



T.C.

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PhTAD TÜREVLİ *DIHİDRO PİROL* BİLEŞİKLERİNİN ANTI-
KANSER AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAŞUK AKŞAHİN

AĞUSTOS

MAŞUK AKŞAHİN

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

AĞUSTOS 2020

**PhTAD TÜREVLİ *DİHİDRO PİROL* BİLEŞİKLERİNİN ANTI-KANSER
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Maşuk AKŞAHİN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman

Doç. Dr. Arif AYAR

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2020

Maşuk AKŞAHİN tarafından hazırlanan “PhTAD TÜREVLİ DİHİDROPIROL BİLEŞİKLERİNİN ANTI-KANSER AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi BIYOTEKNOLOJİ Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Arif AYAR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan : Prof. Dr. Tuba YILDIRIM

Biyoloji Anabilim Dalı, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Deniz ALTUN ÇOLAK

Biyoloji Anabilim Dalı, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 17/08/2020

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

.....

Doç. Dr. Meryem EVECEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Kanserin dokunduđu tüm insanlara...

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.

(İmza)

Maşuk AKŞAHİN

(Tarih)

PhTAD TÜREVLİ DİHİDROPIROL BİLEŞİKLERİNİN ANTI-KANSER AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Maşuk AKŞAHİN

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞUSTOS 2020

ÖZET

Meme kanseri ve diğer tüm kanser çeşitleriyle mücadelede, kanserin gelişim ve yayılmasında etkili olan moleküler yolların belirlenmesi ve antikanserojenik etki gösterebilecek yeni etken maddelerin keşfi daha etkili tedavi seçeneklerinin oluşturulması açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla çalışmamızda, biyolojik olarak aktif olan bisiklik dihidropirol bileşiklerinin N-phenyltriazolinedione (PhTAD) ilavesi ile oluşturulmuş yeni türevlerinin MCF-7 (meme kanseri) ve MCF-12A (normal meme epiteli) hücre hatlarında antikanserojenik aktiviteleri ile gen ifadesi değişimleri arasındaki ilişkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda MCF-7 ve MCF-12A hücre hatlarında, on altı farklı PhTAD türevli dihidropirol bileşiğinin sitotoksik etkileri ve IC₅₀ değerleri MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemiyle, hücre proliferasyonu üzerine etkileri ise gerçek zamanlı hücre analizi sistemi (RTCA) ile belirlenmiştir. Ayrıca bu bileşiklerin hücre hatlarında apoptotik hücre ölümü proteinleri P53, BAX, BCL2, PARP ve bu proteinlerle ilişkili sinyal yollarında önemli rol oynayan proteinler olan HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90α ile Endoplazmik Retikulum (ER) stresinde ana düzenleyici protein olan GRP78 ve GRP94'ün gen ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) yöntemiyle araştırılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda, MCF-7 hücre hattına uygulanan farklı dozlardaki (1,56-100 µM) bileşiklerin hem MTT hem de RTCA yöntemiyle orta ve güçlü sitotoksik ve antiproliferatif aktivite sergiledikleri gözlemlenmiştir. Ayrıca bu bileşiklerin birçoğunun p53 gen ekspresyonunu azaltıcı etkileri olduğu tespit edilmiştir. Buna rağmen bu bileşiklerden önemli bir kısmının BAX/BCL2 oranını artırması ve PARP1 gen ekspresyon düzeyini azaltması ile p53'ten bağımsız olarak apoptoza yol açtıkları sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu bileşiklerin, meme kanserinde önemli bir stratejik hedef olarak görülen HSP90 başta olmak üzere diğer önemli HSP'lerin gen ekspresyonları üzerinde azaltıcı etki gösterdiği ve ER stresinde proteinlerin yeniden katlanmasını sağlayarak tümörleşmeye katkıda bulunan GRP78 ve GRP94 gen ekspresyonu üzerinde de baskılayıcı role sahip oldukları görülmüştür.

Sonuç olarak, PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin MCF-7 hücre hattında apoptotik genleri teşvik edici etkileri ve apoptoz ile ilişkili sinyal yollarıyla ER stresinin düzenlenmesindeki genlerin ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etkilerinin varlığı bu bileşiklerin apoptotik aktiviteyi artırdığını göstermektedir. Bu etkileri göz önüne alındığında bu bileşiklerin antikanser ajanlar olarak kullanılabilirlikleri sonucuna varılmıştır.

Sayfa Adedi : 109

Anahtar Kelimeler : MCF-7, HSP, RT-PZR, RTCA, Apoptoz, PhTAD

Danışman : Doç. Dr. Arif AYAR

INVESTIGATION OF ANTI-CANCER ACTIVITIES OF PhTAD-SUBSTITUTED DIHYDROPYRROLE DERIVATIVES COMPOUNDS

(M. Sc. Thesis)

Maşuk AKŞAHİN

AMASYA UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

August 2020

ABSTRACT

In the fight against breast cancer and all other types of cancer, determining the molecular pathways that are effective in the development and spread of cancer, the discovery of new active substances that may exhibit an anticarcinogenic effect or the determination of the effectiveness of some chemicals are very important in terms of creating new and more effective treatment options. For this purpose, in our study, new derivatives of biologically active bicyclic dihydropyrol compounds formed by the addition of N-phenyltriazolinedione (PhTAD) is aimed to determine the relationship between anticancerogenic activities and gene expression changes in MCF-7 (breast cancer) and MCF-12A (normal breast epithelium) cell lines.

In our study, in the MCF-7 and MCF-12A cell lines, cytotoxic effects and IC50 values of sixteen different PhTAD-derived dihydropyrol compounds by MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) method, their effects on cell proliferation were determined by real-time cell analysis system (RTCA). In addition, in the cell lines of these compounds apoptotic cell death proteins P53, BAX, BCL2, PARP and proteins that play an important role in protein with related signaling pathways HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, hsp90 α and GRP78, and GRP94's which is the main regulatory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) stress gene expression levels were investigated by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method.

As a result of our study, it was observed that compounds of different doses (1.56-100 μ M) applied to the MCF-7 cell line exhibited moderate and strong cytotoxic and antiproliferative activity by both MTT and RTCA method. Also, many of these compounds have been found to have effects that reduce p53 gene expression. However, it has been concluded that a significant portion of these compounds increase the BAX / BCL2 ratio and decrease the level of PARP1 gene expression, leading to apoptosis independent of p53. In addition, these compounds, especially HSP90, which is considered as an important strategic target in breast cancer, other important HSPs have been shown to have a reducing effect on gene expressions and also have a suppressive role on GRP78 and GRP94 gene expression, which contribute to tumorization by re-folding proteins in ER stress.

In conclusion, the effects of PhTAD-derived dihydropyrol compounds on MCF-7 cell line to stimulate apoptotic genes and the presence of suppressive effects on the expression of genes in the regulation of ER stress with apoptosis-related signaling pathways indicates that these compounds increase apoptotic activity. Considering these effects, it is concluded that these compounds can be used as anticancer agents.

Page Number : 109

Key Words : MCF-7, HSP, RT-PCR, RTCA, Apoptosis, PhTAD

Supervisor : Assoc. Prof. Arif AYAR

ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tez konusunun belirlenmesinde, yürütülmesinde ve çalışmalarım boyunca beni destekleyerek, yönlendiren ve tezimin yazımı sırasında bana zaman ayırarak yardımını esirgemeyen tez danışmanım sayın Doç. Dr. Arif AYAR' a teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca akademik açıdan yetişmemi sağlayan, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her konuda destek olan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Tuba YILDIRIM'a,

Tez çalışmamın her aşamasında beni sabırla dinleyen, bilgi birikiminden her an faydalandığım, çalışmalarımın yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında yardım ve desteklerinden her daim faydalandığım sayın Dr. Öğr. Üyesi Burak YAZGAN'a

Tezin ana konusu olan kimyasal bileşiklerin sentezi, hücreye uygulanmasında gerekli tüm aşamalarda bilgi ve desteğini esirgemeyen ve çalışmalarımın devamlılığında Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarlarının tüm imkânlarından yararlanmamı sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Melek GÜL'e,

Biyoinformatiğe giriş konusunda ve moleküler biyoloji tekniklerinin öğrenilmesi ve uygulamasındaki bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve daima gelişmemde teşvik edici yaklaşımlarıyla sınırlarımı aşmamda büyük katkısı olan ve yine Merkezi Araştırma Laboratuvarları'nın imkânlarından yararlanmamı sağlayan sevgili hocam Doç. Dr. Sevgi MARAKLI'ya,

Tüm deneysel aşamalarda tecrübelerinden faydalandığım, çalışmalarımında her kolaylığı sağlayan ve tüm çalışmalarımın bir düzen içinde yürütülmesinde çok büyük katkıları olan Hitit Üniversitesi'nden Öğr. Gör. Seda MESCİ'ye,

Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarının tüm akademik ve idari personeline,

Tüm hayatım boyunca benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevdiğim aileme, Ve bu süreçte tanıdığım tüm güzel insanlara en içten dileklerle teşekkür ederim.

Ayrıca bu tez çalışması FMB-BAP/18-03-21 Proje No' su ile Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2211-Yurtiçi Yüksek Lisans Programı kapsamında desteklenmiştir ve Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Uygulama Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (AUMAULAB) imkanları kullanılarak yapılmıştır. Katkılarından dolayı Amasya Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser	3
2.2. Hücre Döngüsü.....	4
2.2.1. Hücre döngüsü anahtar moleküler düzenleyicileri.....	6
2.2.2. Hücre döngüsü ve kanser	7
2.3. Meme Kanseri	8
2.3.1. Meme kanseri genetiği	10
2.4. Endoplazmik Retikulum (E.R) Stresi.....	13
2.4.1. GRP78 ve GRP94'ün temel işlevleri	15
2.4.2. UPR yolu.....	16
2.5. Isı Şoku Proteinleri (HSP'ler).....	16
2.6. Apoptoz ve Kanser	18
2.6.1. BCL-2 protein ailesi	18

2.6.2. p53.....	20
2.6.3. Kaspazlar.....	21
2.7. PhTAD Türevli Bileşikler ve Kullanım Alanları.....	22
2.8. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	26
2.8.1. MCF-7 hücre hattı.....	26
2.8.2. Sitotoksik Aktivite Testleri.....	27
3. MATERYAL VE METOT.....	28
3.1. Materyal.....	29
3.1.1. Çalışmada kullanılan ekipmanlar.....	29
3.1.2. Çalışmada kullanılan reaktifler.....	29
3.1.3. Çalışmada kullanılan kitler.....	29
3.1.4. N-feniltriazolindione Dihidropirol bileşikleri.....	30
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Hücre kültürü çalışmaları.....	31
3.2.2. Sitotoksisite ve metabolik aktivite ölçüm testi (MTT).....	34
3.2.3. Gerçek zamanlı hücre canlılık testi (RTCA).....	37
3.2.4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri (RT-PZR).....	38
4. BULGULAR.....	44
4.1. PhTAD Türevli Dihidropirol Bileşiklerinin MCF-7 Hücre Hattında Sitotoksik Dozlarının MTT Yöntemi ile Belirlenmesi.....	44
4.2. PhTAD Türevli Dihidropirol Bileşiklerin MCF-7 Hücrelerinde Canlılığa Etkilerinin RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analizi) Yöntemi ile Belirlenmesi..	53
4.3. PhTAD Türevli Dihidropirol Bileşiklerin MCF-7 Hücrelerinde RT-PZR Yöntemiyle mRNA Gen Ekspresyon Düzeylerinin İncelenmesi.....	71
4.3.1. PhTAD türevli dihidropirol bileşikleri uygulanan MCF-7 hücrelerinden total RNA izolasyonu ve miktar tayini.....	71

4.3.2. PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin MCF-7 hücre hattında apoptotik gen ekspresyonları üzerine etkisi.....	72
4.3.3. PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin MCF-7 hücre hattında apoptotik yollaklarda rol oynayan HSP gen ekspresyonları üzerine etkisi.	75
4.3.4. PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin MCF-7 hücre hattında ER stres gen ekspresyonları üzerine etkisi	79
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	81
KAYNAKLAR.....	95
ÖZGEÇMİŞ.....	109



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Dünya Sağlık Örgütü'nün her iki cinsiyette dünya çapında 2018 yılı kanser insidans oranları	9
Çizelge 3.1. Kullanılan ekipman marka ve kullanım amaçları	28
Çizelge 3.2. Kullanılan reaktif ve besiyerlerinin marka ve kullanım amaçları	29
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan kitler	30
Çizelge 3.4. Bileşiklerin syn-anti konformasyonları ve molekül kütleleri	30
Çizelge 3.5. Bileşiklerin dilüsyon öncesi 100µM tüp konsantrasyonları	35
Çizelge 3.6. RT-PZR karışımı	41
Çizelge 3.7. RT-PZR koşulları	41
Çizelge 3.8. Genlerin primer dizileri	42
Çizelge 4.1. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemiyle elde edilen etkin doz ve IC ₅₀ değerleri	53
Çizelge 4.2. MCF-7 hücre hattında RTCA sistemiyle bileşiklerin IC ₅₀ değerleri	68
Çizelge 4.3. Uygulanan dozlardaki total RNA (ng/µL) ve A260/280 değerleri.....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin yetenekleri.....	4
Şekil 2.2. Hücre döngüsü modeli.....	5
Şekil 2.3. Hücre döngüsü ve düzenleyici moleküller	7
Şekil 2.4. PARP yolağı	12
Şekil 2.5. Endoplazmik Retikulum (ER) stres koşullarında UPR aktivasyonu	14
Şekil 2.6. Dihidro pirol bileşiklerinin PhTAD ile formal aminasyonları	25
Şekil 4.1. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 1'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol).....	44
Şekil 4.2. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 2'ye ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)	45
Şekil 4.3. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 3'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol).....	45
Şekil 4.4. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 4'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol).....	46
Şekil 4.5. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 5'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol).....	46
Şekil 4.6. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 6'ya ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol).....	47
Şekil 4.7. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 7'ye ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol).....	47
Şekil 4.8. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 8'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol).....	48
Şekil 4.9. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 9'a ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol).....	48
Şekil 4.10. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 10'a ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol).....	49
Şekil 4.11. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 11'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol).....	49

Şekil 4.12. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 12'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)	50
Şekil 4.13. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 13'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)	50
Şekil 4.14. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 14'ya ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)	51
Şekil 4.15. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 15'ye ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)	51
Şekil 4.16. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 16'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)	52
Şekil 4.17. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 1'e ait RTCA analizi.....	54
Şekil 4.18. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 1'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği.....	54
Şekil 4.19. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 2'e ait RTCA analizi.....	55
Şekil 4.20. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 2'ye ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği	55
Şekil 4.21. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 3'e ait RTCA analizi.....	56
Şekil 4.22. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 3'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği	56
Şekil 4.23. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 4'e ait RTCA analizi.....	57
Şekil 4.24. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 4'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği	57
Şekil 4.25. MCF-7 hücre hattında Bileşik 7'ye bileşiğine ait RTCA analizi	58
Şekil 4.26. MCF-7 hücre hattında Bileşik 7'ye ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği	58
Şekil 4.27. MCF-7 hücre hattında Bileşik 8'e ait RTCA analizi.....	59
Şekil 4.28. MCF-7 hücre hattında Bileşik 8'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği	59
Şekil 4.29. MCF-7 hücre hattında Bileşik 9'a ait RTCA analizi.....	60
Şekil 4.30. MCF-7 hücre hattında Bileşik 9'a ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği	60

Şekil 4.31. MCF-7 hücre hattında Bileşik 10'a ait RTCA analizi	61
Şekil 4.32. MCF-7 hücre hattında Bileşik 10'a ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği	61
Şekil 4.33. MCF-7 hücre hattında Bileşik 11'e ait RTCA analizi	62
Şekil 4.34. MCF-7 hücre hattında Bileşik 11'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği	62
Şekil 4.35. MCF-7 hücre hattında Bileşik 12'e ait RTCA analizi	63
Şekil 4.36. MCF-7 hücre hattında Bileşik 12'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği	63
Şekil 4.37. MCF-7 hücre hattında Bileşik 13'e ait RTCA analizi	64
Şekil 4.38. MCF-7 hücre hattında Bileşik 13'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği	64
Şekil 4.39. MCF-7 hücre hattında Bileşik 14'ya ait RTCA analizi	65
Şekil 4.40. MCF-7 hücre hattında Bileşik 14'ya ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği	65
Şekil 4.41. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 15'ye ait RTCA analizi.....	66
Şekil 4.42. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 15'ye ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği	66
Şekil 4.43. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 16'e ait RTCA analizi.....	67
Şekil 4.44. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 16'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği	67
Şekil 4.45. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin p53 mRNA ekspresyonuna etkisi	70
Şekil 4.46. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin BCL2 mRNA ekspresyonuna etkisi	71
Şekil 4.47. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin BAX mRNA ekspresyonuna etkisi	71
Şekil 4.48. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Parp mRNA ekspresyonuna etkisi	72
Şekil 4.49. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Hsp27 mRNA ekspresyonuna etkisi	73

Şekil 4.50. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Hsp40 mRNA ekspresyonuna etkisi	74
Şekil 4.51. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Hsp60 mRNA ekspresyonuna etkisi	74
Şekil 4.52. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Hsp70 mRNA ekspresyonuna etkisi	75
Şekil 4.53. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Hsp90 mRNA ekspresyonuna etkisi	76
Şekil 4.54. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Grp78 mRNA ekspresyonuna etkisi	77
Şekil 4.55. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Grp94 mRNA ekspresyonuna etkisi	77

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Plaka yerleşimi.....	33
Resim 3.2. Thoma lamı ve sayım için güvenli bölgeler [104].....	34
Resim 3.3. Dihidropirol bileşiklerinin MTT ile kolorometrik ölçümü.....	37
Resim 3.4. RTCA iCELLigence cihazı ve interted mikroskopta incelenen mikroelektrotlu plaka	38



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

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

Simgeler	Açıklama
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
dk	Dakika
kD	kilo Dalton
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
nm	Nanometre
mM	Milimolar
rpm	Dakikadaki devir sayısı
%	yüzde
IC ₅₀	Baskılayıcı konsantrasyon 50

Kısaltmalar	Açıklama
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ATCC [®]	Amerika hücre kültürü koleksiyonu
BRCA	Meme kanseri geni
BCL-2	B hücreli lenfoma 2
BER	Baz eksizyon onarımı
CDK	Siklin bağımlı kinaz
cDNA	Komplementer DNA

DNA	Deoksiribonükleik asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMEM	Dulbecco'nun modifiye edilmiş medyumu
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER	Endoplazmik retikulum
ÖR	Östrojen reseptörü
FBS	Fetal sığır serumu
G1	Gap 1 fazı
G2	Gap 2 fazı
GRP	Glukoz düzenleyici protein
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IHC	İmmünohistokimya
HER2	Epidermal büyüme reseptörü 2
HR	Homolog rekombinasyon
HSP	Isı şok proteini
M	Mitoz
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı-7
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5- diphenyltetrazolium bromide
MCF-12A	Sağlıklı meme epitelyum hücre hattı -12A
M.Ö.	Milattan önce
NAD⁺	Nikotinamid adenin dinükleotidi
S fazı	Sentez fazı
SAC	Metafaz-anafaz geçiş kontrol noktası
p53	Protein 53

PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz
PBS	Fosfat sığır salın
PR	Progesteron reseptörü
rB	Retino blastoma geni
SSB	Tek zincir kırıkları
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
UPR	Katlanmamış protein yanıtı



1. GİRİŞ

Kanser, günümüzde kardiyovasküler hastalıklardan sonra, mortalite ve morbidite oranları açısından ikinci sırada yer almaktadır. Kanser, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne bağlı Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) verilerine göre 2018 yılında dünya genelinde 18,1 milyon kişiyi etkilemiş ve bu sayının 2040 yılında 29,5 milyon olacağı öngörülmüştür. Yine bu verilere göre 2018 yılında 9,6 milyon kişinin kanserden öldüğü bildirilmiştir [1].

Akciğer, kadın meme kanseri ve kolorektum kanserleri insidans açısından ilk üç kanser, ölümlü vakalar içinde ise ilk beş kanser tipi içerisinde yer almaktadır. 2018 yılı içinde kadın meme kanseri ve akciğer kanserine 4,2 milyon (her biri için 2,1 milyon) yeni teşhis konduğu tahmin edilmektedir [1]. Türkiye kanser insidansı, dünya insidansının üzerinde seyrederken, Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelere göre kanser açısından hem kadınlarda hem de erkeklerde daha düşük bir hızda olduğu görülmektedir. Ülkemizde görülen ilk 5 kanser türünün dünyadaki ve diğer gelişmiş ülkelerdeki örüntü ile benzerlikler gösterdiği bilinmektedir. Ülkemizde erkeklerde trake, bronş ve akciğer kanseri, kadınlarda ise meme kanseri en sık görülen kanser türleridir [2].

Dünya çapında meme kanseri, melanom olmayan cilt kanseri dışında kadınlarda en yaygın görülen kanser tipidir. ABD'de 2017 yılında 250 000'den fazla yeni meme kanseri vakası teşhis edilmiş olup tüm kadınların % 12'sinde yaşamları boyunca meme kanseri teşhisi konulması beklenmektedir [3].

Kanser kişilerde sosyal, ruhsal ve fiziksel sorunlara yol açarken bir yandan da tedavinin pahalılığı sosyoekonomik sorunları ortaya çıkarmaktadır. Bu açıdan bakıldığında kanser bir toplum sorunudur ve kanserle savaşmak hepimizin görevidir. Kanserle ilgili savaşın temel önceliği hastalığın tedavi ve önlenmesini büyük ölçüde iyileştirmek için yeni mekanizmalar keşfetmek ve geliştirmektir. Sonuç olarak günümüzde kanser hakkındaki birçok bilgi bu sayede ivme kazanmıştır [4].

Meme kanseri, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2 veya erbB2) dahil olmak üzere hormon reseptörlerinin

ekspresyonuna bağlı olarak farklı alt tiplere sahip karmaşık ve heterojen bir hastalıktır [5]. Bununla beraber bu hastalıkla mücadelede bu reseptörleri aşığı regüle eden kimyasal moleküllerin araştırılması iyi bir strateji olarak görülmüştür. Son yıllarda meme kanseriyle mücadelede FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış birçok ilaç piyasaya sürülmüş, birçok ilacın da klinik araştırmaları devam etmektedir [6]. Tedavide kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi, bifosfanat tedavisi ve hedefli biyolojik terapiler ön plana çıkmaktadır. DNA yapısına alkil bağlayarak hücre bölünmesini engellemeye çalışan alkil ajanları, DNA'yı bozan ve hücre bölünmesini engelleyen antibiyotikler olan antrasiklinler, DNA'ya bağlanarak hücrenin onarımını engelleyen metal platin ilaçlar, hücre bölünmesi de dahil olmak üzere birçok hücresel fonksiyonda önemli rol oynayan yapılar olan hücresel mikrotübüllere müdahale ederek etki gösteren taksanlar ve vinca ajanları meme kanseri kemoterapisinde kullanılan ilaç gruplarıdır. Hormonal tedavide anti östrojen, aromataz inhibitörleri ve yumurtalık baskılayıcı ilaçlar ön plandadır. Hedefli/biyolojik tedavide kemoterapiye göre daha az toksisite ve yan etkileri olan ilaçlar Her2 reseptörü ve mTORC1 gibi kanser hücrelerinin büyümesine ve bölünmesine izin veren bazı normal vücut proteinlerinin etkilerini engellemeye odaklanır [7]. Bu açıdan bakıldığında kanserle tedavide yeni etken maddelerin belirlenmesi veya bazı kimyasal maddelerin etkinliğinin tespiti oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, biyolojik olarak aktif olan bisiklik dihidropirol bileşiklerinin N-phenyltriazolinedione (PhTAD) ilavesi ile oluşturulmuş yeni türevlerinin MCF-7 (meme kanseri) ve MCF-12A (normal meme epiteli) hücre hatlarında antikanser aktivitesi ile gen ifadesi değişimleri arasındaki ilişkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

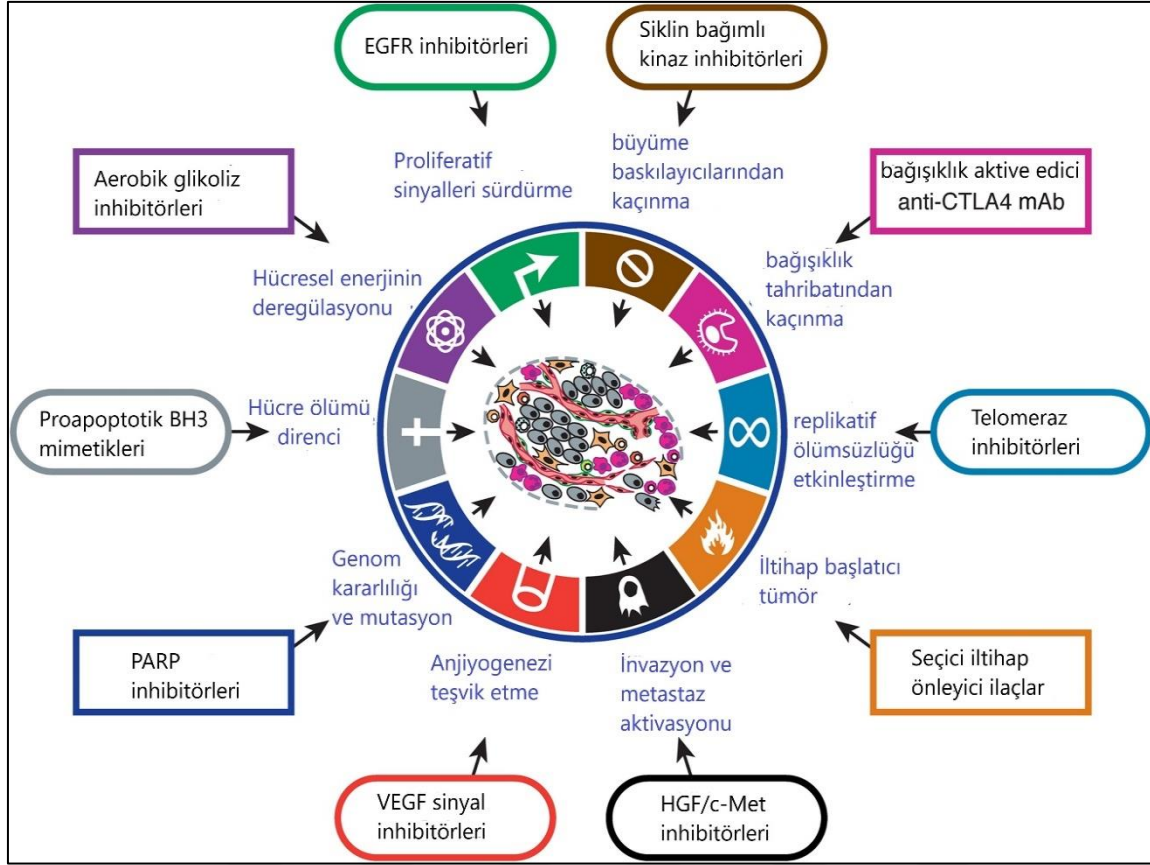
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, DNA tamiri, hücre döngüsü, apoptozis, farklılaşma ve hücre-hücre etkileşimi gibi temel hücresel işlevleri etkileyen genetik hastalıklar grubu olarak tanımlanmaktadır. Kanserin en önemli nedenleri arasında, hücre büyümesini ve metastazı etkileyen DNA mutasyonları gelmektedir. DNA mutasyonlarına neden olan maddeler mutajenler olarak bilinirken, kansere neden olan mutajenler ise kanserojenler olarak bilinmektedir [8].

Canlının en temel birimi olan hücreler, hücre döngüsünün kontrolü altında enzimler, hormonlar, diğer düzenleyici ve uyarıların etkisine bağlı olarak ihtiyaca göre büyümekte ve bölünmektedir. Ayrıca her hücre belli bir süreçte büyümekte, yaşlanmakta ve ölmektedir. Kansere hücreleri ise bu süreçlere çeşitli mekanizmalarla girmeden canlılıklarını koruyabilen hücre gruplarıdır. Kansere tümörleri ise klonal hücrelerin çok aşamalı tümör gelişimleri sonucunda oluşmaktadır [9]. Bu tümör hücrelerinin birçok biyolojik yeteneklerinin olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Bu yetenekler; proliferatif sinyalleşmeyi sürdürme, büyüme baskılayıcılarını atlatma, apoptoza direnme, sınırsız çoğalmayı sağlama, anjiyogenezi indükleme ve istila ve metastazı aktive etme, hücrenin enerji metabolizmasını yeniden programlama ve immün yıkımdan kurtulma şeklinde sıralanabilir (Şekil 2.1). Bu sayede tümörlü hücreler, normal hücrelere göre farklı yapısal özellikler geliştirmekte ve farklı işlevler kazanmaktadır. Anormal özelliklere sahip bu hücreler hem olduğu yerlerde hem de kan ve lenf sistemi yoluyla metastaz yaparak, istila ettikleri doku veya organın görevini yerine getirmesini engellemektedirler [9, 10].

Kansere oluşumunda hem iç (kalıtsal mutasyonlar, hormonlar, immün bozukluklar) hem de çevresel/edinilen (tütün, radyasyon, enfeksiyonlar vb.) sebepler etkilidir. Kansere, kişinin yaşamı biçimiyle ve çevresiyle de yakından alakalıdır. Sigara, diyet (kızarmış yiyecekler, kırmızı et), alkol, güneş ışınları, çevre kirliliği, enfeksiyonlar, stres, obezite ve fiziksel aktivitenin yetersizliği gibi etkenler hastalığın ortaya çıkmasında etkili faktörlerin başında gelmektedir [11, 12].



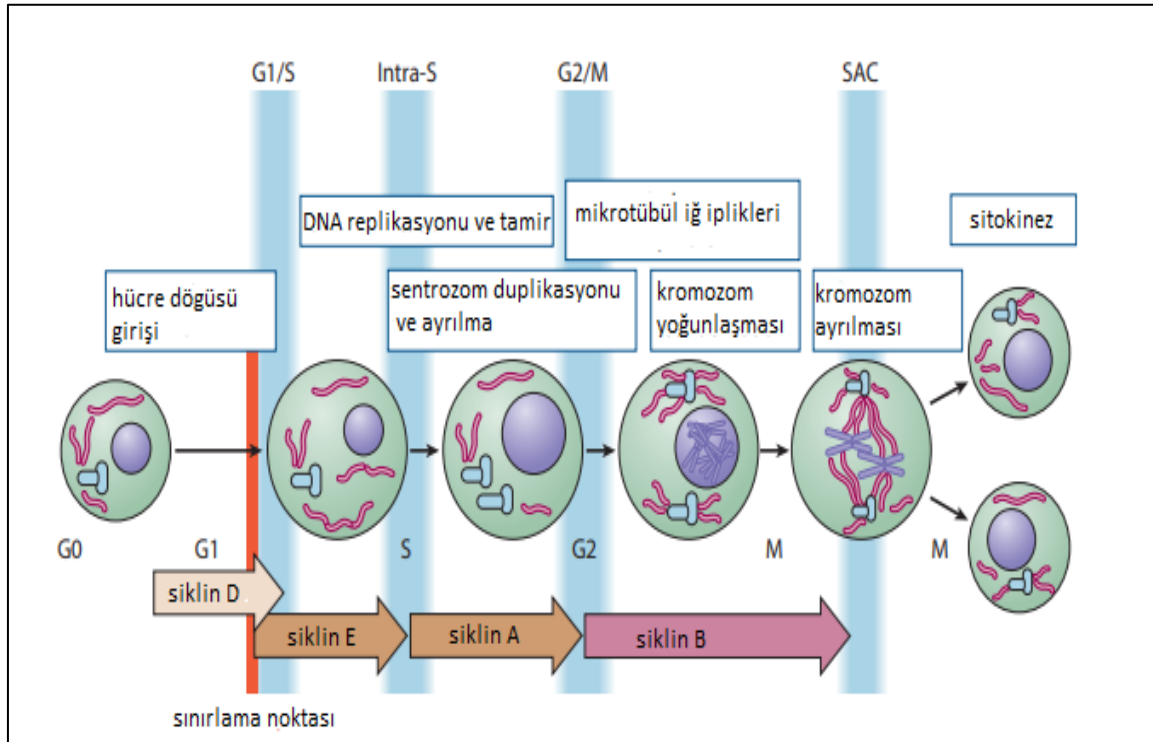
Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin yetenekleri [10]

2.2. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, bir hücrenin bölünmesi ve çoğalması sürecidir. Yani DNA'yı hatasız kopyalamak ve çoğalan kromozomal DNA'nın mitoz ile iki hücreye eşit ayrılmasının sağlanmasıdır. Kontrolsüz hücre çoğalması ise kanserin en temel ayırt edici özelliğidir ve tümör hücreleri tipik olarak hücre döngüsünü doğrudan düzenleyen genleri hasarlı hücrelerdir [13].

Hücre döngüsü mekanizmalarının keşfi 1880'de Flemming ve Strasburger tarafından soğan kök hücrelerinin optik mikroskopta incelenmesi ve mitoz kavramını ortaya atmalarıyla başlamıştır [14]. Hücre döngüsü 20. yüzyılın ilk yarısına kadar çekirdek ve sitoplazmik bölünme ile karakterize olan M fazı (mitoz fazı) ve iki ardışık mitoz arasındaki süreç olan interfaz ile tanımlanmıştır. Howard ve Pelc 1951'de, fasulye kök uçlarını radyoaktif fosforla inkübe etmiş ve DNA replikasyonunun belirli zaman aralıklarında gerçekleştiğini gözlemlemiştir. Bu gözlemler genetik materyalin çoğaltılmasının meydana geldiği DNA

sentezi (S) fazı kavramını ve S ile M fazları arasındaki hücrenin büyümesi ile karakterize G1 ve G2 (Gap1-2) ile tanımlanacak olan hücre döngüsü modelini ortaya koymuştur [15] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Hücre döngüsü modeli [16]

Hücre döngüsü; interfaz, mitoz ve sitokinez olmak üzere üç safhada incelenebilir. İnterfaz aşaması hücrenin bölünme için gerekli hazırlıkları yaptığı safhadır. Bu aşama G0, G1, S ve G2 alt gruplarından oluşur. Hücreler temel olarak bölünme için iç ya da dış bir sinyal almadığı sürece G0 aşamasında sessiz (dinlenme fazı) olarak bekletilirler. Bu aşamada hücre biyokimyasal olarak aktiftir. Sinyal alımı gerçekleştiğinde hücre hacimce büyüdüğü ve genetik materyalin kopyalanması için gerekli materyallerin sentezlendiği G1 fazına geçer. G1 fazında olup sınırlama noktasını geçen her hücre büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaksızın DNA replikasyonunun gerçekleştirildiği S fazına geçer. S fazının başarılı geçmesinden sonra hücre hem DNA sentezinin tamamlandığından emin olmak hem de mitozun güvenli geçmesinin kontrol edilmesine olanak tanıyan G2 aşamasına girer. Mitoz nükleer bölünmenin yani genetik materyalin yavru hücrelere eşit dağılımının gerçekleştiği aşamadır. Sitokinez mitozla eş zamanlı başlayarak sonuçta iki yavru hücre meydana gelmiş olur [17] (Şekil 2.2).

2.2.1. Hücre döngüsünün anahtar moleküler düzenleyicileri

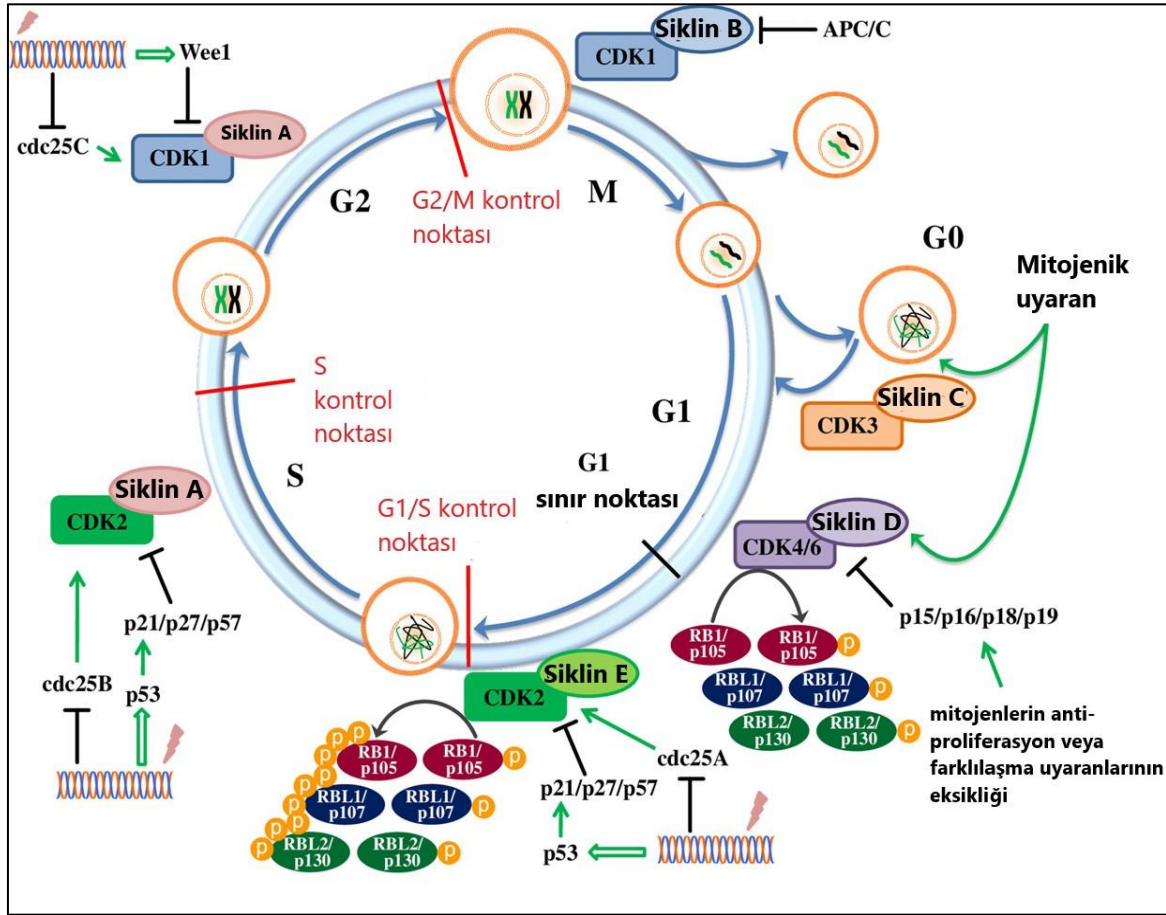
Yetişkin vücuttaki hücrelerin çoğu sessizdir yani biyokimyasal ve işlevsel olarak etkinken yeni hücreler oluşturmak için bölünmezler. Hematopoetik doku ve bağırsak hücreleri ise yüksek bir bölünme serbestisine sahiptir. Çünkü bu dokuların yenilenmesi için aktif çoğalma esastır. Canlı organizmada proliferasyon kararı sıkı bir şekilde düzenlenmekte olup, besleyici maddeler ve büyüme faktörleri, inhibe edici faktörler, çeşitli dış sinyaller, hücrenin komşularından ve dış matriksinden gelen etkileşimlerden etkilenmektedir. Her bir faktör proliferasyonu destekleyen veya baskılayan hücre içi sinyal yollarını uyarır. Hücre iç ve dış tüm sinyalleri birleştirir ve ancak herşey uygunsa hücre döngüsünü başlatabilmektedir [16].

Ökaryotik hücre döngüsü geçişlerini düzenleyen birçok gen, enzim ve hormon koordineli bir şekilde çalışmaktadır. Döngüde karşılaşılabilecek her türlü hasara karşı dur ve geç emirleri ile hücrenin kontrol altında tutulması sağlanır. Bu kontrol noktaları G1-S, intra S, G2-M ve metafaz–anafaz (SAC) geçişinde bulunur [16] (Şekil 2.2).

Kontrol noktalarını düzenleyen proteinlerden olan siklinlerin, hücre bölünmesi sırasında sentez ve yıkımına bağlı olarak konsantrasyonları yükselir veya azalır. Siklinler, siklin/CDK kompleksinin oluşmasını sağlayan “siklin kutusu” adı verilen ve 100 aminoasitlik ortak bir dizi taşırlar. Onları birbirinden ayıran özellik ise N-terminal dizilerinin tamamen farklı olmasıdır. İnsan genomunun 25’ten fazla siklin kodladığı fakat bunlardan sadece A-B-D-E tipi olanların hücre döngüsünde önemli rol üstlendikleri bilinmektedir. Siklinlerin D tipi (D1, D2, D3) sınırlama noktası boyunca işlev gören G1 regülatörleridir. S fazı regülatörü olan siklinler E ve A tipi, Mitotik faz siklinleri ise B ve A tipidir [18] (Şekil 2.3).

Siklin bağımlı kinazlar (CDKs), siklinlerin fosforilasyonu sonucu aktive olan ve yüksek oranda korunmuş Ser/Thr kinazların alt ailesidir. Her CDK belli bir siklinle aktive olmaktadır. CDK’lar hücre döngüsünün her aşamasını karakterize eden, çeşitli olayları başlatan ve regüle eden geniş bir protein yelpazesini fosforile etmektedir. İnsan genomunun 15 CDK kodladığı tespit edilmiş fakat bunların birçoğunun rolleri henüz açıklığa kavuşmamıştır. CDK4/6 hücre döngüsünün girişini düzenlerken, CDK2 G1’den S’ye geçişi ve S sırasındaki bazı olaylarda rol oynamaktadır. Yine CDK1 G2 ve mitoz

aşamalarında ana rol oynarken diğer aşamalarda ilave görevler üstlenmektedir [19] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Hücre döngüsü ve düzenleyici moleküller [20]

CDK inhibitörleri INK4 ve Cip/Kip olarak adlandırılmış iki protein ailesinden oluşur. INK4 proteinleri CDK4/6'yı inhibe ederek siklin D ile etkileşimlerini önler ve G1 aşamasının ilerlemesini durdururlar. Cip/Kip ailesi, p21, p27, p57 proteinlerinden oluşur. Bu aile hem CDK hem de siklinlerle etkileşime girerek tüm CDK-siklin komplekslerinin aktivitesine etki edebilmektedir. Cip/Kip ailesi, CDK2'nin siklin E/A inhibisyonuna neden olurken CDK2/6'nın siklin D ile etkileşimini aktive ederek hücre döngüsünün farklı evrelerinde aktivatör ve inhibitör rol üstlenir [16, 20] (Şekil 2.3).

2.2.2. Hücre döngüsü ve kanser

İnsanlarda gözükten tüm kanser tiplerinde, hücre döngüsüne girişi kontrol eden moleküler yollarda ve p53 yolu düzenleyicilerindeki mutasyonların temel rol aldığı bildirilmiştir

[21, 22]. Hücre döngüsünde en sık karşılaşılan değişiklikler pRB tümör baskılayıcısının kaybı veya mutasyonu, aşırı siklin ve/veya CDK ekspresyonu, CDK inhibitörlerinin ekspresyonunun kaybı olarak sıralanabilir. pRB ve p53 molekülleri, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve stres tepkisinin oluşturulmasında kritik kapı koruyucularıdır ve temel işlevleri kromozomlarda hem yapısal hem de sayısal sapmalar düzeyinde genom bütünlüğünü korumaktır [23, 24].

CDK4 aşırı ekspresyonu melanom, sarkom, glioma ve meme kanserinde tanımlanmıştır. Ayrıca CDK4/6 mutasyonlarının CDK inhibitörlerinin bağlanma kaybına neden olduğu da gözlemlenmiştir [25, 26]. INK4 genleri arasında p16 genleri en sık mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı genlerden biridir. p16 kaybı hücrenin yaşlanma ve CDK4/6 aktivitesinden kaçışına sebep olur. CDK4/6 ve CDK2 ile en alakalı hedef olan RB1/p105 tipik olarak retinoblastom ve küçük akciğer kanserlerinin % 80'inde kaybedilmiştir [27, 28]. Siklin E1/2 gen amplikasyonları özellikle rahim ve yumurtalık kanserlerinde sıklıkla görülür [29]. Kontrol noktası proteinlerini etkileyen mutasyonlar arasında ATM-CHK2-p53 yolu sıklıkla inhibe edilmektedir [30]. Özellikle CHK2 varyantları prostat ve meme kanserine yatkındır. S ve G2/M kontrol noktalarının bir parçası olan BRCA1/2 proteinlerinin gen mutasyonları meme ve yumurtalık kanserlerine yatkındır [31].

CDK aktivasyonu CDC25 (A, B ve C) fosfataz ailesinin üyeleri tarafından fosforilasyon yoluyla düzenlenir. CDC25B'nin primer meme kanserlerinin % 32'sinde aşırı eksprese edildiği gözlemlenmiştir [32].

Anti-kanser ilaç araştırmalarında tümör hücrelerini öldürme stratejileri günümüzde temel hücre transformasyonu olan moleküler hedefleri etkilemeye yönelik değişmektedir. Hücre döngüsü düzenleyici moleküllerinin farklı kanser türlerinde genetik değişim hedefi olduğuna dair kanıtlar, CDK inhibitörlerinin önemini ortaya koymuştur [32].

2.3. Meme Kanseri

Günümüzde görülme sıklığı açısından ilk üç sırada yer alan meme kanserinin tarihi oldukça eskidir. M.Ö. 3000 yılına ait olan ve bilinen en eski cerrahi metin olarak kabul edilen Edwin Smith Papirüsü'nde geçen 48 vakanın 8'inde erkek meme kanserine ait bilgilerin yer aldığı bilinmektedir [33].

Meme kanseri, hem kadınlarda hem erkeklerde meme hücrelerindeki düzensizliklerin sebep olduğu bir kanser tipidir. Meme kanseri diğer kanser türlerinden farklı olarak büyük oranda steroid hormonlarından etkilenmektedir. Birçok doku ve organ embriyogenez sırasında modellenir ve yetişkin yaşamı boyunca bu modelleme değişmeden kalır. Oysa meme bezi ergenlik, hamilelik, emzirme ve menopozal dönemlerde belirgin değişiklikler geçiren dinamik bir organdır [34].

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2018 yılı verilerine göre meme kanseri tüm kanserler içinde % 46,3 ile en sık görülen, tüm ölümlü kanser vakalarında ise % 13 (2,1 milyon) mortaliteye sahip önemli bir kanser tipidir [35]. Kadınlar arasında her 4 kanser vakasından 1'ini oluşturmaktadır ve her 8 kadından 1'i meme kanserinden etkilenmektedir. 185 ülkeden 154'ünde en yüksek insidansa sahip kanser tipi olan meme kanseri, 100'den fazla ülkede kanser ölümünün en önde gelen sebeplerindedir [1] (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Dünya Sağlık Örgütü'nün her iki cinsiyette dünya çapında 2018 yılı kanser insidans oranları [35]

Kanser tipi	Oran
Meme	46,3
Prostat	29,3
Akciğer	22,5
Kolorektum	19,7
Serviks uteri	13,1
Mide	11,1
Karaciğer	9,3
Corpus uteri	8,4
Tiroid	6,7
Yumurta	6,6

Meme kanseri, bir anatomik bölgeyi etkileyen heterojen bir hastalık olmasının yanında aynı zamanda fenotipik değişiklikler gösteren bir hastalıktır. Meme kanseri hastalık biyobelirteçleri olarak tümör morfolojisi ve sınıflandırma derecesi, tümör büyüklüğü, lenf nodu metastazı, östrojen ve progesteron reseptör varlığı (ER-PR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) sayılabilir. Bu belirteçlerin varlığında immünohistokimya ve gen ekspresyon tekniklerinin kullanılmasıyla moleküler alttıplendirme yapılmıştır. Bu moleküler alttıpler biyolojik tedaviye verdiği yanıt ve hastalığa özgü değişiklikler ile

birbirinden ayrılırlar. Farklı tipler meme kanserinin biyolojik çeşitliliğini yansıttığı gibi tedavide kişiselleştirilmiş bir yaklaşıma yönelmeyi de zorunlu kılmaktadır [36].

2.3.1. Meme kanseri genetiği

Meme kanseri ile ilgili birçok gen tanımlanmıştır. Hem onkogenler hem de anti-onkogenlerin mutasyonları ve anormal amplifikasyonları, tümörün başlatılması ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır [37]. Bunların bazıları şunlardır;

BRCA1 ve BRCA2

Meme kanseri vakalarının % 5-10'u kansere duyarlı genlerden kaynaklanmaktadır. Bu genlerden en yaygın olanı 1990'ların ortalarında tespit edilen BRCA1 (BREast CAncer 1) ve BRCA2'dir. BRCA1 17q21 ve BRCA2 13q12 kromozom kolları üzerinde yer alır. Her iki gen de tümör baskılayıcı proteinleri kodlar. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar otozomal dominant olarak kalıtılır [38]. BRCA1 eksikliği, hücre döngüsü kontrol noktasında, anormal sentrozom dublikasyonu, genetik stabilite ve nihayetinde de apoptoz düzensizliğine yol açar. Hastalıktan etkilenen yüzlerce bireyin ailesinde bu genlerin mutasyona uğradığı tespit edilmiştir. BRCA1 görülme sıklığı 1/1000 olup BRCA2 prevalansı net olarak bilinmemektedir. Bu iki genin hem yumurtalık kanseri hem de meme kanseri riskini artırdığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [36-38].

PARP

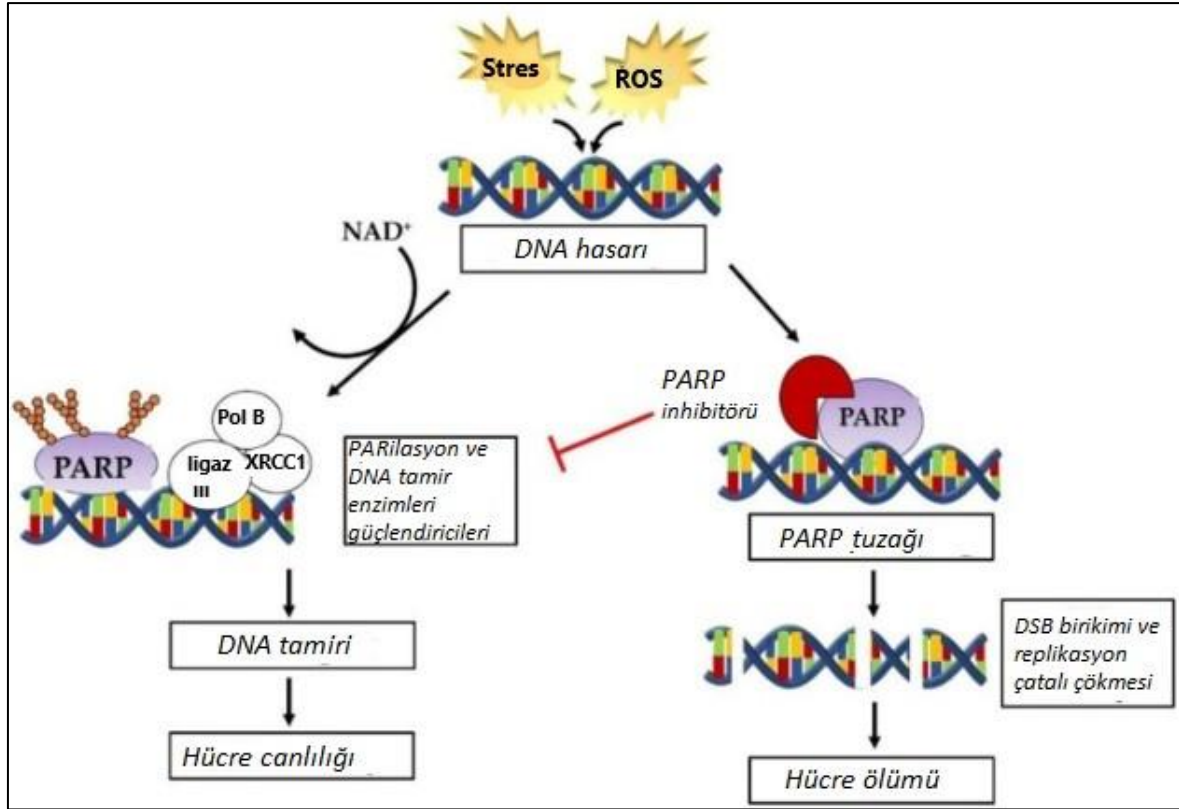
Genomik bütünlüğün korunması için, hücrelerde DNA hasar yanıtı olarak tanımlanan koordine edilmiş bir eylemle endojen veya eksojen olarak indüklenen DNA lezyonlarını tespit eden ve onarabilen mekanizmalar bulunur. Çekirdekte ilgilenilen bölgelerde aşağı yönlü efektörleri toplayan birçok algılayıcı bulunmaktadır. Bunlar arasındaki poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), DNA onarım proteinleri için bir sinyal ve platform görevi gören poli (ADP-riboz) (PAR) zincirlerini sentezleyebilen ve DNA kopmalarıyla aktive olan önemli bir nükleer proteindir. Çeşitli alt tipleri olan PARP'lardan PARP-1, PAR veya mono-ADP-ribozu kendilerine veya diğer hedef proteinlere aktaran 17 enzimi içeren ADP-ribosil transferazların üst ailesine ait bir proteindir. PARP-1'in yanı sıra, PARP2 ve PARP3 de DNA'ya bağımlı (ADP-riboz) transferaz aktivitesine sahiptir. PARP-1 ve PARP2, uzun

PAR zincirlerinin sentezini katalize ederken, PARP3, bir mono-ADP transferazdır. Poli-ADP-ribosilasyon (PARilasyon), negatif yüklü PAR'ın hedef proteinlerin glutamat, aspartat veya lizin kalıntıları üzerine kovalent bağlanmasından oluşur. Bu reaksiyon sırasında, PARP'ler, nikotinamid ve bir proton salınımı ile bir substrat olarak oksitlenmiş nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD⁺) kullanır ve hücre, NAD⁺ seviyelerini geri kazanmak için ATP'yi kullanır [39].

PARilasyon farklı etkiler yaratabilir: protein-DNA etkileşimlerini kararsızlaştırır veya stabilize eder, protein-protein etkileşimlerini ve fonksiyonlarını düzenler, hedef proteinlerin aktivitesini artırır, fakat aynı zamanda proteazom tarafından protein bozulmasını uyarır. PARilasyon yoluyla PARP proteinleri, DNA çoğaltma ve transkripsiyon gibi çok sayıda hücreSEL işlevi kontrol eder ve DNA hasarı tepkisi ve hücre ölümünde büyük öneme sahiptirler [40].

PARP-1, DNA hasarına cevaben 500 kata kadar çıkabilen toplam hücreSEL PARilasyon aktivitesinin % 85-90'ından sorumludur. PARP-1 tek iplik kırıklarını (SSB) tanıyabilir ve temel eksizyon onarımında (BER) yer alır [41]. Hasar görmüş veya yanlış DNA bazı, endonükleaz APEX1'in alımını indükleyen bir abazik bölge oluşturan spesifik glikosilazlar tarafından tanınır [42, 43] PARP-1 ayrıca, homolog rekombinasyonun (HR) ve klasik homolog olmayan uç birleştirme yolunun (NHEJ) aracılık ettiği DNA çift iplik kırıklarının (DSB) onarımında rol alan proteinlerin fonksiyonunu da düzenleyebilir [39] (Şekil 2.4).

BRCA ve PARP-1 arasındaki yakın bağ, iki araştırma grubunun bağımsız olarak PARP inhibisyonunun mutasyona uğramış BRCA1 veya BRCA2 kanserlerinde sentetik ölümcüllüğe neden olduğu vurgulanmıştır. Yapılan çalışmalarda, BRCA1 veya BRCA2'de eksik olan hücrelerin PARP inhibitörlerine duyarlılığı yaklaşık 1000 kat artırdığı gösterilmiştir [44, 45].



Şekil 2.4. PARP yolağı [45]

Her2

Bu gen tirozin kinaz ailesinin bir epidermal büyüme faktörü reseptörüdür (EGFR) ve ligand bağlı heterodimerler oluşturarak aşağı akış sinyal iletim yollarını aktive eder. Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (c-erbB-2), meme kanserinin önemli bir onkogenidir. İnsan kromozomunun 17q12 kolu üzerinde yer alır. Her2 gen ekspresyonu, temel olarak gen amplikasyonu ve yeniden düzenleme yoluyla aktive edilir [46].

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)

Her1 ya da c-erbB-1 olarak da bilinen EGFR, tirozin kinaz ailesinin hücre yüzeyi glikoproteinidir. EGF, TGF-a, amphiregulin, betacellulin gibi ligandlara bağlanarak aktive edilir. PI3K, Ras-Raf-MAPK ve JNK (c-Jun N-terminal kinaz_stresle aktive olan kinazlar) dahil olmak üzere EGFR'nin aşağı akış sinyal yolları, hücre çoğalmasını, hücre istilasını, anjiyogenezi teşvik etmek ve hücreleri apoptoza karşı korumak için tetiklenir. EGFR'nin

aşırı ekspresyonu, çok agresif bir meme kanseri türü olan enflamatuar meme kanseri (IBC) vakalarının % 30'undan fazlasında bulunur. Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ekspresyonu ve HER2 amplifikasyonu olmamasıyla karakterize edilen üçlü negatif meme kanseri (TNBC) vakalarının yarısından fazlasında ayrıca EGFR aşırı ekspresyonu bulunur [47].

Ras

Ras gen ailesi üyelerinden H-ras, K-ras ve N-ras genleri sırasıyla 11 (11p15), 12 (12p12) ve 1 (1p22) kromozomunda bulunur. Bu genler tarafından kodlanan proteinler ileri derecede homologdur ve guanotin trifosfat (GTP) bağlayıcı protein (G proteini) süper ailesine aittir. Nokta mutasyonları, genellikle bu üç insan Ras geninin aşırı ekspresyonu ile ilişkilidir ve çoğu, GTP bağlanması için kodlama alanında bulunan hatalı mutasyonlardır. Ras proteinlerinin mutasyonları nadiren meme kanserinde (< % 5) bulunsa da, Ras sinyal iletim yolundaki anormallikler hem iyi huylu hem de habis meme dokularında gözlenir [48].

c-myc

MYC proteini ilk olarak bir viral onkogeninin hücrel homologu olarak tanımlanmış bazik sarmal-ilmek-sarmal (bHLH) alanı içeren transkripsiyon faktörüdür. bHLH proteinleri, mayadan insana kadar tüm canlı organizmalarda bulunan ve kritik hücrel işlemlerde rol alan, transkripsiyonel regülatörlerin büyük bir üst ailesini oluşturur. MYC'nin insan meme kanserinde aşırı amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu 1986 yılında keşfedilmiş ve meme kanserindeki durumu birçok araştırmada incelenmiştir. MYC, çoklu seviyelerde düzenlenen, transkripsiyonel düzenleme veya protein modifikasyonu yoluyla Wnt, Notch, TGF- β ve PI3K gibi birkaç sinyal yolağının aşağı akış efektörüdür. Meme kanseri hücrelerinde hücre büyümesi, transformasyonu, anjiyogenezi, ve hücre döngüsü kontrolü ile ilişkilendirilmiştir [49, 50].

2.4. Endoplazmik Retikulum (ER) Stresi

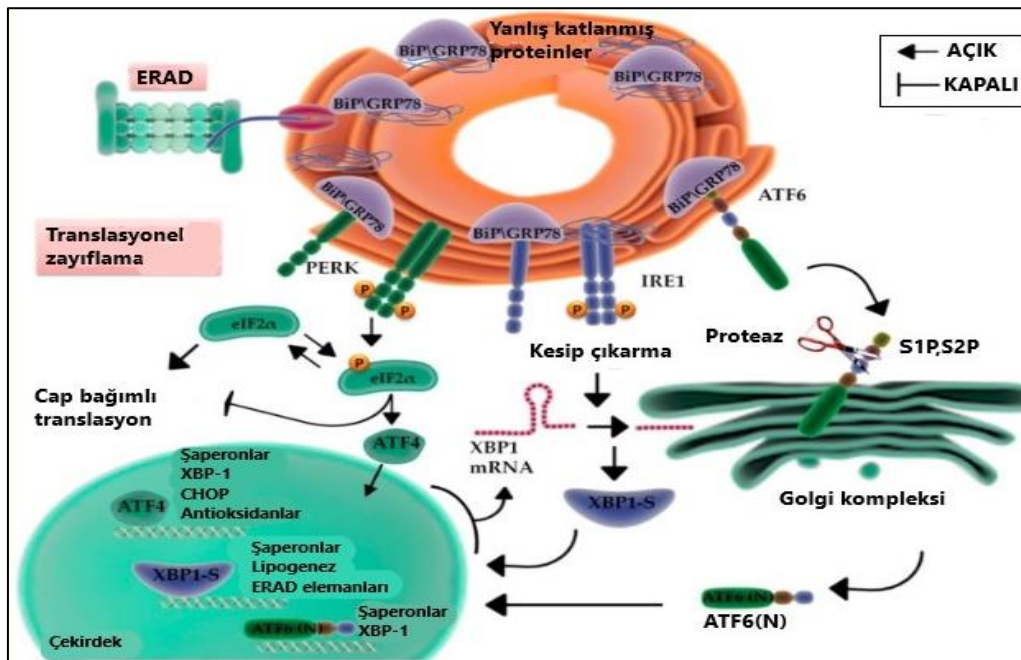
ER'nin temel işlevi hücrede posta görevi görerek uygun şekilde katlanmış proteinlerin nihai hedeflerine ulaşmalarını garanti etmektir [51]. ER bununla birlikte lipid sentezi,

glikojenin bozulması, detoksifikasyon ve Ca^{2+} depolanması ve salıverilmesi gibi birçok temel işlevi de yerine getirir. Bu işlevler bazı hücrel şaperonlar tarafından düzenlenir [52].

Bu şaperonlar üç gruba ayrılabilir;

- 1- Spesifik olmayan proteinlerin montajını ve katlanmasını kolaylaştıran GRP78 ve GRP94
- 2- Glikoproteinlerin olgunlaşma sürecine katılan lektinler,
- 3- Özellikle kollajen için ısı şok proteini 47 (Hsp47) [53]

Hipoksi, açlık, oksidatif etkiler, pH, Ca^{2+} tükenmesi, hipoglisemi, ATP tükenmesi ve viral enfeksiyonlar gibi çeşitli stres faktörleri ER homeostazını bozabilir. Tüm bu etkiler doğru protein katlanmasını engelleyebilir, nihayetinde yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesine neden olarak ER stresi olarak bilinen bir durum yaratabilir. Böyle bir stres durumuna yanıt olarak hücreler, temel amacı ER homeostazını yeniden sağlamak olan UPR (katlanmamış protein yanıtı) adı verilen korunmuş bir sinyal iletim yolu geliştirmiştir. Bununla birlikte, stres koşulları çok yoğun olduğunda ve geri alınmadığında, UPR, genellikle mitokondriyi içeren intrinsik apoptozis yoluyla bir hücre ölüm yolunu aktive eder. Bu nedenle, toksik ve çözülmemiş stres koşullarında, UPR hücreyi hayatta kalmadan ziyade ölüme sürükler [54] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Endoplazmik Retikulum (ER) stres koşullarında UPR aktivasyonu [53]

2.4.1. GRP78 ve GRP94'ün temel işlevleri

ER, salgı ve zar proteinlerinin yanı sıra lipidlerin sentezlendiği özel bir perinükleer organeldir. ER lümeni içinde, protein şaperonlar yeni sentezlenmiş polipeptitlerin katlanmasına yardımcı olur ve katlanmış veya yanlış katlanmış proteinlerin toplanmasını önler. ER'de katlanmış ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesini önlemek için kalite kontrolü yapılır. Bu kalite kontrolünün temelinde şaperonlar adı verilen özel moleküller yer alır. ER'de bilinen calnexin/calcreticulin ve GRP78/GRP94 olmak üzere iki şaperon sistemi bulunmaktadır [55].

En bol miktarda bulunan ER şaperonu, protein translokasyonu sırasında ER'nin geçirgenlik bariyerini korumaktan, protein katlanmasını ve montajını yönlendirmek ve bozulma için yanlış katlanmış proteinleri hedeflemekten sorumlu olan ve HSP70 protein ailesinin ER homologu olan 78 kilo daltonluk GRP78/BiP proteindir [56].

Hsp70 gen ailesinin diğer üyelerinden farklı olarak, GRP78 ökaryotik genomdaki tek bir kopya gen tarafından kodlanır ve indüksiyonu öncelikle transkripsiyon seviyesinde düzenlenir. GRP78 ayrıca bir ER kalsiyum bağlayıcı proteindir. Bununla birlikte GRP78, memeli UPR'sinin bir bekçisi olup stresli olmayan hücrelerde UPR sensörlerine bağlı bulunur. Stres durumunda GRP78 bu sensörleri UPR yolunun aktive olması için serbest bırakır. Anlaşılacağı üzere GRP78, UPR yolunun bir negatif düzenleyicisidir [56, 57].

GRP78, ER'nin dış yüzeyine yerleştirilmiş olan pro-apoptotik makinelerin (BIK ve kaspaz-7 gibi) aktivasyonunu baskılayarak güçlü bir apoptoz bastırıcı olarak da görev yapar [58]. GRP78'in, hücre yüzeyine taşınmasının yanı sıra mitokondri ve çekirdek ile ilişkili olduğu ve hatta spesifik hücre hatlarında aktif olarak salgılandığı da tespit edilmiştir. GRP78, hücrel lokalizasyonlarda sinyalizasyon, proliferasyon, istila, apoptoz, iltihaplanma ve bağışıklığı kontrol eden ek fonksiyonlar üstlenir [56].

Bir başka ana ER şaperonu, ER'de en bol bulunan glikoprotein olan 94 kilodaltonluk GRP94/Gp96 proteindir. Bu şaperon HSP90 proteinin ER homologudur. Mayadan insana kadar korunan GRP78'den farklı olarak, GRP94 sadece çok hücreli organizmalarda bulunur. GRP94, hem doğal hem de adaptif immün yanıtın başlangıcında etkilidir [59]. GRP94, GRP78 gibi, protein katlanmasına katılır, ER protein katlama makinesinin diğer

bileşenleriyle etkileşime girer, ER kalsiyumunu depolar ve ER ile ilişkili bozulma (ERAD) için yanlış katlanmış proteinlerin hedeflenmesine yardım eder [60]. GRP78'e kıyasla, GRP94'ün hedef proteinleri, bağışıklık, büyüme sinyali ve hücre yapışmasındaki kritik rollere daha spesifiktir. GRP94'ün de kanserin yanısıra prion hastalıkları ve otoimmün hastalıklarından sorumlu olduğu düşünülmektedir [56].

2.4.2. UPR yolu

UPR, ER'de başlayan ve üç ayrı sensör, IRE1 α , PERK ve ATF6, tarafından kontrol edilen hücresel stres tepkisini temsil eder. Normalde GRP78 üç sensörün ER lümen alanına bağlanır ve bunları inaktif bir durumda tutar. GRP78 ayrıldıktan sonra, IRE1 ve PERK, homodimerler veya oligomerler oluşturur ve otoposforilasyon yoluyla, aşağı akış yollarını aktive eder. GRP78 tarafından serbest bırakıldığında, ATF6'nın aktif formu çekirdeğe hareket eder ve farklı ER şaperonlarının transkripsiyonunu teşvik eder [54].

2.5. Isı Şok Proteinleri (HSP'ler)

Canlılar suyun donma noktasından 113°C'ye varan sıcaklıklarda yaşamaya adapte olmuşlardır. Her canlı yaşamı için ilgili optimum sıcaklıkların az çok üzerindeki sıcaklıklar hayatta kalmak için zorluklar oluşturmaktadır. Ani bir sıcaklık artışı, protein katlanmalarının açılmasına ve spesifik olmayan yığılmalara, dolayısıyla protein homeostasisinin bozulmasına neden olabilir. Bu tip karmaşıklığın önlenmesi için canlılarda ani sıcaklık artışına yanıt veren ısı şok proteinleri (HSP'ler) bulunmaktadır [61].

HSP'ler, protein katlanmasına ve onları bozulma, oksidatif stres, hipoksi ve termal strese karşı koruyan çeşitli hedef proteinlerin olgunlaşmasında rol oynayan geniş bir şaperon ailesidir. Hücreler, hipertermi, iskemi, anoksi, toksinler ve ultraviyole ışık, viral partiküller, cerrahi, mekanik veya diğer stres türleri gibi fizyolojik ve çevresel etkenlere maruz kaldığında HSP'ler olarak bilinen bir küçük protein grubunun sentezi doğal savunma tepkisi olarak artmaktadır. Bu proteinlerin aşırı artışı, hücrenin ölümcül koşullarda hayatta kalmasını sağlar [61, 62].

HSP'ler geçmişten beri korunmuştur ve her hücrede bulunmaktadır. Ökaryotik hücrelerde birçok farklı rol üstlenen HSP'lerin asıl işlevleri moleküler şaperonlar olarak görev

almaktır. HSP'lerin başlıca görevleri, proteinlerin katlanmasını kolaylaştırmak, yanlış katlanan proteinlerin doğru katlanmasını sağlamak ve ekstrem koşullar altındaki hücrelerde proteinlerin doğal yapılarını ve fonksiyonlarını korumalarını sağlamaktadır. HSP'leri birbirinden ayırmak için moleküler kütlelerine göre sınıflandırma yapılmıştır. Örneğin 70 kilodalton büyüklüğündeki molekül HSP70 sınıf üyelerini temsil eder. Memeli HSP'leri altı grup olup; küçük HSP'ler (HSP27 ve HSP10), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 ve büyük HSP ailesi (HSP110 ve GRP170) şeklindedir [62].

HSP'ler ilk defa *Drosophila melanogaster* tükürük bezlerinde sıcaklığın aniden yükselmesi sonucu transkripsiyonel aktivite ile artan proteinler olarak keşfedilmiştir. HSP'ler ani sıcaklık artışı, pH, radyasyon, yüksek konsantrasyondaki ağır metaller, etanol, antibiyotik, yağ asitleri ve reaktif oksijen formları sonucu sentezleri artmaktadır [63].

Isı şok proteinleri işlevsel olarak 7 farklı sınıfa ayrılabilir [61, 64]. Bunlar;

- 1- Türler arasında ifade düzeyi açısından baskın sınıf olan ve moleküler şaperonlar olarak bilinen HSP'lerdir.
- 2- Yanlış katlanmış veya geri dönüşümsüz biçimde toplanmış proteinleri hücreden temizlemek için gereken proteolitik bileşenlere sahip sınıftır.
- 3- Nükleik asitlerin kovalent olmayan modifikasyonlarını iyileştirmede rol oynayan sınıftır. Stres kaynaklı DNA hasarında rol oynayan DNA ve RNA değiştirici enzimlerini içerir.
- 4- Metabolik enzimleri bulunduran sınıftır. Türler arasındaki varyasyonlar bu grup için önemli bir ayrımdır.
- 5- Strese cevap yollarını başlatmak veya ribozom kurulum yollarını içeren ekspresyon basamaklarını engellemek için gerekli transkripsiyon faktörleri veya kinazlar gibi düzenleyici proteinleri içeren sınıftır.
- 6- Hücre iskeleti gibi hücrenin yapısal sürdürülebilirliğinde rol oynayan proteinleri içeren sınıftır.
- 7- Yukarı regüle edici protein sınıfı olarak taşıma, detoksifiye etme ve membran modüle edici proteinleri içeren sınıftır [61, 64]

Moleküler şaperonlar, varsayılan metabolik koşullar altında hücresel organellere entegre edilecek protein ve peptitlerin ribozomdan çıktıktan sonra zarlardan geçmek üzere katlanmasını ve açılmasını modüle ederek çeşitli sinyal yollarının aktive ya da inhibe

edilmesini sağlarlar. Ayrıca endoplazmik retikulum lümeninden veya mitokondri matriksinden salınan sitoplazmik proteinlerin de uygun şekilde katlanmasını kontrol ederler [64].

Hatalı proteinlerin moleküler şaperonlar tarafından tanınmasını sağlayan özellik hidrofobik amino asitlerin maruziyetidir. Genel olarak moleküler şaperonlar katlanma için yapısal bilgiye katkıda bulunmazlar, istenmeyen moleküller arası etkileşimleri önlerler. En az iki afinite arasındaki değişimler küçük molekül şaperonlar hariç diğer şaperon grupları tarafından ATP'nin bağlanması ve hidrolizi ile kontrol edilir [61].

2.6. Apoptoz ve Kanser

Kanseri tedavi etmenin bir yolu, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesini kontrol altına almak veya nihai olarak sonlandırmaktır. Kansere mücadelede hücre ölümü için hücrenin kendi mekanizmasını kullanmak oldukça etkili bir yöntemdir. Apoptozun hedeflenmesi aynı zamanda tüm kanser türleri için de etkilidir, çünkü apoptozdan kaçma bir kanserin işaretidir ve kanserin nedenine veya türüne özgü değildir. Ek olarak, apoptozu hedef almak en başarılı cerrahi dışı tedavi yöntemidir [65].

Terapötik hedefleme için iki ortak strateji, pro-apoptotik moleküllerin uyarılması ve anti-apoptotik moleküllerin inhibisyonudur. Uygunsuz bir apoptoz tetikleyicisi hücrenin hayatta kalmasını tehlikeye atabileceğinden dolayı apoptoz, ökaryotik hücrelerde yüksek oranda düzenlenir. Bununla birlikte, birçok kanser hücresi, bu sıkı düzenlenmiş hücre ölümü programını, anti-apoptotik moleküllerin seviyelerini değiştirerek veya pro-apoptotik hücre ölümü bileşenlerini etkisizleştirerek atlama için mekanizmalar geliştirir. Genomik analizin ortaya çıkışı, kanserlerin hücre ölümünü atlama izin veren çeşitli mutasyonlara ilişkin önemli bilgiler sağlamıştır. Artık kanser hücrelerinin, belirli bir tümör tipine özgü olan apoptozdan kaçmak için çeşitli mekanizmalarda meydana gelen düzensizlikleri kullandıkları bilinmektedir. Bu düzensizlikler, aşağıda örnekleri verilen içsel ve dışsal yollarda rol alan moleküllerde meydana gelmektedir [65].

2.6.1. BCL-2 protein ailesi

BCL-2 protein ailesi, intrinsik veya mitokondriyal apoptotik yanıtın merkezi kapıcılarıdır. Aile, birbiriyle etkileşime girerek apoptozu teşvik eden veya inhibe eden zıt fonksiyonlara sahip yapısal olarak ilgili proteinlerden oluşur [66]. Tüm BCL-2 üyeleri dış mitokondriyal zar üzerinde bulunur. Bunlar bir iyon kanalı formunda veya porların oluşturulmasıyla membran geçirgenliğinden sorumlu olan homo-hetero dimerlerdir [67].

İşlevlerine ve BCL-2 homolojisi (BH) bölgelerine göre BCL-2 ailesi üyeleri üç gruba ayrılır;

1- Dört BH alanının tamamını içeren anti-apoptotik proteinlerdir ve hücreyi apoptotik uyarıcılardan korurlar. Bazı örnekleri BCL-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1 ve Bcl-B/BCL2L10 şeklindedir.

2- Sadece BH-3 proteinlerinden oluşur, bu nedenle diğer üyelere kıyasla BH-3 alanı ile sınırlıdır. Bu gruptaki örnekler arasında Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk ve Bik gibi moleküller bulunmaktadır. DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu ve endoplazmik retikulum stres gibi hücresel stres zamanlarında apoptozun başlatıcısı olan sadece BH-3 proteinleri aktive olur. Bu nedenle pro-apoptotiktirler.

3- Üçüncü grubun üyeleri dört BH (BH1, BH2, BH3, BH4) alanının tümünü içeren pro-apoptotik gruptur. Bazı örnekleri Bax, Bak ve Bok/Mtd şeklindedir. Pro-apoptotik başlatıcılardan ve efektörlerden gelen apoptotik destekleyici etkiler, anti-apoptotik aile üyeleriyle doğrudan etkileşimleri ile önlenir. Bir hücrenin apoptoz geçirip geçirmediğini veya hayatta kalmasını yöneten mekanizma pro-apoptotik BCL-2 ailesi üyeleri arasındaki bu hassas ve dinamik dengeyi yönetir [68].

Mitokondriyal dış membran permabilitesi (MOMP), intrinsik apoptoz yolunda sitokrom c ve diğer apoptotik proteinlerin sitozol içine salınımını sağlayan ve kaspaz aktivasyonu ve hücre ölümüne yol açan önemli bir yolaktır. BCL-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri olan Bax ve Bak, bu sürece doğrudan katıldığına inanılan kilit düzenleyicilerdir. Bax, sağlıklı hücrelerin sitozol ve mitokondriyal yüzeyi arasında yapıcı bir şekilde yerleşen çözünür bir monomerik proteindir. Hücre stresinden sonra, sadece BH3 proteinleri doğrudan aktivasyon modeline göre Bax'ı doğrudan veya dolaylı yollarla aktive eder. Doğrudan mod, MOMP'a yol açan ve Bax'ı bağlayan ve aktive eden aktivatörler (örn. Bim, t-Bid) ile karakterize edilir. Dolaylı mod, anti-apoptotik proteinin aktivatörleri bağlama kabiliyetini inhibe eden ve böylece daha sonra Bax aracılı apoptozu indükleyen moleküller (örn. Bad, Noxa) ile kendini gösterir. Bax ekstrinsik apoptotik yolağa katılır. Kaspaz 8'i aktive edici t-

Bid'i oluşturmak için Bid'i ayırarak dışsal yolu güçlendirir. Ayrıca Bax'ın mitokondriyal yollarla çapraz yollar sayesinde hücre ölümünde birçok hücrel olayda belirleyici rol oynayan endoplazmik retikulum (ER) sinyal yolağına katıldığı, UPR yolunu modüle ettiği gözlenmiştir [69].

2.6.2. p53

TP53 geni tarafından kodlanan p53, ilk olarak onkojenik bir viral proteinle etkileşime giren 53kD büyüklüğündeki hücrel bir onkojenik protein olarak keşfedilmiştir. p53, DNA hasarından sonra hücre döngüsünü durdurma (p21 ile etkileşim) ve apoptozu tetikleyen (BCL-2 ailesi ile etkileşim) 'genomun gardiyanı' kabul edilen bir tümör baskılayıcı gen dir [70].

Tümör baskılayıcı p53, genomu korur ve hücre büyümesinin durmasını, DNA onarımını, yaşlanmayı ve hücre ölümünü teşvik etmenin yanı sıra otofaji ve kanser metabolizmasını modüle ederek tümör oluşumunu önler [70]. Bununla birlikte, kendi hayatta kalma ve büyümelerini arttırmak için, kanser hücreleri p53'ü etkisizleştirmek için çoklu taktiklerden yararlanır. p53 kısa ve etkin bir şekilde p53-kodlayan genin (TP53) mutasyona uğraması ile inaktive olabilmektedir. Nitekim TP53 insan kanserlerinde en sık mutasyona uğramış gen dir. Kanser türevli p53 mutantları, bir tek orijinal amino asidin farklı bir amino asitle yer değiştirmesi, yanlış eşleşmeler (~% 74), çerçeve kayması, kesme ve silme mutasyonlarını içerir [71].

Yabani tip p53, çeşitli stresörlere cevap olarak sayısız gen ekspresyonunu düzenleyen bir nükleer transkripsiyon faktörü olarak işlev gören bir homotetramer oluşturur. Mutant p53, kanser hücrelerinin hayatta kalması ve büyümesi için gerekli olan yeni bir fonksiyon aktivitesi elde eder. Örneğin, p53 mutantları, diğer transkripsiyon faktörleri veya kofaktörleriyle etkileşime girerek, artan gen transkripsiyonu ve ekspresyonu ile sonuçlanabilir. Ayrıca, diğer transkripsiyon faktörlerinin veya kofaktörlerinin DNA bağlama aktivitesini birleştirip bloke ederek gen transkripsiyonunu engelleyebilir veya transkripsiyonla ilgili olmayan proteinlere bağlanabilir ve hücrel fonksiyonlarını değiştirebilirler. Bu mekanizmalar sayesinde, p53 mutantları kazanılmış fonksiyon aktivitelerini kullanarak kanser malignitesini artırır ve ilaç direncine neden olur [72].

Mutant p53'ün fonksiyon kazanma aktivitesi aynı zamanda replikasyon stresinin ve genom kararsızlığının indüklenmesinde de rol oynar. Replikasyon stresi ile tetiklenen genom kararsızlığı, hemen hemen tüm insan kanserlerinin nedensel ve karakteristik bir özelliğidir [73]. Terapötik direnç ile p53 mutasyonu arasındaki klinik korelasyon 1990'lı yıllardan beri çalışılmaktadır. Yapılan bir araştırmada p53 mutasyonunun meme kanserinde belirgin kötü prognoz ve adjuvan sistemik tedaviye direnç ile ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur [74]. Bir başka çalışma ise, p53 mutasyonunun meme kanserinin Doxorubicin tedavisine verdiği cevabı azalttığını göstermiştir [75]. Mutant p53 barındıran yumurtalık kanseri hastalarının da Cisplatin tedavisine daha az duyarlılık gösterdiği bulunmuştur [76]. Üstelik p53 mutasyonunun kemoresor ve zayıf prognoz ile ilişkisi [77], akciğer kanserinde [78] mide ve kolorektal kanserlerde ve hematolojik malignitelerde de gözlenmiştir [79]. Kemo-direnci tetiklemenin yanı sıra, p53 mutantları radyoterapiye karşı kanser hücresi tepkisini zayıflatabilmektedir [80].

Apoptozisi ortaya çıkarmak, çoğu terapötik stratejinin kanser hücrelerini ortadan kaldırmasının ana yoludur. TP53 hedef genlerinin protein ürünleri, işlemde önemli rol oynamaktadır. Sitotoksik ajanların veya ışınlamanın neden olduğu dış baskılara cevap olarak, yabancı tip p53 çoğunlukla asetilleme ve fosforilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlar yoluyla aktive edilebilir, bu da güçlü apoptozise yol açar [81]. Strese duyarlı p53, PUMA, NOXA, BID ve NIX dahil olmak üzere sadece BH3-proteinlerinin ve ayrıca BAX ve PIDD gibi diğer pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu transkripsiyonel olarak düzenler. Bu proteinler mitokondriyal membran geçirgenliği (MOMP)'nin başlamasında rol oynar ve sonuç olarak kaspaz aktivasyonunu ve apoptozu tahrik eder. Mutant p53, transkripsiyonel aktivitenin ve BCL-2 ailesi ile p53 etkileşiminin bozulmasına yol açarak hem sitozolik hem de nükleer fonksiyonların inhibe edilerek ikili anti-apoptotik etkilere yol açar [72, 82].

2.6.3. Kaspazlar

Hücrenin cellatları olarak kabul gören kaspazlar ilk kez *Caenorhabditis elegans*'ta hücre ölümünün düzenleyicileri olarak keşfedilmiştir [83]. Kaspaz aracılı apoptozis, çok hücreli organizmalarda, işlevsiz veya sağlıklı hücrelerin ortadan kaldırılması yoluyla organ büyüklüğünü, şeklini ve doku homeostazını kontrol etmeye yardımcı olan önemli bir

süreçtir. Kaspazların çoğu, apoptozun uygulanmasında etkili olmasına rağmen, bağışıklık, hücresel tamirat, öğrenme, hafıza ve farklılaşma dahil olmak üzere çeşitli işlemlerde apoptotik olmayan fonksiyonlara da sahiptir [84]. Bu protein ailesinin tüm üyeleri aktif olmayan zimojenler (prokaspaz) olarak sentezlenir ve sadece birkaç basamak proteolitik işlemten sonra tamamen aktif hale gelirler. Yapısal olarak, kaspazlar, katalitik olarak aktif cep oluşturan iki alt birim içerir. Ek olarak, bazı üyeler, etkin aktivasyonları için gerekli olan büyük protein komplekslerinin (örn; apoptozom, inflamatuvar), oluşumunu kolaylaştıran N-terminal protein alım alanları içerir [85].

Kaspazlar genel olarak apoptozis (memelilerde kaspaz-3, -6, -7, -8 ve -9) ve enflamasyonda (kaspaz-1, -4, -5 ve -12) bilinen rolleriyle sınıflandırılmıştır. Kaspazlar, apoptozis süreci sırasındaki geçici aktivasyonlarına bağlı olarak iki kategoriye ayrılabilir. Başlatıcı/apikal kaspazlar (kaspaz-2-8-9-10), apoptozun erken aşamalarında aktive edilir ve hemen sonra, efektör/yürütücü elemanların (kaspaz-3-6-7) enzimatik aktivasyonunu tetikler. Apoptoz sırasında, yüksek seviyelerde kaspaz aktivasyonu, tüm alt hücre kompartmanları boyunca bir protein substratlarının tamamını enzimatik olarak parçalayarak organellerin basit olarak sökülmesine ve daha sonra tüm gerekli hücresel görevlerin kapatılmasına yol açabilir [85].

2.7. PhTAD Türevli Bileşikler ve Kullanım Alanları

Moleküller temelde iki özelliğe sahiptirler. Bunlardan biri stereoizomer çifti olmaları diğeri ise biyolojik aktif bileşiklerin yapısında sıklıkla bulunan triazol ve dihidropirol gibi yapıların yanı sıra azot, ester ve sülfür fonksiyonel gruplarına sahip olmalarıdır.

İki farklı elemanın atomlarını içeren halkasal yapıdaki bileşikler heterosiklik bileşik olarak bilinir. İşlev ve yapıdan bağımsız olarak karbosiklik bileşiklerin karbon halka atomlarının farklı bir elemanla değiştirilmesiyle farklı yapıda heterosiklik türevlerine dönüşmesi mümkün olmaktadır. Bu nedenle heterosiklik bileşikler farmasötik, tıbbi, analitik ve organik kimya gibi alanlarda geniş bir araştırma alanı bulmaktadır. Bir heteroatom içeren beş üyeli halka olan pirol halkası, tipik olarak güçlü ısınma yoluyla proteinlerin ayrışmasıyla oluşan kemik yağında ortaya çıkar. Pirol halkaları, bağların, tendonların, deri ve kemiklerin ve kolajenin yapısal proteininde yüksek konsantrasyonlarda bulunan çeşitli proteinlerin bileşenleri olan hidrokspirolin ve prolin gibi amino asitlerde bulunur. Ayrıca

pirol türevleri alkaloidlerde bulunur. Nikotin, alkaloid içeren en yaygın bilinen piroldur. Hemoglobin, miyoglobin, vitamin B₁₂ ve klorofillerin hepsi, porfirin adı verilen büyük bir halka sisteminde dört pirol ünitesine katılarak oluşturulur [86].

Bir molekül ayna görüntüsünün üzerine bindirilemediğinde, bu molekül ve görüntüsüne kiral denir. Sol ve sağ eller gibi. Kiral moleküllerin üst üste gelmeyen iki ayna görüntüsü formuna enantiomerler denir. Enantiomerler en çok, bir karbon atomunun dört farklı ikame maddesi (asimetrik karbon atomu veya stereojenik karbon veya kiral merkez olarak da adlandırılır) içerdiğinde oluşur. Kiral bir molekül, en az bir asimetrik karbona sahip bir moleküldür. Asimetrik bir merkez gibi davranabilen tek atom karbon değildir. Kükürt, fosfor ve azot bazen sırasıyla omeprazol, siklofosfamid ve metakalon gibi kiral moleküller oluşturabilir. Kiral moleküller optik aktivite sergilerler, bu nedenle enantiomerler bazen optik izomerler olarak da adlandırılır. Bu tür bileşiklerin iki enantiomeri, sırasıyla düz (polar) ışığı sola (-) veya sağa (+) asılı şekilde döndürmelerine bağlı olarak, levorotary (l-izomer) veya dekstrorotary (d-izomer) olarak sınıflandırılabilir. Bir kiral bileşiğin iki enantiomerinin eşmolar bir karışımına (50/50), optik aktivite göstermeyen (\pm) veya (d, l) işaretli rasemik bir karışım (rasemat) adı verilir. Optik izomerler veya enantiomerler, aynı kimyasal formüle, aynı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olan, ancak optik aktiviteleri ve uzamsal düzenlemeleri bakımından farklı olan moleküllerdir. Diastereomerler, iki veya daha fazla kiral merkeze sahip herhangi bir moleküldür. İki kiral karbonlu bir diastereomerde dört izomer bulunur. Enantiomerlerden farklı olarak, diastereomerlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri farklı olabilir ve sonuç olarak kimyasal karakterizasyonları kolaydır ve biyolojik aktiviteleri genellikle farklıdır. Bu, kiral ayrılmasında diastereomerler oluşturmak için enantiomerlerin türevlendirilmesinde ve ayrıca vücutta kiral reseptörleri ile enantiomer aktivitelerinin açıklanması için temeldir. Vücut, her bir rasemik ilaçla farklı şekilde etkileşime girer ve farklı farmakolojik aktiviteler oluşturmak için her bir enantiomeri ayrı bir yolla metabolize edebilmektedir. Bu nedenle, bir izomer istenen terapötik aktiviteleri üretebilir, diğeri etkin olmayabilir veya istenmeyen -toksik etkiler oluşturabilir. Kiralite fenomeni sadece bitki ve hayvanların yaşamında değil aynı zamanda ilaç, tarım ve diğer kimya endüstrilerinde de kilit bir rol oynamaktadır. Tüm proteinler, enzimler, amino asitler, karbonhidratlar, nükleozitler ve bir dizi alkaloid ve hormon kiral bileşiklerdir. İlaç endüstrisinde, şu anda kullanımda olan ilaçların% 56'sı kiral ürünlerdir ve son ürünlerin % 88'i iki enantiomerin eş molar bir karışımından oluşan rasematlar olarak pazarlanmaktadır. Aynı kimyasal yapıya sahip olmalarına rağmen, çoğu rasemik

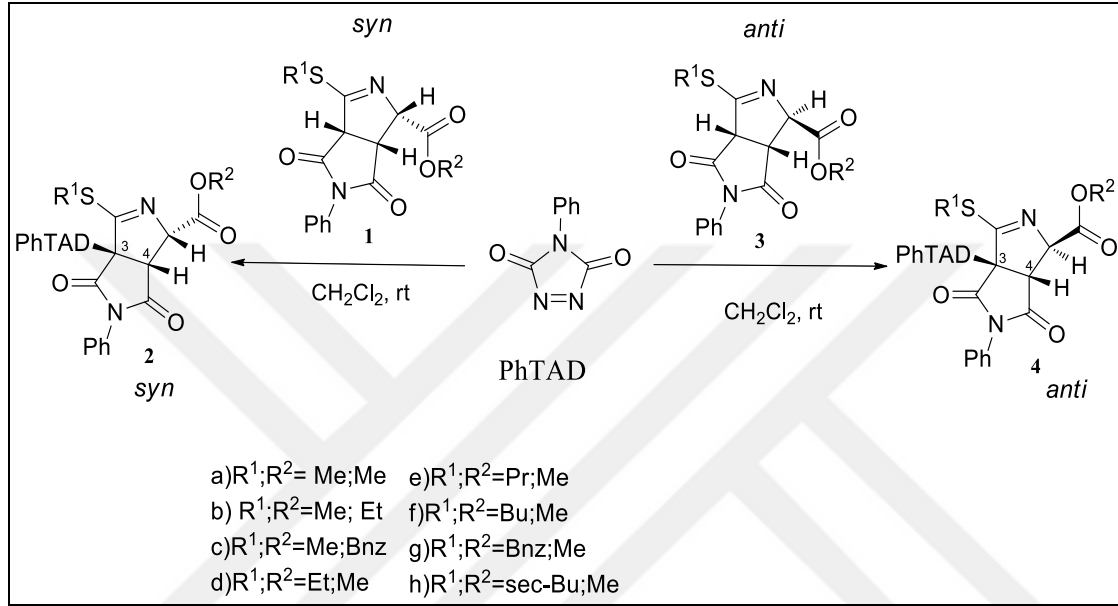
ilaç enantiyomeri, farmakoloji, toksikoloji, farmakokinetik, metabolizma vb. gibi biyolojik aktivitelerde belirgin farklılıklar sergilemektedir. Bu nedenle, istenmeyen izomerin preparasyondan çıkarılması ve hasta için optimal ve doğru bir tedavi kontrolü bulmak için, ilaç endüstrisinde ve klinikte rasemik ilaçların kiral ayrımı ve analizini teşvik etmek önemlidir [87].

Thalidomid çocukları olarak bilinen vakalar stereoizomer çiftinin önemine örnek gösterilebilir. Thalidomide hamile bayanların sabah yaşadıkları bulantıları azaltıcı etkisi tespit edilen nörolojik aktif bir molekül olarak 1950'de piyasaya sürülmüştür. Kullanımının artmaya başlaması ile uzuvları eksik, dolaşım, sindirim ve boşaltım sisteminde yüksek sorunlara sahip çocukların doğumları ve sonrasında da % 50'ye varan ölüm vaka sayısı artışları görülmüştür. Thalomidin neden böyle bir sonuç sergilediği araştırılmış ve piyasadan toplatılan ürünlere farklı iki stereoizomerin aynı anda bulunduğu tespit edilmiştir. İzomerin biri teratojenik etkiye sahipken diğeri ise sedatif özelliktedir [88].

Triazoller beş üyeli iki karbon atomuna ve üç azot atomuna sahip olan, moleküler formülü $C_2H_3N_3$ olan heterosiklik bileşiklerin herhangi birine karşılık gelir. Üç azot atomunun nispi pozisyonlarında farklı olan iki izomer seti vardır. Triazoller nispeten kararlı fonksiyonel gruplardır ve triazol bağlantıları örneğin, DNA'nın fosfat omurgasını değiştirmek gibi çeşitli uygulamalarda kullanılabilir [89]. Bir triazol türevi olan 1,2,4-triazol, son 20 yılda potansiyel olarak anti-mikrobiyal ajanlar, anti-fungal, anti-tüberküloz, anti-HIV, anti-inflamatuar, CNS uyarıcıları, yatıştırıcılar ve anti-anksiyete özellikleriyle en fazla dikkati çekmektedir [90]. Triazolindion bileşikleri (TZD) günümüzde yaygın olarak insülin direnci ve tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılan beş üyeli karbon halka molekülleridir. Son zamanlarda, birçok prospektif çalışma, bu bileşiklerin, anti-proliferatif ajanlar olarak etkisini de belgelemiştir. Antikanser ajan olarak TZD'leri destekleyen klinik çalışmalar sınırlı olsa da, in vitro-hücre kültürlerinde ve in vivo olarak hayvan modellerinde yapılan çalışmalar TZD'lerin akciğer, meme ve kolon kanserlerinde etkinliğini desteklemektedir. Ayrıca bir TZD ilacı olan Rosiglitazon, tip 2 diabetes mellituslu Tayvanlı kadın hastalarda meme kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir [91, 92].

Ene reaksiyonu, bir alilik hidrojen atomuna sahip olan bir alkenin (ene donörü), ikinci bir doymamış türle (enophile) reaksiyona giren π -bağ ile yeni bir ürün oluşturmak üzere reaksiyona girdiği bir perisiklik prosestir [93]. Alilik aminasyon, bir alken ve diazo veya

nitroso elektrofilin ene reaksiyonunun net sonucudur. Biyolojik olarak aktif diastereoizomerik (*syn* / *anti*) dihidropirrolleri (1,3) ve aromatik türevleri yeni organik bileşiklerin sentezi için yeni bir biheterosiklik alkenik yapı olarak tanımlanmıştır [94]. Dihidropirrollerin alilik pozisyonuna N- feniltriazoledion (PhTAD) ilavesiyle elde edilen PhTAD türevlerinin (Şekil 2.6.) *syn* ve *anti* diastomerlerinden *syn* pozisyonunun *anti* pozisyona göre daha aktif olduğu gösterilmiştir [95].



- a) $R^1; R^2 = \text{Me}; \text{Me}$ e) $R^1; R^2 = \text{Pr}; \text{Me}$
b) $R^1; R^2 = \text{Me}; \text{Et}$ f) $R^1; R^2 = \text{Bu}; \text{Me}$
c) $R^1; R^2 = \text{Me}; \text{Bnz}$ g) $R^1; R^2 = \text{Bnz}; \text{Me}$
d) $R^1; R^2 = \text{Et}; \text{Me}$ h) $R^1; R^2 = \text{sec-Bu}; \text{Me}$

Şekil 2.6. Dihidro pirol bileşiklerinin PhTAD ile formal aminasyonları [95]

Bu çalışmada biyolojik aktivite özellikleri bilinen bileşiklerin pirol gibi hetero halkalı bir yapıyla türevlendirilerek dünyada ve ülkemizde en sık karşılaşılan kanser türü olan meme kanserine karşı etkisi incelenmiştir. Ayrıca daha önce sentezlenmiş ve yapıları X-Ray, NMR, 2DNMR, IR, HRMS, elementel analiz gibi yöntemlerle aydınlatılmış hedef moleküllerin bir stereoizomerinin diğerinden farklı aktiviteleri de araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar ileri çalışmalarda hangi izomer üzerinden etkinin daha fazla olacağını açıklayabilmek açısından önem taşımaktadır.

Bunlarla beraber sülfür grubuna bağlı R^1 olarak isimlendirilen ve ester oksijen atomuna bağlı R^2 olarak isimlendirilen alkil gruplarının etkileri ile ilgili bilgi edinimi amaçlanmıştır. Alkil grupları artan karbon sayısı ile seçilmiştir. İndüktif etkinin yanı sıra logP gibi fiziksel değerlerin de alkil gruplarına göre farklılık gösterdiği bilinmekte ve bu etkinin hedef moleküllerde tespiti hem literatür ile uyumu hem de literatüre yeni bir katkı sağlaması öngörülmüştür.

2.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü, canlı dokulardan alınan hücrelerin kontrol edilebilen yapay ve sıvı bir ortamda büyümesini ifade eder. Hücreler dokulardan doğrudan veya enzimatik ve mekanik yollarla elde edilebileceği gibi daha önceden elde edilmiş hücre hatları ve hücre süşlarından alınarak da kültürlenebilmektedir [96]. Hücre kültürü çalışmaları; ortamın sürekli kontrol edilebilmesi, model oluşturabilme, etik izine gerek olmaması, ekonomi ve homojenite sağlayabilme gibi birçok avantaj sağlayan tekniklerdir. Bu teknik, virüslerin incelenmesi, aşı geliştirme, organ-doku yenilenmesi, gen tedavilerinin geliştirilmesi, kansere karşı ilaç geliştirme ve biyokimyasal moleküllerin incelenmesi için başarılı bir şekilde uzun yıllardır kullanılmaktadır [97].

2.8.1. MCF-7 hücre hattı

Bu hücre hattı, Michigan Kanseri Vakfı (Michigan Cancer Foundation)'nda araştırmacı olarak çalışan Dr. Herbert D. Soule'un meme kanseri hücre hattını elde edebildiği 7. denemesine gönderme olarak MCF-7 olarak adlandırılmıştır [98]. Kültürlenmiş hücre çizgilerinde östrojen reseptörü alfa ekspresyonunun sürdürülmesinin özellikle zor olması dikkat çekicidir. MCF-7 hücre çizgilerinin meme kanseri araştırması için popülaritesi özellikle hormon reseptörü pozitif meme kanseri (ER pozitif) olan postmenopozal kadınların tedavisinde klinik ortamda meme kanserinin birçok yönüne olan uygunluğunu yansıtmaktadır. Bu hücreler ayrıca androjen, progesteron ve glukokortikoid reseptörleri de ifade etmektedir. Bu steroid sinyalleme yollarının tümüne karşı hedeflenen ajanlar, metastatik meme kanserli bazı hastaların tedavisi için de aktif olduklarından, MCF-7 hücreleri, diğer hormon yanıtı ve direnç yollarını aydınlatmak için değerli bir model sistemi olarak görev yapmaktadır [99].

Çalışmamızda Dihidropirol bileşiklerinin meme kanseri proliferasyonuna olan etkilerinin incelenmesi amacıyla MCF-7 (meme kanseri) (ATCC HTB22™, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu) ve MCF-12A (normal meme epiteli) (ATCC® CRL-10782™) hücre serileri kullanılmıştır. MCF-7 hücre serisi % 10 FBS içeren RPMI-1640 ve MCF-12A % 5 horse serum içeren besiyerlerinde % 5 CO₂ içeren ve 37⁰C sıcaklık, % 95 atmosfer basıncında kültüre edilmiştir.

2.8.2. Sitotoksik Aktivite Testleri

MTT testi, potansiyel antikanser bileşiklerin aktivitesini değerlendirmek için yaygın kullanılan testlerin başında gelir. Mosmann tarafından 1983 yılında tarif edilmiştir [100]. MTT yöntemi, dehidrojenaz enziminin aktivitesine göre, canlı hücrelerde meydana gelen renk değişiminin kolorometrik olarak belirlenmesi prensibine dayanır. Renk değişimi sarı ile renklendirilmiş formazan tuzlarının aktif hücre mitokondrilerinde tetrazolyum tuzunun azalması sonucu oluşmaktadır. Bu biyo-azalma canlı hücrelerde meydana gelir ve glikoliz yoluyla oluşan NADPH üretimi ile alakalıdır. Bu nedenle oluşan formazan tuzlarının miktarı kültürdeki metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile doğru orantılı kabul edilir. MTT-formazan kristalleri, izopropanol, DMSO veya mineral yağ gibi çeşitli yaygın organik çözücülerde çözünür. MTT deneyi, basit ve hızlı bir kolorimetrik deneyi temsil eder ve nicel veriler sağlar. Bu deney tamamen 96 kuyucuklu mikrotitre plakalarında gerçekleştirilir; böylece, bir dizi değişkeni inceleyen çok sayıda deney kolayca yapılabilir. Bu testin en büyük dezavantajı MTT tetrazolyum tuzu, sadece mitokondride değil, aynı zamanda sitoplazma içinde, hücre yüzeyi, endozom veya lizozom membranları ve hatta hücre dışı ortamda da azaltılabilir. Azaltma işlemi etkileyen faktörler, büyümenin şu andaki fazını, hücre döngüsü fazını ve pH ve D-glikoz konsantrasyonu gibi reaksiyon koşullarını içerir [101, 102].

RTCA, hücre çoğalmasını, morfoloji değişimini ve hücre substratı bağlanma kalitesini gerçek zamanlı olarak ölçmek için e-plakaların zeminine yerleştirilmiş altın mikro-elektrotlar kullanılarak elektriksel empedans izlemesi ile bir bilgisayara veri aktarımını içeren sistemdir. RTCA cihazı, etüv içerisine yerleştirilerek etüv dışında bulunan ve uzaktan bağlantılı bir ağ ile gerçek zamanlı veri görüntüleme ve analiz işlevlerine izin veren kullanıcı dostu yazılıma sahip bir ipad ya da bilgisayar ve iki ayrı elektronik 8 oyuklu plaka bulundurur. Ölçülen elektriksel empedans boyutsuz bir parametre olan Hücre İndeksi (CI) olarak kaydedilir. Hücre ekimi yapılmadan önce hücre endeksi sıfırdır. Hücrelerin yüzeye bağlanmasına paralel olarak hücre endeksi artar [103].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan ekipmanlar

Çalışmada kullanılan ekipmanların model ve kullanım amaçları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan ekipman marka ve kullanım amaçları

Ekipman Türü	Marka	Kullanım Amacı
CO ₂ İnkibatör	Memmert	Hücrelerin çoğaltımı
Laminar Akımlı Kabin	Thermo	Hücre kültürü çalışmaları
İnvert Mikroskop	Leica	Hücre kültürü çalışmaları
Real Time PCR cihazı	Thermo	Gen ifadesinin belirlenmesi
Thermal cycler	Techne Prime	cDNA sentezi
iCELLigence	ACEA	Gerçek Zamanlı Hücre Elektronik Algılama
E-PLAKA L8	ACEA	RTCA hücre ekim plaka
Steril filtre (0,2µm)	Sartorius	Besiyeri ve MTT reaktifinin steril edilmesi
Mikrodrop Okuyucu	Thermo	MTT, RNA ve protein miktar ölçümü
Santrifüj cihazı	Hettich	Hücre kültürü çalışmaları
Santrifüj cihazı	Hermle	RNA izolasyonu ve antioksidan çalışmaları
Azot tankı	Thermo	Hücrelerin uzun süreli stoklanması
-80 Buzdolabı	Thermo	Hücrelerin stoklanması
Buzdolabı (-20 , +4)	Arçelik	Malzemelerin saklanması
Otoklav (class B)	Selecta	Malzemelerin steril edilmesi
Hassas terazi	Shimadzu	Besiyeri bileşenlerinin tartımı
Işık mikroskobu	Olympus	Hücrelerin sayımı ve canlılığının izlenmesi
Thoma Lamı		Hücrelerin mikroskopla sayımı
Vorteks	IKA	Hücre kültrü çalışmaları
Flask (T25-T75)	TPP zell	Hücrelerin büyütülmesi ve çoğaltımı
Plaka (96, 6)	TPP zell	MTT ve RNA izolasyonu
Pipetör	Thermo	Hücre kültürü çalışmaları
Mikro Pipetler	Thermo	Hücre kültürü, MTT, RNA izolasyonu çalışmaları
Pipet uçları	Isolab	Tüm deney aşamalarında

3.1.2. Çalışmada kullanılan reaktifler

Çalışmada kullanılan tüm reaktif ve besiyerlerinin marka ve kullanım amaçları Çizelge 3.2’de listelenmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan reaktif ve besiyerlerinin marka ve kullanım amaçları

Kimyasal adı	Marka	Kullanım amacı
RPMI-1640	Sigma	Hücre besiyeri
DMEM/F12	Sigma	Hücre besiyeri
Penicillin streptomycine	Sigma	Hücre besiyeri
FBS (Fetal Bovine Serum)	Sigma	Hücre besiyeri
PBS (phosphate Buffer Saline)	Sigma	Hücrelerin yıkanması
Sodyum Bikarbonat	Sigma	Hücre besiyerinde
EGF	Sigma	MCF-12A için epidermal büyüme faktörü
İnsülin	Sigma	MCF-12A besiyeri için takviye hormon
Horse Serum	Sigma	Hücre kültürü DMEM/F12 besiyeri serumu
DMSO	EMD Millipore	Bileşiklerin dilüe edilmesinde, hücrelerin saklanmasında, MTT ürünlerinin indirgenmesinde
Trypan Blue	Sigma	Hücre canlılık ve sayım işleminde
Absolute Etanol (1)	Sigma	(1) İzolasyon çalışmalarında
Etanol (2) % 70		(2) Temizlik işlerinde
B-mercaptoethanol	Amresco	RNA izolasyonu çalışmalarında
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	Sigma	Hücrelerin dehidrojenaz aktivitelerine dayalı kolorometrik olarak absorbans ölçümü sonucu etkin sitotoksiteyi tespit etmede

3.1.3. Çalışmada kullanılan kitler

Çalışmada kullanılan kit marka ve lot numaraları Çizelge 3.3.’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan kitler

Kit Türü	Marka	Lot No
1. RNA izolasyon kiti: GeneJET RNA purification	Thermo	K0731 Lot: 00443099
2. Maxima First Strand cDNA synthesis kit with dsDNase	Thermo	K1671 lot:00263972
3. Maxima SYBR Green qPZR Master Mix (2X)	Thermo	K0221
4. MTT kiti	Sigma	

3.1.4. N-feniltriazolindione Dihidropirol bileşikleri

Çalışma boyunca ana materyal olarak kullanılan PhTAD türevli Dihidropirol bileşiklerinin tamamı Amasya Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Melek Gül tarafından sentezlenmiştir. Çalışmada kullanılan bileşiklerin madde kodu, bileşiğe bağlı radikal gruplar ile molekül kütleleri (Çizelge 3.4)'de listelenmiştir.

Çizelge 3.4. Bileşiklerin syn-anti konformasyonları ve molekül kütleleri [95]

Madde No	R ¹ / R ²	Madde No	R ¹ / R ²	Molekül kütlesi
1	Me / Me	2	Me / Me	492,48
3	Et / Me	4	Et / Me	506,51
5	Pr / Me	6	Pr / Me	520,54
7	iPr / Me	8	iPr / Me	520,54
9	Bu / Me	10	Bu / Me	534,56
11	Bnz / Me	12	Bnz / Me	568,58
13	Me / Et	14	Me / Et	506,51
15	Me / Bnz	16	Me / Bnz	568,58

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü çalışmaları

Hücre kültürü besiyerinin hazırlanması

Hücre kültürü çalışmalarının tamamı hücre kültür odasında ve Class II laminar kabin içerisinde gerçekleştirildi.

100 ml MCF-7 için;

- RPMI-1640 (L-glutamin) (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma),
- % 1 Penisilin/Streptomisin (Sigma),
- 0,2 g/100mL sodyum bikarbonat,
- % 10 Fetal bovine serum (FBS) (Sigma),

100 mL MCF-12A (normal meme epiteli) (ATCC® CRL-10782™) için;

- DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium),
- 0,035 g Hepes (Sigma),
- 0,2 g/100 mL sodyum bikarbonat,
- % 5 horse serum (Sigma),
- 1/1 µL sıgır insülini (10µg/mL),
- 3,75 µLEGF (20 ng/mL),
- 1 mL Hidrokortizon (0.5 mg/mL)
- 50 µL kolera toksin (100 ng/mL) içerikli besiyerleri kullanılmıştır.

Hücrelerin stoktan açılması

1. Dondurulmuş halde -80°C 'de muhafaza edilen hücreler alınarak hızlıca çözündürülmeleri sağlandı.
2. Kontaminasyonu önlemek amacıyla tüpler % 70'lik alkolle silinerek laminar güvenlik kabini içerisine alındı.
3. Laminar kabin içerisinde ayrı ayrı açılan hücreler için iki farklı etiket taşıyan 15'lik falkon tüp içerisine 3 mL % 10 FBS içeren RPMI-1640 ve % 5 horse serum içeren DMEM/F12 besiyeri konuldu.

4. Falkonlar santrifüj cihazına karşılıklı yerleştirilerek 1600 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip hücrelerin pellet şeklinde dibe çökmesi sağlandı.
5. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atıldı ve pellet şeklindeki hücreler 5 mL taze besiyeri ile süspansiyon edildi.
6. Süspansiyon edilen hücreler kontaminasyonu önlemek amacıyla ve hücre hattı, pasaj sayısı ve tarihine göre etiketlenen filtre kapaklı 25cm²'lik hücre kültürü flaskı içerisine alındı.
7. Flasklar 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı.
8. Hücrelerin sağlıklı büyümesini takip etmek için çoğalma hızları, morfolojileri ve canlılıkları invert mikroskop ile kontrol edilerek besiyerleri yaklaşık olarak iki günde bir değiştirildi.

Hücrelerin pasajlanması

Rutin mikroskop takibi sonucu hücrelerin flask yüzeyinin % 80-90 oranında kaplamasına müteakip flask inkübatörden alındı.

1. Laminar kabin içerisine alınan flaskdaki besiyeri steril 5 mL'lik plastik pipet ve pipetör ile çekilip atıldı.
2. Flask yüzeyine yapışmamış halde bulunan ölü hücreler 25 cm² flask için yaklaşık 1 mL Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı.
3. Ardından 1 mL Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi, flask hafif çalkalandı ve yaklaşık 4-5 dakika inkübatöre kaldırıldı.
4. Flask yüzeyindeki tüm hücrelerin yüzdüğünden emin olunması için inverted mikroskopta kontrol edildi. Yüzeyde yapışık kalan hücreler varsa flask avuç içiyle hafifçe vurularak ayrılımları sağlandı.
5. Tripsinin inhibisyonu için tripsin hacminin en az iki katı FBS içeren taze besi yeri veya eski kullanılan besiyeri eklendi ve süspansiyon 15'lik falkona alındı.
6. 15'lik falkon içerisindeki süspansiyon 1600 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve tripsin-EDTA solüsyonu içeren tüm süpernatant 1 mL'lik pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
7. Tüp içerisinde kalan hücre pelleti taze besiyeri ile süspansiyon edilerek bir 75cm² veya iki adet 25cm² 'lik flaskta bölünerek pasajlandı.

Yeniden pasajlanan hücreler % 90 nem 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde inkübe edildi.

Hücrelerin dondurulması ve saklanması

1. Flaskın % 80-90 dolmasının ardından besiyeri çekilip atıldı ve 25 cm² flask için 1 mL PBS ile yıkandı.
2. Ardından hücreler 25 cm² flask için 1 mL Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 1600 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve tripsin besiyerinden uzaklaştırıldı.
3. Oluşan hücre pelleti önceden hazırlanmış dondurma besiyerinde (% 70 RPMI-1640 veya DMEM/F12, % 20 Fetal Bovine Serum veya horse serum + % 10 DMSO) süspanse edilerek 2 mL dondurma tüpleri içerisine alındı.
4. Tüpler hücre ismi, besiyeri çeşidi, pasaj sayısı ve pasaj tarihi ile etiketlendi.
5. İçerisinde hücre olan dondurma tüpleri 1 saat -20°C'de bekletildi ve kısa süreli stoklanma için -80°C'de muhafaza edildi. Stok fazlası hücreler uzun süreli muhafaza için sıvı azot tankına kaldırıldı.

Kullanılan hücre sayısının optimizasyonu ve plaka yerleşimi

Deney için kullanılacak uygun hücre sayısının belirlenmesi amacıyla meme kanser hücresi ve normal meme hücresi için üç tekrarlı olarak 96 kuyucuklu mikropalakalarda ekim yapıldı (Resim 3.1). 100µL RPMI-1640 veya DMEM/F12 besiyeri içerisine 2000, 5000, 10000, 20000 hücre kuyucuklara ekildi ve mikropalak 37°C'de % 5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı ve hücrelerin çoğalması inverted mikroskop yardımıyla gözlemlendi. Her bir hücrenin 24 saat sonundaki proliferasyonu karşılaştırılarak deneyler için kuyucuk başına 10000 (1x10⁴) hücre sayısı uygun bulundu ve bu aşamadan sonraki tüm analizler bu şartlarda gerçekleştirildi.



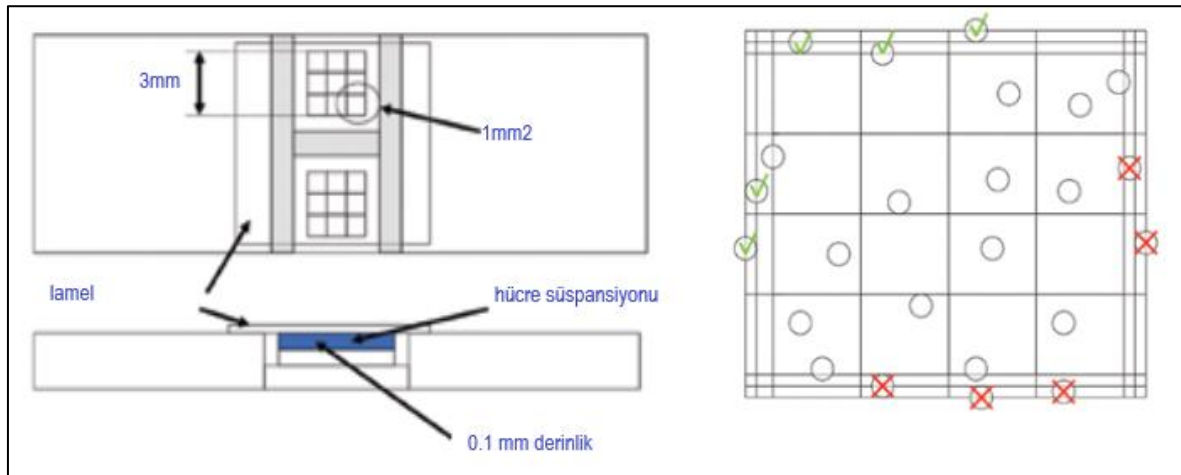
Resim 3.1. Plaka yerleşimi

3.2.2. Sitotoksosite ve metabolik aktivite ölçüm testi (MTT)

MTT testi, potansiyel antikanser bileşiklerin aktivitesini değerlendirmek için yaygın kullanılan testlerin başında gelir. Mosmann tarafından 1983 yılında tarif edilmiştir [100].

Hücrelerin sayımı

Pasajlama protokolü uygulanarak 15'lik falkon tüpe alınan hücreler santrifüj edildi ve süpernatant çekilip atıldı. Pellet halindeki hücreler taze besiyeri ile süspansiyon edildi. Süspansiyon olmuş hücreden 15 µL çekilerek 0,5 mL tüpte üzerine 15 µL Trypane blue boyası eklenerek pipetaj yapıldı ve 2 dk beklendi. Trypane blue boyası ölü hücrelerin sitoplazmasına geçerek hücreleri maviye boyar, canlı hücrelere etki edemediğinden canlı hücreler ışık altında parlak görünür. Boyalı süspansiyondan 10 µL alınarak thoma lamı oluklarına dikkatlice yayıldı. Thoma lamının alt ve üst kısmında bulunan 16 karedeki hücreler mikroskop altında 10X objektif büyütmesinde bu işlem iki defa tekrarlanarak sayıldı ve aritmetik ortalaması alındı. Boyanmış hücreler ölü kabul edilerek sayıma dahil edilmedi (Resim 3.2.). Hücreler thoma lamında sayıldıktan sonra aşağıdaki formüle göre toplam hücre sayısı belirlendi.



Resim 3.2. Thoma lamı ve sayım için güvenli bölgeler [104]

$$\text{Toplam hücre sayısı} = A \times 2 \times 10^4$$

(A: merkez karelerde sayılan hücre toplamı, 2: dilüsyon sabiti)

Sayım sonunda 96'lık plaka kuyucuklarına 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilerek 37°C 'de % 5 CO_2 ayarlı etüvde hücrelerin yeniden metabolik aktivite kazanması ve tripsinin hücre membran proteinleri ile büyüme faktörleri üzerindeki etkisinin ortadan kaldırılması için 24 saat inkübasyona bırakıldı.

Kullanılan bileşiklerin çözülmesi ve uygun konsantrasyonların hazırlanması

Çalışmada kullanılan ve Çizelge 3.4'de verilen bileşiklerin her biri molekül ağırlığına göre hesaplanarak DMSO içinde çözüldü ve stok konsantrasyonları olan $100 \mu\text{M}$ hazırlandı. Çalışılacak diğer konsantrasyonlar (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 ve $1,56 \mu\text{M}$) $100 \mu\text{M}$ stok konsantrasyonunun ileri dilüsyonları ile hazırlandı (Çizelge 3.5). Bu aşamanın sonunda RPMI-1640 ve DMEM/F12 besiyerleri ile $100 \mu\text{L}$ final konsantrasyonları hazırlandı.

Çizelge 3.5. Bileşiklerin dilüsyon öncesi $100 \mu\text{M}$ tüp konsantrasyonları

Madde No	R ¹ / R ²	Madde No	R ¹ / R ²	Molekül kütlesi	Madde (μl)	DMSO (μl)
1	Me / Me	2	Me / Me	492,48	16	4
3	Et / Me	4	Et / Me	506,51	17	3
5	Pr / Me	6	Pr / Me	520,54	17	3
7	iPr / Me	8	iPr / Me	520,54	17	3
9	Bu / Me	10	Bu / Me	534,56	18	2
11	Bnz / Me	12	Bnz / Me	568,58	19	1
13	Me / Et	14	Me / Et	506,51	17	3
15	Me / Bnz	16	Me / Bnz	568,58	19	1

MTT çözeltilisinin hazırlanması

MTT çözeltilisi üretici firmanın kullanım talimatına uyularak her 1 mL steril PBS içerisine 5mg MTT boyası eklendi ve vorteksenerek hazırlandı. Bu işlem MTT boyasının ışığa hassas olması sebebiyle hazırlama işleminde kullanılan tüp aleminyum folyoya sarıldı. Reaktif hazırlaması her deney öncesi taze hazırlanarak kullanıldı.

1/1000 DMSO kontrol hazırlanması

Çalışmada kullanılan bileşiklerin çözücüsü DMSO olması sebebiyle MTT sonucunda çözücünün etkisinin belirlenmesi açısından kontrol DMSO kullanıldı. Bu amaçla % 100 DMSO'dan 10 µL alınarak 90 µL taze serumlu besiyeri ile 1. stok hazırlandı. Daha sonra 10 µL 1.stok ve 990 µL serumlu taze besiyeri alınarak 1/1000 DMSO hazırlandı. Bu işlem her analiz için taze olarak hazırlandı ve kullanıldı.

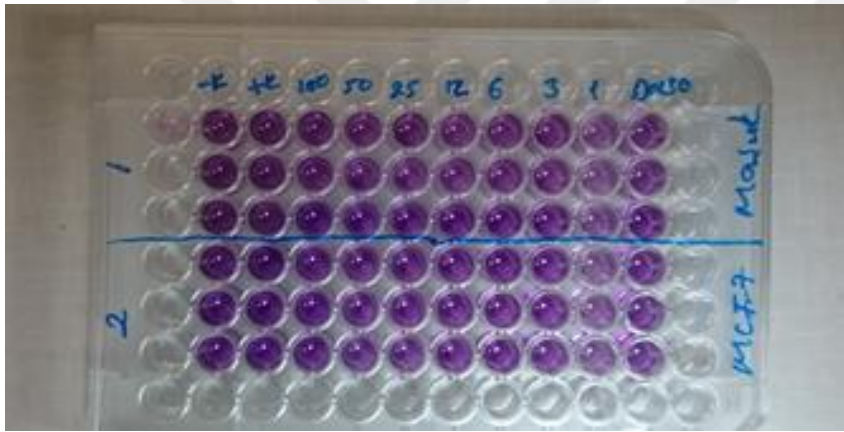
Sitotoksik doz belirlenmesi

1. MTT testinde kullanılacak olan N-feniltriazolindione Dihidropirol bileşiklerinin dilüsyonları, pozitif-negatif kontrol ve MTT boyası aynı gün taze hazırlanarak kullanıldı.
2. 96 kuyucuklu düz tabanlı steril plaka içerisine 100 µL besiyeri içinde 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı.
3. 24 saat hücrelerin plakaya yapışması ve büyüme- çoğalma için gerekli moleküllerin sentezi için inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki besiyeri steril filtreli pipet ile çekilip atıldı ve hücrelerin üzerine hazırlanan 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 ve 1,56 µM konsantrasyonlarındaki 100 µL N-feniltriazolindione Dihidropirol bileşiklerinin konsantrasyonları üç tekrarlı olacak şekilde eklendi.
5. Aynı şekilde negatif kontrol, pozitif kontrol ve 1/1000 DMSO konsantrasyonları da üç tekrarlı olarak eklendi ve 24 saat 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı.
6. 24 saatin sonunda N-feniltriazolindione Dihidropirol bileşiklerinin konsantrasyonları çekildi ve hücrelerin üzerine taze hazırlanmış MTT solüsyonundan 100 µL eklendi.
7. Plaka alüminyum folyoya sarılı olarak MTT solüsyonu ile 3,5-4 saat 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
8. Süre sonunda MTT solüsyonu çekilip atıldı ve oluşan formazan kristallerini çözmek için her kuyucuğa 100 µL DMSO eklendi.
9. Çalışılan dalga boyunda absorbansa neden olabilecek ana etmen olan DMSO blank olarak kullanıldı ve ölçüm sonunda cihazda sıfırlandı.
10. Plaka karanlıkta 10 dk beklendikten sonra spektrofotometrik olarak 570 nm absorbans değerleri okutuldu.

Hesaplama işlemleri için negatif kontrol grubu baz alındı. Negatif kontrol grubundan alınan absorbanların ortalaması %100 canlı kabul edilmiş olup, test kuyucuklarından alınan absorbanların ortalamaları ile karşılaştırıldı. Okunan absorban değerine göre sitotoksikite düzeyleri aşağıdaki formül ile Microsoft Office Excelde hesaplandı:

$$\text{Yüzde canlılık} = \left(\frac{\text{Test kuyucuğunun absorbanı (OD}_{570})}{\text{negatif kontrol kuyucuğunun absorbanı (OD}_{570})} \right) \times 100$$

Deneyle her bir bileşik derişimi ve çözüldüğü solüsyon için üçer kez tekrarlandı (Resim 3.3). Bu sonuçlara göre, bileşiklerin hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri değerlendirilerek doz-cevap ilişkisi tanımlandı.



Resim 3.3. Dihidropirol bileşiklerinin MTT ile kolorometrik ölçümü

3.2.3. Gerçek zamanlı hücre canlılık testi (RTCA)

RTCA iCELLigence sistemi çalışmalarda bileşiklerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktiviteleri için uygulandı (Resim3.4). iCELLigence RTCA cihazının E-plakalarına 1×10^4 hücre/400 μL olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanarak kuyulara yüklenmiştir. Hücrelerin elektrik yüküne maruz kaldığında şok geçirmemesi için yarım saat etüvde bekletildikten sonra cihaz çalıştırılmıştır. Hücrelerin 24 saat süreyle e-plakalara yapışması beklendikten sonra, N-feniltiazolidione dihidropirol bileşiklerinin (50-25-12,5-6,25 μM) değişen konsantrasyonları taze besiyeri ile hazırlanarak e-plakaya eklendi. 24 saat süreyle gerçek zamanlı olarak bileşiklerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri takip edilmiştir. Hücre indeksi (CI) değerlerindeki artış hücre proliferasyonundaki artışı, bu

değerlerdeki düşüş ise hücre çoğalmasının inhibisyonu ise sitotoksik aktivite olarak değerlendirilmiştir.



Resim 3.4. RTCA iCELLigence cihazı ve interted mikroskopta incelenen mikroelektrotlu plaka

3.2.4. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri (RT-PZR)

Total RNA izolasyonu

RNA izolasyonu yapmak amacıyla 6'lı kuyulara kuyu başına 1.5×10^6 hücre sayımı yapılarak son hacim 4 mL olacak şekilde FBS'li RPMI-1640 besiyerine ekim yapıldı. Hücrelerin hem yüzeye tutunması hem de proliferasyon için gerekli proteinlerin sentezinin sağlanması için 6 kuyucuklu flasklar 37°C ve % 5 CO_2 'li etüvde 24 saat boyunca bekletildi. Süre sonunda eski besiyeri uzaklaştırıldı ve MTT deneyi ile belirlenen dozlar taze besiyerinde hazırlanarak her kuyuya eklendi. Negatif kontrol olarak seçilen kuyuya her hangi bir doz uygulanmadan sadece taze besiyeri eklendi. Süre sonunda ilaçlı besiyeri uzaklaştırıldı ve tripsin-edtanın etkinliği için her kuyu 500 μLPBS ile iyice yıkandı. Daha sonra 500 μL tripsin-edta eklendi ve 3 dk beklendi. Kuyulardaki hücrelerin kaldırılması işleminin ardından 3 mL taze besiyeri içinde 1600 rpm'da 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak oluşan pellet RNA izolasyonu için hazır hale getirilmiş oldu.

Bileşiklerin gen ekspresyonları üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla kontrol ve doz gruplarında mRNA ekstraksiyonu GeneJET RNA saflaştırma (Thermo K0731) kitte

önerilen yöntemeye uygun olarak çalışılmıştır. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı µdrop cihazı yardımı ile gerçekleştirilmiştir.

Protokole göre;

Öncelikle her 1 mL liziz tampona 20 µl β-mercaptoethanol olmak kaydıyla gerekli hacimde liziz tampon hazırlandı.

1. Elde edilen hücre pelletleri üzerine liziz tampondan 600 µl eklendi ve homojen bir karışım görülene kadar 10 saniye vortekslendi.
2. Tüplere % 100'lük 360 µl etanol eklendi ve beyazımsı bir renk elde edilene kadar pipetaj yapıldı.
3. Her tüpteki karışımdan 700 µl alınarak Genejet RNA saflaştırma kolonlarına aktarıldı ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem tüplerdeki tüm karışım kullanılarak tekrar edildi ve sonrasında kolon yeni steril 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi.
4. Etanol içeren yıkama tamponu 1'den 700 µl her bir kolona alınarak kapağı iyice kapatıldı ve tüpler 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
5. Etanol içeren yıkama tamponu 2'den kolonlara 600 µl eklendi ve tüpler 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, sonrasında toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı.
6. Etanollü yıkama tamponu 2'den kolonlara 250 µl eklendi ve tüpler 12 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpleri atılarak kolon steril 1,5 mL' lik tüplere aktarıldı.
7. Son olarak kolonlara 50 µl nukleaz içermeyen su eklendi ve tüpler 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

Tüplerde toplanan sıvı cDNA çalışmaları için -20°C'de saklandı.

cDNA (Komplementer Zincir) Sentezi

İzole edilen tek zincirli total RNA'ların komplementer zincirleri, oligo d(T) primeri ve revers transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak, "Maxima First Strand cDNA synthesis kit with dsDNase (Thermo K1671)" ile sentezlenerek cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA sentezi 1. aşama için; 65°C'de 5 dakika bekletildi. 2. aşama için; 42°C'de 1 saat ve inkübasyon sonrası enzimi inhibe etmek için 70°C'de 5 dakika bekletildi. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PZR yapmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

Protokole göre;

1. Her bir örnek için 2µg total RNA olacak şekilde hesaplanarak uygun hacimde alındı.
2. Oligo (dT)₁₈ primerlerinden her bir tüpe 1 µl eklendi toplam hacim 12 µl olacak şekilde nukleaz içermeyen su ile tamamlandı. Karıştırıldı ve 3-5 saniye santrifüjlendi.
3. Karışım olarak örnek başına; 5X Reaction Buffer'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 eklenerek hazırlandı.
4. Karışımından her örnek için toplam hacim 20 µl olacak şekilde tüplere eklendi ve tüpler santrifüj edilerek bileşenler çöktürüldü.
5. Karışım PZR cihazında; 42°C'de 1 saat ve inkübasyon sonrası enzimi inhibe etmek için 70°C'de 5 dakika bekletildi. Elde edilen cDNA örnekleri 5 ng/µL olacak şekilde RNase free water ile dilüe edildi ve kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Gen optimizasyon çalışması

N-feniltriazolindione dihidropirol türevlerinin etkin dozlarının MCF-7 hücre hattına uygulanması sonucu hücrelerde oluşabilecek anti-kanserojenik etkilerin incelenmesi amacıyla P53, BAX, BCL2 alfa, PARP, HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 alfa, GRP78, GRP94 ve β-aktin genlerinin mRNA düzeyleri RT-PZR yöntemiyle belirlendi. Öncelikle insan meme dokusuna özgü bu genlere göre tasarlanan primerlerin bağlanma sıcaklıklarının tespiti için 51-60 °C arası ısı değerleri denendi. Optimizasyonlar kit protokolüne uygun şekilde analiz edilerek bağlanma sıcaklığı her bir gen için belirlendi (Çizelge 3.7).

RT-PZR

Çalışmalar Maxima SYBR Green RT-PZR Master Mix (2x) (Thermo K0221) kit protokolüne uygun şekilde yapılmıştır. Syber Green Master Mix (2x) 5 µl, Forward primer (10mM) 0,5 µl, Reverse primer (10mM) 0,5 µl cDNA 2 µl ve RNase free water 2 µl olacak şekilde hazırlandıktan sonra amplifikasyon protokolü uygulanarak mRNA ekspresyon düzeyleri incelendi (Çizelge 3.6, Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8). Çalışmada kullanılan primerler Oligomer firmasından satın alındı.

Çizelge 3.6. RT-PZR karışımı

Kullanılan Malzeme	Stok Konsantrasyonu	Hacim	Son Konsantrasyon
SYBR Green RT-PZR Master Mix	2X	5 µl	1x
Forward Primer	10 mM	0,5 µl	0,5 mM
Reverse Primer	10 mM	0,5 µl	0,5 mM
cDNA	-	2 µl	5 ng
dH ₂ O	-	2 µl	-
Toplam Hacim		10 µl	

Çizelge 3.7. RT-PZR koşulları

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyon	95 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	15 saniye	
Primer Bağlanması (Bağlanma ısısı)	51 °C (Aktin) 57 °C hsp70 59°C (Bax- BCL2-parp- grp78 grp94-hsp40)	30 saniye	40
	60°C (p53-hsp27-hsp60- hsp90)		
Primer Uzaması	72 °C	60 saniye	
Final Uzaması	72 °C	10 dakika	

Çizelge 3.8. Genlerin primer dizileri

Gen adı	Primer dizisi	Aksesyon No	Ürün uzunluğu (bp)
BAX F	TCATGGGCTGGACATTGGAC	NM_001291428.1	114
BAX R	GAGACAGGGACATCAGTCGC		
BCL2 alpha F	ATCTGGGCCACAAGTGAAGTC	NM_000633.2	209
BCL2 alpha R	TTCGACGTTTTGCCTGAAGAC		
Kaspaz 3 F	GCGGTTGTAGAAGAGTTTCGT	NM_001354777.1	149
Kaspaz 3 R	TTATTAACGAAAACCAGAGCGCC	NM_001354777.1	149
P53 F	GTTTTCCCCTCCCATGTGCTC	NM_001126112.2	170
P53 R	CAGTCTGGCCAATCCAGGGAAG		
PARP F	GAATGCCAGCGTTACAAGCC	NM_001618.4	212
PARP R	TCTCCCTGAGACGTATGGCA		
HSP90 alpha F	GCGCTAGCAGGAGATGGTTA	NM_005348.3	103
HSP90 alpha R	TTTCTGTGCCTACGTGTGCT		
HSP40 F	GAGGGGTTGTGAATGCAGGAG	NM_001300914.1	246
HSP40 R	CTCAGCAAACATGGCATGAGG		
HSP27 F	GAGGAGCATAAAAAGCGCAGC	NM_001540.5	347
HSP27 R	CTAACCACTGCGACCACTCC		
HSP60 F	GACGACCTGTCTCGCCG	NM_002156.5	258
HSP60 R	GGACTTCCCCAACTCTGCTC		
β -Actin-F	TGACGTGGACATCCGCAAAG	NM_001101.5	205
β -Actin-R	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG		
GRP94 F	GCCAGTTTGGTGTCTCGGTTTC	<u>NM_003299.3</u>	168
GRP94 R	GGGTAATTGTCGTTCCCCGT		
GRP78 F	GAACGTCTGATTGGCGATGC	NM_005347.5	143
GRP78 R	ACCACCTTGAACGGCAAGAA		
HSP70 F	AAGGAGACAGCCGAAAGTGT	L12723.2	212
HSP70 R	CTTGTTTCTCTTCTAAGCGAGG		

RT-PZR çalışmalarında elde edilen ham veriler Livak & Schmittgen'in delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) yöntemine göre [105] Mikrossoft Office excel programı kullanılarak ilaç uygulanan ve uygulanmayan grupların housekeeping gen olan aktin genine oranlanarak hesaplandı. Hesaplama işlemi şu şekilde yapıldı;

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct''_{\text{bileşik}} - \Delta Ct''_{\text{Negatif kontrol}}$$

$$\Delta Ct''_{\text{bileşik}} = (C_{tT})_{\text{bileşik}} - (C_{ti})_{\text{bileşik}}$$

$$\Delta Ct''_{\text{Negatif kontrol}} = (C_{tT})_{\text{Negatif kontrol}} - (C_{ti})_{\text{Negatif kontrol}}$$

Kat değişim değeri (Fold Change) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile Microsoft excel kullanılarak hesaplandı.

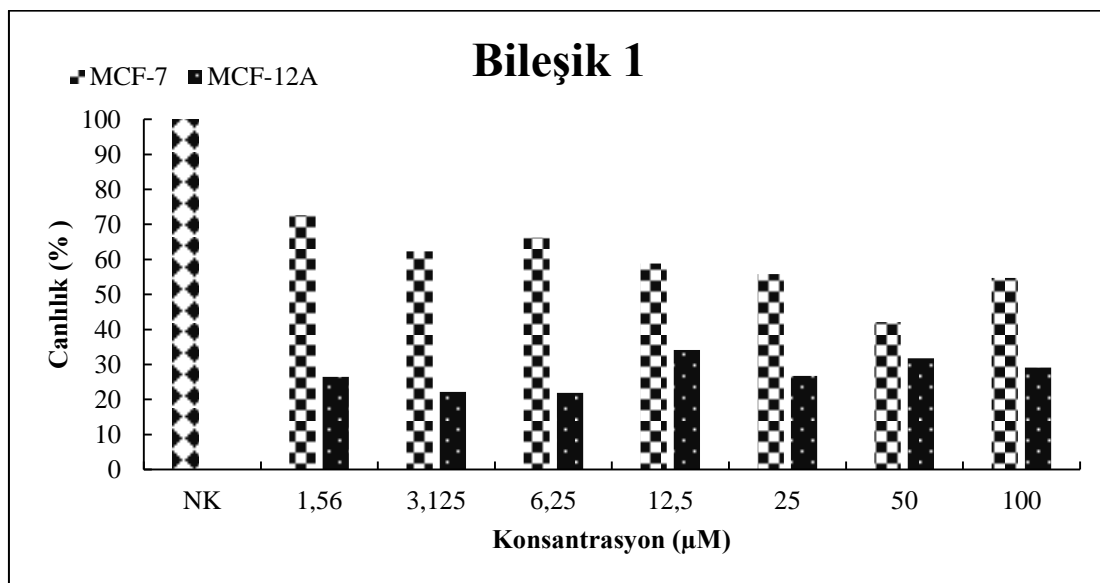
4. BULGULAR

4.1. PhTAD Türevli Dihidropirol Bileşiklerinin MCF-7 Hücre Hattında Sitotoksik Dozlarının MTT Yöntemi ile Belirlenmesi

Çalışmada birbirinin syn ve anti konformasyonuna sahip toplam 16 PhTAD türevli dihidropirol bileşiğinin MCF-7 ve MCF-12A hücreleri üzerindeki en etkin sitotoksik dozlarının belirlenmesi amacıyla MTT testi uygulandı. Doz uygulama işlemi 96'lık plakalarda 24 saat süre ile gerçekleşti. MTT deneyi her bir bileşik birbirinden bağımsız 3 biyolojik tekrarlı olarak çalışıldı. Kontrol grubu olarak hiç doz uygulanmayan kuyulardaki hücrelerin farklı konsantrasyonlardaki dihidropirol bileşiklerine göre daha yoğun proliferasyona sahip olduğu görüldü. Yüzde canlılık hesaplamasında bileşik uygulanmayan kontrol grubu % 100 canlı kabul edildi.

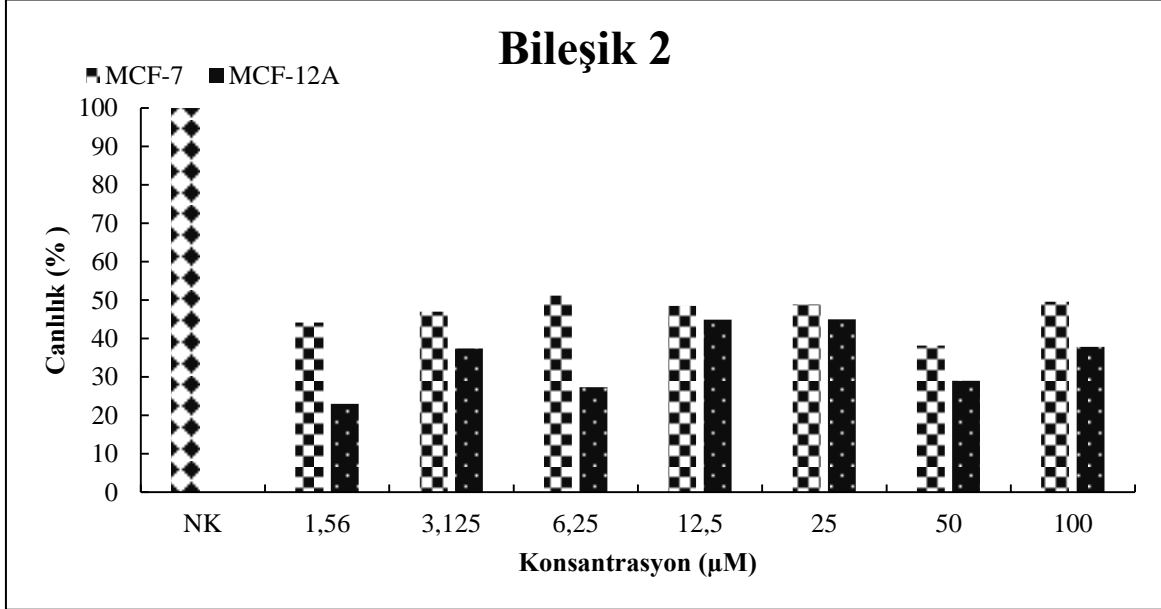
Deneyle sonuçunda absorbans-konsantrasyon değerlerine bağlı olarak her bir bileşiğe ait MCF-7 ve MCF-12A hücrelerindeki yüzde canlılık ve etkin konsantrasyon değerlerine ait grafikler Şekil 4.1-4.16 'da karşılaştırmalı olarak verilmektedir.

Bileşik 1 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelerine göre MCF-7 için 25 μ M, MCF-12A için 12,5 μ M etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1).



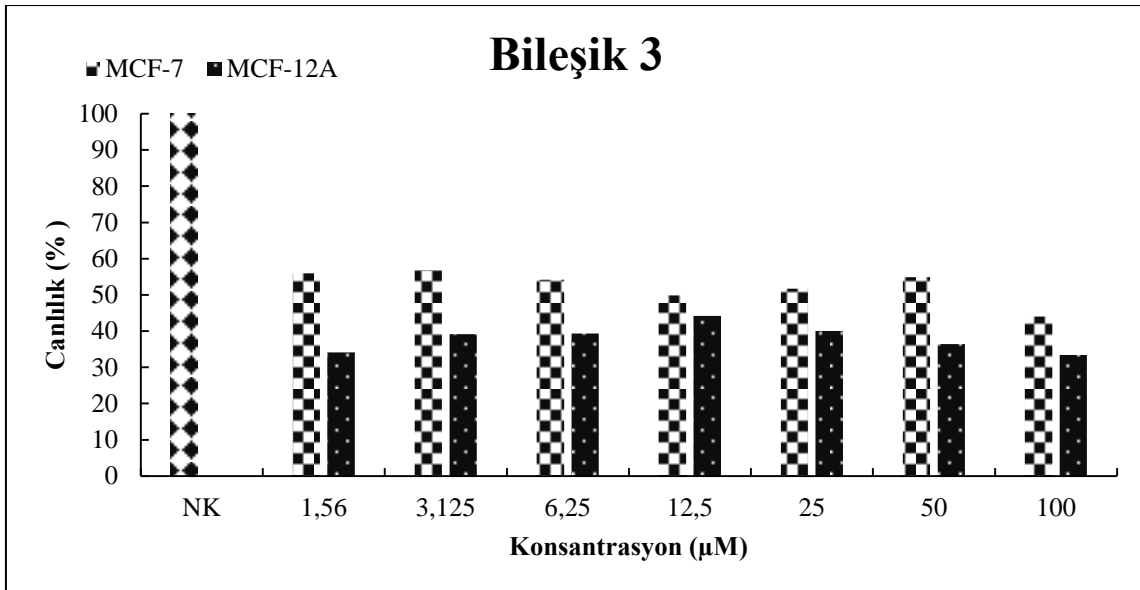
Şekil 4.1. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 1'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 2 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelere göre MCF-7 için 25 μM , MCF-12A için ise 25 μM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2).



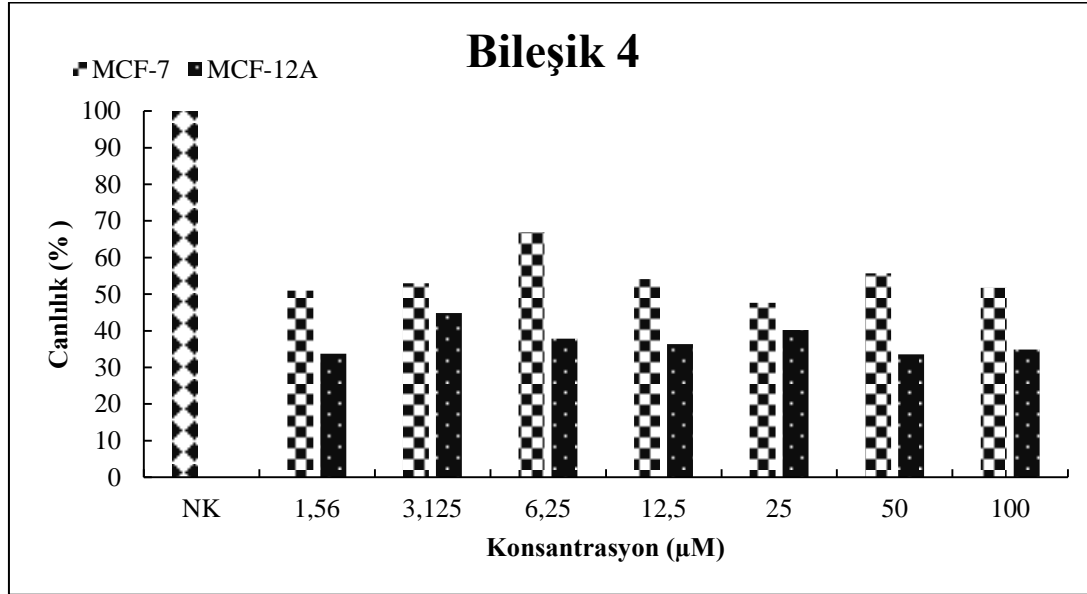
Şekil 4.2. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 2'ye ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 3 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelere göre MCF-7 için 25 μM , MCF-12A için ise 12,5 μM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).



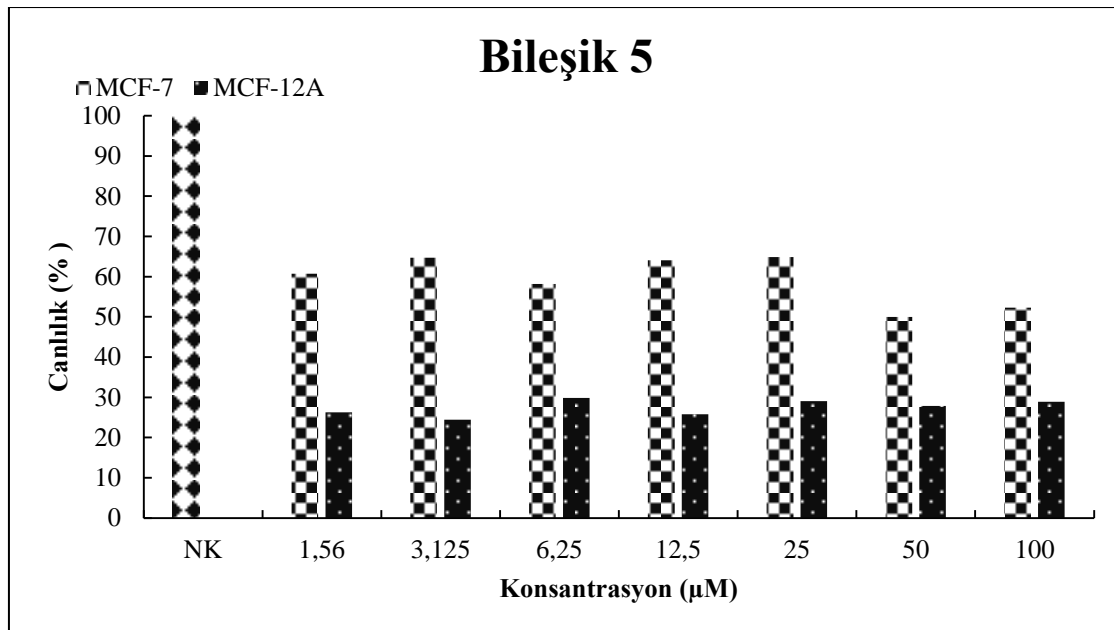
Şekil 4.3. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 3'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 4 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelerine göre MCF-7 için 25 μM , MCF-12A için ise 3,125 μM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).



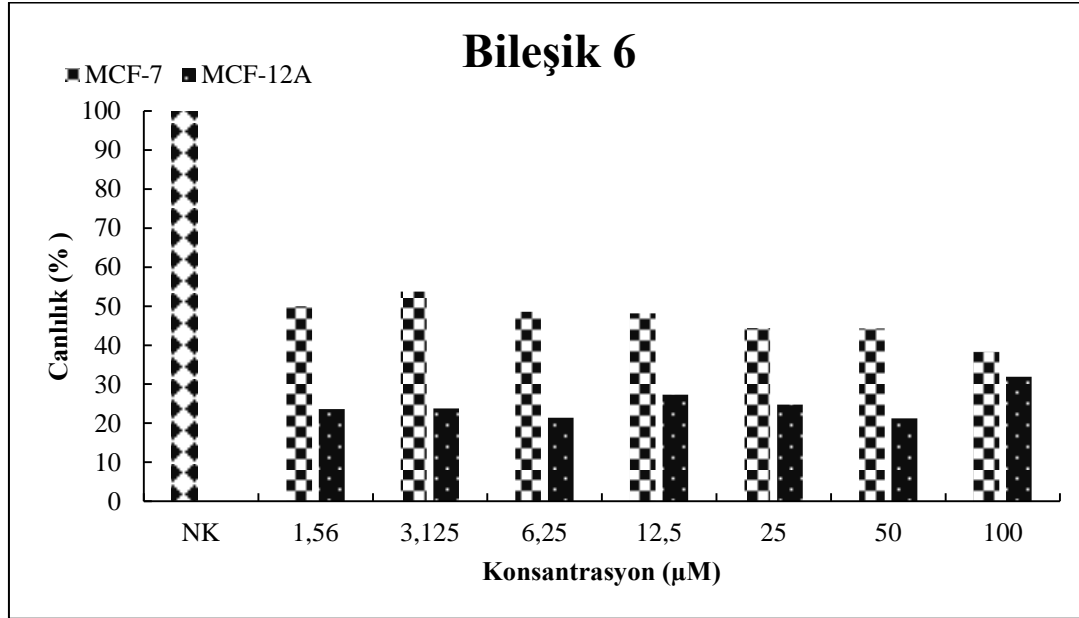
Şekil 4.4. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 4'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 5 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelerine göre MCF-7 için 50 μM , MCF-12A için ise 6,25 μM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5).



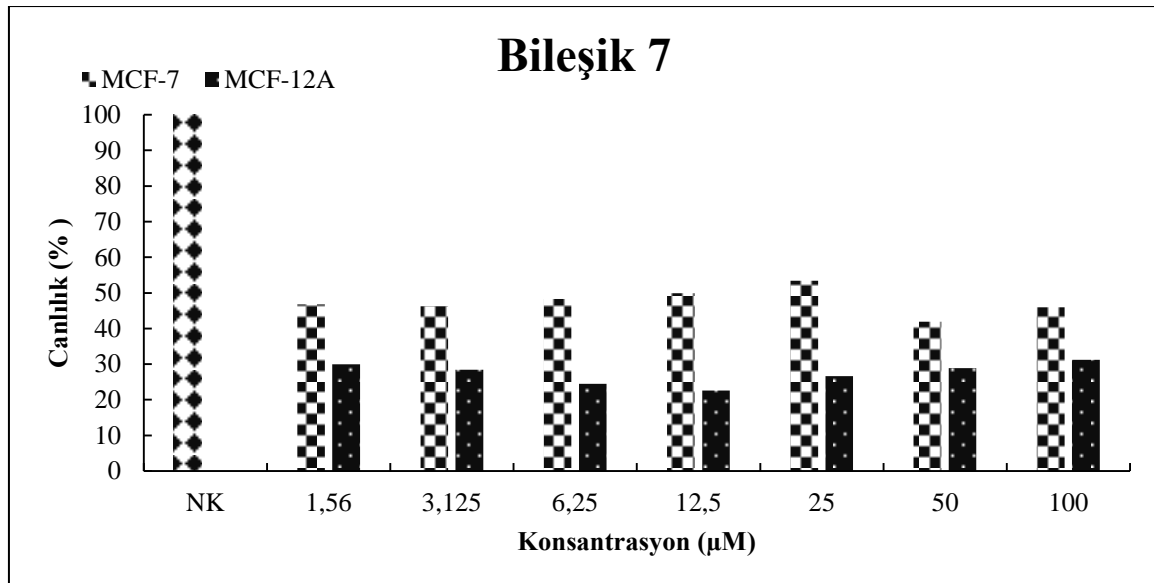
Şekil 4.5. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 5'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 6 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelere göre MCF-7 için 12,5 μ M, MCF-12A için ise 100 μ M etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6).



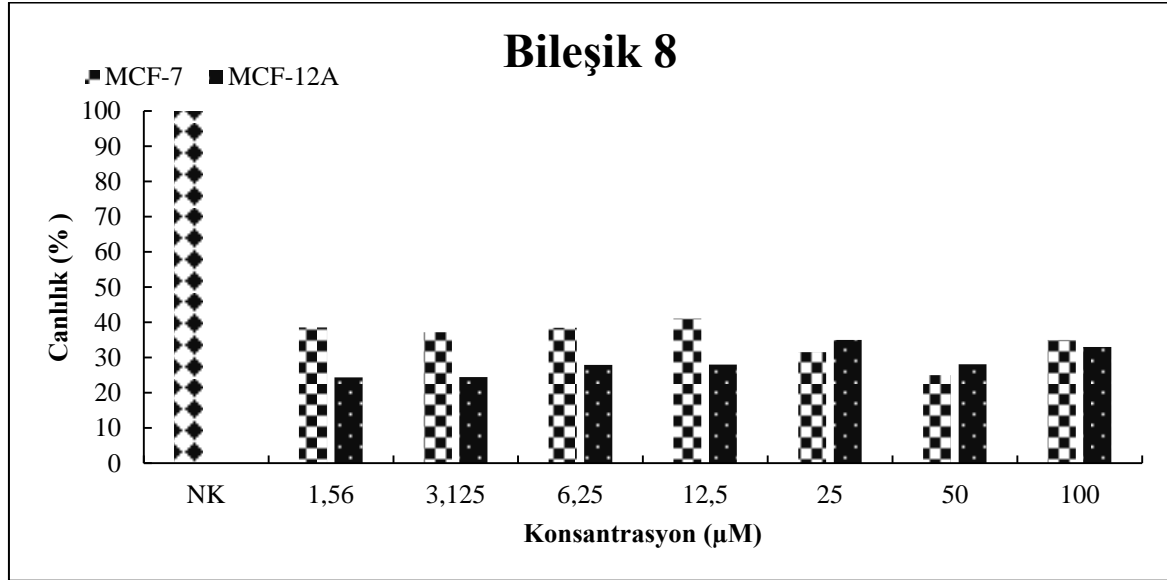
Şekil 4.6. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 6'ya ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 7 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelere göre MCF-7 için 12,5 μ M, MCF-12A için ise 100 μ M etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7).



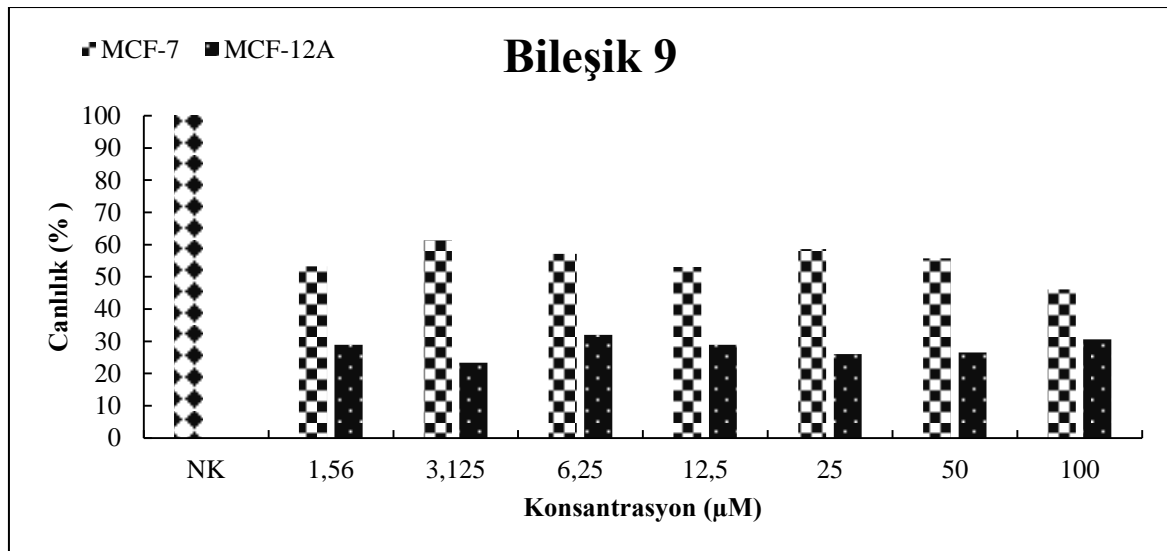
Şekil 4.7. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 7'ye ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 8 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelere göre MCF-7 için 12,5 μ M, MCF-12A için ise 25 μ M etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8).



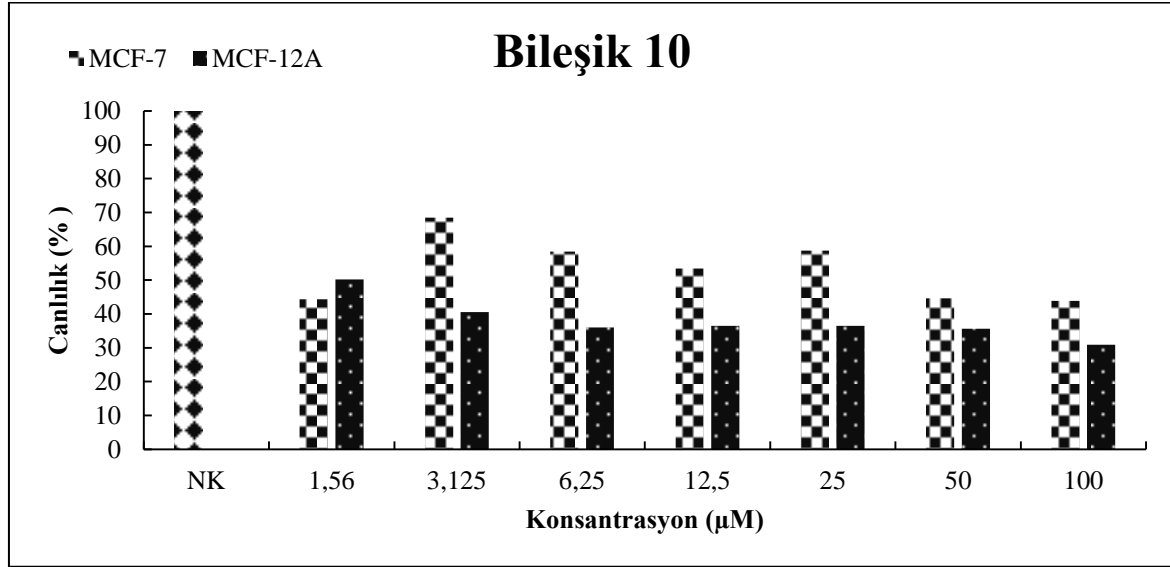
Şekil 4.8. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 8'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 9 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelere göre MCF-7 için 12,5 μ M, MCF-12A için ise 6,25 μ M etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9).



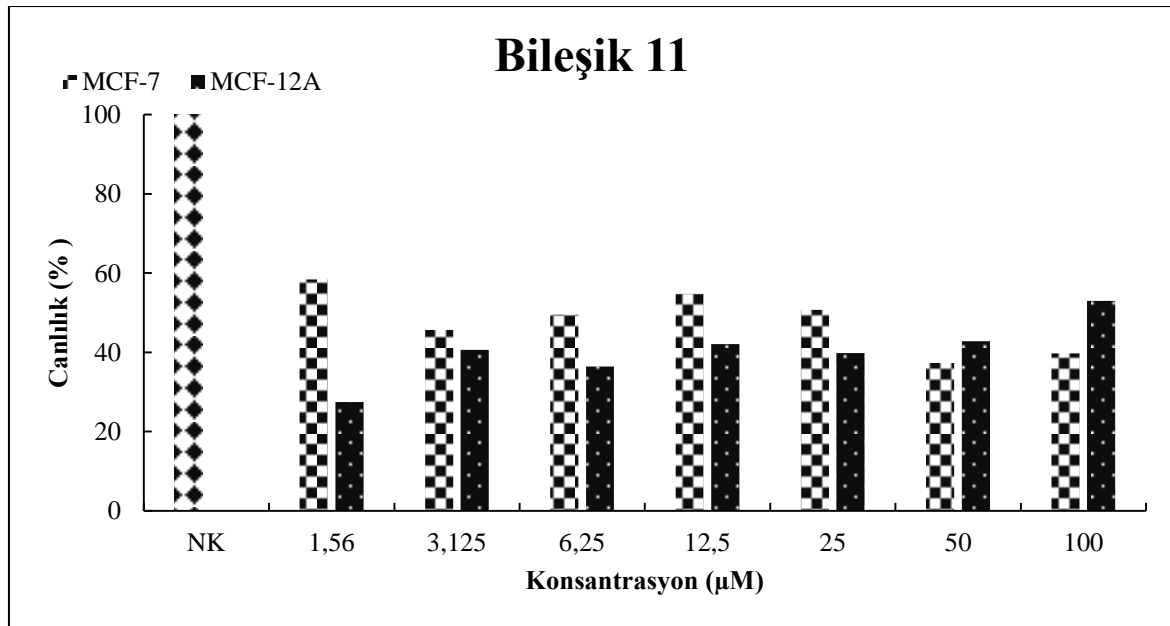
Şekil 4.9. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 9'a ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 10 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelerine göre MCF-7 için 12,5 μM , MCF-12A için ise 1,56 μM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10).



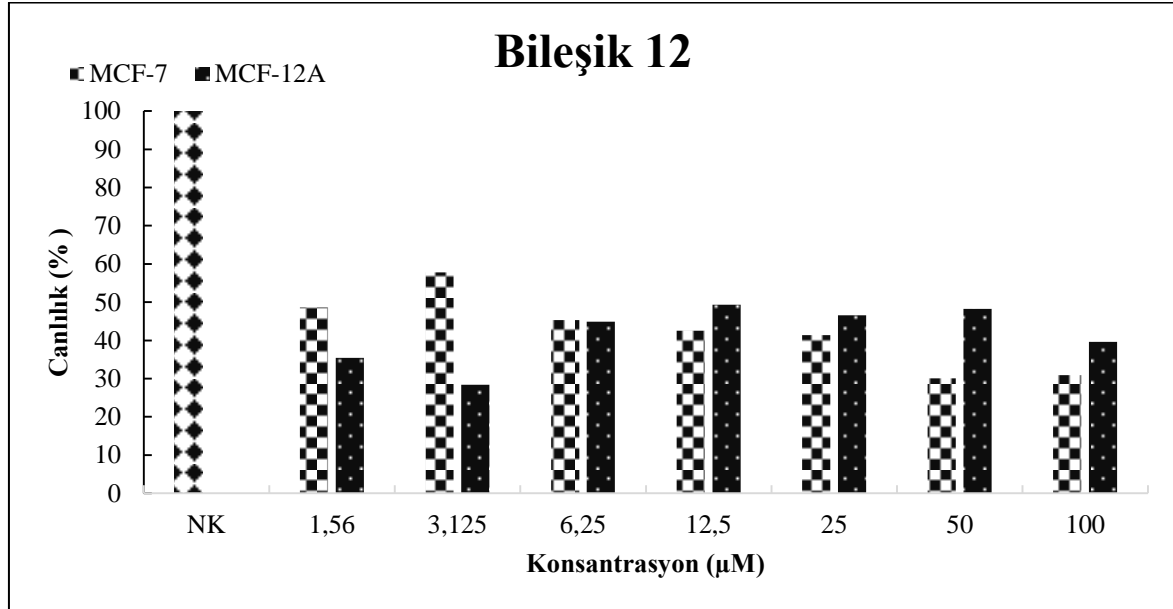
Şekil 4.10. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 10'a ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 11 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelerine göre MCF-7 için 6,25 μM , MCF-12A için ise 100 μM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11).



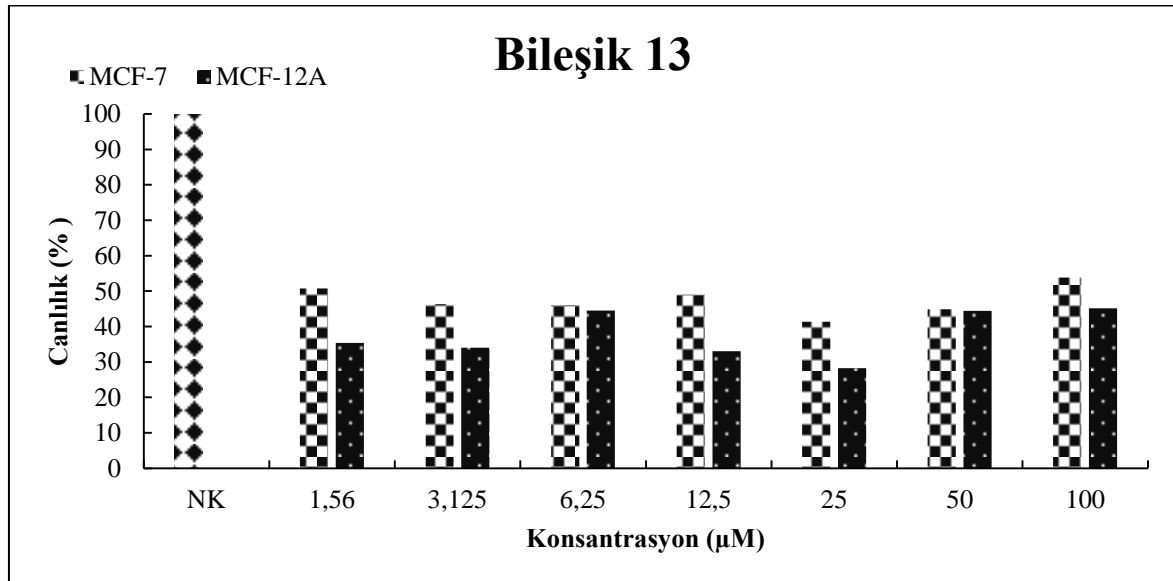
Şekil 4.11. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 11'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 12 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelerine göre MCF-7 için 12,5 μM , MCF-12A için ise 12,5 μM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12).



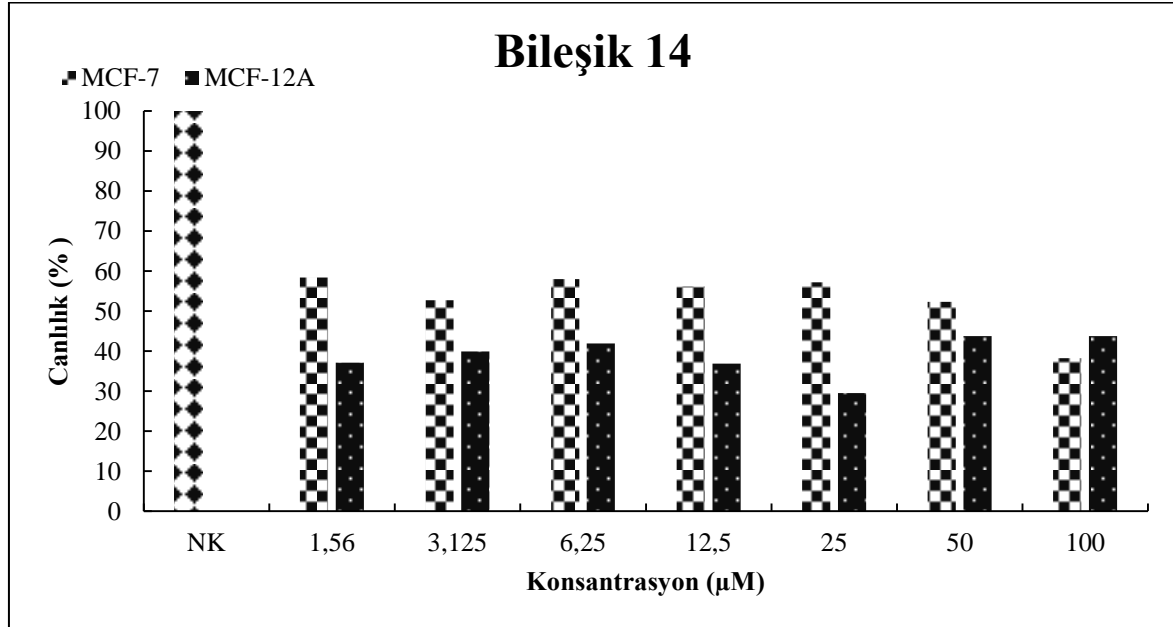
Şekil 4.12. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 12'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 13 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelerine göre MCF-7 için 12,5 μM , MCF-12A için ise 100 μM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13).



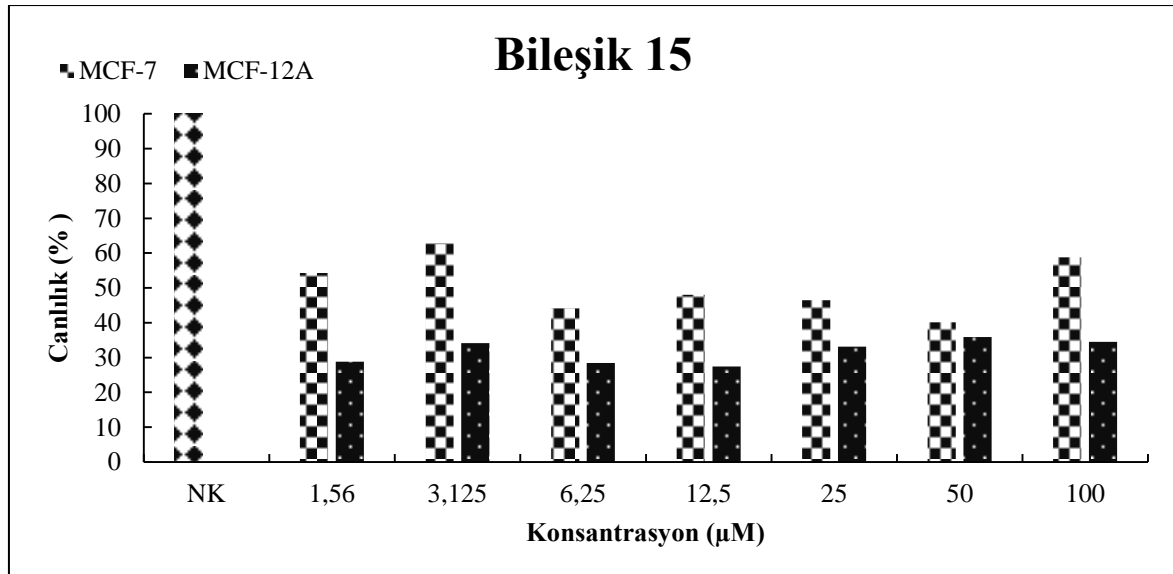
Şekil 4.13. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 13'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 14 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelerine göre MCF-7 için 50 μM , MCF-12A için ise 50 μM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.14).



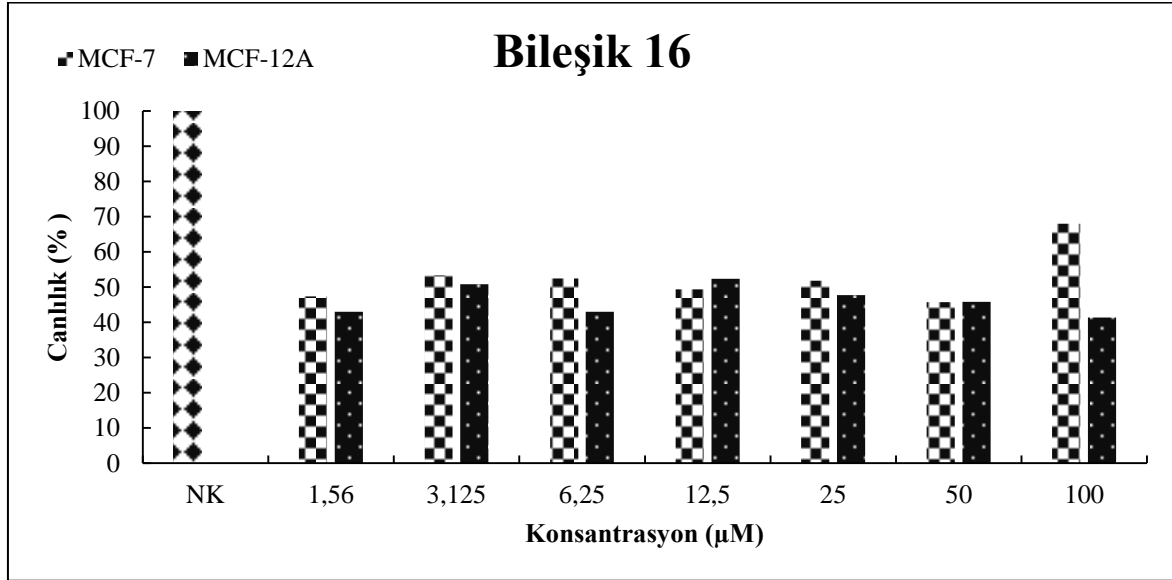
Şekil 4.14. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 14'ya ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 15 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelerine göre MCF-7 için 25 μM , MCF-12A için ise 50 μM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 15'ye ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

Bileşik 16 için MTT deneyi sonucunda elde edilen canlılık yüzdelerine göre MCF-7 için 25 μ M, MCF-12A için ise 3,125 μ M etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. MCF-7 ve MCF12A hücre hattında Bileşik 16'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği (NK: Negatif kontrol)

MTT deneyi sonucu elde edilen % canlılık grafiklerine göre belirlenen ve Çizelge 4.1, 'de gösterilen konsantrasyonlar sonraki çalışmalarda esas alınmıştır.

Çizelge 4.1. MCF-7 hücre hattında MTT yöntemiyle elde edilen etkin doz ve IC₅₀ değerleri

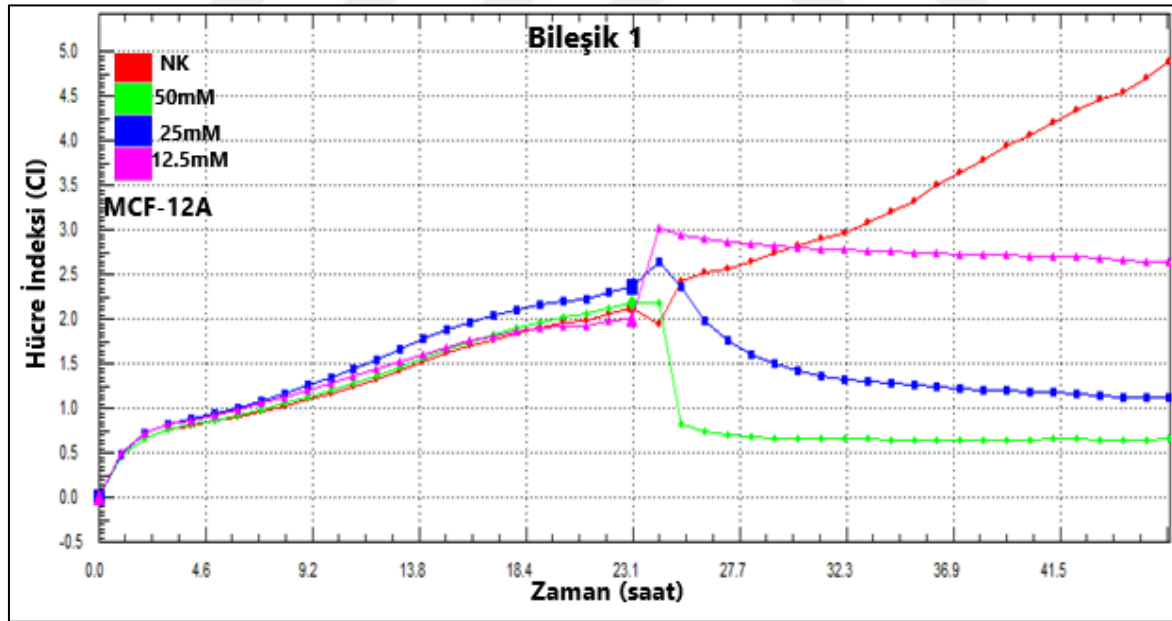
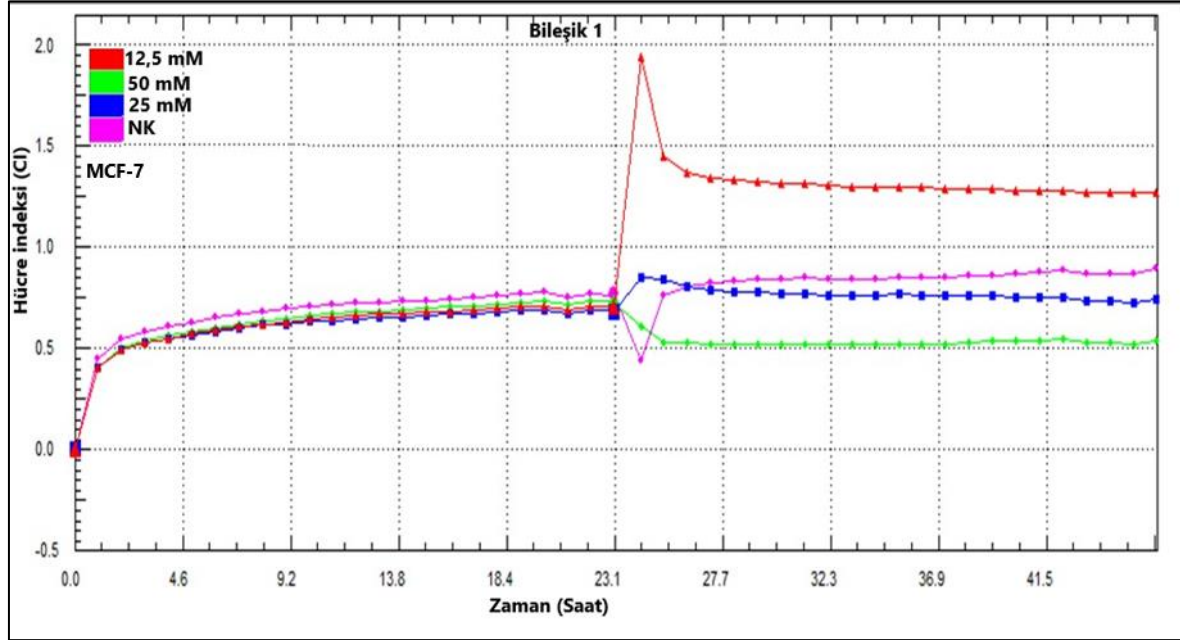
Dihidropirol bileşikleri		MCF-7 Etkin doz (µM)	IC ₅₀ (µM)
Bileşik 1	MeS/OMe (syn)	25	48,41
Bileşik 2	MeS/OMe (anti)	25	26,90
Bileşik 3	EtS/OMe(syn)	25	43,78
Bileşik 4	EtS/OMe(anti)	25	33,77
Bileşik 5	PrS/OMe(syn)	50	67,85
Bileşik 6	PrS/OMe(anti)	12,5	7,07
Bileşik 7	iPrS/OMe(syn)	12,5	19,95
Bileşik 8	iPrS/OMe(anti)	12,5	1,56>IC ₅₀
Bileşik 9	BuS/OMe(syn)	12,5	54,64
Bileşik 10	BuS/OMe(anti)	12,5	35,10
Bileşik 11	BnzS/OMe(syn)	6,25	21,63
Bileşik 12	BnzS/OMe(anti)	12,5	5,49
Bileşik 13	MeS/OEt(syn)	12,5	37,53
Bileşik 14	MeS/OEt(anti)	50	43,65
Bileşik 15	MeS/OBnz(syn)	25	28,12
Bileşik 16	MeS/OBnz(anti)	25	19,29

Bileşik 8 için en etkin doz 12,5 µM bulunmuştur. Bununla beraber bu bileşiğin IC₅₀ değerinin 1,56 µM'dan daha küçük (1,56>IC₅₀) olduğu tespit edilmiştir.

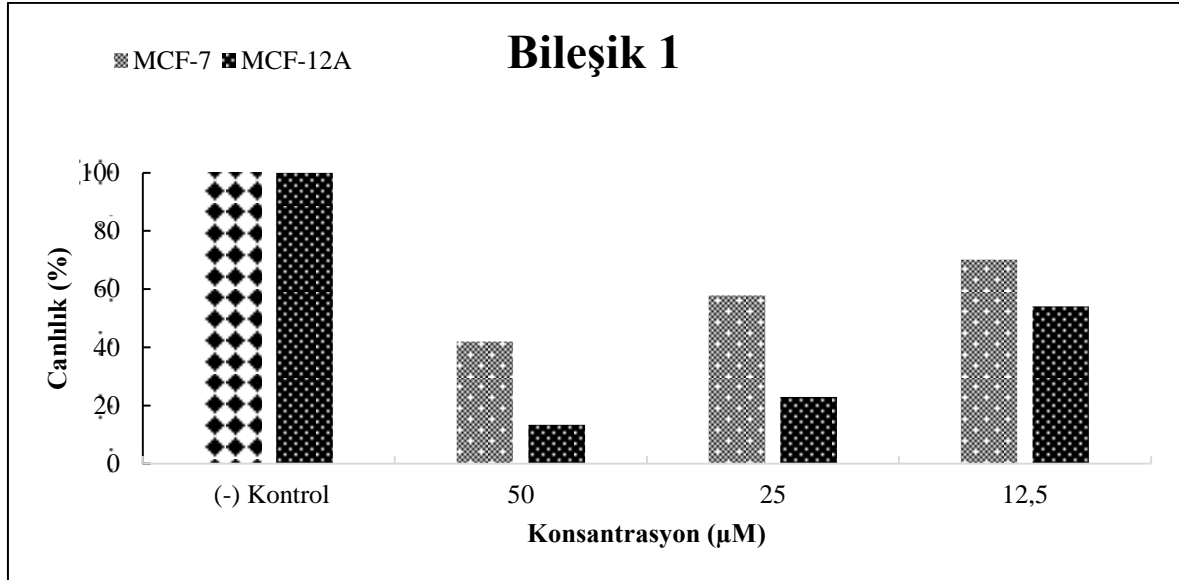
4.2. PhTAD Türevli Dihidropirol Bileşiklerin MCF-7 Hücrelerinde Canlılığa etkilerinin RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analizi) Yöntemi ile Belirlenmesi

MCF-7 hücre hattı üzerinde bileşiklerin syn/anti konformasyonlarının sitotoksik etkisi aynı plakada 3 farklı bileşik dozu ve iki kontrol olarak çalışılmıştır. Bu bileşiklerin MCF-7 hücre hattında MTT deneyleri sonucu elde edilen etkin dozların RTCA ile gerçek zamanlı olarak hücre üzerindeki proliferasyonlarının gözlemlenmesi amacıyla yapılmıştır. Hücrelerin 24 saat süre ile plakalara yapışması beklendikten sonra farklı konsantrasyonlar uygulanmıştır. Bu andan itibaren 24 saatlik süre sonundaki hücre indeksinden (CI) elde edilen yüzde canlılık değerleri hesaplanmıştır. Bileşiklere ait hücre indeksi (CI) ve yüzde canlılık grafikleri aşağıda gösterilmiştir.

RTCA iCELLigence ile MCF-7 hücre hattında elde edilen canlılık yüzdelere Bileşik 1 için göre 25 μ M etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18).

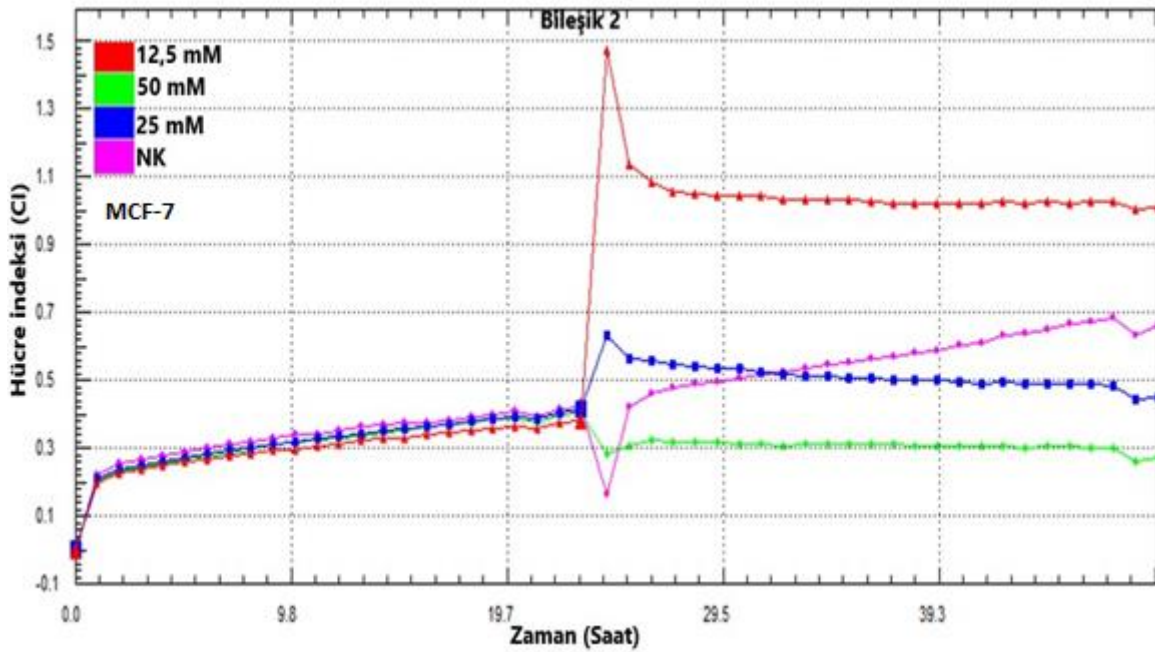


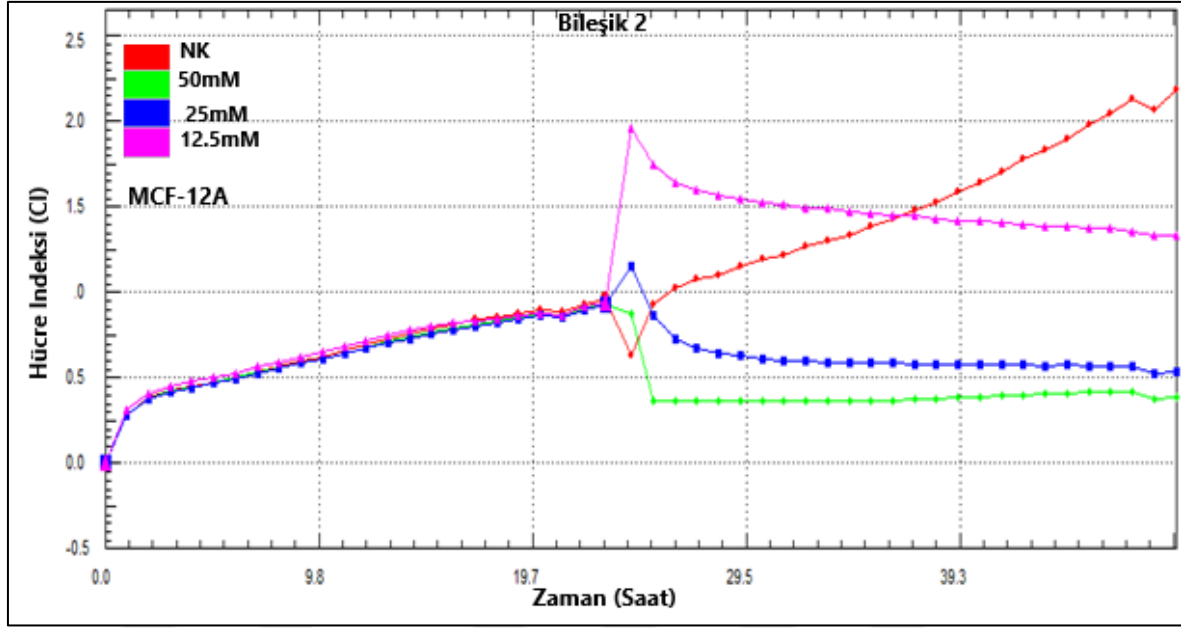
Şekil 4.17. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 1'e ait RTCA analizi



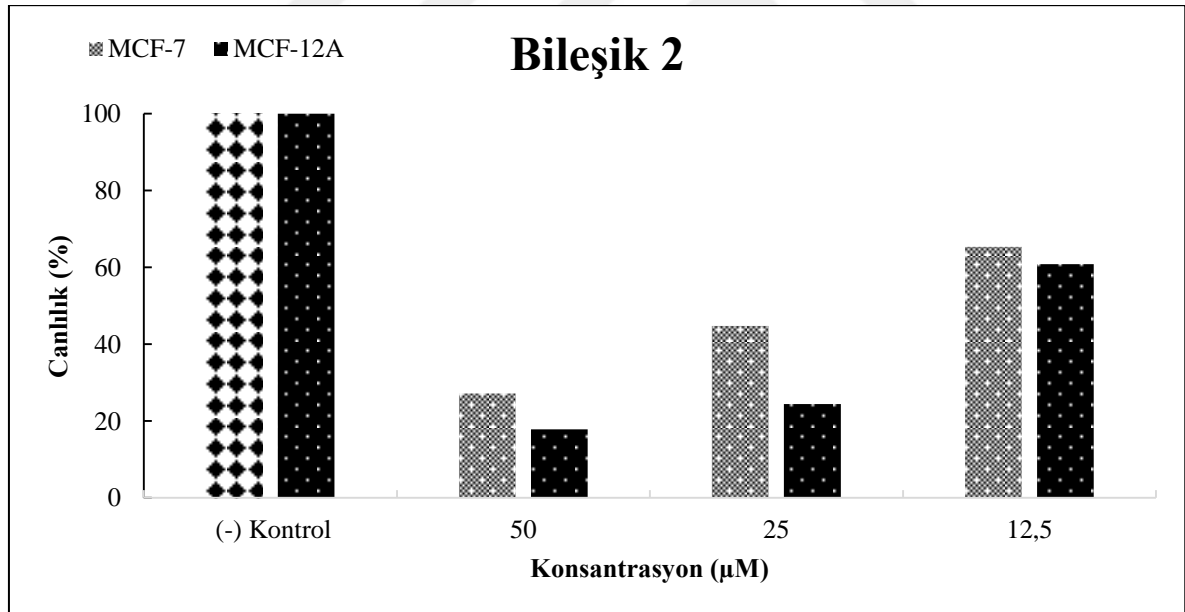
Şekil 4.18. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 1'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında Bileşik 2 için RTCA iCELLigence sistemiyle elde edilen canlılık yüzdelere göre 25 µM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.20).



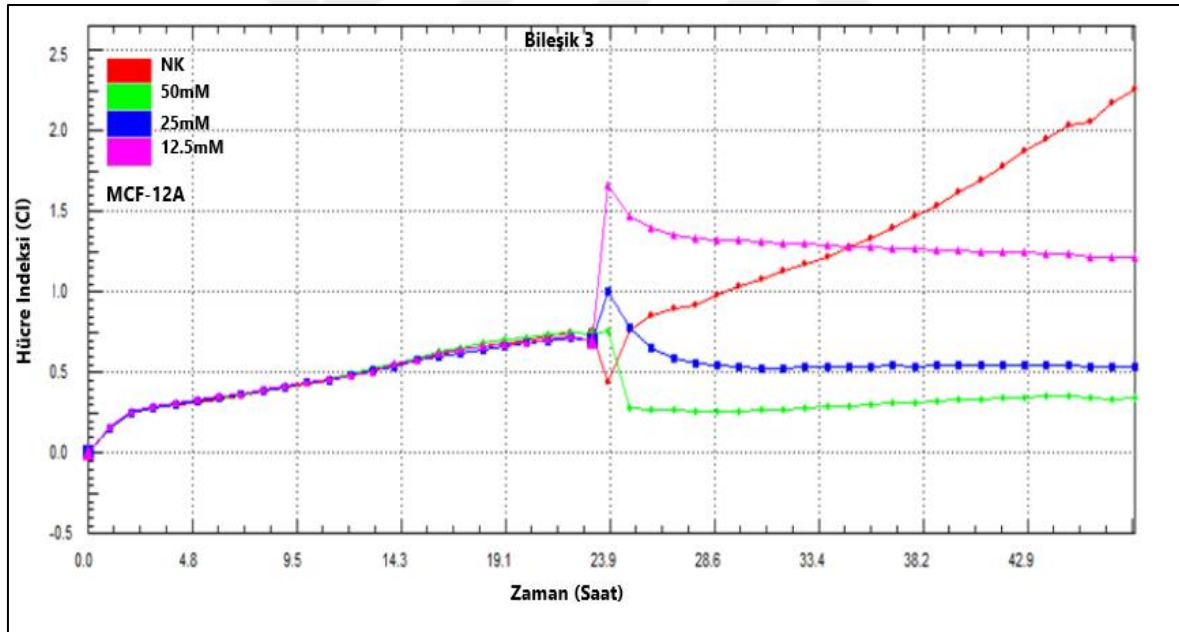
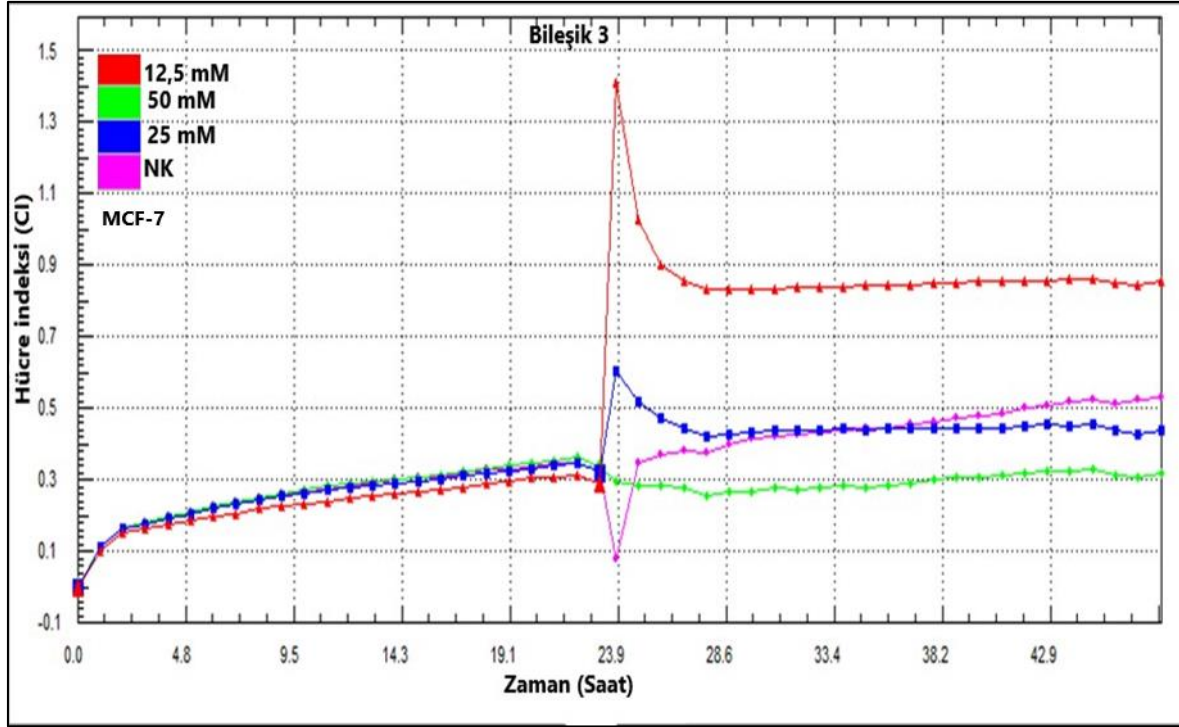


Şekil 4.19. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 2'ye ait RTCA analiz

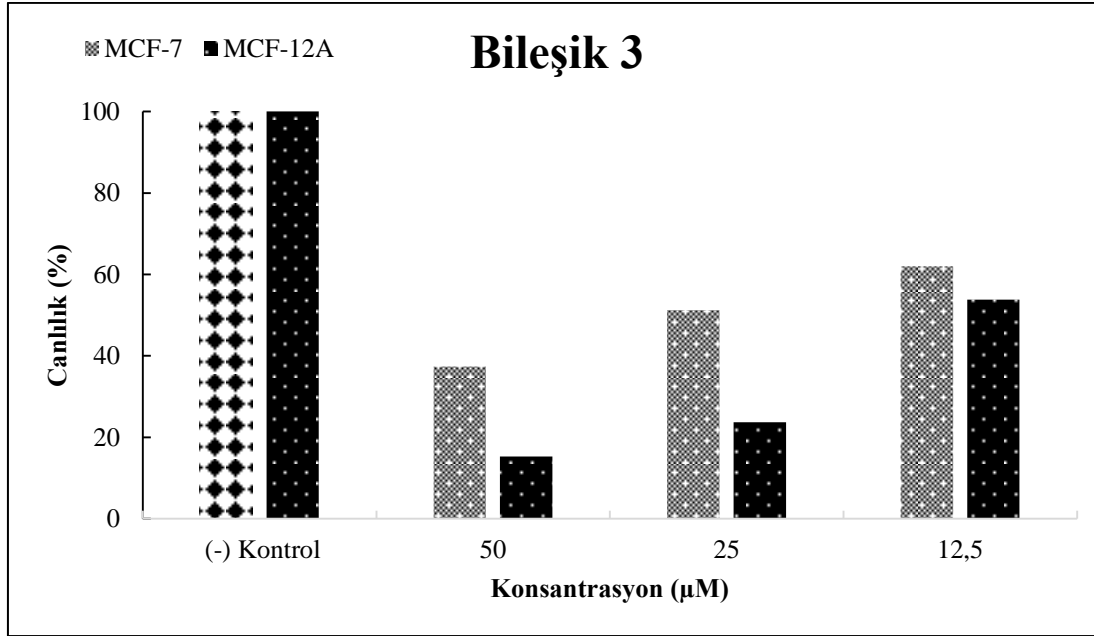


Şekil 4.20. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 2'ye ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında Bileşik 3 için RTCA iCELLigence sistemiyle elde edilen canlılık yüzdelere göre 25 µM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.22).

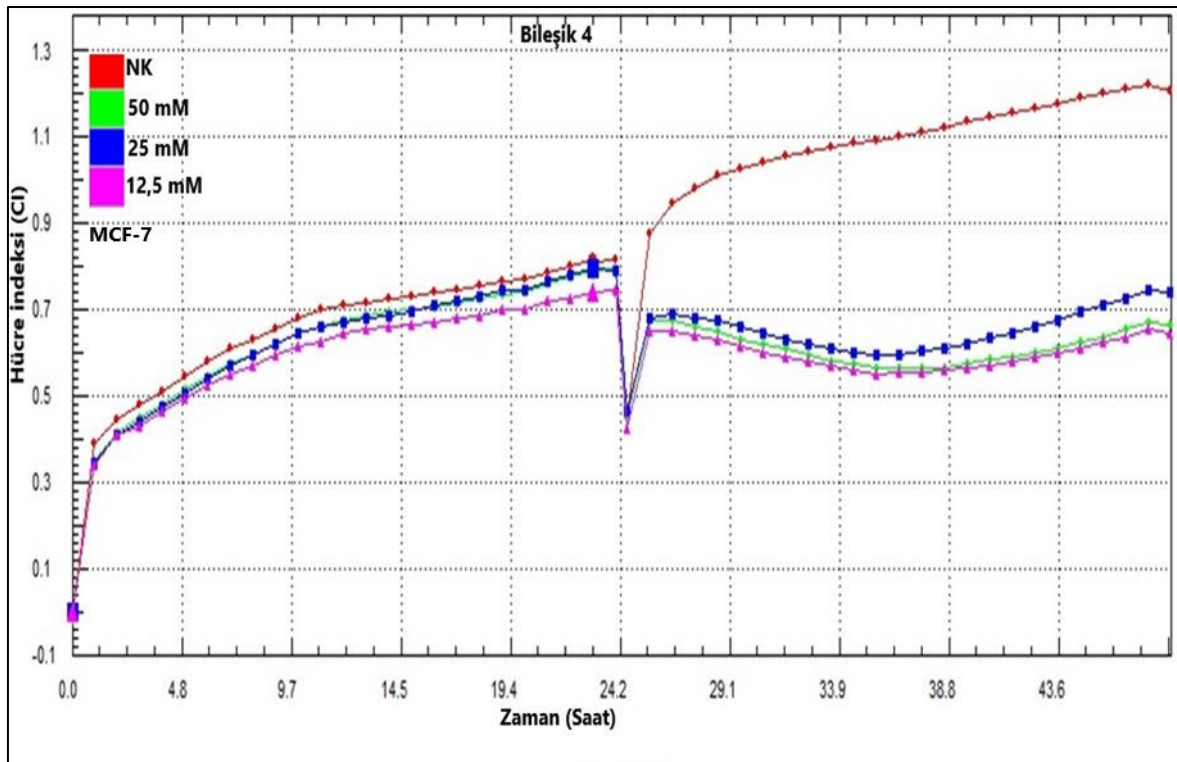


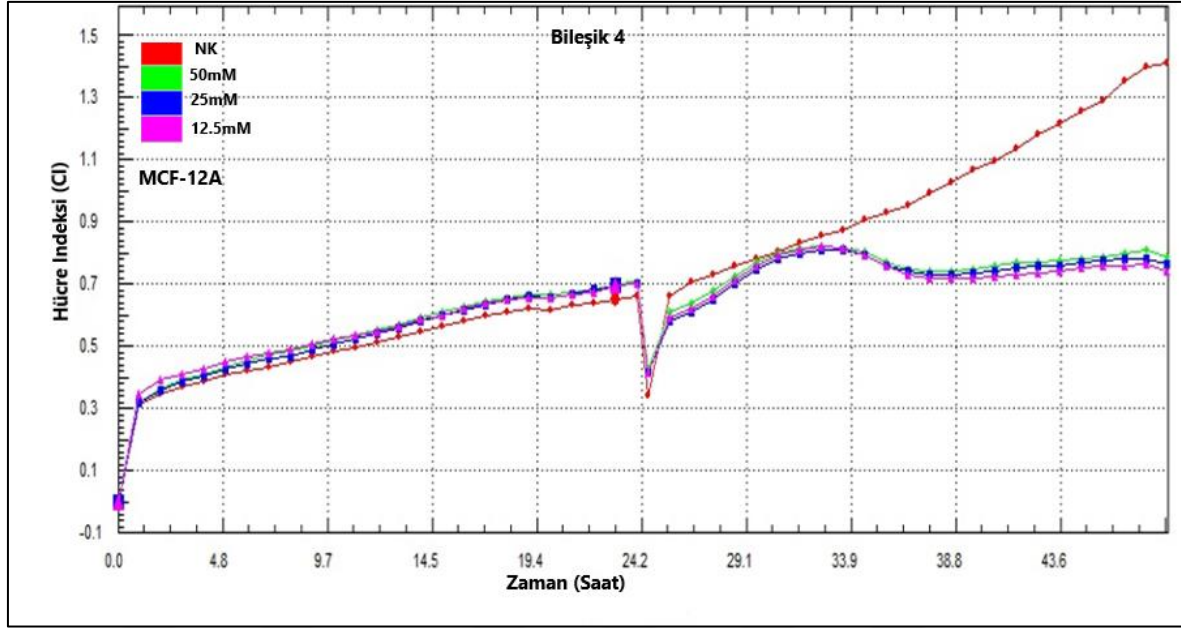
Şekil 4.21. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 3'e ait RTCA analizi



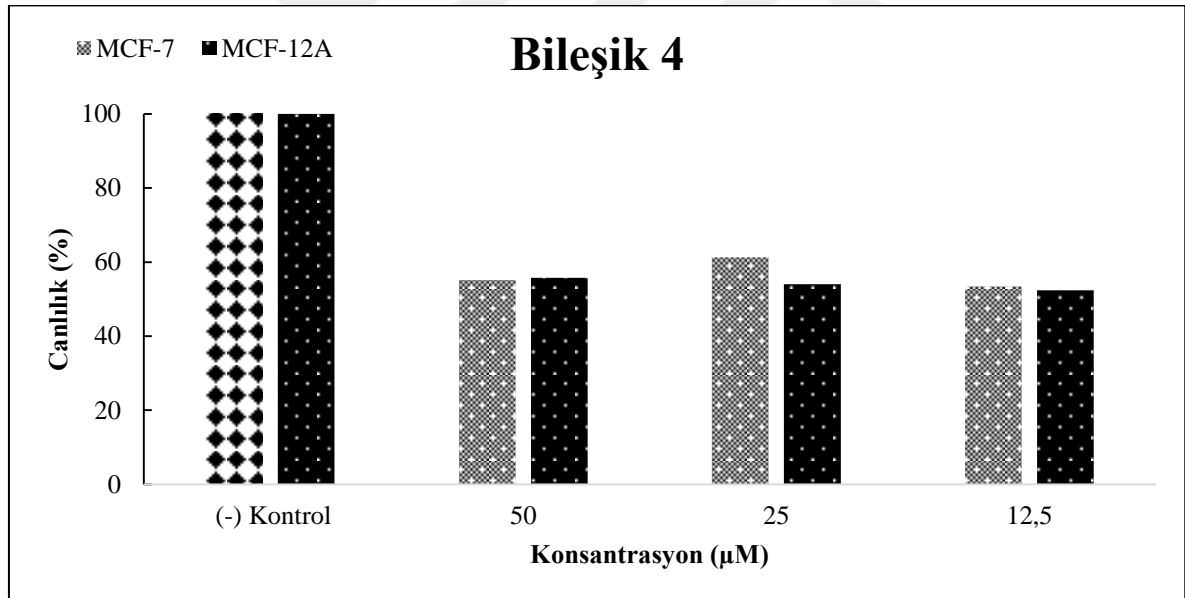
Şekil 4.22. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 3'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında Bileşik 4 için RTCA iCELLigence sistemiyle elde edilen canlılık yüzdelere göre 12,5 µM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.24).



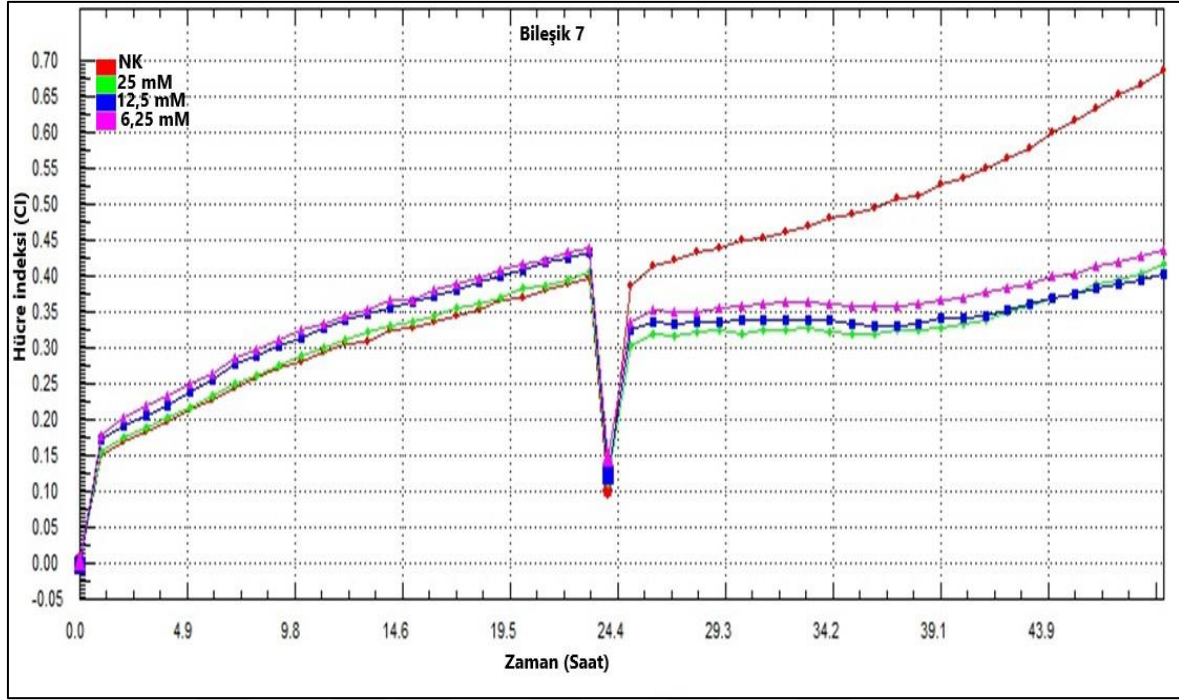


Şekil 4.23. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 4'e ait RTCA analizi

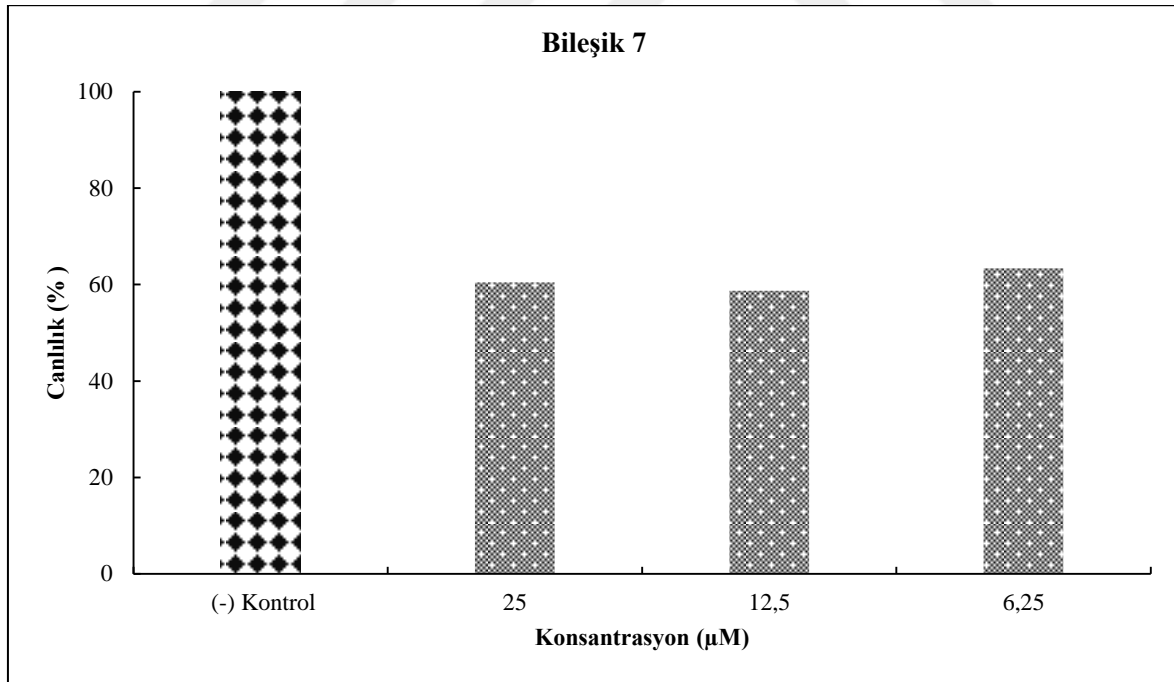


Şekil 4.24. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 4'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında Bileşik 7 için RTCA iCELLigence sistemiyle elde edilen canlılık yüzdelere göre 12,5 µM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.26).

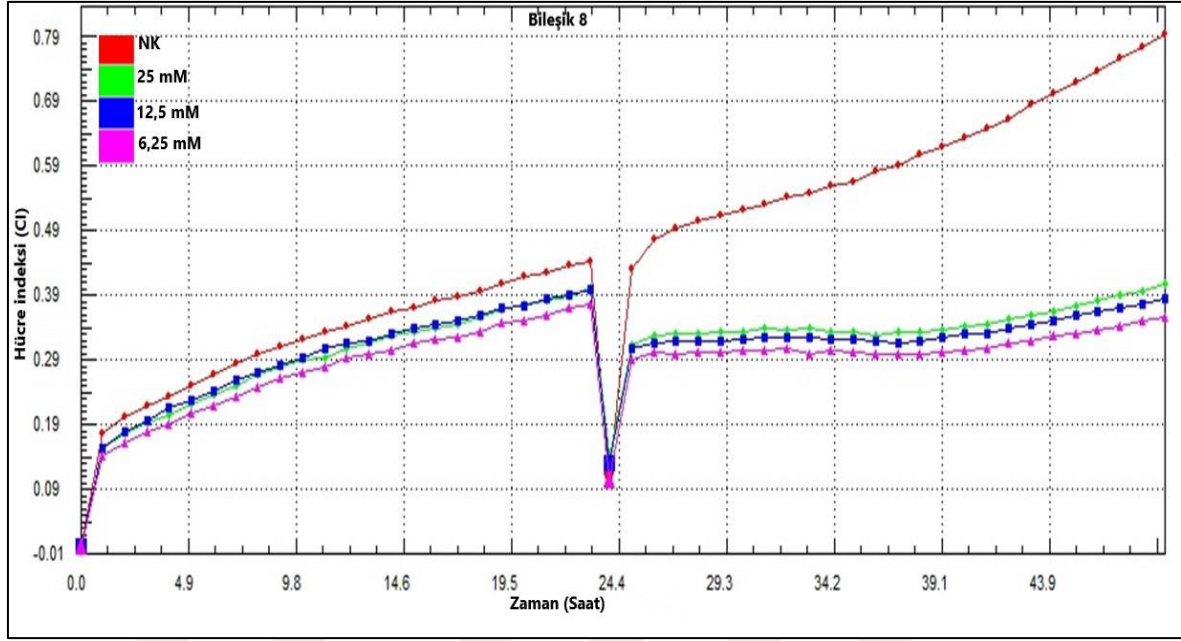


Şekil 4.25. MCF-7 hücre hattında Bileşik 7'ye bileşiğine ait RTCA analizi

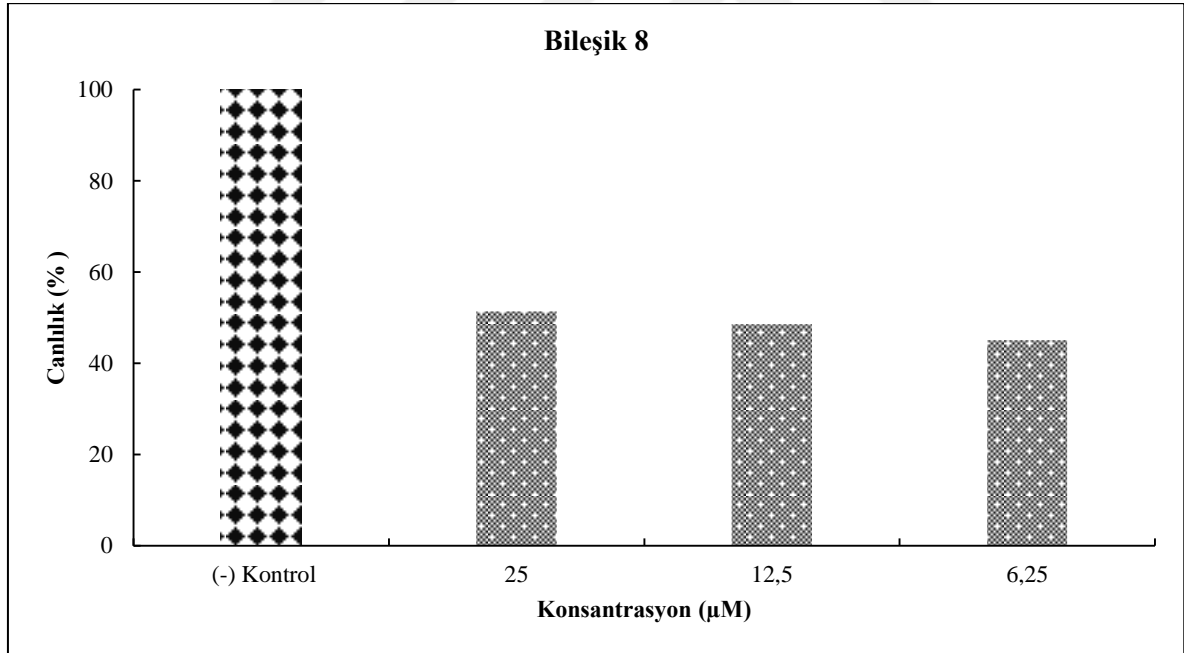


Şekil 4.26. MCF-7 hücre hattında Bileşik 7'ye ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında Bileşik 8 için RTCA iCELLigence sistemiyle elde edilen canlılık yüzdelere göre 12,5 µM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.28).

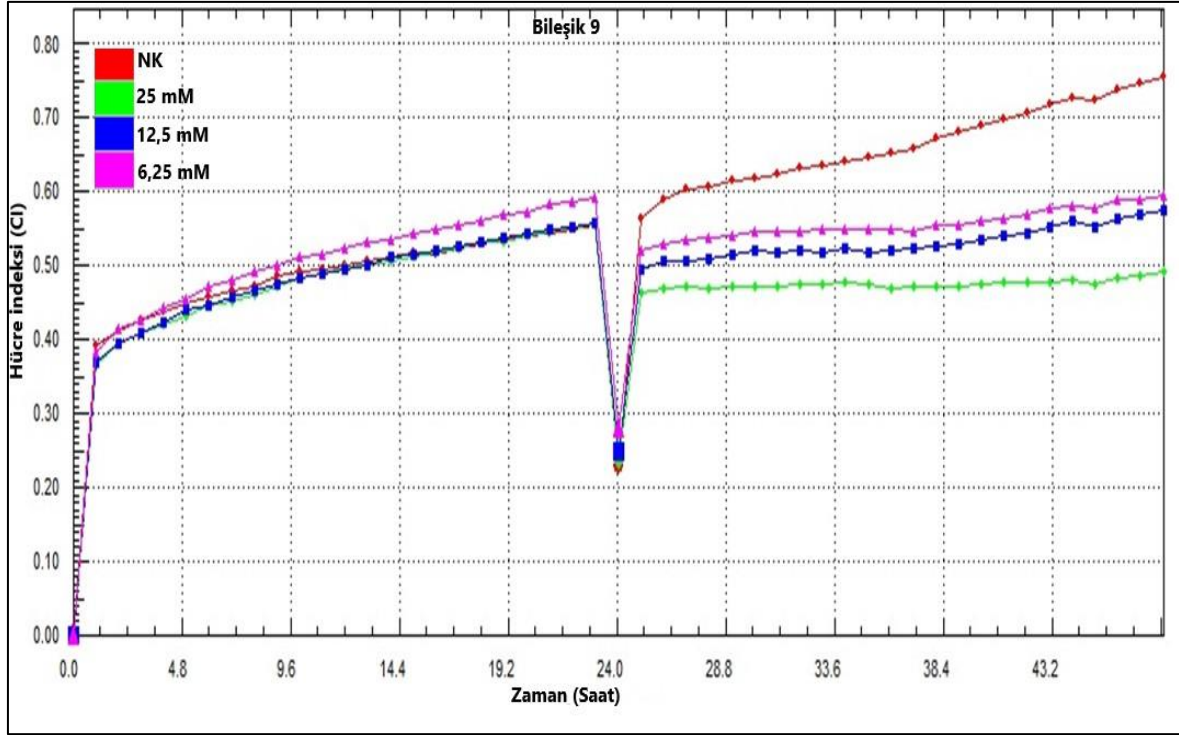


Şekil 4.27. MCF-7 hücre hattında Bileşik 8'e ait RTCA analizi

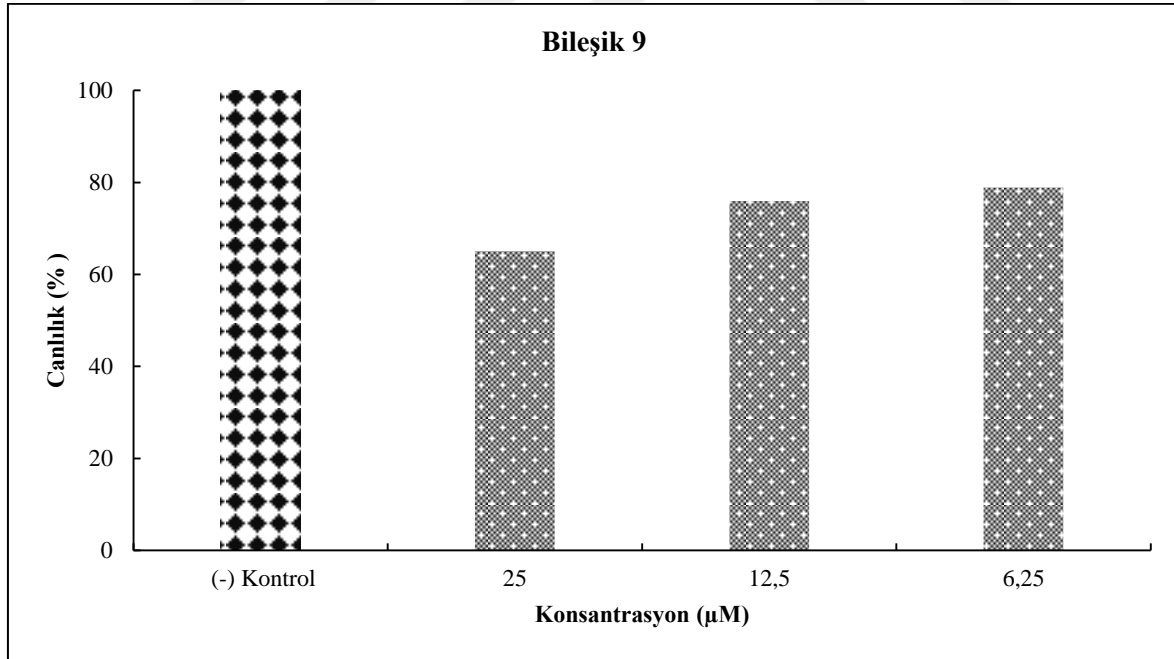


Şekil 4.28. MCF-7 hücre hattında Bileşik 8'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında Bileşik 9 için RTCA iCELLigence sistemiyle elde edilen canlılık yüzdelere göre 25 µM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.30).

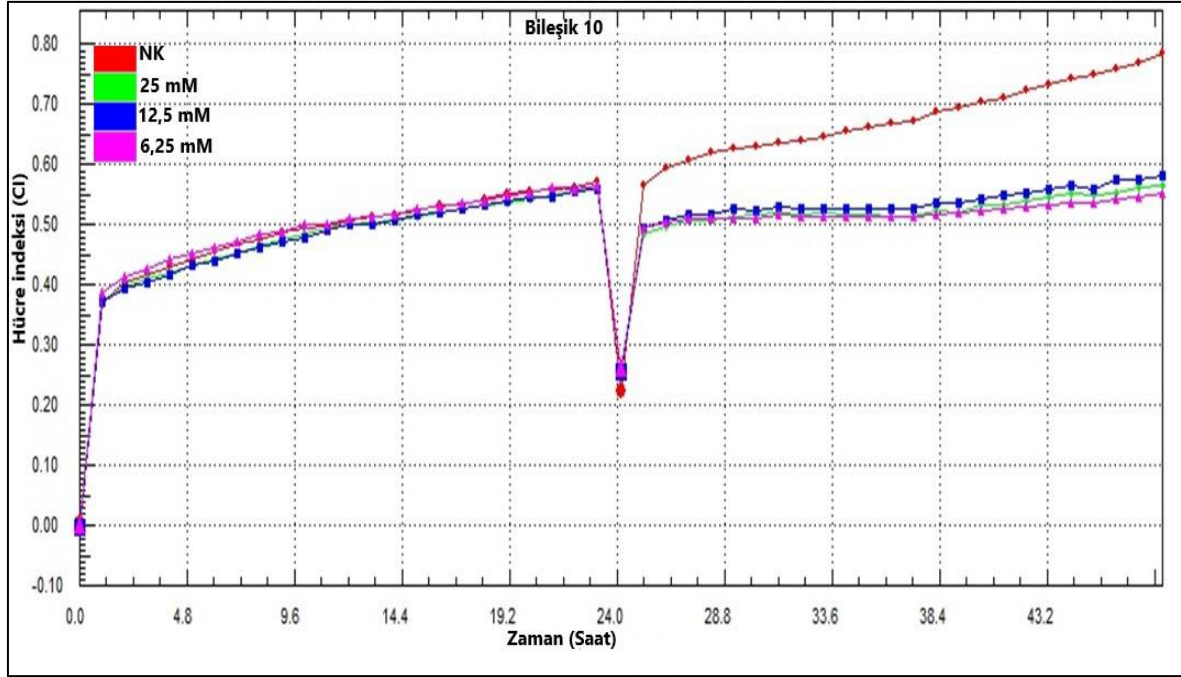


Şekil 4.29. MCF-7 hücre hattında Bileşik 9'a ait RTCA analizi

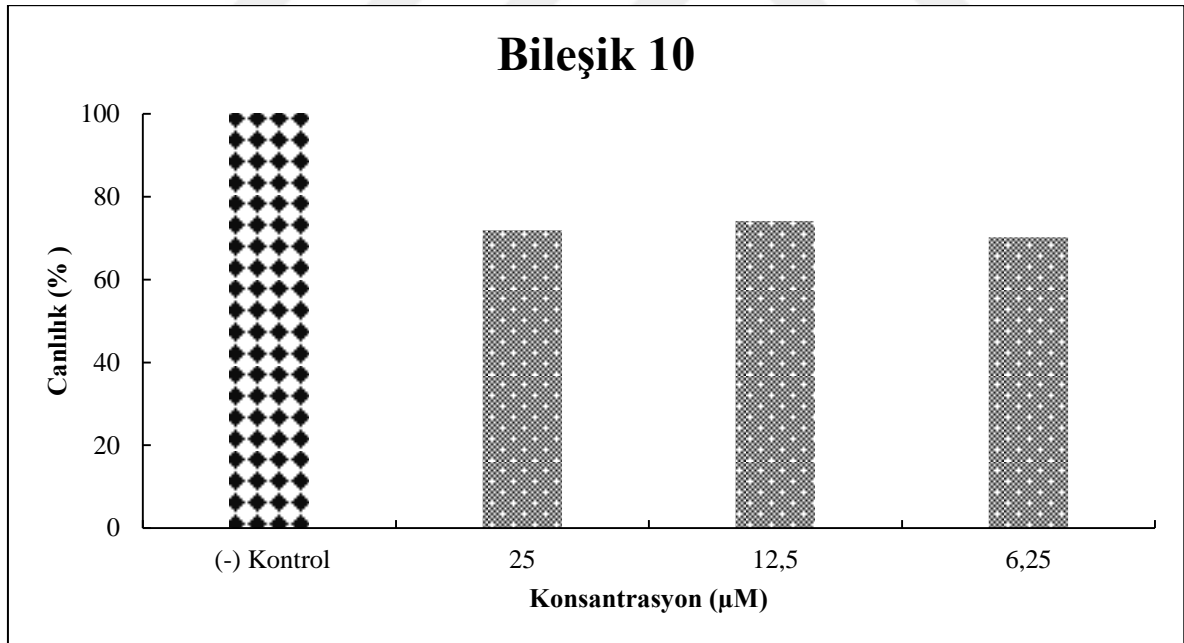


Şekil 4.30. MCF-7 hücre hattında Bileşik 9'a ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında Bileşik 10 için RTCA iCELLigence sistemiyle elde edilen canlılık yüzdelere göre 6,25 µM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.32).

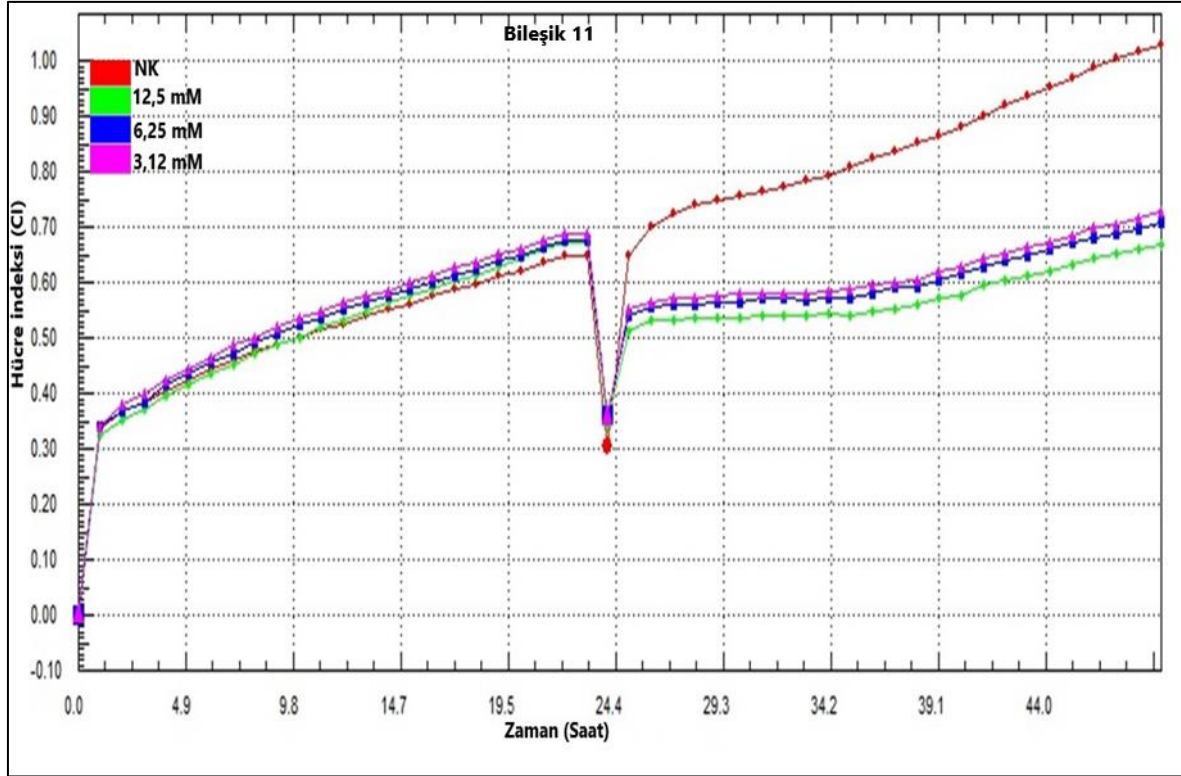


Şekil 4.31. MCF-7 hücre hattında Bileşik 10'a ait RTCA analizi

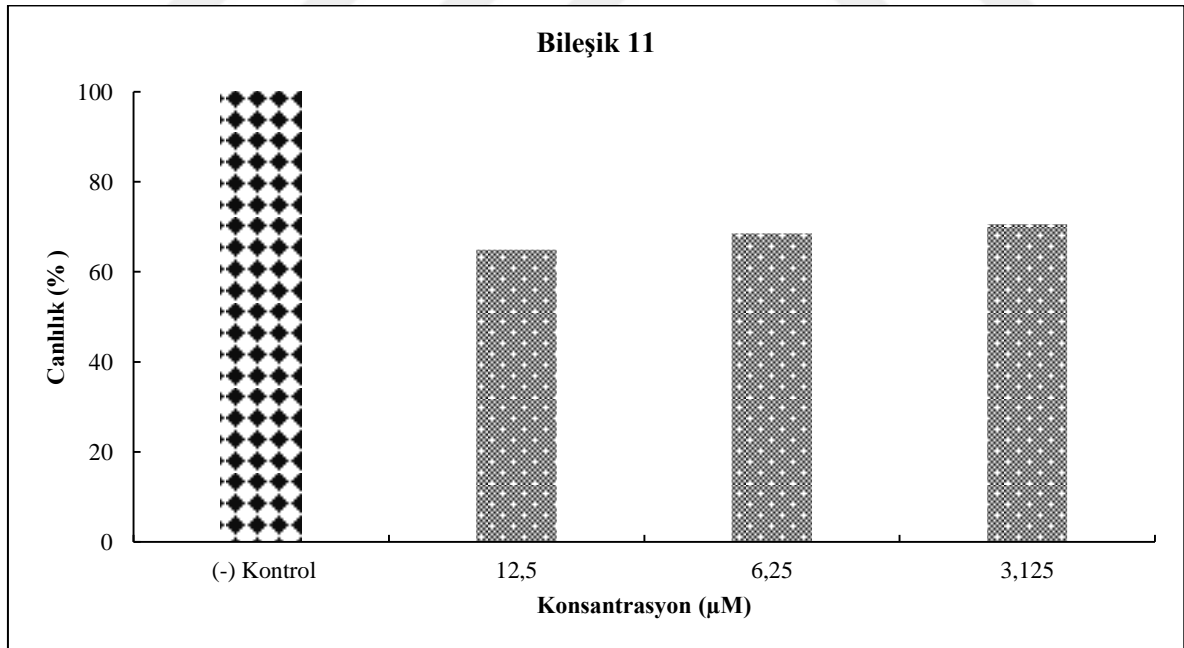


Şekil 4.32. MCF-7 hücre hattında Bileşik 10'a ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında Bileşik 11 için RTCA iCELLigence sistemiyle elde edilen canlılık yüzdelere göre 12,5 µM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.34).

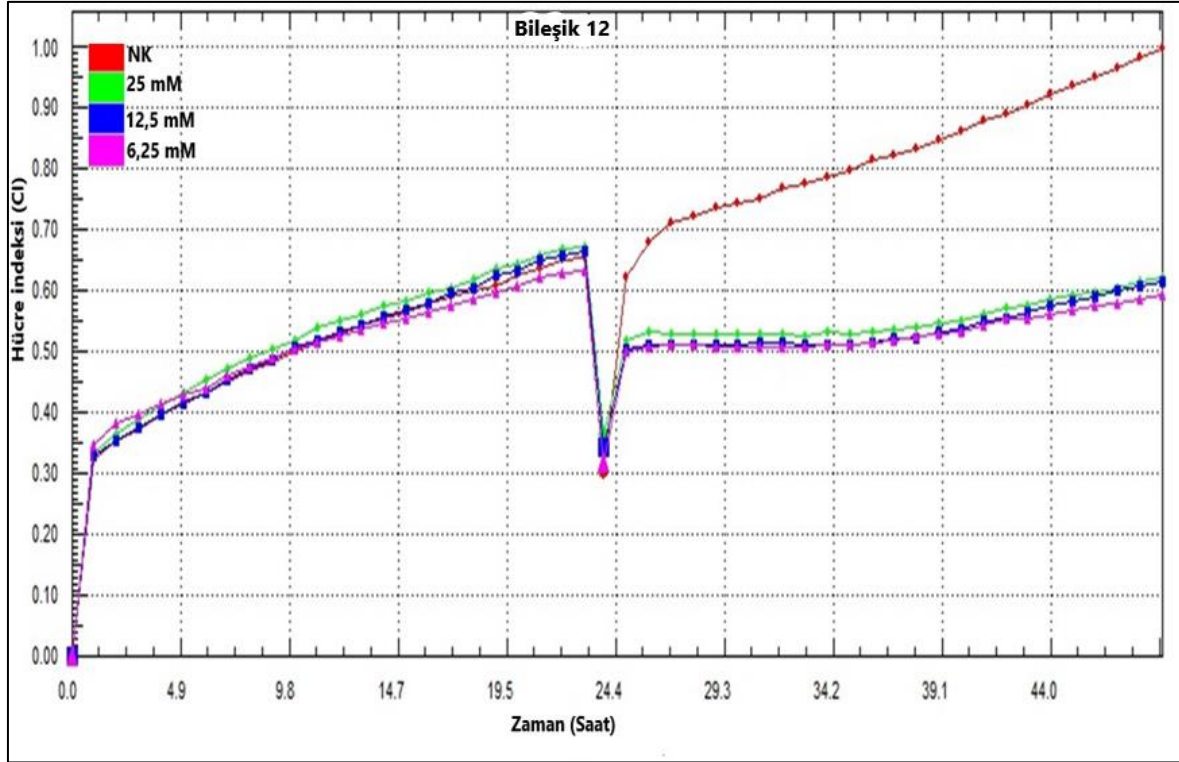


Şekil 4.33. MCF-7 hücre hattında Bileşik 11'e ait RTCA analizi

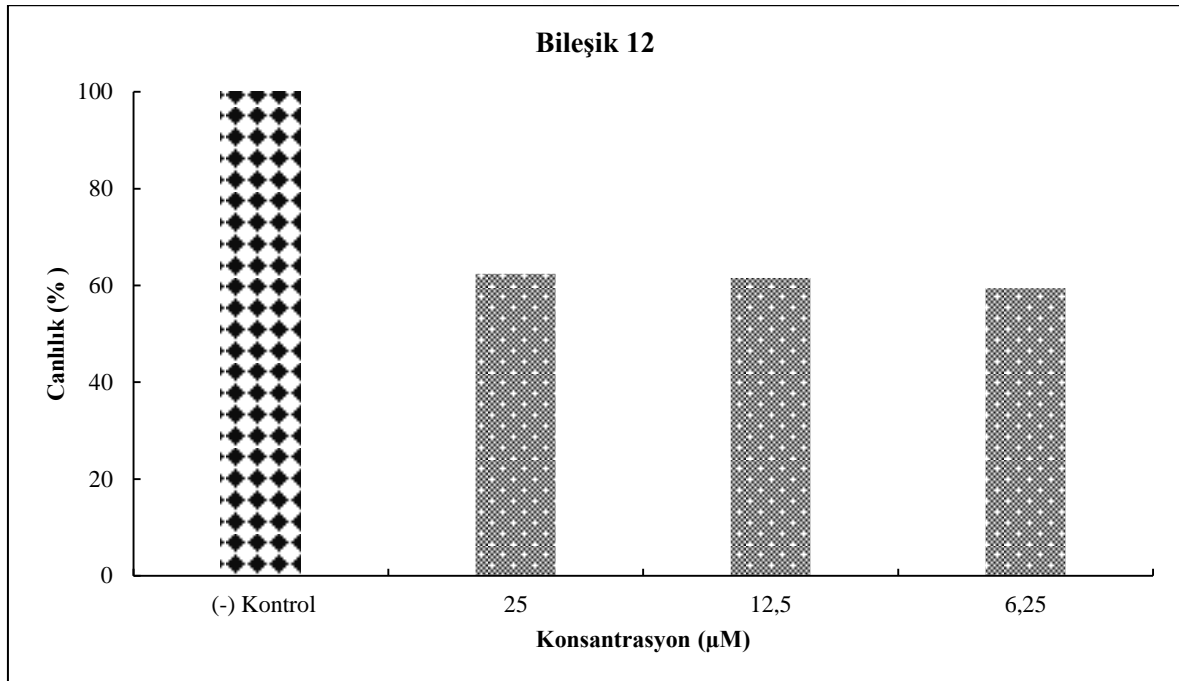


Şekil 4.34. MCF-7 hücre hattında Bileşik 11'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında Bileşik 12 için RTCA iCELLigence sistemiyle elde edilen canlılık yüzdelere göre 6,25 µM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.36).

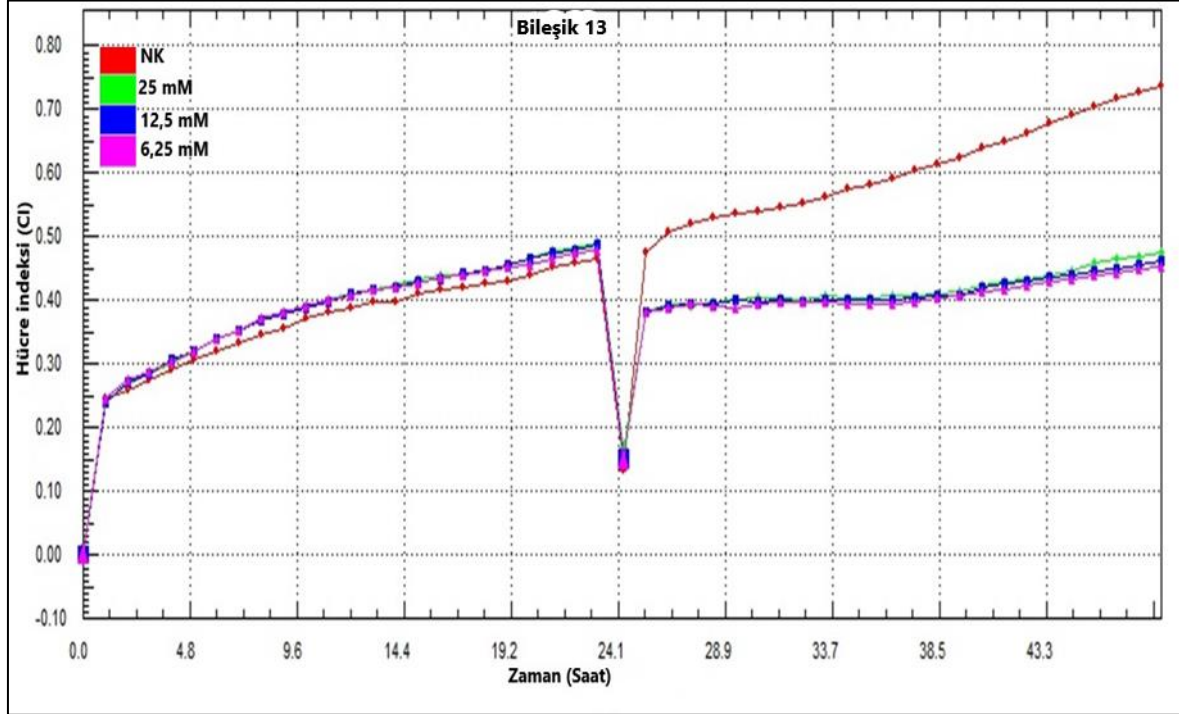


Şekil 4.35. MCF-7 hücre hattında Bileşik 12'e ait RTCA analizi

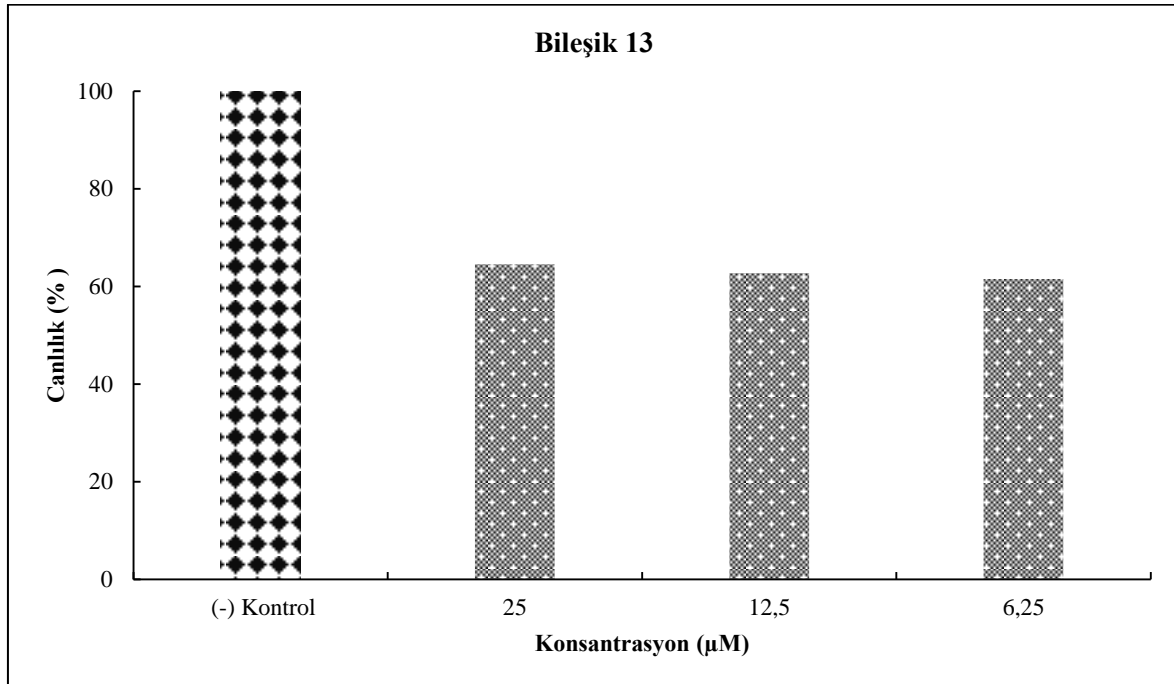


Şekil 4.36. MCF-7 hücre hattında Bileşik 12'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında Bileşik 13 için RTCA iCELLigence sistemiyle elde edilen canlılık yüzdelere göre 6,25 μM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.38).

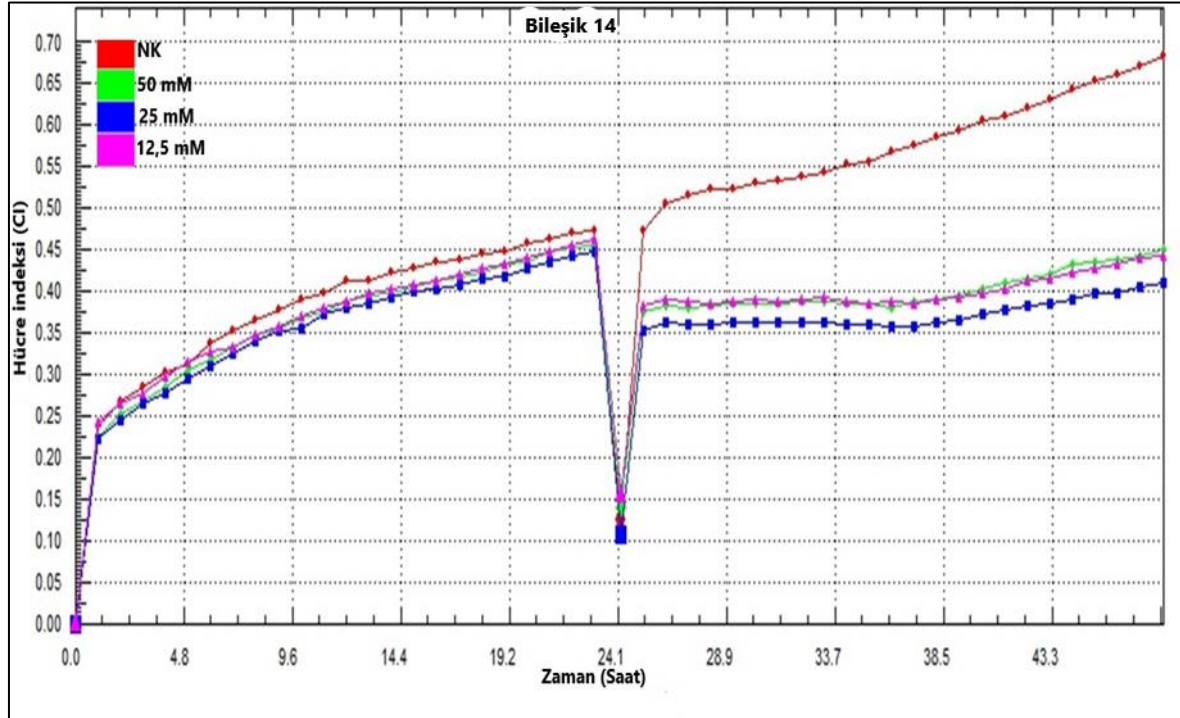


Şekil 4.37. MCF-7 hücre hattında Bileşik 13'e ait RTCA analizi

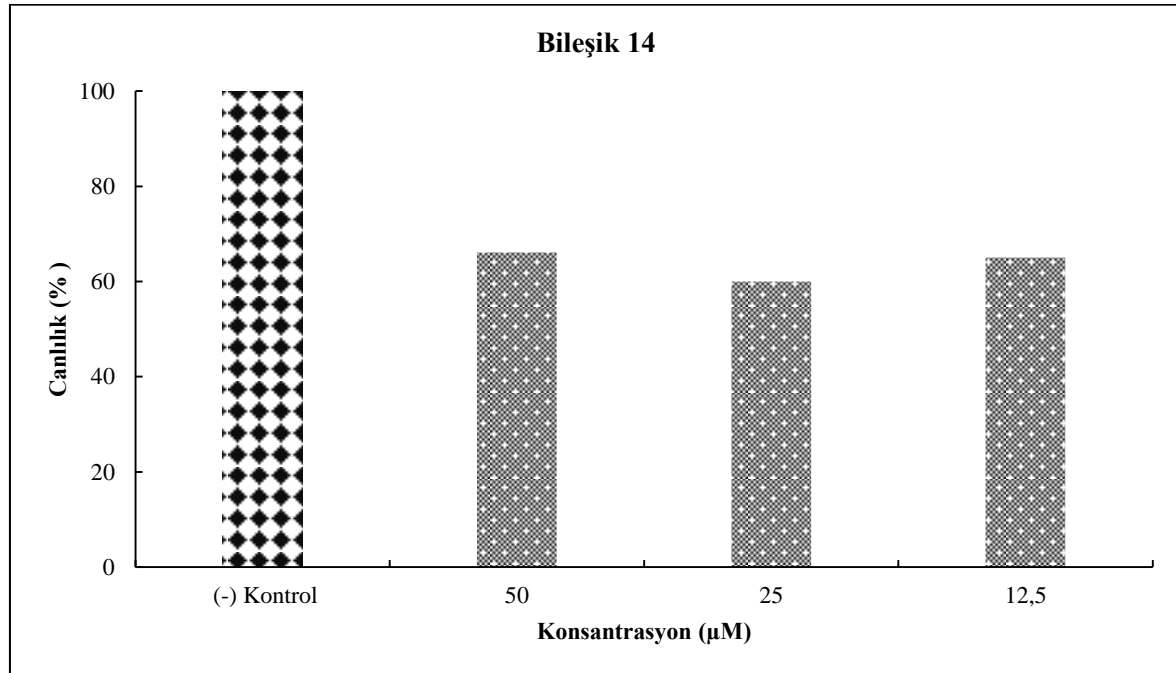


Şekil 4.38. MCF-7 hücre hattında Bileşik 13'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında Bileşik 14 için RTCA iCELLigence sistemiyle elde edilen canlılık yüzdelere göre 25 μ M etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.40).

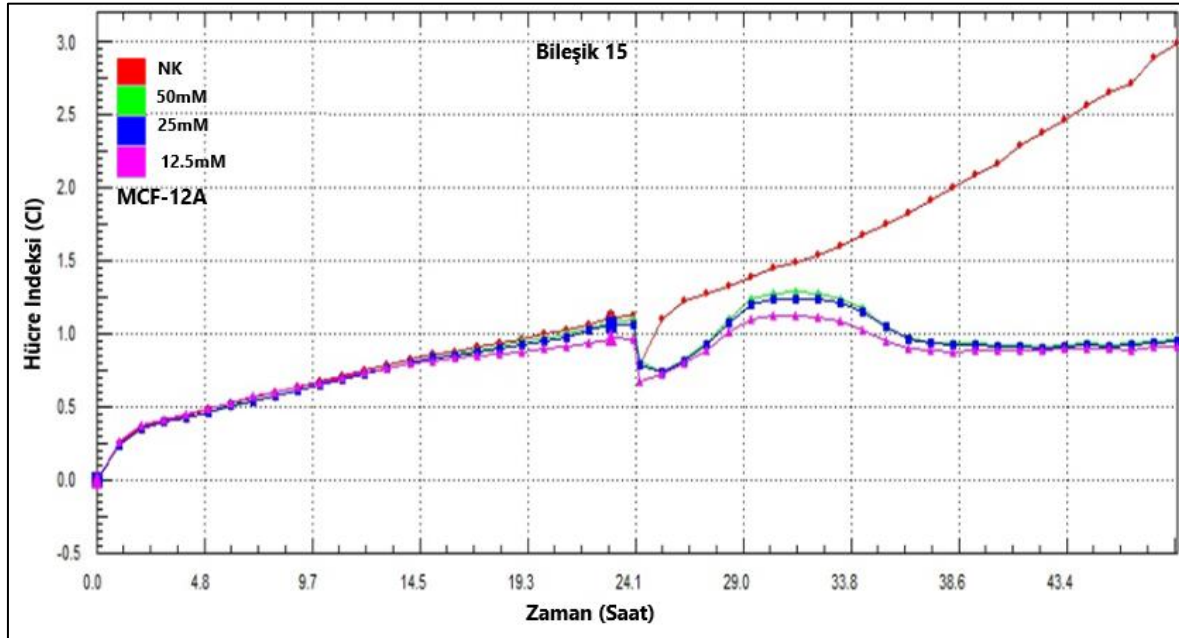
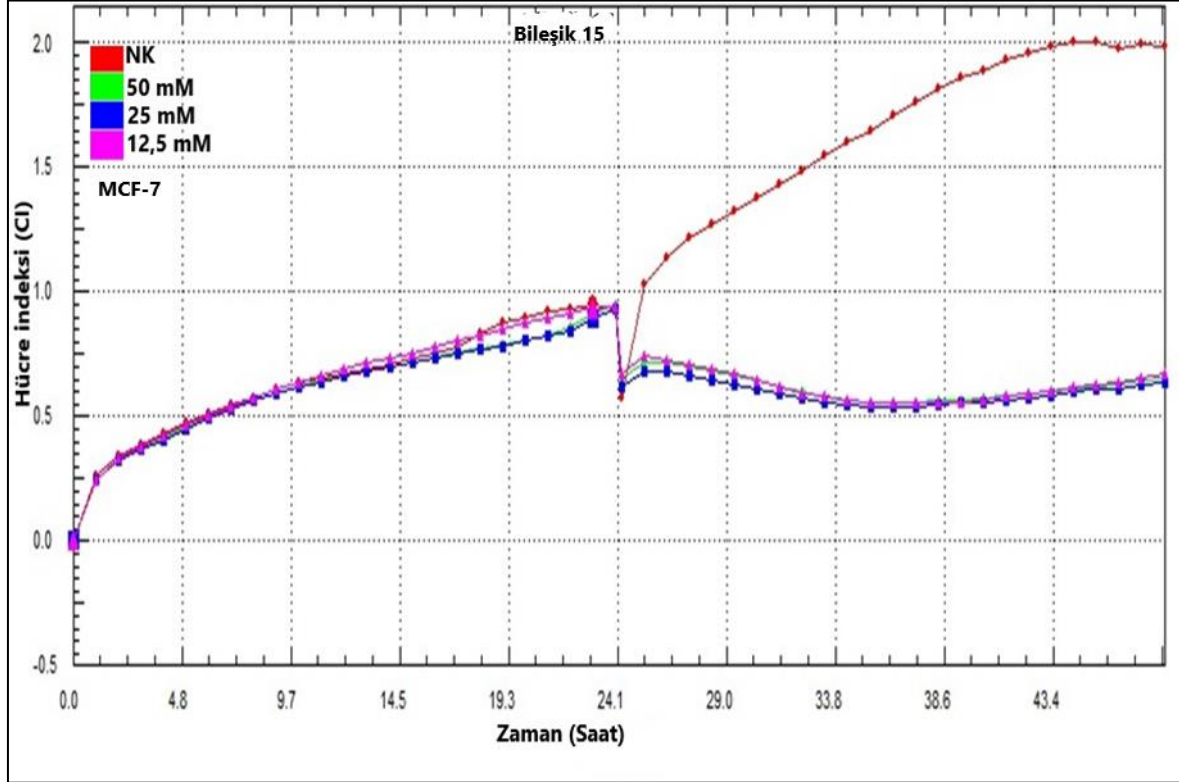


Şekil 4.39. MCF-7 hücre hattında Bileşik 14'ya ait RTCA analizi

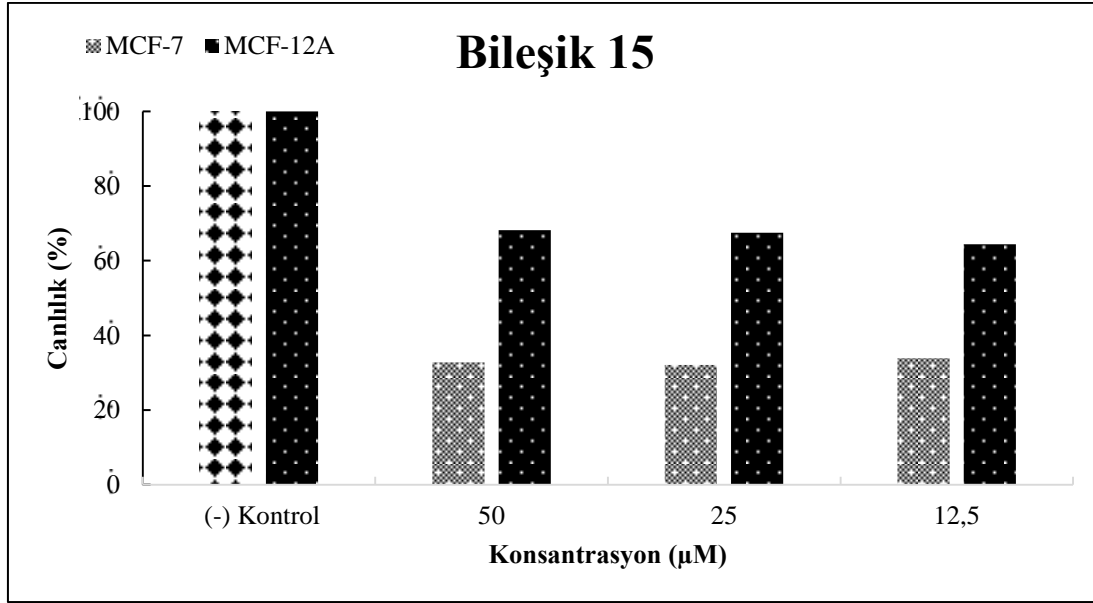


Şekil 4.40. MCF-7 hücre hattında Bileşik 14'ya ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında Bileşik 15 için RTCA iCELLigence sistemiyle elde edilen canlılık yüzdelere göre 12,5 μ M etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.42).

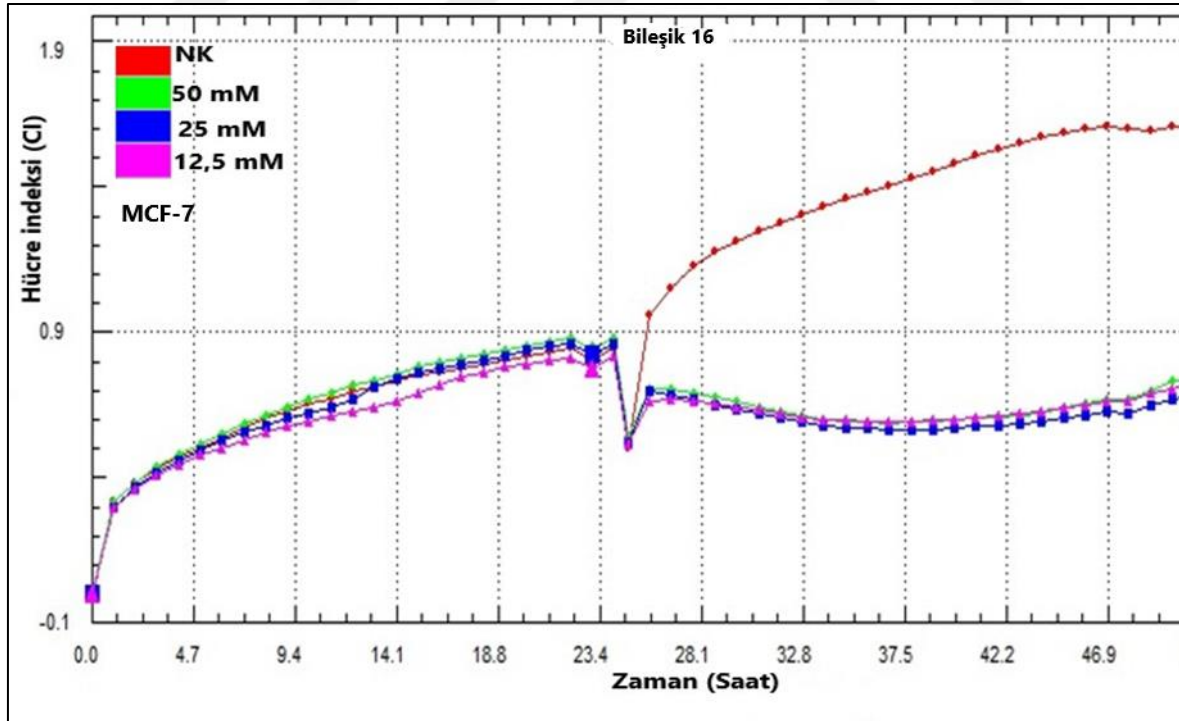


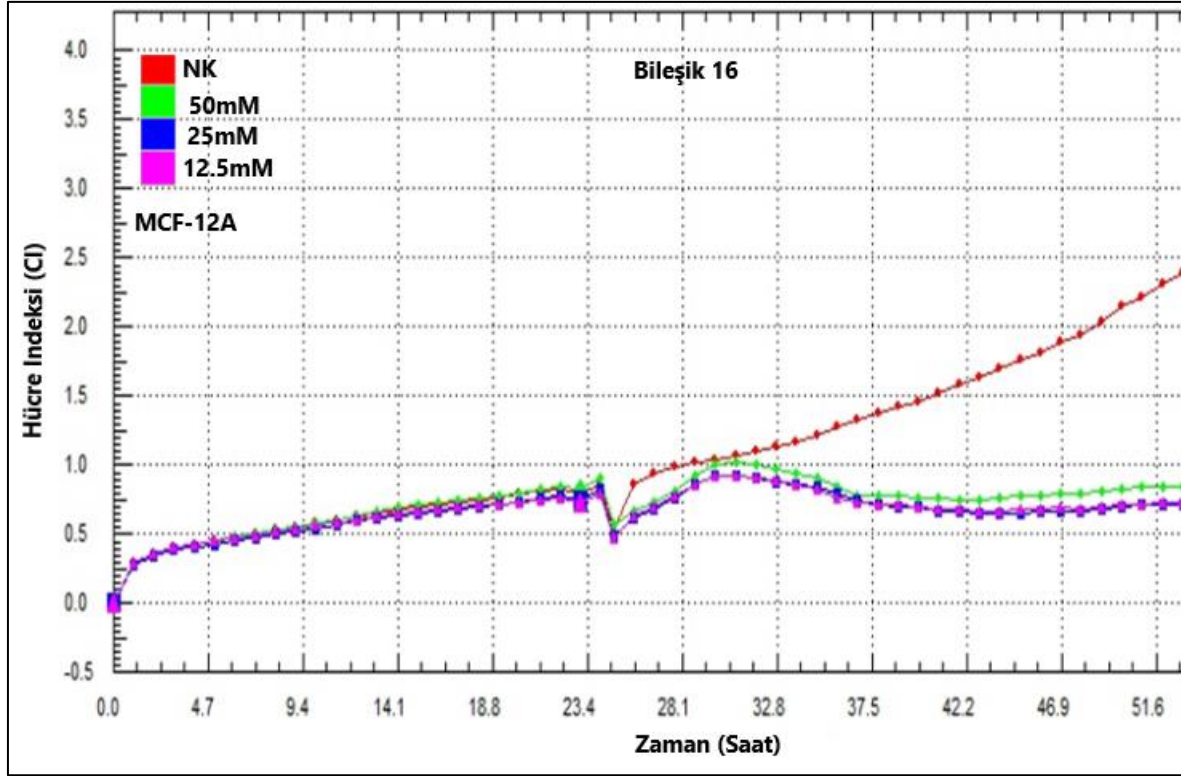
Şekil 4.41. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 15'ye ait RTCA analizi



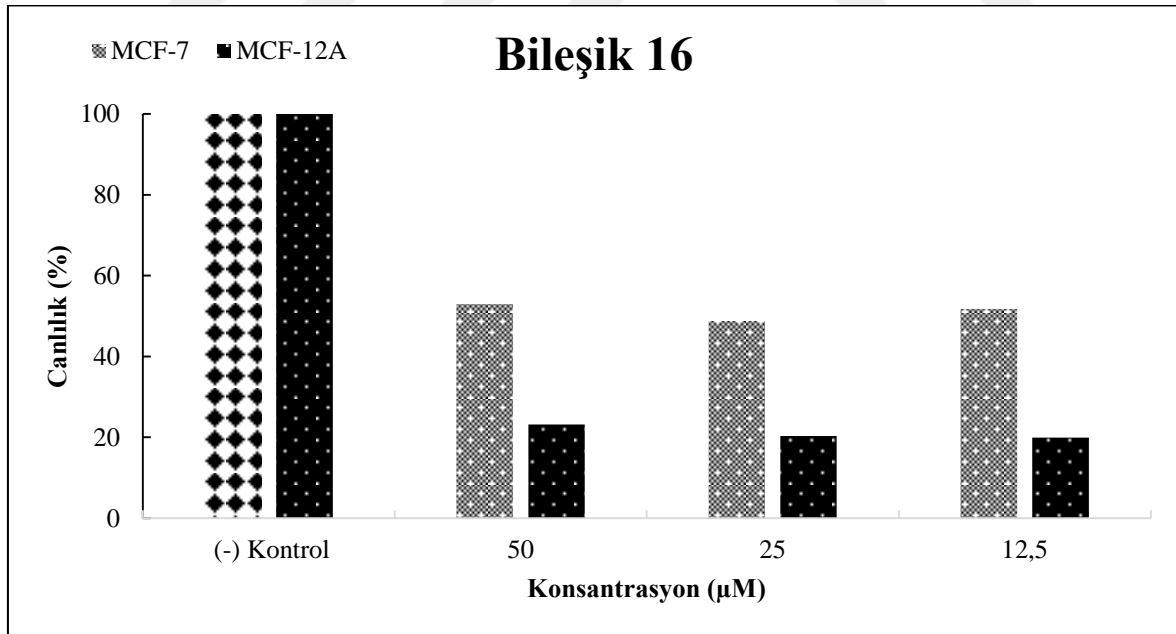
Şekil 4.42. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 15'ye ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

MCF-7 hücre hattında Bileşik 16 için RTCA iCELLigence sistemiyle elde edilen canlılık yüzdelere göre 25 µM etkin doz olarak belirlenmiştir (Şekil 4.44).





Şekil 4.43. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 16'e ait RTCA analizi



Şekil 4.44. MCF-7 ve MCF-12A hücre hattında Bileşik 16'e ait konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

Çizelge 4.2. MCF-7 hücre hattında RTCA sistemiyle bileşiklerin IC₅₀ değerleri

Dihidropirol bileşikleri		Etkin Doz(µM)	IC ₅₀ (µM)
Bileşik 1	MeS/OMe (syn)	25	38,13
Bileşik 2	MeS/OMe (anti)	25	25,06
Bileşik 3	EtS/OMe(syn)	25	29,42
Bileşik 4	EtS/OMe(anti)	12,5	28
Bileşik 7	iPrS/OMe(syn)	12,5	34,55
Bileşik 8	iPrS/OMe(anti)	12,5	19,42
Bileşik 9	BuS/OMe(syn)	25	44,69
Bileşik 10	BuS/OMe(anti)	6,25	1,56>IC ₅₀
Bileşik 11	BnzS/OMe(syn)	12,5	37,29
Bileşik 12	BnzS/OMe(anti)	6,25	1,56>IC ₅₀
Bileşik 13	MeS/OEt(syn)	6,25	1,56>IC ₅₀
Bileşik 14	MeS/OEt(anti)	25	1,51
Bileşik 15	MeS/OBnz(syn)	12,5	1,56>IC ₅₀
Bileşik 16	MeS/OBnz(anti)	25	24,55

Etkin dozları Bileşik 10 için 6,25 µM, Bileşik 12 için 6,25 µM, Bileşik 13 için 6,25 µM, Bileşik 15 için ise 12,5 µM bulunmuştur. Fakat bu bileşiklerin tamamının IC₅₀ değerlerinin 1,56 µM'dan daha küçük (1,56>IC₅₀) olduğu tespit edilmiştir.

4.3. PhTAD Türevli Dihidropirol Bileşiklerin MCF-7 Hücrelerinde RT-PZR Yöntemiyle mRNA Gen Ekspresyon Düzeylerinin İncelenmesi

4.3.1. PhTAD türevli dihidropirol bileşikleri uygulanan MCF-7 hücrelerinden total RNA izolasyonu ve miktar tayini

- Bileşikler % canlılıklarına göre belirlenen konsantrasyonlarda sadece MCF-7 hücrelerine uygulandı ve 24 saat sonrasında total RNA izolasyonları kit üreticisinin (Thermo) önerdiği şekilde yapıldı.
- Hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra RNA miktarları µDrop cihazıyla ölçüldü.
- Elde edilen total RNA (ng/µL) ve A260/280 değerleri Çizelge 4.3.'deki gibi elde edilmiştir.

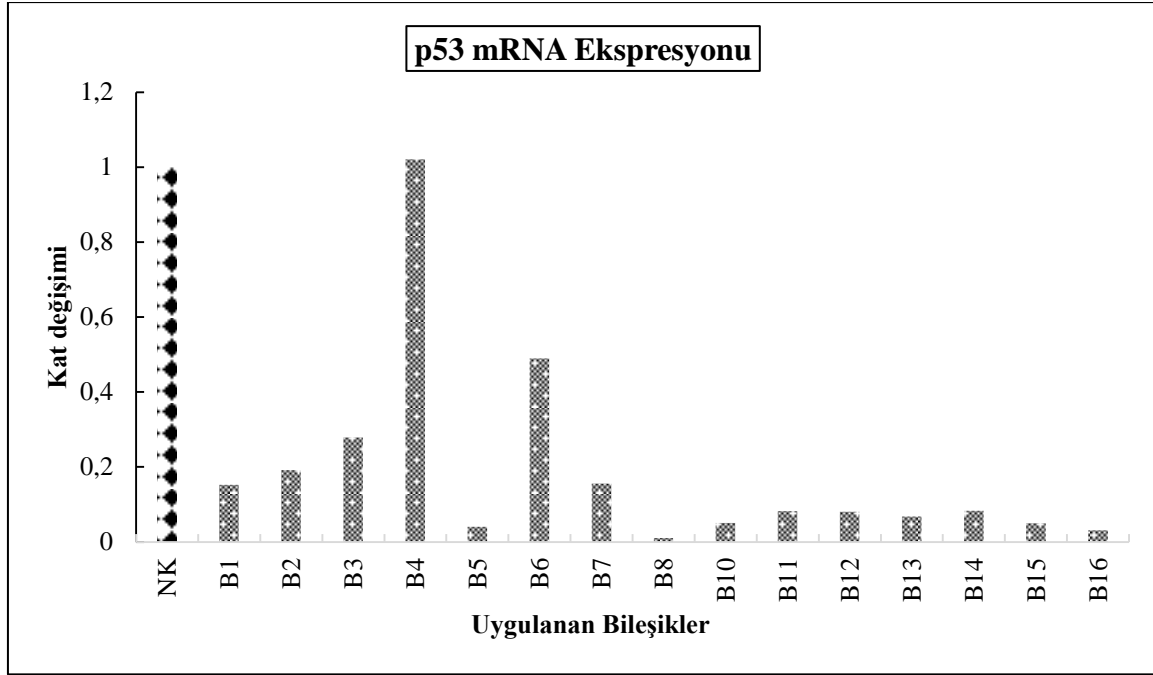
Çizelge 4.3. Uygulanan dozlardaki total RNA (ng/ μ L) ve A260/280 değerleri

Bileşik No	Hücreye uygulanan Doz (μ M)	Total RNA(ng/ μ L)	A260/280
B1	25	95,69	2,002
B2	25	373,2	1,997
B3	25	102,1	2,001
B4	25	242,5	2,058
B5	50	162	2,022
B6	12,5	400	2,058
B7	12,5	466	2,068
B8	12,5	334	2,066
B9	12,5	974,8	2,049
B10	12,5	381	2,087
B11	6,25	198	2,059
B12	12,5	321	2,058
B13	12,5	174	2,052
B14	50	238,6	2,054
B15	25	110	2,099
B16	25	353,7	2,054
Negatif kontrol	-	219,5	2,109

4.3.2. PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin MCF-7 hücre hattında apoptotik gen ekspresyonları üzerine etkisi

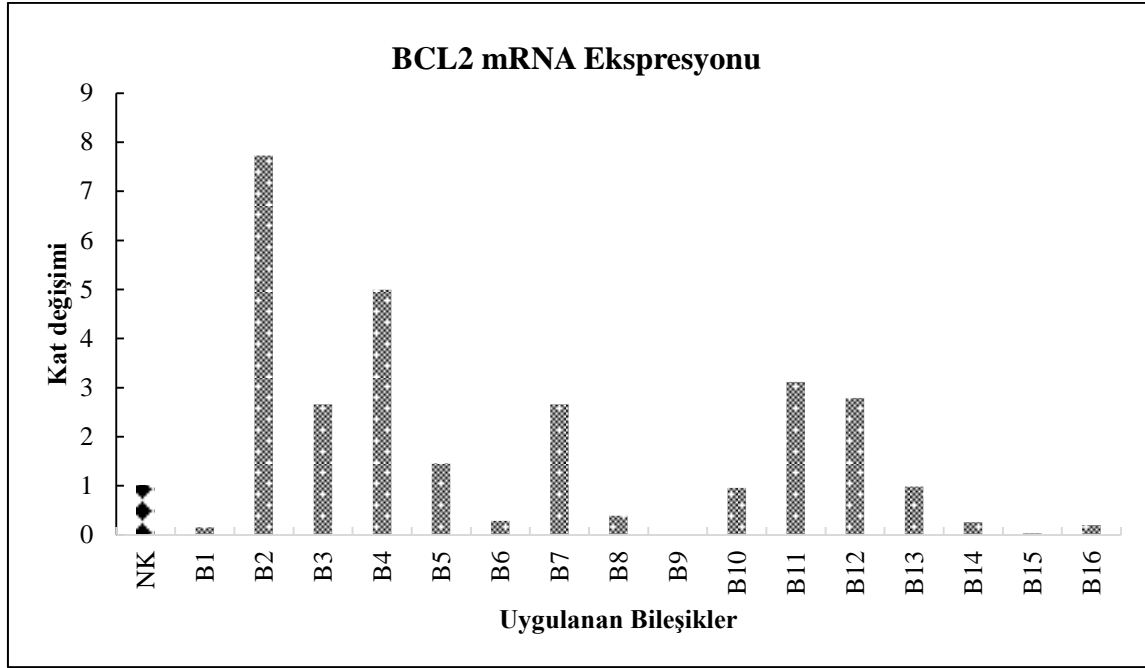
Bir hücrenin apoptoza girmesi veya apoptozdan kaçınmasındaki rolleriyle bilinen BAX, BCL2, P53 ve PARP gibi apoptotik genlerin MCF-7 hücre hattı üzerine mRNA ekspresyonları RT-PZR ile belirlenmiştir. PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin her bir gen ekspresyon düzeyi üzerindeki etkisi, β -aktin referans genine oranlanarak sonuçlar kat değişimi olarak aşağıda verilmiştir.

MCF-7 hücre hattında kontrolle karşılaştırıldığında bileşiklerden p53 gen ekspresyonu üzerine B4 bileşiğinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Kontrole göre B1 ve B7 0,15 kat, B2 0,2 kat, B3 0,28 kat, B5 0,04 kat, B6 0,5 kat, B8 0,011 kat, B10 ve B15 0,05 kat, B11, B12 ve B14 0,08 kat, B13 0,067 kat, B16 0,03 kat p53 gen ekspresyonu üzerine azaltıcı etkisi gözlenmiştir (Şekil 4.45.).



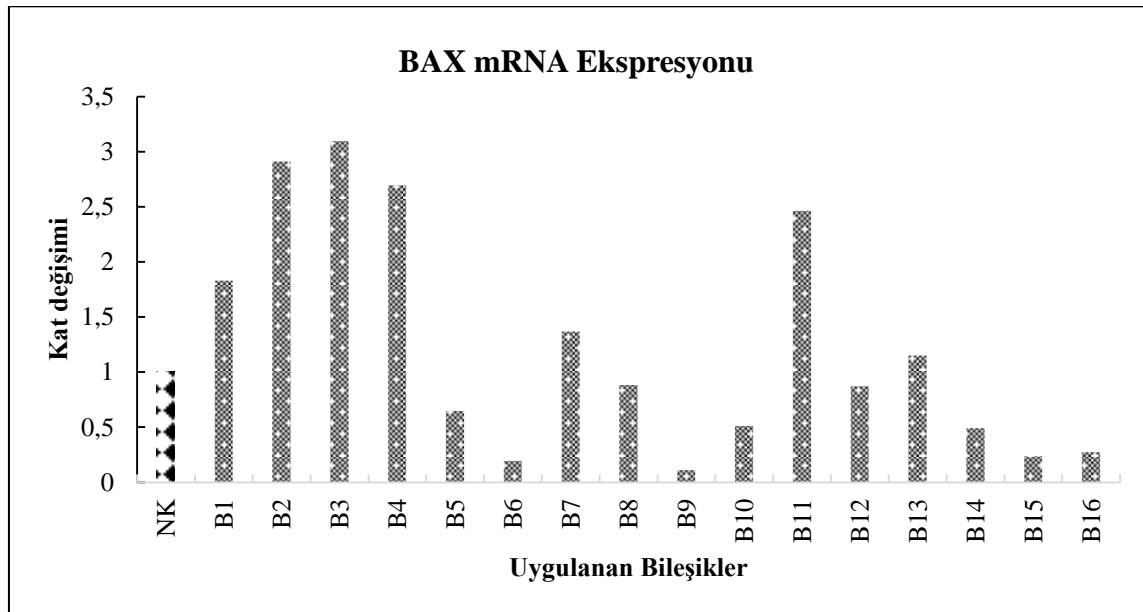
Şekil 4.45. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin p53 mRNA ekspresyonuna etkisi

MCF-7 hücre hattında kontrolle karşılaştırıldığında bileşiklerden B2 7,72 kat, B3 2,65 kat, B4 5 kat, B5 1,45 kat, B7 2,65 kat, B11 3,11 kat, B12 2,79 kat BCL2 ekspresyon miktarını artırıcı etki göstermiştir. Bileşiklerden B1 0,15 kat, B6 0,28 kat, B8 0,38 kat, B9 0,009 kat, B14 0,25 kat, B15 0,03 kat, B16 0,2 kat BCL2 gen ekspresyonu üzerinde önemli miktarda azaltıcı etkisi gözlenmiştir. Ayrıca Bileşiklerden B10 ve B13 BCL2 üzerinde kontrole göre anlamlı bir azaltıcı etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.46).



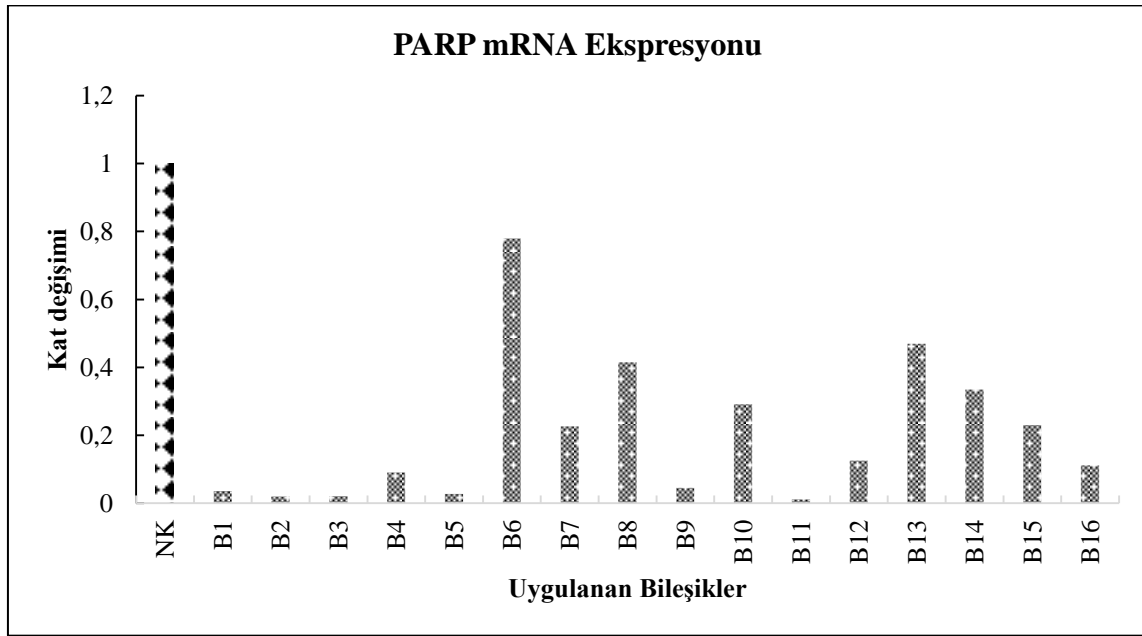
Şekil 4.46. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin BCL2 mRNA ekspresyonuna etkisi

MCF-7 hücre hattında kontrolle karşılaştırıldığında bileşiklerden B5 0,64 kat, B6 0,2 kat, B9 0,11 kat, B10 ve B14 0,5 kat, B15 0,23 kat, B16 0,27 kat BAX gen ekspresyon düzeyini azalttığı gözlenmiştir. B1 1,8 kat, B2 2,9 kat, B3 3 kat, B4 2,7 kat, B7 1,3 kat, B11 2,46 kat BAX gen ekspresyon düzeyini artıcı etkisi gözlenirken B8, B12, B13 bileşikleri kontrole göre anlamlı bir değişim göstermemiştir (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin BAX mRNA ekspresyonuna etkisi

MCF-7 hücre hattında kontrolle karşılaştırıldığında bileşiklerden B8 0,41 kat, B13 0,46 kat ve B6 0,77 kat kontrole göre PARP gen ekspresyonunu azaltıcı etki göstermiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında bileşiklerden B1 0,035 kat, B2 ve B3 0,02 kat, B4 0,09 kat, B5 0,027 kat, B7 ve B15 0,23 kat, B9 0,045 kat, B10 0,29 kat, B11 0,011 kat, B12 0,12 kat, B14 0,33 kat, ve B16 0,111 kat PARP gen ekspresyon düzeylerini önemli miktarda azaltan bir etkiye sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.48).



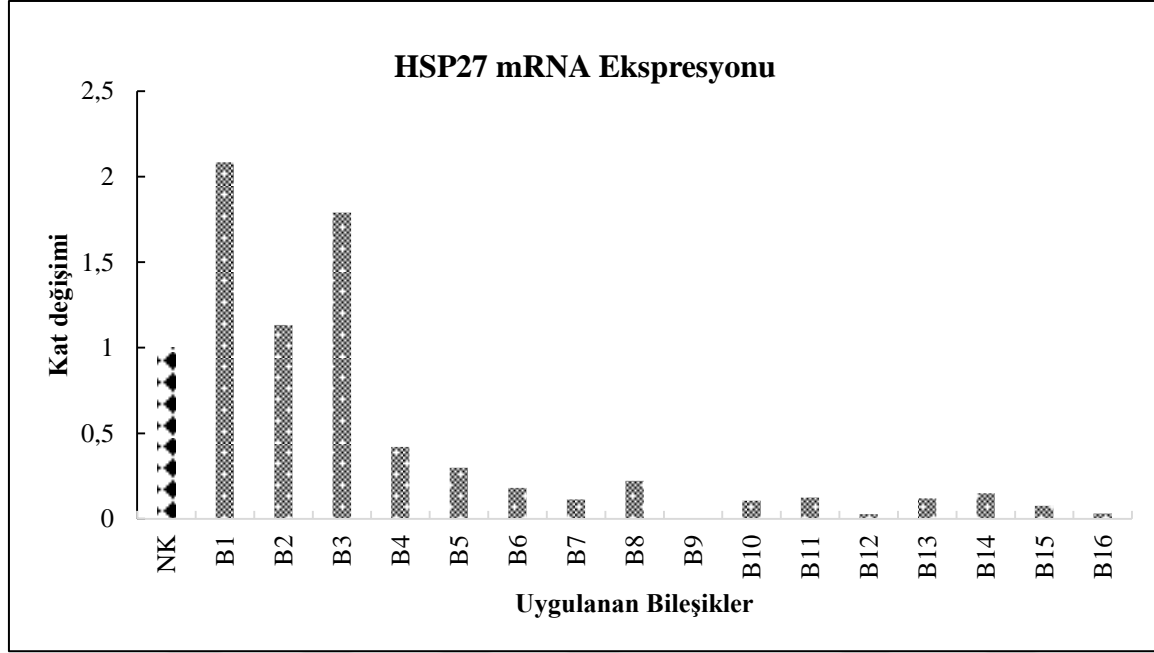
Şekil 4.48. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Parp mRNA ekspresyonuna etkisi

4.3.3. PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin MCF-7 hücre hattında apoptotik yollarda rol oynayan HSP gen ekspresyonları üzerine etkisi

Isı şok proteinlerinden HSP27, HSP40, HSP60, HSP70 ve HSP90, hücre içinde önemli sinyal yollarında bulunan ve hücre proliferasyonu ve metastatik aktivite üzerindeki rolleri ile sıklıkla kanser hücrelerinde stratejik hedefler olarak çalışılmıştır. Bu stratejik yaklaşımlar ışığında PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki mRNA gen ekspresyonları β -aktin referans gen ekspresyonuna oranlanarak sonuçlar kat değişimi olarak aşağıda verilmiştir.

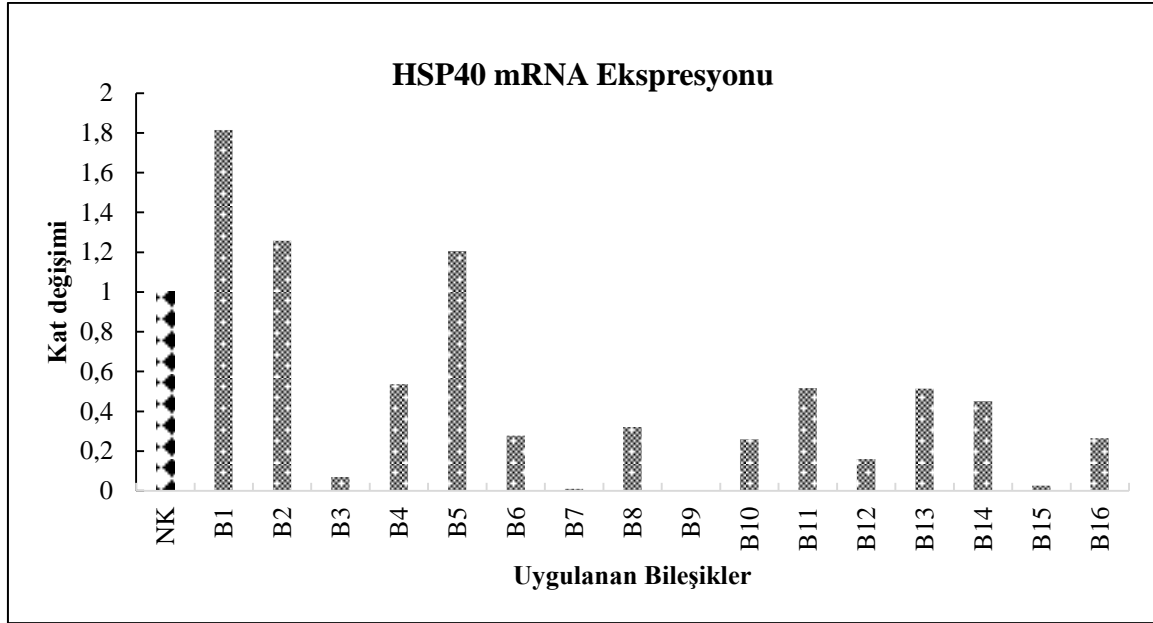
MCF-7 hücre hattında kontrolle karşılaştırıldığında bileşiklerden B1 2 kat, B3 1,8 kat kontrole göre HSP27 gen ekspresyon düzeyini artırmıştır. Bileşiklerden B4 0,42 kat, B5 0,3 kat, B6 0,18 kat, B7 ve B13 0,11 kat, B8 0,22 kat, B9 0,002 kat, B10 0,10 kat, B11

0,125 kat, B12 0,028 kat, B14 0,15 kat, B15 0,07 kat ve B16 0,03 kat HSP27 gen ekspresyon düzeylerini kontrole kıyasla önemli miktarda azaltan bir etkiye sahip oldukları gözlenmiştir. B2 bileşiğinin ise kontrole göre HSP27 gen ekspresyon düzeyine anlamlı bir etksi gözlenmemiştir (Şekil 4.49).



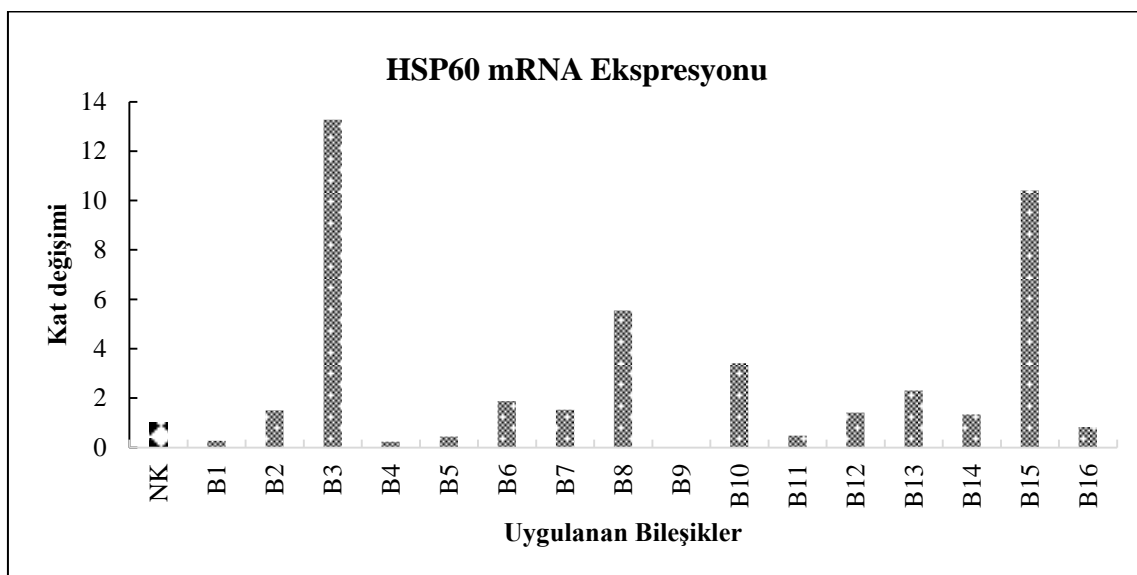
Şekil 4.49. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Hsp27 mRNA ekspresyonuna etkisi

MCF-7 hücre hattında kontrole karşılaştırıldığında bileşiklerden B1 1,18 kat, B2 1,125 kat, B5 1,2 kat HSP40 gen ekspresyon düzeyini artırdığı gözlenmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında B3 0,07 kat, B4, B13, B13 ve B14 0,5 kat, B6 0,28 kat, B7 0,009 kat, B8 0,32 kat, B9 0,00009 kat, B10 0,26 kat, B12 0,16 kat, B15 0,026 kat, B16 0,264 kat HSP40 gen ekspresyon düzeyini önemli miktarda azaltan bir etkiye sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.50.).



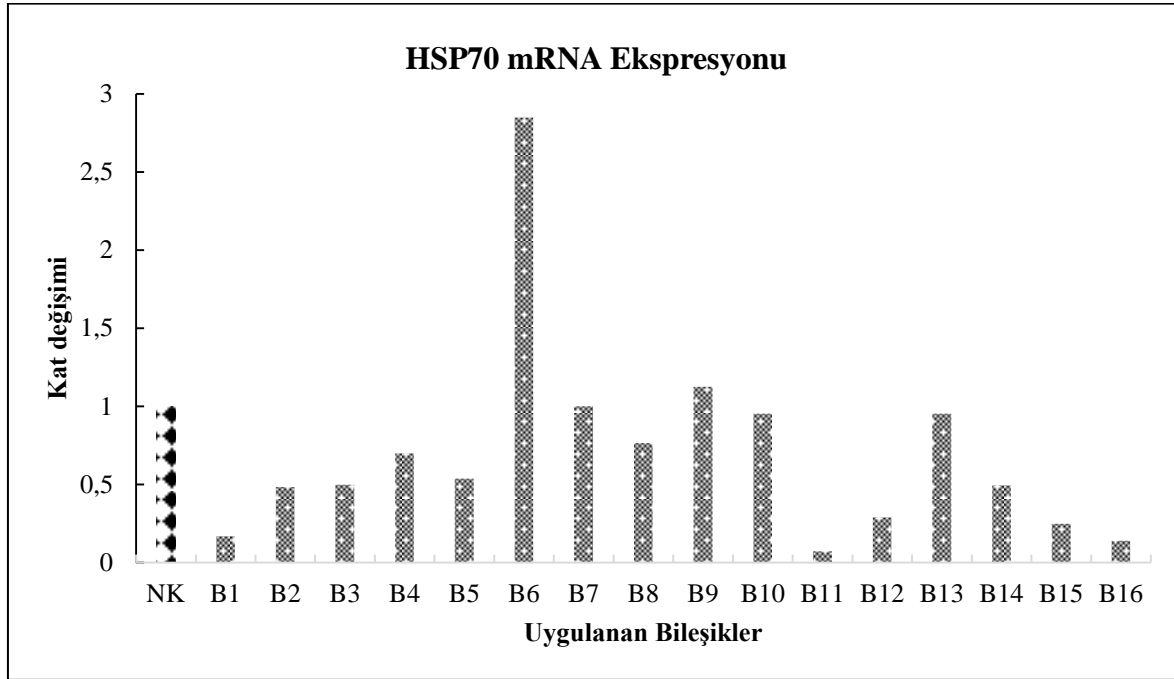
Şekil 4.50. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Hsp40 mRNA ekspresyonuna etkisi

MCF-7 hücre hattında kontrolle karşılaştırıldığında B2 1,5 kat, B3 13,2 kat, B6 1,87 kat, B7 1,5 kat, B8 5,54 kat, B10 3,41 kat, B12 1,4 kat, B13 2,3 kat B14 1,32 kat ve B15 10,4 kat HSP60 gen ekspresyon düzeyini artırıcı etki göstermiştir. Bileşiklerden B1 0,27 kat, B4 0,222 kat, B5 0,43 kat, B9 0,007 kat, B11 0,47 kat ve B16 0,82 kat kontrole göre HSP60 gen ekspresyon düzeyini önemli miktarda azaltıcı etkiye sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.51.).



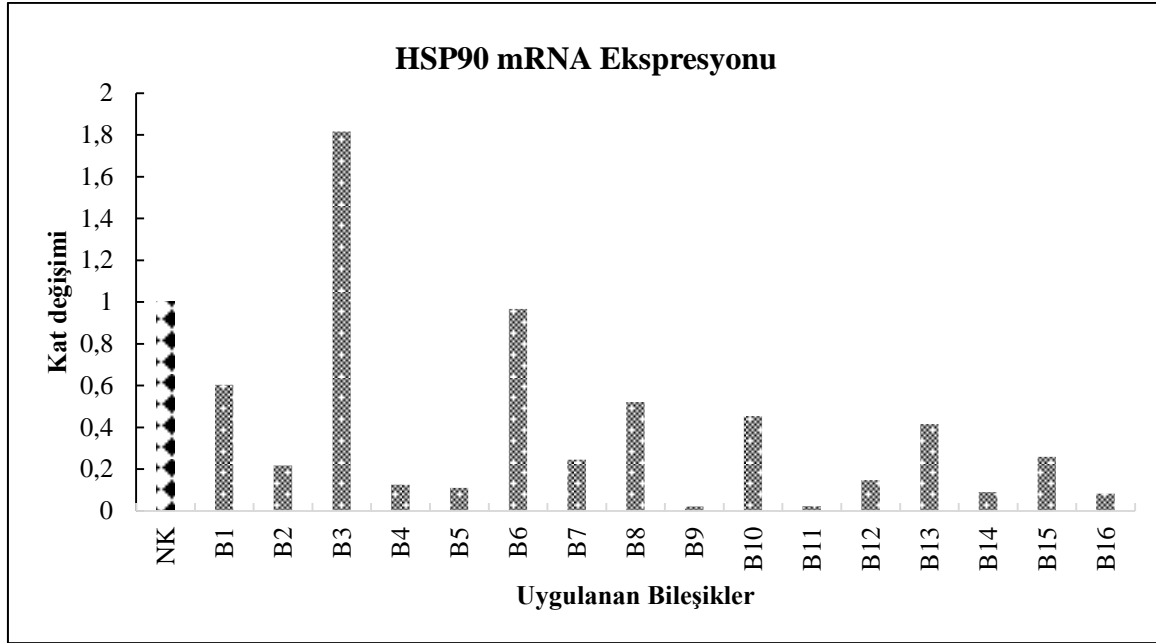
Şekil 4.51. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Hsp60 mRNA ekspresyonuna etkisi

MCF-7 hücre hattında kontrolle karşılaştırıldığında bileşiklerden B1 0,17 kat, B2, B3, B5 ve B14 0,5 kat, B4 0,7 kat, B8 0,76 kat, B11 0,071 kat, B12 0,29 kat, B15 0,25 kat, B16 0,13 kat HSP70 gen ekspresyon düzeylerini önemli miktarda azaltan bir etkiye sahip oldukları gözlenmiştir. Bileşiklerden B7, B9, B10 ve B13 kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmezken B6 2,85 kat HSP70 gen ekspresyon düzeyini artırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.52.).



Şekil 4.52. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Hsp70 mRNA ekspresyonuna etkisi

MCF-7 hücre hattında kontrolle karşılaştırıldığında B1 0,6 kat, B2 0,21 kat, B4 0,125 kat, B5 0,11 kat, B7 0,24 kat, B8 0,5, B9 0,02 kat, B10 0,45 kat, B11 0,02 kat, B12 0,14 kat, B13 0,41 kat, B14 0,09 kat, B15 0,26 kat, B16 0,08 kat HSP90 gen ekspresyon düzeylerini önemli miktarda azaltan bir etkiye sahip oldukları gözlenmiştir. Kontrole göre bileşiklerden B3 1,81 kat HSP90 gen ekspresyon düzeyinde artıcı etki gözlenirken B6'da ise anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.53).

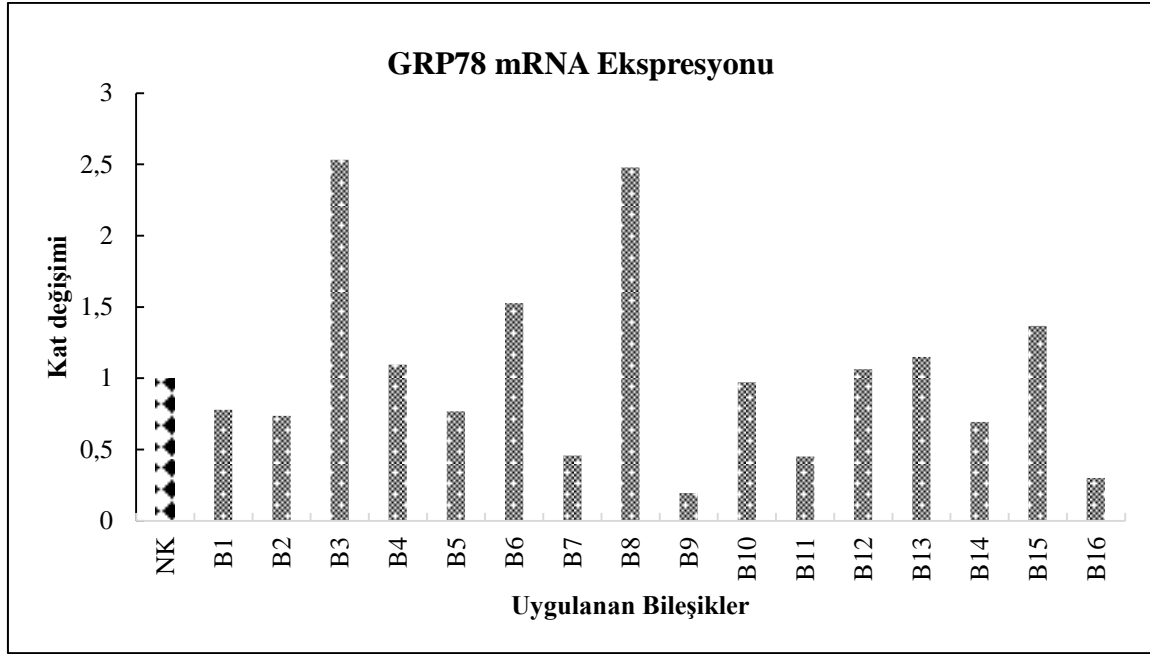


Şekil 4.53. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Hsp90 mRNA ekspresyonuna etkisi

4.3.4. PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin MCF-7 hücre hattında ER stres gen ekspresyonları üzerine etkisi

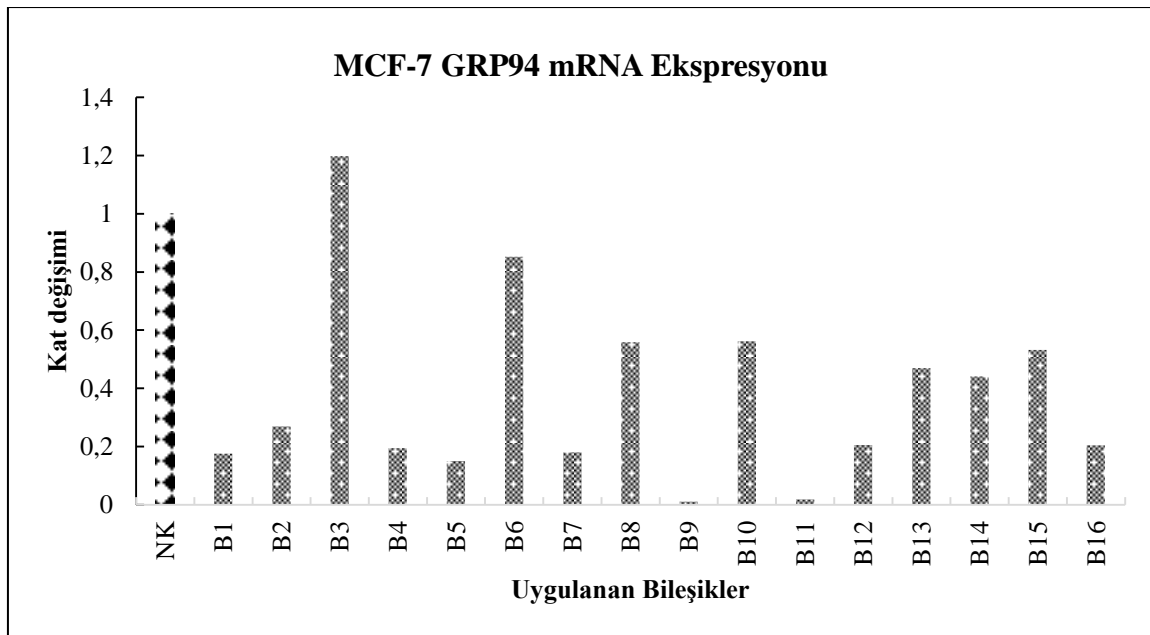
PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki GRP78 ve GRP94 mRNA gen ekspresyonları β -aktin referans gen ekspresyonuna oranlanarak sonuçlar kat değişimi olarak aşağıda verilmiştir.

MCF-7 hücre hattında kontrolle karşılaştırıldığında GRP78 gen ekspresyon düzeyini B1 0,78 kat, B2 0,73 kat, B5 0,76 kat, B7 ve B11 0,45 kat, B9 0,19 kat, B14 0,7 kat, B16 0,3 kat azaltmıştır. Bileşiklerden B3 2,53 kat, B6 1,52 kat, B8 2,47 kat, B15 1,36 kat artırıcı etki gösterirken B4, B10, B12, B13 GRP78 gen ekspresyon düzeyinde kontrole göre anlamlı bir değişim göstermemiştir (Şekil 4.54.).



Şekil 4.54. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Grp78 mRNA ekspresyonuna etkisi

MCF-7 hücre hattında kontrole karşılaştırıldığında GRP94 gen ekspresyon düzeyini B1 0,176 kat, B2 0,27 kat, B4 0,19 kat, B5 0,15 kat, B7 0,18 kat, B8, B10, B13, B14 ve B15 0,5 kat B9 0,011 kat ve B11 0,018 kat azaltıcı etkiye sahiptir. B3 ve B6 bileşikleri kontrole göre anlamlı bir değişim göstermemiştir (Şekil 4.55).



Şekil 4.55. MCF-7 hücresinde (1-16) no'lu bileşiklerin Grp94 mRNA ekspresyonuna etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmanın amacı, dünya genelinde en sık karşılaşılan ve kadınlarda mortalitesi en yüksek kanser tipi olan meme kanserine karşı antikanser potansiyeli yüksek olabileceğini düşündüğümüz PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin etkilerini *in vitro* olarak araştırmaktır. Hücre kültürü deney hayvanlarının kullanıldığı yöntemlere göre etik kurul gereksinimi olmadığından ve kullanılan maddenin etkisinin kısa sürede ve doğrudan test edilmesine olanak sağladığından dünya genelinde yaygın kullanılan bir yöntemdir. Bu amaçla, bu çalışmada *in vitro* çalışmalarla hormon reseptör pozitif olan meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve normal meme epitelyum hücre hattı MCF-12A üzerine bu bileşiklerin öncelikle MTT ve RTCA yöntemiyle sitotoksik ve antiproliferatif etkileri ortaya koyulmuştur. Ayrıca bu bileşiklerin apoptoza girme veya apoptozdan kaçınmada etkili olan genlerle kanser hücrelerinde yüksek oranda sentezlenen HSP'ler ve ER stres genleri üzerindeki etkileri RT-PZR yöntemiyle belirlenerek apoptotik genlerin potansiyel antikanser etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

Meme kanseri, dünya genelinde en sık teşhis edilen kanser tipidir. Meme kanseri risk faktörleri arasında aile öyküsü, menopoz yaşı, ilk doğum ve parite yaşı gibi üreme öyküsü, diyet, alkol kullanımı ve radyasyona maruziyet gibi sebepler sayılabilir [70]. GLOBOCAN verilerine göre meme kanseri 2008 yılında toplam kanser vakalarının %23'ünü ve kanser ölümlerinin %14'ünü oluştururken 2018 yılında bu oranlar sırasıyla %46,3 ve %13 olarak belirlenmiştir [35, 106]. Kanserle mücadelede gelişen teknoloji ve tedavi yöntemlerine rağmen bu oranların daha da artacağı öngörülmektedir [35].

Antikanser ilaçların yapımında; yüksek iyileştirme, yüksek seçicilik ve düşük toksisite özelliği barındıran ajanların kullanımı en önemli kriter haline gelmiştir. Bundan dolayı çalışmalarda, antikanser ilacı veya aday olarak bu özelliklere sahip oldukları düşünülen porfirinler [107], triazol türevleri [108], metal kompleksleri [109] günümüzde oldukça sık denenmektedir.

Heterosiklik organik bileşikler, reaktivite profilini değiştirmek için birçok grup tarafından yaygın olarak kullanılmıştır. Pirol, triazol, pirimidin, indol, kinolin ve pürin oldukça yüksek sitotoksisite profilleri gösteren heterosiklik sınıflarıdır [110]. Yapılan birçok

çalışma heterosiklik bileşiklerin antikanserojenik etkisini ortaya koymuştur [114, 115, 120, 121] Ayrıca pirol ve 1,2,4-Triazol bileşiklerinin antibakteriyel, antitümör, antitüberküloz, antikonvülsan, anti kanser ve analjezik gibi çeşitli ilginç biyolojik etkinliklere sahip olduğu bilinmektedir [111, 112].

1,2,4-triazol, çok sayıda bileşikte bulunan önemli bir çekirdektir. Bu çekirdeği içeren otuz beşten fazla bileşik piyasaya sunulmuştur. 1,2,4-triazol çekirdeği metabolizmaya karşı, bir reseptörün aktif bölgesinde hidrojen bağı alıcısı ve bir donör olarak önemli ve istikrarlı bir farmakofor görevi görmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, kutupsal yapısı nedeniyle, triazol çekirdeğinin ligandın çözünürlüğünü artırabileceği ve ilacın farmakolojik özelliğini önemli ölçüde geliştirebileceği vurgulanmıştır [113].

Triazol halkası ısı şoku inhibitörü, mikrotübül içeren bileşiklerin polimerizasyon inhibitörü ve anjiyogenez inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Örneğin anastrozol, letrozol ve vorozol antikanser ilaç olarak kullanılan önemli triazol bileşiklerindedir [114].

Triapazamin, antikanser aktivitesi bilinen ve ilaç olarak kullanılan triazol türevi 3-arilamino-1,2,4-benzotriazin yapısındaki bir bileşiktir. Baş ve boyun kanserleri için faz 2 ve faz 3 denemeleri yapılan triapazamin bileşiğinin kanserli hücrelerde DNA hasarını onarma yeteneği olduğu gösterilmiştir [115].

1-2-4 triazol türevi anastrozol ilacı meme kanseri hormon reseptör pozitif olan ve yüksek riskli geç menopozdaki kadın hastalarda kullanılan bir antikanser ilaçtır. Meme kanseri hastalarından 203 invaziv hastanın 165'i ER+ olan bir randomize kontrollü çalışmada anastrozol kullanan hastalarda insidansın %54 olduğu bildirilmiştir [116].

Bir diğer triazol türevi olan vorozol ise dekstro-izomer olan aromataz enziminin inhibisyonuna neden olmaktadır. Vorozol, aromatazın doza bağlı inhibisyonunu sağlar ve dolaşımdaki östrojen seviyelerini azaltır. Vorozolün, mastektomi (meme dokusunun alınması) yapılmadan önce 7 gün boyunca tedavi edilen postmenopozal meme kanseri hastalarında intratümöral aromataz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Kadınlarda zayıf bir östrojen olan doku östronu ve östradiol düzeylerinin de sırasıyla %64 ve %80 azaldığı gösterilmiştir. Dört farklı faz II klinik çalışmada, vorozol, estradiolün seçici inhibisyonuna karşılık gelen %18-33 yanıt oranlarını üretmiştir [117].

Bununla birlikte antikanser tedavi çalışmalarında kemoterapinin yan etkilerinin çok fazla olması nedeniyle hedefe yönelik tedaviler ön plana çıkmaktadır. Hedefli tedavide tirozinkinazlar en çok ilgilenilen gruptur. Çünkü hücre büyümesi ve metastazı için gereklidirler. Aktif tirozinkinaz formu, tümör büyümesine ve çoğalmasına, anjiyogenez, metastaz ve antiapoptotik etkilere neden olabilir. Pirol türevleri önemli tirozinkinaz inhibitörleridir [118]. Tirozinkinaz inhibitörü ajanlarının ATP bağlanma bölgesine bağlanarak ATP ile rekabet etmesi beklenir. Kaur ve Singh (2019)'in yaptığı bir çalışmada moleküler modelleme ile ATP molekülüyle rekabet edebilen pirol halkası ile türevlenmiş kurşun molekülünün meme kanseri hücre hatları olan MCF-7, MDA-MB-468 ve T-47D üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, pirol ve oxindol türevlerinin üç hücre hattı üzerindeki büyüme inhibisyonlarının çok güçlü olduğu (%92-99) bildirilmiştir [119].

Yapılan başka bir çalışmada biyolojik olarak oldukça önemli olan kiral 2,5-dihidropirol türevlerinin MCF-7 hücre hattında sitotoksik etkileri incelenmiş ve sonuçta orta düzeyde sitotoksikite gösteren antitümör aktiviteye sahip ajan olabilecekleri bildirilmiştir [120].

Bayadi ve ark. (2017)'nin sülfonamid grubu ile donatılmış pirol türevlerinin MCF-7 hücre hattı üzerinde MTT analizi kullanılarak *in vitro* antikanser aktivitesinin değerlendirildiği çalışma sonucunda; MCF-7 hücresinde referans ilaç olarak kullanılan sisplatinin IC₅₀ değerinin 15,1µM iken pirol türevinin IC₅₀ değerinin 39,0µM olduğu belirtilmiştir [121]. Soares ve ark. (2013)'nin yaptığı farklı bir çalışmada ise; 6,7-bis (hidroksimetil)-1 H, 3H-pirol [1,2- c] tiazollerin MTT yöntemiyle MCF-7 hücre hattına karşı güçlü bir antikanser aktivite gösterdiği ve bu etkinin yapısında bulundurduğu C-5 metil ve C-3 fenil gruplarının birlikteliğinden ileri geldiğini vurgulamışlardır [122].

Çalışmamızda kullandığımız PhTAD türevli dihidropirol bileşikler, yapısında bulundurduğu triazol ve dihidropirol halkaları ile yeni sentezlenmiş heterosiklik bileşiklerdendir [95]. Bu bileşikler, yapıları itibarıyla antimikrobiyal ve antikanser ajan olma adaydırlar. Bu nedenle bu bileşiklerin sitotoksik ve apoptotik etkilerinin incelenmesi, dünya genelinde kadınlardaki görülme sıklığı ve mortalitesiyle öne çıkan meme kanseriyle mücadelede yeni ilaç etken maddesi olabilme yolunda oldukça önem arz etmektedir. Bu amaçla, PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin MCF-7 ve MCF-12A hücrelerine 24 saat süreyle uygulanan (1,56-100µM) konsantrasyonlardaki sitotoksik etkileri hormon

reseptörü pozitif olan ve Her2 reseptörü olmayan meme kanseri alt tipi MCF-7 ve normal epitelyum MCF-12A hücre hattında Mosman [100] tarafından uygulanan yöntem 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) modifiye edilerek kullanılmıştır. Çalışmamız sonucunda, hücre canlılık oranlarının bileşik uygulanmayan kontrol grubuna oranla azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.1-4.16). Analiz sonucunda IC₅₀ değerleri bileşiklerin birbirinin stereoizomerik durumları göz önünde bulundurularak değerlendirildiğinde; 1-2, 3-4, 7-8, 9-10 ve 15-16 nolu bileşikler aynı etkin doza sahip olmasına rağmen farklı IC₅₀ değerleri göstermiştir (Çizelge 4.1). Çalışmamızda etkilerini araştırdığımız bileşiklerle yapılan daha önceki bir çalışmada; bileşiklerin syn/anti diastereoizomerlerinin kimyasal açıdan karşılaştırılması yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda syn pozisyonunun anti pozisyona göre daha etkin aktivite gösterdiği belirlenmiştir [95]. İlaç olarak kullanılacak ajanların farklı izomerlerinin bulunup bulunmadığı ve varsa bu izomerlerin biyolojik aktivitelerinin tespiti önem arz etmektedir. Thalidomide ve Ketalar isimli ilaçlar bu ajanların farklı izomerlerinin önemini vurgulamıştır [87, 88].

Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre ise sadece 14 nolu anti konformasyonunda bulunan bileşiğin syn pozisyonundaki 13 nolu bileşiğe göre daha yüksek etkin doza sahip olmasına rağmen IC₅₀ dozunun daha yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1). MTT testinden elde edilen IC₅₀ sitotoksik dozlarına göre uygulanan 1, 3, 4, 5, 9, 10, 13, 14 nolu bileşiklerin orta düzeyde sitotoksik iken 2, 6, 7, 8, 11, 12, 15, 16 nolu bileşiklerin ise güçlü sitotoksik etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Bu bakımdan anti pozisyonundaki bileşiklerin syn pozisyonundaki bileşiklere göre MCF-7 hücre hattında daha güçlü sitotoksik etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

İlaçların sitotoksik etkilerini analiz etmek için bir dizi sitotoksikite testi mevcuttur. Tetrazolium tuzları (MTS, WST, MTT veya XTT) bazlı kolorimetrik yöntemler, ilaç tarama protokollerinde hücre canlılığını ve proliferasyonunu tahmin etmek için yaygın olarak tek uç nokta yöntemleri olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu tahliller, azaltılmış glikoz konsantrasyonu, azalmış piridin nükleotidleri, asidik pH ve artan süperoksit oluşumu gibi çeşitli koşullarda yanlış sonuçlar vermek gibi birtakım dezavantajlara da sahiptirler [123]. Sitotoksik ve metabolik etkileri ilk defa MCF-7 hücre hattı üzerinde test edilen PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin daha geniş aralıklı konsantrasyonları çalışma kolaylığı ve ekonomik olmasından ötürü çalışmamızda öncelikli olarak MTT yöntemi kullanılmıştır. Her bileşiğin etkin dozlarının belirlenmesinden sonraki

aşamada ise MTT yönteminin dezavantajlarını elimine etmek amacıyla MCF-7 hücresi üzerindeki proliferatif aktivitelerinin incelenmesinde RTCA yöntemi kullanılmıştır.

RTCA, adherent hücrelerin altın kaplamalı mikroelettrot sensörlü plakalara yapıştığında meydana gelen alternatif akım olan empedansın ölçümünün bir program yardımıyla hücre indeksi (CI) olarak analiz edilmesi teknolojisidir [124]. Bu teknoloji ilaç geliştirme, toksikoloji, mikrobiyoloji, viroloji ve tıbbi uygulamalarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır [125, 126]. Gerçek zamanlı hücre analizi (RTCA) iCELLigence sistemi, RTCA xCELLigence sisteminin bir biçimidir; temelde aynı teknoloji kullanılırken iCELLigence kullanıcılara hacimce büyük fakat sayıca daha az kuyu (8 kuyu) ile çalışma fırsatı vermektedir. iCELLigence sistemi, hücre kültürü düzeyinde gerçek zamanlı olarak proliferasyon, migrasyon ve invazyon dahil olmak üzere kanser hücrelerinin yaşayabilirliği, istilası ve ilaçların hücre üzerindeki sitotoksikite davranışını incelemek için kullanılmaktadır [127].

RTCA sistemlerinin kullanıldığı çalışmalar üretici firmanın resmi sitesinde listelenmektedir [128]. Listelenmiş çalışmalarda triazol ya da pirol halkasının kullanıldığı kimyasal bileşiklerle ilgili sadece iki çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan triazol türevli bileşiklerin (3,5-diiodo-4-metoksiariltriazol)tümör damarlanmasını etkileme potansiyeline sahip olup olmadığını araştırmak için primer insan umbilikalven endotel hücreleri (HUVEC'ler) kullanılarak büyüme inhibisyon analizleri xCELLigence teknolojisi ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda Triazol türevlerinin ortalama olarak 1 nM-6 nM konsantrasyonlarında antiproliferatif aktivite gösterdikleri belirtilmiştir [129]. Pirol türevi ile yapılan çalışmada ise araştırmacılar, iyonize radyasyon sonrasında pirol türevlerinin DNA onarımına olan etkisini xCELLigence sistemini kullanarak incelemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda pirol türevlerinin LN428-LIG3 tümör hücre hattında 8-6 kat daha duyarlı oldukları tespit edilmiştir [130].

Deney sonuçları değerlendirildiğinde kontrole göre (50-12,5 μ M) konsantrasyonlarda ilaç uygulanan 1, 2, 3, 4, 15, 16 nolu bileşiklerin canlılık değerleri (%30-%70) arasında olduğu görülmüştür. Diğer yandan (25-6,25 μ M) konsantrasyonlarda bileşik uygulanan 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 nolu bileşiklerinin ise genel olarak (%60- %70) arasında canlılık değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle Çalışmamız sonucunda, RTCA ile elde

edilen yüzde canlılık verileri ile MTT yönteminden elde edilen verilerin benzer olduğu görülmüştür.

Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, gen seviyesinde düzenlenerek DNA hasarından sonra veya gelişim sırasında meydana gelen hasarlı hücrelerin düzenli ve verimli bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlar [131]. Apoptoz mekanizması oldukça karmaşık olup birçok sinyal yolağını içermektedir. Apoptoz, hücrede kaspaz aracılı ekstrinsik veya intrinsik yollarla tetiklenebilir. Her iki yol da sonuç olarak efektör apoptotik kaspazlarını aktive etmek için iş birliği yapmaktadır [132]. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein düzenleyicileri arasındaki denge, bir hücrenin apoptoza girip girmediğini belirlemede kritik bir noktadır. Apoptoz sürecindeki herhangi bir düzensizlik, kontrolsüz hücre proliferasyonu, kanser gelişimi ve ilaç direnci gibi durumlara yol açabilmektedir [133]. Bu nedenle apoptoz düzensizliği kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olarak kabul edilmektedir [10]. Apoptotik sürece dahil olan moleküllerin hedeflendiği terapötik stratejiler kanser hücrelerinin apoptoza duyarlılığını düzeltmek ve tedaviye direncin ortadan kaldırılmasında önemli bir yaklaşım olmaktadır [134]. Bu anlamda literatürde, çalışmamızda kullandığımız bileşiklere benzer triazol veya pirol türevlerini ihtiva eden bileşiklerle ilgili MCF-7 hücre hattındaki sitotoksik etkilerin MTT yöntemi kullanılarak yapıldığı çalışmalar olsa da bu bileşiklerin apoptotik moleküller olan p53, BCL2, BAX, PARP1 ve CASP3 genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleriyle ilgili yapılmış RT-PZR çalışmalarına çok az rastlanmıştır. Bu çalışmalardan birinde, araştırmacılar triazol iskelesi taşıyan sila-ikamelio tioalkin ve merkaptio-tiyon bileşiklerinin MCF-7 hücre hattındaki IC₅₀ değerlerini tespit edip bu bileşiklerin anti-apoptotik BCL2 gen ekspresyonunun housekeeping gen olan aktine normalleştirildiğinde mRNA seviyesinin düştüğünü ifade etmişlerdir [135]. Diğer bir çalışmada ise araştırmacılar, küçük molekül bazlı ilaçların glikosilasyonunun, ana iskelenin biyolojik aktivitelerini önemli ölçüde iyileştirebileceğini varsayarak benzotriazol parçası ile bağlanmış çok fonksiyonlu piridin- bifenil sisteminin S- glikozitleri ve N- glikozitleri tasarlayıp sentezlemişlerdir. Sentezlenen bileşiklerin MCF-7 hücre hattında sitotoksikite etkinliği MTT yöntemi ile test edilmiş ve bu bileşiklerin apoptotik genler olan p53 ile BAX ve anti-apoptotik gen olan BCL2 gen ekspresyon düzeyleri RT-PZR yöntemiyle araştırılmıştır. Sonuç olarak, bu triazol türevlerinin p53 ve BAX seviyelerini önemli miktarda artırırken ($p < 0,05$), anti-apoptotik BCL2 gen seviyesini azalttığını vurgulamışlardır [136].

Tümör baskılayıcı p53, otofaji ve kanser metabolizmasını değiştirip düzenlemenin yanı sıra hücre büyümesinin G1-S geçişinde negatif düzenlenmesi, DNA onarımı, yaşlanma ve hücre ölümünü teşvik ederek genomu korur ve tümör oluşumunu önler [137]. Bununla birlikte, kanser hücreleri, hayatta kalma ve daha fazla büyümek için çoklu yollarla p53'ü etkisiz hale getirirler. Bu nedenle p53 geni insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan genidir ve bu gendeki mutasyonların birikimi meme kanserinde potansiyel bir belirleyici olarak kabul edilmektedir [138].

MTT testi ve RTCA iCELLigence sistemiyle sitotoksik etkileri ve anti-proliferatif özellikleri kanıtlanmış olan bileşiklerin p53 geni üzerine aktine göre normalize edildiğinde sadece B4 bileşiğinin aktinle aynı seviyede etkili olduğu görülmüştür. Çalışılan diğer tüm bileşiklerin p53 mRNA gen ekspresyonunu azaltıcı etki gösterdiği görülmüştür. Elde ettiğimiz bu sonuçların triazol türevleri ile yapılmış çalışmalardaki sonuçlarla uyumlu olmadığı görülmüştür. Öte yandan yabanıl=wild tip p53 proteini çok kısa bir yarı ömre sahiptir ve genellikle normal hücrelerde birikmez, bu nedenle tespit edilemez. Bunun aksine, p53 genindeki mutasyon, uzun bir yarılanma ömrüne sahip, konformasyonel olarak değiştirilmiş ve fonksiyonel olmayan proteine yol açar. Bu nedenle, genellikle immünokimyasal tekniklerle tespit edilebilen tümör hücrelerinde mutant p53 birikmesine yol açar. Bununla birlikte, tüm mutasyonlar kararlı bir protein vermez ve bazı mutasyonlar, analiz sonrası tespit edilemeyen kesilmiş bir proteine yol açar [139]. Yabanıl tip p53, DNA hasarına bir yanıt veya pozitif bir IHC sonucuna yol açan diğer hücrel proteinlere bağlanma sonucu bazı tümörlerde birikebilir [140]. DNA'ya zarar veren bir ilaç olan Adriamisin ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde p53'ün RT-PZR ile mRNA gen ekspresyon düzeyini inceleyen bir çalışmada p53 gen ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir [141]. Başka bir raporda ise ER⁺ ile p53 arasında fiziksel etkileşim oluşturulduğu ve ER⁺ 'in p53'ün insan çift minute 2 (hdm2) tarafından etkisiz hale gelmesini önlemek için üçlü kompleks oluşturmuştur. Bu oluşum p53 seviyesinde bir artış ortaya koymuştur. Bu nedenle MCF-7 hücre hattında biriken proteinin yabanıl tip p53 olmasının muhtemel olabileceğini öne sürmüşlerdir. [142]. Bu sonuçlar ışığında bizim çalışmamız sonucunda da PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin MCF-7 hücrelerinde apoptozu p53'ten bağımsız olarak teşvik ettiği kanaatine varılmıştır.

BCL-2 ailesi üyeleri mitokondriyal bütünlüğün ve mitokondri ile başlatılan kaspaz aktivasyonunun ana düzenleyicileridir. BCL-2 ailesi hem antiapoptotik hem de proapoptotik üyelere sahiptir [143].

Apoptotik sinyaller mitokondriyal dış zar geçirgenliği (MOMP) ile sonuçlanarak sitokrom c'nin salınmasını ve kaspazların aktivasyonunu BCL-2 ailesi üyeleri olan BAX/BAK kompleksleri aracılığıyla tetikler [144]. Bunun tersine, antiapoptotik BCL-2, BAX / BAK' nin homooligomerizasyonunu önlemek için BH3 aktivatörünün veya kısmen aktifleştirilmiş, BH3'e maruz kalan BAX/BAK monomerlerinin aktive edilmesiyle mitokondriyal bütünlüğü korur [145]. Ek olarak tümör hücrelerinin kemoterapötik ajanlar tarafından apoptoz indüksiyonuna duyarlılığı, mitokondrideki BCL-2/BAX proteinlerinin oranı ile kontrol edilir [146]. Apoptotik kontrol noktalarından kaçınmak için, kanser hücreleri sıklıkla antiapoptotik BCL-2 proteinlerini aşırı eksprese eder. Bu nedenle BCL-2 ailesi üyeleri terapötik gelişim için ilgi çekici hedefler olarak ortaya çıkmıştır [147]. Ayrıca Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada D vitamini analogu olarak fenil-pirol türevinin MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliği belirlendikten sonra pirol türevinin qPZR ile gen ekspresyonları üzerindeki etkinliği incelendiğinde önemli ölçüde BAX gen ekspresyonu artırdığı ve BCL2 gen ekspresyonunu azalttığını ifade etmişlerdir [148].

Bizim çalışmamızda kullandığımız 1, 6, 8, 9, 14, 15 ve 16 nolu bileşikler BCL-2 mRNA gen ekspresyonunu kontrole kıyasla azaltmıştır. Yine 1, 2, 3, 4, 7, 11 ve 13 nolu bileşikler ise BAX geni ekspresyonunu artırmıştır. Bu sonuçların hem triazol türevi hem de pirol ile yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür [135, 136, 148]. Bununla birlikte 1, 8, 9, 14, 15 ve 16 nolu bileşiklerin BAX/BCL-2 oranını artırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçların BAX/BCL-2 oranını artıran bileşiklerin hücreyi apoptoza yönlendirdiğini düşündürmektedir.

BRCA1 ve BRCA2 proteinlerinin her ikisi de, DNA bütünlüğü ve genomik stabilitenin korunması için gerekli bir süreç olan çift zincirli DNA kopmalarının homolog rekombinasyon (HR) ile onarılmasında rol oynar. Meme ve yumurtalık kanserlerinin yaklaşık %5-10'u, bu genlerdeki kalıtsal değişiklikler veya mutasyonlardan kaynaklanır. [149]. Nükleer bir enzim olan Poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP1); DNA onarımı, kromatin yeniden modellenmesi ve gen ekspresyonunda rol oynar [150]. BRCA1 ve

BRCA2 genlerinin yetersiz olduğu hücreler (MCF-7) PARP1'in seçici inhibisyonuna karşı aşırı duyarlıdır. Bununla birlikte PARP inhibisyonu çeşitli anti-kanser ilaçlarının sitotoksitesini önemli ölçüde güçlendirir [151]. Bu tezde, üzerinde çalışılan tüm PhTAD türevli dihidropirol bileşiklerinin PARP1 mRNA gen ekspresyonunu azalttığı görülmüştür. Bileşik 6'nın ise güçlü sitotoksik etkisine rağmen PARP1 inhibisyonu, kontrole yakın etki göstermiştir.

Stres veya ısı şok proteinleri (HSPler) hipoksi, hiperoksi, kimyasallara maruz kalma, duygusal, mekanik stres v.b etkiler altında hücrel homeostazın korunmasına yardımcı olan veya hücrenin ölümcül koşullarda hayatta kalmasına izin veren moleküllerdir [152]. HSP'ler moleküler boyutlarına göre; küçük HSP (HSP27), HSP (40, 60, 70, 90, 110) olmak üzere altı gruba ayrılmışlardır [153]. HSP'ler tüm organizmalarda ve farklı hücre alt bölmelerinde evrimsel olarak korunur ve her yerde ifade edilir [154]. HSP'ler ökaryotik hücrelerde birden fazla rol oynar, ancak birincil işlevleri moleküler şaperonlar olarak hizmet etmektir [155]. Şaperon fonksiyonlarına, proteinlerin katlanmasını kolaylaştırarak ve hücreler homeostatik zorluklara maruz kaldıklarında istemci proteinlerinin doğal yapılarını ve fonksiyonlarını koruyarak aracılık ederler [156].

Küçük HSP ailesi, ATP'den bağımsız bir şekilde işlev gören 12-42 kDa yapısında iken büyük HSPler ATP bağımlı şaperonlardır [157]. Strese yanıt olarak oluşturulan sitoprotektif fonksiyonlar normal hücrelerin bir özelliği olmasına karşın HSPlerin düzensiz ifadesi kanserle birlikte çeşitli hastalıkların gelişimine katkı sağlar. Hayatta kalmaya odaklanmış kanser hücrelerinin metabolik hızlarının yüksek olması HSP'lere olan gereksinimini de artırır [10]. Protein katlanması ve stabilizasyonundaki rollerinden dolayı HSP'ler çok sayıda önemli onkojenik yolun kesişme noktasında bulunmaktadır. Bu nedenle HSP'lerin inhibisyonu, aynı zamanda, tümör ilerlemesi için gerekli olan birkaç yola aynı anda saldırarak, birden fazla onkoproteini engellemede bir avantaj sunmaktadır [158].

HSP27, HSP70 ve HSP90, iyi çalışılmış ve stresle indüklenebilir HSP'ler arasındadır. Bu şaperonların ekspresyonunun / aktivitesinin malignitede anlamlı olarak daha yüksek olduğu ve farklı ölüm uyarılarına yanıt verdiği gösterilmiştir [159]. Meme kanseri alt tiplerine göre HSP genlerinin ekspresyonları luminal A (ER+ PR+- Her2- Ki 67 düşük), luminal B (ER+ PR+- Her2- Ki 67 yüksek), HER2, bazal benzeri (TNBC; ER, PR, Her2 negatif) şeklinde sıralanmıştır [160].

Bu nedenle, HSP27, HSP70, HSP90 ve diğer HSP'lerin inhibisyonu, diğer kanser tiplerinde olduğu gibi meme kanserinin tedavisi için güçlü bir antiapoptotik strateji olarak ortaya çıkmıştır.

Apoptotik yollarda yer alan kaspazların inhibisyonuna neden olarak anti apoptotik roller üstlenen HSP'lerin önemli bir grubunu oluşturan HSP (27, 40, 60, 70 ve 90) üzerine daha önce MCF-7 hücre hattında triazol veya pirol türevi ile çalışma yapılmamıştır. Ayrıca bu genlerin mRNA düzeyinde gen ekspresyon çalışması da bulunmamaktadır. Hem pirol hem de triazol halkasını içeren N- feniltriazolindion türevli dihidropirol bileşiklerinin aktif olarak MCF-7 hücre hattında sitotoksik etkilerinin tespit edilmesi sonrası bu bileşiklerin HSP gen ekspresyonlarını RT-PZR yöntemiyle araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar bu bileşiklerin HSP'ler üzerine etkinliklerini göstermiştir (Şekil 4.49-Şekil 4.53).

HSP27 gen ekspresyonuna bileşikler içerisinde 1, 2 kat; 2, 1.3 kat; 3, 1.7 kat artırıcı etkiye sahipken; bileşiklerden 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ve 16 kontrole göre anlamlı derecede azaltıcı etki gösterdikleri bulunmuştur. Bileşik 4 ise kontrole göre yarı yarıya azaltıcı etki göstermiştir (Şekil 4.49). HSP40 gen ekspresyonuna bileşikler içerisinde 1, 1.8 kat artırırken 2 ve 5 çok az miktarda artırıcı etki göstermiştir. Bileşiklerden 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15 ve 16 kontrole göre anlamlı olarak azaltıcı etkiye sahiptir. Ayrıca bileşiklerden 4, 11, 13 ve 14 kontrole göre yarı yarıya azaltıcı etki göstermiştir (Şekil 4.50). HSP60 gen ekspresyonuna bileşikler içerisinde 2, 1.5 kat; 3, 13.2 kat; 6, 1.9 kat; 7, 1.5 kat; 8, 5.5 kat; 10, 3,4 kat; 12, 1.4 kat; 13, 2,3 kat; 14, 1.3 kat; 15, 10 kat artırıcı etkiye sahiptir. Bileşiklerden 1, 4, 9 kontrole göre anlamlı olarak azaltıcı etkiye sahiptir. Ayrıca bileşiklerden 5 ve 11 kontrole göre yarı yarıya azaltıcı etki gösterirken bileşik 16 kontrole yakın etkiye sahiptir (Şekil 4.51). HSP70 gen ekspresyonuna bileşikler içerisinde 1, 11, 12, 15 ve 16 bileşikleri anlamlı olarak azaltıcı etkiye sahiptir. Uygulanan 2, 3, 4, 5, 14 nolu bileşikler kontrole göre yarı yarıya azaltıcı etki göstermiştir. Ayrıca bileşiklerden 6, 2.8 kat artıcı etki gösterirken; 7, 8, 9, 10, 13 kontrole yakın etki göstermiştir (Şekil 4.52). HSP90 gen ekspresyonuna bileşikler içerisinde 2, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 15 ve 16 nolu bileşikleri kontrole göre anlamlı olarak azaltıcı etkiye sahiptir. Uygulanan 1, 8, 10, 13 nolu bileşikler kontrole göre yarı yarıya azaltıcı etki göstermiştir. Bileşiklerden 3, 1.8 kat artıcı etki gösterirken; bileşik 6 kontrolle aynı etkiyi göstermiştir (Şekil 4.53).

Endoplazmik retikulum (ER), zarlı bir hücre içi organel ve salgı yolunun ilk bölümüdür. Bu nedenle, ER, hücresel proteinlerin yaklaşık üçte birinin üretimine ve katlanmasına katkıda bulunur ve ayrılmaz bir şekilde hücresel homeostazın korunması ve sağlık ile hastalık arasındaki ince dengeyle bağlantılıdır [51]. ER, salgı ve transmembran proteinlerin sentezi, katlanması, olgunlaşması, kalite kontrolü ve degradasyonuna dahil olur ve işlev bölgelerine sadece uygun şekilde katlanmış proteinlerin verilmesini sağlar [161].

ER proteinlerinin olgunlaşma işlemi retiküler bölmenin spesifik şaperonları tarafından hassas bir şekilde düzenlenir. Bunlar üç gruba ayrılır: (1) spesifik olmayan proteinlerin toplanmasını ve katlanmasını kolaylaştıran GRP78 ve GRP94; (2) kalinksin ve kalretisin, glikoproteinlerin olgunlaşma sürecinde yer alan lektinler; (3) ve özellikle kollajen için ısı şok proteini 47 (Hsp47)'dir [162].

Terminal olarak yanlış katlanan salgı proteinleri, ER ile ilişkili bozunma (ERAD) adı verilen bir işlemle elimine edilir. Kalsiyum bu süreçte merkezi bir role sahiptir. Çünkü retiküler şaperonlar kalsiyum için farklı afinite değerlerine sahiptir ve aktiviteleri bu iyonun konsantrasyonundaki dalgalanmalarla modüle edilir [163].

ER'de meydana gelen düzensizlikler ER stres olarak bilinen hücresel bir durumu meydana getirir. ER stresine hücresel yanıt, stresin üstesinden gelmek ve ER homeostazını düzeltmek için uyarlanabilir mekanizmaların aktivasyonunu içerir. Bu yanıt, rahatsız edici ajan/ duruma ve stresin yoğunluğuna / süresine bağlıdır [164].

UPR, ER kaynaklı hücresel stres tepkisidir ve enzim 1 gerektiren inositol (IRE1), protein kinaz RNA ile aktive benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) üç ana sensör tarafından kontrol edilir. Her üç ER stres sensörü normal durumda ER yerleşik şaperon GRP78 ile bağlı ve inaktiftir. ER lümeninde biriken yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi GRP78 ile birleşerek üç sensörü serbest bırakır [165].

UPR, ER protein katlama homeostazını yeniden dengelemeye ve hücre sağkalımını teşvik etmeye çalışır. UPR bileşenlerinin uzun süreli aktive edilmesi kanser bağlamında tümör ilerlemesini ve hayatta kalmasını sağlar. ER stresi giderilemezse, hücre ölümünü desteklemek için mekanizmalar tetiklenir [51].

ER stresi sinyal bileşenleri terapötik hedefleri temsil eder. GRP78 kanser ve bakteriyel / viral enfeksiyonlar gibi insan hastalıkları için evrensel bir terapötik hedef olarak kabul edilmiştir [166]. GRP78 (BİP)'i hedefleyen antikolar, fare ksenograft modellerinde küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve glioblastommultiforme'de antitümöral aktivite ve radyasyon etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir [167]. GRP78'e karşı bir monoklonal antikor ile kısa süreli sistemik tedavinin, endometriyal adenokarsinomlu farelerde AKT aktivasyonunu ve apoptozu arttırdığı gösterilmiştir [168]. Ayrıca, ER'de yerleşik GRP94, boyut veya sekansa bakılmaksızın hücrel peptitlerle ilişki kurma kabiliyeti nedeniyle terapötik bir hedef olarak değerlendirilmektedir [169]. Klinik öncesi çalışmalar GRP94 ekspresyonunu multiplmiyelom, hepatoselülerkarsinom, kolon kanseri ve meme kanserinin ilerlemesiyle ilişkilendirmiştir. Son olarak, bu protein antikanser immünoterapisinde kullanılabilecek güçlü bir bağışıklık sistemi modülatörü olarak tanımlanmıştır [170].

Çalışmamızda, MCF-7 hücre hattında N- feniltriazolindion türevli dihidropirol bileşiklerinin ER stresinin ana regülatörü olan GRP78 ve protein katlanmasına destekleyici etkisi ile tümörleşmenin ilerlemesinde önemli rol oynayan GRP94 mRNA gen ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Sonuçta; GRP78 gen ekspresyonuna bileşikler içerisinde 3, 2.5 kat; 6, 1.5 kat; 8, 2.5 kat; 15, 1.4 kat artırıcı etkiye sahipken; 9 ve 16 nolu bileşiklerin anlamlı olarak azaltıcı etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bileşiklerden 7 ve 11 nolu bileşikler kontrole göre yarı yarıya azaltıcı etki gösterirken; 1, 2, 4, 5, 10, 13 ve 14 nolu bileşikler kontrole yakın etki göstermiştir (Şekil 4.54). GRP94 gen ekspresyonu üzerine bileşiklerden 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 12 ve 16 kontrole göre anlamlı olarak azaltıcı etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Uygulanan bileşiklerden 8, 10, 13, 14 ve 15 nolu bileşikler kontrole göre yarı yarıya azaltıcı etki göstermiştir. Ayrıca bileşiklerden 3 ve 6 nolu bileşikler kontrole yakın etki göstermiştir (Şekil 4.55).

Bileşik 9 özellikle HSP90 ve bu proteinin ER'deki yerleşik üyesi olan GRP94 gen ekspresyonu üzerine dikkate değer azaltıcı etki göstermiştir. Bununla beraber HSP70 gen ekspresyonunu kontrole göre çok az oranda artırırken bu şaperonun ER'deki yerleşik üyesi GRP78'i azaltıcı etkisi düşündürücüdür. Bileşik 16 ise hem GRP78 (0,3) hem de GRP94 (0,2) gen ekspresyonu üzerine yakın bir etki göstermiştir. Bu bileşik HSP70 gen ekspresyonu üzerine (0,13) ve HSP90 gen ekspresyonu üzerine ise (0,08) azaltıcı etki göstermektedir. ER stresinin kanserleşme için önemi göz önüne alındığında özellikle

bileşik 9 ve 16 'in hem ana düzenleyici GRP78 hem de GRP94 üzerinde azaltıcı etkisinin hücrenin apoptoza yönlendirilmesinde önemli etkinliğe sahip iki bileşik olabileceğini düşündürmektedir.

MCF-7 hücrelerinin kaspaz 3 genine sahip olup olmadığı tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda kaspaz 3 varlığı immünofloresan hücre boyama (SABC-Cy3) [171] ile kabul edilmiş olsa da diğer birçok çalışmada kaspaz 3 geninin ekson 3 üzerindeki 47. baz çiftinin eksikliğine bağlı olarak MCF-7 hücrelerinde ifade edilemediği vurgulanmıştır [172, 173]. Çalışmamızda RT-PZR yöntemiyle yapılan testlerde MCF-7 hücrelerinde hem kontrol grubunda hem de bileşiklerin uygulandığı gruplarda kaspaz 3 geni ifade edilmemiştir.

Bu tezdeki N-feniltriazolindione türevli Dihidropirol moleküllerinin meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve normal meme epiteli MCF-12A üzerindeki sitotoksik ve antiproliferatif çalışmaları ile mRNA düzeyindeki gen ekspresyonları çalışmaları özgün niteliktedir. Bu tezden elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

1. Dihidropirolün N-feniltriazolindione çekirdeği ile türevlendirilerek elde edilen hedef moleküllerin bir stereoizomerinin diğerinden farklı aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar ileri çalışmalarda hangi izomer üzerinden etkinin daha fazla olacağını göstermesi açısından önemlidir.
2. Çalışmadan elde edilen bir diğer bilgi ise sülfür grubuna bağlı R1 olarak isimlendirilen ve ester oksijen atomuna bağlı R2 olarak isimlendirilen ve artan karbon sayısına göre seçilen alkil gruplarının etkileridir.
3. Hedef moleküllerin tamamının MCF-7 ve MCF-12A üzerinde sitotoksik ve proliferatif etkinlikleri tespit edilmiştir. Diğer yandan anti pozisyonundaki türevlerin hücre üzerinde daha sitotoksik etkinlikte olduğu MTT ve RTCA yöntemlerinden gelen benzer sonuçlarla anlaşılmıştır.
4. Alkil grubu olarak seçilen benzil grubunun da farklı etkinlikte olduğu görülmüştür. Bu bileşiklerden benzil sülfür (Bnz-S) içeren Bileşik (11-12, 15-16)'in güçlü sitotoksik etkide olduğu görülmüştür. Bileşik 12 (syn), MCF-7 üzerindeki IC₅₀ değerinin MTT yöntemiyle 5,49 µM olduğu RTCA yöntemiyle ise 1,56µM'dan düşük olduğu tespit edilmiştir. MCF-12A üzerindeki % canlılık oranı ise %50 civarında olduğu görülmüştür.

5. Yine Benzil içeren Bileşik 16(syn) MTT yöntemine göre MCF-7 ve MCF-12A üzerindeki sitotoksik etkileri benzerdir ve % canlılık oranları %50 civarında olduğu görülmüştür.
6. Benzil gruplarının mezomerik etkinliklerinin literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.
7. mRNA düzeyinde gen ekspresyonları incelendiğinde BAX/BCL2 oranını B1 (syn); 12 kat, B9(syn) 11,7 kat, B15(syn) 7,7 kat artırmıştır.
8. DNA'nın onarımında önemli görevler üstlenen PARP-1 gen düzeyini önemli ölçüde azaltarak hücrenin apoptoza girmesini sağladığı görülmüştür.
9. Bu bileşiklerin p53 gen düzeyini azaltması ise bu bileşiklerin hücreyi p53'ten bağımsız olarak apoptoza yönlendirdiği kanaati oluşturmuştur.
10. Bileşik 9 özellikle meme kanserinde önemli bir molekül olarak görülen HSP90 ve bu proteinin ER'deki yerleşik üyesi olan GRP94 gen ekspresyonu üzerine dikkate değer azaltıcı etki göstermiştir. Bununla beraber HSP70 gen ekspresyonunu kontrole göre çok az oranda artırırken bu şaperonun ER'deki yerleşik üyesi GRP78'i azaltıcı etkisi düşündürücüdür. Ayrıca bu bileşik mitokondriye özgü HSP60 düzeyini de önemli miktarda azalmıştır.
11. Benzil grubu içeren bileşiklerden B15(syn) HSP60 gen düzeyini 10 kat artırırken diğer HSP ve ER stres genleri üzerinde etkili azaltıcı aktivite göstermiştir.
12. Bileşik 16 ise hem GRP78 (0,3) hem de GRP94 (0,2) gen ekspresyonu üzerine yakın bir etki göstermiştir. Bu bileşik HSP70 gen ekspresyonu üzerine (0,13) ve HSP90 gen ekspresyonu üzerine ise (0,08) azaltıcı etki göstermektedir.
13. Bu bileşiklerin sitotoksik etkinlikleri ve hücre üzerindeki anti proliferatif etkinlikleri de göz önünde bulundurularak MCF-7 hücre hattı üzerinde büyüme faktörlerini ve hücre tamir mekanizmalarını baskılayarak apoptotik mekanizmaları teşvik ettiği ve böylece hücreyi apoptoza yönlendirdiğini düşündürmektedir.

Literatürde, apoptotik sinyal yolları ve diğer onkogenik yolların kesişme noktalarında bulunarak tümörleşmede önemli roller üstlenen HSP (27, 40, 60, 70, 90) ve ER stresin düzenlenmesindeki rolleriyle bilinen GRP78 ve GRP94 molekülleri üzerine N-feniltirazol veya pirol ihtiva eden hetero halkalı bileşiklerle yapılmış RT-PZR çalışması yer almamaktadır. Bu çalışmamızın literatüre bu anlamda önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. (2018). Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. *International Agency for Research on Cancer. Geneva: World Health Organization.*
2. İnternet: Giriş URL: [http://www.onkoloji.gov.tr/attachments/article/8653/Ana%20Rapor%202016%20\(v01.2\).pdf](http://www.onkoloji.gov.tr/attachments/article/8653/Ana%20Rapor%202016%20(v01.2).pdf) Son Erişim Tarihi: 07.07.2019
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
4. Hanahan, D. (2014). Rethinking the war on cancer. *The Lancet*, 383(9916), 558-563.
5. Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61.
6. Sannino, S., and Brodsky, J. L. (2017). Targeting protein quality control pathways in breast cancer. *BMC biology*, 15(1), 1-20.
7. İnternet: Giriş URL: <https://www.breastcancertrials.org/BCTIncludes/Resources/BreastCancerDrugs.html> Son Erişim Tarihi: 07.07.2019
8. William S. Klug, Michael R. Cummings, Charlotte A. Spencer (Editörler) (2011), *Genetik kavramlar* (Sekizinci baskı), Ö. Sümer, Ö. Açık (çev.) Türkiye: Palme Yayınevi, 434-440.
9. İnternet: Kutluk, T., ve Kars, A. Kanser Konusunda Genel Bilgiler. TC. Sağlık Bakanlığı Kanser ve Savaş Daire Başkanlığı. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fsbu.saglik.gov.tr%2FEkutuphane%2Fkitaplar%2Fkanser.pdf&date=2019-02-19>. Erişim: 2019-02-19.
10. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
11. Sasco, A. J., Secretan, M. B. and Straif, K. (2004). Tobacco Smoking and Cancer: A Brief Review of Recent Epidemiological Evidence. *Lung cancer*, 45 (Supplement 2), 3-9.
12. Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S. Sung, B. and Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical research*, 25(9), 2097-2116.
13. Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science*, 274(5293), 1672-1677.
14. Paweletz, N. (2001). Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(1), 72-75.

15. Howard, A., and Pelc, S. R. (1951). Synthesis of nucleoprotein in bean root cells. *Nature*, 167(4250), 599-600.
16. Malumbres, M. (2020). Control of the Cell Cycle. In *Abeloff's Clinical Oncology* (pp. 56-73). Content Repository Only!.
17. Chandar, N., ve Viselli, S. (2011). *Lippincott Hücre ve Moleküler Biyoloji* (1. Baskı), Yanık, Betül. (çev.) Türkiye: Nobel tıp kitapçevleri, 188-194.
18. Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*, 30(11), 630-641
19. Abate, A. A., Pentimalli, F., Esposito, L., and Giordano, A. (2013). ATP-noncompetitive CDK inhibitors for cancer therapy: an overview. *Expert opinion on investigational drugs*, 22(7), 895-906.
20. Ventura E., and Giordano, A. (2019). Cell Cycle, *Reference Module in Life Sciences*.
21. Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(3), 222-231
22. Kastan, M. B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015), 316-323.
23. Malumbres, M. (2011). Oncogene-induced mitotic stress: p53 and pRb get mad too. *Cancer cell*, 19(6), 691-692.
24. Manning, A. L., and Dyson, N. J. (2012). RB: mitotic implications of a tumour suppressor. *Nature reviews Cancer*, 12(3), 220-226.
25. Yu, Q., Sicinska, E., Geng, Y., Ahnström, M., Zagozdzon, A., Kong, Y., ... and Sicinski, P. (2006). Requirement for CDK4 kinase function in breast cancer. *Cancer cell*, 9(1), 23-32.
26. Gao, P., Zhou, G. Y., Liu, Y., Li, J. S., Zhen, J. H., and Yuan, Y. P. (2004). Alteration of cyclin D1 in gastric carcinoma and its clinicopathologic significance. *World journal of gastroenterology: WJG*, 10(20), 2936.
27. Zhao, R., Choi, B. Y., Lee, M. H., Bode, A. M., and Dong, Z. (2016). Implications of genetic and epigenetic alterations of CDKN2A (p16INK4a) in cancer. *EBioMedicine*, 8, 30-39.
28. Sherr, C. J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell*, 2(2), 103-112.
29. Karst, A. M., Jones, P. M., Vena, N., Ligon, A. H., Liu, J. F., Hirsch, M. S., Bowtell, DL. D., Etemadmoghadam, D , and Drapkin, R. (2014). Cyclin E1 deregulation occurs early in secretory cell transformation to promote formation of fallopian tube-derived high-grade serous ovarian cancers. *Cancer research*, 74(4), 1141-1152.

30. Falck, J., Petrini, J. H., Williams, B. R., Lukas, J., and Bartek, J. (2002). The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nature genetics*, 30(3), 290-294.
31. Venkitaraman, A. R. (2014). Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. *Science*, 343(6178), 1470-1475.
32. 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.
33. Stiefel, M., Shaner, A., and Schaefer, S. D. (2006). The Edwin Smith Papyrus: the birth of analytical thinking in medicine and otolaryngology. *The Laryngoscope*, 116(2), 182-188.
34. Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W. M., Clarke, M. F., and Wicha, M. S. (2003). Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell proliferation*, 36, 59-72.
35. İnternet: Meme Kanseri URL: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars> Son Erişim Tarihi: 07.07.2019
36. Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M., and Khan, A. U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological research*, 50(1), 33.
37. Dumitrescu, R. G., and Cotarla, I. (2005). Understanding breast cancer risk-where do we stand in 2005?. *Journal of cellular and molecular medicine*, 9(1), 208-221.
38. Eberl, M. M., Sunga, A. Y., Farrell, C. D., and Mahoney, M. C. (2005). Patients with a family history of cancer: identification and management. *The Journal of the American Board of Family Practice*, 18(3), 211-217.
39. Faraoni, I., and Graziani, G. (2018). Role of BRCA mutations in cancer treatment with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Cancers*, 10(12), 487.
40. Golia, B., Singh, H. R., and Timinszky, G. (2015). Poly-ADP-ribosylation signaling during DNA damage repair. *Front. Biosci*, 20, 440-457.
41. El-Khamisy, S. F., Masutani, M., Suzuki, H., and Caldecott, K. W. (2003). A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic acids research*, 31(19), 5526-5533.
42. Chen, Q., Kassab, M. A., Dantzer, F., and Yu, X. (2018). PARP2 mediates branched poly ADP-ribosylation in response to DNA damage. *Nature communications*, 9(1), 1-13.
43. Ronson, G. E., Piberger, A. L., Higgs, M. R., Olsen, A. L., Stewart, G. S., McHugh, P. J., Petermann, E., and Lakin, N. D. (2018). PARP1 and PARP2 stabilise replication forks at base excision repair intermediates through Fbh1-dependent Rad51 regulation. *Nature communications*, 9(1), 1-12.

44. Farmer H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt N.J. A., Johnson, D.A, Richardson, T. B., Santarosa, M., Dillon, K. J., Hickson I., Knights, C., Martin, MB. N., Jackson, S.P., Smith, C.M G., and Ashworth A. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 434(7035), 917.
45. Keung, M. Y. T., Wu, Y., and Vadgama, J. V. (2019). PARP inhibitors as a therapeutic agent for homologous recombination deficiency in breast cancers. *Journal of clinical medicine*, 8(4), 435.
46. Harbeck N. and Gnant M. (2017). Breast cancer. *The Lancet*, 389(10074), 1134–1150.
47. Appert-Collin, A., Hubert, P., Crémel, G., and Bennisroune, A. (2015). Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion. *Frontiers in pharmacology*, 6, 283.
48. Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., and Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer*, 11(11), 761.
49. Chen, Y., and Olopade, O. I. (2008). MYC in breast tumor progression. *Expert review of anticancer therapy*, 8(10), 1689-1698.
50. Vita, M., and Henriksson, M. (2006). The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *In Seminars in cancer biology* (Vol. 16, No. 4, pp. 318-330). Academic Press.
51. Almanza, A., Carlesso, A., Chintha, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., Luis, A., McCarthy, N., Montibeller, L., Papaioannou, S.A., Püschel, F., Sassano, M.L., Skoko, J., Agostinis, P., Bellerocche, J., Eriksson, L.A., Fulda, S., Gorman, A.M., Healy, S., Kozlov, A., Pinedo, C.M., Rehm, M., Chevet, E., and Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling—from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS journal*, 286(2), 241-278.
52. Kim, I., Xu, W., and Reed, J. C. (2008). Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature reviews Drug discovery*, 7(12), 1013-1030.
53. Sisinni, L., Pietrafesa, M., Lepore, S., Maddalena, F., Condelli, V., Esposito, F., and Landriscina, M. (2019). Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Breast Cancer: The Balance between Apoptosis and Autophagy and Its Role in Drug Resistance. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 857.45.
54. Limonta, P., Moretti, R. M., Marzagalli, M., Fontana, F., Raimondi, M., and Montagnani Marelli, M. (2019). Role of endoplasmic reticulum stress in the anticancer activity of natural compounds. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 961.
55. Ni, M., and Lee, A. S. (2007). ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS letters*, 581(19), 3641-3651.
56. Zhu, G., and Lee, A. S. (2015). Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis. *Journal of cellular physiology*, 230(7), 1413-1420.

57. Ni, M., Zhang, Y., and Lee, A. S. (2011). Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochemical Journal*, 434(2), 181-188.
58. Reddy, R. K., Mao, C., Baumeister, P., Austin, R. C., Kaufman, R. J., and Lee, A. S. (2003). Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(23), 20915-20924.
59. Yang, Y., and Li, Z. (2005). Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function?. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, 20(2).
60. 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.
61. Richter, K., Haslbeck, M., and Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular cell*, 40(2), 253-266.
62. Chatterjee, S., and Burns, T. (2017). Targeting heat shock proteins in cancer: a promising therapeutic approach. *International journal of molecular sciences*, 18(9), 1978.
63. Goldschmidt, R. (1935). Gen und ausseneigenschaft. *Zeitschrift für induktive Abstammungs-und Vererbungslehre*, 69(1), 70-131.
64. Mattoo, R. U., and Goloubinoff, P. (2014). Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(17), 3311-3325.
65. Koff, J., Ramachandiran, S., and Bernal-Mizrachi, L. (2015). A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *International journal of molecular sciences*, 16(2), 2942-2955.
66. Adams, C. M., Clark-Garvey, S., Porcu, P., & Eischen, C. M. (2019). Targeting the Bcl-2 family in B cell lymphoma. *Frontiers in oncology*, 8, 636.
67. Minn, A. J., Vélez, P., Schendel, S. L., Liang, H., Muchmore, S. W., Fesik, S. W., ... Fill, M., and Thompson, C.B. (1997). Bcl-x L forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, 385(6614), 353-357.
68. Dewson, G. K. R. M., and Kluck, R. M. (2010). Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health Cytoskeleton*, 2(9), 22.
69. Liu, Z., Ding, Y., Ye, N., Wild, C., Chen, H., and Zhou, J. (2016). Direct activation of Bax protein for cancer therapy. *Medicinal research reviews*, 36(2), 313-341.
70. Kasthuber, E. R., and Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in context. *Cell*, 170(6), 1062-1078.

71. Muller, P. A., and Vousden, K. H. (2014). Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer cell*, 25(3), 304-317.
72. Zhou, X., Hao, Q., and Lu, H. (2019). Mutant p53 in cancer therapy—the barrier or the path. *Journal of molecular cell biology*, 11(4), 293-305.
73. Negrini, S., Gorgoulis, V. G., and Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(3), 220-228.
74. Bergh, J., Norberg, T., Sjögren, S., Lindgren, A., and Holmberg, L. (1995). Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nature medicine*, 1(10), 1029-1034.
75. Aas, T., Børresen, A. L., Geisler, S., Smith-Sørensen, B., Johnsen, H., Varhaug, J. E., Alksen, L.A., and Lønning, P. E. (1996). Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nature medicine*, 2(7), 811-814.
76. Shelling, A. N. (1997). Role of p53 in drug resistance in ovarian cancer. *The Lancet*, 349(9054), 744-745.
77. Wilson, W. H., Teruya-Feldstein, J., Fest, T., Harris, C., Steinberg, S. M., Jaffe, E. S., and Raffeld, M. (1997). Relationship of p53, bcl-2, and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*, *The Journal of the American Society of Hematology*, 89(2), 601-609.
78. Horio, Y., Takahashi, T., Kuroishi, T., Hibi, K., Suyama, M., Niimi, T., Shimokata, K., Yamakawa, K., Nakamura, Y., Ueda, R., and Takahashi, T. (1993). Prognostic significance of p53 mutations and 3p deletions in primary resected non-small cell lung cancer. *Cancer research*, 53(1), 1-4.
79. Hamada, M., Fujiwara, T., Hizuta, A., Gochi, A., Naomoto, Y., Takakura, N., Takahashi, K., Roth, J.A., Tanaka N., and Orita, K. (1996). The p53 gene is a potent determinant of chemosensitivity and radiosensitivity in gastric and colorectal cancers. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 122(6), 360-365.
80. Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V., and Kastan, M. B. (1992). Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(16), 7491-7495.
81. Vazquez, A., Bond, E. E., Levine, A. J., and Bond, G. L. (2008). The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature reviews Drug discovery*, 7(12), 979.
82. Green, D. R., and Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 458(7242), 1127-1130.

83. Hedgecock, E. M., Sulston, J. E., and Thomson, J. N. (1983). Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 220(4603), 1277-1279.
84. Fuchs, Y., and Steller, H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(6), 329.
85. Xu, D. C., Arthurton, L., and Baena-Lopez, L. A. (2018). Learning on the fly: the interplay between caspases and cancer. *BioMed research international*, 2018.
86. İnternet: PhTAD türevli bileşikler ve kullanım alanları URL: <https://tr.apicmo.com/heterocycles-introduced/> Son Erişim Tarihi: 07.07.2019
87. Nguyen, L. A., He, H., and Pham-Huy, C. (2006). Chiral drugs: an overview. *International journal of biomedical science: IJBS*, 2(2), 85.
88. Sekhon, B. S. (2010). Enantioseparation of chiral drugs—an overview. *Int J Pharm Technol Res*, 2, 1584-1594.
89. İnternet: PhTAD türevli bileşikler ve kullanım alanları URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Triazole> Son Erişim Tarihi: 07.07.2019
90. Patel, N. B., Khan, I. H., and Rajani, S. D. (2010). Pharmacological evaluation and characterizations of newly synthesized 1, 2, 4-triazoles. *European journal of medicinal chemistry*, 45(9), 4293-4299.
91. Corigliano, D. M., Syed, R., Messineo, S., Lupia, A., Patel, R., Reddy, C., Dubey, P. K., Colica, C., Amato, R., De Sarro, G., Alcaro, S., Indrasena, A., and Brunetti, A. (2018). Indole and 2,4-Thiazolidinedione conjugates as potential anticancer modulators. *PeerJ*, 6, e5386.
92. Tseng, C. H. (2017). Rosiglitazone reduces breast cancer risk in Taiwanese female patients with type 2 diabetes mellitus. *Oncotarget*, 8(2), 3042.
93. Niu, D., and Hoye, T. R. (2014). The aromatic ene reaction. *Nature chemistry*, 6(1), 34.
94. Oikonomou, K., Georgiou, D., Katsamakas, S., Hadjipavlou-Litina, D., and Elemen, Y. (2015). Sulfanyl 5H-dihydropyrrole derivatives via 1, 3-dipolar cycloaddition, their further chemical manipulation and antioxidant activity. *ARKIVOC: Online Journal of Organic Chemistry*, 2015.
95. Gul, M., Elemen, Y., Pelit, E., Derneksi, E., Georgiou, D., Oikonomou, K., Lis, T., and Szafert, S. (2017). Synthesis of PhTAD-substituted dihydropyrrole derivatives via stereospecific C–H amination. *Research on Chemical Intermediates*, 43(2), 1031-1045.
96. İnternet: Hücre kültürü çalışmaları URL: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PJ1563-PJT1267-COL31122-Gibco-Cell-Culture-Basics-Handbook-Global-FLR.pdf> Son Erişim Tarihi: 06.02.2019

97. İnternet:Hücre kültürü çalışmaları URL: http://aquafind.com/articles/Cell_Culture.php Son Erişim Tarihi: 06.02.2019
98. Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1409-1416.
99. Lee, A. V., Oesterreich, S., and Davidson, N. E. (2015). MCF-7 cells—Changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 107(7).
100. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
101. Grela, E., Ząbek, A., and Grabowiecka, A. (2015). Interferences in the Optimization of the MTT Assay for Viability Estimation of *Proteus mirabilis*. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 7(4), 159.
102. 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), e0155772.
103. İnternet: Sitotoksik aktivite testleri URL: <https://www.aceabio.com/products/icelligence/> Son Erişim Tarihi: 06.02.2019
104. İnternet: Sitotoksisite ve metabolik aktivite ölçüm testi (MTT) URL: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/fundamental-techniques-in-cell-culture.pdf Son Erişim Tarihi: 06.20.2019
105. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.
106. 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.
107. Xue, X., Lindstrom, A., and Li, Y. (2019). Porphyrin-based nanomedicines for cancer treatment. *Bioconjugate chemistry*, 30(6), 1585-1603.
108. El-Sherief, H. A., Youssif, B. G., Bukhari, S. N. A., Abdelazeem, A. H., Abdel-Aziz, M., and Abdel-Rahman, H. M. (2018). Synthesis, anticancer activity and molecular modeling studies of 1, 2, 4-triazole derivatives as EGFR inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 156, 774-789.
109. Pöthig, A., and Casini, A. (2019). Recent Developments of Supramolecular Metal-based Structures for Applications in Cancer Therapy and Imaging. *Theranostics*, 9(11), 3150.

110. Kidwai, M., Venkaramanan, R., Mohan, R., and Sapra, P. (2002). Cancer chemotherapy and heterocyclic compounds. *Current medicinal chemistry*, 9(12), 1209-1228.
111. Kaur, R., Rani, V., and Abbot, V. (2017). Recent synthetic and medicinal perspectives of pyrroles: An overview. *J Pharm Chem Chem Sci*. 2017; 1 (1): 17-32. *J Pharm Chem Chem Sci* 2017 Volume 1, Issue 1.
112. Chohan, Z. H., Sumrra, S. H., Youssoufi, M. H., and Hadda, T. B. (2010). Metal based biologically active compounds: Design, synthesis, and antibacterial/antifungal/cytotoxic properties of triazole-derived Schiff bases and their oxovanadium (IV) complexes. *European journal of medicinal chemistry*, 45(7), 2739-2747.
113. Kaur, R., Ranjan Dwivedi, A., Kumar, B., and Kumar, V. (2016). Recent developments on 1, 2, 4-triazole nucleus in anticancer compounds: a review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 16(4), 465-489.
114. H Zhou, C., and Wang, Y. (2012). Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. *Current medicinal chemistry*, 19(2), 239-280.
115. Hiremath, S. B., and Devendrappa, S. L. (2018). Safety and efficacy of tirapazamine as anti-cancer drug: a meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 7(4), 783.
116. Cuzick, J., Sestak, I., Forbes, J. F., Dowsett, M., Cawthorn, S., Mansel, R. E., Loibl, S., Bonanni, B., Evans, D. G., Howell, A., and IBIS-II investigators (2020). Use of anastrozole for breast cancer prevention (IBIS-II): long-term results of a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 395(10218), 117-122.
117. Goss, P. E. (1998). Pre-clinical and clinical review of vorozole, a new third generation aromatase inhibitor. *Breast cancer research and treatment*, 49(1), S59-S65.
118. Kaya, M. (2017). *Investigation of anticancer properties of the novel synthesised pyrrole derivatives as potential tyrosine kinase inhibitors*. Unpublished Master's Thesis, İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey
119. Kaur, M., and Singh, P. (2019). Targeting tyrosine kinase: development of acridone-pyrrole-oxindole hybrids against human breast cancer. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 29(1), 32-35.
120. Shi, F., Tao, Z. L., Yu, J., and Tu, S. J. (2011). Highly enantioselective synthesis of biologically important 2, 5-dihydropyrroles via phosphoric acid-catalyzed three-component reactions and evaluation of their cytotoxicity. *Tetrahedron: Asymmetry*, 22(23), 2056-2064.
121. Bavadi, M., Niknam, K., and Shahraki, O. (2017). Novel pyrrole derivatives bearing sulfonamide groups: Synthesis in vitro cytotoxicity evaluation, molecular docking and DFT study. *Journal of Molecular Structure*, 1146, 242-253.

122. Soares, M. I., Brito, A. F., Laranjo, M., Paixão, J. A., Botelho, M. F., and e Melo, T. M. P. (2013). Chiral 6, 7-bis (hydroxymethyl)-1H, 3H-pyrrolo [1, 2-c] thiazoles with anti-breast cancer properties. *European journal of medicinal chemistry*, 60, 254-262.
123. Oktem, O., Bildik, G., Senbabaoglu, F., Lack, N. A., Akin, N., Yakar, F., Urman D., Guzel Y., Balaban B., Iwase A., and Urman, B. (2016). Cytotoxicity and mitogenicity assays with real-time and label-free monitoring of human granulosa cells with an impedance-based signal processing technology intergrating micro-electronics and cell biology. *Reproductive Toxicology*, 60, 82-91.
124. Ke, N., Wang, X., Xu, X., and Abassi, Y. A. (2011). The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 740, 33–43.
125. Teng, Z., Kuang, X., Wang, J., and Zhang, X. (2013). Real-time cell analysis—a new method for dynamic, quantitative measurement of infectious viruses and antiserum neutralizing activity. *Journal of virological methods*, 193(2), 364-370.
126. Kustermann, S., Boess, F., Buness, A., Schmitz, M., Watzele, M., Weiser, T., Singer, T., Suter, L., and Roth, A. (2013). A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 27(5), 1589–1595.
127. Türker Şener, L., Albeniz, G., Dinç, B., and Albeniz, I. (2017). iCELLigence real time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Experimental and therapeutic medicine*, 14(3), 1866-1870.
128. İnternet: Tartışma ve Sonuç <https://www.aceabio.com/publications/> Son Erişim Tarihi: 07.05.2020
129. Beale, T. M., Bond, P. J., Brenton, J. D., Charnock-Jones, D. S., Ley, S. V., and Myers, R. M. (2012). Increased endothelial cell selectivity of triazole-bridged dihalogenated A-ring analogues of combretastatin A–1. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(5), 1749-1759.
130. Diaz-Perez, S., Kane, N., Kurmis, A. A., Yang, F., Kummer, N. T., Dervan, P. B., & Nickols, N. G. (2018). Interference with DNA repair after ionizing radiation by a pyrrole-imidazole polyamide. *PloS one*, 13(5).
131. Fuchs, Y., and Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147(4), 742-758.
132. Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87.
133. Plati, J., Bucur, O., and Khosravi-Far, R. (2008). Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of cellular biochemistry*, 104(4), 1124-1149.

134. Fulda, S. (2015, April). Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Seminars in cancer biology* (Vol. 31, pp. 84-88).
135. Mousazadeh, H., Milani, M., Zarghami, N., Alizadeh, E., and Safa, K. D. (2017). Study of the Cytotoxic and Bactericidal Effects of Sila-substituted Thioalkyne and Mercapto-thione Compounds based on 1, 2, 3-Triazole Scaffold. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 121(5), 390-399.
136. Khodair, A. I., Attia, A. M., Gendy, E. A., Elshaier, Y. A., and El-Magd, M. A. (2019). Discovery of New S-Glycosides and N-Glycosides of Pyridine-biphenyl System with Antiviral Activity and Induction of Apoptosis in MCF 7 Cells. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 56(6), 1733-1747.
137. Zhou, X., Hao, Q., and Lu, H. (2018). Mutant p53 in cancer therapy—the barrier or the path. *Journal of molecular cell biology*, 11(4), 293-305.
138. Hall, P., Ray, A., Lemoine, N., Midgley, C., and Krausz, T. (1991). p53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology. *Lancet (British edition)*, 338(8765).
139. Montero, S., Guzmán, C., Vargas, C., Ballestín, C., Cortés-Funes, H., and Colomer, R. (2001). Prognostic value of cytosolic p53 protein in breast cancer. *Tumor biology*, 22(5), 337-344.
140. Lacroix, M., Toillon, R. A., and Leclercq, G. (2006). p53 and breast cancer, an update. *Endocrine-related cancer*, 13(2), 293-325.
141. Kaabinejadian, S., Fouladdel, S. H., Ramezani, M., and Azizi, E. (2008). p53 expression in MCF-7, T47D and MDA-MB 468 breast cancer cell lines treated with adriamycin using RT-PCR and immunocytochemistry. *J Biol Sci*, 8, 380-385.
142. Liu, G., Schwartz, J. A., and Brooks, S. C. (2000). Estrogen receptor protects p53 from deactivation by human double minute-2. *Cancer research*, 60(7), 1810-1814.
143. Emily, H. Y. C., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S. J. (2001). BCL-2, BCL-XL sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular cell*, 8(3), 705-711.
144. Ren, D., Tu, H. C., Kim, H., Wang, G. X., Bean, G. R., Takeuchi, O., Jeffers, J. R., Zambetti, G. P., Hsieh, J. J., and Cheng, E. H. (2010). BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6009), 1390-1393.
145. Chen, H. C., Kanai, M., Inoue-Yamauchi, A., Tu, H. C., Huang, Y., Ren, D., Kim, H., Takeda, S., Reyna, D. E., Chan, P. M., Ganesan, Y. T., Liao, C. P., Gavathiotis, E., Hsieh, J. J., and Cheng, E. H. (2015). An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family. *Nature cell biology*, 17(10), 1270-1281.

146. Mohan, S., Abdelwahab, S. I., Kamalidehghan, B., Syam, S., May, K. S., Harmal, N. S., Shafifiyaz, N., Hadi, A. H., Hashim, N. M., Rahmani, M., Taha, M. M., Cheah, S. C., and Zajmi, A. (2012). Involvement of NF- κ B and Bcl2/Bax signaling pathways in the apoptosis of MCF7 cells induced by a xanthone compound Pyranocycloartobiloxanthone A. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 19(11), 1007–1015.
147. Inoue-Yamauchi, A., Jeng, P. S., Kim, K., Chen, H. C., Han, S., Ganesan, Y. T., Ishizawa, K., Jebiwott, S., Dong, Y., Pietanza, M.C., Kris, M.G., James J. Hsieh, J.J., Cheng E.H., and Hellmann, M. D. (2017). Targeting the differential addiction to anti-apoptotic BCL-2 family for cancer therapy. *Nature communications*, 8(1), 1-14.
148. Wang, C., Wang, B., Hou, S., Xue, L., Kang, Z., Du, J., Li Y., Liu X., Wang Q., and Zhang, C. (2019). Discovery of novel nonsteroidal VDR agonists with novel diarylmethane skeleton for the treatment of breast cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 163, 787-803.
149. Roy, R., Chun, J., and Powell, S. N. (2012). BRCA1 and BRCA2: important differences with common interests. *Nature Reviews Cancer*, 12(5), 372-372.
150. Nalabothula, N., Al-jumaily, T., Eteleeb, A. M., Flight, R. M., Xiaorong, S., Moseley, H., Rouchka, E. C., and Fondufe-Mittendorf, Y. N. (2015). Genome-wide profiling of PARP1 reveals an interplay with gene regulatory regions and DNA methylation. *PLoS one*, 10(8).
151. Węsierska-Gądek, J., Zulehner, N., Ferk, F., Składanowski, A., Komina, O., and Maurer, M. (2012). PARP inhibition potentiates the cytotoxic activity of C-1305, a selective inhibitor of topoisomerase II, in human BRCA1-positive breast cancer cells. *Biochemical pharmacology*, 84(10), 1318-1331.
152. Wang, X., Chen, M., Zhou, J., and Zhang, X. (2014). HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy. *International journal of oncology*, 45(1), 18-30.
153. Wu, J., Liu, T., Rios, Z., Mei, Q., Lin, X., and Cao, S. (2017). Heat shock proteins and cancer. *Trends in pharmacological sciences*, 38(3), 226-256.
154. Jäättelä, M. (1999). Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annals of medicine*, 31(4), 261-271.
155. Beere, H. M. (2004). The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of cell science*, 117(13), 2641-2651.
156. Liu, T., Daniels, C. K., and Cao, S. (2012). Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacology & therapeutics*, 136(3), 354-374.
157. Bepperling, A., Alte, F., Kriehuber, T., Braun, N., Weinkauff, S., Groll, M., Haslbeck, M., and Buchner, J. (2012). Alternative bacterial two-component small heat shock protein systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), 20407–20412.

158. Xia, Y., Rocchi, P., Iovanna, J. L., and Peng, L. (2012). Targeting heat shock response pathways to treat pancreatic cancer. *Drug discovery today*, 17(1-2), 35-43.
159. Joly, A. L., Wettstein, G., Mignot, G., Ghiringhelli, F., and Garrido, C. (2010). Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *Journal of innate immunity*, 2(3), 238-247.
160. Zoppino, F. C., Guerrero-Gimenez, M. E., Castro, G. N., and Ciocca, D. R. (2018). Comprehensive transcriptomic analysis of heat shock proteins in the molecular subtypes of human breast cancer. *BMC cancer*, 18(1), 700.
161. Stefan, C. J., Manford, A. G., Baird, D., Yamada-Hanff, J., Mao, Y., and Emr, S. D. (2011). Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER-plasma membrane contact sites. *Cell*, 144(3), 389-401.
162. Sisinni, L., Pietrafesa, M., Lepore, S., Maddalena, F., Condelli, V., Esposito, F., and Landriscina, M. (2019). Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in breast cancer: The balance between apoptosis and autophagy and its role in drug resistance. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 857.
163. Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., and Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nature cell biology*, 7(8), 766-772.
164. Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(2), 89-102.
165. Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Developmental cell*, 3(1), 99-111.
166. Booth, L., Roberts, J. L., Cash, D. R., Tavallai, S., Jean, S., Fidanza, A., Cruz-Luna, T., Siembiba, P., Cycon, K. A., Cornelissen, C. N., and Dent, P. (2015). GRP78/BiP/HSPA5/Dna K is a universal therapeutic target for human disease. *Journal of cellular physiology*, 230(7), 1661-1676.
167. Dadey, D. Y., Kapoor, V., Hoye, K., Khudanyan, A., Collins, A., Thotala, D., and Hallahan, D. E. (2017). Antibody Targeting GRP78 Enhances the Efficacy of Radiation Therapy in Human Glioblastoma and Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines and Tumor Models. *Clinical Cancer Research*, 23(10), 2556-2564.
168. Lin, Y. G., Shen, J., Yoo, E., Liu, R., Yen, H. Y., Mehta, A., Rajaei, A., Yang, W., Mhawech-Fauceglia, P., DeMayo, F.J., Gill, P., Lee A.S., and Lydon, J. (2015). Targeting the glucose-regulated protein-78 abrogates Pten-null driven AKT activation and endometrioid tumorigenesis. *Oncogene*, 34(43), 5418-5426.
169. Chen, Y. G., Ashok, B. T., Liu, X., Garikapaty, V. P. S., Mittelman, A., and Tiwari, R. K. (2003). Induction of heat shock protein gp96 by immune cytokines. *Cell stress & chaperones*, 8(3), 242.

170. Zhang, K., Peng, Z., Huang, X., Qiao, Z., Wang, X., Wang, N., Xi, H., Cui, J., Gao, Y., Huang, X., Gao, H., Wei, B., and Chen, L. (2017). Phase II Trial of Adjuvant Immunotherapy with Autologous Tumor-derived Gp96 Vaccination in Patients with Gastric Cancer. *Journal of Cancer*, 8(10), 1826–1832.
171. Zhang G.P., Lu Y.Y., Lv J.C., Ou H.J. (2006). Effect of ursolic acid on caspase-3 and PARP expression of human MCF-7 cells. *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica*. 31(2):141-144.
172. Jänicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., and Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9357-9360.
173. Kagawa, S., Gu, J., Honda, T., McDonnell, T. J., Swisher, S. G., Roth, J. A., and Fang, B. (2001). Deficiency of caspase-3 in MCF-7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clinical cancer research*, 7(5), 1474-1480.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Maşuk AKŞAHİN
 Uyuğu : Türkiye Cumhuriyeti
 Doğum tarihi ve yeri : 01.01.1988- Diyarbakır
 Medeni hali : Bekar
 e-posta : maşuk_aksahin@hotmail.com

Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Lisans	Dicle Üniversitesi	2013
Yüksek Lisans	Amasya Üniversitesi	2020
İş Deneyimi/Yıl	Çalıştığı Yer	Görevi
2020	TÜSEB	Proje personeli

Yabancı Dili

İngilizce

Bilimsel Faaliyetler (Yayınlar, Bildiriler, Katıldığı Projeler)

1. Akşahin, M., Ayar A., Gül, M., Mesci, S. (2019). Antioxidant and Cytotoxic Activity Studies of MCF-7 Cell Line of PhTAD-substituted Dihydropyrrole Derivatives Compounds, 7th Drug Chemistry Conference: Design, Synthesis, Production and Standardization of Drug Active Substances, Antalya, Turkey. (Sözlü sunum ve poster)
2. Akşahin, M., Yazgan, B., Mesci, S. Ayar A., Gül, M., Yıldırım, T. (2020). 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 Ankara, Turkey. (Sözlü sunum)
3. Yazgan, B., Akşahin, M., Gül, M., Ayar A., Yıldırım, T. (2020). The effect of dihydropyrrole derivatives compounds on apoptotic activity in the breast cancer cell line, 3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences Ankara, Turkey. (Sözlü sunum)