumors from three BRCA1-linked kindreds. *Cancer Research*, 54(23), 6069-6072.
- Norbury, C. J., & Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41(1), 367-401.
- Nowakowska, Z. (2007). A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42(2), 125–137.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260), 23-28.
- Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Research*, 24(1), 9.
- Ottmann, O. G., Druker, B. J., Sawyers, C. L., Goldman, J. M., Reiffers, J., Silver, R. T., & Baccarani, M. (2002). A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood*, 100(6), 1965-1971.

- Oyouni, A. A. A. (2017). Human Cancer Genetics, Stem Cells, and Medical Molecular Biology: An Epigrammatic Review. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 14(3), 881-885.
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews*, 9(2), 91-102.
- Perren, T. J. (1991). c-erbB-2 oncogene as a prognostic marker in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 63(3), 328.
- Petek, D., Hannouche, D., & Suva, D. (2019). Osteonecrosis of the femoral head: pathophysiology and current concepts of treatment. *EFORT open reviews*, 4(3), 85-97.
- Polyak, K. (2002). Breast cancer gene discovery. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(18), 1-18.
- Rasmussen, T. H., & Nielsen, J. B. (2002). Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (E-Screen). *Biomarkers*, 7(4), 322-336.
- Reers, M., Smiley, S. T., Mottola-Hartshorn, C., Chen, A., Lin, M., & Chen, L. B. (1995). Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. In *Methods in Enzymology* (Vol. 260, pp. 406-417). Academic Press.
- Riedl, S. J., & Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5), 405.
- Rieger, P. T. (2004). *The biology of cancer genetics. Seminars in Oncology Nursing*, 20(3), 145-154.
- Serova, O. M., Mazoyer, S., Puget, N., Dubois, V., Tonin, P., Shugart, Y. Y., & Lenoir, G. M. (1997). Mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families: are there more breast cancer-susceptibility genes?. *American Journal of Human Genetics*, 60(3), 486.
- Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., & Greene, G. L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95(7), 927-937.
- Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R. P., & Canaani, E. (1985). Fused transcript of Abl and Bcr Genes in Chronic Myelogenous Leukaemia. *Nature*, 315(6020), 550.

- Smith D, Toft D. (1993). Steroid Receptors and Their Associated Proteins. *Mol Endocrinol* 7:4-11.
- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., & Serrano, F. O. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 103(7), 113-122.
- Spring, L. M., Gupta, A., Reynolds, K. L., Gadd, M. A., Ellisen, L. W., Isakoff, S. J., & Bardia, A. (2016). Neoadjuvant endocrine therapy for estrogen receptor–positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *JAMA oncology*, 2(11), 1477-1486.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., & Larochette, N. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441.
- Uslu, D. (2011). Bazı bitkisel kaynaklı gıda destek ürünlerinin endokrin bozucu etki potansiyellerinin in vitro yöntemi ile belirlenmesi. Yayımlanmış Yüksek Lisans Tezi. İzmir: *Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.
- Van Delft, M. F., & Huang, D. C. (2006). How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Research*, 16(2), 203.
- van der Burg, B., de Groot, R. P., Isbrücker, L., Kruijer, W., & de Laat, S. W. (1991). Oestrogen directly stimulates growth factor signal transduction pathways in human breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 40(1-3), 215-221.
- van England, M., Nieland, L.J.W., Ramaekers, F.C.F., Shutte, B. Reutelingsperger, C.P.M. (1998). Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.*, 31, (1-9).
- Vanparys C., Depiereux S., Nadzialek S., Robbens J., Blust R., Kestemont P., Coen W. D (2010). Performance of the flowcytometric E-screen assay in screening estrogenicity of pure compounds and environmental samples. *Science of the Total Environment*; 408, (4451–4460).

- Veronesi, U., Cascinelli, N., Mariani, L., Greco, M., Saccozzi, R., Luini, A., ... & Marubini, E. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 347(16), 1227-1232.
- Vogel, V. G., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Cronin, W. M., Cecchini, R. S., Atkins, J. N., Bevers, T. B., et. al. (2006). Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP study of tamoxifen and raloxifene (STAR) P-2 trial. *JAMA: Journal of the American Medical Association*, 295(23), 2727-41.
- Vogel, V. G., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Cronin, W. M., Cecchini, R. S., ... Atkins, J. N. (2010). Update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial: Preventing Breast Cancer. *Cancer Prevention Research*, 3(6), 696–706.
- von Lintig, F. C., Dreilinger, A. D., Varki, N. M., Wallace, A. M., Casteel, D. E., & Boss, G. R. (2000). Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 62(1), 51-62.
- Vousden, K. H., & Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 594.
- Weinstein, I. B., & Joe, A. K. (2006). Mechanisms of disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 3(8), 448.
- Woo, C. C., Loo, S. Y., Gee, V., Yap, C. W., Sethi, G., Kumar, A. P., & Tan, K. H. B. (2011). Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: possible involvement of PPAR- γ pathway. *Biochemical Pharmacology*, 82(5), 464-475.
- Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., ... & Averill, D. (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, 265(5181), 2088-2090.

Yadav, P., Lal, K., Kumar, A., Guru, S. K., Jaglan, S., & Bhushan, S. (2017). Green synthesis and anticancer potential of chalcone linked-1, 2, 3-triazoles. *European journal of medicinal chemistry*, 126, 944-953.

Ye, W., Shu, H., Wen, Y., Ye, W., Li, H., Qin, Y., & Li, X. (2019). Renal histopathology of prolonged acute kidney injury in HELLP syndrome: a case series and literature review. *International Urology and Nephrology*, 51(6), 987-994.

Zeiss, C. J. (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Veterinary Pathology*, 40(5), 481-495.

Zuckerberg, L. R., Yang, W. I., Gadd, M., Thor, A. D., Koerner, F. C., Schmidt, E. V., & Arnold, A. (1995). Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. *Modern Pathology: an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*, 8(5), 560-567.

EK-1