



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NAPROKSEN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN MEME EPİTELİ
VE FARKLI MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
ANTİKANSER ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

OZAN ÇUHADAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. PINAR MEGA TİBER

2020-İSTANBUL



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NAPROKSEN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN MEME EPİTELİ
VE FARKLI MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA
ANTİKANSER ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

OZAN ÇUHADAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. PINAR MEGA TİBER

2020-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.

Ozan uhadar



TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmamı titizlikle yönlendiren, her zaman zekâsından, bilgisinden ve tecrübesinden yararlandığım, desteğini hiçbir zaman esirgemeyip daima yanımda olan, sadece tez çalışmalarımı değil vizyonu ve öngörüsü ile yol gösteren, çok değerli danışman hocam **Doç. Dr. Pınar Mega Tiber'** e engin bilgisi, desteği, emeği, sonsuz sabrı ve yardımları için,

Tez çalışmam esnasında her türlü konuda bilgisini ve yardımını esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve tecrübeleriyle destek veren değerli hocam **Prof. Dr. Oya Orun'a**,

Deneysel çalışmalarım dahil yüksek lisans eğitimim ve tez dönemimde desteğini tecrübelerini esirgemeyen bölüm asistanlarımız **Arş. Gör. Sevgi Koçyiğit** ve **Arş. Gör. Olca Kılınç** ve **Dr. Öğr. Esra Aydoğmuş'a**

Bölümüm Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Görevlileri, değerli hocalarım **Prof. Dr. Hülya Cabadak**, **Doç. Dr. Ayşe İnhan Garip**, **Dr. Öğr. Üyesi Cevdet Nacar** ve **Arş. Gör. Banu Aydın'a** güler yüzleri, yardımları, tecrübeleriyle verdikleri destekleri için,

Yüksek lisans eğitimim boyunca aynı sıraları paylaştığım, beraber çalıştığımız süre boyunca çalışmaktan büyük keyif aldığım arkadaşlarım **Gözde Önder Narin**, **Hande İpek Yekte**, **Pınar İyiöl**, **Melike Karadeniz**, **M. Gökhan Albar'a**,

Son olarak eğitimimin her döneminde desteğini ve yardımlarını benden hiç esirgemeyen, her zaman her koşulda yanımda olduklarını hissettiren eşsiz ve en değerli varlığım olan **AİLEME**, bu süreç zarfında kaybettiğim beni büyütüp yetiştiren **Anneannem'e**, En içten teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu tez çalışması, Marmara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'nın SAG-C-YLP-141118-0609 no'lu proje desteği ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvar olanakları tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
TABLOLAR LİSTESİ	Viii
RESİMLER LİSTESİ	IX
1.ÖZET	1
2.SUMMARY	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER	7
4.1. Kanser.....	7
4.1.1. Kanser Etiyolojisi.....	9
4.1.2. Kanser Biyolojisi.....	9
4.2. Meme Kanseri.....	10
4.2.1. Meme Kanseri Etiyolojisi.....	12
4.2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi.....	12
4.2.3. Meme Kanseri Sınıflandırılması.....	14
4.2.3.1. Meme kanseri histopatolojik sınıflandırılması.....	14
4.2.3.2. Meme kanseri moleküler sınıflandırma.....	17
4.3. Hücre Hatları Moleküler ve Hücresel Biyolojisi.....	18

4.3.1. MDA-MB-453 Hücre Hattı.....	18
4.3.2. T47D Hücre Hattı.....	19
4.3.3. MCF10A Hücre Hattı.....	20
4.4. Non Steroidal Antienflamatuar İlaçlar (NSAID), Naproksen ve Apoptoz İlişkisi.....	20
4.5. Apoptoz.....	25
4.6. Mitokondriyal Membran Potansiyeli.....	29
5. GEREÇLER ve YÖNTEMLER.....	31
5.1. Kullanılan Gereçler.....	31
5.1.1. Kullanılan cihazlar.....	31
5.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	32
5.2. Meme Epiteli ve Meme Kanseri Hücre Hattı ve Hücre Kültürü.....	33
5.2.1. Dondurulmuş hücre hatlarının çözündürülmesi.....	33
5.2.2. Hücre hatları kültür işlemleri.....	34
5.2.3. Hücre hattının pasajlanması.....	34
5.2.4. Hemositometrik hücre sayımı.....	34
5.3. Sitotoksosite Analizleri.....	35
5.3.1. MTT testi protokolü.....	35
5.3.2. SGK669'un hazırlanması.....	35
5.3.3. SGK669 konsantrasyonlarının hücrelere uygulanması.....	35
5.4. Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	36
5.4.1. Mitokondriyal membran potansiyeli testi protokolü.....	36
5.4.2. Apoptoz tayini protokolü.....	37

6. BULGULAR.....	39
6.1. Hücre canlılığı ve Sitotoksosite Analizleri.....	39
6.2. Apoptoz Belirlenmesi.....	51
6.2.1. Mitokondriyal membran potansiyel deneyi.....	51
6.2.2. Annexin V/PI	55
7. TARTIŞMA-SONUÇ.....	59
8. KAYNAKLAR.....	63
9. ÖZGEÇMİŞ.....	68
10. EKLER.....	69
EK I- Kongre Bildirisi.....	69

KISALTMALAR

ER:	Östrojen reseptörü
PR:	Progesteron reseptörü
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
HER2:	İnsan epidermal büyüme faktörü
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü
BRCA1:	Tümör baskılayıcı geni
BRCA2:	Tümör baskılayıcı geni
mTOR:	Rapamisin'in memeli hedefi
PI3K:	Fosfoinositid 3-kinaz
Akt:	Protein kinaz B
Fas:	Ölüm reseptörü
DMSO:	Dimetilsülfoksit
FBS:	Fetal sığır serumu
HS:	Horse Serum
PI:	Propidyum iyodür
JC-1:	5,5', 6,6' tetrakloro-1,1', 3,3' tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür
MMP:	Mitokondriyal membran potansiyeli
$\Delta\Psi_m$:	Mitokondriyal membran potansiyeli
COX-1:	Siklooksijenaz-1
COX-2:	Siklooksijenaz-2
IC50:	Maksimum İnhibisyon Derişiminin Yarısı
μg :	Mikrogram
μL :	Mikrolitre
ml:	Mililitre
μM :	Mikromolar
mM:	Milimolar
PBS:	Fosfat Tampon Çözeltisi
NSAID:	Non-steroidal anti-enflamatuar ilaçlar
ÜNMK:	Üçlü Negatif Meme Kanseri

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 4.1.1. Globocan 2018 araştırmasına göre dünya üzerindeki kanser çeşitlerinin yeni vaka ve ölüm oranları. (<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers>, erişim tarihi: 04 Mart 2020).....8
- Şekil 4.2.1. Meme kanseri patogenezi ve histolojik ve moleküler alt tipleri. (<http://www.pathophys.org/breast-cancer/breastcancer-copy/>, erişim tarihi: 04 Mart 2020).....11
- Şekil 4.2.2. Meme anatomisi ve histolojisi. (<http://www.pathophys.org/breast-cancer/breastnormal-copy/>, erişim tarihi: 04 Mart 2020).....11
- Şekil 4.2.3. Globocan 2018 araştırmasına göre türkiyeninde dahil olduğu asya kıtası üzerindeki kanser çeşitlerinin oranları. (<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/935-asia-fact-sheets.pdf>, erişim tarihi: 04 Mart 2020).....13
- Şekil 4.2.4. Globocan 2018 araştırmasına göre türkiye üzerindeki kanser çeşitlerinin oranları. (<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>, erişim tarihi: 04 Mart 2020).....13
- Şekil 4.2.5. Globocan 2018 araştırmasına göre türkiye üzerindeki kanser çeşitlerinin ayrıntılı oranları. (<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/>, erişim tarihi: 04 Mart 2020).....14
- Şekil 4.2.6. Meme kanseri histopatolojik sınıflandırılması. (<https://www.researchgate.net/figure/Histological-classification-of-breast>, erişim tarihi: 04 Mart 2020).....16
- Şekil 4.2.7. Meme kanseri moleküler sınıflandırması. (<https://www.jcancer.org/v08p3131.htm>, erişim tarihi: 04 Mart 2020).....17
- Şekil 4.4.1. En yaygın NSAID'lerin kimyasal yapıları. (Elsaman ve ark., 2016).....21
- Şekil 4.4.2. Naproksenin kimyasal yapısı ve kimyasal yapısının 3 boyutlu yapısı. (<https://en.wikipedia.org/wiki/Naproxen>, erişim tarihi: 04 Mart 2020).....22

Şekil 4.4.3. Naproksenin, PI3-K sinyal yolunun inhibisyonu yoluyla aracılık edilen hücre döngüsü ve apoptozun düzenlenmesi üzerindeki etkisini gösteren bir şema. (Kim ve ark., 2014).....	24
Şekil 4.5.1. Apoptoz yolları şematik gösterimi. (https://www.cusabio.com/pathway/Apoptosis.html , erişim tarihi: 04 Mart 2020).....	25
Şekil 4.5.2. Meme kanseri apoptotik yolların şematik gösterimi. (https://www.cusabio.com/Breast-Cancer/?key=PR , erişim tarihi: 04 Mart 2020).....	29
Şekil 6.1. SGK669 nolu bileşiğin farklı konsantrasyonlarda, T47D meme kanseri hücre hattı ile 24 ve 48 saat etkileşime girmesi sonucu canlılık oranındaki değişimi.....	46
Şekil 6.2. SGK669 nolu bileşiğin farklı konsantrasyonlarda, MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattı ile 24 ve 48 saat etkileşime girmesi sonucu canlılık oranındaki değişimi.....	47
Şekil 6.3. SGK669 nolu bileşiğin farklı konsantrasyonlarda, MCF10A meme epiteli hücre hattı ile 24 ve 48 saat etkileşime girmesi sonucu canlılık oranındaki değişimi.....	48
Şekil 6.4. SGK669 nolu bileşiğin, T47D hücreleriyle 24 ve 48 saat etkileşimi sonucu artan konsantrasyonlarda mitokondriyal membran potansiyel değişimi.....	52
Şekil 6.5. SGK669 nolu bileşiğin, MDA-MB-453 hücreleriyle 24 ve 48 saat etkileşimi sonucu artan konsantrasyonlarda mitokondriyal membran potansiyel değişimi.....	53
Şekil 6.6. SGK669 nolu bileşiğin, MCF10A hücreleriyle 24 ve 48 saat etkileşimi sonucu artan konsantrasyonlarda mitokondriyal membran potansiyel değişimi.....	54
Şekil 6.7. SGK669 nolu bileşiğin, T47D hücreleriyle 24 ve 48 saat etkileşimi sonucu artan konsantrasyonlarda apoptoz değişimi.....	56
Şekil 6.8. SGK669 nolu bileşiğin, MDA-MB-453 hücreleriyle 24 ve 48 saat etkileşimi sonucu artan konsantrasyonlarda apoptoz değişimi.....	57

TABLolar LİSTESİ

Tablo 6.1. SGK669 nolu bileşimin farklı konsantrasyonlarda, T47D hücre hattı ile 24 saat etkilişimi sonrası GraphPad Prism7 de yorumlanan değerleri.....	40
Tablo 6.2. SGK669 nolu bileşimin farklı konsantrasyonlarda, T47D hücre hattı ile 48 saat etkilişimi sonrası GraphPad Prism7 de yorumlanan değerleri.....	41
Tablo 6.3. SGK669 nolu bileşimin farklı konsantrasyonlarda, MDA-MB-453 hücre hattı ile 24 saat etkilişimi sonrası GraphPad Prism7 de yorumlanan değerleri.....	42
Tablo 6.4. SGK669 nolu bileşimin farklı konsantrasyonlarda, MDA-MB-453 hücre hattı ile 48 saat etkilişimi sonrası GraphPad Prism7 de yorumlanan değerleri.....	43
Tablo 6.5. SGK669 nolu bileşimin farklı konsantrasyonlarda, MCF10A hücre hattı ile 24 saat etkilişimi sonrası GraphPad Prism7 de yorumlanan değerleri.....	44
Tablo 6.6. SGK669 nolu bileşimin farklı konsantrasyonlarda, MCF10A hücre hattı ile 48 saat etkilişimi sonrası GraphPad Prism7 de yorumlanan değerleri.....	45
Tablo 6.7. SGK669 nolu bileşimin T47D hücreleriyle 24 ve 48 saat etkilişimi sonucu canlı ve apoptotik hücrelerin yüzde değerleri.....	55
Tablo 6.8. SGK669 nolu bileşimin MDA-MB-453 hücreleriyle 24 ve 48 saat etkilişimi sonucu canlı ve apoptotik hücrelerin yüzde değerleri.....	55

RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.3.1. MDA-MB-453 meme kanseri hücre görüntüsü. (https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-131 , erişim tarihi: 04 Mart 2020).....	18
Resim 4.3.2. T47D meme kanseri hücre görüntüsü. (https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-133 , erişim tarihi: 04 Mart 2020).....	19
Resim 4.3.3. MCF10A meme epiteli hücre görüntüsü. (https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-10317 , erişim tarihi: 04 Mart 2020).....	20
Resim 6.1. T47D İnsan meme kanseri hücre hattı; 24 saat SGK669 inkübasyonu sırasıyla, kontrol, 20 µM, 50 µM.....	49
Resim 6.2. T47D İnsan meme kanseri hücre hattı; 48 saat SGK669 inkübasyonu sırasıyla, kontrol, 20 µM, 50 µM.....	49
Resim 6.3. MDA-MB-453 İnsan meme kanseri hücre hattı; 24 saat SGK669 inkübasyonu sırasıyla, kontrol, 20 µM, 50 µM.....	50
Resim 6.4. MDA-MB-453 İnsan meme kanseri hücre hattı; 48 saat SGK669 inkübasyonu sırasıyla, kontrol, 20 µM, 50 µM.....	50
Resim 6.5. Örnek seçilen T47D İnsan meme kanseri hücre hattı; 24 saat 20 µM SGK669 konsantrasyonu inkübasyonun floresans mikroskobu ile görüntülenmesi, Kontrol, Nekroz, Apoptoz görüntüleri.....	58

1. ÖZET

Naproksen Türevi Bileşiklerin Meme Epiteli Ve Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarında Antikanser Etkisinin İncelenmesi

Öğrenci Adı: Ozan Çuhadar

Danışman Adı: Doç. Dr. Pınar Mega Tiber

Anabilim Dalı : Biyofizik Anabilim Dalı

Amaç: Çalışmamızda, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında sentezlenen S-naproksen türevi triazol-tiyooeter hibrit moleküllerinden biri olan SGK669 nolu bileşiğin, meme epiteli MCF10A ve iki farklı meme kanseri hücre hattında kullanılması (T47D, MDA-MB-453) ve yarattığı biyolojik ve antikanser etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve yöntem: Hücre hatlarının SGK669 nolu bileşiğin farklı konsantrasyonları (10,25,50,75,100 μ M) ile 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonrasında maddelerin hücre canlılığı ve sitotoksitesi MTT testi ile belirlendi. Apoptotik etkiler JC-1 floresan probu kullanılarak mitokondrial membran potansiyelleri değişimi ve Annexin V ve PI floresan boyama ile Tali görüntü tabanlı sitometrede belirlenmiştir.

Bulgular: SGK669 bileşiğinin %50 inhibisyon konsantrasyonları 24 ve 48 saat için sırasıyla, MCF10A; 27 μ M ve 30 μ M, T47D; 6 μ M ve 15 μ M, MDA-MB-453; 13 μ M ve 15 μ M olarak belirlenmiştir. Belirlenen IC50 dozlarında mitokondriyal membran potansiyelinde 24 ve 48 saat için sırasıyla, T47D’de %48 ve %56, MDA-MB-453’de %12 ve %23 azalma ve Annexin V/PI boyama testi ile T47D’da %16 ve %16, MDA-MB-453’de %15 ve %15 oranlarında apoptoz gözlenmiştir.

Sonuç: Araştırmamızda, SGK669 nolu bileşiğin, T47D, MDA-MB-453 hücre hatlarında doza bağlı olarak apoptotik etkiyi arttırıcı ve çoğalmayı önleyici etkisi olduğu, bu nedenle terapötik bir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Naproksen, meme kanseri, meme epiteli hücre hattı, sitotoksite, apoptoz

2. SUMMARY

Investigation of Anticancer Effect of Naproxen Derivative Compounds On Breast Epithelium And Different Breast Cancer Cell Lines

Student Name: Ozan Çuhadar

Name of Supervisor: Doç. Dr. Pınar Mega Tiber

Department: Department Of Biophysics

Objective: In this study, we aimed to determine the anticancer and biological effects of triazole-thioether hybrid molecule derived from S-Naproxen, SGK669, which was synthesized in Marmara University Faculty of Pharmacy Department of Pharmaceutical Chemistry, on breast epithelial cell line MCF10A and two different breast cancer cell lines (T47D, MDA-MB-453).

Material and methods: Using the MTT colorimetric method, SGK669 was evaluated in vitro against the cell lines, for cell viability and cytotoxicity at different doses (10, 25, 50, 75, 100 μ M) following 24 and 48 hours incubation. Apoptosis was evaluated by mitochondrial membrane potential changes using JC-1 probe and Annexin-V/PI staining by using the Tali image-based cytometer.

Results: The 50% inhibition concentrations of compound SGK669 for 24 and 48 hours respectively were 27 μ M and 30 μ M for MCF10A cell line; 6 μ M and 15 μ M for T47D cell line; 13 μ M and 15 for MDA-MB-453 cell line. IC50 values were further used to determine changes in mitochondrial membrane potential for 24 and 48 hours respectively. a decrease of 48 ve 56% for T47D; 12 and 23% for MDA-MB-453 were noted in MMP tests and Annexin V/PI staining displayed 16 and 16% apoptosis for T47D; and 15 and 15% for MDA-MB-453; .

Conclusion: As a result of this research, the compound SGK669 was found to induce apoptosis and inhibited cell proliferation in cell lines T47D and MDA-MB-453 in a dose-dependent manner, suggesting a therapeutic potential. .

Keywords: Naproxen, breast cancer, breast epithelial cell line, cytotoxicity, apoptosis

3.GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık karşılaşılan ölüm sebebi olarak modern tıbbın önemli bir problemidir. (Behroozeh ve ark. 2019).

Kanser yıllar boyunca çevresel karsinojen faktörlerin etkileri sonucu mutasyonların meydana gelmesi ile oluşan ve kontrolsüz hücre büyümesiyle tanımlanan çok nedenli bir hastalıktır (Kittaneh ve ark., 2013). 2008 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünyanın her yerinde 7.6 milyon ölümün başlıca önde gelen nedenlerinden birinin kanser olduğunu bildirmiştir. Gelişmiş ülkelerde, yaklaşık % 20 veya beş kişiden biri kanserden ölmektedir. Kanser insidansının artması, kemoterapi ve cerrahi prosedürler dahil olmak üzere birçok farklı terapötik yolun bulunma zorunluluğunu getirmiştir. Cerrahi, radyasyon veya kemoterapi dahil olmak üzere çeşitli tedavi stratejilerinin belirlenmesinde hastalığın evresi önemlidir. Bu yöntemlerin büyük bir kısmı hücre çoğalması ve sağ kalımından sorumlu sinyal iletim yollarını hedeflemektedir (Domvri ve ark. 2013).

Meme kanseri en çok tekrar eden kanserlerden biridir ve hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerdeki kadınlar arasında en önde gelen ölüm nedenidir. Kentleşmenin artması ve batı yaşam tarzlarının benimsenmesi nedeniyle gelişmekte olan ülkelerde meme kanseri sıklığı artmaktadır. Dünya çapında yılda 1,1 milyondan fazla vaka teşhis edilmekte ve 410,000'den fazla hasta ölmektedir (Ferlay ve ark., 2010). 2012 yılında 1,7 milyon kadına meme kanseri teşhisi konulmuşken, son beş yıl içinde bu sayı toplamda 6,3 milyona kadar yükselmiştir. 2008 tahminlerinden bu yana, meme kanseri sıklığı % 20'den fazla artarken, ölüm oranı % 14 artmıştır. Meme kanserinin gelişmiş dünyanın bir hastalığı olduğu düşünülse de, meme kanseri vakalarının yaklaşık % 50'si ve ölümlerin % 58'i daha az gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Kanser gelişimi, hücre ölüm mekanizmasının bozulması sebebiyle, hücre çoğalmasının hücre ölümünden fazla olduğu malign hücrelerden kaynaklanmaktadır. Meme kanseri düşük bir tedavi oranı ve kolay tekrarlama özelliğine sahip olmakla birlikte büyük sıklıkla cerrahi ve radyasyon ile tedavi edilirken bazen bu tedaviler kemoterapi ve hormonal terapilerle desteklenmektedir (Ferlay ve ark., 2015). Son yıllarda, antikanser tedavileri ile birlikte önemli düzeyde

toksosite ve ilaç direncinin ortaya çıktığı görülmektedir. Kanser hücre hatlarında apoptozu indükleyebilen ve tümör büyümesini geciktirebilen ilaçlar aranması en etkili tedavi yöntemlerinden biri olarak günümüzde yerini almıştır. Sentetik kimya veya doğal kaynaklardan sentezlenen pro-apoptotik bileşikler, normal memeli hücrelere yan etki göstermeksizin kanser hücrelerine spesifik etkili alternatif kaynaklardır (Perumalsamy ve ark., 2017).

Meme kanseri hastalarının sağ kalım oranını iyileştirmek için ilgili genlerin ve belirteçlerin çalışılarak erken saptanması büyük önem taşımaktadır (Khawaled ve ark., 2017). Bu çalışmalar erken tanı ve kişisel tedavi uygulamaları için değerlidir. Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER - 2) gibi meme kanserinin yaygın biyolojik göstergeleri, moleküler düzeyde meme kanseri tanısının konulmasının yanı sıra, klinik çalışmalarında moleküler alt tip sınıflandırılması ile uygun tedavi yönteminin belirlenmesinde etkilidir (Wang ve ark., 2018).

Tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 20-30'unda HER2 ekspresyonu artmaktadır. Başlangıçta sıçan glioblastomunda onkogen olarak tanımlanan HER2 / neu (insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2) meme kanserinde yinelenen ve kötü prognozla ilişkilidir. HER2 sinyal ileti yolağı, reseptörün heterodimerizasyonu ve tirozin kinaz aktivitesi ile hücre çoğalmasında, metastaz ve anjiyogenezde rol oynayan genlerin transkripsiyonunu sağlamaktadır (Gutierrez ve ark., 2011) (Shrivastava ve ark., 2018).

Meme kanseri, çeşitli genetik değişiklikler ve belirgin morfolojik ve moleküler özellikler ile karakterize edilen karmaşık ve heterojen bir hastalıktır. Gen ekspresyon profili ile birlikte östrojen reseptörü alfa (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2) durumunun değerlendirilmesi, meme kanseri'nin bir alt tip sınıflandırmasını ortaya çıkarmıştır. Sınıflandırma; Lümen A (ER + / PR +, HER2-), Lümen B (ER + / PR +, HER2 +), HER2 + ile zenginleştirilmiş (HER2 pozitif) ve Bazal benzeri veya Üçlü Negatif (ER -, PR -, HER2-) olarak yapılmaktadır (Perou ve ark., 2000). Her alt tip farklı prognoza sahiptir, uygun tedaviye ihtiyaç duyar ve spesifik yanıt gösterir (Sørli ve ark., 2001).

Antikanser ajanların fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için apoptoz indüksiyonu temel mekanizmalardan birisidir. Mitokondriden sitoplazmaya apoptotik faktörlerin salınması esas olarak mitokondriyal Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından kontrol edilmektedir. Apoptozun inhibe edilmesi veya başlatılması, esas olarak Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin aktiviteleri ile düzenlenmektedir. Uyarım üzerine, defosforilasyon veya uyarılma gibi translasyon sonrası değişikliklere maruz kalırlar ve aktive olurlar. Aktive edilmiş proteinler çok alanlı proapoptotik elemanlarla etkileşir, oligomerizasyonuna yol açar ve mitokondriyal membranın artan geçirgenliğine yol açar. Apoptotik indüksiyona genellikle artan Bax / Bcl-2 oranı eşlik etmektedir (Miyashita ve ark., 1994) (Mondal ve ark., 2012).

Güçlü bir COX-1 ve COX-2 inhibitörü olan Naproksen en yaygın olarak bilinen ve kullanılan non-steroidal anti-enflamatuar ilaçlardan (NSAID'ler) biridir. 1976'da reçete formunda "naprosin" olarak tanıtılmıştır. Naproksen, artrit, ankilozan spondilit, tendinit, bursit veya gut gibi koşullarla ilişkili inflamasyonu tedavi etmek için kullanılmaktadır (Hoffman ve ark., 2002). COX-2 seçici ve seçici olmayan NSAID'ler ciddi kardiyovasküler olayların sayısında ve risklerinde artışa yol açmaktadır. Geniş çapta epidemiyolojik çalışmalarda görülmüştür ki Naproksen diğer NSAID'lere göre daha düşük kardiyovasküler risk taşımaktadır (Avorn ve ark., 2007) (Trelle ve ark., 2010). Son yıllarda NSAID'lerin kanser önleyici ajanlar olarak da etkileri saptanmış, naproksenin ise belirgin COX inhibisyonuna ilave ek bir hedef moleküle daha sahip olması nedeniyle diğer NSAID'lere göre daha etkili bir kanser önleyici ajan olduğu ileri sürülmüştür (Kim ve ark., 2014).

Sıçan mesane kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada naproksen için potansiyel hedef bölgeler belirlenmiştir ve bilgisayar kinaz profillemesi çalışmaları sonucunda fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3-K) naproksen için önemli bir potansiyel bölge olduğu gösterilmiştir. Bu profillemesi çalışması, *in vitro* kinaz çalışmalarıyla desteklenerek, naproksenin fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3-K) ile etkileştiği ve kinaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2014).

Dünya’da ve Türkiye’de en yaygın kanser türlerinden biri olan meme kanseri tedavisine yönelik yeni moleküllerin geliştirilmesi üzerinde çalışmalar mevcuttur. Günümüzde, Non-steroidal antiinflamatuvar etkinliği olduğu bilinen (+)-2-(6-Metoksi-2-naftil) propionik asit (Naproksen)’in, insan göğüs kanserinde (MCF7) (Deb ve ark., 2014), mesane kanserinde (Kim ve ark., 2014), kolorektal adenokarsinoma (CaCo2), hepatosellüler karsinoma (HepG2), epiteloid serviks karsinoma (Hela), Akciğer karsinoma (A5W9), meme bezi karsinoma ve epidermoid larenks karsinoma (Hep2) (Motwami ve ark, 2013) hücrelerinde antikanser etkinliği bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğr. Üyesi Prof. Dr. Ş. Güniz Küçükgülzel’in laboratuvarında sentezlenen çeşitli S-naproksen triazol-tiyooeter hibrit moleküllerinden biri olan SGK669 nolu bileşiğin, meme epiteli (MCF10A) ve farklı meme kanseri hücre hatlarında kullanılarak [T47D (İnsan meme kanseri invaziv duktal karsinom) (ER+,PR+,HER2-), MDA-MB-453 (İnsan meme kanseri metastatik karsinom) (ER-,PR-,HER2+)] oluşturduğu biyolojik ve antikanser etkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kanser

Kanser, dünya çapında diğer ölümlü hastalıklardan sonra önde gelen ikinci ölüm nedenidir ve 2018'de tahmini 9,6 milyon insanın ölümden sorumludur. Küresel olarak, her 6 ölümden 1'i kansere bağlıdır. Kanserden ölümlerin yaklaşık % 70'i düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelir. Kanserden ölümlerin yaklaşık üçte biri, önde gelen 5 durum ve diyet riskinden kaynaklanmaktadır; yüksek vücut kitle indeksi, düşük meyve ve sebze alımı, fiziksel aktivite eksikliği, tütün kullanımı ve alkol kullanımı (Ferlay ve ark., 2013).

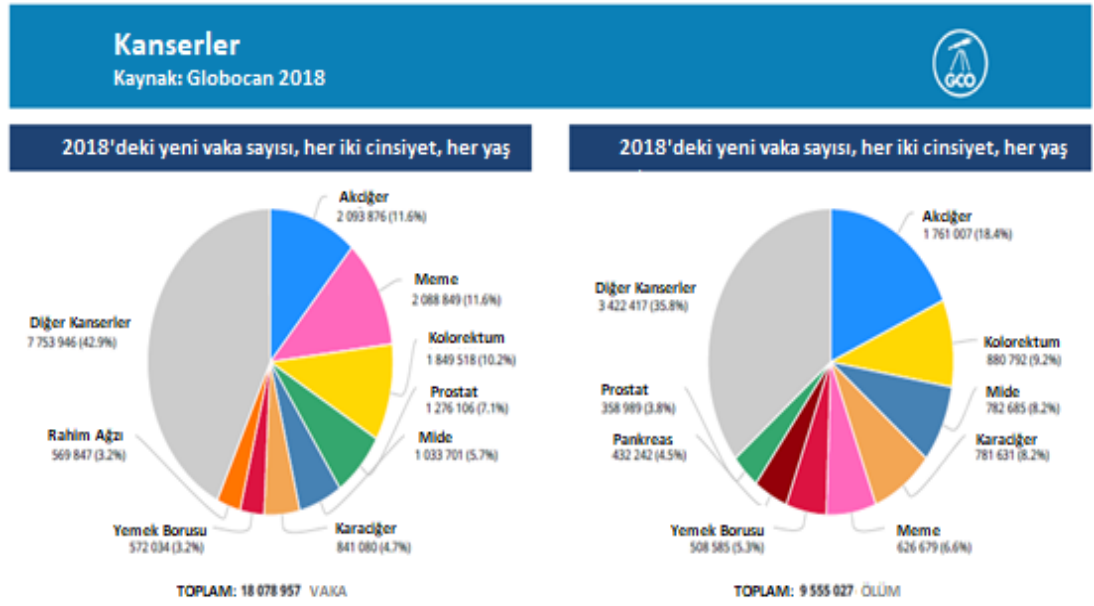
Tütün kullanımı kanser için en önemli risk faktörüdür ve kanser ölümlerinin yaklaşık % 22'sinden sorumludur. Hepatit ve insan papilloma virüsü (HPV) gibi kansere neden olan enfeksiyonlar, düşük ve orta gelirli ülkelerde kanser vakalarının % 25'inden sorumludur (Plummer ve ark., 2016).

2017 yılında, düşük gelirli ülkelerin sadece % 26'sı genel olarak kamu sektöründe patoloji hizmetleri olduğunu bildirmiştir. Yüksek gelirli ülkelerin % 90'ından fazlası, düşük gelirli ülkelerin % 30'u kamu sektörlerinde tedavi hizmetleri olduğunu bildirmiştir. Kanserin ekonomik etkisi önemlidir ve artmaktadır. 2010 yılında kanserin yıllık toplam ekonomik maliyetinin yaklaşık 1.16 trilyon dolar olduğu tahmin edilmektedir (Stewart ve ark., 2014).

Düşük ve orta gelirli her 5 ülkeden sadece 1'i kanser politikasını yürütmek için gerekli verilere sahiptir. Kansere tüm insanlığı etkiler, ancak özellikle bir bütün olarak kanser yerine spesifik tümör tipleri göz önüne alındığında, yerel, ulusal ve bölgesel sınırlar arasında belirgin farklılıklar vardır. Kansere insidansı ve kanserin neden olduğu ölümlere ilişkin epidemiyolojik veriler; ulusal kanser kayıtlarının eksiksiz olmasına veya ülkenin bir bölümünü kapsayan nüfus tabanlı kayıtlara, hastane kayıtlarına veya kanser oluşumu ile ilgili mevcut verilere bağlıdır. Verilerin yokluğunda, mümkün olan en iyi tahmini sağlamak için çevre ülkelerden çıkarımlar yapılmalıdır. Dünya Kansere Raporu, dünya çapında kanser dağılımının en güncel değerlendirmesi olan GLOBOCAN 2012'den veri sağlamaktadır. Bulgular, yüksek gelirli ülkelerin en

yüksek kanser insidansına sahip olduğunu, bununla beraber ölüm ve sağkalım verilerinden anlaşılacağı gibi tespit, teşhis ve tedavi için en iyi hizmetleri sundukları için ölüm oranının gelişmemiş ülkeler göre daha düşük olduğunu göstermektedir. En yaygın kanserler arasında akciğer, meme, prostat ve kolorektal kanserler bulunur. Epidemiyolojik geçmişi olan ülkelerde, bu kanserler giderek yaygınlaşmaktadır, ancak mide, özofagus ve karaciğer kanseri insidansı da yüksektir. Düşük gelirli ülkelerden elde edilen veriler, rahim ağzı kanserinin hala kadınlar arasında en yaygın kanser olduğunu göstermektedir. Düşük ve orta gelirli ülkelerde, belirli tümörlerin insidansı nispeten düşük olabilir, ancak karşılık gelen ölüm oranı verileri genellikle norm olarak geç evre tanıyı yansıtır ve sonuç olarak kötü klinik sonuçlar verir (Stewart ve ark., 2014).

International Agency for Research on Cancer
World Health Organization



Şekil 4.1.1. Globocan 2018 araştırmasına göre dünya üzerindeki kanser çeşitlerinin yeni vaka ve ölüm oranları. (<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>, erişim tarihi: 04 Mart 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

4.1.1. Kanser Etiyolojisi

Çoğu kanser; çevresel, yaşam tarzı veya davranışsal maruziyetlerden kaynaklanan risklerle ilişkilidir. Farklı topluluklar için kaydedilen en yüksek insidansla en düşük oranın karşılaştırılması veya zaman içindeki değişikliklerin incelenmesi, kanserin dünyadaki dağılımını hangi faktörlerin belirlediğine ve bu etkilerinden nasıl farklılaştıklarına dair ipuçları sağlar. En önemli faktörden biri tütün içimidir. Akciğer kanserinin yüksek gelirli ülkelerde görülme sıklığı artmıştır. Kronik enfeksiyonlar Afrika ve Asya'nın bazı bölgelerinde yaygın kanserlerde önemli bir rol oynamaya devam etmektedir, ancak kronik enfeksiyonlar Avrupa ve Kuzey Amerika'da çok daha az yaygındır. Diyet, kanser gelişimi üzerinde bir etki yapar; Afrika ve Asya'nın bazı bölgelerinde bu bazen aflatoksinler gibi güçlü kanserojenlerin etkisiyle ilişkilidir, ancak yüksek gelirli ülkelerde bu öncelikle enerji açısından zengin gıda alımı ve kısmen düşük fiziksel aktivite seviyelerine bağlıdır. Alkol alımı ve kasıtlı güneşe maruz kalma hakkındaki kişisel seçimler, belirli kanser türlerinin insidansına yansır. Dünya genelinde, tehlikeli işlerde çalışma ve çevre kirliliği, düşük ve orta gelirli ülkelerde kansere neden olmaktadır (Stewart ve ark., 2014).

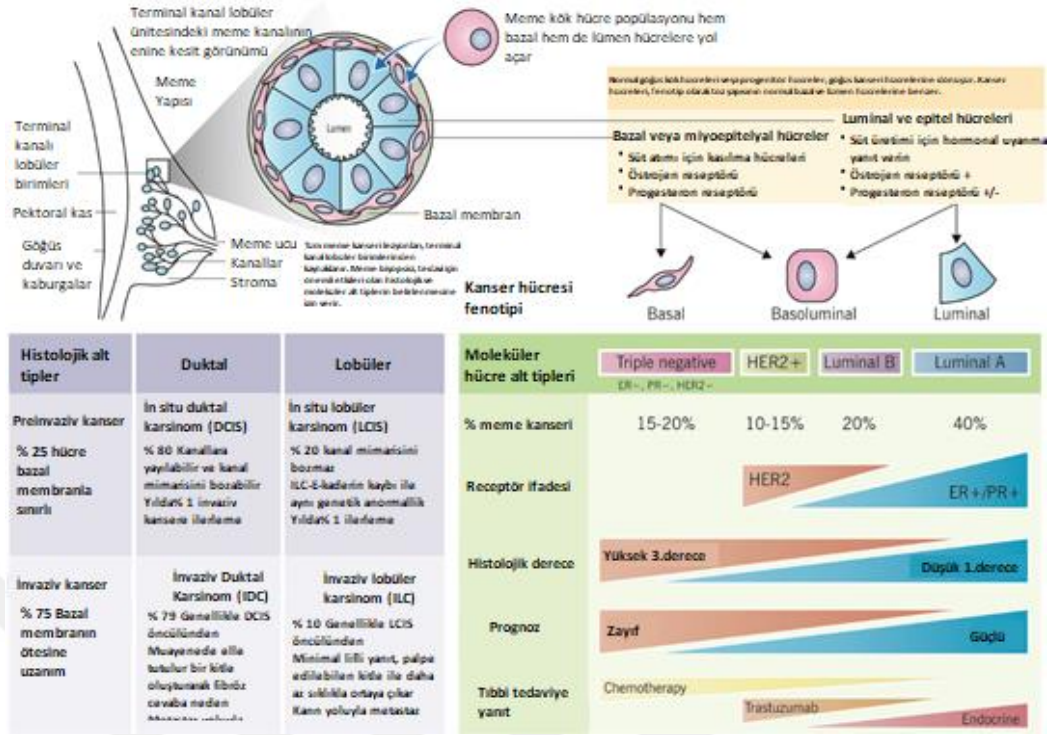
4.1.2. Kanser Biyolojisi

Rasyonel olarak tasarlanmış terapi geliştirmek ve önleyici seçenekler sunmak için kanser biyolojisini anlamak çok önemlidir. On yıllardır, kanser hücrelerinin normal hücrelerden nasıl farklılaştığını tanımlamak için araştırmalar yapılmıştır. İnsan genomunun spesifikasyonu, DNA metilasyon modellerindeki değişiklikler gibi epigenetik değişikliklerle belirlenen ilgili somatik mutasyonlar ve değiştirilmiş gen ifadesi dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar tümör hücresi tiplerinin normal hücrelerden nasıl farklılaştığının tanımlanmasını sağlamıştır. Mutasyon veya epigenetik değişiklik, diğer etkilerinin yanı sıra, metabolizmayı değiştirmiş veya büyümeyi farklılaştıran uyarılara yanıt olarak farklılaşmış hücre içi sinyallere aracılık etmiştir. Paralel olarak, kanser kök hücrelerinin ve tümör mikroçevresinin rolleri tanımlanmıştır. Buna göre iltihaplanma, yeni kan damarlarının büyümesi ve bağışıklık tepkisinin modifikasyonunun tümör büyümesine nasıl aracılık ettiği, farklı kanser önleme ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesini mümkün kılmaktadır (Stewart ve ark., 2014)

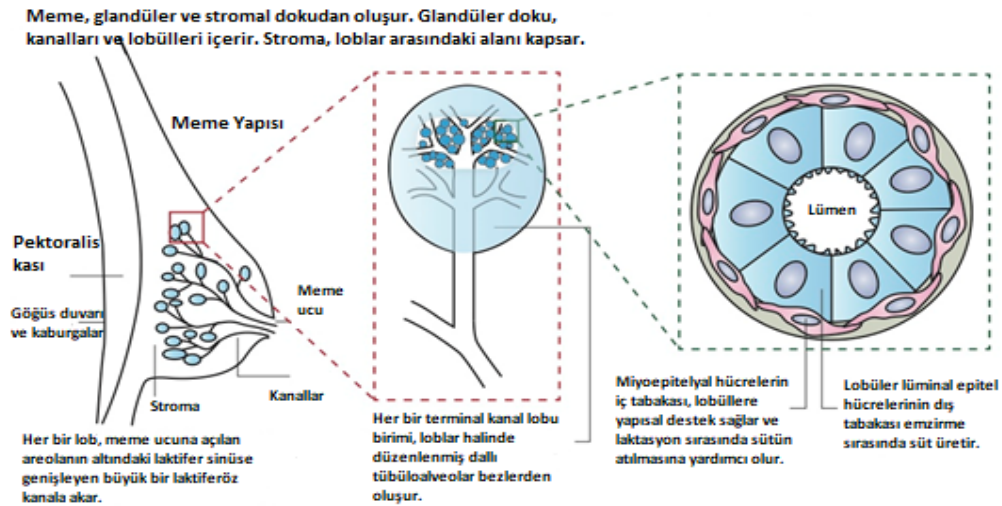
4.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen kanser olup, her yıl 2,1 milyon kadını etkilemektedir ve kadınlar arasında kansere bağlı en fazla ölüme neden olmaktadır. 2018' de 627.000 kadının meme kanserinden öldüğü tahmin edilmektedir - bu, kadınlar arasındaki tüm kanser ölümlerinin yaklaşık % 15'idir. Meme kanseri oranları daha gelişmiş bölgelerdeki kadınlar arasında daha yüksek olmakla birlikte, küresel olarak hemen hemen her bölgede oranlar artmaktadır. Meme kanseri sonuçlarını ve hayatta kalmayı iyileştirmek için erken teşhis önemlidir. Meme kanseri için iki erken teşhis stratejisi vardır: erken tanı ve tarama. Kadınların çoğunda zayıf sağlık sistemlerine sahip sınırlı kaynak ortamlarından dolayı meme kanserinin geç evrede fark edildiği görülmektedir. Erken belirti ve semptomların bilinmesi, tanı konan hastanın derhal tedaviye sevk edilmesi çok önem arz etmektedir, bu yüzden erken tanı programlarına öncelik vermelidir (Ferlay ve ark., 2018).

İyi karakterize edilmiş meme kanseri risk faktörleri arasında yaş, aile öyküsü, üreme faktörleri, mamografik yoğunluk bulunur. Meme kanserine neden olan ajanlar arasında alkol tüketimi, kombine östrojen-progestojen kontraseptiflerin kullanımı ve menopoz tedavisi ve X ve γ radyasyonuna maruz kalma sayılabilir. Meme kanserlerinin küçük bir kısmı, yüksek penetrasyonlu meme kanseri duyarlılık genlerindeki (BRCA1 ve BRCA2) kalıtsal mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Birkaç daha düşük penetrasyonlu gen de meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir ve artan riskle bağlantılı birçok lokus vardır. Son moleküler ve genetik çalışmalar, meme kanserinin prognozu ve tedaviye yanıtı açısından farklılık gösteren oldukça heterojen bir hastalık grubu olduğunu vurgulamıştır. Farklı meme kanseri alt tiplerinin altında yatan moleküler yolların ve genetik değişikliklerin daha iyi anlaşılması, meme kanseri tedavisine daha hedefli ve kişiselleştirilmiş bir yaklaşıma yol açmaktadır (Stewart ve ark., 2014).



Şekil 4.2.1. Meme kanseri patogenezi ve histolojik ve moleküler alt tipleri. (<http://www.pathophys.org/breast-cancer/breastcancer-copy/>, erişim tarihi: 04 Mart 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır.)



Şekil 4.2.2. Meme anatomisi ve histolojisi. (<http://www.pathophys.org/breast-cancer/breastnormal-copy/>, erişim tarihi: 04 Mart 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

4.2.1. Meme Kanseri Etiyolojisi

Meme kanseri etiyojisi; endokrin ve hiç doğum yapmamışlık, 30 yaşından sonra ilk doğum ve hormonal öykü dahil olmak üzere üreme faktörlerini içeren bir çok faktöre bağlıdır; alkollü içeceklerin tüketimi, bazı kontraseptiflerin kullanımı ve menopozal (hormon replasmanı) tedavi ve iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma gibi çevresel faktörler; ve yüksek kalorili diyetler ve egzersiz eksikliği gibi yaşam tarzı faktörlerine de bağlıdır. Bu tür yaşam tarzı faktörlerinin bir süredir var olduğu sanayileşmiş ülkelerde yıllık görülme sıklığı 100.000 kadın başına 70-90 yeni vakadır. Sanayileşmenin daha yeni olduğu ülkelerde meme kanseri vakalarında artan bir insidans ve daha yüksek ölüm oranı vardır. Meme kanserinin küçük bir kısmı ailesel bir yatkınlıktan kaynaklanmaktadır ve iki yüksek riskli-yüksek penetrasyonlu gen tanımlanmıştır; BRCA1 ve BRCA2. Bu genlerdeki mutasyonlar, meme kanseri riskini büyük ölçüde artırır. Birkaç daha düşük penetrasyonlu gen de tanımlanmıştır ve genom içinde artan riske bağlı olan ancak belirli genlerin henüz tanımlanmadığı birçok lokus vardır. Bu nedenle, meme kanseri olan çoğu hasta için, kişisel ve aile öyküsü ile üreme ve yaşam tarzı faktörleri dahil olmak üzere çoklu faktörler tümör gelişiminde rol oynar (Stewart ve ark., 2014).

4.2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanser ve kanserden ölümün nedenidir. 2012 yılında tahmini 1,7 milyon yeni vaka (kadınlarda tüm kanserlerin % 25'i) ve 0,5 milyon kanser ölümü (kadınlarda tüm kanser ölümlerinin % 15'i) vardır. 140 ülkede kadınlarda en sık görülen kanser tanısı meme kanseridir. 101 ülkede en sık kanserden dolayı ölüm nedenidir. Yaşa göre standart insidans oranları batı Avrupa'da en yüksek ve Doğu Asya'da en düşüktür. İnsani gelişme en yüksek seviyelere ulaşan ülkelerde insidans oranları artma eğilimindedir. Düşük ve çok yüksek kalkınma seviyelerine sahip olarak sınıflandırılan ülkeler arasında 2 kattan fazla bir fark vardır. Tahmini yeni vakaların yaklaşık % 43'ü ve kanser ölümlerinin % 34'ü Avrupa ve Kuzey Amerika'da meydana gelmiştir. Ölüm oranları, 1980'lerin sonlarından ve 1990'ların başından bu yana, çok gelişmiş ülkelerde, gelişmiş tespit ve erken tanı (popülasyon tabanlı tarama yoluyla) ve daha etkili tedavilerin bir kombinasyonunun bir sonucu olarak azalmaktadır (Stewart ve ark., 2014).

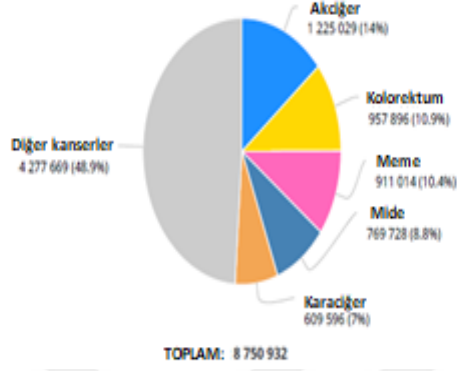
ASYA

Kaynak: Globocan 2018



2018'deki yeni vaka sayısı, her iki cinsiyet, her yaş

Coğrafya



Şekil 4.2.3. Globocan 2018 araştırmasına göre türkiyeninde dahil olduğu asya kıtası üzerindeki kanser çeşitlerinin oranları. (<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/935-asia-fact-sheets.pdf>, erişim tarihi: 04 Mart 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

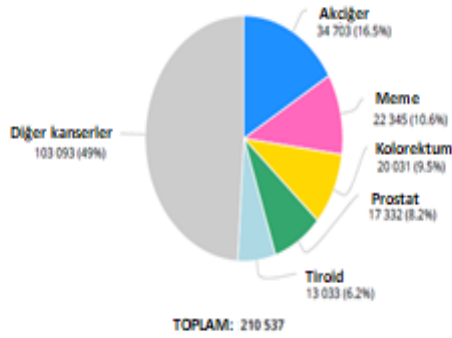
TÜRKİYE

Kaynak: Globocan 2018



2018'deki yeni vaka sayısı, her iki cinsiyet, her yaş

Coğrafya



Şekil 4.2.4. Globocan 2018 araştırmasına göre türkiye üzerindeki kanser çeşitlerinin oranları. (<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>, erişim tarihi: 04 Mart 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

Kanser bölgesine göre İncedans, Mortalite ve Prevalans

Kanserler	Yeni vakalar				Ölümler			5 yıllık yaygınlık (tüm yaşlarda)		
	sayı	Rank	(%)	Cum.risk	sayı	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Prop.
Akciğer	34 703	1	16.5	4.48	33 683	1	28.9	4.43	32 632	39.84
Meme	22 345	2	10.6	4.80	5 452	5	4.7	1.14	68 288	164.37
Prostat	17 332	3	8.2	5.16	5 165	6	4.4	0.93	39 103	96.86
Tiroid	13 033	4	6.2	1.42	742	21	0.64	0.09	45 836	55.95
Mide	11 934	5	5.7	1.45	10 006	2	8.6	1.19	16 369	19.98
Kolon	11 286	6	5.4	1.35	7 971	3	6.8	0.89	27 043	33.01
Mesane	11 235	7	5.3	1.46	4 222	10	3.6	0.46	31 746	38.75
Pankreas	8 403	8	4.0	1.06	2 025	14	1.7	0.24	21 682	26.47
Lösemi	6 473	9	3.1	0.79	6 416	4	5.5	0.79	4 033	4.92
Lösemi	6 029	10	2.9	0.82	4 681	8	4.0	0.50	16 566	20.22
Bevin, sınır sistemi	5 909	11	2.8	0.67	5 084	7	4.4	0.60	15 135	18.48
Hodgkin dışı	5 733	12	2.7	0.88	2 886	11	2.5	0.34	15 839	19.34
lenfoma	5 463	13	2.6	1.35	1 051	20	0.90	0.24	17 269	41.57
Böbrek	4 728	14	2.2	0.61	2 484	12	2.1	0.31	11 640	14.21
Karaciğer	4 362	15	2.1	0.52	4 307	9	3.7	0.52	3 127	3.82
Çiğnek	3 820	16	1.8	0.50	1 847	15	1.6	0.23	10 608	12.95
Yumurtalık	3 729	17	1.8	0.84	2 191	13	1.9	0.51	9 901	23.83
Rahim ağzı	2 356	18	1.1	0.51	1 280	17	1.1	0.28	6 683	16.09
Dudak, Ağız boşluğu	2 331	19	1.1	0.31	1 509	16	1.3	0.20	5 432	6.63
Deri	1 948	20	0.93	0.24	452	25	0.39	0.05	5 356	6.54
Hodgkin lenfoma	1 763	21	0.84	0.22	1 153	19	0.99	0.13	1 924	2.35
Testis	1 622	22	0.77	0.18	669	22	0.57	0.07	4 809	5.87
Testis	1 565	23	0.74	0.16	239	26	0.20	0.03	5 610	6.85
Yemek borusu	1 560	24	0.74	0.27	204	27	0.17	0.04	5 644	13.98
Nazofarenks	1 470	25	0.70	0.18	1 255	18	1.1	0.15	1 419	1.73
Mezotelyoma	922	26	0.44	0.10	513	24	0.44	0.06	2 861	3.49
Tükürük bezleri	825	27	0.39	0.11	597	23	0.51	0.08	884	1.08
Kaposi sarkomu	511	28	0.24	0.06	99	30	0.08	0.01	1 239	1.51
Anüs	473	29	0.22	0.05	44	32	0.04	0.00	1 213	1.48
Vulva	342	30	0.16	0.04	37	33	0.03	0.00	889	1.09
Hipofarenks	282	31	0.12	0.06	100	29	0.09	0.02	757	1.82
Orofarenks	247	32	0.12	0.03	112	28	0.10	0.01	425	0.52
Orofarenks	203	33	0.10	0.03	77	31	0.07	0.01	606	0.74
Vajina	98	34	0.05	0.02	20	34	0.02	0.00	268	0.65
Penis	19	35	0.01	0.00	4	35	0.00	0.00	63	0.16
YEMERİLEMEK	210 537	-	-	22.77	116 710	-	-	13.08	470 851	574.79

Şekil 4.2.5. Globocan 2018 araştırmasına göre Türkiye üzerindeki kanser çeşitlerinin ayrıntılı oranları. (<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-factsheets.pdf>, erişim tarihi: 04 Mart 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

4.2.3. Meme Kanseri Sınıflandırılması

4.2.3.1. Meme kanseri histopatolojik sınıflandırılması

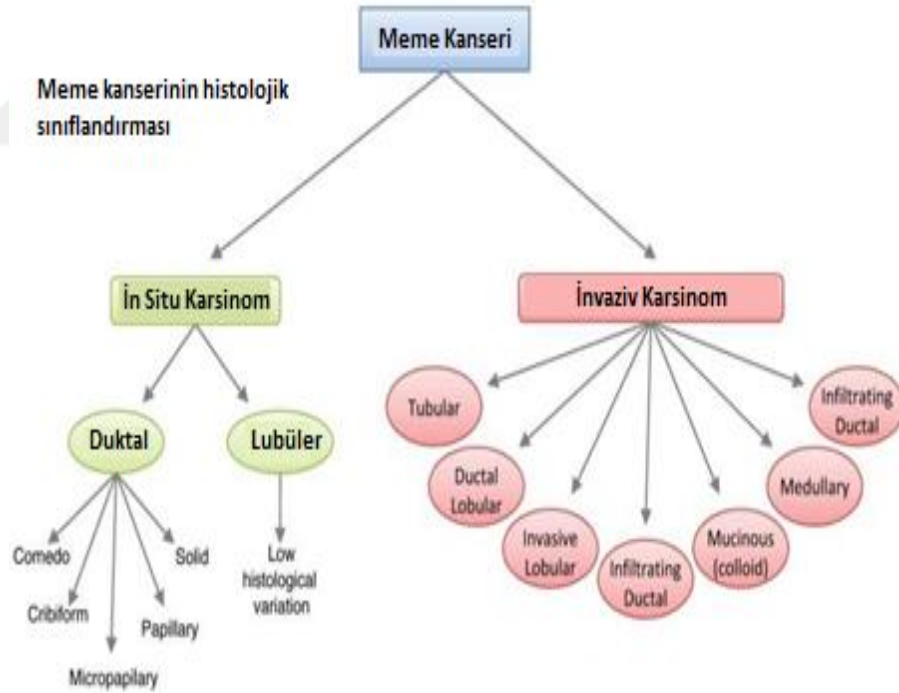
Birçok meme kanseri türü ve bunları tanımlamanın birçok farklı yolu vardır. Meme kanseri teşhisi ile farklı meme kanserlerini karşılaştırmak kolaydır. Meme kanseri türü, memedeki etkilenen spesifik hücreler tarafından belirlenir. Çoğu meme kanseri, vücuttaki organları ve dokuları hizalayan epitel hücrelerinde başlayan tümörler olan karsinomlardır. Memede karsinomlar oluştuğunda, genellikle kanallardaki (süt kanallarında) veya lobüllerde (süt üreten bezlerde) hücrelerde başlayan adenokarsinom adı verilen daha spesifik bir tiptir. Meme kanseri türü, kanserin yayılıp yayılmadığını da belirtebilir. Yerinde meme kanseri (in situ duktal karsinom veya DCIS) süt kanalında başlayan ve meme dokusunun geri kalanında

büyümeyen bir kanserdir. İnvaziv (veya infiltratif) göğüs kanseri çevreleyen meme dokusu içine yayılma özelliğine sahip olan meme kanserlerinin hepsini tarif etmek için kullanılmaktadır. Duktal karsinoma in situ (DCIS; intraduktal karsinom olarak da bilinir), invaziv olmayan veya pre-invaziv bir meme kanseridir. İnvaziv (veya infiltre edici) meme kanseri çevredeki meme dokusuna yayılmıştır. En yaygın tipler invaziv duktal karsinom ve invaziv lobüler karsinomdur. İnvaziv duktal karsinom, tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 70-80'ini oluşturur. Bazı invaziv meme kanserlerinin özel özellikleri vardır veya tedavilerini ve görünümünü etkileyen farklı şekillerde gelişirler. Bu kanserler daha az yaygındır, ancak diğer meme kanseri tiplerinden daha ciddi olabilir. Üçlü negatif meme kanseri, tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 15'ini oluşturan agresif bir invaziv meme kanseri türüdür. Tedavisi zor bir kanserdir. İnflamatuvar meme kanseri, nadir görülen bir invaziv meme kanseri türüdür. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık % 1 ila % 5'ini oluşturur. Memedeki diğer hücre türlerini etkileyen başka meme kanseri türleri vardır. Bu kanserler çok daha az yaygındır ve bazen farklı tedavi türlerine ihtiyaç duyar. Memenin paget hastalığı meme kanallarında başlar ve meme ucunun derisine ve daha sonra areola (meme başı çevresindeki koyu daire) yayılır. Tüm meme kanseri vakalarının sadece yaklaşık % 1 ila 3'ünü oluşturan nadir meme kanseri türüdür. Memenin sarkomları tüm meme kanserlerinin % 1'inden daha azını oluşturan nadir meme kanseri türüdür. Anjiyosarkom, kan damarlarını veya lenf damarlarını hizalayan hücrelerde başlar, meme dokusunu veya memenin derisini içerebilir. Bazıları o bölgedeki önceki radyasyon tedavisi ile ilgili olabilir. Filloid tümörler nadir görülen meme tümörleridir. Kanallarda veya lobüllerde gelişen karsinomların aksine, memenin bağ dokusunda (stroma) gelişirler. Çoğu iyi huyludur, ancak malign (kanseri) olan diğer türleri de vardır (<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer.html#references> erişim tarihi: 04 Mart 2020).

Dünya sağlık örgütü tarafından yapılan sınıflandırma aşağıdaki gibidir.

- 1) İn situ karsinom
 - a) İn situ duktal karsinom (DCIS)
 - b) İn situ lobüler karsinom (LCIS)
- 2) İnvaziv karsinom

- a) Duktal karsinom (% 70-80)
- b) Lobüler karsinom (% 5-10)
- c) Tübüler karsinom (% 2)
- d) Kribriform karsinom (% 1)
- e) Medüller karsinom (% 1-5)
- f) Müsinöz (kolloid) karsinom (% 1-2)
- g) İnvaziv papiller karsinom (% 1)
- h) İnvaziv mikropapiller karsinom
- i) Apokrin karsinom
- j) Sekretuar (juvenil) karsinom
- k) Adenoid kistik karsinom
- l) Metaplastik karsinom
- m) Nöroendokrin tümör
- n) İnflamatuvar karsinom (Tavasolli ve ark., 2003)



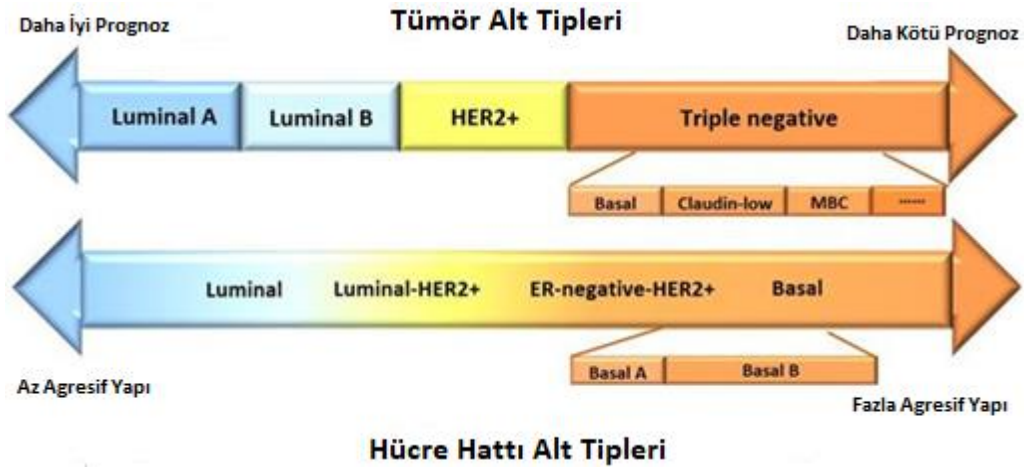
Şekil 4.2.6. Meme kanseri histopatolojik sınıflandırılması.

(https://www.researchgate.net/figure/Histological-classification-of-breast-cancer-subtypes-This-scheme-currently-used-by_fig1_47701118, erişim tarihi: 04 Mart 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

4.2.3.2. Meme kanseri moleküler sınıflandırma

Meme kanseri hastalarının sağ kalım oranını iyileştirmek için ilgili genlerin ve belirteçlerin çalışılarak erken saptanması büyük önem taşımaktadır (Khawaled ve ark., 2017). Bu çalışmalar erken tanı ve kişisel tedavi uygulamaları için değerlidir. Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER - 2) gibi meme kanserinin yaygın biyolojik göstergeleri, moleküler düzeyde meme kanseri tanısının konulmasının yanı sıra, klinik çalışmalarında moleküler alt tip sınıflandırılması ile uygun tedavi yönteminin belirlenmesinde etkilidir (Wang ve ark., 2018).

Meme kanseri, çeşitli genetik değişiklikler ve belirgin morfolojik ve moleküler özellikler ile karakterize edilen karmaşık ve heterojen bir hastalıktır. Gen ekspresyon profili ile birlikte östrojen reseptörü alfa (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2) durumunun değerlendirilmesi, meme kanseri'nin bir alt tip sınıflandırmasını ortaya çıkarmıştır. Sınıflandırma; Lümen A (ER + / PR +, HER2-), Lümen B (ER + / PR +, HER2 +), HER2 + ile zenginleştirilmiş (HER2 pozitif) ve Bazal benzeri veya Üçlü Negatif (ER -, PR -, HER2-) yapılmaktadır (Perou ve ark., 2000). Her alt tip farklı prognoza sahiptir, uygun tedaviye ihtiyaç duyar ve spesifik yanıt gösterir (Sørli ve ark., 2001).



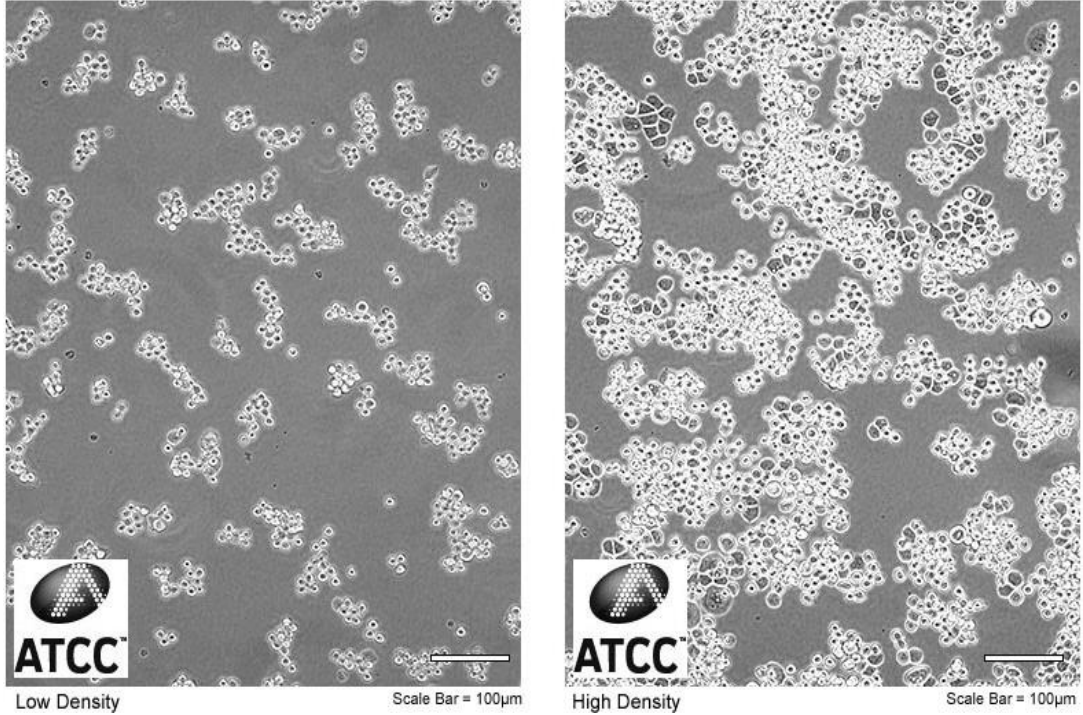
Şekil 4.2.7. Meme kanseri moleküler sınıflandırması. (<https://www.jcancer.org/v08p3131.htm>, erişim tarihi: 04 Mart 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır.)

4.3. Hücre Hatları Moleküler ve Hücresel Biyolojisi

4.3.1. MDA-MB-453 Hücre Hattı

Meme kanseri metastatik karsinomudur. MDA-MB-453 hücre hattı 48 yaşındaki beyaz ırk bir kadının meme kanseri dokusundan 1976 yılında elde edilmiştir. Hücre kültürü ortamında flaska yapışır. Östrojen reseptörü ve progesteron reseptörü negatif olup HER2 amplifikasyonu pozitif olan hücre hattıdır. Bu nedenle ÜNMK olmayan sınıflandırmasına dahildir (Kao. ve ark. 2009).

ATCC Number: **HTB-131**™
Designation: **MDA-MB-453**



Resim 4.3.1. MDA-MB-453 meme kanseri hücre görüntüsü.

([https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-131.aspx?geo_country=tr#documentation)

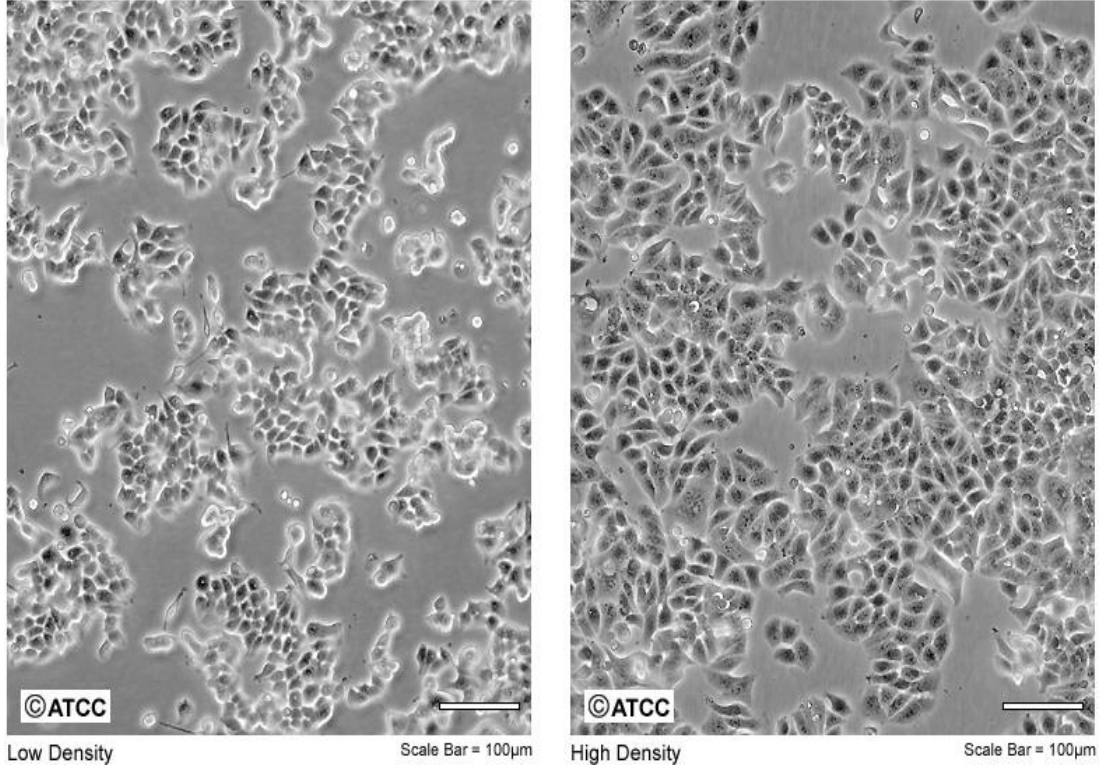
[131.aspx?geo_country=tr#documentation](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-131.aspx?geo_country=tr#documentation), erişim tarihi: 04 Mart 2020)

4.3.2. T47D Hücre Hattı

Meme kanseri invaziv duktal karsinomasıdır. T47D hücre hattı 54 yaşındaki beyaz ırk bir kadının meme kanseri dokusundan 1981 yılında elde edilmiştir. Hücre kültürü ortamında flaska yapışır. Östrojen reseptörü ve progesteron reseptörleri pozitif olup HER2 amplifikasyonu negatif olan hücre hattıdır. Bu nedenle ÜNMK olmayan sınıfına dahildir (Kao. ve ark., 2009)

ATCC Number: **HTB-133**

Designation: **T-47D**

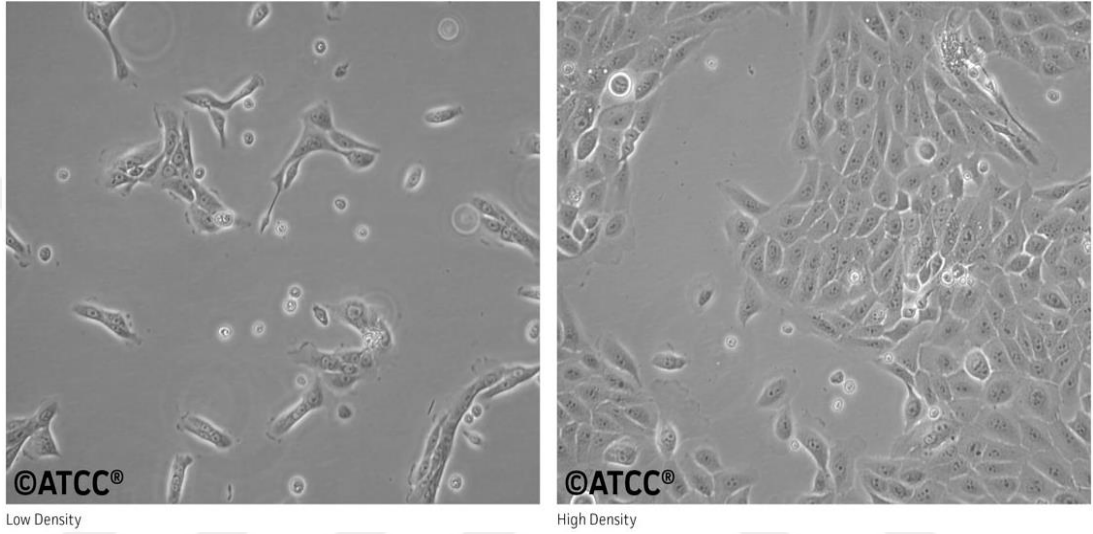


Resim 4.3.2. T47D meme kanseri hücre görüntüsü. (https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-133.aspx?geo_country=tr#documentation, erişim tarihi: 04 Mart 2020)

4.3.3. MCF10A Hücre Hattı

MCF10A hücre hattı tümörigenik olmayan epitel hücre hattıdır. MCF10A hücre hattı 36 yaşındaki beyaz ırk bir kadının meme epitel dokusundan 1984 yılında elde edilmiştir. Elektron mikroskopuyla çekilmiş hücre görüntülerinde luminal duktal karakterizasyonda olduğu belirtilmiştir (Soule ve ark., 1991).

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

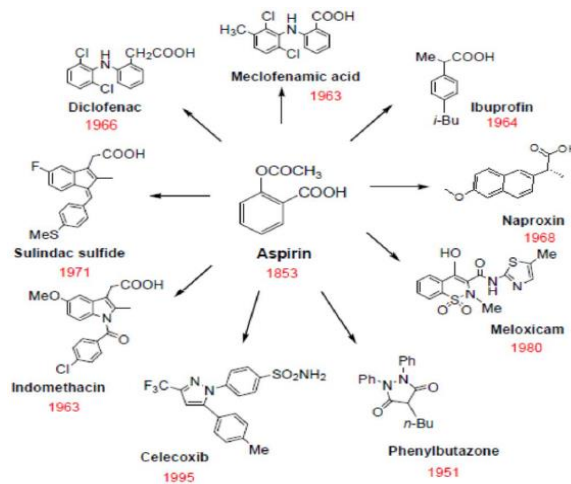


Resim 4.3.3. MCF10A meme epiteli hücre görüntüsü. (https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-10317.aspx?geo_country=tr#documentation, erişim tarihi: 04 Mart 2020)

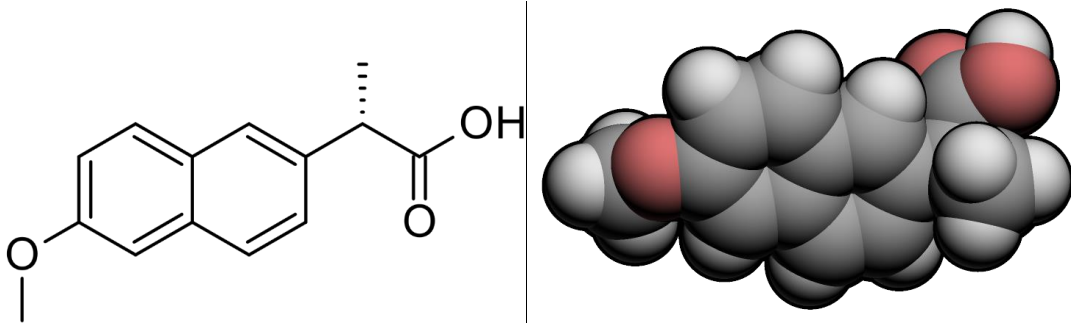
4.4. Non Steroidal Antienflamatuar İlaçlar (NSAID), Naproksen ve Apoptoz İlişkisi

Steroid olmayan anti-enflamatuar ilaçlar (NSAID'ler), enflamatuar durumların tedavisi için yaygın olarak kullanılan çeşitli bir ilaç sınıfıdır, birçok kanser türünün önlenmesinde ve tedavisinde oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, siklooksijenaz (COX) inhibisyonundan kaynaklanan toksisite ve fizyolojik açıdan önemli prostaglandinlerin baskılanması kanser kemopreventi için kullanımlarını sınırlar. Bu durum araştırmacıları gastrointestinal ya da kardiyovasküler yan etkilere yol açmayacak, ancak etkili bir anti-kanser aktivitesi gösterebilecek NSAID türevlerini elde etmek için molekül yapılarını manipüle etmeye teşvik etmiştir. Yapılan

araştırmalar ve raporlar, bazı NSAID türevlerinin çeşitli kanser hücreleri soylarına karşı anti-kanser aktivitesi gösteren etkili ajanlar olduğunu göstermiştir. Steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar modern tıpta en sık reçete edilen ilaçlar arasındadır. Ağrı, ateş ve inflamasyonun hafifletilmesinde çok etkilidirler. NSAID'ler, araziidonik asidin prostaglandinlere ve tromboksanlara dönüşümünü katalize eden bir enzim olan siklooksijenazın inhibisyonu yoluyla anti-inflamatuar etkilerini gösterir. Dünyadaki nüfusun yaşlanması ve büyümesinin yanı sıra, özellikle gelişmekte olan ülkelerde kansere neden olan davranışların, özellikle sigara içiciliğinin giderek daha fazla artması nedeniyle, küresel kanser yükü büyük ölçüde artmaya devam etmektedir. GLOBOCAN 2008 tahminlerine göre, 2008 yılında yaklaşık 12.7 milyon kanser vakası ve 7.6 milyon kanser ölümünün meydana geldiği tahmin edilmektedir; bunlardan % 56'sı ve ölümlerin % 64'ü ekonomik olarak gelişen ülkelerde meydana gelmiştir. NSAID ilaçlardan olan Aspirin için kanser gelişimine karşı koruyucu bir rolün ilk raporu 1988'de kolorektal kanseri ile ilişkisi yoluyla belgelenmiştir. Daha sonra kolon ve / veya rektumda benzer etkileri gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Diğer organlar için de faydalı etkiler tanımlanmıştır. Antineoplastik aktiviteleri açısından *in vitro* çalışmalar, mekanizmanın esas olarak apoptozun indüklenmesi ve hücre çoğalmasının önlenmesinden kaynaklandığını göstermiştir. Diğer çalışmalarda, fosfodiesteraz-5 (PDE-5) inhibisyonu veya siklik guanozin monofosfat (cGMP) yükselmesi gibi COX'den bağımsız veya hedef dışı etkilerin de bu ilaçların antineoplastik özelliklerine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (Elsaman ve ark., 2016).



Şekil 4.4.1. En yaygın NSAID'lerin kimyasal yapıları. (Elsaman ve ark., 2016)



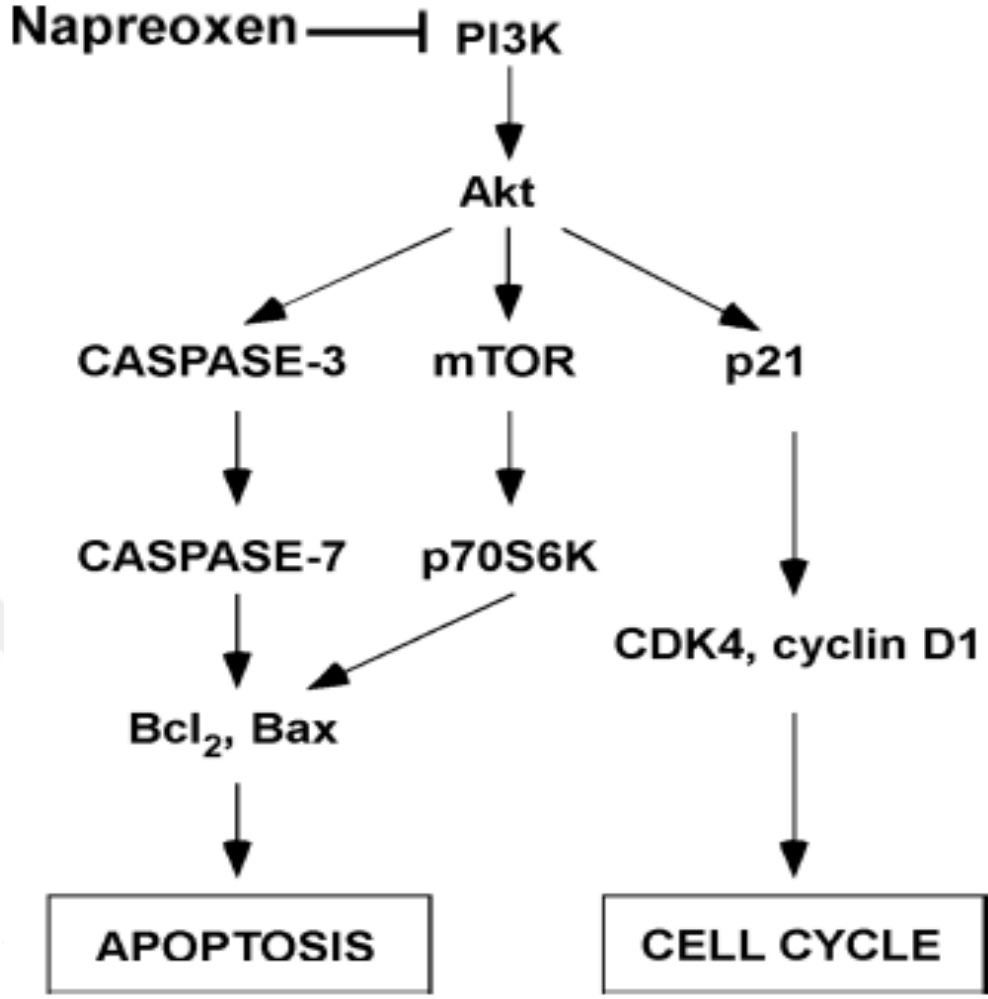
Şekil 4.4.2. Naproksenin kimyasal yapısı ve kimyasal yapısının 3 boyutlu yapısı. (<https://en.wikipedia.org/wiki/Naproxen>, erişim tarihi: 04 Mart 2020)

Yeni ilaçların geliştirilmesinde yer alan büyük maliyet ve zaman nedeniyle, ilaç yeniden repozisyonu (yeniden yerleştirme) kullanımı özellikle caziptir. İlaçların yeniden repozisyonu (yeniden yerleştirme), yeni kullanımlar için mevcut ilaçların geliştirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Piyasadaki mevcut ilaçlar toksisite ve güvenlik açısından zaten test edilmiştir ve Gıda ve İlaç İdaresi'nden lisans almak için uygun veya onaylanmış farmakokinetik özelliklere sahiptir. Ayrıca, yeni bir ilacın geliştirilmesi genellikle 10 ila 17 yıl gerektirirken, ilacın yeniden konumlandırılması bir ilacın hastaya getirilmesi için gereken süreyi azaltabilir. Bu nedenle, ilaçların yeniden konumlandırılması yeni ilaç geliştirmeye kıyasla önemli ölçüde para ve zaman tasarrufu sağlayabilir. (Kim ve ark., 2014).

Enflamasyon ve kanser arasındaki fonksiyonel ilişki ilk olarak 1863'te Rudolf Virchow'un kanserin kronik inflamasyon bölgesinde ortaya çıktığını varsaydığı zaman ortaya çıktı. O zamandan beri çok sayıda çalışma, kronik inflamasyonun tümörögenezdeki rolü ve steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçların (NSAID) anti-kanser ajanları olarak potansiyel kullanımı üzerinde durdu. Her ne kadar gastrointestinal kanama ve artmış kardiyovasküler problemler bilinen NSAID'lerin çoğuyla ilişkili olsa da, naproksen, insanda olası kardiyoprotektif rolü olan, olumsuz kardiyovasküler etkilerin az görüldüğü bir ilaçtır.. Faz II klinik çalışmasında, naproksenin ilerleyici prostat kanserini erken tekrarlayan hastalıklarla tedavi etmede güvenli ve etkili olduğu bulunmuştur ve son zamanlarda kolon kanseri murin modeli

kullanılarak yapılan yeni bir çalışma, bu ilacın anti-kanser özelliklerini de göstermiştir. NSAID'lerin kemopreventif etkilerini gösterdikleri moleküler mekanizmalar, bugüne kadar yoğun bir tartışma konusudur. En çok kabul gören hipotez, siklooksijenaz (COX-1 ve -2) inhibisyonu ile prostaglandin düzeylerini düşürme özelliklerine odaklanmıştır. Meme kanseri hastalarında artmış prostaglandin E2 (PGE2) seviyeleri ile birlikte COX-2'nin aşırı ekspresyonu bildirilmiştir. Bilinen bir COX-2'den türetilmiş prostaglandin olan PGE2'nin, lokal tümör mikro ortamını modüle ederek kanser hücrelerinin ilerlemesinde ve metastazında önemli bir rol oynadığı unutulmamalıdır. Bu nedenle, kanser hücrelerinde PGE2'yi azaltmak için gelişmiş bir kapasiteye sahip moleküller büyük ilgi görmektedir (Deb ve ark., 2014).

Sıçan mesane kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada naproksen için potansiyel hedef bölgeler belirlenmiştir ve bilgisayar kinaz profillemeye çalışmaları sonucunda fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3-K) naproksen için önemli bir potansiyel bölge olduğu gösterilmiştir. Bu profillemeye çalışması, *in-vitro* kinaz çalışmalarıyla desteklenerek, naproksenin fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3-K) ile etkileştiği ve kinaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2014).



Şekil 4.4.3. Naproksenin, PI3-K sinyal yolunun inhibisyonu yoluyla aracılık edilen hücre döngüsü ve apoptozun düzenlenmesi üzerindeki etkisini gösteren bir şema. (Kim ve ark., 2014).

Dünya’da ve Türkiye’de en yaygın kanser türlerinden biri olan meme kanseri tedavisine yönelik yeni moleküllerin geliştirilmesi üzerinde çalışmalar mevcuttur. Günümüzde, Non-steroidal antiinflamatuvar etkinliği olduğu bilinen (+)-2-(6-Metoksi-2-naftil) propionik asit (Naproksen)’in, insan göğüs kanserinde (MCF7), (Deb ve ark., 2014), mesane kanserinde (Kim ve ark., 2014), kolorektal adenokarsinoma (CaCo2), hepatosellüler karsinoma (HepG2), epiteloid serviks karsinoma (Hela), akciğer karsinoma (A5W9), meme bezi karsinoma ve epidermoid larenks karsinoma (Hep2) (Motwami ve ark, 2013) hücrelerinde antikanser etkinliği bildirilmiştir.

Apoptoz (a-po-toe-sis) terimi ilk olarak 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü formunu tanımlamak için klasik bir makalede kullanıldı, ancak apoptoz kavramının bazı bileşenleri açıkça yıllar önce tarif edilmiştir. Memeli hücrelerinde apoptoz sürecinde yer alan mekanizmalar hakkındaki anlayışımız, nematod *Caenorhabditis elegans*'ın gelişimi sırasında meydana gelen programlanmış hücre ölümünün araştırılmasından kaynaklanmaktadır. Bu organizmada, yetişkin solucanın oluşumunda 1090 somatik hücre üretilir, bunlardan 131 tanesi apoptoz veya "programlanmış hücre ölümü" geçirir. Bu 131 hücre, solucanlar arasında esasen değişmez olan bu süreçte dikkat çekici doğruluk ve kontrolü gösteren geliştirme sürecinde belirli noktalarda ölmektedir. Apoptoz o zamandan beri, hücrelerin genetik olarak belirlenmiş eliminasyonunu içeren "programlanmış" hücre ölümünün ayırt edici ve önemli bir noktası olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, programlanmış hücre ölümünün farklı formlarının olabileceği ve bu farklı formların bazılarının henüz keşfedilmemiş olabileceğini belirtmek önemlidir (Elmore, 2007).

Apoptoz, normal olarak gelişme ve yaşlanma sırasında ve dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak ortaya çıkar. Ayrıca apoptoz, bağışıklık reaksiyonlarında veya hücrelerin hastalık veya zararlı maddelerden zarar görmesi gibi durumlarda ortaya çıkan bir savunma mekanizmasıdır. Apoptozu tetikleyebilen hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyaran ve koşullar olmasına rağmen, aynı uyarana yanıt olarak tüm hücrelerin kesin ölümü beklenmez. Işınlama veya kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarıyla sonuçlanır ve bu da p53'e bağlı bir yoldan apoptotik ölüme yol açabilir. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar, bazı hücrelerde (örn. Timositler) apoptotik ölüme yol açabilirken, bazı hücrelerde apoptotik ölüm gerçekleşmez veya hücre çoğalması gözlemlenir (Elmore, 2007).

Bir kısım hücreler ligand bağlanması ve protein çapraz bağlanması yoluyla apoptoza yol açabilen Fas veya TNF reseptörlerini eksprese etmektedir. Bazı hücrelerin, hormon veya büyüme faktörü gibi bir hayatta kalma faktörü tarafından bloke edilmesi gereken bir ölüm yolu vardır. Aynı zamanda, apoptozu nekrozdan ayırt etme sorunu da vardır, bu iki süreç bağımsız olarak, sırayla ve aynı anda meydana gelebilir. Bazı durumlarda

hücrelerin apoptoz veya nekroz nedeniyle ölüp ölmediğini belirleyen, uyaranların türü ve / veya uyaranların derecesidir. Düşük dozlarda, ısı, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçları gibi çeşitli zararlı uyaranlar apoptozu indükleyebilir, ancak bu aynı uyaranlar daha yüksek dozlarda nekroza neden olabilir. Son olarak, apoptoz, “kaspaz” adı verilen bir grup sistein proteazının aktivasyonunu ve başlangıç uyaranlarını hücrenin son ölümüne bağlayan karmaşık bir olaylar dizisini içeren koordineli ve genellikle enerjiye bağımlı bir süreç olarak tanımlanabilir (Elmore, 2007).

Apoptotik hücre ölümüne alternatif olarak nekroz ise hücrenin pasif bir kurban olduğu ve enerjiden bağımsız bir ölüm tarzını takip ettiği toksik bir süreçtir. Ancak nekroz, hücre ölümünden sonra meydana gelen yıkıcı süreçlere atıfta bulunduğundan, bazıları tarafından hücre ölümü mekanizmasını tanımlamak için uygun olmayan bir terim olarak kabul edilir. Nekroza onkoz, karyoliz ve hücre şişmesi gibi özelliklerle karakterize iken, apoptozu karakterize eden süreçler hücre büzülmesi, piknoz ve karyoreksisolarak tanımlanmıştır. Bu nedenle, "onkotik hücre ölümü" ve "onkotik nekroz" terimleri, hücre şişmesinin eşlik ettiği hücre ölümünü tanımlamak için alternatifler olarak önerilmiştir, ancak bu terimler şu anda yaygın olarak kullanılmamaktadır (Elmore, 2007).

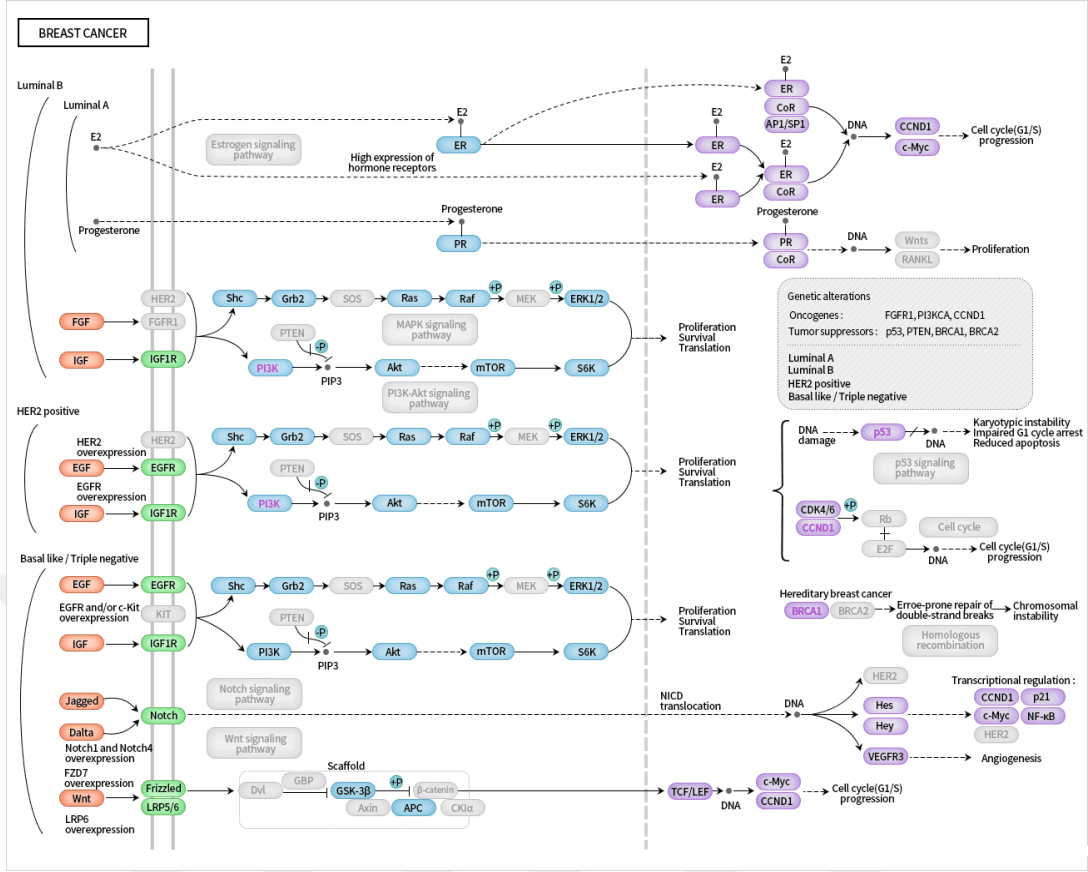
Apoptoz ve nekrozun mekanizmaları ve morfolojileri farklı olsa da, bu iki süreç arasında ortak noktalar vardır. Kanıtlar, nekroz ve apoptozun “apoptoz-nekroz sürekliliği” olarak tanımlanan ortak bir biyokimyasal ağın morfolojik ifadelerini temsil ettiğini göstermektedir. Örneğin, devam eden bir apoptotik süreci nekrotik bir sürece dönüştürecek iki faktör, kaspazların ve hücre içi ATP'nin mevcudiyetinde bir azalmayı içerir. Bir hücrenin nekroz veya apoptoz ile ölüp ölmediği kısmen hücre ölüm sinyalinin doğasına, doku tipine, dokunun gelişim evresine ve fizyolojik ortama bağlıdır (Elmore, 2007).

Geleneksel histoloji kullanarak, apoptozu nekrozdan ayırmak her zaman kolay değildir ve uyaranın yoğunluğu ve süresi, ATP tükenmesinin derecesi ve kaspazların mevcudiyeti gibi faktörlere bağlı olarak ikisi aynı anda ortaya çıkabilir. Nekroz, genellikle geniş hücre alanlarını etkileyen kontrolsüz ve pasif bir süreçtir, oysa apoptoz kontrol edilir ve enerjiye bağlıdır ve tek tek veya hücre kümelerini etkileyebilir.

Nekrotik hücre hasarına iki ana mekanizma aracılık eder; hücrenin enerji kaynağına müdahale ve hücre zarlarına doğrudan hasar (Elmore, 2007).

Nekroz ile ortaya çıkan bazı önemli morfolojik değişiklikler arasında hücre şişmesi; sitoplazmik vakuol oluşumu; şişmiş endoplazmik retikulum; sitoplazmik kabarcıkların oluşumu; yoğunlaşmış, şişmiş veya yırtılmış mitokondri; ribozomların ayrıştırılması ve ayrılması; bozulmuş organel membranlar; şişmiş ve yırtılmış lizozomlar; ve sonunda hücre zarının bozulması. Hücre zarı bütünlüğünün kaybı, sitoplazmik içeriğin çevre dokuya salınmasına ve sonuçta enflamatuar hücrelerin alınmasıyla kemotatik sinyaller gönderilmesine neden olur. Apoptotik hücreler ise hücresel bileşenlerini çevreleyen interstisyel dokuya serbest bırakmadıklarından ve makrofajlar veya bitişik normal hücreler tarafından hızlı bir şekilde fagositozlandıkları için esasen enflamatuar reaksiyonbaşlatmazlar. Piroz ve karyoreksisin apoptoz için özel olmadığını ve nekroz ile ortaya çıkan sitomorfolojik değişiklik spektrumunun bir parçası olabileceğini belirtmek de önemlidir (Elmore, 2007).

Bugüne kadar, araştırmalar iki ana apoptotik yol olduğunu göstermektedir: ekstrinsik veya ölüm reseptör yolu ve intrinsik veya mitokondriyal yol. Bununla birlikte, şimdi iki yolun bağlantılı olduğuna ve bir yoldaki moleküllerin diğerini etkileyebileceğine dair kanıtlar vardır. T hücresi aracılı sitotoksisite ve hücrenin performans-granzimedent bağımlı öldürülmesini içeren ek bir yol vardır. Performans/granzim yolu, granzim B veya granzim A yoluyla apoptozu indükleyebilir. Ekstrinsik, intrinsik ve granzim B yolları, aynı terminalde veya yürütme yolunda birleşir. Bu yol, kaspaz-3'ün parçalanmasıyla başlatılır ve DNA parçalanması, hücre iskeleti ve nükleer proteinlerin bozulması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimlerin oluşumu, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve son olarak fagositik hücreler tarafından tutulumu ile sonuçlanır. (Elmore, 2007).



Şekil 4.5.2. Meme kanseri apoptotik yolların şematik gösterimi.

(<https://www.cusabio.com/Breast-Cancer/?key=PR>, erişim tarihi: 04 Mart 2020)

4.6. Mitokondriyal Membran Potansiyeli

Hücre sağlığının önemli bir göstergesi olan mitokondriyal fonksiyon, mitokondriyal membran potansiyelindeki (MMP) değişiklikler izlenerek değerlendirilebilir. Genellikle hücrenin güç evleri olarak adlandırılan mitokondri, hücre fizyolojide hayati bir rol oynar. Ökaryotik hücrelerdeki hücresel enerjinin (ATP) çoğunluğu, mitokondride oksidatif fosforilasyon yoluyla üretilir; bu sırada elektronlar, elektron donörlerinden oksijen gibi elektron alıcılarına aktarılır. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri, bir dizi redoks reaksiyonu yoluyla elektrokimyasal bir gradyan oluşturur. Bu elektrokimyasal gradyan, ATP sentezini yönlendirir ve mitokondriyal fonksiyonu değerlendirmek için anahtar bir parametre olan mitokondriyal membran potansiyelini (MMP) üretir. Mitokondriyal disfonksiyonlar, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. Ksenobiyotik bileşiklerin toksisitesi mitokondriyal fonksiyon üzerinde doğrudan veya

ikincil bir etkiye sahip olabilir. Bu bileşiklerin çoğu, mitokondride çeşitli makromolekülleri sarsarak ve dolayısıyla farklı mitokondriyal fonksiyonları etkileyerek MMP'yi azaltır. MMP'deki bir azalma aynı zamanda apoptoza da bağlanabilir. Bu nedenle bu organeller in vitro toksisite çalışmaları için ideal bir hedeftir. (Sakamuru ve ark.,2016).

Solunum zinciri aktivitesi tarafından üretilen proton elektrokimyasal gradyanı mevcut solunum enerjisinin % 90'ından fazlasını oluşturur ve bu nedenle, toplam değerler ve dalgalanmalarla ilgili değerlendirmesi ve doğru ölçümü, mitokondriyal fonksiyonun anlaşılmasının paha biçilmez bir bileşenidir. Sonuç olarak, diferansiyel protonik birikim ve nakil tarafından üretilen iç mitokondriyal membran boyunca elektrik potansiyelindeki değişiklikler mitokondriyal membran potansiyeli veya $\Delta\Psi$ olarak bilinir ve mitokondrinin fonksiyonel metabolik durumunu yansıtır.

İç mitokondriyal membran enerjisi oksidatif fosforilasyon yoluyla iletir. Bu, ökaryotik hücrelerde ATP üretiminden sorumlu ana süreçtir. ATP sentezine yol açan tüm biyokimyasal olaylar ve reaksiyonlar dizisi, Mitchell'in kemiosmotik teorisine dayanmaktadır. Mitchell bu teoriyle mitokondriyal solunumun iç mitokondriyal membran boyunca protonların elektrokimyasal bir gradyanını nasıl oluşturduğunu zarif bir şekilde tarif etmiştir ki bu da mitokondriyal F1-F0 ATP sentazının aktivitesi yoluyla ATP sentezinin arkasındaki itici güçtür. Bununla birlikte, oksidatif fosforilasyonun nasıl düzenlendiği henüz tam olarak anlaşılammıştır, çünkü bu sistem üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak hareket eden ve hücrel homeostazdaki çeşitli değişikliklere yanıt olarak aktivitesini değiştiren neredeyse sayısız efektör ve modülatör vardır. (Teodoro ve ark., 2018).

5. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

5.1. Kullanılan Gereçler

5.1.1. Kullanılan cihazlar

Deneyleyler, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı laboratuvar olanakları kullanılarak yapılmıştır.

• Etüv	New Bruswick, Galaxy 48 R
• Karbondioksit Etüvü	Farma Scientific
• İnvirt ışık mikroskobu	Olympus CKX41
• Floresans mikroskobu	Olympus CKX41
• Manyetik Karıştırıcı	Hanna
• Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Kotterman
• pH Metre	WTW
• Santrifüj	Hettich 30 RF
• Karıştırıcı (Vorteks)	Janke & Kunkel
• Terazi	Oertling NA-114
• Derin Dondurucu (-20 oC)	Arçelik
• Derin Dondurucu (-70 oC)	So-Low
• Buzdolabı	Arçelik
• Kırık Buz Makinesi	Scotsman AF-10
• Çalkalama Cihazı	IKA-Vibrax-VXR
• Otomatik Mikro Pipetler	Gilson
• Otoklav	All American
• Distile Su Cihazı	GFL
• Fotograf Makinesi	Canon
• Laminar Flow	Tezsan
• Elisa Reader	Biotek
• TALI Image-Based Cytometer cihazı	Life Technologies

5.1.2. Kullanılan kimyasallar

• DMEM Medium	Gibco
• DMEM/F12 Medium	Gibco
• RPMI 1640 Medium	Gibco
• Penicilin streptomycine	Gibco
• Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
• Horse Serum (HS)	Gibco
• Aquagard – 1 Solution	Biological Industrie
• DMSO (dimetilsülfoksit)	Santa Cruz
• Trypan Blue	
• Cell Proliferation Kit 1 (MTT)	Roche
• Tali Apoptosis Kit	Invitrogen
• JC-1 Mitochondrial Membran Potential Assay Kit	Cayman
• Aseton	Merck
• Etanol	Merck
• Etanol	Teksol
• Cholera Toxin	Sigma Aldrich
• Hydrocortisone	Sigma Aldrich
• İnsulin	Sigma Aldrich
• L-glutamine	Gibco
• Epidermal Growth Factor	Peptotech
• TrypLETM Express Enzyme	Gibco

5.2. Meme Epiteli ve Meme Kanseri Hücre Hattı ve Hücre Kültürü

5.2.1. Dondurulmuş hücre hatlarının çözülmesi

- Kriyotüpler içinde -80 °C'de %80 RPMI 1640, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %10 dimetilsülfoksit (DMSO) ile dondurulmuş T47D meme kanser hücre hattı -80 °C'den alınıp, 10 mL RPMI 1640 kültür ortamı içerisine eklendi ve 50 mL'lik falkona aktarılarak 1200 rpm'de 5 dk. santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra dipte oluşan hücre peletine değmeden üst sıvı atıldı. Hücre peletinin olduğu falkona 5 mL RPMI 1640 eklendi. Pipetaj yapıldıktan sonra, 25 cm²'lik flaska aktarıldı. 37 °C'de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona kaldırıldı. Benzer işlemler MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattı ve MCF10A meme epiteli hücre hattı içinde yapıldı.

5.2.2. Hücre hatları kültür işlemleri

- T47D meme kanseri hücreleri %10 fetal sığır serumu, %1 penisilin streptomisin, 500µl insülin içeren RPMI 1640 ortamında, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Haftada 3 kere kültür ortamı değiştirilerek hücreler çoğaltıldı.
- MDA-MB-453 meme kanseri hücreleri %10 fetal sığır serumu, %1 penisilin streptomisin içeren DMEM ortamında, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Haftada 3 kere kültür ortamı değiştirilerek hücreler çoğaltıldı.
- MCF10A meme epiteli hücreleri %10 at serumu, %1 penisilin streptomisin, 100µl epidermal growth factor, 500 µl insülin, 250 µl hydrocortisone, 50 µl cholera toxin içeren DMEM ortamında, 37 °C'de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Haftada 3 kere kültür ortamı değiştirilerek hücreler çoğaltıldı.

5.2.3. Hücre hattının pasajlanması

Hazırlanan flaskalar inkübatörden alındıktan sonra hücre üzerindeki besiyeri atıldı. Besiyeri atıldıktan sonra hücreler 2 defa PBS/EDTA, 1 defa PBS ile yıkandı. En son flaska Tripsin eklenerek, 5 dk. 37 °C' de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonrası Tripsinin toksik etkisinin giderilmesi için üzerine Tripsinin iki katı kadar besiyeri eklendi ve 15 mL'lik falkona aktarıldı. Falkona aktarılan hücreler 1200 RPM'de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası hücre peleti üzerindeki süpernatant dikkatlice alınıp atıldı. Hücre peleti üzerine besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı. Her pasaj sırasında yaklaşık 1x10⁶ milyon hücre/12,5 mL besiyerinde olacak şekilde 75 cm²'lik flaskalara ekim yapıldı. 75 cm²'lik flaska ekilen hücreler 37 °C'de, %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona kaldırıldı.

5.2.4. Hemositometrik hücre sayımı

Canlı hücre sayımı Toma camı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu işlem için 200 µl'lik ependorfa 1:1 oranında yani 20 µl tripan mavisi ile 20 µl hücre olacak şekilde karıştırıldı. Hücre süspansiyonu tripan mavisi ile seyreltildiğinde, canlı hücreler boyayı metabolize etmeyip hücre dışında tuttıkları için beyaz, küçük ve yuvarlak olarak görünürler. Ölü hücreler ise membranları boyaya geçirgen olduğundan büyük ve koyu mavi hale gelirler. Oluşan bu durumlar sonucunda hücreler mikroskop kullanılarak canlılık yönünden değerlendirilip sayıldı ve kültürün bir milimetrekaresindeki canlı hücre sayısı hesaplandı.

Canlı hücre sayısı/mL = N x 2x 10⁴

N= Toma lamı üzerindeki sayma alanındaki hücre miktarı.

5.3. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite Analizleri

5.3.1. MTT testi protokolü

Hücre canlılık oranının belirlendiği bu testte, sarı tetrazolyum tuzu MTT 'nin, metabolik aktif hücreler tarafından mor formazan kristallerine dönüştürülmesine dayanır. Bu hücrel redüksiyon, piridin nükleotid kofaktörleri NADH ve NADPH'yi içerir. Oluşan formazan kristalleri çözündürülür ve ortaya çıkan renkli çözelti bir spektrofotometre kullanılarak ölçülür. Bu testte öncelikle hücreler 96-kuyucuklu plakaya, her kuyuda 100 µl medyum ve 5×10^3 hücre olacak şekilde, 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası maddeler, 3 tekrar olacak şekilde, belirlenen konsantrasyonlarda, çözücünün kontrol ve toksik etkilerini incelemek için %0,1 Aseton grubu da oluşturularak, uygulandı. İnkübasyon periyotlarından sonra her kuyuya 10 µl MTT etiketleme reaktifi eklendi ve 4 saat inkübasyona kaldırıldı. 4 saat inkübasyon sonrası her kuyuya 100 µl buffer çözücü solüsyonundan eklendi. 24 saat inkübasyon sonrası 96-kuyuku plakanın, 550 nm dalgoboyunda Elisa Reader'da ölçümü yapıldı.

5.3.2. SGK669'un hazırlanması

Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğr. Üyesi Prof. Dr. Ş. Güniz Küçükgülzel'in laboratuvarında sentezlenen çeşitli S-naproksen triazol-tiyoeeter moleküllerinden biri olan SGK669 nolu bileşik, aseton içinde çözülerek 20 mM'lık bir ana stok hazırlandı. Daha sonra hücrelere uygulanacak SGK669 konsantrasyonları, ana stok kullanılarak hücre hatlarına göre RPMI 1640, DMEM ve DMEM/F12 ile hazırlandı.

5.3.3. SGK669 konsantrasyonlarının hücrelere uygulanması

Belirlenen konsantrasyonlarda (10, 25, 50, 75, 100 µM) SGK669 ve SGK669'u çözdüğümüz asetonun toksik etkisini incelemek üzere hazırladığımız kontrol grubuyla beraber 3 ayrı grup oluşturularak hücrelere uygulandı.

5.4. Apotoz Analizleri

5.4.1. Mitokondriyal membran potansiyeli testi protokolü

$\Delta\Psi_m$, mitokondriyal fonksiyonun önemli bir parametresidir ve hücre sağlığının bir göstergesi olarak kullanılmıştır. $\Delta\Psi_m$ 'in varyasyonları, sitofluorimetrik, lipofilik katyonik boya olan 5,5', 6,6' tetrakloro-1,1', 3,3' tetraetilbenzimi- dazolilkarbosiyanin iyodür (JC-1) kullanılarak çalışılmıştır. JC-1 diğer katyonik boyalara göre mitokondriye girmesi ve probun topaklanmasına bağlı olarak floresan özelliklerini değiştirmesi bakımından avantajlara sahiptir. Yüksek $\Delta\Psi_m$ 'li sağlıklı hücrelerde, JC-1, yoğun kırmızı floresanlı J-agregaları olarak bilinen kompleksleri oluşturur. Bununla birlikte, düşük $\Delta\Psi_m$ 'li hücrelerde, JC-1, yeşil flüoresans gösteren monomerik formda kalır. Kırmızının yeşil flüoresansa oranı arttıkça, mitokondriyal zarın polarizasyonu da artar. MMP (Mitokondriyal Membran Potansiyeli) kiti (JC-1 Mitokondriyal Membran Potansiyeli Deney Kiti, 10009172, Cayman Chemical), apoptoz dahil olmak üzere çeşitli koşullarda mitokondriyal davranışı incelemek için kullanıldı. Bu testte uygulanan işlemler sırasıyla aşağıdaki gibidir:

- Hücreler siyah 96-kuyucuklu plakaya, her kuyuda 100 µl besiyeri ve 75×10^3 hücre olacak şekilde ekilerek, 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübasyona kaldırıldı.
- 24 saat inkübasyon sonrası maddeler belirlenen konsantrasyonlarda kuyucuklara eklendi, ayrıca kuyulardan bir kısmı %0,1 aseton içeren kontrol grubu olarak ayrıldı.
- İnkübasyon periyotlarından sonra, yapışan hücrelerin üzerindeki besiyeri atıldı. Tekrar 100 µl taze besiyeri eklendi.
- Her kuyuya 5 µl JC-1 etiketleme reaktifi eklendi ve pipetaj yapıldı. 25 – 30 dk. inkübasyona kaldırıldı.
- İnkübasyondan alınan siyah 96- kuyucuklu plaka 2100 rpm'de 5 dk. santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası üst sıvı atıldı.
- Her kuyuya 200 µl tampon çözeltisi eklendi ve 2100rpm'de 5 dk. Santrifüj yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı.
- Son olarak her kuyuya 100 µl tampon çözelti konuldu ve belirlenen dalga boylarında apoptotik ve canlı hücrelerin absorbans değerlerini ölçmek için Çoklu plaka okuyucu'da okuma yapıldı.

5.4.2. Annexin V/PI apoptoz tayini protokolü

Apoptoz, gelişimin normal bir parçası olarak gerçekleşen hücre ölümü sürecidir. Apoptoz, nekrozdan nükleer kromatinin sıkışması ve parçalanması, sitoplazmanın büzülmesi ve zar asimetrisinin kaybı dahil olmak üzere karakteristik, morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile ayırt edilebilir. Tali apoptoz kiti (Annexin V Alexa Fluor 488 ve Propidyum İyodür, A10788, Invitrogen) kullanılarak apoptotik, ölü ve canlı hücre sayısı belirlenir. Bu testte, hücreler Annexin V ve propidyum iyodür (PI) ile boyanarak sayıları belirlenir. Annexin V apoptotik hücreleri belirleyerek yeşil floresans, PI ise nekrotik hücreleri belirleyerek kırmızı floresans gösterir. Bu testte uygulanan işlemler sırasıyla aşağıdaki gibidir:

- Hücreler 6-kuyucuklu plakaya, her kuyuda 2 ml besiyeri ve 1×10^6 hücre olacak şekilde ekildi, 37°C 'de %5 CO_2 içeren etüvde 24 saat inkübasyona kaldırıldı.
- 24 saat inkübasyon sonrası maddeler, belirlenen konsantrasyonlarda, kontrol ve toksik etkilerini incelemek için %0,1 Aseton grubu da oluşturularak ayrıca kuyulardan bir kısmı %0,1 aseton içeren kontrol grubu olarak ayrıldı.
- İnkübasyon periyotlarından sonra her kuyudaki besiyeri atıldı. 6-kuyucuklu plakaya, hücreleri pasajlamak için tripsinize işlemi uygulandı. 5 dk, 37°C 'de, %5 CO_2 içeren etüvde inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonrası tripsine maruz bırakılan hücrelerin üzerine tripsinin iki katı kadar besiyeri eklendi ve hücreler ependorfa alındı, santrifüj yapıldı.
- Üst sıvısı atılan hücrelerin üzerine 100 μl 1X Annexin bağlayıcı tampon (Annexin Binding Buffer) eklendi, hücrelerbu tamponda çözüldü.
- Annexin bağlayıcı tampon eklendikten sonra her birine 5 μl Annexin V eklendi ve karıştırıldı.
- Ependorftaki hücreler karanlık ortamda 20 dk inkübasyona kaldırıldı.
- İnkübasyondan alınan hücelere santrifüj yapıldı.
- Üst sıvı atıldı ve tekrar hücrelerin üzerine 100 μl 1X Annexin bağlayıcı tampon eklendi.
- Daha sonra her birinin üzerine 1 μl PI eklendi ve 5 dk inkübasyona kaldırıldı.

- Son olarak boyanmış hücrelerden 25 µl alınıp, Tali Slide'a yüklenip Tali görüntü tabanlı sitometre kullanılarak canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri belirlendi.



6. BULGULAR

6.1. Hücre Canlılığı ve Sitotoksikite Analizleri

SGK669 nolu bileşik ile 24 ve 48 saat indüklenen T47D, MDA-MB-453 ve MCF10A hücrelerine MTT testi uygulandı. Uygulama sonrasında Elisa Reader'da 550 nm dalga boyunda okuma yaparak, maddelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi belirlendi. Elde edilen verilere göre maddelerin artan konsantrasyonlarda ve uygulanan süreye bağlı olarak hücre sayısında azalmaya yol açtığı gözlemlendi. Elde edilen verilerin yüzde canlılık oranları hesaplanarak IC50 değerlerinin belirlenebilmesi için GraphPad Prism istatistik programı kullanılmıştır. Hesaplanan yüzde canlılık oranları programa girilerek analiz edilmiştir. Sonuçlar Tablo 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6' de verilmiştir. SGK669 nolu bileşiğin belirli konsantrasyonlardaki hücre canlılığına etkisi ışık mikroskobu ile Resim 6.1, 6.2, 6.3 ve 6.4'de gösterilmiştir.

Tablo 6.1. SGK669 nolu bileşğin farklı konsantrasyonlarda, T47D hücre hattı ile 24 saat etkililiğini sonrası GraphPad Prism7'den elde edilen analiz sonuçları.

Nonlin fit		SGK669-24h-T47D
log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope		
Best-fit values		
LogIC50		-5,219
HillSlope		-1,574
IC50		0,000006037
Std. Error		
LogIC50		0,1128
HillSlope		0,4676
95% Confidence Intervals		
LogIC50		-5,458 to -4,980
HillSlope		-2,565 to -0,5823
IC50		3,481e-006 to 1,047e-005
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		16
R square		0,882
Absolute Sum of Squares		2716
Sy.x		13,03
Number of points		
Analyzed		18

Tablo 6.2. SGK669 nolu bileşğin farklı konsantrasyonlarda, T47D hücre hattı ile 48 saat etkililişimi sonrası GraphPad Prism7 de yorumlanan değerleri.

Nonlin fit		SGK669-48h-T47D
log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope		
Best-fit values		
LogIC50		-4,8
HillSlope		-3,041
IC50		0,00001585
Std. Error		
LogIC50		0,03078
HillSlope		0,4479
95% Confidence Intervals		
LogIC50		-4,864 to -4,736
HillSlope		-3,970 to -2,112
IC50		1,369e-005 to 1,836e-005
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		22
R square		0,9472
Absolute Sum of Squares		2108
Sy.x		9,788
Number of points		
Analyzed		24

Tablo 6.3. SGK669 nolu bileşimin farklı konsantrasyonlarda, MDA-MB-453 hücre hattı ile 24 saat etkilişimi sonrası GraphPad Prism7’den elde edilen analiz sonuçları.

Nonlin fit	SGK669-24h-MDAMB453
log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope	
Best-fit values	
LogIC50	-4,873
HillSlope	-1,551
IC50	0,00001341
Std. Error	
LogIC50	0,1015
HillSlope	0,5229
95% Confidence Intervals	
LogIC50	-5,090 to -4,655
HillSlope	-2,672 to -0,4293
IC50	8,125e-006 to 2,214e-005
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	14
R square	0,7806
Absolute Sum of Squares	5284
Sy.x	19,43
Number of points	
Analyzed	16

Tablo 6.4. SGK669 nolu bileşimin farklı konsantrasyonlarda, MDA-MB-453 hücre hattı ile 48 saat etkilişimi sonrası GraphPad Prism7 de yorumlanan değerleri.

Nonlin fit	SGK669-48h-MDAMB453
log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope	
Best-fit values	
LogIC50	-4,802
HillSlope	-2,781
IC50	0,00001578
Std. Error	
LogIC50	0,06284
HillSlope	0,815
95% Confidence Intervals	
LogIC50	-4,935 to -4,669
HillSlope	-4,509 to -1,054
IC50	1,161e-005 to 2,145e-005
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	16
R square	0,8551
Absolute Sum of Squares	4639
Sy.x	17,03
Number of points	
Analyzed	18

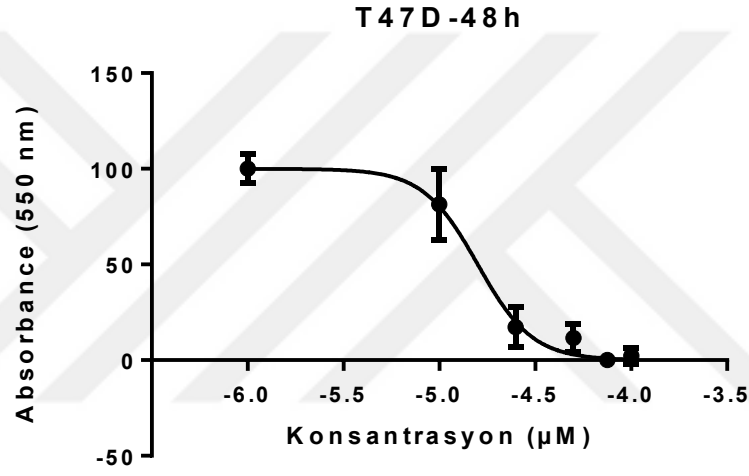
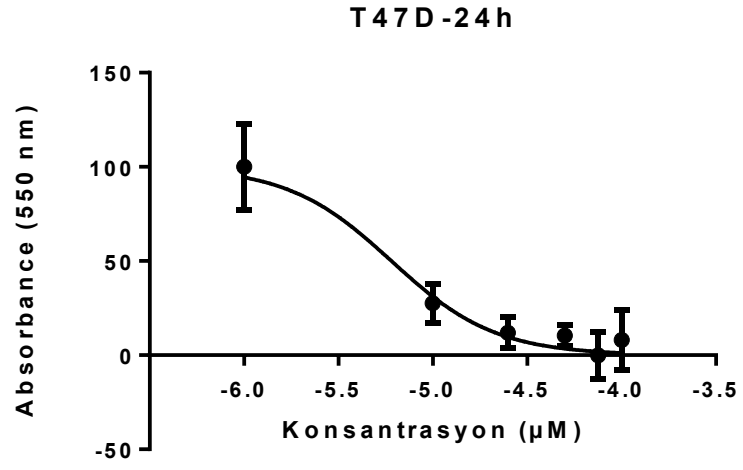
Tablo 6.5. SGK669 nolu bileşğin farklı konsantrasyonlarda, MCF10A hücre hattı ile 24 saat etkililişimi sonrası GraphPad Prism7’den elde edilen analiz sonuçları.

Nonlin fit	SGK669-24h-MCF10A
log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope	
Best-fit values	
LogIC50	-4,559
HillSlope	-1,858
IC50	0,00002758
Std. Error	
LogIC50	0,1407
HillSlope	1,027
95% Confidence Intervals	
LogIC50	-4,861 to -4,258
HillSlope	-4,061 to 0,3452
IC50	1,377e-005 to 5,526e-005
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	14
R square	0,5302
Absolute Sum of Squares	17764
Sy.x	35,62
Number of points	
Analyzed	16

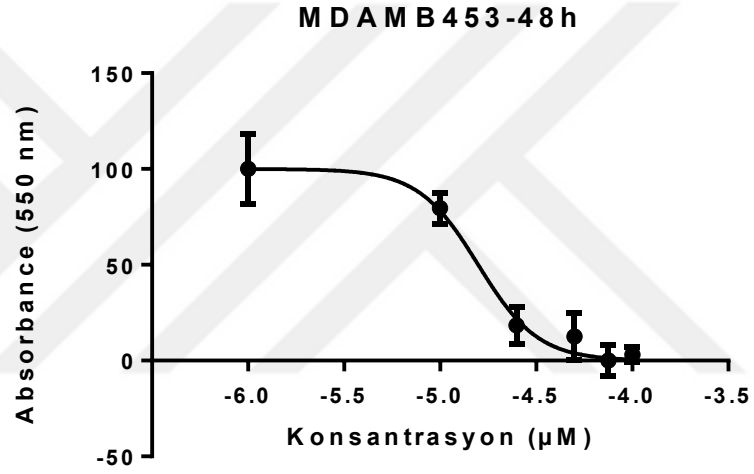
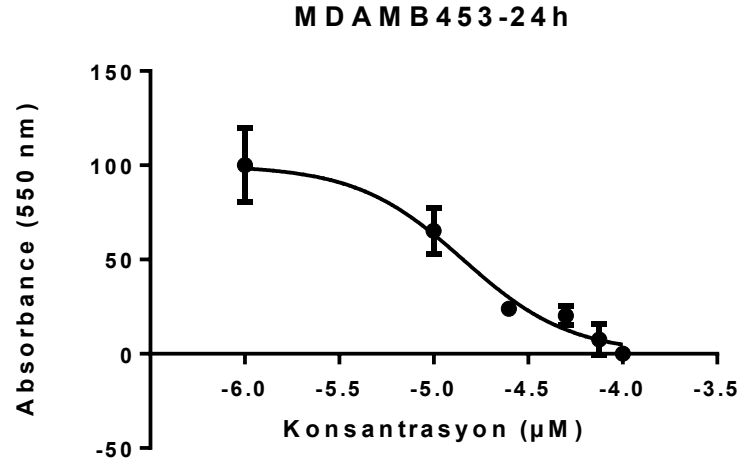
Tablo 6.6. SGK669 nolu bileşimin farklı konsantrasyonlarda, MCF10A hücre hattı ile 48 saat etkililiğini sonrası GraphPad Prism7’den elde edilen analiz sonuçları.

Nonlin fit	
log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope	
Best-fit values	
LogIC50	-4,521
HillSlope	-1,399
IC50	0,00003013
Std. Error	
LogIC50	0,1443
HillSlope	0,6501
95% Confidence Intervals	
LogIC50	-4,827 to -4,215
HillSlope	-2,777 to -0,02102
IC50	1,490e-005 to 6,093e-005
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	16
R square	0,5137
Absolute Sum of Squares	16744
Sy.x	32,35
Number of points	
Analyzed	18

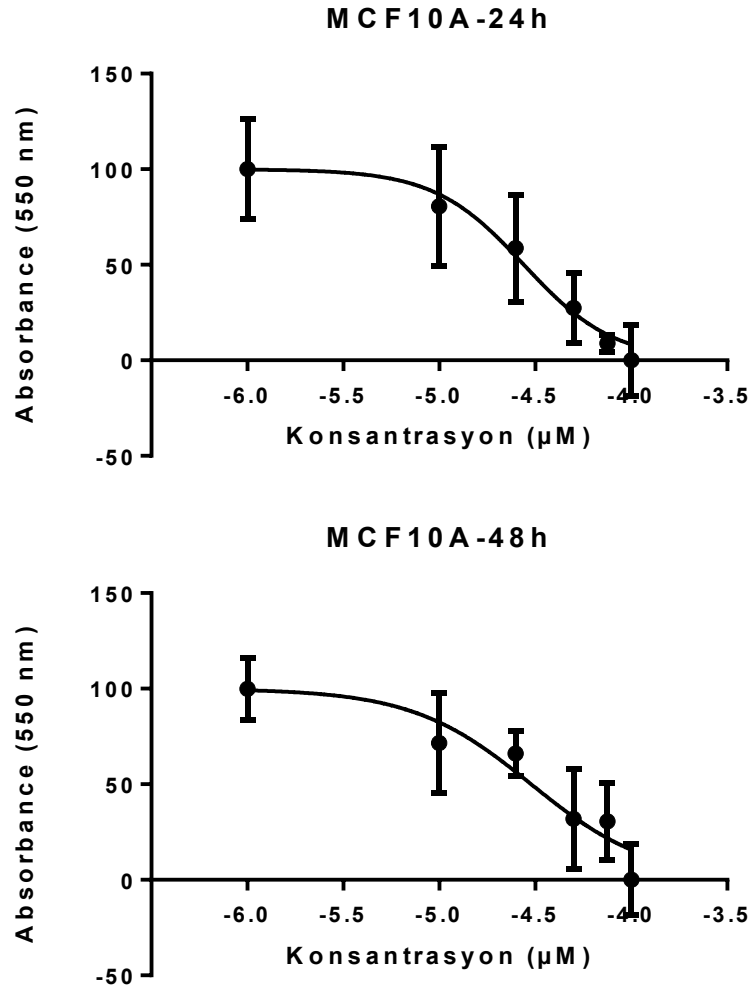
Bu verilerden yola çıkarak elde edilen canlılık oranları değişimleri Şekil 6.1, 6.2 ve 6.3’deki grafiklerde gösterilmektedir. Elde ettiğimiz istatistiksel bilgilere dayanarak SGK669 nolu bileşimin %50 inhibisyon konsantrasyonları sırasıyla; T47D hücre hattı 24 saat için 6 μ M ve 48 saat için 15 μ M, MDA-MB-453 hücre hattı 24 saat için 13 μ M ve 48 saat için 15 μ M, MCF10A hücre hattı 24 saat için 27 μ M ve 48 saat için 30 μ M olarak belirlenmiştir.



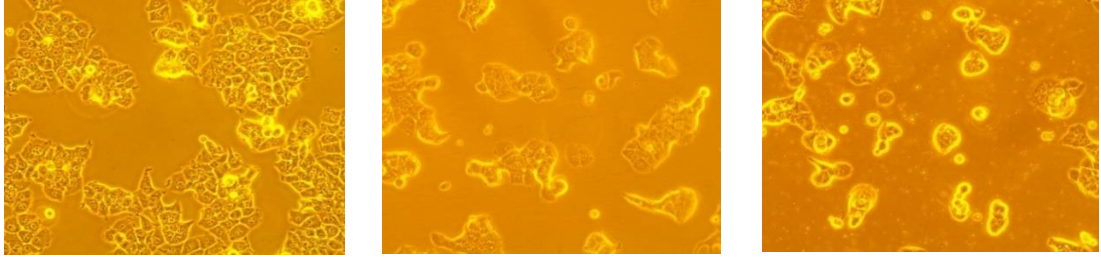
Şekil 6.1. SGK669 nolu bileşiğin farklı konsantrasyonlarda T47D meme kanseri hücre hattı ile 24 ve 48 saat etkileşime girmesi sonucu canlılık oranındaki değişimi.



Şekil 6.2. SGK669 nolu bileşiğin farklı konsantrasyonlarda, MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattı ile 24 ve 48 saat etkileşime girmesi sonucu canlılık oranındaki değişimi.



Şekil 6.3. SGK669 nolu bileşiğin farklı konsantrasyonlarda, MCF10A meme epiteli hücre hattı ile 24 ve 48 saat etkileşime girmesi sonucu canlılık oranındaki değişimi.

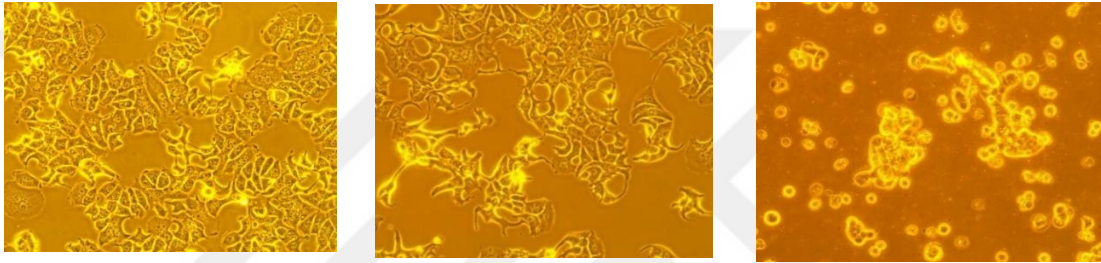


Kontrol

20 µM

50 µM

Resim 6.1. T47D İnsan meme kanseri hücre hattı; 24 saat SGK669 inkübasyonu sırasıyla, kontrol, 20 µM, 50 µM.

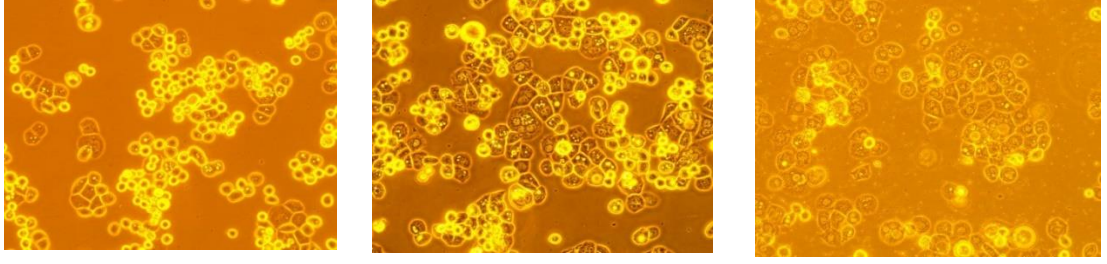


Kontrol

20 µM

50 µM

Resim 6.2. T47D İnsan meme kanseri hücre hattı; 48 saat SGK669 inkübasyonu sırasıyla, kontrol, 20 µM, 50 µM

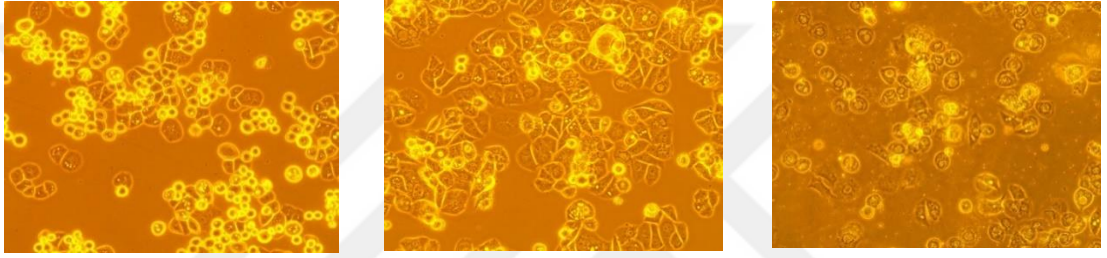


Kontrol

20 µM

50 µM

Resim 6.3. MDA-MB-453 İnsan meme kanseri hücre hattı; 24 saat SGK669 inkübasyonu sırasıyla, kontrol, 20 µM, 50 µM



Kontrol

20 µM

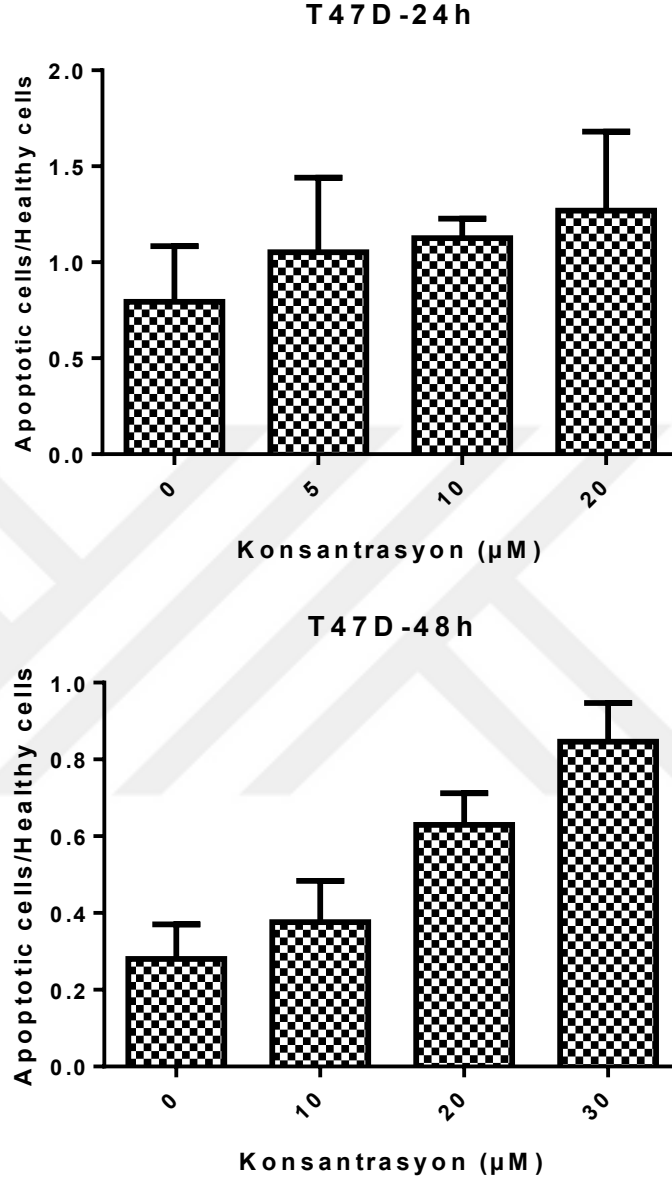
50 µM

Resim 6.4. MDA-MB-453 İnsan meme kanseri hücre hattı; 48 saat SGK669 inkübasyonu sırasıyla, kontrol, 20 µM, 50 µM

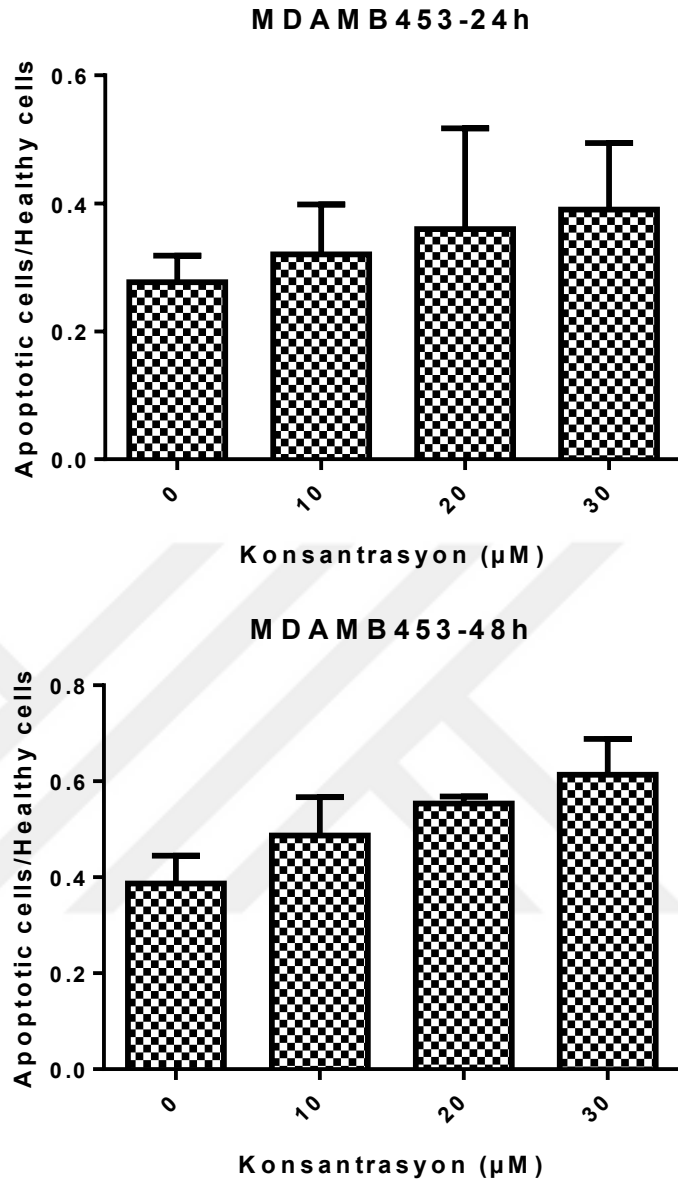
6.2. Apoptoz miktarlarının belirlenmesi

6.2.1. Mitokondriyal membran potansiyel deneyi

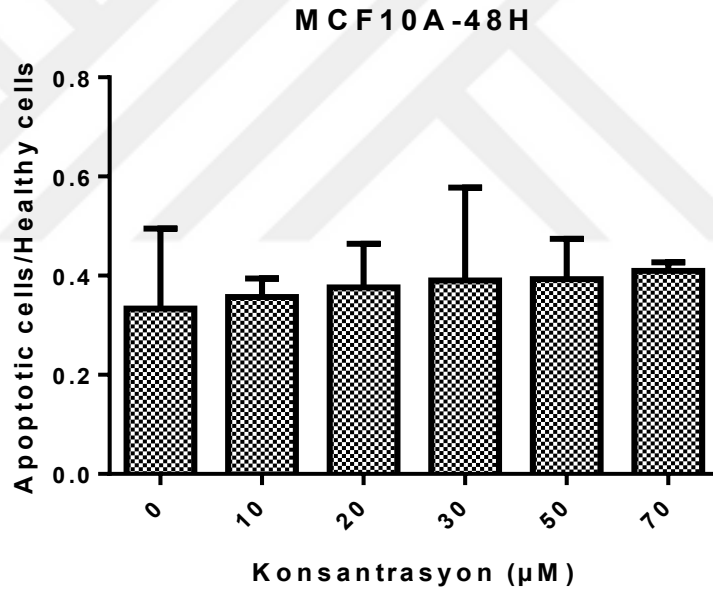
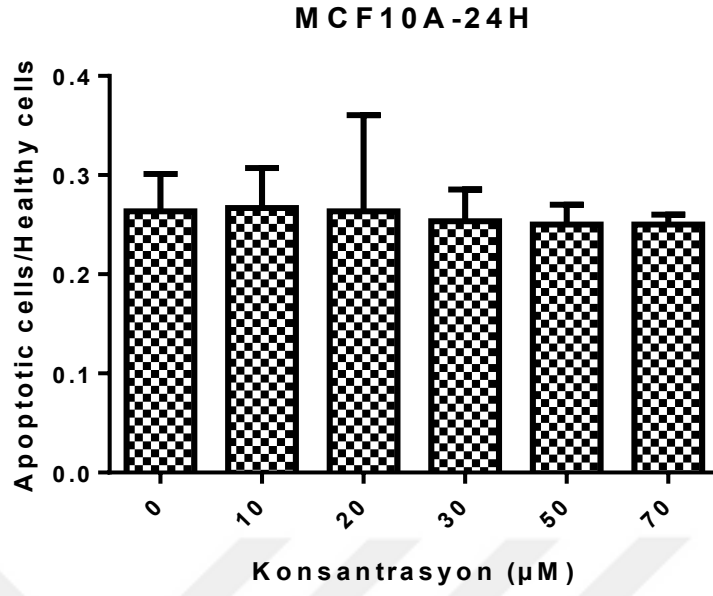
SGK669 nolu bileşimin, T47D, MDA-MB-453 ve MCF10A hücre hatlarında, 24 ve 48 saat uygulanması sonucu mitokondriyal membran potansiyeli deneyi yapıldı. Uygulama sonrasında Elisa Reader'da canlı hücrelerin floresans yoğunluğunu belirlemek için 535 nm ve 595 nm, apoptotik hücrelerin floresans yoğunluğunu belirlemek için ise 485 nm ve 535 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Elde edilen verilere göre maddelerin artan konsantrasyonları ve uygulama sürelerine bağlı olarak mitokondriyal membran potansiyelinde azalma gözlemlenmiştir. Belirlenen IC50 dozlarında, SGK669 nolu bileşimin T47D hücre hattında 24 saat için %48 ve 48 saat için %56, MDA-MB-453 hücre hattında 24 saat için %12 ve 48 saat için %23 mitokondriyal membran potansiyeli azalmasına yol açtığı gözlemlenmiştir. Sonuçlar Şekil 6.4, 6.5 ve 6.6'da gösterilmiştir.



Şekil 6.4. SGK669 nolu bileşiğin T47D hücreleriyle 24 ve 48 saat etkileşimi sonucu artan konsantrasyonlara bağlı mitokondriyal membran potansiyel değişimi.



Şekil 6.5. SGK669 nolu bileşiğin, MDA-MB-453 hücreleriyle 24 ve 48 saat etkileşimi sonucu artan konsantrasyonlara bağlı mitokondriyal membran potansiyel değişimi.



Şekil 6.6. SGK669 nolu bileşiğin, MCF10A hücreleriyle 24 ve 48 saat etkileşimi sonucu artan konsantrasyonlara bağlı mitokondriyal membran potansiyel değişimi.

6.2.2. Annexin V/PI deneyi

SGK669 nolu bileşimin T47D ve MDA-MB-453 hücre hatlarına 24 saat ve 48 saat uygulanması sonucu apoptoz oluşumu Annexin V/PI analiziyle de test edildi. Uygulama sonrasında Tali görüntü tabanlı sitometre kullanılarak canlı, ölü ve apoptotik hücre yüzdeleri belirlendi. Elde edilen verilere göre maddelerin artan konsantrasyonları ve uygulama sürelerine bağlı olarak apoptoz yüzdelerinde artış gözlemlendi. Sonuçlar Tablo 6.7 ve Tablo 6.8’de gösterilmiştir.

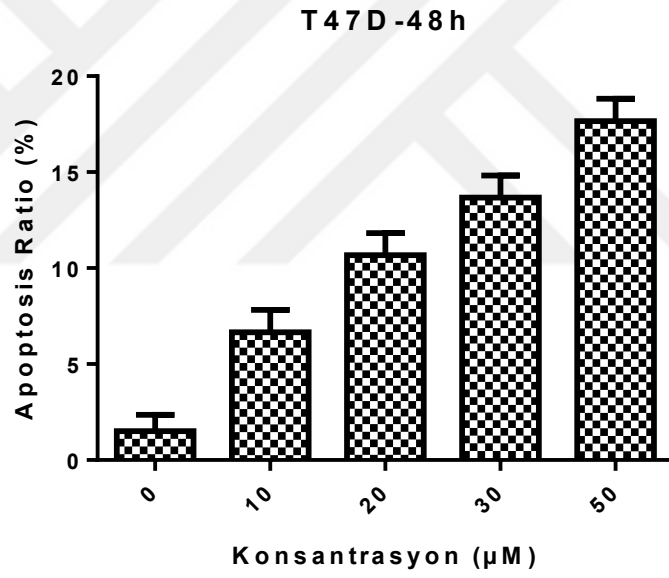
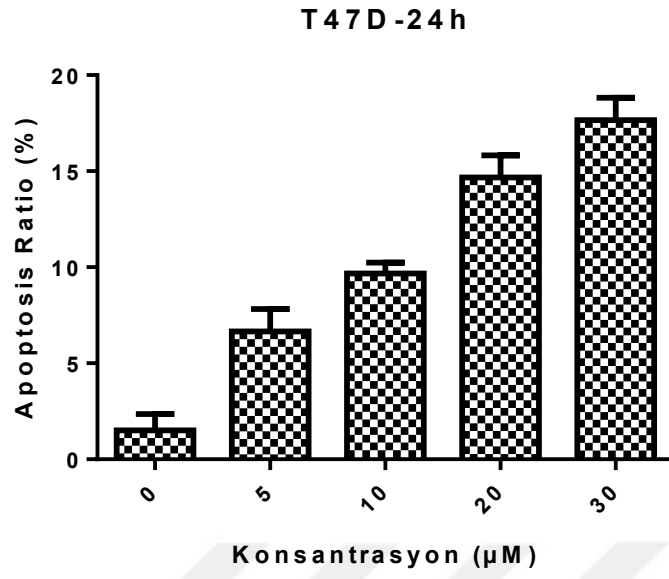
Tablo 6.7. SGK669 nolu bileşimin T47D hücreleriyle 24 ve 48 saat etkilşimi sonucu canlı ve apoptotik hücrelerin yüzde değerleri.

SGK669	Kontrol	5 µM	10 µM	20 µM	30 µM
Canlı (24h)	88%	73%	68%	61%	27%
Apoptotik(24h)	2%	6%	10%	14%	17%
SGK669	Kontrol	10 µM	20 µM	30 µM	50 µM
Canlı(48h)	89%	86%	59%	25%	29%
Apoptotik(48h)	2%	6%	10%	13%	17%

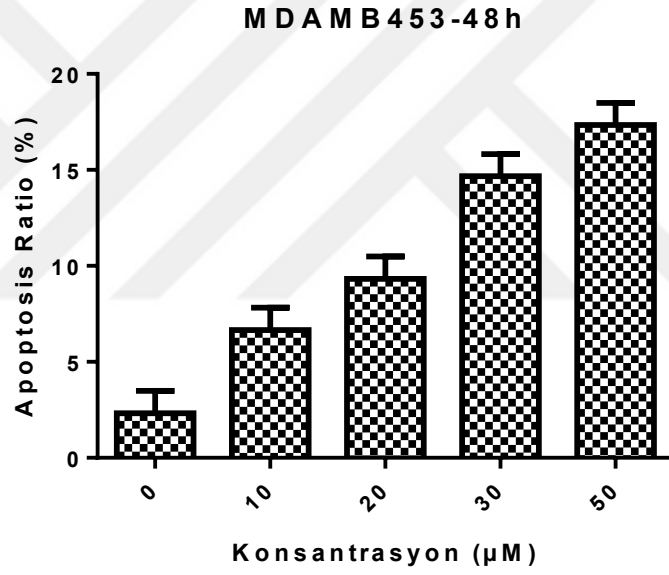
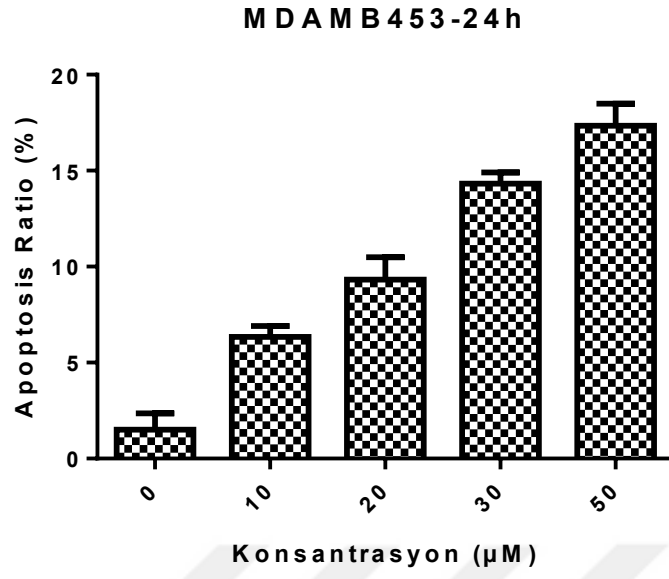
Tablo 6.8. SGK669 nolu bileşimin MDA-MB-453 hücreleriyle 24 ve 48 saat etkilşimi sonucu canlı ve apoptotik hücrelerin yüzde değerleri.

SGK669	Kontrol	10 µM	20 µM	30 µM	50 µM
Canlı (24h)	94%	85%	76%	66%	32%
Apoptotik(24h)	2%	6%	10%	14%	18%
SGK669	Kontrol	10 µM	20 µM	30 µM	50 µM
Canlı(48h)	93%	87%	81%	37%	45%
Apoptotik(48h)	3%	6%	10%	14%	17%

Bu verilerden yola çıkarak elde ettiğimiz istatistiksel verilere dayanarak, SGK669 nolu bileşimin farklı konsantrasyonlardaki apoptotik etkisi, belirlenen IC50 dozlarında, T47D hücre hattında 24 saat için %16 ve 48 saat için %16, MDA-MB-453 hücre hattında 24 saat için %15 ve 48 saat için %15 olarak gözlemlenmiştir. Sonuçlar Şekil 6.7 ve Şekil 6.8’de gösterilmiştir.

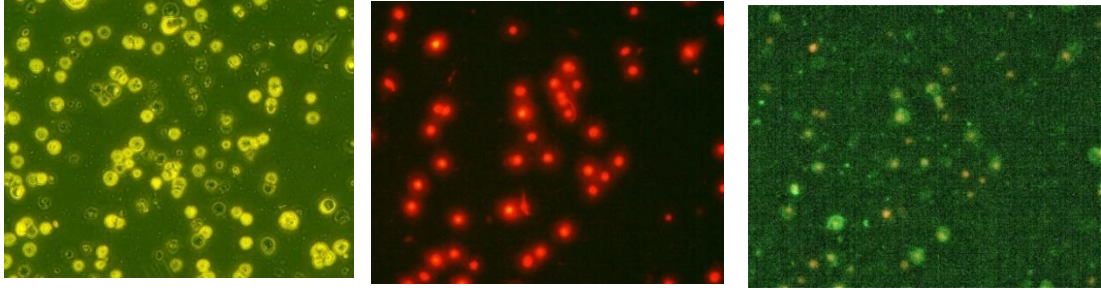


Şekil 6.7. SGK669 nolu bileşimin T47D hücreleriyle 24 ve 48 saat etkileşimi sonucu artan konstrasyonlara bağlı olarak apoptoz değişimi.



Şekil 6.8. SGK669 nolu bileşiğin, MDA-MB-453 hücreleriyle 24 ve 48 saat etkileşimi sonucu artan konsantrasyonlara bağlı olarak apoptoz değişimi.

SGK669 nolu bileşimin T47D ve MDA-MB-453 hücreleri üzerindeki etkisi ayrıca floresan mikroskop kamerasıyla incelendi. Yeşil boyanan hücrelerin apoptoza, kırmızı boyanan hücrelerin ise nekroza gittiği Resim 6.5’de gösterilmiştir.



20 μ M hücre görüntüsü

20 μ M nekroz görüntüsü

20 μ M apoptoz görüntüsü

Resim 6.5. T47D insan meme kanseri hücre hattında 24 saat, 20 μ M SGK669 konsantrasyonu uygulaması sonrası hücrelerin floresans mikroskobu ile görüntülenmesi. Kontrol, Nekroz, Apoptoz görüntüleri.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ülkemizde kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ikinci sıraya yükselen kanser, çevresel (kimyasal, radyasyon, virüsler gibi) ve organizmadan kaynaklanan nedenler (hormonal, bağışıklık bozuklukları, kalıtsal mutasyonlar ve diğer genetik nedenler gibi) ile birlikte ortaya çıkarken ardışık hücreleri de etkileyerek uzak organlarda metastaza da (yayılma) sebep olabilmektedir. Anormal hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve yayılması olarak tanımlanan kanser, günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. Dünyada ve ülkemizde kanser vakalarının hızla artması ve ölüm sebepleri arasında ilk sıralarda yer alması, bu konuda yeni ilaçların ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi konusunda daha fazla çalışma yapılması gerektiğini göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün güncel verilerine göre Türkiye'de meme kanseri insidansı akciğer kanserinden sonra gelen en ölümcül kanser türüdür. Bu yüksek insidansı sebebiyle çalışmamızda SGK 669 nolu bileşimimizle etkileşimde, insan meme kanseri metastatik karsinomu (MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattı), insan meme kanseri invaziv duktal karsinomu (T47D meme kanseri hücre hattı) ve insan tümörigenik olmayan epitel hücrelerini (MCF-10A meme epitel hücre hattı) kullanılmasına karar verilmiştir.

Steroid olmayan anti-enflamatuar ilaçlar (NSAID'ler), enflamatuar durumların tedavisi için yaygın olarak kullanılan ilaç çeşitlerinden biridir ve birçok kanser türünün önlenmesinde ve tedavisinde oldukça etkili olduğu bilinmektedir. Ağrı, ateş ve inflamasyonun hafifletilmesinde çok etkilidirler. NSAID'ler, araşidonik asidin prostaglandinlere ve tromboksanlara dönüşümünü katalize eden bir enzim olan siklooksijenazın inhibisyonu yoluyla antienflamatuar etkilerini gösterir (Elsaman ve ark., 2016). Bununla birlikte, NSAID'lerin siklooksijenaz (COX) inhibisyonundan kaynaklanan toksisitesi ve fizyolojik açıdan önemli prostaglandinleri baskılaması kanser kemopreventi için kullanımlarını sınırlamış, araştırmacıları gastrointestinal ve kardiyovasküler koruyucu özelliği gelişmiş bir anti-kanser aktivitesi olan NSAID türevlerini elde etmek için yapılarını manipüle etmeye teşvik etmiştir..

Non-steroidal antiinflamatuvar etkinliği olduğu bilinen (+)-2-(6-Metoksi-2-naftil) propionik asit (Naproksen)'in, insan göğüs kanserinde (MCF-7), (MDA-MB-231) (Deb ve ark., 2014), mesane kanserinde (Kim ve ark., 2014), kolorektal adenokarsinoma (CaCo2), hepatosellüler karsinoma (HepG2), epiteloid serviks karsinoma (Hela), Akciğer karsinoma (A5W9), meme bezi karsinoma (MCF-7) ve epidermoid larenks karsinoma (Hep2) (Motwami ve ark., 2013) hücrelerinde antikanser etkinliği bildirilmiştir. Sıçan mesane kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada naproksen için potansiyel hedef bölgeler belirlenmiştir ve bilgisayar kinaz profillemeye çalışmaları sonucunda fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3-K) naproksen için önemli bir potansiyel bölge olduğu gösterilmiştir. Bu profillemeye çalışması, *in vitro* kinaz çalışmalarıyla desteklenerek, naproksenin fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3-K) ile etkileştiği ve kinaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2014).

Çalışmamızda, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında sentezlenen çeşitli S-naproksen üzerinden türeyen triazol-tiyoeter hibrit moleküllerinden biri olan SGK669 nolu bileşiğin, meme epiteli MCF-10A ve farklı meme kanseri hücre hatlarında kullanılması (T47D, MDA-MB-453) ve yarattığı biyolojik ve antikanser etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. SGK669 nolu bileşiğin farklı konsantrasyonlardaki (10,25,50,75,100 µM) sitotoksik etkisi %50 inhibisyon konsantrasyonları sırasıyla, MCF-10A hücre hattı 24 saat için 27 µM ve 48 saat için 30 µM, T47D hücre hattı 24 saat için 6 µM ve 48 saat için 15 µM, MDA-MB-453 hücre hattı 24 saat için 13 µM ve 48 saat için 15 µM belirlenmiştir. Deb ve ark., MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışmalarda, 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM) naproksen sodyum ve 4 farklı türevinin sitotoksik etkisi araştırılmış, %50 inhibisyon konsantrasyonları (IC50) sırasıyla, MCF-7 hücre hattında 24 saat için naproksen Sodyum 5 mM, 1.türev 1,8 mM, 2.türev 3 mM, 3.türev 10 mM ve 4.türev 2,7 mM, MDA-MB-231 hücre hattında ise 24 saat için Naproksen Sodyum 10 mM, 1.türev 1,6 mM, 2.türev 3 mM, 3.türev 10 mM, 4.türev 5,9 mM olarak belirlenmiştir. Yaptıkları çalışmada Naproksen Sodyum ve türevlerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında önemli miktarda apoptoza yol açtığı ve aynı zamanda kanser hücreleri

üzerinde güçlü anti-inflamatuar ve anti-tümör özelliklerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bizim T47D ve MDA-MB-453 meme kanseri hücre hatlarında elde ettiğimiz sonuçlar Deb ve arkadaşlarının sonuçlarıyla korelasyon taşımaktadır. Bizim kullandığımız türevler çok daha düşük dozlarda (20-30 μM) etkili olmuş ; saptanan apoptoz miktarı ise 4.türev için MDA-MB-231 meme kanseri hücresinde belirledikleri dozda (6 mM) yaptıkları apoptoz deneyinde elde edilen değerlere yakın bulunmuştur (4 saat için yaklaşık %20, 24 saat içinde yaklaşık %10 hücre canlılık oranı) (Deb ve ark., 2014).

Naproksenin doğal formuyla yapılan çalışmalar da çeşitlilik göstermektedir. Kim ve ark., UM-UC-5 ve UMUC-14 mesane kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışmada, 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0 mM, 0.5 mM, 1 mM 2 mM) Naproksenin sitotoksik etkisini incelemiş, UM-UC-5 hücre hattı; 24 saat için %40, UMUC-14 hücre hattı; 24 saat için %30 hücre canlılığında azalma gözlemlemişlerdir. Ayrıca Naproksen için belirledikleri dozlarda (0 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM) apoptoz deneyi yapmışlar ve sırasıyla UM-UC-5 hücre hattı; 24 saat için %10, UMUC-14 hücre hattı; 24 saat için %6 oranlarında apoptoz gözlemlemişlerdir. Aynı grup ayrıca naproksenin *in vivo* olarak anti-üriner mesane kanseri etkilerine de sahip olduğunu göstermişlerdir. (Kim ve ark., 2014). Motwami ve ark., da kolorektal adenokarsinoma (CaCo2), hepatosellüler karsinoma (HepG2), epiteloid serviks karsinoma (Hela), Akciğer karsinoma (A5W9), meme bezi karsinoma (MCF-7) ve epidermoid larenks karsinoma (Hep2) hücre hatları üzerinde yaptıkları çalışmada, belirledikleri dozlardaki Naproksenin 24, 48, 72, 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlardaki (10 nM, 100 nM, 1000 nM, 10 000 nM) sitotoksik etkisini, CaCo2 hücre hattı; 72 saat için 4,14 μM , 96 saat için 3,79 μM , HepG2 hücre hattı; 72 saat için 4,54 μM , 96 saat için 3,91 μM , MCF7 hücre hattı; 72 saat için 4,56 μM , 96 saat için 3,81 μM , Hela hücre hattı için; 72 saat için 4,30 μM , 96 saat için 3,91 μM , A5W9 hücre hattı; 72 saat için 4,30 μM , 96 saat için 2,58 μM , Hep2 hücre hattı; 72 saat için 4,40 μM , 96 saat için 4,14 μM olarak belirlemişlerdir. Ayrıca, her grubun en yüksek konsantrasyon aralığını hücrelere 96 saat uygulayarak kanser hücre hatlarında apoptoz gözlenlemişlerdir. Çalışmalarında, Naproksenin kanser hücre hatlarına karşı antikanser etkilere sahip olduğunu belirlemişlerdir (Motwami ve ark, 2013).

Çalışmamızda, naproksen türevi SGK669 nolu bileşiğinin belirlenen IC50 dozlarında mitokondriyal membran potansiyeli değerlerinde T47D hücre hattı 24 saat ve 48 saat inkübasyonu ile sırasıyla %48 ve %56, MDA-MB-453 hücre hattıyla 24 saat ve 48 saat inkübasyonu %12 ve %23 azalma gözlenmiştir. Annexin V/PI deneyleri sonucunda ise belirlenen IC50 dozlarında, SGK669 nolu bileşiğin, T47D hücre hattı için sırasıyla 24 ve 48 saat için %16 ve 48 saat için %16, MDA-MB-453 hücre hattı 24 saat için %15 ve 48 saat için %15 oranlarında apoptoz gözlenmiştir.

Kontrol grubu meme epiteli hücre hattı (MCF-10A) üzerinde yapılan hücre canlılığı (MTT) ve mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) deneylerinden, hücre canlılığı %50 inhibisyon konsantrasyonları sırasıyla 24 saat için 27 µM ve 48 saat için 30 µM olarak belirlenmiş, kanser hücre hatlarına karşı absorban değerleri ve grafikleri baz alınacak olursa hücre canlılığında önemli bir azalış görülmemiştir. Benzer olarak belirlenen IC50 dozlarından yola çıkılarak yapılan mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) deneylerinden mitokondriyal membran potansiyelinde önemli değişimler gözlenmemiştir.

Bu araştırma sonucunda, SGK669 nolu bileşiğin, T47D, MDA-MB-453 hücre hatlarında doza bağlı olarak apoptotik etkiyi arttırıcı ve çoğalmayı önleyici etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu araştırma, Dünya’da ve Türkiye’de ölüm oranının yüksek olduğu meme kanserinde etkili bir tedavi yönteminin bulunmasına katkı sağlayacaktır. Çalışmamız, *in vivo* ortamda yapılacak olan çalışmalar için öncülük etmektedir. Yapılması planlanan *in vivo* çalışmalardan elde edilecek sonuçlarla SGK 669 bileşiğinin meme kanserinde antitümör ajanı olarak etki potansiyeli belirlenecektir.

8. KAYNAKLAR

Avorn J. Keeping science on top in drug evaluation. *N Engl J Med.* 2007 Aug 16;357(7):633–635.

Baldassari F, Zerbinati C, Galasso M, Corrà F, Minotti L, Agnoletto C, Previati M, Croce CM and Volinia S. Screen for MicroRNA and Drug Interactions in Breast Cancer Cell Lines Points to miR-126 as a Modulator of CDK4/6 and PIK3CA Inhibitors. *Frontiers in Genetics.* 2018 May 18;9(174):1-11.

Behroozeh A, Tabrizi MM, Kazemi SM, Choupani E, Kabiri N, Ilbeigi D, Nasab AH, Khiyavi AA, Kurdi AS. Evaluation the Anti-Cancer Effect of PEGylated Nano-Niosomal Gingerol, on Breast Cancer Cell lines (T47D), In-Vitro. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018 May 2;19 (3):645-648.

Deb J, Majumder J, Bhattacharyya S and Jana SS. A novel naproxen derivative capable of displaying anti-cancer and anti-migratory properties against human breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2014, 14(567):1471-2407.

Domvri K, Zarogoulidis P, Darwiche K, et al. Molecular targeted drugs and biomarkers in NSCLC, the evolving role of individualized therapy. *Journal of Cancer.* 2013 Nov 23;4(9):736-754.

Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495-516.

Elsaman T, Ali MM, Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) Derivatives with Anti-Cancer Activity. *American Journal of Research Communication.* 2016: Vol 4(4). ISSN: 2325-4076.

Ferlay J, M Colombet, I Soerjomataram, C Mathers, DM. Parkin, M Piñeros, A Znaor and F Bray. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer:* 144, 1941–1953 © 2018 UICC.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers CD, Parkin D. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer.* 2010;127:2893–2917.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 2015;136:359–386.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.

Gutierrez C, Schiff R. HER2: biology, detection, and clinical implications, *Arch. Pathol. Lab Med.* 2011 Dec 19;135(1):55-62.

Hasson SS, Al-Shubi ASH, Al-Busaidi JZ, Al-Balushi MS, Hakkim FL, Rahan L, Aleemallah GM, Al-Jabri AA. Potential of Aucklandia Lappa Decne Ethanolic Extract to Trigger Apoptosis of Human T47D and Hela Cells, *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018 June 21;19(7):1917-1925.

Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* 2002 Feb 1; 277(5):3247–3257.

Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi Y-L, Girard L, et al. Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. *PLoS ONE* 4(7): e6146.

Khawaled S, Aqeilan RI. RUNX1, a new regulator of EMT in breast cancer. *Oncotarget.* 2017 Feb 20; 8(11):17407-17408.

Kim MS, Kim JE, Lim DY, Huang Z, Chen H, Langfald A, Lubet RA, Grubbs CJ, Dong Z, and Bode AM. Naproxen induces cell cycle arrest and apoptosis in human urinary bladder cancer cell lines and chemically induced cancers by targeting PI3-K. *Pathol. Lab Med.* 2014 Feb; 7(2):236-245.

Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Levin TR, Pickhardt P, Rex DK, Thorson A, Winawer SJ. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the

US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology*, CA Cancer J Clin. 2008;(58):130–160.

Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res*. 1994 Jun 15;54:3131–3135.

Mondal S, Bhattacharya K, Mallick A, Sangwan R, Mandal C. Bak Compensated for Bax in p53-null Cells to Release Cytochrome c for the Initiation of Mitochondrial Signaling during Withanolide D-Induced Apoptosis. *PLoS ONE*. 2012 Mar 29;7(3) 34277.

Motawi TMK, Bustanji Y, EL-Maraghy S, Taha MO, and Al-Ghoussein MAS. Evaluation of naproxen and cromolyn activities against cancer cells viability, proliferation, apoptosis, p53 and gene expression of survivin and caspase-3. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2013 Jan 24;29(2):153-61.

Perou CM, Sùrlie T, Eisen MB, Rijn MVDR, Jeffreyk SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge E, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lunning PE, Bùrresen-Dale AL, Brown PO and Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 May 24;406:747–752.

Perumalsamy H, Sankarapandiana K, Kandaswamyb N, Balusamyc SR, Periyathambid D, Raveendirane N. Cellular effect of styrene substituted biscoumarin caused cellular apoptosis and cell cycle arrest in human breast cancer cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2017 Sep 24;92:104–114.

Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health*. 2016 Sep;4(9):e609-16. doi: 10.1016/S2214-109X(16)30143-7.

Sakamuru S, Attene-Ramos MS, Xia M. Mitochondrial membrane potential assay. *Methods Mol Biol*. 2016; 1473:17-22.

Shrivastava R, Trivedi S, Singh PK, Asif M, Chourasia M K, Khanna A, Bhadauria S. Design and development of PEGylated liposomal formulation of HER2 blocker

Lapatinib for enhanced anticancer activity and diminished cardiotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018 Jun 12; 503:677-683.

Sørli, T, Perou CM, Tibshirani R, Aas, T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisenh MB, Rijn MVD, Jeffreyj SS, Thorsenk T, Quistl H, Matesec JC, Brownm PO, Botsteinc D, Lønningg PE and Børresen-Daleb AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*. 2001 Sep 11; 98(19):10869-10874.

Soule H, McGrath CM. Immortal human mammary epithelial cell lines 1991.

Stewart BW, Wild CP. *World cancer report 2014* Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014.

Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report*. 1st ed. Lyon; 2014:15-16.

Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report*. 1st ed. Lyon; 2014:81-82.

Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report*. 1st ed. Lyon; 2014:183-184.

Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report*. 1st ed. Lyon; 2014:361-362.

Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report*. 1st ed. Lyon; 2014:362-363.

Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report*. 1st ed. Lyon; 2014:363-364.

Tavasolli FA, D.P., *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of the Breast and Female Genital Organs*. . Lyon IARC Press, 2003: p. 9-113.

Teodoro JS, Palmeira CM, Rolo AP. Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi$) Fluctuations Associated with the Metabolic States of Mitochondria. *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols* *Methods in Molecular Biology*. 2018.

Trelle S, Reichenbach S, Wandel S, Hildebrand P, Tschannen B, Villiger PM, Egger M, Jüni P. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *BMJ*. 2010 Oct 08;342:7086.

Wang T, Ha M. Silencing ARHGAP9 correlates with the risk of breast cancer and inhibits the proliferation, migration, and invasion of breast cancer. *J Cell Biochem.* 2018 May 4;1-10.



9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Ozan	Soyadı	Çuhadar
Doğum Yeri	Altındağ	Doğum Tarihi	15.05.1991
Uyruğu	T.C.	Tel	05375810174
E-mail	ozan_cuhadar@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi	2019
Lisans	Gazi Üniversitesi	2015

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Kabin Memuru	Türk Hava Yolları	2020-
Kalite ve Regülasyon Uzman Yardımcısı	KRM Yönetim Danışmanlık A.Ş.	2016-2017

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FC E	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Çalıştığı Projeler

Katıldığı Kongreler/ Posterler/ Sözlü Sunumlar

1. Cell Death Symposium 2019, İstanbul, 3-5 October 2019

10. EKLER

EK-I Kongre Bildirisi



CELL DEATH SYMPOSIUM 2019

www.celldeathsymposium2019.com

Cell Death: Degeneration and Regeneration

ABSTRACT BOOK

ISBN: 978-605-63544-8-9



03-05 OCTOBER 2019 | MARMARA UNIVERSITY BASIBUYUK CAMPUS · ISTANBUL

ANTI-CANCER EFFECT OF TRIAZOLE-THIOETHER HYBRID MOLECULE DERIVED FROM 5-NAPROXEN (SGK669) COMPOUND ON T47D AND MDA-MB-453 HUMAN BREAST CANCER CELL LINES

Ozan Çuhadar¹, Pınar Mega Tiber¹, Dya Orun¹, Kaan Birgül^{1,2}, Ş.Güniz Küçükgüzel³

¹Marmara University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Bağbüzük, Istanbul, Turkey

²Marmara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Haydarpaşa, Istanbul, Turkey

³Aitınbaşı University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, 34144, Bakırköy, Istanbul, Turkey

Cancer is an important problem of modern medicine as the most common cause of death after cardiovascular diseases (1). In recent years, significant toxicity and drug resistance have emerged with anticancer treatments. The search for drugs that can induce apoptosis in cancer cell lines and delay tumor growth has taken its place as one of the most effective treatment methods. Naproxen, known to have nonsteroidal antiinflammatory activity, is used in human breast cancer (2), bladder cancer (3), colorectal adenocarcinoma (CoCo2), hepatocellular carcinoma (HepG2), epitheloid cervical carcinoma (Hela), Lung carin (A549), mammary gland carcinoma and epidermoid larynx carcinoma (Hep2) (4) cells have been reported to have anticancer activity. In this study, we aimed to determine the anticancer and biological effects of triazole-thioether hybrid molecule derived from 5-Naproxen, SGK669, which was synthesized in Marmara University Faculty of Pharmacy Department of Pharmaceutical Chemistry on different breast cancer cell lines T47D, MDA-MB-453. T47D and MDA-MB-453 cell lines were cultured in RPMI and DMEM medium in 5% CO₂ at 37°C with different concentrations of SGK669 (10-25-50-75-100µM) for 24 and 48 hours. Growth inhibition of the compound was evaluated by the MTT test. The IC₅₀ value 6 µM, 13 µM and 13 µM, 15 µM following 24 and 48h for T47D cell line and MDA-MB-453 cell line, respectively. The apoptotic effects of different concentrations of compound (SGK 669) on T47D and MDA-MB-453 cells were determined by the JCL-Mitochondrial Membrane Potential kit and the Tali Annexin-PI Apoptosis kit assays. Our results show that SGK669 inhibits cell viability and apoptosis was induced by SGK669 in a concentration-dependent manner.

Keywords: Naproxen, Breast Cancer, T47D, MDA-MB-453, Cytotoxicity, Apoptosis

