

T.C.
Ege Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kimyasallarla İndüklenen Meme Kanseri Oluşum Mekanizmalarında Olası Antikanser
İlaç Hedeflerinin Araştırılması

Farmasotik Toksikoloji Yüksek Lisans Derecesi ile Doktora Programı

Doktora Tezi

Uzman Eczacı Elif İNCE

İzmir

2018

T.C.
Ege Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kimyasallarla İndüklenen Meme Kanseri Oluşum Mekanizmalarında Olası
Antikanser İlaç Hedeflerinin Araştırılması

Farmasotik Toksikoloji Anabilimdalı
Farmasotik Toksikoloji Yüksek Lisans Derecesi ile Doktora Programı

Doktora Tezi

Uzman Eczacı Elif İNCE

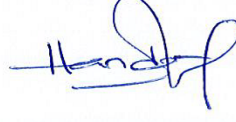
Danışman
Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN

İzmir

2018

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Başkan : Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN

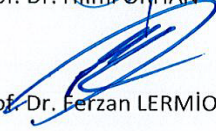


(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Hilmi ORHAN



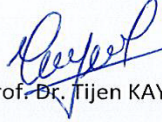
Üye : Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS



Üye : Prof. Dr. Halit Sinan SÜZEN



Üye : Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ



Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:12.11.2018.....

Önsöz

Lisans eğitimim sırasında toksikolojiye olan ilgim bitirme tezimi yapmak için Farmasotik Toksikoloji alanını seçmeme neden oldu. Ardından bitirme tezinde de danışman hocam olan Prof. Dr. Hande GÜRER-ORHAN'ın danışmanlığında doktora eğitimime başladım. Tezimden önceki dönemde danışman hocamın araştırmacı olarak yer aldığı "İndol ve karbazol türevi yeni ilaç etken maddesi geliştirilmesi: Antioksidan ve kanserde kemopreventif aktivitelerinin değerlendirilmesi" adlı Tübitak projesinde çalışma fırsatı buldum. Melatonin ve türevleriyle ilgili olarak grubumuzun işbirliğiyle yürüttüğü bu çalışmaların 8-9 yıllık bir geçmişi bulunmaktaydı. Devam eden süreçte melatoninin meme kanseriyle ilgili etkileri çalışmalarımızı bu yöne çevirmemize neden oldu ve tez konumun belirlenmesi bu şekilde gerçekleşti. Toksikolojik açıdan risk olarak değerlendirdiğimiz bazı durumların bakış açısı değiştirildiğinde önemli bir tedavi seçeneği haline geliyor olması toksikolojik bakış açısının ne kadar önemli olduğunu, 'bilgi'nin çok önemli bir güç olduğunun bir kez daha farkına varmamı sağladı. Yaşadığımız en büyük sıkıntı ise proje süreçlerindeki gecikmelerdi. Tez konumu gereken zamanda projelendirmiş olmama rağmen ülkenin içinde bulunduğu genel sıkıntılı süreçler nedeniyle uzun süre beklemek zorunda kaldık. Proje kabulünden sonraki süreçte öğrendiğim en önemli şeyse bilimsel yeterlilik kadar finansal anlamda proje yönetim süreçlerine hakim olmanın da başarılı olma ve süreklilik için gerekli olduğuydu.

Daha güzel yarınlarda, daha iyi imkanlarla, daha çok çalışabilmek dileğiyle.

İzmir, 2018

Elif İNCE

Özet

Kimyasallarla İndüklenen Meme Kanseri Oluşum Mekanizmalarında Olası Antikanser İlaç Hedeflerinin Araştırılması

Meme kanseri, dünyada görülme sıklığı hızla artan ve kadınlarda kanserden ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan bir kanser türüdür. Endojen östrojenlerin ve eksojen östrojenik bileşiklerin bazılarının hem reseptör aracılığıyla hücre proliferasyonunu arttırarak, hem de metabolizmaları sonucu oluşan reaktif kinon metabolitlerinin DNA'ya bağlanmasıyla kanserin oluşum ve gelişimine katkıda bulunduğu bildirilmektedir.

Endojen bir hormon olan melatoninin hormon-ilişkili meme kanserinde östrojen reseptörü aracılıklı etkileri değiştirdiği ve dokularda lokal östrojen sentezini inhibe ettiği bilinmektedir. Meme kanserinin önlenmesi ve tedavisinde destekleyici ajan olarak kullanımının diğer ilaçların etkinliğini artırdığı ve yan etkilerini azalttığı gösterilmiştir. Ancak melatoninin yarılanma ömrünün kısa oluşu ve oral biyoyararlanımının düşük oluşu ilaç olarak kullanımını kısıtladığı için bu tez çalışmasında bazı indol türevi melatonin analoglarının benzer etkinliklerinin test edilmesi düşünülmüştür.

Tez çalışması kapsamında 1-etilindol, 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon ve 2-metilindol yapısındaki melatonin analogu bileşiklerin kimyasallarla indüklenen meme kanserinin oluşumunda rol oynayan hedefler üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu hedefler, östrojenik bileşiklerin bağlanması ile hücre proliferasyonunu artıran östrojen reseptörü, lokal östrojen sentezini katalize eden aromataz enzimi ve östrojen ya da kimyasalları genotoksik metabolitlere dönüştüren CYP1B1 enzimidir. Türevlerin sırasıyla potansiyel östrojen reseptör antagonisti, aromataz inhibitörü ve CYP1B1 inhibitörü etkileri araştırılmıştır. Ayrıca hem insan sağlıklı meme epiteli hücre hattı (MCF-10A), hem de ER+ (MCF-7 BUS) ve üçlü negatif (MDA-MB-231) insan meme kanseri hücre hatları üzerindeki kısa ve uzun süreli sitotoksik etkileri de değerlendirilmiştir.

Maddelerden bazılarının ER antagonizması, aromataz inhibisyonu veya CYP1B1 inhibisyonu yönünde etkileri olduğu, bazılarının ise birden fazla hedefte etkileri

olduğu görülmüştür. Etkili bazı türevlerin sağlıklı meme hücrelerinde sitotoksosite göstermezken meme kanseri hücrelerinde sitotoksosite göstermeleri ve özellikle uzun süreli maruziyet ile hücrelerin koloni oluşumunu tamamen engellemiş olmaları ilaç adayı olabilecekleri yönünde umut vericidir. Bazılarının MCF-7 BUS hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin MDA-MB-231 hücre hattına kıyasla daha güçlü bulunması sitotoksik etkilerinin hormon-ilişkili olabileceğini, bazılarında hücreler arasında etki farkı gözlenmemesi ise sitotoksik etkilerinin temelinde test edilen hedeflerin dışında mekanizmaların da rol oynadığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak indol türevi melatonin analoglarından bazılarının belirlenen üç farklı hedef üzerinde melatoninden daha etkili oldukları bulunmuştur. Bununla birlikte araştırılan hedefler üzerinde etkili olduğu bulunan bileşikler, etki güçleri bakımından mevcut tedavi ajanlarına alternatif olabilecek üstünlükte bulunmamıştır. Bu nedenlerle sözkonusu bileşiklerin meme kanserinin önlenmesinde kemopreventif ve/veya tedavi etkinliğini güçlendirerek yan etkileri azaltmaya aday adjuvan ajan olabilecekleri düşünülmektedir. Tez çalışmasında ortaya konan yapı-aktivite ilişkileri, var olan ilaçlardan daha güçlü yeni ilaç adaylarının geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir. Bu tezde klinik öncesi ilaç keşif çalışmaları kapsamında yer alan hedef belirleme, etki belirleme/ölçme yöntemi seçimi ve validasyonu, orta/hızlı çıktılı tarama, moleküler modelleme ile öngörüs el veri elde etme ile *in vitro* etkinlik ve toksisite testlerini kapsayan bütüncül bir yaklaşım kullanılarak hit/öncü-molekül belirlenmesi amaçlanmış ve gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri; ER antagonizması; Aromataz inhibisyonu; CYP1B1 inhibisyonu, sentetik melatonin analogları.

Abstract

Investigation of Mechanisms of Chemically-Induced Breast Cancer as Targets for Anticancer Drugs

Breast cancer is the second cause of death among female cancers and its incidence is increasing rapidly all over the world. It was reported that endogen estrogens and xenoestrogens play a role in the initiation and progression of breast cancer via two complementary pathways; by increasing cell proliferation via binding to estrogen receptor and by inducing oxidative DNA damage as a result of metabolism of estrogens to their reactive quinone metabolites. Melatonin, a natural indolic hormone, is known to be beneficial in breast cancer via modulation of estrogen receptor mediated effects and via inhibiting local biosynthesis of estrogens by aromatase inhibition. Furthermore melatonin is reported to play a role as a potent adjuvant agent to increase effectiveness and to reduce side effects of the conventional breast cancer therapy. However short half-life and low bioavailability of melatonin limit its therapeutic use.

Therefore the present thesis is aimed to investigate the potential effects of melatonin analogues on the selected targets that are involved in the chemical-induced breast carcinogenesis. Our selected target proteins were are estrogen receptor, aromatase and CYP1B1 enzymes. The inhibitory activities of the compounds on estrogen induced cell proliferation as a consequence of their ER antagonist effects were investigated. Inhibitory effects of the compounds on both aromatase, enzyme responsible for local estrogen biosynthesis, and CYP1B1, enzyme catalysing biotransformation of chemicals/estrogens to their reactive metabolites, were investigated. Furthermore short-term and long-term cytotoxicity of the compounds were evaluated in both non-tumorigenic breast epithelial cell line (MCF-10A) and two different breast cancer cell lines (MCF-7 BUS and MDA-MB231).

We found that some of the compounds have ER antagonist, aromatase inhibitor and/or CYP1B1 inhibitory activity; some of them were effective against more than one target. Some of the compounds that were found to be effective on selected targets caused cytotoxicity on human breast cancer cell lines without having cytotoxic effect on non-tumorigenic breast cancer cell line which indicates that

these molecules can be promising candidates for breast cancer therapy without causing harm to the healthy cells. Some of the tested indol derivatives were found to inhibit formation of colonies dramatically in long term cytotoxicity studies in MCF-7 cells which suggests an important role for them as novel drug candidates. It was also found that some compounds are more cytotoxic to ER + (MCF-7 BUS) cells than ER-(MDA-MB-231) breast cancer cells implying the hormon related mode of action of their cytotoxic activity. On the other hand for some compounds, there were no differences between their cytotoxic effects on ER+ or ER- cell lines suggesting that off-target mechanisms may be involved in their cytotoxicity. Although effective compounds are not as potent as current therapy agents, they were much more effective than their parent compound, melatonin, on all three selected targets. We suggest that these compounds could be promising candidates with lower side-effects in the prevention and treatment of breast cancer as an adjuvant therapeutical agent. The structure-activity relationships obtained from this study may provide data for further studies to develop more potent molecules and alternatives to current therapies. In the present thesis, target identification, selection and validation of method, medium/high throughput screening on selected target, molecular modelling studies to provide predictive data, early phases of the efficacy and toxicity determination were conducted to identify a hit/lead among tested indole derivative melatonin analogs as in the preclinical stages of drug discovery studies.

Keywords: Breast cancer; ER antagonist; Aromatase inhibitor; CYP1B1 inhibitor, Melatonin analogues

İçindekiler

Özet.....	I
Abstract.....	III
İçindekiler	V
Tablolar Listesi	X
Şekiller Listesi.....	XI
Kısaltmalar Listesi	XVII
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kimyasal Karsinogenez	3
2.2 Meme Kanseri.....	4
2.2.1 Meme Kanserinin Sınıflandırılması.....	5
2.2.2 Meme Kanserinde Risk Faktörleri.....	6
2.2.3 Eksojen/Ksenobiyotiklerle İndüklenen Meme Kanseri	8
2.2.4 Endojen Östrojenler ile İndüklenen Meme Kanseri	9
2.2.4.1 Östrojen Reseptörü Aracılıklı Etkiler.....	11
2.2.4.2 Östrojen Reseptöründen Bağımsız Etkiler	12
2.3 Meme Kanseri Tedavisinde Östrojeni Hedef Alan Terapötik Yaklaşımlar.....	16
2.3.1 Selektif Östrojen Enzim Modülasyonu (SEEM)	16
2.3.1.1 Aromataz İnhibisyonu ve İnhibitörleri	17
2.3.2 Selektif Östrojen Reseptör Modülasyonu (SERM)	20
2.3.3 Biyoaktivasyondan sorumlu enzimlerin modülasyonu	24
2.4 Melatonin	25
2.4.1 Melatoninin Meme Kanserindeki Koruyucu Etki Mekanizması	28
2.4.2 Östrojenlerin Plazma Konsantrasyonunun Melatonin Tarafından Modülasyonu	30
2.4.3 Selektif Östrojen Reseptör Modülatörü (SERM) Olarak Melatonin	31
2.4.4 Selektif Östrojen Enzim Modülatörü (SEEM) Olarak Melatonin	33

2.4.5	Östrojenin Metabolizmasında Yer Alan Enzimlerin Regülasyonu	34
2.4.6	Melatoninin Terapotik Olarak Kullanımı	35
3	GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1	Gereç	36
3.1.1	Kullanılan Kimyasallar	36
3.1.2	Kullanılan Gereçler	38
3.1.3	Kullanılan Melatonin Analogları.....	39
3.1.3.1	KD Kodlu Bileşikler	40
3.1.3.2	N0 Kodlu Bileşikler	49
3.1.3.3	M Kodlu Bileşikler.....	54
3.1.4	Kullanılan Çözeltiler	56
3.1.4.1	Aromataz Aktivitesi Ölçüm Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	56
3.1.4.1.1	NADPH-Kofaktör Karışımı.....	56
3.1.4.1.2	Durdurucu Çözelti	56
3.1.4.1.3	Enzim-Substrat Karışımı	56
3.1.4.2	E-Screen Analizinde Kullanılan Çözeltiler.....	56
3.1.4.2.1	Büyüme İçin Gerekli Eksiksiz Besi Ortamı	56
3.1.4.2.2	Hormon İçermeyen Besi Ortamı	57
3.1.4.2.3	% 10 (a/h) Trikloroasetik Asit (TCA) Çözeltisinin Hazırlanması	57
3.1.4.2.4	% 1 Asetik Asit Çözeltisinin Hazırlanması	57
3.1.4.2.5	% 0,4 (a/h) Sülfrodamin-B Boyasının Hazırlanması	57
3.1.4.2.6	10mM Tris-baz Çözeltisinin Hazırlanması (pH 10,7).....	57
3.1.4.2.7	Stok 17-β Östradiolün Hazırlanması	57
3.1.4.2.8	Stok Fulvestranın Hazırlanması	58
3.1.4.3	CYP1 Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	58
3.1.4.3.1	NADPH Çözeltisinin Hazırlanması	58
3.1.4.3.2	Potasyum Fosfat Tamponunun Hazırlanması	58
3.1.4.3.3	Stok Etoksirezorufin Çözeltisinin Hazırlanması.....	58

3.1.4.3.4	Stok Ketokonazol Çözeltisinin Hazırlanması	59
3.1.4.4	Sitotoksosite Analizinde Kullanılan Çözeltiler	59
3.1.4.4.1	MCF-10A hücre hattı için gerekli eksiksiz büyüme ortamı	59
3.1.4.4.2	MCF-7 BUS ve MDA-MB-231 hücre hatları için gerekli eksiksiz büyüme ortamı	59
3.1.4.4.3	MTT [3(4,5dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] Çözeltisinin Hazırlanması	59
3.1.4.4.4	NADH çözeltisinin hazırlanması.....	59
3.1.4.4.5	Sodyum piruvat çözeltisinin hazırlanması	60
3.1.4.4.6	Metanol : Asetik asit çözeltisinin hazırlanması.....	60
3.1.4.4.7	%0,5 Kristal viyole çözeltisinin hazırlanması	60
3.2	Yöntemler	60
3.2.1	Rutin Hücre Kültürü.....	60
3.2.2	ER Agonist/Antagonist Etkinin Belirlenmesi (E-Screen).....	61
3.2.3	Aromataz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	63
3.2.3.1	Aromataz Aktivitesinin Dolaylı Olarak Ölçülmesi	63
3.2.4	CYP1 Aktivitesi Ölçüm Yöntemi [7- Etoksirezorufin O-Dealkilasyon (EROD) Yöntemi].....	64
3.2.5	Sitotoksitenin Farklı Yöntemlerle Değerlendirilmesi.....	65
3.2.5.1	MTT Yöntemi.....	65
3.2.5.2	LDH yöntemi.....	65
3.2.5.3	Sülforodamin B yöntemi.....	66
3.2.5.4	Koloni Oluşum Yöntemi.....	67
3.2.6	Moleküler Modelleme ile Yapı-Aktivite Çalışması	68
3.2.7	İstatistiksel Değerlendirme	69
4	BULGULAR	70
4.1	Yöntemlerin Laboratuvar Koşullarına Uyarlanması ile İlgili Bulgular.....	70
4.1.1	ER Agonist/Antagonist Etkinin Belirlenmesi İçin Uygulanan E-Screen Yönteminin Kısmi Validasyonu	70

4.1.1.1	Standart Maddelerin EC ₅₀ ve IC ₅₀ değerleri	70
4.1.1.2	E-screen Yönteminin “Analiz İçi” ve “Analizler Arası” Tekrarlanabilirliği	72
4.1.2	Aromataz Aktivitesi Ölçüm Yönteminin Kısmi Validasyonu.....	73
4.1.2.1	Standart Maddelerin IC ₅₀ değerleri.....	73
4.1.2.2	Aromataz Aktivitesi Ölçüm Yönteminin “Analiz İçi” ve “Analizler Arası” Tekrarlanabilirliği.....	74
4.1.3	CYP1 Aktivite Ölçüm (EROD) Yönteminin Kısmi Validasyonu	75
4.1.3.1	Standart Maddelerin IC ₅₀ Değerleri.....	75
4.1.3.2	CYP1 Aktivite Ölçüm Yönteminin “Analiz İçi” ve “Analizler Arası” Tekrarlanabilirliği.....	76
4.1.4	Sitotoksosite Ölçüm Yöntemlerinin Kısmi Validasyonu	76
4.1.4.1	MTT Yönteminin Kısmi Validasyonu	76
4.1.4.2	LDH Aktivitesi Ölçüm Yönteminin Kısmi Validasyonu.....	79
4.1.4.3	Sülforodamin B Yönteminin Kısmi Validasyonu.....	82
4.1.4.4	Koloni Oluşum Yönteminin Kısmi Validasyonu	84
4.2	Melatonin Analoglarının Antikanser İlaç Hedefleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması ile İlgili Bulgular	84
4.2.1	Östrojen Reseptör Agonist/Antagonist Etkinliklerin Araştırılması.....	84
4.2.1.1	Tek Doz Tarama Çalışmaları.....	84
4.2.1.2	hER α Docking Çalışması Bulguları.....	88
4.2.1.3	Melatonin ve Seçilen Analoglarının IC ₅₀ Değerlerinin Hesaplanması	89
4.2.2	Aromataz İnhibitör Etkinliğin Araştırılması.....	96
4.2.2.1	Tek Doz Tarama Çalışmaları.....	96
4.2.2.2	hCYP19A1 (Aromataz) Docking Çalışması Bulguları	98
4.2.2.3	Melatonin ve Seçilen Analoglarının IC ₅₀ Değerlerinin Hesaplanması.....	100
4.2.2.4	Aromataz İnhibitör Etkinliğin Dolaylı Aktivite Ölçüm Yöntemi ile Araştırılması	103
4.2.3	CYP1 Aktivitesi Üzerine Etkilerin Araştırılması	104
4.2.3.1	Mikrozomal CYP1 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerin Araştırılması	104

4.2.3.1.1	Tek Doz Tarama Çalışmaları	104
4.2.3.1.2	Melatonin ve Seçilen Analoglarının IC ₅₀ Değerlerinin Hesaplanması 107	
4.2.3.2	hCYP1B1 Docking Çalışması Bulguları	112
4.2.3.3	Rekombinant CYP1 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerin Belirlenmesi	113
4.2.4	Sitotoksik Etkilerin Araştırılması	116
4.2.4.1	Sitotoksitenin MTT Yöntemiyle Araştırılması	116
4.2.4.2	Sitotoksitenin LDH Yöntemi ile Araştırılması.....	124
4.2.4.3	Sitotoksitenin Sülfrodamin B Yöntemiyle Araştırılması.....	126
4.2.4.4	Melatonin Analoglarının Farklı Meme Kanseri Hücrelerinde IC ₅₀ Değerlerinin Hesaplanması.....	128
4.2.4.5	Uzun Süreli Sitotoksitenin Koloni Oluşum Yöntemi ile Araştırılması ..	133
5	TARTIŞMA.....	136
6	SONUÇ VE ÖNERİLER	151
7	KAYNAKLAR	153
	TEŞEKKÜR.....	181
	ÖZGEÇMİŞ	182

Tablolar Listesi

Tablo 2.1 Meme kanseri riskini artıran faktörler	8
Tablo 2.2 Aromataz inhibitörlerinin sınıflandırılması.....	18
Tablo 3.1 Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal maddeler	36
Tablo 3.2 Tez çalışması kapsamında kullanılan gereçler	38
Tablo 4.1 E-screen yönteminin 17- β -östradiol (10^{-10} M) ile hesaplanan “analiz içi” ve “analizler arası” tekrarlanabilirliği.....	73
Tablo 4.2 Ketokonazol ve aminoglutetimitin literatürde yer alan IC ₅₀ değerleri ile bu çalışmadan elde edilen IC ₅₀ değerlerinin karşılaştırılması (Wouters ve ark., 1988)..	74
Tablo 4.3 Aromataz aktivitesi ölçüm yönteminin “analiz içi” ve “analizler arası” tekrarlanabilirliği	74
Tablo 4.4 CYP1 aktivite ölçüm “analiz içi” ve “analizler arası” tekrarlanabilirliği.....	76
Tablo 4.5 MCF-7 BUS hücrelerinde sitotoksitenin MTT yöntemi ile belirlenmesinde Triton X-100 (171 μ M) ile elde edilen analiz içi ve analizler arası tekrarlanabilirlik düzeyleri.....	79
Tablo 4.6 MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşum yönteminde % 0,5 DMSO ile elde edilen analiz içi tekrarlanabilirlik düzeyleri.....	84
Tablo 4.7 Biyolojik olarak aktif bulunan melatonin analoglarının uygulanan tüm testlerdeki etkilerinin özeti (+ : Tek doz tarama çalışmasında etkili bulunan ancak doz-yanıt ilişkisini araştırmak için değerli bulunmayan; – : etkili bulunmayan).	135

Şekiller Listesi

Şekil 2.1 Östrojenin indüklediği karsinojenezde östrojen reseptörü aracılıklı ve östrojen reseptöründen bağımsız yollar	11
Şekil 2.2 Östrojenin endojen metabolizması ve yolda yer alan biyoaktivasyon ve detoksifikasyondan sorumlu enzimler	15
Şekil 2.3 Steroidlerin sağlıklı ve kanserli meme dokusundaki biyotransformasyonunda yer alan enzimatik yollar	20
Şekil 2.4 Farklı sınıflardaki SERM'lerin kimyasal yapıları	23
Şekil 2.5 Melatoninin biosentez basamakları	26
Şekil 2.6 Melatoninin östrojen sinyal yolağındaki etkileri	33
Şekil 4.1 ER agonisti olduğu bilinen östradiol için proliferatif etki- konsantrasyon grafiğı ve EC ₅₀ değeri	71
Şekil 4.2 ER antagonisti olduğu bilinen fulvestran ile ER antagonisti etkinin iki basamaklı yaklaşım kullanılarak bilinen ER antagonisti fulvestran ile belirlenmesi ve proliferatif etki- konsantrasyon grafiğı	71
Şekil 4.3 Ketokonazol (A) ve aminoglutetimitin (B) aromataz enzimi üzerine inhibitör etkileri ve IC ₅₀ değeri	73
Şekil 4.4 Ketokonazol (A) ve alizarinin (B) mikrozomal CYP1 enzimleri üzerine inhibitör etkisi ve IC ₅₀ değeri	75
Şekil 4.5 MCF-10A hücrelerinde EtOH ve Triton X-100'ün sitotoksik etkisinin MTT yöntemiyle değerlendirilmesi	77
Şekil 4.6 MCF-7 BUS hücrelerinde EtOH ve Triton X-100'ün sitotoksik etkisinin MTT yöntemiyle değerlendirilmesi	78
Şekil 4.7 MDA-MB-231 hücrelerinde EtOH ve Triton X-100'ün sitotoksik etkisinin MTT yöntemiyle değerlendirilmesi	78
Şekil 4.8 MCF-10A hücrelerinde EtOH ve Triton X-100 ile A) 4 saat B) 24 saat inkübasyon sonucu besi ortamında saptanan LDH aktivitesi	80

Şekil 4.9 MCF-7 BUS hücrelerinde EtOH ve Triton X-100 ile A) 4 saat B) 24 saat inkübasyon sonucu besi ortamında saptanan LDH aktivitesi.	81
Şekil 4.10 MDA-MB-231 hücrelerinde Triton X-100 ile A) 4 saat B) 24 saat inkübasyon sonucu besi ortamında saptanan LDH aktivitesi.	81
Şekil 4.11 MCF-10A hücrelerinde EtOH ve Triton X-100'ün sitotoksik etkisinin sülforodamin B yöntemiyle değerlendirilmesi.....	82
Şekil 4.12 MCF-7 BUS hücrelerinde EtOH ve Triton X-100'ün sitotoksik etkisinin sülforodamin B yöntemiyle değerlendirilmesi.....	83
Şekil 4.13 MDA-MB-231 hücrelerinde Triton X-100'ün sitotoksik etkisinin sülforodamin B yöntemiyle değerlendirilmesi.....	83
Şekil 4.14 1-etilindol grubu bileşiklerin (10 µM) E-Screen yöntemi ile elde edilen proliferatif etki (PE) değerleri.	85
Şekil 4.15 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin (10 µM) E-Screen yöntemi ile elde edilen proliferatif etki (PE) değerleri.....	85
Şekil 4.16 2-metilindol grubu bileşiklerin (10 µM) E-Screen yöntemi ile elde edilen proliferatif etki (PE) değerleri.	86
Şekil 4.17 1-etilindol grubu bileşiklerin (10 µM), 0,1 nM E ₂ varlığında MCF-7 BUS hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin E-Screen yöntemi ile değerlendirilmesi.....	87
Şekil 4.18 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin (10 µM), 0,1 nM E ₂ varlığında MCF-7 BUS hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin E-Screen yöntemi ile değerlendirilmesi.	87
Şekil 4.19 2-metilindol grubu bileşiklerin (10 µM), 0,1 nM E ₂ varlığında MCF-7 BUS hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin E-Screen yöntemi ile değerlendirilmesi.....	88
Şekil 4.20 NO/4 bileşiğinin ERα bağlanma bölgesindeki docking pozusu.	89
Şekil 4.21 Melatoninin 0,1 nM östradiol varlığında MCF-7 BUS hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisinin E-Screen yöntemi ile değerlendirilmesi.....	90

Şekil 4.22 1-etilindol grubu bileşiklerin östrojen reseptör antagonisti etkilerinin E-screen yöntemi ile değerlendirilmesi ve IC ₅₀ değerleri	92
Şekil 4.23 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin östrojen reseptör antagonisti etkilerinin E-screen yöntemi ile değerlendirilmesi ve IC ₅₀ değerleri.	94
Şekil 4.24 2-metilindol grubu bileşiklerin östrojen reseptör antagonisti etkilerinin E-screen yöntemi ile değerlendirilmesi ve IC ₅₀ değerleri	96
Şekil 4.25 1-etilindol grubu bileşiklerin (100 µM) aromataz aktivitesi üzerine etkileri.	97
Şekil 4.26 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin (100 µM) aromataz enzim aktivitesi üzerine etkileri.	98
Şekil 4.27 KD1 bileşiğinin (A) ve KD10 bileşiğinin (B) aromataz enziminin aktif bölgesindeki öngörülen bağlanma pozları.....	99
Şekil 4.28 Melatoninin aromataz enzimi üzerine inhibitör etkisi ve IC ₅₀ değeri.....	100
Şekil 4.29 Yeni sentezlenen melatonin analoglarına ait aromataz enzimi inhibisyon grafikleri ve IC ₅₀ değerleri	102
Şekil 4.30 KD1 ve KD20 maddelerine ait dolaylı aktivite ölçüm yöntemi ile elde edilen enzim inhibisyon grafikleri ve IC ₅₀ değerleri.	104
Şekil 4.31 1-etilindol grubu bileşiklerin (10 µM) CYP1 enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	105
Şekil 4.32 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin (10 µM) CYP1 enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	106
Şekil 4.33 2-metilindol grubu bileşiklerin (10 µM) CYP1 enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	106
Şekil 4.34 Melatoninin mikrozomal CYP1 enzimleri üzerine inhibitör etkisi ve IC ₅₀ değeri.....	107
Şekil 4.35 1-etilindol grubu bileşiklerin mikrozomal CYP1 inhibitör etkinlikleri ve IC ₅₀ değerleri.....	109

Şekil 4.36 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin mikrozomal CYP1 inhibitör etkinlikleri ve IC ₅₀ değerleri	111
Şekil 4.37 2-metilindol grubu bileşiklerin mikrozomal CYP1 inhibitör etkinlikleri ve IC ₅₀ değerleri.	112
Şekil 4.38 KD6 bileşiğinin (A) ve KD14 bileşiğinin (B) CYP1B1 enziminin aktif bölgesindeki ön görülen bağlanma pozunu.....	113
Şekil 4.39 1-etilindol grubu bileşiklerin rekombinant CYP1B1 enzimi üzerine inhibitör etkinlikleri ve IC ₅₀ değerleri.....	114
Şekil 4.40 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin rekombinant CYP1B1 enzimi üzerine inhibitör etkinlikleri ve IC ₅₀ değerleri.....	115
Şekil 4.41 2-metilindol grubu bileşiklerin rekombinant CYP1B1 enzimi üzerine inhibitör etkinlikleri ve IC ₅₀ değerleri.	115
Şekil 4.42 1-etilindol grubu bileşiklerin (10 µM), MCF-10A hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi..	116
Şekil 4.43 1-etilindol grubu bileşiklerin (10 µM), MCF-7 BUS hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi.....	117
Şekil 4.44 1-etilindol grubu bileşiklerin (10 µM), MDA-MB-231 hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi.....	118
Şekil 4.45 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin (10 µM) MCF-10 A hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi.	119
Şekil 4.46 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin (10 µM), MCF-7 BUS hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi.	120

Şekil 4.47 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin (10 µM), MDA-MB-231 hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi..	121
Şekil 4.48 2-metilindol grubu bileşiklerin (10 µM), MCF-10A hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi.	122
Şekil 4.49 2-metilindol grubu bileşiklerin (10 µM) MCF-7 BUS hücreleriyle 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi.	123
Şekil 4.50 2-metilindol grubu bileşiklerin (10 µM), MDA-MB-231 hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi.....	123
Şekil 4.51 MCF-10A hücrelerinde test bileşikleriyle (10 µM) 4 saat inkübasyon sonucu besi ortamında saptanan LDH aktivitesi.....	124
Şekil 4.52 MCF-7 BUS hücrelerinde test bileşikleriyle (10 µM) 4 saat inkübasyon sonucu besi ortamında saptanan LDH aktivitesi.....	125
Şekil 4.53 MDA-MB-231 hücrelerinde test bileşikleriyle (10 µM) 4 saat inkübasyon sonucu besi ortamında saptanan LDH aktivitesi.....	126
Şekil 4.54 MCF-10A hücrelerinde bileşiklerle (10 µM) 24 saat inkübasyon sonucu sitotoksisitenin sülfrodamin B yöntemi ile değerlendirilmesi.	127
Şekil 4.55 MCF-7 BUS hücrelerinde sitotoksisitenin bileşiklerle (10 µM), 24saat inkübasyon sonucu sülfrodamin B yöntemi ile değerlendirilmesi.....	127
Şekil 4.56 MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksisitenin bileşiklerle (10 µM) 24saat inkübasyon sonucu sülfrodamin B yöntemi ile değerlendirilmesi.....	128
Şekil 4.57 Etkin bileşiklerin MCF-7 BUS hücreleriyle 72 saat inkübasyonu sonucu sitotoksisitenin MTT yöntemiyle değerlendirilmesi ve IC ₅₀ değerleri.....	130
Şekil 4.58 Etkin bileşiklerin MDA-MB-231 hücreleriyle 72 saat inkübasyonu sonucu sitotoksisitenin MTT yöntemiyle değerlendirilmesi ve IC ₅₀ değerleri.....	132

Şekil 4.59 Bileşiklerin (10 µM) MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkileri. 134



Kısaltmalar Listesi

AA-NAT	Arilalkilamin N-asetiltransferaz
CaM	Kalmodulin
cAMP	Siklik adenzin mono fosfat
CD-FBS	Aktif kömür-dekstran ile muamele edilmiş f3tal sığır serumu
COMT	Katekol-o-metil transferaz
DES	Dietilstilbestrol
DMBA	7,12-dimetilbenz[a]antrasen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoksiribon3kleik asit
E ₁	3stron
E ₂	17 β -3stradiol
E ₃	3striol
EC ₅₀	%50 Etkili konsantrasyon
ER	3strojen resept3r3
ER+	3strojen resept3r3 pozitif
ERE	3strojen Yanıt Elementi
EROD	7- Etoksirezorufin O-Dealkilasyon
EtOH	Etanol
FBS	F3tal sığır serumu
FDA	Gıda ve İlaç Kurumu
5-HTP	5-hidroksitriptofan
G6PDH	Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz
HFC	7-Hidroksitri fluorometilkumarin

H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
hCYP19A1	İnsan aromataz enzimi
HO [•]	Hidroksil radikali
IC ₅₀	% 50 inhibitör etkili konsantrasyon
KE	Koloni etkinliği
LDH	Laktat dehidrojenaz
MEM-NEAA	Minimum temel ortam-esansiyel olmayan amino asit
MFC	7-Metoksi-4-triflorometilkumarin
MLT	Melatonin
MT1	Melatonin Reseptörü 1
MT2	Melatonin Reseptörü 2
MTT	3(4,5dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NQO1	NAD(P)H kinon oksidoredüktaz 1
O ₂ ^{•-}	Süper oksit anyon radikali
8-oxo-dG	8-okso-deoksiguanozin
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PKA	Protein Kinaz A
PR	Progesteron reseptör
SRB	Sülforodamin-B
SEEM	Selektif Östrojen Enzim Modülatörü
SERM	Selektif Östrojen Reseptör Modülatörü
TCA	Trikloroasetik asit
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin

1 GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve tüm dünyada insidansının arttığı bildirilmiştir. Meme kanseri insidansı gelişmiş ülkelerde, gelişmemiş ülkelere kıyasla daha yüksek olmasına rağmen kanserden ölüm oranlarının gelişmiş ülkelerde daha düşük olması meme kanserinin tedavi edilebilir olduğunun kanıtıdır.

Meme kanseri olgularının çok büyük bir kısmı hormon-bağımlıdır ve yapılan *in vitro/ in vivo* çalışmalar östrojenlere maruziyetle meme kanseri riski arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir. Endojen östrojenin indüklediği karsinojenizde iki farklı mekanizmanın rolü olduğu gösterilmiştir. Bunlardan ilki östrojen reseptörü aracılığı ile hücre proliferasyonunun artırılması, diğeri ise östrojenin oksidatif metabolizması sonucu oluşan reaktif kinon metabolitlerinin DNA hasarı oluşturmasıdır. Benzer mekanizmaların bilinen ksenoöstrojenlerin (dietilstilbestrol, bisfenol-A gibi) indüklediği meme kanseri oluşumunda da rol aldığı bildirilmektedir.

Hormon bağımlı meme kanserinde östrojenin etkisini ortadan kaldırmayı amaçlayan iki temel tedavi yaklaşımı bulunmaktadır; östrojenin reseptörü aracılığıyla gerçekleşen etkileri hedef alan selektif östrojen reseptör modülatörleri (SERM) ve östrojen sentezinde yer alan enzimatik yolları etkileyen selektif östrojen enzim modülatörleri (SEEM). Bu ilaçların çeşitli yan etkilerinin olması ve tedavi sırasında bazı ilaçlara direnç gelişmesi gibi faktörler hem meme kanserine karşı preventif etkili hem de yan etkisi az yeni ajanların geliştirilmesi konusundaki çalışmaların sürmesini desteklemiştir.

Melatonin pineal bezden salgılanan ve başlıca fizyolojik rolü sirkadyen ritm ve uyku döngüsünü düzenlemek olan indol yapılı bir hormondur. Melatoninin fizyolojik konsantrasyonlarda meme kanseri hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve meme kanserinde östrojen sinyal yolağıyla etkileşerek onkostatik etkili olduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla kanıtlanmıştır. Melatonin bu etkisini reseptör aracılıklı olarak östrojenlerin etkilerini önleyerek ve östrojenlerin dokuda lokal olarak sentezinden sorumlu enzim aktivitesini değiştirerek gerçekleştirebilmektedir. Ancak yarı ömrünün kısa olması ve oral yararlanımının düşük olması gibi faktörler melatoninin

meme kanseri tedavisinde kullanımını kısıtlamaktadır. Bu amaçla yarılanma ömrü daha uzun melatonin türevlerinin meme kanserinin önlenmesi ve tedavisinde umut vadeci olduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında amacımız endojen östrojen ve/veya çeşitli ksenobiyotikler tarafından indüklenen meme kanserinde toksisite mekanizmasını oluşturan basamakların kanserden korunmada olası antikanserojenik etki hedefi olma potansiyelleri nedeniyle bu hedeflere yönelik aday bileşikler araştırmaktır. Bu amaçla ilaç keşif çalışmalarında erken evre etkinlik ve toksisite çalışmalarının gerçekleştirilmesinde yer alan hedef belirleme, hedef üzerinde etkilerin orta/hızlı çıktılı tarama çalışmaları ile belirlenmesine yer verilmiştir. Ayrıca moleküler modelleme çalışmalarından yararlanılarak sadece etkili olacağı öngörülen maddelerin biyolojik aktiviteleri araştırılarak güçlü etkili, toksisitesi düşük "hit" bileşiklerin tespit edilmesi ile maliyet ve zaman kaybının önlenmesi amaçlanmıştır.

Bu bağlamda tez çalışması kapsamında sentezlenen melatonin analoglarının östrojenin reseptöre bağlanmasını engelleyerek hücre proliferasyonunu inhibe eden ER antagonisti etkileri, östrojenin periferal dokuda lokal olarak sentezini sağlayan aromataz enzimini inhibe edici etkileri ve östrojenlerin reaktif oksidatif metabolitlerine dönüşümünü katalizleyen CYP1B1 enzimini inhibe edici etkileri araştırılmıştır. Ayrıca bu yollarda etkili bulunan olası ilaç adayı bileşiklerin sitotoksik etkileri hem insan sağlıklı meme epiteli hücrelerinde hem de hormon reseptörlerini taşıyan/taşımayan 2 farklı insan meme kanseri hücresinde farklı yöntemler kullanılarak araştırılmış ve bu bileşiklerin sitotoksik etki mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kimyasal Karsinogenez

Kimyasal karsinogenez, farklı birçok basamaktan oluşan ve kimyasallara maruziyet sonucu malign tümörlerin oluşumuyla sonlanan çok aşamalı bir süreçtir. Kimyasal karsinogenez başlatma, geliştirme, ilerleme olmak üzere 3 aşamada gerçekleşmektedir. Karsinogenler hücre içi DNA, RNA ve proteinlerle etkileşerek ya da onlarla kovalent bağlanarak mutasyona giden değişikliklere neden olmaktadır (Taningher, Saccomanno, Santi, Grilli ve Parodi, 1990).

Başlatma, kanser gelişiminin ilk basamağıdır. Bu basamakta DNA ile kalıcı hasar oluşturulur ve mutasyona uğramış hücrenin bölünmesiyle hasar genetik olarak aktarılır. Başlatıcıların çoğu vücutta belirli bir bölgeye ya da doku tipine spesifik etkilidir. Bu bileşikler genellikle doğrudan DNA ile etkileşmezler ancak metabolizmaları sonucu oluşan metabolitleri DNA'ya kovalent bağlanarak mutasyonlara neden olurlar. Başlatıcının dozu ile oluşan tümör hücreleri sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Klaassen, Casarett ve Doull, 2013; Liu ve ark., 2015).

Geliştirme basamağında başlatıcı tarafından mutasyona uğramış hücrelerin proliferasyonu gerçekleşmektedir (Trosko, 2001). Başlatıcıların aksine geliştiriciler DNA ya da makromoleküllere kovalent bağlanmazlar fakat hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak hücreler arası yolları etkileyerek hücre proliferasyonunu artırabilirler (Klaunig, Kamendulis ve Xu, 2000). Geliştiriciler tek başına karsinogenik etkili değildir ancak mutasyona uğramış hücrenin proliferasyonuna neden olurlar (Klaassen ve ark., 2013; Klaunig ve ark., 2000).

Üçüncü aşama olan ilerleme aşamasında ise benign preneoplastik lezyonların neoplastik kanserlere dönüşümü söz konusudur. Bu basamakta inflamasyon, immün sistemin baskılanması ve genetik stabilitenin bozulması gibi süreçler de rol almaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011). İlerleme aşaması geri dönüşüzdür ve karyotipik değişiklikler meydana gelmektedir. Malign tümörlerin oluşumuyla birlikte

büyüme kontrolü ortadan kalkmakta, büyüme hızı aşırı artmakta, invazyon ve metastaz gerçekleşmektedir (Klaassen ve ark., 2013; Liu ve ark., 2015).

Kimyasal karsinojenler etki mekanizmalarına göre iki gruba ayrılmaktadır; Genotoksik karsinojenler ve genotoksik olmayan (epigenetik) karsinojenler.

Genotoksik karsinojenler DNA hasarı oluşturarak tümör oluşumunu başlatırlar. Bileşiğin kendisi DNA ile doğrudan etkileşebilmekte ya da metabolizması sonucu oluşan reaktif metaboliti DNA hasarına neden olmaktadır.

Epigenetik karsinojenler ise genotoksik etkili olmayıp başka mekanizmalarla kanser oluşturma yeteneğine sahiptirler (Klaassen ve ark., 2013). Bu bileşikler etkilerini hücre büyümesi, bölünmesi, kronik inflamasyon, steroid hormon reseptör aktivasyonu gibi pek çok fizyolojik süreci hedef alarak göstermektedirler (Liu ve ark., 2015). Kanserde geliştirici olarak yer alan epigenetik karsinojenlere 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD), asbest, fenobarbital örnek olarak verilebilir.

2.2 Meme Kanseri

Meme kanseri dünyada en sık görülen ikinci kanser türüdür (Ferlay ve ark., 2015). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC)'nın yürütmüş olduğu GLOBOCAN 2012 adlı proje kapsamında 184 ülkeden toplanan veriler, kanser nedeniyle ölüm sıralamasında meme kanserinin 2. sırada yer aldığını göstermektedir. 2016 yılında kadınlarda 246.660 yeni meme kanseri vakası görüleceği ve yaklaşık 40.450 kişinin bu sebeple hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir. Amerika'da yeni görülen tüm kanser vakalarının % 14,6 sını kadınlarda görülen meme kanseri oluşturmaktadır (Cancer Statistics Review, 1975-2015 - SEER Statistics, 2018). Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür ve 2012 yılında yaklaşık 1,67 milyon kadına ilk kez meme kanseri teşhisi konulduğu tahmin edilmektedir (tüm kanser vakalarının %25'i) (Ferlay ve ark., 2015).

Meme kanseri görülme sıklığı gelişmekte olan ülkelerde düşük olduğu halde ölüm oranları yüksekken, gelişmiş ülkelerde ise meme kanserinden ölüm oranlarının daha düşük olması tarama ve tedavideki gelişmelerin önemine dikkat çekmektedir (Ferlay ve ark., 2015).

2.2.1 Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kanseri tek bir hastalık olarak değil farklı klinik ve patolojik özelliklere sahip alt grupları olan bir hastalık grubu olarak tanımlanmaktadır. Bu alt gruplama, hastanın veya tümörün farklı fenotipik ve genotipik özelliklerine (tümör evresi, derecesi, genetik geçmişi ve klinikteki davranışı) göre yapılmaktadır. Bu alt tiplerin tedaviye yanıtları da farklılık gösterdiğinden meme kanserinde alt tipin tanımlanması doğru tedavinin uygulanması ve tedavi etkinliğinin artırılması açısından çok önemli olmaktadır (Blows ve ark., 2010; Perou ve ark., 2000; Reis-Filho ve Pusztai, 2011).

Perou ve arkadaşları gen ekspresyon profiline dayanarak meme kanserinin 4 alt tipini tanımlamışlardır (Perou ve ark., 2000). Fakat bu yöntem klinik ve araştırmalar için maliyetli ve karışık olması nedeniyle çok kullanılabilir olmadığından immünohistokimyasal göstergelerin kullanılması tercih edilmektedir (Goldhirsch ve ark., 2011; Rick ve ark., 2014).

Bu yaklaşıma göre tümörler östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) ve epidermal büyüme faktör reseptörü (HER2) ekspresyonlarına göre 4 alt tipe ayrılmaktadır; luminal A, luminal B, üçlü-negatif bazal-benzeri ve HER2 (Reis-Filho ve Pusztai, 2011).

Luminal A; meme kanserlerinin en sık görülen (% 40) alt tipidir. Bu tip tümörler ER ve/veya PR eksprese ederken HER2 eksprese etmezler. Diğer tümör tiplerine göre büyüme hızları yavaştır ve daha az agresiftirler. Yüksek sağ kalım ve düşük nüks oranına sahip tüm alt tipler arasında en iyi prognoza sahip tiptir. Bu iyi prognoz hormon reseptör ekspresyonunun var olmasıyla açıklanmaktadır çünkü hormon reseptör ekspresyonu ile hormonal tedaviye yanıt arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır.

Luminal B; meme kanserlerinin % 10-20' lik kısmı bu tiptedir. Bu tümörler ER+ ve/veya PR+ olmakla birlikte HER2 eksprese etmeleri nedeniyle luminal A tipinden ayrılırlar. Proliferasyon hızları yüksektir ve luminal A tümörlere kıyasla prognozu kötüdür.

Üçlü negatif bazal-benzeri; meme kanserlerinin yaklaşık % 10-20' si bu tiptedir ve adından da anlaşılacağı üzere hiçbir hormon reseptörünü eksprese etmezler. ER-, PR-, HER2- olan bu tümörler agresif ve invaziv özelliktedir. Bazal benzeri tümörler Afroamerikan kadınlarda, menopoz öncesi dönemdeki ve BRCA1 gen mutasyonu taşıyan kadınlarda daha sık görülmektedir. Hormonal tedaviye yanıt vermedikleri ve bu tümörler için hedeflenen bir tedavi yaklaşımı bulunmadığından kötü bir prognoza sahiptirler.

HER2 tipi; tüm meme kanserlerinin % 10'u bu tiptedir. HER2 ekspresyonu yüksek olan bu tipte hormon reseptörleri eksprese edilmemektedir. Bu tip kanserler bazal benzeri kanserler gibi agresif büyüme ve yayılma özelliği gösterirler. Kısa vadede prognozu luminal kanserlere göre daha kötüyken üçlü negatif kanserlere göre daha iyidir çünkü HER2+ ekspresyonu olduğu için bu reseptörleri hedefleyen tedavi yaklaşımları bulunmaktadır (Blows ve ark., 2010; Goldhirsch ve ark., 2011; Perou ve Borresen-Dale, 2011; Rick ve ark., 2014).

2.2.2 Meme Kanserinde Risk Faktörleri

Meme kanserinin oluşumunda yer alan risk faktörleri Tablo 2.1'de özetlenmiştir. Bu faktörlerden cinsiyet, yaş, aile öyküsü, erken menarj, geç menopoz gibi faktörler değiştirilemeyen faktörlerken sigara içme, alkol tüketimi, menopoz döneminde kombine hormon preparatlarının kullanımı gibi faktörler değiştirilebilir risk faktörleridir (Demark-Wahnefried, Bandera, Gapstur ve Patel, 2012; Kushi ve ark., 2012).

25 yaşından önce meme kanseri görülme riski çok düşükken 45 yaşına gelindiğinde risk 100 kata kadar artmaktadır (Hulka ve Moorman, 2001). Bu durum üreme hormonlarının meme kanseri etiyolojisinde rol oynadığını göstermektedir (Dumitrescu ve Cotarla, 2005). Erken menarj, geç menopoz, ilk gebeliğin geç yaşta olması ve hiç doğum yapmamış olmak meme dokusunun yaşam boyu hormonlara maruziyetini ve meme kanseri riskini artıran faktörlerdir. Diğer taraftan ilk gebelik yaşının erken olması, uzun emzirme süresi, yüksek doğum sayısı meme kanseri riskini azaltmaktadır. Hormon replasman tedavisi ve oral kontraseptif gibi eksojen hormonların kullanımı da meme kanseri riskini artırmaktadır (Collaborative Group

on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996, 1997). Yaşam şekliyle ilgili faktörlerden olan alkol tüketiminin önemli risk faktörü olduğu çok sayıda epidemiyolojik çalışmada gösterilmiştir (Singletary ve Gapstur, 2001). Bununla beraber sebze, meyve, omega-3 ve doymamış yağ asitlerinden zengin beslenmenin riski azalttığı, tam tersi yönde beslenmenin meme kanseri riskinde artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Dumitrescu ve Cotarla, 2005).

Meme kanseri % 5-10 oranında kalıtsal mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Tanımlanan ilk meme kanseri yatkınlık geni, BRCA1 genidir (Hall ve ark., 1990). Bu genin transkripsiyonuyla meme ve overlerde tümör baskılayıcı olan BRCA1 proteini üretilir (Miki ve ark., 1994). BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonu olan bireylerde meme ve over kanserine yatkınlığın arttığı bildirilmiştir (Schwartz ve ark., 2008). BRCA1 mutasyonu taşıyan kadınların % 44 ile % 78' inde, BRCA2 mutasyonu taşıyan kadınların ise % 31 ile % 56'sında 70 yaşına kadar meme kanseri gelişmesi beklenmektedir (Chen ve Parmigiani, 2007).

İyonize radyasyon hem erkeklerde hem de kadınlarda meme kanseri riskini artırmakta ve diğer klasik etkili karsinojenler gibi genotoksik etkiye neden olarak DNA'da hasar oluşturmaktadır (Land ve ark., 2003; Little ve McElvenny, 2017). İyonize radyasyona erken yaşta maruz kalanlarda (20 yaşından önce atom bombasından etkilenenler veya tıbbi radyasyona maruz kalanlar) meme kanseri riskinin arttığı bildirilmiştir (Henderson ve ark., 2010; Land ve ark., 2003).

Hem epidemiyolojik çalışmalar hem de mekanistik ve kemiricilerde yapılan çalışmalar çevresel kimyasalların meme kanseri gelişiminde muhtemel rol oynadığını göstermekte ve kimyasallar ile meme kanseri arasındaki ilişkinin araştırma önceliği taşıdığı belirtilmektedir (Interagency Breast, Cancer and Environmental Research and Coordinating Committee, 2013).

Tablo 2.1 Meme kanseri riskini artıran faktörler

Artan yaş
Östrojen maruziyetinde artış
➤ Erken menarj (< 12)
➤ Geç menopoz (>55)
➤ İleri ilk doğum yaşı (≥30)
➤ Doğum yapmamış olmak
➤ Oral kontraseptif kullanımı
➤ Hormon replasman tedavisi
Aile öyküsü
BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonu
Benign meme tümörü öyküsü
Meme dokusunun dansitesi
Radyasyon tedavisi
Diyet ve yaşam şekliyle ilgili faktörler
➤ Alkol tüketimi
➤ Sigara içmek
➤ Obezite
➤ Egzersiz yapmamak

2.2.3 Eksojen/Ksenobiyotiklerle İndüklenen Meme Kanseri

Hem epidemiyolojik hem de laboratuvar çalışmaları kimyasallarla indüklenen meme kanserinde rol oynayan mekanizmaları şu şekilde açıklamaktadır; DNA hasarı, meme bezlerinin gelişiminde ve hormonal yanıtlarda değişiklik, hormonal tümör gelişiminde ilerleme (Rodgers, Udesky, Rudel ve Brody, 2018). Hayvan çalışmalarında meme kanserine neden olduğu gösterilmiş 216 tane kimyasal bileşik bulunmaktadır (Rudel, Attfield, Schifano, ve Brody, 2007). *In vitro* çalışmalarda östrojeni taklit ederek ya da onunla etkileşerek östrojene duyarlı meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu stimüle ettiği gösterilen ve böylece meme kanseri riskini artırdığı bilinen 250'ye yakın kimyasal bileşik bulunmaktadır (Brody ve ark., 2007; Soto ve ark., 1995). Bu maddelerden en iyi bilinen ikisi dietilstilbestrol (DES) ve dimetilbenzantrasen (DMBA)' dir.

DES sentetik östrojen türevi bir bileşiktir. 1940-1971 yılları arasında hamilelerde düşük tehdi ve diğerkomplikasyonların önlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Adam ve ark., 1977). DES'in sıçanlarda meme bezi yapısında ve gen ekspresyonlarında değışikliğe neden olduğı bulunmuştur. Prenatal maruz kalan kadınlarda 40 yaşından sonra meme kanseri görölme riskinin benzer risk faktörü taşımasına rağmen DES'e maruz kalmayan kadınlara oranla iki kat fazla olduğı belirlenmiştir (Hoover ve ark., 2011; Palmer ve ark., 2006).

DMBA, polisiklik aromatik yapıda ve karsinojen olduğı kanıtlanmış bir bileşiktir (Rundle ve ark., 2000). Polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) meme, deri, pankreas, akciğerkve diğerkpek çok kansere neden olan mutasyonları indükledikleri bildirilmektedir (Denison ve Nagy, 2003; Kimura ve ark., 2007). PAH'lar aril hidrokarbon reseptörlerini aktive ederek ve nükleer translokator protein ile kompleks oluşturarak CYP1A1 ve CYP1B1 gibi faz-1 enzimlerinin indüksiyonuna neden olur. Bu enzimler DMBA molekölünün toksik ve mutajenik ara ürünlere dönüştürmesini katalizler. Bu ara ürünler kanser oluşumunu indükleyen DNA mutasyonlarına neden olur (Rundle ve ark., 2000).

2.2.4 Endojen Östrojenler ile İndüklenen Meme Kanseri

Östrojenler 18 karbon taşıyan steroid yapıda bir grup hormondur. İnsan vücudunda 9 farklı östrojen molekölü bulumakta olup 17 β -östradiol (E_2), östron (E_1) ve östriol (E_3) bunların başlıca üç tanesidir. Östrojenler menopoz öncesi dönemde başlıca overlerde sentezlenir. Menopoz sonrası dönemde ve erkeklerde ise östrojen sentezi gonad dışı dokularda, lokal olarak testosteronun aromatisasyonu sonucu gerçekleşmektedir (E. R. Simpson, 2003).

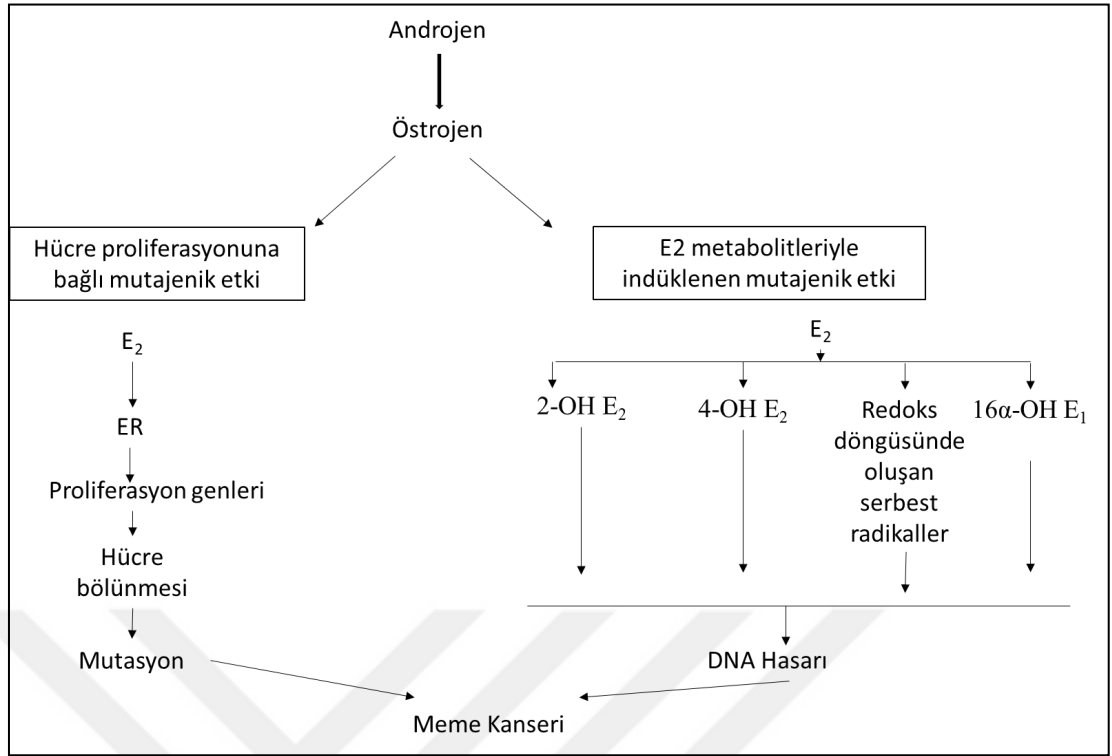
Doğal hormonlar olan östron ve östradiol kemiriciler ve insanlarda yapılan çalışmaların sonuçlarına dayanarak karsinojen olarak kabul edilmektedir (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1999). Bu bileşikler standart bakteri ve memeli test sistemlerinde mutasyonu indüklemedikleri için bilimsel kuruluşlar tarafından epigenetik karsinojen olarak sınıflandırılmıştır (Drevon, Piccoli, ve Montesano, 1981; Lang ve Redmann, 1979; Lang ve Reimann, 1993).

Puberte döneminde ve seksüel olgunlaşma sırasında meme gelişimi dolaşımdaki biyolojik olarak en aktif steroid hormon olan 17- β -östradiol tarafından stimüle edilmektedir. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonda ve uzun süreli östradiole maruz kalmanın meme kanserine neden olduğuna dair yeterli kanıt bulunmaktadır (S Cos ve ark., 2008; J. Russo ve Russo, 2006).

Meme kanseri hormon-bağımlı kanserlere klasik bir örnektir. Yeni tanı konan meme kanseri vakalarının yaklaşık % 95'i başlangıçta hormon bağımlıdır ve bu durum menopoz durumundan bağımsızdır.

Yaşam boyu östrojene maruziyetin artışının meme ve endometriyum gibi hormon-ilişkili kanserlerin gelişiminde başlıca bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (Clemons ve Goss, 2001; Henderson, Ross, ve Bernstein, 1988; Roy ve Abul-Hajj, 1997; Roy, Cai, Felty, ve Narayan, 2007). Endojen kaynakların yanında, kontrasepsiyon amaçlı kullanılan 17 α -etinilöstradiol; hormon replasman tedavisinde kullanılan mestranol, premarin gibi sentetik östrojenler de östrojenlere toplam maruziyeti artırmaktadır (Okoh, Deoraj ve Roy, 2011). Erken menarj ve geç menopoz yaşayan kadınlarda meme kanseri riski artarken, tersi durumda meme kanseri riskinin azaldığı görülmüştür (Xu ve ark., 2004). Yapılan bir kohort çalışmada menopoz öncesi kadınlarda serum östrojen düzeylerinin yüksek olması ile meme kanseri görülme sıklığı arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Kaaks ve ark., 2005). Yine bir kohort çalışmada, 35 yaşından önce bilateral overektomi operasyonu geçirmiş olmanın yaşam boyunca meme kanseri görülme sıklığını % 75 azalttığı gösterilmiştir (Feinleib, 1968).

Östrodiolün meme kanseri gelişiminde önemli bir faktör olduğu kanıtlanmıştır ve yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, endojen östrojenin indüklediği karsinogenepte iki farklı mekanizmanın rolü olduğunu göstermiştir. Bunlardan ilki östrojen reseptörü aracılıklı, diğeri ise östrojen reseptöründen bağımsız etkilerdir (Preston-Martin, Pike, Ross, Jones ve Henderson, 1990; Yue ve ark., 2003) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Östrojenin indüklediği karsinojenizde östrojen reseptörü aracılıklı ve östrojen reseptöründen bağımsız yollar

2.2.4.1 Östrojen Reseptörü Aracılıklı Etkiler

Östrojen ER'ye bağlandığında reseptörün konformasyonel değişikliklere uğramasıyla homodimerizasyon gerçekleşir (Kumar ve Chambon, 1988). Dimerizasyona uğrayan ER, DNA üzerinde hedef genlerin promotör bölgelerinde bulunan Östrojen Yanıt Elementi (ERE; estrogen response element) bölgesine bağlanır. Homodimerize ER koregülatör olarak adlandırılan proteinlerle etkileşime girerek bir transkripsiyonel kompleks oluşturduğunda gen regülasyonu gerçekleşmektedir. Bu koregülatörler ER transkripsiyon kompleksini aktive (koaktivatör) ya da inaktive (inaktivatör) ederek hedef gendeki ER ekspresyonunu değiştirmektedir (Hall ve McDonnell, 2005).

Hücre proliferasyonundaki artışın kanser oluşumundaki rolü Preston-Martin ve ark. tarafından açıklanmıştır. Hücre proliferasyonu arttığında DNA replikasyonu sırasında yanlış eşleşmelerin olma olasılığı artmaktadır. Hücre bölünme hızı kontrolsüz bir şekilde arttığında oluşan bu nokta mutasyonlarının onarımı için yeterli süre

olmayacağından DNA'daki katım ürünleri ve/veya kırıklar bölünme sonrasında sabit mutasyonlara dönüşür. Oluşan bu mutasyonların kimyasal karsinogenezin ilk basamağı olan "başlatma" rolünü üstleneceği düşünülmektedir. Reseptöre bağlanmanın aynı zamanda proto-onkogenleri ve onkogenleri de aktive ederek kanser oluşumuna katkı sağladığı da ifade edilmektedir (Preston-Martin ve ark., 1990).

2.2.4.2 Östrojen Reseptöründen Bağımsız Etkiler

Östrojenin ER'den bağımsız olarak da meme kanserini tetikleyebildiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla kanıtlanmıştır. ER taşımayan insan benign meme epitel hücresi olan MCF-10F hücrelerinin östradiole maruz bırakılmasının malign tümörlerin oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir. Malign tümörlere dönüşümün erken evrelerinde görülen duktal yapıların farklılaşmasının kaybolması, östradiole maruz bırakılan bu hücrelerde gösterilmiştir. Ayrıca hücrelerin koloni oluşturma etkinliklerinde de artış saptanmıştır (J. Russo ve ark., 2006; J. Russo ve Russo, 2006). ER α taşımayan ve Wnt-1 protoonkogen ekspresyonu artmış farelerde, yapılan bir çalışmada farelerin yumurtalıkları cerrahi yolla çıkarıldığında meme dokusunda tümör oluşma süresinin uzadığı gösterilmiştir. Bu farelere östradiol verildiğinde ise tümör oluşum süresi kontrole kıyasla azalmış ve bu sonuç östradiolün reseptörden bağımsız etkilerine kanıt olarak sunulmuştur (Yue, Yager, Wang, Jupe, ve Santen, 2013). Menopoz döneminde uygulanan hormon tedavisinin hem ER+ hem de ER- tümör riskini artırması da östradiolün reseptörden bağımsız olarak meme kanserine yol açtığını destekleyen bir bulgudur (Yager, 2015).

ER'den bağımsız etkiler östrojenin oksidatif metabolizması sonucu oluşan genotoksik metabolitlerinden kaynaklanmaktadır. Oluşan bu genotoksik metabolitler direk olarak DNA hasarına neden olmaktadır.

Östrojenler oksidatif metabolizması sonucu 2-OH ve 4-OH metabolitlerine dönüşür. 2-OH katekol oluşumu CYP1A1 ve CYP3A4 tarafından katalizlenirken 4-OH katekol oluşumu CYP1B1 tarafından katalizlenmektedir. Östrojenlerin 2-OH ve 4-OH katekol metabolitleri biyolojik özellikleri açısından farklılık göstermektedir; 2-OH metabolitleri zayıf östrojenik etkilidir ve pek çok deneysel sistemde kısmi antagonist

olarak rol aldıkları gösterilmiştir (Franks, MacLusky ve Naftolin, 1982; MacLusky, Naftolin, Krey ve Franks, 1981) fakat 4-OH metabolitleri güçlü östrojenik etkiye sahiptir. İnsan meme kanseri hücrelerinde 4-OH E₂' nin ER'ye bağlanma afinitesi E₂' ye göre yaklaşık 1,5 kat daha fazladır (Van Aswegen, Purdy ve Wittliff, 1989). 2-OH E₂ östrojen reseptöründen E₂' ye göre daha hızlı ayrılırken, 4-OH E₂ reseptöre daha uzun süre bağlı olarak kalmaktadır (Yager, 2015). Yapılan çalışmalar östrojenlerin 4-OH metabolitlerinin 2-OH metabolitlerine göre daha karsinojenik olduğunu göstermektedir. Bu durumun bir detoksifikasyon enzimi olan katekolamin-O-metiltransferaz (COMT)'ın 2-OH metabolitine 4-OH metabolitinden daha yüksek afinite göstermesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Lavigne ve ark., 2001).

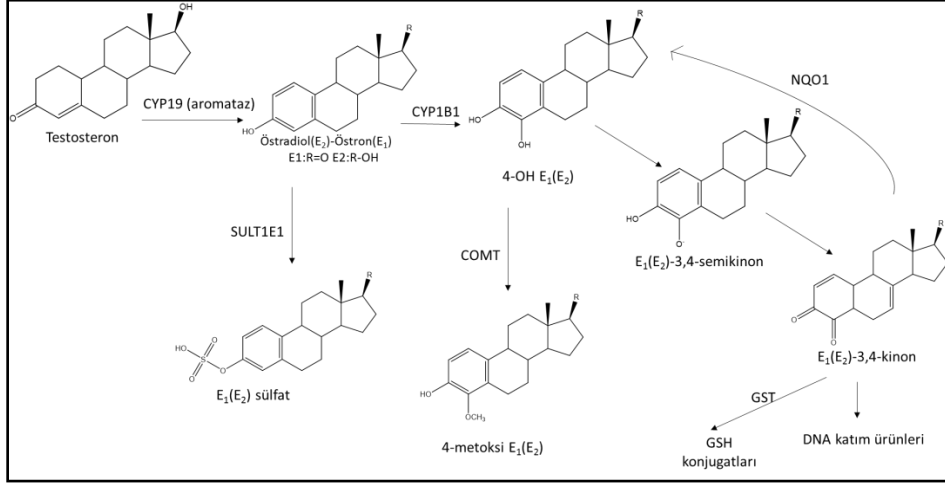
2-OH ve 4-OH katekol metabolitler oksidatif metabolizmaları sonucu 2,3- ve 3,4-kinon metabolitlerine dönüşmektedir (E. Cavalieri ve ark., 2006). Oluşan reaktif kinon türevleri DNA daki pürin bazlarına kovalan olarak bağlanarak DNA katım ürünleri (4-OH-östradiol-1-N7-guanin and 4-OH-östradiol-1-N3-adenin) oluşumuna sebep olur. Bu katım ürünlerinin DNA'dan ayrılmasıyla nokta mutasyonlarına karşı hassas olan apürinik bölgeler oluşur. DNA'daki apürinik bölgelerin hatalı baz eksizyon onarımı sonucu çeşitli kanser tiplerinin oluşumuna yol açan mutasyonlar oluşabilmektedir. 3,4- kinon metabolitleri stabil olmayan DNA katım ürünleri oluşumuna yol açarken 2,3- kinon metabolitlerinin oluşturduğu DNA katım ürünleri stabildir (E. L. Cavalieri ve Rogan, 2011). Östrojen kinon metabolitlerinin meme kanseri olgularında kontrol grubuna göre daha yüksek oranda bulunması bu metabolitlerin mutasyon ve kanser oluşum sürecinde bir rolü olabileceğini göstermektedir (Rogan ve ark., 2003).

Östrojenlerin kinon metabolitlerine dönüşümü sırasında, semikinon yapısı moleküler oksijen varlığında enzimatik olmayan otooksidasyona uğrayarak kinon yapısına dönüşebilmekte, oluşan kinonun semikinon yapısına geri dönüşümü ise sitokrom P450 redüktaz aracılıklı redoks döngüsü ile gerçekleşmektedir. Bu süreçte oksijen molekülü süperoksit anyon radikaline (O₂^{•-}) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) indirgenir. H₂O₂ ortamda Fe⁺² iyonları varlığında reaktif hidroksil radikaline (HO[•]) dönüştürülmektedir. Hidroksil radikali lipitlerle etkileşerek yağ asidi zincirlerinden bir hidrojen atomu kopartmaya yetecek reaktiviteye sahiptir ve özellikle

membranlarda lipid peroksidasyonu denen bozunma sürecinin başlamasına yol açar (E. L. Cavalieri ve Rogan, 2011, 2012).

Sağlıklı kişilerde östrojen metabolizması sırasında oluşan katekol metabolitleri karaciğerde glukronit ve sülfat konjugasyonu ile inaktive edilirken, ekstrahepatik dokularda COMT enzimi aracılığı ile metilasyon sonucu detoksifiye edilmektedir (Ercile Cavalieri ve Rogan, 2014; Yue ve ark., 2013). Metoksi östrojenler CYP1A1 ve CYP1B1 üzerinde feedback inhibisyona neden olmakta ve bu durum aktivasyondan sorumlu enzimlerin ekspresyonunun düzenlenmesi ve östrojen homeostazının sağlanmasına yardımcı olmaktadır (Dawling, Roodi ve Parl, 2003).

Östrojenlerin oksidatif metabolizması sırasında oluşan kinon metabolitleri Faz II enzimleri arasında yer alan NAD(P)H kinon oksidoredüktaz 1 (NQO1) enzimi aracılığı ile katekol metabolitlerine indirgenebilmekte ve ardından COMT enzimi ile detoksifiye edilmektedir. Kinon metabolitleri aynı zamanda glutatyon-S-transferaz (GST) enzimi aracılığıyla, GSH konjugatları şeklinde vücuttan uzaklaştırılabilirler (Liehr, 2002; Yager, 2015). Şekil 2.2’de şematize edilen bu metabolik yolda yer alan Faz I enzimleri endojen östrojenlerin biyoaktivasyonuna neden oldukları için kanser oluşumunda önemli birer faktör, Faz II enzimleri ise koruyucu/detoksifikasyonda rol oynadıkları için kanserden korunmada önemli birer basamak olmaktadır.



Şekil 2.2 Östrojenin endojen metabolizması ve yolakta yer alan biyoaktivasyon ve detoksifikasyondan sorumlu enzimler

Östrojen metabolizması sırasında aktivasyondan sorumlu CYP enzimleri ve detoksifikasyondan sorumlu enzimler (COMT, NQO1, GSH) arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin diyet, çevresel maruziyetler, yaşam şekli, yaşlanma ve genetik faktörler nedeniyle kinon metabolitleri ve nihai olarak depürine edici DNA katım ürünleri oluşumu yönünde bozulması DNA hasarıyla sonuçlanmakta ve bu durumun kanser başlama evresini tetikleyebileceği ifade edilmektedir (Ercole Cavaliere ve Rogan, 2014). ER+ insan meme kanseri hücresi olan MCF-7 hücreleri, TCDD ile muamele edildiğinde östrojenin oksidatif metabolizması sonucu oluşan reaktif katekol ve kinon türevlerinin arttığı; aynı hücrelerde COMT enzimi de inhibe edilirse oksidatif DNA hasarının bir biyogöstergesi olan 8-okso deoksiguanozin (8-oxo-dG) düzeylerinin arttığı gözlenmiştir (Lavigne ve ark., 2001). Benzer şekilde östrojen reseptörü taşımayan sağlıklı insan meme epitel hücresi olan MCF-10F hücreleri, östradiolle muamele edilip COMT enzimi de inhibe edildiğinde oksidatif DNA hasarında artış gözlenmiştir (Zahid ve ark., 2007). Meme kanserli kadınlarda yapılan bir çalışmada aktivasyondan sorumlu CYP enzimlerinin yüksek miktarda, deaktivasyondan sorumlu enzimlerin ise düşük miktarda eksprese edildiği, kanserli olmayan kadınlarda ise durumun bunun tam aksini gösterdiği gözlenmiştir (Singh ve ark., 2005). Östrojen metabolizmasındaki dengenin meme kanserindeki önemi ve rolü, bu yolakta yer alan biyoaktivasyondan sorumlu enzimlerin (CYP19A1 ve CYP1B1) inhibisyonu ve detoksifikasyondan sorumlu enzimlerin (COMT, NQO1 ve

GST) aktivasyonu/indüksiyonuna neden olan resveratrol, N-asetilsistein ve sulforafan gibi maddelerin varlığında östrojen-DNA katım ürünleri oluşumunun azalmasının saptanmasıyla doğrulanmıştır (Yang ve ark., 2013; Zahid ve ark., 2008).

2.3 Meme Kanseri Tedavisinde Östrojeni Hedef Alan Terapötik Yaklaşımlar

Östrojenin hormon-bağımlı meme kanserinin ilerleme ve gelişimindeki rolü göz önüne alındığında meme kanserinin tedavisinde ana yaklaşım östrojenin etkisini ortadan kaldırmaktır. Bu anlamda uygulanan ilk antiöstrojenik yaklaşım 'overektomi' ile overlerin alınması olmuştur. Memenin cerrahi olarak alınması, radyoterapi, kemoterapi ve hormon terapisi de günümüzde kullanılan tedavi yaklaşımlarıdır.

Östrojen sinyal yolağı ile etkileşen ilaçlar iki grupta sınıflandırılmaktadır: östrojenlerin sentezinde yer alan enzimlerin aktivitesini etkileyen selektif östrojen enzim modülatörleri (SEEM) (örneğin formestan, letrozol) ; endojen östrojenlerin etkisini reseptör aracılıklı olarak etkileyen selektif östrojen reseptör modülatörleri (SERM) (örneğin tamoksifen ve türevleri) (Barker, 2003; Wong ve Ellis, 2004).

2.3.1 Selektif Östrojen Enzim Modülasyonu (SEEM)

Östrojenlerin vücutta başlıca üretildiği yerler menopoz öncesi ve sonrasında farklılık göstermektedir. Menopoz öncesi kadınlarda östrojen sentezi başlıca overlerde gerçekleşmekteyken menopoz sonrası dönemde periferel dokularda (yağ, kas dokusu ya da tümör dokusunda) androjenlerin enzimatik olarak östrojenlere dönüştürülmesi ile üretilirler (Miller, 1990). Steroidlerin meme dokusundaki biyotransformasyon yolları Şekil 2.3'de görülmektedir (Pasqualini ve Chetrite, 2005). CYP19A olarak da isimlendirilen aromataz enzimi androjenlerin (testosteron ve androstendion) östrojenlere dönüşümünü katalizlemektedir. Bu östrojenler, östrojen sülfataz ve östrojen sülfotransferaz enzimlerinin aktivitesine bağlı olarak sülfat konjugatı ya da konjuge olmamış aktif formuna dönüşürler. Östrojen sülfataz enzimi konjuge olmamış aktif östrojen formunun oluşumu yönünde çalışmaktadır (Suzuki ve ark., 2003). 17-β-hidroksisteroid dehidrojenaz (tip I ve tip II) enzimleri ise düşük aktiviteye sahip olan androstendion ve östronun sırasıyla aktivitesi daha yüksek olan testosteron ve 17-β-östradiole dönüşümünü katalizlemektedir (Hilborn,

Stal, ve Jansson, 2017). Normal meme dokularındaki aksine meme kanserli dokularda aktif türevlerin oluşumu yönünde bir eğilim söz konusu olmaktadır (Pasqualini ve Chetrite, 2005).

Görüldüğü gibi östrojenler bir dizi steroid hormon dönüşüm reaksiyonu sonucu oluşan son ürünlerdir. Bu basamaklardan herhangi birinin inhibisyonu östrojen düzeylerinde azalmayla sonuçlanmaktadır. Özellikle östrojen biyosentezine özgü olan son basamağın spesifik olarak inhibisyonu östrojen düzeylerinde baskılamaya neden olmaktadır (C. Jordan ve Furr, 2006). Bu basamağı katalizleyen aromataz enzimi prostetik spesifik sitokrom P450 ve ubikuitöz flavoprotein NADPH sitokrom P450 redüktaz gruplarını taşımaktadır (S. E. Bulun ve Simpson, 1994). Aromataz enziminin östrojen sentezindeki kilit rolü bu enzimi inhibe eden ajanların geliştirilmesi ve bunların hormon bağımlı tümörlerde kullanımı konusundaki ilginin artmasına neden olmuştur.

2.3.1.1 Aromataz İnhibisyonu ve İnhibitörleri

Endojen östrojenler içerisinde en potent bileşik olan östradiol, androjenlerden hareketle sitokrom P450 enzim kompleksi olan 'aromataz' aracılığıyla sentezlenmektedir (E. R. Simpson ve ark., 1994). Aromataz enzimi menopoza öncesi kadınlarda overlerde, menopoza sonrası kadınlarda ise adipoz dokuda en yüksek miktarda bulunmaktadır.

Aromataz inhibitörleri etki mekanizmalarına ve yapılarına göre başlıca iki gruba ayrılmaktadır. Tip-1 inhibitörler steroid yapılı androstendion türevi bileşiklerdir ve enzimin substrat bölgesine geri dönüşsüz olarak bağlanırlar. Tip-2 inhibitörler ise non-steroidal yapıdadır ve enzimin "hem" grubuna geri dönüşlü olarak bağlanırlar ve büyük çoğunluğu triazol grubu taşımaktadır.

Tip-1 inhibitörler genellikle Tip-2 ajanlardan daha spesifik inhibitörlerdir (C. Jordan ve Furr, 2006). Formestan ve eksemestan gibi bazı tip-1 inhibitörlerin enzimin katalitik bölgesindeki inhibitör etkinlikleri ihmal edilebilir düzeydedir fakat metabolizmaları sonucu oluşan ara ürünler enzimin aktif bölgesine geri dönüşsüz olarak bağlanarak enzimi inhibe etmektedir (Johnston, 1998). Bu bileşikler bu etki

mekanizmaları ile kendi metabolizmalarını inhibe ettikleri için “intihtar inhibitörleri” olarak adlandırılırlar. İnhibitör etkinlikleri metabolize olmalarına bağlı olan bu bileşikler sadece kendisini metabolize eden enzimi inhibe ettikleri için etkileri daha spesiftir (C. Jordan ve Furr, 2006).

Tip 1 inhibitörlerin aksine Tip 2 inhibitörlerin etkisi geri dönüşlüdür ve etkinin sürdürülebilmesi bileşiğin ortamdaki varlığına bağlıdır. Tip 2 inhibitörler aromataz enzimidaki CYP450 yapısında bulunan “hem” grubuyla etkileşmektedir (Kao, Cam, Laughton, Zhou ve Chen, 1996). Aromataz enziminin aminoasit dizilimi sitokrom P450 enzim ailesinin diğer üyelerinden farklıdır (Vanden Bossche, Moereels, ve Koymans, 1994). Bu farklılık aromataz enzime selektif ilaçların geliştirilmesini ve böylece yapısında hem grubu taşıyan diğer CYP enzimlerini inhibe etmek yerine aromataz enziminin spesifik olarak inhibe edilmesine olanak sağlamaktadır (Santen ve Misbin, 1981).

Aromataz inhibitörleri geliştirilme zamanına göre de 3 gruba ayrılmaktadır (Tablo 2.2). Bunlar birinci, ikinci ve üçüncü kuşak inhibitörlerdir.

Tablo 2.2 Aromataz inhibitörlerinin sınıflandırılması

	<u>Tip 1 (Steroidal)</u>	<u>Tip 2 (Non-steroidal)</u>
1.Kuşak	-	Aminoglutetimit
2.Kuşak	Formestan	Fadrazol
3.Kuşak	Eksemestan	Anastrazol, Letrazol

1.kuşak inhibitör *olan aminoglutetimit*, meme kanserinin tedavisinde kullanılan ve klinik çalışmalarda etkinliği gösterilen aromataz inhibitörü ilk ajandır (Lipton ve Santen, 1974). Plazma östrojen düzeylerini baskılamada kısmen etkilidir ve etkisi spesifik değildir. Aynı zamanda aminoglutetimit, mide bulantısı, kusma, uyuşukluk

ve uyku hali gibi çok sayıda yan etkiye sahiptir (Hughss ve Burley, 1970). Bu nedenle daha iyi tolere edilebilen aromataz inhibitörleri geliştirilmiştir.

2.kuşak aromataz inhibitörleri steroidal inhibitör **formestan** ve non-steroidal **fadrazoldür**. Formestan, plasental mikrozomlarda aromataz aktivitesini inhibe etmede aminoglutetimiten 60 kat daha potent bulunmuştur fakat oral biyoyararlanımı düşük bulunmuştur. (C. Jordan ve Furr, 2006).

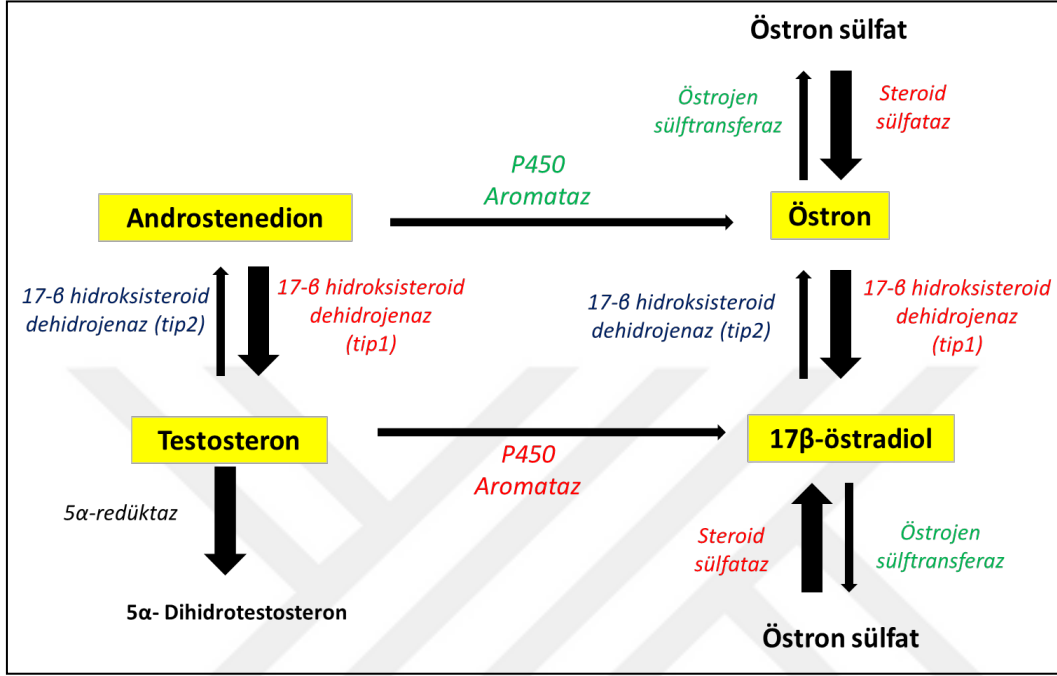
Fadrazol imidazol yapılı tip 2 aromataz inhibitörüdür. Birinci kuşak inhibitörlerden çok daha potent bir bileşik olsa da yarı ömrünün kısa oluşu, *in vivo* etkinliğinin diğer triazol yapılı inhibitörlere göre düşük oluşu ve kortizol ve aldosteron sentezini de inhibe ettiğinin bildirilmiş olması nedeniyle günümüzde yaygın olarak kullanımı bulunmamaktadır (C. Jordan ve Furr, 2006).

3.kuşak aromataz inhibitörleri nonsteroidal inhibitörler olan **anastrozol** ve **letrozol** ile steroidal inhibitör olan **eksemestan**dir (Brueggemeier, Hackett ve Diaz-Cruz, 2005). 3. kuşak inhibitörler *in vitro* aromataz inhibisyonunda aminoglutetimiten çok daha potent bileşiklerdir. Aminoglutetimitin mikromolar konsantrasyonuyla elde edilen etki anastrozol ve letrozolün nanomolar konsantrasyonlarında görülmektedir. Bu bileşiklerin *in vivo* olarak da daha etkin oldukları gösterilmiştir. Anastrozol, letrozol ve eksemestanın miligramlık günlük dozu tüm vücuttaki aromatazasyonu inhibe etmeye yetmektedir ve dolaşımdaki östrojen seviyesi ölçülebilir düzeylerin altına düşmektedir (Lonning, 1996). Anastrozol (Arimidex; Astra-Zeneca, Londra), 1 mg/gün dozda plazma östradiol seviyesini % 97 oranında inhibe etmektedir (Brueggemeier ve ark., 2005).

Letrozol (Femara; Novartis, Basel, İsviçre), periferal aromatazı güçlü bir şekilde inhibe eder ve menopoz sonrası kadınlarda östrojen sentezini baskılar. Letrozolün 2,5 mg/gün dozu aromataz enzimini % 99'dan daha yüksek oranda inhibe etmektedir (Dowsett ve ark., 1995). İki hafta boyunca 0,1 mg/gün letrozol kullanımının dolaşımdaki östron, östron sülfat ve östradiol düzeylerini % 95'ten daha fazla baskıladığı gösterilmiştir (Demers, 1994).

Eksemestan (Aromasin; Pfizer, New York), plasentada sentezlenen aromatazın potent inhibitörüdür ve 25 mg'lık oral tek dozunun plazma ve idrar östrojen

düzeylerinde uzun süreli bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. 2-3 gün kullanımdan sonra dolaşımdaki östrojen düzeylerinde maksimum azalma gerçekleşmektedir (Brueggemeier ve ark., 2005; Evans ve ark., 1992).



Şekil 2.3 Steroidlerin sağlıklı ve kanserli meme dokusundaki biyotransformasyonunda yer alan enzimatik yollar. Melatonin selektif östrojen enzim modülatörü (SEEM) etkisiyle düşük aktiviteye sahip androjenlerin biyolojik olarak aktif östrojenlere dönüşümünü katalizleyen enzimlerin (kırmızı renkli) ekspresyonunu ve aktivitesini inhibe ederken, östrojenlerin inaktif türevlerine dönüşümünde yer alan enzimlerin (yeşil renkli) ekspresyonunu ve aktivitesini artırmaktadır (Gonzalez-Gonzalez, Mediavilla ve Sanchez-Barcelo, 2018; Pasqualini ve Chetrite, 2005).

2.3.2 Selektif Östrojen Reseptör Modülasyonu (SERM)

Selektif östrojen reseptör modülatörleri östrojen reseptörüne bağlanan ve doku türüne bağlı olarak reseptörün biyolojik aktivitesinde farklı değişikliklere neden olan sentetik non-steroidal ajanlardır (Oseni, Patel, Pyle ve Jordan, 2008). SERM'ler kemik dokusu gibi bazı dokularda doğal hormon östradiolün etkisini taklit ederek

agonist etkili ya da hormonun etkisine zıt yönde antagonist etkili olabilmektedir (Nilsson ve Koehler, 2005).

Östrogen reseptörü, geniş bir reseptör ailesi olan nükleer hormon reseptörlerinin bir üyesidir. Nükleer reseptörlerin diğer reseptör tiplerinin aksine DNA'ya doğrudan bağlanabilmesi, transkripsiyon faktörü olarak rol almalarına olanak sağlamaktadır (Pawlak, Lefebvre ve Staels, 2012). 17- β -östradiol hormonu en potent endojen östrojendir ve ER'ye bağlanmada yüksek selektiviteye sahiptir.

Östrojenler veya SERM'ler ER 'ye bağlandıktan sonra östrojen sentezinden sorumlu genleri aktive eden bir dizi olay gerçekleşmektedir (Bkz 2.2.4.1).

Östrojen reseptörüne bağlanarak onun fonksiyonunu düzenleyen ve transkripsiyonu pozitif ya da negatif yönde etkileyen yirmiden fazla koregülatör protein tanımlanmıştır (McKenna, Lanz ve O'Malley, 1999; Smith, Nawaz ve O'Malley, 1997). Ligandın reseptöre bağlanmasıyla oluşan reseptör kompleksinin farklı düzenleyici proteinlerle etkileşmesi farklı sonuçlara neden olmaktadır. Meme kanserinin tedavisinde en sık kullanılan SERM olan tamoksifenin meme dokusunda ER antagonisti iken uterus ve kemik dokuda parsiyel agonist ya da agonist etkili olması bu duruma örnektir (C. V Jordan ve Furr, 2017). Tamoksifen meme dokusunda promotor gen üzerinde transkripsiyonu inaktive edici proteinlerle etkileşerek antagonist etkili olmakta, endometriumda ise aktivatör proteinlerle etkileşerek östrojen reseptör agonisti olarak hareket etmektedir (Shang ve Brown, 2002).

SERM'ler selektif östrojen agonisti özelliklerinden dolayı osteoporoz gibi östrojen eksikliğinden kaynaklanan hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde kullanılmaktadır. Bunun yanında selektif östrojen antagonisti özellikleriyle de gelişiminde östrojenin rol oynadığı hormon-bağımlı meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Günümüzde kullanılan SERM'lerin kullanımını kısıtlayan başlıca etkileri zayıf agonist etkileri olması ve sıcak basmasına neden olmalarıdır (Riggs, 2003).

SERM'ler kimyasal yapılarına göre farklı sınıflara ayrılmaktadır. Bunlar trifeniletillenler (tamoksifen), benzotiyofenler (raloksifen, arzoksifen), fenilindoller

(bazedoksifen, pipendoksifen) ve tetrahidronaftalenlerdir (lasofoksifen) (Patel ve Bihani, 2018) (Şekil 2.4).

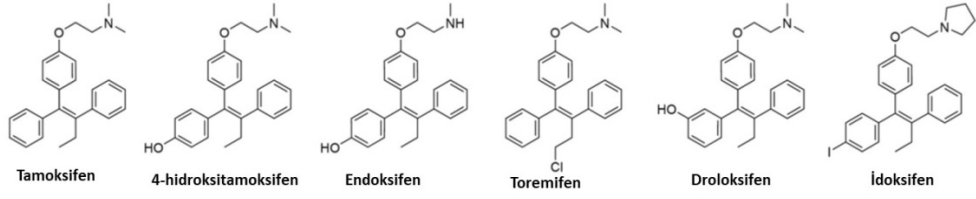
ABD Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından onaylanmış klinik olarak kullanımı bulunan üç adet SERM bulunmaktadır. **Tamoksifen** meme kanserinin önlenmesi ve tedavisinde, **toremifen** ileri evre meme kanserinin tedavisinde, **raloksifen** menopoz sonrası osteoporozun tedavisinde ve önlenmesinde kullanılmaktadır.

Tamoksifen, meme kanserinin bütün aşamalarında endokrin tedavi seçeneği olarak kullanılan en önemli ajandır. Menopoz sonrası kadınlarda tamoksifen kullanımı, bazı dokulardaki reseptör agonisti etkisinden dolayı östrojen replasman tedavisine benzer şekilde yan etkilere neden olmaktadır. Bunlar venöz tromboz, pulmoner emboli, felç ve endometriyal kanserdir (Baum ve ark., 2002). Tamoksifen kullanan meme kanseri hastalarında endometriyal kanser görülme sıklığının iki kat arttığı belirlenmiştir (Assikis, Neven, Jordan ve Vergote, 1996).

Tamoksifen, meme kanserinin önlenmesinde kullanımı onaylanmış preventif etkili hormonal bir ajandır. Ailesinde meme kanseri öyküsü olanlar ya da BRCA gen mutasyonu taşıyan kadınlar meme kanseri gelişiminde potansiyel adaylar olarak görülse de tamoksifenin preventif olarak hangi durumlarda kullanılabileceği konusunda tartışmalar devam etmektedir (Riggs, 2003).

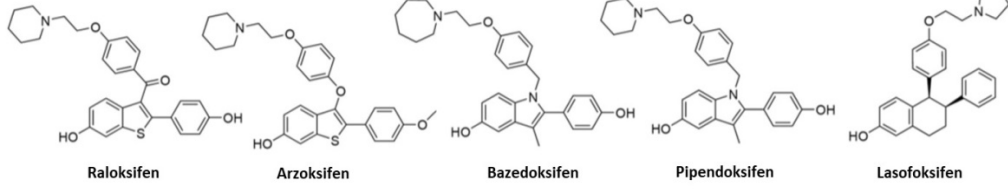
Raloksifen (orijinal adı LY156,750), östrojen reseptörüne yüksek afinite gösteren non-steroidal antiöstrojenik bir ajandır (Black, Jones ve Falcone, 1983) ve menopoz sonrası kadınlarda osteoporozun önlenmesinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır. İlk olarak meme kanserinin tedavisinde kullanılması hedeflenmiş fakat daha sonra sıçanlarda kemik yoğunluğunun azalmasına neden olmayışı ve tamoksifenle stimüle edilen endometriyal kanser oluşumunu inhibe etmesi yönündeki bulgular raloksifenin osteoporozun önlenmesine yönelik ilaç geliştirme çalışmalarında yer bulmasına zemin hazırlamıştır (Gottardis ve Jordan, 1987; Gottardis, Ricchio, Satyaswaroop ve Jordan, 1990; V. C. Jordan, Phelps ve Lindgren, 1987).

Trifeniletilen SERM'ler



Benzotiyofen SERM'ler

İndol ve Tetrahidronaftalen SERM'ler



Şekil 2.4 Farklı sınıflardaki SERM'lerin kimyasal yapıları

Tamoksifenin ER üzerindeki parsiyel agonist etkileri nedeniyle güvenlilik aralığı daha geniş, saf antagonist bileşiklerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. **Fulvestran** bu anlamda klinik çalışmalarda etkinliği tanımlanan ilk 'saf antiöstrojen' ilaçtır. Fulvestran ER'ye bağlandığında dimerizasyonunu bozmakta, aktivasyon faktörlerini inaktive etmekte, ER degradasyonunu artırmakta ve nükleer ER lokalizasyonunu bozmaktadır. Bunun sonucunda transkripsiyonu ve hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir (Wakeling, 2000). Ayrıca hücre içi ER düzeyleri ve ER yarı ömrü de azalmaktadır (Howell, Osborne, Morris ve Wakeling, 2000). Bu mekanizması nedeniyle "östrojen reseptör baskılayıcı (downregulator)" olarak adlandırılmaktadır. Tamoksifenin aksine fulvestran uterusu proliferasyona neden olmamaktadır (Wakeling, Dukes ve Bowler, 1991). Aynı zamanda kan-beyin bariyerini geçemediği için östrojenin beyindeki etkilerini engellemekte ve bu nedenle sıcak basmasına neden olmamaktadır (Wade, Blaustein, Gray ve Meredith, 1993). Tamoksifene dirençli ileri evre meme kanserli kadınlarla yapılan klinik çalışmalar ikinci basamak fulvestran tedavisinin en az ikinci basamak anastrozol tedavisi kadar etkili olduğunu göstermektedir (Robertson, 2002).

2.3.3 Biyoaktivasyondan sorumlu enzimlerin modülasyonu

Kimyasallarla indüklenen meme kanserinin önlenmesinde bir diğer yaklaşım hormon konsantrasyonlarını ve hormonal dengeyi bozmadan zararlı, genotoksik metabolitlerin oluşumunu ve etkilerini inhibe etmektir. Bu yolla meme kanseri oluşumu önlenebileceği gibi östrojenlerin yararlı etkilerinin ortadan kalkması da önlenmiş olmaktadır. Östrojenin metabolitlerinden kaynaklanan genotoksitenin önlenmesinde iki yaklaşım söz konusudur: östrojenin reaktif metabolitlerine dönüşümünü katalizleyen enzimlerin inhibisyonu ya da oluşan reaktif metabolitlerin detoksifikasyonundan sorumlu Faz II enzimlerinin indüksiyonu (Liehr, 2002).

Östadiolün hepatik katekol metabolitlerine dönüşümü büyük oranda CYP3A ve CYP1A tarafından gerçekleştiriliyor olsa da bu enzimlerin inhibe edilmesinin meme kanserinin önlenmesinde etkili olmadığı bulunmuştur (Hammond, Zhu, Wang, Ricci ve Liehr, 1997). Bu metabolitler hepatik Faz II enzimleri tarafından konjugatlarına dönüştürülüp vücuttan uzaklaştırılmaktadırlar (Raftogianis, Creveling, Weinshilbom ve Weisz, 2000). Meme kanserinin etkili bir şekilde önlenmesi için lokal olarak meme dokusunda CYP1B1 enzimi aracılığıyla 4-OH katekol metabolitlerinin oluşumunun inhibe edilmesinin önemli bir yaklaşım olduğu bildirilmiştir (Hayes ve ark., 1996). Östradiolün CYP1B1 tarafından 4-OH katekol metabolitine dönüşmesi ve östrojene duyarlı dokularda bu metabolitin yüksek oranlarda bulunması östrojenle ilişkili tümör oluşumunda önemli rol oynar (E. L. Cavalieri ve Rogan, 2011; Gajjar, Martin-Hirsch ve Martin, 2012). CYP1B1 enziminin çeşitli kanser tiplerinde (meme, kolon, deri, beyin, testis vb.) normal dokulara kıyasla daha yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir (Gajjar ve ark., 2012). CYP1B1'in kanser oluşum sürecinde yer alan önemli bir enzim olduğu CYP1B1 taşımayan farelerin DMBA ile indüklenen tümör oluşumuna karşı dirençli bulunmasıyla gösterilmiştir (Chun ve Kim, 2003). Diğer yandan CYP1B1 taşımayan farelerde yapılan çalışmalarda bu enzimin eksprese edilmemesinin farenin gelişimini etkilemediği ve herhangi bir anomaliye neden olmadığı bulunmuştur (Bruno ve Njar, 2007). CYP1B1 enziminin polimorfik bir enzim olduğu gösterilmiş ve *Leu* alleli homozigot olan kadınlarda meme kanseri riskinin arttığı bildirilmiştir (Zheng ve ark.,

2000). Bu bilgiler CYP1B1 enzimini selektif olarak inhibe eden yeni kemopreventif bileşiklerin geliştirilmesi için esas teşkil etmektedir (Chun ve Kim, 2003).

Diğer bir yolak da östrojenin metabolizması sırasında oluşan reaktif kinon metabolitlerinin detoksifikasyonunda rol alan kinon redüktaz (NQO1) enziminin indüklenmesidir. NQO1 indüksiyonunun kimyasallarla indüklenen kanser oluşumuna karşı koruyucu olduğu *in vivo* hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (Cuendet, Oteham, Moon ve Pezzuto, 2006).

Faz II enzimlerinin indüksiyonu katekol metabolitlerinin konjugasyonunun artmasını sağlayarak redoks döngüsüne giren metabolit miktarını ve dolayısıyla kanser riskini azaltmaktadır. MCF-7 hücrelerinde COMT enziminin inhibe edilmesi E₂ metabolizması sonucu oluşan DNA katım ürünlerinin artmasına neden olmuştur (Lavigne ve ark., 2001). Bunun yanında COMT enziminin inhibe edilmesinin sıçanlarda tümör oluşumunu arttırması bu enzimin E₂ metabolizması sırasında oluşan reaktif metabolitlerin detoksifikasyonundaki önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca COMT enzim aktivitesi düşüklüğü ile birlikte GST polimorfizmi bulunan (GST genlerinin 2 tipini taşımayan) kadınlarda meme kanseri riskinin 4,1 kat arttığı bildirilmiştir (Ritchie ve ark., 2001).

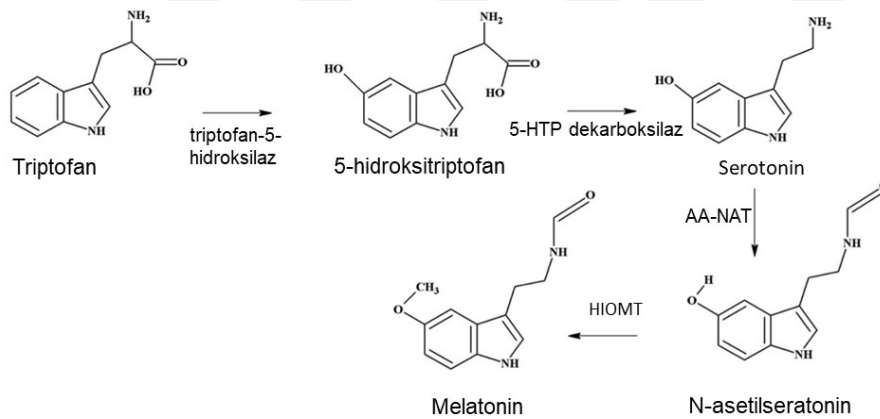
2.4 Melatonin

Melatonin (MLT), N-asetil-5-metoksitriptamin, indol halkası taşıyan ve pineal bezden salgılanan bir hormondur. Pineal bez dışında retina, timüs, kemik iliği, deri ve gastrointestinal kanalda da melatonin sentezi gerçekleşmektedir. Sadece pineal bezden salgılanan melatoninin kan dolaşımına geçtiği diğer bölgelerde üretilen melatoninin lokal olarak etki gösterdiği bilinmektedir (Pandi-Perumal ve ark., 2006).

Melatonin sentezi ve salgılanması diurnal ritme göre gerçekleşmekte; gece karanlığında artarken ışık varlığında azalmaktadır (Brainard ve ark., 2001). Gece saatlerinde plazma melatonin konsantrasyonları en yüksek seviyeye ulaşırken (80-150 pg/mL), gündüz plazma konsantrasyonları düşüktür (10-20 pg/mL) (Dziegiel, Podhorska-Okolow ve Zabel, 2008). Gece ışığa maruz kalma sonucu melatoninin sentez ritminin bozulmasının meme kanserinin tüm aşamalarında rol oynadığı

gösterilmiştir (Claustrat, Brun ve Chazot, 2005; Steven M. Hill ve ark., 2011; Jasser, Blask ve Brainard, 2006). Gece vardiyasında çalışan kadınlarda gece ışığa maruziyet nedeniyle melatonin düzeylerinin azaldığı ve meme kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir (Bonde ve ark., 2012; Davis, Mirick, Chen ve Stanczyk, 2012; Davis, Mirick ve Stevens, 2001; Haus ve Smolensky, 2006).

Melatonin biyosentezi (Şekil 2.5), mitokondride triptofanın triptofan-5-hidroksilaz enzimiyle 5-hidroksitriptofana (5-HTP) dönüştürülmesiyle başlar. Daha sonra 5-HTP sitozolde bulunan 5-HTP dekarboksilaz enzimiyle dekarboksilasyona uğrayarak serotonine (5-hidroksitriptamin) dönüşür. Serotonin, arilalkilamin N-asetiltransferaz (AA-NAT) enzimiyle N-asetilserotonine dönüştürülür. AA-NAT enzimi melatonin sentezinde hız kısıtlayıcı enzimdir. Son olarak da N-asetilserotonin, hidroksiindol-O-metiltransferaz enzimiyle melatonine dönüştürülür (Pandi-Perumal ve ark., 2006).



Şekil 2.5 Melatoninin biyosentez basamakları (AA-NAT: arilalkilamin N-asetiltransferaz, HIOMT: hidroksiindol-O-metiltransferaz).

Pineal bezden salgılanan melatonin yağda çözünürlüğünün yüksek olması sebebiyle pasif difüzyonla periferel dolaşımdan diğer sıvılara ya da hücrelere geçer. Serumdaki melatoninin % 70'i albümine bağlı olarak bulunurken serbest dolaşan % 30'luk kısmı çevre dokulara difüze olur (Hardeland, Pandi-Perumal ve Cardinali, 2006). Melatoninin kandaki yarılanma ömrü biekspansiyel özellik göstermektedir. İlk dağılımındaki yarı ömrü 2 dakika iken ikincisi 20 dakikadır (Claustrat ve ark., 2005).

Dolaşımdaki melatonin ana olarak karaciğerde metabolize edilmektedir. CYP enzimleri tarafından hidroksilasyona uğratarak 6-hidroksi melatonine dönüştürülür. CYP1A1 ve CYP1A2 enzimlerinin karaciğerde melatonin metabolizmasından sorumlu olduğu bilinmektedir (Ma, Idle, Krausz ve Gonzalez, 2005). 6-hidroksi melatonin daha sonra başlıca sülfat konjugatlarına, daha az miktarda da glukuronit konjugatlarına dönüştürülür (Claustrat ve ark., 2005).

Artan yaşla birlikte melatonin sentezinin azaldığı bilinmektedir. 40-50 yaşlarına gelindiğinde melatonin sentezinin belirgin derecede azaldığı ve 70 yaşından sonra birçok bireyde diurnal ritmin ortadan kalktığı görülmektedir (Dziegiel ve ark., 2008). Bu durumun yaşlılıkta uyku azalmasıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir (Bartsch, Bartsch ve Karasek, 2002). Melatonin sentezinde mevsimsel olarak da farklılık söz konusu olmaktadır. Kış aylarında plazma melatonin düzeyleri yaz aylarına göre daha yüksektir (Vijayalaxmi, Reiter, Tan, Herman ve Thomas, 2004).

Melatonin etkilerinin çoğunu reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Bu reseptörler membran reseptörleri olan MT1 ve MT2 reseptörleri ve nükleer reseptör ailesinde bulunan RZR/ROR reseptörleridir. MT1 ve MT2 reseptörleri G-proteine bağlı reseptörlerdir ve bu reseptörlerin aktivasyonu ile çeşitli hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu/inhibisyonu gerçekleşmektedir (Carpentieri, Diaz de Barboza, Areco, Peralta López ve Tolosa de Talamoni, 2012; Dubocovich ve Markowska, 2005).

Melatonin çok sayıda fizyolojik ve patolojik süreçte rol almaktadır. Melatoninin başlıca fizyolojik rolü sirkadyen ritmi düzenlemektir (R J Reiter, 1993). Bunun yanında mevsimsel üreme ritmi ve uyku-uyanıklık döngüsünün düzenlenmesi, antioksidan etki, immün sistemin modülasyonu, mitokondriyel aktivite gibi çok sayıda fizyolojik olayda rolü olduğu bilinmektedir (Acuna Castroviejo ve ark., 2011; Emilio J. Sanchez-Barcelo ve ark., 2007; Karasek ve Winczyk, 2006; R J Reiter ve ark., 2007; Russel J Reiter ve ark., 2003). Ayrıca melatoninin başta meme kanseri olmak üzere farklı tümör tiplerinde onkostatik etkili olduğu bulunmuştur (S Cos ve ark., 2008; Emilio J. Sanchez-Barcelo ve ark., 2005).

2.4.1 Melatoninin Meme Kanserindeki Koruyucu Etki Mekanizması

Melatoninin kanser üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar uzun yıllara dayanmaktadır. İlk olarak 1978 yılında Cohen ve arkadaşları pineal bezin meme kanseri etiyolojisinde olası bir rolü olabileceği teorisini ortaya atmışlar ve pineal bezin fonksiyonunda azalmanın (MLT salınımında azalma) östrojen düzeylerinde artışa neden olacağı, bunun sonucu olarak da artmış östrojen maruziyetinin meme kanseri gelişiminde rol alacağını ileri sürmüşlerdir (Cohen, Lippman ve Chabner, 1978). Birkaç yıl sonra Tamarkin ve arkadaşları plazma melatonin düzeyleri ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi tanımlamışlardır. ER+ meme kanserli kadınlarda gece plazma melatonin düzeylerinin ER- meme kanserli kadınlara ve sağlıklı kadınlara göre düşük olduğunu göstermişlerdir. Özellikle melatonin düzeyi en düşük olan kadınlarda östrojen reseptör konsantrasyonunun en yüksek olduğu saptanmıştır (Tamarkin ve ark., 1982). Epidemiyolojik alışmalar gece vardiyalı çalışan kadınlarda meme kanseri riskinin arttığını göstermiştir (Davis ve ark., 2001; Hansen, 2001). Bu durumun sirkadyen ritmin bozulması ve melatonin düzeylerinin baskılanmasıyla ilişkili olabileceği düşünölmektedir (Russel J Reiter, Tan, Erren, Fuentes-Broto ve Paredes, 2009).

Melatoninin sıçanlarda meme büyümesini inhibe ettiğini gösteren alışmalar (Aubert, Janiaud ve Lecalvez, 1980; Blask ve ark., 1991), insan meme hücrelerinde yapılan *in vitro* araştırmaların sayısında artışa neden olmuştur. Hill ve Blask 1988 yılında melatoninin fizyolojik konsantrasyonlarda (10^{-9} M) MCF-7 hücrelerinde hücre proliferasyonunu önemli oranda inhibe ettiğini göstermiştir (S M Hill ve Blask, 1988). MCF-7 hücreleri östrojene duyarlı hücreler olduğundan insan ER+ meme kanseri çalışmaları için kullanışlı bir modeldir. Melatoninin MCF-7 hücrelerindeki antiproliferatif etkisi uzun yıllardır çalışılmakta olan bir konudur. Bu etkinin özellikleri şu şekilde sıralanmaktadır (Blask ve Hill, 1986; S Cos ve Blask, 1994; Samuel Cos, Gonzalez, Martinez-Campa ve ark., 2006b):

- a. Etki geri dönüşlüdür ve melatonin ortamdan uzaklaştırıldığında hücreler kendi büyüme döngülerine dönmektedir.

- b. Melatonin molekülüne özel bir etkidir; melatonin prekürsörleri, metabolitleri veya diğer metoksiindol türevleri tarafından aynı etki görülmez.
- c. Etki doza bağımlıdır ve sadece 1 nM' a yakın konsantrasyonlarda (fizyolojik konsantrasyon) hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görülmüştür, suprafizyolojik veya subfizyolojik konsantrasyonlarda etki kaybolur.
- d. Hücrelerde östrojen reseptörü bulunmasıyla ilişkilidir. Melatonin, MCF-7 hücreleri gibi ER+ olan T47D, ZR-75-1 hücrelerinde de proliferasyonu inhibe ederken ER taşımayan (MDA-MB-231, BT-20) hücrelerde etkili değildir.
- e. Etki, ortamda serum varlığına bağlıdır; serum içermeyen büyüme ortamında eğer ortama östradiol, prolaktin veya epidermal büyüme faktörü gibi mitojenik ajanlar eklenmezse melatonin antimitojenik etkisini kaybetmektedir. Bu da melatoninin serumdaki mitojenik bileşik ya da bileşiklerle etkileştiği hipotezini kanıtlar niteliktedir.

Bu etkinin çok sayıda mekanizmayla gerçekleştiği düşünülmele birlikte elde edilen veriler melatoninin meme kanseri hücrelerindeki etkisinin genetik faktörler ve östrojen sinyal yolağı ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Samuel Cos, Gonzalez, Martinez-Campa ve ark., 2006a).

Sadece ER eksprese eden meme kanseri hücrelerinin melatoninin antimitojenik etkisine duyarlı olması, onkostatik etkilerinin tümör hücrelerinin östrojene yanıt yolağıyla etkileşerek gerçekleştiğine bir kanıttır.

Melatoninin onkostatik etkisinde yer alan farklı olası mekanizmalar şu şekilde açıklanmaktadır (Samuel Cos, Gonzalez, Martinez-Campa ve ark., 2006a; Frascini, Demartini, Esposti ve Scaglione, 1998; Karbownik, Lewinski ve Reiter, 2001; Leon-Blanco, Guerrero, Reiter, Calvo ve Pozo, 2003; Mediavilla, Sanchez-Barcelo, Tan, Manchester ve Reiter, 2010; Russel J. Reiter, 1980):

- a. Nöroendokrin–reproduktif eksen ile etkileşerek tümör büyümesinde yer alan bazı hormonların sentezinin azalmasıyla (özellikle gonadal östrojenler),

- b. Antioksidan etkilerinin sonucu olarak,
- c. Epitelyal meme kanseri hücrelerinde antiöstrojenik etkisinin sonucu olarak,
- d. İmmun savunmayı güçlendirici etkisine bağlı olarak,
- e. Tümör hücrelerinde telomeraz aktivitesini inhibe ederek,
- f. Sirkadiyen ritmi düzenleyerek,
- g. Metastazı önleyerek,

Bu tez kapsamında, melatoninin meme kanseri üzerindeki tüm bu etki mekanizmaları arasından östrojen sinyal yolağına etkileri üzerinde durulacaktır. Melatoninin östrojen sinyal yolağındaki etkisi üç farklı yolla gerçekleşmektedir: östrojenlerin gonadal sentezinin modülasyonu; endojen östrojenlerin etkisini reseptör aracılıklı olarak etkileyerek selektif östrojen reseptör modülatör (SERM) etki; östrojenlerin sentezinde yer alan enzimlerin aktivitesini etkileyerek selektif östrojen enzim modülatörü (SEEM) etki (Şekil 2.6).

2.4.2 Östrojenlerin Plazma Konsantrasyonunun Melatonin Tarafından Modülasyonu

Melatonin hipotalamo-hipofizyel üreme sistemi üzerindeki etkileri aracılığıyla hayvanlarda mevsimsel üremeyi kontrol eden bir hormondur (Arendt, 1986; Russel J. Reiter, 1980). Mevsime bağlı olarak üreyen memelilerde melatonin hipotalamo-hipofizyel sistemde reseptör bölgelerini aktive ederek üreme fonksiyonunu kontrol etmektedir (Dubocovich ve Markowska, 2005). Farklı memeli türlerinde melatoninin overlerdeki östrojen sentezini azalttığı gösterilmiştir (Russel J. Reiter, 1980). Pineal bezin salgılarında bozulma sonucu melatonin düzeylerinin azalmasının östrojen düzeylerinde artışa neden olacağı ve bu durumun meme kanseri riskini artırabileceği ileri sürülmüştür (Cohen ve ark., 1978).

Melatoninin insanlarda üreme sistemi üzerine etkileri tam olarak aydınlatılmış değildir. Serum melatonin düzeyleri ile overlerin aktivitesi arasında ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Kauppila, Kivela, Pakarinen ve Vakkuri, 1987) ve melatoninin nöroendokrin-reproduktif sistem üzerinde düzenleyici rolü olduğu ileri

sürülmektedir (Luboshitzky ve Lavie, 1999). Bununla birlikte luteal granuloza hücrelerinde melatoninin steroidojenez üzerinde doğrudan uyarıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir (Woo ve ark., 2001) ve ayrıca sıçan overlerinde antral folikül hücrelerinde fonksiyonel MT1 reseptörleri saptanmıştır (Soares, Masana, Erşahin ve Dubocovich, 2003).

Tüm bu veriler melatoninin östrojen sentezini baskılayarak overlerin fonksiyonunu düzenlediğini ve böylece dolaylı olarak meme kanseri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.

2.4.3 Selektif Östrojen Reseptör Modülatörü (SERM) Olarak Melatonin

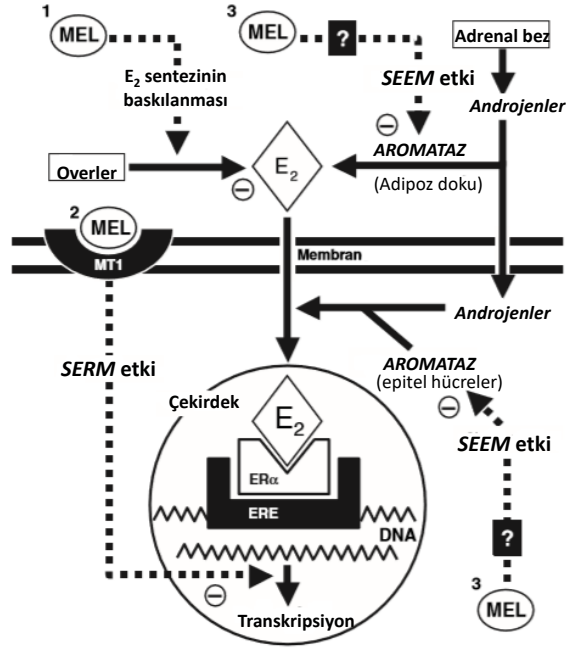
Melatonin ER ile etkileşerek SERM gibi hareket etmektedir. Böylece melatonin, östrojene duyarlı MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde fizyolojik konsantrasyonlarda (1 nM) E₂ ile indüklenen hücre proliferasyon ve invazyonunu önlemektedir (S Cos, Fernandez, Güzmes ve Sanchez-Barcelo, 1998; S Cos ve Sanchez-Barcelo, 2000). Melatonin ayrıca tamoksifen gibi antiöstrojenlere duyarlılığı arttırmakta ve E₂ ile indüklenen büyüme faktörleri ve protoonkogenlerin ekspresyonunu da azaltmaktadır (Mediavilla ve ark., 1997; T. M. Molis, Spriggs, Jupiter ve Hill, 1995; Wilson, Blask ve Lemus-Wilson, 1992).

Melatonin bu SERM etkisini diğer bileşiklerin aksine direkt olarak östrojen reseptörüne bağlanmak veya östradiolün reseptörüne bağlanmasını etkilemek suretiyle değil farklı bir mekanizmayla östrojen sinyal yolağıyla etkileşerek göstermektedir (T. M. Molis, Spriggs ve Hill, 1994; T. Molis, Walters ve Hill, 1993; Emilio J. Sanchez-Barcelo ve ark., 2005). Melatonin ER α ekspresyonunu azaltmakta ve östrojen-östrojen reseptör (E₂-ER) kompleksinin DNA üzerinde östrojen reseptörünün ekspresyonundan sorumlu olan ERE'ye bağlanmasını inhibe etmektedir (T. M. Molis ve ark., 1994; T. Molis ve ark., 1993; Rato ve ark., 1999). Melatonin bu etkisini melatonin membran reseptörlerine (MT1) bağlanarak gerçekleştirmektedir ve MT1 reseptörünün ekspresyonundaki artışın melatoninin meme kanseri hücrelerinde büyümeyi baskılayıcı etkisini artırdığı gösterilmiştir (Yuan, Collins, Dai, Dubocovich ve Hill, 2002). MT1 reseptörü G proteinlerine bağlı bir reseptördür ve bu reseptörün melatonin tarafından aktive olması farklı G

proteinlerini modüle etmekte ve böylece çok sayıda sinyal iletim yolağını etkilemektedir. Bu reseptörlerin aktivasyonu adenilat siklaz enzimini inhibe eder ve bunun sonucunda cAMP/PKA (protein kinaz A) aktivitesi azalır (Lai ve ark., 2008).

Melatonin ve östrojen siklik adenzin mono fosfat (cAMP) düzeyleri üzerine zıt etkilidirler. cAMP düzeylerindeki artış ER α reseptör aktivasyonuna neden olabilmektedir (Aronica ve Katzenellenbogen, 1993; Emilio J. Sanchez-Barceló ve ark., 2005). Östrojenler MCF-7 hücrelerinde adenilat siklazı aktive ederek cAMP düzeylerini transkripsiyonel olmayan bir mekanizmayla arttırmakta ve oluşan cAMP steroidlerle indüklenen sitoplazmik ve membrana bağlı düzenleyici proteinlerin modülasyonunda yer almaktadır (non genomik etki). Aynı zamanda ER-aracılıklı transkripsiyonu artırarak da steroidlerin genomik etkisine katkıda bulunmaktadır (Aronica, Kraus ve Katzenellenbogen, 1994). Melatoninin, MCF-7 hücrelerinde, MT1 reseptörlerine bağlanarak forskolinle ve östrojenle indüklenen cAMP artışını inhibe ettiği ve böylece ER α gen transkripsiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Kiefer, Ram, Yuan ve Hill, 2002; Emilio J. Sanchez-Barcelo ve ark., 2005).

Melatonin MT1 reseptöründen bağımsız olarak da antiöstrojenik etki göstermektedir. Melatonin kalmoduline (CaM) bağlanarak Ca⁺² /kalmodulin kompleksinin oluşumunu inhibe etmektedir. CaM, sadece ER α ' nın transkripsiyonel aktivasyonunda yer almakta ve E₂-ER kompleksinin ERE'ye bağlanmasını kolaylaştırarak östrojen reseptörünün transkripsiyonel aktivitesini modüle etmektedir (Garcia Pedrero ve ark., 2002). Bu modüle edici etki ER β için söz konusu değildir. Melatoninin Ca⁺²/CaM kompleksine bağlanması bu kompleksin östrojen sinyal yolağındaki pozitif etkilerini önlemektedir (Dai, Inscho, Yuan, ve Hill, 2002). Melatoninin SERM etkisi bir bütün olarak değerlendirildiğinde de, insan meme kanseri hücrelerinin melatonine duyarlılığının ER α /ER β oranına bağlı olduğu ve ER β ekspresyonundaki artışın bu etkiyi ortadan kaldırdığı bilinmektedir (del Rio ve ark., 2004).



Şekil 2.6 Melatoninin östrojen sinyal yolağındaki etkileri. 1) E₂ sentezinin baskılanması, 2) SERM etki, 3) SEEM etki (Emilio J. Sanchez-Barcelo ve ark., 2005)

2.4.4 Selektif Östrojen Enzim Modülatörü (SEEM) Olarak Melatonin

Östrojenlerin lokal olarak sentezi farklı dokularda enzimatik olarak gerçekleşmektedir. Bu durum özellikle menopoz sonrası kadınlarda meme kanseri oluşumunda önemli bir faktördür. Östrojenlerin sentez ve dönüşümünde rol alan enzimler ve melatoninin bu basamaklardaki etkisi Şekil 2.3'de gösterilmiştir. Melatonin aromataz, sülfataz ve 17 β -HSD1 ekspresyonunu ve aktivitesini inhibe ederken, östrojenin sülfat konjugasyonunu katalizleyen sülfotranferaz enzim ekspresyonunu ve aktivitesini artırmaktadır (S Cos ve ark., 2008; Emilio J. Sanchez-Barcelo ve ark., 2005).

MCF-7 hücrelerinin aromatazı eksprese ettiği bilinmektedir. Hücrelerin büyüme ortamında testosteron ilavesinin hücre proliferasyonu arttırdığı gösterilmiştir (Samuel Cos, Martinez-Campa, Mediavilla ve Sanchez-Barcelo, 2005). Bu etkinin ER inhibitörü tamoksifen varlığında azalırken androjen reseptör inhibitörü bir ajan eklendiğinde değişmemesi, hücre proliferasyonunun testosterondan aromataz aracılığı ile oluşan östrojenin reseptörüne bağlanması sonucu gerçekleştiğini kanıtlamaktadır (Samuel Cos, Gonzalez, Martinez-Campa ve ark., 2006b).

Melatoninin, MCF-7 hücrelerinde hem bazal hem de cAMP veya kortizol ile indüklenmiş aromataz aktivitesini azalttığı bulunmuş ve mRNA düzeylerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Samuel Cos ve ark., 2005).

Melatoninin aromataz enzimi üzerindeki modülatör etkisi DMBA ile indüklenen meme kanserli sıçanlarda *in vivo* olarak da kanıtlanmıştır. Bu modelde tümörlerin gelişimi östrojene bağımlı olduğundan overektomize edilmiş hayvanlarda tümör sayısı ve büyüklüğü önemli oranda azalmıştır. Overektomize edilen hayvanlara testosteron uygulandığında ise lokal olarak östrojen sentezi devam ettiğinden tümör büyümesi devam etmiştir ve bu hayvanlara melatonin verilmesi testosteronla indüklenen tümör büyümesini inhibe etmiştir (Samuel Cos, Gonzalez, Güzmes ve ark., 2006).

Meme kanser hücrelerinde aromataz gen ekspresyonu promoter II ve I.3 bölgelerinin kontrolü altındadır ve cAMP bu süreçte yer almaktadır (S. E. Bulun ve ark., 2003). Melatonin MT1 reseptörlerine bağlanarak cAMP düzeylerini azalttığı bilinmektedir. MCF-7 hücrelerinde melatonin nanomolar konsantrasyonlarda forskolinle indüklenen cAMP artışını azalttığı gösterilmiştir (Kiefer ve ark., 2002) . Bu nedenle melatonin cAMP yolağı aracılığıyla da aromatazı modüle etmektedir.

2.4.5 Östrojenin Metabolizmasında Yer Alan Enzimlerin Regülasyonu

Östrojenlerin metabolizmasının ilk basamağında CYP1B1 enzimi ile hidroksile metabolitlerine dönüşümü yer almaktadır (Şekil 2.2). Bu nedenle östradiolün 4-OH katekol metabolitlerine dönüşümünü inhibe etmenin meme kanserinin önlenmesinde bir hedef olabileceği belirtilmiştir(Liehr, 2002). Yapılan bir çalışmada melatoninin CYP1B1, CYP1A1 ve CYP1A2 enzimlerini inhibe edici etkisi olduğu ve böylece bu enzimler aracılığı ile karsinojenik metabolitlerine dönüşen prokarsinojenlerin toksik etkisini önleyebileceği ifade edilmektedir (Chang, Chen, Yang ve Yeung, 2010).

Östrojenin metabolizması sırasında CYP enzimleri aracılığıyla oluşan hidroksile türevler bir sonraki basamakta kinon metabolitlerine dönüşmektedir (Şekil 2.2). Kinon metabolitlerinin DNA'da depürine DNA katım ürünlerinin oluşmasından ve

potansiyel karsinojenik etkiden sorumlu oldukları bildirilmektedir. Oluşan kinon metabolitleri NADPH kinon oksidoredüktaz (NQO1) tarafından katekol metabolitlerine indirgenir ve daha sonra Faz II enzimi olan COMT tarafından inaktif metabolitine dönüştürülür. Bu nedenle NQO1 enzim aktivasyonu ve indüksiyonuna neden olan bileşikler östrojene bağlı kanser oluşumunda olası koruyucu etkileri bakımından önemli görünmektedir. Melatoninin NQO1 enzimi üzerine etkilerine bakıldığında hücrelerde yapılmış *in vitro* bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla beraber sıçanlarda akut karaciğer hasarında melatoninin NQO1 ekspresyonunda artışa neden olduğu (Jung, Hong, Zheng, Lee ve Hong, 2009), akut pankreatit modelinde melatonin uygulanmasının ise NQO1 ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Jung ve ark., 2010). Literatür bilgileri ışığında melatoninin, antioksidan savunma sisteminin bir parçası olan NQO1 enzimi üzerine indükleyici etkisi olduğu düşünülmektedir.

2.4.6 Melatoninin Terapotik Olarak Kullanımı

Melatoninin bölüm 2.4 'te belirtilen fizyolojik etkilerinden dolayı uyku bozuklukları, jet-lag, bazı hormon bağımlı kanserler, depresyon gibi pek çok patolojik sürecin tedavisinde kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir. Ancak melatonin molekülünün ilaç olarak kullanımı konusunda bazı kısıtlamalar bulunmaktadır. Melatoninin yarılanma ömrü kısadır ve çok hızlı bir şekilde metabolik inaktivasyona uğraması nedeniyle oral biyoyararlanımı çok düşüktür. Ayrıca birden fazla reseptör alt tipi aracılığıyla gerçekleşen etkileri, farmakolojik etkinin selektif olmasını zorlaştırmaktadır. Bunun yanında melatonin kullanımı farklı ülkelerde farklı düzenlemelere tabidir. Örneğin Amerika'da diyet destek ürünü olarak kabul ediliyorken, bazı Avrupa ülkelerinde ilaç olarak kabul edildiğinden sadece reçete ile satışına izin verilmektedir. Öte yandan patentlenebilir olmayışı nedeniyle ilaç firmalarının düzenleyici kuruluşlara bu molekülün ilaç olarak kabul edilmesine yönelik bir talebi bulunmamaktadır. Tüm bu nedenler melatonin türevi yeni moleküllerin geliştirilmesine yol açmıştır (Emilio J. Sanchez-Barcelo ve ark., 2007).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3.1’de belirtilmiştir.

Tablo 3.1 Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal madde	Firma adı
CD-FBS	Sigma F6765
DMEM (fenol kırmızısı içermeyen)	Gibco 21063029
DMEM	Gibco 41966029
DMEM F12	Sigma D8062
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Merck 8.02912.2500
Etanol	Merck K41392783037
FBS	Gibco 10270-106
Horse serum	Gibco
Heat inactivated FBS	Gibco 10500-064
MEM-NEAA	Gibco 11140
L-Glutamin	Gibco 25030-024

17 β -östradiol	Sigma E8875
Sodyum pirüvat	Sigma P5280
Tripsin-EDTA	Invitrogen 25300
MTT	Sigma M2128
CYP 19 kit	Corning 459520
MCF-7 BUS hücreleri	Prof. Ana Soto'dan temin edildi.
MDA-MB-231	Prof. John Meerman' dan temin edilmiştir.
MCF-10A hücreleri	ATCC- CRL10317
Horse serum	Invitrogen 16050-122
İnsülin	Sigma I-1882
Epidermal büyüme faktörü	Peprotech AF-100-15
Hidrokortizon	Sigma H0888
PBS	Invitrogen 10010-015
Fulvestran	Sigma I4409
Ketokonazol	Sigma K1003
Triton X- 100	Sigma T8787
Rekombinant CYP1B1 enzimi	Corning 456-220

NADPH	Sigma N6505
Etoksirezorufin	Sigma 46121
Dipotasyumhidrojen fosfat(K_2HPO_4)	Merck 105101.1000
Potasyumdihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck 104873
Asetik asit	
Sulforodamin B	Sigma 341738
TCA	Sigma 27242
Tris-base	Sigma T1503
NADH	Sigma N8129

3.1.2 Kullanılan Gereçler

Tez çalışması kapsamında kullanılan gereçler Tablo 3.2’de belirtilmiştir.

Tablo 3.2 Tez çalışması kapsamında kullanılan gereçler

Makine ve teçhizat	Firma adı ve modeli
Buzdolabı	Ariston hotpoint
75 cm ² flask	SPL Life 70025
25 cm ² flask	SPL Life 70075
İnkübatör	Nuaire nu-5510e
Laminar akımlı kabin	Shinsaeng scbn 1013/1300

Mikroskop	Olympus cxx41
Neubauer sayım kamarası	Marienfeld 0640110
Otomatik mikropipet (0,5-10 µl)	Brand ve Eppendorf
Otomatik mikropipet (10-100 µl)	Brand ve Eppendorf
Otomatik mikropipet (100-1000µl)	Brand ve Eppendorf
8 kanallı otomatik mikropipet	Brand 703708 ve Gilson
Otomatik pipetör	Brand
Steril filtre	Minisart NML Syringe Filters 16534- K
96 kuyucuklu plaka	Corning- 3599 Greiner bio one 655-209
Spektrofotometre	Thermo Scientific Varioskan Flash plaka okuyucu
Su banyosu	Wisabath wb-22
Terazi	Sartorius BI610 ve GP1200P
Vorteks	Nüvenm110 velpscientifica 2x3

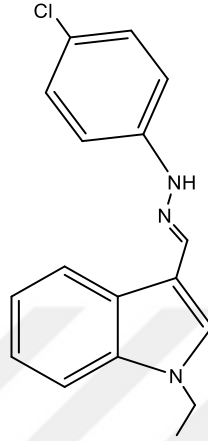
3.1.3 Kullanılan Melatonin Analogları

Bu tez çalışmasında kullanılan melatonin analogları Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sibel Süzen ve grubu tarafından sentezlenmiştir. Bileşikler kimyasal yapılarına göre 3 gruba ayrılmıştır. N0 kodlu maddeler 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon yapısında, KD kodlu maddeler 1-etilindol yapısında ve M kodlu bileşikler 2-metilindol yapısındadır.

3.1.3.1 KD Kodlu Bileşikler

KD1

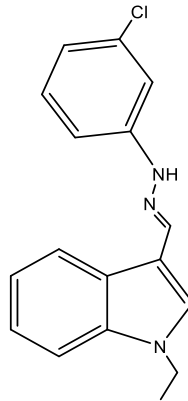
3- { ([2-(4-Klorofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 297,79 g/mol

KD2

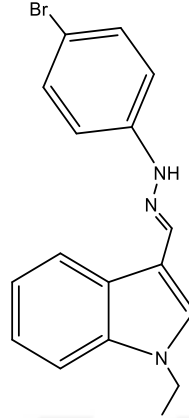
3- { ([2-(3-Klorofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 297,79 g/mol

KD3

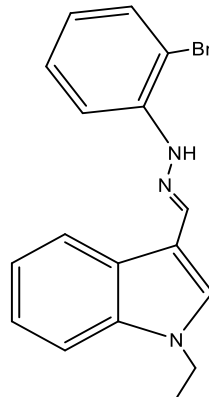
3- { ([2-(4-Bromofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 342,24 g/mol

KD4

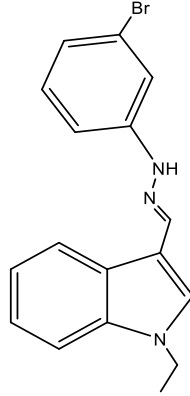
3- { ([2-(2-Bromofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: : 342,24 g/mol

KD5

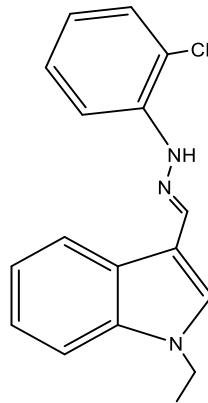
3- { ([2-(3-Bromofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 342,24 g/mol

KD6

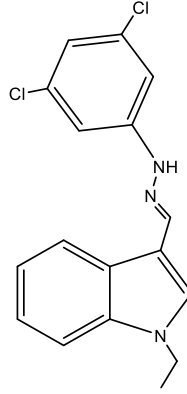
3- { ([2-(2-Klorofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 297,79 g/mol

KD7

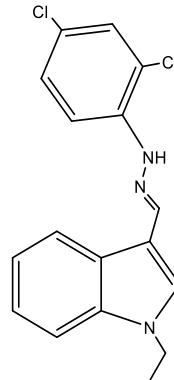
3- { ([2-(3,5-Diklorofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 332,23 g/mol

KD8

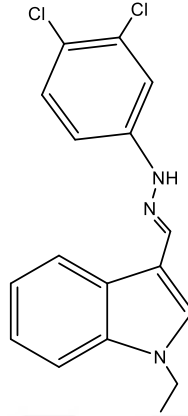
3- { ([2-(2,4-Diklorofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 332,23 g/mol

KD9

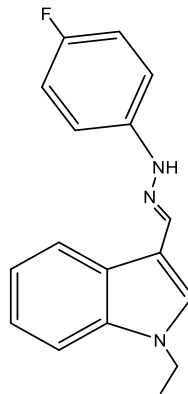
3- { ([2-(3,4-Diklorofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 332,23 g/mol

KD10

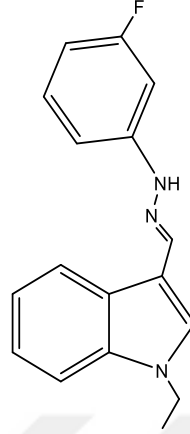
3- { ([2-(4-Florofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 281,33 g/mol

KD11

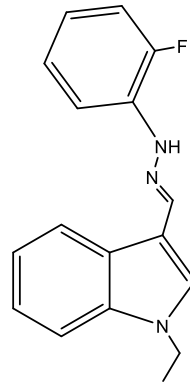
3- { ([2-(3-Florofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 281,33 g/mol

KD12

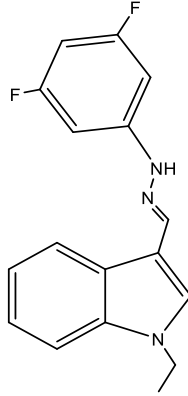
3- { ([2-(2-Florofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 281,33 g/mol

KD13

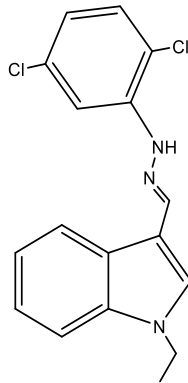
3- { ([2-(3,5-Diflorofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 299,32 g/mol

KD14

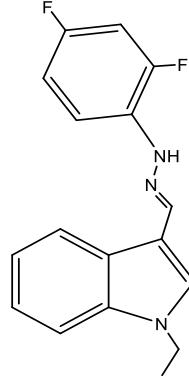
3- { ([2-(2,5-Diklorofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 332,23 g/mol

KD15

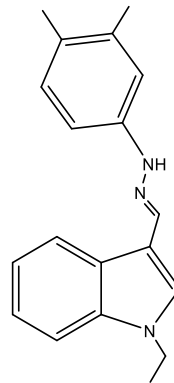
3- { ([2-(2,4-Diflorofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 299,32g/mol

KD17

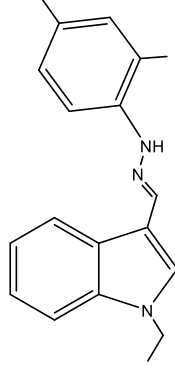
3- { ([2-(4-Klorofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 291,4 g/mol

KD18

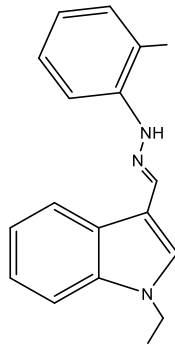
3- { ([2-(2,4-Dimetilfenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 291,4 g/mol

KD19

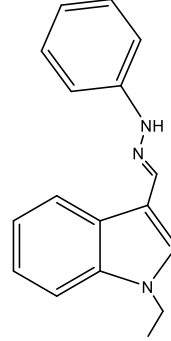
3- { ([2-(orto-tolilfenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol



Molekül ağırlığı: 277,37 g/mol

KD20

3- { ([2-(4-Klorofenil)hidraziniliden]metil } -1-etil- 1 H-indol

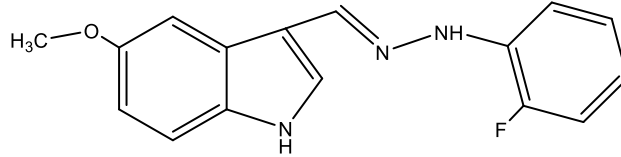


Molekül ağırlığı: 263,34 g/mol

3.1.3.2 NO Kodlu Bileşikler

N1/9B

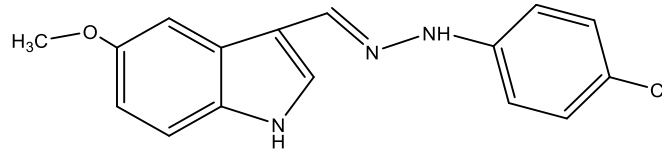
3-[[2-(2-florofenil)hidraziniliden]metil]-5-metoksi-1H-indol



Molekül ağırlığı: 283,3 g/mol

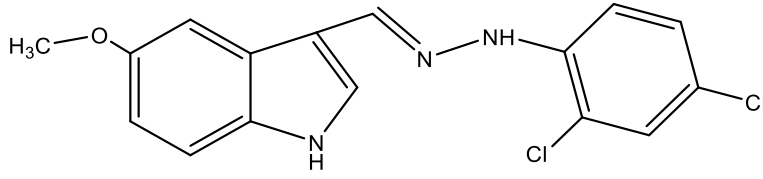
N0/1

3-[[2-(4-klorofenil)hidraziniliden]metil]-5-metoksi-1H-indol



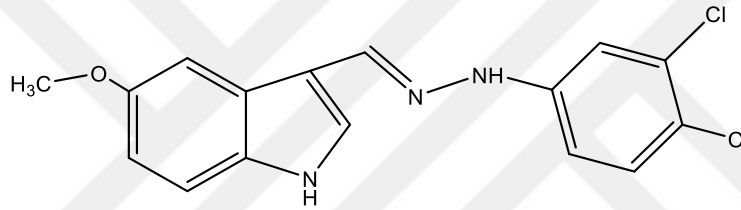
Molekül ağırlığı: : 299,75 g/mol

N0/2 3-[[2-(2,4-diklorofenil)hidraziniliden]metil]-5-metoksi-1H-indol



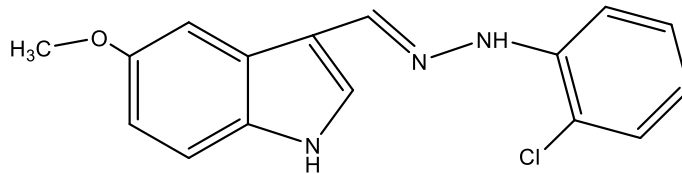
Molekül ağırlığı: 334,19 g/mol

N0/3 3-[[2-(3,4-diklorofenil)hidraziniliden]metil]-5-metoksi-1H-indol



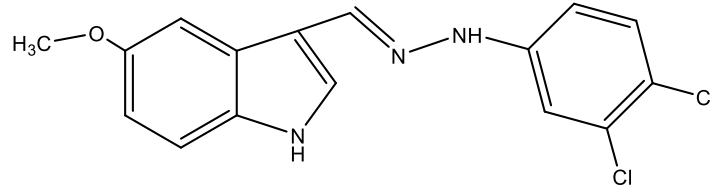
Molekül ağırlığı: 334,19 g/mol

N0/4 3-[[2-(2-klorofenil)hidraziniliden]metil]-5-metoksi-1H-indol



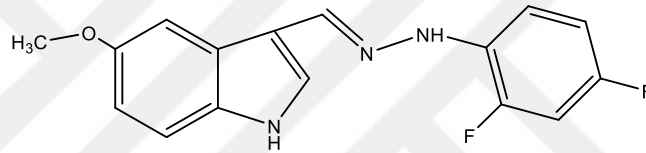
Molekül ağırlığı: 299,75 g/mol

N0/5 3-[[2-(3,5-diklorofenil)hidraziniliden]metil]-5-metoksi-1H-indol



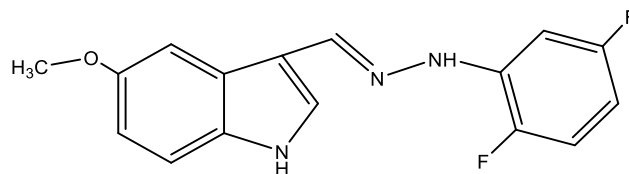
Molekül ağırlığı: 286 g/mol

N0/7 3-[[2-(2,4-diflorofenil)hidraziniliden]metil]-5-metoksi-1H-indol



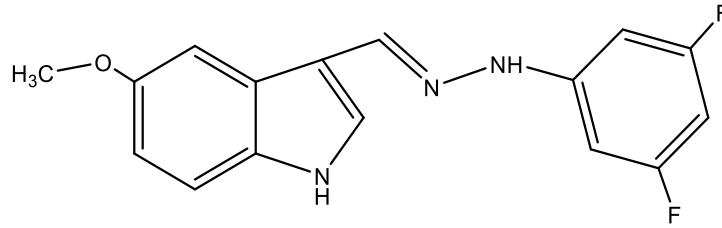
Molekül ağırlığı: 301,29 g/mol

N0/8 3-[[2-(2,5-diflorofenil)hidraziniliden]metil]-5-metoksi-1H-indol



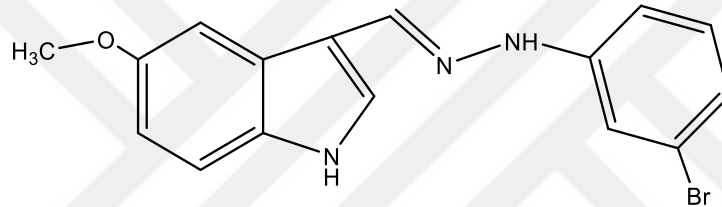
Molekül ağırlığı: 301,29 g/mol

N0/10 3-[[2-(3,5-diflorofenil)hidraziniliden]metil]-5-metoksi-1H-indol



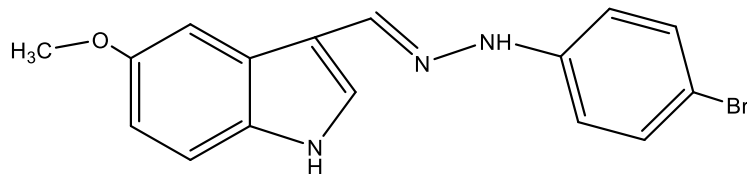
Molekül ağırlığı: 286 g/mol

N0/13 3-[[2-(3-bromofenil)hidraziniliden]metil]-5-metoksi-1H-indol



Molekül ağırlığı: 344,2 g/mol

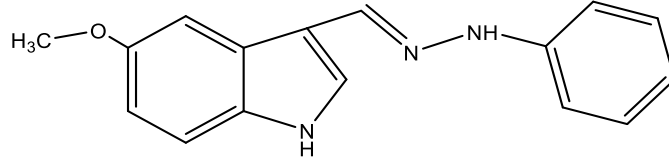
N0/14 3-[[2-(4-bromofenil)hidraziniliden]metil]-5-metoksi-1H-indol



Molekül ağırlığı: 287 g/mol

N0/15

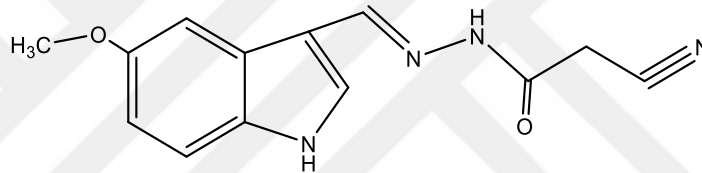
5-metoksi-3-[(2-fenilhidraziniliden)metil]-1H-indol



Molekül ağırlığı: 265,30 g/mol

N0/16

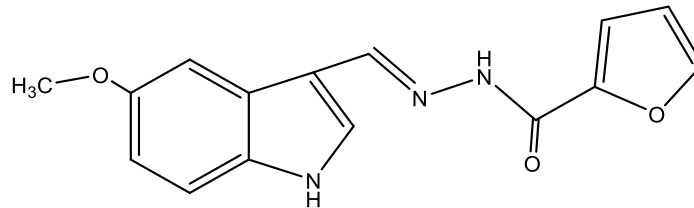
2-siyano N'-[(5-metoksi-1H-indol-3-il)metiliden]asetohidrazid



Molekül ağırlığı: 283,3 g/mol

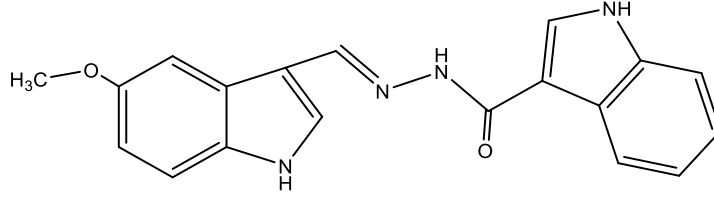
N0/17

N'-[(5-metoksi-1H-indol-3-il)metiliden]furan-2-karbohidrazid



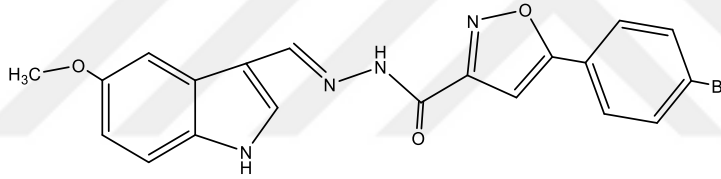
Molekül ağırlığı: 283,28g/mol

N0/18 N'-[(5-metoksi-1H-indol-3-il)metiliden]-1H-indol-3-karbohidrazid



Molekül ağırlığı: 332,35 g/mol

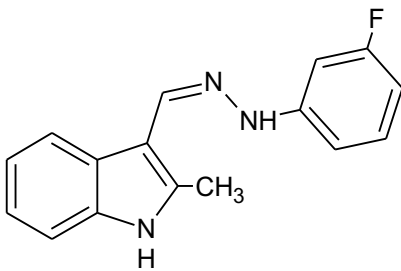
N0/20 5-(4-bromofenil)-N'-[(5-metoksi-1H-indol-3-il)metiliden]-1,2-oksazol-3-karbohidrazid



Molekül ağırlığı: 439,26 g/mol

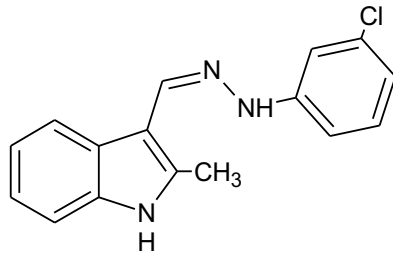
3.1.3.3 M Kodlu Bileşikler

M3 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (3-florofenil) hidrazon



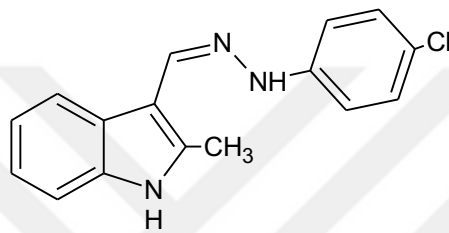
Molekül ağırlığı: 269 g/mol

M5 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (3-klorofenil) hidrazon



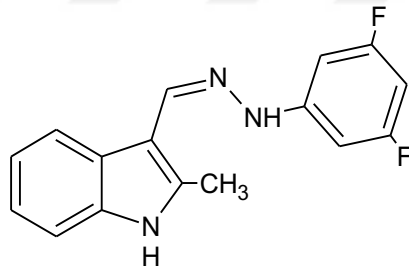
Molekül ağırlığı: 286 g/mol

M6 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (4-klorofenil) hidrazon



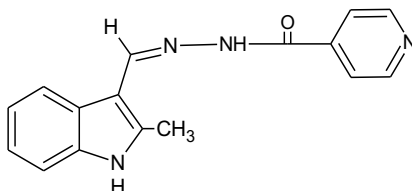
Molekül ağırlığı: 286 g/mol

M16 2-Metil-1-H-indol-3-karboksialdehit (3,5-diflorofenil) hidrazon



Molekül ağırlığı: 287 g/mol

M23 2-metilindol-3-karboksialdehit izonikotinoil hidrazon



Molekül ağırlığı: 280 g/mol

3.1.4 Kullanılan Çözeltiler

3.1.4.1 Aromataz Aktivitesi Ölçüm Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Aromataz aktivitesi ölçümünde ticari olarak satılan Corning® Supersomes™ Kit HTS CYP19-MFC kiti kullanılmıştır. Kitte kullanılan çözeltiler üretici firma tarafından belirtilen şekilde hazırlanmıştır. Kit içeriği, CYP19 aromataz enzimi, kontrol proteini, potasyum fosfat tamponu (pH:7,4), durdurucu çözelti, kofaktör karışımı (NADP, MgCl₂, glukoz-6-fosfat), glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH), 7-metoksi-4-triflorometil kumarin (MFC, enzimin substratı)(25mM), ketokonazol (2mM) ve hidroksitriklorometilkumarin (HFC, standart metaboliti)(0,25 mM)'den oluşmaktadır.

3.1.4.1.1 NADPH-Kofaktör Karışımı

187,5 µl kofaktör, 150 µl G6PDH, 100 µl kontrol proteini ve 14,56 ml distile su (37 °C) karıştırılarak hazırlanır.

3.1.4.1.2 Durdurucu Çözelti

Kit bileşenine 72 ml asetonitril eklenir ve oda sıcaklığında saklanır.

3.1.4.1.3 Enzim-Substrat Karışımı

150 µl CYP19, 20 µl MFC (25mM), 2ml tampon çözeltisi, 7,83 ml distile su (37 °C) karıştırılarak hazırlanır.

3.1.4.2 E-Screen Analizinde Kullanılan Çözeltiler

3.1.4.2.1 Büyüme İçin Gerekli Eksiksiz Besi Ortamı

Fenol kırmızı içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içerisine % 10 fetal sığır serumu (FBS) eklenerek büyüme için gerekli eksiksiz besi ortamı hazırlanmıştır.

3.1.4.2.2 Hormon İçermeyen Besi Ortamı

Fenol kırmızısı içermeyen Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içersine % 10 aktif kömür-dekstran ile muamele edilmiş fetal sığır serumu (CD-FBS), %1 minimum temel ortam-esansiyel olmayan amino asit (MEM-NEAA) ve % 1 sodyum pirüvat eklenerek hormon içermeyen besi ortamı hazırlanmıştır.

3.1.4.2.3 % 10 (a/h) Trikloroasetik Asit (TCA) Çözeltisinin Hazırlanması

10 g TCA tartılarak bir miktar distile suda çözülmüş ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.4.2.4 % 1 Asetik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

10 ml asetik asit çözeltisi alınıp, distile suyla 1 L' ye tamamlanmıştır. Sülfrodamin B ile boyama sonrasında bağlanmamış fazla boya % 1'lik asetik asit çözeltisiyle yıkayarak uzaklaştırılmıştır.

3.1.4.2.5 % 0,4 (a/h) Sülfrodamin-B Boyasının Hazırlanması

1 g sülfrodamin-B (SRB) üzerine bir miktar % 1'lik asetik asit çözeltisi eklenmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülmüştür. % 1'lik asetik asit çözeltisiyle 250 ml'ye tamamlanmıştır. Boya çözeltisinin ışıktan etkilenmemesi için renkli şişede saklanmıştır.

3.1.4.2.6 10mM Tris-baz Çözeltisinin Hazırlanması (pH 10,7)

0,1211 g tris-baz üzerine bir miktar distile su eklenmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. 1 M NaOH çözeltisi ile pH'sı 10,7' ye ayarlanmıştır. Distile su ile son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.4.2.7 Stok 17- β Östradiolün Hazırlanması

1 mg östradiol 0,918ml etanolde çözümlenerek $4 \cdot 10^{-3}$ M konsantrasyonda stok östradiol çözeltisi hazırlanmış ve filtreden süzülerek sterilize edilmiştir. Hormon içermeyen

besi ortamı kullanılarak ana stoktan hareketle 4.10^{-5} M, 4.10^{-7} M, 4.10^{-9} M, 4.10^{-10} M konsantrasyonlarda standart östradiol (E_2) çözeltileri hazırlanmıştır.

E-screen yönteminde pozitif kontrol olarak 10^{-10} M final konsantrasyonda östradiol çözeltisi kullanılmıştır.

3.1.4.2.8 Stok Fulvestranın Hazırlanması

3,1 mg fulvestran tartılıp 1,277 ml DMSO'da çözülerek 4.10^{-3} M final konsantrasyonda stok fulvestran çözeltisi hazırlanmış ve filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Daha sonra hormon içermeyen besi ortamıyla dilüsyonlar yapılarak gerekli konsantrasyonda çözeltiler elde edilmiştir.

3.1.4.3 CYP1 Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

3.1.4.3.1 NADPH Çözeltisinin Hazırlanması

1 mg NADPH, 109 μ l 90mM pH 7,4 olan fosfat tamponunda çözülerek 11 mM konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Çözelti her deney günü taze hazırlanmıştır. 0,22 mM final konsantrasyonda kullanılmıştır.

3.1.4.3.2 Potasyum Fosfat Tamponunun Hazırlanması

3,919 g K_2HPO_4 tartılmış ve bir miktar distile suda çözülerek hacmi 250 ml'ye tamamlanmıştır. 3,062 g KH_2PO_4 tartılmış ve bir miktar distile suda çözülerek hacmi 250 ml'ye tamamlanmıştır. K_2HPO_4 çözeltisi üzerine KH_2PO_4 ekleyerek pH ayarlaması yapılmış ve pH 7,4 olan 90 mM'lık tampon çözeltisi hazırlanmıştır.

3.1.4.3.3 Stok Etoksirezorufin Çözeltisinin Hazırlanması

1 mg etoksirezorufin 5,6 ml DMSO'da çözülerek 740 μ M'lık stok çözelti hazırlanmıştır. Fosfat tamponu ile 1:4 oranında dilüe edilerek deney ortamına 5 μ l eklendiğinde final konsantrasyonu 3,7 μ M olmuştur.

3.1.4.3.4 Stok Ketokonazol Çözeltisinin Hazırlanması

1 mg ketokonazol 0,470 ml DMSO'da çözülerek 4 mM konsantrasyonda stok ketokonazol çözeltisi hazırlanmıştır. Gerekli dilüsyonlar bu çözeltiden hareketle yapılmıştır.

3.1.4.4 Sitotoksisite Analizinde Kullanılan Çözeltiler

3.1.4.4.1 MCF-10A hücre hattı için gerekli eksiksiz büyüme ortamı

DMEM-F12 içerisine % 5 at serumu (horse serum) , 20 ng/ml epidermal büyüme faktörü, 0,5 µg/ml hidrokortizon ve 10 µg/ml insülin eklenerek eksiksiz büyüme ortamı hazırlanmıştır.

3.1.4.4.2 MCF-7 BUS ve MDA-MB-231 hücre hatları için gerekli eksiksiz büyüme ortamı

Fenol kırmızı içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içerisine % 10 fetal siğir serumu (FBS) eklenerek büyüme için gerekli eksiksiz besi ortamı hazırlanmıştır.

3.1.4.4.3 MTT [3(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] Çözeltisinin Hazırlanması

MTT boyası 5 mg/ml konsantrasyonda PBS içerisinde hazırlanmıştır. Filtre edilerek sterilize edilmiştir. Çözelti alüminyum folyo ile sarılarak saklanmıştır.

3.1.4.4.4 NADH çözeltisinin hazırlanması

Deney ortamındaki final konsantrasyonu 300 µM olacak şekilde PBS içerisinde ve her deney günü taze hazırlanmıştır.

3.1.4.4.5 Sodyum piruvat çözeltisinin hazırlanması

Deney ortamındaki final konsantrasyonu 770 µM olacak şekilde PBS içerisinde ve her deney günü taze hazırlanmıştır.

3.1.4.4.6 Metanol : Asetik asit çözeltisinin hazırlanması

75 ml metanol ile 25ml asetik asit karıştırılarak 3:1 metanol: asetik asit çözeltisi hazırlanmıştır.

3.1.4.4.7 %0,5 Kristal viyole çözeltisinin hazırlanması

0,5 mg kristal viyole tartılıp 100 ml distile suda çözülmüştür ve renkli şişede saklanmıştır.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Rutin Hücre Kültürü

Çalışmalarımızda ER + insan meme kanseri hücresi olan MCF-7 BUS, üçlü negatif insan meme kanseri hücresi olan MDA-MB-231 ve sağlıklı insan meme epitel hücresi olan MCF-10A hücre hatları kullanılmıştır. Üç hücre türü de yüzeye tutunan (adherent) hücrelerdir.

MCF-7 BUS hücre hattı Tufts Enstitüsü'nden Prof. Ana Soto, MDA-MB-231 hücre hattı ise Leiden Üniversitesi'nden Prof. John Meerman tarafından gönderilmiştir. MCF-7 BUS ve MDA-MB-231 hücreleri, 25 cm²'lik flasklarda % 10 FBS içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ile idame ettirilmiştir.

MCF-10A hücre hattı ATCC (American Type Culture Collection) den satın alınmıştır. Hücreler % 5 at serumu (horse serum) , 20 ng/ml epidermal büyüme faktörü, 0,5 µg/ml hidrokortizon ve 10 µg/ml insülin içeren DMEM-F12 ile idame ettirilmiştir.

Tüm hücre hatları 37 °C'de % 5 CO₂'li atmosfer ortamında inkübe edilmiştir. Hücreler % 70 doluluğa ulaştığında alt kültürleme protokolü uygulanmıştır. Besi ortamı flasktan uzaklaştırılmış ve flask bir kez PBS ile yıkanmıştır. 1 ml tripsin-EDTA çözeltisi

eklenmiş ve hücreler yüzeyden uzaklaşınca tripsinin aktivitesini durdurmak için 3 ml eksiksiz büyüme ortamı eklenmiştir. Elde edilen bu hücre süspansiyonu steril bir tüpe alınarak 153 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atılıp, hücreler 2 ml besi ortamında süspande edilmiş ve 1:4 -1:7 oranında yeni flaska aktarılmıştır.

3.2.2 ER Agonist/Antagonist Etkinin Belirlenmesi (E-Screen)

Olası ER agonist/antagonist etkinin belirlenmesinde Soto ve arkadaşları (Soto ve ark., 1995) tarafından geliştirilen ve Rasmussen ve arkadaşları (Rasmussen ve Nielsen, 2002) tarafından 96 kuyucuklu plakaya uyarlanmış olan E-screen yöntemi kullanılmıştır. ER agonisti etki, hormon içermeyen ortamda ER agonisti bileşik varlığında MCF-7 BUS hücre proliferasyonu ölçülerek belirlenmektedir.

Bileşiklerin olası ER antagonisti etkileri E-Screen yönteminin modifiye edilmesiyle oluşturulan iki basamaklı bir yaklaşımla değerlendirilebilmektedir (Soto, Maffini, Schaeberle ve Sonnenschein, 2006). Bu yaklaşıma göre ilk basamakta hücreler, östradiolün hücre proliferasyonunu belirgin ölçüde artıran en düşük konsantrasyonu ve bileşiğin farklı konsantrasyonları ile birlikte inkübe edilmektedir. Bileşiğin konsantrasyona bağlı olarak östradiolün proliferatif etkisini inhibe edip etmediği test edilmektedir. Bu basamakta etkili görülen bileşiklerin bu etkisinin reseptör aracılıklı bir etki mi yoksa sitotoksosite sonucu mu olduğu ikinci basamak uygulanarak araştırılmaktadır. Bu kez hücreler bileşiğin hücre proliferasyonunu inhibe etmede etkili olan en düşük konsantrasyonu ve östradiolün artan konsantrasyonları ile inkübe edilmektedir. Eğer ilk basamakta proliferasyonda gözlenen inhibisyon reseptör aracılıklı ise östradiolün artan konsantrasyonlarıyla etki tersine çevrilerek hücre proliferasyonunda artış gözlenmektedir. Şayet bileşiğin etkisi sitotoksiteden kaynaklanıyor ise ikinci basamakta östradiolün artan konsantrasyonları ile hücre proliferasyonunda artış görülmemektedir.

Hücrelerin tripsinizasyonu sonrası elde edilen hücre süspansiyonu santrifüj edilerek üst faz atılmış ve hücreler taze besi ortamında süspande edilerek hemasitometrede mikroskop altında sayılmıştır.

MCF-7 BUS hücreleri her bir kuyucukta 6000 hücre olacak şekilde ve 100 µl büyüme için gerekli besi ortamı içerisinde 96 kuyucuklu plakaya ekilmiş ve hücrelerin tutunması için 24 saat beklenmiştir. Sürenin sonunda besi yeri uzaklaştırılmıştır. ER agonisti etkinin araştırılması için test bileşikleri hormon içermeyen besi ortamı içerisinde final DMSO oranı % 0,5 i geçmeyecek şekilde kuyucuklara eklenmiş ve 144 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her bir plakada negatif kontrol olarak hormon içermeyen besi ortamı, taşıyıcı kontrol olarak % 0,5 DMSO içeren hormon içermeyen besi ortamı ve pozitif kontrol olarak da 10^{-10} M E_2 kullanılmıştır.

Antagonist etkinin belirlenmesinde hücreler E_2 'nin 10^{-10} M ve bileşiğin $1,37 \cdot 10^{-8}$ - 10^{-5} M aralığındaki konsantrasyonları ile 144 saat inkübe edilmişlerdir. Bu basamakta E_2 'nin proliferatif etkisini inhiye eden bileşikler ikinci basamakta da test edilmişlerdir. Hücreler, bileşiğin hücre proliferasyonunu belirgin derece azaltan en düşük konsantrasyonu ve östradiolün $4,57 \cdot 10^{-13}$ - 10^{-9} M aralığındaki konsantrasyonları ile 144 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresinin sonunda analiz ortamının kuyucuklardan uzaklaştırılmasıyla deney sonlandırılmıştır. Kuyucuklar oda sıcaklığındaki PBS ile yıkanarak ölü hücreler ve besi ortamı kalıntıları uzaklaştırılmıştır. 100 µl buz soğukluğunda % 10 TCA çözeltisi kuyucuklara eklenmiş ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de yarım saat bekletilerek hücrelerin yüzeye sabitlenmesi sağlanmıştır. Plakalar distile suyla 5 kez yıkanmış ve bir gece kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün kuyucuklara damlalık yardımıyla % 0,4 (a/h)'lük sülförödamın-B çözeltisi eklenmiş ve 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Proteinlere bağlanmamış fazla boyanın uzaklaştırılması için hücreler % 1'lik asetik asit çözeltisiyle 4-5 kez yıkanmış ve bir gece karanlıkta kurumaya bırakılmıştır. 100 µl 10 mM Tris baz çözeltisi (pH 10,7) eklenerek 20 dk orbital karıştırıcıda boyanın tamamen çözünmesi sağlanmış ve renk şiddeti çoklu plaka okuyucuda 492 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine göre proliferatif etki değerleri hesaplanmıştır. Proliferatif etki test edilen bileşik ile elde edilen hücre sayısının hormon içermeyen besi ortamında oluşan (negatif kontrol) hücre sayısına oranıdır (Soto ve ark., 1995).

PE = Hücre sayısı (bileşik veya E_2 varlığında) / Hücre sayısı (negatif kontrol)

3.2.3 Aromataz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Aromataz aktivitesi insan rekombinant aromataz enzimi ile floresans veren bir substrat olan 7-metoksi-4-triflorometilkumarin (MFC)'in kullanıldığı Corning® Supersomes™ Kit HTS CYP19-MFC kiti kullanılarak ölçülmüştür. 96 kuyucuklu plaka formatında yüksek hızlı taramaya olanak veren bu yöntem, MFC'nin aromataz enzimiyle 7-Hidroksitri-florometilkumarin (HFC)'e dönüşmesi ve floresans şiddetindeki azalmanın belirlenmesiyle inhibitör aktivitenin değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır.

Yönteme göre her bir kuyucuğa farklı konsantrasyonda test maddesi içeren 100 µl NADPH-kofaktör karışımı eklenmiştir. 37 °C'de 10 dakika inkübasyonun ardından tüm kuyucuklara 100 µl enzim-substrat karışımı eklenmiş ve 37 °C'de 30 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır. Kuyucuklara 75 µl durdurucu çözelti eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Floresans şiddeti 409 nm eksitasyon ve 530 nm emisyon dalga boyunda çoklu plaka okuyucuda ölçülmüş ve inhibitör aktivite kontrolün %'si olarak ifade edilmiştir. Pozitif kontrol olarak aromataz inhibitörü olan ketokonazol kullanılmıştır.

Test edilecek melatonin analoglarının aromataz inhibitör etkinlikleri önce 10^{-4} M konsantrasyonda taranmış, bu konsantrasyonda aktivite gösteren bazı bileşiklerin 8 farklı konsantrasyondaki aktiviteleri araştırılarak IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

3.2.3.1 Aromataz Aktivitesinin Dolaylı Olarak Ölçülmesi

MCF-7 BUS hücrelerinde, östrojeniz ortamda, testosteron aromataz enzimi aracılığıyla östradiole dönüştürülür. Oluşan östradiole bağlı olarak hücre proliferasyonu gerçekleşir ve böylece bileşiklerin aromataz enzimi üzerine inhibitör etkinlikleri dolaylı olarak değerlendirilmiş olur (Samuel Cos ve ark., 2005)

Yönteme göre MCF-7 BUS hücreleri 6000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 48 saat kuyucuk yüzeyine tutunmaya bırakılmıştır. Ardından kuyucuklardaki besi ortamı uzaklaştırılmış, hücreler hormon içermeyen besi ortamında 10 µM testosteron ve 10 µM test bileşiği ile 120 saat inkübasyona

bırakılmıştır. Sürenin sonunda hücre canlılığı MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir (Bkz. 3.2.5.1).

3.2.4 CYP1 Aktivitesi Ölçüm Yöntemi [7- Etoksirezorufin O-Dealkilasyon

(EROD) Yöntemi]

CYP1 enzim aktivitesi EROD yöntemiyle ölçülmüştür. CYP-1 e selektif bir substrat olan 7-etoksirezorufin, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 aktivitesiyle rezorufine dönüşür. Oluşan rezorufinin floresans şiddeti 530 nm ekzitasyon ve 582 emisyon dalga boyunda ölçülür.

Çalışmada kullanılan fenobarbitalle indüklenmiş sıçan karaciğer mikrozomları Prof. Dr. Hilmi ORHAN tarafından sağlanmıştır. CYP1 enzim kaynağı olarak mikrozom kullanılan çalışmalarda, deney ortamına 10 µl mikrozom, 90 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7,4), 0,22 mM NADPH, 3,7 µM 7-etoksirezorufin ve test bileşiği son hacim 1 ml olacak şekilde eklenmiştir. NADPH ilavesiyle reaksiyon başlatılmıştır. 30 °C 'de 10 dakika inkübasyonun ardından 2 ml soğuk aseton ilavesiyle reaksiyon durdurulmuştur. Soğutmalı santrifüjde 12500 g (+4 °C)'de 5 dakika santrifüjden sonra üst fazların floresans şiddeti 530 ekzitasyon ve 586 emisyon dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Kullanılan enzim miktarını azaltması ve aynı anda birçok örneğin ölçümüne olanak sağlaması bakımından yöntem 96 kuyucuklu plakaya uyarlanmıştır. Buna göre final hacmi 250 µl olan inkübasyon ortamına 90 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7,4), 0,22 mM NADPH, 3,7 µM 7- etoksirezorufin ve test bileşiği eklenerek 30 °C 'lik su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda 500 µl soğuk aseton ilavesiyle reaksiyon durdurulmuştur ve santrifüjden sonra üst fazın 250 µl'si 96 kuyucuklu siyah plakaya alınarak floresans şiddeti ölçülmüştür.

İnsan rekombinant CYP1B1 enzimi kullanılan çalışmalarda deney ortamında 1,25 pmol enzimi ve 0,2 µM substrat kullanılarak 37°C sıcaklıkta yöntem aynı şekilde uygulanmıştır. Ortamdaki final DMSO % 1'i geçmeyecek şekilde çalışılmıştır.

3.2.5 Sitotoksitenin Farklı Yöntemlerle Değerlendirilmesi

3.2.5.1 MTT Yöntemi

Sitotoksite çalışmalarında ER+ MCF-7 BUS ve üçlü negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ile sağlıklı meme epiteli hücresi olan MCF-10A hücreleri kullanılmıştır. Hücreler tripsinlenmeyi takiben santrifüj edilmiş ve daha sonra üst faz uzaklaştırılmıştır. Süspande edilen hücreler hemositometrede sayım sonrası 96 kuyucuklu plakalara 180 µl hacimde her bir kuyucukta 6000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler kuyucuk yüzeyine tutunmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Bu sürenin sonunda test maddeleri farklı konsantrasyonlarda ve final DMSO oranı % 0,5 olacak şekilde eklenmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak 171 µM Triton X-100, negatif kontrol grubu olarak sadece besi ortamı, çözücü kontrol grubu olarak ise % 0,5 DMSO içeren besi ortamı kullanılmıştır. Tüm test grupları en az 3 farklı kuyucukta çalışılmıştır. Test bileşikleriyle 24 ve/veya 72 saat inkübasyonun ardından kuyucuklardaki ortam uzaklaştırılarak deney sonlandırılmıştır.

Suda çözünebilen bir tetrazolyum tuzu olan MTT, mitokondrideki süksinat dehidrojenaz enzimiyle mor renkli formazan kristallerine dönüşmektedir. Formazan kristallerinin renk şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmekte ve hücre canlılığının bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Deney sonlandırıldıktan sonra kuyucuklar PBS ile bir kez yıkanarak besi ortamı atıkları uzaklaştırılmıştır. 40 µl büyüme için eksiksiz besi ortamı ve 10 µl MTT boyası kuyucuklara eklenmiş ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda ortam uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 150 µl DMSO eklenmiş ve boyanın çözünmesi sağlanmıştır. Renk şiddeti 550 nm'de çoklu plaka okuyucuda fotometrik olarak ölçülmüş ve hücre canlılığı kontrol grubuna oranla % cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.5.2 LDH yöntemi

Sitoplazmik bir enzim olan laktat dehidrojenaz (LDH) hücre membran hasarı durumunda hücre dışına sızar. Bu nedenle hücre dışına sızan LDH enzim

aktivitesinin ölçülmesi sitotoksitenin belirlenmesinde önemli bir parametredir. LDH enzimi pirüvatın laktata dönüşümünü katalizler. Reaksiyon sırasında kofaktör olarak ortamda tüketilen NADH'ın absorbansındaki azalma kinetik olarak ölçülür (Hassoun, Roche ve Stohs, 1993). Yönteme göre çalışmada kullanılan üç farklı hücre tipi de her bir kuyucukta 50000 hücre olacak şekilde ekilmiş ve hücreler 24 saat tutunmaya bırakılmıştır. Test maddeleri 10 µM final konsantrasyonda ve final DMSO oranı % 0,5'i geçmeyecek şekilde eklenmiştir. Bileşiklerle 4 saat inkübasyonun ardından deney ortamından 25 µl alınarak üzerine 135 µl PBS eklenmiş ve 37 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 20 µl NADH (final konsantrasyonu 300 µM) ve 20 µl sodyum pirüvat (final konsantrasyonu 770 µM) eklenerek aktivite 340 nm'de 4 dakika boyunca kinetik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar evrensel birim U/L formülüne göre hesaplanmıştır.

$$U/L (\mu\text{mol/dak/L}) = [(\Delta A/\text{dak})/6,3 \times 10^{-3}] \times (200/25)$$

200 = küvetteki toplam hacim (µL)

25 = alınan besi ortamı hacmi (µL)

6,3x10⁻³ = NADH'ın 339 nm'deki mikromolar absorpsiyon katsayısı

ΔA/dak = ΔA/(240/60) dakikadaki absorbans değişimi ortalaması

3.2.5.3 Sülfrodamin B yöntemi

Sülfrodamin B (SRB), hafif asidik koşullarda proteinlerin aminoasit rezidüleriyle elektrostatik kompleks oluşturan aminoksantan yapısında bir boyadır ve hücre protein miktarının ölçülmesini sağlamaktadır. Hücre protein miktarı hücre sayısı ile korelasyon gösterdiğinden bu yöntem ilaçlarla indüklenen sitotoksitenin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Skehan ve ark., 1990).

Üç farklı hücre tipi de her bir kuyucukta 50000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 24 saat tutunmaya bırakılmıştır. Test maddeleri 10 µM final konsantrasyonda ve ortamdaki final DMSO oranı % 0,5'i geçmeyecek şekilde hücrelerin üzerine eklenmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda kuyucuklardaki besi ortamı uzaklaştırılmış ve kuyucuklar 100 µl PBS ile yıkanmıştır. 100 µl buz soğukluğunda % 10 TCA çözeltisi eklenmiş ve +4°C'de yarım saat

bekletilerek hücrelerin yüzeye sabitlenmesi sağlanmıştır. Plakalar distile suyla 5 kez yıkanmış ve bir gece kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra % 0,4' lük SRB çözeltisi ile 20 dakika inkübasyona bırakılmış ve % 1' lik asetik asit çözeltisiyle 4-5 kez yıkanmıştır. Plakalar bir gece karanlıkta kurumaya bırakılmıştır. Kuyucuklara 100 µl 10 mM Tris baz çözeltisi (pH 10,7) eklenerek 20 dakika orbital karıştırıcıda boyanın tamamen çözünmesi sağlanmış ve renk şiddeti çoklu plaka okuyucuda 492 nm'de ölçülmüştür.

3.2.5.4 Koloni Oluşum Yöntemi

Koloni oluşum yöntemi, tek bir hücrenin bir koloni haline gelme yeteneğine dayanan ve uzun süreli (kronik) sitotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılan *in vitro* bir hücre sağkalım değerlendirme yöntemidir (Franken, Rodermond, Stap, Haveman ve Van Bree, 2006).

MCF-7 BUS ve MDA-MB-231 hücreleri 6 kuyucuklu plakaya 500 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat tutunmaya bırakılmıştır. Daha sonra test bileşikleri 10 µM konsantrasyonda, 3 ml taze büyüme ortamı içerisinde ve final DMSO oranı % 0,5'i geçmeyecek şekilde eklenmiştir. Test bileşikleri ile 15 gün inkübasyonun ardından deney ortamı uzaklaştırılmış ve kuyucuklar PBS ile yıkanmıştır. Kuyucuklara metanol: asetik asit (3:1) çözeltisi eklenmiş ve -20 °C'de 10 dakika bekletilerek hücrelerin kuyucuklara sabitlenmesi sağlanmıştır. Daha sonra kuyucuklar 2 ml PBS ile 2 kez yıkanmış ve % 0,5 kristal viyole çözeltisi ile 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler distile suyla yıkanmış ve 1 gece kurumaya bırakılmıştır. Boyanan koloniler mikroskopta sayılarak koloni etkinliği (KE) değerleri aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$\text{Koloni Etkinliği (KE)} = \frac{\text{Oluşan koloni sayısı}}{\text{Ekilen hücre sayısı}} \times 100$$

KE değerinin hesaplanmasının ardından maruziyet sonucu canlı kalan hücre fraksiyonu hesaplanmıştır.

$$\text{Canlı Hücre Fraksiyonu} = \frac{\text{Örneğin KE değeri}}{\text{Kontrol KE değeri}} \times 100$$

3.2.6 Moleküler Modelleme ile Yapı-Aktivite Çalışması

Moleküler modelleme çalışmaları Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Atilla Akdemir tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında etkinlikleri araştırılan bileşiklerin hedef proteinlerimiz olan aromataz (hCYP19A1) enzimi, insan rekombinant CYP1B1 (hCYP1B1) enzimi ve hER α reseptörü ile olası ligand-protein bağlanma ilişkileri araştırılmıştır.

RCSB Protein Data Bank (www.pdb.org) veribankasından hedef proteinlerimiz için kristal yapıları elde edilmiş, hazırlanmış ve docking çalışmalarında kullanılmıştır. hCYP19A1 enzimi için 3s79 kodlu kristal yapısı, hCYP1B1 enzimi için 3pmo kodlu kristal yapısı ve hER α reseptörü için 5ufx kodlu kristal yapısı indirilmiştir. Kristal yapılarına hidrojen atomları MOE bilgisayar programı (v2018.0101, Chemical Computing Group, Inc, Montreal, Kanada) "protonate 3D" yöntemini kullanılarak eklenmiştir (Labute, 2009). Daha sonra tüm su molekülleri, tampon molekülleri ve ligandlar silinerek protein yapıları mol2 dosyaları olarak kaydedilmiştir.

Docking çalışmalarında kullanılacak ligandların hazırlanması amacıyla tüm ligandlar için 3 boyutlu moleküler yapılar MOE bilgisayar programı kullanılarak hazırlanmıştır. Fizyolojik pH değerlerinde mevcut olan protomerler hazırlanmıştır. Daha sonra MMFF94x forcefield kullanılarak steepest-descent enerji minimizasyon protokolü uygulanmıştır. Ligandlar mol2 dosyası olarak kaydedilmiştir.

Docking çalışmaları için GOLD Suite programı kullanılmıştır (v5.6.2, CCDC Software Limited, Cambridge, BK). hCYP19A1 ve hCYP1B1 için P450 enzim ayarları ve ChemScore fonksiyonu, hER α için ChemScore fonksiyonu kullanılmıştır. Her ligand hedef proteinin bağlanma bölgesine 50 kez dock edilmiştir ve en yüksek skor gösteren pozlar analiz için kaydedilmiştir.

Docking sonuçlarının analizinde yüksek skor yanı sıra ligand ve bağlanma bölgesi arasında şekil uyumluluğu ve ligand-protein bağlanma ilişkilerinin uyumluluğu incelenmiştir. Ayrıca, ligandların düşük enerjili konformasyonda bulunmaları gerekmektedir.

3.2.7 İstatistiksel Değerlendirme

Gruplar arası farklılığın istatistiksel olarak değerlendirmesi IBM SPSS Statistics 25 programı kullanılarak non-parametrik Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. IC_{50} ve EC_{50} değerleri GraphPad Prism 5 programı kullanılarak hesaplanmıştır.



4 BULGULAR

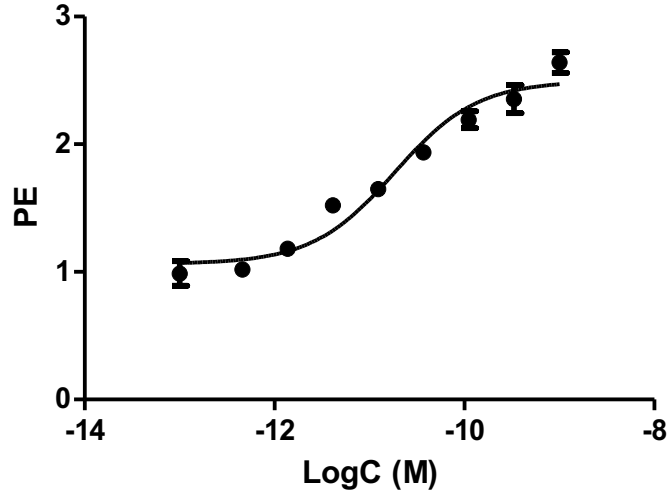
4.1 Yöntemlerin Laboratuvar Koşullarına Uyarlanması ile İlgili Bulgular

4.1.1 ER Agonist/Antagonist Etkinin Belirlenmesi İçin Uygulanan E-Screen

Yönteminin Kısmi Validasyonu

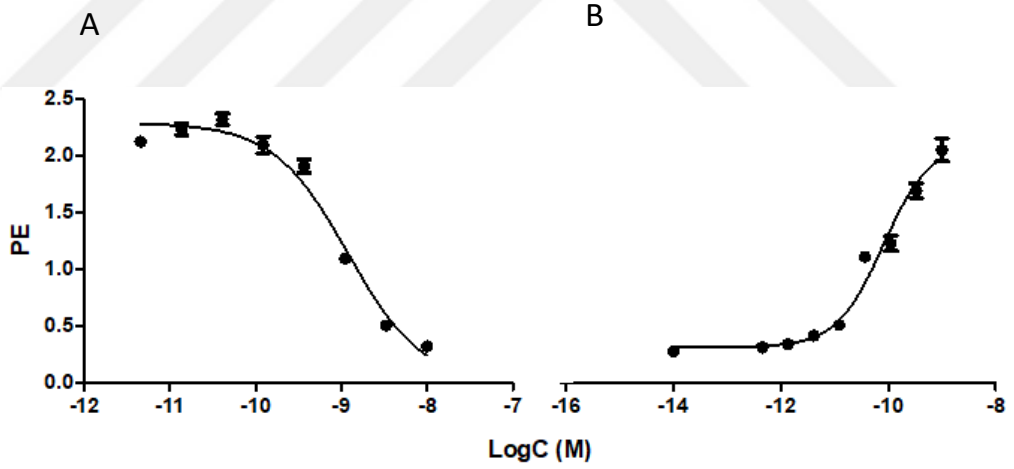
4.1.1.1 Standart Maddelerin EC_{50} ve IC_{50} Değerleri

Yöntemin kısmi validasyon çalışmaları kapsamında standart maddeler ile yöntemin performansı değerlendirilmiştir. Agonist etkinin belirlenmesinde 17- β -östradiol 8 farklı konsantrasyonda kullanılmış ve proliferatif etki-konsantrasyon grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.1). Östradiol $1,37 \cdot 10^{-12}$ M ve üzeri konsantrasyonlarda doza bağlı olarak hücre proliferasyonunda artışa neden olmuş ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Östradiolün EC_{50} değeri $1,84 \cdot 10^{-11}$ M olarak hesaplanmış ve bu değer literatür verileriyle uyumlu bulunmuştur (Van Lipzig ve ark., 2005).



EC50	1.840e-011
------	------------

Şekil 4.1 ER agonisti olduğu bilinen östradiol için proliferatif etki- konsantrasyon grafiği ve EC₅₀ değeri (PE: Proliferatif Etki).



Şekil 4.2 ER antagonisti olduğu bilinen fulvestran ile ER antagonisti etkinin iki basamaklı yaklaşım kullanılarak bilinen ER antagonisti fulvestran ile belirlenmesi ve proliferatif etki-konsantrasyon grafiği. A) 10^{-10} M E₂ ve artan fulvestran konsantrasyonları ile gözlenen proliferasyon. B) $1,1 \cdot 10^{-9}$ M fulvestran varlığında E₂'nin artan konsantrasyonları ile gözlenen proliferasyon (PE: Proliferatif Etki).

Antagonist etkinin belirlenmesinde kullanılan iki basamaklı yöntemin performansı ise bilinen ER antagonisti fulvestran ile değerlendirilmiştir. İlk basamakta hücreler 10^{-10} M östradiol varlığında fulvestranın $4,5 \cdot 10^{-12}$ - 10^{-8} M aralığındaki 8 farklı konsantrasyonuyla muamele edilmiştir. Fulvestranın 10^{-9} M'dan itibaren hücre proliferasyonunu belirgin derecede azalttığı görülmüş ve IC_{50} değeri $1,19 \cdot 10^{-9}$ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2 A). Bu değer literatürde fulvestran için $3 \cdot 10^{-9}$ M olarak bildirilen IC_{50} değeri ile uyumlu olduğu gözlenmiştir (Zimmermann, Liebl ve Von Angerer, 2005). Gözlenen bu etkinin reseptör aracılıklı olduğunu kanıtlamak amacıyla ikinci basamakta fulvestranın $1,1 \cdot 10^{-9}$ M'lık konsantrasyonu varlığında hücreler östradiolün $4,57 \cdot 10^{-13}$ - 10^{-9} M aralığındaki konsantrasyonları ile inkübe edilmiştir. Fulvestranın ER antagonisti etkisinin östradiolün artan konsantrasyonlarıyla tersine çevrildiği ve hücre proliferasyonunun arttığı bulunmuştur (Şekil 4.2 B). Bu bulgular ile yöntemin antagonist etkiyi belirlemede başarılı olduğu görülmüştür.

4.1.1.2 E-screen Yönteminin “Analiz İçi” ve “Analizler Arası”

Tekrarlanabilirliği

Yöntemin kısmi validasyon çalışmaları kapsamında yöntemin analiz içi ve analizler arası tekrarlanabilirliği araştırılmıştır. Aynı plakanın 6 farklı kuyucuğunda 17- β -östradiol ile inkübasyon sonucu elde edilen ortalama ve standart sapmalar ile gün içi tekrarlanabilirlik; 10 farklı günde 17- β -östradiol ile inkübasyon sonucu elde edilen ortalama ve standart sapma değerleri ile analizler arası tekrarlanabilirlik hesaplanmıştır. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi varyasyon katsayısı analiz içi % 4 ve analizler arası % 4,5 olarak hesaplanmış ve bu değerlere göre yöntemin tekrarlanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

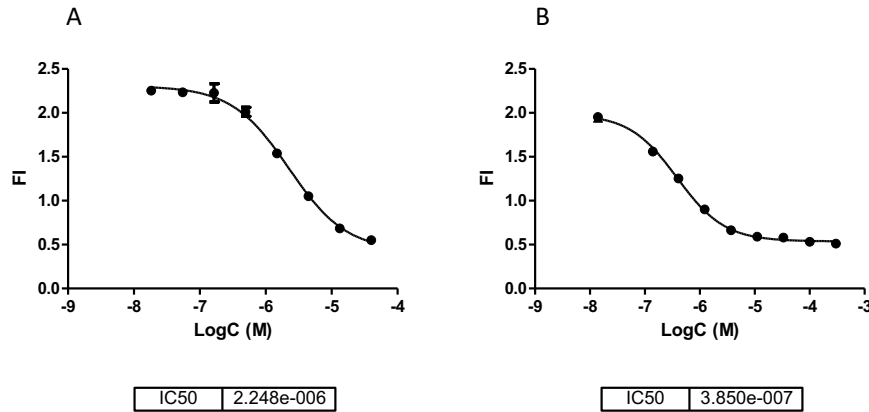
Tablo 4.1 E-screen yönteminin 17- β -östradiol (10^{-10} M) ile hesaplanan “analiz içi” ve “analizler arası” tekrarlanabilirliği

	Analiz içi (n=6)	Analizler arası (n=10)
Ortalama \pm SS	0,829 \pm 0,03	0,81 \pm 0,03
% Varyasyon katsayısı	4	4,5

4.1.2 Aromataz Aktivitesi Ölçüm Yönteminin Kısmi Validasyonu

4.1.2.1 Standart Maddelerin IC₅₀ Değerleri

Aromataz aktivitesi ölçüm yönteminin laboratuvar koşullarında kısmi validasyonu kapsamında standart maddeler ile yöntemin performansı değerlendirilmiştir. Ketokonazol ve aminoglutetimitin farklı konsantrasyonlarda aromataz enzim inhibitör etkinliğini gösteren grafikler Şekil 4.3'tedir. Ketokonazol ve aminoglutetimitin aromataz enzimini başarılı bir şekilde inhibe ettiği görülmüş ve elde edilen IC₅₀ değerleri literatürle uyumlu bulunmuştur (Tablo 4.2) (Wouters, De Coster, Goeminne, Beerens ve Van Dun, 1988).



Şekil 4.3 Ketokonazol (A) ve aminoglutetimitin (B) aromataz enzimi üzerine inhibitör etkileri ve IC₅₀ değerleri (FI: Floresans şiddeti).

Tablo 4.2 Ketokonazol ve aminoglutetimitin literatürde yer alan IC₅₀ değerleri ile bu çalışmadan elde edilen IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması (Wouters ve ark., 1988).

Standart Madde	Referans IC ₅₀	Ölçülen IC ₅₀
Ketokonazol	2.10 ⁻⁶ M	2,3. 10 ⁻⁶ M
Aminoglutetimit	6.10 ⁻⁷ M	3,9. 10 ⁻⁷ M

4.1.2.2 Aromataz Aktivitesi Ölçüm Yönteminin “Analiz İçi” ve “Analizler Arası” Tekrarlanabilirliği

Aromataz aktivitesi ölçüm yönteminin validasyonu için yöntemin analiz içi ve analizler arası tekrarlanabilirliği sabit miktarda rekombinant enzim ve substrat (50 µM MFC) varlığında enzim aktivitesi ölçülerek hesaplanmıştır. Analiz içi tekrarlanabilirlik aynı gün içinde 5 farklı kuyucukta ölçülen enzim aktivite değerlerinin, analizler arası tekrarlanabilirlik ise 3 farklı günde ölçülen enzim aktivite değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanarak belirlenmiştir.

Tablo 4.3 Aromataz aktivitesi ölçüm yönteminin “analiz içi” ve “analizler arası” tekrarlanabilirliği

	Analiz içi (n=5)	Analizler arası (n=3)
Ortalama ± SS	2,33 ± 0,07	2,27 ± 0,23
% Varyasyon katsayısı	2,8	10

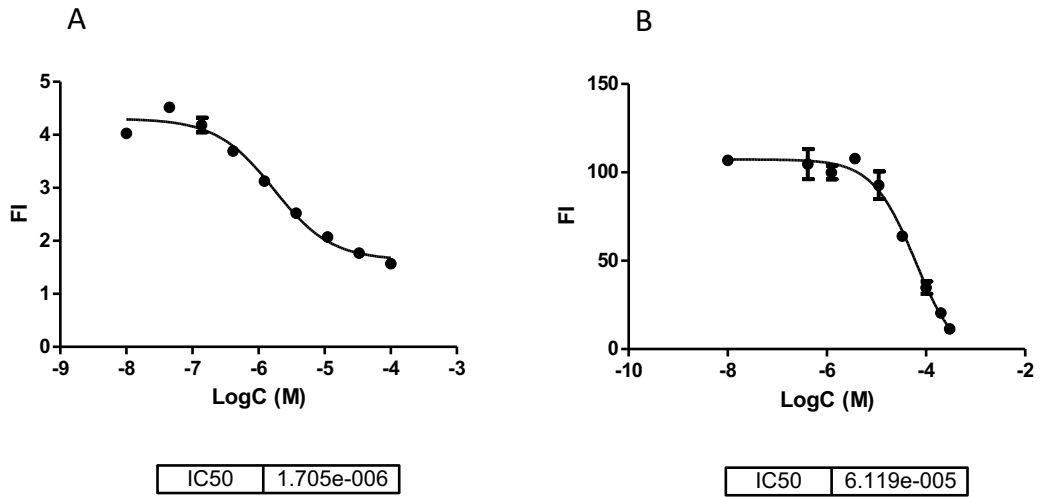
Tablo 4.3'te görüldüğü gibi analiz içi % 2,8'lik, analizler arası % 10'luk varyasyon katsayısı elde edilmiştir. Elde edilen varyasyon katsayılarına göre yöntemin tekrarlanabilirliğinin kabul edilebilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Aromataz aktivitesinin dolaylı ölçüm yönteminin validasyonu, Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN danışmanlığında laboratuvarımızda tamamlanmış olan Senem ÖZCAN SEZER'in 'Yeni Sentezlenen Melatonin Analoglarının Aromataz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması' başlıklı doktora tezi kapsamında yapılmış ve yayımlanmış olduğundan bu tez kapsamında yöntem validasyonu yapılmamıştır (Ozcan-Sezer ve ark., 2018).

4.1.3 CYP1 Aktivite Ölçüm (EROD) Yönteminin Kısmi Validasyonu

4.1.3.1 Standart Maddelerin IC₅₀ Değerleri

Yöntemin kısmi validasyon çalışmaları kapsamında standart maddeler ile yöntemin performansı değerlendirilmiştir. Genel CYP inhibitörü ketokonazol ve CYP1 inhibitörü alizarinin 9 farklı konsantrasyonda, mikrozomal CYP1 enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkinlikleri araştırılmıştır. Enzim inhibisyon grafikleri ve değerleri Şekil 4.4'de verilmiştir. IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında ketokonazolün (IC₅₀=1,7.10⁻⁶ M) alizarine (IC₅₀=6,1.10⁻⁵ M) kıyasla mikrozomal CYP1 enzim aktivitesini daha güçlü bir şekilde inhibe ettiği gözlenmiştir.



Şekil 4.4 Ketokonazol (A) ve alizarinin (B) mikrozomal CYP1 enzimleri üzerine inhibitör etkisi ve IC₅₀ değerleri (FI: Floresans şiddeti).

4.1.3.2 CYP1 Aktivite Ölçüm Yönteminin “Analiz İçi” ve “Analizler Arası” Tekrarlanabilirliği

CYP1 aktivite ölçüm yönteminin kısmi validasyonu için yöntemin analiz içi ve analizler arası tekrarlanabilirliği sıçan karaciğer mikrozomlarında CYP1 aktivitesi ölçülerek araştırılmıştır. Analiz içi tekrarlanabilirlik aynı gün içinde eşit miktarda mikrozom ve substrat olarak etoksirezorufin (3,7 µM) içeren 10 farklı tüpteki enzim aktivite değerlerinin, analizler arası tekrarlanabilirlik ise 3 farklı gündeki enzim aktivite değerlerinin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanarak belirlenmiştir.

Tablo 4.4’de görüldüğü gibi analiz içi % 3,4’ lük, analizler arası % 9,3’ lük varyasyon katsayısı elde edilmiştir. Analiz içi ve analizler arası % varyasyon değerlerine göre yöntemin başarılı bir şekilde yürüdüğü ve tekrarlanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

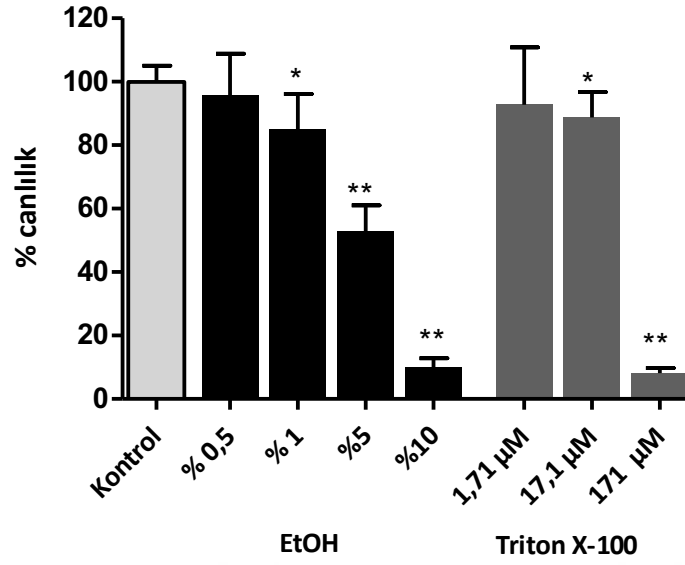
Tablo 4.4 CYP1 aktivite ölçüm “analiz içi” ve “analizler arası” tekrarlanabilirliği.

	Analiz içi (n=10)	Analizler arası (n=4)
Ortalama % inhibisyon ± SS	54,8 ± 1,9	48,4 ± 4,5
% Varyasyon katsayısı	3,4	9,3

4.1.4 Sitotoksite Ölçüm Yöntemlerinin Kısmi Validasyonu

4.1.4.1 MTT Yönteminin Kısmi Validasyonu

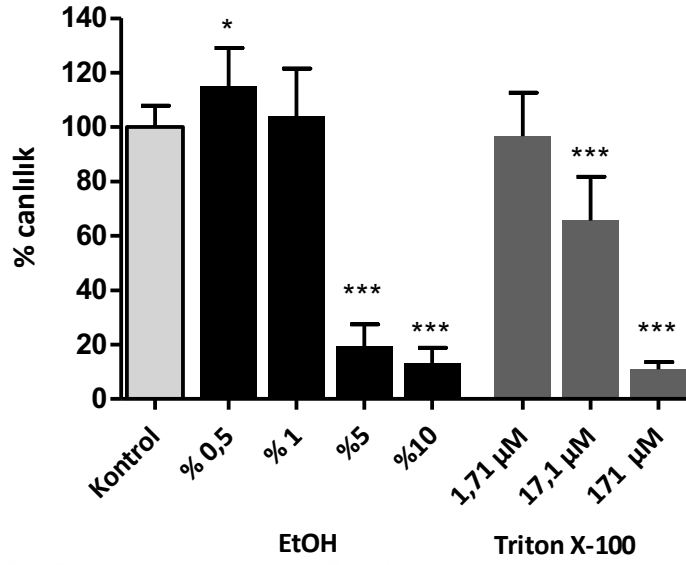
MTT yönteminin kısmi validasyonu için sitotoksik oldukları bilinen Triton X-100 ve etanol çözeltilerinin tez kapsamında kullanılan hücre hatlarıyla, farklı konsantrasyonlarda 24 saat inkübasyonu sonucu canlılık üzerine etkileri değerlendirilmiştir.



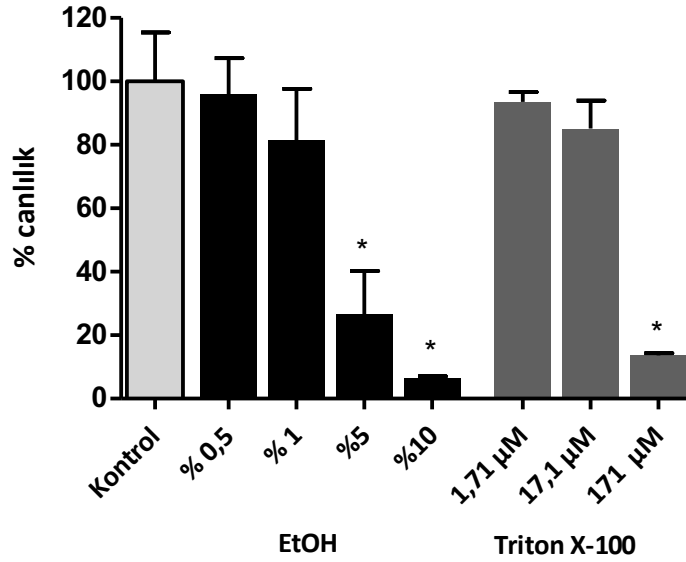
Şekil 4.5 MCF-10A hücrelerinde EtOH ve Triton X-100'ün sitotoksik etkisinin MTT yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma kontrol grubuna göre yapılmıştır (* p<0,05, ** p<0,005, EtOH: Etanol).

MCF-10A hücrelerinde etanol ve Triton X-100'ün hücre canlılığını doza bağlı olarak ve istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı görülmüştür (Şekil 4.5). Benzer şekilde MCF-7 BUS ve MDA-MB-231 hücrelerinde de Triton X-100 ve etanolün artan konsantrasyonlarda hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttıkları saptanmıştır (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7)

Triton X-100'ün 171 µM konsantrasyonda üç hücre tipinde de sitotoksik olduğu saptanmış ve ileri çalışmalarımızda pozitif kontrol grubu olarak kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.6 MCF-7 BUS hücrelerinde EtOH ve Triton X-100'ün sitotoksik etkisinin MTT yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma kontrol grubuna göre yapılmıştır (* p<0,05, ***p<0,001, EtOH: Etanol).



Şekil 4.7 MDA-MB-231 hücrelerinde EtOH ve Triton X-100'ün sitotoksik etkisinin MTT yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma kontrol grubuna göre yapılmıştır (* p<0,05, EtOH: Etanol).

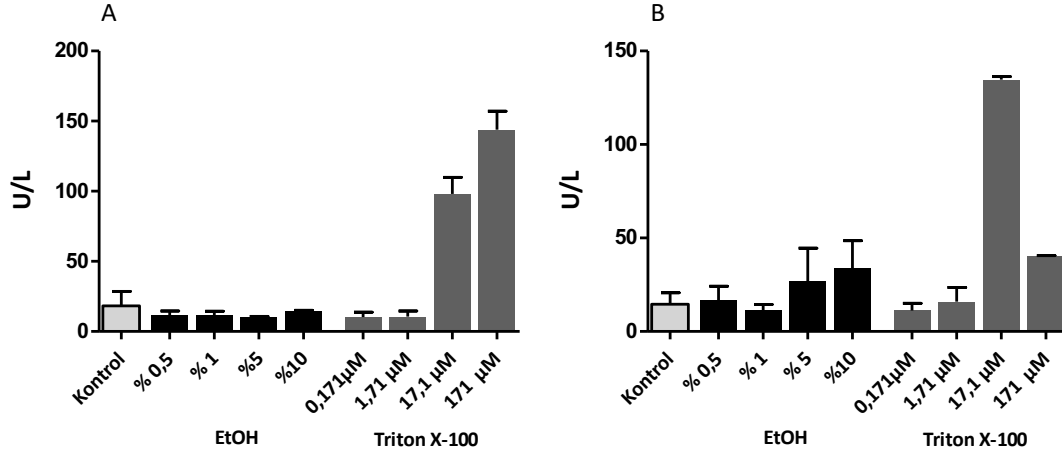
Yöntemin kısmi validasyon çalışmaları kapsamında MCF-7 BUS hücrelerinde yöntemin analiz içi ve analizler arası tekrarlanabilirliği araştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan Triton X-100 (171 µM) ile aynı gün içinde 4 farklı kuyucuktan elde edilen absorbans değerleri kullanılarak analiz içi, 4 farklı günde aynı konsantrasyonda Triton X-100 ile yapılan çalışmalardan elde edilen absorbans değerleri kullanılarak ise analizler arası tekrarlanabilirlik hesaplanmış, % varyasyon katsayısı olarak ifade edilmiştir (Tablo 4.5). Analiz içi % 3,1, analizler arası % 8,3 olarak bulunun varyasyon katsayısı değerlerinin kabul edilebilir sınırlarda olduğu görülmüş ve yöntemin tekrarlanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.5 MCF-7 BUS hücrelerinde sitotoksitenin MTT yöntemi ile belirlenmesinde Triton X-100 (171 µM) ile elde edilen analiz içi ve analizler arası tekrarlanabilirlik düzeyleri

	Analiz içi (n=4)	Analizler arası (n=4)
Ortalama Absorbans Şiddeti ± SS	0,1 ± 0,002	0,05 ± 0,005
% Varyasyon katsayısı	3,1	8,3

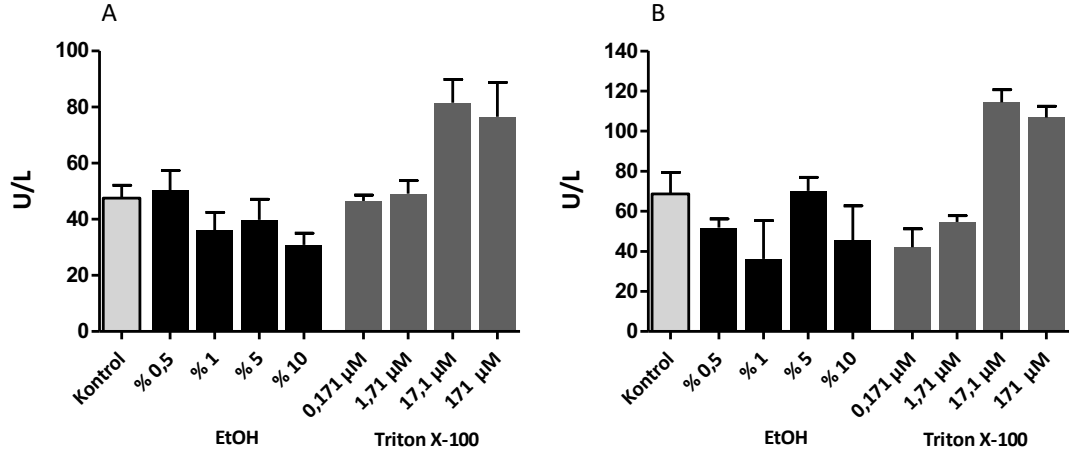
4.1.4.2 LDH Aktivitesi Ölçüm Yönteminin Kısmi Validasyonu

MCF-10A hücrelerinde etanol ve Triton X-100 ile muamele sonucu oluşan membran hasarına bağlı olarak besi ortamına salınan LDH aktiviteleri ölçülmüştür. Etanolün hiçbir konsantrasyonu 4 saat inkübasyon sonucu MCF-10A hücrelerinde membran hasarına neden olmamıştır. 24 saat inkübasyon sonucunda ise % 5 ve % 10 oranında etanol varlığı membran hasarına neden olmuş ve LDH aktivitesinde artış gözlenmiştir. Triton X-100'ün 17,1 µM konsantrasyonda, zamana bağlı olarak LDH aktivitesinde artışa neden olduğu bulunmuştur (Şekil 4.8).

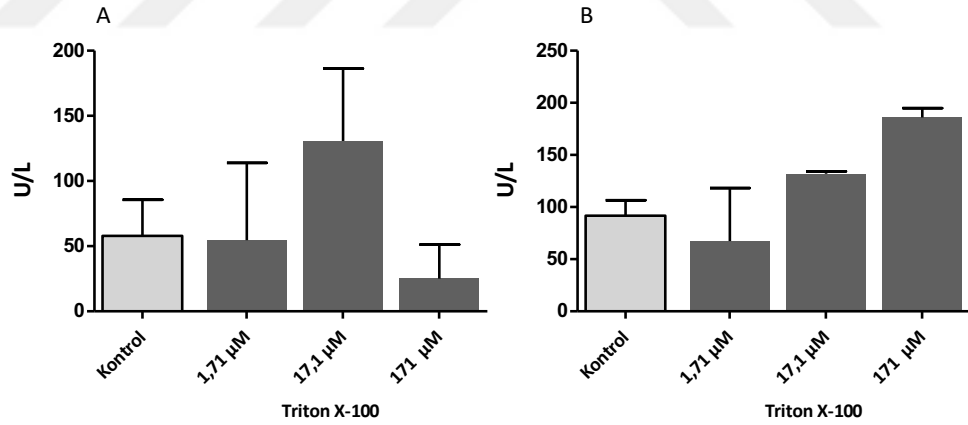


Şekil 4.8 MCF-10A hücrelerinde EtOH ve Triton X-100 ile A) 4 saat B) 24 saat inkübasyon sonucu besi ortamında saptanan LDH aktivitesi. Barlar üç farklı çalışmanın “ortalama \pm standart sapma” değerlerini göstermektedir. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma kontrol grubuna göre yapılmıştır (EtOH: Etanol).

Etanol, MCF-7 BUS hücrelerinde 4 ve 24 saat inkübasyon sonucu LDH enzim aktivitesinde doza bağlı anlamlı bir artışa neden olmamıştır. Triton X-100 ise MCF-7 BUS hücrelerinde 17,1 μ M ve 171 μ M konsantrasyonda, LDH aktivitesinde artışa neden olmuştur (Şekil 4.9). LDH aktivitesinde gözlenen artışın, dolayısı ile Triton X-100 ile indüklenen membran hasarının uzayan inkübasyon süreleri ile arttığı da görülmüştür (Şekil 4.9 A ve B).



Şekil 4.9 MCF-7 BUS hücrelerinde EtOH ve Triton X-100 ile A) 4 saat B) 24 saat inkübasyon sonucu besi ortamında saptanan LDH aktivitesi. Barlar üç farklı çalışmanın “ortalama \pm standart sapma” değerlerini göstermektedir. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma kontrol grubuna göre yapılmıştır (EtOH: Etanol).

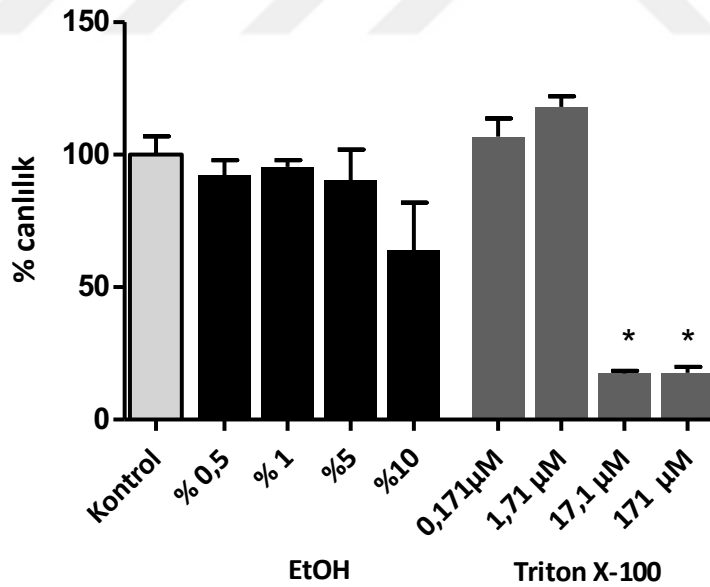


Şekil 4.10 MDA-MB-231 hücrelerinde Triton X-100 ile A) 4 saat B) 24 saat inkübasyon sonucu besi ortamında saptanan LDH aktivitesi. Barlar üç farklı çalışmanın “ortalama \pm standart sapma” değerlerini göstermektedir. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma kontrol grubuna göre yapılmıştır.

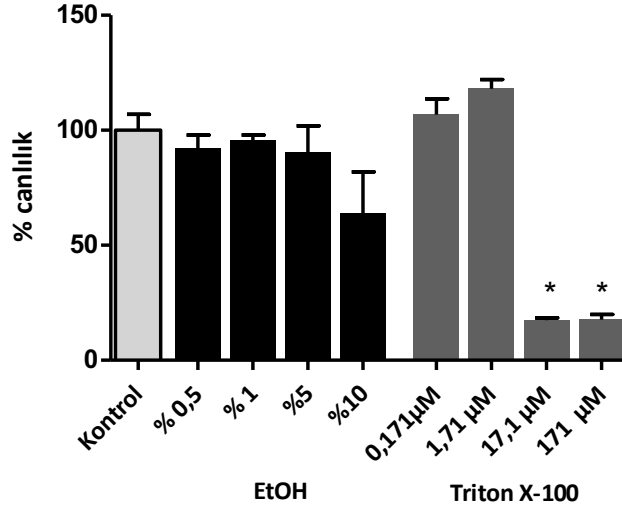
Triton X-100, 17,1 µM konsantrasyonda MDA-MB-231 hücreleri ile 4 saat inkübe edildiğinde LDH aktivitesinde artışa neden olurken 171 µM konsantrasyonda aktivitede artış gözlenmemiştir. MDA-MB-231 hücrelerinin Triton X-100 ile 24 saat inkübasyonu sonucunda membran hasarına bağlı LDH aktivitesinde doza bağlı olarak artmıştır (Şekil 4.10).

4.1.4.3 Sülfrodamin B Yönteminin Kısmi Validasyonu

Sitotoksik oldukları bilinen Triton X-100 ve etanolün MCF-10A ve MCF-7 BUS hücrelerindeki canlılık üzerine etkileri sülfrodamin B yöntemi ile değerlendirilmiştir. MCF-10A hücrelerinde etanol sadece ortamda % 10 oranında bulunduğu durumda sitotoksik etkili bulunmuştur (Şekil 4.11). MCF-7 BUS hücrelerinde ise % 5 ve % 10 oranında etanolün sitotoksik etkili olduğu belirlenmiştir. Triton X-100 ün 17,1 µM ve 171 µM konsantrasyonlarda her iki hücre tipinde de sitotoksik etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.12).

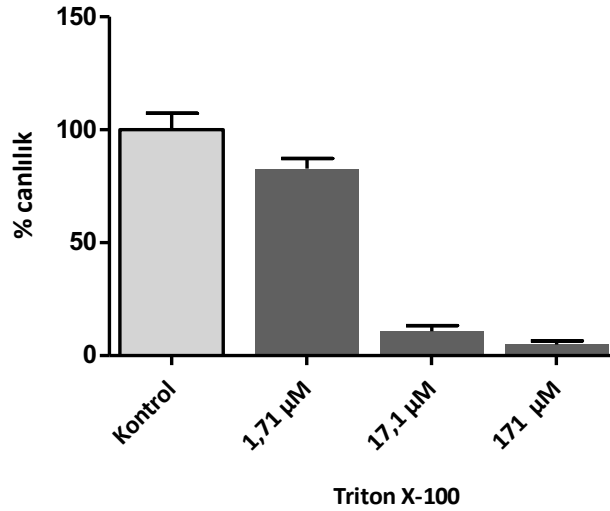


Şekil 4.11 MCF-10A hücrelerinde EtOH ve Triton X-100'ün sitotoksik etkisinin sülfrodamin B yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma kontrol grubuna göre yapılmıştır (* p<0,05, EtOH: Etanol).



Şekil 4.12 MCF-7 BUS hücrelerinde EtOH ve Triton X-100'ün sitotoksik etkisinin sülforodamin B yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma kontrol grubuna göre yapılmıştır (EtOH: Etanol).

Triton X-100'ün MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksitesinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 MDA-MB-231 hücrelerinde Triton X-100'ün sitotoksik etkisinin sülforodamin B yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma kontrol grubuna göre yapılmıştır (EtOH: Etanol).

4.1.4.4 Koloni Oluşum Yönteminin Kısmi Validasyonu

Yöntemin kısmi validasyon çalışmaları kapsamında MDA-MB-231 hücrelerinde yöntemin analiz içi tekrarlanabilirliği araştırılmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılan % 0,5 DMSO içeren büyüme ortamı ile aynı gün içinde farklı kuyulardan elde edilen koloni etkinliği verileri kullanılarak analiz içi tekrarlanabilirlik hesaplanmış ve % varyasyon katsayısı olarak ifade edilmiştir (Tablo 4.6). Analiz içi yüzde varyasyon katsayısı % 9,8 olarak bulunmuş ve yöntemin tekrarlanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.6 MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşum yönteminde % 0,5 DMSO ile elde edilen analiz içi tekrarlanabilirlik düzeyleri

	Analiz içi (n=4)
Ortalama Koloni Etkinliği \pm SS	13,7 \pm 1,35
% Varyasyon katsayısı	9,8

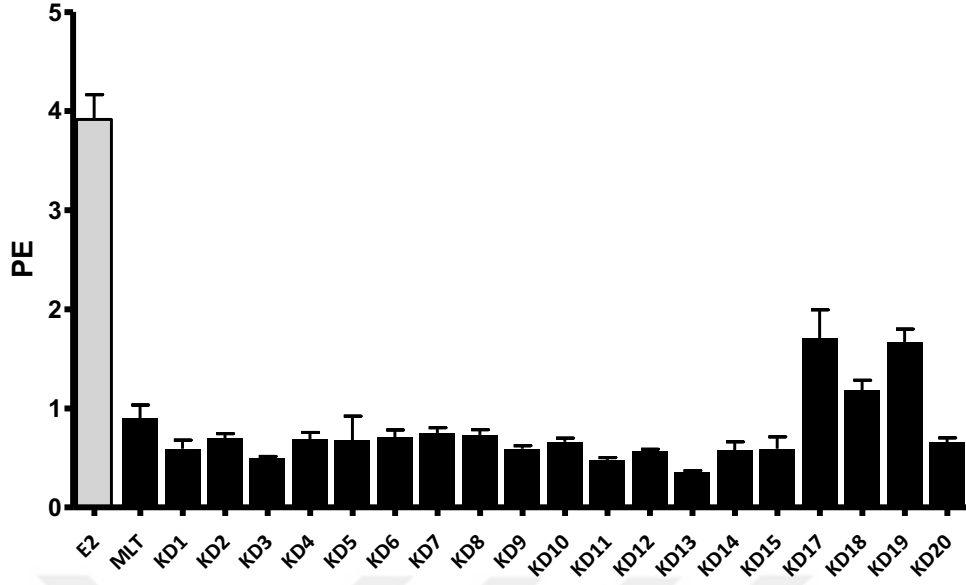
4.2 Melatonin Analoglarının Antikanser İlaç Hedefleri Üzerine Etkilerinin

Araştırılması ile İlgili Bulgular

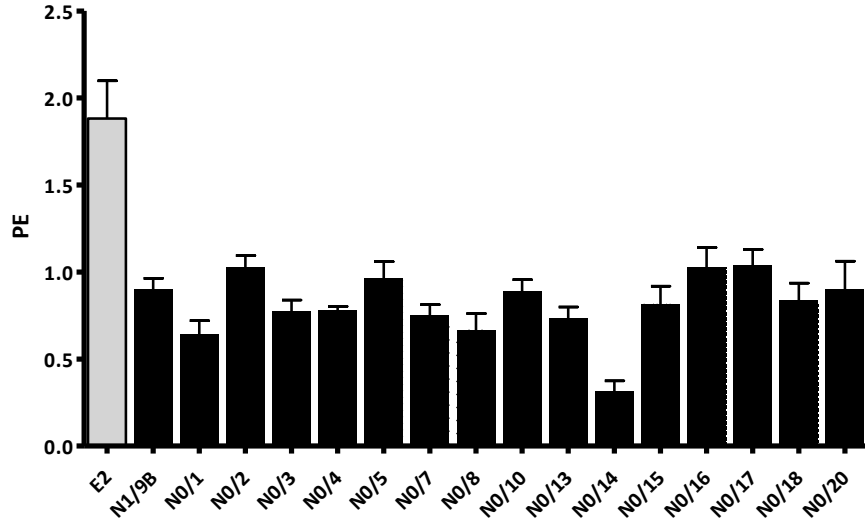
4.2.1 Östrojen Reseptör Agonist/Antagonist Etkinliklerin Araştırılması

4.2.1.1 Tek Doz Tarama Çalışmaları

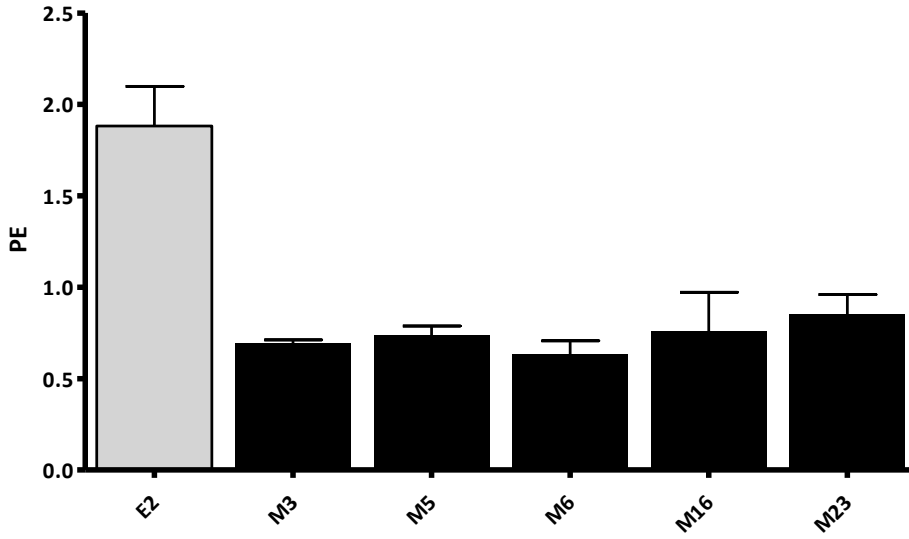
Öncelikle bileşiklerin 10 μ M konsantrasyonda olası agonist/antagonist etkinlikleri E-screen yöntemi ile araştırılmış ve bu dozlarda etkili olan “hit” moleküllerin saptanması amaçlanmıştır. ER agonist etkinin belirlenmesinde MCF-7 BUS hücreleri östrojen içermeyen ortamda sadece test bileşikleriyle inkübe edilmiş ve hücre proliferasyonuna bağlı olarak proliferatif etki değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.14 1-etilindol grubu bileşiklerin (10 µM) E-Screen yöntemi ile elde edilen proliferatif etki (PE) değerleri (E₂: östradiol, MLT: Melatonin).



Şekil 4.15 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin (10 µM) E-Screen yöntemi ile elde edilen proliferatif etki (PE) değerleri (E₂: östradiol).

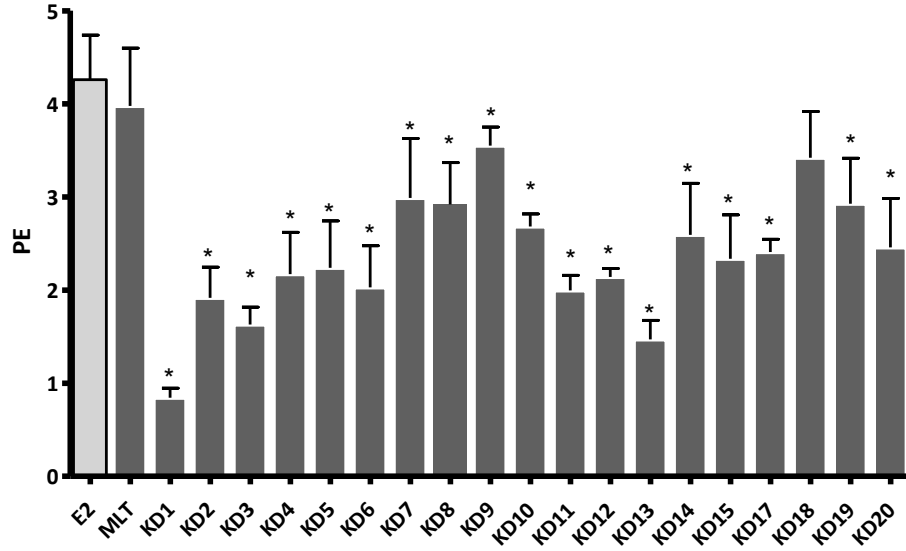


Şekil 4.16 2-metilindol grubu bileşiklerin (10 μ M) E-Screen yöntemi ile elde edilen proliferatif etki (PE) değerleri (E₂: östradiol).

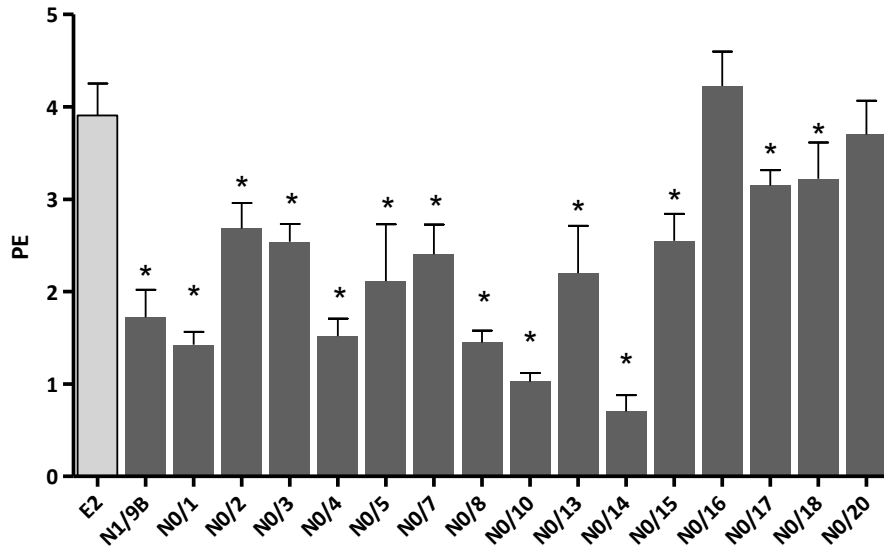
1-etilindol grubu bileşiklerden KD17, KD18 ve KD19 dışındaki hiçbir bileşiğin östrojenik etkili olmadığı görülmüştür (Şekil 4.14). 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu ve 2-metil grubu bileşiklerden hiçbiri östrojenik etkili bulunmamıştır (Şekil 4.15, Şekil 4.16).

Bileşiklerin olası östrojenik etkileri kontrol edildikten sonra bazı analogların proliferatif etki değerlerinin 1'in altında bulunması bu bileşiklerin östrojen reseptör antagonisti olabileceğini düşündürmüştür. Bileşiklerin olası ER antagonisti etkileri ortamda 0,1 nM östradiol ve 10 μ M test bileşiği varlığında araştırılmıştır.

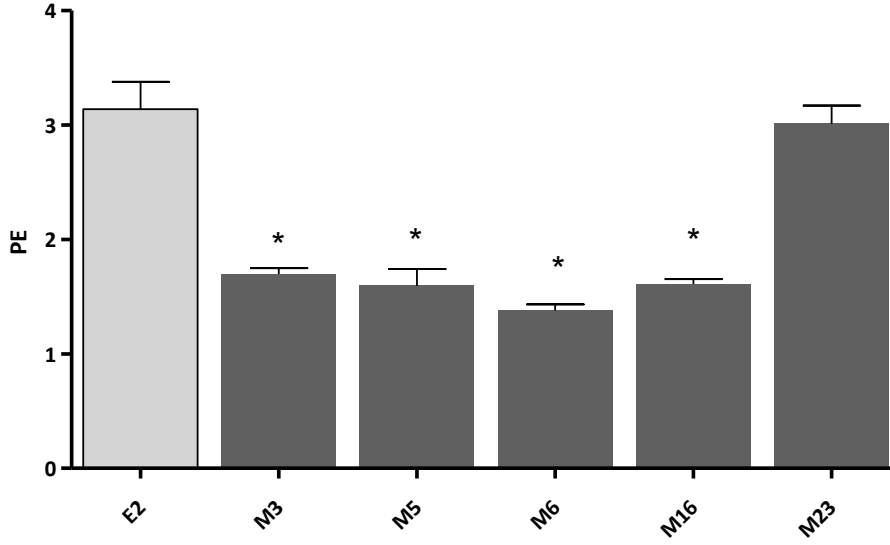
1-etilindol grubu bileşiklerden KD1, KD3 ve KD13' ün (Şekil 4.17); 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerden N1/9B, N0/1, N0/4, N0/8, N0/10 ve N0/14' ün (Şekil 4.18) ve 2-metilindol yapısındaki bileşiklerden M3, M5, M6' nın (Şekil 4.19) ortamda östrojen varlığında dahi hücre proliferasyonunu güçlü bir şekilde engellediği görülmüştür.



Şekil 4.17 1-etilindol grubu bileşiklerin (10 μ M), 0,1 nM E_2 varlığında MCF-7 BUS hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin E-Screen yöntemi ile değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma E_2 grubuna kıyasla yapılmıştır (* $p < 0,05$, E_2 : östradiol, PE: proliferatif etki).



Şekil 4.18 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin (10 μ M), 0,1 nM E_2 varlığında MCF-7 BUS hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin E-Screen yöntemi ile değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma E_2 grubuna göre yapılmıştır (* $p < 0,05$, E_2 : östradiol, PE: proliferatif etki).



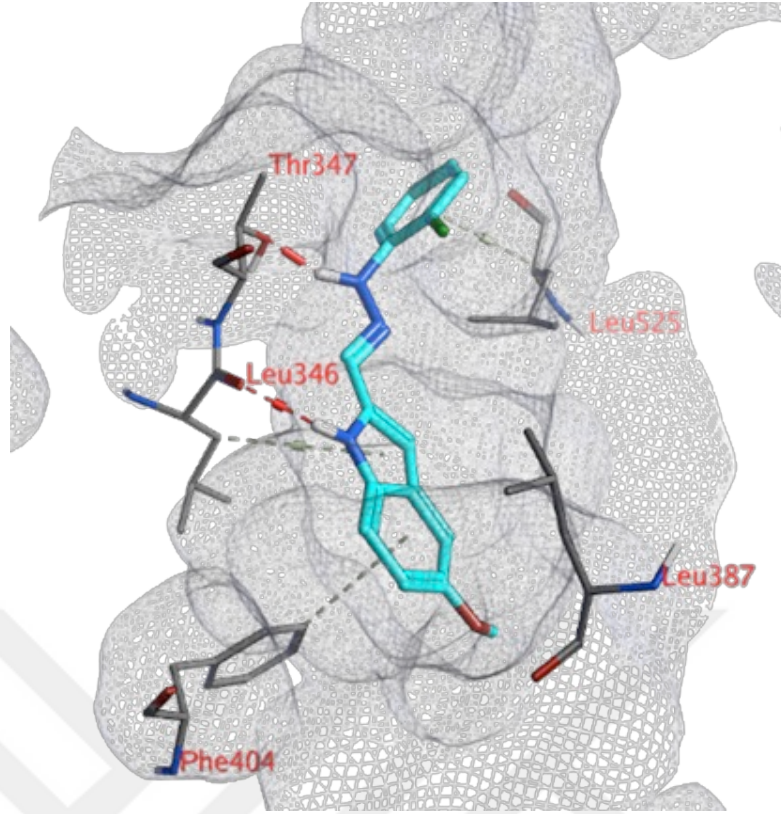
Şekil 4.19 2-metilindol grubu bileşiklerin (10 μ M), 0,1 nM E₂ varlığında MCF-7 BUS hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerinin E-Screen yöntemi ile değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma E₂ grubuna göre yapılmıştır (* p<0,05, E₂: östradiol, PE: proliferatif etki).

4.2.1.2 *hER α Docking Çalışması Bulguları*

1-etilindol ve 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşikleri ile hER α (5ufx) kristal yapısı arasındaki ligand-protein bağlanma ilişkileri araştırılmıştır.

Elde edilen docking pozlarının çoğu benzerlik göstermektedir. Ligandların fenil grubu Met343, Leu525 ve Val533 aminoasitlerinin yan zincirlerinin yakınında bulunmakta ve hidrofobik etkileşimler oluşturmaktadır. Fenil grubuna bitişik amino grubu Thr347'nin yan zincir hidroksil grubu ile hidrojen bağları oluşturmaktadır. Bisiklik kısım, Leu384, Met388, Met421, Phe425, Leu436, Ala350 ve Leu525 tarafından oluşturulan hidrofobik boşlukta bulunmaktadır. 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşikler buna ek olarak Leu346 ile hidrojen bağı oluşturabilmektedirler (Şekil 4.20).

Bu sonuçlara dayanarak N0/4, KD2 ve KD4 bileşiklerinin hER α reseptörüne bağlanması öngörülmektedir.

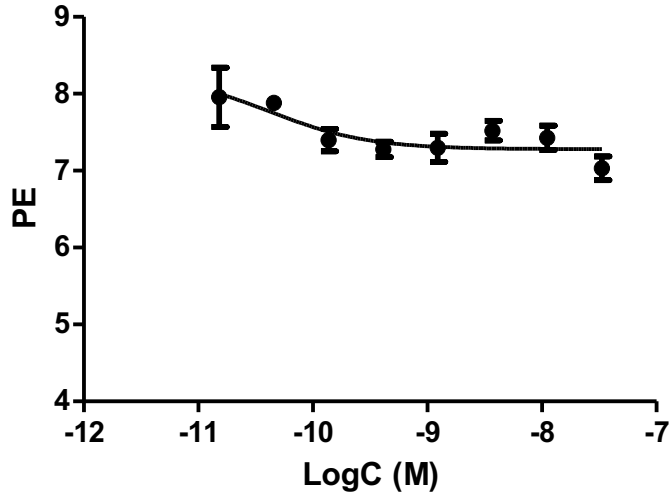


Şekil 4.20 NO/4 bileşiğinin ERα bağlanma bölgesindeki docking pozunu.

4.2.1.3 Melatonin ve Seçilen Analoglarının IC₅₀ Değerlerinin

Hesaplanması

Referans bileşik olan melatoninin fizyolojik/farmakolojik konsantrasyonlarının, 10^{-10} M östradiol varlığında, hücre proliferasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Melatoninin, çalışılan konsantrasyonlarda ($3,3 \cdot 10^{-8}$ - $1,5 \cdot 10^{-11}$ M), östradiolün neden olduğu hücre proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde inhibe etmediği belirlenmiştir (Şekil 4.21).



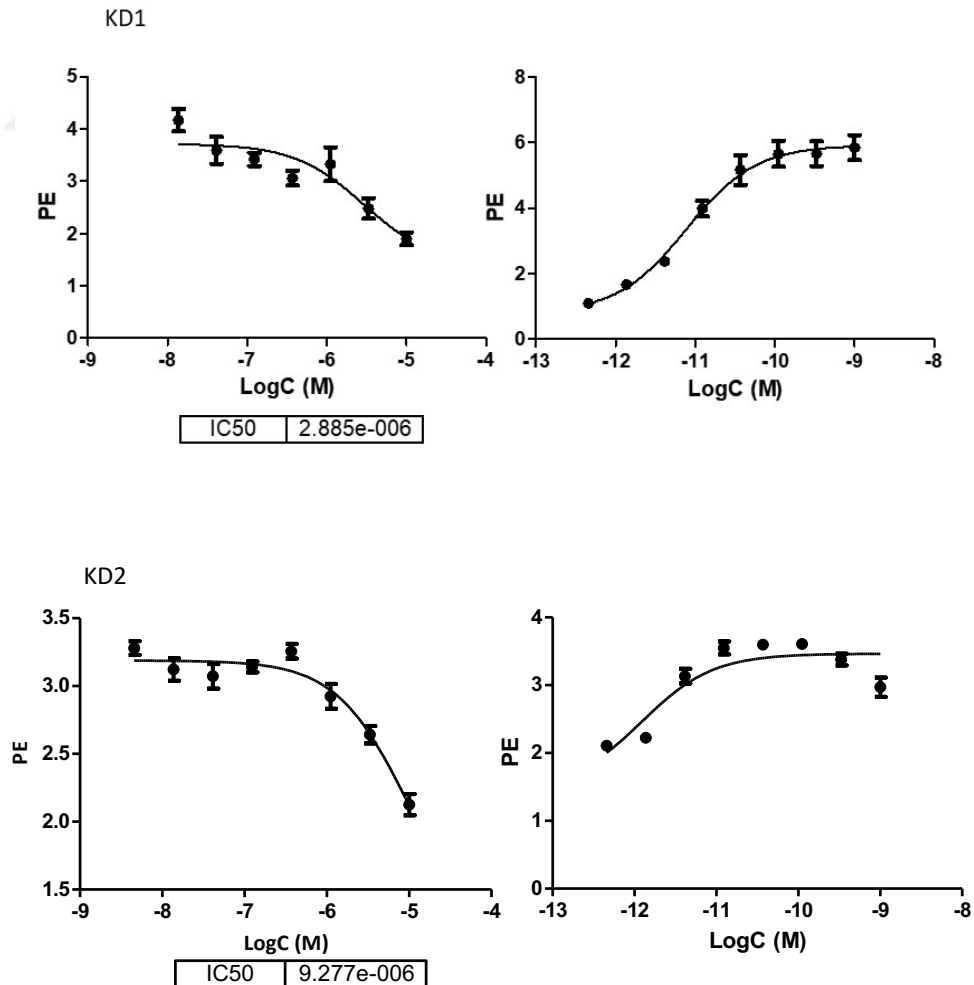
Şekil 4.21 Melatoninin 0,1 nM östradiol varlığında MCF-7 BUS hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisinin E-Screen yöntemi ile değerlendirilmesi (PE: proliferatif etki).

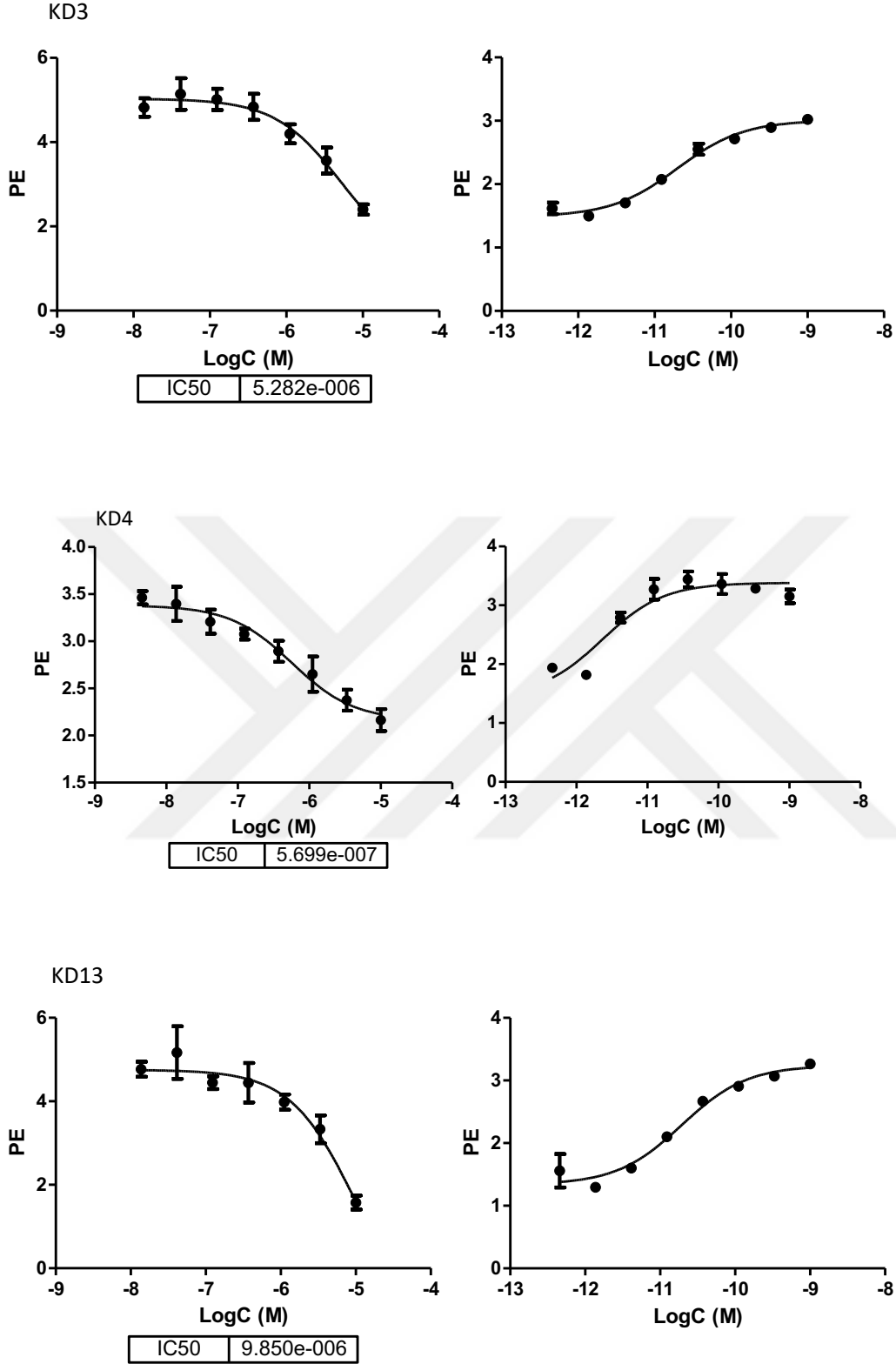
Tek doz tarama çalışması sonucu hücre proliferasyonunu azalttığı gözlenen melatonin analogu bileşikler ile moleküler modelleme çalışması sonuçlarına göre ER antagonisti olabileceği öngörülen bazı analogların (KD2 ve KD4) östrojen reseptör antagonisti etkinlikleri iki basamaklı yaklaşımla değerlendirilmiştir. 1-etilindol grubunda test edilen bileşiklerin tamamı (Şekil 4.22), 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubunda test edilen analoglardan ise N0/1 dışındaki tüm bileşikler yöntemin ilk basamağında östradiol varlığında hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir (Şekil 4.23). Moleküler modelleme çalışması sonucu önerilen KD4 bileşiği, en düşük IC_{50} değeri ile ($5,7 \cdot 10^{-7} M$) östradiole bağlı hücre proliferasyonunu inhibe eden en güçlü bileşik olmuştur.

İkinci basamakta ise hücreler test edilen bileşiğin proliferasyonu belirgin olarak azaltan en düşük konsantrasyonu ve östradiolün artan konsantrasyonları ($4,57 \cdot 10^{-13} - 10^{-9} M$) ile muamele edilmiştir. KD1, KD3, KD4, KD13, N1/9B ve N0/4 bileşikleri ve östradiolün artan konsantrasyonuyla inkübasyon sonucu hücre proliferasyonunun arttığı gözlenmiştir. Bu durum ilk basamaktaki etkinin sitotoksiteden kaynaklanmadığını ve antagonist bir etki olduğunu göstermektedir. KD2, N0/8 ve N0/14 bileşikleri ise birinci basamakta hücre proliferasyonunu azaltırken ikinci basamakta bu etki östradiol tarafından tersine çevrilememiş, proliferasyonda doza

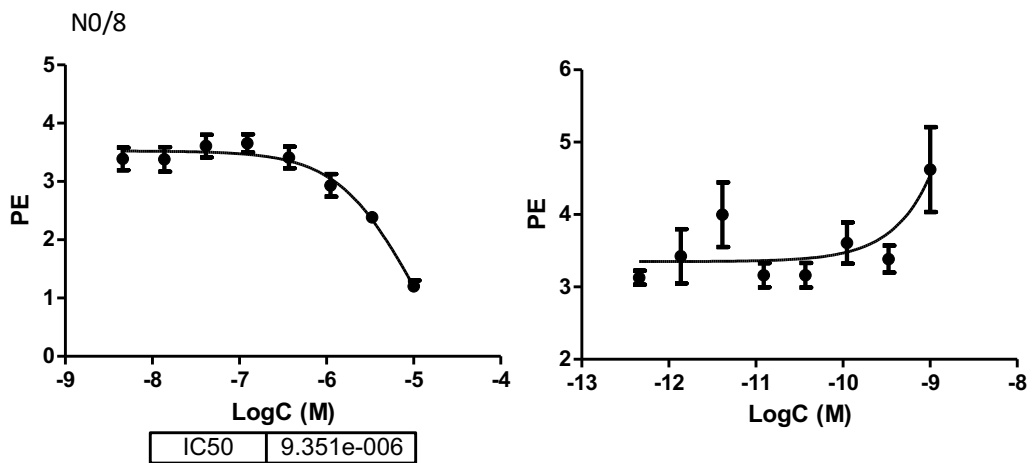
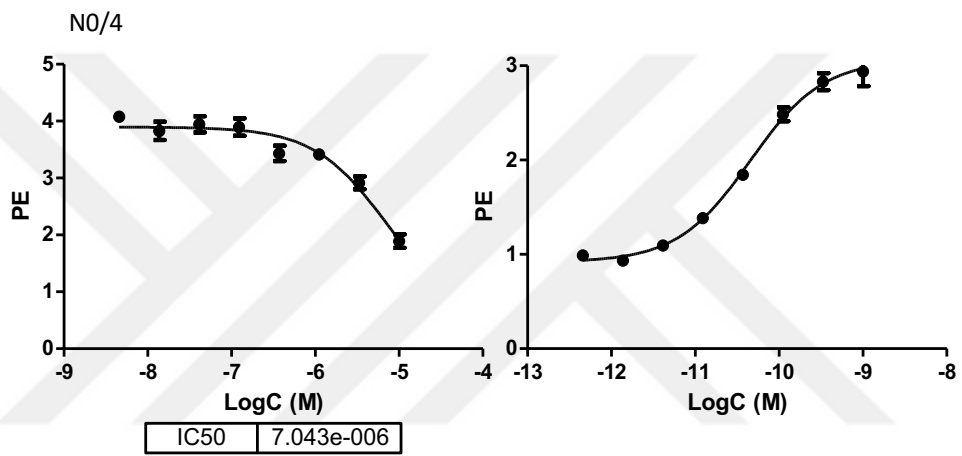
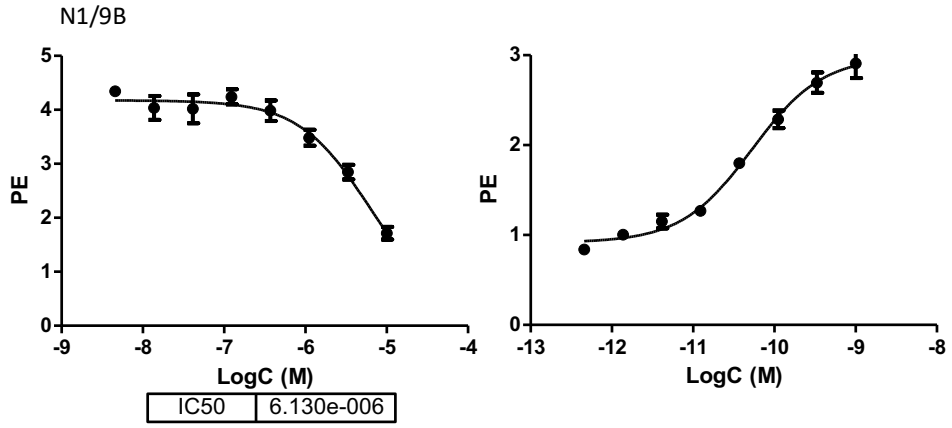
bağlı bir artış gözlenmemiştir (Şekil 4.23). N0/1 bileşiği ise ilk basamakta doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe edemediğinden bu bileşikle ikinci basamağa geçilmemiştir. Sonuç olarak 1-etilindol grubundan KD1, KD3, KD4 ve KD13'ün; 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubundan ise N1/9B ve N0/4 bileşiklerinin ER antagonist etkili olduğu belirlenmiştir.

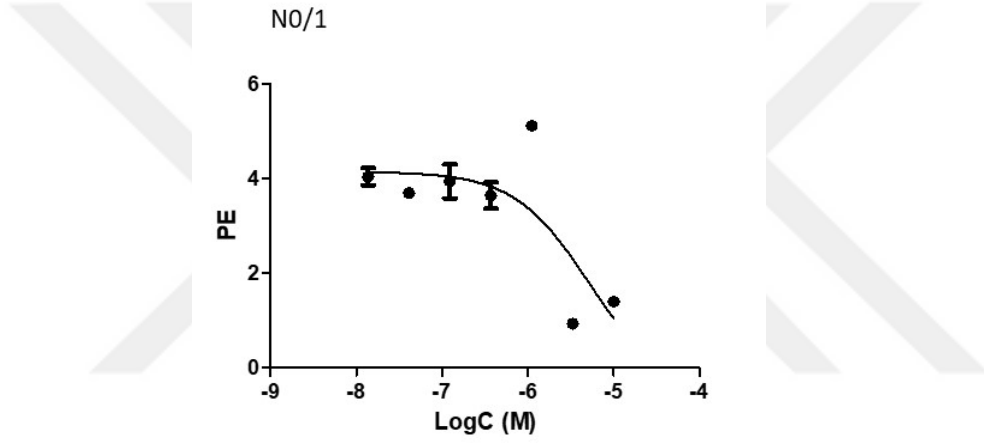
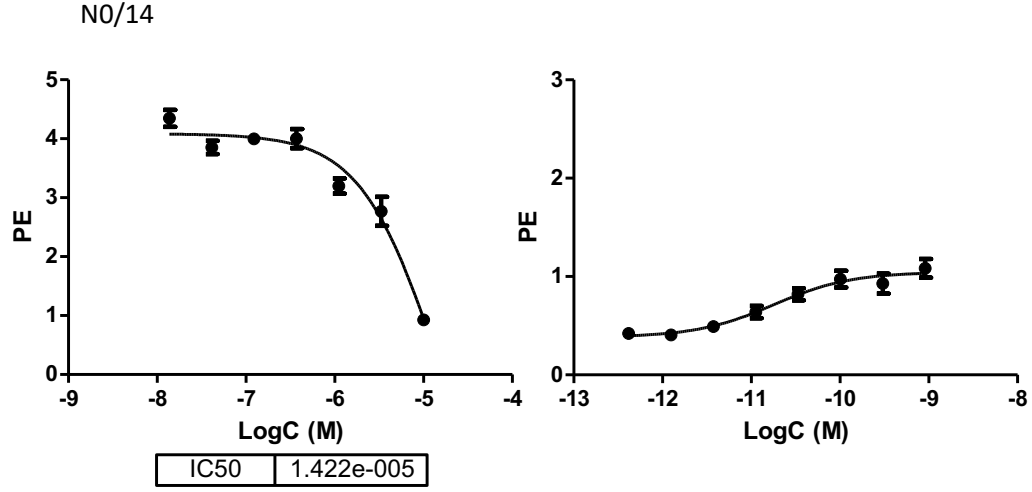
2-metilindol grubunda test edilen M3, M5, M6 ve M16 bileşikleri ilk basamakta östradiolün neden olduğu hücre proliferasyonunu doza bağlı olarak inhibe etmiştir. İkinci basamakta ise bileşiklerin proliferasyonu inhibe eden tek dozu varlığında östradiolün artan dozları uygulanmış ve hücre proliferasyonunda doza-bağlı artış gözlenmiştir (Şekil 4.24). Bu bulgu maddelerin ilk basamakta sitotoksik etkileriyle değil, ER aracılıklı etkileri nedeniyle hücre proliferasyonunu azalttığını göstermiştir. 2-metilindol grubu bileşikler içinde ER antagonist etkisi en güçlü bileşik ise M6 (IC_{50} : 9.10^{-7} M) olmuştur (Şekil 4.24).



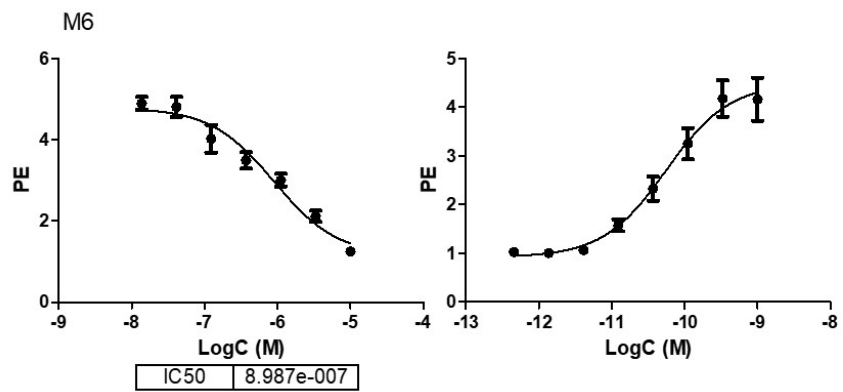
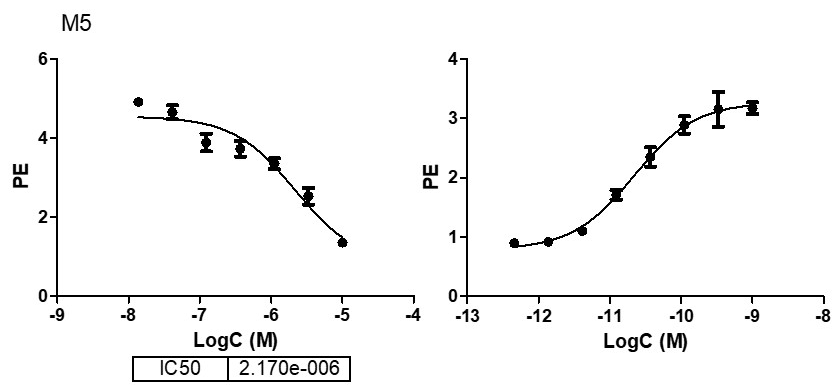
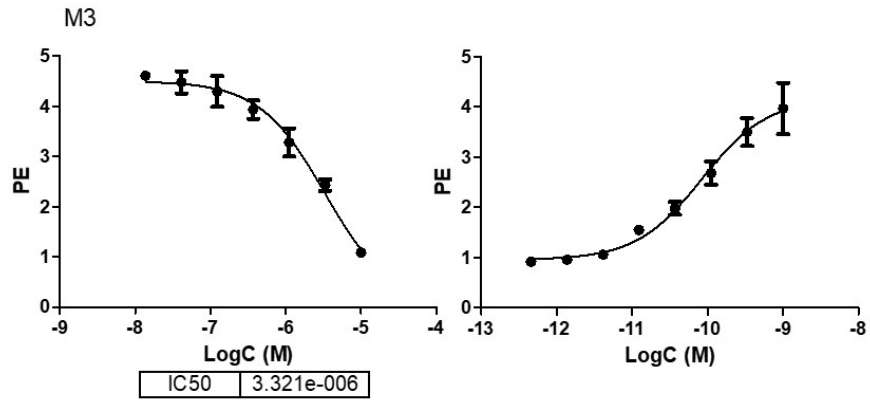


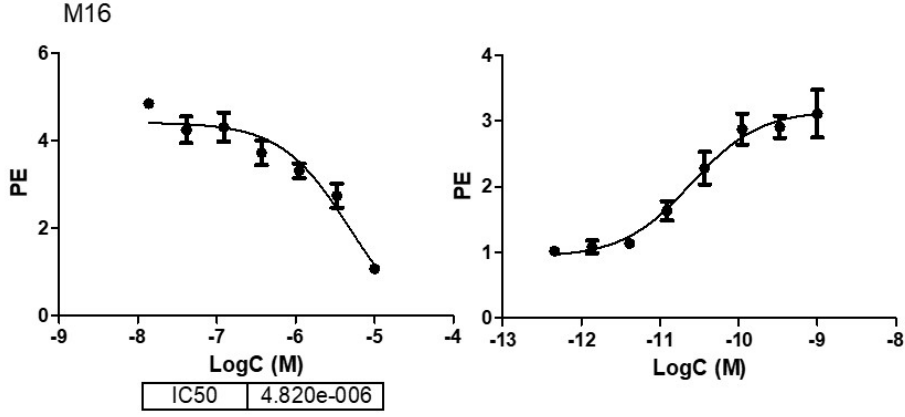
Şekil 4.22 1-etilindol grubu bileşiklerin östrojen reseptör antagonisti etkilerinin E-screen yöntemi ile değerlendirilmesi ve IC₅₀ değerleri (PE: proliferatif etki).





Şekil 4.23 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin östrojen reseptör antagonisti etkilerinin E-screen yöntemi ile değerlendirilmesi ve IC_{50} değerleri (PE: proliferatif etki).



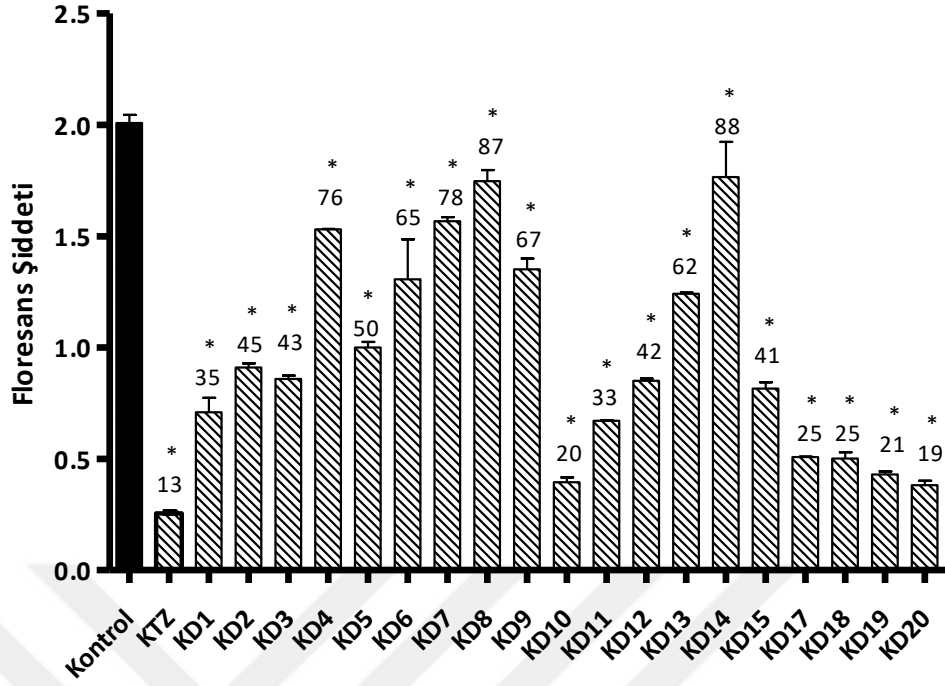


Şekil 4.24 2-metilindol grubu bileşiklerin östrojen reseptör antagonisti etkilerinin E-screen yöntemi ile değerlendirilmesi ve IC₅₀ değerleri (PE: proliferatif etki)

4.2.2 Aromataz İnhibitör Etkinliğinin Araştırılması

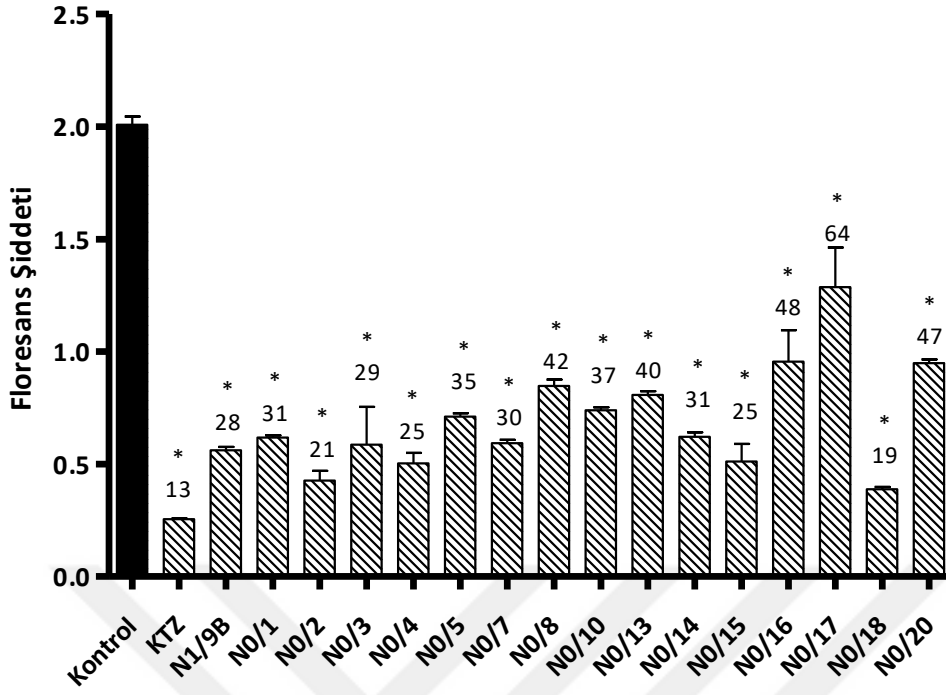
4.2.2.1 Tek Doz Tarama Çalışmaları

Öncelikle yeni sentezlenen melatonin türevi bileşiklerin 100 µM konsantrasyonda aromataz enzim aktivitesi üzerine etkileri floresans özellikli bir substrat (MFC) ve insan rekombinant aromataz enziminin kullanıldığı *in vitro* bir yöntemle araştırılmıştır. Buna göre 1-etilindol grubu bileşiklerden KD1, KD10, KD17, KD18, KD19 ve KD20'nin aromataz enzimini güçlü bir şekilde inhibe ettikleri saptanmıştır (Şekil 4.25).



Şekil 4.25 1-etilindol grubu bileşiklerin (100 µM) aromataz aktivitesi üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler kontrole göre hesaplanmış % değerlerdir. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma kontrol grubuna göre yapılmıştır (* p<0,05, KTZ: Ketokonazol).

N0/17 dışında 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin de tamamı aromataz enzim aktivitesini kontrole oranla % 50'den fazla oranda inhibe etmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin (100 µM) aromataz enzim aktivitesi üzerine etkileri. Barlar üzerindeki değerler kontrole göre hesaplanmış % değerlerdir. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma kontrol grubuna göre yapılmıştır (* p<0,05, KTZ: Ketokonazol).

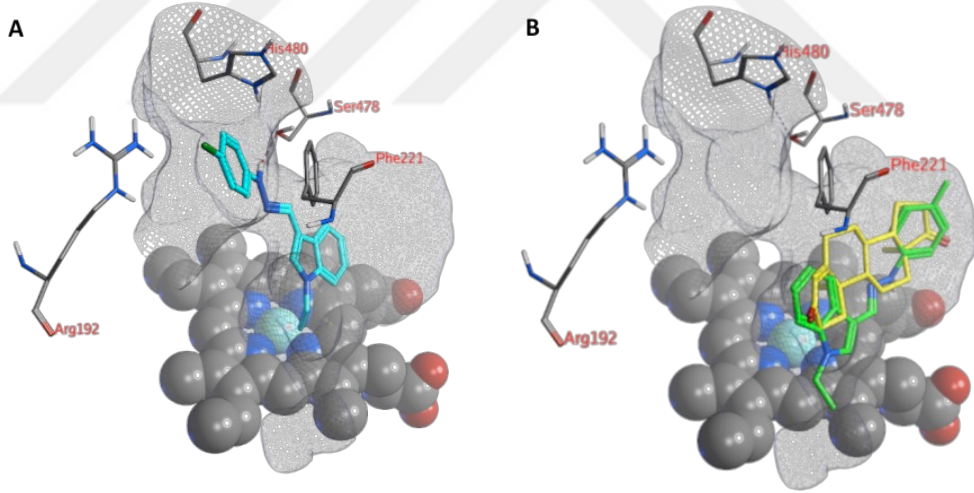
4.2.2.2 hCYP19A1 (Aromataz) Docking Çalışması Bulguları

1-etilindol ve 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin hCYP19A1 (pdb: 3S79) enziminin aktif bölgesine bağlanma durumları araştırılmış ve iki bağlanma pozisyonu öngörülmüştür. Poz 1’de ligandın ikincil amin grubu ve Ser478 aminoasidinin yan zinciri arasında bir hidrojen bağı oluşturulur (Şekil 4.29 A). Phe221, Trp224 ve Thr310 arasında hidrofobik etkileşimler oluşturulmaktadır. Fenil halkasında para pozisyonunda klor substitüsyonu bulunan KD1 bileşiği pozisyon 1’e bağlanma olasılığı en yüksek bileşik olarak tespit edilmiştir. Bu klor atomu Arg192(uzaklık < 4.8 Å) aminoasidinin katyonik yan zincirine yakın konumda bulunmaktadır ve elektrostatik etkileşmelerin oluşması mümkündür.

5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubundaki bileşikler Ser478 ve Arg192 ile etkileşimin korunduğu benzer bağlanma pozisyonlarından bağlanabilmektedirler. Sadece bisiklik halkadaki oryantasyonunda küçük farklılıklar gözlenirse de bu durum bu kısmın hem grubuyla etkileşmesine engel olmamaktadır.

Docking çalışması yapılan bileşiklerin çoğunda poz 1 için benzer bağlanma pozisyonları elde edilmiştir.

Docking poz 2'de ligand enzimin aktif bölgesi ile hidrojen bağı oluşturmaz. Bununla birlikte, ligandın aktif bölgedeki yeri ve oryantasyonu, ASD601'e (kristal yapısında gözleendiği gibi) çok benzemektedir. Phe134, Trp224 ve hem grubunun yan zincirleri ile hidrofobik etkileşimler oluşmaktadır (Şekil 4.29 B). Fenil halkasında para pozisyonunda flor substitüsyonu bulunan KD10 bileşiği pozisyon 2'e bağlanma olasılığı en yüksek bileşik olarak tespit edilmiştir. Bu bağlanma pozisyonu pozisyon 1'e kıyasla daha az gözlenmektedir.



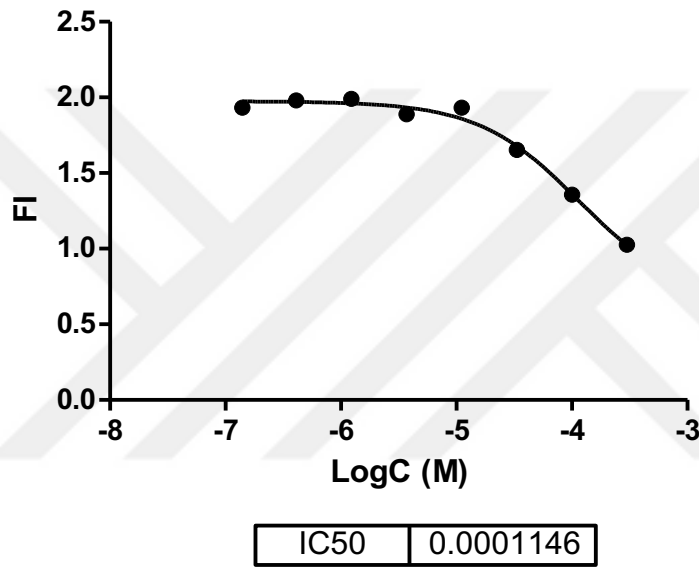
Şekil 4.27 KD1 bileşiğinin (A) ve KD10 bileşiğinin (B) aromataz enziminin aktif bölgesindeki öngörülen bağlanma pozları.

Moleküler modelleme ve docking çalışmalarının sonucuna göre KD1, KD10, KD7 ile NO/3, NO/1, NO/8 bileşiklerinin aromataz enziminin aktif bağlanma bölgesiyle etkileşerek enzimi inhibe edebileceği öngörülmektedir.

4.2.2.3 Melatonin ve Seçilen Analoglarının IC₅₀ Değerlerinin

Hesaplanması

Öncelikle sentezlenen bileşiklerin ana molekülü olan melatoninin farklı konsantrasyonlarda (0,14-300 µM) aromataz enzim aktivitesi üzerine olası inhibitör etkinliği araştırılmıştır. Melatoninin 33,3 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda aromataz enzimini inhibe ettiği bulunmuştur (Şekil 4.28).

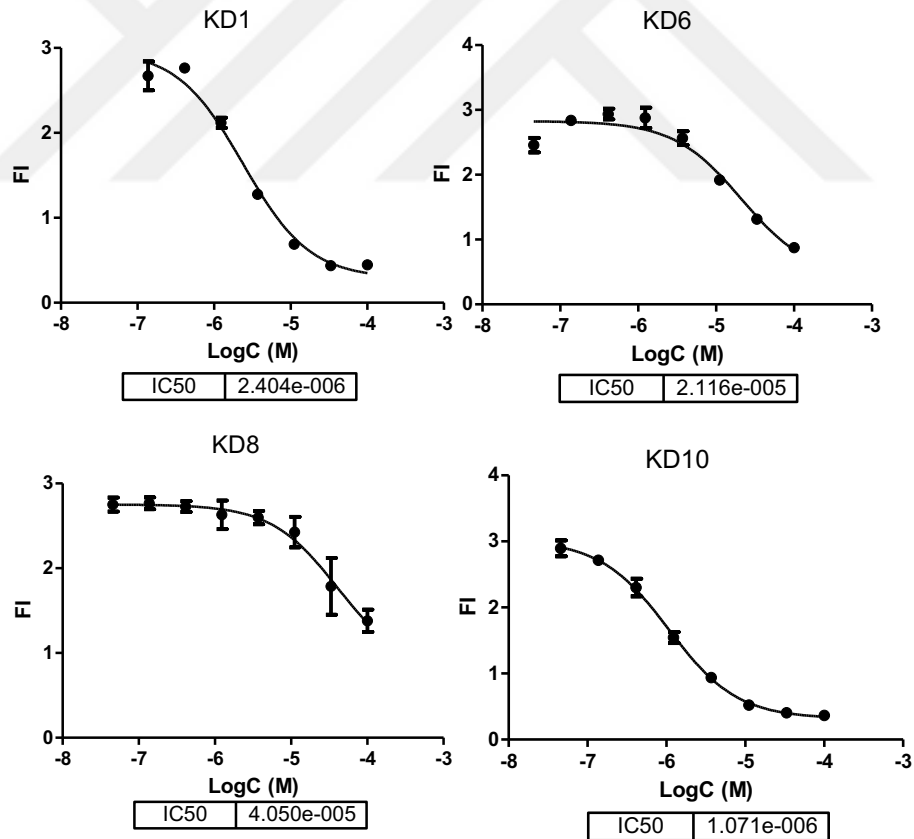


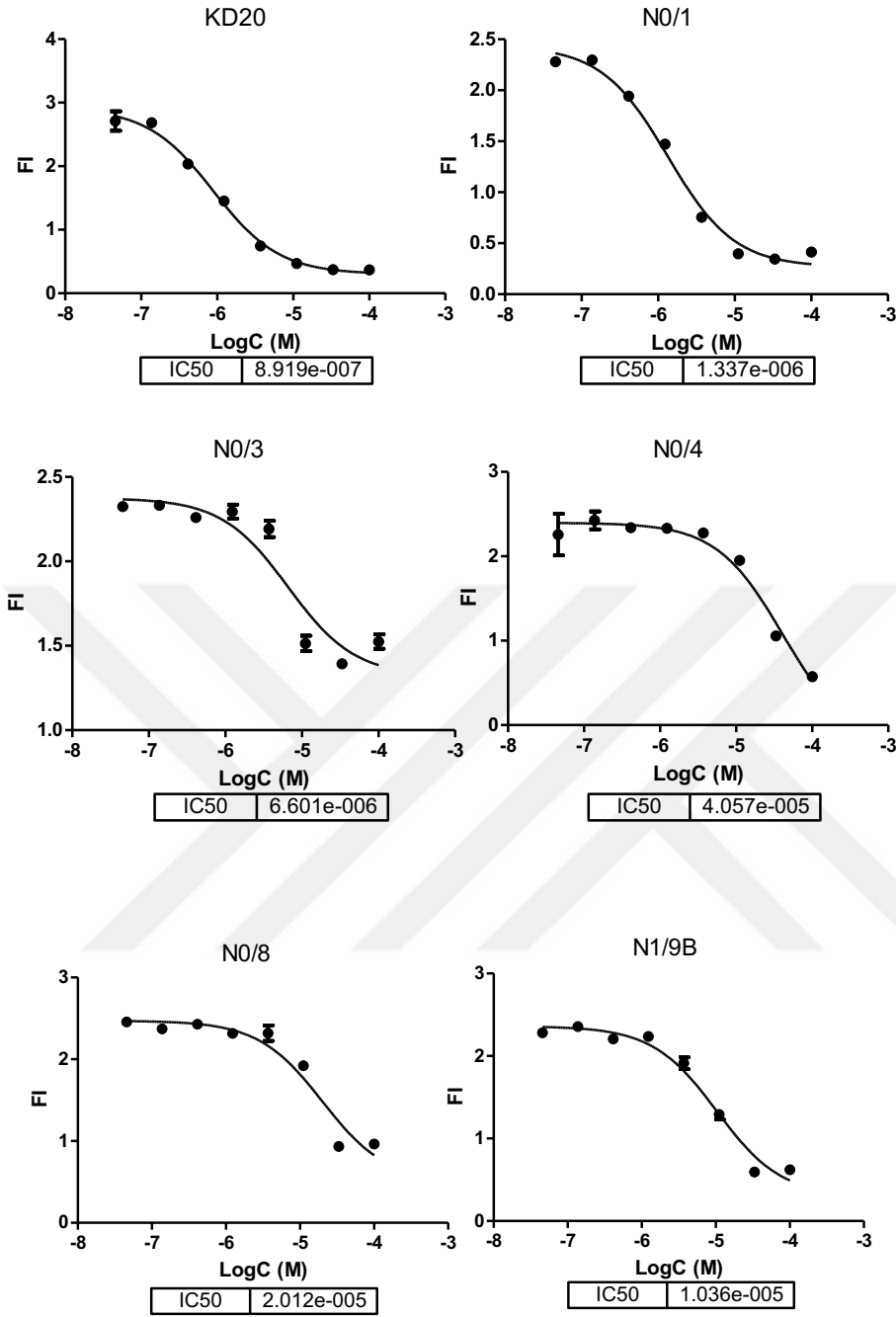
Şekil 4.28 Melatoninin aromataz enzimi üzerine inhibitör etkisi ve IC₅₀ değeri (FI: floresans şiddeti).

Tek konsantrasyonları ile (100 µM) yapılan tarama çalışmasında aromataz inhibitör etkinlikleri yüksek bulunan bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmış ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Enzim-inhibisyon grafiği araştırılacak bileşiklerin seçiminde moleküler modelleme çalışmalarından da yararlanılmıştır. Buna göre 1-etilindol grubu bileşiklerden hem tek konsantrasyon tarama sonuçları hem de docking çalışma sonuçlarına göre KD1, KD10 ve KD20 seçilmiş ve farklı konsantrasyonlardaki inhibitör etkileri araştırılmıştır. KD6 ve KD8 bileşikleri ise halojen substitüsyonunun bulunduğu pozisyonun aktiviteye etkisini değerlendirmek amacıyla çalışmaya dahil edilmiştir.

5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin neredeyse tamamı tek konsantrasyonda aromataz enzimini güçlü bir şekilde inhibe etmiş olduğundan, moleküler modelleme bulgularından da yararlanılarak seçilen N0/1, N0/3 ve N0/8' in farklı konsantrasyonlardaki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca ER antagonist etkili olduğu belirlenen N1/9B ve N0/4 bileşiklerinin de sekiz farklı konsantrasyonda aromataz inhibitör etkileri araştırılmış ve enzim inhibisyon grafikleri elde edilmiştir (Şekil 4.29).

Buna göre KD1, KD10 ile N0/1, N0/3 bileşiklerinin 1.10^{-6} - 6.10^{-6} M konsantrasyon aralığındaki IC_{50} değerleri ile inhibitör etkinliği yüksek bileşikler olduğu belirlenmiştir. Test edilen tüm bileşikler içerisinde KD20 bileşiği aromataz enzimini inhibe eden en güçlü bileşik olarak tespit edilmiş ve IC_{50} değeri 9.10^{-7} M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.29).





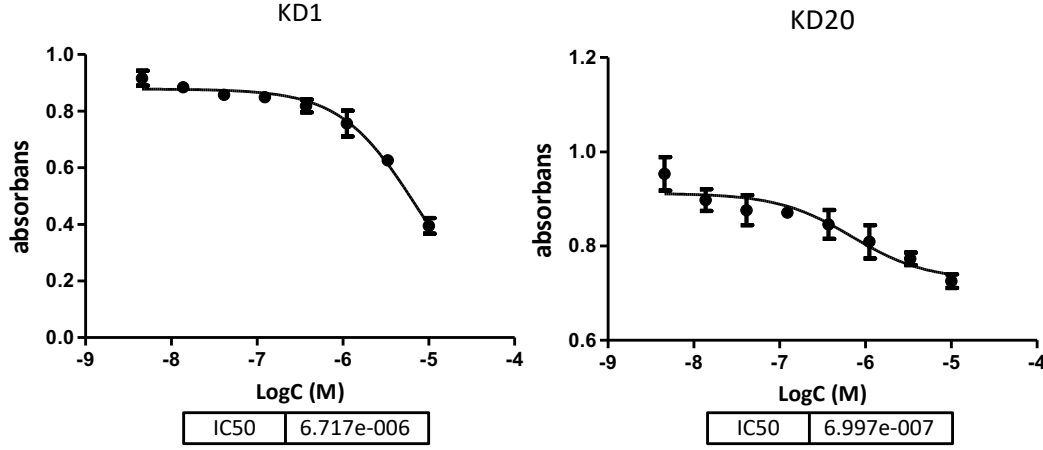
Şekil 4.29 Yeni sentezlenen melatonin analoglarına ait aromataz enzimi inhibisyon grafikleri ve IC₅₀ değerleri (FI: Floresans şiddeti).

2-metilindol yapısındaki bileşiklerin aromataz aktivitesi üzerine etkinlikleri daha önce grubumuz tarafından yapılan bir başka tez çalışması kapsamında araştırılmış ve yayımlanmış olduğundan bu tez kapsamında bu verilere yer verilmemiştir. Elde edilen verilere göre 2-metilindol grubu bileşiklerin aromataz enzimini güçlü bir

şekilde inhibe ettiği görülmüş ve bu veriler moleküler modelleme çalışmalarıyla da desteklenmiştir (Ozcan-Sezer ve ark., 2018).

4.2.2.4 Aromataz İnhibitör Etkinliğin Dolaylı Aktivite Ölçüm Yöntemi ile Araştırılması

Doğrudan aktivite ölçüm yönteminde 8.10^{-7} M'lık IC_{50} değeri ile aromataz enzimini inhibe eden en güçlü bileşik olan KD20 ve hem aromataz enzimini inhibe eden hem de tez kapsamında araştırdığımız diğer hedeflerde etkili olduğunu bulduğumuz KD1 bileşiğinin, aromataz enzimi üzerine inhibitör etkileri hücre temelli bir yöntem kullanılarak da araştırılmıştır. Östrojensiz ortamda testosteron varlığında bileşiklerin MCF-7 BUS hücre proliferasyonu üzerine etkileri değerlendirilerek maddelerin aromataz aktivitesi üzerine etkileri dolaylı olarak belirlenmiştir. Bu maddelere ait enzim inhibisyon grafikleri Şekil 4.30'da gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre KD1 bileşiğinin IC_{50} değeri $6,7.10^{-6}$ M, KD20 bileşiğinin IC_{50} değeri ise 6.10^{-7} M olarak bulunmuştur. KD1 bileşiğinin hücre temelli olan bu yöntemdeki inhibitör aktivitesi (IC_{50} : $6,7.10^{-6}$ M) direk ölçüm yöntemine göre (IC_{50} : $2,4.10^{-6}$ M) yaklaşık 3 kat düşük bulunmuştur. KD20 bileşiği biri hücre temelli olan iki *in vitro* yöntemde de benzer IC_{50} değerleri ile aromataz enzimini başarılı bir şekilde inhibe etmiştir (Şekil 4.29, Şekil 4.30).



Şekil 4.30 KD1 ve KD20 maddelerine ait dolaylı aktivite ölçüm yöntemi ile elde edilen enzim inhibisyon grafikleri ve IC₅₀ değerleri.

4.2.3 CYP1 Aktivitesi Üzerine Etkilerin Araştırılması

Öncelikle bileşiklerin, sıçan karaciğer mikrozomal CYP1 enzimleri üzerine olası inhibitör etkinlikleri CYP1 enzimlerine spesifik bir substrat olan 7-etoksirezorufinin kullanıldığı EROD yöntemiyle araştırılmıştır. Mikrozomal CYP aktivitesini güçlü şekilde inhibe eden ve moleküler modelleme sonuçlarına göre inhibitör etkisi öngörülen bileşiklerin insan rekombinant CYP1B1 enzimi üzerine inhibitör etkinlikleri araştırılmıştır.

4.2.3.1 Mikrozomal CYP1 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerin

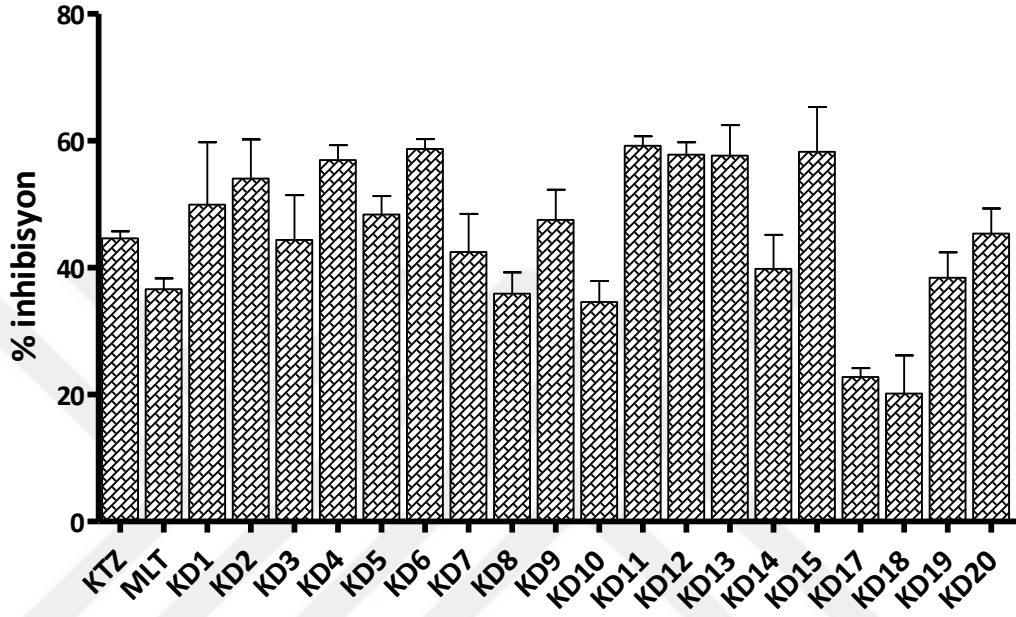
Araştırılması

4.2.3.1.1 Tek Doz Tarama Çalışmaları

Öncelikle yeni sentezlenen melatonin analoglarının 10 µM konsantrasyonda mikrozomal CYP1 enzim aktivitesi üzerine etkileri EROD yöntemiyle araştırılmıştır.

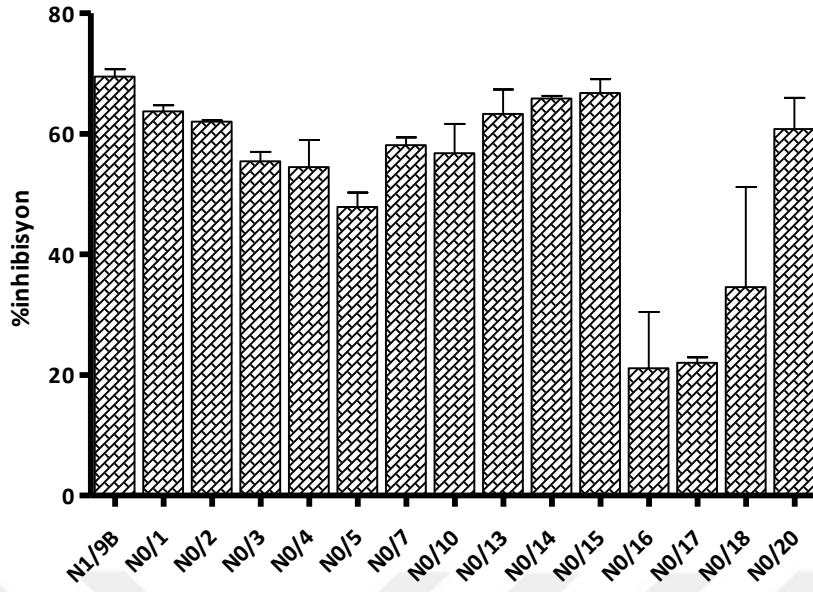
1-etilindol grubu bileşikler 10 µM konsantrasyonda mikrozomal CYP1 inhibisyonunu değişen oranlarda inhibe etmişlerdir. KD17 ve KD18 bileşikleri ise mikrozomal CYP1

enzimlerini inhibe etmede diğer bileşikler kadar etkili olamamışlardır. ER antagonist ve/veya aromataz inhibitör etkileri bulunan KD1, KD4, KD13 ve KD20 bileşiklerinin mikrozomal CYP1 inhibitör etkileri CYP inhibitörü olan ketokonazolden daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.32).

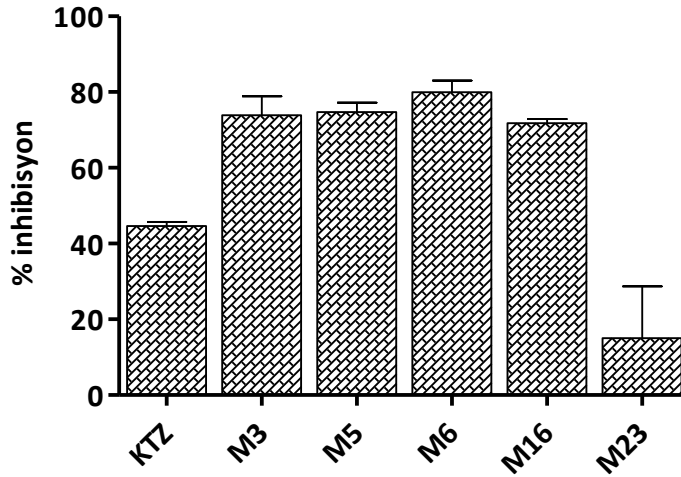


Şekil 4.31 1-etilindol grubu bileşiklerin (10 µM) CYP1 enzim aktivitesi üzerine etkileri. 7-etoksirezorufin O-dealkilasyon (EROD) yöntemi sıçan karaciğer mikrozomlarında uygulanmıştır. % inhibisyon değerleri kontrol grubuna kıyasla hesaplanmıştır. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma kontrol grubuna göre yapılmıştır (KTZ: Ketokonazol, MLT: Melatonin).

5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubunda, aromataz enzimini inhibe etmede de başarılı bulunmayan N0/17 bileşiği dışındaki tüm bileşikler mikrozomal CYP1 enzimlerini güçlü bir şekilde inhibe etmişlerdir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin (10 µM) CYP1 enzim aktivitesi üzerine etkileri. 7-etoksirezorufin O-dealkilasyon (EROD) yöntemi sıçan karaciğer mikrozomlarında uygulanmıştır. % inhibisyon değerleri kontrol grubuna kıyasla hesaplanmıştır. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma kontrol grubuna göre yapılmıştır.



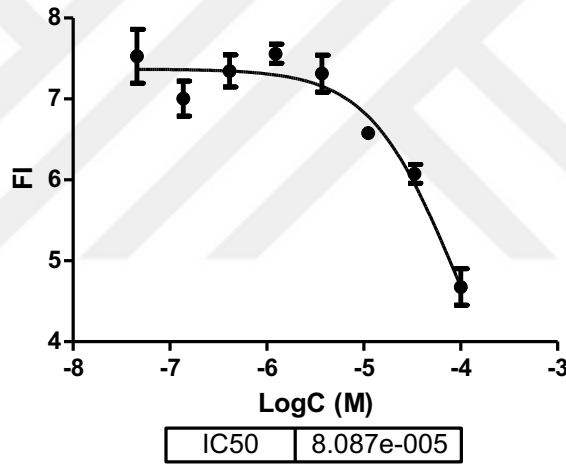
Şekil 4.33 2-metilindol grubu bileşiklerin (10 µM) CYP1 enzim aktivitesi üzerine etkileri. 7-etoksirezorufin O-dealkilasyon (EROD) yöntemi sıçan karaciğer mikrozomlarında uygulanmıştır. % inhibisyon değerleri kontrol grubuna kıyasla hesaplanmıştır. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma kontrol grubuna göre yapılmıştır (KTZ: Ketokonazol).

2-metilindol grubu bileşiklerden M3, M5, M6 ve M16 bileşikleri mikrozomal CYP1 enzimlerini % 70-80 oranında inhibe ederken M23 bileşiğinin inhibisyon düzeyi kontrole kıyasla % 15 bulunmuştur. M23 dışındaki bileşikler mikrozomal CYP1 enzimlerini ketokonazole kıyasla daha yüksek oranda inhibe etmiştir (Şekil 4.33).

4.2.3.1.2 Melatonin ve Seçilen Analoglarının IC₅₀ Değerlerinin

Hesaplanması

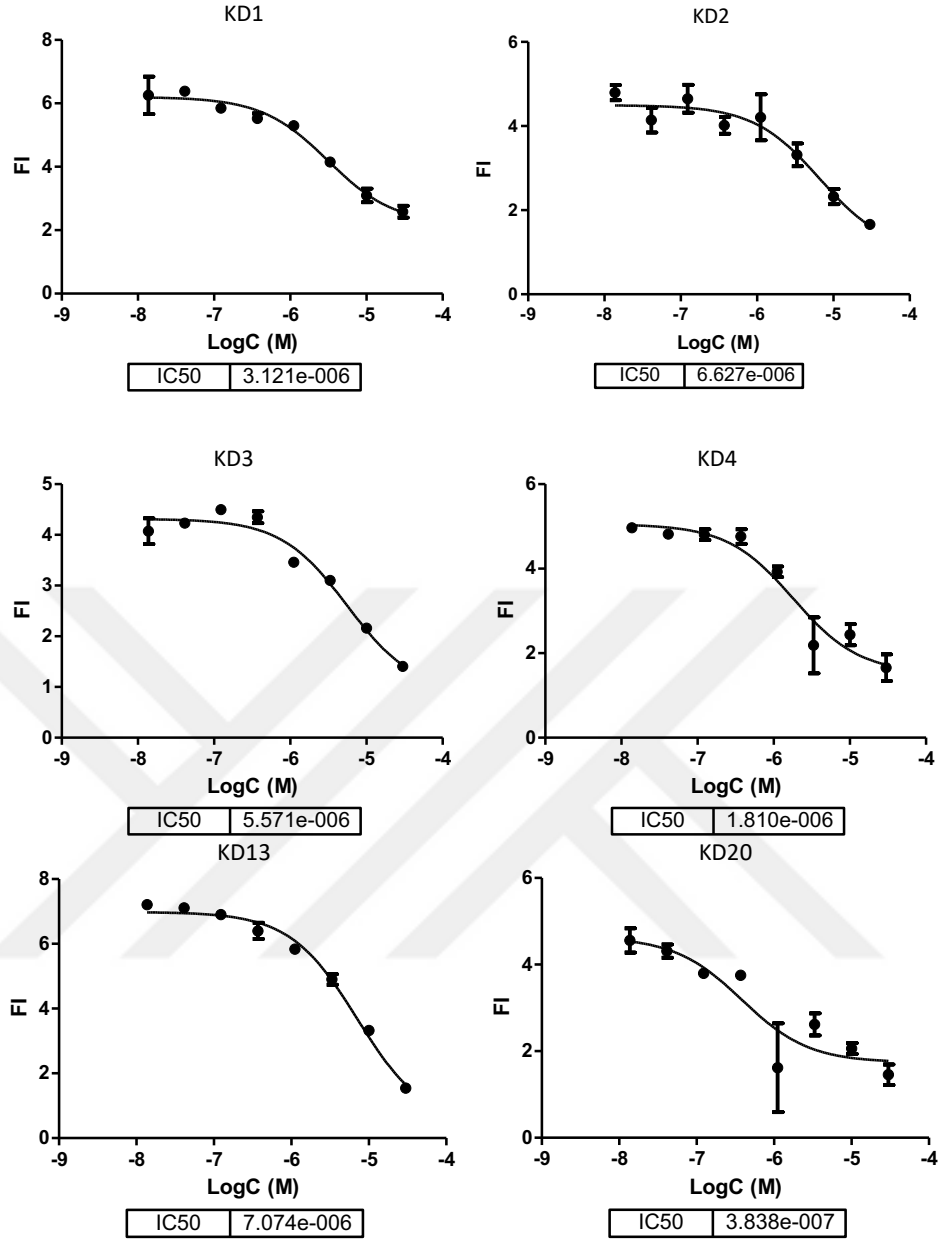
Melatoninin farklı konsantrasyonlarda mikrozomal CYP1 üzerine inhibitör etkinliği araştırılmış ve IC₅₀ değeri $80,9 \cdot 10^{-6}$ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.34).



Şekil 4.34 Melatoninin mikrozomal CYP1 enzimleri üzerine inhibitör etkisi ve IC₅₀ değeri (FI: floresans şiddeti).

Tek konsantrasyonda yapılan tarama çalışmalarında mikrozomal CYP1 inhibitör aktivitesi yüksek bulunan bileşik sayısı fazla olduğundan, moleküler modelleme bulgularından da yararlanılarak, 'hit' bileşikler seçilmiştir. Bu bileşiklerin sıçan karaciğer mikrozomlarında 8 farklı konsantrasyondaki CYP1 inhibitör etkileri araştırılarak doz-yanıt eğrileri elde edilmiş ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

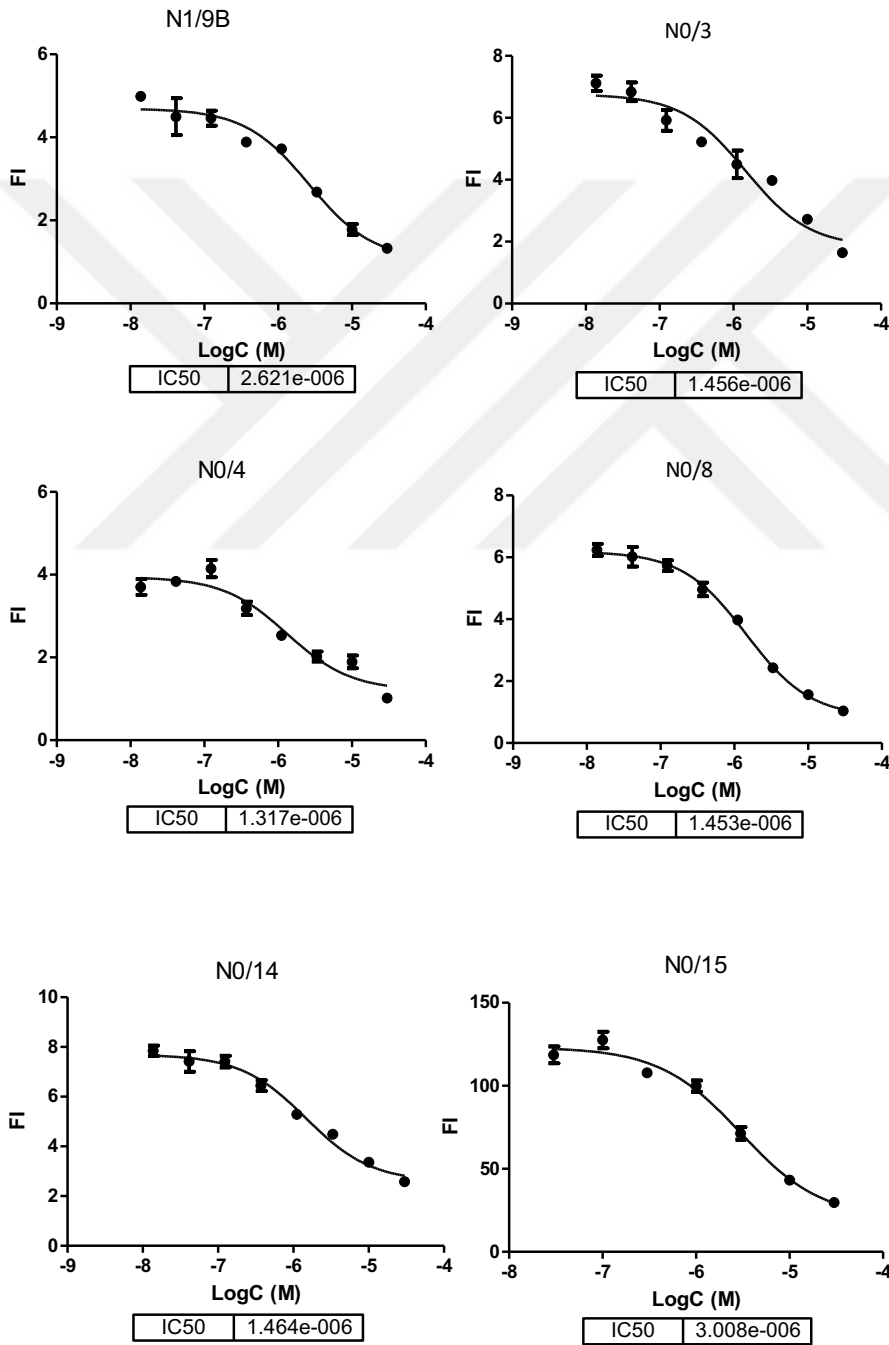
Buna göre 1-etilindol grubu bileşiklerden KD1 ve KD4 moleküler modelleme bulgularına göre; KD2, KD3 ve KD13 ER antagonisti etkinlikleri nedeniyle; KD20 ise aromataz enzimini inhibe eden en potent bileşik olması nedeniyle seçilmiş ve doza bağlı olarak enzim inhibisyon grafikleri elde edilmiştir (Şekil 4.35). Bu bileşikler arasında KD20 bileşiği (IC₅₀: 3,8.10⁻⁷ M) inhibitör etkisi en yüksek bileşik olmuş, CYP1 inhibitör etkinliği de ketokonazolden (IC₅₀: 1,7.10⁻⁶ M) yaklaşık 5 kat yüksek bulunmuştur. Diğer bileşiklerin IC₅₀ değerleri ise 1,8.10⁻⁶ -7.10⁻⁶ M aralığında bulunmuştur.

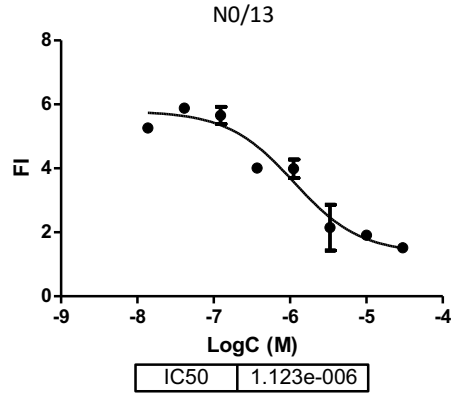


Şekil 4.35 1-etilindol grubu bileşiklerin mikrozomal CYP1 inhibitör etkinlikleri ve IC₅₀ değerleri (FI: floresans şiddeti).

5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubunda N0/14 ve N0/15 bileşikleri tek doz tarama çalışmasında inhibitör etkisi en yüksek bileşikler olduğundan; N0/13 ve N0/3 bileşikleri moleküler modelleme sonuçlarına göre; N0/4 ve N0/8 bileşikleri ise aromataz inhibitör etkinlikleri nedeniyle seçilmiştir. N1/9B bileşiği ise aromataz

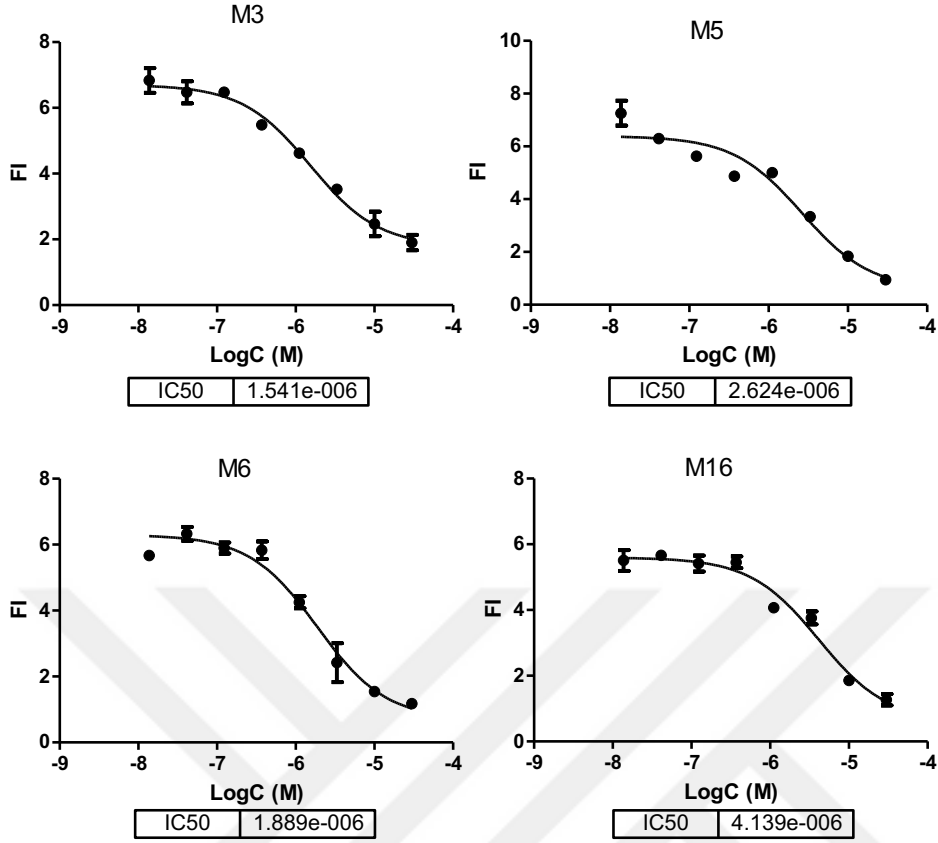
inhibitörü ve ER antagonisti etkilerinin yanı sıra hem tek doz tarama çalışmasında mikrozomal CYP1 inhibitör etkinliği en yüksek bileşik olduğu hem de moleküler modelleme çalışmalarında inhibitör etkili olacağı öngörüldüğü için seçilmiştir. Seçilen bu bileşiklerin farklı dozlarda mikrozomal CYP1 enzimlerine inhibitör etkileri araştırılmış ve IC₅₀ değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.36). Bileşiklerin IC₅₀ değerleri 1,3.10⁻⁶ - 3.10⁻⁶ M aralığında bulunmuştur.





Şekil 4.36 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin mikrozomal CYP1 inhibitör etkinlikleri ve IC₅₀ değerleri (FI: floresans şiddeti).

2-metilindol grubu bileşiklerden M3, M5, M6 ve M16'nın 8 farklı konsantrasyonda mikrozomal CYP1 enzimleri üzerine inhibitör etkileri araştırılmıştır. M3 ve M6 bileşikleri sırasıyla $1,5 \cdot 10^{-6}$ M ve $1,8 \cdot 10^{-6}$ M IC₅₀ değerleriyle mikrozomal CYP1 enzimlerini inhibe eden en güçlü bileşikler olmuştur (Şekil 4.37).



Şekil 4.37 2-metilindol grubu bileşiklerin mikrozomal CYP1 inhibitör etkinlikleri ve IC₅₀ değerleri (FI: floresans şiddeti).

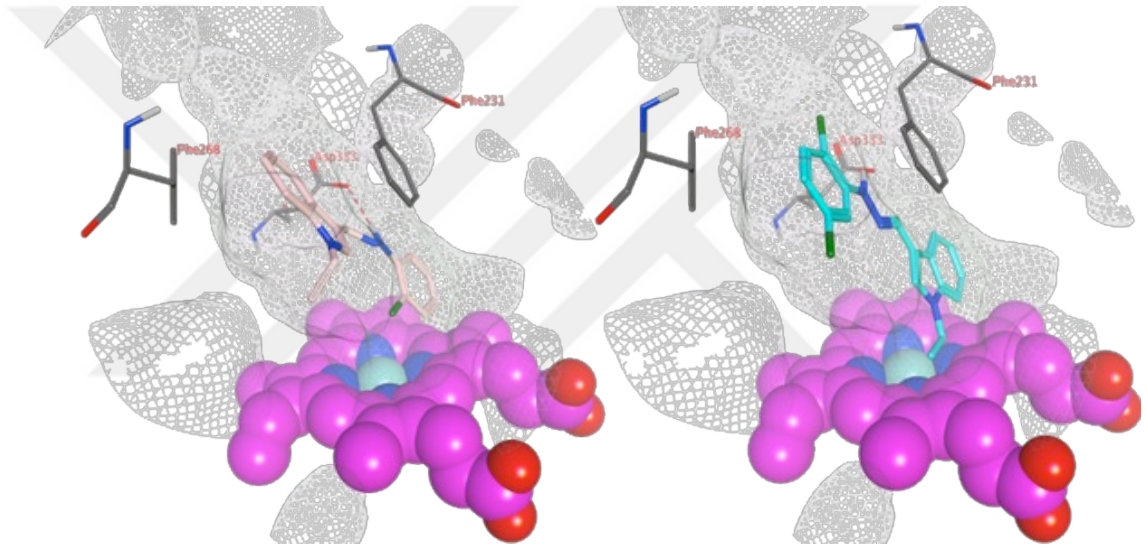
4.2.3.2 hCYP1B1 Docking Çalışması Bulguları

Enzim inhibisyon çalışmaları öncelikle sıçan karaciğer mikrozomları kullanılarak gerçekleştirilirken docking çalışmaları sadece insan rekombinant CYP1B1 enziminin aktif bölgesiyle yapılmıştır.

Ligandlar aktif bağlanma bölgesinde fenil grubu ya da hem grubuna yakın bisiklik kısım ile lineer konformasyonda bulunurlar (Şekil 4.38 A). Birinci poz da bisiklik grup Phe231 ve Phe268'nin yakınında bulunur ve süstitüe fenil grubu hem grubuna yakinken hidrofobik etkileşmeler oluşturur (Şekil 4.38 A). Ligandların amin grubu ise Asp333'ün yan zinciriyle hidrojen bağı oluşturmaktadır.

İkinci poz da, molekülün oryantasyonu değişmekte ve sübstitüe fenil grubu ile Phe231 ve Phe268 arasında hidrofobik etkileşimler oluşmaktadır (Şekil 4.38 B). Bu pozisyonda hidrojen bağı oluşmamaktadır fakat yan zincir konformasyonunda küçük değişimler meydana gelirse ligand ile hidrojen bağı kurulması da mümkün olmaktadır.

Moleküler modellemesi yapılan ligandların çoğu poz 1 ve 2' ye benzer pozlarda enzime bağlanmışlardır. Yapılan docking çalışması sonuçlarına göre KD1, KD4, KD6, KD8, KD14, N1/9B, N0/13, N0/3 bileşiklerinin insan rekombinant CYP1B1 enzimine karşı inhibitör etkili olacağı öngörülmektedir.



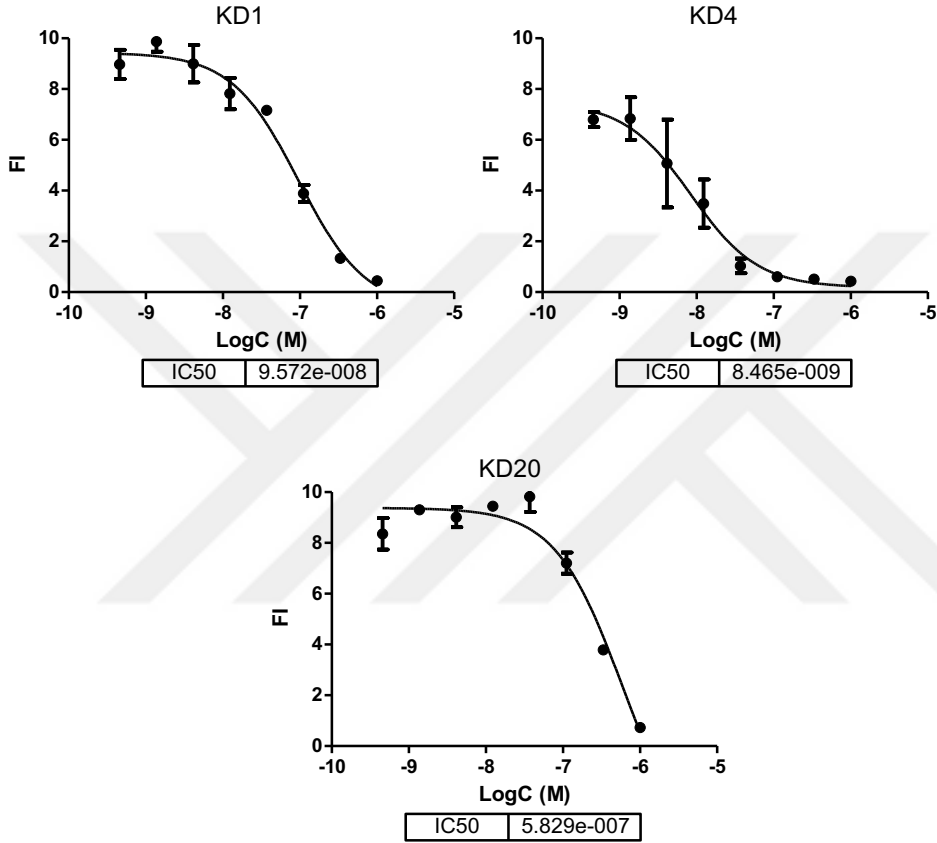
Şekil 4.38 KD6 bileşiğinin (A) ve KD14 bileşiğinin (B) CYP1B1 enziminin aktif bölgesindeki ön görülen bağlanma pozunu

4.2.3.3 Rekombinant CYP1 Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerin

Belirlenmesi

Moleküler modelleme çalışması sonuçlarına göre CYP1B1 enzimini inhibe edeceği öngörülen, mikrozomlarla elde edilen IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında da mikrozomal CYP1 enzimlerini inhibe etmede en etkili bulunan bileşiklerin insan rekombinant CYP1B1 enzimi üzerine inhibitör etkinlikleri, EROD yöntemi kullanılarak

araştırılmıştır. Buna göre 1-etilindol grubundan KD1, KD4, KD20'nin; 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubundan N1/9B, N0/3, N0/4 ve N0/4'ün; 2-metilindol grubundan ise M3 ve M6'nın farklı konsantrasyonlarda rekombinant CYP1B1 enzimi üzerine inhibitör etkileri araştırılmış ve elde edilen doz-yanıt eğrilerine göre IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

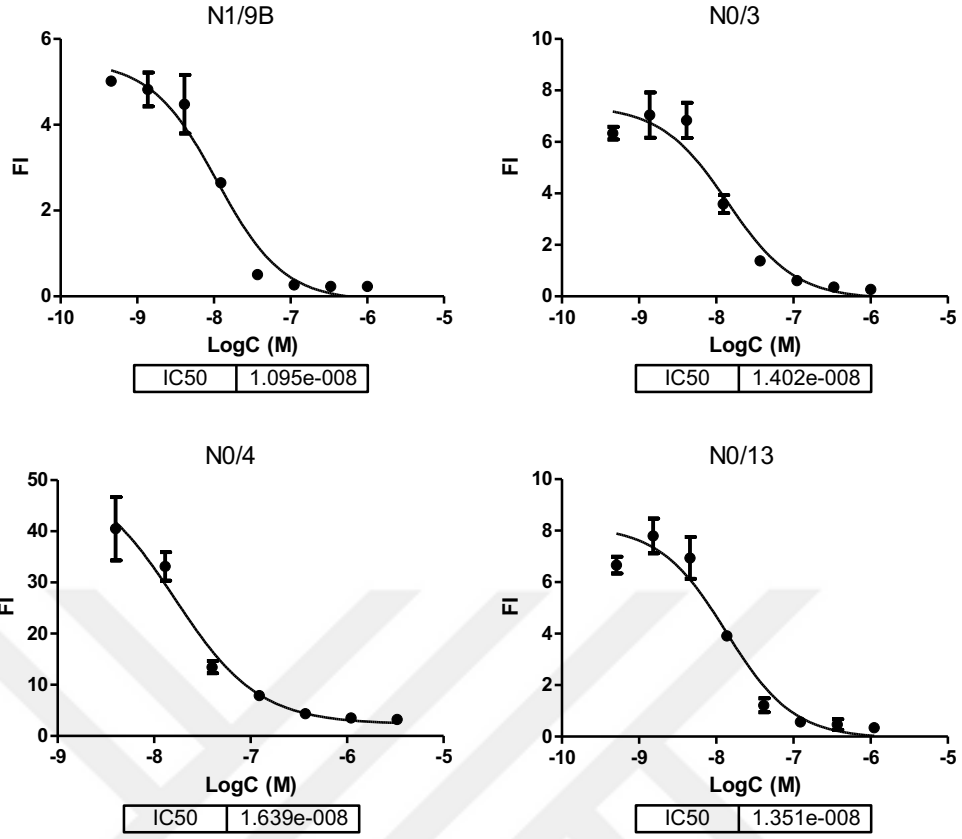


Şekil 4.39 1-etilindol grubu bileşiklerin rekombinant CYP1B1 enzimi üzerine inhibitör etkinlikleri ve IC_{50} değerleri (FI: floresans şiddeti).

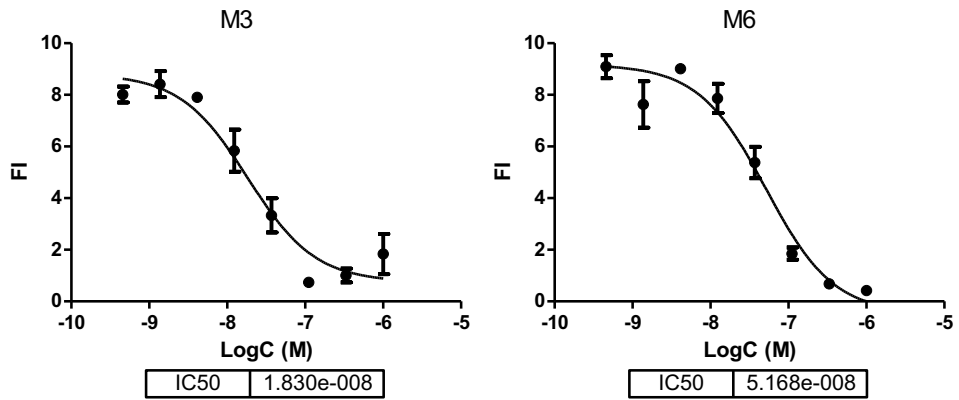
Test edilen bileşiklerden KD4 bileşiği $8,5 \cdot 10^{-9}$ M'lık IC_{50} değeriyle CYP1B1 enzimini inhibe eden en potent bileşik olarak belirlenmiştir (Şekil 4.39).

5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubundaki N1/9B, N0/3, N0/4, N0/13 bileşiklerinin IC_{50} değerleri 10^{-8} - $1,6 \cdot 10^{-8}$ M aralığında bulunmuştur (Şekil 4.40).

M3 bileşiğinin IC_{50} değeri $1,8 \cdot 10^{-8}$ M, M6 bileşiğinin IC_{50} değeri ise $5,1 \cdot 10^{-8}$ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.41).



Şekil 4.40 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin rekombinant CYP1B1 enzimi üzerine inhibitör etkinlikleri ve IC₅₀ değerleri (FI:Floresans Şiddeti).



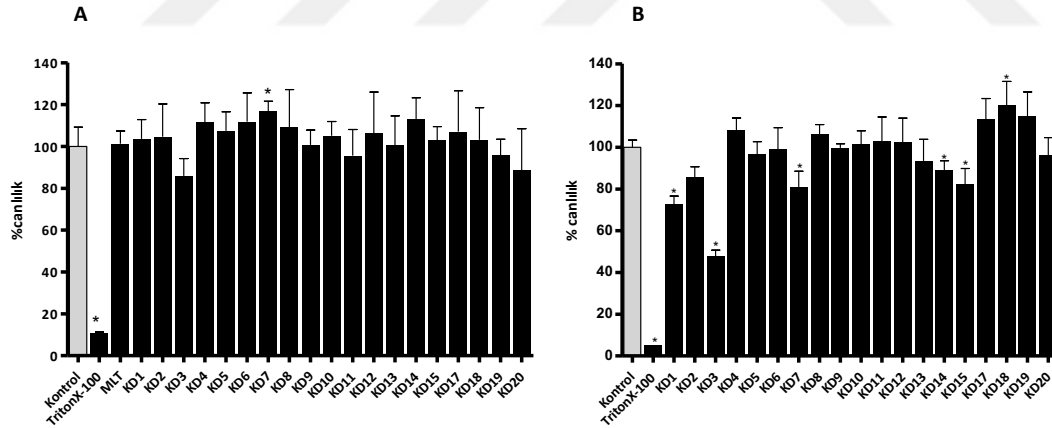
Şekil 4.41 2-metilindol grubu bileşiklerin rekombinant CYP1B1 enzimi üzerine inhibitör etkinlikleri ve IC₅₀ değerleri (FI: floresans şiddeti).

4.2.4 Sitotoksik Etkilerin Araştırılması

4.2.4.1 Sitotoksitenin MTT Yöntemiyle Araştırılması

Yeni sentezlenen melatonin analogu bileşiklerin tek konsantrasyondaki sitotoksik etkileri biri sağlıklı insan meme epitel hücresi MCF-10A olmak üzere, 3 farklı meme hücre hattı kullanılarak araştırılmıştır. Meme kanseri hücresi olarak da ER+ MCF-7 BUS ve üçlü negatif MDA-MB-231 hücre hatları kullanılmıştır.

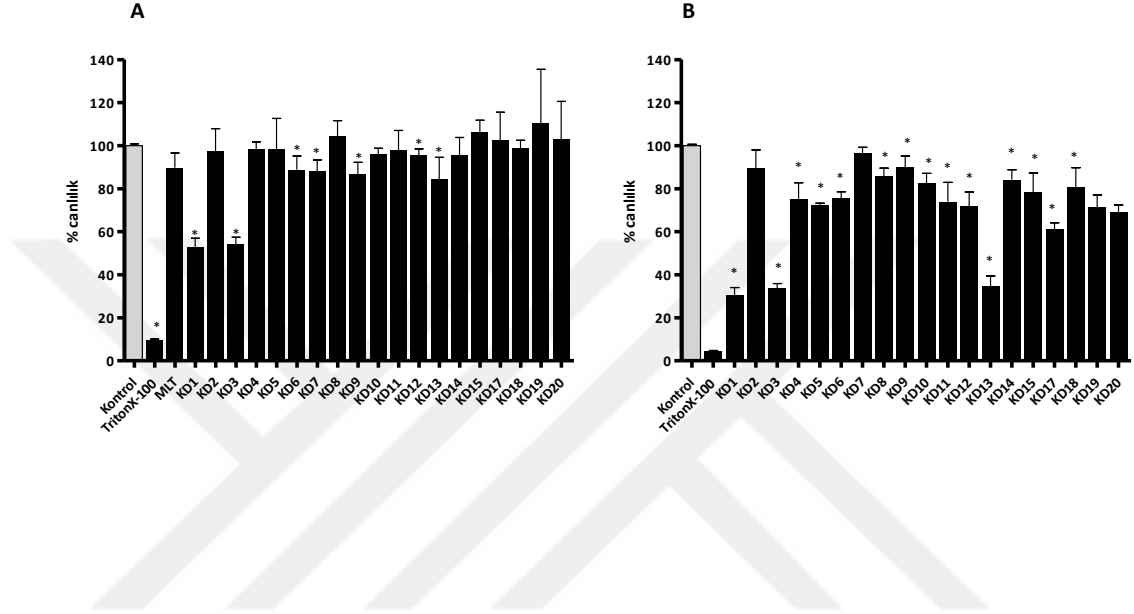
Öncelikle 1-etilindol grubu bileşiklerin sağlıklı insan meme epitel hücresi olan MCF-10A hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkileri 10 µM konsantrasyonda MTT yöntemiyle araştırılmıştır. Hücreler melatonin analoglarıyla 24 ve 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. 1-etilindol grubu bileşikler MCF-10A hücreleriyle 24 saat inkübasyon sonucu hücre canlılığında azalmaya neden olmazken, 72 saat inkübasyon sonucunda KD3, KD7, KD14 ve KD15 hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır (Şekil 4.42).



Şekil 4.42 1-etilindol grubu bileşiklerin (10 µM), MCF-10A hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır (*p<0,05).

1-etilindol grubu bileşiklerin canlılık üzerine etkileri ER+ MCF-7 BUS hücrelerinde MTT yöntemi ile araştırılmış, KD1 ve KD3'ün 24 saat inkübasyon sonucu hücre

canlılığını önemli oranda azalttığı görülmüştür. Bu sitotoksik etki bileşiklerle 72 saat inkübasyon sonucu zamana bağlı olarak artmıştır. Ayrıca KD13 bileşiği MCF-7 BUS hücreleriyle 24 saat inkübasyon sonucu canlılık üzerine belirgin bir değişikliğe neden olmazken, inkübasyon süresinin artışı ile sitotoksitede belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.43).

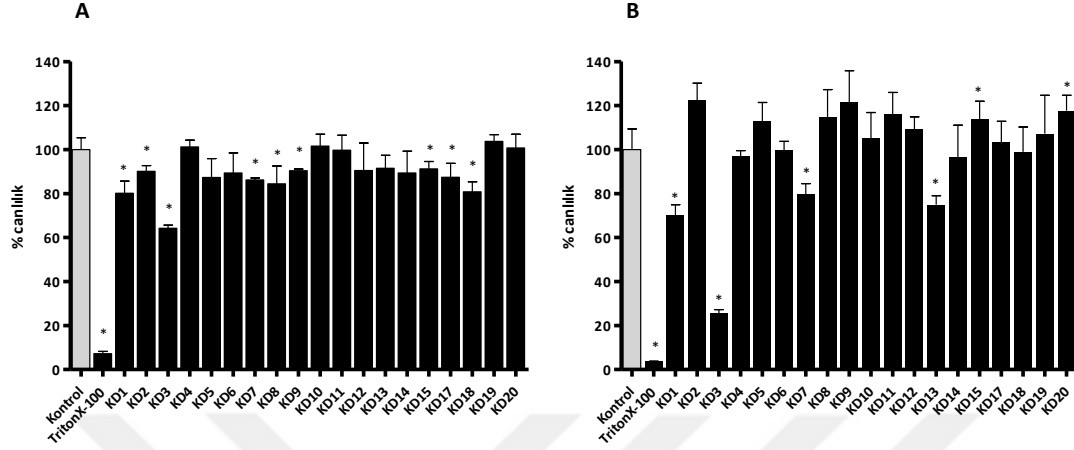


Şekil 4.43 1-etilindol grubu bileşiklerin (10 µM), MCF-7 BUS hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır (*p<0,05, MLT: Melatonin).

1-etilindol yapısındaki bileşiklerin sitotoksik etkileri üçlü negatif MDA-MB-231 hücrelerinde de araştırılmış, bazı bileşikler 24 saat inkübasyon sonucu hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.44 A). 72 saat inkübasyon sonucunda sitotoksik etkisi en güçlü bileşik ise KD3 olmuştur (Şekil 4.44 B).

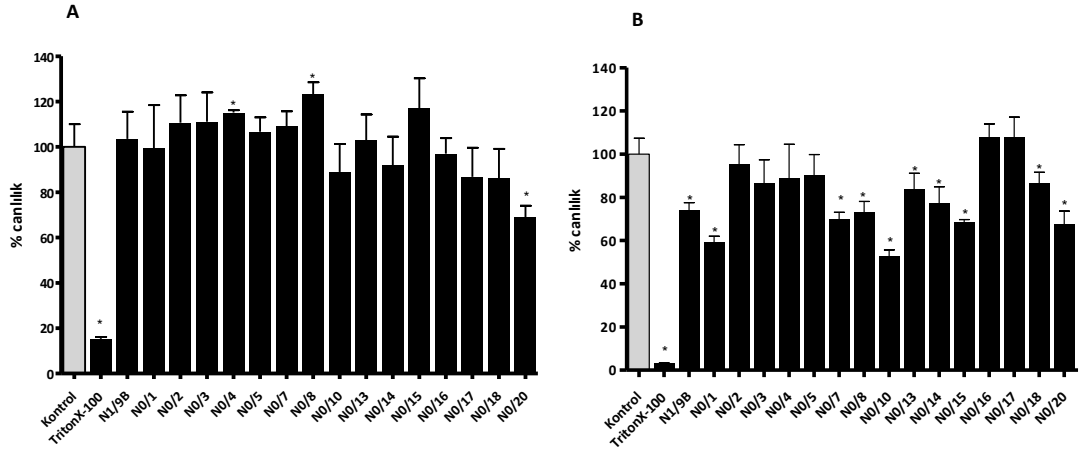
Sonuç olarak KD3 bileşiği her iki meme kanseri hücresinde de sitotoksik etkili olmasının yanı sıra sağlıklı meme epitel hücresinde de sitotoksik etkili bulunmuştur. KD1 ve KD13 bileşikler ise sağlıklı meme epitel hücresi olan MCF-10A hücrelerinde sitotoksik etkiye neden olmazken, iki meme kanseri hücresinde de (MCF-7 BUS, MDA-MB-231) sitotoksik etkili bulunmuştur. Ayrıca KD1 ve KD13'ün sitotoksik etkisinin

ER+ MCF-7 BUS hücrelerinde, üçlü negatif MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla daha güçlü olduğu gözlenmiştir.



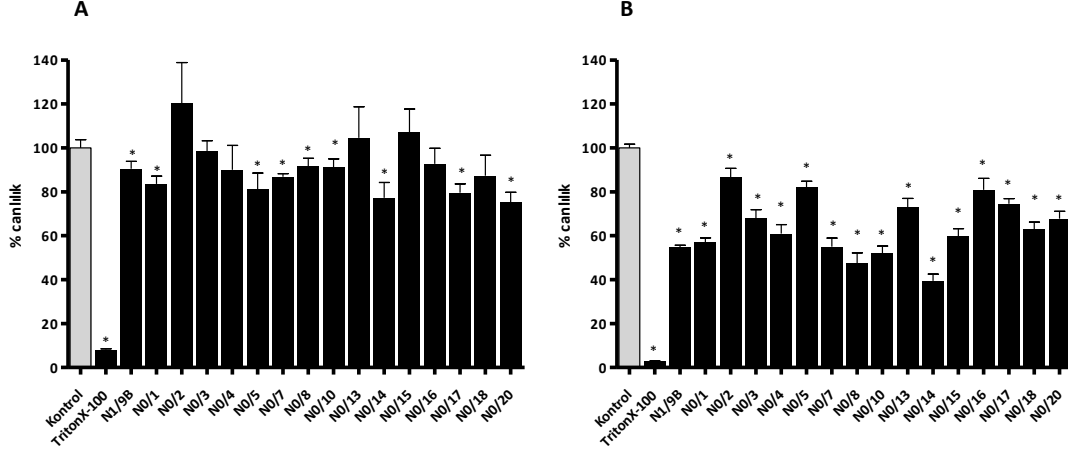
Şekil 4.44 1-etilindol grubu bileşiklerin (10 µM), MDA-MB-231 hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır (*p<0,05).

5-metoksiindol-3- aldehit hidrazon grubu bileşiklerin canlılık üzerine etkileri yine MTT yöntemiyle 3 farklı hücrede araştırılmıştır. Bileşiklerin 10 µM konsantrasyonda MCF-10A hücreleriyle 72 saat inkübasyonu sonucu NO/1 ve NO/10 hücre canlılığını % 60'ın altına düşürerek belirgin sitotoksik etkiye neden olmuştur. NO/20 bileşiği ise 24 saat inkübasyon sonucunda hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltırken (Şekil 4.45A), bu sitotoksik etki inkübasyon süresine bağlı olarak artmıştır (Şekil 4.45 B).



Şekil 4.45 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin (10 µM) MCF-10 A hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır (*p<0,05).

5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubunun MCF-7 BUS hücrelerinde canlılık üzerine etkilerine bakıldığında, bileşiklerin 24 saat inkübasyon sonucu hücre canlılığını % 70'in altına düşürmediği görülmüştür (Şekil 4.46 A). Bileşiklerle 72 saat inkübasyon sonucunda ise araştırılan diğer yollarda da etkili bulunan N1/9B, N0/3, N0/4, N0/8, N0/14 bileşikleri istatistiksel olarak anlamlı derecede sitotoksik etki göstermiş ve hücre canlılığını % 70'in altına düşürmüştür (Şekil 4.46 B).

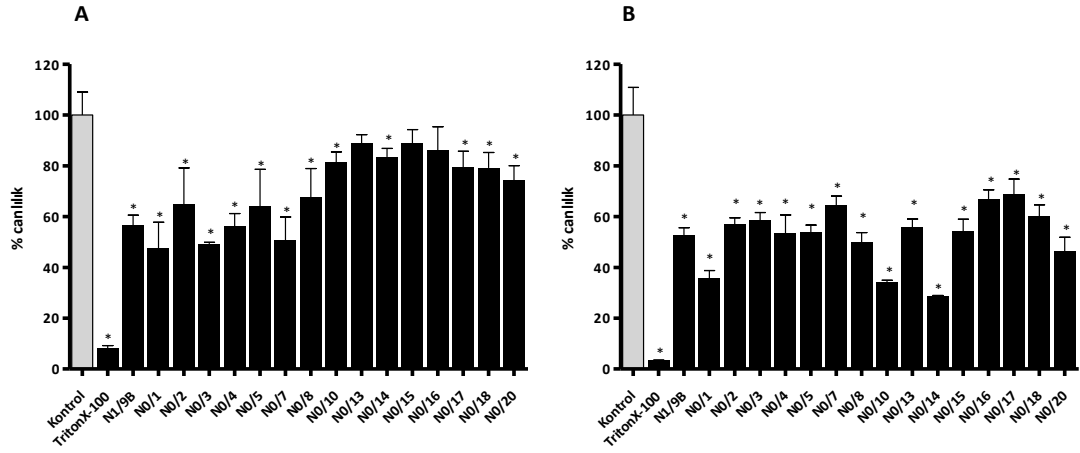


Şekil 4.46 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin (10 µM), MCF-7 BUS hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır (*p<0,05).

5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon yapısındaki bileşiklerin üçlü negatif insan meme kanseri hücresi MDA-MB-231 hücreleriyle 24 saat inkübasyon sonucunda hücre canlılığını değişen oranlarda ve istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttıkları görülmüştür (Şekil 4.47 A). Ayrıca sitotoksitenin zamana bağlı olarak arttığı bulunmuştur (Şekil 4.47 B).

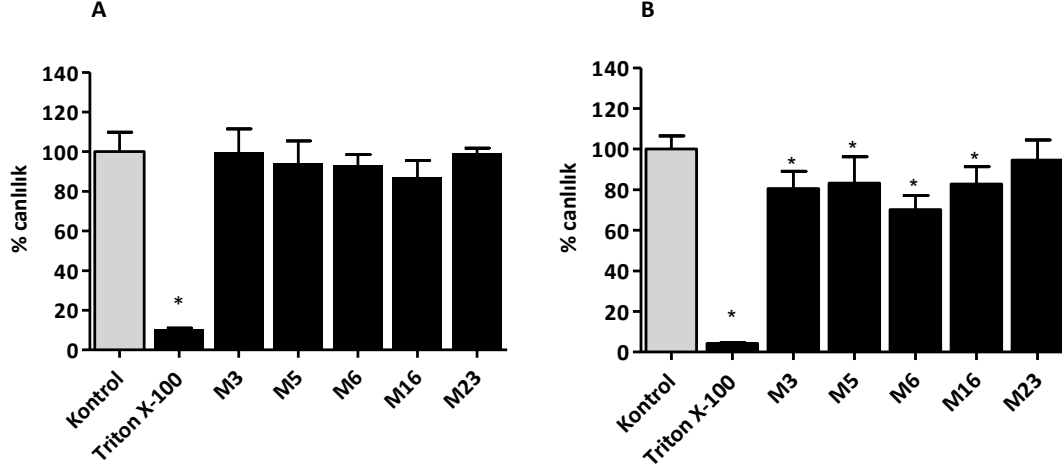
Sonuç olarak N0/1 ve N0/10, 72 saat inkübasyon sonucu hem sağlıklı meme epitel hücrelerinde hem de insan meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etkili bulunmuştur.

ER antagonist, aromataz inhibitör ve CYP1 inhibitör etkilerini de araştırdığımız N1/9B, N0/3, N0/4, N0/8 ve N0/14 ise MCF-7 BUS ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etkili bulunurken sağlıklı meme epiteli hücre hattı olan MCF-10A hücrelerinde sitotoksisiteye neden olmamıştır.



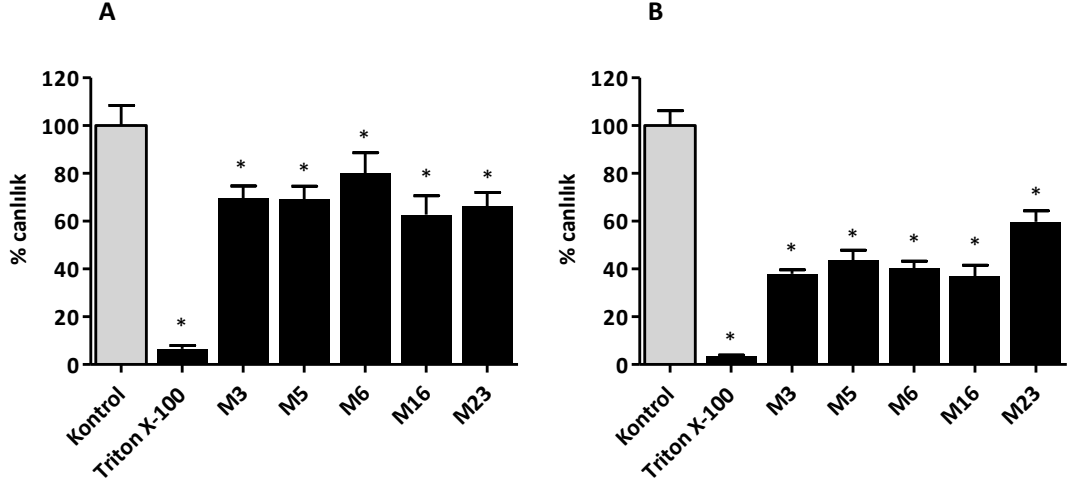
Şekil 4.47 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin (10 µM), MDA-MB-231 hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır (*p<0,05).

2-metilindol grubundaki M3, M5, M6 ve M16 bileşiklerinin sağlıklı insan meme epiteli hücresi olan MCF-10A hücre hattında canlılık üzerine etkileri araştırılmıştır. Bileşiklerin 24 ve 72 saat inkübasyon sonucu hücre canlılığını % 70' in altına düşürmediği ve önemli bir sitotoksik etkiye neden olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.48).

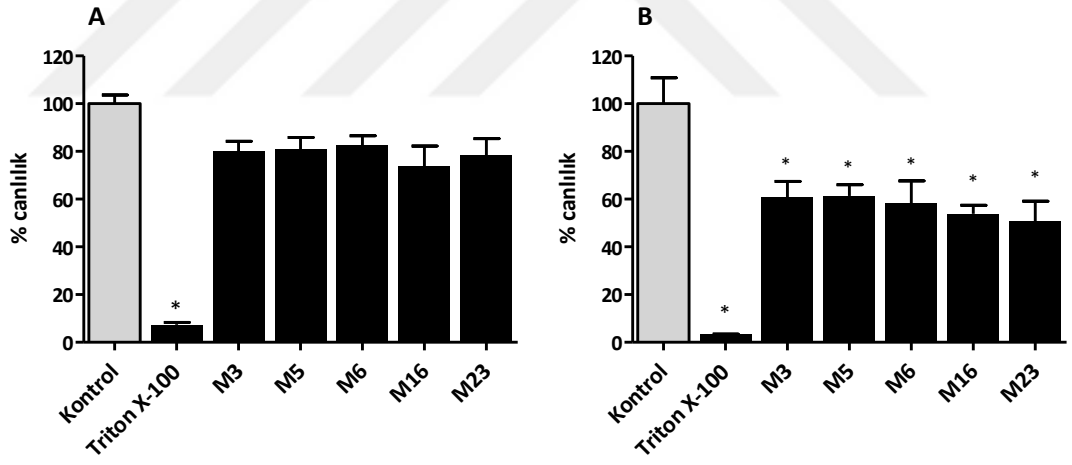


Şekil 4.48 2-metilindol grubu bileşiklerin (10 μ M), MCF-10A hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır (* $p < 0,05$).

Ardından bileşiklerin insan meme kanseri hücrelerindeki etkileri araştırılmıştır. Bileşikler MCF-7 BUS hücrelerinde hücre canlılığını zaman bağlı olarak ve istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır (Şekil 4.49). MDA-MB-231 hücrelerinde bileşikler 24 saat inkübasyon sonucu anlamlı bir sitotoksositeye neden olmazken (Şekil 4.50 A), 72 saat inkübasyon sonucunda hücre proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır (Şekil 4.50 B). Bileşiklerin ER+ MCF-7 BUS hücre hattındaki sitotoksik etkilerinin, üçlü negatif MDA-MB-231 hücre hattına kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.49, Şekil 4.50).



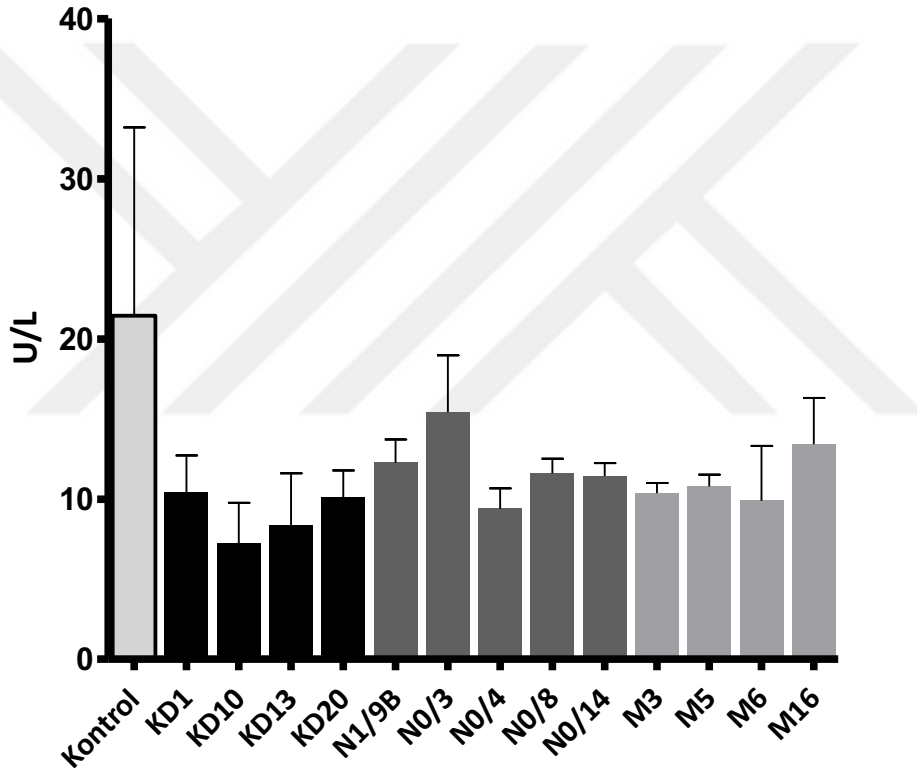
Şekil 4.49 2-metilindol grubu bileşiklerin (10 µM) MCF-7 BUS hücreleriyle 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır (*p<0,05).



Şekil 4.50 2-metilindol grubu bileşiklerin (10 µM), MDA-MB-231 hücreleriyle A) 24 saat, B) 72 saat inkübasyonu sonucu hücre canlılığının MTT yöntemiyle değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır (*p<0,05).

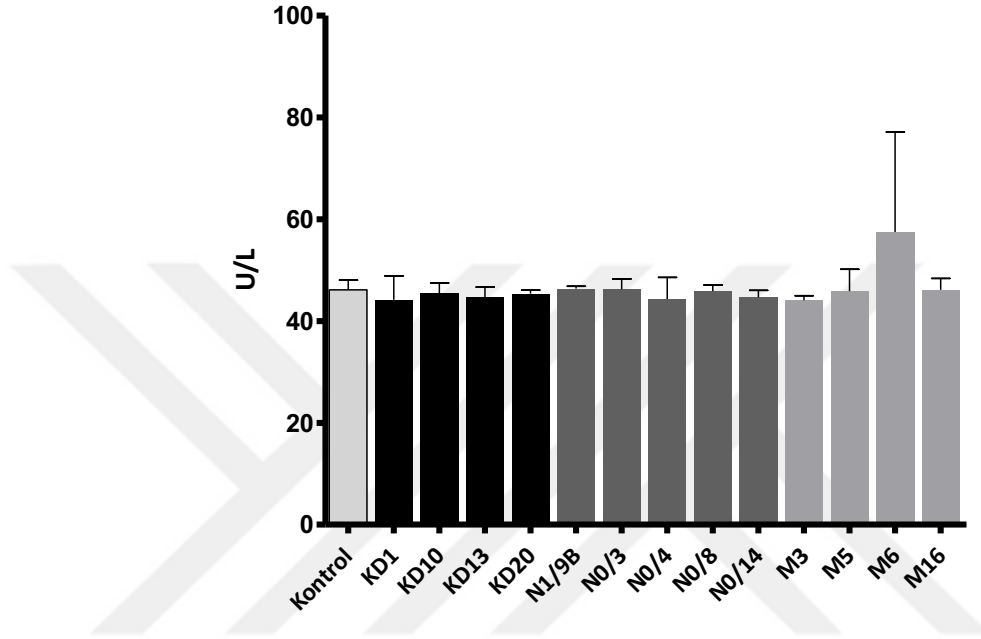
4.2.4.2 Sitotoksitenin LDH Yöntemi ile Araştırılması

ER antagonisti, aromataz inhibitörü ve CYP1B1 inhibitörü olduğu bulunan bileşiklerin MCF-10A, MCF-7 BUS ve MDA-MB-231 hücrelerindeki kısa süreli sitotoksik etkileri LDH yöntemiyle araştırılmıştır. Hücreler bileşiklerin 10 µM konsantrasyonu ile 4 saat inkübe edilmiş ve ardından deney ortamındaki LDH aktivitesi kinetik olarak ölçülmüştür. Test edilen bileşiklerin MCF-10A hücrelerinde membran hasarını indükleyici bir etkisinin olmadığı bulunmuştur (Şekil 4.51).



Şekil 4.51 MCF-10A hücrelerinde test bileşikleriyle (10 µM) 4 saat inkübasyon sonucu besi ortamında saptanan LDH aktivitesi. Barlar üç farklı çalışmanın “ortalama ± standart sapma” değerlerini göstermektedir. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözümü kontrol grubuna göre yapılmıştır.

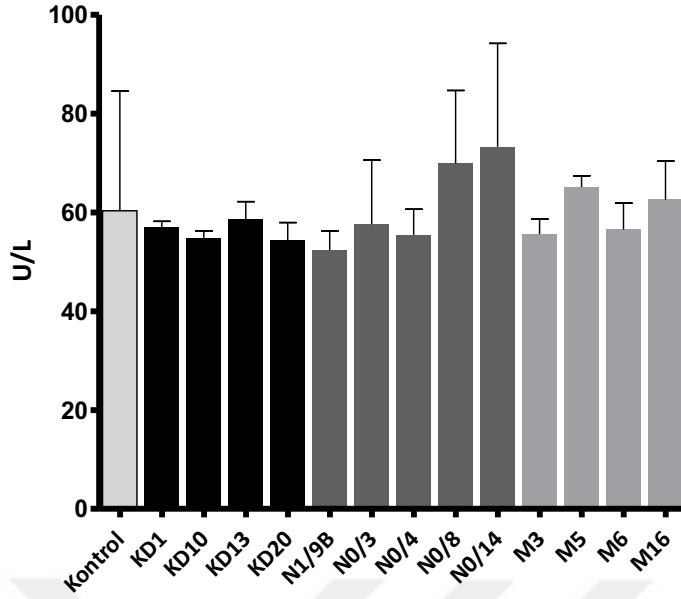
MCF-7 BUS hücrelerinde sadece M6 bileşiği 10 μ M konsantrasyonda membran hasarını indükleyerek LDH aktivitesini artırmış ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.52).



Şekil 4.52 MCF-7 BUS hücrelerinde test bileşikleriyle (10 μ M) 4 saat inkübasyon sonucu besi ortamında saptanan LDH aktivitesi. Barlar üç farklı çalışmanın “ortalama \pm standart sapma” değerlerini göstermektedir. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır.

MDA-MB-231 hücrelerinde ise N0/8 ve N0/14 bileşiklerin 4 saat inkübasyon sonucu deney ortamındaki LDH aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artışa neden olmuştur (Şekil 4.53).

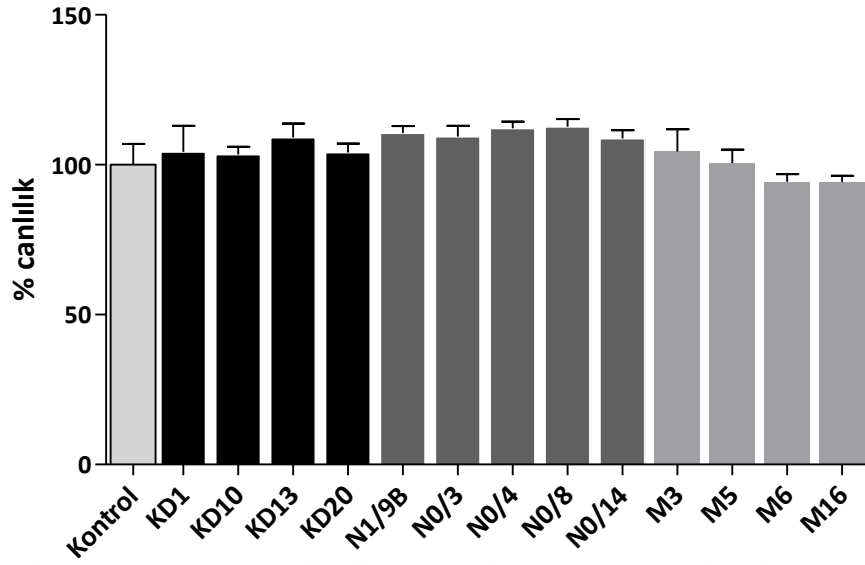
Sonuç olarak test edilen bileşiklerin hücrelerle kısa süreli maruziyet sonucu membran hasarına neden olmadığı bulunmuştur.



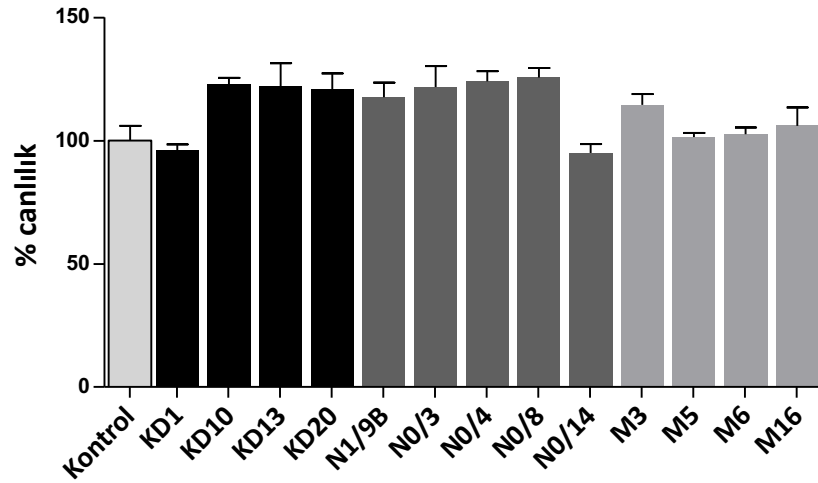
Şekil 4.53 MDA-MB-231 hücrelerinde test bileşikleriyle (10 μ M) 4 saat inkübasyon sonucu besi ortamında saptanan LDH aktivitesi. Barlar üç farklı çalışmanın “ortalama \pm standart sapma” değerlerini göstermektedir. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözümü kontrol grubuna göre yapılmıştır.

4.2.4.3 Sitotoksitenin Sülfrodamin B Yöntemiyle Araştırılması

Çalışma kapsamındaki farklı hedeflerde etkili görünen analogların MCF-10A, MCF-7 BUS, MDA-MB-231 hücrelerindeki sitotoksik etkileri sülfrodamin B yöntemiyle de araştırılmıştır. Hücreler bileşiklerin 10 μ M konsantrasyonu ile 24 saat inkübe edilmiş ve canlılık üzerine etkileri sülfrodamin B yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bileşikler MCF-10A hücrelerinde, MTT yöntemiyle elde edilen bulgulara benzer şekilde, sitotoksisiteye neden olmamıştır (Şekil 4.54). MCF-7 BUS hücrelerinde sitotoksik olduğu MTT yöntemiyle gösterilen bileşikler (Şekil 4.55) ise sülfrodamin B yönteminde hücre canlılığında azalmaya neden olmamıştır.

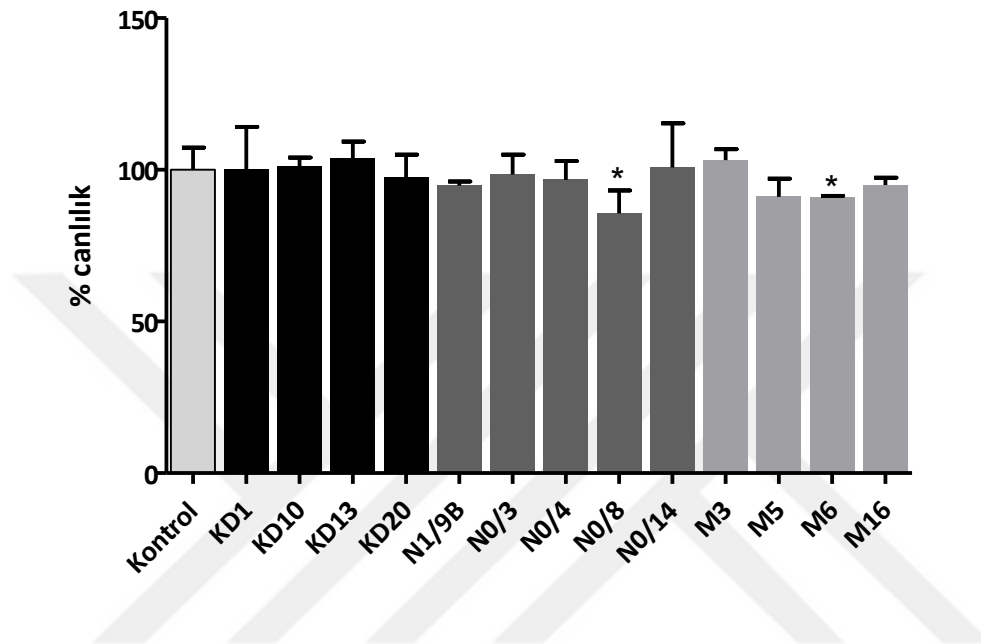


Şekil 4.54 MCF-10A hücrelerinde bileşiklerle (10 μ M) 24 saat inkübasyon sonucu sitotoksitenin sülforodamin B yöntemi ile değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözümü kontrol grubuna göre yapılmıştır.



Şekil 4.55 MCF-7 BUS hücrelerinde sitotoksitenin bileşiklerle (10 μ M), 24saat inkübasyon sonucu sülforodamin B yöntemi ile değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözümü kontrol grubuna göre yapılmıştır (*p<0,05).

Bileşiklerin üçlü negatif meme kanseri hücresi olan MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık üzerine etkileri sülfrodamin B yöntemiyle değerlendirildiğinde ise N0/8 ve M6 bileşiklerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde hücre canlılığını azalttığı görülmüştür (Şekil 4.56).



Şekil 4.56 MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksitenin bileşiklerle (10 μ M) 24saat inkübasyon sonucu sülfrodamin B yöntemi ile değerlendirilmesi. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır (* $p < 0,05$).

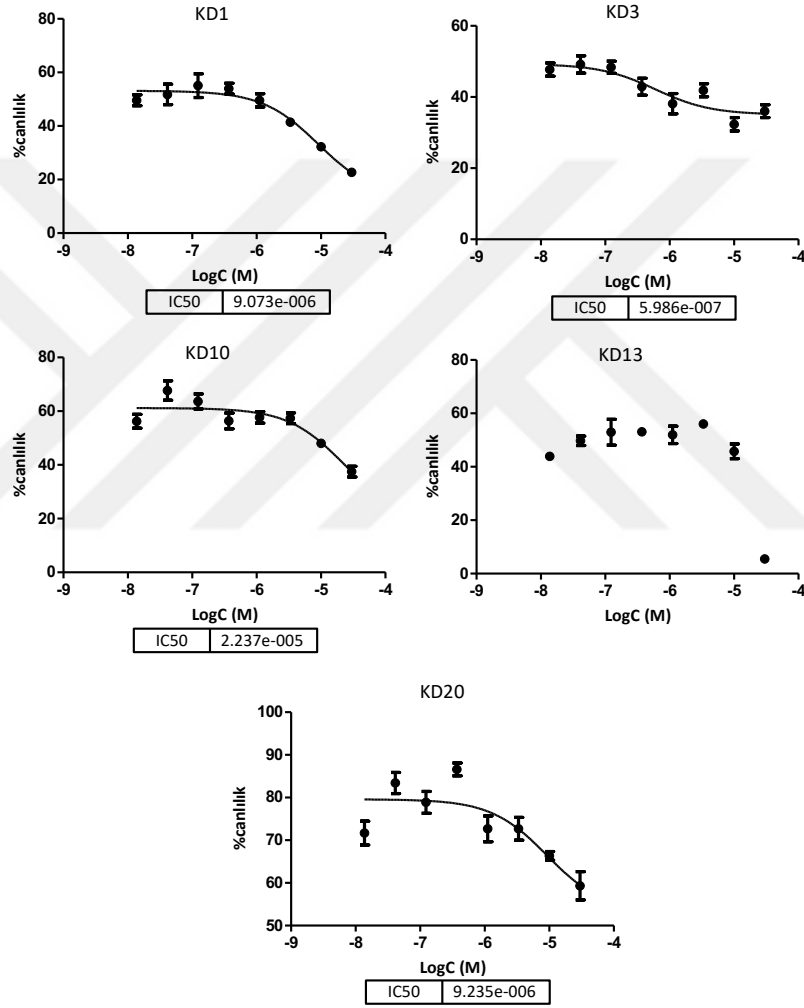
4.2.4.4 Melatonin Analoglarının Farklı Meme Kanseri Hücrelerinde

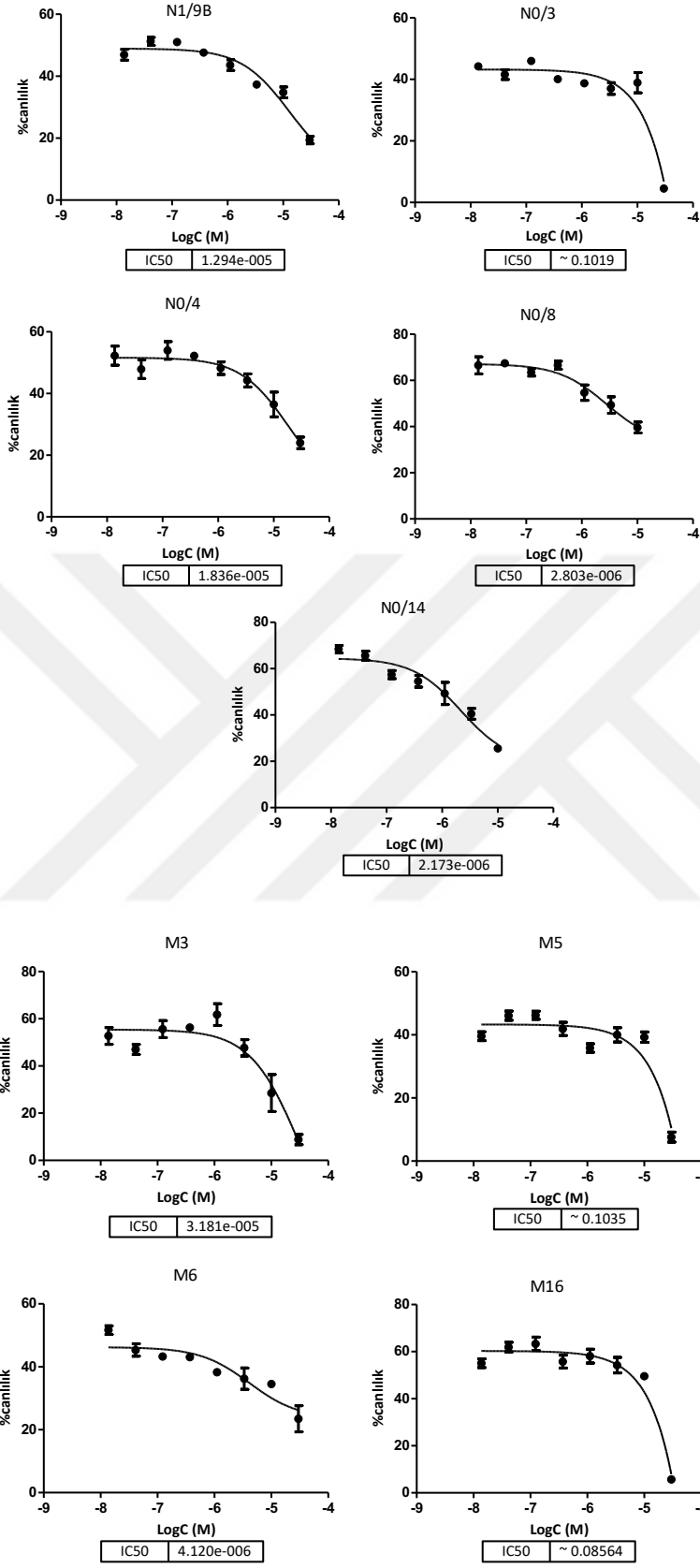
IC₅₀ Değerlerinin Hesaplanması

Tek doz tarama çalışmalarında meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etkili olan ve bunun yanında araştırdığımız diğer yollarda da etkili görünen bileşiklerin sitotoksik etkilerinin hormon ilişkili olup olmadığını aydınlatılmak amacıyla ER+ MCF-7 BUS hücre hattı ile üçlü negatif meme kanseri hücresi olan MDA-MB-231 hücre hatlarında bileşiklerin hücre canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Hücreler bileşiklerin 8 farklı konsantrasyonu ile 72 saat inkübasyona bırakılmış ve canlılık MTT

yöntemiyle değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler ile konsantrasyon - % canlılık grafikleri çizilmiş ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

KD13, N0/3 ve M5 bileşikleri MCF-7 BUS hücrelerinde doza bağlı bir sitotoksisite göstermemiş ve IC₅₀ değeri hesaplanamamıştır. KD1, KD3, KD20, N0/8, N0/14 ve M6 bileşiklerinin ise $0,59 \cdot 10^{-6}$ - $9,2 \cdot 10^{-6}$ M aralığındaki IC₅₀ değerleriyle taranan bileşikler arasında en etkili bileşikler oldukları bulunmuştur (Şekil 4.57).

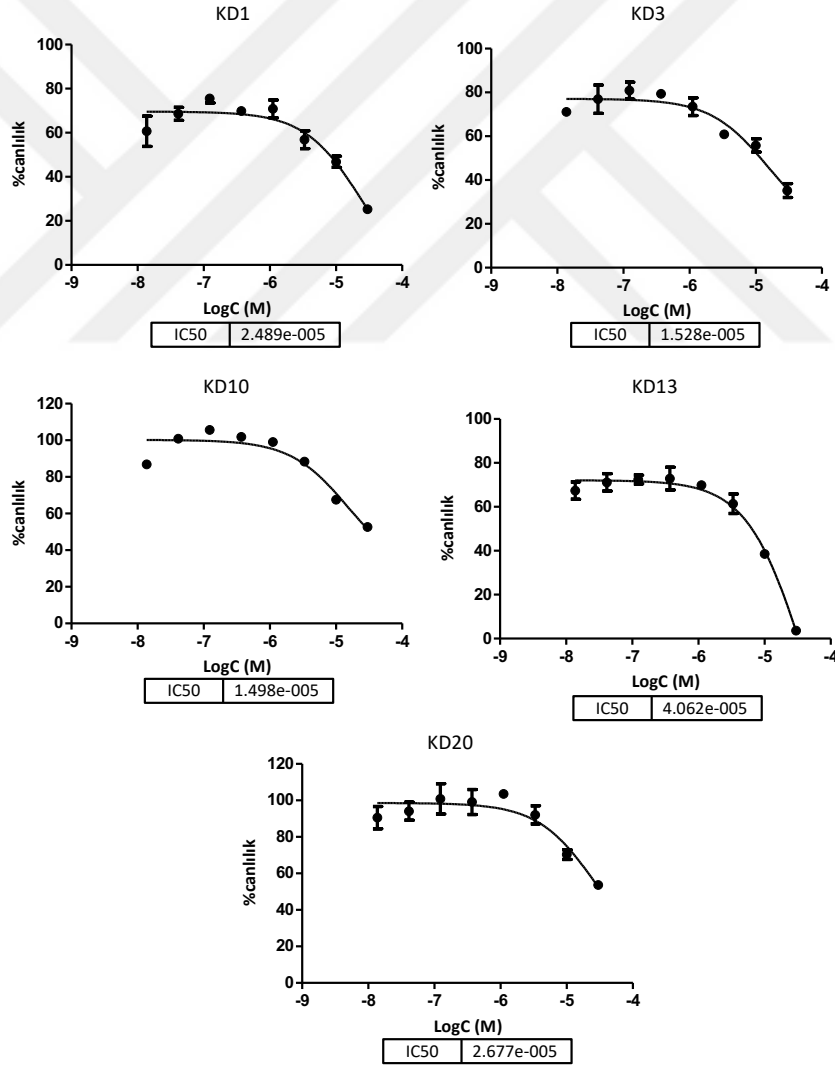


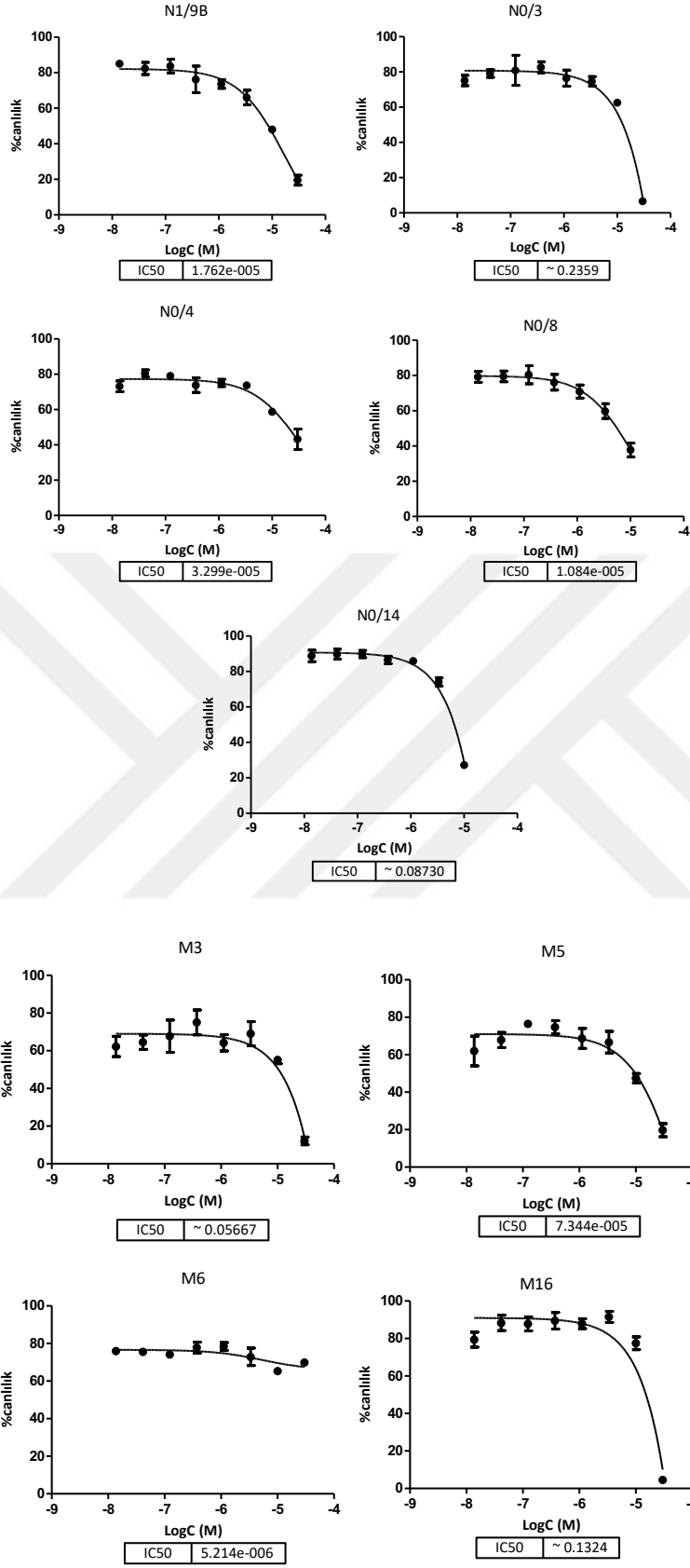


Şekil 4.57 Etkin bileşiklerin MCF-7 BUS hücreleriyle 72 saat inkübasyonu sonucu sitotoksitenin MTT yöntemiyle değerlendirilmesi ve IC₅₀ değerleri.

Şekil 4.58’de bileşiklerin konsantrasyona bağlı % canlılık değerleri ve IC₅₀ değerleri görülmektedir. N0/3 ve M3 bileşikleri MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığını konsantrasyona bağlı şekilde inhibe edememiş ve bu nedenle IC₅₀ değeri hesaplanmamıştır.

Her iki hücre hattında elde edilen IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında test edilen bazı bileşiklerin MDA-MB-231 hücrelerindeki toksik etkili konsantrasyonlarının MCF-7 BUS hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu, bir başka ifadeyle ER+ hücrelerdeki sitotoksik etkinin üçlü negatif hücrelerdekine göre daha güçlü olduğu görülmüştür (Şekil 4.57, Şekil 4.58).





Şekil 4.58 Etkin bileşiklerin MDA-MB-231 hücreleriyle 72 saat inkübasyonu sonucu sitotoksitenin MTT yöntemiyle değerlendirilmesi ve IC₅₀ değerleri.

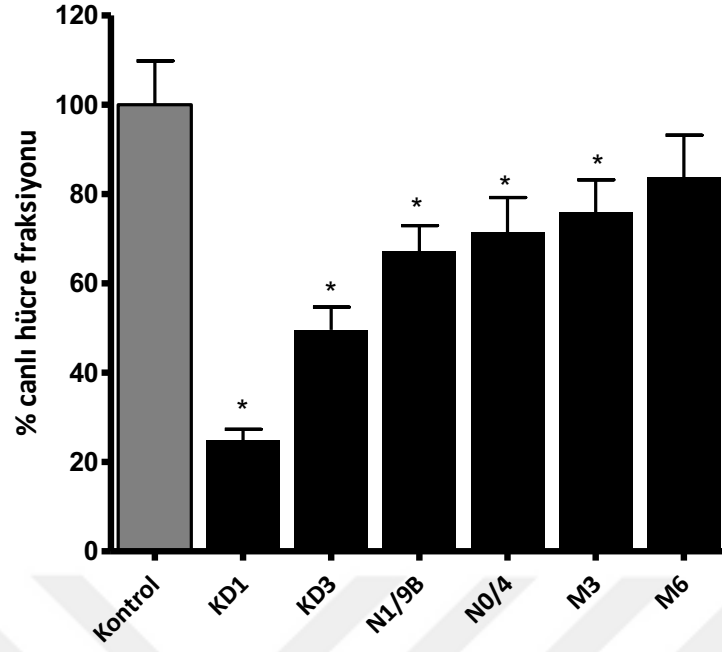
4.2.4.5 Uzun Süreli Sitotoksitenin Koloni Oluşum Yöntemi ile

Araştırılması

MCF-7 BUS ve MDA-MB-231 hücrelerinde sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile araştırılan ve IC_{50} değeri 10^{-5} M' in altında bulunan bileşiklerin uzun süreli sitotoksik etkileri koloni oluşum yöntemi ile değerlendirilmiştir. Buna göre 1-etilindol grubundan KD1, KD3; 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubunda N1/9B, N0/4 ve 2-metilindol grubundan M3, M6'nın bileşikleri seçilmiş ve 10 μ M konsantrasyonda koloni oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. Test edilen bileşiklerin hepsi 10 μ M konsantrasyonda MCF-7 BUS hücrelerinde koloni oluşumunu engellemiş ve koloni oluşumu gözlenmemiştir. Bileşiklere ait koloni etkinliği ve canlı hücre fraksiyonu değerleri 0 olarak hesaplanmıştır.

MDA-MB-231 hücrelerinde de bileşiklerin 10 μ M konsantrasyonda uzun süreli sitotoksik etkileri koloni oluşum yöntemi ile değerlendirilmiş ve maruziyet sonrası canlı kalan koloni sayısına göre canlı hücre fraksiyonu % olarak hesaplanmıştır.

Test edilen analogların MDA-MB-231 hücrelerinde değişen oranlarda koloni oluşumunu inhibe ettiği görülmüş ve KD1' in koloni oluşumunu inhibe etmede etkili bileşik olduğu saptanmıştır (Şekil 4.59).



Şekil 4.59 Bileşiklerin (10 µM) MDA-MB-231 hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkileri. İstatistiksel değerlendirmede karşılaştırma çözücü kontrol grubuna göre yapılmıştır (*p<0,05).

Tez kapsamında araştırılan melatonin analoglarının uygulanan tüm testlerdeki etkileri Tablo 4.7'de özetlenmiştir.

Tablo 4.7 Biyolojik olarak aktif bulunan melatonin analoglarının uygulanan tüm testlerdeki etkilerinin özeti (+ : Tek doz tarama çalışmasında etkili bulunan ancak doz-yanıt ilişkisini araştırmak için değerli bulunmayan; – : etkili bulunmayan).

Bileşik adı	ER-antagonisti Etki	Aromataz inhibisyonu	Mikrozomal CYP1 inhibisyonu	Rekombinant CYP1B1 inhibisyonu	MCF-10A sitotoksosite	MCF-7 BUS sitotoksosite	MDA-MB-231 sitotoksosite
KD1	IC ₅₀ : 2,9 µM	IC ₅₀ : 2,4 µM	IC ₅₀ : 3 µM	IC ₅₀ : 95,7 nM	–	IC ₅₀ : 9,1 µM	IC ₅₀ : 24,9 µM
KD2	IC ₅₀ : 9,3 µM	+	IC ₅₀ : 6,7 µM		–	–	–
KD3	IC ₅₀ : 5,3 µM	+	IC ₅₀ : 5,6 µM		+	IC ₅₀ : 0,6 µM	IC ₅₀ : 15,3 µM
KD4	IC ₅₀ : 0,6 µM	–	IC ₅₀ : 1,8 µM	IC ₅₀ : 8,5 nM	–	–	–
KD10	+	IC ₅₀ : 1,1 µM	+		–	IC ₅₀ : 22,4 µM	IC ₅₀ : 15 µM
KD13	IC ₅₀ : 9,9 µM	+	IC ₅₀ : 7,1 µM		–	Doz- yanıt ilişkisi yok	IC ₅₀ : 40,6 µM
KD20	+	IC ₅₀ : 0,8 µM	IC ₅₀ : 0,4 µM	IC ₅₀ : 0,6 µM	–	IC ₅₀ : 9,2 µM	IC ₅₀ : 26,8 µM
N1/9B	IC ₅₀ : 6,1 µM	IC ₅₀ : 10 µM	IC ₅₀ : 2,6 µM	IC ₅₀ : 10,9 nM	–	IC ₅₀ : 12,9 µM	IC ₅₀ : 17,6 µM
N0/3	+	IC ₅₀ : 6,6 µM	IC ₅₀ : 1,5 µM	IC ₅₀ : 14 nM	–	Doz- yanıt ilişkisi yok	Doz- yanıt ilişkisi yok
N0/4	IC ₅₀ : 7 µM	IC ₅₀ : 41 µM	IC ₅₀ : 1,3 µM	IC ₅₀ : 16,4 nM	–	IC ₅₀ : 18,4 µM	IC ₅₀ : 33 µM
N0/8	IC ₅₀ : 9,4 µM	IC ₅₀ : 20 µM	IC ₅₀ : 1,5 µM		–	IC ₅₀ : 2,8 µM	IC ₅₀ : 10,8 µM
N0/14	–	+	IC ₅₀ : 1,5 µM		–	IC ₅₀ : 2,2 µM	Doz- yanıt ilişkisi yok
M3	IC ₅₀ : 3,3 µM	Daha önce yayınlandı (Ozcan-Sezer et al., 2018)	IC ₅₀ : 1,5 µM	IC ₅₀ : 18,3 nM	–	IC ₅₀ : 31,8 µM	Doz- yanıt ilişkisi yok
M5	IC ₅₀ : 2,2 µM		IC ₅₀ : 2,7 µM		–	Doz- yanıt ilişkisi yok	IC ₅₀ : 73,4 µM
M6	IC ₅₀ : 0,9 µM		IC ₅₀ : 1,9 µM	IC ₅₀ : 51,7 nM	–	IC ₅₀ : 4,1 µM	IC ₅₀ : 5,2 µM
M16	IC ₅₀ : 4,8 µM		IC ₅₀ : 4,1 µM		–	Doz- yanıt ilişkisi yok	Doz- yanıt ilişkisi yok

5 TARTIŞMA

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen ve kanserden ölüm nedenleri arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alan kanser türüdür (Ferlay ve ark., 2015; Parkin, 2004). TC Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kanser Dairesi Başkanlığı'nın 2015 yılı verilerine göre ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanser (% 24,7) türü olduğu bildirilmiştir. Meme kanseri tanısı alan kadınların % 44,5' inin 50-69 yaş arasında olduğu, % 40,6'sının ise 25-49 yaş aralığında yer aldığı görülmektedir (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2015). Bu durum menopoz sonrası dönemde de riskin devam ettiğinin bir kanıtıdır. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayımlanan GLOBOCAN 2012 projesinin verilerine göre gelişmekte olan ülkelerde meme kanseri insidansı gelişmiş ülkelere göre daha düşükken, meme kanserinden ölüm oranları daha yüksek bulunmuştur (Ferlay ve ark., 2015). Bu veri teşhis ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelerin önemini ve hastalığın tedaviye yanıt verdiğini kanıtlar niteliktedir.

Meme kanserinin nedenleri araştırıldığında endojen östrojenlere maruziyet ile meme kanseri arasında pozitif bir ilişki olduğu görülmüş ve yaşam boyu östrojene maruziyeti artıran geç menopoz, erken menarş, geç ilk doğum yaşı, doğum sayısının az olması, emzirme süresinin kısa olması gibi faktörlerin meme kanseri riskini artırdığı bildirilmiştir (Berkey, Frazier, Gardner ve Colditz, 1999; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002; Hankinson, Colditz ve Willett, 2004; Medina, 2004).

Östrojenin meme kanseri oluşumundaki etkileri reseptör aracılıklı ve reseptörden bağımsız olarak gerçekleşebilmektedir. Östrojen, reseptörlerine bağlanarak hücre proliferasyonunu arttırmakta ve hücre proliferasyonundaki artış DNA replikasyonunda hatalı eşleşmelere, onarım proseslerinin bu hızlı proliferasyona yetişememesine ve oluşan hataların kalıcı nokta mutasyonları ile sonuçlanmasına neden olabilmektedir (Preston-Martin ve ark., 1990). Diğer taraftan östrojenin metabolizması sonucu oluşan reaktif metabolitleri genotoksik etkiye neden olarak meme kanserinin başlama evresinde görev alabilmektedir (Yue ve ark., 2003). Benzer şekilde pek çok kimyasal maddenin de toksik metabolitlerine

biyotransformasyonu sonucu oluşan reaktif metabolitlerinin meme kanserinde rolü olduğu bilinmektedir (Rundle ve ark., 2000). Bu mekanizmalardan hareketle meme kanseri tedavisinde östrojeni hedef alan antikanser ilaçların geliştirilmesindeki başlıca hedefler östrojenin ER aracılıklı etkilerinin önlenmesi ve östrojen sentezinin inhibe edilmesidir (Wong ve Ellis, 2004).

Melatonin pineal bezden salgılanan indol yapılı bir hormondur ve başta sirkadiyen ritmi düzenlemek olmak üzere çok sayıda fizyolojik olayda rol almaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar vardiyalı çalışan kadınlarda sirkadyen ritimde bozulma, uykusuzluk, melatonin düzeylerinde azalma ile ilişkili olarak meme kanseri riskinin arttığını göstermiştir (Davis ve ark., 2001; Hansen, 2001; Russel J Reiter ve ark., 2009). IARC insanlarda sınırlı veri olmasına rağmen günün karanlık saatlerinde ışığa maruz bırakılan hayvanlarda kanser gelişimine ait yeterli kanıt bulunmasına dayanarak sirkadyen ritm bozukluğuna neden olan “gece vardiya” çalışmalarını “insanlarda büyük olasılıkla karsinojen” olarak ifade edilen Grup 2A’da sınıflamaktadır (IARC monograph, 2007). Melatoninin meme kanserindeki onkostatik etkileri çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışmada gösterilmiş (S Cos ve Sanchez-Barcelo, 2000; S M Hill ve Blask, 1988; E J Sanchez-Barcelo, Cos, Fernandez ve Mediavilla, 2003); bu etkilerini reseptör aracılıklı olarak (SERM etkisi) ya da östrojenlerin dokularda lokal olarak sentezini sağlayan enzimleri modüle ederek (SEEM etki) gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Emilio J. Sanchez-Barcelo ve ark., 2005). Bununla birlikte melatoninin düşük yarılanma ömrüne sahip olması ve oral biyoyararlanımının düşük olması ilaç olarak kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca patentlenebilir olmayışı da melatoninin ilaç olarak üretiminden kaçınılması sonucunu doğurmuştur. Literatürde yarılanma ömrü daha uzun ve daha etkin melatonin analoglarının sentezlenmesinin tedavi başarısını artırabileceği belirtilmektedir (Emilio J. Sanchez-Barcelo ve ark., 2007).

Bugüne kadar Prof. Dr. Sibel Süzen ve grubu ile birlikte yürüttüğümüz çalışmalarda yeni sentezlenen çok sayıda indol temelli melatonin türevi bileşiğin antioksidan etki potansiyelleri araştırılmıştır. Sentezlenen bazı bileşiklerin radikal süpürücü ve/veya hidrojen peroksitle indüklenen oksidasyonu indirgeyici (redükta) aktivite göstererek antioksidan etkili oldukları ve bu nedenle oksidatif stresle ilişkili

hastalıkların önlenme ve tedavisinde destekleyici ajan olarak kullanılmaya aday bileşikler olabilecekleri belirtilmiştir (Gurer-Orhan ve ark., 2016; Shirinzadeh, Eren, Gurer-Orhan, Suzen ve Özden, 2010; Shirinzadeh, Ince, Westwell ve Gurer-Orhan, 2016; Suzen ve ark., 2013). İlaç keşif çalışmalarının erken evrelerinde belirlenen ve toksisite potansiyellerinin göstergesi olan sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri de tarafımızdan araştırılmış ve birçok bileşiğin güçlü antioksidan etki gösterirken sitotoksik etkiye neden olmadıkları görülmüştür. Bu ön veriler sentezlenen bileşiklerin ileri çalışmalarla değerlendirilmeye değer olduklarını göstermiştir. Bu süreçte sentezlenen bileşiklerin ana molekülü olan melatoninin aromataz inhibisyonu yaptığının ve aromataz inhibisyonunun da endokrin bozucu etki ile sonuçlanabileceğini bilmemiz, bu bileşiklerin endokrin sistem ilişkili advers etkilerinin olabileceğini düşündürmüştür. Gerçekten de bu tez çalışması öncesinde yaptığımız ön çalışmalarda 2-metilindol grubu melatonin analogu bazı bileşiklerin aromataz enzimi üzerine inhibitör etkili olduğu bulunmuştur (Ozcan-Sezer ve ark., 2018). Sağlıklı kişilerde endokrin sistem fonksiyonlarını değiştirerek toksisiteye (endokrin bozucu etki) neden olan bu “advers etki”nin hormon-bağımlı meme kanseri olgularında tedavi seçeneği olabileceği düşüncesiyle tez kapsamındaki bileşiklerin meme kanserinin tedavisinde farklı hedeflerdeki etkinlikleri araştırılmıştır.

İlaç keşif ve geliştirme süreçleri göz önüne alındığında prelinik aşamada *in vivo* çalışmalar öncesinde uygulanan yaklaşım;

- Etkinlik açısından hedef belirleme,
- Hedefin ölçülmesi için bir yöntem belirleme,
- Çok sayıdaki etkin madde adayının etkinliklerini belirlerken maliyeti düşürmek ve zaman kazanmak amacıyla bilgisayar tabanlı moleküler modelleme çalışmaları ile öngörülse (predictive) etkinlik ve/veya toksisite verisi elde etme,
- Bu elemenden geçen maddelerin seçilen hedeflerdeki biyolojik etkilerini orta/hızlı tarama teknikleri ile araştırma,

- Tüm bu çalışmalardan elde edilen yapı-aktivite verileri ile birlikte etkin ve toksik olmayan “öncü” etkin madde adayını belirlemek üzere *in vivo* testlere geçmek yönündedir.

Bu tez çalışması kapsamında da söz konusu *in vitro* prelinik ilaç keşif basamaklarının her birine örnek oluşturacak çalışmaların yapılması hedeflenmiştir.

Tez çalışması kapsamında indol türevi melatonin analogları için hormon ilişkili meme kanserlerindeki olası terapotik hedefler olarak;

1. Melatoninin ER modülatör etkinliğinin bildirilmesi nedeniyle **östrojen reseptörü**,
2. Melatoninin aromataz inhibitörü etkisinin bildirilmesi nedeniyle **aromataz enzimi**,
3. Melatoninin CYP1B1 inhibitör etkisinin bildirilmesi nedeniyle **CYP1B1 enzimi** seçilmiştir.

Bu hedefler üzerinde 1-etilindol (KD), 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon (N1 ve N0) ve 2-metilindol (M) yapısında toplam 40 indol türevi melatonin analogunun etkileri araştırılmıştır.

Bileşiklerin belirlenen ilk terapotik hedef olan ER üzerine etkileri E-Screen yöntemiyle araştırılmıştır. E-screen yöntemi çevresel kirleticilerin olası östrojenik etkilerini belirlemek amacıyla 1995 yılında Soto ve ark. tarafından geliştirilen *in vitro* hücre temelli bir proliferasyon testidir (Soto ve ark., 1995). Yöntem hayatta kalabilmek ve proliferasyon için östrojene bağımlı olan insan meme kanseri hücreleri olan MCF-7 hücrelerinin hormon içermeyen ortamda test edilen bileşik varlığında proliferasyonlarının izlenmesi esasına dayanmaktadır. Hücreler proliferasyon olduğu durumda test edilen maddenin östrojenik etkili olduğu ve bu etkisini östrojen reseptörü agonisti etki mekanizması ile gösterdiği söylenebilmektedir. Rasmussen ve arkadaşları tarafından 96 kuyucuklu plakaya adapte edilmiş olan yöntem (Rasmussen ve Nielsen, 2002) çok sayıda kimyasal bileşiğin östrojenik etki potansiyelini hızlı bir şekilde ölçmeye olanak sağlamıştır ve bu yöntem kullanılarak çok sayıda çevresel ve doğal kaynaklı bileşiğin östrojenik etki potansiyelleri belirlenmiştir (DeCastro, Korrick, Spengler ve Soto, 2006; Flor, He, Lehmler ve

Ludewig, 2016; Real ve ark., 2015; Resende, de Oliveira, de Camargo, Vilegas, ve Varanda, 2013; Tatay, Espin, Garcia-Fernandez ve Ruiz, 2018). Tez kapsamında kullanılan bileşiklerin öncelikle hedeflediğimiz hormon bağımlı meme kanseri tedavisinde advers/istenmeyen etki olarak görülebilecek östrojenik etki potansiyelleri araştırılmış ve test edilen bileşiklerin hiçbirinin östrojenik etkili olmadığı gösterilmiştir. Bu yönü ile maddelerin östrojen-bağımlı (ER+) meme kanseri hücrelerinin proliferasyonuna neden olmak şeklinde bir advers etki potansiyelleri bulunmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16).

Takiben, E-Screen yöntemini bulan Soto ve arkadaşlarının belirttiği (Soto ve ark., 2006; Soto, Sonnenschein, Prechtel, Weill ve Olea, 1999) modifikasyonlar yapılarak, iki basamaklı bir yaklaşımla, maddelerin östrojen reseptör antagonisti etkinliği araştırılmıştır. İlk basamakta hücreler östradiolün hücre proliferasyonunu artıran konsantrasyonu ve antagonist etkisi araştırılan bileşiğin artan konsantrasyonlarıyla muamele edilmiştir. Bu basamakta östradiol ile indüklenen hücre proliferasyonunu inhibe eden bileşiklerle, ER antagonisti olma potansiyellerinin belirlenmesi için ikinci basamağa geçilmiştir. Zira maddeler bu etkilerini reseptör antagonisti etki aracılığıyla gösterebilecekleri gibi sitotoksik etkileriyle de hücre proliferasyonunu inhibe etmiş olabilirler; bunun test edilmesi için ikinci basamak uygulanmıştır. Bu basamakta hücreler bileşiğin hücre proliferasyonunu belirgin derecede azaltan en düşük konsantrasyonu ve östradiolün artan konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Maddenin neden olduğu proliferasyondaki azalma, etkinin reseptör aracılıklı olması durumunda östradiolün artan konsantrasyonu ile tersine çevrilmiştir. Östradiolün artan konsantrasyonları ile hücre proliferasyonunda artış görülememesi ise maddenin sitotoksik etkili olduğunu göstermiştir. Çalışmada test edilen bileşikler arasından NO/14 maddesinin sitotoksik olduğu, bunun dışında ilk basamakta proliferasyonu önleyen 9 maddenin farklı oranlarda antagonist etkili oldukları görülmüştür (Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24). KD4 ve M6 maddelerinin sırasıyla $0,5 \cdot 10^{-6}$ M ve $0,9 \cdot 10^{-6}$ M IC_{50} değerleri ile çalışmadaki en potent ER antagonisti bileşikler olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.22 ve Şekil 4.24). Melatoninin ortamda $1 \cdot 10^{-10}$ M östradiol varlığında MCF-7 BUS hücre proliferasyonunu inhibe etmediği belirlenmiştir (Şekil 4.21). Literatürde de melatoninin antiöstrojenik

etkisini direkt olarak ER'ye bağlanarak değil hücre membranında bulunan MT1 ve MT2 reseptörlerine bağlanarak gösterdiği bildirilmiştir. Melatonin MT1 ve MT2 reseptörlerine bağlanarak ER α ekspresyonunu azaltmakta ve östradiol-ER kompleksinin DNA üzerinde bulunan östrojen yanıt elementine (ERE) bağlanmasını inhibe etmektedir (T. M. Molis ve ark., 1994; Rato ve ark., 1999; Yuan ve ark., 2002). Bu tez çalışması kapsamında bileşiklerin MT1 ve MT2 reseptörlerine olan afinitesi ve bu yol ile ER α ekspresyonu üzerindeki olası etkileri araştırılmamıştır. Ayrıca MCF-7 hücreleri bu etkiyi gözlememize olanak verecek düzeylerde MT1 ve MT2 reseptörü eksprese etmemekte, benzeri çalışmalar söz konusu reseptörler ile transfekte edilmiş MCF-7 hücreleri kullanılarak yapılmaktadır (Yuan ve ark., 2002). Benzeri model kullanılarak maddelerin bu yolak üzerindeki etkilerinin de araştırılması, etki mekanizmalarının tam olarak aydınlatılması açısından gelecekte yapmayı planladığımız çalışmalar arasında yer almaktadır.

Menopoz sonrası kadınlarda hormon bağımlı meme kanseri insidansının yüksek olması gonad dışında sentezlenen hormonların meme kanserinde önemli rol oynadığını düşündürmüştü ve periferik dokularda aromataz enziminin androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalizlediği gösterilmiştir (I. H. Russo ve Russo, 1998). Meme kanserli dokularda aromataz enzim aktivitesinin sağlıklı meme dokusuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (S. Bulun, Zeitoun, Sasano ve Simpson, 1999; E. Simpson ve ark., 1999). Aromataz enzimi aracılığı ile lokal olarak sentezlenen östrojen, hormon-bağımlı kanser hücrelerinin proliferasyonunu artıracak için androjenlerin östrojenlere dönüşümünde yer alan enzimleri inhibe eden ilaçların geliştirilmesi tedavi yaklaşımında önem kazanmıştır (Barker, 2003). Ayrıca meme kanserlerinin tedavisinde kullanılan SERM ilaçların meme dokusunda ER antagonist etkileri ile kanser hücrelerinin proliferasyonunu önlemesinin yanı sıra endometriyum gibi farklı dokularda ER agonist etkileri sonucu ciddi advers etkilere neden olmaları tedavide östrojen sentezinin önlenmesinin daha az yan etkili bir yaklaşım olacağını düşündürmüştür (Berry, 2005). Meme kanserinin önlenmesi ve tedavisinde klinikte başarılı olan aromataz inhibitörleri (anastrozol, letrozol, eksemestan) bulunmaktadır (Brueggemeier ve ark., 2005; Ghosh, Lo ve Egbuta, 2016). Fakat bu ilaçlarla tedavide baş ağrısı, uykusuzluk, bulantı, artralji gibi çok

sayıda yan etki görülmektedir (Dizdar ve ark., 2009; Ghosh ve ark., 2016; Tomao ve ark., 2011) ve ayrıca tedaviye direnç gelişebilmektedir (Jansen ve ark., 2013). Bu nedenlerle bu ilaçlara alternatif olabilecek, yan etkisi düşük yeni aromataz inhibitörlerinin arayışı devam etmektedir (Prior ve ark., 2017).

Melatoninin *in vitro* ve *in vivo* modellerde aromataz aktivitesini ve ekspresyonunu inhibe ettiği bilgisinden hareketle (Samuel Cos, Gonzalez, Güzmes ve ark., 2006; Samuel Cos ve ark., 2005), sentezlenen melatonin türevlerinin aromataz inhibitör etkinliklerinin araştırılması planlanmıştır. 1-etilindol (KD) ve 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon (N0) yapısındaki toplam 35 yeni melatonin analogu bileşiğin aromataz inhibitör etkinlikleri insan rekombinant aromataz enzimi ve floresans bir substratın kullanıldığı *in vitro* bir yöntemle araştırılmıştır. Bu yöntem daha önce hem grubumuz hem de başka araştırmacılar tarafından aromataz inhibitörlerinin belirlenmesinde kullanılmış bir yöntemdir (Bonfield ve ark., 2012; Ozcan-Sezer ve ark., 2018). Öncelikle yöntemin başarısı araştırılmış, aromataz inhibitörü olduğu bilinen ketokonazolün farklı konsantrasyonları ile enzim inhibisyon grafiği elde edilerek IC_{50} değeri $2,3 \cdot 10^{-6}$ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.3). Bu değer literatürde bildirilen $2 \cdot 10^{-6}$ M değerine benzer bulunması ve yöntemin tekrarlanabilir olduğunun gösterilmesi üzerine bileşiklerin $100 \mu\text{M}$ konsantrasyonda aromataz enzimi üzerine inhibitör etkinliklerinin taranması çalışmasına geçilmiştir. Hem 1-etilindol grubu bileşikler hem de 5-metoksiindol 3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerin değişen oranlarda aromataz enzimini inhibe ettiği görülmüş, gruplarda yer alan maddeler genel olarak kıyaslandığında 5-metoksiindol 3-aldehit hidrazon grubunun $100 \mu\text{M}$ konsantrasyonda daha güçlü inhibisyon yaptığı görülmüştür (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26). Bu bulgu indol halkasında 5- konumunda metoksi grubu bulunmasının inhibitör aktiviteyi artıracak şekilde yorumlanabilir.

Tek konsantrasyonda aromataz inhibitör etkinliği yüksek bulunan bileşiklerin etkinlikleri 8 farklı konsantrasyonda araştırılmış ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.29). Maliyeti düşürmek amacıyla ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarında yararlanılan öngörüsül yaklaşımlardan tez çalışmamızda da yararlanılmış ve doz-yanıt etkisi araştırılacak bileşiklerin seçiminde moleküler modelleme sonuçları da

göz önüne alınarak sentezlenen 35 maddeden 10 tanesi ile aromataz inhibitör etkinlik araştırma çalışmalarına devam edilmiştir.

Tek konsantrasyonda yapılan tarama çalışmalarında 1-etilindol bileşiklerinin indol halkasına bağlı fenil grubunda halojen sübstitüsyonunun aktiviteyi azalttığı görülmüş, fenil grubunda sübstitüsyon bulunmayan 3-([2-(4-Klorofenil)hidraziniliden]metil)-1-etil-1 H-indol (KD20) bileşiğinin inhibitör etkisi en güçlü bileşik olduğu gözlenmiştir. Enzim inhibisyonunun doza bağımlılığının araştırıldığı ileri çalışmalarda da $8,9 \cdot 10^{-7}$ M IC_{50} değeriyle KD20'nin en potent bileşik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.29). KD20 bileşiğinin IC_{50} değeri birinci kuşak aromataz inhibitörü aminoglutetimite ($6 \cdot 10^{-7}$ M) (Wouters ve ark., 1988) yakın bulunurken, 3. kuşak aromataz inhibitörü olan letrozolün $4 \cdot 10^{-9}$ M'lık IC_{50} (Di Matteo ve ark., 2016) değeriyle karşılaştırıldığında inhibitör etkinliğinin düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte test edilen maddelerin ana bileşiği olan melatoninin farmakolojik dozlarında aromataz inhibitör etkinliği de araştırılmış ve IC_{50} değeri $1,1 \cdot 10^{-4}$ M bulunmuştur (Şekil 4.28). Dolayısı ile melatoninde yapılan kimyasal modifikasyonlar sonucu sentezlenen yeni indol türevlerinin melatoninin aromataz inhibitör etkisini artırdığı görülmüştür.

Aromataz inhibitör etkinlik açısından yapı-aktivite ilişkisine bakıldığında hem 1-etilindol (KD) hem de 5-metoksiindol 3-aldehit hidrazon (NO) bileşiklerinde fenil halkasındaki halojen sübstitüsyonu *para* konumunda bulunurken aktivitenin yüksek olduğu, *orto* konumunda bulunduğu ise aktivitenin belirgin derecede azaldığı belirlenmiştir. 1-etilindol grubu bileşiklerde fenil halkasında Cl atomu *para* pozisyonunda bulunduğu (KD1) IC_{50} değeri $2,4 \cdot 10^{-6}$ M iken, Cl atomu *orto* pozisyonunda bulunduğu (KD6) IC_{50} değeri $2,1 \cdot 10^{-5}$ M olarak hesaplanmış ve aktivitede 10 katlık bir azalma olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerde de fenil halkasında Cl atomu *para* pozisyonunda bulunduğu (NO/1) IC_{50} değeri $1,34 \cdot 10^{-6}$ M iken Cl atomu *orto* pozisyonunda bulunduğu (NO/4) IC_{50} değeri $4,1 \cdot 10^{-5}$ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.29). *Orto* pozisyonunda halojen süstitüsyonunun sterik uyuşmazlığa neden olduğu grubumuz tarafından daha önce yapılan bir çalışmada da gösterilmiştir (Ozcan-Sezer ve ark.,

2018). Bu tez çalışması verileri de belirlemiş olduğumuz bu yapı-etki ilişkisini desteklemektedir.

Aromataz inhibitör aktivitesi yüksek bulunan KD1 ve KD20 bileşiklerinin inhibitör etkinlikleri hücre temelli *in vitro* bir yöntem kullanılarak da araştırılmıştır. Aromataz aktivitesinin dolaylı olarak ölçümüne olanak sağlayan bu yöntemde aromataz enzimini eksprese ettiği bilinen ve çoğalmaları için östrojene bağımlı, ER+ insan meme kanser hücreleri olan MCF-7 BUS hücreleri kullanılmıştır (Zhou ve ark., 1993). Yönteme göre hücreler hormon içermeyen ortamda testosteron ile inkübe edilmiş ve testosteronun aromataz enzimi aracılığıyla östrojenlere dönüşmesi sonucu hücre proliferasyonu belirlenmiştir (Samuel Cos ve ark., 2005). Takiben ortama eklenen bileşiklerin aromataz inhibitörü olmaları durumunda ortamda yeterli östrojen oluşmayacağından bu etki hücrelerin proliferasyonundaki azalma değerlendirilerek belirlenmiştir.

KD1 ve KD20 bileşiklerinin söz konusu modelde 5.10^{-8} - 1.10^{-5} M konsantrasyon aralığında aromataz aktivitesi üzerine dolaylı etkileri araştırılmıştır. Dolaylı aktivite ölçüm yönteminde KD1 ve KD20 bileşiklerinin IC₅₀ değerleri sırasıyla $6,7.10^{-6}$ M ve 7.10^{-7} M iken doğrudan aktivite ölçüm yönteminde sırasıyla $2,4.10^{-6}$ M ve $8,9.10^{-7}$ M olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.29 ve Şekil 4.30). Maddeler her iki yöntemde de doza bağımlı olarak aromataz enzimini inhibe etmiş ve böylece hücre içermeyen bir yöntemle etkin maddelerin belirlenmesi, hücre temelli *in vitro* bir yöntemle daha desteklenmiştir. İki yöntemde birbirine yakın fakat farklı IC₅₀ değerleri görülmesi de hücre içeren yöntemde hücre membranlarını geçerek hücre içine girme, hedefe ulaşma ve metabolizma gibi farklılıkların olması ile açıklanabilir.

Tez çalışmasında üçüncü terapötik hedef olarak seçilen CYP1B1 enzimi, DMBA'nın da aralarında yer aldığı birçok ksenobiyotiğin organizmada genotoksik metabolitlerine biyotransformasyonundan sorumludur. Ayrıca endojen östrojenler CYP1B1 enzimi ile reaktif 4-OH katekol ve takiben kinon metabolitlerine dönüşmekte ve bu metabolitlerin DNA bazlarıyla katım ürünü oluşturması sonucu kimyasal karsinogenезin ilk basamağını oluşturan genotoksik etki meydana gelmektedir. Bu nedenle de menopoz öncesi dönemde PAH'lara maruziyetin yüksek olduğu ortamlarda çalışan kadınların CYP1B1 enzimi ile gerçekleşen genotoksik

etkiler açısından daha yüksek risk altında oldukları iddia edilmektedir (Badal ve Delgoda, 2013). Kimyasal karsinogenin başlatma evresinde rol aldığı bilinen endojen östrojen de dahil çok sayıda prokarsinogenin nihai karsinogene dönüşmesini katalize eden CYP1B1 enzimini (Liehr, Fang, Sirbasku ve Ari-Ulubelen, 1986; Murray ve ark., 1997) inhibe eden bileşiklerin geliştirilmesinin kemopreventif olabileceği düşünülmektedir (Chun ve Kim, 2003).

Öncelikle sentezlenen melatonin analoglarının tek konsantrasyonda sıçan karaciğer mikrozomlarında genel CYP1 inhibitör etkileri araştırılarak olası "hit" bileşikler belirlenmeye çalışılmıştır. Tek doz tarama çalışmalarında bileşiklerin büyük bir kısmının mikrozomal CYP1 enzimlerini inhibe ettiği görülmüş, gruplar birbiriyle karşılaştırıldığında 2-metilindol grubunun (M23 bileşiği hariç) inhibitör etkinliği en yüksek grup olduğu bulunmuştur (Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33). 1-etilindol grubunda indol halkasına bağlı fenil grubunda dimetil sübstitüsyonunun (KD17 ve KD18) CYP1 inhibitör etkiyi azalttığı bulunmuştur (Şekil 4.31). Hem 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu (N0) hem de 2-metilindol (M) grubu bileşiklerde fenil grubu yerine başka grup veya halkaların bağlanmasının (N0/16, N0/17, N0/18 ve M23) CYP1 inhibitör etkinliği azalttığı bulunmuştur. Etkili görünen bileşik sayısının fazla olması nedeniyle hem tek konsantrasyon tarama çalışmasında inhibitör etkili görünen hem de moleküler modelleme çalışmalarında inhibitör etkili olacağı öngörülen bileşikler seçilerek farklı konsantrasyonlarda mikrozomal CYP1 inhibitör etkileri 8 farklı konsantrasyonda araştırılmış ve IC₅₀ değerleri elde edilmiştir. Mikrozomlarda CYP1 inhibitör etkisi en potent bileşik 3,8.10⁻⁷ M IC₅₀ değerine sahip KD20 bileşiği olarak bulunmuş, test edilen diğer bileşikler de µM düzeylerde IC₅₀ değeriyle CYP1 enzimlerini inhibe etmiştir (Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37).

Mikrozomlarda yapılan tarama ve IC₅₀ belirleme çalışması sonucunda IC₅₀ değeri 3,0.10⁻⁶ M ve altında olan 9 maddenin (KD1, KD4, KD20, N1/9B, N0/3, N0/4, N0/13, M3 ve M6) rekombinant saf CYP1B1 izozimi üzerine olası inhibitör etkileri araştırılmıştır. CYP1B1 inhibitör etkinliği açısından en potent bileşiğin 8,5.10⁻⁹ M IC₅₀ değerine sahip KD4 bileşiği olduğu bulunmuştur (Şekil 4.39). Çok sayıda bitkide bulunan ve kemopreventif bileşik adayı olarak önerilen (Jang ve ark., 1997) resveratrolün CYP1B1 enzimini 1,4.10⁻⁶ M IC₅₀ değeriyle inhibe ettiği (Chang ve ark.,

2010), bu molekülden hareketle sentezlenen analoglar arasında ise en potent bileşiğin 6.10^{-9} M IC_{50} değerine sahip olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2002). CYP1 enzimlerinin potent inhibitörü olan α -naftoflavonun ise insan rekombinant CYP1B1 enzimini 5.10^{-9} M IC_{50} değeri ile inhibe ettiği rapor edilmiştir (Shimada ve ark., 1998). CYP1B1 inhibitör etkilerini araştırdığımız melatonin analogları arasında en potent bileşik olan KD4'ün (IC_{50} : $8,5.10^{-9}$ M) resveratroiden daha güçlü inhibitör etkisi olduğu, resveratrol analogları ve α -naftoflavon ile kıyaslandığında ise CYP1B1 bu bileşiklere yakın etkiye sahip olduğu görülmüştür. Ancak KD4 ve etkili bulduğumuz diğer bileşiklerin inhibitör etkilerinin CYP1B1'e spesifik olup olmadığının da araştırılması gerekmektedir. Mikrozoamlarda $3,8.10^{-7}$ M IC_{50} değeriyle CYP1 inhibitör etkisi en potent bileşik KD20 iken bu bileşik rekombinant CYP1B1 enzimini inhibe etmede diğer bileşikler kadar etkili olamamıştır. Mikrozoamlarda diğer CYP1 izozimlerinin de bulunması ve yöntemde kullanılan etoksirezorufinin CYP1A1 ve CYP1A2 enzimlerinin de substratı olması bu farklılığın sebebi olabilir.

CYP1B1 enzim ekspresyonunun birçok kanserli dokuda sağlıklı çevre dokuya oranla daha yüksek olduğu bildirilmiş (Murray ve ark., 1997) ve bu yüksek düzeylerin CYP1B1 ile inaktif metabolitlerine dönüşen dozetaksel gibi kemoterapotik ilaçlara karşı direnç gelişmesinde rol aldığı belirtilmiştir (McFadyen ve ark., 2001). Bu mekanizma nedeniyle, CYP1B1 inhibitörü olduğu tespit edilen bileşiklerin kemoterapotik ilaçlarla birlikte kullanıldıklarında tedavi etkinliğini artırabileceği de düşünülmektedir.

Kemoterapotik ilaçlarla karşılaşılan problemlerden biri de terapötik ajanların toksik etkisinin tümörlü dokuya spesifik olmayışı ve sağlıklı hücrelerde de sitotoksisiteye neden olmasıdır. Bu nedenle tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin öncelikle sağlıklı insan meme epitel hücresi olan MCF-10A hücre hattında sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Ardından maddelerin hedeflediğimiz hormon-bağımlı, ER+ insan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7 BUS) sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Son olarak da hormon reseptörü eksprese etmeyen üçlü negatif meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) sitotoksisiteleri değerlendirilerek olası sitotoksik etkilerinin tez kapsamında kullandığımız terapötik hedefler üzerinden (hormon-ilişkili) mi gerçekleştiği, bu etkide farklı mekanizmaların da rol alıp almadığı aydınlatılmaya

çalışılmıştır. Öncelikle maddelerin tek konsantrasyonda sitotoksik etkileri mitokondriyal enzim aktivitesi üzerinden hücre canlılığının belirlendiği MTT testi ile 24 ve 72 saatlik inkübasyonlarla araştırılmıştır. N0/20 haricinde maddelerin hiçbirinin 24 saat inkübasyon sonucunda sağlıklı meme hücrelerinde sitotoksik etkisi olmadığı görülmüştür (Şekil 4.42, Şekil 4.45, Şekil 4.48). Yapı aktivite açısından değerlendirildiğinde N0/20 molekülünün neden olduğu erken sitotoksik etkinin grubundaki diğer türevlerden yapıcı çok daha büyük olması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. İnkübasyon süresi 72 saate çıkarıldığında N0/20'nin yanı sıra KD3, N0/1 ve N0/10'unda MCF-10A hücrelerinde sitotoksik etkiye neden oldukları görülmüş ve bu şekilde advers etkilerinin olması bu ajanların kemopreventif ajan olarak önerilemeyeceğine, tedavi amacı ile önerilme durumunda da yarar/zarar oranının göz önünde bulundurulmasının gerekliliğine dikkat çekmiştir. MTT testi ile sitotoksik etkisi olmadığı bulunan bileşiklerin sitotoksik potansiyelleri farklı mekanizmalar aracılığıyla 2 yöntem daha kullanılarak araştırılmıştır. Bunlardan ilki hücre canlılığının protein düzeyleri üzerinden ölçülmesine olanak veren sülförödamine B deneyi, diğeri ise membran hasarı göstergesi olarak hücre dışına sızan LDH aktivitesinin belirlenmesi yöntemleridir. MTT testi ile sağlıklı meme hücrelerinde sitotoksik etkisi olmadığı görülen maddelerin benzer etkisi her iki yöntemle de doğrulanmıştır (Şekil 4.51, Şekil 4.54). Takiben maddelerin meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile 24 ve 72 saatlik inkübasyonlarla araştırılmıştır. MCF-7 BUS hücrelerinde 1-etilindol grubunda yer alan çoğu bileşik zamana bağlı olarak artan sitotoksik etkiye neden olurken, KD1 ve KD3'ün her iki inkübasyon süresinde de güçlü olarak sitotoksik etkiye neden olduğu, KD13'ün ise sadece 72 saatlik inkübasyonda güçlü sitotoksik etkili olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.43). 5-metoksiindol 3-aldehit hidrazon bileşikleri (N0) 24 saatlik inkübasyon sonucu hücre canlılığını % 70'in altına düşürmezken 72 saat inkübasyon sonucunda maddelerin hepsi istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etkiye neden olmuştur (Şekil 4.46).

KD3 bileşiğinin üç hücre tipinde de güçlü sitotoksik etkili bulunması etkinin gerçekleşmesinde reseptörden bağımsız mekanizmaların da rol aldığını düşündürmüştür. MCF-10A'daki sitotoksik etki sadece tek doz tarama çalışmasıyla

gösterilmiş olduğundan ileride bu bileşiğin sağlıklı meme hücresinde farklı konsantrasyonlardaki sitotoksik etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Araştırdığımız yollarda etkin görünen bileşiklerin tamamı MCF-7 BUS hücrelerinde sitotoksik etkili bulunmuştur. Bu bileşiklerin sağlıklı hücrede sitotoksikiteye neden olmazken kanserli hücrede sitotoksik olmaları ilaç adayı olabilecekleri düşüncesini güçlendiren bir bulgudur. Etkin bileşiklerin toksik etkisine katkıda bulunan mekanizmaları aydınlatabilmek amacıyla bileşiklerin hücrelerle 4 saat inkübasyonu sonucu membran dışına sızan LDH aktivitesi ölçülmüş, bileşiklere kısa süreli maruziyet sonucu membran hasarı oluşmadığı gösterilmiştir.

1-etilindol ve 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon grubu bileşiklerde fenil halkasında Cl (KD1, N0/1) ve Br (KD3, N0/14) atomlarının *para* konumunda bulunmasının F atomu bulunmasına kıyasla kanser hücrelerinde görülen sitotoksik etkiyi artırdığı, Cl ve Br karşılaştırıldığında ise Br atomu taşıyan moleküllerin Cl atomu taşıyanlara göre daha potent sitotoksik etkili oldukları görülmüştür.

Analog bileşiklerden bazılarının (KD1, KD20, N0/4, N0/8, N0/14) MCF-7 BUS hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin MDA-MB-231 hücre hattına kıyasla daha güçlü bulunması sitotoksik etkilerinin hormon-ilişkili olabileceğini, bazılarının ise hem ER+ hem de ER- olan iki hücre hattında da sitotoksik etki göstermesi ise sitotoksik etkilerinin test edilen hedeflerin dışında mekanizmalarla ortaya çıktığını düşündürmüştür (Şekil 4.57, Şekil 4.58). MTT yöntemiyle elde edilen IC₅₀ değerleri 10⁻⁵ M'ın altında olan bileşiklerin uzun süreli sitotoksik etkileri koloni oluşum yöntemiyle araştırılmıştır. KD1, KD3, N1/9B, N0/4, M3, M6 bileşiklerinin kanser hücreleriyle 15 gün inkübasyon sonucu koloni oluşumu üzerine etkileri araştırıldığında bileşiklerin MCF-7 BUS hücrelerinde koloni oluşumunu tamamen engellediği, MDA-MB-231 hücrelerinde ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede inhibe ettiği bulunmuştur (Şekil 4.59). Bu verilerden hareketle, ileri araştırmalarla advers etkilerinin olmadığına da gösterilmesi sonrasında, maddelerimizin uzun süreli olarak kemopreventif ve/veya tedaviyi destekleyici adjuvan ajanlar olarak kullanılmasında yüksek başarı elde edilebileceği düşünülmektedir. Bunun ötesinde, halihazırda tedavi protokolleri henüz tam olarak oluşmamış üçlü negatif meme

kanserlerinin tedavisi ve risk faktörleri yüksek olan kadınlarda önlenmesi için umut vaat eden etkin madde adayları olabilecekleri de düşünülmüştür.

Lissoni ve arkadaşları tarafından 1990'lı yılların başında yürütülen klinik çalışmalar kanserli hastalarda melatonin kullanımının tedavide yarar sağladığına dair kanıtlar sunmaktadır (Lissoni ve ark., 1991, 1994, 1995). Tamoksifene yanıt vermeyen metastatik meme kanserli 14 kadında yapılan pilot bir çalışmada tedaviye melatonin eklenmesinin tümör büyüklüğünde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Farklı kanser türlerinde metastatik hastaların sağ kalım süresini uzattığı, kemoterapiye bağlı yan etkilerin şiddeti ve sıklığının azaldığı belirtilmiştir (Panzer ve Viljoen, 1997).

Melatoninin aromataz inhibitörü ilaçlarla birlikte kullanıldığında bu ilaçlarla indüklenen osteoporozu azalttığı, ilaçların aromataz inhibitör etkinliğini arttırdığı ve kendi aromataz inhibitörü etkisiyle tedaviye katkı sağladığı bildirilmiştir (Sanchez-Barcelo, Mediavilla, Alonso-Gonzalez ve Reiter, 2012). Tamoksifen ve raloksifen gibi SERM bileşikleriyle birlikte kullanıldığında onların antiöstrojenik etkilerini artırdığı bulunmuştur (S Cos ve ark., 2008). Ayrıca melatoninin antioksidan etkileriyle radyoterapiden kaynaklanan yan etkilerin azaltarak tedavide daha yüksek dozlara çıkılmasına ve böylece etkinliğin artırılmasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Shirazi, Mihandoost, Mohseni, Ghazi-Khansari ve Rabie Mahdavi, 2013). Dolayısıyla bu tez çalışması verilerine göre, östrojen reseptör modülatörü, östrojen enzim modülatörü, CYP1B1 inhibitörü ve kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri bakımından melatoninden daha potent olduğu belirlenen bazı indol türevlerinin, melatoninin tedavide kullanımında olan ajanların yanında, destekleyici olarak kullanıldığında elde edilen tedavi başarısını daha da artıracakları yönünde olumlu görüşler oluşturulmuştur.

Antiöstrojenik bileşiklerin meme kanseri riski yüksek kadınlarda kemopreventif olarak kullanımı söz konusudur ve bu konuda yapılan klinik çalışmalar bulunmaktadır (Mallick, Benson ve Julka, 2016). SERM'lerden tamoksifen ve raloksifen ile aromataz inhibitörü anastrozol ve eksemestanın kemopreventif olarak kullanımları ile meme kanseri riskini azalttığı kanıtlanmıştır (Coopey ve ark., 2012; Cuzick ve ark., 2014; Fisher ve ark., 1998). Ancak hem selektif östrojen reseptör modülatörlerinin hem de aromataz inhibitörlerinin yan etkileri tedavi başarısının

azalmasına yol açmaktadır (Roche, Tang, Coopey ve Hughes, 2018). Bu nedenle bu tez kapsamında test edilen melatonin analoglarının, advers/toksik etkileri olmaması durumunda, kemopreventif etki potansiyellerinin de olabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında hormon-ilişkili antikanser etkinlikleri araştırılan 1-etilindol (KD), 5-metoksiindol-3-aldehit hidrazon (NO) ve 2-metilindol (M) grubu bileşiklerin antioksidan etkileri grubumuz tarafından daha önce yapılan çalışmalarda araştırılmış ve bu bileşiklerden bazılarının güçlü radikal süpürücü ve/veya hidrojen peroksitle indüklenen oksidasyonu indirgeyici etkilerinin olduğu bulunmuştur. Oksidatif stresin fizyolojik bir olay olan yaşlanma ile diyabet, romatoid artrit ve kanser gibi çok farklı hastalıkların etiyolojisinde rolü olduğu bildirilmektedir. Bu tez çalışmasının konusu olan kimyasal karsinogenlerin de tüm evrelerinde oksidatif stresin rol aldığı gösterilmiştir (James E. Klaunig, Wang, Pu ve Zhou, 2011). Östradiol ile indüklenen meme kanserinde de östradiolün metabolizması sırasında oluşan reaktif metabolitler tarafından indüklenen oksidatif hasarın rolü olduğu bildirilmiştir (E Cavalieri, Frenkel, Liehr, Rogan ve Roy, 2000). Bu nedenle bu tez kapsamında test edilen bileşiklerin antioksidan etki potansiyelleri nedeniyle de kanserin yanı sıra diğer oksidatif stres-ilişkili hastalıklarda da destekleyici tedavi ajanı olarak önerilebileceği düşünülmektedir. Ancak bu bileşiklerin tez kapsamında gözlemlediğimiz etkileri nedeniyle, antioksidan etkileri bakımından diyabet, romatoid artrit gibi hastalıklarda ilaç olarak önerilmesi durumunda endokrin sistem üzerinde advers etki potansiyellerinin olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde hormon bağımlı (ER+) meme kanserlerinin tedavi protokolleri ve tedavide kullanılan ajanlar oldukça başarılıdır. Bununla birlikte ana terapötik hedefe yönelik ajanlar olan ER antagonist ve aromataz inhibitörü ajanlara karşı direnç gelişmesi ve yan etkilerin görülmesi tedavide başlıca sorunlar arasında yer almaktadır. Bu durumlar araştırmacıları alternatif, daha etkin ve daha az advers etkiye sahip etkin madde arayışına yöneltmektedir.

Bu tez çalışmasında, melatoninin meme kanserinde bilinen önleyici ve destekleyici tedavi etkilerinden hareketle bazı indol türevi melatonin analoglarının seçilen hedeflerdeki etkileri araştırılmıştır. Hormon ilişkili meme kanserlerinde seçilen terapötik hedeflerde etkili bulunan ve sağlıklı meme hücresinde sitotoksik etkileri olmayan bileşiklerin hormon ilişkili meme kanserlerinin tedavisinde mevcut rejimlere alternatif olmasa da adjuvan olarak kullanılabilecek ilaç adayı bileşikler olabileceği düşünülmektedir. Tamoksifene dirençli olgularda melatoninin tedaviye yanıtı artırması ve diğer tedavi ajanlarının aksine yan etkisinin bulunmaması bu önerimizi desteklemektedir.

Tez çalışma süresi ve maddi imkanlar yeni indol türevlerinin farklı dokulardaki (meme ve endometriyal) östrojen reseptörleri üzerine etkilerini araştırmamıza yeterli olmamıştır. İleri çalışmalarda meme dokusundaki ER üzerinde antagonist etkili bulunan türevlerin endometriyal ER üzerinde olası agonist etkileri olup olmadığının araştırılması planlanmaktadır.

Melatoninin meme kanseri oluşumunda koruyucu ve tedavi edici etkileri olduğu artık bilinmekle birlikte yarılanma ömrünün kısa oluşu ve oral biyoyararlanımının düşük oluşu ilaç olarak kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle grubumuz Prof. Sibel Süzen ve grubu ile işbirliği içinde daha etkin analogların araştırılması çalışmalarını yürütmektedir. Bu tez çalışmasında biyolojik aktivite açısından melatoninden daha etkin bileşikler bulunmuştur ancak bu türevlerin melatoninin tedavide kullanımını kısıtlayan yarılanma ömrü ve biyoyararlanımları yönünden melatoninden üstün oldukları yönünde bir araştırma henüz yapılmamıştır. İleri çalışmalarımızda etkin madde adayı olabileceğini düşündüğümüz bir/birkaç maddenin yarılanma ömrü ve

biyoyararlanımı açısından melatonine üstünlük sağlayıp sağlamadıklarının da araştırılması planlanmaktadır.

Etkinliği yüksek olan indol türevi bileşiklerle yapmayı planladığımız ileri çalışmalarda, bileşiklerin mevcut tedavi rejimlerinde yer alan SERM ve SEEM etkili ajanlarla kombine kullanıldıklarında araştırdığımız yollarda ve kanserli hücre proliferasyonundaki etkileri araştırılacaktır. Ayrıca tez çalışması sonrası devam edecek çalışmalarda elde edilen verilerden hareketle etken madde aday bileşiklerin hücre ortamında metabolize olup olmadıkları kontrol edilerek varsa metabolitleri aracılığıyla gerçekleşen etkileri aydınlatılmaya çalışılacaktır.

Test edilen bazı türevlerin hem ER+ (MCF-7), hem de üçlü negatif (MDA-MB-231) meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etkili bulunmaları sitotoksitelerinin temelinde hormon ilişkili yollar dışında mekanizmaların da rol aldığını düşündürmektedir. Literatürde melatoninin onkostatik etkisinin temelinde apoptotik yolları indükleyici etkisinin olabileceği bildirilmektedir. Bu veriden hareketle ileri çalışmalarımızda indol türevlerinin olası apoptoz indükleyici etkilerinin de araştırılması ve sitotoksik etki mekanizmalarının aydınlatılması planlanmaktadır. Maddelerimizin bazılarının MDA-MB-231 hücrelerinde de sitotoksik etkili bulunmaları, tedavi için belirgin terapötik hedefleri olmayan ve bu nedenle etkin tedavi protokolleri geliştirilememiş üçlü negatif meme kanserlerinin önlenme ve tedavisi açısından da umut vaad edici görünmektedir. Bu amaçla bu yönde de ileri çalışmalar yapılması planlanmaktadır.

Bu tez çalışmasında indol türevlerinin ER antagonist etkisi araştırılmıştır ancak meme kanseri tedavisinde etkili olduğu bilinen bazı terapötik ajanların ER antagonist etkilerinin yanı sıra ER ekspresyonunu baskılamak şeklinde daha güçlü etki gösterdikleri de bilinmektedir. Bu mekanizmadan hareketle doktora sonrası çalışma olarak türevlerin ER ekspresyonu üzerinde olası baskılayıcı etkileri western blot çalışmaları ile araştırılacaktır.

7 KAYNAKLAR

- Acuna Castroviejo, D., Lopez, L. C., Escames, G., Lopez, A., Garcia, J. A., Reiter, R. J. (2011). Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11, 221–40.
- Adam, E., Decker, D. G., Herbst, A. L., Noller, K. L., Tilley, B. C., Townsend, D. E. (1977). Vaginal and cervical cancers and other abnormalities associated with exposure in utero to diethylstilbestrol and related synthetic hormones. *Cancer Research*, 37(4), 1249–51.
- Arendt, J. (1986). Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, 8, 266–320.
- Aronica, S. M., Katzenellenbogen, B. S. (1993). Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Molecular Endocrinology*, 7(6), 743–752.
- Aronica, S. M., Kraus, W. L., Katzenellenbogen, B. S. (1994). Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(18), 8517–21.
- Assikis, V. J., Neven, P., Jordan, V. C., ve Vergote, I. (1996). A realistic clinical perspective of tamoxifen and endometrial carcinogenesis. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 32A(9), 1464–76.
- Aubert, C., Janiaud, P., Lecalvez, J. (1980). Effect of pinealectomy and melatonin on mammary tumor growth in Sprague-Dawley rats under different conditions of lighting. *Journal of Neural Transmission*, 47(2), 121–30.
- Badal, S., Delgoda, R. (2013). CYP1B1: Friend OR Foe? A critical review. *OA Biochemistry*, 1(1), 1–7.
- Barker, S. (2003). Anti-estrogens in the treatment of breast cancer: current status and future directions. *Current Opinion in Investigational Drugs (London,*

England : 2000), 4(6), 652–7.

Bartsch, C., Bartsch, H., Karasek, M. (2002). Melatonin in clinical oncology. *Neuro Endocrinology Letters, 23 Suppl 1*, 30–8.

Baum, M., Budzar, A. U., Cuzick, J., Forbes, J., Houghton, J. H., Klijn, J. G. M., ... ATAC Trialists' Group. (2002). Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet (London, England), 359(9324)*, 2131–9.

Berkey, C. S., Frazier, A. L., Gardner, J. D., ve Colditz, G. A. (1999). Adolescence and breast carcinoma risk. *Cancer, 85(11)*, 2400–9.

Berry, J. (2005). Are all aromatase inhibitors the same? A review of controlled clinical trials in breast cancer. *Clinical Therapeutics, 27(11)*, 1671–84.

Black, L. J., Jones, C. D., Falcone, J. F. (1983). Antagonism of estrogen action with a new benzothiophene derived antiestrogen. *Life Sciences, 32(9)*, 1031–6.

Blask, D. E., Hill, S. M. (1986). Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *Journal of Neural Transmission. Supplementum, 21*, 433–49.

Blask, D. E., Pelletier, D. B., Hill, S. M., Lemus-Wilson, A., Grosso, D. S., Wilson, S. T., ve Wise, M. E. (1991). Pineal melatonin inhibition of tumor promotion in the N-nitroso-N-methylurea model of mammary carcinogenesis: potential involvement of antiestrogenic mechanisms in vivo. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 117(6)*, 526–32.

Blows, F. M., Driver, K. E., Schmidt, M. K., Broeks, A., van Leeuwen, F. E., Wesseling, J., ... Huntsman, D. (2010). *Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. PLoS Medicine (Vol. 7).*

Bonde, J. P., Hansen, J., Kolstad, H. A., Mikkelsen, S., Olsen, J. H., Blask, D. E., ...

- Åkerstedt, T. (2012). Work at night and breast cancer – report on evidence-based options for preventive actions. *Scandinavian Journal of Work, Environment ve Health*, 38(4), 380–390.
- Bonfield, K., Amato, E., Bankemper, T., Agard, H., Steller, J., Keeler, J. M., ... Ma, L. (2012). Development of a new class of aromatase inhibitors: Design, synthesis and inhibitory activity of 3-phenylchroman-4-one (isoflavanone) derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(8), 2603–13.
- Brainard, G. C., Hanifin, J. P., Greeson, J. M., Byrne, B., Glickman, G., Gerner, E., Rollag, M. D. (2001). Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(16), 6405–12.
- Brody, J. G., Moysich, K. B., Humblet, O., Attfield, K. R., Beehler, G. P., Rudel, R. A. (2007). Environmental pollutants and breast cancer: Epidemiologic studies. *Cancer*, 109(12 SUPPL.), 2667–2711.
- Brueggemeier, R. W., Hackett, J. C., Diaz-Cruz, E. S. (2005). Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocrine Reviews*, 26(3), 331–45.
- Bruno, R. D., Njar, V. C. O. (2007). Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development. *Bioorganic ve Medicinal Chemistry*, 15(15), 5047–60.
- Bulun, S. E., Sebastian, S., Takayama, K., Suzuki, T., Sasano, H., Shozu, M. (2003). The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 86(3–5), 219–24.
- Bulun, S. E., Simpson, E. R. (1994). Regulation of aromatase expression in human tissues. *Breast Cancer Research and Treatment*, 30(1), 19–29.
- Bulun, S., Zeitoun, K., Sasano, H., ve Simpson, E. (1999). Aromatase in Aging Women. *Seminars in Reproductive Medicine*, 17(04), 349–58.
- Cancer Statistics Review, 1975-2015 - SEER Statistics. (2018). Retrieved October 3,

2018, from https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/

- Carpentieri, A., Diaz de Barboza, G., Areco, V., Peralta López, M., Tolosa de Talamoni, N. (2012). New perspectives in melatonin uses. *Pharmacological Research*, 65(4), 437–44.
- Cavalieri, E., Chakravarti, D., Guttenplan, J., Hart, E., Ingle, J., Jankowiak, R., ... Sutter, T. (2006). Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: Implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*.
- Cavalieri, E., Frenkel, K., Liehr, J. G., Rogan, E., Roy, D. (2000). Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst Monogr*, (27), 75–93.
- Cavalieri, E. L., Rogan, E. G. (2011). Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, (125), 169-80.
- Cavalieri, E. L., Rogan, E. G. (2012). The etiology and prevention of breast cancer. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, (9), 55-69.
- Cavalieri, E., Rogan, E. (2014). The molecular etiology and prevention of estrogen-initiated cancers: Ockham's Razor: Pluralitas non est ponenda sine necessitate. Plurality should not be posited without necessity. *Molecular Aspects of Medicine*, 36(1), 1–55.
- Chang, T. K. H., Chen, J., Yang, G., Yeung, E. Y. H. (2010). Inhibition of procarcinogen-bioactivating human CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 enzymes by melatonin. *Journal of Pineal Research*, 48(1), 55–64.
- Chen, S., Parmigiani, G. (2007). Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(11), 1329–33.
- Chun, Y. J., Kim, S. (2003). Discovery of Cytochrome P450 1B1 Inhibitors as New Promising Anti-Cancer Agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(6), 657–68.

- Claustrat, B., Brun, J., Chazot, G. (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews*, 9(1), 11–24.
- Clemons, M., Goss, P. (2001). Estrogen and the risk of breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 344(4), 276–85.
- Cohen, M., Lippman, M., Chabner, B. (1978). Role of pineal gland in etiology and treatment of breast cancer. *The Lancet*, 312(8094), 814–16.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (1996). Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet (London, England)*, 347(9017), 1713–27.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet (London, England)*, 350(9084), 1047–59.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *The Lancet*, 360(9328), 187–95.
- Coopey, S. B., Mazzola, E., Buckley, J. M., Sharko, J., Belli, A. K., Kim, E. M. H., ... Hughes, K. S. (2012). The role of chemoprevention in modifying the risk of breast cancer in women with atypical breast lesions. *Breast Cancer Research and Treatment*, 136(3), 627–33.
- Cos, S., Blask, D. E. (1994). Melatonin modulates growth factor activity in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Pineal Research*, 17(1), 25–32.
- Cos, S., Fernandez, R., Güézmés, A., Sanchez-Barceló, E. J. (1998). Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Research*, 58(19), 4383–90.

- Cos, S., Gonzalez, A., Güezmes, A., Mediavilla, M. D., Martinez-Campa, C., Alonso-Gonzalez, C., Sanchez-Barcelo, E. J. (2006). Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity. *International Journal of Cancer*, *118*(2), 274–8.
- Cos, S., Gonzalez, A., Martinez-Campa, C., Mediavilla, M. D., Alonso-Gonzalez, C., Sanchez-Barcelo, E. J. (2006a). Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detection and Prevention*, *30*(2), 118–28.
- Cos, S., Gonzalez, A., Martinez-Campa, C., Mediavilla, M. D., Alonso-Gonzalez, C., Sanchez-Barcelo, E. J. (2006b). Estrogen-signaling pathway: A link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detection and Prevention*, *30*(2), 118–28.
- Cos, S., Gonzalez, A., Martinez-Campa, C., Mediavilla, M. D., Alonso-Gonzalez, C., Sanchez-Barcelo, E. J. (2008). Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator. *Current Cancer Drug Targets*, *8*(8), 691–702.
- Cos, S., Martinez-Campa, C., Mediavilla, M. D., Sanchez-Barcelo, E. J. (2005). Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Pineal Research*, *38*(2), 136–42.
- Cos, S., Sanchez-Barcelo, E. J. (2000). Melatonin and mammary pathological growth. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *21*(2), 133–70.
- Cuendet, M., Oteham, C. P., Moon, R. C., Pezzuto, J. M. (2006). Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. *Journal of Natural Products*, *69*(3), 460–3.
- Cuzick, J., Sestak, I., Forbes, J. F., Dowsett, M., Knox, J., Cawthorn, S., ... IBIS-II investigators. (2014). Anastrozole for prevention of breast cancer in high-risk postmenopausal women (IBIS-II): an international, double-blind, randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, *383*(9922), 1041–48.
- Dai, J., Inscho, E. W., Yuan, L., Hill, S. M. (2002). Modulation of intracellular calcium

and calmodulin by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Pineal Research*, 32(2), 112–9.

Davis, S., Mirick, D. K., Chen, C., Stanczyk, F. Z. (2012). Night Shift Work and Hormone Levels in Women. *Cancer Epidemiology Biomarkers ve Prevention*, 21(4), 609–18.

Davis, S., Mirick, D. K., ve Stevens, R. G. (2001). Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(20), 1557–62.

Dawling, S., Roodi, N., Parl, F. F. (2003). Methoxyestrogens exert feedback inhibition on cytochrome P450 1A1 and 1B1. *Cancer Research*, 63(12), 3127–32.

DeCastro, B. R., Korrick, S. A., Spengler, J. D., Soto, A. M. (2006). Estrogenic activity of polychlorinated biphenyls present in human tissue and the environment. *Environmental Science ve Technology*, 40(8), 2819–25.

Del Rio, B., Pedrero, J. M. G., Martinez-Campa, C., Zuazua, P., Lazo, P. S., Ramos, S. (2004). Melatonin, an Endogenous-specific Inhibitor of Estrogen Receptor α via Calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38294–302.

Demark-wahnefried, W., Bandera, E. V, Gapstur, S., Patel, A. V. (2012). American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for Cancer Prevention Reducing the Risk of Cancer With Healthy Food Choices and Physical Activity. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62, 30–67.

Demers, L. M. (1994). Effects of Fadrozole (CGS 16949A) and Letrozole (CGS 20267) on the inhibition of aromatase activity in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 30(1), 95–102.

Denison, M. S., ve Nagy, S. R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43(1), 309–34.

Di Matteo, M., Ammazalorso, A., Andreoli, F., Caffa, I., De Filippis, B., Fantacuzzi, M., ... Amoroso, R. (2016). Synthesis and biological characterization of 3-(imidazol-1-ylmethyl) piperidine sulfonamides as aromatase inhibitors.

Bioorganic ve Medicinal Chemistry Letters, 26, 3192–94.

Dizdar, O., Ozçakar, L., Malas, F. U., Harputluoglu, H., Bulut, N., Aksoy, S., ... Altundag, K. (2009). Sonographic and electrodiagnostic evaluations in patients with aromatase inhibitor-related arthralgia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(30), 4955–60.

Dowsett, M., Jones, A., Johnston, S. R., Jacobs, S., Trunet, P., Smith, I. E. (1995). In vivo measurement of aromatase inhibition by letrozole (CGS 20267) in postmenopausal patients with breast cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 1(12), 1511–5.

Drevon, C., Piccoli, C., Montesano, R. (1981). Mutagenicity assays of estrogenic hormones in mammalian cells. *Mutation Research*, 89(1), 83–90.

Dubocovich, M. L., Markowska, M. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27(2), 101–10.

Dumitrescu, R. G., Cotarla, I. (2005). Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(1), 208–21.

Dziegiel, P., Podhorska-Okolow, M., Zabel, M. (2008). Melatonin: adjuvant therapy of malignant tumors. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 14(5), RA64-70.

Evans, T. R., Di Salle, E., Ornati, G., Lassus, M., Benedetti, M. S., Pianezzola, E., Coombes, R. C. (1992). Phase I and endocrine study of exemestane (FCE 24304), a new aromatase inhibitor, in postmenopausal women. *Cancer Research*, 52(21), 5933–9.

Feinleib, M. (1968). Breast cancer and artificial menopause: a cohort study. *Journal of the National Cancer Institute*, 41(2), 315–29.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5),

359–86.

- Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Redmond, C. K., Kavanah, M., Cronin, W. M., ... Wolmark, N. (1998). Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of the National Cancer Institute*, *90*(18), 1371–88.
- Flor, S., He, X., Lehmler, H.-J., Ludewig, G. (2016). Estrogenicity and androgenicity screening of PCB sulfate monoesters in human breast cancer MCF-7 cells. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(3), 2186–2200.
- Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, *1*(5), 2315–19.
- Franks, S., MacLusky, N. J., ve Naftolin, F. (1982). Comparative pharmacology of oestrogens and catechol oestrogens: actions on the immature rat uterus in vivo and in vitro. *The Journal of Endocrinology*, *94*(1), 91–8.
- Fraschini, F., Demartini, G., Esposti, D., Scaglione, F. (1998). Melatonin Involvement in Immunity and Cancer. *Neurosignals*, *7*(1), 61–72.
- Gajjar, K., Martin-Hirsch, P. L., Martin, F. L. (2012). CYP1B1 and hormone-induced cancer. *Cancer Letters*, *324*(1), 13–30.
- Garcia Pedrero, J. M., del Rio, B., Martinez-Campa, C., Muramatsu, M., Lazo, P. S., Ramos, S. (2002). Calmodulin Is a Selective Modulator of Estrogen Receptors. *Molecular Endocrinology*, *16*(5), 947–60.
- Ghosh, D., Lo, J., Egbuta, C. (2016). Recent Progress in the Discovery of Next Generation Inhibitors of Aromatase from the Structure-Function Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, *59*(11), 5131–48.
- Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thürlimann, B., Senn, H. J. (2011). Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Annals of Oncology*, *22*(8), 1736–47.
- Gonzalez-Gonzalez, A., Mediavilla, M. D., Sanchez-Barceló, E. J. (2018). Melatonin: A

- Molecule for Reducing Breast Cancer Risk. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(2), 336.
- Gottardis, M. M., Jordan, V. C. (1987). Antitumor actions of keoxifene and tamoxifen in the N-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinoma model. *Cancer Research*, 47(15), 4020–4.
- Gottardis, M. M., Ricchio, M. E., Satyaswaroop, P. G., Jordan, V. C. (1990). Effect of steroidal and nonsteroidal antiestrogens on the growth of a tamoxifen-stimulated human endometrial carcinoma (EnCa101) in athymic mice. *Cancer Research*, 50(11), 3189–92.
- Gurer-Orhan, H., Karaaslan, C., Ozcan, S., Firuzi, O., Tavakkoli, M., Saso, L., Suzen, S. (2016). Novel indole-based melatonin analogues: Evaluation of antioxidant activity and protective effect against amyloid β -induced damage. *Bioorganic ve Medicinal Chemistry*, 24(8), 1658–64.
- Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B., King, M. C. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science (New York, N.Y.)*, 250(4988), 1684–9.
- Hall, J. M., McDonnell, D. P. (2005). Coregulators in Nuclear Estrogen Receptor Action: From Concept to Therapeutic Targeting. *Molecular Interventions*, 5(6), 343–57.
- Hammond, D. K., Zhu, B. T., Wang, M. Y., Ricci, M. J., Liehr, J. G. (1997). Cytochrome P450 metabolism of estradiol in hamster liver and kidney. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 145(1), 54–60.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–74.
- Hankinson, S. E., Colditz, G. A., Willett, W. C. (2004). Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Research : BCR*, 6(5), 213–8.
- Hansen, J. (2001). Increased breast cancer risk among women who work

- predominantly at night. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 12(1), 74–7.
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S. R., Cardinali, D. P. (2006). Melatonin. *The International Journal of Biochemistry ve Cell Biology*, 38(3), 313–16.
- Hassoun, E. A., Roche, V. F., Stohs, S. J. (1993). Release of Enzymes by Ricin from Macrophages and Chinese Hamster Ovary Cells in Culture. *Toxicology Methods*, 3(2), 119–129.
- Haus, E., Smolensky, M. (2006). Biological Clocks and Shift Work: Circadian Dysregulation and Potential Long-term Effects. *Cancer Causes ve Control*, 17(4), 489–500.
- Hayes, C. L., Spink, D. C., Spink, B. C., Cao, J. Q., Walker, N. J., Sutter, T. R. (1996). 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9776–81.
- Henderson, Amsterdam, A., Bhatia, S., Hudson, M. M., Meadows, A. T., Neglia, J. P., ... Oeffinger, K. C. (2010). Systematic review: Surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. *Annals of Internal Medicine*, 152(7) , 444-55.
- Henderson, B. E., Ross, R., Bernstein, L. (1988). Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Research*, 48(2), 246–53.
- Hilborn, E., Stal, O., Jansson, A. (2017). Estrogen and androgen-converting enzymes 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase and their involvement in cancer: with a special focus on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 2, and breast cancer. *Oncotarget*, 8(18).
- Hill, S. M., Blask, D. E. (1988). Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Research*, 48(21), 6121–6.
- Hill, S. M., Blask, D. E., Xiang, S., Yuan, L., Mao, L., Dauchy, R. T., ... Duplesis, T.

- (2011). Melatonin and associated signaling pathways that control normal breast epithelium and breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(3), 235–45.
- Hoover, R. N., Hyer, M., Pfeiffer, R. M., Adam, E., Bond, B., Cheville, A. L., ... Troisi, R. (2011). Adverse Health Outcomes in Women Exposed In Utero to Diethylstilbestrol. *New England Journal of Medicine*, 365(14), 1304–14.
- Howell, A., Osborne, C. K., Morris, C., Wakeling, A. E. (2000). ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, vequot;purevequot; antiestrogen. *Cancer*, 89(4), 817–25.
- Hughss, S. W., Burley, D. M. (1970). Aminoglutethimide: a vequot;side-effectvequot; turned to therapeutic advantage. *Postgraduate Medical Journal*, 46(537), 409–16.
- Hulka, B. S., Moorman, P. G. (2001). Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*, 38(1), 103-13.
- IARC monograph. (2007). *Shiftwork*. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono98-8.pdf>
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. (1999). <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol72/mono72.pdf>
- Interagency Breast, Cancer and Environmental Research, ve Coordinating Committee. (2013). *Breast Cancer and the Environment. Prioritizing Prevention*. https://www.niehs.nih.gov/about/assets/docs/breast_cancer_and_the_environment_prioritizing_prevention_508.pdf
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V, Thomas, C. F., Beecher, C. W., ... Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5297), 218–20.
- Jansen, M. P. H. M., Knijnenburg, T., Reijm, E. A., Simon, I., Kerkhoven, R., Droog, M., ... Zwart, W. (2013). Hallmarks of aromatase inhibitor drug resistance revealed by epigenetic profiling in breast cancer. *Cancer Research*, 73(22),

6632–41.

- Jasser, S. A., Blask, D. E., Brainard, G. C. (2006). Light during darkness and cancer: relationships in circadian photoreception and tumor biology. *Cancer Causes and Control : CCC*, 17(4), 515–23.
- Johnston, J. O. (1998). Aromatase inhibitors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 33(5), 375–405.
- Jordan, C. and Furr, B. J. A. (2006). An Introduction to the Regulation of Sex Steroids for the Treatment of Cancer. Jordan, V.C and Furr, B. J. A (Eds.), *Hormone Therapy in Breast and Prostate* (s. 1–16). *Cancer: Humana Press*
- Jordan, V. C., Phelps, E., Lindgren, J. U. (1987). Effects of anti-estrogens on bone in castrated and intact female rats. *Breast Cancer Research and Treatment*, 10(1), 31–5.
- Jordan, C. V, Furr, B. J. A. (2017). An Introduction to the for the Treatment of Cancer. *European Journal of Cancer*, 44(2009), 30–38.
- Jung, K. H., Hong, S.W., Zheng, H.M., Lee, D.H., and Hong, S.S. (2009). Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model. *Journal of Pineal Research*, 47(2), 173–183.
- Jung, K. H., Hong, S.W., Zheng, H.M., Lee, H.S., Lee, H., Lee, D.H., ... Hong, S.S. (2010). Melatonin ameliorates cerulein-induced pancreatitis by the modulation of nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB in rats. *Journal of Pineal Research*, 48(3), 239–50.
- Kaaks, R., Berrino, F., Key, T., Rinaldi, S., Dossus, L., Biessy, C., ... Riboli, E. (2005). Serum Sex Steroids in Premenopausal Women and Breast Cancer Risk Within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 97(10), 755–65.
- Kao, Y. C., Cam, L. L., Laughton, C. A., Zhou, D., Chen, S. (1996). Binding characteristics of seven inhibitors of human aromatase: a site-directed

- mutagenesis study. *Cancer Research*, 56(15), 3451–60.
- Karasek, M., Winczyk, K. (2006). Melatonin in humans. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 57 Suppl 5, 19–39.
- Karbownik, M., Lewinski, A., Reiter, R. J. (2001). Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *The International Journal of Biochemistry ve Cell Biology*, 33, 735–53.
- Kauppila, A., Kivela, A., Pakarinen, A., Vakkuri, O. (1987). Inverse seasonal relationship between melatonin and ovarian activity in humans in a region with a strong seasonal contrast in luminosity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 65(5), 823–828.
- Kiefer, T., Ram, P. T., Yuan, L., Hill, S. M. (2002). Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 71(1), 37–45.
- Kim, S., Ko, H., Park, J. E., Jung, S., Lee, S. K., Chun, Y. J. (2002). Design, synthesis, and discovery of novel trans-stilbene analogues as potent and selective human cytochrome P4501B1 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 160–164.
- Kimura, K., Satoh, K., Kanno, A., Hamada, S., Hirota, M., Endoh, M., ... Shimosegawa, T. (2007). Activation of Notch signaling in tumorigenesis of experimental pancreatic cancer induced by dimethylbenzanthracene in mice. *Cancer Science*, 98(2), 155–62.
- Klaassen, C. D., Casarett, L. J., Doull, J. (2013). *Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons* 8th edition. Klaassen C.D.(Ed.), McGraw-Hill Education.
- Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., Xu, Y. (2000). Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Human ve Experimental Toxicology*, 19(10), 543–55.
- Klaunig, J. E., Wang, Z., Pu, X., Zhou, S. (2011). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*,

254(2), 86–99.

- Kumar, V., Chambon, P. (1988). The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*, 55(1), 145–56.
- Kushi, L. H., Doyle, C., McCullough, M., Rock, C. L., Demark-Wahnefried, W., Bandera, E. V., ... American Cancer Society 2010 Nutrition and Physical Activity Guidelines Advisory Committee. (2012). American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62(1), 30–67.
- Labute, P. (2009). Protonate3D: assignment of ionization states and hydrogen coordinates to macromolecular structures. *Proteins*, 75(1), 187–205.
- Lai, L., Yuan, L., Chen, Q., Dong, C., Mao, L., Rowan, B., ... Hill, S. M. (2008). The Galphai and Galphaq proteins mediate the effects of melatonin on steroid/thyroid hormone receptor transcriptional activity and breast cancer cell proliferation. *Journal of Pineal Research*, 45(4), 476–88.
- Land, C.E., Tokunaga, M., Koyama, K., Soda, M., Preston, D.L., Nishimori, I., Tokuoka, S. (2003). Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1990. *Radiation Research*, 160(6), 707–17.
- Lang, R., Redmann, U. (1979). Non-mutagenicity of some sex hormones in the Ames salmonella/microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 67(4), 361–5.
- Lang, R., Reimann, R. (1993). Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. I. Communication: examination for the induction of gene mutations using the Ames Salmonella/microsome test and the HGPRT test in V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 21(3), 272–304.
- Lavigne, J. A., Goodman, J. E., Fonong, T., Odwin, S., He, P., Roberts, D. W., Yager, J. D. (2001). The effects of catechol-O-methyltransferase inhibition on estrogen metabolite and oxidative DNA damage levels in estradiol-treated MCF-7 cells. *Cancer Research*, 61(20), 7488–7494.
- Leon-Blanco, M.M., Guerrero, J.M., Reiter, R.J., Calvo, J.R., Pozo, D. (2003).

- Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *Journal of Pineal Research*, 35(3), 204–11.
- Liehr, J.G. (2002). Breast carcinogenesis and its prevention by inhibition of estrogen genotoxicity. In *Endocrine Therapy in Breast Cancer* (Vol. 1, pp. 1–18).
- Liehr, J. G., Fang, W. F., Sirbasku, D. A., Ari-Ulubelen, A. (1986). Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters. *Journal of Steroid Biochemistry*, 24(1), 353–6.
- Lipton, A., Santen, R. J. (1974). Proceedings: Medical adrenalectomy using aminoglutethimide and dexamethasone in advanced breast cancer. *Cancer*, 33(2), 503–12.
- Lissoni, P., Barni, S., Ardizzoia, A., Tancini, G., Conti, A., Maestroni, G. (1994). A randomized study with the pineal hormone melatonin versus supportive care alone in patients with brain metastases due to solid neoplasms. *Cancer*, 73(3), 699–701.
- Lissoni, P., Barni, S., Cattaneo, G., Tancini, G., Esposti, G., Esposti, D., Fraschini, F. (1991). Clinical results with the pineal hormone melatonin in advanced cancer resistant to standard antitumor therapies. *Oncology*, 48(6), 448–50.
- Lissoni, P., Barni, S., Meregalli, S., Fossati, V., Cazzaniga, M., Esposti, D., Tancini, G. (1995). Modulation of cancer endocrine therapy by melatonin: a phase II study of tamoxifen plus melatonin in metastatic breast cancer patients progressing under tamoxifen alone. *British Journal of Cancer*, 71(4), 854–6.
- Little, M. P., McElvenny, D. M. (2017). Male Breast Cancer Incidence and Mortality Risk in the Japanese Atomic Bomb Survivors – Differences in Excess Relative and Absolute Risk from Female Breast Cancer. *Environmental Health Perspectives*, 125(2), 223–29.
- Liu, Y., Yin, T., Feng, Y., Cona, M. M., Huang, G., Liu, J., ... Ni, Y. (2015). Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical therapeutic research. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 5(5), 708–29.

- Lonning, P. E. (1996). Aromatase inhibition for breast cancer treatment. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, 35 Suppl 5, 38–43.
- Luboshitzky, R., Lavie, P. (1999). Melatonin and sex hormone interrelationships--a review. *Journal of Pediatric Endocrinology ve Metabolism : JPEM*, 12(3), 355–62.
- Ma, X., Idle, J. R., Krausz, K. W., Gonzalez, F. J. (2005). Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 33(4), 489–94.
- MacLusky, N. J., Naftolin, F., Krey, L. C., Franks, S. (1981). The catechol estrogens. *Journal of Steroid Biochemistry*, 15, 111–24.
- Mallick, S., Benson, R., Julka, P. K. (2016). Breast cancer prevention with anti-estrogens: review of the current evidence and future directions. *Breast Cancer*, 23(2), 170–77.
- McFadyen, M. C., McLeod, H. L., Jackson, F. C., Melvin, W. T., Doehmer, J., Murray, G. I. (2001). Cytochrome P450 CYP1B1 protein expression: a novel mechanism of anticancer drug resistance. *Biochemical Pharmacology*, 62(2), 207–12.
- McKenna, N. J., Lanz, R.B., ve O'Malley, B. W. (1999). Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology. *Endocrine Reviews*, 20(3), 321–44.
- Mediavilla, M. D., Güezmez, A., Ramos, S., Kothari, L., Garijo, F., Sanchez Barcelo, E. J. (1997). Effects of melatonin on mammary gland lesions in transgenic mice overexpressing N-ras proto-oncogene. *Journal of Pineal Research*, 22(2), 86–94.
- Mediavilla, M. D., Sanchez-Barcelo, E. J., Tan, D. X., Manchester, L., Reiter, R. J. (2010). Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Current Medicinal Chemistry*, 17(36), 4462–81.
- Medina, D. (2004). Breast cancer: the protective effect of pregnancy. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*,

10(1 Pt 2), 380–4.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., ... Ding, W. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5182), 66–71.

Miller, W. R. (1990). Endocrine treatment for breast cancers: biological rationale and current progress. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 37(4), 467–80.

Molis, T. M., Spriggs, L. L., Hill, S. M. (1994). Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 8(12), 1681–90.

Molis, T. M., Spriggs, L. L., Jupiter, Y., Hill, S. M. (1995). Melatonin modulation of estrogen-regulated proteins, growth factors, and proto-oncogenes in human breast cancer. *Journal of Pineal Research*, 18(2), 93–103.

Molis, T., Walters, M., Hill, S. (1993). Melatonin modulation of estrogen-receptor expression in mcf-7 human breast-cancer cells. *International Journal of Oncology*, 3(4), 687–94.

Murray, G. I., Taylor, M. C., McFadyen, M. C., McKay, J. A., Greenlee, W. F., Burke, M. D., Melvin, W. T. (1997). Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Research*, 57(14), 3026–31.

Nilsson, S., Koehler, K. F. (2005). Oestrogen Receptors and Selective Oestrogen Receptor Modulators: Molecular and Cellular Pharmacology. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96(1), 15–25.

Okoh, V., Deoraj, A., Roy, D. (2011) Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signalings contribute to breast cancer, 1, 115-33.

Oseni, T., Patel, R., Pyle, J., Jordan, V. (2008). Selective Estrogen Receptor Modulators and Phytoestrogens. *Planta Medica*, 74(13), 1656–65.

Ozcan-Sezer, S., Ince, E., Akdemir, A., Öztürk Ceylan, Ö., Suzen, S., ve Gurer-Orhan, H. (2018). Aromatase Inhibition by 2-methyl indole hydrazone derivatives

- evaluated via molecular docking and in vitro activity studies. *Xenobiotica*, 1–24.
- Palmer, J. R., Wise, L. A., Hatch, E. E., Troisi, R., Titus-Ernstoff, L., Strohsnitter, W., ... Hoover, R. N. (2006). Prenatal Diethylstilbestrol Exposure and Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers ve Prevention*, 15(8), 1509–14.
- Pandi-Perumal, S. R., Srinivasan, V., Maestroni, G. J. M., Cardinali, D. P., Poeggeler, B., Hardeland, R. (2006). Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *The FEBS Journal*, 273(13), 2813–38.
- Panzer, A., Viljoen, M. (1997). The validity of melatonin as an oncostatic agent. *Journal of Pineal Research*, 22(4), 184–202.
- Parkin, D. M. (2004). International variation. *Oncogene*, 23(38), 6329–40.
- Pasqualini, J. R., Chetrite, G. S. (2005). Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 93(2–5), 221–36.
- Patel, H. K., Bihani, T. (2018). Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacology and Therapeutics*.
- Pawlak, M., Lefebvre, P., Staels, B. (2012). General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12(6), 486–504.
- Perou, C. M., Borresen-Dale, A.-L. (2011). Systems Biology and Genomics of Breast Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(2), a003293.
- Perou, C.M., Sorile, T.E., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Ress, C. A., ... Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–52.
- Preston-Martin, S., Pike, M. C., Ross, R. K., Jones, P. A., Henderson, B. E. (1990). Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Research*, 50(23), 7415–21.
- Prior, A. M., Yu, X., Park, E. J., Kondratyuk, T. P., Lin, Y., Pezzuto, J. M., Sun, D.

- (2017). Structure-activity relationships and docking studies of synthetic 2-arylindole derivatives determined with aromatase and quinone reductase 1. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27(24), 5393–99.
- Raftogianis, R., Creveling, C., Weinshilboum, R., Weisz, J. (2000). Estrogen metabolism by conjugation. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, (27), 113–24.
- Rasmussen, T. H., Nielsen, J. B. (2002). Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (E-Screen). *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 7(4), 322–36.
- Rato, A. G., Pedrero, J. G., Martinez, M. A., del Rio, B., Lazo, P. S., Ramos, S. (1999). Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(8), 857–68.
- Real, M., Molina-Molina, J.-M., Jimenez, J., Dieguez, H. R., Fernandez, M. F., Olea, N. (2015). Assessment of hormone-like activities in Ginkgo biloba, Elettaria cardamomum and Plantago ovata extracts using in vitro receptor-specific bioassays, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 32(9), 1531-41 .
- Reis-Filho, J.S., Pusztai, L. (2011). *Gene expression profiling in breast cancer: Classification, prognostication, and prediction. The Lancet* , 378(9805), 1812-23.
- Reiter, R. J. (1980). The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine Reviews*, 1(2), 109–31.
- Reiter, R. J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, 49(8), 654–64.
- Reiter, R. J., Tan, D.X., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Leon, J., Czarnocki, Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1129–46.

- Reiter, R. J., Tan, D. X., Erren, T. C., Fuentes-Broto, L., Paredes, S. D. (2009). Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis. *Integrative Cancer Therapies*, 8(4), 354–60.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Pilar Terron, M., Flores, L. J., Koppisepi, S. (2007). Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Advances in Medical Sciences*, 52, 11–28.
- Resende, F. A., de Oliveira, A. P. S., de Camargo, M. S., Vilegas, W., Varanda, E. A. (2013). Evaluation of Estrogenic Potential of Flavonoids Using a Recombinant Yeast Strain and MCF7/BUS Cell Proliferation Assay. *PLoS ONE*, 8(10), e74881.
- Rick, A., Cammie, B., Burke, A., Gansler, T., Gapstur, S., Gaudet, M., ... Simpson, S. (2014). Breast Cancer Facts ve Figures 2013-2014. *American Cancer Society*, 38.
- Riggs, B.L, Hartmann, L.C. (2003). Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice., 348(12), 1–12.
- Ritchie, M. D., Hahn, L. W., Roodi, N., Bailey, L. R., Dupont, W. D., Parl, F. F., Moore, J. H. (2001). Multifactor-Dimensionality Reduction Reveals High-Order Interactions among Estrogen-Metabolism Genes in Sporadic Breast Cancer. *The American Journal of Human Genetics*, 69(1), 138–147.
- Robertson, J.F. (2002). Estrogen receptor downregulators: New antihormonal therapy for advanced breast cancer. *Clinical Therapeutics*, 24(SUPPL. A).
- Roche, C. A., Tang, R., Coopey, S. B., Hughes, K. S. (2018). Chemoprevention acceptance and adherence in women with high-risk breast lesions. *The Breast Journal*. doi: 10.1111/tbj.13064
- Rodgers, K. M., Udesky, J. O., Rudel, R. A., Brody, J. G. (2018). Environmental chemicals and breast cancer: An updated review of epidemiological literature informed by biological mechanisms. *Environmental Research*, 160, 152–82.
- Rogan, E. G., Badawi, A. F., Devanesan, P. D., Meza, J. L., Edney, J. A., West, W. W., ... Cavalieri, E. L. (2003). Relative imbalances in estrogen metabolism and conjugation in breast tissue of women with carcinoma: potential biomarkers of

- susceptibility to cancer. *Carcinogenesis*, 24(4), 697–702.
- Roy, D., Abul-Hajj, Y. J. (1997). Estrogen-nucleic acid adducts: Guanine is major site for interaction between 3,4-estrone quinone and COIII gene. *Carcinogenesis*, 18(6), 1247–49.
- Roy, D., Cai, Q., Felty, Q., Narayan, S. (2007). Estrogen-Induced Generation of Reactive Oxygen and Nitrogen Species, Gene Damage, and Estrogen-Dependent Cancers. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 10(4), 235–57.
- Rudel, R. A., Attfield, K. R., Schifano, J. N., Brody, J. G. (2007). Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention. *Cancer*, 109(12 SUPPL.), 2635–66.
- Rundle, A., Tang, D., Hibshoosh, H., Estabrook, A., Schnabel, F., Cao, W., ... Perera, F. P. (2000). The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. *Carcinogenesis*, 21(7), 1281–9.
- Russo, I. H., Russo, J. (1998). Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3(1), 49–61.
- Russo, J., Fernandez, S. V., Russo, P. A., Fernbaugh, R., Sheriff, F. S., Lareef, H. M., ... Russo, I. H. (2006). 17-Beta-estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. *The FASEB Journal*, 20(10), 1622–1634.
- Russo, J., Russo, I. H. (2006). The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 102(1–5 SPEC. ISS.), 89–96.
- Sanchez-Barcelo, E. J., Cos, S., Fernandez, R., Mediavilla, M. D. (2003). Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocrine-Related Cancer*, 10(2), 153–9.
- Sanchez-Barcelo, E. J., Cos, S., Mediavilla, D., Martinez-Campa, C., Gonzalez, A.,

- Alonso-Gonzalez, C. (2005). Melatonin-estrogen interactions in breast cancer. *Journal of Pineal Research*, 38(4), 217–22.
- Sanchez-Barcelo E.J., Martinez-Campa, C.M., Mediavilla, M.D., Gonzalez, A., Alonso-Gonzalez, C., Cos, S. (2007). Melatonin and Melatonergic Drugs as Therapeutic Agents: Ramelteon and Agomelatine, the Two Most Promising Melatonin Receptor Agonists. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic ve Immune Drug Discovery*.
- Sanchez-Barcelo, E. J., Mediavilla, M. D., Alonso-Gonzalez, C., Reiter, R. J. (2012). Melatonin uses in oncology: breast cancer prevention and reduction of the side effects of chemotherapy and radiation. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21(6), 819–831.
- Santen, R. J., Misbin, R. I. (1981). Aminoglutethimide: review of pharmacology and clinical use. *Pharmacotherapy*, 1(2), 95–120. R
- Schwartz, G. F., Hughes, K. S., Lynch, H. T., Fabian, C. J., Fentiman, I. S., Robson, M. E., ... Consensus Conference Committee The International Consensus Conference Committee. (2008). Proceedings of the International Consensus Conference on Breast Cancer Risk, Genetics, veamp; Risk Management, April, 2007. *Cancer*, 113(10), 2627–2637.
- Shang, Y., Brown, M. (2002). Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5564), 2465–8.
- Shimada, T., Yamazaki, H., Foroozesh, M., Hopkins, N. E., Alworth, W. L., Guengerich, F. P. (1998). Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Chemical Research in Toxicology*, 11(9), 1048–56.
- Shirazi, A., Mihandoost, E., Mohseni, M., Ghazi-Khansari, M., Rabie Mahdavi, S. (2013). Radio-protective effects of melatonin against irradiation-induced oxidative damage in rat peripheral blood. *Physica Medica*, 29(1), 65–74.
- Shirinzadeh, H., Eren, B., Gurer-Orhan, H., Suzen, S., Özden, S. (2010). Novel Indole-Based Analogs of Melatonin: Synthesis and in Vitro Antioxidant Activity

Studies, 2187–2202.

Shirinzadeh, H., Ince, E., Westwell, A. D., ve Gurer-Orhan, H. (2016). Novel indole-based melatonin analogues substituted with triazole , thiadiazole and carbothioamides : studies on their antioxidant , chemopreventive and cytotoxic activities, *6366*(January).

Simpson, E. R. (2003). Sources of estrogen and their importance. *Journal of Steroid Biochemistry ve Molecular Biology*, *86*, 225–30.

Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., ... Bulun, S. E. (1994). Aromatase Cytochrome P450, The Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis. *Endocrine Reviews*, *15*(3), 342–55.

Simpson, E., Rubin, G., Clyne, C., Robertson, K., O'Donnell, L., Davis, S., Jones, M. (1999). Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocrine-Related Cancer*, *6*(2), 131–7.

Singh, S., Chakravarti, D., Edney, J. A., Hollins, R. R., Johnson, P. J., West, W. W., ... Rogan, E. G. (2005). Relative imbalances in the expression of estrogen-metabolizing enzymes in the breast tissue of women with breast carcinoma. *Oncology Reports*, *14*(4), 1091–6.

Singletary, K.W., Gapstur, S.M. (2001). Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA*, *286*(17), 2143–51.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., ... Boyd, M. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anti-Cancer Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute*, *82*(13), 1107–1112.

Smith, C. L., Nawaz, Z., O'Malley, B. W. (1997). Coactivator and Corepressor Regulation of the Agonist/Antagonist Activity of the Mixed Antiestrogen, 4-Hydroxytamoxifen. *Molecular Endocrinology*, *11*(6), 657-66.

Soares, J. M., Masana, M. I., Erşahin, C., Dubocovich, M. L. (2003). Functional

Melatonin Receptors in Rat Ovaries at Various Stages of the Estrous Cycle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(2), 694–702.

Soto, A. M., Maffini, M. V., Schaeberle, C. M., Sonnenschein, C. (2006). Strengths and weaknesses of in vitro assays for estrogenic and androgenic activity. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 20(1), 15–33.

Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N., Serrano, F. O. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 103 Suppl(suppl 7), 113–22.

Soto, A. M., Sonnenschein, C., Prechtel, N., Weill, B., Olea, N. (1999). Methods to Screen Estrogen-Agonists and Antagonists. *Journal of Medicinal Food*, 2(3–4), 139–42.

Suzen, S., Tekiner-Gulbas, B., Shirinzadeh, H., Uslu, D., Gurer-Orhan, H., Gumustas, M., Ozkan, S. A. (2013). Antioxidant activity of indole-based melatonin analogues in erythrocytes and their voltammetric characterization. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(6), 1143–55.

Suzuki, T., Miki, Y., Nakata, T., Shiotsu, Y., Akinaga, S., Inoue, K., ... Sasano, H. (2003). Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in normal human tissue and breast carcinoma. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 86(3–5), 449–54.

Tamarkin, L., Danforth, D., Lichter, A., DeMoss, E., Cohen, M., Chabner, B., Lippman, M. (1982). Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 216(4549), 1003–5

Taningher, M., Saccomanno, G., Santi, L., Grilli, S., Parodi, S. (1990). Quantitative predictability of carcinogenicity of the covalent binding index of chemicals to DNA: comparison of the in vivo and in vitro assays. *Environmental Health Perspectives*, 84, 183–92.

Tatay, E., Espin, S., Garcia-Fernandez, A.J., Ruiz, M.J. (2018). Estrogenic activity of

zearalenone, α -zearalenol and β -zearalenol assessed using the E-screen assay in MCF-7 cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 28(4), 239–42.

Tomao, F., Spinelli, G., Vici, P., Pisanelli, G. C., Casciulli, G., Frati, L., ... Tomao, S. (2011). Current role and safety profile of aromatase inhibitors in early breast cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 11(8), 1253–63.

Trosko, J. E. (2001). Commentary: is the concept of “tumor promotion”; a useful paradigm? *Molecular Carcinogenesis*, 30(3), 131–7.

Türkiye Kanser İstatistikleri. (2015).

https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf

Van Aswegen, C. H., Purdy, R. H., Wittliff, J. L. (1989). Binding of 2-hydroxyestradiol and 4-hydroxyestradiol to estrogen receptors from human breast cancers. *Journal of Steroid Biochemistry*, 32(4), 485–92.

Van Lipzig, M. M. H., Vermeulen, N. P. E., Gusinu, R., Legler, J., Frank, H., Seidel, A., Meerman, J. H. N. (2005). Formation of estrogenic metabolites of benzo[a]pyrene and chrysene by cytochrome P450 activity and their combined and supra-maximal estrogenic activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(1), 41–55.

Vanden Bossche, H. V, Moereels, H., ve Koymans, L. M. (1994). Aromatase inhibitors--mechanisms for non-steroidal inhibitors. *Breast Cancer Research and Treatment*, 30(1), 43–55.

Vijayalaxmi, Reiter, R. J., Tan, D.-X., Herman, T. S., Thomas, C. R. (2004). Melatonin as a radioprotective agent: a review. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 59(3), 639–53.

Wade, G. N., Blaustein, J. D., Gray, J. M., Meredith, J. M. (1993). ICI 182,780: a pure antiestrogen that affects behaviors and energy balance in rats without acting in the brain. *The American Journal of Physiology*, 265(6 Pt 2), R1392-8.

Wakeling, A. E. (2000). Similarities and distinctions in the mode of action of

- different classes of antioestrogens. *Endocrine-Related Cancer*, 7(1), 17–28.
- Wakeling, A. E., Dukes, M., Bowler, J. (1991). A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Research*, 51(15), 3867–73.
- Wilson, S. T., Blask, D. E., Lemus-Wilson, A. M. (1992). Melatonin augments the sensitivity of MCF-7 human breast cancer cells to tamoxifen in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology ve Metabolism*, 75(2), 669–70.
- Wong, Z.W., Ellis, M.J. (2004). First-line endocrine treatment of breast cancer: aromatase inhibitor or antioestrogen? *British Journal of Cancer*, 90(1), 20–25.
- Woo, M. M., Tai, C. J., Kang, S. K., Nathwani, P. S., Pang, S. F., Leung, P. C. (2001). Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(10), 4789–97.
- Wouters, W., De Coster, R., Goeminne, N., Beerens, D., van Dun, J. (1988). Aromatase inhibition by the antifungal ketoconazole. *Journal of Steroid Biochemistry*, 30(1–6), 387–9.
- Xu, W.H., Xiang, Y.B., Ruan, Z.X., Zheng, W., Cheng, J.R., Dai, Q., ... Shu, X.O. (2004). Menstrual and reproductive factors and endometrial cancer risk: Results from a population-based case-control study in urban Shanghai. *International Journal of Cancer*, 108(4), 613–619.
- Yager, J.D. (2015). Mechanisms of estrogen carcinogenesis: The role of E2/E1-quinone metabolites suggests new approaches to preventive intervention--A review. *Steroids*, 99(Pt A), 56–60.
- Yang, L., Zahid, M., Liao, Y., Rogan, E. G., Cavalieri, E. L., Davidson, N. E., ... Kensler, T. W. (2013). Reduced formation of depurinating estrogen-DNA adducts by sulforaphane or KEAP1 disruption in human mammary epithelial MCF-10A cells. *Carcinogenesis*, 34(11), 2587–92.
- Yuan, L., Collins, A. R., Dai, J., Dubocovich, M. L., Hill, S. M. (2002). MT1 melatonin receptor overexpression enhances the growth suppressive effect of melatonin in human breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 192(1–2),

147–56.

- Yue, Santen, R. J., Wang, J. P., Li, Y., Verderame, M. F., Bocchinfuso, W. P., ... Cavalieri, E. L. (2003). Genotoxic metabolites of estradiol in breast: Potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 86(3–5), 477–86.
- Yue, W., Yager, J. D., Wang, J. P., Jupe, E. R., Santen, R. J. (2013). Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids*, 78(2), 161–70.
- Zahid, M., Gaikwad, N. W., Ali, M. F., Lu, F., Saeed, M., Yang, L., ... Cavalieri, E. L. (2008). Prevention of estrogen-DNA adduct formation in MCF-10F cells by resveratrol. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(2), 136–45.
- Zahid, M., Saeed, M., Lu, F., Gaikwad, N., Rogan, E., Cavalieri, E. (2007). Inhibition of catechol-O-methyltransferase increases estrogen–DNA adduct formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(11), 1534–40.
- Zheng, W., Xie, D. W., Jin, F., Cheng, J. R., Dai, Q., Wen, W. Q., ... Gao, Y. T. (2000). Genetic polymorphism of cytochrome P450-1B1 and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers ve Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 9(2), 147–50.
- Zhou, D., Wang, J., Chen, E., Murai, J., Siiteri, P. K., Chen, S. (1993). Aromatase gene is amplified in MCF-7 human breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 46(2), 147–53.
- Zimmermann, J., Liebl, R., Von Angerer, E. (2005). Diphenylfuran-based pure antiestrogens with selectivity for the estrogen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry ve Molecular Biology*, 94, 5.

TEŞEKKÜR

Yeni bir doktora öğrencisinin daha danışmanlığını yapmayı düşünmediği halde bana inanarak, danışmanım olmayı kabul eden ve doktora eğitimim süresince yaşadığım her türlü problemde beni destekleyek, bana yeni ufuklar açmaya çalışan, başarılı olmam için hiçbir yardımı esirgemeyen Prof. Dr. Hande GÜRER ORHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimime önemli katkıları bulunan Farmasotik Toksikoloji anabilimdalının değerli öğretim üyeleri Prof. Dr Hilmi ORHAN ve Prof. Dr Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS'a çok teşekkür ederim. Tezimde yer alan melatonin türevlerinin sentezini gerçekleştiren Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasotik Kimya Anabilimdalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sibel SÜZEN ve grubuna, moleküler modelleme çalışmalarını gerçekleştiren Bezmialem Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji anabilimdalı öğretim üyesi Doç. Dr. Atilla Akdemir'e katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sürecinde yaşadığım her türlü problemi aşmaya yardımcı olarak çalışma arkadaşlığının yanı sıra dostluğunu da esirgemeyen Eczacı Alev Taşcıoğlu Aliyev'e, hayatım boyunca manevi desteklerini hiç eksik etmeyen aileme çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının bir kısmı 117S065 numaralı TÜBİTAK projesi tarafından desteklenmiştir.

İZMİR, 2018

Elif İNCE

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Manisa’da doğdum. 2007 yılında başladığım Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi lisans eğitimimi Temmuz 2012’ de tamamladım. Şubat 2013’te İzmir Katip Çelebi Eczacılık Fakültesi Farmasotik Toksikoloji Anabilimdalı’na ‘Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı’ kapsamında araştırma görevlisi olarak atandım. Aynı yıl doktora eğitimine başlamak üzere Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasotik Toksikoloji Anabilimdalı’na görevlendirildim.

E-posta: ecz.elifince@gmail.com

