



**BENZOFURAN SÜBSTİTÜE KALKON TÜREVLERİNİN
İNSAN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hülya GÜNDÜZ



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BENZOFURAN SÜBSTİTÜE KALKON TÜREVLERİNİN İNSAN MEME
KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Hülya GÜNDÜZ

Doç. Dr. Ferda ARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2019

TEZ ONAYI

Hülya GÜNDÜZ tarafından hazırlanan “Benzofuran Sübstitüe Kalkon Türevlerinin İnsan Meme Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ferda ARI

Başkan: Doç. Dr. Ferda ARI
Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye: Doç. Dr. Egemen Dere
Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe Taner
Bursa Teknik Üniversitesi,
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Biyomühendislik Bölümü

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü

01/08/2019

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

-tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

-görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

-başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,

-atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,

-kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,

-ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

01/08/2019

Hülya GÜNDÜZ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BENZOFURAN SÜBSTİTÜE KALKON TÜREVLERİNİN İNSAN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hülya GÜNDÜZ

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ferda ARI

Kanser, genetik ve çevresel koşullar ile hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalmasıyla ortaya çıkan kompleks bir hastalıktır. Dünya çapında kadınlar arasında meme kanseri en sık görülen ve akciğer kanserinden sonra ölüm oranı en fazla olan kanser türüdür. Meme kanseri için yeni tedavilerin gelişmesine rağmen tedavideki başarı hala tatmin edici değildir. Bu sebeple, meme kanseri hastalarında uygulanabilecek yeni yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir. Günümüzde kullanılan antikanser ilaçların çoğu bitkisel kökenlidir ve halen yeni etkin bileşikler de araştırılmaktadır. Kalkon türevleri doğada bol miktarda bulunan aromatik bileşiklerdir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, kalkon türevlerin birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu ve kanser tedavisinde umut verici olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, sentezi ve karakterizasyonu yapılmış olan iki benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin (Kompleks 1 ve Kompleks 2) anti kanser etkileri insan meme kanseri hücre soylarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) araştırılmıştır. Komplekslerin hücre canlılığı üzerindeki etkisi 24, 48 ve 72 saat süreyle SRB canlılık testleriyle belirlenmiştir. Sitotoksite yanıtları ATP canlılık testi ile 48 ve 72 saat süreyle doğrulanmıştır. Komplekslerin sitotoksik aktivitesi sağlıklı insan hücre soyu olan BEAS-2B hücrelerinde de değerlendirilmiştir. Kalkon türevlerin sitotoksik etkilerinden sorumlu hücre ölümünü belirlemek amacıyla floresan boyama (Hoechst 33342 ve PI) yöntemi kullanılmıştır. Komplekslerin hücrelerde yara iyileşmesi üzerine etkileri MDA-MB-231 hücre soyunda araştırılmıştır.

Sonuç olarak, benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında doza ve zamana bağlı olarak hücre büyümesini engelledikleri belirlenmiştir. Ayrıca komplekslerin hücrelerde apoptozu indükleyerek, migrasyon yeteneklerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Alınan sonuçlara göre benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin meme kanseri tedavisinde etkili bir ajan olabileceği ve ileri analizlerin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, kalkonlar, sitotoksite

2019, xi+78 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF BENZOFURAN SUBSTITUTE CHALCONE DERIVATIVES ON HUMAN BREAST CANCER CELLS

Hulya GUNDUZ

Bursa Uludag University
Sciences and Art Faculty
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ferda ARI

Cancer is a complex disease that causes uncontrolled division and proliferation of cells by genetic and environmental conditions. Among women worldwide, breast cancer is the most common cancer with the highest mortality rate after lung cancer. Despite the recent development of new treatments for breast cancer, it is still not satisfactory. Therefore, new approaches should be developed for breast cancer patients. Herbal natural compounds are important in the treatment of cancer. Chalcone derivatives are aromatic compounds which are abundant in nature. In recent research, has shown chalcone derivatives have many biological activities and promising in the treatment of cancer. Therefore, in this thesis, the anti-cancer effects of two benzofuran substituted chalcone derivatives (Complex 1 and Complex 2) which were synthesized and characterized were investigated in human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231). The effect of complexes on cell viability was determined by SRB viability tests for 24, 48 and 72 hours. Cytotoxicity responses were confirmed by ATP viability test for 48 and 72 hours. Cytotoxic activity of complexes was also evaluated in healthy human cell line BEAS-2B cells. Fluorescent staining (Hoechst 33342 and PI) was used for to determine cell death responsible the cytotoxic effects of chalcone derivatives. The effects of complexes on wound healing were investigated in the MDA-MB-231 cell line. As a result, It has been identified benzofuran substituted chalcone derivatives inhibit cell growth time and dose dependent manner in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines.

In addition, it has been found that complexes induce apoptosis in cells and cause a decrease in migration ability. According to the results, it was concluded that benzofuran substituted chalcone derivatives can be an effective agent in the treatment of breast cancer and further analysis should be performed.

Keywords: Breast cancer, chalcones, cytotoxicity

2019, xi + 78 page

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince bana her konuda desteğini esirgemeyen, bilge ve deneyimleriyle yol gösteren sayın danışman hocam Doç. Dr. Ferda ARI'ya,

Çalışmalarım süresince bana yardımcı olan, sorularımı yanıtsız bırakmayan, sayın hocam Doç. Dr. Egemen DERE'ye

Bu tez çalışmasın da kullanılan; Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde sentezi ve karakterisasyonu yapılan benzofuran süstitüe kalkon türevleri ile katkılarından dolayı sayın hocam Demet Coşkun'a

Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan arkadaşım Hediye AVCI'ya,

Her konuda yanımda olan ve tez çalışma sürecimdeki tüm zorlukları benle beraber aşan canım nişanlım Taner ASLANTAŞ'a,

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ve hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak her zaman yanımda olan, bugünlere gelmemde en büyük emeğin sahibi canım aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Hülya GÜNDÜZ

01/08/2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
GİRİŞ	1
1. KAYNAK ÖZETLERİ	4
1.1. Kanser	4
1.2. Meme Kanseri	6
1.2.1. Meme Kanseri Hücre Soyları.....	7
1.2.2. Meme Kanseri ve Moleküler Biyolojisi.....	9
1.2.3. Meme Kanseri ve Apoptozis.....	10
1.3. Apoptozis	10
1.3.1. Apoptozisin İndüklenmesi	12
1.3.2. Apoptozisin Mekanizmaları.....	13
1.3.3. Apoptotik Hücrede Görülen Morfolojik Değişiklikler	17
1.3.4. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar	18
1.3.5. Apoptozisin Genetik Kontrolü	20
1.4. Flavonoidler	23
1.5. Kalkonlar.....	24
1.6. Benzofuranlar.....	24
1.7. Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite	26
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	27
2.1. Materyal	27
2.1.1. Kimyasal maddeler	27
2.1.2. Sarf malzemeler	27
2.1.3. Cihazlar	28
2.2. Yöntem.....	29
2.2.1. Benzofuran Süstitüe Kalkon Türevlerinin (Kompleks 1 ve Kompleks 2) Hazırlanması	29
2.2.2. Hücre Kültürü	29
2.2.2.1. Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması	29
2.2.2.2. Hücre Soylarının Pasajlanması	30
2.2.2.3. Hücre Soylarının Stoklanması	30
2.2.2.4. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	31
2.2.2.5. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı.....	31
2.2.3. SRB (Sulforhadamine B) Canlılık Metodu	31
2.2.4. ATP (adenozin trifosfat) Canlılık Metodu	32
2.2.5. Hoechst 33342, Propidiyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi	34
2.2.6. Yara İyileşmesi (Migrasyon)	35
2.2.7. İstatistiksel Analiz.....	36
3. BULGULAR	37
3.1. SRB Canlılık Testi Bulguları	37
3.2. ATP Canlılık Testi Bulguları	42
3.3. Faz/Kontrast Mikroskop İle Morfolojik Görüntü Bulguları	46
3.4. Hoechst 33342, Propidium İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi Bulguları	49
3.5. Yara İyileşmesi (Migrasyon Yeteneği) Bulguları	54
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	57

KAYNAKLAR DİZİNİ	64
ÖZGEÇMİŞ	74



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Santigrat Derece

Kısaltmalar	Açıklama
A31	İnsan melanoma
A549	İnsan akciğer kanser hücre soyu
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	Edinsel bağışıklık yetmezlik sendromu
AIF	Apoptosis indükleyici faktör
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive eden faktör
Apo-1	Fas ilişkili ölüm reseptörü
ATP	Adenozin trifosfat
B16	Fare melanoma
BAX	Bcl-2 ilişkili X proteini
Bcl	Gen ailesi
Bcl1	B hücre lenfoma geni1
Bcl2	B hücre lenfoma geni2
Bcl-XL	Bcl-2 ilişkili XL proteini
BEAS-2B	Sağlıklı akciğer hücre soyu
BH1-BH4	Bcl-2 homolog bölgesi
Bim	Gen
Bmf	Gen
BRCA1	Meme kanseri geni 1
BRCA2	Meme kanseri geni 2
BT-20	Meme kanser hücre soyu
C06	Kalkon türevi
CARD	Kaspaz takviye alanı
CaSki	İnsan ince bağırsak kanser soyu
CCRF-CEM	Akut lenfoblastik lösemi hücresi
CD95	Fas ilişkili ölüm reseptörü
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CDK-C	Siklin-siklin bağımlı kinaz
CDKI	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
C-MYC	Onkogen
CSF	Koloni uyarıcı faktör
CT26.WT	İnsan kolon kanser hücre soyu
DD	Ölüm domaini
DED	Kaspaz ölüm alanı
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksi ribonükleik asit
DR	Ölüm reseptörü
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
Er	Östrojen hormon reseptörü
FADD	Fas ilişkili ölüm alanı
Fas	Gen
FasL	Gen
FBS	Fetal sıgır serumu
GAP	GTPaz aktive edici proteinler
GDP	Guanozin difosfat
GEF	Guanine exchange factor
GTP	Guanozin trifosfat
H1975	İnsan akciğer kanser hücre soyu
HCT116	İnsan kolon kanser hücre soyu
HeLa	İnsan rahim ağzı kanser hücre soyu
HEPG-2	İnsan karaciğer kanser hücre soyu
HER2	Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HF-6	İnsan foliküler lenfoması
Ht29	İnsan kolon kanser hücre soyu
HUVEC	İnsan endotel hücre soyu
IAP	Apoptoz inhibitörleri
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
ICAD	Kaspazla aktive edilen DNaz inhibitörü
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü inducing ligand
IL2	İnterlökin2
L2H17	Kalkon türevi
LC50	% 50 letal konsantrasyon
LC70	% 70 letal konsantrasyon
LNCaP	İnsan prostat kanser hücre soyu
MCF-7	İnsan meme kanser hücre soyu
MDA-MB-231	İnsan meme kanser hücre soyu
MOMP	Mitokondri dışı membran permeabilizasyonu
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NCI-H460	İnsan akciğer kanser hücre soyu
NGF	Nöron büyüme faktörü
p21	Protein 21
p53	Protein 53
PANC-1	İnsan pankreas kanser hücre soyu
PARP	Poli(ADP-riboz)polimeraz
PBS	Fosfat tuz tamponu
PC-3	İnsan prostat kanser hücre soyu
PI	Propidyum iyodür
PR	Progesteron hormonu reseptör
RAS	Onkogen
Rb	Retinoblastoma

RIP	Reseptör etkileşim protein
ROCK I	Rho ilişkili sarmal oluşturan kinaz I
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SMAC	İkinci mitokondriya türevi kaspaz
Smmc7221	İnsan karaciğer kanser hücre soyu
SNU-398	İnsan karaciğer kanser hücre soyu
SNU-423	İnsan karaciğer kanser hücre soyu
SRB	Sulforhodamine B
SW	İnsan kolon kanser hücre soyu
TCA	Trikloroasetik asit
TNBC	Üçlü negatif meme kanserleri
TNF	Tümör nekrozis faktör
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
TRADD	TNFR-1 ilişkili ölüm protein
TRAIL	TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
USA	United States of America
UV	Ultraviyole
WRL68	İnsan karaciğer kanser hücre soyu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Kanser ve normal hücre çoğalması (Anonim 2015)	5
Şekil 1.2. Çeşitli hücre ölüm tipleri (Bortner ve Cidlowski 2014)	11
Şekil 1.3. Ekstrinsik (Dışsal) apoptozis yolağı (Sartorius ve ark. 2001).	15
Şekil 1.4. Mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptozis yolağı (Zimmermann ve ark. 2001) 16	
Şekil 1. 5. Apoptozis ve nekrozisde görülen morfolojik değişiklikler (Hekim 2014)	20
Şekil 1.6. Flavonoid yapısı (Taşkın 2016)	23
Şekil 1.7. Kalkon yapısı (Taşkın 2016).....	24
Şekil 1.8. Benzofuran halkası (Taşkın 2016).....	24
Şekil 1.9. Tezde kullanılan komplekslerin kimyasal yapıları (Coşkun ve Ahmedzade 2008, Coşkun ve ark. 2011)	25
Şekil 2.1. Lusiferin/lusiferaz biyoluminesans tepkimesi (Roda ve ark. 2009).....	33
Şekil 3.1. Benzofuran sübstitüe kalkon türevi (Kompleks 1 ve Kompleks 2) ile muamele edilen BEAS-2B hücrenin 24 ve 48 saat SRB testine göre canlılık yüzdelerinin grafiğı. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir.***Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (p<0,001) ifade etmektedir.....	38
Şekil 3.2. Benzofuran sübstitüe kalkon türevi (Kompleks 1) ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat SRB testine göre canlılık yüzdelerinin grafiğı. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. ***Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (p<0,001) ifade etmektedir.....	39
Şekil 3.3. Benzofuran sübstitüe kalkon türevi (Kompleks 2) ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat SRB testine göre canlılık yüzdelerinin grafiğı. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir.***Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (p<0,001) ifade etmektedir	40
Şekil 3.4. Benzofuran sübstitüe kalkon türevi (Kompleks 1) ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin ATP canlılık testi sonucuna göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir. ***Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (p<0,001) ifade etmektedir	43
Şekil 3.5. Benzofuran sübstitüe kalkon türevi (Kompleks 2) ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin ATP canlılık testi sonucuna göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir. ***Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (p<0,001) ifade etmektedir.....	44
Şekil 3.6. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerin Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 48 saatlik muamele sonrasındaki faz/kontrast görüntüleri.....	47
Şekil 3.7. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerin Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 72 saatlik muamele sonrasındaki faz/kontrast görüntüleri.....	48
Şekil 3.8. MCF-7 hücrelerini Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 48 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri (oklar piknotik hücreleri göstermektedir) 50	
Şekil 3.9. MDA-MB-231 hücrelerini Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 48 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri (oklar piknotik hücreleri göstermektedir) 51	

Şekil 3.10. MCF-7 hücrelerini Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 72 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri (oklar piknotik hücreleri göstermektedir)52	
Şekil 3.11. MDA-MB-231 hücrelerini Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 72 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri (oklar piknotik hücreleri göstermektedir)53	
Şekil 3.12. Benzofuran sübtitüe kalkon türevinin (Kompleks 1) MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyon yeteneği üzerindeki etkisi.....	55
Şekil 3.13. Benzofuran sübtitüe kalkon türevinin (Kompleks 2) uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyon yeteneği üzerindeki etkisi.....	56



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Meme Kanseri Hücre Soylarının Özellikleri (Uğurlu 2013).....	8
Çizelge 3.1. BEAS-2B, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının SRB canlılık testine göre hesaplanan IC_{50} ve IC_{70} değerleri (IC_{50} : Hücrelerin %50'sini öldüren doz, IC_{70} : Hücrelerin %70'ini öldüren doz).....	41
Çizelge 3.2. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının ATP canlılık testine göre hesaplanan IC_{50} ve IC_{70} değerleri (IC_{50} : Hücrelerin %50'sini öldüren doz, IC_{70} : Hücrelerin %70'ini öldüren doz).	45



GİRİŞ

Kanser, daha çok gelişmiş ülkelerde bulunması ile dünyanın hemen hemen her yerinde rastlanan ve insanların ölmesinin başlıca nedenlerden biri olan; genetiğe, yaşa, tütün tüketimine, beslenmeye ve çevresel koşullara göre değişebilen kompleks bir hastalıktır (Peto 2001, Urruticoechea ve ark. 2010). Son 30 yılda farklı kanser türlerin görülmesi neredeyse ikiye katlanmıştır ve şayet daha etkili tedavi metotları geliştirilmezse gelecek yıllarda bu sayının giderek artacağı öngörülmektedir (Globocan 2018).

Kanser gelişiminin temelinde hücrel proliferasyonun artması olduğu gibi apoptotik süreçlerinde baskılanması olabilmektedir. Apoptoz kanser oluşumuna sebep olacak sitotoksositeye karşı önemli bir hücre ölüm mekanizmasıdır (Lu ve ark. 2012). Çok hücreli organizmalarda mitoz ile meydana gelen hücreler ve apoptozdan ötürü ölen hücreler arasında çok hassas bir denge bulunmaktadır. Bu dengedeki bozulma kanserin oluşmasına sebep olmaktadır (Cotter 2009). Organizmada kanser geliştiğinde, ölüm sinyali alması gereken hücrelerde bu sinyallerin alınmadığı ve bu nedenle hassas dengenin bozulduğu ortaya çıkmaktadır (Wong 2011). Tümör baskılayıcı olarak bilinen p53 genin zarar görmesi sonucunda apoptoz sinyali alması gerekli olan hücreler bu sinyali almamakta ve bölünüp, gelişmeye devam ettikleri bilinmektedir (Bauer ve Helfand 2006, Morton ve ark. 2010). Ayrıca organizmada kanser vaziyetinde; kaspaz-3 etkinliğinin yitirilmesi, ölüm sinyallerinde hasarlar meydana gelmesi ve pro-apoptotik/antiapoptotik protein dengesinde bozulmalar gibi patojenik nedenler gözlemlenmektedir (Hunter ve ark. 2007, Wong 2011). Bu nedenlerden kanser tedavilerinde apoptozu uyarıcı ajanların kullanıldığı bilinmektedir (Cotter 2009, Wong 2011). Literatür incelendiğinde birçok çalışmada, doğal bileşiklerin apoptozu indükleyici antikanser aktivitesinin bildirildiği görülmüştür.

Meme kanseri, değişik moleküllerde meydana gelen farklılıklarla; yaşama, büyüme ve terapi gibi etkenlere bağlı olarak tedaviye yanıt vermede farklılık arz eden türleri olan heterojenik yapıda olan bir hastalıktır (Di Cosimo ve Baselga 2010). Meme kanseri tedavilerinde; radyoterapi, kemoterapi, cerrahi yöntemler, hormon tedavisi ve hedef odaklı tedaviler uygulanmaktadır (Di Cosimo ve Baselga 2010, Tryfonidis ve ark. 2015).

Ancak uygulanan bu tedavi yöntemlerinde hem tedaviye karşı direnç gelişebilmekte hem de bu tedaviler çeşitli yan etkilere neden olabilmektedir (Selwood 2009, Collins ve ark. 2011). Bu kritik etkilerden dolayı doğal bileşiklere olan alaka artmıştır (Nobili ve ark. 2009).

Flavonoidler, kimyasal yapılarında farklı fenolik gruplar bulunduran ve biręok doğal üründe bulunan poli-fenolik bileşiklerin bir alt grubunu oluşturmaktadır. Bu moleküllerin büyük kısmı bitkinin tohum, çiçek ve yapraklarında bulunur. Flavonoidler meyve ve sebzelerin doğal yapılarında var olan antioksidanlar olarak da bilinmektedirler. Bilhassa bitkilerin renk pigmentlerinden sorumlu olan düşük moleküler ağırlıktaki bileşiklerdir (Perez-Vizcaino ve Duarte 2010). Flavonoidlerin anti-viral, anti-alerjik, anti-inflamatuar, anti-diyabetik, anti-bakteriyel, anti-mikrobiyal gibi biręok farmakolojik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Duarte ve ark. 2001). Geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahip olan bu bileşikler aynı zamanda serbest radikal söndürme, lipid peroksidasyonunu inhibe etme ve metallerle şelat oluşturma gibi biręok önemli özelliklere de sahiptirler. Bu özelliklerinden ötürü hücreleri kanser, kardiyovasküler ve enflamasyon hastalık gibi patolojik hasarlardan korudukları bilinmektedir (Heim ve ark. 2002).

Flavonoidlerin bir alt grubu olan kalkonlar da oldukça yaygın biyolojik aktivite spektrumuna sahip bileşiklerdir (Singh ve ark. 2014). Kalkonlar çoğunlukla aromatik halkada poli-hidroksi gruplar ihtiva etmektedirler. Bu fenolik grupların serbest radikal söndürücü özellikleri, kalkonca zengin bitki ekstraktlarının gıdaların bozulmasını önleyici madde ya da ilaç olarak kullanımı açısından ilgi görmelerine neden olmuştur (Mahapatra ve ark. 2015). Yapı aktivite ilişkisi ęalıřmaları aril halkalarındaki elektron çekici/sağlayıcı veya aril/heteroaril grupları ile türevlendirilen kalkonların anti-kanser aktivite özelliklerine sahip olduklarını göstermiştir. Bunun yanı sıra sentetik ve doğal kalkonların çoğunun sahip oldukları biyolojik potansiyeline bağlı olarak biręok kanser hücrelerinde anti-kanser aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Mahapatra ve ark. 2015). 2012 yılında Zhang ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir ęalıřmada on üç yeni kalkon türevinin sentezi geręekleřtirilmiřtir. Sentezledikleri bu bileşiklerin anti-kanser aktivitelerine bakılmış ve sonuç olarak sentezlenmiş tüm bu bileşiklerin anti kanser aktiviteye neden oldukları rapor edilmiştir (Zhang ve ark. 2012).

Başka bir çalışmada ise çeşitli kalkon türevlerinin sitotoksik aktiviteleri; A549, MCF-7, PC3, WRL68 ve HT-29 kanser hücreleri üzerinde MTT canlılık analizi ile araştırılmış ve çalışma sonucunda kalkon türevlerinin tüm kanser hücre hatlarına karşı yüksek sitotoksik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (Syam ve ark.m2012).

Tüm bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında, sentezi ve karakterizasyonu yapılmış olan benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin, birbirinden farklı özelliklere sahip MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre soyları üzerinde sitotoksik, apoptotik etkileri ve migrasyon yetenekleri araştırılmıştır.



1. KAYNAK ÖZETLERİ

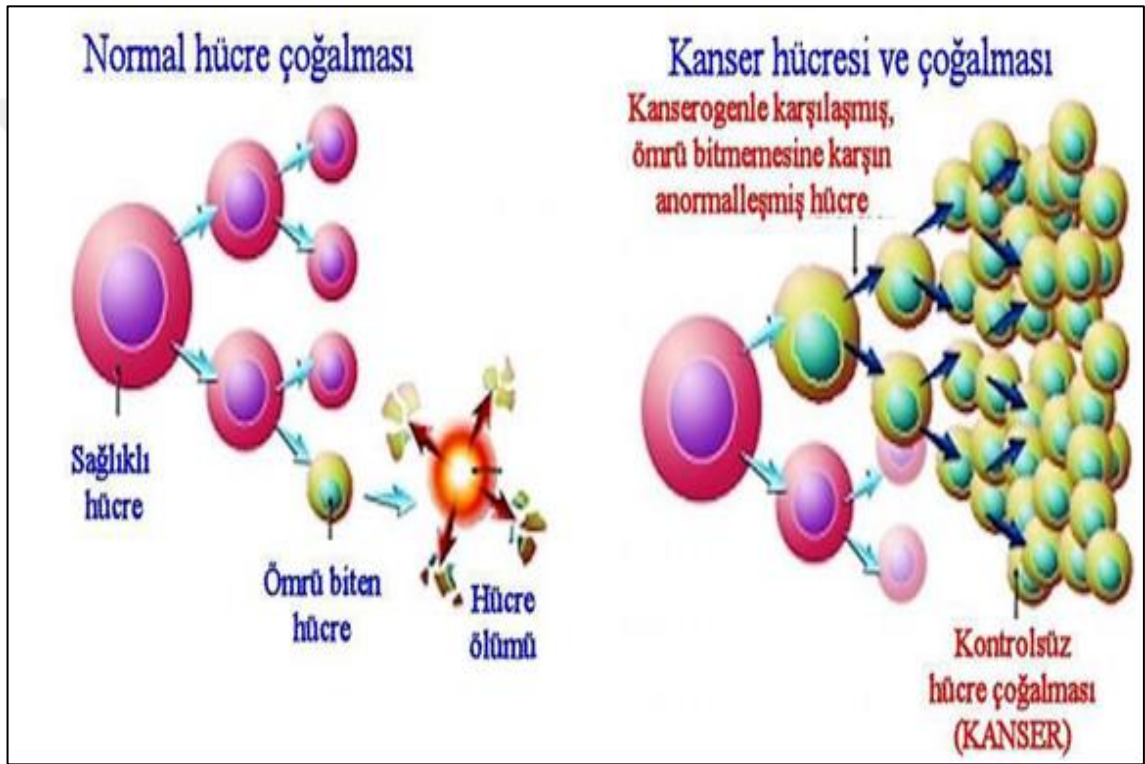
1. 1. Kanser

Kanser, hücrelerdeki DNA hasarı ile hücrelerin anormal veya kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve çoğalması olarak bilinmektedir (Şekil 1.1). Karmaşık birçok etkileşim ihtiva eden hücre siklusundaki düzenlenme hataları; hücre bölünme evrelerindeki kontrolün bozulmasına bağlı olarak kontrol noktalarındaki değişimler kanser oluşumuna neden olmaktadır. Kanser gelişiminde, hücre siklusunun kontrol kaybı, apoptozun engellenmesi, DNA hasarı veya onarımının kritik yolları önemli aşamaları temsil etmektedirler (Karimi ve ark. 2014).

DNA hasarı; fiziksel ajanlar (iyonizan radyasyon, UV radyasyon vb.) ve kimyasal ajanlar (toksik metaller, benzopiren, aflatoksin, kemoterapi ilaçları vb.) gibi ekzojen etkenlerden oluşabileceği gibi, kimyasal değişiklikler (metilasyon, deaminasyon), yanlış eşleşmeler (delesyonlar/insersiyon), oksidatif hasar ve replikasyon hataları gibi endojen etkenlerden de oluşabilmektedir (Wang ve ark. 2014). Bu gibi DNA hasarlarında, yanlış bilgi aktarımını veya bilgi kaybını önlemek maksadıyla DNA hasarının şekline ve hangi hücre evresinde bulunduğuna bağlı olarak DNA onarımı gerek olmaktadır. Onarılma olmadığı zaman tümör hücreleri veya gelişimsel bozukluklar oluşabilmektedir (Özcan ve ark. 2008).

Tümör oluşumunda, tümör baskılayıcı genler (p53, retinoblastoma (Rb)) ve onkogenler (Her2, c myc, ras vb) olmak üzere iki tür gen grubunun rolü bulunmaktadır. Tümör baskılayıcı genler, hücre bölünmesini doğrudan veya dolaylı olarak kontrol altına alarak kanser gelişimini baskılamaktadır. Tümör baskılayıcı genlerin her iki allelerinde meydana gelen mutasyonlar bu özelliklerini yitirmelerine neden olmakta ve hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek ekstrem hücre proliferasyonuna neden olabilmektedir. Onkogenler ise kanser oluşumunu doğrudan ve dolaylı olarak neden olan genleri oluşturmaktadır. Proto-onkogenler; hücre döngüsünde tetikleyici etkiye sahiptir, yalnız çeşitli mekanizmalar ile ekspresyonlarında artma ve hücre içi kontrol mekanizmalarına karşı oluşmaları sonucunda proto-onkogenler onkogenlere dönüşerek hücre bölünmesinde aşırılığa neden olabilmektedirler (Cabadak 2008, Çefle 2003).

Radyasyon, ilaç, basınç gibi dış faktörler ile hücrenin strese maruz kalması ile DNA hasarı olursa, hücre bu uyarılara p53 seviyesini artırarak cevap vermektedir. Uyarılan p53, p21'in aktivasyonu sağlanarak G1 kontrol noktasında Rb proteininin daha fazla fosforlanmasının önüne geçmekte ve hücre siklusunu durdurmaktadır. Bu durum hücreye tamir için zaman vermektedir. Hasar onarım yapılmıyorsa, hücre apoptoza gitmektedir. Onkogenik aktivitenin fazlalaşmasıyla tümör supresörünün inaktivasyonu p53 geninin tahribine neden olarak hücre döngüsü üzerinde kontrolün kaybolmasına sebep olmaktadır (Çefle 2003).



Şekil 1.1. Kanser ve normal hücre çoğalması (Anonim 2015)

Yukarıda tanımlanan sebepler hücrenin kontrolsüz çoğalmasına neden olan anormal aktiviteleri, aslında hücre sinyal iletimi, hücre döngüsü ve programlı hücre ölümünü düzenlenmesi gibi prosedürlerde anahtar görev üstlenen çok fazla proteinin işlevinin tanımlanabilmesine imkan sağlamaktadır (Arıcan 2010).

1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri patolojik ve etiyolojik olarak oldukça heterojonik yapıdadır (Verma ve ark. 2012). Tüm dünyada her gün binlerce kadına meme kanseri tanısı konmaktadır. Meme kanseri, kadınlarda diğer kanser tiplerine göre belirgin farkla daha çok mortaliteye sahip kanser tipidir (Jemal ve ark. 2011). Dünyada bir yıl içerisinde bir buçuk milyondan daha fazla kadına meme kanseri teşhisi konulmaktadır. 2015 yılında yaklaşık olarak 570.000 kadının ölümüne neden olan meme kanseri, kadınlarda görülen tüm kanser türlerinin dörtte birini oluşturmaktadır. 2017 yılında Amerika’da, kadınlarda görülen kanser vakalarından %30’unun meme kanseri olduğu tahmin edilmektedir (Sun ve ark. 2017, Coleman 2017). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)’nın verilerine göre, tüm dünyada her iki cinsiyette yeni vaka oran sayısı %11.6 olup ve ölüm oran sayısı ise %6.6 olduğu belirtilmiştir (Globocan 2018). Türkiye’de meme kanseri insidansı 100 binde 43 olup yılda yaklaşık olarak 15.000 kadında meme kanseri tanısı konulmaktadır (Türkiye Kanser Kontrol Planı 2018). 2017 yılında Türkiye Kanser İstatistiği (TÜİK) verilerine göre, kanser tanısı konulan her dört kadından biri meme kanseri olup, bu oranlarda zamanla artış olacağı düşünülmektedir (Türkiye Kanser İstatistiği 2017).

Meme kanseri; yaş, yaşam şekli, menopoz yaşı, menstürasyonun başlangıç yaşı, ilk hamilelik yaşı ve aile geçmişi gibi birçok etmenle ilişkilidir. Menopozun geç yaşlarda olması ve menstrüasyonun erken yaşlarda görülmesi vücudun östrojen maruziyetinin artması beraberinde meme kanseri riskini de arttırır. Başka önemli bir risk faktörü de ilk çocuğu doğurma yaşıdır. İlk çocuk doğumu 20 yaşından önce gerçekleştiren kadınlar ile 30 yaşından sonra çocuk doğumu gerçekleştiren kadınlara göre meme kanseri riski 2 kat daha azalmaktadır (McPherson ve ark. 2000). Emzirme olayının da meme kanserine karşı koruyucu olması ve bir yıl süre ile emziren kadınlarda meme kanseri riskinde azalma olduğu tahmininde bulunmaktadır (Möller ve ark. 2002). Yaşam tarzına bağlı olarak meme kanserine neden olan risk faktörleri arasında obezite, alkol tüketimi, radyasyon maruziyeti ve fiziksel etkinliğinin azlığı bulunmaktadır (Danaei ve ark. 2005).

BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki aileden gelen mutasyonların ya da somatik mutasyonların meme kanseri gelişimine önemli etkenler olduğu bilinmektedir (Lalloo ve Evans 2012). Birinci derecedeki yakınlıklarda meme kanseri mazisi bulunması meme kanseri riskini arttırmaktadır (Higa 2009). Meme kanserine yakalanmanın % 10'u ailevi faktörlerden olmaktadır (McPherson ve ark. 2000).

1.2.1. Meme Kanseri Hücre Soyları

Klinikte meme kanserinin sınıflandırılması tümör morfolojisindeki tipik farklılıklara dayanmaktadır. Meme kanserinde; farklı tipleri olan lobüler karsinoma ve farklı bir tipi olmayan duktal karsinoma, tübüler, müsinoz, medüller, lenf bezi kistik karsinoma gibi tipleri bulunmaktadır. Meme tümörlerinin histolojik olarak alt gruplara ayrılması; hücresel farklılaşmanın derecesi, mitotik etkinlik ve çekirdek polimorfizmi gibi etkenlere bağlıdır. Küçük boyutlu tübüler karsinoma gibi meme kanserleri duktal karsinomalara göre erken dönemde görülebilirler. Uzak veya yakın bölgedeki metastazlar histolojik olarak farklı olmalarına neden olur. Meme tümörleri; progesteron hormonu reseptörlerinin (PR), östrojen hormonu reseptörlerinin (Er) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (Her2) onkogenlerinin ifadelerinden temel alınarak 5 alt gruba ayrılmaktadır. Genellikle ER içerenler ER içermeyenlere nazaran daha fazla bulunur. Ayrıca ER içermeyen meme tümörleri ER içeren meme tümörlerine göre daha büyüktür, histolojik olarak farkı daha kolaydır ve lenf nodları daha çok rastlanmaktadır (Anderson ve ark. 2002).

Luminal A ve Luminal B olmak üzere 2 tane ER/PR pozitif alt grup vardır ve 3 tane ER negatif alt grup bulunmaktadır. ER negatif olan gruplardan bir tanesinde Her2 ve ilgili genlerin anlatımının arttığı ve bu grubun Her2'nin alt grubu olarak nitelendiği; ikinci ER negatif grupta ise normalde miyoepitel ya da bazal hücrelerden sorumlu genlerin anlatımlarının arttığı; üçüncü ER negatif grupta ise farklı genlerin anlatımıyla normal benzeri bir seyir izleyen profile sahip olduğu bildirilmiştir (Perou ve ark. 2000). Normal ve luminal gruplar, ER negatifin Her2 ve bazal alt gruplarına göre daha az agresiflik göstermektedir (Sorlie ve ark. 2001). ER negatifin, bazal benzeri ve Her2 gibi alt gruplardaki prognozu çok zordur (Bauer ve ark. 2007) ve iki grupta ileri safhalarda kendini göstermesi mümkün olmaktadır (Iwase ve ark. 2010).

Bazal benzeri ve Her2 meme tümörleri diğer alt gruplardan daha fazla kök hücre bulundurmakta bu da klinikte çok kötü bir ilerleyişe sebep olmaktadır (Park ve ark. 2010). Meme tümörlerinde yaklaşık olarak %20 oranında Her2 onkogeni artmaktadır (Hudis 2007). ER pozitif meme tümörlerinde ise Her2 pozitifliği ve PR negatifliği belirtilmektedir (Huang ve ark. 2005). Meme kanserlerinde ER, Her2 ya da PR ifadeleri göstermezse bu tür tümörlere üçlü negatif meme kanserleri (TNBC) denmektedir. Meme kanserlerinde yaklaşık olarak %15'i bu grup meydana getirmektedir (Cadoo ve ark. 2013). TNBC'nin genç kadınlarda, BRCA1 geninde mutasyon oluşmuş kadınlarda, Amerika ve Afrikalı kadınlarda görülme oranı daha fazladır (Dent ve ark. 2007). TNBC'ler 3.derece ve daha büyük tümörler olup agresif fenotip içermekte ve daha kötü sonuçlar ortaya çıkarmaktadırlar (Dent ve ark. 2009).

1958 yılında meme kanseri için ilk bulunan hücre soyu BT-20'dir. Sonrasında MD Anderson meme kanseri hücre soyları bulunmuştur. 1973 yılında ise en tanınmış meme kanser hücre soyu Michigan Cancer Foundation tarafından oluşturulan MCF-7 hücre soyudur. Meme kanseri hücre soylarından MCF-7 ve MDA-MB-231, epitel kaynaklı ve metastaz oluşturulmuş meme kanseri olan bir hastanın plevral efüzyondaki habis hücrelerinden meydana getirilmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücreleri bulunduğu yüzeye yapışan hücrelerdir. Meme kanseri araştırmaları için hücre soyları arasında iyi örneklerdir (Holliday ve Speirs 2011). Meme adenokarsinoma hücre soylarının; ER, PR, Her2 durumları ve p53 mutasyon ile ilgili özellikleri Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Meme Kanser Hücre Soyların Özellikleri (Uğurlu 2013)

	Alt tür	ER durumu	PR durumu	Her2 durumu	p53 mutasyonu
MCF-7	Luminal A	Pozitif	Pozitif	Normal	+/- Yabani tip
MDA-MB-231	Bazal B	Negatif	Negatif	Normal	++ Mutant

Er: Östrojen hormon reseptör, Her2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü, PR: Progesteron Hormon reseptörü.

1.2.2. Meme Kanseri ve Moleküler Biyolojisi

Meme kanserindeki gelişimin altında yatan işleyiş tam olarak aydınlatılamamıştır. Çevresel karsinojenlere maruz kalmalarından sonra kazanılan mutasyonlar ile germ-line mutasyonlarla kalıtılan genetik değişimler sonucunda proto onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin aktivasyonu ile apoptozis mekanizmasında bozulma ve/veya kontrolsüz hücre proliferasyonu sonucunda meme kanseri gelişiminin başladığı öne sürülmektedir. Çeşitli büyüme faktörleri ve bağlantılı reseptörlerde oluşabilecek çeşitli bozuklukların da kontrolsüz hücre çoğalmasına sebep olarak insan meme kanserinde önemli olduğu bilinmektedir (Sainsbury ve ark. 1985, Richard ve ark. 1987, Brown ve ark. 1995).

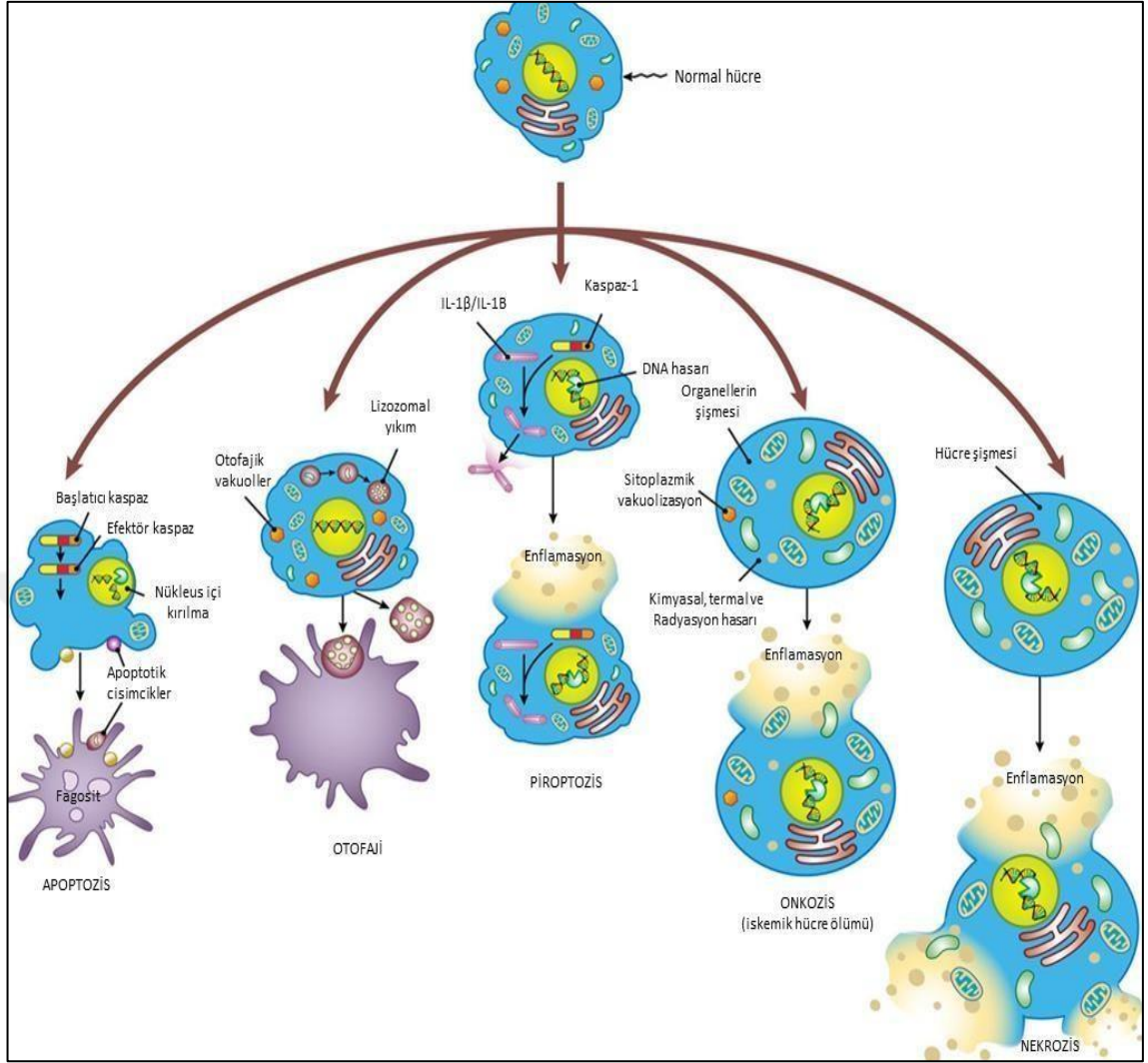
Er'nin, östrojen uyarısıyla büyümede olduğu gibi meme kanseri gelişiminde de çok önemli olduğu bilinmektedir. Östrojenin (Er) fonksiyonunu Er α ve Er β olarak adlandırılan iki spesifik hücre içi reseptörü aracılığıyla gerçekleştirdiği bilinmektedir. Bu reseptörler, hormon bağımlı transkripsiyon regülatör olarak işlev yaparlar. Meme kanseri patofizyolojisinde Er kritik bir rol oynar. Meme kanseri hastalarında Er α 'nın fazla ekspresyonu, iyi anlaşılmalı olan bir prognostik ve prediktif faktördür. Er β 'nin prognostik anlamı tam olarak tanımlanamamıştır (Dotzlaw ve ark. 1999, Speirs ve Kerin 2000, Su ve ark. 2000). Genetik değişiklikler germ-line mutasyonlarla kalıtılır veya sonradan çevresel karsinojenlere maruz kalmayla oluşabilen somatik mutasyonlarla kazanılır. Bu çevresel karsinojenler, kimyasal (polisiklik hidrokarbonlar), fiziksel (iyonize radyasyon) ve biyolojik (virüsler) karsinojenlerdir (Danaei ve ark. 2005). Mevcut çalışmalar karsinogenez sürecini hangi genetik değişiklikleri hızlandırdığını keşfetmeye yönelmiştir. İnvaziv duktal karsinoma dönüşümü üzerinde durulan modele göre; hiperplaziden insitu karsinomaya geçiş ve sonuçta da invaziv karsinoma gelişimi söz konusudur. Meme kanserinin genetik temelindeki çalışmalar tümöröenez sürecinde birçok role sahip özellikli genlere yönelmiştir. Bu genler; onkogenler (ras, c-myc genleri), büyüme faktörü reseptör genleri (HER2), tümör süpresör genleri (BRCA1, BRCA2, p53), hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alan genler (telomeraz) ve apoptozisde yer alan genler (Bcl gen ailesi) olarak sayılabilir (Oesterreich ve Fuqu 1999, Cui ve Hoppe 2000).

1.2.3. Meme Kanseri ve Apoptozis

Normal meme evölüsyonu, apoptozis ve hücre proliferasyonu arasındaki dengeyle kontrol altına alınmaktadır. Meme, ergenlik ve hamilelik dönemleri olacak şekilde iki ayrı fizyolojik ilerleme ile gelişimini tamamlayan bir organdır. Memenin proliferasyon ve farklılaşmasında bariz değişiklikler bu dönemlerde oluşabilmektedir. Proliferasyon ve apoptozis arasındaki denge, hormonal, kemoterapi ve radyoterapi tedavilerin sonucunda tümörün gelişim veya gerilemesinde çok önemlidir. Bütün bu gelişmelerde apoptozisin indüklenmesi oldukça önemli bir yer almaktadır (Hickman 1992, Reed 1999, Tamm ve ark. 2001).

1.3. Apoptozis

Çok hücreli organizmalarda, organizmanın gelişimi ve doku homeostazisinin sağlanmasında büyük önem taşıyan ve yeni hücre oluşumu ile hücre ölümü arasında her zaman bir denge bulunmaktadır. Günde yaklaşık olarak 1×10^{14} yeni hücre oluşmakta ve milyarlarca hücre ise ölmektedir böylelikle sabit denge sağlanmaktadır (Fischer ve Schulze-Osthoff 2005). Bu dengede oluşan bozulmalar kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojik durumları tetikleyebilmektedir (Danial ve Korsmeyer 2004). Var olan hücreler patolojik hücre ölümü nekroz ve programlanmış hücre ölümü olan apoptozis gibi çeşitli hücre ölümleriyle yok olmaktadır (Şekil 1.2.)



Şekil 1.2. Çeşitli hücre ölüm tipleri (Bortner ve Cidlowski 2014)

Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr adlı bir patolog tarafından programlı hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır (Kerr ve ark. 1972). Apoptozis için tipik olan agaroz jel elektroforezinde “ladder pattern” yapısı 1980 yılında Wyllie tarafından gösterilmiştir (Wyllie 1980). 1993 yılında Cohen, apoptozisin genler tarafından kontrol edilen bir ölüm tipi olduğunu timus hücreleriyle yaptığı çalışmalarda göstermiştir (Cohen 1993). Apoptozis organizmanın yaşam döngüsü için gerekli olan ve genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla kontrol edilmektedir.

İnsanlarda embriyonik periyotta parmak aralarındaki perdelerin ve kurbağalarda metamorfoz esnasında kuyruklarının kaybolması apoptozis ile gerçekleşmektedir (Franz ve Kidson 1997). Postnatal periyotta kan hücrelerinin uzaklaştırılması, menstruel siklus sonunda açılan korpus luteumun tekrar eski durumuna dönmesi ve menstruasyon sırasında endometriyal hücrelerinin yıkımı apoptozis ile gerçekleşir. Aynı zamanda immün sistemde önemli olan T lenfosit hücreleri timusda olgunlaşırlar. Bu hücrelerin etkisiz olanları veya organizmanın kendi dokularına karşı tepkime verme potansiyeli taşıyanları kan dolaşımına girmeden önce apoptozisle ölürlere (Ford 2001). Bir takım patolojik durumlarda da apoptozis görülebilmektedir. Örneğin; Parkinson hastalığı, İnsüline bağımlı tip diabet, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, AIDS, viral enfeksiyonlar, tümör oluşumu ve organ transplantasyonlarında hücreler apoptozisle ölebilmektedirler (Elmore 2007).

Apoptozis; hücrenin yuvarlaklaşması, hücresel hacmin azalması (piknoz), pseudopodların retraksiyonu, nükleer fragmentasyon (karyoreksis), kromatin kondensasyonu, plazma membran blebilenmesi (bütünlük kaybı olmadan), sitoplazmik organellerin modifikasyonları, in vivo fagositler tarafından yutulması ile karakterize edilmektedir (Barkla ve Gibson 1999, Baehrecke 2002).

1.3.1. Apoptozisin İndüklenmesi

Hücrelerde apoptozisin meydana gelebilmesi için hücre içi veya dışından gelen bir uyarıcı ile genetik mekanizmanın harekete geçmesi icap etmektedir (Erdoğan 2003). Hücre içi uyarıcılardan bazıları; hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, sitokinler, Bcl-2 ailesi, p53 geninin aktivasyonu, onkojenler ve viral/bakteriyel enfeksiyonlardır. Hücre dışı uyarıcılardan bazıları ise; tümör nekrozis faktör (TNF), nöron büyüme faktörü (NGF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), Fas/FasL, IL-2, glukokortikoidler, ilaç ve radyasyondur. Bu faktörler dışında apoptozisi düzenleyen ya da uyaran birçok gen de bulunmaktadır (Kaya 2007). Apoptozisin düzenlenmesinde mitokondri önemli bir rol oynamaktadır. Apoptotik süreçte sitokrom-c ve apoptozis indükleyici faktör (AIF) gibi birçok apoptotik faktör, mitokondriden sitoplazmaya salınmaktadır (Kumar ve ark. 2005). Sitoplazmaya salınan bu proteinlerin en önemlisi Bcl-2 ailesidir (Chang ve Yang 2000). Bcl-2 ailesi proteinleri anti-apoptotik (Bcl-X1, Bcl-1, Bcl-2) ve proapoptotik (Bax, Bcl-Xs, Bad, Bak, Bim, Bid) olan birbirine

zıt etkili iki grup üyeden oluşur. Hücrenin apoptozisle ölüme gidip gitmeyeceğini belirleyen bu proteinlerin göreceli oranıdır. Pro-apoptotik olan proteinler fazla eksprese edildiğinde hücreler apoptozise daha eğilimli, anti-apoptotik olan proteinler daha fazla eksprese edildiğinde ise hücreler apoptozise daha dayanıklı olmaktadır (Kumar ve ark. 2005). Bcl-2 ailesinden olan pro-apoptotik proteinlerin sağlıklı hücrelerin sitozollerinde bulunmakta ve hücrel stres, büyüme faktörü yoksunluğu veya serbest radikal hasarı gibi apoptotik sinyaller sonucunda anti-apoptotik proteinlerin bulunduğu mitokondri yüzeyine doğru yer değiştirmektedir ve Bcl-2 ailesinden olan anti-apoptotik proteinlerin normal işlevleri bozulmaktadır. Böylece mitokondriyal membranda porlar oluşmakta ve sitokrom-c gibi pro-apoptotik faktörler zarlar arası bölgelerden açığa çıkabilmektedir. Bu da apoptozom oluşmasını ve kaspaz kaskadı aktivasyonuna sebep olmaktadır (Suh 2002, Fan ve ark. 2005).

Kaspazlar, proteinleri aspartat kalıntılarında kesen hücre içi sistein proteazlardır. Kaspaz aktivitesinde hatalı düzenlenme olması hücre için ölümcül olabilir. Kaspazlar, prokaspazlar olarak oluştuğundan sonra belirli kısımları kesilerek uzaklaştırılıp aktif kaspaz haline alırlar (Fischer ve ark. 2003, Solakoğlu 2009). Kaspazlar birbirlerini proteolitik olarak etkinleştirerek bir kaskada sebep olmaktadır. Kaspaz 2, 8, 9, 10 olarak bilinen başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla harekete geçen ölüm sinyallerini Kaspaz 3, 6, 7 olan efektör kaspazlara aktarmaktadırlar. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin oluşumuna sebep olmaktadır (Adams ve Cory S 2001, Spierings ve ark. 2004).

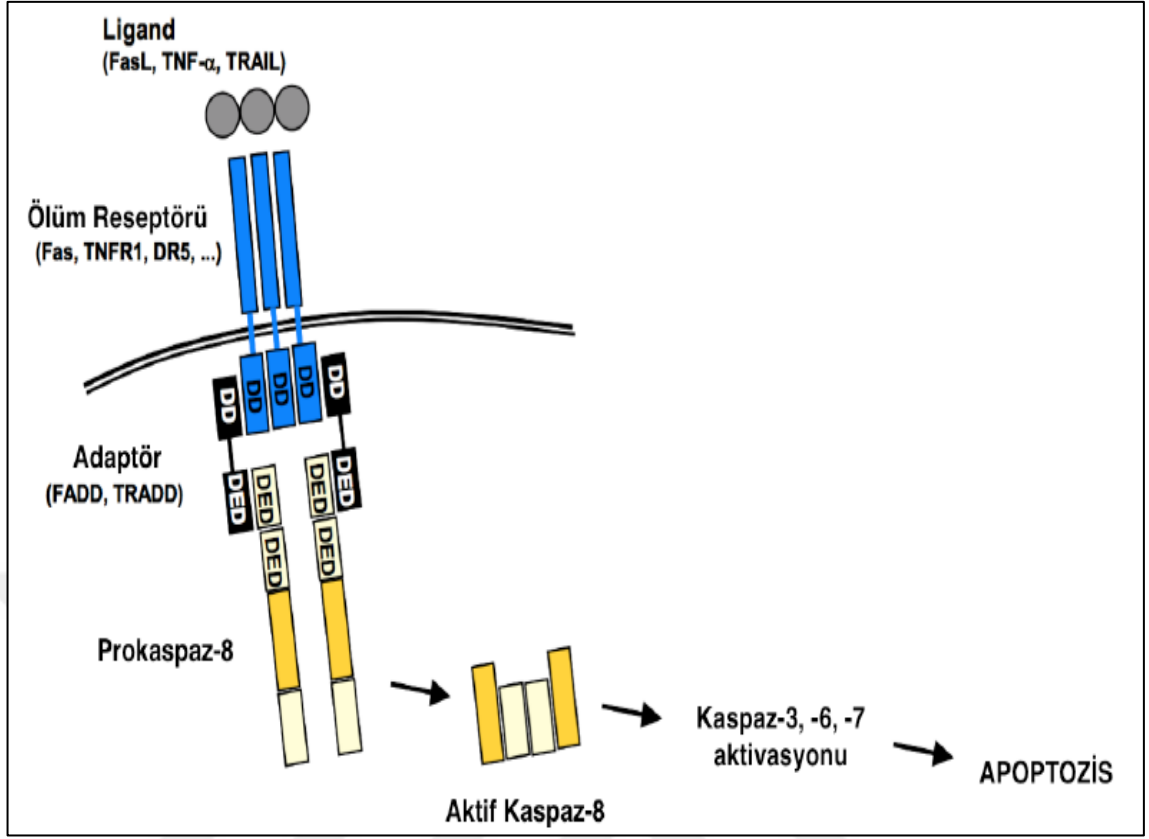
1.3.2. Apoptozisin Mekanizmaları

Apoptozisin indüklenmesinde; ekstrinsik (dışsal) yolak, İntrensik (içsel) yolak ve endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması gibi üç sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir.

1.3.2.1. Ekstrinsik (Dışsal) Yolak

Apoptozisin ekstrinsik yoluyla indüklenmesi, plazma membranındaki ekstraselüler ligandlar ve ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile başlar (Şekil 1.3.). Tümör nekroz faktör reseptörü (TNF-R) ve Fas (Apo-1 ve CD95) tipik ölüm reseptörleridir. Sitolitik ölüm alanı (death domain; DD) içeren iki reseptör de TNFR ailesine aittir. TNFR ailesinin

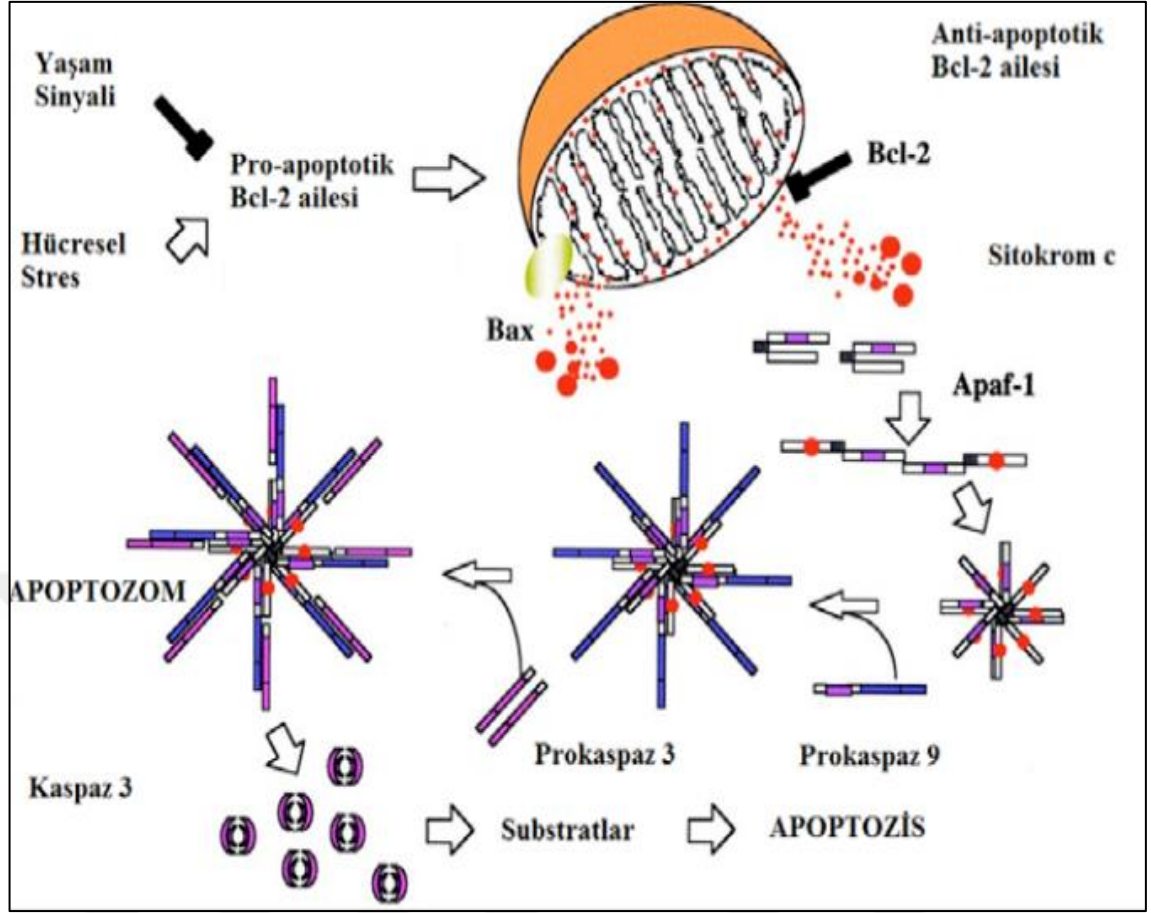
tüm üyeleri spesifik bir şekilde liganları tanıyan ve ölüm reseptörleri ile aktifleşecek sisteyince zengin ekstraselüler subdomains bölgelerine sahiptirler. Apoptozu gerçekleştiren enzimler sisteyin aspartik asit proteazlardır. Ölüm bölgesi olarak adlandırılan korunmuş DNA dizisi içeren bölge sinyalizasyon ölüm reseptörünün sitoplazmik parçasını oluşturmaktadır. Reseptör-kaynaklı yolu, Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksine (DISC) başlatıcı kaspazların (kaspaz-8 ve 10) alımı yol açar. DISC, TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi proteinini (TRADD) ve adaptör protein Fas ilişkili ölüm alanını (FADD) içerir. Bu ölüm bölgeleri prokaspaz-8'i aktifleştirmektedir. Aktifleşmiş kaspazlar hemen efektör kaspazları (3, 6, 7) aktifleşirir. Şekil 1.3.'te gösterildiği gibi başlatıcı kaspazlar, protein-protein etkileşim motiflerini barındıran uzun bir 'prodomain' içerir. Bu motifler, ya kaspaz takviye alanı (CARD; caspase recruitment domain) ya da ölüm etkileyici alanıdır (DED; death effector domain). Kaspazlar bu motifler sayesinde adaptör moleküllerle etkileşimlerini sağlarlar (Lamkanfi 2011). DISC aslında pro-kaspaz-8, Fas, FADD ve FasL içeren bir komplekstir. Prokaspaz-8 moleküller DISC yakınına getirilir, aktif kaspaz-8 hemen kaspaz-3 veya diğer kaspazları ayırır, sonuçta apoptozis oluşur (Lawen 2008).



Şekil 1.3. Ekstrinsik (Dışsal) apoptozis yolağı (Sartorius ve ark. 2001).

1.3.2.2. İntrensik (İçsel) Yolak

Mitokondriyal yolu, DNA hasarı, sitotoksik ilaç tedavisi, oksidatif stres ve açlık gibi intraselüler ve ekstrasellüler stresler aktif hale getirir. Apoptozisi başlatan sebepler çoğunlukla mitokondri iç membran potansiyelinin bozukluğuna ve geçirgenliğinin aniden artırmasına sebep olmaktadır. Apoptotik sinyaller, sitoplazmadaki apoptotik proteaz aktifleştiren faktör-1'e (Apaf-1) bağlanan ve mitokondri zarları arasından gelen sitokrom c içeren moleküllerin serbest kalmasına yol açar (Şekil 1.4.). Sitokrom c'nin serbest kalması, mitokondri geçirgenliğine ve mitokondri membran potansiyelinin bozulmasına neden olmaktadır. Sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanması, kaspazların aktivasyonu ile apoptozom oluşmasına neden olur (Denault ve Salvesen 2002, Kroemer ve Reed 2000).



Şekil 1.4. Mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptozis yolağı (Zimmermann ve ark. 2001)

Mitokondrial apoptotik yolu, Bcl-2 ailesine ait olan apoptotik faktörler etkiler. Hücre döngüsünün S-fazına girişini geciktirerek ilerlemesini engelleyen ve ilk bulunan proto-onkogen Bcl-2 proteindir (Vaux ve ark. 1988). Yaşam fonksiyonları için Bcl-2 homolog bölgesine (BH1-BH4) sahiptir. Bcl-2 protein ailesinin üç tane grubu bulunmaktadır. Birinci grup anti-apoptotik proteinler (Bcl-2 ve Bcl-XL), ikinci grup pro-apoptotik proteinler (Bak ve Bax) ve üçüncü grup pro-apoptotik proteinlerdir (Bad, Bik, Bid, ve Bim). Bcl-2 protein ailesinin en önemli olan anti-apoptotik üyeleri Bcl-2 ve Bcl-XL'dir (Cory ve Adams 2002, Mund ve ark. 2003). Apoptozisdeki Bcl-2 ailesinin rolünü açıklamak üzere pek çok model ortaya çıkmıştır. Bir modele göre Bcl-2 üyeleri kaspazların aktivasyonunu doğrudan kontrol etmektedirler (Strasser ve ark. 2000), diğer modele göre mitokondrial bütünlüğü koruyarak görev yaptıkları ileri sürülmektedir (Wang 2001). Conradt ve Horvitz (1998) tarafından önerilen modele göre, BH3 üyeler transkripsiyonel upregülasyonu (Bax), defosforilasyonu (Bad), subselüler yerleştirme

(Bim, Bmf) ve proteoliz (Bid) gibi mekanizmalarla aktifleştirilmektedirler. Aktive edilmiş BH3 proteinleri proapoptotik üyeleri inhibisyonda anti-apoptotik Bcl-2 üyeleri engellemektedir. Sonuç olarak, proapoptotik faktörler apoptozom oluşumunda ve kaspaz aktivasyonunda rol oynayan sitokrom c gibi sitoplazmaya mitokondri iç zarından serbest bırakılır (Gewies 2003). Bu faktörler mitokondriden sitokrom c'nin serbest bırakılmasını engeller. Ayrıca mitokondriden gelen düzenleyici proteinler olarak bilinen apoptozis inhibitör proteinler kaspaz aktivitesini inhibe edebilmektedir.

1.3.2.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis

Son dönemlerde amiloid β nörotoksisiteye neden olan kaspaz 12'ye tabi Endoplazmik Retikulum aracılı apoptotik mekanizma tanımlanmıştır (Nakamura ve ark. 2000, Keane ve ark. 2001). Bu mekanizma ölüm reseptör aracılı apoptozis ve mitokondrial/sitokrom-c'den farklı bir mekanizmadır. Kaspaz 12, Endoplazmik Retikulum membranında lokalize durumda bulunur ve Endoplazmik Retikulum aracılı apoptozise gerekli olan bir kaspazdır. Son çalışmalara göre prokaspaz 12, Ca^{++} seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesiyle aktifleşir. Aktif olan kaspaz 12 sitoplazmaya yönelerek kaspaz 9 ile etkileşime girer ve sitozolik kaspaz kaskadını aktifleştirir (Rao ve ark. 2001).

1.3.3. Apoptotik Hücrede Görülen Morfolojik Değişiklikler

Apoptotik hücreler, nükleer fragmentasyon, hücre çekirdeğinin küçülmesi (piknoz), deformasyon ve komşu hücrelerle bağlantı kaybı gibi karakteristik morfolojik özellikler ile tanımlanmaktadır. Kromatin kondanse olarak nükleer membranın altında yer alır ve plazma membranı bleblenir. Sonunda hücre kondanse kromatin, sitozol ve organelleri içeren membranla çevrili apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler; makrofajlar, neoplastik hücreler veya parankimal hücreler vasıtasıyla fagosite edilir ve dokudan herhangi bir inflamatuvar yanıt oluşturmadan uzaklaştırılırlar. Bu morfolojik değişimler, apoptotik hücrelerde oluşan tipik moleküler ve biyokimyasal olayların sonucudur. DNA'nın oligonükleozomal parçalanmasını sağlayan proteolitik enzimlerin aktivasyonu ve sitoplazma ile organellerin bütünlük ve şekillerini belirleyen bazı protein substratları bu olaylardan öne çıkanlardır (Saraste ve Pulkki 2000, Kepp ve ark 2011). Hücrenin yaralanmalar sonucunda zarar görerek şişip ve patlayarak ölmesi olarak bilinen diğer bir hücre ölüm biçimi ise nekrozisdir (Şekil 1.5.). Apoptozisten

farklı olarak programlı fizyolojik bir mekanizma olmayıp ve kontrolsüz bir şekilde gerçekleştiği bilinmektedir. Yalnız nekrotik ölümden anahtar regülatörler olan Reseptörü Etkileyen Protein (RIP; receptor interacting protein) kinazlar ve PARP'ın bulunmasıyla programlı nekroz kavramı kabul edilmeye başlamıştır. Programlı nekrozun potansiyel sinyal komponentleri RIP kinazlar, NADPH oksidazlar, poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP1) ve kalpainler olarak tanımlanmıştır. Hücre nekrozla ölüme gittiğinde hücrenin membran bütünlüğü bozularak hücre içeriği dışarıya yayılır ve bu durumda komşu hücreler zarar görebilir dokuda güçlü bir inflamatuvar yanıt ortaya çıkar (Golstein ve Kroemer 2007, Ouyang ve ark. 2012).

1.3.4. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Farklar

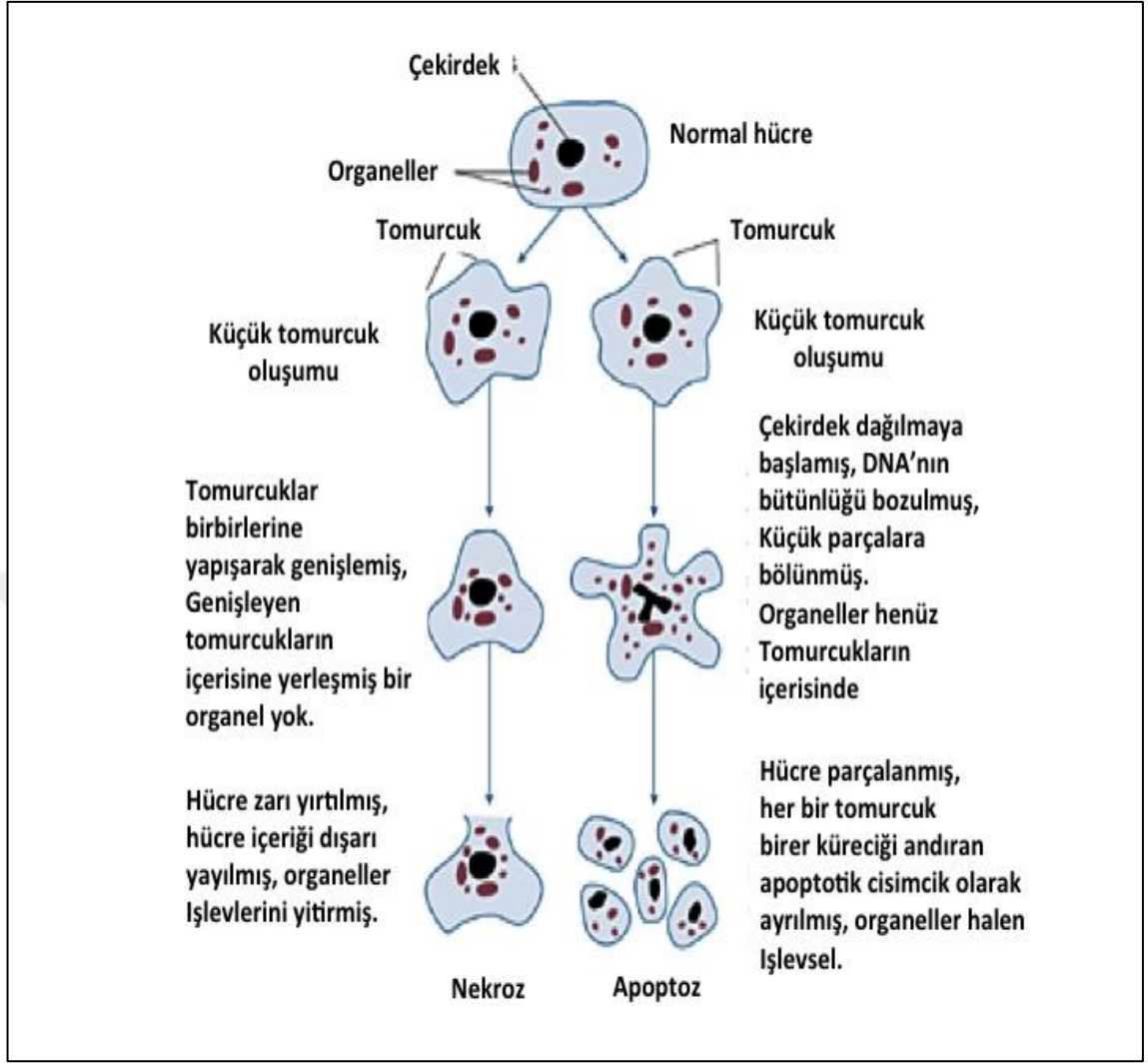
Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar aşağıdaki maddeler ve Şekil 1.5.'de gösterildiği gibi özetlenebilir.

1. Nekroz çoğunlukla bileşik hücre gruplarını etkilerken, apoptozis ise tek tek hücreleri etkiler (Holdenrieder ve Stieber 2004).
2. Nekroz fizyolojik olmayan uyarıcılarla başlar, apoptozis fizyolojik veya fizyolojik olmayan uyarıcılarla başlayabilir (Wyllie 1980, Lu ve ark. 2000).
3. Nekroza maruz kalan hücreler, çevreye salıverdiği kemotaktik moleküller ile çağrılan makrofajlar aracılığıyla fagosite olurlar. Apoptozise maruz kalan hücre ise çevreye kemotaktik molekül salıvermez; böylelikle epitel hücreleri veya makrofajlar vasıtasıyla fagositoza uğrar (Wyllie 1980, Lu ve ark. 2000).
4. Nekroz ile ölen hücrelerde kromatin yapısı hemen hemen normal hücrelerdeki yapıya benzerdir, fakat apoptozis ile ölen hücrelerin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşma (kromatin kondensasyonu) görünür (Ulukaya 2010).
5. Nekrozda zar bütünlüğünde bozulma olur, apoptozisde ise hücre apoptotik cisimcikler oluşturur ve asla zar bütünlüğünde bozulma olmaz. Bu nedenle nekrozda inflamatuvar yanıt olur ama apoptozisde olmaz (Yılmaz 2005).
6. Nekrozda hücre içine çokça sıvı girmesiyle mitokondri ve sitoplazmada şişme görülürken ("cell swelling"), apoptozisde ise tam tersi olarak hücrede büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür ("cell shrinkage") (Ulukaya 2003).

7. Hücre içi ATP seviyesine göre hücreler nekroz veya apoptozis ile ölürlür. Şayet hücre ciddi hasarlar görmüş ise apoptozis için gereken enerjiyi sağlayamaz olur ve nekroz ile ölüme gidilecektir (Chandra ve ark. 2000).

8. Nekroz esnasında DNA'nın gelişigüzel sindirimi mevcuttur. Oysaki apoptozisde DNA'nın, intranükleozomal bölgelerinden 180-200 baz çifti veya katları halindeki boyutlarda DNA parçalarının oluşmasını sağlayacak şekilde kırılma mevcuttur. Böylelikle agaroz jel elektroforezde apoptozis için tipik "ladder pattern" olarak bilinen merdiven biçiminde kırılmalar oluşturur (Wyllie 1980, Ulukaya 2003).

9. Normalde plazma membranının iç yüzünde var olan fosfolipidlerin'in membranın dış yüzüne transloke olması nekrozdan farklı olarak apoptotik hücrede görülür. Gerçekleşen bu olay apoptotik hücrenin makrofajlar ve komşu hücreler tarafından bilinmesi ve fagosite edilmesini sağlar (Ulukaya 2003).



Şekil 1. 5. Apoptozis ve nekrozisde görülen morfolojik değişiklikler (Hekim 2014)

1.3.5. Apoptozisin Genetik Kontrolü

Apoptozisin kontrol mekanizmalarında çok sayıda protein ve gen rol oynar. Bu protein ve genler apoptotik yollaklardaki aktiviteleri ve spesifik hastalıklarla olan bağlantıları esas alınarak sınıflandırılabilirler. Çeşitli uyarıcılar bazı ölüm yollarının düzenleyicilerini aktif hale getirerek bir kaskad harekete geçirirler. Bcl-2 süper ailesi, kaspaz aktivasyonunu ya pozitif ya da negatif yönde düzenler. Bazı apoptozis düzenleyicileri ise daha ileri etaplarda rol alıp ve bazı kaskadları aktif hale getirirler. Bu düzenleyiciler, apoptozisi aktif hale getiren ve kanser ya da tümörjenez terapilerin de önem arz eden p53 gibi tümör baskılayıcı genler veya c- myc gibi onkogenlerdir.

c-Myc: Bir transkripsiyon faktörü olan c-Myc, pek çok insan tümör tipinde anormal bir şekilde düzenlenmektedir ve apoptozisin kontrolünde önemli bir rol üstlenmektedir. İnsan c-Myc proteininin kısa bir ömrü olup nükleusta yer alır ve 439 amino asitten oluşur. c-Myc; protein biyosentezi, metabolizma, hücre siklus düzenlenmesi, hücre adezyonu, apoptozis (Bcl-2'yi aşağı yöne düzenleyerek), ve sitoskelet yapımında bulunan belirli gen sınıflarıyla sistemli olarak etkileşimde bulunur. Proto-onkogen olan c-myc'nin kusurlu düzenlenmesi, neoplastik transformasyonu ve hücre proliferasyonunu (p21'i aşağı ve siklinleri yukarı yöne düzenleyerek) teşvik eder. Ayrıca bu hatalı düzenlenme büyüme faktörü ve besin eksikliğinde apoptotik genlerin aktifleşmesini sağlar. Myc, Shh, Wnt, EGF gibi çeşitli mitojenik sinyallerle de aktifleşme gösterilir. Myc aktivasyonu bazı biyolojik etkilerle bu hedef genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesiyle olur (Evan ve ark. 1992, Kauffmann-Zeh ve ark. 1997).

p53: Bir Nükleer fosfoprotein olan insan p53 geni, 17. kromozomun kısa kolunda (17p 13,1) yer alır ve hücre siklusunun ilerleyişi ile apoptozis olmak üzere iki ana süreçte önemli katkı sağlar. p53, hücreSEL veya viral onkogenlerin neden olduğu transformasyonu baskılanmasından dolayı bir tümör baskılayıcı gen olarak sınıflandırılır. Birçok kanser türlerinin mutant p53 baskılayıcı genine sahip olduğu ortaya konulmuştur. İnsan kanserlerinde sıklıkla p53 mutasyonuna veya delesyonlara rastlanır ve kanserlerin yaklaşık olarak %50'sinden fazlasıyla bağlantılıdır. Bunlar meme, mesane, akciğer, karaciğer, kolon, cilt ve prostat kanserleridir. Herhangi bir uyarıcı ile oluşan DNA hasarında, p53 aktifleşip bir dizi olayı başlatır. Bu olaylar ile hasarlı olan hücre, G1 fazında durdurulur ve S fazına giremez. Böylelikle DNA hasarı oluşmuş hücrede ya onarım yapılır ya da hücrenin apoptozise gitmesi sağlanır. DNA hasarı sonucunda p53 proteininin transkripsiyonu ve böylece translasyonu artar. Ortaya çıkan p53 proteini, bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü (CDKI) olan p21 proteininin sentezini uyarıp hücre döngüsünü p21 proteini vasıtasıyla G1 evresinde durdurur. p21 proteini bu işlevini siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerine bağlanarak ortaya koyar. p21 proteini siklin-siklin bağımlı kinaz (CDK-C) kompleksine bağlandığı zaman CDK-C kompleksi, Retinoblastoma (Rb) proteinini fosforile edemeyecektir. Bu sonuçlara göre Rb-E2F kompleksinden E2F transkripsiyon faktörü ayrılmaz ve DNA sentezi için gerekli enzimlerin ve birtakım proteinlerin ekspresyonu gerçekleşemez. Böylelikle hücre döngüsü S fazına geçilmeden durdurulur (El-Deiry ve ark. 1993, Cachot ve ark.

1998). Şayet DNA hasarı, hücrenin tamir mekanizmasının onarabileceği kapasitenin üzerinde gerçekleşmesi sonucu onkogenik sürecin engellenmesi için apoptozis gerçekleşir. Hem hücre yüzeyinde yer alan TNFR aile üyesi olan Fas (CD95) reseptörlerinin uyarılmasıyla hem de mitokondriden sitokrom c salınımıyla gerçekleşen apoptotik süreçlerin her ikisinde de p53 proteini önemlidir (Zörnig ve ark. 2001, Dumont ve ark. 2003).

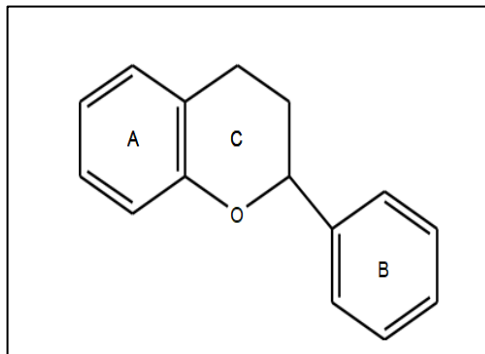
Ras: Memelilerde ras onkogen gen ailesi p21s olarak isimlendirilen ve molekül ağırlığı 21 kDa olup proteinleri kodlayan üç üyeden (K-, H- ve N- ras) meydana gelmektedir. Membranla bağlantılı proteinler olan p21s, guanin trifosfat (GTP) bağlamakta ve hidrolize uğratmaktadır yani GTP bağlayıcı proteinlerdir. Ras ailesi proteinleri GDP bağlı veya GTP bağlı formlarıyla, iki konformasyon arasında geçişler ile hücre içindeki çeşitli proteinleri etkiler ve onların da konformasyonlarının değiştirmesine ve fosforilendirmelerine neden olarak hücre içi sinyal iletimini tetikler. Ras'ın bağlanan GTP'yi hidrolizinden sonra, proteine bağlı kalan GDP'nin ayrılması için Guanin Değişim Faktörlerine (GEF; Guanine Exchange Factor) gereksinim vardır. GEF proteinleri Ras-GDP ile etkileşime geçer ve proteinden GDP uzaklaşarak, Ras'ın hücre içi konsantrasyonu daha fazla olan GTP'yi bağlayabilmesine imkan tanır. Bağlı hale gelen GTP Ras'ın içsel GTPaz aktivitesiyle ve aynı zamanda Ras'a bağlı olan GTPaz Aktive edici Proteinler'in (GAP) etkisiyle hidroliz olmaktadır. Ras'ın GTP bağlı yapısı, proteinin bağlı olduğu sinyal iletiminin daha alt aşamalarda bulunan moleküllerin de konformasyonel değişiklik oluşturmaları ve fosforillenerek sinyal iletimine katılmalarına neden olur. GTPaz'ın bozuk olması, molekülün GTP formunun sürekli aktif kalmasına neden olacağından DNA transkripsiyonu ve nükleus proteinleri sürekli aktive edilir (Quincoces ve ark. 1997, Telkoparan ve Tazebay 2011).

Rb (Retinoblastom): İnsanın 13. kromozomunda bulunan tümör baskılayıcı genidir. Rb gen ürünü olan Rb proteini hücre siklus düzenlemelerinde önemli rolü bulunan nükleer bir fosfoproteindir. Rb proteini, S evresinde hücresel replikasyonda bulunan nükleer transkripsiyon faktörü olan E2F proteini ile etkileşim haline girmektedir. Bu etkileşim ile E2F'nin transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon görmesinin önüne geçmektedir. Rb proteininin fosforile hali inaktif, defosforile hali ise aktiftir. Defosforile halindeki Rb, E2F aracılığıyla kontrol altına alınan genlerin transkripsiyonunu baskılamak için

E2F'ye bağlanır. Rb'nin G1 evresinin sonunda Cdk4,6 ve siklin D kompleksleri tarafından fosforille olması E2F'den ayrılmasına sebep olur. Hücre siklusünün yol alması için gerekli olan proteinleri kodlayan hedef genlerin ekspresyonunu uyarmaktadır. Rb mutantlar (yapısal fosforilenme olmuş ve E2F bağlanması olmamış), S evresi restriksiyon bölgesinde kontrolsüz bir şekilde hücre bölünmesine sebep olmaktadır ve böylelikle hücreler tümörojenik olarak gelişmektedir (Hanahan ve Weinberg 2000, Kopnin 2000).

1.4. Flavonoidler

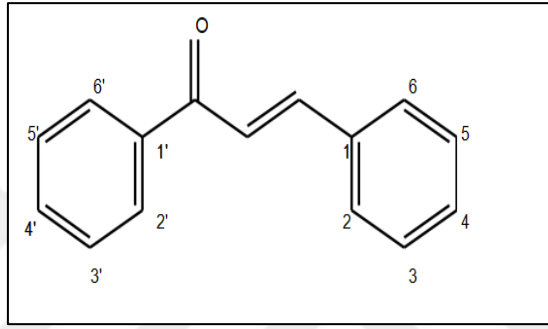
Flavonoidler, farklı kimyasal özellikleri ve yapıları bulunan polifenolik moleküllerin bir sınıfıdır ve genellikle hemen hemen her bitkide (yaprak, tohum, meyve, dal ve çiçek) var olan pigment bileşikleridir (Şekil 1.6.). Flavonoidler hücrede birçok işlev göstermektedir ve en başlıcaları arasında fizyolojik düzenleyici, kimyasal haberci ve hücre döngüsünün inhibitörleri olarak işlev göstermeleri sayılabilir. Flavonoidlerin güçlü antioksidan etkisinin dışında yaşlanma, kanser, nörodejeneratif hastalıklar (alzheimer, parkinson), ateroskleroz gibi kardiyovasküler düzensizlikler, iskemik yaralanma ve inflamasyon gibi hastalıklar ile bağlantılı oldukları belirlenmiştir (Sghaiera ve ark. 2011). Flavonoller, flavanonlar, flavonlar, antosiyanidinler, kateşinler, dihidroflavonoller, isoflavonlar ve kalkon'ları bulunduran ana flavonoid grubunda 4.000'den fazla birbirinden farklı flavonoid tanımlanmıştır. Besleyici bir özelliği bulunmayan bileşikler olmaları nedeniyle vitaminlere benzetilirler (Cook ve Samman 1996).



Şekil 1.6. Flavonoid yapısı (Taşkın 2016)

1.5. Kalkonlar

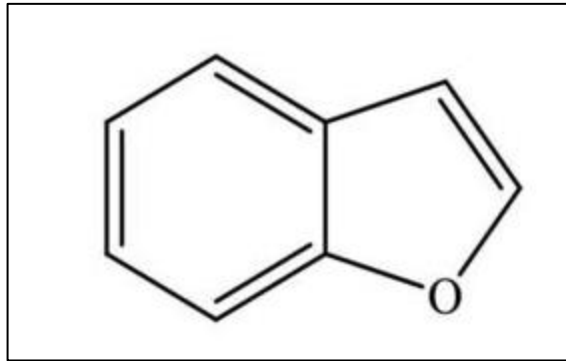
Flavonoid ailesinden olan kalkonlar hem doğal hem de sentetik olarak oluşturulabilen geniş biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerdir (Lunardi ve ark. 2003). Flavonoid üyelerinden heterosiklik C halkası bulundurmayan bileşikler kalkon türevleri bileşiklerdir (Şekil 1.7.). Flavonoidlerin esas yapısındaki propan zinciri üstünde α,β -doymamış karbonil grubunun bulunması, keton grubu ve yeni bir çift bağ oluşması ile kalkonlar oluşur. Böylelikle 1,3-diaril-2-propen-1-on yapısı bulunduran bileşiklerin tümüne kalkon diyebiliriz (Kamal ve ark. 2011).



Şekil 1.7. Kalkon yapısı (Taşkın 2016)

1.6. Benzofuranlar

Benzofuran, bir furan halkası ile benzen çekirdeğinin birleşmesinden ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bu bileşiğin başka bir adı ise 'kumaron'dur. Kumarondan oluşturulan sentetik reçine, yağlı boya katkı maddesi olarak kullanılabilir.

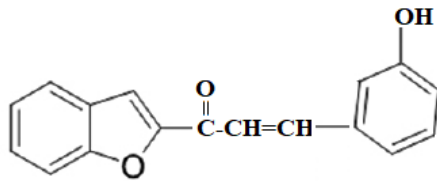


Şekil 1.8. Benzofuran halkası (Taşkın 2016)

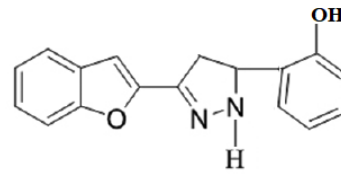
Benzofuranlar pek çok uygulama alanı olan, bisiklik halkalı yapıdaki bileşiklerdir (Kamal ve ark. 2011). Doğal olarak birçok üründe de olduğu bilinen benzofuran türevleri; farmakolojik, psikolojik ve toksik etkiler göstermekte, sedatifler, hipnotik, kimyasal tarım ilaçları, kozmetik, tıbbi ilaçlar, antitümör antiinflamatuvar ve optik parlaticılar olarak birçok alanda yer almaktadır (Kamal ve ark. 2011). Antibakteriyel, angiogenesis inhibitör, antifungal aktivite gibi kuvvetli biyolojik etki gösteren yapılarıdır ve son zamanlarda organik kimya ve ilaç kimyası alanlarında dikkat çekmektedirler. Örneğin; anti-bakteriyel özelliklere sahip 5-metoksi benzofuran doğal benzofuranlardandır (Gilchrist 1985).

Benzofuranların geçen birkaç yılda dikkat çeken önemli özelliklerinden biriside kemoterapik aktiviteleridir (Khan ve ark. 2005). Son zamanlarda, benzofuran türevleri, anti-kanser, antimikrobiyal, nöroprotektif, immüno-modülatör, anti-ammatory ve antioksidan özellikleri de dâhil olmak üzere değerli biyolojik faaliyetlerinden dolayı araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Tan ve ark. 2010).

Bu tez çalışmasında kullanılan benzofuran süstitüe kalkon türevlerinden Kompleks 1'in (3-(Süstitüe Aril)-1-(benzofuran-2-il)-2-propenonlar-3- hidroksibenzaldehit.) 2008 yılında; Kompleks 2'nin (3-(Süstitüe Aril)-1-(benzofuran-2-il)-5-(2-dihidroksi fenil)-2-pirazolin) 2011 yılında sentezleri ve karakterizasyonları Coşkun ve arkadaşları tarafından tamamlanmıştır (Coşkun ve Ahmedzade 2008, Coşkun ve ark. 2011). Kompleks 1 ve 2 şekil 1.9 da gösterilmiştir.



3- (Süstitüe Aril)-1-(benzofuran-2-il)-2-propenonlar-3- hidroksibenzaldehit



3-(Süstitüe Aril)-1-(benzofuran-2-il)-5-(2-dihidroksi fenil)-2-pirazolin)

Şekil 1.9. Tezde kullanılan komplekslerin kimyasal yapıları (Coşkun ve Ahmedzade 2008, Coşkun ve ark. 2011)

1.7. Hücree Canlılığı ve Sitotoksisite

Sitotoksisite, ilaçların ve/veya kimyasalların hücresele etkilerine bakılması için kullanılan bir terimdir (Thangaraj 2016). Sitotoksisitede kullanılan ilaçların ve/veya kimyasalların hücre proliferasyonuna etki yapıp yapmadığına ve hücreyi ölüme götürüp götürmediğine bakılmaktadır (Riss ve ark. 2004).

Günümüzde sitotoksisite tayini farklı yöntemlerle ya da farklı ajanlarla yapılmaktadır. Sitotoksisitede uygulanan ilaçların ve/veya kimyasalların etkisi; enzim etkinliği, hücre yapışması, hücre membranının geçirgenliği, ATP üretimi, nükleotit alımı ve ko-enzim üretimi gibi etkenlere bağlı olarak farklılık göstermektedir (Thangaraj 2016). Sitotoksisite çalışmaları hücrelerin çoğalması ve ölümlü gibi farklı parametreler değerlendirilmektedir (Weyermann ve ark. 2005). Sitotoksisite çalışmalarında luminesans ve kolorimetrik esaslı yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca ilerleyen teknolojiyle yeni ve daha hassas metotlar da uygulanabilmektedir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal maddeler

- Benzofuran süstitüe kalkon türevleri, Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü
- Fetal sığır serumu (FBS), Gibco
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin,10mg/ml streptomisin), Gibco
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Gibco
- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Gibco
- 0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma
- Triton X-100, Sigma
- Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Chemosensitivity Assay, Dcs Innovative Diagnostic Systeme, Hamburg, Almanya
- Tripanmavisi (%0,5), Biological Industries
- Hoechst 33342 62249, Thermo Fisher Scientific, ABD
- Tris bazı TRS001, BioShop, Kanada
- TCA T6399, Sigma, ABD
- Sülforodamin B sc-253615A, Santa Cruz, ABD
- Asetik asit 100063, Merck, Almanya

2.1.2. Sarf malzemeler

- 25cm² ve 75cm²'lik flask, Sunub
- 6 kuyulu plate, Sunub
- 96 kuyulu flat plate, Sunub

- 96 kuyulu beyaz pleyt 3917, Corning, ABD
- 5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Set inject
- 10µl'lik pipet uçları, Expell
- 100µl'lik pipet uçları, Expell
- 200µl'lik pipet uçları, Expell
- 1000µl'lik pipet uçları, Expell
- 10 ml hacimli serolojik pipet, Sunub
- 25 ml hacimli serolojik pipet, Sunub
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Non-pyrogenic
- Steril santrifüj tüpleri (15ml), Sunub
- Steril santrifüj tüpleri (50ml), Sunub
- Thoma lamı, Marienfeld, Almanya
- Kriyovial, Sarstedt, Almanya
- 2 ml'lik cam pastör pipetler, ISOLAB, Almanya

2.1.3. Cihazlar

- Spektrofotometre (EL800UV, BioTeK, USA)
- Saf su cihazı Direct-Q® 3 UV, Merck, Almanya
- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D
- Luminometre (FLx800 Mikroplate Floresans Okuyucu)
- CO₂ inkübatörü, Panasonic, Japonya
- Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve OT4060, Türkiye
- Steril kabin, ESCO, Singapur
- Multipipet cihazı, Multipette eppendorf, Hamburg, Almanya
- Inverted mikroskop, EUROMEX, Hollanda

- Aspiratör, Rocker 300, Tayvan
- Kuru hava sterilizatörü, Elektro-mag M 420, Türkiye
- Santrifüj, NF 800R, Türkiye
- 10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Orange Scientific
- 0,5-5ml pipet, Brand
- 10ml pipet, Eppendorf
- 5-50µl Transferpipet, Thermo Scientific
- Pipet boy, ISO fill
- 20-200µl Transferpipet, Brand, Almanya

2.2. Yöntem

2.2.1. Benzofuran Sübstitüe Kalkon Türevlerinin (Kompleks 1 ve Kompleks 2) Hazırlanması

Benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin (Kompleks 1 ve Kompleks 2) stok çözeltisi 25mM olacak şekilde DMSO ile çözümleri sağlandı. Bu çözünmüş Kompleksler daha sonra 0,5ml'lik tüplere 25'şer µl olacak şekilde alikotlandı ve -20°C'de saklandı. Her deney için kullanılacak miktara göre seyreltmeler ise kültür besiyerinde yapıldı.

2.2.2. Hücre Kültürü

Çalışmamızda MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre soyları kullanıldı. Hücreler kriyovial içerisinde ve -80°C dolaplarda saklandı.

2.2.2.1. Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerini çoğaltılmak amacıyla kriyovialler -80°C den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre süspansiyonları %5 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren 5 ml RPMI ("Roswell Park Memorial Institute Medium") besiyeri içerisine alındı.

Falkon tüp 1000rpm'de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatant olan kısım aspire edildi ve hücre peleti üzerine 2ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı ve hücre süspansiyonu içerisinde 4ml besiyeri bulunan 25cm² flasklara alınarak 37 °C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi.

2.2.2.2. Hücre Soylarının Pasajlanması

Deneyleerde kullanılan hücre soyları, flask yüzeyini tamamen kapladıklarında (konfluent fask) flask içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan arındırılması için 1X PBS (Gibco) ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışmış olan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0.5ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) kullanıldı ve hücreler 37 °C'de, %5 CO₂'li ortamda 4-5 dk inkübe edildi. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı görülen hücrelere, tripsin oranını inhibe edilmesi için en az iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Böylelikle Tripsin-EDTA'nın hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan (falkondaki toplam hacim tripsinin 10 katı olmalı) 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 1000 rpm'e 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti 1ml hücre besiyerinde çözüldükten sonra 9ml besiyeri ilave edildi ve 10ml'lik hücre süspansiyonu 75cm²'lik flasklara alınarak 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Hücre pasajlama metoduyla hücreler istenilen sayıya ulaşana kadar çoğalmaları sağlandı.

2.2.2.3. Hücre Soylarının Stoklanması

Kullanılan hücreler flask yüzeyini tamamen kapladıklarında (konfluent flask) flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) eklendi. Hücreler 37°C'de, %5CO₂'li ortamda 4-5dk inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı görülen hücrelere, tripsin oranını inhibe edilmesi için iki katı kadar besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu içerisinde 2ml besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp (Orange Scientific) içerisine alındı. 1000rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve pelet üzerine her bir

kriyovial için karanlık ortamda 1.5ml dondurucu medium (5ml DMSO+5ml FBS+ 40ml DMEM) ilave edildi. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine konularak -80°C'ye kaldırıldı.

2.2.2.4. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soyları için kullanılan besiyeri ortamı için %5 Fetal Bovine Serum (Hyclone USA), %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin, Gibco), %1 L-glutamin (Gibco) içeren RPMI 1640 (Hyclone USA) solüsyonu kullanıldı.

2.2.2.5. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10µl 0,5ml'lik tüpe alındı ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi (Biological Industries) konarak iyice karışması sağlandı. Hematositometre distile su ile iyice temizlendi. Bu karışımdan 10µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta bu lam üzerinde beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

2.2.3. SRB (Sulforhadamine B) Canlılık Metodu

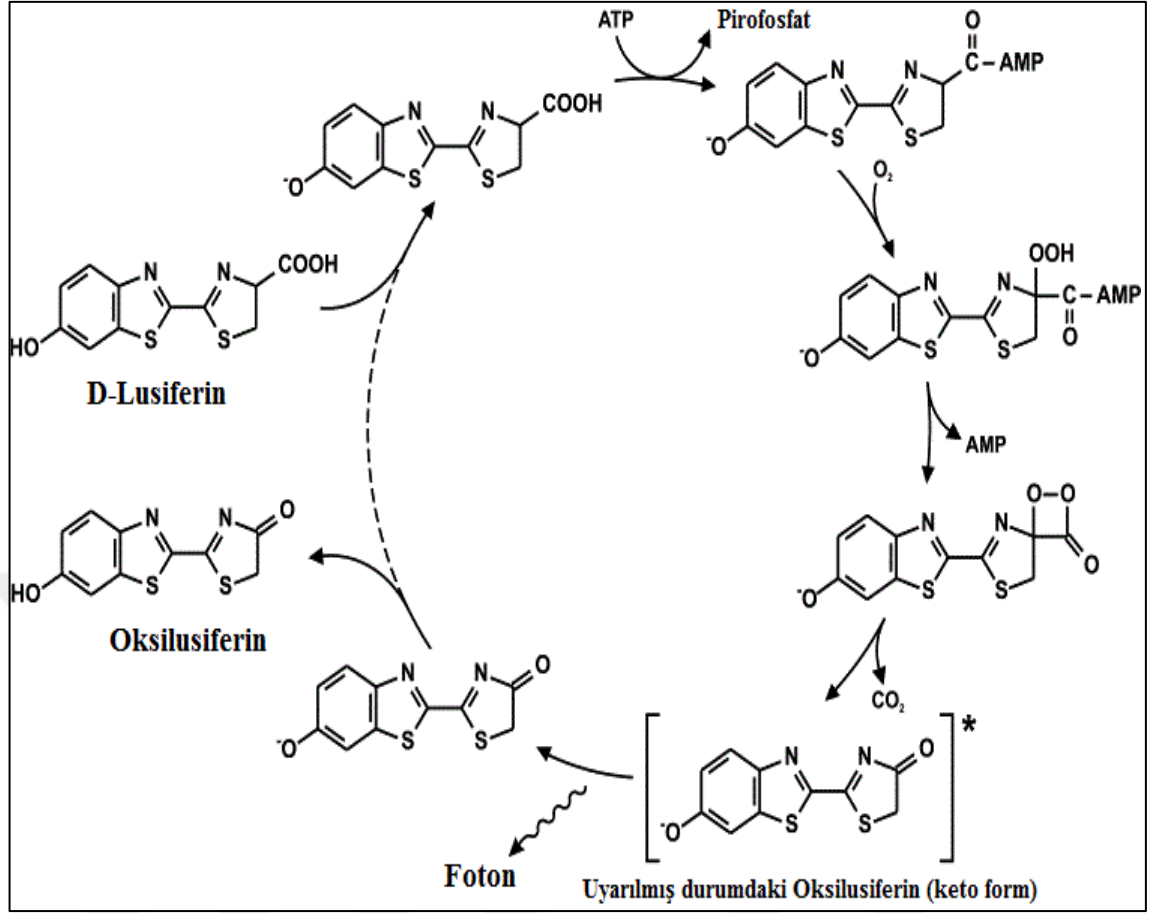
Bu yöntemin prensibi hücre kültüründe büyütülen kanser (veya herhangi bir çeşit hücre) hücrelerindeki protein içeriğinin ölçülmesi temeline dayanır. SRB deneyi, 1990 yılında geliştirilmesinden bu yana, hücre tabanlı çalışmalarda sitotoksiteyi araştırmak için çeşitli tarama deneylerini ucuz bir şekilde yapmak için kullanılmıştır (Skehan ve ark. 1990, Vichai ve Kirtikara, 2006). Bu yöntem, hafif asidik koşullar altında proteinlere bağlanan ve daha sonra bazik koşullar kullanılarak elde edilebilen SRB özelliğine dayanır.

SRB testi için, benzofuran süstitüie kalkon türevlerini (Kompleks 1 ve Kompleks 2) 0-100µM konsantrasyonlarda, 3 tekrarlı ve 100µl olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. MCF-7, MDA-MB-231 ve BEAS-2B hücreleri sayılarak 100µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Ardından hücreler, 24, 48 ve 72 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 96-kuyulu pleytin her bir kuyusuna (son hacim 200µl iken) 50µl %50'lik TCA

(w/v) eklendi ve +4 °C'de 1 saat fikse edildi. Sonrasında, 96-kuyulu pleyt 5 kez distile su ile yıkandı ve pleytin kuruması beklendi. Pleytin her kuyusuna 50µl SRB (%1 asetik asit (v/v) içerisinde %0.4 olacak şekilde hazırlandı) boyası eklendi ve 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 96- kuyulu pleyt 5 kez %1 asetik asitle (v/v) ile yıkandı. Hücrelere bağlanan boyayı çözmek amacıyla 96-kuyulu pleytin her bir kuyusuna 100µl, 10mM Tris Bazı eklendi ve 562nm'de okuma alındı.

2.2.4. ATP (adenozin trifosfat) Canlılık Metodu

ATP metodu lüminesans temelli yöntemle ilgili olarak in vitro sitotoksite ölçümleri için güvenilir ve hassas olarak uygulanabilmektedir. Hücrede en önemli enerji deposu olan ATP; sinyal iletimi, biyolojik sentez, taşıma, hareket gibi önemli prosesler için kullanılmaktadır. Hücre canlılık ölçümlerinde en hassas nokta hücre ATP'dır. Bu yöntemin prensibi hücre kültür ortamında büyütülen normal veya kanser hücrelerindeki intraselüler ATP içeriğindeki ölçülme temeline dayanmaktadır. İntrasellüler ATP içeriğindeki seviye yaşayan hücrelerin sayısının belirlenmek için kullanılan bir belirteçtir (Andreotti ve ark. 1995, Dexter ve ark. 2003, Ulukaya ve ark. 2008). Hücrelerde ATP seviyesi mitokondriyal toksinler veya kemoterapötik ajanlar ile muamele edildiğinde önemli ölçüde azalmaktadır. ATP yöntemi; lüsiferinin Mg^{+2} ve ATP mevcudiyetinde lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olup lüminesans sinyalin oluşmasına dayanmaktadır (Şekil 2.1.). Hücre sayısı ile lüminesans sinyal (ATP konsantrasyonu) arasında doğrusal bir bağlantı bulunmaktadır (Andreotti ve ark. 1995, Mueller ve ark. 2004, Wadhawan ve ark. 2010).



Şrkil 2.1. Lusiferin/lusiferaz biyoluminesans tepkimesi (Roda ve ark. 2009)

ATP testi için, benzofuran süstitüe kalkon türevlerini (Kompleks 1 ve Kompleks 2) 0-100µM konsantrasyonlarda, 3 tekrarlı ve 100µl olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 100µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Ardından hücreler, 48 ve 72 saat 37 °C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, hücre içi ATP moleküllerini dışarı çıkarmak amacıyla, kuyulara 50µl "5X hücre lizis tamponu" pipetlendi ve 4-5 defa pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında 20 dakikalık bekleme süresi ardından, kuyu içerisindeki karışımdan 50µl alınarak, beyaz renkli 96-kuyulu pleytlere aktarıldı. Aktarılan hacmin üzerine, 50µl lusiferin-lusiferaz karışımı (Adenosine 5'-triphosphate bioluminescent somatic cell assay kit) pipetlendi ve bioluminesans luminometre cihazında ölçüldü.

Böylece benzofuran süstitü kalkan türevleri ile muamele edilen ve edilmeyen hücrelerin değerlerine bakılarak sitotoksik/sitostatik etkileri hakkında bilgi edinildi. % Canlılık aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

(%) Canlılık hesabı = $[100 \times (\text{Kompleks ile tedavi edilen hücre absorbanısı} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbanısı} - \text{kör ortalama})]$ olarak hesaplanmaktadır.

2.2.5. Hoechst 33342, Propidiyum İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür duruma gelebilmektedir. Hoechst 33342, DNA'ya bağlanan ve intakt membrandan geçen bir floresan boyadır ayrıca ölü (apoptotik/nekrotik) veya canlı hücrelerin çekirdeklerini boyayabilmek için kullanılmaktadır. Propidium iyodür (PI), yalnızca hasarlı olan hücre membranlarından geçebilen, primer nekrotik veya geç apoptotik/sekonder nekrotik olan bütün ölü hücreleri boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır. Primer nekrozis (hücre hacminin büyümesi fakat piknotik ya da fragmente nükleusların gözlenmemesi) toksik koşullar (hipoksi, hipertermi, iskemi, vb) altında gerçekleşen bilinen ölüm şeklidir. Piknotik nükleus ile karakterize olan sekonder nekrozis apoptozisin geç fazıdır.

Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin membranları erken apoptozis (intakt) olmasına karşın daha ileri periyotlarda geç apoptozis/sekonder nekrozun oluşması ile hücrelerin membran bütünlükleri zarar görmektedir. Sekonder nekroz aşamasına dek olan sürede hücreler non-vital boyalar denilen (PI) boyalar ile boyanırlarsa apoptozis başlamış olmasına karşın membran intakt olmasından dolayı bu gibi boyalar ile boyanamazlar. Yani Hoechst boyası pozitif ve PI negatif boyanmaktadır. Sekonder nekroz oluştuktan sonraki adımlarda hücrelerin membran bütünlüklerin bozulması ile non-vital boyalar ile boyanmaya başlarlar. Dolayısıyla Hoechst pozitif ve PI pozitif boyanmaktadır (Ulukaya ve ark. 2011). İkili boyama metodu kullanılarak ajanlara maruz kalmış hücrelerin ölüm şekilleri hakkında nükleus morfolojisini inceleyerek yapılabilir. Nekrotik hücrelerde; çekirdeğin normal hücrelerden biraz büyük olması ve daha az boyanması özelliği aranırken apoptotik hücrelerde ise çekirdeğin normal hücrelerden daha küçük olma özelliği aranmaktadır.

Bu maksatla, ajanların hücre soyları üzerindeki etkilerinin morfolojik olarak floresan mikroskopta gözlemlenmek için ikili boyama metodu kullanıldı.

İkili boyama yöntemi için; MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soyları sayılarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 100µl içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Kompleks 1 ve Kompleks 2 0-50µM konsantrasyonlarında 100µl içerisinde olacak şekilde kuyulara ilave edildi. Negatif kontrol kuyularına 100µl taze besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler, 48 ve 72 saat 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Komplekslerin uygulamasını takiben, kuyulardan besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine PBS içerisinde konsantrasyonları 1 mg/ml PI, 5mg/ml Hoechst 33342 olacak şekilde hazırlanan ikili boyama çözeltisinden 200µl pipetlendi ve karanlıkta 20 dakika 37°C'de inkübe edildi. Süre sonunda komplekslerin hücrelerde neden olduğu ölüm şekli floresan mikroskop altında değerlendirildi.

2.2.6. Yara İyileşmesi (Migrasyon)

Benzofuran süstitüe kalkon türevlerinin (Kompleks 1 ve Kompleks 2) tedavi sonrası hücrelerin migrasyon (göç etme) özellikleri için yara iyileşmesi (migrasyon) deneyi yapıldı.

Yara iyileşmesi deneyi için, MDA-MB-231 hücreleri 6-kuyulu pleytlere (her kuyucukta 5×10^5 hücre) 2 tekrarlı olacak şekilde ekildi. Ertesi gün, %90 doluluk oranına sahip kuyularda, bir yatay ve bir dikey olmak üzere, 10µl mikro pipet ucuyla yaralar oluşturulmuştur. Yara oluşturulurken yüzeyden kalkan hücreler, 1X PBS ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı ve hücrelerin besiyerleri benzofuran süstitüe kalkon türevlerinin varlığı ve/veya yokluğunda tazelendi. Hemen ardından, yara oluşturulmuş hücrelerin 0. saat görüntüleri invert mikroskop altında elde edildi ve pleytt 37°C'de %5'lik CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. Yara iyileşmesinin takibi 5, 10 ve 15. saatlerde hücre görüntüleri invert mikroskop altında alınarak yapıldı.

2.2.7. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analiz sonuçları Graph Pad bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Yüzde canlılık değerleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak hesaplandı. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p<0,05$, $p<0,01$ ve $p<0,001$ değerlerine göre belirlendi. IC_{50} ve IC_{70} değerleri Microsoft Excel yazılımı kullanılarak hesaplandı.

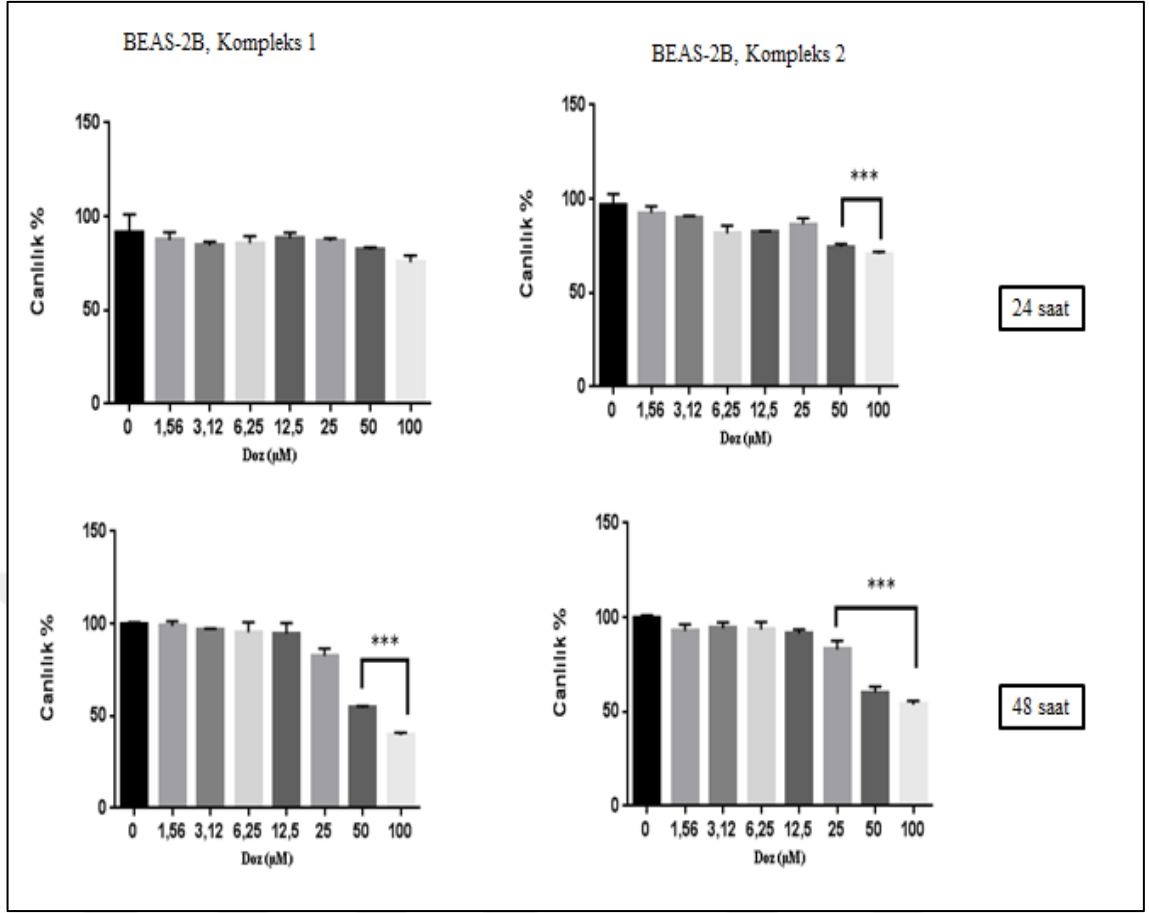


3.BULGULAR

3.1. SRB Canlılık Testi Bulguları

Benzofuran süstitü kalkan türevlerinin (Kompleks 1 ve Kompleks 2) doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik aktiviteleri insan meme kanseri hücre soylarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) ve sağlıklı akciğer hücre soyunda (BEAS-2B) belirleyebilmek için SRB canlılık testi yapıldı. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarına 24, 48 ve 72 saat ve BEAS-2B hücre soyuna ise 24 ve 48 saat süre ile Kompleks 1 ve Kompleks 2 uygulanmıştır.

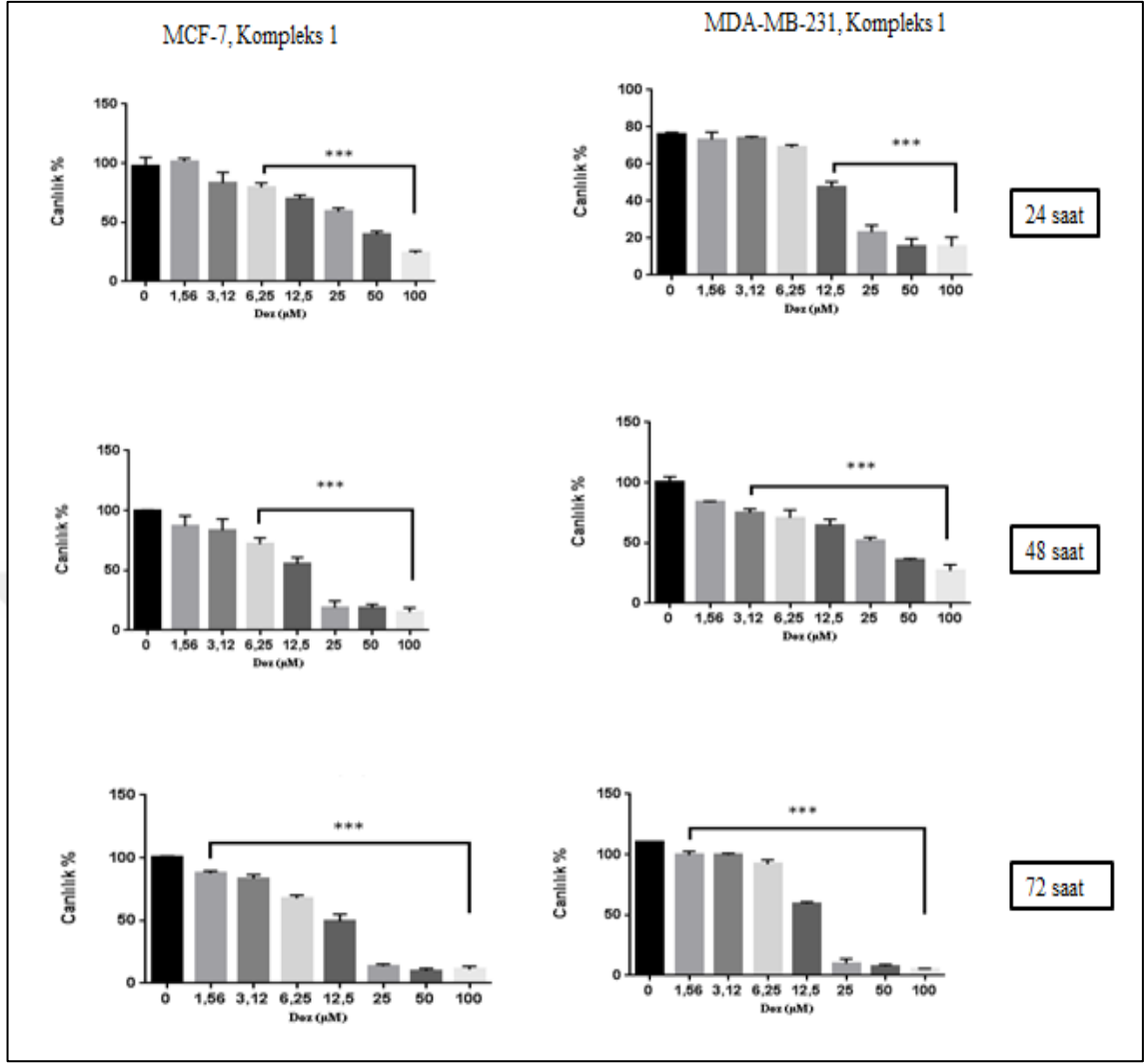
BEAS-2B sağlıklı hücrelerine uygulanan Kompleks 1 ve Kompleks 2'in canlılık yüzdeleri şekil 3.1.'de Kompleks 1'in 24 saatte hücre canlılığı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı ve 48 saate ise sadece yüksek konsantrasyonlarda (50 ve 100µM) istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,001$, Şekil 3.1.). Kompleks 2'nin ise 24 saatte 50 ve 100µM dozlarında; 48 saate ise 25, 50 ve 100µM dozlarında hücre canlılığında %50'nin altına düşmeyen bir azalma belirlendi ($p<0,001$, Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Benzofuran süstitüe kalkon türevi (Kompleks 1 ve Kompleks 2) ile muamele edilen BEAS-2B hücrenin 24 ve 48 saat SRB testine göre canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir.***Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,001$) ifade etmektedir

Kompleks 1'in MCF-7 meme kanseri üzerine etkisi değerlendirildiğinde; 24 ve 48 saatte 6,25µM ve üzerindeki dozlarında, 72 saatte ise 1,56µM dozundan itibaren istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi ($p < 0,001$, Şekil 3.2.). Kompleks 1'in MDA-MB-231 meme kanseri üzerine etkisi değerlendirildiğinde; 24 saatte 12,5, 25, 50 ve 100µM dozlarında, 48 saatte 3,12µM dozunda, 72 saatte ise 1,56µM ve üzeri dozlarında hücre canlılıklarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalmalara sebep olduğu bulundu ($p < 0,001$, Şekil 3.2.).

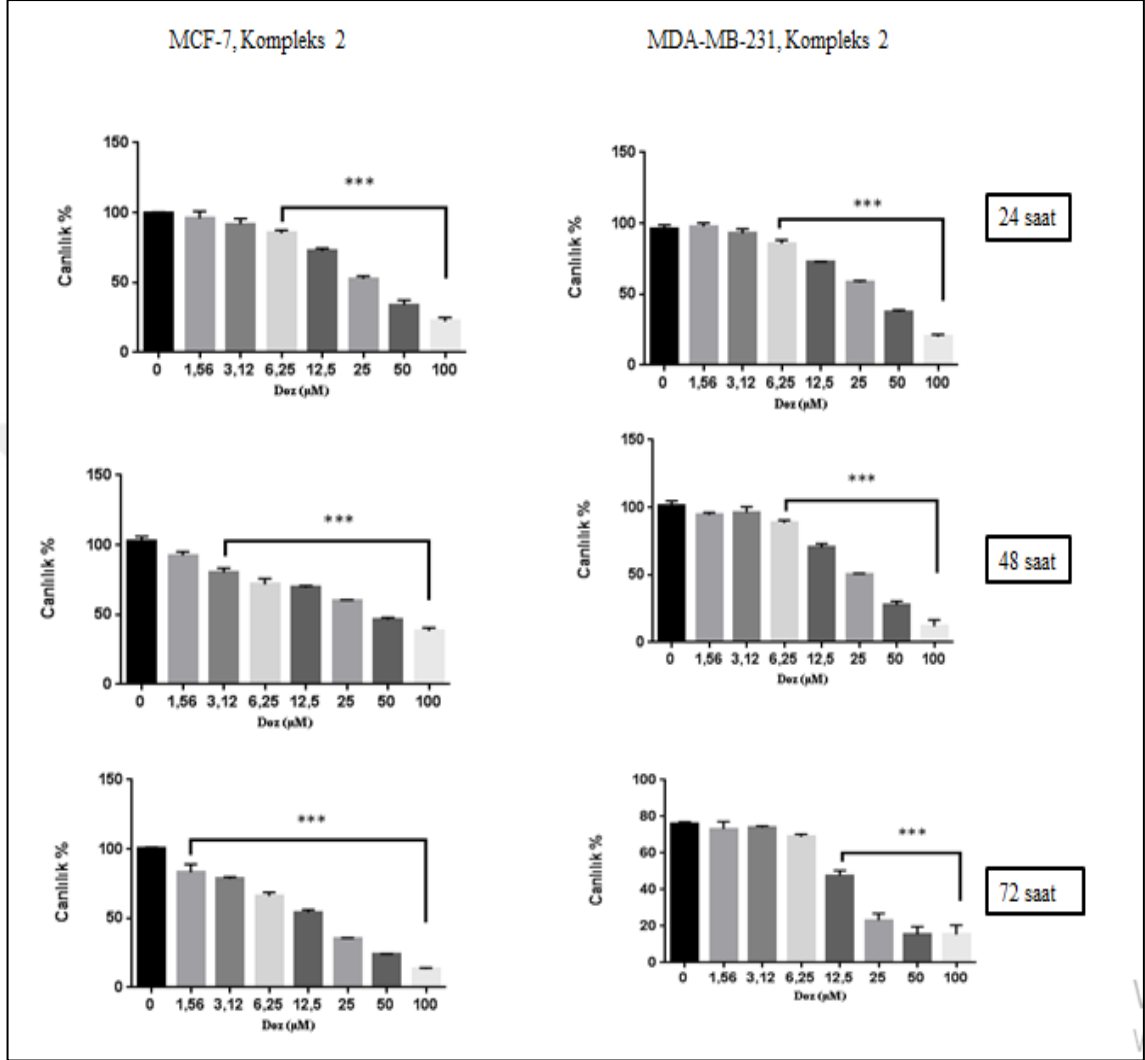
Alınan bu sonuçlar, Kompleks 1'in MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını göstermektedir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Benzofuran sübtitüe kalkon türevi (Kompleks 1) ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat SRB testine göre canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir. ***Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,001$) ifade etmektedir

MCF-7 hücrelerinde Kompleks 2'nin etkisi değerlendirildiğinde; 24 saatte 6,25μM ve üzeri dozlarında, 48 saatte 3,12μM ve üzeri dozlarında, 72 saatte ise tüm dozlarda istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı azalmalar gözlemlendi ($p < 0,001$, Şekil 3.3.). MDA-MB-231 hücrelerinde Kompleks 2'nin 24 ve 48 saatte 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100μM dozlarında, 72 saatte ise 12,5μM dozundan itibaren yüksek dozlarda istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalma bulundu ($p < 0,001$, Şekil 3.3.).

Alınan SRB sonuçlarına göre Kompleks 2'nin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Benzofuran sübtitüe kalkon türevi (Kompleks 2) ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat SRB testine göre canlılık yüzdelerinin grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız kuyunun ortalamasını temsil etmektedir.***Aynı doz içinde hücre soyları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,001$) ifade etmektedir

Sitotoksik verilerin değerlendirilmesinde önemli olan parametrelerden IC_{50} (kontrol hücrelerine kıyasla kompleksler ile hücrelerin % 50'sini öldüren konsantrasyon) ve IC_{70} (kontrol hücrelerine kıyasla kompleksler ile hücrelerin % 70'sini öldüren konsantrasyon) değerlerini hesaplamak için SRB canlılık test sonuçları kullanıldı.

Farklı konsantrasyon ve zamana bağlı olarak komplekslerin MCF-7, MDA-MB-231 ve BEAS-2B hücre soylarında hesaplanan IC₅₀ ve IC₇₀ değerleri Çizelge 3.1’te gösterilmiştir.

IC₅₀ değerleri incelendiğinde, en düşük IC₅₀ değeri Kompleks 1 için 24 saatte MDA-MB-231 hücrelerinde 27,8µM, 48 saatte MDA-MB-231 hücrelerinde 20,5µM ve 72 saatte ise en düşük IC₅₀ değeri MCF-7 hücrelerinde 14,6µM olarak gözlendi (Çizelge 3.1). Bu durum Kompleks 1’in MCF-7 hücresinde 72 saat uygulama sonrasında daha etkili olduğunu göstermektedir.

Kompleks 2’in IC₅₀ değerleri incelendiğinde, en düşük IC₅₀ değeri 24, 48 ve 72 saatte MCF-7 hücrelerinde sırasıyla 43,4µM, 22,3µM ve 13,91µM olarak belirlendi (Çizelge 3.1). Bu da Kompleks 2’in MCF-7 hücresinde 72 saat uygulama sonrasında etkili olduğu göstermektedir.

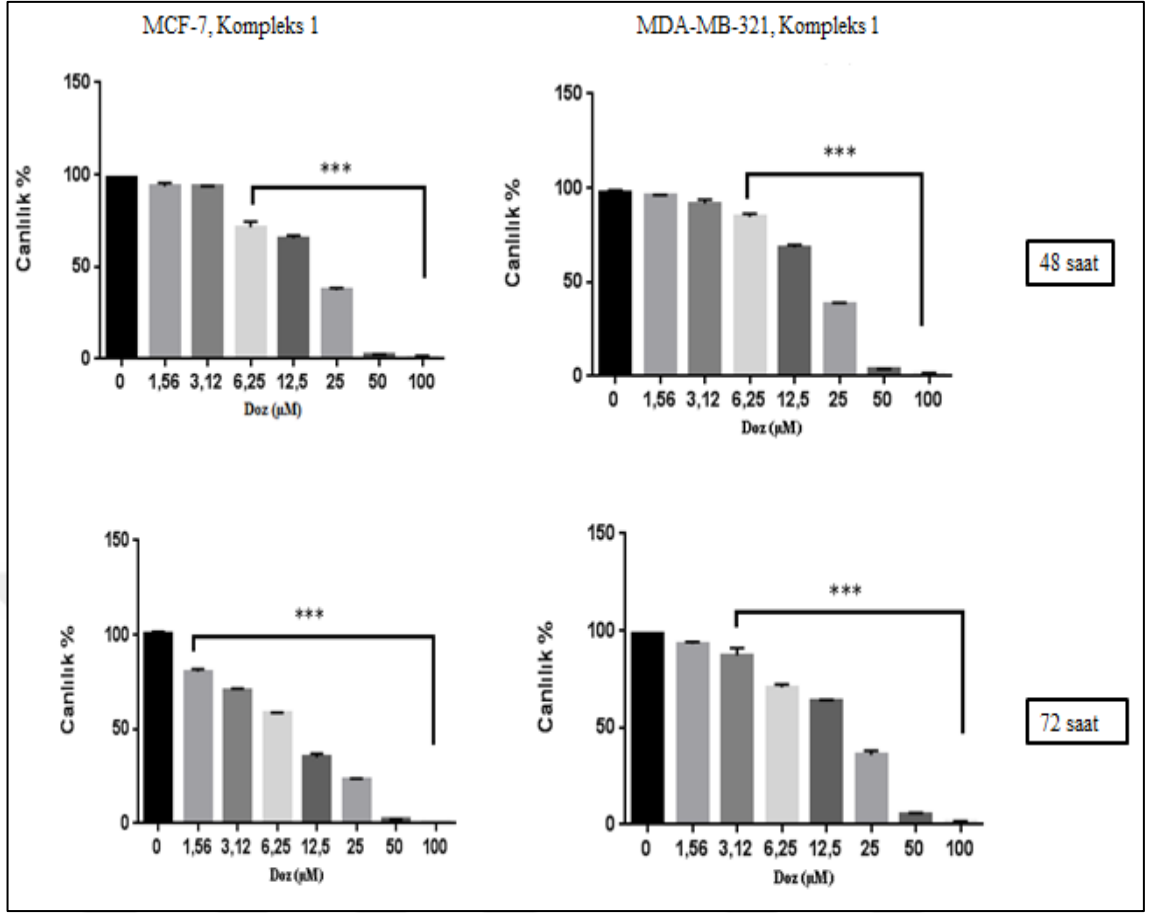
Çizelge 3.1. BEAS-2B, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının SRB canlılık testine göre hesaplanan IC₅₀ ve IC₇₀ değerleri (IC₅₀: Hücrelerin %50’sini öldüren doz, IC₇₀: Hücrelerin %70’ini öldüren doz)

Kompleks 1				Kompleks 2					
Doz (µM)	MCF-7	MDA-MB-231	BEAS-2B	Doz (µM)	MCF-7	MDA-MB-231	BEAS-2B		
IC ₅₀	36,3 µM	27,80 µM	>100 µM	24 saat	IC ₅₀	43,4 µM	54,82 µM	>100 µM	24 saat
	MCF-7	MDA-MB-231	BEAS-2B		MCF-7	MDA-MB-231	BEAS-2B		
IC ₅₀	20,58 µM	20,55 µM	64,93 µM	48 saat	IC ₅₀	22,37 µM	46,86 µM	>100 µM	48 saat
	MCF-7	MDA-MB-231	BEAS-2B		MCF-7	MDA-MB-231	BEAS-2B		
IC ₅₀	14,64 µM	17,95 µM	-	72 saat	IC ₅₀	13,91 µM	19,35 µM	-	72 saat
	MCF-7	MDA-MB-231	BEAS-2B		MCF-7	MDA-MB-231	BEAS-2B		
IC ₇₀	12,22 µM	7,06 µM	>100 µM	24 saat	IC ₇₀	10,88 µM	3,77 µM	>100 µM	24 saat
	MCF-7	MDA-MB-231	BEAS-2B		MCF-7	MDA-MB-231	BEAS-2B		
IC ₇₀	9,76 µM	13,21 µM	36,17 µM	48 saat	IC ₇₀	9,66 µM	17,64 µM	39,18 µM	48 saat
	MCF-7	MDA-MB-231	BEAS-2B		MCF-7	MDA-MB-231	BEAS-2B		
IC ₇₀	7,40 µM	13,39 µM	-	72 saat	IC ₇₀	5,35 µM	11,50 µM	-	72 saat

3.2. ATP Canlılık Testi Bulguları

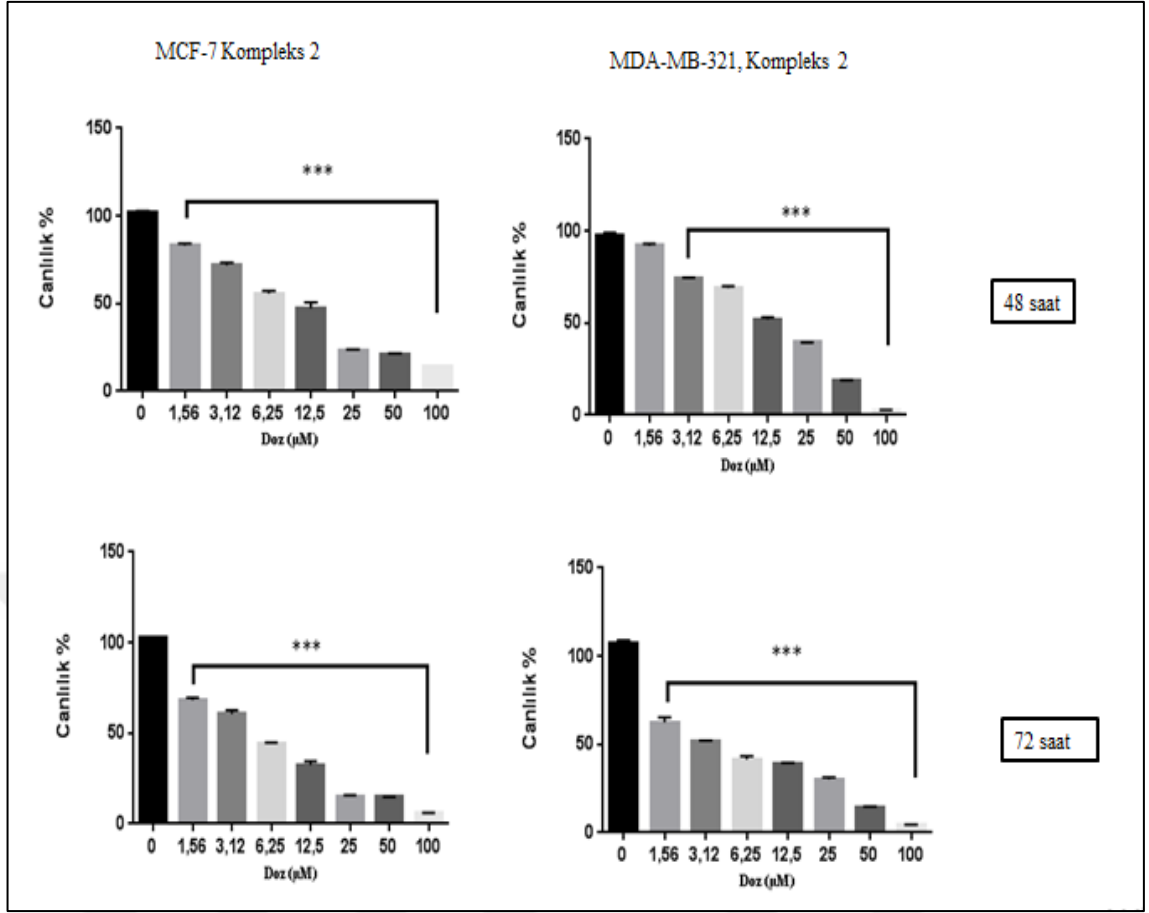
Benzofuran süstitüe kalkon türevlerinin (Kompleks 1 ve Kompleks 2) doza ve zamana bağı olarak insan meme kanseri hücre soylarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) sitotoksisite üzerine etkisini belirlemek için daha hassas olan ATP canlılık testi yapıldı. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarına 48 ve 72 saat ile Kompleks 1 ve Kompleks 2 uygulandıında alınan sonuçlar Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'te gösterildi.

Komplekslerin MCF-7 meme kanseri üzerine etkisi değerlendirildiğinde, Kompleks 1'in 48 saatte 6,25µM ve daha üst dozlarında; 72 saatte ise Kompleks 1'in uygulandığı tüm dozlarında istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalma gözlendi ($p<0,001$, Şekil 3.4). MDA-MB-231 hücrelerinde Kompleks 1'in hücre canlılıklarını 48 saatte 6,25µM ve üzeri dozlarında; 72 saatte ise 3,12µM ve üzeri dozlarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi ($p<0,001$, Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Benzofuran sübtitüe kalkon türevi (Kompleks 1) ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin ATP canlılık testi sonucuna göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir. ***Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,001$) ifade etmektedir

Kompleks 2'in MCF-7 meme kanseri üzerine etkisi değerlendirildiğinde, 48 ve 72 saatlik uygulamalar sonrasında 1,56μM ve üzeri dozlarında istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalma bulundu ($p < 0,001$, Şekil 3.5). MDA-MB-231 hücrelerinde ise, Kompleks 2'in hücre canlılığını 48 saatte 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100μM dozlarında; 72 saatte ise 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 ve 100μM dozlarında istatistiksel olarak kontrole göre anlamlı bir şekilde inhibe ettiği gözlemlendi ($p < 0,001$, Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Benzofuran süstitüe kalkon türevi (Kompleks 2) ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin ATP canlılık testi sonucuna göre yüzde canlılık grafikleri. Her bir veri noktası 3 bağımsız deneyin ortalamasını göstermektedir. ***Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ($p < 0,001$) ifade etmektedir

Sitotoksik verilerin değerlendirilmesinde IC_{50} ve IC_{70} değerlerini hesaplamak için SRB'den daha hassas ve güvenilir olan ATP canlılık testi sonuçları da kullanıldı. Çizelge 3.2.'de farklı konsantrasyon ve zamana bağlı olarak komplekslerin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında hesaplanan IC_{50} ve IC_{70} değerleri gösterilmiştir. IC_{50} değeri incelendiğinde, en düşük IC_{50} değeri Kompleks 1 için 48 saatte MDA-MB-231 hücre soyunda $18,8\mu M$ ve 72 saatte ise en düşük IC_{50} değeri MCF-7 hücre soyunda $8,4\mu M$ olarak hesaplandı (Çizelge 3.2).

Kompleks 2'nin IC_{50} değerleri hesaplandığında, 48 saatte en düşük IC_{50} değeri MDA-MB-231 hücre soyu $3,9\mu M$, 72 saatte ise en düşük IC_{50} değeri MCF-7 hücre soyu $5,1\mu M$ olarak bulundu (Çizelge 3.2).

Böylelikle Kompleks 1'in MCF-7 hücresinde 72 saatlik uygulamasında ve Kompleks 2 için ise MDA-MB-231 hücresinde 48 saatlik uygulamasında en etkili olduğu belirlendi.

Çizelge 3.2. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının ATP canlılık testine göre hesaplanan IC₅₀ ve IC₇₀ değerleri (IC₅₀: Hücrelerin %50'sini öldüren doz, IC₇₀: Hücrelerin %70'ini öldüren doz)

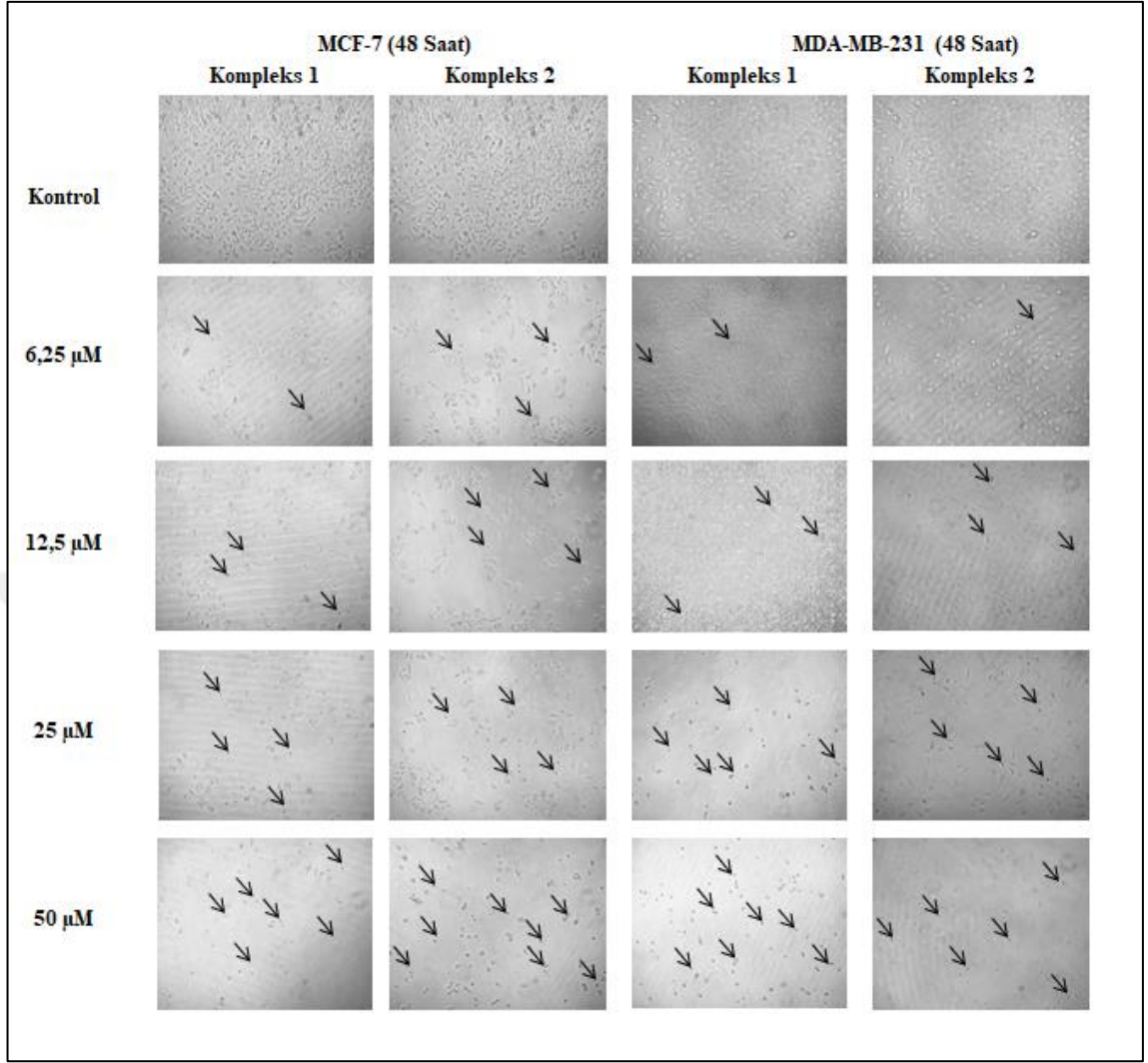
Kompleks 1				Kompleks 2			
Doz (µM)	MCF-7	MDA-MB-231		Doz (µM)	MCF-7	MDA-MB-231	
IC ₅₀	19,67 µM	18,88 µM	48 saat	IC ₅₀	10,52 µM	3,90 µM	48 saat
	MCF-7	MDA-MB-231			MCF-7	MDA-MB-231	
IC ₅₀	8,47 µM	20,22 µM	72 saat	IC ₅₀	5,18 µM	14,39 µM	72 saat
	MCF-7	MDA-MB-231			MCF-7	MDA-MB-231	
IC ₇₀	8,25 µM	6,22 µM	48 saat	IC ₇₀	3,49 µM	1,33 µM	48 saat
	MCF-7	MDA-MB-231			MCF-7	MDA-MB-231	
IC ₇₀	3,33 µM	11,88 µM	72 saat	IC ₇₀	3,12 µM	5,49 µM	72 saat

Benzofuran süstitüe kalkon türevlerinin (Kompleks 1 ve Kompleks 2) doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik aktiviteleri insan meme kanseri hücre soylarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) SRB canlılık testinin sonuçlarını desteklemek amacıyla daha hassas ve güvenilir olan ATP canlılık testiyle de komplekslerin sitotoksik etkileri tekrarlandı.

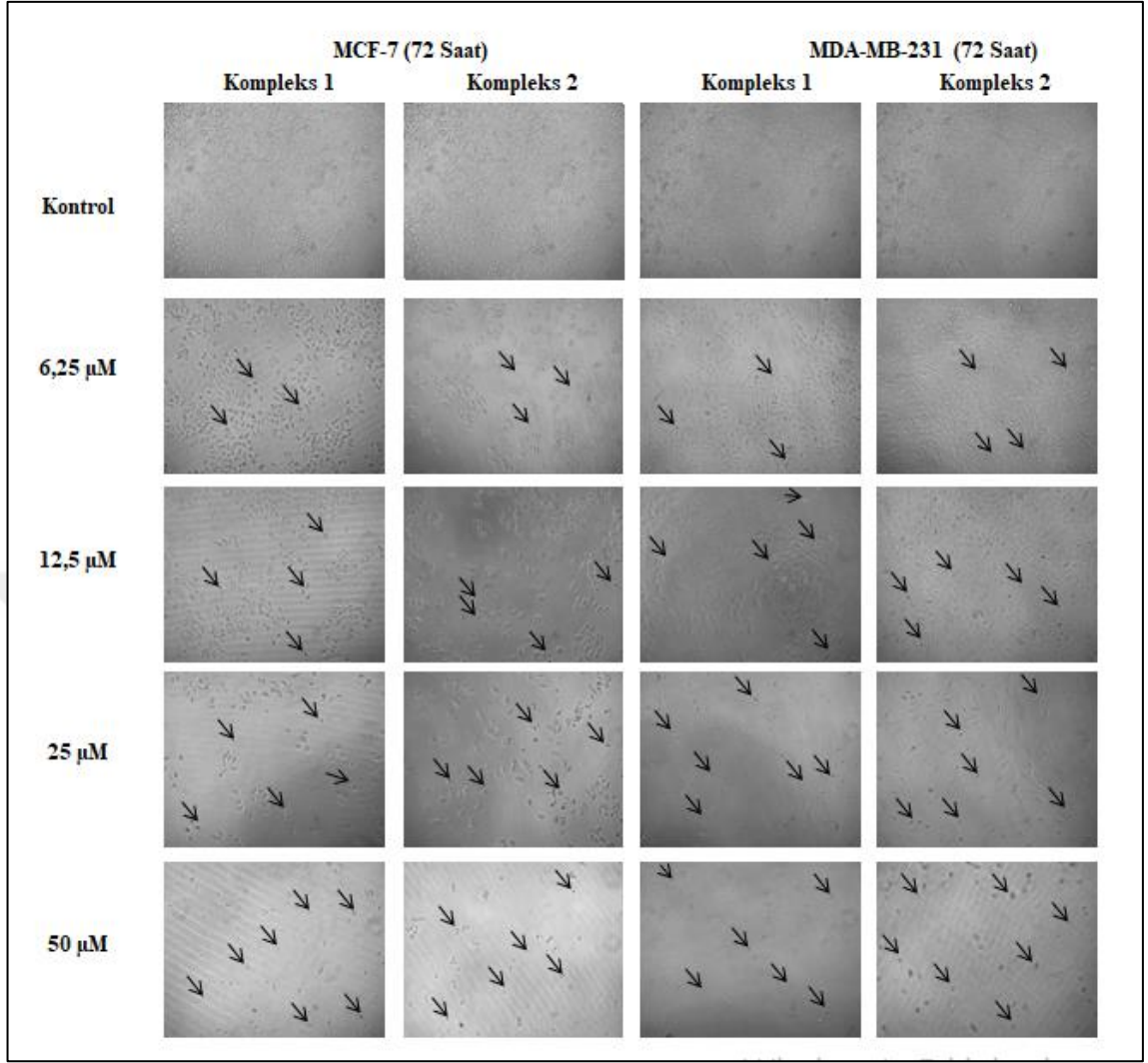
Alınan sonuçlarda ATP verileri ile hesaplanan IC₅₀ değerlerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Böylelikle ATP canlılık testinin daha hassas ve güvenilir olduğunu tekrardan kanıtlamış olmaktadır.

3.3. Faz/Kontrast Mikroskop İle Morfolojik Görüntü Bulguları

MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre soylarına benzofuran süstitüe kalkon türevlerinin (Kompleks 1 ve Kompleks 2) doza (0-50 μ M) ve zamana (48 ve 72 saat) bağı etkisi faz/kontrast mikroskop görüntüleriyle morfolojik olarak değerlendirildi. 48 saatlik veriler Şekil 3.6.'da ve 72 saatlik veriler ise Şekil 3.7.'de gösterilmiştir. Faz/kontrast mikroskobundan elde edilen görüntüler komplekslerin doz bağımlı şekilde hücrelerin flask zemininden ayrılmasına neden olduğunu yani hücrelerin öldüğünü göstermektedir. Komplekslere maruz kalan MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde 25-50 μ M konsantrasyonlarda; küçülme, hücresel blebler (tomurcuklanmalar), apoptotik cisimlerin oluşumu ve hücre yuvarlaklaşması ile hücrelerin yüzer hale gelmesi (hücrelerin ölü olduğunu gösterir) gibi morfolojik değişimler gözlenmiştir. Genellikle, artan konsantrasyonlarda hücrelerin birbirinden ayrılmasına, daha küçük görülmelerine ve sayılarının azalmasına yol açmıştır. Faz/kontrast mikroskop görüntüleriyle de bir kez daha benzofuran süstitüe kalkon türevlerinin (Kompleks 1 ve Kompleks 2) MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre soylarında sitatoksik etkili olduğu morfolojik olarak da gözlemlendi (Şekil 3.6. ve Şekil 3.7.).



Şekil 3.6. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerin Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 48 saatlik muamele sonrasındaki faz/kontrast görüntüleri



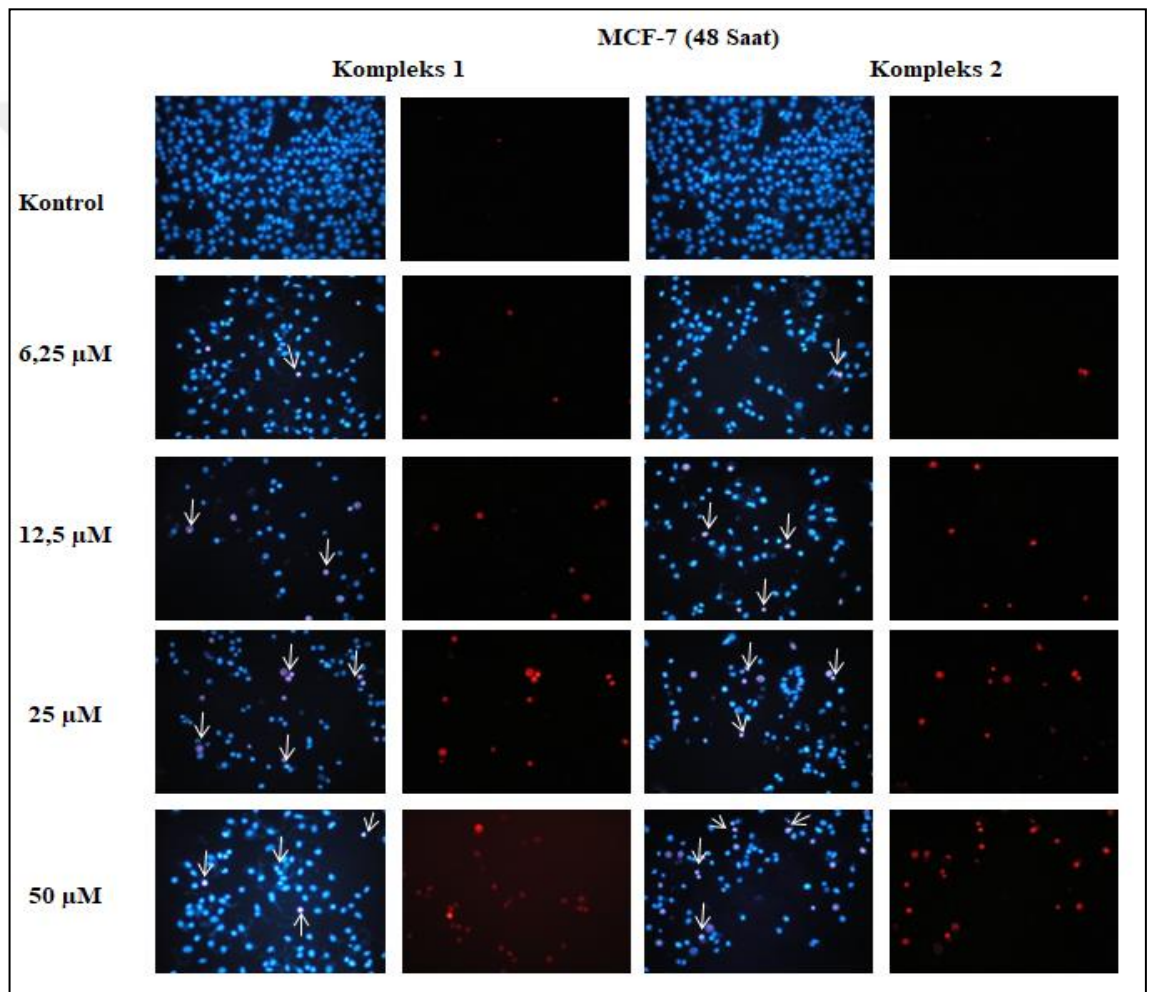
Şekil 3.7. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerin Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 72 saatlik muamele sonrasındaki faz/kontrast görüntüleri

3.4. Hoechst 33342, Propidium İyodür (PI) ile İkili Boyama Yöntemi Bulguları

Hücre ölüm modunu araştırmak için floresan boyama yöntemi uygulandı. Hoechst 33342 dsDNA'ya bağlandığında mavi floresans görüntüsü verilen bir nükleik asit boyasıdır. PI, yalnızca membran hasarlı hücelere girebilen ve böylelikle tüm ölü hüceleri (geç apoptotik/sekonder nekrotik veya primer nekrotik) boyayabilen kırmızı floresan görüntüsü verebilen nükleik asit boyasıdır. Nükleusun; normal hücelere göre daha küçük olması apoptotik hücelerde aranırken, daha az boya alması ve biraz daha büyük olması özelliği ise nekrotik hücelerde arandı.

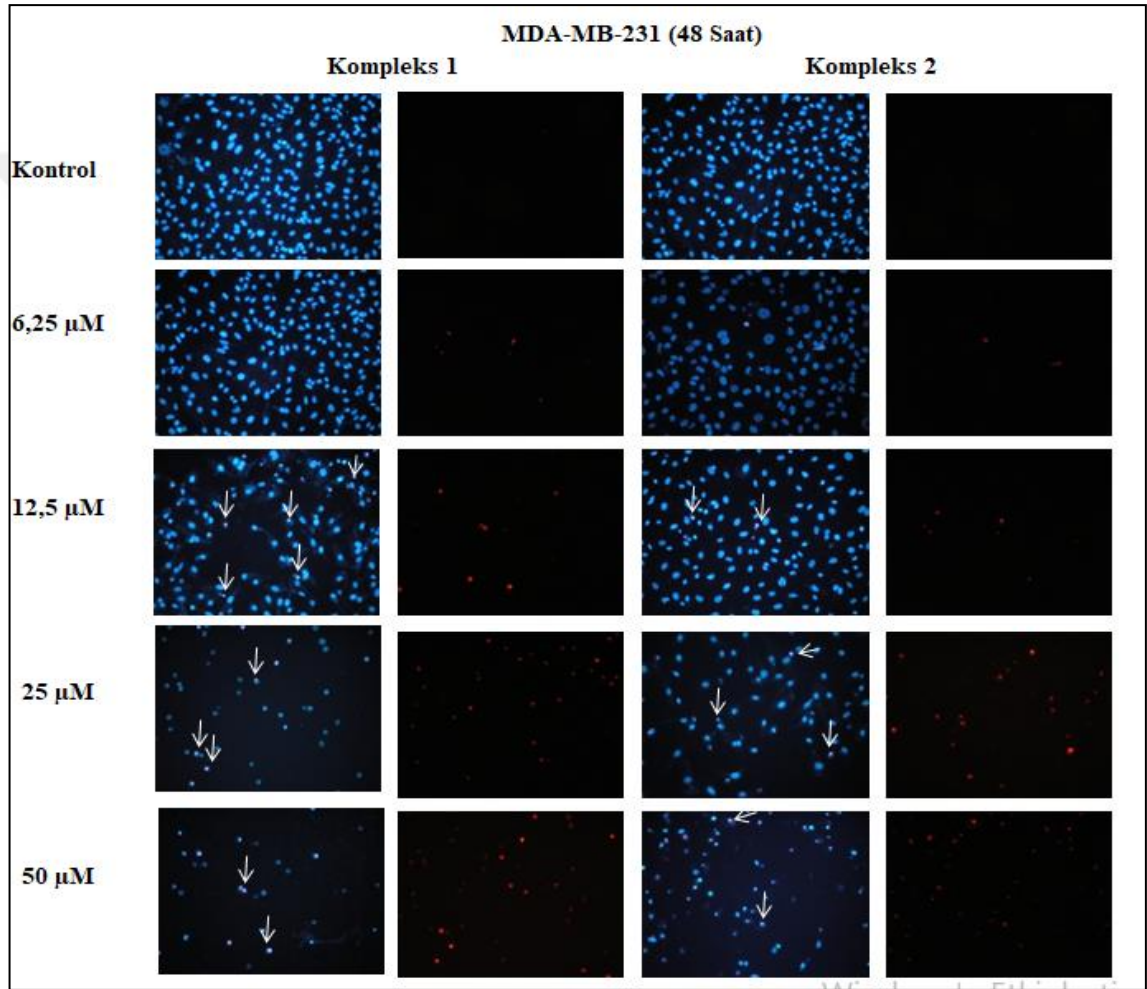
Bu maksatla; MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre soylarına benzofuran sübtitüe kalkon türevleri (Kompleks 1 ve Kompleks 2) 0-50µM konsantrasyonları uygulandı. Söz konusu kompleksler 48 ve 72 saat uygulamasının ardından hücelere ikili boyama metodu uygulanarak floresan mikroskop görüntülerine değerlendirme yapıldı. MDA-MB-231 ve MCF-7 hücelerine 0-50µM benzofuran sübtitüe kalkon türevleri uygulanmasını takiben yapılan 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrasında floresans mikroskop görüntüleri değerlendirildi.

MCF-7 hücre soyularında Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin 48 saat sonrasında doza (6,25, 12,5, 25 ve 50 μ M) bağlı olarak hücre yoğunluğunun kontrole kıyasla azaldığı gözlemlendi (Şekil 3.8.). Her iki kompleksin Hoechst 33342 (mavi) boyama sonucu değerlendirildiğinde doz artışına paralel olarak hücrelerde çoğunlukla piknozis ve bazı hücrelerde nükleer fragmentasyon varlığı gözlemlendi. Özellikle Kompleks 2'nin 25 μ M dozunda piknotik hücrelerin yoğunluğu dikkati çekmektedir. Hücreleri PI (kırmızı) ile boyadığımızda özellikle her iki kompleks için de 50 μ M dozunda yüksek oranda pozitif görüntü vardır.



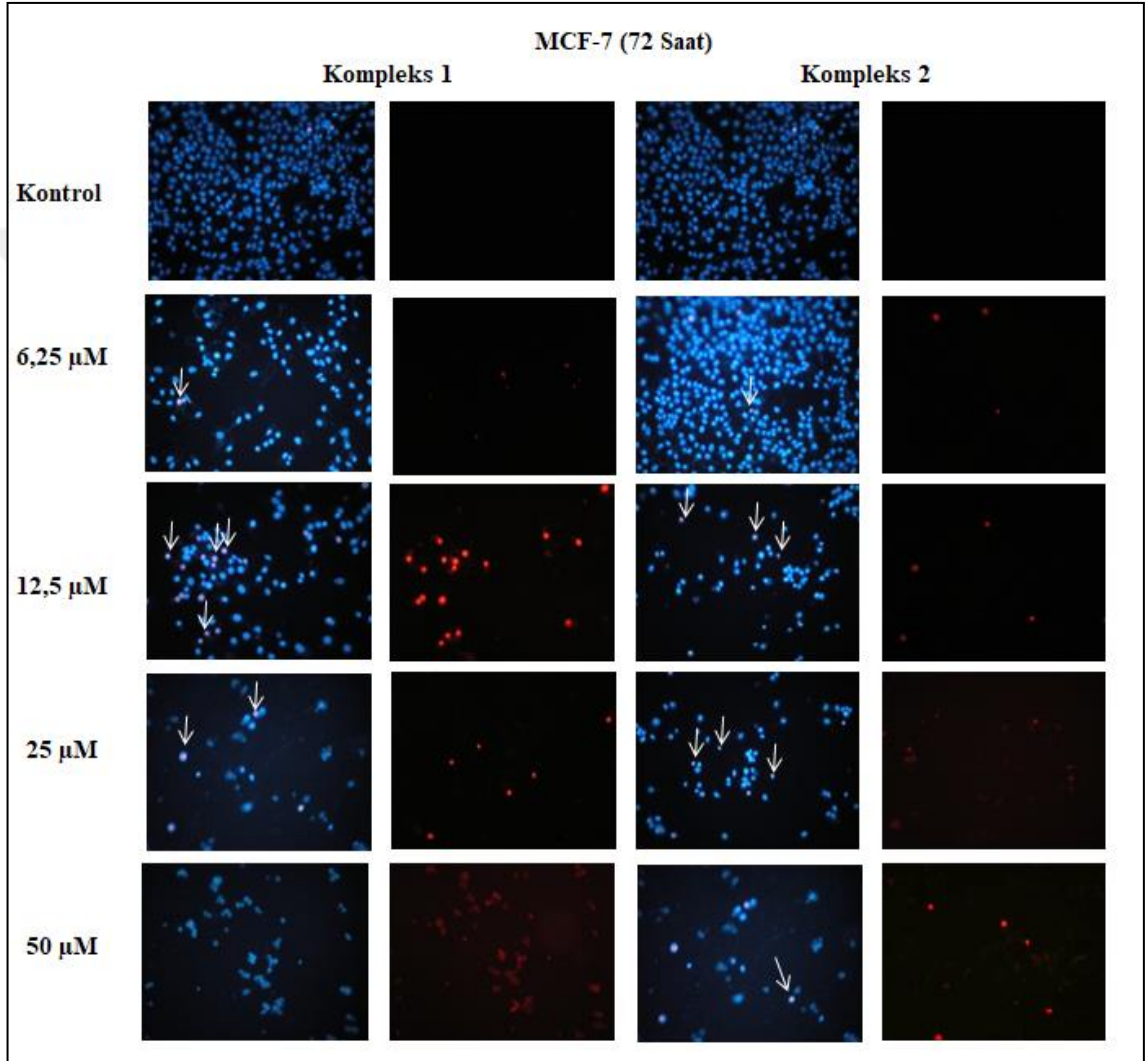
Şekil 3.8. MCF-7 hücrelerini Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 48 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri (oklar piknotik hücreleri göstermektedir)

MDA-MB-231 hücre soylarında Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin 48 saat sonrasında Hoechst 33342 (mavi) floresan boyama sonuçları değerlendirildiğinde doza bağlı olarak hücre canlılıklarında azalmalar gözlemlendi (Şekil 3.9.). Hoechst 33342 boyamasında hücrelerde her iki komplekste de 25 ve 50µM dozlarında hücrelerin küçüldüğü ve piknotik nükleusların varlığı gözlemlenmiştir. Özellikle 25µM dozunda tüm hücrelerde PI pozitifliği gözlemlenmiştir. Buna rağmen 50µM dozunda her iki kompleks içinde hücrelerin çoğu PI boyanmıştır (Şekil 3.9.).



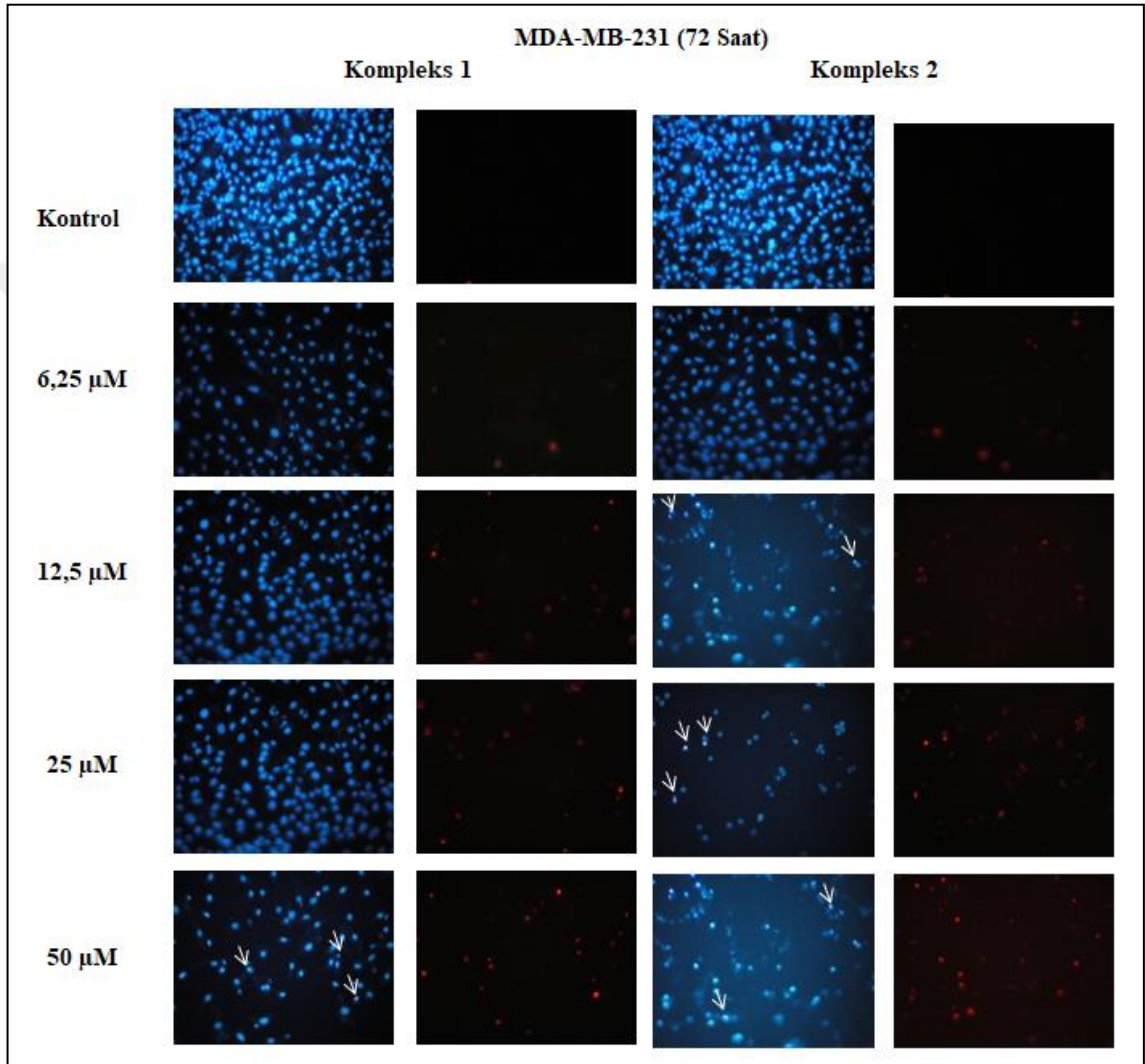
Şekil 3.9. MDA-MB-231 hücrelerini Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 48 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri (oklar piknotik hücreleri göstermektedir)

MCF-7 hücrelerinde Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile muamele sonrasında floresan boyama ile hücre ölümleri değerlendirildiğinde; hücre ölümlerinin doza bağımlı olarak azaldığını gözlemledik (Şekil 3.10.). 72 saat süre sonundaki Hoechst 33342 ve PI floresan boyama sonuçları hücre canlılık analiz sonuçlarımızı teyit etmektedir. Hoechst 33342 boyamasında hücrelerde Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin de 12,5 ve 25 μ M dozlarında hücrelerde küçülmeler ve her iki komplekste PI ile tamamen boyanamayan hücrelerin gözlenmiştir (Şekil 3.10.)



Şekil 3.10. MCF-7 hücrelerini Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 72 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri (oklar piknotik hücreleri göstermektedir)

MDA-MB-231 hücre soyularında Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin 72 saat uygulaması sonrasında floresan boyamada sonucunda doza bağlı olarak kontrole göre hücre yoğunluklarında azalma gözlemlendi. Kompleks 1'in 25 ve 50µM dozlarında ve Kompleks 2'nde 12,5, 25 ve 50µM dozlarında hücreler PI (kırmızı) ile pozitif olarak boyanma olduğunda gözlemlendi (Şekil 3.11.).















Şekil 3.11. MDA-MB-231 hücrelerini Kompleks 1 ve Kompleks 2 ile 72 saatlik muamele sonrasındaki floresan mikroskop görüntüleri (oklar piknotik hücreleri göstermektedir)

3.5. Yara İyileşmesi (Migrasyon Yeteneği) Bulguları

Migrasyon analizinde MDA-MB-231 hücreleri kullanıldı. Bu hücrelerin MCF-7 hücrelerinden daha agresif ve daha hızlı göç etme yeteneğine sahip olması nedeniyle yara iyileşmesi (migrasyon) deneyi sadece MDA-MB-231 hücrelerinde yapıldı.

Yara iyileşmesi deneyinde MDA-MB-231 hücrelerinde benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin 25 ve 50 μ M dozlarda uygulaması sonrasında hücre görüntüleri alınmaya başlandı. Hücreler komplekslerin uygulandığı ilk anda (0. Saat) ve daha sonra devamlı gözlenerek kontrol grubumuzda (tedavi almamış) yara iyileşmesi tamamen oluncaya kadar fotoğraflandı.













Alınan hücre görüntüleri incelendiğinde, kontrol hücrelerinde 5. saatten itibaren yaranın kapanmaya başladığı gözlemlendi. Buna rağmen 25 ve 50 μ M dozlarda Kompleks 1 uygulanan hücrelerde 5. saatte yarada herhangi bir kapanma olmadığı belirlendi. 25 μ M Kompleks 1 uygulamasının 15. saatte yara iyileşmesinde hafif bir kapanmaya neden olduğu gözlenirken 50 μ M dozunda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 3.12.).

		Saat			
		0	5	10	15
Kompleks 1	Kontrol				
	25 µM				
	50 µM				

Şekil 3.12. Benzofuran süstitüe kalkon türevinin (Kompleks 1) MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyon yeteneği üzerindeki etkisi

Kompleks 2'nin MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyon yeteneği üzerine etkileri incelendiğinde; Kompleks 1'e benzer şekilde 50µM dozunun 25µM dozuna oranla daha etkili olduğu ve migrasyon yeteneğini engellediği belirlenmiştir (Şekil 3.13.).

Kontrol hücrelerinde 15. saatte yaranın iyileşmesi gözlenirken Kompleks 2'nin 25µM dozunda yaranın bir miktar kapandığı ve 50µM dozunun yara iyileşmesini tamamen engellediği gözlenmiştir (Şekil 3.13.).

		Saat			
		0	5	10	15
Kompleks 2	Kontrol				
	25 μ M				
	50 μ M				

Şekil 3.13. Benzofuran süstitüe kalkon türevinin (Kompleks 2) uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyon yeteneği üzerindeki etkisi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, bütün dünyada kadınlar arasında en fazla rastlanan kanser tipi olup ve tüm kanser ölümleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Meme kanseri tedavisinde radyoterapi, cerrahi girişimi ve kemoterapi önemli yer tutmaktadır. Son senelerde modern kemoterapi uygulamaları geliştirilmesine karşın tatmin edici bir sonuç elde edilememiştir. Günümüzde uygulanan kemoterapötik ajanların %60'lık kısmı doğal kaynaklardan orjinlenmektedir (Newman ve ark. 2003, Cragg ve Newman 2005). Bazı kemoterapik ilaçlarının yan etkileri ve yüksek toksisitelerinden dolayı yeni oluşturulan ilaçların özellikle kanser hücrelerine sitotoksik ve normal hücrelere daha az toksik olmaları ile yan etkilerinin de az olmaları istenmektedir. Günümüzde klinikte çok sayıda antikanser ajanı çeşitli doğal kaynaklardan (bakteriler, bitkiler, deniz organizmaları, mantarlar ve mikroorganizmalar gibi) elde edilerek kullanılmaktadır (Mann 2002, Prakash ve ark. 2013). Özellikle bitkisel kaynaklardan elde edilen pek çok anti kanser ilaç günümüzde klinikte kullanılmaktadır. Bitkisel kaynakların büyük bir kısmını da oluşturan flavonoidler de antikanser, antiproliferatif ve antimutajenik önemli biyolojik aktivitelere sahiptirler (Chahar ve ark. 2011). Flavonoidlerin antiproliferatif ve antioksidan işlevlerinin yanı sıra hücre farklılaşması, apoptozu tetikleme ve hücre döngüsünde düzenleme gibi özellikleri de bulunmaktadır (Choi ve ark. 2008). Flavonoidlerin bir alt grubu olan kalkanlar doğal ya da sentetik olarak elde edilebilmektedir. Yapılan çalışmalar kalkan türevlerinin, antimikrobiyal, immünomodülatör, nöroprotektif, antioksidan ve antikanser gibi değerli biyolojik özelliklerinin olduğunu göstermiştir (Tan ve ark. 2010, Bahekar ve ark. 2016).

Yukarıdaki bilgiler ışığında bu tez çalışmasında Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde sentezlenen ve karakterizasyonları yapılan benzofuran süstitüe kalkan türevlerinin sitotoksik etkileri insan meme kanseri hücre soylarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) araştırılmıştır. 2003 yılında Nam ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 2'-5'-dihidroksikalkan bileşiklerinin, birçok farmakolojik özelliklerin yanı sıra sitotoksik etkilerin olduğunda gösterilmiştir. Kalkan türevlerinin insan endotel (HUVEC) ve kanser hücrelerine (HCT 116 insan kolon kanseri, B16 Fare melanoma, A31 insan melenoma) karşı sitotoksik etkileri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan kalkan bileşiklerinin önemli derecede antikanser potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir (Nam ve ark. 2003). Son

zamanlarda, farklı kanser hücre soylarında kalkon türevlerinin sitotoksik aktivitesi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır örneğin bir çalışmada, birden çok kalkon türevi sentezlenmiş (COX-1 ve/veya COX-2 seçiciliğine sahip 1,3-diarilprop-2-en-1-on yapısında olan kalkon) ve HepG2, A549 ve MCF-7 hücre soylarında 72, 96 ve 168 saatleri sonucunda sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Nakhjavania ve ark. 2014). Tez çalışmasında kullandığımız kalkon türevlerinin MCF-7 hücre soyunda 72 saatlik IC₅₀ değeri 14,6µM iken Nakhjavania ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise MCF-7 hücre soyunda 72 saatlik IC₅₀ değeri 23,3µM'dır. Bu durumda kullandığımız kalkon türevlerinin aynı zaman diliminde ve aynı hücre soyunda daha etkili çıkmıştır. Jovanovic ve arkadaşları Rutenyum(II)-DMSO kalkon komplekslerinin HeLa hücrelerinde sitotoksik ve apoptotik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Jovanovic ve ark. 2016). Bir kalkon analogu olan α-β-doymamış ketonu taşıyan bir bileşik sentezi ve karakterizasyonunu yapan Zhu ve arkadaşları NCI-H460, A549 ve H1975 hücre soylarında sitotoksikite gösterdiğini bulmuşlardır (Zhu ve ark. 2018). 2006 yılında yapılan bir çalışmada ise, kalkon türevinin (1,3-difenil-2-propenon) MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında 48 saat sonucunda IC₅₀ değerleri sırasıyla 4,9µg/ml, 6,0µg/ml olduğunu aynı zamanda hücre döngüsü ilerlemesinin engellendiğini ve hücre apoptotik sisteminin başlatılmasını göstermişlerdir (Hsu ve ark. 2006). Bizim çalışmamızda ise 48 saatteki IC₅₀ değerleri MCF-7:20,5µM ve MDA-MB-231:20,5µM olarak bulduk böylece Hsu ve arkadaşların yaptığı çalışmadaki farklı kalkon türevlerin aynı hücre soylarındaki poliferasyonu daha etkili bulunmuştur.

Bu tez çalışmamızda, benzofuran süstitüe kalkon türevlerinin MCF-7, MDA-MB-231 ve BEAS-2B hücre soyları üzerine muhtemel baskılayıcı, sitotoksik tesirlerini belirleyebilmek için SRB ve ATP canlılık testi metotları kullanılmıştır. SRB canlılık testine göre Kompleks 1'in BEAS-2B sağlıklı hücreler üzerinde 24 saatte hücre canlılığı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı 48 saate ise sadece yüksek konsantrasyonlar da (50 ve 100µM) istatistiksel olarak hücre canlılığında azalma olduğu belirlenmiştir (p<0,001). Kompleks 2'nin ise 24 saatte 50 ve 100µM dozlarında; 48 saate ise 25, 50 ve 100µM dozlarında istatistiksel olarak hücre canlılığında kontrole göre anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (p<0,001). Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığını 24, 48 ve 72 saatte artan doza bağlı olarak hücre canlılığının %50'nin altında olduğu belirlenmiştir (p<0,001).

SRB hücre canlılığı analiz sonuçları, komplekslerin doza ve zamana bağlı olarak kanser hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) sağlıklı hücrelere (BEAS-2B) oranla daha etkili olduğunu göstermektedir. Bu durum anti kanser ajanlarda aranan bir özellik olup oldukça önemlidir.

SRB canlılık testi sonuçlarımızı doğrulamak amacıyla ATP canlılık yöntemi kullanıldı. Uygulanan ATP canlılık testinde benzofuran süstitü kalkan türevlerinin hücre canlılığı üzerindeki olan etki belirlenirken hücre için ATP miktarı, SRB testinde ise protein içeriğine göre belirlenmektedir. Metabolik aktiviteyi ölçmeye dayanmayan SRB boyası protein bağlayabilen anyonik bir boyadır. Bu nedenle SRB bu yöntemde, bağlanan boya miktarı hücre kütlesi için olarak kullanılabilir. Hücrelerdeki metabolik aktiviteyi gösteren ATP testinde ise hücre canlılığı intraselüler ATP düzeylerine göre belirlenmektedir. Böylelikle SRB ve ATP test sonuçları birbirinden farklı olabilmektedir. ATP seviyesindeki azalmaya bağlı olarak gözlenen hücre canlılığındaki düşüşün SRB testi sonuçlarında gözlenenden daha fazla olması, SRB testinde hücrelerin ölüyor olmasına rağmen hücre proteinlerinin yapılarında bozulmanın başlamamasından kaynaklanmaktadır. Bu farklılık kullanılan ilacın etki mekanizmasına bağlı olarak değişmektedir (Ulukaya ve ark. 2008). Bu yüzden bu tez çalışmamızda farklı iki canlılık testi kullanarak sitotoksisteyi belirledik.

ATP canlılık testine göre Kompleks 1 ve Kompleks 2'nin 48 ve 72 saatlerinde MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığını artan doza bağlı olarak hücre canlılığının %50'nin altında olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$). Böylelikle farklı iki test kullanılarak komplekslerin anti proliferatif aktiviteleri doğrulandı. ATP sonuçları değerlendirilerek IC_{50} değerleri hesaplandı. Bu IC_{50} değerleri de komplekslerimizin antikanser potansiyele sahip olduklarını göstermektedir. Nitekim literatürde çok daha yüksek IC_{50} değerlerine sahip kalkan türevleri bulunmaktadır. Örneğin; 2016 yılında yapılan bir çalışmada, kinazolinon kalkan türevinin HCT-116 kolon kanseri hücreleri üzerinde 6, 12, 24 ve 48 saatte IC_{50} değerleri 600, 140, 26 ve $16\mu M$ olarak hesaplanmış ve mitokondriyal bağımlı apoptozisi indüklediği bildirilmiştir (Wani ve ark. 2016). Yine farklı bir çalışmada, kalkan türevinin (L2H17) kolon kanseri hücre soylarında (IC_{50} değeri SW620 11.65mM, HCT116 25.95mM ve CT26.WT 3.36mM) antikanser aktiviteye sahip olduğunu bildirmiştir (Xu ve ark. 2015). Marquina ve arkadaşları

tarafından 11 (2'-hidroksi-4'-alkoksi kalkon) kalkon türevinin sentezi ve karakterizasyonu yapıldıktan sonra dört insan kanser hücresi soylarında (PC-3, MCF-7, HF-6 ve CaSki) antiproliferatif aktiviteleri açısından biyolojik olarak değerlendirilmiştir. IC₅₀ değerleri PC-3 hücre soyunda düşük çıktığında (IC₅₀ 8.08 ve 13.75µM) daha ileri analizler PC-3 hücre soyunda yapılmış diğer hücre soylarında ise IC₅₀ >50 olduğunda daha ileri analizler yapılmamıştır (Marquina ve ark. 2019). Marquina ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile bizim yaptığımız çalışmayı karşılaştırdığımızda aynı hücre soyunda (MCF-7) farklı kalkon türevlerin IC₅₀ >50 değerleri çıkmıştır. Böylelikle bizim çalışmamız antiproliferatif olarak daha etkili olduğu görülmektedir.

Bu sonuçlar tez çalışmamızda kullandığımız komplekslerin IC₅₀ değerlerinin 3,9 ve 20,2µM arasında değişerek insan meme kanseri hücrelerinde yüksek antikanser potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Nitekim grubumuz tarafından daha önce yapılan bir çalışmada farklı yapıya sahip olan 10 tane benzofuran süstitüe kalkon türevlerin sitotoksik aktiviteleri meme, akciğer ve prostat kanseri hücre soyları üzerinde değerlendirilmiş ve aril-1-(7-etoksi-1-benzofuran-2-il)-2-propenon kalkon türevinin MCF-7, A549 ve PC-3 kanser hücrelerin de sırasıyla IC₅₀ değerleri 2µM, 9µM ve 10µM olarak hücreler üzerinde güçlü inhibe edici etkiler olduğunu göstermişlerdir (Coşkun ve ark. 2017) Tez çalışmasında kullandığımız komplekslerin MCF-7 hücre soyunda 72 saatlik ATP sonucunda Kompleks 1'in IC₅₀ değeri 8,4µM ve Kompleks 2'nin IC₅₀ değeri 5,1µM Coşkun ve arkadaşların yaptığı çalışmada ise MCF-7 hücre soyunda 72 saatlik ATP sonucunda IC₅₀ değeri 2 µM bulunmuştur. Böylelikle grubumuzun önceki yaptığı çalışmadaki farklı kalkon türevinin aynı hücre soyundaki poliferasyonu daha etkili bulunmuştur. 2018 yılında bir dizi triazolokinoksalin-kalkon türevlerinin sentezi yapılmış ve üç hücre soyuna (MCF-7, HCT-116 ve HEPG-2) karşı sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmesi sonucunda bazı triazolokinoksalin-kalkon türevlerinin IC₅₀ değerlerinin 65 ile 34.28µM aralığında olduğunu gösterilmiştir (Alswah ve ark. 2018). Bizim çalışmamızda ise MCF-7 hücre soyunun IC₅₀ değerleri Kompleks 1 için 14,6µM ve Kompleks 2 için 13,9µM olması tezimizde kullandığımız komplekslerin daha etkili olduğunu düşünmekteyiz.

Faz/kontrast mikroskobundan elde edilen görüntüler, komplekslerin doz bağımlı şekilde hücrelerde küçülme, apoptotik cisimlerin oluşumu, hücre yuvarlaklaşması ile hücrelerin yüzer hale gelmesi (hücrelerin ölü olduğunu gösterir) gibi morfolojik değişmelere neden olduğunu göstermiştir. Böylelikle faz/kontrast mikroskop görüntüleriyle de bir kez daha benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin (Kompleks 1 ve Kompleks 2) MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre soylarında sitotoksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir. Hücreler Hoechst 33342 ve PI floresans boyaları kullanılarak floresans mikroskopla görüntüleri alındı. 48 saat sonunda hücreleri eş zamanda Hoechst 33342 (mavi) ve PI (kırmızı) ile boyadığımızda Şekil 3.8.'de özellikle PI (kırmızı) her iki kompleks için de 50µM dozunda yüksek oranda pozitif görüntü almamız bu dozda, MCF-7 hücre soyunda ölüm modunun apoptozisden daha çok sekonder nekrozis=geç apoptoz olduğu söylenebilir. Şekil 3.9.'da ise MDA-MB-231 hücre soyunda 25µM dozunda tüm hücrelerde PI pozitifliği gözlenmedi. 50µM dozunda her iki kompleks içinde hücrelerin çoğu PI boyanmıştır. Bu dozda hücrelerin çoğunluğunun apoptozisden daha fazla sekonder nekrozis ile öldüğünü göstermektedir. 72 saat sonunda hücreleri floresans boyaları ile boyadığımızda Şekil 3.10.'da PI (kırmızı) her iki komplekste 12,5 ve 25µM dozlarında PI ile tamamen boyanamayan hücrelerin varlığı nedeniyle hücre ölüm modunun apoptozis olduğunu göstermektedir. Komplekslerin 25 ve 50µM dozlarında PI pozitif olarak boyanması sonucu bu dozlarda MCF-7 hücrelerin geç apoptoz/sekonder nekrozis yoluyla öldüğünü göstermektedir. Şekil 3.11.'de ise Kompleks 1'in 25 ve 50µM dozlarında ve Kompleks 2'inde 12,5, 25 ve 50µM dozlarında hücreler PI (kırmızı) ile pozitif olarak boyanma olduğunda her iki kompleks için ölüm modunun apoptozis olmadığı ve sekonder nekrozis/geç apoptoz olduğu söylenebilir.

Alınan sonuçlar, hücrelerin ölüm modunun apoptozisden daha çok sekonder nekrozis=geç apoptoz olduğu söylenebilir. Sonuç olarak benzofuran sübstitüe kalkon türevlerin hücrelerde canlılık analizlerimizi destekleyerek apoptozisi indüklediğini göstermiştir.

Farklı kalkon türevlerinin kanser hücrelerinde apoptoza neden olduğu daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, yeni sentezlenmiş kalkon türevi (1-(5'-metoksi-3',4'-metilendioksifenil)-2-metilprop-2-en-1-on) HeLa, CCRF-CEM ve B16-F10.luc2 hücrelerinde apoptozu indüklediği belirlenmiştir. (Canela ve ark. 2017).

2013 yılında yapılan bir çalışmada 2-asetil tiyofeninkalkon türevinin, HT29 hücre soyunda sitotoksik aktivitesinin apoptozis ile gerçekleştiği gösterilmiştir (Vasconcelos ve ark. 2013). Fogaça ve arkadaşları sentezledikleri dört 2-asetiltiyofenin kalkon türevlerinin insan meme kanser hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) 48 saatlik tedaviden sonra 5.52 ile 34.23 μ M arasında değişen IC₅₀ değerleri ile meme kanseri hücrelerinin canlılığının %50'sini inhibe edildiğini ve hücre ölüm modunun apoptoz olduğunu göstermişlerdir (Fogaça ve ark. 2017). Bizim çalışmamızda ise 48 saatlik ATP sonucunda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının IC₅₀ değerleri 3,9 ile 19,6 μ M olması tezimizde kullandığımız komplekslerin daha etkili olduğunu düşünmekteyiz.

2019 yılında yapılan bir çalışmada, 20 farklı ksantin/kalkon türevli bileşiklerin insan pankreas kanseri hücre soyunda (PANC-1) uygulanmış ve IC₅₀ değerleri 0.90 \pm 0.62 ile 1.41 \pm 0.58 μ M arasında değişmekte olup en güçlü bileşik 11'in (IC₅₀ 0.3 μ M) apoptotik etkisi, hücre döngüsü üzerindeki etkisi ve sitotoksik etkisi kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Sonuç olarak bileşik 11'in (1,3-dimetil ksantin) apoptozisi indüklediğini bulmuşlardır (Abou-Zied ve ark. 2019). Bir çalışmada aromatik bir keton olan kalkonun, insan hepatik ve akciğer kanseri hücrelerinin apoptozisi indüklediğini ve kanser hücresi göçünü inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir (Donga ve ark. 2018). Bir başka çalışmada ise yeni bir kalkon türevinin (-1,2,3-triazol türevinin) karaciğer kanseri hücre soylarına uygulanması sonucunda kalkon türevinin HepG2, SNU-423, SMMC7221 ve SNU-398 hücrelerinde sırasıyla IC₅₀ değerleri 0,9 μ M 2,7 μ M 6,2 μ M ve 4,6 μ M olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda konsantrasyona bağlı bir şekilde HepG2 hücrelerinin büyümesini ve koloni oluşumunu inhibe edebildiğini göstermişlerdir (Yan ve ark. 2019).

Kanser ölümlerinin % 90'ında metastaz gelişimi sorumludur (Hanahan ve Weinberg 2000). Metastaz, kanser hücrelerinin oluştukları bölgeden vücudun farklı doku ve organlarına yayılmasıdır. Bu anjiojenez (damar oluşumu), invazyon (yayılma) ve migrasyon (göç etme) gibi birbirleriyle ilişkili bir dizi kompleks ve çok basamaklı olaylar zinciri ile gerçekleşir (Poste ve Fidler 1980). 2010 yılında Juan ve arkadaşları üç kalkon türevinin (4-Maleamik Asit ve 4-Maleamid Peptidi) PC-3 ve LNCaP hücre soylarında hücre canlılığını doza ve zamana bağlı bir şekilde azalttığını ve migrasyonu

önlenmesinde etkili olduğunu göstermişlerdir (Juan ve ark. 2010). Başka bir çalışmada da kalkon türevlerinden L2H17'nin CT26.WT hücrelerinde hücre invazyonu ve migrasyonunu inhibe ettiklerini gösterilmiştir (Xu ve ark. 2015).

Bu tez çalışmasında, komplekslerin hücre migrasyonu üzerindeki inhibitör etkisi değerlendirmek amacıyla insan meme kanseri hücresi MDA-MB-231 kullanıldı. Alınan sonuçlar tez çalışmamızda kullandığımız benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin anti migrasyon aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiş olan benzofuran sübstitüe kalkon türevlerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre soylarında sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. *In vitro* olarak yapılan bu çalışmanın umut vaat edici neticelerden ötürü daha ileri analizlerle etkisinin değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abou-Zied, H.A., Youssif, B.G.M., Mohamed, M.F.A., Hayallah, A.M., Abdel-Aziz, M. 2019.** EGFR inhibitors and apoptotic inducers: Design, synthesis, anticancer activity and docking studies of novel xanthine derivatives carrying chalcone moiety as hybrid molecules. *Bioorg Chem.*, 22(89): 102997.
- Adams, J.M., Cory, S. 2001.** Life or death decisions by the Bcl-2 family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1): 61-66.
- Alswah, M., Bayoumi, A.H., Elgamal, K., Elmorsy, A., Ihmaid, S., Ahmed, E.A.H. 2018.** Design, Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Novel Chalcone Derivatives Bearing Triazolo[4,3-a]-quinoxaline Moieties as Potent Anticancer Agents with Dual EGFR Kinase and Tubulin Polymerization Inhibitory Effects. *Molecules*, 23(1): 48
- Anderson, W. F., Chatterjee, N., Ershler, W. B., ve Brawley, O. W. 2002.** Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the surveillance, epidemiology, and end results database. *Breast Cancer Research and Treatment*, 76: 27–36.
- Andreotti, P.E., Cree, I.A., Kurbacher, C.M., Hartmann, D.M., Linder, D., Harel, G. 1995.** Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 55(22): 5276-5282.
- Anonim, 2015.** kanser <https://dogalbitkiselorganiksaglik.blogspot.com.tr/2015/10/kanser-hakknda-hersey.html> (Erişim tarihi: 01.03.2019).
- Arıcan, E. 2010.** Kanser genetiği ders notları, <http://aves.istanbul.edu.tr/earican/dokumanlar> (Erişim tarihi: 01.01.2019).
- Baehrecke, E.H. 2002.** How death shapes life during development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(10): 779–787.
- Bahekar, S.P., Hande, S.V., Agrawal, N.R., Chandak, H.S., Bhoj, P.S., Goswami K. 2016.** Reddy Sulfonamide chalcones: Synthesis and in vitro exploration for therapeutic potential against *Brugia malayi*. *Eur. J. Med. Chem*, 29(124): 262-269.
- Barkla, D.H., Gibson, P.R. 1999.** The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology*, 31(3): 230-238.
- Bauer, J. H., Helfand, S. L. 2006.** New tricks of an old molecule: lifespan regulation by p53. *Aging cell*, 5(5): 437-440.
- Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A., Caggiano, V. 2007.** Descriptive analysis of estrogen receptor (er)-negative, progesterone receptor (pr)- negative, and her2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: A population- based study from the california cancer registry. *Cancer*, 109: 1721-1728.
- Bortner, C. D., Cidlowski, J. A. 2014.** Ion channels and apoptosis in cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1638): 20-1304.
- Brown, L. F., Berse, B., Jackman, R. W., Tognazzi, K., Guidi, A. J., Dvorak, H. F., Senger, D. R., Connolly, J. L., Schnitt, S. J. 1995.** Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Human pathology*, 26(1): 86-91.
- Cabadak H. 2008.** Hücre Siklusu ve Kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3) : 51 – 56.
- Cachot, J., Galgani, F., Vincet, F. 1998.** cDNA cloning and expression analysis of flounder p53 tumour suppressor gene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 121(3): 235-242.

- Cadoo, K. A., Fournier, M. N., Morris, P. G. 2013.** Biological subtypes of breast cancer: Current concepts and implications for recurrence patterns. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 57: 312-321.
- Canela, M.D., Noppen, S., Bueno, O., Prota, A.E., Bargsten, K., Saez-Calvo, G., Jimeno, M.L., Benkheil, M., Ribatti, D., Velazquez, S., Camarasa, M.J., Díaz, J.F., Steinmetz, M.O., Priego, E.M., Perez-Perez, M.J., Liekens, S. 2017.** Antivascular and antitumor properties of the tubulin-binding chalcone TUB091. *Oncotarget*, 28(9): 14325-14342.
- Chahar, M.K., Sharma, N., Dobhal, M.P. 2011.** JC. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev*, 5: 1–12.
- Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. 2000.** Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radicals Biology and Medicine*, 29(3-4): 323-33.
- Chang, H.Y., Yang, X. 2000.** Proteases for Cell Suicide: functions and Regulation of Caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 821-846.
- Choi, B.H., Kim, W., Wang, Q.C., Kim, D.C., Tan, S.N., Yong, J.W., Kim, K.T., Yoon, H.S. 2008.** Kinetin riboside preferentially induces apoptosis by modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in cancer cells. *Cancer Lett*, 1: 37-45.
- Cohen, J.J. 1993.** Apoptosis. *Immunology Today*, 14(3): 126-130.
- Coleman C. 2017.** Early Detection and Screening For Breast Cancer. *Seminars in Oncology Nursing*, 33(2):141-155.
- Collins, K. K., Liu, Y., Schootman, M., Aft, R., Yan, Y., Dean, G. 2011.** Effects of breast cancer surgery and surgical side effects on body image over time. *Breast cancer research and treatment*, 126(1):167-176.
- Conradt, B., Horvitz, H.R. 1998.** The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell*, 93(4): 519-529.
- Cook, N.C., Samman, S. 1996.** Flavonoids. Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects and Dietary Sources. *J Nutr Bioche*, 7: 66–76.
- Cory, S., Adams, J.M. 2002.** The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or death switch. *Nat. Rev. Cancer*, 2(9): 647-56.
- Coşkun D., Ahmedzade M. 2008.** 3-(Substituted Aryl)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propenones, Part 1: Synthesis and Characterization of Some Novel Chalcones. *Synthetic Communications*, 38(21): 3613-3622.
- Coşkun D., Ahmedzade M., Kirbağ S. 2011.** 3-(Substituted Aryl)-1-benzofuranyl-2-propenones: Antimicrobial Properties of Some Chalcones-Type Compounds and their 2-Pyrazoline Derivatives. *E-Journal of Chemistry*, 8(4): 1574-1581.
- Coşkun, D., Erkisa, M., Ulukaya, E., Coşkun M. F., Arı, F. 2017.** Novel 1-(7-ethoxy-1-benzofuran-2-yl) substituted chalcone derivatives: Synthesis, characterization and anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 136: 212-222.
- Cotter, T. G. 2009.** Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews Cancer*, 9(7): 501-507.
- Cragg, G.M., Newman, D.J. 2005.** Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1): 72–79.
- Cui, J., Hopper, J.L. 2000.** Why are the majority of hereditary cases of earlyonset breast cancer sporadic? A simulation study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 9(8): 805-12.
- Çefle K. 2003.** p53 tümör süpresör geni. *İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası*, 66(2):121-126.

- Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., Ezzati, M. 2005.** Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *The Lancet*, 366(9499): 1784-1793.
- Danial, N. N., Korsmeyer, S. J. 2004.** Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2): 205-219.
- Denault, J.B., Salvesen, G.S. 2002.** Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev.*, 102 (12): 4489-500.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A. 2007.** Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13: 4429-4434.
- Dent, R., Hanna, W. M., Trudeau, M., Rawlinson, E., Sun, P., Narod, S. A. 2009.** Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 115: 423-428.
- Dexter, S.J., Camara, M., Davies, M., Shakesheff, K.M. 2003.** Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomaterials Journal*, 24: 27-34.
- Di Cosimo, S., Baselga, J. 2010.** Management of breast cancer with targeted agents: importance of heterogeneity. *Nature reviews Clinical oncology*, 7(3): 139-147.
- Donga, N., Liu, X., Zhao, T., Wang, L., Li, H., Zhang, Z., Li, X., Bai, X. Zhang, Y., Yang, B. 2018.** Apoptosis-inducing effects and growth inhibitory of a novel chalcone, in human hepatic cancer cells and lung cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105: 195-203.
- Dotzlaw, H., Leygue, E., Watson, P.H., Murphy, L.C. 1999.** Estrogen receptor-beta messenger RNA expression in human breast tumor biopsies: relationship to steroid receptor status and regulation by progestins. *Cancer Research*, 59(3): 529-532
- Duarte, J., Perez-Vizcaino, F., Jimenez, J. Tamargo, J. Zarzuelo, A. 2001.** Flavonoids and cardiovascular disease. *Studies in Natural Product Chemistry*, 25: 565-605.
- Dumont, P., Leu, J. J., Della Pietra, A. C., George, D. L., Murphy, M. 2003.** The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature genetics*, 33(3): 357-365.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, P.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercewr, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. 1993.** WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 75(4):817.
- Elmore, S. 2007.** Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathology*, 35(4): 495-516.
- Erdoğan, B.B. 2003.** Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi*, 4(3): 165-174.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z. & Hancock, D. C. 1992.** Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, 69(1): 119-128.
- Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J. 2005.** Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11): 719-727.
- Fischer, U., Janicke, R.U., Schulze-Osthoff, K. 2003.** Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation*, 10(1): 76-100.
- Fischer, U., Schulze-Osthoff, K. 2005.** New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacological reviews*, 57(2): 187-215.

- Fogaça, T.B.C., Martins. R.M., Begnini, K.R., Carapina, C., Ritter, M., Pereira, C.M., Seixas, F.K., Collares, T. 2017.** Apoptotic effect of chalcone derivatives of 2-acetylthiophene in human breast cancer cells. *Pharmacol Rep*, 69(1): 156-161.
- Ford, W.C.L. 2001.** Biological mechanisms of male infertility. *The Lancet*, 357(9264): 1223-1224.
- Franz, T.A., Kidson, S.H. 1997.** Mapping of interdigital apoptosis in the chick and duck hindlimb. *Embryology*, 93(2): 85-94.
- Gewies, A. 2003.** Introduction to Apoptosis. ApoReview. <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf> (Erişim tarihi: 29.06.2019).
- Gilchrist, T.L. 1985.** Heterocyclic Chemistry. Longman Scientific, England, 174p.
- Globocan 2018.** Breast cancer. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20/Breast-fact-sheet.pdf> (Erişim tarihi: 01.06.2019)
- Golstein, P., Kroemer, G. 2007.** Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1): 37-43.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000.** The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1): 57-70.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, J.D. 2002.** Flavonoid antioxidants. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584
- Hekim, N. 2014,** Apoptosis ve nekroz. bilimvebilimadami.com/programli-hücreölümleri-birbirlerinden-farklı-olabilir (Erişim Tarihi: 22.05.2019)
- Hickman, J.A. 1992.** Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev*, 11:121-39.
- Higa, G.M. 2009.** Breast cancer: beyond the cutting edge. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 10(15): 2479-98.
- Holdenrieder, S., Stieber, P. 2004.** Apoptotic markers in cancer. *Clinical Biochemistry*, 37: 605-617.
- Holliday, D. L., Speirs, V. 2011.** Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, 13(4): 215.
- Hsu, Y.L., Kuo, P.L., Tzeng, W.S., Lin, C.C. 2006.** Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Food Chem Toxicol*, 44(5): 704-13.
- Huang, H. J., Neven, P., Drijkoningen, M., Paridaens, R., Wildiers, H., van Limbergen, E., ve ark. 2005.** Association between tumour characteristics and her-2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary operable breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 58: 611-616.
- Huang, K. C. 1998.** The pharmacology of Chinese herbs. CRC press. China, 544p
- Hudis, C. A. 2007.** Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. *New England Journal of Medicine*, 357: 39-51.
- Hunter, A. M., LaCasse, E. C., Korneluk, R. G. 2007.** The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*, 12(9): 1543-1568.
- Iwase, H., Kurebayashi, J., Tsuda, H., Ohta, T., Kurosumi, M., Miyamoto, K. 2010.** Clinicopathological analyses of triple negative breast cancer using surveillance data from the Fig. 2 Estimates of 5-year relative survival for female breast cancer patients in selected countries. *Cell Biochem Biophys*, 72: 333–338
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. 2011.** Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2): 69-90.
- Jovanovic, K.K., Gligorijevic, N., Gaur, R., Mishra, L., Radulovic, S. 2016.** Anticancer activity of two ruthenium(II)-DMSO-chalcone complexes: Comparison of cytotoxic, pro-apoptotic and antimetastatic potential. *J. Buon.*, 21(2): 482-490.

- Juan, R., Claudia, A., Luis, V., Neira, G., Jose, D., Bianca, N., Michael, H., Radostina, G., Hans, B., Carsten, S., Klaus, J., Michael, L., Anja, R., 2010.** New 4-Maleamic Acid and 4-Maleamide Peptidyl Chalcones as Potential Multitarget Drugs for Human Prostate Cancer, *Pharmaceutical Research*, 28(4): 907-919.
- Kamal, M., Shakya, K. A., Jawaid, T., 2011.** Benzoforals: a New Profile Of Biological Activities. *International Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, 1(3).
- Karimi P., Shahrokni A., Nezami Ranjbar MR. 2014** Implementation of proteomics for cancer research, past present and future, *Asian Pac J Cancer Prev*, 15: 2433-2438.
- Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J., Evan, G. 1997.** Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI (3) K and PKB. *Nature*, 385: 544-548.
- Kaya, M. 2007.** Bazı monoteren ve uçucu yağların, hücre çoğalması ve apoptozis üzerine etkilerinin memeli hücre kültürleriyle araştırılması. *Y.Lisans Tezi*, AÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.
- Keane, R.W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Bethea, J.R., Krajewski, S., Reed, J.C., Dietrich, W. D. 2001.** Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60: 422-429.
- Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J., Kroemer, G. 2011.** Cell death assays for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(3): 221-237.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. 1972.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4): 239.
- Khan, M.W., Alam, M.J., Rashid, M.A., Chowdhury, R., 2005.** A new Structural alternative in benzo [b] furans for antimicrobial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13: 4796-4805.
- Kopnin, B.P. 2000.** Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, 65: 2-27.
- Kroemer, G., Reed, J.C. 2000.** Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.*, 6(5): 513-519.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. 2005.** Cellular adaptations, cell injury, and cell death: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. *Elsevier Saunders*, 3-46.
- Laloo, F., Evans, D.G. 2012.** Familial breast cancer. *Clin Genet*, 82(2): 105-114.
- Lamkanfi, M. 2011.** Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat. Rev*, 11: 213 – 220.
- Lawen, A. 2008.** Apoptosis-an introduction. *BioEssays*, 25(9): 888-896.
- Lu, J. J., Dang, Y. Y., Huang, M., Xu, W. S., Chen, X. P., Wang, Y. T. 2012.** Anti-cancer properties of terpenoids isolated from *Rhizoma Curcumae*—A review. *Journal of ethnopharmacology*, 143(2): 406-411.
- Lu, J., Ashwell, K., Ken, W.S., Waite, P. 2000.** Advances in spinal cord injury: *Role of Apoptosis*. *Spine*, 25: 1859-1866.
- Lunardi, F., Guzela, M., Rodrigues, A. T., Correa, R., Eger-Mangrich, I., Steindel, M., Grisard, E. C., Assreuy, J., Calixto, J. B., Santos, A. R. S. 2003.** Tripanocidal and Leishmanicidal Properties of Substitution-Containing Chalcones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 1449-1451.

Mahapatra, D. K., Bharti, S. K., Asati, V., 2015. Anti-cancer Chalcones: Structural and Molecular Target Perspectives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 98(15): 69-114.

Mann, J. 2002. Natural products in cancer chemotherapy: past, present, and future. *Nat.Rev. Cancer*, 2(2): 143-148.

Marquina, S., Maldonado-Santiago, M., Sánchez-Carranza, J.N., Antúnez-Mojica, M., González-Maya, L., Razo-Hernández, R.S., Alvarez, L. 2019. Design, synthesis and QSAR study of 2'-hydroxy-4'-alkoxy chalcone derivatives that exert cytotoxic activity by the mitochondrial apoptotic pathway. *Bioorg Med Chem.*, 27(1): 43-54.

McPherson, K., Steel, C.M., Dixon, J.M. 2000. ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ (Clinical research ed.)*, 321: (7261).

Morton, J. P., Timpson, P., Karim, S. A., Ridgway, R. A., Athineos, D., Doyle, B., 2010. Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1): 246-251.

Möller, T., Olsson, H., Ranstam, J. 2002. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *The Lancet*, 360(9328): 187-195.

Mueller, H., Kassack, M.U., Wiese, M. 2004. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *Journal of Biomolecular Screening*, 9: 506–515.

Mund, T., Gewies, A., Schoenfeld, N., Bauer, M.K. and Grimm, S. 2003. Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *Faseb J.*, 17(6): 696-8.

Nakamura, K., Bossy-Wetzel, E., Burns, K., Fadel, M. P., Lozyk, M., Goping, S., Opas, M., Bleackly, R.C., Green, D.R., Michalak, M. 2000. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *The Journal of cell biology*, 150(4): 731-740.

Nakhjavania, M., Zarghib, A., Shirazi, FH., 2014. Cytotoxicity of selected novel chalcone derivatives on human breast, lung and hepatic carcinoma cell lines, Iran. *J. Pharm. Res.*,13(3): 953-958.

Nam, N. H., Kim, Y., You, Y. J., Hong, D. H., Kim, H. M., Ahn, B. Z., 2003. Cytotoxic 2', 5'-Dihydroxychalcones with Unexpected Antiangiogenic Activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38: 179-187.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *Journal of Natural Products*, 66: 1022-1037.

Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E. 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, 59(6): 365-378.

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

Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F.T., Zhou, T.T., Liu, B. Bao, J.K. 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6): 487-498.

Özcan, A.G., Serbes, U., Arıcan, E., 2008, Evolution of the cytotoxicity interactions between epirubicin and daunorubicin in HeLa cell cultures. *African Journal of Biotechnology*, 7(6): 706-711.

- Park, S. Y., Lee, H. E., Li, H., Shipitsin, M., Gelman, R., Polyak, K. 2010.** Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 16: 876-887.
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., 2010.** Flavonols and cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6): 478-494.
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A. 2000.** Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406: 747-752
- Peto, J. 2001.** Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*, 411(6835): 390-395.
- Poste, G., Fidler, I.J. 1980.** The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, 283:139-146.
- Prakash, O., Kumar, A., Kumar, P. 2013.** Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review. *Am. J. Pharmacol. Sci.*, 1(6): 104-115.
- Quincoces, A.F., Polanco, I., Thomson, T., Leon, J. 1997.** Positive autoregulation of ras genes expression in fibroblasts. *FEBS Letters*, 416: 317-323.
- Rao, R. V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., Bredesen, D. E. 2001.** Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program mechanism of caspase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36): 33869-33874.
- Reed, J.C. 1999.** Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol.* 17:2941-53.
- Richard, J., Sainsbury, C., Needham, G., Farndon, J., Malcolm, A., Harris, A. 1987.** Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *The Lancet*, 329(8547): 1398-1402.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L. 2004.** Cell viability assays. *Assay Guidance Manual (Internet)*
- Roda, A.,Michelini, E., Mirasoli, M. 2009.** Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 28(3): 307-322.
- Sainsbury, J. R. C., Sherbet, G. V., Farndon, J. R., & Harris, A. L. 1985.** Epidermal-growth-factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *The Lancet*, 325(8425): 364-366.
- Saraste, A., Pulkki, K. 2000.** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Research*, 45(3): 528-37.
- Sartorius, U., Schmitz, I. and Krammer, PH. 2001.** Molecular mechanisms of deathreceptor- mediated apoptosis. *Chembiochem.*, 2(1): 20-29.
- Selwood, K. 2009.** Side effects of chemotherapy. *Cancer in Children and Young People: Acute Nursing Care*, 35-71.
- Sghaiera, M.B., Skandrani, I., Nasra, N., Francac, M.G.D., Chekir-Ghediraa, L., Ghediraa, K., 2011.** Flavonoids and Sesquiterpenes From *Teucrium Ramosissimum* Promote Antiproliferation of Human Cancer Cells and Enhance Antioxidant Activity: A Structure–Activity Relationship Study. *Environmental Toxicology and Pharmacology, AAPS.* 32: 336–348.
- Singh, P., Anand, A., Kumar, V. 2014.** Recent developments in biological activities of chalcone. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 85: 758-777.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. 1990.** New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82(13):1107–1112.
- Solakoğlu, Z. 2009.** Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim*, 22 (3): 20-25.

- Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H. 2001.** Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 10869-10874.
- Speirs, V., Kerin, M.J. 2000.** Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer. *British Journal of Surgery*, 87: 405-409
- Spierings, D.C., de Vries, E.G., Vellenga, E., van den Heuvel, F.A., Koornstra, J.J., Wesseling, J., Hollema, H., de Jong, S. 2004.** Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52(6): 821-831.
- Strasser, A., O'Connor, L. and Dixit, V.M. 2000.** Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.*, 69: 217-45.
- Su, J.L., Mckee, D.D., Ellis, B., Kadwell, S.H., Wisely, G.B., Moore, L.B., Triantafillou, J.A., Kost, T.A. Fugua, S., Moore, J.T. 2000.** Production and characterization of an estrogen receptor beta subtypespecific mouse monoclonal antibody. *Hybridoma*, 19: 481-487
- Suh, Y. 2002.** Cell signaling in aging and apoptosis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 123: 881-890.
- Sun Y.S, Zhao Z, Yang Z.N, Xu F, Lu H.J, Zhu Z.Y, Shi W, Jiang J, Yao P.P, Zhu H.P. 2017.** Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11): 1387-1397.
- Syam, S., Abdelwahab, SI., Al-Mamary, MA., Mohan, S., 2012.** Synthesis of chalcones with anticancer activities. *Molecules*, 17: 6179-6195.
- Tamm, I., Schriever, F., Dorken, B. 2001.** Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncol.* 2: 33-43.
- Tan, Y.X., Yang, Y., Zhang, T., Chen, R.Y., Yu, D.Q. 2010.** Bioactive 2-arylbenzofuran derivatives from *Morus wittiorum*. *Fitoterapia*, 81: 742-746.
- Taşkın, M. 2016.** Benzofuran süstitüe kalkonların sentezi. *Yüksek lisans tezi*, Adıyaman Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Adıyaman.
- Telkoparan, P., Tazebay, U. H. 2011.** Ras Protein Ailesi: Hücresel İşlevi, Moleküler Kontrolü, Onkogenezdaki Rolü. *Turkish Journal of Biochemistry*, 36(4): 367–373.
- Thangaraj, P. 2016.** Determination of Cytotoxicity. In *Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products*. Springer International Publishing, 159-161.
- Tryfonidis, K., Senkus, E., Cardoso, M. J., Cardoso, F. 2015.** Management of locally advanced breast cancer [mdash] perspectives and future directions. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(3): 147-162.
- Türkiye Kanser İstatistikleri 2017.** Ankara, 2018 <http://hsgm.saglik.gov.tr/> Türkiye, (Erişim Tarihi: 20.06.2019).
- Türkiye Kanser Kontrol Planı. 2013-2018.** Meme Kanseri Taramaları. http://kanser.gov.tr/Dosya/NCCP_2013-2018.pdf. (Erişim Tarihi: 15.05.2019).
- Uğurlu, D. 2013.** Effects of biological compound Turkish propolis extract on breast cancer cells (Doctoral dissertation, Bilkent University).
- Ulukaya, E. 2003.** Apoptozis ders notları. http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf-(Erişim tarihi:12.05.2019).
- Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Yilmaztepe-Oral, A., Demirci, M. 2008.** The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology In Vitro*, 22: 232-239.

- Ulukaya, E. 2010.** Hücre siklusu ve apoptozis: Akciğer Kanserleri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar, İstanbul, <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf>. (Erişim tarihi: 09.01.2019).
- Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. 2011.** Apoptosis: Why and how does it occur in biology? *Cell Biochemistry and Function*, 29: 468-480.
- Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Vinals, F., Capella, G. 2010.** Recent advances in cancer therapy: an overview. *Current pharmaceutical design*, 16(1): 3-10.
- Vasconcelos, A., Campos, V.F., Nedel, F., Seixas, F.K., Dellagostin, O.A., Smith, K.R. 2013.** Cytotoxic and apoptotic effects of chalcone derivatives of 2-acetyl thiophene on human colon adenocarcinoma cells. *Cell Biochem Funct*, 31: 289-97.
- Vaux, D.L., Cory, S. and Adams, J.M. 1988.** Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(6189): 440-42.
- Verma, R., Bowen, R. L., Slater, S. E., Mihaimed, F., Jones, J. L. 2012.** Pathological and epidemiological factors associated with advanced stage at diagnosis of breast cancer. *British Medical Bulletin*, 103: 129-145.
- Vichai, V., Kirtikara, K. 2006.** Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*, 1(3):1112-1116.
- Wadhawan, T., McEvoy, J., Prüß, B.M., Khan, E. 2010.** Assessing tetrazolium and ATP assays for rapid in situ viability quantification of bacterial cells entrapped in hydrogel beads. *Enzyme and Microbial Technology*, 47: 166-173.
- Wang N., Wang W., Huo P. 2014,** Mitochondria-mediated apoptosis in human lung cancer A549 cells by 4-methylsulfinyl-3-butenyl isothiocyanate from radish Seeds. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15: 2133-2139.
- Wang, X. 2001.** The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 15(22): 2922-2933.
- Wani, Z.A., Guru, S.K., Rao, A.V., Sharma, S., Mahajan, G., Behl, A., Kumar, A., Sharma, P.R., Kamal, A., Bhushan, S., Mondhe, D.M. 2016.** A novel quinazolinone chalcone derivative induces mitochondrial dependent apoptosis and inhibits PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human colon cancer HCT-116 cells. *Food Chem Toxicol*, 87: 1-11.
- Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A. 2005.** A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*, 288(2): 369-376.
- Wong, R. S. 2011.** Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1): 1.
- Wyllie, A.H. 1980.** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284(5756): 555-6.
- Xu, S., Chen, M., Chen, W., Hui, J., Ji, J., Hu, S., Zhou, J., Wang, Y., Liang, G. 2015.** Chemopreventive effect of chalcone derivative, L2H17, in colon cancer development. *BMC Cancer*, 15: 870.
- Yan, W., Xiangyu, C., Ya, L., Yu, W., Feng, X. 2019.** An orally antitumor chalcone hybrid inhibited HepG2 cells growth and migration as the tubulin binding agent. *Invest New Drugs*, 11: 1-7.
- Yılmaz, İ. 2005.** Erişkin Ratlarda Deneysel Varikozel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hücrelerinde Apoptozis Düzeylerinin Yükselmesi; Ve Yükselmiş Olan Apoptozisin Varikosektomi Sonrası Gerileme Düzeyi Ve Süresinin Tunel Yöntemi İle Değerlendirilmesi. *Doktora Tezi*, Taksim EAH, Üroloji Kliniği, İstanbul.

Zhang, H., Liu, J.J., Sun, J., Yang, X.H., Zhao, T.T., Lu, X., 2012. Design, synthesis and biological evaluation of novel chalcone derivatives as anti-tubulin agents, *Bioorg Med Chem.*, 20(10): 3212-8.

Zhu, M., Wang, J., Xie, J., Chen, L., Wei, X., Jiang, X., Bao, M., Qiu, Y., Chen, Q., Li, W., Jiang, C., Zhou, X., Jiang, L., Qiu, P., Wu, J. 2018. Design, synthesis, and evaluation of chalcone analogues incorporate α,β -Unsaturated ketone functionality as anti-lung cancer agents via evoking ROS to induce pyroptosis. *Eur J Med Chem.*, 5(157): 1395-1405.

Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R. 2001. The machinery of programmed. *Pharmacol Ther.*, 92(1): 57-70.

Zörnig, M., Hueber, A-O., Baum, W., Evan, G. 2001. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 133(2): 31-302.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hülya GÜNDÜZ
Doğum Yeri ve Tarihi : Van/Muradiye 07.02.1995
Yabancı Dil : İngilizce
Eğitim Durumu
Lise : Muradiye Çok Programlı Lisesi
Lisans : Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü
İletişim (e-posta) : hulyagunduz1991@gmail.com

