



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA FLURBİPROFEN
TÜREVİ SGK597 BİLEŞİĞİNİN ANTİKANSER ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

İREM ATLIHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. PINAR MEGA TİBER

2021-İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA FLURBİPROFEN
TÜREVİ SGK597 BİLEŞİĞİNİN ANTİKANSER ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

İREM ATLIHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. PINAR MEGA TİBER

2021-İSTANBUL

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

İrem Atlıhan

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının özellikle zorlu koronavirüs pandemisi koşullarında gerçekleştirilmesini sağlayan, engin bilgisini her zaman paylaşan, sabrını esirgemeyen, beni daima motive eden ve bana güvenen değerli danışmanım **Doç. Dr. Pınar Mega Tiber'e,**

Bilgi, birikim ve tecrübesiyle bana her an yol gösteren kıymetli hocam **Prof. Dr. Oya Orun'a,**

Uygulama aşamasında tüm sorularımı sabırla cevaplayan ve yardımını esirgemeyen **Arş. Gör. Sevgi Koçyiğit Sevinç ve Arş. Gör. Olca Kılınç'a,**

Çalışma hipotezim için ihtiyaç duyduğum ilaç teminini sağlayan Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Ana Bilim Dalı öğretim üyesi **Prof. Dr. Şükriye Güniz Küçükgül'e,**

Üzerimde emeği olan **Prof. Dr. Hülya Cabadak, Doç. Dr. Ayşe İnhan Garip, Doç. Dr. Banu Aydın Omay ve Dr. Öğr. Üyesi Cevdet Nacar'a,**

Akademik dil kullanımı ve görsel hazırlama konusunda bakış açımı genişleten **Dr. Enes Akyüz'e,**

Heyecanımı paylaşıp güler yüzünü eksik etmeyen **Fümet Duygu Üstündağ'a,**

Bana her zaman inanan, yanımda olan, her türlü desteği sağlayan ve ne kadar şanslı olduğumu hissettiren canım **aileme,**

Teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışması, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Ana Bilim Dalı laboratuvar imkanları kullanılarak yapılmıştır.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
RESİMLER LİSTESİ.....	viii
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Meme Kanseri.....	5
4.1.1. Meme kanseri alt tipleri	6
4.1.2. Türkiye’de meme kanseri.....	8
4.1.3. MCF-7 hücre hattı	10
4.1.4. MCF-10A hücre hattı	11
4.2. Apoptoz.....	12
4.3. Mitokondriyal Membran Potansiyeli	13
4.4. Non-SteroidaI Anti-İnflamatuar İlaçlar	14
4.4.1. Flurbiprofen ve flurbiprofen türevi bileşikler	16
4.4.2. Flurbiprofen türevi SGK597 bileşiğı	17
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	19
5.1. Kullanılan Gereçler.....	19
5.1.1. Kullanılan cihazlar	19
5.1.2. Kullanılan kimyasallar	20
5.2. Hücre Kültürü	21
5.2.1. Dondurulmuş MCF-10A meme epiteli hücre hattının çözülmesi	21
5.2.2. Dondurulmuş MCF-7 meme kanseri hücre hattının çözülmesi	22
5.2.3. MCF-10A meme epiteli hücre hattı kültürü.....	22
5.2.4. MCF-7 meme kanseri hücre hattı kültürü	22
5.2.5. Hücrelerin pasajlanması	22
5.2.6. Hücrelerin hemositometrik sayımı	23
5.3. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite Analizi	24

5.3.1. Flurbiprofen türevi SGK597'nin hazırlanması	24
5.3.2. WST-8 testi protokolü.....	24
5.4. Apoptoz Tayini	26
5.4.1. JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli testi protokolü.....	26
5.4.2. Western emdirimi protokolü	27
6. BULGULAR	31
6.1. WST-8 Testi Sonuçları	31
6.2. JC-1 Mitokondriyal Membran Potansiyeli Testi Sonuçları	34
6.3. Western Emdirimi Sonuçları	35
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	37
8. KAYNAKLAR	40

KISALTMALAR

AA:	Araşidonik asit
Apaf-1:	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
APS:	Amonyum persülfat
ATP:	Adenozin trifosfat
β met:	β -merkapttoetanol
BRCA1:	İnsan meme kanseri tip 1 geni
BRCA2:	İnsan meme kanseri tip 2 geni
BSA:	Sığır serum albümin
CCK-8:	Cell Counting Kit 8
CO ₂ :	Karbondioksit
COX:	Siklooksijenaz
c-PARP:	Klivaj olmuş poli ADP riboz polimeraz
$\Delta\Psi_M$:	Mitokondriyal membran potansiyeli
DCIS:	Duktal karsinoma in situ
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER:	Östrojen reseptörü
FBS:	Fetal sığır serumu
HER2:	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
JC-1:	5,5,6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'tetraetilbenzimi-dazolilkarbosianin iyodür
KCl:	Potasyum klorür
Ki-67:	Proliferasyon indeksi

LCIS:	Lobüler karsinoma in situ
MetAP-2:	Metiyonin aminopeptidaz-2
MMP:	Mitokondriyal membran potansiyeli
NaCl:	Sodyum klorür
NaF:	Sodyum florür
NSAİİ:	Non-steroidal anti-inflamatuar ilaç
PAGE:	Poliakrilamid jel elektroforezi
PARP:	Poli ADP riboz polimeraz
PBS:	Fosfat tamponlu salin
PG:	Prostaglandin
PLA2:	Fosfolipaz A2
PR:	Progesteron reseptörü
RIPA:	Radyoimmünopresipitasyon tahlil tamponu
RNA:	Ribonükleik asit
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SGK597:	4-(4-klorofenil)-3-(1-(2-fluoro-[1,1'-bifenil]-4il)etil)-5-((4-fluorobenzil)tiyo)-4H-1,2,4-triazol
TEMED:	Tetrametiletildiamin
TMHDF:	Türkiye Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu
UMKVT:	Ulusal Meme Kanseri Veri Tabanı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1. 2020 yılında her yaştan kadında 100 000’de insidans oranına göre ülkelerde en çok görülen kanserler	5
Şekil 4.2. Memenin anatomik yapısı.....	6
Şekil 4.3. Türkiye’de 2020 yılında kadınlarda görülen tahmini yeni kanser vaka oranları	9
Şekil 4.4. Türkiye’de 2020 yılında kadınlarda görülen kansere bağlı ölüm oranları ...	9
Şekil 4.5. İntrinsik apoptoz mekanizması	13
Şekil 4.6. Mitokondri yapısı.....	14
Şekil 4.7. NSAİİ’lerin etki mekanizması.....	15
Şekil 4.8. Flurbiprofen’in 2-boyutlu yapısı.....	16
Şekil 4.9. Flurbiprofen’in 3-boyutlu yapısı.....	16
Şekil 4.10. Flurbiprofen türevi SGK597’nin kimyasal yapısı	18
Şekil 5.1. Hemositometrik hücre sayımı aşamaları.....	23
Şekil 5.2. WST-8 testi protokol aşamaları	25
Şekil 5.3. JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli testi protokol aşamaları	26
Şekil 5.4. Western emdirimi protokol aşamaları.....	28
Şekil 6.1. Artan konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat süreyle SGK597 uygulanan MCF-7 meme kanseri hücrelerinin canlılık oranı.	31
Şekil 6.2. Artan konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat süreyle SGK597 uygulanan MCF-10A meme epitel hücrelerinin canlılık oranı.....	32
Şekil 6.3. MCF-7 hücre hattının, artan dozlarda SGK597 ile 48 saat inkübasyonu sonrası yeşil/kırmızı floresans oranı.....	35
Şekil 6.4. MCF-10A hücre hattının, artan dozlarda SGK597 ile 48 saat inkübasyonu sonrası yeşil/kırmızı floresans oranı.....	35
Şekil 6.5. Western emdirimi analizi sonucu elde edilen (a) Bax, Bcl-2, β -aktin protein bantları ve (b) Bax/Bcl-2 protein oranı.	36
Şekil 6.6. Western emdirimi analizi sonucu elde edilen (a) c-PARP protein bantları ve (b) c-PARP protein ekspresyonu.....	36

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 6.1. Farklı konsantrasyonlarda SGK597 ile 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattı için GraphPad Prism 8’de belirlenen istatistiksel sonuçlar	32
Tablo 6.2. Farklı konsantrasyonlarda SGK597 ile 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-10A meme epiteli hücre hattı için GraphPad Prism 8’de belirlenen istatistiksel sonuçlar.	33



RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.1. MCF-7 meme kanseri hücreleri.	11
Resim 4.2. MCF-10A meme epitel hücreleri.	11
Resim 6.1. MCF-7 hücrelerinin (a) 0, (b) 10, (c) 25 ve (d) 50 μ M SGK597 ile 48 saat inkübasyon sonrası mikroskop altındaki görüntüsü.	34



1. ÖZET

Meme kanseri hücre soylarında flurbiprofen türevi SGK597 bileşığının antikanser etkisinin incelenmesi

Öğrenci Adı: İrem ATLIHAN

Danışman Adı: Doç. Dr. Pınar MEGA TİBER

Ana Bilim Dalı: Biyofizik

Amaç: Bu çalışmada, MCF-7 meme kanseri ve MCF-10A meme epiteli hücrelerine uygulanan flurbiprofen türevi SGK597 bileşığının sitotoksik ve apoptotik etkilerinin *in vitro* olarak belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve yöntem: MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinde SGK597'nin canlılık ve sitotoksisite üzerine etkisi WST-8 yöntemi ile belirlendi. İki hücre hattı için de IC₅₀ değeri hesaplandı. JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli testi ile bu potansiyeldeki değişimler incelendi. Western emdirimi sonucu apoptozla ilişkili Bax, Bcl-2 ve c-PARP protein ekspresyon seviyeleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar GraphPad Prism 8 istatistik programında analiz edildi.

Bulgular: SGK597'nin 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonrası MCF-7 için IC₅₀ değeri sırasıyla 28,74 µM ve 17,28 µM; MCF-10A için ise 65,9 µM ve 50,5 µM olarak belirlendi. Mitokondriyal membran potansiyeli, artan konsantrasyonlarda SGK597 uygulaması sonucu MCF-7 hücrelerinde depolarizasyon eğilimi gösterirken, MCF-10A için aynı eğilim görülmedi. Yapılan ekspresyon deneyleri sonucunda apoptoz belirteçlerinden biri olan Bax/Bcl-2 oranı ve c-PARP ekspresyon düzeyinde bir artış belirlenmedi.

Sonuç: Araştırmamızda, SGK597 bileşığının MCF-7 hücre proliferasyonunu baskıladığını ve hücrelerde apoptotik etkiyi artırdığını tespit etmiş olduk. Bu sonuçlar, SGK597'nin antikanser ajan olarak kullanılması yönünde aday bir bileşik olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Flurbiprofen, MCF-7, MCF-10A, meme kanseri, apoptoz.

2. SUMMARY

Determination of anticancer effect of flurbiprofen derivative SGK597 compound in breast cancer cell lines

Student Name: Irem ATLIHAN

Name of Supervisor: Assoc. Prof. Pinar MEGA TIBER

Department: Biophysics

Objective: In this study, it was aimed to determine the cytotoxic and apoptotic effects of the flurbiprofen derivative SGK597 compound applied to MCF-7 breast cancer and MCF-10A breast epithelial cells *in vitro*.

Material and methods: The effect of SGK597 on cell viability and cytotoxicity in MCF-7 and MCF-10A cells was determined by the WST-8 method. IC₅₀ value was calculated for both cell lines. By the use of JC-1 mitochondrial membrane potential test, the changes in this potential were examined. The protein expression levels of Bax, Bcl-2 and c-PARP associated with apoptosis were determined using Western blot analysis. The obtained results were analyzed in GraphPad Prism 8 statistical program.

Results: IC₅₀ value was determined for MCF-7 as 28.74 μ M and 17.28 μ M; for MCF-10A as 65.9 μ M and 50.5 μ M after 24 and 48 hours incubation of SGK597, respectively. In the mitochondrial membrane potential, a depolarization tendency was observed in MCF-7 cells, while the same tendency was not observed for MCF-10A. Expression analyses, on the other hand, did not display any increase in Bax/Bcl-2 ratio and c-PARP expression level, which are known as apoptosis markers.

Conclusion: In our research, we determined that the compound SGK597 suppressed MCF-7 cell proliferation and increased the apoptotic effect in cells. These results indicate that SGK597 is a candidate compound for use as an anticancer agent.

Keywords: Flurbiprofen, MCF-7, MCF-10A, breast cancer, apoptosis.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser vakalarında hastalığın tekrar etmesinde görülen artış ve kemoterapötik ajanların ciddi yan etkileri, halihazırda kullanılan çeşitli antikanser ilaçların klinik etkinliğini azaltmaktadır. Bu nedenle, minimum yan etkiye sahip alternatif veya sinerjik antikanser ilaçlar geliştirmeye her zaman ihtiyaç vardır (Ali ve ark., 2012). Klasik kemoterapötik ilaçlar çoğunlukla doğrudan hücrenin DNA'sını hedef alır. Ancak mutasyonlar, hücrenin bu ilaçlara karşı direnç geliştirmesine neden olur. Son zamanlarda tasarlanan yeni antikanser ilaçlar ise kanser hücrelerinde anormal ekspresyona sahip proteinleri hedeflemektedir (Meegan ve O'Boyle, 2019).

Memeli hücrelerindeki iki sitoplazmik metiyonin aminopeptidazdan biri olan ve kanser hücrelerinde yüksek ekspresyona sahip olduğu bilinen MetAP-2, daha önceki çalışmalarda bazı antikanser ilaçların hedefi olarak tanımlanmıştır (Heinrich ve ark., 2019). İyi bir MetAP-2 inhibitörü olup, 4-(4-klorofenil)-3-(1-(2-fluoro-[1,1'-bifenil]-4il)etil)-5-((4-fluorobenzil)tiyo)-4H-1,2,4-triazol kimyasal yapısına sahip flurbiprofen türevi SGK597 sentez bileşiği daha önce prostat kanseri hücre hatlarında test edilmiştir. Bu bileşiğin antikanser ve apoptotik aktiviteye sahip olabileceği düşünülmüştür (Yılmaz ve ark., 2020).

Meme ve prostat kanseri, sırasıyla kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen iki invaziv kanserdir. Bu iki kanser türünün önemli biyolojik benzerliklere sahip olduğu bilinmektedir. Patofizyolojilerinin anlaşılmasıyla beraber meme ve prostat kanserine karşı yeni tedavi stratejilerinin yolu açılmıştır (Risbridger ve ark., 2010). Buna bağlı olarak, prostat kanserine karşı antikanser etki gösterebilecek bileşiklerin meme kanserine karşı da kullanılabileceği düşünülebilir.

Bunun yanı sıra, non-steroidal anti-inflamatuar ilaçların apoptozu indükleyerek onkolojik hastalıklara karşı kemoprofilaktik bir rol oynayabileceği varsayılmaktadır. Flurbiprofen, selektif olmayan COX inhibitörü non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlardan biridir. İnsan meme kanseri hücre hatlarında yapılan araştırmalar, COX-2'nin aşırı ekspresyonunun meme kanseri patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Singh ve Lucci, 2002).

Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde uygulanan SGK597 bileşinin MCF-7 meme kanseri ve MCF-10A meme epiteli hücre hattındaki sitotoksik ve apoptotik etkilerinin WST-8, JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli ve Western emdirimi analizi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Daha önce detaylı olarak incelenmemiş bu unsurların açıklığa kavuşturulmasıyla, literatürde MCF-7 meme kanseri hücrelerinde flurbiprofen türevi SGK597 kullanımının apoptozu moleküler olarak nasıl etkilediğine dair fikir sahibi olunması beklenmektedir.

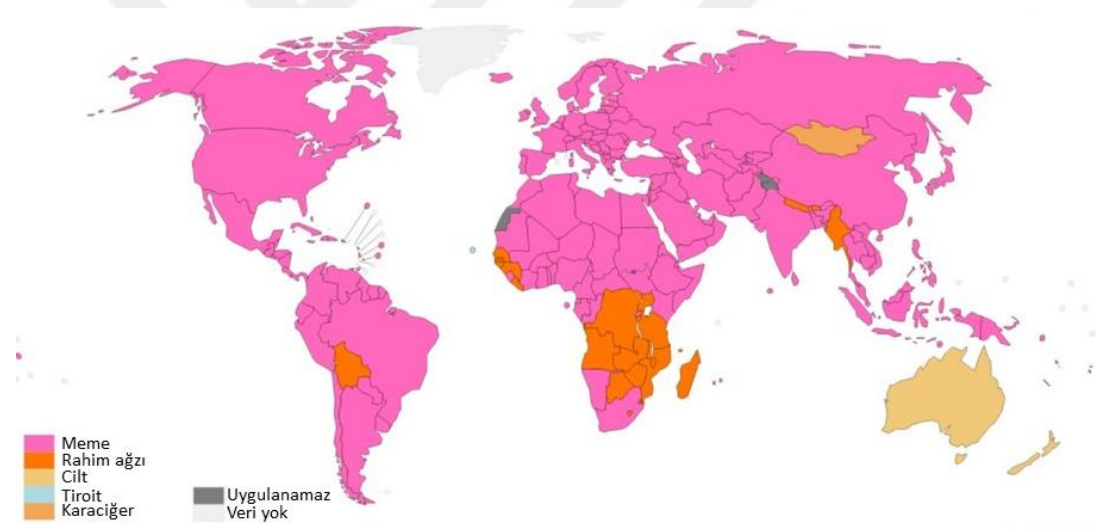


4. GENEL BİLGİLER

4.1. Meme Kanseri

Kanser hücreleri, DNA ve/veya RNA'nın mutasyonu nedeniyle normal hücrelerden oluşur. Bu durum çeşitli faktörlerle indüklenebilir. Bu faktörler radyasyon, virüsler, bakteriler, mantarlar, parazitler, ısı, havadaki kimyasallar, beslenme şekli, hücre seviyesinde yaralanma, serbest radikaller, DNA ve RNA'nın evrimi ve yaşlanması şeklinde açıklanabilir (Sharma ve ark., 2010).

Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen kanserdir. Dünya genelinde her yıl 1,5 milyondan fazla kadına meme kanseri teşhisi konmaktadır. Vaka sayısı kadınlarda erkeklerden 100 kat daha fazladır. 2020'de her yaştan kadında insidans oranına göre ülkelerde en çok görülen kanserler Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



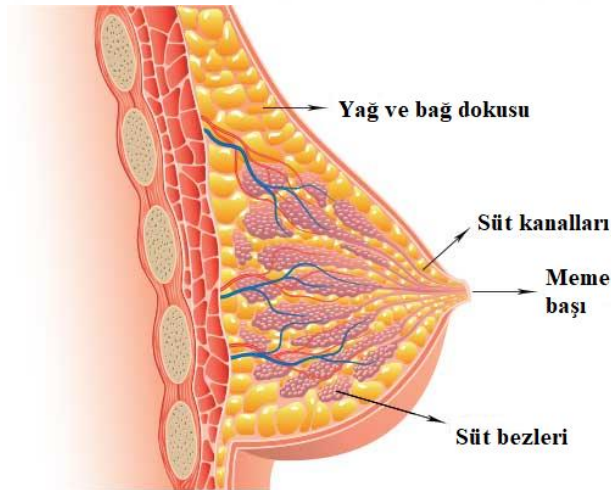
Şekil 4.1. 2020 yılında her yaştan kadında 100 000'de insidans oranına göre ülkelerde en çok görülen kanserler (<https://gco.iarc.fr>, Erişim tarihi: 23 Mart 2021).

Kadınlarda meme kanserinde en büyük risk faktörü yaştır. Meme kanseri insidansı artan yaşla büyük ölçüde ilişkilidir. 2016 yılında, Amerika'da meme kanseri ile ilişkili tüm ölümlerin yaklaşık %99,3'ü ve %71,2'si sırasıyla 40 ve 60 yaş üstü kadınlarda rapor edilmiştir (Sun ve ark., 2017). Diğer önemli risk faktörleri ise aile öyküsü, obezite, geç menopoz, erken menarş, düşük parite, düşük emzirme oranları ve meme kanseri ile ilişkili olduğu düşünülen gen mutasyonlarıdır (Becker, 2015).

Meme kanseri ile ilgili birçok gen tanımlanmıştır. Onkogenlerin ve anti-onkogenlerin mutasyonları ve anormal amplifikasyonu, tümör başlatma ve ilerleme süreçlerinde anahtar rol oynar. BRCA1 ve BRCA2, meme kanseri riskine karşı bilinen iki anti-onkogendir. Her ikisi de tümör baskılayıcı proteinleri kodlar. Bir birey BRCA1 veya BRCA2 genlerinde zararlı mutasyonları ailesinden miras alırsa meme kanseri riski büyük ölçüde artabilir. Bunun yanı sıra insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2), meme kanserinde önemli bir onkogendir. Primer meme kanserlerinin yaklaşık %20'sinde tespit edilen HER2'nin aşırı ekspresyonu, kanser kök hücre sayısını artırır. Ayrıca EGFR proteini, tirozin kinaz ailesinin bir hücre yüzeyi glikoproteinidir ve EGFR'nin aşırı ekspresyonu, çok agresif bir meme kanseri alt tipi olan enflamatuar meme kanseri vakalarının %30'undan fazlasında bulunur (Sun ve ark., 2017).

4.1.1. Meme kanseri alt tipleri

Meme, glandüler ve stromal olmak üzere iki ana doku tipinden oluşur. Glandüler dokular süt bezleri (lobül) ve kanalları (duktus), stromal dokular ise memenin yağ ve bağ dokularını içerir. Bu yapılar Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.2. Memenin anatomik yapısı (<http://www.drerkanozturk.com>, Erişim tarihi: 16 Temmuz 2020).

Meme kanserleri hangi hücre kökenli olduğuna bağlı olarak, karsinomlar ve sarkomlar olmak üzere iki geniş sınıfa ayrılabilir. Karsinomlar memenin epitel

hücrelerinden, sarkomlar ise stromal hücrelerinden kaynaklanır. Çoğu meme kanseri karsinomdur (Feng ve ark., 2018).

İnvaziv olmayan meme kanseri hücreleri (karsinoma in situ) yalnızca süt bezleri ve kanallarıyla sınırlıdır ve memenin çevresindeki yağ ve bağ dokularını istila etmez. Süt bezleriyle sınırlı olduğunda lobüler karsinoma in situ (LCIS), süt kanallarıyla sınırlı olduğunda ise duktal karsinoma in situ (DCIS) olarak bilinir. İnvaziv meme kanseri hücreleri ise kanallar ve lobüler duvardan geçer ve memenin çevresindeki yağ ve bağ dokularını istila eder. Evre IV veya ileri meme kanseri olarak da bilinen metastatik meme kanserleri ise, vücuttaki diğer organlara yayılmış meme kanserleridir (Sharma ve ark., 2010).

Meme kanseri hücrelerinde, hormonların veya HER2 proteininin hücrelere yapışabileceği ve hücrelerin büyümesini teşvik edebileceği reseptörler bulunabilmektedir. Hormonlar, özellikle östrojen, meme kanseri hücrelerinin büyümesini tetikleyebilmektedir. Östrojen hormonu için reseptörleri olan meme kanserine östrojen reseptörü pozitif (ER pozitif) meme kanseri denir. Meme kanserlerinin yaklaşık %70'i ER pozitifdir. Östrojen hormon reseptörü olmayan meme kanserine ise östrojen reseptörü negatif (ER negatif) meme kanseri denir. Meme kanseri hücrelerinin ayrıca progesteron hormonu için de reseptörleri olabilir ve bu hücreler progesteron reseptörü pozitif (PR pozitif) olarak bilinir. Bazı meme kanseri hücrelerinin yüzeyinde ise HER2 reseptörü fazlaca bulunur. Bunlar da HER2 pozitif meme kanseri olarak bilinmektedir. (<https://www.macmillan.org.uk>, Erişim tarihi: 16 Temmuz 2020)

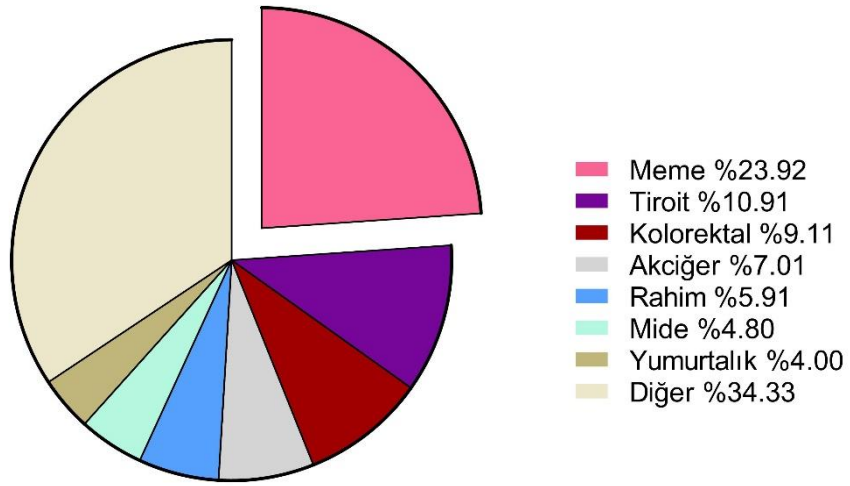
Belirli genlerin ekspresyon paternine dayanarak meme kanserleri beş intrinsik veya moleküler alt tipe ayrılır: Luminal A, Luminal B, HER2, üçlü negatif/bazal benzeri ve normal meme benzeri.

- Luminal A alt tipi: ER ve/veya PR pozitif, HER2 negatiftir. Düşük Ki-67 seviyelerine sahiptir. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturur.
- Luminal B alt tipi: ER ve/veya PR pozitif, HER2 pozitifdir. Yüksek Ki-67 seviyelerine sahiptir. Luminal A kanserlerinden daha hızlı gelişir.

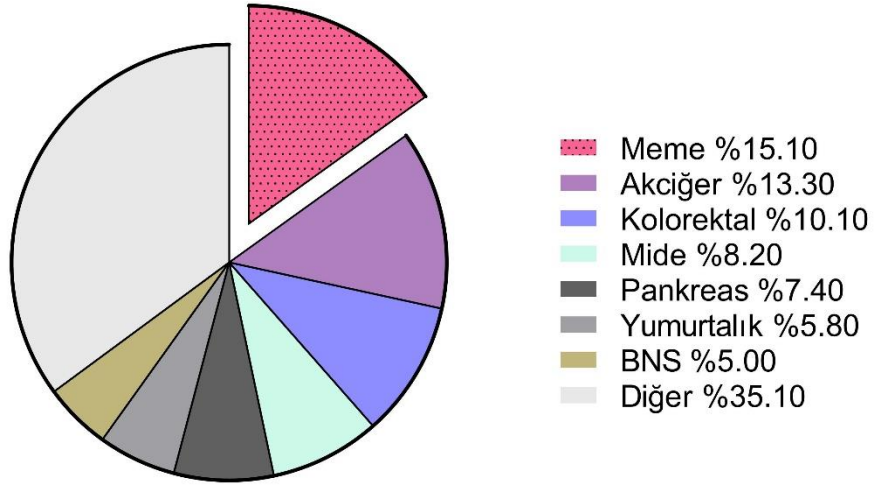
- HER2 alt tipi: Meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturur. ER ve PR ekspresyonunun olmaması, HER2 ve proliferasyon gen kümelerinin yüksek ekspresyonu, luminal ve bazal kümelerin düşük ekspresyonu ile karakterizedir.
- Üçlü negatif/bazal benzeri alt tipi: ER negatif, PR negatif ve HER2 negatif olarak karakterize edilir. Genellikle diğer meme kanseri tiplerinden daha agresif davranır. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur.
- Normal benzeri alt tipi: Luminal A alt tipine benzer. ER ve/veya PR pozitif, HER2 negatiftir. Düşük seviyelerde Ki-67 proteinine sahiptir. Prognozu, luminal A prognozundan biraz daha kötüdür (Feng ve ark., 2018).

4.1.2. Türkiye’de meme kanseri

Kanser insidans ve ölüm oranı, Türkiye de dahil olmak üzere gelişmekte olan ülkelerde gün geçtikçe artmaktadır. Türkiye’de meme kanseri insidansı 1993’te 24/100 000 iken 2015’te 43,8/100 000 seviyesine ulaşarak neredeyse iki katına çıkmıştır. Hatta 2017’de 50/100 000 olarak bildirilmiştir. Özellikle Türkiye’nin batısında görülen bu artış, yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler, yaşlanma, artan nüfus ve fırsatçı tarama programları ile açıklanmaktadır. Sosyal, kültürel, eğitimsel ve ekonomik faktörler nedeniyle meme kanserinin sıklığı, tanı evresi ve tedavisi Türkiye’nin her bölgesinde aynı değildir (Ozmen ve ark., 2019). 2020 yılında Türkiye’de kadınlarda en çok görülen kanser ve kansere bağlı ölüm oranları sırasıyla Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Türkiye'de 2020 yılında kadınlarda görülen tahmini yeni kanser vaka oranları (<https://gco.iarc.fr>, Erişim tarihi: 23 Mart 2021).



Şekil 4.4. Türkiye'de 2020 yılında kadınlarda görülen kansere bağlı ölüm oranları (<https://gco.iarc.fr>, Erişim tarihi: 23 Mart 2021).

Türkiye Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu (TMHDF) tarafından 2005'ten beri yürütülen Ulusal Meme Kanseri Veri Tabanı (UMKVT), 36 farklı merkezden veri toplayarak ülke genelindeki meme kanseri hastalarına dair bir kayıt defteri oluşturmaktadır. 1 Mayıs 2005-17 Nisan 2017 tarihleri arasında veri tabanında kaydedilen veriler değerlendirildiğinde Türkiye'de meme kanseri tanısı konmuş yaklaşık 20 000 hastanın %57,7'sinin luminal A, %20,6'sının luminal B, %9,6'sının HER2, %12,1'inin üçlü negatif tipinde olduğu görülmektedir. Türkiye Cumhuriyeti

Sağlık Bakanlığı, 50 yaşın altındaki meme kanseri vakalarının, tüm vakaların % 47'sini oluşturduğunu ortaya koyan UMKVT sonuçları nedeniyle ücretsiz mamografi tarama yaşını 50-69'dan 40-69'a değiştirmiştir (Ozmen ve ark., 2019).

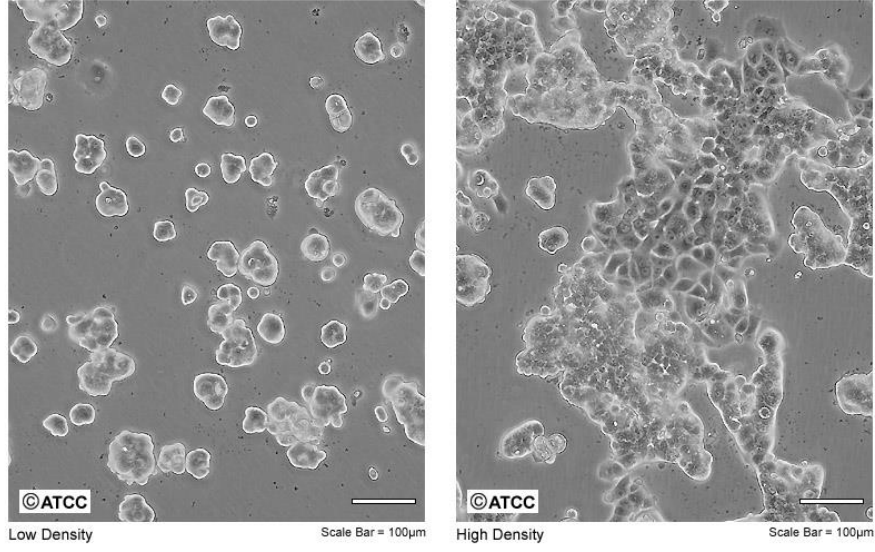
Bununla birlikte, gelişmiş ülkelerde erken teşhis ve gelişmiş tedavi yöntemleriyle insidans ve ölüm oranları düşmektedir. Türkiye'de erken teşhiste yaşanan gecikmelerin bir kısmı, meme kanserini ihmal etmekle ilişkilendirilmektedir. Yapılan bir araştırmaya göre Türk kadınının yalnızca %11'inin mamografi çektiği ve %56'sının meme kanseri hakkında yeterli bilgiye sahip olduğu görülmektedir (Ozmen ve ark., 2014). Erken teşhis, tanı, cerrahi, radyasyon terapisi ve ilaç tedavisine yapılacak katkıların Türkiye'deki mevcut sağlık hizmetleri programlarına entegre edilmesiyle oranlar iyileştirilebilir (Ozmen, 2008).

4.1.3. MCF-7 hücre hattı

Hücre hatları, kanser araştırmalarında *in vitro* modeller olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle meme kanserinde moleküler tanı için hücre hatları kilit bir unsur olarak görülmektedir.

MCF-7 hücre hattı, 1973 yılında Michigan Kanser Vakfı'ndan Dr. Soule ve meslektaşları tarafından 69 yaşındaki bir Kafkas kadından izole edilmiş, ismini vakfın baş harflerinden almıştır. ER pozitif ve PR pozitifdir. Luminal A moleküler alt tipine ait yapışan hücrelerdendir. Zayıf-agresif, invaziv olmayan ve düşük metastatik potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Antikanser ilaçları da dahil olmak üzere meme kanseri araştırmaları için uygun bir model hücre hattı olduğu kanıtlanmıştır (Comşa ve ark., 2015; Camarillo ve ark., 2014). Mikroskop altındaki görüntüsü Resim 4.1'de görülmektedir.

ATCC Number: **HTB-22**
Designation: **MCF-7**

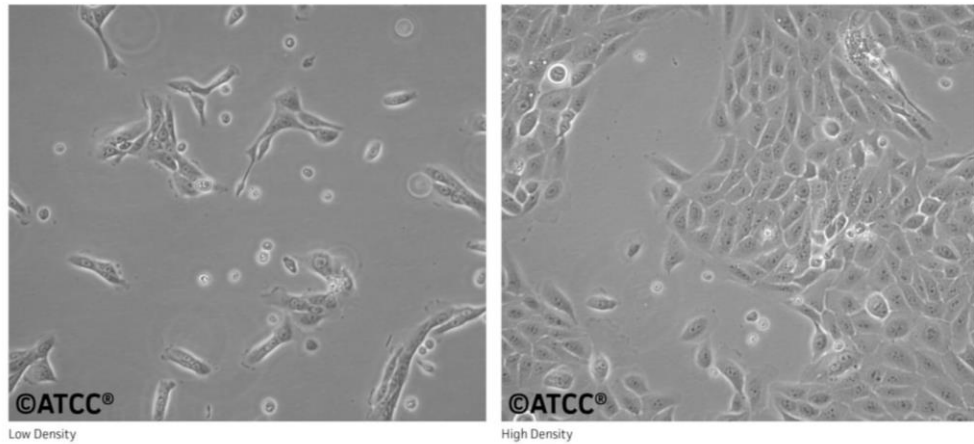


Resim 4.1. MCF-7 meme kanseri hücreleri (<https://www.lgcstandards-atcc.org>, Erişim tarihi: 16 Temmuz 2020).

4.1.4. MCF-10A hücre hattı

İnsan normal meme epiteli hücre hattı MCF-10A, toksisite çalışmalarında bir model olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Yapışan özellikteki MCF-10A hücreleri, 36 yaşındaki bir Kafkas kadından izole edilmiştir. Mikroskop altındaki görüntüsü Resim 4.2’de gösterilmiştir.

ATCC Number: **CRL-10317**
Designation: **MCF-10A**



Resim 4.2. MCF-10A meme epitel hücreleri (<https://www.lgcstandards-atcc.org>, Erişim tarihi: 16 Temmuz 2020).

4.2. Apoptoz

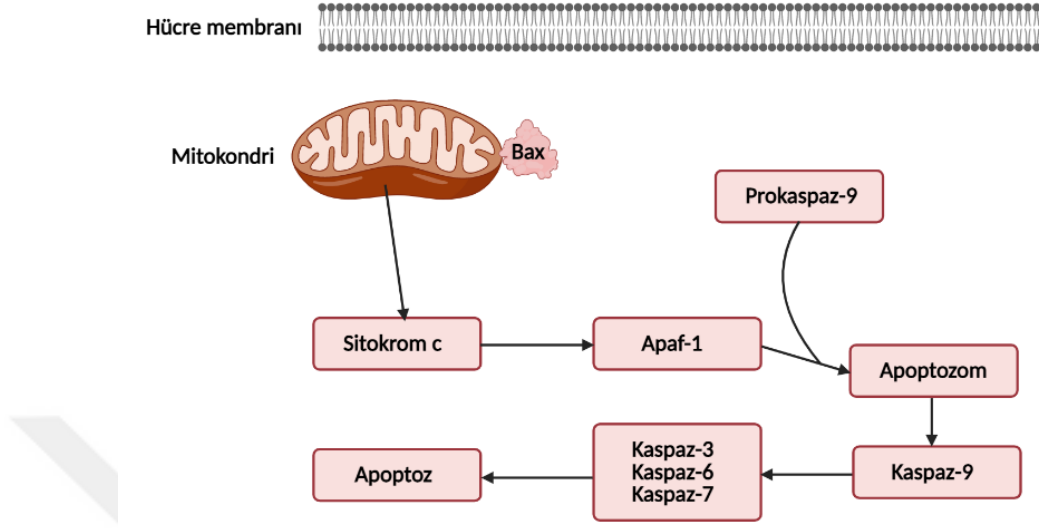
Programlanmış hücre ölümü apoptoz olarak bilinmektedir. Bu süreç dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma veya hücrelerin zarar görmesi gibi bir durumda savunma mekanizması olarak ortaya çıkar. Apoptozu tetikleyebilen çok çeşitli uyarıcı ve koşullar olmasına rağmen, her hücre aynı uyarana aynı yanıtı vermeyecektir. Bazı durumlarda ise uyarıcı türü ve dozu, hücrelerin apoptozla mı nekroza mı gideceğini belirler. Nekroz, genellikle geniş alanları etkileyen kontrolsüz ve pasif bir süreçtir. Oysa apoptoz kontrollü bir süreçtir, enerjiye bağlıdır ve belirli hücreleri etkiler. Isı, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçları gibi çeşitli uyarıcılar düşük dozlarda apoptozu indükleyebilir, ancak yüksek dozlarda nekroza neden olabilir.

Apoptoz mekanizmaları bir dizi moleküler olay içerir ve oldukça karmaşıktır. Bugüne kadar araştırmalar iki ana apoptotik yolak olduğunu göstermektedir: ekstrinsik ve intrinsik. Ekstrinsik sinyal yolları, transmembran reseptör aracılığıyla etkileşimleri içerir. İntrinsik sinyal yolları ise hücre içinde mitokondriyal olarak başlatılır.

Mitokondriyal dış zarda pro-apoptotik ve anti-apoptotik protein gruplarını içeren Bcl-2 protein ailesi bulunmaktadır. Anti-apoptotik proteinler apoptozu inhibe eder ve bazıları Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL olarak sıralanabilir. Pro-apoptotik proteinler ise apoptozu indükler ve bazıları Bax, Bak, Bad olarak sıralanabilir. Pro-apoptotik proteinler normal koşullarda inaktiftir.

İntrinsik yolu başlatan uyarıcılar, pozitif veya negatif hücre içi sinyaller üretir. Bu uyarıcılar mitokondriyal permeabilite geçiş porlarını açar. Sağlıklı hücrelerde sitozolde bulunan Bax gibi pro-apoptotik proteinler bu bölgelere bağlanır ve anti-apoptotik proteinler baskılanır. Böylece mitokondriyal zarda değişiklikler meydana gelir. Bunun sonucunda kaspaz aktivatörü olan sitokrom c, mitokondriden sitozole geçer ve bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanarak ATP yoluyla Prokaspaz-9'u aktive eder. Oluşan kompleks yapıya apoptozom denir ve bu yapı bir dizi proteolitik kaspaz aktivasyonunu başlatır. Özellikle poli ADP riboz polimeraz (PARP), bu kaspaz aktivasyonu sonucu parçalanarak klivaj olmuş PARP (c-PARP) haline dönüşür.

Sonunda hücre apoptoza gider (Elmore, 2007; Boulares ve ark., 1999). Bu mekanizma Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

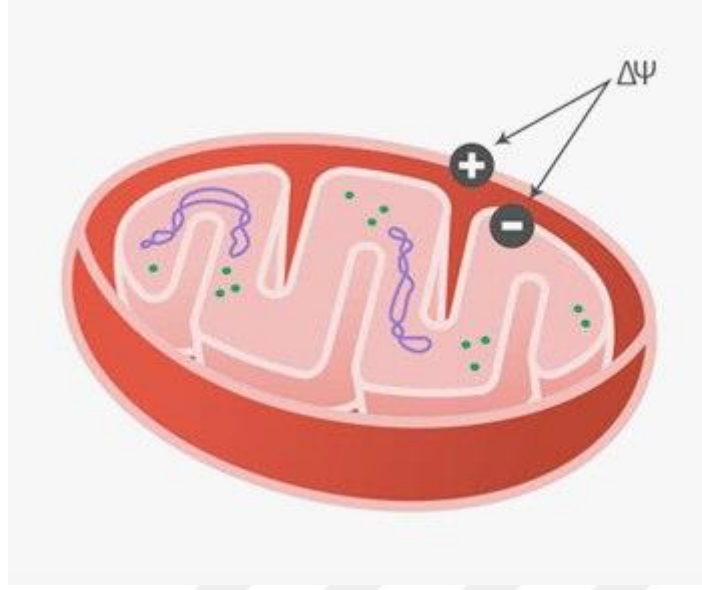


Şekil 4.5. İntrinsik apoptoz mekanizması (Erekat, 2018'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Pro- ve anti-apoptotik proteinlerin oranı dengesizleştğinde tümör gelişimi ve kanser tedavisine karşı direnç kolaylaşabilir (Campbell ve Tait, 2018). Apoptozun bu biyokimyasal mekanizmalarının bilinmesi, kanser hücrelerini hedefleyen ve hücre ölümünü tetikleyen yeni tedavilerin geliştirilmesine yol açmıştır (Nguyen ve Pandey, 2019).

4.3. Mitokondriyal Membran Potansiyeli

Mitokondri, ATP üretir ve hücresel enerjiyi kontrol eder. Mitokondrinin ayrıca apoptotik süreçte önemli ve hatta merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir (Ly ve ark., 2003). İç kısmı elektronegatif olan mitokondri, ATP üretmek için mitokondriyal zar boyunca bir elektrokimyasal proton gradyanı oluşturur ve oksitlenebilir substratlar kullanır. Mitokondriyal membran potansiyelinin yönü, katyonların içe ve anyonların dışa doğru taşınmasını sağlayacak, böylece mitokondride katyon birikimini teşvik edecek şekildedir. Bu elektrokimyasal gradyan, ATP sentezini sağlar. Mitokondrinin yapısı Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Mitokondri yapısı (<https://www.thermofisher.com/tr/en/home.html>, Erişim tarihi: 13 Ağustos 2020).

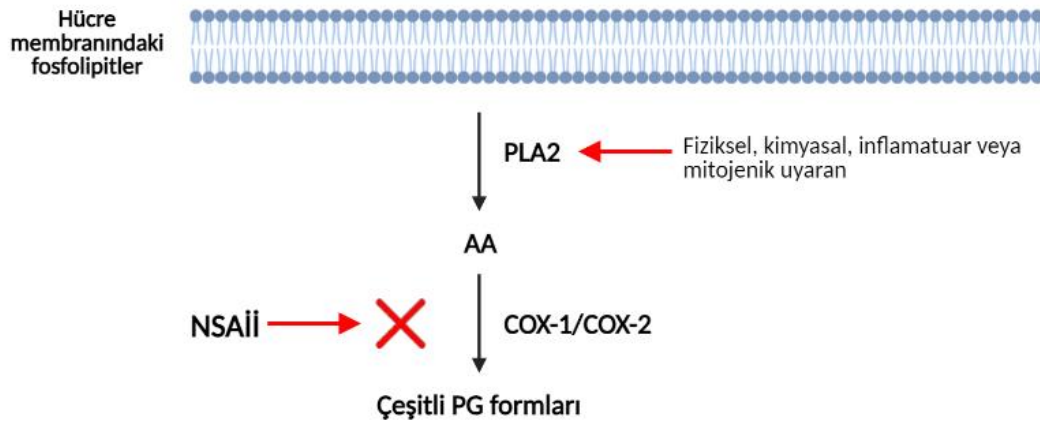
Apoptoz sırasında mitokondriyal permeabilite geçiş porlarının açılmasıyla elektrokimyasal gradyan kaybı yaşanır ve mitokondriyal membran potansiyeli (MMP, $\Delta\Psi_M$) azalır. MMP'deki azalma, matriks yoğunlaşmasına ve sitokrom c'nin zarlar arası boşluğa geçmesine neden olarak apoptozu kolaylaştırır. Bu nedenle $\Delta\Psi_M$, hücre sağlığının bir göstergesi olarak kullanılabilen mitokondriyal fonksiyonun temel bir parametresidir. Mitokondriden sitokrom c ve diğer apoptojenik faktörlerin salınımı, apoptozun başlatılmasında önemli bir olaydır, ancak salınımın gerçek mekanizması hala tartışılmaktadır (Gottlieb ve ark., 2003; Sivandzade ve ark., 2019).

4.4. Non-Steroidil Anti-İnflamatuar İlaçlar

Non-steroidil anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİİ'ler) dünya çapında en sık reçete edilen ilaçlar arasındadır. Flurbiprofen, ibuprofen, mefenamik asit, selekoksib, aspirin ve diklofenak NSAİİ'lere örnektir. Bu ilaçlar antipiretik, analjezik ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir. Kronik inflamasyon ve kanser arasındaki ilişki 1863'te Rudolf Virchow tarafından keşfedilmiştir. Bu nedenle, inflamasyonu engelleyen bu ilaçların kanser tedavisinde veya önlenmesinde yararlı olabileceğine inanılmaktadır. Son yıllarda, NSAİİ'lerin anti-inflamatuar özellikleri apoptozu indüklemeye, anjiyogenezi inhibe etmeye ve hücrel bağışıklık tepkilerini artırma yetenekleri nedeniyle kanser tedavisi ve önlenmesinde kullanımı konusunda giderek daha fazla araştırma

yapılmaktadır. Literatürde NSAİİ'lerin kanserden koruyucu etkileri ile ilgili çok sayıda rapor bulunmaktadır. Pek çok çalışmada bu ilaçların meme, prostat, kolorektal, yumurtalık ve baş ve boyun kanserleri gibi çeşitli kanser türlerinde kanser riskini azalttığı düşünülmüştür.

İnflamasyona neden olan uyaranlar, fosfolipaz A2 (PLA2) enzimi aracılığıyla hücre membranındaki fosfolipitlerden araşidonik asit (AA) koparır. Siklooksijenaz (COX) enziminin iki izoformu olan COX-1 ve COX-2, araşidonik asitten çeşitli prostaglandin (PG) formlarının sentezini katalizler. PG'ler inflamasyonun bilinen mediatörleridir. NSAİİ'ler COX enzimini ve buna bağlı olarak COX ürünlerinin sentezini inhibe etme yeteneğine sahiptir (Wong, 2019). Bu mekanizma Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

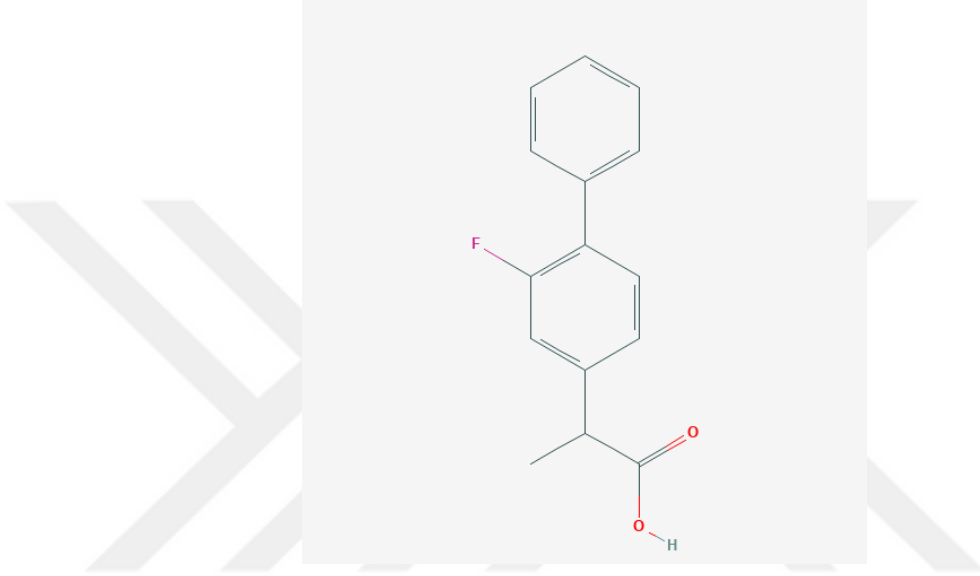


Şekil 4.7. NSAİİ'lerin etki mekanizması (Peesa ve ark., 2016'dan değiştirilerek kullanılmıştır).

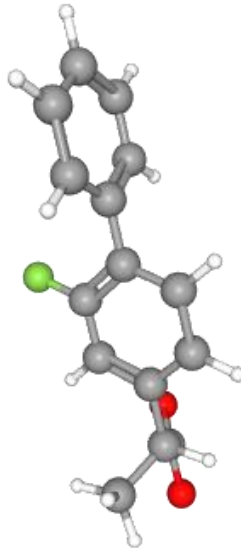
Günümüzde NSAİİ'lerin meme kanserini önlemedeki rolünü kanıtlayan çalışmalar mevcuttur. NSAİİ kullanımıyla düşen PG seviyesi, östrojen sentetaz olarak da bilinen aromataz aktivitesini inhibe eder. Bu da serum östrojen seviyesinin düşmesine ve sonuç olarak hormon reseptörü pozitif tümör insidansının azalmasına neden olur. Ayrıca COX-2 enzimi meme kanserinde normal meme dokusuna kıyasla yaklaşık %40 daha fazla eksprese edilir. Bu noktada NSAİİ'ler içerisinde seçici olarak COX-2 inhibitörü olan ajanlar kanser araştırmalarında önemli rol oynar (Moris ve ark., 2016).

4.4.1. Flurbiprofen ve flurbiprofen türevi bileşikler

Flurbiprofen 2-[2-floro-4bifenil]propiyonik asit kimyasal yapısına sahip, fenilalkanoik asit türevi, anti-inflamatuvar, antipiretik ve analjezik etkiye sahip, selektif olmayan COX inhibitörü NSAİİ'lerden biridir (McCormick ve Moon, 1983). Flurbiprofenin 2-boyutlu ve 3-boyutlu kimyasal yapısı sırasıyla Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Flurbiprofen'in 2-boyutlu yapısı (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, Erişim tarihi: 16 Temmuz 2020).



Şekil 4.9. Flurbiprofen'in 3-boyutlu yapısı (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, Erişim tarihi: 16 Temmuz 2020).

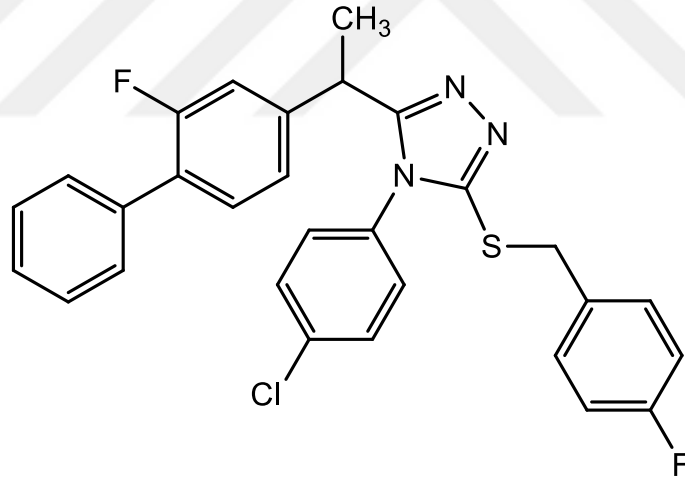
Yapılan çalışmalar, flurbiprofen ve yapısal türevlerinin antikanser aktivitesi sergilediğini bildirmiştir. Metastatik meme kanserli hastalarda kemoterapiye flurbiprofen eklendiğinde bu hastaların tedaviye daha iyi yanıt verdiği görülmüştür (Powles ve ark., 1978). Medulloblastoma ve glioblastoma multiformdan türetilen tümör hücre hatlarının büyümesini baskılamak için flurbiprofenin etkinliği incelenmiş, flurbiprofenin çeşitli tümör hücrelerinin büyümesini doza bağlı olarak etkili bir şekilde inhibe ettiği ortaya konmuştur (King ve Khalili, 2001). İnsan MG63 osteosarkom hücrelerinde, flurbiprofenin hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi araştırılmış, sonuçlar flurbiprofenin proliferasyonu değiştirebileceğini ve Ca^{2+} artışını engelleyebileceğini düşündürmüştür (Tseng ve ark., 2006). COX inhibitörü olmayan R-flurbiprofen fareler üzerinde test edilmiş ve kolon kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı, polip çoğalmasını önlediği görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak R-flurbiprofen'in profilaksi ve tedavi çalışmalarının insanlar üzerinde denenmesi önerilmiştir (Wechter ve ark., 1997). Mikrodalga destekli reaksiyonlarla sentezlenen flurbiprofen hidrazit-hidrazon bileşiklerinden birinin büyümeyi HL-60 (TB) lösemi kanser hücrelerinde %66,37, OVCAR-4 yumurtalık kanser hücrelerinde ise %77,34 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir (Aydın ve ark., 2013). Bir başka çalışmada ise yeni flurbiprofen hidrazit türevleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerden birinin antikanser aktivitesi, %20,8 ile en belirgin etkiyi lösemi kanseri hücre hattı üzerinde göstermiştir (Çıkla ve ark., 2013).

4.4.2. Flurbiprofen türevi SGK597 bileşiği

SGK597 bileşiği, 4-(4-klorofenil)-3-(1-(2-fluoro-[1,1'-bifenil]-4il)etil)-5-((4-fluorobenzil)tiyo)-4H-1,2,4-triazol kimyasal yapısına sahip flurbiprofen tiyoeterdir. Bu bileşik aynı zamanda düşük bağlanma enerjisi ve iyi bağlanma moduna sahip, iyi bir metiyonin aminopeptidaz-2 (MetAP-2) inhibitörüdür. MetAP'lar, metiyoninin yeni sentezlenen proteinlerin amino terminalinden çıkarılmasından sorumlu proteazlardır. DNA onarımı, sinyal transdüksiyonu, hücre transformasyonu ve anjiyogenez gibi birçok temel hücre fonksiyonu için metiyoninin MetAP tarafından proteinlerden eksizyonu gereklidir. Ökaryotlarda, MetAP-1 ve MetAP-2 olarak bilinen iki proteinin MetAP aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir. Mevcut raporlar MetAP-2'nin

anjiyogenez olayındaki yeri nedeniyle farklı tümör tiplerinin büyümesinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Hatta MetAP-2'nin bir onkogen olarak işlev görebileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, bu enzim konsantrasyonlarında azalma sağlanarak kanser hücrelerine karşı kullanılabilir. MetAP-2 inhibitörü olduğu bilinen TNP-470 bileşiğinin metastatik meme kanseri tedavisinde insan klinik çalışmalarına girdiği bilinmektedir (Selvakumar ve ark., 2006; Selvakumar ve ark., 2009). TNP-470 bileşiğinin sırasıyla 4,9 ve 4,4 µg/ml IC₅₀ değeriyle PC-3 (prostat kanseri) ve MDA-MB-231 (meme kanseri) hücrelerinin büyümesini sitotoksik olarak inhibe ettiği de belirlenmiştir (Yamaoka ve ark., 1993).

Yapılan çalışmalar SGK597 bileşiğinin androjen reseptörü negatif prostat kanseri PC-3 ve DU-145 ile androjen reseptörü pozitif prostat kanseri LNCaP hücre proliferasyonunu 24 saatlik inkübasyon sonucu sırasıyla 27,1, 6,9 ve 106,7 µM IC₅₀ değerleri ile inhibe ettiğini göstermiştir (Yılmaz ve ark., 2020). SGK597'nin kimyasal yapısı Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Flurbiprofen türevi SGK597'nin kimyasal yapısı (Yılmaz ve ark., 2020).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Gereçler

5.1.1. Kullanılan cihazlar

Etüv	New Brunswick Galaxy 48R
Ters ışık mikroskobu	Olympus CKX41
Laminar flow kabini	Tezsan
Elisa reader	BioTek Synergy H1
Otoklav	
Distile su cihazı	GFL
Blok ısıtıcı	Stuart SBH200D
Manyetik karıştırıcı	WiseStir MSH-20A
pH metre	WTW
Santrifüj	Beckman Coulter Allegra X-30R
Mikro santrifüj	Eppendorf 5415R
Plaka santrifüj	Tehtnica Centric 322A
Vorteks karıştırıcı	LMS VTX-3000L
Hassas terazi	Kern EMB 600-2
Derin dondurucu (-20°C)	Bosch
Derin dondurucu (-80°C)	Thermo Scientific
Buzdolabı	Arçelik
Çalkalayıcı	Barnstead MaxQ 4000
Pipet tabancası	Nichiryo
Mikro pipetler	Thermo Scientific
Dikey elektroforez cihazı	XCell SureLock
Güç kaynağı	Wealtec Elite 300 Plus

Kemilüminesans görüntüleme cihazı

Biostep Celvin

5.1.2. Kullanılan kimyasallar

DMEM/F12

Gibco

DMEM

Gibco

DMSO

Santa Cruz

At Serumu

FBS

Gibco

Pen/Strep

Gibco

PBS

Invitrogen

EDTA

Trypsin

Gibco

Aquaguard-1 Solution

Biological Industries

Tripan mavisi

Wisent Inc.

SGK597

Marmara Üniversitesi

Cell Counting Kit 8 (CCK-8)

Abbkine

JC-1 MMP Assay Kit

Cayman

Proteaz inhibitör kokteyli

NaF

Santa Cruz

RIPA

Santa Cruz

Akrilamid Mix

PanReac AppliChem

Tris

APS

AppliChem

TEMED

Glisin

AppliChem

Gliserol

Bromofenol mavisi

Protein marker

Metanol

Merck

BSA

Mouse monoclonal β -aktin primer antikoru

Mouse monoclonal Bax primer antikoru

Mouse monoclonal Bcl-2 primer antikoru

Mouse monoclonal c-PARP primer antikoru

Mouse monoclonal β -aktin sekonder antikoru

Mouse monoclonal Bax sekonder antikoru

Mouse monoclonal Bcl-2 sekonder antikoru

Mouse monoclonal c-PARP sekonder antikoru

NaCl

BioFroxx

KCl

Tween 20

Western emdirimi ölçüm kiti

Advansta WesternBright ECL

5.2. Hücre Kültürü

5.2.1. Dondurulmuş MCF-10A meme epiteli hücre hattının çözülmesi

%80 DMEM/F12, %10 at serumu ve %10 DMSO ile cryo tüp içerisinde -80°C 'de dondurularak biyolojik aktiviteleri durdurulmuş MCF-10A meme epiteli hücre hattı dondurucudan çıkarıldı. 50 mL'lik falkon tüpüne 10 mL DMEM/F12 kondu ve üzerine MCF-10A meme epiteli hücre hattı aktarıldı. 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından hücre pelletine dokunmadan serolojik pipet yardımıyla süpernatant atıldı. Hücre pelletinin üzerine 5 mL DMEM/F12 eklenip pipetaj yapılarak karışmaları sağlandı ve 25cm^2 'lik flaska aktarıldı. 37°C 'de, %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi.

5.2.2. Dondurulmuş MCF-7 meme kanseri hücre hattının çözülmesi

%80 DMEM, %10 FBS ve %10 DMSO ile cryo tüp içerisinde -80°C 'de dondurularak biyolojik aktiviteleri durdurulmuş MCF-7 meme kanseri hücre hattı dondurucudan çıkarıldı. 50 mL'lik falkon tüpüne 10 mL DMEM kondu ve üzerine MCF-7 meme kanseri hücre hattı aktarıldı. 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından hücre pelletine dokunmadan serolojik pipet yardımıyla süpernatant atıldı. Hücre pelletinin üzerine 5 mL DMEM eklenip pipetaj yapılarak karışmaları sağlandı ve 25cm^2 'lik flaska aktarıldı. 37°C 'de, %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi.

5.2.3. MCF-10A meme epiteli hücre hattı kültürü

MCF-10A meme epiteli hücreleri için 500 mL DMEM/F12 içerisine 25 mL at serumu, 100 μL EGF, 250 μL hidrokortizon, 50 μL kolera toksini, 500 μL insülin ve 5 mL Pen/Strep eklenerek medyum hazırlandı. Hücreler yeterli miktarda medyum kullanılarak 37°C 'de, %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi. Medyum haftada 3 kez değiştirilerek hücreler çoğaltıldı.

5.2.4. MCF-7 meme kanseri hücre hattı kültürü

MCF-7 meme kanseri hücreleri için 500 mL DMEM içerisine 50 mL FBS ve 5 mL Pen/Strep eklenerek medyum hazırlandı. Hücreler yeterli miktarda medyum kullanılarak 37°C 'de, %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi. Medyum haftada 3 kez değiştirilerek hücreler çoğaltıldı.

5.2.5. Hücrelerin pasajlanması

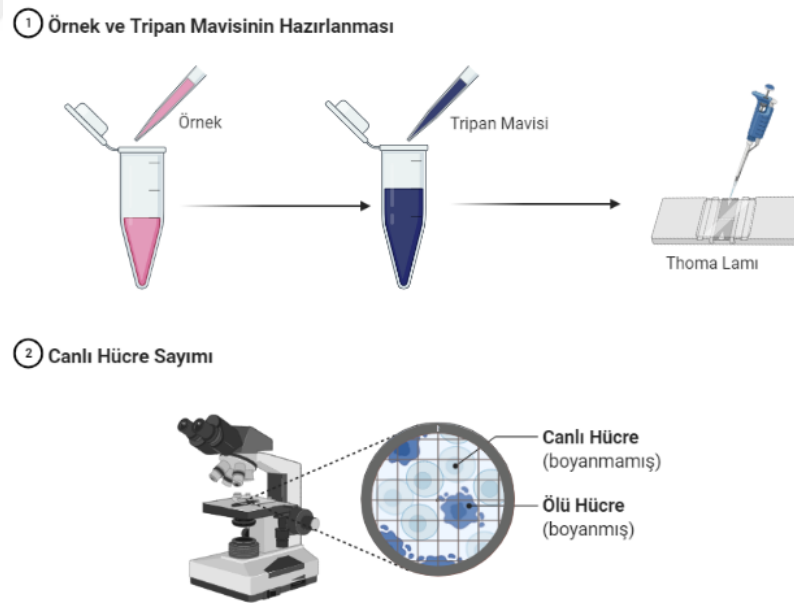
Hücreler sıkışık duruma geldiğinde ortamdaki medyum yetersiz kalır ve kontakt inhibisyon nedeniyle hücrelerin çoğalması durur. Bu sebeple hücrelerin pasajlanması gerekir.

- Pasaj işlemleri için 25cm^2 'lik flastaki hücrelerin sıkışıklığı mikroskop altında değerlendirildi.
- Yaklaşık %70 yoğunluğa ulaşıldığında flastaki medyum atıldı. Hücreler 2 kez PBS/EDTA ve 1 kez PBS ile yıkandı.
- Trypsin ile 37°C 'de, %5 CO_2 içeren etüvde 5 dakika muamele edildi.

- Medyum eklenerek tripsin inaktifte edildikten sonra falkona alınan hücreler 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjün ardından hücre pelletine dokunmadan pipet yardımıyla süpernatant atıldı.
- Hücre pelleti üzerine 1 mL medyum eklenip pipetaj yapıldı.
- Hücre sayımı yapıldıktan sonra hücreler istenilen yoğunluğun elde edileceği şekilde seyreltilerek 75cm²’lik flaska ekildi.
- Hücreler 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona kaldırıldı.

5.2.6. Hücrelerin hemositometrik sayımı

Hücrelerin hemositometrik sayımı için tripan mavisi adı verilen negatif yüklü bir boya kullanıldı. Hücre canlıysa ve membranı zarar görmemişse bu boya hücre içine girmemektedir. Ancak canlı olmayan hücreler boyayı absorbe etmekte ve mikroskop altında mavi görünmektedir. Sayım için uygulanan işlem basamakları aşağıda sıralanmış ve Şekil 5.1’de gösterilmiştir.



Şekil 5.1. Hemositometrik hücre sayımı aşamaları (<https://biorender.com> kullanılarak çizilmiştir, Erişim tarihi: 14 Şubat 2021).

- Canlı hücre sayımını gerçekleştirmek için 200 µL’lik eppendorfa 10 µL tripan mavisi ve 10µL örnek 1:1 oranında eklendi.

- Hazırlanan hücre süspansiyonu, thoma laminin bölmelerine 10'ar µL kondu.
- Thoma lamı mikroskopa yerleştirildi ve boyanmamış canlı hücreler sayıldı.
- Toplam canlı hücre sayısını hesaplamak için sayma alanlarındaki ortalama canlı hücre sayısı N, seyreltme faktörü 2, sayma hacmini mm³'ten mL'ye dönüştürmede kullanılan çarpım faktörü 10⁴ olmak üzere aşağıdaki formül kullanıldı.

$$1 \text{ mL'de toplam canlı hücre sayısı} = N \times 2 \times 10^4$$

5.3. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite Analizi

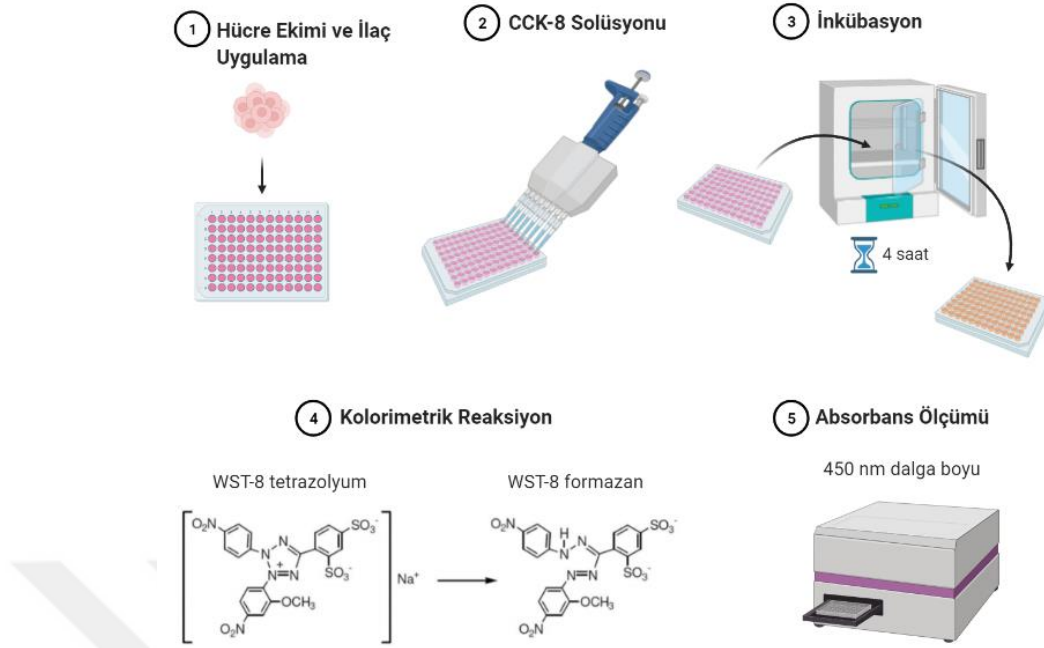
5.3.1. Flurbiprofen türevi SGK597'nin hazırlanması

Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Ana Bilim Dalı'ndan beyaz renkte toz halde temin edilen 50 mg SGK597, 1 mL DMSO içinde çözülerek 96 mM'lik ana stok hazırlandı. Daha sonra hücrelere uygulanacak düşük konsantrasyonlar için bu ana stok kullanıldı.

5.3.2. WST-8 testi protokolü

WST-8 testi, hücre canlılığı ve proliferasyonunu ölçmede kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. WST-8'e dayanan CCK-8 deney kitinde, hücre içine rahatça girip elektron taşıma görevi yapan mediatörlerle birlikte heterosiklik organik yapıdaki renksiz, hücre membranını geçemeyen, negatif yüklü WST-8 tetrazolyum tuzu (2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu) kullanılır. WST-8 tetrazolyum tuzu, hücresel dehidrojenazlar tarafından mediatörler aracılığıyla elektron alarak suda çözünebilir turuncu formazan ürününe indirgenir. Bu olay yalnızca aktif mitokondri varlığında görülür. Dolayısıyla canlı olmayan hücreler renk reaksiyonuna neden olamazken, canlı hücreler kültür ortamını turuncuya dönüştürür. Spektrofotometrik yöntemlerle absorbans ölçümü yapılarak ortamdaki canlı hücre sayısı hesaplanır (Tokur ve Aksoy, 2017).

Uygulanan işlem basamakları aşağıda sıralanmış ve Şekil 5.2'de gösterilmiştir.



Şekil 5.2. WST-8 testi protokol aşamaları (<https://biorender.com> kullanılarak çizilmiştir, Erişim tarihi: 14 Şubat 2021).

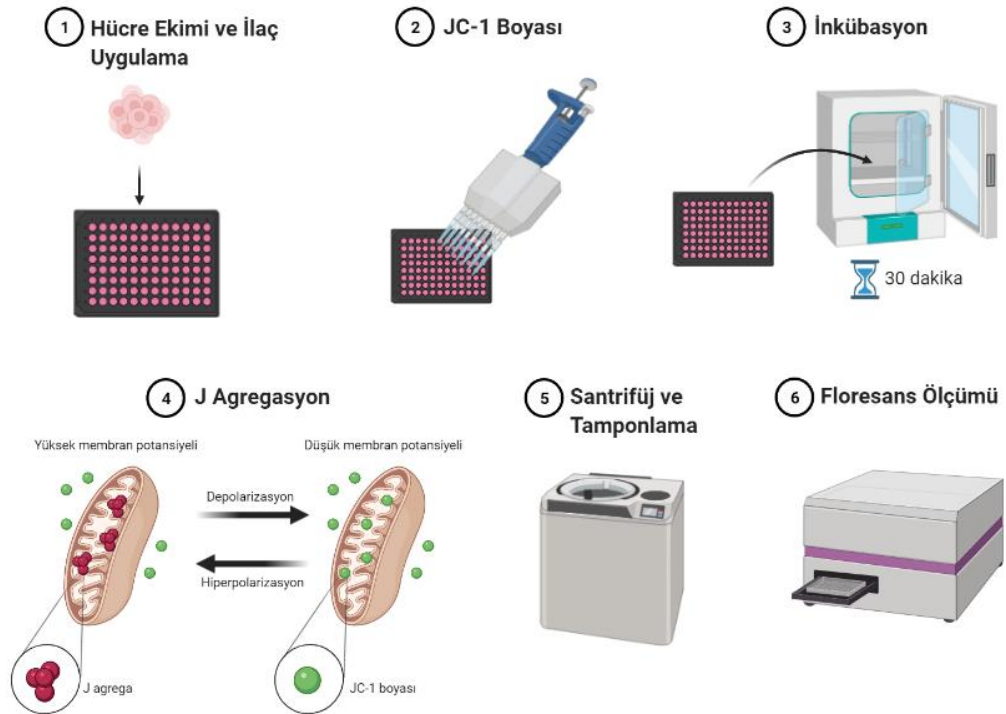
- Hücreler 96 kuyulu iki ayrı plakaya, her kuyuda 100 μL medyum ve 1500 hücre olacak şekilde ekildikten sonra 24 saat süreyle 37°C’de, %5 CO_2 içeren etüvde inkübasyona kaldırıldı.
- İnkübasyon sonrası medyum değiştirildi ve ilaç uygulanmayan kontrol grubu, %0,1 DMSO içeren kontrol grubu, artan konsantrasyonlarda (10, 25, 50, 75, 100 μM) SGK597 içeren deney grubundan 3’er tekrar olacak şekilde uygulama yapıldı.
- 24 ve 48 saatlik inkübasyon periyotlarından sonra kuyulardaki medyum atıldı. Her kuyuya 100 μL taze medyum ve 10 μL CCK-8 solüsyonu eklendi. Plaka, çalkalayıcıya 5 dakika konduktan sonra 37°C’de, %5 CO_2 içeren etüvde 4 saatlik inkübasyona kaldırıldı.
- Elisa Reader kullanılarak 450 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü.

5.4. Apoptoz Tayini

5.4.1. JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli testi protokolü

JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli testi, sağlıklı ve apoptotik hücrelerde MMP'yi tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Lipofilik ve katyonik özellik gösterip yeşil floresans veren bir boya olan JC-1 (5,5,6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimi-dazolilkarbosianin iyodür) mitokondriye girme kabiliyetine sahiptir. Sağlıklı hücrelerde mitokondrinin yüksek elektronegatifliğine bağlı olarak JC-1, mitokondriye girer ve kırmızı floresans veren J agregatları oluşturur. Buna karşın, apoptotik hücrelerde elektrokimyasal potansiyel kaybı yaşayan mitokondriye çok daha az JC-1 boyası girdiği için yeterli miktarda J agregatları oluşamaz ve yeşil floresans görülür (Sivandzade ve ark., 2019). Yeşil/kırmızı floresans oranına bakılarak MMP depolarizasyonu ve apoptotik hücre oranı değerlendirilebilir.

Uygulanan işlem basamakları aşağıda sıralanmış ve Şekil 5.3'te gösterilmiştir.



Şekil 5.3. JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli testi protokol aşamaları (<https://biorender.com> kullanılarak çizilmiştir, Erişim tarihi: 14 Şubat 2021).

- Hücreler 96 kuyulu siyah plakaya, her kuyuda 100 µL medyum ve 50 000 hücre olacak şekilde ekildikten sonra 24 saat süreyle 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona kaldırıldı.
- İnkübasyon sonrası medyum değiştirildi. İlaç uygulanmayan kontrol grubu ve artan konsantrasyonlarda (10, 25, 50, 75, 100 µM) SGK597 içeren deney grubundan 3’er tekrar olacak şekilde uygulama yapıldı.
- 48 saatlik inkübasyonun ardından kuyulardaki medyum atıldı. JC-1 boyası medyum ile 1:9 oranında seyreltilti. Her kuyuya karanlık ortamda 5 µL seyreltilmiş JC-1 eklenip pipetaj yapıldı. 37°C’de, %5 CO₂ içeren etüvde 30 dakika inkübasyona kaldırıldı.
- Plaka, 2100 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra kuyulardaki süpernatant atıldı ve her kuyuya 150 µL tampon çözeltisi eklendi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra plaka 2100 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi, kuyulardaki süpernatant atıldı, her kuyuya 100 µL tampon çözeltisi eklendi.
- Elisa Reader kullanılarak sağlıklı hücreler için 535 ve 595 nm’de sırasıyla uyarma ve emisyon dalga boyunda floresans yoğunluğu, apoptotik hücreler için 485 ve 535 nm’de uyarma ve emisyon dalga boyunda floresans yoğunluğu ölçüldü.

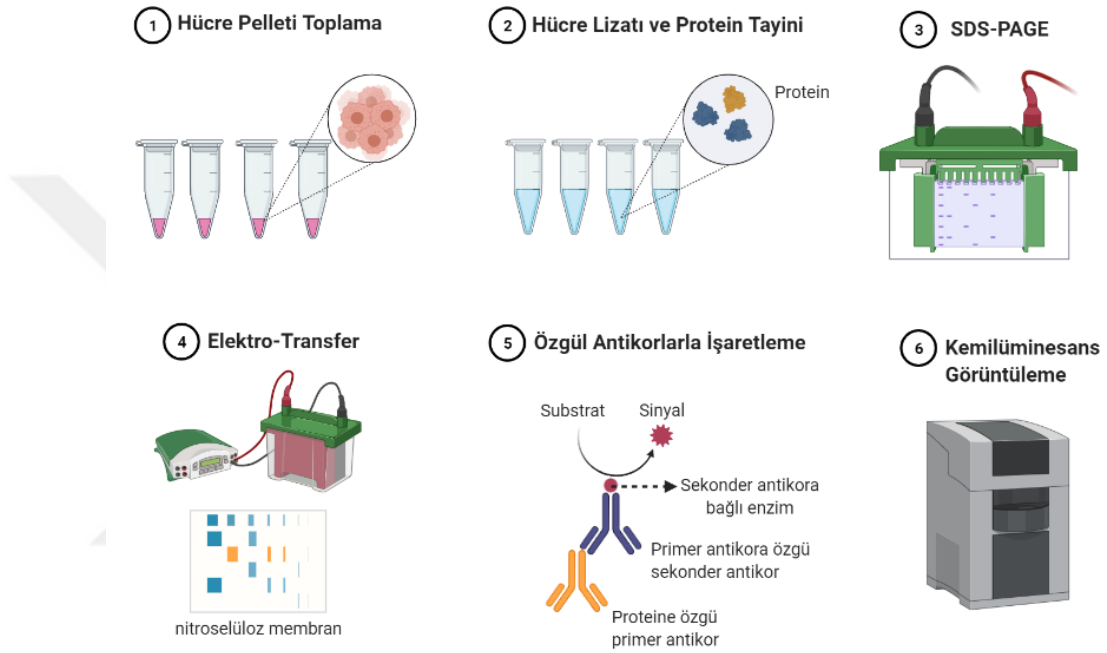
5.4.2. Western emdirimi protokolü

Western emdirimi, bir numunedeki spesifik bir proteini, o proteine özgü antikoru kullanarak tayin etme yöntemidir. Proteinler pozitif veya negatif yüklü olabilmektedir. Negatif yüklü sodyum dodesil sülfat (SDS) protein başına eşit miktarda bağlanan bir çeşit iyonik deterjandır. Yüksek sıcaklıkta denatüre olan proteinlerin tamamı SDS ile muamele edildiğinde negatif yüklenir. Böylece proteinler arasında şekilden ve yükten kaynaklanan farklar elimine edilir. SDS’ye ek olarak kullanılan β-merkaptetanol (βmet) ile proteinlerin disülfid bağları kırılarak denatürasyon desteklenir. Numunelerin kuyulara doğru ve kolay şekilde yüklenebilmesi için yoğunluğu artıran gliserol ve renk veren bromofenol mavisinden faydalanılır.

Proteinler belirli oranlarda akrilamid ile hazırlanan gözenekli yürütme jelinde hareket eder ve molekül ağırlığına göre ayrılarak (Sieving etkisi) protein bantlarını

oluşturur. Oluşan bantlar nitroselüloz membrana transfer edildikten sonra membran ve antikorlar arasında spesifik olmayan bağlanmaları en aza indirmek için blokaj işlemi yapılır. İlgili proteine özgü primer antikordan sonra konjuge enzim içeren, primer antikora özgü sekonder antikor ile muamele sonrası kemilüminesans görüntüleme yapılır.

Uygulanan işlem basamakları aşağıda sıralanmış ve Şekil 5.4'te gösterilmiştir.



Şekil 5.4. Western emdirimi protokol aşamaları (<https://biorender.com> kullanılarak çizilmiştir, Erişim tarihi: 14 Şubat 2021).

- Her örnek için 25cm²'lik flaska 5 mL DMEM içerisinde 800 000'er hücre ekildi. 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası flasklardaki medyum atıldı ve taze medyum eklendi. Deney grubu için hücreler 10, 25, 50 µM SGK597 ile 37°C'de, %5 CO₂ içeren etüvde 48 saat muamele edildi. Flasklardaki medyum atıldıktan sonra hücreler sırasıyla 2 kez PBS/EDTA ve 1 kez PBS ile yıkandı, tripsin ile 5 dakika muamele edildi. DMEM eklenerek tripsin inaktive edildikten sonra falkonlara alınan örnekler 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından hücre pelletine dokunmadan pipet yardımıyla

süpernatant atıldı. Örnekler, 1 mL DMEM eklenip pipetaj yapılarak eppendorflara alındı ve 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra 1 mL PBS eklenerek 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve bu işlem iki kez daha tekrarlandı. Elde edilen hücre pelletleri -80°C'de deney gününe kadar saklandı.

- Örnekler deney günü -80°C'den çıkarıldı. Her örnek için 8 µL proteaz inhibitör kokteyli, 2 µL NaF, 190 µL RIPA parçalama (lisis) tamponu kullanılarak lisis solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan solüsyondan her örneğe 200'er µL eklenip pipetaj yapıldı ve 30 dakika muamele edildi. Örnekler +4°C'de 14 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Proteinleri içeren süpernatant, pipet yardımıyla alınarak yeni eppendorflara aktarıldı. Elisa Reader kullanılarak protein konsantrasyonu (µg/µL) belirlendi. Deneyde kullanılmak üzere 50 µg protein için gerekli hacim hesaplandı.
- SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için iki tekrar olacak şekilde %12'lik yürütme jeli ve %4'lük yükleme jeliyle kasetler hazırlanıp tanka yerleştirildi. Tank, kuyuların seviyesini geçene kadar 1X yürütme tamponu (25 mM tris, 192 mM glisin ve %0,1 SDS içerir) ile dolduruldu. Her örnekten alınan 50 µg protein, hesaplanan miktarda distile su, βmet ve 4X yükleme tamponu (1 M Tris-HCl, %100 gliserol, %20 SDS, %0,1 bromofenol mavisi ve distile su içerir) ile karıştırılıp +95°C'de 5 dakika bekletilerek denatüre edildi. Denatüre edilen örnekler protein belirteçleri ile birlikte kuyulara dikkatlice yüklendi. Kapak kapatıldıktan sonra elektrotlar bağlandı ve 150 V'ta 2 saat yürütme sağlandı.
- Yürütme esnasında 5X transfer tamponu (25 mM tris, 192 mM glisin ve %20 metanol içerir) hazırlandı. Transfer için gereken sünger, filtre kağıdı ve nitroselüloz membranlar bu tampon ile ıslatılarak +4°C'de saklandı. Yürütme tamamlandıktan sonra tanktaki yürütme tamponu atıldı ve jel, kasetten çıkarıldı. Arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat ederek pens yardımıyla transfer kaseti hazırlandı ve transfer tamponu ile doldurulan tanka yerleştirildi. Kapak kapatıldıktan sonra elektrotlar bağlandı ve 25 V'ta 2 saat transfer sağlandı. Transfer sonunda membranlar, pens

yardımıyla alındı ve blokaj işlemi için %5'lik sığır serum albümin (BSA) ile çalkalayıcıda 1 saat muamele edildi.

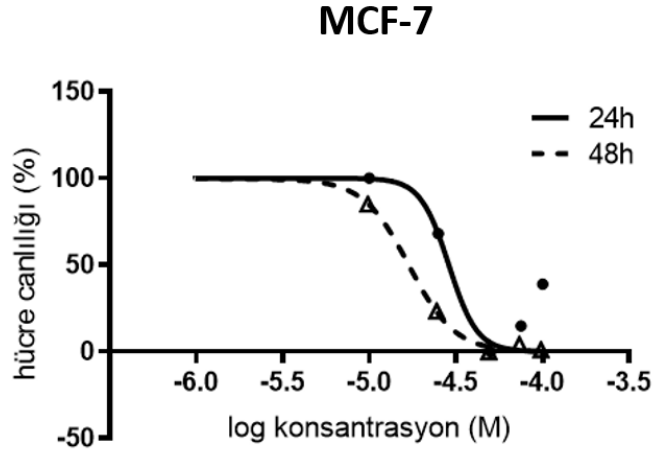
- Membranlar, %1 BSA içeren 1X TBS-T içerisinde çözölen β -aktin, Bcl-2, Bax ve c-PARP primer antikorları ile +4°C'de çalkalayıcıda gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası membranlar çalkalayıcıda 1X TBS-T (pH değeri 8 olacak şekilde 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g tris ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanan 1X TBS ve %0,1 Tween 20 içerir) ile üç defa 10'ar dakika yıkandı. Yıkama sonrası membranlar %1 BSA içeren 1X TBS-T içerisinde çözölen sekonder antikor ile çalkalayıcıda 2 saat muamele edildikten sonra 1X TBS-T ile üç defa 10'ar dakika yıkandı. Membranların tüm yüzeyine kemilüminesans substrat çözeltisinden 1 mL uygulandı ve 2 dakika beklendi. Miktar tayini, kemilüminesans görüntöleme sistemi Biostep Celvin ve TotalLab 1D yazılımı kullanılarak yapıldı.

6. BULGULAR

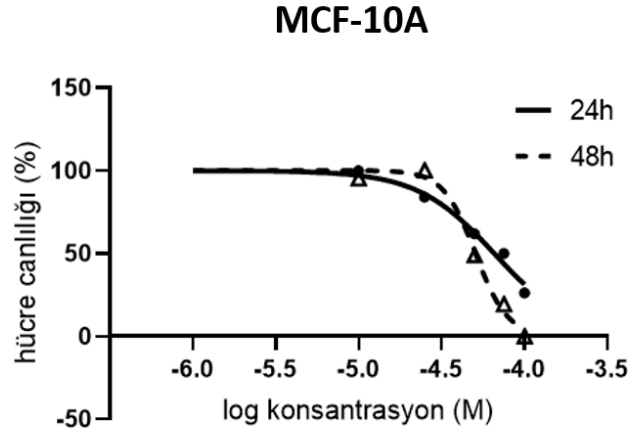
6.1. WST-8 Testi Sonuçları

MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinin, farklı konsantrasyonlarda SGK597 ile 24 ve 48 saatlik inkübasyonu için yöntemler bölümünde açıklandığı gibi WST-8 testi protokolü uygulanmıştır. Elde edilen absorbans değerlerinin analizi sonrası, hücre canlılık oranı ve IC₅₀ değerlerinin hesaplanması için GraphPad Prism 8 istatistik programı kullanılmıştır.

Elde edilen istatistiksel verilere göre SGK597'nin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonu için IC₅₀ değeri sırasıyla 28,74 μ M ve 17,28 μ M; MCF-10A meme epitel hücrelerinde ise 65,9 μ M ve 50,5 μ M olarak belirlenmiştir. Artan konsantrasyonlarda SGK597 uygulaması için MCF-7 hücre canlılık oranı Şekil 6.1'de, MCF-10A hücre canlılık oranı ise Şekil 6.2'de gösterilmiştir. Uygulanan 0, 10, 25, 50, 75, 100 μ M SGK597 için logaritmik konsantrasyon değerleri sırasıyla -6, -5, -4,6, -4,3, -4,125 ve -4 M olarak verilmiştir.



Şekil 6.1. Artan konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat süreyle SGK597 uygulanan MCF-7 meme kanseri hücrelerinin canlılık oranı.



Şekil 6.2. Artan konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat süreyle SGK597 uygulanan MCF-10A meme epitel hücrelerinin canlılık oranı.

MCF-7 ve MCF-10A hücreleri için diğer program çıktıları sırasıyla Tablo 6.1 ve Tablo 6.2’de gösterilmiştir.

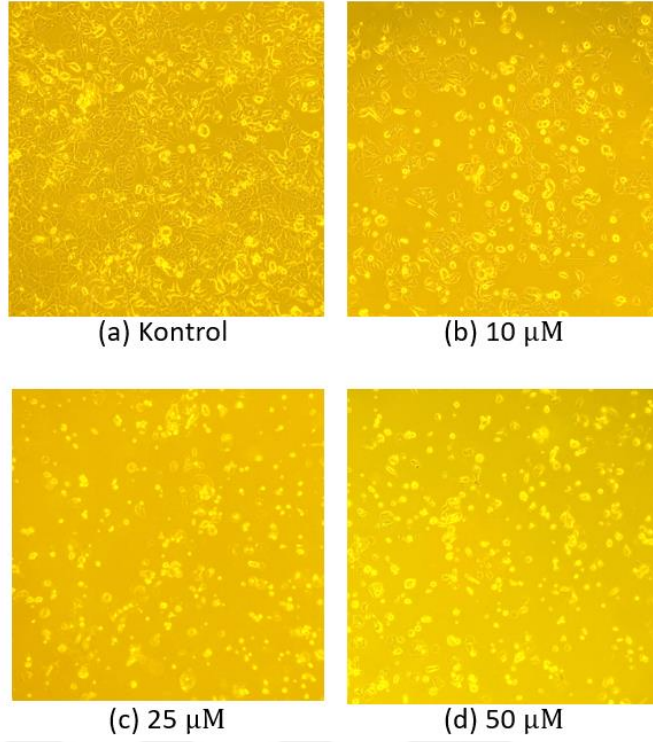
Tablo 6.1. Farklı konsantrasyonlarda SGK597 ile 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-7 meme kanseri hücre hattı için GraphPad Prism 8’de belirlenen istatistiksel sonuçlar.

Nonlin fit	MCF-7 24h	MCF-7 48h
log(inhibitor) vs. normalized response --		
Variable slope		
Best-fit values		
LogIC50	-4.542	-4,762
HillSlope	-5.292	-3,266
IC50	2.874e-005	1,728e-005
95% CI (profile likelihood)		
LogIC50	-infinity to +infinity	-4,879 to +infinity
HillSlope	-infinity to 0.2766	-infinity to -1,880
IC50	???	1,322e-005 to ???
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	16	16
R squared	0.06123	0,8911
Sum of Squares	25567	3735
Sy.x	39.97	15,28
Number of points		
# of X values	18	18
# Y values analyzed	18	18

Tablo 6.2. Farklı konsantrasyonlarda SGK597 ile 24 ve 48 saat muamele edilen MCF-10A meme epiteli hücre hattı için GraphPad Prism 8’de belirlenen istatistiksel sonuçlar.

Nonlin fit	MCF-10A 24h	MCF-10A 48h
log(inhibitor) vs. normalized response --		
Variable slope		
Best-fit values		
LogIC50	-4,181	-4,297
HillSlope	-1,865	-4,477
IC50	6,590e-005	5,050e-005
95% CI (profile likelihood)		
LogIC50	??? to +infinity	-4,568 to ???
HillSlope	-infinity to +infinity	-infinity to 0,4212
IC50	???	2,702e-005 to ???
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	10	10
R squared	-0,4668	0,1745
Sum of Squares	20638	15866
Sy.x	45,43	39,83
Number of points		
# of X values	12	12
# Y values analyzed	12	12

MCF-7 hücre canlılığındaki değişimin morfolojik etkileri mikroskop altında incelenmiştir. Artan konsantrasyonlarda SGK597 uygulanan hücrelerin şekil ve büyüklüklerinin doza bağlı olarak değiştiği görülmüştür. Hücreler küçülmüş, büzüşmüş ve yuvarlaklaşmıştır. Bu değişimler Resim 6.1’de gösterilmiştir.

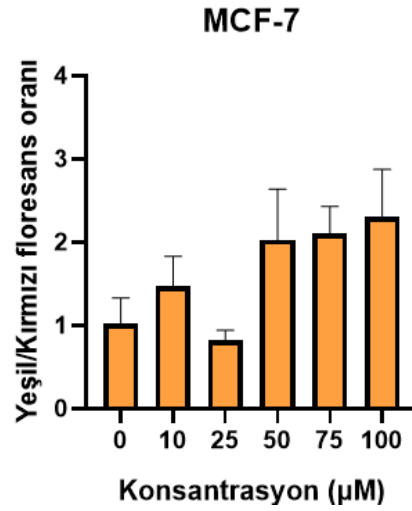


Resim 6.1. MCF-7 hücrelerinin (a) 0, (b) 10, (c) 25 ve (d) 50 μ M SGK597 ile 48 saat inkübasyon sonrası mikroskop altındaki görüntüsü.

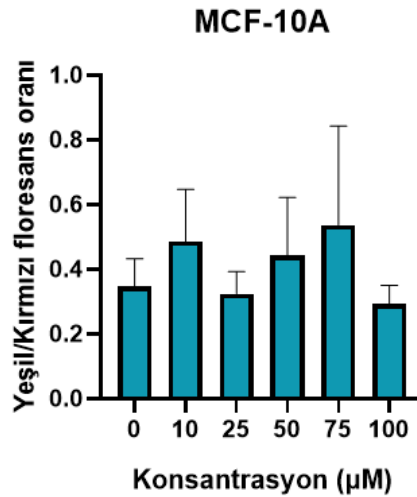
6.2. JC-1 Mitokondriyal Membran Potansiyeli Testi Sonuçları

MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinin, farklı dozlarda SGK597 ile 48 saatlik inkübasyonu için JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli testi protokolü uygulanmıştır. Sağlıklı hücrelerde kırmızı, apoptotik hücrelerde ise yeşil floresans elde edilmiştir. Bu değerlerin analizi için GraphPad Prism 8 istatistik programı kullanılmıştır.

MCF-7 hücrelerinde doza bağlı olarak mitokondriyal membran potansiyelinde genel olarak düşüş (depolarizasyon) ve apoptotik hücre oranında artış belirlenirken, MCF-10A hücrelerinde sürekli bir değişiklik görülmemiştir. Bu durum sırasıyla Şekil 6.3 ve Şekil 6.4'te gösterilmiştir.



Şekil 6.3. MCF-7 hücre hattının, artan dozlarda SGK597 ile 48 saat inkübasyonu sonrası yeşil/kırmızı floresans oranı.

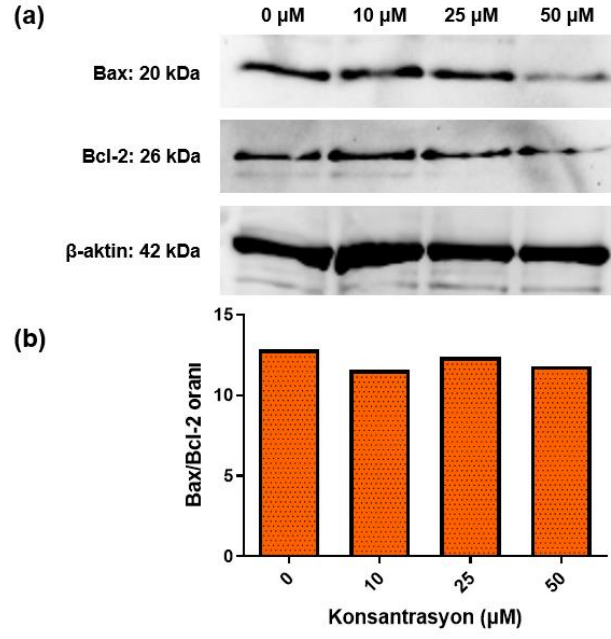


Şekil 6.4. MCF-10A hücre hattının, artan dozlarda SGK597 ile 48 saat inkübasyonu sonrası yeşil/kırmızı floresans oranı.

6.3. Western Emdirimi Sonuçları

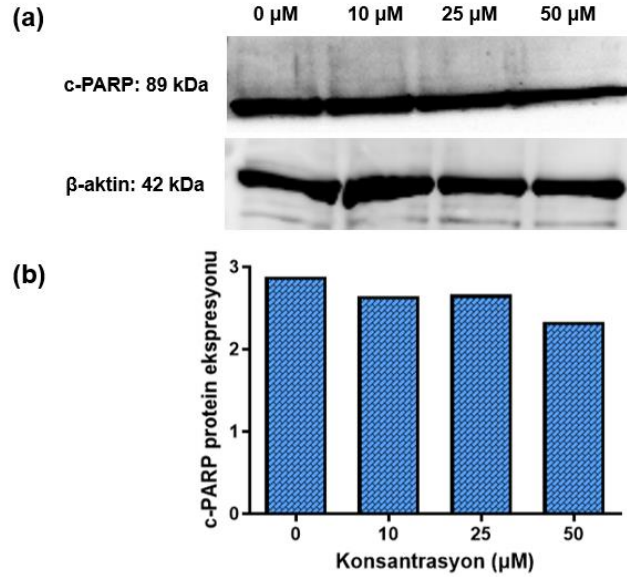
SGK597 ile 48 saat inkübe edilen MCF-7 hücreleri için Western emdirimi protokolü uygulanarak Bax, Bcl-2, c-PARP proteinleri tayin edilmiştir. Bu protein seviyelerinin normalizasyonu için β -aktin protein miktarı da belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların analizi için GraphPad Prism 8 istatistik programı kullanılmıştır.

Bax/Bcl-2 protein oranı incelendiğinde, SGK597'nin MCF-7 hücrelerinde bu oranı değiştirmedeği görülmüştür. Elde edilen Bax ve Bcl-2 protein bantları ile oranı, Şekil 6.5'te gösterilmiştir.



Şekil 6.5. Western emdirimi analizi sonucu elde edilen (a) Bax, Bcl-2, β -aktin protein bantları ve (b) Bax/Bcl-2 protein oranı.

Öte yandan, c-PARP protein ekspresyonunda da kayda değer bir değişim gözlenmemiştir. Elde edilen c-PARP protein bantları ve ekspresyon seviyeleri Şekil 6.6'da gösterilmiştir.



Şekil 6.6. Western emdirimi analizi sonucu elde edilen (a) c-PARP protein bantları ve (b) c-PARP protein ekspresyonu.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Flurbiprofen türevi SGK597'nin daha önce prostat kanseri hücrelerine karşı antikanser etkisi olabileceği saptanmıştır (Yılmaz ve ark., 2020). Prostat kanserinin nedenleri karmaşıktır ve tam olarak belirlenmemiştir. Olası risk faktörleri yaş, ırk, coğrafya, aile öyküsü ve genetik faktörlerdir. Bu risk faktörleri arasında aile öyküsü, prostat kanseri gelişimi için en bilinen risk faktörlerindendir. Ailesel prostat kanseri riskinin yaklaşık %35'i bilinen genlerle açıklanmaktadır. BRCA1 ve BRCA2, kalıtsal meme ve yumurtalık kanserine neden olan iki ana gendir. Ailede meme kanseri öyküsü bulunan BRCA1 ve BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında prostat kanseri riskinin arttığına dair kesin kanıtlar vardır. Ayrıca önceki çalışmalar, birinci derece akrabalarda meme kanseri aile öyküsünün prostat kanseri ile ilişkili olduğunu da bildirmiştir (Ren ve ark., 2019).

Önceki çalışmalara dayanarak prostat kanserine karşı faydalı etkiler gösteren ajanların meme kanserine karşı da etkili olabileceği düşünülmektedir. Karboksiamido-triazol'un, *in vitro* olarak meme ve prostat kanseri göçünün seçici bir inhibitörü olduğu keşfedilmiştir ve bu bileşiğin kanser hastalarında faz III klinik deneylerine girdiği bilinmektedir. Fenilboronik asit ise farelerde meme ve prostat kanseri göçünü ve tümör metastazını seçici olarak inhibe ettiği gösterilen karboksiamido-triazol ve migrastatin'in *in vitro* özelliklerine olumlu bir şekilde benzemektedir (Bradke ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışmada insan prostat kanseri hücre hatları PC-3 ve LNCaP farelere deri altından aşılanmış, yeşil çayda bol miktarda bulunan epigallokateşin gallat enjekte edildiğinde ise prostat kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği ve boyutlarını hızla azalttığı görülmüştür. Epigallokateşin gallat, insan meme kanseri hücre hattı MCF-7'de de *in vivo* olarak denenmiş ve tümör gelişimini inhibe ettiği ortaya konmuştur. Hatta bu sonuçla yeşil çayın yüksek tüketimi ile bazı Asya ülkelerinde prostat ve meme kanserlerinin düşük görülme sıklığı arasında bir ilişki olabileceği düşünülmüştür (Liao ve ark., 1995).

Sinamik asit türevlerinin de meme ve prostat kanseri hücrelerinin büyümesi üzerindeki inhibe edici etkileri test edilmiştir. İncelenen bileşikler arasında 3,4,5-

trihidroksisinnamik asit desil ester, apoptozun indüklenmesiyle kanser hücresi büyümesinin en güçlü inhibisyonunu göstermiştir. Bu bileşiğin meme ve prostat kanserine karşı yeni bir antikanser ajan olabileceği belirtilmiştir (Imai ve ark., 2019).

Bir başka çalışmada ise tamoksifen, östrojen ve artemisine dayalı bir dizi hibrit bileşik sentezlenmiş ve insan prostat (PC-3) ve meme (MCF-7) kanseri hücre hatlarına karşı *in vitro* aktiviteleri açısından analiz edilmiştir. Bazı hibritlerin PC-3 ve MCF-7 hücre hatlarında antikanser aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Fröhlich ve ark., 2020).

Bu çalışmada ise artan konsantrasyonlarda SGK597'nin 24 ve 48 saat süreyle MCF-7 hücre hattına uygulanmasıyla IC_{50} değeri sırasıyla 28,74 μM ve 17,28 μM ; MCF-10A hücre hattına uygulanmasıyla ise 65,9 μM ve 50,5 μM olarak hesaplanmıştır. PC-3 prostat kanseri hücre hattının SGK597 ile 24 saatlik inkübasyonu için belirlenen IC_{50} değerinin 27,1 μM olduğu bilinmektedir. Bu değer MCF-7 için belirlenen değer ile yakın olması, iki kanser türü arasında bir ilişki olabileceği düşüncesini beslemektedir. Ancak IC_{50} değeri hücre fonksiyonların sekteye uğradığı sessiz, büyümesi duran, ölü, erken veya geç apoptotik süreçteki hücrelerin tamamına göre belirlenmektedir. Dolayısıyla uygulanan WST-8 testi apoptozu gösteremez. Ancak hücrelerin canlılığı ve metabolik aktivitesi hakkında fikir verir.

İlaç tasarımı sırasında vücudumuzdaki olası etkileşimler ve zararlar düşünülmektedir. Yeni ilaç adayının IC_{50} değeri ne kadar düşükse, ilgili hastalık için yeni ilaç haline gelme potansiyeli o kadar yüksektir. Bu nedenle ilerleyen testlerde MCF-7 hücreleri için 48 saatlik inkübasyon tercih edilmiştir. Öte yandan, MCF-10A meme epitel hücrelerinde IC_{50} değeri çok daha yüksek çıkmıştır. Bu durum, MCF-7 için uygulanacak SGK597'nin aynı inkübasyon süresinde MCF-10A'da önemli bir etkiye neden olmayacağını düşündürmektedir.

Apoptoz belirteçlerinden biri olduğu bilinen mitokondriyal membran potansiyelinin MCF-10A hücrelerinde SGK597'nin düşük konsantrasyonu için radikal olarak değişmemesi, SGK597'nin normal meme epiteline ciddi zarar vermeyeceğini akla getirmektedir. Öte yandan, MCF-7 hücrelerinde SGK597'nin artan konsantrasyonlarda uygulanması sonucu mitokondriyal membran potansiyeli düşüş seyri göstermiştir. Bu durum apoptotik veya nekrotik hücre ölümüne bağlı olabilir.

SGK597'nin MCF-7 hücrelerinde apoptotik etkisinin daha detaylı değerlendirilmesi için yapılan Western emdirimi sonucunda Bax/Bcl-2 protein oranında ve c-PARP protein ekspresyonunda bir değişiklik görülmemiştir. Apoptoza giden hücrelerde Bax/Bcl-2 oranının ve c-PARP ekspresyon seviyesinin artması beklenmektedir. Elde edilen sonuca göre SGK597'nin MCF-7 hücrelerini apoptoza götürmediği fikri güçlenmektedir. Bunun dışında apoptozla ilişkili Bax/Bcl-2 oranı ve c-PARP protein ekspresyonunda bir değişiklik olmamasına rağmen JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli testi sonucu görülen depolarizasyon, hücrelerde bir miktar apoptotik uyarım olduğunu ve SGK597'nin proliferasyonu baskılamasının yanında apoptotik bir ajan olarak kullanılabilme potansiyelinin olduğunu düşündürmektedir. Farklı proteinlerle yapılacak çalışmalar, ilacın farklı yollar üzerinde etkili olduğunu gösterebilir. Western emdirimi nicel değerlendirme bakımından çok hassas değildir ve deneylerin en az üç kez tekrarlanması gerekir. Apoptotik hücre ölümünün kesin tayini için daha ileri testlere ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda SGK597'nin proliferasyonu baskılayıcı etkisi gözlenmiş, ayrıca bu etkinin kanser hücre hattında sağlıklı hücre hattına göre önemli ölçüde yüksek olduğu görülmüştür. Mitokondriyal membran potansiyeli ölçümleri SGK597'nin apoptotik etkisi olduğunu da düşündürmektedir. Ancak bu gözlemin apoptozu gösterecek farklı yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir.

NSAİİ'lerin meme kanseri üzerindeki etkisine yönelik çalışmaların çelişkili sonuçlara yol açtığı açıktır. Bu farklılıkların ilaç tasarımına mı yoksa NSAİİ'lerin meme kanserinin doğal seyri üzerindeki etki mekanizmasının tam olarak anlaşılmamasına mı bağlı olduğu bilinmemektedir. Bu etkilerin anlaşılması, yapılacak ileri çalışmalara muhtaçtır.

8. KAYNAKLAR

Ali R, Mirza Z, Ashraf GM, Kamal MA, Ansari SA, Damanhour GA, Abuzenadah AM, Chaudhary AG, Sheikh IA. New anticancer agents: recent developments in tumor therapy. *Anticancer Res.* 2012;32(7):2999-3005.

Aydın S, Basu NK, Arora P, Basu A, Nichols DB, Talele TT, Akkurt M, Çelik I, Büyükgüngör O, Küçükgüzel ŞG. Microwave assisted synthesis of some novel Flurbiprofen hydrazidehydrazones as anti-HCV NS5B and anticancer agents. *Mar Pharm Journ.* 2013;17:26-34.

Becker S. A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. *Int J Gynaecol Obstet.* 2015;131:S36-S39.

Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem.* 1999; 274(33), 22932–22940.

Bradke TM, Hall C, Carper SW, Plopper GE. Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell adhesion & migration.* 2008;2(3):153-160.

Camarillo IG, Xiao F, Madhivanan S, Salameh T, Nichols M, Reece LM, Leary JF, Otto K, Natarajan A, Ramesh A, Sundararajan R. Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: an in vitro model study. In: *Electroporation-Based Therapies for Cancer.* Elsevier; 2014, p:55–102.

Campbell KJ, Tait S. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open biology.* 2018;8(5):180002.

Comşa S, Cimpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer research.* 2015;35:3147-3154.

Çıkla P, Tatar E, Küçükgüzel İ, Şahin F, Yurdakul D, Basu A, Krishnan R, Nichols DB, Kaushik-Basu N, Küçükgüzel ŞG. Synthesis and characterization of flurbiprofen

hydrazide derivatives as potential anti-HCV, anticancer and antimicrobial agents. *Medicinal Chemistry Research*. 2013;22(12):5685–5699.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495–516.

Erekat NS. Apoptosis and its Role in Parkinson's Disease. In: *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*. Codon Publications; 2018, p:65-82.

Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, Ji X, Liu W, Huang B, Luo W, Liu B, Lei Y, Du S, Vuppapapati A, Luu HH, Haydon RC, He TC, Ren G. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*. 2018;5(2):77–106.

Fröhlich T, Mai C, Bogautdinov RP, Morozkina SN, Shavva AG, Friedrich O, Gilbert DF, Tsogoeva SB. Synthesis of Tamoxifen-Artemisinin and Estrogen-Artemisinin Hybrids Highly Potent Against Breast and Prostate Cancer. *ChemMedChem*. 2020;15(15):1473-1479.

Gottlieb E, Armour SM, Harris MH, Thompson CB. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 2003;10(6):709–717.

Heinrich T, Seenisamy J, Becker F, Blume B, Bomke J, Dietz M, Eckert U, Friesen-Hamim M, Gunera J, Hansen K, Leuthner B, Musil D, Pfalzgraf J, Rohdich F, Siegl C, Spuck D, Wegener A, Zenke FT. Identification of Methionine Aminopeptidase-2 (MetAP-2) Inhibitor M8891: A Clinical Compound for the Treatment of Cancer. *J Med Chem*. 2019;62(24):11119–11134.

Imai M, Yokoe H, Tsubuki M, Takahashi N. Growth Inhibition of Human Breast and Prostate Cancer Cells by Cinnamic Acid Derivatives and Their Mechanism of Action. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2019;42(7):1134-1139.

King JG Jr, Khalili K. Inhibition of human brain tumor cell growth by the anti-inflammatory drug, flurbiprofen. *Oncogene*. 2001;20(47):6864–6870.

Liao S, Umekita Y, Guo J, Kokontis JM, Hiipakka RA. Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate. *Cancer Letters*. 1995;96(2):239-243.

Ly J, Grubb D, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; An update. *Apoptosis*. 2003;8(2):115-28.

McCormick DL, Moon RC. Inhibition of mammary carcinogenesis by flurbiprofen, a non-steroidal antiinflammatory agent. *British journal of cancer*. 1983;48(6):859–861.

Meegan MJ, O’Boyle NM. *Anticancer Drugs. Pharmaceuticals*. 2019;12(3):134.

Moris D, Kontos M, Spartalis E, Fentiman IS. The Role of NSAIDs in Breast Cancer Prevention and Relapse: Current Evidence and Future Perspectives. *Breast care*. 2016;11(5):339–344.

Nguyen C, Pandey S. Exploiting Mitochondrial Vulnerabilities to Trigger Apoptosis Selectively in Cancer Cells. *Cancers*. 2019;11(7):916.

Ozmen V, Boylu S, Ok E, Canturk NZ, Celik V, Kapkac M, Girgin S, Tireli M, Ihtiyar E, Demircan O, Baskan MS, Koyuncu A, Tasdelen I, Dumanli E, Ozdener F, Zaborek P. Factors affecting breast cancer treatment delay in Turkey: a study from Turkish Federation of Breast Diseases Societies. *The European Journal of Public Health*. 2014;25(1):9–14.

Ozmen V, Ozmen T, Dogru V. Breast Cancer in Turkey; An Analysis of 20.000 Patients with Breast Cancer. *European Journal of Breast Health*. 2019;15(3):141–146.

Ozmen V. Breast Cancer in the World and Turkey. *Journal of Breast Health*. 2008;4:2-5.

Peesa JP, Yalavarthi PR, Rasheed A, Mandava VBR. A perspective review on role of novel NSAID prodrugs in the management of acute inflammation. *Journal of Acute Disease*. 2016;5(5):364–381.

Powles TJ, Alexander P, Millar JL. Enhancement of anti-cancer activity of cytotoxic chemotherapy with protection of normal tissues by inhibition of P.G. synthesis. *Biochemical Pharmacology*. 1978;27(9):1389–1392.

Ren ZJ, Cao DH, Zhang Q, Ren PW, Liu LR, Wei Q, Wei WR, Dong Q. First-degree family history of breast cancer is associated with prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2019;19(1):871.

Risbridger GP, Davis ID, Birrell SN, Tilley WD. Breast and prostate cancer: more similar than different. *Nature Reviews Cancer*. 2010;10(3):205–212.

Selvakumar P, Lakshmikuttyamma A, Das U, Pati HN, Dimmock JR, Sharma RK. NC2213: a novel methionine aminopeptidase 2 inhibitor in human colon cancer HT29 cells. *Molecular cancer*. 2009;8:65.

Selvakumar P, Lakshmikuttyamma A, Dimmock JR, Sharma RK. Methionine aminopeptidase 2 and cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1765(2):148–154.

Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2010;1(2):109–126.

Singh B, Lucci A. Role of Cyclooxygenase-2 in Breast Cancer. *Journal of Surgical Research*. 2002;108(1):173-179.

Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-protocol*. 2019;9(1):e3128.

Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International journal of biological sciences*. 2017;13(11):1387–1397.

Tokur O, Aksoy A. In Vitro Sitotoksiste Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2017;6(1):112-118.

Tseng LL, Cheng HH, Huang CJ, Liu SI, Kuo CC, Chen WC, Huang JK, Hsu SS, Chang HT, Kao CH, Ho CM, Jan CR. Dual effect of flurbiprofen on cell proliferation and agonist-induced Ca(2+) movement in human osteosarcoma cells. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2006;98(2):160–167.

Wechter WJ, Kantoci D, Murray ED Jr, Quiggle DD, Leipold DD, Gibson KM, McCracken JD. R-flurbiprofen chemoprevention and treatment of intestinal adenomas in the APC^{Min}/+ mouse model: implications for prophylaxis and treatment of colon cancer. *Cancer Res*. 1997;57:4316-4324.

Wong RSY. Role of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Cancer Prevention and Cancer Promotion. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2019;2019:1–10.

Yamaoka M, Yamamoto T, Ikeyama S, Sudo K, Fujita T. Angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470) potently inhibits the tumor growth of hormone-independent human breast and prostate carcinoma cell lines. *Cancer research*. 1993;53:5233-5236.

Yılmaz Ö, Bayer B, Bekçi H, Uba AI, Cumaoğlu A, Yelekci K, Küçükgül SG. Synthesis, Anticancer Activity on Prostate Cancer Cell Lines and Molecular Modeling Studies of Flurbiprofen-Thioether Derivatives as Potential Target of MetAP (type II). *Medicinal Chemistry*. 2020;16(6):735-749.