

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PARP1/2 İNHİBİTÖR KOMBİNASYONLARININ MDA-MB-231
MEME KANSERİ TEDAVİSİNDEKİ ANTİ-NEOPLASTİK
ETKİSİNİN DEŞİFRE EDİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MAZLUM CÖMERT**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Can Ali AĞCA**

BİNGÖL-2021

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda bana destek veren danışman hocam Doç. Dr. Can Ali AĞCA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yaptığım çalışmalar boyunca desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Ramazan GÜNDOĞDU'ya, deneyler sırasında yardımcı olan arkadaşlarım Dilan ERASLAN, Abdullah YILDIRIM, Deniz ÖZDEMİR ve Sıdıka AÇIKGÖZ'e, her türlü sorunlarımda yardımcı olmaya çalışan Prof. Victor Nedzvetsky'e, tüm Bingöl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü hocalarıma, bu günlere gelmemi sağlayan, destekleriyle başarıya ulaştıran Aileme teşekkür ederim.

Ayrıca 2020.00.02 nolu proje ile katkı sağlayan Bingöl Üniversitesi BAP birimine tüm destekleri için teşekkürü borç bilirim.

Mazlum CÖMERT

Bingöl 2021

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	ix
1.GİRİŞ	1
1.1. Poli ADP-Riboz Polimeraz (PARP).....	5
1.2. PARP İnhibitörleri.....	6
1.3. DNA Hasarı	8
1.3.1. Homolog ve Homolog Olmayan Rekombinasyon	9
1.3.2. Tümör Süpresör Protein p53	10
1.3.3. Hücre Döngüsü Kontrol Noktası p21	11
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	12
2.1. Materyal.....	12
2.2. Yöntem	12
2.2.1. Hücre Kültürü Koşulları	12
2.2.2. Hücre Canlılık Testi WST-I Deneyi	13
2.2.3. Western Blot	14
2.2.4. Akridin Oranj-Etidyum Bromür Boyama Deneyi	16
2.2.5. İstatistiksel Analiz.....	17
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	18
3.1.Hücre Canlılık Testi (WST-I) Sonuçları	18
3.2.Western Blot Deneyi Sonuçları	19

3.3. Akridin Oranj-Etidyum Bromür Deneyi Sonuçları	21
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	25
KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ	37



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
ATCC	: American Type Culture Collection
BER	: Baz Eksizyon Onarımı
BRCA-1	: Breast Cancer-1
BRCA-2	: Breast Cancer-2
CO ₂	: Karbondioksit
CQ	: Klorokin
DISC	: Ölüm Sinyal Kompleksi
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikasit
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
GLOBOCAN	: Uluslararası Kanser ajansı
HR	: Homolog Rekombinasyon
mA	: Miliamper
ml	: Mililitre
NAD ⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NER	: Nükleotid Eksizyon Onarımı
nM	: Nanomolar
O ₂	: Oksijen
OH	: Hidroksil
p53	: Tümör protein 53
PAC	: Paklitaksel

PARP	: Poli ADP-Riboz Polimeraz
PARP-1	: Poli ADP-Riboz Polimeraz-1
PARP-2	: Poli ADP-Riboz Polimeraz-2
PARPi	: PARP İnhibitörü
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SiY	: Sağlık İstatistikleri Yıllığı
TEMED	: Tetrametilendiamin
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
WST-1	: Water Soluble Tetrazolium-1

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Türkiye Halk Sağlık Genel Müdürlüğü istatistiğine göre kadınlarda	2
Şekil 1.2. PARPi ve BRCA1/2 genlerinin tek.....	4
Şekil 1.3. Poli ADP-Riboz Polimeraz enziminin bölgeleri.....	5
Şekil 1.4. PARP inhibitörleri ve DNA hasarı ilişkisi.....	7
Şekil 1.5. Homolog olmayan rekombinasyon	10
Şekil 1.6. Hücrede meydana gelen hasar ile.....	11
Şekil 3.1. Olaparib ile tedavi edilen MDA-MB-231	18
Şekil 3.2. Rucaparib ile 48 saat tedavi edilen MDA-MB-231	19
Şekil 3.3. Olaparib ve Rucaparib kombinasyonun.....	20
Şekil 3.4. 48 saat Rucaparib ile tedavi edilen hücrelerin	21
Şekil 3.5. Olaparib dozları uygulanan hücrelerin.....	21
Şekil 3.6. MDA- MB-231 hücrelerine belirlenen	22
Şekil 3.7. Belirlenen dozlarda Rucaparib uygulanan	23
Şekil 3.8. Olaparib ve Rucaparib için kombinasyon.....	24

PARP1/2 İNHİBİTÖR KOMBİNASYONLARININ MDA-MB-231 MEME KANSERİ TEDAVİSİNDEKİ ANTI-NEOPLASTİK ETKİSİNİN DEŞİFRE EDİLMESİ

ÖZET

Kanser günümüzün ve çağımızın en ölümcül hastalığıdır. Kadınlarda meme kanseri en sık görülen kanser türüdür. Meme kanserinin kadınlarda sıkça görülmesi ve ölüm oranının yüksekliği, meme kanseri üzerine yapılan çalışmaların artmasına neden olmuştur. Meme kanseri hücrelerinde BRCA1/2 mutasyonu sıkça görülmektedir. DNA çift zincir kırıkları tamirinde rol alan BRCA'da meydana gelen mutasyon ile PARP proteinleri önem kazanmaktadır. Replikasyon sırasında tek zincirde meydana gelen hasarlardan sorumlu olan PARP, PARP inhibitörleri tarafından baskılanmaktadır. 2014 yılında Olaparib ile başlayan çalışmalarda PARP inhibitörleri meme kanseri tedavisinde önem kazanmıştır. Bu çalışmada BRCA1/2 mutasyonlu meme kanseri hücresi olan MDA-MB-231 hücre hattına, PARP inhibitörlerinden Olaparib ve Rucaparib ile yapılan antineoplastik kombinasyon tedavisinin sonuçları araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, BRCA, PARP, olaparib, rucaparib.

DESCRIPTION OF THE ANTI-NEOPLASTIC EFFECT OF PARP1/2 INHIBITOR COMBINATIONS IN THE TREATMENT OF MDA-MB-231 BREAST CANCER

ABSTRACT

Cancer is the deadliest disease of our day and age. Breast cancer is the most common type of cancer in women. The prevalence of breast cancer in women and the high mortality rate have led to an increase in studies on breast cancer. BRACA1/2 mutation is frequently seen in breast cancer cells. PARP proteins gain importance with the mutation occurring in BRCA, which is involved in the repair of DNA double-strand breaks. PARP, which is responsible for single chain damage during replication, is suppressed by PARP inhibitors. In the studies that started with Olaparib in 2014, PARP inhibitors gained importance in the treatment of breast cancer. In this study, the results of antineoplastic combination therapy with PARP inhibitors Olaparib and Rucaparib to the MDA-MB-231 cell line, a breast cancer cell with BRACA1/2 mutation, were investigated.

Keywords: Breast Cancer, BRACA, PARP, Olaparib, Rucaparib.

1.GİRİŞ

Kanser, büyüme ve gelişmede rol alan genlerin veya proteinlerin mutasyona uğraması ya da ölüm reseptörlerinin hasarlı olması nedeniyle oluşan kontrolsüz büyüme olarak tanımlanabilir. Bunların devamında canlı vücudunda bir hücre kümeleşmesi meydana gelir ve anjiyogenesis, metastaz gibi diğer olaylarda gerçekleşir (Aslan 2006; Bray 2018). Kanser söz konusu bu olayların birikmesi sonucu oluşan bir grup hastalıktır. Halk arasında yaygın olarak bilinen ancak akademik bilginin sınırlı olduğu ve psikolojik açıdan zor ve korkulan bir hastalık türüdür (Bray 2018).

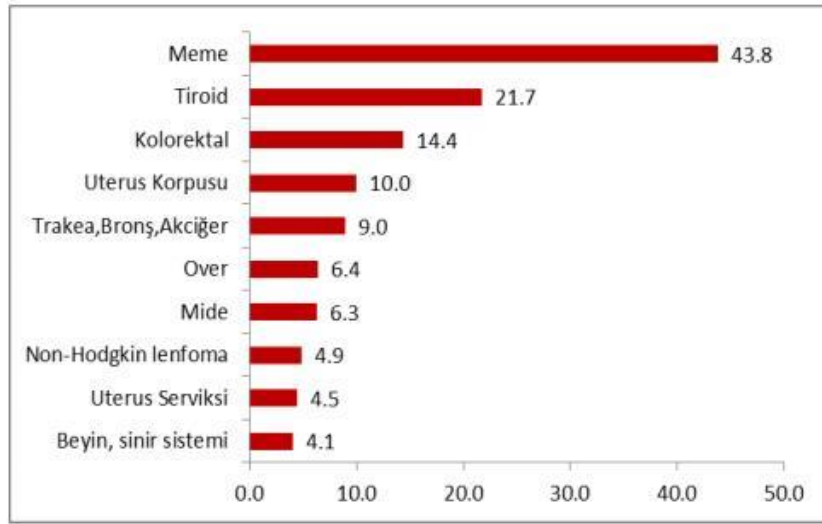
Kanser ülkemizde ve dünyada ölüm oranı olarak kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan yaygın bir hastalıktır. Dünya çapında, ölüme neden olan hastalıklar arasında oranı %22.3, ülkemizde ise bu oran %55.7'dir (Aslan 2006). Sık görülen türleri erkek ve kadınlarda farklılık göstermektedir. Erkeklerde akciğer, kolorektal ve prostat kanseri sıkça görülürken, kadınlarda meme kanseri, kolorektal ve mide kanseri daha çok görülür. Kanser türleri ülkelere ve coğrafyalara göre de farklılık göstermektedir (Bray 2018). Yirminci yüzyılın yaşama koşullarında kanser yaşam süresinin uzaması için en önemli engeli oluşturur. Günümüzde nüfus artışının hızı ve yaşlanma oranının giderek yükselmesine bağlı olarak kanser görülme sıklığı da artmıştır. Ayrıca çevresel etkenler, hava kirliliği ve kullanılan yakıtların oluşturduğu atıklar da kanserin görülme sıklığını arttıran nedenlerdendir (Masoudiyekta 2018; Aslan vd. 2007). Dünya genelinde ekonomik koşullar ve sağlıksız yaşam tarzları, buna bağlı olarak sağlık desteğinin geç ya da tam anlamıyla karşılanamaması kanser hastalığının ölüm oranını arttırmaktadır. Özellikle nüfus yoğunluğunun fazla olduğu bölgelerde hastalığın görülme sıklığının artması, buna karşılık olarak da sağlık koşullarının yetersiz kalması gibi durumlar görülmektedir. Akademik olarak bakılırsa kanser çalışmaları özellikle son dönemde yeni tedavi yöntemlerinin keşfi ile daha da artmıştır. Kanser, ölüm oranı yüksek bir hastalık olduğundan

tedavisi

önem

kazanmaktadır. Tedavi yöntemlerinde hasta doku dışında sağlıklı dokulara da zarar gelmesi, farklı tedavi yöntemlerinin araştırılması için gerekli olmuştur (Aslan 2006; Aslan vd. 2007).

Meme kanseri kadınlar arasında en fazla görülen tümör çeşididir. Her yıl yaklaşık bir buçuk milyon kadını etkilemektedir. Kanser teşhislerinin yaklaşık dörtte birini meme kanseri oluşturur ve kadınlarda ölüm nedeni olarak ikinci en yüksek orana sahiptir. Görülme sıklığının yüksekliğine rağmen mortalitesinin düşük olması erken tanı ile tedavi olasılığının yüksek olmasına bağlıdır (Masoudiyekta 2018; Aslan vd. 2007).



Şekil 1.1. Türkiye Halk Sağlık Genel Müdürlüğü istatistiğine göre kadınlarda meydana gelen kanser türlerinin dağılımı

Meme kanserinde erken tanı her zaman hastanın yaşamı için çok önem arz etmektedir. Ülkemizde kadınların genel olarak en az 2 çocuklu olması ve buna bağlı olarak emzirme süresinin uzaması, alkol tüketiminin kadınlar arasında az olması meme kanseri riskini düşürücü etkenler olarak görülebilir. Ancak yeterli egzersiz, fiziksel aktivitenin az olması ve sağlık kontrollerinin yeterli yapılmaması da riski arttıran nedenlerdendir (Aslan vd. 2007). Doğurganlığa bağlı olarak Asya ülkelerinde meme kanseri görülme sıklığı ile kadınların sayısı arasındaki fark azdır. Avrupa ülkelerinde ise bu oran kuzeyden güneye ve batıdan doğuya gidildikçe azalmaktadır. Kadınlarda doğum oranının yüksek olması meme kanseri riskini düşürücü etmen olarak dikkat çekmektedir. Batı ülkelerine kıyasla

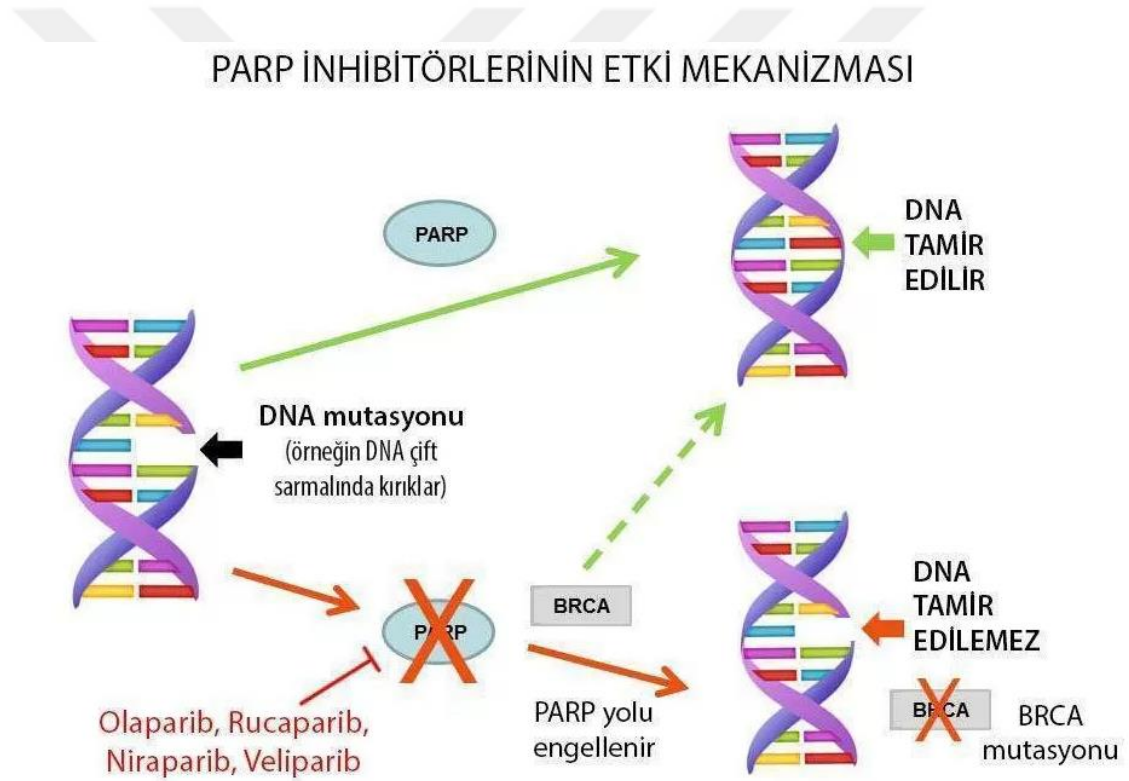
doğuda eğitim seviyesi ve verilen bilgilendirmenin sınırlı olması, bilinçli hastaların az olmasına böylece erken tanı ve teşhisin kısıtlı sayıda olmasına neden olmaktadır (Masoudiyekta 2018; Karayurt vd. 2008).

Kanser tedavisinde farklı tedavi türleri bulunmaktadır. Kemoterapi, cerrahi yöntem, radyoterapi, immunoterapi ve hormon tedavileri bunların başında gelir. Kullanılan yöntemlerden özellikle kemoterapi en yaygın olanıdır. Kemoterapinin hastalığa neden olan hücreleri yok etmesi dışında sağlıklı hücrelere de zarar vermesi büyük sorun teşkil etmektedir. Ayrıca kanserin en önemli sorunlarından biri olan metastaza da engel olamaması kemoterapi için hastaları alternatif tedavi yöntemleri ile yardımcı tedavi uygulamasına itmektedir (Baykara 2016; Çetin 2013). Kişiselleştirilmiş tedavi yönteminde ise hastalığa neden olan etmen saptanıp, oluşan hataya özgü tedavi uygulanmasıdır. Kansere neden olan biyobelirteçlerin belirlenmesi ve bu biyobelirteçlere özgü ilaçların uygulanması daha az zarar ile daha olumlu sonuçlar alınmasını sağlamaktadır. Kişiselleştirilmiş tedavi hastanın tümöre neden olan proteinine direkt etki etmesi veya diğer faktörlere etki mekanizmasının spesifik olmasından dolayı daha etkili bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Baykara 2016; Yavuz vd. 2007).

Kanserin tedavisi zor olması veya tedavi edildiğinde sağlıklı hücrelere de zarar verilmesinden dolayı hastaları farklı tedavi yöntemlerine de sürüklemektedir. Alternatif tedavi yöntemlerinde akupunktur, aromaterapi ve bitkisel ilaçlar yer almaktadır. Ayrıca palyatif tedavi denilen hastanın psikolojik olarak kansere karşı savaşması sağlanmaktadır. Teknolojinin artması ve hastalık hakkında bilginin günümüzde daha kolay ulaşılır olması insanları alternatif tedavi yöntemlerine daha fazla itmekte ve alternatif tedavi yöntemlerine daha çok ilgi duyulmasını sağlamaktadır (Yavuz vd. 2007).

Meme kanserinde kullanılan tedaviler arasında kemoterapik ajan olan PARPi (PARP İnhibitörleri) yer almaktadır. BRCA (Breast Cancer) mutasyonu sonucunda diğer DNA tamir yollarının aktifleşmemesi için PARP yolağının da inhibisyonuna ihtiyaç duyulur. Günümüzde PARP inhibitörlerinin bir kısmı halen araştırılmakta olup bir kısmı ise klinik olarak kullanılmaktadır (Liu at al. 2015; Koç 2009).

Meme kanseri hastalarında BRCA1/2 genlerinin mutasyonu sıkça görülmektedir. BRCA'larda meydana gelen mutasyonlar ile genin inaktif hale geçmesi ve DNA hasarının onarılmaması, bunu takiben tümör oluşumuna kadar devam eden yolağı oluşturur (Clift at al. 2019). BRCA1 geni, 17.kromozomda bulunur ve 1863 aminoasitten meydana gelen BRCA1 proteinini kodlar. BRCA2 ise 13.kromozomda bulunur ve 3418 aminoasitten oluşan BRCA2 proteinini kodlar. BRCA, tümör süpresör gen ailesinden olup, kanser oluşumunu engeller. DNA sentezi sırasında özellikle çift zincir kırıklarının düzenlenmesinde rol oynarlar. BRCA'da meydana gelen bir mutasyonda DNA tamiri yapılamaz ve p53 ile aktif edilen apoptoz yolağı aktifleşir ve hücre ölümü gerçekleşir (Clift at al. 2019; Arvas 2004).

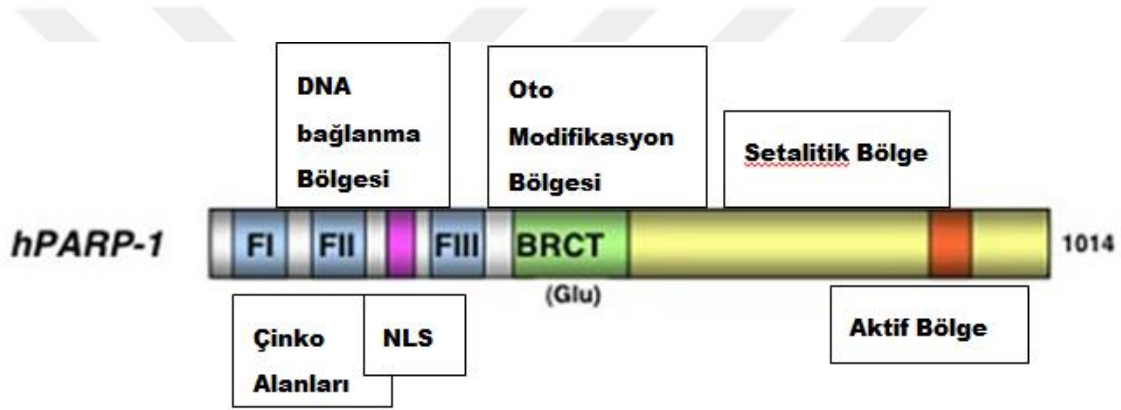


Şekil 1.2. PARPi ve BRCA1/2 genlerinin tek zincir kırığında yaptığı tamir ile BRCA1/2'nin mutasyonlu olduğu durumda çift zincir kırığının PARP ile tamir edilememesi (Özdoğan 2021)

DNA replikasyonu sırasında meydana gelen tek ve çift zincir kırığı tamirinde BRCA dışında PARP proteini de rol oynamaktadır. Çift zincir kırığı, eşleşme sırasında meydana gelen tek zincir kırığı nedeniyle oluşmaktadır. Tek zincir kırığının, çift zincir kırığına dönüşmemesi için PARP'ın tek zinciri baz ekleme ile tamir etmesi gerekir (Ulaslı 2013).

1.1. Poli ADP-Riboz Polimeraz (PARP)

Poli ADP-Riboz Polimeraz (PARP), DNA tek ve çift zincir kırıklarında tamir mekanizması için gerekli enzimleri aktifleştiren protein yapıdaki moleküldür. Yapısında farklı genler ile kodlanan 113 kDa ağırlığında PARP1 ve 62 kDa ağırlığında PARP2 bölgeleri bulunur. DNA zinciri kopmalarında ilk sinyali alan enzimdir. Yapısında 3 temel bölge bulunur. Bunlar DNA'ya bağlanan ve tanıyan bölge olan “DNA Bağlanma Bölgesi”, BRTC denilen “Oto Modifikasyon Bölgesi” ana protein kısmını oluşturur ve son olarak enzimleri aktifleştiren ve onlara bağlanan kısım “Katalitik Bölge” olarak adlandırılır (Dubois 2020; Murai 2012).



Şekil 1.3. Poli ADP-Riboz Polimeraz enziminin bölgeleri (Kraus 2008)

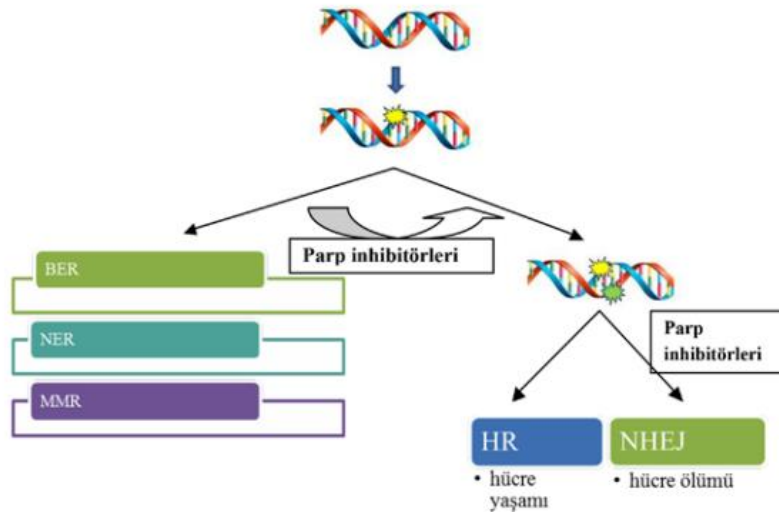
PARP, ökaryotik hücrelerin çekirdeğinde, bol miktarda bulunan bir enzimdir. DNA hasarı meydana geldiğinde aktifleşen PARP, DNA polimeraz, topoizomerez ve ligaz gibi enzimleri aktifleştirip tek zincirde meydana gelen hasarı onarmakla görevlidir. Tek zincirde meydana gelen mutasyonun birçok sebebi olabilir. Çevresel koşullar, radyasyon, bazı kimyasallar, X-ışınları, UV ışınları ve replikasyon sırasında meydana gelen yanlış eşleme tek zincir kırığına neden olmaktadır. Eşleme sırasında eksik olan baz yerine karşı zincir referans alınarak ekleme yapılmaktadır. Normal koşullarda oluşan hasar, PARP proteini ile aktif hale gelen enzimler tarafından karşı zincire bakılarak tamir edilir. Ancak PARP'ın engellemesi durumunda tek zincir kırığı eşleme ile çift zincir kırığına dönüşmektedir. Memeli hücrelerinde PARP, DNA tamiri, apoptozis, hücre

regülasyonu, farklılaşma ve kromozom stabilizasyonunda rol oynayan önemli bir enzimdir (Dubois 2020; Tok 2015).

BRCA mutasyonu gerçekleşmiş bir meme kanseri hücresinde çift zincir kırığı tamir edilemez. Tek zincirde meydana gelen hasar PARP ile tamir edilebilir. Replikasyon öncesi meydana gelen tek zincir kırığı, eşleme ile bir bazın eksikliği çift zincir kırığına dönüşebilmektedir. PARP protienini baskılanır ise çift zincir kırığı oluşumu gözlemlenecektir. PARP'ın görevini yapmasını engelleyen bazı inhibitörler vardır. Bunlara örnek Olaparip, Rucaparip, Niraparip, Talazoparip ve Veliparip verilebilir. Bu inhibitörler PARP'a bağlanarak DNA tamir mekanizmasında rol oynayan enzimleri aktivelemesini engeller (Murai 2012; Tok 2015).

1.2. PARP İnhibitörleri

PARP inhibitörleri (PARPi), kombine tedavi yöntemi ile DNA onarım sistemlerinde rol alan PARP'a etki ederek hedefe yönelik tedaviyi amaçlayan ajan olarak kullanılmaktadırlar. Yapılan çalışmaların en önemli neticesi, 2018 yılında FDA tarafından onaylanan ve BRCA mutantlı metastatik meme kanseri hastalarının tedavisinde kullanılan "Olaparip"dir (Tok 2015). Bu yöntem, PARP tarafından aktif edilen homolog rekombinasyon onarım sisteminin baskılanmasını ve DNA tek ve çift zincir kırıklarının tamir edilmesinin engellenmesini sağlamaktadır. PARP inhibisyonu için farklı görüşler mevcuttur. PARP'ın baskılanması ve tek zincir kırıklarının çift zincir kırıklarına dönüşüp, homolog rekombinasyonun yetersiz kalması ve hücrenin ölmesi bu görüşlerden biridir. Diğerleri ise DNA hasarına karşı hücreleri duyarlı hale getirmesidir. Kombine tedavi stratejisi ile maksimum etki beklenirken hastalara minimum zarar verilmesi de göz önüne alınmaktadır (Glendenning 2011; Curtin 2012).



Şekil 1.4. PARP inhibitörleri ve DNA hasarı ilişkisi (Toss and Cortesi 2013)

İlk olarak 2003 yılında PARP inhibitörleri çalışılmaya başlanmıştır. PARP inhibitörleri genellikle kombine tedaviler için kullanılmaktadır. Yakın zamanı çalışmalarla söz konusu inhibitörlerin kombin tedavilerde kullanımının, var olan etkiyi arttırmada büyük rol oynadığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda PARP inhibitörlerinin antikanser aktivitesi dışında, nörotravma, kronik kalp yetmezliği, pulmoner rahatsızlıklar ve vasküler rahatsızlıklarda da kullanılabileceği dair görüşler giderek artmaktadır (Tok 2015; Sodhi 2010).

Olaparip, 2014 yılında FDA tarafından yumurtalık, meme ve pankreatik kanserler için monoterapi ajanı olarak onaylandı (Dubois 2020). PARP inhibitörlerinde ilk çalışılan inhibitör Olaparip'tir. Yapılan çalışmalarda Olaparip'in BRCA mutasyonu olan hastalarda progresyonu azalttığı ve ölüm riskini düşürdüğü gösterilmiştir (Daumar 2018). Baz eksilmesi tamiri sırasında PARP'ın DNA'ya bağlanması gerekmektedir. Olaparip, PARP'ın aktif bölgesine bağlanarak DNA'dan ayrılmasını önler ve PARP'ı hapsedir. Böylece PARP işlev göremez ve bloke olur. PARP'ın Platin bazlı tedavilerde, özellikle ameliyat sonrası tekrarlanma olasılığını düşürdüğü de bildirilmiştir (Dubois 2020; Murai 2014).

Rucaparib, DNA transkripsiyonu ve onarımında rol alan bir PARP inhibitörüdür. Diğer inhibitörlerden farklı olarak PARP2/3/4/10/15/16 ile daha yüksek bağlanma afinitesi

göstermektedir. Klinik tedavilerde ağız yoluyla kullanılmaktadır. BRCA mutasyonunda kanser riskinin artmasından dolayı PARP yolağının inhibisyonu önem kazanır. Rucaparip, BRCA ve diğer DNA onarım enzimleri için, gelişmiş meme kanseri ve diğer malign tümörlerde ilgili mutasyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Rucaparib, Amerika'da 2016 yılında BRCA mutasyonu olan kadınların yumurtalık kanseri tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır (Murai 2014; Plummer 2013).

PARP inhibitörlerinin genel olarak kullanım amacı, BRCA mutasyonu gerçekleşmiş bir hücrede tek zincir kırığının, çift zincir kırığına dönüşmesini sağlamak ve bu yolla BRCA yolağının inaktif olma sebebinden dolayı hücrenin DNA'yı tamir edememesi ve ölümle sonuçlanmasıdır.

Bu tezde BRCA mutasyonlu meme kanseri hücresi MDA-MB-231 hücre hattında PARP inhibitörlerinin kombinasyonları ile tedavi edilerek ve hücrelerin programlı hücre ölümü apoptozise sürüklenmesi hedeflenmiştir.

1.3. DNA Hasarı

DNA hasarının birçok farklı nedeni ve buna bağlı birçok farklı sonucu olmaktadır. Ultraviyole, X-ışınları, iyonize radyasyon ve kimyasal ajanlar gibi nedenlerden dolayı DNA hasarı oluşabilir. DNA'da meydana gelen hasarlar bölünme ile diğer hücrelere de aktarılır. Meydana gelen hasar DNA replikasyonu sırasında birçok kontrol noktası ile tespit edilmektedir. Hücre döngüsünde bu noktaları kontrol eden proteinler mevcuttur (Chatterjee 2017). Kontrolsüz büyüme ve bölünme ile kanser meydana gelmektedir. DNA üzerinde meydana gelen hasar birçok yöntemle tespit edilmekte ve tamiri gerçekleştirilmektedir. Tamir mümkün olmayan durumlarda hücre ölümü için gerekli emirler verilir. Bu kontrol noktalarında meydana gelen mutasyonlar, sürekli bölünme ile kansere neden olmaktadır. Hücrede bulunan serbest radikaller hücre içinde bulunan makromoleküllerle etkileşime girerek hasar oluşturmaktadır. Bunu takiben oksidatif stres meydana gelir ve oksidatif stres tamir edilemez ise hücre ölümü ile sonuçlanır. Oksidatif stres, baz modifikasyonları, tek ve çift zincir kırığı, DNA ve protein arasında çapraz bağlanma gibi hasarlar meydana getirebilir (Furgason 2013; Basu 2018). Hücre döngüsü sırasında replikasyon meydana gelirken, tek zincirde oluşan eksiklik daha sonradan çift zincir kırığına dönüşmektedir. Hücre hayatta kalma mekanizması, DNA hasarı olduğu

sırada tamir mekanizmasını devreye koymaktadır. Tamir mekanizmasının bilinen en önemli elemanlarından biri de PARP'tır. PARP replikasyon sırasında işlev görmez ise meydana gelen baz eksikliği, replikasyondan sonra çift zincir kırığına dönüşüp ciddi DNA hasarına neden olur. PARP'ın gerekli enzimleri aktifleştirip tek baz hatasını düzeltmesi hayati öneme sahiptir (Onur 2009; Atmaca 2009). Günümüzde PARP, bu özelliğinden dolayı kanser tedavilerinde sıkça çalışılmaya başlanmıştır. Tamir mekanizması çalışmadığı zaman hücre ölümüne neden olur. Aksi durumda kanserleşmeye neden olmaktadır (Onur 2009; Furgason 2013).

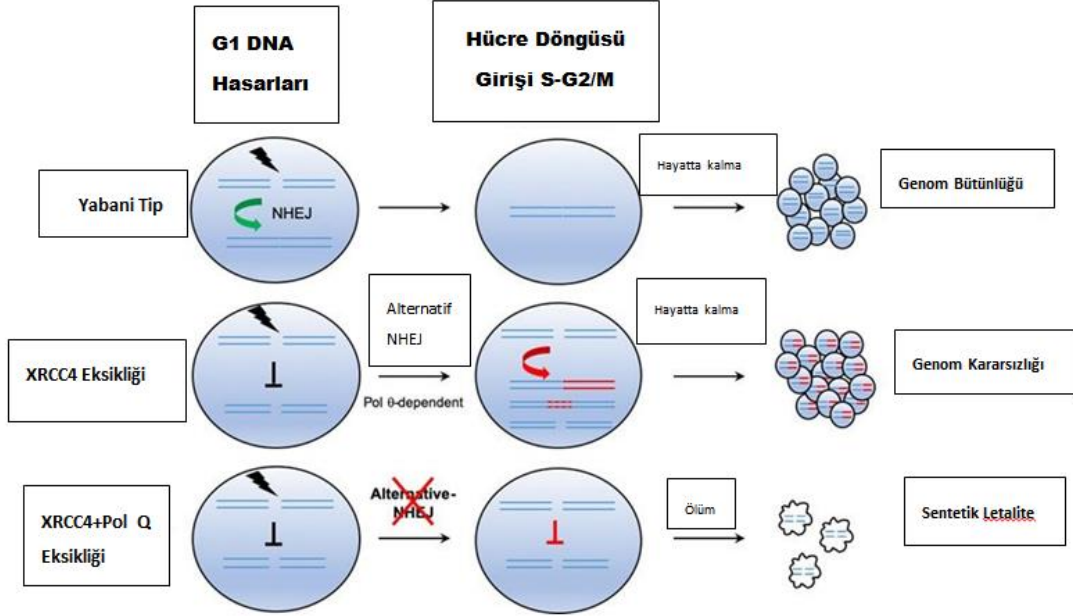
DNA hasarı endojen ve ekzojen kaynaklı olabilir. Endojen kaynaklı hasarlara örnek olarak replikasyon hataları, oksidatif stres, insersiyon, delesyon gibi hatalar ve metilasyon gibi kimyasal değişimler verilebilir. Ekzojen kaynaklı hasarlara ise kimyasal ajanlar yani alkilleyici ajanlar, etidyum bromür vb. maddeler, fiziksel ajanlara ise ultraviyole radyasyon ve iyonize radyasyon örnek verilebilir (Onur 2009; Atmaca 2009).

1.3.1. Homolog ve Homolog Olmayan Rekombinasyon

DNA da oluşan bir hatanın nasıl ve hangi yollarla tamir edildiğinin bilinmesi yapılacak tedaviler açısından önemli rol oynamaktadır. Kanserde önemli bir sorun teşkil eden ölümsüzlük, tedavi uygulamasında asıl dikkate alınması gereken konuyu oluşturmaktadır. Kanserli hücrelerin meydana gelen hasar ile sürekli bölünüp, tamir mekanizmalarını devre dışı bırakması görülmektedir. Hücrede meydana gelen bir hasar kontrol edilerek ya tamir edilir ya da hücre ölüme sürüklenir. Ancak kanserli hücrede tamir mekanizması çalışmamakla birlikte hücre ölümü de engellendiği için sürekli olarak bölünerek kanser genişlemektedir. Burada özellikle çift zincir kırıkları en yıkıcı olan hasar modelidir. Onarılmadığı takdirde hücresel ölüme veya hatanın devamlılığı ile kansere neden olabilir. Bu nedenle tedavi yöntemlerinde DNA hasarı, özellikle çift zincir kırıkları oluşumu için çaba gösterilmektedir. DNA tek ve çift zincir kırıklarında iki tür tamir mekanizması rol oynamaktadır (Onur 2009; Furgason 2013).

Homolog olmayan rekombinasyonda (NHEJ), kardeş kromatitten destek alınamaz, bu yüzden DNA'nın hasarlı bölgelerinden bir bölüm kesilip atılır ve gerekli enzimlerle birleşme sağlanır. Hasar tamir edilir fakat bir miktar nükleotit kaybına neden olur. Bu

nedenle homolog rekombinasyon daha etkili bir sonuç vermektedir (Ou and Schumacher 2018).



Şekil 1.5. Homolog olmayan rekombinasyon ile DNA hşarının tedavi edilmesi (Yu at al. 2020)

Homolog Rekombinasyon (HR), çift sarmalda meydana gelen kopmalar ve zincirler arası çapraz bağlanmaları çıkarmak için kullanılan mekanizmadır. HR aynı zamanda replikasyon çatallarının korunması ve telomerlerin korunması için de önemli role sahiptir. Kanseri oluşumunun önlenmesinde HR tamiri vazgeçilmezdir. Hasarlı bölge kardeş kromatitten yardım alınarak tamir edilir. Bu sebepten dolayı daha doğru ve eksiksiz bir tamir yapılmasını sağlamaktadır. İki mekanizmada da hemen aynı enzimler rol oynamaktadır. PARP'ın uyarılması ve DNA ligaz, Polimeraz, MRN ve RAD51 gibi enzimler işlev görmektedir (San Filippo and Sung 2008; Zwaka and Thomson 2009).

1.3.2. Tümör Süpresör Protein p53

Genom gardiyanı olarak adlandırılan p53 proteini, insanda 17.kromozomda bulunmaktadır. Kanseri türlerinin %50'sinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Kanseri hücrelerde en çok mutasyona uğrayan protein olduğu bilinmektedir. Normal koşullarda p53, meydana gelen hataları tamir etmek için gerekli yolları aktifleştirir. PTEN, p21,

CDK ve Kaspaz proteinlerini aktifleştiren ve hücre döngüsü sırasında kontrol sağlayan elementleri uyaran tümör süpresör genidir. p53'ün hücre sitoplazmasında ekspresyonunun artışı, DNA hasarı oluşunun kanıtıdır. Hücre döngüsü kontrolü, DNA'da meydana gelen hataların düzeltilmesi, oluşan hasar sonucu hücrenin Apoptoza sürüklenmesi veya hatanın tamiri ile hücrenin sağ kalımı p53 kontrolünde gerçekleşmektedir (Meng et al. 2018; Hanson et al. 2020).



Şekil 1.6. Hücrede meydana gelen hasar ile p53'ün hücre ölümü veya sağ kalımı ile ilgili seçimi yapması (Panatta 2021)

1.3.3. Hücre Döngüsü Kontrol Noktası p21

İnsanda 6.kromozomda p21.2 bölgesinde bulunan genidir. Hücre bölünmesi sırasında oluşan DNA hasarı ile G1 evresinde bölünmeyi durdurmakla görevlidir. Kontrol noktalarından en önemli olanı p21'dir. p21, p53'ün aktif etmesi ile görevini yapabilir. CDK'ları inhibe edebilir ve böylece hücre döngüsü kontrolü sağlar. Kaspaz aktivasyonunu kontrol ederek hücrenin Apoptoza gitmesine neden olur. Yapılan çalışmalarda p21'in kanser oluşumu ve tedavisi için önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Hücre içinde p21 ekspresyonunda artış olması DNA hasarı oluştuğunun ve hücre döngüsünün durdurulmaya çalışıldığını göstermektedir (Shamloo and Usluer 2019).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

MDA-MB-231 Hücre Hattı ATCC® (Amerika Birleşik Devletleri) firmasından temin edildi. DMEM besiyeri Life Technologies Inc. (Grand Island, NY) firmasından, Penisilin/Streptomisin Gibco (ABD), Phosphate Buffer Saline (PBS) Invitrogen (Almanya) firmalarından temin edildi. Fetal Bovine Serum (FBS), MTT, Kristal Viyole ve Tween-20 Sigma–Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi. Primer ve Sekonder Antikorlar (Bax (B-9): sc-7480, Tubulin (YL1/2): sc-53029, Bcl-2 (C-2): sc-7382, p53 (DO-1): sc-126, GAPDH (0411): sc-47724) Santa Cruz Biotechnology (Teksas, ABD) firmasından, (p21 Waf1/Cip1 (12D1) #2947) Cell Signaling Technology (Massachusetts, ABD) firmasından temin edildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre Kültürü Koşulları

Meme kanseri hücreleri olan MB-MDA-231 hücre hattı -80 °C'den çıkarılıp ilk aşamada çözündürüldü. Çalışmaya başlanmadan önce kabin %70 Etanol ile temizlendi. Kabine alınacak her malzeme, kabin içine konulmadan önce etanol ile temizlendi. Hücrelerin çoğalması için petri kaplarına ekimleri yapıldı. Hücreler CO₂ inkübatörde yapışması ve çoğalması için bekletildi. Kullanılan tüm malzemelerin steril olmasına dikkat edildi. Kabinde çalışma sırasında eldiven ve koruyucu giysi kullanıldı. Her yapılan çalışma sonrası kabin tekrar %70'lik Etanol ile temizlendi. Kabin içi 1 saatlik UV ışığına maruz bırakıldı. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler toplanarak 75'lik doku kaplarında DMEM (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) besiyeri içinde çoğaltıldı. DMEM besiyerine ek olarak %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin eklendi. Hücreler %5'lik CO₂ inkübatörde kültüre alındı.

Pasajlama işlemi için hücreler 75'lik doku kaplarında belirli bir sayıya ulaştıktan sonra yapılmalıdır. Ortama ekilen hücre sayısı belirli bir süre geçtikten sonra ortamda besin, oksijen ve yeterli alan bulamamalarından dolayı ölüm fazına geçerler. Bunu engellemek amacı ile belirli gün aralığıyla pasajlama yapılması gerekmektedir. Pasajlama için kirli besiyeri çekildi ve hücreler Tripsin ile toplandı. Toplanan hücreler santrifüj edildi ve ölü olan hücreler süpernatant kısımda uzaklaştırıldı. Pelletten bir dahaki pasajlama süresine bağlı olarak miktar belirlenip hücre alındı. Hücreler 10 ml besiyeri ile tekrar 75'lik doku kabına ekildi ve CO₂ inkübatörde bekletildi.

2.2.2. Hücre Canlılık Testi WST-I Deneyi

Hücre proliferasyonunu bilmek kanserli hücrenin faaliyetlerini anlamak için önemli bir yere sahiptir. Hücre bölünmesi sırasında birçok kontrol noktası bulunur. Kansere neden olan hücrede bu noktalarda meydana gelen hasarların anlaşılması önemlidir. Hücre canlılık testlerinin kullanım amacı uygulanan ilaç veya kimyasal ile ortamda bulunan hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini ölçmektir. Bu canlılık testlerinin MTT (Metiltiazol Difenil Tetrazolyum), XTT ve MTS gibi farklı çalışma şekilleri olan türleri bulunmaktadır. Metabolik aktivite ölçümü için kullanılan hücre proliferasyon deneylerinden biri de WST-I'dır. Proliferasyona uğrayan hücrelerde mitokondri, ortama dehidrogenaz enzimi salgılar. Bu enzim ortama deney kiti ile verilen Tetrazolyum tuzunu indirgemektedir. İndirgenen Tetrazolyum Formazon adı verilen maddeye dönüşerek renk oluşumuna neden olur. Renk değişimi ile absorbans değerleri farklılaşır ve Elisa cihazı kullanılarak ölçüm yapılır. Elisa cihazı antijen-antikor ilişkisine dayanan, konsantrasyona bağlı ölçüm yapan cihazdır. Ölçüm genellikle 450 nm ile 570 nm arasında yapılmaktadır (Terzioğlu 2013).

Besiyeri içinde CO₂ inkübatörde kültüre alınan hücreler toplandı. Santrifüj edilerek ters mikroskop altında sayıldı. Sayım sonucu elde edilen değer ile gerekli hesaplama yapılarak hücre sayısı belirlendi. Malzemeler %70 etanol ile temizlenerek kabine alındı. 96 kuyucuklu plaka içine MB-MDA-231 hücre hattından 24 kuyucuğa 3×10^3 adet hücre ekildi. Kuyucuklara ilk olarak 100 µl medium bırakıldı ve gece boyunca hücrelerin yapışması için CO₂ inkübatörde bekletildi. 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırılıp PARP inhibitörleri ile tedavi edildi. 6 farklı konsantrasyon ile (1-6,25-12,5-25-50-100 µM) 48

saatlik Rucaparib tedavisi uygulandı. Olaparib için ise 7 konsantrasyon (1-15,625-31,5-62,5-125-250-500 μ M) ile 48 saatlik tedavi uygulandı. Tedavi sonrası her kuyucuktaki 90 μ l medium üzerine 10 μ l WST-I solüsyonu eklendi. 4 saat CO₂ inkübatörde bekletildi. Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvarında Elisa cihazı ile 450 nm ve 490 nm absorbans sonuçlar alındı.

2.2.3. Western Blot

2.2.3.1. Western Blot için Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Standart Lizis Tamponu

1 M 500 ml protein lizis çözeltisi için gerekli malzemeler; 10 ml 1M tris (pH 8,0), 100 ml 5 M NaCl, 50 ml glycerol, 50 ml 1% NP-40, 5 ml 0.5M EDTA(pH 8,0), 0,5 ml 0,5M EGTA (pH 8,0), 50 ml 0,5 M NaF, 2,16 gr 20 mM beta-glycerophosphate, 2,5 ml 1mM Na₃VO₄ behere konulur. Üzerine 250 ml distile su eklenir ve manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Üzeri 500 ml'ye tamamlandı.

SDS Tamponu Hazırlanması

Hassas terazide 14,4 gr glisin tartıldı. 3,03 gr tris base tartıldı. 500 ml su eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 5 ml %20 SDS eklendi. Üzeri 1 litreye tamamlandı ve her örneğe ayrı etiketleme yapıldı.

Transfer Tamponu Hazırlanması

Hassas terazide 28,8 gr glisin tartıldı. 6,06 gr tris base tartıldı. 400 ml su katıların üzerine eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Üzerine 20 ml metanol eklendi ve tekrar karıştırıldı. Üzeri 500 ml'e tamamlandı.

TBS Tamponun Hazırlanması

Hassas terazide 17,53 gr NaCl ve 12,11 gr tris base tartıldı. 300 ml su eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 7,5 ml HCl eklendi ve pH'sı 7,4'e ayarlandı. Toplamda 500 ml tamamlanması için distile su eklendi.

TBS-T yıkama solüsyonu hazırlanması

Hazırlanan konsantrasyonu yüksek TBS'ten 25 ml alınıp distile su ile 100 ml'e tamamlandı. 1 ml Tween-20 eklenip manyetik karıştırıcı ile homojenize edildi.

Separating jel hazırlanışı

%12'lik 10 ml Separating jel için, falkon tüp içinde 3,3 ml distile su, 4 ml akrilamid, 2,5 ml Tris (pH:8,8), 0,1 ml SDS, 0,1 ml APS ve son olarak 4 µL TEMED eklendi. APS ve TEMED eklemesi yapılırken dikkatli ve seri olunmalıdır. Reaksiyon hızları yüksek olduğundan ekleme yapıldıktan sonra jel kalıba hemen dökülmelidir.

Stacking jel hazırlama

2 ml Stacking jel için, 1,4 ml distile su içine 0,33 ml akrilamid eklendi. 0,25 ml Tris (pH:6,8), 0,02 ml SDS ve APS ile 0,002 ml TEMED eklendi.

Protein izolasyonu için ilk olarak MDA-MB-231 hücre hattı 6 cm'lik petri içinde $2,5 \times 10^4$ hücre 3 ml DMEM olacak şekilde ekim yapıldı. Tedavi dozları 5 µM Rucaparib, 10 µM Rucaparib, 10 µM Olaparib, 5 µM+10 µM Ruc./Olap., 10 µM+10 µM Ruc./Olap. şeklinde yapıldı. 48 saatlik tedavi için CO₂ inkübatörde bekletildi. Protein elde edilecek hücreler toplandı ve PBS ile yıkandı. PBS daha sonra ortamdan uzaklaştırıldı. Örnekler buz üzerinde bekletildi. 6600 rpm 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Lizis aşamasında Lizis Buffer içine her birinden 1:1000 oranında inhibitörler (PMSF, Benzdamin, Löpeptin, DTT) eklendi. Tüm işlemler buz üzerinde yapıldı. Lizis aşamasından sonra 14.000 rpm 10 dk +4 °C'de santrifüj edildi ve süpernatant kısım alındı. Total protein Bradford Deneyi ile belirlendi.

Jel elektroforezi için %12'lik SDS-PAGE için Separating jel hazırlandı. Sabitleştirilmiş aparata katılma için döküldü. APS ve TEMED (Her iki maddenin konsantrasyonu proteinlerin büyüklüğüne göre değişmektedir.) eklendikten sonra jel katılma başlanacağı için bu işlemler hızlı yapıldı. İzopropanol jel üzerine eklenerek düz bir çizgi elde edildi. Katılmasından sonra izopropanol ortamdan uzaklaştırıldı. Stacking jel eklendi ve hava kabarcığı yokluğu kontrol edilerek dikkatli şekilde tarak eklendi. Stacking jel katıldıktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve elektroporatore yerleştirildi.

Elektroporator, Running Buffer (0,125 M Tris-HCl, %20 Glycerol, %4 SDS, %0,004 Bromophenol Blue, %10 2-mercaptoethanol) ile dolduruldu.

Elektroforez güç kaynağına bağlandı ve tampon ile dolduruldu. Tamponun jeli tamamen kapatmasına dikkat edildi. Tarak dikkatlice çekildi. Marker ve örnekler kuyucuklara eklendi. Yaklaşık 2 saat yürütme yapıldı. Yürütmeden sonra jel dikkatlice çıkarıldı. Tarak kısmı kesildi.

Transfer işlemi ile jelden örnekler uygun boyutlardaki membrana aktarılması için süngerlerle birlikte sandviç modeli yapıldı. 4 °C’de elektriksel alanda jelden membrana Transfer Buffer (25 mM Tris, 190 mM Glycine, %20 Methanol) içinde aktarım yapıldı. Transfer yaklaşık 90 dakika sürdü. Proteinler jelden PVDF membrana transfer edildi. Ardından %5’lik yağsız süt tozunda bloklama yapıldı.

Yağsız süt tozu içinde gece boyunca primer antikorla birlikte 4 °C’de bekletildi. Primer antikor uygulanmış membran TBS ile yıkandı. Yaklaşık 1 saat boyunca sekonder antikora maruz bırakıldı. 5x5 (yıkama sayısı/dakika) olacak şekilde TBS ile yıkandı. ECL kiti ile muamele edilip karanlık odada X-Ray film üzerine aktarıldı.

2.2.4. Akridin Oranj-Etidyum Bromür Boyama Deneyi

-80 °C’den çıkarılan MDA-MB-231 hücre hattı ilk olarak 3 cm’lik petri kaplarına ekildi. Hücreler çoğaldıktan sonra 75’lik doku kaplarına ekimi gerçekleştirildi. Hücreler belirli bir sayıya ulaştıktan sonra toplandı, gerekli olan miktarın alınması için sayım yapıldı ve 12 kuyucuklu kap içerisine her birine 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Önceden hesaplanan dozlar meme kanseri hücre hattına uygulandı. İlk aşamada Olaparib ve Rucaparib için 0,1 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M ve 10 μ M dozları ile 48 saatlik tedaviler yapıldı. Deney sonlandırma yapılmadan önce negatif görüntüler alındı. 48 saat sonunda hücreler Tripsin ile toplandı. Toplanan hücreler etiketlenmiş endopod tüplerine konuldu. 2500 rpm’de 4 dakika 4 °C’de santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldı ve hücre yoğunluğuna göre PBS eklendi. Ters mikroskopta görüntü alınacağı için örneklerin lam üzerine konulmalıdır. Ao-EtBr boyasının DNA’ya bağlanması için mikroskopta görüntü alınmadan yaklaşık 10 dakika önce örneklere eklenmesi gerekmektedir. Örneklerden 30

μl , AO-EtBr boyasından 10 μl olacak şekilde lam üzerine örnekler eklendi. Örneklerin düz ve tek sıra halinde durmaları için lamel ile örneklerin üzeri kapatıldı. Ters mikroskopta 20x'te görüntüleri alındı.

Rucaparib ve Olaparib için belirlenen dozlarda tek olarak uygulanan örnekler sonrası kombinasyon için tekrar 12 kuyucuklu kap içine her kuyucuğa 1×10^5 hücre ekildi. Hücreler bir gün yapışması için bekletildikten sonra kombinasyon dozları uygulandı. 48 saat dolmadan yine negatif görüntüler alındı. 48 saat sonunda tripsin ile hücreler toplandı. Santrifüj işlemi diğer örneklerde olduğu gibi yapıldı. Örnekler lam üzerine 30 μl örnek, 10 μl boya olacak şekilde eklendi ve 10 dakika bekletildikten sonra görüntüleri alındı.

2.2.5. İstatistiksel Analiz

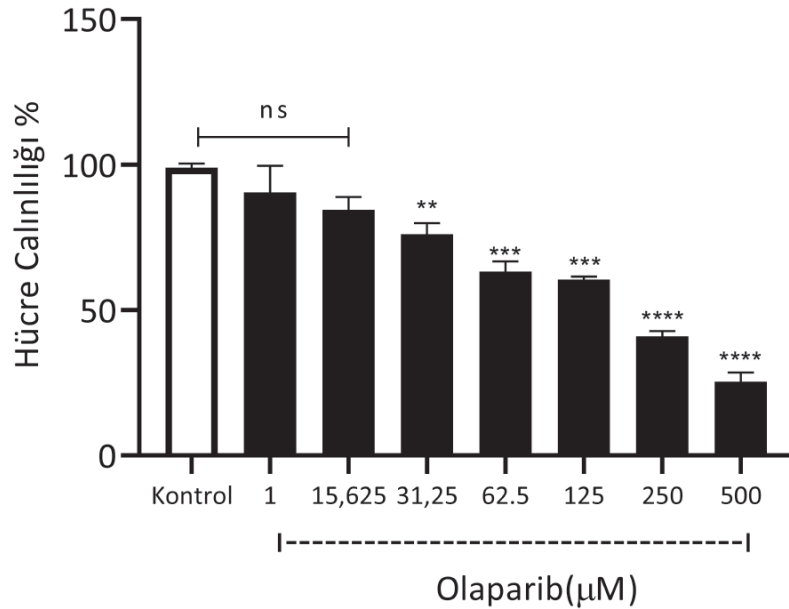
Verilerin istatistiksel analizi Anova Tukey ile değerlendirildi. Gruplar arası farklılıklar, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ şeklinde gösterilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1.Hücre Canlılık Testi (WST-I) Sonuçları

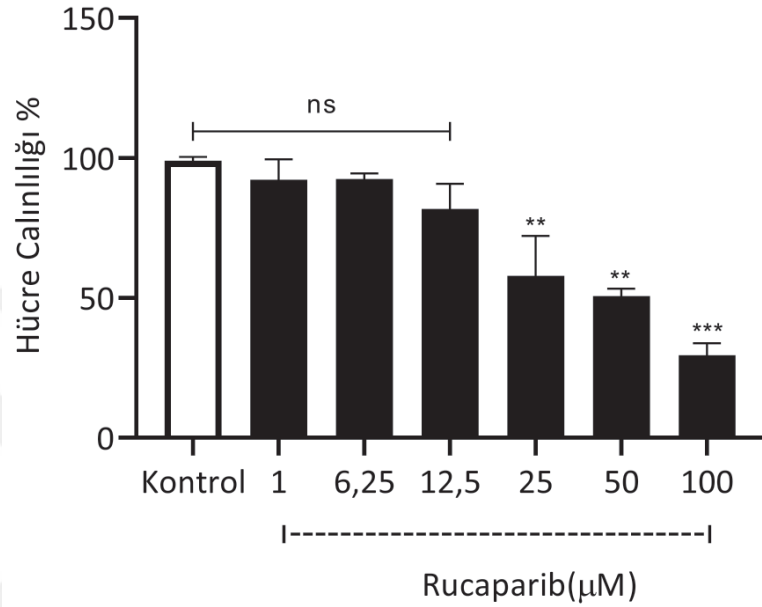
MDA-MB-231 hücrelerinin Olaparib ve Rucaparib ile belirlenen dozlarda tedavileri sonucu, 48 saat sonrasında WST-I kiti eklenerek alınan sonuçları Şekil 5 ve Şekil 6’da verilmiştir.

48 saat Olaparib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde, uygulanan dozlar seri dilüsyon ile belirlendi. Belirlenen dozlarda hücrelere uygulanan tedavilerde 1 ve 15,625 μ M dozlarda etki gözlemlenmedi. İstatistiksel olarak anlamlı etki 31,25 μ M doz uygulamasından sonra gözlemlenirken, hücre canlılık oranını %50 altına indirmek için gerekli doz miktarı 250 μ M olarak belirlendi.



Şekil 3.1. Olaparib ile tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları

48 saat Rucaparib tedavi edilen MDA-MB-231 hücrelerinde 1 μ M ile 12,5 μ M dozları için anlamlı bir değer elde edilemedi. 25 μ M ve 50 μ M dozları için anlamlı sonuç elde edilmeye başlandı. 100 μ M Rucaparib uygulandığında canlılık oranının %50'nin altına düştüğü gözlemlendi.

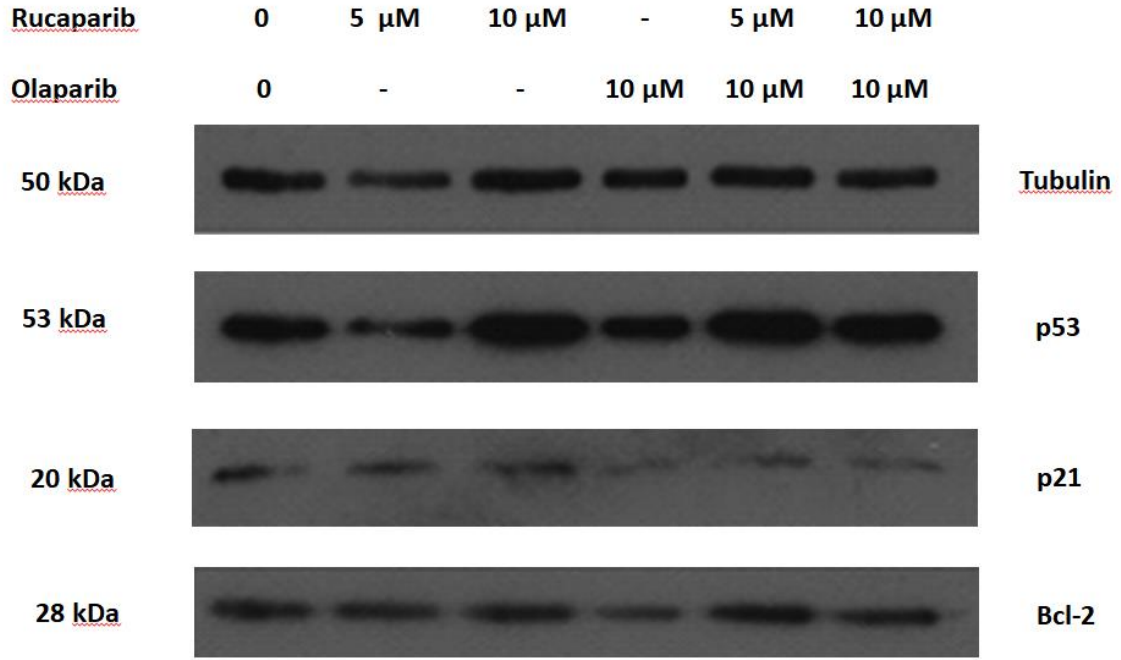


Şekil 3.2. Rucaparib ile 48 saat tedavi edilen MDA-MB-231 hücre hattının WST-I sonuçları

3.2. Western Blot Deneyi Sonuçları

MDA-MB-231 hücre hattına PARPi olan Olaparib ve Rucaparib kombinasyon tedavisi yapıldı. Deney için belirlenen tedavi süresi 48 saatti. Uygulanan dozlardan Rucaparib için 5 μ M ve 10 μ M olan dozlar, Olaparib için 10 μ M dozları kombinasyon dışında tek olarak da uygulandı.

Uygulanan dozlarda p53 miktarının özellikle kombinasyon dozlarında arttığı gözlemlendi. 5 μ M Rucaparib ve 10 μ M Rucaparib'in 10 μ M Olaparib ile kombinasyonlarında, kontrol miktarlarına göre ekspresyonlarında artış gözlemlendi. Rucaparib için 10 μ M uygulanan dozda yine p53 ekspresyonunun arttığı gözlemlendi. 5 μ M Rucaparib ve 10 μ M Olaparib dozlarında p53 ekspresyonu miktarında artışa neden olmadığı gözlemlendi.



Şekil 3.3. Olaparib ve Rucaparib kombinasyonunun Bcl-2, p21 ve p53 proteinlerinin ekspresyonları üzerine etkisi

Hücre döngüsü kontrol noktalarından biri de p21'dir. DNA hasarı meydana geldiğinde p21 ekspresyonunda artış beklenir. Rucaparib için 5 μ M ve 10 μ M dozları uygulandığında kontrol ile kıyaslandığında p21 ekspresyonunda artış tespit edildi. Olaparib için 10 μ M uygulanan dozda kontrol noktasına göre p21 ekspresyonunda azalma gözlemlenmedi. Uygulanan dozların kombinasyonu yapıldığında p21 ekspresyonunda her iki kombinasyonda artış tespit edildi.

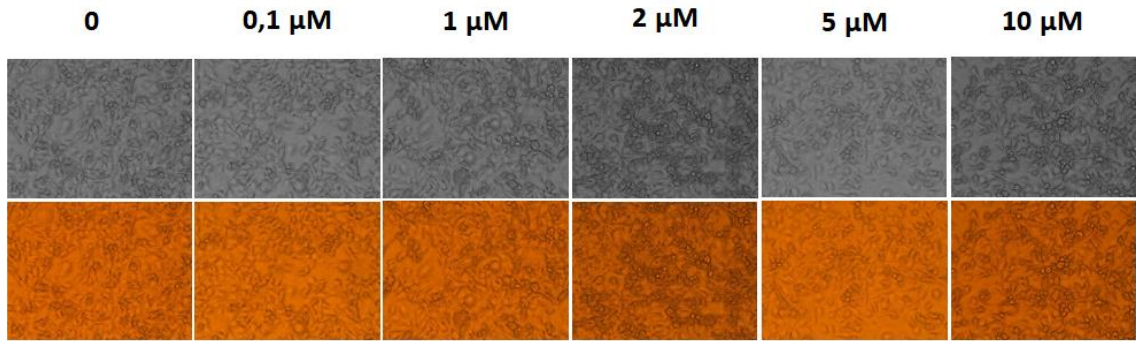
Tübülün protein ekspresyonu kanıtı olarak gösterilmektedir. Her hücre içinde bulunduğu için hücre içinde protein varlığı için belirteç olarak kullanılır. Tübülün ekspresyonu seviyesi sabit şekilde tespit edildi.

Uygulanan tedavi dozları ile hücrelerde apoptozun tetiklenmesi buna bağlı olarak da anti-apoptotik belirteçlerin azalması, pro-apoptotik belirteçlerin artması beklenmektedir. Bcl-2 bir anti-apoptotik belirteçtir. 5 μ M ve 10 μ M Rucaparib dozlarında ve 10 μ M Olaparib

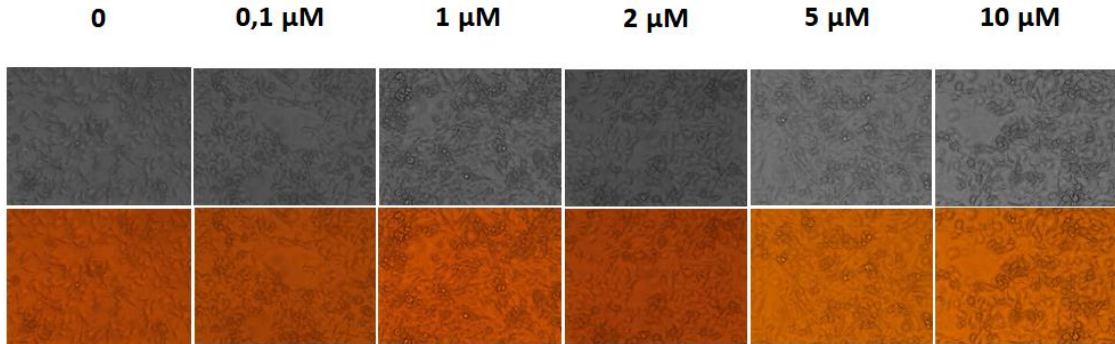
dozu uygulandığında Bcl-2 miktarında değişiklik gözlemlenmedi. Ancak kombinasyon dozlarında kontrol ile kıyaslandığında Bcl-2 ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlendi.

3.3. Akridin Oranj-Etidyum Bromür Deneyi Sonuçları

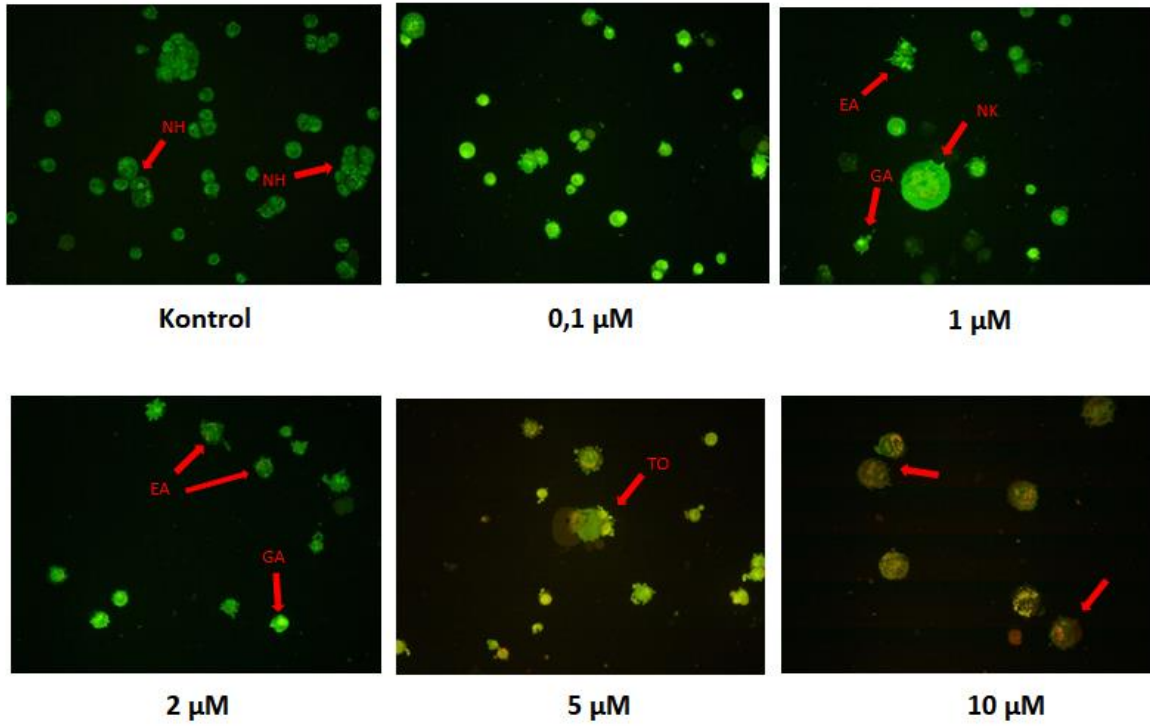
MDA-MB-231 hücre hattından her kuyucuğa 1×10^5 olacak şekilde ekim yapıldı ve bu hücreler Olaparib ve Rucaparib ile 0,1 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM ve 10 μM olmak üzere 48 saatlik tedavi edildi.



Şekil 3.4. 48 saat Rucaparib ile tedavi edilen hücrelerin sonlandırma öncesi alınan negatif görüntüleri

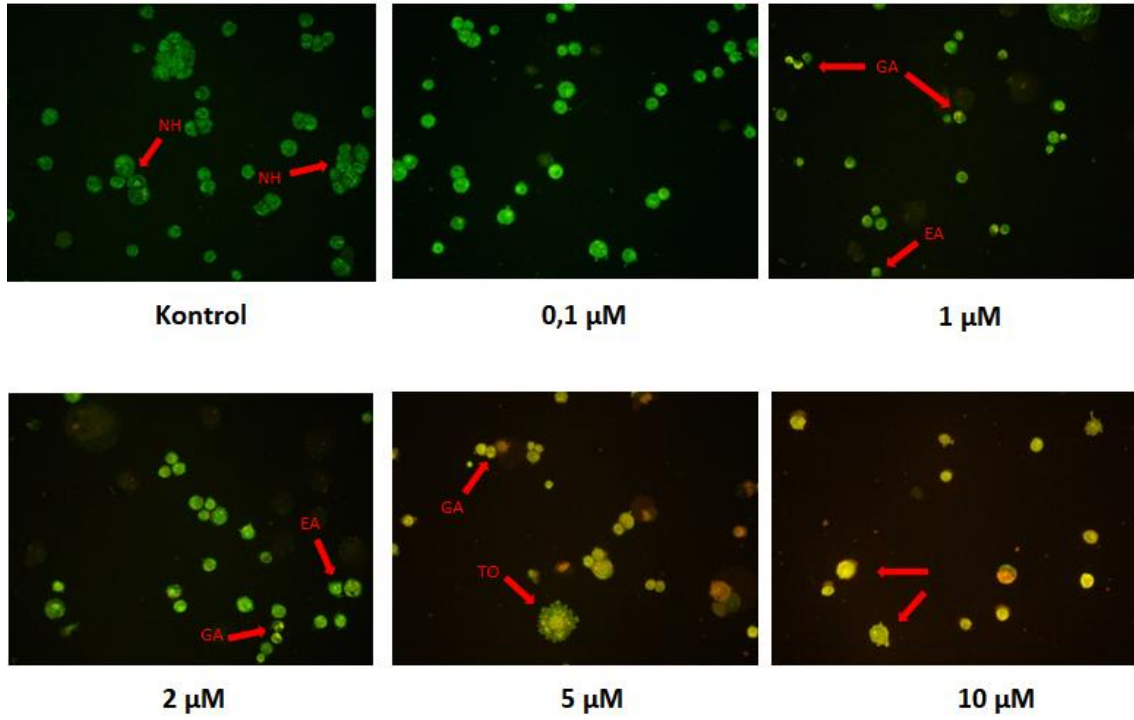


Şekil 3.5. Olaparib dozları uygulanan hücrelerin tedavi sonlandırma öncesi negatif görüntüleri



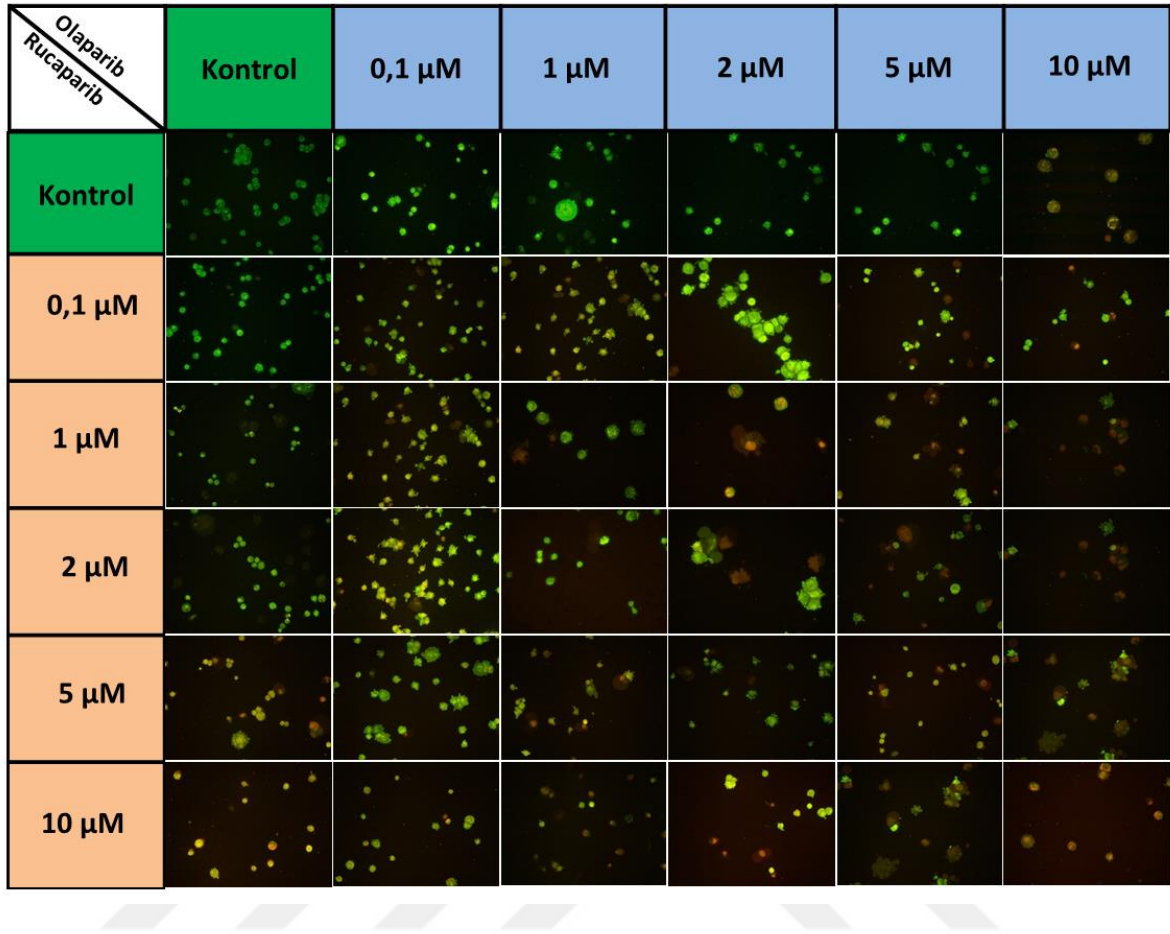
Şekil 3.6. MDA- MB-231 hücrelerinin Olaparib ile tedavi sonrası AO-EB deneyi sonuçları ve oluşan Nekroz (NK), Erken Apoptoz (EA), Geç Apoptoz (GA) ve Tomurcaklanma (TO) evrelerinin gözlemlenmesi

Olaparib dozları uygulanan hücrelerde doz miktarı arttıkça, hücre morfolojilerinin değiştiği gözlemlendi. Apoptoza giden hücrelerin çekirdeklerinde oluşan düzensizlik ve tomurcuklanma hücrelerde hasar oluştuğunu tespit etmemizi sağladı. Özellikle 5 µM ve 10 µM dozlarında çekirdekte turuncu renklerin oluşumu gözlemlendi.



Şekil 3.7. Rucaparib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde AO-EB boyaması ile gözlemlenen Nekroz (NK), Erken Apoptoz (EA), Geç Apoptoz (GA) ve Tomurcuklanma (TO) evreleri ve hücre morfolojileri

Belirlenen dozlarda Rucaparib uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde doz arttıkça morfolojik değişimler gözlemlendi. 1 µM dozundan başlamak üzere hücrelerde meydana getirilen hasar ile Geç Apoptoz ve Erken Apoptoz evreleri gözlemlendi. 5 µM ve 10 µM Rucaparib uygulanan hücrelerde hücre çekirdeğinde turuncu renk yoğunluğu ve tomurcuklanma gözlemlendi.



Şekil 3.8. Olaparib ve Rucaparib için kombinasyon dozlarının uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinin sonuçları

Yapılan Rucaparib ve Olaparib tedavileri sonrası, belirlenen dozlarla kombinasyonlar yapıldı. 0,1 μ M kombinasyonlarında hücre morfolojilerinde değişiklik minimum düzeydeydi. Kombinasyon dozu arttıkça turuncu renk oluşumu gözlemlemeye başladık. 1 μ M Rucaparib ile 2 μ M Olaparib kombinasyonunda hücrelerde meydana gelen hasar ile rengin yeşilden turuncuya döndüğü gözlemlendi. 5 μ M Rucaparib ve 5 μ M Olaparib kombinasyonunda hücre sayısının azaldığını, renk oluşumunun da özellikle hücre çekirdeklerinde kırmızıya döndüğü gözlemlendi. En yüksek dozlar olan 10 μ M kombinasyonunda hücre sayısında ciddi bir azalış ve hücrelerde turuncu renk ve kırmızı renk tespit edildi.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kanser çağımızın en büyük problemini oluşturan hastalığıdır. Kanserinin bilinmeyenlerinin çok olması onu diğer ölümcül hastalıklardan ayıran özelliğidir. Günümüzde teknoloji bizlere, tüm hastalıklara dair bilgi toplamanın kolay olduğu, araştırmaların oldukça fazlaştığı ve akademik açıdan çalışmaların desteklendiği bir çağ mümkün kılmaktadır. Buna bağlı olarak hastaların daha bilinçli, tedavi yöntemleri hakkında daha fazla bilgi sahibi olduğu bir dönem görülmektedir. Özellikle meme kanserinde erken teşhis çok önemlidir. Bilinçli hastalarının, kitle oluşumunu önceden fark edebilmesi hayati önem taşımaktadır. Kadınlarda çok yüksek oranda görülen meme kanseri, yaş ortalaması her ne kadar yüksek olsa da, çevre kirliliği, iklim dengesizliği, evlilik ve doğurganlık oranlarının düşmesi ile beraber daha genç yaşlardaki kadınlarda görülme sıklığı artmaktadır. Meme kanserinin sıklığının artması ve letalitesinin yüksek olması da akademik açıdan daha fazla çalışılmasını sağlamaktadır (Aslan 2006; Aslan vd. 2007).

Kanser hücresinin en önemli sorunlarından biri sürekli olarak bölünmesidir. Bunu engellemek için hücrenin kendine ait genom gardiyanı denilen yapıları mevcuttur. Hücre bölünmesini engellemek hem kanserin büyümesini hem de metastaz ile başka bir organa veya dokuya geçmesinin önlemek demektir (Yavuz vd. 2007). PARP inhibitörleri BRCA mutasyonlu meme kanseri hücrelerinde sürekli bölünen kanser hücrelerini ölüme itmektedir. Çift zincir kırığı tamiri yapan BRCA mutasyonlu olduğu için görevini yapamamaktadır. PARP ise kullanılan inhibitörler ile susturulunca tek zincir kırığı, çift zincir kırığına dönüşüp hücre ölümü gerçekleşecektir(Liu Y at al. 2015; Koç 2009). Meme kanseri hastalarında BRCA1/2 mutasyonu sıkça görülmektedir. BRCA geni DNA çift zincir kırıklarını kontrol ettiğinden kanser oluşumu için önemli bir noktadır. Kanserli hücrenin bölünmesinin engellemek, tümör oluşumunu engellemek demektir. Meydana gelen hasar çift zincir kırığı ise BRCA aktif hale gelir. Ancak hücrede BRCA mutasyonlu olduğunda bu tamir mekanizması çalışmaz. Çift zincir kırığı meydana getirmek için PARP proteinlerinin susturulması gerekir. PARP DNA'da meydana gelen tek zincir

kırıklarını onarmada rol oynar. PARP'ın baskılanması tek zincirde oluşan hasarın, replikasyon ile eksik eşleme yapılması ve çift zincir kırığına dönüşmesini sağlar. BRCA mutasyonlu bir hücrede oluşan bu hasar hücre bölünmesini engeller. Hücre hasarı onaramadığı için ve DNA stabil halde olmadığı için daha fazla bölünemez ve ölüme gider (Clift at al. 2019)

Yaptığımız çalışmada PARP inhibitörlerinin en yaygın olan iki türünü kombin tedavide kullandık. Her PARP inhibitörünün farklı bağlanma bölgesi ve afinitesi vardır. Genellikle PARP inhibitörleri diğer kemoterapik ajanlar ile bir arada kullanılmaktadır. Ancak mevcut kemoterapi ilaçları hala sağlıklı hücrelere zarar vermektedir. Özellikle meme kanserinde kullanılan Trastuzumab, Cisplatin, Carboplatin gibi ilaçların yan etkileri sağlıklı hücrelere de etki etmektedir. Kişiyi özel tedavi yöntemlerinde bu yan etki en aza indirilmektedir. PARP inhibitörlerinin son dönemde yaygın olması, kişiyi özel tedavinin öncülü olmasındandır. Kullanılan inhibitörler sadece bağlanma afinitesi yüksek olduğu proteinlere bağlanarak işlev görürler. Diğer kemoterapik ajanlar gibi kimyasal içerikli olup, tümöre direkt etki ederek yok etme şeklinde çalışmadıklarından sağlıklı hücrelere zararları minimum düzeydedir (Glendenning 2011; Curtin 2012).

Bu çalışmada BRCA1/2 mutasyonlu MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına PARP inhibitörleri uygulandı. Hücrelerde BRCA mutasyonlu olduğu için çift zincir kırıklarının tamir mekanizması işlev görmemekteydi. Uygulanan Rucaparib ve Olaparib kombinasyonu ile farklı bağlanma afinitesi gösteren ilaçlar kullanmak amaçlanmıştır. Böylece PARP proteini için susturma işlemi daha olası hale getirilmiştir. PARP inhibitörleri kullanarak tek zincirdeki hasarın tamir edilememesi, eşleme sırasında tek zincirdeki boşluğun karşı zincirinde de boşluk oluşmasına neden olur. Replikasyon tamamlandıktan sonra yeni oluşan DNA'da çift zincir kırığı meydana gelmiş olur. Bunu tamiri için gerekli enzimleri aktiveştiren BRCA geni de mutasyonlu olduğu için çift zincir tamiri gerçekleşmez. Hasarlı DNA hücreyi ölüme sürükler.

2019 yılında Ming Yi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kanser tedavisinde DNA hasarı oluşturma ve DNA hasarı tamirinin önemini işaret etmişlerdir. Meme kanserinde BRCA mutasyonunun sıkça görülmesini ve buna bağlı olarak PARP inhibitörlerinin öneminin arttığından belirtmiştir. Tek zincir kırıklarından sorumlu PARP'ın tamir

mekanizmasındaki ve kanser tedavisinde PARP inhibitörlerinin kullanımına dikkat çekmişlerdir. Kombinasyon tedavileri ile meme kanseri ile savaşta daha etkili sonuçlar alınacağını belirtmişler (Ming et al. 2019)

Son dönemde PARP inhibitörlerinin mekanizmalarının son 10 yılda daha fazla çalışıldığını Mateo ve arkadaşları ise 2019 yılında yaptıkları çalışmada göstermiştir. Bazı PARP inhibitörlerinin meme kanserinde kullanıldığını (Olaparib ve Talazoparib), bazı PARP inhibitörlerinin de (Rucaparib, Niraparib ve Olaparib) yumurtalık kanserinde diğer kemoterapik ajanlarla birlikte kullanıldığında olumlu sonuçlar elde edildiğini göstermiştir. Sonuç olarak BRCA mutasyonlu kanser türlerinde PARP inhibitörlerinin önemli bir tedavi seçeneği olduğunu ve kombinasyon tedavilerindeki önemine dikkat çekilmiştir (Mateo et al. 2019).

Hücre canlılık testinde uygulanan dozlara bağlı olarak hücrelerin proliferasyon seviyesi ölçülmektedir. Yaptığımız WST-I deneyi sonuçlarında Rucaparib dozlarından 1 μ M, 6,25 μ M ve 12,5 μ M olanların hücre canlılığına anlamlı bir etki yapmadığı gözlemlendi. Doz miktarı arttıkça proliferasyon seviyesinde düşüş gözlemlenmeye başladık. 25 μ M ve 50 μ M Rucaparib dozlarında hücre canlılık seviyesinde anlamlı düşüşler gözlemlendi. En yüksek doz olan 100 μ M Rucaparib uygulandığında ortamda bulunan hücrelerin %50 oranında öldüğü gözlemlendi.

Olaparib için yapılan canlılık testinde 1 μ M ve 15,625 μ M dozlarında anlamlı bir değişim gözlemlenmedi. 31,25 μ M Olaparib dozunda hücre proliferasyonunda değişiklik gözlemlendi ancak yeterli seviyede değildi. 62,5 μ M ve 125 μ M Olaparib dozlarında hücre canlılık seviyesinde düşüş daha anlamlı bir değer oluşturdu. 250 μ M ve 500 μ M dozlarında hücre proliferasyonu ve ortamda bulunan hücre canlılığında yüksek düzeyde düşüş gözlemlendi. Hücrelerin en az %50 oranında öldüğü tespit edildi.

Yapılan araştırmalarda hücre canlılık testlerinde hücrelerin %50 oranında öldürülmesine neden olan dozlar ele alınmaktadır. Yaptığımız hücre canlılık (WST-I) deneyinde MDA-MB-231 hücre hattına etki eden Rucaparib dozu 50 μ M ve üzeri olarak belirlenmiştir. Olaparib'in hücreleri %50 oranında öldürme dozu ise 250 μ M ve üzeri olarak belirlenmiştir.

2018 yılında yapılan çalışmada Zhao ve arkadaşları MDA-MB-231 hücre hattında Olaparib, Karboplatin ve BKM120 (Buparlisib) ilaçları kombinasyonunu çalışmışlardır. Olaparib tek olarak MDA-MB-231 hücre hattına uygulandığında hücreleri %50 oranında öldürme dozu 95,1 μ M olarak belirlenmiştir. Bu oranın diğer ilaçlarla kombinasyon halinde uygulandığında düştüğü yani ilaç dozunun daha az olmasına rağmen ortamdaki hücrelerin %50'sini öldürebildiğini tespit etmişlerdir (Zhao at al. 2018).

BRCA mutasyonlu meme kanseri hücrelerinde PARP inhibitörlerinin kullanılmasının olumlu etkileri olduğunu 2020 yılında Keung ve arkadaşları göstermiştir. PARP inhibitörleri türlerini ve farklı bağlanma afiniteleri olduklarını belirten bu çalışmada MDA-MB-231 hücre hattına uygulanan Rucaparib için hücre canlılığını %50 altına indirme dozu 20 μ M olarak belirlenmiştir (Keung at al. 2020).

Yapılan araştırmalar göz önüne alınırsa PARP inhibitörlerinin hücre proliferasyonuna etkisinin azımsanmayacak derecede olduğu ve kombinasyon tedavilerde kullanılan doz oranının daha düşük olmasına rağmen etki gösterebildikleri belirtilmektedir. Olaparib ve Rucaparib için kombinasyon yapılması hem farklı bağlanma afinitesi göstermelerinden dolayı hem de etki dozlarının farklı olması birlikte kullanıldıklarında daha olumlu sonuçlar alınacağına işaretler. Hücre koşullarının farklı olması, yapılan pasajlamalar ile hücre yapılarında oluşan değişiklikler veya ilaç yapılarının tam anlamıyla aynı olmamasından dolayı hücre proliferasyonu etkileme dozları ve %50 hücre canlılığına etki etme oranları aynı olmamaktadır.

Olaparib ve Rucaparib için belirlenen dozlarda Western Blot deneyi yapıldı ve kombinasyonlar ilk olarak bu deneyde denendi. Rucaparib için 5 μ M ve 10 μ M dozları ile Olaparib için 10 μ M dozu ile kombinasyon tedavileri yapıldı. Western Blot deneyinde p53, p21 ve Bcl-2 protein ekspresyonlarına bakıldı. Yaptığımız deneyde DNA hasarı oluşturmak ve buna bağlı olarak Apoptozun tetiklenmesi yani hücre ölümü istenmektedir. DNA hasarının gerçekleşmesiyle p53 miktarında artış beklenmektedir. Aldığımız sonuçlara bakılırsa 5 μ M Rucaparib kullanıldığında p53 miktarında artış gözlemlenmedi. Ancak Rucaparib için 10 μ M dozunda gerekli hasar oluşturulduğunu ve buna bağlı olarak p53 ekspresyonunda anlamlı derecede artış olduğu söyleyebiliriz. Kombinasyon uygulanan hücrelerde hem 5 μ M Rucaparib ve 10 μ M Olaparib dozunda hem de 10 μ M

Rucaparib ve 10 μ M Olaparib dozunda p53 ekspresyon seviyesinde kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış olduğu tespit edilmiştir.

Hücre döngüsü kontrol noktası elemanlarından olan ve hücre döngüsünü durdurabilen p21, hücre döngüsünde DNA hasarına verilen tepkinin kanıtı olarak gösterilmektedir. BRCA mutasyonlu bir hücrede çift zincir kırığı oluşturulduğunda tamir mekanizması devreye giremez ve hücre döngüsünün durması gerekir. PARP inhibitörleriyle susturulmuş olan PARP proteininden dolayı da, tek zincir kırıklarını tamir edemez. p21 ekspresyonunda artış beklenir. Hücre döngüsü hata düzeltilemediğinden p53 aktif hale gelir, p21'i tetikler ve ekspresyonunu artırır (Shamloo at al. 2019).

Yaptığımız Western Blot deneyinde ekspresyon miktarına baktığımız p21, kontrol grubuna göre 5 μ M Rucaparib ve 10 μ M Rucaparib dozları uygulanan örneklerde ekspresyon artışı tespit edildi. 10 μ M Olaparib uygulanan hücrelerde p21 ekspresyonunda değişiklik gözlemlenmedi. Olaparib için etkili dozun hücre canlılık testinde gösterildiği gibi yüksek olması bunun nedeni olabilir. Olaparib ve Rucaparib kombinasyonları uygulanan örneklerde 10 μ M Olaparib ile 5 μ M Rucaparib ve 10 μ M Rucaparib dozlarının p21 ekspresyonunda artışa neden olduğu belirlendi. Bu yaptığımız çalışmada özellikle kombinasyon uygulanan hücrelerde istenilen DNA hasarının oluşturulduğunu, hücre ölümü için gerekli proteinlerin uyarıldığı anlamına gelmektedir.

Zhao ve arkadaşlarının 2018'de yaptığı çalışmada MDA-MB-231 hücre hattında Olaparib ile Karboplatin ile BKM120 kombinasyonunun etkilerini araştırmışlardır. Söz konusu çalışmada Olaparib ve Karboplatin uygulanan hücreler ile Olaparib, Karboplatin ve BKM120 uygulanan hücrelerde p53 ile p21'in protein ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Uygulanan Olaparib ve Karboplatin ile hem p53 miktarında hem de p21 düzeyinde kayda değer bir artışın olduğu belirtilmiştir. Aynı şekilde kontrol grubu ile kıyaslandığında ilaçların kombinasyonu denendiğinde p53 ekspresyonunda ve p21 ekspresyonunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir (Zhao at al. 2018).

Akridin Oranj-Etidyum Bromür boyama deneyinde DNA hasarı, Apoptoza giden hücreler ve Nekroz gerçekleşen hücreler gözlemlenebilmektedir. Akridin boyası nükleik asitlere

bağlanan bir boyadır. Çift zincirli DNA yeşil renkte, tek zincirli DNA ise turuncu renkte gözlemlenir. Etidyum Bromür hasar görmüş DNA'ya bağlandığı için özellikle hücrelerde kırmızı renk görmeyi beklemekteyiz (Keiser 2002). Yaptığımız AO-EtBr deneyinde Olaparib için 1 μ M ve 2 μ M dozlarında kırmızı ve turuncu renk gözlemlenmedi. Ancak morfolojik değişimlere bakılınca 1 μ M Olaparib uygulanan hücrelerde şişen hücre şekilleri gözlemlendi. Nekroz belirtisi olan hücre şişmesi oluşan hasarı ve hücre ölümünü desteklemektedir. 5 μ M Olaparib ve 10 μ M Olaparib uygulanan hücrelerde turuncu ve çekirdekte kırmızı renk gözlemlendi. Hücrelerde DNA hasarı olduğu ve Apoptoza giden hücrelerde tomurcuklanma başladığı gözlemlendi.

2019 yılında Fok ve arkadaşları yaptıkları çalışma ile AZD7648-Radyasyon ve AZD7648-Doksorubisin kombinasyonlarının DNA hasarı etkisini araştırmışlardır. Olaparib ile AZD7648 kombinasyonunu da DNA'ya etkisini ve apoptozis etkisini belirlemek için uygulamışlardır. Kombinasyon sonucu hücrelerin Apoptoza sürüklendiğini, DNA hasarı olduğunu göstermiştir. Olaparib'in homolog olmayan rekombinasyon tamir yöntemini engellemede önemli bir seçenek olduğu belirtilmiştir (Fok 2019).

Wah Po ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları çalışmada Floksetin maddesini Adenokarsinoma hücrelerine uyguladıktan sonra Apoptoz ve Otofaji etkilerine bakmışlardır. Uygulanan Floksetin'in Apoptoz etkilerini gözlemlemek için AO-EtBr deneyi sonuçları almışlardır. Aldıkları sonuçlarda Floksetin dozu arttıkça hücrelerde turuncu ve kırmızı rengin arttığı, hücre morfolojilerinin değiştiğini gözlemlemişlerdir (Wah at al. 2020).

PARP inhibitörlerinin mekanizması ve yumurtalık kanseri ile ilgili yapılan çalışmaları Zheng ve arkadaşları 2020 yılında araştırmışlardır. Özellikle Olaparib, Rucaparib ve Niraparib'in DNA hasarı oluşturduğunu ve genom düzensizliği oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. PARP inhibitörlerinin kanserli hücreleri apoptozise ittiğini ve DNA tamir yollarını baskıladığı gözlemlemişlerdir (Zheng 2020).

Sonuç olarak MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına uygulanan Olaparib-Rucaparib kombinasyonunun, kişiselleştirilmiş tedavi için önemli bir seçenek olduğu gösterilmiştir.

Bu kombinasyonun BRCA1/2 mutasyonuna sahip hücrelerde hücre ölümünü tetiklediği ve hücre döngüsünü inhibe eden p53 ve p21 ekspresyonunda artış göstererek Apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir.



KAYNAKLAR

Aslan Ö, Vural H, Kömürcü Ş, Özet A (2006) Kemoterapi alan kanser hastalarına verilen eğitimin kemoterapi semptomlarına etkisi. CÜ Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi 10: 15-28

Aslan FE, Gürkan A (2007) Kadınlarda meme kanseri risk düzeyi. Meme Sağlığı Dergisi 3: 63-68

Arvas M, Gezer A (2004) Ailevi Over Kanseri BRCA Genleri ve Over Kanseri Tarama Programları. Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi 7(2): 53-58

Atmaca A, Aksoy A (2009) Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 20(2): 79-83

Baykara O (2016) Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi 5(3): 154-165

Basu Ashis K (2018) DNA Damage Mutagenesis and Cancer. International journal of molecular sciences 19(4): 970

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018 Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA A Cancer Journal For Clinicians 68(6): 394-424

Chatterjee N, Walker GC (2017) Mechanisms of DNA damage repair and mutagenesis. Environmental and Molecular Mutagenesis 58(5): 235-263

Clift KE, Macklin SK, Hines SL (2019) Patients with pathogenic variants for breast cancer other than BRCA1 and BRCA2 qualitative interviews about health care experiences. Hereditary Cancer in Clinical Practice 17(1): 1-7

Curtin NY (2012) Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and PARP inhibitors. Drug Discov Today Disease Models. 9: 51-58

Çetin A, Püsküllü MO (2013) Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Bitirme Ödevi s. 85

Daumar P, Dufour R, Dubois C, Penault-Llorca F, Bamdad M, Mounetou E (2018) Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantitation of intracellular PARP inhibitor Olaparib in cancer cells. *J Pharm Biomed Anal* 152: 74–80

Dubois C (2020) Low-Dose and Long-Term Olaparib Treatment Sensitizes MDA-MB-231 and SUM1315 Triple-Negative Breast Cancers Spheroids to Fractionated Radiotherapy. *Journal of Clinical Medicine* 9(1): 64

Fok JHL (2019) AZD7648 is a potent and selective DNA-PK inhibitor that enhances radiation chemotherapy and olaparib activity. *Nature Communications* 10(1): 1-15

Furgason JM, Bahassi EM (2013) Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacol Therapeut* 137: 298-308

Glendenning J, Tutt A (2011) PARP inhibitors-current status and the walk towards early breast cancer. *The Breast*, s. 12-19

Liu Y, Nguyen N, Colditz GA (2015) Links between alcohol consumption and breast cancer a look at the evidence. *Women's Health* 11: 65-77

Isakoff SJ (2010) A phase II trial of the PARP inhibitor veliparib (ABT888) and temozolomide for metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, s. 1019-1019

Hanson RL, Batchelor E (2020) Rucaparib treatment alters p53 oscillations in single cells to enhance DNA double strand break induced cell cycle arrest. *Cell Reports* 33(2): 108240

Hu Y, Guo M (2020) Synthetic lethality strategies Beyond BRCA1/2 mutations in pancreatic cancer. *Cancer Science* 111(9): 3111

Karayurt Ö, Coşkun A, Cerit K (2008) Hemşirelerin meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesine ilişkin inançları ve uygulama durumu. *Meme Sağlığı Dergisi Journal of Breast Health* 4(1): 15-20

Keiser J (2002) Acridine Orange for malaria diagnosis: its diagnostic performance its promotion and implementation in Tanzania, and the implications for malaria control. *Annals of Tropical Medicine Parasitology* 96(7): 643-654

Keung MY (2020) Response of breast cancer cells to PARP inhibitors is independent of BRCA status. *Journal of Clinical Medicine* 9(4): 940

Koç Z, Sağlam Z (2009) Kadınların meme kanseri, koruyucu önlemler ve kendi kendine meme muayenesi ile ilgili bilgi ve uygulamalarının belirlenmesi ve eğitimin etkinliği. *Meme Sağlığı Dergisi* 5(1): 25-33

Kraus WL (2008) PARP-1 An Abundant and ubiquitous protein with roles in many cellular processes. *Enabling Epigenetics Research*, <https://www.activemotif.com.cn/parp1>

Kummar S (2015) Randomized trial of oral cyclophosphamide and veliparib in high grade serous ovarian primary peritoneal or fallopian tube cancers or BRCA mutant ovarian cancer. *Clinical Cancer Research* 21(7): 1574-1582

Masoudiyekta L, Bayatiyani HR, Dashtbozorgi B, Gheibizadeh M, Malehi AS, Moradi M (2018) Effect of education based on health belief model on the behavior of breast cancer screening in women. *Asia Pacific Journal of Oncology Nursing* 5(1): 114-120

Mateo J (2019) A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. *Annals of Oncology* 30(9): 1437-1447

Meng X (2018) AZD1775 increases sensitivity to olaparib and gemcitabine in cancer cells with p53 mutations. *Cancers* 10(5): 149

Murai J (2012) Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Research* 72(21): 5588-5599

Murai J (2014) Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Molecular cancer therapeutics* 13(2): 433-443

Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F (2009) DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Dergi* 7(2): 61-70

Ou HL, Schumacher B (2018) DNA damage responses and p53 in the aging process. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 131(5): 488-495

URL-1 <https://www.drozdogan.com/over-kadin-yumurtalik-kanseri-tedavisi-gelinen-son-nokta> (erişim tarihi: 05.02.2021)

Panatta E (2021) Understanding p53 tumour suppressor network. *Biology Direct* 16(1): 1-7

Plummer R (2013) A phase II study of the potent PARP inhibitor Rucaparib (PF01367338 AG014699) with temozolomide in patients with metastatic melanoma demonstrating evidence of chemopotential. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 71(5): 1191-1199

Po WW (2020) Fluoxetine simultaneously induces both apoptosis and autophagy in human gastric adenocarcinoma cells. *Biomolecules Therapeutics* 28(2): 202

Shamloo B, Usluer S (2019) p21 in cancer research. *Cancers* 11(8): 1178

San F, Joseph S, Patrick KH (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem* 77: 229-257

Sodhi RK, Singh N, Jaggi AS (2010) Poly (ADP ribose) polymerase 1 (PARP1) and its therapeutic implications. *Vasc Pharmacol* 53: 77-87

Terzioğlu G, Keskin AÜ, Demirel GY (2013) Hücre proliferasyonu ölçüm yöntemleri ve çeşitli ticari proliferasyon kitlerinin karşılaştırılması. *Türk J Immunol* 1(3): 74-89

Tok F, Kaymakçioğlu BK (2015) Kanseri tedavisinde yeni bir yaklaşım Poli (ADP-riboz) polimeraz-1 inhibitörleri. *Clinical and Experimental Health Sciences* 5(1): 41-52

Ulaslı M (2013) Expression of PARP1 Gene in Breast Cancer Patients. *International Journal of Hematology Oncology UHOD Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi* 23(4)

Yavuz M (2007) Meme kanserli hastaların tamamlayıcı ve alternatif tedavi yöntemlerini kullanma durumlarının incelenmesi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 27(5): 680-686

Yi M (2019) Advances and perspectives of PARP inhibitors. *Experimental hematology oncology* 8(1): 1-12

Yu W (2020) Repair of G1 induced DNA double-strand breaks in S-G2/M by alternative NHEJ. *Nature Communications* 11(1): 1-15

Zhao H (2018) Antitumor effects and mechanisms of olaparib in combination with carboplatin and BKM120 on human triple negative breast cancer cells. *Oncology R* 40(6): 3223-3234

Zheng F (2020) Mechanism and current progress of Poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors in the treatment of ovarian cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 123: 109661

Zwaka TP, Thomson JA (2009) Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Essentials of Stem Cell Biology* Academic Press, s. 417-422



