



T.C.

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İZOİNDOL TÜREVLİ BİLEŞİKLERİN İNSAN MEME VE KOLON
KANSERİ HÜCRELERİNDE ÇOKLU İLAÇ DİRENCİNE VE
APOPTOTİK SİNYAL YOLAKLARINA ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

SEDA MESCİ

AĞUSTOS

**İZOİNDOL TÜREVLİ BİLEŞİKLERİN İNSAN MEME VE KOLON
KANSERİ HÜCRELERİNDE ÇOKLU İLAÇ DİRENCİNE VE APOPTOTİK
SİNYAL YOLAKLARINA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Seda MESCİ

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİMDALI**

Danışman

Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2020

Seda MESCİ tarafından hazırlanan “İZOİNDOL TÜREVLİ BİLEŞİKLERİN İNSAN MEME VE KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDE ÇOKLU İLAÇ DİRENCİNE VE APOPTOTİK SİNYAL YOLAKLARINA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Amasya Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

Biyoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan: Prof. Dr. Birsen AYDIN KILIÇ

Biyoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Burak YAZGAN

Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Kemal BİLGİN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: 10/08/2020

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Meryem EVECEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Seda MESCİ

10.08.2020

İZOİNDOL TÜREVLİ BİLEŞİKLERİN İNSAN MEME VE KOLON KANSERİ
HÜCRELERİNDE ÇOKLU İLAÇ DİRENCİNE VE APOPTOTİK SİNYAL
YOLAKLARINA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

(Doktora Tezi)

Seda MESCİ

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2020

ÖZET

Meme kanseri kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür ve dünya çapında tüm kanserlerin yaklaşık dörtte birini oluşturmaktadır. Kolon kanseri ise erkeklerde ve kadınlarda en çok rastlanan kanser türüdür. Bu kanserlerin tedavi yöntemlerinde karşılaşılan en önemli sorunlar hücrelerin sitotoksik etkenler ile ilaca karşı direnç geliştirmeleri ve apoptozun baskılanmasıdır.

Bu çalışmada, kanser hücrelerinde proapoptotik ve antikanserojen etki göstereceği düşünülen heterohalkalı bileşiklerin MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde çoklu ilaç direncine (MDR) ve apoptotik sinyal yollarına etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Heterohalkalı bileşiklerin antioksidan aktiviteleri serbest radikal süpürücü, indirgeyici ve metal şelatlama yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. MCF-7 (meme kanseri), MCF-12A (normal meme epiteli), DLD-1 (kolon kanseri) ve CCD-18Co (normal kolon epiteli) hücre hatlarında, bileşiklerin sitotoksik dozu ve IC₅₀ değeri MTT yöntemiyle; hücre canlılığına etkisi gerçek zamanlı hücre analizi sistemi (RTCA) ile belirlenmiştir. IC₅₀ değeri belirlenen bileşiklerin belirtilen hücre hatlarında; anti-karsinogenik etkileri çoklu ilaç direncinde rol oynayan genler ve apoptotik hücre ölümünde önemli rol oynayan genlerin mRNA düzeyleri Real Time-PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. Ayrıca apoptoz ve ilişkili sinyal yollarında yer alan proteinlerin miktarları membran ilişkili protein array kit ile ölçülmüştür.

Heterohalkalı bileşikler yüksek antioksidan aktiviteye sahiptirler ve IC₅₀ değerleri serbest radikal süpürücü (DPPH) yöntem ile 98-108 µg / mL ve metal şelatlama yöntemi ile 21-35 µg / mL olarak tespit edilmiştir. Bileşiklerin MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde antiproliferatif ve sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiş ve IC₅₀ değerleri 25-100 µM arasında tespit edilmiştir. Bileşikler çoklu ilaç direnci (ABCB1, ABCC10, ABCC11 ve ABCG2) genlerinin ifadelerinde anlamlı bir azalış, apoptotik hücre ölümü (p53, BAX ve CASP3) genlerinin ifadelerinde anlamlı bir artış ve BCL2, PARP, HSP27, HSP40, HSP60, HSP70 ve HSP90 genlerinin ifadelerinde anlamlı bir azalış göstermiştir. Ayrıca bileşiklerin apoptoz ve ilişkili sinyal yollarında yer alan proteinlerin ifadelerinde anlamlı bir sonuç verdiği ve hücreleri apoptoza yönlendirdiği belirlenmiştir.

Bileşiklerin MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde çoklu ilaç direncini baskılama yeteneğine sahip ve apoptozun indüklenmesini artıran yeni bir ilaç aday olabileceği düşünülmektedir.

Sayfa Adedi : 224

Anahtar Kelimeler : İzoidol türevli bileşikler, MCF-7, DLD-1, MDR, Apoptoz

Danışman : Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ISOINDOL DERIVATIVE COMPOUNDS
ON MULTI-DRUG RESISTANCE AND APOPTOTIC SIGNALING PATHWAYS IN
HUMAN BREAST AND COLON CANCER CELLS

(Ph. D. Thesis)

Seda MESÇİ

AMASYA UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCES

August 2020

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer type among women and accounts for about a quarter of all cancers worldwide. Colon cancer is the fourth most common form of cancer in men and women. The most important problems encountered in the treatment methods of these cancers are the development of the cells' resistance to cytotoxic factors and drugs and suppression of apoptosis.

In this thesis, it is aimed to investigate the effects of heterocyclic compounds, which are predicted to have a proapoptotic and anticarcinogenic effect on cancer cells, on multiple drug resistance (MDR) and apoptotic signal pathways in MCF-7 and DLD-1 cells.

The antioxidant activities of heterocycle compounds were determined using free radical scavenging, reducing and metal chelating methods. In MCF-7 (breast cancer), MCF-12A (normal breast epithelium) and DLD-1 (colon cancer), CCD-18Co (normal colon epithelium) cell lines, the cytotoxic dose and IC₅₀ value of the compounds are determined by MTT method; Its effect on cell viability was determined by real-time cell analysis system (RTCA). IC₅₀ value of the specified compounds in the specified cell lines; mRNA levels of anti-carcinogenic effects of genes involved in multiple drug resistance and genes that play an important role in apoptotic cell death were determined by RT-PCR method. In addition, the amounts of proteins contained in apoptosis and associated signaling pathways were measured with the membrane-associated protein array kit.

Heterocyclic compounds have high antioxidant activity and IC₅₀ values were determined as 98 and 108 µg / mL by free radical scavenger (DPPH) method and 21 and 35 µg / mL by metal chelation method. The compounds have antiproliferative and cytotoxic effects in MCF-7 and DLD-1 cell lines, and IC₅₀ values in MCF-7 and DLD-1 cells were determined between 25 and 100 µM. Expression of the multiple drug resistance (ABCB1, ABCC10, ABCC11 and ABCG2) genes of compounds showed a significant decrease. Compounds showed a significant increase in the expression of apoptotic cell death (p53, BAX, CASP3, GRP94 and GRP78) genes. In addition, the compounds showed a significant decrease in the expression of BCL2, PARP, HSP27, HSP40, HSP60, HSP70 and HSP90 genes. In addition, the compounds gave a meaningful result in the expression of the proteins involved in apoptosis and associated signaling pathways, and it was found to direct cells to apoptosis.

The compounds are thought to be a new drug candidate capable of suppressing multiple drug resistance in MCF-7 and DLD-1 cells and enhancing the induction of apoptosis.

Page Number : 224

KeyWords : Isoindol derivative compounds, MCF-7, DLD-1, MDR, Apoptosis

Supervisor : Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince beni destekleyen, yönlendiren ve tüm aşamalarında bana zaman ayırarak yardımını esirgemeyen saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Tuba YILDIRIM' a teşekkürü bir borç bilirim. Doktora tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Birsen AYDIN KILIÇ, Doç. Dr. Melek GÜL ve Dr. Öğretim Üyesi Burak YAZGAN hocalarıma katkı, öneri ve eleştirilerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Amasya Üniversitesi, Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı imkânlarını kullanımına sunduğu için Prof. Dr. Tuba YILDIRIM, Doç. Dr. Melek GÜL ve Doç. Dr. Sevgi MARAKLI, hocalarıma teşekkür ederim. Deney aşamalarında ve tez yazımında bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan Doç. Dr. Arif AYAR, Doç. Dr. Sevgi MARAKLI ve Dr. Öğretim Üyesi Burak YAZGAN hocalarıma da ayrıca teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim boyunca eğitimime katkıda bulunan ve yardımcı olan Amasya Üniversitesi Öğretim üyeleri Prof. Dr. Vahit KONAR, Dr. Öğretim Üyesi Önder İDİL hocalarıma ve Hitit Üniversitesi Öğretim üyeleri Prof. Dr. İrfan KURTBAŞ, Doç. Dr. Hüseyin KAYADİBİ hocalarıma teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca tez dönemi boyunca benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevdiğim annem, babam, ablam ve kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması FMB-BAP 18-0333 ve FMB-BAP 19-0407 Proje No' ları ile Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Heterohalkalı Bileşikler	3
2.2. Kanser	5
2.2.1. Meme kanseri	8
2.2.2. Kolon kanseri	10
2.3. Kanser Hücrelerinin Özellikleri	13
2.3.1. Klonal orijin	13
2.3.2. İmmortalite	14
2.3.3. Genetik instabilite	15
2.3.4. Kontakt inhibisyonu	17
2.3.5. Proliferasyonun devamlı artışı	17
2.3.6. Metastaz	18
2.4. Kanser ve Hücre Döngüsü	19
2.5. Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler	22
2.6. Telomerler	28

	Sayfa
2.7. Kanser ve Antioksidanlar	30
2.8. Kanser ve Sitotoksisite	32
2.9. Kanser ve Hücre Membranı	34
2.10. Kanserde Çoklu İlaç Direnci	36
2.11. Kanserde ABC Taşıyıcılarının Rolü	37
2.12. ABC Taşıyıcı Proteinler	39
2.13. Meme ve Kolon Kanserinde ABC Taşıyıcı Proteinleri	43
2.13.1. ABCB1 taşıyıcı proteini (MDR1-P-gp)	43
2.13.2. ACCC alt ailesi taşıyıcı proteinleri	44
2.13.3. ABCG2 taşıyıcı proteini (BCRP)	48
2.14. Kanser ve Apoptoz	49
2.15. Kanser ve Apoptotik Sinyal Yolakları	53
3. MATERYAL VE YÖNTEM	63
3.1. Materyal	63
3.1.1. Antioksidan analizlerinde kullanılan kimyasal malzemeler	63
3.1.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal malzemeler	63
3.1.3. Moleküler analizlerde kullanılan kimyasal malzemeler	63
3.1.4. Protein analizlerinde kullanılan kimyasal malzemeler	64
3.1.5. Besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanması	64
3.2. Yöntem	67
3.2.1. Test bileşikleri	67
3.2.2. Antioksidan aktivite	69
3.2.3. Hücre kültürü	72
3.2.4. Hücre proliferasyon analizi	73

	Sayfa
3.2.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri.....	76
3.2.6. Apoptotik hücre ölümü ile ilgili proteinlerin miktarlarının membran ilişkili protein array kit ile ölçülmesi	81
4. BULGULAR	86
4.1. Antioksidan Analizleri	86
4.1.1. Serbest radikal süpürücü aktivite (DPPH).....	87
4.1.2. Metal şelatlama aktivitesi (Fe ²⁺ iyonlarının şelatlama aktivitesi)	88
4.1.3. İndirgeme aktivitesi	89
4.2. Hücre Proliferasyon Analizleri	91
4.2.1. MTT yöntemi.....	91
4.2.2. MTT verilerinin istatistiksel analizi.....	97
4.2.3. Gerçek zamanlı hücre analizi (RTCA)	101
4.3. Moleküler Analizler.....	112
4.3.1. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri.....	112
4.4. Protein Analizleri	121
4.4.1. Membran ilişkili protein array analizi	121
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	147
KAYNAKLAR.....	170
EKLER	197
EK-1. FMB-BAP 18-0333 proje komisyon kararı.....	198
EK-2. FMB-BAP 19-0407 proje komisyon kararı.....	199
ÖZGEÇMİŞ	200

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Hücre hatlarına ait tezde kullanılan besiyerler ve serumlar.....	72
Çizelge 3.2. Primer dizileri, kaynaklar ve ürün uzunluğu	79
Çizelge 3.3. Gerçek zamanlı PZR (qRT - PCR) Amplifikasyon programı	80
Çizelge 3.4. BCA protein testi kit standardı konsantrasyonları.....	82
Çizelge 4.1. BM-1, SM-1 bileşiklerinin DPPH absorbans ölçümleri	87
Çizelge 4.2. BM-2, SM-2 bileşiklerinin DPPH absorbans ölçümleri.....	87
Çizelge 4.3. BM-1, SM-1 bileşiklerinin metal şelatlama absorbans ölçümleri.....	88
Çizelge 4.4. BM-2, SM-2 bileşiklerinin metal şelatlama absorbans ölçümleri.....	89
Çizelge 4.5. BM-1, SM-1 bileşiklerinin indirgeme absorbans ölçümleri.....	90
Çizelge 4.6. BM-2, SM-2 bileşiklerinin indirgeme absorbans ölçümleri.....	90
Çizelge 4.7. Bileşiklerin MCF-7 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	92
Çizelge 4.8. Bileşiklerin MCF-12A hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	92
Çizelge 4.9. Bileşiklerin DLD-1 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri	94
Çizelge 4.10. Bileşiklerin CCD-18CO hücre hattında MTT absorbans sonuçları	95
Çizelge 4.11. MCF-7 ve MCF-12A hücre hatlarında BM-1 ve SM-1 bileşiklerinin istatistik verileri	98
Çizelge 4.12. DLD-1 ve CCD-18CO hücre hatlarında BM-1 ve SM-1 bileşiklerinin istatistik verileri	99
Çizelge 4.13. MCF-7 ve MCF-12A hücre hatlarında BM-2 ve SM-2 bileşiklerinin istatistik verileri	100
Çizelge 4.14. DLD-1 ve CCD-18CO hücre hatlarında BM-2 ve SM-2 bileşiklerinin istatistik verileri	101
Çizelge 4.15. Bileşiklerin MCF-7 hücre hattında RTCA absorbans değerleri	102
Çizelge 4.16. Bileşiklerin MCF-12A hücre hattında RTCA absorbans değerleri	102
Çizelge 4.17. Bileşiklerin DLD-1 hücre hattında RTCA absorbans değerleri	107

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.18. Bileşiklerin CCD-18CO hücre hattında RTCA absorbans değerleri.....	107
Çizelge 4.19. MCF-7 hücre hattından izole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu	112
Çizelge 4.20. DLD-1 hücre hattından izole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu	112
Çizelge 4.21. MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinden izole edilen proteinlerin konsantrasyonu	121
Çizelge 4.22. BCA protein testinin 562 nm absorbans değerleri.....	121
Çizelge 4.23. Apoptoz array haritası.....	123
Çizelge 4.24. Apoptoz sinyal array haritası	123

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. ABC transport yapısı	43
Şekil 2.2. ABCB1/MDR1 yapısı	44
Şekil 2.3. ABCC'lerin genel yapısı	46
Şekil 2.4. ABCG2/BCRP yapısı	49
Şekil 3.1. Test bileşiklerinin kimyasal yapıları ve isimleri	68
Şekil 3.2. SM-1'in sentezine ait kimyasal yapı	69
Şekil 3.3. SM-2'in sentezine ait kimyasal yapı	69
Şekil 4.1. BM-1, SM-1 bileşiklerinin DPPH aktivitesi	88
Şekil 4.2. BM-2, SM-2 bileşiklerinin DPPH aktivitesi	88
Şekil 4.3. BM-1, SM-1 bileşiklerinin metal şelatlama aktivitesi.....	89
Şekil 4.4. BM-2, SM-2 bileşiklerinin metal şelatlama aktivitesi.....	89
Şekil 4.5. BM-1, SM-1 bileşiklerinin indirgeme aktivitesi	90
Şekil 4.6. BM-2, SM-2 bileşiklerinin indirgeme aktivitesi	90
Şekil 4.7. Bileşiklerin MCF-7 ve MCF-12A hücre hatlarında MTT analizleri.....	94
Şekil 4.8. Bileşiklerin DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında MTT analizleri.....	96
Şekil 4.9. MCF-7 ve MCF-12A hücre hatlarında BM-1 ve SM-1 bileşiklerinin hücre canlılığı açısından istatistiksel analizi	98
Şekil 4.10. DLD-1 ve CCD-18CO hücre hatlarında BM-1 ve SM-1 bileşiklerinin hücre canlılığı açısından istatistiksel analizi	99
Şekil 4.11. MCF-7 ve MCF-12A hücre hatlarında BM-2 ve SM-2 bileşiklerinin hücre canlılığı açısından istatistiksel analizi	100
Şekil 4.12. DLD-1 ve CCD-18CO hücre hatlarında BM-2 ve SM-2 bileşiklerinin hücre canlılığı açısından istatistiksel analizi	101
Şekil 4.13. Bileşiklerin MCF-7 ve MCF-12A hücre hatlarında RTCA analizleri.....	104
Şekil 4.14. Bileşiklerin DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında RTCA analizleri	109

Şekil	Sayfa
Şekil 4.15. Bileşiklerin MCF-7 hücre hattında çoklu ilaç direnci (MDR) genlerine ait mRNA ekspresyonları	110
Şekil 4.16. Bileşiklerin DLD-1 hücre hattında çoklu ilaç direnci (MDR) genlerine ait mRNA ekspresyonları	113
Şekil 4.17. Bileşiklerin MCF-7 hücre hattında apoptotik sinyal yollarına ait mRNA ekspresyonları	118
Şekil 4.18. Bileşiklerin DLD-1 hücre hattında apoptotik sinyal yollarına ait mRNA ekspresyonları	119
Şekil 4.19. BCA protein testi standart eğrisi	122
Şekil 4.20. BM-1 bileşiğinin MCF-7 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri.....	130
Şekil 4.21. SM-1 bileşiğinin MCF-7 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri.....	132
Şekil 4.22. BM-2 bileşiğinin MCF-7 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri.....	134
Şekil 4.23. SM-2 bileşiğinin MCF-7 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri.....	136
Şekil 4.24. BM-1 bileşiğinin DLD-1 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri.....	139
Şekil 4.25. SM-1 bileşiğinin DLD-1 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri.....	141
Şekil 4.26. BM-2 bileşiğinin DLD-1 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri.....	143
Şekil 4.27. SM-2 bileşiğinin DLD-1 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri.....	145
Şekil 5.1. Bileşiklerin çoklu ilaç direncine ve apoptotik yollara etkileri.....	167

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Heterohalkalı bileşikler.....	3
Resim 2.2. Normal ve kanserli hücre çoğalma mekanizması.....	5
Resim 2.3. Kanser hücresi	5
Resim 2.4. Normal ve kanser hücresi arasındaki farklar	6
Resim 2.5. Kanser metastaz oluşumu	6
Resim 2.6. Tümör oluşumu	7
Resim 2.7. Dünyada kadınlara ve erkelere ait 2020 kanser istatistikleri.....	8
Resim 2.8. Meme Kanser anatomisi	9
Resim 2.9. Kolon Kanser anatomisi	12
Resim 2.10. Kanser ve klonol orijin	13
Resim 2.11. Kanser ve immortalite	15
Resim 2.12. Kanser ve genetik	16
Resim 2.13. Kanser ve Metastaz.....	18
Resim 2.14. Hücre döngüsü kontrol noktaları	20
Resim 2.15. Onkogenler ve Tümör baskılayıcı genlerin hücre döngüsüne etkisi	26
Resim 2.16. Onkogenler ve Tümör baskılayıcı genlerin Apoptoz mekanizmasına etkisi	27
Resim 2.17. Kanserde Telomer ve Telomeraz.....	29
Resim 2.18. Hücre membranının genel yapısı.....	35
Resim 2.19. Çoklu ilaç direnci ve apoptoz mekanizması.....	37
Resim 2.20. Kanserde ilaç direnci	38
Resim 2.21. ATP taşıyıcı proteinlerin yapısı.....	40
Resim 2.22. İnsan ABC protein envanteri (ilaç araştırması yapılan)	41
Resim 2.23. ABC proteinlerinin NBD'lere göre filogenetik ağacı	41

Resim	Sayfa
Resim 2.24. ABC üst ailesine ait proteinlerin sınıflandırılması.....	42
Resim 2.25. ABCC'lerin kromozomdaki lokasyonları.....	45
Resim 2.26. ABCC'lerin sınıflandırılması	45
Resim 2.27. ABCC proteinlerinin insan dokularında ekspresyonları.....	46
Resim 2.28. Apoptoz ve dışsal yollar	51
Resim 2.29. Apoptoz ve içsel yollar	52
Resim 2.30. Apoptotik sinyal yolları	57
Resim 2.31. Kanserde Chk1 (CHEK1) ve Chk2 (CHEK2) mekanizması.....	58
Resim 2.32. Kanserde IGF/IGFR mekanizması ve apoptoz	59
Resim 2.33. Apoptoz ve sinyal yolları	60
Resim 3.1. Antioksidan aktivite çalışması.....	70
Resim 3.2. Tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarının görüntüleri.....	73
Resim 3.3. MTT testi çalışması	75
Resim 3.4. RTCA testi çalışması	76
Resim 3.5. MCF-7 ve DLD-1 hücre hatlarında BCA protein testi çalışması	82
Resim 4.1. Bileşiklerin MCF-7 hücre hattında RTCA görüntüleri.....	105
Resim 4.2. Bileşiklerin MCF-12A hücre hattında RTCA görüntüleri.....	106
Resim 4.3. Bileşiklerin DLD-1 hücre hattında RTCA görüntüleri.....	110
Resim 4.4. Bileşiklerin CCD-18CO hücre hattında RTCA görüntüleri	111
Resim 4.5. Gen bölgelerine ait erime eğrisi analizi	120
Resim 4.6. MCF-7 (meme kanseri) hücrelerinde apoptoz array görüntüleri.....	122
Resim 4.7. DLD-1 (kolon kanseri) hücrelerinde apoptoz array görüntüleri	122
Resim 4.8. MCF-7 (meme kanseri) hücrelerinde apoptoz sinyal array görüntüleri	122
Resim 4.9. DLD-1 (kolon kanseri) hücrelerinde apoptoz sinyal array görüntüleri.....	123

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
cm ²	Santimetrekare
CO ₂	Karbondioksit
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
g	Gram
H ₂ O	Su
kB	Kilo baz
L	Litre
mg	Miligram
mM	Milimolar
mL	Mili litre
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
M	Molar
NH ₂	Amin
nm	Nanometre
ng	Nanogram
p	Anlamlılık değeri
rcf/g	Göreceli santrifüj kuvveti
rpm	Dakikadaki devir sayısı
w/v	Hacimde ağırlıkça yüzde
q	Kromozom

Kısaltmalar	Açıklama
AA	Amino asit
ABC	ATP Bağlama Kaseti
ADP	Adenin Difosfat
AFP	Alfa Feto Protein
AIF	Apoptoz İndükleme Faktörü
AKT	Protein Kinaz B
ANOVA	Varyans Analizi
APC	Adenomatöz Polipozis Coli
ATM	Ataksi Telanjiektazi Mutasyonu
ATP	Adenin Trifosfat
ATTC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
BAD	BCL2 İlişkili Hücre Ölümü Agonisti
BAX	BCL2 İlişkili X
BCL2	B Hücreli Lenfoma 2
BHA	bütillenmiş hidroksianisol
BHT	bütillenmiş hidroksitoluen
BID	BH3 ile Etkileşen Ölüm Agonisti
BIRC	Bakuloviral IAP Tekrar İçeren Protein
BRAF	v-Raf Murin Sarkomu Viral Onkogen Homolog B
BRCA	Meme Kanseri Duyarlılığı Geni
CAD	Kaspaz Aktive Edici Deoksirübönükleaz
CASP	Kaspaz

CDK	Sikline Bağımlı Kinaz
CDKN	Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü
cDNA	Komplementer Deoksiribo Nükleik asit
CEA	Karsino Embriyojenik Antijen
CED	Kaspaz Efektör Bölgesi
c-Fos	Fos geni AP-1 Transkripsiyon Faktörü Alt Birimi
CHEK	Kontrol Noktası Kinazı
c-Jun	Jun geni AP-1 Transkripsiyon Faktörü Alt Birimi
CTNNB	Katenin Beta
CYCS	Sitokrom C
DCC	Kolorektal Kanserde Silinen Bölge
DED	Ölüm Efektör Bölgesi
dH₂O	Distile su
DIABLO	Düşük PI ile Direkt IAP Bağlayıcı Protein
DLD-1	Kolorektal Adenokarsinom
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
DPPH	1,1-difenil-2-pikril-hidrazil
E2F	E2 Transkripsiyon Faktörü
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EIF2A	Ökaryotik Çeviri Başlatma Faktörü 2A
FAS	Apoptoz Antijeni
FASLG	Apoptoz Antijeni Ligandı

GALLiC	3,4,5-trihidroksibenzoik asit
GRP	Endoplazmik Retikulum Stres Geni
HepG2	İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı
HIV-1	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü-1
HSF	Isı Şok Faktörü
HSP	Isı Şok Protein
HT-29	İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı
hTERT	İnsan Telomeraz Ters Transkriptaz
HTRA2	Yüksek Sıcaklık Gereksinimli Serin Proteaz 2
IC₅₀	% 50 İnhibitör Konsantrasyonu
ICAD	Kaspaz Aktive Edici Deoksirübönükleaz İnhibitörü
ID50	% 50 İnfektif Doz
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFBP	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein
JNK	c-Jun N-Terminal Kinaz
KBB	Kan-beyin bariyeri
kDa	Kilo dalton
K562	İnsan Miyelojenöz Lösemi Hücre Hattı
KRAS	Kirsten Sıçan Sarkomu Viral Onkogen Homoloğu
LTA	Lenfotoksin Alfa
MAPK	Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinaz
MBD	Membran bağlanma domaini
MCF-7	İnsan Meme Adenokarsinom
MDM2	E3 Ubikitin-Protein Ligazı

MDR	Çoklu İlaç Direnci
MRP	Çoklu İlaç Direnci ile İlişkili Protein
mRNA	Mesajcı ribo nükleik asit
mTOR	Rapamisinin Memeli Hedefi
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
M.Ö.	Milattan önce
M.S.	Milattan sonra
MSD	Membran kapsama domaini
MSS	Merkezi sinir sistemi
Myc	Transkripsiyon Faktörlerini Kodlayan Proto-Onkogenler Ailesi
NBD	Çekirdek bağlanma domaini
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NFKBIA	NFKB İnhibitörü Alfa
P13K	Fosfosinositid 3-Kinazlar
P53 (TP53)	Tümör Protein 53
PARP	Poli (ADP-Riboz) Polimeraz
PDTC	Pirolidin ditiyokarbamat
P-gp	P-Glikoprotein
PIK3CA	Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Ünite Alfa
PSMD9	Proteazom 26S Alt Ünitesi Atpase 9
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloğu
Post Hoc	Gruplar arası farkın belirlenmesine yönelik çoklu karşılaştırma
RAF	Hızlandırılmış Fibrosarkom
RAS	G-Proteini Türünde Bir Proto-Onkogen

RB	Retinoblastoma Protein
REL-A (P65)	Nükleer Faktör NF-Kappa-B P65 Alt Birimi
RNA	Ribo Nükleik asit
RNS	Reaktif Azot Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RTCA	Gerçek Zamanlı Hücre Analizi
RUNX	Runt ile İlgili Transkripsiyon Faktörü
SE	Standart hata
SMAC	İkinci Mitokondri Türevi Kaspaz Aktivatörü
SMAD	Transformasyon Faktörü Beta Süper Ailesinin Reseptörleri
SRC	Embriyonik Gelişim ve Hücre Büyümesi Proto-Onkogeni
STAT	Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyon Aktivatörü
TMD	transmembranal domain
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TNFRSF	Tümör Nekroz Faktör Reseptör Süper Ailesi
Trolox	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
TSG	Tümör Baskılayıcı Gen
XIAP	X'e Bağlı Apoptoz Proteini İnhibitörü

1. GİRİŞ

Organik kimyanın önemli bir sınıfını oluşturan izoindol türevli heterohalkalı bileşikler, yapısal olarak diğer ilaç aktif bileşiklerle kolaylıkla türevlendirilebilen antikanserojen, antiinflamatuvar, antiviral, antiproliferatif ve antiallerjik özellikleri bilinen bileşiklerdir. Yapılan literatür incelemelerine göre, heterohalkalı bileşiklerin farklı disiplinlerde uygulama alanına yönelik çok fazla çalışma olmasına rağmen, bu bileşiğin izoindol türevleriyle ilgili biyolojik aktivite çalışmalarına az rastlanmaktadır.

Kanser günümüzde en önemli sağlık problemlerinden biridir ve tedavisi için cerrahi müdahale, kemoterapi, immünoterapi, gen terapisi, radyoterapi ve fotodinamik terapi olmak üzere birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemlerinde karşılaşılan en önemli sorun ise hücrelerin tedaviye ya da ilaca karşı direnç geliştirmeleridir. Yapılan araştırmalar, apoptozu baskılayıcı faktörlerin kanser direncinin oluşumunda çok önemli olduğunu göstermektedir. Metastatik ve anjiyogenetik kanserli (meme ve kolon vb.) hastaların % 90'ından fazlasında kemoterapi direnci meydana gelmektedir ve bu durum tedavide başarısız sonuçlara neden olmaktadır. İlaç taşıma proteinleri tümör yapısı oluşturduğunda; apoptozun baskılanmasına, proliferasyonun artmasına, ilaç-hedef etkileşiminde değişikliklere, ilaç inaktivasyonuna ve sitotoksik etkenlere karşı direnç oluşmasına sebep olmaktadır.

Kanser için etkili terapotik tedavide engel olarak ortaya çıkan P-gp (P-glikoprotein) çoklu ilaç direncine (MDR, ABC taşıyıcı proteinler) ve antikanser ilaçların tümör hücrelerinden atılımına neden olmaktadır. P-gp işlevini bloke eden moleküller geliştirmeye yönelik birçok araştırma yapılmaktadır ve çoklu ilaç direncini yok edebilecek çok sayıda moleküller sentezlenmektedir. P-gp'yi inhibe edici bu moleküller P-gp modülatörleri olarak adlandırılmaktadır. Kanser tedavilerinde P-gp ekspresyonunun ve/veya modülasyonunun da substrat oluşturabilecek antikanser ilaçların araştırılması ve geliştirilmesi dikkat çekici bir strateji olarak düşünülmektedir.

Hücre ölümü (Apoptoz) normal gelişim ve olgunlaşma döngüsünün önemli bir parçasıdır. Hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki homeostatik denge normal fizyolojik süreçlerin sürdürülmesi için kritik öneme sahiptir. Kanser tedavilerinde ortaya çıkan en önemli problem ilaç direnci gelişimi ile birlikte hücre ölümünün engellenmesinden (apoptoz baskılanması) kaynaklanmaktadır.

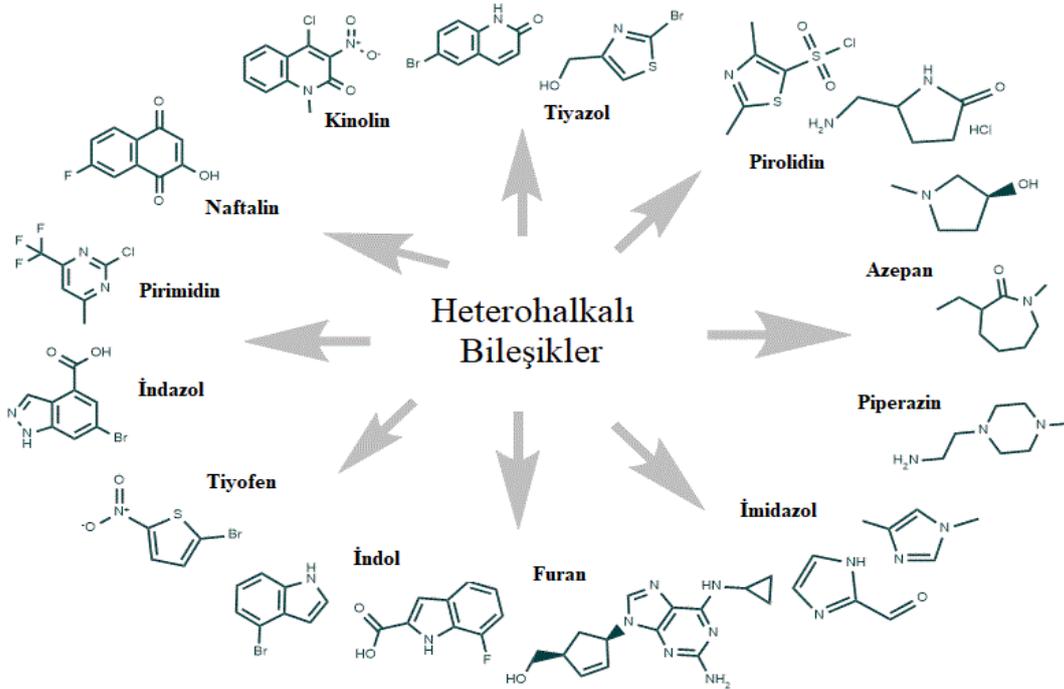
Son yıllarda çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılabilecek biyolojik etkili bileşiklerin keşfedilmesi en popüler araştırma konuları arasında yer almaktadır. Bu nedenle tedaviye yönelik farklı çalışmalar yapılmakta ve terapötik bileşiklerin bu hastalık üzerindeki etkileri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Günümüzde ilaç direncinin ortadan kaldırılmasını ve dirençli hücrelerin apoptoza yönlendirilmesini sağlayacak anti-kanser ajanlarının araştırılması ve geliştirilmesi ana hedeflerdendir.

Bu tez çalışmasında; MCF-7 (insan meme adenokarsinoma) ve DLD-1 (insan kolon adenokarsinoma) hücrelerinde proapoptotik ve antikanserojen etki göstereceği düşünülen heterohalkalı bileşiklerin çoklu ilaç direncine (MDR) ve apoptotik sinyal yollarına etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylece hücre proliferasyonunu engelleyici, apoptozun indüklenmesini ve ilaç-hedef etkileşimini artıran yeni ilaç adayı bileşiklerin *in vitro* çalışılması planlanmıştır. Heterohalkalı bileşiklerin antioksidan aktiviteleri serbest radikal süpürücü (DPPH), indirgeyici ve metal şelatlama yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. MCF-7 (meme kanseri), MCF-12A (normal meme epiteli) ve DLD-1 (kolon kanseri), CCD-18Co (normal kolon epiteli) hücre hatlarında, heterohalkalı bileşiklerin sitotoksik dozu ve IC₅₀ değeri MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemiyle; hücre canlılığına etkisi gerçek zamanlı hücre analizi sistemi (RTCA) ile tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri belirlenen heterohalkalı bileşiklerin belirtilen hücre hatlarında, anti-karsinojenik etkileri, kemoterapi direncinde önemli rol oynayan pompa proteinleri ABCB1 (MDR1-P-gp), ABCC3 (MRP3), ABCC10 (MRP7), ABCC11 (MRP8), ABCG2 (BCRP) ve apoptotik hücre ölümü ve ilişkili sinyal yollarında önemli rol oynayan proteinleri p53, PARP, BCL2, BAX, CASP3, ısı şok proteinlerinin (HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 α), endoplazmik retikulum stres genlerinin (GRP78 ve GRP94) mRNA düzeyleri qPCR yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca apoptoz ve ilişkili sinyal yollarında yer alan proteinler olan; BAD, BAX, BID, BIM, Casp3, Casp7, Casp8, CD40, CD40L, cIAP-2, cytoC, DR6, Fas, FasL, HTRA, p38, p27, p53, SMAC, sTNF-R1, sTNF-R2, TNF-alpha, TNF-beta, TRAILR-1, TRAILR-2, TRAILR-3, TRAILR-4, ATM, CHK1, CHK2, eIF2a, SMAD BCL-2, BCL-W, HSP27, HSP60, HSP70, IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6, IGF-1sR, Livin, p21, Survivin, XIAP, AKT, Erk1/2, Ikb α , JNK, NFKB, PARP, TAK1 miktarları membran ilişkili protein array kit ile ölçülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Heterohalkalı Bileşikler

Heterohalkalı bileşikler, en az bir heteroatom içeren halkalı bileşiklerdir, bunlar yaygın olarak azot, oksijen, fosfor ve kükürttür. Heterohalkalı bileşikler, oldukça yaygın biyolojik aktiviteye sahip moleküllerdir (Gupta, 2015; Nirwan, Pareek ve Chohadia, 2015) (Resim 2.1). Ana iskeletinde heterohalkayı içeren DNA ve RNA, klorofil, hemoglobin, vitaminler gibi birçok hayati önemi olan moleküller bulunmaktadır. Triazin türevleri, antimikrobiyal ve anti-inflamatuvar aktiviteye sahiptir, aynı zamanda üriner antiseptikler olarak da kullanılmaktadırlar. Benzimidazol türevlerinin antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antihelmintik gibi geniş biyolojik aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir (Gupta, 2015; Nirwan ve diğerleri, 2015; Al-Mulla, 2017).



Resim 2.1. Heterohalkalı bileşikler
(<https://berrchem.com/intermediates/heterocyclic.html>)

Heterohalkalı bileşiklerin birçoğu eşsiz fizikokimyasal özellikleri ve çok yönlülüğü nedeniyle farmakolojinin ve tıbbi kimyanın temel taşları haline gelmiştir. Günümüzde satışa sunulan ilaçlarla birlikte maligniteye karşı umut verici birçok da araştırma devam etmektedir. Özellikle, anti kanser araştırmaları, bu bileşiklerin çok yönlülüğü ve dinamik çekirdek iskeletinden yararlanmaktadır (Martins ve diğerleri, 2015).

Doğal bileşiklerin yapısında bulunan pirolidinler ve türevleri, hücre sinyal yollarındaki etkisi bilinen sentetik moleküllerdir (Harvey 1998; Dondas, Grigg ve Kilner, 2003; N'ajera ve Sansano, 2009). Seksen civarında pirolidin alkaloidi bilinmektedir (Taskıran, 2010). Pirolidin halkası azot atomu içeren beş üyeli bir halka olup, amino asit ve proteinler başta olmak üzere, doğal bileşiklerin yapısında sıkça görülmektedir. Pirolidin ve izoindol fonksiyonel grupları biyolojik aktivitesi bilinen fakat türevlendirmede yan yana getirilmemiş moleküllerdir.

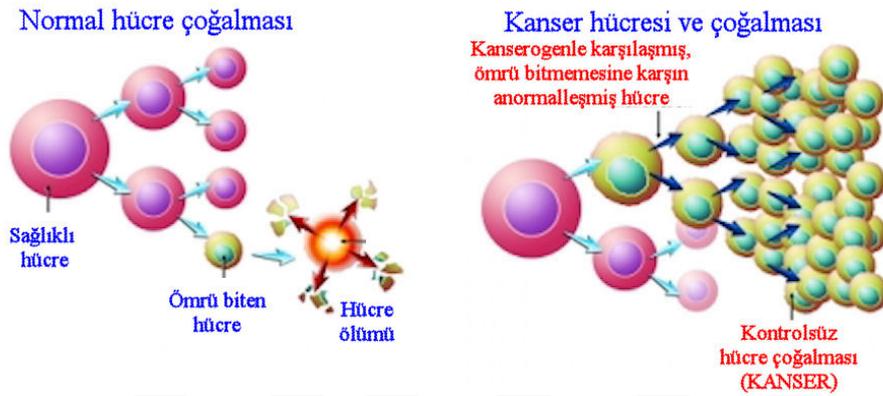
Olefenik dipolarafillerle gerçekleştirilen 1,3-dipolar siklokatalizasyon reaksiyonları en çok kullanımı olan sentetik perisiklik reaksiyonlardandır. Özellikle, doğal alkaloidlerin ve biyolojik öneme sahip oldukça fazla molekülün temel iskeletini oluşturan pirolidin türevlerinin sentezi için azometin ilidler ile alkenler arasındaki dipolar siklokatalizasyon tepkimeleri tercih edilmektedir (Michael, 2008).

Pirolidin türevli bileşiklerin böbrek kanseri hücreleri (Morais, Pat, Gobe, Johnson ve Healy, 2006) ve vasküler düz kas hücreleri üzerine antiproliferatif etkileri olduğu bildirilmiştir (Cifarelli ve diğerleri, 2008). Bu bileşiklerin, böbrek karsinom hücrelerinde apoptozu arttıran etkileri de gösterilmiştir (Morais ve diğerleri, 2006; Riera, Afonso, Collin ve Lomri, 2015). Kim, Mahidara ve Seolo (2001)'in çalışmasında; pirolidin türevli bileşiğin bir mekanizma aracılığıyla DNA transkripsiyon faktörüne ısı şok faktörünün (HSF1) bağlanmasını indüklediği bilinmektedir. Pirolidin ve ditiyokarbamat kombinasyonu olan pirolidin ditiyokarbamat (PDTC), antioksidan, metal şelatlayıcı ve güçlü NF- κ B (Nükleer Faktör kappa B) önleyici özellikleri bilinen tiyol içeren sentetik bileşiklerdir (İlbey ve diğerleri, 2009). Ayrıca PDTC'nin paradoksik pro-oksidan aktivite gösterdiği çalışmalar bulunmaktadır (Chinery ve diğerleri, 1997). Son zamanlarda PDTC potansiyel bir anti kanser ajan olarak araştırmacıların ilgisini çekmektedir ve *in vitro* araştırmalarda, birçok kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki oluşturduğu gözlenmiştir (Chinery ve diğerleri, 1997; Liu, Liu ve Zhang, 2008; Liu, Wang, Guo, Teng ve Yu, 2014).

İzoindol türevleri HIV-1 (insan immün yetmezlik virüsü-1) revers transkriptazın inhibitörü olarak farmakolojik özelliğe sahiptirler (Enders, Braig ve Raabe, 2001). Piperidin türevli izoindol halkası içeren bileşiklerin HT-29, K562 ve HepG2 hücre hatları üzerine sitotoksitesisi çalışılmış ve özellikle HepG2 hücre hatları üzerine anti tümör etkileri saptanmıştır (Liu ve diğerleri, 2014).

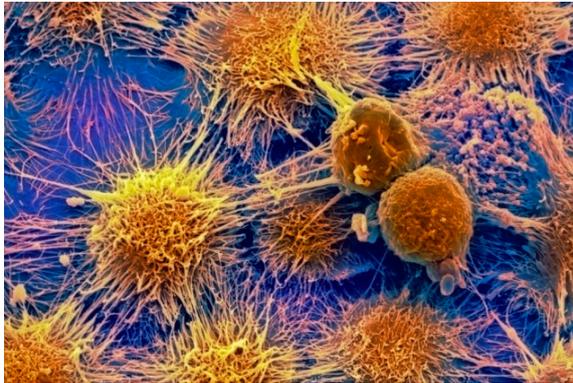
2.2. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyüme eğilimini ve anormal yayılımını tanımlamak için kullanılan bir terimdir (Dunlop ve Campbell, 2000; Hanahan ve Weinberg, 2011; Sarkar ve diğerleri, 2013; López-Lázaro, 2018) (Resim 2.2).



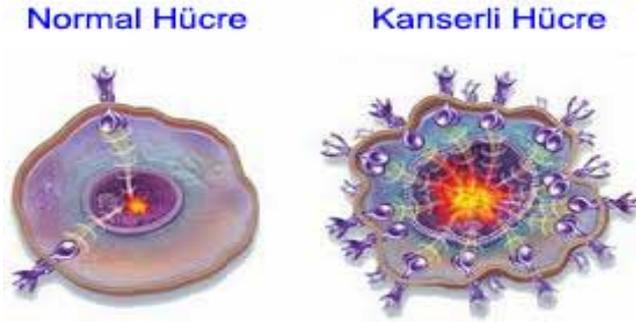
Resim 2.2. Normal ve kanserli hücre çoğalma mekanizması
(<https://dogalbitkiselorganiksaglik.blogspot.com.tr/2015/10/kanserhakkndahersey.html>)

Hipokrat (M.Ö. 460-377) organizmada iyileşme göstermeyen yeni yapılanmaları tanımlamak için ilk defa “Kanser” terimini kullanmıştır. Hipokrat; kanseri vücut yüzeyinde oluşan, farklı karakterde, kırmızı, yavaş bir şekilde büyüyen şişlikler olarak bildirmiştir ve “Carcinos” ve / veya “Carcinoma” olarak adlandırmıştır. Galen (M.S. 2. yüzyıl) ise bu şekildeki yapıların görünümünü yengece benzetmesi nedeniyle latince de yengeç anlamına gelen “cancer” ismini vermiştir (Resim 2.3). Türk tıp tarihinde Tarsuslu Osman Hayri Efendi’nin “Kenz üs-sıhhat ül-ebdaniye” (1298) adlı eserinde fındık büyüklüğündeki, ağrılı ve etrafı damarlı bir oluşumu ifade etmek için kanser terimi “seratan” olarak tanımlanmıştır (Atıcı, 2007; Gedikli, 2013).



Resim 2.3. Kanser hücresi (<http://www.dailymail.co.uk/health/article-2402396/Monster-inside-body-How-does-single-rogue-cell-turn-deadly-cancer.html>)

Canlıların temel yapı taşı olan hücreler, enzimler, hormonlar ve uyarıların etkisiyle, homeostatik denge içerisinde büyür, bölünür, yaşlanır ve ölürlür. Kanser hücreleri ise çeşitli etkenlerle değişime uğrayarak düzensiz ve kontrolsüz bir şekilde sürekli olarak büyümeye ve bölünmeye devam ederler (Topal, Öter ve Korkmaz, 2009; Öncel, 2012) (Resim 2.4). Kanser bir genom hastalığı olup, temel sorunu DNA’da yapı değişikliğiyle başlayan süreçte kontrolsüz çoğalmasındır (Matsumoto, Shimizu, Takai ve Marusawa, 2015).



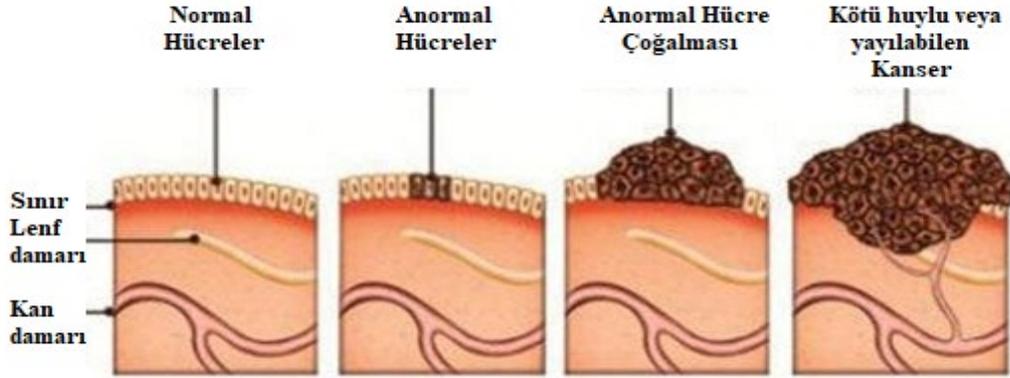
Resim 2.4. Normal ve kanser hücresi arasındaki farklar (http://www.primadonastems.com/wpcontent/uploads/2016/02/The_Difference_Between_Normal_And_Cancer_Cells.jpg)

Kontrolsüz çoğalan hücreler kan ve lenf yoluyla primer lokalizasyonları dışına da sıçrayarak (metastaz) vücudun başka yerlerinde sürekli büyümeye devam ederek yaşamsal fonksiyonları tehdit etmeye başlamaktadır. Kanser hücrelerinde yapısal ve işlevsel farklılıklar meydana gelmektedir. Hücreler normalde gerçekleştirdikleri fonksiyonları ve işlevleri yapamazlar veya yeni fonksiyonlar oluştururlar (Paduch, 2016) (Resim 2.5).



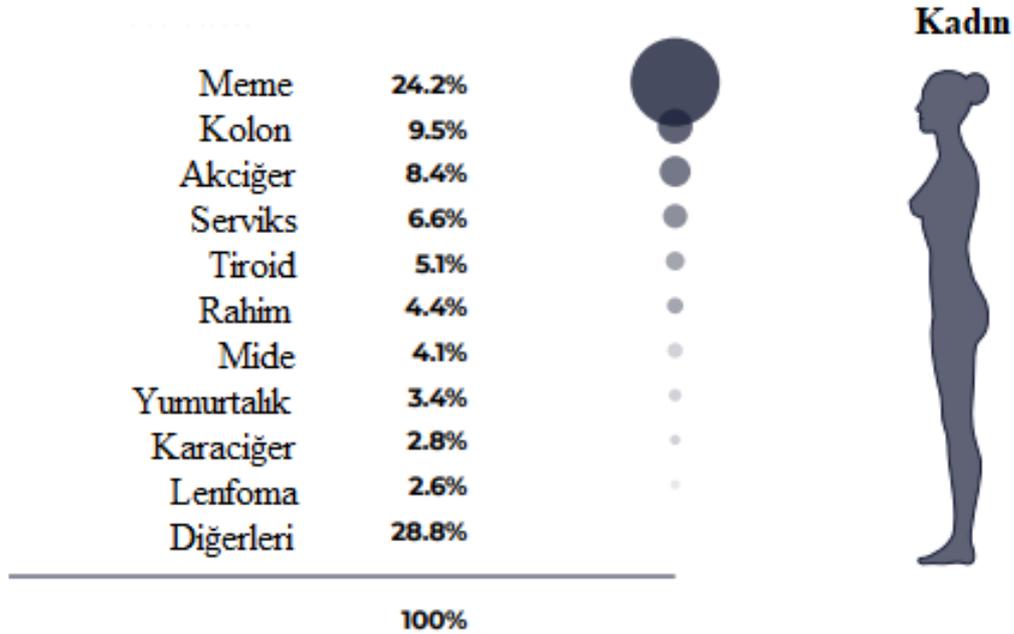
Resim 2.5. Kanser metastaz oluşumu (<http://www.cancerhelpline.in/how-cancer-grows>)

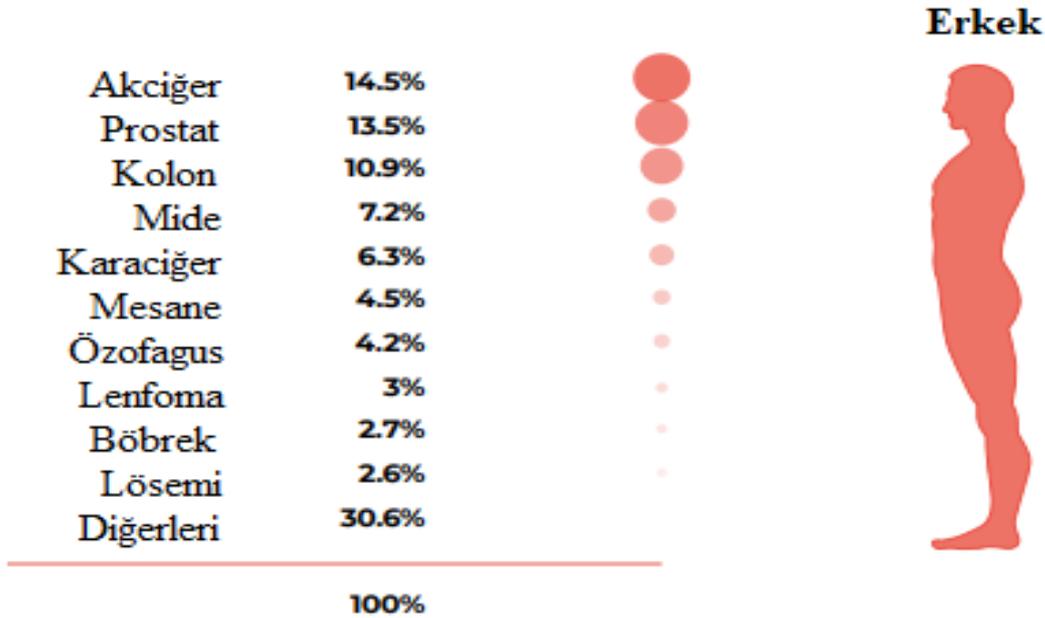
Metastaz ve anjiyogenez yaparak kan ve lenf yoluyla diğer dokulara ve organlara taşınan kanser hücreleri, birbirine yapışmayan (nonadherent), gelen sinyallere yanıt vermeyen, özelleşmeyen ve apoptoz yeteneğini kaybeden bir yapıya sahiptir (Aslan, 2010) (Resim 2.6).



Resim 2.6. Tümör oluşumu (<http://www.cancerhelpline.in/how-cancer-grows>)

Kanser, % 22'lik oranla dünyada ve ülkemizde kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedeni olarak bildirilmektedir (Soylu, 2014). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO; World Health Organization) 2020 verilerine göre; 2040 yılında yaklaşık 30 milyon insanın kansere yakalanacağı ve her 6 kişiden birinin kanser nedeniyle yaşamını yitireceği rapor edilmiştir. 2018 verilerine göre; kadınlarda % 24,2'lik oranla meme kanseri ve % 9,5'luk oranla kolon kanseri ilk sıralarda yer alırken, erkeklerde meme kanseri % 1'lik oranla nadir görülmektedir ve kolon kanseri % 10,9'luk oranla üçüncü sırada yer almaktadır (WHO, 2020) (Resim 2.7).





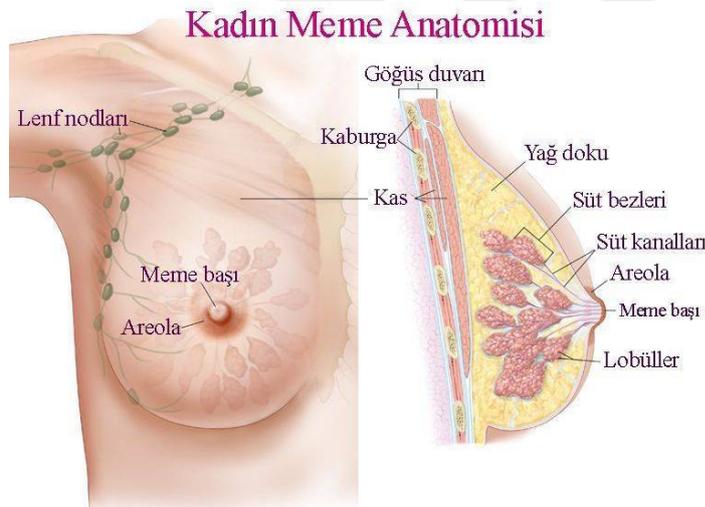
Resim 2.7. Dünyada kadınlara ve erkelere ait 2020 kanser istatistikleri (WHO, 2020)

2.2.1. Meme kanseri

Meme kanseri kadınlar arasında en yaygın görülen ve özellikle Asyalılarda en sık rastlanan kanser türüdür (Polyak, 2007; Libson ve Lippman, 2014). Dünya çapında, tüm kanserlerin yaklaşık dörtte birini oluşturur. Dünya çapında kadınlarda ve batı yaşam tarzına sahip gelişmiş ülkelerde görülen kanserlerin yaklaşık % 25'ini oluşturan ciddi bir sağlık sorunudur (Toriola, 2013; Becker, 2015; Baldassarre ve Belletti, 2016; WHO, 2020). Meme kanseri yönetimi için cerrahi, radyasyon tedavisi, endokrin tedavisi ve kemoterapi gibi çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır (Lukaszewicz, Wtorek, Bujnowski ve Skokowski, 2010; Libson ve Lippman, 2017).

2012'deki Dünya Sağlık Örgütü raporuna göre, 2030'a kadar, küresel meme kanseri insidansının artması öngörülmektedir (Bray, Jemal, Grey, Ferlay ve Forman, 2012). Meme kanserinin dört aşaması vardır: En erken durumdaki kanser, aşama 0 (yerinde karsinom) olarak adlandırılır ve aşama I'den IV'e kadar değişir. Evre IV, hastalığın en agresif evresidir. Daha yüksek bir aşama daha gelişmiş bir metastatik kanser anlamına gelir. Bazı aşamalar ayrıca A, B ve C olarak adlandırılan alt aşamalara ayrılır. Erken tespit edildiğinde (yani aşama I, lokalize meme kanseri), 5 yıllık sağkalım oranı % 100'dür. Kanser diğer organlara

yayılması yaygındır. Meme kanseri tipik olarak akciğerlere, kemiklere, karaciğere veya beyine yayılır (DeSantis, Siegel ve Jemal, 2014). Meme kanseri özellikle süt üretiminden sorumlu lobüller ve kanallar da ki meme dokusunda malign bir tümör geliştiğinde ortaya çıkar (Klevos ve diğerleri, 2017) (Resim 2.8). Çoğu hastada meme kanserinin kesin nedeni belirsizliğini korumaktadır, ancak gelişimi yaşlanma, aile öyküsü, obezite, alkol tüketimi, östrojen maruziyeti ve duyarlılık genlerinin, özellikle BRCA1 (meme kanseri duyarlılığı geni 1) ve BRCA2 (meme kanseri duyarlılığı geni 2)'nin kalıtımı gibi çeşitli risk faktörleri ile ilişkilidir. Uzun süreli östrojen maruziyeti, erken âdet, geç menopoz, doğurmamışlık ve hormon replasman tedavisi dâhil eksojen östrojen maruziyetinden kaynaklanabilmektedir (Klevos ve diğerleri, 2017; Lee ve diğerleri, 2017). Meme tümörleri, olaylar dizisinin yeterince anlaşılmadığı çoklu gen değişikliklerinin tüm ayırt edici özelliklerini taşır. Meme kanseri hücrelerinin genomu genel olarak kararsızdır ve çoğunlukla kromozom instabilitesi olarak sınıflandırılır (Ingvarsson, 2004).



Resim 2.8. Meme Kanseri anatomisi (<https://www.drozdogan.com/meme-kanseri-belirtileri-evreleri-ve-tedavisi/>)

Meme kanseri vakalarının yaklaşık % 5-10'unun kalıtsal olduğu düşünülmektedir (Pavelić ve Gall-Trošelj, 2001; Suter ve Marcum, 2007). Kalıtsal meme kanseri sendromu, p53 (tümör protein 53), ATM (ataksi telanjiektazi mutasyonu), PTEN (fosfataz ve tensin homoloğu), DNA uyuşmazlığı onarım proteinleri (MSH2, MLH1, PMS1, PMS2, MSH3, MSH6), BRCA1 ve BRCA2 gibi çeşitli duyarlılık genlerindeki genetik değişiklikleri içerir (Pavelić ve Gall-Trošelj, 2001). Kanserin somatik veya germlinal hücrelerde sporadik ve/veya kalıtsal genetik mutasyonların sonucu olduğu belirtilmektedir (Edler ve Kopp-Schneider, 2005; Schulz 2006; Wunderlich, 2007). Bu mutasyonlar, hücre büyümesi ve

çoğalmasından sorumlu olan MAPK (mitojenle aktifleştirilen protein kinaz), RB/E2F (Retinoblastoma protein/ E2 transkripsiyon faktörü), P13K/AKT/mTOR (Fosfosinositid 3-kinazlar/Protein kinas B/Rapamisininin memeli hedefi) ve p53 yollarını içeren bir dizi hücreyel yolu etkilemektedir (Vogelstein ve Kinzler, 2004; Schulz 2006; Suter ve Marcum, 2007).

Malign meme kanseri, hücre büyümesini ve proliferasyonunu yöneten genlerde değişikliklerin meydana geldiği karmaşık moleküler bir hastalıktır (Sledge ve Miller, 2003; Ingvarsson, 2004). Meme kanserinin baskın şekli, başlangıçta mutasyona uğramış onkogenlerin kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açtığı sporadik niteliktedir (Kenemans, Verstraeten ve Verheijen, 2004). Daha sonra, özellikle tümör baskılayıcı genlerde (TSG) diğer genetik mutasyonların maligniteye yol açtığı düşünülmektedir (Suter ve Marcum, 2007).

Meme kanserinin gelişiminde sadece genetik değil aynı zamanda epigenetik olaylar da önemli olabilmektedir. Kanser hücreleri genellikle transkripsiyonel olarak baskıcı kromatin oluşumuna sıkıca bağlı olan gen promotör bölgelerinin anormal bir metilasyonunu gösterir. Bu fenomen, gen fonksiyonunun kaybı ile ilişkilidir. Bu tür epigenetik süreçler, alternatif olarak tümör duyarlılık genlerinin mutasyonlarına neden olurlar ve DNA onarım genlerinin inaktivasyonu ile genetik değişikliklerle sonuçlanırlar (Pavelić ve Gall-Trošelj, 2001).

2.2.2. Kolon kanseri

Kolon kanseri, ekonomik olarak “gelişmiş” popülasyonların bir hastalığıdır. Avrupa’da kolon kanseri hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık görülen kanser türlerindedir (Labianca ve diğerleri, 2004; Bogaert ve Prenen, 2014; Tariq ve Ghias, 2016; Granados-Romero ve diğerleri, 2017). Tüm malign tümörlerin % 13’ünü temsil eden gastrointestinal sistemdeki en yaygın malign kanseridir (Granados-Romero ve diğerleri, 2017) 2000 yılında tahmini 225.000 Avrupa’da kolon kanseri vakası meydana gelmiştir ve yetişkinlerdeki tüm habis tümörlerin % 8’ini oluşturmuştur. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlardan yaklaşık % 50 daha fazladır (Labianca ve diğerleri, 2004).

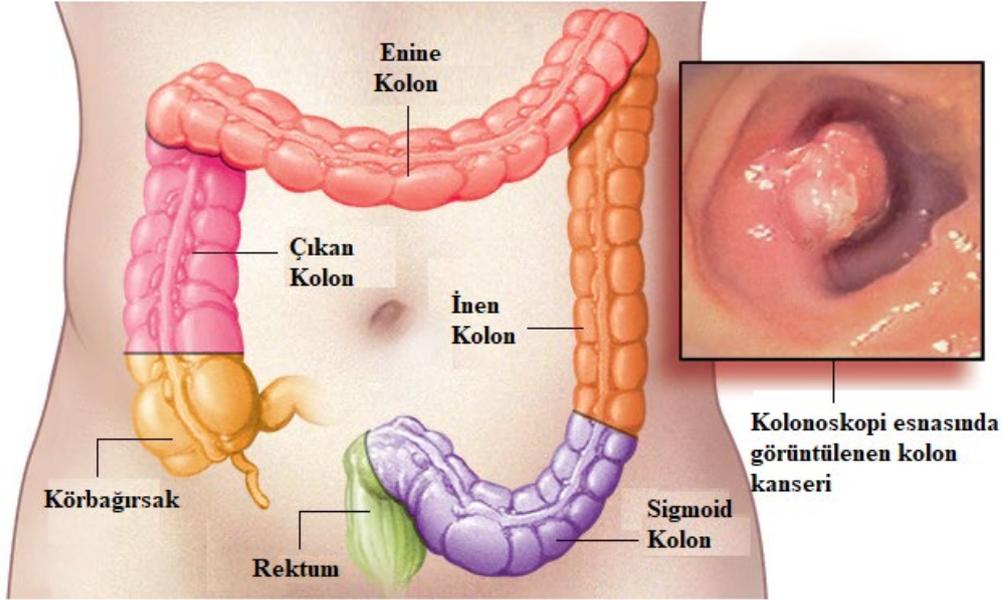
Kolon kanseri, sigara kullanımı, fiziksel hareketsizlik, obezite, kırmızı işlenmiş et ve aşırı alkol tüketimi gibi birçok risk faktörü nedeniyle hızla artan oranlara sahiptir ve 65-74 yaş arası kişilerde yaygın bir hastalıktır. (Jemal ve Bray, 2011; Birsu Cincin ve diğerleri, 2015).

Bununla birlikte, kanser genç hastalarda da, obezite, hareketsiz yaşam tarzı, kötü beslenme alışkanlıkları (yağ ve proteinlerde yüksek) ve sigara içme gibi risk faktörleri nedeniyle daha sık teşhis edilmektedir (Granados-Romero ve diğerleri, 2017). Yüksek alkol tüketimi de kolon kanseri riskini artırmaktadır (Labianca ve diğerleri, 2004).

Bazı epidemiyolojik çalışmalar et alımını ve kolon kanseri riskini incelemiştir. Kanıtlar, kırmızı etin ve işlenmiş etin kolon kanseri riskini artırdığını göstermektedir (Labianca ve diğerleri, 2004). Beslenme, kolon kanseri etiolojisinde şimdiye kadar belirlenen en önemli ekzojen faktördür. Kolon kanserlerin % 70'inin beslenme müdahalesi ile önlenebileceği tahmin edilmektedir (Stewart ve Kleihus, 2003). Sebzelerden zengin diyetlerin kolon kanserine karşı koruduğuna dair kanıtlar önemlidir ve gıdalardan toplam lif alımının yaklaşık iki katına çıkarılması kolon kanser riskini % 40 oranında azaltabilmektedir. Ayrıca fiziksel aktivitenin, ömür boyu kolon kanseri riskini azalttığına dair kanıtlar bulunmaktadır (Labianca ve diğerleri, 2004).

Kolon kanseri hastalarının % 10'undan daha azında, gerçek bir kalıtsal yatkınlık vardır. Bununla birlikte, kolon kanseri vakalarının çoğu, aile öyküsü veya genetik yatkınlığı olmayan sporadik temellidir (Stewart ve Kleihus, 2003; Labianca ve diğerleri, 2004; Al-Sohaily, Biankin, Leong, Kohonen-Corish ve Warusavitarne, 2012; Bogaert ve Prenen, 2014). Sporadik kolon kanserinin % 80'inde mevcut olan adenomun gelişimi kromozomal instabilitenin bir yolu olarak bilinmektedir ve sporadik kanserin % 20'sinde ve kalıtsal kolorektal kanserin % 80'inde esas olarak APC % 60 (adenomatöz polipozis coli), p53 % 70, DCC % 70 (kolorektal kanserde silinen bölge), KRAS % 40 (Kirsten sıçan sarkomu viral onkogen homoloğu) ve BAX % 50 (BCL2 ilişkili X) oranında bulunmaktadır (Granados-Romero ve diğerleri, 2017)

Kolon kanseri, uzun yıllar boyunca kolonositlerin klonlarında meydana gelen düzensiz mutasyonların ve diğer genetik olayların birikmesinin bir sonucu olarak meydana gelmektedir (Church ve diğerleri, 2016) (Resim 2.9). Kolon adenokarsinom gelişimi, gastrointestinal özellikte epitelyal hücreler, spesifik onkogenler ve/veya tümör baskılayıcı genlerde sıralı genetik ve epigenetik mutasyonlar kazanarak kanser başlangıcına, ilerlemesine ve metastazına neden olmaktadır (De Rosa ve diğerleri, 2015; Tariq ve Ghias, 2016).



Resim 2.9. Kolon Kanseri anatomisi (<https://flashresim.com/blog/saglik/kolon-kanseri-belirtileri-ve-tedavisi/>)

Kolon kanserine, DNA'daki mutasyon hataları, baskılayıcı tümör genlerinin transkripsiyonel olarak susturulması, hücre döngüsünün kontrolünde yer alan genler, onarım ve apoptoz veya baskılayıcı gen tümörlerindeki mutasyonlarla ilişkili genetik, sporadik veya kalıtsal olmayan faktörler neden olabilmektedir. APC, DCC, BRAF (v-Raf murin sarkomu viral onkogen homolog B), PIK3CA (Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Ünite Alfa), AKT ve TP53 gibi veya KRAS ve CTNNB1 (katenin beta 1) gibi onkogenlerin varlığı, ayrıca kromozomal anomaliler, gen mutasyonları, proliferasyon, farklılaşma, apoptoz ve anjiyogenez içeren epigenetik değişiklikler ile birlikte EGFR17 yoluyla tedaviye yanıtı öngören biyobelirteçler olarak kabul edilmektedir (Martin ve diğerleri, 2010; Poulgiannis, Frayling ve Arends, 2010; Granados-Romero ve diğerleri, 2017; Wong ve Xie, 2017).

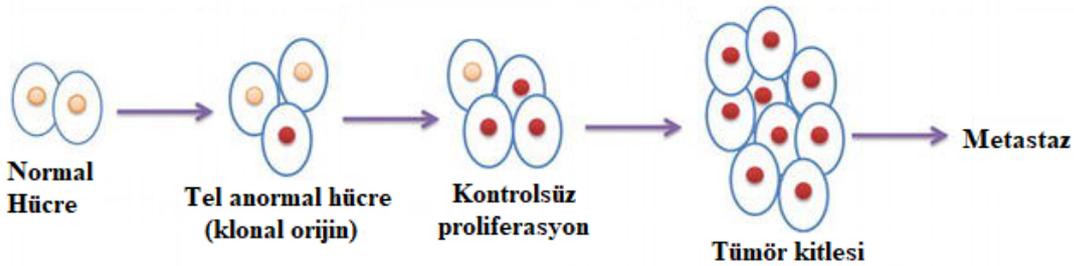
Son birkaç yıldır, kolon kanserinin çok heterojen bir hastalık olduğuna ve tümörün moleküler ve genetik özelliklerinin prognozu ve hedefe yönelik tedaviye yanıt verdiğine dair daha fazla kanıt bulunmaktadır (Bogaert ve Prenen, 2014). Kanser Genom Atlası, 2012'de; kolon kanserinde genomik değişikliklerin keşfedilmesi için birçok çaba harcanmıştır ve son zamanlarda ekzon sekansı, DNA kopya numarası, promotor metilasyonu, mRNA ve microRNA ekspresyonunu analiz ederek 276 kolon kanseri örneğindeki somatik değişiklikler bildirilmiştir (Cancer Genome Atlas Research Network, 2012; Bogaert ve Prenen, 2014).

Apoptotik fonksiyondaki anormallikler kolon kanserin patogenezinin, kısmen kanser hücrelerini öldürerek hareket eden kemoterapötik ilaçlara ve radyoterapi direncine katkıda bulunmaktadır. Kolon epitel hücreleri, kripta denilen kolon duvarına derin invajinasyonlarla yapılandırılmaktadır. Bu hücreler, kripta'nın tabanında bulunan kök hücrelerden kaynaklanmaktadır. Kök hücreler asimetrik olarak bölünmekte, özellikle habis bir klon haline gelebilecek mutasyonlar geliştirmeye karşı savunmasızdır ve bu olasılığa karşı koymak için hücreler apoptoza oldukça yatkındır (Watson, 2004).

2.3. Kanser Hücrelerinin Genel Özellikleri

2.3.1. Klonal orijin

Çoğu kanser hücresi tek bir anormal hücreden, bazı kanserler ise birden fazla sayıda malign klonlardan oluşmaktadır. Bu klonlar ya bir saha hasarı sonucu (dokunun birden fazla sayıda hücresinin karsinojene maruz kalması) ya da bazı genlerdeki kalıtsal hasarlar sonucu oluşurlar (Dennis, Vass, Wit, Keith ve Oien, 2002) (Resim 2.10).



Resim 2.10. Kanser ve klonal orijin (Aiyengar, Chiranjeevi ve Rani, 2017)

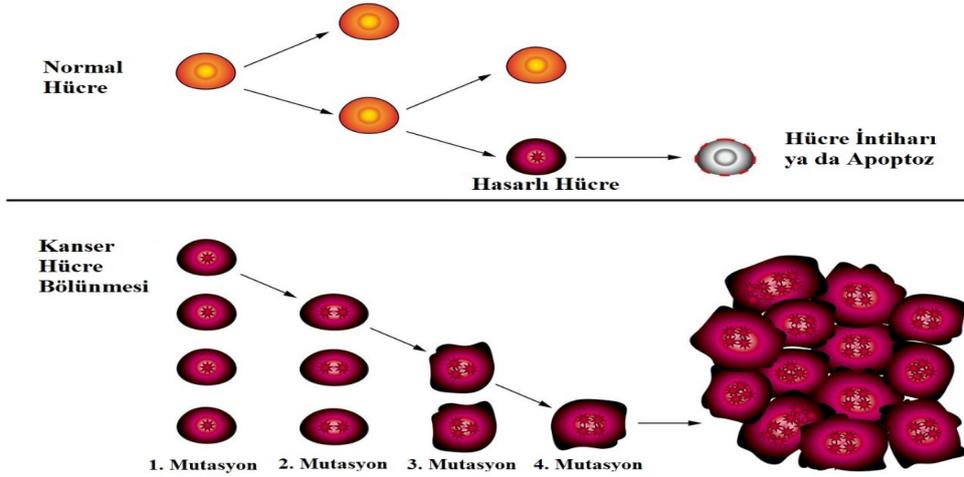
Tümörlerin kökenleri, bir hücreden veya birçok hücreden oluşsa da, deneysel onkologlar için oldukça dikkat çekicidir. Son yıllarda tümörlerin ve onların öncüllerinin klonal orijinleri hakkında temelde yeni moleküler tekniklerin erişilebilirliği ile gerçek bir bilgi patlaması olmuştur. Kanserler, doku ekosistemlerinin farklılaşan görüntüleri içinde tekrarlayan bir klonal genişleme, genetik çeşitlendirme ve klonal seçim süreci ile gelişmektedir. Kanserler, farklı köken ve mutasyon spektrumları ile karakterize edilen sıra dışı sınıflarda, cinslerde ve türlerde bulunmaktadır. Bu nedenle her kanser bireysel olarak eşsizdir. Kanserler değişken zaman dilimlerinde (~ 1–50 yaş) gelişmekte ve herhangi bir hastada klonal yapı, genotip ve fenotip zamanla değişmektedir. Eş zamanlı olarak herhangi bir kanser, örtüşen veya farklı

doku habitatlarını işgal eden çok sayıda farklı sub-klonal kanser türleridir (Iannaccone, Weinberg ve Deamant, 1987; Greaves ve Maley, 2012).

2.3.2.İmmortalite

Ölümsüzlük (immortalite), kanserlerin ortak bir özelliğidir. Mevcut kanser araştırmacıları ve biyoloji ders kitapları, ölümsüzlüğün “kanserin ayırt edici özelliklerinden” biri olduğunu bildirmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2000; Alberts ve diğerleri, 2008; Lodish ve diğerleri, 2008). Ölümsüzlük kanserlerin ortak bir özelliğidir, ancak kökeni ve amacı hala belirsizlik göstermektedir. Kanserler normal hücrelerden rastgele karyotipik yeniden düzenlemeler ve kansere özgü seçim ile üretilmektedir. Bu tür düzenlemeler de mitoz genleri düzensiz olduğundan, kanser karyotipleri kendiliğinden değişmekle birlikte, spesifiklik için klonal seçimlerle de sürekli olarak dengelenmektedir. İmmortalite ve tümörojenisite, tam olarak bireysel klonal, değişken karyotiplerle eşzamanlı olarak ve telomeraz yokluğunda ortaya çıkmaktadır. Böylece klonal ve değişken karyotiplerin kanserlerin ölümsüzlüğünü oluşturduğu sonucuna varılmaktadır (Duesberg ve McCormack, 2013).

Vücuttaki normal hücrelerin çoğunda bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise limitsiz çoğalırlar (bölünürler) ve sınırsız sayıda hücre oluşturmaktadır. Kromozom uç yapılarına ait telomerler immortalite mekanizması olarak da bilinmektedir. Hücre diferansiye (kök hücreden tamamen farklılaşmış) olurken, birçok normal hücrede telomerler zamanla kısalmaktadır. Fakat kanser hücrelerindeki ve kök hücrelerindeki telomerler telomeraz enziminin aktivitesiyle sürekli yenilenmektedirler. Telomeraz enzimi hücreler farklılaşırken telomer programının yapısı gereği azalmaktadır. Tamamen diferansiye olmuş bir hücre istirahat (senescent) durumuna geçtiğinde ise çoğalma kapasitesini yitirmektedir. Ama kanser hücrelerinde telomeraz enzimi etkinliğini sürdürmeye devam etmektedir veya enzim aktive edilmektedir. Kanser hücrelerinde telomerlerin uzunluğu sabit kalmaktadır ve hücreler sınırsız sayıda çoğalarak ölümsüzleşmektedir (Dennis ve diğerleri, 2002) (Resim 2.11).

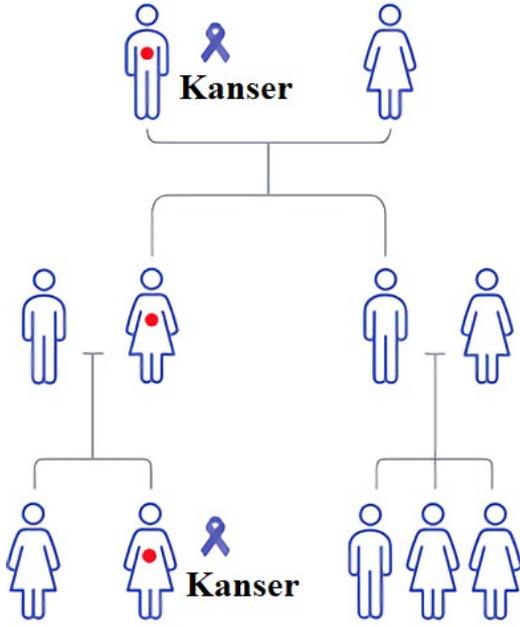


Resim 2.11. Kanser ve immortalite (Lun ve diğerleri, 2015)

2.3.3.Genetik instabilite

Genomik instabiliteye, kanserin ayırt edici özelliklerini oluşturmaya yardımcı olan "kolaylaştırıcı bir özellik" denilmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2000; 2011). Kanser hücreleri binlerce mutasyon geçirmektedir. Kanser hücreleri tüm kromozom segmentlerini kaybetse bile kazançlıdırlar. Çünkü kanser hücrelerinin genomlarının çoğunun somatik kopya sayısının değiştiği durumlarda bile, bu hücreler gelişmeye devam etmektedirler (Andor, Maley ve Ji, 2016). Genomik bütünlükteki değişiklikler gen dozajıyla sınırlı olduğu sürece, genellikle hücre seviyesinde tolere edilebilirler (Gerstein ve Otto, 2009; Fehrmann ve diğerleri, 2015), ancak genomik instabilite artmaya devam ettiğinde, hücrede genomik değişikliklerin sonuçları ölümcül bir seviyeye ulaşmaktadır (Andor ve diğerleri, 2017).

Genomik instabilite, hem kanser başlangıcında hem de ilerlemesinde kritik roller oynamaktadır. Bu kararsızlık, basit deoksiribonükleik asit (DNA) sekans değişikliklerinden kromozomal seviyedeki yapısal ve sayısal anormalliklere kadar genetik olarak çeşitli seviyelerde kendini gösterebilmektedir (Ferguson ve diğerleri, 2015; Wu, Zhu, Thompson ve Hannun, 2018). Genetik anormallikler DNA tamirindeki veya DNA yanlış eşleşmelerindeki (mismatche) kusurlardan dolayıdır ve kanser hücrelerinin heterojen yapı oluşturmaya yol açmaktadır. Bu durum kanser hücrelerinin proliferasyon kontrol mekanizmalarından kaçarak klonlar oluşturmaya neden olmaktadır. Klonlar ise yabancı ortamlarda yaşama yeteneği kazanmaya ve metastaz oluşturmaya başlamaktadır (Dennis ve diğerleri, 2002) (Resim 2.12).



● Mutasyon

Resim 2.12. Kanser ve genetik (<https://www.nipd.com/products/oncology/presentia/>)

Dünya çapında tüm kanserlerin % 4'ü genetik materyalden dolayı belirli kanserleri geliştirme riski göstermektedir (Stewart ve Kleihues, 2003). Bazı durumlarda, spesifik bir gen mutasyonu, olağanüstü derecede yüksek bir kanser riski anlamına gelebilmektedir. Örneğin, BRCA1 geninde belirli mutasyonları olan kadınların, yaşamlarının yaklaşık % 70'inde meme veya yumurtalık kanseri geliştirme riski bulunmaktadır. Neyse ki, bu tür yüksek ihtimale sahip mutasyonlar popülasyonda nadir görülmektedir. Fakat tek gen kusurlarının neden olduğu yaklaşık 20 kanser sendromu da bilinmektedir (Sloan ve Gelband, 2007).

Meme kanseri riskinde rol oynadığı bilinen genetik faktörler yaklaşık 30 gen içermektedir. Bunlar arasında yüksek penetrasyona sahip erken başlangıçlı BRCA1 ve BRCA2 meme kanseri genleri ve daha ılımlı penetrasyona sahip nadir genler bulunmaktadır (Collins ve Politopoulos, 2011). Yaygın kanserlerin epidemiyolojisi, birçok malignitenin ailelerde görülme eğilimini desteklemektedir. Aile öyküsü, prostat kanseri için bir risk faktörü olarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Hanahan ve Weinberg, 2000; Hemminki ve Czene, 2002) Aile öyküsü bulunan hastalarda benzer şekilde meme kanseri ve kolon kanseri gibi yaygın maligniteler için risk faktörü de oluşturmaktadır (Fuchs ve diğerleri, 1994; Pomerantz ve Freedman, 2011).

Kanser profilleri ve insidans (yeni olgu sayısı) hızları, gelişmişlik düzeyi yüksek ülkelerde az gelişmiş ülkelere oranla daha düşük seviyeler göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde kadınlarda meme ve kolorektal kanseri görülürken erkeklerde akciğer ve prostat kanseri görülmektedir. Az gelişmiş ülkelerde ise kadınlarda meme ve serviks kanseri sık görülürken erkeklerde akciğer, mide ve karaciğer kanseri daha sık görülmektedir. Türkiye’de kadınlarda meme ve kolorektal kanserleri görülürken erkeklerde akciğer ve mesane kanserleri daha sıklıkla tespit edilmiştir (Gedikli, 2013).

2.3.4.Kontakt inhibisyonu

Kültür ortamında büyütülen ve çoğaltılan normal hücreler, yapıştığı alt tabakaya tutunamazlarsa bölünemezler. Normal hücreler büyümeye, çoğalmaya başladıklarında ve tüm yüzeyi tek tabaka halinde (monolayer) kapladıklarında (konfluent hale geldiklerinde) bölünme özelliklerini kaybetmektedirler. Ayrıca besiyerleri içerisinde büyüme faktörleri ve besin elemanları (nütrientleri) gibi bölünmeleri için gerekli tüm ihtiyaçları mevcut olsa bile bölünemezler. Kanser hücrelerinde ise durum farklıdır. Bir besiyeri içerisinde alt tabakaya yapışmaya gereksinim duymadan bağımsız olarak bölünmeye devam edebilirler. Hatta hücre kültürü ortamında birden fazla tabaka oluşsa bile çoğalmaya devam edebilirler (Dennis ve diğerleri, 2002).

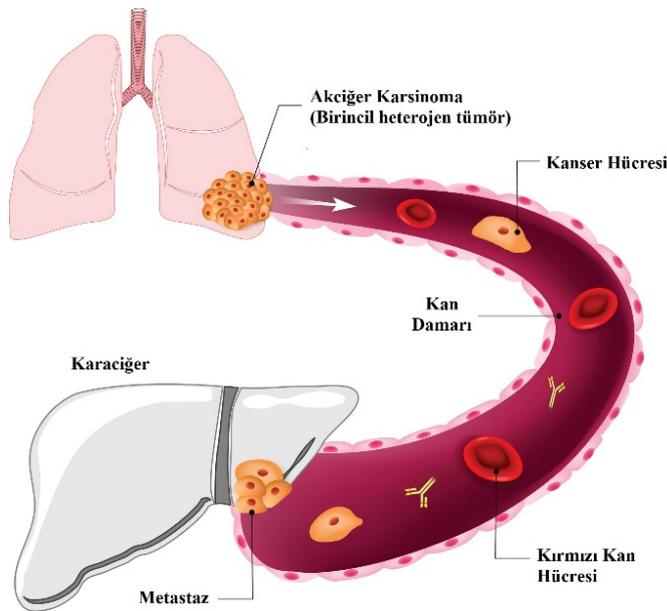
2.3.5.Proliferasyonun devamlı artışı

Sınırsız proliferasyon özelliği kültür ortamındaki kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Kanser hücreleri büyümek ve çoğalmak için gerekli besin faktörlerini tüketmelerine rağmen büyümeye devam etmektedirler. Bu durum kültür ortamında kendi kendilerini öldürene kadar devam edebilmektedir (Dennis ve diğerleri, 2002; Wu ve diğerleri, 2018).

2.3.6.Metastaz

Metastaz, kanser hücrelerinin birincil tümörden çevre dokulara ve uzak organlara yayılmasını içerir, bu durum kanser morbidite ve mortalitesinin birincil nedenidir (Hanahan ve Weinberg, 2000; Chambers, Groom ve MacDonald, 2002; Fidler, 2003; Welch, 2006; Bacac, 2008; Lazebnik, 2010; Tarin, 2011). Metastatik kaskadın tamamlanması için, kanser hücrelerinin primer tümörden ayrılması, dolaşım ve lenfatik sistemlere dâhil olması,

bağışıklık saldırısından kaçınması, uzak kılcal damarlara da dâhil olması, uzak organları da istila etmesi ve çoğalması gerekmektedir. Kanser metastazının kökenini açıklamak için çeşitli hipotezler geliştirilmiştir. Bunlar epitelyal mezenkimal geçişi, kök hücrelerde mutasyon birikimini ve makrofaj kolaylaştırıcı süreçleri içermektedir. Ayrıca metastatik hücreler, anjiyogenez, proliferasyonu kolaylaştıran, makroskopik ve habis sekonder tümörler ile sonuçlanan bir mikro ortam oluşturmaktadır (Seyfried ve Huysentruyt, 2013) (Resim 2.13). Metastazın kanserlerin yaklaşık % 90'ında görüldüğü tahmin edilmektedir (Chaffer ve Weinberg, 2011). Bu tahmin 50 yıldan fazla bir süre içinde çok az değişmiştir (Chambers ve diğerleri, 2002; Fidler, 2003; Welch, 2006; Duffy, McGowan ve Gallagher, 2008; Tarin, 2011). Her ne kadar sistemik metastaz kanser ölümlerinin yaklaşık % 90'ından sorumlu olsa da, kanser araştırmalarının çoğu *in vivo* durumda metastaz içermemektedir (Lazebnik, 2010; Seyfried, 2012; Seyfried ve Huysentruyt, 2013). Metastaz özelliği benign (iyi huylu) tümörlerde veya normal hücrelerde bulunmamaktadır. Metastaz süreci, ekstrasellüler matrikse tutunabilen hücresel proteinlerdeki anormalliklerinden veya proteinlerin kaybolmasından, hücreler arası etkileşim (interaksiyon) bozukluğundan, hücrelerin bazal membrana tutunmalarındaki anormalliklerden ve metalloproteinaz gibi enzimlerle (kolejenazlar) bazal membranın yıkılmasından dolayı gerçekleşmektedir. Sorumlu proteinler keşfedildikçe ve onların mekanizmaları aydınlatıldıkça metastatik süreç daha iyi anlaşılacaktır (Dennis ve diğerleri, 2002).

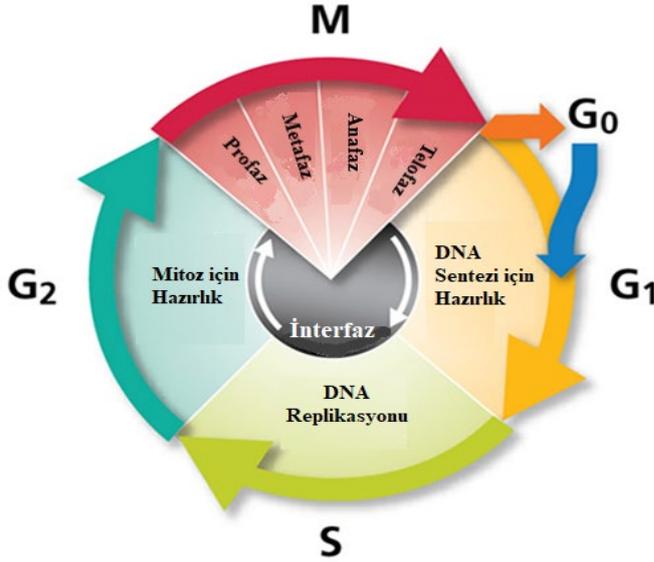


Resim 2.13. Kanser ve Metastaz (<https://www.shutterstock.com/tr/image-vector/primary-lung-cancers-metastasis-liver-430612987>)

2.4. Kanser ve Hücre Döngüsü

Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşümü sürecinde birçok mekanizma rol oynamaktadır ve kanser araştırmaları için bu mekanizmaların nasıl meydana geldiğini anlamak normal bir hücrenin yaşamsal döngüsünü bilmekle mümkündür. Hücre döngüsü, hücre içeriğinin kopyalanmasını, hücre bölünmesini içeren ve bu süreçlerin tekrar ettiği olaylar dizisidir. Yaşamsal döngü (hücre siklusu) dinlenme ve bölünme dönemi olarak bilinmektedir. Hücre döngüsü dört aşamaya ayrılmaktadır. Bunlar; dinlenme fazı (G₀), senteze hazırlık fazı (G₁), DNA sentezi fazı (S), hücrenin kendini bölünmeye hazırladığı faz (G₂) kromozomların ayrıldığı ve hücrenin bölündüğü mitoz fazı (M)'dir. Bu dönemlerin art arda ve zamanında başlayabilmesi ve hatasız bir şekilde yürütülebilmesi için kontrol görevi üstlenmiş birçok protein bulunmaktadır (Resim 2.14). Dinlenme fazı, S-fazındaki genetik materyali çoğaltmak için metabolik rolün ve replikasyonun normal seyrinin sağlanması ve G₂ fazında meydana gelen mitoz için hazırlamayı içermektedir. Hücrede bölünme döngüsünün sıkı kontrolü, genetik bilginin en doğru şekilde aslına uygun olarak çoğaltılmasının ve mitoz sırasında bu bilgilerin doğru ayrılmasının takibi için çok önemlidir. Kontrol noktaları ağırlıklı olarak hücre döngüsünün dört aşamasında meydana gelir: Bunlar; G₁'de, G₁ / S geçişinde, G₂ / M geçişinde ve metafaz / anafaz geçişindedir. DNA hasar kontrol noktası, hasar meydana geldiği sırada hücre döngüsünün durumuna bağlı olarak G₁, S veya G₂ fazındaki hücreleri durdurmaktadır. Hücre döngüsü ilerlemesinin durdurulmasıyla birlikte, kontrol noktaları da gerekli onarım genlerinin uyarılmasını tetiklemektedir. CDK molekülleri hücre döngüsü ilerlemesini düzenlediğinden, kinaz aktivitesinin düzenlenmesinde yer alan genler, hücre döngüsü durmasına yol açan sinyal iletim mekanizmasında yer almaktadır. Hücre döngüsünün durdurulması, genetik materyalin onarımına izin vererek ikincil hataların oluşmasını önler ve döngünün bir sonraki fazına uygun ilerlemeyi sağlamaktadır. Bu kontrolleri ve takibi düzenleyen genler ya proto-onkogenler ya da tümör baskılayıcı genler (TSG; antionkogen) olarak bilinmektedir. Çeşitli nedenlerden dolayı hücrenin normal büyümesini ve farklılaşmasını düzenleyen bu proto-onkogenler ile tümör baskılayıcı genler arasında dengenin bozulması, hücrelerdeki DNA dizilerinde anormalliklere ve kanser oluşumuna engel olan proteinlerin sentezinde ise azalmaya sebep olmaktadır. DNA dizilerinde meydana gelen değişiklikler proto-onkogenlerin kanser oluşumunu başlatan onkogenlere dönüşmesine ve tümör oluşumunu engelleyen tümör baskılayıcı genlerin ise inaktif olmasına neden olmaktadır (Collins, Jacks

ve Pavletich, 1997; Meeran ve Katiyar, 2008; Topal ve diğeri, 2009; Aslan, 2010; Leal-Esteban ve Fajas, 2020).



Resim 2.14. Hücre döngüsü kontrol noktaları
(<http://beta.bdbiosciences.com/br/research/apoptosis/analysis>)

Hücre büyümesi hücrelerin ölme hızını aştığında kanserin ortaya çıktığı düşünülmekte, böylece hücreler kontrol edilemeyen bir oranda bölünmektedir (Bergman ve Harris, 1997). Artık kanser hücre döngüsünün düzenlenmesindeki arızaların ürünü olarak tanımlanmaktadır. Normalde öldürülen, yaralı veya mutasyona uğramış hücrelerin, hücre döngüsü boyunca ilerlemesine izin verilir (Story ve Kodym, 1998). Mutasyonlar çoğunlukla proto-onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde görülmektedir. Proto-onkogenler normalde farklı hücre çoğalması seviyelerinde hareket eder, ancak mutasyona uğradığında tümör büyümesini teşvik edebilmektedir. Benzer şekilde, tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu, hücre döngüsü ilerlemesinin inhibisyonunu engelleyerek anormal büyümeyi kolaylaştıracaktır (Vermeulen, Van Bockstaele ve Berneman, 2003).

Normal koşullar altında, büyüme düzenleyici mekanizmalar homeostazı sürdürmeye çalışmaktadır (McDonnell, Meyn ve Robertson, 1995; Bergman ve Harris, 1997). Bir hücre içindeki homeostaz, proliferasyon, büyüme durması ve apoptoz arasındaki denge ile düzenlenmektedir (Story ve Kodym, 1998). Hücre büyümesi ve ölüm arasındaki dengede bozulma sonucu hiperplazi oluşmaktadır ve hiperplazi süreci geri dönüşümlüdür. Fakat uyarı çıkarıldıktan sonra, oluşan kanser hücreleri geri dönüşümsüzdür. Kanser hücreleri, hücre içi sinyal yollarının mutasyonuna bağlı olarak büyüme uyarımından karakteristik

olarak bağımsızdır. Bu bağımsızlık, pozitif veya negatif uyarandan bağımsız olarak hücre döngüsüne yeniden girişi kolaylaştırmaktadır (Molinari, 2000).

DNA hasarını takiben hücre tahribatının (apoptotik ölüm) düzenlenmesi, bu nedenle mutasyona uğramış hücrelerin çoğalmasını önlemede önemli bir yoldur, bu da kanser öncesi hücrelerin çoğalmasını önemli ölçüde artırmaktadır (Harms-Ringdahl, Nicotera ve Radford, 1996). Birçok protein, hücre döngüsü ve apoptozda ikili bir rol oynar. DNA hasarının derecesi ve bu proteinlerin seviyesi hücre ilerlemesini veya ölümünü belirlemektedir. DNA hasarı, hücre döngüsü kontrol mekanizmalarının bozulmasına yol açan bazı çevresel hareketler kaynaklanabilmektedir (Harms-Ringdahl ve diğerleri, 1996). Hücre döngüsü kontrol noktaları, hücre büyümesini ve gelişimini kontrol eden, karmaşık etkileşim ağını düzenleyen mekanizmalardır. Bu kontrol noktalarının mutasyonu her türlü kansere neden olmaktadır (Vermeulen, Berneman ve Van Bockstaele, 2003).

Büyüme durması, DNA onarımı ve apoptozun tümör baskılanması, potansiyel kanserlerin gelişiminde kritik yollardır (Bellamy, 1997; Foster, 2008). Tümör baskılayıcı bir gen olan p53, büyük bir rol oynadığı için "genom koruyucusu" (Kirsch ve Kastan, 1998) olarak tanımlanmıştır. p53 mutasyona uğramış hücrelerin çoğalmasına karşı genomu korumaktadır. Hücre döngüsü kontrol noktalarını takip eden tümör baskılayıcı genlerin mutasyonları, hasarlı hücrelerin hücre döngüsü boyunca ilerlemesine izin vererek tümör hücrelerinin gelişimine yol açmaktadır (Foster, 2008; DeVita, Lawrence ve Rosenberg, 2012). Karmaşık onkojenik sinyal ağlarının yakın noktalarında ve regülasyonu azaltmada, tüm kanserleri karakterize eden anormal hücre çoğalmasının merkezinde yer alan hücre döngüsü motoru, kanserde umut verici bir teşhis ve terapötik hedefdir. İnsan dokularında klinik sonuç ölçütlerine sahip hücre döngüsü biyobelirteçleri, günümüzde hücre döngüsündeki temel keşiflerin teşhis ve terapötik uygulamalara dönüştürülmesinde önemli bir kaynak oluşturmaktadır (Williams ve Stoeber, 2012).

2.5. Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler

Normal hücreleri enfekte edebilen ve tümör hücrelerine dönüştürebilen tümör virüsleri üzerinde yapılan çalışmalar, onkogenlerin ilk keşfine yol açmıştır. Rous sarkom virüsü ile ilişkili onkogen Src'nin normal tavuk hücrelerinin genomundan kaynaklandığının keşfedilmesi, bir virüs tarafından aktive edilebilen onkojenik potansiyele sahip bir hücresel

genin (proto-onkogen) varlığını ortaya koymuştur. Hücresel proto-onkogenlerin genetik değişikliklerinin insan tümör oluşumunda rol oynadığına dair kanıtlar DNA transfeksiyon deneylerinden kaynaklanmaktadır (Heaney ve Melmed, 2005). Onkogenlerin, proto-onkogenlerin, tümör baskılayıcıların ve mutasyon genlerinin keşfi ile karsinogenez mekanizmalarının anlaşılmasında önemli ilerleme sağlanmıştır. Onkogenler hücrenel veya viral (yani, bir virüs tarafından hücreye sokulan) genlerdir. Proto-onkogenler normal hücrenel genlerdir; onkogenlere dönüşmeleri, amplifikasyon veya modifikasyon gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla meydana gelmektedir (Rice, Bryant, Handley ve Hall, 2014). Kanser hücreleri, proliferasyonu tetikleyen, büyüme baskılanmasının ve apoptoz sinyallerinin kaçmasına izin veren, anjiyogenez, invazyon ve metastazı teşvik eden moleküler değişikliklerin edinilmesi nedeniyle malign olmayan dokuda ortaya çıkmaktadır (Zhu ve diğerleri, 2015). Bu süreç stokastiktir (değişken/rastlantısal), zamanla tümör farklı genetik ve epigenetik özellikler taşıyan bir grup hücre oluşturarak dinamik bir şekilde gelişmeye devam etmektedir (Stratton, Campbell ve Futreal, 2009). Ortaya çıkan heterojenlik, tümör evriminin temelidir ve tümör hücrelerinin seçimine yol açmaktadır. Bu hücreler yeniden bağlanmış sinyal ağları ve onkogen bağımlılığı ile ortaya çıkmaktadır (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). Kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesi kısmen anormal gen ekspresyon düzenlenmeleri ile açıklanabilmektedir. Çoğu kanser geni, tümörlerde tipik davranışlara bağlı olarak onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak karakterize edilirken, bazı genler çift onkojenik ve tümör baskılayıcı fonksiyonlar sergilemektedir (Hopkins ve Groom, 2002; Zhang ve diğerleri, 2014; 2015).

Hücreleri dönüştürmek için, bilinen birçok onkogen alellerinin sadece birinde aktif bir mutasyon gerektirirken, tümör baskılayıcı genler her iki alelde de deaktive edici mutasyonlar gerektirmektedir. Genetik mutasyonların yanı sıra kanser, kromozomlardaki onkogenlerin çoklu kopyalarına bağlı gen ekspresyonundan, kovalent modifikasyonlardan, gen promotörlerinin hiperaktivasyonuna bağlı aşırı ekspresyonundan ve epigenetik rahatsızlıklardan da kaynaklanabilmektedir (Brosh ve Rotter, 2009; Wrzeszczynski ve diğerleri, 2011; Rice ve diğerleri, 2014; Aguda, del Rosario ve Chan, 2015; Zhu ve diğerleri, 2015). Neoplastik dönüşümün ürünlerinin hücre proliferasyonunu negatif olarak düzenleyen genlerdeki değişiklikleri içerebileceği düşüncesi, başlangıçta hücre hibrid deneylerinden elde edilen kanıtlardan, ailesel neoplazm çalışmalarından ve tümörlerde alelik heterozisite de gözlenen kayıplardan kaynaklanmıştır. Bu oluşuma neden olan genler tümör baskılayıcı genlerdir. Onkogenlere dönüştürüldüğünde tümörleri indükleyen proto-onkogenlerin aksine,

tümör baskılayıcı genler tümör hücrelerinde inaktif veya geçersiz bir allel olarak bulunur. Tümör baskılayıcı genler normal olarak hücrelerde çoğalmayı baskımlarken, bu genlerden yoksun olan tümör hücreleri de malignite ile ilişkili kısıtlanmamış büyüme sergilemektedir (Heaney ve Melmed, 2005).

Onkogenlerin ve tümör baskılayıcıların belirlendiği kriterler aşağıda verilmektedir:

- ❖ Belirli bir veya çeşitli tümör hücrelerinde istenen bir genin yapısında ve ekspresyonunda uygun değişiklikler,
- ❖ Belirli tümörlerin, istenen genin kalıtsal mutasyonları olan genç bireylerde ortaya çıkması,
- ❖ Transgenik hayvanlarda tümör oranının, istenen bir genin aktive edilmiş bir formunu ifade eden (onkogenler) veya istenen bir genin nakavt mutasyonlarının (tümör baskılayıcılar) bulunması,
- ❖ Kültürlenmiş hücrelerde *in vitro* olarak morfolojik transformasyona ve/veya sınırsız büyümeye (onkogenler), hücre büyümesinin baskılanmasına ve/veya transformasyonuna (tümör baskılayıcı) neden olma yeteneğidir (Kopnin, 2000; Rice ve diğerleri, 2014; Zhu ve diğerleri, 2015).

Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, kanserde iki ana itici güçtür (Bowden, Schneider, Domann ve Kulesz-Martin, 1994). Bugüne kadar binden fazla insan geninin TSG olduğu veya tümör baskılayıcı rol oynadığı bildirilmiştir (Davoli ve diğerleri, 2013; Zhao ve diğerleri, 2016). Kanser Genom Atlası (TCGA) gibi son zamanlardaki yüksek verimli projeler birçok yeni TSG'nin keşfedilmesine yol açmıştır (Davoli ve diğerleri, 2013). TSG'lerin fonksiyonları, sinyal yolları, kromatinin yeniden modellenmesi, DNA hasar ve onarım süreçleri de dâhil olmak üzere çeşitli hücresel süreçler arasında geniş çapta bulunmaktadır (Zhao ve diğerleri, 2016; Jia ve Zhao, 2019). Son zamanlarda, onkogenik ve tümör baskılayıcı fonksiyonlara sahip genler, Kanser Genom Atlas (TCGA) veritabanı kullanılarak 12 ana kanser tipi olarak tanımlanmıştır (Hopkins ve Groom, 2002). Bir veri madenciliği yaklaşımı kullanılarak, araştırmacılar kinazlar (örn. BCR, CHEK2, MAP2K4, NTRK3 ve SYK) veya transkripsiyon faktörleri (örn. BRCA1, EZH2, NOTCH1, NOTCH2, STAT3 ve TP53) ile temsil edilen genleri, genomik ve gen ekspresyon seviyelerinde değerlendirmektedir (Lee ve Muller, 2010; Wrzeszczynski ve diğerleri, 2011; Rice ve diğerleri, 2014; Zhu ve diğerleri, 2015; Wang, Wu, Rajasekaran ve Shin, 2018).

Tümör gelişiminde, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler anormal hücre büyümesini teşvik etmek ve sürdürmek için tamamlayıcı olarak çalışılmaktadır (Morris ve Chan, 2015). Onkogenler fonksiyon kazancı varyantları ile kansere neden olurken TSG'ler fonksiyon kaybı ile çalışmaktadır. Birkaç iyi bilinen onkogen (örn. RAS) ve TSG (örn. TP53) olsa da, bir genin tümör etkinleştirme aktivitelerinin tüm kanser türleri için aynı olmadığı anlaşılmaktadır (Visvader, 2011; Zhu ve diğerleri, 2015; Schaefer ve Serrano, 2016; Schneider, Schmidt-Supprian, Rad ve Saur, 2017). Farklı kanser türlerinde hücreli ilişkili genlerin fonksiyonel durumu yalnızca tümör biyolojisini anlamak için değil, aynı zamanda hedefli tedaviler ve ilaç etkileşimi için de kritiktir (Morris ve Chan, 2015; Zhu ve diğerleri, 2015; Schneider ve diğerleri, 2017; Sleire ve diğerleri, 2017; Chandrashekar ve diğerleri, 2020).

Proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler; sitokinler, büyüme faktörleri, sinyal transdüksiyon molekülleri, transkripsiyon faktörleri için hücre yüzey reseptörlerinin düzenlenmesinde yer alan proteinleri, hücre döngüsü ve apoptozun epigenetik düzenleyicilerini kodlamaktadır (Klein, 1988; Heaney ve Melmed, 2005; Rice ve diğerleri, 2014; Kavianpour, Ahmadzadeh, Shahrabi ve Saki, 2016). Proto-onkogenler normal hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenlemede önemli rol oynarlar ve bugüne kadar 200'den fazla tanımlanmıştır. Proto-onkogenlerin hücreli fonksiyonları, zara bağlı reseptörler (örn; Erb2 ve epidermal büyüme faktörü reseptörü), hücre dışı ligandları (örn; V-sis ve trombosit türevli büyüme faktörü), sitoplazmik sinyal transdüksiyon molekülleri (örn; Src, ras ve raf) veya nükleer mitojenle indüklenebilir transkripsiyon faktörleri (örn; Jun, fos, myc) ve nükleer transkripsiyon faktörleri (örn; Östrojen reseptörü- α)'dirler. İnsan tümörleri ile ilişkili bu farklı grupları proto-onkogenler kapsamaktadır (Katoh ve Teradal, 1993; Stass ve Mixson, 1997; Heaney ve Melmed, 2005; Rice ve diğerleri, 2014).

Tümör baskılayıcı genlerin tanımlanması, ailesel kanser çalışmaları ile büyük ölçüde kolaylaştırılmıştır. Retinoblastoma yatkınlık geninin (Rb) tanımlanması ve izolasyonunda bu durum en iyi şekilde gösterilmiştir (Heaney ve Melmed, 2005; Rice ve diğerleri, 2014). Meme kanserine özgü tümör baskılayıcı genler; ERBB2, PI3KCA, MYC, RB1, BRCA1, BRCA2, CCND1 TP53, PTEN, ATM, CHK2, RUNX1, RUNX2, RUNX3'dır (Lee ve Muller, 2010; Aguda ve diğerleri, 2015; Wang ve diğerleri, 2018). Kolon kanserine özgü

tümör baskılayıcı genler; KRAS, BRAF, PI3KCA APC, TP53, TGFBR2, CTNNA1, SMAD4'dür (Aguda ve diğerleri, 2015; Qi ve Ding, 2017; Wang ve diğerleri, 2018).

TP53, insan kanserinde, özellikle akciğer tümörlerinde en yaygın somut mutasyona uğramış geni temsil eden iyi bilinen bir TSG'dir (Bailey ve diğerleri, 2018). Şifrelenmiş p53 proteininin klasik fonksiyonları hücre döngüsü regülasyonu, DNA onarımı, stresin aracılık ettiği yaşlanma, apoptoz ve anjiyogenezdir. Bu fonksiyonlar esas olarak bir p53 tetramerin hedef genlerin promotörüne bağlanmasıyla meydana gelmektedir (Brosh ve Rotter, 2009). Birçok kanser tipinde TP53 mutasyonu, lokal ve uzak metastaz olayları, tedaviye direnç ve sağkalımda azalma gibi kötü prognoz ile ilişkilidir (Campling ve El-Deiry, 2003; Rice ve diğerleri, 2014; Zhou, Liu ve Myers, 2016; Wang ve diğerleri, 2018). “Genomun koruyucusu” olarak ün yapmasına rağmen, yakın zamanda yapılan çalışmalar TP53 değişikliklerini aktive etmenin kanser gelişimini ve ilerlemesini destekleyebileceğini göstermiştir (Brosh ve Rotter, 2009, Soussi ve Wiman, 2015). Mutasyonun TP53 geni içindeki yerine bağlı olarak, protein yapısı ve DNA bağlanma aktivitesi kaybolabilmekte veya değiştirilebilmektedir (Barros-Filho ve diğerleri, 2019).

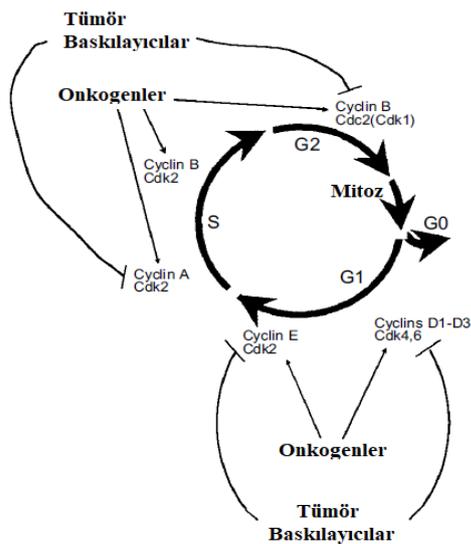
TSG'lerin çoğunun aksine, TP53 genellikle silme veya kısalma mutasyonları ile inaktive değildir. Gerçekten de, TP53 lokusundaki mutasyonların %74'ü, insan tümörlerindeki proteinlerde bulunabilen “missense (yanlış anlamlı)” noktası mutasyonlarıdır (Brosh ve Rotter, 2009) Aslında, değiştirilmiş TP53 başlangıçta varsayılan onkojenik özelliklere sahip bir kanser antijeni olarak düşünülmüştür (Brosh ve Rotter, 2009; Rice ve diğerleri, 2014; Zhu ve diğerleri, 2015; Wang ve diğerleri, 2018; Barros-Filho ve diğerleri, 2019).

Tümör baskılayıcılar (anti-onkogenler, resesif tümör genleri) hücrel genlerdir, inaktivasyonu tümör oluşumu olasılığını artırırken, işlevlerinin değişmesi tümör hücrelerinin büyümesini baskılayabilir. Tümör baskılayıcılarla ilişkili mutasyon genlerinin tümör hücrelerinin büyümesini etkileyemediğine dikkat çekilmektedir. Bununla birlikte, işlevlerindeki bozulma, mutasyonların ve/veya diğer genetik anormalliklerin oranını arttırmaktadır. Bu genlerin inaktivasyonu, çeşitli onkojenik mutasyonların ortaya çıkma olasılığını o kadar güçlü bir şekilde artırır ki, tümör oluşumu kaçınılmaz olarak er ya da geç ortaya çıkmaktadır (Kopnin, 2000; Rice ve diğerleri, 2014).

Bazı hücrelerin aşırı çoğalması, tümör oluşumu için bir temeldir ve bu nedenle hücre döngüsünün düzenlenmesinde meydana gelen bozulmalar, tümör hücrelerinin en bilinen

belirtileridir. Sıralı sikline bağılı kinazların aktiviteleri, hücre döngüsünün motorudur. Her sikline bağımlı kinaz (CDK), katalitik aktivitenin oluşması için aktifleştirici alt birimin ve siklin varlığını gerektiren holoenzim kompleksinin katalitik bir alt birimidir. CDK aktivitesinin düzenlenmesi, hücre döngüsü fazları sırasında belirli siklinlerin yönlendirilmiş değişiklikleri yoluyla gerçekleşir. CDK'nin aktivitesi de fosforilasyon ile düzenlenmektedir (Kopnin, 2000; Rice ve diğerleri, 2014).

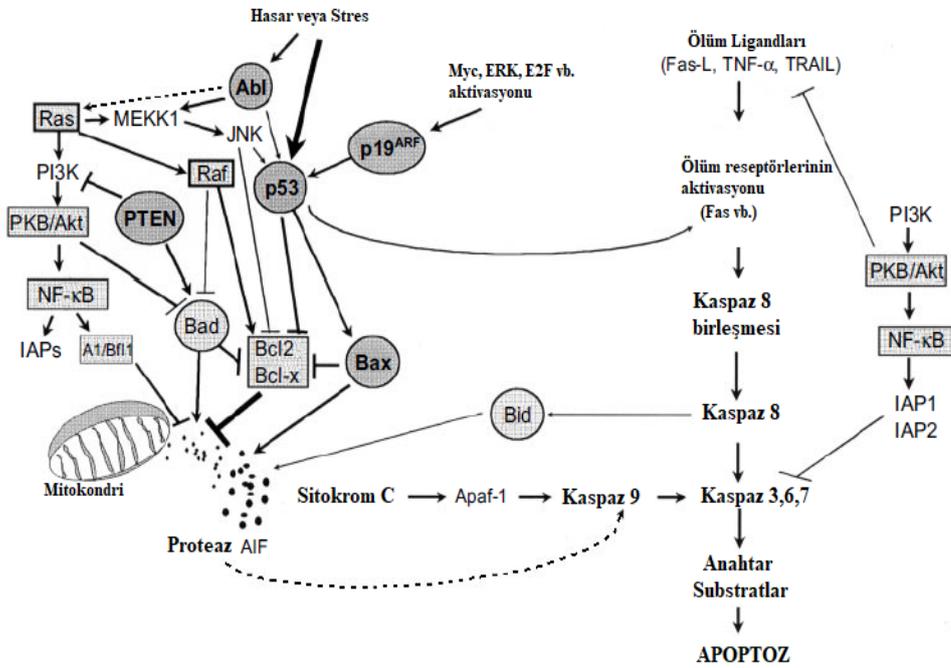
Aktif formlarda siklin-CDK, belirli bir fazın çalışmasını kontrol eden düzenleyici proteinleri fosforile etmektedir. Birçok onkogen ve tümör baskılayıcı gen, bir veya daha fazla siklin-CDK kompleksini düzenlemektedir. Protein ürünleri, presentetik faz G1'in başlangıç aşamalarından sorumlu olan sikline bağılı kinazların aktivitesini (CDK4 ile D1-D3 siklin kompleksleri veya hücre tipine bağılı olarak CDK6) ve G1'in DNA sentezinin (siklin E-CDK2)S fazına geçişini arttırmaktadır. Bazı proto-onkogenler ve tümör baskılayıcılar, siklin A-CDK2 (CDK1) (DNA replikasyonu için gereklidir) ve siklin B-CDK1 G2 fazının mitoz geçişinden sorumlu olan komplekslerin aktivitesini düzenlemektedir. (Kopnin, 2000; Rice ve diğerleri, 2014) (Resim 2.15). İnsan hücrelerinde CDK1 ailesi sınıfı p21, p27 ve p57 olmak üzere üç üye içermektedir (Cuadrado, Gutierrez-Martinez, Swat, Nebreda ve Fernandez-Capetillo, 2009). p27 proteini birçok yerde fosforile edilmektedir. Bunlar serin 10, treoninler 157, 187, 198 ve tirozinler 74, 88, 89'dur (De Vita, Riccardi, Malanga, Scrima, De Marco ve Viglietto, 2012).



Resim 2.15 Onkogenler ve Tümör baskılayıcı genlerin hücre döngüsüne etkisi (Kopnin, 2000)

Apoptozun kontrol altına alınması (programlanmış hücre ölümü), onkogenlerin ve tümör baskılayıcıların düzenleyici aktiviteleri için bir başka önemli noktadır. Apoptoz, spesifik öldürücü ligandların reseptör bağlanması, büyüme / kurtarma faktörlerinin eksikliği, DNA ve hücre iskeleti, hipoksi ve diğer olumsuz durumlar gibi çeşitli sinyallerle indüklenebilmektedir. Ayrıca substratlarını aspartat kalıntılarına bölen bir sistein proteaz ailesi olan kaspazların aktivasyonu ile gerçekleştirmektedir (Kopnin, 2000).

Kaspazların 3, 6, 7 aktivasyonunun en az iki farklı sinyal yolundan gerçekleştirildiği düşünülmektedir (Green, 1998; Nuñez, Benedict, Hu ve Inohara, 1998). Birincisi, adaptör proteinlerin ve pro-kaspazların, özellikle prokaspaz 8'in toplanmasıyla sonuçlanan öldürücü moleküllerin (Fas-ligand, TNF-a, vb.) yoluyla spesifik reseptör bağlanması ile başlatılması ve aktif kaspaz 8 oluşumudur. Kaspazların 3, 6, 7 aktivasyonunun alternatif bir mekanizması, AIF (apoptoz indükleme faktörü) proteaz ve/veya sitokrom C'nin mitokondriden salınması ile aktive edilen kaspaz 9'u içermektedir (Kopnin, 2000) (Resim 2.16).



Resim 2.16. Onkogenler ve Tümör baskılayıcı genlerin Apoptoz mekanizmasına etkisi (Kopnin, 2000)

2.6. Telomerler

Kanser genellikle yaşa bağlı genetik bir hastalıktır, ancak normal hücreler bir süre boyunca genomik instabilite biriktiğinde ve replikatif ölümsüzlük kabiliyeti kazandığında ortaya çıkmaktadır. Art arda hücre bölünmeleri sırasındaki telomer aşınması, kromozomal dengesizliğini indükler ve tümör oluşumu ile sonuçlanabilecek genomik yeniden düzenlemelere önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Kromozomların uçlarındaki tekrarlayan (TTAGGG) DNA-protein kompleksleri olan telomerler, kanser hücrelerinin hayatta kalması için çok önemlidir. Tümörlerin büyük çoğunluğu telomeraz adı verilen bir enzim tarafından korunmaktadır. Telomer uzunluğunu sürdürme ve telomeraz ekspresyonunun altında yatan mekanizmalar transkripsiyonel, transkripsiyon sonrası ve epigenetik düzenlemeyi içermekte ve bu mekanizmaların derinlemesine anlaşılması, hastalığın erken tespiti, hastalık prognozunun belirlenmesi ve terapötiklerin geliştirilmesi için yeni biyobelirteçler ve hedefler sağlayabilmektedir (Dahse, Fiedler ve Ernst, 1997; Aubert ve Lansdorp, 2008; Artandi ve DePinho, 2010; Akıncılar, Unal ve Tergaonkar, 2016; Jafri, Ansari, Alqahtani ve Shay, 2016; Okamoto ve Seimiya, 2019; Olsson, Wapstra ve Friesen, 2018).

Telomerler kromozom uçlarını füzyondan ve DNA hasarı bölgeleri olarak tanınmasından korumaktadır. Progresif hücre bölünmeleri sırasında normal somatik hücrelerdeki telomerlerin kritik kısalmasıyla ortaya çıkan disfonksiyonel telomerler, hücre yaşlanmayı tetikleyen DNA hasar tepkilerini ortaya çıkarmaktadır. Onkojenik değişiklikler kazanan hücreler yaşlanmayı atlamakta (uzun ömür süresi) ve kritik olarak kısaltılmış çoklu telomerler krizi başlatana kadar bölünmeye devam etmektedir. Kriz dönemi geniş hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte, bazı nadir hücreler krizden kaçır ve hücre büyümesini sürdürmek için kararlı fakat genellikle kısaltılmış telomer uzunluklarını korur ve sonunda malign bir fenotipe ilerlemektedir. Kanser hücreleri, diğer proteinlerle kompleks oluşturan ters transkriptaz aktivitesine sahip bir protein olan telomerazı kodlayan normal olarak sessiz insan TERT genini (hTERT) aktive ederek ve/veya bir ribonükleoprotein yapmak için fonksiyonel bir RNA (hTERT tarafından da kodlanır) enzim kompleksini düzenleyerek proliferatif ölümsüzlüğe ulaşmaktadır. Nadiren, telomerlerin (ALT) alternatif uzatılması olarak adlandırılan başka bir DNA rekombinasyon mekanizması, yaşlanmayı atlamak için telomer yıpranmasını tersine çevirmektedir. hTERT genellikle tüm somatik hücrelerde susturulmasına rağmen, insan kanserlerinin yaklaşık % 90'ında anlamlı olarak

2.7. Kanser ve Antioksidanlar

Kanser gelişimini tanımlamak için kullanılan bir terim olan karsinogenez, kontrolsüz hücrelerin başlatılması, teşviki ve ilerlemesinden oluşan çok aşamalı bir süreçtir. Karsinogenezi başlatma adımı, deoksiribonükleik aside (DNA) zarar verilmektedir. Hücreler çoğalma ve artış döneminde anormal hücrelere dönüşmeye başlamaktadır. İlerleme döneminde ise, bu anormal hücrelerde, malign hücrelerin oluşumuna yol açan başka değişiklikler meydana gelmektedir (Klaunig ve Kamendulis, 2004; Bennett, Rojas ve Seefeldt, 2012; Fuchs-Tarlovsky, 2013).

Kanser ilerlemesini azaltmanın önerilen yolları arasında, doğal olarak oluşan ajanları veya sentetik maddeleri kullanarak, kanser ilerlemesi baskılanması ve oksidatif stresi azaltarak kanser gelişme riskinin azaltılması büyük ilgi görmüştür (Bennett ve diğerleri, 2012). Oksidatif stres, çok sayıda bozukluğun ve kardiyovasküler hastalıklar, diyabet gibi patofizyolojik süreçlerin patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) veya reaktif azot türlerinin (RNS) üretimi ve uzaklaştırılması arasındaki dengesizliğin sonucudur (Kowluru ve Chan, 2007). ROS veya RNS eksojen ve endojen kaynaklardan üretilmektedir (Bennett ve diğerleri, 2012; Fuchs-Tarlovsky, 2013). Antioksidan savunma mekanizmaları arasında bulunan glutatyon, süperoksit dismutaz ve katalaz oksidatif hasara karşı vücudu korumaktadır (Franco, Schoneveld, Georgakilas ve Panayiotidis, 2008). ROS'un aşırı üretimi, nükleik asitlere, proteinlere veya lipitlere zarar veren karsinogenez ile ilişkilendirilmiştir. Karsinogenez sırasında, DNA zincirlerinde kopmalar ve anormal DNA bağlantılarının oluşumu gözlenmiştir (Klaunig ve Kamendulis, 2004; Valko ve diğerleri, 2007; Khan, Afaq ve Mukhtar, 2008; Reuter, Gupta, Chaturvedi ve Aggarwal, 2010; Bennett ve diğerleri, 2012).

Kanseri önleme veya tedavi etme çabaları, araştırmacıları oksidatif stres ile karsinogenez süreci arasındaki bağlantıyı bulmaya ve potansiyel kimyasal önleyici bileşikler ve antioksidan aktiviteleri olan bileşikler keşfetmeye yönlendirmiştir (Khan ve diğerleri, 2008; Bennett ve diğerleri, 2012). Antioksidanlar, deney sistemlerinde serbest radikal üreten antikanser ilaçlar ile onkojenik transformasyona karşı koruma sağlamaktadır. Antioksidanlar radyasyon ve kemoterapinin ağırlı yan etkilerini azaltmakta, böylece antioksidanların faydalı etkilerini desteklemektedir (Borek, 2004).

Antioksidanlar tedavi sırasında normal hücrelerin korunmasında ve bazı kanserlerin tedavisinde adjuvan olarak hareket etmektedir. Deneysel çalışmalar, antioksidanların kanser hücrelerini apoptoz ile seçici olarak öldürdüğünü, tümör anjiyogenezini ve metastatik büyümeyi inhibe ettiğini, normal hücrelerde, *in vitro* ve *in vivo* apoptozu önlediğini göstermektedir (Borek, 2004).

p53 veya PTEN gibi kalıtsal tümör baskılayıcı genlerin eksikliği nedeniyle yüksek kanser riski olan kişiler için antioksidanlarla tedavi, tümör gelişimini geciktirmekte veya hatta önlemekte etkili olabilmektedir (Fuchs-Tarlovsky, 2013).

Antioksidanlar, endojen ve eksojen olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır ve bunlar oksidan/antioksidan dengesini sağlamak için serbest radikallerden vücudu korurlar ve serbest radikalleri etkisizleştirmek için kullanılırlar (Sen ve Chakraborty, 2011; Karabulut, ve Gülay, 2016). Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak iki alt grupta sınıflandırılabilir (Pham-Huy, He ve Pham-Huy, 2008; Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009; Sen, Chakraborty, Sridhar, Reddy ve De, 2010). Enzimatik antioksidanlara süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz örnek verilebilmektedir. Nonenzimatik antioksidanlara glutatyon, melatonin, ürik asit, bilirubin, albümin, koenzim Q10, selenyum, α -lipoik asit, seruloplazmin ve transferrin örnek verilebilmektedir (Karabulut ve Gülay, 2016). Eksojen kaynaklı antioksidanlar; vitamin eksojen antioksidanlar [α -tokoferol (vitamin E), β -karoten (vitamin A), askorbik asit (vitamin C) ve folik asit (vitamin B9)] ve ilaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016). Endojen veya eksojen uyaranlarla üretilen ROS, anahtar genlerin mutasyonu yoluyla normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine yol açabilen DNA, proteinler ve lipitlere zarar verebilmektedir (Sammar, Abu-Farich, Rayan, Falah ve Rayan, 2019). Kanser başlangıcı ve ilerlemesi, dengesiz bir redoks dengesi, endojen olarak ROS üretimi, DNA hasarı, hücre apoptozunun önlenmesi ve sonuç olarak daha yüksek bir hücre sağkalım oranına yol açan hücrelerin doğal bir savunma sistemi nedeniyle de ortaya çıkabilmektedir (Galaris, Skiada ve Barbouti, 2008; Jambunathan, Bangarusamy, Padma ve Sundaravadivelu, 2014; Sammar ve diğerleri, 2019). Bu durum göz önüne alındığında, hücre içi ROS'un aşırı üretimi, antioksidanlar tarafından kanser hücrelerinin gelişimini ve yayılmasını önlemek veya bastırmak için terapötik ajanlar olarak hedeflenmektedir (Fuchs-Tarlovsky, 2013; Sammar ve diğerleri, 2019).

Hipoksi, serbest oksijen radikallerin oluşumuna ve oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır. Hipoksi antikanser ilaçların etkinliğini etkileyerek MDR'yi tetikleyebilmektedir (Wang ve diğerleri, 2017). Ayrıca hipoksi, yaygın bir MDR mekanizması olan hücre içi kemoterapötik ajanları dışarı pompalayan ABCB1 ve ABCG2 ekspresyonunu da indükleyebilmektedir (He ve diğerleri, 2016; Badowska-Kozakiewicz, Liszcz, Sobol ve Patera, 2017). Bu nedenle oksidatif stresin hedeflenmesi, kanserde MDR'nin üstesinden gelmek için umut verici bir strateji olarak görülmektedir (Ye ve diğerleri, 2019).

2.8. Kanser ve Sitotoksisite

Sitotoksisite, bir bileşiğin hücreleri öldürme özelliği olarak tanımlanmaktadır. Aktif maddelerin kanser hücreleri üzerindeki toksik etkisini belirlemek için sitotoksisite deneyleri yapılabilmektedir. Sitotoksik ajanlar, çok sayıda kanser türü için tercih edilen tedavi olmaya devam etmektedir (Martinez-Serra ve diğerleri, 2014; Adan, Kiraz ve Baran, 2016). Sitotoksik kemoterapi ajanları mitozda olan hücreleri G0'dakilere göre daha fazla etkilemektedir (Mycek, Finkel, Clark, Cubeddu ve Howland, 2000). Antikanser bileşiklerinin potansiyelini değerlendirmek için sitotoksisite deneylerinde, en düşük sitotoksik konsantrasyon araştırılmaktadır. Sitotoksik ilaçlar, hücrelerin çoğalmasından sorumlu hücre içi sinyal molekülleri, membran reseptörleri ve kinazların işlevine müdahale etmekte, hücre ölümünü indüklemeden önce hücre büyümesini ve bölünmesini engellemektedir (Elmore, 2007).

Kültürlenmiş hücrelerle *in vitro* hücre canlılığı ve sitotoksisite deneyleri, kimyasalların sitotoksisite testleri ve ilaç taraması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testlerin uygulanması son yıllarda artan bir ilgi göstermektedir. Halen bu deneyler, ilaç geliştirme sırasında hem bileşik toksisitesini hem de tümör hücresi büyüme inhibisyonunu değerlendirmek için onkolojik araştırmalarda da kullanılmaktadır (Ishiyama ve diğerleri, 1996; Aslantürk, 2018)

Sitotoksik ilaçlarla kemoterapi, bazı kanser türleri için ana tedavi yöntemidir (Koch, Mayer, Honecker, Schittenhelm ve Bokemeyer, 2003). Bu kemoterapötik ilaçların, hastaya uygulanmasından önce güçlü ve etkili olduğunun izlenmesi ve sağlanması önemlidir. Birkaç bileşiğin sitotoksik aktivitesini hızlı bir şekilde belirlemek için *in vitro* hücre bazlı deneyler geliştirilmiştir. Hücre bazlı analizler, farklı hedef hücrelerin çeşitli kemoterapötik ajanlara

duyarlılığındaki varyasyonların belirlenmesinde de yararlıdır (Carmichael, DeGraff, Gazdar, Minna ve Mitchell, 1987; Alami ve diğerleri, 2007; Florento ve diğerleri, 2012).

Sitotoksisite, *in vitro* çalışmalarda biyolojik değerlendirme için en önemli göstergelerden biridir. *İn vitro* olarak, ilaçlar ve pestisitler gibi kimyasallar, hücre zarlarının tahrip edilmesi, protein sentezinin önlenmesi, reseptörlere geri dönüşümsüz bağlanma vb. gibi farklı sitotoksisite mekanizmalarına sahiptir. Bu hasarların neden olduğu hücre ölümünü belirlemek için ucuz, güvenilir ve tekrarlanabilir kısa süreli sitotoksisite ve hücre canlılığı deneyleri bulunmaktadır. Sitotoksisite ve hücre canlılığı analizleri çeşitli hücre fonksiyonlarına dayanmaktadır. Günümüzde toksikoloji ve farmakoloji alanlarında geniş bir sitotoksisite deneyi spektrumu kullanılmaktadır. Bu deneyler için farklı sınıflandırmalar vardır: (1) Boya dışlama deneyleri (2) Kolorimetrik deneyler (3) Florometrik deneyler ve (4) Lüminometrik deneyler. Bu testler arasından uygun yöntemi seçmek, doğru ve güvenilir sonuçlar elde etmek için önemlidir. Çalışmada kullanılacak sitotoksisite ve hücre canlılığı tayinleri seçilirken, çalışmanın gerçekleştirileceği laboratuvarındaki kullanılabilirlik, test bileşikleri, tespit mekanizması, özgünlük ve duyarlılık gibi farklı parametrelerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Aslantürk, 2018).

Hücrelerin canlılık seviyeleri ve/veya proliferasyon oranları hücre sağlığının iyi göstergeleridir. Fiziksel ve kimyasal ajanlar hücre sağlığını ve metabolizmasını etkileyebilir. Bu ajanlar hücre zarlarının tahrip edilmesi, protein sentezinin önlenmesi, reseptörlere geri döndürülemez bağlanma, polideoksinükleotid uzamasının inhibisyonu ve enzimatik reaksiyonlar gibi farklı mekanizmalar yoluyla hücreler üzerinde toksisiteye neden olabilmektedir (Ishiyama ve diğerleri, 1996). Bu mekanizmaların neden olduğu hücre ölümünü belirlemek, ucuz, güvenilir ve tekrarlanabilir kısa süreli sitotoksisite ve hücre canlılığı deneylerine ihtiyaç bulunmaktadır (Aslantürk, 2018). Hücre canlılığı ve sitotoksisite deneyleri, hücre zarı geçirgenliği, enzim aktivitesi, hücre uyumu, ATP üretimi, ko-enzim üretimi ve nükleotit alım aktivitesi gibi çeşitli hücre fonksiyonlarına dayanmaktadır. Deneyin sonunda kaç canlı hücrenin kaldığını ve / veya kaç hücrenin öldüğünü bilmek önemlidir. Günümüzde toksikoloji ve farmakoloji alanlarında geniş bir sitotoksisite ve hücre canlılığı tayini spektrumu kullanılmaktadır. Etkileşim tipinin değerlendirilmesinde test yöntemi seçimi çok önemlidir (Sliwka ve diğerleri, 2016; Aslantürk, 2018).

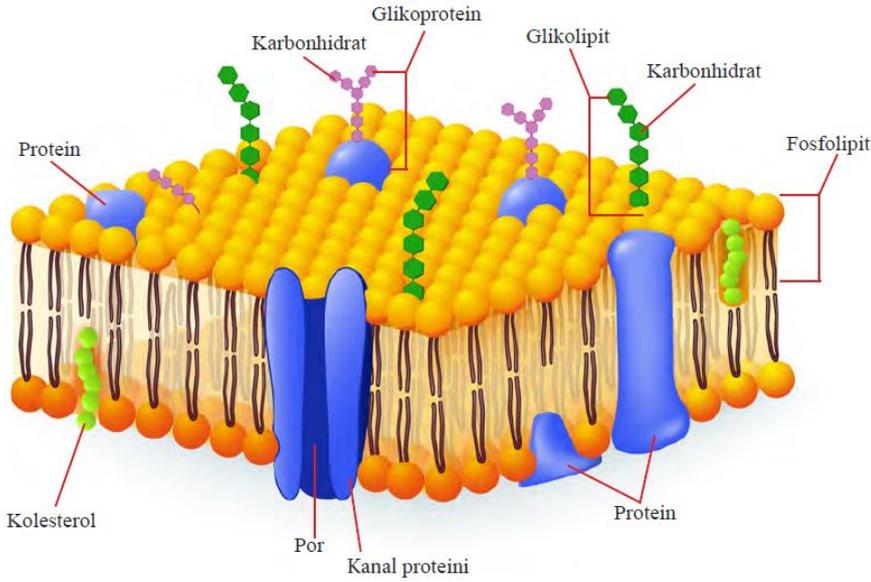
Sitotoksosite ve hücre canlılığı deneyleri için farklı sınıflandırmalar olmasına rağmen, bu deneyler ölçüm tiplerine (renk değişiklikleri, floresan vb.) göre sınıflandırılır.

- ❖ Boya dışlama deneyleri: Tripan mavisi, eozin, kongo kırmızısı, eritrosin B deneyleri
- ❖ Kolorimetrik deneyler: MTT testi, MTS testi, XTT testi, WST-1 testi, WST-8 testi, LDH deneyi, SRB deneyi, NRU deneyi ve Kristal viyole deneyi
- ❖ Florometrik deneyler: Alamar mavi deneyi ve CFDA-AM deneyi
- ❖ Luminometrik deneyler: ATP testi ve (RTCA) gerçek zamanlı canlılık testi (Aslantürk, 2018)

2.9. Kanser ve Hücre Membranı

Hücre zarları, önemli hücresel bariyerleri ile normal ve kanser hücrelerinin ilk temas yapılarını temsil etmektedir. İyonlar, hormonlar, sitokinler, enzimler, büyüme ve hareketlilik faktörleri, reseptörler, hücre dışı matris, diğer stromal elementler ve hücre altı zar veziküllerinden hücre dışı sinyaller, sinyalleme işlemlerini başlatmak için önce hücre membranı ile etkileşime girmelidir (Resim 2.18). Bu nedenle, hücre veya plazma zarları, sinyalleri ve maddeleri dış hücrelerden ve bitişik hücrelerden seçici olarak bir hücrenin içine iletebilen hücresel filtrelerdir. Bunun tersine, adlandırılan karmaşık bir süreçte diğer hücrelere, mikro ile makro çevreye sinyaller ve moleküller de serbest bırakabilirler. Ayrıca hücreler bölümlere ayrılmıştır. Bunlar biyosentez, enerji üretimi, replikasyondan sorumlu çeşitli hücre içi membran yapıları ile iletim, geri dönüşüm, imha, salgı ve diğer hücresel faaliyetlerde görevli organellerdir (Nicolson, 2015; Zalba ve Hagen, 2017).

Hücre zarları, kanserleri tanımlayan biyokimyasal olaylarda yakından rol oynar ve özellikle kanser metastazında yoğun rol oynamaktadır (Nicolson, 1982). Metastazların oluşturulması, yeni mikro-ortamlarında malign hücreler, normal hücreler, stroma ve hücre dışı matris arasında karmaşık bir etkileşim gerektirmekte ve bu etkileşimlere öncelikle hücre zarları aracılık etmektedir (Xu, Boudreau ve Bissell, 2009; Nicolson, 2015; Zalba ve Hagen, 2017).



Resim 2.18. Hücre membranının genel yapısı (<https://www.canlibilimi.com/hucre-zari-ve-hucre-zarinin-gorevleri/>)

Hücresinin malign transformasyonu hücre membranında o kadar büyük değişikliklere yol açmaktadır ki, “kansere, bir membran hastalığıdır” denilebilir. Kanserde görülen membran değişiklikleri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Hücre yüzeyindeki karbonhidrat kalıntılarında değişiklik sonucu membranda yeni karbonhidratlar oluşmaya başlar.
2. Membranda majör histokompatibilite antijeni (MHA = Doku uygunluğu antijeni) kaybı meydana gelir.
3. Sialik asit konsantrasyonunun artmasına bağlı, membranın (-) yükü artar.
4. Membrandan karbonhidratların ve aminoasitlerin transportu artar.
5. Alfa Feto Protein (AFP), Karsino Embriyogenik Antijen (CEA) gibi onkofetal antijenler ortaya çıkar. Bunlara ilaveten membranda çeşitli hormon veya büyüme faktörlerinin reseptörlerinde de değişiklikler olabilmektedir. Hatta bu değişikliklerin tespiti bazı kanser vakalarında spesifik tedaviye olanak sağlamaktadır (Erdamar, Hacıevliyagil Kazancı ve Gök, 2014).

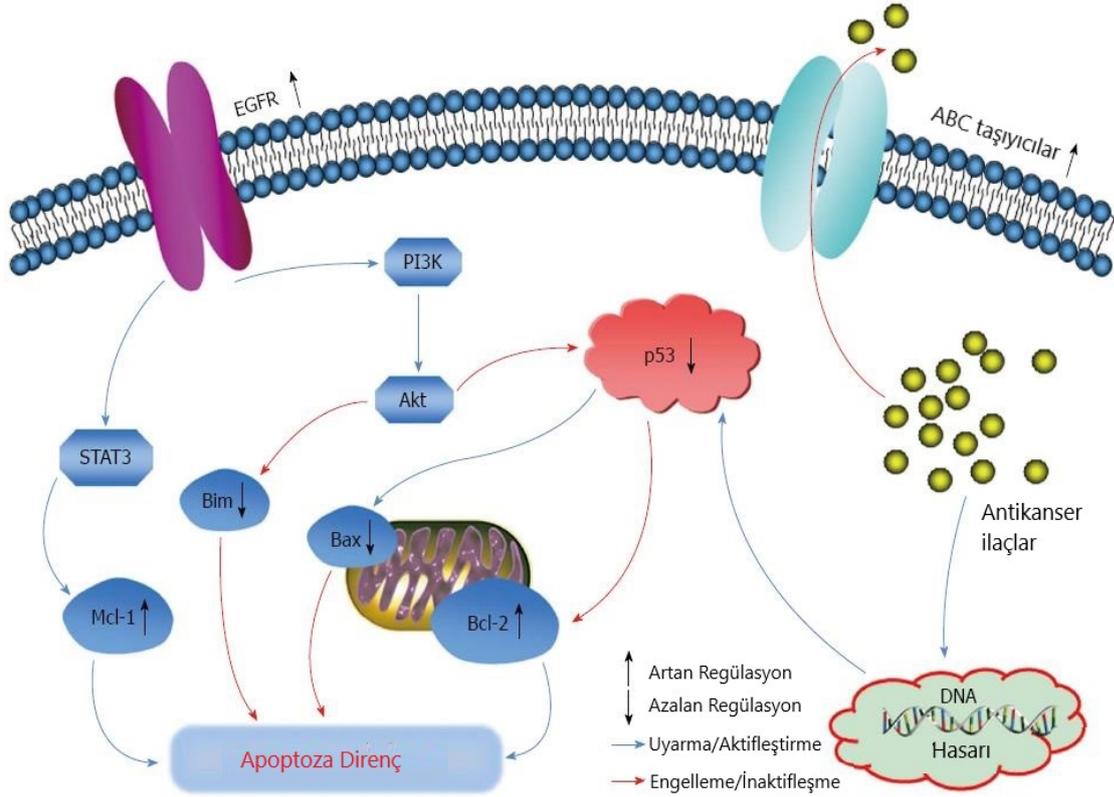
Tümör hücrelerinin ilaca hassasiyetini azaltan mekanizmalar:

- ❖ Beyni periferel dolaşımdan ayıran merkezi sinir sistemindeki (MSS) doğal savunma mekanizması ve kan beyin bariyeri (KBB),
- ❖ Membran transport proteinlerini kodlayan genlerin ifadesinde artışa bağlı olarak hücre içine ilaç girişinin azalması,

- ❖ Artan ilaca bağılı olarak DNA tamir sistemlerindeki adaptif cevap,
- ❖ İlacın hedef molekülünde mutasyonlara veya posttranslasyonel modifikasyonlara bağılı olarak, hedef molekülün ilaca bağlanma etkinliğinin azaltılması (Bozkurt, Atmaca ve Uzunoglu 2013).

2.10. Kanserde Çoklu İlaç Direnci

Taşıyıcı hipotezi, farmakokinetik direnç mekanizması gelişiminde, kan beyin bariyerindeki ilaç taşıyıcılarının aşırı ekspresyonu ve aktiviteleri sonucu hedef alanda ilacın yeterli yoğunluğa ulaşamaması ve apoptoz direnci ile ilgilidir. Bu hipotez ilk olarak kanserde kemoterapi direncinde açıklanmış ve popüler olmuştur (Taşkiran ve diğerleri, 2015; Kadkol, Jain ve Patil, 2019) (Resim 2.19). Kanserin tedavisinde kullanılan çoklu doğal ürün ilaçlarına karşı direnç kazandığını gösteren ilk ABC proteini başlangıçta 1976'da tanımlanan 170 kDa P-glikoproteinidir. İnsanlarda bu protein MDR1 geni tarafından kodlanır ve farelerde MDR1A (MDR1) ve MDR1B (MDR3) genleri tarafından üretilir. 10 yıldan uzun süredir, P-glikoproteininin tip 1 izoformları, memeli hücrelerinde birçok ilaca direnç kazandıracak tek protein olduğuna inanılıyordu. Bununla birlikte, çeşitli insan tümörlerinde P-glikoproteini saptamada başarısız olan çalışmalarla birlikte, P-glikoproteininin aşırı ekspresyonunun olmadığı durumlarda çoklu ilaç direnci gösteren insan tümör hücre hatlarının, diğer çoklu ilaç direnci veren proteinlerle ilgili çalışmalar rapor edilmiştir. 1992 yılında, doksorubisin akciğer kanseri hücre hattından 190 kDa MRP'yi kodlayan cDNA'nın klonlanması, kısa süre sonra MRP cDNA transfeksiyon deneyleri ile izah edildi ve ikinci bir ABC proteini aşırı ekspresyonunun memeli hücrelerinde birçok ilaca direnç gösterebileceğiyle ilgili kesin kanıt sağlandı. P-glikoprotein ve MRP'nin sağladığı çoklu ilaç direnci, ilaç birikiminde ATP'ye bağılı azalma ile karakterizedir. Bununla birlikte, çoklu ilaç direncine aracılık etme konusunda bu ortak kabiliyete rağmen, bu iki memeli ABC proteininin önemli yapısal, mekanik ve farmakolojik özelliklere göre önemli ölçüde farklılık gösteren bir üstünlüğü vardır (Boumendjel, Florin ve Boutonnat, 2009; Karvar, 2014; Kadkol ve diğerleri, 2019; Ye ve diğerleri, 2019).

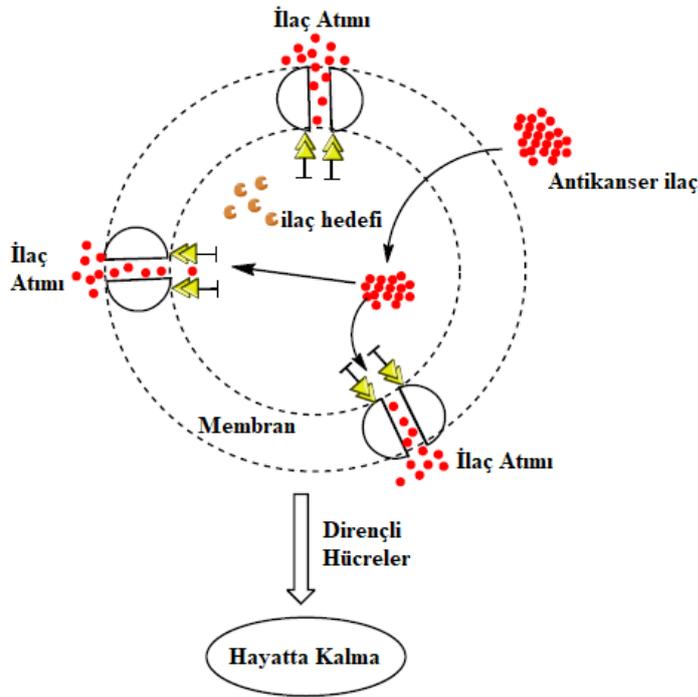


Resim 2.19.Çoklu ilaç direnci ve apoptoz mekanizması (Hu, Li, Gao ve Cho, 2016)

2.11. Kanserde ABC Taşıyıcılarının Rolü

Kanserde MDR'yi daha iyi anlamak ve kanser hücrelerinde ilaç direncinin gelişimini engelleyebilecek ilaçları bulmak için birçok alanda araştırmalar devam etmektedir. Araştırmacılar, çoklu ilaç taşıma aracı olarak adlandırılan P glikoproteinini, birçok anti kanser ilacının direncini arttırmak için hücrelerdeki genetik değişikliklerin bir sonucu olarak artan miktarlarda eksprese edildiğini belirlemiştir (Thomas ve Coley, 2003; Karvar, 2014; Kadkol ve diğerleri, 2019). Genetik ve moleküler araştırmalar, insanlarda bu çoklu ilaca dirençli hücrelerin, gen ifadesinin artmasına neden olan artmış MDR1 genleri içerdiğini göstermiştir. P-glikoproteini kodlayan MDR1 geni tüm insan kanserlerinin yaklaşık yarısında belirgin seviyelerde eksprese edilir. Çoklu ilaç taşıyıcılar, hayvan hücrelerinden çıkan ilaçların akışı veya ekstraksiyonunda tanımlanan iki önemli mekanizmalardan biridir. İlaç akışı için diğer mekanizma, çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein (MRP) olarak bilinen bir genin ekspresyonunu içermektedir. Hem MDR1 hem de MRP genleri, ATP'ye bağlı taşıyıcıların bir süper ailesinin üyesidir. Muhtemelen bu süper ailenin tanımlanamayan diğer üyeleri ilaç direncinin diğer biçimleriyle de ilgilidir. MDR etyolojisi çok faktörlü olabilir, ancak yukarıda bahsedilen sitotoksik ilaçlara klasik direnç, çoğunlukla bir ilaç çıkış pompası

görevi gören 170 kDa ATP'ye bağlı bir zar taşıyıcı olan P-glikoproteininin aşırı ifadesine bağlıdır. Bu taşıyıcılar, çeşitli moleküllerin hücre zarı boyunca taşınmasını sağlamak için ATP'yi hidroliz edince salınan enerjiyi kullanırlar. Normal dokulardaki fizyolojik ifadelerine ek olarak, birçoğu eksprese edilir ve daha da önemlisi insan tümörlerinde aşırı eksprese edilmektedir (Thomas ve Coley, 2003; Karvar, 2014; Domenichini, Adamska ve Falasca, 2019; Kadkol ve diğerleri, 2019). Kansersiz dokuda, P-glikoprotein ekspresyonu, kolon, böbrek, adrenal, pankreas ve karaciğerin epitelyal hücreleri gibi normal olarak P-glikoproteini eksprese eden dokulardan türetilen tümörlerde en yüksek direnç potansiyeline neden olmaktadır. Kemoterapi başlamadan önce tümörlerde teşhis anında, P-glikoprotein ekspresyonu düşük olabilir, ancak kemoterapi ajanlarına maruz kaldıktan sonra artar ve bu hücrelerde MDR gelişimine neden olmaktadır (Boumendjel ve diğerleri, 2009; Karvar, 2014; Kadkol ve diğerleri, 2019) (Resim 2.20).



Resim 2.20. Kanserde ilaç direnci (Kadkol ve diğerleri, 2019)

Kanser hücresi çoklu ilaç direncinin önemli bir mekanizmasının, apoptoza veya diğer hücre ölüm şekillerine yol açan yolların bastırılmasını içerdiği düşünülmektedir (Sharma ve diğerleri, 2006; Baguley, 2010; Olson ve Hallahan, 2004). Antikanser ilaçlar genellikle p38 kinaz gibi stres yollarını indükler veya PI3K (fosfatidil-3-fosfat kinaz) ve ERK1 (hücre dışı düzenlenmiş kinaz-1) tarafından koordine edilenler gibi “hayatta kalma” yollarını bastırmaktadır (Hersey, Zhuang ve Zhang, 2006; Baguley, 2010). Bu yolların modülasyonu,

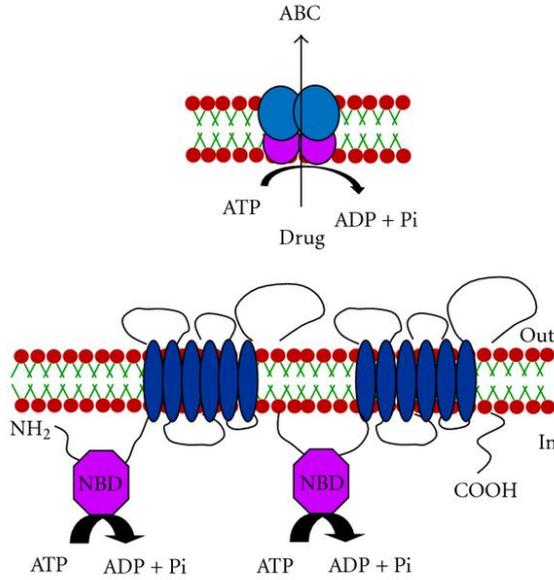
BCL-2 protein ailesinin ve akrabalarının aktivite dengesini etkiler, bu da dış mitokondriyal membranın stabilitesini kontrol etmektedir (Danial, 2007; Baguley, 2010). BCL-2 ailesi üyelerinin dengesindeki bir değişiklik, dış mitokondriyal zarın bozulduğu ve normal olarak iç ve dış mitokondriyal zarlar arasındaki boşlukta depolanan proteinlerin sitoplazmaya geçişine yol açmaktadır (Forte ve Bernardi, 2006; Baguley, 2010; Fan ve diğerleri, 2018).

2.12. ABC Taşıyıcı Proteinler

ABC (ATP-binding cassette) taşıyıcı ailesi çeşitli ilaçların, ksenobiyotiklerin ve endojen bileşiklerin, membranlardan taşınmasını sağlayan proteinlerden oluşmaktadır. ABC proteinleri substratlarını membranlardan pompalayan, ATP'ye bağımlı olarak çalışan primer aktif taşıyıcılardır (Resim 2.21). Bunların bağırsak segmentleri, karaciğer, böbrek gibi ilaç emilimi, metabolizması ve atılımından sorumlu organların yanı sıra, beyin ve kalp gibi diğer önemli dokulardaki varlığı da bilinmektedir. ABC taşıyıcıları, dizi ve yapısal homoloji temelinde A'dan G'ye atanan 7 alt aileye sahip en büyük transmembran protein ailesidir. İnsan ABC taşıyıcıları, ABC genlerinde polimorfizmlerden kaynaklanan çeşitli hastalıklarla ilgilidir. Bu hastalıklar; kistik fibroz, adrenoleukodistrofi, Stargardt hastalığı, Tangier hastalığı, Mendel hastalıkları, ailesel intrahepatik kolestaz (karaciğer içinde olan), Dubin-Johnson sendromu, psöoksositoma elastikum, X bağlantılı sideroblastoz anemi, yaşla ilişkili maküla dejenerasyonu, ailesel hipopaproteinemi ve retinitis pigmentosum'dur (Boumendjel ve diğerleri, 2009; Calcagno ve Ambudkar, 2010; Karvar, 2014; Domenichini ve diğerleri, 2019).

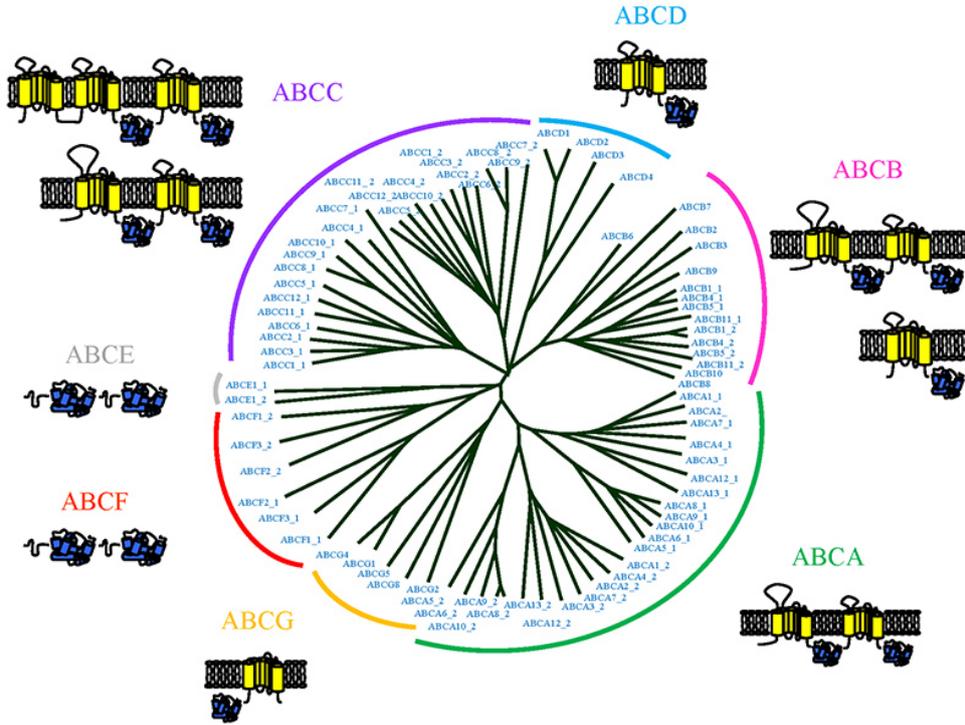
ABC taşıyıcı ailesinin önemli üyeleri olan P-glikoprotein (P-gp/MDR), çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinler (MRP'ler) ve meme kanseri rezistans proteini (BCRP), ilaçların bağırsaklardan atılımında rol oynamakta; karaciğer ve böbreklerde ise ilaçların sırasıyla safra ve idrar ile atılımlarını kolaylaştırmaktadır. İnsan ABCB (MDR / TAP) ailesi yapısal olarak çeşitli ilaçlara karşı MDR'den sorumludur. ABCB1 veya MDR1 (P-glikoprotein), lipid taşınması ana işlev olan diğer biyolojik süreçlerde de yer almaktadır. Bu nedenle, ABC taşıyıcılarının ilaç ve ilaç metabolitlerinin farmakokinetiğinde ve detoksifikasyonunda önemli görev üstlendiği bilinmektedir (Marchetti, Mazzanti, Beijnen ve Schellens, 2007; Rees, Johnson ve Lewinson, 2009; Karvar, 2014). ABC taşıyıcı proteinleri, sağlıklı dokularla birlikte birçok tümör dokusunda da eksprese edilebilmektedir. Bu taşıyıcılar, kemoterapi ilaçlarını hücrelerden dışarı atarak, ilacın tümör dokusunda toplanmasına

engellemekte ve böylece uygulanan kemoterapinin başarısız olmasına neden olmaktadır. Çoklu ilaç direnci (MDR; multidrug resistance) olarak tanımlanan bu durum kanser tedavisinde önemli bir sorun olarak önemini korumaktadır (Pala Kara, Oztürk, Oztürk ve Okyar, 2013).

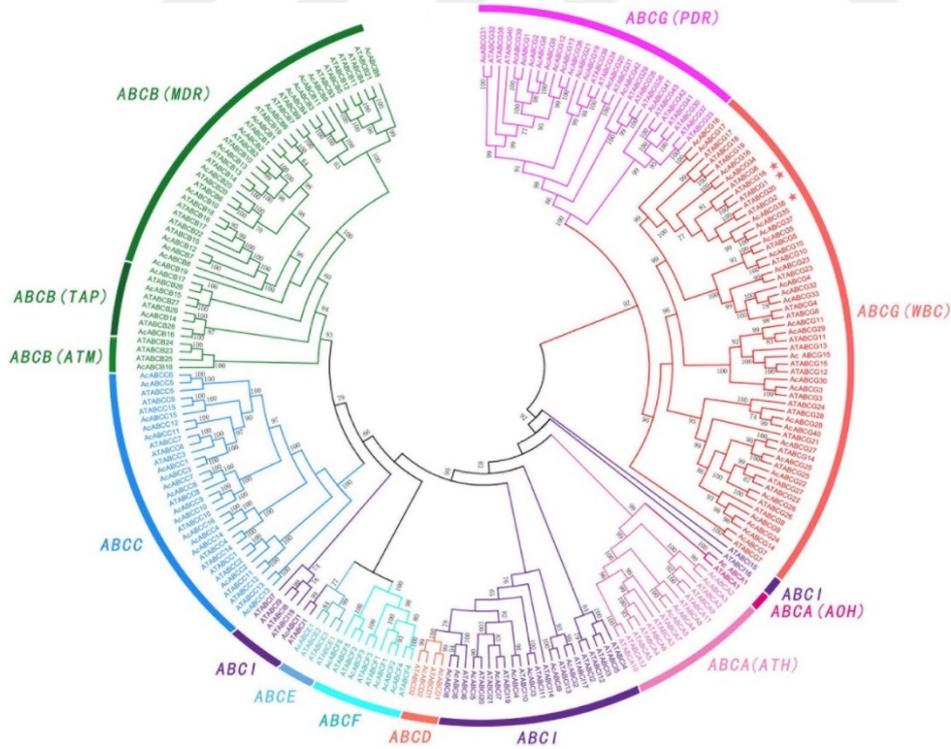


Resim 2.21. ATP taşıyıcı proteinlerin yapısı (Prasad, Sharma ve Rawal, 2011)

Taşıyıcı proteinler çok sayıda taşıyıcıyı içerisinde barındıran çok geniş bir ailedir. İnsanda ATP bağımlı taşıyıcılar, iyon kanalları, sekonder taşıyıcılar ve sınıflanmamış taşıyıcılar olmak üzere dört ana grup taşıyıcı protein bulunmaktadır. Bu ana gruplar açıldığında, birçok alt grup taşıyıcı proteinin varlığı göze çarpar. Sonuçta, organizmada görev yapan binlerce taşıyıcı proteinin olduğunu söylemek mümkündür (Marchetti ve diğerleri, 2007; Pala Kara ve diğerleri, 2013) (Resim 2.22 ve Resim 2.23). İnsan genomunda 49 gen ile temsil edilmekte olan bu üst aile, gen yapıları, domainlerinin sayısı ve organizasyonu, amino asit dizilimleri temel alınarak 7 alt aileye ayrılmıştır (Dean, Rzhetsky ve Allikmets, 2001; Stavrovskaya ve Stromskaya, 2008; Braconi ve diğerleri, 2020) (Resim 2.24).



Resim 2.22. İnsan ABC protein envanteri (ilaç araştırması yapılan) (<http://local.biochemistry.utoronto.ca/stagljjar/research/>)

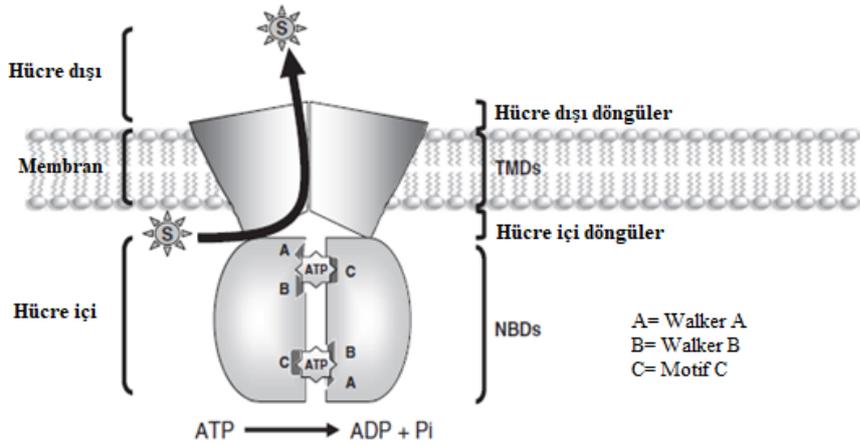


Resim 2.23. ABC proteinlerinin NBD'lere göre filogenetik ağacı (Xiong, Feng, Yuan, Zhou ve Miao, 2015)

Alternatif isim	ABC1	MDR	MRP	ALD	OABP	GCH20	WHITE
Alt-aile	ABCA	ABCB	ABCC	ABCD	ABCE	ABCF	ABCG
Protein sayısı	12	11	13	4	1	3	5
İlaç direncine neden olan protein	ABCA2	ABCB1 (P-gp) ABCB4 (MDR2) ABCB11 (BSEP)	ABCC1 (MRP1) ABCC2-6 (MRP2-6) ABCC10 (MRP7) ABCC11 (MRP8)				ABCG2 (BCRP)

Resim 2.24. ABC üst ailesine ait proteinlerin sınıflandırılması (Stavrovskaya ve Stromskaya, 2008)

Bu proteinlerin fonksiyonel bir birimi tipik olarak iki sitoplazmik ATP bağlayan domain (NBD, nucleotid-binding domain) ve membran çift tabakasının içine doğru uzanan iki transmembranal domainden (TMD) oluşmaktadır. NBD'ler, ATP bağlanması ve hidrolizi için gerekli olan Walker A, Motif C ve Walker B motifleri denilen aminoasit dizileri içermektedir. L0 dimerleşme kabiliyetine sahiptir, yapısal ve düzenleyici işlevlerde rol oynamaktadır. İki adet TMD ve NBD içeren ABC proteinlerine tam taşıyıcılar (P-gp, ABCB1), birer adet TMD ve NBD içerenlere yarım taşıyıcılar (BCRP, ABCG2) denilmektedir. Walker A: ATP'nin fosfat zincirini sarar; Walker B: ATP hidrolizi için gerekli olan bir magnezyum iyonunu koordine eder ve stabilize eden bir aspartat kalıntıya katkıda bulunur. ABC imgesi (motif C) ve diğer aromatik halkalar bulunduran D, H, Q motifleri ise özgünlük ve yüksek oranda korunum sağlanmaktadır. Yarım taşıyıcıların taşıma fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için homodimer veya heterodimer oluşturmaları gerekir. Bazı ABC proteinlerinde ise ilave bir TMD içeren 5 adet transmembranal segment bulunmaktadır (MRP1, ABCC1) (Dean ve diğerleri, 2001, Stavrovskaya ve Stromskaya, 2008; Atalay, 2007; Boumendjel ve diğerleri, 2009; Anreddy ve diğerleri, 2014; Domenichini ve diğerleri, 2019; Ye ve diğerleri, 2019) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. ABC transport yapısı (Boumendjel ve diğerleri, 2009)

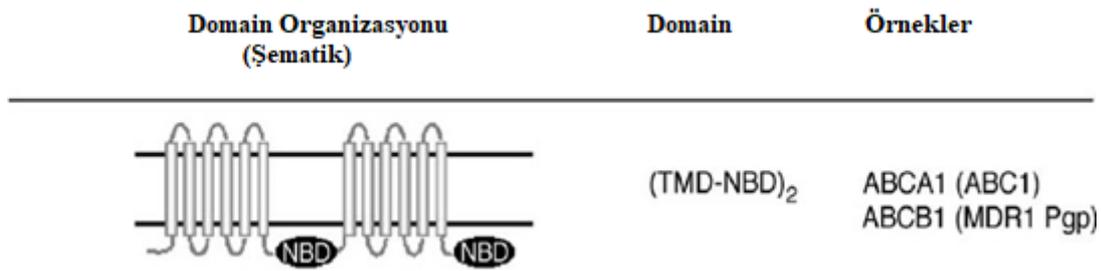
2.13. Meme ve Kolon Kanserinde ABC Taşıyıcı Proteinleri

2.13.1. ABCB1 taşıyıcı proteini (P-gp, MDR1)

ABC (ATP-binding cassette) taşıyıcı ailesinin ilk keşfedilen üyesi olan P-glikoprotein (P-gp), ATP hidrolizine bağımlı olarak çalışan ve efluks (dışa atım) pompası işlevi gören bir membran proteindir (Abaan, Mutlu, Baran, Atalay ve Gunduz, 2009; Fan ve diğerleri, 2018). ABC ailesinin ABCB alt ailesine ait olan P-gp, insanlarda 7q21.1 kromozomunda yer alan MDR1/ABCB1 geni tarafından kodlanmaktadır ve klonlanan ilk ABC taşıyıcısıdır. P-gp 1280 amino asitin birleşmesinden oluşur ve molekül ağırlığı 160-170 kDa'dur. Molekül, altışar transmembranal segment içeren iki transmembranal alan ve iki nükleotid bağlayıcı alandan oluşmaktadır (Atalay, 2007; Pala Kara ve diğerleri, 2013) (Şekil 2.2). ABCB1 böbrek, plasenta, karaciğer, adrenal bezler, bağırsak ve kan-beyin bariyer hücrelerinde bulunan, ksenobiyotiklere ve hücrel toksik maddelere karşı koruma işlevi gören apikal bir membran taşıyıcısıdır (Sauna ve diğerleri, 2001; Gottesman, Fojo ve Bates, 2002; Sarkadi, Homolya, Szakács ve Váradi, 2006; Domenichini ve diğerleri, 2019). ABCB1'in aşırı ekspresyonu, kanser kemoterapisinde kullanılan çok çeşitli bileşiklere anlamlı direnç kazandırır (Sauna, Smith, Müller, Kerr ve Ambudkar, 2001; Peng ve diğerleri, 2011; Figueroa-González, Jacobo-Herrera, Zentella-Dehesa ve Pereda-Miranda, 2012). ABCB1 taşıyıcısı, küçük ve kalın bağırsak epitelyumunun apikal membranında, plasentanın sinsitiotrofoblastında, karaciğer hepatositlerinin safra kanal membranında, böbrek proksimal tübüllerinin apikal zarında ve endotel hücrelerinin luminal yüzeyinde, beyin kılcal damarlar,

testisler de lokalizedir (Mathias, Hitti ve Unadkat, 2005; Zhou, 2008; Anreddy ve diğeri, 2014).

ABCB1'in hücrel lokalizasyonu, eksojen ve endojen toksiklerin hücrelerden idrar ve safraya akmasına aracılık ederek vücuttan atılmalarını teşvik eder (Sarkadi ve diğeri, 2006; Sita, Hrelia, Tarozzi ve Morroni, 2017). ABCB1'in aşırı ekspresyonu, akut miyeloid lösemi, çocukluk çağı tümörleri, meme kanserleri, hematolojik maligniteler ve katı tümörler gibi çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir Taşıyıcı, MDR1 geninde kodlanmıştır (Juliano ve Ling, 1976; Verrelle ve diğeri, 1991; Leighton ve Goldstein, 1995; Schinkel ve diğeri, 1995). İnsanlarda MDR1-ABCB1 bir ilaç taşıyıcı olarak işlev gören MDR1 ve MDR2 ve fosfolipid taşıyıcı olarak MDR2-ABCB1 olmak üzere iki MDR geni bulunmaktadır (Schinkel ve diğeri, 1995; Kuo, 2007; Anreddy ve diğeri, 2014).

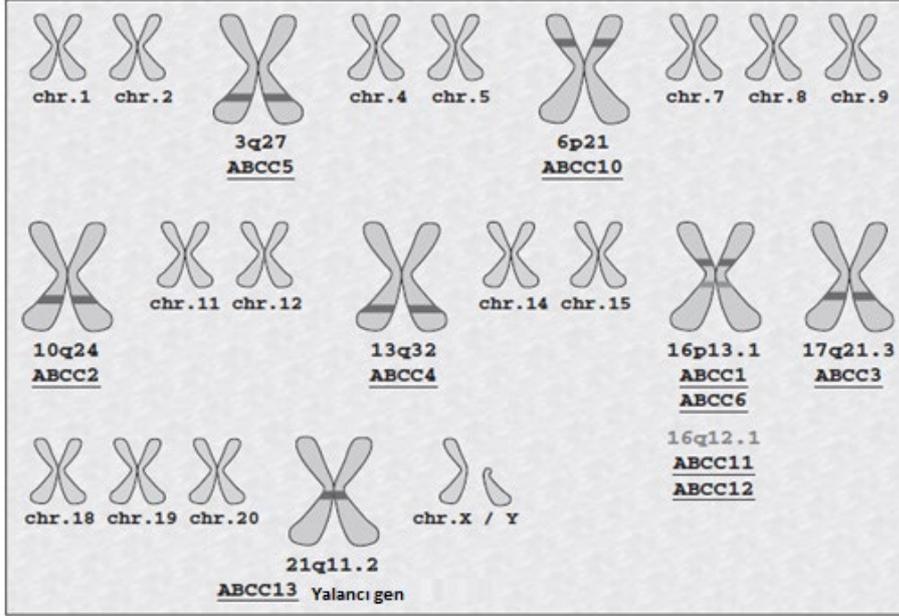


Şekil 2.2. ABCB1/MDR1 yapısı (Pohl, Devaux ve Herrmann, 2005)

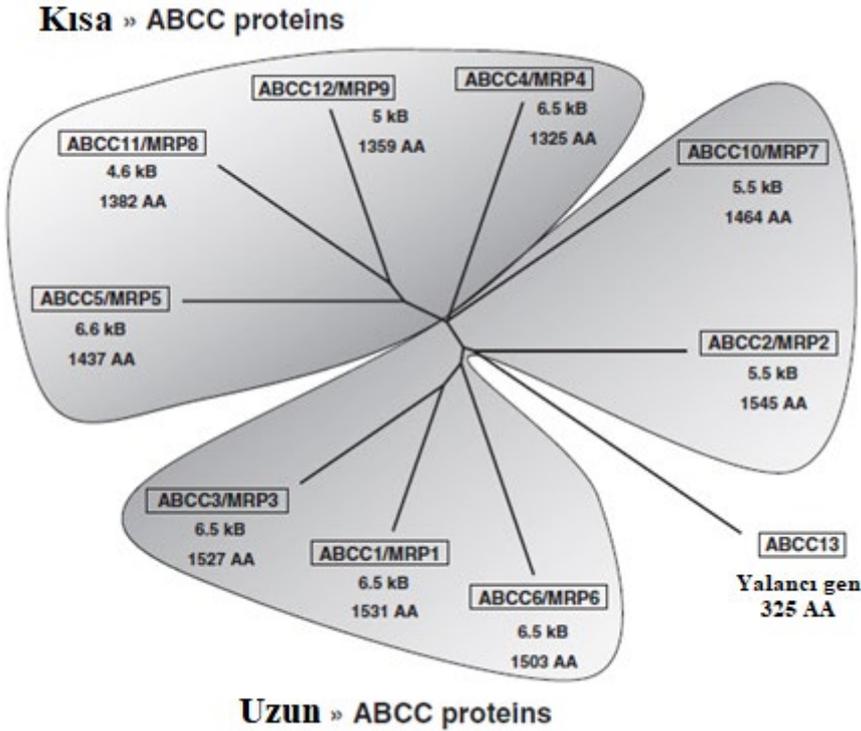
2.13.2. ABCC alt ailesi taşıyıcı proteinleri (MRP'ler)

Çoklu ilaç direnci ilişkili protein (Multidrug Resistance Associated Protein, MRP), ABC taşıyıcı ailesinin ABCC alt ailesine dâhildir. ABCC alt ailesine ait proteinler kromozomun çeşitli bölgelerinde konumlanmıştır (Boumendjel ve diğeri, 2009) (Resim 2.25). ABCC alt ailesi (ABCC genleri), moleküler ağırlıkları 180–195 kDa arasında olan; yapı, membran lokasyonu, substrat özgüllüğü ve afinitesi açısından farklılık gösteren 13 proteinden oluşmaktadır (Bozkurt ve diğeri, 2013) (Resim 2.26). Bunlardan dokuzu MRP ilişkilidir ve MRP1'den MRP9' a kadar isimlendirilmiştir (sırasıyla ABCC1-6 ve ABCC10-12). Diğer üçü ise kistik fibrozis transmembran kondüktans düzenleyici proteini (CFTR/ABCC7) ve sülfonilüre reseptörleridir (SUR1/ABCC8 ve SUR2/ABCC9). MRP1-9'da şekilsel ve fonksiyonel benzerlikler bulunmaktadır. Herbirinde iki tane çoklu membrana bağlanan alan [membran bağlanma domaini (MBD)] bulunmaktadır. Bunlara ek olarak MRP1-3, 6 ve 7'de

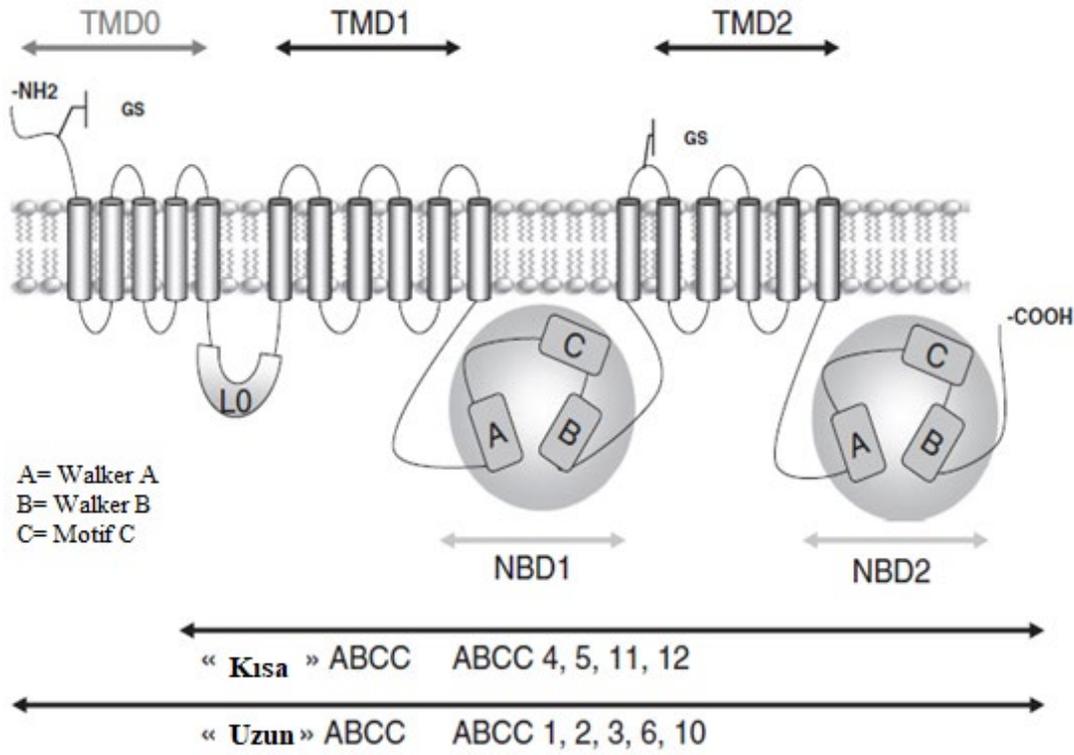
ek bir MSD daha bulunmaktadır (MSD0) (Toyota ve diğçerleri, 2008; Pala Kara ve diğçerleri, 2013) (Şekil 2.3). İnsan dokularının birçoğunda ABCC proteinlerinin ekspresyonu görölmektedir (Boumendjel ve diğçerleri, 2009) (Resim 2.27).



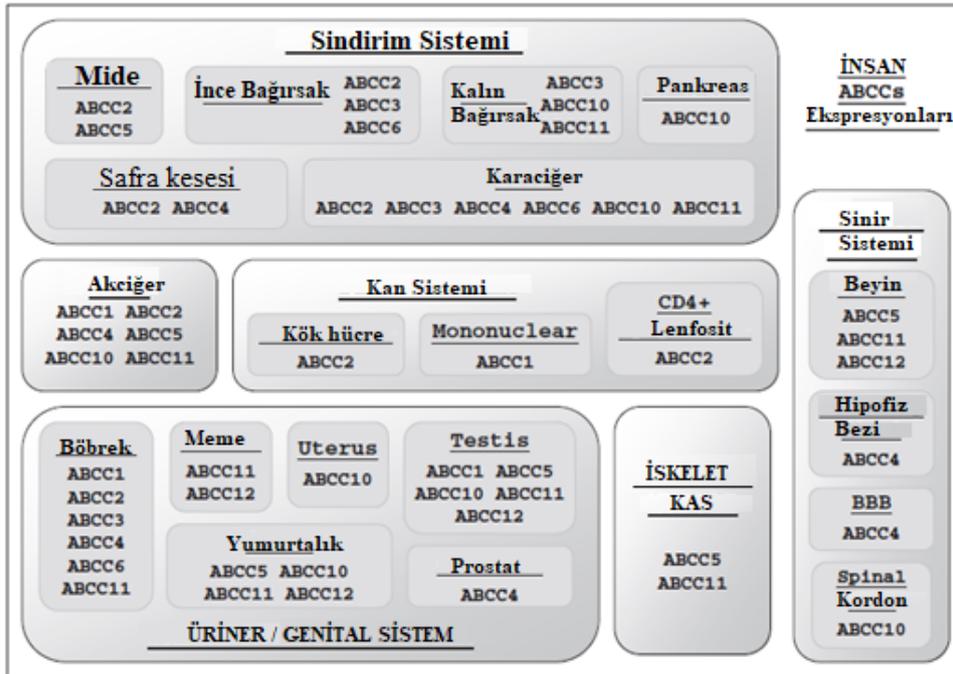
Resim 2.25. ABCC'lerin kromozomdaki lokasyonları (Boumendjel ve diğçerleri, 2009).



Resim 2.26. ABCC'lerin sınıflandırılması (Boumendjel ve diğçerleri, 2009).



Şekil 2.3. ABCC'lerin genel yapısı (Boumendjel ve diğerleri, 2009).



Resim 2.27. ABCC proteinlerinin insan dokularında ekspresyonları (Boumendjel ve diğerleri, 2009).

Beyin tümörlerinde, bilhassa glioblastomalarda, ABCC geninin aşırı ifadesinin çoklu ilaç direnciyle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. P-gp proteininin sentezlenmediği kanser hücrelerinde ABCC proteinlerinin yüksek miktarda sentezlendiği gösterilmiştir (Bozkurt ve diğerleri, 2013). Abe ve arkadaşlarının insan glioblastoma hücre kültürlerinde yaptığı bir çalışmada; ABCC mRNA düzeyleriyle, vinkristin ve etoposid kemoterapötik ajanlarına karşı gelişen direnç arasında korelasyon tespit edilmiştir (Abe ve diğerleri, 1994; Benyahia ve diğerleri, 2004). ABCC2 ve ABCC3'ün ise doksorubisin, epirubisin, vinkristin, vinblastin ve etoposid gibi kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen ilaç direncinde rol aldığı gösterilmiştir (Borst, Zelcer ve van Helvoort, 2000). ABCC4 geni susturulmuş farelerde yapılan çalışmalarda, Topotekan'ın (topoizomeraz inhibitörü) beyin hücrelerine alımında artış tespit edilmiştir (Leggas ve diğerleri, 2004). Ayrıca farklı evrelerdeki glioblastomalı hastalardan alınan dokularda yapılan diğer bir çalışmada, farklı evrelerdeki gliomlarda ABCC1 mRNA düzeylerinin de farklılaştığı gösterilmiştir. Bu düzeylerin normal beyin dokularında en az olmasına karşın, ileri evredeki malign glioblastomalarda en üst seviyede olduğu tespit edilmiştir (Abe ve diğerleri, 1994; Bronger ve diğerleri, 2005; Bozkurt ve diğerleri, 2013; Boumendjel ve diğerleri, 2009).

ABCC3 (MRP3)

İnsan, sıçan ve fare ile klonlanmış karaciğer, bağırsak ve adrenal bezde tespit edilen ABCC3, intrahepatik safra kanalı epitel hücrelerinin (kolanjiyositler) bazolateral membranlarında, portal yolları çevreleyen hepatositlerde ve bağırsak epitel hücrelerinde bulunmaktadır. ABCC3'ün ekspresyonu kolonda ileumda olduğundan daha yüksektir. Bundan başka, ABCB1'in en yüksek ekspresyon gösterdiği terminal ileum haricinde, insan bağırsağının incelenen kısımlarında ABCC3'ün en fazla eksprese edilen taşıyıcı olduğu görülmüştür (Boumendjel ve diğerleri, 2009). ABCC3'ün MDR aracılı küçük hücreli akciğer kanseri (KHDAK), meme kanseri, prostat kanseri, kolorektal kanser, yumurtalık kanseri ve tüm akut lenfoblastik lösemide önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Choi, 2005; Kruh, Guo, Hopper-Borge, Belinsky ve Chen, 2007; Sodani, Patel, Kathawala ve Chen, 2012; Anreddy ve diğerleri, 2014; Domenichini ve diğerleri, 2019).

ABCC10 (MRP7)

Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu kullanarak ABCC10 transkriptleri, pankreas, testis, kolon, omurilik, bademcikler, akciğer, trakea ve ciltte nispeten daha yüksek seviyelerde bildirilen çoğu dokuda tespit edilmiştir. Bağırsak, yumurtalık, rahim, karaciğer ve plasentada orta derecede ekspresyon tespit edilmiştir. Testis, yumurtalık, bağırsak, böbrek ve akciğerde en yüksek seviyelerde bulunan birçok dokuda transkripsiyonu eksprese edilmektedir. Müren balığı (muraenidae) ve insanda ki ABCC10'un % 84 oranında amino asit benzerliği bulunmaktadır (Boumendjel ve diğerleri, 2009). Ayrıca, son bulgular ABCC10 (MRP7)'in çeşitli antikanser ilaçlara direnç sağlamada rol oynayan fonksiyonel taşıyıcılar olduğunu göstermiştir. Hopper ve diğerleri çalışmalarında; ters transkripsiyon-PCR analizi kullanılarak cilt, testis, dalak, mide, kolon, böbrek, kalp ve beyinde düşük düzeyde MRP7 transkripsiyon ekspresyonu bildirilmiştir (Hopper ve diğerleri, 2001; Choi, 2005; Kruh ve diğerleri, 2007; Anreddy ve diğerleri, 2014; Domenichini ve diğerleri, 2019).

ABCC11 (MRP8)

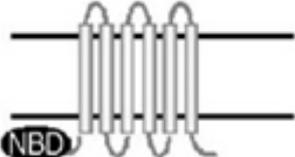
Dokularda ABCC11 transkript ekspresyonu ile çelişen verilere rağmen ABCC11 seviyeleri, normal göğüs, yumurtalık, akciğer, testis, böbrek, karaciğer, kolon ve beyin dâhil olmak üzere çeşitli insan dokularında eksprese edilmektedir. Transfekte MDCKII ve HepG2 hücrelerinde, ABCC11 apikal kutupta lokalizedir (Boumendjel ve diğerleri, 2009). Ayrıca, son bulgular ABCC11 (MRP8) 'in çeşitli antikanser ilaçlara direnç sağlamada rol oynayan fonksiyonel taşıyıcılar olduğunu göstermiştir (Choi, 2005; Kruh ve diğerleri, 2007; Kuang ve diğerleri, 2010; Anreddy ve diğerleri, 2014; Lang, Wu, Pan, Qu ve Zhang, 2018).

2.13.3.ABCG2 taşıyıcı proteini (BCRP)

Meme kanseri direnç proteini (Breast cancer resistance protein- BCRP/ABCG2), ABC ailesinin en son keşfedilen üyesidir. İlk olarak 1998 yılında Doyle ve diğerleri tarafından doksorubisine dirençli MCF7 meme kanseri hücre dizisinden (MCF-7/AdrVp) klonlanmıştır ve bu sebeple meme kanseri direnç proteini adını almıştır. ABC ailesinin ABCG alt ailesine ait olan BCRP geni, insanlarda 4q22 kromozomunda bulunmaktadır. 655 amino asit içeren BCRP proteini, 72 kDa ağırlığındadır ve tek NH₂-terminal sitozolik nükleotid bağlayıcı ve altı transmembranal segmentten oluşan tek bir transmembranal alan içermektedir (Doyle ve

diğerleri, 1998; Chearwae, Shukla, Limtrakul ve Ambudkar 2006; Atalay, 2007; Matsuo ve diğerleri, 2011; Pala Kara ve diğerleri, 2013; Anreddy ve diğerleri, 2014; Fan ve diğerleri, 2018) (Şekil 2.4). Farelerdeki BCRP1 geni ile insandaki BCRP arasında % 81 homoloji bulunmaktadır. İnsandaki BCRP taşıyıcı proteinin ATP bağımlı efluks (dışa atım) pompası substratı olan ilaçlara karşı dirence neden olduğu bilinmektedir. BCRP/BCRP1, hidrofobik bileşikler, zayıf bazlar, organik anyonlar, birçok endojen ve eksojen moleküllerin glukuronid, sülfat ve glutatyon konjugatları da dâhil, geniş substrat seçiciliği yüksek olan bir taşıyıcı proteindir. BCRP ile P-gp ve MRP2 taşıyıcı proteinleri arasındaki substrat benzerliği oldukça fazladır (Pala Kara ve diğerleri, 2013; Anreddy ve diğerleri, 2014).

ABCG2, esas olarak plazma zarında bulunan ve plasentada, ince bağırsakların apikal yüzeyinde, kolon epitelinde, karaciğer kanaliküler zarında, insan beyninin mikrodamar endotelinin lüminal yüzeylerinde, kan damarlarında ve kılcal damarlarda yaygın bir taşıyıcıdır (Doyle ve diğerleri, 1998; Rocchi ve diğerleri, 2000; Maliepaard ve diğerleri, 2001; Cooray, Blackmore, Maskell ve Barrand 2002; Choi, 2005; Anreddy ve diğerleri, 2014; Domenichini ve diğerleri, 2019). Geniş dağılımı ve ekspresyonu, fetüsün ve yetişkinin toksinlere ve ksenobiyotiklere karşı korunmasında rol oynadığını düşündürmektedir (Schinkel ve Jonker, 2012; Anreddy ve diğerleri, 2014).

Domain Organizasyonu (Şematik)	Domain	Örnekler
	NBD-TMD	ABCG2 (BCRP1)

Şekil 2.4. ABCG2/BCRP yapısı (Pohl ve diğerleri, 2005)

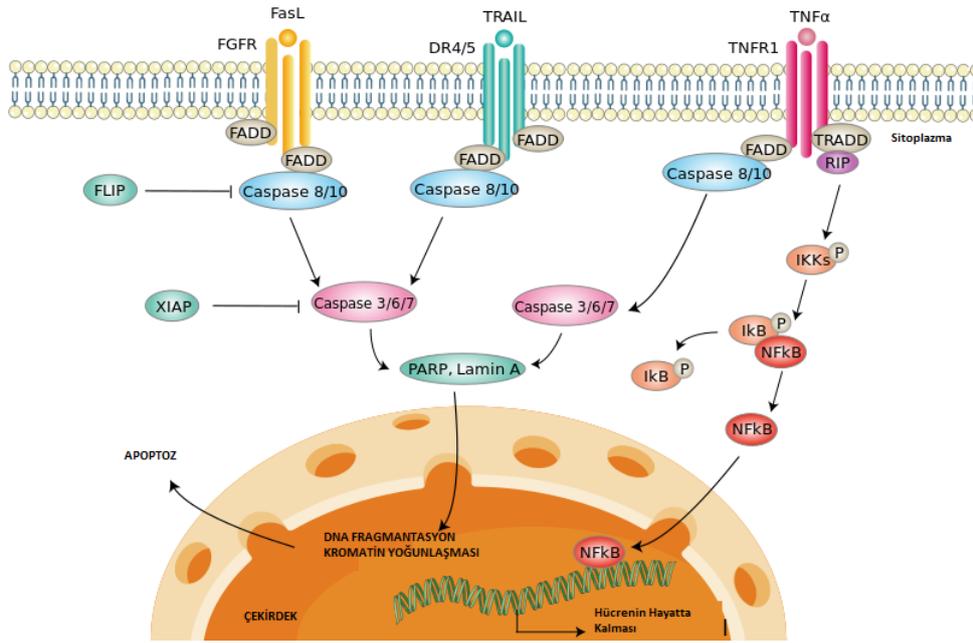
2.14. Kanser ve Apoptoz

Apoptoz, embriyonik gelişim ve yetişkin doku homeostazında kritik rol oynayan kontrollü hücre eliminasyonunun bir metazoan işlemidir (Ashkenazi, 2015). Programlanmış hücre ölümünün veya apoptozun inaktivasyonu, kanser gelişiminin merkezinde yer almaktadır (Brown ve Attardi, 2005; Jan ve Chaudhry, 2019). Apoptoz, doku homeostazında hastalıklı

ve gereksiz veya başka bir şekilde faydalı amaçlarına hizmet etmiş olan anormal hücrelerin ortadan kaldırılmasında kritik ve doğal bir fizyolojik rol oynamaktadır. Apoptoz gelişimsel sinyaller, hücresel stres ve hücre döngüsünün bozulması dâhil olmak üzere çeşitli uyaranlarla başlatılabilir. Ayrıca, apoptozun uygulanması, karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri içeren nispeten biçimsiz bir sinyal işlemidir. Tümörlerde hücre ölüm mekanizmalarını hedefleyen ve doğrudan hedef ilaçların geliştirilmesi, kanser tedavisinin önemli bir yolunu oluşturmaktadır (Karna ve Yang, 2009).

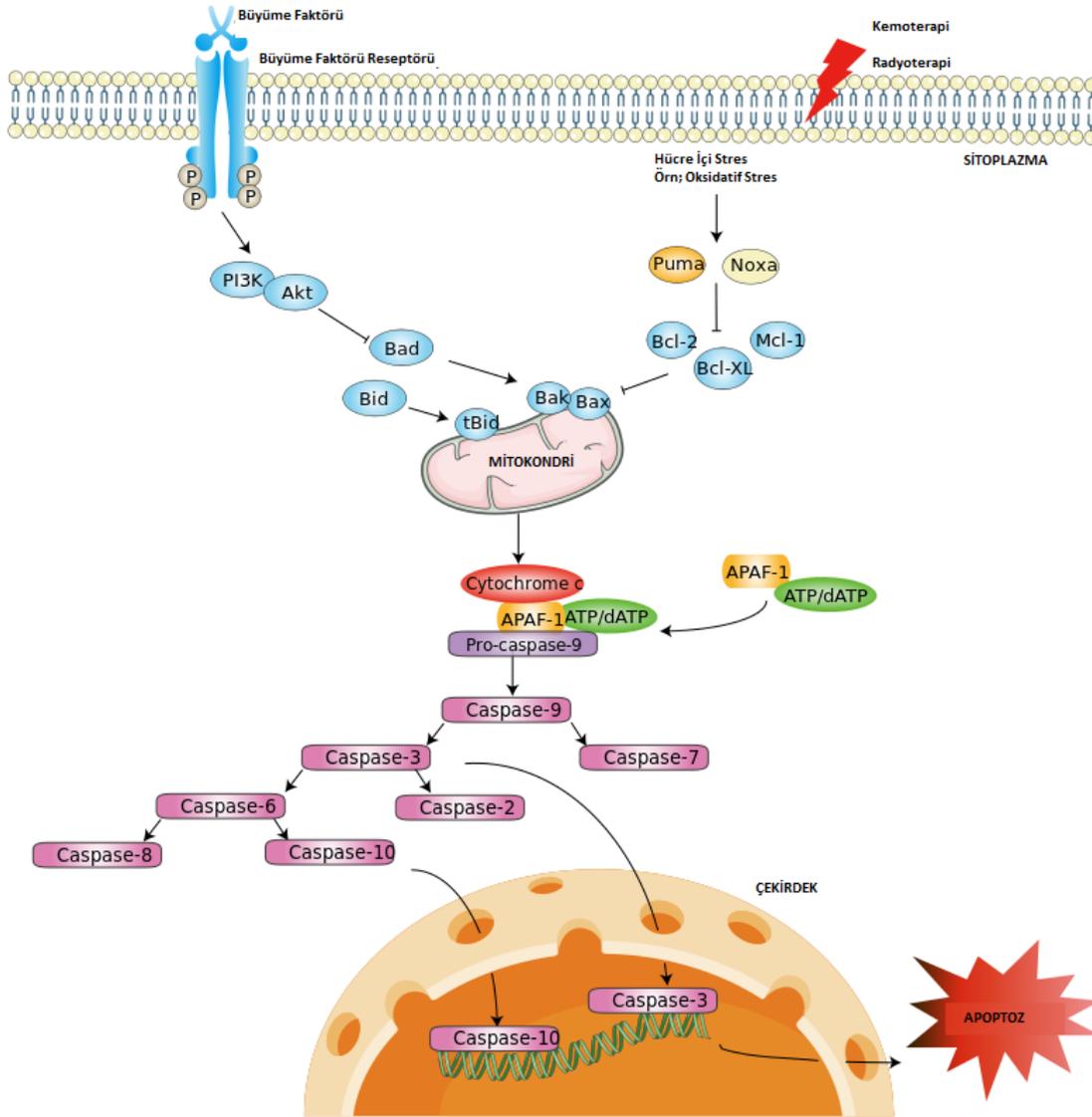
Apoptoz düzensizliği, kanser de dâhil olmak üzere birçok önemli hastalığa katkıda bulunmaktadır. İki ayrı ama birbirine bağlı olan sinyal yolu, kaspaz adı verilen ölüm proteazlarının çekirdek hücre içi mekanizmasını aktive ederek apoptozu kontrol etmektedir. İçsel apoptotik yol, ciddi hücre hasara veya strese tepki olarak BCL-2 protein ailesinin üyeleri ve mitokondri yoluyla kaspazlarla etkileşime girer. Dışsal yol, bağışıklık efektör hücreleri üzerinde eksprese edilen kognat ölüm ligandlarına cevap veren hücre yüzeyi ölüm reseptörleri yoluyla kaspazları aktive etmektedir (Debatin, 2004; Fulda, 2013; Ashkenazi, 2015; Jan ve Chaudhry, 2019). Apoptoz, ölüm reseptörü (dışsal) yoluyla ve mitokondri bağımlı (içsel) yolla olmak üzere iki şekilde başlatılmaktadır. Dışsal yol, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanan ligandların kaspaz-8'i aktive etmesiyle başlamaktadır. İçsel yol ise mitokondriden salınan sitokrom C'nin sitoplazmada apoptozom oluşumuna neden olarak sırasıyla kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olmaktadır. Kaspaz-3 ise efektör kaspazları keserek hücreyi ölüme götürmektedir (Wei, Jin, Cao ve Li, 2016). Kanser ilk olarak, hücre kütesinin artmasına ve birikmesine yol açan hızlandırılmış ve düzensiz hücre proliferasyonuna bağlandığı daha sonra, bazı kanserlerin, artan hücre proliferasyon hızından ziyade fizyolojik hücre ölümü eksikliğinden (hücre intihar veya apoptoz olarak da bilinir) kaynaklandığı bulunmuştur (Burz, Berindan-Neagoe, Balacescu ve Irimie, 2009). Günümüzde, iyi tanımlanmış iki apoptotik sinyal yolunun düzensizliği; ekstrinsik / ölüm reseptörleri ve intrinsik / mitokondriyal yol, kanser tedavisinde üstesinden gelinmesi gereken klinik problem olarak kabul edilmektedir (Debatin, 2004; Fulda, 2013; Belkacemi, 2018). Dışsal apoptotik yollar; dışsal apoptotik sinyalleme yollarına veya ölüm reseptör yollarına, hücre ölüm efektörlerinin aktivitesi için ligand-reseptör etkileşimlerine bağlı olan zar-ötesi ölüm reseptörleri aracılık etmektedir (Elmore, 2007). Bu reseptörler, Tümör Nekroz Faktörü (TNF) reseptör geni süper ailesinin bir parçasıdır. TNF, sitokinlerin TNF süper ailesinin (TNFSF) kurucu üyesidir. TNFSF ligandları için reseptörler, TNF reseptörü süper familyası (TNFRSF) olarak bilinmektedir. Bazıları hücre ölümünü indükleyebilir. Çünkü sitoplazmik

ölüm alanı (DD) içerirler. DD'nin varlığı TNFRSF'nin ölüm reseptörleri olarak bilinen bir alt grubunu tanımlamaktadır. En iyi karakterize edilmiş ligandlar ve karşılık gelen ölüm reseptörleri; FasL / Fas (Apo1 veya CD95 olarak da bilinir), TNF- α / TNFR1, Apo3L / DR3 (Apo3 olarak da bilinir), Apo2L / DR4 (ayrıca Apo2, TRAILR1, Apo2L / DR5 (Apo2, TRAILR2 olarak da bilinir)'dir (Chicheportiche ve diğerleri, 1997; Ashkenazi ve Dixit, 1998; Debatin, 2004; Karna ve Yang, 2009; Plati, Bucur ve Khosravi-Far, 2011; Fulda, 2013; Belkacemi, 2018; Pfeffer ve Singh, 2018; Jan ve Chaudhry, 2019) (Resim 2.28).



Resim 2.28. Apoptoz ve dışsal yollar (<https://www.creative-diagnostics.com/extrinsic-apoptosis-pathway.htm>)

İçsel apoptotik yollar; mitokondri tarafından kontrol edilen hücre içi sinyalleri çoğaltmaktadır. Bu, iç yollar mitokondriyal membranın değişmesine, mitokondriyal zarda potansiyel kaybına ve sitokrom C ve SMAC / DİABLO'nun mitokondriden salınımını işaret etmektedir (Du, Fang, Li, Li ve Wang, 2000). Bundan sonra sitokrom C, apoptozom oluşturmak için Apaf-1'in yanı sıra prokaspaz-9'u bağlar ve (Hill, Adrain, Duriez, Creagh ve Martin, 2004) kaspaz-9 aktivasyonuna neden olmaktadır (van Loo ve diğerleri, 2002; Debatin, 2004; Schimmer, 2004; Karna ve Yang, 2009; Plati ve diğerleri, 2011; Fulda, 2013; Belkacemi, 2018; Pfeffer ve Singh, 2018) (Resim 2.29). Apoptoz, hedef proteinleri parçalayan bir sistein proteinleri sınıfı olan kaspazlar (sistein aspartil-spesifik proteazlar) tarafından gerçekleştirilmektedir (Kerr, 1972; Pfeffer ve Singh, 2018).



Resim 2.29. Apoptoz ve içsel yollar (<https://www.creative-diagnostics.com/intrinsic-apoptosis-pathway.htm>)

Model organizmalardaki temel bulgular, mitokondriyal dış zarın geçirgenliğini kontrol ederek apoptoza olan bağlılığı düzenleyen bir protein ailesini, BCL-2 ailesini ortaya çıkarmak için klinik sitogenetikteki bulgularla birleştirilmiştir (Letai, 2017). Apoptoz ve BCL-2 ailesi artık insan kanserine ayrılmaz bir şekilde bağlı gibi görünse de, bu bağlantı apoptozun erken çalışmalarında net değildi (Kerr, 1972; Letai, 2017). Apoptozu (Yunanca da “ağaçtan yapraklar gibi“ düşme) çeşitli memeli doku kesitlerinde gözlemledikleri morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü paterniyle ilişkilendirmeyi önermişlerdir. Gözlemledikleri apoptoz, nükleer yoğunlaşma ve hücresel fragmentasyon ile karakterize edilmiştir, ardından fragmanların yakındaki hücreler tarafından fagositozu izlenmiştir (Letai, 2017).

2.15. Kanser ve Apoptotik Sinyal Yolakları

Kanser gelişiminde, apoptoz ve hücre proliferasyonu arasında ciddi bir ilişki bulunmaktadır. Hücre siklusunun sorunsuz olarak çalışması, hücre büyümesi ve hücre proliferasyonu için önemlidir (Yu ve diğerleri, 2005; Tian ve diğerleri, 2015;). Genomik mutasyonlar olduğu kadar mitokondriyel mutasyonlar da kanserlere sebep olmaktadır (Segal ve Saltz, 2007; Ekmekçi, Tanyolac ve Ayhan, 2008).

Meme kanserindeki temel genetik kusurlar; TP53 (p53), PTEN (fosfataz ve tensin homoloğu), Rb (retinoblastom geni), BRCA-1 (meme kanseri duyarlılık geni-1), BRCA-2 (meme kanseri duyarlılık geni-2) gibi tümör baskılayıcı genlerdeki heterozigotluğun kaybolması (LOH) ya da c-erbB-2 ve c-Myc (myelositomatozis selüler onkogen) gibi onkogenlerdeki amplifikasyonlardır (Lee ve Muller, 2010). Apoptoz; hücrelerde cep oluşturması, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu gibi morfolojik değişiklikler ile sistein proteazlarının aktivasyonu ile karakterizedir (Lee ve diğerleri, 2005).

Apoptotik hücre ölümünde sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya geçmesi, MMP (mitokondriyal membran potansiyeli), BCL-2 protein ailesi tarafından yönetilmektedir (Chandrupa ve diğerleri, 2014). Apoptozun kontrolü, antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan ve apoptozu düzenlemede görevli bir onkoprotein grubu olan BCL-2 protein ailesidir (Vargas ve Burd, 2010; Cort, Özben, Saso, De Luca ve Korkina, 2016). BCL-2, BCL-XL ve BCL-W anti-apoptotik üyeleri BAX / BAK'ın aktivasyonunu inhibe ederken, BAD, BİD, BİK ve BİM pro-apoptotik üyeleri ise BAX / BAK aktivasyonunu teşvik eder (O'Neill, Huang, Zhang, Chen ve Luo, 2016; Zhang, Huang, O'Neill, Pang ve Luo, 2016). BAD, PKA (Protein Kinaz A) tarafından Ser112'de ve AKT tarafından Ser136'da fosforile edilmektedir (Thejver ve diğerleri, 2020).

Hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğinin belirlenmesinde hücre içi BCL-2/BAX oranı son derece önemlidir. Eğer BAX fazla ise hücre apoptoza gidecektir, BCL-2 fazla ise apoptoz inhibe edilecektir. Kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen dirençte, apoptotik hücre ölümünü engelleyici faktörlerin de etkili rol oynadığı tespit edilmiştir (Lee ve diğerleri, 2005; Vargas ve Burd, 2010; Bozkurt ve diğerleri, 2013). Kaspazlar hücreyi apoptozdan koruyan proteinleri ortadan kaldıran veya inaktive eden bir protein grubudur. Ayrıca apoptozu inhibe

eden negatif regülatörleri de yıkarak hücre ölümünü tetiklemektedirler. Kaspazlar sistein aspartat proteazlardır ve bunlardan kaspaz 3 birçok ligandı kendisine hedef seçerek parçalanmalarına neden olur. Bunun sonucunda, DNA ve çekirdek fragmentasyonu, hücre zarında balonlaşma ile meydana gelen apoptotik yapılar ile hücrenin apoptotik ölümü gerçekleşir (Vargas ve Burd, 2010; Gedikli, 2013). Apoptozda yer alan proapoptotik ve antiapoptotik mekanizmalarda görevli proteinler hedeflenerek yapılan çalışmalar, kanser tedavisinde umut verici gelişmeler olarak görülmektedir. Hücrenin apoptoza gitmesinde birçok sinyal protein önemli rol oynamaktadır. Bu proteinlere örnek olarak; PKC, PI3K, PTEN, mTOR (rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi), Akt (protein kinaz B), p38, MAPK (mitojen aktif protein kinaz), JNK (c-Jun N-terminal kinaz) gibi moleküller verilebilir. Kaspaz aktivitesini ve Ras sinyal yolunu hedefleyen bileşikler, BCL-2 (B-hücreli lenfoma-2) kontrol noktasına müdahale eden moleküller, p53 antagonistleri gibi bazı potansiyel ilaçlar geliştirilme aşamasındadır. Bu moleküllerin tek başına ya da kombine olarak terapötik ajanlarla birlikte kullanımı kanser tedavisi için önerilmektedir (Muşdal, 2012).

İnsan kaspaz 8 ve 9 enzimlerinde CARD (kaspaz aktivasyonu ve güçlendirme bölgesi) kısımları vardır. Bu sayede, adaptör proteinleri ile etkileşerek ölüm reseptör kompleksine bağlanabilir (Parrish, Freel ve Kornbluth, 2013). Kaspaz 8, birçok ölüm ligand reseptöre sinyal komplekslerinin bağlanması yolu ile aktive olmaktadır. Bu reseptörler, sinir büyüme faktörü (NGF) ve tümör nekrozis faktör (TNF) ailesindedir ve TNF α , FasL (Fas ligand) ile TRAIL (tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand) içerirler. Prokaspaz 8'in N-terminal prodomain kısmında iki ölüm efektör bölgesi (DED) homologu bulunmaktadır. Prokaspaz 8 reseptör ilişkili adaptöre (Mort 1) bağlanır ve bu yolla DED kısımlarının homofilik etkileşimlerine neden olmaktadır. Proenzimin bağlanması proteolitik sürece ve aktivasyona yol açar, böylece otokataliz veya ilgili kaspazlar ile etkileşim açığa çıkmaktadır. Aktivasyondan sonra, kaspaz 8 apoptotik sinyali artırmaktadır, artan sinyal sonucunda da kaspaz 3 aktivasyonu proteolitik yolla sağlanır ya da indirekt olarak kesme ve aktivasyon yoluyla BİD üzerinden sağlanmaktadır. BİD, mitokondriyal sitokrom C salınımına ve kaspaz 9 aktivasyonuna yol açmaktadır (Kim ve diğerleri, 2001; Meller, Skradski, Simon ve Henshall, 2002).

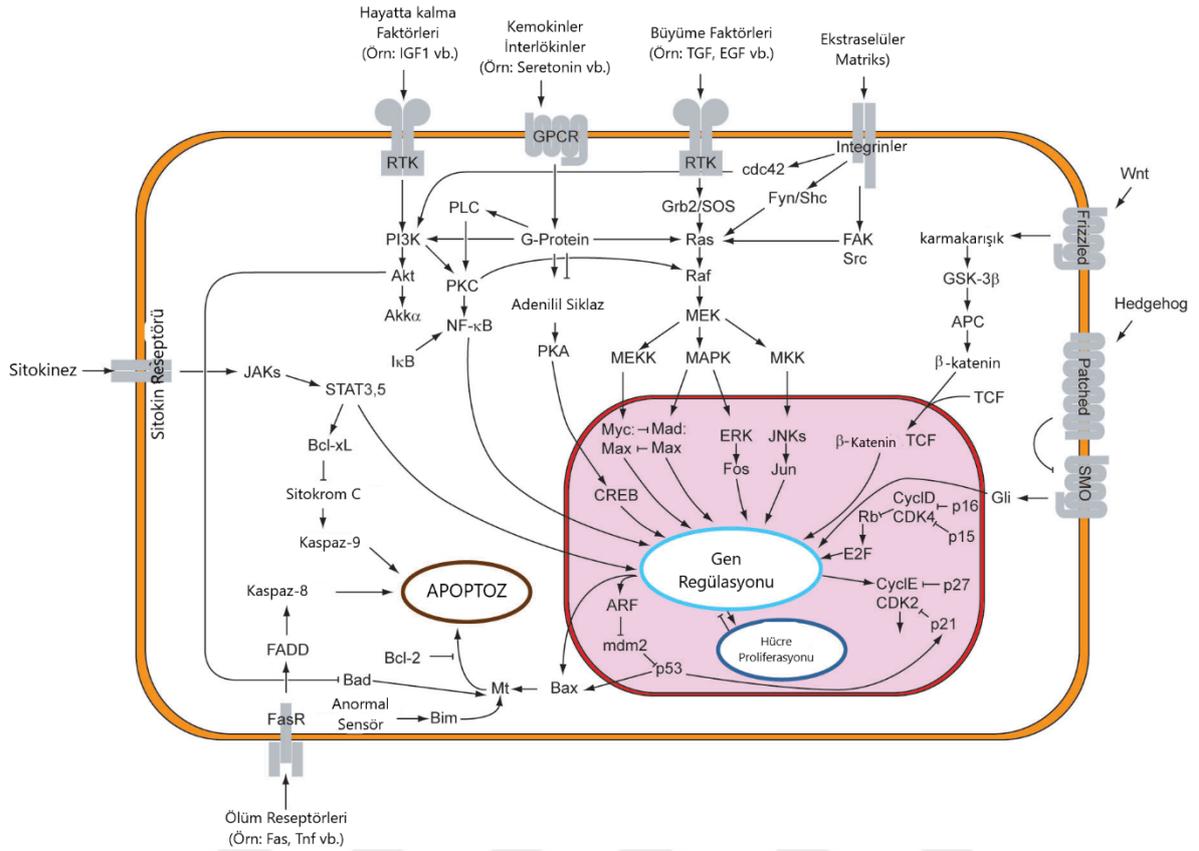
U.V ışığı, kimyasal maddeler, DNA hasarına yol açan ajanlar ve çeşitli kemoterapötikler apoptozu başlatmaktadır. Burada mitokondriyal hasara bağlı sitokrom C'nin sitoplazmaya

salınımı yoluyla kaspaz 9 aktivasyonu sağlanmaktadır. Memelilerde CED-4 (kaspaz efektör bölgesi-4) homologu olan Apaf-1 (apoptoz aktive edici faktör-1) sitokrom C'ye bağlanır, bu da dATP veya ATP bağlanmasını uyarmaktadır. Apaf-1/Sitokrom C/dATP kompleksi "Apoptozom" adını almaktadır. Prokaspaz 9, bu kompleksi CARD ile Apaf-1 arasındaki homofilik iç etkileşimler yolu ile bağlar. Otoproses sonucu olgun kaspaz 9, 35 kDa geniş alt ünite ve buna N-terminal prodomain kısmına 12 kD küçük alt ünite eklenmesi ile meydana gelir ve aktif enzim oluşturmaktadır. Bu apoptozom ile bağlı kaspaz 9, prokaspaz 3 gibi kaspaz zimojenlerinin aktivasyon sürecini başlatmaktadır (Salvesen ve Dixit, 1999). Kaspaz 3, 6 ve 7 efektör grubu oluşturup başlatıcı kaspazlardan 8 veya 9 tarafından "aşağı akış" yolu ile aktive olmaktadır ve fonksiyonları hücrelerdeki hedef proteinleri (non-kaspaz) özel yerlerinden kesmektedir. Bu hedefler arasında klasik bir örnek; poly (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1) enziminin kaspaz 3 veya 7 tarafından kesilmesidir ya da Lamin-A'nın kaspaz 6 tarafından kesilmesidir. Bugün itibariyle 17 kaspaz hedefi bilinmektedir. Kaspazların kesme işlemi tek bir noktada, hedefe çeşitli yollarla direk veya indirek etki ederek olmaktadır. Örneğin; endonükleaz CAD (kaspaz aktive edici deoksirübonükleaz) inhibitörü olan ICAD (kaspaz aktive edici deoksirübonükleaz inhibitörü) kesildiği zaman aktive olmaktadır ve kesilen aktif fragment ortama salınmaktadır. Öte yandan, PARP'ın elimine edilmesi DNA tamirinde bozukluğa yol açmaktadır. Sonuç olarak; tüm bu kesilme işlemleri fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler yaparak apoptotik hücrelerin oluşumuna yol açmaktadır (Kim ve diğerleri, 2001; Elmore, 2007) (Resim 2.30).

En yaygın dağılım gösteren hücre bölünme inhibitörü ve apoptoz indükleyicisi (TP53) p53'tür. Bunun nedeni, değişik kaynaklardan sinyalleri alıp büyüme duraklamasına neden olabilmesi ve apoptoz için önemli birçok geni aktive edebilmesidir. Normal büyüme ve onkogenik sinyal yolları TP53 gen ekspresyonunu azaltmak için STAT3'ü kullanırlar. Bu durum, p53 mutasyonları ya da p53 ile etkileşen ARF ve MDM2 gibi proteinlerde mutasyonlar olmadan normal hücre bölünmesinin ve tümöral gelişimin gerçekleşebildiğinin bir açıklaması olabilmektedir. TP53 mutasyonu her ne kadar insan tümörlerinin yarısında görülse dahi, ARF veya MDM2 fonksiyonunu bozan mutasyonlar sadece bazı kanserlerde görülmektedir; birçok kanser bu mutasyonları taşımadıkları halde azalmış p53 ekspresyonu göstermektedir. Örneğin, meme kanserlerinin % 80'inde RNA düzeyinde azalmış TP53 ekspresyonu gösterilmesine karşılık TP53 mutasyonuna rastlanılmamıştır. Ancak, STAT3 sinyalleşmesi engellendiğinde, p53 fonksiyonu tekrardan geri kazanılıp, p53-aracılı tümör hücre apoptozu gerçekleştirilebilmiştir. Bu özellik, düşük düzeyde p53 ifade eden değişik

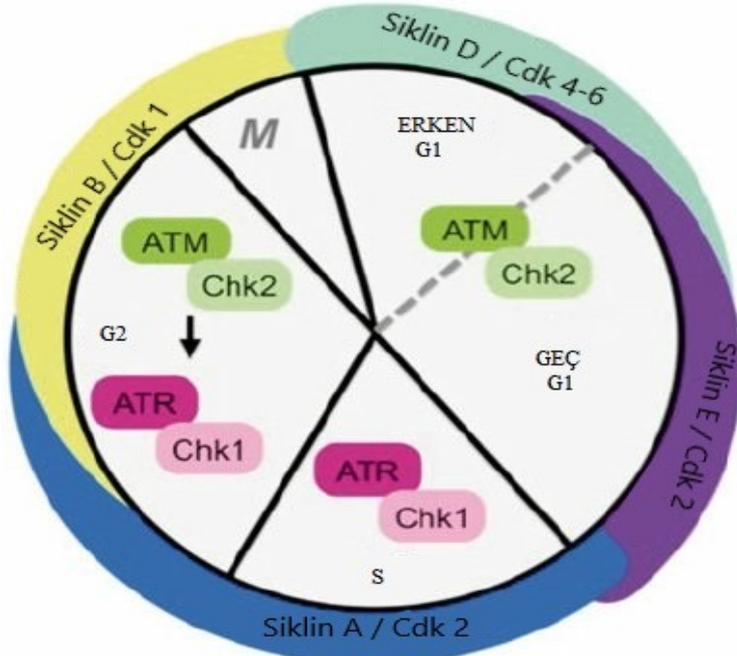
kanser hücrelerindeki p53 fonksiyonunu geri kazanabilmek için olası bir yolu teşkil edebilmektedir (Perry, 2010; Pascal ve diğerleri, 2018). Tümör baskılayıcı proteinler hücre döngüsünü düzenler ve/veya apoptozu teşvik etmektedir. Tümör baskılayıcı genlerden p53 ve proto-onkogen BAX (BCL-2 ilişkili X proteini) apoptozu indüklediği bilinen ve en yoğun çalışılan genler arasındadır. p53 genetik mutasyonu ve genomik kararsızlığı önlemektedir. Ayrıca p53 birçok preoksidan ve antioksidan genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Düşük regülasyon ve p53 kaybı, redoks dengesizliği, ROS üretiminin artması, mutajenez ve agresif tümör gelişimi ile ilişkilidir (Tanigawa, Fujii ve Hou, 2008). Genellikle p53, kanser hücrelerinde, özellikle MDR kanser hücrelerinde upregüle etmektedir veya mutasyona uğramaktadır (Stiewe ve Haran, 2018; Ye ve diğerleri, 2019). Bugüne kadar, N ve C - terminus bölgelerinde spesifik serin / treonin kalıntılarında apoptoz için p53'ü fosforile etmek için 10 kinaz tanımlanmıştır. Apoptoz için dokuz fosforilasyon bölgesi (serin 20, 33, 46, 366 ve 392 ve treonin 81, 304, 377 ve 387) tespit edilmiştir (Yogosawa ve Yoshida, 2018).

Rel / NF-kappaB (NF-κB) transkripsiyon faktörleri, programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) anahtar regülatörleridir. Aktiviteleri, çeşitli dokularda normal gelişim ve homeostaz için önemli fizyolojik ilgiye sahiptir ve önemli patolojik sonuçlar, hepatosit apoptozu, nörodejenerasyon ve kanser dâhil olmak üzere anormal NF-kappaB aktivitesi ile ilişkilidir. NF-kappaB en iyi proapoptotik uyarılara yanıt olarak koruyucu aktivitesi ile karakterize edilirken, programlanmış nekrozun baskılanmasındaki rolü daha yakın zamanda ortaya çıkmıştır. NF-kappaB en çok antiapoptotik proteinlerin ve antioksidan moleküllerin ekspresyonunu aktive ederek programlanmış hücre ölümünü antagonize eder, ancak belirli koşullar altında ve belirli hücre tiplerinde apoptozu da teşvik etmektedir (Fan, Dutta, Gupta, Fan, ve Gélinas, 2008). Memeli NF-κB ailesi 5 üye içermektedir. Bunlar; NF-κB1 (p105 ve p50), NF-κB2 (p100 ve p52), c-Rel, RelB ve RelA (p65)'dir. Bu proteinler DNA bağlanmasına, dimerizasyonuna ve sitoplazmada NF-κB dimerlerini tutan spesifik inhibitör faktörlerle IκB'lere aracılık eden bir Rel homoloji domaini (RHD) içermektedir. Birçok uyarıcı, çoğunlukla IκB kinaza bağlı fosforilasyona neden olur ve IκB proteinlerinin inaktive etmesiyle NF-κB'yi aktive etmektedir. Serbest kalan NF-κB dimerleri çekirdeğe girer, burada sitokinleri, büyüme faktörlerini, hücre yapışma moleküllerini, pro- ve antiapoptotik proteinleri kodlayan farklı genlerin transkripsiyonunu düzenlemektedir (Luo, Kamata ve Karin, 2005).



Resim 2.30. Apoptotik sinyal yolları (<https://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>)

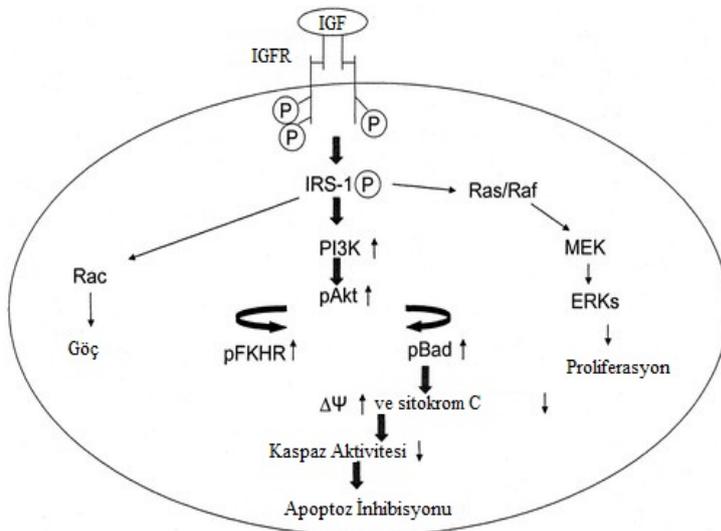
Chk1 (CHEK1) ve Chk2 (CHEK2), yapısal olarak serin / treonin kinazlar olup, çeşitli genotoksiklere yanıt olarak aktive edilmektedir. Chk1 ve Chk2'nin temel görevi, özellikle ATM ve ATR olmak üzere fosfatidilinositol 3-kinaz ailesinin proksimal kontrol noktası kinazlarından ve ATX'ten kontrol noktası sinyallerini iletmektir ve bunlar Chk1 ve / veya Chk2'yi fosforile ederek aktive etmektedir. Chk2, hücre döngüsü boyunca eksprese edilen stabil bir proteindir, DNA hasarı olmadığında büyük ölçüde aktif olmadığı görülür, esas olarak çift zincirli DNA kopmalarına yanıt olarak ATM tarafından aktive edilmektedir ve aktivasyonu dimerizasyon ve otofosforilasyonu içermektedir (Bartek ve Lukas, 2003) (Resim 2.31).



Resim 2.31. Kanserde Chk1 (CHEK1) ve Chk2 (CHEK2) mekanizması (Beishline ve Azizkhan-Clifford, 2014)

IGF'lerin varlığı ilk olarak Salmon ve Daughaday tarafından önerilmiştir (Salmon ve Daughaday 1957). Bu durum kıkırdağa sülfat katılmasının büyüme hormonu aracılı stimülasyonunun bir serum faktörünün aracılık ettiğini gösteren çalışmalara dayanmaktadır. Bu faktöre başlangıçta “sülfatlama faktörü”, ardından “somatomedin” adı verilmiştir. Daha sonra, insülin ile kısmi yapısal homolojiye, yağ ve kas hücrelerine glikoz alımının uyarılmasına dayanan “insülin benzeri” terimi kullanılmıştır (Brahmkhatri, Prasanna ve Atreya, 2015). IGF1 ve IGF2, çok sayıda hücre tipi ve dokusunun büyümesinde, farklılaşmasında ve hayatta kalmasında rol oynayan hem mitojenik hem de metabolik fonksiyonlara sahip büyüme faktörleridir. IGF'ler büyüme faktörleri arasında benzersizdir, çünkü sistemik olarak (hormonlar gibi), lokal olarak (otokrin / parakrin faktörleri gibi) hareket edebilirler. İnsülin / IGF ekseninin metabolik fonksiyonları iyi bilinmektedir, çünkü insülin, hücreli glikoz, amino ve yağ asidi alımının yanı sıra glikojen, lipid ve protein sentezini, diğer ilgili metabolikleri kontrol eden önemli bir düzenleyicidir. (Mohan ve Baylink, 2002; Sipos, Szekely, Kis, Tulassay ve Muzes, 2017). Ayrıca IGF'ler birden fazla işlevde gösterir. Oto-, para- ve endokrin biyolojik etkiler uygulayarak, çeşitli doku ve hücrelerde farklı miktarlarda ve oranlarda olmasına rağmen, farklı yerlerde ifade edilebilmektedir. Esas olarak büyüme hormonları gibi davranırlar, insan hücrelerinin ve dokularının büyümesini düzenleyerek ömürlerini etkilerler. Doku homeostazını koruma

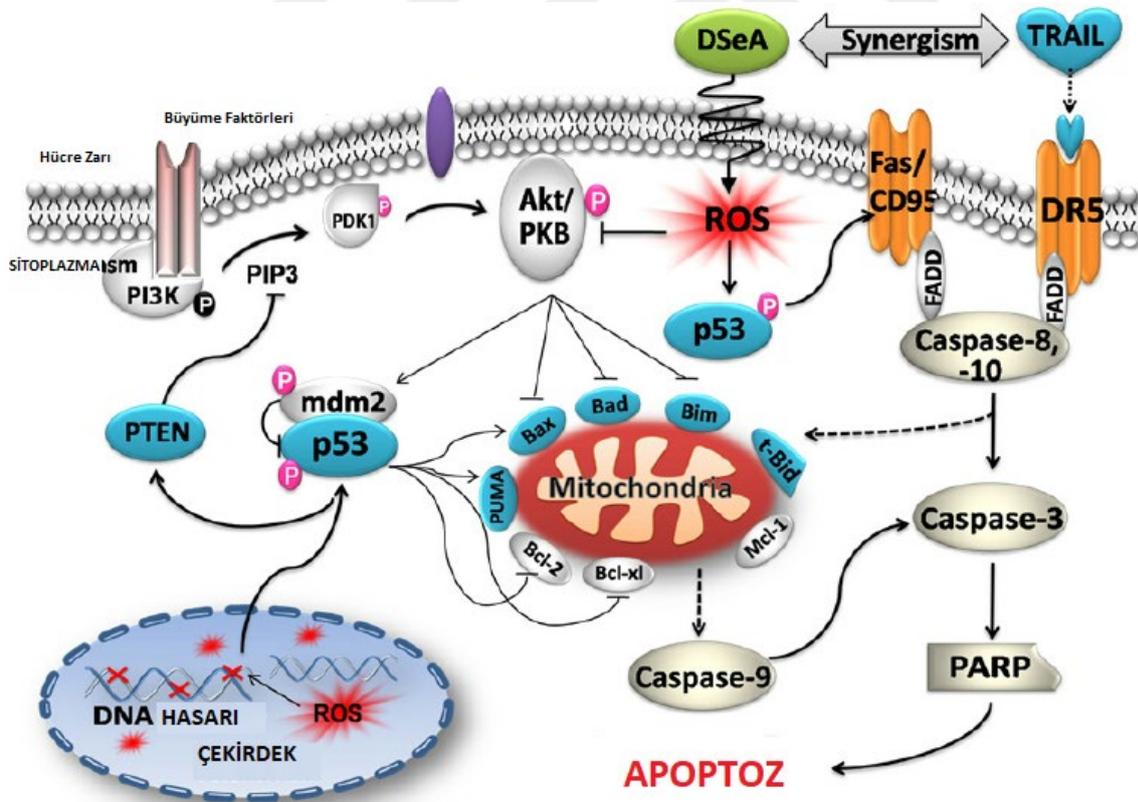
üzerinde önemli bir etkiye sahiptirler ve normal dokuda farklılaşmış bir fenotip mevcuttur, anjiyogenez, hücre yapışması, migrasyon ve yara iyileşmesinde rol oynamaktadırlar (Iams ve Lovly, 2015; Sipos ve diğerleri, 2017). IGF'ler diğer sinyal yollarıyla birlikte apoptoz ile hücre sağkalımı arasındaki dengenin belirlenmesinde de rol oynamaktadır. Antiapoptotik ve sağkalım yanlısı etkiler bazı kanser türlerinin gelişimi ve ilerlemesi için büyük önem taşımaktadır. İnsülin / IGF sinyaline hücrel yanıtın çeşitliliği büyüme faktörlerinin mevcudiyetine, reseptörlerin ve sinyal moleküllerinin oranlarına, hücre ve doku tiplerine ayrıca doku mikro çevresine bağlıdır (Massoner, Ladurner-Rennau, Eder ve Klocker, 2010; Sipos ve diğerleri, 2017) (Resim 2.32).



Resim 2.32. Kanserde IGF/IGFR mekanizması ve apoptoz (Delafontaine, Song ve Li, 2004)

Hücre sinyal yollarındaki Protein Kinaz C'nin (PKC)'nin tümör gelişiminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Memeli hücrelerinde PKC'nin aşırı aktivasyonunun hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli bir rolü vardır. Ayrıca, PKC hücre proliferasyonu ve canlılık düzenleyicisi olarak bilinen fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) protein sinyalizasyonunu aktive etmektedir. Protein Kinaz C (PKC) ROS tarafından düzenlenen sinyal enzimlerinden biridir ve tümör gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. PKC'deki çoklu sistein residuları, ROS tarafından oksidatif olarak aktive edilebilir. PKC, hücre büyümesini baskılayıcı ve hücre ölümünün düzenlenmesine katkıda bulunan serin/treonin kinaz ailesini temsil etmektedir. PKC fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), protein sinyalizasyon için efektörlere akış yönünde hareket edebilir. PI3K aracılı sinyal yolu; hücre proliferasyonu, hücrenin hayatta kalmasını, farklılaşmasını ve apoptozu düzenlemektedir (Maurya ve Vinayak, 2015).

Hüresel onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sonucu, Ras ve PTEN/Akt yolları gibi çeşitli sinyal yollarının regülasyonunun bozulduğu bildirilmiştir. Tümör baskılayıcı bir gen olan PTEN'in ürünü, Akt ve mTOR proteinlerini defosforile eden bir fosfatazdır. PTEN'in mutasyona uğraması sonucu, Akt ve mTOR proteinleri fosforile durumda kalır ve hücrede çoğalma sinyalleri başlar. Akt, apoptozdan kaçışı, proliferasyonu ve hücre döngüsü için protein sentezini artırıcı etkisi ile tümör büyümesi ve ilerlemesini etkilemektedir (Küçüköner ve Işıkdoğan, 2013). mTOR hücre büyümesi ve metabolizmasında önemli role sahiptir. Kanserde önemli olduğu saptanan üç temel sinyalizasyon yolu; (PI3K)/AKT kinaz zinciri, Protein Kinaz C (PKC) ailesi ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)/Ras bulunmaktadır (Wei ve diğerleri, 2016). mTOR; PI3K/AKT sinyal yolağının akış aktivasyonunda anahtar bir kinazdır. Bu yollar kanserde sıklıkla bozulur ve bu yüzden de mTOR önemli bir antitümör hedefidir. Antikanser ajanlar olarak; mTOR inhibitörleri birçok kanser tipinde önem taşımaktadır (Küçüköner ve Işıkdoğan, 2013) (Resim 2.33).



Resim 2.33. Apoptoz ve sinyal yolları (Cao ve diğerleri, 2014)

Memeli hücreleri ısıya yanıt olarak ve çok sayıda stresli uyarana karşı, oldukça korunmuş bir protein ailesini eksprese etmektedir (Lindquist ve Craig, 1988). Stres proteinlerinin bu ailesi, ısı şoku proteinleri (HSP) ve glikozla düzenlenmiş proteinler (GRP) içerirler (Little, Ramakrishnan, Roy, Gazit ve Lee, 1994; Garrido, Gurbuxani, Ravagnan ve Kroemer, 2001). Tümör hücrelerini apoptoza, konakçı savunma mekanizmalarına ve çeşitli tedavi şekillerine karşı dirençli hale getirir. HSP'ler, birçok fonksiyona sahip moleküler koruyuculardır. Isının yanı sıra hipoksi, ışınlama, enfeksiyon veya toksik ajanlar da dahil olmak üzere birçok başka stres biçimine tepki olarak tüm organizmalarda üretilen, oldukça korunmuş bir protein grubudur (Lindquist ve Craig, 1988). Stres genleri olarak da belirlenen gen seti HSP'ler, bir grup proteinin sentezini indükler. HSP'ler, stres bağımlı olarak yanlış katlanan ya da yeni sentezlenen proteinlerin doğru katlanmasını sağlayan ve agregasyonunu engelleyen moleküler şaperonlar olarak rol oynamaktadır (Gupta ve diğerleri, 2010). Bu proteinler çok fonksiyonlu moleküler şaperonlardır. Neoplazmlarda HSP'nin ekspresyonu apoptozun düzenlenmesinde, tümörlere karşı immün yanıtta ve çoklu ilaç direncinde rol oynamaktadır (Levine, Momand ve Finlay, 1991; Ciocca ve diğerleri, 1993). Artan HSP seviyeleri, hücrelerin apoptoza karşı daha dirençli olmasını sağlamaktadır. Bilinen en immünojenik moleküllerden biri olan HSP'ler, hücrel bağışıklığı artırmaktadır (Kaufmann, 1990). Karsinogenezdeki HSP'lerin rollerinin anlaşılması, tümör davranışı ve potansiyel prognoz ile ilgili önemli etkilere sahiptir (Lebret, William, Watson ve Fitzpatrick, 2003). Çeşitli kanserlerde (göğüs kanseri, böbrek kanseri, çeşitli lösemiler, mesane kanseri vb.) HSP'lerin regülasyonu arttırdığı bildirilmiştir (Jolly ve Morimoto, 2000; Lebret ve diğerleri, 2003). Bu nedenle, karsinogenez sırasında HSP ekspresyonu birçok tümörde değişmektedir (Fuller ve diğerleri, 1994). HSP'lerin tümörlü dokulardaki aşırı ekspresyonu, meme, böbrek ve mesane kanseri olan hastalarda prognostik değere sahip olmakla ilişkilendirilmiştir (Lebret ve diğerleri, 2003; Mosser ve diğerleri, 2004). HSP60, HSP70 ve HSP90 regülasyonlarının arttığı proteom analizi ile gözlenmiştir (Lim ve diğerleri, 2002). HSP'ler normal hücrel fonksiyonlarda, örneğin hücre döngüsünün devamlılığında önemlidir. Şaperon fonksiyonu olan majör HSP'ler; HSP104, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 ve küçük HSP'ler (HSP27)'dir (Thomas ve diğerleri, 2005). HSP27 üç serin kalıntısında (S15, S78 ve S82) fosforilasyon edilmektedir (Jovcevski ve diğerleri, 2015).

Glikoz regülasyon ilişkili proteinler (GRP'ler), kanser dokularındaki glikoz yoksunluğu, oksidatif stres ve hipoksi gibi çeşitli stres koşullarına hücrel tepki ile upregüle edilen moleküler şaperonlardır (Zhang, Zhang, Wang, Wu ve Yang, 2015; Tsai ve diğerleri, 2018;

Lu ve diğeri, 2019). GRP'ler yapısal olarak tüm organlarda bazal seviyelerde eksprese edilir ve strese neden olabilen ER şaperonları olarak protein katlanması, toplanması ve bozulmasında başlıca rol oynamaktadır. GRP'ler proliferasyon, apoptoz ve bağışıklığı düzenleyen işlevlerde tespit edilmiştir. GRP78 / BiP ER şaperonu, protein translokasyonu, protein katlanması sırasında yol gösteren ve parçalanma için yanlış katlanmış proteinleri hedefleyen ER'nin geçirgenlik bariyerini korumaktan sorumlu olan 78 kilodalton glikoz ayarlı proteindir. GRP78 aynı zamanda bir ER kalsiyum bağlayıcı proteindir (Ma ve Hendershot, 2004; Zhu ve Lee, 2015). Bir diğeri büyük ER şaperonu, ER'de en bol bulunan glikoprotein olan 94 kilodalton glikoz düzenlenmiş proteindir (GRP94 / Gp96). GRP78 mayadan insana kadar farklı organizmalarda bulunurken, GRP94 sadece çok hücreli organizmalarda bulunmaktadır. GRP94, GRP78 gibi, protein katlanmasına katılır, ER kalsiyumunu depolar ve ER ile ilişkili yanlış katlanmış proteinlerin hedeflenmesine yardımcı olmaktadır (Marzec, Eletto ve Argon, 2012; Zhu ve Lee, 2015). GRP78 ile karşılaştırıldığında, GRP94'ün proteinleri bağışıklık, büyüme sinyali ve hücre yapışmasında kritik rollerle daha seçicidir. GRP94 istemci proteinlerinin örnekleri arasında histokompatibilite sınıf I (MHC I), insülin benzeri büyüme faktörü II (IGF II), Toll benzeri reseptör I (TLR1) ve bir dizi integrin bulunur. (Eletto, Dersh ve Argon, 2010; Staron ve diğeri, 2010; Zhu ve Lee, 2015).

Bu bilgiler doğrultusunda; meme ve kolon kanserlerinin tedavilerinde ortaya çıkan ilaç direncinin ortadan kaldırılmasını ve dirençli hücrelerin apoptoza yönlendirilmesini sağlayacak bir anti-kanser ajan olabileceği düşünülen heterohalkalı bileşiklerin etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamda ilaç direncinde rol oynayan ABCB1, ABCCC3, ABCC10, ABCC11 ve ABCG2 genleri, apoptotik mekanizmada önemli rol alan p53 PARP, BCL2, BAX, CASP3, ısı şok proteinleri (HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 α), endoplazmik retikulum stres proteinleri (GRP78 ve GRP94) bu hedefler doğrultusunda seçilmiştir. Ayrıca heterohalkalı bileşiklerin meme ve kolon kanserleri üzerindeki etkileri, apoptoz ve ilişkili sinyal yollarında önemli olan BAD, BAX, BID, BIM, Casp3, Casp7, Casp8, CD40, CD40L, cIAP-2, cytoC, DR6, Fas, FasL, HTRA, p38, p27, p53, SMAC, sTNF-R1, sTNF-R2, TNF-alpha, TNF-beta, TRAILR-1, TRAILR-2, TRAILR-3, TRAILR-4, ATM, CHK1, CHK2, eIF2a, SMAD BCL-2, BCL-W, HSP27, HSP60, HSP70, IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6, IGF-1sR, Livin, p21, Survivin, XIAP, AKT, Erk1/2, Ikb α , JNK, NFKB, PARP, TAK1 proteinleri hedeflenerek incelenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Antioksidan analizlerinde kullanılan kimyasal malzemeler

Etanol (32205), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH, 300267), demir (II) klorür FeCl_2 (372870), ferrozin (160601), sodyum fosfat monobazik dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4+2\text{H}_2\text{O}$, 71505), sodyum fosfat dibasik (Na_2HPO_4 , 255793), potasyum ferrisiyanit ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 702587), trikloroasetik asit (TCA, T4885), demir (III) klorür (FeCl_3 , 157740), (Ethylenedinitrilo)tetraasetik asit (EDTA, 798681), gallik asit (GALLIC) ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$, 842649), bütillenmiş hidroksianisol (BHA, B1253), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT, W218405) ve (\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-carboksilik asit (Trolox, 238813) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

3.1.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal malzemeler

L-glutamin ve yüksek glukoz içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, D6429), Eagles Minimum Essential Medium (EMEM, M4655), penisilin-streptomisin (P4333), Sodyum pirüvat (S8636), Sodyum bikarbonat (31437), Horse serum (H1270), Hidrokortizon (H0888), HEPES (H0887), EGF (E9644), insülin (I0516), Mitomycin C (M0503), MTT (M2128) ve *C. toxin* (C8052) Sigma-Aldrich; RPMI-1640 (21875), Thermo Fisher Scientific; FBS (04-007-1A), tripsin-EDTA (03-052-1B) Biological Industries firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Moleküler analizlerde kullanılan kimyasal malzemeler

KCl (P9333), NaCl (S9888), KH_2PO_4 (1551139), Na_2HPO_4 (S7907), HCl (H1758), etanol (32205), dimetil sülfoksit (DMSO, D8418), NaOH (S0899), Trypan blue Çözeltisi (T8154), Sigma-Aldrich; RNA izolasyon kiti (K0731), cDNA sentez kiti (K1622), Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2X (K0221), Thermo Fisher Scientific firmasından temin edilmiştir. β -Aktin, ABCB1 (MDR1-P-gp), ABCC3 (MRP3), ABCC10 (MRP7), ABCC11 (MRP8), ABCG2 (BCRP) primerleri İnvitrogen; p53, PARP, BAX, BCL2, CASP3, GRP94

ve GRP78, HSP27, HSP40, HSP60, HSP70 ve HSP90 α primerleri Oligomer firmasından temin edilmiştir.

3.1.4. Protein analizlerinde kullanılan kimyasal malzemeler

RIPA buffer (9806S), β -mercapto ethanol (M131) ve BCA Protein Assay kit (23225) Thermo Fisher Scientific; Human Apoptosis Array C1 (AAH-APO-1-8), Human Apoptosis Signaling Array C1 (AAH-APOSIG-1-8) Raybiotech firmasından temin edilmiştir.

3.1.5. Besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanması

Antioksidan aktivitede kullanılan çözeltiler

0,25 mM 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH):

5 mg DPPH 50 mL etanol içerisinde çözülerek hazırlanmıştır ve karanlıkta stoklanmıştır.

2 mM demir (II) klorür ($FeCl_2$):

0,0397 g $FeCl_2$ 100 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır ve karanlıkta stoklanmıştır.

5 mM ferrozin:

0,123 g ferrozin 50 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

0,2 M 6,6 pH fosfat tamponu:

31,20 g 0,2 M $NaH_2PO_4+2H_2O$ 1 L saf suda çözülerek hazırlanmıştır. 35,59 g 0,2 M Na_2HPO_4 1 L saf suda çözülerek hazırlanmıştır. 250 mL $NaH_2PO_4+2H_2O$, 93,75 mL Na_2HPO_4 ve 50 mL saf su karıştırılarak 0,1 M HCl veya KOH ile pH ayarlanmıştır. Hacim 500 mL'ye tamamlanmıştır.

% 1'lik potasyum ferrisiyanit ($K_3Fe(CN)_6$):

1 g $K_3Fe(CN)_6$ 100 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

% 10'luk trikloroasetik asit (TCA):

10 g TCA 100 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

% 0,1'lik demir (III) klorür ($FeCl_3$):

100 mg $FeCl_3$ 100 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır ve karanlıkta stoklanmıştır.

Hücre kültürü ve moleküler çalışmalarda kullanılan çözeltiler

DMEM (1X):

250 mL DMEM için, 0,60 g $NaHCO_3$ ve 0,8962 gr HEPES kullanılarak besiyeri içerisinde çözülmüştür. pH 7,2-7,4 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 0,20 µm filtre yardımı ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

Çalışmada kullanılan 250 mL 1X DMEM miktarı aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
1X DMEM	217,195 mL
% 10 Horse serum	25 mL
Sodyum pirüvat	2,5 mL
Penisilin/streptomisin	2,5 mL
Hidrokortizon,	2,5 mL
İnsülin	250 µL
<i>Clostridium botulinum toxin (C.toxin)</i>	50 µL
EGF	5 µL

EMEM (1X):

250 mL EMEM için, 0,375 g NaHCO₃ kullanılarak besiyeri içerisinde çözülmüştür. pH 7,2-7,4 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 0,20 µm filtre yardımı ile steril edilerek +4 °C'de saklanmıştır.

Çalışmada kullanılan 250 mL 1X EMEM miktarı aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
1X EMEM	219,75 mL
% 10 FBS	25 mL
Sodyum pirüvat	2,5 mL
Penisilin/streptomisin	2,5 mL
İnsülin	250 µL

RPMI (1X):

250 mL RPMI için, 0,5 g NaHCO₃ kullanılarak besiyeri içerisinde çözülmüştür. pH 7,2-7,4 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 0,20 µm filtre yardımı ile steril edilerek +4 °C'de saklanmıştır.

Çalışmada kullanılan 250 mL 1X RPMI miktarı aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>Miktar</u>
1X RPMI	224,5 mL
% 10 FBS	25 mL
Penisilin/streptomisin	2,5 mL

1X PBS:

800 mL dH₂O içerisine NaCl, KCl, Na₂HPO₄ ve KH₂PO₄ eklenmiştir. pH 7,4 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hacim 1 L olana kadar dH₂O ile tamamlanmıştır ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanmıştır.

<u>Bileşik</u>	<u>Kütle</u>	<u>Molarite</u>
NaCl (8.4 g/mol)	8 g	0.137 M
KCl (74.551 g/mol)	0,2 g	0.0027 M
Na ₂ HPO ₄ (41.96 g/mol)	1.44 g	0.01 M
KH ₂ PO ₄ (136.086 g/mol)	0,24 g	0.0018 M

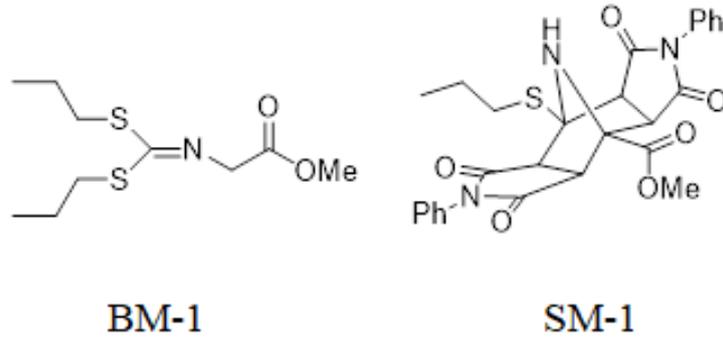
Primerler:

Invitrogen ve Oligomer firması tarafından HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) saflıkta sentezlenen primerler 100 µM olacak şekilde nükleaz içermeyen H₂O'da (Sigma-Aldrich) stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok çözeltiden 1/10 seyreltme yapılarak 10 µM'lık primer stoğu elde edilmiş ve çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.2. Yöntem

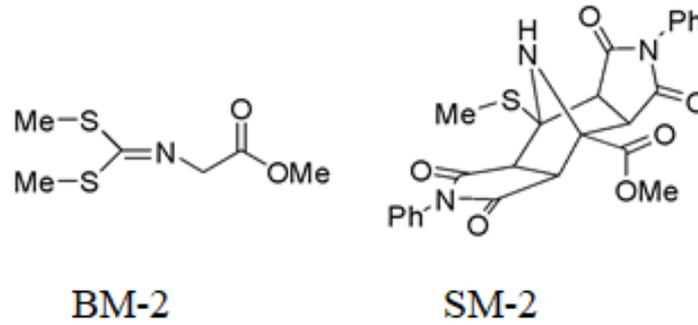
3.2.1. Test bileşikleri

Tez çalışmasında kullanılan test bileşikleri; Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Melek Gül tarafından iki başlangıç (BM) ve iki son madde (SM) olarak sentezlenmiştir. Başlangıç maddeleri glisin imin türevlidir. Son maddeler ise izoindol ve piroolidin halkalıdır, bu nedenle heterohalkalı bileşikler grubundadır. Başlangıç ve son madde olarak seçilen bileşikler ilk ürün ve son ürün olarak karşılaştırmalı çalışmalar yapmak için tercih edilmiştir. Glisin imin türevli başlangıç bileşiklerin ve son ürün olarak sentezlenen heterohalkalı bileşiklerin kimyasal yapıları ve isimleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Bileşiklerin sentezine ait bilgiler Doç. Dr. Melek Gül tarafından hazırlanmıştır ve sentez yapıları Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



BM-1: Methyl 2-((bis(propylthio)methylene)amino)acetate

SM-1: Methyl (3aR,4aS,7aS,8aR)-1,3,5,7-tetraoxo-2,6-diphenyl-8-(propylthio)decahydro-4,8-epiminopyrrolo[3,4-f]isoindole-4(1H)-carboxylate:



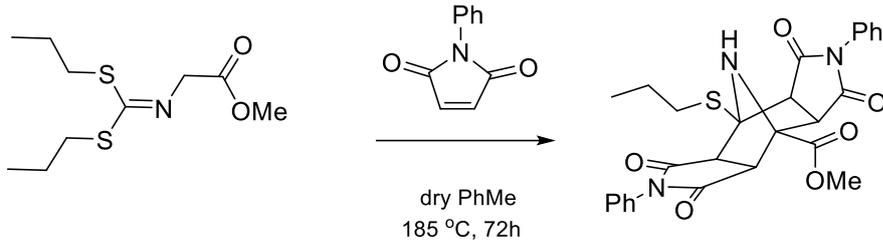
BM-2: Methyl 2-((bis(methylthio)methylene)amino)acetate

SM-2: Methyl (3aR,4aS,7aS,8aR)-8-(methylthio)-1,3,5,7-tetraoxo-2,6-diphenyldecahydro-4,8-epiminopyrrolo[3,4-f]isoindole-4(1H)-carboxylate

Şekil 3.1. Test bileşiklerinin kimyasal yapıları ve isimleri

SM-1 Sentezi:

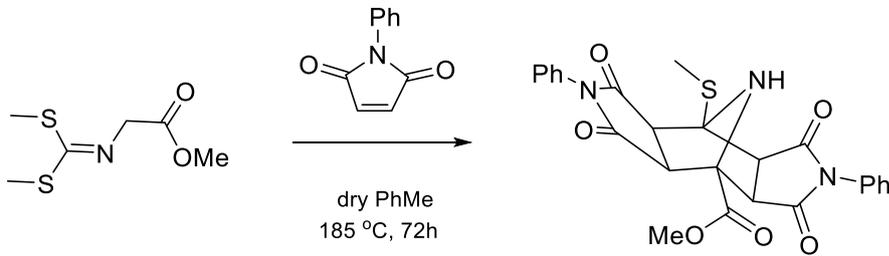
Metil-2-((bis(propiltiyo)metilen)amino)asetat- BM-1 (1 mmol) ve N-fenilmaleimid (5.5 mmol) 10 mL toluene içerisinde 185 °C kapalı kaptaki Ar ile doldurularak ısıtılmıştır. 72 saatin sonunda, tepkime sonlandırılmış ve saflaştırmak için 1:1 hekzan:etilasetat ile kolon kromatografisi yapılmıştır. Verim % 32; erime noktası 215 °C; Rf 0.065 FTIR: 3159, 3063, 2963, 1780, 1730, 1709, 1596, 1574, 1498, 1424, 1377, 1204, 792, 759 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm) δ 1.022 (3H, t, J=7.3 Hz), 1.690-1.723 (4H, m), 3.008 (2H, m), 3.64-3.711 (2H, d, J=7.07 Hz), 3.948 (3H, -OCH₃, s), 7.280-7.49 (10H, m, Harom.), 7.675 (1H, NH, s) ppm, ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, ppm) δ 13.82, 13.717, 22.332, 32.030, 52.932, 53.842, 72.352, 126.129, 128.801, 129.010, 129.229, 131.326, 171.033, 172.288, 172.412 ppm; HRMS(EIC): Exact Mass 519.15; [M+H]⁺ ion 520.1503, [M-H]⁺ iyon 518.1445 m/z.



Şekil 3.2. SM-1'in sentezine ait kimyasal yapı

SM-2 Sentezi:

SM-1'in sentezinde kullanılan aynı yöntem ile birlikte BM-2 kullanılarak SM-2'nin sentezi gerçekleştirilmiştir. Verim % 38; erime noktası: 209-207 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δH 7,67 (s, 1H), 7.47-7.42 (m, 7H), 7.36-7.28 (m, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.67 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 3.30 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 2.49 (s, 3H), ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δC 173.68, 172.10, 171.42, 131.91, 128.95, 128.67, 127.05, 69.54, 60.74, 52.18, 49.62, 42.27, 13.19 ppm; HRMS(EIC): Exact Mass 491.12; [M+H]⁺ ion 492.1502, [M-H]⁺ ion 490.1452 m/z. anal. Hesaplanılan C₂₅H₂₁N₃O₆S: C, 61.09; H, 4.31; N, 8.55 Found: C, 60.86; H, 4.25; N, 8.46.

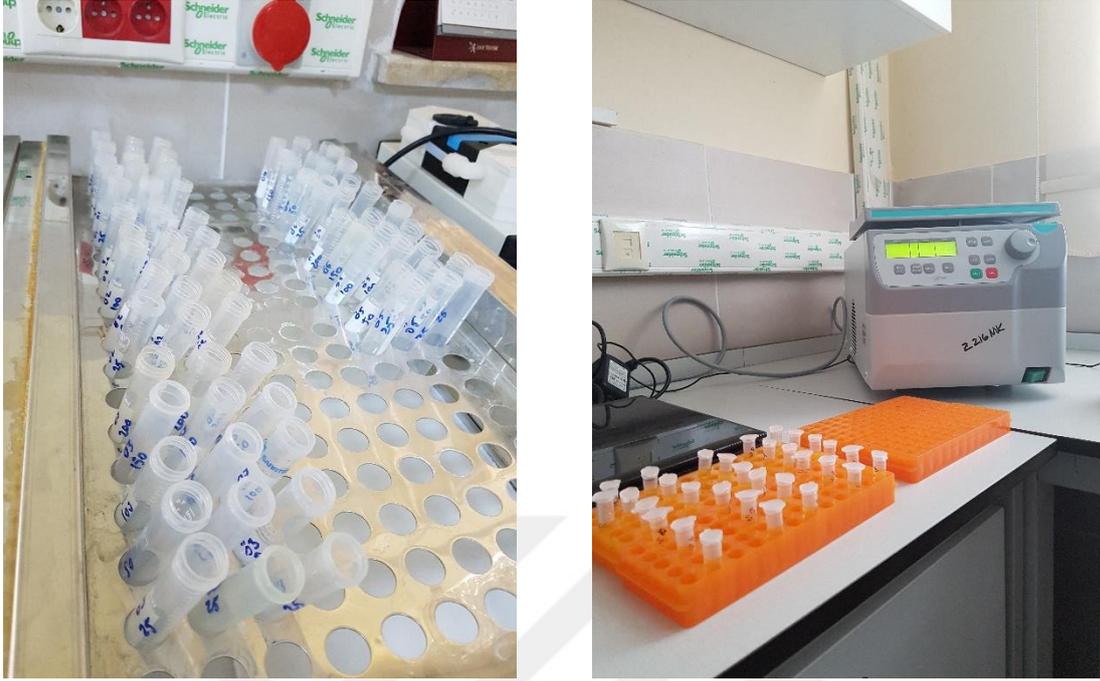


Şekil 3.3. SM-2'in sentezine ait kimyasal yapı

3.2.2. Antioksidan aktivite

İzoindol türevli bileşiklerin antioksidan aktiviteleri (25-200 µM) serbest radikal süpürücü (Brand-Williams ve diğerleri, 1995), indirgeme (Oyaizu, 1986) ve metal şelatlama (Decker ve Welch, 1990) yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

Ana stok için bileşikler DMSO'da 1mg / mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışılacak dozlar belirlenerek (25-50-100-150-200 µM) beş farklı konsantrasyonda bileşikler elde edilmiştir (Resim 3.1).



Resim 3.1. Antioksidan aktivite çalışması

Serbest radikal süpürücü aktivite (DPPH)

Serbest radikal süpürücü aktivitesi; 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) ile Brand-Williams, Cuvelier ve Berset (1995) tarafından kullanılan yöntemle belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonları hazırlanmış olan bileşiklerden üç tekrar yapılarak çalışılmıştır. Her üç tekrarlı konsantrasyondan 100 µL alınarak içerisinde 600 µL EtOH ve 60 µL (20 mg/L) DPPH çözeltisi eklenmiştir. Kontrol grubu 3,5 mL EtOH ve 0,5 DPPH çözeltisi hazırlanarak çalışılmıştır ve blank olarak sadece EtOH kullanılmıştır. Standart olarak bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve Trolox (25-200 µg/mL) kullanılmıştır. Hazırlanan karışımlar kuvvetlice çalkalanmış, 30 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletilmiş ve 517 nm'de absorbanstaki azalma ölçülmüştür. Yüzde inhibisyon aktivitesi, aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

Serbest radikal süpürücü etki % = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$. (A_0 = kontrol absorbanısı ve A_1 = örnek solüsyon absorbanısı)

Metal şelatlama aktivitesi (Fe^{2+} iyonlarının şelatlama aktivitesi)

Demirli iyonlar (Fe^{2+}) üzerinde bileşiklerin şelat aktivitesi Decker ve Welch (1990)'in önerdiği protokole göre ölçülmüştür. Farklı konsantrasyonlardaki bileşiklerden 125 µL alınarak 462,5 µL deiyonize su ile karıştırılmıştır. Karışım 30 dakika boyunca oda sıcaklığında 12,5 µL $FeCl_2$ (2 mM) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra reaksiyon, oda sıcaklığında 25 dakika boyunca 25 µL ferrozin (5 mM) ilave edilerek başlatılmıştır ve daha sonra absorbans 562 nm'de ölçülmüştür. Blank; 55 µL $FeCl_2$ ve 925µL deiyonize su ile kontrol grubu; 55 µL $FeCl_2$, 925µL deiyonize su ve 25 µL ferrozin hazırlanmıştır. 562 nm'de absorbanstaki azalma ölçülmüştür. Bileşiklerin Fe^{2+} üzerindeki şelatlama aktivitesi, aynı konsantrasyonlarda bütillenmiş hidrokstoluen (BHT), Trolox ve EDTA kullanılmıştır. Metal şelatlama aktivitesi (%) = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$.

İndirgeme aktivitesi

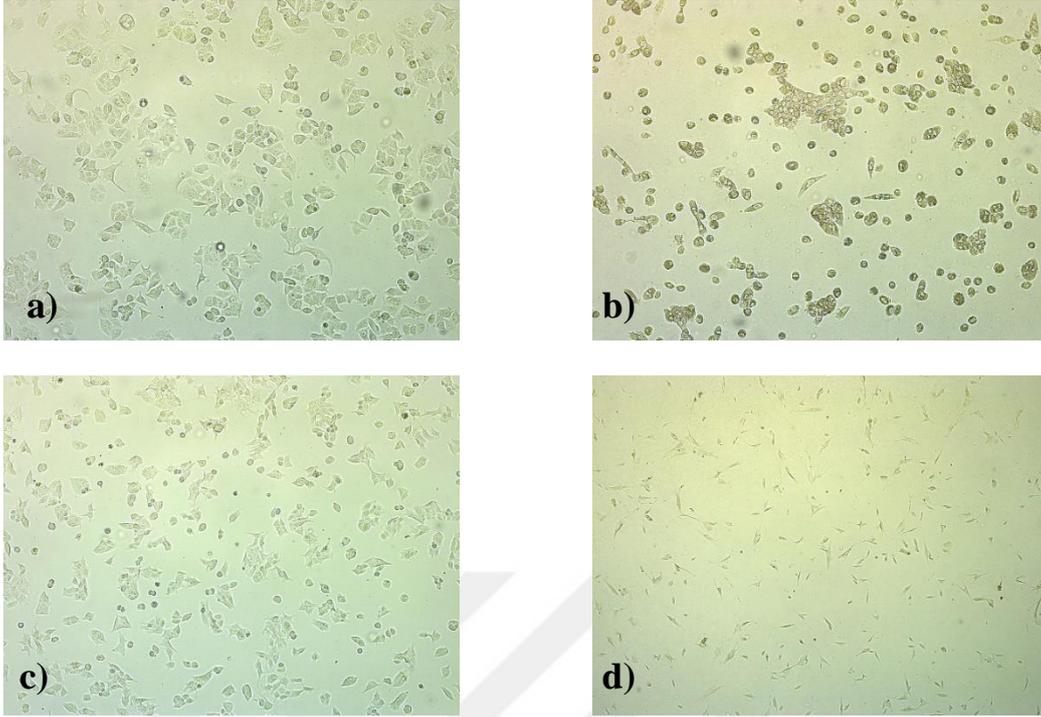
Bileşiklerin indirgeme aktivitesinin ölçümleri Oyaizu (1986) yöntemine göre yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki bileşiklerden 1,5 mL mikrosantrifüj tüplere 12,5 µL alınarak 500 µL fosfat tamponu (0.2 M) (pH 6.6) ve 625 µL potasyum ferrisiyanit [$K_3Fe(CN)_6$] (% 1, w/v) ile karıştırılmıştır. Karışım 20 dakika boyunca 50 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra 625 µL trikloroasetik asit (TCA) (% 10, w/v) ilave edilmiştir ve 10 dakika boyunca 3.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Son olarak 625 µL üst katman çözeltisinden alınarak 625 µL deiyonize su ve 125 µL $FeCl_3$ (% 0.1, w/v) ile karıştırılmıştır ve absorbans, spektrofotometrede 700 nm'de ölçülmüştür. Blank-1; 625 µL trikloroasetik asit (TCA) (% 10, w/v), 62,5 µL $FeCl_3$ ve 312,5 µL deiyonize su ile blank-2; 62,5 µL $FeCl_3$, 312,5 µL deiyonize su hazırlanmıştır. Blank-1 çalkalanmadan ve ısıtılmadan santrifüjlenmiştir. Blank-2 çalkalanmış ve ısıtılmış ancak santrifüjlenmemiştir. Kontrol grubu; 12,5 µL deiyonize su, 50 µL fosfat tamponu ve 625 µL potasyum ferrisiyanit [$K_3Fe(CN)_6$] (% 1, w/v) karıştırılarak 50 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. 625 µL trikloroasetik asit (TCA) (% 10, w/v) eklenerek 10 dakika boyunca 3.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Son olarak 625 µL üst katman çözeltisinden alınarak 625 µL deiyonize su ve 125 µL $FeCl_3$ (% 0.1, w/v) ile karıştırılmıştır. 700 nm'de absorbanstaki azalma ölçülmüştür. Standart olarak EDTA, Gallic ve Trolox kullanılmıştır.

3.2.3. Hücre kültürü

Bu çalışmada, ATCC (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu)'den satın alınan MCF-7 (meme kanseri) (ATCC® HTB22™)/MCF-12A (normal meme epiteli) (ATCC® CRL-10782™) ve DLD-1 (kolon kanseri) (ATCC® CCL221™)/CCD-18Co (normal kolon epiteli) (ATCC® CRL-1459™) hücre hatları (Resim 3.2) Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Kimya Bölümünden temin edilmiştir. Hücre hatları 0,2 g / 100 mL sodyum bikarbonat, % 10'luk hücre hattına uygun serum ve % 1 penisilin/streptomisin içeren hücre hattına uygun besiyeri kullanılarak (Çizelge 3.1) 25 cm² veya 75 cm²'lik flasklarda, % 5 CO₂ ve 37 °C sıcaklıktaki etüvde (Memmert) 24 saat inkübasyona bırakılarak üretilmiştir. Hücreler % 80 doygunluğa ulaşmıca kadar büyütüldükten sonra fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (phosphate buffered saline; PBS) ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Hücrelerin pasajlanmasında 1X Tripsin-EDTA kullanılmıştır. Hücre morfolojisi ters mikroskop (Leica/DM IL LED) ile fotoğraflanmıştır.

Çizelge 3.1. Hücre kültüründe kullanılan besiyerleri ve serumlar

Hücre Hatları	Besiyerler	Serumlar
MCF-7	RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)	FBS (Fetal bovine serum)
MCF-12A	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Horse Serum
DLD-1	RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)	FBS (Fetal bovine serum)
CCD-18Co	EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)	FBS (Fetal bovine serum)



Resim 3.2. Tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarının görüntüleri; a) MCF-7, b) MCF-12A, c) DLD-1 ve d) CCD-18Co

Test bileşiklerinin hazırlanması

Bileşikler DMSO içinde çözülerek, 100 mM stok çözelti hazırlanmış ve ışık görmeyecek şekilde karanlıkta +4 °C’de saklanmıştır. Çalışmada farklı dozlarda 1,56 μ M, 3,125 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M bileşikler hazırlanarak kullanılmıştır. Hücrelere uygulanan tüm dozların DMSO oranı % 0,1’in altında olmasına dikkat edilmiştir.

3.2.4. Hücre proliferasyon analizleri

MCF-7 ve MCF-12A, DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında, izoindol türevli bileşiklerin sitotoksik dozu (1,56-100 μ M) MTT testi (van Meerloo ve diğerleri, 2011) ve RTCA yöntemiyle (Moniri ve diğerleri, 2015) belirlenmiştir.

MTT yöntemi

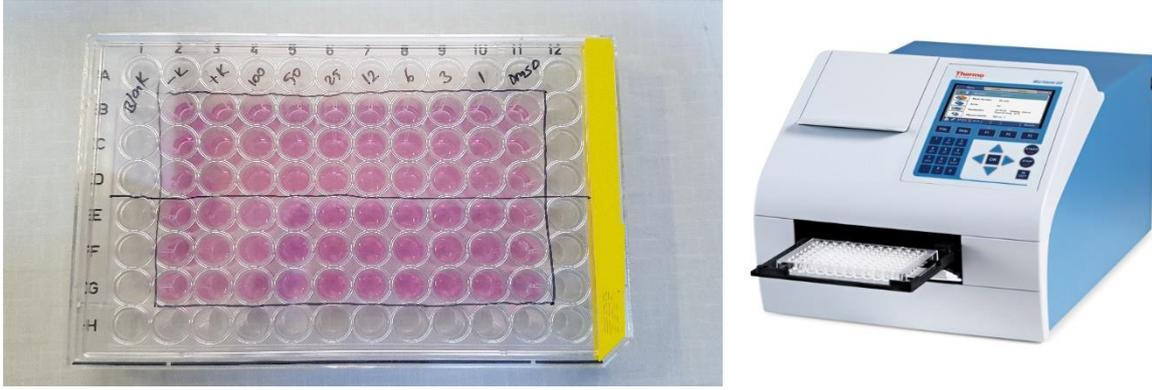
MTT testi, formazan boyalarının ya da MTT azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivitenin inkübe edilen hücrelerde meydana gelen renk değişiminin kolorimetrik ölçümüne dayanan, hücre çoğalma miktarının tespit edildiği bir yöntemdir. Bu yöntemle kullanılacak olan herhangi bir terapötik ajanın hücre üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkileri

belirlenebilmektedir. Bileşiklerin, MCF-7 (meme kanseri), MCF-12A (normal meme epiteli), DLD-1 (kolon kanseri) ve CCD-18Co (normal kolon epiteli) hücre hatları üzerindeki olası sitotoksik etkisi MTT (Sigma-Aldrich) ile üretici firmanın kullanım talimatına göre uygulanmıştır. Oluşan renk değişikliği sarı ile renklendirilmiş formazan tuzlarının aktif hücre mitokondrilerinde tetrazolyum tuzunun azalması sonucunda oluşmaktadır. Bu bileşiklerin absorbans değeri metabolik olarak aktivitelerinin belirlenebilmesi ile orantılıdır.

MTT testinde kullanılacak hücre sayısını belirlemek için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. 96 kuyulu hücre kültür plakasının her kuyucuğunda 100 μL 'de 2×10^4 , $1,5 \times 10^4$, 1×10^4 ve 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Optimizasyon çalışması sonucu hücre sayısının 1×10^4 olmasına karar verilmiştir.

MTT yönteminin uygulamasından bir gün önce, 96'lık plaka içerisine 1×10^4 /kuyu olacak şekilde hücre sayımı yapılmıştır. Hücre hattına uygun besiyeri kullanılarak 100 μL / kuyu medyum hazırlanmış ve plakaya ekimi yapılmıştır. Mikroplakalar, 24 saat 37 °C ve % 5 CO₂ ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlanmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra seri dilüsyonlar halinde (100 μM – 1,56 μM) hazırlanan bileşikler kuyulara ilave edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücrelere 100 μL MTT (5 mg / mL) çözeltisi eklenerek 2 saat bekletilmiş ve daha sonra kuyulara 100 μL DMSO (dimetilsülfoksit) eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır (van Meerloo, Kaspers ve Cloos, 2011).

İnkübasyonu yapılan hücreler, mikroplaka okuyucu spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific/Multiskan) ile 570 nm absorbans değerinde ölçümleri üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre canlılığı eğrisi belirlenerek % 50 baskılayıcı konsantrasyon (IC₅₀) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplanmıştır. (Sitotoksite=test absorbans değeri/kontrol absorbans değer ortalaması x 100) Deneyler her bir bileşik derişimi ve çözüldüğü solüsyon için üçer kez tekrarlanmıştır. Bu sonuçlara göre, bileşiklerin hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir ve doz-cevab ilişkisi tanımlanmıştır. Elde edilen veriler, çözücü kontrolle (% 0,1 DMSO'lu hücre) ve canlılık oranları % 100 olarak kabul edilen negatif kontrolle (besiyeri+hücre) karşılaştırılmıştır. Her bir konsantrasyon üç kuyu için tekrarlı olarak çalışılmıştır (Resim 3.3).



Resim 3.3. MTT testi çalışması

İstatistik

Veri setleri arasındaki farklılıkların önemi, MCF-7 ve MCF-12A, DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında MTT testinin en etkili dozları (üçlü tekrar) seçilerek SPSS 20.0 programı kullanılarak ANOVA testi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar tüm hücre hatları için $ID50 \pm SE$ (ortalamanın standart hatası) olarak belirtilmiştir.

Gruplar arasındaki ilişkileri anlamak için Post Hoc analizler de gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle ilk olarak varyans testi sonucunun homojenliği gözlenmiştir ve bu sonuçlara bağlı olarak farklı testler uygulanmıştır. Games-Howell ve Tukey testleri, MCF-7 ve MCF-12A, DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında heterohalkalı bileşiklerin çoklu karşılaştırmaları için kullanılmıştır.

Gerçek zamanlı hücre analizi sistemi (RTCA)

Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Sistemi (RTCA) kullanılacak hücre sayısını belirlemek için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. 8 kuyulu e-plakalarına her kuyucuğunda $400 \mu L$ 'de 2×10^4 , $1,5 \times 10^4$, 1×10^4 ve 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Optimizasyon çalışması sonucu hücre sayısının 1×10^4 olmasına karar verilmiştir. MCF-7 (meme kanseri), MCF-12A (normal meme epiteli), DLD-1 (kolon kanseri) ve CCD-18Co (normal kolon epiteli) hücreleri % 10'luk hücre hattına uygun serum içeren besiyeri kullanılarak %5 CO_2 ve $37^\circ C$ 'de inkübe edilmiştir. Deney sırasında hücre proliferasyonu ve bileşiklerin olası sitotoksik aktivitelerinin belirlenebilmesi için hücreler iCELLingence RTCA cihazının (ACEA) e-plakalarına 1×10^4 hücre / $400 \mu L$ olacak şekilde yüklenmiştir. 24 saat süreyle

hücrelerin e-plakalara yapışması beklendikten sonra, bileşiklerin uygun konsantrasyonları (100-50-25 μM) belirlenmiştir ve 24 saate kadar gerçek zamanlı olarak bileşiklerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri takip edilmiştir. Hücre indeksi değerlerindeki artış hücre proliferasyonundaki artışı, bu değerlerdeki düşüş ise hücre çoğalmasının inhibisyonu ve/veya hücre ölümünün göstergesi ise sitotoksik aktivite olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler sadece besiyeri ve hücre ekilen e-plakaların canlılık oranları % 100 olarak kabul edilerek analiz edilmiştir (Moniri ve diğerleri, 2015) (Resim 3.4).



Resim 3.4. RTCA testi çalışması

3.2.5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri

Bileşiklerin anti-karsinojenik etkileri; meme ve kolon dokusuna özgü olan, kemoterapi direncinde önemli rol oynayan pompa proteinleri ABCB1 (MDR1-P-gp), ABCC3 (MRP3), ABCC10 (MRP7), ABCC11 (MRP8), ABCG2 (BCRP) ve apoptotik hücre ölümü ile ilişkili sinyal yollarında önemli rol oynayan p53, PARP, BAX, BCL2, CASP3, GRP94, GRP78, HSP27, HSP40, HSP60, HSP70 ve HSP90 α genlerinin mRNA düzeyleri qPCR yöntemiyle belirlenmiştir. β -Aktin geni ise housekeeping kontrol geni olarak kullanılmıştır.

Total RNA izolasyonu

MCF-7 (meme kanseri) ve DLD-1 (kolon kanseri) hücreleri 24 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra 6'lı plakalara 2×10^6 hücre sayımı yapılarak ekilmiştir. MTT ve RTCA sonuçlarına göre sitotoksik dozu 50 μM olarak belirlenen bileşiklerin uygulandığı hücreler 24. saatin sonunda 1X PBS ile yıkanmıştır ve 1X tripsin EDTA ile kaldırılmıştır. Gen

ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla kontrol ve doz gruplarında mRNA miktarı kitte önerilen yöntemle uygun olarak çalışılmıştır.

Protokole göre;

- ❖ Süspans edilen hücreler (2×10^6 hücre) bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış, 250 x g'de 5 dakika santrifüj ile pellet elde edilmiş ve supernatantı atılmıştır. 600 μ L β -mercaptoethanol'lü Lysis Buffer eklenmiş ve homojen bir karışım görülene kadar 15 saniye vortekslenmiştir.
- ❖ % 100'lük 360 μ L etanol eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır.
- ❖ Tüp içindeki karışımdan 700 μ L alınarak RNA saflaştırma kolonuna (Thermo Fisher Scientific / GeneJET) aktarılmış ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon yeni steril 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- ❖ Yıkama tamponu-1'den 700 μ L kolonun içine aktarılmış ve kolon içeren tüp 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- ❖ Yıkama tamponu -2'den kolona 600 μ L eklenmiş ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- ❖ Yıkama tamponu-2'den kolona 250 μ L eklenmiş ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonda biriken sıvı atılmış ve kolon steril yeni bir 1,5 mL' lik tüpe aktarılmıştır.
- ❖ Son olarak 50 μ L nükleaz içermeyen H₂O eklenmiş ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpte toplanan sıvı qPZR çalışmaları için -20°C'de saklanmıştır.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı nanodrop (Thermo Fisher Scientific /Multiskan) cihazı yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesi işleminde öncelikle uygun konsantrasyonlarda (ng / μ L) sulandırılan RNA örnekleri 260 ve 280 nm'de okutulmuştur. RNA konsantrasyonu (μ g / mL) = [OD (Optik yoğunluk) 260 x sulandırma oranı x 40 (μ g / mL)] formülü aracılığıyla hesaplanmıştır. $A_{260} / A_{280} \cong 2.0$ RNA örnekleri çalışmaya dâhil edilmiştir.

cDNA (komplementer zincir) sentezi

İzole edilen total RNA'ların komplementer zincirleri, oligo d(T) primeri ve revers transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak, "Thermo Fisher Scientific; cDNA sentez kiti (K1622)" ile sentezlenerek cDNA'ya dönüştürülmüştür (Techne Prime/Thermal Cycler).

cDNA sentezi 1. aşama için; 65 °C’de 5 dakika bekletilmiştir. 2. aşama için; 42 °C’de 1 saat ve inkübasyon sonrası enzimi inhibe etmek için 70 °C’de 5 dakika bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA’lar, qPZR yapmak üzere -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Protokole göre;

- ❖ Herbir örnek 100 ng total RNA olacak şekilde hesaplanarak uygun hacimde kullanılmıştır.
- ❖ Oligo (dT)18 primerlerinden her bir tüpe 1 µL eklenmiş ve toplam hacim 12 µL olacak şekilde nükleaz içermeyen H₂O ile tamamlanarak 3-5 saniye santrifüjlenmiştir.
- ❖ 5X Reaksiyon tamponun’dan 4 µL, RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)’den 1 µL, 10 mM dNTP karışımından 2 µL ve RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL) enziminden 2 µL eklenmiştir.
- ❖ Toplam hacim 20 µL olacak şekilde santrifüj edilerek bileşenler çöktürülmüştür.
- ❖ Karışım PZR cihazında; 42 °C’de 1 saat ve inkübasyon sonrası enzimi inhibe etmek için 70 °C’de 5 dakika bekletilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri -20 °C’de saklanmıştır.

PZR çalışmalarında ABCB1 (MDR1-P-gp), ABCC3 (MRP3), ABCC10 (MRP7), ABCC11 (MRP8), ABCG2 (BCRP), BAX, BCL2, PARP, p53, CASP3, HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 α , GRP94, GRP78 ve β -Aktin genlerine ait spesifik primerlerin bağlanma sıcaklıklarının tespiti için sıcaklık optimizasyon denemeleri yapılmıştır. Bu bağlamda toplam hacim 20 µL olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. Her bir gen için aynı karışım ve aynı PZR programı uygulanmıştır.

Gerçek zamanlı PZR (qRT-PCR)

NCBI veri tabanı aracılığı ile genlerin dizileri belirlenmiştir. Çizelge 3.2 ‘de belirtilen aksesyon numaraları doğrultusunda NCBI primer blast programı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) yardımıyla gerçek zamanlı PZR için gerekli olan primerler tasarlanmıştır. Syber Green Master Mix (2x) 5 µL, Forward primer (10 mM) 1 µL, Reverse primer (10mM) 1 µL, cDNA 2 µL ve nükleaz içermeyen H₂O 1 µL olacak şekilde hazırlandıktan sonra Piko Real 96 (Thermo Fisher Scientific) cihazı kullanılarak ve amplifikasyon program uygulanarak mRNA ekspresyon düzeyleri incelenmiştir (Çizelge 3.3). Tüm örnekler iki tekrarlı olarak çalışılmıştır. Gerçek zamanlı

PZR sonrasında erime eğrisi (melt curve) analizi yapılarak primerlerin özgünlüğü test edilmiştir.

Çizelge 3.2. Primer dizileri, referanslar ve ürün uzunluğu

Genler	Primer Dizileri (5'-3')	Referanslar	Ürün Uzunluğu
β-Aktin F	TGACGTGGACATCCGCAAAG	NM_001101.5	205
β-Aktin R	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG		
ABC1 F	GTTTCAGGTGGCTCTGGATAAG	NM_001348946.1	93
ABC1 R	AGCGATGACGTCAGCATTAC		
ABCC3 F	TACTCCAAGACAGAGACAGAGG	NM_003786.4	111
ABCC3 R	CCGGTAGCGCACAGAATAAT		
ABCC10 F	TCACCCTGTCTCCACTGTAT	NM_001198934.1	133
ABCC10 R	AACTGGCACCTCTGGTTTAG		
ABCC11 F	GTGGTGCTGATCGTCTTCTT	XM_017023801.2	106
ABCC11 R	CCATGGTTCATTGCTCTCT		
ABCG2 F	TCGTACTGGGACTGGTTATAGG	XM_017008852.2	101
ABCG2 R	GTTGGTCGTCAGGAAGAAGAG		
BAX F	TCATGGGCTGGACATTGGAC	NM_001291428.1	114
BAX R	GAGACAGGGACATCAGTCGC		
BCL2 F	ATCTGGGCCACAAGTGAAGTC	NM_000633.2	209
BCL2 R	TTCGACGTTTTGCCTGAAGAC		
PARP F	GAATGCCAGCGTTACAAGCC	NM_001618.4	212
PARP R	TCTCCCTGAGACGTATGGCA		
P53 F	GTTTTCCCTCCCATGTGCTC	NM_001126112.2	170
P53 R	CAGTCTGGCCAATCCAGGGAAG		
CASP3 F	GCGGTTGTAGAAGAGTTTCGT	NM_001354777.1	146
CASP3 R	TTATTAACGAAAACCAGAGCGCC		
HSP27 F	GAGGAGCATAAAAGCGCAGC	NM_001540.5	347
HSP27 R	CTAACCCTGCGACCACTCC		
HSP 40 F	GAGGGGTTGTGAATGCAGGAG	NM_001300914.1	246
HSP 40 R	CTCAGCAAACATGGCATGAGG		
HSP 60 F	GACGACCTGTCTCGCCG	NM_002156.5	258
HSP 60 R	GGACTTCCCCAACTCTGCTC		
HSP70 F	AAGGAGACAGCCGAAAGTGT	L12723.2	212
HSP70 R	CTTGGTTTCTCTTCTAAGCGAGG		
HSP90 F	GCGCTAGCAGGAGATGGTTA	NM_005348.3	103
HSP90 R	TTTCTGTGCCTACGTGTGCT		
GRP78 F	GAACGTCTGATTGGCGATGC	NM005347.5	143
GRP78 R	ACCACCTTGAACGGCAAGAA		
GRP94 F	GCCAGTTTGGTGTGCGTTTC	NM_003299.3	168
GRP94 R	GGGTAATTGTCGTTCCCCGT		

Çizelge 3.3. Gerçek zamanlı PZR (qRT-PCR) amplifikasyon programı

Amplifikasyon Programı		
Başlangıç denatürasyonu	95 °C	10 dakika
Denatürasyon	95 °C	15 saniye
Bağlanma sıcaklığı	β-Aktin için 51 °C	30 saniye
	ABCB1 için 55 °C	
	ABCC3 için 53 °C	
	ABCC10 için 49 °C	
	ABCC11 için 53 °C	
	ABCG2 için 53 °C	
	BAX için 59 °C	
	BCL2 için 59 °C	
	PARP için 59 °C	
	p53 için 60 °C	
	CASP3 için 59 °C	
	HSP27 için 60 °C	
	HSP40 için 59 °C	
	HSP60 için 60 °C	
HSP70 için 57 °C		
HSP90α için 59 °C		
GRP94 için 59 °C		
GRP78 için 59 °C		
Uzama	72 °C	30 saniye
Final uzama	72 °C	10 dakika

40 döngü

qPZR analizinde Ct (cycle threshold) değeri, floresan sinyal miktarının tespit edilebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değeri) geçen döngü sayısının belirlemesi açısından önemlidir. Ct değeri ne kadar küçük olursa gen ifadesi o kadar erken döngüde başlamaktadır. Gen ifadesinin belirlenmesi için $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerinin hesaplanması gerekmektedir. Hesaplamalar aşağıda belirtilen işlem basamakları ile gerçekleştirilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001).

Referans gen için ΔCT değeri hesaplanmıştır.

$$\Delta CT = Ct (\text{hedef gen}) - Ct (\text{referans gen})$$

Her primer grubu için $\Delta\Delta CT$ değeri hesaplanmıştır.

$$\Delta\Delta CT = \Delta Ct (\text{hedef gen}) - \Delta Ct (\text{referans gen})$$

Genlerin ifadelerinin upregüle (yukarı doğru regülasyon) veya downregüle (aşağı doğru regülasyon) olup olmadığı $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin hesaplanmasıyla elde edilmiştir.

3.2.6. Apoptotik hücre ölümü ile ilgili proteinlerin miktarlarının membran ilişkili protein array ile ölçülmesi

Apoptoz ve ilişkili sinyal yollarında yer alan proteinler olan; BAD, BAX, BID, BIM, Casp3, Casp7, Casp8, CD40, CD40L, cIAP-2, cytoC, DR6, Fas, FasL, HTRA, p38, p27, p53, SMAC, sTNF-R1, sTNF-R2, TNF-alpha, TNF-beta, TRAILR-1, TRAILR-2, TRAILR-3, TRAILR-4, ATM, CHK1, CHK2, eIF2a, SMAD BCL-2, BCL-W, HSP27, HSP60, HSP70, IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6, IGF-1sR, Livin, p21, Survivin, XIAP, AKT, Erk1/2, IkbA, JNK, NFkB, PARP, TAK1 miktarları membran ilişkili protein array kit ile ölçülmüştür.

Protein izolasyonu

MCF-7 (meme kanseri) ve DLD-1 (kolon kanseri) hücreleri 24 saat 37 °C’de inkübe edildikten sonra 75’lik flaslara 5×10^6 hücre sayısı hesaplanarak ekilmiştir. MTT ve RTCA sonuçlarına göre sitotoksik dozu 50 µM olarak belirlenen bileşikler hücrelere uygulanmıştır. 24. saatin sonunda hücreler 1X PBS ile yıkanmış ve 1X tripsin EDTA ile kaldırılmıştır. 15 mL’lik santrifüj tüpler içerisine alınan hücreler 16 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek pellet elde edilmiştir. Tüp içerisine 500 µL RIPA tamponu (Thermo Fisher Scientific, 9806) eklenererek pipetaj yapılmış ve tüpler buz üzerine alınarak 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra steril bir mikrosantrifüj tüp içerisine alınan örnekler 14 000 x g de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Örneklere ait süpernatantlar steril mikrosantrifüj tüp içerisine alınmış ve izole edilen proteinler -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

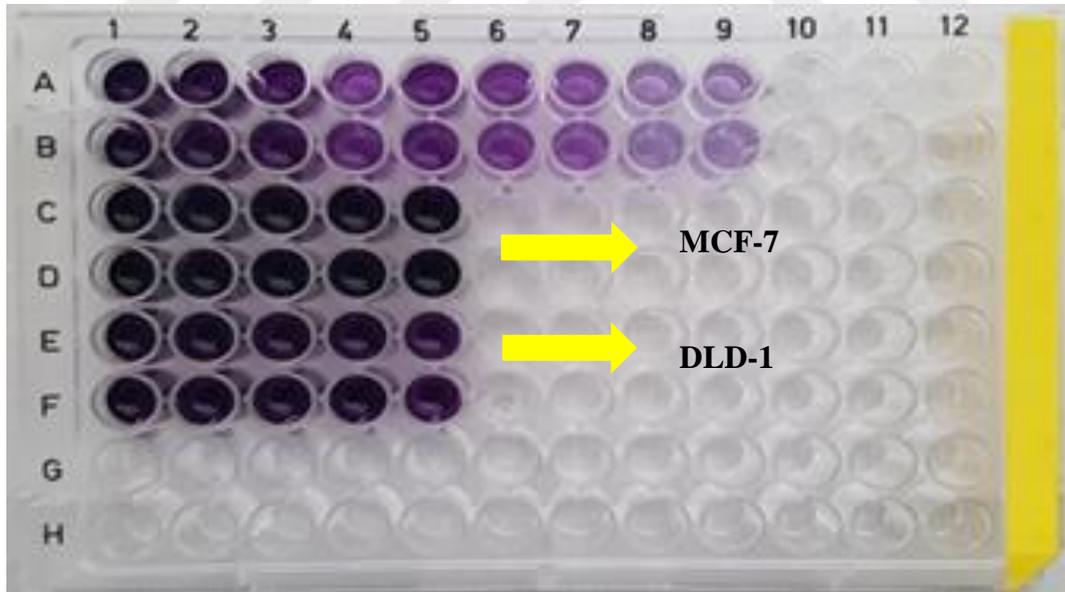
Protein miktar tayini

Protein konsantrasyonları “Thermo Fisher Scientific BCA Protein Assay” ile belirlenmiştir (Çizelge 3.4). BCA’nın iki solüsyonu (Reagent A ve B) 50:1 oranında karıştırılarak, 96-kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 200 µL eklenmiştir. Elde edilen protein lizatlarından ve konsantrasyonları bilinen protein standartlarından her bir kuyucuğa iki tekrarlı olacak şekilde 10’ar µL eklenerek BCA kimyasalı ile iyice karışması sağlanmıştır. Ayrıca

kuyucuklara ripa tamponu blank olarak eklendikten sonra oluşan ürünün ışıktan etkilenmemesi için 96-kuyucuklu plaka alüminyum folyo ile sarılarak tepkimenin oluşması için 37 °C’de 30 dk inkübe edilmiştir. 96-kuyucuklu plakanın oda sıcaklığında beklendikten sonra 562 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür (Thermo Fisher Scientific). Standartların absorbans değeri kullanılarak standart grafik çizilip, doğrusal grafiğin formülü ile R2 değeri hesaplanmış ve ilgili yere absorbans değerleri yazılarak protein lizatlarının konsantrasyonları $\mu\text{g} / \text{mL}$ cinsinden hesaplanmıştır (Resim 3.5).

Çizelge 3.4. BCA protein testi kit standardı konsantrasyonları

Tüpler	Dilüsyon hacmi (mL)	BSA'nın kaynağı ve hacmi (mL)	Final BSA konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
A	0	Stoktan 300	2
B	125	Stoktan 375	1,5
C	325	Stoktan 325	1
D	175	B dilüsyon tüpünden 175	0,75
E	325	C dilüsyon tüpünden 325	0,50
F	325	E dilüsyon tüpünden 325	0,25
G	325	F dilüsyon tüpünden 325	0,125
H	400	G dilüsyon tüpünden 100	0,025
I	400	0	0 (Blank)



Resim 3.5. MCF-7 ve DLD-1 hücre hatlarında BCA protein testi çalışması

Membran ilişkili protein array analizleri:

Apoptoz array

- ❖ Kit içerisindeki tüm materyaller oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiştir.
- ❖ Protein örnekleri bloklama tampon ile 300 µg olacak şekilde dilüe edilmiş ve buz üzerine alınmıştır.
- ❖ Tüm inkübasyonlar ve yıkamalar hafif rotasyon / sallanma (~ 0.5-1 devir / sn) altında yapılmıştır.
- ❖ Membranların antikor olan yüzünün sol üst kısmı işaretlenmiş ve tray üzerine yerleştirilmiştir.
- ❖ 2 mL bloklama tamponu membran üzerine eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tampon kısmı pipetle aspire edilmiştir.
- ❖ 1 mL protein örneği membran üzerine pipetlenerek 5 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra örnek pipetle aspire edilmiştir.
- ❖ 2 mL yıkama tamponu-1 membran üzerine eklenmiş, oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmış ve sıvı kısım pipetle aspire edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır (yıkama tamponu-1 hazırlanması: 10 mL 20X yıkama tamponu-1 içerisine 190 mL nükleaz içermeyen H₂O eklenmiştir).
- ❖ 2 mL yıkama tamponu-2 membran üzerine eklenmiş, oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra sıvı kısım pipetle aspire edilmiştir. Bu işlem 2 kere tekrarlanmıştır (yıkama tamponu-2 hazırlanması: 10 mL 20X yıkama tamponu-2 içerisine 190 mL nükleaz içermeyen H₂O eklenmiştir).
- ❖ 1 mL biotinlenmiş antikor membranı üzerine eklenmiş ve 2 saat ya da gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sıvı kısım pipetle aspire edilmiştir (Biotinlenmiş antikor membranı hazırlanması: 150 µL biotinlenmiş antikor membranı vial içerisine pipetlenmiş ve karıştırılmıştır. Mikrosantrifüj tüpe alınmış ve 1,85 mL bloklama tamponu eklenmiş ve pipetle karıştırılmıştır).
- ❖ 2 mL yıkama tamponu-1 eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sıvı kısım pipetle aspire edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır.
- ❖ 2 mL yıkama tamponu-2 membran üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra sıvı kısım pipetle aspire edilmiştir. Bu işlem 2 kere tekrarlanmıştır.

- ❖ 2 mL 1X HRP-Streptavidin membran üzerine eklenmiş ve 2 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra pipetle sıvı kısım çekilmiştir (HRP Streptavidin hazırlanması: 10 µL HRP Streptavidin içerisine 9990 µL bloklama tamponu eklenmiştir).
- ❖ 2 mL yıkama tamponu-1 membran üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sıvı kısım pipetle aspire edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır.
- ❖ 2 mL yıkama tamponu-2 membran üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sıvı kısım pipetle aspire edilmiştir. Bu işlem 2 kere tekrarlanmıştır.
- ❖ 250 µL tespit etme tamponu-C ve 250 µL tespit etme tamponu-D steril bir mikrosantrifüj tüp içerisinde karıştırılarak membran üzerine pipetlenmiş ve 5 dakika bekletilmiştir.
- ❖ Membranın resimleri kemilüminesans görüntüleme cihazına (Vilber Lourmat/FX5) alınarak her bir spottaki protein ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.
- ❖ Membran resimlerindeki protein ekspresyonlarına ait dizi görüntüsünden elde edilen sayısal verilerin otomatik hesaplanması Excel tabanlı analiz yazılımı araçlarıyla ve İmage J programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

Apoptoz sinyal array

- ❖ Kit içerisindeki tüm materyaller oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiştir.
- ❖ Protein örnekleri bloklama tamponu ile 300 µg olacak şekilde dilüe edilmiş ve buz üzerine alınmıştır.
- ❖ Tüm inkübasyonlar ve yıkamalar hafif rotasyon / sallanma (~ 0.5-1 devir / sn) altında yapılmıştır.
- ❖ Membranların antikor olan yüzünün sol üst kısmı işaretlenmiş ve tray üzerine yerleştirilmiştir.
- ❖ 2 mL bloklama tamponu membran üzerine eklenmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası buffer kısmı pipetle aspire edilmiştir.
- ❖ 1 mL protein örneği membran üzerine pipetlenmiş ve 5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra örnek pipetle ile aspire edilmiştir.
- ❖ 2 mL yıkama tamponu-1 membran üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra sıvı kısım pipetle aspire edilmiştir. Bu işlem 3 kere

- tekrarlanmıştır (yıkama tamponu-1 hazırlanması: 10 mL 20X yıkama tamponu-1 içerisine 190 mL nükleaz içermeyen H₂O eklenmiştir).
- ❖ 2 mL yıkama tamponu-2 membran üzerine eklenmiştir ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra sıvı kısım pipetle aspire edilmiştir. Bu işlem 2 kere tekrarlanmıştır (yıkama tamponu-2 hazırlanması: 10 mL 20X yıkama tamponu-2 içerisine 190 mL nükleaz içermeyen H₂O eklenmiştir).
 - ❖ 1 mL tespit etme antikor kokteyli membran üzerine eklenmiş ve 1,5-2 saat ya da geceboyu inkübasyona bırakıldıktan sonra sıvı kısım pipetle aspire edilmiştir (Tespit etme antikor kokteyli hazırlanması: tespit etme antikor kokteyl viali içerisine 2 mL bloklama tamponu eklenmiş ve pipetle karıştırılmıştır).
 - ❖ 2 mL yıkama tamponu-1 eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra sıvı kısım pipetle aspire edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır.
 - ❖ 2 mL yıkama tamponu-2 membran üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sıvı kısım pipetle aspire edilmiştir. Bu işlem 2 kere tekrarlanmıştır.
 - ❖ 2 mL 1X HRP-Anti-Rabbit IgG konsantrasyonu membran üzerine eklenmiş ve 2 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra pipetle sıvı kısım çekilmiştir (HRP-Anti-Rabbit IgG konsantrasyonunun hazırlanması: 10 µL HRP-Anti-Rabbit IgG konsantrasyon içerisine 9990 µL bloklama tamponu eklenmiştir).
 - ❖ 2 mL yıkama tamponu-1 membran üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sıvı kısım pipetle aspire edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır.
 - ❖ 2 mL yıkama tamponu-2 membran üzerine eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sıvı kısım pipetle aspire edilmiştir. Bu işlem 2 kere tekrarlanmıştır.
 - ❖ 250 µL tespit etme tamponu-C ve 250 µL tespit etme tampon- D steril bir mikrosantrifüj tüp içerisinde karıştırılarak membran üzerine pipetlenmiş ve 5 dakika bekletilmiştir.
 - ❖ Membranın resimleri kemilüminesans görüntüleme cihazına (Vilber Lourmat/FX5) alınarak her bir spottaki protein ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.
 - ❖ Membran resimlerindeki protein ekspresyonlarına ait dizi görüntüsünden elde edilen sayısal verilerin otomatik hesaplanması Excel tabanlı analiz yazılımı araçlarıyla ve İmage J programıyla gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Antioksidan Analizleri

İzoindol türevli bileşiklerin antioksidan aktiviteleri (25-200 μM) serbest radikal süpürücü (Brand-Williams ve diğerleri, 1995), indirgeme (Oyaizu, 1986) ve metal şelatlama (Decker ve Welch, 1990) yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre canlılığı eğrisi belirlenerek % 50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplanmıştır.

BM-1 ve SM-1 için; DPPH aktivitesi BHT, BHA ve Trolox standartlarına göre karşılaştırılmıştır. IC_{50} değeri BM-1 için 175 $\mu\text{g} / \text{mL}$ iken SM-1 için 96 $\mu\text{g} / \text{mL}$ bulunmuştur (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2) (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Metal şelatlama aktivitesi BHT, EDTA ve Trolox standartlarına göre karşılaştırılmıştır. IC_{50} değeri BM-1 için 81 $\mu\text{g} / \text{mL}$ iken SM-1 için 21 $\mu\text{g} / \text{mL}$ bulunmuştur (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4) (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). DPPH ve metal şelatlama aktivitesi sonucu SM-1 > BM-1 olarak değerlendirilmiştir. BM-1 ve SM-1 yapısal olarak karşılaştırdığımızda en büyük farklılık SM-1'in heterohalkalı yapı haline getirilmesidir. SM-1'de toplam üç heterohalkalı yapı bulunmaktadır. Heterohalkalı yapılar seçici bağlanmaya sebep olan enerji düzeyine sahip olmaları nedeniyle biyolojik aktivite özelliklerini geniş skala da gösteren moleküllerdir. SM-1 olarak sentezlenen molekülde bulunan N-H pirolidin halkası da bu seçiciliği arttıran H-bağlanma özelliği nedeniyle BM-1 bileşiğine göre etkin olarak tespit edilmiştir.

İndirgeme aktivitesi EDTA, GALLİC ve Trolox standartlarına göre karşılaştırılmıştır. İndirgeme aktivitesi sonuçları standart sentetik antioksidan bileşiklere oranla çok düşük bir değer olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6) (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Bu değerler, hücre canlılığı için yapılan MTT ve RTCA analizlerinin IC_{50} değerleri ile yaklaşık olarak benzer sonuçlar vermiştir.

BM-2 ve SM-2 için; DPPH aktivitesi BHT, BHA ve Trolox standartlarına göre karşılaştırılmıştır. IC_{50} değeri BM-2 için 142 $\mu\text{g} / \text{mL}$ iken SM-2 için 108 $\mu\text{g} / \text{mL}$ bulunmuştur (Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8) (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Metal şelatlama aktivitesi BHT, EDTA ve Trolox standartlarına göre karşılaştırılmıştır. IC_{50} değeri BM-2 için 148 $\mu\text{g} / \text{mL}$ iken SM-2 için 35 $\mu\text{g} / \text{mL}$ bulunmuştur (Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10) (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). DPPH ve metal

şelatlama aktivitesi sonucu SM-2 > BM-2 olarak değerlendirilmiştir. BM-2 ile SM-2 arasındaki temel farklılık diğer BM-1 ve SM-1 moleküllerinde olduğu gibi heterohalkalı ve hetero atoma bağlı aktif hidrojen bağı içermesiyle açıklanmaktadır. BM-2 bileşiğine göre karşılaştırıldığında SM-2 molekülünün bisiklik yapıda olması nedeniyle aktif bölge ile etkileşimde seçiciliği arttırıcı özelliğe sahip olduğu öngörülmektedir.

İndirgeme aktivitesi EDTA, GALLİC ve Trolox standartlarına göre karşılaştırılmıştır. İndirgeme aktivitesi sonuçları standart sentetik antioksidan bileşiklere oranla çok düşük bir değer olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12) (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). Bu değerler, hücre canlılığı için yapılan MTT ve RTCA analizlerinin IC₅₀ değerleri ile yaklaşık olarak benzer sonuçlar vermiştir.

4.1.1. Serbest radikal süpürücü aktivite (DPPH)

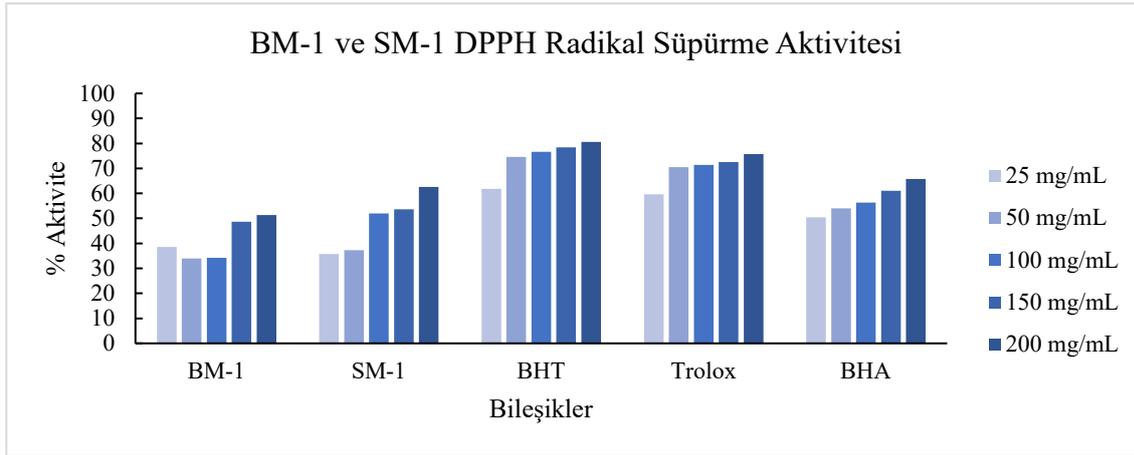
Serbest radikal süpürücü aktivitesi; 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) ile Brand-Williams ve diğerleri tarafından kullanılan yöntemle belirlenmiştir. Standart olarak bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve Trolox (25-200 µg/mL) kullanılmıştır. Yüzde inhibisyon aktivitesi, aşağıda verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır: Serbest radikal süpürücü aktivitesi (%) = [(A₀ - A₁) / A₀] x 100 (A₀ = kontrol absorbansı ve A₁ = örnek solüsyon absorbansı)

Çizelge 4.1. BM-1, SM-1 bileşiklerinin DPPH absorbans ölçümleri

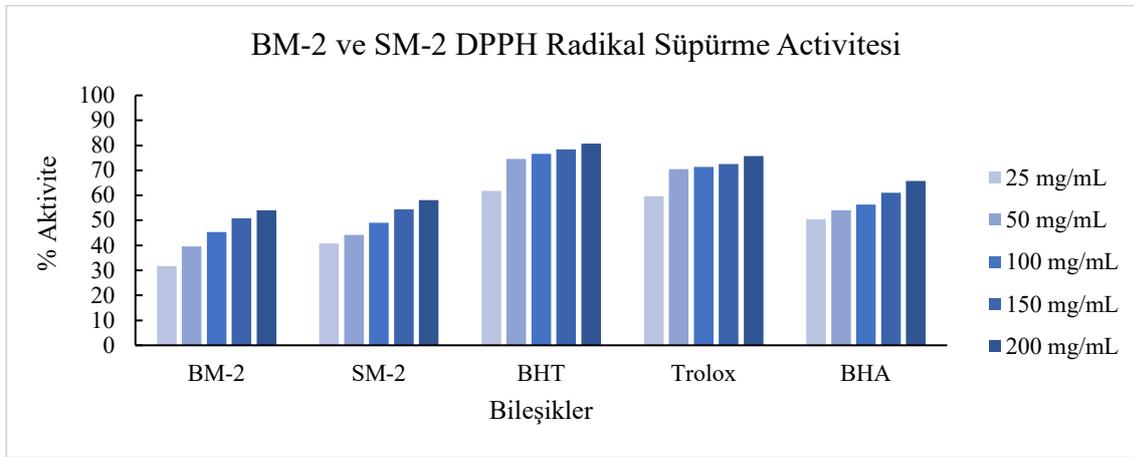
Bileşikler	25 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	150 mg/mL	200 mg/mL	IC ₅₀
BM-1	38,53	33,94	34,25	48,64	51,28	175,75
SM-1	35,76	37,28	51,92	53,67	62,58	93,44
BHT	61,84	74,57	76,67	78,36	80,65	
Trolox	59,59	70,52	71,38	72,54	75,68	
BHA	50,45	53,97	56,29	60,99	65,82	

Çizelge 4.2. BM-2, SM-2 bileşiklerinin DPPH absorbans ölçümleri

Bileşikler	25 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	150 mg/mL	200 mg/mL	IC ₅₀
BM-2	31,65	39,57	45,27	50,84	54,03	142,46
SM-2	40,72	44,16	49,08	54,38	58,09	108,68
BHT	61,84	74,57	76,67	78,36	80,65	
Trolox	59,59	70,52	71,38	72,54	75,68	
BHA	50,45	53,97	56,29	60,99	65,82	



Şekil 4.1. BM-1, SM-1 bileşiklerinin DPPH aktivitesi



Şekil 4.2. BM-2, SM-2 bileşiklerinin DPPH aktivitesi

4.1.2. Metal şelatlama aktivitesi (Fe²⁺ iyonlarının şelatlama aktivitesi)

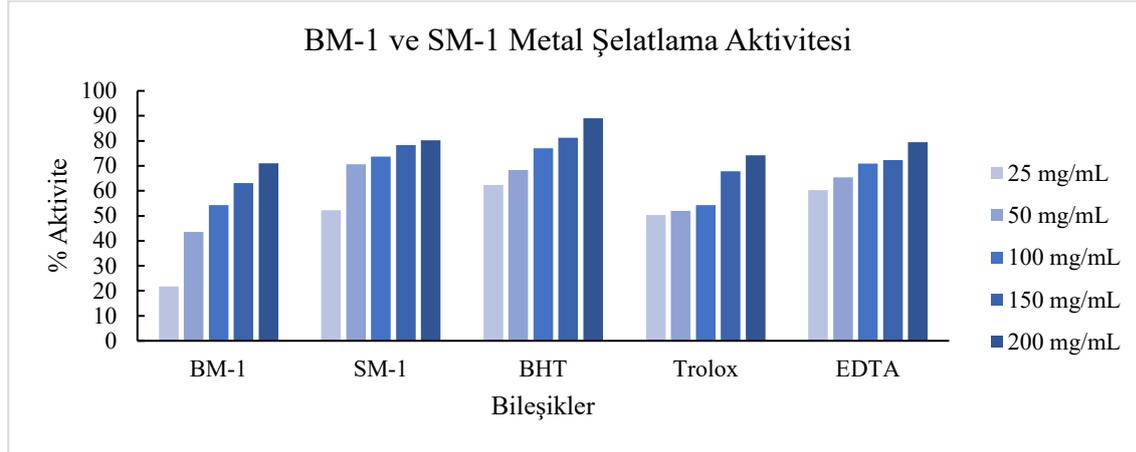
Demir iyonları (Fe²⁺) üzerinde bileşiklerin şelat aktivitesi Decker ve Welch yöntemine göre ölçülmüştür. Standart olarak bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), Trolox ve EDTA (25-200 µg/mL) kullanılmıştır. Metal şelatlama aktivitesi (%) = $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$

Çizelge 4.3. BM-1, SM-1 bileşiklerinin metal şelatlama absorbans ölçümleri

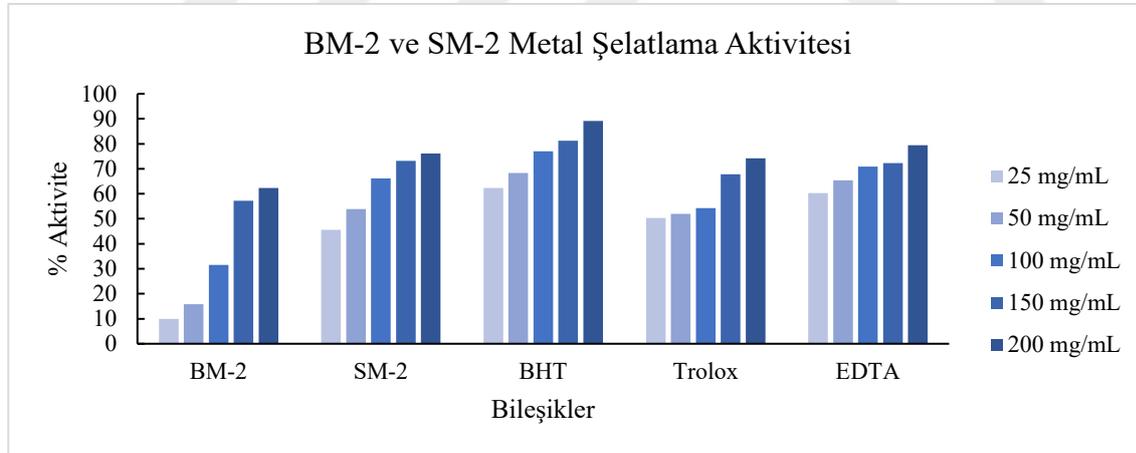
Bileşikler	25 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	150 mg/mL	200 mg/mL	IC50
BM-1	21,66	43,54	54,33	63,15	71,04	81,34
SM-1	52,29	70,61	73,72	78,26	80,19	21,88
BHT	62,37	68,29	77,00	81,25	89,09	
Trolox	50,38	52,01	54,27	67,84	74,25	
EDTA	60,28	65,38	70,85	72,32	79,47	

Çizelge 4.4. BM-2, SM-2 bileşiklerinin metal şelatlama absorbans ölçümleri

Bileşikler	25 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	150 mg/mL	200 mg/mL	IC50
BM-2	10,00	15,82	31,51	57,24	62,35	148,39
SM-2	45,62	53,87	66,21	73,12	76,09	35,67
BHT	62,37	68,29	77,00	81,25	89,09	
Trolox	50,38	52,01	54,27	67,84	74,25	
EDTA	60,28	65,38	70,85	72,32	79,47	



Şekil 4.3. BM-1, SM-1 bileşiklerinin metal şelatlama aktivitesi



Şekil 4.4. BM-2, SM-2 bileşiklerinin metal şelatlama aktivitesi

4.1.3. İndirgeme aktivitesi

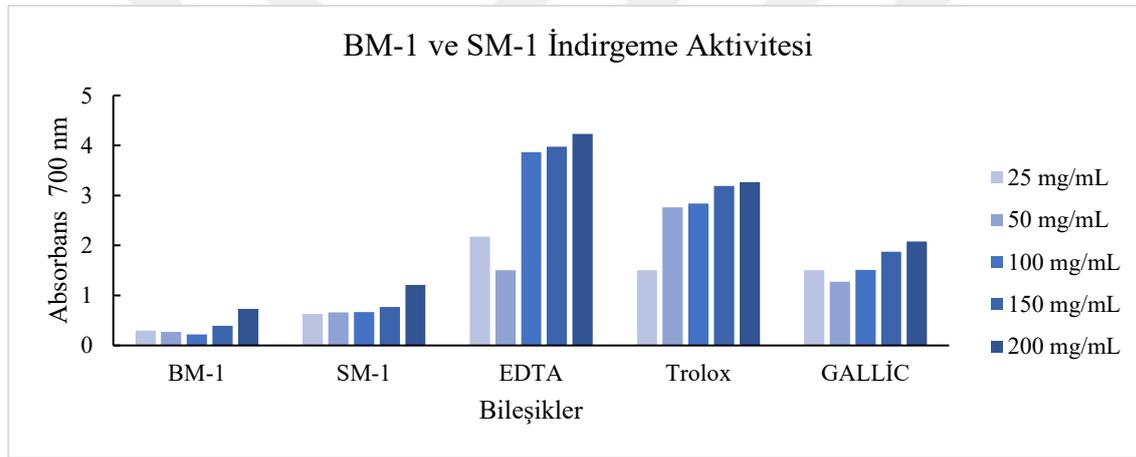
Bileşiklerin indirgeme aktivitesinin ölçümleri Oyaizu yöntemine göre yapılmıştır. Standart olarak EDTA, GALLİC ve Trolox kullanılmıştır. İndirgeme Aktivitesi: 700 nm absorbans ölçüm değeri olarak verilmiştir.

Çizelge 4.5. BM-1, SM-1 bileşiklerinin indirgeme absorbans ölçümleri

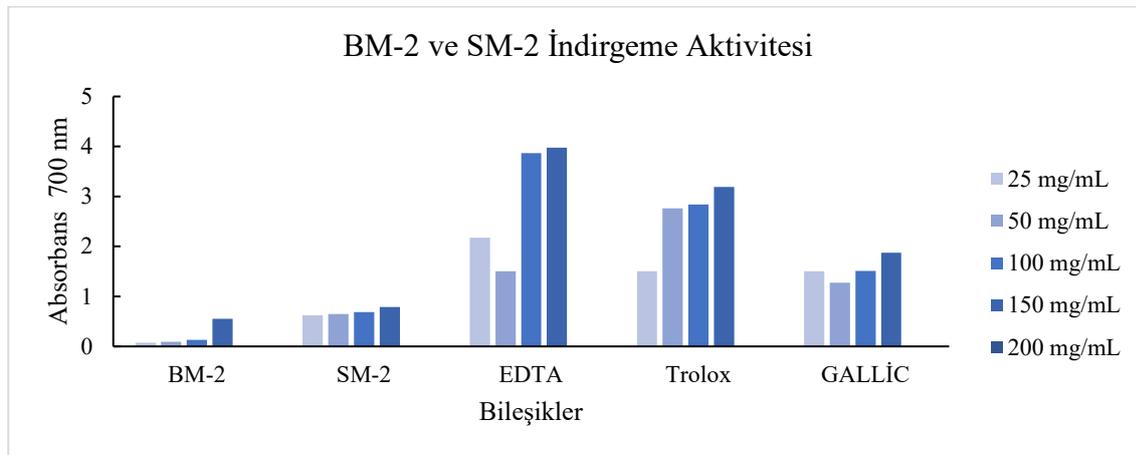
Bileşikler	25 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	150 mg/mL	200 mg/mL
BM-1	0,296	0,272	0,219	0,394	0,733
SM-1	0,629	0,660	0,666	0,770	1,212
EDTA	2,178	1,503	3,865	3,975	4,231
Trolox	1,506	2,765	2,837	3,188	3,270
GALLİC	1,506	1,273	1,511	1,876	2,078

Çizelge 4.6. BM-2, SM-2 bileşiklerinin indirgeme absorbans ölçümleri

Bileşikler	25 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	150 mg/mL	200 mg/mL
BM-2	0,072	0,093	0,130	0,554	0,841
SM-2	0,623	0,648	0,686	0,786	0,995
EDTA	2,178	1,503	3,865	3,975	4,231
Trolox	1,506	2,765	2,837	3,188	3,270
GALLİC	1,506	1,273	1,511	1,876	2,078



Şekil 4.5. BM-1, SM-1 bileşiklerinin indirgeme aktivitesi



Şekil 4.6. BM-2, SM-2 bileşiklerinin indirgeme aktivitesi

4.2. Hücre proliferasyon analizleri

MCF-7 ve MCF-12A, DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında, heterohalkalı bileşiklerin sitotoksik dozu (1,56-100 μM) MTT testi (van Meerloo ve diğerleri, 2011) ve RTCA yöntemiyle (Moniri ve diğerleri, 2015) belirlenmiştir. Ayrıca Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre canlılığı eğrisi belirlenerek % 50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplanmıştır.

4.2.1. MTT yöntemi

Heterohalkalı bileşiklerin, MCF-7 ve MCF-12A, DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatları üzerindeki olası sitotoksik etkisi MTT (Sigma-Aldrich) ile üretici firmanın kullanım talimatına göre uygulanmıştır. Anti-kanser bileşiği olan kurkumin (100 μM) ve mitomisin C (100 μM) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

MCF-7 hücre hattında; BM-1 bileşiğinin *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 50 μM konsantrasyonda, SM-1 bileşiğinin ise en iyi etkiyi 100 μM konsantrasyonda göstermiştir. BM-2 bileşiğinin hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 25 μM konsantrasyonda, SM-2 bileşiğinin ise en iyi etkiyi 100 μM konsantrasyonda göstermiştir. MCF-7 hücre hattında bileşiklerin % canlılık aktiviteleri 83 ile 56 arasında belirlenmiştir. Bu nedenle BM-1, SM-1, BM-2 ve SM-2 bileşiklerin MCF-7 hücresinde antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir (Çizelge 4.7) (Şekil 4.7). Bileşikler arasında karşılaştırılma yapıldığında; BM-1'in % canlılık aktivitesi 83,51 iken SM-1'in % canlılık aktivitesi 69,18 olarak tespit edilmiştir. SM-1 bileşiği BM-1 bileşiğine oranda MCF-7 hücrelerinde daha etkili sitotoksik aktiviteye sahiptir. BM-2'in % canlılık aktivitesi 60,90 iken SM-2'in % canlılık aktivitesi 56,03 olarak tespit edilmiştir. SM-2 bileşiği BM-2 bileşiğine oranda MCF-7 hücrelerinde daha etkili sitotoksik aktiviteye sahiptir. BM-1 ve BM-2 ile SM-1 ve SM-2 arasındaki en büyük farklılık heterohalkalı yapıdan kaynaklanmaktadır. Heterohalkalı yapılar seçici bağlanmaya sebep olan enerji düzeyine sahip olmaları nedeniyle biyolojik aktivite özellikleri daha yüksek orana sahip moleküllerdir.

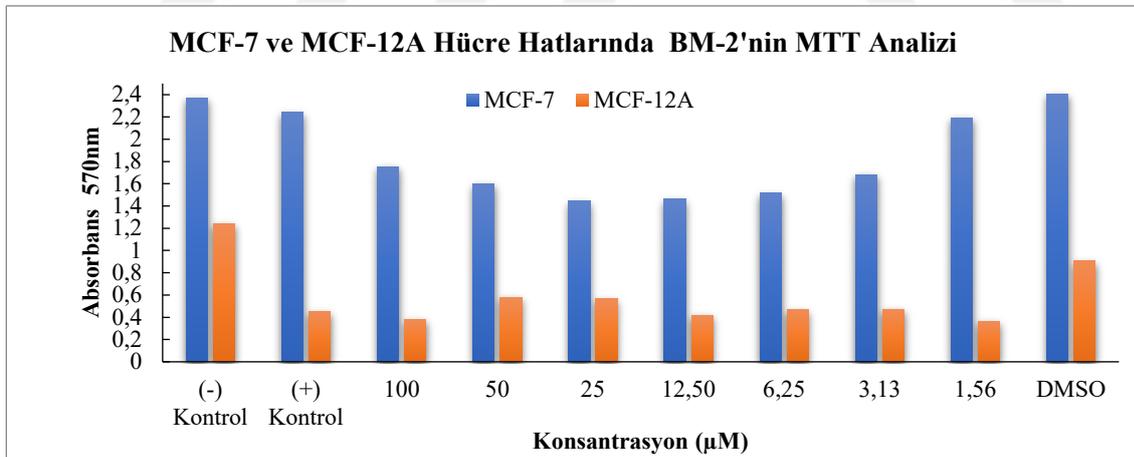
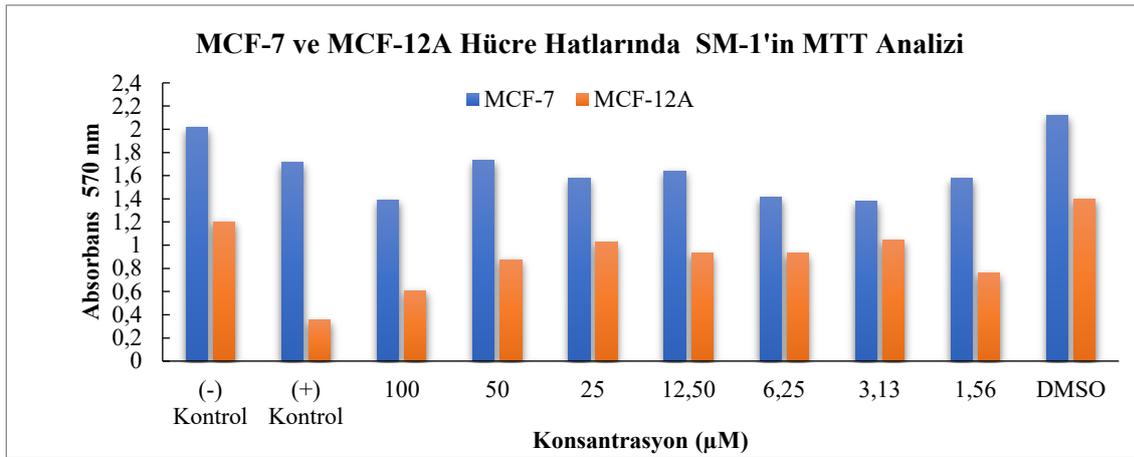
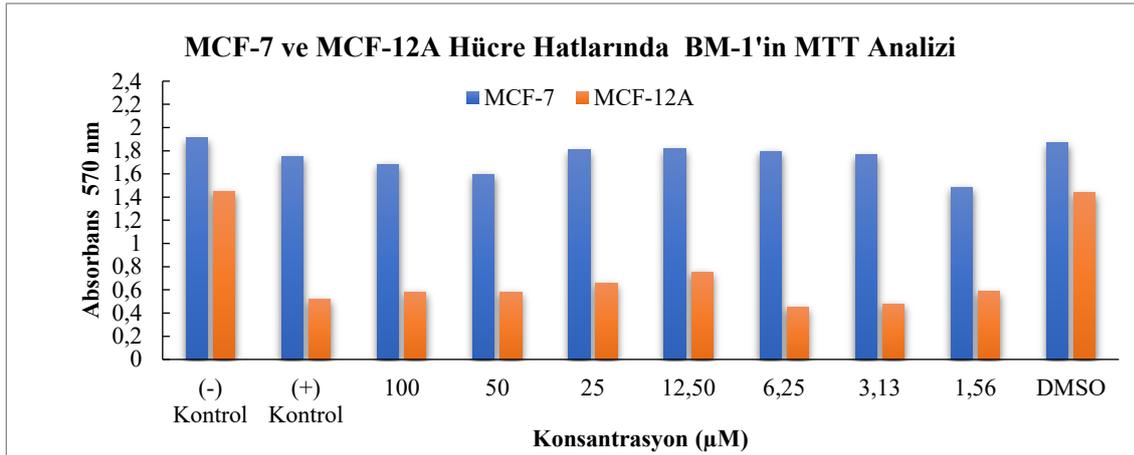
Çizelge 4.7. Bileşiklerin MCF-7 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri

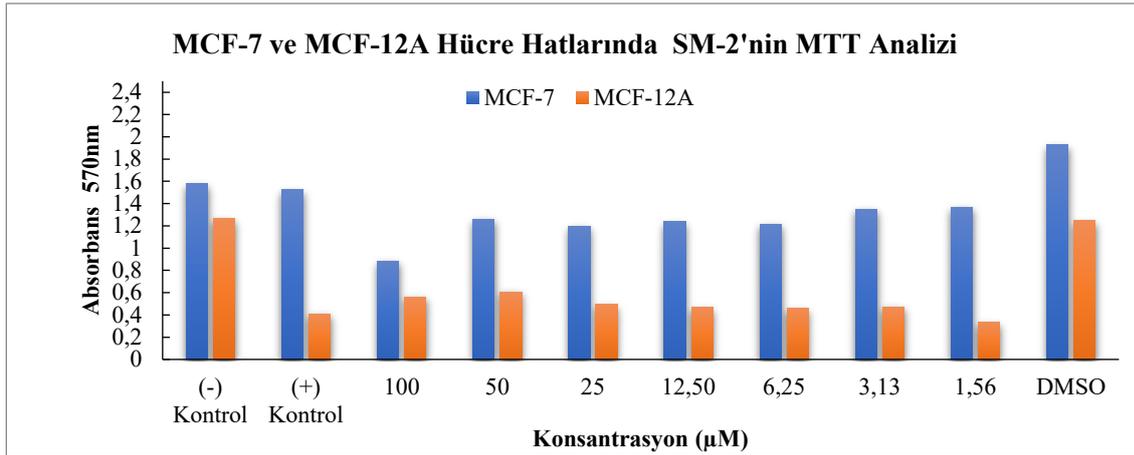
MCF-7 Hücre Hattı	BM-1	SM-1	BM-2	SM-2
(-) Kontrol	1,9130	2,0121	2,3733	1,5800
(+) Kontrol	1,7510	1,7138	2,2402	1,5250
100 µM	1,6832	1,3921	1,7520	0,8854
50 µM	1,5976	1,7289	1,5981	1,2575
25 µM	1,8076	1,5749	1,4454	1,1978
12,5 µM	1,8150	1,6396	1,4626	1,2386
6,25 µM	1,7970	1,4131	1,5158	1,2147
3,13 µM	1,7648	1,3779	1,6808	1,3493
1,56 µM	1,4859	1,5749	2,1942	1,3699
DMSO	1,8673	2,1201	2,4070	1,9292
% Aktivite	83,51	69,18	60,90	56,03

MCF-12A hücre hattında; BM-1 bileşiğinin *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. SM-1 bileşiği negatif kontrole göre karşılaştırıldığında en yüksek aktivite 100 µM konsantrasyondadır. BM-2 ve SM-2 bileşiklerinin tüm konsantrasyonlarda yüksek aktivite gösterdiği bulgulanmıştır (Çizelge 4.8) (Şekil 4.7). SM-1 ve SM-2 heterohalkalı yapıları nedeniyle yüksek biyolojik aktiviteye sahiptirler ve MCF-12A normal hücrelerinde de belirli oranda sitotoksik aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu sitotoksik aktivitenin (+) kontrol olarak kullanılan anti kanserojen ajanlara oranla benzer niteliğe sahip olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.8. Bileşiklerin MCF-12A hücre hattında MTT absorbans ölçümleri

MCF-12A Hücre Hattı	BM-1	SM-1	BM-2	SM-2
(-) Kontrol	1,4500	1,2029	1,2436	1,2649
(+) Kontrol	0,5189	0,3522	0,4509	0,4099
100 µM	0,5808	0,6091	0,3824	0,5631
50 µM	0,5821	0,8758	0,5799	0,6082
25 µM	0,6595	1,0268	0,5670	0,4932
12,5 µM	0,7543	0,9314	0,4185	0,4674
6,25 µM	0,4496	0,9295	0,4684	0,4590
3,13 µM	0,4785	1,0411	0,4711	0,4737
1,56 µM	0,5842	0,7576	0,3632	0,3317
DMSO	1,4379	1,3977	0,9057	1,2465





Şekil 4.7. Bileşiklerin MCF-7 ve MCF-12A hücre hatlarında MTT analizleri

DLD-1 hücre hattında: BM-1 bileşiğinin *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 50 µM konsantrasyonda, SM-1 bileşiği ise en iyi etkiyi 100 µM konsantrasyonda göstermiştir. BM-2 bileşiğinin hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 50 µM konsantrasyonda, SM-2 bileşiği ise en iyi etkiyi 100 µM konsantrasyonda göstermiştir. DLD-1 hücre hattında bileşiklerin % canlılık aktiviteleri 71 ile 43 arasında belirlenmiştir. BM-1, SM-1 ve BM-2 bileşikleri DLD-1 hücrelerinde antiproliferatif aktiviteye sahiptir. SM-2 bileşiği ise DLD-1 hücrelerinde sitotoksik aktiviteye sahiptir (Çizelge 4.9) (Şekil 4.8). Bileşikler arasında karşılaştırılma yapıldığında; BM-1'in % canlılık aktivitesi 69,98 iken SM-1'in % canlılık aktivitesi 71,31 olarak tespit edilmiştir. BM-1 ve SM-1 bileşiği DLD-1 hücrelerinde benzer sitotoksik aktiviteye sahiptir. BM-2'in % canlılık aktivitesi 65,02 iken SM-2'in % canlılık aktivitesi 43,91 olarak tespit edilmiştir. SM-2 bileşiği BM-2 bileşiğine oranda DLD-1 hücrelerinde daha etkili sitotoksik aktiviteye sahiptir. SM-2 molekülünün bisiklik yapıda olması nedeniyle BM-2 bileşiğine göre biyolojik aktivitede seçiciliği artırıcı özelliğe sahip olduğu düşünülmektedir.

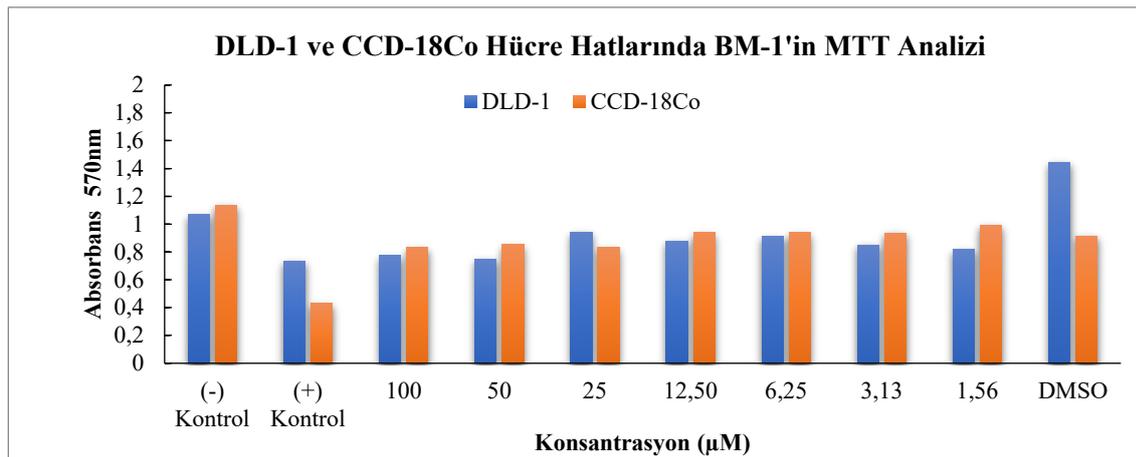
Çizelge 4.9. Bileşiklerin DLD-1 hücre hattında MTT absorbans ölçümleri

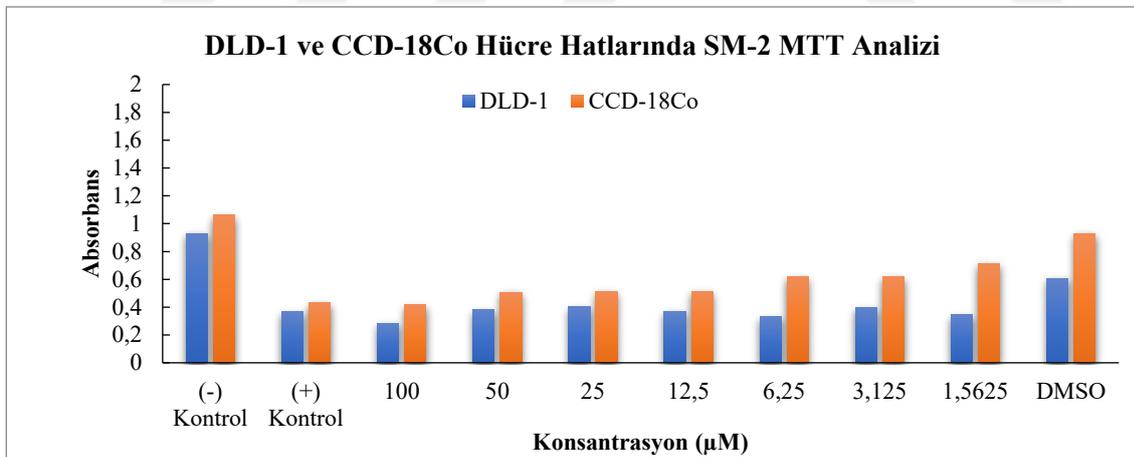
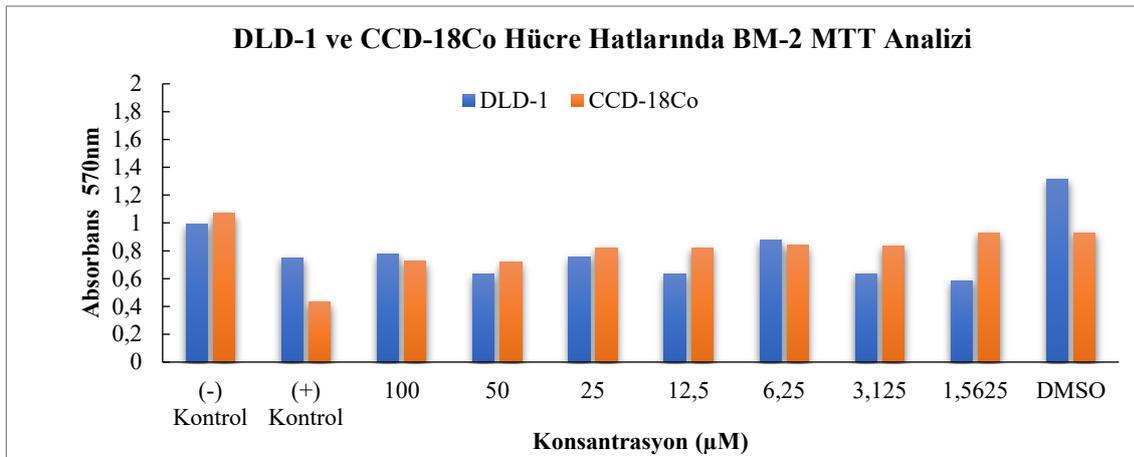
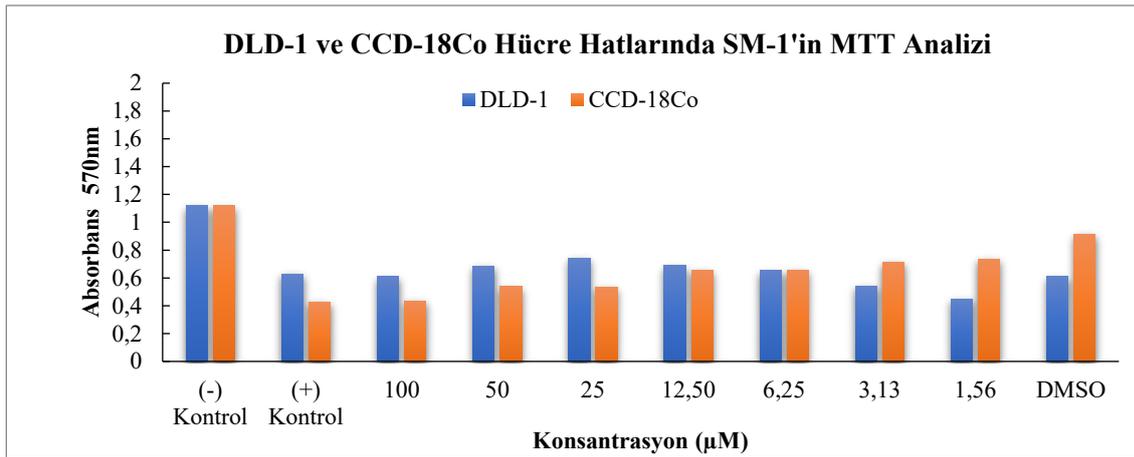
DLD-1 Hücre Hattı	BM-1	SM-1	BM-2	SM-2
(-) Kontrol	1,0681	1,1193	0,9917	0,9290
(+) Kontrol	0,7345	0,6282	0,7517	0,3658
100 µM	0,7733	0,6120	0,7795	0,2836
50 µM	0,7475	0,6851	0,6301	0,3831
25 µM	0,9428	0,7429	0,7588	0,4028
12,5 µM	0,8789	0,6899	0,6320	0,3689
6,25 µM	0,9098	0,6528	0,8763	0,3297
3,13 µM	0,8494	0,5422	0,6341	0,3947
1,56 µM	0,8160	0,4493	0,5865	0,3446
DMSO	1,4458	0,6093	1,3154	0,6069
% Aktivite	69,98	71,31	65,02	43,91

CCD-18Co hücre hattında; BM-1 bileşiğinin *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. SM-1 bileşiği ise tüm konsantrasyonlarda yüksek aktivite göstermiştir. BM-2 bileşiğinin hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. SM-2 bileşiğinin ise tüm konsantrasyonlarda yüksek aktivite göstermiştir (Çizelge 4.10) (Şekil 4.8). SM-1 ve SM-2 heterohalkalı bileşikler yüksek biyolojik aktiviteye sahip olmalarına rağmen CCD-18Co hücrelerinde düşük oranda sitotoksik aktivite gösterdikleri gözlenmiştir. Ayrıca sitotoksik aktivitenin (+) kontrol olarak kullanılan anti kanserojen ajanlara oranla daha az sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. Bileşiklerin CCD-18Co hücre hattında MTT absorbans sonuçları

CCD-18Co Hücre Hattı	BM-1	SM-1	BM-2	SM-2
(-) Kontrol	1,1378	1,1189	1,0686	1,0614
(+) Kontrol	0,4288	0,4288	0,4296	0,4296
100 μ M	0,8329	0,4364	0,7243	0,4166
50 μ M	0,8540	0,5379	0,7182	0,5071
25 μ M	0,8324	0,5341	0,8229	0,5133
12,5 μ M	0,9409	0,6555	0,8229	0,5144
6,25 μ M	0,9404	0,6571	0,8392	0,6170
3,13 μ M	0,9374	0,7136	0,8371	0,6191
1,56 μ M	0,9937	0,7364	0,9295	0,7147
DMSO	0,9145	0,9145	0,9293	0,9293





Şekil 4.8. Bileşiklerin DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında MTT analizleri

4.2.2. MTT verilerinin istatistiksel analizi

Veri setleri arasındaki farklılıkların önemi, MCF-7 ve MCF-12A, DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında MTT testinin en etkili dozları (üçlü tekrar) seçilerek (100-50-25 μ M) SPSS 20.0 programı kullanılarak ANOVA testi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar hücre hatları için $ID50 \pm SE$ (ortalamanın standart hatası) olarak belirtilmiştir.

Gruplar arasındaki ilişkileri anlamak için Post Hoc analizler de gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle ilk olarak varyans testi sonucunun homojenliği gözlenmiştir ve bu sonuçlara bağlı olarak farklı testler uygulanmıştır. Games-Howell ve Tukey testleri, MCF-7 ve MCF-12A, DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında heterohalkalı bileşiklerin çoklu karşılaştırmaları için kullanılmıştır.

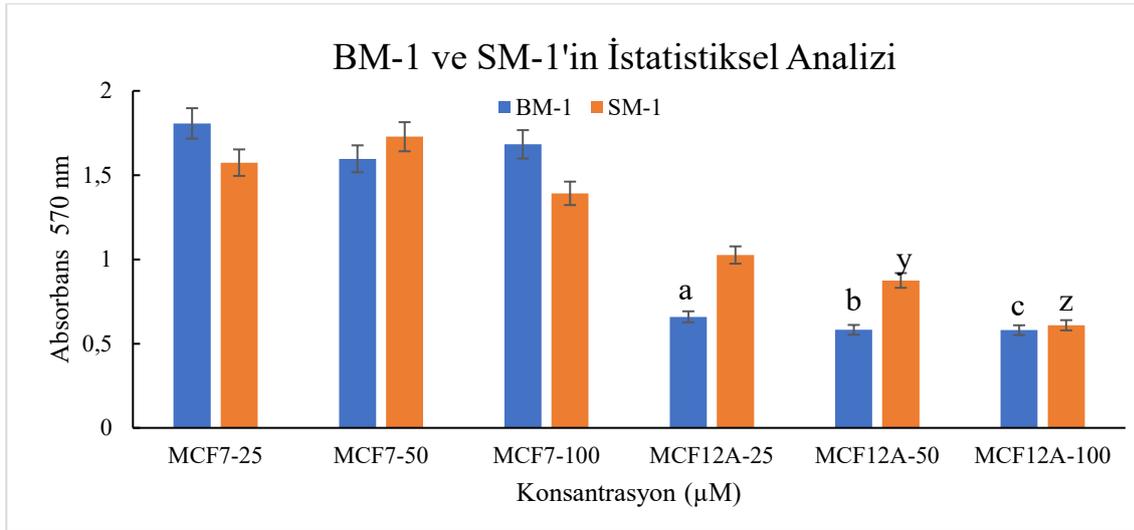
Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; MCF-7 ve MCF-12A, DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatları ile bileşiklerin hücre canlılığı konsantrasyonları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p < 0,005$).

MCF-7 ve MCF-12A hücre hatları arasında BM-1 ve SM-1 bileşiklerinin hücre canlılığı açısından konsantrasyon farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.11) (Şekil 4.9).

BM-1 bileşiğinin MCF-7 ve MCF-12A hücre hatları arasında sitotoksik aktiviteleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; MCF-7 hücresinin 25 μ M konsantrasyonu ile MCF-12A hücresinin 25 μ M konsantrasyonu arasında, MCF-7 hücresinin 50 μ M konsantrasyonu ile MCF-12A hücresinin 50 μ M konsantrasyonu arasında ve MCF-7 hücresinin 100 μ M konsantrasyonu ile MCF-12A hücresinin 100 μ M konsantrasyonu arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir. SM-1 bileşiğinin MCF-7 ve MCF-12A hücre hatları arasında sitotoksik aktiviteleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; MCF-7 hücresinin 50 μ M konsantrasyonu ile MCF-12A hücresinin 50 μ M konsantrasyonu arasında ve MCF-7 hücresinin 100 μ M konsantrasyonu ile MCF-12A hücresinin 100 μ M konsantrasyonu arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir.

Çizelge 4.11. MCF-7 ve MCF-12A hücre hatlarında BM-1 ve SM-1 bileşiklerinin istatistik verileri

Hücre Hatları	Konsantrasyon (μM)	Bileşikler ID50 [μm] \pm SE	
		BM-1	SM-1
MCF-7	25	1,807 \pm 0,085	1,574 \pm 0,164
	50	1,597 \pm 0,009	1,728 \pm 0,167
	100	1,683 \pm 0,042	1,392 \pm 0,103
MCF-12A	25	0,659 \pm 0,167	1,026 \pm 0,097
	50	0,582 \pm 0,077	0,875 \pm 0,179
	100	0,580 \pm 0,048	0,609 \pm 0,125



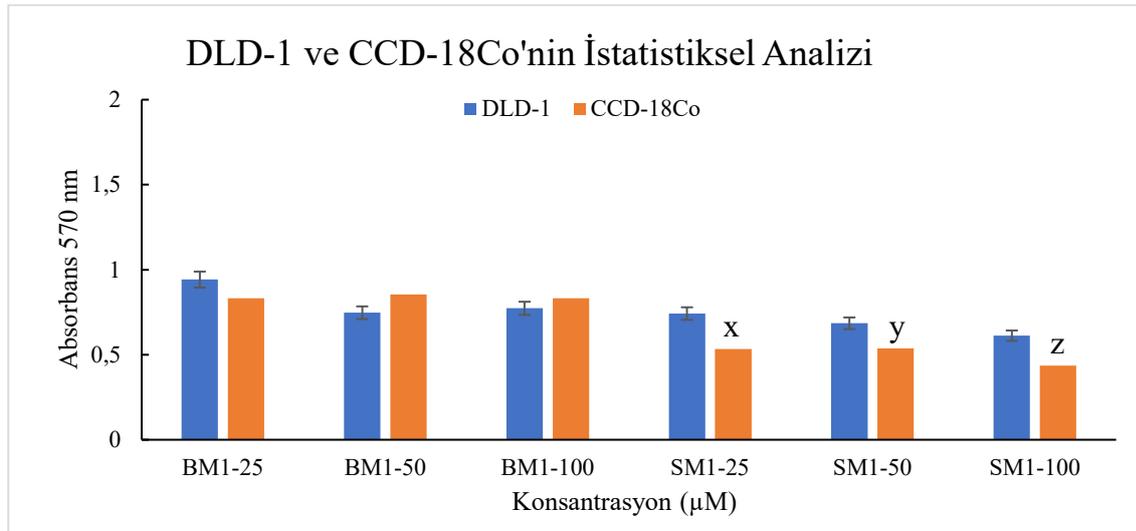
Şekil 4.9. MCF-7 ve MCF-12A hücre hatlarında BM-1 ve SM-1 bileşiklerinin hücre canlılığı açısından istatistiksel analizi. (a, b, c ve x, y, z hücre hatları arasındaki istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.)

BM-1 ve SM-1 bileşikleri arasında CCD-18Co hücre hattında hücre canlılığı açısından konsantrasyon farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.12) (Şekil 4.10).

CCD-18Co hücre hattının BM-1 ve SM-1 bileşikleri arasında sitotoksik aktiviteleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; BM-1 bileşiğinin 25 μM konsantrasyonu ile SM-1 bileşiğinin 25 μM konsantrasyonu arasında, BM-1 bileşiğinin 50 μM konsantrasyonu ile SM-1 bileşiğinin 50 μM konsantrasyonu arasında ve BM-1 bileşiğinin 100 μM konsantrasyonu ile SM-1 bileşiğinin 100 μM konsantrasyonu arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12. DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında BM-1 ve SM-1 bileşiklerinin istatistik verileri

Bileşikler	Konsantrasyon (μM)	Hücre Hatları ID50 [μm] \pm SE	
		DLD-1	CCD-18Co
BM-1	25	0,942 \pm 0,025	0,832 \pm 0,005
	50	0,747 \pm 0,082	0,854 \pm 0,012
	100	0,773 \pm 0,002	0,832 \pm 0,003
SM-1	25	0,742 \pm 0,074	0,534 \pm 0,021
	50	0,685 \pm 0,047	0,537 \pm 0,026
	100	0,612 \pm 0,048	0,436 \pm 0,02



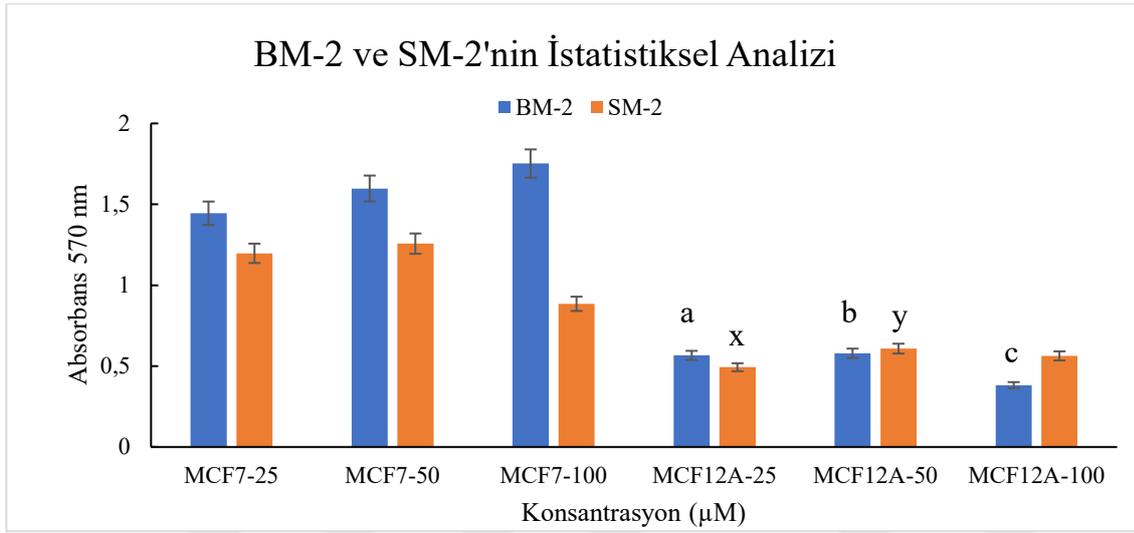
Şekil 4.10. DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında BM-1 ve SM-1 bileşiklerinin hücre canlılığı açısından istatistiksel analizi. (a, b, c ve x, y, z bileşikler arasındaki istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.)

MCF-7 ve MCF-12A hücre hatları arasında BM-2 ve SM-2 bileşiklerinin hücre canlılığı açısından konsantrasyon farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.13) (Şekil 4.11).

BM-2 bileşiğinin MCF-7 ve MCF-12A hücre hatları arasında sitotoksik aktiviteleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; MCF-7 hüresinin 25 μM konsantrasyonu ile MCF-12A hüresinin 25 μM konsantrasyonu arasında, MCF-7 hüresinin 50 μM konsantrasyonu ile MCF-12A hüresinin 50 μM konsantrasyonu arasında ve MCF-7 hüresinin 100 μM konsantrasyonu ile MCF-12A hüresinin 100 μM konsantrasyonu arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir. SM-2 bileşiğinin MCF-7 ve MCF-12A hücre hatları arasında sitotoksik aktiviteleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; MCF-7 hüresinin 25 μM konsantrasyonu ile MCF-12A hüresinin 25 μM konsantrasyonu arasında ve MCF-7 hüresinin 50 μM konsantrasyonu ile MCF-12A hüresinin 50 μM konsantrasyonu arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir.

Çizelge 4.13. MCF-7 ve MCF-12A hücre hatlarında BM-2 ve SM-2 bileşiklerinin istatistik verileri

Bileşikler	Konsantrasyon (μM)	Hücre Hatları ID50 [μm] \pm SE	
		BM-2	SM-2
MCF-7	25	1,445 \pm 0,075	1,197 \pm 0,086
	50	1,598 \pm 0,127	1,257 \pm 0,067
	100	1,752 \pm 0,079	0,885 \pm 0,100
MCF-12A	25	0,566 \pm 0,106	0,493 \pm 0,059
	50	0,579 \pm 0,139	0,608 \pm 0,097
	100	0,382 \pm 0,059	0,563 \pm 0,040



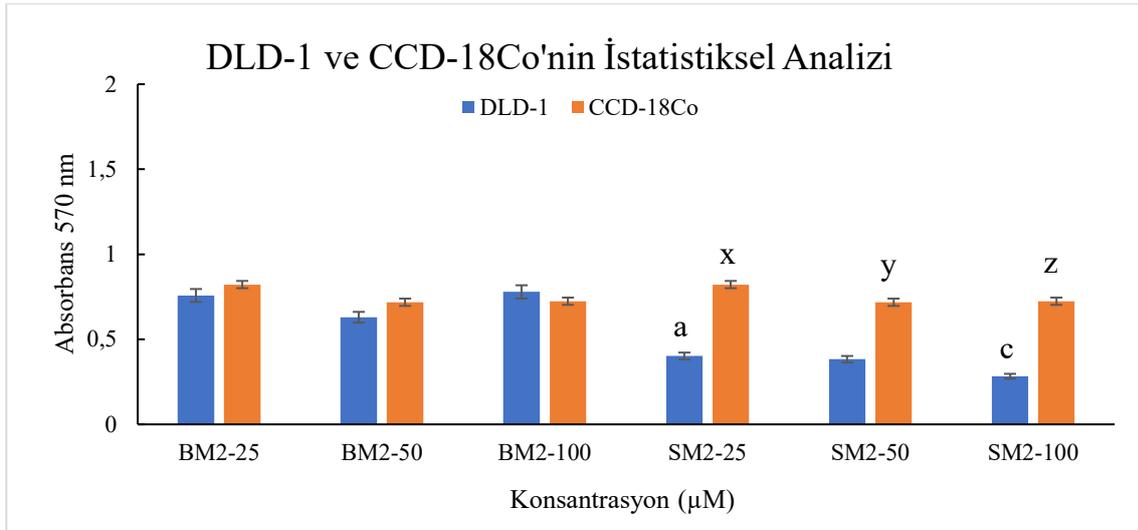
Şekil 4.11. MCF-7 ve MCF-12A hücre hatlarında BM-2 ve SM-2 bileşiklerinin hücre canlılığı açısından istatistiksel analizi. (a, b, c ve x, y, z hücre hatları arasındaki istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.)

BM-2 ve SM-2 bileşikleri arasında DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarının hücre canlılığı açısından konsantrasyon farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.14) (Şekil 4.12).

DLD-1 hücre hattının BM-2 ve SM-2 bileşikleri arasında sitotoksik aktiviteleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; BM-2 bileşiğinin 25 μM konsantrasyonu ile SM-2 bileşiğinin 25 μM konsantrasyonu arasında ve BM-2 bileşiğinin 100 μM konsantrasyonu ile SM-2 bileşiğinin 100 μM konsantrasyonu arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir. CCD-18Co hücre hattının BM-2 ve SM-2 bileşikleri arasında sitotoksik aktiviteleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; BM-2 bileşiğinin 25 μM konsantrasyonu ile SM-2 bileşiğinin 25 μM konsantrasyonu arasında, BM-2 bileşiğinin 50 μM konsantrasyonu ile SM-2 bileşiğinin 50 μM konsantrasyonu arasında ve BM-2 bileşiğinin 100 μM konsantrasyonu ile SM-2 bileşiğinin 100 μM konsantrasyonu arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir.

Çizelge 4.14. DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında BM-2 ve SM-2 bileşiklerinin istatistik verileri

Bileşikler	Konsantrasyon (μM)	Hücre Hatları ID50 [μm] \pm SE	
		DLD-1	CCD-18Co
BM-2	25	0,758 \pm 0,056	0,822 \pm 0,003
	50	0,630 \pm 0,037	0,718 \pm 0,001
	100	0,779 \pm 0,027	0,724 \pm 0,007
SM-2	25	0,402 \pm 0,037	0,822 \pm 0,003
	50	0,383 \pm 0,086	0,718 \pm 0,001
	100	0,283 \pm 0,062	0,724 \pm 0,007



Şekil 4.12. DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarının BM-2 ve SM-2 bileşiklerinin hücre canlılığı açısından istatistiksel analizi. (a, b, c ve x, y, z bileşikler arasındaki istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.)

4.2.3. Gerçek zamanlı hücre analizi (RTCA)

Heterohalkalı bileşiklerin, MCF-7 ve MCF-12A, DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatları üzerindeki olası sitotoksik etkisi RTCA yöntemi ile iCELLigence üretici firmanın kullanım talimatına göre uygulanmıştır. Ayrıca Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre canlılığı eğrisi belirlenerek % 50 baskılayıcı konsantrasyon (IC_{50}) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplanmıştır.

MCF-7 hücre hattında; BM-1 bileşiğinin *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 25 μM konsantrasyonda göstermiştir. BM-1 bileşiğinin IC_{50} değeri 59 μM olarak tespit edilmiştir. SM-1 bileşiğinin hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 100 μM konsantrasyonda göstermiştir. SM-1 bileşiğinin IC_{50} değeri 25 μM 'dan daha küçük olarak tespit edilmiştir. BM-2 bileşiğinin hücre

canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 100 μM konsantrasyonda göstermiştir. BM-2 bileşiğinin IC_{50} değeri 100 μM 'dan daha büyük olarak tespit edilmiştir. SM-2 bileşiğinin hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında en iyi etkileri 100 ve 50 μM konsantrasyonlarda göstermiştir. SM-2 bileşiğinin IC_{50} değeri 76 μM olarak tespit edilmiştir. BM-1, SM-1, BM-2 ve SM-2 bileşikleri MCF-7 hücresinde sitotoksik aktiviteye sahiptir (Çizelge 4.15) (Şekil 4.15) (Resim 4.1).

SM-1 bileşiği BM-1 bileşiğine oranda MCF-7 hücrelerinde daha etkili sitotoksik aktiviteye sahiptir. SM-2 bileşiği BM-2 bileşiğine oranda MCF-7 hücrelerinde benzer oranda sitotoksik aktivite göstermiştir.

Çizelge 4.15. Bileşiklerin MCF-7 hücre hattında RTCA absorbans değerleri

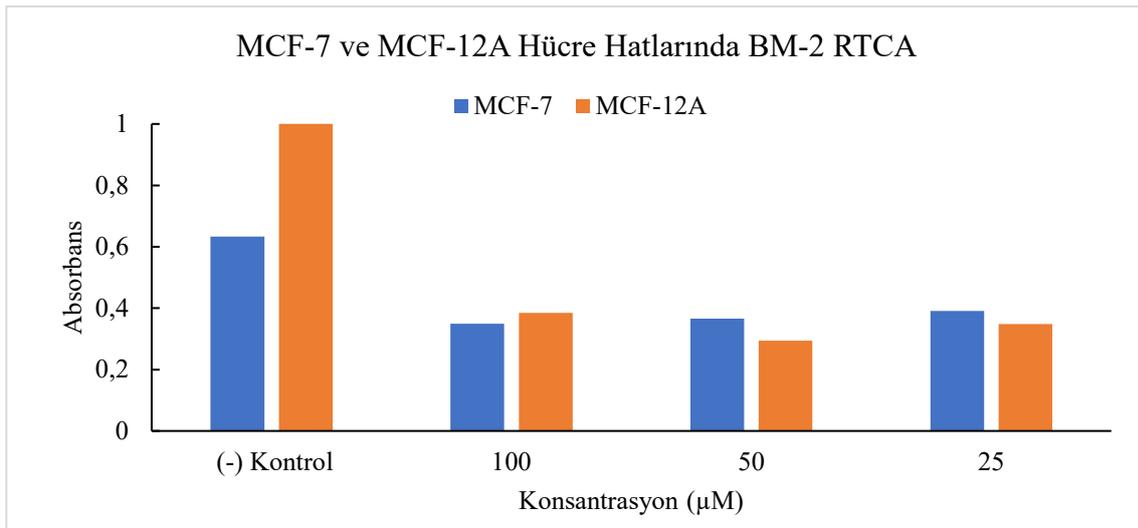
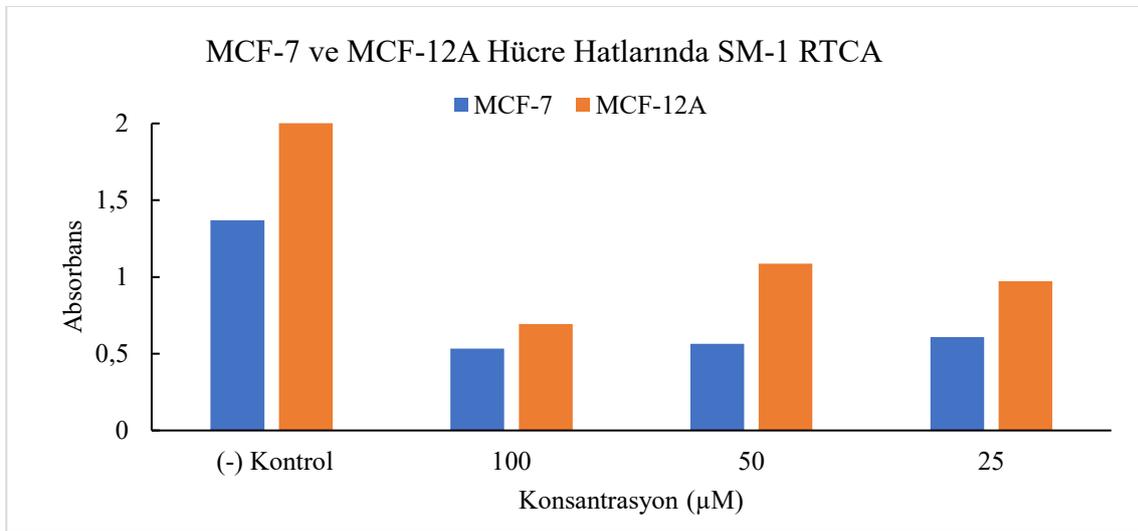
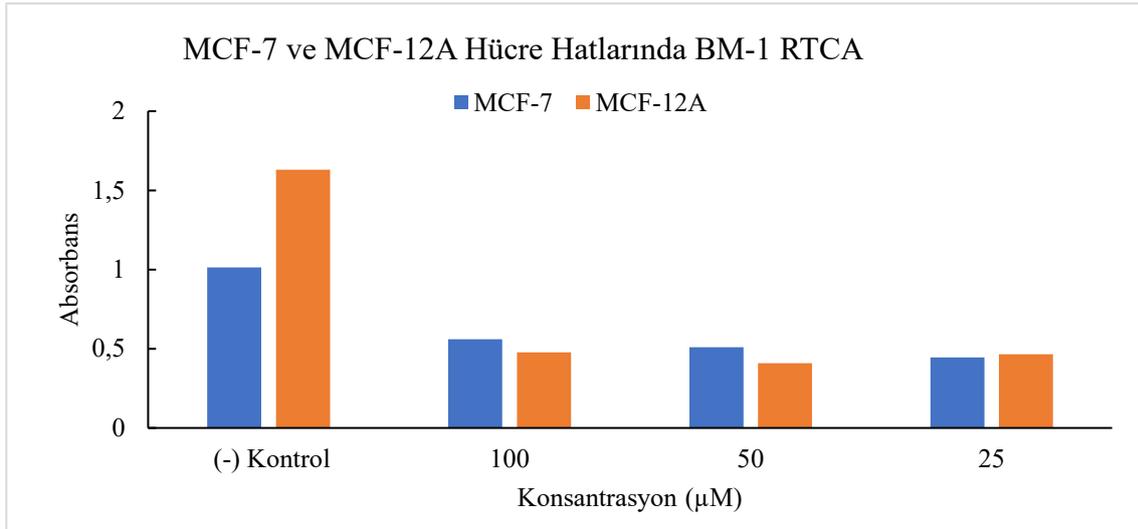
MCF-7 Hücre Hattı	BM-1	SM-1	BM-2	SM-2
(-) Kontrol	1,0140	1,3699	0,6332	0,7226
100 μM	0,5592	0,5329	0,3488	0,3669
50 μM	0,5097	0,5638	0,3661	0,3623
25 μM	0,4449	0,6079	0,3909	0,4439

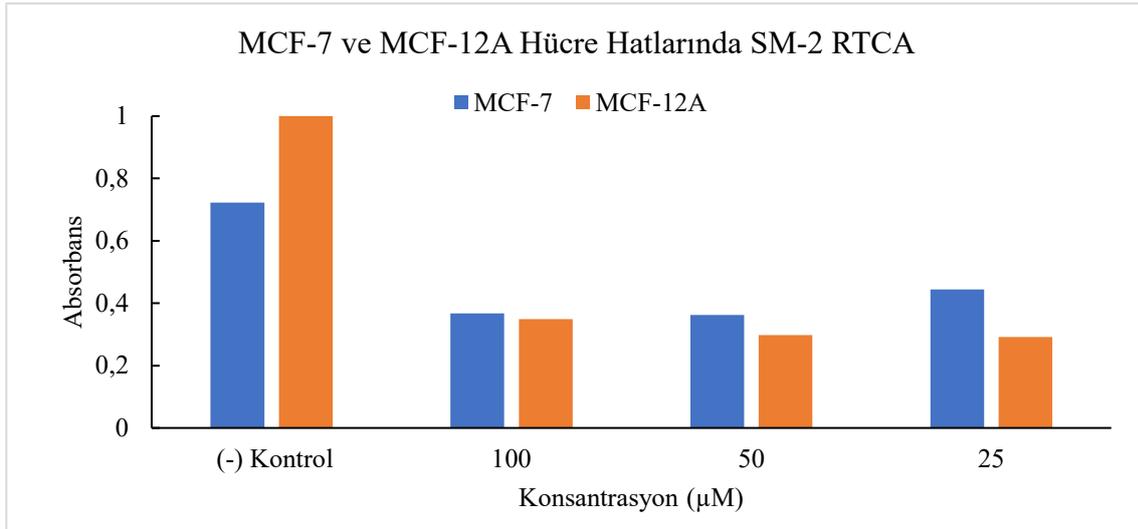
MCF-12A hücre hattında: BM-1, SM-1, BM-2 ve SM-2 bileşiklerinin *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.16) (Şekil 4.13) (Resim 4.2).

SM-1 ve SM-2 heterohalkalı yapıları nedeniyle yüksek biyolojik aktiviteye sahiptirler ve MCF-12A normal hücrelerinde de belirli oranda sitotoksik aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir.

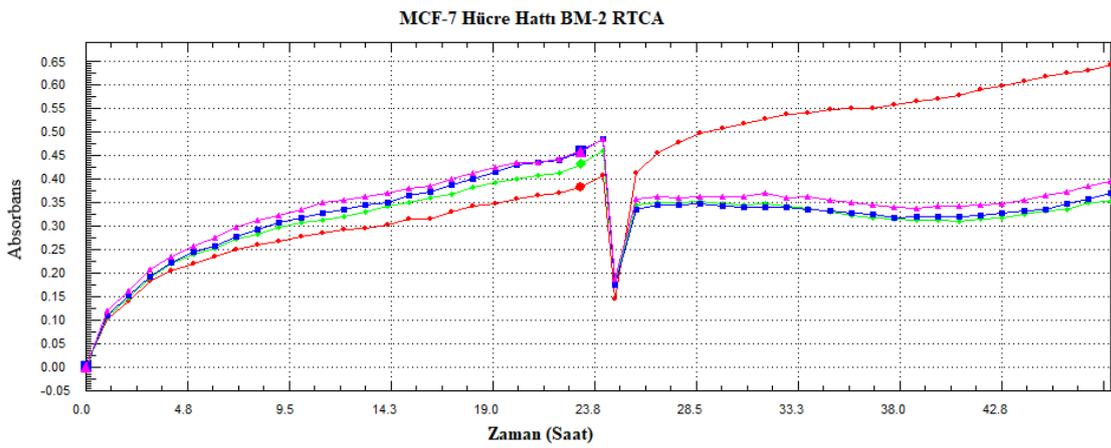
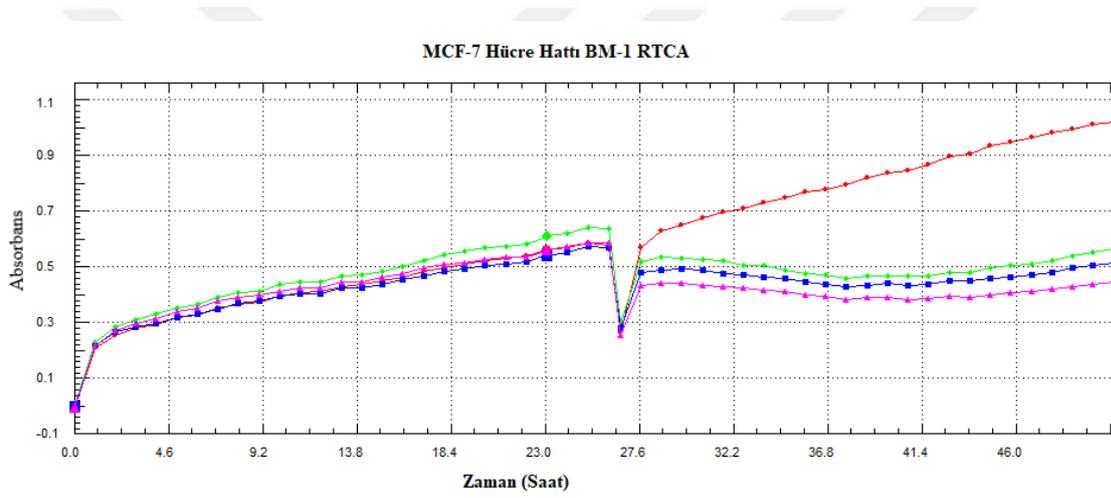
Çizelge 4.16. Bileşiklerin MCF-12A hücre hattında RTCA absorbans değerleri

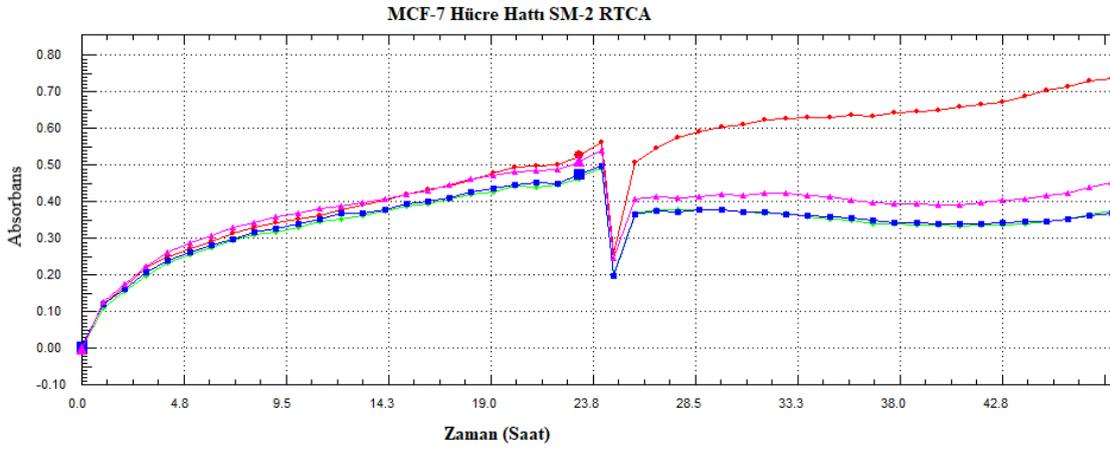
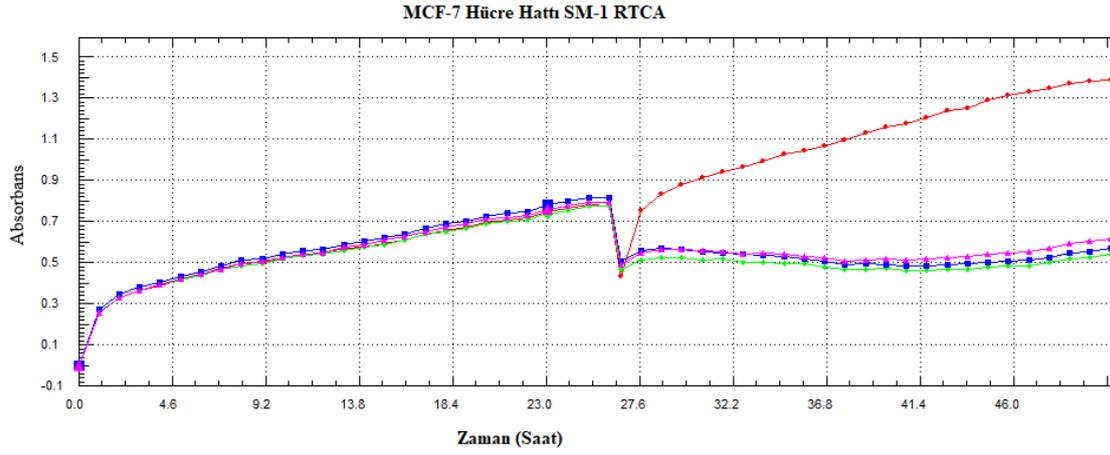
MCF-12A Hücre Hattı	BM-1	SM-1	BM-2	SM-2
(-) Kontrol	1,6297	2,0143	1,2536	1,1994
100 μM	0,4768	0,6924	0,3848	0,3490
50 μM	0,4088	1,0860	0,2941	0,2977
25 μM	0,4659	0,9722	0,3478	0,2918



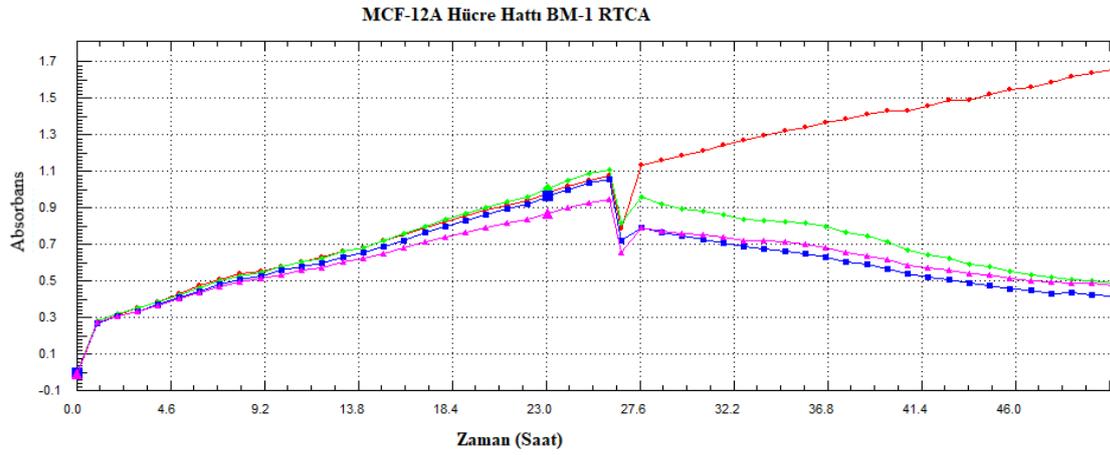


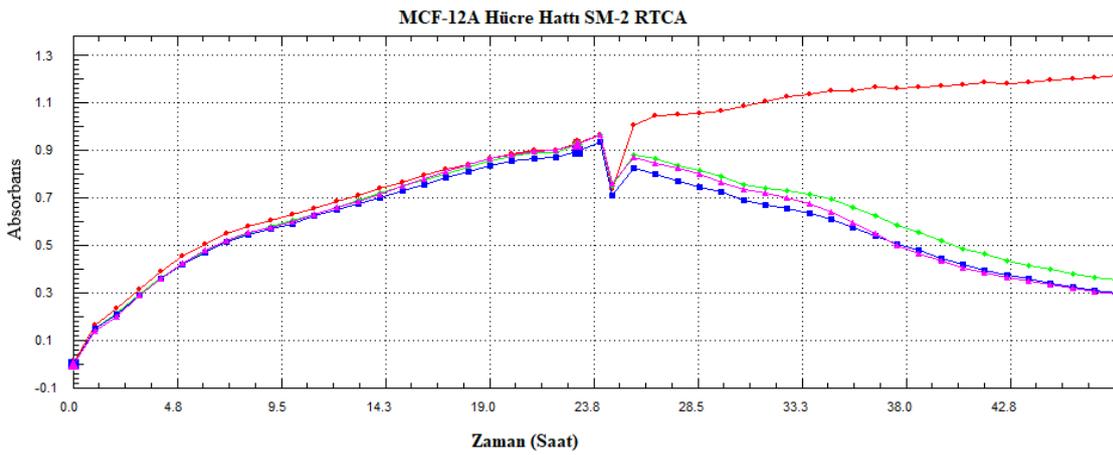
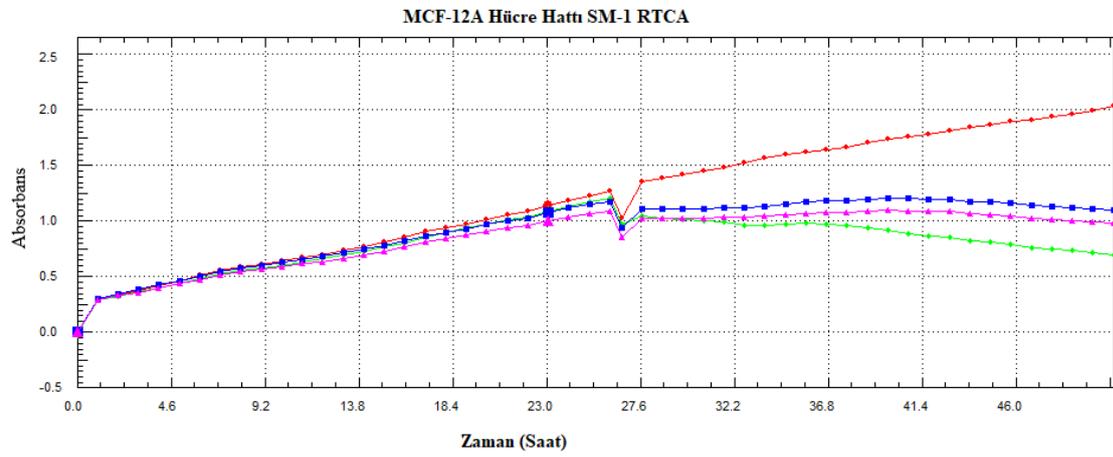
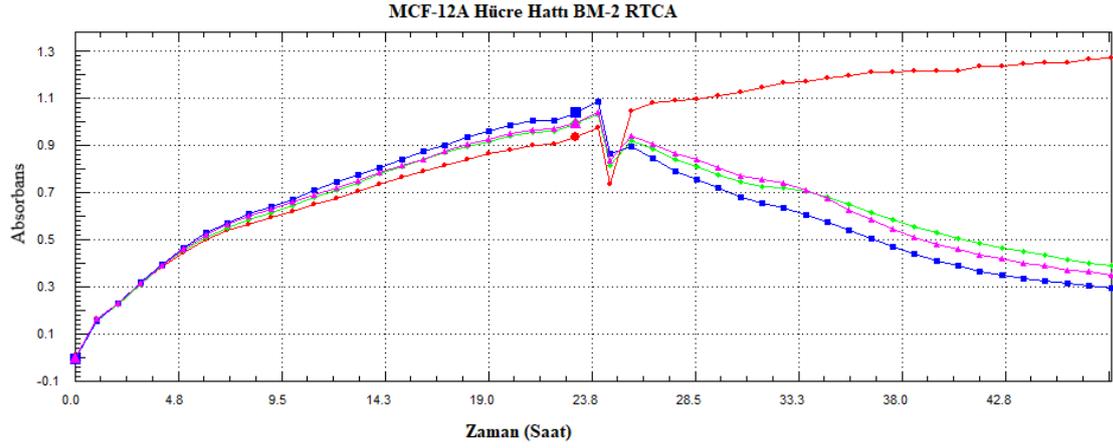
Şekil 4.13. Bileşiklerin MCF-7 ve MCF-12A hücre hatlarında RTCA analizleri





Resim 4.1. Bileşiklerin MCF-7 hücre hattında RTCA görüntüleri (Kırmızı: (-) kontrol, yeşil: 100 μ M, mavi: 50 μ M, pembe: 25 μ M)





Resim 4.2. Bileşiklerin MCF-12A hücre hattında RTCA görüntüleri (Kırmızı: (-) kontrol, yeşil: 100 μ M, mavi: 50 μ M, pembe: 25 μ M)

DLD-1 hücre hattında; BM-1 bileşiğinin negatif kontrole göre karşılaştırıldığında *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir. SM-1 bileşiğinin hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında en iyi etkiyi 25 μM konsantrasyonda göstermiştir, % canlılık aktivitesi ise 83 olarak belirlenmiştir. BM-2 bileşiğinin negatif kontrole göre karşılaştırıldığında hücre canlılığı üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir. SM-2 bileşiğinin, hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrol ile karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda aynı etkiye sahip olduğu bulunmuştur. SM-1 ve SM-2 bileşikleri DLD-1 hücresinde antiproliferatif aktiviteye sahiptir (Çizelge 4.17) (Şekil 4.14) (Resim 4.3).

SM-1 ve SM-2 bileşikleri BM-1 ve SM-1 bileşiklerine oranda DLD-1 hücrelerinde daha etkili sitotoksik aktiviteye sahiptir. SM-1 ve SM-2 bileşikleri heterohalkalı yapılara sahiptirler ve seçici bağlanmaya sebep olan enerji düzeyleri nedeniyle biyolojik aktivite özelliklerini geniş skala da gösteren moleküllerdir.

Çizelge 4.17. Bileşiklerin DLD-1 hücre hattında RTCA absorbans değerleri

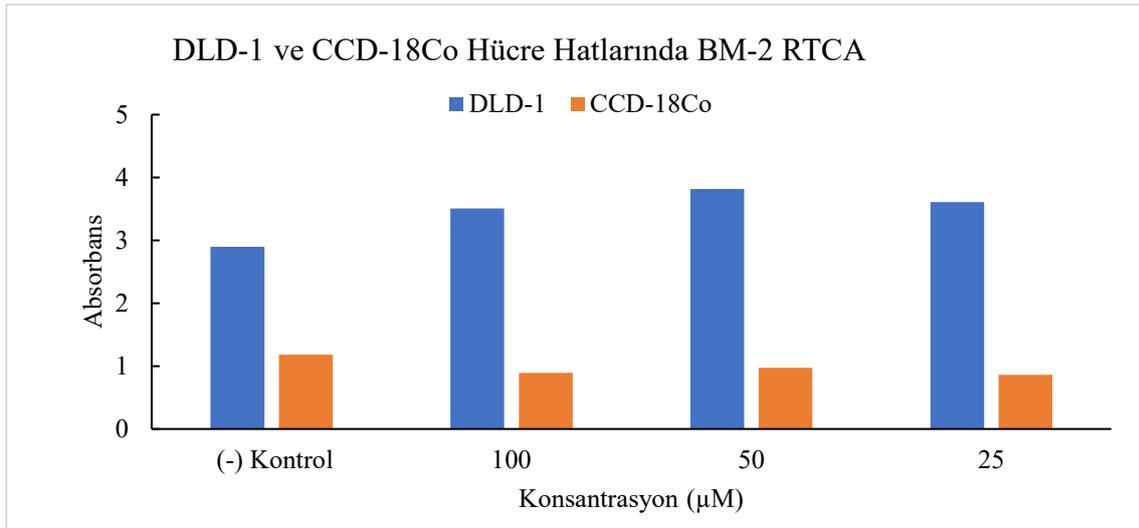
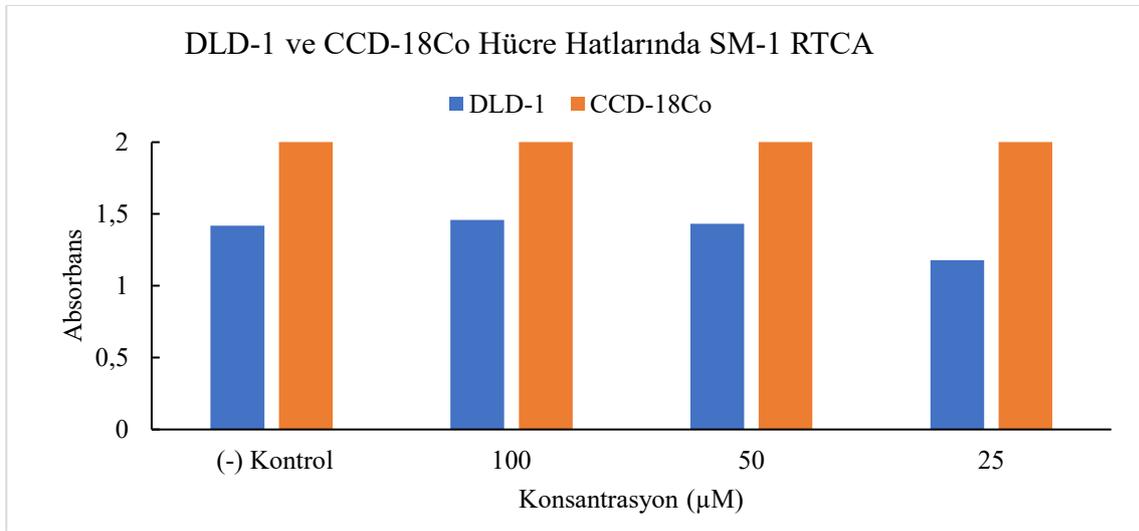
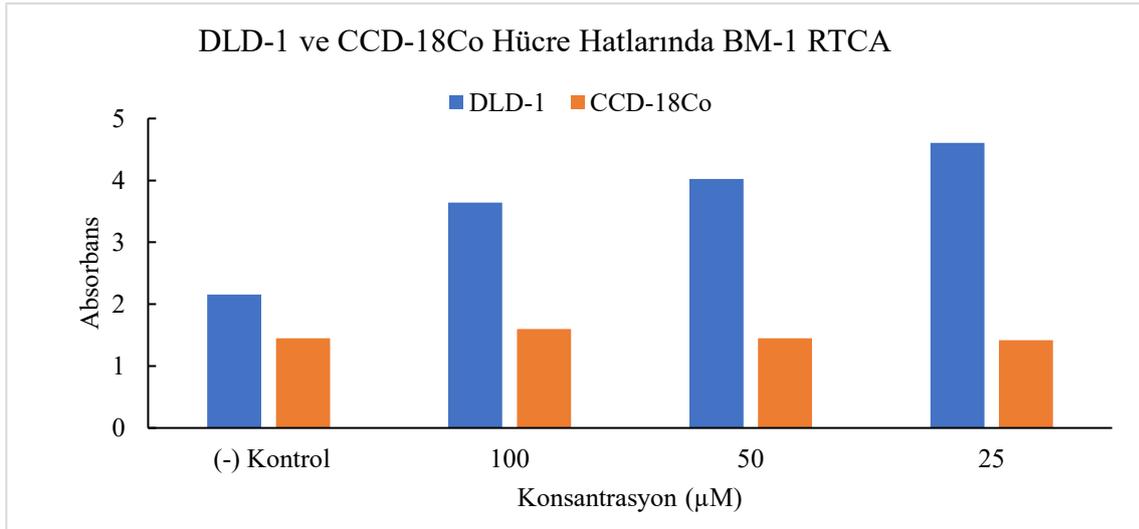
DLD-1 Hücre Hattı	BM-1	SM-1	BM-2	SM-2
(-) Kontrol	2,1536	1,4177	2,9003	0,7817
100 μM	3,6410	1,4587	3,5096	0,7236
50 μM	4,0237	1,4327	3,8196	0,7387
25 μM	4,6064	1,1792	3,6072	0,7783

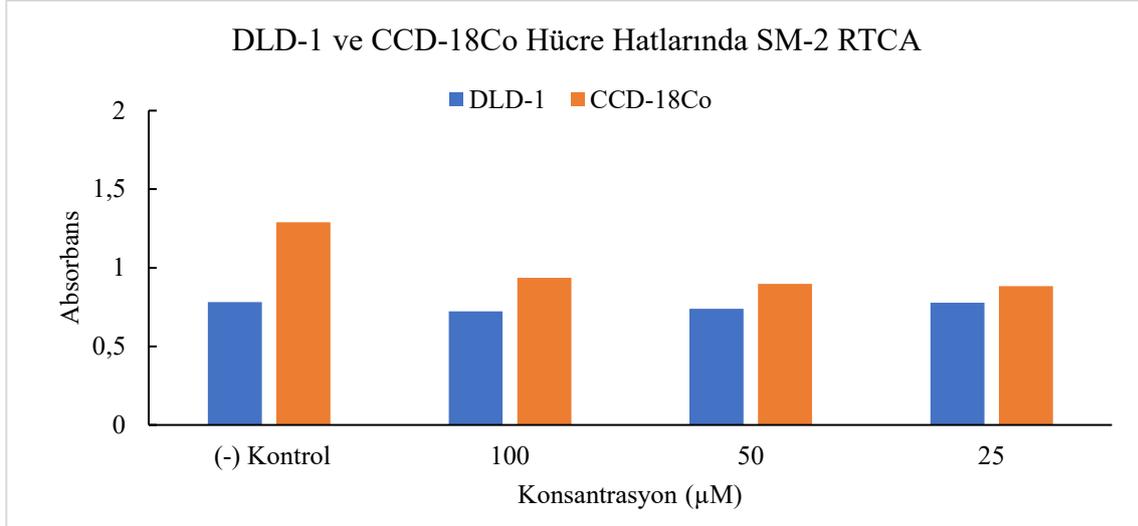
CCD-18Co hücre hattında; BM-1, SM-1, BM-2 ve SM-2 bileşiklerinin *in vitro* hücre canlılığı üzerine etkisi negatif kontrole göre karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda düşük aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.18) (Şekil 4.18) (Resim 4.4).

SM-1 ve SM-2 heterohalkalı bileşikleri yüksek biyolojik aktiviteye sahip olmalarına rağmen CCD-18Co hücrelerinde düşük oranda sitotoksik aktivite gösterdikleri gözlenmiştir.

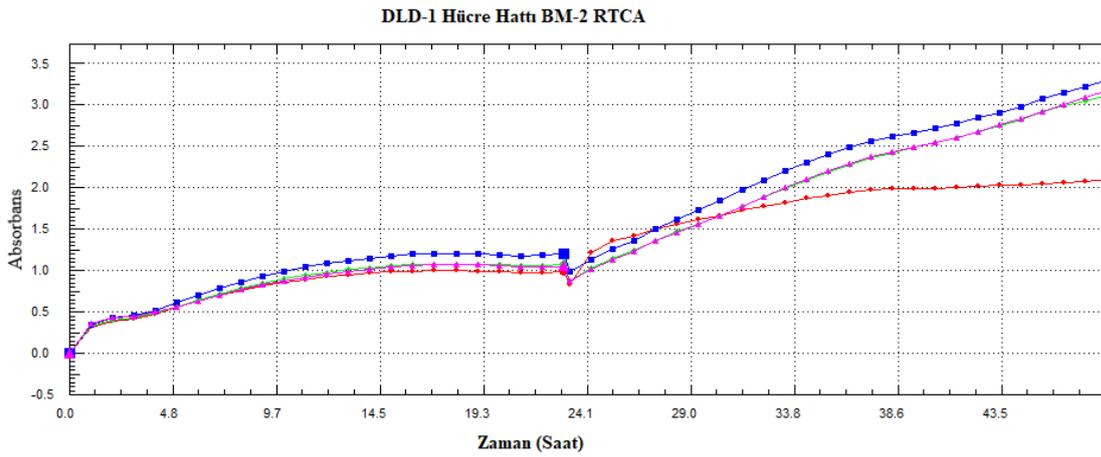
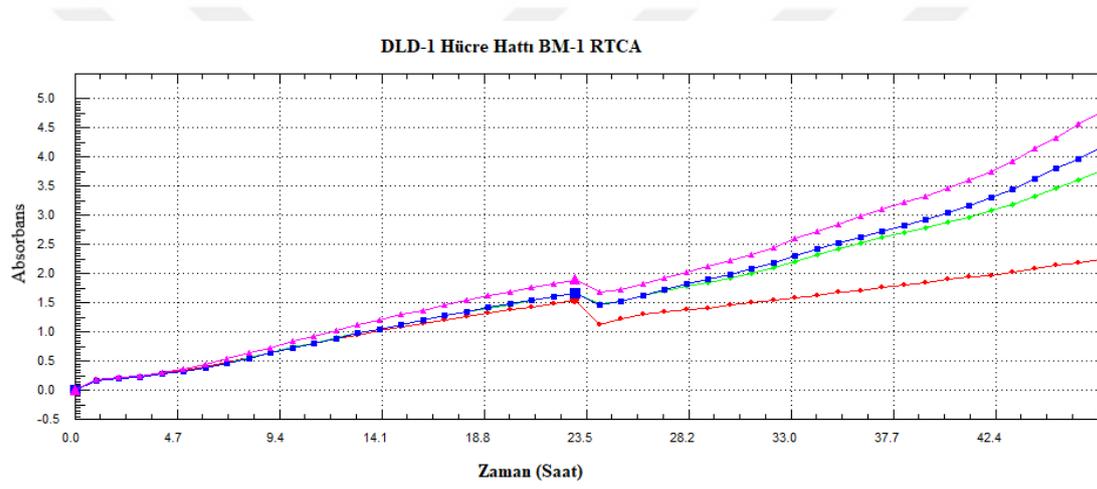
Çizelge 4.18. Bileşiklerin CCD-18Co hücre hattında RTCA absorbans değerleri

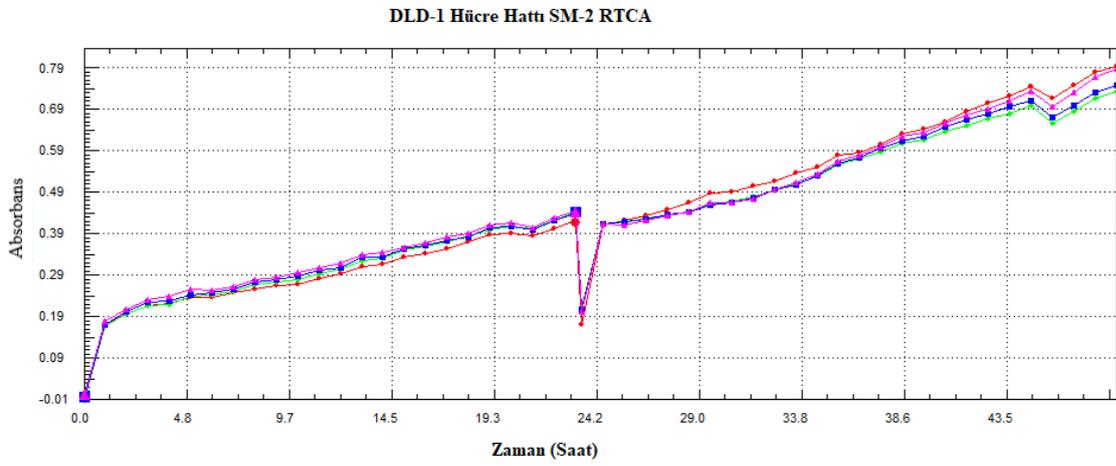
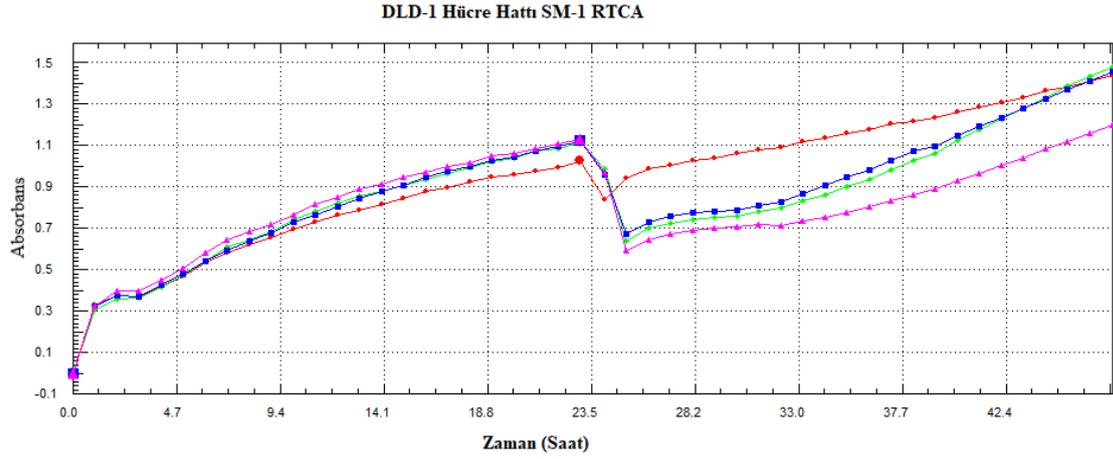
CCD-18Co Hücre Hattı	BM-1	SM-1	BM-2	SM-2
(-) Kontrol	1,4509	3,5082	1,1820	1,2892
100 μM	1,5988	2,4487	0,8945	0,9359
50 μM	1,4471	2,7894	0,9719	0,8984
25 μM	1,4189	2,1496	0,8604	0,8827



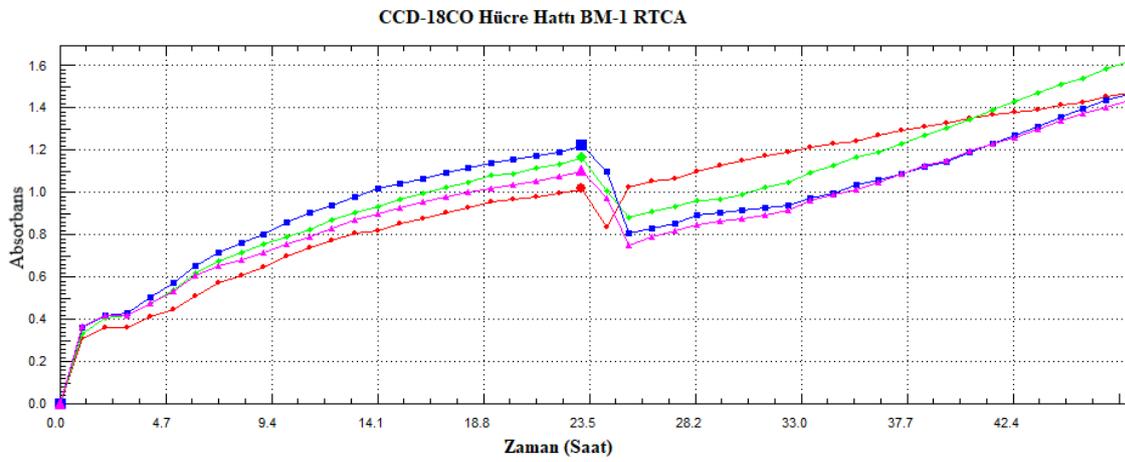


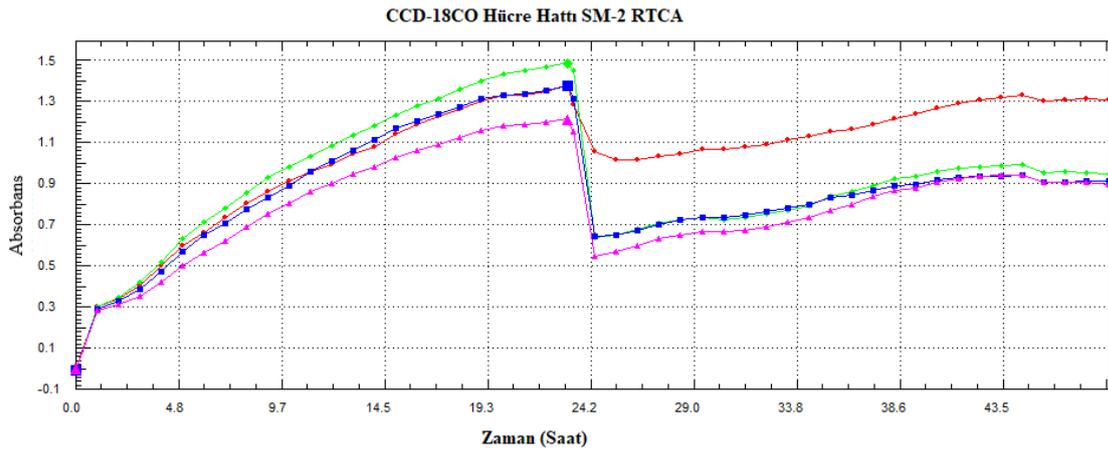
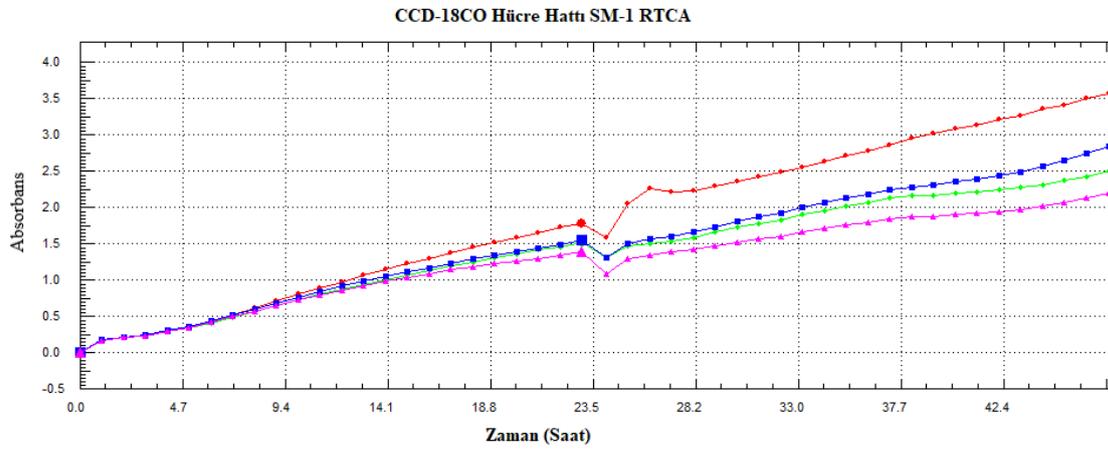
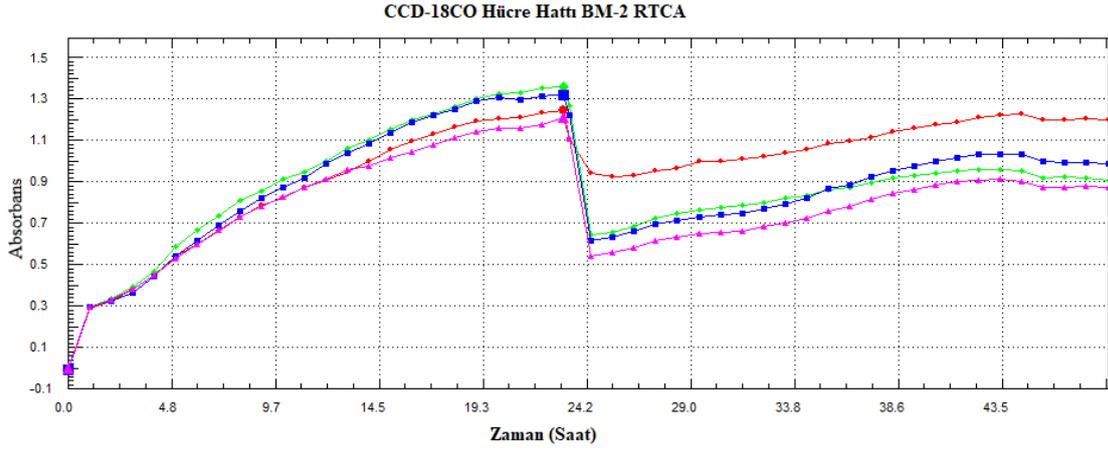
Şekil 4.14. Bileşiklerin DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında RTCA analizleri





Resim 4.3. Bileşiklerin DLD-1 hücre hattında RTCA görüntüleri (Kırmızı: (-) kontrol, yeşil: 100 μ M, mavi: 50 μ M, pembe: 25 μ M)





Resim 4.4. Bileşiklerin CCD-18Co hücre hattında RTCA görüntüleri (Kırmızı: (-) kontrol, yeşil: 100 μ M, mavi: 50 μ M, pembe: 25 μ M)

4.3. Moleküler Analizler

4.3.1. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri

MTT ve RTCA testleri sonucundaki veriler dikkate alındığında MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde tüm bileşikler için ortalama IC_{50} değeri 50 μ M olarak belirlenmiştir. Bu hücelere bileşiklerin 50 μ M konsantrasyonu uygulanarak qRT-PCR analizleri çalışılmıştır.

MCF-7 ve DLD-1 hücre hatlarından izole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı nanodrop cihazı yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesi işleminde öncelikle uygun konsantrasyonlarda (ng/μ L) sulandırılan RNA örnekleri 260 ve 280 nm'de ölçülmüştür. RNA konsantrasyonu (μ g/mL) = [OD (Optik yoğunluk) 260 x sulandırma oranı x 40 (μ g/mL)] formülü aracılığıyla hesaplanmıştır. $A_{260}/A_{280} \cong 2.0$ RNA örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir (Çizelge 4.19 ve Çizelge 4.20) (Resim 4.5).

Çizelge 4.19. MCF-7 hücre hattından izole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı

Bileşikler	ng/ μ L	260/280
BM-1	528,6	2,037
BM-2	616,7	2,043
SM-1	705,6	2,036
SM-2	649,5	2,040

Çizelge 4.20. DLD-1 hücre hattından izole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu

Bileşikler	ng/ μ L	260/280
BM-1	422,0	2,031
BM-2	1037,0	2,032
SM-1	1210,0	2,039
SM-2	471,1	2,036

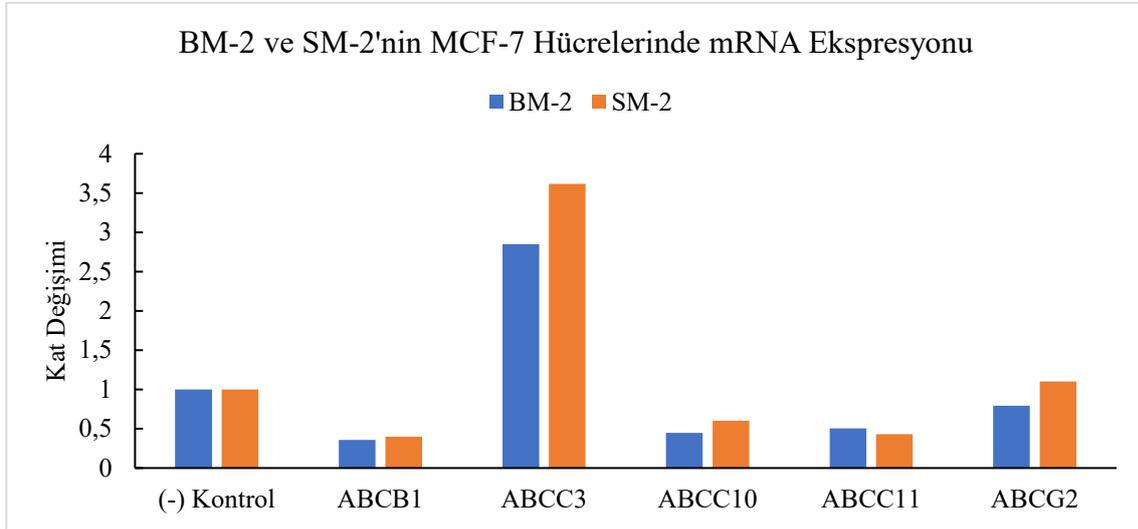
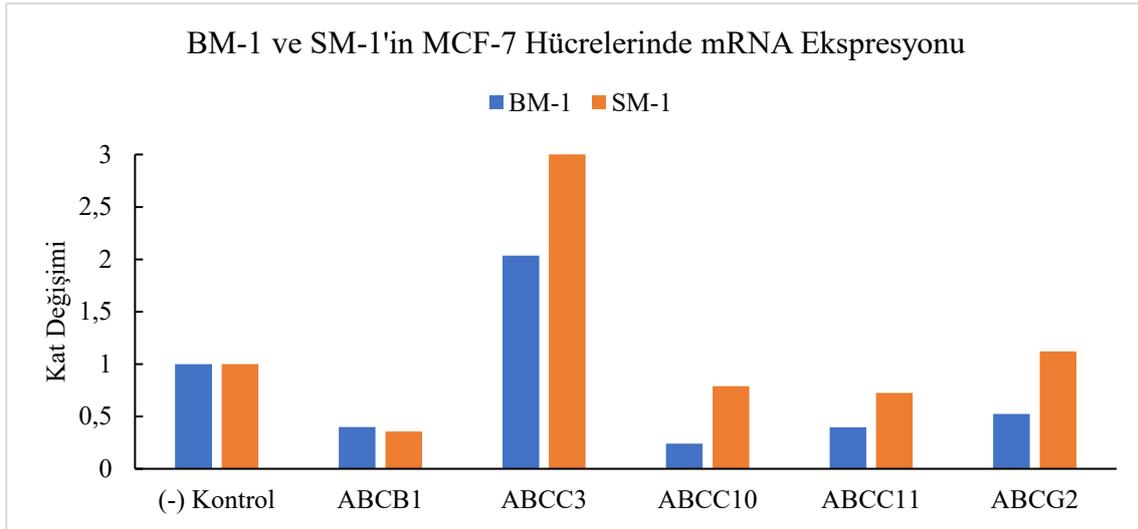
İzole edilen tek zincirli total RNA'lar 100 ng olacak şekilde hesaplanarak oligo d(T) primeri ve revers transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak (Thermo Fisher; cDNA sentez kiti (K1622)) cDNA'ya dönüştürülmüştür.

MCF-7 ve DLD-1 hücre hatlarında, heterohalkalı bileşiklerin anti-karsinojenik etkileri, kemoterapi direncinde önemli rol oynayan pompa proteinleri; ABCB1 (MDR1-P-gp), ABCC3 (MRP3), ABCC10 (MRP7), ABCC11 (MRP8), ABCG2 (BCRP) ve apoptotik sinyal yollarında önemli rol oynayan proteinleri; BAX, BCL2 α , CASPS3, p53, PARP, HSP27,

HSP40, HSP70, HSP60, HSP90 α , GRP78 ve GRP94 mRNA ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. Bileşiklere ait mRNA gen ifadesindeki kat (fold) artışı ve azalışı Microsoft Excel programı yardımı ile hesaplanmıştır.

MCF-7 hücrelerinde çoklu ilaç direnç genlerinin gerçek zamanlı qRT-PCR sonuçları analiz edildiğinde; BM-1 bileşiğinde; ABCB1, ABCC10, ABCC11 ve ABCG2 genlerinin ifadeleri kontrol grubuna göre 0,5 kat azalış göstermiş ve ABCC3 gen ifadesinde ise artış tespit edilmiştir. SM-1 bileşiğinde; ABCB1, ABCC10 ve ABCC11 genlerinin ifadeleri kontrol grubuna göre yaklaşık 0,5 kat azalış göstermiş ve ABCC3 ve ABCG2 genlerinin ifadelerinde artış tespit edilmiştir. BM-2 bileşiğinde; ABCB1, ABCC10, ABCC11 ve ABCG2 genlerinin ifadeleri kontrol grubuna göre yaklaşık 0,5 kat azalış göstermiş ve ABCC3 gen ifadesinde artış tespit edilmiştir. SM-2 bileşiğinde; ABCB1, ABCC10 ve ABCC11 genlerinin ifadeleri kontrol grubuna göre yaklaşık 0,5 kat azalış göstermiş, ABCC3 ve ABCG2 genlerinin ifadelerinde ise artış tespit edilmiştir. (Şekil 4.15).

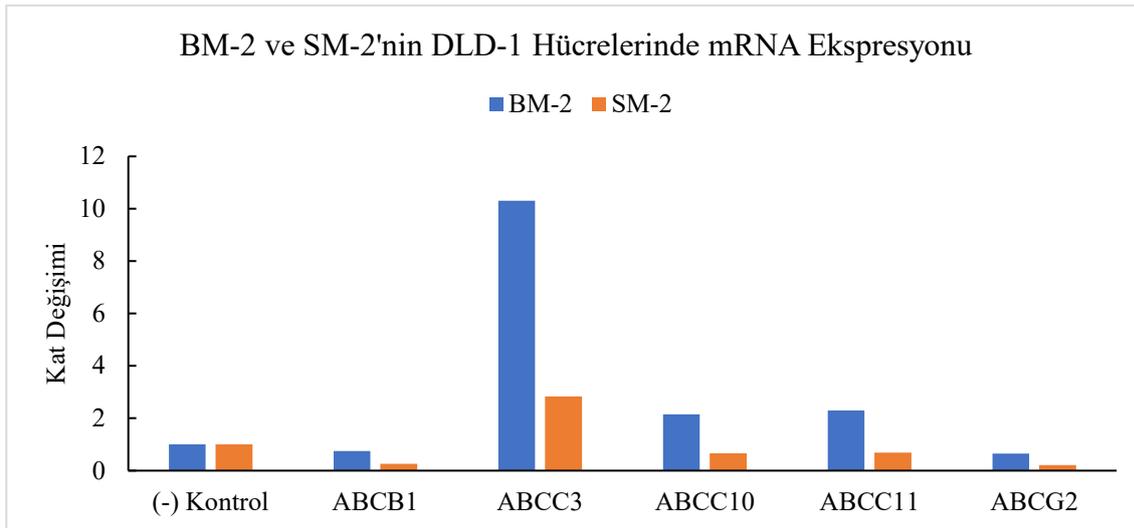
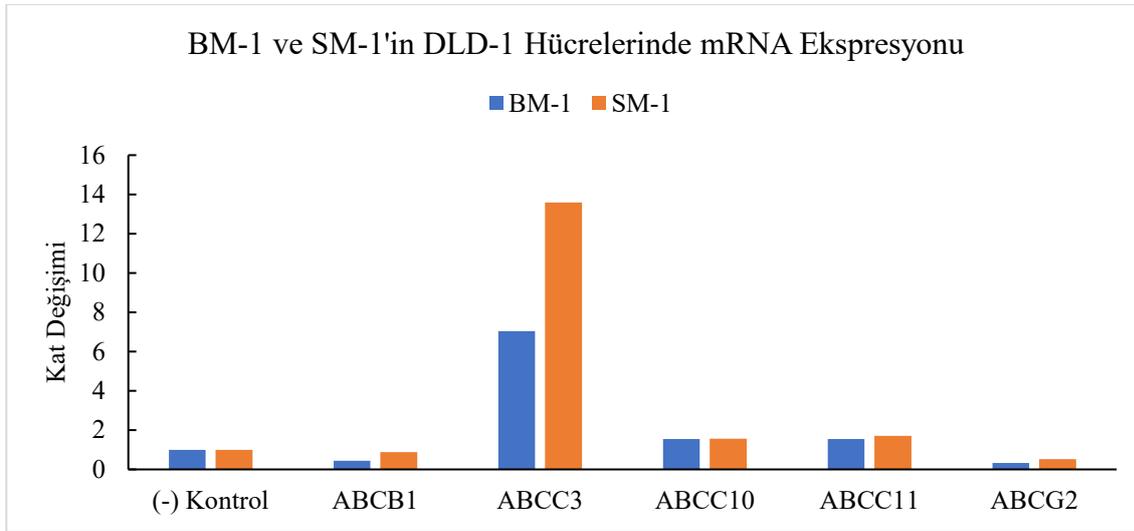
BM-1, BM-2, SM-1 ve SM-2'nin MCF-7 hücrelerinde çoklu ilaç direncinde rol oynayan ABC transport genlerinde kontrole göre gen ifadelerini azalttığı (ABCC3 geni dışında) ve böylece ilaç direncini baskıladığı tespit edilmiştir. BM-1 ve SM-1 karşılaştırıldığında sadece ABCB1 gen ifadesinin SM-1 için daha etkili sonuç verdiği gözlenmiştir. BM-1 ABCC10, ABCC11 ve ABCG2 gen ifadelerinin azaltılması ve ilaç direncini baskılamada daha etkili sonuç vermiştir. BM-2 ve SM-2 karşılaştırıldığında ABCB1 gen ifadesinin BM-2 ve SM-2 aynı etkide sonuç verdiği gözlenmiştir. BM-2'nin ABCC10, ABCG2 ve SM-2'nin ise ABCC11 gen ifadelerinin azaltılması ve ilaç direncini baskılamada daha etkili sonuç verdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.15. Bileşiklerin MCF-7 hücre hattında çoklu ilaç direnci (MDR) genlerine ait mRNA ekspresyonları

DLD-1 hücresinde çoklu ilaç direnç genlerinin gerçek zamanlı qRT-PCR sonuçları analiz edildiğinde; BM-1 bileşiğinde; ABCB1 ve ABCG2 genlerinin ifadeleri kontrol grubuna göre 0,5 kat azalış göstermiş ve ABCC3, ABCC10 ve ABCC11 genlerinin ifadelerinde ise artış tespit edilmiştir. SM-1 bileşiğinde; ABCB1 ve ABCG2 genlerinin ifadeleri kontrol grubuna göre yaklaşık 0,5 kat azalış göstermiş, ABCC3, ABCC10 ve ABCC11 genlerinin ifadelerinde ise artış tespit edilmiştir. BM-2 bileşiğinde; ABCB1 ve ABCG2 genlerinin ifadeleri kontrol grubuna göre 0,5 kat azalış göstermiş, ABCC3, ABCC10 ve ABCC11 genlerinin ifadelerinde ise artış tespit edilmiştir. SM-2 bileşiğinde; ABCB1, ABCC10, ABCC11 ve ABCG2 genlerinin ifadeleri kontrol grubuna göre yaklaşık 0,5 kat azalış göstermiş ve ABCC3 gen ifadesinde artış tespit edilmiştir (Şekil 4.16).

BM-1, BM-2, SM-1 ve SM-2'nin DLD-1 hücrelerinde çoklu ilaç direncinde rol oynayan ABC transport genlerinde kontrole göre gen ifadelerini azalttığı (ABCC3 geni dışında) ve böylece ilaç direncini baskıladığı tespit edilmiştir. BM-1 ve SM-1 karşılaştırıldığında sadece ABCB1 gen ifadesinin BM-1 için daha etkili sonuç verdiği gözlenmiştir. BM-1 ve SM-1 ABCC10, ABCC11 ve ABCG2 gen ifadelerinin azaltılması ve ilaç direncini baskılamada aynı etkiye sonuç verdiği gözlenmiştir. BM-2 ve SM-2 karşılaştırıldığında SM-2'nin tüm ABC transport gen ifadelerinin azaltılması ve ilaç direncini baskılamada BM-1'e göre daha etkili sonuç verdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.16. Bileşiklerin DLD-1 hücre hattında çoklu ilaç direnci (MDR) genlerine ait mRNA ekspresyonları

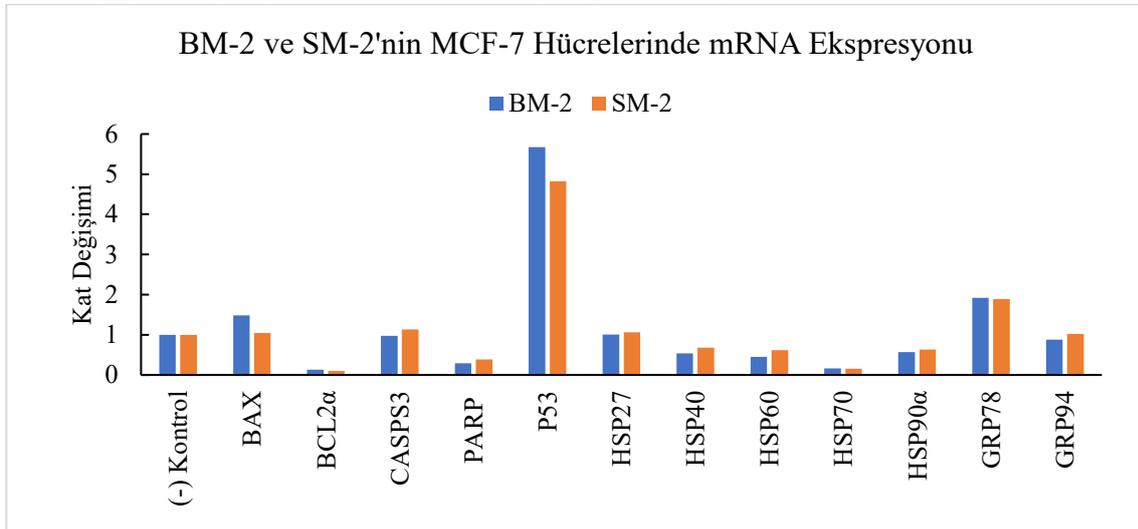
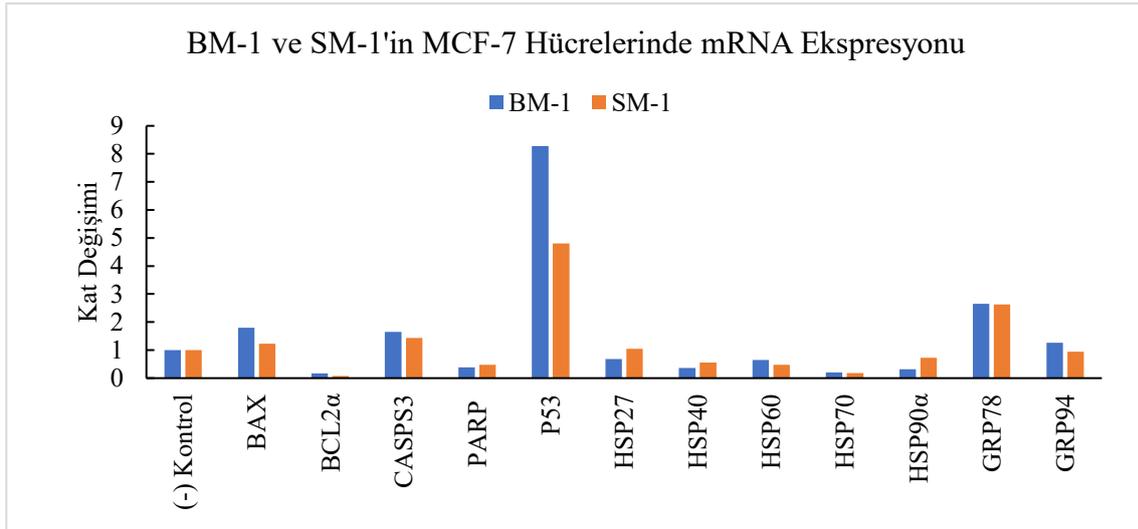
MCF-7 hücresinde apoptotik sinyal yolak genlerinin gerçek zamanlı qRT-PCR sonuçları analiz edildiğinde; BM-1 bileşiği uygulanan MCF-7 hücresinde; kontrol grubuna göre p53 gen ifadesi 8 kat, BAX gen ifadesi 2 kat, CASP3 gen ifadesi 1,5 kat artış göstermiştir. BCL-2 gen ifadesi 0,9 kat, PARP gen ifadesi 0,6 kat, HSP27 gen ifadesi 0,3 kat, HSP40 gen ifadesi 0,6 kat, HSP60 gen ifadesi 0,4 kat ve HSP90 gen ifadesi 0,7 kat azalış göstermiştir. GRP78 ve GRP94 genlerinin ifadelerinde anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir.

SM-1 bileşiği uygulanan MCF-7 hücresinde; kontrol grubuna göre p53 gen ifadesi 5 kat, BAX gen ifadesi 1,5 kat ve CASP3 gen ifadesi 1,5 kat artış göstermiştir. BCL-2 gen ifadesi 1 kat, PARP gen ifadesi 0,5 kat, HSP40 gen ifadesi 0,5 kat, HSP60 gen ifadesi 0,5 kat ve HSP90 gen ifadesi 0,3 kat azalış göstermiştir. HSP27, GRP94 ve GRP78 gen ifadelerinde anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir.

BM-2 bileşiği uygulanan MCF-7 hücresinde; kontrol grubuna göre p53 gen ifadesi 5,5 kat ve BAX gen ifadesi 1,5 kat artış göstermiştir. CASP3 gen ifadesinde anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. BCL-2 gen ifadesi 0,9 kat, PARP gen ifadesi 0,7 kat, HSP40 gen ifadesi 0,5 kat, HSP60 gen ifadesi 0,6 kat ve HSP90 gen ifadesi 0,4 kat azalış göstermiştir. HSP27, GRP78 ve GRP94 gen ifadelerinde anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir.

SM-2 bileşiği uygulanan MCF-7 hücresinde; kontrol grubuna göre p53 gen ifadesi 5 kat artış göstermiştir. BAX ve CASP3 genlerinin ifadelerinde anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. BCL-2 gen ifadesi 0,9 kat, PARP gen ifadesi 0,6 kat, HSP40 gen ifadesi 0,3 kat ve HSP60 gen ifadesi 0,4 kat azalış göstermiştir. HSP27, GRP78 ve GRP94 genlerinin ifadelerinde anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir. (Şekil 4.17).

BM-1, BM-2, SM-1 ve SM-2'nin MCF-7 hücrelerinde apoptotik sinyal yollarında rol oynayan p53, BAX ve CASP3 gen ifadelerini artırdığı, BCL-2, PARP ve HSP gen ifadelerini azalttığı ve böylece hücreyi apoptoza yönlendirerek hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir. BM-1 ve SM-1 karşılaştırıldığında; P53, BAX ve CASP3 gen ifadelerini artırmada BM-1, HSP gen ifadelerini azaltmada ise SM-1 daha etkili kat değişimi göstermiştir. BM-2 ve SM-2 karşılaştırıldığında; P53 ve BAX gen ifadelerini artırmada, HSP gen ifadelerini azaltmada BM-2, BCL-2 gen ifadesini azaltmada ve CASP3 gen ifadelerini artırmada ise SM-2 daha etkili kat değişimi göstermiştir. Bileşiklerin endoplazmik retikulum stres genleri olan GRP'lerin ifadelerinde anlamlı bir kat değişimi tespit edilmemiştir.



Şekil 4.17. Bileşiklerin MCF-7 hücre hattında apoptotik sinyal yollarına ait mRNA ekspresyonları

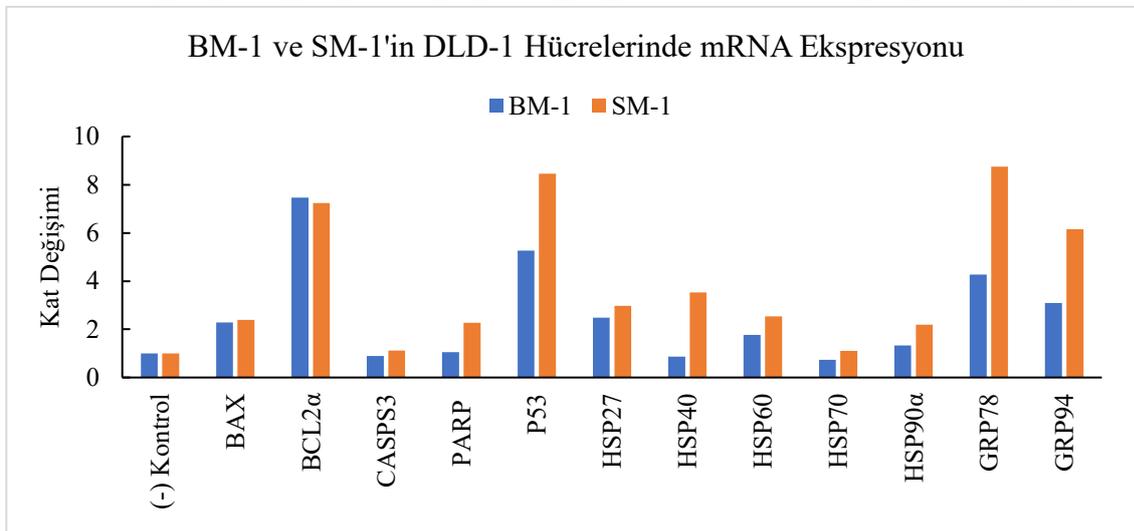
MCF-7 hücresinde apoptotik sinyal yolak genlerinin gerçek zamanlı qRT-PCR sonuçları analiz edildiğinde; BM-1 bileşiği uygulanan DLD-1 hücresinde; p53 gen ifadesi 5 kat ve BAX gen ifadesi 2,5 kat artış göstermiştir. CASP3 gen ifadesinde anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. BCL-2, PARP, GRP78, GRP94 ve HSP genlerinin ifadelerinde anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir.

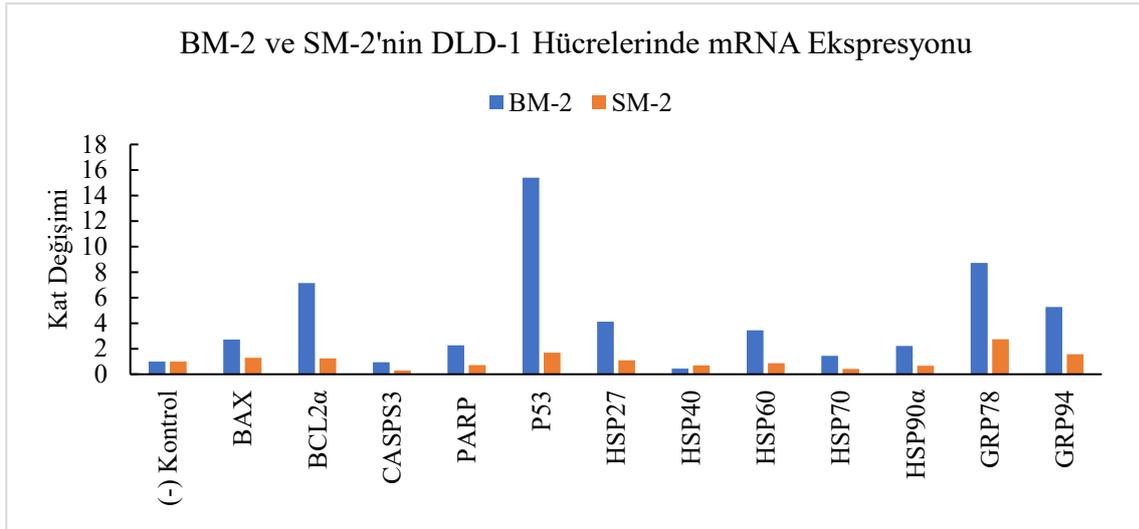
SM-1 bileşiği uygulanan DLD-1 hücresinde; p53 gen ifadesi 8,5 kat ve BAX gen ifadesi 2,5 kat artış göstermiştir. CASP3 gen ifadesinde anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. BCL-2, PARP, GRP78, GRP94 ve HSP genlerinin ifadelerinde anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir.

BM-2 bileşiği uygulanan DLD-1 hücresinde; p53 gen ifadesi 15,5 kat ve BAX gen ifadesi 3 kat artış göstermiştir. CASP3 gen ifadesinde anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. HSP40 gen ifadesi 0,5 kat azalış göstermiştir. BCL-2, PARP, GRP78, GRP94 ve HSP40 dışındaki diğer HSP genlerinin ifadelerinde anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir.

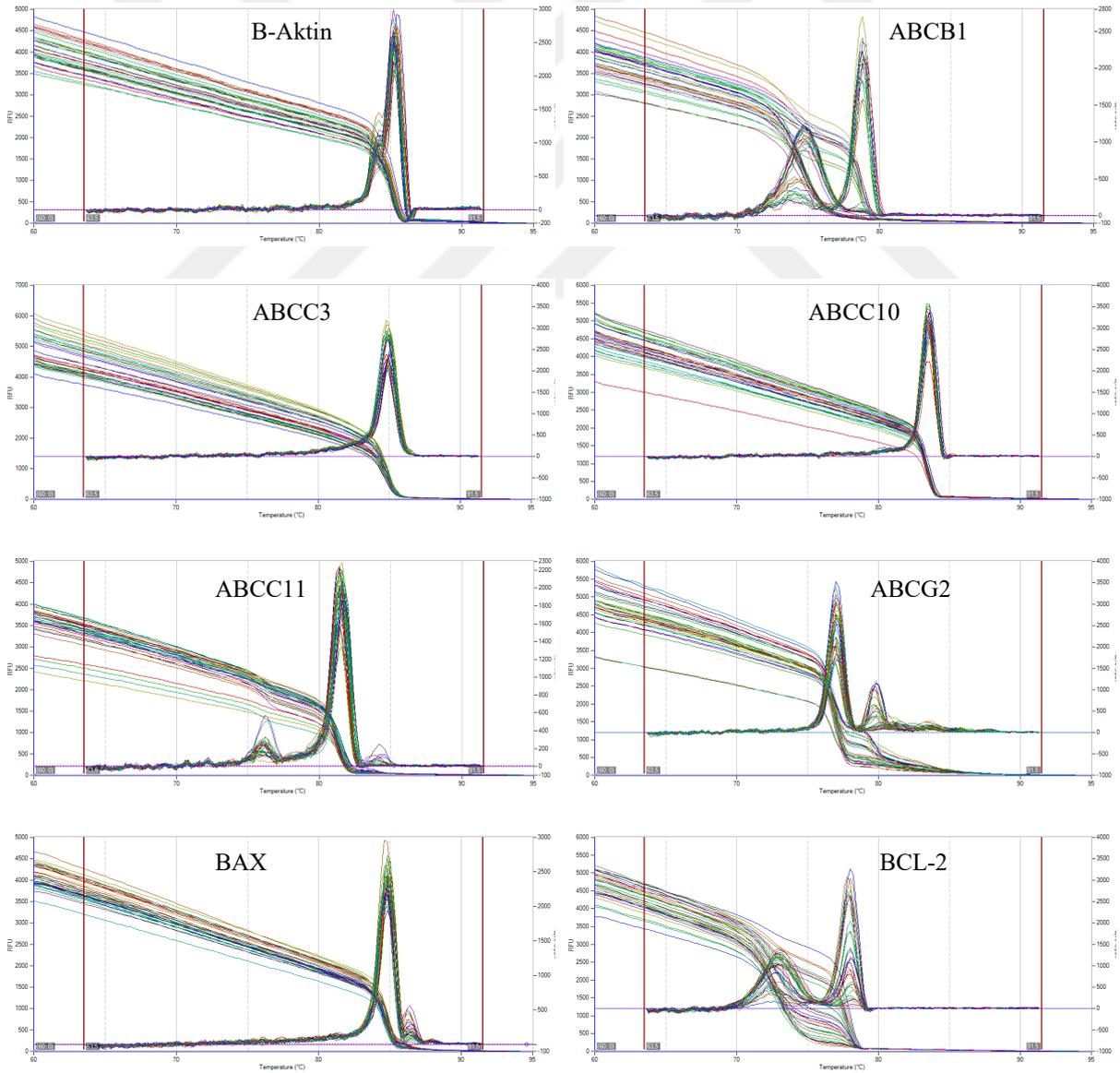
SM-2 bileşiği uygulanan DLD-1 hücresinde; p53 gen ifadesi 2 kat ve BAX gen ifadesi 1,5 kat artış göstermiştir. CASP3 gen ifadesinde anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. PARP ve HSP27 dışındaki diğer HSP genlerinin ifadeleri anlamlı bir azalış göstermiştir. BCL-2, GRP78, GRP94 ve HSP27 genlerinin ifadelerinde anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir (Şekil 4.18).

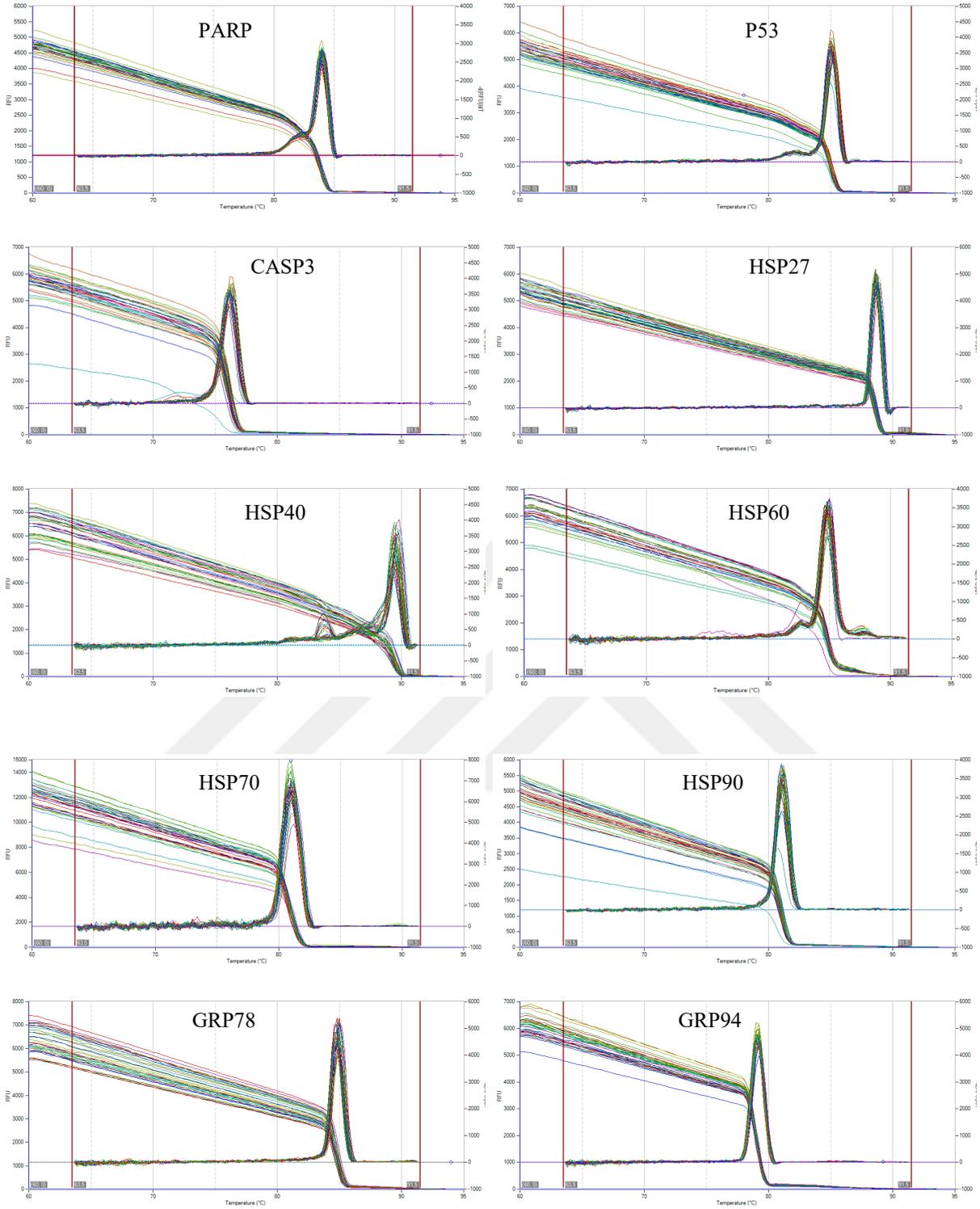
BM-1, BM-2, SM-1 ve SM-2'nin DLD-1 hücrelerinde apoptotik sinyal yollarında rol oynayan p53 ve BAX gen ifadelerini artırdığı, PARP ve HSP gen ifadelerini azalttığı ve böylece hücreyi apoptoza yönlendirerek hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir. BM-1, BM-2, SM-1 ve SM-2 karşılaştırıldığında; P53, BAX ve CASP3 gen ifadelerini artırmada SM-1'in ve SM-2, HSP gen ifadelerini azaltmada ise BM-1 ve SM-2'nin daha etkili kat değişimi gösterdiği gözlenmiştir. Bileşiklerin endoplazmik retikulum stres genleri olan GRP'lerin ifadelerinde anlamlı bir kat değişimi tespit edilmemiştir.





Şekil 4.18. Bileşiklerin DLD-1 hücre hattında apoptotik sinyal yollarına ait mRNA ekspresyonları





Resim 4.5. Gen bölgelerine ait erime eğrisi analizi

4.4. Protein Analizleri

4.4.1. Membran ilişkili protein array analizi

MCF-7 (meme kanseri) ve DLD-1 (kolon kanseri) hücreleri 24 saat 37 °C’de inkübe edildikten sonra 75’lik flaklara 5×10^6 hücre sayısı hesaplanarak ekimleri yapılmış ve RIPA tamponu ile protein izolasyonları kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Protein konsantrasyonları Thermo BCA Protein testi ile belirlenmiştir ve μg cinsinden hesaplanmıştır. Protein örnekleri bloklama tamponu ile 300 μg olacak şekilde dilüe edilmiştir (Çizelge 4.21 ve 4.22) (Şekil 4.19) (Resim 4.6-4.9).

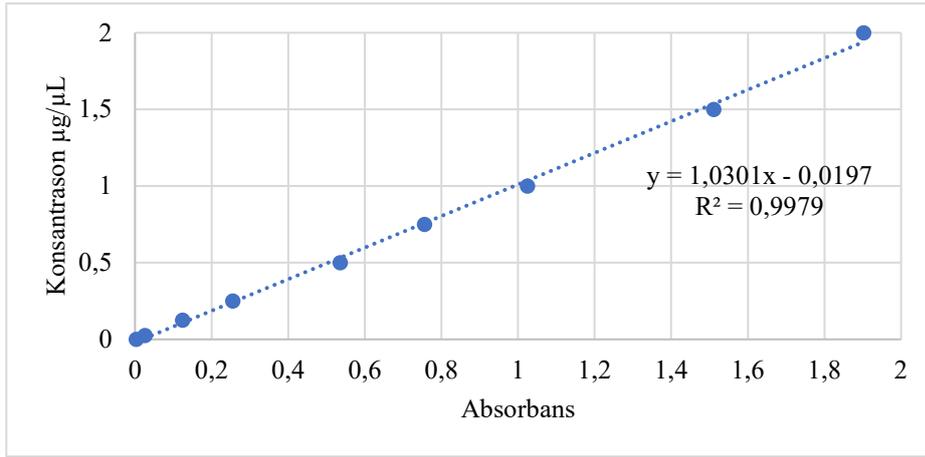
Çizelge 4.21. MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinden izole edilen proteinlerin konsantrasyonu

Bileşikler	MCF-7 hücre konsantrasyonu (μg)	DLD-1 hücre konsantrasyonu (μg)
BM-1	1669	3363
SM-1	1602	3153
BM-2	1628	3552
SM-2	1708	3269
(-) Kontrol	2420	2524

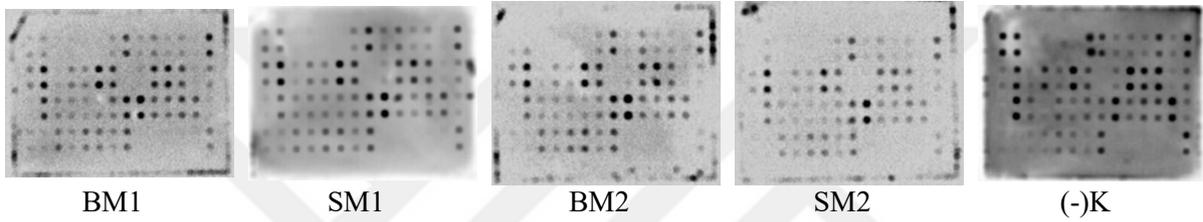
MCF-7 ve DLD-1 hücre hatlarında, heterohalkalı bileşiklerin apoptoz ve ilişkili sinyal yollarında yer alan proteinler olan; BAD, BAX, BID, BIM, Casp3, Casp7, Casp8, CD40, CD40L, cIAP-2, cytoC, DR6, Fas, FasL, HTRA, p38, p27, p53, SMAC, sTNF-R1, sTNF-R2, TNF-alpha, TNF-beta, TRAILR-1, TRAILR-2, TRAILR-3, TRAILR-4, ATM, CHK1, CHK2, eIF2a, SMAD BCL-2, BCL-W, HSP27, HSP60, HSP70, IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6, IGF-1sR, Livin, p21, Survivin, XIAP, AKT, Erk1/2, IkbA, JNK, NFKB, PARP, TAK1 miktarları membran ilişkili protein array kit ile ölçülmüştür. Bileşiklere ait protein miktarındaki kat (fold) artışı ve azalışı Microsoft Excel programı yardımı ile hesaplanmıştır.

Çizelge 4.22. BCA protein testinin 562 nm absorbans değerleri

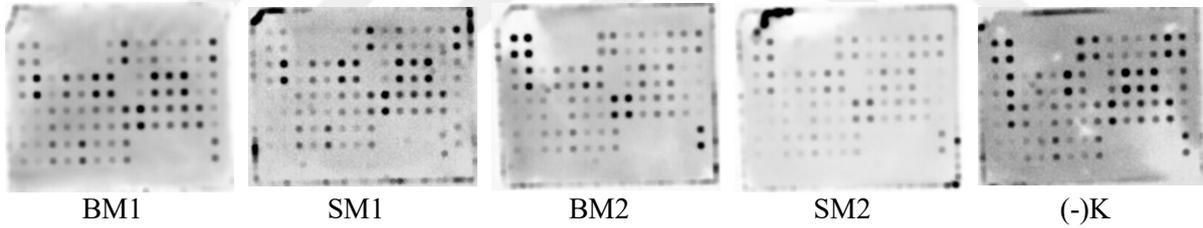
Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbans (562 nm)
2	1,9025
1,5	1,5113
1	1,0252
0,75	0,7564
0,5	0,5366
0,25	0,2554
0,125	0,1250
0,025	0,0266
0	0,0034



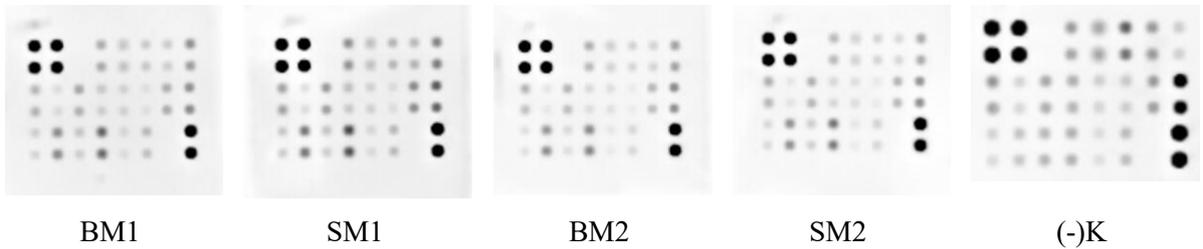
Şekil 4.19. BCA protein testi standart eğrisi



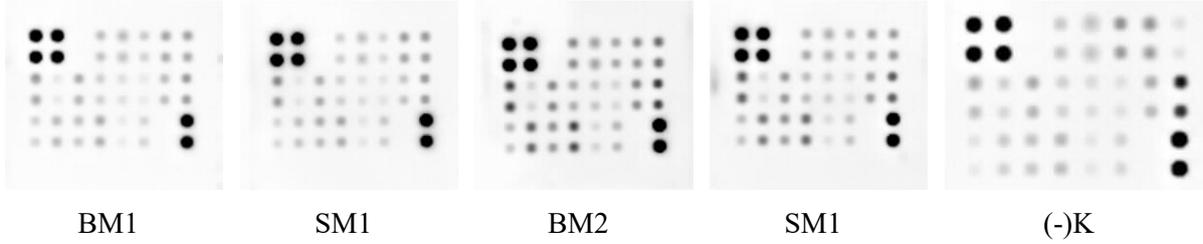
Resim 4.6. MCF-7 (meme kanseri) hücrelerinde apoptoz array görüntüleri



Resim 4.7. DLD-1 (kolon kanseri) hücrelerinde apoptoz array görüntüleri



Resim 4.8. MCF-7 (meme kanseri) hücrelerinde apoptoz sinyal array görüntüleri



Resim 4.9. DLD-1 (kolon kanseri) hücresinde apoptoz sinyal array görüntüleri

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1-2	Pozitif	Pozitif	Negatif	Negatif	Blank	Blank	bad	bax	bcl-2	bcl-w	BID	BIM	Kaspaz-3	Kaspaz-8
3-4	CD40	CD40L	cIAP-2	cytoC	DR6	Fas	FasL	Blank	HSP27	HSP60	HSP70	HTRA	IGF-I	IGF-II
5-6	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-3	IGFBP-4	IGFBP-5	IGFBP-6	IGF-1sR	livin	p21	p27	p53	SMAC	Survivin	sTNF-R1
7-8	sTNF-R2	TNF-alpha	TNF-beta	TRAILR-1	TRAILR-2	TRAILR-3	TRAILR-4	XIAP	Blank	Blank	Negatif	Negatif	Negatif	Pozitif

Çizelge 4.23. Apoptoz array haritası

	A	B	C	D	E	F	G	H
1-2	Pozitif	Pozitif	Negatif	AKT(\$473)	ATM	BAD(\$112)	Kaspaz-3	Kaspaz-7
3-4	CHK1 (\$280)	CHK2(T68)	eIF2a (\$52)	Erk1/2(t202)	hsp27(\$82)	IkbA (\$32)	JNK(T193)	NFKB
5-6	PARP	P27(T198)	P38(T180/Y182)	P53(\$15)	SMAD2	TAK1	Negatif	Pozitif

Çizelge 4.24. Apoptoz sinyal array haritası

Apoptoz array sonuçları analiz edildiğinde; BM-1 bileşiği uygulanan MCF-7 hücresinde kontrol grubuna göre; BAX protein miktarı 5 kat, BİD protein miktarı 4 kat, BİM protein miktarı 1,8 kat, CASP3 protein miktarı 2,8 kat, CASP8 protein miktarı 4,2 kat, CD40 protein miktarı 4,5 kat, CD40LG protein miktarı 3,5 kat, cIAP-2 protein miktarı 2,5 kat, cytoC protein miktarı 1,6 kat, DR6 (TNFRSF21) protein miktarı 4 kat, FAS protein miktarı 3 kat, FASLG protein miktarı 3,7 kat, HTRA2 protein miktarı 1,5 kat, p27 protein miktarı 3,3 kat, p53 protein miktarı 1,8 kat, SMAC protein miktarı 1,8 kat, sTNF-R2 protein miktarı 7 kat, TNF-alpha protein miktarı 4 kat, TNF-beta protein miktarı 8,6 kat, TRAILR-1 protein miktarı 4,1 kat, TRAILR-2 protein miktarı 4,5 kat, TRAILR-3 protein miktarı 5,3 kat, TRAILR-4 protein miktarı 6 kat, IGFBP1 protein miktarı 5,8 kat, IGFBP2 protein miktarı 1,9 kat, IGFBP3 protein miktarı 1,8 kat, IGFBP4 protein miktarı 6,3 kat, IGFBP5 protein miktarı 1,3 kat ve IGFBP6 protein miktarı 1,9 kat artış göstermiştir. BAD ve sTNF-R1 protein miktarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. BLC-2, BCL-w, HSP27, HSP60, HSP70, IGF1, IGF2, IGF1sR, livin, survivin, p21 ve XIAP protein miktarında anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir.

SM-1 bileşigi uygulanan MCF-7 hücresinde kontrol grubuna göre; BAX protein miktarı 2,8 kat, BİD protein miktarı 1,8 kat, CASP8 protein miktarı 1,7 kat, CD40 protein miktarı 4 kat, CD40LG protein miktarı 2,6 kat, cIAP-2 protein miktarı 1,5 kat, DR6 (TNFRSF21) protein miktarı 2 kat, FAS protein miktarı 2,1 kat, FASLG protein miktarı 2,7 kat, p27 protein miktarı 2 kat, sTNF-R2 protein miktarı 3,3 kat, TNF-alpha protein miktarı 2,3 kat, TNF-beta protein miktarı 4,3 kat, TRAILR-1 protein miktarı 3,5 kat, TRAILR-2 protein miktarı 3,3 kat, TRAILR-3 protein miktarı 4,2 kat ve TRAILR-4 protein miktarı 4,2 kat, IGFBP4 protein miktarı 2,7 kat, IGFBP6 protein miktarı 1,3 kat artış göstermiştir. BAD, BİM, CASP3, cytoC, HTRA2, p53, SMAC, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP5 ve sTNF-R1 protein miktarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. HSP27 protein miktarı 0,4 kat, ve survivin protein miktarı 0,5 kat azalış göstermiştir. BLC-2, BCL-w, HSP60, HSP70, IGF1, IGF2, IGF1sR, livin, p21 ve XIAP protein miktarında anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir.

BM-2 bileşigi uygulanan MCF-7 hücresinde kontrol grubuna göre; BAD protein miktarı 2,6 kat, BAX protein miktarı 14 kat, BİD protein miktarı 14 kat, BİM protein miktarı 3 kat, CASP3 protein miktarı 2,8 kat, CASP8 protein miktarı 9,3 kat, CD40 protein miktarı 11 kat, CD40LG protein miktarı 7,8 kat, cIAP-2 protein miktarı 5,2 kat, cytoC protein miktarı 2,6 kat, DR6 (TNFRSF21) protein miktarı 2,9 kat, FAS protein miktarı 6,7 kat, FASLG protein miktarı 8,7 kat, HTRA2 protein miktarı 2,2 kat, p27 protein miktarı 5,5 kat, p53 protein miktarı 2,5 kat, SMAC protein miktarı 4,7 kat, sTNF-R2 protein miktarı 6,6 kat, TNF-alpha protein miktarı 6,9 kat, TNF-beta protein miktarı 17,9 kat, TRAILR-1 protein miktarı 10 kat, TRAILR-2 protein miktarı 11 kat, TRAILR-3 protein miktarı 18,5 kat, TRAILR-4 protein miktarı 11,5 kat IGFBP1 protein miktarı 3,7 kat, IGFBP2 protein miktarı 1,9 kat, IGFBP3 protein miktarı 2,8 kat, IGFBP4 protein miktarı 8,8 kat, IGFBP5 protein miktarı 2,6 kat ve IGFBP6 protein miktarı 4,4 kat artış göstermiştir. sTNF-R1 protein miktarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. BLC-2, BCL-w, HSP27, HSP60, HSP70, IGF1, IGF2, IGF1sR, livin, survivin, p21 ve XIAP protein miktarında anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir.

SM-2 bileşigi uygulanan MCF-7 hücresinde kontrol grubuna göre; BAD protein miktarı 1,3 kat, BAX protein miktarı 10,3 kat, BİD protein miktarı 4,2 kat, BİM protein miktarı 2 kat, CASP3 protein miktarı 2 kat, CASP8 protein miktarı 6 kat, CD40 protein miktarı 4,5 kat, CD40LG protein miktarı 5,8 kat, cIAP-2 protein miktarı 2,2 kat, cytoC protein miktarı 2 kat, DR6 (TNFRSF21) protein miktarı 3,7 kat, FAS protein miktarı 4,2 kat, FASLG protein miktarı 4,8 kat, HTRA2 protein miktarı 1,7 kat, p27 protein miktarı 2,1 kat, p53 protein miktarı 1,8 kat,

SMAC protein miktarı 2 kat, sTNF-R2 protein miktarı 4,2 kat, TNF-alpha protein miktarı 1,8 kat, TNF-beta protein miktarı 13 kat, TRAILR-1 protein miktarı 9,8 kat, TRAILR-2 protein miktarı 8,5 kat, TRAILR-3 protein miktarı 12,8 kat, TRAILR-4 protein miktarı 10 kat IGFBP1 protein miktarı 3,3 kat, IGFBP2 protein miktarı 1,2 kat, IGFBP3 protein miktarı 1,4 kat, IGFBP4 protein miktarı 2,4 kat, IGFBP5 protein miktarı 1,2 kat ve IGFBP6 protein miktarı 1,9 kat artış göstermiştir. sTNF-R1 protein miktarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. HSP27 protein miktarı 0,9 kat ve IGF1 protein miktarı 0,4 kat azalış göstermiştir. BLC-2, BCL-w, HSP60, HSP70, IGF2, IGF1sR, livin, survivin, p21 ve XIAP protein miktarında anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir (Şekil 4.20).

BM-1 bileşiği uygulanan DLD-1 hücresinde kontrol grubuna göre; BAX protein miktarı 2,5 kat, CASP8 protein miktarı 2,9 kat, CD40 protein miktarı 3,3 kat, CD40LG protein miktarı 2,3 kat, cIAP-2 protein miktarı 4 kat, cytoC protein miktarı 3,2 kat, DR6 (TNFRSF21) protein miktarı 2,5 kat, FAS protein miktarı 1,5 kat, FASLG protein miktarı 3,4 kat, HTRA2 protein miktarı 1,8 kat, p27 protein miktarı 2 kat, p53 protein miktarı 1,5 kat, SMAC protein miktarı 2,4 kat, sTNF-R1 protein miktarı 1,5 kat, sTNF-R2 protein miktarı 4,8 kat, TNF-alpha protein miktarı 7,2 kat, TNF-beta protein miktarı 2,2 kat, TRAILR-1 protein miktarı 3,5 kat, TRAILR-2 protein miktarı 1,8 kat, TRAILR-3 protein miktarı 5,8 kat, TRAILR-4 protein miktarı 1,3 kat, IGFBP3 protein miktarı 1,3 kat, IGFBP4 protein miktarı 5 kat ve IGFBP6 protein miktarı 2,3 kat artış göstermiştir. BAD, BİD, BİM, CASP3, IGFBP1, IGFBP2 ve IGFBP5 protein miktarlarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. HSP27 protein miktarı 0,4 kat ve azalış göstermiştir. BLC-2, BCL-w, HSP60, HSP70, IGF1, IGF2, IGF1sR, livin, survivin, p21 ve XIAP protein miktarlarında anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir.

SM-1 bileşiği uygulanan DLD-1 hücresinde kontrol grubuna göre; BAX protein miktarı 1,5 kat, CASP8 protein miktarı 1,6 kat, CD40 protein miktarı 1,4 kat, CD40LG protein miktarı 1,2 kat, cIAP-2 protein miktarı 2,3 kat, cytoC protein miktarı 1,5 kat, DR6 (TNFRSF21) protein miktarı 1,2 kat, FASLG protein miktarı 1,6 kat, p27 protein miktarı 1,3 kat, SMAC protein miktarı 1,3 kat, sTNF-R2 protein miktarı 1,6 kat, TNF-alpha protein miktarı 2,7 kat, TNF-beta protein miktarı 3,3 kat, TRAILR-3 protein miktarı 1,3 kat, IGFBP4 protein miktarı 2,7 kat ve IGFBP6 protein miktarı 1,6 kat artış göstermiştir. BAD, BİD, BİM, CASP3, FAS, HTRA2, p53, sTNF-R1, TRAILR-1, TRAILR-2, TRAILR-4, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3 ve IGFBP5 protein miktarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. HSP27 protein miktarı 0,5 kat, HSP60 protein miktarı 0,3 kat, HSP70 protein miktarı 0,2 kat, survivin protein miktarı 0,3 kat, IGF1 protein

miktarı 0,4 kat ve IGF2 protein miktarı 0,2 kat azalış göstermiştir. BLC-2, BCL-w, IGF1sR, p21, livin ve XIAP protein miktarlarında anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir.

BM-2 bileşiği uygulanan DLD-1 hücresinde kontrol grubuna göre; CD40 protein miktarı 1,8 kat, CD40LG protein miktarı 1,2 kat, cIAP-2 protein miktarı 5,2 kat, cytoC protein miktarı 1,2 kat, DR6 (TNFRSF21) protein miktarı 1,5 kat, FASLG protein miktarı 1,2 kat, sTNF-R2 protein miktarı 2 kat, TNF-alpha protein miktarı 1,8 kat ve TNF-beta protein miktarı 1,4 kat artış göstermiştir. BAD, BAX, BİD, BİM, CASP3, CASP8, FAS, HTRA2, p27, p53, SMAC, sTNF-R1, TRAILR-1, TRAILR-2, TRAILR-3, TRAILR-4, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5 ve IGFBP6 protein miktarlarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. BLC-2 protein miktarı 0,5 kat, BCL-w protein miktarı 0,2 kat, HSP27 protein miktarı 0,7 kat, HSP60 protein miktarı 0,5 kat, HSP70 protein miktarı 0,6 kat, IGF1 protein miktarı 0,6 kat, IGF2 protein miktarı 0,8 kat, IGF1sR protein miktarı 0,5 kat ve survivin protein miktarı 0,8 kat azalış göstermiştir. Livin, p21 ve XIAP protein miktarlarında anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir.

SM-2 bileşiği uygulanan DLD-1 hücresinde kontrol grubuna göre; BİM protein miktarı 1,1 kat, CD40 protein miktarı 2,1 kat, CD40LG protein miktarı 1,3 kat, cIAP-2 protein miktarı 3,5 kat, cytoC protein miktarı 1,5 kat, DR6 (TNFRSF21) protein miktarı 2 kat, FASLG protein miktarı 1,6 kat, sTNF-R2 protein miktarı 2,6 kat, TNF-alpha protein miktarı 2,2 kat, TNF-beta protein miktarı 1,7 kat, TRAILR-1 protein miktarı 1,5 kat ve TRAILR-3 protein miktarı 1,4 kat artış göstermiştir. BAD, BAX, BİD, CASP3, CASP8, FAS, HTRA2, p27, p53, SMAC, sTNF-R1, TRAILR-2, TRAILR-4, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5 ve IGFBP6 protein miktarlarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. BLC-2 protein miktarında 0,2 kat, HSP60 protein miktarı 0,3 kat, HSP70 protein miktarı 0,5 kat, IGF1 protein miktarı 0,6 kat, IGF2 protein miktarı 0,8 kat, IGF1sR protein miktarı 0,5 kat ve survivin protein miktarı 0,8 kat azalış göstermiştir. BCL-w, HSP27, p21, livin ve XIAP protein miktarlarında anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir (Şekil 4.21).

Apoptoz sinyali array sonuçları analiz edildiğinde; BM-1 bileşiği uygulanan MCF-7 hücresinde kontrol grubuna göre; P27 (T198) protein miktarı 2,5 kat ve P53 (S15) protein miktarı 2,7 kat artış göstermiştir. ATM (S1981), BAD (S112), CASP3 (ASP175), CASP7 (ASP198), CHK1 (S280), CHK2 (T68), eIF2a (S52), P38 (T180/Y182) ve SMAD2 (S245/250) protein miktarlarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. ERK1/2 (T202) protein miktarı 0,5 kat, HSP27 (S82) protein miktarı 0,2 kat, IkbA (S32) protein miktarı 0,6 kat, NFkB (S536) protein

miktarı 0,7 kat ve TAK1 (S412) protein miktarı 0,5 kat azalış göstermiştir. AKT (S473), JNK (T193) ve PARP (ASP214) protein miktarlarında anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir (Şekil 4.20).

SM-1 bileşiği uygulanan MCF-7 hücresinde kontrol grubuna göre; eIF2a (S52) protein miktarı 1,2 kat, P27 (T198) protein miktarı 3 kat ve P53 (S15) protein miktarı 3 kat artış göstermiştir. ATM (S1981), BAD (S112), CASP3 (ASP175), CASP7 (ASP198), CHK1 (S280), CHK2 (T68), P38 (T180/Y182) ve SMAD2 (S245/250) protein miktarlarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. ERK1/2 (T202) protein miktarı 0,4 kat, HSP27 (S82) protein miktarı 0,3 kat, IκBa (S32) protein miktarı 0,7 kat ve NFκB (S536) protein miktarı 0,6 kat azalış göstermiştir. AKT (S473), JNK (T193), PARP (ASP214) ve TAK1 (S412) protein miktarlarında anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir (Şekil 4.21).

BM-2 bileşiği uygulanan MCF-7 hücresinde kontrol grubuna göre; P27 (T198) protein miktarı 2,3 kat ve P53 (S15) protein miktarı 2 kat artış göstermiştir. ATM (S1981), BAD (S112), CASP3 (ASP175), CASP7 (ASP198), CHK1 (S280), CHK2 (T68), eIF2a (S52), P38 (T180/Y182) ve SMAD2 (S245/250) protein miktarlarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. AKT (S473) protein miktarı 0,2 kat, ERK1/2 (T202) protein miktarı 0,7 kat, HSP27 (S82) protein miktarı 0,3 kat, IκBa (S32) protein miktarı 0,8 kat, JNK (T193) protein miktarı 0,3 kat, NFκB (S536) protein miktarı 0,7 kat, PARP (ASP214) protein miktarı 0,3 kat ve TAK1 (S412) protein miktarı 0,4 kat azalış göstermiştir (Şekil 4.22).

SM-2 bileşiği uygulanan MCF-7 hücresinde kontrol grubuna göre; P27 (T198) protein miktarı 2,2 kat ve P53 (S15) protein miktarı 12 kat artış göstermiştir. ATM (S1981), BAD (S112), CASP3 (ASP175), CASP7 (ASP198), CHK1 (S280), CHK2 (T68), eIF2a (S52), P38 (T180/Y182) ve SMAD2 (S245/250) protein miktarlarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. AKT (S473) protein miktarı 0,3 kat, ERK1/2 (T202) protein miktarı 0,6 kat, HSP27 (S82) protein miktarı 0,4 kat, IκBa (S32) protein miktarı 0,8 kat, JNK (T193) protein miktarı 0,3 kat, NFκB (S536) protein miktarı 0,7 kat, PARP (ASP214) protein miktarı 0,2 kat ve TAK1 (S412) protein miktarı 0,3 kat azalış göstermiştir (Şekil 4.23).

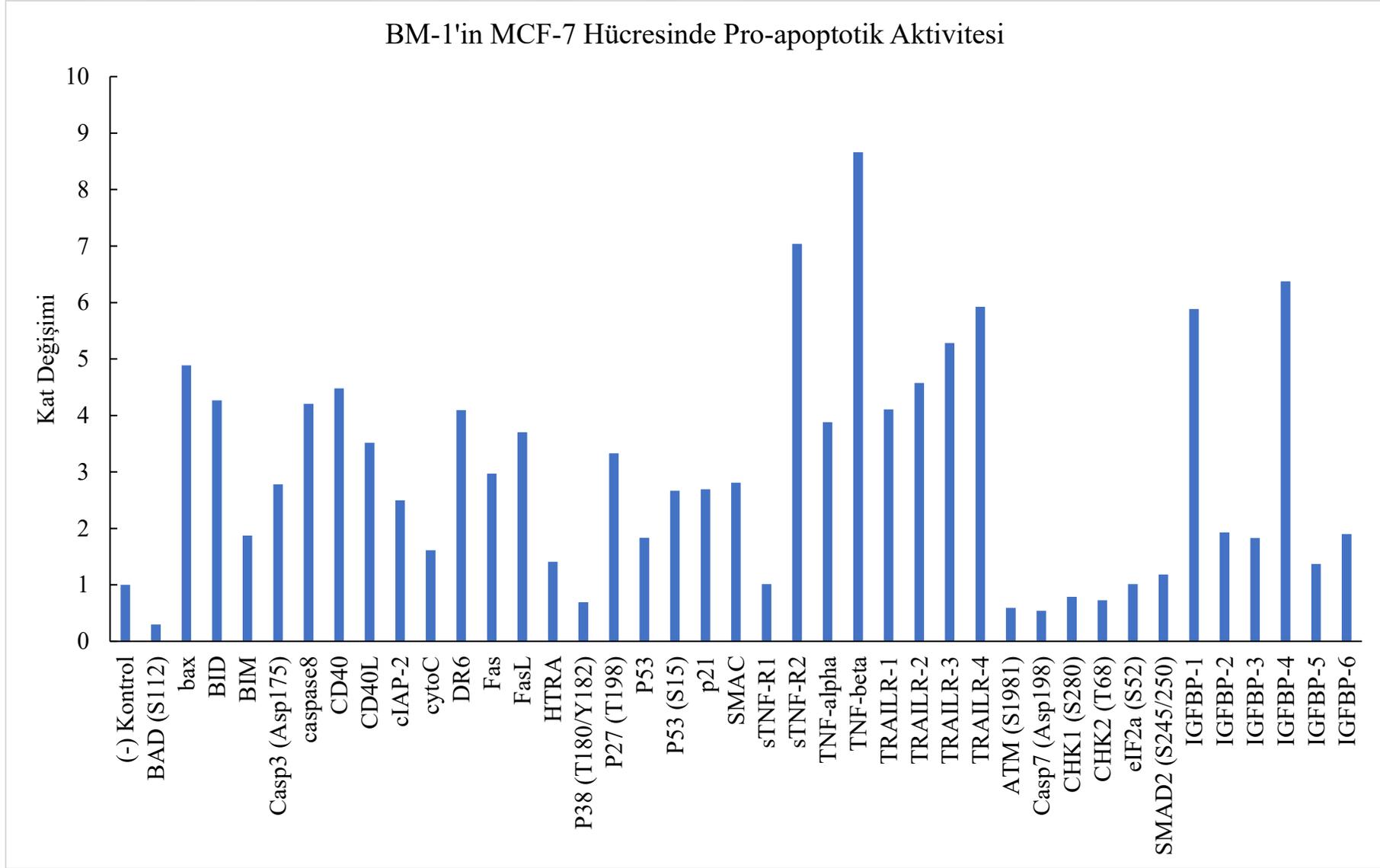
BM-1 bileşiği uygulanan DLD-1 hücresinde kontrol grubuna göre; ATM (S1981), BAD (S112), CASP3 (ASP175), CASP7 (ASP198), CHK1 (S280), CHK2 (T68), eIF2a (S52), P27 (T198), P38 (T180/Y182), P53 (S15) ve SMAD2 (S245/250) protein miktarlarında anlamlı bir artış

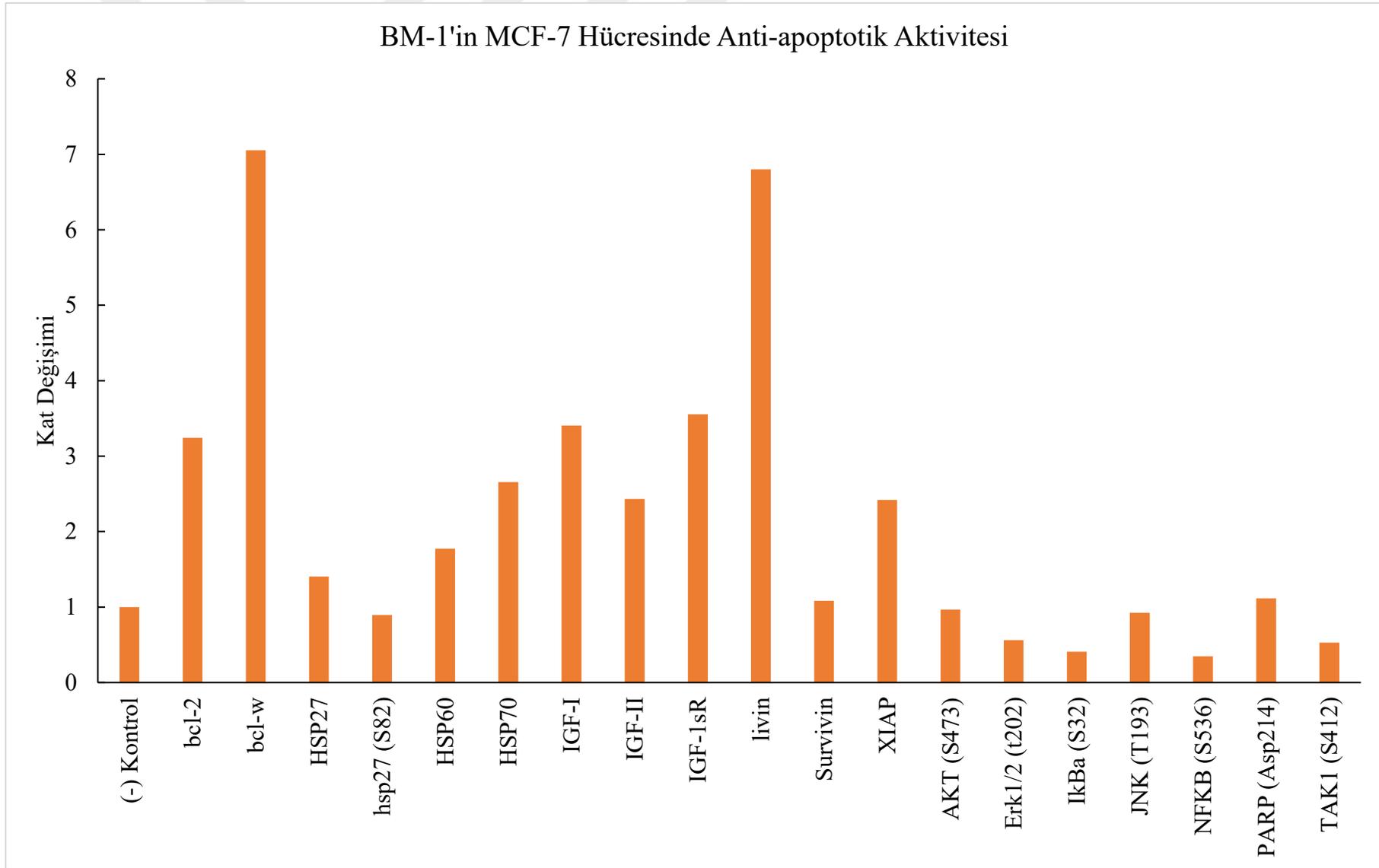
tespit edilmemiştir. AKT (S473) protein miktarı 0,8 kat, ERK1/2 (T202) protein miktarı 0,5 kat, HSP27 (S82) protein miktarı 0,5 kat, IκBa (S32) protein miktarı 0,6 kat, JNK (T193) protein miktarı 0,5 kat, NFκB (S536) protein miktarı 0,8 kat, PARP (ASP214) protein miktarı 0,5 kat ve TAK1 (S412) protein miktarı 0,8 kat azalış göstermiştir (Şekil 4.24).

SM-1 bileşiği uygulanan DLD-1 hücresinde kontrol grubuna göre; CASP7 (ASP198) protein miktarı 3,5 kat ve CHK1 (S280) protein miktarı 2,6 kat artış göstermiştir. ATM (S1981), BAD (S112), CASP3 (ASP175), CHK2 (T68), eIF2a (S52), P27 (T198), P38 (T180/Y182), P53 (S15) ve SMAD2 (S245/250) protein miktarlarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. AKT (S473) protein miktarı 0,5 kat, NFκB (S536) protein miktarı 0,3 kat ve TAK1 (S412) protein miktarı 0,1 kat azalış göstermiştir. ERK1/2 (T202), HSP27 (S82), IκBa (S32), JNK (T193) ve PARP (ASP214) protein miktarlarında anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir (Şekil 4.25).

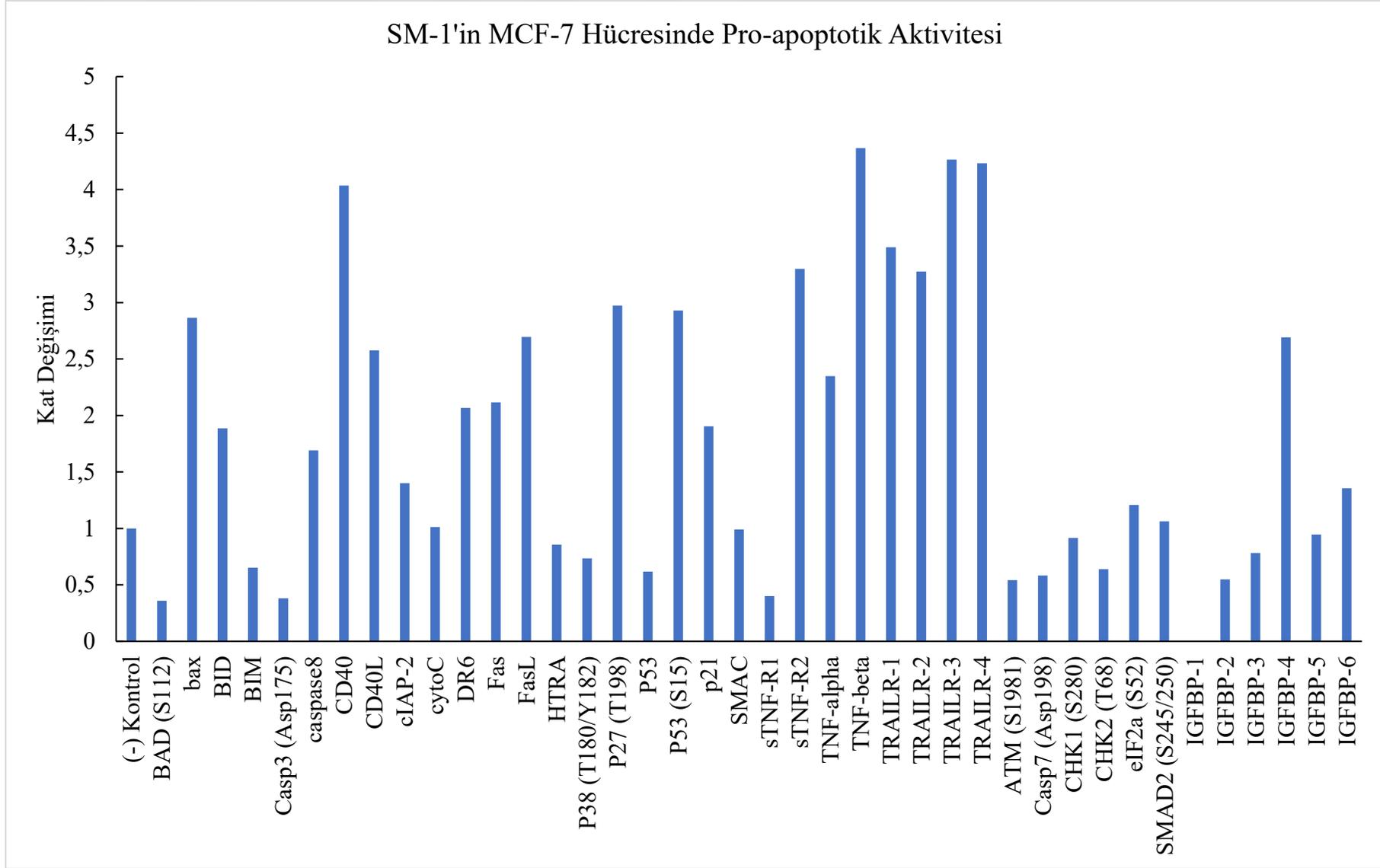
BM-2 bileşiği uygulanan DLD-1 hücresinde kontrol grubuna göre; ATM (S1981) protein miktarı 0,1 kat, CASP7 (ASP198) protein miktarı 5,7 kat, eIF2a (S52) protein miktarı 1,7 kat, P38 (T180/Y182) protein miktarı 1,5 kat, P53 (S15) protein miktarı 2,5 kat ve SMAD2 (S245/250) protein miktarı 0,1 kat artış göstermiştir. BAD (S112), CASP3 (ASP175), CHK1 (S280), CHK2 (T68) ve P27 (T198) protein miktarlarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. NFκB (S536) protein miktarı 0,1 kat azalış göstermiştir. AKT (S473), ERK1/2 (T202), HSP27 (S82), IκBa (S32), JNK (T193), PARP (ASP214) ve TAK1 (S412) protein miktarlarında anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir (Şekil 4.26).

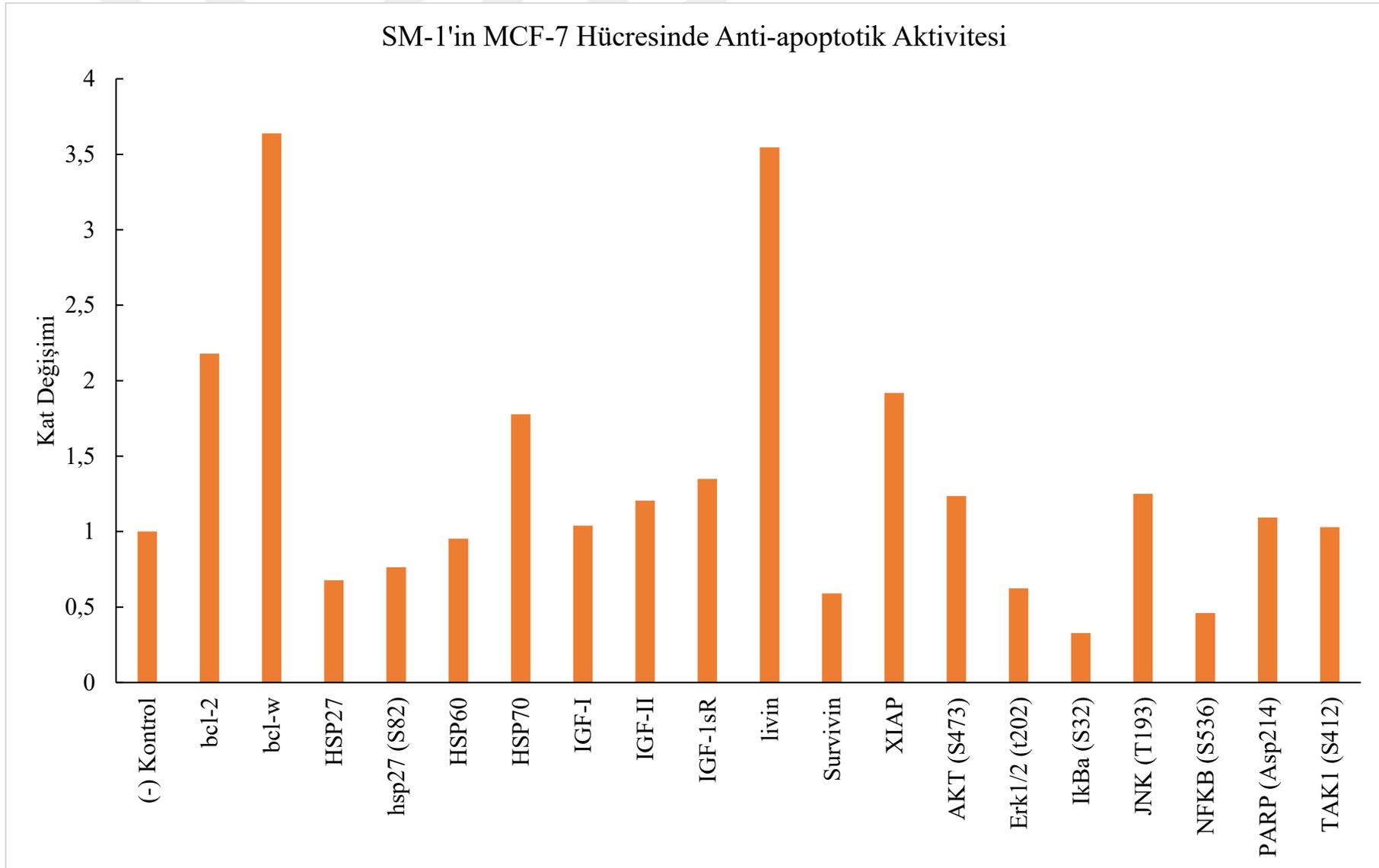
SM-2 bileşiği uygulanan DLD-1 hücresinde kontrol grubuna göre; CASP7 (ASP198) protein miktarı 3,9 kat, CHK1 (S280) protein miktarı 1,2 kat, P38 (T180/Y182) protein miktarı 1,5 kat ve P53 (S15) protein miktarı 2 kat artış göstermiştir. ATM (S1981), BAD (S112), CASP3 (ASP175), CHK2 (T68), eIF2a (S52), P27 (T198) ve SMAD2 (S245/250) protein miktarlarında anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. ERK1/2 (T202) protein miktarı 0,3 kat, HSP27 (S82) protein miktarı 0,3 kat, IκBa (S32) protein miktarı 0,5 kat, JNK (T193) protein miktarı 0,3 kat ve NFκB (S536) protein miktarı 0,7 kat azalış göstermiştir. AKT (S473), PARP (ASP214) ve TAK1 (S412) protein miktarlarında anlamlı bir azalış tespit edilmemiştir (Şekil 4.27).





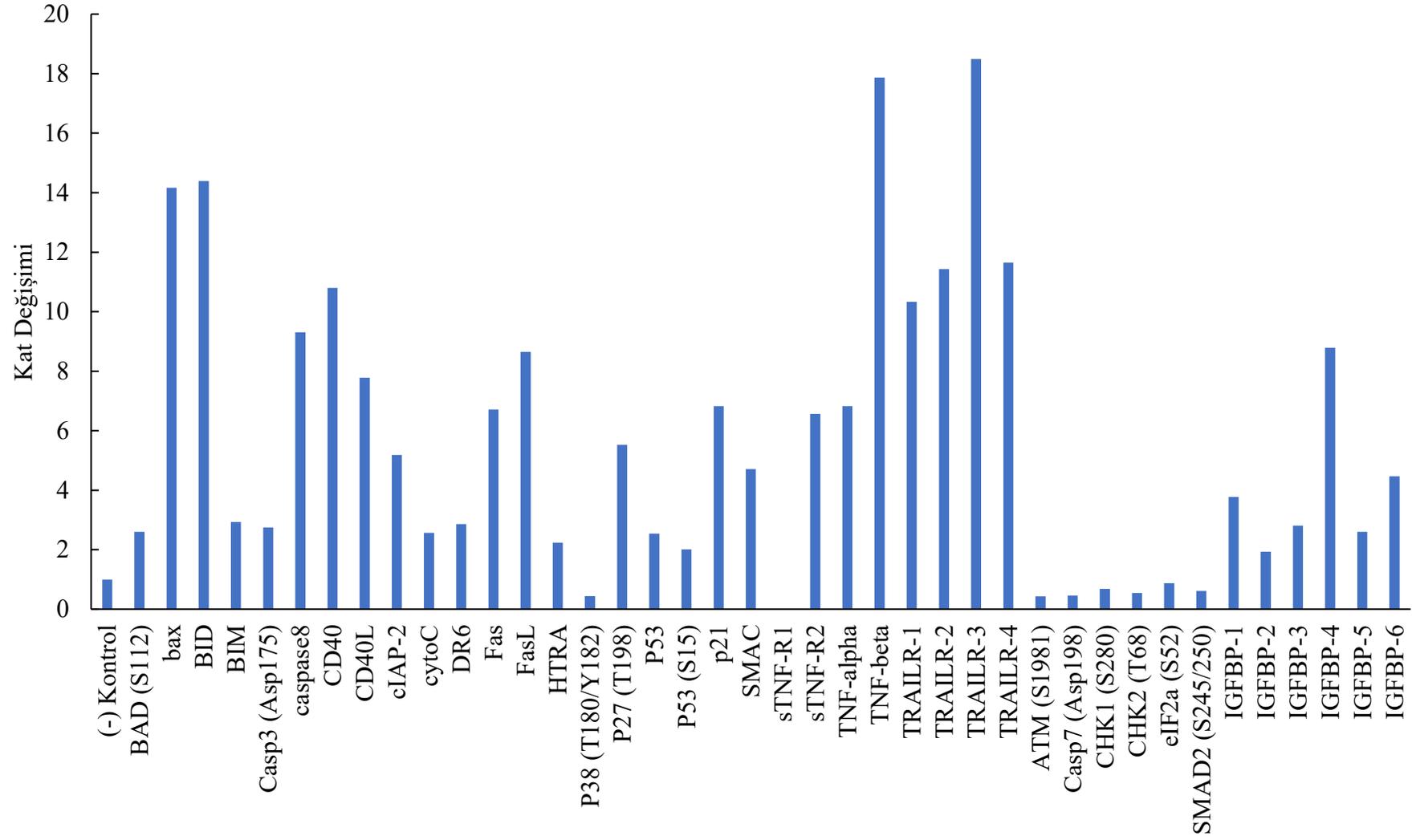
Şekil 4.20. BM-1 bileşiminin MCF-7 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri

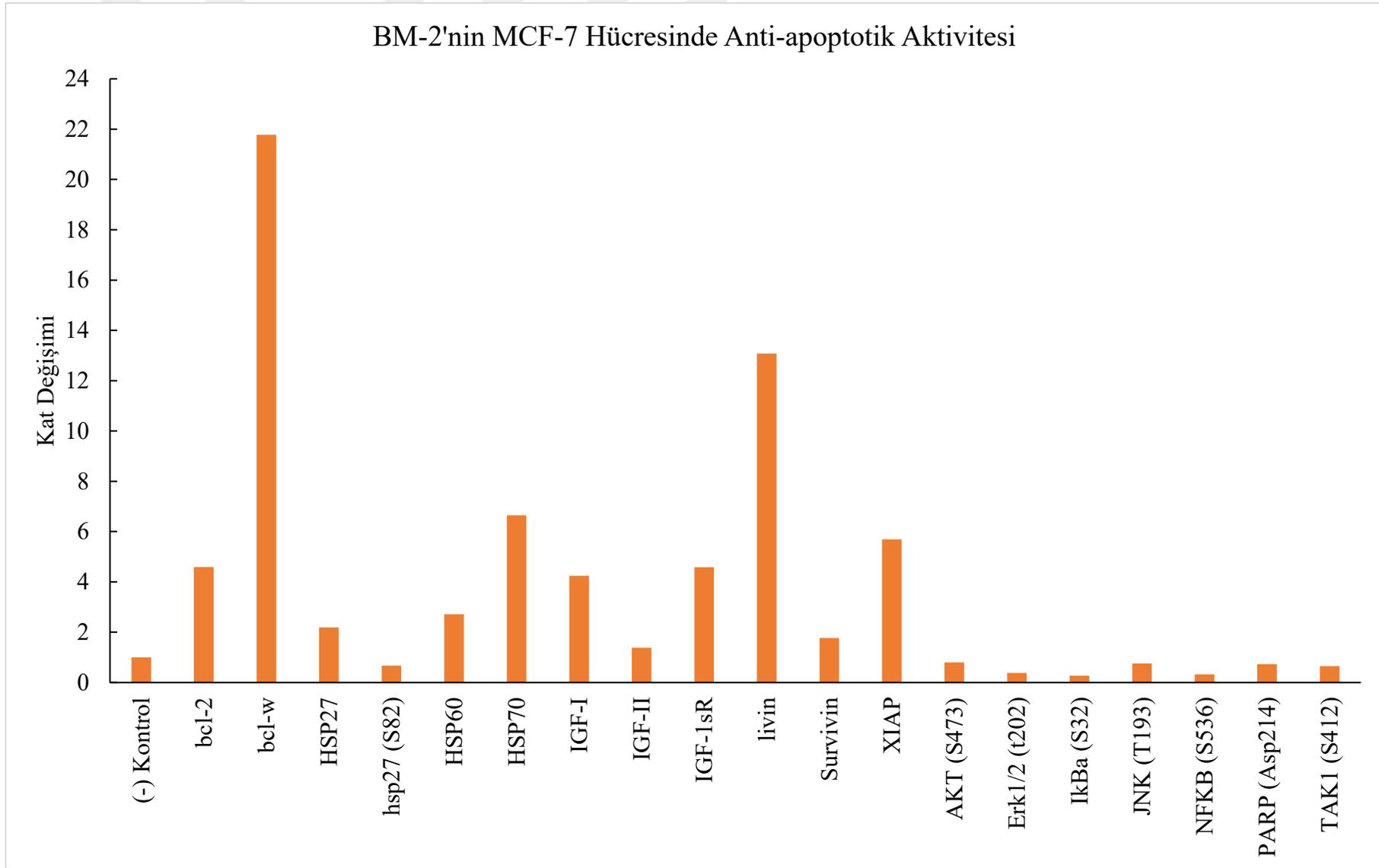




Şekil 4.21. SM-1 bileşiğinin MCF-7 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri

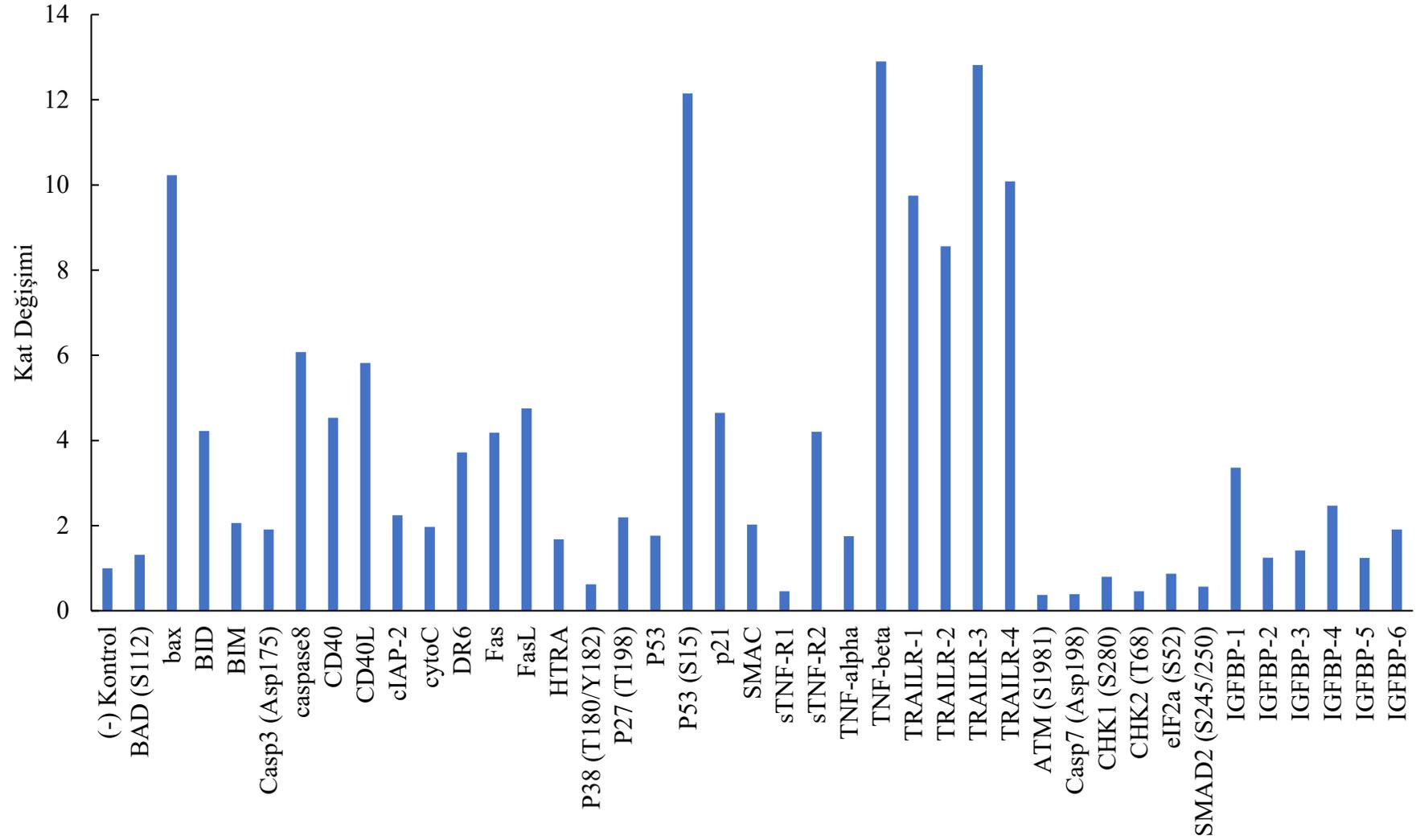
BM-2'nin MCF-7 Hücresinde Pro-apoptotik Aktivitesi

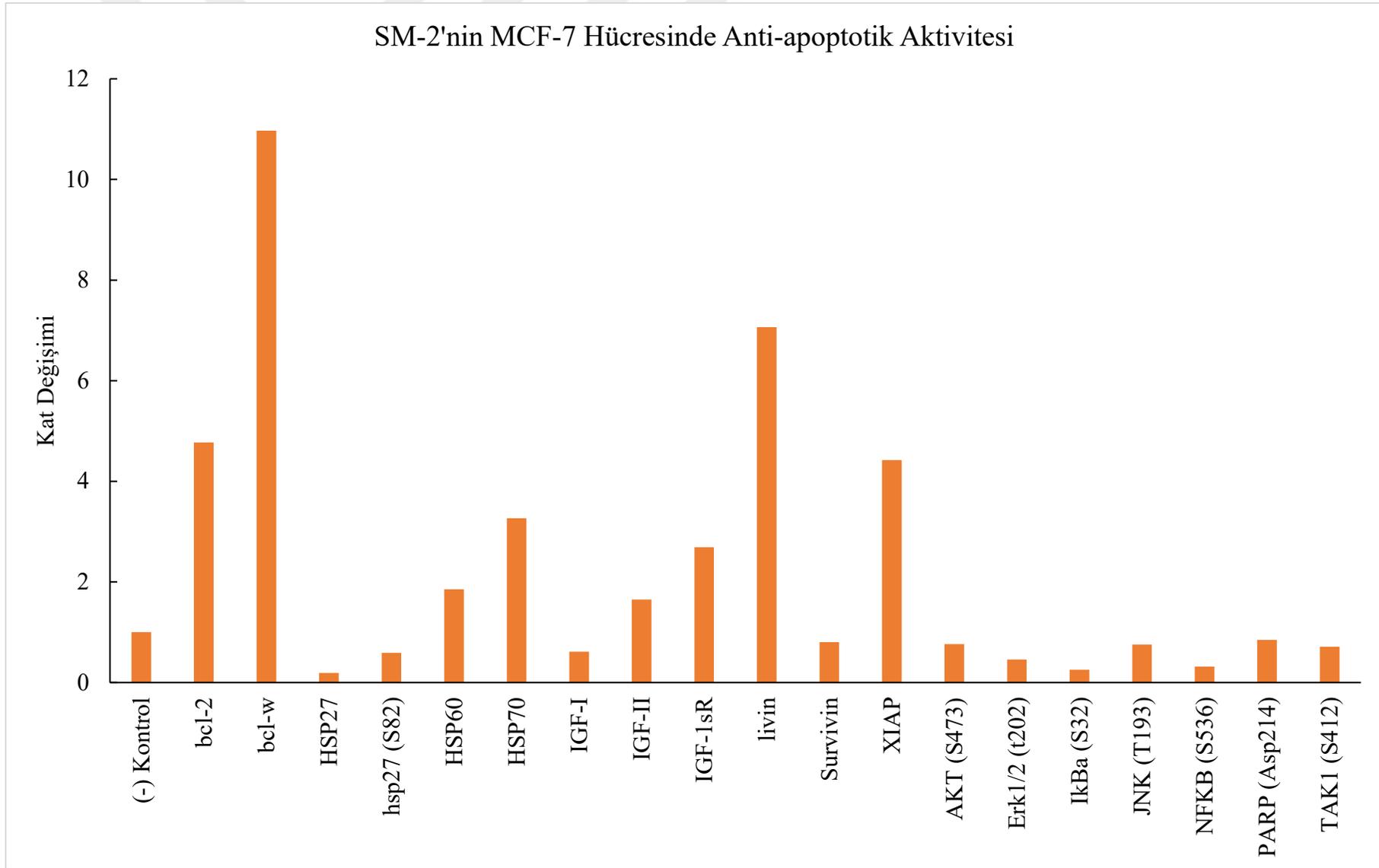




Şekil 4.22. BM-2 bileşiminin MCF-7 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri

SM-2'nin MCF-7 Hücresinde Pro-apoptotik Aktivitesi





Şekil 4.23. SM-2 bileşiğinin MCF-7 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri

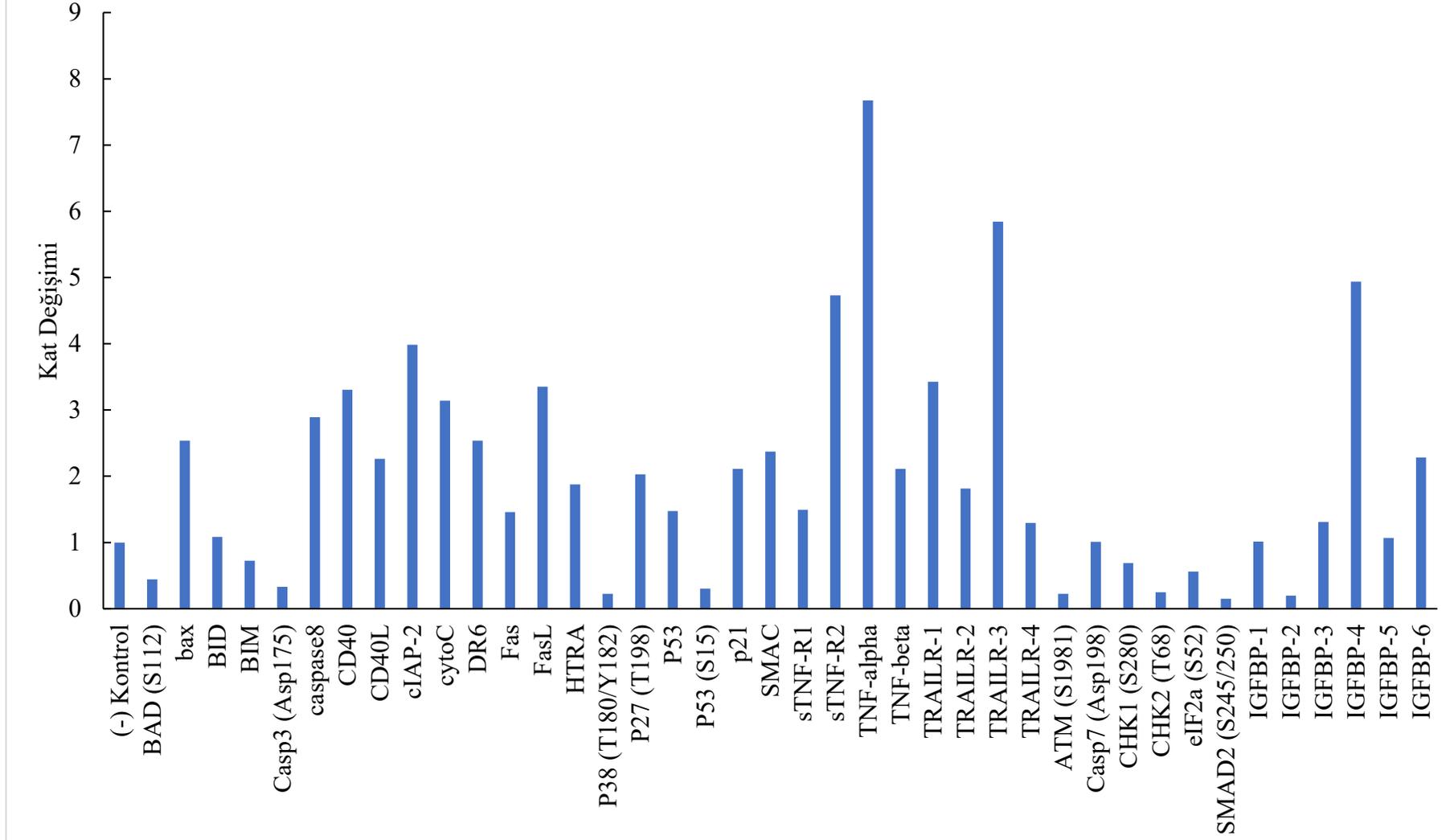
MCF-7 hücresinde BM-1 bileşiğinin hücreyi ölüme sürükleyen pro-apoptotik yollar olan BAX, BİD, BİM, CASP3, CASP8, CD40, CD40LG, cIAP-2, cytoC, DR6 (TNFRSF21), FAS, FASLG, HTRA2, p27, p53, SMAC, sTNF-R2, TNF-alpha, TNF-beta, TRAILR-1, TRAILR-2, TRAILR-3, TRAILR-4, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5 ve IGFBP6 protein ifadelerinde kat artışında etkili olduğu gözlenirken hücreyi ölümden koruyan anti-apoptotik yollar olan HSP27, survivin, ERK1/2, IκBα, NFκB ve TAK1 protein ifadelerinde ise kat azalışına etkisi olduğu tespit edilmiştir.

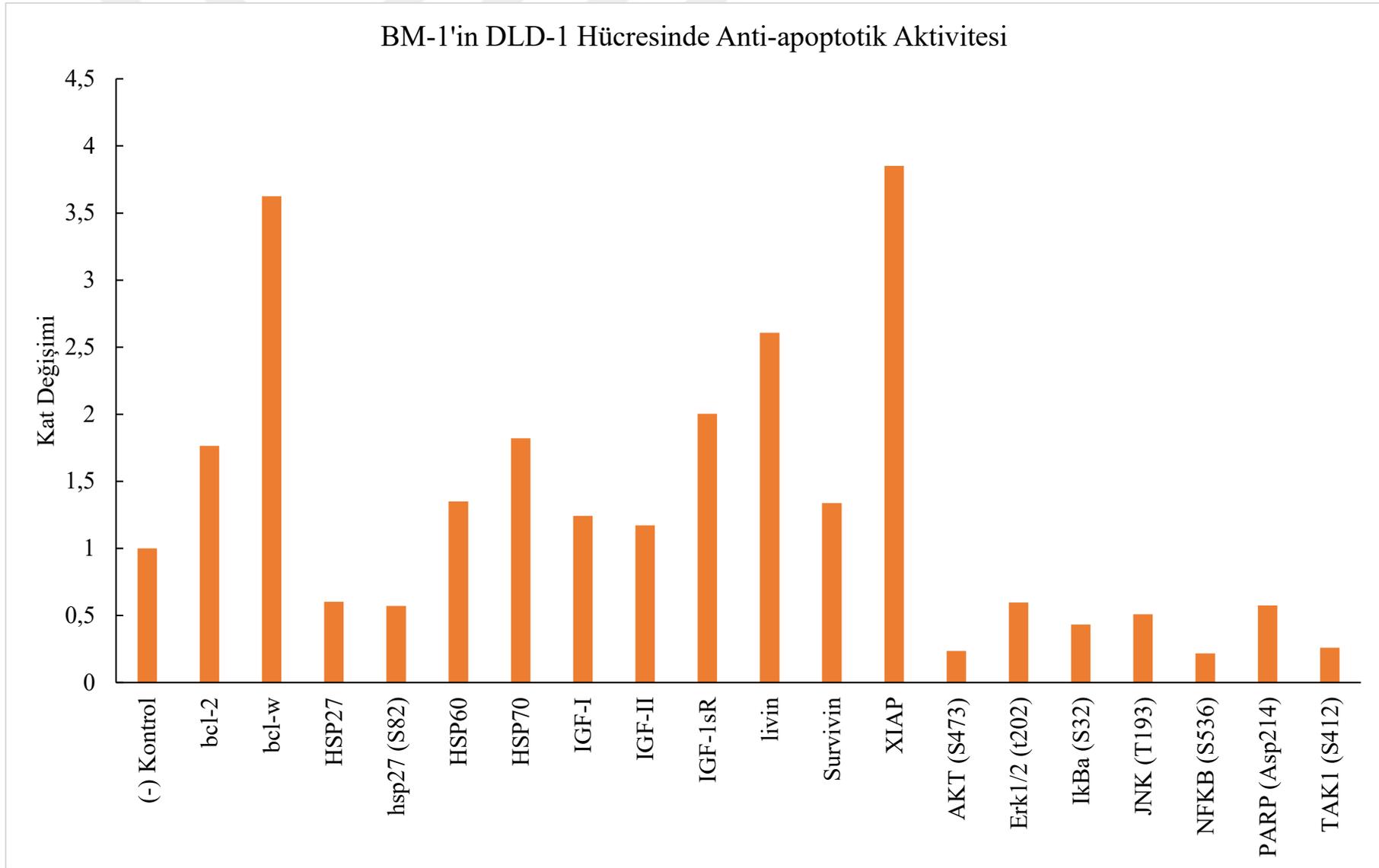
MCF-7 hücresinde SM-1 bileşiğinin hücreyi ölüme sürükleyen pro-apoptotik yollar olan BAX, BİD, CASP8, CD40, CD40LG, cIAP-2, DR6 (TNFRSF21), FAS, FASLG, p53, p27, eIF2α, sTNF-R2, TNF-alpha, TNF-beta, TRAILR-1, TRAILR-2, TRAILR-3, TRAILR-4, IGFBP4 ve IGFBP6 protein ifadelerinde kat artışında etkili olduğu gözlenirken hücreyi ölümden koruyan anti-apoptotik yollar olan HSP27, survivin, ERK1/2, IκBα ve NFκB protein ifadelerinde ise kat azalışına etkisi olduğu tespit edilmiştir.

MCF-7 hücresinde BM-2 bileşiğinin hücreyi ölüme sürükleyen pro-apoptotik yollar olan BAD, BAX, BİD, BİM, CASP3, CASP8, CD40, CD40LG, cIAP-2, cytoC, DR6 (TNFRSF21), FAS, FASLG, HTRA2, p27, p53, SMAC, sTNF-R2, TNF-alpha, TNF-beta, TRAILR-1, TRAILR-2, TRAILR-3, TRAILR-4, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5 ve IGFBP6 protein ifadelerinde kat artışında etkili olduğu gözlenirken hücreyi ölümden koruyan anti-apoptotik yollar olan AKT, ERK1/2, HSP27, IκBα, JNK, NFκB, PARP ve TAK1 protein ifadelerinde ise kat azalışına etkisi olduğu tespit edilmiştir.

MCF-7 hücresinde SM-2 bileşiğinin hücreyi ölüme sürükleyen pro-apoptotik yollar olan BAD, BAX, BİD, BİM, CASP3, CASP8, CD40, CD40LG, cIAP-2, cytoC, DR6 (TNFRSF21), FAS, FASLG, HTRA2, p27, p53, SMAC, sTNF-R2, TNF-alpha, TNF-beta, TRAILR-1, TRAILR-2, TRAILR-3, TRAILR-4, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5 ve IGFBP6 protein ifadelerinde kat artışında etkili olduğu gözlenirken hücreyi ölümden koruyan anti-apoptotik yollar olan HSP27, IGF1, AKT, ERK1/2, IκBα, JNK, NFκB, PARP ve TAK1 protein ifadelerinde ise kat azalışına etkisi olduğu tespit edilmiştir.

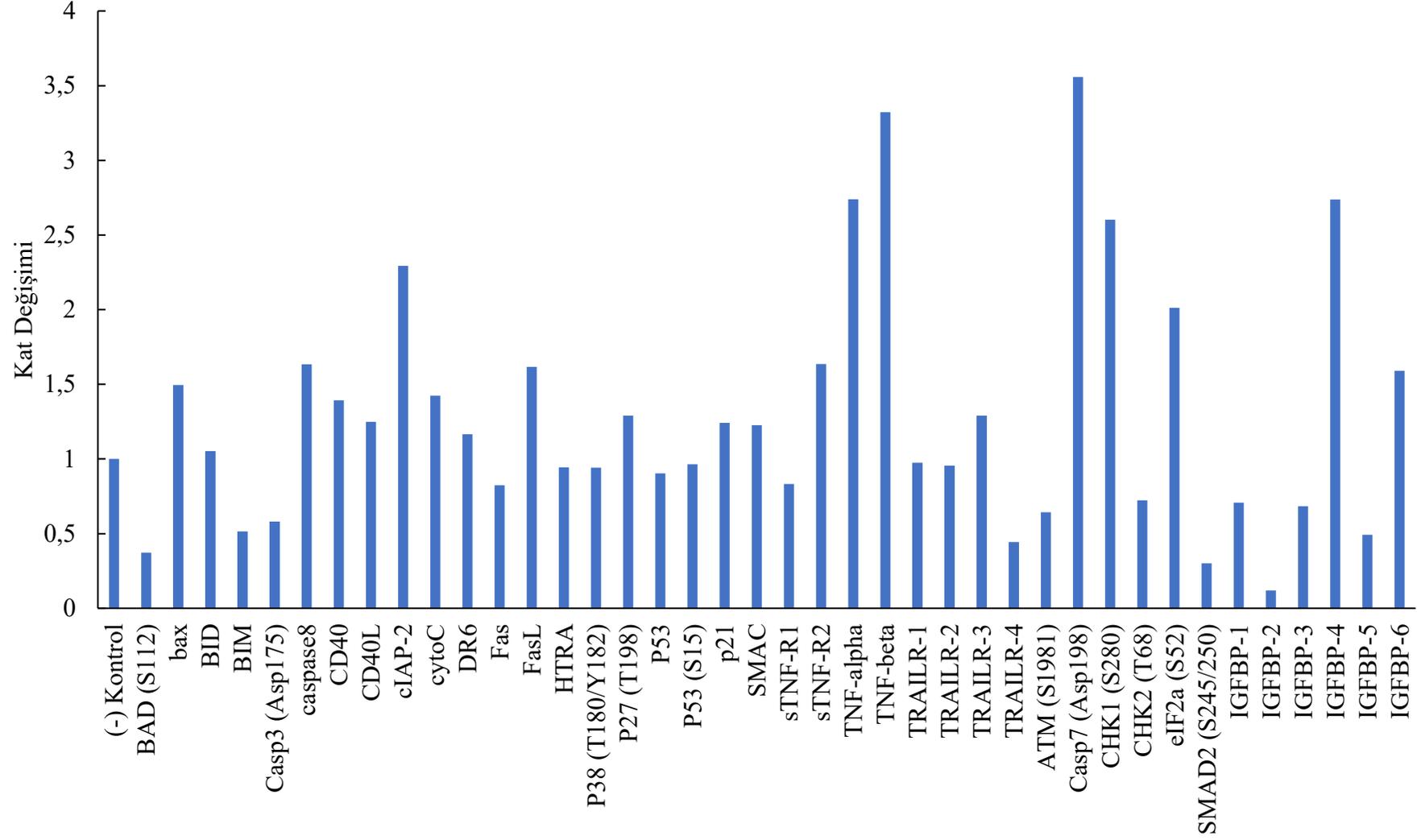
BM-1'in DLD-1 Hücresinde Pro-apoptotik Aktivitesi

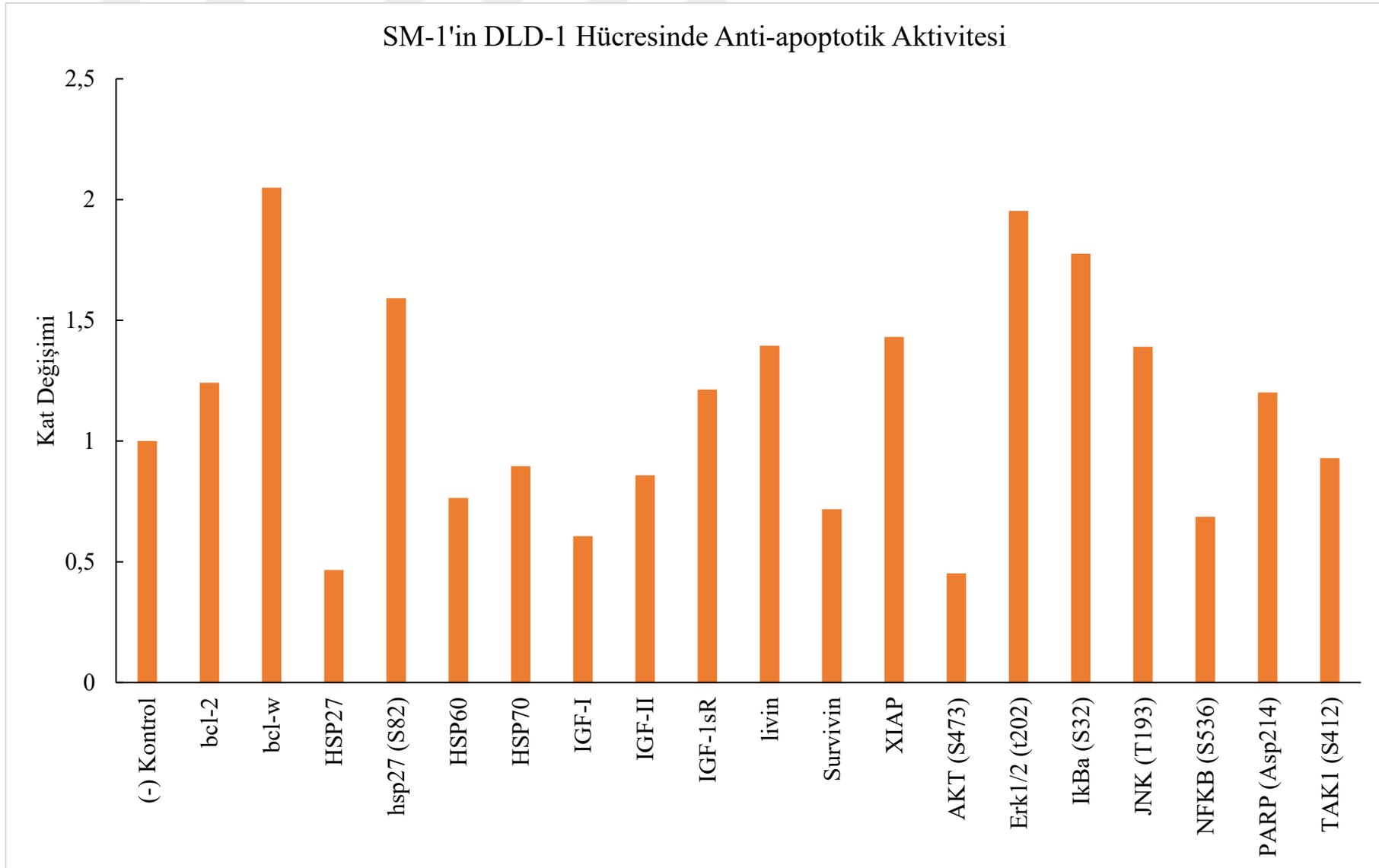




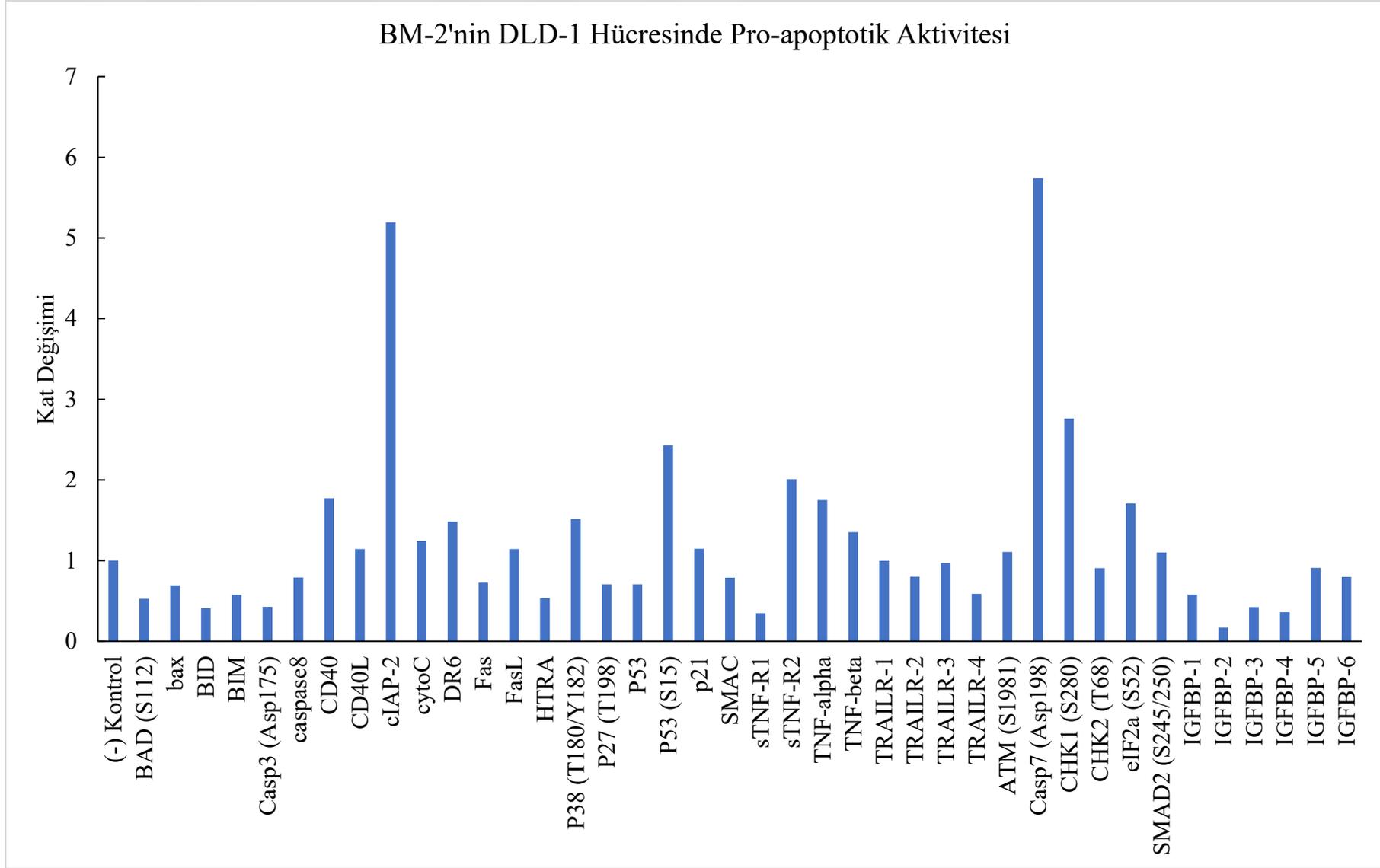
Şekil 4.24. BM-1 bileşiminin DLD-1 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri

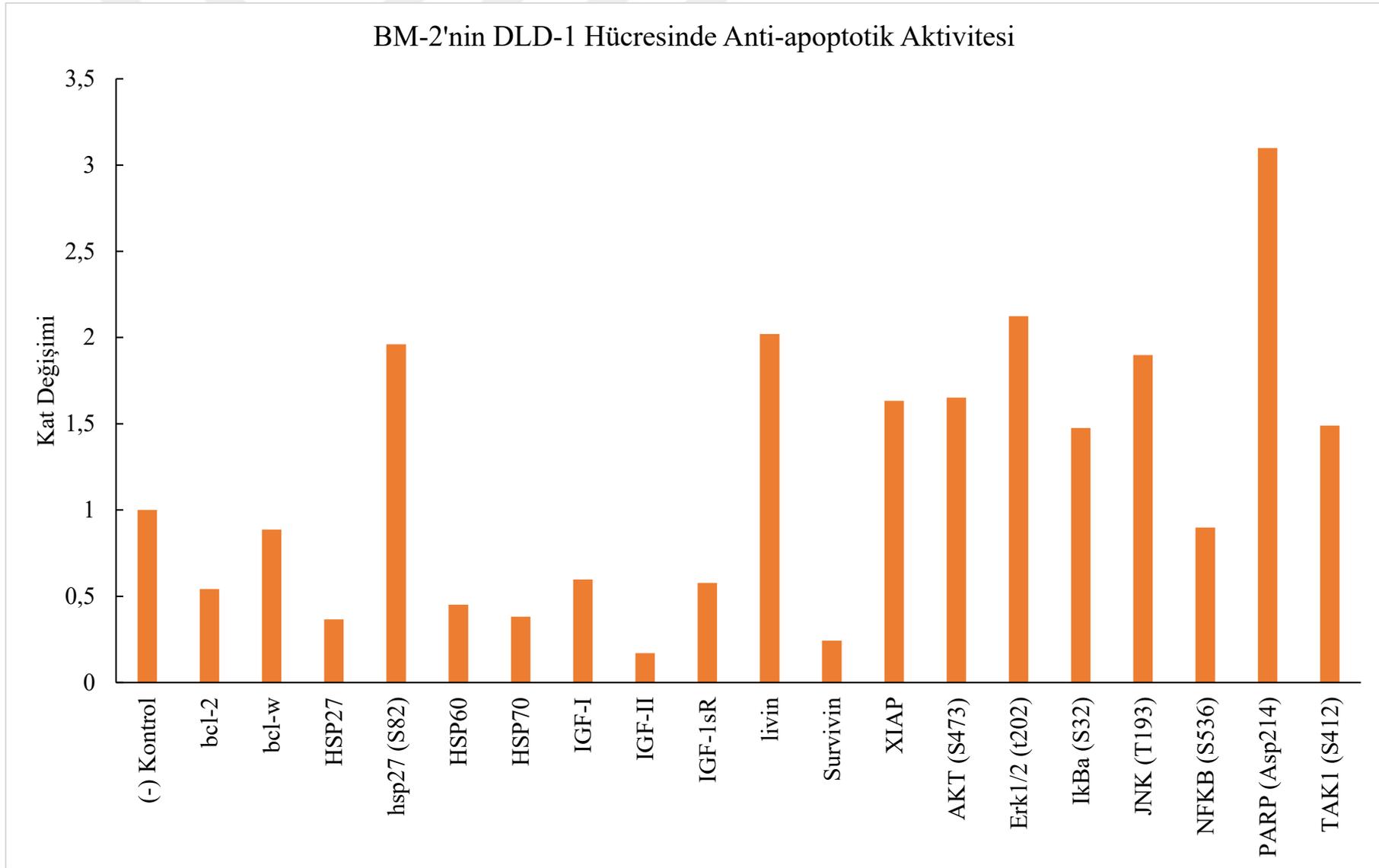
SM-1'in DLD-1 Hücresinde Pro-apoptotik Aktivitesi



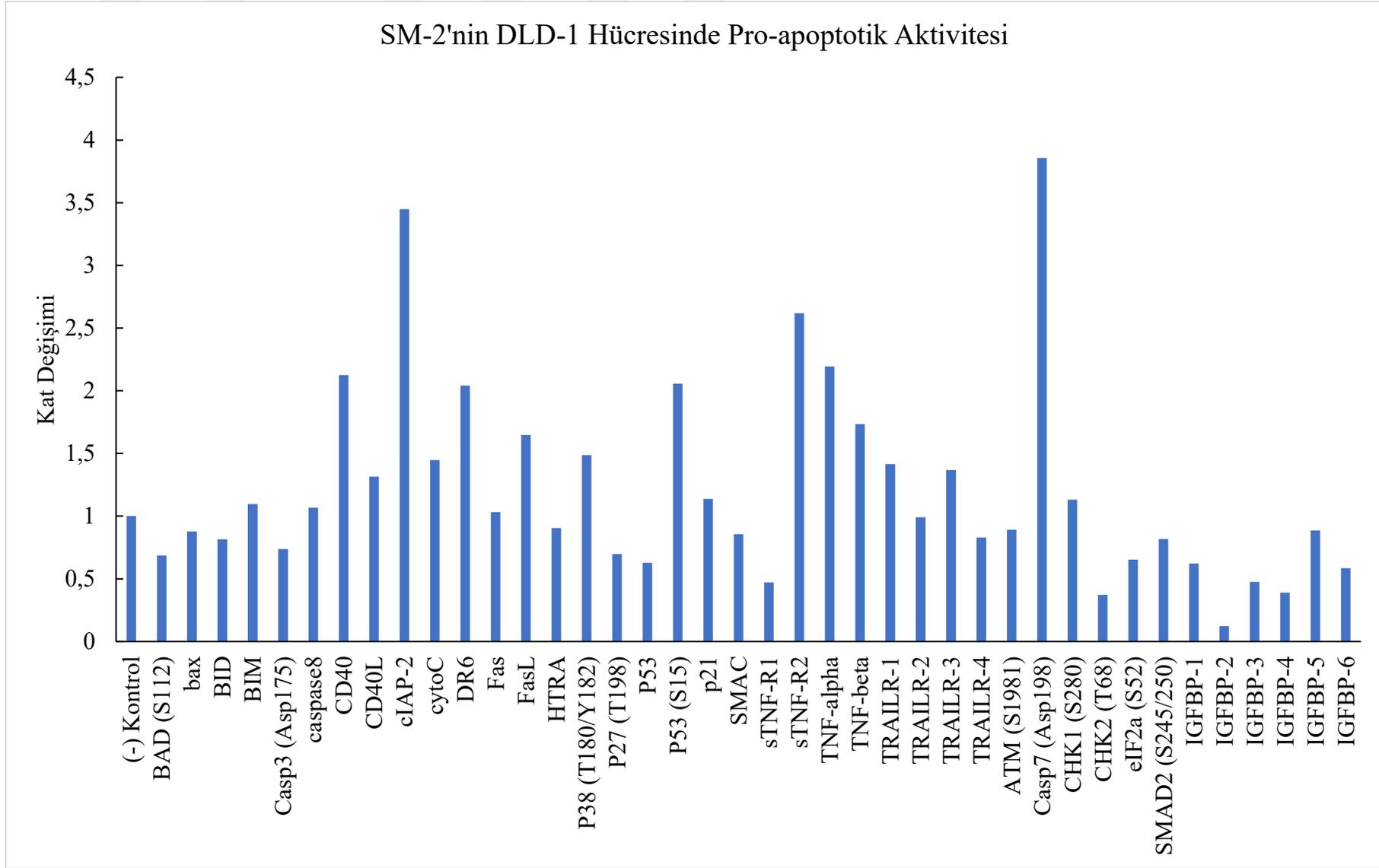


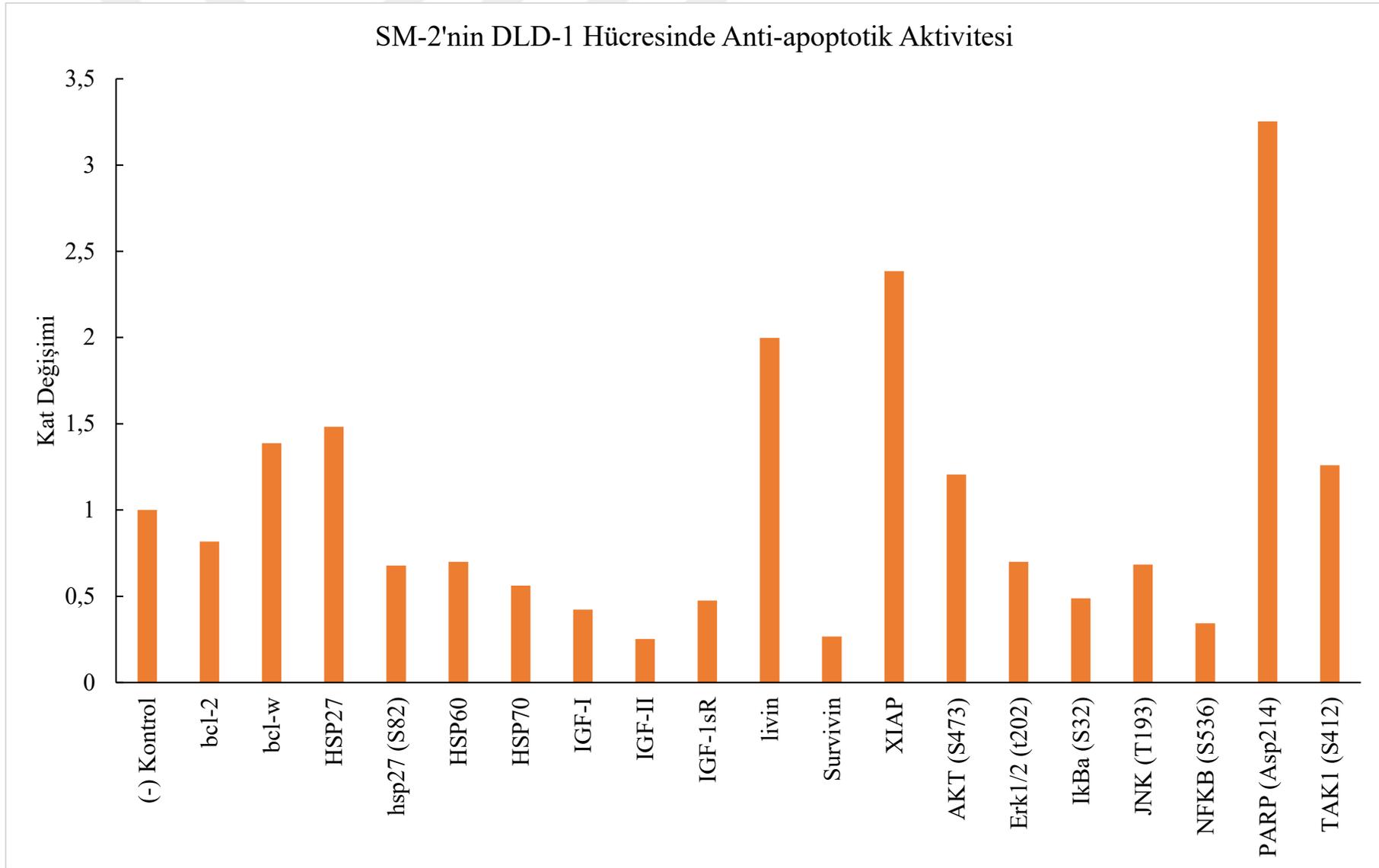
Şekil 4.25. SM-1 bileşiğinin DLD-1 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri





Şekil 4.26. BM-2 bileşiminin DLD-1 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri





Şekil 4.27. SM-2 bileşiğinin DLD-1 hücre hattında pro-apoptotik ve anti-apoptotik aktiviteye etkileri

DLD-1 hücresinde BM-1 bileşiminin hücreyi ölüme sürükleyen pro-apoptotik yollar olan BAX, CASP8, CD40, CD40LG, cIAP-2, cytoC, DR6 (TNFRSF21), FAS, FASLG, HTRA2, p27, p53, SMAC, sTNF-R1, sTNF-R2, TNF-alpha, TNF-beta, TRAILR-1, TRAILR-2, TRAILR-3, TRAILR-4, IGFBP3, IGFBP4 ve IGFBP6 protein ifadelerinde kat artışında etkili olduğu gözlenirken hücreyi ölümden koruyan anti-apoptotik yollar olan AKT ERK1/2 HSP27, I κ Ba JNK, NF κ B, PARP ve TAK1 protein ifadelerinde ise kat azalışına etkisi olduğu tespit edilmiştir.

DLD-1 hücresinde SM-1 bileşiminin hücreyi ölüme sürükleyen pro-apoptotik yollar olan BAX, CASP8, CD40, CD40LG, cIAP-2, cytoC, DR6 (TNFRSF21), FASLG, p27, SMAC, sTNF-R2, TNF-alpha, TNF-beta, TRAILR-3, IGFBP4, IGFBP6, CASP7 ve CHK1 protein ifadelerinde kat artışında etkili olduğu gözlenirken hücreyi ölümden koruyan anti-apoptotik yollar olan HSP27, HSP60, HSP70, survivin, IGF1, IGF2, AKT, NF κ B ve TAK1 protein ifadelerinde ise kat azalışına etkisi olduğu tespit edilmiştir.

DLD-1 hücresinde BM-2 bileşiminin hücreyi ölüme sürükleyen pro-apoptotik yollar olan CD40, CD40LG, cIAP-2, cytoC, DR6 (TNFRSF21), FASLG, sTNF-R2, TNF-alpha TNF-beta, ATM, CASP7, eIF2a, p38, p53 ve SMAD2 protein ifadelerinde kat artışında etkili olduğu gözlenirken hücreyi ölümden koruyan anti-apoptotik yollar olan BCL-2, BCL-w, HSP27, HSP60, HSP70, IGF1, IGF2, IGF1sR, survivin, NF κ B protein ifadelerinde ise kat azalışına etkisi olduğu tespit edilmiştir.

DLD-1 hücresinde SM-2 bileşiminin hücreyi ölüme sürükleyen pro-apoptotik yollar olan BİM, CD40, CD40LG, cIAP-2, cytoC, DR6 (TNFRSF21), FASLG, sTNF-R2, TNF-alpha, TNF-beta, TRAILR-1 ve TRAILR-3, CASP7, CHK1, p38 ve p53 protein ifadelerinde kat artışında etkili olduğu gözlenirken hücreyi ölümden koruyan anti-apoptotik yollar olan BCL-2, HSP60, HSP70, IGF1, IGF2, IGF1sR, survivin, ERK1/2, HSP27, I κ Ba, JNK ve NF κ B protein ifadelerinde ise kat azalışına etkisi olduğu tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Heterohalkalı bileşik türevleri ve çeşitli kanser türleri ile ilgili çalışmalara ait kapsamlı olarak literatür bilgileri aşağıda verilmiştir.

Literatür araştırmasında birçok heterohalkalı yapıya sahip izoindol ve/veya pirolidin türevli bileşikler ile çalışmaların mevcut olduğu tespit edilmiştir. Bu bileşikler ile birçok kanser hücrelerinde antikanser aktivite (antioksidan, sitotoksikite, gen ekspresyonu, ilaç direnci, apoptotik sinyal yolları) çalışmaları yapılmıştır. Heterohalkalı bileşiklerin kanser hücrelerine etkisi üzerine yapılan çalışmalar, araştırmacılar tarafından uzun yıllardır ön planda tutulmaktadır ve günümüzde önemi devam etmektedir.

Aiyengar ve diğerleri, 2017 çalışmalarında; nitrik oksitler üzerine antioksidan aktivite araştırmalarını rapor ederek NO'nun endotel sentezinden sorumlu olduğunu, iltihaplanma, anjiyogenez, apoptoz, hücre döngüsü, istila ve metastaz gibi kansere bağlı olayları modüle ettiğini bildirmişlerdir. Endotel nitrik oksit'in seçici olarak hedeflenmesinin, meme kanseri tedavisi için faydalı bir terapötik veya kemopreventif önlemi sağlamada yararlı olacağını belirtmişlerdir (Aiyengar ve diğerleri, 2017).

Tez çalışmamda; heterohalkalı bileşiklerin antioksidan aktiviteleri serbest radikal süpürücü (DPPH), indirgeyici ve metal şelatlama yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Antioksidan çalışmalarının verilerine göre pirolidin yapıya sahip SM-1 ve SM-2 bileşiklerinin oksidatif hasarı önlemede ve azaltmada ön plana çıktığı tespit edilmiştir.

Küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinde pirolidin ditiyokarbamatın sitotoksik etkileri tespit edilmiştir. Tahata ve diğerleri, 2014'ün araştırmalarına göre; pirolidin ditiyokarbamatın (PDTC) sitosidal (sitotoksik) etkisi, küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) hücre hatlarında (NCI-H196 ve NCI-H889) hücre canlılığı, hücre döngüsü durması ve apoptoz indüksiyonu üzerine odaklanarak araştırılmıştır. PDTC, NCI-H889'a kıyasla NCI-H196'ya karşı çok daha güçlü bir doza bağlı sitotoksik aktivite sergilerken, normal insan embriyonal akciğer fibroblast MRC-5 hücrelerinde böyle bir aktivite gözlenmemiştir. NCI-H196 hücrelerinde, S fazında, DNA fragmentasyonuna eşlik etmeyen c-myc ekspresyonunun baskılanmasına paralel olarak hücre döngüsü durması gözlenmiştir. NCI-H196 hücrelerinde, oksidatif strese bağlı genlerin ekspresyonunda bir değişiklik ile birlikte hücre içi ROS'da geçici bir artış doğrulanmıştır. Ayrıca, bir serbest radikal süpürücü olan N-

asetil-l-sistein (NAC) ilavesi, sadece bu oksidatif ilişkili genlerin ekspresyonundaki PDTC-tetikleme değişikliklerini ortadan kaldırmakla kalmamış, aynı zamanda hücre canlılığında PDTC'nin hücre hasarı ile ilişkili morfolojik değişikliklere neden olduğu azalmayı neredeyse tamamen kaldırmıştır. Dolayısıyla bu sonuçlar PDTC'nin neden olduğu sitotoksitenin pro-oksidan aktivitesine bağlandığını düşündürmektedir. PDTC'nin neden olduğu sitotoksitate, $CuCl_2$ ile daha da arttırılmış, ancak hücre içi Cu birikiminin sitotoksitede önemli bir rol oynadığı olasılığını destekleyen, geçirgen olmayan bir bakır spesifik şelatör olan bifosproin disülfonat (BCPS) tarafından kaldırılmıştır. Önemli olarak, PDTC'nin Cu akışından sorumlu olduğu bilinen ATP7A ekspresyonunu upregüle (yukarı doğru regülasyon) ettiğini ancak bakır alım taşıyıcısı olarak bilinen CTR1 ekspresyonunu etkilemediği ilk kez gösterilmiştir. Çok daha düşük dozda cisplatin (5 uM) ve toksik olmayan PDTC (0,1 uM) dozunun kombinasyonu, sinerjistik olarak NCI-H196 hücrelerinde önemli bir sitotoksitateye neden olmuştur. ATP7A'nın SCLC için birinci basamak tedaviyi temsil eden platin (cisplatin gibi) direncinde kritik bir rol oynadığı düşünüldüğünde, platin bazlı tedavi gerektiren hastalar için ilave terapötik reaktif olarak PDTC'nin umut verici bir aday olduğu bildirilmiştir (Tahata ve diğerleri, 2014).

Florento ve diğerleri 2012 çalışmalarında; heterohalkalı bileşikler olan paklitaksel, dosetaksel, oksaliplatin, bikalutamid ve anastrozol'un sitotoksik aktivitelerini MTT testi ile MCF-7, NCI-H2126, SKOV-3, PC-3, HT-29 hücre hatlarında çalışmışlardır. Bileşiklerin benzer etki gösterdiğini ve sitotoksik aktiviteye sahip olduklarını belirtmişlerdir. Seçilen onkoloji ürünlerinin doz-cevap eğrisiyle karşılaştırıldığında; kültürdeki hücelere eklenen bileşiklerin artan doz konsantrasyonunda benzer bir doz yanıtı oluşturduğu gözlenmiştir. Doz yanıtının benzer olduğu ve istatistiksel analiz farkının anlamlı olmadığı kanıtlanmıştır (Florento ve diğerleri 2012).

Liu ve diğerleri, 2014 araştırmalarında; piperidin türevli izoindol halkası içeren bileşiklerin; HT-29, K562 ve HepG2 hücre hatları üzerine sitotoksitesini çalışmışlar ve özellikle HepG2 hücre hatları üzerine antitümör etkilerini saptamışlardır. İzoindolinonların antitümör, antikonvülsan ve benzeri gibi çok çeşitli biyolojik aktiviteleri vardır. Bazı izoindolinon türevleri antitümör ilaç molekülleri olarak incelenmiştir. Çalışmada bir dizi yeni 2-benzil-6-ikameli-etoksi-izoindolinon türevinin tasarımı, sentezi ve biyolojik aktiviteleri rapor edilmiştir. Tüm hedef bileşikler (bileşikler 9-12), HT-29, K562, HepG2 hücre hattı kullanılarak sitotoksitesileri açısından test edilmiştir. Tert-butil 4- (2- (2-benzil-3-

oksoizoindolin-5-iloksi) etil) piperazin-1-karboksilat bileşiğinin (bileşik 11), IC₅₀ değeri (5,89 µM) ile HepG2 kanser hücresinde antitümör aktivitesi gösterilmiştir (Liu ve diğerleri, 2014).

Jiao, Watts, Xue, Hannafon ve Ding, 2018 çalışmalarında; MDA-MB-231, MCF-7, U-145, A2780 hücre hatlarını kullanarak heterohalkalı sorafenib bileği ile MTS deneyleri yaparak hücre canlılığı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışmaya göre; kanser hücrelerinin sorafenib ile ön muamelesi, Bach1 proteininin DHA (Dokosaheksaenoik asit) kaynaklı bozunmasını önemli ölçüde azaltmıştır. Sonuç olarak, DHA ile indüklenen HO-1 gen transkripsiyonu, western blot ve raportör gen analizi ile kanıtlanmış ve sorafenib tarafından tersine çevrilmiştir. NCI-Onkoloji İlaç Seti IV'ün taranması, DHA'nın sitotoksitesini arttıran sorafenib dâhil bir grup antikanser bileşiğinin yanı sıra DHA'nın sitotoksitesini zayıflatan bir dizi bileşik belirlenmiştir. Sorafenibin DHA ile indüklenen HO-1 ekspresyonunu zayıflattığını, kanser hücresi canlılığını ve tümör büyümesini baskılamak için DHA ile sinerji içinde hareket ettiği gösterilmiştir. DHA'nın bilinen sağlık yararları ve sorafenib'in klinik etkinliği göz önüne alındığında, bunların kombinasyonu kansere karşı dikkat çekici bir terapötik stratejidir (Jiao ve diğerleri, 2018).

Bittkau ve diğerleri, 2019 *in vitro* çalışmalarında; dokuz farklı (HL-60, Raji, HeLa, ARPE-19, OMM-1, A-375, HCT-116, HepG2, HaCaT) hücre hatları üzerindeki üç farklı heterohalkalı fucoidans bileşiğe ait hücre canlılığı verilerini yayınlamışlardır. Çalışmada, tümör (HL-60, Raji, HeLa, OMM-1, A-375, HCT-116, Hep G2) ve tümör olmayan (ARPE-19, HaCaT) hücre hatları üç referans bileşiği (fucoidan, heparin, enoksaparin) ile çalışılmıştır. Tüm fucoidanslar standart bir prosedüre göre ekstrakte edilmiş ve piyasada bulunan bir MTS analizinde test edilmiştir. Hücre canlılığı, test bileşikleri (1-100 µg / mL) ile 24 saatlik inkübasyondan sonra ölçülmüştür. Birkaç istisna dışında, fucoidans ve heparinler hücre canlılığını bozmadığı aksine fucoidans, süspansiyon hücre hatlarında hücre canlılığını önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Fucoidans, tümör hücrelerinin canlılığını az seviyede arttırmış ve tümör dışı hücrelerin canlılığı üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır. HeLa ve ARPE-19 hücrelerinin hücre canlılığı, fucoidansların protein içeriği ve toplam fenolik içeriği (TPC) ile negatif korelasyon göstermiştir (Bittkau ve diğerleri, 2019).

Huang, Huang, Sun ve Yan, 2019 çalışmalarında; 4T1, CT26, HepG2 ve A549 hücre hatlarında piroolidin türevi bileşikler MTT analizi ile *in vitro* kanser hücrelerine karşı

değerlendirmişlerdir. Elde edilen çeşitli spiro [indoline-3,30-pirolidinlerin] biyolojik aktiviteleri, MTT testi ile fare göğüs kanseri hücreleri 4T1, fare kolon kanseri hücreleri CT26, insan karaciğer kanseri hücreleri HepG2 ve insan akciğer kanseri hücreleri A549'a karşı araştırılmıştır. Sonuçlar, sekiz bileşiğin HepG2 hücrelerine karşı sitotoksikite gösterdiğini ve bileşik 2j'nin 24 saat içinde yaklaşık 50 mg / L IC₅₀ değeri ile CT26 hücrelerine umut verici şekilde sitotoksikite gösterdiğini kanıtlamıştır (Huang ve diğerleri, 2019).

Tapfuma ve diğerleri, 2019 çalışmalarında; bitki izolatlarından elde edilen ekstratların A549 (akciğer karsinomu) ve UMG87 (glioblastom) hücre hatlarında sitotoksik aktivite açısından değerlendirilmiş ve glioblastom hücre hatlarında sitotoksik aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Önemli derecede sitotoksikite sadece *Alternaria sp.* türünde UMG87 glioblastom hücreleri üzerinde KTDL7 (IC₅₀ = 21,49 µg / mL) tespit edilmiştir. Elde edilen ekstartlarda sekonder metabolit olarak 1,8-dihidroksinaftalin, anserinon B, felligridin B, metasitofilin, phomopsidin ve vermikosidin A miktarca belirgin bileşen olarak belirlenmiştir (Tapfuma ve diğerleri, 2019).

NMR yöntemleri kullanılarak yapıları aydınlatılan Spirooksindolpirolidin türevli sentezlenen bileşiklerden bazılarının FaDu hipofaringeal kanser hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu ve bileşiklerin apoptotik hücre ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir. Arumugam ve diğerleri, 2018'e göre; sentezlenen bileşikler, FaDu hipofaringeal tümör hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Bileşiklerin çoğu standart antikanser madde olan bleomisine benzer sitotoksikite göstermiş, bunlardan ikisi referans ilaca göre biraz daha aktif bulunmuştur. Sentezlenen bileşikler, bir kanser hücresi modelindeki apoptozu indükleyen özellikleri açısından da değerlendirilmiş, bileşiklerin bazı türevleri ile yapılan tedavinin apoptotik hücre ölümüne yol açtığı bulunmuştur (Arumugam ve diğerleri, 2018).

Chiu ve diğerleri, 2017 çalışmalarında; RTCA ve WST-1 analizlerini kullanarak heterohalkalı ketorolak trometamin, bupivakain, metilprednizolon bileşiklerinin hücre canlılığına etkisini tendon hücrelerinde çalışmışlardır. Dört ilacın hepsi % 100 konsantrasyonlarında karşılaştırılabilir sitotoksikiteye sahip olduğu bulunmuştur. % 50 konsantrasyon kullanıldığında, WST-1 analizine göre betametazon, xCELLigence'de

nispeten azalmış sitotoksositeye sahip olduğu, % 10 konsantrasyon kullanıldığında ise, betametazon en az sitotoksositeye sahip oldu tespit edilmiştir. xCELLigence hücre indeksi ile WST-1 testinin sonucu arasında güçlü ve pozitif korelasyon bulunmuştur (Pearson korelasyonu $[r] = 0,914$). xCELLigence ve WST-1 arasında gen ifadesinin pozitif korelasyonu da gözlenmiştir. Tip I kollajen: $[r] = 0,823$; tip III kollajen: $[r] = 0,899$; tenascin-C: $[r] = 0,917$; decorin: $[r] = 0,874$; ve skleraxis: $[r] = 0,965$ (Chiu ve diğerleri, 2017).

Öztürk, Arslan, Dokumaci ve Mükerrerem, 2018 çalışmalarında; kolorektal kanser hücre hattı (Colo-205), insan meme adenokarsinoma hücre hattı (MCF-7) ve normal insan fibroblast hücre hattı kullanılarak vanadyum pentoksidin sitotoksik aktivitesini araştırmışlardır. Sitotoksik etkilerini incelemek için 5 farklı konsantrasyonda hücrelerin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizini yapmışlardır. Vanadyum pentoksidin Colo-205 hücrelerinde hücre indeksini 25 μM ve 50 μM 'de azalttığı, 100 μM , 150 μM ve 200 μM konsantrasyonlarında arttırdığı ve MCF-7 hücrelerinde ise kontrole kıyasla tüm konsantrasyonlarda hücre indeksini arttırdığı tespit edilmiştir. Vanadyum pentoksidin farklı konsantrasyonlarda çeşitli kanser hücreleri üzerinde farklı etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (Öztürk ve diğerleri, 2018).

Larsson ve diğerleri, 2020 çalışmalarında, HCC38, MCF-7, MCF-10A ve MDA-MB-436 hücre hatlarını kullanarak heterohalkalı bileşiklerin hücre canlılığı deneylerini gerçekleştirmişlerdir. Platin ajanlar (cisplatin ve karboplatin) ve bir proteazom inhibitörü (bortezomib) ile tedavi edilen MCF7 ve HCC38 meme kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek için konvansiyonel 2D hücre bazlı kanser ilacı deneysel değişkenlikleri tespit edilmiştir. Varyans bileşeni analizi, hücre canlılığındaki değişikliklerin öncelikle farmasötik ilaç ve hücre hattı seçimi ile ilişkili olduğunu, büyüme ortamının tipine veya test inkübasyon süresine bağlı olma olasılığının daha düşük olduğunu göstermiştir. Deneysel parametrelerin optimizasyonu sadece veri kalitesini önemli ölçüde arttırmakla kalmamış, aynı zamanda bortezomib ve cisplatin ile muamele edilmiş HCC38, MCF7, MCF-10A ve MDA-MB-436 hücreleri için tekrarlanabilir sonuçlara yol açmıştır. Bulgular tekrarlanabilirliğin (aynı analistin aynı deneyi birden çok kez tekrarlanması veya farklı analistlerin aynı deneyi birden çok kez tekrarlanması) gerçekleştirildiğini göstermektedir (Larsson ve diğerleri, 2020).

Tez çalışmamda; MCF-7 (meme kanseri), MCF-12A (normal meme epiteli) ve DLD-1 (kolon kanseri), CCD-18Co (normal kolon epiteli) hücre hatlarında, heterohalkalı bileşiklerin sitotoksik dozu ve IC₅₀ değeri MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemiyle; hücre canlılığına etkisi gerçek zamanlı hücre analizi sistemi (RTCA) ile tespit edilmiştir. SM-1 ve SM-2 bileşiklerin sitotoksik aktivite çalışmaları neticesinde; hücre canlılığını azalttığı, hücre çoğalmasını önlediği ve hücre büyümesini baskıladığı tespit edilmiştir.

Kemosensitize edici heterohalkalı bir bileşik olan fumitremorgin C (FTC)'nin, MCF-7 hücre hattında P-glikoproteini veya meme kanseri direnç proteini (BCRP) kodlayan genin direncini neredeyse tamamen tersine çevirdiği rapor edilmiştir. Rabindran, Ross, Doyle, Yang ve Greenberger, 2000 çalışmalarına göre; MCF-7 / BCRP hücrelerinde FTC'nin ters aktivitesi, artan doz antitümör ilaçları ile kombinasyon halinde bileşiğin sabit bir dozu kullanılarak belirlenmiştir. FTC (5 mM), mitoksantron (29,4 kat), doksorubisin (6,6 kat) ve topotekanın (6,5 kat) toksisitesini arttırmıştır. Paklitaksel (1.1 kat) ile herhangi bir aktivite saptanmamıştır. Bu bulgular, BCRP'yi aşırı eksprese eden ilaçla seçilen üç hücre hattında FTC'nin aktivitesine yakından paralel olduğu belirtilmiştir. Ayrıca FTC, vektör transfekte edilmiş MCF-7 hücrelerinde mitoksantron ve topotekanın toksisitesini 2,5-5,6 kat arttırmıştır. Bu etkinin bir sonucu olarak FTC, BCRP aşırı eksprese eden hücrelerdeki topotekanın IC₅₀'sini, tedavi edilmeyen vektör ile transfekte edilmiş hücrelerde belirlenenin altına düşürmüştür ve DMF (doz değiştirici faktör), beklenen maksimum DMF değerini aşmıştır. Bu daha önce kemoterapötik ilaçlara direnç göstermeyen MCF-7 hücrelerinde ve küçük hücreli olmayan iki akciğer karsinomu hücre hattında (H460 ve A549) gözlemlenmiştir. Vektör transfekte edilmiş MCF-7 hücreleri üzerindeki FTC aktivitesi büyük olasılıkla MCF-7 hücrelerinde BCRP'nin bilinen düşük ekspresyon seviyesinden kaynaklanmakta olduğu belirtilmiş ve mitoksantrona karşı intrinsik direncin, ilaç hassasiyeti olmadığında bazı hücre hatlarında meydana geldiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, MCF-7 hücrelerinde FTC'ye duyarlı ikinci bir ilaç direnci mekanizmasının var olabileceği düşünülmektedir (Rabindran ve diğerleri, 2000).

İki farklı insan glioblastoma hücre hattında heterohalkalı indol türevli indometasin bileşiğinin 5 ile 50 µM arasındaki konsantrasyonlarda sitotoksik aktiviteyi arttırdığı belirtilmiştir. Benyahia ve diğerleri, 2004'e göre; 190 kDa çoklu ilaca dirençli protein MRP1, insan gliomalarının çoklu ilaca direnç fenotipinde yer alacak gibi görünmektedir.

MRP1 ekspresyonu, gliomlu 17 hastanın cerrahi tümör örneklerinde değerlendirilmiştir. Ayrıca, MRP'nin inhibitörü olan indometasinin, MRP1 (GL15 ve 8MG) ifade eden iki glioblastom hücre hattının etoposit (VP16) ve vinkristin (VCR) kemosensitivite üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Tümör örnekleri değerlendirildiğinde, 14/15 yüksek dereceli gliomada % 90'dan fazla boyanmış tümör hücresinde MRP1 ekspresyonu gözlenmiştir. MRP1 14 tümör örneğindeki vasküler endotelial hücrelerin zarında da güçlü bir şekilde eksprese edilmiş, bu da antikanser ilaç geçirgenliğinin beyin tümörü damarları arasında da sınırlı olabileceğini düşündürmüştür. 5 ila 50 μ M arasındaki konsantrasyonlarda, indometasin, her iki hücre hattında etopositin sitotoksik etkisini önemli ölçüde arttırmıştır, ancak 8MG hücrelerine kıyasla VCR'nin GL15 hücreleri üzerindeki sitotoksitesinin arttırılmasında daha etkili olmuştur. Bu sonuçlar, indometasin ile VCR veya etoposit arasındaki ilişkinin gliomaların klinik yönetiminde ilgi çekici olabileceğini düşündürmektedir (Benyahia ve diğerleri, 2004).

Meme kanseri hastalarından alınan tümör dokularında MRP1 ekspresyonu RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. MRP1 aşırı ekspresyonunun hastalarda çoklu ilaç direncine aracılık edebileceği tespit edilmiştir. Abaan ve diğerleri, 2009 çalışmalarına göre; RT-PCR reaksiyonunun ilk aşamasında, FFPE (parafine gömülmüş) dokularından elde edilen cDNA'lar, 291 bp'lik MRP1 primerleri ile amplifiye edilmiştir. Numunelerin çoğunda, MRP1 band yoğunluğu agaroz jel üzerinde zayıf görüntü vermiştir. İkinci RT-PCR amplifikasyonu aşamasında, 166 bp'lik MRP1 primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarından sonra, tüm hasta örnekleri için MRP1 primerleri kullanılarak RT-PCR gerçekleştirilmiştir. Duyarlı (S) ve dirençli (R) HL60 hücreleri kontrol olarak kullanılmıştır. (Abaan ve diğerleri, 2009).

K562 (miyelojenöz lösemi) hücrelerinde bir tirozin kinaz inhibitörü olan heterohalkalı yapılı ponatinib ilacının ABCB1, ABCC1 ve ABCG2 çoklu ilaç direnci genleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ponatinib'in ABCB1 ve ABCG2 gen inhibitörü olduğu vurgulanmıştır. Sen ve diğerleri, 2012'e göre; Ponatinib, BCR-ABL'ye karşı, T315I ve ayrıca FMS benzeri tirozin kinaz 3'e karşı güçlü aktiviteye sahip yeni bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Farmakolojik olarak ilgili Ponatinib 50 ile 200 nmol / L konsantrasyonlarda MDR- ilişkili ATP bağlayıcı kaset (ABC) proteinleri ABCB1, ABCC1 ve ABCG2 için test edilmiştir. Ponatinib, bu proteinleri aşırı eksprese eden hücrelerde ABCG2 ve ABCB1 substratlarının alımını, ABCB2 üzerinde ABCB1'den daha büyük bir etkiye neden olarak arttırmıştır.

Ponatinib, ilaç-substrat bağlanmayı (ABCB2 ve ABCB1'e IAAP bağlanmasını), 0,04 ve 0,63 mmol / L IC_{50} değerleri ile güçlü bir şekilde inhibe etmiştir. Ponatinib, ABCG2 ATPase aktivitesini konsantrasyona bağlı bir şekilde ve ABCB1 ATPase aktivitesini farmakolojik olarak (her iki proteinin bir substratı olmasıyla) düşük konsantrasyonlarda uyarmıştır. ABCB1 ve ABCG2 ile transfekte edilmiş K562 hücrelerini eksprese eden BCR-ABL'nin ponatinib IC_{50} değerleri, K562 hücrelerinde yaklaşık olarak 2 kat daha gen ifadesini artırmıştır. Ponatinib, dirençli K562 hücreleri üzerinde ABCB1 ve ABCG2 ekspresyonunu kısmi olarak azaltmıştır. Farmakolojik olarak ilgili konsantrasyonlarda ponatinib, substrat kemoterapi ilaçları ile ABCB1 ve ABCG2 genlerinde sinerjistik sitotoksiste gelişmiş ve apoptoza neden olmuştur. Bu taşıma proteinlerini aşırı eksprese eden hücrelerde daunorubisin, mitoksantron, topotekan ve flavopiridol ilaçları tarafından gen ifadesi indüklenmiştir. Ponatinib ve kemoterapi ilaçlarının kombinasyonları daha fazla test yapılmasını gerektirmektedir (Sen ve diğerleri, 2012).

Tuy ve diğerleri, 2016 araştırmalarında; kolorektal karsinomlu hastalar için önemli bir ilaç olan heterohalkalı yapıya sahip irinotekan'ın, ABCG2 ekspresyon düzeyini incelemişlerdir. İrinotekan bazlı tedavinin kemoterapi direnci için yararlı bir biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir. Kolorektal kanserli 189 hastanın primer tümör örneklerini kullanarak, ABCG2 proteininin immünohistokimyasal ekspresyonu ile SN-38'e (aktif bir metabolit irinotekan) karşı duyarlılığını değerlendirmek için kültür ilaç duyarlılık testi sonuçları arasındaki ilişki araştırılmıştır. 189 hastadan 17'sine irinotekan bazlı kemoterapi uygulanmış, yanıtları ve progresyonsuz sağkalım (PFS) analiz edilmiştir. Artan ABCG2 ekspresyonu olan hastaların tümörleri, incelenen tümörlerin % 60'ını oluşturmuş ve düşük ABCG2 ekspresyonu olan hastalara kıyasla SN-38'e göre anlamlı derecede daha dirençli bulunmuştur ($P < 0.001$). Çok değişkenli bir lojistik regresyon analizinde, ABCG2 proteininin artan ekspresyonu, SN-38'e karşı direncin bağımsız ve anlamlı olduğunu göstermiş, direnç riskini ise 12 kat arttırmıştır. Artan ABCG2 ekspresyonu ve SN-38'e karşı düşük duyarlılık, irinotekan bazlı kemoterapiye direnç ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur (sırasıyla $P = 0,01$ ve $0,028$). ABCG2 ekspresyonu artmış hastaların progresyonsuz sağkalımı düşük ABCG2 ekspresyon seviyeleri olan hastalara kıyasla anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur (104'e karşı 242 gün; $P = 0,047$). Primer tümörlerde artan immünohistokimyasal ekspresyon, metastatik kolorektal kanserli hastalar için irinotekan bazlı kemoterapiye direncinde yararlı bir biyobelirteç olabileceği tespit edilmiştir (Tuy ve diğerleri, 2016).

Kemoteropik bir ajan olduğu düşünölen dacomitinib bileşiginin, 1,0 mM dozda ABCB1 ve ABCG2 genlerinde ilaç direncini önemli ölçüde tersine çevirdiği bildirilmiştir. Fan ve diğerleri, 2018'in araştırmalarına göre; son yıllarda, epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) aşırı eksprese eden çeşitli insan kanserlerinde tedavi için küçük moleküler tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'ler) geliştirilmiştir. Aynı zamanda, bazı TKI'ların ABC taşıyıcı aracılı MDR'yi inhibe edebildikleri gösterilmiştir. Dacomitinib, bazı prelinik ve klinik çalışmalarda pozitif antikanser aktiviteleri gösteren ikinci nesil, geri dönüşsüz bir TKI'dir. Birçok TKI, ABC taşıyıcılarının substratları veya inhibitörleri olduğundan, bu çalışma dacomitinib'in, MDR'ye aracılık eden ABCB1 (P-gp), ABCG2 (BCRP) ve ABCC1 (MRP1) dâhil olmak üzere MDR'ye aracılık eden ABC alt aile üyeleri ile etkileşime girip giremeyeceğini araştırmaktadır. Sonuçlar, 1.0 mM'deki dacomitinibin, ABCB1 ve ABCG2'nin aracılık ettiği, ancak ABCC1'in aracılık ettiği ilaç direncini önemli ölçüde tersine çevirdiğini göstermiştir. ABCB1 aşırı eksprese eden hücreler üzerindeki ters etkisi, ABCG2 aşırı eksprese eden hücrelerdekinden daha güçlü bulunmuştur. Ayrıca, ters konsantrasyondaki dacomitinib protein ekspresyon seviyesini ve ABCB1 ve ABCG2'nin lokalizasyonunu etkilememiştir. Bu nedenle, bu modüle edici etki mekanizmalarından birincisi; dacomitinib'nin, ABCB1 veya ABCG2 taşıyıcılarının bir inhibitörü olarak, trans membran domain (TMD) ilaç-substrat bölgesine stabil bir şekilde bağlanabilmesidir. İkincisi, dacomitinib'nin, ATPase aktivitesini inhibe etmesi ve TMD konformasyonunun stabilitesini muhafaza etmesi, böylece ABCB1 veya ABCG2 taşıyıcısının ilaç akış fonksiyonunu inhibe edebilmesidir. Bu çalışma, ABCB1 veya ABCG2 genlerini aşırı eksprese eden kanserlerde ABCB1 ve / veya ABCG2 taşıyıcılarının dacomitinib ve substratları ile yararlı bir kombinasyonla terapötik strateji sağlamaktadır (Fan ve diğerleri, 2018).

Gupta ve diğerleri, 2018 çalışmalarında; heterohalkalı vorukiklib bileşiginin sitotoksitesi MTT deneyi ile ABCB1 ve ABCG2 gen ekspresyonlarını western blotlama analiziyle ve hücrelerin apoptozu üzerindeki etkisini belirlemek için akış sitometrisi analizini kullanmışlardır. Bileşiklerin gen ekspresyonunu azaltarak hücreleri apoptoza sürüklediği gösterilmiştir. ABCB1 ve ABCG2 substratlarının hücre içi birikimi ve akışı sintilasyon sayacı ile ölçölmüştür. ABCB1 ve ABCG2 proteinlerinin ekspresyonu ve hücre içi lokalizasyonu üzerindeki etkiler Western blotlama ve immünofloresan ile belirlenmiştir. Vanadat duyarlı ATPase analizi, vorukiklibin ABCB1 ve ABCG2'nin ATPase aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için yapılmıştır. Vorukiklib'in ABCB1 ve ABCG2 apoptozu

üzerindeki etkisini belirlemek için akım sitometrisi analizi yapılmıştır. Vorukiklib, ABCB1 aşırı eksprese eden hücrelerde paklitaksel ve doksorubisinin yanı sıra ABCG2 aşırı eksprese eden hücrelerde mitoksantron ve SN-38'in etkisini önemli ölçüde güçlendirdiği tespit edilmiştir. Vorukiklib, ABCC10'u aşırı derecede eksprese eden hücreleri paklitaksele duyarlı hale getirirken, ABCC1 substratlarının sitotoksitesini değiştirmediği bulunmuştur. Ayrıca vorukiklib, hücre içi birikimini arttırmış ve anti-kanser ilaçlarının ABCB1 veya ABCG2'yi aşırı eksprese eden hücrelerden akışını azalttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, vorukiklib ABCB1 veya ABCG2'nin ekspresyonunu veya hücre altı lokalizasyonunu değiştirmemiştir. Vorukiklib konsantrasyona bağlı bir şekilde hem ABCB1 hem de ABCG2'nin ATPase aktivitesini uyarmıştır. Son olarak, vorukiklib, ABCB1 veya ABCG2- aşırı eksprese eden hücrelerde ilaca bağlı apoptotik bir etki sergilemiştir. Voruciclib halen faz I klinik çalışma ilacıdır ve kanser kemoterapisi için geleneksel anti-kanser ilaçlarıyla birlikte potansiyel kullanımı güçlü bir şekilde desteklenmektedir (Gupta ve diğerleri, 2018).

Braconi ve diğerleri, 2020 çalışmalarında; heterohalkalı tetrahydroisoquinoline türevli bileşiklerin HT29 ve A549 hücre hatları kullanılarak P-gp etkileşim profillerini ve iki ABC taşıyıcısı olan çoklu ilaç direnci ilişkili protein-1 (MDR-1) ve meme kanseri direnç proteinine (BCRP) karşı seçiciliklerini immüno blot analizi yöntemi ile değerlendirmiş ve bileşiklerin P-gp'ye karşı çok aktif ve seçici olduğu gösterilmiştir. Bileşiklerin en iyi P-gp aktivite profili ile donatıldığını gösterdiklerinden, hücre hatları tek başlarına ve çeşitli P-gp seviyelerine sahip farklı kanser hücre hatlarında antineoplastik ilaç doksorubisin ile birlikte uygulandıklarında test edilmiştir. Bileşikler, klinik olarak gözlemlenen doksorubisine dirençli kanserlere benzeyen hücre modellerinde doksorubisine doğru anlamlı bir duyarlılaştırma aktivitesi göstermiş ve bu durum da kemosensitleştirmenin etkilerinin P-gp'nin inhibisyonundan kaynaklandığını göstermiştir. Rapor edilen serilerin tasarımı, hem PBS'de hem de insan plazmasında stabil olan ve farklı kanser hücre hatlarındaki antineoplastik ajan olan doksorubisinin etkisini iyileştirebilen iki güçlü P-gp substratının tanımlanmasına izin vermiştir (Braconi ve diğerleri, 2020).

Heterohalkalı aminobisfosfonatların ABCA1 ve ABCB1'in osteosarkomda nasıl düzenlendiği analiz edilmiştir. V γ 9V δ 2 T hücrelerinin ABCA1'e bağlı aktivasyonunu arttırdığı ve ABCB1 eksprese eden osteosarkom için etkili bir strateji olabileceği rapor edilmiştir. Belisario ve diğerleri, 2020'de; 2D-kültürleşmiş doksorubisine duyarlı insan U-2OS ve Saos-2 hücreleri, doksorubisine dirençli (U-2OS / DX580 ve Saos-2 / DX580), U-

2OS ve Saos-2 hücrelerinin 3D kültürlerini kullanmıştır. DX580 ve 3D kültürleri, ebeveyn hücrelerine göre daha yüksek seviyelerde ABCB1 ve doksorubisine karşı daha yüksek dirence sahip olduğu bildirilmiş ve. ABCA1 seviyelerini, IPP akışını ve V γ 9V δ 2'yi düşürdüğü bildirilmiştir. T hücresi kaynaklı öldürme; kemo-immün dirençli hücrelerde, Ras / Akt / mTOR, Karaciğer X Reseptörü a (LXRa) tarafından indüklenen ABCA1-transkripsiyonunu inhibe etmiştir ve Ras / ERK1 / 2 / HIF-1a, ABCB1'i yukarı regüle etmiştir. Çalışmada ABCB1 yüksek ABCA1 düşük fenotipinin kemo-immün direncinin bir göstergesi olduğu belirtilmiştir. Aminobisfosfonatlar ilaca dirençli osteosarkomlara karşı yeni kemo-immün duyarlılaştırıcı araçlar olarak önerilmiştir (Belisario ve diğerleri, 2020).

Kollateral duyarlılığı (CS) adı verilen bir fenomen, sentetik bir ölümcül gibi davranan MDR'yi engellemek için yeni bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. Bu durum belirli bir ajana karşı direnç kazanılması üzerine geliştirilen genetik değişikliklerin, ikinci bir ajana karşı aşırı duyarlılık gelişmesini takip etmektedir. Riganti ve diğerleri, 2020 çalışmalarında; MDR modülatörleri olarak görev yapan ligandların ve CS destekleyici ajanları olarak işlev gören üç bileşik, F397, F400 ve F421 tanımlanmışlardır. CS mekanizmalarını MRP1 ifade eden hücrelerin "saf" modelinde (MDCK-MRP1) ve MRP1 ifade eden / ilaca dirençli küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde (A549 / DX) çalışmışlardır. *In vitro* sonuçlara göre; (i) üç ligandın MRP1 ifade eden hücreler için yüksek ölçüde sitotoksik olduğu, (ii) etkilerinin MRP1 aracılı olduğu, (iii) akciğer tümörlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan terapötik ajan olan cis-Pt'nin neden olduğu sitotoksiteyi arttırdıkları ve (iv) etkilerinin ROS aracılı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, akciğer tümörü ksenograflarında yapılan bir klinik öncesi *in vivo* çalışmaların, *in vitro* bulguları doğruladığı ve üç CS destekleyici ajanının akciğer dirençli tümörlerde yeni bir terapötik yaklaşım için aday olduğu rapor edilmiştir (Riganti ve diğerleri, 2020).

Tez çalışmamda; heterohalkalı bileşiklerin belirtilen hücre hatlarında, anti-karsinojenik etkileri, kemoterapi direncinde önemli rol oynayan pompa proteinleri ABCB1 (MDR1-P-gp), ABCC3 (MRP3), ABCC10 (MRP7), ABCC11 (MRP8), ABCG2 (BCRP) mRNA düzeyleri qPCR yöntemiyle belirlenmiştir. MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde tüm bileşiklerin MDR mRNA ekspresyonlarını (ABCC3 gen ifadesi dışında) önemli ölçüde azalttığı ve bu bileşiklerin kemoterapi direncinin baskılanmasında önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir. Bileşikler incelendiğinde MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde en etkili sonucu SM-2 göstermiştir.

Kim ve diğeri, 2001 çalışmalarında; pirolidin bileşiminin mekanizma aracılığıyla, DNA transkripsiyon faktörü olan ısı şok faktörünün (HSF1) bağlanmasını indüklediğini rapor etmişlerdir. Kemoterapötik ajanların kanser hücrelerine karşı toksisitesine, programlı hücre ölümünün başlaması aracılık etmektedir. Apoptoz, kaspaz adı verilen bir sistein proteaz ailesi tarafından yayılan, evrimsel olarak korunan bir hücre içi proteolitik olay dizisidir. Birçok reseptör ve reseptör aracısız ölüm sinyali, kaspaz-8'in (FLICE / MACH) aktivasyonu yoluyla apoptozu indükler. Apoptozun azalmasıyla sitotoksik ilaçlara tümör direnci mekanizmaları, kaspaz-8'in ekspresyonunun değişmesi, FLIP (FLICE benzeri İnhibitör Protein) gibi kaspaz-8 inhibitörlerinin yukarı regülasyonu veya kaspaz-8'in BCL-2 tarafından sekestrasyonu (ilaçların kandan ayrılıp başka dokuda birikmesi) ile meydana gelebilir. Kaspaz-8 ve apoptozun modülasyonu, ilaca dirençli malignitelerin radyasyona veya kombinasyon kemoterapisine duyarlılaştırılması için terapötik bir strateji olabilir (Kim ve diğeri, 2001).

Alami ve diğeri, 2007 çalışmalarında; topoizomerez II inhibitörü olan Xanafide (ksanafid) bileşiminin insan meme kanseri hücre hatlarında *in vitro* ve *in vivo* anti-proliferatif etkilerini araştırmışlardır ve MCF-7 hücre hattında etkili anti-proliferatif sonuç bildirmişlerdir. Bir DNA'ya bağlanan ve topoizomerez II inhibitörü olan ksanafid, sitotoksik etki göstermiştir. Bu çalışma, insan meme kanseri hücre hatlarında, ksanafid *in vitro* ve *in vivo* anti-proliferatif etkilerini araştırmak için yapılmıştır. Ksanafidin MCF-7, MDA-MB-231, SKBR-3 ve T47D hücre hatlarına karşı *in vitro* aktivitesi, paklitaksel, dosetaksel, gemitabin, vinorelbin ve doksorubisin gibi kemoteropatik ajanlarla karşılaştırılmalı çalışılmıştır. MCF-7'de ksanafid, toplam büyüme inhibisyonu (TGI) konsantrasyonları gemitabin, vinorelbin ve doksorubisine göre daha düşük TGI değerleri göstermiştir. MCF-7 (östrojen reseptörü (ER / p53), ksanafide en duyarlı hücre hattı olarak bulunmuştur. MDAMB-231 ve SKBR-3 hücreleri, ksanafide benzer bir hassasiyet göstermiştir. Bu bileşik T47 D hücresinde (ER / p53) aktivitesi göstermemiştir. Ksanafid *in vivo* aktivitesi, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında dosetaksel ile karşılaştırılmıştır. Ksanafid, MCF-7 hücre hattında en yüksek dozda, dosetakselden biraz daha etkili bulunmuş, fakat MDA-MB-231 hücre hattında, dosetaksel, ksanafid'den daha etkili sonuç vermiştir. Bu çalışma hücre hatlarının ksanafide duyarlılığı ile her iki topoizomerez II izoformunun hücresele seviyeleri arasında bir ilişki olmadığını göstermektedir. ER / p53 ekspresyonları meme kanseri hastalarının ksanafid

tedavisine cevap verebileceğini veya direnç gösterebileceğini düşündürmektedir (Alami ve diğerleri, 2007).

Cincin ve diğerleri, 2014 çalışmalarında; biyoflavonoid bileşiği olan heterohalkalı yapılı kuersetin'in DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında apoptotik ve antiproliferatif etkileri araştırılmıştır. Kuersetin'in erken kolorektal karsinom için bir biyobelirteç olabileceği bildirilmiştir. Biyoflavonoid bileşiği olan kuersetin glikozit formunda bulunmaktadır. Her ne kadar farklı çalışmalar kuersetin'in güçlü bir antioksidan olduğunu göstermesine rağmen, bu bileşiğin etkisi iyi anlaşılamamıştır. Bu çalışmada, kuersetin'in DLD-1 kolon kanseri hücre hatlarında apoptotik ve antiproliferatif etkileri olup olmadığı araştırılmıştır. Kuersetin'in zaman ve doza bağlı antiproliferatif ve apoptotik etkileri WST-1 hücre proliferasyon ve laktat dehidrojenaz (LDH) sitotoksitesite deneyi ile nükleozom zenginleştirme faktörünün saptanması, kaspaz-3 aktivitesindeki değişiklikler, plazma zarında fosfatidilserin (PS) lokalizasyonu, mitokondriyal membran potansiyelinin (MMP) kaybı ile belirlenmiştir. DLD-1 kolon kanseri hücrelerinde zamana ve doza bağlı bir şekilde kuersetin'e yanıt olarak kaspaz-3 aktivitesinde, MMP kaybında ve apoptotik hücre popülasyonunda önemli artışlar bulunmuştur. Bu sonuçlar kuersetin'in kolon kanseri hücreleri üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkileri olduğunu ortaya koymuştur. *In vivo* analizlerle desteklenen kuersetin aktivitesinin, erken kolorektal karsinom için bir biyobelirteç olabileceği bildirilmiştir (Cincin ve diğerleri, 2014).

Tian ve diğerleri, 2015 çalışmalarında; heterohalkalı bileşik olan kordisep'i A3 adenosin reseptörünü bağlayan, g proteini aktive eden, cAMP oluşumunu önleyen, glikojen sentaz kinaz - 3- / β - katenin aktivasyonunu, siklin D1 ve c-myc ekspresyonunu baskılayan bir molekül olarak açıklamışlar ve bileşiğin hücre proliferasyonunu inhibe ederek apoptoz oluşumuna neden olduğunu belirtmişlerdir. Kordisep, 3-deoksiadenozin, geleneksel Çin tıbbında kullanılan *Cordyceps militaris*'in mantarının baskın fonksiyonel bileşenidir. Kordisep tarafından kanser hücrelerinin inhibisyonunu araştıran önceki çalışmalar, sadece hücre apoptozunu değil, aynı zamanda hücre proliferasyonunu da kontrol ettiğini belirlemişlerdir. Ayrıca çalışmalar, A3 adenosin reseptörünü bağlayan, g proteini aktive eden, cAMP oluşumunu önleyen, glikojen sentaz kinaz - 3- / β - katenin aktivasyonunu baskılayan, siklin D1 ve c - myc ekspresyonunu baskılayan hücre çoğalmasını inhibe eden moleküler mekanizmaları açıklamıştır. Kordisep, DR3 reseptörünü bağlayarak ve dolayısıyla kaspaz - 8 / -3'ü aktive ederek hücre apoptozunu indüklemektedir. Birlikte ele

alındığında, bu çalışmalar kordisep'in doğal bir ilaç olarak kullanılabileceğini göstermektedir, çünkü sadece tümör hücresi proliferasyonunu kontrol etmekle kalmaz, aynı zamanda kanser hücresi apoptozunu da indüklemektedir (Tian ve diğerleri, 2015).

Giofrè ve diğerleri, 2016 çalışmalarında isoindol türevli bileşiklerin 9-22 μM aralığında antiproliferatif aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. p53 ve MDM2 protein inhibisyonunun antitümör aktivitesini biyolojik veriler ile desteklemişlerdir. Giofrè ve diğerleri, 2016'da bir dizi spiro [izoindol-1,5-izoksazolidin] -3 (2H) -on, izoindolin-3-metilen-1 N-benzilnitronun 1,3-dipolar sikloadisyon bileşiğini sentezlemişlerdir. Bileşikler (bazı türevleri) üç farklı insan kanser hücre hattı üzerinde (nöroblastom SH-SY5Y, HT-29 kolorektal adenokarsinom ve HepG2 hepatosellüler karsinom hücreleri) sitotoksik ve antiproliferatif etki göstermiştir. Özellikle, en aktif bileşik 9–22 μM aralığında IC_{50} göstermiştir ve biyolojik testler, antitümör aktivitesinin protein-protein p53-MDM2 etkileşiminin inhibisyonuna bağlanabileceğini düşündürmektedir. MDM2-p53 etkileşiminin inhibitörü olarak SH-SY5Y kanser hücre dizilerinde yeni sentezlenmiş bileşiklerin oynadığı rolü daha iyi açıklığa kavuşturmak için farklı çalışmalara ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (Giofrè ve diğerleri, 2016).

Spirooksindolpirolidin heterohalkalı bileşikleri *in vitro* hücre kültürleri ile antikanser aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Özellikle kaspaz-3'ün aracılık ettiği kaspaza bağlı apoptotik yol için malign tümörlerin tedavisinde kullanılan iyi terapötik ajanlardan biri olarak işlev görebileceği belirtilmiştir. Kumar ve diğerleri, 2019 çalışmalarına göre; küçük bir spirooksindolpirolidin hibrid bileşiği iyonik sıvı içinde ilk kez sentezlenmiş, Spirooksindol-pirolidin heterosiklik melezlerin sentezini ve karakterizasyonunu takiben, kanser ve kanser olmayan hücreleri içeren farklı *in vitro* hücre kültürleri ile konsantrasyon ve zaman periyotlarındaki değişikliklere karşı antikanser aktiviteleri açısından test edilmiştir. Sonuç olarak, sentezlenen spirooksindolpirolidin melezlerinin, malign tümörlerin tedavisinde kullanılan daha iyi terapötik ajanlardan biri olarak işlev görebildiği gösterilmiştir (Kumar ve diğerleri, 2019).

Heterohalkalı benzimidazol türevlerinin PARP inhibisyon ve hücresel proliferasyon analizleri yapılmıştır. Bileşiklerin 4 μM IC_{50} dozunda potansiyel antikanser aktivite sergilediği bildirilmiştir. Min ve diğerleri, 2019 araştırmalarında; benzimidazol karboksamid türevlerinin serilerini sentezlemişler, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve HRMS ile karakterize etmişlerdir. PARP inhibisyon analizleri ve hücresel proliferasyon analizleri de

gerçekleştirilmiştir. 5cj ve 5cp bileşikleri, referans ilaç veliparibine benzer şekilde PARP-1 ve PARP-2'ye karşı yaklaşık 4 μM 'lık IC_{50} değerlerine sahip potansiyel antikanser aktiviteleri sergilemiştir. İki bileşik 17,4 μM ve 11,4 μM , 19,8 μM ve 15,5 μM değerleriyle, Mipar-MB-436 ve CAPAN-1 hücre hatlarına karşı veliparib ve olaparib'den daha iyi *in vitro* sitotoksiste göstermiştir (Min ve diğerleri, 2019).

Tez çalışmamda; apoptotik hücre ölümü ve ilişkili sinyal yollarında önemli rol oynayan proteinleri p53, PARP, BCL2, BAX, CASP3, ısı şok proteinlerinin (HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 α), endoplazmik retikulum stres genlerinin (GRP78 ve GRP94) mRNA düzeyleri qPCR yöntemiyle belirlenmiştir. MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde tüm bileşiklerin p53, BAX ve CASP3 gen ifadelerinde anlamlı artış göstererek hücreyi ölüme sürüklediği tespit edilmiştir. Ayrıca bileşiklerin ısı şok proteinlerinin (HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 α) gen ifadelerini azaltma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Bileşiklerin endoplazmik retikulum stres genlerinin (GRP78 ve GRP94) ifadelerini azaltma da etkileri tespit edilememiştir. Bileşiklerin gen ifadeleri incelendiğinde SM-1 ve SM-2 etkili sonuçlar vermiştir ve bileşiklerin benzer niteliğe sahip olduğu bulunmuştur.

Morais ve diğerleri, 2006 çalışmalarında; pirolidin türevli bileşiklerin böbrek kanseri hücreleri üzerine antiproliferatif etkileri olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bileşiklerin, böbrek karsinom hücrelerinde apoptozu arttıran etkilerini de göstermişlerdir. Nükleer faktör-kB'nin (NF-kB) aktivasyonu, renal hücreli karsinomun (RCC) gelişimi, ilerlemesi ve metastazında rol oynamıştır. Bu çalışmada, bir NF-kB inhibitörü olan pirolidin ditiyokarbamatın (PDTC) iki metastatik insan RCC hücre hattı, ACHN ve SN12K1 (böbrek adenokarsinoma) üzerindeki etkisi araştırılmaktadır. RCC hücre hatları ve normal hücreler 25 veya 50 mM PDTC'ye maruz bırakılmıştır. Apoptoz, akış sitometrisi ve TdT aracılı çentik-uç etiketleme yöntemleri ile ölçülmüştür. Hücre canlılığı ve proliferasyonu sırasıyla MTT ve BrdU deneyleri ile ölçülmüştür. NF-kB alt birimleri, I κ B'ler, I κ B Kinaz (IKK) kompleksi ve apoptotik düzenleyici proteinlerin ekspresyonu, Western blotlama ve / veya immünofloresan ile analiz edilmiştir. NF-kB alt birimlerinin DNA bağlanma aktivitesi ELISA ile ölçülmüştür. RCC hücre hatları, proksimal tübüler epitel hücresinin veya HK-2 hücresinin normal primer kültürlerinden NF-kB beş alt biriminin tümünün daha yüksek bazal ekspresyonuna sahip olduğu bulunmuştur. PDTC, RCC'nin canlılığını ve çoğalmasını azaltmış, ancak normal hücreleri etkilememiştir. İki RCC hücre hattından, ACHN hücrelerinde, NF-kB beş alt biriminin hepsinin SN12K1'den daha yüksek bazal düzey

ekspresyonuna sahip olduğu ve PDTC'ye daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. PDTC gen ifadesinde genel bir düşüşe neden olurken her iki RCC hücre hattındaki NF-kB beş alt birimi, beklenmedik bir şekilde ACHN hücre hattında PDTC, tüm NF-kB alt birimlerinin DNA bağlanma aktivitesini, IKK kompleksinin (IKK-a, IKK-b ve IKK-g), önleyici birimler olan IκB-a ve IκB-b'nin ve NF-kB'nin nükleer ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiş, ancak SN12K1'de değişiklik saptanmamıştır. PDTC her iki RCC hücre hattında apoptozda önemli bir artışa neden olmuştur. Bu durum pro-apoptotik protein olan BAX'ta belirgin değişiklikler olmaksızın BCL-2 ve BCL-XL anti-apoptotik ekspresyonundaki bir azalma ile ilişkilendirilmiştir. Bu veriler PDTC'nin bazı RCC formlarında bir antikanser ajan olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Morais ve diğerleri, 2006).

Pirolidin ve ditiyokarbamat kombinasyonu olan pirolidin ditiyokarbamat (PDTC) bileşiğinin antioksidan, metal şelatlayıcı ve NF-κB (Nükleer Faktör kappa B) önleyici özelliklerini tespit etmişlerdir. İlbey ve diğerleri, 2009 araştırmalarına göre; çalışmanın amacı ratlar üzerinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), nükleer faktör-kB inhibitörü (NF-kB) ekspresyonunu ve bir NF-kB inhibitörü, pirolidin ditiyokarbamatın (PDTC) cisplatin kaynaklı testis hasarına karşı potansiyel kemoprotektif etkilerini değerlendirmektir. Ratlar dört eşit gruba ayrılmıştır: Grup 1 kontrol olarak kullanılmış, grup 2'ye 5 gün boyunca cisplatin (CIS) enjekte edilmiş (7 mg / kg / gün intraperitoneal olarak [IP]), grup 3; sadece PDTC ile enjekte edilmiş ve grup 4, PDTC ilave olarak CIS (100 mg / kg IP) enjekte edilmiştir. Testis dokusunun vücut ve testis ağırlıkları, plazma testosteron düzeyleri ve histopatolojik yapısı belirlenmiştir. iNOS ve NF-kB aktivitesi, NF-kB aktivitesini tanımlamak için p65 boyama ile immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Testis dokusunda malondialdehid (MDA), azaltılmış glutatyon (GSH) ve nitrik oksit (NO) seviyeleri ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi değerlendirilmiştir. Vücut ve testiküler ağırlıklar, plazma testosteron seviyeleri, GSH-Px aktivitesi ve GSH seviyeleri önemli ölçüde azalırken, CIS grubundaki ratlarda MDA ve NO seviyeleri önemli ölçüde artmıştır. PDTC tedavisi plazma testosteron düzeylerini arttırmıştır. CIS + PDTC grubunda GSH ve GSH-Px aktivitesinde anlamlı bir artış ve testiküler dokuda MDA ve NO düzeylerinde bir azalma gözlenmiştir. İmmünohistokimyasal olarak, CIS enjekte edilmiş sıçanlarda kontrole kıyasla iNOS ve NF-kB / p65 ekspresyonu için belirgin bir boyama tespit edilmiştir. BDT, düzensiz seminifer tübüllere, seminifer epitel tabakalarının azalmasına, önemli ölçüde olgunlaşmanın durdurulmasına ve perivasküler fibrozise neden olmuştur. Ayrıca, BDT ile tedavi edilen ratlara PDTC uygulaması da bu histopatolojik durumu önemli

ölçüde önlemiştir. CIS, NF-kB / p65'in aktivasyonu yoluyla iNOS ekspresyonunu indüklemiştir. NF-kB inhibitörü olan PDTC ve CIS tarafından ile indüklenen testis toksisitesi önlenabilmektedir (İlbey ve diğerleri, 2009).

İzoindol türevli heterohalkalı bileşiklerin, HIV-1 için revers transkriptaz inhibitörü olarak farmakolojik özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Métifiot ve diğerleri, 2012 çalışmalarında; HIV-1 integrasyonu inhibe eden bir dizi laktam ve ftalimid türevine dayanarak, raltegravir ile karşılaştırılabilir biyokimyasal ve antiviral aktivitelere sahip yeni bir molekül olan XZ-259 geliştirilmiştir. Virüs intasomuyla kompleks halinde bulunan XZ-259 ve diğer dört türevinin kristal yapıları belirlenmiştir. Bileşikler, integras aktif bölgesinin integras-Mg²⁺-DNA arayüzüne bağlanmıştır. Biyokimyasal ve antiviral deneylerde kullanılan XZ-259 ve Y143R mutasyonuna sahip raltegravire (antiretroviral) ilaca dirençli HIV-1 entegrasyonlarını inhibe etmiştir. HIV-1 intasomunun (protein kompleksi) moleküler dinamik analizleri, viral DNA'nın ilaç direncindeki önemini vurgulamaktadır (Métifiot ve diğerleri, 2012).

Pirolidin türevi bileşiğin güçlü bir anti-meme kanseri bileşiği olduğu bildirilmiştir. Spiro [pirolidin-3,3-oksindol], önemli biyolojik aktivite gösteren alkaloidlerde çekirdek bir yapı olarak bulunur. Çalışmada MCF-7 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonuna karşı inhibitör aktivite sergileyen spiro [pirolidin-3,3-oksindol] motifleri taşıyan bir bileşik tasarımı ve sentezi rapor edilmiştir. Bu moleküllerin MCF-7 hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir. Kimyasal proteomik kullanarak en güçlü bileşik 51 ile hedef dekonvolüsyon (ters çözüm işlemi), potansiyel hücresel bağlanma mekanizmaları olarak histon deasetilaz 2 (HDAC2) ve inhibitin 2 gösterilmiştir. Bileşik 51'in HDAC2 ile moleküler kenetlenmesi, varsayılan bağlanma etkileşimleri ile ilgili bilgiler gözlenmiştir (Hati ve diğerleri, 2006).

Mohan ve diğerleri, 2013 çalışmalarında; A549 akciğer kanseri hücreleri üzerinde *Murraya koenigii* Spreng'den izole edilen karbazol alkaloidi olan girinimbine ile antiproliferatif aktivite, MTT ve apoptoz tespiti, annexin V ve lizozomal stabilite deneyleri yapmışlardır. Çok parametrelili sitotoksikite deneyleri, mitokondriyal membran potansiyeli ve sitokrom c translokasyonundaki değişimi araştırmak için yapılmış; ROS, kaspaz ve insan apoptoz protein array deneyleri (Human Apoptosis Antibody Array Kit, RayBiotech, USA), apoptotik mekanizma hücre ölümünü araştırmak için yapılmıştır. Girinimbine, 19.01 µM IC50 ile hücre ölümünü indüklemiş ve apoptozun erken evresinde anlamlı bir indüksiyon

göstermiştir. Girinimbine kanser hücrelerinin antiproliferatif ve apoptotik etkilerine yukarı ve aşağı regülasyon yoluyla aracılık etmiştir. Hem iç hem de dış yollara önemli bir etkisi belirlenmiştir. p53'ün yanı sıra hücre çoğalması baskılayıcı proteinleri, p27 ve p21'in regülasyonu ve insülin / IGF-1'in önemli rolü tanımlanmıştır. Ayrıca kaspaz 3 ve 8'in önemli ölçüde aktive olduğu bulunmuştur. Girinimbine'in antikanser ilaç gelişimi için potansiyel bir ajan olabileceği belirtilmiştir (Mohan ve diğerleri, 2013).

Leo ve diğerleri, 2019 çalışmalarında; insan kolorektal kanser hücre dizisi HCT 116'da Guggulsterone (GS) bileşiğinin anti-kanser etkileri test edilmiş, potansiyel hedefler kütle spektrometrisine dayalı proteomik yaklaşımı protein array antikor dizileri (Human Apoptosis Signaling Array C1 Kit, RayBiotech, USA) ile doğrulanan anahtar yollar kullanılarak belirlenmiştir. Hücre proliferasyonu / migrasyonu, tümör oluşumu, hücre büyümesi, metabolizması ve DNA replikasyonu ile ilgili proteinlerin aşağı regüle edildiği tespit edilirken, ekzositoz / tümör supresyonunda fonksiyonel rolü olan proteinin yukarı regüle olduğu bulunmuştur. Çalışmada GS bileşiğinin BCL-2 ekspresyonunu değiştirdiği apoptozom oluşumunu tetikleyen sitokrom c'nin mitokondriyal salınımına ve ayrıca intrinsik apoptoz yoluyla kaspaz-3 / -7'nin aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca GS bileşiği p53 proteininin ekspresyonunu indüklerken, p21 ekspresyonunu etkilememiştir. GS'nin, düzenlenmiş gen ürünleri BCL-2, cIAP-1 ve survivin ekspresyonu yoluyla kolon kanseri hücrelerinde NF-kB sinyalini inhibe ettiği bulunmuştur (Leo ve diğerleri, 2019).

Tez çalışmamda; apoptoz ve ilişkili sinyal yollarında yer alan proteinler olan; BAD, BAX, BID, BIM, Casp3, Casp7, Casp8, CD40, CD40L, cIAP-2, cytoC, DR6, Fas, FasL, HTRA, p38, p27, p53, SMAC, sTNF-R1, sTNF-R2, TNF-alpha, TNF-beta, TRAILR-1, TRAILR-2, TRAILR-3, TRAILR-4, ATM, CHK1, CHK2, eIF2a, SMAD BCL-2, BCL-W, HSP27, HSP60, HSP70, IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6, IGF-1sR, Livin, p21, Survivin, XIAP, AKT, Erk1/2, IkbA, JNK, NFkB, PARP, TAK1 miktarları membran ilişkili protein array kit ile ölçülmüştür. Bileşiklerin MCF7 ve DLD-1 hücreleri üzerinde apoptozu arttırdığı, büyüme faktörlerini ve hücre tamir mekanizmalarını bloke edici özellikleri ile antikanserojenik bir molekül olabileceği düşünülmektedir. Bileşikler hem içsel yolla (mitokondriden salınan sitokrom C'nin sitoplazmada apoptozom oluşumuna neden olarak kaspaz-3'ün aktivasyonu) hem de dışsal yolla (hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanan ligandların kaspaz-8'i aktive etmesiyle) hücreleri ölüme sürüklediği gözlenmiştir.

Bu bilgiler ışığında; tez çalışmasında kullandığım heterohalkalı yapıya sahip izoindol türevli piroolidin bileşiklerine literatür taramalarında rastlanılmamıştır. Bileşikler MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde yapılan antioksidan, sitotoksik aktivite, çoklu ilaç direnci (MDR), apoptoz ve ilişkili sinyal yolları çalışmaları için özgün nitelik taşımaktadır.

Tez çalışmamda; MCF-7 (insan meme adenokarsinoma) ve DLD-1 (insan kolon adenokarsinoma) hücrelerinde proapoptotik ve antikanserojen etki göstereceği düşünülen heterohalkalı bileşiklerin çoklu ilaç direncine (MDR) ve apoptotik sinyal yollarına etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Böylece hücre proliferasyonunu engelleyici, apoptozun indüklenmesini ve ilaç-hedef etkileşimini artıran yeni ilaç adayları bileşiklerin *in vitro* çalışmaları planlanmıştır.

Heterohalkalı bileşiklerin antioksidan aktiviteleri serbest radikal süpürücü (DPPH), indirgeyici ve metal şelatlama yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. MCF-7 (meme kanseri), MCF-12A (normal meme epiteli) ve DLD-1 (kolon kanseri), CCD-18Co (normal kolon epiteli) hücre hatlarında, heterohalkalı bileşiklerin sitotoksik dozu ve IC₅₀ değeri MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemiyle; hücre canlılığına etkisi gerçek zamanlı hücre analizi sistemi (RTCA) ile tespit edilmiştir. IC₅₀ değeri belirlenen heterohalkalı bileşiklerin belirtilen hücre hatlarında, anti-karsinojenik etkileri, kemoterapi direncinde önemli rol oynayan pompa proteinleri ABCB1 (MDR1-P-gp), ABCC3 (MRP3), ABCC10 (MRP7), ABCC11 (MRP8), ABCG2 (BCRP) ve apoptotik hücre ölümü ve ilişkili sinyal yollarında önemli rol oynayan proteinleri p53, PARP, BCL2, BAX, CASP3, ısı şok proteinlerinin (HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 α), endoplazmik retikulum stres genlerinin (GRP78 ve GRP94) mRNA düzeyleri qPCR yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca apoptoz ve ilişkili sinyal yollarında yer alan proteinler olan; BAD, BAX, BID, BIM, Casp3, Casp7, Casp8, CD40, CD40L, cIAP-2, cytoC, DR6, Fas, FasL, HTRA, p38, p27, p53, SMAC, sTNF-R1, sTNF-R2, TNF-alpha, TNF-beta, TRAILR-1, TRAILR-2, TRAILR-3, TRAILR-4, ATM, CHK1, CHK2, eIF2a, SMAD BCL-2, BCL-W, HSP27, HSP60, HSP70, IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5, IGFBP-6, IGF-1sR, Livin, p21, Survivin, XIAP, AKT, Erk1/2, Ikb α , JNK, NFKB, PARP, TAK1 miktarları membran ilişkili protein array kit ile ölçülmüştür.

Heterohalkalı bir bileşik olan izoindol türevli piroolidin ile yapılan literatür çalışmalarında antioksidan ve sitotoksik aktivite çalışmalarına rastlanılmamıştır. Antioksidan aktivite

çalışmaları bileşikler için ilk ve tek olma özelliğine sahiptir. Antioksidan çalışmalarının verilerine göre pirolidin yapıya sahip SM-1 ve SM-2 bileşiklerinin oksidatif hasarı önlemede ve azaltmada ön plana çıktığı tespit edilmiştir. MCF-7 ve MCF-12A, DLD-1 ve CCD-18Co hücre hatlarında yapılan sitotoksik aktivite çalışmaları özgün niteliğe sahiptir.

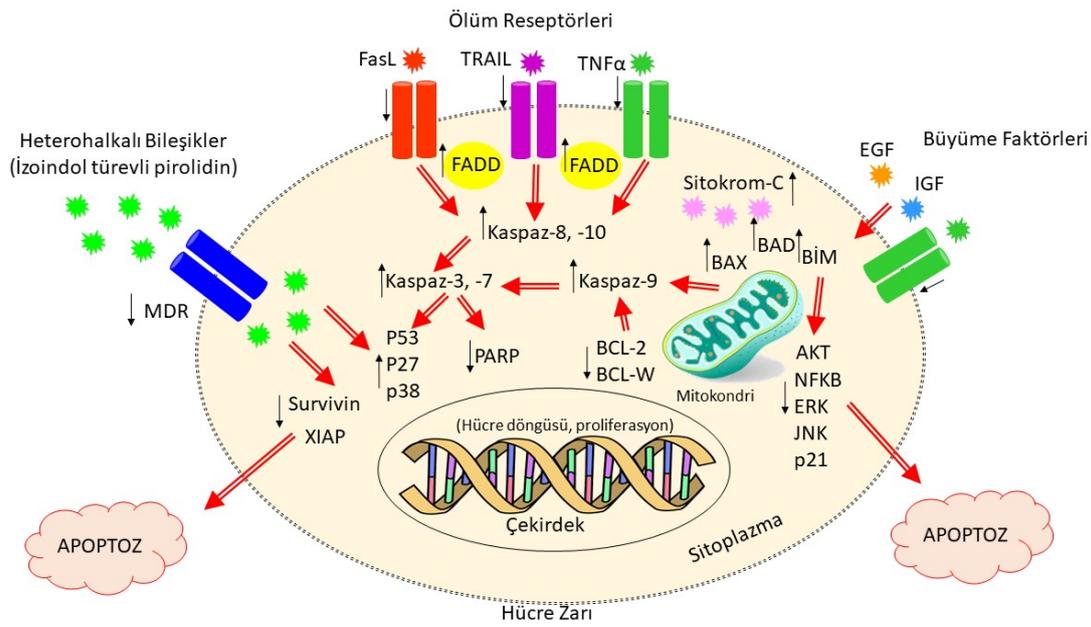
BM-1 ve SM-1 yapısal olarak karşılaştırdığımızda en büyük farklılık SM-1 bileşiğinin heterohalkalı yapıya sahip olmasıdır. SM-1 bileşiğinde toplam üç heterohalkalı yapı bulunmaktadır. Heterohalkalı yapılar seçici bağlanmaya sebep olan enerji düzeyine sahip olmaları nedeniyle biyolojik aktivite özelliklerini geniş skala da gösteren moleküllerdir. Sentezlenen molekülde bulunan N-H pirolidin halkası da bu seçiciliği arttıran H-bağlanma özelliği nedeniyle etkindir. BM-2 ile SM-2 arasındaki temel farklılık diğer molekülde olduğu gibi heterohalkalı ve hetero atoma bağlı aktif hidrojen bağı içermesiyle açıklanabilmektedir. SM-2 molekülün bisiklik yapıda olması aktif bölge ile etkileşimde seçiciliği arttıran yönde olduğunu göstermektedir. SM-1 ve SM-2 bileşiklerin sitotoksik aktivite çalışmaları neticesinde; hücre canlılığını azalttığı, hücre çoğalmasını önlediği ve hücre büyümesini baskıladığı tespit edilmiştir. Bu çalışmalar hem bileşikler hem de hücre dizileri için benzersizdir. Antioksidan ve sitotoksik aktivite çalışmaları karşılaştırıldığında bileşiklerin paralel sonuçlar verdiği, sitotoksik ve antioksidan aktivite çalışmalarında önemli seçici özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Heterohalkalı bileşiklerin çoklu ilaç direncinde, apoptotik ve hücre ölümü ilişkili sinyal yollarında önemli rol oynayan gen ifadelerine bakıldığında; MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde tüm bileşiklerin MDR mRNA ekspresyonlarını (ABCC3 gen ifadesi dışında) önemli ölçüde azalttığı ve bu bileşiklerin kemoterapi direncinin baskılanmasında önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir. Apoptotik ve ilişkili sinyal yolları verileri neticesinde; MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde tüm bileşiklerin p53, BAX ve CASP3 gen ifadelerinde anlamlı artış göstererek hücreyi ölüme sürüklediği tespit edilmiştir. Ayrıca bileşiklerin ısı şok proteinlerinin (HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 α) gen ifadelerini azaltma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Bileşiklerin endoplazmik retikulum stres genlerinin (GRP78 ve GRP94) ifadelerini azaltma da etkileri tespit edilememiştir.

Protein array sonuçları kapsamında bileşiklerin MCF7 ve DLD-1 hücreleri üzerinde BAD, BAX, BİD, BİM, CASP3, CASP7, CASP8, sitokrom-C, Fas, TNF, TRAIL, p27, p38 ve p53 pro-apoptotik yollarında protein ekspresyonunu artırdığı ve BCL-2, BCL-W, IGF, survivin,

XIAP, AKT, ERK, JNK, NFKB, PARP, p21 anti-apoptotik yollarda ise protein ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir.

Apoptotik ve ilişkili sinyal yolak protein ifadelerinin verileri neticesinde; MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde SM-1 ve SM-2 bileşiklerine ek olarak BM-1 ve BM-2 bileşiklerinin de apoptozu arttırdığı, büyüme faktörlerini ve hücre tamir mekanizmalarını bloke edici özellikleri ile antikanserojenik bir molekül olabileceği düşünülmektedir. Bileşikler hem içsel yolla (mitokondriden salınan sitokrom C'nin sitoplazmada apoptozom oluşumuna neden olarak kaspaz-3'ün aktivasyonu) hem de dışsal yolla (hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanan ligandların kaspaz-8'i aktive etmesiyle) hücreleri ölüme sürüklediği gözlenmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Bileşiklerin çoklu ilaç direncine ve apoptotik yollara etkileri

MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde tüm bileşiklerin ölüm ligandları olan FasL, TNF-alpha, TNF-beta, TRAIL ve bu ligandlara ait reseptörler olan Fas, TNF-R, TRAILR proteinlerinde ekspresyonu artırarak ve ölüm domainleri yoluyla Casp3, Casp7, Casp8 sinyallerini indükleyerek hücreyi apoptozu sürüklediği tahmin edilmektedir.

MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde tüm bileşiklerin çoklu ilaç direncinde rol oynayan ABC genlerini inhibe ederek, p53 ve p27 sinyal dizilerini ve kaspaz yolaklarını indükleyerek ve survivin ekspresyonu yoluyla hücreyi ölüme götürdüğü düşünülmektedir.

DLD-1 hücrelerinde BM-2, SM-1 ve SM-2 bileşiklerinin ısı şok proteinleri olan HSP'lerin ekspresyonunu azaltarak, p38 ve kaspaz yolaklarını indüklemesi yoluyla hücrede pro-apoptotik aktiviteye etki ettiği tahmin edilmektedir.

MCF-7 ve DLD-1 hücrelerinde BM-1, SM-1 ve SM-2 bileşiklerinin IGFBP büyüme faktörlerinde ekspresyonunu arttırmasıyla BAD, BAX, BID, BIM pro-apoptotik yolları indükleyerek BCL-2, cIAP-1 ve survivin ekspresyonu yoluyla hücrelerde AKT, JNK, ERK1/2 ve NF- κ B sinyallerini inhibe ettiği düşünülmektedir.

Bileşikler incelendiğinde MCF-7 hücrelerinde en etkili sonucu SM-2 gösterirken DDL-1 hücrelerinde ise hem SM-1 hem de SM-2 etkili sonuç göstermiştir. SM-1 ve SM-2 bileşiklerinin izoindol ve pirolidin heterohalkalı yapıları, seçici bağlanmaya sebep olan enerji düzeyine sahip olmaları nedeniyle biyolojik aktivite özelliklerini geniş skala da gösteren moleküllerdir. SM-1 bileşiği N-H pirolidin halkası H-bağlanma özelliği nedeniyle seçici özellik gösterirken SM-2 bileşiği ise bisiklik yapıda olması nedeniyle aktif bölge ile etkileşimini arttırmaktadır. SM-1 ve SM-2 bileşikleri köprülü bileşikler olup bu yapılar köprü başında bulunan aktif N-H bağı başlangıç maddesinden en büyük farklılığa sebep olacak bölgedir. Bu bölge yapıların asidik, bazik, yükseltgen ve indirgen özellik kazanmasına sebep olmuştur. Ayrıca SM-1 bileşiğinin uzun alkil zinciri sebebiyle etkili olduğu, SM-2 bileşiğinin ise köprü ayağında S-metil grubunun bulunması sistemi gergin halden uzaklaştırdığı için etkin sonuç verdiği düşünülmektedir.

MCF-7 ve DLD-1 hücre hatlarında BM-1 ve BM-2 bileşiklerinin SM-1 ve SM-2 bileşiklerine benzer nitelikte ilaç direnci ve anti-apoptotik gen ifadelerinde kat değişimini azaltmada ve pro-poptotik gen ifadelerinde kat değişimini arttırmada etkili olduğu gözlenmiştir. Glisin metil ester türevi olarak sentezlenen BM-1 ve BM-2 bileşikleri benzer iskelete sahip olmalarının yanı sıra kükürt atomuna bağlı alkil gruplarının farklılığı sebebiyle de farklı yapılara sahiptir. BM-1 bileşiği uzun alkil zincirine sahiptir ve etkinliğinin sebebi lipofilitenin artışı ile açıklanabilir. BM-2 bileşiğinin kükürt atomuna bağlı metil grubu moleküle sterik olarak engel olmadığından etkin olduğu düşünülmüştür.

Elde edilen etkili sonuçlar göz önüne alındığında; çalışmanın devamında bileşiklerin belirtilen hücre hatlarında; hücre döngüsüne ve apoptoza etkisinin (PI boyama ve AnnexinV/PI dual staining) akış sitometri yöntemiyle değerlendirilmesi; apoptozla ilişkilendirilen sinyal yollarında rol alan gen ve protein ifade analizlerinin verimliliğini artıracaktır. Ayrıca içsel (BCL-2 ailesi) ve dışsal (ölüm reseptörleri) yolakla hücreleri ölüme sürükleyen kaspaz yollarının hızlı blotlama yöntemi ile değerlendirilmesinin kanıta dayalı verileri güçlendirileceği düşünülmektedir. Ek olarak bileşiklere ait antimikrobiyal ve genotoksikite testlerinin de yapılmasıyla tüm biyolojik aktivite verilerinin bilim dünyasına fayda sağlayacağı ön görülmektedir.

Heterohalkalı bir yapıya sahip olan izoindol türevli pirolidin bileşiklerinin, MCF-7 ve DLD-1 hücreleri için anti-kanser araştırmalarında hücre büyümesini ve çoğalmasını önleme potansiyeline sahip olduğu, kemoterapi direncini ortadan kaldırdığı, apoptoz ve ilişkili yollarla kanser hücrelerini ölüme sürüklediği gözlenmiştir. Çalışmalar sonucunda heterohalkalı bir yapıya sahip olan izoindol türevli pirolidin bileşiklerinin, farmasötik araştırmalarda terapötik olma potansiyeline sahip olduğu ve yeni türevlerin geliştirilmesine yönelik daha fazla çalışmaya ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abaan, O. D., Mutlu, P. K., Baran, Y., Atalay, C. and Gunduz, U. (2009). Multidrug resistance mediated by MRP1 gene overexpression in breast cancer patients. *Cancer Invest*, 27(2), 201-205.
- Abe, T., Mori, T., Kohno, K., Seiki, M., Hayakawa, T. Welgus, H.G., Hori, S. and Kuwano, M., (1994). Expression of 72-kDa IV collagenase and invasion activity of human glioma cells. *Clin. exp. Metast.* 12(4):296-304.
- Adan, A., Kiraz, Y. and Baran, Y. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17, 1213.
- Aguda, B. D., del Rosario, R. C. and Chan, M. W. (2015). Oncogene-tumor suppressor gene feedback interactions and their control. *Math Biosci Eng*, 12(6), 1277-1288.
- Aiyengar, T. M., Chiranjeevi, P. and Rani, H. S. (2017). Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Breast Cancer. In Nitric Oxide Synthase - Simple Enzyme-Complex Roles. doi: 10.5772/67493
- Akıncılar, S. C., Unal, B. and Tergaonkar, V. (2016). Reactivation of telomerase in cancer. *Cellular and molecular life sciences*, 73(8), 1659–1670.
- Alami, N., Paterson, J., Belanger, S., Juste, S., Grieshaber, C. K. and Leyland-Jones, B. (2007). Comparative analysis of xanafide cytotoxicity in breast cancer cell lines. *British journal of cancer*, 97(1), 58–64.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2008). Molecular Biology of the Cell, 5th Edition, *Garland Science*, New York, pp 1616.
- Al-Mulla, A. A (2017). Review: Biological Importance of Heterocyclic Compounds, *Der Pharma Chemica*, 9(13):141-147.
- Al-Sohaily, S., Biankin, A., Leong, R., Kohonen-Corish, M. and Warusavitarne, J. (2012). Molecular pathways in colorectal cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 27(9), 1423-1431.
- Andor, N., Graham, T. A., Jansen, M., Xia, L. C., Aktipis, C. A., Petritsch, C. and Maley, C. C. (2016). Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity. *Nature medicine*, 22(1), 105.
- Andor, N., Maley, C. C. and Ji, H. P. (2017). Genomic Instability in Cancer: Teetering on the Limit of Tolerance. *Cancer Res*, 77(9), 2179-2185.
- Anreddy, N., Gupta, P., Kathawala, R. J., Patel, A., Wurple, J. N. and Chen, Z. S. (2014). Tyrosine kinase inhibitors as reversal agents for ABC transporter mediated drug resistance. *Molecules*, 19(9), 13848-13877.
- Arora, R., Lee, Y., Wischnewski, H., Brun, C. M., Schwarz, T. and Azzalin, C. M. (2014). RNaseH1 regulates TERRA-telomeric DNA hybrids and telomere maintenance in ALT tumour cells. *Nature communications*, 5, 5220.

- Artandi, S. E. and DePinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 9-18.
- Arumugam, N., Almansour, A. I., Kumar, R. S., Al-Thamili, D. M., Periyasami, G., Periasamy, V. S. and Menéndez, J. C. (2018). Regio and stereoselective synthesis of anticancer spirooxindolopyrrolidine embedded piperidone heterocyclic hybrids derived from one-pot cascade protocol. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1-11.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling an modulation. *Science*, 281(5381), 1305-1308.
- Ashkenazi, A. (2015). Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions. *J Clin Invest*, 125(2), 487-489.
- Aslan, G. (2010). Tümör immünolojisi. *Turkish Journal of Immunology*, 15, 7-13.
- Leal-Esteban, L. C. and Fajas, L. (2020). Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 165715.
- Aslantürk, Ö. S. (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*.
- Atalay, C. (2007). Multi-drug resistance and cancer. *Expert Opin Ther Patents*, 17, 511-520.
- Atıcı, E. (2007). Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 22, 197-204.
- Aubert, G. and Lansdorp, P. M. (2008). Telomeres and aging. *Physiol Rev*, 88(2), 557-579.
- Aydemir, B. ve Karadağ Sarı, E. (2009). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Vet J*, 2 (2): 56-60.
- Bacac, M. and Stamenkovic, I. (2008). Metastatic Cancer Cell. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 3(1), 221-247.
- Badowska-Kozakiewicz, A. M., Liszcz, A., Sobol, M. and Patera, J. (2017). Retrospective evaluation of histopathological examinations in invasive ductal breast cancer of no special type: an analysis of 691 patients. *Archives of medical science : AMS*, 13(6), 1408-1415.
- Baguley, B. C. (2010). Multidrug resistance in cancer. *Methods Mol Biol*, 596, 1-14.
- Bailey, M. H., Tokheim, C., Porta-Pardo, E., Sengupta, S., Bertrand, D., Weerasinghe, A., Colaprico, A., Wendl, M. C., Kim, J., Reardon, B., Ng, P. K., Jeong, K. J., Cao, S., Wang, Z., Gao, J., Gao, Q., Wang, F., Liu, E. M., Mularoni, L., Rubio-Perez, C. and Ding, L. (2018). Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell*, 173(2), 371-385.

- Baldassarre, G. and Belletti, B. (2016). Molecular biology of breast tumors and prognosis. *F1000Res*, 5.
- Bartek, J. and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 3(5), 421–429.
- Barros-Filho, M. C., Guisier, F., Rock, L. D., Becker-Santos, D. D., Sage, A. P., Marshall, E. A. and Lam, W. L. (2019). Tumour Suppressor Genes with Oncogenic Roles in Lung Cancer. In *Tumor Suppressor Genes*. IntechOpen..
- Becker, S. (2015). A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. *Int J Gynaecol Obstet*, 131 Suppl 1, S36-39.
- Beishline, K. and Azizkhan-Clifford, J. (2014). Interplay between the cell cycle and double-strand break response in mammalian cells. *Methods Mol Biol*, 1170, 41-59.
- Belisario, D. C., Akman, M., Godel, M., Campani, V., Patrizio, M. P., Scotti, L., Kopecka, J. and Riganti, C. (2020). ABCA1/ABCB1 Ratio Determines Chemo-and Immune-Sensitivity in Human Osteosarcoma. *Cells*, 9(3), 647.
- Belkacemi, L. (2018). Exploiting the Extrinsic and the Intrinsic Apoptotic Pathways for Cancer Therapeutics. *J Cancer Cure*. 1(1), 1004.
- Bellamy, C. O. C. (1997). p53 and apoptosis, *British Medical Bulletin*, 53(3), 522–538.
- Bennett, L. L., Rojas, S., and Seefeldt, T. (2012). Role of Antioxidants in the Prevention of Cancer. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 4(4), 215-222.
- Benyahia, B., Huguet, S., Declèves, X., Mokhtari, K., Crinière, E., Bernaudin, J. F. and Delattre, J. Y. (2004). Multidrug Resistance-Associated Protein MRP1 Expression in Human Gliomas: Chemosensitization to Vincristine and Etoposide by Indomethacin in Human Glioma Cell Lines Overexpressing MRP1. *Journal of Neuro-Oncology*, 66(1/2), 65–70.
- Bergman, P. J. and Harris, D. (1997). Radioresistance, Chemoresistance, and Apoptosis Resistance. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 27(1), 47–57.
- Bittkau, K. S., Dörschmann, P., Blümel, M., Tasdemir, D., Roider, J., Klettner, A. and Alban, S. (2019). Comparison of the Effects of Fucoidans on the Cell Viability of Tumor and Non-Tumor Cell Lines. *Marine drugs*, 17(8), 441.
- Blackburn, E. H., Epel, E. S. and Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*, 350(6265), 1193–1198.
- Braconi, L., Bartolucci, G., Contino, M., Chiaramonte, N., Giampietro, R., Manetti, D., Riganti, C. and Dei, S. (2020). 6, 7-Dimethoxy-2-phenethyl-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline amides and corresponding ester isosteres as multidrug resistance reversers. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 35(1), 974-992.

- Brahmkhatri, V. P., Prasanna, C. and Atreya, H. S. (2015). Insulin-like growth factor system in cancer: novel targeted therapies. *Biomed Res Int.* 538019.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J. and Forman, D. (2012). Global cancer transitions according to the human development index (2008-2030): A population-based study. *Lancet Oncol* 13, 790-801.
- Bronger, H., König, J., Kopplow, K., Steiner, H.-H., Ahmadi, R., Herold-Mende, C. and Nies, A. T. (2005). ABC Drug Efflux Pumps and Organic Anion Uptake Transporters in Human Gliomas and the Blood-Tumor Barrier. *Cancer Research*, 65(24), 11419–11428.
- Brosh, R. and Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 9, 701–713.
- Brown, J. M. and Attardi, L. D. (2005). The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer*. 5(3):231-237.
- Bogaert, J. and Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of gastroenterology*, 27(1), 9–14.
- Borek, C. (2004). Dietary antioxidants and human cancer. *Integr Cancer Ther*, 3(4), 333-341.
- Borst, P., Zelcer, N. and van Helvoort, A. (2000). ABC transporters in lipid transport. *Biochim Biophys Acta*. 1486(1):128-144.
- Boumendjel, A., Florin, A. and Boutonnat, J. (2009). Reversal agents of multidrug resistance mediated by multidrug resistance-associated proteins (MRPs) In: Boumendjel A., Boutonnat J., Robert J., editors. ABC Transporters and Multidrug Resistance. John Wiley & Sons Inc; Hoboken, NJ: pp. 261–288.
- Bowden, G. T., Schneider, B., Domann, R. and Kulesz-Martin, M. (1994). Oncogene activation and tumor suppressor gene inactivation during multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer research*, 54(7), 1882–1885.
- Bozkurt, E., Atmaca, H. and Uzunoğlu, S. (2013). Glioblastoma tümörlerinde çoklu ilaç direnci, *Genel Tıp Dergisi*, 23, 133-43.
- Burz, C., Berindan-Neagoe, I., Balacescu, O. and Irimie, A. (2009). Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 48(6), 811–821.
- Calcagno, A. M., and Ambudkar, S. V. (2010). Molecular mechanisms of drug resistance in single-step and multi-step drug-selected cancer cells. *Methods Mol Biol*, 596, 77-93.
- Campling, B. G. and el-Deiry, W. S. (2003). Clinical implications of p53 mutations in lung cancer. *Methods in molecular medicine*, 75, 53–77.

- Cancer Genome Atlas Research Network (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487, 330-337.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517), 202-209.
- Cao, X., Sun, Z., Cao, Y., Wang, R., Cai, T., Chu, W., Hu, W. and Yang, Y. (2014). Design, Synthesis, and Structure Activity Relationship Studies of Novel Fused Heterocycles-Linked Triazoles with Good Activity and Water Solubility. *J. Med. Chem.* 57, 3687-3706.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer research*, 47(4), 936-942.
- Chaffer, C. L. and Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(6024), 1559-1564.
- Chambers, A. F., Groom, A. C. and MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews. Cancer*, 2(8), 563-572.
- Chandrappa, C.P., Govindappa, M., Kumar, N.V., Channabasava, R., Sadananda, T.S. and Sharanappa, P. (2014). *In Vitro* Anticancer Activity of Quercetin Isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam on Human Hepatoma Cell Line (Hepg2), *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 9(6), 85-91.
- Chandrashekar, P., Ahmadinejad, N., Wang, J., Sekulic, A., Egan, J. B., Asmann, Y. W. and Liu, L. (2020). Somatic selection distinguishes oncogenes and tumor suppressor genes. *Bioinformatics*, 36(6), 1712-1717.
- Chearwae, W., Shukla, S., Limtrakul, P. and Ambudkar, S. V. (2006). Modulation of the function of the multidrug resistance-linked ATP-binding cassette transporter ABCG2 by the cancer chemopreventive agent curcumin. *Mol Cancer Ther*, 5(8), 1995-2006.
- Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I. and Browning, J. L. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 272(51), 32401-32410.
- Chinery, R., Brockman J.A., Peeler M.O., Shyr, Y., Beauchamp, R.D. and Coffey., R.J. (1997). Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal cancer: a p53-independent induction of p21WAF1/CIP1 via C/EBP β . *Nat Med* 3, 1233-124.
- Chiu, C. H., Lei, K. F., Yeh, W. L., Chen, P., Chan, Y. S., Hsu, K. Y. and Chen, A. C. Y. (2017). Comparison between xCELLigence biosensor technology and conventional cell culture system for real-time monitoring human tenocytes proliferation and drugs cytotoxicity screening. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 12(1), 149.
- Choi, C. H. (2005). ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int*, 5, 30.

- Church, J. (2016). Molecular genetics of colorectal cancer. *Seminars in Colon and Rectal Surgery*, 27(4), 172-175.
- Cifarelli, V., Luppi, P., Tse, H.M., He, J., Piganelli, J. and Trucco, M. (2008). Human proinsulin Cpeptide reduces high glucose-induced proliferation and NF- κ B activation in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 201, 248–57.
- Cincin, Z. B., Unlu, M., Kiran, B., Bireller, E. S., Baran, Y. and Cakmakoglu, B. (2015). Apoptotic Effects of Quercitrin on DLD-1 Colon Cancer Cell Line. *Pathol Oncol Res*, 21(2), 333-338.
- Ciocca, D. R., Clark, G. M., Tandon, A. K, Fuqua, S. A, Welch, W. J. and McGuire, W. L. (1993). Heat shock protein HSP70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst*; 85, 570-574.
- Collins, K., Jacks, T. and Pavletich, N. P. (1997). The cell cycle and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 2776–2778.
- Collins, A., and Politopoulos, I. (2011). The genetics of breast cancer: risk factors for disease. *Appl Clin Genet*, 4, 11-19.
- Cooray, H. C., Blackmore, C. G., Maskell, L. and Barrand, M. A. (2002). Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport*, 13(16), 2059–2063.
- Cort, A., Özben, T., Saso, L., De Luca, C. and Korkina, L. (2016). Redox Control of Multidrug Resistance and Its Possible Modulation by Antioxidants, *Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 17. 4251912.
- Cuadrado, M., Gutierrez-Martinez, P., Swat, A., Nebreda, A. R. and Fernandez-Capetillo, O. (2009). p27Kip1 stabilization is essential for the maintenance of cell cycle arrest in response to DNA damage. *Cancer research*, 69(22), 8726-8732.
- Cusanelli, E. and Chartrand, P. (2015). Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity. *Frontiers in Genetics*, 6. 143.
- Dahse, R., Fiedler, W. and Ernst, G. (1997). Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. *Clinical Chemistry*, 43(5), 708-714.
- Danial, N. N. (2007). BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(24), 7254–7263.
- Davoli, T., Xu, A. W., Mengwasser, K. E., Sack, L. M., Yoon, J. C., Park, P. J. and Elledge, S. J. (2013). Cumulative haploinsufficiency and triplosensitivity drive aneuploidy patterns and shape the cancer genome. *Cell*, 155(4), 948-962.

- Dean, M., Rzhetsky, A. and Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome research*, 11(7), 1156–1166.
- Debatin, K. M. (2004). Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 53(3), 153-159.
- Decker, E.A. and Welch, B. (1990) Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38, 674-677.
- Delafontaine, P., Song, Y. H. and Li, Y. (2004). Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(3), 435-444.
- De Rosa, M., Pace, U., Rega, D., Costabile, V., Duraturo, F., Izzo, P. and Delrio, P. (2015). Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*, 34(3), 1087-1096.
- Dennis, J. L., Vass, J. K., Wit, E. C., Keith, W. N. and Oien, K. A. (2002). Identification from public data of molecular markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin. *Cancer research*, 62(21), 5999-6005.
- DeSantis, C., Siegel, R. and Jemal, A. (2014). Cancer treatment and survivorship: facts and figures 2014–2015. *American Cancer Society*, 2015, 3-6.
- DeVita, V. T., Lawrence, T. S. and Rosenberg, S. A. (2012). *Cancer: principles & practice of oncology: primer of the molecular biology of cancer*. Lippincott Williams & Wilkins.
- De Vita, F., Riccardi, M., Malanga, D., Scrima, M., De Marco, C. and Viglietto, G. (2012). PKC-dependent phosphorylation of p27 at T198 contributes to p27 stabilization and cell cycle arrest. *Cell cycle*, 11(8), 1583-1592.
- Domenichini, A., Adamska, A. and Falasca, M. (2019). ABC transporters as cancer drivers: Potential functions in cancer development. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1863(1), 52-60.
- Dondas, H. A., Grigg, R. and Kilner, C. (2003). X = Y = ZH systems as potential 1,3-dipoles. Part 58: cycloaddition route to chiral conformationally constrained (R)-pro-(S)-pro peptidomimetics, *Tetrahedron*, 59 (43), 8481–8487.
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K. and Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15665–15670.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1), 33–42.
- Duesberg, P. and McCormack, A. (2013). Immortality of cancers: a consequence of inherent karyotypic variations and selections for autonomy. *Cell Cycle*, 12(5), 783-802.

- Duffy, M. J., McGowan, P. M. and Gallagher, W. M. (2008). Cancer invasion and metastasis: changing views. *The Journal of pathology*, 214(3), 283-293.
- Dunlop, R. J. and Campbell, C. W. (2000). Cytokines and advanced cancer. *Journal of pain and symptom management*, 20(3), 214-232.
- Edler, L. and Kopp-Schneider, A. (2005). Origins of the mutational origin of cancer. *International journal of epidemiology*, 34(5), 1168-1170.
- Ekmekçi, Y., Tanyolac, D. and Ayhan, B. (2008). Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *Journal of plant physiology*, 165(6), 600-611.
- Eletto, D., Dersh, D. and Argon, Y. (2010). GRP94 in ER quality control and stress responses. *In Seminars in cell & developmental biology* 21 (5), 479-485.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Enders, D., Braig, V. and Raabe, G. (2001). Asymmetric synthesis of 3-aryl-substituted 2,3-dihydro-1H-isoindol-1-ones. *Canadian Journal of Chemistry*, 79, 1528–1535.
- Erdamar, H., Hacıevliyagil Kazancı, F. ve Gök, S. (2014). Kanserde Biyokimyasal Değişiklikler, *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 5(3): 430-438.
- Fan, Y., Dutta, J., Gupta, N., Fan, G. and Gélinas, C. (2008). Regulation of Programmed Cell Death by NF- κ B and its Role in Tumorigenesis and Therapy. *Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy*, 223–250.
- Fan, Y. F., Zhang, W., Zeng, L., Lei, Z. N., Cai, C. Y., Gupta, P. and Trombetta, L. D. (2018). Dacomitinib antagonizes multidrug resistance (MDR) in cancer cells by inhibiting the efflux activity of ABCB1 and ABCG2 transporters. *Cancer Lett*, 421, 186-198.
- Fehrmann, R. S., Karjalainen, J. M., Krajewska, M., Westra, H. J., Maloney, D., Simeonov, A. and van Haagen, H. H. (2015). Gene expression analysis identifies global gene dosage sensitivity in cancer. *Nature genetics*, 47(2), 115.
- Ferguson, L. R., Chen, H., Collins, A. R., Connell, M., Damia, G., Dasgupta, S. and Maxwell, C. A. (2015). Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Semin Cancer Biol*, 35, 5-24.
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews cancer*, 3(6), 453-458.
- Figuroa-González, G., Jacobo-Herrera, N., Zentella-Dehesa, A. and Pereda-Miranda, R. (2012). Reversal of multidrug resistance by morning glory resin glycosides in human breast cancer cells. *Journal of natural products*, 75(1), 93-97.

- Florento, L., Matias, R., Tuaño, E., Santiago, K., dela Cruz, F. and Tuazon, A. (2012). Comparison of cytotoxic activity of anticancer drugs against various human tumor cell lines using in vitro cell-based approach. *International journal of biomedical science: IJBS*, 8(1), 76.
- Forte, M. and Bernardi, P. (2006). The permeability transition and BCL-2 family proteins in apoptosis: co-conspirators or independent agents?. *Cell death and differentiation*, 13(8), 1287–1290.
- Foster, I. (2008). Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 14(2), 144-149.
- Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A. G. and Panayiotidis, M. I. (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer letters*, 266(1), 6–11.
- Fuchs, C. S., Giovannucci, E. L., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Speizer, F. E. and Willett, W. C. (1994). A Prospective Study of Family History and the Risk of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 331(25), 1669–1674.
- Fuchs-Tarlovsky, V. (2013). Role of antioxidants in cancer therapy. *Nutrition*, 29(1), 15-21.
- Fulda, S. (2013). How to target apoptosis signaling pathways for the treatment of pediatric cancers. *Front Oncol*, 3, 22.
- Fuller, K.J., Issels, R.D., Slosman, D.O., Guillet, J.G., Soussi, T. and Polla, B.S. (1994). Cancer and the heat shock response. *Eur J Cancer*. 30, 1884–1891.
- Galaris, D., Skiada, V. and Barbouti, A. (2008). Redox signaling and cancer: the role of "labile" iron. *Cancer letters*, 266(1), 21–29.
- Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L. and Kroemer, G. (2001). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 286(3), 433–442.
- Gedikli, S. (2013), *Melatoninin Mcf-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun ve Sitotoksitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Mtt Hücre Canlılık Testi ve İmmünitokimya Yöntemleriyle Araştırılması*, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Gerstein, A. C. and Otto, S. P. (2009). Ploidy and the causes of genomic evolution. *Journal of Heredity*, 100(5), 571-581.
- Giofrè, S. V., Cirimi, S., Mancuso, R., Nicolò, F., Lanza, G., Legnani, L. and Romeo, R. (2016). Synthesis of spiro [isoindole-1, 5'-isoxazolidin]-3 (2H)-ones as potential inhibitors of the MDM2-p53 interaction. *Beilstein journal of organic chemistry*, 12(1), 2793-2807.
- Gottesman, M. M., Fojo, T. and Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 48-58.

- Granados-Romero, J. J., Valderrama-Treviño, A. I., Contreras-Flores, E. H., Barrera-Mera, B., Herrera Enríquez, M., Uriarte-Ruíz, K. and Arauz-Peña, G. (2017). Colorectal cancer: a review. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 5(11).
- Greaves, M. and Maley, C. C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), 306-313.
- Green, D. R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*, 94(6), 695-698.
- Gupta, M., (2015). Heterocyclic Compounds and their Biological Significance: A Review *Int. J. Physical, Chem. Mat. Sci.*, 4(1), 21-24.
- Gupta, P., Zhang, Y. K., Zhang, X. Y., Wang, Y. J., Lu, K. W., Hall, T. and Chen, Z. S. (2018). Voruciclib, a Potent CDK4/6 Inhibitor, Antagonizes ABCB1 and ABCG2-Mediated Multi-Drug Resistance in Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem*, 45(4), 1515-1528.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Harms-Ringdahl, M., Nicotera, P. and Radford, I. R. (1996). Radiation induced apoptosis. *Mutation Res.*, 366, 171-179.
- Harvey. A. L., 1998. Advances in Drug Discovery Techniques, *John Wiley and Sons*, West Sussex, England, 50-153.
- Hati, S., Tripathy, S., Dutta, P. K., Agarwal, R., Srinivasan, R., Singh, A. and Sen, S. (2016). Spiro [pyrrolidine-3, 3-oxindole] as potent anti-breast cancer compounds: Their design, synthesis, biological evaluation and cellular target identification. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.
- He, X., Wang, J., Wei, W., Shi, M., Xin, B. and Zhang, T. (2016). Hypoxia regulates ABCG2 activity through the activation of ERK1/2/HIF-1 α and contributes to chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 17, 188–98.
- Heaney, A. P. and Melmed, S. (2005). Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Tumorigenesis of the Endocrine System. *In Endocrinology*. 301-309.
- Hemminki, K. and Czene, K. (2002). Attributable risks of familial cancer from the Family-Cancer Database. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 11(12), 1638-1644.
- Hersey, P., Zhuang, L. and Zhang, X. D. (2006). Current strategies in overcoming resistance of cancer cells to apoptosis melanoma as a model. *International review of cytology*, 251, 131-158.
- Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M. and Martin, S. J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO journal*, 23(10), 2134-2145.

- Hopkins, A. L. and Groom, C. R. (2002). The druggable genome. *Nature reviews Drug discovery*, 1(9), 727-730.
- Hopper, E., Belinsky, M. G., Zeng, H., Tosolini, A., Testa, J. R. and Kruh, G. D. (2001). Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer letters*, 162(2), 181–191.
- Hu, T., Li, Z., Gao, C. Y. and Cho, C. H. (2016). Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World journal of gastroenterology*, 22(30), 6876–6889.
- Huang, Y., Huang, Y. X., Sun, J. and Yan, C. G. (2019). A [3+ 2] cycloaddition reaction for the synthesis of spiro [indoline-3, 3'-pyrrolidines] and evaluation of cytotoxicity towards cancer cells. *New Journal of Chemistry*, 43(23), 8903-8910.
- Iams, W. T. and Lovly, C. M. (2015). Molecular Pathways: Clinical Applications and Future Direction of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Pathway Blockade. *Clin Cancer Res.* 21, 4270–4277.
- Ingvarsson, S. (2004). Genetics of breast cancer. *Drugs of Today*, 40(12), 991-1002.
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y. and Ueno, K. (1996). A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 19(11), 1518–1520.
- Iannaccone, P. M., Weinberg, W. C. and Deamant, F. D. (1987). On the clonal origin of tumors: A review of experimental models. *International Journal of Cancer*, 39(6), 778–784.
- İlbey, Y. O., Ozbek, E., Simsek, A., Cekmen, M., Otunctemur, A. and Somay, A. (2009). Chemoprotective Effect of a Nuclear Factor- κ B Inhibitor, Pyrrolidine Dithiocarbamate, Against Cisplatin-Induced Testicular Damage in Rats. *Journal of andrology*, 30(5), 505-514.
- İnternet: Heterohalkalı bileşikler URL: <https://berrchem.com/intermediates/heterocyclic.html>.
Son Erişim Tarihi: 05.05.2020
- İnternet: Normal ve kanserli hücre çoğalma mekanizması URL: <https://dogalbitkiselorganiksaglik.blogspot.com.tr/2015/10/kanserhakkndahersey.html>.
Son Erişim Tarihi: 05.05.2020
- İnternet: Kanser hücresi URL: <http://www.dailymail.co.uk/health/article-2402396/Monster-inside-body-How-does-single-rogue-cell-turn-deadly-cancer.html>. Son Erişim Tarihi: 05.05.2020
- İnternet: Normal ve kanser hücresi arasındaki farklar URL: http://www.primadonastems.com/wpcontent/uploads/2016/02/The_Difference_Between_Normal_And_Cancer_Cells.jpg. Son Erişim Tarihi: 05.05.2020
- İnternet: Kanser metastaz oluşumu URL: <http://www.cancerhelpline.in/how-cancer-grows>. Son Erişim Tarihi: 05.05.2020

İnternet: Tümör oluşumu URL: <http://www.cancerhelpline.in/how-cancer-grows>. Son Erişim Tarihi: 05.05.2020

İnternet: Meme Kanseri anatomisi URL: <https://www.drozdogan.com/meme-kanseri-belirtileri-eyreleri-ve-tedavisi>. Son Erişim Tarihi: 05.05.2020

İnternet: Kolon Kanseri anatomisi URL: <https://flashresim.com/blog/saglik/kolon-kanseri-belirtileri-ve-tedavisi>. Son Erişim Tarihi: 05.05.2020

İnternet: Kanseri ve genetik URL: <https://www.nipd.com/products/oncology/presentia>. Son Erişim Tarihi: 05.05.2020

İnternet: Kanseri ve Metastaz URL: <https://www.shutterstock.com/tr/image-vector/primary-lung-cancers-metastasis-liver-430612987>. Son Erişim Tarihi: 05.05.2020

İnternet: Hücre döngüsü kontrol noktaları URL: <http://beta.bdbiosciences.com/br/research/apoptosis/analysis>. Son Erişim Tarihi: 05.05.2020

İnternet: Hücre membranının genel yapısı URL: <https://www.canlibilimi.com/hucre-zari-ve-hucre-zarinin-gorevleri>. Son Erişim Tarihi: 05.05.2020

İnternet: İnsan ABC protein envanteri (ilaç araştırması yapılan) URL: <http://local.biochemistry.utoronto.ca/staglar/research>. Son Erişim Tarihi: 05.05.2020

İnternet: Apoptoz ve dışsal yollar URL: <https://www.creative-diagnostics.com/extrinsic-apoptosis-pathway.htm>. Son Erişim Tarihi: 05.05.2020

İnternet: Apoptoz ve içsel yollar URL: <https://www.creative-diagnostics.com/intrinsic-apoptosis-pathway.htm>. Son Erişim Tarihi: 05.05.2020

İnternet: Apoptotik sinyal yolları URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>. Son Erişim Tarihi: 05.05.2020

Jafri, M. A., Ansari, S. A., Alqahtani, M. H. and Shay, J. W. (2016). Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med*, 8(1), 69.

Jambunathan, S., Bangarusamy, D., Padma, P. R. and Sundaravadivelu, S. (2014). Cytotoxic activity of the methanolic extract of leaves and rhizomes of *Curcuma amada* Roxb against breast cancer cell lines. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 7, S405-S409.

Jan, R. and Chaudhry, G. E. (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull*, 9(2), 205-218.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90.

- Jia, P. and Zhao, Z. (2019). Characterization of Tumor-Suppressor Gene Inactivation Events in 33 Cancer Types. *Cell Rep*, 26(2), 496-506 e493.
- Jiao, Y., Watts, T., Xue, J., Hannafon, B. and Ding, W. Q. (2018). Sorafenib and docosahexaenoic acid act in synergy to suppress cancer cell viability: a role of heme oxygenase 1. *BMC cancer*, 18(1), 1042.
- Jolly, C. and Morimoto, R. I. (2000). Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(19), 1564-1572.
- Jovceviski, B., Kelly, M. A., Rote, A. P., Berg, T., Gastall, H. Y., Benesch, J. L. and Ecroyd, H. (2015). Phosphomimics destabilize Hsp27 oligomeric assemblies and enhance chaperone activity. *Chemistry & biology*, 22(2), 186-195.
- Juliano, R. L. and Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 455(1), 152-162.
- Kadkol, H., Jain, V. and Patil, A. (2019). Multi Drug Resistance in Cancer Therapy-An Overview. *Journal of Critical Reviews*, 1-6.
- Karabulut, H. and Gülay, M. Ş. (2016). Antioxidants. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1(1), 65-76.
- Karna, P. and Yang, L. (2009). Apoptotic signaling pathway and resistance to apoptosis in breast cancer stem cells. In *Apoptosis in Carcinogenesis and Chemotherapy*, 1-23.
- Karvar, S. (2014). The role of ABC transporters in anticancer drug transport. *Turkish Journal of Biology*, 38, 800-805.
- Katoh, M. and Terada, M. (1993). Oncogenes and tumor suppressor genes. In *Gastric cancer*, 196-208.
- Kaufmann, S. H. (1990). Heat shock proteins and the immune response. *Immunology today*, 11, 129-136.
- Kavianpour, M., Ahmadzadeh, A., Shahrabi, S. and Saki, N. (2016). Significance of oncogenes and tumor suppressor genes in AML prognosis. *Tumour Biol*, 37(8), 10041-10052.
- Kenemans, P., Verstraeten, R. A. and Verheijen, R. H. (2004). Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*, 49(1), 34-43.
- Kerr, J. F. (1972). wyllie ah, Currie ar. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-257.
- Khan, N., Afaq, F. and Mukhtar, H. (2008). Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxidants & redox signaling*, 10(3), 475-510.

- Kim, P. K., Mahidara, R. and Seolo, W. (2001). The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat.* 5, 293-296.
- Kirsch, D. G. and Kastan, M. B. (1998). Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *Journal of clinical oncology*, 16(9), 3158-3168.
- Klaunig, J. E. and Kamendulis, L. M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 239-267.
- Klein, G. (1988). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Acta Oncol*, 27(4), 427-437.
- Klevos, G. A., Ezuddin, N. S., Vinyard, A., Ghaddar, T., Gort, T., Almuna, A. and Welsh, C. F. (2017). A Breast Cancer Review: Through the Eyes of the Doctor, Nurse, and Patient. *Journal of Radiology Nursing*, 36(3), 158-165.
- Koch, S., Mayer, F., Honecker, F., Schittenhelm, M. and Bokemeyer, C. (2003). Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions in vitro. *British journal of cancer*, 89(11), 2133-2139.
- Kopin, B. P. (2000). Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry. Biokhimiia*, 65(1), 2-27.
- Kowluru, R. A. and Chan, P. S. (2007). Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Experimental diabetes research*, 2007, 43603.
- Kruh, G. D., Guo, Y., Hopper-Borge, E., Belinsky, M. G. and Chen, Z. S. (2007). ABCC10, ABCC11, and ABCC12. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 453(5), 675-684.
- Kuang, Y. H., Shen, T., Chen, X., Sodani, K., Hopper-Borge, E., Tiwari, A. K. and Chen, Z. S. (2010). Lapatinib and erlotinib are potent reversal agents for MRP7 (ABCC10)-mediated multidrug resistance. *Biochemical pharmacology*, 79(2), 154-161.
- Kumar, R. S., Almansour, A. I., Arumugam, N., Mohammad, F., Kotresha, D. and Menéndez, J. C. (2019). Spirooxindole-pyrrolidine heterocyclic hybrids promotes apoptosis through activation of caspase-3. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 27(12), 2487-2498.
- Kuo, M. T. (2007). Roles of multidrug resistance genes in breast cancer chemoresistance. *In Breast Cancer Chemosensitivity*, 23-30.
- Küçüköner, M. ve Işıkdöğün, A. (2013). Kanser tedavisinde mTOR sinyal yolu ve mTOR inhibitörleri/mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Dicle Tip Dergisi*, 40(1), 156.
- Labianca, R., Beretta, G., Gatta, G., de Braud, F., and Wils, J. (2004). Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 51(2), 145-170.
- Lang, Z., Wu, Y., Pan, X., Qu, G. and Zhang, T. (2018). Study of differential gene expression between invasive multifocal/multicentric and unifocal breast cancer, *JBUON*, 23(1): 134-142.

- Larsson, P., Engqvist, H., Biermann, J., Rönnerman, E. W., Forssell-Aronsson, E., Kovács, A. and Parris, T. Z. (2020). optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.
- Lazebnik, Y. (2010). What are the hallmarks of cancer?. *Nature Reviews Cancer*, 10(4), 232-233.
- Leal-Esteban, L. C. and Fajas, L. (2020). Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 165715.
- Lebret, T., William, R., Watson, G. and Fitzpatrick, J. M. (2003). Heat shock proteins: their role in urological tumors. *The Journal of urology*, 169(1), 338-346.
- Lebret, T., Watson, R. W. G., Molinié, V., O'Neill, A., Gabriel, C., Fitzpatrick, J. M. and Botto, H. (2003). Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 98(5), 970-977.
- Lee, E. Y. and Muller, W. J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(10), a003236.
- Lee, M.V., Katabathina, V.S., Bowerson, M.L., Mityul, M.I., Shetty, A.S. and Elsayes, K.M. (2017). BRCA-associated cancers: Role of imaging in screening, diagnosis, and management. *Radiographics*, 37, 1005-1023.
- Lee, H. J., Wang, C. J., Kuo, H. C., Chou, F. P., Jean, L. F. and Tseng, T. H. (2005). Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicology and applied pharmacology*, 203(2), 124-131.
- Leggas, M., Adachi, M., Scheffer, G. L., Sun, D., Wielinga, P., Du, G. and Scheper, R. J. (2004). Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. *Molecular and cellular biology*, 24(17), 7612-7621.
- Leighton, J. C. and Goldstein, L. J. (1995). P-glycoprotein in adult solid tumors: expression and prognostic significance. *Hematology/Oncology Clinics*, 9(2), 251-274.
- Leo, R., Therachiyil, L., Siveen, S. K., Uddin, S., Kulinski, M., Buddenkotte, J. and Krishnankutty, R. (2019). Protein Expression Profiling Identifies Key Proteins and Pathways Involved in Growth Inhibitory Effects Exerted by Guggulsterone in Human Colorectal Cancer Cells. *Cancers*, 11(10), 1478.
- Letai, A. (2017). Apoptosis and Cancer. *Annual Review of Cancer Biology*, 1(1), 275-294.
- Levine, A. J., Momand, J. and Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 351(6326), 453-456.
- Libson, S. and Lippman, M. (2014). A review of clinical aspects of breast cancer. *Int Rev Psychiatry*, 26(1), 4-15.

- Lim, S. O., Park, S. J., Kim, W., Park, S. G., Kim, H. J., Kim, Y. I. and Jung, G. (2002). Proteome analysis of hepatocellular carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 291(4), 1031-1037.
- Lindquist, S. and Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, 22(1), 631-677.
- Little, E., Ramakrishnan, M., Roy, B., Gazit, G. and Lee, A. S. (1994). The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 4(1), 1-18.
- Liu, H., Liu, Y. and Zhang, J. T. (2008). A new mechanism of drug resistance in breast cancer cells: fatty acid synthase overexpression-mediated palmitate overproduction. *Mol Cancer Ther*, 7(2), 263-270.
- Liu, J., Wang, L., Guo, N., Teng, Y. and Yu, P. (2014). Design, synthesis and biological evaluation of the novel isoindolinone derivatives. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(9):256-260.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A. and Matsudaira, P. (2008). *Molecular cell biology*. New York: W.H. Freeman MacMillan.1280.
- López-Lázaro, M. (2018). The stem cell division theory of cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 123, 95-113.
- Lu, T., Wang, Y., Xu, K., Zhou, Z., Gong, J., Zhang, Y. and Song, Z. (2019). Co-downregulation of GRP78 and GRP94 induces apoptosis and inhibits migration in prostate cancer cells. *Open Life Sciences*, 14(1), 384-391.
- Lukaszewicz, K., Wtorek, J., Bujnowski, A. and Skokowski, J. (2010). Monitoring of breast tissue thermo-ablation by means of impedance measurements. *J Physics: Conference Series*, IOP Publishing, pp 1-4.
- Lun, Z. R., Lai, D. H., Wen, Y. Z., Zheng, L. L., Shen, J. L., Yang, T. B. and Ayala, F. J. (2015). Cancer in the parasitic protozoans *Trypanosoma brucei* and *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(29), 8835-8842.
- Luo, J. L., Kamata, H. and Karin, M. (2005). IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest*, 115(10), 2625-2632.
- Ma, Y. and Hendershot, L. M. (2004). The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe?. *Nature Reviews Cancer*, 4(12), 966-977.
- Maliepaard, M., Scheffer, G. L., Faneyte, I. F., van Gastelen, M. A., Pijnenborg, A. C., Schinkel, A. H. and Schellens, J. H. (2001). Subcellular localization and distribution of

- the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer research*, 61(8), 3458-3464.
- Marchetti, S., Mazzanti, R., Beijnen, J. H. and Schellens, J. H. (2007). Concise review: Clinical relevance of drug drug and herb drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Oncologist*, 12(8), 927-941.
- Martín, M., Rodríguez-Lescure, A., Ruiz, A., Alba, E., Calvo, L., Ruiz-Borrego, M., Santaballa, A., Rodríguez, C. A., Crespo, C., Abad, M., Domínguez, S., Florián, J., Llorca, C., Méndez, M., Godes, M., Cubedo, R., Murias, A., Batista, N., García, M. J., Caballero, R. and de Alava, E. (2010). Molecular predictors of efficacy of adjuvant weekly paclitaxel in early breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 123(1), 149–157.
- Martinez-Serra, J., Gutierrez, A., Muñoz-Capó, S., Navarro-Palou, M., Ros, T., Amat, J. C. and Gines, J. (2014). xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies. *OncoTargets and therapy*, 7, 985.
- Martins, P., Jesus, J., Santos, S., Raposo, L. R., Roma-Rodrigues, C., Baptista, P. V. and Fernandes, A. R. (2015). Heterocyclic Anticancer Compounds: Recent Advances and the Paradigm Shift towards the Use of Nanomedicine's Tool Box. *Molecules*, 20(9), 16852-16891.
- Marzec, M., Eletto, D. and Argon, Y. (2012). GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(3), 774-787.
- Massoner, P., Ladurner-Rennau, M., Eder, I. E. and Klocker, H. (2010). Insulin-like growth factors and insulin control a multifunctional signalling network of significant importance in cancer. *Br J Cancer*. 103, 1479–1484.
- Mathias, A. A., Hitti, J. and Unadkat, J. D. (2005). P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression in human placentae of various gestational ages. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(4), R963-R969.
- Matsuo, H., Takada, T., Ichida, K., Nakamura, T., Nakayama, A., Suzuki, H. and Shinomiya, N. (2011). ABCG2/BCRP dysfunction as a major cause of gout. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 30(12), 1117-1128.
- Matsumoto, T., Shimizu, T., Takai, A. and Marusawa, H. (2015). Exploring the Mechanisms of Gastrointestinal Cancer Development Using Deep Sequencing Analysis. *Cancers*, 7(2), 1037–1051.
- Maurya, A. K. and Vinayak, M. (2015). Anticarcinogenic action of quercetin by downregulation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase C (PKC) via induction of p53 in hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Molecular biology reports*, 42(9), 1419-1429.
- McClintock, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics*, 26(2), 234.

- McDonnell, T. J., Meyn, R. E. and Robertson, L. E. (1995). Implications of apoptotic cell death regulation in cancer therapy. *In Seminars in cancer biology* 6(1), 53-60.
- Meeran, S. M. and Katiyar, S. K. (2008). Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, 2191–2202.
- Meller, R., Skradski, S. L., Simon, R. P. and Henshall, D. C. (2002). Expression, proteolysis and activation of caspases 6 and 7 during rat C6 glioma cell apoptosis. *Neuroscience letters*, 324(1), 33-36.
- Métifiot, M., Maddali, K., Johnson, B. C., Hare, S., Smith, S. J., Zhao, X. Z. and Pommier, Y. (2012). Activities, Crystal Structures, and Molecular Dynamics of Dihydro-1H-isoindole Derivatives, Inhibitors of HIV-1 Integrase. *ACS Chemical Biology*, 8(1), 209–217.
- Min, R., Wu, W., Wang, M., Tang, L., Chen, D., Zhao, H. and Jiang, Y. (2019). Discovery of 2-(1-(3-(4-Chloroxyphenyl)-3-oxo-propyl) pyrrolidine-3-yl)-1H-benzo [d] imidazole-4-carboxamide: A Potent Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor for Treatment of Cancer. *Molecules*, 24(10), 1901.
- Mohan, S. and Baylink, D. J. (2002). Beyond carrier proteins: IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and-independent mechanisms. *J endocrinol*, 175, 19-31.
- Mohan, S., Abdelwahab, S. I., Cheah, S. C., Sukari, M. A., Syam, S., Shamsuddin, N. and Rais Mustafa, M. (2013). Apoptosis effect of girinimbine isolated from *Murraya koenigii* on lung cancer cells *in vitro*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Molinari, M. (2000). Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell proliferation*, 33(5), 261-274.
- Moniri, M. R., Young, A., Reinheimer, K., Rayat, J., Dai, L. J. and Warnock, G. L. (2015). Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology*, 67(2), 379-386.
- Morais, C., Pat, B., Gobe, G., Johnson, D. W. and Healy, H. (2006). Pyrrolidine dithiocarbamate exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects in renal cell carcinoma cell lines. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(12), 3377-3388.
- Morris, L. G. and Chan, T. A. (2015). Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer*, 121(9), 1357-1368.
- Mosser, D. D. and Morimoto, R. I. (2004). Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene*, 23(16), 2907-2918.
- Muller, H. J. (1938). The remaking of chromosomes. *Collecting net*, 13, 181-198.

- Muşdal, Y. (2012). *Özgün Heterosiklik Bileşiklerin Glutatyon Transferaz P1-1 İnhibitörleri Olarak Araştırılması ve İnsan Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi*, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Mycek, M. J., Finkel, R., Clark, M. A., Cubeddu, L. X. and Howland, R. D. (2000). *Pharmacology*. Philadelphia, Pa.: *Lippincott Williams & Wilkins*, pp 564.
- Nicolson, G. L. (1982). Cancer metastasis: Organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 695(2), 113-176.
- Nicolson, G. L. (2015). Cell membrane fluid-mosaic structure and cancer metastasis. *Cancer Res*, 75(7), 1169-1176.
- Nirwan, N., Pareek, C. and Chohadia, A. (2015). Role of Nitrogen-Containing Natural Heterocyclic Compounds in Medical Science: A Mini Review. *IJSRST*, 1(1), 76-84.
- Nuñez, G., Benedict, M. A., Hu, Y. and Inohara, N. (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, 17(25), 3237-3245.
- N'ajera, C. and Sansano, J. M. 2009. "1,3-dipolar cycloadditions: applications to the synthesis of antiviral agents," *Organic and Biomolecular Chemistry*, vol. 7, no. 22, pp. 4567–4581.
- Okamoto, K. and Seimiya, H. (2019). Revisiting Telomere Shortening in Cancer. *Cells*, 8(2).
- Olson, J. M. and Hallahan, A. R. (2004). p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends in molecular medicine*, 10(3), 125-129.
- Olsson, M., Wapstra, E. and Friesen, C. R. (2018). Evolutionary ecology of telomeres: a review. *Ann N Y Acad Sci*, 1422(1), 5-28.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.
- O'Neill, K. L., Huang, K., Zhang, J., Chen, Y. and Luo, X. (2016). Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane. *Genes & development*, 30(8), 973-988.
- Öncel, M. (2012). Isı şok proteinleri ve kanser. *Eur J Basic Med Sci*, 2(1), 16-23.
- Öztürk, E., Arslan, A. K. K., Dokumacı, A. H. and Mükerrerem, B. Y. (2018). Real-time analysis of impedance alterations by the effects of vanadium pentoxide on several carcinoma cell lines. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 1-6.
- Paduch, R. (2016). The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. *Cellular Oncology*, 39(5), 397–410.
- Pala Kara, Z. P., Oztürk, N., Oztürk, D. and Okyar, A. (2013). ABC transporters: circadian rhythms and sex-related differences. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 3(1), 1-13.

- Parrish, A. B., Freel, C. D. and Kornbluth, S. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6), a008672.
- Pascal, L. E., Wang, Y., Zhong, M., Wang, D., Chakka, A. B., Yang, Z. and Wang, Z. (2018). EAF2 and p53 Co-Regulate STAT3 Activation in Prostate Cancer. *Neoplasia*, 20(4), 351–363.
- Pavelic, K. and Gall-Troselj, K. (2001). Recent advances in molecular genetics of breast cancer. *J Mol Med (Berl)*, 79(10), 566-573.
- Peng, X. X., Shi, Z., Tiwari, A. K., Damaraju, V. L., Fu, L., Cass, C. E. and Chen, Z. S. (2011). Up-regulation of P-glycoprotein confers acquired resistance to 6-mercaptopurine in human chronic myeloid leukemia cells. *Oncology letters*, 2(3), 549-556.
- Perry, M. E. (2010). The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(1), a000968.
- Pfeffer, C. M., and Singh, A. T. K. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*, 19(2).
- Pham-Huy, L. A., He, H. and Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.
- Plati, J., Bucur, O. and Khosravi-Far, R. (2011). Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb)*, 3(4), 279-296.
- Pohl, A., Devaux, P. F. and Herrmann, A. (2005). Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1733(1), 29-52.
- Polyak, K. (2007) Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 117(11): 3155-3163.
- Pomerantz, M. M. and Freedman, M. L. (2011). The genetics of cancer risk. *Cancer J*, 17(6), 416-422.
- Poulogiannis, G., Frayling, I. M. and Arends, M. J. (2010). DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology*, 56(2), 167-179.
- Prasad, R., Sharma, M. and Rawal, M. K. (2011). Functionally Relevant Residues of Cdr1p: A Multidrug ABC Transporter of Human Pathogenic *Candida albicans*. *Journal of amino acids*, 2011, 531412.
- Qi, L. and Ding, Y. (2017). Screening of Tumor Suppressor Genes in Metastatic Colorectal Cancer. *Biomed Res Int*, 2017, 2769140.
- Rabindran, S. K., Ross, D. D., Doyle, L. A., Yang, W. and Greenberger, L. M. (2000). Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer research*, 60(1), 47-50.

- Rees, D. C., Johnson, E. and Lewinson, O. (2009). ABC transporters: the power to change. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(3), 218-227.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free radical biology and medicine*, 49(11), 1603-1616.
- Rice, H., Bryant, S., Handley, C. and Hall, M. (2014). Oncogenes and tumor suppressor genes: An essential building block of cancer. *The Chemist*, 87(2), 15.
- Riera, H., Afonso, V., Collin, P. and Lomri, A. (2015). A Central Role for JNK/AP-1 Pathway in the Pro- Oxidant Effect of Pyrrolidine Dithiocarbamate through Superoxide Dismutase 1 Gene Repression and Reactive Oxygen Species Generation in Hematopoietic Human Cancer Cell Line U937. *PLoS ONE*. 10(5): e0127571.
- Riganti, C., Giampietro, R., Kopecka, J., Costamagna, C., Abatematteo, F. S., Contino, M. and Abate, C. (2020). MRP1-Collateral Sensitizers as a Novel Therapeutic Approach in Resistant Cancer Therapy: An *In Vitro* and *In Vivo* Study in Lung Resistant Tumor. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3333.
- Robin, J. D., Ludlow, A. T., Batten, K., Magdinier, F., Stadler, G., Wagner, K. R. and Wright, W. E. (2014). Telomere position effect: regulation of gene expression with progressive telomere shortening over long distances. *Genes & development*, 28(22), 2464-2476.
- Rocchi, E., Khodjakov, A., Volk, E. L., Yang, C. H., Litman, T., Bates, S. E. and Schneider, E. (2000). The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. *Biochemical and biophysical research communications*, 271(1), 42-46.
- Salmon, W. D. and Daughaday, W. H. (1957). A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 49(6), 825-836.
- Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 10964-10967.
- Sammar, M., Abu-Farich, B., Rayan, I., Falah, M. and Rayan, A. (2019). Correlation between cytotoxicity in cancer cells and free radical-scavenging activity: In vitro evaluation of 57 medicinal and edible plant extracts. *Oncol Lett*, 18(6), 6563-6571.
- Sarkadi, B., Homolya, L., Szakács, G. and Váradi, A. (2006). Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinmunity defense system. *Physiological reviews*, 86(4), 1179-1236.
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S. and Longacre, M. (2013). Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *International journal of molecular sciences*, 14(10), 21087–21113.

- Sauna, Z. E., Smith, M. M., Müller, M., Kerr, K. M. and Ambudkar, S. V. (2001). The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 33(6), 481-491.
- Savage, S. A. (2018). Beginning at the ends: telomeres and human disease. *F1000Res*, 7.
- Schaefer, M. H. and Serrano, L. (2016). Cell type-specific properties and environment shape tissue specificity of cancer genes. *Scientific reports*, 6, 20707.
- Schimmer, A. D. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer research*, 64(20), 7183-7190.
- Schinkel, A. H. and Jonker, J. W. (2012). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 138-153.
- Schinkel, A. H., Mol, C. A. A. M., Wagenaar, E., van Deemter, L., Smit, J. J. M. and Borst, P. (1995). Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice. *European journal of cancer*, 31(7), 1295-1298.
- Schneider, G., Schmidt-Supprian, M., Rad, R. and Saur, D. (2017). Tissue-specific tumorigenesis: context matters. *Nature reviews. Cancer*, 17(4), 239–253.
- Segal, N. H. and Saltz, L. B. (2009). Evolving treatment of advanced colon cancer. *Annual review of medicine*, 60, 207-219.
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R. and De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 3(1), 91-100.
- Sen, S. and Chakraborty, R. (2011). The Role of Antioxidants in Human Health. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, 1–37.
- Sen, R., Natarajan, K., Bhullar, J., Shukla, S., Fang, H. B., Cai, L. and Baer, M. R. (2012). The novel BCR-ABL and FLT3 inhibitor ponatinib is a potent inhibitor of the MDR-associated ATP-binding cassette transporter ABCG2. *Molecular cancer therapeutics*, 11(9), 2033-2044.
- Seyfried, T. N. and Huysentruyt, L. C. (2013). On the origin of cancer metastasis. *Critical reviews in oncogenesis*, 18(1-2), 43.
- Seyfried, T. (2012). *Cancer as a metabolic disease: on the origin, management, and prevention of cancer*. John Wiley & Sons. pp 438.
- Sharma, S. V., Gajowniczek, P., Way, I. P., Lee, D. Y., Jiang, J., Yuza, Y. and Settleman, J. (2006). A common signaling cascade may underlie “addiction” to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes. *Cancer cell*, 10(5), 425-435.
- Shay, J. W. (2013). Are short telomeres predictive of advanced cancer?. *Cancer discovery*, 3(10), 1096–1098.

- Sipos, F., Szekely, H., Kis, I. D., Tulassay, Z. and Muzes, G. (2017). Relation of the IGF/IGF1R system to autophagy in colitis and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 23(46), 8109-8119.
- Sita, G., Hrelia, P., Tarozzi, A. and Morroni, F. (2017). P-glycoprotein (ABCB1) and Oxidative Stress: Focus on Alzheimer's Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 7905486.
- Sledge Jr, G. W. and Miller, K. D. (2003). Exploiting the hallmarks of cancer: the future conquest of breast cancer. *European Journal of Cancer*, 39(12), 1668-1675.
- Sleire, L., Førde, H. E., Netland, I. A., Leiss, L., Skeie, B. S. and Enger, P. Ø. (2017). Drug repurposing in cancer. *Pharmacological research*, 124, 74-91.
- Śliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., Milczarek, M., Mielczarek, S., Lubelska, K. and Flis, A. (2016). The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PloS one*, 11(5).
- Sloan, F. A. and Gelband, H. (2007). Cancer causes and risk factors and the elements of cancer control. In *Cancer Control Opportunities in Low-and Middle-Income Countries*. Washington (DC): National Academies Press (US).
- Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R. J. and Chen, Z. S. (2012). Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chinese journal of cancer*, 31(2), 58.
- Soussi, T. and Wiman, K. G. (2015). TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death & Differentiation*, 22(8), 1239-1249.
- Soylu, C. (2014). Cognitive Behavioral Therapy in Cancer Patients. *Psikiyatride Guncel Yaklasimlar- Current Approaches in Psychiatry*, 6(3).
- Staron, M., Yang, Y., Liu, B., Li, J., Shen, Y., Zúñiga-Pflücker, J. C. and Li, Z. (2010). gp96, an endoplasmic reticulum master chaperone for integrins and Toll-like receptors, selectively regulates early T and B lymphopoiesis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 115(12), 2380-2390.
- Stass, S. A. and Mixson, J. (1997). Oncogenes and tumor suppressor genes: therapeutic implications. *Clinical Cancer Research*, 3(12), 2687-2695.
- Stavrovskaya, A. A. and Stromskaya, T. P. (2008). Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)*, 73(5), 592-604.
- Stewart, B.W. and Kleihus, P. (eds) (2003). *World Cancer Report Lyon*. IARC Press.
- Stiewe, T. and Haran, T. E. (2018). How mutations shape p53 interactions with the genome to promote tumorigenesis and drug resistance. *Drug Resistance Updates*, 38, 27-43.
- Story, M. and Kodym, R. (1998). Signal transduction during apoptosis; implications for cancer therapy. *Front Biosci*, 3, d365-d375.

- Stratton, M. R., Campbell, P. J. and Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719-724.
- Suter, R. and Marcum, J. A. (2007). The molecular genetics of breast cancer and targeted therapy. *Biologics: targets & therapy*, 1(3), 241.
- Tahata, S., Yuan, B., Kikuchi, H., Takagi, N., Hirano, T. and Toyoda, H. (2014). Cytotoxic effects of pyrrolidine dithiocarbamate in small-cell lung cancer cells, alone and in combination with cisplatin. *International journal of oncology*, 45(4), 1749-1759.
- Tanigawa, S., Fujii, M. and Hou, D. X. (2008). Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(3), 797-804.
- Tapfuma, K. I., Uche-Okerefor, N., Sebola, T. E., Hussan, R., Mekuto, L., Makatini, M. M. and Mavumengwana, V. (2019). Cytotoxic activity of crude extracts from *Datura stramonium*'s fungal endophytes against A549 lung carcinoma and UMG87 glioblastoma cell lines and LC-QTOF-MS/MS based metabolite profiling. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 1-12.
- Tarin, D. (2011). Cell and tissue interactions in carcinogenesis and metastasis and their clinical significance. *In Seminars in cancer biology*, 21(2), 72-82.
- Tariq, K. and Ghias, K. (2016). Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med*, 13(1), 120-135.
- Taşkıran, E., Bebek, N., Özkan, A., Candan, F., Cantürk, İ. A., Gökçeer, S. Y. and Kocaman, G. (2015). Drug Resistance and Resistance Mechanisms in Epilepsy. *Journal of the Turkish Chapter of ILAE*, 21(2), 43-53.
- Thejer, B. M., Adhikary, P. P., Kaur, A., Teakel, S. L., Van Oosterum, A., Seth, I. and Jazayeri, J. A. (2020). PGRMC1 phosphorylation affects cell shape, motility, glycolysis, mitochondrial form and function, and tumor growth. *BMC molecular and cell biology*, 21, 1-24.
- Thomas, H. and Coley, H. M. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer control*, 10(2), 159-165.
- Thomas, X., Campos, L., Mounier, C., Cornillon, J., Flandrin, P., Le, Q. H., Piselli, S. and Guyotat, D. (2005). Expression of heat-shock proteins is associated with major adverse prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leukemia research*, 29(9), 1049-1058.
- Tian, X., Li, Y., Shen, Y., Li, Q., Wang, Q. and Feng, L. (2015). Apoptosis and inhibition of proliferation of cancer cells induced by cordycepin. *Oncology letters*, 10(2), 595-599.
- Topal, T., Öter, S. ve Korkmaz, A. (2009). Melatonin ve kanserle ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi*, 19(3), 137-143.

- Toriola, A. T. and Colditz, G. A. (2013). Trends in breast cancer incidence and mortality in the United States: implications for prevention. *Breast cancer research and treatment*, 138(3), 665-673.
- Toyoda, Y., Hagiya, Y., Adachi, T., Hoshijima, K., Kuo, M. T. and Ishikawa, T. (2008). MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: historical background and new research directions. *Xenobiotica*, 38(7-8), 833-862.
- Tsai, Y.-L., Ha, D. P., Zhao, H., Carlos, A. J., Wei, S., Pun, T. K. and Lee, A. S. (2018). Endoplasmic reticulum stress activates SRC, relocating chaperones to the cell surface where GRP78/CD109 blocks TGF- β signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201714866.
- Tuy, H. D., Shiomi, H., Mukaisho, K. I., Naka, S., Shimizu, T., Sonoda, H. and Tani, M. (2016). ABCG2 expression in colorectal adenocarcinomas may predict resistance to irinotecan. *Oncology letters*, 12(4), 2752-2760.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- van Loo, G., Van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S. and Vandenameele, P. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death & Differentiation*, 9(1), 20-26.
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J. and Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *In Cancer cell culture*, 237-245.
- Vargas, A. J. and Burd, R. (2010). Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. *Nutrition reviews*, 68(7), 418-428.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. and Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), 131-149.
- Vermeulen, K., Berneman, Z. N. and Van Bockstaele, D. R. (2003). Cell cycle and apoptosis. *Cell proliferation*, 36(3), 165-175.
- Verrelle, P., Frédéric, M., Fonck, Y., Feillel, V., Dionet, C., Kwiatkowski, F. and Chassagne, J. (1991). Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance P-glycoprotein in breast carcinoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 83(2), 111-116.
- Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330), 314-322.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, 10(8), 789-799.

- Wang, P., Wan, W., Xiong, S., Wang, J., Zou, D., Lan, C. and Wu, N. (2017). HIF1 α regulates glioma chemosensitivity through the transformation between differentiation and dedifferentiation in various oxygen levels. *Scientific reports*, 7(1), 1-16.
- Wang, L. H., Wu, C. F., Rajasekaran, N. and Shin, Y. K. (2018). Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell Physiol Biochem*, 51(6), 2647-2693.
- Watson, A. J. (2004). Apoptosis and colorectal cancer. *Gut*, 53(11), 1701-1709.
- Wei, L., Jin, X., Cao, Z. and Li, W. (2016). Evodiamine Induces Extrinsic and Intrinsic Apoptosis of Ovarian Cancer Cells via the Mitogen-Activated Protein kinase/phosphatidylinositol-3-kinase/protein Kinase B Signaling Pathways. *Journal of traditional Chinese medicine*, 36(3), 353–359.
- Welch, D. R. (2006). Do we need to redefine a cancer metastasis and staging definitions?. *Breast disease*, 26, 3–12.
- Williams, G. H. and Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. *J Pathol*, 226(2), 352-364.
- Wong, K. K. and DePinho, R. A. (2003). Walking the telomere plank into cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 95(16), 1184–1186.
- Wong, K. and Xie, G. (2017). Updates on the Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Colorectal Cancer: Open Access*, 03(01).
- World Health Organization. (2020). WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. *World Health Organization*. pp 160.
- Wright, W. E. and Shay, J. W. (2005). Telomere biology in aging and cancer. *Journal of the American Geriatrics Society*, 53(9s), S292-S294.
- Wrzeszczynski, K. O., Varadan, V., Byrnes, J., Lum, E., Kamalakaran, S., Levine, D. A. and Lucito, R. (2011). Identification of tumor suppressors and oncogenes from genomic and epigenetic features in ovarian cancer. *PLoS One*, 6(12), e28503.
- Wu, S., Zhu, W., Thompson, P. and Hannun, Y. A. (2018). Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nat Commun*, 9(1), 3490.
- Wunderlich, V. (2007). Early references to the mutational origin of cancer. *International journal of epidemiology*, 36(1), 246-247.
- Xiong, J., Feng, J., Yuan, D., Zhou, J. and Miao, W. (2015). Tracing the structural evolution of eukaryotic ATP binding cassette transporter superfamily. *Scientific reports*, 5, 16724.
- Xu, R., Boudreau, A. and Bissell, M. J. (2009). Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra-and intra-cellular matrices. *Cancer and metastasis reviews*, 28(1-2), 167-176.
- Ye, Q., Liu, K., Shen, Q., Li, Q., Hao, J., Han, F. and Jiang, R. W. (2019). Reversal of Multidrug Resistance in Cancer by Multi-Functional Flavonoids. *Front Oncol*, 9, 487.

- Yogosawa, S. and Yoshida, K. (2018). Tumor suppressive role for kinases phosphorylating p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer science*, 109(11), 3376-3382.
- Yu, X., Acehan, D., Ménétret, J. F., Booth, C. R., Ludtke, S. J., Riedl, S. J. and Akey, C. W. (2005). A structure of the human apoptosome at 12.8 Å resolution provides insights into this cell death platform. *Structure*, 13(11), 1725-1735.
- Zalba, S. and Ten Hagen, T. L. (2017). Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treat Rev*, 52, 48-57.
- Zhang, L., Chen, L. H., Wan, H., Yang, R., Wang, Z., Feng, J. and Zhu, H. (2014). Exome sequencing identifies somatic gain-of-function PPM1D mutations in brainstem gliomas. *Nature genetics*, 46(7), 726-730.
- Zhang, X., Zhang, L., Wang, S., Wu, D. and Yang, W. (2015). Decreased functional expression of Grp78 and Grp94 inhibits proliferation and attenuates apoptosis in a human gastric cancer cell line in vitro. *Oncology letters*, 9(3), 1181-1186.
- Zhang, J., Huang, K., O'Neill, K. L., Pang, X. and Luo, X. (2016). Bax/Bak activation in the absence of Bid, Bim, Puma, and p53. *Cell death & disease*, 7(6), e2266-e2266.
- Zhou, S. F. (2008). Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*, 38(7-8), 802-832.
- Zhou, G., Liu, Z. and Myers, J. N. (2016). TP53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma and their impact on disease progression and treatment response. *Journal of cellular biochemistry*, 117(12), 2682-2692.
- Zhu, K., Liu, Q., Zhou, Y., Tao, C., Zhao, Z., Sun, J. and Xu, H. (2015). Oncogenes and tumor suppressor genes: comparative genomics and network perspectives. *BMC genomics*, 16(7), S8.
- Zhu, G. and Lee, A. S. (2015). Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis. *J Cell Physiol*, 230(7), 1413-1420.



EKLER

EK-1 FMB-BAP 18-0333 proje komisyon kararı

Evrak Tarih ve Sayısı: 17/12/2019-E.6438



T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü



Sayı : 96828008-604.99-
Konu : Komisyon Kararı

Sayın Öğr. Gör. Seda MESCİ

2018 Yılı FMB-BAP 18-0333 no'lu "Heterohalkalı Bileşiklerin DLD-1 (Kolon Kanseri) ve CCD-18Co (Normal Kolon Epiteli) Hücrelerinde Çoklu İlaç Direncine (MDR) Etkileri" başlıklı projenin yürütücülüğünü Prof. Dr. Tuba YILDIRIM'ın yaptığı projede araştırmacı olarak görev aldınız. 13.12.2019 tarihinde Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu toplantısında proje Sonuç Raporu uygun görülmüş olup, söz konusu projenin kapatılmasına karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

e-İmzalıdır
Prof.Dr. Recep KÜRKCÜ
Koordinatör

Evrakın Doğrulanması İçin: https://ebys.amasya.edu.tr/en/Vision/Validate_Doc.aspx?V=BE6P3Z92Y

Akbulak Mah. Hakimiyet Cad. No:4/3 P.K. :05100 Merkez/Amasya
Telefon No: 0 (358) 212 77 47 Faks No: 0 (358) 213 03 64
E-Posta: bap@amasya.edu.tr İnternet Adresi:
www.amasya.edu.tr/akademik/rektorluge-bagli-birimler

Bilgi İçin: Songül BAL
Unvan: Bilgisayar İşletmeni
Telefon No: 211 50 55-5142



EK-2 FMB-BAP 19-0407 proje komisyon kararı

Evrak Tarih ve Sayısı: 25/06/2020-E.1899



T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü



Sayı : 96828008-604.99-
Konu : Komisyon Kararı

Öğr. Gör. Seda MESCİ
Hitit Üniversitesi

2019 Yılı FMB-BAP 19-0407 no'lu "İzoindol Türevli Piroolidin Bileşiklerinin İnsan Meme Kanseri (MCF-7) Hücrelerinde Apoptoz ve Sinyal Yolakları Üzerine Etkisi" başlıklı projenin yürütücülüğünü Prof. Dr. Tuba YILDIRIM'ın yaptığı projede araştırmacı olarak görev aldınız. 23.06.2020 tarihinde Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu toplantısında proje Sonuç Raporu uygun görülmüş olup, söz konusu projenin kapatılmasına karar verilmiştir. Bilgilerinize rica ederim.

e-İmzalıdır
Prof.Dr. Recep KÜRKÇÜ
Koordinator

24/06/2020 Memur
25/06/2020 Şube Müdürü

: Ezo ATICI
: Şükriye PEKER

Evrakın Doğrulanması İçin: https://ebys.amasya.edu.tr/en/Vision/Validate_Doc.aspx?V=BE6E3MB56

Akbilak Mah. Hakimiyet Cad. No:4/3 P.K. :05100 Merkez/Amasya
Telefon No: 0 (358) 212 77 47 Faks No: 0 (358) 213 03 64
E-Posta: bap@amasya.edu.tr İnternet Adresi:
www.amasya.edu.tr/akademik/rektorluge-bagli-birimler

Bilgi İçin: Ezo ATICI
Unvan: Memur
Telefon No: 211 50 55-5142



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Seda MESCİ
 Uyuğu : Türkiye Cumhuriyeti
 Doğum tarihi ve yeri : 01.05.1984 - Çorum
 Medeni hali : Bekâr
 e-posta : sedamesci@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Lisans	Gazi Üniversitesi	2008
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi	2011
Doktora	Amasya Üniversitesi	-
İş Deneyimi/Yıl	Çalıştığı Yer	Görevi
2017-2018	Çorum Belediyesi	Biyolog
2018- devam	Hitit Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

Yabancı Dili

İngilizce

Bilimsel Faaliyetler (Yayınlar, Bildiriler, Katıldığı Projeler)

Yayınlar

Salur, A. and Mesci, S. (2007). Additional Records for the Odonata Fauna of Çorum Province, *Munis Entomology & Zoology*, 2 (1): 169-170. ISSN: 1306-3022

Salur, A. and Mesci, S. (2009). Gerromorphan Fauna (Insecta: Heteroptera) of Çorum Province (Turkey), *Munis Entomology & Zoology*, 4 (2): 340-345. ISSN: 1306-3022

Darılmaz, M. C., Salur, A. and Mesci, S., (2010). Aquatic Coleoptera fauna of Çorum and Yozgat Provinces (Turkey), *Biological Diversity and Conservation*, 3 (2): 89-96. ISSN: 1308-5301

Salur, A. and Mesci, S. (2011). Nepomorphan Fauna of The Çorum Province (Insecta: Heteroptera), *Munis Entomology & Zoology*, 6 (2): 1014-1016. ISSN: 1306-3022

Mesci, S. and Hasbenli, A. (2015). Contributions to the genus *Platystoma* (Diptera: Platystomatidae) fauna of Turkey with seven new records. *Turkish Journal of Zoology*, 39(5), 804-810. ISSN: 1300-0179

Mesci, S. and Hasbenli, A. (2015). Contributions to subfamily Otitinae (Diptera: Ulidiidae) fauna of Turkey with four new. *Turkish Journal of Zoology*, 39(6), 1090-1094. ISSN: 1300-0179

Mesci, S., Tuncel, Z. and Turbay, R. (2019). Microbiological properties of both drinking and domestic waters in Çorum. *International Journal of Science Letters*, 1(1), 56-67. ISSN: 2687-4733

Mesci, S., Marakli, S., Yazgan, B. and Yıldırım, T. (2019) The effect of ATP-binding cassette (ABC) transporters in human cancers. *International Journal of Science Letters*, 1(1), 14-19. ISSN: 2687-4733

Mesci, S., Gül, M., Eryılmaz, S., Lis, T., Szafert, S. and Yıldırım, T. (2020). Antioxidant and cytotoxic activity of isoindole compounds in breast cancer cells (MCF-7). *Journal of Molecular Structure*, (1217), 128366. ISSN: 0022-2860

Bildiriler

Mesci, S., Salur, A., Çorum İli Nepomorpha Faunasına Katkılar (Insecta: Heteroptera), Karadeniz Teknik Üniversitesi, 19.Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon, PZ-013, 485, 23-27 Haziran, 2008.

Mesci, S., Salur, A., Çorum İli Cıvırı Gerromorpha Faunası (Insecta: Heteroptera), Karadeniz Teknik Üniversitesi, 19.Ulusal Biyoloji Kongresi, Trabzon, PZ-014, 485, 23-27 Haziran, 2008.

Mesci, S., Salur, A., Türkiye Gerromorflarının Bazı Ekolojik Özellikleri (Insecta: Heteroptera), Nevşehir Üniversitesi, 9.Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Nevşehir, 315, 7-10 Ekim, 2009.

Salur, A., Mesci, S., Telli, M., Bazı Leptopodomorfların Türkiye'deki Yayılışları ve Ekolojik Özellikleri (Insecta: Heteroptera), Nevşehir Üniversitesi, 9.Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Nevşehir, 248, 7-10 Ekim, 2009.

Yıldırım, T., Mesci, S., Yazgan, B., Sırıkten, B., ATP-binding cassette transporters. International DNA Day and Genome Congress, IDGC17, Ahi Evran University, Kırşehir, PP-194, 211, 24-28 April 2017.

Yavuz, C., Güçkan, R., Kılınç, Ç., Yazgan, B., Mesci, S., Yıldırım, T., Analyses of antibiotic resistance related to biofilm activity and ESBL genes of *Klebsiella pneumoniae*. VI. International Molecular Medicine, İstanbul, PP-122, 241, 22-25 May 2017.

Tuncel, Z., Mesci, S., Turbay, R., Microbiological Properties of Both Drinking and Usage Waters in Çorum, International Congress of Health and Environment, ICOHE, 2017, Çukurova University, Adana, PP-6, 242, 23-25 October 2017.

Mesci, S., Hasbenli, A., Contributions to genus *Platystoma* (Diptera: Platystomatidae) of Turkey, International Symposium of Ecology 2018, P-19, 768, 19-23 June 2018.

Mesci, S., Hasbenli, A., Contributions to subfamily Otitinae (Diptera: Ulidiidae) fauna of Turkey, International Symposium of Ecology 2018, P-20, 1130, 19-23 June 2018.

Mesci, S., Gül, M., Yıldırım, T., Antioxidant and Cytotoxic Activity Studies of Sulfur Containing Glycine Imine Derivatives, 7th Multidisciplinary Cancer Research & 1st Basic Oncology Congress, İzmir, SS014, 83, 11-14 October 2018.

Akşahin, M., Ayar, A., Gül, M., Mesci, S., Antioxidant and Cytotoxic Activity Studies of MCF-7 Cell Line of PhTAD-substituted Dihydropyrrole Derivatives Compounds, 7th International Drug Chemistry Conference, Antalya, OP92, 14-17 March 2019.

Mesci, S., Yazgan, B., Gül, M., Yıldırım T., Cytotoxic activity studies by RTCA assay of sulfur containing glycine imine derivatives in the MCF-7 cell line, 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020), Ankara, ID:403, 19-20 March 2020.

Mesci, S., Yazgan, B., Gül, M., Yıldırım T., Effects of sulfur containing glycine imine derivatives on the apoptotic mechanism in MCF-7 cell lines, 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020), Ankara, ID:404, 19-20 March 2020.

Akşahin, M., Yazgan, B., Mesci, S., Ayar, A., Gül, M., Yıldırım T., Investigation of cytotoxic activity and heat shock proteins expression of PhTAD-substituted dihydropyrrole derivatives in MCF-7 breast cancer cell line, 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020), Ankara, ID:788, 19-20 March 2020.

Projeler

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Heterohalkalı Bileşiklerin DLD-1 (Kolon Kanseri) ve CCD-18CO (Normal Kolon Epiteli) Hücrelerinde Çoklu İlaç Direncine (MDR) Etkileri	Amasya Üniversitesi	9.993,04 TL	03.09.2018 03.09.2019	Araştırmacı	FMB-BAP 18-0333
İzoindol Türevli Prolidin Bileşiklerinin İnsan Meme Kanseri (MCF-7) Hücrelerinde Apoptoz ve Sinyal Yolakları Üzerine Etkisi	Amasya Üniversitesi	14.988,00 TL	24.04.2019 24.04.2020	Araştırmacı	FMB-BAP 19-0407
Kolon Kanseri Hücrelerinde Sulfonamid Türevi Bileşiklerin Apoptoz Mekanizmasına Etkileri	Amasya Üniversitesi	19.992,26 TL	14.12.2020 14.12.2021	Araştırmacı	FMB-BAP 20-0456