ÖSTROJEN RESEPTÖR MODÜLATÖRÜ TAMOKSİFEN VE 2-BENZOFURAN BAĞLI KALKON KOMPLEKS KOMBİNASYONUNUN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE ANTİKANSER ETKİ VE MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

İpek AYDIN

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÖSTROJEN RESEPTÖR MODÜLATÖRÜ TAMOKSİFEN VE 2-BENZOFURAN BAĞLI KALKON KOMPLEKS KOMBİNASYONUNUN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE ANTİKANSER ETKİ VE MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

İpek AYDIN

0000-0001-5727-9928

Prof. Dr. Ferda ARI
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2025
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans

ÖSTROJEN RESEPTÖR MODÜLATÖRÜ TAMOKSİFEN VE 2-BENZOFURAN BAĞLI KALKON KOMPLEKS KOMBİNASYONUNUN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE ANTİKANSER ETKİ VE MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

İpek AYDIN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ferda ARI

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında en yaygın görülen malignitedir. Çeşitli kemoterapi ajanlarının yaygın kullanımına rağmen, daha etkili ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi kritik öneme sahiptir. Östrojen reseptör inhibitörü olan tamoksifen, meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır; ancak gelişen direnç ve sınırlayıcı etkisi önemli sorunlar oluşturmaktadır. Normal hücrelere zarar vermeden sadece kanser hücrelerini hedefleyebilen yeni antikanser moleküllerinin belirlenmesi gerekmektedir. Doğal olarak bitkilerde bulunan kalkon türevleri, kemoterapötiklerin repertuarını zenginleştirmek için önemli bir ilham kaynağıdır. Kalkonların doğal ya da sentetik türevleri anti-kanser özellikleri açısından detaylı bir şekilde araştırılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, 2-benzforuan bağlı kalkon kompleksi ve östrojen reseptör inhibitörü tamoksifenin kombinasyonundan oluşan yeni tedavi yaklaşımının MCF-7 meme kanseri hücrelerinde antikanser aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. 2-benzofuran bağlı kalkon kompleksi, tamoksifen ve kombinasyon tedavisinin hücre canlılığına etkisi SRB yöntemi ile belirlenmiştir. Hücrelerde ölüm modunun (apoptoz/nekroz) belirlenmesi Anneksin-V/Hoechst/Propidyum İyodür üçlü boyama yöntemiyle analiz edilmiştir. Hücre ölümünü doğrulamak için apoptozis, nekroz ve otofaji yollarını hedefleyen inhibitörler Z-VAD-FMK, Nec-1, NSA ve 3-MA kullanılmıştır. Ayrıca kombinasyonun migrasyon, matrijel invazyon ve koloni oluşturma yetenekleri test edilmiştir. Sonuçlar, meme kanseri hücrelerinde 2-benzofuran bağlı kalkon kompleksinin tamoksifen ile kombinasyonunun doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik aktiviteyi arttırdığını ve apoptozu tetiklediğini göstermiştir. Ayrıca kombinasyonun hücre göçünü azalttığı ve koloni oluşturma kapasitesini engellediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar 2-benzofuran bağlı kalkon kompleksi ve tamoksifen kombinasyonunun meme kanseri tedavisinde umut vaat eden etkili bir strateji olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kalkon kompleksi, Tamoksifen, Meme kanseri, Sitotoksisite
2025, xx + 88 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE ANTI-CANCER EFFECTS AND MECHANISMS OF THE ESTROGEN RECEPTOR MODULATOR TAMOXIFEN AND 2-BENZOFURAN-BONDED CHALCONE COMPLEX COMBINATION ON BREAST CANCER CELLS

İpek AYDIN

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ferda ARI

Breast cancer continues to be the most common malignancy among women worldwide. Despite the widespread use of various chemotherapy agents, the development of more effective and targeted treatment strategies is of critical importance. Tamoxifen, an estrogen receptor inhibitor, is widely used in the treatment of breast cancer; however, developing resistance and its limiting effect pose significant problems. It is necessary to identify new anticancer molecules that can target only cancer cells without damaging normal cells. Chalcone derivatives naturally found in plants are an important source of inspiration to enrich the repertoire of chemotherapeutics. Natural or synthetic derivatives of chalcones are being investigated in detail for their anticancer properties.

In this thesis study, it was aimed to evaluate the anticancer activity of a new treatment approach consisting of the combination of 2-benzofuran-linked chalcone complex and estrogen receptor inhibitor tamoxifen in MCF-7 breast cancer cells. The effects of 2-benzofuran-linked chalcone complex, tamoxifen and combination therapy on cell viability were determined by the SRB method. Determination of death mode (apoptosis/necrosis) in cells was analyzed by Annexin-V/Hoechst/Propidium Iodide triple staining method. Inhibitors targeting apoptosis, necrosis and autophagy pathways Z-VAD-FMK, Nec-1, NSA and 3-MA were used to confirm cell death. In addition, migration, matrigel invasion and colony formation abilities of the combination were tested. The results showed that the combination of 2-benzofuran-linked chalcone complex with tamoxifen increased cytotoxic activity and triggered apoptosis in breast cancer cells depending on dose and time. It was also found that the combination reduced cell migration and inhibited colony formation capacity. These results suggest that the combination of 2-benzofuran-linked chalcone complex and tamoxifen may be a promising and effective strategy in the treatment of breast cancer.

Key words: Chalcone Derivatives, Tamoxifen, Breast Cancer, Cytotoxicity
2025, xx + 88 pages.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım boyunca danışmanlığımı yapan, benim için çok değerli olan bilgi ve tecrübeleriyle bana her daim yol gösteren, ilgi ve yardımlarını benden hiç eksik etmeyen, her zaman daha iyi olmam için uğraşan sevgili ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ferda ARI'ya,

Çalışmalarım boyunca bana her konuda yardımcı olan, tüm süreci birlikte yaşayan sorularımı asla yanıtsız bırakmayan, deneyim ve önerilerini paylaşan, beni her zaman destekleyen ve aynı heyecanı benimle paylaşan başta hocam Dr. Sibel ÇINAR ASA, tecrübeleri ile beni her zaman yönlendiren, farklı açılardan bakmamı sağlayan hocalarım Dr. Oğuzhan AKGÜN ve Dr. Emine Gonca TUNA'ya, çalışmalarımda yol gösteren, emeği geçen Bursa Uludağ Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvarı (BUMKAL) üyelerine,

Yüksek lisansım boyunca sıkıştığımda ve daraldığımda benden hiç desteklerini esirgemeyen bana her zaman motive veren, daha güçlü durmamı sağlayan, her düştüğümde kaldıran arkadaşlarım Ayşen SAĞNAK ve Halime Sena EKMEKCİ'ye,

Tez çalışmam boyunca analizini gerçekleştirdiğim bileşiğin sentezini yapan ve kullanım izni veren hocam Sayın Doç. Dr. Demet COŞKUN'a,

Her zaman yanımda olup her türlü sıkışıklık ve yorgunluğuma koşan, teşvik eden, güçlü durmamı sağlayan ve bugüne gelmemde en büyük emeğin sahibi aileme çok teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tez çalışması, FYL-2024-1706 No'lu yüksek lisans tez projesi olarak Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

İpek AYDIN
04/06/2025

İçindekiler

ÖZET....ix
ABSTRACT....x
TEŞEKKÜR....xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ....xiv
1. GİRİŞ…….....1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI....3
2.1. Kanser....3
2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi....6
2.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri....8
2.4. Meme Anatomisi....9
2.5. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırması....10
2.5.1. İnvaziv Olmayan *(in situ)* Karsinom....11
2.5.2 İnvaziv Karsinom....12
2.6. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması....13
2.6.2. Luminal A....14
2.6.3. Luminal B....15
2.6.4. ER....15
2.6.5. PR....16
2.6.6. HER2....16
2.6.7. TNBC....17
2.7. Apoptozis....17
2.7.1. Apoptozisde Kaspazların Görevi....18
2.7.2. Apoptozis Mekanizmaları....19
2.8. Meme Kanserindeki Önemli Sinyal Yolları....21
2.8.1. ER Sinyal Yolağı....21
2.8.2. HER2 Sinyal Yolu....22
2.9. Meme Kanserinde Tedavi Yaklaşımları....23
2.9.1. Cerrahi....23
2.9.2. Radyoterapi....23
2.9.3. Kemoterapi....24
2.9.4. Endokrin Terapi....24
2.10. TAM....24
2.11. Flavonoidler....26
2.12. Kalkonlar....27
2.13. Benzofuranlar....28
2.14. Tez Çalışmasında Kullanılan 2-Benzofuran Bağlı Kalkon Kompleksinin Kimyasal Yapısı....29
3. MATERYAL ve YÖNTEM....30
3.1 Materyal....30
3.1.1. Kimyasal Maddeler....30
3.1.2. Sarf Malzemeler....30
3.1.3. Cihazlar....31
3.1.4. Kitler....31
3.2. Yöntem....32
3.2.6. Kullanılan Kimyasalın ve Kemoterapötik Ajanın Hazırlanması....34
3.2.7. Sülforodamin B (SRB) Hücre Canlılık Yöntemi....34
3.2.8. Üçlü Floresan Boyama....36

3.2.9. İnhibitör Uygulamaları 38
3.2.10. Koloni Oluşturma Testi 40
3.2.11. Migrasyon Analizi 41
3.2.12. Matrigel İnvazyon Analizi 42
3.2.13.İstatiksel Analiz 44
4. BULGULAR 45
4.1. Meme Kanseri ve Sağlıklı Hücrelerin Kültürde Çoğaltılması 45
4.2. SRB Canlılık Analizi 45
4.3. Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri Üzerinde Sebep Olduğu Hücre Ölümü Modunun Belirlenmesi 50
4.4. Z-VAD-FMK Bulguları 52
4.5. Nekrostatin-1 (Nec-1) Bulguları 53
4.6. Nekrosulfonamid (NSA) Bulguları 53
4.7. 3-Metiladenin (3-MA) Bulguları 54
4.8. Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücreleri Üzerinde Koloni Oluşturma Yeteneğine Etkisi 55
4.9. Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerinde Hücre Göçüne (Migrasyon) Etkisinin Belirlenmesi 57
4.10. Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerinde İnvazyon Etkisinin Belirlenmesi 59
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 61
KAYNAKLAR 69
ÖZGEÇMİŞ 87

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
µM	Mikromolar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
ml	Mililitre
µL	Mikrolitre
w/v	Ağırlık/Hacim
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
dk	Dakika
cm^2	Santimetrekare

Kısaltmalar	Açıklama
3-MA	3-Metiladenin
ABD	Amerika Birleşik Devleti
AVEN	Apoptoz ve Kaspaz Aktivasyonu İnhibitörü
Aneksin-V-FITC	Aneksin 5-Floresein İzotiyosinat
BAK	Bcl-2 Antagonist Katili
BAX	Bcl-2 İlişkili X Proteini
BC	Meme Kanseri
BCA	Bikinkoninik Asit Analizi
Bcl-2	B Hücre Lenfoma-2 Proteini
Bcl-W	Bcl-2 Benzeri protein 2
Bcl-XL	B-Hücreli Lenfoma Ekstra Büyük Proteini
BL1	Bazal Benzeri 1
BL2	Bazal Benzeri 2
CD95	Fas Reseptör
CO_2	Karbondioksit
CHOP	DNA Hasarına Neden Olabilen Transkript 3
DCIS	Duktal in situ Karsinoma
DED	Ölüm efektör alanı
DISC	Ölümü İndükleyen Sinyalleme Kompleksi
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium 12
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DR	Ölüm reseptörü
DR3	Ölüm Reseptörü 3
DR4	Ölüm Reseptörü 4
DR5	Ölüm Reseptörü 5
ECM	Ekstraselüler Matriks
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	Östrojen Reseptörü
ERBB2	Reseptör tirozin protein kinaz erbB-2

ERE	Östrojen Tepki Elementi
ERα	Östrojen Reseptörü Alfa
ERβ	Östrojen Reseptörü Beta
FADD	Fas ile İlişkili Ölüm Alanı Proteini
FBS	Fötal Bovin Serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FITC	Floresin İzotiyosiyanat
HeLa	Henrietta Lacks Servikal Hücre Hattı
HER1	Epidermal Büyüme Faktörü 1
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
HER3	Epidermal Büyüme Faktörü 3
IAP	Apoptoz İnhibitörü
IARC	Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IDC	İnvazif Duktal Karsinoma
ILC	İnvazif Lobüler Karsinoma
IM	İmmünomodülatör
IRE1α	İnozitol Gerektiren Kinaz 1 Alfa
JNK	c-Jun NH2- Terminal Kinaz
Ki-67	Hücre Proliferasyon Markırı
LAR	Luminal Androjen Reseptörü
LCIS	Lobüler in situ Karsinoma
MAPK	Mitojen Aktiviteli Protein Kinaz
MCF-10A	Sağlıklı Meme Epiteryal Hücre Soyu
MCF-7	Meme Kanseri Hücre Soyu
MLKL	Psödokinaz gibi Karışık Soy Kinaz Alanı
MSL	Mezenkimal Kök Benzeri
MYC	Transkripsiyon Faktörlerini Kodlayan Düzenleyici Genler
Nec-1	Nekrostatin 1
NOX	NADPH Oksidaz
NSA	Nekrosülfonamid
PBS	Fosfat Tuz Tamponu
PI	Propidyum İyodür
PI3K	Fosfoinositid-3 Kinaz
PR	Progesteron
PS	Fosfodilserin
RIPA	Radio İmmünopresipitasyon Analiz
RIPK1	Reseptörle Etkileşime Giren Serin/Treonin Protein Kinaz 1
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodyum dodeasil sülfat
SEER	Gözetim, Epidemiyoloji ve Sonuçlar Programı
SERD	Seçiçi Östrojen Reseptör İndirgeyicisi
SERM	Seçiçi Östrojen Reseptör Modülatörü
SMAC	İkinci Mitokondri Kökenli Kaspaz Aktivatörü
SRB	Sulforhodamine B
TAM	Tamoksifen
TCA	Trikloroasetik Asit
TL1A	TNF benzeri ligand 1A

TNBC	Üçlü Negatif Meme Kanseri
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TNFR1	Tümör Nekroz Faktörü Reseptör 1
TRADD	Tümör Nekroz Faktörü reseptör tip 1 ile ilişkili ölüm alanı proteini
TRAF2	TNF Reseptörüyle İlişkili Faktör 2
TRAIL-R1	TNF ile ilişkili apoptozis indükleyen ligand reseptörü 1
TRİPSİN-EDTA	Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit
Z-VAD-FMK	Benziloksikarbonil(Cbz)-L-Val-Ala-Asp(Ome)-Fluorometilketon

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1	Kanser Oluşumu ve Yayılımı	3
Şekil 2.2	Kanser hücresinin 14 temel özelliği	4
Şekil 2.3	GLOBOCAN 2022'ye göre dünyada her iki cinsiyette kansere bağlı insidans ve mortalite	5
Şekil 2.4	2022 'de her iki cinsiyet için kanser vakalarının dağılımı	7
Şekil 2.5	Dünyada meme kanseri insidansının varyasyon grafiği	7
Şekil 2.6	Meme kanseri risk faktörleri	9
Şekil 2.7	Memenin bileşenleri	10
Şekil 2.8	Meme kanserinin sınıflandırılması	11
Şekil 2.9	İnvaziv meme karsinomunun temsili morfolojik sınıflandırması: (a) invaziv karsinom NST, (b) klasik lobüler karsinom, (c) tübüler karsinom, (d) mukuslu karsinom, (e) invaziv mikropapiller karsinom (f) pleomorfik lobüler karsinom, (g) medüller karsinom, (h) metaplastik karsinom, (i) adenoid kistik karsinom	13
Şekil 2.10	Meme kanseri alt tipleri	14
Şekil 2.11	Kaspazların sınıflandırılması	19
Şekil 2.12	Apoptozisin ekstrinsik (dışsal) ve intrinsik (içsel) yolağı	21
Şekil 2.13	ER sinyal yolu	22
Şekil 2.14	HER2 sinyal yolu	23
Şekil 2.15	Tamoksifen (TAM) metabolizması	26
Şekil 2.16	Tamoksifenin (TAM) meme kanseri üzerindeki etki mekanizması	26
Şekil 2.17	Flavonoid bileşiğinin kimyasal yapısı	27
Şekil 2.18	Kalkonun yapısı ve numaralandırması	28
Şekil 2.19	Benzofuranların genel yapısı	29
Şekil 2.20	2-Benzofuran bağlı kalkon kompleksinin kimyasal yapısı (GP-16k)	30
Şekil 3.1	Tez çalışmasında kullanılan MCF-7 insan meme kanseri hücre soyunun ATCC'deki faz kontrast mikroskopi görüntüleri	33
Şekil 3.2	Tez çalışmasında kullanılan MCF-10A insan meme hücre soyunun ATCC'deki faz kontrast mikroskopi görüntüleri	33
Şekil 3.3	Sülforodamin B (SRB) testinin deneysel şematik gösterimi	36
Şekil 3.4	Üçlü floresan boyamanın deneysel şematik gösterimi	38
Şekil 3.5	Koloni oluşturma testi analizinin deneysel şematik gösterimi	41
Şekil 3.6	Transwell migrasyon analizinin deneysel şematik gösterimi	43
Şekil 3.7	Matrigel transwell invazyon analizinin deneysel şematik gösterimi	44
Şekil 4.1	Tez çalışmasında kullanılan meme kanseri hücre soyu MCF-7 (4x büyütme oranı) ve sağlıklı meme epitel hücre	46

soyu MCF-10A (10x büyütme oranı) hücrelerinin ışık mikroskopu görüntüleri

Şekil 4.2 Meme kanseri hücre soyu MCF-7 üzerinde GP-16k'nın 24, 48 ve 72 saatlik SRB canlılık analizi sonuçları. * Kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (*p<0,05, ***p<0,01, ***p<0,001). Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma. 47

Şekil 4.3 MCF-7 hücrelerinin Tamoksifen (TAM) ile tedavisinin SRB hücre canlılık analizi sonuçları. Tedavi görmemiş kontrole göre TAM'ın farklı dozlarının (25-100μM) 48 saat tedavi sonucu (A) ve TAM 100 μM dozunun farklı tedavi sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) canlılığa etkisi (B) karşılaştırıldığında (*p<0,05, ***p<0,01, ***p<0,001) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma. 48

Şekil 4.4 MCF-7 hücrelerinin GP-16k (1,56-25 μM) ve Tamoksifen (TAM) 100 μM dozu ile kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saat tedavisinin SRB hücre canlılık analizi. Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında (*p<0,05, ***p<0,01, ***p<0,001) ve GP-16k'ya göre karşılaştırıldığında (#p<0,05 ##p<0,01 ###p<0,001) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma. 49

Şekil 4.5 Sağlıklı meme epitel MCF-10A hücrelerinin GP-16k (1,56-25 μM) ve Tamoksifenin (TAM) 100 μM dozu ile kombinasyonlarının 48 saat tedavisinin SRB hücre canlılık analizi. Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında (*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001) ve GP-16'ya göre karşılaştırıldığında (#p<0,05 ##p<0,01 ###p<0,001) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma. 50

Şekil 4.6 MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, GP-16k'nın farklı dozları (1,56-3,12 μM) ve Tamoksifen (TAM) kombinasyonu ile 24 saatlik tedavileri sonrasındaki üçlü floresan boyama sonuçları. Bileşik uygulanmamış hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. 20x büyütme (Ölçek çubuğu: 125 μm). 52

Şekil 4.7 MCF-7 meme kanseri hücrelerinin pankaspaz inhibitörü Z-VAD-FMK (20 μM) ile 24 saat ön tedavisi sonrasında, GP-16k (1,56-12,5 μM) ve Tamoksifenle (TAM) 100 μM kombinasyonuna 48 saat maruz bırakılmasının tedavi 53

	sonrası hücre canlılığı sonuçları. Aynı zaman periyotları içinde eşit dozlarda inhibitör almış (Z-VAD-FMK (+)) ve almamış (Z-VAD-FMK (-)) GP1-16k'nın muamelelerin etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (* p<0,05, ** p<0,01 ve *** p<0,001) ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma	
Şekil 4.8	MCF-7 meme kanseri hücrelerinin nekroptoz inhibitörü Nec-1 (25 μM) ile 24 saat tedavisi sonrasında, GP-16k (1,56-12,5 μM) ve Tamoksifenle (TAM) 100 μM kombinasyonuna 48 saat tedavi sonrası hücre canlılığı sonuçları. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma.	54
Şekil 4.9	MCF-7 meme kanseri hücrelerinin MLKL inhibitörü NSA (5 μM) ile 4 saat tedavisi sonrasında, GP-16k (1,56-12,5 μM) ve Tamoksifenle (TAM) 100 μM kombinasyonuna 48 saat maruz bırakılmasının tedavi sonrası hücre canlılığı sonuçları. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma	55
Şekil 4.10	MCF-7 meme kanseri hücrelerinin otofaji inhibitörü 3-MA (1,25 μM) ile 4 saat tedavisi sonrasında, GP-16k (1,56-12,5 μM) ve Tamoksifen (TAM) 100 μM kombinasyonuna 48 saat maruz bırakılmasının tedavi sonrası hücre canlılığı sonuçları. Aynı zaman periyotları içinde eşit dozlarda inhibitör uygulanmış (3-MA (+)) ve uygulanmamış (3-MA (-)) GP-16k'nın etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*p<0,05, **p<0,01 ve *** p<0,001) ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma	56
Şekil 4.11	MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde GP-16k (0,78-3,12 μM) ve Tamoksifen (TAM) 100 μM ile kombinasyonunun koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkisinin görüntüleri (A) (10x büyütme) ve koloni sayısı (%) grafiği (B). İstatistiksel olarak anlamlılık değeri *** p<0,001 ifade etmektedir.	58
Şekil 4.12	MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde GP-16k (6,25-12,5 μM) ve Tamoksifen (TAM) 100 μM ile kombinasyonunun hücre göçü (migrasyonu) üzerindeki etkisinin görüntüleri (A) (20x büyütme) Hücre sayısı grafiği (B) Migrasyon grafiği (%) (C). İstatistiksel olarak anlamlılık değeri *** p<0,001 ifade etmektedir.	59
Şekil 4.13	MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde GP-16k (6,25-12,5 μM) ve Tamoksifen (TAM) 100 μM ile	61

kombinasyonunun invazyon üzerindeki etkisinin görüntüleri (A) (20x büyütme) Hücre sayısı grafiği (B) İnvazyon grafiği (%) (C). İstatistiksel olarak anlamlılık değeri *** $p<0,001$ ifade etmektedir.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1	Tez çalışmasında kullanılan hücre soyları ve besiyerlerinin içerikleri	34
Çizelge 3.2	Erken, geç apoptozis ve nekrotik hücrelerin gösterimi	38
Çizelge 4.1	GP-16k ile TAM kombinasyonunun MCF-7 ve MCF-10A hücreleri üzerinde IC_{50} değerleri	51

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'nün Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan 2020 küresel kanser istatistiklerine göre, 185 ülke ve bölgeyi kapsayan otuz altı kanser türü arasında meme kanseri yeni vaka sayısı 2,26 milyona kadar çıkarak 2,2 milyon akciğer kanseri vakasını geride bırakmıştır. Dahası, meme kanseri dünya çapında kadın sağlığı için en tehdit edici kanserdir ve 2020'de 4,43 milyon kadın kanser ölümünün yaklaşık %15,5'ini oluşturmaktadır (Luo ve ark., 2021).

Meme kanseri, dünya çapında kadınlarda en sık görülen kötü huylu tümördür ve erken evre, metastatik olmayan hastaların yaklaşık %70-80'inde tedavi edilebilir. Moleküler düzeyde, meme kanseri heterojendir; moleküler özellikler arasında insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER2) aktivasyonu ve hormon reseptörlerinin (östrojen ve progesteron) aktivasyonu bulunur. Tedavi stratejileri moleküler alt tipe göre farklılık gösterir. Meme kanserinin yönetimi multidisiplinerdir; yerel bölgesel (cerrahi ve radyasyon tedavisi) ve sistemik tedavi yaklaşımlarını içerir (Harbeck ve ark., 2019). Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) veya (HER2) moleküler belirteçleri gibi immünohistokimya belirteçlerinin varlığına göre, meme kanseri üç ana alt tipe ayrılabilir: hormon reseptörü pozitif (ER+, PR+, HER2−), HER2 pozitif (ER−, PR−, HER2+) ve üçlü negatif meme kanseri TNBC (ER−, PR−, HER2−). Bunlar arasında ER+ meme kanseri tüm meme kanseri hastalarının yaklaşık %60-75'ini oluşturur. Adjuvan endokrin tedavisi çoğu ER+ meme kanseri için kanıtlanmış etkili bir sistemik tedavidir ve hormon reseptörü pozitif meme kanserlerini tedavi etmek için en yaygın kullanılan tedavi haline gelmiştir (Yen ve ark., 2022).

Son zamanlarda, birincil/metastatik meme kanserini hedef alan çeşitli FDA onaylı ilaçlar geliştirilmiş ve hastalara uygulanmıştır, ancak bunların hala birçok sınırlaması vardır. Tamoksifen (TAM) de klinikte kullanılan özellikle postmenopozal hastalarda meme kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan hidrofobik endokrin bir ilaçtır (Yao ve ark., 2020).TAM, meme kanseri tekrarlama oranını %40-50 oranında azaltmada klinik olarak önemli etkiler göstermiştir. Ayrıca tedaviden sonra mortalite ve geçici remisyon oranını azaltabilir (Karn ve ark., 2010).

TAM, östrojenle rekabet ederek östrojenin yerini alan ve böylece dolaşımdaki östrojen seviyelerini baskılamak yerine meme dokusunda östrojen fonksiyonunu inhibe eden seçici östrojen modülatörüdür (SERM) (Ali ve ark., 2016). Bu nedenle, antiöstrojenler östrojen kaynaklı sinyalleri kesintiye uğratır ve bu da hücre çoğalmasının inhibisyonu, tümör büyümesinin durması ve apoptozis indüksiyonu gibi hücresel cevaplarla sonuçlanmaktadır (Dorssers ve ark., 2001).

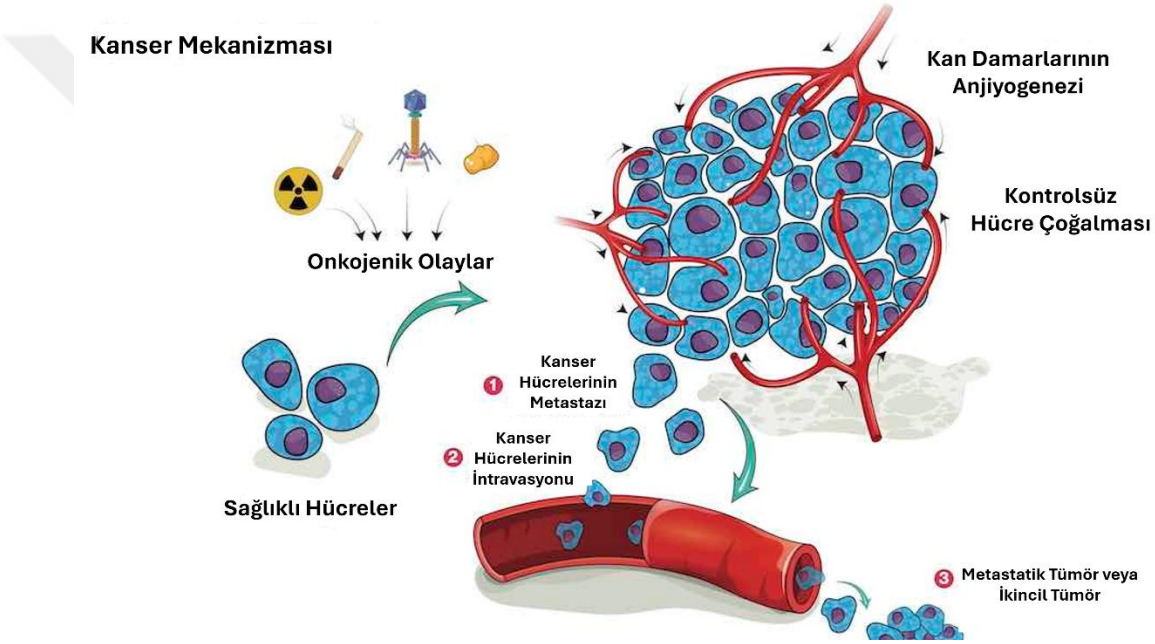
Mevcut kemoterapi ilaçlarının neden olduğu yan etkiler hala hastanın sağlığını tehdit eden uzun vadeli bir zorluktur. Bu nedenle, normal hücrelere ve insan sağlığına zarar vermeden meme kanseri için yeni kemoterapi ajanları geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. Doğal ürünler öncü bileşikler olarak yeni ilaçların geliştirilmesinde son derece önemli bir rol oynar (Lai ve ark., 2023).Hem doğal hem de sentetik yollarla elde edilebilen kalkon üyeleri, flavonoid ailesinin üyeleridir ve geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahiptirler (Alioglu ve ark., 2023). Benzofuran türevleri geleneksel tedavilere kıyasla artırılmış etkinliğe sahip yeni tedaviler tasarlamak için hayati biyolojik aktivitelere sahip temel bileşiklerdir. Benzofuranın çekirdeğindeki belirli pozisyonlara ikame edicilerin tanıtılmasının, terapötik değere sahip olabilecek benzersiz yapısal özellikler ile yeni türevlerle sonuçlandığı ileri sürülmektedir. Bu nedenle, son yıllarda, benzofuranların türevleri yeni ilaçların geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmıştır (Farhat ve ark., 2022).

Mevcut bilgiler doğrultusunda yapılan tez çalışmasında ER+ insan meme kanseri hücre soyu MCF-7, östrojenin tümör gelişimindeki rolünü incelemek ve ER modülatörlerinin etkilerini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır. MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde 2-benzofuran bağlı kalkon kompleksinin tek başına ve TAM ile kombine ilaç tedavisinin hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Böylece yeni bir kombinasyon stratejisinin birlikte kullanılmasıyla antikanser aktiviteleri belirlenmiş ve bu kombinasyonunun moleküler düzeyde meme kanseri üzerinde etki mekanizmaları araştırılmıştır. Sonuç olarak yapılan kombinasyon stratejisinin meme kanseri tedavisinde umut vadeden yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

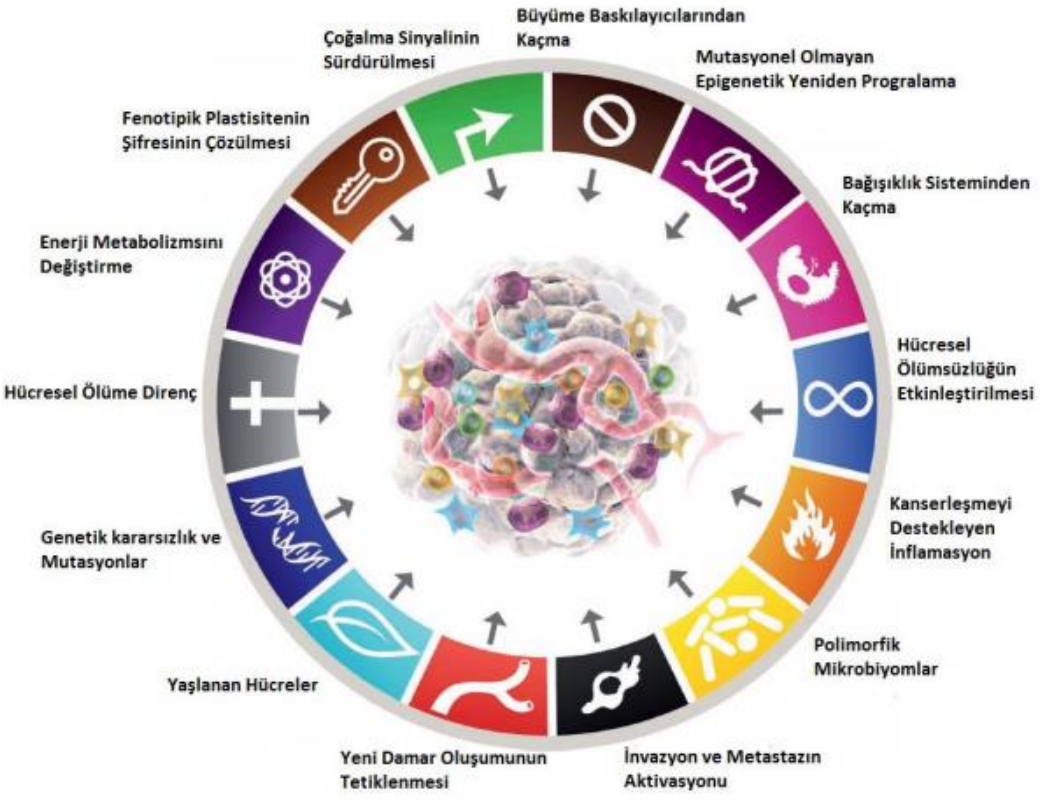
Kanser, hücre bölünmesini, hayatta kalmayı, istilayı veya dönüştürülmüş fenotipin diğer özelliklerini düzenleyen genlerdeki mutasyonların birikmesinden kaynaklanan genetik bir hastalıktır (Balmain ve ark., 2003) (Şekil 2.1). Yani kanser vücuttaki hücre tiplerinin ve organlarının çoğundan kaynaklanan, normal doku sınırlarını aşarak istila edebilen ve uzak organlara metastaz yapabilen hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize edilir (Stratton ve ark., 2009).



Şekil 2.2. Kanser Oluşumu ve Yayılımı (Bu şekil Cancerworld ‘den alınarak çizilmiştir)

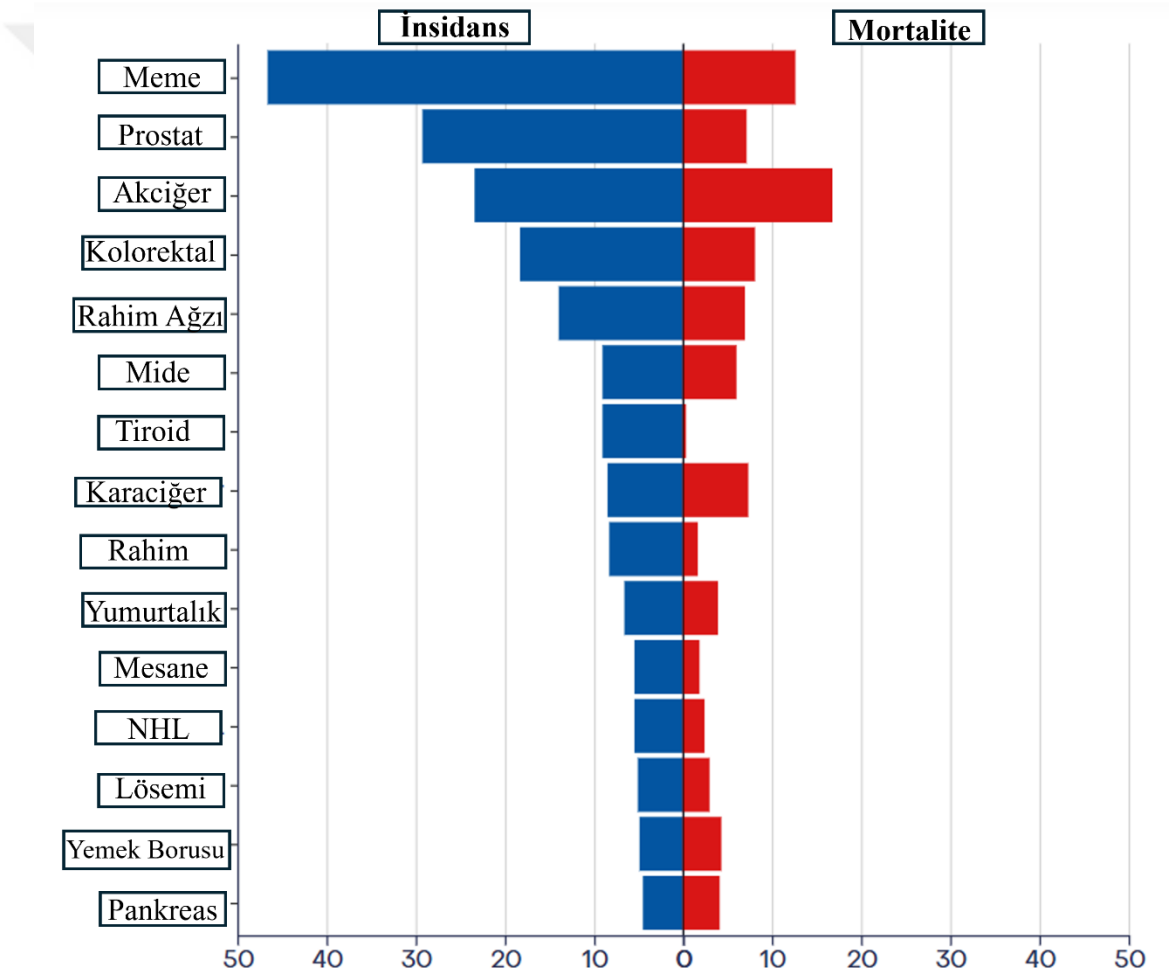
Spontan tümörler tek bir hücreden kaynaklanmakla birlikte, klinik tanı aşamasında insan tümörleri, hücre yüzeyi reseptörlerinin ekspresyonu, proliferasyon ve anjiyogenez gibi heterojenlik sergiler. Tümörlerin genetik olarak farklı tümör hücre klonlarını içeren bir yapıya sahip olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır (Marusyk & Polyak, 2010). Bu tür tümörlerin heterojenliği, histolojik ve moleküler özelliklerine göre alt tiplere sınıflandırılmasına ve gen ekspresyon profillerindeki farklılıklar ile tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (Vassilev & DePamphilis, 2017).

Kanser türleri arasında önemli farklılıklar olmasına rağmen hepsinin ortak özellikleri mevcuttur. Bu özellikler, kanserin ayırt edici özellikleri olarak adlandırılmakta ve tümör biyolojisinin temel belirleyicilerini oluşturmaktadır. Sürekli proliferatif sinyalleme, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, apoptozdan kaçma, doku istilası ve metastaz, sınırsız replikasyon potansiyeli, sürekli anjiyogenez, bağışıklık gözetiminden kaçınma, düzensiz hücresel enerji, genomik istikrarsızlık bu özelliklerdendir (Macheret & Halazonetis, 2015). Bu özelliklerinin bilinmesi (Şekil 2.2), tümörün ileri evrelere erişmeden erken teşhis imkânına ve tedaviye etkin çözümlerin geliştirilmesine olanak sağlar. Hanahan'ın son derlemesinde, kanser hücrelerine özgü olarak görülen 14 özelliği tanımlanmıştır (Hanahan, 2022).



Şekil 3.2. Kanser hücresinin 14 temel özelliği Bu şekil (Hanahan, 2022)'den uyarlanmıştır

GLOBOCAN 2022 verilerine göre meme kanseri her iki cinsiyette de 46,8 insidans oranı ile en sık görülen kanser türü olarak öne çıkmaktadır. Bunu prostat kanseri (29,4), akciğer kanseri (23,6), kolorektal kanser (18,4), rahim ağzı kanseri (14,1) ve diğer kanser türleri takip etmektedir (GLOBOCAN 2022) (Şekil 2.3). Meme kanserinin bu kadar yaygın olmasında hormonal düzeyler, genetik yatkınlık, fiziksel aktivite düzeyi ve yaşam tarzı gibi faktörlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Erken tanı yöntemlerindeki ilerlemeler sayesinde mortalite oranları düşmektedir. Ancak daha az gelişmiş bölgelerdeki insidans oranları arttıkça meme kanserinin küresel değişimi kaçınılmazdır (Wilkinson & Gathani, 2022).



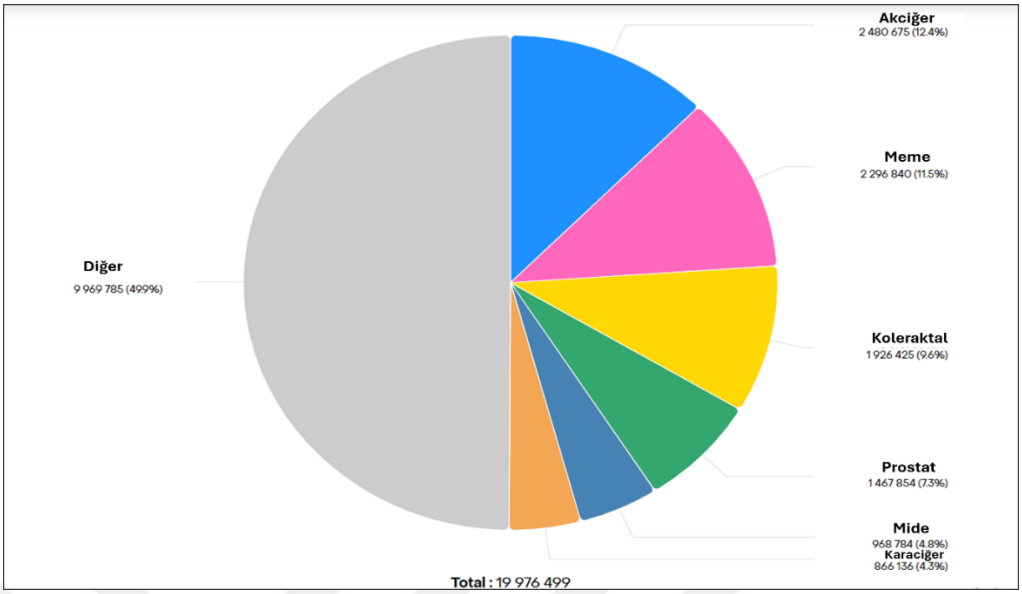
Şekil 2.4. GLOBOCAN 2022'ye göre dünyada her iki cinsiyette kansere bağlı insidans ve mortalite

2.2. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

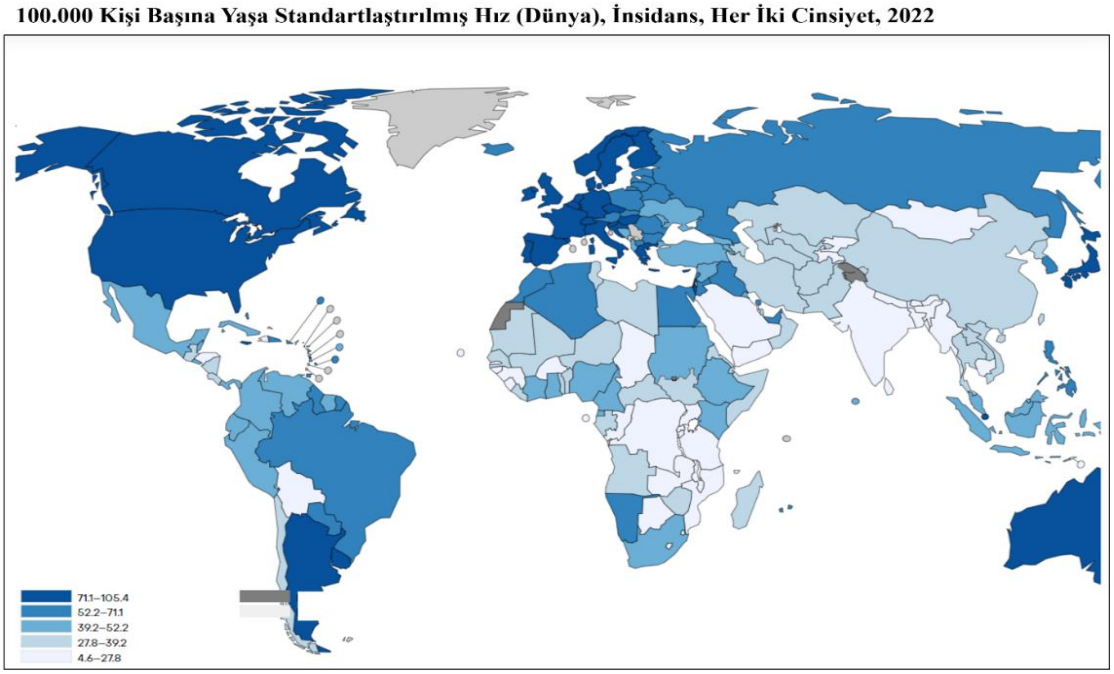
Meme kanseri dünyada kadınlarda en sık görülen malign tümördür. İstatiksel raporlar incelendiğinde, 2020'de küresel olarak yaklaşık 2,3 milyon yeni meme kanseri vakası teşhis edildiği ve 2040 yılında bu sayının 3 milyona ulaşacağı öngörülmüştür (Arnold ve ark., 2022). Meme kanserinin; gözetim, epidemiyoloji ve sonuçlar programı (SEER) veri tabanına göre beş yıllık sağkalım oranı, tüm meme kanseri tipleri ve dereceleri için %90'dır. Lokal ve uzak nüks, meme kanseri tedavisinde en büyük sorunlardan birini oluşturmaktadır. SEER'e göre, metastazlar meme kanserine bağlı ölümlerin %90'ın fazlasından sorumludur ve Amerika Birleşik Devletinde (ABD) metastatik meme kanserli kadınlar için 5 yıllık göreceli sağkalım oranı %30'dur. Bununla birlikte, meme kanseri hastalarının sadece %6'sına ilk tanı anında evre IV hastalık teşhisi konmaktadır (Abe ve ark., 2011; Riggio ve ark., 2021; Burguin ve ark., 2021).Bu nedenle, meme kanserine bağlı ölümlerin çoğu, ilk tedaviden sonra ilerleyen ve metastaz yapan lokalize hastalıktan kaynaklanmaktadır. Meme kanserinin tanı ve tedavisindeki büyük ilerlemelere rağmen, metastatik hastalık tedavi edilemez olmaya devam etmektedir. Bazı alt tiplerin metastaz yapma olasılığı diğerlerine göre daha yüksektir. TNBC ve HER2 ile karakterli tümörler, tedaviden sonraki 5 yıl içinde nüks etme olasılığı bakımından luminal alt tiplere göre daha yüksek bir risk içermektedir (Burguin ve ark., 2021; Mantooth ve ark., 2024).

Kötü huylu tümörün görülme sıklığı dünyanın her bölgesinde artmaktadır ancak en yüksek orana sanayileşmiş ülkelerde rastlanmaktadır. Küresel olarak vakaların yarısı gelişmiş ülkelerdedir (Bellanger ve ark., 2018).ABD'de de meme kanseri, yeni tanımlanan kanserlerin %14'ünü oluşturmaktadır. Bu eğilim temel olarak zayıf beslenme, nikotin kullanımı, aşırı stres ve batılı yaşam tarzı olarak adlandırılan düşük fiziksel aktivite gibi etiyolojik faktörlerden kaynaklandığı bilinmektedir.

GLOBOCAN 2022 verilerine göre dünya çapında en sık teşhis edilen kanser türü akciğer kanseridir (%12,4). Bunu meme kanseri (%11,5), kolorektal kanser (%9,6), prostat kanseri (%7,3), mide kanseri (%4,8), karaciğer kanseri (%4,3) ve diğer kanser türleri (%49,9) takip etmektedir. Her iki cinsiyette toplam vaka sayısı 19,9 milyon olurken, meme kanseri vakaları her iki cinsiyette toplam 2,2 milyon vakayı oluşturmaktadır (Şekil 2.4) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. 2022 ‘de her iki cinsiyet için kanser vakalarının dağılımı (GLOBOCAN 2022)



Şekil 2.6. Dünyada meme kanseri insidansının varyasyon grafiği (GLOBOCAN 2022)

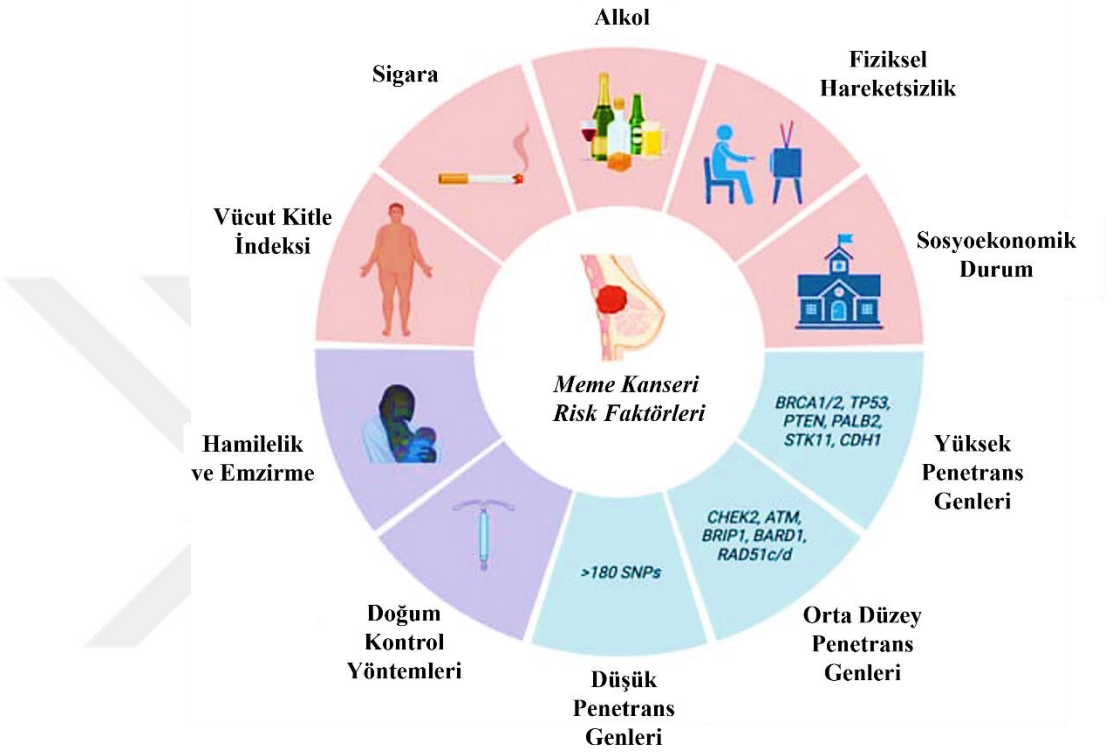
2.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanserinin etiyolojisi karmaşıktır. Meme kanserinin birçok nedeni olmakla birlikte gelişmesinde çeşitli risk faktörleri rol oynamaktadır. Meme kanseri gelişimiyle ilişkili faktörler temelde; çevresel/sporadik (fiziksel aktivite, vücut yapısı ve alkol tüketimi), doğuştan/genetik ve üreme sistemi bozukluklarına bağlı risk faktörleri olarak sınıflandırılır (Zhu ve ark., 2023).Kadınların üreme hayatıyla ilişkili olan meme kanseri için bilinen risk faktörleri, kalıtım ve sosyoekonomik durum gibi diğer faktörler, ABD'deki meme kanseri vakalarının yalnızca yaklaşık yarısını oluşturmaktadır (Coyle, 2004). Çoğu meme kanseri, hormonal düzey ile ilişkilidir ve bu nedenle bu hormonlara maruziyeti artıran herhangi bir faktör potansiyel bir risk faktörüdür. Özellikle, yumurtalıklar tarafından üretilen endojen östrojenlere maruziyetin artmasıyla ilişkili üreme faktörleri, örneğin daha erken adet görme, geç menopoz, düşük doğum sayısı ve ilk doğumda geç yaş, meme kanseri risk faktörleri olarak kabul edilir (Dossus & Benusiglio, 2015). Çevre ve yaşam tarzının yanı sıra, bir kadının genetik geçmişi de meme kanserine yakalanma riskine katkıda bulunur. Ailesinde bu hastalığın öyküsü varsa meme kanseri geliştirme riski artar.

Meme kanserine genetik yatkınlıktan şüphelenildiğinde klinik uygulamada dört yüksek penetrasyonlu gen test edilir: meme kanserine duyarlılık geni olarak bilinen Breast Cancer 1 (BRCA1) ve Breast Cancer 2 (BRCA2) genleri, tümör proteini 53 (TP53) ve kaderin 1 (CDH1). Bugüne kadar BRCA1 ve BRCA2 en yaygın ve en kapsamlı şekilde çalışılmış meme kanseri duyarlılık genleridir. Ailesel meme kanserinin %40'ı kadarını oluştururlar. BRCA1 ile ilişkili kanserlerin aksine, BRCA2 tümörleri genellikle sporadik meme kanserleriyle benzer özelliklere sahip (ER) ve (PR) ifade eder (Narod & Foulkes, 2004).

Bazı fenotipik özellikler BRCA1 veya BRCA2'de mutasyon taşıma olasılığını etkiler. Örneğin, seçilmemiş TNBC olan hastaların %15'i kadarında BRCA1 mutasyonu bulunurken, BRCA2 ile bir ilişki görünmemektedir (Gonzalez-Angulo ve ark., 2011). Li-Fraumeni sendromu tümör baskılayıcı gen TP53'teki mutasyonlardan kaynaklanır. Etkilenen bireylerde sarkom, premenopozal meme kanseri, beyin kanseri, lösemi, germ

hücreli tümör ve bazı kanser türlerinin görülme riski artmıştır (True, 2000).CDH1'de kalıtsal, germ hattı mutasyonu olan bir birey, tümör oluşumuna neden olmak için tek bir somatik olay yeterli olduğundan invaziv lobüler karsinoma açısından artmış risk altındadır (Berx & Van Roy, 2001) (Şekil 2.6).

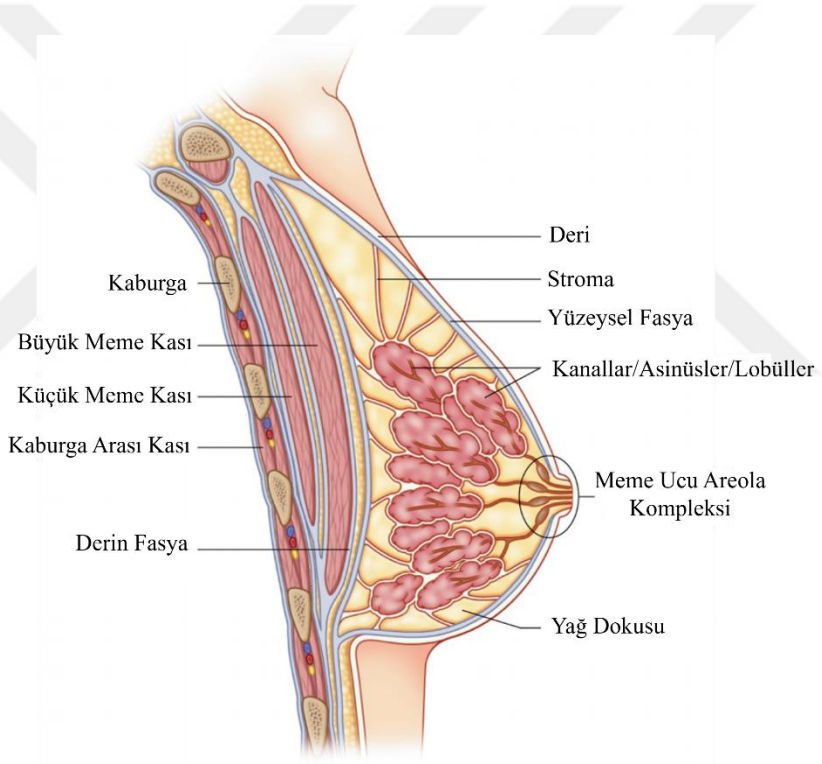


Şekil 2.7. Meme kanseri risk faktörleri (Zhu ve ark., 2023)'den değiştirilerek alınmıştır

2.4. Meme Anatomisi

Meme bezi (göğüs), yenidoğanın beslenmesi için süt salgılayan benzersiz anatomik yapısıyla memelileri diğer tüm hayvanlardan ayırır. Meme bezleri; meme ucundan yağ yastığına doğru büyüyen, yağ hücreleri tarafından oluşturulan, vasküler endotel hücreleri, fibroblastlar ve bağışıklık hücreleri tarafından infiltre edilen epitel hücreleri gibi bir dizi farklı hücre tipinden oluşan karmaşık salgı organlarıdır (Macias & Hinck, 2012).Meme bezi, karmaşık bir stroma içine gömülü, oldukça dallanmış bir epitel tüp ağından oluşur. Meme epiteli, embriyonik gelişim sırasında bir epidermal plakoddan kaynaklanır. Bununla birlikte, kanal uzamasının ve çatallanmasının çoğu, steroid hormon ve büyüme faktörü reseptörü sinyallemesine yanıt olarak doğum sonrası gerçekleşir (Huebner &

Ewald, 2014). Meme bezleri, ön kısmın deri altı tabakasında ve lateral torasik duvarın bir kısmında bulunur. Her meme, her biri birçok lobülden oluşan 15-20 lob içerir (Johnson & Cutler, 2016).Bu lobüllere terminal duktuler veya asiniler, yani süt üreten bezler denir. Ana süt kanalları iki kat kübik epitel ile kaplıyken, küçük kanallar tek kattır. Duktal epitel, sütü kanallar boyunca ileri itmeye yarayan miyoepitelyal hücrelerle tamamen çevrilidir. Bu hücreler sürekli bir bazal membranla çevrilidir. Kanallar, meme ucu-areola kompleksinin altında genişleyerek süt veren sinüsleri oluşturur ve daha sonra meme ucundaki 10-15 delikten çıkar (McGuire, 2019).Memenin tepesinde, merkezi bir yükselti olan meme ucunu çevreleyen pigmentli bir alan olan areola bulunur (Johnson & Cutler, 2016) (Şekil 2.7).

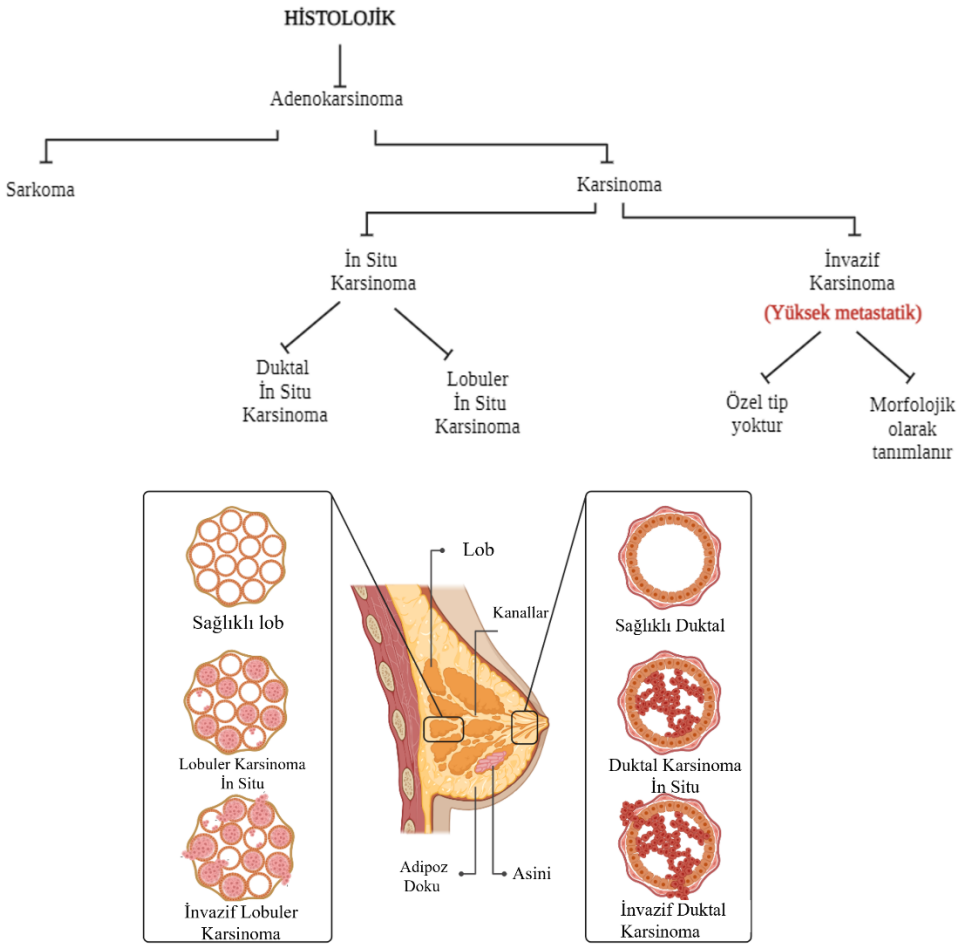


Şekil 2.8. Memenin bileşenleri (McGuire, 2019)'dan değiştirilerek alınmıştır

2.5. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırması

Meme karsinomunun histopatolojik sınıflandırması tümörlerin morfolojik özelliklerinin çeşitliliğine dayanmaktadır (Viale, 2012). Meme kanseri, köken (meme dokusu içindeki spesifik yapılar), istila (tümör hücresi infiltrasyonu), tümör derecesi (görünüş), lenf nodu durumu (yayılma) ve bilinen öngörücü belirteçlerin varlığı açısından farklılıklar ile

karakterize edilir. Meme kanseri, *in situ* (duktal ve lobüler) ve invaziv olarak ikiye ayrılır (Vuong ve ark., 2014) (Şekil 2.8).



Şekil 2.9. Meme kanserinin sınıflandırılması (Zubair ve ark., 2021; Mamede A. 2024) BioRender'dan alınmıştır)

2.5.1. İnvaziv Olmayan *(in situ)* Karsinom

Çevre dokulara yayılmayan meme kanserini içerir. Kanserli hücreler lobüler kanal sisteminde sınırlı kalır ve bu da en yaygın meme kanseri türlerine, yani Duktal Karsinom *in situ* (DCIS) veya Lobüler Karsinom *in situ*'ya (LCIS) yol açar (Malhotra ve ark., 2010).

DCIS, meme kanallarının lümeninde bulunan neoplaztik epitel hücrelerinin prekanseröz proliferasyonu olarak tanımlanır. DCIS, yarı sürekli miyoepitelyal hücrelerden oluşan bir tabaka ile kaplıdır ve sağlam bir bazal membran ile çevrilidir (Cowell ve ark., 2013).

LCIS, terminal kanal lobüler aparat içinde yumuşak, homojen malign hücrelerin çoğalmasıyla karakterize, ayrı patolojik özelliklere sahiptir. Lobüler yapı ve çevreleyen bazal membran, çevredeki stomaya invazyon belirtisi olmaksızın sağlam kalır. Hücreler tipik olarak düşük histolojik ve nükleer derecelidir, yüksek (ER +) ve yavaş büyüme ve iyi prognoz gibi tümör belirteç özelliklerine sahiptir. Bu, daha agresif sitolojik ve biyolojik özelliklerle karakterize edilen invaziv olmayan duktal muadili DCIS'den çok farklıdır (Frykberg, 1999).

2.5.2 İnvaziv Karsinom

İnvaziv meme kanseri, malign hücrelerin miyoepitelyal ve bazal membran katmanlarını aşarak çevredeki stromaya uzandığı memenin malign epitelyal neoplazmıdır. Heterojen bir tümör grubundan oluşur (Shea ve ark., 2020).

İnvaziv Lobüler Karsinoma (ILC), meme kanserinin en yaygın 'özel' morfolojik alt tipidir ve tüm vakaların %15'i kadarını oluşturur. Tümörler genellikle iyi bir prognostik fenotipe sahiptir ve endokrin tedaviye genellikle iyi yanıt verirler (Reed ve ark., 2015).ILC'ler, hücrelerin tek sıra halinde düzenlendiği ve stroma boyunca dağıldığı karakteristik diskohezif büyüme desenlerinin temelini oluşturan E-kaderin fonksiyonunun eksikliğiyle dikkat çeker. Tipik olarak, luminal moleküler alt tipte tümör grubudur (McCart Reed ve ark., 2021).

İnvaziv Duktal Karsinoma (IDC), tüm invaziv meme kanserlerinin %72-80'ini oluşturan en yaygın histolojik tiptir (Arps ve ark., 2013).Süt kanalı hücrelerinde başlar, daha sonra kanal duvarları boyunca yayılır ve çevredeki meme dokusuna sızar (Chen ve ark., 2017).İnvaziv karsinomlar ayrıca mitotik hız, nükleer pleomorfizm ve kanserli olmayan doku yüzdesi gibi parametrelerin değerlendirilmesi yoluyla kanser hücrelerinin farklılaşma düzeyine endeksli puanlanan derecelere bağlı olarak sınıflandırılır. Geriye kalan tümör tipleri;

-Tübüler Karsinom

-Musinöz Karsinom

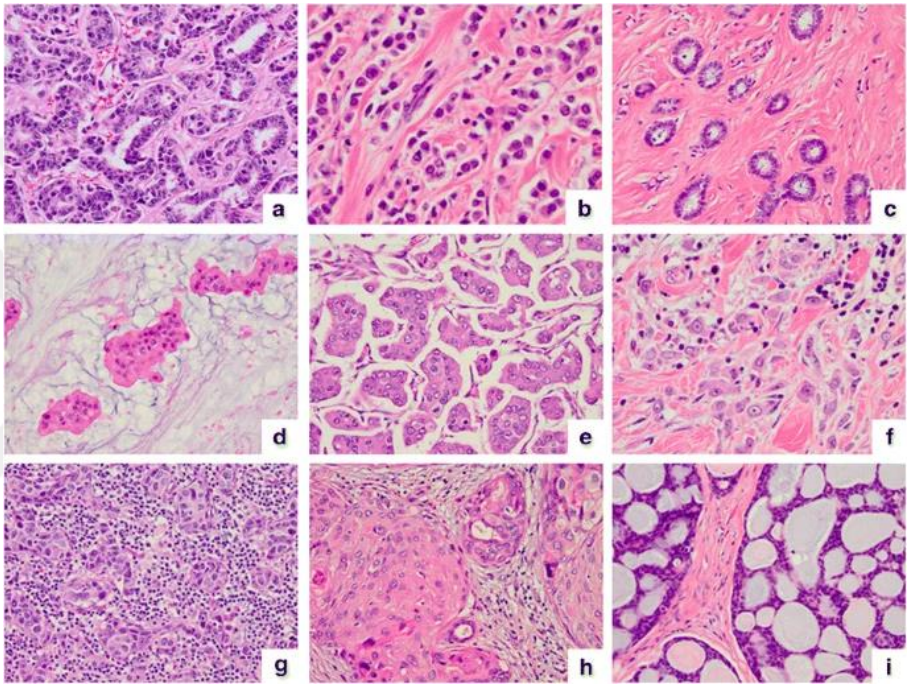
-Metaplastik Karsinom

-Medüller Karsinom

-Nöroendokrin Karsinom

-Apokrin Karsinom

dahil olmak üzere morfolojik olarak farklı tanımlanır (Vuong ve ark., 2014)

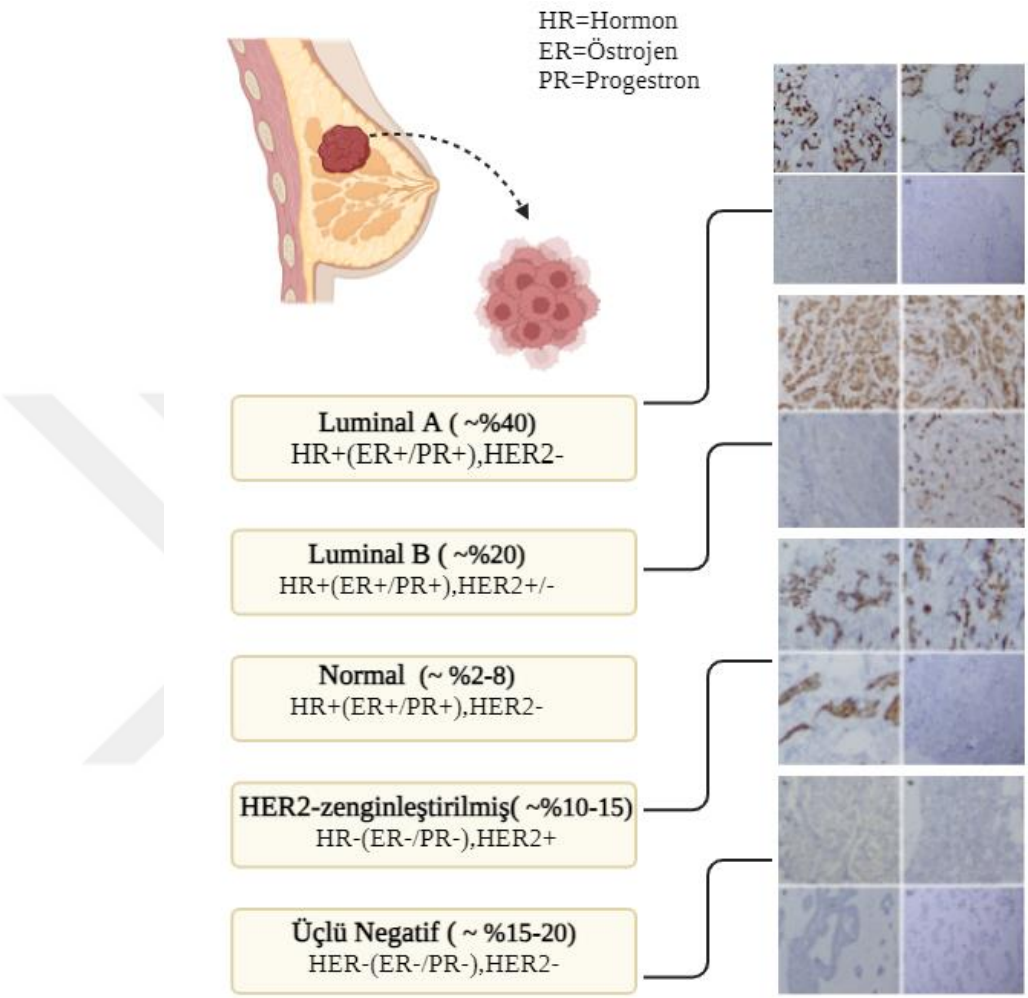


Şekil 2.10. İnvaziv meme karsinomunun temsili morfolojik sınıflandırması: (a) invaziv karsinom NST, (b) klasik lobüler karsinom, (c) tübüler karsinom, (d) mukuslu karsinom, (e) invaziv mikropapiller karsinom (f) pleomorfik lobüler karsinom, (g) medüller karsinom, (h) metaplastik karsinom, (i) adenoid kistik karsinom (Vuong ve ark., 2014).

2.6. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması

Meme kanseri, birden fazla alt tipi olmakla birlikte genetik ve klinik olarak heterojenlik göstermektedir. Meme kanseri alt tiplerin sınıflandırılması yıllar içinde gelişme gösterirken en yaygın olarak kabul edilen sınıflandırma, hormon reseptörlerinin ekspresyonuna dayanan ER, PR ve HER2 immünohistokimyasal analizlerle yapılmaktadır (Barzaman ve ark., 2020).Bu sınıflandırmaya göre luminal A, luminal B,

HER2+ ve TNBC olmak üzere dört meme kanseri alt tipi yaygın olarak tanınmaktadır (Moccia & Haase, 2021)(Şekil 2.10).



Şekil 2.11. Meme kanseri alt tipleri (Orrantia-Borunda ve ark., 2022)'den alınarak Biorender'da tasarlanmıştır

2.6.2. Luminal A

Luminal A alt tipi, en yaygın meme kanseri alt tipi olarak meme karsinomlarının %50-60'ını temsil eder (Lam ve ark., 2014) .Luminal A meme tümörleri, meme kanallarının luminal tarafındaki hücrelerle ilgili genlerin ER ve/veya PR+, HER2- ile karakterizedir ayrıca düşük Ki-67 (hücre proliferasyon belirteci) ekspresyonuna sahiptir (%20'den az). Klinik olarak düşük dereceli, yavaş büyüyen, daha az nüks insidansı ve daha yüksek sağkalım oranı ile iyi prognoz gösterir. Bu karsinomlar hormon tedavisine yüksek yanıt

oranı ve kemoterapiye daha sınırlı bir fayda gösterir (Orrantia-Borunda ve ark., 2022).Ki-67 indeksi, luminal A'yı daha yüksek riskli ER+ luminal B meme kanserinden ayıran bir hücresel proliferasyon belirtecidir (Creighton, 2012). Bu alt tip, diğer alt tiplerle karşılaştırıldığında en düşük TP53 mutasyon oranına sahiptir (Lam ve ark., 2014).

2.6.3. Luminal B

Luminal B alt tipi, düşük PR, yüksek proliferasyona, hormon tedavisinin daha zayıf yanıta sahip ER+ tümörleri temsil eder. ER ifade etmelerine rağmen, luminal B tümörleri östrojenle düzenlenen genlerin karşılık gelen bir ifadesini göstermez ve bu nedenle büyüme için alternatif sinyal yollarına bağlanabilirler. Luminal B alt tipinin yaygınlığı %10 ile %30 arasında değişmektedir (Lam ve ark., 2014).Moleküler düzeyde, luminal B kanserlerinin gen ifadesi, gen kopyası, somatik mutasyon ve DNA metilasyonu düzeylerinde luminal A kanserlerinde önemli ölçüde farklı görünmektedir. Luminal B kanserleri ayrıca luminal A kanserlerine göre daha fazla genetik ve genomik değişikliklere sahiptir (Creighton, 2012). Luminal B tümörleri, Luminal A'ya kıyasla daha yüksek dereceli ve daha kötü prognozludur. Yüksek bir Ki-67 ekspresyonuna (%20'den fazla) sahip olabilirler. Genellikle orta veya yüksek histolojik yapıya sahiptirler. Bu tümörler kemoterapi ile hormonal tedaviden de fayda görebilirler. Yüksek Ki-67, luminal A'dan daha hızlı büyümelerini ve daha kötü prognozları ortaya çıkarır (Inic ve ark., 2014). Bu tip Luminal tümörlerin %10-20'sini oluşturur (Orrantia-Borunda ve ark., 2022).

2.6.4. ER

ER, kullanılan en eski ve en yaygın meme kanseri biyobelirteçlerden biridir (Ellis ve ark., 2001). ER, 60 farklı reseptörden oluşan steroid ve nükleer reseptör (NR) süper ailesine aittir. ER'ler, hücre zarından yayılan ve reseptörlerine bağlanan östrojenler tarafından aktive edilir ve bu bağlanma sonucunda çeşitli fizyolojik süreçlere aracılık ederler. Esas olarak iyi diferansiyedir, daha az agresiftir ve prognoz açısından ER- meme kanserine göre daha iyidir (Rakha ve ark., 2010). ER ’nün luminal A ve B alt tipleri altında ER+/PR+, ER+/PR-, ER-/PR-, ER-/PR+ dört alt sınıfı vardır (Zubair ve ark., 2021). Östrojenin biyolojik fonksiyonları ER'e bağlanma ile aracılık edilir. ERα ve ERβ olmak üzere ikiye ayrılır. Östrojen sinyallemesi, organlardaki ERα ve ERβ aktiviteleri

arasındaki dengeye bağlı olarak özellikle uyarılır veya engellenir. Hem ERα hem de ERβ1, ER hedef gen transkripsiyonu için ligand bağlanması gerektirir (Kowalczyk ve ark., 2021).Ligand bağımlı ER sinyal mekanizmalarında, östrojenin ER ile bağlanması, çeşitli ortak düzenleyicilerin ER hedef genlerinin transkripsiyonunu uyarmasına izin veren bir konformasyonel değişikliğe neden olur (Belachew & Sewasew, 2021;Castoria ve ark., 2010).

2.6.5. PR

PR, meme bezlerinin lobulo-alveolar gelişimi için kritik olan ve blokajı ER tarafından düzenlenen bir gendir. Meme bezlerinin duktal büyümesini indükleyen ER'nin aksine, PR, duktal morfogenezi düzenler (Cui ve ark., 2005).PR, meme kanserinin PR+'den daha agresif olması nedeniyle tümör saldırganlığının negatif bir göstergesi olarak kabul edilir. Bu reseptörün de luminal A ve B alt tipleri altında ER+/PR+, ER+/PR-, ER-/PR-, ER-/PR+ dört alt sınıfı vardır (Zubair ve ark., 2021). PR, ER'nin yukarı regüle edilmiş hedef genidir, ekspresyonu östrojene bağlıdır ve PR, ER etkisini düzenleyebilir. PR ayrıca meme kanserinde genel sağ kalım veya hastalıksız sağ kalımın önemli bir prognostik biyobelirtecidir (Asavasupreechar ve ark., 2020).

2.6.6. HER2

HER2, HER gen ailesine aittir. HER2 için bilinen spesifik bir ligand yoktur veya reseptör bir liganda bağlanamaz. Ligand bağlanması üzerine reseptörler homodimerler veya heterodimerler oluşturur ve sitoplazmik tirozinleri fosforile ederek aktive olurlar. HER2 özellikle tümör oluşumundan sorumlu olan HER1 ve HER3 ile heterodimerler oluşturur (Suter & Marcum, 2007). HER2'nin ERBB2 amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu hem homodimerizasyonunu hem de diğer ErbB proteinleriyle heterodimerizasyonunu teşvik eder. Böylece hücresel dönüşümü, sağkalımı, çoğalmayı, invazyonu ve dolayısıyla tümör büyümesinin yayılmasını yönlendiren aşağı akış yollarının aşırı aktivasyonuna neden olur (Yoon & Oh, 2024).

HER2+ grup, meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturur. ER, PR yokluğu ve yüksek HER2 ekspresyonu ile karakterize olan alt tiptir. Luminal gruplara kıyasla daha hızlı büyürler ve HER2 hedefli tedavilerin uygulanmasından sonra iyi prognoz gösterirler.

HER+ alt tipi daha agresif ve hızlı büyüyen yapıya sahip olup kendi içinde iki alt gruba ayrılır: luminal HER2 (ER+, PR+, HER2+ ve Ki-67:15-30%) ve HER2 ile zenginleştirilmiş (HER2+, ER-, PR-, Ki-%67>30) (Orrantia-Borunda ve ark., 2022). HER2 normal meme dokusunda bulunan bir transmembran protein-tirozin kinaz reseptörüdür. Ayrıca HER2 ve ER/PR sinyal yolları arasındaki yakın iletişim, endokrin tedavilere direnci artırmaktadır (Zubair ve ark., 2021).

2.6.7. TNBC

ER-, PR- ve HER2- ile karakterizedir ve tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur. Meme kanseri türleri arasında en agresif ve heterojen olanıdır (Orrantia-Borunda ve ark., 2022). ER, PR ve HER2 'nin eksikliği, yoğun mitotik aktiviteye ve kötü prognoza sahip daha yüksek nükleer dereceli kansere yol açar. Hormonal ekspresyon olmadığı için TNBC'ler endokrin ve hedefe yönelik tedavilere duyarlı değildir. TNBC, genetik, transkripsiyonel, histolojik ve klinik açıdan belirgin farklılıklar gösteren, geniş bir biyolojik ve klinik çeşitliliğe sahip kanser türünü tanımlayan işlevsel bir terimdir (Børresen-Dale, 2003).

TNBC'lerin altı alt tipi vardır bunlar; Bazal benzeri alt tip (BL1), (BL2), mezenkimal (M), mezenkimal kök benzeri (MSL), immünomodülatör (IM) ve luminal androjen reseptörleri (LAR)'dır. TNBC'nin terapötik çeşitliliği, reseptörlerin yokluğu nedeniyle genellikle sınırlıdır ve ölüm oranlarının diğer alt tiplerden çok daha yüksek olmasına neden olur. Ek olarak, TNBC'ler geleneksel kemoterapiye daha az yanıt verir, hastalar tekrarlama ve nüksetme riskinde artış yaşarlar (Fultang ve ark., 2021).

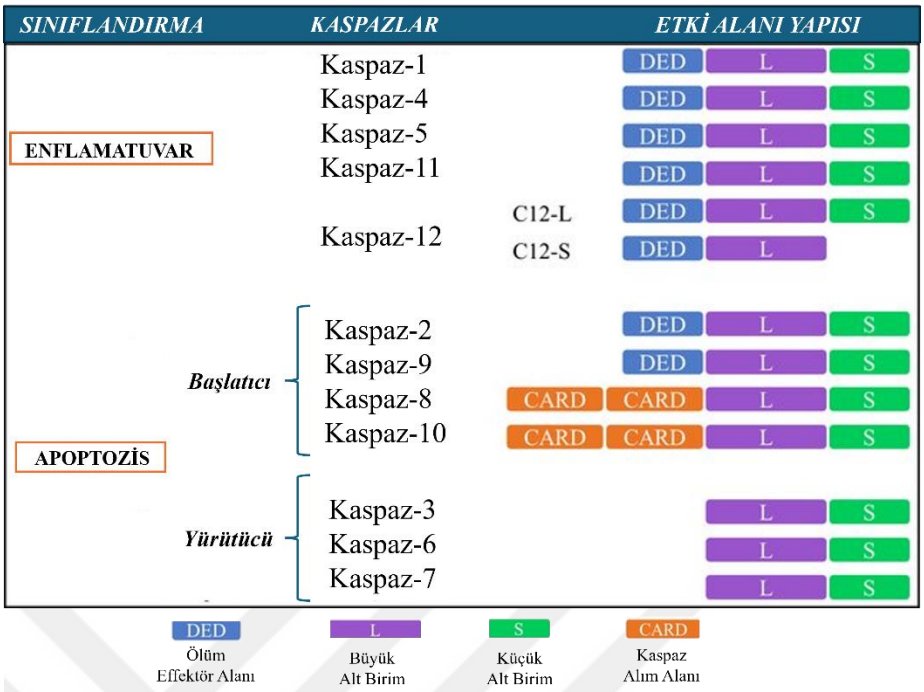
2.7. Apoptozis

Apoptozis, embriyogenez ve yetişkin doku homeostazisi gibi normal fizyolojik süreçlerde önemli işlevler gerçekleştiren, sıkı bir şekilde düzenlenmiş ve evrimsel olarak korunan hücre ölüm programıdır. Ancak aynı zamanda bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak da görev alır. Apoptozis, onarılamaz DNA lezyonları oluşturan sitotoksik ilaç tedavileri ve radyoterapi programları da dahil olmak üzere birçok uyarana, enfeksiyona, hasara karşı fizyolojik hücre ölümü tepkisidir (Morana ve ark., 2022).Morfolojik olarak apoptozun varlığı hücreyi büzülme ve piknozla baş başa bırakır, bu DNA parçalanması, kromatin

yoğunlaşması ve sitoplazmanın sıkışmasıyla karakterize edilir. Plazma zarının kabarcıklanması, çekirdeğin kırılmasına (karyoreksis) neden olan koşulları takip eder. Bu, hücrelerin çevresindeki dokulardan ayrılmasına ve sitoplazmanın sıkıca paketlenmiş organellerle gömülü olduğu hücre parçalarına ayrılmasına neden olur. Daha sonra, apoptotik cisimler olarak adlandırılan bu kompakt cisimler tomurcuklanma sürecini üstlenir (Obeng, 2021).Apoptozis için sinyalleme, hücre içindeki veya hücre dışındaki tetikleyici olaylardan başlatılan birden fazla bağımsız yolla gerçekleşir. Tüm apoptozis sinyalleme yolları, aspartat kalıntılarındaki proteinleri kesen bir sistein proteaz (kaspazlar) ailesi tarafından aktive edilen ortak bir hücre yıkımı mekanizmasında birleşir (Strasser ve ark., 2000).

2.7.1. Apoptozisde Kaspazların Görevi

Kaspazlar, apoptozis ve inflamasyonda hayati roller oynayan sistein proteaz enzim ailesine aittir (McIlwain ve ark., 2013). Bir kaspazın aktif bölgesinde, bir aspartik asit kalıntısından sonra bir hedef proteine saldıran bir nükleofilik sistein bulunur (Galluzzi ve ark., 2016).Bu saldırı, substrattaki belirli aspartik asit kalıntılarından sonra hedef proteinin kopmasıyla sonuçlanır. Kaspazlar bu mekanizma aracılığıyla, substrat inaktivasyonuna neden olabilse de apoptoz ve inflamasyon gibi düzenli süreçlere katılan aktif sinyal molekülleri de üretebilir. Kaspazlar, apoptozdaki (memelilerde kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7, kaspaz-8 ve kaspaz-9) ve inflamasyondaki (insanlarda kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5 ve kaspaz-12 ve farelerde kaspaz-1, kaspaz-11 ve kaspaz-12) bilinen rollerine göre genel olarak sınıflandırılmıştır (Cookson & Brennan, 2001). Apoptoza katılan kaspazlar, apoptoz inhibitörleri (IAP'ler) olarak bilinen proteinler tarafından inhibe edilir. Ayrıca apoptozda yer alan kaspazlar, etki mekanizmalarına göre başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8 ve kaspaz-9) ve yürütücü kaspazlar (kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7) olarak alt sınıflara ayrılmıştır (Sahoo ve ark., 2023) (Şekil 2.11).



Şekil 2.12. Kaspazların sınıflandırılması (Fang & Peng, 2022)'den alınarak çizilmiştir

2.7.2. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozis, dahil olan adaptörler ve başlatıcı kaspazlarla ayrılan birkaç apoptotik yol üzerinden gerçekleşebilir. Bu yollar genel olarak dışsal ve içsel olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır;

1. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme/Ekstrinsik (dışsal) yolak
2. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması/İntrinsik (içsel) yolak

2.7.2.1. Ekstrinsik (Dışsal) Yolak

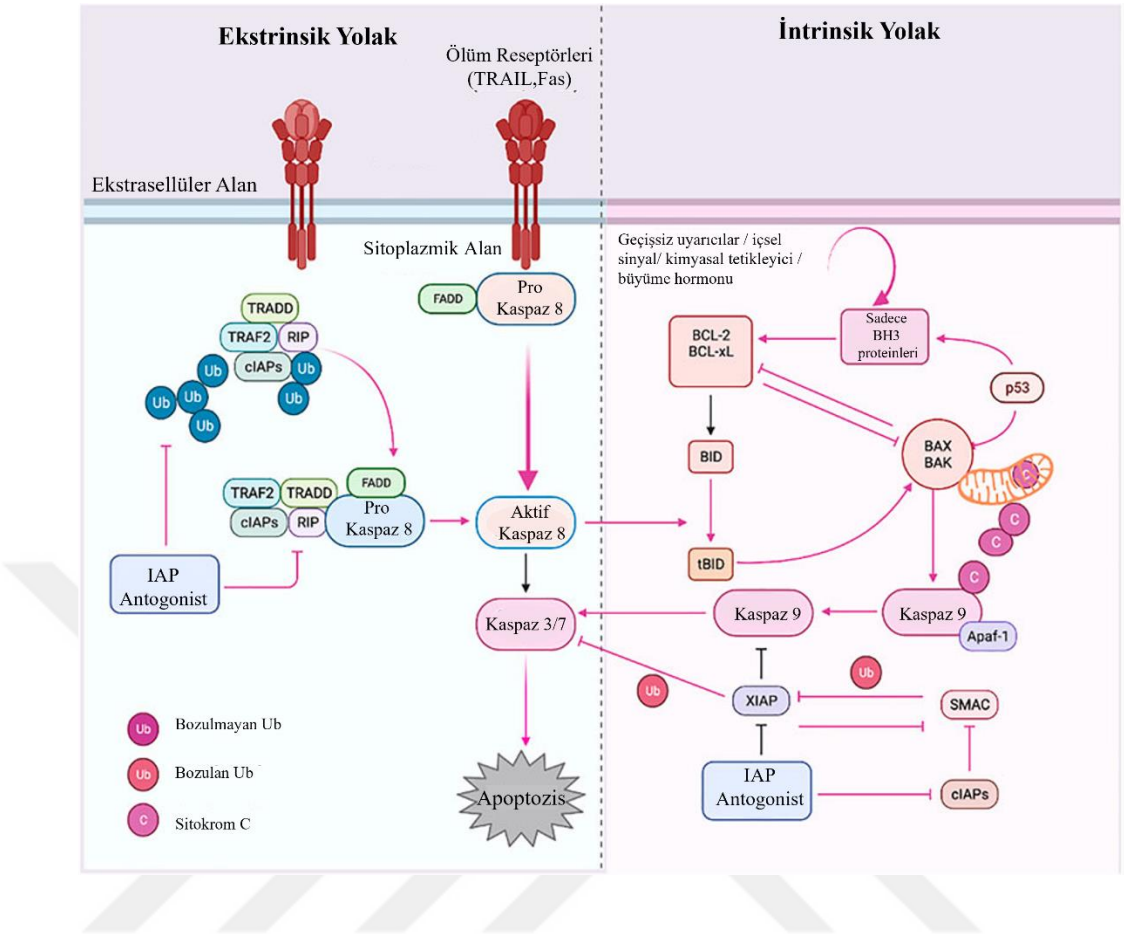
Ekstrinsik apoptozis, ölüm reseptörlerine bağlanan ligandlar aracılığıyla iletilen ekstrasellüler alan tarafından tetiklenir. Bu reseptörler tümör nekroz faktörü (TNF) süper ailesinin üyeleridir. Tümör nekroz faktörü reseptörü 1 (TNFR1), fas reseptörü (CD95), ölüm reseptörü 3 (DR3), TNF ile ilişkili apoptozis indükleyen ligand reseptörü-1 ve 2'yi (TRAIL-R1 ve TRAIL-R2) içerir (Sahoo ve ark., 2023).Bir ölüm reseptörü (DR) ligandının ilgili bir DR'ye bağlanması, monomerik pro-kaspaz-8 proteininin, ölüm efektör alanı (DED) aracılığıyla, aktive olmuş DR'nin sitoplazmik kuyruğunda oluşan ölümü

indükleyen sinyalleme kompleksi (DISC)'e alınmasına neden olur. Ayrıca bu kompleks adaptör protein FADD ve TRADD'yi de içerir. Kaspaz-8 monomerlerinin işe alınması dimerizasyon ve aktivasyonla sonuçlanır (Kang ve ark., 2004). DR aracılı kaspaz-8 aktivasyonunun sonucu hücre tipine bağlıdır. Tip I hücreler olarak adlandırılan hücrelerde, kaspaz-8 yürütücü kaspazları keserek etkinleştirir ve doğrudan apoptozu başlatır (Samraj ve ark., 2006). Bu mekanizma, ölüm reseptörleri aracılığıyla dışsal apoptozun düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir (Şekil 2.12).

2.7.2.2. İntrinsik (içsel) Yolak

İçsel apoptozis, mitokondri kaynaklı salınan faktörlere bağlı olduğu için mitokondriyal apoptoz olarak da bilinir. İçsel apoptoz yolunun temel özelliği pro-apoptopik sinyallemenin mitokondriyal membranın bütünlüğünü bozması ve ardından sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasıdır. Bu yol, büyüme faktörü yoksunluğu, sitoskeletal bozulma, DNA hasarı, katlanmamış proteinlerin birikmesi, hipoksi ve diğerleri dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel stresler tarafından aktive edilir (Brenner & Mak, 2009).Pro-apoptopik proteinler Bax ve Bak'ın mitokondriyal membrana yerleştirilmesi ve daha sonra sitokrom c'nin mitokondriyal intermembran boşluktan sitozole salınmasına yardımcı olur (Kim, 2005).Anti-apoptopik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinleri ise sitokrom c'nin salınmasını engeller (Ghobrial ve ark., 2005). Sitokrom c'nin sitozole salınmasının ardından, apoptozom üretmek için Apaf–1 ve prokaspaz-9 ile birleşir. Apoptozom, kaspaz 9'u tetikler. Aktif olan kaspaz-9, kaspaz-3 ve diğer kaspazları tetikleyen sinyal kaskadını başlatır. Bu kaskad DNA'nın bozulması gibi biyokimyasal olayları tetikleyerek hücrenin programlanmış ölümüne, yani apoptoza yol açar (Yuan & Akey, 2013;Jan & Chaudhry, 2019).Bu süreç, hücre homeostazını ve doku bütünlüğünü korumak için kritik öneme sahiptir.

Genellikle içsel yolakta yer alan proteinler arasında SMAC/DIABLO, Kaspaz-9, Bcl-2 Bcl-w, Nox, Aven ve Myc bulunur (Elmore, 2007). Bu proteinlerin aralarındaki etkileşimler, içsel apoptoz yollarını koordine eder ve hücrenin programlanmış yıkımı ya da hayatta kalmasını belirler (Şekil 2.12.).



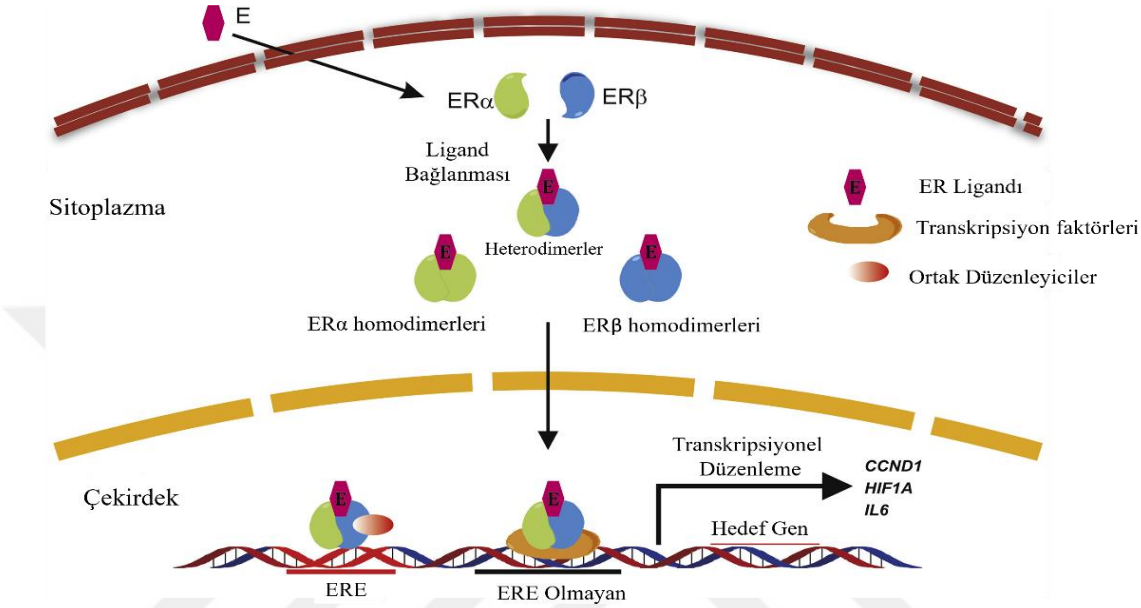
Şekil 2.13. Apoptozisin ekstrinsik (dışsal) ve intrinsik (içsel) yolağı (Chaudhry ve ark., 2022'den alınarak çizilmiştir

2.8. Meme Kanserindeki Önemli Sinyal Yolları

2.8.1. ER Sinyal Yolağı

ER'ler, nükleer (ERα, ERβ) oluşur. Erα ve Erβ ligand bağlanması sonucu hedef genlerin ifadesini aktive eden veya baskılayan transkripsiyonel faktörlerdir (Cheskis ve ark., 2007; (Renoir ve ark., 2013).Meme kanseri hücreleri yüksek ERα ekspresyonuna ve düşük ERβ ekspresyonuna sahiptir. Bu iki tip nükleer hormon reseptörü, ligand bağlanmasının ardından homo veya heterodimerler oluşturur ve transkripsiyonel düzenleme için hücre çekirdeğine taşınır. Bu, ER'lerin ana işlevidir. ER dimerleri, hedef genlerin ERE bölgesine bağlanır ve transkripsiyonel aktivitenin düzenlenmesini sağlar (Şekil 2.13). Ayrıca ER'ler yardımcı düzenleyicileri işe alarak transkripsiyonel aktiviteyi modüle edebilirler. ER'lerin hedef genlerin ekspresyonunu kontrol ettiği bir diğer

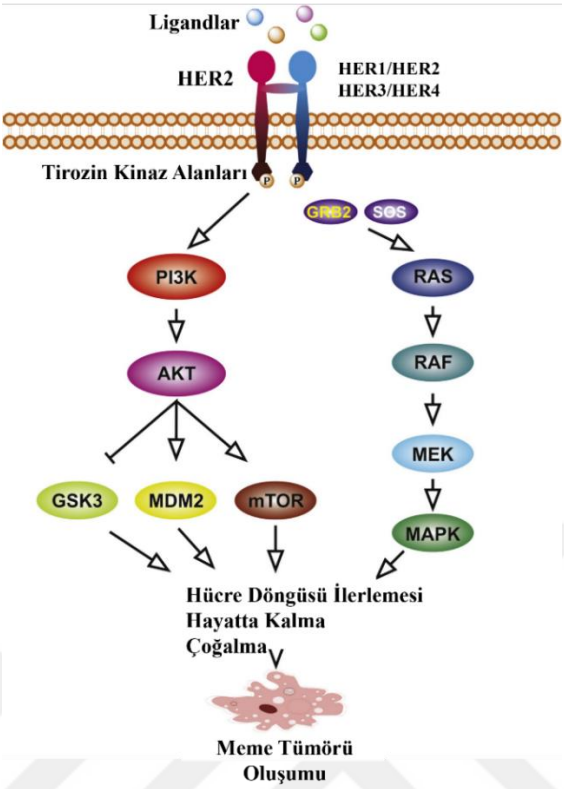
mekanizma, diğer transkripsiyon faktörleri için yardımcı düzenleyici olarak hareket etmesidir (Feng ve ark., 2018).Böylece ER'ler, yalnızca kendi etki alanlarında değil, daha geniş bir genetik ağda önemli bir tamamlayıcı rol üstlenir.



Şekil 2.14. ER sinyal yolu (Feng ve ark., 2018)'den alınarak çizilmiştir

2.8.2. HER2 Sinyal Yolu

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR'ler veya HER'ler) , normal dokularda ve birçok kanser türünde ifade edilen bir tirozin kinaz reseptörleri ailesidir (Sergina & Moasser, 2007). HER2, EGFR'lerin bir üyesidir (Roskoski, 2014). HER2, transmembran alanı, hücre dışı ligand bağlama alanı ve hücre içi alanından oluşan bir reseptör tirozin kinazdır. HER2'nin sürekli aktif formu, onu diğer moleküllerle dimer oluşturmak için tercih edilen bileşen haline getirir ve bu durum HER2'ye çeşitli yollar aracılığıyla birçok hücresel fonksiyonu etkileme yeteneği kazandırır. Ligand bağlanması ve ardından gelen dimerizasyon, HER2'nin hücre içi alanındaki tirozin kalıntılarının fosforilasyonunu uyarır, bu da mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve fosfoinositid-3 Kinaz (PI3K) yolları gibi birden fazla sinyal yolunun aktivasyonuna yol açar (Şekil 2.14). Bu sinyal yolları özellikle meme kanseri ve diğer kanser türlerinde tümör oluşumuyla yoğun bir şekilde ilişkilidir (Feng ve ark., 2018 ;Wieduwilt & Moasser, 2008; Wee & Wang, 2017).



Şekil 2.15. HER2 sinyal yolu (Feng ve ark., 2018)'den alınarak çizilmiştir

2.9. Meme Kanserinde Tedavi Yaklaşımları

2.9.1. Cerrahi

Meme cerrahisi yaklaşımları, genellikle meme rekonstrüksiyonunun izlediği memenin total eksizyonu (mastektomi) veya meme koruyucu cerrahidir (lumpektomi). Mastektomi, tümörlü meme dokusunun tamamının cerrahi olarak çıkarılması işlemidir ve genellikle daha ileri evre kanser vakalarında tercih edilir. Lumpektomi, meme tümörünün çevresindeki normal doku ile birlikte eksizyonu anlamına gelir (Schnitt ve ark., 2020).

2.9.2. Radyoterapi

Yüksek enerjili radyasyonlar tüm memeye veya memenin bir kısmına (meme koruyucu cerrahiden sonra), göğüs duvarına (mastektomiden sonra) ve bölgesel lenf düğümlerine uygulanır. Bu tedavi, kanser hücrelerinin yok edilmesi veya ölmesinin engellenmesi amacıyla kullanılır. Radyasyon tedavisi tüm meme kanseri alt tiplerini tedavi etmek için

kullanılır, ancak TNBC alt tipinde hormon reseptörleri yer almadığı için bu tedavi yönteminin uygulanması daha önem taşımaktadır (Boyages, 2017).

2.9.3. Kemoterapi

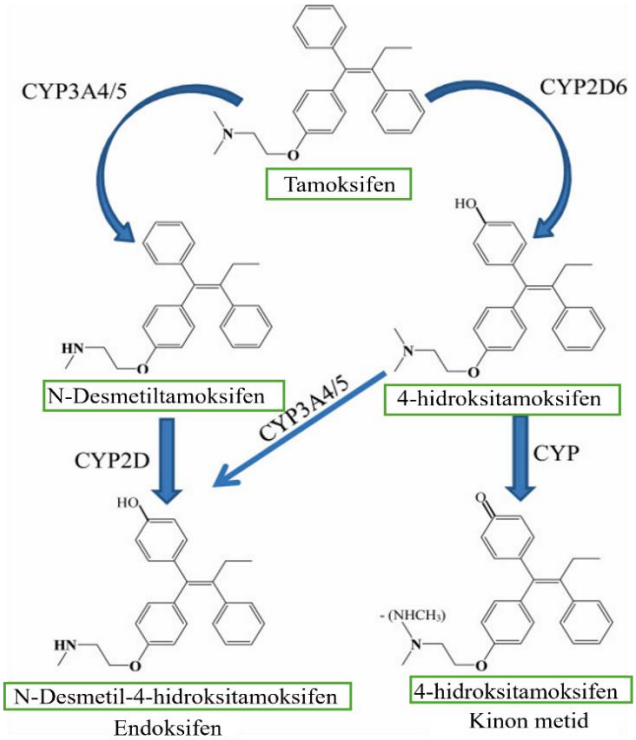
Meme kanseri kemoterapisi, alkilleyici ajanlar, antimetabolitler ve tubulin inhibitörleri dahil olmak üzere çeşitli sitotoksik ilaç ailelerini içerir (Nabholtz & Gligorov, 2005).Antrasiklinlerin (doksorubisin, daunorubisin, epirubisin ve idarubisin) etki mekanizması, DNA interkalasyonunu içerir ve böylece makromoleküler biyosentezi inhibe eder. Dosetaksel ve paklitaksel dahil olmak üzere taksanlar, mikrotübüllere bağlanır ve bölünme esnasında anafaz aşamasındaki kardeş kromatitlerin zıt kutuplara dağılımını önleyerek hücre döngüsünün durmasına ve apoptoza yol açar. Kemoterapi neoadjuvan (cerrahi tedavi öncesinde tümörü küçültmek amacıyla) ve adjuvan (cerrahi sonrası olası tedavi mikroskobik hastalıkları ortadan kaldırmak amacıyla) ortamda kullanılabilir. Ayrıca metastatik meme kanseri tedavisinde uygulanabilir (Burguin ve ark., 2021).

2.9.4. Endokrin Terapi

Endokrin terapi, hormon reseptörü (HR) pozitif invaziv meme kanserini tedavi etmenin ana stratejisidir. Bu terapinin amacı, doğrudan ER'yi veya östrojen sentezini (aromataz inhibitörleri) hedeflemektedir (Howlader ve ark., 2014). Endokrin tedavi ER, meme kanseri tümörlerinin %75'inde ifade edilir ve tümör oluşumunu yönlendirmek için çeşitli nükleer (genomik) ve nükleer olmayan (genomik olmayan) işlevler yürütür. ERα baskın olarak meme tümörlerinde ifade edilir ve bu nedenle ER+ meme kanserinde endokrin tedavi için daha uygun bir hedef olarak kabul edilir (Rasha ve ark., 2021). En yaygın endokrin terapi türleri SERM'ler, seçici modülatörler östrojen reseptör parçalayıcıları (SERD'ler) ve aromataz inhibitörleridir (Howlader ve ark., 2014).

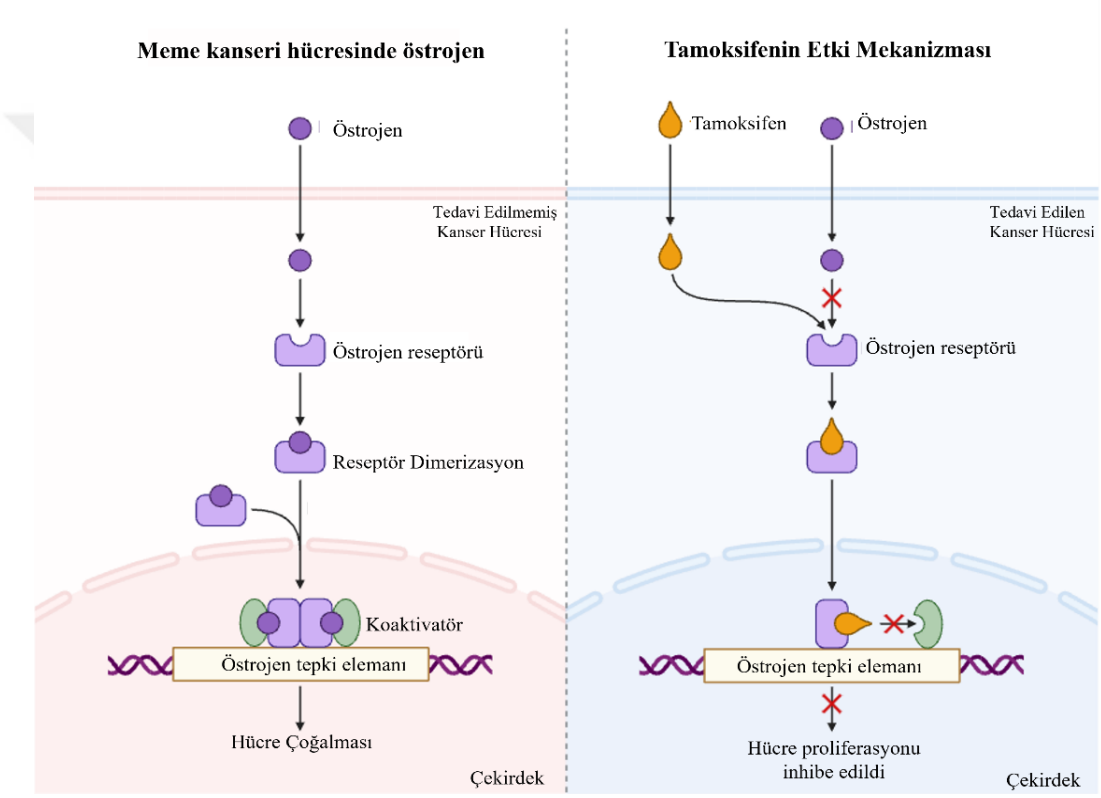
2.10. TAM

SERM olan TAM, ER'ye bağlanarak östrojenle rekabet eden antiöstrojenlerdir. Bu bağlanma, ER ligand bağlama alanının konformasyonunu değiştirir ve ER çekirdeğe taşındığında, hücre döngüsü ilerlemesinde (siklin D1), hücre çoğalmasında (IGF-1 gibi) veya hücre göçünde (kolajenaz) yer alan yardımcı faktör alımını ve sonraki gen transkripsiyonunu engeller (Björnström & Sjöberg, 2005). TAM oral uygulamadan sonra hemeprotein sitokrom P450 tarafından metabolize edilir. Bu hidroksile edilmiş TAM metabolitleri olan 4-hidroksi-N-desmetil-tamoksifen (endoksifen) ve 4-hidroksitamoksifen (4-OH-TAM) oluşumuyla sonuçlanır (Johnson ve ark., 2004). TAM ile karşılaştırıldığında, 4-OH-TAM hedef protein ER'sine daha etkin bir şekilde bağlanır. Ayrıca, ilişki oranı daha güçlüdür ve ayrışma oranı ER'lerle daha yavaştır. 4-OH-TAM'ın ER'ye bağlanmasından sonra, reseptörde koaktivatörlerin bağlanmasını engelleyen ve böylece meme kanserinde ER transkripsiyonel aktivitesini düzenleyen konformasyonel değişiklikler meydana gelir (Mishra ve ark., 2021) (Şekil 2.15).



Şekil 2.16. Tamoksifen (TAM) metabolizması(Mishra ve ark., 2021)'dan alınarak çizilmiştir

TAM tedavisi ER + meme kanserinde ölüm oranını azaltırken, bazı hastalarda uzun süreli TAM tedavisi buna karşı direnç kazanılmasına neden olmaktadır (Mishra ve ark., 2021).Bununla birlikte hormona duyarlı meme kanserinde, TAM kısmi bir antagonist bir ajan olarak etki ederek reseptöre bağlanmak için östrojenle rekabet eder ve ER fonksiyonunu bozar. TAM bağlı ER kompleksi, genlerin östrojen tarafından açılmasını önleyerek kanser hücresi büyümesinden veya çoğalmasından sorumlu olan östrojenik etkilerin inhibisyonuna yol açar (Chang, 2012) (Şekil 2.16).

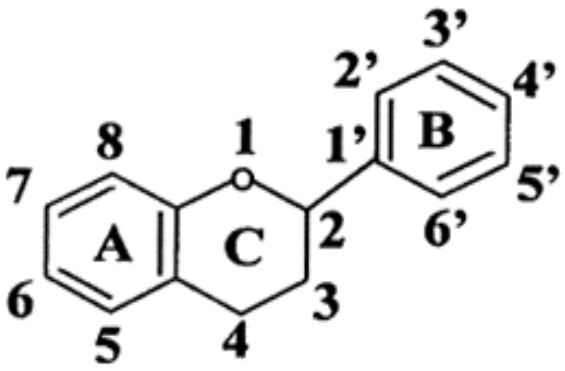


Şekil 2.17. Tamoksifenin (TAM) meme kanseri üzerindeki etki mekanizması (Schuurman ve ark., 2019)'dan alınarak çizilmiştir

2.11. Flavonoidler

Flavonoidler hidroksillenmiş fenolik maddelerdir ve mikrobiyal enfeksiyona yanıt olarak bitkiler tarafından sentezlendikleri bilinmektedir. Flavonoidlerin biyolojik aktiviteleri, kimyasal yapıya bağlıdır. Flavonoidlerin kimyasal yapısı, yapısal sınıflarına, hidroksilasyon derecesine, konjugasyonlara, polimerizasyon ve diğer ikamelere,

derecesine bağlıdır (Kumar & Pandey, 2013) (Şekil 2.17). Raporlara göre, 10.000'den fazla flavonoid tespit edilmiş ve flavonoller, antosiyaninler, flavanonlar, flavonlar, izoflavonlar ve kalkonlar dahil olmak üzere çeşitli alt sınıflara ayrılmıştır. Flavonoidler antikanser başta olmak üzere antioksidan ve anti inflamatuar vb. etkilere sahiptir. Flavonoidlerin hücrelerde hayatta kalma, çoğalma, farklılaşma, göç ve anjiyojenik etki gösterme yeteneklerinin; hormon aktivitelerinde yer alan moleküler hedefleri ve sinyal yollarını düzenleme potansiyellerinden kaynaklandığı görülmektedir (Hosseinzadeh ve ark., 2020). Diyet flavonoidleri hidroksil, metoksi ve glikozidik yan grupların düzenlenmesinde ve A- ve B- halkaları arasındaki konjugasyonda farklılık gösterir. Metabolizma sırasında hidroksil grupları eklenir, metillenir, sülfatlanır veya glukuronidasyona uğrar (Heim ve ark., 2002).Flavonoidler, kanseri tedavi edici bileşikler olarak umut vaat etmekle birlikte kemoterapi ajanları için de aday gösterilmektedir. Yeni antikanser ilaç çalışmalarında, flavonoidlerin kimyasal iskeletinde yapısal değişiklikler ile biyolojik aktivitenin artırılması amaçlanmaktadır. Daha güçlü kanser karşıtı etkiler göstermek için yapılarını değiştiren yeni ilaçları doğal kaynaklardan geliştirmek ve üretmek için daha fazla çalışma gerekmektedir (Sak, 2014).

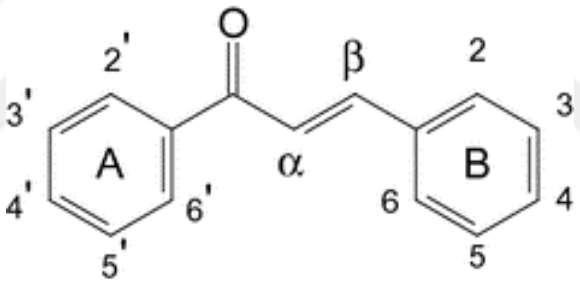


Şekil 2.18. Flavonoid bileşiğinin kimyasal yapısı (Heim ve ark., 2002)

2.12. Kalkonlar

Kalkonlar veya 1,3-diaril-2-propen-1-onlar, flavonoid ailesine aittir. Kimyasal olarak, iki aromatik halkanın üç karbonlu α, β-doymamış karbonil sistemiyle birleştirildiği açık zincirli flavonoidlerdir (Rozmer & Perjési, 2016) (Şekil 2.18). Yüksek bitkilerde flavonoid sentezinin öncüleri olan kalkonlar (1,3-difenil-2-propen-1-on), antimikrobiyal,

antiinflamatuar, antioksidan ve antikanser dahil olmak üzere geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahiptir. Apoptozis, otofaji, diğer hücre ölümü tiplerinin indüklenmesi, hücre döngüsü değişiklikleri ve hücre sağkalımı veya ölümüyle ilişkili çeşitli sinyal yollarının modülasyonu dahil olmak üzere çok sayıda moleküler etki mekanizması mevcuttur (Michalkova ve ark., 2021). Kalkonların biyoaktiviteleri, iki aromatik kalıntıdaki (aldehit ve asetofenon) ikame edicilerin pozisyonuna, sayısına ve doğasına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Esnek yapıları nedeniyle kalkonlar birçok enzime ve reseptöre etkili bir şekilde bağlanabilir; bu da bu bileşiklerin birçok biyolojik uygulama yelpazesinde etkili olmasını sağlar. Bununla birlikte, kalkonlar, belirli koşullar altında, oksitleyici özelliklere sahiptir. Bu özellik, kalkonların antitümör aktivitesi ile ilişkili olabilir ve artan süperoksit oluşumu, hücresel glutatyon tükenmesi, fenoksit radikal üretimi gibi mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirilebilir (Constantinescu & Lungu, 2021).

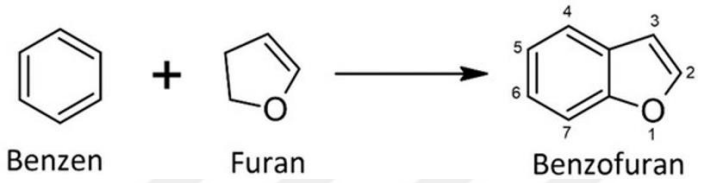


Şekil 2.19. Kalkonun yapısı ve numaralandırması (Rozmer & Perjési, 2016)

2.13. Benzofuranlar

Bitkilerde doğal olarak bulunan benzofuran; benzen ve furan halkasının birleşmesiyle oluşan bir heterosiklik bileşiktir ve sentetik reaksiyonlarla da elde edilebilir (Şekil 2.19). Benzofuran türevleri, çeşitli biyolojik olaylarda, geleneksel tedavilere kıyasla artırılmış etkinliğe sahip yeni tedaviler tasarlamak için oldukça önemli yapılardır. Son yıllarda benzofuran türevleri anti-kanser, anti-enfektif, anti-dislipidemik, antioksidadif ve nörodejeneretif bozuklukların tedavisinde önemli özellikler üstlenmiştir (Miao ve ark., 2019). Antikanser aktiviteye sahip kemoterapi tedavilerinin sitotoksik yan etkilerinin normal hücrelere verdiği hasar göz önüne alındığında, benzofuranların kanser hücrelerine karşı seçiciliğini etkilemede önemli bir potansiyele sahip olduğu bilinmektedir (Farhat ve

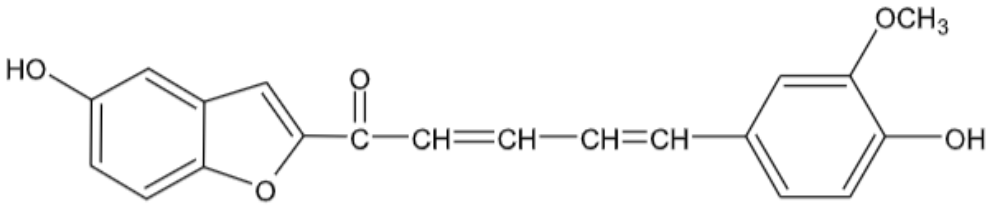
ark., 2022).Benzofuran türevlerinin çoğu, referans antikanser ilaçlarla karşılaştırıldığında çeşitli kanser hücresine karşı inhibitör potansiyel göstermektedir. Böylece antikanser ajanları olarak geliştirmek için umut verici adaylar arasında gösterilirler. Benzofuran iskelelerinin ilaç benzeri özelliklerini büyük ölçüde artıran ikame edicilerin etkilerini incelemeye odaklanmak için daha fazla araştırma gerekmektedir (Abbas & Dawood, 2023).



Şekil 2.20. Benzofuranların genel yapısı (Farhat ve ark., 2022)'den alınarak çizilmiştir

2.14. Tez Çalışmasında Kullanılan 2-Benzofuran Bağlı Kalkon Kompleksinin Kimyasal Yapısı

Kaynak araştırması bölümünün 2.2 alt başlığında açıklanan meme kanserinin artan insidans ve mortalite oranları ele alındığında, bu oranları düşürecek yeni bir tedavi stratejisine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla tez çalışmasında, Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Demet Coşkun tarafından sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmış 2-benzofuran bağlı kalkon türevi [(2E,4E)-1-(5-hidroksi-1-benzofuran-2il)-5-(4-hidroksi-3metoksifenil) penta-2,4-dien-1-on] (GP-16k) kullanılmıştır (Şekil 2.20).



Şekil 2.21. 2-Benzofuran bağlı kalkon kompleksinin kimyasal yapısı (GP-16k)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

-Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (DMEM F12), Gibco/ABD

-Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640), Gibco/ABD

-Fetal Bovine serumu (FBS), Gibco/ABD

-Fosfat tuz tamponu (PBS), Thermo Scientific/ABD

-0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco/ABD

-Penisilin-Streptomisin (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco/ABD

-Sülforodamin B (SRB), Santa Cruz Biotechnology/ ABD

-Tripan mavisi (%0,5), Gibco/ABD

-Hoechst 33342, Thermo Scientific/ABD

-Dimetil sülfoksit (DMSO), Gibco/ABD

-Propidyum İyodür, Cell Signaling Technology/ABD

-Z-Vad-FMK, Enzo/ABD

-Nekrosulfonamid (NSA), RayBiotech/ABD

-Nekrostatin-1 (Nec-1), Enzo/ABD

-3-Metiladenin (3-MA), Santa Cruz Biotechnology/ABD

-Tamoksifen (TAM) 10 mg tablet, DEVA/ Türkiye

-Kristal viyole, Sigma/ABD

-Trikloroasetik asit (TCA), Sigma/ABD

- Metanol, Merck/Almanya

- Asetik asit, Merck/Almanya

- TRIS (Base), Ultra Pure, BioShop/Kanada

- Matrigel, Corning/ABD

3.1.2. Sarf Malzemeler

-25cm2 ve 75cm2'lik flask, Thermo Scientific/ABD

-96 kuyulu plate, Thermo Scientific/ABD

-6 kuyulu flat plate, Thermo Scientific/ABD

-5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Genject

-Steril tek kullanımlık filtreler (0,22 mikron çapında), Millipore/ABD

-Steril santrifüj tüpleri (15ml), Thermo Scientific/ABD

-Steril santrifüj tüpleri (50ml), Thermo Scientific/ABD

-10µl'lik pipet uçları, Corning/ABD

-100µl'lik pipet uçları, Corning/ABD

-1000µl'lik pipet uçları, Corning/ABD

-Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham/ABD

-Kriyovial, Thermo Scientific/ABD

-2 ml 'lik cam pastör pipetler, Isolab/Almanya

-Transwell insert, Corning, ABD

3.1.3. Cihazlar

-Class II Laminar Akım, Haier/Çin

-Mikro plaka spektrofotometre, Biotek/ABD

-CO_2 inkübatörü, Panasonic/ABD

-Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve/Türkiye

-Multipipet sistemi, Hamburg/Almanya

-EVOS M5000 hücre görüntüleme sistemi, İnvitrogen/ABD

-Soğutuculu Santrifüj, Beckman Culture/ABD

-10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Axygen/ABD

-Luminometre (FL×800 Mikroplate) Biotek, ABD

- Saf su cihazı, Direct-Q® 3 UV, Merck, Almanya

- Hassas terazi, Shimadzu AUW220D, Japonya

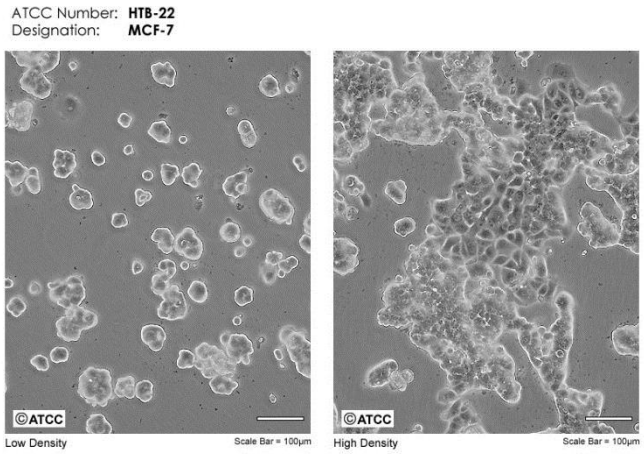
3.1.4. Kitler

- Anneksin V-FITC/PI Apoptozis Kit, Elabscience, ABD

3.2. Yöntem

3.2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Hücreler

Tez çalışmasında kanser ve sağlıklı olmak üzere 2 meme hücre soyu kullanıldı. Bunlar MCF-7 insan meme kanseri ve MCF-10A insan sağlıklı meme epitel hücre soyudur. Kullanılan insan meme kanseri hücrelerinin özellikleri aşağıda belirtilmiştir;



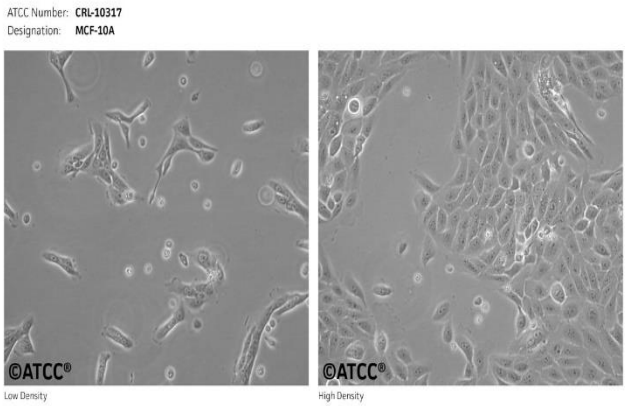
MCF-7 meme kanseri hücre soyu

-4.evre invaziv duktal karsinomalı kadın hastadan izole edilmiş

-Morfolojisi epitelyal

-Çoğalma mekanizmasında, artmış östrojen ekspresyonu ve proliferasyon, artmış Her-2/Neu/c ErbB-2 ekspresyonu

Şekil 3.22. Tez çalışmasında kullanılan MCF-7 insan meme kanseri hücre soyunun ATCC'deki faz kontrast mikroskopi görüntüleri ("American Type Culture Collection" [ATCC], 2024).



MCF-10A meme hücre soyu

-Kadın hastadan izole edilmiş

-Normal meme epitelyum hücresi

-Luminal duktal hücre karakterizasyonu

-P53 ekspresyonu normal

-Diploit karyotip

Şekil 3.23**.** Tez çalışmasında kullanılan MCF-10A insan meme hücre soyunun ATCC'deki faz kontrast mikroskopi görüntüleri (''American Type Culture Collection'' [ATCC], 2024)

3.2.2. Hücre Soyları ve Besiyerleri

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan hücre soyları ve besiyerlerinin içerikleri.

Hücre Soyu	Büyüme Besiyeri
MCF-7	%5 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin, RPMI-1640
MCF-10A	%5 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin, 20ng/ml EGF, 50ng/ml kolera toksin, 100 IU/ml insulin, 500ng/ml hidrokortizon ve DMEM-F12

3.2.3. Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması

Hücre soyları -86^{0}C ‘de ki dondurucuda stoklarda bulunan karyoviyal tüplerden alınarak 37^{0}C’de su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldü. Çözülen her hücre soyuna 5ml besiyeri eklendi ve 1000 rpm’de 5 dakika santrifuj edilerek hücreler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atılarak üzerine 1ml taze besiyeri eklendi ve tek hücre haline gelecek şekilde iyice karıştırıldı. Hazırlanan hücreler 75 cm^2’lik hücre kültürü flasklarına ekilerek homojen bir şekilde dağılmaları sağlandı. Hücreler 37^{0}C ve %5’lik CO_2 ortamda inkübe edilerek büyütüldü.

3.2.4. Hücre Soylarının Pasajlanması

Hücre soyları %80-90 yoğunluğa (konfluent) ulaştıktan sonra kullanmış oldukları besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücreler 1x PBS ile tüm yüzeyi kaplayacak şekilde yıkandı ve ardından 1x PBS’de aspire edildi. Flaska %0,05 Tripsin-EDTA eklenerek 37^{0}C ve %5’lik CO_2 ortamında 3 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde mikroskop altında hücrelerin yüzeyden kalktıkları gözlemlendikten sonra FBS içeren büyüme besiyeri eklenerek enzim aktivitesinin inhibe edilmesi sağlandı. Hücreler 15ml’lik falkon tüplere toplandı ve ardından 1000 rpm’de 5 dakika santrifuj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve kalan hücre peleti kısmı büyüme besiyeri ile süspanse edildi. Hücreler 1:3 olacak şekilde 10 ml besiyeri içinde yeni flasklara ekildi ve 37^{0}C ve %5’lik CO_2 ortamında inkübasyona bırakıldı.

3.2.5. Tripan Mavisi Dışlama Testi ile Hücrelerin Sayılması

Tripan mavisi dışlama testi, belirli bir hücre popülasyonunda canlı (boyanmamış) ve ölü (mavi) hücrelerin doğrudan sayılmasına olanak sağlar. Hücrelerin sayısını belirlemek için büyüme ortamında bulunan hücrelerin besiyeri aspire edildi. Hücreler 1x PBS ile yıkandıktan sonra %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 37°C ve %5'lik CO_2 ortamında 3 dakika inkübe edildi. Mikroskop altında hücrelerin yüzeyden kalktıkları gözlemlendikten sonra FBS içeren besiyeri eklenerek enzim aktivitesi inhibe edildi. Hücreler 15ml'lik falkon tüplere toplanarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifuj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Kalan hücre peleti taze besiyeri ile süspanse edildi ve 1:1 oranında %0,4'lük tripan mavisi boyası ile karıştırıldı. Hazırlanan hücre-boya çözeltisi Hemositometriye aktarıldı. Mikroskopta 5 ayrı alanda hücreler sayıldı ve bu sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml de bulunan canlı hücre sayısı hesaplandı.

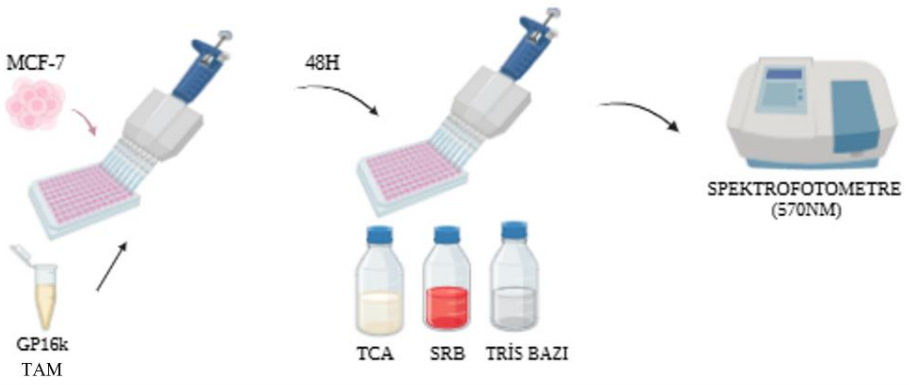
3.2.6. Kullanılan Kimyasalın ve Kemoterapötik Ajanın Hazırlanması

Yeni sentezlenen ve karakterizasyonu yapılan 2-benzofuran bağlı kalkon kompleksi (GP-16k) toz halinde olup 336 gr/mol moleküler ağırlığa sahiptir. Bu bilgiden hareketle, çözücüsü DMSO olan kimyasalın 50 mM ana stok çözeltisi hazırlandı. TAM, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Klinik kullanıma sahip TAM tablet formdan havanda ezilerek toz hale getirildi. DMSO'da çözülerek 13,46 mM ana stoklar şeklinde alikot yapıldı ve ileri analizlerde kullanılmak üzere alikotları -20°C de saklandı. Her deney için seyreltme işlemleri hücrelerin besiyerleri ile yapıldı. Hücrelerin maruz kaldığı DMSO konsantrasyonu %0,01'i geçmeyecek şekilde hazırlandı.

3.2.7. Sülforodamin B (SRB) Hücre Canlılık Yöntemi

SRB testi, protein boyası SRB'nin, trikloroasetik asitle (TCA) sabitlenmiş canlı hücrelerdeki proteinlerin bazik amino asit kalıntılarına elektrostatik ve pH'a bağlı olarak bağlanma yeteneğine dayanmaktadır. Boyanın öncelikle zayıf asidik koşullar altında hücrelere bağlanması sağlanır ve devamında zayıf bazik koşullar altında hücrelerden çıkarılarak ölçüm için çözündürülebilir (Voigt, 2005). Hücresel protein içeriğinin

ölçülmesine dayalı olarak hücre yoğunluğunun belirlenmesi için kullanılır (Vichai ve Kirtikara, 2006).



Şekil 3.24. Sülforodamin B (SRB) testinin deneysel şematik gösterimi (Biorender ile çizilmiştir)

MCF-7 meme kanseri hücreleri %5 FBS, 100 IU/ml penisilin-100 µg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri içerisinde 37^0C ve %5'lik CO_2 ortamında 75cm^2 hücre kültürü kaplarında kültüre edildi. Hücreler sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına kuyu başına $5x10^3$ hücre gelecek şekilde ekildi. Eş zamanlı olarak GP-16k değişen konsantrasyonlarında (1,56-25 µM) ve TAM (100 µM) eklenerek 24, 48 ve 72 saat boyunca 37^0C ve %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi sürelerinin bitiminde hücrelere %50 (w/v) soğuk TCA eklenerek +4°C'de 1 saat bekletildi. Ardından kuyular yıkanarak kuruması sağlandı ve kuyulara %0,4 (w/v) SRB çözeltisinden eklendi oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Boyalar kuyulardan %1'lik asetik asit çözeltisiyle yıkanarak uzaklaştırıldı. Proteinlere bağlanan SRB boyası ise 10 mM Tris-baz kullanarak çıkarıldı. Optik yoğunluk (absorbans) 570nm dalga boyunda ELISA "microplate" (Bio-Tek, ABD) okuyucusunda ölçüldü. Her bir doz üç tekrarlı olarak 3 kez çalışıldı. Tedavi uygulanmış ve kontrol hücrelerinden elde edilen absorbans değerlerine göre örneklerin % canlılığı aşağıdaki formülle hesaplandı.

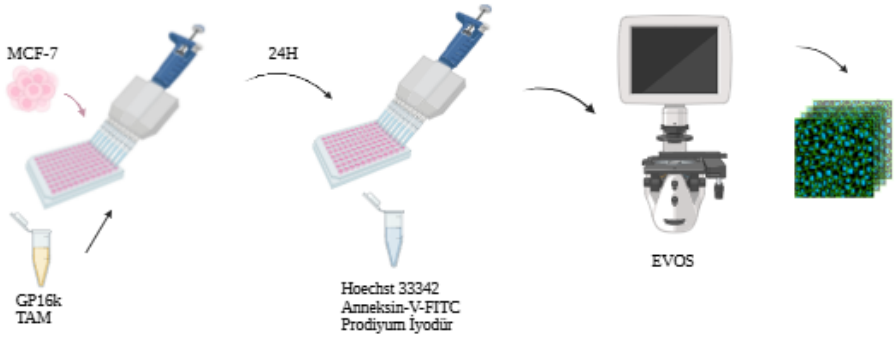
$$Canlılık\ (\%) = [100 \times (Örnek\ Abs) \div (Kontrol\ Abs)]$$

Aynı şekilde GP-16k'nın TAM ile kombinasyonu sağlıklı meme epitelyal hücre soyu MCF-10A üzerindeki hücre canlılığına etkisi aynı doz aralığında (1,56-25 μM) 48 saat araştırıldı. Elde edilen sonuçlar yukarıdaki formülle hesaplanarak Graphpad Prism 9.0 programı ile grafik haline dönüştürüldü.

3.2.8. Üçlü Floresan Boyama

Apoptozisin erken tespit edilmesi, plazma zarının sitoplazmik yüzünde bulunan bir fosfolipid olan fosfatidilserinin (PS), apoptozis sırasında çoğu hücre tipinde ve birçok apoptotik uyarıyla hücre yüzeyine taşınmasıyla gözlemlenir. PS'nin hücre yüzeyine lokalizasyonu, apoptotik hücrelerin komşu hücreler veya makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar. PS, hücre yüzeyine ulaştığında, floresan izotiyosiyanat (FITC) etiketli annexin V'nin bağlanmasıyla tespit edilebilir. Annexin V proteini, PS gibi negatif yüklü fosfolipitlere kalsiyum varlığında spesifik olarak bağlanan bir fosfolipit bağlayıcı protein ailesine aittir. Çoğu durumda, PS'nin hücre yüzeyine taşınması; DNA yoğunlaşmasından ve membran tomurcuklanmasından önce gerçekleşir, böylece erken apoptozis hızlı ve kolay tespit edilir (Bossy-Wetzel & Green, 2000). Hoechst 33342 veya 4′,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) gibi DNA'ya bağlanan boyalar, membran bütünlüğü korunanlar dahil olmak üzere, hücrelerde nükleer yoğunlaşmayı gözlemlemek için kullanılabilir (Crowley ve ark., 2016).

Floresan dışlama boyası propidyum iyodür (PI), kültür sistemlerinde yaygın olarak hayati bir boya olarak kullanılır ve sağlam bir plazma membranı olmayan ölmekte olan hücrelerdeki çekirdeği etiketler Geç apoptotik ve nekrotik hücrelerde, plazma ve nükleer membranların bütünlüğü azalır. PI'nin membranlardan geçmesine, nükleik asitlere karışmasına ve kırmızı floresans göstermesine izin verir (Rieger ve ark., 2011).



Şekil 3.4. Üçlü floresan boyamanın deneysel şematik gösterimi (Biorender ile çizilmiştir)

MCF-7 hücrelerindeki GP-16k ve TAM neden olduğu ölüm modunu belirlemek amacıyla üçlü floresan boyama yöntemi kullanıldı. Hücrelerdeki çekirdek morfolojisi Hoechst 33342 floresan boyası kullanılarak belirlendi. Hücreler eş zamanlı olarak Anneksin V-FITC (yeşil floresan) ve PI (kırmızı floresan) ile boyandı. Bu amaçla MCF-7 hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına $5x10^3$ hücre/kuyu miktarında ekilerek 37 ^{0}C %5'lik ortamda GP-16k'nın (1,56-6,25 µM) ve TAM 100 µM dozu ile 24 saat maruz bırakıldı. Tedavi sürecinin ardından Annexin tampon çözeltisinde bulunan 3 µg/ml Hoechst 33342, 1 µg/ml PI ve Annexin-V-FITC boyalarından oluşan çözeltiyle 20 dakika boyunca 37^{0}C ve %5'lik CO_2 ortamında inkübe edildi. Hücrelerin çekirdek morfolojileri ve membran bütünlüğü EVOS M5000 Invitrogen floresan mikroskobu ile değerlendirildi.

Çizelge 3.2. Erken, geç apoptozis ve nekrotik hücrelerin gösterimi

	Erken Apoptopik Hücreler	**Geç Apoptopik Hücreler**	**Nekrotik Hücreler**	**Kontrol Hücreleri**
Hoechst 33342	+	+	+	+
Anneksin-V-FITC	+	+	-	-
Propidyum İyodür (PI)	-	+	+	-

3.2.9. İnhibitör Uygulamaları

3.2.9.1. Apoptotik Hücre Ölümünün Doğrulanması

Kaspazlar, hücredeki apoptoz sürecinde önemli bir role sahip olan protein parçalayıcı enzimlerdir. Pan-kaspaz inhibitörü Z-VAD-FMK, hücrelerde programlanmış hücre ölümü (apoptoz) sırasında kaspaz enzimlerinin aktivasyonunu engelleyen bir bileşiktir. Z-VAD-FMK, hücrelerin apoptoz sürecinde kaspaz enzimlerinin inaktivasyonuna bağlı olarak hücre ölümüne maruz kalmalarını önleyerek hücre hayatta kalma oranlarını artırır (Van Noorden, 2001).

GP-16k ve TAM ile kombinasyona maruziyet sonucu hücre ölümünün apoptosis ile gerçekleştiğini göstermek amacıyla pan-kaspaz Z-VAD-FMK kullanıldı. MCF-7 meme kanseri hücre soylarının pan-kaspaz inhibitörü Z-VAD-FMK (20 μM) (Akgun ve ark., 2019) ile 24 saat uygulandı. Ardından GP-16k (1,56-12,5 μM) doz aralığında ve TAM'e (100 μM) 48 saat maruz bırakıldı. Tedavi sonrası kaspaz inhibitörü ile ön tedavi görmüş ve görmemiş hücrelerdeki canlılık SRB canlılık analizi ile tayin edildi.

3.2.9.2. Nekroptozis Hücre Ölümü RIPK1 İnhibitör Analizi

Nekrostatinler ise RIPK1'in kinaz aktivitesini inhibe eden triptofan bazlı bileşiklerdir. Nekrostatin-1 (Nec-1) özel bir nekroptoz inhibitörü olduğu doğrulanan RIP1 kinazın seçici ve güçlü bir allosterik inhibitörüdür (Liu ve ark., 2015). Ölüm alanı reseptör etkileşimi için temel bir yapı olan T-döngüsüyle etkileşime girerek, RIP1 kinaz aktivitesini inhibe eder. ATP bağlayıcı aktif merkeze yakın kinaz alanının hidrofobik cebine allosterik olarak bağlanır ve RIP1, DLG-out inaktif bir konformasyon benimser. Aktivasyon halkasına bağlandıktan sonra Nec-1, RIP1 otofosforilasyonunu güçlü bir şekilde inhibe edebilir. RIP1 fosforilasyonu, RIP3'ün RIP1'e alınmasına ve ardından RIP1-RIP3 kompleksinin oluşumuna yol açar ve bu da MLKL'yi fosforile eder. Bu nedenle, Nec-1, RIP1 fosforilasyonunu inhibe ederek RIP1-RIP3-MLKL sinyal iletimini etkili bir şekilde engeller (Cao & Mu, 2021).

GP-16k ve TAM ile kombinasyona maruziyet sonucu hücre ölümünün nekroptozis ile gerçekleşip gerçekleşmediğini göstermek için Nec-1 kullanıldı. MCF-7 hücreleri Nec-1 (25 μM) (Aztopal ve ark., 2018) ile 24 saat tedavi edildi. Süre sonunda kuyulardan Nec-1 çekildi. Ardından GP-16k (1,56-12,5 μM) dozlarında ve TAM (100 μM) 48 saat maruz bırakıldı. Tedavi sonrası RIPK1 inhibitörü ile ön tedavi görmüş ve görmemiş hücrelerdeki canlılık SRB canlılık analizi ile tayin edildi.

3.2.9.3. Nekroptozis Hücre Ölümü MLKL İnhibitör Analizi

Psödokinaz karışık soy kinaz alanı benzerinin (MLKL), protein kinaz RIPK3 tarafından fosforilasyonu üzerindeki aktivasyonu, hücresel membranların parçalanmasına hücre içi bileşenlerin salınmasına neden olduğu nekroptozu tetikler (Yoon ve ark., 2017). Nekrosulfonamid (NSA), MLKL üzerindeki Cys86'yı hedef alarak nekroptozu engeller ve böylece MLKL oligomerizasyonuna müdahale eder. Hem NSA hem de inhibitör monobodiler sadece MLKL'nin membranlara taşınmasını bloke eder, ancak insan MLKL fosforilasyonunu veya oligomerizasyonunu engellemez. MLKL çoğu durumda sitomembran translokasyonundan bağımsız bir mekanizma kullanarak nekroptotik olmayan işlevleri ortaya çıkarmaktır (Zhan ve ark., 2021).

GP-16k ve TAM ile kombinasyona maruziyet sonucu hücre ölümünün nekroptozis olduğunu göstermek için NSA kullanıldı. MCF-7 hücreleri 4 saat boyunca NSA (5 μM) ya maruz bırakıldı (Dos Santos ve ark., 2020).Ardından GP1-16k (1,56-12,5 μM) dozlarında ve TAM (100 μM) 48 saat boyunca uygulandı. Tedavi sonrası MLKL inhibitörü ile ön tedavi görmüş ve görmemiş hücrelerdeki canlılık SRB canlılık analizi ile tayin edildi.

3.2.9.4. Otofoji Hücre Ölümü İnhibitör (3-Metiladenin) Analizi

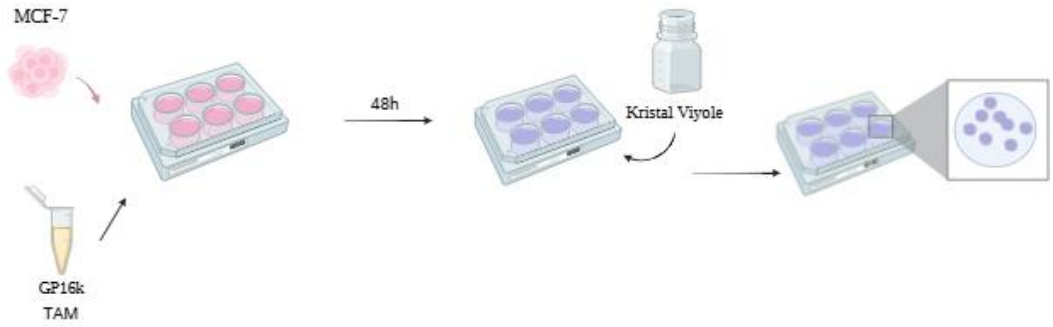
3-Metiladenin (3-MA), PI3K'yı inhibe ederek otofajiyi engelleyen yaygın bir otofaji inhibitörüdür (Ren ve ark., 2023). PI3K inhibitörlerinin tümü hem sınıf I hem de sınıf III PI3K'yı hedef almasına rağmen, PI3P üretimini engellemek için PI3K'yı inhibe ederek otofajiyi baskılamaktadır. Ayrıca 3-MA diğer kinazları, glikojen

metabolizması, endositoz, proteoliz ve mitokondriyal geçirgenlik geçişi gibi hücresel süreçleri otofaji-bağımsız bir şekilde etkileyebilir (Wu ve ark., 2010).

GP-16k ve TAM ile kombinasyonuna maruziyet sonucu hücre ölümünün otofoji ile gerçekleşip gerçekleşmediğini göstermek için 3-MA kullanıldı. MCF-7 hücreleri 3-MA otofaji inhibitörü (1,25 µM) 4 saat boyunca uygulandı (Aydinlik ve ark., 2017). Ardından GP-16k (1,56-12,5 µM) ve TAM (100 µM) 48 saat maruz bırakıldı. Tedavi sonrası otofaji inhibitörü 3-MA ile ön tedavi görmüş ve görmemiş hücrelerdeki canlılık SRB canlılık analizi ile tayin edildi.

3.2.10. Koloni Oluşturma Testi

GP-16k ve TAM ile ikili kombinasyonu sonrasında, tek bir hücrenin, en az 50 hücreden oluşan topluluk/koloni haline gelme kabiliyetinin ölçüldüğü koloni oluşumu analizi veya klonojenik testi yapıldı (Franken ve ark., 2006).



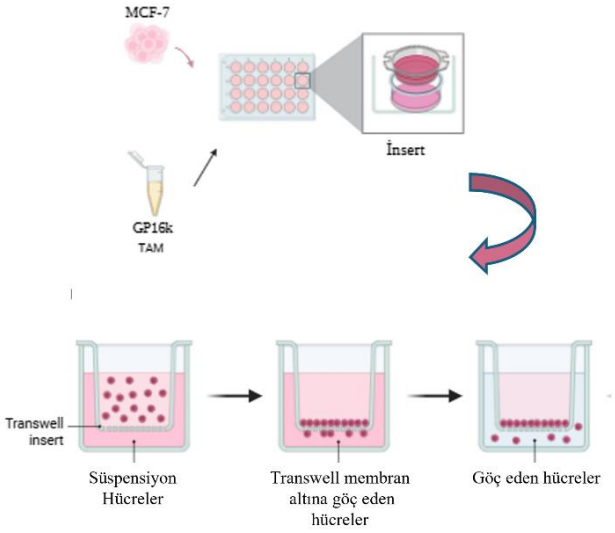
Şekil 3.5. Koloni oluşturma testi analizinin deneysel şematik gösterimi (Biorender ile çizilmiştir)

Koloni oluşturma testi için, MCF-7 hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyu başına $3x10^3$ hücre olacak şekilde 2 ml besiyeri içerisine ekildi. 24 saat sonrasında GP-16k (0,78-3,12 µM) ve TAM (100 µM) dozu eklendi, ardından 48 saat boyunca hücreler tedavi edildi. Süre bitiminde GP-16k ve TAM kuyulardan çekildi. 1x PBS ile kuyular

yıkanarak kuyulardan uzaklaştırıldı. Devamında kuyulara 2ml büyüme medyumu eklendi. Hücrelerin koloni oluşturma kabiliyeti her gün ışık mikroskopu ile takip edildi. 5 gün sonunda, kontrol kuyusundaki her bir kolonide 50 hücre oluştuğu için deney sonlandırıldı. Medyumlar uzaklaştırılıp kuyular 1x PBS ile yıkandı. Kuyular %100'lük metanol ile oda sıcaklığında 10 dakika boyunca fikse edildi. Fiksasyon sonucunda %0,05'lik kristal viyole ile boyanıp 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Fazla boya 1x PBS ile yıkanarak kuyulardan uzaklaştırıldı. Oluşan koloniler fotoğraflandı ve mikroskop görüntüleri çekildi.

3.2.11. Migrasyon Analizi

Göç etme yeteneği, hücrelerin dokular içinde veya farklı organlar arasında konumlarını değiştirmelerine olanak tanır. Göç, hücrelerin bazal membranlar, ekstraselüler matriks (ECM) lifleri veya plastik plakalar gibi bir substrat üzerinde yönlendirilmiş hareketi olarak tanımlanır. Bu nedenle, göç, herhangi bir engelleyici lif ağı olmadan 2B yüzeylerde meydana gelir (Kramer ve ark., 2013).GP-16k ve TAM ile kombinasyonunun, tedavi sonrasında hücrelerin migrasyon (göç etme) üzerindeki özelliklerini araştırmak için transwell boyden chamber hücre migrasyon testi yapıldı.



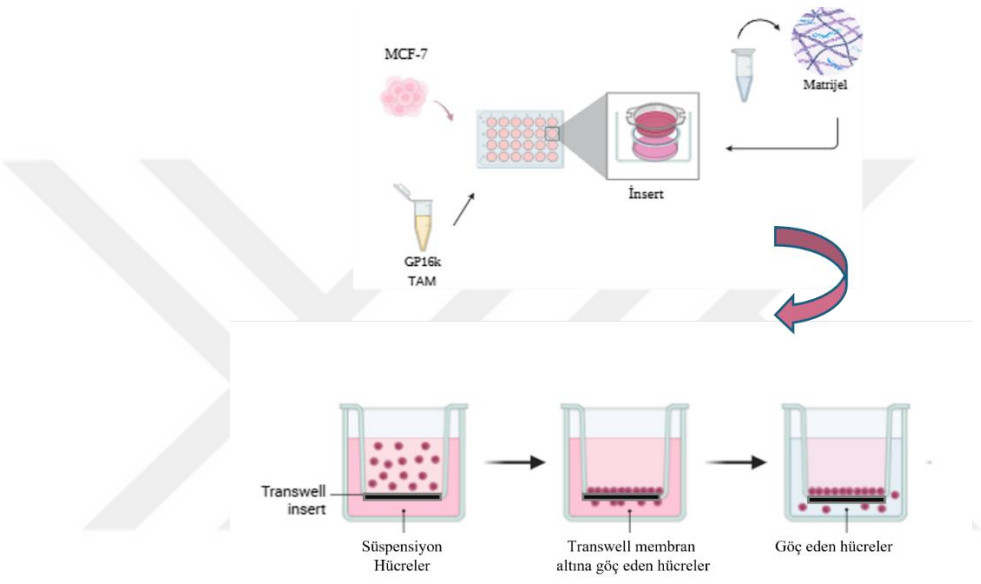
Şekil 3.6. Transwell migrasyon analizinin deneysel şematik gösterimi (Biorender ile çizilmiştir)

Hücre süspansiyonu (100 µL) %1 FBS içeren besiyeri içerisinde kuyu başına $1,5x10^5$ hücre olacak şekilde hazırlandı ve (8.0 µm por çapındaki) insertler içine bırakıldı. MCF-7 hücreleri %1 FBS içeren besiyeri içerisinde hazırlanan GP-16k (6,25 ve 12,5 µM) ve TAM (100 µM) maruz bırakıldı. İnsertlerin dışında kalan alanlara kemoatraktan özellik sağlaması için %10 FBS içeren besiyeri eklendi. Hücreler bu şekilde 37^0C ve %5'lik CO_2 ortamında 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından insertler hücre kültürü kaplarından çıkarıldı ve 1 kez 1x PBS ile yıkanıp, %100'lük soğuk metanol ile fikse edildi. Tekrar 1 kez PBS ile yıkandı. Ardından %0,05 kristal viyole (%20'lik metanol ile hazırlanmış) boyası ile boyandı. Her bir insert için rastgele 3 alan mikroskop altında incelendi ve fotoğraflandı.

3.2.12. Matrigel İnvazyon Analizi

İnvazyon, 3B bir matris boyunca hücre hareketi olarak tanımlanır ve buna 3B ortamın yeniden yapılandırılması eşlik eder. Matris boyunca hareket etmek için, bir hücre şeklini değiştirmeli ve bir yandan hücre bağlanma substratını sağlayan, diğer yandan hareket eden hücre gövdesine doğru bir bariyer oluşturan ECM ile etkileşime girmelidir.

İnvazyon yapışmayı, hücre dışı matris bileşenlerinin proteolizini ve göçü gerektirir, bu nedenle istilacı hücreler ECM' yi yeniden şekillendirir (Kramer ve ark., 2013) GP-16k ve TAM ile kombinasyonun metastaz üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla hücre göçünün tayini için kullanılan transwell boyden chamber matrigel hücre invazyon analizi kullanıldı (Justus ve ark., 2014).



Şekil 3.7. Matrigel transwell invazyon analizinin deneysel şematik gösterimi (Biorender ile çizilmiştir)

Bu amaçla hücre invazyonu için kullanılacak insertler öncelikle serumsuz besiyerinde 0,4 mg/ml son konsantrasyonunda hazırlanmış matrigel ile kaplandı. 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına yerleştirilmiş insertler 37^0C'lik inkübatörde 2,5 saat bekletilerek matrigellerin jelleşmesi sağlandı. Hücre süspansiyonu (100 µL) %1 FBS içeren besiyeri içerisinde kuyu başına $1,5x10^5$ hücre olacak şekilde hazırlandı. MCF-7 hücreleri %1 FBS içeren besiyeri içerisinde hazırlanan GP-16k (6,25 ve 12,5 µM) ve TAM (100 µM) maruz bırakıldı. İnsertlerin dışında kalan alanlara kemoatraktan özellik sağlaması için %10 FBS içeren besiyeri eklendi. Hücreler bu şekilde 37^0C ve %5'lik CO_2 ortamında 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından insertler hücre kültürü kaplarından

çıkarıldı ve 1 kez 1x PBS ile yıkanıp, %100'lük soğuk metanol ile fikse edildi. Tekrar 1x PBS ile yıkandı. Ardından %0,05 kristal viyole (%20'lik metanol ile hazırlanmış) boyası ile boyandı. Her bir insert için rastgele 3 alan mikroskop ile incelendi ve fotoğraflandı.

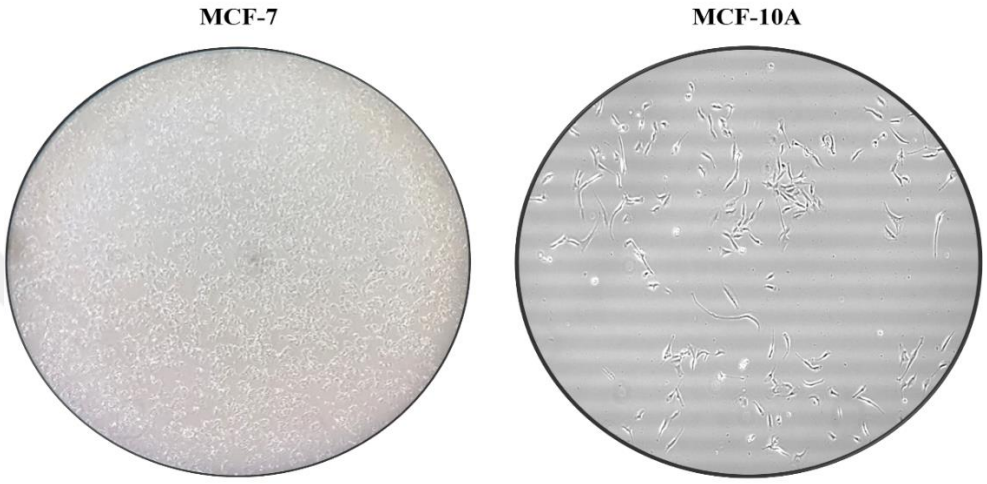
3.2.13.İstatiksel Analiz

Tüm deneysel veriler GraphPad programı kullanılarak çoklu veri analizi ANOVA ile değerlendirildi. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler *p<0,05, ***p<0,01, ***p<0,001 değerine göre belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Meme Kanseri ve Sağlıklı Hücrelerin Kültürde Çoğaltılması

Meme kanseri (MCF-7) ve sağlıklı meme epitel hücre soyu (MCF-10A) Çizelge 3.1 'de verilen besiyerleri içerisinde 37^0C ve %5'lik CO_2 ortamında %80 konfluensiye ulaşıncaya kadar çoğaltıldı. Hücrelerin morfolojik görüntüleri Şekil 4.1' de verilmiştir.

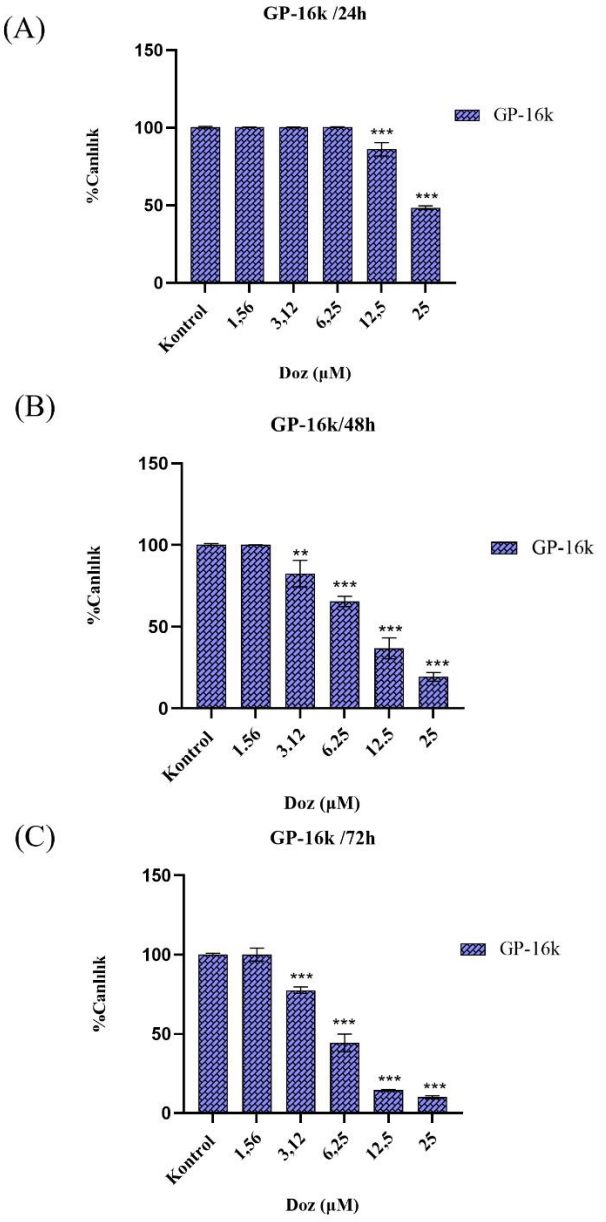


Şekil 25. Tez çalışmasında kullanılan meme kanseri hücre soyu MCF-7 (4x büyütme oranı) ve sağlıklı meme epitel hücre soyu MCF-10A (10x büyütme oranı) hücrelerinin ışık mikroskopu görüntüleri

4.2. SRB Canlılık Analizi

GP-16k 50 mM ve TAM 13,46 mM ana stokları hazırlanan bileşikler -20°C'den alınarak kültür ortamına alındı. MCF-7 hücreleri üzerinde GP-16k'nin farklı dozları (1.56-25 µM) hücrelerle eş zamanlı olarak uygulanarak 24, 48 ve 72 saat boyunca tedavi edildi (Şekil 4.2). GP-16k'nın 24 saatlik SRB hücre canlılık analizi sonucunda yüksek dozlarda (12,5 ve 25 µM) sitotoksik etki görülürken canlılık sırayla %86,12 ve %48,46 olarak belirlendi ($p<0,01$) (Şekil 4.2 A). Özellikle 48 saatlik canlılık analizi sonucunda kompleksin daha düşük dozlarında da (3,12-25 µM) hücre canlılığında azalmalar olduğu görüldü. Hücre canlılığı 3,12 µM; %82,52, 6,25 µM; %65,53, 12,5 µM; %36,76 ve 25 µM; %19,29 olarak belirlendi ($p<0,0001$) (Şekil 4.2 B). Tedavi süresi arttıkça (72 saat) canlılığın özellikle (3,12-25 µM) dozları arasında önemli oranda düştüğü gözlendi. Böylece hücre canlılığı

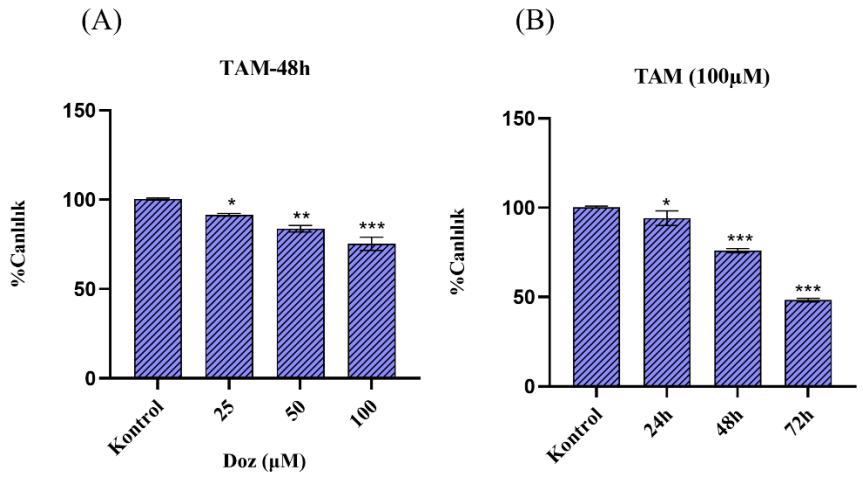
sırayla 3,12 µM; %77,62, 6,25 µM; %54,02, 12,5 µM;14,50 ve 25 µM;10,15 olarak belirlendi, böylece GP-16k doz bağımlı sitotoksik etki gösterdi (p<0,001) (Şekil 4.2 C).



Şekil 26. Meme kanseri hücre soyu MCF-7 üzerinde GP-16k'nın 24, 48 ve 72 saatlik SRB canlılık analizi sonuçları. * Kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir (*p<0,05, ***p<0,01, ***p<0,001). Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma.

SRB sonucuna göre, GP-16k'nın IC_{50} değerleri 24, 48 ve 72 saat için sırayla 24,49 µM, 9,63 µM ve 6,88 µM olarak belirlendi (Çizelge 4.1).

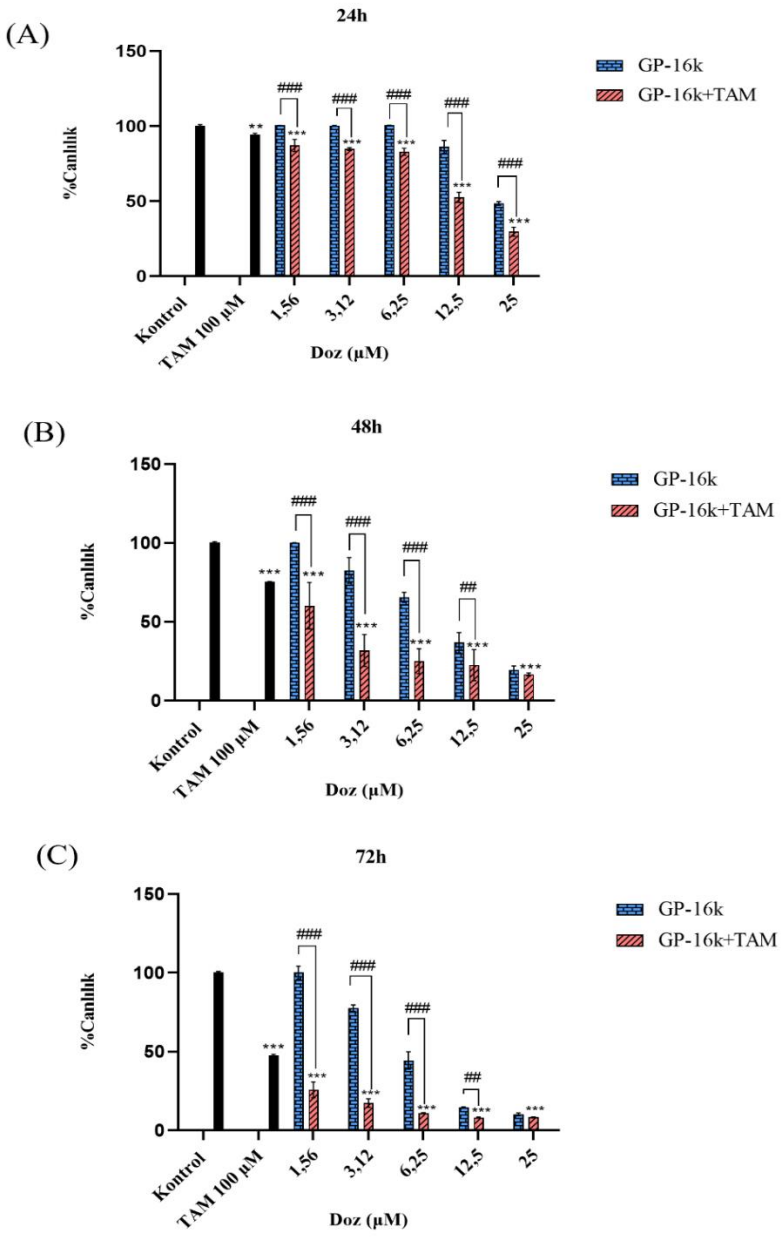
TAM'ın farklı dozları (25-100 µM) 48 saat boyunca hücrelere uygulandı. Elde edilen sonuçlara göre hücre canlılığı 25 µM dozda %91, 50 µM dozda %83,3 ve 100 µM dozda %75 olduğu görüldü (Şekil 4.3 A). En etkili doz olarak belirlenen 100 µM dozu 24, 48 ve 72 tedavi sürelerinin ardından sırayla 24 saat için %94,14; 48 saat için %75,34 ve 72 saat için %47,32 hücre canlılığına yol açtı ($p<0,05$) ($p<0,01$) ($p<0,001$) (Şekil 4.3 B).



Şekil 27. MCF-7 hücrelerinin Tamoksifen (TAM) ile tedavisinin SRB hücre canlılık analizi sonuçları. Tedavi görmemiş kontrole göre TAM'ın farklı dozlarının (25-100 µM) 48 saat tedavi sonucu (A) ve TAM 100 µM dozunun farklı tedavi sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) canlılığa etkisi (B) karşılaştırıldığında (*$p<0,05$, ***$p<0,01$, ***$p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma.

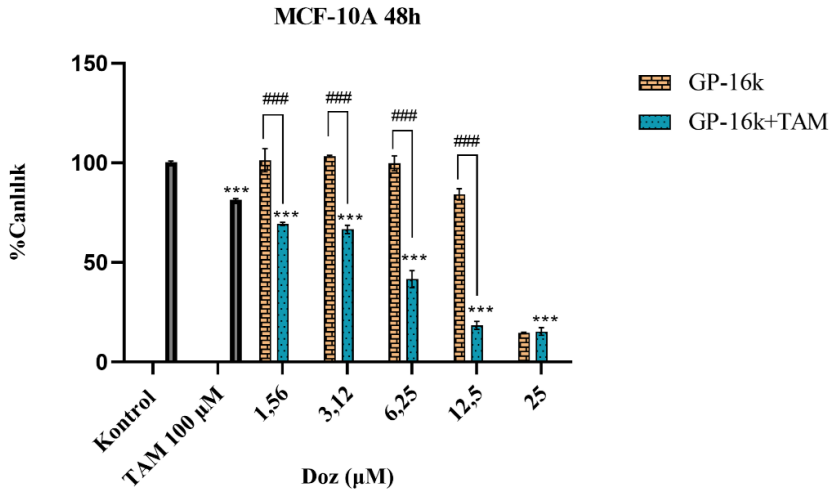
MCF-7 hücre soyunda farklı zaman aralıklarında (24, 48 ve 72 Saat) GP-16k (1,56-25 µM) ve TAM'ın seçilen 100 µM dozu ile kombine tedavisi uygulandı. Kombinasyonun kompleksin tek başına hücre canlılığına etkisinden daha çok, doza bağlı olarak azalmaya sebep olduğu görüldü (Şekil 4.4). Ayrıca bu etkinin tedavi süresi arttıkça belirgin olarak hücre canlılığında düşüşe sebep olduğu gözlendi. 24 saatlik tedavi sonucu kombinasyonun 12,5 µM; %52,52 ve 25 µM; %29,72 hücre canlılığı gözlemlenirken (Şekil 4.4 A), 48 saatlik tedavi sonucunda 1,56-25 µM arasındaki tüm dozlarda sırayla 1,56 µM; %60,16, 3,12 µM; %31,78, 6,25 µM; %25,04, 12,5 µM; %22,52 ve 25 µM;

%16,65 hücre canlılığında düşüşe sebep oldu (Şekil 4.4 B). 72 saatlik tedavi sonucunda 1,56-25 µM (Şekil 4.4 C) arasındaki tüm dozlarda kontrole kıyasla belirgin olarak azalmalar görüldü. 24, 48 ve 72 saat zaman aralıklarında IC_{50} değerleri sırası ile 13,88 µM, 2,12 µM ve <1,56 µM olarak belirlendi (Çizelge 4.1). Alınan bu sonuçlarla birlikte ileri analizde kullanılmak üzere uygulanacak kombinasyon tedavisinin 48 saat GP-16k (1,56-12,5 µM) ve TAM (100 µM) kombinasyonu olmasına karar verildi ($p<0,001$) (Şekil 4.4).



Şekil 28. MCF-7 hücrelerinin GP-16k (1,56-25 µM) ve Tamoksifen (TAM) 100 µM dozu ile kombinasyonlarının 24, 48 ve 72 saat tedavisinin SRB hücre canlılık analizi. Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında (*p<0,05, ***p<0,01, ***p<0,001) ve GP-16k'ya göre karşılaştırıldığında (#p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma.

Bunun yanı sıra GP-16k'nın farklı dozları ve TAM'nin kombinasyonları sağlıklı meme epitel hücre soyu MCF-10A üzerindeki sitotoksik etkisi SRB hücre canlılık analizi ile belirlendi. Bu analiz sonuçlara göre 48 saatlik tedavi sürecinde sağlıklı hücrelerde, aynı dozlarda (1,56-25 µM) GP-16k'nın kanser hücrelerinde sebep olduğu kadar sitotoksik etkiye sebep olmadığı ve kombinasyon tedavisinin aynı şekilde sağlıklı hücreler üzerinde kanser hücrelerinde olduğu kadar sitotoksik etkisi olmadığı tespit edildi (p<0,001) (Şekil 4.5). GP-16k (1,56-6,25 µM) dozlarında hücre canlılığında azalma göstermezken 12,5 µM dozunda %84,28 ve 25 µM dozunda %14,66 canlılık gösterdi. Kombinasyon da ise bu durum 1,56 µM; %69,38, 3,12 µM; %66,62, 6,25 µM; %41,64, 12,5 µM; %18,14 ve 25 µM; %15,36 olarak belirlendi.



Şekil 29. Sağlıklı meme epitel MCF-10A hücrelerinin GP-16k (1,56-25 µM) ve Tamoksifenin (TAM) 100 µM dozu ile kombinasyonlarının 48 saat tedavisinin SRB hücre canlılık analizi. Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre farklı dozlar karşılaştırıldığında (*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001) ve GP-16'ya göre karşılaştırıldığında (#p<0,05 ##p<0,01 ###p<0,001) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma.

MCF-10A sağlıklı meme epitel hücrelerindeki IC_{50} değerleri GP-16k için 18,66 µM iken kombinasyon tedavisinde 5,20 µM olarak belirlendi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. GP-16k ile TAM kombinasyonunun MCF-7 ve MCF-10A hücreleri üzerinde IC_{50} değerleri.

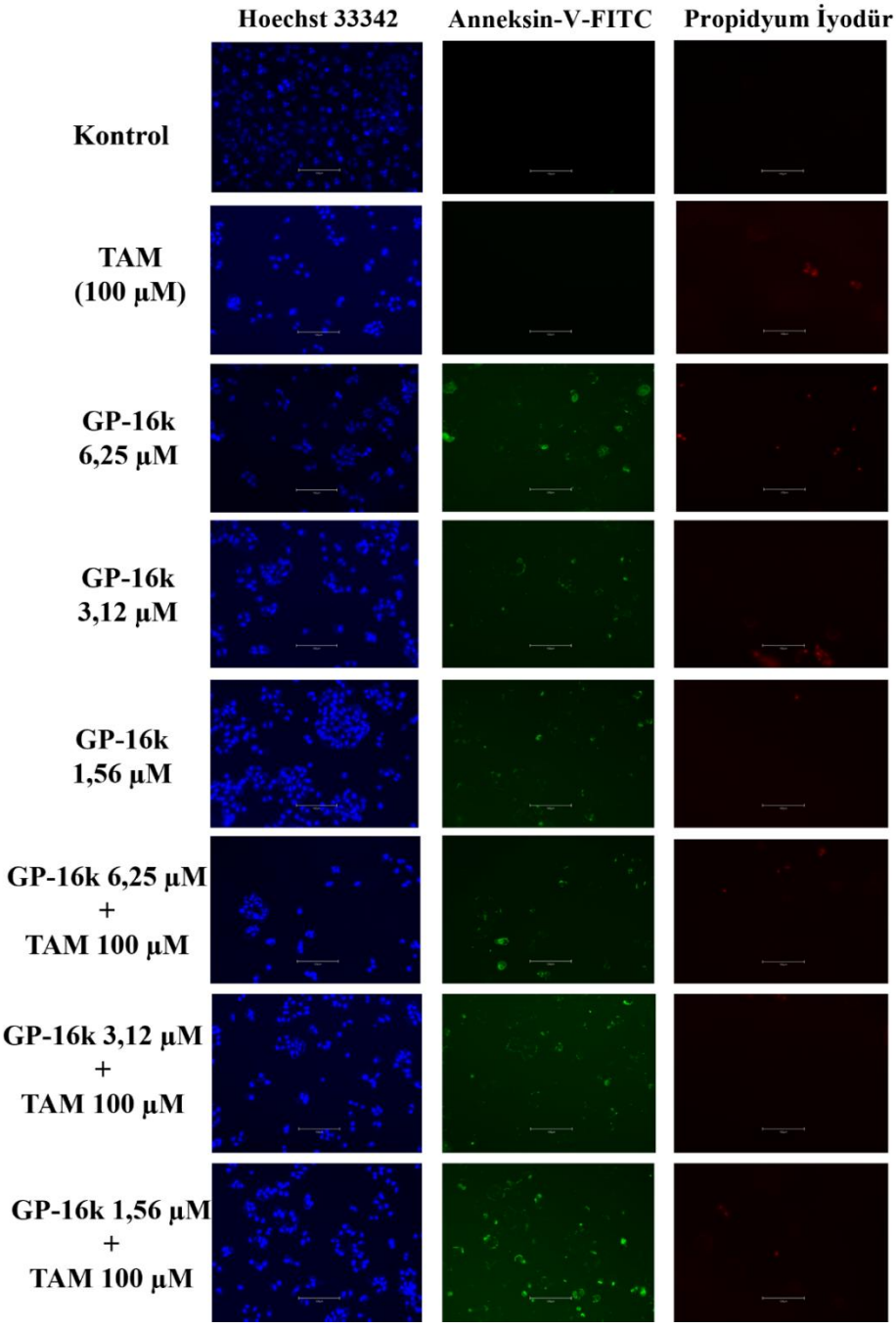
IC_{50} (µM)	**MCF-7**			**MCF-10A**
	24h	**48h**	**72h**	**48h**
GP-16k	24,49	9,63	6,88	18,66
GP-16k+TAM	13,88	2,12	<1,56	5,20

4.3. Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri Üzerinde Sebep Olduğu Hücre Ölümü Modunun Belirlenmesi

Kombinasyon tedavisinin hücre ölüm modunu belirlemek amacıyla üçlü boyama yöntemi kullanıldı. İnsan meme kanseri MCF-7 hücrelerine 24 saat boyunca GP-16k'nın artan dozları (1,56-6,25 µM) ve kombinasyon için TAM'nin 100 µM dozu uygulandı. Tedavi süresi sonunda üçlü boyama yöntemi Hoechst 33342, Annexin-V-FITC ve propidyum iyodür (PI) floresan boyaları ile boyandı. Floresan mikroskop altında 20x objektifle hücrelerin morfolojik analizi için her kuyuda aynı alan 3 farklı floresan filtre görüntülendi ve fotoğraflandı.

MCF-7 hücrelerinde GP-16k ile 24 saatlik tedavi sonucu hücrelerde az miktarda Annexin-V pozitif hücreler görülürken PI-pozitif hücrelere sadece yüksek dozlarda rastlandı (Şekil 4.6). GP-16k tedavisi, özellikle yüksek dozlarda (6,25 µM) Annexin-V sinyalinde artışa neden oldu. Bu, apoptozun erken evresinde hücrelerin artışını göstermektedir. Ancak GP-16k ile TAM kombinasyon tedavisinde Annexin-V pozitif hücrelerde her dozda (1,56-6,25 µM) artış görülürken, PI-pozitif hücreler az olarak görüldü. Hoechst 33342 boyaması sonucu apoptotik belirteçler olarak kabul edilen piknotik ve parlak hücre nükleusları net bir şekilde izlendi. Yine doza bağlı olarak kombinasyonlarda hücre çekirdeklerinin yoğunlaşarak küçüldüğü gözlendi. Tekli

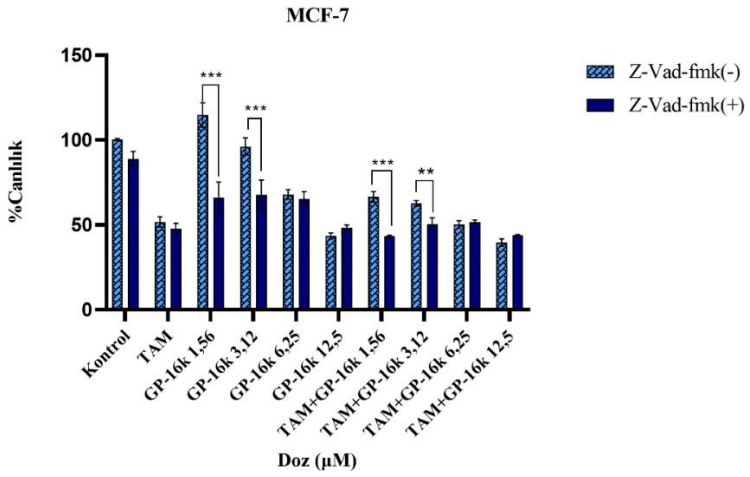
uygulamalara kıyasla kombinasyon tedavilerinde hücre canlılığında azalma görüldü (Şekil 4.6).



Şekil 30. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, GP-16k'nın farklı dozları (1,56-6,25 µM) ve Tamoksifen (TAM) 100 µM kombinasyonu ile 24 saatlik tedavileri sonrasındaki üçlü floresan boyama sonuçları. Bileşik uygulanmamış hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. 20x büyütme. (Ölçek çubuğu: 125 µm).

4.4. Z-VAD-FMK Bulguları

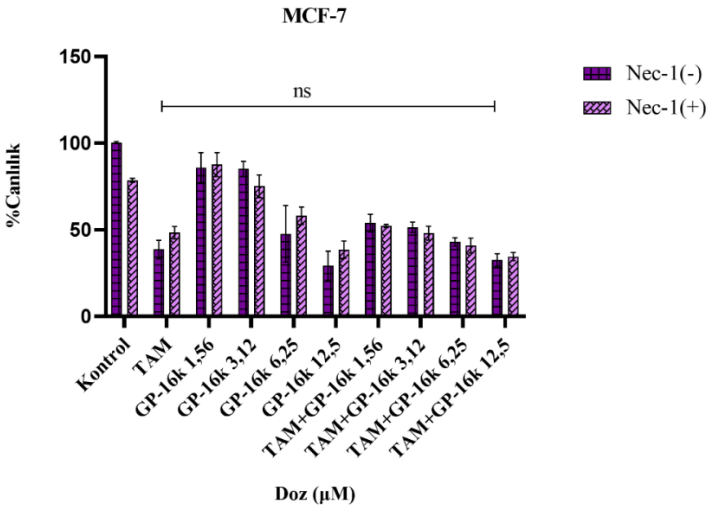
Kaspazlar, hücre ölümü (apoptoz) sürecinde önemli rol oynayan bir grup enzimdir. Bu sebeple MCF-7 meme kanseri hücrelerine GP-16k (1,56-12,5 µM) ve TAM 100 µM kombinasyonunun kaspazları tetikleyerek hücreleri ölüme götürdüğünü ispatlamak için pan kaspaz inhibitörü Z-VAD-FMK uygulandı. Hücreler 24 saat boyunca ön uygulama Z-VAD-FMK ile tedavi edilip ardından 48 saat boyunca GP-16k ve TAM'a maruz bırakıldı. Sonuçlar, pan-kaspaz inhibitörü ön tedavisi uygulanan GP-16k'nın 1,56 ve 3,12 dozlarının hücre canlılığını azalttığını gösterdi. Z-VAD-FMK uygulanmayan kombinasyon dozlarında hücre canlılığı sırayla 1,56 µM; %66,54, 3,12 µM; %62,63, 6,25 µM; %50,36 ve 12,5 µM; %39,66 olurken Z-VAD-FMK uygulanan kombinasyon dozları 1,56 µM; %43,36, 3,12 µM; %50,48, 6,25 µM; %51,70 ve 12,5 µM; %43,98 olarak belirlendi. Z-VAD-FMK ön uygulama yapılan hücrelerde kombinasyonun 1,56 ve 3,12 µM dozlarında canlılığın azaldığı görüldü. Elde edilen bu sonuçlarla birlikte kombinasyonlarda Z-VAD-FMK ön tedavisi uygulanan hücrelerde, uygulanmayan hücrelere göre canlılığın artmadığı belirlendi (Şekil 4.7).



Şekil 31. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin pankaspaz inhibitörü Z-VAD-FMK (20 µM) ile 24 saat ön tedavisi sonrasında, GP-16k (1,56-12,5 µM) ve Tamoksifenle (TAM) 100 µM kombinasyonuna 48 saat maruz bırakılmasının tedavi sonrası hücre canlılığı sonuçları. Aynı zaman periyotları içinde eşit dozlarda inhibitör almış (Z-VAD-FMK (+)) ve almamış (Z-VAD-FMK (-)) GP1-16k'nın muamelelerin etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$) ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma.

4.5. Nekrostatin-1 (Nec-1) Bulguları

Nec-1, RIP1 sinyalleşme basamaklarını inhibe ederek nekroptoz sinyal yolaklarını durdurur. Ayrıca Nec-1 ROS'u hedef alarak nekroptozu da etkiler ve RIP1 'i hedef alarak apoptozu inhibe eder (Cao & Mu, 2021). Bu sebeple MCF-7 meme kanseri hücrelerine RIPK1 inhibitörü Nec-1 ile hücreleri 24 saat ön tedavisinin ardından hücreler 48 saat GP-16k (1,56-12,5 µM) ve TAM'e (100 µM) maruz bırakıldı. Sonuçlar SRB canlılık analizi ile ölçüldü. Alınan bulgularda MCF-7 hücrelerinde Nec-1 ile muamele edilen kombinasyon dozlarında (1,56-12,5 µM) hücre canlılığında herhangi bir değişim olmadığı görüldü (Şekil 4.8).

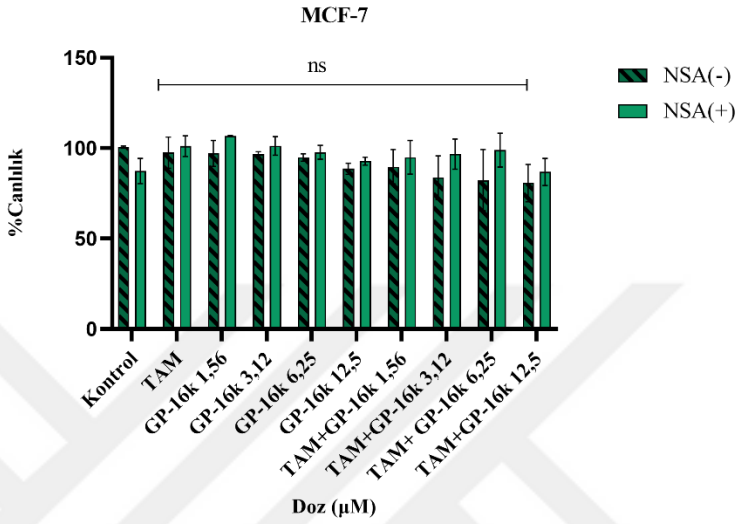


Şekil 32. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin hücrelerinin nekroptoz inhibitörü Nec-1 (25 µM) ile 24 saat tedavisi sonrasında, GP-16k (1,56-12,5 µM) ve Tamoksifenle (TAM) 100 µM kombinasyonuna 48 saat tedavi sonrası hücre canlılığı sonuçları. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma.

4.6. Nekrosulfonamid (NSA) Bulguları

Nekrosulfonamid (NSA), nekroptozu baskılayan spesifik bir MLKL inhibitörüdür. MLKL'nin N-terminal alanını hedefler ve sonuç olarak MLKL'nin aracılık ettiği nekrotik membran bozulmasını bloke eder (Sun ve ark., 2012). Bu sebeple MLKL inhibitörü olan NSA ile MCF-7 hücrelerine 4 saat boyunca muamele edildi. Süre sonunda hücrelere hem

GP-16k'nın (1,56-12,5 µM) kendi başlarına hem de TAM'ın 100 µM dozu ile kombinasyona 48 saat boyunca maruz bırakıldı. Sonuçlar SRB canlılık analizi ile ölçüldü. Alınan sonuçlarda GP-16k'nın herhangi bir dozunda ve TAM ile kombinasyonunda hücre canlılığında istatiksel olarak anlamlı değişimlere sebep olmadığı görüldü (Şekil 4.9).

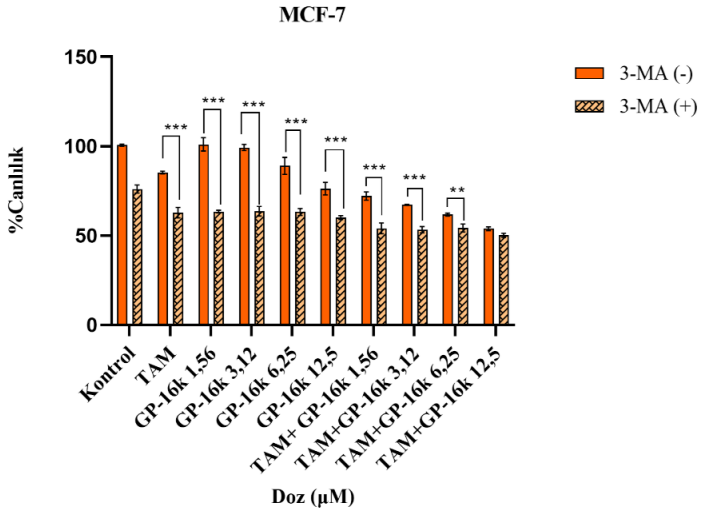


Şekil 33. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin hücrelerinin MLKL inhibitörü NSA (5 µM) ile 4 saat tedavisi sonrasında, GP-16k (1,56-12,5 µM**)** ve Tamoksifenle (TAM) 100 µM kombinasyonuna 48 saat maruz bırakılmasının tedavi sonrası hücre canlılığı sonuçları. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma

4.7. 3-Metiladenin (3-MA) Bulguları

3-Metiladenin (3-MA), PI3K'yı inhibe ederek otofajiyi engelleyen yaygın bir otofaji inhibitörüdür (Ren ve ark., 2023). GP-16k ve TAM ile kombinasyonuna maruziyet sonucu hücre ölümünün otofoji yolu ile olup olmadığını göstermek için otofaji inhibitörü 3-MA kullanıldı. MCF-7 hücreleri kombinasyon tedavisi öncesi 3-MA (1,25 µM) ile 4 saat boyunca muamele edildi. Süre bitiminde GP1-16k (1,56-12,5 µM) dozları ve TAM'nin 100 µM dozu ile kombinasyona 48 saat boyunca maruz bırakıldı. Elde edilen sonuçlarda, GP-16k'nın tekli inhibitör uygulanan 1,56-12,5 µM doz aralığında, inhibitör uygulanmayan hücrelere göre canlılığı azalttığı görüldü. 3-MA uygulanmayan kombinasyon dozlarında hücre canlılığı 1,56 µM; %72,16, 3,12 µM; %67,27, 6,25 µM; %61,79 ve 12,5 µM; %53,89 olarak belirlenirken 3-MA uygulanan kombinasyon

dozlarında 1,56; %54,07, 3,12 µM; %53,28, 6,25 µM; %54,25 ve 12,5 µM; %50,12 olarak belirlendi. İnhibitör uygulanan kombinasyon dozları (1,56-6,25 µM) canlılığı azaltırken, 12,5 µM dozu herhangi bir değişikliğe sebep olmadı. Böylece 3-MA uygulanan kombinasyon dozlarında hücre canlılığında artışa sebep olmadı (Şekil 4.10).

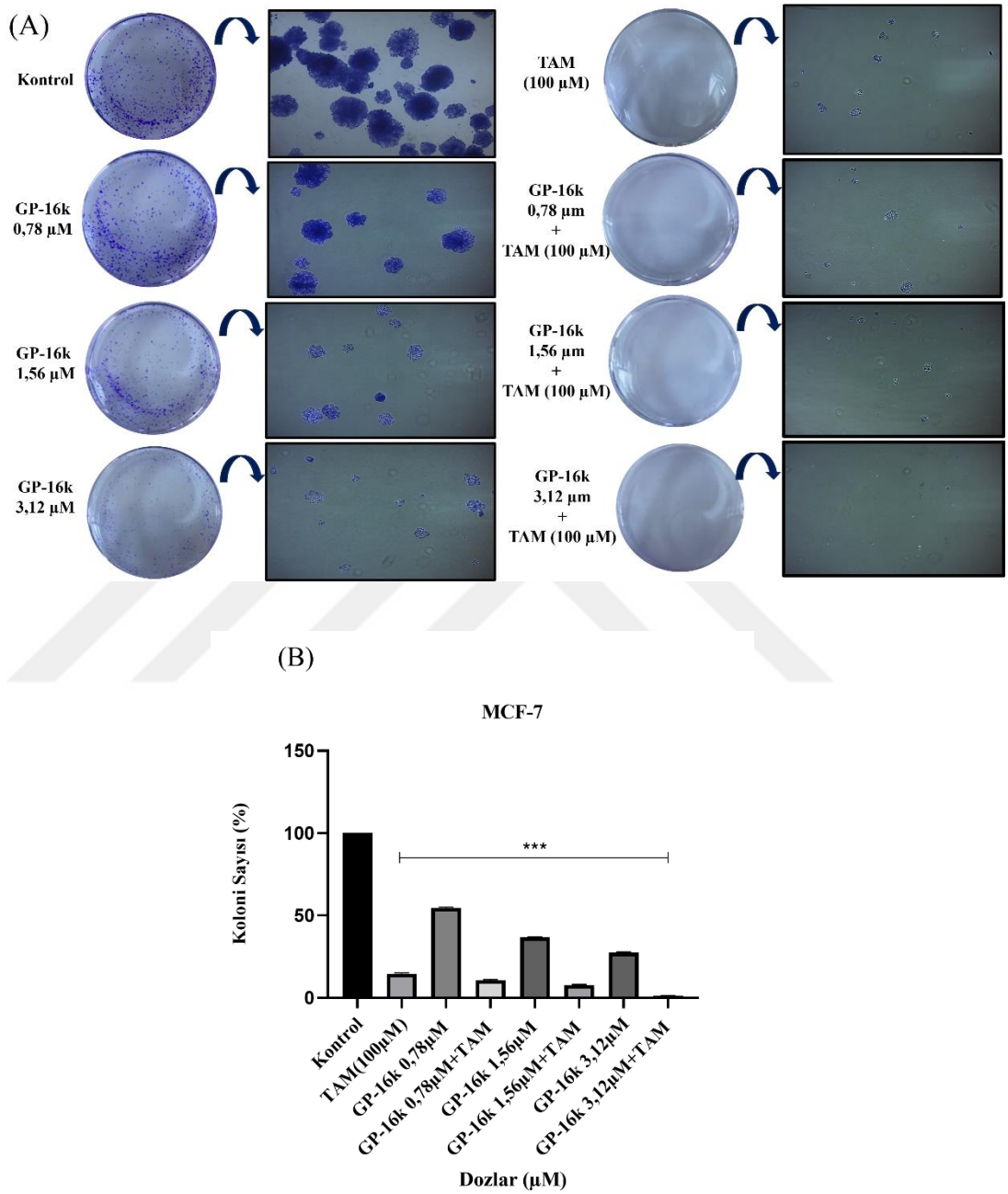


Şekil 34. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin otofaji inhibitörü 3-MA (1,25 µM) ile 4 saat tedavisi sonrasında, GP-16k (1,56-12,5 µM) ve Tamoksifen (TAM) 100 µM kombinasyonuna 48 saat maruz bırakılmasının tedavi sonrası hücre canlılığı sonuçları. Aynı zaman periyotları içinde eşit dozlarda inhibitör uygulanmış (3-MA (+)) ve uygulanmamış (3-MA (-)) GP-16k'nın etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*p<0,05, **p<0,01 ve *** p<0,001) ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma

4.8. Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücreleri Üzerinde Koloni Oluşturma Yeteneğine Etkisi

MCF-7 hücreleri üzerinde GP-16k'nın ve TAM kombinasyonunun hücrelerin koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkisi incelendi. MCF-7 meme kanseri hücrelerine GP-16k'nın (0,78-3,12 µM) dozları ile TAM'nin (100 µM) dozu uygulandı. Sonuç olarak IC_{50} değerlerinin altında seçilen GP-16k'nın dozları kontrol hücrelerine kıyasla koloni sayısında azalmaya sebep oldu. Ayrıca kontrol hücrelerine kıyasla GP-16k'nın artan dozlarında daha küçük koloniler gözlendi (Şekil 4.11 A). GP-16k'nın 0,78-3,12 µM doz aralığında yüzde koloni sayısı %55, %36,9 ve %27,39 olurken, TAM %15 olarak belirlendi. Kombinasyon dozlarında ise sırayla %10, %8 ve %1,36 koloni sayısı gösterdi

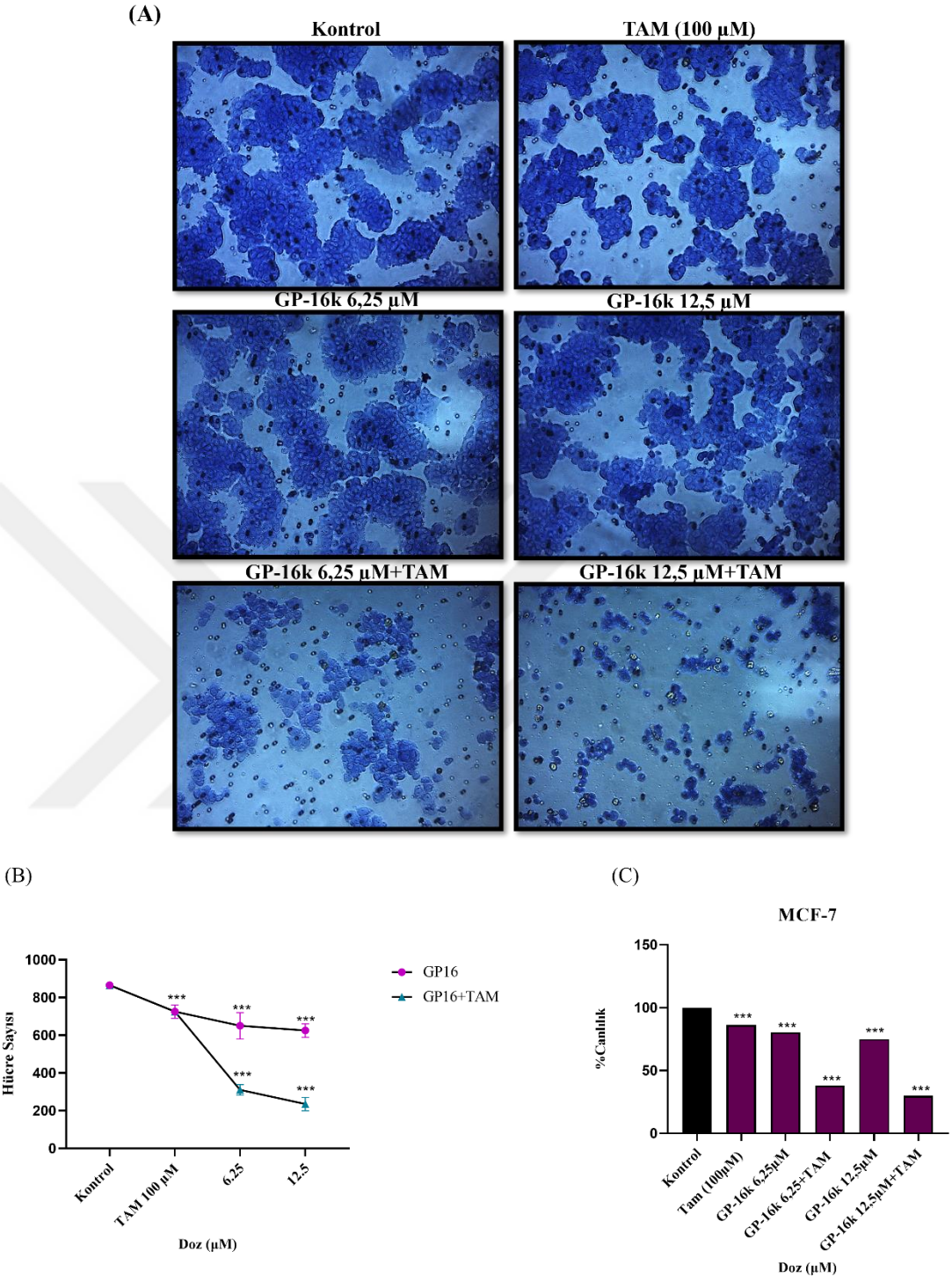
(Şekil 4.11 B). Bu sayede GP-16k ve TAM kombinasyon tedavisinin koloni oluşumunu engellediği tespit edildi (Şekil 4.11).



Şekil 351. MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde GP-16k (0,78-3,12 µM) ve Tamoksifen (TAM) 100 µM ile kombinasyonunun koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkisinin görüntüleri (A) (10x büyütme) ve koloni sayısı (%) grafiği (B). İstatistiksel olarak anlamlılık değeri *** $p<0,001$ ifade etmektedir.

4.9. Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerinde Hücre Göçüne (Migrasyon) Etkisinin Belirlenmesi

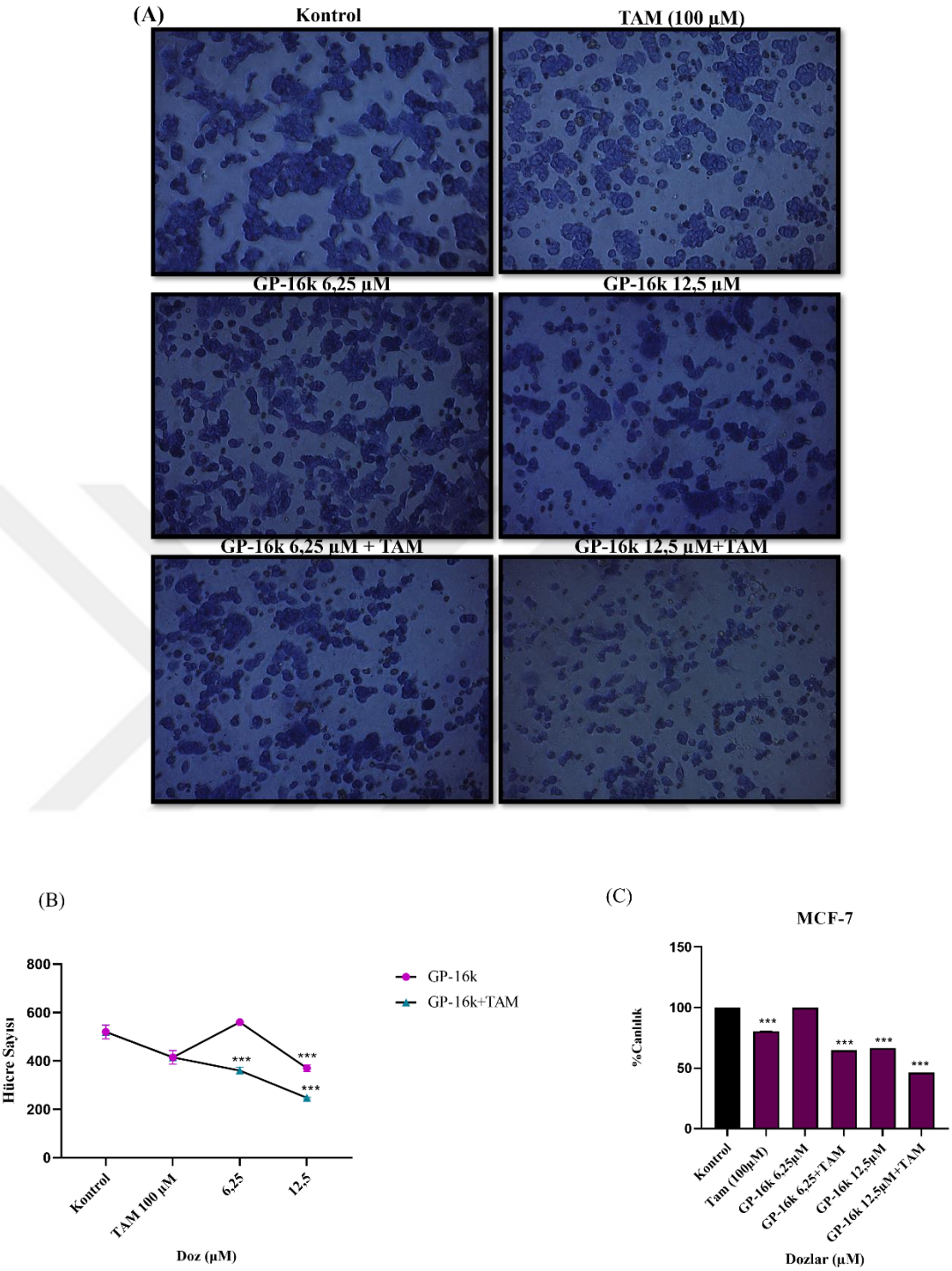
Hücrelerin göç etme kabiliyeti (migrasyon) etkisine bakmak için MCF-7 hücreleri üzerinde insert (por çapı: 8.0 μm) kullanılarak migrasyon analizi yapıldı. Hücre migrasyonu, kanser hücrelerinin bir doku bölgesinden diğerine hareket etme yeteneğidir. GP-16k'nın 6,25 ve 12,5 μM dozları ile TAM'nin 100 μM dozu uygulandı. Şekil 4.12'de mikroskop görüntülerinde görüldüğü gibi her iki kombinasyonda hücre yoğunluğunun belirgin şekilde azaldığı dikkat çekmektedir. Bunun yanında kombinasyon tedavisinde hücre morfolojisinin küçüldüğü görüldü (Şekil 4.12 A). GP-16k ve TAM uygulaması kontrol grubuna kıyasla migrasyon gösteren hücre sayısını azaltırken, kombinasyonlarda bu fark daha belirgin şekilde görüldü (Şekil 4.12 B). GP-16k tek başına 6,25 μM dozu uygulanması sonrası migrasyon gösteren hücre sayısı %80,45 olurken 12,5 μM dozunda hücre sayısının %74,71'e düştüğü görüldü. TAM ise %86,20 olarak belirlendi. Kombinasyondaki migrasyon gösteren hücre sayısı 6,25 μM doz için %37,93 olurken 12,5 μM doz için %29,88 olarak belirlendi (Şekil 4.12 C). Kombinasyonların 6,25 ve 12,5 μM dozları hücrelerin göç etme kabiliyetini iyi bir şekilde inhibe etti (Şekil 4.12).



Şekil 36. MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde GP-16k (6,25 ve 12,5 µM) ve Tamoksifen (TAM) 100 µM ile kombinasyonunun hücre göçü (migrasyonu) üzerindeki etkisinin görüntüleri (A) (20x büyütme) Hücre sayısı grafiği (B) Migrasyon grafiği (%) (C). İstatistiksel olarak anlamlılık değeri *** p<0,001 ifade etmektedir.

4.10. Kombinasyon Tedavisinin MCF-7 Hücrelerinde İnvazyon Etkisinin Belirlenmesi

Matrigel invazyon analizi, hücre invazyonunu değerlendirmek için kullanılan bir in vitro yöntemdir. Bu analiz, kanser hücrelerinin invaziv (yayılma) kapasitesini ve potansiyel metastatik yeteneklerini belirlemek için kullanılır. GP1-16k'nın 6,25 ve 12,5 µM dozları uygulandı ve 24 saat inkübasyon sonrasında insertler çıkartılarak fikse edildi ve hücreler fotoğraflandı. Bu analiz sonucunda hücrelerin invaziv kapasitelerini inhibe edebilme yeteneğini test etmek için GP-16k ve TAM'nin doza bağlı olarak matrigel kaplı insertlerden daha az geçtiği görüldü. Ayrıca bileşiklerin kendi başına kıyasla kombinasyonların her iki dozunda (6,25-12,5 µM) hücrelerin morfolojilerinin küçüldüğü ve artan ölüm sebebiyle hücre sayılarının azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.13 A). Kombinasyonların her iki dozunda invaziv hücre yoğunluğunun belirgin şekilde daha az olduğu görülmektedir (Şekil 4.13 B). GP-16k'nın 6,25 µM dozunda invazyon gösteren hücre sayısında farklılık olmazken, 12,5 µM dozunda %66,60 olarak belirlendi. TAM ise %80,5 olarak görüldü. Kombinasyon da invazyon gösteren hücre sayısının 6,25 µM dozu için %64,80 ve 12,5 µM dozu için %46,29 olduğu görüldü (Şekil 4.13 C). Böylece matrigel kullanılarak gerçekleştirilen invazyon analizi sonucunda kombinasyon tedavisinin hücrelerin invazyon yeteneğini önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (Şekil 4.13).



Şekil 37. MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde GP-16k (6,25 ve 12,5 µM) ve Tamoksifen (TAM) 100 µM ile kombinasyonunun invazyon üzerindeki etkisinin görüntüleri (A) (20x büyütme) Hücre sayısı grafiği (B) İnvazyon grafiği (%) (C). İstatistiksel olarak anlamlılık değeri *** p<0,001 ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri, dünyada kadınlarda en sık teşhis edilen kötü huylu tümördür ve kötü huylu tümörlerden kaynaklanan birinci ölüm nedenidir. Meme kanserinin görülme sıklığı dünyanın tüm bölgelerinde sürekli artmaktadır. Bu nedenle, tespit ve tedavisindeki ilerlemeye ve bunun sonucunda iyileşmiş ölüm oranlarına rağmen, yeni tedavi stratejileri geliştirmek önemlidir (Smolarz ve ark., 2022).Günümüzde meme kanserini tedavi etmek için endokrin tedaviler, sitotoksik kemoterapiler ve hedefli tedaviler dahil olmak üzere çeşitli tedaviler kullanılmaktadır. Çok çeşitli tedaviler geliştirilmiş olsa da genel sağ kalım oranı düşük kalmaya devam etmektedir (Wang ve Minden, 2022). Meme kanserini tedavi etmede en etkili yöntem kemoterapidir. Kemoterapötik ajanlar öncelikle kanser hücrelerinde çoğalmayı seçici olarak inhibe etmeyi ve apoptozu aktive etmeyi amaçlar. Bununla birlikte, uzun süreli tedavi nedeniyle ilaca karşı kazanılmış direnç gelişiminin yanısıra yan etkilerle de sıklıkla karşılaşılmaktadır (Varghese ve ark., 2020). Bu sebeple kanser hücrelerini hedefleyen ve sağlıklı hücrelerde en az etkiye sahip anti kanser ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Yeni etkili terapötik anti kanser ilaçlar ve tedavi yöntemi dikkat edilmesi gereken en iyi yoldur. Meme kanseri tedavisinde en sık kullanılan kemoterapi ilaçları arasında Doksorubisin, Paklitaksel, Dosetaksel, Tiyoridazin, Disülfiram, Kamptotesin yer alır (Núñez ve ark., 2016). Meme kanserlerinin yaklaşık %70'i ER+'dir. Meme kanseri hücrelerinin çoğunluğu fonksiyonel hormon reseptörleri ifade ettiğinden, reseptör antagonistleri önemli kanser önleyici ajanlardır. Meme kanserinin tedavisi için yeni terapötik ajanların geliştirilmesinde çekici bir farmasötik hedeftir. Östrojen ve meme kanseri arasındaki bağlantı, 'antiöstrojenik stratejilerin' terapötik ajanlar olarak potansiyele sahip olabileceğini öne sürmüştür. 1980'lerden beri ER+ meme kanseri için birinci basamak tedavi olarak bilinmektedir (Khanam ve Shamsuzzaman, 2015).TAM; steroid olmayan bir antiöstrojen ilaçtır ve ER+ hastalarda adjuvan tedavi olarak kullanılır (Mishra ve ark., 2021).

Doğal kaynaklı bileşikler olan benzofuran türevleri yeni potansiyel terapötik ajanların tasarlanması ve geliştirilmesi için kullanılabilecek biyodinamik ajanlardır (Miao ve ark., 2019).Doğanın biyolojik olarak aktif heterosikller koleksiyonunda, benzofuran türevleri önemli bir grubu oluşturur (Khanam ve Shamsuzzaman, 2015). Benzofuran anolaglarının gösterdiği biyolojik etkiler, antikanser, antimikrobiyal, antiinflamatuar,

antifungal, analjezik, antiparaziter, antihiperglisemik, antihiperlipidemik, antikonvülsan, antipiretik, antitüberküloz, kapsamaktadır (Bendi ve ark., 2024).Çalışmalar, benzofuranların insan meme kanseri MCF-7 hücrelerine ve yumurtalık kanseri Hela hücrelerine karşı güçlü sitotoksik aktiviteler sergilediğini göstermiştir (Zhang ve ark., 2005; Miert ve ark., 2005). Başka bir çalışma 2-ve 3-benzofurankaroksilik asit türevlerinin lösemi (K562, MOLT-4), serviks karsinomu (HeLa), endotel (HUVEC) hücrelerinde sitotoksik aktivite ve kanser hücre hatlarına karşı seçicilik göstermiştir (Napiórkowska ve ark., 2019). Bu kapsamlı terapötik potansiyel yelpazesi göz önüne alındığında, benzofuran ve türevleri önemli ilgi kaynağını oluşturmaktadır(Bendi ve ark., 2024). Çeşitli antikanser ilaçları geliştirilmiş olsa da yeni etkili antikanser ajanları ve kombinasyon stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Kombinasyon tedavileri genellikle monoterapilerden daha etkilidir ve uzun süreli tedavi sırasında daha düşük toksisite seviyeleri gösterir (Wang ve Minden, 2022). TAM'nin meme kanseri ve çeşitli kanser türlerindeki etki mekanizmalarına ve hedef dışı etkilerin altında yatan potansiyel mekanizmalara bakıldığında daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Benzofuran bağlı kalkon bileşiklerinin de etki mekanizmalarının tam olarak açıklığa kavuşturulması ve potansiyel terapötik ajanlar olarak güvenilirliğinin ve etkililiğinin değerlendirilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Mevcut tez çalışmasında sentezi ve karakterizasyonu yapılan GP-16k ile seçici ER modülatörü TAM kombinasyonunun MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etki ve mekanizmaları araştırılmıştır. Çalışmada öncelikle meme kanseri hücre soyu MCF-7 üzerinde GP-16k'nın kendi başına (3,12-25 µM; 48, 72 saat ve 12,5-25 µM; 24 saat) kontrole kıyasla hücre canlılığında doza ve zamana bağımlı olarak istatiksel anlamlı azalmalara neden olduğu belirlendi. Sonuçlara göre GP-16k'nın IC_{50} değerleri 24 saat için 24,49 µM 48 saat için 9,63 µM ve 72 saat için 6,88 µM olarak hesaplandı (Çizelge 4.1). Yechan Lee ve ark. yaptığı çalışmada benzofuran-indol hibrit iskeletine dayalı türevin mutant EGFR'ye karşı ümit verici bir inhibitör etki gösterdiğini ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde (KHDAK) güçlü antikanser özellik gösterdiğini buldular (Lee ve ark., 2024).Akciğer kanseri (A549) ve serviks kanseri (Hela) hücre hatlarında yapılan çalışmada dipiperazin kısmına bağlı yeni benzofuran türevlerinin, standart ilaç doksorubisine kıyasla her iki hücre hattına karşı antikanser aktiviteleri

olduğu görülmüştür (Vishnu ve ark., 2023). Başka bir çalışmada da benzoil benzofuran türevlerinin sentezi için sentetik prosedür çıkartılarak TNBC hücrelerinde antikanser aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Selepe ve ark., 2022). Çalışmamızda TAM tek başına uygulamada (25-100 µM; 48 saat) kontrole kıyasla istatiksel anlamlı azalmalar gösterdi (Şekil 4.3). Yapılan benzer çalışmalarda TAM'nin dozlarında (5, 10, 25 ve 50 µM) meme kanseri (MCF-7), prostat kanseri (PC-03), kolon kanseri (HT-29), böbrek kanseri (786-0), yumurtalık kanseri (NCI-ADR,OVCAR-03), melanoma (UACC62), akciğer kanseri (NCI-H460), lösemi (K-562) gibi birçok kanser hücre soyunda sitotoksik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Petinari ve ark., 2004). Diğer bir çalışmada da MCF-7 hücre soyu üzerinde TAM'nin 10-50 µM dozu 48 saatlik uygulama da sitotoksik aktivite belirlenmiştir (Motawi ve ark., 2016).

Tez çalışmasında GP-16k ve TAM kombine edilerek meme kanseri hücrelerinde etkin bir tedavi seçeneği geliştirmek hedeflenmiştir. Çalışmamızda meme kanseri hücre soyu MCF-7, kombinasyonunun artan dozlarına 3 farklı süre ile maruz bırakılarak, ardından SRB hücre canlılık testleri ile farklı zamanlardaki IC_{50} değerleri hesaplandı. Böylece kombinasyon tedavisinde 24 saat için 13,88 µM, 48 saat için 2,12 µM ve 72 saat için <1,56 µM olarak IC_{50} değerleri belirlendi. Sonuç olarak kombinasyon tedavisinin kontrole ve bileşiklerin tek başlarına oranla hücre canlılığında doza ve zamana bağlı olarak istatiksel açıdan anlamlı azalmalara neden olduğu görüldü (Şekil 4.4). Bir sonraki aşamaya geçildiğinde GP-16k'nın TAM ile kombinasyonunda sağlıklı hücre soyunda sitotoksik etkisi değerlendirildi. Sağlıklı hücre soyu MCF1-10A üzerinde bileşiklerin kendi başlarına (1,56-25 µM) dozlarında ve kombinasyonlarının sitotoksik etkisi 48 saat boyunca araştırıldı. Kombinasyonların yüksek dozlarında sağlıklı hücrelerde canlılığın düştüğü gözlemlenirken, meme kanserinde istatiksel olarak düşüşlere sebep olan dozlarda (1,56-12,5 µM) sağlıklı hücrelerde canlılığı düşürmediği görüldü. GP-16k ve TAM ile kombinasyon tedavisinin spesifik olarak kanser hücrelerinde daha etkili olduğu tespit edildi (Şekil 4.5). Yapılan bir çalışmada borik asit içeren yeni kalkonun ve bis-kalkon türevinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla MCF-10A sağlıklı meme hücrelerinde maksimum konsantrasyonda (25 µM) sitotoksik etkisi olmadığı görülmüştür (Modzelewska ve ark., 2006). Başka bir çalışmada benzofuran-2-asetik ester türevlerinin 75 µM uygulanan dozda MCF-10A meme epitel hücrelerinde hücre canlılığında herhangi

bir etkisi olmadığı belirlenmiştir (Giordano ve ark., 2017). Farklı bir çalışmada kalkon hibritlerinin MCF-10A hücre soyunda meme kanseri hücrelerine kıyasla daha düşük sitotoksisite göstermiştir (Wang ve ark., 2024). Sonuçlarımız literatür bilgisini desteklemektedir. Yapılan bir çalışmada MCF-7 hücrelerinde uygulanan Nar (250 μM)-TAM (100 nM) kombinasyonu, her iki ajanın monoterapi etkilerine kıyasla sinerjistik bir etki göstererek hücre çoğalmasını ve canlılığını belirgin şekilde inhibe ettiğini göstermiştir (Hatkevich ve ark., 2014). Celastrolün ve TAM'ın farklı dozları kombine edilerek MCF-7 hücrelerinde apoptozu indüklemiştir (Wang ve ark., 2021).TAM'ın α-mangostinin ile kombinasyonu MCF-7 hücrelerinde antiproliferatif etki göstermiştir (Vargas-Castro ve ark., 2023). Fatostatin ve TAM'ın sinerjik kullanımı, MCF-7 ve T47D hücrelerinde hücre canlılığını ve invazyonunu önemli ölçüde baskılayarak apoptozu indüklemiştir (Liu ve ark., 2020). Bu sonuçlardan yola çıkarak daha sonraki ileri analizlerimiz GP-16k için 1,56-12,5 μM doz aralığında ve TAM'nin 100 μM dozuna 48 saat maruz bırakılarak MCF-7 hücre soyu üzerinde gerçekleştirildi.

TAM ve GP-16k kombinasyonu tarafından tetiklenen hücre ölüm modunu belirlemek amacıyla ölüm belirteçleri araştırılmıştır. Apoptoz belirteci olan Annexin-V-FITC boyaması yapılarak floresan mikroskobu ile görüntülendi. Bu boya ile erken dönem apoptotik hücrelerin varlığı belirlenebilmektedir. Ayrıca, PI ve Hoechst 33342 gibi diğer boyalarla birlikte Annexin-V etiketlemesi kullanmak da mümkündür; bu, apoptozisin ilerleyici aşamalarının karakterizasyonuna olanak tanır (Bossy-Wetzel ve Green, 2000).Yapılan Hoechst 33342/Annexin-V-FITC/PI üçlü boyama sonucunda MCF-7 hücrelerinde GP-16k'nın artan dozunun kombinasyonlarında hücre sayısında daha çok azalma ve apoptozise uğramış hücre sayısında artış olduğu görüldü. Bu durum hücrelerde, membran hasarına bağlı olarak erken apoptozis geliştiğini göstermektedir. (Şekil 4.6). Böylece sonuç olarak kombinasyon tedavisi sonrasındaki ölüm modunun MCF-7 hücrelerinde apoptozu tetiklediği güçlü bir şekilde gösterilmiştir. Kombinasyon tedavisi, tekli tedavilere kıyasla apoptoz indüksiyonunda daha etkili bulundu. Benzer bir çalışmada dört farklı 2-asetiltiyofenin kalkon türevlerinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerindeki sitotoksik etkileri MTT ile değerlendirildi ve floresan DAPI boyama ile bu bileşiklerin apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (Fogaça ve ark., 2017). Akridin-9-il içeren veya akridin-4-il içeren seri yeni kalkon türevinin 24, 48 ve 72 saatlik MCF-7 ve MDA-MB-

231 hücrelerinde Annexin V/PI boyama ile birlikte apoptopik hücre ölümünü indüklediği belirlenmiştir (Vilková ve ark., 2022). Para-hidroksi meta-metoksi kalkon ve doksorubisin kombinasyonunun T47D meme kanseri hücrelerinde 24 saatlik uygulama sonrası Annexin V/PI boyaması ile apoptozu indüklemiştir (Arianingrum ve ark., 2015). Metoksifenil kalkon ve sisplatin kombinasyonu Annexin V/PI boyaması sonucunda apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Su ve ark., 2017) . Bu sebeple aldığımız sonuçlar literatür bilgisini de doğrulamaktadır.

Hücrelerin ölüm modunu doğrulamak amacıyla yapılan inhibitör deneylerinde, MCF-7 hücrelerinde kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-FMK ön uygulama sonucu hücre canlılığında bir artışın görülmemesi, ölümün kaspaz bağımlı apoptozis ile gerçekleşmediğini göstermektedir (Şekil 4.7). Bu durum MCF-7 hücrelerinin kaspaz 3'ü aktive etmemesinden kaynaklanıyor olabilir (Tian, 2023; Wang ve ark., 2016).Dolayısı ile hücre ölümü kaspaz aracılı gerçekleşmiyorsa pan-kaspaz inhibitörü de bir etki göstermeyecektir. Bu yüzden inhibitörün etkisi sınırlı kalmıştır. Kaspaz-3 yokluğunda hücre ölümü, kaspaz bağımsız yolla gerçekleşiyor olabilir. Benzer bir çalışmada da MCF-7 hücrelerinde Z-VAD-FMK'nın TAM ile uygulanması, hücre ölümünü önlememiştir (Kallio ve ark., 2005). Bu durum, TAM'ın indüklediği hücre ölümünün kaspaz-bağımsız mekanizmalarla gerçekleşebileceğini düşündürmektedir. MCF-7 hücrelerinde Equol ve TAM uygulamalarına bağlı olarak indüklenen apoptozun, pan-kaspaz inhibitörü Z-VAD-FMK ile inhibe edilmeye çalışılmasına rağmen tam olarak baskılanamaması, hücre ölümün kaspaz-bağımsız mekanizmalar aracılığıyla da gerçekleştirebileceğini düşündürmektedir (Charalambous ve ark., 2013). Ayrıca nekrotik hücre ölümünde kavşak görevi gören RIPK1 inhibitörü olan Nec-1 ön uygulama sonucu, hücre canlılığında herhangi bir artış gözlenmedi (Şekil 4.8). Kombinasyon tedavisi RIPK1'e bağımlı bir mekanizmayı devreye sokmadığı için Nec-1 etkisiz kalmıştır. Böylece kombinasyonun nekroptotik hücre ölüm yolağını tercih etmediği kanıtlandı. Alternatif hücresel ölüm mekanizmalarını hedeflemiş ve hücre ölüm yolları üzerinde farklı bir etki mekanizması geliştirmiş olabilir (Şekil 4.8). MLKL inhibitörü olan NSA, ön uygulama sonucunda NSA ve kombinasyon hücre canlılığı üzerinde önemli bir etki yapmamıştır. Böylece hücre ölümünün MLKL aracılı nekroptoz olmadığı da belirlenmiştir (Şekil 4.9). Bir çalışmada kolon kanseri hücrelerinde Nec-1 ve NSA inhibitörlerinin hücre canlılığını

koruduğu gösterilmiştir(Yan ve ark., 2021). Başka bir çalışmada Nec-1'in renal tübüller epitel hücreleri üzerinde bir etkisinin olmadığını göstermektedir (Tristão ve ark., 2012). İnhibitör olarak 3-MA kullanılması sonucunda hücre canlılığında artış meydana gelmemesi kombinasyonun otofaji ölüm yolunu aktive etmediğini göstermektedir (Şekil 4.10). Bu sonuçlar 3-MA'nın otofajiyi engelleyen bir inhibitör olarak kullanılmasına rağmen, kombinasyonun hücre ölümünü başka bir yol ile indüklemediğini veya etkili olmadığını ortaya koymaktadır. Yapılan bir çalışmada da 3-MA kullanılan MCF-7 hücre soyunda doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı görüldü (Sheng ve ark., 2013). Bu sonuçlarla birlikte farklı ölüm modlarına ait inhibitör uygulamalarıyla beraber ölümün kaspaz bağımlı olmayan apoptoz yoluyla olabileceği, nekroptoz veya otofoji kaynaklı bir ölüm gerçekleşmediği sonucuna varıldı.

Hücrelerin GP-16k ve TAM ile kombinasyon sonucu uygulaması sonrası koloni, migrasyon ve matrigel invazyon yetenekleri incelenmiştir. Bu çalışmada hücrelerin koloni oluşturma kabiliyetini değerlendirmek için MCF-7 hücre soyunda GP-16k'nın (0,78-3,12 µM) dozları ve TAM ile kombinasyonları uygulanmıştır. Elde ettiğimiz bulgularda GP-16k ve TAM'nin tekli uygulamalarda kontrol hücrelerine oranla koloni oluşumunu azalttığı görüldü. Kombinasyon tedavisinin MCF-7 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini inhibe ettiğini ve hücrelerin proliferasyonunu baskıladığını gösterdi. Böylece bu sonuçlar GP-16k ve TAM kombinasyon tedavisinin meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını engelleme potansiyelini destekledi (Şekil 4.11). Benzer bir çalışmada da kullanılan trimetoksi fenil yapısına sahip benzofuran kalkon türevinin MCF-7 hücrelerinde koloni oluşumunu önleyici bir etki gösterdiği ifade edilmiştir (Lai ve ark., 2023).

Çalışmanın devamında hücrelerin göç etme yeteneklerini değerlendirmek için MCF-7 hücrelerinde insert migrasyon analizi gerçekleştirildi. GP-16k'nın kontrole oranla 6,25-12,5 µM dozlarında insertlerden daha az hücre geçişi görülürken her iki dozun TAM ile kombinasyonunda hücre morfolojilerinin küçüldüğü görüldü (Şekil 4.12). Bu bulgular kombinasyon tedavisinin kanser hücrelerinin metastatik özelliklerini baskılayabileceğini ve hücrelerin yayılmasını engelleyebileceğini işaret eder. Hücre migrasyonunun inhibe

edilmesi, kanserin yayılmasını engellemeye yönelik potansiyel tedavi stratejisi olabilmektedir.

MCF-7 hücrelerinin GP-16k ve TAM ile tedavisi altındaki invazyon/istila yeteneğini değerlendirmek amacıyla matrigel invazyon analizi gerçekleştirilmiştir. Matrigel hücrelerin matrise bağlanma, matrisin içine ve içinden istila etme ve bir kemo-çekici maddeye doğru göç etme yeteneği için kullanılmaktadır. GP-16k'nın ve TAM'nin kendi başına tedavisindeki MCF-7 hücrelerinin matrigel bariyerini aşarak insertlerden daha az geçtiği, kombinasyon tedavisi ile de kombinasyon dozuna bağlı olarak bu etkinin yoğun bir şekilde artarak invazyon yeteneğini inhibe ettiği görüldü (Şekil 4.13). Bu kombinasyon tedavisinin kanser hücrelerinin potansiyel metastatik yayılmalarını engellediğini gösterir. Bulgularımıza benzer şekilde çeşitli kanser türleriyle yapılan çalışmalarda kalkon türevlerinin migrasyon ve invazyon yeteneğini bastırdığı bulunmuştur. Kalkon türevleri 4′-Amino-1-Naftil-Kalkon (D14) ve 4′-Amino-4-Metil-1-Naftil-Kalkon (D15)**,** EMT ile ilgili genleri düzenleyen p53 aracılığıyla osteosarkom hücre hattında migrasyon ve invazyonu engellediği görülmüştür (Seba ve ark., 2018). Glioblastoma hücrelerinde yeni 2' -hidroksikalkon türevlerinin anti invazyon aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Mendanha ve ark., 2021).Başka bir çalışmada da 2,2-dimetilbenzopiran içeren bir dizi kalkon bazlı bileşiğinin Hep3b karaciğer hücre hattında anti invazyon potansiyeli vurgulanmıştır (Wang ve ark., 2015). Meme kanseri MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarında başka bir benzo[*b*]furan kalkon türevinin PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunu hedefleyerek inhibe ettiği ve apoptozu indükleyerek hücre sağkalımı, çoğalması, göçü üzerinde etkisi gösterilmiştir (Kamal ve ark., 2016).2-(4-Benziloksi-3-metoksifenil)-5(karbetoksietilen)-7-metoksi-benzofuran türevinin, p53 mutant hepatosit karsinom hücrelerinde metastaz etkilerini baskıladığı belirlenmiştir (Tseng ve ark., 2023).

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında yeni sentezlenen 2-benzofuran bağlı kalkon kompleksinin (GP-16k) TAM ile kombinasyonu, insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerinde belirgin bir sitotoksik etki oluşturduğu gösterilmiştir. Elde edilen bulgular, bu sitotoksik etkinin apoptoz mekanizması aracılığıyla gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, kombinasyonun hücre invazyonu ve migrasyonunu azaltarak metastatik fenotipin

baskılanmasına yönelik potansiyel bir antikanser etki gösterdiği değerlendirilmiştir. Bu yönüyle, geliştirilen bileşiğin metastaz sürecine yönelik alternatif bir tedavi yaklaşımı sunabileceği düşünülmektedir. Ancak, bu sonuçların doğrulanması ve klinik uygulamalara taşınabilmesi için ileri düzey in vivo ve farmakokinetik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abbas, A. A., & Dawood, K. M. (2023). Anticancer therapeutic potential of benzofuran scaffolds. *RSC Advances*, *13*(16), 11096–11120. https://doi.org/10.1039/D3RA01383A

Abe, O., Abe, R., Enomoto, K., Kikuchi, K., Koyama, H., Masuda, H., Nomura, Y., Ohashi, Y., Sakai, K., Sugimachi, K., Toi, M., Tominaga, T., Uchino, J., Yoshida, M., Haybittle, J. L., Leonard, C. F., Calais, G., Geraud, P., Collett, V., … Caffier, H. (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet*, *378*(9793), 771–784. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60993-8

Akgun, O., Erkisa, M., & Ari, F. (2019). Effective and new potent drug combination: Histone deacetylase and Wnt/β-catenin pathway inhibitors in lung carcinoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*, 15467–15482. https://doi.org/10.1002/jcb.28813

Ali, S., Rasool, M., Chaoudhry, H., N Pushparaj, P., Jha, P., Hafiz, A., Mahfooz, M., Abdus Sami, G., Azhar Kamal, M., Bashir, S., Ali, A., & Sarwar Jamal, M. (2016). Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformation*, *12*, 135–139. https://doi.org/10.6026/97320630012135

Alioglu, I., Cinar-Asa, S., Coskun, D., & Ari, F. (2023). Benzofuran Substituted Chalcone Derivatives Trigger Apoptotic Cell Death Through Extrinsic Pathway in Human Lung and Breast Cancer Cells. *Iranian Journal of Science*, *47*(4), 1057–1069. https://doi.org/10.1007/s40995-023-01494-8

Arnold, M., Morgan, E., Rumgay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., Siesling, S., & Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast*, *66*, 15–23. https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.08.010

Arps, D. P., Healy, P., Zhao, L., Kleer, C. G., & Pang, J. C. (2013). Invasive ductal carcinoma with lobular features: a comparison study to invasive ductal and invasive

lobular carcinomas of the breast. *Breast Cancer Research and Treatment*, *138*(3), 719–726. https://doi.org/10.1007/s10549-013-2493-2

Asavasupreechar, T., Saito, R., Miki, Y., Edwards, D. P., Boonyaratanakornkit, V., & Sasano, H. (2020). Systemic distribution of progesterone receptor subtypes in human tissues. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *199*. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105599

Aydinlik, S., Erkisa, M., Cevatemre, B., Sarimahmut, M., Dere, E., Ari, F., & Ulukaya, E. (2017). Enhanced cytotoxic activity of doxorubicin through the inhibition of autophagy in triple negative breast cancer cell line. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1861*, 49–57. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.013

Aztopal, N., Erkisa, M., Erturk, E., Ulukaya, E., Tokullugil, A. H., & Ari, F. (2018). Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis in breast cancer stem cells. *Chemico-Biological Interactions*, *280*, 51–58. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.003

Balmain, A., Gray, J., & Ponder, B. (2003). The genetics and genomics of cancer. *Nature Genetics*, *33*(S3), 238–244. https://doi.org/10.1038/ng1107

Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E., & Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*, *84*, 106535. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535

Belachew, E. B., & Sewasew, D. T. (2021). Molecular Mechanisms of Endocrine Resistance in Estrogen-Receptor-Positive Breast Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.599586

Bellanger, M., Zeinomar, N., Tehranifar, P., & Terry, M. B. (2018). Are global breast cancer incidence and mortality patterns related to country-specific economic development and prevention strategies? *Journal of Global Oncology*, *2018*(4), 1–16. https://doi.org/10.1200/JGO.17.00207

Bendi, A., Sirija, M. R., Bhathiwal, A. S., Chinmay, Chauhan, V., & Tiwari, A. (2024). Exploring the potential therapeutic role of benzofuran derivatives in cancer treatment. *Journal of Molecular Structure*, *1317*. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.139121

Berx, G., & Van Roy, F. (2001). The E-cadherin/catenin complex: An important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Research*, *3*, 289–293. https://doi.org/10.1186/bcr309

Björnström, L., & Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Molecular Endocrinology*, *19*(4), 833–842. https://doi.org/10.1210/me.2004-0486

Børresen-Dale, A.-L. (2003). *TP53* and breast cancer. *Human Mutation*, *21*(3), 292–300. https://doi.org/10.1002/humu.10174

Bossy-Wetzel, E., & Green, D. R. (2000). *Detection of Apoptosis by Annexin V Labeling* (pp. 15–18). https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)22004-1

Boyages, J. (2017). Radiation therapy and early breast cancer: Current controversies. *Medical Journal of Australia*, *207*(5), 216–222. https://doi.org/10.5694/mja16.01020

Brenner, D., & Mak, T. W. (2009). Mitochondrial cell death effectors. *Current Opinion in Cell Biology*, *21*(6), 871–877. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.004

Burguin, A., Diorio, C., & Durocher, F. (2021). Breast cancer treatments: Updates and new challenges. *Journal of Personalized Medicine*, *11*(8). https://doi.org/10.3390/jpm11080808

Cao, L., & Mu, W. (2021). Necrostatin-1 and necroptosis inhibition: Pathophysiology and therapeutic implications. *Pharmacological Research*, *163*, 105297. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105297

Castoria, G., Migliaccio, A., Giovannelli, P., & Auricchio, F. (2010). Cell proliferation regulated by estradiol receptor: Therapeutic implications. *Steroids*, *75*(8–9), 524–527. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.10.007

Chang, M. (2012). Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomolecules & Therapeutics*, *20*, 256–267. https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.3.256

Charalambous, C., Pitta, C. A., & Constantinou, A. I. (2013). Equol enhances tamoxifen's anti-tumor activity by induction of caspase-mediated apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *BMC Cancer*, *13*. https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-238

Chaudhry, G.-S., Md Akim, A., Sung, Y. Y., & Sifzizul, T. M. T. (2022). Cancer and apoptosis: The apoptotic activity of plant and marine natural products and their

potential as targeted cancer therapeutics. *Frontiers in Pharmacology, 13*. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.842376

Chen, Z., Yang, J., Li, S., Lv, M., Shen, Y., Wang, B., Li, P., Yi, M., Zhao, X., Zhang, L., Wang, L., & Yang, J. (2017). Invasive lobular carcinoma of the breast: A special histological type compared with invasive ductal carcinoma. *PLOS ONE*, *12*(9), e0182397. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182397

Cheskis, B. J., Greger, J. G., Nagpal, S., & Freedman, L. P. (2007). Signaling by estrogens. *Journal of Cellular Physiology*, *213*(3), 610–617. https://doi.org/10.1002/jcp.21253

Constantinescu, T., & Lungu, C. N. (2021). Anticancer Activity of Natural and Synthetic Chalcones. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(21), 11306. https://doi.org/10.3390/ijms222111306

Cookson, B. T., & Brennan, M. A. (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in Microbiology*, *9*(3), 113–114. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01936-3

Cowell, C. F., Weigelt, B., Sakr, R. A., Ng, C. K. Y., Hicks, J., King, T. A., & Reis-Filho, J. S. (2013). Progression from ductal carcinoma *in situ* to invasive breast cancer: Revisited. *Molecular Oncology*, *7*(5), 859–869. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.07.005

Coyle, Y. M. (2004). The Effect of Environment on Breast Cancer Risk. *Breast Cancer Research and Treatment*, *84*(3), 273–288. https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000019964.33963.09

Creighton, C. (2012). The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics: Targets and Therapy*, 289. https://doi.org/10.2147/BTT.S29923

Crowley, L. C., Marfell, B. J., & Waterhouse, N. J. (2016). Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(9), pdb.prot087205. https://doi.org/10.1101/pdb.prot087205

Cui, X., Schiff, R., Arpino, G., Osborne, C. K., & Lee, A. V. (2005). Biology of Progesterone Receptor Loss in Breast Cancer and Its Implications for Endocrine Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(30), 7721–7735. https://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.004

Dorssers, L. C. J., van der Flier, S., Brinkman, A., van Agthoven, T., Veldscholte, J., Berns, E. M. J. J., Klijn, J. G. M., Beex, L. V. A. M., & Foekens, J. A. (2001). Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *Drugs*, *61*(12), 1721–1733. https://doi.org/10.2165/00003495-200161120-00004

Dos Santos, A. F., Inague, A., Arini, G. S., Terra, L. F., Wailemann, R. A. M., Pimentel, A. C., Yoshinaga, M. Y., Silva, R. R., Severino, D., de Almeida, D. R. Q., Gomes, V. M., Bruni-Cardoso, A., Terra, W. R., Miyamoto, S., Baptista, M. S., & Labriola, L. (2020). Distinct photo-oxidation-induced cell death pathways lead to selective killing of human breast cancer cells. *Cell Death & Disease*, *11*(12), 1070. https://doi.org/10.1038/s41419-020-03275-2

Dossus, L., & Benusiglio, P. R. (2015). Lobular breast cancer: incidence and genetic and non-genetic risk factors. *Breast Cancer Research*, *17*(1), 37. https://doi.org/10.1186/s13058-015-0546-7

Ellis, M. J., Coop, A., Singh, B., Mauriac, L., Llombert-Cussac, A., Jänicke, F., Miller, W. R., Evans, D. B., Dugan, M., Brady, C., Quebe-Fehling, E., & Borgs, M. (2001). Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: Evidence from a phase III randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*, *19*(18), 3808–3816. https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.18.3808

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516. https://doi.org/10.1080/01926230701320337

Fang, Y., & Peng, K. (2022). Regulation of innate immune responses by cell death-associated caspases during virus infection. *The FEBS Journal*, *289*(14), 4098–4111. https://doi.org/10.1111/febs.16051

Farhat, J., Alzyoud, L., Alwahsh, M., & Al-Omari, B. (2022). Structure–Activity Relationship of Benzofuran Derivatives with Potential Anticancer Activity. *Cancers*, *14*(9), 2196. https://doi.org/10.3390/cancers14092196

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., & Ren, G. (2018a). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular

pathogenesis. In *Genes and Diseases* (Vol. 5, Issue 2, pp. 77–106). Chongqing University. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T.-C., & Ren, G. (2018b). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, *5*(2), 77–106. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001

Fogaça, T. B., Martins, R. M., Begnini, K. R., Carapina, C., Ritter, M., de Pereira, C. M. P., Seixas, F. K., & Collares, T. (2017). Apoptotic effect of chalcone derivatives of 2-acetylthiophene in human breast cancer cells. *Pharmacological Reports*, *69*, 156–161. https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.10.003

Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, *1*, 2315–2319. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339

Frykberg, E. R. (1999). Lobular carcinoma in situ of the breast. *Breast Journal*. https://doi.org/10.1046/j.1524-4741.1999.00002.x

Fultang, N., Chakraborty, M., & Peethambaran, B. (2021). Regulation of cancer stem cells in triple negative breast cancer. *Cancer Drug Resistance (Alhambra, Calif.)*, *4*, 321–342. https://doi.org/10.20517/cdr.2020.106

Galluzzi, L., López-Soto, A., Kumar, S., & Kroemer, G. (2016). Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity*, *44*(2), 221–231. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.020

Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *55*(3), 178–194. https://doi.org/10.3322/canjclin.55.3.178

Giordano, C., Rovito, D., Barone, I., Mancuso, R., Bonofiglio, D., Giordano, F., Catalano, S., Gabriele, B., & Andò, S. (2017). Benzofuran-2-acetic ester derivatives induce apoptosis in breast cancer cells by upregulating p21Cip/WAF1 gene expression in p53-independent manner. *DNA Repair*, *51*, 20–30. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.01.006

Gonzalez-Angulo, A. M., Timms, K. M., Liu, S., Chen, H., Litton, J. K., Potter, J., Lanchbury, J. S., Stemke-Hale, K., Hennessy, B. T., Arun, B. K., Hortobagyi, G. N., Do, K. A., Mills, G. B., & Meric-Bernstam, F. (2011). Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, *17*, 1082–1089. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2560

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31–46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2

Hatkevich, T., Ramos, J., Santos-Sanchez, I., & Patel, Y. M. (2014). A naringenin-tamoxifen combination impairs cell proliferation and survival of MCF-7 breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, *327*, 331–339. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.05.017

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*(10), 572–584. https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5

Hosseinzadeh, E., Hassanzadeh, A., Marofi, F., Alivand, M. R., & Solali, S. (2020). Flavonoid-Based Cancer Therapy: An Updated Review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *20*(12), 1398–1414. https://doi.org/10.2174/1871520620666200423071759

Howlader, N., Altekruse, S. F., Li, C. I., Chen, V. W., Clarke, C. A., Ries, L. A. G., & Cronin, K. A. (2014). US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *Journal of the National Cancer Institute*, *106*(5). https://doi.org/10.1093/jnci/dju055

Huebner, R. J., & Ewald, A. J. (2014). Cellular foundations of mammary tubulogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *31*, 124–131. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.019

Inic, Z., Zegarac, M., Inic, M., Markovic, I., Kozomara, Z., Djurisic, I., Inic, I., Pupic, G., & Jancic, S. (2014). Difference between Luminal A and Luminal B subtypes

according to Ki-67, tumor size, and progesterone receptor negativity providing prognostic information. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, *8*, 107–111. https://doi.org/10.4137/CMO.S18006

Jan, R., & Chaudhry, G.-S. (2019). Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *9*(2), 205–218. https://doi.org/10.15171/apb.2019.024

Johnson, M. C., & Cutler, M. L. (2016). Anatomy and Physiology of the Breast. In *Management of Breast Diseases* (pp. 1–39). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46356-8_1

Johnson, M. D., Zuo, H., Lee, K. H., Trebley, J. P., Rae, J. M., Weatherman, R. V., Desta, Z., Flockhart, D. A., & Skaar, T. C. (2004). Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Research and Treatment*, *85*(2), 151–159. https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000025406.31193.e8

Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). In vitro cell migration and invasion assays. *Journal of Visualized Experiments*. https://doi.org/10.3791/51046

Kallio, A., Zheng, A., Dahllund, J., Heiskanen, K. M., & Härkönen, P. (2005). Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis*, *10*, 1395–1410. https://doi.org/10.1007/s10495-005-2137-z

Kamal, A., Lakshma Nayak, V., Nagesh, N., Vishnuvardhan, M. V. P. S., & Subba Reddy, N. V. (2016). Benzo[b]furan derivatives induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human breast cancer cells. *Bioorganic Chemistry*, *66*, 124–131. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.04.004

Kang, T.-B., Ben-Moshe, T., Varfolomeev, E. E., Pewzner-Jung, Y., Yogev, N., Jurewicz, A., Waisman, A., Brenner, O., Haffner, R., Gustafsson, E., Ramakrishnan, P., Lapidot, T., & Wallach, D. (2004). Caspase-8 Serves Both Apoptotic and Nonapoptotic Roles. *The Journal of Immunology*, *173*(5), 2976–2984. https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.2976

Karn, A., Jha, A. K., Shrestha, S., Acharya, B., Poudel, S., & Bhandari, R. B. (2010). Tamoxifen for Breast Cancer. *Journal of Nepal Medical Association*, *49*(177). https://doi.org/10.31729/jnma.140

Khanam, H., & Shamsuzzaman. (2015). Bioactive Benzofuran derivatives: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *97*, 483–504. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.039

Kim, R. (2005). Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer*, *103*(8), 1551–1560. https://doi.org/10.1002/cncr.20947

Kowalczyk, W., Waliszczak, G., Jach, R., & Dulińska-Litewka, J. (2021). Steroid Receptors in Breast Cancer: Understanding of Molecular Function as a Basis for Effective Therapy Development. *Cancers*, *13*(19), 4779. https://doi.org/10.3390/cancers13194779

Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., & Dolznig, H. (2013). In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *752*(1), 10–24. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.08.001

Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, *2013*(1). https://doi.org/10.1155/2013/162750

Lai, W., Chen, J., Gao, X., Jin, X., Chen, G., & Ye, L. (2023). Design and Synthesis of Novel Chalcone Derivatives: Anti-Breast Cancer Activity Evaluation and Docking Study. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(21), 15549. https://doi.org/10.3390/ijms242115549

Lam, S. W., Jimenez, C. R., & Boven, E. (2014). Breast cancer classification by proteomic technologies: Current state of knowledge. *Cancer Treatment Reviews*, *40*(1), 129–138. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.06.006

Lee, Y., Lee, S., Lee, Y., Song, D., Park, S. H., Kim, J., Namkung, W., & Kim, I. (2024). Anticancer Evaluation of Novel Benzofuran–Indole Hybrids as Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Pharmaceuticals*, *17*. https://doi.org/10.3390/ph17020231

Liu, Y., Zhang, N., Zhang, H., Wang, L., Duan, Y., Wang, X., Chen, T., Liang, Y., Li, Y., Song, X., Li, C., Han, D., Chen, B., Zhao, W., & Yang, Q. (2020). Fatostatin in combination with tamoxifen induces synergistic inhibition in er-positive breast cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, *14*, 3535–3545. https://doi.org/10.2147/DDDT.S253876

Liu, Z. Y., Wu, B., Guo, Y. S., Zhou, Y. H., Fu, Z. G., Xu, B. Q., Li, J. H., Jing, L., Jiang, J. L., Tang, J., & Chen, Z. N. (2015). Necrostatin-1 reduces intestinal inflammation and colitis-associated tumorigenesis in mice. *American Journal of Cancer Research*, *5*, 3174–3185.

Luo, Y., Wu, W., Zha, D., Zhou, W., Wang, C., Huang, J., Chen, S., Yu, L., Li, Y., Huang, Q., Zhang, J., & Zhang, C. (2021). Synthesis and biological evaluation of novel ligustrazine-chalcone derivatives as potential anti-triple negative breast cancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *47*, 128230. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128230

Macheret, M., & Halazonetis, T. D. (2015). DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *10*, 425–448. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040424

Macias, H., & Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *WIREs Developmental Biology*, *1*(4), 533–557. https://doi.org/10.1002/wdev.35

Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H., & Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, *10*(10), 955–960. https://doi.org/10.4161/cbt.10.10.13879

Mantooth, S. M., Abdou, Y., Saez-Ibañez, A. R., Upadhaya, S., & Zaharoff, D. A. (2024). Intratumoral delivery of immunotherapy to treat breast cancer: current development in clinical and preclinical studies. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1385484

Marusyk, A., & Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1805*(1), 105–117. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.11.002

McCart Reed, A. E., Kalinowski, L., Simpson, P. T., & Lakhani, S. R. (2021). Invasive lobular carcinoma of the breast: the increasing importance of this special subtype. *Breast Cancer Research*, *23*(1), 6. https://doi.org/10.1186/s13058-020-01384-6

McGuire, K. P. (2019). Breast Anatomy and Physiology. In *Breast Disease* (pp. 1–9). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-04606-4_1

McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(4), 1–28. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656

Mendanha, D., Vieira De Castro, J., Moreira, J., Costa, B. M., Cidade, H., Pinto, M., Ferreira, H., & Neves, N. M. (2021). A new chalcone derivative with promising antiproliferative and anti-invasion activities in glioblastoma cells. *Molecules*, *26*. https://doi.org/10.3390/molecules26113383

Miao, Y. H., Hu, Y. H., Yang, J., Liu, T., Sun, J., & Wang, X. J. (2019a). Natural source, bioactivity and synthesis of benzofuran derivatives. *RSC Advances*, *9*, 27510–27540. https://doi.org/10.1039/c9ra04917g

Miao, Y. H., Hu, Y. H., Yang, J., Liu, T., Sun, J., & Wang, X. J. (2019b). Natural source, bioactivity and synthesis of benzofuran derivatives. *RSC Advances*, *9*, 27510–27540. https://doi.org/10.1039/c9ra04917g

Michalkova, R., Mirossay, L., Gazdova, M., Kello, M., & Mojzis, J. (2021). Molecular mechanisms of antiproliferative effects of natural chalcones. *Cancers*, *13*(11). https://doi.org/10.3390/cancers13112730

Mishra, A., Srivastava, A., Pateriya, A., Tomar, M. S., Mishra, A. K., & Shrivastava, A. (2021). Metabolic reprograming confers tamoxifen resistance in breast cancer. *Chemico-Biological Interactions*, *347*, 109602. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109602

Moccia, C., & Haase, K. (2021). Engineering Breast Cancer On-chip—Moving Toward Subtype Specific Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.694218

Modzelewska, A., Pettit, C., Achanta, G., Davidson, N. E., Huang, P., & Khan, S. R. (2006). Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *14*, 3491–3495. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.01.003

Motawi, T. K., Abdelazim, S. A., Darwish, H. A., Elbaz, E. M., & Shouman, S. A. (2016). Modulation of Tamoxifen Cytotoxicity by Caffeic Acid Phenethyl Ester in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*. https://doi.org/10.1155/2016/3017108

Nabholtz, J.-M., & Gligorov, J. (2005). The role of taxanes in the treatment of breast cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *6*(7), 1073–1094. https://doi.org/10.1517/14656566.6.7.1073

Napiórkowska, M., Cieślak, M., Kaźmierczak-Barańska, J., Królewska-Golińska, K., & Nawrot, B. (2019). Synthesis of new derivatives of benzofuran as potential anticancer agents. *Molecules*, *24*. https://doi.org/10.3390/molecules24081529

Narod, S. A., & Foulkes, W. D. (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews Cancer*, *4*(9), 665–676. https://doi.org/10.1038/nrc1431

Núñez, C., Capelo, J. L., Igrejas, G., Alfonso, A., Botana, L. M., & Lodeiro, C. (2016). An overview of the effective combination therapies for the treatment of breast cancer. *Biomaterials*, *97*, 34–50. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.04.027

Obeng, E. (2021). Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Brazilian Journal of Biology*, *81*(4), 1133–1143. https://doi.org/10.1590/1519-6984.228437

Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O., & Ramírez-Valdespino, C. A. (2022). Subtypes of Breast Cancer. In *Breast Cancer* (pp. 31–42). Exon Publications. https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer-subtypes

Petinari, L., Kohn, L. K., De Carvalho, J. E., & Genari, S. C. (2004). Cytotoxicity of tamoxifen in normal and tumoral cell lines and its ability to induce cellular transformation in vitro. *Cell Biology International*, *28*, 531–539. https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.04.008

Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., & Ellis, I. O. (2010). Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *120*(2), 293–308. https://doi.org/10.1007/s10549-010-0746-x

Rasha, F., Sharma, M., & Pruitt, K. (2021). Mechanisms of endocrine therapy resistance in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *532*. https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111322

Reed, A. E. M., Kutasovic, J. R., Lakhani, S. R., & Simpson, P. T. (2015). Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. *Breast Cancer Research*, *17*(1), 12. https://doi.org/10.1186/s13058-015-0519-x

Ren, H. W., Yu, W., Wang, Y. N., Zhang, X. Y., Song, S. Q., Gong, S. Y., Meng, L. Y., Gan, C., Liu, B. J., & Gong, Q. (2023). Effects of autophagy inhibitor 3-methyladenine on a diabetic mice model. *International Journal of Ophthalmology*, *16*(9), 1456–1464. https://doi.org/10.18240/ijo.2023.09.12

Renoir, J.-M., Marsaud, V., & Lazennec, G. (2013). Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochemical Pharmacology*, *85*(4), 449–465. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.10.018

Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments*, *50*. https://doi.org/10.3791/2597

Riggio, A. I., Varley, K. E., & Welm, A. L. (2021). The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer. *British Journal of Cancer*, *124*(1), 13–26. https://doi.org/10.1038/s41416-020-01161-4

Roskoski, R. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research*, *79*, 34–74. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002

Rozmer, Z., & Perjési, P. (2016). Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochemistry Reviews*, *15*(1), 87–120. https://doi.org/10.1007/s11101-014-9387-8

Sahoo, G., Samal, D., Khandayataray, P., & Murthy, M. K. (2023). A Review on Caspases: Key Regulators of Biological Activities and Apoptosis. *Molecular Neurobiology*, *60*(10), 5805–5837. https://doi.org/10.1007/s12035-023-03433-5

Sak, K. (2014). Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacognosy Reviews*, *8*(16), 122. https://doi.org/10.4103/0973-7847.134247

Samraj, A. K., Keil, E., Ueffing, N., Schulze-Osthoff, K., & Schmitz, I. (2006). Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(40), 29652–29659. https://doi.org/10.1074/jbc.M603487200

Schnitt, S. J., Moran, M. S., & Giuliano, A. E. (2020). Lumpectomy Margins for Invasive Breast Cancer and Ductal Carcinoma in Situ: Current Guideline Recommendations, Their Implications, and Impact. *Journal of Clinical Oncology*, *38*(20), 2240–2245. https://doi.org/10.1200/JCO.19.03213

Schuurman, T. N., Witteveen, P. O., van der Wall, E., Passier, J. L. M., Huitema, A. D. R., Amant, F., & Lok, C. A. R. (2019). Tamoxifen and pregnancy: an absolute contraindication? *Breast Cancer Research and Treatment*, *175*(1), 17–25. https://doi.org/10.1007/s10549-019-05154-7

Seba, V., Silva, G., Dos Santos, M. B., Baek, S. J., França, S. de C., Fachin, A. L., Regasini, L. O., & Marins, M. (2018). Chalcone derivatives 4′-amino-1-naphthyl-chalcone (D14) and 4′-amino-4-methyl-1-naphthyl-chalcone (D15) suppress migration and invasion of osteosarcoma cells mediated by p53 regulating emt-related genes. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*. https://doi.org/10.3390/ijms19092838

Selepe, M. A., Kunyane, P., Seboletswe, P., Nair, S., Cele, N., Engelbrecht, M., Joubert, D. F., Vandevoorde, C., Singh, P., & Sonopo, M. S. (2022). Synthesis and evaluation of benzoylbenzofurans and isoflavone derivatives as sirtuin 1 inhibitors with antiproliferative effects on cancer cells. *Bioorganic Chemistry*, *128*. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.106101

Sergina, N. V., & Moasser, M. M. (2007). The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends in Molecular Medicine*, *13*(12), 527–534. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.10.002

Shea, E. K. H., Koh, V. C. Y., & Tan, P. H. (2020). Invasive breast cancer: Current perspectives and emerging views. *Pathology International*, *70*(5), 242–252. https://doi.org/10.1111/pin.12910

Sheng, Y., Sun, B., Guo, W. T., Zhang, Y. H., Liu, X., Xing, Y., & Dong, D. L. (2013). 3-Methyladenine induces cell death and its interaction with chemotherapeutic drugs is independent of autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *432*, 5–9. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.106

Smolarz, B., Nowak, A. Z., & Romanowicz, H. (2022). Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*, *14*(10), 2569. https://doi.org/10.3390/cancers14102569

Strasser, A., O'Connor, L., & Dixit, V. M. (2000). Apoptosis Signaling. *Annual Review of Biochemistry*, *69*(1), 217–245. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.217

Su, Y. K., Huang, W. C., Lee, W. H., Bamodu, O. A., Zucha, M. A., Astuti, I., Suwito, H., Yeh, C. T., & Lin, C. M. (2017). Methoxyphenyl chalcone sensitizes aggressive epithelial cancer to cisplatin through apoptosis induction and cancer stem cell eradication. *Tumor Biology*, *39*. https://doi.org/10.1177/1010428317691689

Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., & Wang, X. (2012). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis

signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, *148*(1–2), 213–227. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.031

Suter, R., & Marcum, J. A. (2007). The molecular genetics of breast cancer and targeted therapy. *Biologics : Targets & Therapy*, *1*(3), 241–258.

Tian, T. (2023). MCF-7 cells lack the expression of Caspase-3. *International Journal of Biological Macromolecules*, *231*. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123310

Tristão, V. R., Gonçalves, P. F., Dalboni, M. A., Batista, M. C., De Souza Durão, M., & Monte, J. C. M. (2012). Nec-1 protects against nonapoptotic cell death in cisplatin-induced kidney injury. *Renal Failure*, *34*, 373–377. https://doi.org/10.3109/0886022X.2011.647343

True. (2000). *British Journal of Cancer*, *82*, 1932–1937. https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1167

Tseng, T. H., Shao, Y. C., Lee, Y. J., & Lee, H. J. (2023). 2-(4-Benzyloxy-3-methoxyphenyl)-5-(carbethoxyethylene)-7-methoxy-benzofuran, a Benzofuran Derivative, Suppresses Metastasis Effects in P53-Mutant Hepatocellular Carcinoma Cells. *Biomedicines*, *11*. https://doi.org/10.3390/biomedicines11072027

Van Noorden, C. J. F. (2001). The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochemica*, *103*(3), 241–251. https://doi.org/10.1078/0065-1281-00601

Vargas-Castro, R., García-Becerra, R., Díaz, L., Avila, E., Ordaz-Rosado, D., Bernadez-Vallejo, S. V., Cano-Colín, S., Camacho, J., Larrea, F., & García-Quiroz, J. (2023). Enhancing Tamoxifen Therapy with α-Mangostin: Synergistic Antiproliferative Effects on Breast Cancer Cells and Potential Reduced Endometrial Impact. *Pharmaceuticals*, *16*. https://doi.org/10.3390/ph16111576

Varghese, E., Samuel, S. M., Líšková, A., Samec, M., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2020). Targeting Glucose Metabolism to Overcome Resistance to Anticancer Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancers*, *12*. https://doi.org/10.3390/cancers12082252

Vassilev, A., & DePamphilis, M. (2017). Links between DNA Replication, Stem Cells and Cancer. *Genes*, *8*(2), 45. https://doi.org/10.3390/genes8020045

Viale, G. (2012). The current state of breast cancer classification. *Annals of Oncology*, *23*. https://doi.org/10.1093/annonc/mds326

Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, *1*(3), 1112–1116. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179

Vilková, M., Michalková, R., Kello, M., Sabolová, D., Takáč, P., Kudličková, Z., Garberová, M., Tvrdoňová, M., Béres, T., & Mojžiš, J. (2022). Discovery of novel acridine-chalcone hybrids with potent DNA binding and antiproliferative activity against MDA-MB-231 and MCF-7 cells. *Medicinal Chemistry Research*, *31*, 1323–1338. https://doi.org/10.1007/s00044-022-02911-0

Vishnu, T., Veerabhadraiah, M., Krishna Chaitanya, V., Nagamani, M., Raghavender, M., & Jalapathi, P. (2023). Design, synthesis and anticancer activity of 5-((2-(4-bromo/chloro benzoyl) benzofuran-5-yl) methyl)-2-((1-(substituted)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)benzaldehyde analogues. *Molecular Diversity*, *27*, 2695–2713. https://doi.org/10.1007/s11030-022-10575-6

Voigt, W. (n.d.). Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. In *Chemosensitivity* (pp. 039–048). Humana Press. https://doi.org/10.1385/1-59259-869-2:039

Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C., & Lakhani, S. R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv*, *465*(1), 1–14. https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7

Wang, H., Zhu, J., Zhang, Q., Tang, J., & Huang, X. (2024). Current scenario of chalcone hybrids with antibreast cancer therapeutic applications. *Archiv Der Pharmazie*, *357*(5). https://doi.org/10.1002/ardp.202300640

Wang, L., Chen, G., Lu, X., Wang, S., Han, S., Li, Y., Ping, G., Jiang, X., Li, H., Yang, J., & Wu, C. (2015). Novel chalcone derivatives as hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitor: Synthesis, anti-invasive and anti-angiogenic properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *89*, 88–97. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.036

Wang, L., Tang, L., Yao, C., Liu, C., & Shu, Y. (2021). The Synergistic Effects of Celastrol in combination with Tamoxifen on Apoptosis and Autophagy in MCF-7 Cells. *Journal of Immunology Research*, *2021*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2021/5532269

Wang, S., He, M., Li, L., Liang, Z., Zou, Z., & Tao, A. (2016). Cell-in-cell death is not restricted by caspase-3 deficiency in MCF-7 cells. *Journal of Breast Cancer*, *19*, 231–241. https://doi.org/10.4048/jbc.2016.19.3.231

Wang, Y., & Minden, A. (2022). Current Molecular Combination Therapies Used for the Treatment of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(19), 11046. https://doi.org/10.3390/ijms231911046

Wieduwilt, M. J., & Moasser, M. M. (2008). The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*(10), 1566–1584. https://doi.org/10.1007/s00018-008-7440-8

Wilkinson, L., & Gathani, T. (2022). Understanding breast cancer as a global health concern. *The British Journal of Radiology*, *95*(1130). https://doi.org/10.1259/bjr.20211033

Wu, Y.-T., Tan, H.-L., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., Wenk, M. R., Ong, C.-N., Codogno, P., & Shen, H.-M. (2010). Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(14), 10850–10861. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.080796

Yan, S., Li, Q., Zhang, D., Wang, X., Xu, Y., Zhang, C., Guo, D., & Bao, Y. (2021). Necroptosis pathway blockage attenuates PFKFB3 inhibitor-induced cell viability loss and genome instability in colorectal cancer cells. *American Journal of Cancer Research*, *11*, 2062–2080.

Yao, J., Deng, K., Huang, J., Zeng, R., & Zuo, J. (2020). Progress in the Understanding of the Mechanism of Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.592912

Yen, C., Zhao, F., Yu, Z., Zhu, X., & Li, C. G. (2022). Interactions Between Natural Products and Tamoxifen in Breast Cancer: A Comprehensive Literature Review. *Frontiers in Pharmacology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.847113

Yoon, J., & Oh, D.-Y. (2024). HER2-targeted therapies beyond breast cancer — an update. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *21*(9), 675–700. https://doi.org/10.1038/s41571-024-00924-9

Yoon, S., Kovalenko, A., Bogdanov, K., & Wallach, D. (2017). MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular

Vesicle Generation. *Immunity*, *47*, 51-65.e7. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.001

Yuan, S., & Akey, C. W. (2013). Apoptosome Structure, Assembly, and Procaspase Activation. *Structure*, *21*(4), 501–515. https://doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024

Zhan, C., Huang, M., Yang, X., & Hou, J. (2021). MLKL: Functions beyond serving as the Executioner of Necroptosis. *Theranostics*, *11*(10), 4759–4769. https://doi.org/10.7150/thno.54072

Zhang, G. N., Zhong, L. Y., Bligh, S. W. A., Guo, Y. L., Zhang, C. F., Zhang, M., Wang, Z. T., & Xu, L. S. (2005). Bi-bicyclic and bi-tricyclic compounds from Dendrobium thyrsiflorum. *Phytochemistry*, *66*, 1113–1120. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.001

Zhu, J. W., Charkhchi, P., Adekunte, S., & Akbari, M. R. (2023). What Is Known about Breast Cancer in Young Women? *Cancers*, *15*(6), 1917. https://doi.org/10.3390/cancers15061917

Zubair, M., Wang, S., & Ali, N. (2021). Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. *Frontiers in Pharmacology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.632079