



**T. C.**

**ORDU ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TRİMETAZİDİNİN MCF-7 HÜCRELERİNİN  
PROLİFERASYONU, APOPTOZU, MİGRASYONU VE ATP  
MİKTARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

**EMRE KENDİGELEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**ORDU 2021**

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**Emre KENDİGELEN**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

### TRİMETAZİDİNİN MCF-7 HÜCRELERİNİN PROLİFERASYONU, APOPTOZU, MİGRASYONU VE ATP MİKTARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

EMRE KENDİGELEN

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ, 70 SAYFA

(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. ZÜLAL ATLI ŞEKEROĞLU)

Kadınlarda en sık görülen kanser olan meme kanseri önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kemoterapi, kanser tedavisinde de uygulanan yaygın bir yöntem olmasına rağmen, kemoterapi direnci ve kanserin tekrarlanması tedaviyi sınırlandırabilmektedir. Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılacak daha güvenli, daha etkili ve daha az yan etkilere sahip olan yeni ajanların geliştirilmesi araştırmacıların üzerinde çok çalıştığı konulardan birisi haline gelmiştir.

Anti-iskemik bir ilaç olan Trimetazidin (TMZ), hipoksi veya iskemiye maruz kalan hücrelerin enerji metabolizmasını korumaktadır ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bir yağ asiti oksidasyon inhibitörü de olan TMZ, yağ asitlerinin B-oksidasyonunu bloke ederek ve ATP üretimini yağ asiti oksidasyonundan glukoz oksidasyonuna doğru kaydırarak metabolizmayı optimize edebilmektedir. Bu çalışma TMZ'nin hem tek başına hem de albumin-bağlı paklitaksel olan abraksan (AB) ile birlikte meme kanseri hücrelerindeki olası antitümöral etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır.

Bir meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücreleri TMZ ve/veya AB ile muamele edilmiş ve bu ajanların hücre canlılığı, apoptoz, migrasyon ve ATP seviyeleri üzerindeki etkileri sırasıyla MTT testi, akridin oranj-ethidium bromür boyaması, yara iyileşmesi testi ve kolorimetrik yöntemle belirlenmiştir. Hücreler yapılan MTT testi sonucunda belirlenen TMZ (50, 100 ve 250  $\mu$ M) ve/veya AB (1  $\mu$ M) konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiştir. TMZ'nin MCF-7 hücrelerinde özellikle AB ile kullanıldığında sitotoksiteyi ve apoptozu artırabilme, hücre göçü ve hücrelerdeki ATP miktarını azaltabilme yoluyla meme kanseri hücrelerinin gelişimini baskılayabileceği ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir. Bu sonuçlar meme kanseri tedavisinde TMZ'nin AB ile birlikte kombinasyon tedavisinde kullanılabilme potansiyelinin bulunduğunu işaret etmektedir.

Bu çalışma TMZ'nin AB ile birlikte kemoterapik bir ajan olarak kullanılabilmesine dair destekleyici sonuçlar verdiği için; TMZ'nin hem AB hem de meme kanseri tedavisinde kullanılan diğer kemoterapötikler ile kombinasyon tedavisindeki kullanılabilirliği ve anti-tümöral olabilecek etkilerinin henüz bilinmeyen mekanizmalarının araştırılmasına ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Abraksan, Apoptoz, ATP, Meme Kanseri, Migrasyon, Trimetazidin, Sitotoksite

## ABSTRACT

### EFFECTS OF TRIMETAZIDINE ON PROLIFERATION, APOPTOSIS, MIGRATION AND ATP LEVEL OF MCF-7 CELLS

EMRE KENDİGELEN

ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED  
SCIENCES

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

MASTER THESIS, 70 PAGES

(SUPERVISOR: PROF.DR. ZÜLAL ATLI ŞEKEROĞLU)

Breast cancer, the most frequently occurring cancer in women, is a major public health problem. Although chemotherapy is a common method used in cancer treatment, chemotherapy resistance and recurrence may limit the therapy. For this reason, the development of new agents that are safer, more effective and have less side effects to be used in cancer therapy has become one of the most studied topics by researchers.

Trimetazidine (TMZ), an anti-ischemic drug, prevents the reduction in intracellular ATP ratio by protecting the energy metabolism of cells exposed to hypoxia or ischemia. It is used in treatment of various diseases. TMZ, a fatty acid oxidation inhibitor, optimizes cell metabolism by blocking fatty acid  $\beta$ -oxidation and shifting ATP production from fatty acid oxidation towards glucose oxidation. The aim of the study is to investigate the possible antitumoral effects of TMZ on breast cancer cells alone or in combination with the albumin-bound paclitaxel, abraxane (AB).

MCF-7 cells, a breast cancer cell line, were treated with TMZ and/or AB, and the effects of these agents on cell viability, apoptosis, migration and ATP levels were determined using MTT test, acridine orange-ethidium bromide staining, wound healing test and colorimetric method, respectively. The cells were treated with TMZ (50, 100 and 250  $\mu$ M) and/or AB (1  $\mu$ M) concentrations determined by the MTT test for 24, 48 and 72 hours. This study has shown for the first time that TMZ can suppress the growth of breast cancer cells by inducing the cytotoxicity and apoptosis, suppressing cell migration and reducing ATP levels in MCF-7 cells, especially when used in combination with AB. These results demonstrate that TMZ has a potential to be used in combination therapy with AB in the treatment of breast cancer.

Because this study displays supportive results that TMZ can be used as a chemotherapeutic agent together with AB, it is necessary to investigate the usability of TMZ in combination therapy with chemotherapeutics used in the treatment of breast cancer and unknown mechanisms of its potential anti-tumoral effects.

**Keywords:** Abraxane, Apoptosis, ATP, Breast Cancer, Cytotoxicity, Migration, Trimetazidine.

## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, alıőmanın yürütölmesi ve yazımı esnasında başta danıőman hocam Sayın Prof. Dr. Zölal ATLI ŞEKEROĞLU'na saygı ve teőekkürlerimi sunarım. Deney ve çalışmalar aşamasında desteklerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Vedat ŞEKEROĞLU'na ve Sayın Seval KONTAŐ YEDİER'e teşekkür ederim.

Meme kanseri ile ilgili literatür taramasında, meme kanserine ait bilgilerin oluőturulmasında ve tezin bu kısımlarının yazılmasındaki ve yorumlanmasındaki katkı ve desteklerinden dolayı Tıbbi Onkoloji Uzmanı Dr. Neslihan ÖZYURT'a teşekkür ederim.

Sevgili ailem, babam Ahmet Cemal KENDİGELEN ve annem Güldane KENDİGELEN'e saygılarımla birlikte sonsuz teőekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	II
<b>ABSTRACT</b> .....	III
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	IV
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	V
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	VII
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	VIII
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	IX
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
2.1 Meme Kanseri .....	4
2.2 Memenin Anatomisi .....	4
2.3 Meme Kanseri Tipleri .....	5
2.4. Meme Kanseri Risk Faktörleri .....	7
2.4.1. Çevresel Faktörler .....	7
2.4.2. Diyet ve Yaşam Tarzı Faktörleri .....	7
2.4.3. Cinsiyet .....	8
2.4.4. Benign Meme Hastalığı .....	8
2.4.5. Ailesel Faktörler .....	8
2.4.6. Meme Dansitesi .....	9
2.4.7 Meme Kanserine Kalıtsal Yatkınlık .....	9
2.4.8. Hormonal Faktörler .....	10
2.5 Meme Kanseri Tedavisi .....	11
2.6 Meme Kanseri Hücre Hatları .....	12
2.6.1 MCF-7 .....	12
2.7 Apoptoz ve Kanser .....	13
2.8 Hücre göçü (Migrasyon) ve Metastaz .....	14
2.9 Trimetazidin (TMZ) .....	16
2.10 Abraksan (AB) .....	20
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	24
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	24
3.1.1 Trimetazidin dihidroklorid .....	24
3.1.2 Abraksan .....	24
3.1.3 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) .....	25
3.1.4 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) .....	25
3.1.5 Fetal Bovine Serum (FBS) .....	25
3.1.6 Penisilin/Strepomisin Antibiyotiği .....	25
3.1.7 Tripsin-EDTA .....	25
3.1.8 Tripan Mavisi .....	26
3.1.9 Dimetil Sülfoksit (DMSO) .....	26
3.1.10 Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) .....	26
3.1.11 Akridin Oranj (AO) .....	26
3.1.12 Ethidium Bromür (EB) .....	26
3.1.13 Mitomisin-C (MMC) .....	26
3.1.14 ATP Kiti .....	26
3.2 Kullanılan Cihazlar .....	27
3.2.1 Karbondioksit (CO <sub>2</sub> )'li İnkübatör .....	27

3.2.2 Biyogüvenlik Kabini .....	27
3.2.3 Invert Mikroskop.....	27
3.2.4 Floresan Mikroskop .....	27
3.2.5 Hücre Sayım Cihazı .....	27
3.2.6 Su Banyosu .....	27
3.2.7 Vorteks Karıştırıcı.....	27
3.2.8 Santrifüj.....	28
3.2.9 Hassas Terazî .....	28
3.2.10 Mikroplaka Okuyucu .....	28
3.3 Hücre Kültürü.....	28
3.3.1 Kullanılan Hücre Hattı .....	28
3.3.2 Hücre Kültürünün Yönetimi .....	29
3.3.3 Hücre Hattının Çözülmesi.....	29
3.3.4 Hücrelerin Pasajlanması.....	29
3.3.5 Hücre Hattının Dondurulması .....	30
3.4 Deney Planı ve Deney Grupları .....	30
3.4.1 Negatif Kontrol Grubu .....	30
3.4.2 Trimetazidin (TMZ) Grubu.....	30
3.4.3 Abraksan (AB) Grubu .....	31
3.4.4 Trimetazidin+Abraksan Grubu .....	31
3.5 MTT Testi .....	31
3.6 Akridin Oranj (AO) ve Ethidium Bromid (EB) Boyama.....	33
3.7 Yara İyileşmesi Testi (Wound Healing Assay).....	34
3.8 ATP Miktarının Ölçümü .....	34
3.9 İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	35
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>36</b>
4.1 Bulgular.....	36
4.1.1 MTT Testi Sonuçları .....	36
4.1.2 AO-EB Boyama Sonuçları .....	48
4.1.3 Yara İyileşmesi Testi Sonuçları .....	51
4.1.4 ATP Testi Sonuçları.....	54
4.2 Tartışma.....	56
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>59</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>61</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>70</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Memenin anatomik yapısı (Erel ve Atahan, 2019).....	5
Şekil 2.2 Epitelyal meme kanserinin sınıflandırılması .....	6
Şekil 2.3 Trimetazidinin etki mekanizması (Huqi, 2011).....	17
Şekil 2.4 Hipoksik tümör hücrelerinde ATP üretim mekanizması ve hücresel değişiklikler.....	19
Şekil 2.5 Abraksanın içeriği.....	22
Şekil 3.1 Trimetazidinin kimyasal yapısı.....	24
Şekil 3.2 Abraksanın kimyasal yapısı.....	25
Şekil 3.3 Çalışmamızda kullanılan MCF-7 hücreleri. ....	28
Şekil 4.1 TMZ konsantrasyonlarının 96 kuyucuklu kültür kaplarında MTT testi için yapılan uygulama planı .....	36
Şekil 4.2 AB konsantrasyonlarının 96 kuyucuklu kültür kaplarında MTT testi için yapılan uygulama planı .....	37
Şekil 4.3 24, 48 ve 72 saatlik TMZ uygulaması sonrası elde edilen ortalama hücre canlılığı verileri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi.....	39
Şekil 4.4 24, 48 ve 72 saatlik TMZ muamelesi sonrası elde edilen ortalama sitotoksisite verileri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi. ..	40
Şekil 4.5 24, 48 ve 72 saatlik AB uygulaması sonrası elde edilen ortalama hücre canlılığı verileri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi.....	42
Şekil 4.6 24, 48 ve 72 saatlik AB uygulaması sonrası elde edilen ortalama sitotoksisite verileri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi. ..	43
Şekil 4.7 24, 48 ve 72 saatlik AB ve TMZ+AB uygulaması sonrası elde edilen ortalama hücre canlılığı verileri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi.....	45
Şekil 4.8 24, 48 ve 72 saatlik AB ve TMZ+AB uygulaması sonrası elde edilen ortalama sitotoksisite verileri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi.....	47
Şekil 4.9 TMZ ve/veya AB maruziyeti sonrası AO-EB ile boyanmış MCF-7 hücreleri.....	49
Şekil 4.10 TMZ ve/veya AB maruziyeti sonrası AO-EB ile boyanmış MCF-7 hücrelerinde normal, apoptotik ve nekrotik hücreler. ....	50
Şekil 4.11 24, 48 ve 72 saatlik AB ve TMZ+AB uygulaması sonrası elde edilen apoptoz yüzdeleri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi.....	51
Şekil 4.12 Kontrol grubu, TMZ ve/veya AB ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin yara iyileşmesi testi görüntüleri .....	53
Şekil 4.13 Kontrol grubu ve TMZ ve/veya AB uygulanan MCF-7 hücrelerinin 0., 24., 48. ve 72. saatlerdeki yarık aralıklarına ait grafik.....	54
Şekil 4.14 24, 48 ve 72 saatlik AB ve TMZ+AB uygulaması sonrası elde edilen ATP değerleri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi. ....	55



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 2.1.</b> Meme kanseri alt gruplarının sınıflandırılması.....	7
<b>Çizelge 4.1.</b> TMZ konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetleri sonucu elde edilen verilerden hesaplanan hücre canlılığı (%) değerleri .....	38
<b>Çizelge 4.2.</b> TMZ konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetleri sonucu elde edilen verilerinden hesaplanan sitotoksosite değerleri.....	40
<b>Çizelge 4.3.</b> AB konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetleri sonucu elde edilen verilerden hesaplanan hücre canlılığı (%) değerleri.....	41
<b>Çizelge 4.4.</b> AB konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetleri sonucu elde edilen verilerden hesaplanan sitotoksosite (%) değerleri.....	43
<b>Çizelge 4.5.</b> AB ve AB+TMZ'nin 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetleri sonucu elde edilen verilerinden hesaplanan hücre canlılığı değerleri.....	45
<b>Çizelge 4.6.</b> AB ve AB+TMZ'nin 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetleri sonucu elde edilen verilerinden hesaplanan sitotoksosite değerleri.....	47

## SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

---

<b>AB</b>	: Abraksan
<b>AO</b>	: Akridin Oranj
<b>ASCO</b>	: American Society Of Clinical Oncology
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>BCL2</b>	: B-cell Lymphoma 2
<b>BRCA1</b>	: Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein
<b>BRCA2</b>	: Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein
<b>CDH1</b>	: Cadherin-1
<b>CDK 4/6</b>	: Cyclin Dependent Kinase 4/6
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DPBS</b>	: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
<b>EB</b>	: Ethidium Bromür
<b>EMEM</b>	: Eagle's Minimum Essential Medium
<b>ER</b>	: Östrojen Reseptör
<b>ESM</b>	: Ekstraselüler Matriks
<b>FBS</b>	: Fetal Bovine Serum
<b>FDA</b>	: U.S. Food and Drug Administration
<b>GEM</b>	: Gemsitabin
<b>HER2</b>	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>IC50</b>	: İnhibitör Konsantrasyon
<b>LCIS</b>	: Lobüler Karsinoma In Situ
<b>MDA-MB-231</b>	: İnsan İnvaziv Duktal Karsinoma Hücre Hattı (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)
<b>MCF-7</b>	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
<b>MMC</b>	: Mitomisin-C
<b>MTOR</b>	: Mammalian Target Of Rapamycin
<b>MTT</b>	: 3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>NCI</b>	: Uluslararası Kanser Enstitüsü
<b>PAK</b>	: Paklitaksel
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Salin)
<b>PR</b>	: Progesteron Reseptörü
<b>PTEN</b>	: Phosphatase and Tensin Homolog (Fosfataz ve Tensin Homologu)
<b>SE</b>	: Standart Hata
<b>SERM</b>	: Seçici Östrojen Reseptör Modülatörleri
<b>TMZ</b>	: Trimetazidin
<b>TP53</b>	: Tümör Protein 53
<b>WHO</b>	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

---

## 1. GİRİŞ

Kanser, tüm dünyada insidansı, morbidite ve mortalite oranları giderek artan ciddi bir halk sağlığı sorunudur (Siegel ve ark., 2020). Tüm kanser vakalarının, 2018 yılında yaklaşık 9,6 milyon insanın ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Cinsiyete göre en sık ölüme neden olan kanserler erkeklerde; akciğer, kolorektal, mide, prostat ve karaciğer kanseri, kadınlarda; meme, kolorektal, akciğer, serviks ve tiroid kanserleridir (WHO, 2021).

Meme kanseri günümüzde kadınlarda en çok karşılaşılan kanser türlerinden biridir. Bu nedenle kadın sağlığını etkileyen önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser olmasının yanında, birçok ülkede kadınlardaki kanser ölümlerinin de başlıca nedenidir (Jemal ve ark., 2004; Ronco ve ark., 2010; Koçak ve ark., 2011; Yılmaz ve Atak, 2014). Kadınlarda, kansere bağlı ölümlerin ortalama %15'i meme kanserine bağlı olmaktadır. Kansere bağlı ölümlerde ise akciğer kanserinin arkasından 2. sırada gelmektedir (Jemal ve ark., 2004; Koçak ve ark., 2011; Yılmaz ve Atak, 2014). Yüksek gelirli ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunu olan meme kanseri, düşük gelirli ülkelerde de doğumda beklenen yaşam süresinin uzaması ve batılı yaşam biçiminin benimsenmesi sonucu, risk faktörlerinin sıklığına bağlı olarak toplumdan topluma değişmekte ve insidansı artmaktadır (Ceber ve ark., 2005; Yılmaz ve Atak, 2014).

Kemoterapi, meme kanseri tedavisinde de uygulanan en yaygın ve etkili yöntemdir. Ancak, kemoterapi süresince, hastaların tedaviye cevap vermemesi veya tedavi sonrası kanserin tekrarlanması sıklıkla görülen bir durumdur (Krishan ve ark., 1997; Demirel Kars, 2009). Kemoterapide başarıya ulaşmak için hastalara genellikle birden fazla antikanser ilacı uygulanmaktadır. Ancak, sonradan kazanılan ya da tedavi öncesi kişide varolan ilaç dirençliliği, kemoterapide başarıya ulaşmayı büyük ölçüde engellemektedir. Kemoterapiye karşı gelişen direnç, pekçok antikanser ilacın hastalar üzerinde beklenen etkiyi gösterememesine ve hastalığın daha agresif karakter kazanarak ilerlemesine neden olmaktadır (Demirel Kars, 2009). Bu nedenle tedavide kullanılacak daha güvenli, daha etkili ve daha az yan etkilere sahip olan yeni ajan arayışları devam etmektedir ve nükleik asitlerle etkileşime girebilen yeni

moleküllerin araştırılması, tasarlanması ve yeni antikanser ilaçların geliştirilmesi günümüzde araştırmacıların üzerinde çok çalıştığı konulardan birisi haline gelmiştir.

Mikrotubullerin dinamik davranışı; mitoz süresince hücre fonksiyon, hücre sinyalizasyonu, migrasyon ve hücre içi trafik için çok önemlidir (Jordan ve ark., 2004). Bu işlevler sıklıkla birçok kanser tipinde deregüle edilirken mikrotubuller kemoterapi için cazip hücre hedefleri olarak kabul edilmektedir. Paklitaksel, solid tümörlerin geniş bir paneline karşı en aktif mikrotübül hedefleyici kemoterapotik ajanlardan birisidir (Nabholtz ve ark., 1996; Holmes ve ark., 1991). Paklitaksel'in geniş spektrumlu aktivitesi, kanser fenotipinin çok temel elementlerini hedefleyen etki mekanizmaları (örneğin hücre proliferasyonunun kontrolü, DNA hasarı) ile tahmin edilmektedir (Foa ve ark., 1994; Khanna ve ark., 2015). Sb-Paklitaksel ve dosetaksel'in meme kanserinin tedavisindeki faydaları kanıtlanmıştır; ancak kimyasal formülasyonları birçok sınırlamalar getirmektedir. Hem Sb-Paklitaksel hem de dosetaksel çözünürlüklerinin artırılabilmesi için solventlerin kullanımını gerektirmektedir ve bu solventler aşırı duyarlılık ve uzun süreli periferik nöropati de dahil olmak üzere diğer toksisiteler ile ilişkilendirilmiştir (Gelderblom ve ark., 2003; ten Tije ve ark., 2003; Weiss ve ark., 1990). Abraksan (AB), adjuvant kemoterapiden sonra kombinasyon kemoterapisinde başarısız olan veya nükseden metastatik meme kanseri hastalarının kullanımı için geliştirilmiş 130 nm ortalama çapa sahip albumin nanopartiküllerine bağlı paklitakseldir (Bartels ve Wilson, 2004; Garber, 2004). ABS, tek başına paklitaksel'e göre daha büyük bir terapötik indekse sahiptir. Geleneksel Paklitaksel tedavisine göre daha az toksisite ile daha yüksek dozlarda uygulanabilmektedir (Gradishar ve ark., 2005; Socinski ve ark., 2012; Iwamoto, 2013). Meme kanseri tedavisinde etkinliği artırabilmek için ABS ile birlikte diğer kemoterapik ajanların kombine edilerek uygulanması daha etkili sonuçlar verilebileceği düşünülmektedir.

Trimetazidin (TMZ) (1-2,3,4 trimethoxybenzyl piperazine dihydrochloride) (Vastarel tablet) piperazin grubu bir ilaçtır ve angina pectoris, periferik damar tıkanıklığı, çeşitli serebrovasküler hadiseler, tinnitus, vasküler kökenli vertigolar ve Meniere sendromunda kullanılmaktadır (Knight ve Fox, 1995; Kantor ve ark., 2000). Uzun yıllardır üzerinde çeşitli çalışmalar yapılan bu ilacın, koroner kan akımı ve sistemik hemodinamiyi etkilemeksizin sitoprotektif etki gösteren anti-iskemik bir

madde olduğu dikkati çekmiştir (Knight ve Fox, 1995; Abacı ve Kabakçı, 1996). TMZ, hipoksi veya iskemiye maruz kalan hücrelerin enerji metabolizmasını korur (Mody ve ark., 1998; Belardinelli, 2000; El Banani ve ark., 2000; Huqi, 2011). Tümör içi hipoksi sonucu; hücreler çoğalmak için gerekli olan enerjiyi düşük oksijen ve besin seviyelerinde anaerobik glikolizi artırarak sağlarlar. Bahsedilen bu hipoksik durum meme kanseri hücrelerinin patogenezinde de önemli rol oynamaktadır. TMZ, hipoksik hücrelerde ATP üretiminde glukoz kullanılması için yağ asitlerinin  $\beta$  oksidasyonunda metabolik sapma sağlayıp glukoz oksidasyonunu artıran bir ajandır. Glukoz oksidasyonundaki artış ile ATP üretimi artar ve mitokondriyal fonksiyonlar korunur (Patnos ve ark., 2005; Tritto ve ark., 2005; Gambert ve ark., 2006; Cha ve ark., 2009).

TMZ'nin, hücreleri glukozun mitokondriyal oksidatif yıkıma yönlendirmesi sayesinde tümör hücrelerindeki sahte-hipoksik durumu normale çevirebileceği, dolaylı olarak apoptozu indükleyebileceği ve hipoksiye dayandırılan radyoterapiye ve kemoterapiye karşı oluşan direnç ve kötü prognozu engelleyebileceği öne sürülmektedir (Huqi, 2011). Bu nedenle bu çalışma, dünyada ve ülkemizde çok sık rastlanan kanser tiplerinden olan meme kanseri hücrelerinde TMZ'nin olası etkilerini araştırmak amacıyla tasarlanmıştır. TMZ'nin insana ait kanser hücreleri üzerindeki olası anti-tümöral etkisinin araştırıldığı çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle, TMZ'nin hem tek başına hem de meme kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapik bir ajan olan AB ile birlikte kullanıldığında meme kanseri hücre kültürlerinde hücre canlılığı, sitotoksosite, apoptoz, migrasyon ve ATP düzeyleri üzerindeki etkileri ilk kez bu çalışma ile araştırılacaktır. Çalışmamızın sonuçları ile, bu ilacın meme kanseri tedavisi için antitümör ve kemoterapotik ajan olabilme potansiyeli hakkındaki bilgiler elde edilecektir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Meme Kanseri**

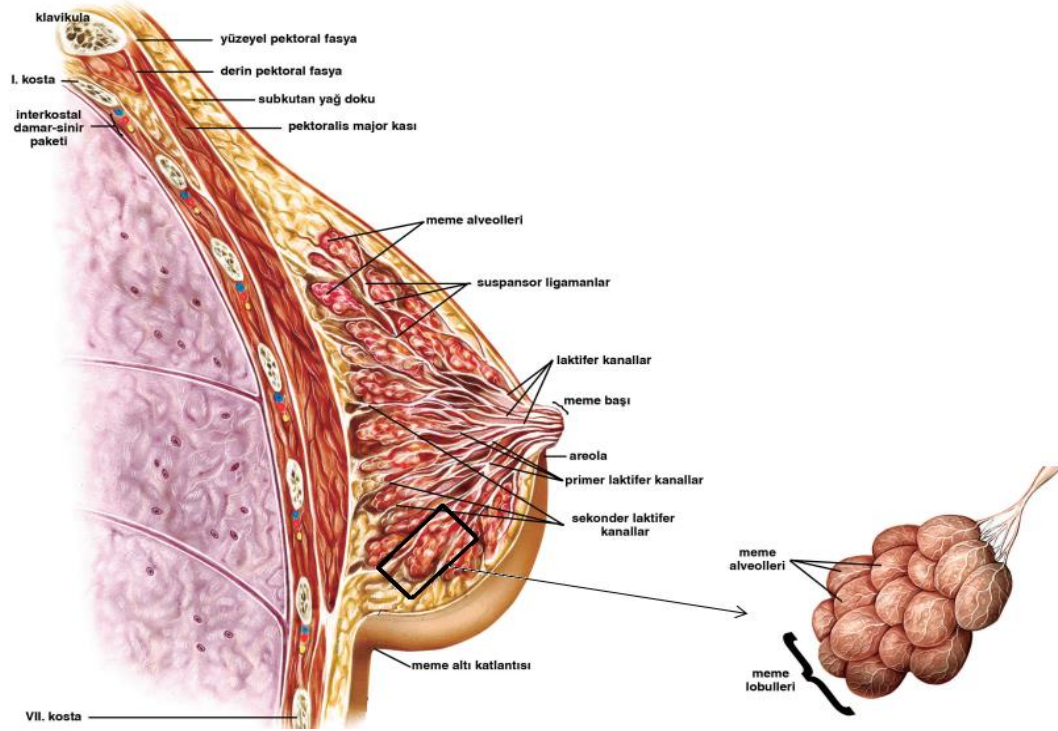
Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türleri arasında yer almaktadır (Prat ve ark., 2010). Sadece kadınlarda değil, erkeklerde de görülen bir kanser türü olan meme kanseri, erkeklerde kadınlara oranla oldukça nadir görülen bir kanser tipidir (Weiss ve ark., 2005). ABD’de yapılan bir araştırma sonucunda, 2018 yılı için tahmin edilen meme kanseri olgusunun tüm kanser olgularının %30’unu ve ölüm oranlarının ise toplam kanser ölüm oranlarının %14’ünü oluşturabileceği rapor edilmiştir (Siegel ve ark., 2018). Dünya çapında, kadın meme kanseri, tüm kanser vakalarının %24,5’ini ve tüm kanser ölümlerinin %15,5’ini oluşturur ve kadınlarda sıklık ve ölüm oranlarında önde gelen kanser nedeni olarak akciğer kanserini geride bırakmıştır. Uluslararası Kanser Enstitüsü (NCI) verilerine göre her sekiz kadından birinde meme kanseri gelişebileceği ve her 30 kadından birinin de meme kanseri nedeniyle öleceği tahmin edilmektedir (Curado ve ark., 2007).

Meme kanseri insidansı, sosyoekonomik olarak gelişmiş ülkelerde daha yüksektir. Bu durum meme kanserinde hormonal, reproduktif ve yaşam tarzını içeren risk faktörlerinin daha yüksek prevalansının yanı sıra mamografik taramaya daha fazla erişimi de yansıtmaktadır. 1990’lardan beri ABD ve diğer ülkelerde meme kanserinden ölümlerde yaklaşık % 24’lük bir azalma gerçekleşmiştir. Taramada mamografinin kullanılması ve adjuvan tedavilerin uygulanması bu azalmaya eşit derecede katkı sağlamıştır. Endüstriyel olmayan toplumlarda meme kanseri sıklığı geçmişte daha düşük olmasına rağmen günümüzde artma eğilimine girmiştir (American Cancer Society, 2020).

### **2.2 Memenin Anatomisi**

Yetişkin kadın memesi ikinci ve altıncı kaburgalar ve sternum kenarı ile orta aksiller çizgi arasında yer alır. Meme; deri, deri altı doku ve meme dokusundan oluşur. Meme dokusu ise hem epitelyal hem de stromal elemanları içerir. Her bir meme, fibröz bağ dokusu tarafından desteklenen 15 ila 20 lob olarak tanımlanan glandüler dokudan (süt bezleri) oluşur. Loblar arasındaki boşluk yağ dokusu ile doldurulur. Memenin kanlanması internal mammarian ve lateral torasik arterlerden sağlanır. Memenin lenfatik drenajı, yüzeysel ve derin bir lenfatik pleksus yoluyla gerçekleşir ve memenin lenfatik drenajının >%95’i aksiller lenf nodları

yoluyla, geri kalanı ise internal mammarian nodlar yoluyla olur (Şekil 2.1) (American Cancer Society, 2020).



Şekil 2.1 Memenin anatomik yapısı (Erel ve Atahan, 2019)

### 2.3 Meme Kanseri Tipleri

Meme kanseri, kompleks ve heterojen bir hastalıktır. Bu nedenle, uygulanacak tedaviler seçilirken çeşitli sınıflandırmalar yapılmaktadır. Meme kanseri meme epitel dokusunda hücrelerin anormal çoğalması ile karakterizedir. Epitelyal meme tümörleri invaziv ve noninvaziv karsinomlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Pek çok meme tümörü süt bezlerinde ya da süt kanallarında başlayan maligniteler oldukları için, birçok farklı türü bulunmasına rağmen meme kanserinin genel olarak duktal (süt kanallarından kaynaklanan) ve lobüler (süt bezlerinden kaynaklanan) olarak iki ana türü vardır. Duktal ve lobüler kanserler de, süt bezinin veya süt kanalının içinde olmasına (in situ) veya dışına çıkmış (invaziv) olmasına göre iki alt gruba ayrılırlar (Şekil 2.2). Noninvaziv meme kanserleri genellikle olduğu bölgede kalan ve yayılım göstermeyen kanserler iken, invaziv meme kanserleri ise tümörün olduğu bölgeden ayrılarak yayılım gösterirler. En sık görülen meme kanseri tipi duktal invaziv meme kanseridir ve tüm meme

kanserlerinin yaklaşık % 70-80'ini oluşturur (Baydar Dalar, 2014; American Cancer Society, 2020).



### Şekil 2.2 Epitelyal meme kanserinin sınıflandırılması

Meme kanseri ayrıca, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) ekspresyonlarına göre beş temel moleküler alt gruba ayrılır. Bu gruplar, 1) luminal A, 2) luminal B, 3) bazal benzeri, 4) düşük klaudinli ve 5) HER2 pozitif olarak isimlendirilmektedir (Çizelge 2.1). Hormon reseptör pozitif, HER2 negatif grup tüm vakaların %60'ını, hormon reseptör pozitif, HER2 pozitif grup %15'ini, hormon reseptör negatif HER2 pozitif grup %5'ini, hormon reseptör negatif, HER2 negatif (triple negatif) grup ise %20'sini oluşturur. Bu grupların tedavi hedefleri ve prognozları farklı olduğundan tedavilerinde farklılıklar mevcuttur (ASCO, 2018). Bazal benzeri ve düşük klaudinli gruplar ER, PR ve HER2 ekspresyonu açısından yoksun olduğu için üçlü negatif meme kanseri olarak da adlandırılır. Üçlü negatif grup hızlı çoğalma ve metastaz yapma özelliklerinden dolayı invazyon riski yüksek, sağkalımı kötü ve tedaviye dirençlidir (Holliday ve Speirs, 2011).



**Çizelge 2.1** Meme kanseri alt gruplarının sınıflandırılması

<b>Gruplar</b>	<b>ER</b>	<b>PR</b>	<b>HER2</b>
Luminal A	+	+/-	-
Luminal B	+	+/-	+
Bazal Benzeri	-	-	-
Düşük Klaudinli	-	-	-
HER2	-	-	+

#### **2.4. Meme Kanseri Risk Faktörleri**

Pek çok faktör meme kanseri gelişimi ile ilişkili olmakla beraber bu faktörlerin çoğu aslında kadınlarda düşük-orta derecede bir risk artışına neden olur. Meme kanserine yakalanan kadınların yaklaşık %50'sinde yaş ve cinsiyet dışında herhangi bir risk faktörü tanımlanamaz (American Cancer Society, 2020).

Meme kanseri için önemli risk faktörlerinden bazıları aşağıda kısaca özetlenmiştir:

##### **2.4.1 Çevresel Faktörler**

İyonize radyasyona maruz kalmak meme kanseri riskini artırır ve artış özellikle genç yaşta maruz kalma durumunda belirgindir. Bu durum, atom bombası saldırılarından kurtulularda, çok kez tanısal X-ray incelemesi yapılanlarda ve terapötik ışınlama alan kadınlarda gözlemlenmiştir. 15 yaşından önce Hodgkin lenfoma tedavisi için ışınlama yapılan kadınlarda meme kanseri gelişme riskinde belirgin bir artış bildirilmiştir (American Cancer Society, 2020).

##### **2.4.2 Diyet ve Yaşam Tarzı Faktörleri**

Gözlemsel çalışmalar, yüksek yağlı diyetlerin, düşük yağlı diyetlere göre daha yüksek meme kanseri oranları ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, bazı prospektif epidemiyolojik çalışmaların meta-analizi ile, gelişmiş ülkelerde yetişkin kadınlarda yağ alımı ile meme kanseri riski arasında bir ilişki tespit edilmemiştir. Meme kanseri riski tüketilen alkol miktarı ile doğrusal olarak artmaktadır. Vitamin C, folat ve  $\beta$ -karoten gibi besinlerin alımının azalması, alkol tüketimiyle ilgili riski artırabilir. Obezite, hem postmenopozal kadınlarda meme kanseri gelişme riskinin artması hem de kanser mortalitesi artışı ile ilişkilidir. Vücut

kitle indeksi  $\geq 31.1$  olan kadınların meme kanserine yakalanma riski, vücut kitle indeksi  $\leq 22.6$  olanlara göre 2,5 kat daha fazladır (American Cancer Society, 2020).

### **2.4.3 Cinsiyet**

Meme kanseri daha çok kadınlarda teşhis edilmekte ve kadınlarda görülen en yaygın kanser türü olarak bilinmektedir. Tanı almış tüm meme kanserlerinin %1“den daha azını erkekler oluşturmaktadır. Ancak epidemiyolojik çalışmalar erkeklerde son 30 yılda meme kanseri oluşumunda bir artış olduğunu göstermektedir. Meme kanseri teşhisi konulan erkek hastalardan alınan dokuların meme kanseri olan kadınlardan alınan dokulara göre östrojen ve progesteron reseptörü ifadesinin %80 daha fazla olduğu ileri sürülmüştür. Bu reseptörlerin aşırı ifadesi ile BCL2 protein seviyesinin de korele olduğu bulunmuştur. Obezite, testis hormonal fonksiyon bozukluğu veya Klinefelter sendromu nedeniyle artan östrojen seviyeleri de erkeklerde meme kanseri oluşumuna yol açan risk faktörleri arasındadır (Weiss ve ark., 2005; Speirs ve Shaaban, 2000; Gnerlich ve ark., 2011).

### **2.4.4 Benign Meme Hastalığı**

Benign meme lezyonları proliferatif veya non-proliferatif olarak sınıflandırılır. Proliferatif olmayan hastalık artmış meme kanseri riski ile ilişkili değildir, oysa atipisi olmayan proliferatif hastalık riskte küçük bir artışa neden olur. Atipik hiperplazili proliferatif hastalık ise, daha büyük kanser gelişimi riski ile ilişkilidir (American Cancer Society, 2020).

### **2.4.5 Ailesel Faktörler**

Aile öyküsü uzun zamandır bir risk faktörü olarak kabul edilmesine rağmen, meme kanseri gelişmiş vakaların sadece %5-10 kadarında gerçekten aile öyküsü saptanır. Genel olarak, bir kadının meme kanseri olan bir annesi veya kız kardeşi varsa, meme kanseri geliştirme riski 1,5 kat ile 3 kat artmaktadır. Aslında aile öyküsü, meme kanserli akrabaların sayısına, kesin akrabalığa, tanı yaşı ve etkilenmeyen akrabaların sayısına bağlı olarak farklı etkileri olan heterojen bir risk faktörüdür. Tanımlanmış bir genetik yatkınlığın yokluğunda bile, ailesinde meme kanseri öyküsü olan kadınlar, muhtemelen ortak çevresel maruziyetlerin, açıklanamayan genetik faktörlerin veya her ikisinin bir kombinasyonundan dolayı bir miktar artmış riskle karşı karşıyadır (American Cancer Society, 2020).

#### **2.4.6 Meme Dansitesi**

Mamografik olarak meme yoğunluğu, meme kanseri riskinin önemli bir belirleyicisi olarak ortaya çıkmıştır ve kanser tesbitini zorlaştırmaktadır. Meme dansitesi değişikliklerinin önemli bir bileşeni genetik olsa da, menopoz sonrası hormon replasman tedavisinin başlatılması ve kesilmesiyle de değiştiği gösterilmiştir. Meme dansitesi >75% den fazla olan kadınlarda >10% dan fazla olanlara göre risk 4,7 kat artmaktadır (American Cancer Society, 2020).

#### **2.4.7 Meme Kanserine Kalıtsal Yatkınlık**

BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonlar, meme ve over kanseri riskinde önemli bir artış ile ilişkilidir ve tüm meme kanserlerinin %5 ile %10'unu oluşturur. Bu mutasyonlar otozomal dominant kalıtılır ve değişen penetrasyona sahiptir. Mutasyon taşıyıcılarında tahmini yaşam boyu meme kanseri gelişme riski %26-85 arasında, over kanseri riski ise BRCA1 ve BRCA2 taşıyıcılarında sırasıyla %16- 63 ve %10-27 arasında değişmektedir. On farklı uluslararası çalışmanın meta-analizinde, meme kanseri için 70 yaşında kümülatif risk BRCA1 taşıyıcıları için %57 ve BRCA2 için %40 olarak saptanmıştır. 700'den fazla farklı BRCA1 ve 300 farklı BRCA2 mutasyonu tanımlanmıştır ve mutasyonun gen içindeki konumunun hem meme hem de over kanseri riskini etkilediği gösterilmiştir. BRCA1 veya BRCA2 mutasyonları ile ilişkili diğer kanserler; erkek meme kanseri, fallop tüpü ve prostat kanseri bulunur. BRCA2 taşıyıcılarında melanom ve mide kanseri riski artışı da olabilir. BRCA1/2 mutasyon taşıyıcılarında kanser riskini azaltmak için yakın takip ve tarama, seçici östrojen reseptör modülatörleri (SERM) ile kemoprevensiyon ve profilaktik meme ve salpingo-ovaryan cerrahi bulunur. BRCA1 veya BRCA2 taşıyıcıları arasında kanser riskinin azaltılmasında çevresel ve yaşam tarzı faktörlerinin rolüne ilişkin büyük ilgi olsa da şu anda mevcut veriler tutarsızdır. Ailesinde önemli meme kanseri öyküsü olan ancak BRCA mutasyonları için negatif saptanan kadınların meme kanseri riski yaklaşık dört kat artmıştır. Buna karşılık, bir BRCA mutasyonu saptanan ailelerde, mutasyon için negatif saptanan kadınlar, diğer risk faktörlerinin yokluğunda meme kanseri gelişimi için yüksek risk altında değildir ve özel bir takip ya da tedavi gerektirmez. BRCA1 mutasyonu olan kadınlarda triple-negatif/basal-benzeri, evre 3 tümör, ER ve PR negatifliği ve HER2 overekspresyonu olma olasılığı sporadik vakalara göre daha fazladır. BRCA2 kanserlerinin fenotipi

sporadik kanserlerde görüldenden farklı değildir. Yeni tanı almış meme kanseri olan hastada, tanı yaşının genç olması ( $\leq 40$  yaş), bilateral meme kanseri ve BRCA1 fenotipi ile uyumlu bir malignite öyküsünün varlığı gibi durumlarda genetik danışmanlık verilmelidir.

Diğer genetik mutasyonlar, BRCA1 ve BRCA2'den daha düşük prevalans veya penetrasyona sahiptir. TP53 ve PTEN'in her biri vakaların  $<1\%$ 'ini oluştururken, CDH1'deki mutasyonlar, diffüz mide kanseri ve lobüler meme kanserine otozomal dominant yatkınlıkla ilişkilidir. TP53 mutasyonları (Li-Fraumeni sendromu) olan genç kadınların HER2+ meme kanserine daha yatkın olduğu saptanmıştır. Checkpoint kinaz 2 (CHEK2) geninde spesifik bir mutasyon, 60 yaşından önce tanı almış üç veya daha fazla meme kanserli bireyi olan ailelerin  $11.4\%$ 'ünde bulunmuş, ancak beş ülkeden 10.860 seçilmemiş meme kanseri hastası üzerinde yapılan büyük bir çalışmada, CHEK2 mutasyon vakaların yalnızca  $1.9\%$ 'unda ve kontrollerin  $0.7\%$ 'sinde (olasılık oranı, 2.34) tanımlanmıştır. Yeni nesil dizilemenin artan kullanımı, yüksek ve orta nüfuzlu gen panellerinin ticari olarak temin edilebilmesindeki artan kolaylık, muhtemelen gelecek yıllarda genetik tarama yaklaşımını değiştirecektir (American Cancer Society, 2020).

#### **2.4.8 Hormonal Faktörler**

Birçok kadında meme kanseri gelişimi, kadın üreme hormonları, özellikle endojen östrojenler ile ilişkili görünmektedir. Erken menarş, geç menapoz, hiç doğum yapmama veya ilk full-term gebeliğin geç yaşta olması ve menopoz meme kanseri gelişme riskini artırır. Postmenopozal kadınlarda hormon replasman tedavisi, obezite gibi plazma östrojen seviyelerinde artışa neden olan durumlar da artmış meme kanseri riski ile ilişkilidir. Yaş spesifik meme kanseri insidansı, menopoza kadar yaşla birlikte dik bir şekilde artar sonrasında ise platoya ulaşır. Hormon replasmanı olmaksızın yumurtalıkların alındığı premenopozal kadınlarda, cerrahi yapılan yaş azaldıkça artan bir risk azalmasıyla birlikte, yaşamın ilerleyen dönemlerinde de meme kanseri riski belirgin şekilde azalır. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları olan kadınlardan elde edilen veriler, yumurtalıkların erken yaşta alınmasının bu popülasyonda da meme kanseri riski üzerinde önemli bir koruyucu etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir. İlk full-term gebeliği 30 yaşından sonra olan kadınların meme kanseri riski, 18 yaşından önce olan kadınlara kıyasla 2 ile 5

kat daha yüksektir. Hiç doğum yapmamış kadınlar, doğum yapmış kadınlara göre meme kanseri gelişimi için daha büyük risk altındadır. Kombine östrojen ve progesterin hormon replasman tedavisi kullanımı da meme kanseri riskini artırmaktadır. Uzun süre emzirmenin ise meme kanseri riskini azalttığı ileri sürülmüştür (American Cancer Society, 2020).

## **2.5 Meme Kanseri Tedavisi**

Meme kanselerinde uygulanan tedavi yöntemlerini incelediğimizde, kemoterapi, cerrahi yöntem, radyasyon tedavisi, hormon tedavisi, immünoterapi gibi yöntemlerle karşılaşmaktayız. Kullanılan bu tedavi yöntemleri çoğu meme kanser türlerinde başarı sağlamakla birlikte metastatik bazı türlerde aynı başarıyı sağlayamadığı tespit edilmiştir. Kanserin kişiye özgü bir hastalık olmasından dolayı tedavilerin biyolojik farklılıklar göstermesi ve kullanılan her yöntemin avantaj ve dezavantajlarının olmasından dolayı, meme kanserinin tedavisi için tek bir tedavi yönteminden bahsetmek imkansızdır (Baykara, 2016).

Meme kanseri tedavisinin ilk aşamasını hastalığı evreleme ve patolojik özelliklerini ortaya koyma oluşturur. Meme kanseri tedavisinde alt gruplara özgü tedaviler uygulanmaktadır. ER ve/veya PR pozitif olan alt grupta kemoterapi ek olarak tamoksifen ya da letrozol gibi hormonal ajanlar uygulanırken, HER2 pozitif vakalarda trastuzumab/pertuzumab gibi monoklonal antikolar uygulanır. Üçlü negatif meme kanseri alt grubu tedavisinde ise reseptör duyarlılığı söz konusu olmadığı için kemoterapi tek tedavi seçeneği olarak görünmektedir (Dawood, 2010; American Cancer Society, 2020).

Meme kanseri tedavisinde kullanılan anti-HER2 ilaçlarına ek olarak mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitörleri ve CDK4/6 (Cyclin Dependent Kinase 4/6) inhibitörleri gibi ilaçlar endokrin tedavi ile birlikte uygulanarak meme kanserinde sağ kalım süresini artırabilmektedir. Ancak en agresif ve kötü prognozlu bir meme kanseri tipi olan ve kemoterapi dışında tedavi seçeneğinin olmadığı üçlü negatif meme kanserinde görülen kemoterapiye direnç, tedavinin başarısını sınırlayan önemli etken olarak varlığını sürdürmektedir (Yurtsever ve Tiftik, 2021).

Meme kanserinin bu şekilde sınıflandırılması; hastalığın riskini, tekrar edip etmeyeceği ve verilecek tedavinin etkili olup olmayacağını predikte eder. ER durumu

tüm duktal karsinoma in situ hastalarında; ER ve PR durumu da tüm invaziv meme kanserli hastalarda saptanmalıdır. Tümörde HER2 durumunun araştırılması tüm yeni tanı invaziv meme kanserlerinde ve rekürrens durumlarında mutlaka yapılmalıdır (Partridge ve ark. 2016).

Sitotoksik ilaçlar, anti HER2 ilaçlar ve endokrin tedaviler; adjuvan, neoadjuvan ya da palyatif amaçlarla kullanılabilir. Adjuvan tedaviler cerrahi sonrası muhtemel mikrometastazların yok edilmesi ile nüksü engellemek için verilmekteyken; neoadjuvan tedaviler lokal ileri hastalıkta operasyon sonrası mikroskopik rezidünün kalmaması, rezeksiyonun yapılabilmesi ya da meme koruyucu cerrahiye olanak sağlanması amacıyla yapılmaktadır. Palyatif tedaviler ise metastatik hastalıkta hastalık ilerlemesinin durdurularak organ yetmezliklerinin ya da disfonksiyonlarının engellenmesi, hastalığa bağlı semptomların azaltılması ve optimal konforun sağlanması amacıyla verilmektedir (Vincent ve ark., 2015).

## **2.6 Meme Kanseri Hücre Hatları**

1900'lü yılların ortalarında laboratuvarlarda hayvansal hücre kültürü teknikleri uygulanmaya başlanmış fakat 19. yy ortalarına doğru doku kaynaklarından ayrılarak sürdürülebilir yaşayan hücre hatları kavramı çıkarılmıştır. 1951 yılında George Gey tarafından ilk kanser hücre hattı ortaya konmuştur (Dündar, 2017; Dindaroğlu, 2019). İnsan meme kanseri hücre hatları çok iyi derecede deneysel modellerdir ve hem in vivo hem in vitro koşullarda doku gibi büyütüldüğünde, klinik önemi olan pekçok konunun araştırılmasında kullanılabilen yenilenebilir kaynaklardandır. Bu hücre hatlarının kolay temin edilmeleri, hızlı çoğalabilen ve gelişebilen hücre modelleri olmasından dolayı da sıklıkla tercih edilmektedir (Neve ve ark., 2006; Holliday ve Speirs, 2011; Beşli, 2018).

### **2.6.1 MCF-7**

İnsan meme kanseri modellerinden biri olan MCF-7 hücre hattı, 1970 yılında 69 yaşında beyaz bir kadının metastatik dokusundan izole edilen epitel hücrelerdir (Kars ve ark., 2006; Karabekir 2017). MCF-7 hücre hattının ismi 1973' de Herbert Soule ve arkadaşları tarafından Detroit' de kurulan hücre hattı enstitüsüne ithafen Michigan Cancer Foundation-7' nin baş harflerinden gelmektedir (Glodek 1990, Levenson ve Jordan, 1997; Dindaroğlu, 2019).

MCF-7, büyük ölçüde östrojen reseptör (ER) luminal epitel hücre tipindedir. ER aracılığı ile hormon duyarlılığının olması sebebiyle (ER pozitif oldukları için) hormonal yanıt çalışmalarında sıklıkla kullanılan ideal bir model olarak büyük öneme sahiptirler ve meme kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılırlar (Levenson ve Jordan, 1997; Karabekir, 2017).

## **2.7 Apoptoz ve Kanser**

Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, çok hücreli organizmalarda doku homeostazisini sağlayan, DNA hasarı onarılamayan veya ve/veya normal olmayan hücrelerin ortadan kaldırılmasını amaçlayan, genetik olarak programlanmış hücrenin kendi kendini yok etme mekanizmasıdır (Özcan, 2018).

Apoptoz sürecinde, bazı morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler gerçekleşmektedir. Hücrenin büzüşmesi, komşu hücrelerle temasın azalması, plazma membranının tomurcuklanması, fosfolipidlerin membranın dış yüzeyine yönelmesi, kromatin kondensasyonu ve nükleer fragmentasyon apoptotik bir hücrede gözlemlenen temel morfolojik değişikliklerdir. Süreç, lizozomlar içinde bozulan apoptotik cisimciklerin oluşumu ve makrofajlar veya fagositik aktiviteye sahip diğer hücreler tarafından hücrenin yok edilmesi ile sonuçlanmaktadır. Apoptoz sırasında meydana gelen pek çok hücresel ve şekilsel değişimler, tüm apoptotik süreçte önemli rol oynayan kaspaz enzimlerinin görev aldığı bazı süreçler neticesinde gelişir (Çelen, 2017; Özcan, 2018).

Apoptoza; büyüme ve sağ kalım faktörlerinin eksikliği, hücre-matriks etkileşiminde kayıp, hipoksi, ilaçlar, toksinler gibi bazı kimyasal ajanlardan ve UV ışınları gibi fiziksel ajanlar başta olmak üzere çeşitli hücre dışı uyaranlar sebep olabilir. Başta hücre döngüsü kontrol noktası bozukluklarına yol açan DNA hasarları olmak üzere, telomer disfonksiyonu ve onkojenik mutasyonlardan kaynaklanan uygun olmayan proliferatif sinyaller gibi iç uyaranlar da apoptozu indükleyebilmektedir (Özcan, 2018). Apoptoz, hücre membranındaki ölüm reseptörlerinin uyarılması kaynaklı ekstrinik yolak ve mitokondri-apoptozom sisteminin uyarılması kaynaklı intrinsik yolak olarak iki yolak tarafından tetiklenmektedir. Kaspaz enzimlerinin aktivitesi apoptozun tetiklenmesinden DNA fragmentasyonuna, plazma membranının tomurcuklanmasından, fosfolipid

asimetrisinin bozulmasına kadar tüm apoptoz sürecinde yer almaktadır (Çelen, 2017). Ekstrinsik ya da dış kaynaklı apoptoz, hücre membranındaki ölüm reseptörlerine bazı aktivatörlerin bağlanmasıyla tetiklenmektedir ve hücre dışı bir sinyalin hücre membranına bağlı reseptörler aracılığıyla apoptotik aktiviteye dönüşmesi olarak tanımlanmaktadır. İntrinsik ya da iç kaynaklı ya da mitokondriyal apoptoz, çeşitli hücre içi sinyallerin ya da uyarıların tetiklediği ve mitokondri membran geçirgenliğindeki değişim sonucunda kaspaz-9'un aktifleşmesi ile sonuçlanan apoptoz tipidir ve büyük ölçüde BCL-2 protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. Apoptoza yol açan mekanizmaların bozukluğu kanser ve otoimmün hastalıklar gibi birçok patolojik duruma neden olabilmektedir (Çelen, 2017; Özcan, 2018).

Kontrolsüz hücre proliferasyonlarına neden olan gen mutasyonlarının uzun süre birikmesi, aktif anti-apoptotik yolları ve telomeraz aktivitesinden dolayı kanser hücreleri uzun ömürlüdür. Hızlı çoğaldıkları için yaşamaları için gerekli organizasyonu sağlayamadıklarından dolayı normalde apoptoza girmeleri beklenir. Ancak pekçok kanser hücresi apoptozdan kaçır ve hatta köken aldığı hücreden daha uzun süre yaşayabilir. Apoptoztan kaçış ya da direnç de dahil olmak üzere birbiri ile ilişkili pekçok mekanizma sayesinde kanserli hastalarda kemoterapiye karşı direnç gelişmektedir (Wang ve ark., 2013; Pan ve ark., 2016; Çelen, 2017; Celepli ve ark., 2020).

Kanserin temelde hücre proliferasyonundaki artış ve apoptozdaki azalmaya bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir. Birçok kemoterapi ilacı, tümördeki hücrelerin DNA sentezini ve hücre bölünmesini engelleyerek apoptozu indüklemektedir. Böylece kemoterapi tedavisi ile apoptoz uyarılmakta ve tümör hücreleri yok edilebilmektedir. Ancak ilaç tedavisi sonrasında hücrelerin apoptoza duyarlılıklarının değişmesi ve ilaç direncinin gelişmesi, kemoterapi direncine yol açan önemli mekanizmalardır. Bu nedenle, kanserde ilaç tedavisinin en önemli hedeflerinden birisi tümörü oluşturan hücreleri apoptoza yönlendirmektir (Kaya ve ark., 2012).

## **2.8 Hücre göçü (Migrasyon) ve Metastaz**

Tümör hücreleri oluştukları primer odaktan kopup uzak bölgelere metastaz yapabilirler (Göksu ve Kazan, 2017). Metastaz, kanser hücrelerinin köken aldıkları



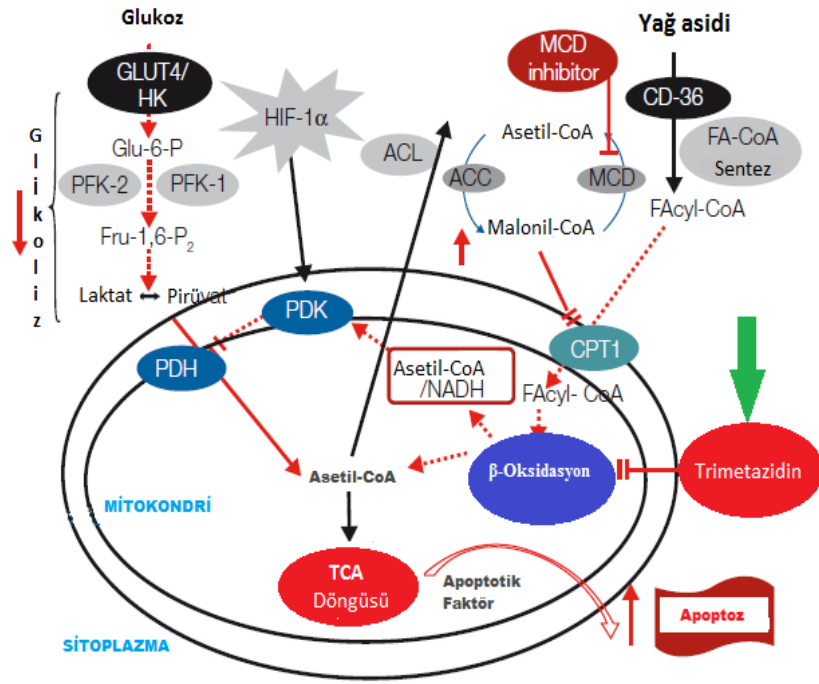
bölgeden ayrılarak vücudun farklı doku ve organlarına yayılması sürecidir. Metastaz gelişimi konvansiyonel tedavilere dirence neden olarak ve prognozu kötüleştirerek yaşam sürecini kısaltan bir süreçtir (Güllü ve Akalın, 2005). Bu süreç; anjiyenez, invazyon, migrasyon ve proliferasyon gibi bir dizi olaylar zincirini kapsamaktadır (Güllü ve Akalın, 2005).

Metastatik hücrelerin, çevre dokulara invazyon, yayılma, farklı vücut bölümlerine yapışma ve yeni damar oluşumu (anjiyogenez) başlatabilme yetenekleri mevcuttur. Metastatik hücreler, apoptozdan kaçabilme ya da apoptoz direncine yol açan mekanizmaları sayesinde hücre çoğalmasını durduran ya da inhibe eden sinyallerden kaçabilme yeteneğine de sahiptir (Göksu ve Kazan, 2017).

Adezyon, hücre polaritesi ve hücre iskeletindeki değişimler zamanla malign tümörlerin göç yeteneklerinin artmasına ve çevre dokulara invazyon kapasitesi kazanmalarına yol açar (Pehlivanoğlu ve ark., 2019). Bir metastazın gelişebilmesi için tümör hücrelerinin primer kitleden ayrılarak çevre dokuya invazyonu ile başlayan bir dizi sürecin tamamlanması gerekmektedir (Göksu ve Kazan, 2017). Lokal invazyon, kan ve/veya lenfatik damarlara giriş, dolaşım sistemi ile taşınma, uzak organ parankimine geçiş, küçük tümör nodülleri oluşturma, makroskopik tümör gelişimi, invazyon ve metastaz sürecinin basamaklarıdır. Kanser hücreleri hem birbirleriyle hem de ekstraselüler matriks (ESM) ile olan bağlantılarını değiştirecek E-kadherin kaybı gibi bazı değişiklikler kazanırlar. (Pehlivanoğlu ve ark., 2019). E-kadherin etkinliğinin kırılması gibi değişimler artmış metastatik potansiyel ile yakından ilişkilidir (Göksu ve Kazan, 2017). Tümör hücreleri daha sonra bazal membran ve ESM parçalarlar ve bu sayede migrasyon sürecini başlatarak primer tümör dokusundan ayrılırlar. Göç eden hücreler dolaşıma katılabilmek için endotel bazal membranı geçerler. Bu sayede çevre dokulara ve dolaşım sistemine geçer ve uzak dokulara ulaşırlar (Güllü ve Akalın, 2005; Göksu ve Kazan, 2017; Pehlivanoğlu ve ark. 2019). Doku parankimine ulaşma imkanı bulan hücreler proliferasyon artışı ile yeni geldikleri bölgelerde çoğalmaya başlarlar ve bu kısımları işgal ederler (Güllü ve Akalın, 2005; Göksu ve Kazan, 2017).

## 2.9 Trimetazidin (TMZ)

Trimetazidin (TMZ) (1-2,3,4 trimethoxybenzyl piperazine dihydrochloride) (Vastarel tablet) piperazin grubu bir ilaçtır ve angina pectoris, periferik damar tıkanıklığı, çeşitli serebrovasküler hadiseler, tinnitus, vasküler kökenli vertigolar ve Meniere sendromunda kullanılmaktadır (Knight ve Fox, 1995; Kantor ve ark., 2000). TMZ'nin kısa ürün bilgisinde pik plazma konsantrasyonuna oral uygulamadan 5 saat sonra ulaştığı ve temel olarak böbrekler ile değişmemiş bileşik olarak atıldığı bildirilmektedir (Shedage ve ark., 2014). Uzun yıllardır üzerinde çeşitli çalışmalar yapılan bu ilacın, koroner kan akımı ve sistemik hemodinamiyi etkilemeksizin sitoprotektif etki gösteren anti-iskemik bir madde olduğu dikkati çekmiştir (Knight ve Fox, 1995; Abacı ve Kabakçı, 1996). TMZ, hipoksi veya iskemiye maruz kalan hücrelerin enerji metabolizmasını korumak suretiyle hücre içi ATP oranının azalmasını önlemektedir (El Banani ve ark., 2000). TMZ'nin çalışma mekanizması, mitokondrial 3 ketoaçil-koa-tiyolaz enzimi inhibisyonu üzerindedir. İskemi sırasında oluşan metabolik hasarı, yağ asidi  $\beta$  oksidasyonunda etkili olan uzun zincirli 3-ketoaçil-KoA tiolaz enzimini selektif ve kısmi olarak inhibe eder (Kantor ve ark., 2000). ATP üretiminde glukoz kullanılması için yağ asitlerinden  $\beta$  oksidasyonla ATP üretiminde metabolik sapma sağlar ve glukoz oksidasyonunu artırır (Mody ve ark., 1998; Belardinelli, 2000; Huqi, 2011) (Şekil 2.3).



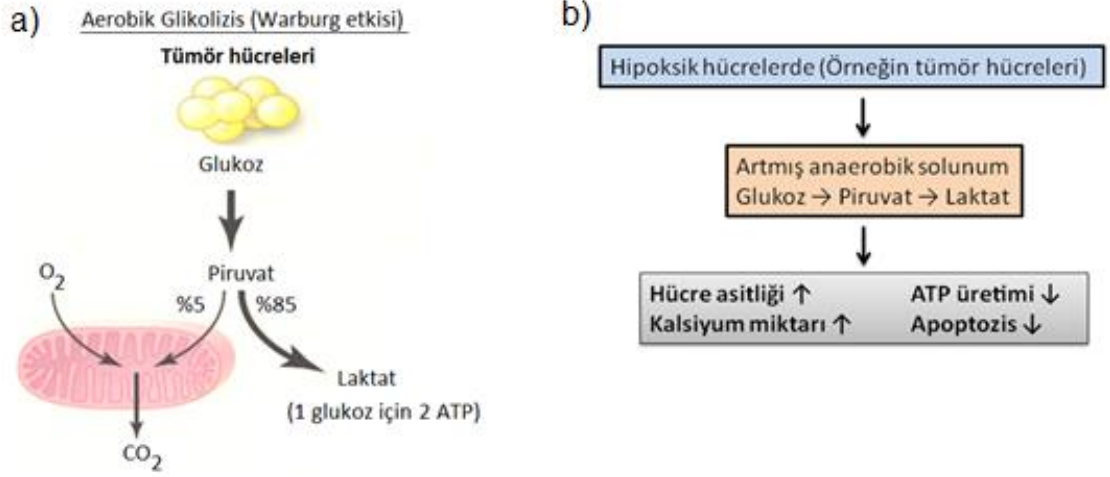
**Şekil 2.3** Trimetazidin'in etki mekanizması (Huqi, 2011)

Çeşitli çalışmalarla TMZ'nin iskemik veya hipoksik hücrelerde; iyon kanallarının çalışmasını düzenlediği (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz), hücrenin iskemiye toleransını artırdığı, intrasellüler asidozu sınırladığı, pH'yı düzenlediği, aşırı Na<sup>+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> birikimini inhibe ederek ve K<sup>+</sup> kaçışını engelleyerek intrasellüler ödemi önlediği, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve aşırı birikimini önlediği, serbest oksijen radikallerine bağlı membran hasarına karşı hücreyi koruduğu, antioksidan etki gösterdiğini, inorganik fosfatın birikimini önlediği, yüksek enerjili fosfatları koruduğu, intrasellüler ATP seviyelerini dengelediği ve iskemi sırasında mitokondriyal fonksiyonlarda koruma sağladığı belirtilmiştir. Ancak normal koşullarda hücrel iyonlar ve kanallar üzerine doğrudan etki yapmamaktadır (El Banani ve ark.,2000; Kantor ve ark., 2000; Bardi ve ark., 2002; İkizler ve ark., 2003; Marzilli ve Klein, 2003; Opie, 2003; Faure ve ark., 2003; Argaud ve ark., 2005; Chazov ve ark., 2005; Patnos ve ark., 2005; Tritto ve ark., 2005; Gambert ve ark., 2006; Di Napoli ve ark., 2007; Cha ve ark., 2009). TMZ ile ilgili yapılan çalışmaların bize gösterdiği anti-iskemik bir ajan olarak hipoksik şartlarda sellüler düzeyde koruyucu etki göstermesidir.

Oksijen eksikliği durumu olan hipoksi, pek çok insan kanser hücrelerinin ortak bir özelliğidir. Oksijen eksikliği; anormal bir mikrosirkülasyon, hızlı tümör

büyümesi ve yüksek interstisyel basınçtan kaynaklanır. Ancak tümör hücrelerinin bu olumsuz çevresel faktörlere adaptasyonuna yol açan mekanizmalar halen tam olarak anlaşılammıştır (Miyake ve ark., 2008). Hipoksik hücrelerde enerji üretimi çok yüksek oranda laktik asit fermentasyonu ile sağlanır (Şekil 2.4). Bu olayların sonucu hücrenin asitliği ve kalsiyum birikimi artar. Buna karşın ATP üretimi azalır, pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonları değişir ve hücreler apoptozdan kaçmaya başlar (Şekil 2b) (Vander Heiden ve ark., 2009; Qiu ve ark., 2015).

Kanser hücrelerinin ortak bir özelliği olan aerobik glikoliz (Warburg etkisi) ve bunun hücre ölümüne karşı direnç sağladığı düşünülmektedir (Huqi, 2011). Warburg etkisi, hücrelerin oksijenin varlığında bile enerji kaynağı olarak fermentasyonu kullanılmasıdır ve glukoz alımı ve tüketiminde artış olmasına rağmen, oksidatif fosforilasyonda azalma ve laktat üretimi ile karakterize edilir (Şekil 2.4) (Currie ve ark., 2013). Kanser hücrelerinde glikolitik oranlarındaki artışlar, dolaylı olarak kanser hücrelerinin mitokondriyal enerji üretim durumunda bir azalmayı da göstermektedir (Şekil 2.4). Çünkü glukoz metabolizmasında piruvatın oksidasyonu olmaksızın glikolizin artışı yönündeki değişim sonucu, ortamda yüksek oranda oksijen bulunmasına rağmen karbohidratlardan mitokondriyal solunum yoluyla yeterince ATP üretmez (Currie ve ark., 2013). Kanser hücreleri glukozu ATP üretimi için mitokondride parçalamaktan ziyade; glukozu riboz üretimi, protein glikozilasyon ve serin sentezi gibi bazı anabolik olaylar için kullanma eğilimindedirler (Carracedo ve ark., 2013). Kanser hücrelerinin enerji metabolizmalarındaki değişimlerin anlaşılması ise kanser tedavisi için yeni yaklaşımları harekete geçirmiştir (Currie ve ark., 2013).



**Şekil 2.4** Hipoksik tümör hücrelerinde ATP üretim mekanizması ve hücrel değişiklikler

Tümör mikroçevresindeki hipoksinin; kanser hücrelerinde genetik instabilite ve gen ekspresyonunda bozulmaya yol açtığı, hücrelerin mutasyon oranını artırdığı, hücrelerin apoptosise karşı daha dayanıklı ve radyo/kemoterapiye karşı daha az duyarlı hale gelmesine neden olarak direnç kazanmasına yol açtığı, tümörün invazyon yeteneği geliştirmesinde, agresif karakter kazanmasında ve metastaz gelişmesinde önemli rol oynadığı ortaya konmuştur (Sowter ve ark., 2001; Eskiizmir, 2015).

Tümör hücrelerinde mitokondrinin bu şekilde devre dışı bırakılması ve glukozu oksidatif metabolizma ile mitokondrielerde parçalayamaması apoptozisi engelleyebilmekte ve kanser hücrelerinin ölümsüz duruma geçmesine de yol açabilmektedir. Sonuçta apoptozis, yeterli mitokondriyal enerji üretimi ve sinyalizasyon gerektirecek şekilde kodlanmış ve pro-apoptotik faktörlerin salınmasına neden olan bir hücrel süreçtir. Araştırmalar, bu özellikleri sergileyen kanser hücrelerinin çeşitli metabolik yollarda görev alan önemli genlerde mutasyonlara sahip olduklarını göstermişlerdir (Huqi, 2011). Aerobik glikolize ek olarak, pekçok kanser hücresi azalmış substrat oksidasyonu, solunum zincirine ait birimlerin aktivitesi ve ekspresyonunda değişim, serbest oksijen radikallerinin aşırı oluşumu ve birikimi, mitokondriyal DNA mutasyonlarının oluşumu, mitokondriyal membran potansiyelinde değişimler, mitokondrinin iç membranı boyunca ATP sentez ve solunum zincirine ait komplekslerin organizasyonunda bozulma ve

apoptozun kontrolünde değişmeler gibi pekçok metabolik değişiklikler de gösterir. Sonuç olarak, mikroskobik, moleküler, biyokimyasal ve genetik seviyede mitokondrial disfonksiyon kanser hücrelerinin özelliklerinden birisidir (Solaini ve ark., 2011).

Tümör içi hipoksi sonucu; hücreler çoğalmak için gerekli olan enerjiyi düşük oksijen ve besin seviyelerinde anaerobik glikolizi artırarak sağlarlar. Bahsedilen bu hipoksik durum meme kanseri hücrelerinin patogeneğinde de önemli rol oynamaktadır. TMZ, hipoksik hücrelerde ATP üretiminde glukoz kullanılması için yağ asitlerinin  $\beta$  oksidasyonunda metabolik sapma sağlayıp glukoz oksidasyonunu artıran bir ajandır. Glukoz oksidasyonundaki artış ile ATP üretimi artar ve mitokondriyal fonksiyonlar korunur (Patnos ve ark., 2005; Tritto ve ark., 2005; Gambert ve ark., 2006; Cha ve ark., 2009).

TMZ'nin doğrudan insana ait bir kanser hücresi üzerindeki antikanser etkisinin araştırıldığı sadece bir çalışmaya rastlanmıştır (Atlı Şekeroğlu ve ark. 2021). TMZ'nin meme kanseri hücre hatları üzerinde yapılmış olan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, doğrudan mitokondriyi hedefleyen ve oksijenli solunumla ATP üretimini artıracak şekilde çalışan TMZ'nin, insan meme kanseri tedavisindeki olası potansiyelini araştırmak için planladığımız bu çalışma, gerçekleştirilecek ilk çalışma olması nedeniyle oldukça önemlidir.

## **2.10 Abraksan (AB)**

Taksan sınıfında bulunan paklitaksel (PAK) kemoterapide kullanılan önemli ajanlardan bir tanesidir. PAK; antitümör etkilerini, hücrede mikrotübüllerin toplanmasını arttırmak ve depolimerizasyonunu önleyerek stabil mikrotübül toplulukları oluşturmak suretiyle göstermektedir (Erdemoğlu ve Şener, 2000). Mikrotübüllerin dinamik davranışı; mitoz süresince hücresel fonksiyon, hücre sinyalizasyonu, migrasyon ve hücre içi trafik için çok önemlidir (Jordan ve Wilson, 2004). PAK'ın primer etki mekanizması mikrotübüllerin dinamiklerini baskılamaktır (Manfredi ve Horwitz, 1994). Bu, metafaz-anafaz geçişlerinin blokajı ve sonuçta mitozun inhibisyonu ve apoptozun indüksiyonu ile sonuçlanmaktadır. Diğer mikrotübül bozucu ilaçların aksine PAK özellikle polimerik tubulinlere bağlanarak

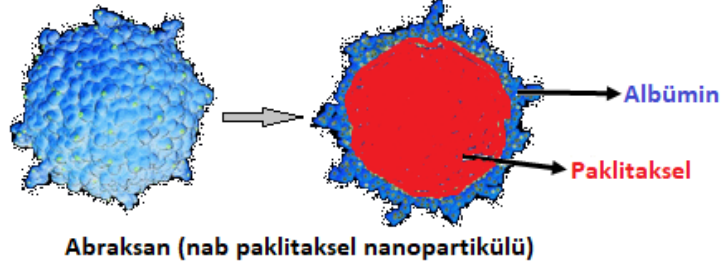
mikrotübülleri stabilize etmekte ve bu şekilde tubulinlerin ayrılmasını engellemektedir (Amos ve Löwe, 1999).

PAK; baş, boyun, kolon, küçük hücreli olmayan akciğer ve metastatik meme kanserini de içinde barındıran birçok kanserli dokuda kullanılan bir ilaçtır. Ancak PAK'ın da içinde bulunduğu taksan grubu ilaçların klinik ilerlemeleri hidrofobikliği ve sulu çözeltilerde zayıf çözünürlüğü (0.5 mg/L'den az) nedeniyle sınırlandırılmıştır (Brannon-Peppas ve ark., 2004) (Park ve ark., 2008; Miele ve ark., 2009). PAK kremofor miselleri tarafından saklanmakta ve sistemik maruziyeti uzatarak ilaç toksisitesini artırmaktadır (Desai, 2008). Bu toksik etki birçok antikanser ilaçlarında görülen istenmeyen etkilerden bir tanesidir. Bu zayıf çözünen ilaçların intravenöz enjeksiyonu, erimeyen ilaçların agregasyonu nedeniyle kan damarlarında embolizasyona neden olabilir ve yüksek ilaç konsantrasyonları sonucunda lokal toksisite gösterebilir (Park ve ark., 2008).

Birçok farklı araştırmada, antikanser ilaçların doku ve hücre dağılım profillerinin ilaçların submikronik kolloidal sistemler içine sıkışmaları ile kontrol edilebileceğini göstermiştir. Nanoparçacık ilaç taşıyıcı sistemler son yıllarda çokça çalışılmakta ve onları cazip ilaç taşıyıcısı haline getiren birçok özellikleri de gün geçtikçe daha iyi anlaşılmaktadır. Ayrıca nanopartiküller tümörü çevreleyen damarlardan sızdırıcı endotel doku içinden kaçabilir ve artırılmış geçirgenlik ve tutma etkisi yoluyla bazı solid tümörlerde birikebilir (Danhier ve ark., 2009).

Taksanların zayıf suda çözünürlüğün üstesinden gelmek için, bir araç olarak lipid bazlı çözücüler kullanılmış ve çoğunlukla PAK için, kremofor içermeyen ve ilacın dolaşım süresini artıran yeni sistemik formülasyonlar geliştirilmiştir. Nanoteknolojik yöntemler ile PAK modifiye edilerek herhangi bir çözücü içermeyen nanotanecek albumin-bağlı paklitaksel olan abraksan (AB) ortaya çıkarılmıştır (Şekil 2.5) (Miele ve ark., 2009). AB, 2005 yılında ilk pasif tümör hedefleyen polimerik nanoilaç olarak FDA (Food and Drug Administration, Gıda ve İlaç İdaresi) onayını almıştır (Gradishar ve ark., 2005). Pasif hedefleme, nanotıp ilişkili ilacın, artmış damar geçirgenliğinden yararlanarak, tümör bölgesindeki interstisyel sıvı içine önemli ölçüde ekstravazasyonunu ifade eder. Buna ek olarak, solid tümörler fonksiyonel lenflerden yoksun olma eğilimindedirler ve ekstravaze nanomateryaller

tümör alanında uzun sürelerde korunur. Artırılmış geçirgenlik ve saklama olarak adlandırılan etkisi düşük moleküler ağırlıklı kemoterapötik ajanların tümörlere dağıtımını geliştirmek için kullanılan en önemli yöntemler arasındadır (Lammers ve ark., 2008).



### Şekil 2.5 Abraksanın içeriği

AB, insan kanından elde edilmiş albümin içerir ve albümin:PAK oranı 9:1'dir. Ortalama partikül büyüklüğü yaklaşık olarak 130 nm, hidrodinamik çapı 110 nm'dir (Anonim-b.; Kratz, 2008; Danhier ve ark., 2009; Costanzo ve ark., 2009). İnsan serum albüminine bağlı amorf halde PAK nanopartikülleri içeren AB, albüminin plazma bileşenlerinin endotelial transitozuna aracılık ettiği bilinmektedir ve in vitro çalışmalar albümin varlığının endotelial hücrelerden PAK taşınmasını artırdığını göstermiştir (Anonim-c).

AB, PAK'a göre çok sayıda avantaja sahiptir. Bunlardan en önemlisi AB'nin yapısında hiçbir sürfaktan ve çözücü bulunmamasıdır. Böylece PAK'ın ticari formülasyonunda bulunan Cremophor EL'nin neden olduğu toksisite ortadan kalkmaktadır. Ayrıca ilacı plazmaya uzun sürede ve sürekli salarak depo etkisi sağlar ve bunun sonucunda da infüzyon süresini kısaltır. Toksik etkisinin daha az olması nedeniyle haftalık tolere edilebilen maksimum doz miktarı PAK'a göre % 70-80 daha fazladır (Işık, 2013).

AB, kanserli hastalarda intravenöz ilaç verilmesi için geliştirilmiş, düzenleyicilerin FDA onaylı tek örneğidir. 6 aylık adjuvant kemoterapiden sonra kombinasyon kemoterapisinde başarısız olan veya nükseden metastatik meme kanseri hastalarının kullanımı için geliştirilmiştir. PAK'ın kandaki zayıf çözünürlüğünün üstesinden gelmektedir ve 30 dakikalık bir süre boyunca hastaların %50 daha fazla PAK almalarını sağlamaktadır (Bartels ve Wilson, 2004; Garber.,



2004). Gemcitabin ile kombinasyon halinde pankreasın metastatik adenokarsinomasına sahip hastaların birinci basamak tedavisi için ve karboplatin ile kombinasyon halinde lokal olarak ilerlemiş veya metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanserine sahip hastaların birinci basamak tedavisi için de tanımlanmıştır (Kudlowitz ve Muggia, 2014). AB, tek başına PAK'a göre daha büyük bir terapötik indekse sahiptir. Geleneksel PAK tedavisine göre daha az toksisite ile daha yüksek dozlarda uygulanabilmektedir (Gradishar ve ark., 2005; Socinski ve ark., 2012; Iwamoto, 2013). AB, mesane ve multipl miyelom gibi diğer kanserler için klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir (Merlot, 2014).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

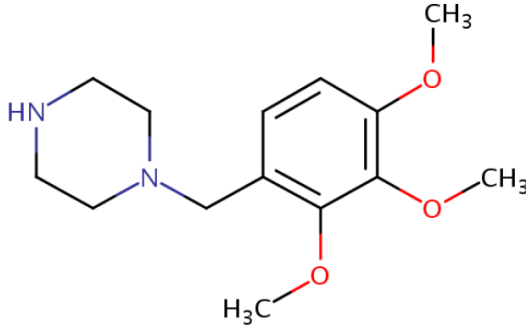
##### 3.1.1 Trimetazidin dihidroklorid

Çalışmamızda etken madde olarak Sigma marka trimetazidin dihidroklorid kullanılmıştır. Trimetazidin dihidrokloridin kimyasal yapısı Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

Kimyasal Adı (IUPAC): 1-[(2,3,4-trimethoxyphenyl)methyl]piperazine;dihydrochloride

Kapalı Formül:  $C_{14}H_{24}Cl_2N_2O_3$

Molekül Ağırlığı: 339.3 g/mol



Şekil 3.1 Trimetazidinin kimyasal yapısı

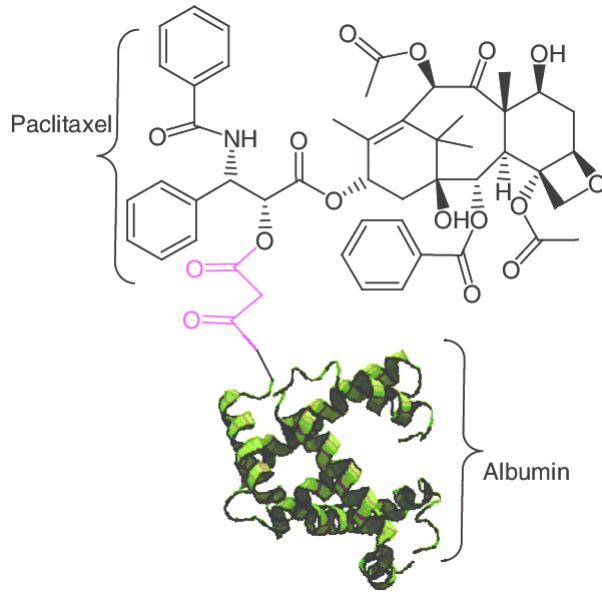
##### 3.1.2 Abraksan

Çalışmamızda mem kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapotik bir madde olan albumine bağlı bir paklitaksel olan abraxsan kullanılmıştır (Şekil 3.2).

Kimyasal Adı (IUPAC): [(1*S*,2*S*,3*R*,4*S*,7*R*,9*S*,10*S*,12*R*,15*S*)-4,12-diacetyloxy-15-[(2*R*,3*S*)-3-benzamido-2-hydroxy-3-phenylpropanoyl]oxy-1,9-dihydroxy-10,14,17,17-tetramethyl-11-oxo-6-oxatetracyclo[11.3.1.0<sup>3,10</sup>.0<sup>4,7</sup>]heptadec-13-en-2-yl] benzoate

Kapalı Formül:  $C_{47}H_{51}NO_{14}$

Molekül Ağırlığı: 853.9 g/mol



**Şekil 3.2** Abraksanın kimyasal yapısı

### 3.1.3 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

Bu tampon, MCF-7 hücre hatlarının pasajlanması sırasında hücreleri yıkamak için kullanılmıştır ve Gibco'dan temin edilmiştir.

### 3.1.4 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)

Hücreleri büyütülmesi, çoğaltılması gibi hücre kültürü uygulamalarında ve dondurulup saklanması gibi diğer işlemlerde ATCC'den alınan EMEM besiyeri kullanılmıştır.

### 3.1.5 Fetal Bovine Serum (FBS)

Gibco marka Fetal Bovine Serum, %10 oranında hücrelerin kültüre edildiği ve dondurulduğu EMEM besiyerine eklenmiştir.

### 3.1.6 Penisilin/Streptomisin Antibiyotiği

Penisilin/Streptomisin antibiyotik solüsyonu, bakteriyel kontaminasyonu kontrol etmek için hücre kültürü ortamına ek olarak kullanılan ikili bir antibiyotik solüsyonudur. Gibco marka penisilin/streptomisin antibiyotiği hücrelerin kültüre edildiği ve dondurulduğu EMEM besiyerine eklenmiştir.

### 3.1.7 Tripsin-EDTA

Hücre pasajlanması ve hasatı sırasında hücrelerin yapıştığı kültür kaplarından kalkmasını ve ayrılmasını sağlamak amacıyla, Lonza marka Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılmıştır. Bu solüsyon hücre ile kültür kabı arasında oluşan protein

bağlarını, lizin ve arjinin aminoasitlerinin olduğu yerden parçalayan bir serin proteaz enzimidir.

### **3.1.8 Tripan Mavisi**

Hücreler pasajlanırken, hücre ekimi yapılırken ve hücreler dondurulurken hücre sayısını belirlemek ve hücre canlılığını ölçmek için hücreler Gibco marka tripan mavisi ile boyanmıştır.

### **3.1.9 Dimetil Sülfoksit (DMSO)**

Hücreleri sıvı azot buhar fazında dondurularak saklanması amacıyla besiyerindeki hücre süspansiyonunun içerisine kryoprotektif bir ajan olarak Merck marka DMSO eklenmiştir. Çalışmamızda ayrıca çözücü olarak MTT testinde de kullanılmıştır.

### **3.1.10 Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)**

Çalışmamızda hücre canlılığı ve sitotoksitenin ölçülmesinde kullanılan MTT testinde, membran geçirgen bir boya olan Sigma marka thiazolyl blue tetrazolium bromide kullanılmıştır.

### **3.1.11 Akridin Oranj (AO)**

Çalışmamızda apoptozu belirlemek için yapılan deneylerde hücreleri boyamak için Invitrogen marka akridin oranj solüsyonu kullanılmıştır.

### **3.1.12 Ethidium Bromür (EB)**

Çalışmamızda apoptozu belirlemek için yapılan deneylerde hücreleri boyamak için Sigma marka Ethidium Bromür kullanılmıştır.

### **3.1.13 Mitomisin-C (MMC)**

Çalışmamızda hücre göçünü (migrasyon) belirlemek için yapılan deneylerde hücrelerin proliferasyonunu engellemek için Sigma marka Mitomisin-C kullanılmıştır.

### **3.1.14 ATP Kiti**

Çalışmamızda ATP miktarlarının belirlenmesi için Biovision marka ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit kullanılmıştır.

## **3.2 Kullanılan Cihazlar**

### **3.2.1 Karbondioksit (CO<sub>2</sub>)'li İnkübatör**

Hücrelerin uygun sıcaklık, nem ve pH ortamında çoğaltılması ve kültürlerin devam ettirilmesi için CO<sub>2</sub>'li inkübatör kullanılmıştır. Çalışmamızda CO<sub>2</sub> inkübatörü olarak Memmert Inco 108 kullanılmıştır.

### **3.2.2 Biyogüvenlik Kabini**

Hücrelerin kültür ortamına ekimi, test solüsyonlarının hazırlanıp kültürle eklenmesi ve bu işlemler esnasında oluşabilecek kontaminasyonu engellemek için Clean Air by Baker BioVanguard B Greenline marka biyogüvenlik kabini kullanılmıştır.

### **3.2.3 Invert Mikroskop**

Hücrelerin kültürleri devam ederken hücrelerin çoğalmalarının ve morfolojilerinin incelenmesinde ZEISS marka Primo Vert model invert mikroskop kullanılmıştır.

### **3.2.4 Floresan Mikroskop**

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan akridin oranj-etidium bromür boyamasında hücrelerin görüntülenmesi için Leica marka DM2500 model floresan mikroskop kullanılmıştır.

### **3.2.5 Hücre Sayım Cihazı**

Çalışmada kullanılan hücreler tripan mavisi boyası ile boyanarak canlı, ölü ve toplam hücre sayıları ve canlılık oranları masa üstü İnvitrogen marka hücre kültür sayımı cihazı ile otomatik olarak belirlenmiştir.

### **3.2.6 Su Banyosu**

Daihan marka su banyosu hücrelerin split, ekim ve dondurulma işlemlerinde kullanılan solüsyonların ısıtılarak uygun sıcaklığa getirilmesi ve testlerde kullanılan hücrelerin çözündürülmesi için kullanılmıştır.

### **3.2.7 Vorteks Karıştırıcı**

Çalışmada kullanılan kimyasalların hazırlanması sırasında, konsantrasyonların dairesel salınım hareketi ile homojenize edilerek karıştırılması amacıyla Stuart marka vorteks karıştırıcı kullanılmıştır.

### 3.2.8 Santrifüj

Hücre süspansiyonlarındaki hücreleri çöktürmek amacıyla MPW-351R marka santrifüj kullanılmıştır.

### 3.2.9 Hassas Terazi

Çalışmamızda kullanılan kimyasalların tartılması amacıyla, Radwag marka terazi kullanılmıştır.

### 3.2.10 Mikroplaka Okuyucu

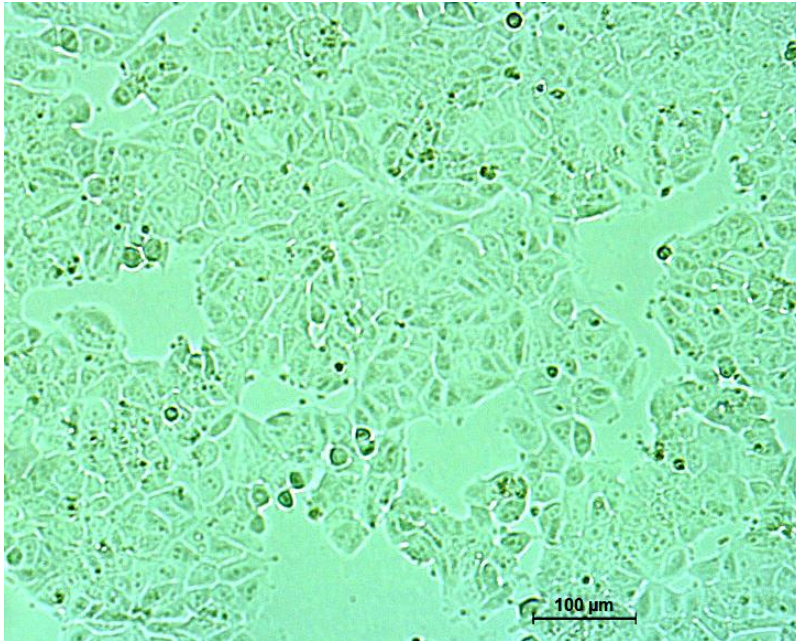
Hücrelerin kimyasallar ile maruziyetinden sonra MTT testi ile canlılıklarının kolorometrik olarak ölçülmesinde BioTek marka mikroplaka okuyucu kullanılmıştır.

## 3.3 Hücre Kültürü

### 3.3.1 Kullanılan Hücre Hattı

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında in vitro model olarak MCF-7 (ATCC® HTB-22™) meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır (Şekil 3.3). 69 yaşında beyaz bir bayan hastanın meme epitel dokusundan elde edilmiş olan MCF-7 hücre hattı American Type Cell Culture'dan (ATCC) temin edilmiştir. MCF-7 hücreleri ER/PR pozitif ve HER2 negatiftir.

Yapılan deneylerle TMZ ve/veya AB'nin MCF-7 hücrelerinin sitotoksiste, apoptoz, göç ve ATP miktarları üzerindeki etkilerinin test edilmesi hedeflenmiştir.



Şekil 3.3 Çalışmamızda kullanılan MCF-7 hücreleri

### 3.3.2 Hücre Kültürünün Yönetimi

MCF-7 hücreleri %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin antibiyotiği ile zenginleştirilmiş EMEM besiyerinde 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kültür kaplarında çoğaltılmıştır. Hücreler her gün invert mikroskopta gözlenmiş, kontrolleri yapılmış ve besiyerleri haftada iki defa değiştirilmiştir.

### 3.3.3 Hücre Hattının Çözülmesi

MCF-7 hücreleri, -196°C sıvı azot bulunan tankta, buhar fazında muhafaza edilmiştir. Kültür zamanı geldiğinde, sıvı azot tankında bulunan dondurulmuş hücreler kullanılmak için sıvı azottan çıkarılarak, 37°C sıcaklıktaki su banyosunda hızlıca çözülmüştür. Hücrelerin dondurulduğu ortamda bulunan DMSO ve FBS'i uzaklaştırılmak için, çözünen hücreler 15 ml'lik santrifuj tüpüne aktarılıp üzerine besiyeri eklenmiştir ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifuj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin bulunduğu pellet kısmına taze besiyeri eklenerek flaska ekim yapılmıştır. %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücreler her gün invert mikroskop altında incelenmiş ve besiyerleri haftada iki kez değiştirilmiştir. Bu işleme hücreler konfluent (%80 yoğunluk) duruma ulaşana kadar devam edilmiştir.

### 3.3.4 Hücrelerin Pasajlanması

MCF-7 hücreleri konfluent (%80 yoğunluk) duruma ulaştığında, hücreler flasktan kaldırılarak ve ayrılarak yani split edilerek yeni kültür kaplarına ekim yapılmıştır. Pasajı yapılacak hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler DPBS ile yıkanmıştır. Hücrelere tripsin eklenerek flask 5 dk 37 °C'lik CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletilmiş ve hücrelerin yüzeyden kaldırılmaları sağlanmıştır. Bekleme süresi dolduktan sonra, tripsinin etkisini yok etmek amacıyla tripsin ile eşit miktarda besiyeri flaska eklenmiştir. Flaskın içindeki karışım birkaç kez pipetle resüspanse edilmiş ve 15 ml'lik falkon tüpüne aktarılarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifuj edilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra tüpte kalan pellet üzerine taze besiyeri eklenerek süspanse edilmiştir. Eşit miktarda hücre süspanasyonu (10 µl) ve tripan mavisi boyası (10 µl) karıştırılmış ve bu karışımın 10 µl'si hücre sayım cihazının lamına aktarılarak 1 ml'deki canlı hücre sayısı, ölü hücre sayısı ve canlılık değerleri (%) belirlenmiştir. Sayım sonrası hücre süspanasyonu ve besiyeri yapılacak çalışmanın amacına uygun oranda pipetlenerek yeni ekimler yapılmıştır ve hücreler

inkübasyona bırakılmıştır. Yeterli hücre sağlanıncaya kadar ekim yapılmaya devam edilmiştir. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı uygulanacak testlerde kullanılmış bir kısmı ise dondurularak saklanmıştır.

### **3.3.5 Hücre Hattının Dondurulması**

Hücrelerin gereğinden fazla pasajlanmasını önlemek, hücrelerin değişimini önlemek, dönüşü olmayan genetik bozulmalara sebep olmamak ve deneylerde aynı ya da yakın pasaj numaralı hücreler kullanmak amacıyla hücreler sıvı azotta dondurularak stoklanmıştır. Hücreler, 1 ml'de bir milyon hücre olacak şekilde, %5 DMSO içeren besiyeri içerisinde kriyojenik tüplere alınmıştır. Tüpler önce 1 günlüğüne -80 °C'de tutulmuş, daha sonra sıvı azot tankı içerisine transfer edilmiştir.

### **3.4 Deney Planı ve Deney Grupları**

Deneylerimizde negatif kontrol ve TMZ ve/veya AB grupları oluşturulmuştur ve 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet süresi uygulanmıştır.

#### **3.4.1 Negatif Kontrol Grubu**

TMZ ve ABS saf suda çözülerek kullanıldığı için, negatif kontrol grubu kültürleri uygun hacimlerde (besiyerinin %10'u kadar) saf su ilave edilerek inkübe edilmiştir.

#### **3.4.2 Trimetazidin (TMZ) Grubu**

TMZ konsantrasyonlarının hazırlanması için öncelikle bir stok çözeltisi oluşturulmuş ve seyreltme işlemi uygulanarak farklı konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Kültürlere 0 mM, 0.005 mM, 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM ve 2 mM TMZ konsantrasyonları eklenerek MTT testi yapılmıştır. MTT testinin sonuçları değerlendirilerek hem hücre canlılığı hem inhibitör konsantrasyon (IC50) değerleri, hem de sonraki testlerde kullanılacak TMZ konsantrasyonları belirlenmiştir.

MTT deneyleri sonucu karar verilen TMZ'in 3 farklı konsantrasyonu, besiyerinin %10'u kadar hacimde hücre kültürlerine ilave edilmiş ve kültürler 24, 48 ve 72 saatliğine TMZ ile inkübe edilmiştir.



### 3.4.3 Abraksan (AB) Grubu

AB konsantrasyonlarının hazırlanması için öncelikle bir stok çözeltisi oluşturulmuş ve seyreltme işlemi uygulanarak farklı konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Kültürlere 0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  AB konsantrasyonları eklenerek MTT testi yapılmıştır. MTT testinin sonuçları değerlendirilerek hem hücre canlılığı hem inhibitör konsantrasyon ( $\text{IC}_{50}$ ) değerleri, hem de sonraki testlerde kullanılacak AB konsantrasyonu belirlenmiştir.

MTT deneyleri sonucu karar verilen AB konsantrasyonu besiyerinin %10'u kadar hacimde hücre kültürlerine ilave edilmiş ve kültürler 24, 48 ve 72 saatliğine inkübe edilmiştir.

### 3.4.4 Trimetazidin+Abraksan Grubu

Kültürler MTT deneyleri sonucu karar verilen AB ve üç farklı TMZ konsantrasyonu ile birlikte, besiyerinin %10'u kadar hacimde hücre kültürlerine ilave edilmiş ve kültürler 24, 48 ve 72 saatliğine inkübe edilmiştir.

### 3.5 MTT Testi

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) testi, hücre canlılığını ve metabolik aktiviteyi ölçen, hızlı, kantitatif, tekrarlanabilir, kolorimetrik bir testtir (Doyle ve Griffiths, 1998; Çetin ve Bullerman, 2005). İlaç duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan MTT testi yeni antikanser ilaç taramalarında da kullanılmaktadır (Campling ve ark., 1991). Tetrazolium tuzunun sadece metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesinden dolayı bu yöntem sadece canlı hücreleri saptar. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olup fenol kırmızısı içermeyen medyum veya tuz solüsyonlarında hazırlandığında sarımtırak bir solüsyon oluşturur. Tetrazolium halkasının dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu MTT, mor renkli çözünmeyen formazana dönüşür. Oluşan bu formazan izopropanol, DMSO veya başka bir çözücü yardımı ile çözünebilir hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir (Denizot ve Lang, 1986; Doyle ve Griffiths, 1998; Subhashini ve ark., 2005).

MTT testi ile çalışmamızda kullanacağımız TMZ ve AB'nin konsantrasyonları belirlenerek, bunların MCF-7 hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her bir kuyucukta  $1 \times 10^4$  sayıda olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler deney gruplarında belirtildiği şekilde saf su (negatif kontrol) ve farklı TMZ ve/veya AB konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Hücreler, negatif kontrol olan saf su ile ve saf suda çözülerek hazırlanan stok TMZ ve AB çözeltileri ve bu çözeltilerden seri sulandırma ile oluşturulan değişik konsantrasyonlardan oluşan çalışma solüsyonları ile 24, 48 ve 72 saatliğine muamele edilmiştir. Başlangıçta TMZ için 2000 mM stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra uygun şekilde seyreltme yapılarak hücreler 0 mM, 0.005 mM, 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM ve 2 mM TMZ konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. AB için öncelikle 100  $\mu$ M'luk stok bir çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra uygun şekilde seyreltme yapılarak hücreler 0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M AB konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saatliğine muamele edilmiştir. Aynı şartlarda ilaçsız inkübe edilen hücreler negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sonrasında, kuyucuklara PBS içerisinde hazırlanmış 20  $\mu$ l MTT solüsyonu (%5'lik) eklenmiştir. Kültür kabındaki hücreler 3 saat 37 °C'de inkübatörde bekletilmiş ve daha sonra içerisinde MTT solüsyonu bulunan besiyeri aspire edilmiştir. Süre sonunda MTT ile oluşan formazan kristallerini çözmek için kuyucuklara 100'er  $\mu$ L DMSO eklenerek 15 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Her bir kuyucuk mikropłaka okuyucu ile 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Okunan absorbans değerlerine göre hücre canlılığı ve sitotoksite düzeyleri şu formüllere göre hesaplanmıştır:

**Hücre canlılığı (%)** = (Ortalama doğrulanmış mualeme kuyucuğunun absorbans değeri/Ortalama doğrulanmış kontrol kuyucuğunun absorbans değeri)X100.

**Sitotoksisite (% İnhibisyon)** = 100 - (Ortalama doğrulanmış mualeme kuyucuğunun absorbans değeri/Ortalama doğrulanmış kontrol kuyucuğunun absorbans değeri)X100

Kontrol kuyucuklarından elde edilen değerlerin ortalaması %100 canlı hücre olarak kabul edilmiştir. Muamele kuyucuklardan elde edilen değerleri kontrol değerlere oranlanarak yüzde olarak hücre canlılığı ve sitotoksosite belirlenmiştir. MTT deneyleri farklı zamanlarda 3 kez tekrarlanmıştır.

Kontrole göre %50 oranında sitotoksosite gösteren konsantrasyon (İnhibitör Konsantrasyon=IC50 değeri) sitotoksik doz olarak kabul edilmiştir.

### **3.6 Akridin Oranj (AO) ve Ethidium Bromid (EB) Boyama**

Sitotoksosite değerlendirilmesi kapsamında hücre ölüm tipinin belirlenmesi amacıyla MCF-7 hücre kültüründe AO-EB boyaması yapılmıştır. Bu yöntemle canlı, apoptotik ve nekrotik hücreler arasındaki ayırım yapılabilmektedir ve floresan boyalar olan AO ve EB'nin hücreler tarafından farklı alınımı ile çekirdekteki kromatin yoğunlaşmasının morfolojik değişimlerini göstermektedir. AO hem canlı hem de ölü hücreleri boyayan vital bir boya iken EB membran hasarı meydana geldiğinde hücreleri boyar. Normal nükleer kromatine sahip canlı hücreler parlak ve bütün bir çekirdeğe sahiptir (fragmentsiz) ve yeşil görünür. Erken apoptotik hücrelerin membran yapısı tam olarak bozulmamıştır. Bu hücreler de yeşil görünür ancak DNA'sı parçalanmaya başladığı için (fragmentli) kromatin yoğunlaşmış olarak görünür. Geç apoptotik hücreler parçalanmış nükleer kromatin içerirler (fragmentli) ve turuncu görünürler. Nekrotik hücreler ise parçalanmamış (fragmentsiz), normal nükleer kromatine sahiptir ve parlak kırmızı görünürler (Takahashi ve ark. 2004; Kasibhatla et al, 2006; Keleştemur, 2016; Dindaroğlu, 2019).

Test için 24 bölmeli kültür kapları kullanılmıştır. Her bölmeye steril edilmiş yuvarlak lameller konulmuş ve hücrelerin lameller üzerinde büyüebilmesi için lameller attachment faktör ile kaplanmıştır. Her bölmeye 25.000 MCF-7 hücresi ekilmiştir ve hücreler MTT testi sonucu belirlenen konsantrasyonlarda TMZ (50, 100 ve 250  $\mu$ M) ve/veya AB (1  $\mu$ M) ile birlikte 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiştir. Muamele süresi sonunda, bölmelerde bulunan yuvarlak lameller lam üzerine alınmış ve üzerlerine 20  $\mu$ l AO-EB (100  $\mu$ g/ml AO ve 100  $\mu$ g/ml EB) karışımı damlatılmıştır. Boyanmış hücrelerin hemen floresan mikroskopta fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraf çekimlerinde hücrelerin sitoplazmalarında bulunan fragmentlerin görünür ve en az 100 hücre sayılacak şekilde çekim yapılmasına dikkat edilmiştir.

Her bir deney grubundan 100 hücre sayılmış ve hücrelerin analizleri şu şekilde yapılmıştır:

Yeşil içi parlak hücreler: Canlı hücreler (içinde fragment yok ya da parçacıklı değil). Yeşil-içinde fragment ya da granüller olanlar: Erken apoptotik hücreler.

Turuncu-kırmızı içinde fragment ya da granüller olanlar: Apoptotik hücreler.

Turuncu-kırmızı içi parlak: Nekrotik hücreler (içinde fragment yok ya da parçacıklı değil).

Apoptosis yüzdesi şu formüle göre hesaplanmıştır:

**%Apoptosis** = (Erken apoptotik hücreler+apoptotik hücreler)/sayılan toplam hücre sayısı×100%).

### 3.7 Yara İyileşmesi Testi (Wound Healing Assay)

Yara iyileştirme deneyi, hücre göçünün araştırılması için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir ve bu çalışmada TMZ ve/veya AB'nin MCF-7 hücrelerinin göçü üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullanılmıştır.

Hücreler 6 bölmeli kültür kaplarına her bölmede 50.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Bölmelerdeki hücreler konfluent (%80) olduklarında orta hattın solu ve sağından pipet ucuyla çizgiler oluşturulmuştur. Daha sonra besiyeri aspire edilip hücreler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Hücreler 5 µg/ml Mitomisin-C içeren serumsuz besiyeri içinde TMZ (50, 100 ve 250 µM) ve/veya AB (1 µM) AB ile muamele edilmiştir. Çizgi oluşturulan bölgelerin hemen fotoğrafları çekilerek 0. saat çekimleri tamamlanmıştır. Aynı bölgelerin fotoğrafları 24., 48. ve 72. saatte de çekilerek proliferasyondaki değişim kontrol edilmiştir. Deney sonunda fotoğraflardaki çizik atılarak oluşturulan boşlukların alanları ImageJ yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

Hücrelerin göç hızı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\text{Göç oranı (\%)} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

Bu formülde; A<sub>0</sub>: Çizik atıldıktan hemen sonra ölçülen alan (0. saat) ve A<sub>t</sub>: Her muamele süresi (24, 48 ve 72 saat) sonunda ölçülen alanı göstermektedir.

### 3.8 ATP Miktarının Ölçümü

ATP miktarları kolorimetrik yöntem ile belirlenmiştir. Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her bir bölmede 1x10<sup>4</sup> sayıda olacak şekilde ekilmiştir. TMZ ve/veya ABS ile muamele edilen hücreler ve kontrol hücreleri TMZ (50, 100 ve 250 µM) ve/veya AB (1 µM) AB ile 24, 48 ve 72 saatliğine inkübasyona bırakılmıştır.

ATP miktarlarının ölçülmesi amacıyla satın alınan Biovision marka ATP Colorimetric/Fluorometric Assay kitinin katalog bilgileri doğrultusunda işlemler yapılmıştır. 96 kuyucuklu bölmelerdeki absorbans değerleri 570 nm'de mikropilaka okuyucuda cihazda okutulmuştur. Hem kontrol hem de muamele gruplarına ait absorbans değerlerine göre hücrelerdeki ATP miktarları nmol olarak belirlenmiştir.

### **3.9 İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi**

Deneyler üç kez tekrarlanmıştır ve veriler üç tekrarın ortalaması ve  $\pm$  standart hatası (SE) olarak ifade edilmiştir. İnceleme sonucunda elde edilen tüm verilerin homojenliği ve grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı SPSS programı kullanılarak tek yönlü varyans analiz metodu (ANOVA) ile belirlenmiştir. Farkın önemli olduğu gruplarda ise, elde edilen sonuçlar GraphPad Prism 8 yazılımı (San Diego, CA, USA) kullanılarak Student's t-testi ile karşılaştırılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

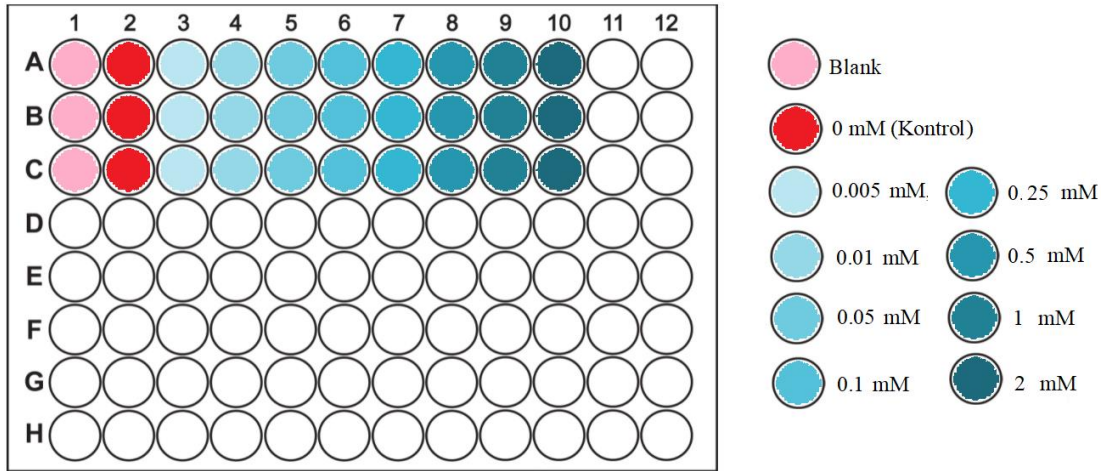
## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Bulgular

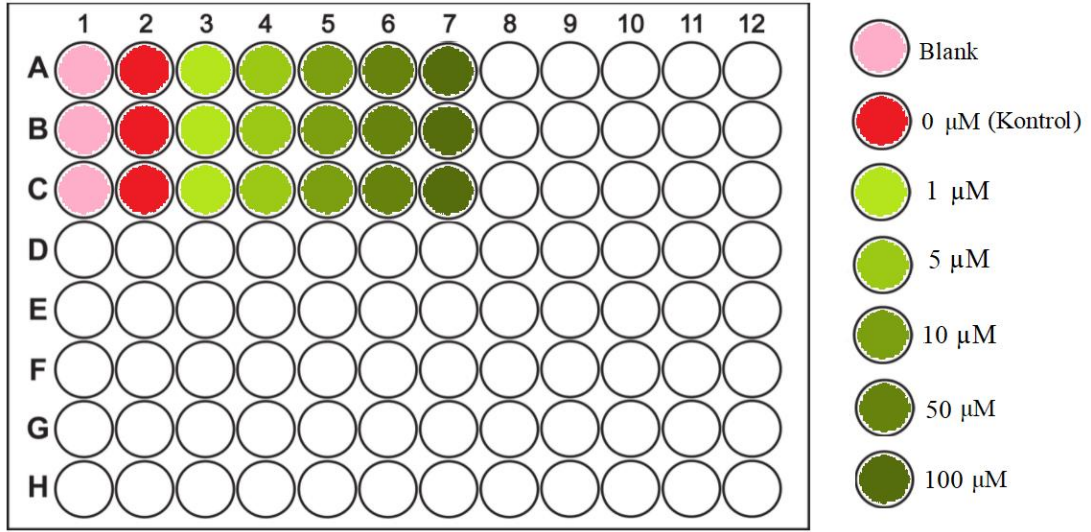
TMZ ve/veya AB'nin MCF-7 hücre kültürlerinde sitotoksikite, apoptoz, hücre göçü ve ATP miktarı üzerindeki olası etkilerini araştırmak amacıyla uygulanan MTT testi, AO-EB boyaması, yara iyileşmesi testi ve ATP miktar analizi sonuçları detaylı şekilde aşağıda verilmiştir. Elde edilen veriler grafiklendirilip tablolar oluşturulmuştur ve istatistiksel analizler uygulanarak veriler değerlendirilmiş ve yorumlanmıştır.

#### 4.1.1 MTT Testi Sonuçları

MTT testi ile mitokondriyal aktivite ölçülerek TMZ ve/veya AB'nin çeşitli maruziyet süreleri sonrası, kuyucuklardaki canlı hücrelerin oranını nasıl etkilediği belirlenmiştir. Hücreler TMZ ve/veya AB'nin farklı konsantrasyonları ile 24, 48, 72 saatliğine muamele edilmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Uygulamadan sonra MTT testi protokolündeki işlemler gerçekleştirilmiştir ve 570 nm'de mikropılaka okuyucu ile absorbans değerleri okunmuştur.



Şekil 4.1 TMZ konsantrasyonlarının 96 kuyucuklu kültür kaplarında MTT testi için yapılan uygulama planı



**Şekil 4.2** AB konsantrasyonlarının 96 kuyucuklu kültür kaplarında MTT testi için yapılan uygulama planı

24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sürelerinin sonunda elde edilen sonuçlara göre, tekrarlı olarak uygulanan konsantrasyonların ortalama değerleri blank değerinden (sadece besiyerinin absorban değerini) çıkarılarak normalizasyon yapılmıştır.

TMZ ile 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sürelerine bırakılan MCF-7 hücrelerinin hücre canlılık değerleri hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Bu değerlerin istatistiksel olarak karşılaştırılması yapılarak grafiklendirilmiştir (Şekil 4.3).

MTT testinde TMZ'nin 24 saatlik maruziyeti sonucu MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığı değerleri konsantrasyon artışına bağlı olmayan azalmalar göstermiştir. Test edilen hiçbir TMZ konsantrasyonu hücre canlılığı değerini %50'nin altına düşürmemiştir. Hücre canlılığında görülen azalmalardan, sadece en yüksek iki konsantrasyonda gözlenen azalmaların negatif kontrole göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.3).

48 saatlik TMZ maruziyeti sonucunda, 24 saatlik uygulamaya benzer bir şekilde hücre canlılığında konsantrasyon artışına bağlı olmayan düşüşler tespit edilmiştir. Test edilen TMZ konsantrasyonlarından hiçbirisi hücre canlılığı değerini %50'nin altına düşürmemiştir. 48 saatlik uygulama süresinde düşük iki konsantrasyon (0.005 ve 0.01 mM) hariç, test edilen diğer konsantrasyonlarda hücre

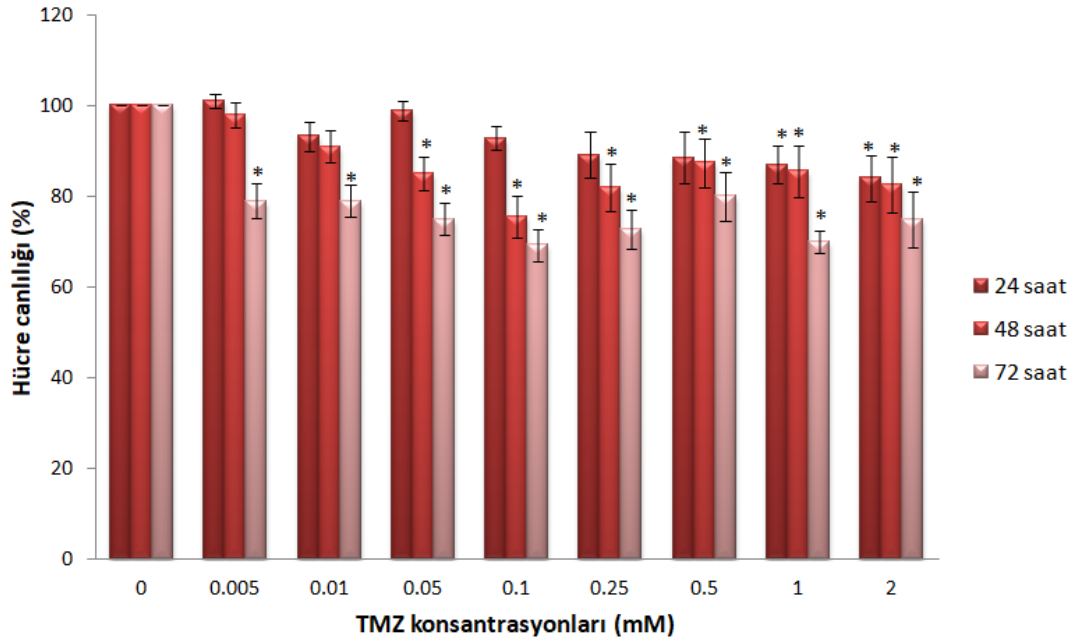
canlılığında gözlenen düşüşler negatif kontrole göre istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.3).

72 saatlik TMZ muamelesi sonrasında hücre canlılığı değerlerine bakıldığında, diğer muamele sürelerinde görüldüğü gibi konsantrasyon artışına bağlı olmayacak şekilde hücre canlılığı değerlerinin azaldığı görülmüştür. Hiçbir TMZ konsantrasyonu hücre canlılığını %50'nin altına düşürmese de, 72 saatlik muamele önceki muamele sürelerine göre hücre canlılığı değerlerini daha fazla düşürmüştür. Hücre canlılığı değerleri negatif kontrole göre kıyaslandığında test edilen tüm TMZ konsantrasyonunda istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.3).

**Çizelge 4.1** TMZ konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetleri sonucu elde edilen verilerden hesaplanan hücre canlılığı (%) değerleri

Konsantrasyonlar (mM)	24 saat Hücre canlılığı (%)	48 saat Hücre canlılığı (%)	72 saat Hücre canlılığı (%)
0	100	100	100
0.005	101	98	79
0.01	93	91	79
0.05	99	85	75
0.1	93	76	69
0.25	89	82	73
0.5	89	87	80
1	87	86	70
2	87	86	70





**Şekil 4.3** 24, 48 ve 72 saatlik TMZ uygulaması sonrası elde edilen ortalama hücre canlılığı verileri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi

TMZ ile 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sürelerine bırakılan MCF-7 hücrelerinin sitotoksosite değerleri hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Bu değerlerin istatistiksel olarak karşılaştırılması yapılarak grafiklendirilmiştir (Şekil 4.4).

TMZ'nin 24 saatlik maruziyeti sonucu sitotoksitenin konsantrasyona bağlı olmayan artışlar gösterdiği belirlenmiştir. Negatif kontrole göre kıyaslandığında sitotoksosite değerlerinde görülen bu artışların en yüksek iki konsantrasyonda (1 ve 2 mM) istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.4).

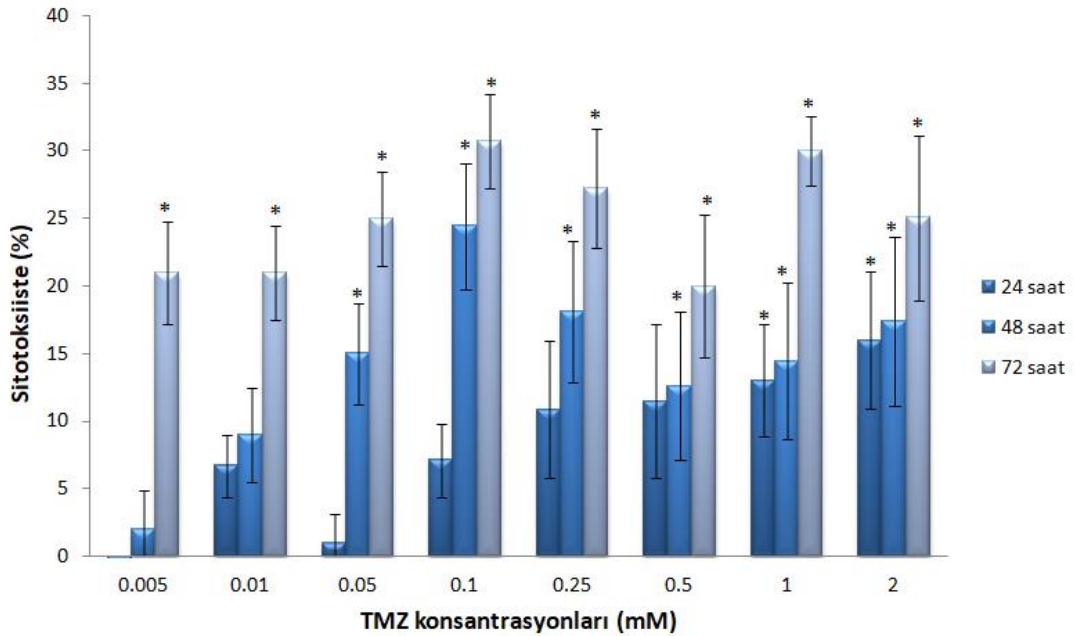
48 saatlik maruziyet süresi sonucunda, TMZ'nin sitotoksitesi 24 saatlik uygulamaya benzer şekilde konsantrasyona bağlı olmayan artışlar göstermiştir. 48 saatlik uygulama süresinde test edilen düşük iki TMZ konsantrasyonu (0.005 ve 0.01mM) hariç diğer konsantrasyonlarda sitotoksitede gözlenen artışlar negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.4).

72 saatlik maruziyet sonrasında, sitotoksitede konsantrasyona bağlı olmayan artışlar görülmüştür. 24 ve 48 saatlik uygulamalara göre, 72 saatlik muamele sonucu

sitotoksitenin daha fazla arttığı belirlenmiştir. Test edilen tüm TMZ konsantrasyonlarında görülen sitotoksosite değerleri negatif kontrol ile kıyaslandığında aralarındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.4).

**Çizelge 4.2** TMZ konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetleri sonucu elde edilen verilerinden hesaplanan sitotoksosite değerleri

Konsantrasyonlar (mM)	24 saat Sitotoksosite (%)	48 saat Sitotoksosite (%)	72 saat Sitotoksosite (%)
0	0	0	0
0.005	-1	2	21
0.01	7	9	21
0.05	1	15	25
0.1	7	24	31
0.25	11	18	27
0.5	11	13	20
1	13	14	30
2	16	17	25

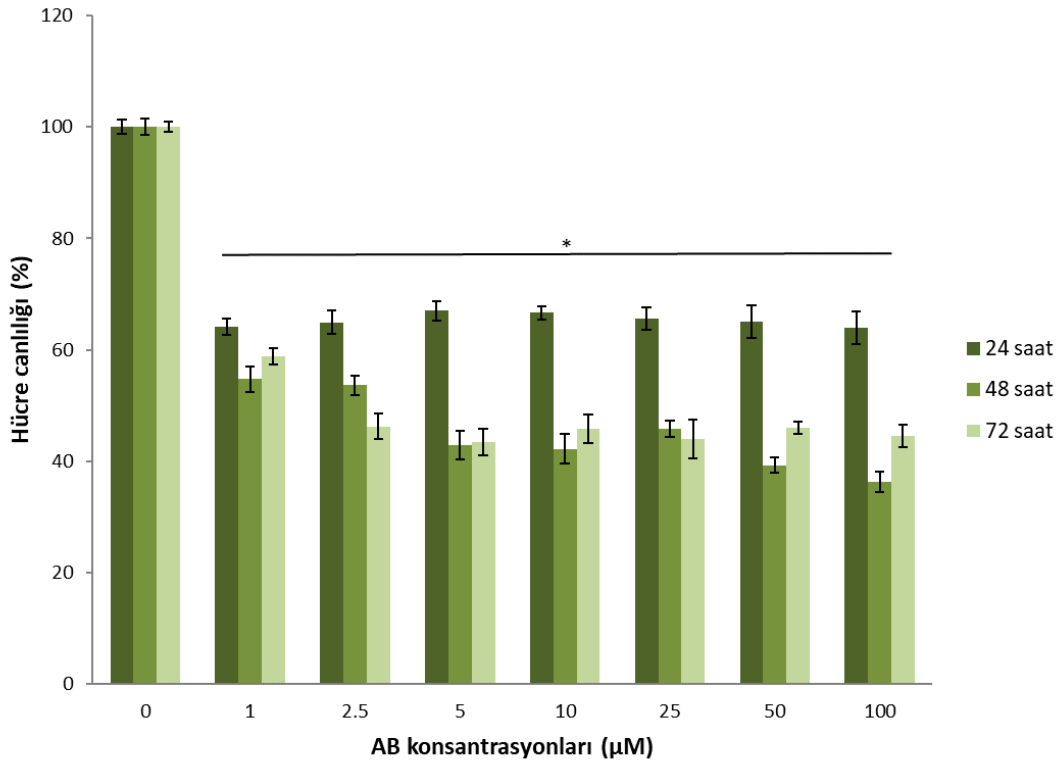


**Şekil 4.4** 24, 48 ve 72 saatlik TMZ muamelesi sonrası elde edilen ortalama sitotoksosite verileri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi

AB ile 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sürelerine bırakılan MCF-7 hücrelerinin canlılıkları hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3’de gösterilmiştir. Bu değerlerin istatistiksel olarak karşılaştırılması yapılarak grafiklendirilmiştir (Şekil 4.5). AB’nin 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetleri sonucu MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığı değerleri konsantrasyon artışına bağlı olmayan azalmalar göstermiştir. 24, 48 ve 72 saatliğine 1, 2, 5, 10, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  AB ile muamele edilen hücrelerin canlılığında görülen tüm azalmaların negatif kontrole göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). 24 saatlik muamelede test edilen hiçbir AB konsantrasyonu hücre canlılığı değerini %50’nin altına düşürmemiştir. 48 saatlik muamelede 5  $\mu\text{M}$  AB muamelesinden sonra, 72 saatlik muamelede ise 1  $\mu\text{M}$  AB muamelesinden sonra hücre canlılığı değerleri %50’nin altına inmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.5).

**Çizelge 4.3** AB konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetleri sonucu elde edilen verilerden hesaplanan hücre canlılığı (%) değerleri

<b>Konsantrasyonlar</b>	<b>24 saat</b>	<b>48 saat</b>	<b>72 saat</b>
<b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Hücre canlılığı (%)</b>	<b>Hücre canlılığı (%)</b>	<b>Hücre canlılığı (%)</b>
0	100	100	100
1	64	55	59
5	65	54	46
10	67	43	43
50	67	42	46
100	66	46	44

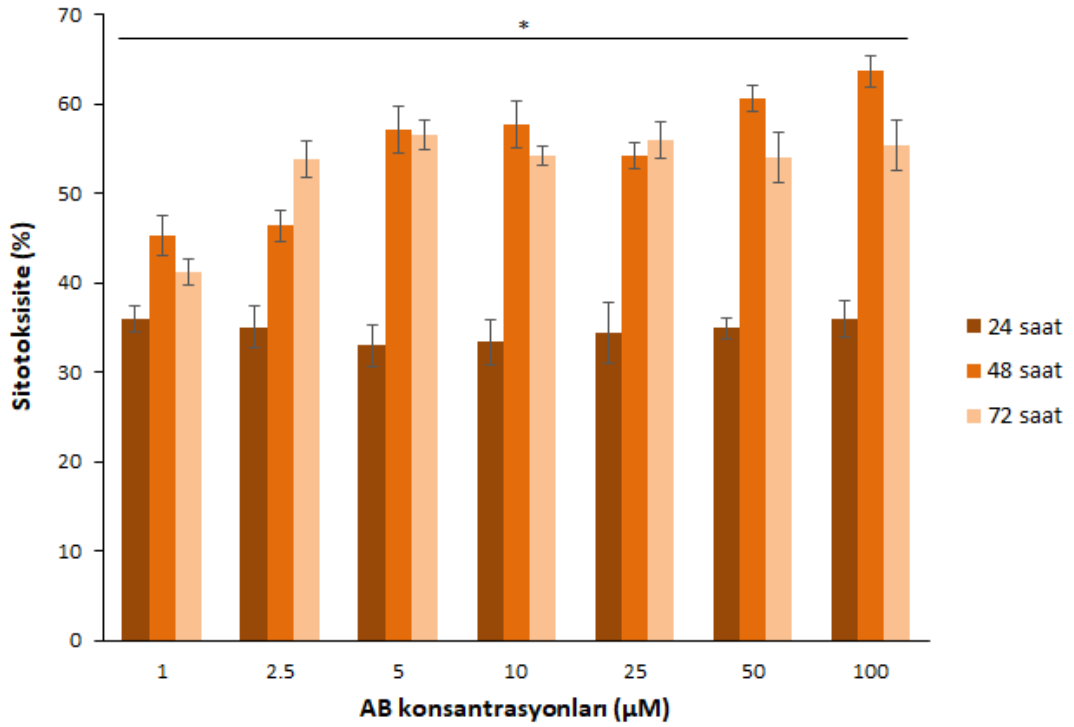


**Şekil 4.5** 24, 48 ve 72 saatlik AB uygulaması sonrası elde edilen ortalama hücre canlılığı verileri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi

AB ile 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet sürelerine bırakılan MCF-7 hücrelerinin sitotoksosite değerleri hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'de gösterilmiştir. Bu değerlerin istatistiksel olarak karşılaştırılması yapılarak grafiklendirilmiştir (Şekil 4.6). 24, 48 ve 72 saatlik AB'nin muamelesi sonucu sitotoksitede konsantrasyon artışına bağlı olmayan artışlar görülmüştür. Negatif kontrole göre kıyaslandığında, sitotoksosite değerlerinde görülen bu artışların test edilen tüm AB konsantrasyonlarında ve tüm muamele sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). 48 saatlik muamelede 5 µM AB muamelesinden sonra, 72 saatlik muamelede ise 1 µM AB muamelesinden sonra sitotoksosite değerleri %50'nin üzerine çıkmıştır (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.6).

**Çizelge 4.4** AB konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetleri sonucu elde edilen verilerden hesaplanan sitotoksosite (%) değerleri

Konsantrasyonlar ( $\mu\text{M}$ )	24 saat Sitotoksosite (%)	48 saat Sitotoksosite (%)	72 saat Sitotoksosite (%)
0	0	0	0
1	36	45	41
5	35	46	54
10	33	57	57
50	33	58	54
100	34	54	56



**Şekil 4.6** 24, 48 ve 72 saatlik AB uygulaması sonrası elde edilen ortalama sitotoksosite verileri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi

24 saatlik AB uygulamasından sonra test edilen hiçbir AB konsantrasyonu hücre canlılığını %50'nin altına düşürmediği ya da sitotoksisiteyi %50'nin üzerine çıkarmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle 24 saatlik muamelede AB için IC50 değeri bulunamamıştır. AB ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde 48 saatlik muamelede

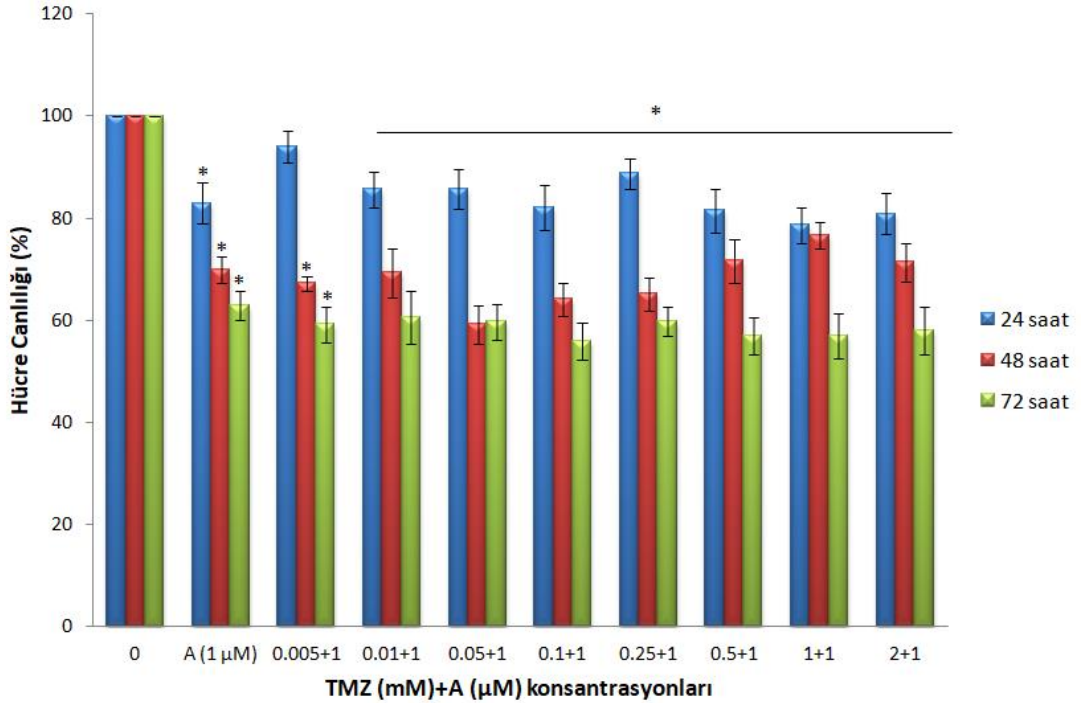
IC50 değeri 3,4  $\mu$ M ve 72 saatlik muamele için IC50 değeri 2  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır. Daha sonraki deneylerde 72 saatlik muamelede belirlenen IC50 değerinin yarısı olan 1  $\mu$ M AB'nin kullanılmasına karar verilmiştir.

1  $\mu$ M AB'nin tek başına 24, 48 ve 72 saatlik maruziyeti sonucu muamele süresinin artışına bağlı olarak MCF-7 hücrelerinin canlılığını düşürdüğünü belirlenmiştir. AB'nin muamelesi sonucu hücre canlılığında görülen düşüşler kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). AB'nin TMZ ile muamelesi sonucu en düşük TMZ konsantrasyonu olan 0.005 mM TMZ+AB'nin 24 saatlik maruziyeti hariç, test edilen tüm AB+TMZ konsantrasyonlarının tüm muamele sürelerinde hücre canlılığı değerlerini düşürdüğü ve hücre canlılığında görülen bu düşüşlerin negatif kontrole göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). AB+TMZ muamelesinin özellikle 72 saatlik muamele süresinde MCF-7 hücrelerinin canlılığını daha fazla düşürdüğü gözlenmiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.7).

İstatistiksel açıdan önemli bulunmamasına rağmen, 24 saatlik AB+TMZ uygulamalarından 0.1 mM TMZ+AB (%82), 0.5 mM TMZ+AB (%82), 1 mM TMZ+AB (%79) ve 2 mM TMZ+AB (%81) maruziyetlerinin hücre canlılığı değerlerini tek başına AB'nin (%83) neden olduğundan daha fazla düşürdüğü görülmüştür. 0.005 mM TMZ+AB, 0.01 mM TMZ+AB, 0.05 mM TMZ+AB, 0.1 mM TMZ+AB ve 0.25 mM TMZ+AB'nin 48 saatlik muamelesi sonucu elde edilen hücre canlılığı değerleri sırasıyla %67, %69, %59, %64 ve %65 olarak bulunmuştur. Bu değerler tek başına AB'nin 48 saatlik muamelesi sonucu gözlenen hücre canlılığı değeri olan %70'den daha düşüktür. 72 saatlik TMZ+AB uygulamalarından elde edilen tüm hücre canlılığı değerleri ise, AB'nin tek başına yol açtığından (%63) daha düşük olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.7). Bu sonuçlar özellikle uzun süreli muamelelerde TMZ'nin AB'nin etkinliğini artırabileceğini ve daha fazla MCF-7 hücresinin ölümüne yol açabileceğini göstermektedir.

**Çizelge 4.5** AB ve AB+TMZ'nin 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetleri sonucu elde edilen verilerinden hesaplanan hücre canlılığı değerleri

Konsantrasyonlar	24 saat	48 saat	72 saat
	Hücre Canlılığı (%)	Hücre Canlılığı (%)	Hücre Canlılığı (%)
0	100	100	100
A (1 $\mu$ M)	83	70	63
0.005 mM TMZ+ A (1 $\mu$ M)	94	67	59
0.01 mM TMZ+ A (1 $\mu$ M)	86	69	61
0.05 mM TMZ+ A (1 $\mu$ M)	86	59	60
0.1 mM TMZ+ A (1 $\mu$ M)	82	64	56
0.25 mM TMZ+ A (1 $\mu$ M)	89	65	60
0.5 mM TMZ+ A (1 $\mu$ M)	82	72	57
1 mM TMZ+ A (1 $\mu$ M)	79	77	57
2 mM TMZ+ A (1 $\mu$ M)	81	71	58



**Şekil 4.7** 24, 48 ve 72 saatlik AB ve TMZ+AB uygulaması sonrası elde edilen ortalama hücre canlılığı verileri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi

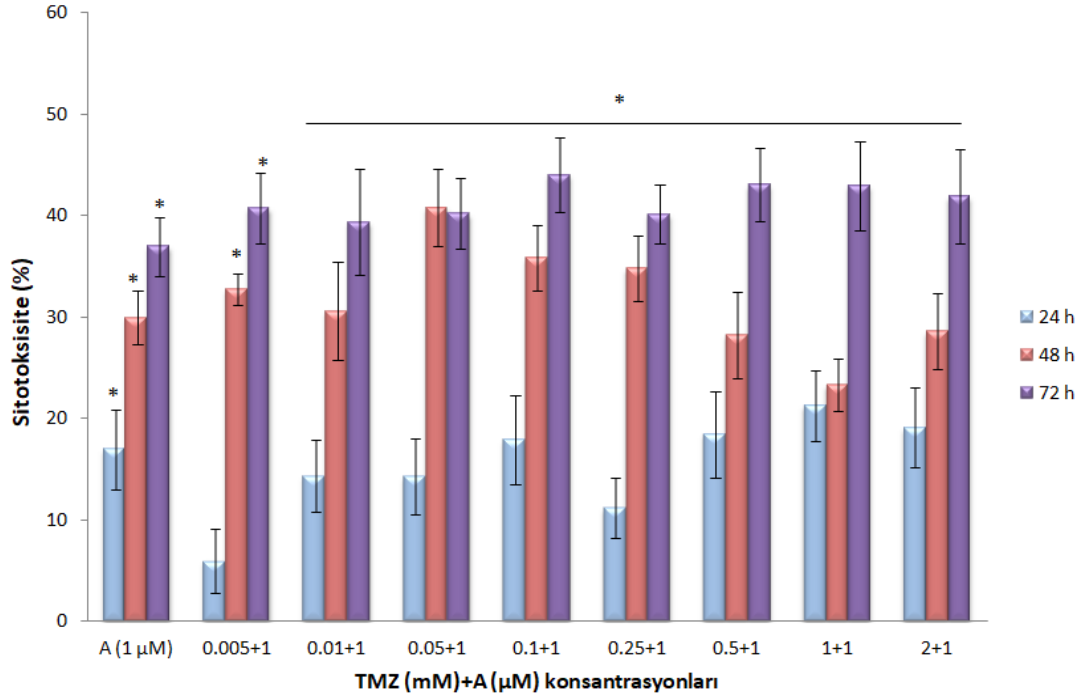
24, 48 ve 72 saatlik maruziyetler sonucu AB'nin tek başına ve TMZ ile birlikte uygulandığında MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksiteseleri Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8'da gösterilmiştir. AB'nin sitotoksitesesi muamele süresi arttıkça artış göstermiş ve tüm muamele sürelerinde sitotoksitede görülen artışlar negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ). TMZ+AB'nin test edilen en düşük konsantrasyonlarının (0.005+1) 24 saatlik muamelesi hariç, test edilen tüm AB+TMZ konsantrasyonlarında ve tüm muamele sürelerinde artışlar gösteren sitotoksitesite değerleri negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli olmuştur ( $p<0.05$ ). Özellikle 72 saatlik AB+TMZ uygulamasının sitotoksitesiteyi daha çok artırdığı gözlemlenmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8).

İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da, 24 saatlik AB+TMZ uygulamalarından 0.1 mM TMZ+AB (%18), 0.5 mM TMZ+AB (%18), 1 mM TMZ+AB (%21) ve 2 mM TMZ+AB (%19) maruziyetlerinin sitotoksitesiteyi tek başına AB'nin (%17) neden olduğu sitotoksiteden daha fazla olduğu bulunmuştur. 0.005 mM TMZ+AB, 0.01 mM TMZ+AB, 0.05 mM TMZ+AB, 0.1 mM TMZ+AB ve 0.25 mM TMZ+AB'nin 48 saatlik muamelesi sonucu elde edilen sitotoksitesite değerleri sırasıyla %33, %31, %41, %36 ve %35 olarak bulunmuştur. Bu değerler tek başına AB'nin 48 saatlik muamelesi sonucu elde edilen sitotoksitesite değeri olan %30'dan daha yüksektir. 72 saatlik TMZ+AB uygulamalarından elde edilen tüm sitotoksitesite değerleri AB'nin tek başına yol açtığı sitotoksitesite değerinden (%37) daha yüksek olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.8). Bu sonuçlar uzun süreli TMZ+AB muamelesinin MCF-7 hücrelerinde AB'nin sitotoksitesitesini artırabileceğini göstermektedir.



**Çizelge 4.6** AB ve AB+TMZ'nin 24, 48 ve 72 saatlik maruziyetleri sonucu elde edilen verilerinden hesaplanan sitotoksosite değerleri

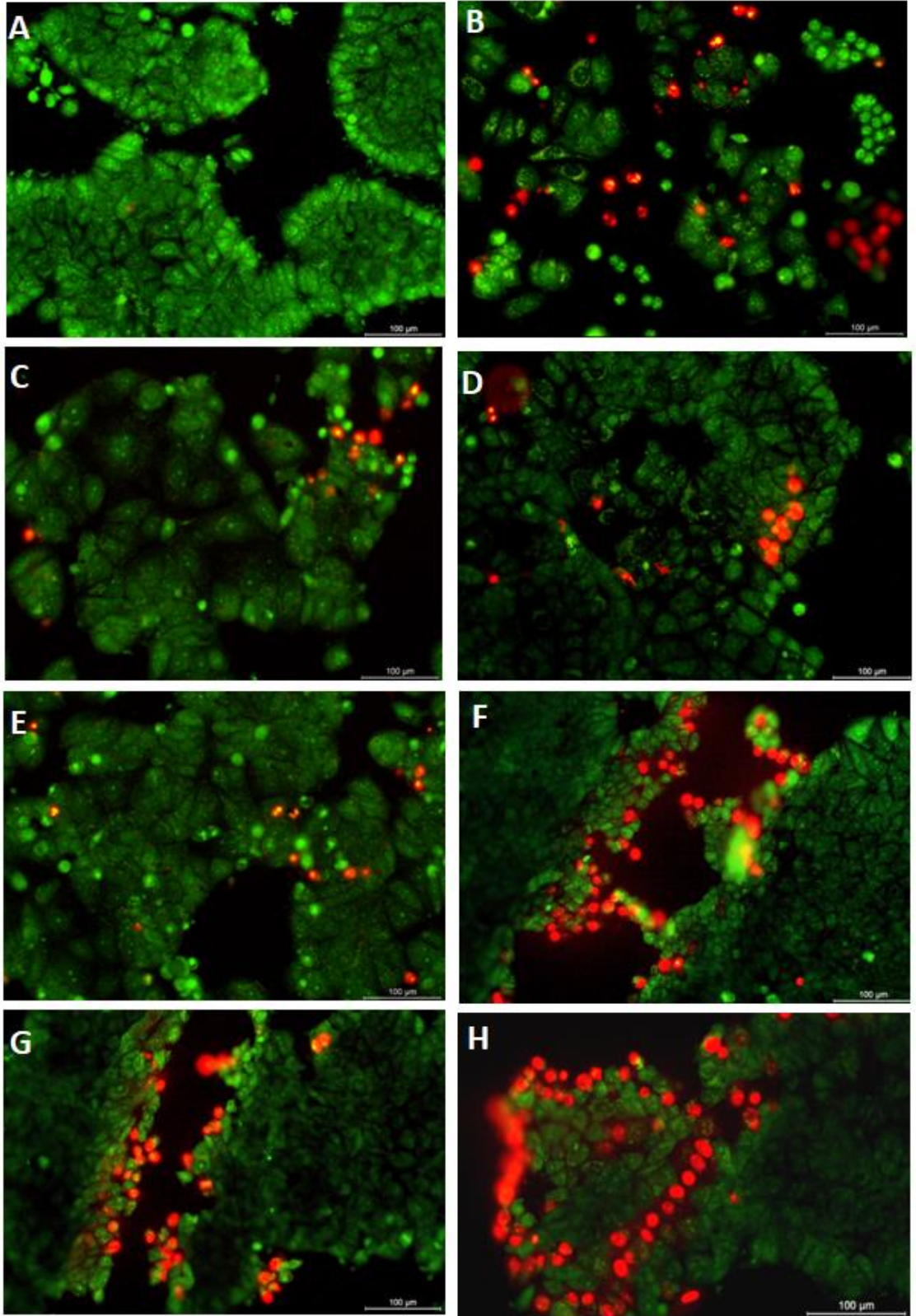
Konsantrasyonlar	24 saat	48 saat	72 saat
	Sitotoksosite (%)	Sitotoksosite (%)	Sitotoksosite (%)
A (1 µM)	17	30	37
0.005 mM TMZ+ A (1 µM)	6	33	41
0.01 mM TMZ+ A (1 µM)	14	31	39
0.05 mM TMZ+ A (1 µM)	14	41	40
0.1 mM TMZ+ A (1 µM)	18	36	44
0.25 mM TMZ+ A (1 µM)	11	35	40
0.5 mM TMZ+ A (1 µM)	18	28	43
1 mM TMZ+ A (1 µM)	21	23	43
2 mM TMZ+ A (1 µM)	19	29	42



**Şekil 4.8** 24, 48 ve 72 saatlik AB ve TMZ+AB uygulaması sonrası elde edilen ortalama sitotoksosite verileri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi

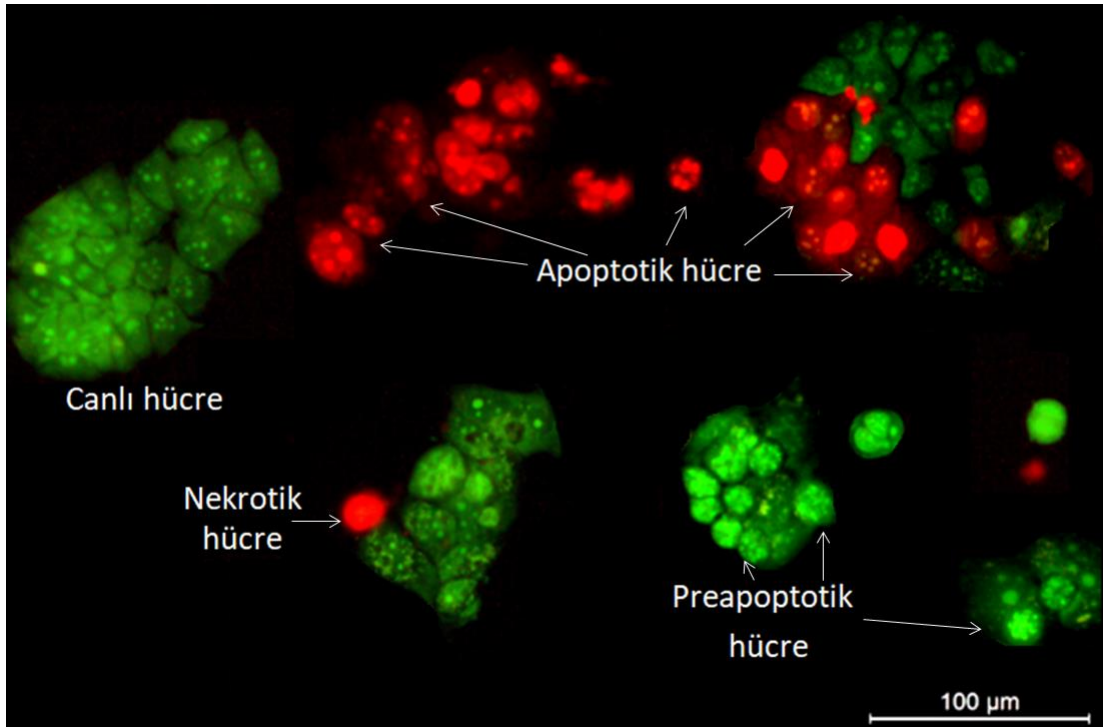
#### **4.1.2 AO-EB Boyama Sonuçları**

TMZ ve/veya AB'nin hücreler üzerindeki apoptotik etkisi AO-EB boyaması ile morfolojik olarak değerlendirilmiştir. AO-EB boyası ile boyanmış MCF-7 hücrelerine bazı fotoğraf rnekleri Şekil 4.9'de sunulmuştur. MCF-7 hücreleri, yapılan MTT testi sonucunda belirlenen TMZ (50, 100 ve 250  $\mu\text{M}$ ) ve/veya AB (1  $\mu\text{M}$ ) konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiş ve AO-EB boyası ile boyanmıştır. Boyanan MCF-7 hücrelerindeki canlı hücreler, apoptotik hücreler ve nekrotik hücreler sayılarak (Şekil 4.10) ve TMZ ve/veya AB'ye maruz bırakılan hücrelerdeki apoptoz oranı hesaplanmıştır.



**Şekil 4.9** TMZ ve/veya AB maruziyeti sonrası AO-EB ile boyanmış MCF-7 hücreleri. A) Kontrol, B) AB, C) 50  $\mu$ M TMZ, D) 100  $\mu$ M, E) 250  $\mu$ M, F) 50  $\mu$ M TMZ+A, D) 100  $\mu$ M+A, E) 250  $\mu$ M+A

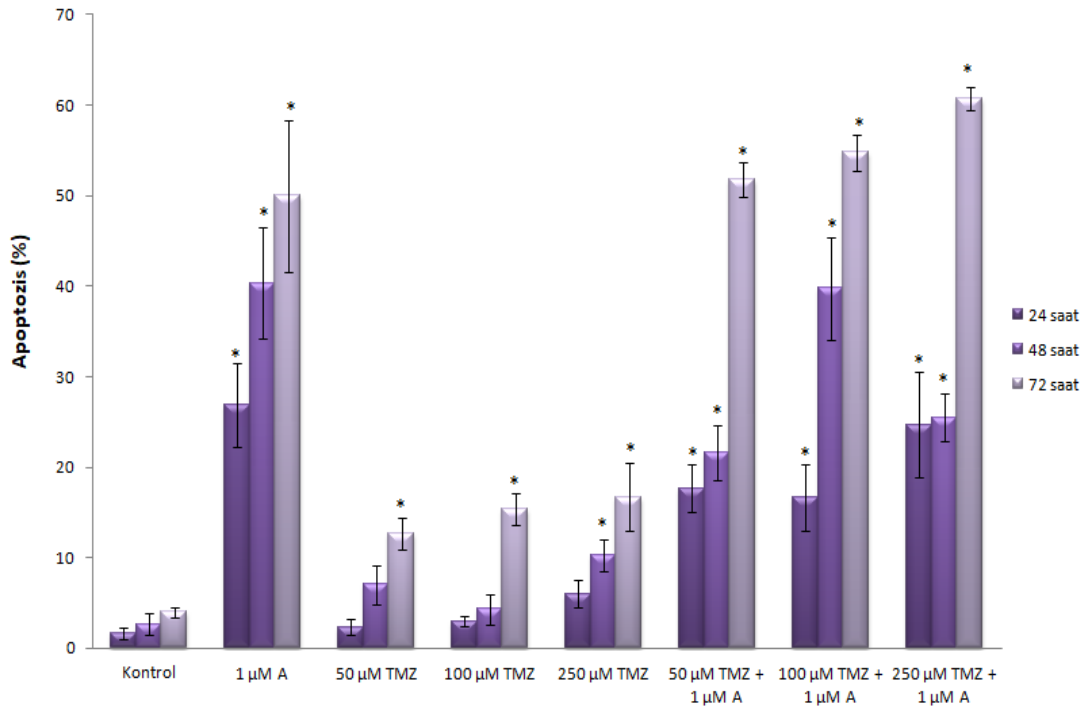
TMZ ile muamele edilen hücrelerdeki yeşil renkteki preapoptotik ve kırmızı/turuncu renkteki apoptotik hücrelerin çekirdeklerindeki fragmantasyonun oluşmaya başladığı dikkat çekmiştir. AB'nin hem tek başına hem de TMZ ile birlikte uygulandığı hücrelerde ise preapoptotik, apoptotik ve nekrotik hücrelerin sayılarındaki belirgin artışlardan dolayı hücrelerdeki morfolojik değişimler daha fazla dikkat çekmiştir. AB ve TMZ+AB uygulanan kültürlerde apoptotik ve nekrotik hücrelerin kalktığı, daha yuvarlağımsı hale geldikleri ve besiyeri içinde yüzdükleri tespit edilmiştir. Ayrıca tek başına AB'nin uygulandığı kültürlerde çok belirgin şekilde sağlıklı hücreler de dahil pek çok hücrenin hücreler arası bağlantıların zayıfladığı ve hücrelerin şekillerinin yuvarlak biçim aldığı gözlenmiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).



**Şekil 4.10** TMZ ve/veya AB maruziyeti sonrası AO-EB ile boyanmış MCF-7 hücrelerinde normal, apoptotik ve nekrotik hücreler

24, 48 ve 72 saatlik maruziyetler sonucu AB'nin tek başına ve TMZ ile birlikte uygulandığında MCF-7 hücreleri üzerindeki apoptoz oranları ve istatistiksel olarak yapılan karşılaştırma sonuçları Şekil 4.11'de gösterilmiştir. 1 µM AB muamelesi sonucu muamele süresi arttıkça apoptoz oranı artış göstermiş ve tüm muamele sürelerinde görülen artışlar negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak

önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ). TMZ'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında (50, 100 ve 250  $\mu\text{M}$ ), konsantrasyon ve muamele süresinde artışlara paralel olarak apoptoz oranı da artış göstermiştir. 48 saatlik muamelede en yüksek TMZ konsantrasyonu ve 72 saatlik muamelede tüm TMZ konsantrasyonlarında görülen bu artışlar negatif kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli olmuştur ( $p<0.05$ ). 24 saatlik TMZ muamelesi sonucu apoptoz oranında görülen hafif artışlar istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır. TMZ+AB'nin birlikte muamelesi sonucu ise, test edilen tüm konsantrasyon ve muamele sürelerinde apoptoz oranının arttığı görülmüştür. Apoptoz oranları konsantrasyon ve muamele süresinin artışı ile paralel olarak artmıştır. Tüm AB+TMZ konsantrasyonlarında ve tüm muamele sürelerinde artışlar gösteren apoptoz oranları negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli olmuştur ( $p<0.05$ ). Özellikle 72 saatlik AB+TMZ uygulamasının apoptozu daha fazla indüklediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11** 24, 48 ve 72 saatlik AB ve TMZ+AB uygulaması sonrası elde edilen apoptoz yüzdeleri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi

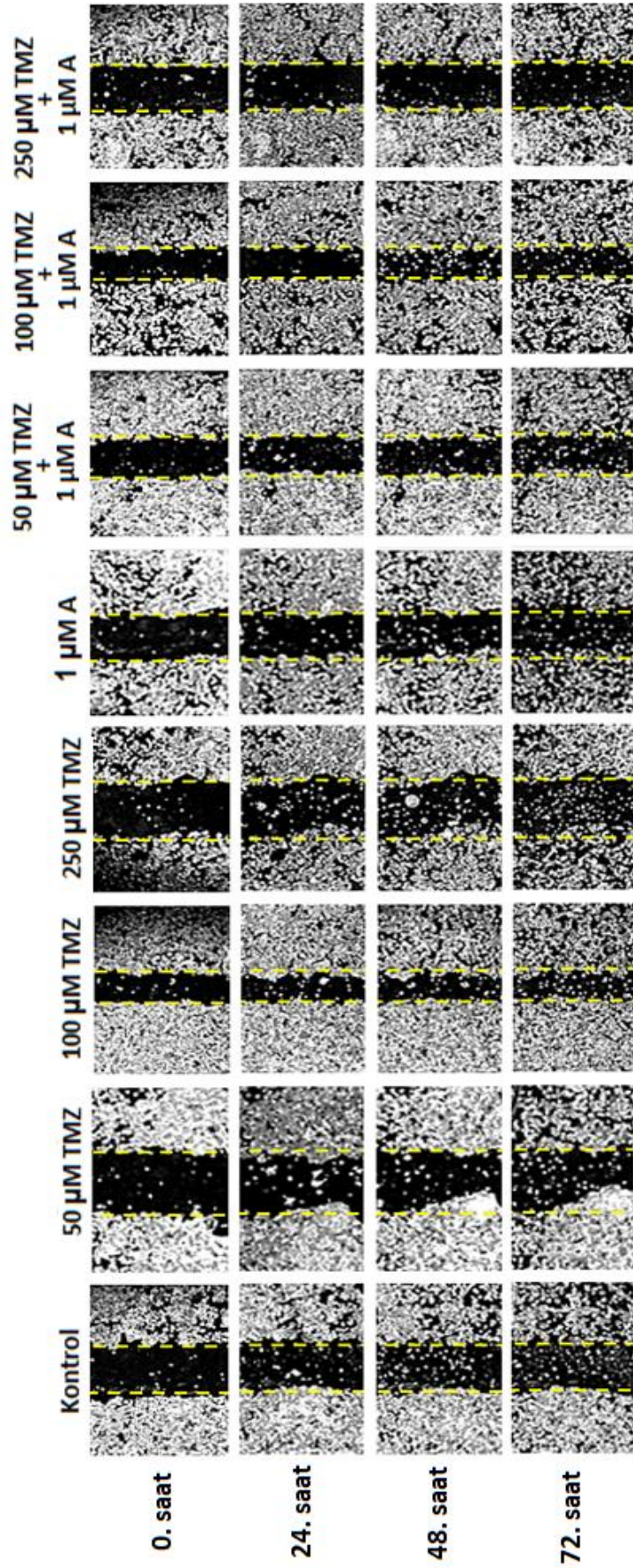
### 4.1.3 Yara İyileşmesi Testi Sonuçları

Çalışmamızda yara iyileşmesi deneyi ile TMZ ve/veya AB'nin MCF-7 hücrelerinin proliferasyon ve göçü üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. TMZ

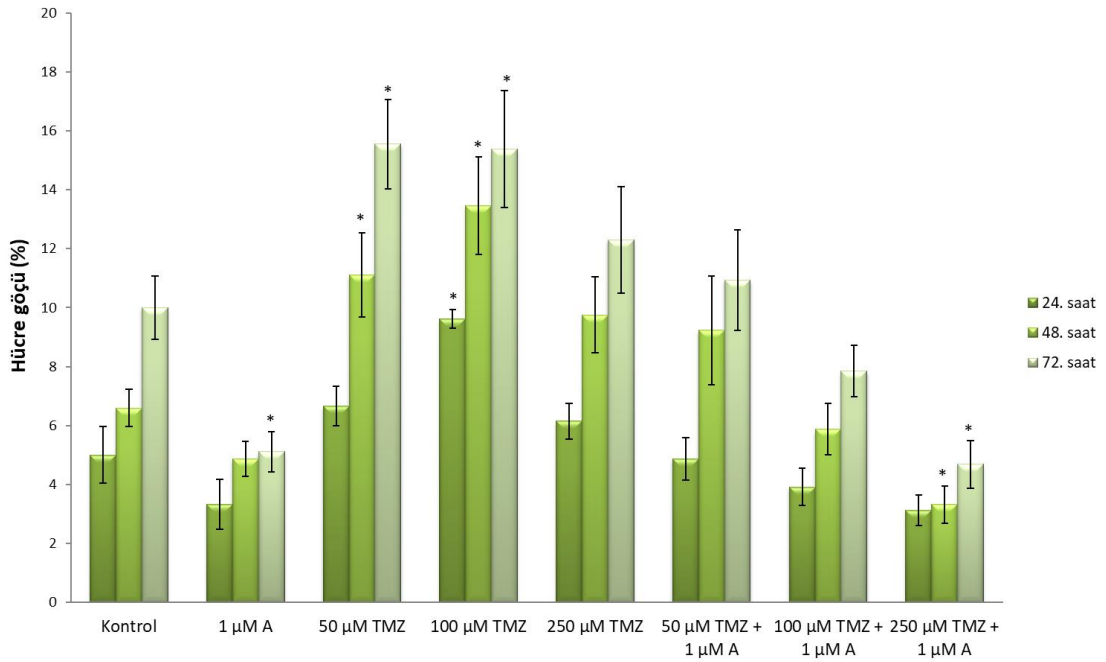
ve/veya AB ile muamele edilen hücrelerin, ilk başta oluşturulan boşlukların durumu (ne ölçüde kapandığı ya da kapanmadığı) 0., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde görüntülenmiş (Şekil 4.12) ve analizleri yapılmıştır.

AB (1  $\mu\text{M}$ ) ile muamele edilen hücrelerde çizik atılarak açılan boşluğun muamele süresine bağlı olarak hücre göçünden dolayı daraldığı ve kontrol grubu ile kıyaslandığında boşluğa göç eden hücre yüzdesinin azaldığı görülmüştür. Kontrol grubuna göre kıyaslandığında (%10), AB maruziyeti sonucu göç eden hücre yüzdesi değeri sadece 72 saatte (%5.11) istatistiksel olarak anlamı olmuştur ( $p<0.05$ ). TMZ muamelesi konsantrasyon artışına bağlı olmayan ancak muamele süresinin uzumasına bağlı olarak göç eden hücre yüzdesini artırmıştır. Bu artışlar 50  $\mu\text{M}$  TMZ konsantrasyonu ile muamelede 48. ve 72. saatte, 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda ise tüm muamele sürelerinde kontrol grubundaki göç oranından istatistiksel anlamda daha fazla olmuştur ( $p<0.05$ ). 250  $\mu\text{M}$  TMZ konsantrasyonu ile muamele edilen hücrelerde göç oranı diğer TMZ konsantrasyonlarına göre azalmış olmasına rağmen bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır. AB ve TMZ birlikte hücrelere uygulandığında göç eden hücre yüzdesi azalmıştır. En yüksek konsantrasyon olan 250  $\mu\text{M}$  TMZ+1  $\mu\text{M}$  AB'nin 48. ve 72. saatteki azalmış hücre göçü yüzdeleri (%3.32 ve %4.68) kontrol grubu ile kıyaslandığında (48. saate %6.60 ve 72. saatte %10) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.13). Bu sonuçlar bize en yüksek TMZ konsantrasyonu ve AB'nin birlikte muamelesi, MCF-7 hücrelerinin göçünü önleyebileceğini göstermektedir.





Şekil 4.12 Kontrol grubu, TMZ ve/veya AB ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin yara iyileşmesi testi görüntüleri



**Şekil 4.13** Kontrol grubu ve TMZ ve/veya AB uygulanan MCF-7 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saatlerdeki yarık aralıklarına ait grafik

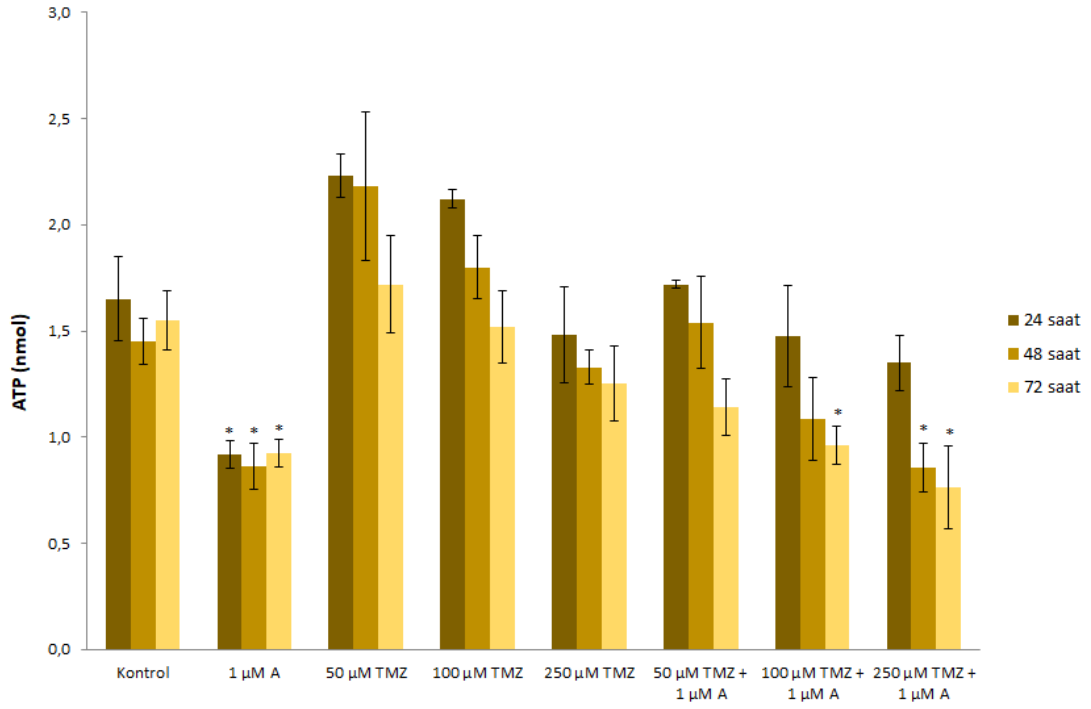
#### 4.1.4 ATP Testi Sonuçları

TMZ (50, 100 ve 250 µM) ve/veya AB (1 µM) AB ile 24, 48 ve 72 saatliğine muamele edilen hücrelerdeki ATP miktarları ve istatistiksel olarak karşılaştırılması Şekil 4.14'de gösterilmiştir.

1 µM AB muamelesi sonucu 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sürelerinde ATP miktarı azalmış ve tüm muamele sürelerinde görülen bu düşüşler negatif kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). TMZ'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında (50, 100 ve 250 µM), konsantrasyon ve muamele süresindeki artışlara paralel olarak ATP miktarı azalma göstermiştir. 50 µM'lık TMZ muamelesinde tüm muamele sürelerinde ATP miktarı kontrol grubundaki değerlerin üzerine çıkmıştır. 24 ve 48 saatlik 100 µM TMZ muamelesi de önce ATP miktarı kontrol grubundaki değerlerin üzerine çıkarmıştır, ancak 72 saatlik muamele ile ATP miktarı kontrol grubundaki değerlerin altına düşmüştür. 50 ve 100 µM TMZ muamelesi sonucu görülen bu artışlar kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli bulunmamıştır. 250 µM'lık TMZ'nin 24, 48 ve 72 saatlik muamelelerinde ATP miktarı kontrol grubundaki değerlerin altına inmiştir. TMZ+AB'nin test edilen tüm konsantrasyonlarında, konsantrasyon ve muamele süresindeki artışlara paralel olarak ATP miktarı azalmıştır. Bu azalmalar negatif kontrol ile karşılaştırıldığında 48



saatlik muamelede en yüksek TMZ+AB konsantrasyonu (250 TMZ+ 1  $\mu$ M AB), 72 saatlik muamelede ise en yüksek iki TMZ+AB konsantrasyonunda (100 TMZ+ 1  $\mu$ M AB ve 250 TMZ+ 1  $\mu$ M AB) ATP miktarında görülen azalmalar istatistiksel açıdan önemli olmuştur ( $p<0.05$ ). İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da, AB+TMZ uygulamalarından en yüksek TMZ konsantrasyonu olan 250 TMZ+ 1  $\mu$ M AB maruziyetinin 48 ve 72 saatlik uygulamasındaki ATP miktarları (24 saatte 0.87, 72 saatte 0.93) tek başına AB muamelesindeki ATP miktarlarından (24 saatte 0.86, 72 saatte 0.77) daha düşük olduğu görülmüştür. Özellikle en yüksek TMZ+AB konsantrasyonunun 48 ve 72 saatlik uygulamasının ATP miktarını önemli ölçüde düşürdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14** 24, 48 ve 72 saatlik AB ve TMZ+AB uygulaması sonrası elde edilen ATP değerleri ve standart hata değerlerinin grafiksel olarak gösterimi

## 4.2 Tartışma

TMZ'nin doğrudan kanser hücreleri üzerindeki etkisini araştıran oldukça az çalışma vardır. Daha önce yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalar, TMZ'nin bazı ilaçlarla birlikte kullanıldığında bazı kanser hücrelerinde daha güçlü etkiler sergileyebildiğini göstermiştir. Troglitazon (30 M) ve artan TMZ konsantrasyonlarının (0,1-3 mM) ile birlikte muamele edilen bir murin akciğer alveolar karsinom hücre hattında hücre ATP seviyelerini azalttığı ve konsantrasyona bağlı bir şekilde apoptozu indüklediği ileri sürülmüştür (Andela ve ark., 2005). Araştırmacılar 3 mM TMZ'nin proliferasyonda belirgin bir azalma gösterse de, TMZ'nin troglitazon ile birlikte kullanıldığında daha düşük proliferasyon değerlerine yol açtığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde TMZ'nin apoptozu indüklediğini, ancak troglitazon ile birlikte kullanıldığında apoptozda ilave bir artışa yol açtığı da belirlenmiştir. Son olarak TMZ'nin hücre ATP düzeylerinde konsantrasyona bağlı bir azalmaya neden olduğu ve troglitazon ile birlikte kullanıldığında hücrelerdeki ATP düzeylerdeki düşüşü güçlendirdiği ileri sürülmüştür. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da TMZ özellikle AB ile birlikte kullanıldığında apoptozu artırdığı ve ATP miktarını azalttığı görülmüştür.

İki yağ asidi oksidasyon inhibitörü olan etomoksir ve TMZ (konsantrasyon verilmemiştir) ile muamele edilen meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) reoksijenasyondan sonra büyüme inhibisyonu ve azalmış ATP seviyeleri gözlenmiştir (Bensaad ve ark., 2014). Bu sonuçlarla uyumlu olarak bizim sonuçlarımızda da MCF-7 hücrelerinde TMZ ve/veya AB muamelesinin hücre canlılığını, göçünü ve ATP miktarını azalttığı görülmektedir.

Bir glutaminaz C inhibitörü olan C.968 (10  $\mu$ M) ve TMZ (1000  $\mu$ M) ile muamele edilen meme kanseri hücrelerinde (MB-MDA-231) hücre canlılığında önemli düşüşler olduğu ve en güçlü etkinin 72 saatlik muamelede olduğu bulunmuştur (Halama ve ark., 2018). Bu çalışmadan elde edilen hücre canlılığı verileri de çalışmamızın sonuçları ile uyumludur. Çünkü bizim çalışmamızda da özellikle 72 saatlik muamelede azalmış hücre canlılığı ve artmış sitotoksosite gözlenmiştir.

TMZ'nin tek başına ve AB ve Gemsitabin (GEM) ile birlikte pankreas kanseri hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, TMZ'nin yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını önemli ölçüde azaltmasına rağmen, hücreler TMZ+GEM, TMZ+AB ve GEM+AB ile muamle edildiğinde daha düşük hücre canlılığı değerleri bulunmuştur (Atlı Şekeroğlu ve ark. 2021a). Kombine tedavilerin hücre canlılığı değerlerinin tek başına AB veya GEM+AB'ninkinden daha düşük olarak bulundu. TMZ'nin AB ve/veya GEM ile kombine tedavisinin apoptoz oranlarını önemli ölçüde arttırdığı da rapor edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca; en düşük hücre göçü oranlarının TMZ+AB ve TMZ+AB+GEM muamelelerinde bulunduğunu ve TMZ'nin tek başına veya AB ve/veya GEM ile birlikte muamelesinin ATP seviyelerini önemli ölçüde azalttığı da gösterilmiştir. Pankreas kanseri hücre hattında yapılan bu çalışmanın sonuçları bizim verilerimiz ile yakından benzerlik göstermektedir. Bizim sonuçlarımız da TMZ+AB kombinasyonunun meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığını ve ATP miktarını düşürdüğünü, hücre göçünü baskıladığını ve apoptozu artırdığını göstermiştir.

Görüldüğü gibi çalışmamıza ait sonuçlar, TMZ'nin olası antitümoral potansiyelinin araştırıldığı sınırlı sayıdaki çalışmaları sonuçları ile paralellik göstermektedir. Çalışmamız ve daha önceden yapılan çalışmalar, TMZ'nin farklı ilaçlar ile birlikte kullanıldığında sitotoksikite ve apoptozda artışa, hücre göçünün baskılanmasına ve ATP seviyelerinde düşüşe neden olabileceği hipotezini desteklemektedir.

Kemoterapi, kanser tedavisinde en etkili yaklaşım olarak görülse de, ne yazık ki meme kanseri olan hastaların genellikle ameliyattan sonra tümörleri kullanılan kemoterapi ilaçlarına karşı direnç geliştirebilmektedir. Bu dirençten dolayı birçok antikanser ilacı beklendiği etkiyi gösterememektedir ve daha etkili tedavilere ihtiyaç vardır. Tedavinin sonlandırılması genellikle kemoterapik ajanın normal dokulara da hasar verilmesinden kaynaklanır. Bu nedenle yeni antikanser ilaçların ve tedaviyi iyileştirme stratejilerinin geliştirilmesi kritik öneme sahiptir. Birden fazla yol hedeflenebileceğinden kanser tedavisinde optimal bir yaklaşım olarak kabul edilen kombinasyon tedavisi, iki veya daha fazla terapötik ajanın birlikte uygulanması olarak tanımlanır. Monoterapi yaklaşımı birçok farklı kanser türü için hala çok

yaygın olarak kullanılsa da, genellikle kombinasyon terapisinden daha az etkili olduğu ve daha uzun bir sağ kalım sağlayabileceği düşünülmektedir. Çünkü geleneksel monoterapötik teknikler seçici değildir ve hem sağlıklı hem de kanserli hücreleri yok edebilmektedir (Atlı Şekeroğlu ve ark., 2021b). Bu çalışmanın sonuçları; düşük toksisiteye sahip, önemli yan etkileri olmayan, tümör hücrelerindeki sahte-hipoksik durumu normale çevirebilen ve normal hücreler üzerinde güvenli bir profil sergileyen TMZ'nin (Huqi, 2011), AB ile kullanıldığında meme kanseri hücrelerinde sitotoksite, apoptoz, hücre göçü üzerindeki etkilerinden dolayı anti-tümöral aktiviteye sahip olabileceğini sergilemiştir. Bu sonuçlar meme kanseri tedavisinde TMZ'nin AB ile birlikte kombinasyon tedavisinde kullanılabilme potansiyelinin bulunduğunu da göstermektedir.

Kanser dışındaki hastalıklar için kullanılan mevcut farmasötik ajanların kanser tedavisi için kullanılması onkoloji uygulamaları için alternatif bir terapötik yaklaşımdır. Ayrıca bu yaklaşım, ilaçların onaylanması ve pazara sürülmesi için gerekli maliyeti de düşürmektedir (Atlı Şekeroğlu ve ark., 2021b). İlaçların farklı endikasyonlarda yeniden konumlandırılması (repositioning) amacıyla ilaç temel araştırma altyapısının geliştirilmesi, Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumunun 2016 yılı performans programında da bulunan hedeflerden birisidir. (Sağlık Bakanlığı, 2018). TMZ, hâlihazırda piyasada bulunan ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Diğer yağ asiti oksidasyon inhibitörlerine göre toksik olmaması ve önemli yan etkilerinin olmaması nedeniyle de güvenli bir profile sahip olan TMZ'nin, hücreleri glukozun mitokondriyal oksidatif yıkıma yönlendirmesi sayesinde tümör hücrelerindeki sahte-hipoksik durumu normale çevirebileceği, dolaylı olarak apoptozu indükleyebileceği ve hipoksiye dayandırılan radyoterapiye ve kemoterapiye karşı oluşan direnç ve kötü prognozu engelleyebileceği öne sürülmüştür (Huqi, 2011). Bu çalışmada TMZ'nin meme kanseri hücre kültürlerinde sitotoksiteyi ve apoptozu indükleyebildiği ve hücre göçücü baskılayabildiği gösterildiği için, sonuçlarımız daha önceden TMZ ile ilgili öne atılan bu hipotezi destekler niteliktedir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kemoterapide kullanılan ilaçlara karşı oluşan direnç, tüm kanserlerde olduğu gibi, oldukça agresif seyreden ve kötü prognoza sahip olan tiplerinin de bulunduğu meme kanserleri için de önemli bir sorundur. Bu nedenle tedavide kullanılacak daha güvenli, daha etkili ve daha az yan etkilere sahip olan yeni ajan arayışları devam etmektedir.

Yeni moleküllerin sentezlenmesi ve piyasaya sürülmesi sürecinin çok zaman aldığı, yeni moleküllerin çoğunun daha piyasaya çıkmadan elendiği ve piyasaya ilk çıkış için büyük maliyetler gerektiği düşünülürse; mevcut ve bilinen ilaçların yeni endikasyonlar, yeni hastalıklar için kullanılması ve yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesine yönelik araştırmaların yapılması pek çok avantaja sahiptir. Bu açıdan bakıldığında, çalışmamız söz konusu hedefi ve avantajı doğrudan karşılamaktadır. Çünkü, çalışmamızda kullandığımız ilaç olan TMZ, halihazırda piyasada bulunmakta ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, hücre kültürü yöntemi ile sitotoksosite çalışmaları, ilaç geliştirme çalışmalarının prelinik aşamasında ve toksikolojik araştırmalarda, spesifik etkilerin moleküler düzeyde anlaşılmasını sağlamakta ve yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız TMZ; hâlihazırda piyasada bulunan ve anti-iskemik bir ajan olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır. Ancak, meme kanseri üzerindeki olası anti-tümoral etkisi hakkında yapılmış çalışmalar oldukça sınırlıdır. TMZ'nin yağ asitlerinden  $\beta$ -oksidasyonla ATP üretiminde metabolik sapma sağlayıp hücreleri glukozun mitokondriyal oksidatif yıkıma yönlendirmesi sayesinde tümör hücrelerindeki sahte-hipoksik durumu normale çevirebilme özelliği göz önüne alındığında, bu ilacın meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisinin incelendiği bu çalışma oldukça önemlidir. Meme kanserinin özellikle kadınlarda kansere bağlı ölümlerde oldukça önemli bir yer tuttuğu düşünüldüğünde, TMZ'nin meme kanser tedavisindeki etkinliğini farklı parametreler kullanarak çok yönlü bir şekilde araştıran çalışmamızın önemi ortaya çıkmaktadır. TMZ'nin insana ait bir meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinde özellikle AB ile kullanıldığında sitotoksisiteyi ve apoptozu artırabilme, hücre göçünü ve hücrelerdeki ATP miktarını azaltabilme yoluyla meme kanseri hücrelerinin ölümünü

indükleyebileceği *in vitro* olarak ilk kez bizim çalışmamız ile gösterilmiştir. Mevcut literatür bilgileri göz önüne alındığında, TMZ ile ilgili özellikle meme hücreleri kullanılarak daha fazla araştırmanın yapılması gerekliliği açıktır.

Bu çalışma TMZ'nin AB gibi kemoterapötik ajanlarla birlikte kemoterapik bir ajan olarak kullanılabilmesine dair destekleyici sonuçlar verdiği için; sonuçlarımız gelecek öngörülerini için bilimsel bir kaynak oluşturabilecek, bu ilacın kullanımı ile ilgili yeni düzenlenmelerin yapılabilmesine rehberlik edebilecektir. Ancak TMZ'nin hem AB hem de meme kanseri tedavisinde kullanılan diğer kemoterapötikler ile kombinasyon tedavisindeki etkilerinin ve TMZ'nin çalışmamız sonucu ortaya çıkan anti-tümoral olabilecek özelliklerinin henüz bilinmeyen mekanizmalarının araştırılarak desteklenmesine ihtiyaç vardır.

Toplumda oldukça yüksek oranda kanser hastası olduğu ve kanserin dünya çapında önemli bir ölüm nedeni olduğu düşünüldüğünde, kanser tedavisi için umut verici özelliklere sahip olabileceği düşünülen TMZ'nin meme kanseri hücreleri ve dolayısıyla meme kanserinin tedavisindeki olası antitümör etkisinin araştırılması; bu ilacın yeniden konumlandırılması ve yeni tedavi stratejileri için etkinliğinin belirlenmesi gibi konu başlıklarını kapsayan çalışmaların yapılması oldukça önemli ve faydalı bir yaklaşım olacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

- Abacı, A. & Kabakçı, G. (1996). "Trimetazidine", *Türkiye Klinikleri Journal of Cardiology*, 9, 228-231.
- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures (2020). Retrieved from <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2020/cancer-factsand-figures-2020.pdf> (Ziyaret tarihi: 22.03.2020).
- Amos, LO. & Löwe, J. (1999). How Taxol stabilises microtubule structure. *Chemistry & Biology*, 6(3), R65-R69.
- Andela, VB., Altuwaijri, S., Wood, J. & Rosier, RN. (2005). Inhibition of  $\alpha$ -oxidative respiration is a therapeutic window associated with the cancer chemopreventive activity of PPAR $\gamma$  agonists. *FEBS Lett* 2005;579:1765—9
- Anonim-b:[http://www.faq.s.org/sec-filings/100701/Abraxis-BioScience-Inc\\_8K/dex102.htm#b](http://www.faq.s.org/sec-filings/100701/Abraxis-BioScience-Inc_8K/dex102.htm#b) (Ziyaret tarihi: 25.04.2021)
- Anonim-c:[www.has-sante.fr/portail/jcms/c.../abraxane](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c.../abraxane) (Ziyaret tarihi:15.03.2021)
- Argaud, L., Gomez, L., Gateau-Roesch, O., Couture-Lepetit, E., Loufouat, J., Robert, D. & Ovize, M. (2005). "Trimetazidine inhibits mitochondrial permeability transition pore opening and prevents lethal ischemia-reperfusion injury", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39, 893-899.
- Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., Işık, S. & Aydın B. (2021b). Effects of Reverse Transcriptase Inhibitors on Proliferation, Apoptosis, and Migration in Breast Carcinoma Cells. *Int J Toxicol* 40(1):52-61. doi: 10.1177/1091581820961498.
- Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V. & Küçük N. (2021a). Trimetazidine alone or in combination with gemcitabine and/or abraxane decreased cell viability, migration and ATP levels and induced apoptosis of human pancreatic cells. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 45(6):101632. doi: 10.1016/j.clinre.2021.101632.
- Bartels, C.L. & Wilson, A.F. (2004). How does a novel formulation of paclitaxel affect drug delivery in metastatic breast cancer? *U.S. Pharmacist*, 29, HS18-HS23.
- Baydar Dalar, Z. (2014) T1-2N0M0 Evreli Meme Kanseri Hastalarda Prognostik Ve Prediktif Faktörler. Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ekişehir.
- Baykara, O. (2016). *Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar*. *Balikesir Sağlık Bil Derg* 5 (3) 154-165.
- Belardinelli, R. (2000). "Trimetazidine and the contractile response of dysfunctional myocardium in ischaemic cardiomyopathy", *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 19, 35-39.

- Bensaad, K., Favaro, E., Lewis, C.A., Peck, B., Lord, S., Collins, C.M., Pinnick, K.E., Wigfield, S., Buffa, F.M., Li, J.L., Zhang, Q., Wakelam, M.J.O., Karpe, F., Schulze, A. & Harris, A.L. (2014). Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 $\alpha$  contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation. *Cell Rep* 9(1):349-365.
- Beşli, N. (2018). Metforminin MCF-7 Hücre Hattında İnvazyon Ve Metastaza Olan Etkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Programı İstanbul
- Blardi, P., de Lalla, A., Volpi, L., Auteri, A. & Di Perri, T. (2002). “Increase of adenosine plasma levels after oral trimetazidine: a pharmacological preconditioning? ”, *Pharmacological Research*, 45, 69-72.
- Brannon-Peppas, L. & Blanchette, J. O. (2004), Nanoparticle And Targeted Systems For Cancer Therapy. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2004, 56 (11), 1649–1659.
- Carracedo, A., Cantley, L.C. & Pandolfi, P.P. (2013). “Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight”, *Nature Reviews Cancer*, 13 (4), 227-232.
- Campling, B.G., Pym, J., Baker, H.M., Cole, S.P. & Lam, Y.M. (1991). “Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay”, *British Journal of Cancer*, 63, 75-83.
- Ceber, E., Sogukpinar, N., Mermer, G. & Aydemir, G. (2005). Nutrition, lifestyle, and breast cancer risk among Turkish women. *Nutrition and Cancer*, 53 (2), 152-159.
- Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P. & Karagin PH. (2020). Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji* 24 (3), 103- 111.
- Çelen, M. (2017). Investigation of zebularine effect on caspase-3, caspase-8 and caspase-9 involved in apoptotic pathway in skbr3 breast cancer cell line. Yüksek Lisans Tezi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bilecik
- Çetin, Y. & Bullerman, L.B. (2005). “Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay”, *Food and Chemical Toxicology*, 43, 755-764.
- Cha, Y.C., Oka, C., Earm, Y.E., Wakabayashi, S. & Noma, A. (2009). “A model of Na/H exchanger and its central role in regulation of ph and na in cardiac myocytes”, *Biophysical Journal*, 97, 2674-2683
- Chazov, E.I., Lepakchin, V.K., Zharova, E.A., Fitilev, S.B., Levin, A.M., Rumiantzeva, E.G. & Fitileva, T.B. (2005). “Trimetazidine in angina combination therapy--the TACT study: trimetazidine versus conventional treatment in patients with stable angina pectoris in a randomized, placebo-controlled, multicenter study”, *American Journal of Therapeutics*, 12, 35-42.
- Costanzo, F.D., Gasperoni, S., Rotella, V. & Costanzo, F.D. (2009), Targeted Delivery Of Albumin Bound Paclitaxel İn The Treatment Of Advanced Breast Cancer, *Oncotargets And Therapy*, 2009:2 179–188.



- Curado, MP., Edwards, B., Shin, HR., Storm, H., Ferlay, J. & Heanue M et al., editors (2007). Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX. IARC Scientific Publication No. 160. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Currie, C., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T.C. & Farese, R.V.Jr. (2013). "Cellular fatty acid metabolism and cancer", *Cell Metabolism*, 18, 153-161.
- Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., Jérôme, C., Marchandbrynaert, J., Feron, O. & Pr at, V. (2009), Paclitaxel-Loaded Pegylated Plgbased Nanoparticles: In Vitro And In Vivo Evaluation, *Journal Of Controlled Release* 133(2009) 11–17.
- Dawood, S. (2010). Triple-negative breast cancer. *Drugs*;70(17):2247-58
- Demirel Kars, M., Darcansoy İşeri,  ., Arpacı, F. & Gündüz, U. (2009). Meme kanseri MCF-7 hücre hattında paklitaksel ve vinkristin'e karşı gelişmiş  oklu ila  direnci mekanizmalarının mikrodizin analizi ile belirlenmesi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 24 (4), 153-158.
- Denizot, F. & Lang, R. (1986). "Rapid colorimetrik assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability", *Journal of Immunological Methods*, 89, 271-277.
- Desai, N. (2008). Nab Technology A Drug Delivery Platform Utilising Endothelial Gp60 Receptor-Based Transport And Tumour-Derived Sparc For Targeting, Drug Delivery Report Winter 2007/2008, *Technology Overviews Syf* 37-41 ISSN 1750-2322.
- Di Napoli, P., Chierchia, S., Taccardi, A.A., Grilli, A., Felaco, M., De Caterina, R. & Barsotti, A. (2007). "Trimetazidine improves post-ischemic recovery by preserving endothelial nitric oxide synthase expression in isolated working rat hearts", *Nitric Oxide*, 16, 228-236.
- Dindaroğlu, G. (2019). Yeni sentezlenen 4-amino antipirin türevli schiff bazı bakır (II) kompleksinin insana ait normal ve adenokarsinom meme hücre hatları üzerinde sitotoksik etkilerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ordu.
- Doyle, A. & Griffiths J.B. (1998). Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. United Kingdom: John Wiley&Sons.
- Dündar, B. (2017). Glut-1 (Slc2a1) ve Glut-3 (Slc2a3) Genlerinin Ve Bu Genleri Hedefleyen Mikrona Ekspresyonlarının Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarında (Skbr-3, MDA-MB-231, MCF-7, hTERT) Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Bursa.
- El Banani, H., Bernard, M., Baetz, D., Cabanes, E., Cozzone, P., Lucien, A. & Feuvray, D. (2000). "Changes in intracellular sodium and pH during ischaemia-reperfusion are attenuated by trimetazidine. Comparison between low- and zero-flow ischaemia", *Cardiovascular Research*, 47, 688-696.
- Erdemoğlu, N. & şener B. (2000). Taksan Sınıfı Bileşiklerin Antitümör Etkileri, *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 29 (1) 77-90,

- Erel, S. & Atahan, M.K. (2007) Memenin Anatomisi, Fizyolojisi ve Değerlendirilmesi Erişim adres: [https://www.researchgate.net/publication/337305869\\_Memenin\\_Anatomisi\\_Fizyolojisi\\_ve\\_Degerlendirilmesi](https://www.researchgate.net/publication/337305869_Memenin_Anatomisi_Fizyolojisi_ve_Degerlendirilmesi)
- Eskiizmir, G. (2015). "Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinomas", *Turkish Archives of Otorhinolaryngology*, 53, 120-127.
- Faure, J.P., Baumert, H., Han, Z., Goujon, J.M., Favreau, F., Dutheil, D., Petit, I., Barriere, M., Tallineau, C., Tillement, J.P., Carretier, M., Mauco, G., Papadopoulos, V. & Hauet, T. (2003). "Evidence for a protective role of trimetazidine during cold ischemia: targeting inflammation and nephron mass", *Biochemical Pharmacology*, 66, 2241-2250.
- Foa, R., Norton, L. & Seidman, A.D. (1994). Taxol (paclitaxel): a novel anti-microtubule agent with remarkable anti-neoplastic activity. *International Journal of Clinical and Laboratory Research*, 24 (1), 6-14.
- Gambert, S., Vergely, C., Filomenko, R., Moreau, D., Bettaieb, A., Opie, L.H. & Rochette, L. (2006). "Adverse effects of free fatty acid associated with increased oxidative stress in postischemic isolated rat hearts", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 283,147-152.
- Garber, K. (2004). Improved paclitaxel formulation hints at new chemotherapy approach, *Journal of the National Cancer Institute*, 96 (2), 90-91.
- Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., Sparreboom, A. (2001). Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation, *European Journal of Cancer*, 37 (13), 1590-1598.
- Glodek, Cass, Ph.D., A history of the Michigan Cancer Foundation, the Beginnings & Growth of Detroit's Anticancer Movement (1990), page 68, Michidan Cancer Foundation, Detroit.
- Gnerlich, JL., Deshpande, AD., Jeffe. DB., Seelam, S., Kimbuende, E. & Margenthaler, JA. (2011). Poorer survival outcomes for male breast cancer compared with female breast cancer may be attributable to in-stage migration. *Ann Surg Oncol*. 2011; 18(7): 1837-1844.
- Göksu, E. & Kazan, S. (2017). *Metastazların Moleküler Mekanizmaları Türk Nöroşir Dergisi* 27(2):137-142,
- Gradishar, W.J., Tjulandin, S., Davidson, N., Shaw, H., Desai, N., Bhar, P., Hawkins, M. & O'Shaughnessy, J. (2005). Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 23 (31), 7794-7803.
- Guide lines for adjuvant systemic therapy of invasive breast cancer fig. 7-2; ASCO Sep 2018 Sixth Edition.
- Güllü, İH. & Akalın, İ. (2005). Metastaz biyolojisi. *Üroonkoloji Bülteni* 2005 • Sayı 4 16-19.

- Halama, A., Kulinski, M., Dib, SS., Zaghlool, SB. & Siveen, KS. (2018). Iskandarani A, et al. Accelerated lipid catabolism and autophagy are cancer survival mechanisms under inhibited glutaminolysis. *Cancer Lett* 2018;430:133—47.
- Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 13:215.
- Holmes, F.A., Walters, R.S., Theriault, R.L., Forman, A.D., Newton, L.K., Raber, M.N., Buzdar, A.U., Frye, D.K. & Hortobagyi, G.N. (1991). Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer, *J Natl Cancer Inst*, 83 (24), 1797-1805.
- Huqi, A. 2011. “Cancer and inhibition of fatty acid oxidation”, *Heart and Metabolism*, 51, 27-30.
- İkizler, M., Dernek, S., Sevin, B. & Kural, T. (2003). “Trimetazidine improves recovery during reperfusion in isolated rat hearts after prolonged ischemia”, *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 3, 303-308.
- Işık, G. (2013). Meme kanseri tedavisinde paklitaksel yüklü polikationik ve anyonik siklodekstrin nanoküre formülasyonu ve in vitro değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara.
- Iwamoto, T. (2013). Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs, *Biol Pharm Bull*, 36 (5), 715-718.
- Jemal, A., Tiwari, RC., Murray, T., Ghafoor, A., Samuels, A., Ward, E., Feuer, EJ. & Thun, MJ. (2004). Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin*, 54 (1), 8-29.
- Jordan, M.A. & Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs, *Nat Rev Cancer*, 2004; 4 (4), 253-265
- Kantor, P.F., Lucien, A., Kozak, R. & Lopaschuk, G.D. (2000). “The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase”, *Circulation Research*, 86, 580-588.
- Karabekir, G. (2017). MCF-7 hücre soyunda resveratrolün apoptoz mekanizması üzerine etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Bilim Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul.
- Kars, MD., İşeri, OD., Gündüz, U., Ural, AU., Arpacı, F. & Molnar, J. (2006). Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. *Anticancer Res* 26B:4559-68
- Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, GP., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzler, E. & Green, DR. (2006). Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. *CSH Protoc* (3): pdb.prot4493.
- Kaya, C., Çalışkan, Y. & Yönden Z. (2012). Apoptozis. *Mustafa Kemal Üniv.Tıp Derg*, Cilt 3, Sayı 11, 26 – 37.

- Keleştemur, Ü. (2016). Malatya’da yetişen farklı kayısı çeşitlerinin hücre kültür sisteminde sitotoksik/apoptotik etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Malatya.
- Khanna, C., Rosenberg, M. & Vail, D.M. (2015). A review of paclitaxel and novel formulations including those suitable for use in dogs, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29 (4), 1006-1012.
- Knight, C. & Fox, K. (1995). “From antianginal drugs to myocardial cytoprotective agents”, *American Journal of Cardiology*, 76, 4-7.
- Koçak, S., Çelik, L., Özbaş, S., Dizbay, S., Tükün, A. & Yalçın, B. (2011). Meme kanserinde risk faktörleri, riskin değerlendirilmesi ve prevansiyon: İstanbul 2010 konsensus raporu. *Meme Sağlığı Dergisi*, 7(2), 47-67.
- Kratz, F. (2008). Albumin as drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J. Controlled Release*. 132, 171–183.
- Krishan, A., Fitz, C.M. & Andritsch, I. (1997). Drug retention, efflux, and resistance in tumor cells. *Cytometry*, 29 (4), 279-85.
- Kudlowitz, D. & Muggia, F. (2014). Nanoparticle albumin-bound paclitaxel (nab-paclitaxel): extending its indications, *Expert Opinion on Drug Safety*, 13 (6), 681-685.
- Lammers, T., Hennink, W.E. & Storm, G. (2008). Tumour-targeted Nanomedicines: Principles and Practice, *British Journal of Cancer*. 99, 392 – 397.
- Levenson, A.S., & Jordan, V.C. (1997). MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research*, 57:3071–3078.
- Manfredi, J.J. & Horwitz, S.B. (1984). Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action, *Pharmacology & Therapeutics*, 25 (1), 83-125.
- Marzilli, M. & Klein, W. (2003). “Efficacy and tolerability of trimetazidine in stable angina: a meta-analysis of randomized, double-blind, controlled trials”, *Coronary Artery Disease*, 14, 171-179.
- Merlot, A.M., Kalinowski, D.S. & Richardson, D.R. (2014). Unraveling the mysteries of serum albumin-more than just a serum protein, *Frontiers in Physiology*, 5, 299.
- Miele, E., Spinelli, G., Miele, E., Tomao, F. & Tomao, S. (2009). Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane®ABI-007) in the treatment of breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 4, 99-104.
- Miyake, K., Yoshizumi, T., Imura, S., Suqimoto, K., Batmunkh, E., Kanemura, H., Morine, Y. & Shimada, M. (2008). “Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , histone deacetylase 1, and metastasis-associated protein 1 in pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation”, *Pancreas*, 36, e1-e9.
- Mody, F.V., Singh, B.N., Mohuidin, I.H., Coyle, K.B., Buxton, D.B., Hansen, H.W., Sumida, R. & Schelbert, H.R. (1998). “Trimetazidine induced enhancement of myocardial glucose utilization in normal and ischemic

- myocardial tissue: an evaluation by positron emission tomography”, *American Journal of Cardiology*, 82, 42-49.
- Nabholtz, J.M., Gelmon, K., Bontenbal, M., Spielmann, M., Catimel, G., Conte, P., Klaassen, U., Namer, M., Bonnetterre, J., Fumoleau, P. & Winograd, B. (1996). Multicenter, randomized comparative study of two doses of paclitaxel in patients with metastatic breast cancer, *J Clin Oncol*, 14 (6), 1858-1867.
- Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.-P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P.T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N.J., Kuo, W.-L., Stilwell, J.L., Pinkel, D., Albertson, D.G., Waldman, F.M., McCormick, F., Dickson, R.B., Johnson, M.D., Lippman, M.E., Ethier, S.P., Gazdar, A.F. & Gray J.W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10 (6): 515-27.
- Opie, L. (2003). “Preconditioning and metabolic anti-ischaemic agents”, *European Heart Journal*, 24, 1854-1856.
- Özcan, S. (2018). Her2+ Meme Kanseri Hücrelerinde Pan-Her İnhibitörü Dacomitinib’e Hücre Ölümü Cevabının Aven Tarafından Düzenlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Ankara.
- Pan, ST., Li, ZL., He, ZX., Qiu, JX. & Zhou SF. (2016). Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* ;43:723-37
- Park, J. H., Lee, S., Kim, J., Park, K., Kim, K. & Kwon, I.C. (2008). Polymeric Nanomedicine For Cancer Therapy, *Progress In Polymer Science*. 33 113–137.
- Partridge, AH., Hughes, ME., Warner, ET., Ottosen, RA., Wong, Y-N. & Edge, SB et al. (2016). Subtype-dependent relationship between young age at diagnosis and breast cancer survival. *Journal of Clinical Oncology*.;34(27):3308-14.
- Patnos, C., Bescond-Jacquet, A., Tzeis, S., Paizis, I., Mourouzis, I., Moraitis, P., Malliopoulou, V., Politi, E.D., Karageorgiou, H., Varonos, D. & Cokkinos, D.V. (2005). “Trimetazidine protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury in an experimental timing – dependent manner”, *Basic Research in Cardiology*, 100, 154-160.
- Pehlivanoğlu, B., Aysal, A., Ekmekci, S., Şahin, Y., Topper, Mh., Gündoğdu, B., Erdoğan, İH. & Kelten Talu, C. (2019), Neoplastik Hastalıkların Moleküler Patolojik Mekanizmaları. *Güncel Patoloji Dergisi* (J Curr Pathol. 2019;2:62-80.)
- Prat, A., Parker, JS., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, JI., He, X. & Perou, CM. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.*; 12(5): R68.
- Qiu, Y., Li, P. & Ji, C. (2015). “Cell death conversion under hypoxic condition in tumor development and therapy”, *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (10), 25536-25551.

- Ronco, AL., Stéfani, E. & Stoll, M. (2010). Hormonal and metabolic modulation through nutrition: Towards a primary prevention of breast cancer: *The Breast*, 19 (5), 322-332.
- Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumunun 2016 <https://titck.gov.tr/storage/Archive/2018/dynamicModulesAttachment/747bf958-fd6b-4db0-8996-b8593e4e1829.pdf>
- Shedage, A., Khanna, A., Gole, M., Purandare, S. & Malhotra, G. (2014). Comparative Steady State Cross-Over Bioequivalence Study of 35mg Trimetazidine Extended-Release Tablets. *Journal of J Bioequivalence & Bioavailability*, 6(6): 192-196.
- Siegel, R.L., Miller, KD. & Jemal, A. (2018). Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 68(1): 7-30.
- Siegel, R.L., Miller, K. D. & Jemal, A. (2020). Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 70(1), 7-30.
- Socinski, M.A., Bondarenko, I., Karaseva, N.A., Makhson, A.M., Vynnychenko, I., Okamoto, I., Hon, J.K., Hirsh, V., Bhar, P., Zhang, H., Iglesias, J.L. & Renschler, M.F. (2012). Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: final results of a phase III trial, *J Clin Oncol*, 30 (17), 2055-2062.
- Solaini, G., Sgarbi, G. & Baracca, A. (2011). “Oxidative phosphorylation in cancer cells”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 534-542.
- Sowter, H.M., Ratcliffe, P.J., Watson, P., Greenberg, A.H. & Harris, A.L. (2001). “HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors”, *Cancer Research*, 61, 6669–6673.
- Speirs, V. & Shaaban, A.M. (2009). The rising incidence of male breast cancer. *Breast Cancer Res Treatment*, 115:429–430
- Subhashini, J., Mahipal, S.V.K., Reddanna, P. 2005. “Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia *in vitro*”, *Cancer Letters*, 224 (1), 31-43.
- Takahashi, A., Matsumoto, H., Yuki, K., Yasumoto, J.I., Kajiwara, A., Aoki, M., Furusawa, Y., Ohnishi, K. & Ohnishi, T. (2004). High-LET radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of p53 status. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 60(2):591-7.
- ten Tije, A.J., Verweij, J., Loos, W.J. & Sparreboom, A. (2003). Pharmacological effects of formulation vehicles: implications for cancer chemotherapy, *Clinical Pharmacokinetics*, 42 (7), 665-685.
- Tritto, I., Wang, P., Kuppusamy, P., Giraldez, R., Zweier, J.L. & Ambrosio, G. (2005). “The antianginal drug trimetazidine reduces neutrophil mediated cardiac reperfusion injury”, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 46, 89-98.

- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C. & Thompson, C.B. (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation", *Science*, 324 (5930),1029-1033.
- Vincent T. DeVita., Theodore S. Lawrence. & Steven A. Rosenberg. (2015). DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology: Tenth Edition. 1117-1121 Publisher: Wolters Kluwer Health Adis (ESP)
- Weiss, JR., Moysich, K.B. & Swede, H. (2005). Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14(1): 20-26.
- Weiss, R.B., Donehower, R.C., Wiernik, P.H., Ohnuma, T., Gralla, R.J., Trump, D.L., Baker, J.R. Jr, Van Echo, D.A., Von Hoff, D.D. & Leyland-Jones, B., (1990). Hypersensitivity reactions from taxol, *Journal of Clinical Oncology*, 8 (7), 1263-1268.
- World Health Organization (WHO). Cancer. <http://www.who.int/cancer/en/>
- Yılmaz, M.S. & Atak, N. (2014). Meme kanseri riskinin beslenme ile ilişkili faktörler açısından değerlendirilmesi. *Turk J Public Health*, 12 (1), 51-60.
- Yurtsever, A.S. & Tiftik, R.N. (2021). Kemoterapiye Dirençli Meme Kanseri Tedavisinde Yeni Ufuklara Doğru: Uzun Kodlamayan Rna'lar. Bölüm 19. 301-310.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	EMRE KENDİGELEN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Hitit Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	2014
Yüksek Lisans	
Üniversite	Biruni Üniversitesi
Enstitü Adı	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programı	İş Sağlığı Ve Güvenliği
Mezuniyet Tarihi	2018
Yüksek Lisans	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mezuniyet Tarihi	2021
Yayımlar	