



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**ÇEŞİTLİ KEMOTERAPİ AJANLARININ FARKLI SICAKLIK VE
ÇÖZÜCÜLERDEKİ ÇÖZÜNÜRLÜKLERİNİN VE ANTİKANSER
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE KAYNAR

DOÇ. DR. ERCAN ÇAÇAN

TOKAT– 2024



Bu tez çalışması, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünü tarafından 2022/97 no'lu proje ile desteklenmiştir.

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN danışmanlığında hazırlamış olduğum “Çeşitli Kemoterapi Ajanlarının Farklı Sıcaklık ve Çözücülerdeki Çözünürlüklerinin ve Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

18/12/2024

Ayşe KAYNAR





ÖZET

ÇEŞİTLİ KEMOTERAPİ AJANLARININ FARKLI SICAKLIK VE ÇÖZÜCÜLERDEKİ ÇÖZÜNÜRLÜKLERİNİN VE ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Kaynar, Ayşe

Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ercan Çağan

Ocak 2024, 69+ xiii sayfa

Kanser insan hayatını tehdit eden ve dünya genelinde ölüme sebep olan hastalıkların başında gelmektedir. 2020 verilerine göre dünya çapında yaklaşık 19 milyon kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon da ölüm tespit edilmiştir. Bu kanser vakaları içerisinde, meme kanseri ve over kanseri kadınlarda sıklıkla karşılaşılan ve hayatı tehdit eden kanser türleri arasında ön sıralarda yer almaktadır. Kanser tedavisinde cerrahi müdahaleden sonra çeşitli tedavi modaliteleri uygulansa da kemoterapi bu tedavilerin temelini oluşturmaktadır. Docetaxel, meme, over ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri dahil olmak üzere farklı kanser türlerinin tedavisinde kullanılan, klinik açıdan iyi bilinen bir anti-mitotik kemoterapi ilacıdır. Lapatinib, daha önce kemoterapötik tedavi almış hastalarda ilerlemiş veya metastatik HER-pozitif meme kanserinin tedavisinde kullanılan bir antineoplastik ajan ve tirozin kinaz inhibitörüdür. Ayrıca, kanser tedavisi için yeni bir umut olan paladyum (II) komplekslerinin antikanser aktiviteleri bulunmaktadır. Bu kompleksler kemoterapide sıklıkla kullanılan diğer kemoterapötik ajanlara göre daha düşük yan etkilere sahiptir. Düşük çözünürlük, yeni kimyasal bileşiklerin formülasyonunda ve geliştirilmesinde olduğu kadar bunların jenerik geliştirilmesinde de temel sorundur. Kemoterapide de karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi de çözünürlüktür. Bu çalışmamızın asıl hedefi çeşitli kemoterapi ajanlarının farklı sıcaklık ve çözücüler kullanıp çözünürlüklerini arttırarak antikanser aktivitelerinde artış sağlayabilmektir. Bu tez çalışmasında shake flask yöntemi kullanılarak docetaxel, lapatinib ve Pd(II) komplekslerinin (Comp-A ve Comp-B); DMSO, PEG200 ve PEG400'ün çeşitli konsantrasyonlarında, 25°C, 30°C ve 35°C sıcaklıklar kullanılarak hazırlandı. Bu yöntemle, ilk olarak kullanılacak çözücü ve ilaç miktarları ölçülerek karıştırıldı. Daha sonra hazırlanan solüsyonlar 24 saat boyunca gerekli sıcaklıkta shakerda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası santrifüj edilerek süpernatant kısmı alındı ve çeşitli konsantrasyonları hazırlandı. Hazırlanan ilaç çözeltileri de MTT deneylerinde kullanıldı. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri yapılarak hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelendi. Elde edilen verilere göre, kullanılan ilaç ve bileşikler, uygulanan çözücü, sıcaklık ve doza bağlı olarak farklı sitotoksik etki gösterdi. Genel itibariyle, çözünme oranına bağlı olarak meme ve over kanseri hücre hatlarındaki canlılık oranlarında azalma meydana geldiği gözlemlendi. Sonuç olarak, elde ettiğimiz ön veriler ışığında, kemoterapi ilaçlarının geliştirilmesinde ve etkinliğinde, bu ajanların çözünürlük seviyelerinin tedavi açısından önem arz edebileceğini ortaya koyduk.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Paladyum, Docetaxel, Lapatinib, Shake Flask Yöntemi

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE SOLUBILITIES AND ANTI-CANCER ACTIVITIES OF VARIOUS CHEMOTHERAPY AGENTS IN DIFFERENT TEMPERATURES AND SOLVENTS

Kaynar, Ayşe

Master's Thesis, Department of Biology

Advisor: Associate Prof. Dr. Ercan Cacan

January 2024, 69+ xiii page

Cancer is one of the diseases that threaten human life and cause death worldwide. According to 2020 data, approximately 19 million cancer cases and approximately 10 million deaths were detected worldwide. Among these cancer cases, breast cancer and ovarian cancer are among the most common and life-threatening cancer types in women. Although various treatment modalities are applied after surgical intervention in cancer treatment, chemotherapy forms the basis of these treatments. Docetaxel is a clinically well-established anti-mitotic chemotherapy drug used in the treatment of different types of cancer, including breast, ovarian and non-small cell lung cancer. Lapatinib is an antineoplastic agent and tyrosine kinase inhibitor used in the treatment of advanced or metastatic HER-positive breast cancer in patients who have received prior chemotherapeutic therapy. Additionally, palladium (II) complexes, which are a new hope for cancer treatment, have anticancer activities. These complexes have lower side effects than other chemotherapeutic agents frequently used in chemotherapy. Low solubility is a fundamental problem in the formulation and development of new chemical compounds as well as in their generic development. One of the most important problems encountered in chemotherapy is drug solubility. The main goal of this study is to increase the anticancer activities of various chemotherapy agents by increasing their solubility by using different temperatures and solvents. In this thesis study, docetaxel, lapatinib and Pd(II) complexes (Comp-A and Comp-B) were used using the shake flask method; It was prepared using various concentrations of DMSO, PEG200 and PEG400, and temperatures of 25°C, 30°C and 35°C. With this method, first the amounts of solvent and drug to be used were measured and mixed. Then, the prepared solutions were incubated in the shaker at the required temperature for 24 hours. After incubation, the supernatant was removed by centrifugation and various concentrations were prepared. The prepared drug solutions were also used in MTT experiments. Statistical analysis was performed and its effect on cell viability was examined. According to the results, the drugs and compounds used showed different cytotoxic effects in a dose, solvent and temperature dependent. In general, it was observed that the viability of breast and ovarian cancer cell lines decreased depending on the solubility rate. In conclusion, in the light of the preliminary data we obtained, we demonstrated that the solubility levels of these agents may be important in terms of treatment in the development and effectiveness of chemotherapy drugs.

Key Words: Cancer, Palladium, Docetaxel, Lapatinib, Shake Flask Method

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimde her koşulda desteğini esirgemeyen, tanımaktan ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, sahip olduğu akademik bilgi ve tecrübeleri sınırsız bir şekilde paylaşarak, koşulsuz fayda sağlayabildiğim değerli danışmanım Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunmamı kabul eden, kattıkları engin bilgileri ve düşünceleri için sayın jüri üyelerine teşekkür ederim.

Çalışmalarımda bana bilgi ve desteklerini esirgemeyen ve her koşulda yardımlarını gösteren başta Aysun KESKİN ve Burcu BAL ÇAVDAR'a, Esra YILMAZ, Çağla SEVİNÇ ve F. Nihan ÇELİK'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım boyunca aldığım her kararda, giriştiğim her işte beni daima destekleyen ve her durumda arkamda duran canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayşe KAYNAR

Şubat 2024

İÇİNDEKİLER

ETİK SÖZLEŞME.....	iii
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
TABLolar LİSTESİ	xiii
1 GİRİŞ	1
2 LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	3
2.1 Kanser Nedir?	3
2.2 Meme Kanseri.....	3
2.3 Over Kanseri	5
2.4 Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi	7
2.5 Moleküler Temelleri	9
2.6 Tedavi Yöntemleri	11
2.6.1 Kemoterapi.....	11
2.6.2 Radyoterapi	14
2.6.3 İmmünoterapi	15
2.6.4 Tamamlayıcı ve Alternatif Tedaviler	16
2.7 Kemoterapide Çözünürlüğü Etkileyen Faktörler	17
2.7.1 Sıcaklık.....	17
2.7.2 Karıştırma Süresi.....	18
2.7.3 Çözücü Cinsi	18
2.8 Shake Flask Yöntemi	19
2.9 Paladyum (II) Kompleksleri	20
2.10Programlanmış Hücre Ölüm Yolları	23

2.10.1 Apoptoz.....	24
2.10.2 Nekroz.....	26
2.10.3 Otofaji	27
2.10.4 Piroptoz	28
3 MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1 Shake Flask Yöntemi Kullanılarak İlaçların Hazırlanması	30
3.2 Hücre Kültürü	31
3.3 Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi.....	32
3.4 İstatiksel Analiz ve Veri Görselleştirme.....	33
4 BULGULAR	34
4.1 Docetaxelin farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün MCF-7 hücre hattına etkisinin belirlenmesi	34
4.2 Lapatinibin farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün MCF-7 hücre hattına etkisinin belirlenmesi	36
4.3 Comp-A'nın farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün MCF-7 hücre hattına etkisinin belirlenmesi.....	39
4.4 Comp-B farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün MCF-7 hücre hattına etkisinin belirlenmesi	41
4.5 Docetaxel'in farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün OV2008 hücre hattına etkisinin belirlenmesi	44
4.6 Lapatinib'in farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün OV2008 hücre hattına etkisinin belirlenmesi	47
4.7 Comp-A'nın farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün OV2008 hücre hattına etkisinin belirlenmesi	50
4.8 Comp-B farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün OV2008 hücre hattına etkisinin belirlenmesi	52
4.9 Tartışma	54
5 SONUÇ VE ÖNERİLER	59
6 KAYNAKÇA	61

KISALTMALAR

ADP: Adenozin difosfat

ATP: Adenozin trifosfat

Bax: Bcl-2-ilişkili X proteini

Bcl2: B-hücreli lenfoma 2

DISC: Ölüme Neden Olan Sinyal Kompleksi

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleikasit

DR: Ölüm Reseptörü

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

IL: İnterlökin

MMR: Yanlış Eşleşme Tamiri

MTT: (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür)

NF-kB: Nükleer Faktör Kappa B

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

PEG: Polietilen glikol

RNA: Ribonükleikasit

TNF: Tümör Nekroz Faktör

TRADD: TNF-1 ile ilişkili Ölüm Alanı

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

μ L: mikro litre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Over karsinomlarının histolojik tipleri (Cho ve Shih, 2009).....	6
Şekil 2: OV2008 hücre hattı (sol) ve MCF-7 hücre hattı (sağ)	7
Şekil 3: Docetaxelin etki mekanizması (Noguchi,2006)	13
Şekil 4: Lapatinib tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak ATP bağlanmasını bloke eder ve downstream kaskadı inhibe eder (Moy ve Goss,2006).	14
Şekil 5: Shake flaks yöntemi çalışma prensibi	20
Şekil 6: Paladyum (II) komplekslerinin sentezi (Al-Janabi ve ark., 2020).....	22
Şekil 7: Apoptozda ekstrinsik ve intrinsik yollar şematik gösterimi (Sapkota, 2022)....	25
Şekil 8: Nekroz aktivasyonuna neden olan yollar (Hou ve ark., 2013).	26
Şekil 9: Otofaji şematik gösterimi (Anding ve Baehrecke, 2015).	27
Şekil 10: Piroptoz moleküler mekanizması şematik gösterim (Fang ve ark., 2020).	29
Şekil 11: Docetaxelin shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.....	34
Şekil 12: Docetaxelin shake flask yöntemi ile 30°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	35
Şekil 13: Lapatinibin shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	37
Şekil 14: Lapatinibin shake flask yöntemi ile 30°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	38
Şekil 15: Comp-A'nın shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	39
Şekil 16: Comp-A'nın shake flask yöntemi ile 30°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	40
Şekil 17: Comp-B'nın shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	42
Şekil 18: Comp-B'nın shake flask yöntemi ile 30°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	43
Şekil 19: Docetaxel'in shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	44
Şekil 20: Docetaxel'in shake flask yöntemi ile 30°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	45

Şekil 21: Docetaxel'in shake flask yöntemi ile 35°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	46
Şekil 22: Lapatinib'in shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	47
Şekil 23: Lapatinibin shake flask yöntemi ile 30°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	48
Şekil 24: Lapatinibin shake flask yöntemi ile 35°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	49
Şekil 25: Comp-A'nın shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	50
Şekil 26: Comp-A'nın shake flask yöntemi ile 30°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	51
Şekil 27: Comp-B'nın shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	52
Şekil 28: Comp-B'nın shake flask yöntemi ile 30°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri.	53

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: Çözeltiler hazırlanırken kullanılacak çözücü ve ilaç miktarları	30
Tablo 2: Dilüsyonlar hazırlanırken kullanılacak miktarlar	31



1 GİRİŞ

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kanser tedavisi için umut verici yeni metal kompleksler sentezlenmiş ve literatüre kazandırılmıştır. Bu komplekslerden biri de kanser hücrelerinde önemli bir antitümör aktiviteye sahip olan ve genel olarak kullanılan kemoterapötik ajanlara kıyasla daha düşük yan etkilere sahip olduğu gözlemlenen paladyum (II) kompleksleridir. Ayrıca paladyum (II) komplekslerinin platine kıyasla daha iyi bir çözünürlüğe sahip olması bu kompleksleri çekici hale getirmektedir (Ulukaya ve ark., 2011). Docetaksel ve lapatinib çeşitli kanserlerin tedavisinde klinikte kullanılan iki önemli kemoterapi ajanı olarak bilinmektedir. Docetaksel, mikrotübül depolimerizasyonunu önlerken aynı zamanda mikrotübül düzeneğini teşvik ederek ve stabilize ederek sitotoksik aktivitesini uygulayan bir antimikrotübül ajanıdır. Bu, normal hücre bölünmesinin inhibisyonu ile sonuçlanır. *In vitro* ve *in vivo* olarak docetaxel, çok çeşitli kanser hücrelerine karşı antineoplastik aktiviteye sahiptir, çeşitli antineoplastik ajanlarla sinerjistik aktivite gösterir ve genellikle insan meme kanseri hücre hatlarına karşı paklitakselden daha fazla sitotoksik aktiviteye sahiptir (Lyseng-Williamson ve Fenton, 2005). Lapatinib, hem epidermal büyüme faktörü reseptörünün hem de insan epidermal reseptörü (HER) 2'nin tirozin fosforilasyonunu inhibe eder, böylece reseptör aktivasyonunu önler (Dhillon ve Wagstaff, 2007). Antikanser ilaçların çoğunluğu zayıf sulu çözünürlüğe sahiptir, sağlıklı dokuda olumsuz etkiler yaratır ve bu nedenle kanser kemoterapisinin hem klinik etkinliği hem de terapötik güvenliği üzerinde büyük sınırlamalar getirir (Dragojevic ve ark., 2015). Düşük çözünürlük, ilaç keşfi ve geliştirilmesinde önemli bir sorundur. Azalmış çözünürlük ile ilişkili zorluklar hastalık alanına göre değişir. Onkoloji programlarında bu konu önemli bir sorundur ve yeterli çözünürlüğün sağlanamaması genellikle büyük bir engeldir. Çözünürlük sorunları genellikle projeye özgüdür ve kısmen terapötik hedefler tarafından yönlendirilir. Düşük çözünürlüğün üstesinden gelebilmek için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Yaklaşımlar, çözünürlük riskini tahmin etmek için yapısal tasarım sırasında siliko yöntemlerin uygulanmasını, potansiyel sorunları erken tanımlamak için çözünürlüğün taranmasını, çözünürlüğü artırmak için yapının değiştirilmesini ve çözünürlüğü ve çözünme oranını artırmak için formülasyonların geliştirilmesini içerir (Di ve ark., 2012). Heterojen olan çözünürlük reaksiyonları genellikle dengeye ulaşmak için yavaştır. Yüzey

aktif bileşikler, suda doygunluğa ulaşınca kadar çözündüğünde, sulu çözünürlük verilerinin yorumlanmasını zorlaştırabilecek kendi kendine ilişkili agregalar oluşturabilir. Kosolventlerin kullanımı (örneğin, etanol, propilen glikol, polietilen glikol, 1-metil-2-pirolidon) bu etkilerin bazılarını hafifletebilir (Avdeef, 2007). Fizikokimyasal bir özellik olarak çözünürlük, sıcaklıktan, basınçtan, malzemelerin saflığından, tampon çözeltilerin bileşiminden ve polimorfizm, agregasyon ve aşırı doymuş çözeltilerin oluşumu gibi bileşik özelliklerinden etkilenir. Bir ölçüm olarak çözünürlük, karıştırma süresi, sedimentasyon süresi, sulu tamponun bileşimi, sıcaklık, fazla katı miktarı ve faz ayırma tekniği dahil olmak üzere çeşitli deneysel faktörlerden de etkilenir (Baka ve ark., 2008).

Zayıf çözünürlük iki ana faktörden kaynaklanır. Yüksek lipofilisite ve katının çözünürlüğünü enerjetik olarak maliyetli hale getiren güçlü moleküller arası etkileşimler. İyi ve zayıf çözünür ile kastedilen, kısmen beklenen terapötik doza ve potansiyele bağlıdır. Zayıf sulu çözünürlük genellikle uygun formülasyon çalışmaları ile aşılabılır. Bununla birlikte, bu yaklaşım pahalıdır ve başarı garantisi yoktur (Faller ve Ertl, 2007). İlaç maddesinin çözünürlüğü veya çözünmesi, ilaç maddesinin malzeme mühendisliği veya formülasyon yaklaşımları yoluyla esas olarak iki seviyede değiştirilebilir. Bir metal maddenin çözünürlüğünü ve / veya çözünmesini arttırmak veya değiştirmek için hangi yol izlenirse izlensin, geliştirmenin ilerleyen aşamalarında ticari olarak uygulanabilir bir sürece ölçeklenebilir olması gerekir. Bir ilaç maddesinin sulu çözünürlüğünün yanı sıra, geçirgenliği de biyoyararlanım için ikinci kritik bir husustur (Stegemann ve ark., 2007).

2 LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1 Kanser Nedir?

Kanser, dünya çapında sekiz ölümden birinden sorumlu bir hastalıktır. İnsan vücudunun hücre tiplerinin ve organlarının çoğundan kaynaklanan ve normal doku sınırlarının ötesine geçebilen ve metastaz ile uzak organlara geçiş yapabilen, hücrelerin nispeten sınırsız çoğalması ile karakterize edilen, çeşitli risk faktörleri ve epidemiyolojiye sahip 100'den fazla farklı hastalığı kapsar (Stratton ve ark., 2009). Bu hastalığın oluşumunu sınırlamaya yönelik dünya çapındaki birçok çabaya rağmen, kanser son 50 yılda önde gelen ölüm nedeni haline gelmiştir. Kanserli hastalar için hayatta kalma oranları, özellikle ileri bir aşamada tespit edilenler için son derece düşük kalmaktadır. Kanserlin erken teşhisi yapılan hastalar, daha ileri kanserli hastalardan daha iyi iyileşme ve sağkalım oranına sahiptir. Çoğu durumda, evre 1 kanserlerin saptanması, %90'dan fazla beş yıllık sağkalım oranı ile ilişkilidir. Lezyonlar daha erken tespit edildiğinde (prealign aşamada), tedavi genellikle iyileştiricidir. Tümörlerin birçok proteinin kana salınımını indüklediği bilinmektedir. Çeşitli modifikasyonlar nedeniyle yabancı moleküller olarak görünürler ve bağışıklık sisteminin aktivasyonuna yol açarlar. Yüksek riskli bireylerin serumlarında otoantikörlerin varlığı, kanser gelişiminin başlangıcını önceden bildirir ve yararlı klinik tanı ve prognostik bilgiler için moleküler imzalar olarak önemlidir. Bu tür otoantikörler, kanserlin klinik tanısından önce meme ve diğer kanserli hastaların serumlarında tespit edilebilir. Meme ve diğer kanser serumlarındaki otoantikörler, sinyal iletimi, hücre döngüsü regülasyonu, hücre proliferasyonu ve apoptozda rol oynayan önemli molekülleri hedef alır ve bunların hepsi karsinogeneizde anahtar süreçlerdir (Ullah ve Aatif, 2009).

2.2 Meme Kanseri

Meme kanseri, memedeki hücrelerin hızla büyüdüğü ve kontrolsüz hale geldiği bir hastalıktır. Bu kanser türü, meme hücrelerinin veya dokusunun kanserli hücreye dönüşmesine göre birçok şekilde sınıflandırılır. Meme kanseri lobüllerden, kanallardan ve bağ dokusundan kaynaklanabilir. Kanserden esas olarak meme kanalları veya lobülleri etkilenir. Meme kanserinin metastazı kan damarları ve lenf düğümleri yoluyla gerçekleşebilir. En sık görülen meme kanseri türü invaziv duktal ve lobüler karsinomdur.

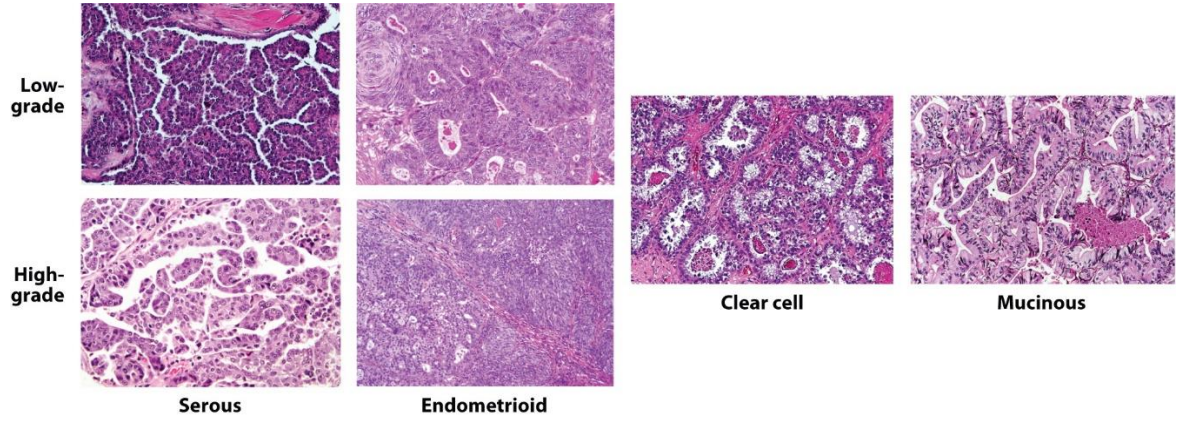
İnvaziv duktal karsinomda, karsinom kanallarda başlar ve daha sonra hızla büyür ve meme dokusunun diğer bölgelerine yayılır. Metastaz yoluyla vücudun diğer bölgelerine yayılabilir. İnvaziv lobüler karsinom ise meme lobüllerinden başlayıp diğer organlara ilerler ve yakın çevrede invazyon ve metastaz yapar (Singh ve Sain, 2023).

Bir meme kanseri hücre hattı olan MCF-7, metastatik meme kanseri olan bir hastanın plevral efüzyonundan türetilmiştir. Bu hücre hattının bir araştırma aracı olarak kullanışlılığı, dünya çapındaki laboratuvarlarda benimsenmesine yol açmıştır. MCF-7, kirlenici stromal hücrelerden arındırılmış, homojen olarak sınırsız bir şekilde kendi kendini kopyalayan materyal kaynağı sağlar ve basit standart ortamlarda kolayca kültürlenebilir. Böyle bir hücre hattı, kemopreventif bir ilaç ile bir kanser hücresi arasındaki etkileşimi incelemek için idealdir (Ray ve ark., 2006). Meme kanseri hastalarının çoğunluğu için spesifik bir risk faktörünü tanımlamak mümkün olmasa da bunlar çeşitlidir ve genetik değişikliklere neden olabilmektedir. Bu genetik değişiklikler arasında, DNA hasarına yanıt olarak DNA onarımını ve transkripsiyonel düzenlemeyi kontrol eden BRCA1 ve BRCA2 genlerini etkileyen mutasyonlar, genetik değişikliklerin birikmesine yol açabilir ve meme kanseri de dahil olmak üzere farklı tipte maligniteler geliştirmek için yaşam boyu riski büyük ölçüde artırabilir. Gerçekten de BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki mutasyonlar, dünya çapında meme kanseri için tanımlanmış en güçlü duyarlılık belirteçlerini temsil eden kalıtsal meme ve over kanseri riskinin artmasıyla ilişkilidir ve BRCA45-BRCA80 mutasyon taşıyıcıları için yaşam boyu meme kanseri riski tahmini %1-2 arasındadır. Benzer şekilde, TP53'ü etkileyen mutasyonlar da üçlü negatif meme kanseri ile ilişkilidir (García-Aranda ve Redondo, 2019).

Meme kanseri tedavisinin seçimi örneğin; tümör semptomları, organ disfonksiyonunun derecesi, östrojen ve progesteron reseptör durumu, gen amplifikasyonu, nüks yeri, hastalıksız aralık, hastanın menopoz durumu ve önceki tedaviye yanıt gibi birçok faktörden etkilenir (Baker ve ark., 2009). Meme kanseri sıklıkla normal meme gelişiminin düzenlenmesinde rol oynayan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR veya HER), tirozin kinazların (RTK'lar) ekspresyonu ve aktivasyonunun artması ile ilişkilidir. RTK'lar, çeşitli adaptör proteinleri ve sinyal enzimleri için yerleştirme yerleri sağlar ve bu da çeşitli downstream sinyal yollarını aktive eder. Bu olaylar hücre proliferasyonu, hayatta kalma, hareketlilik vb. ile bağlantılıdır. Bu nedenle, EGFR'lerin inhibisyonu önemli bir antitümörojenik etkiye sahip olabilir (Moy ve Goss, 2006).

2.3 Over Kanseri

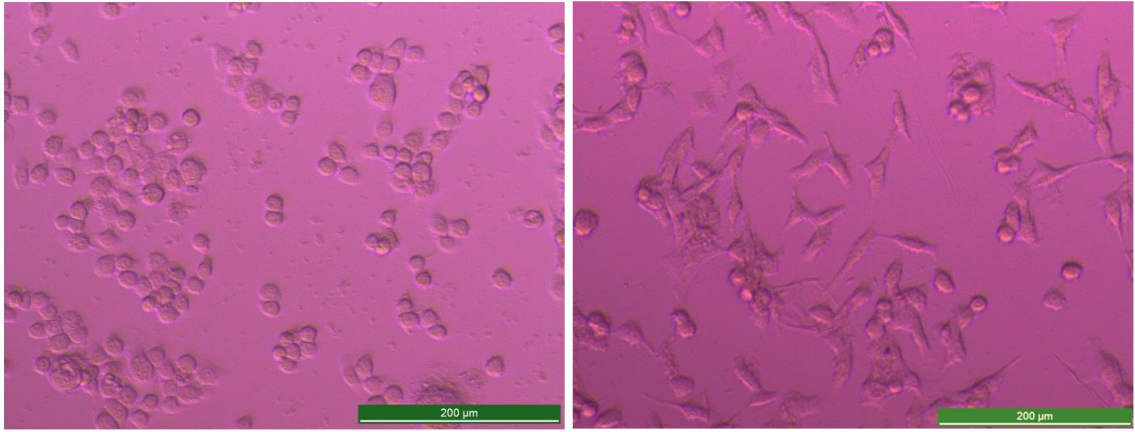
Kadınlarda ölüme neden olan başlıca kanser türlerinden biri de over kanseridir ve hızlı progresyon, geç metastazlar ve kötü prognoz ile karakterize jinekolojik malignitelerden kaynaklanan önde gelen ölüm nedenidir (Wu ve ark., 2008). Over karsinomu genellikle "sessiz katil" olarak adlandırılır, çünkü semptomlar tedavi şansının zayıf olduğu ileri aşamalara kadar ortaya çıkmaz. Erken evre over karsinomu olan kadınlarda sağkalım oranları %70-90 arasında iken, ileri evre hastalığı olan kadınlarda ise %20-30 arasında değişmektedir (Goff ve ark., 2000). Over neoplazmalar histolojik olarak köken aldığı dokuya göre dört kategoriye ayrılır. Çoğu over neoplazmı (%80 ila %85) koelomik epitelden türetilir ve epitelyal karsinomlar olarak adlandırılır. Daha az yaygın olan tümörler, ilkel germ hücrelerinden, özelleşmiş gonadal stromadan veya spesifik olmayan mezenkimden türetilir. Ek olarak, over, çoğunlukla gastrointestinal sistemden veya memeden metastatik karsinomların yeri olabilir. Seröz tümörler histolojik olarak fallop tüpü epiteline benzemektedir. Evre I ve evre IIa hastalığı olan hastaların yaklaşık %30'unda bilateral tutulum vardır. Kaba muayenede seröz karsinomlar düzensiz ve multiloküler bir görünüme sahiptir. Müsinöz tümörler histolojik olarak endoservikal epitelini andırır ve genellikle 20 cm veya daha büyük çaptadır. Hastaların %10 ila %20'sinde bilateraldirler. Endometrioid tümörler endometriyumun karsinomlarına çok benzer ve hastaların yaklaşık %20'sinde primer endometriyal kanser ile birlikte ortaya çıkar. Hastalığın erken evresinde, vakaların yaklaşık %10'unda bilateraldirler. Endometrioid over karsinomlarının yaklaşık %10'u endometriozis ile ilişkilidir, ancak endometriozisin malign transformasyonu hastaların %1'inden azında görülür. Yumurtalığın berrak hücreli karsinomları nadirdir. Vakaların yaklaşık %25'inde endometriozis ile birlikte görülürler. Brenner tümörü, tüm yumurtalık neoplazmalarının sadece %2-3'ünü temsil eder ve bu tümörlerin %2'sinden azı kötü huyludur. Brenner tümörlerinin yaklaşık %10'u, aynı veya zıt yumurtalıkta müsinöz bir kistadenom veya dermoid kist ile birlikte ortaya çıkar. Her histolojik tip için düşük malign potansiyele veya sınırdaki histolojik görünüme sahip tümörler mevcuttur. Malign seröz tümörlerin yaklaşık %5-10'u sınırdaki iken, malign müsinöz tümörlerin %20'si bu kategoriye girer. Endometrioid, berrak hücreli ve Brenner tümörleri nadiren sınırdaki bulunur (Hacker ve ark., 2010).



Şekil 1: Over kansinomlarının histolojik tipleri (Cho ve Shih, 2009)

Over kanseri kemoterapiye yüksek yanıt oranı ile karakterize olmasına rağmen, yüksek mortalite oranı büyük ölçüde birinci basamak kemoterapötik ajanlara direnç gelişmesine bağlıdır. Başlangıçta kemoterapiye yanıt veren hastaların çoğunluğu iki yıl içinde kemodirençli hastalıkla nüksedecektir. Yumurtalık kanserinin ilerlemesini ve edinilmiş kemorezistansın gelişimini yönlendiren moleküler ve genetik değişikliklerin anlaşılması, dirençli hastalığın ortaya çıkmasını öngörmek ve önlemek için stratejilere yol açabilir (Ali ve ark., 2013). Over kanseri gelişme riskinin artmasıyla ilişkili bir dizi genetik faktör vardır. Germline BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları, over kanseri için bilinen en önemli genetik risk faktörleridir ve her iki mutasyon da hastaların %17'sinde bulunur. CHEK2, MRE11A, RAD50, ATM ve TP53 gibi DNA onarımında rol oynayan diğer genlerdeki kalıtsal mutasyonlar da over kanseri gelişme riskini artırabilir (Matulonis ve ark., 2016). Majör hücre içi sinyal yolları over kanseri hücre gelişiminde rol oynar. Malign mekanizmaların anlaşılması ve over hücrelerinin epitelyal over karsinomuna dönüşümü, spesifik over kanseri biyobelirteçlerini tanımlamanın bir yolu olarak görülmektedir. Over kanserinde genetik amplifikasyon, mutasyonlar, hipermetilasyon ve çok sayıda kromozomal delesyon bulunmuştur. Bu, tümör baskılayıcı genler ve onkogenler gibi over kanseri gelişiminde rol oynayan birkaç ana gen kategorisinin tanımlanmasına işaret etmektedir. Bu nedenle, bu genler, kanser hücresi büyümesi, sağkalım, invazyon ve metastazda merkezi bir rol oynayan hücre sinyal yollarıyla doğrudan bağlantılıdır. Literatüre göre over kanseri ile ilişkili sinyal yolları şunlardır: Aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir arttırıcısı (NF-kB) yolu,

transkripsiyon aktivatörü 3 (Jak-STAT 3) yolu, mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolu, proto-onkogen tirozin-protein kinaz Src yolu, ErbB aktivasyon yolu, lisofosfatidik asit (LPA) yolu, fosfatidilinositol 3-kinazlar (PI3K) yolu, Müllerian inhibitör madde reseptör yolu, EGF ve VGEF yolları ve ER beta yolu (Longuespée ve ark., 2012). EGFR ve GPCR yolakları da kanser proliferasyonu ve sağkalımının çeşitli yönlerinde yer almaktadır. GPCR aracılı hücre sağkalım sinyali, G-protein sinyal (RGS) proteinlerinin düzenleyicisinin aktivitesine karşı çıkan G-proteinleri tarafından kontrol edilir. RGS proteinleri, GTP'nin GDP'ye hidrolizini arttırmak için G-proteinlerinin aktive edilmiş $G\alpha$ alt birimine doğrudan bağlanarak GPCR sinyalinin sonlandırılmasını hızlandırır, bu da G-proteinlerini inaktif bir duruma döndürür. Bu nedenle, RGS proteinleri hücre sağkalımı ve tümör oluşumunda önemli roller oynar (Cacan, 2017).



Şekil 2: OV2008 hücre hattı (sol) ve MCF-7 hücre hattı (sağ)

2.4 Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Kanser epidemiyolojisine ilişkin derin ve doğru bilgi, bu durumların olası nedenleri ve nüfus eğilimleri hakkında temel bilgiler sağlar ve böylece önleme, tarama ve teşhis için etkili politikalar geliştirmeyi amaçlayan zamanında ve uygun sağlık müdahaleleri oluşturmayı mümkün kılar (Mattiuzzi ve Lippi, 2019). Ulusal Kanser Enstitüsü, kanseri anormal hücrelerin çoğalabileceği ve komşu dokuyu istila edebileceği bir grup bozukluk olarak tanımlar. Kanser, vücudun çoğu bölgesinde gelişebilir, bu da çeşitli kanser formlarına neden olabilir ve bazen kan ve lenf sistemleri yoluyla yayılabilir (Gaidai ve ark., 2023). Dünyada ve ülkemizde dolaşım sistemi hastalıklarından sonra ölüme sebep

olan ikinci hastalık kanserdir. Dünya üzerinde 2020 yılında 19 milyon 292 bin kişiye kanser teşhisi konulurken, 9 milyon 958 bin kişi kanser sebebiyle hayatını kaybetmiştir. Kanser ölümlerinin önde gelen nedeni 1,8 milyon ölümle (%18) Akciğer kanseri olmaya devam ederken, bunu kolorektal (%9,4), karaciğer (%8,3), mide (%7,7) ve meme (%6,9) kanserleri izlemektedir. Kansere bağlı ölüm nedenleri yıllar geçtikçe artmaktadır ve gerekli önlemler alınmazsa her geçen yıl çoğalarak daha da artacağı tahmin edilmektedir. Kanser tetikleyen çeşitli risk faktörleri belirlenmiştir. Tütün ve tütün ürünleri kullanımı, obezite, meyve ve sebzeden fakir diyet, fiziksel aktivite eksikliği, alkol kullanımı, HPV (Human Papilloma Virus) enfeksiyonu, hepatit veya diğer kanserojen enfeksiyonlara maruziyet, ultraviyole radyasyon maruziyeti, kentsel hava kirliliği ve katı yakıt kullanımından kaynaklanan iç mekân dumanı kansere neden olan risk faktörleridir. Tütün kullanımı ise bunlar arasında en başta gelenidir (Kabalak, 2023).

Kanser hastaları, birincil hastalıktan ve / veya hastalığın tedavisinin neden olduğu birçok farklı semptomdan muzdarip olabilir. Bu etkenlerin tümü bir araya gelerek hastaya, hastalığın neden olduğu tümör yükünün öznel karşılığı olan bir semptom yükü yükler. Bu semptomlar ağrı, gastrointestinal semptomlar (örneğin, bulantı, ishal), kaşeksi, yorgunluk, bilişsel bozukluklar, anksiyete ve depresyon gibi terminolojiler altında kategorize edilir. Semptomlar tedavide gecikmelere neden olabilir veya tedavinin erken sonlandırılmasına neden olabilir, fonksiyon ve rehabilitasyonu bozabilir ve önemli sıkıntılara neden olabilir (Cleeland ve ark., 2003). Anjiyogenez olarak bilinen bir işlemle yeni bir kan damarı kaynağının olmaması durumunda, yerinde bir tümör süresiz olarak uykuda kalabilir. Paradoksal olarak, anjiyogenezin kendisinin, vücudumuzda kanseri teşvik eden onkogenler veya tümörlerin büyümesini engellediği bilinen birçok tümör baskılayıcı genin kontrolü altında olduğu öne sürülmektedir. Zararsız in-situ tümörlerde karşılaşıldığı gibi, kanser hücrelerinin oluşturulmasında da aynı genler rol oynamaktadır (Folkman ve Kalluri, 2004).

Meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında en sık görülen kanserdir ve tüm kanser vakalarının yaklaşık %25'ini ve kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin %15'ini oluşturur (Sonalike ve ark., 2023). 2022 yılında tahmini 287.850 yeni invaziv kadın meme kanseri vakası ve 43.250 ölüm meydana gelmiştir (Hiatt ve ark., 2023). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) istatistiklerine dayanarak, önemli kentleşmeye, ekonomide hızlı büyümeye ve nüfus sosyoekonomik durumuna sahip ülkelerin yeni vakalarda kayda değer

bir artış gösterdiği bulunmuştur. Tanımlayıcı epidemiyolojik verilere dayanarak, meme kanseri, hayvansal protein ve doymuş yağlar bakımından zengin, yüksek kalorili bir diyet edinen, aktif olmayan bir yaşam tarzı ile ilişkili olan varlıklı bir toplumun hastalığıdır. Meme kanseri, alacalı formlarda ortaya çıkan, kendi kendine yeten bulaşıcı olmayan bir hastalıktır ve etiolojisinin, bireysel üreme paternine, hormonal faktörlere, diyet, fiziksel aktiviteye, yaşam tarzına ve belirli geliş prosedürlerine maruz kalmaya bağlı olarak çok faktörlü olduğu gözlenmektedir. Mutasyona uğramış hücreler genellikle bir yumru oluşturan lobüllerde veya kanallarda başlar ve sıklıkla mamogram ile görülebilir. İyi huylu bir tümörün bozulması, tümör hücrelerinin çevre dokuları (örneğin, kan ve lenf damarları) istila ettiği metastaz ile sonuçlanabilir (Tan ve ark., 2023). Son yıllarda yapılan araştırmalar, meme kanseri riskini artıran birkaç genetik faktörü de tanımlamıştır. Meme kanseri riskiyle ilişkili en iyi bilinen genler, kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık %25'inden sorumlu olan BRCA1 ve BRCA2'dir (Sonalike ve ark., 2023). Normal hücrelerde, bu genler hasarlı DNA'yı onaran proteinlerin yapılmasına yardımcı olur. Bu genlerin mutasyona uğramış versiyonları, kansere yol açabilecek anormal hücre büyümesine yol açabilir (Singh ve Sain, 2023). PALB2, CHEK2 ve ATM gibi diğer genler de daha düşük penetrasyona sahip olmakla birlikte meme kanserine yatkınlıkla ilişkilendirilmiştir. Bu genetik mutasyonlara sahip bireylerin tanımlanması, artan süreyans, risk azaltıcı cerrahi ve kemoprevensiyon gibi hedeflenen önleme stratejilerine izin verir (Sonalike ve ark., 2023).

2.5 Moleküler Temelleri

Kanser, temelde genetik materyalde meydana gelen deformasyonlar sonucu oluştuğu için genetik bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Mutasyonların nedeni olarak birçok etken gösterilebilir; kimyasal, radyasyon, virüsler gibi çevresel etkenlerle sonradan olabileceği gibi, germ hücreleri ile de kalıtılabilir (Ayhan ve Ogava, 2013). Tümörlerin, nokta mutasyonları ve gen amplifikasyonu, delesyon ve translokasyon gibi birikmiş moleküler genetik veya genomik değişikliklerin bir sonucu olarak geliştiği ve ilerlediği iyi bilinmektedir. Bu değişikliklerin analizi, tarihsel olarak, onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA hasarı onarımında yer alan genler dahil olmak üzere kanserle ilişkili yeni genlerin tanımlanmasına yol açmıştır. Son teknolojik gelişmeler ve insan genomu

projesinin başarısı, kanser genomunun moleküler manzarasını ortaya çıkarma girişimlerini ve kanserle ilişkili yeni genlerin keşfini büyük ölçüde kolaylaştırmıştır (Cho ve Shih, 2009). Bir tümör hücresi, spesifik büyüme avantajları elde etmek için gen fonksiyonunda kalıtsal değişikliklere uğrar. Onkogenler, hücre büyümesini ve hayatta kalmasını desteklemek için DNA hipometilasyonuna ve histon hiperasetilasyonuna maruz kalabilir (Cacan ve ark., 2015). Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör gen inaktivasyonları, hücrenin kontrolsüz çoğalması, kontak inhibisyonun kaybolması, invazyon ve metastaz yeteneği kazanması gibi malign özellikler kazanmasına yol açar. Proto-onkogenler hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında görevlidir. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olur (Aliustaoğlu, 2009).

Bazı gen aileleri, özellikle protein kinazlar, kanser genleri arasında özellikle belirgin bir şekilde öne çıkmaktadır. Ayrıca, kanser genleri belirli sinyal yollarında kümelenir. Örneğin, klasik MAPK/ERK yolunda upstream mutasyonları, *EGFR*, *ERBB2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *PDGFRA* ve *PDGFRB* gibi hücre zarına bağlı reseptör tirozin kinazlarda ve ayrıca *NF1*, *PTPN11*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS* ve *BRAF* gibi downstream sitoplazmik bileşenlerinde bulunur. Gliomlardaki son kapsamlı mutasyonel analizler, hemen hemen tüm vakaların bu kritik sinyal yollarındaki genlerden birinde bir mutasyona sahip olduğunu göstermiştir. Kanser hücreleri mutasyona uğramış kanser genleri tarafından kodlanan anormal proteinlere bağımlı olduklarından, yeni kanser terapötiklerinin geliştirilmesi için hedef haline gelmişlerdir. Meme kanserinde yaygın olarak çoğaltılan ve aşırı eksprese edilen *ERBB2* (*HER2* olarak da bilinir) tarafından kodlanan proteine karşı yönlendirilen bir antikordur. (Stratton ve ark., 2009).

Kanserin genetik temeli, özellikle onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA uyumsuzluk onarım genleri gibi belirli gen sınıflarını içerir. Başlangıçta bakteri ve mayalarda tanımlanan DNA uyumsuzluk onarım genlerinin insan homologları çeşitli sporadik kanserlerin patogenezinde rol oynamıştır. Kanserdeki rollerinin anlaşılması, DNA onarımı süreçlerindeki işlevlerinin anlaşılmasına bağlıdır (Li, 2003). Uyumsuzluk onarımı eksikliği ağırlıklı olarak kolon, endometriyum ve yumurtalık kanserleriyle bağlantılıdır (Jiricny ve Nyström-Lahti, 2000). Replikatif uyumsuzluk onarımının (MMR) birincil işlevi, DNA sentezi sırasında DNA polimeraz kaymasının bir

sonucu olarak ortaya çıkan baz-baz uyumsuzluklarını ve ekleme/silme döngülerini ortadan kaldırmaktır. İnsanlarda en az altı farklı MMR proteini gereklidir. Uyumsuzluğun tanınması için MSH2 proteini, baz-baz yanlış çiftlerinin mi yoksa ekleme/silme döngülerinin mi onarılacağına bağlı olarak iki ek MMR proteini (MSH6 veya MSH3) ile bir heterodimer oluşturur. İlk durumda MSH6 gereklidir, ikinci durumda ise MSH3 ve MSH6 kısmen yedekli işlevlere sahiptir. Beş insan MMR geninden (MSH2, MLH1, MSH6, PMS2 ve PMS1) herhangi birinin germ hattı değişikliği, tüm kolon kanseri vakalarının %1-5'ini oluşturan kalıtsal polipozis olmayan kolon kanserine (HNPCC) yol açar. HNPCC ailelerinden yatkın bireylerde yaşam boyu kolorektal karsinom (%70-85), endometriyal karsinom (%50) ve ayrıca topluca "HNPCC tümör spektrumu" olarak adlandırılan bazı diğer kanserler (%15'in altında) gelişme riski yüksektir (Peltomäki, 2001).

2.6 Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavisinde çeşitli tedavi türleri uygulanmıştır. Cerrahi onkoloji, immünoterapi, hormon tedavisi, radyoterapi, kemoterapi ve hatta çeşitli RNA moleküllerinin enjeksiyonu dahil olmak üzere birçok farklı yöntem bulunmaktadır. Bunlar arasında kemoterapi, özellikle metastaz ile komplike olan kanserler için oldukça başarılı bir seçimdir (Behranvand, ve ark., 2021).

2.6.1 Kemoterapi

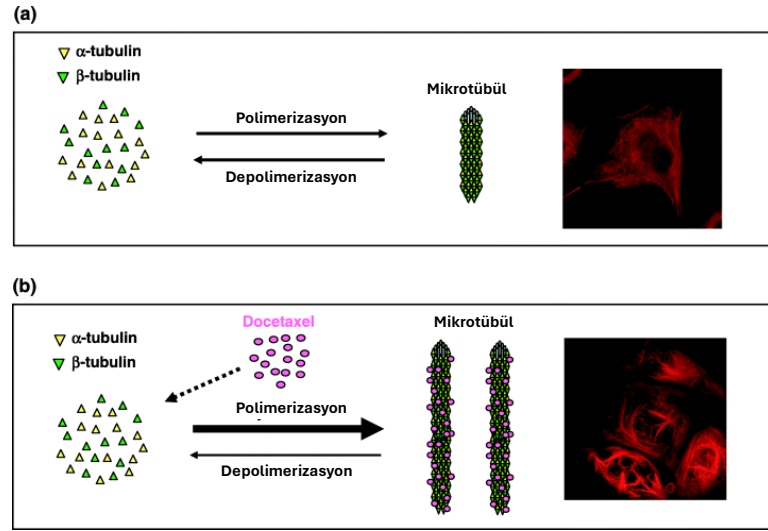
Kanser kemoterapisinde ilerleme, yeni yapılara, yeni etki mekanizmalarına ve yüksek düzeyde deneysel antitümör aktiviteye sahip ilaçların keşfi ve geliştirilmesi sayesinde kaydedilmiştir (Lavelle ve ark., 1995). Kemoterapi hem kanser hücrelerine hem de normal hücrelere etki eder, tümör büzülmesine neden olur, ancak neredeyse kaçınılmaz olarak birçok epitel ve epitel dışı dokuya zarar vermesi nedeniyle ciddi veya hatta hayatı tehdit edici olabilecek yan etkilere neden olur (Nencioni ve ark., 2018). Ancak spesifik bir antitümör aktivitesine sahip değildir, bu nedenle sadece malign hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını engellemekle kalmaz, aynı zamanda saç kökleri, sindirim sistemi

epiteli ve kemik iliği kök hücreleri gibi yüksek proliferasyon oranlarına sahip normal hücreleri baskılayarak normal hücreler ve dokular üzerinde ciddi yan etkilere ve hasarlara yol açarlar. Bu nedenle sık sık uygulanmaları önerilmez ve risk-fayda oranlarının dikkate alınması esastır. Kemoterapötik ilaçların uygun dozu, hedeflenen tümör hücrelerinin sayısına, ilaca direnç ve ilaç toksisitesi verilerine göre belirlenebilir. Kemoterapi ilaçlarının etkinliği, kalan tümör hücrelerinin sayısına ve gözlenen yan etkilere dayanarak tahmin edilmektedir (Behranvand, ve ark., 2021).

Kemoterapi, klinik düzeyde; primer indüksiyon tedavisi, neoadjuvan tedavi ve adjuvan tedavi olmak üzere 3 farklı şekilde uygulanmaktadır. Primer indüksiyon kemoterapisi ilerlemiş kanser hastalarında veya etkili bir tedavi alternatifi bulunmayan kanser türlerinde kullanılır. Çoğunlukla ilerlemiş metastatik hastalarda tercih edilen bir tedavi türüdür ve amacı tümör-ilişkili semptomları iyileştirmek, yaşam kalitesini yükseltmek ve tümör gelişiminde zamanı uzatmaktır. Neoadjuvan kemoterapi, lokalize kanserli hastalarda alternatif lokal tedavilerin işe yaramadığı durumlarda uygulanan kemoterapi yöntemidir. En sık kullanıldığı kanser türleri arasında mesane kanseri, özofagus kanseri, larinks kanseri, lokal olarak ilerlemiş küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve osteojenik sarkom bulunur. Adjuvan tedavi ise cerrahi operasyon ve radyoterapiyi destekleyici tedavi olarak tanımlanabilir. Burada kemoterapinin amacı lokal ve sistemik nüksetme insidansının önüne geçebilmektir. Meme kanserinde, mide kanserinde, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, Wilm tümöründe, anaplastik astrositom ve osteojenik sarkomlu hastalarda hem hastalıksız sağkalım (DFS) hem de genel sağkalım süresinin (OS) uzamasında etkili olan bir tedavi yöntemidir (Yazıcı, 2014).

Tüm antikanser ilaçlar, hücre büyümesi için gerekli olan mekanizmalara zarar verir. Docetaxel, hücre sağkalımı için gerekli olan mikrotübüllerin işlevini bozarak hücreleri öldürür. Aynı zamanda anti-apoptotik gen *Bcl2*'yi inhibe eder ve bir hücre döngüsü inhibitörü olan *p27*'nin ekspresyonunu teşvik eder. Bu nedenle docetaxel, yeni hücrelerin oluşmasını önler, mevcut hücrelerin apoptoza uğramasına neden olur ve diğer hücrelerin olgunlaşmasını ve çoğalmasını durdurur (Baker ve ark., 2009). Sitotoksik bir taksan olan docetaxel, esas olarak mitotik ve fazlar arası hücresel fonksiyonlar için gerekli olan hücrelerdeki mikrotübüler ağı bozarak sitotoksik aktivitesini uygulayan bir antimikrotübül ajandır. Aynı anda mikrotübül düzeneğini teşvik eder, stabilize eder ve mikrotübül depolimerizasyonunu önler, böylece normal hücre bölünmesini inhibe eder.

Docetaxel esas olarak sitokrom P450 (CYP) 3A4 izoenzimi tarafından bir minör ve üç majör olarak küçük inaktif metabolitelere metabolize edilir. Esas olarak safra yolu ile feçesle atılır. Çok küçük bir kısmı da direkt olarak idrarla atılır (Lyseng-Williamson ve Fenton, 2005). Docetaxel, meme kanseri hücre hatları da dahil olmak üzere çok çeşitli kanser hücrelerine karşı *in vitro* ve *in vivo* antineoplastik aktiviteye sahiptir. (Baker ve ark., 2009). Meme, küçük hücreli dışı akciğer, over ve baş-boyun kanserlerinde önemli aktiviteye sahiptir (Clarke ve Rivory, 1999).

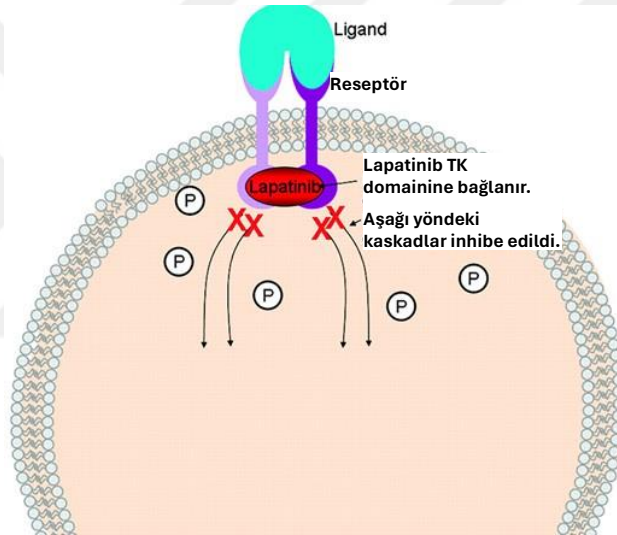


Şekil 3: Docetaxelin etki mekanizması (Noguchi,2006)

Mikrotübüllerin seviyeleri, α -tübülün ve β -tübülünün polimerizasyonu ile mikrotübüllerin depolimerizasyonu arasındaki denge ile düzenlenir. Docetaxel tedavisi olmayan tümör hücreleri (şekil 3.a) ile, docetaxel tedavisi olan tümör hücreleri (şekil 3.b) karşılaştırıldığında, mikrotübüllerin sentezinin artmasına yol açan artmış polimerizasyon ve azalmış depolimerizasyon göstermektedir (Noguchi,2006).

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER) reseptör tirozin kinaz ailesi, birçok kanserin biyolojisinde önemli bir rol oynar. Meme ve gastrointestinal kanser türlerinde ve ek tümör tiplerinde de daha düşük oranlarda, EGFR ve HER2 veya HER3 ile homo veya heterodimerizasyonu, kanser hücresi büyümesi ve hayatta kalması için gereklidir. HER2'yi aşırı eksprese eden meme kanseri hastaları, hastalıklarının daha agresif bir seyrine sahiptir. Bir tirozin kinaz inhibitörü olan lapatinib, reseptörün hücre içi alanının ATP'ye bağlanma bölgesine bağlanarak EGFR ve HER2 tirozin kinaz aktivitesini bloke eder ve tümör hücresi büyümesinin inhibisyonuna neden olur. Lapatinib genellikle iyi

tolere edilir (Voigtlaender ve ark., 2018). Lapatinib, tirozin kinaz reseptör alanından (yarı ömür ≥ 300 dakika) yavaş bir ayrışma oranına sahiptir, bu da tümör hücrelerinde tirozin kinaz aktivitesinin uzun süreli inhibisyonuna neden olabilir. Hem EGFR hem de HER2'nin tirozin kinaz alanlarındaki adenosin trifosfat (ATP) bağlanma bölgesi için rekabet eder, böylece ATP'nin tirozin kalıntısının fosforilasyonu için bir kofaktör olarak kullanılmasını önler, bu da reseptör aktivasyonu sırasında önemli bir adımdır. Lapatinibin HER'den yavaş ayrışmasının, bağlı molekülün konformasyonundaki değişikliklerle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Dhillon ve Wagstaff, 2007). Bu inhibitör, metastatik HER2 pozitif meme kanseri tedavisi için 2007'den beri ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Segovia-Mendoza ve ark., 2015).



Şekil 4: Lapatinib tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak ATP bağlanmasını bloke eder ve downstream kaskadı inhibe eder (Moy ve Goss, 2006).

2.6.2 Radyoterapi

Radyasyon tedavisi, lokalize solid kanserlerin tedavisinde mevcut en etkili sitotoksik tedavidir. Bu yaklaşımın başarısı, ABD'de kanserli hastaların yaklaşık %60'ının, icadından bir yüzyıl sonra ve diğer birçok tedavi yöntemindeki ilerlemelere rağmen küratif radyasyon tedavisi almaya devam etmesiyle örneklenmektedir. Son 20 yılda, klinik radyasyon terapisinde fiziksel doz verme seçeneklerinde çarpıcı bir artış olmuştur (Schaue ve McBride, 2015). Radyasyonun birincil mekanizması, apoptoz ve hücre ölümü ile sonuçlanan tümör hücresi DNA'sına geri dönüşümsüz olarak zarar veren reaktif

oksijen türlerinin üretilmesidir (Graham ve Unger, 2018). Radyoterapide normal dokulara verilen zararı en aza indirirken kötü huylu tümörleri yok etmek için iyonlaştırıcı radyasyon kullanılmaktadır ve oldukça etkili olabilmektedir. Hücrelölümüllük, çekirdekte üretilen çift sarmallı DNA kırılmalarının sayısı ile ilişkili olarak görünmektedir. Dokuların radyoterapiye duyarlılığı, radyasyon hasarını onarma, yeniden doldurma ve yeniden oksijenlendirme yeteneklerine bağlı gibi görünmektedir. Çift ve tek sarmallı DNA kırılmalarını onarma kapasitesi normal doku ve farklı tümörler arasında değişir. Yeniden çoğalma yeteneğı önemlidir, çünkü hücreler radyasyon tarafından öldürülen hücrelerin yerini almak için hızla bölünebilir. Tümörler büyüdükçe, neoplazmı beslemek için yeni kan damarları gelişir. Genel olarak, yeni kan damarları doğada ilkeldir ve kan temini büyüyen tümörü beslemek için yetersizdir. Hipoksik hücreler içeren ve radyodirenç kaynağı olan bu tür tümörlerde nekrotik alanlar gelişir. Bununla birlikte, radyoterapi seyri sırasında hipoksik olan hücreler yeniden oksijenlenebilir ve daha radyoduyarlı hale gelebilir (Symonds ve Greenhalgh, 2014).

2.6.3 İmmünoterapi

Çoğu kanser hastası cerrahi, radyasyon ve / veya kemoterapi kombinasyonu ile tedavi edilir. Primer tümör, çoğu durumda, bu standart tedavilerin bir kombinasyonu ile etkili bir şekilde tedavi edilebilirken, hastalığın yayılmış tümör hücreleri yoluyla metastatik yayılmasını önlemek genellikle etkili değildir. Bu nedenle, kan dolaşımında bulunan yayılmış tümör hücrelerinin ve uzak organlardaki mikrometastazların yok edilmesi, kanser immünoterapisinde umut verici bir başka yaklaşımı temsil etmektedir. Kanser immünoterapisinin temel stratejileri, tümöre özgü antikorların ve hücrelölümüllük mekanizmaların terapötik potansiyelinden yararlanmayı amaçlamaktadır. Pasif antikor tedavisi, büyük miktarlarda tümör antijenine özgü antikorların tekrar tekrar uygulanmasına dayanırken, aktif immünoterapi, aşılamaı takiben konağın bağışıklık sistemi tarafından hem humoral hem de sitotoksik T hücresi efektör mekanizmalarını birleştiren tümöre özgü bir immün yanıtın oluşturulmasını amaçlamaktadır (Schuster ve ark., 2006). İmmünoterapiler, ilerlemiş kanserlerin tedavisi için umut verici bir yöntem sunar, çünkü bağışıklık sistemi sistemiktir ve bu nedenle metastatik hastalığa saldırabilir. Tümöre özgü sitotoksik T lenfositleri (CTL'ler) ve aktive edilmiş doğal

öldürücü (NK) hücreler, kanser hücresi öldürmede özellikle önemli roller oynar ve birçok immünoterapinin temelini oluşturur (Cacan ve ark., 2015). Kanser immünoterapisi, kanserle savaşmak için vücudun kendi bağışıklık sistemini kullanmayı amaçlamaktadır. Bugünün başarıları, 1980'lerin sonlarında James Allison ve diğerlerinin laboratuvarlarında, T hücrelerine fren yapan protein reseptörlerini deşifre etmek için yapılan temel araştırmalara dayanmaktadır (McNutt, 2013). Kanser immünoterapisinde; monoklonal antikolar, adoptif immünoterapi, aşılar, sitokinler gibi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (Şakalar ve ark., 2013). Bu immünoterapötik yöntemlerden üzerinde en fazla klinik çalışma yapılan ve onay almış olan yöntem monoklonal antikolardır. Monoklonal antikoların aktive olmaları hücre yüzeyindeki reseptörler ile bağlantı kurmaları sonucu oluşur. Bu sayede ortaya bir sinyalizasyon çıkar ve farklı biçimlerde gelişebilir. Anti CD-20 monoklonal antikoru apoptozu indükler, EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) bağlayan antikor ise doğal ligandların bağlanmasını engeller ve reseptörleri bloke eder. Monoklonal antikorda bulunan Fc reseptörü sayesinde mononükleer hücreler ve lökositler antikorla kaplı hücreleri fagosite ederek ya da sitotoksik granüllerini boşaltarak yok ederler. FcγR ise IgG (İmmünoglobülinG) molekülüne özgü bir reseptör olarak tanımlanır. IgG yapısında olanlar klasik kompleman kaskadı yoluyla inflamasyon cevap oluşmasına neden olabilir. Gelişen inflamasyon cevap, fagositik lökositlerin kemotaktik etki yapmasını, bununla birlikte sekonder sitokinlerin salınmasına neden olarak vasküler geçirgenliği artırır ve bu sayede monoklonal antikolar hücre içine daha rahat nüfuz edebilirler (Barbaros ve Dikmen, 2015).

2.6.4 Tamamlayıcı ve Alternatif Tedaviler

Tamamlayıcı tedavi, hastalığın semptomlarını ve ilaçların yan etkisini azaltmak, yaşam kalitesini arttırmak, fiziksel ve psikolojik açıdan destek sağlayarak bilimsel tıbbi destek amaçlı yapılan tedavilerdir. Alternatif tedavi ise, etkisi bilimsel olarak kanıtlanmamış tedavilerin bilimsel tıbbi uygulamalar yerine kullanılmasıdır. Tamamlayıcı ve alternatif tedavi (TAT) kanser üzerinde kullanımı giderek artmaktadır (Kav ve ark., 2008). Kanser hastalarının TAT kullanımına yönelme sebepleri tıbbi tedaviye destek olma ve kanserin tekrarlamasını önleme amaçlı olabileceği gibi konvansiyel tedavilerin yerine son bir çare

olarak bu yöntemlere başvurabilmektedirler (Kurt ve ark., 2013). TAT tedavileri kabaca 5 şekilde kategorize edilebilir. Alternatif tıbbi sistemler, zihin-beden müdahaleleri, biyolojik temelli terapiler, manipülatif ve beden tabanlı yöntemler ve enerji terapileri (Cassileth ve Deng, 2004).

2.7 Kemoterapide Çözünürlüğü Etkileyen Faktörler

Çözünürlük, ilaç keşfi ve ilaç adayı seçim sürecinin çok erken dönemlerinde değerlendirilmesi ve anlaşılması gereken yeni bir molekülün temel fizikokimyasal parametrelerinden biridir. Sentezlenen maddenin ilk miktarından, genellikle birkaç miligramdan başlayarak, ilk analitik testler serisi, maddenin belirli bir çözücüdeki denge çözünürlüğünün yanı sıra, maddenin belirli koşullar altında çözeltideki konsantrasyonunu yansıtan görünür veya dinamik çözünürlüğü içerir. Denge çözünürlüğünün değeri genellikle normalde 4 ila 24 saat arasında olan test süresi ile sınırlıdır. Maddenin sulu bir sistemdeki çözünürlüğü ve görünür çözünürlüğü çeşitli faktörlere bağlıdır (Stegemann ve ark., 2007). Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ne (BCS) göre, bir ilacın en yüksek doz mukavemeti 250 mL veya daha az sulu ortamda 1 ila 7,5 pH aralığında çözünür değilse, suda az çözünür olduğu kabul edilir. Birçok sitotoksik ilaç, ilacın çözünmesi için yüksek kafes enerjisine ve ilaç moleküllerinin su ile hidrojen bağları oluşturmasını engelleyen hacimli polisiklik yapıları nedeniyle bu kategoriye girmektedir (Narvekar ve ark., 2014).

2.7.1 Sıcaklık

Çözünürlüğün sıcaklığa bağımlılığı, mutlak sıcaklık T 'nin bir fonksiyonu olarak çözünürlüğün davranışını tanımlamak için sıklıkla kullanılan van't Hoff denklemi tarafından çözünenin mol fraksiyonu ile ilgilidir. Sabit basınçta, bir katının T sıcaklığının bir fonksiyonu olarak bir sıvı içindeki çözünürlüğü ilişkisi ile ifade edilebilir (Wei ve ark., 2012). Sıcaklığın arttırılması katı bileşiğin çözünmesini hızlandırır ve sıklıkla aşırı doymuş bir çözelti ile sonuçlanır (Loftsson ve Hreinsdóttir, 2006).

2.7.2 Karıştırma Süresi

Karıştırma, sıvı sistemin homojenliğini artırır. Karıştırma süresi, ölçek büyütme veya küçültmede kullanılan çok önemli bir parametredir. Bu sürenin belirlenmesi farklı fiziksel ve kimyasal teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Karıştırma süresinin ölçülmesi birçok araştırma makalesinin odak noktası olmuştur. Bununla birlikte, tüm durumlar için altın standart yoktur. Bazı yöntemler laboratuvar ölçeğinde iyi çalışırken, büyük ölçekte başarısız olurlar. Bu nedenle, mutlak değerleri farklı yöntemlerle karşılaştırmak anlamsızdır. Ayrıca, literatürde bildirilen verilerin karşılaştırılması zordur, çünkü homojenlik farklı kriterlere göre tanımlanmıştır. Bu nedenle, karıştırma süresi sadece göreceli homojenlik açısından anlamlıdır (Tan ve ark., 2011).

2.7.3 Çözücü Cinsi

Normalde ilaçların çözücülerdeki çözünürlüğü, ilaç molekülleri ve çözücü molekülleri arasındaki etkileşimin sonucudur. Çözücü, çözelti içindeki moleküller veya iyonlar arasındaki çekimi azaltarak ilaç moleküllerini veya iyonlarını çözer. Bu nedenle ilacın ve çözücünün fiziksel ve kimyasal özellikleri de dahil olmak üzere polarite, dielektrik sabiti ve ayrıca çözünme prosesinin sıcaklık ve pH gibi faktörlerini de içerir. Yukarıda belirtilen faktörler, çözünürlük profilinin şeklini tahmin etmek için kesinlikle gerekli faktörlerdir (Yang ve ark., 2019). Organik çözücülerin kullanımına, üretimine ve bertarafına giderek daha fazla odaklanılmaktadır ve bu nedenle tehlikeli olmayan alternatiflerin geliştirilmesine (yeşil kimya ve mühendisliğin çeşitli hedeflerinden biri) önem verilmektedir. Son zamanlarda yapılan bir dizi inceleme, PEG kimyasını ve biyoteknoloji ve tıptaki uygulamalarını da kapsamıştır. Polietilen glikol, PEG: $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{H}$ 200 ila on binler arasında çeşitli moleküler ağırlıklarda mevcuttur. Oda sıcaklığında, suda çözünür ve higroskopik polimer, moleküler ağırlığı 600'den düşük olanlar renksiz viskoz bir sıvıdır. PEG'lerin sayısal tanımı genellikle ortalama moleküler ağırlığın sayısını gösterir. Düşük molekül ağırlıklı sıvı PEG'ler, su ilavesi olsun veya olmasın, kendi başlarına çözücü olarak kullanılabilir. PEG, FDA'nın GRAS (Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınan Bileşikler) listesinde, ayrıca düşük yanıcılık özelliğine sahiptir ve biyolojik olarak parçalanabilir (Chen ve ark.,

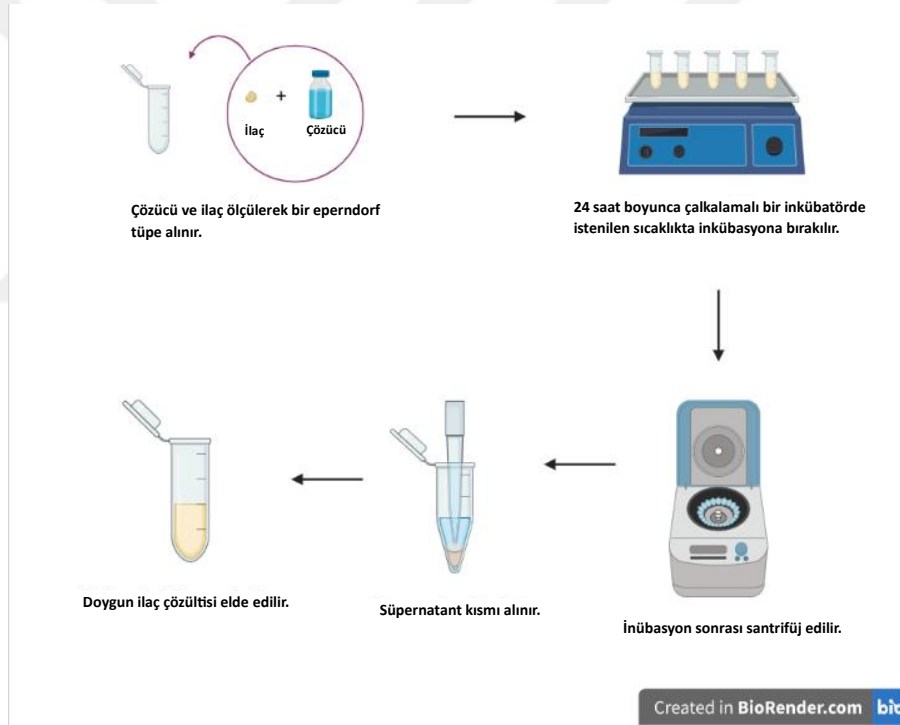
2005). Kanser ilacı geliştirme ile ilgili olarak, amaç, antikanser ilaçların tümör penetrasyonunu, bunları PEG ile sararak iyileştirmektir. Bu da ilaçların hastalara olumsuz yan etkilerini azaltır. Bununla birlikte, PEGilasyon, retiküloendotelyal sistem tarafından alımdan kaçarak bu ilaçların kandaki dolaşım süresini arttırmaya yardımcı olur (Hoffmann, 2022). Dimetil sülfoksit $[(CH_3)_2S]$; DMSO], amfipatik yapısı nedeniyle küçük hidrofobik ilaç moleküllerini çözmek için yaygın olarak çözücü olarak kullanılan organik bir polar aprotik moleküldür. DMSO, membrana nüfuz etme ve suyla yer değiştirme özellikleri nedeniyle hücre kriyoprezervasyonu için yaygın olarak kullanılır. Geniş çözündürme kabiliyeti nedeniyle DMSO, birçok ilaç türü için iyi bir çözücüdür ve genellikle hem in vitro hem de in vivo çalışmalar için tercih edilmektedir. Bazı çalışmalar DMSO'nun toksik olabileceğini kabul etse de bu çözücünün kullanımı o kadar yaygındır ki, kullanılan DMSO konsantrasyonu genellikle bildirilmez (Galvao ve ark., 2014).

2.8 Shake Flask Yöntemi

İlaç adaylarının çözünürlüklerinin belirlenmesi, ilaç araştırmalarında hem keşif hem de geliştirme aşamalarında önemlidir. İlaç araştırmalarının erken aşamalarında, ilaç benzeri adayları taramak için diğer fizikokimyasal parametrelerle (lipofilisite, iyonizasyon, geçirgenlik) birlikte çözünürlük kullanılır (Baka ve ark., 2008). Shake flask yöntemi, çözünürlüğün sağlanmasında en güvenilir ve yaygın olarak kullanılan tekniklerden biri olarak kabul edilir. Numune hazırlama, dengeleme, fazların ayrılması, doymuş çözeltinin ve artık katının analizi ve veri analizi ve yorumu olarak belirli adımlardan oluşur (Veseli ve ark., 2019). Bu yöntem kullanılarak yapılan çözünürlük deneyleri birkaç günden haftalara kadar devam edebilir (Bergström ve ark., 2002). Farmasötik literatürde yaygın olarak kullanılan iki çözünürlük terimi kinetik çözünürlük ve termodinamik (denge) çözünürlüğüdür. Kinetik çözünürlük indüklenmiş bir çökeltinin çözeltide ilk görüldüğü sırada bir bileşiğin konsantrasyonudur. Termodinamik çözünürlük ise fazla katısı mevcut olup çözelti ve katının dengede olduğu doymuş çözelti içerisindeki bir bileşiğin konsantrasyonu olarak tanımlanabilir (Baka ve ark., 2008).

Kinetik çözünürlük ölçümlerinin aksine, termodinamik çözünürlük testleri, katı bir bileşiğin bir sıvı içinde dağıtılmasıyla gerçekleştirilir. Termodinamik çözünürlük

genellikle bir bileşimin gerçek çözünürlüğü ve geliştirme ihtiyaçları için altın standart olarak kabul edilir. Bununla birlikte, bu değerler mutlak sayılar değildir ve kinetik değerler gibi, çok sayıda bileşik özelliğe ve deneysel faktöre bağlıdır. Termodinamik çözünürlük ölçümü için, bileşiklerin çözünme hızı önemli bir rol oynar, çünkü bileşimin kristal yapısı, çözünürlük işleminin bir parçası olarak bozulmak zorundadır. Sonuç olarak, erken keşifte sıklıkla üretilen amorf malzeme veya zayıf kristalin malzeme, kristalin ilaca kıyasla neredeyse her zaman tüm çözücülerde daha yüksek çözünürlük gösterir. Kristalinitenin yanı sıra, çözünme hızı, karıştırma hızı, ilaç çözünürlüğü, sıcaklık, zaman, partikül boyutu, bileşik viskozitesi, çözücü viskozitesi (difüzyon katsayısı) ve çözücünün polaritesi gibi bir dizi ek faktörden etkilenir (Alsenz ve Kansy, 2007).



Şekil 5: Shake flaks yöntemi çalışma prensibi

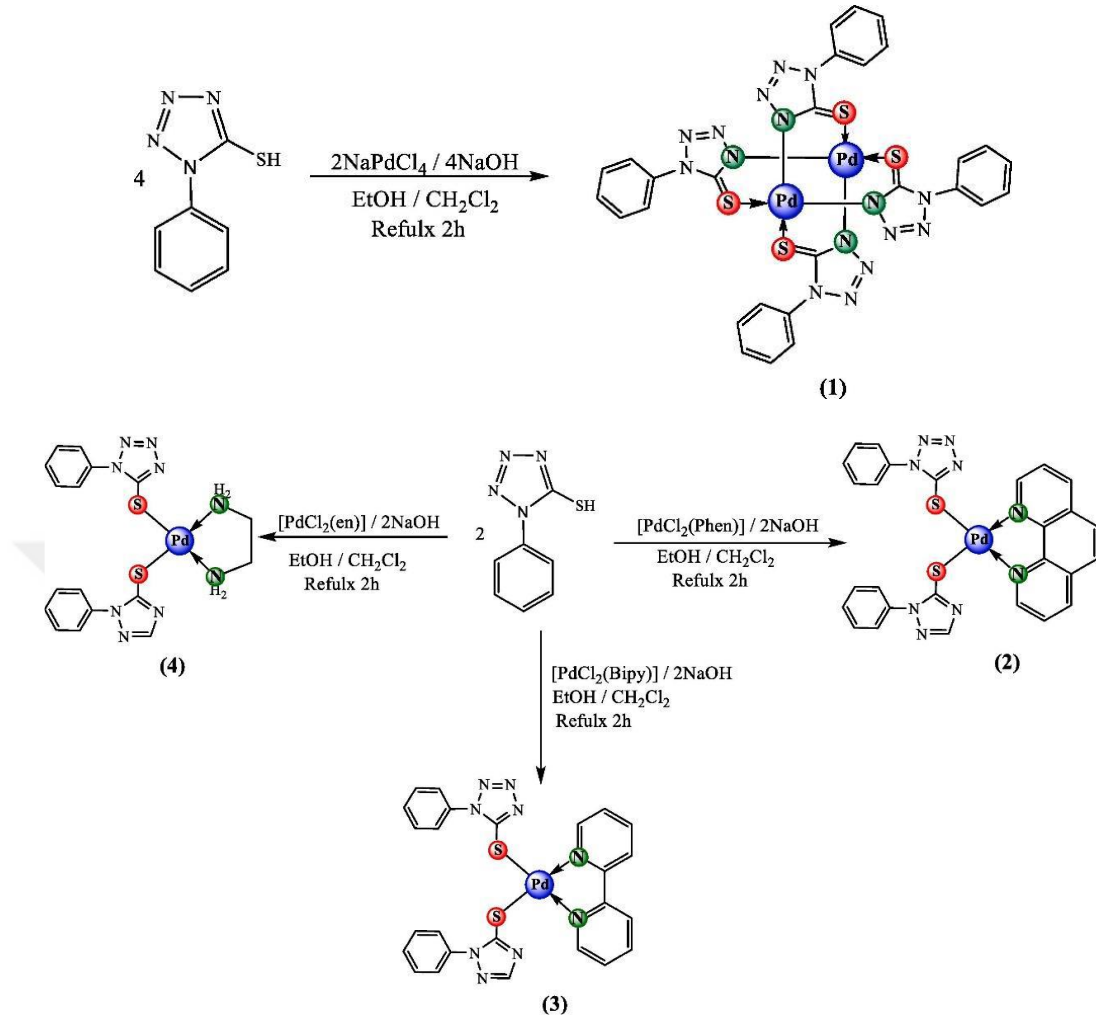
2.9 Paladyum (II) Kompleksleri

Son yıllarda, tümör hücre hatlarına karşı umut verici antikanser aktiviteye sahip çok sayıda paladyum (II) (Pd) kompleksi sentezlenmiş ve yayınlanmıştır (Ulukaya ve ark., 2011). Pd (II) komplekslerinin sitotoksitesi, düşük konsantrasyonlarda bile çeşitli

kanser hücresi tiplerinde bildirilmiştir. Ayrıca, Pd bileşikleri Pt ile karşılaştırıldığında çözünürlüğünün daha iyi olduğu görülmektedir ve bu nedenle daha uygun antikanser ilaç olabilme potansiyeline sahiptir. Pd komplekslerinin bir diğer önemli özelliği, bazı türevlerin sisplatin ile karşılaştırıldığında azaltılmış nefrotoksisite göstermesidir. Bu nedenle, Pd (II) kompleksleri kimyasal ve fiziksel özellikleri açısından umut verici antitümör ajanları temsil etmektedir. Çeşitli dezavantajları nedeniyle platin bazlı kemoterapötik ajanlardan sadece ikisi (karboplatin ve oksaliplatin) FDA tarafından onay almıştır. Bu da paladyum (II) (Pd) komplekslerinin potansiyel antikanser ajanları olarak ilgi çekmesini sağlamıştır (Kaçar ve ark., 2014).

Spesifik bir merkezi metal iyonunun kullanımı biyolojik aktiviteyi güçlü bir şekilde etkileyebilir, çünkü her metal redoks yeteneği, ligandlar ve hedeflenen moleküller ile bağlanma tercihleri ve ligand değişim kinetiği dahil olmak üzere farklı fizikokimyasal özellikler gösterir. Paladyum (Pd), prospektif antikanser komplekslerinde merkezi koordinatör metal olarak odaklanmaktadır. En yaygın Pd oksidasyon durumu +2'dir. Bu metale olan büyük bilimsel ilgi, oksidatif +2 durumundaki hem elektronik yapı hem de koordinasyon kimyası açısından Pt (II) ile benzerliğinden kaynaklanmaktadır (Ferraro ve ark., 2022). Toksikolojik testler, yapılan çalışmalarda paladyum bileşiklerinin platin bazlı bileşiklerden 10 kat daha düşük toksisitesini göstermiştir (Surrah ve ark., 2006).

Pd (II) kompleksleri, metal merkezinin Pt (II) (elektronik yapı ve koordinasyon kimyası) ile benzerliği nedeniyle çok dikkat çekmiştir (Carneiro ve ark., 2020). Paladyum bileşikleri iki gruba ayrılabilir. Birincisinin çekirdeğinde bir paladyum atomu bulunur ve bu bileşik ayrıca kanıtlanmış biyolojik aktiviteye sahip piridin, kinolin veya analogları gibi ligandlar içerir. Antikanser özelliklere sahip ikinci grup paladyum türevleri, çekirdekte iki veya ikiden fazla paladyum atomu içeren moleküllerdir. Çekirdeklerinde geçiş metalleri içeren sitostatikler, kanser hücrelerinin DNA'sı ile etkileşime girer. Bu hem kovalent hem de kovalent olmayan bağlar üreterek oluşur. Paladyum türevleri oligonükleotide bağlanır ve bu da DNA'nın replikasyonunu bloke eder. Her iki türev grubu da diğer oligonükleotid uç bölgelerine karşı yüksek seçicilik gösterir (Czarnomysy ve ark., 2021).



Şekil 6: Paladyum (II) komplekslerinin sentezi (Al-Janabi ve ark., 2020).

Pd (II) kompleksleri için önerilen diğer bir hedef hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptoz hücre ölüm yollarını aktive eden mitokondridir. İntrinsik apoptozun başlangıcı genellikle Bax/Bcl-2 oranının tersine çevrilmesi, sitokrom c'nin salınması ve ardından kaspaz kaskadı aktivasyonu ile ilişkilidir. Buna karşılık, ekstrinsik apoptoz aktivasyonu, hücre ölümü reseptör genleri DR4 ve DR5'in ekspresyonundaki bir artışla tetiklenir. Ayrıca bazı Pd (II) komplekslerinin hücre döngüsünü G2/M fazında bloke edebildiği ve diğer Pd (II) komplekslerinin antioksidan sistemler gibi hücre içi sülfhidril protein grupları ile etkileşime girebildiği de gösterilmiştir. Bu etkileşimler, bu bileşiklerle tedavi edilen kanser hücrelerinde endoplazmik retikulum değişikliği ile gösterildiği gibi, artan hücre içi ROS ve ardından redoks dengesizliği ve oksidatif stres ile ilişkilidir (Ferraro ve ark., 2022). Kaçar ve ark., (2014), yaptıkları bir çalışmada Pd (II) kompleksi ile tedavi ettikleri kanser hücre hatlarında morfolojik olarak büzülme, kabarcıklanma ve sivri uç oluşumu

gibi tipik apoptotik özellikler gözlemlemişlerdir. Bu da komplekslerin kanser hücrelerini apoptoza götürdüğüne dair güçlü bir veri sunmaktadır (Kaçar ve ark., 2014).

2.10 Programlanmış Hücre Ölüm Yolları

Çok hücreli organizmaların gelişimi ve homeostazı sadece düzenlenmiş hücre proliferasyonuna bağlı değildir, aynı zamanda artık ihtiyaç duyulmayan veya organizma için potansiyel bir tehlike oluşturan hücrelerin bertaraf edilmesine de bağlıdır. Bu, neoplastik dönüşüm riski taşıyan hasarlı hücrelerin veya patojen replikasyonu için mikroplar tarafından kaçırılanların çıkarılmasını içerir. Programlanmış hücre ölümü (PCD), organizmanın bu tür hücrelerin yok edilmesini koordine ettiği birincil aracı temsil eder. Transkripsiyonel değişikliklerin ve post-translasyonel protein modifikasyonlarının karmaşık kaskadları yoluyla hücre ölümünü tetikleyen membrana bağlı ve sitozolik proteinleri uyaran gelişimsel programlar ve strese bağlı sinyaller tarafından indüklenebilir (Bedoui ve ark., 2020).

Onkogenlerin veya tümör baskılayıcı genlerin mutasyonundan kaynaklanan karmaşık bir genetik hastalık olan kanser, sinyal yollarının değişmesi nedeniyle gelişebilmektedir ve PCD ile çok sayıda bağlantısı olduğu iyi bilinmektedir (Ouyang ve ark., 2012). Hücre ölümü normal dokuların gelişiminde ve homeostazında önemli bir rol oynar ve kanser büyümesi ve ilerlemesi üzerinde derin etkileri vardır. Hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengesizliğin kanser, otoimmün hastalık, nörodejeneratif bozukluklar, viral enfeksiyonlar ve AIDS gibi insan hastalıklarıyla bağlantılı olduğu bilinmektedir. Kanser tedavisinin temelini, kemoterapi ve radyoterapi gibi bir dizi tedavi yöntemi ile kontrolsüz ve hızlı bir şekilde büyüyen bu hücrelerin çeşitli ölüm yollarına sokulması oluşturur. Çoğu kemoterapötik ajan ve iyonlaştırıcı radyasyon, programlanmış hücre ölümlerini indüklemek için endojen mekanizmaları kullanır (Tan ve ark., 2009).

Hücre ölümü, farklı proteaz sınıflarının (kaspazlar, kalsanlar, katalinler ve transglutaminazlar) ve nükleazların, fonksiyonel yönlerin veya immünolojik özelliklerin katılımı da dahil olmak üzere enzimolojik kriterlere dayanarak tanımlanır. Programlanmış hücre ölümünün çeşitli yolları bulunmaktadır ve bunların başında apoptoz ve nekroz gelmektedir (Duprez ve ark., 2009).

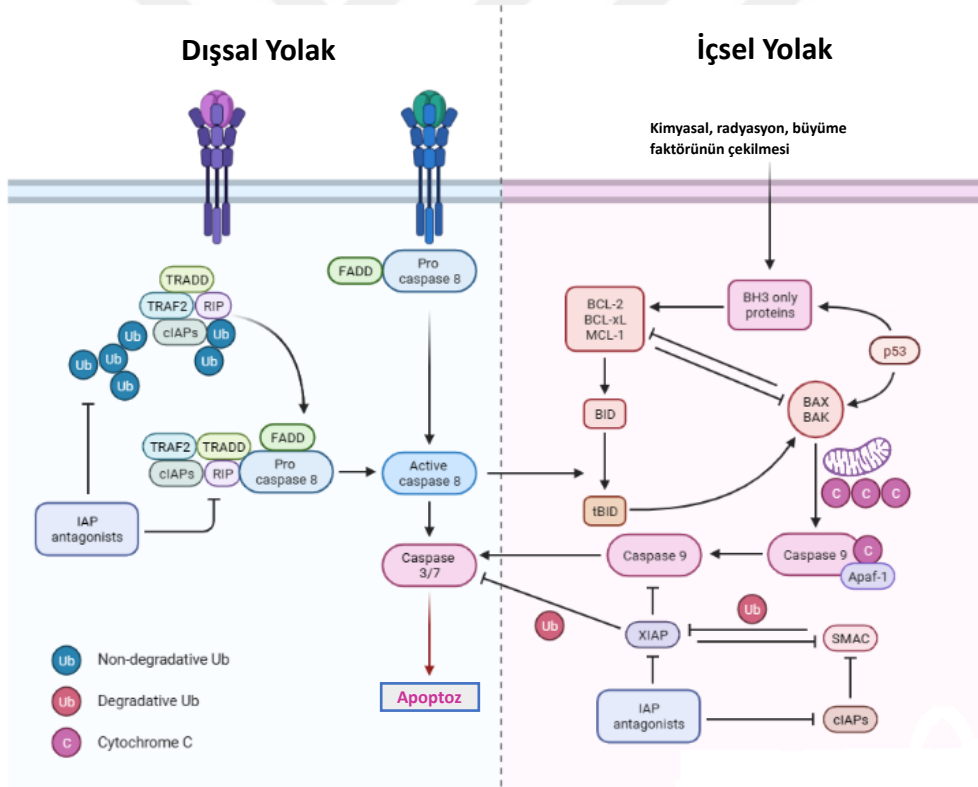
2.10.1 Apoptoz

Geliştirilmekte olan yeni küçük moleküllerin ve biyolojik ajanların çoğu, apoptozda rol oynayan yolları hedef almaktadır. Apoptozun morfolojik özellikleri arasında hücre zarı kabarcıkları, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve nükleozomal fragmentasyon sayılabilir. Normal şartlar altında, apoptoz geçiren hücreler makrofajlar veya hücrelerin fraksiyone edilmiş karkaslarını tüketen komşu hücreler tarafından tanınır. Apoptoz, kemoterapiye bağlı hücre ölümünün önemli bir mekanizması olarak kabul edilmiştir ve apoptozu düzenleyen yollar birçok klinik öncesi ilaç keşif araştırmasının odak noktasıdır. (Ricci ve Zong, 2006).

Memeli hücrelerinde kaspazlar intrinsik veya ekstrinsik apoptotik yol tarafından aktive edilir (Duprez ve ark., 2009). İntrinsik yol genellikle DNA hasarı ve yüksek düzeyde reaktif oksijen türleri (ROS) içeren hücre içi stres sinyallerine yanıt olarak ve ayrıca viral enfeksiyon ve onkogenlerin aktivasyonu ile aktive edilir. Ekstrinsik yol, hücre dışı bir ligandın plazma zarındaki bir reseptöre bağlanmasıyla tetiklenir. Her iki yol da hücre yapısının ve organelerin hızlı bir şekilde parçalanmasına aracılık eden kaspazlar adı verilen proteolitik enzimleri aktive eder. Kaspazlar, aspartik asit içeren motiflerin bölünmesine katılan nükleofilik sistein kalıntısı içeren bir protein ailesidir (Ricci ve Zong, 2006). Apoptozun önemli bir özelliği, BCL-2 ailesinin proapoptotik ve antiapoptotik proteinleri, başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, -9 ve -10) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) arasındaki denge ile düzenlenen mitokondriden sitokrom c'nin salınmasıdır (Bertheloot ve ark., 2021).

Apoptoz, intrinsik ve ekstrinsik yol olarak adlandırılan iki ana yolla tetiklenir. İntrinsik yolak, BCL-2 (B hücreli lenfoma-2ailesi) proteinleri BAK ve BAX'ın oligomerizasyonu ile aktive edilir. BAK / BAX oligomerleri, mitokondriyal dış zarda gözenekler oluşturur ve sitokrom c'nin sitosol içine salınmasına yol açar. BAK / BAX'ın aktivasyonu proapoptotik (örneğin, BAD ve BID) veya antiapoptotik (örneğin, BCL-2) BCL-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenir. Sitokrom c, prokaspaz-1'i işe alan ve apoptozu oluşturan Apaf-9'a bağlanır. Apoptozomda, kaspaz-9, kaspaz işleme kaskadını başlatan otoproteolitik bölünme ile aktive edilir. Ekstrinsik yolak, tümör nekroz faktörü (TNF)

reseptörü 1 (TNFR1), ölüm reseptörleri veya TLR'ler (Toll-Like Reseptörleri) gibi membran reseptörlerinin katılımıyla aktive edilir. Bu proteinler, TNFR1 ile ilişkili ölüm alanı proteini (TRADD) veya Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini (FADD), reseptör etkileşimli serin / treonin protein kinaz 1 (RIPK1) ve prokaspaz-8'i içeren sinyal komplekslerinin oluşumunu indükler. RIPK1'in hücresel apoptoz inhibitörleri (cIAP'ler) tarafından ubiquitilasyonu, kompleksi stabilize eder ve transkripsiyon faktörü NFκB'nin aktivasyonunu indükler. DISC'te de bulunan FLIP, hücre sağkalımını, hücre proliferasyonunu ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini teşvik ederken kaspaz-8 aktivitesini sınırlar. Bu yoldaki dengesizlikler, hücresel stres tarafından dayatılanlar gibi, kaspaz-8 ve kaspaz-10'un aktivasyonuna izin verir ve bu da kaspaz aktivasyon kaskadını tetikler. Aktif olduktan sonra, cellat kaspazları (yani, kaspaz-2, -6, -8 ve -10) programlanmış apoptotik ölüme neden olur (Bertheloot ve ark., 2021).

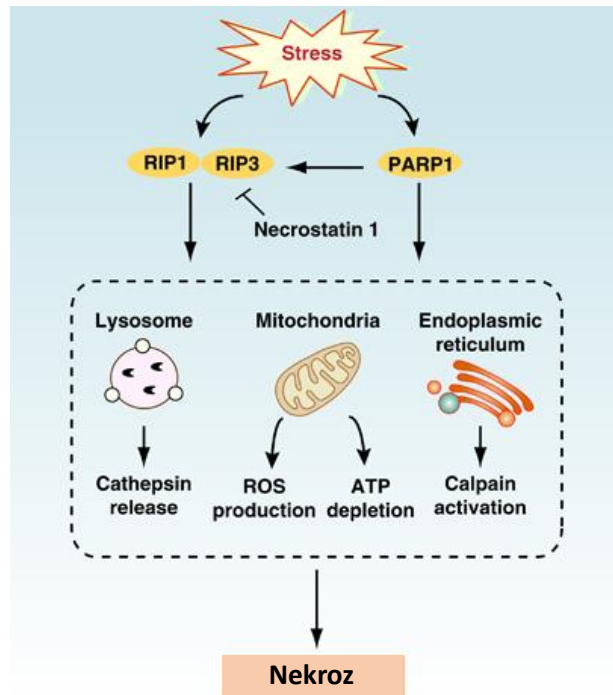


Şekil 7: Apoptozda ekstrinsik ve intrinsik yollar şematik gösterimi (Sapkota, 2022)

2.10.2 Nekroz

Nekroz, hücre ölümünün geri dönüşümsüz inflamatuvar bir şeklidir. Apoptozdan farklı olarak, metabolik veya terapötik bir stresten sonra ortaya çıkan nekroz, hızlı hücre ölümüne yol açan biyoenerjetik bir uzlaşmadan kaynaklanır (Amaravadi ve Thompson, 2007). Nekroz sırasında hücreler önce şişer ve daha sonra plazma zarı çöker ve hücreler hızla lize edilir. Düzenlenmiş bir hücre ölümü şekli olan nekrotik hücre ölümünün terapötik amaçlar için modüle edilebileceğini göstermektedir. Normal dokuların zarar görmesini önlemek için bastırılabilir veya tümör dokularının hasarını indüklemek için aktive edilebilir (Proskuryakov ve ark., 2003).

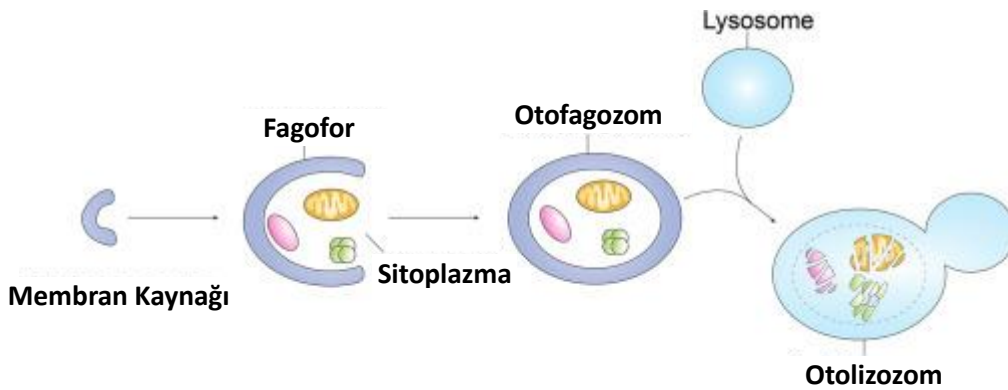
Nekrozun temel nedenleri arasında aşırı kalsiyum yüklenmesi, ROS oluşumu, hücresel enerji tükenmesi ve membran lipid hasarı yer alır. Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), DNA zincirinin kırılmasıyla aktive olur, böylece DNA onarımını ve hasarlı DNA'ya enzim erişimini kolaylaştırır. PARP-1'in uyarılmış aşırı aktivasyonu, TRAF2/RIP1/JNK'ya bağlı bir şekilde nekroza yol açan ATP tükenmesine neden olur. Nekroz aktivasyonu genellikle artan ROS üretimi, kalpain aktivasyonu, lizozomal istikrarsızlık ve katepsin salınımı yoluyla gerçekleşir (Hou ve ark., 2013).



Şekil 8: Nekroz aktivasyonuna neden olan yollar (Hou ve ark., 2013).

2.10.3 Otofaji

Otofaji, hücresel içeriklerin otofagozom adı verilen çift zarlı bir vezikül tarafından tutulduğu ve bozunma için lizozoma getirildiği evrimsel olarak korunmuş, katabolik bir süreçtir. Bu çok adımlı süreç, otofajinin başlamasını, otofagozomun uzamasını ve bu işlemin tamamlanmasını kontrol eden otofaji ile ilişkili (Atg) proteinler tarafından yürütülür ve düzenlenir. Geleneksel olarak, otofaji, hücre kalite kontrolünün bir yöntemi olarak hücresel stresörlere yanıt olarak hareket eden bir hücre hayatta kalma mekanizması olarak düşünülür (Anding ve Baehrecke, 2015). Bu hücre ölümü, sitoplazmada büyük vakuollerin yanı sıra moleküler belirteçlerin varlığıyla ilişkilendirilir. Genel olarak, plazma zarı blebbing, nükleer yoğunlaşma dahil olmak üzere apoptozun karakteristik özellikleri ve kromatin parçalanması görülmez ve kaspazların rolü yoktur. Ökaryotlarda bulunur ve merkezi yolun bileşenlerinin dikkate değer bir şekilde korunması vardır. Dış besinler tükendiğinde veya bunları alma yolları bozulduğunda enerji sağlar, fazla veya hasarlı organelleri ve diğer hücresel bileşenleri uzaklaştırır ve hücrelerdeki uzun ömürlü proteinlerin ve protein agregatlarının parçalanmasında rol oynar. Otofaji, istilacı organizmaları izole etmek ve yok etmek için hücresel savunmada da işlev görür (Green, 2022).



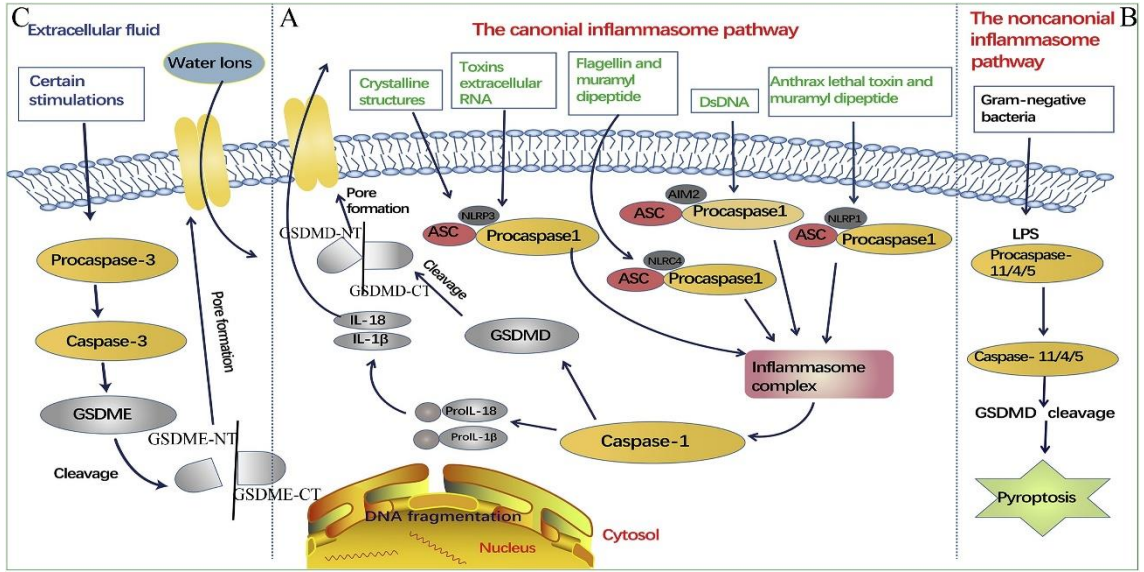
Şekil 9: Otofaji şematik gösterimi (Anding ve Baehrecke, 2015).

Otofaji, Atg genleri tarafından genetik olarak düzenlenen çok adımlı bir süreçtir (Anding ve Baehrecke, 2015). Otofajinin aşırı koşullar altında hücre sağkalımı için çok önemli olduğu iyi bilinmektedir ve hücre içi makromoleküllerin bozulması, besinler az olduğunda minimum hücre çalışması için gerekli enerjiyi sağlar. Otofajik aktivasyon kanser progresyonunun erken evrelerinde koruyucu bir rol oynayabilir. Otofaji, protofajik genleri aktive ederek ve onkogeneizde anti-otofajik genleri bloke ederek bir tümör

baskılayıcı olarak işlev görebilir. Bununla birlikte, Beclin-1, Bcl-2, Sınıf III ve I PI3K, mTORC1 / C2 ve p53'ü içeren bir dizi yolu düzenleyerek karsinogeneze tümör yanlısı bir rol olan ters rolü de oynayabilir (Ouyang ve ark., 2012). Otofaji, in vitro seçilmiş bir kemoterapötik ajan paneline yanıt veren bazı kanser hücrelerinin, özellikle BAX ve BAK gibi temel apoptotik modülatörlerden veya kaspazlardan yoksun olanların, ölümünden sorumlu görünmektedir. Bununla birlikte, bilinen vakaların çoğunda, otofaji, stresle başa çıkmak amacıyla ölmekte olan hücreler tarafından aktive edilen sitoprotektif bir yanıt oluşturur ve inhibisyonu, hücre ölümünü önlemek yerine hızlandırır (Galluzzi ve ark., 2012). Ayrıca reaktif oksijen türleri (ROS) lipozomlarda bozulma için sitoplazmik içeriğin (tükenmiş organeller ve protein agregaları) tutulmasını içeren kendi kendine katabolik bir süreç olan otofaji yoluyla hücre ölümünü indükleyebilir (Dasari ve Bernard Tchounwou, 2014).

2.10.4 Piroptoz

Piroptoz, IL -1 β , IL-18, HMGB1 ve LDH dahil olmak üzere pro-inflamatuar hücre içi içeriklerin salınmasıyla birlikte membran gözenek oluşumu, hücre şişmesi ve ardından hücre lizisi / membran yırtılması ile karakterize pro-inflamatuar programlanmış bir hücre ölümüdür (Berkel ve Cacan, 2023). Piroptoz terimi ilk olarak 2001 yılında türetilmiştir ve ateş veya ateş ile ilgili Yunan köklerinden pyro ve bu hücre ölümü biçiminin enflamatuar doğasını yansıtan bir düşmeyi belirtmek için ptosis (to-sis) kaynaklanmaktadır. Dikkat çekici bir şekilde, piroptotik hücrelerin plazma zarının erken geçirgenleşmesi, nekroptoz ve tesadüfi nekroz gibi diğer kaspazdan bağımsız immünojenik hücre ölümü formları tarafından paylaşılır (Vande Walle ve Lamkanfi, 2016). Bu hücre ölümü şekli başlangıçta bazı özellikleri apoptoza benzediği için apoptoz olarak kabul edildi. Daha sonra, bu ölüm şeklinin apoptozdan farklı olduğu gözlemlendi (Yu ve ark., 2021). Apoptoz hücre lizisi ile ilişkili olmamasına ve genellikle immünolojik olarak sessiz kabul edilmesine rağmen, piroptoz geçiren hücreler yine de apoptotik hücrelerle bazı özellikleri paylaşır. Annexin V boyama, DNA parçalanması, kromatin yoğunlaşması, kaspazlar 3 ve 7'nin doygunluğu ve poli (ADP-riboz) polimeraz 1'in (PARP1) bölünmesi, apoptozun ayırt edici özellikleri olarak kabul edilir. (Vande Walle ve Lamkanfi, 2016).



Şekil 10: Piroptoz moleküler mekanizması şematik gösterim (Fang ve ark., 2020).

A Bu enflamatuarlar ASC'yi işe alır ve bağlar, bu da prokaspaz-1'i işe alan ve kaspaz-1'i aktive eden ASC odağına yol açar. Kaspaz-1, proIL-18 / 1β'nin bölünmesi ve olgunlaşmasında ve gasdermin D'nin (GSDMD) bölünmesinde rol oynar. GSDMD'NIN (GSDMD-NT) N-terminal fragmanı, plazma zarındaki gözenekleri serbest bırakır ve oluşturur, bu da IL-18 / 1β ve su akışının salgılanmasına neden olur, hücre şişmesi ve ozmotik lizis üretir. GSDMD'NIN (GSDMD-BT) C-terminal fragmanı sitoplazma içinde kalır (Fang ve ark., 2020).

B Kanonik olmayan enflamatuar yolda, bakterilerden türetilen lipopolisakkarit (LPS), GSDMD'nin bölünmesiyle piroptozu indükleyen kaspaz-4/5/11'i tanır ve aktive eder (Fang ve ark., 2020).

C Piroptoz giden yeni bir yol, bazı stimülasyonların, apoptozun bir substratı olarak kabul edilen bir moleküler olan kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olduğu bulunmuştur. Mutür kaspaz-3, GSDME'NIN (GSDME-CT) C-terminal parçası ve GSDME'NIN N-TERMINAL parçası (gsdme-nt) dahil olmak üzere gasdermin E'nin (GSDME) bölünmesini indükler. GSDME-NT ayrıca gözenek oluşumuna katılır ve piroptozla sonuçlanır (Fang ve ark., 2020).

3 MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma kapsamında kullanılan OV2008 ve MCF7 kanser hücre hatları Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kanser Araştırma Laboratuvarı tarafından sağlandı. Hücreler -80 °C'den çıkarılarak T75 flasklarda kültüre edilip 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Hücre çoğalması yeterince sağlandıktan sonra tripsin ile muamele edilerek 96 kuyucuklu pleytlere transfer edildi. Daha sonra Docetaxel, Lapatinib, COMP-A ve COMP-B çeşitli çözücü ve sıcaklıklarda shake flask yöntemi kullanılarak hazırlandı ve farklı konsantrasyonları uygun dozlarda uygulanarak inkübasyona bırakıldı. Kullanılan ilaçların antikanser aktivitelerinin belirlenmesi için MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid] testi yapıldı. Deneylerin hepsi en az üçer defa tekrarlanıp GraphPad Prism 8.0 programı kullanılarak analiz edildi.

3.1 Shake Flask Yöntemi Kullanılarak İlaçların Hazırlanması

Çözeltiler hazırlanırken tablodaki miktarlar kullanıldı.

KONSANTRASYON	ÇÖZÜCÜ MİKTARI	İLAÇ MİKTARI
%100 DMSO	200µL DMSO	2 mg
%100 Su	200 µL Su	2 mg
%50 DMSO	100µL DMSO + 100µL su	2 mg
%50 PEG200	100µL PEG200 + 100µL su	2 mg
%50 PEG 400	100µL PEG400 + 100µL su	2 mg
%20 DMSO	40µL DMSO + 160 µL su	2 mg
%20 PEG 200	40µL PEG200 + 160 µL su	2 mg
%20 PEG400	40µL PEG400 + 160 µL su	2 mg

Tablo 1: Çözeltiler hazırlanırken kullanılacak çözücü ve ilaç miktarları

Kullanılan her bir ilaç için aynı prosedür ayrı ayrı uygulandı. Gerekli çözücü ve ilaç miktarları ayarlanarak ependorflara alındı ve iyice vortekslendi. Hazırlanan çözeltiler 100 rpm’de 24 saat shaker inkübatörde (Lab ART) ilgili sıcaklık ayarlanarak inkübasyona bırakıldı. Bu işlemden sonra 5000 rpm’de 15 dk santrifüj edilerek süpernatant kısmı yeni ependorflara alındı.

Seyreltme Katsayısı	DİLÜSYON HAZIRLAMA
5x	20 µL stok çözelti + 80 µL çözücü
10x	20 µL 5x’lik çözelti + 180 µL çözücü
20x	20 µL 10x’lik çözelti + 380 µL çözücü

Tablo 2: Dilüsyonlar hazırlanırken kullanılacak miktarlar

Hazırlanan her bir çözeltinin 3 ayrı dilüsyonunu 5x, 10x, 20x olacak şekilde yapıldı. Her bir dilüsyon için stok çözeltiden 20 µL alınıp 80 µL çözücü eklenerek 5x’lik dilüsyon elde edildi. 10x dilüsyonu için 20 µL 5x’lik çözeltiden alınarak 180 µL çözücü eklendi. 20x dilüsyonu için 20 µL 10x’lik çözeltiden alınarak 380 µL çözücü eklenerek hazırlandı ve hazırlanan çözeltiler ilgili deneylerde kullanıldı.

3.2 Hücre Kültürü

Over kanseri OV2008 ve meme kanseri MCF7 hücre hatları -80 °C saklandı. Tüm hücre hazırlama işlemleri laminar kabinde (Esco class II type A2), steril ortamda gerçekleştirildi. -80°C’ den çıkarılan hücreler oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildi. Daha sonra her hücre hattına uygun media kullanarak flasklara ekim yapıldı. Kullanılan hücre hatları için %10 (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, Biological Industries), %2(v/v) Penisilin-Streptomisin (Biological Industries) ve %0,22 (wt/v) NaHCO₃ (Serva,Almanya) ilave edilen katkılı RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) kullanıldı. Konfluent hücreler belirli yoğunluğa ulaştıktan sonra pasajlandı. İlk olarak T75 flasklarda bulunan hücrelerin medium uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Daha sonra 37°C’deki 3 mL tripsin (Biological

Industries) flaska ilave edildi. T75'lik flasklar yaklaşık 2-3 dakika süreyle 37 °C inkübasyona bırakıldı. Hücreler flasklardan ayrıldıktan sonra 10 mL önceden oda sıcaklığına getirilmiş medium eklendi. Serolojik steril pipetlerle yapılan pipetajdan sonra, flasklardaki hücreler 50 mL falkon tüplere aktarıldı ve 2000 rpm'de 4 dakika santrifüjlendi. Tripsin uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler tekrar 10 mL medium içerisinde çözdürüldü ve hücre yoğunluğuna göre istenen dilüsyonlarda flasklara ekim yapıldı. Bir T75 flaskındaki toplam hacim 20 mL'ye tamamlandı. Hücreler arası yoğunluğu ayarlamak amacıyla hücreler sürekli kontrol edildi ve ölü hücreleri uzaklaştırmak için aralıklı olarak mediumları değiştirildi. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında ise sayım yapılarak ilgili deneylerde kullanılmıştır.

3.3 Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılan kemoterapötik ajanların, ayrı ayrı kültüre edilen meme ve over kanseri hücre hatlarının proliferasyonu üzerindeki etkilerini ölçmek amacıyla MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid] testi uygulandı. Hücreler farklı derişimlerdeki ajanlarla 48 saat inkübasyona bırakıldı ve daha sonra MTT protokolü uygulandı. MTT testi, materyallerin sitotoksitesini değerlendirmek için sıklıkla tercih edilen kolorimetrik bir testtir. Bu test MTT'yi mavi, çözünmeyen formazan bileşiğine dönüştürebilen dehidrogenaz enzim aktivitesini ölçmektedir. Uygulanan materyalin sitotoksik etkisi nedeniyle hücrede dehidrogenaz aktivitesinin etkilendiği durumlarda mavi renkli formazan oluşmamakta, formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu çalışmada formazan oluşumu spektrofotometre ile optik yoğunluğun ölçülmesiyle saptandı. Kısaca özetleyecek olursak, muamele edilmiş adherent hücreler kültür ortamından kaldırılarak 96 kuyucuklu pleytte 100 µL taze besi yeri içeren kültür ortamına aktarıldı. Önceden hazırlanmış olan 12 mM MMT stok solüsyonundan 10 µL alınıp her kuyucuğa ilave edildi. Negatif kontrol olarak, yine MMT stok solüsyonundan 10 µL alınıp içerisinde sadece 100 µL media bulunan kuyucuğa ilave edildi. Hücreler daha sonra 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra yine önceden hazırlanacak olan 0.01 M SDS-HCl çözeltisinden 100 µL alınıp her kuyucuğa ilave edildi ve tekrar 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra örnekler bir pipet yardımıyla karıştırıldıktan sonra 570 nm'de absorbansları okundu.

Sonuçlar % hücre inhibisyonu olarak rapor edildi ve çözücü ile muamele edilmiş hücrelerin optik densitesi %100 olarak kabul edildi. Buna göre % inhibisyon $[1 - (A_{\text{test}} / A_{\text{çözücü kontrol}}) \times 100]$ formülüne göre hesaplandı. Tüm maddeler kanser hücre hatları kullanılarak 3 kez test edildi.

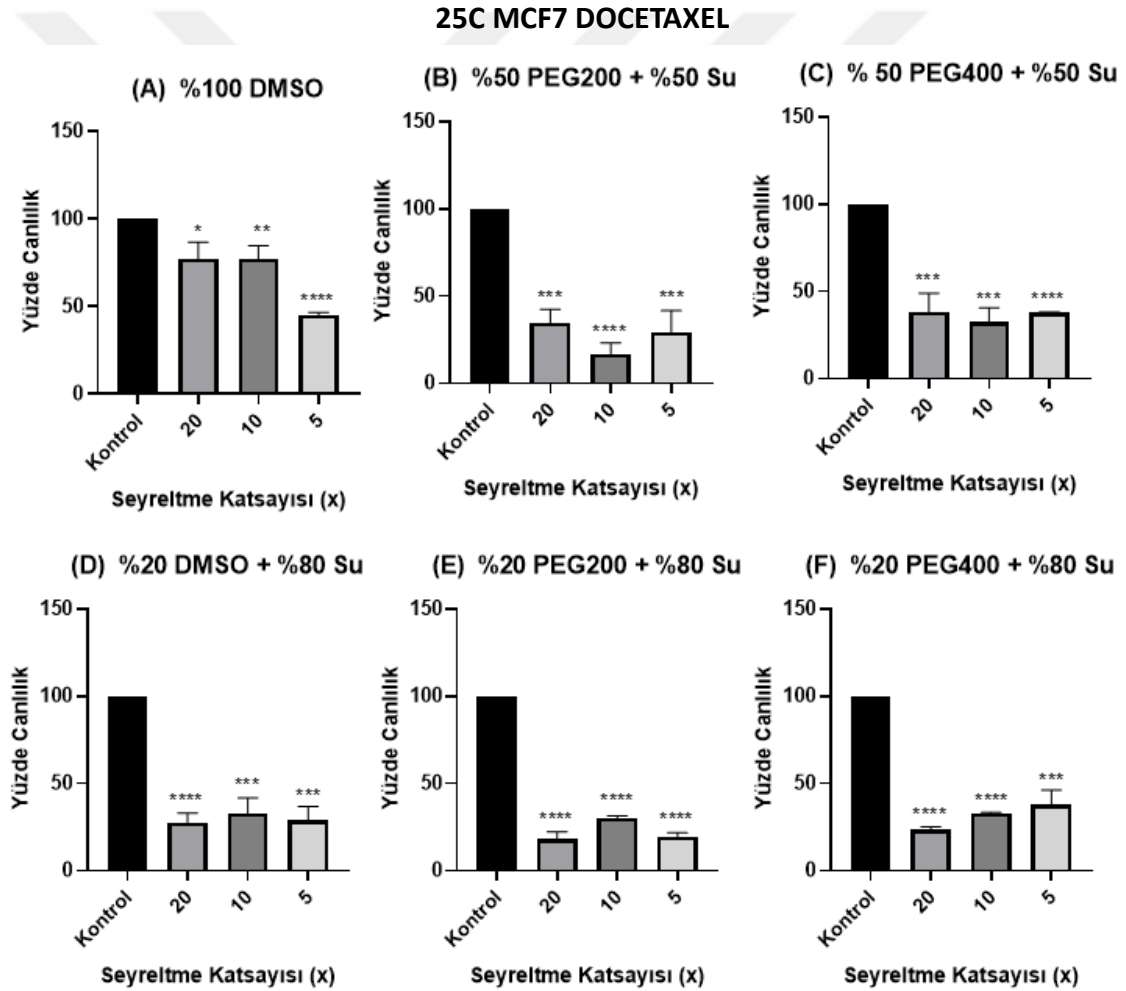
3.4 İstatiksel Analiz ve Veri Görselleştirme

Bu çalışmada, MTT testlerinde deney grupları ile kontrol grupları kıyaslanarak analizi yapıldı. Bu doğrultuda, kontrollerin canlılıkları %100 olarak baz alınarak, deney gruplarında karşılaşılan değişimler gözlemlendi. İstatistiksel olarak karşılaştırması yapılan verilerin kontrol grubu ile hedef genlerin arasındaki Student's T-test metodu kullanıldı. P değerlerinin 0.05 ve altındaki durumlar istatistiksel olarak anlamlı olduğunda yıldızlı simgelerle görselleştirildi. (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Görselleştirmelerde GraphPad programı tercih edildi.

4 BULGULAR

4.1 Docetaxelin farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün MCF-7 hücre hattına etkisinin belirlenmesi

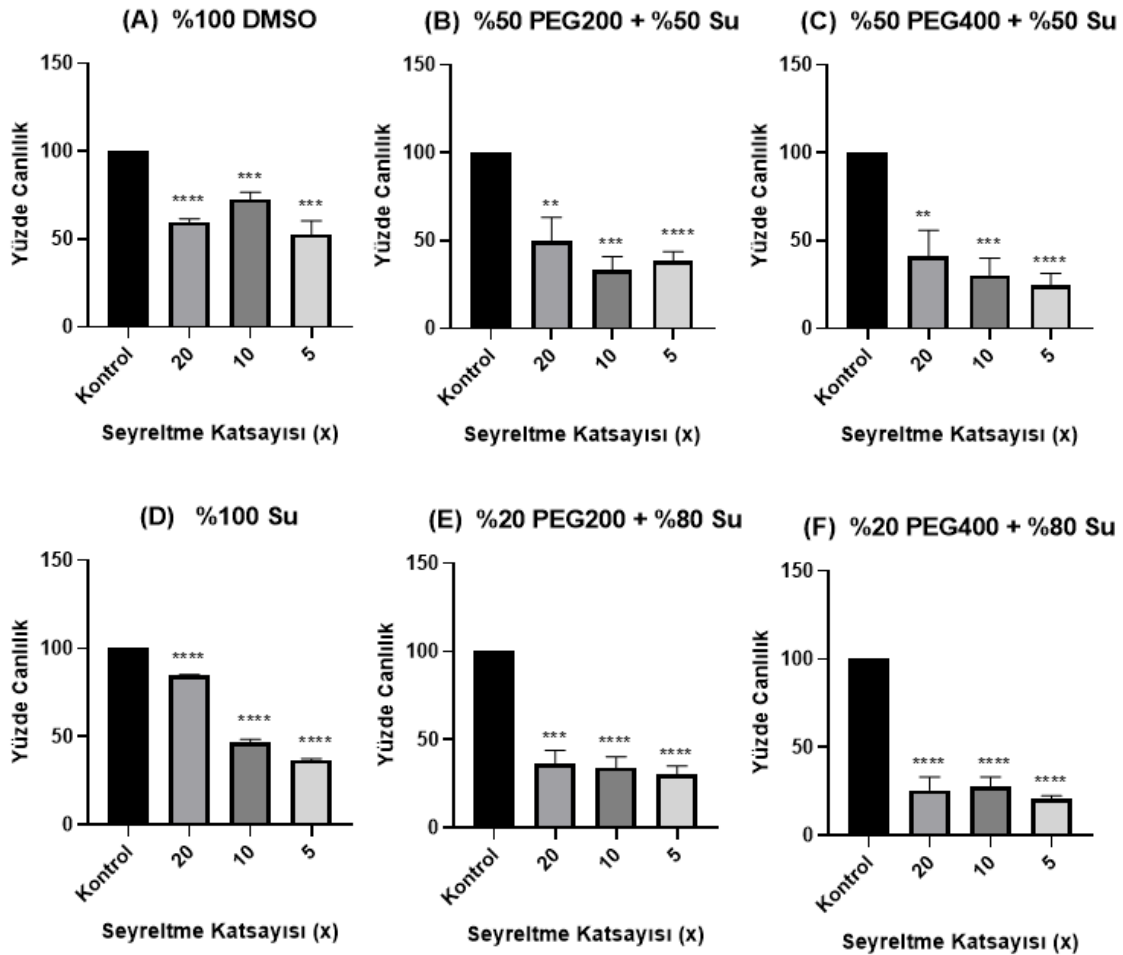
Docetaxelin shake flask yöntemi ile farklı sıcaklıklarda (25°C ve 30°C) ve çözücülerde (DMSO, PEG200, PEG400, su) hazırlanmış formülasyonlarının hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek için MTT testi yapıldı. Deneylerde MCF-7 hücre hattı kullanıldı. Genel olarak docetaxel hücre hattı üzerinde sitotoksik bir etki oluşturdu.



Şekil 11: Docetaxelin shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. MCF-7 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Docetaxelin 25°C’de hazırlanan formülasyonlarında kullanılan çözücülerin tüm seyreltmeleri hücreler üzerinde sitotoksik etki oluşturdu. Tüm çözücülerde kullanılan 3 seyreltmede de IC50 değeri sağlandı ve hepsinde IC50 değeri 20x seyreltmeden itibaren görüldü. Ancak %100’lük DMSO’nun sadece 5x’lik seyreltmesinde bu değer sağlanmadı. Diğer iki seyreltmede (10x ve 20x) sağ kalım oranının diğerlerine göre fazla olduğu gözlemlendi.

30C MCF7 DOCETAXEL



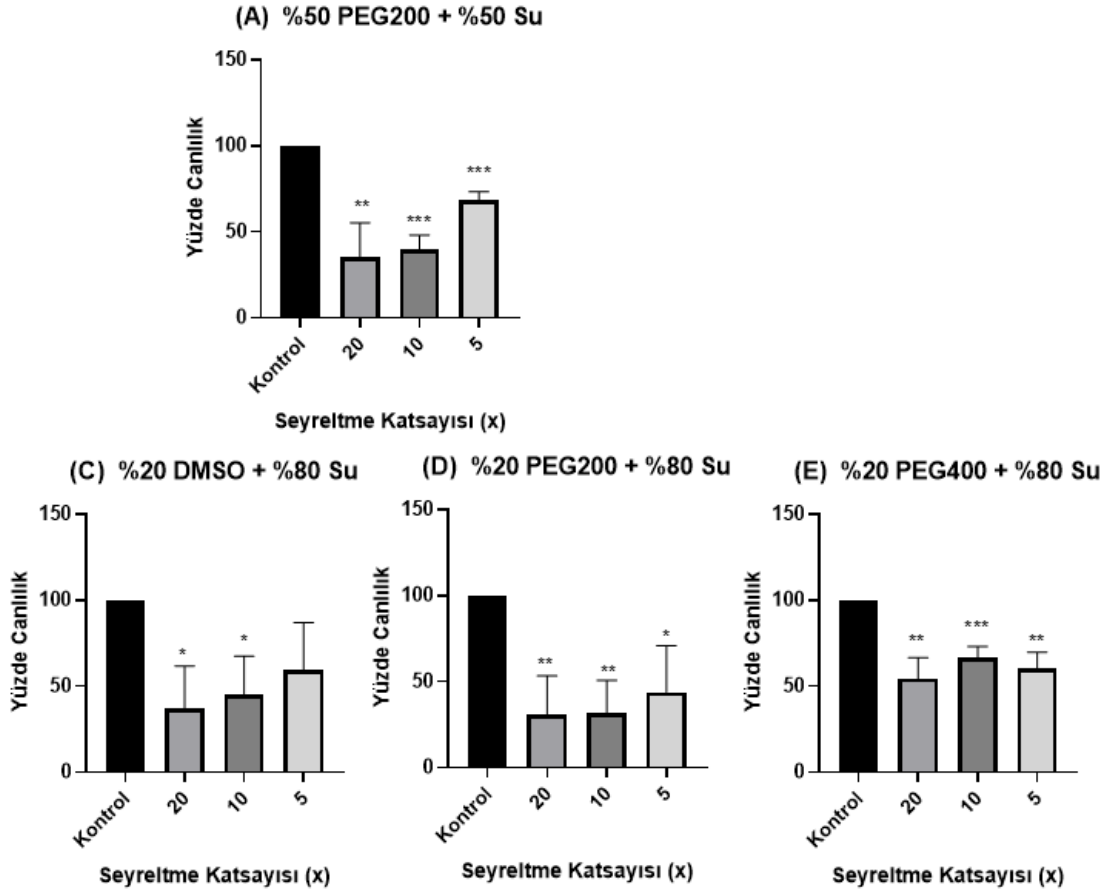
Şekil 12: Docetaxelin shake flask yöntemi ile 30°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. MCF-7 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm’de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Docetaxelin 30°C’de hazırlanan formülasyonlarında kullanılan çözücülerin tüm seyreltmeleri hücreler üzerinde sitotoksik etki oluşturdu. Hücre canlılık testinde elde edilen veriler ile düzenli bir sitotoksik etki gözlemlendi. Yine 25°C’de olduğu gibi %100’lük DMSO’da sağ kalım oranının diğerlerine göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. PEG200 ve PEG400 ile hazırlanan formülasyonlarda benzer sonuçlar elde edildi.

4.2 Lapatinibin farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün MCF-7 hücre hattına etkisinin belirlenmesi

Lapatinibin shake flask yöntemi ile farklı sıcaklıklarda (25°C ve 30°C) ve çözücülerde (DMSO, PEG200, PEG400, su) hazırlanmış formülasyonlarının hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek için MTT testi yapıldı. Deneylerde MCF-7 hücre hattı kullanıldı. Genel olarak lapatinib hücre hattı üzerinde sitotoksik bir etki oluşturdu.

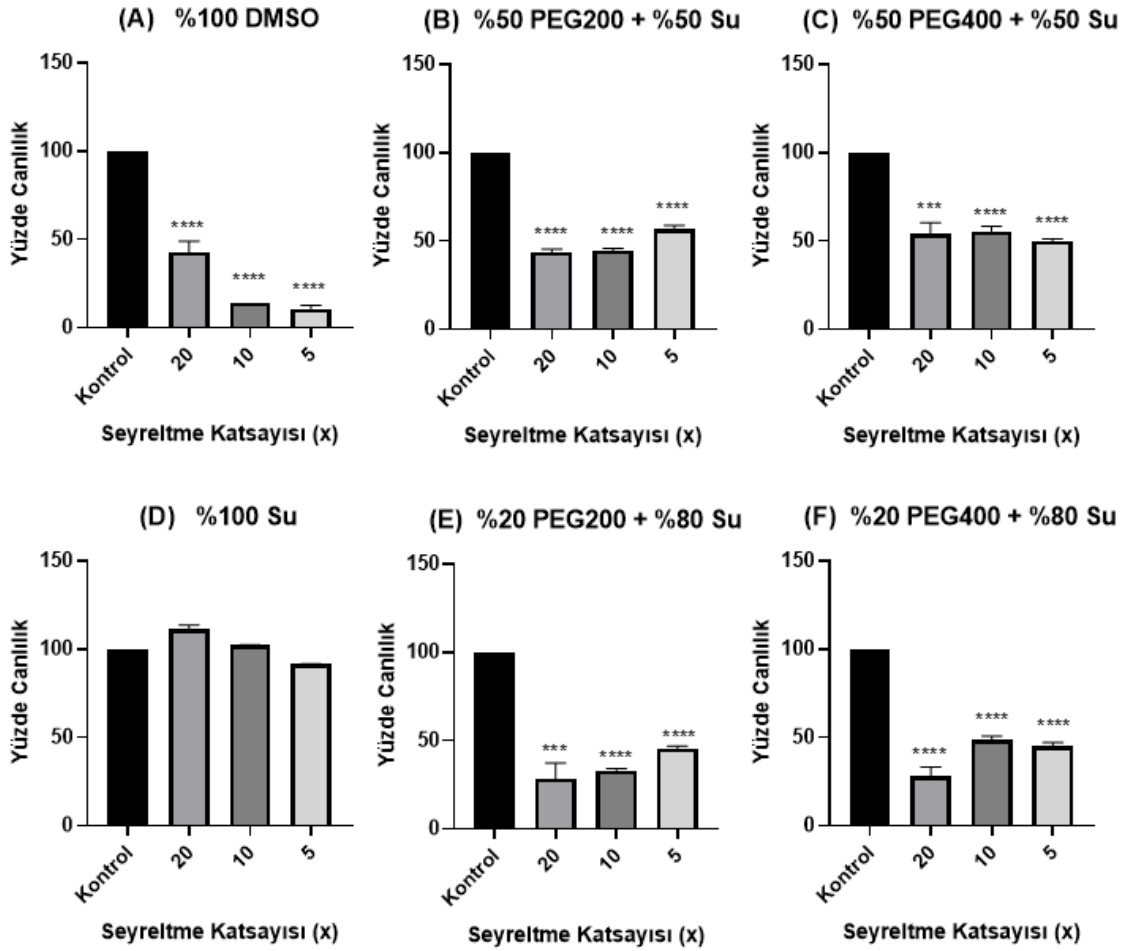
25C MCF7 LAPATİNİB



Şekil 13: Lapatinibin shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. MCF-7 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: $P < 0.0001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.1$) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Lapatinib 25°C'de hazırlanan formülasyonlarında kullanılan çözücülerde farklı sitotoksik etkiler oluşturdu. En iyi sitotoksik etki %50'lik PEG200'de elde edildi. %50'lik PEG200 kendi içindeki 3 seyreltmede anlamlı sonuçlar verdi. %20'lik PEG200'ün canlılık üzerindeki etkileri %50'lik PEG200 ile benzer sonuçlar verdi. PEG400'de ise hücreler üzerinde sitotoksik etki oranının düşük olduğu gözlemlendi. İlacın MCF-7 hücre hattı sağ kalımında dalgalanmalar oluşturduğu gözlemlendi.

30C MCF7 LAPATİNİB

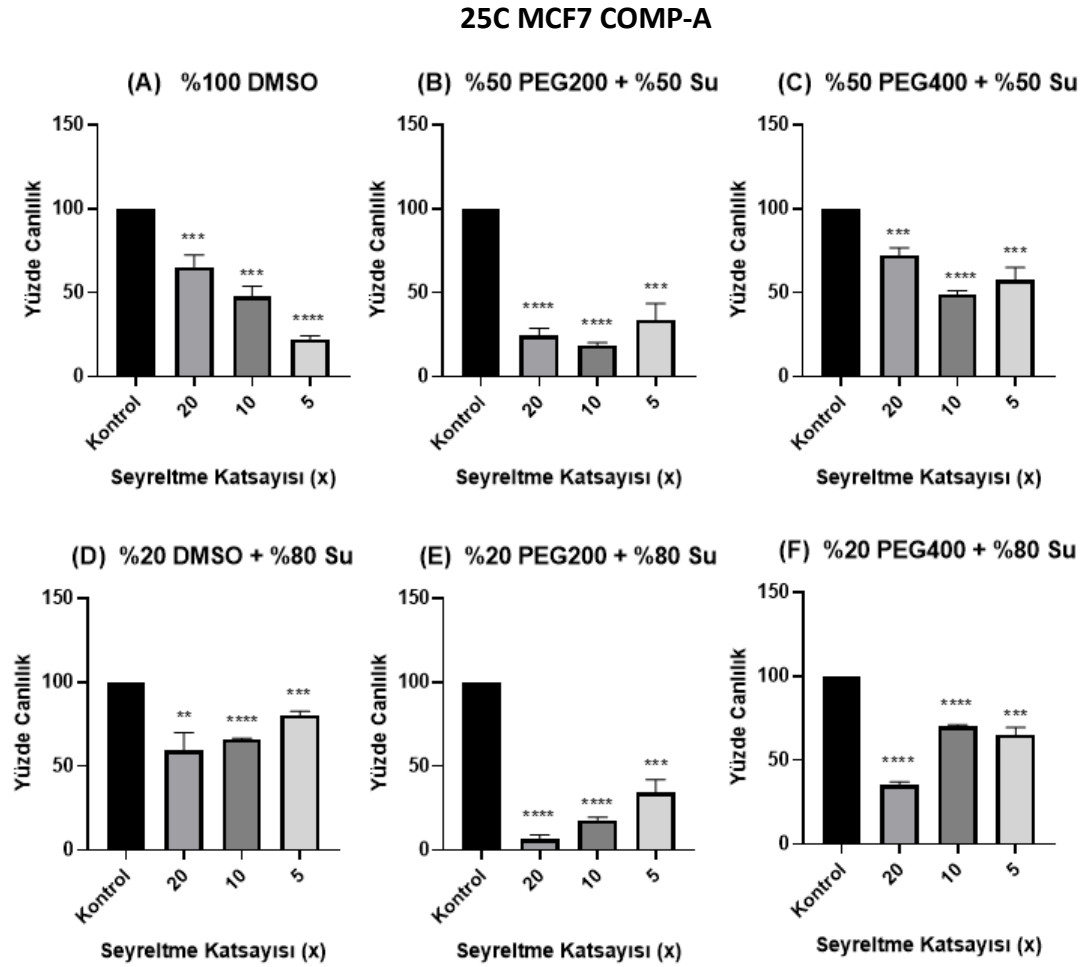


Şekil 14: Lapatinibin shake flask yöntemi ile 30°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. MCF-7 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Lapatinibin 30°C'de hazırlanan formülasyonlarında su hariç tüm çözücülerde sitotoksik etki oluştu ve IC50 değeri sağlandı. %100'lük DMSO'da sitotoksik etki 20x seyreltmede başladı ve diğer seyreltmelerinde de hücre sağ kalımı büyük oranda azaldı. %50'lik PEG200 ve %50'lik PEG400'de lapatinibin hücre canlılığı üzerindeki etkileri birbirine yakın değerlerde oluştu. İki çözücüde de IC50 değeri 20x seyreltmeden itibaren görülmeye başlandı. Su ile hazırlanan formülasyonda hücreler üzerinde sitotoksik etki görülmedi. Genel olarak bakılacak olursa lapatinib 30°C'de MCF-7 hücre hattına en iyi sitotoksik etkiyi %100'lük DMSO'da gösterdi.

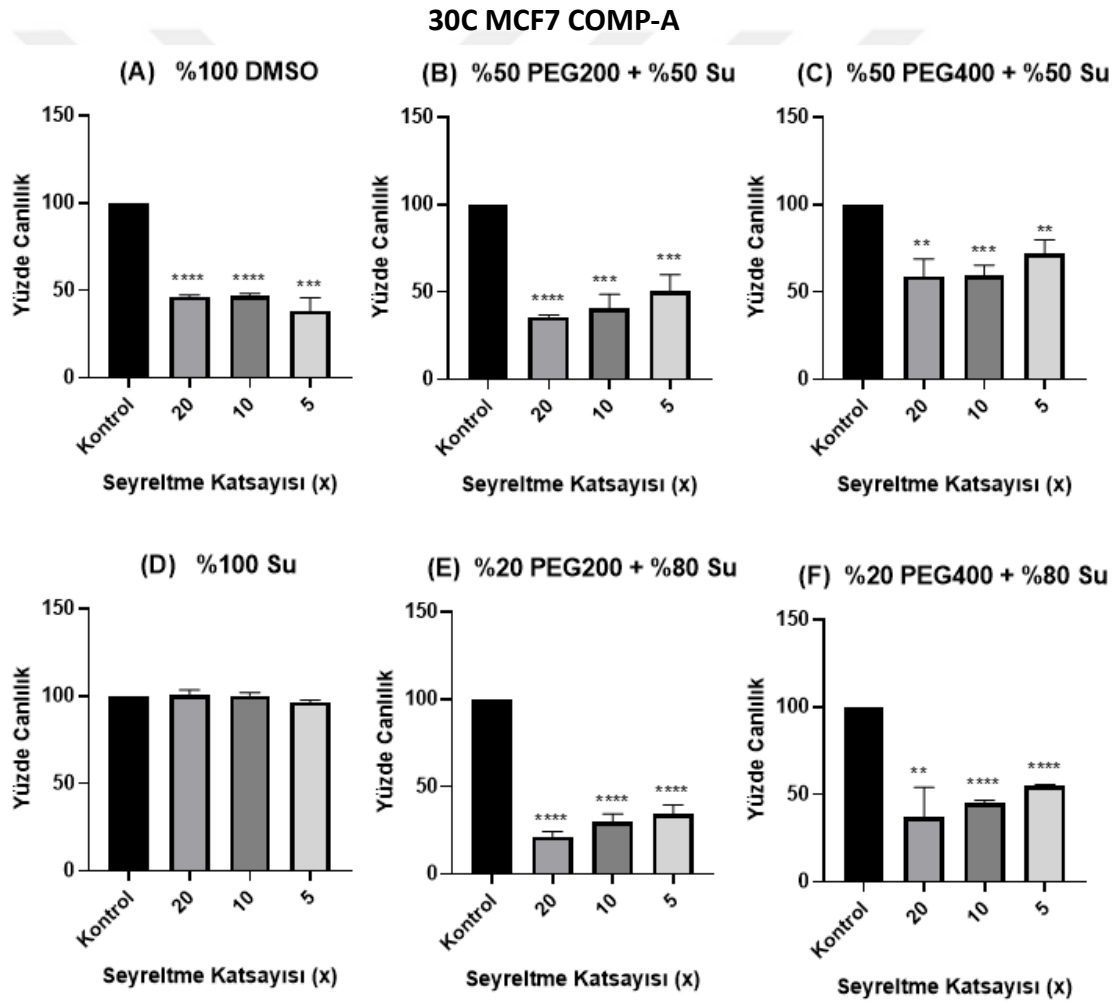
4.3 Comp-A'nın farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün MCF-7 hücre hattına etkisinin belirlenmesi

Comp-A'nın shake flask yöntemi ile farklı sıcaklık (25°C ve 30°C) ve farklı çözücülerde (DMSO, PEG200, PEG400, su) hazırlanmış formülasyonlarının hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek için MTT testi yapıldı. Deneylerde MCF-7 hücre hattı kullanıldı.



Şekil 15: Comp-A'nın shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. MCF-7 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Comp-A 25°C’de hazırlanan formülasyonlarında genel olarak tüm çözücülerde sitotoksik etki gösterdi. Ancak her çözücüdeki etki oranı birbirinden farklı olarak gözlemlendi. %100’lük DMSO’daki hücre canlılığı seyreltme oranı ile orantılı bir şekilde değişti. Düzenli ve anlamlı sonuçlar elde edildi. PEG200’ün hem %50’lik hem de %20’lik derişiminde yüksek sitotoksik etki elde edildi. PEG400’de ise düzensiz bir sitotoksik etki oluştu. Comp-A 25°C’de MCF-7 hücre hattında en iyi etkiyi PEG200’deki çözünürlüğü ile sağladı.



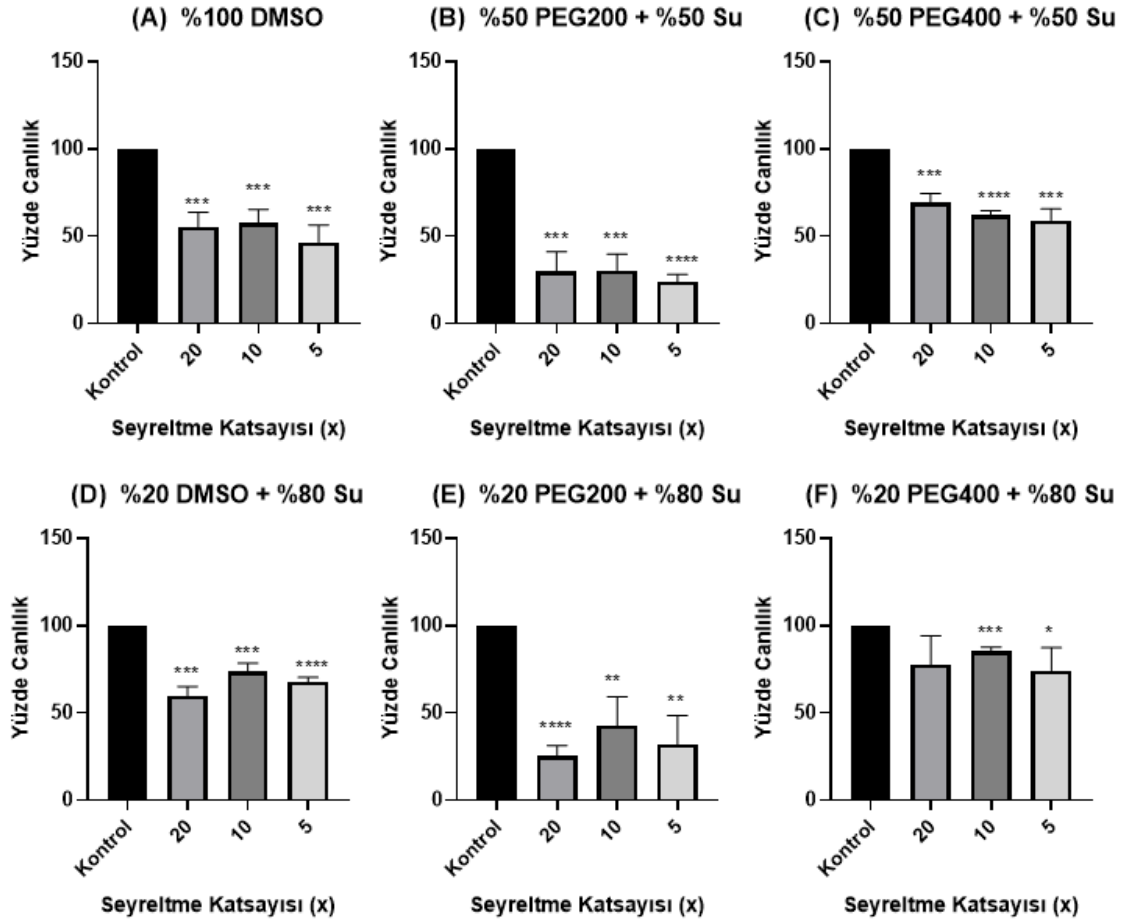
Şekil 16: Comp-A’nın shake flask yöntemi ile 30°C’deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. MCF-7 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm’de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Comp-A 30°C’de hazırlanan formülasyonları her çözücünde farklı sitotoksik etki gösterdi. En iyi sitotoksik etkiyi %20’lik PEG200’ de gösterdi. Bu çözücünde 20x seyreltmeden itibaren IC50 değeri sağlandı. Sudaki çözünürlük hücre canlılığı üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermedi. Geri kalan diğer çözücülerde de sitotoksik etki belirgin şekilde görüldü.

4.4 Comp-B farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün MCF-7 hücre hattına etkisinin belirlenmesi

Comp-B’nın shake flask yöntemi ile farklı sıcaklık (25°C ve 30°C) ve farklı çözücülerde (DMSO, PEG200, PEG400, su) hazırlanmış formülasyonlarının hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek için MTT testi yapıldı. Deneylerde MCF-7 hücre hattı kullanıldı.

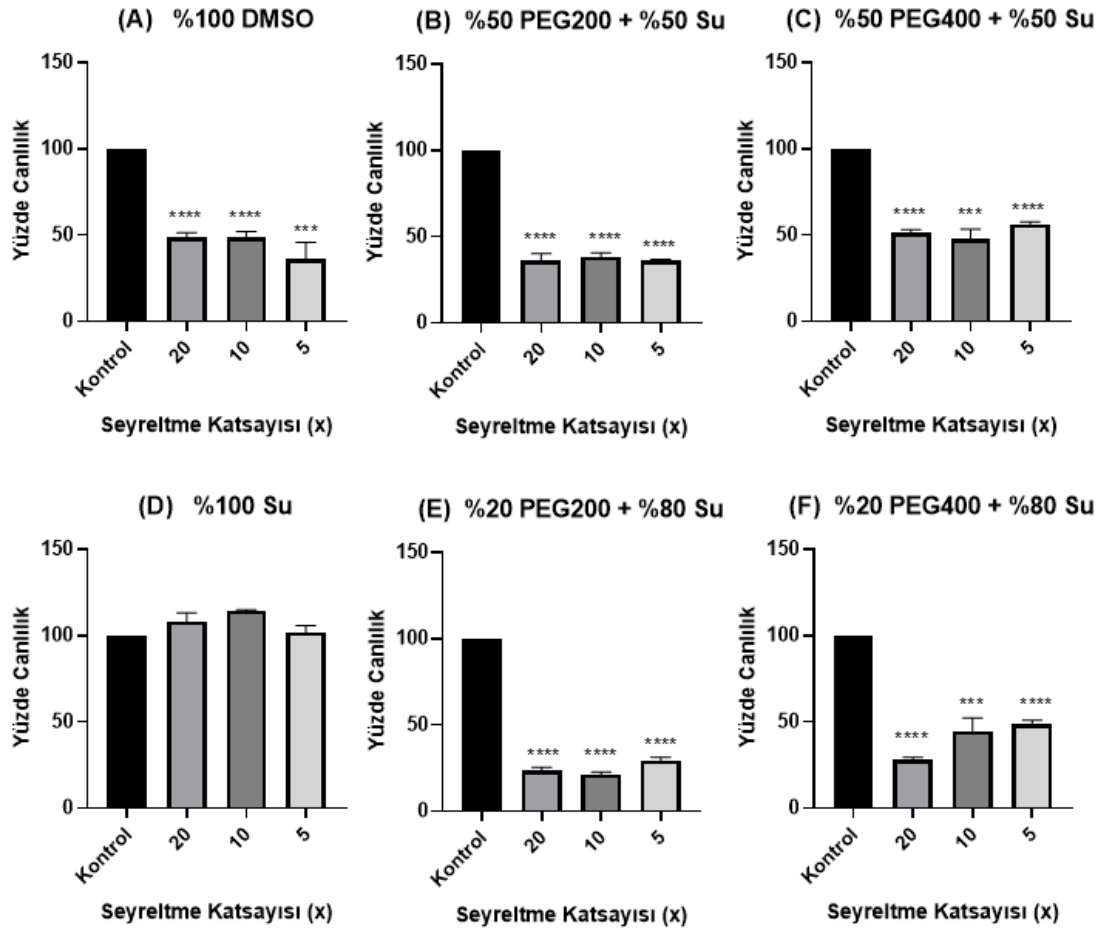
25C MCF7 COMP-B



Şekil 17: Comp-B'nin shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. MCF-7 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: $P < 0.0001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.1$) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Comp-B'nin 25°C'de hazırlanan formülasyonları MCF-7 hücre hattında farklı sitotoksik etkiler gösterdi. En iyi etki %50'lik PEG200'de gözlemlendi. Genel olarak PEG200 ile hazırlanan formülasyonların diğer çözücülere göre daha etkili sonuç verdiği gözlemlendi.

30C MCF7 COMP-B

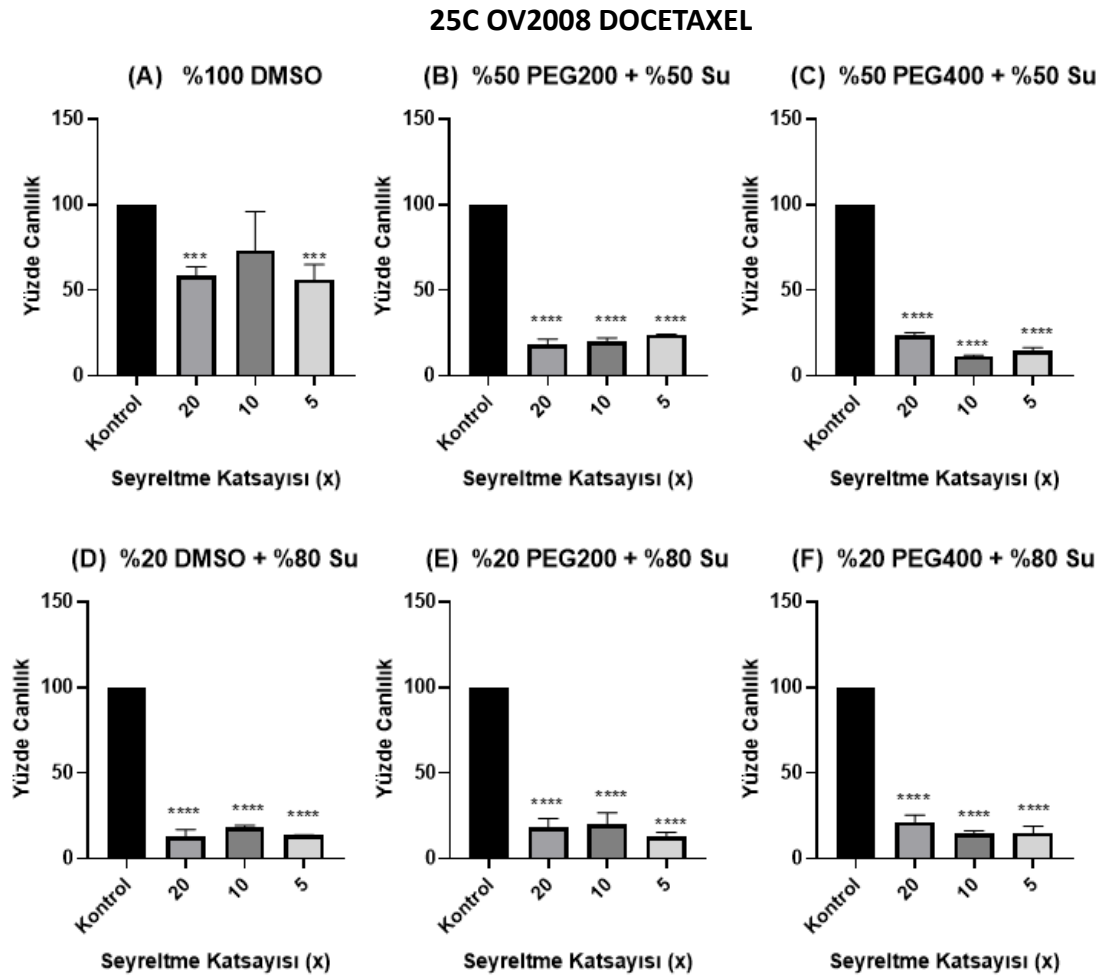


Şekil 18: Comp-B'nın shake flask yöntemi ile 30°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. MCF-7 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Comp-B'nın 30°C'de hazırlanan formülasyonları su hariç tüm çözücülerde sitotoksik etki gösterdi. Hücre canlılık grafikleri Comp-A'daki grafikler ile karşılaştırıldığında değerlerin çok yakın olduğu gözlemlendi. Her iki kompleks de aynı çözücülerde benzer sitotoksik etki gösterdi. Comp-B 30°C'de MCF-7 hücre hattı üzerinde en yüksek sitotoksik etkiyi %20'lik PEG200 gösterdi. Sudaki çözünürlük ise herhangi bir sitotoksik etki göstermedi.

4.5 Docetaxel'in farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün OV2008 hücre hattına etkisinin belirlenmesi

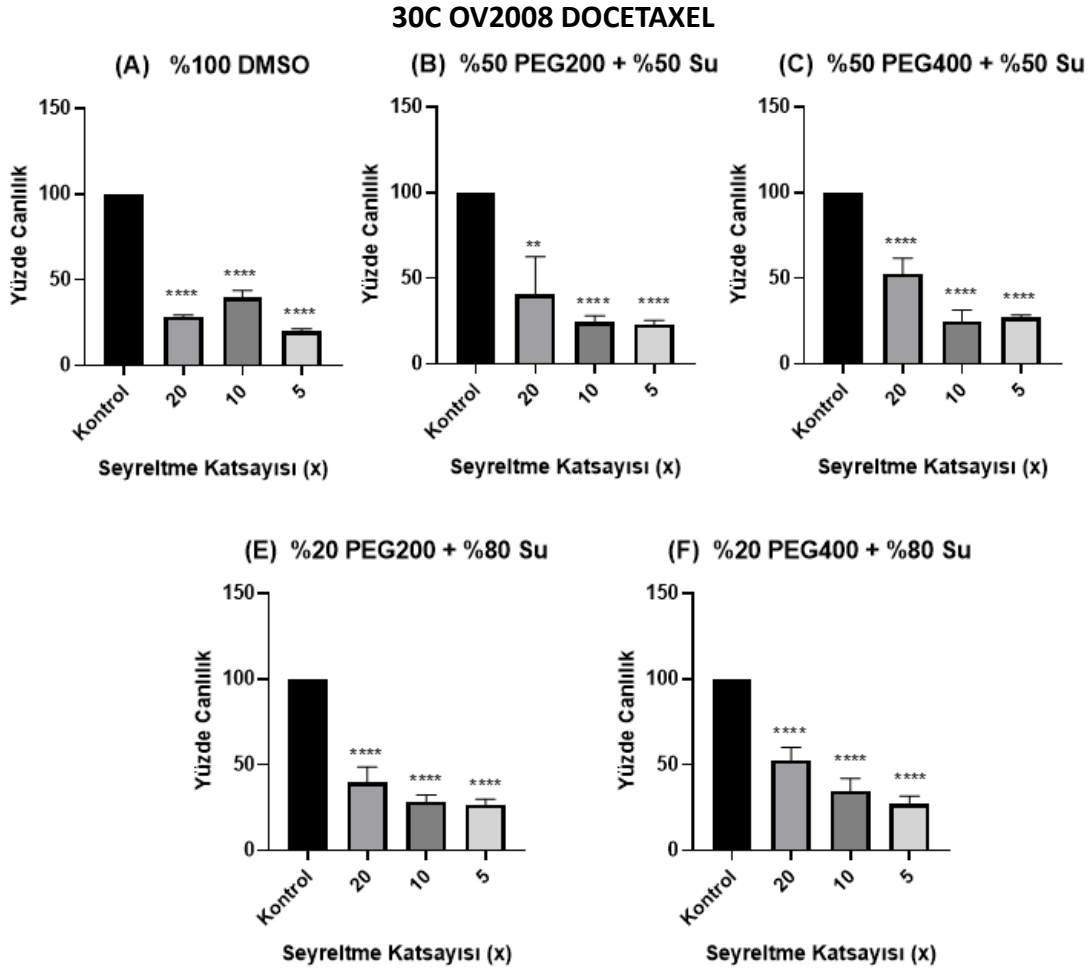
Docetaxel'in shake flask yöntemi ile farklı sıcaklıklarda (25°C, 30°C, 35°C) ve çözücülerde (DMSO, PEG200, PEG400, su) hazırlanmış formülasyonlarının hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek için MTT testi yapıldı. Deneylerde OV2008 hücre hattı kullanıldı.



Şekil 19: Docetaxel'in shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. OV2008 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Docetaxel 25°C'de hazırlanan formülasyonları hücreler üzerinde etkili bir sitotoksikite oluşturdu. Docetaxel OV2008 hücre hattı üzerinde de MCF-7 hücre hattındakine benzer şekilde sitotoksik etki gösterdi. Hücre canlılığının her iki hücre hattında da %100'lük

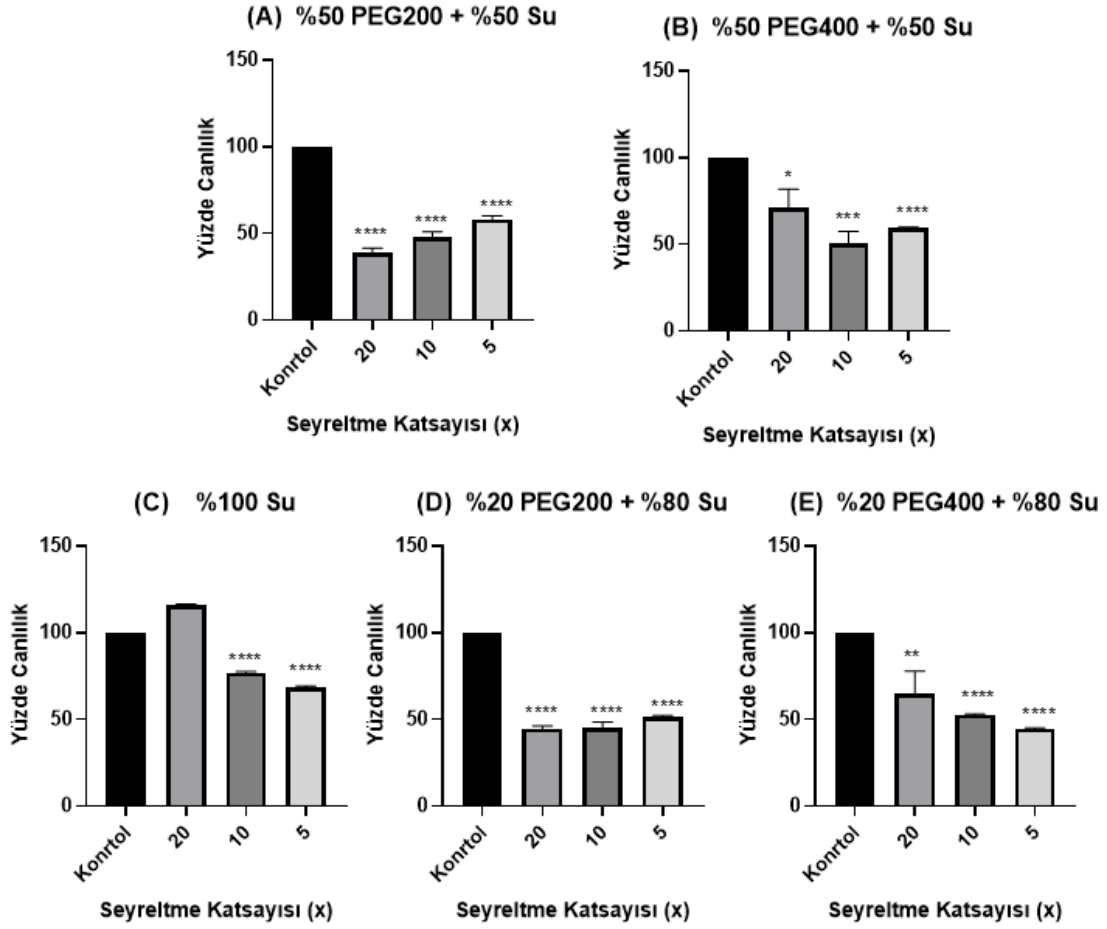
DMSO’da diğer çözeltilere kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlendi. Docetaxel’in %100’lük DMSO dışındaki tüm çözücülerdeki derişimleri OV2008 hücre hattı üzerinde IC50 değerini sağlayıp anlamlı ve yüksek düzeyde sitotoksik etki oluşturdu.



Şekil 20: Docetaxel’in shake flask yöntemi ile 30°C’deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. OV2008 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm’de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Docetaxel 30°C’de hazırlanan formülasyonları hücreler üzerinde sitotoksik bir etki oluşturdu. Hücreler üzerindeki sitotoksik etkinin de iki hücre hattında da benzerlik gösterdiği gözlemlendi. Tüm formülasyonlarda sitotoksik etki 20x seyreltmeden itibaren görülmeye başlandı ve IC50 değeri sağlandı. Hücre canlılığı üzerinde en etkili sonuç docetaxelin %100’lük DMSO’daki çözünürlüğü ile sağlandı.

35C OV2008 DOCETAXEL



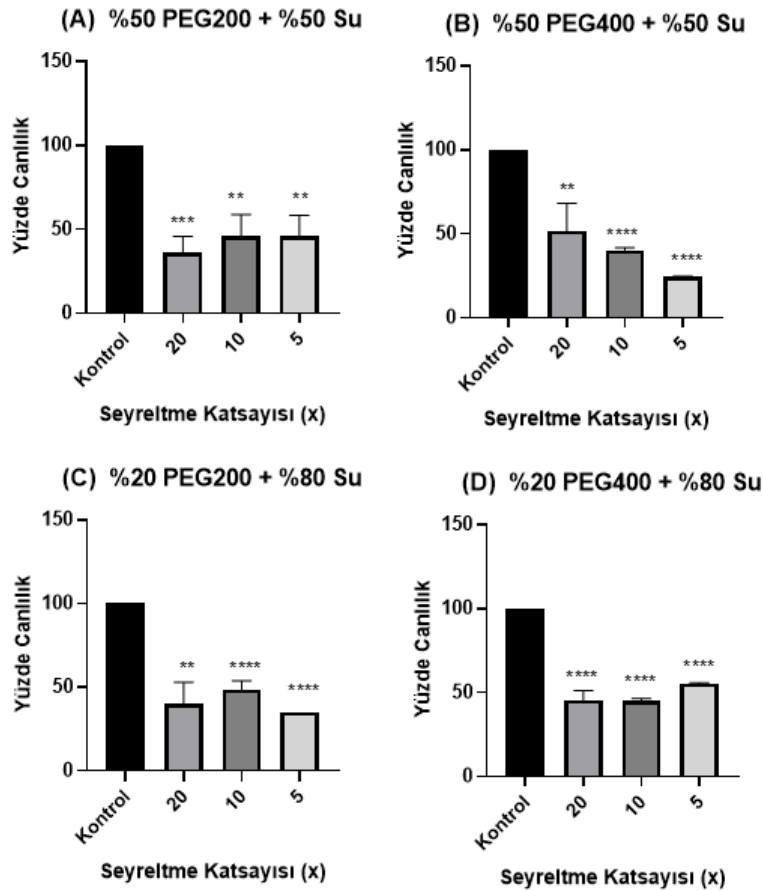
Şekil 21: Docetaxel'in shake flask yöntemi ile 35°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. OV2008 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: $P < 0.0001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.1$) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Docetaxel 35°C'de hazırlanan formülasyonları hücreler üzerinde sitotoksik etki oluşturdu. Ancak bu etkiler her bir çözücüde farklı sonuçlandı. Sadece %100 sudaki 20x'lik seyreltmede sitotoksik etki görülmedi. PEG200'ün %50'lik ve %20'lik konsantrasyonlarında benzer sitotoksik etkiler oluştu. Yine PEG400'ün de her iki konsantrasyonunda benzer sitotoksik etkiler görüldü.

4.6 Lapatinib'in farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün OV2008 hücre hattına etkisinin belirlenmesi

Lapatinib'in shake flask yöntemi ile farklı sıcaklıklarda (25°C, 30°C, 35°C) ve çözücülerde (PEG200, PEG400, su) hazırlanmış formülasyonlarının hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek için MTT testi yapıldı. Deneylerde OV2008 hücre hattı kullanıldı.

25C OV2008 LAPATİNİB

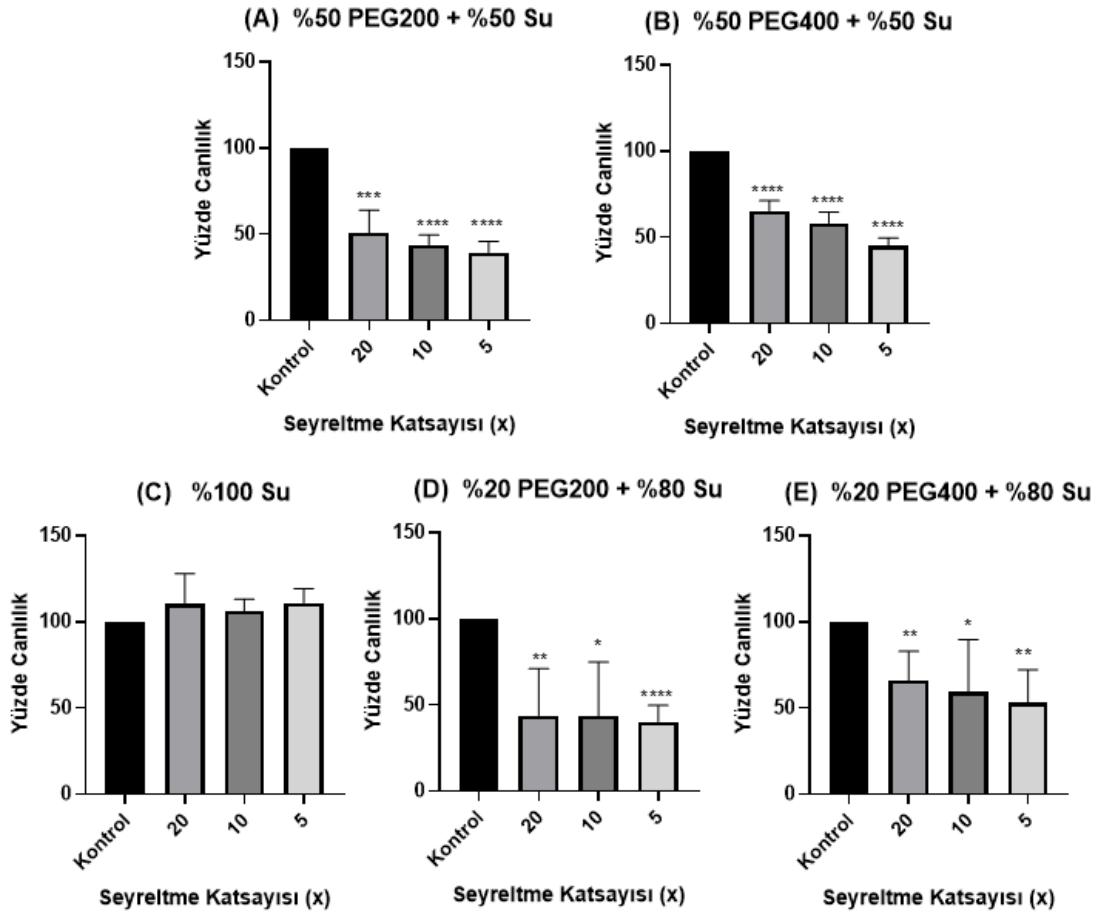


Şekil 22: Lapatinib'in shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. OV2008 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Lapatinibin 25°C'de hazırlanan formülasyonları hücreler üzerinde sitotoksik etki oluşturdu. %50'lik PEG200'ün her 3 seyreltmede de sitotoksik etki oluşturduğu ve hücrelerin %50'den fazlasını öldürdüğü gözlemlendi. %50'lik PEG400'ün OV2008

hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi de seyreltme katsayısı ile orantılı olacak şekilde düzenli bir grafik oluşturdu. %20'lik PEG200 ve %20'lik PEG400'ün sitotoksik etki oluşturduğu gözlemlendi. Her iki çözücünün 3 seyreltmede de sitotoksik etkinin IC50 değerini sağladığı gözlemlendi. Lapatinib 25°C'de en fazla sitotoksik etkiyi ise %50'lik PEG400'ün 5x seyreltmesinde gösterdi.

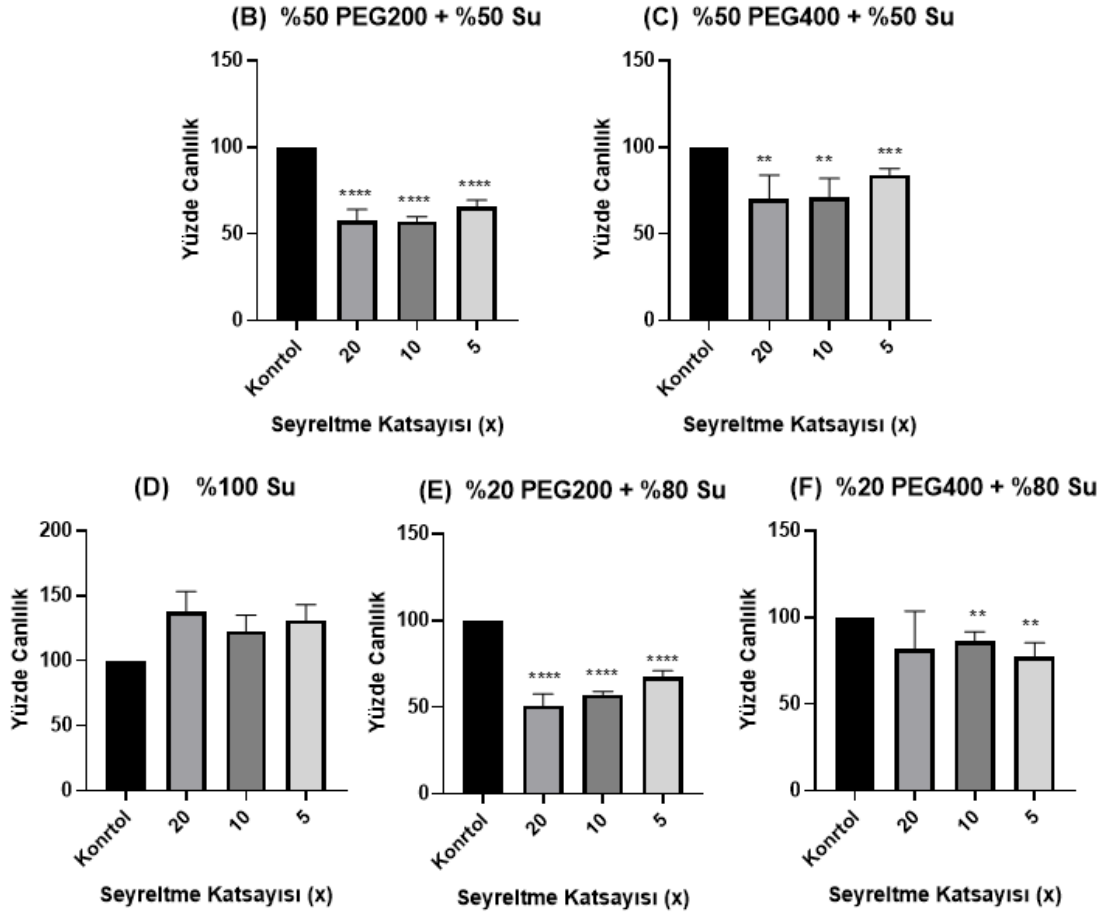
30C OV2008 LAPATİNİB



Şekil 23: Lapatinibin shake flask yöntemi ile 30°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. OV2008 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Lapatinibin 30°C'de hazırlanan formülasyonları hücreler üzerinde farklı sitotoksik etkiler oluşturdu. En iyi etkiyi ise %50'lik PEG200'de gösterdi. Sudaki formülasyon hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksisite oluşturmadı.

35C OV2008 LAPATİNİB



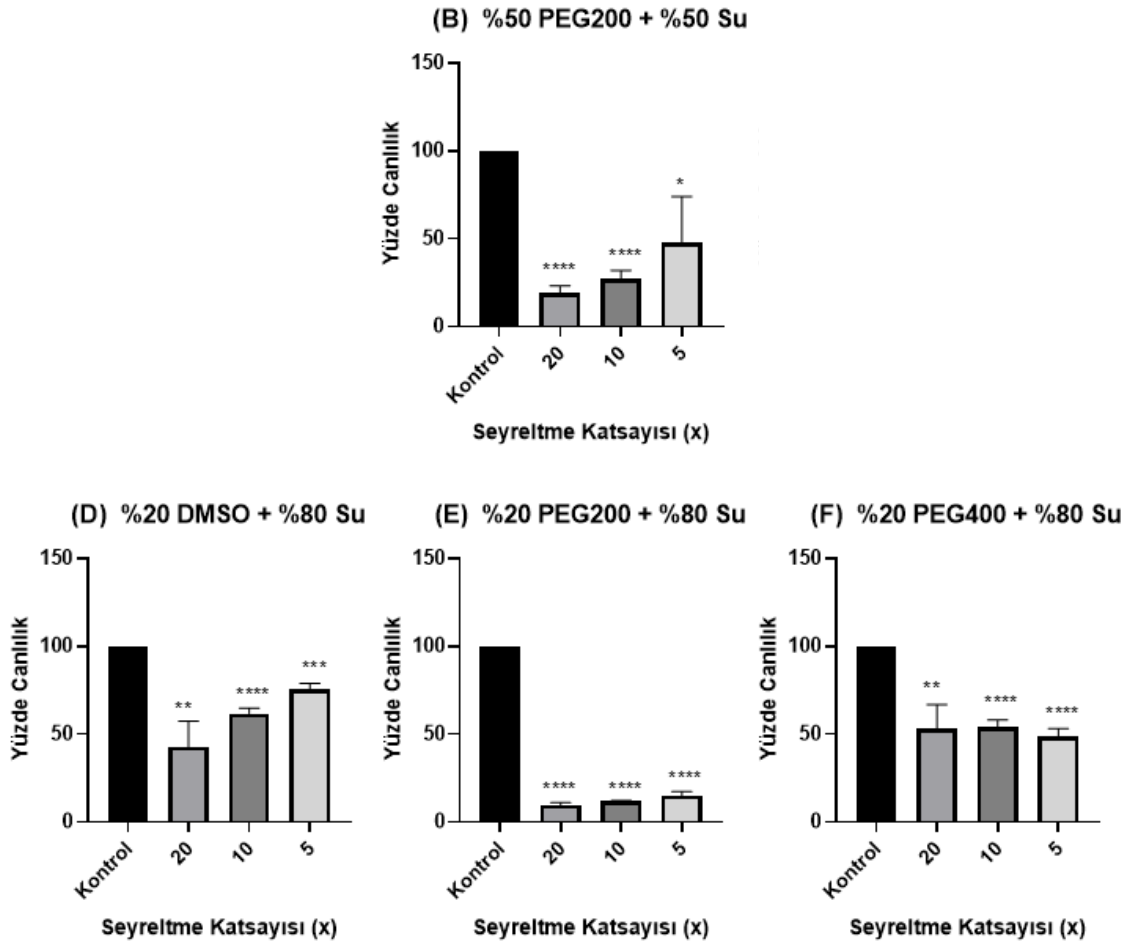
Şekil 24: Lapatinibin shake flask yöntemi ile 35°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. OV2008 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P <0.0001, **: P<0.01, *: P<0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Lapatinibin 35°C'de hazırlanan formülasyonları hücreler üzerinde farklı sitotoksik etkiler oluşturdu. %50'lik PEG200'de 20x seyreltmenden itibaren sitotoksik etki gözlemlenmeye başlandı. 3 seyreltmede de hücre canlılığı birbirine yakın seviyelerde ölçüldü. %20'lik PEG200'deki sitotoksik etki ile %50'lik PEG200'deki etki birbirlerine yakındı. %20'lik PEG200 de 3 seyreltmede hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdi. Sudaki formülasyonda ise hücreler üzerinde sitotoksik etki görülmedi. %50'lik PEG400 ve %20'lik PEG400 hücre canlılığı üzerinde benzer etkiler gösterdi. Her ikisi de düşük seviyelerde sitotoksik etki gösterdi.

4.7 Comp-A'nın farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün OV2008 hücre hattına etkisinin belirlenmesi

Comp-A'nın shake flask yöntemi ile farklı sıcaklıklarda (25°C ve 30°C) farklı çözücülerde (DMSO, PEG200, PEG400, su) hazırlanmış formülasyonlarının hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek için MTT testi yapıldı. Deneylerde OV2008 hücre hattı kullanıldı.

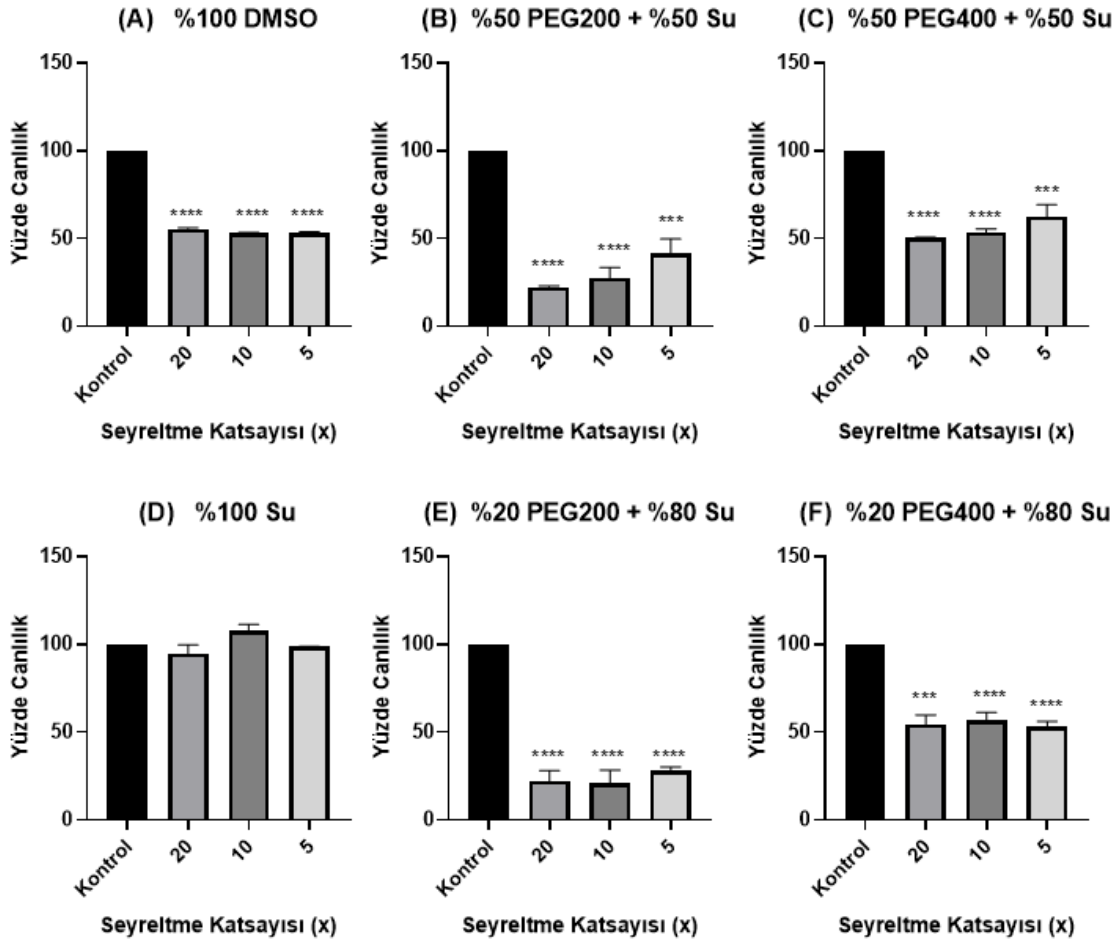
25C OV2008 COMP-A



Şekil 25: Comp-A'nın shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. OV2008 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Comp-A 25°C’de hazırlanan formülasyonları hücreler üzerinde değişken bir sitotoksik etki gösterdi. En iyi sitotoksik etki %20’lik PEG200’de görüldü. PEG200’ün kullanılmasının hücreler üzerindeki canlılığa PEG400’e göre daha etkili olduğu gözlemlendi.

30C OV2008 COMP-A

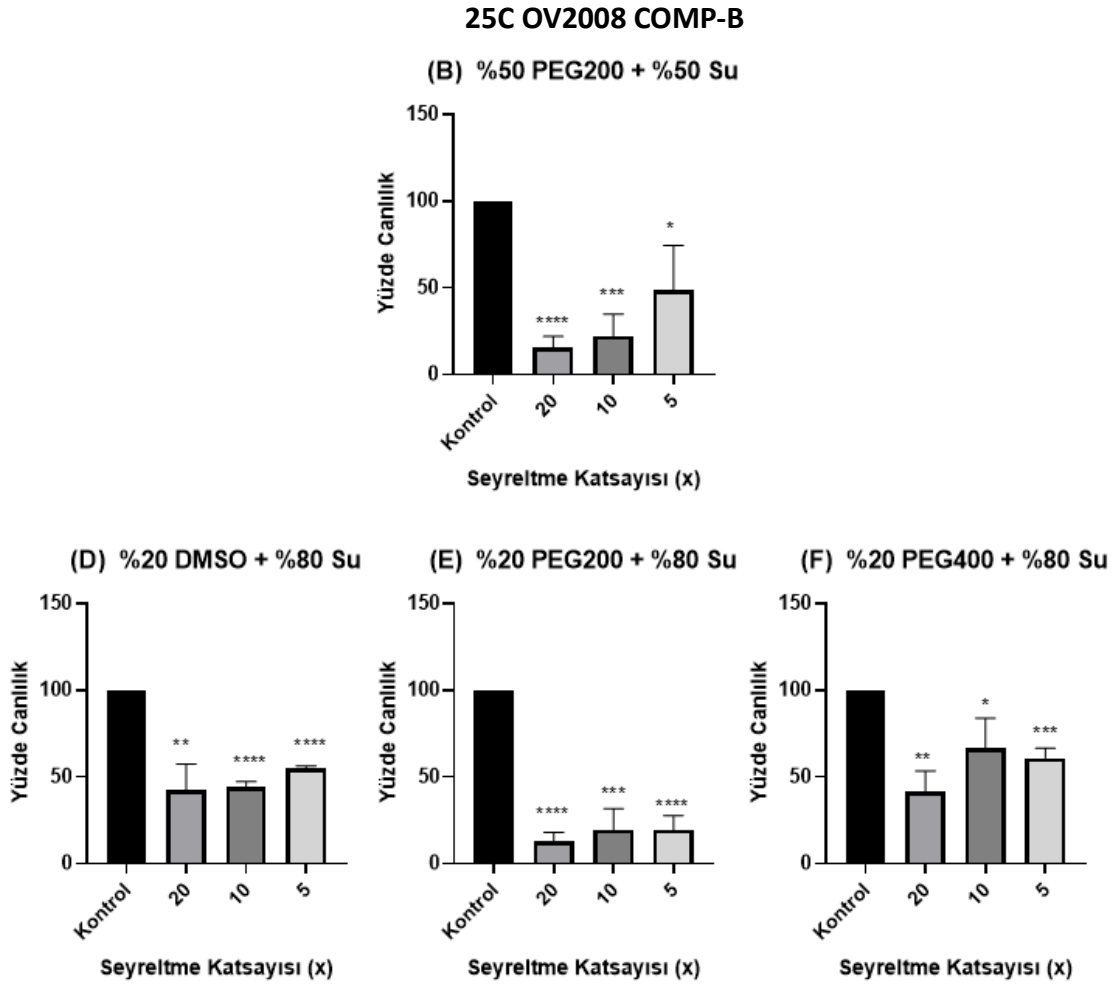


Şekil 26: Comp-A’nın shake flask yöntemi ile 30°C’deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. OV2008 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm’de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Comp-A 30°C’de hazırlanan formülasyonları hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdi. Ancak gösterdiği sitotoksik etkiler her çözücünde farklı sonuçlandı. En iyi sitotoksik etkiyi PEG200’de gösterdi. Sudaki formülasyonda sitotoksik etki göstermedi. DMSO ve PEG400’deki sitotoksik etkiler de birbirine çok yakın seviyelerdedir.

4.8 Comp-B farklı çözücü ve sıcaklıklardaki çözünürlüğünün OV2008 hücre hattına etkisinin belirlenmesi

Comp-B'nin shake flask yöntemi ile farklı sıcaklıklarda (25°C ve 30°C) farklı çözücülerde (DMSO, PEG200, PEG400, su) hazırlanmış formülasyonlarının hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini gözlemlemek için MTT testi yapıldı. Deneylerde OV2008 hücre hattı kullanıldı.

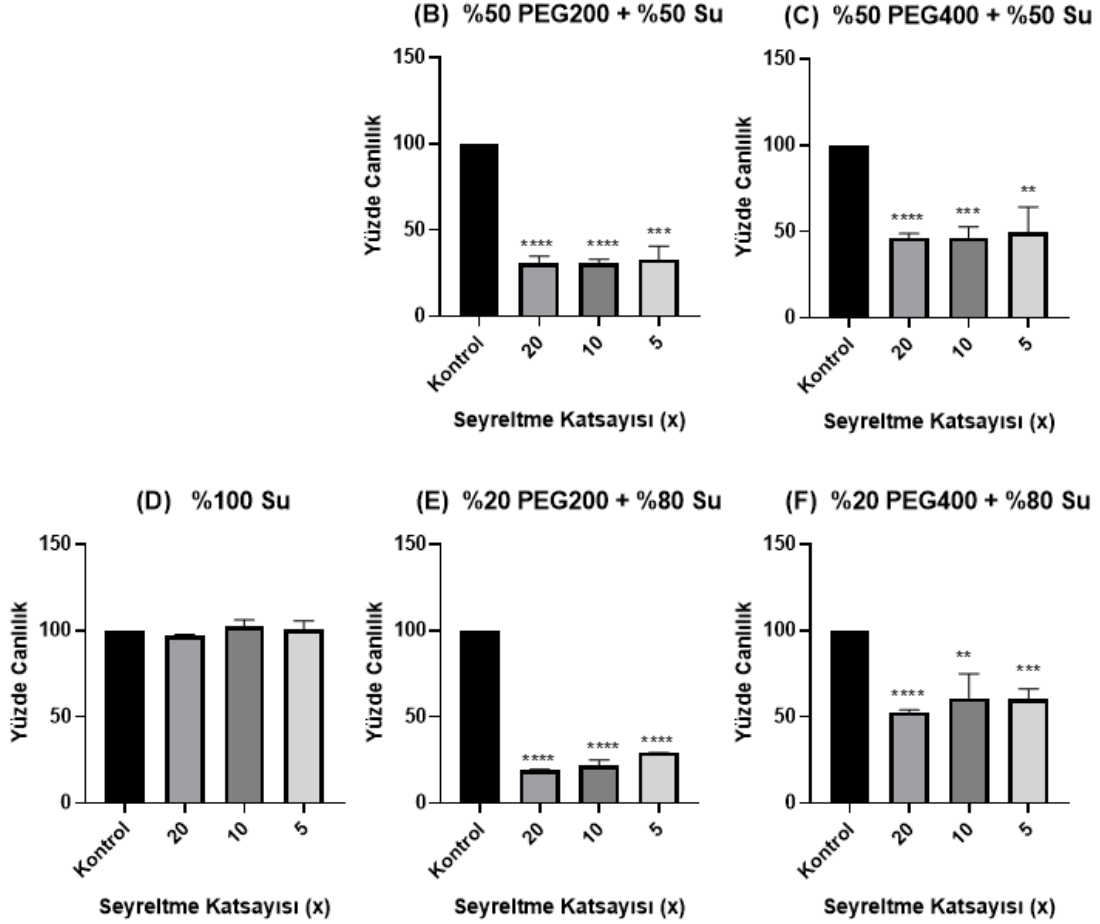


Şekil 27: Comp-B'nin shake flask yöntemi ile 25°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. OV2008 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: P < 0.0001, **: P < 0.01, *: P < 0.1) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Comp-B 25°C'de hazırlanan formülasyonları hücreler üzerinde en iyi sitotoksik etkiyi %50'lik ve %20'lik PEG200'ün gösterdi. İki konsantrasyonda da etkiler birbirine çok

yakın seviyelerdedir. Tek farklılık %50'lik konsantrasyondaki 5x'lik seyreltmede görüldü. %20'lik DMSO ve %20'lik PEG400'de sitotoksik etki olduğu gözlemlendi.

30C OV2008 COMP-B



Şekil 28: Comp-B'nın shake flask yöntemi ile 30°C'deki çözünürlüğü ve MTT deney verileri. OV2008 hücre hatları farklı ilaç çözeltileri ile muamele edildi. 48 saat inkübasyon sonrası MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm yapılmış olup arka plan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaplandı. Hata çubukları SD değerlerini belirtmektedir. İstatistiksel analizi GraphPad programında kontrol gruplarına göre t-testi ile analiz edildi (****: $P < 0.0001$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.1$) Deneyler üç kez tekrar edildi.

Comp-B 30°C'de PEG'ler ile hazırlanan formülasyonları hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdi. En iyi sitotoksik etkiyi PEG200'de göstermiştir. DMSO ve sudaki çözünürlükler canlılık üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermedi. PEG400'deki sitotoksik etkiler de birbirine çok yakın seviyelerdedir.

4.9 Tartışma

Son zamanlarda antikanser aktiviteye sahip olan yeni metal kompleksler sentezlenmiştir. Bunlar arasında farklı paladyum (II) kompleksleri bulunmaktadır. Platin komplekslerine göre daha düşük yan etkilere sahip olan bu kompleksler alternatif bir yol sunmaktadır. Bu tez çalışmasında bazı Pd (II) kompleksleri kullanıldı. Kontrol olarak docetaxel ve lapatinib kullanıldı. Bu kompleksler ve ilaçlar farklı çözücü ve sıcaklıklarda hazırlanıp over kanser hücre hattı OV2008 ve meme kanser hücre hattı MCF-7 üzerindeki sitotoksik etkileri incelendi.

Çalışmamızda komplekslerin sitotoksik etkilerini incelemek için shake flask yöntemi ile hazırlanan çözeltiler farklı oranlarda seyreltilerek (5x, 10x, 20x) MCF-7 ve OV2008 hücre hatları ile MTT testlerine tabii tutuldu. MTT verilerine göre; kullanılan her çözücüde ilaçlar farklı çözünürlük göstermiş olup farklı sitotoksik etkiler elde edildi.

Yapılan bir çalışmada Pd (II) komplekslerinin belirli konsantrasyonlarda kanser hücre hatları üzerinde antikanser aktivite gösterdiği ve bu komplekslerin oluşturduğu potansiyel hücre ölüm mekanizmasının da araştırma alanı olabilirliği sonucuna ulaşmıştır (Al-Janabi ve ark., 2020). Genel olarak, Pd (II) komplekslerinin birincil hedefi DNA gibi görünmektedir. Tümör hücrelerinde hem kovalent hem de kovalent olmayan DNA'ya bağlanabildikleri, genetik hasara ve duplikasyonun inhibisyonuna neden oldukları bildirilmiştir (Gao ve ark., 2009). Organometalik paladyum-sakarinat kompleksleri, incelenen başka bir Pd (II) türevleri sınıfını temsil eder. Hem in vitro hem de in vivo modellerde farklı kanserlere karşı önemli antiproliferatif aktivite sergilerler. Özellikle, apoptoz yoluyla hücre ölümü aktivasyonu yoluyla meme kanserine karşı zorlayıcı antitümör aktivitesi tanımlanmıştır. Östrojene duyarlı MCF-7 ve üçlü negatif MDA-MB-231 hücre modellerinde deneysel IC50 değerleri düşük mikromolar aralıkta olduğu saptanmıştır (Ferraro ve ark., 2022). Çalışmamızda kullandığımız Pd kompleksleri de MCF-7 hücre hattında sitotoksik etki gösterdi. Formülasyonlar hazırlanırken yapılan sıcaklık değişimi ile sitotoksik etkilerde de farklılıklar meydana geldi. Kullanılan çoğu çözücü formülasyonunda kompleksler hücre canlılığını %50'nin altına düşürmeyi başardı. Ancak düzenli bir değişim söz konusu değildir. MCF-7 hücre hattının yanında bu kompleksler OV2008 hücre hattında denendi. Bu hücre hattında da benzer sonuçlar elde edildi. Her iki hücre hattı üzerinde anlamlı sitotoksik etkiler oluştu. Al-Saif ve arkadaşları

altı yeni PdCl₂ bazlı paladyum kompleksi sentezledi. Kolorektal adenokarsinom (Caco-2) ve meme kanseri (MCF-7) hücre hatları üzerindeki sitotoksikite analizlerinde sentezlenen bileşiklerin her birinin antikanser aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, altı kompleks arasında en güçlü aktivite, pikolinik asit içeren kompleks tarafından gösterildi. Bu da bu kompleksin insan kolorektal adenokarsinomu ve meme kanserine karşı kullanılan potansiyel bir antikanser bileşiği olabileceğini gösteriyor (Al-Saif ve ark., 2020). Araştırmacılar tarafından seçilen Pd (II) kompleks ligandlarından biri, malonat, oksalat ve pirofosfat ligandları ile konjuge edilmiş 2-hidrazinopiridindir. Komplekslerin aktivitesi meme (MCF-7), hepatosellüler (HepG-2), prostat (PC-3) ve gırtlak (HEP-2) kanseri hücre hatları üzerinde test edildi. Oluşturulan oksalat ligand bileşiği, taranan tüm hücre hatlarına karşı en iyi antiproliferatif ve sitotoksik aktiviteyi gösterdi (Czarnomysy ve ark., 2021). Ulukaya ve arkadaşları, Pd (II) kompleksi ile yaptıkları bir çalışmada, kompleksin in vitro hücre ölümü reseptörleri yoluyla apoptozu indükleyerek meme kanseri hücrelerine karşı güçlü bir anti-kanser aktivitesine sahip olduğu sonucuna varmıştır. Kompleks in vivo modelde de tümör hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde azaltabilir. Ayrıca farklı bir Pd kompleksi ile yapılan benzer bir çalışmada, kompleksin sisplatin ile eşit aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Ek olarak, kompleksin hayvanlar tarafından iyi tolere edildiği ve sisplatine kıyasla daha az toksik olduğu bulunmuştur (Ulukaya ve ark., 2011). Bu çalışmada da Pd komplekslerinin docetaxel ve lapatinib ile benzer antikanser aktivite gösterdiği elde edildi. Docetaxel ve lapatinib hidrofobik ilaçlar olup sudaki çözünürlükleri oldukça düşüktür. Deney sonucunda da sudaki çözünürlüklerinde sitotoksik etki görülmedi. Benzer şekilde, kullandığımız Pd (II) kompleksleri de sudaki formülasyonları ile hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etki oluşturmadi. Pd (II) kompleksleri farklı bir çalışmada solunabilir nanopartikül haline getirilerek küçük hücreli olmayan akciğer kanseri üzerinde çalışıldı. In vitro sitotoksikite değerlendirmesi, PdNP'nin, NP ve serbest Pd (II) kompleksi ile karşılaştırıldığında hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını gösterdi. Çalışma ayrıca DSPE-PEG200 gibi PEG'ile lipidlerin ilaç taşıyıcısı olarak kullanılma potansiyelini destekledi (Erkisa ve ark., 2021). Çalışmamızda kullandığımız Pd (II) kompleksleri MCF-7 ve OV2008 hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdi. Kullanılan iki kompleks (Comp-A ve Comp-B) her iki hücre hattında 25°C ve 30°C'de de %20'lik PEG200'de en iyi sitotoksik etkiyi gösterdi. Sıcaklık arttıkça çözünürlüğün de doğru orantılı olarak artmasıyla hücreler üzerindeki

sitotoksik etkinin artması hedeflendi. Ancak kompleksler üzerindeki sıcaklık değışikliğı hücre canlılığını beklenen şekilde etkilemedi. İstatistiksel olarak anlamlı bir etki gözlemlenmedi.

Fossella ve arkadaşları docetaxel ile yaptıkları çalışmalarında belirtilen olumlu yanıt oranı, progresyonsuz sağkalım, 1 yıllık sağkalım ve yaşam kalitesi üzerindeki etki, docetaxelin, birinci basamak platin bazlı tedaviden sonra ilerleyen KHDAK'lı hasta grubunda klinik olarak anlamlı aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. İkinci basamak kemoterapiyi değerlendiren gelecekteki randomize çalışmalar, referans kontrol rejimi olarak docetaxeli içermesi gerektiğı sonucuna ulaşmışlardır. (Fossella ve ark., 2000). Docetaxel, insan meme kanseri hücre hatlarına ve in vitro olarak yeni ekilen insan meme kanseri hücrelerine karşı önemli sitotoksik aktiviteye sahiptir. Ayrıca farelerde meme tümörlerine ve insan meme tümörü ksenogreftlerine karşı aktivite göstermiştir. Özetle, docetaxel, ileri ve/veya metastatik meme kanseri hastalarının tedavisinde önemli sitotoksik aktiviteye ve klinik etkinliğe sahip, ümit verici bir taksoiddir (Fulton ve Spencer, 1996). Docetaxelin yeni bir submikronik Tween®80 içermeyen dispersiyon formülasyonu ile yakın zamanda yapılan bir doz bulma çalışması, Tween®80 ile mevcut docetaxel formülasyonuna kıyasla eşmolar dozlarda hematolojik ve hematolojik olmayan toksisite (sıvı tutulumu) insidansı ve şiddetinin daha düşük olduğunu göstermiştir (Tije ve ark., 2003). Docetaxelin polimerik misel formülasyonu ile in vivo ve in vitro sitotoksikite deneyinde antitümör etkinliği olumlu yönde etkileyebileceğı sonucuna ulaşılmıştır (Lee ve ark., 2011). Huynh ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada docetaxel çözünürlüğünü arttırabilmek için çeşitli çözücüler kullanmışlardır. En yüksek artışı tributirinde sağlamışlardır (Huynh ve ark., 2008). Çalışmamızda docetaxel farklı çözücüler (DMSO, PEG200, PEG400, su) içinde farklı sıcaklıklar kullanarak hazırlandı. Hazırlanan formülasyonlar MCF-7 ve OV2008 hücre hatları üzerinde test edildi. Elde edilen sonuçlar her iki hücre hattında da birbirine benzemektedir. Docetaxelin su hariç kullanılan diğer çözücülerde etkili bir çözünme sağladığı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi ile görüldü. Bu etki çoğu formülasyonda hücre canlılığını %50'nin altına düşürdü. Farklı sıcaklıklar kullanıldığında oluşan sitotoksikite değışkenlik gösterdi. Sitotoksik etkinin en iyi gözlemlendiğı sıcaklık 25°C oldu. Sıcaklık artışıyla birlikte çözünürlüğün artarak sitotoksik etkiyi de arttırması beklendi. Ancak bu durumun aksine

sitotoksitenin azaldığı görüldü. Veriler arasında istatistiksel olarak düzenli bir değişim olmaması nedeniyle anlamlı bir etki gözlemlendi.

Lapatinib meme kanseri tedavisinde aktif ve iyi tolere edilen bir oral ikili tirozin kinaz inhibitörüdür. Lapatinib'in klinik etkinliği sadece ErbB-2 aşırı eksprese eden meme kanserinin tedavisi ile sınırlıdır. Lapatinib, refrakter metastatik meme kanseri hastalarında ve beyin metastazı olan hastalarda potansiyel fayda sağlayan birinci basamak metastatik tedavi olarak aktiftir (Moy ve Goss, 2006). Bu çalışmada lapatinibin hazırlanan formülasyonları over kanseri hücre hattı olan OV2008 hücre hattında denendi. Bu hücre hattı üzerinde de sitotoksik etki oluşturduğu gözlemlendi. Suda çözünürlüğün zayıf olması, ilaç geliştirmede ciddi bir sorundur. Birçok araştırmacı bu sorunun üstesinden gelmek için çaba sarf etmiştir ve klatrat tarafından yakalanan yüzey aktif maddelerin eklenmesi ve lipozomlar veya diğer nano taşıyıcılarla kapsüllenmesi de dahil olmak üzere çeşitli stratejiler geliştirildi. Gao ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada lapatinib içeren, lipoprotein benzeri nanopartiküller hazırladı ve karakterize etti. LTNP'ler, lapatinibin suda çözünürlüğünü önemli ölçüde arttırmış, glioblastoma hücrelerinde proliferasyonunu inhibe edip apoptozu indüklediği sonucuna ulaşmışlardır (Gao ve ark., 2014). Antikanser ilacı olan lapatinib tamamlayıcı yöntemler kullanılarak CD(siklodekstrin) kompleksi oluşumu özellikleri açısından karakterize edilmiştir. CD'lerin, özellikle ikame edilmiş türevleri, lapatinib çözünürlüğünü önemli ölçüde arttırmıştır. Bu, gelişmiş biyoyararlanımlı yeni bir lapatinib formülasyonunun başlangıç noktası olabilir (Tóth ve ark., 2016). İn vivo olarak yapılan bir çalışmada yüksek yağlı bir diyetle birlikte lapatinib oral yolla uygulanmıştır ve biyoyararlanımda 3.25 kat artışa neden olmuştur. Bu nedenle, yüksek yağ seviyesinin lapatinib biyoyararlanımını iyileştirmede olumlu bir rol oynadığını tahmin edilmiştir (Zhu ve ark., 2023). Bu çalışmamızda lapatinibin çözünürlüğünü arttırabilmek için farklı çözücüler kullanıldı. Lapatinib bu çözücülerde farklı sıcaklıklar kullanılarak hazırlandı. Su haricindeki kullanılan diğer çözücülerde etkili bir çözünme sağladığı, MTT deneyi sonucunda, kullanılan formülasyonların sitotoksik etki oluşturması ile gözlemlendi. OV2008 hücre hattında en iyi sitotoksik etki her sıcaklık için farklı çözücüde elde edildi. MCF-7 hücre hattında ise iki sıcaklıkta DMSO ile en iyi sitotoksik etki elde edildi. Sıcaklık değişiminin ise düzenli bir değişikliğe neden olmadığı görüldü. Genel olarak lapatinib her iki hücre

hattı üzerinde de çeşitli sitotoksik etki gösterdi. Ancak hedeflendiği gibi bir etki gözlemlenmediği için istatistiksel olarak anlamsız sonuçlandı.



5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser, dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ve tedavi büyük bir zorluk olmaya devam etmektedir. Herhangi bir tedavinin amacı, mümkün olduğu kadar çok kanser hücrelerini öldürmek ve normal hücrelerin ölümünü en aza indirmektir (Tran ve ark., 2019). Yeni antikanser ilaçların geliştirilmesi için umut verici bir temeli, geçiş metali bazlı ilaçlar sağlamaktadır. Daha doğru ve güvenilir bir kemoterapi için araştırmacılar tarafından yapılan sürekli çalışmalar umut vermektedir (Czarnomysy ve ark., 2021). Farmasötik yardımcı maddeler, ilaç formülasyonlarında önemli bir role sahiptir. Birçok aktif farmasötik bileşen (API), sulu çözeltilerde düşük çözünürlük ve yavaş çözünme gösterir. Çözünürlüğü arttırmak için çeşitli formülasyon stratejileri geliştirilmiştir. Formülasyon sürecinde, polietilen glikol (PEG) gibi yardımcı maddelerin yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Paus ve ark., 2015). Buna benzer olarak DMSO'nun güçlü çözücü özellikleri, olumlu ve iyi belgelenmiş bir toksikolojik profille birleştiğinde, formülasyon bilim adamlarını ilaç dağıtım teknolojilerinde uygulamalar geliştirmeye teşvik etmiştir. DMSO şu anda aktif farmasötik bileşen (API) olarak onaylanmıştır (McKim ve Strub, 2007). Bu tez çalışmasında ise, Pd (II) komplekslerinin farklı çözücü (PEG200, PEG400, DMSO, su) ve sıcaklıklardaki (25°C, 30°C, 35°C) antikanser aktivitesi incelendi. Mevcut çalışmada over kanseri OV2008 ve meme kanseri MCF-7 hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri MTT testi ile ortaya konuldu.

Pd (II) kompleksinin neden olduğu hücre ölümü şeklini aydınlatmak için çeşitli yaklaşımlar yapılmıştır. Morfolojik ve moleküler analizler hücrelerin ağırlıklı olarak apoptozdan öldüğünü göstermiştir. Hem MDA-MB-435 hem de HeLa hücreleri, apoptoz için belirgin bir belirteç olan büzülme ve kanama sergilemiştir (Kaçar ve ark., 2014). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada kullanılan Pd komplekslerinin hiçbirinin apoptotik hücre ölümüne neden olmadığı bazı komplekslerin hücreleri nekroza götürdüğü sonucuna ulaşılmıştır. Buna karşın bazı komplekslerin bir meme kanseri hücre hattında (MCF-7) apoptozu indüklediği bulunmuştur. Bu da aynı kompleksin farklı hücre hatlarında farklı ölüm yollarını indükleyebileceği anlamına gelmektedir (Ulukaya ve ark., 2011). Bu tez çalışmasında da kullanılan komplekslerin sitotoksik etki oluşturduğu ancak bu etkiyi hangi ölüm yollarını indükleyerek

gerçekleştirdiği bilinmemektedir. Kullanılan her iki hücre hattını da aynı ölüm yoluna götürerek mi etki ettiği ve farklı hücre hatlarında da benzer yolları kullanarak mı hücreleri ölümüne götüreceği merak uyandırmaktadır.



6 KAYNAKÇA

- Ali, M.W., Cacan, E., Liu, Y., Pierce, J.Y., Creasman, W.T., Murph, M.M., Govindarajan, R., Eblen, S.T., Greer, S.F. and Hooks, S.B., (2013) Transcriptional Suppression, DNA Methylation, and Histone Deacetylation of the Regulator of G-Protein Signaling 10 (RGS10) Gene in Ovarian Cancer Cells. PLOS ONE, 8(3).
- Aliustaoğlu, M., 2009. Temel Kanser Fizyopatolojisi. Klinik Gelişim.
- Al-Janabi, A.S.M., Alheety, M.A., Al-Samrai, O.A.Y., Shaaban, S., Kibar, B. and Cacan, E., 2020. Anti-cancer and anti-fungal evaluation of novel palladium(II) 1-phenyl-1H-tetrazol-5-thiol complexes. Inorganic Chemistry Communications, 121.
- Al-Saif, F.A., Al-Humaidi, J.Y., Binjawhar, D.N. ve Refat, M.S., 2020. Six new palladium(II) mixed ligand complexes of 2-, 3-, 4-monosubstituted derivative of pyridine ring with caffeine moiety: Synthesis, spectroscopic, morphological structures, thermal, antimicrobial and anticancer properties. Journal of Molecular Structure, 1218.
- Alsenz, J. ve Kansy, M., 2007. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. Advanced Drug Delivery Reviews, 59, 546–567.
- Amaravadi, R. K. ve Thompson, C. B., 2007. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. Clinical Cancer Research, 13, 7271–7279.
- Anding, A. L. ve Baehrecke, E. H., 2015. Autophagy in cell life and cell death. In Current Topics in Developmental Biology, 114, 67–91.
- Avdeef, A., 2007. Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs. Advanced Drug Delivery Reviews, 59, 568–590.
- Ayhan, A. ve Ogava, H., 2013. Kanser Moleküler Temeli ve Genel Cerrahi Uygulamalarındaki Önemi, 1–28.
- Ayhan, A. ve Ogawa, H., 2003. Kanser Moleküler Temeli ve Genel Cerrahi Uygulamalarındaki Önemi. Nature, 427, 2004.
- Baka, E., Comer, J. E. A. ve Takács-Novák, K., 2008. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 46(2), 335–341.
- Baker, J., Ajani, J., Scotté, F., Winther, D., Martin, M., Aapro, M. S. ve von Minckwitz, G., 2009. Docetaxel-related side effects and their management. European Journal of Oncology Nursing, 13(1), 49–59.
- Barbaros, B., ve Dikmen, M., 2015. Kanser İmmünoterapisi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31(4), 177–181.

- Bedoui, S., Herold, M. J. ve Strasser, A., 2020. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21, 678–695.
- Behranvand, N., Nasri, F., Zolfaghari Emameh, R., Khani, P., Hosseini, A., Garssen, J. ve Falak, Reza, 2022. Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. *Cancer Immunol Immunother* 71, 507–526.
- Bergström, C. A. S., Norinder, U., Luthman, K. ve Artursson, P., 2002. Experimental and computational screening models for prediction of aqueous drug solubility. *Pharmaceutical Research*, 19(2), 182–188.
- Berkel, C. and Cacan, E., 2023. Chemo-sensitive and chemo-resistant ovarian cancer cells show differences in cellular processes leading to pyroptotic cell death. *Research Square*, 1-21.
- Bertheloot, D., Latz, E. ve Franklin, B. S., 2021. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular and Molecular Immunology*, 18, 1106–1121.
- Carneiro, T. J., Martins, A. S., Marques, M. P. M. ve Gil, A. M., 2020. Metabolic Aspects of Palladium (II) Potential Anti-Cancer Drugs. *Frontiers in Oncology*, 10.
- Cassileth, B. R., ve Deng, G., 2004. Complementary and Alternative Therapies for Cancer. *The Oncologist*, 9(1), 80–89.
- Cho, K. R. ve Shih, I. M., 2009. Ovarian cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4, 287–313.
- Clarke, S. J. ve Rivory, L. P., 1999. Clinical pharmacokinetics of docetaxel. *Clinical Pharmacokinetics*, 36(2), 99–114.
- Cleeland, C. S., Bennett, G. J., Dantzer, R., Dougherty, P. M., Dunn, A. J., Meyers, C. A. ve Lee, B. N., 2003. Are the symptoms of cancer and cancer treatment due to a shared biologic mechanism? A cytokine-immunologic model of cancer symptoms. *Cancer*, 97(11), 2919–2925.
- Czarnomysy, R., Radomska, D., Szewczyk, O. K., Roszczenko, P. ve Bielawski, K., 2021. Platinum and palladium complexes as promising sources for antitumor treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 8271.
- Cacan, E., 2017. Epigenetic regulation of RGS2 (Regulator of G-protein signaling 2) in chemoresistant ovarian cancer cells. *Journal of Chemotherapy*, 29(3), 173–178.
- Cacan, E., Greer, S.F., and Garnett-Benson, C., 2015. Radiation-induced modulation of immunogenic genes in tumor cells is regulated by both histone deacetylases and DNA methyltransferases. *International Journal of Oncology*, 47, 2264–2275.
- Cacan, E., Spring, A.M., Kumari A., Greer S.F., Garnett-Benson C., 2015. Combination Treatment with Sublethal Ionizing Radiation and the Proteasome Inhibitor,

- Bortezomib, Enhances Death-Receptor Mediated Apoptosis and Anti-Tumor Immune Attack. *International Journal of Molecular Sciences* 16(12), 30405-30421.
- Dasari, S., ve Bernard Tchounwou, P., 2014. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, 740, 364–378.
- Dhillon, S. ve Wagstaff, A.J., 2007. Lapatinib. *Drugs* 67, 2101–2108.
- Di, L., Fish, P. V. ve Mano, T., 2012. Bridging solubility between drug discovery and development. *Drug Discovery Today*, 17, 486–495.
- Dragojevic, S., Ryu, J.S. ve Raucher, D. Polymer-Based Prodrugs: Improving Tumor Targeting and the Solubility of Small Molecule Drugs in Cancer Therapy. *Molecules* 2015, 20, 21750-21769.
- Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T. V. ve Vandenabeele, P., 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*, 11(13), 1050–1062.
- Erkisa, M., Arı, F., Büyükköroğlu, G., Şenel, B., Yilmaz, V. T., ve Ulukaya, E., 2021. Preparation and Characterization of Palladium Derivate-Loaded Micelle Formulation in Vitro as an Innovative Therapy Option against Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Chemistry & Biodiversity*, 18(9).
- Faller, B. ve Ertl, P., 2007. Computational approaches to determine drug solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 533–545.
- Fang, Y., Tian, S., Pan, Y., Li, W., Wang, Q., Tang, Y., Yu, T., Wu, X., Shi, Y., Ma, P. ve Shu, Y., 2020. Pyroptosis: A new frontier in cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 121.
- Ferraro, M. G., Piccolo, M., Misso, G., Santamaria, R. ve Irace, C., 2022. Bioactivity and Development of Small Non-Platinum Metal-Based Chemotherapeutics. *Pharmaceutics*, 14, 954.
- Folkman, J. ve Kalluri, R., 2004. Cancer without disease. *Nature*, 427.
- Fossella, F.V., Vore, D., Kerr, R.N., Crawford, J., Natale, R.R., Dunphy, F., Kalman, L., Miller, V., Lee, J.S., Moore, M., Gandara, D., Karp, D., Vokes, E., Kris, M., Kim, Y., Gamza, F. ve Hammershaimb, L., 2000. Randomized Phase III Trial of Docetaxel Versus Vinorelbine or Ifosfamide in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Previously Treated With Platinum-Containing Chemotherapy Regimens. *Journal of Clinical Oncology*, 18(12), 2354-2362.
- Fulton, B. ve Spencer, C.M., 1996. Docetaxel. *Drugs*, 51(6), 1075–1092.
- Gaidai, O., Yan, P. ve Xing, Y., 2023. Future world cancer death rate prediction. *Scientific Reports*, 13(1), 1-9.

- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V. ve Kroemer, G., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19, 107–120.
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M. R. ve Cordeiro, M. F., 2014. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB Journal*, 28(3), 1317–1330.
- Gao, E., Liu, C., Zhu, M., Lin, H., Wu, Q. ve Liu, L., 2009. Current Development of Pd (II) Complexes as Potential Antitumor Agents. *Anticancer Agents Med. Chem.*, 9, 356–368.
- Gao, H., Wang, Y., Chen, C., Chen, J., Wei, Y., Cao, S. ve Jiang, X., 2014. Incorporation of lapatinib into core–shell nanoparticles improves both the solubility and anti-glioma effects of the drug. *International Journal of Pharmaceutics*, 461, 478–488.
- García-Aranda, M. ve Redondo, M., 2019. Immunotherapy: A challenge of breast cancer treatment. *Cancers*, 11(12).
- Goff, B. A., Mandel, L., Muntz, H. G. ve Melancon, C. H., 2000. Ovarian carcinoma diagnosis: Results of a national ovarian cancer survey. *Cancer*, 89(10), 2068–2075.
- Graham, K. ve Unger, E., 2018. Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 6049–6058.
- Green, D. R., 2022. Nonapoptotic Cell Death Pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 14(11).
- Guan, J. ve Li, G.M., 2023. Critical Reviews and Perspectives DNA mismatch repair in cancer immunotherapy. *NAR Cancer*, 5(3), 1–13.
- Hacker, N.F., Gambone, J.C., HobeL, C.J., 2010. *Hacker & Moore's Essentials of Obstetrics and Gynecology*. Saunders Elsevier, 475, Sydney.
- Hiatt, R.A., Worden, L., Rehkopf, D., Engmann, N., Troester, M., Witte, J. S. ve Porco, T.C., 2023. A complex systems model of breast cancer etiology: The Paradigm II Model. *PLOS ONE*, 18(5), 1–24.
- Hoffmann, M. M., 2022. Polyethylene glycol as a green chemical solvent. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 57.
- Hou, W., Zhang, Q., Yan, Z., Chen, R., Zeh, H. J., Kang, R., Lotze, M.T. ve Tang, D., 2013. Strange attractors: DAMPs and autophagy link tumor cell death and immunity. *Cell Death and Disease*, 4.

- Huynh, L., Grant, J., Leroux, J.C., Delmas, P. ve Allen, C., 2008. Predicting the Solubility of the Anti-Cancer Agent Docetaxel in Small Molecule Excipients using Computational Methods. *Pharm Res* 25, 147–157.
- Jiricny, J., Nyström-Lahti, M., 2000. Mismatch repair defects in cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, 10 (2), 157-161.
- Kabalak, P.A., 2023. 4 Şubat 2023 Dünya Kanser Günü Basın Bildirisi, Türkiye Solunum Derneği.
- Kacar, O., Adiguzel, Z., Yilmaz, V. T., Cetin, Y., Cevatemre, B., Arda, N., Baykal, A.T., Ulukaya, E. ve Acilan, C., 2014. Evaluation of the molecular mechanisms of a palladium(II) saccharinate complex with terpyridine as an anticancer agent. *Anti-Cancer Drugs*, 25(1), 17–29.
- Kav, S., Hanoğlu, Z., ve Algier, L., 2008. Türkiye’de kanserli hastalarda tamamlayıcı ve alternatif tedavi yöntemlerinin kullanımı: Literatür taraması. *UHOD- Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 18(1), 32–38.
- Kurt, H., Keşkek, S. O., Çil, T., ve Canataroğlu, A., 2013. Complementary/alternative therapies in patients with breast cancer. *Türk Onkoloji Dergisi*, 28(1), 10-15.
- Lavelle, F., Bissery, M. C., Combeau, C., Riou, J. F., Vrignaud, P. ve Andre, S., 1995. Preclinical evaluation of docetaxel (taxotere). *Seminars in Oncology*, 22, 3–16.
- Lee, S.W., Yun, M.H., Jeong, S.W., In, C.H., Kim, J.Y., Seo, M.H., Pai, C.M. ve Kim, S.O., 2011. Development of docetaxel-loaded intravenous formulation, Nanoxel-PM using polymer-based delivery system. *J. Controlled Release*, 155 262-271.
- Li, G-M., 2003. DNA mismatch repair and cancer. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 8 (4), 997-1017.
- Loftsson, T. ve Hreinsdóttir, D., 2006. Determination of Aqueous Solubility by Heating and Equilibration: A Technical Note, *AAPS PharmSciTech*, 7(1).
- Longuespée, R., Boyon, C., Desmons, A., Vinatier, D., Leblanc, E., Farré, I. ve Salzet, M., 2012. Ovarian cancer molecular pathology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31, 713-732.
- Lyseng-Williamson, K.A. ve Fenton, C., 2005. Docetaxel. *Drugs* 65, 2513–2531.
- Mattiuzzi, C. ve Lippi, G., 2019. Current cancer epidemiology. *Journal of Epidemiology and Global Health*, 9(4), 217–222.
- Matulonis, U. A., Sood, A. K., Fallowfield, L., Howitt, B. E., Sehouli, J. ve Karlan, B. Y., 2016. Ovarian cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 1–22. Wu, H. J., Cao, Y., Weng, D., Xing, H., Song, X., Zhou, J., Xu, G., Lu, Y., Wang, S. ve Ma, D., 2008. Effect of tumor suppressor gene PTEN on the resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines and related mechanisms. *Cancer Letters*, 271(2), 260–271.

- McKim, A.S. ve Strub, R., 2007. Dimethyl Sulfoxide USP, PhEur in Approved Pharmaceutical Products and Medical Devices. *Pharmaceutical Technology*, 32, 5.
- McNutt, M., 2013. Cancer Immunotherapy. *Science*, 342, 1417-1417.
- Moy, B. ve Goss, P. E., 2006. Lapatinib: Current Status and Future Directions in Breast Cancer. *The Oncologist*, 11(10), 1047–1057.
- Narvekar, M., Xue, H. Y., Eoh, J. Y. ve Wong, H. L., 2014. Nanocarrier for poorly water-soluble anticancer drugs- Barriers of translation and solutions. *AAPS PharmSciTech*, 15(4), 822-833.
- Nencioni, A., Caffa, I., Cortellino, S., ve Longo, V. D., 2018. Fasting and cancer: molecular mechanisms and clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 18(11), 707–719.
- Noguchi, S., 2006. Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers. *Cancer Science*, 97(9), 813-820.
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B. ve Bao, J. K., 2012. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, 45(6), 487–498.
- Paus, R., Prudic, A. ve Ji, Y., 2015. Influence of excipients on solubility and dissolution of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 485(1–2), 277-287.
- Peltomäki, P., 2001. DNA mismatch repair and cancer. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 488 (1), 77-85.
- Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G. ve Gabai, V. L., 2003. Necrosis: A specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research*, 283, 1–16.
- Ray, R. S., Rana, B., Swami, B., Venu, V. ve Chatterjee, M., 2006. Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF7 cell line. *Chemico-Biological Interactions*, 163(3), 239–247.
- Ricci, M. S. ve Zong, W.X., 2006. Chemotherapeutic Approaches for Targeting Cell Death Pathways. *The Oncologist*, 11(4), 342–357.
- Sapkota, A., 2022. Apoptosis- Definition, Pathways, Assay, Examples (vs Necrosis), *Microbe Notes*, <https://microbenotes.com/apoptosis/>-(26.01.2024).
- Schaue, D. ve McBride, W. H., 2015. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12, 527–540.
- Schuster, M., Nechansky, A. and Kircheis, R., 2006. Cancer immunotherapy, *Biotechnology Journal*, 1, 138-147.

- Segovia-Mendoza, M., González-González, M. E., Barrera, D., Díaz, L. ve García-Becerra, R., 2015. Efficacy and mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitors gefitinib, lapatinib and neratinib in the treatment of her2-positive breast cancer: Preclinical and clinical evidence. *American Journal of Cancer Research*, 5, 2531–2561.
- Singh, R. ve Sain, N., 2023. Etiology Of Breast Cancer. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 14(3).
- Sonalika, S., Mishra, S., Mahapatro, S. ve Sahoo, D., 2023. Advancements and Challenges in Breast Cancer: A Comprehensive Review. *Medical Research Archives*, 11(6), 1-7.
- Stegemann, S., Leveiller, F., Franchi, D., de Jong, H. ve Lindén, H., 2007. When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31, 249–261.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J. ve Futreal, P. A., 2009. The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719-724.
- Symonds, P.R. ve Greenhalgh, T.A., 2014. Principles of chemotherapy and radiotherapy. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 24(9), 259-265.
- Şakalar, Ç., İzgi, K. Ve Canatan, H., 2013. Kanser İmmün Terapi ve Monoklonal Antikorlar, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, 27(2), 105–110.
- Tan, M. L., Ooi, J. P., Ismail, N., Moad, A. I. H. ve Muhammad, T. S. T., 2009. Programmed cell death pathways and current antitumor targets. *Pharmaceutical Research*, 26, 1547–1560.
- Tan, R. K., Eberhard, W. ve Büchs, J., 2011. Measurement and characterization of mixing time in shake flasks. *Chemical Engineering Science*, 66(3), 440–447.
- Tan, X. J., Cheor, W. L., Cheng, E. M., Ab Rahman, K. S., Wan Muhamad, W. Z. A. ve Leow, W. Z., 2023. Breast cancer status, grading system, etiology, and challenges in Asia: An updated review. *Oncologie*, 25, 99–110.
- Tije, A.J., Verweij, J., Loos, W.J. ve Sparreboom, A., 2003 Pharmacological Effects of Formulation Vehicles. *Clin Pharmacokinet* 42, 665–685.
- Tóth, G., Jánoska, A., Völgyi, G., Szabo, Z.I., Orgovan, G. Mirzahosseini, A. ve Noszal, B., 2016. Physicochemical Characterization and Cyclodextrin Complexation of the Anticancer Drug Lapatinib. *Journal of Chemistry*, 2017, 9.
- Tran P, Pyo Y-C, Kim D-H, Lee S-E, Kim J-K, Park J-S., 2019. Overview of the Manufacturing Methods of Solid Dispersion Technology for Improving the Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs and Application to Anticancer Drugs. *Pharmaceutics*, 11(3), 132.

- Ullah, M. F. ve Aatif, M., 2009. The footprints of cancer development: Cancer biomarkers. *Cancer Treatment Reviews*, 35, 193.–200.
- Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Ikitimur, E. I., Guney, E. ve Yilmaz, V. T., 2011. Anti-cancer activity of a novel palladium(II) complex on human breast cancer cells in vitro and in vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10), 4957–4963.
- Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Sarımahmut, M., Güney, E., Sakellaridis, N. Ve Yılmaz, V.T., 2011. Cell death-inducing effect of novel palladium(II) and platinum(II) complexes on non-small cell lung cancer cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 137, 1425–1434.
- Vande Walle, L. ve Lamkanfi, M., 2016. Pyroptosis. *Current Biology*, 26 (13), R568-R572.
- Veseli, A., Žakelj, S. ve Kristl, A., 2019. A review of methods for solubility determination in biopharmaceutical drug characterization. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 45, 1717–1724.
- Voigtlaender, M., Schneider-Merck, T. ve Trepel, M., 2018. Lapatinib. *Small Molecules in Oncology*, 211.
- Wu, H., Cao, Y., Weng, D., Xing, H., Song, X., Zhou, J., Xu, G., Lu, Y., Wang, S. ve Ma, D., 2008. Effect of tumor suppressor gene PTEN on the resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines and related mechanisms. *Cancer Lett*, 271(2), 260-71.
- Yang, Z., Shao, D., ve Zhou, G., 2019. Solubility parameter of lenalidomide for predicting the type of solubility profile and application of thermodynamic model. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 132, 268–275.
- Yazıcı, Z., 2014. Kanser Kemoterapisi. *Temel ve Klinik Farmakoloji*, 12, 949-975.
- Yu, P., Zhang, X., Liu, N., Tang, L., Peng, C. ve Chen, X., 2021. Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 6, 128.
- Zhu J, Xu G, Yang D, Song Y, Tong Y, Kong S, Ding H, Fang L., 2023. Dose-sparing effect of lapatinib co-administered with a high-fat enteral nutrition emulsion: preclinical pharmacokinetic study. *PeerJ*, 11.