T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEGUELİN'İN DENEYSEL MEME KANSERİ TEDAVİSİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

SERAP ÇELEBİ YILMAZ

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc-2012970058

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEGUELİN'İN DENEYSEL MEME KANSERİ TEDAVİSİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERAP ÇELEBİ YILMAZ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Hilal KOÇDOR

Bu araştırma BAP tarafından 2017.KB.SAG.019 proje numarasıyla desteklenmiştir.
TEZ KODU: DEU. HSI. MSc-2012970058

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Serap ÇELEBİ YILMAZ'ın'Deguelin'in Deneysel Meme Kanseri Tedavisindeki Etkinliğinin Araştırılması' konulu Yüksek Lisans tezini 19/06/2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. Hüray IŞLEKEL
DEÜ, SBE, Moleküler Tıp AD.
BAŞKAN

Prof. Dr. Bilal KOÇDOR
DEÜ, SBE, Moleküler Tıp AD.
ÜYE

Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU
Celal Bayar Üniversitesi,
Histoloji-Embriyoloji AD.
ÜYE

Prof. Dr. Ayfer ÜLGENALP
DEÜ, Tıp Bilimleri Bölümü,
Tıbbi Genetik AD.
ÜYE

Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU
Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi,
Biyokimya AD.
ÜYE

YEDEK ÜYELER

Prof. Dr. Gülden DİNİZ
İzmir Demokrasi Üniversitesi,
Patoloji AD.
ÜYE

Doç. Dr. Zeynep YÜCE
DEÜ, Temel Tıp Bilimleri Bölümü,
Tıbbi Biyoloji AD.
ÜYE

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TABLOLAR DİZİNİ ..... **iii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **iv**
KISALTMALAR ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vii**
ÖZET **1**
ABSTRACT **2**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **3**
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi 3
1.2. Araştırmanın Amacı 4
1.3. Araştırmanın Hipotezleri 4
2. GENEL BİLGİLER **5**
2.1. Meme Dokusunun Yapısı 5
2.1.1. Meme Anatomisi 5
2.1.2. Meme Fizyolojisi 6
2.2.MEME KANSERİ 6
2.2.1. Meme Kanseri Tarihçesi 6
2.2.2. Meme Kanserinin İnsidansı ve Epidemiyolojisi 6
2.2.3. Meme Kanserinin Etiyolojisi 7
2.2.4. Meme Tümörlerinin Moleküler Sınıflaması 10
2.2.5. Meme Kanserinde TNM Evreleme Sistemi 11
2.2.6. Meme Kanserinde Tedavi 13
2.3. Paklitaksel (PCX) 16
2.4. Doksorubisin (DX) 18
2.5. Deguelin (DEG) 18
3. GEREÇ VE YÖNTEM **20**
3.1. Araştırmanın Tipi: 20
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı: 20
3.3.Çalışma Materyali 20
3.3. Araştırmanın Değişkenleri: 20

3.4. Veri Toplama Araçları: 21
3.4.1. Kullanılan Cihazlar 21
3.4.2. KullanılanSarf Malzemeler ve Diğer Gereçler 22
3.5. Uygulanan Yöntemler 23
3.5.1. Hücre Kültürü 23
3.5.2. Hücre Canlılık Testi 27
3.5.3. Akım Sitometrik Analizler 31
3.5.4. Hücre Lizatı Eldesi 34
3.5.5. Wound Healing Assay (Migrasyon Analizi) 34
3.5.6. Koloni Formasyon (Agaroz Koloni-3D)Analizi 36
3.5.7. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini 37
3.5.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Tayini 38
3.6. Araştırma Planı ve Takvimi 39
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi 40
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları 40
3.9. Etik Kurul Onayı 40
4.BULGULAR 41
4.1. Hücre Canlılık Testi Bulguları 41
4.2. Akım Sitometrik Analizi 43
4.2.1. Akım Sitometrik-Apoptoz Analizi 43
4.2.2. Hücre Döngüsü 47
4.3. Wound Healing Assay (Migrasyon Analizi) 52
4.4. Koloni Formasyon (Agaroz Koloni-3D) Analizi 55
4.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini 56
4.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Tayini 57
5.TARTIŞMA 58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 61
7. KAYNAKLAR 62
8. EKLER 74

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2. 1. Meme kanseri risk faktör insidansı 8
Tablo 2. 2. Meme Kanseri Moleküler Alt-Tiplerinin Sınıflandırılması 10
Tablo 2. 3. Moleküler Subtipler (55) 11
Tablo 2. 4. AJCC'ye göre Meme Kanserinde TNM Sınıflandırma 13
Tablo 2. 5. Moleküler Alt Tiplere Göre Cerrahi Seçimi 14

Tablo 3. 1. Projede kullanılan mevcut makine-teçhizat listesi 21
Tablo 3. 2. Projede kullanılan sarf malzeme ve diğer gereçler 22
Tablo 3. 3. Kullanılan Hücre Hatları ve Özellikleri 23
Tablo 3. 4. Hücre Canlılık deneyi için hücre hatlarına verilen Doksorubisin, Paklitaksel ve Deguelin 96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı 30
Tablo 3. 5. Akım Sitometrik Analizlerde Tüm Hücre Hatları İçin Oluşturulan Gruplar 31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2. 1. Memenin tanjensiyel ve sagital kesimi (17. Referanstan alınmıştır) 5
Şekil 2. 2. Memenin arteryel beslenmesi 5
Şekil 2. 3. Meme Kanseri T Evrelemesi (61) 12
Şekil 2. 4. Meme Kanseri N Evrelemesi (61) 12
Şekil 2. 5. Paklitakselin kimyasal yapısı (96) 17
Şekil 2. 6. Doksorubisin Kimyasal Yapısı (104) 18
Şekil 2. 7. Deguelinin kimyasal yapısı 19

Şekil 3. 1. Meme Kanseri Hücre Hatları 25
Şekil 3. 2. WST-8 ‘ in formazana indirgenme mekanizması (123) 28

Şekil 4. 1. Hücre Hatlarında Elde edilen Doksorubisin, Paklitaksel ve Deguelin 72 saatlik IC50 Dozları 42
Şekil 4. 2. Hücre hatlarında belirlenen IC50 dozları ile 72 saatlik Doksorubisin, Paklitaksel ve Deguelin uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik-Apoptoz Analizi bulguları 44
Şekil 4. 3. MDA-MB-231 Hücre Hattında Apoptoz Analiz Verileri 45
Şekil 4. 4. MCF-7 Hücre Hattında Apoptoz Analiz Verileri 45
Şekil 4. 5. BT-474 Hücre Hattında Apoptoz Analiz Verileri 46
Şekil 4. 6. MDA-MB-468 Hücre Hattında Apoptoz Analiz Verileri 46
Şekil 4. 7. Hücre hatlarında Apoptoz Analiz (Q4+Q2) sonuçları 47
Şekil 4. 8. Hücre hatları üzerinde belirlenen IC50 dozları ile 72 saatlik Doksorubisin, Paklitaksel ve Deguelin uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analiz bulguları 48
Şekil 4. 9. MDA-MB-231 ve MCF-7 Hücre Hatlarında Hücre Döngüsü Analiz Verileri 49
Şekil 4. 10. MDA-MB-468 ve BT-474 Hücre Hatlarında Hücre Döngüsü Analiz Verileri 50
Şekil 4. 11. Hücre Hatlarında Hücre Döngüsü Analiz (G0/G1) sonuçları 51
Şekil 4. 12. MDA-MB-231 hücre hattında migrasyon analizinde mikroskop altında 4X‘lik büyütmede 1. ve 24. saat sonunda fotoğraflanan yara iyileşme süreci 52
Şekil 4. 13. MCF-7 hücre hattında migrasyon analizinde mikroskop altında 4X‘lik büyütmede 1. ve 48. saat sonunda fotoğraflanan yara iyileşme süreci 53
Şekil 4. 14. MDA-MB-468 hücre hattında migrasyon analizinde mikroskop altında 4X‘lik büyütmede 1. ve 58. saat sonunda fotoğraflanan yara iyileşme süreci 53
Şekil 4. 15. BT-474 hücre hattında migrasyon analizinde mikroskop altında 4X‘lik büyütmede 1. ve 58. saat sonunda fotoğraflanan yara iyileşme süreci 54
Şekil 4. 16. Hücre hatlarında migrasyon analizinde başlangıca göre fark grafiği 54
Şekil 4. 17. Hücre hatlarında Koloni Sayısı Analiz sonuçları 55
Şekil 4. 18. Hücre hatlarında SOD Aktivitesi sonuçları 56
Şekil 4. 19. Hücre hatlarında SOD Aktivitesi sonuçları 56

KISALTMALAR

PCX: Paklitaksel

DX: Doksorubisin

DEG: Deguelin

OSI: Oksidatif Stres İndeksi

SOD: Süperoksit Dismutaz

PBS: Fosfat Buffer Solüsyon

DMSO: Dimetil Sülfoksit

CCK: Cell Caunting Kit

ER: Östrojen Reseptörü

PR: Progesteron Reseptörü

OK: Oral Kontraseptifler

HRT: Hormon Replasman Tedavisi

TNM: Tümör-nod-metastaz sistemi

AJCC: American Joint Committee on Cancer

UICC: The International Union for Cancer Control

DCIS: Duktal karsinoma in situ

LCIS: Lobüler karsinoma in situ

NKT: Neoadjuvan kemoterapi

MKC: Meme koruyucu cerrahi

RM: Radikal Mastektomi

MRM: Modifiye Radikal Mastektomi

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

CD52: Cluster of Differentiation 52

CD20: Cluster of Differentiation Antigen 20

ROS: Serbest oksijen radikalleri

FBS: Fötal Bovine Serum

PI3K: Fosfoinositid 3-kinaz

TGF alpha: Transforme büyüme faktör alfa

WST: Suda çözünebilen tetrazolyum tuzları

PS: Fosfatidilserin

PI: Propidyum

NADPH: Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Fosfat İndirgenmiş formu

NADH: Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid İndirgenmiş formu

TOS: Total Oxidant Status

TAS: Total Antioxidant Status

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, kişisel gelişimime de katkı sağlayarak yol gösteren, daima destek olan Değerli Danışmanım Prof. Dr. Hilal KOÇDOR başta olmak üzere,

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı ve Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm değerli hocalarıma, tezimin laboratuvar çalışmalarını gerçekleştirebilmek için olanak sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'a,

Akım sitometrik analizlerin gerçekleştirilmesinde geç saatlere kadar çalışan Uzman Dr. Halil ATEŞ'e ayrı ayrı teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Zaman kavramını önemsemeyerek benimle gece, gündüz, haftasonu demeden çalışan, her konuda destek olan, tüm zor koşullara rağmen beraber gülebildiğimiz değerli arkadaşlarım Nina GHANITABE, Hakan CENGİZ ve Gamze BEYOĞLU'na,

Hayatımın her döneminde bana maddi, manevi destek olan, daima yanımda olan sevgili annem Hamide ÇELEBİ ve babam Muzaffer ÇELEBİ'ye, sahip olduğum için hep şükrettiğim ablam Serpil ÇELEBİ DEMİR ve kardeşim Seray ÇELEBİ'ye,

Hayatıma girdiği günden beri yüzümü güldürmek için çabalayan, geç saatlere kadar laboratuvarda yanımda bekleyen, her yorgunluğumu bir tatlı çikolata ile unutturan, sonsuz destek ve sabır gösteren sevgili eşim Ufuk Çağrı YILMAZ'a teşekkür ediyorum.

Serap ÇELEBİ YILMAZ

DEGUELİN'İN DENEYSEL MEME KANSERİ TEDAVİSİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Serap ÇELEBİ YILMAZ, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı,
serapcelebi37@gmail.com

ÖZET

Meme kanseri, dünya üzerinde en çok çalışılan kanser türlerindendir. Meme kanserinde kullanılan standart tedaviye alternatif olarak daha potent ve toksisitesi daha az ajanlar gereklidir. Deguelin, bazı hücre hatlarında çalışılmış ve literatürde olumlu sonuçların yer aldığı ''Ümit vaad edici'' bir ajandır.

Bu çalışma, anti-kanser ajan olabilecek deguelinin, meme kanseri hücre hatlarında etkinliğini ve toksisitesini, standart tedavisinde kullanılan ilaçlar ile karşılaştırmak amacıyla gerçekleştirildi. Yapılan çalışmada kullanılan hücre hatları ile genel bir meme kanseri evreni elde edilmesi düşünüldü. Araştırmanın bu evreni temsil edecek meme kanseri hücre hatları üzerinde yapılması planlandı. Çalışmada, hücre hatlarında her bir ajan için etkin konsantrasyon elde edilip, bu konsantrasyon ile çalışmanın diğer aşamalarına geçildi. Standart tedavide kullanılan iki ajanın (doksorubisin ve paklitaksel) etkinliği deguelin ile karşılaştırıldı. Hücre canlılık testi ile deguelin, paklitaksel ve doksorubisin için IC50 dozları elde edildi. Bu dozlar etkin konsantrasyon olarak ele alındı ve tedavi dozları olarak kullanıldı. Tedavi edilmiş hücrelere; Oksidatif Stres İndeksi (OSİ), Flow sitometrik analizler (Apoptoz, Cell Cycle), SOD analizi yapıldı, Koloni Formasyonu, Migrasyon ve Angiogenez Assay gibi tümör hücresinin 3boyutlu büyümesi ile ilgili bulgular elde edilerek ajanların etkileri karşılaştırıldı. İstatistiksel analizler; Holm-Sidak ve ANOVA testleri kullanılarak SigmaStat 3.5 programında gerçekleştirildi.

Araştırmada, deguelinin meme kanseri hücrelerinin çoğalmasında, standart tedavide kullanılan ajanlara benzer özellikler gösterdiği, antikanser etkisinin kanser hücrelerinin yayılımını azaltarak olabileceği gözlendi.

Anahtar Sözcükler: Meme Kanseri Hücre Hatları, Deguelin, IC50, Apoptoz, Hücre döngüsü, Koloni Formasyonu, Hücre Migrasyonu, Oksidatif Stress

INVESTIGATION OF DEGUELIN'S EFFICACY IN EXPERIMENTAL BREAST CANCER TREATMENT

Serap CELEBI YILMAZ, Dokuz Eylül University, Health Science Institute, Department of Molecular Medicine,
serapcelebi37@gmail.com

ABSTRACT

Breast cancer is the second most common type of cancer among women in the USA and it is one of the most studied cancer type in the world. As an alternative for the standard treatment used in breast cancer there is a need for agents which are more potent and have less toxicity. Deguelin is an agent among the "promising" agent that has positive foreknowledge in the literature, although it has only been experimented on a few cell lines.

The aim of this study was to experiment the activity of Deguelin, which might be an anti-cancer agent, on breast cancer cell lines and to compare its **toxicity** to the medicine used in the standard treatment.

The research was planned to be made on breast cancer cell lines representing this nature. Once the effective concentration for each agent on the cell lines was obtained, the next steps of our study were studied with this concentration.The effectivity of the two agents (Doksorubisin and Paklitaksel) used in the standard treatment was compared to Deguelin. IC50 doses were determined for deguelin, paklitaksel and doksorubisin by cell vitality tests on the breast cancer cell lines.These doses were handled effectively and used as treatment doses. Flow cytometric analyzes (apoptosis,cell cycle), Oxidative Stress Index (OSI), SOD analysis were done to the treated cells and the effects of agents was compared by obtaining evidences related to the tumor cell line 3d growth such as Colony Formation, Migration and Angiogenesis Assay.Statistical analyzes were executed in the SigmaStat 3.5 programme by using the ANOVA and Holm-Sidak tests.

In the study, it was observed that Deguelin had similar characteristics with the agents used in the treatment of breast cancer cells, and the anticancer effect could be reduced by the spread of cancer cells.

Key Words: Breast Cancer Cell Lines, Deguelin, IC50, Apoptosis, Cell Cycle, Colony Formation, Cell Migration, Oksidative Stress

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Kadınlarda Türkiye'de ve tüm dünyada sık görülen kanser türü meme kanseridir (1). ABD'de, kadınlarda en çok görülmekte olan ikinci kanserdir (2). Ülkeler arasında meme kanseri insidansı farklılık göstermektedir. ABD'de her sekiz kadından biri, tüm yaşamı süresince meme kanseri olma riski ile karşı karşıyadır. Meme kanseri, kadınlarda gelişmekte olan ülkelerde kansere bağlı ölüm sebeplerinden en sık görüleni olmakla birlikte gelişmiş ülkelerde ikinci sıradadır (2,3).

Meme kanseri hem erken tanısı konulabilen hem de yaygın ve önemli bir sağlık sorunu olan kanser türüdür (4). Kanser tedavisinde kullanılan ajanlar normal dokular için toksiktir. Bu yüzden, toksik olmayan ve ya düşük toksisiteye sahip ilaçlara ihtiyaç vardır (5).

Deguelin, Afrika'da bulunan Mundulea sericea (Leguminosae) adında bir bitkiden izole edilmiş bir rotenoiddir (6). Deguelin güçlü bir apoptotiktir. Kolon, prostat, insan malign bronşiyal epitelyal hücreleri ve küçük olmayan akciğer kanserinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (7,8,9). Transforme hücreler ve çeşitli kanser hücreleri üzerinde damar gelişimini önleyen bir inhibitördür. Bunlara ek olarak Deguelin siklooksijenaz-2, Nekroz Faktör KB ve nucleoporini hedefler ve böylece çeşitli kanser türlerine karşı önleyici ve tedavi edici aktiviteye sahip olduğuyla ilgili çalışmalarda bilgiler gösterilmiştir (10).

Doksorubisin, apoptotik hücre ölümünü indüklenmesi, serbest radikallerin oluşumu ve topoizomeraz inhibisyonu gibi çeşitli farklı mekanizmalar içeren bir antrasiklin antineoplastik antibiyotiktir (11). Meme kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri ve sarkoma gibi birçok solid tümörde etkili olan klinik tedavide kullanılan antikanser bir ajandır (12). Doksorubisin diğer malignitelerde olduğu gibi meme kanseri tedavisinde de yaygın olarak kullanılan antrasiklinler grubundan bir kemoterapötik maddedir (13).

Paklitaksel, taxanlar grubundandır. Meme kanseri tedavisinde kullanılan, mikrotübüllerdeki β-tübülün subunitlere bağlanarak hücreleri G2/M fazında bloke eden ve apoptotik hücre ölümüne yönlendiren antineoplastik bir ilaçtır (14).

Bu çalışmada, potansiyel bir kemoterapötik ajan olan Deguelin ile meme kanseri tedavisinde kullanılan Doksorubisin ve Paklitakseli karşılaştırmak ve olası tedavi etkinliğini artırmak hedeflenmektir. Bunun için her bir ilacın ayrı ayrı hücre hatları üzerindeki etkisinin, deneysel olarak meme kanseri hücre hatları üzerinde araştırılması planlanmıştır. Elde edilecek

verilerin ileride in-vivo çalışmalara ışık tutacağı, ayrıca onkoloji alanında literatüre önemli katkılarda bulunacağı düşünülmektedir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Deguelin son yıllarda muhtemel kanser önleyici ajanlar arasında tanımlanmaktadır. Doksorubisin ve Paklitaksel diğer maligniteler gibi meme kanseri tedavisinde de yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardır.

Bu çalışmada amaç; Doksorubisin ve Paklitaksel gibi standart tedavide kullanılan ajanların etkinliği ile Deguelin'in meme kanseri hücre hatları üzerindeki etkinliğini ve olası yan etkilerini yaygın kullanılan standart tedavi ajanları ile karşılaştırmaktır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Yapılan çalışmada kullanılan hücre hatları ile genel bir meme kanseri evreni elde edilmesi düşünüldü. Araştırmanın bu evreni temsil edecek meme kanseri hücre hatları üzerinde yapılması planlandı: Bu nedenle hücre hatlarının özelliklerinden dolayı MDA-MB-231 (insan meme invaziv duktal karsinom), BT-474 (insan meme invaziv duktal karsinom), MDA-MB-468 (insan meme epitelyal adenokarsinom) ve MCF-7 (insan meme invaziv duktal karsinom-wild type) hücre hatları kullanıldı.

H1: Deguelin, meme kanseri hücrelerinin canlılığını azaltmaktadır.

H2: Deguelin, meme kanseri hücrelerinin hücre döngüsünü durdurucu etki göstermektedir.

H3: Deguelin, meme kanseri hücrelerini apoptotik ya da nekrotik hücre ölümüne yönlendirerek bu tip kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir.

H4: Deguelin hücre hatlarında hücrelerin migrasyon ve invazyonunu azaltmaktadır.

H5: Standart kemoterapötiklerle karşılaştırıldığında antineoplastik açıdan en az onlar kadar etkindir. Bu etkinliği değişik mekanizmalar ile meydana gelmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

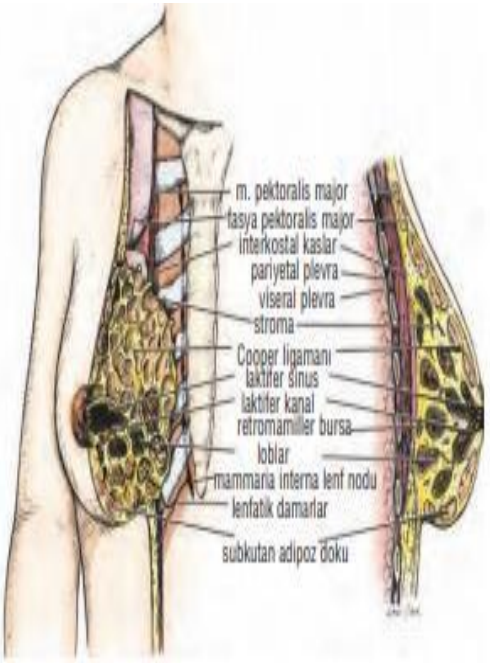
2.1. Meme Dokusunun Yapısı

2.1.1.Meme Anatomisi

Meme, pektoralis majör kas ile etrafındaki deri arasında bulunan modifiye apokrin ter bezidir (15).

Meme bezleri, anterior ve lateral torasik duvarda bulunmaktadır. Meme, 15-20 lobtan oluşmaktadır (Şekil 2.1). Memenin memebaşını çevreleyen pigmentli alana "areola" denir. Meme başı 4. kosta hizasında yer alır. Sinir uçları bakımından zengindir, kıl folikülü içermez.. Yağ ve ter bezleri bulunur. Areolanın büyüklüğü 15-60 mm çapındadır ve rengi koyudur. Areolanın koyuluğu östrojen seviyesine bağlı artar (16,17)

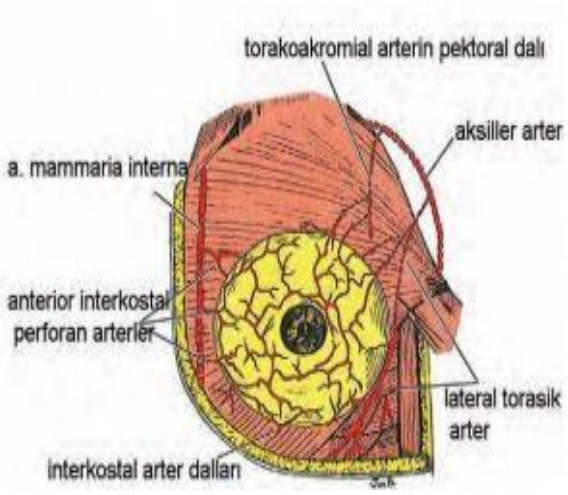
Meme dokusu; cilt, meme parankimi, cilt altı yağ dokusu ve stromal dokudan oluşmaktadır (18). Memede meydana gelen fizyolojik olaylar koltuk altı kuyruğunda gerçekleşir (19).



Şekil 2. 1. Memenin tanjensiyel ve sagital kesimi (17. Referanstan alınmıştır)

Memenin arteriyal kanlanması Şekil 2.2'de gösterilmiştir (20).

Şekil 2. 2. Memenin arteryel beslenmesi



Memenin beslenmesi, 3 arterden olur: 1) Anterior perforan interkostal dalları; 2) laterali, torakoakromiyal trunkusun pektoral dalı veya lateral torasik arter dalları; 3) interkostal arterin lateral kutanöz dalları. (17,20)

2.1.2.Meme Fizyolojisi

Memenin gelişimi ve fonksiyonları çeşitli hormonların etkileri ile gerçekleşir. Bu hormonlardan en önemli olanları prolaktin, östrojen, progesteron, oksitosin, tirod hormonları ve büyüme hormonudur (21). Östrojen hem meme epiteli gelişiminde hem de duktal epitelin gelişiminde etkili bir homondur (22,23).

Progesteron, prolaktin hormonu ile sinerjik etki gösterir. Östrojen reseptörlerinin sentezini uyarır ve epitel hücrelerinin diferansiasyonunda etkilidir (24).

Oksitosin hipotalamus bezinden salgılanan bir hormondur. Süt verme, areola ve meme başının uyarılması ile salgılanır (25).

2.2.MEME KANSERİ

2.2.1. Meme Kanseri Tarihçesi

Meme hastalığı ile alakalı ilk yazılı kaynaklar 1862 yılında Edwin Smith tarafından eski Mısır'da bulunan papirüslerdir. Bu papirüsler 48 vaka içerir ve apse, travma ve tümör ile ilgili bilgiler bulunur (26).

M.S. 100. yıllarda İskenderiye'li Leonides sağlam meme dokusu ve tümör dokusunu ilk kez çıkaran kişidir (27).

Arceo memenin cerrahi yolla çıkarıldığı ilk mastektomiyi tanımlamıştır. Halsted, 1882'de ilk radikal mastektomiyi yapmış, 1894 yılında da Halstedian Hipotezi'ni tanımlamıştır. Bu hipotez, meme kanserinin lokal bir hastalık olduğu ve lenfatik yolla yayıldığı varsayımına dayanır (28).

2.2.2. Meme Kanserinin İnsidansı ve Epidemiyolojisi

Meme kanseri, tüm dünyada yaygın sağlık sorunlarından biridir. Günümüzde kadınlarda meme kanseri en fazla görülen ve ölümcül iken, insidansı ve ölüm oranı son birkaç on yılda dünya çapında değişmiştir. Gelişmiş ülkeler, 1980'lerde başlayan ve tarama mamografisinin yaygın olarak benimsenmesinin bir sonucu olarak 1990'larda devam eden insidans hızlarında hızlı bir artış yaşadı (29). Meme kanserindeki artışın nedeni, tarama yöntemlerinin düzenli ve sık kullanılması ile açıklanmaktadır (30). Ayrıca meme kanseri sıklık oranları coğrafik değişikliler göstermektedir. Meme kanseri sıklığının en düşük olduğu ülkeler arasında Japonya, Mozambik ve Gambiya bulunurken, sıklığının en yüksek olduğu ülkeler ise ABD ve Kuzey Avrupa ülkeleridir. Bunun nedeni, beslenme alışkanlıkları, kadınların erken yaşta mensturasyonu, ileri doğum yaşı ve geç menapoz gibi değişikliklerin etkisinde kalmasıdır (31).

Amerikan Kanser Birliği, 2018'de kadınlarda yaklaşık 266.120 yeni invazif meme kanseri vakası olacağını, Erkeklerde ise 2,550 yeni olgu ve kadınlardaki vakalara ek 63.960 in situ meme lezyonları teşhis edileceğini öngörmektedir. Verilerin mevcut olduğu en son 10 yıl olan 2005'ten 2014'e kadar, beyaz kadınlarda invaziv meme kanseri insidans oranları stabilken, siyah kadınlarda yılda %0.3 oranında artış mevcuttur. Bununla birlikte 2018'de 41.400 meme kanseri ölümü (40.920 kadın, 480 erkek) tahmin edilmektedir (32).

Sağlık Bakanlığının verilerine göre Türkiye'de 2015 yılında yaşa bağlı kanser hızı kadınlarda yüz binde 177,5, erkeklerde yüz binde 247,6'dır. Toplam kanser insidansı ise yüz binde 212,6'dır. Son 5 yıl verilerine göre; meme kanserinde erkeklerde kanser sıklığında azalma gözlemlenirken, kadınlarda değişiklik gözlenmemiştir. Ülkemizde erkeklerde bronş, akciğer kanseri ve trakea, kadınlarda ise meme kanseri en fazla görülen kanserlerdir.

Türkiye'de, her dört kadından birisine meme kanseri teşhisi konmaktadır. Bir yıl içinde toplam 17.183 kadın meme kanserine yakalanmıştır (33).

2.2.3. Meme Kanserinin Etiyolojisi

Meme kanserinde etiyoloji artık aydınlanmaya başlamıştır. Hastalık için çok sayıda risk faktörü bulunmaktadır. Bu risk faktörleri arasında kadın olmak, ailede meme kanseri öyküsü, geç menapoz, erken menarş, uzamış hormon replasman tedavisi, BRCA1, BRCA2 DNA tamir genlerinde mutasyon bulunmaktadır (34). Genel olarak sınıflandırılırsa genetik, hormonal, reprodüktif ve çevresel etkenlerin meme kanseri oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir.

2.2.3.1. Genetik Nedenler

Meme kanserinin yaklaşık %15'i, birinci derece akrabalarda (anne, kızkardeş veya kız) hastalık öyküsü olan kadınlarda ortaya çıkar ve meme kanserlerinin yaklaşık %5-10'u doğrudan kalıtımla ilişkilendirilebilir (35,36). Meme kanseri duyarlılığının kalıtımı tam olarak anlaşılamamış olsa da, kalıtımsal olarak genetik risk faktörleri BRCA1 ve BRCA2'deki gen mutasyonlarıdır (37). Meme kanserinin ortaya çıkma yaşı aile hikâyesi olan kişilerde daha erken olabilmektedir. Bu durumlarda hastalık bilateral olmaya eğilimlidir (38).

BRCA1 (17q21) geni, genomik stabilite ve DNA kırık tamirinde rol oynayan tümör baskılayıcı bir gendir (39). BRCA1 (Breast cancer susceptility gene) meme kanserine yatkınlık genidir ve BRCA1 geninin over kanseri ve meme kanserinde etiyolojik rol oynadığı varsayılır. (40).

BRCA1 taşıyıcı olan kişilerde meme kanseri riski %40–80, BRCA2 gen mutasyonu olan kişilerde meme kanseri riski %40–70'dir. Erkeklerde görülen meme kanseri ise genellikle BRCA2 gen mutasyonu ile ilişkilidir (37).

Meme kanserinde ailesel, sporadik ve herediter risk faktör insidansı Tablo 2.1'de gösterilmiştir (41).

Tablo 2. 1. Meme kanseri risk faktör insidansı

Sporadik	%65 - 75
Herediter	%5 - 10
Ailesel	%20 - 30
BRCA-1	%45
BRCA-2	%35
STK11/LKB1(Peutz-Jeghers Sendromu)	< %1
ATM (Ataksia-telenjektasia)	< %1
MSH2/MHL1 (Muir-Torre Sendromu)	< %1
PTEN (Cowden Hastalığı)	< %1
p53 (Li-Fraumeni Sendromu)	%1

2.2.3.2. Reprodüktif Nedenler

Yaş

Meme kanseri görülme sıklığı yaşa bağlı olarak belirgin bir artış göstermektedir. Meme kanseri tanısı konan hastaların %75'i postmenopozal dönemde bulunmaktadır. Meme kanserine yakalanma riski 25 yaşında, 1/19608 ve 80 yaşında ise 1/8'dir (42).

Doğurganlık, Emzirme

Erken menarş (<12 yaş), meme kanserinde risk faktörüdür. Geç menopoza girme ise östrojenin uzun etkisinin sonucu olarak kanser riskini artırır (43,44). Emzirmeyen kadınlarda meme kanseri riskinin yüksek olduğu, emziren kadınlarda ise riskin düşük olduğu bildirilmektedir (45).

Spontan veya tıbbı düşükler de meme kanseri riski ile ilişkilendirilen faktörlerdendir. Bu hipoteze dayanarak gebeliği tamamlamamış kadınlarda artmış meme kanseri riski olacağı düşünülmektedir (46).

2.2.3.3. Hormonal Nedenler

Östrojen

Östrojen hormonu meme epiteli ve meme kanserinin gelişiminde etkin rol oynar. Östrojen düzeyleri meme kanseri tedavisinde dikkat edilen bir husustur. Östrojen, meme epiteli hücrelerinde ERα ve ERβ ile etkileşimi sonucu etki göstermektedir (47). Görülen meme kanserleri vakalarının yaklaşık %70'i ER pozitiftir. ER(+) olan tümör ER (-) olan tümörlere göre daha yavaş büyüme gösterirler.

Progesteron

Progesteron reseptörü (PR), 2 ayrı izoforma sahip bir östrojen düzenleyicigendir. Bu izoformlar PRA ve PRB'dir. PRA izoformu PRB'ye göre vücutta daha çok eksprese edilir. PRB ise meme kanserine daha spesifik olandır. ER pozitif/PR pozitif tümörlere kıyasla tümör çapı büyük ve nodal tutulum daha sıktır (48).

Oral Kontraseptifler (OK)

Oral kontraseptifler koruyucu etki amacıyla kullanılır. Ancak aynı zamanda meme kanseri riskini çok düşük oranda (1.24 kat) artırmaktadır (49).

Hormon Replasman Tedavisi (HRT)

HRT genellikle menopoz sonrasında meydana gelen değişiklikleri önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Menopoz sonrası hormon replasmanının meme kanseri riskini artırdığı bilinmektedir (50).

2.2.3.4. Çevresel Nedenler

Alkol

Beslenme faktörleri ve meme kanseri ilişkisi açısından en belirgin risk faktörüdür. Premenopozal kadınlarda günde 12 gram alkol alımı ile total östrojen düzeyinin arttığı ve bu artışın meme kanseri görülme sıklığında artışa neden olduğu bilinmektedir (51).

Beslenme

Vücut kitle indeksi ve meme kanseri riski arasındaki ilişki artmış endojen östrojen düzeyi ile açıklanmaktadır. Ayrıca folat alımı meme kanseri riskini azaltmaktadır (52).

Fiziksel aktivite

Erginlik döneminde ve erişkin dönemde yapılan egzersizin meme kanserine yakalanma riskini azaltabileceği belirtilmektedir (53).

Radyasyon

Kanser riski radyasyon dozu ile doğru orantılı artmaktadır. 30 yaş altı kadınlarda iyonizan radyasyona maruziyetin meme kanseri riskini arttırdığı, 40 yüş üstü kadınlarda ise maruziyet nedeniyle artma gözlenmemiştir (54).

2.2.4. Meme Tümörlerinin Moleküler Sınıflaması

Meme kanseri histolojik görünüm, metastatik özellik, metastatik özellik, mutasyon tipi, histolojik özellik, sellüler görünüm ve tedaviye cevap gibi birçok açıdan heterojen hastalık grubudur. Meme karsinomunun moleküler subtipleri son 11 yılda yoğun olarak çalışılmıştır. Moleküler taksonomi çalışmaları günümüzde devam etmekte ve yapılan çalışmalarla değişim geçirecek gibi görünmektedir (55).

Meme kanserinde ilk ''Moleküler Sınıflama'' 2000 yılında Perou ve Sorlie tarafından gen ekspresyon farklılıklarını gösteren kapsamlı bir çalışma sonucu önerilmiştir. Bu çalışma sonucunda, Tablo 2.2 'de gösterildiği üzere, farklı alt gruplara ayrılmıştır: ''Luminal'' (sıklıkla iki ya da üç subgruba ayrımlaşan) ''HER-2 pozitif'' ve ''bazal'' (56).

Tablo 2. 2. Meme Kanseri Moleküler Alt-Tiplerinin Sınıflandırılması

LuminalA	ER ve/veya PR(+) ve HER-2 (-) Ki67< %14
Luminal B	ER ve/veya PR(+) ve HER-2 (-) Ki-67 ≥ % 14
HER-2	ER/PR(-) ve HER-2(+)
Triple negatif (Bazal like)	ER/PR/HER-2 (-)
Normal meme benzeri	Non-epitelial hücre gen ekspresyonu (+)

Luminal A tümörlü hastaların prognozları çok iyi olup, metastazlar çoğu kez kemiklerle sınırlıdır. Luminal-B tümörler, daha agresif seyirlidirler. Bu grubun en önemli farkı tümörlerin yüksek proliferasyon hızına sahip olmalarıdır. Luminal A ile B arasındaki sınır değeri, genellikle immünhistokimyasal olarak tümör hücrelerinin %14'ünden azının nükleer Ki67 ekspresyonu göstermesi olarak kabul edilir. Ayrıca Her2 pozitif tümörlerden yaklaşık %30 kadarı immünohistokimyasal olarak luminal B fenotipindedir (Tablo 2.3) (57,58).

Tablo 2. 3. Moleküler Subtipler (55)

Moleküler Subtip				
	Luminal A	**Luminal B**	**HER2/neu**	**Basal benzeri**
Gen ekspresyon paterni	Luminal sitokeratinlerin ekspresyonu yüksek ekspresyonu	Luminal sitokeratinlerin ekspresyonu, orta-düşük ekspresyonu	HER2/neu yüksek ekspresyonu,	Bazal epitelial genlerin ve bazal sitokeratinlerin yüksek ekspresyonu
Klinik ve biyolojik özellikler	İnvaziv meme kanserlerinde ~%50si, ER/PR pozitif, ER2/neu negatif	İnvaziv meme kanserlerinin ~%20si, ER/PR pozitif, HER/neu ekspresyonu değişken (+ya da-)	İnvaziv meme kanserlerinde~%15i, ER/PR pozitif, HER2/neu pozitif, Yüksek Proliferasyon, Yaygın TP53 mutasyonu, Yüksek histolojik derece ve nodal pozitiflik oranı	İnvaziv meme kanserlerinde ~%15si, Yüksek Proliferasyon, Yaygın TP53 mutasyonu, BRCA1 disfoksiyonu
Histolojik korelasyon	Tübüler karsinom Kribriform karsinom Düşük dereceli invaziv ductal karsinom, NOS Klasik lobüler karsinom	İnvaziv ductal karsinom, NOS Mikropapiller karsinom	Yüksek invaziv ductal karsinom, NOS	Yüksek invaziv ductal karsinom, NOS Metaplastik ve Medüller karsinom
Tedaviye cevap ve seyir	Endokrin tedaviye cevap Kemoterapiye cevap değişken İyi prognoz	Endokrin tedaviye cevap (tamoksifen ve aromataz inhibitörleri) Kemoterapiye cevap değişken Prognoz, luminal A kadar iyi değil	Trastuzumaba (Herceptin) cevap Antrasiklin grubu kemoterapiye cevap Kötü prognoz	Endokrin tedaviye ya da trastuzumaba (Herceptin)cevap yok Platinum grubu kemoterapiye duyarlı Genellikle kötü prognoz

2.2.5. Meme Kanserinde TNM Evreleme Sistemi

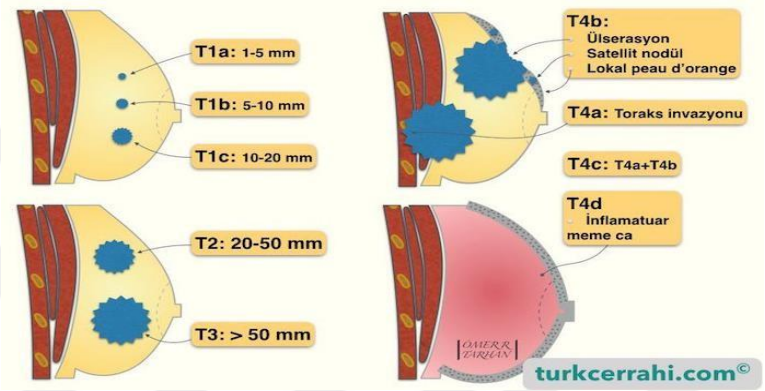
Dünyada meme kanseri için birden fazla evreleme sistemi kullanılmaktadır. Klinikte en çok kullanılan evreleme sistemi “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) ve “The International Union for Cancer Control” (UICC) tarafından tespit edilen tümör-nod-metastaz (TNM) sistemidir. Bu sistem, primer tümörün uzanım ve boyutu (T), lenf nodu tutulumu (N) ve uzak metastaz (M) gibi faktörlere ilave olarak anatomik olmayan prognostik faktörler ile

destekleyerek sınıflandırmaktadır (59). Tümörün evresi tedaviyi şekillendiren prognostik bir faktördür (60).

AJCC ve UICC, yapılan çalışmalar ve elde edilen yeni verileri dikkate alarak TNM sınıflamasını periyodik olarak güncellenmektedir. TNM evreleme revizyon döngüsü 6-8 yıldır. Tanı tarihi 1 Ocak 2010 tarihinden sonra olan olgular için geçerlidir (59).

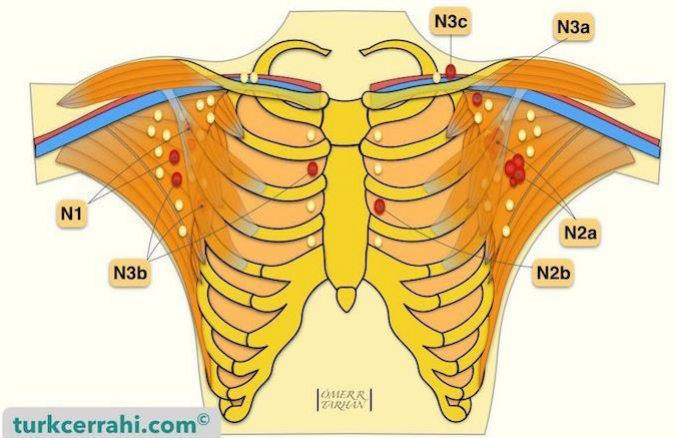
Primer Tümör (T):

Primer tümörün T sınıflamasında boyut milimetre olarak ölçülmelidir. Sınıflamanın klinik yada patolojik ölçümlere göre belirlenmesi "c'' veya "p" işaretleri ile yapılır.



Şekil 2. 3. Meme Kanseri T Evrelemesi (61)

Bölgesel Lenf Nodülleri (N) Klinik Sınıflandırma:



Şekil 2. 4. Meme Kanseri N Evrelemesi (61)

Uzak metastaz (M): Metastazın var olup, olmadığına göre ayrım yapılır.

Tablo 2. 4. AJCC'ye göre Meme Kanserinde TNM Sınıflandırma

ANATOMİK EVRE/PROGNOSTİK GRUPLAR			
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1*	N0	M0
Evre IB	T0	N1mi	M0
	T1*	N1mi	M0
Evre IIA	T0	N1**	M0
	T1*	N1**	M0
	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Evre IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Evre IIIC	Herhangibir T	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

2.2.6. Meme Kanserinde Tedavi

Meme kanserinde prognoz ve tedavi yaygın şekilde tümör nodu metastazı evrelemesine dayanır (62). Lenfovasküler yayılım, hormon reseptör durumu, ERBB2 (HER2 veya HER2/neu), overekspresyonu, histolojik derece, hastanın menopoz durumu ve yaşı da önemli faktörlerdendir (63, 64,65). Temel olarak meme kanseri tedavisinde cerrahi, radyasyon tedavisi, biyolojik tedavi, endokrin tedavisi ve kemoterapi gibi çeşitli yaklaşımlar ayrı ayrı ya da birarada kullanılmaktadır (66).

Kanser tedavisi lokal ya da sistemik tedavi ile olur.

Lokal tedavi: Radyoterapi ve ameliyat bu tür tedavilerdir. Amacı, meme kanserini yok etmektir. Meme kanseri yayıldığında ise yayılan bölgelerdeki hastalığı kontrol amacıyla kullanılabilir.

Sistemik tedavi: Kemoterapi, biyolojik tedavi ve hormon terapisidir. Sistemik tedavi tümörü küçültmek için ya da ameliyat veya radyoterapiden sonra ise kanserin nüksünü önlemek için uygulanır (67,68,69).

2.2.6.1. Cerrahi Tedavi

Meme kanseri erken evrede tespit edilirse tedavisi cerrahi rezeksiyondur. Hastalığın evresine göre uygulanabilecek cerrahi yöntem değişebilmektedir. En sık kullanılan yöntem modifiye radikal mastektomidir (70, 71).

Cerrahi tedavinin seçiminde hasta, tümör özellikleri ve moleküler alt tip dikkate alınır. (Tablo 2.5). Örneğin; HER2+ ve bazal tipte, HER2+- grupta rmastektomi tercih edilmesi önerilebilir (72, 73).

Tablo 2. 5. Moleküler Alt Tiplere Göre Cerrahi Seçimi

	NKT (Neodjuvan Kemoterapi	**MKC (Meme Koruyucu Cerrahi)**	**Mastektomi**
Luminal A	Hayır	Evet	Hayır
Luminal B	Hayır	Evet	Hayır
Bazal	Evet	Hayır	Hayır
Her2+	Evet	Hayır	Evet

2.2.6.1.1. Meme Koruyucu Cerrahi (MKC)

Londra'da bulunan Guy's hastanesinde 1972 yılında yayınlanan ilk klinik çalışma sayesinde bilimsel temele oturmuştur (74,75).

Meme koruyucu cerrahi meme kanserinde Evre 0, 1, 2 ve 3A da endike olup, invaziv duktal kanserli hastalarda MKC uygulaması için kozmetik sonular, hastanın tercihi, kozmetik, hastanın yaşı, tıbbi sonuçlar, tümörün boyutu-sayısı, mamografik bulgular ve aksiller lenf nodlarının durumu göz önünde bulundurulur (76).

2.2.6.1.2. Mastektomi

Mastektomi (radikal veya modifiye), geçtiğimiz yüzyılda meme kanserinin tedavisinde cerrahi prosedür olmuştur.

Radikal mastektomi lokal ve bölgesel kontrolde etkili olmaktadır, ancak fiziksel bozukluklara sebep olabilmektedir. Bu uygulama, m.pektoralis major, minör ve aksiller doku ve tüm meme dokusu çıkarılarak, Modifiye Radikal Mastektomi ise, m.pektoralis major'un fasiası, tüm meme dokusu, m.pektoralis minor ve aksiller lenf dokusu çıkarılarak uygulanır (77, 78,79).

2.2.6.2. Radyoterapi

Radyoterapi, kanseri tedavi etmek için yüksek enerjili X-ışınlarının kullanılmasıdır. Radyasyon duruma göre vücut dışından uygulanabilir (dış radyasyon) ya da tümörün içine radyoaktif madde yerleştirilerek uygulanır (brakiterapi). Radyoterapi endikasyonları esas olarak tümör büyüklüğü ve lenf nodu tutulumu, yani hastalığın evresine göre belirlenmektedir. Radyoterapi, hem cerrahiden sonra kalan kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için hem de cerrahi tedavi öncesi tümörün küçültülmesi için uygulanabilir. En önemli yan etkileri ise halsizlik, memede şişlik, memede ağrı ve uygulanan bölgede yanıktır (67,80).

2.2.6.3. Hormonal Tedavi

Hormon reseptörü pozitif olan meme kanserlerinde etkilidir. Tedavi ile östrojen hormonunu bloke edilir, bu sayede hormonun aktif hale geçmesi ve kanser hücrelerinin çoğalmasını uyarması engellenir. Amacı; tedavi sonrasında vücutta kalmış olan kanser hücrelerinin ortadan kaldırılmasıdır (81).

Antiöstrojen tedavi: En sık kullanılan ilaç Tamoksifendir. Etki mekanizaması; sitozoldeki ER'üne bağlanıp, meme dokusuna östrojen girişini engellemektir (82,83).

Aromataz İnhibitörleri: Aromataz enzimi testesteron, androjen ve androstenedionu östrojene çevirir (84). Aromataz inhibitörleri ise, aromataz enzimini durdurur ve yumurtalıklar dışında üretilen östrojen miktarını azaltır. Bu özellikleri nedeniyle bu inhibitörler meme kanseri tedavisinde kullanılır (85).

Progestin: Progestinlerin, östrojen üretimini baskıladığı, ER ve PR azalmasını sağladığı ve artmış östrojen döngüsüne sebep olduğu belirtilmektedir (86).

2.2.6.4. Kemoterapi

Adjuvan kemoterapi

Kemoterapi, node-pozitif olan veya 1 cm'den büyük bir tümör bulunan vakalar için standart tedavidir. Hormon reseptörü negatif hastalar, kemoterapiden hormon reseptör-pozitif hastalığından daha fazla yarar sağlar (87).

Meme kanserinde gözlenen son yıllardaki mortalite azalmasında adjuvan tedavilerin gelişimi etkilidir. Erken evre meme kanseri vakalarında 5 yıllık sağkalım %50 ile %95 arasındadır. HER–2, kemoterapi tedavisinin etkinliğinde önemlidir. HER–2 pozitif olan hastalarda antrasiklin temelli adjuvan tedavilerin daha etkili olduğu gözlenmiştir (88,89).

Antrasiklinler dünyada en yaygın kullanılan ve en etkili antineoplastik ajanlar grubudur. Bunlar arasında ilk kullanılanlar arasında Doksorubisin ve Epirubisin bulunmaktadır. Paklitaksel ve Doksetaksel, hücresel mikrotübül elementlerini stabilize ederek mitotik tutulmaya neden olan en yaygın kullanılan taksanlardır. (90,91).

2.2.6.5.İmmun Terapi

Kanser vakalarında uygulanan immün terapi modern tıbbın adjuvan yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Tedavideki amaç, hastanın immün sisteminin aktive edilip kullanılmasıdır. Bu sayede immün sisteme ait hücrelerin kanser hücrelerini hedef alması ve yok etmesi sağlanmak istenmektedir.

Monoklonal Antikorlar

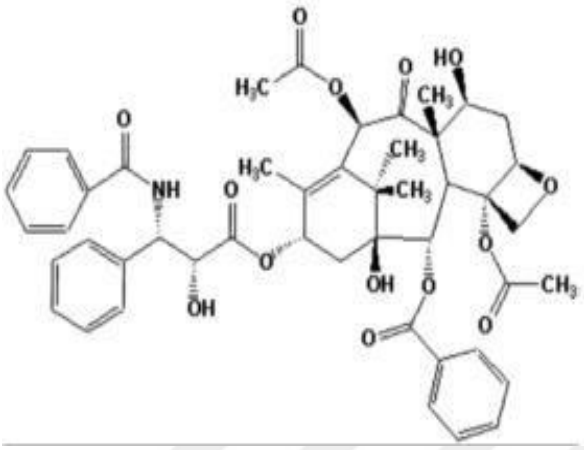
Monoklonal antikorlar renal hücre kanseri, melanoma, lösemi, meme, akciğer kanseri, kolorektal kanser ve lenfomada tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Monoklonal antikorlar, HER2, CD20, VEGF ve EGFR gibi kanser progresyonunu destekleyen büyüme faktörlerini ya da CD52 gibi kanser hücrelerindeki farklılaşma antijenlerini hedef alırlar (92,93).

Günümüzde Trastuzumab, Alemtuzumab, Rituximab, Cetuximab ve Bevacizumab ilaç olarak üretilen başlıca monoklonal antikorlardır (94).

2.3. Paklitaksel (PCX)

Paklitaksel (PCX), meme kanseri tedavisinde kullanılan, stabilite sorunu olan ve suda çözünürlüğü düşük bir antikanser ajandır. NCI tarafından birden fazla bitkinin tarandığı, doğal antikanser bileşikler bulmak amacıyla planlanan programda, ABD'de yetişen Taxus brevifolia'nın kabuğundan 1971 yılında izole edilmiş doğal diterpendir (95,96). Klinikte kullanılan ilk taksan türevi paklitaksel’dir. Günümüzde genellikle Taxol® ticari preparatı kullanılmaktadır (97).

Paklitaksel, kristal tosz yapıda ve beyaz renklidir. Lipofilik yapıda, erime sıcaklığı 216-217°C'dir. Molekül formülü C47H51NO14, sudaki çözünürlüğü 0,3 µg/ml'dir. (Şekil 2.5) (98).



Şekil 2. 5. Paklitakselin kimyasal yapısı (96)

1979 yılında, Dr. Susan Band Horwitz etki mekanizmasını keşfetmiştir. Paklitakselin tubulinlere bağlanması, klinik uygulamalar açısından onu önemli hale getirmiştir. Antitümör etkisini, depolimerizasyonunu önleyerek stabil mikrotübül toplulukları oluşturarak ve hücrede mikrotübüllerin toplanmasını arttırarak göstermektedir (99).

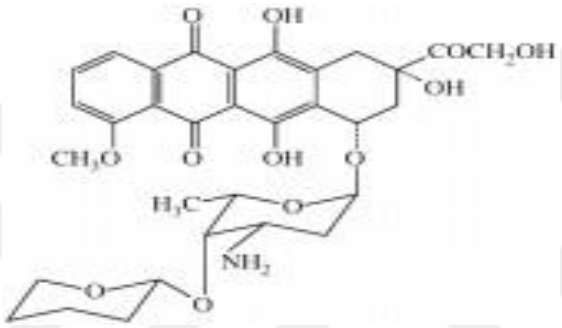
Paklitaksel hücreler üzerindeki etkisi iki yolla meydana gelir. Mikrotübüller üzerinde tubulin proteinlerine bağlanıp, stabilize ederek hücre bölünmesini durdururlar. β tubulindeki N-terminal 31 amino asite bağlanarak (rao2) hücrelerin G2/M evresinde kalmasına sebep olur. Bir diğer mekanizması ise hücreleri apoptozise yönlendirmesidir. Hücrelerin mitotik evreye geçmesini engeller ve hücreler bölünemez. Mitotik evrede kalan hücre sayısı arttıkça, apoptozise yönlendirici sinyallerin oluşmaya başlamasına neden olur (100,101).

Nötropeni, mukoza iltihabı, nörotoksisite, dispne, mide bulantısı, kusma, hipotansiyon, ürtiker, aşırı duyarlılık, periferal nöropati, miyopati, pulmoner yağ embolisi, miyalji, diyare, karaciğer fonksiyonlarında artış, alopesi (saç dökülmesi) sık görülen yan etkilerindendir.

2.4. Doksorubisin (DX)

Doksorubisin, antrasiklin türevi, farklı kanser türlerine etki gösteren, geniş spektrumlu, antitümöral bir antibiyotiktir. Antrasiklinler ilk defa 1963 yılında Streptomyces peucetius variete caesiu kültüründen (bir mantar türü) üretilmiştir (102). 1967-1969 yılları arasında ilk tedaviye giren ve antrasiklin grubunun en yaygın kullanılan ajanıdır. Lösemi, lenfoma, yumuşak doku ve kemik sarkomları, Wilms tümörü, nöroblastom, hepatoblastom tedavisinde kullanılmaktadır (103).

Antrasiklin molekülü, bir tetrasiklik çekirdek ve bir aminoşekerden (daunosamin) oluşur. Tetrasiklin çekirdek kırmızı rengini verir (104) (Şekil 2.6).



Şekil 2. 6. Doksorubisin Kimyasal Yapısı (104)

Hücrede çeşitli şekillerde etki gösterir. DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyon ve sentezini inhibe ederek, DNA zincir kırıklarına neden olur. DNA ve RNA polimerazların inhibisyonuna neden olur. Hücre membranına bağlanıp, membran fonksiyonunu bozar. (105,106).

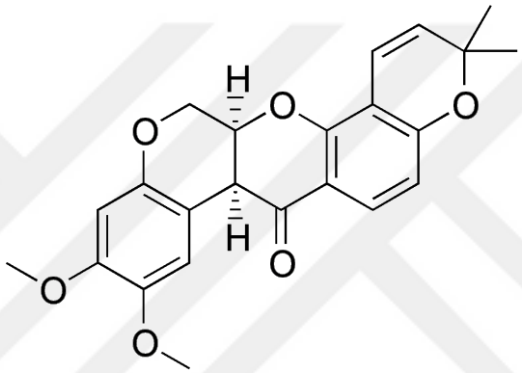
Doksorubisin, fazla yan etkiye sahip etkili bir kemoterapik ajandır. En önemli yan etki doza bağlı olarak ortaya çıkan kronik kardiyomiyopatidir. Bunun dışında saç dökülmesi, kemik iliği supresyonu, lokal toksisite, mukozit, nefrotoksisite sık görülen yan etkileridir (107).

2.5. Deguelin (DEG)

Deguelin, doğal rotenoidler grubundan Afrika'da bulunan Mundulea sericea (Leguminosae) adlı bitkiden izole edilmiş doğal bir bileşiktir (6). Mitokondriyal NADH dehidrojenaz aktivitesini inhibe eder. Ayrıca steady-state mRNA seviyelerini, ornitin dekarboksilaz enzim aktivitelerini baskılayarak kemopreventif aktivite gösterir (108,109).

Deguelinin kolon, prostat, insan malign bronşiyal epitelyal hücreleri ve küçük olmayan akciğer kanseri hücre hatlarında apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Transforme hücreler ve çeşitli kanser hücreleri üzerinde damar gelişimini önleyen bir inhibitördür (7,8,9). Bunlara ek olarak Deguelin siklooksijenaz-2, Nekroz Faktör KB ve nucleoporini hedefler ve böylece çeşitli kanser türlerine karşı önleyici ve tedavi edici aktiviteye sahip olduğuyla ilgili çalışmalarda bilgiler gösterilmiştir (10). Apoptozu indükleyerek premalign ve malign insan bronşiyal epitelyal (HBE) hücrelerinin proliferasyonunu bloke eder. Ayrıca, Deguelin seçici bir şekilde bir fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) bağımlı veya bağımsız bir şekilde Akt aktivitesini bloke eder, böylece büyük bir anti apoptotik yolun aktivitesini azaltır (110).

Deguelinin kimyasal yapısı Şekil 2.7'de gösterilmiştir. Moleküler formülü $C_{23}H_{22}O_6$ dır.



Şekil 2. 7. Deguelinin kimyasal yapısı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi:

Araştırma invaziv olmayan deneysel çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Araştırma Ocak 2016 - Aralık 2018 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Onkoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.3.Çalışma Materyali:

Araştırmada çalışma materyali olarak MDA-MB-231 (insan meme invaziv duktal karsinom), BT-474 (insan meme invaziv duktal karsinom), MDA-MB-468 (insan meme epitelyal adenokarsinom) ve MCF-7 (insan meme invaziv duktal karsinom-wild type) hücre hatları kullanıldı.

Hücre hatları Prof. Dr. Hilal KOÇDOR'un hücre kültürü arşivinden temin edildi.

3.3. Araştırmanın Değişkenleri:

Araştırmanın bağımlı değişkenleri meme kanseri hücre hatlarının canlılığı, apoptotik ve nekrotik hücre ölümü ve hücre döngüsünün S ve Sub-G1 aşamalarında durdurma oranları, migrasyon; bağımsız değişkeni ise Deguelin'dir.

3.4. Veri Toplama Araçları:

3.4.1. Kullanılan Cihazlar

Projede kullanılan makine ve teçhizat listesi Tablo 3.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 3. 1. Projede kullanılan mevcut makine-teçhizat listesi

ADI/MODELİ	PROJEDE KULLANIM AMACI
Hava Akış kabineti/	Hücre kültürü çalışmaları için kullanılmıştır.
Inverted mikroskop/Olympus CKX41	Hücrelerin kontrolü ve hücre sayımı amacıyla kullanılmıştır.
CO2 inkübatörü/Thermo Forma Steri-cycle	Hücrelerin belirli sıcaklık ve $C0_2$ içeren ortamda saklanması amacıyla kullanılmıştır.
Soğutmalı Santrifüj/Sigma 3-16K	Hücre kültürü ve Akım sitometrik çalışmalarda kullanılmıştır.
Akım Sitometrik analiz Cihazı/BD FACS Calibur	Apoptoz ve Hücre Döngüsü analizinde kullanılmıştır.
Otoklav/Hirayama Hiclave	Pipet vb. malzemelerin sterilizasyonu amacıyla kullanılmıştır.
ELİSA Plak okuyucu/Thermo Multiskan Ascent	Hücre canlılık testi sonuçlarının alınması için kullanılmıştır.
Etüv/Thermo Heraeus	Steril edilmiş malzemeleri kurutmak için kullanılmıştır.
Distile su cihazı/uv plus ultra pure water system	Su banyosunda kullanım ve temizlik amacıyla kullanılmıştır.
Su Banyosu/GFL	Hücre ortamları ve kimyasalların 37 °C ısıya gelmesi için kullanılmıştır.
Buzdolabı (-20,+4)/ Siemens	Kimyasalların saklanması için kullanılmıştır.
Santrifüj	Hücre lizat ve Apoptoz ve Hücre Döngüsü analizinde kullanılmıştır.
Hassas Terazi	Kuru kimyasalları tartmak için kullanılmıştır.
Mikrodalga	Koloni analizi için kullanılmıştır.
Derin dondurucu (-80) / Indesit	Hücre hatlarının saklanması için kullanılmıştır.
Sıvı Nitrojen Depolama Tankı (-196) (MVEXLC)	Hücre hatlarının saklanması için kullanılmıştır.

3.4.2. KullanılanSarf Malzemeler ve Diğer Gereçler

Projede kullanılan sarf malzeme ve diğer gereçler Tablo 3.2'de gösterilmektedir.

Tablo 3. 2. Projede kullanılan sarf malzeme ve diğer gereçler

Maddenin Adı	Markası-Cat No
Doksorubisin (Adrimisin)	Saba
Paklitaksel (Taksen)	Koçak Farma
Deguelin	Sigma-Aldrich
DMEM/F-12 (1:1) (1X)	Gibco
Fetal Sığır Serumu (FBS)	Gibco
Tripsin-EDTA 0.25% (1X)	Gibco
Penisilin/streptomisin	Gibco
L-Glutamin	Gibco
Tripsin-EDTA	Gibco
Hücre canlılık testi (*Cell Counting Kit8-CCK8)*	Sigma
Akım Sitometrik Apoptoz analiz Kiti	BD Pharmingen
Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analiz Kiti (*CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit*)	Cycle TEST PLUS
TAS-TOS Kiti	Rel-Assay
SOD Kiti	Sigma
DMSO	CryoSure-DMSO
Wound Healing Plate	İbidi
Binding Buffer	BD Facscanto II
Agaroz	Sigma
Cell Scraper	Costar
Tripan mavisi	Sigma-Aldrich
Akım Sitometri tüpü	BD Falcon
Microtest 96 Well Plate	Costar
Microtest 6 Well Plate	Costar
25 cm2'lik steril hücre kültür kabı	Greiner bio-one
75 cm2'lik steril hücre kültür kabı	Greiner bio-one
15 mL'lik steril santrifüj tüpü	Santa Cruz
50 mL'lik steril santrifüj tüpü	Santa Cruz
2 mL'lik cryovial	Greiner bio-one
1 mL'lik pipet	Greiner bio-one
2 mL'lik pipet	Greiner bio-one
5 mL'lik pipet	Greiner bio-one
10 mL'lik pipet	Greiner bio-one
25 mL'lik pipet	Greiner bio-one
10 µL 'lik filtreli pipet ucu	Costar
100 µL 'lik filtreli pipet ucu	Costar
200 µL 'lik filtreli pipet ucu	Costar

1000 µL ‘lik filtreli pipet ucu	Costar
Lateks Eldiven	Beybi
Otoklav bandı	SUSSEX
Parafilm	American National Can
Es 7x	Mp Biomedicals

3.5. Uygulanan Yöntemler

3.5.1. Hücre Kültürü

3.5.1.1. Hücre Hatlarının Özellikleri

Çalışmamızda kullanılan hücre hatları ile genel bir meme kanseri evreni elde edilmesi düşünülmüştür. Reseptörlerin varlığına göre Meme Kanseri progronuzunu belirleyen 5 ayrı durum söz konusudur. Araştırmanın bu evreni temsil edecek meme kanseri hücre hatları üzerinde yapılması planlanmaktadır. Bu hücre hatlarına ait özellikler aşağıda, Tablo 3.3’de özetlenmiştir.

Tablo 3. 3. Kullanılan Hücre Hatları ve Özellikleri

Hücre Hattı	Primer Tümör	Hücrenin Orijini	Östrojen Reseptör	Progesteron Reseptör	ERBB2 Amplifikasyonu	Mutant P53
MDA-MB-468	Adenokarsinom	Metastaz (plevral efüzyon)	-	-	-	+
MDA MB-231	Invaziv duktal karsinom	Metastaz (plevral efüzyon)	-	-	-	+
MCF-7	Invaziv duktal karsinom (wild-type)	Metastaz (plevral efüzyon)	+	+	-	-
BT-474	Invaziv duktal karsinom	Primer	+	+	+	+

Deneyler 4 adet iki boyutlu yüzeye bağımlı meme kanseri hücre hattı kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.3).

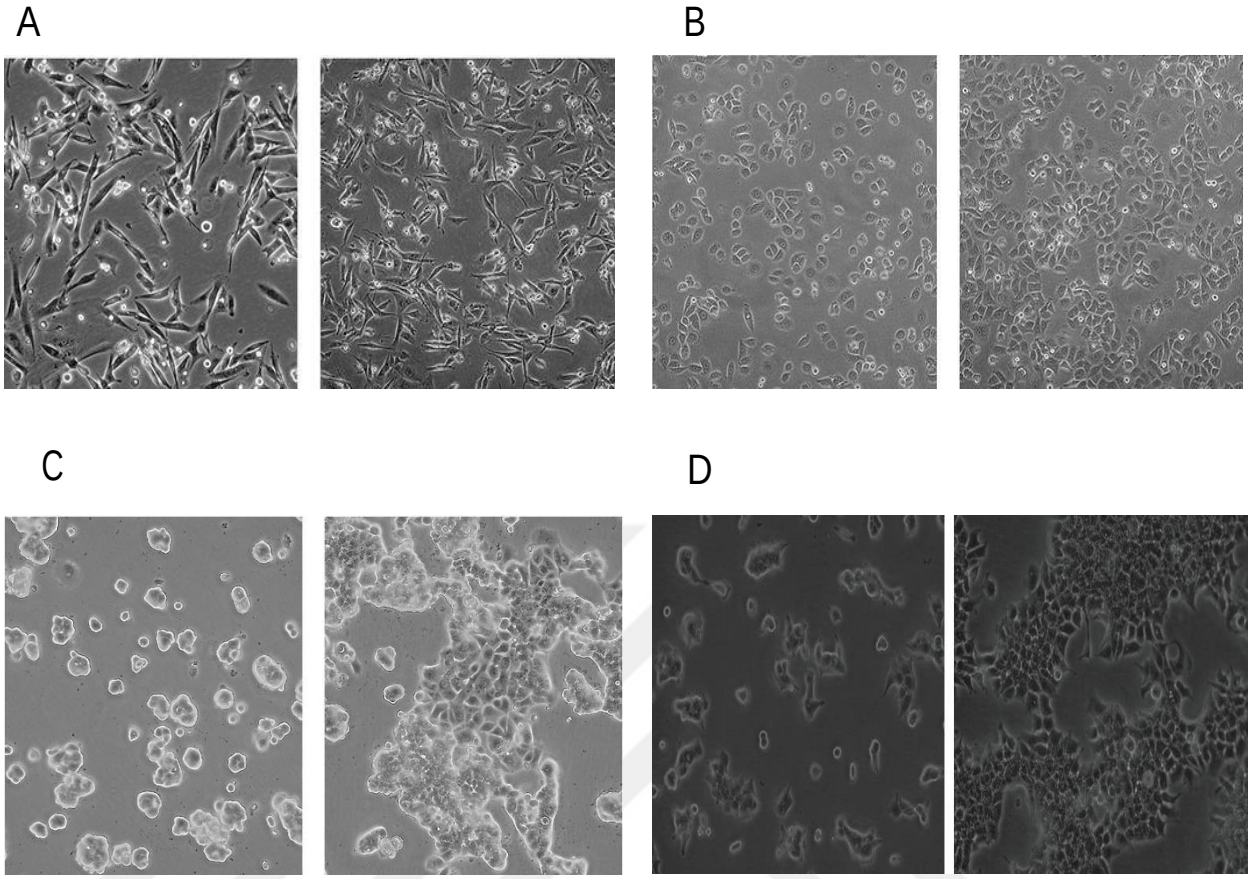
MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı 1973 yılında M. D. Anderson Kanser Merkezinde bir hastadan elde edilmiştir. Epitel benzeri morfolojiye sahip hücre hattı fenotipik olarak iğ şeklinde hücreler olarak görülür. In vitro kültürde invaziv fenotipe sahiptir. Kemoinvaziv ve kemotaksis aktiviteye sahiptir. MDA-MB-231 hücre hattı ayrıca transformasyon ve tümör indikatörü göstergesi olarak agarozda çoğalabilir ve nispeten yüksek koloni oluşturma verimliliği sergiler. In vivo kültürde, nude mice farelerde meme yağ tümörleri

oluşturur. Nude mice larda kuyruk damarına hücrelerin introvenöz (IV) enjeksiyonu ile deneysel metastaz ürettiği gösterilmiştir (111,112,113).

MDA-MB-468 meme kanseri hücre hattı 1977 yılında R. Cailleau ve arkadaşları tarafından, meme metastatik adenokarsinoması olan 51 yaşındaki bir Siyah kadın hastanın plevral efüzyonundan izole edilmiştir. Transforme büyüme faktör alfa (TGF alpha) ve Epidermal büyüme faktörü (EGF) ekspresyonuna sahiptir. Epitelyal morfolojide, tümörojenik, adherent büyüyen hücrelerdir (114,115).

BT-474 hücre hattı, E. Lasfargues ve W.G. tarafından memenin solid, invaziv duktal karsinomundan izole edilmiştir. Epitelyal morfolojide, tümörojenik, adherent, düzensiz hücrelerdir (116,117).

MCF-7 hücre hattı, 1970 yılında 69 yaşında bir Kafkas kadının meme dokusundan izole edilmiştir. Meme adenokarsinomundan türetilen yaygın olarak çalışılan bir epitelyal, adherent kanser hücre hattıdır. Farklılaşmış meme epitelyumunun özelliklerini taşır. Ayrıca, sitoplazmik östrojen reseptörleri yoluyla, estradiolü işleme yeteneğine sahiptir. MCF-7 hücre hattınında östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü pozitif, HER2 negatiftir (118,119).



Şekil 3. 1. Meme Kanseri Hücre Hatları

A: MBA-MD-231 Hücre Hattı; B: MBA-MD-468 Hücre Hattı;
C:MCF-7 Hücre Hattı; D: BT-474 Hücre Hattı)

3.5.1.2. Hücrelerin Kültürde İdamesi

MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve MCF-7 meme kanseri hücre hatları %15 (v/v) oranında FBS, %1 (v/v) 2 Mm L-glutamin içeren DMEM F-12 ortamında kültüre edildi. Bakteri kontaminasyonunun önlenmesi için100 IU/mL penisilin ve 100 μg/mL streptomisinden oluşan antibiyotik çözeltisinden %1 (v/v) oranında kültür ortamına ilave edildi. (120).

BT-474 meme kanseri hücre hattı steril hücre hattı %15 (v/v) oranında FBS, %1 (v/v) 2 Mm L-glutamin içeren DMEM F-12 ortamında kültüre edildi. Bakteri kontaminasyonunun önlenmesi için 100 IU/mL penisilin ve 100 μg/mL streptomisinden oluşan antibiyotik çözeltisinden %1 (v/v) oranında kültür ortamına ilave edildi (121).

Hücreler 25 cm^2'lik hücre kültür kaplarına ekildi ve 37°C'de 5% CO_2 içeren inkübatör ortamında bekletilerek canlılıklarının devamı sağlandı. Kültür kaplarında üretilen hücre hatları %80 yoğunluğa ulaşana kadar iki günde bir beslendi. Bu yoğunluğa gelen kaplardaki hücrelerin çoğaltılması amacıyla pasajlama işlemi uygulandı. Pasajlama işlemi ile hücreler 75 cm^2 kültür kaplarına alınıp çoğaltıldı (122).

3.5.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Steril pipet kullanılarak flask içindeki ortam uzaklaştırıldı. Hücreleri kültür kabının yüzeyinden kaldırmak amacıyla Tripsin-EDTA çözeltisi ilave edildi. Hücre kültür kapları inkübatörde hücreler yüzeyden kalkana kadar bekletildi. Hücreler hücre kültür kabı yüzeyinden ayrıldığında Tripsin-EDTA inhibisyonu amacıyla hücre besin ortamı hücre kültür kabına ilave edildi. Kültür kabı içindeki ortam, Tripsin-EDTA ve hücre içeren süspansiyon aspire edilerek steril santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Steril santrifüj tüpü dibinde gözlenen hücre peleti üzerine 10 mL kültür ortamı ilave edildi ve pipet ucuyla hücreler süspanse edildi. Kültür kabına 2 mL süspanse haldeki kültür ortamından paylaştırılarak üzerlerine 5 mL ortam eklendi ve çoğalması için inkübatöre yerleştirildi (122).

3.5.1.4. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler Tripsin-EDTA aracılığıyla kültür kabı yüzeyinden kaldırıldıktan sonra hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pellet üzerine dondurma ortamı konularak resüspanse edildi ve 2mL'lik steril hücre dondurma tüplerine dağıtıldı. Hücrelerin dondurma ortamı içerisinde kademeli olarak dondurulması amacıyla önce -20ºC'de 2 saat, -80ºC'de 1 gün bekletildikten sonra -196°C'deki sıvı azot tankına alındı. Her hücre hattı için dondurma ortamı olarak %10 (v/v) DMSO içeren ortam kullanıldı. Steril hücre dondurma tüpleri üzerine tarih, hücre hattı ismi, pasaj no, kişi adı yazıldı (122).

3.5.1.5. Hücrelerin Çözülmesi

Hazırlanan ortam 37 °C'de su banyosunda ısıtıldı. Kabinette steril ortamda hücre kültür kapları üzerine tarih, pasaj no, hücre hattı ismi, kişi adı yazıldı ve kültür kabı içine 37 °C'ye getirilmiş kültür ortamından 10 mL konuldu. Hücre sıvı azot tankından çıkarılarak hızlı bir biçimde 37 °C'ye getirilmiş olan su banyosunda çözüldü. Hücre dondurma tüpünün dış kısmı steril edildikten sonra laminer flow kabine alındı ve içindeki hücre süspansiyonu çekilerek

hazırlanmış olan kültür kabı içine ilave edildi. Kültür kabı inkübatöre yerleştirilerek idamesi sağlandı (122).

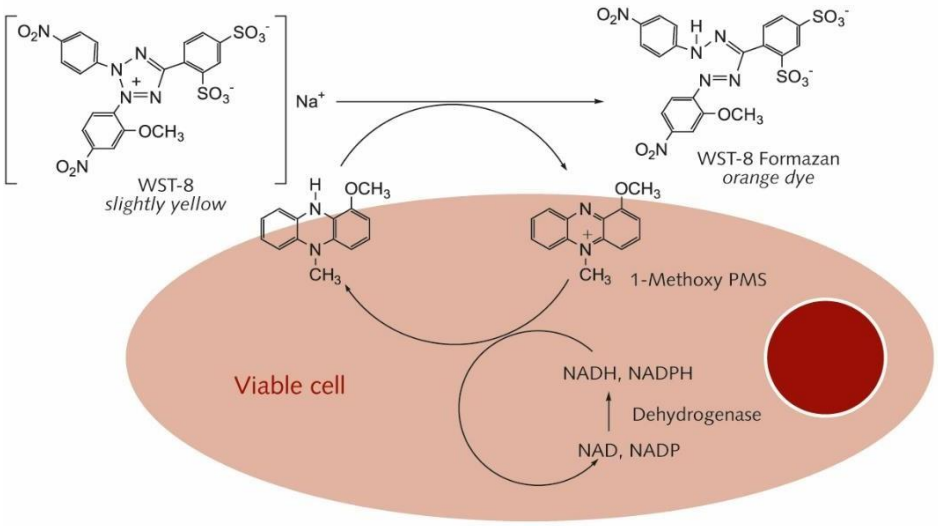
3.5.1.6. Hücrelerin Sayılması

Thoma lamı distile su, alkol ve tekrar distile su sıralamasıyla temizlendi. Mikroskop altına konulan thoma lamının üzerine lamel yerleştirildi. Santrifüj sonrası elde edilmiş olan pellet üzerine isteğe bağlı olarak (2,5-10 mL) ortam ile resüspanse edildi. 1:1 (v/v) oranında tripan mavisi ile steril ependorf içinde birleştirildi (50 µL:50 µL). Thoma lamının her iki tarafındaki lam ve lamelin birleştiği ortadaki kapiller boşluklara 10 µL tripan mavisi ile boyanmış hücre süspansiyonu verildi. 16 büyük kareyi barındıran thoma lamının yüzeyinde tüm hücreler sayıldı (10x 'lik büyütmede). Sayılma esnasında üst ve sol dahil sağ ve alt çizgi hariç olarak sayıldı. Thoma lamının her iki tarafındaki karelerde sayılan hücrelerin sayısının ortalaması alındı. Sayılan ortalama hücre sayısı x Dilüsyon Faktörü x 10^4 formülü ile 1mL'deki hücre sayısı bulundu (122).

3.5.2. Hücre Canlılık Testi

3.5.2.1. Yöntemin Prensibi

Çalışmada hücre canlılık testi olarak CCK-8 kullanıldı. Suda çözünebilen tetrazolyum tuzları (WST) suda çözünebilen formazanları oluşturmaktadır. WST-8 oldukça stabil bir tetrazolyum tuzu olup, CCK-8 testinde kullanılmaktadır. Elektron taşıyıcısı stabil olan 1-Metoksi-PMS'dir (123). WST-8, 1-Metoksi-PMS'nin indirgenmiş formuyla beraber reaksiyona girerek indirgenir. Bu taşıyıcı hücre membranında bulunmaktadır ve nikotinamid-adenin-dinukleotid indirgenmiş formu (NADH) ya da nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat indirgenmiş formu (NADPH) ile reaksiyona girer. NADH ve NADPH ile laktat dehidrogenaz ve laktik asit gibi dehidrogenaz enzimleri ve substratlarının reaksiyonları ile NAD+ ve NADP+'den oluşur. Canlı hücrelerde bulunan dehidrogenazlar tarafından WST-8'in indirgenip oluşturduğu formazan ürünü 450 nm/650 nm dalga boyunda pik absorbans veren güçlü bir turuncu renk oluşturur ve bu rengin yoğunluğu mikroplak okuyucuda ölçülür (123). WST-8'in formazana indirgenme mekanizması Şekil 3.2.'de gösterilmektedir (123).



Şekil 3. 2. WST-8 ‘ in formazana indirgenme mekanizması (123)

3.5.2.2. Doksorubisin ve Paklitaksel Ajanlarının Hazırlanması

Meme kanseri tedavisinde (kemoterapi) standart olarak kullanılan ajanlar olan Doksorubisin ve Paklitaksel ticari hazır enjektable hali ile kullanılmıştır.

Paklitaksel stoğu 30 mg/5mL olan ara stok elde eldesinden sonra bu ara stoktan seri dilüsyonlar ile 200 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM ve 0,01 nM olmak üzere yedi farklı doz hazırlandı. Tüm hücre hatları için DMEM F-12 ortamı kullanıldı.

Doksorubisin stoğu 2 mg/mL olan ara stok elde eldesinden sonra bu ara stoktan seri dilüsyonlar ile 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM ve 0,01 nM olmak üzere beş farklı doz hazırlandı. Tüm hücre hatları için DMEM F-12 ortamı kullanıldı.

3.5.2.3. Deguelin Çözeltisinin Hazırlanması

Deguelin toz halinde temin edilmiştir. Çözücüsü DMSO’dur. Toz halindeki Deguelin çözücüsünde çözdürülerek stok çözeltisinin konsantrasyonu 10.000 µM olarak ayarlandı. Elde edilen stok solüsyondan seri dilüsyonlar ile konsantrasyonlar elde edildi.

Önce büyük konsantrasyonlarda, konsantrasyon aralıkları büyük olacak ölçümlerle olası etkin dozlar hakkında bilgi sahibi olmaya çalışıldı. Daha sonra ara stoktan; hücre hatları için 50000 nM, 10000 nM, 5000 nM, 1000 nM, 500 nM, 100 nM, 10 nM ve 1 nM olmak üzere 8 farklı doz hazırlandı.

Çözücü olarak DMSO kullanıldığından, hücre canlılık testi için 1/1000 v/v oranında DMSO içeren ortamla bir kontrol çözeltisi hazırlandı.

Ana ve ara stok çözeltiler, DMSO içeren kontrol çözeltisi her bir deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı.

3.5.2.4. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

Hücre canlılık testi hücrelerin, Doksorubisin, Paklitaksel ve Deguelin ile muamelesinin takibinde gelişen sitotoksik cevabının saptanması amacıyla yapıldı. Etkili ilaç dozlarının saptanabilmesi için; her bir gruptaki hücreler 96'lı well-plate aktarılır ve azalan konsantrasyonlardaki ilaçlar **IC_{50} dozları** (İnhibitör Konsantrasyon) hesaplamak için kuyucuklarda olan sabit hücre sayılarına eklendi. 96 kuyucuklu plate'in 12 well'lik bölümü gruplara, 8 well'lik bölümü de konsantrasyonlara ayrılarak 8 ayrı konsantrasyonun denenmesi sağlandı. IC_{50} dozlarını saptamaya yönelik bu işlem ve bundan sonra gerçekleştirilecek laboratuvar yöntemleri en az 3'er kez tekrar edildi. Hücre canlılık testi yapılarak kullanılacak ilaçlar (Doksorubisin, Paklitaksel ve Deguelin) hücre viabilitesi (yaşayabilirlik) hakkında verileri elde edilirken bir yandan da bu ilaçların etkili konsantrasyonlarının da belirlenmesi sağlandı.

Hücre Canlılık testi için; çalışmada kullanılan meme kanseri hücreleri adheren (yüzeye yapışan) hücreler olduklarından tripsinizasyonla kültür kabından kaldırıldı. Hücre süspansiyonu tripan mavisi sayım yöntemi ile thoma lamında sayılarak 96 Kuyucuklu Kültür kabının her kuyucuğuna hücreler (10.000 cells/well) ekildi. Sonra hücrelerin yapışması için inkübatörde 72 saat ön inkübasyona bırakıldı. 96 kuyucuklu kültür kabının kuyucuklarından ortamlar çekilerek, farklı konsantrasyonlarda Doksorubisin (100 nM-0,01 nM), Paklitaksel (200 nM-0,01 nM) , Deguelin (5000 nM-1 nM) çözeltilerinden her kuyucuğa 200 µL hacimde konuldu. Her grup için sekiz kuyucuk olacak şekilde gruplar hazırlandı. İlaç uygulanmayan, sadece hücre ve ortamdan oluşan bir kontrol gurubu yanı sıra bir de ilacın çözündüğü DMSO içeren hücre ve ortam kontrol grubu oluşturuldu. Hücre canlılık testi için Tablo 3.4'de belirtildiği gibi, hücrelere 96 kuyucuklu steril hücre kaplarında planlanan aralıktaki Doksorubisin, Paklitaksel ve Deguelin dozları uygulandı.

Tablo 3. 4. Hücre Canlılık deneyi için hücre hatlarına verilen Doksorubisin, Paklitaksel ve Deguelin 96 kuyucuklu kültür kabındaki doz dağılımı

	1	2	3	4	5	6	7
	KONTROL	**DMSO**	**DX**	**DX**	**DX**	**DX**	**DX**
A	Kontrol	1/1000 v/v	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM
B	Kontrol	1/1000 v/v	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM
C	Kontrol	1/1000 v/v	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM
D	Kontrol	1/1000 v/v	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM
E	Kontrol	1/1000 v/v	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM
F	Kontrol	1/1000 v/v	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM
G	Kontrol	1/1000 v/v	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM
H	Kontrol	1/1000 v/v	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	KONTROL	**DMSO**	**PCX**	**PCX**	**PCX**	**PCX**	**PCX**	**PCX**	**PCX**
A	Kontrol	1/1000 v/v	200 nM	100 nM	50 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM
B	Kontrol	1/1000 v/v	200 nM	100 nM	50 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM
C	Kontrol	1/1000 v/v	200 nM	100 nM	50 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM
D	Kontrol	1/1000 v/v	200 nM	100 nM	50 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM
E	Kontrol	1/1000 v/v	200 nM	100 nM	50 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM
F	Kontrol	1/1000 v/v	200 nM	100 nM	50 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM
G	Kontrol	1/1000 v/v	200 nM	100 nM	50 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM
H	Kontrol	1/1000 v/v	200 nM	100 nM	50 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01 nM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	KONTROL	**DMSO**	**DEG**	**DEG**	**DEG**	**DEG**	**DEG**	**DEG**	**DEG**	**DEG**
A	Kontrol	DMSO	50000 nM	10000 nM	5000 nM	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM
B	Kontrol	DMSO	50000 nM	10000 nM	5000 nM	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM
C	Kontrol	DMSO	50000 nM	10000 nM	5000 nM	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM
D	Kontrol	DMSO	50000 nM	10000 nM	5000 nM	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM
E	Kontrol	DMSO	50000 nM	10000 nM	5000 nM	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM
F	Kontrol	DMSO	50000 nM	10000 nM	5000 nM	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM
G	Kontrol	DMSO	50000 nM	10000 nM	5000 nM	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM
H	Kontrol	DMSO	50000 nM	10000 nM	5000 nM	1000 nM	500 nM	100 nM	10 nM	1 nM

Doksorubisin, paklitaksel ve deguelin ile muamele edilen hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca inkübatörde bekletildi. 72 ve 96 saatlik grupların 48. saatte ortam değişimleri yapıldı. İlaca maruziyet sonucunda ilaç kalıntılarının CCK-8 ile girişim olasılığını ortadan kaldırmak için iki kere PBS ile yıkandı ve son olarak 100 µL ortam eklendi ve 10 µL CCK-8 verildikten sonra 3 saat inkübatörde inkübe edildi. 450 nm (650 nm referans dalga boyu) dalga boyunda canlı hücrelerin ürünü olan formazanın oluşturduğu absorbans ölçümleri mikroplak okuyucudan alındı. Elde edilen absorbans değerleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak canlı hücre oranı belirlendi. Kontrol grubu hücrelerinin canlılık oranı %100 olarak kabul edilip ilaç uygulanan grupların canlılık oranı buna göre hesaplandı.

Hücre canlılık testinde her doz grubu 8 kuyucuktan oluşturuldu ve birbirinden bağımsız deneyler olarak ise üç-dört farklı zamanda tekrarlandı. Yüzde canlılık oranları hesaplandıktan sonra %50 canlılık oranına karşılık gelen doksorubisin, paklitaksel ve deguelin konsantrasyonları (µM) IC50 dozları olarak saptandı.

3.5.3. Akım Sitometrik Analizler

Apoptoz analizi AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit I ve Cell Cycle analizi Cell Cycle Kit ile gerçekleştirildi. Sonuçlar çift lazerli akım sitometrisinde değerlendirildi. Akım Sitometrik Analizlerde oluşturulan gruplar Tablo 3.5'de sunulmuştur;

Tablo 3. 5. Akım Sitometrik Analizlerde Tüm Hücre Hatları İçin Oluşturulan Gruplar

HÜCRE HATTI	**GRUPLAR (72 saatlik inkübasyon süresi)**				
	KONTROL	**KONTROL-DMSO**	**DOKSORUBİSİN (IC50 DOZU)**	**PAKLİTAKSEL (IC50 DOZU)**	**DEGUELİN (IC50 DOZU)**
MDA-MB-231	Kontrol	Kontrol-DMSO	Doksorubisin	Paklitaksel	Deguelin
BT-474	Kontrol	Kontrol-DMSO	Doksorubisin	Paklitaksel	Deguelin
MDA-MB-468	Kontrol	Kontrol-DMSO	Doksorubisin	Paklitaksel	Deguelin
MCF-7	Kontrol	Kontrol-DMSO	Doksorubisin	Paklitaksel	Deguelin

3.5.3.1. Apoptoz Analizi (Annexin V yöntemi)

3.5.3.1.1. Yöntemin Prensibi

Bu çalışmada apoptoz analizi BD Pharmingen firmasından temin edilen "*AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit I"* ile gerçekleştirildi. FITC-Anneksin-V kompleks kitinin hücre yüzeyinde olan fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri yardımıyla ölçüldü. Anneksin-V, PS'e bağlanarak, floresan bir madde olan floresan izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenip, apoptotik hücrenin görünür hale gelmesi sağlanır. FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki PS'e bağlanma oranı Akım sitometrik olarak ölçüldü. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak Propidyum iyodür (PI) eklendi. Annexin V-FITC (yeşil floresan) ve ölü hücreleri boyayan boya olan PI ile boyanma farklılığına göre hücreler aşağıdaki gibi birbirinden ayrımlandı;

Canlı hücreler (FITC-PI-),
Erken apoptotik hücreler (FITC+PI-)
Geç apoptotik (FITC+PI+)
Nekrotik hücrelerin (FITC+PI+)

3.5.3.1.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

Meme kanseri hücreleri tripsinizasyonla kültür kabından kaldırıldı. Hücre süspansiyonu tripan mavisi sayım yöntemi ile thoma lamında sayılarak 6 kuyucuklu kültür kabının her kuyucuğuna $5x10^5$hücre ekildi. 72 saatlik ön inkübasyondan sonra hücre canlılık testinde Doksorubisin, Paklitaksel ve Deguelin için belirlenen IC50 dozlar kuyucuklara verildi ve 72 saat inkübe edildi. 72 saatlik ilaca maruziyet sonrasında 6 kuyucuklu kültür kabının her kuyucuğundaki ortamlar çekilip 15 ml'lik tüplere aktarıldı. Kuyucuklara 1 ml Tripsin-EDTA eklenip hücreler kaldırıldı. Tripsin-EDTA inaktivasyonu için yeterli miktarda ortam kuyucuklara eklendi ve çekilip steril tüplere aktarıldı. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Her tüpe 3'er ml bağlanma tamponu (binding buffer) eklendi ve resüspanse edilip 15 ml'lik tüplerin içindekiler 17x100 mm'lik tüplere aktarıldı ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Yıkama işlemi 3'er defa tekrar edildi. Tüplere önce 5 µL AnnexinV, daha sonra 5 µL PI eklendi. Tüpler karanlık ortamda 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüplere 400'er µL bağlanma tamponu eklendi ve cihaza (BD FACSCanto II)verildi. Erken apoptoz, geç apoptoz, nekroz ve canlı hücre oranları çift lazerli akım sitometrisinde değerlendirildi (124).

3.5.3.2. Hücre Döngüsü Analizi

3.5.3.2.1. Yöntemin Prensibi

Bu çalışmada hücre döngüsü analizi "*Cycle Test Plus DNA Reagent Kit"* ile gerçekleştirildi. Bu analiz, hücrelerin hücre döngüsünün hangi aşamasında olduğunun belirlenmesi için yapılan işlemdir. PI boyasının hücrelerin DNA'sına bağlanıp ışıma vermesi temeline dayanır. Bağlanan boya miktarı her bir hücredeki total DNA miktarı ile orantılıdır (125).

3.5.3.2.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

Hücreler tripsinizasyonla kültür kabından kaldırıldı. Hücre süspansiyonu tripan mavisi sayım yöntemi ile thoma lamında sayılarak 6 kuyucuklu kültür kabının her kuyucuğuna hücre ekildi. 72 saatlik ön inkübasyondan sonra hücre canlılık testinde Doksorubisin, Paklitaksel ve Deguelin için belirlenen IC50 dozlar kuyucuklara verildi ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 6 kuyucuklu kültür kabının her kuyucuğundaki ortamlar çekilip 15 ml'lik tüplere aktarıldı. Kuyucuklara 1 ml Tripsin-EDTA eklenip hücreler kaldırıldı. Tripsin-EDTA inaktivasyonu için yeterli miktarda ortam kuyucuklara eklendi ve çekilip 15 ml'lik tüplere aktarıldı. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine tampon çözeltisi (Dimetilsülfoksit içeren sükroz-sitrat tamponu) eklendi ve hücreler resüspanse edildi (yıkama işlemi). 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandıktan sonra boyama işlemine geçildi ve bu aşamadan sonraki işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Yıkama işlemlerinin ardından tampon çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 250 µL çözelti A (Tripsin içeren sitrat tamponu) her tüpe eklendi ve el ile hafifçe çalkalandı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra çözelti A uzaklaştırılmadan 200 µL çözelti B (Tripsin inhibitörü ve RNAz içeren sitrat tamponu) tüplere eklendi ve el ile hafifçe çalkalandı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. +4°C'de muhafaza edilmiş olan çözelti C (PI boyama çözeltisi) her tüpe 200 µL olacak şekilde eklendi. Buz üzerinde 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Çözelti C eklendikten sonra üç saat içerisinde örnekler çift lazerli akım sitometri cihazında (BD FACSCanto II)analiz edildi. G0/G1, sentez fazı ve G2+Mitoz fazına ait hücreler *ModFitLT3.2* programı kullanılarak yüzde (%) olarak değerlendirildi.

3.5.4. Hücre Lizatı Eldesi

3.5.4.1. Yöntemin Prensibi

Hücre lizatı eldesi, hücre fraksiyonlamasında, organel izolasyonunda, protein ekstraksiyonunda ve saflaştırılmasında ilk adımdır.

Çalışmada planlanan gruplardan Total Oksidant Status, Total Antioksidant Status ve Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi kullanılmak üzere hücre lizatı elde edildi.

3.5.4.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

Planlanan her grup için 25 cm^2'lik flaska $3x10^6$ hücre olacak şekilde hücreler ekildi. Tedavi gruplarına hücre canlılık testleri ile belirlenmiş etkin dozu içeren ortam ve kontrol gruplara normal ortam ilave edildi. Hücreler belirlenen zaman diliminde (72 saat) inkübatörde inkübe edildi. Steril cam pastör pipet yardımıyla ortamlar hücre kültür kaplarından uzaklaştırıldı. Kültür yüzeyi steril PBS ile iki kez yıkandı. PBS uzaklaştırılarak, kültür yüzeylerindeki hücreler cell scraper ile kültür kabının yüzeyinden kaldırıldı. Hücreler hücre kültür kabı yüzeyinden ayrıldıktan sonra 3ml steril PBS ile toplandı, steril ependorf tüpüne aktarıldı ve 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Üst faz atıldıktan sonra steril santrifüj tüpü dibinde gözlenen hücre peleti üzerine1 ml lysis buffer (RIPA buffer) eklendi ve pipet ucuyla hücreler süspanse edildi. Hücreler Lysis buffer içindeyken santrifüj tüpü buz üzerinde 30 dakika bekletilerek, her 10 dakikada bir vorteklendi. Süre sonunda 10,000 x g'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üst faz (süpernatant) yeni ependorfa alındı. Ependorfların üzeri etiketlenerek kısa süreli saklamak için -20°C'ye, uzun süreli saklamak için ise -80°C'ye konuldu.

3.5.5. Wound Healing Assay (Migrasyon Analizi)

3.5.5.1. Yöntemin Prensibi

Deguelin ile tedavi edilmiş meme kanseri hücreleri ve tedavi edilmemiş meme kanseri hücreleri Culture-Insert 2 Well kullanılarak karşılaştırıldı. Bu analiz ile hücrelerin göç yoluyla analizinin kinematiği incelenir.

3.5.5.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

Planlanan her grup için 25cm^2'lik flaska $3x10^6$ hücre ya da 6 kuyucuklu steril kültür kabına $5x10^5$ hücre olacak şekilde hücreler ekildi. Tedavi gruplarına hücre canlılık testleri ile belirlenmiş etkin dozu içeren ortam ve kontrol gruplarına normal ortam ilave edildi. Hücreler

belirlenen zaman diliminde (72 saat) inkübatörde inkübe edildi. Steril cam pastör pipetleri kullanarak ortamlar hücre kültür kaplarından uzaklaştırıldı. Kültür yüzeyi PBS ile bir kez yıkandı. PBS uzaklaştırılarak hücre kültür kaplarına 2 mL Tripsin-EDTA çözeltisi, hücreleri yapıştıkları hücre kültür kabının yüzeyinden kaldırmak amacıyla ilave edildi. Hücreler hücre kültür kabı yüzeyinden ayrıldığında Tripsin-EDTA inhibisyonu amacıyla konulan ve Tripsin-EDTA hacminin en az 2 katı kadar ortam hücre kültür kabına ilave edildi. Kültür kabı içindeki ortam, Tripsin-EDTA ve hücre içeren süspansiyon aspire edilerek steril santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Üst faz atıldıktan sonra steril santrifüj tüpü dibinde gözlenen hücre peleti üzerine 5-6 mL kültür ortamı ilave edildi ve pipet ucuyla hücreler süspanse edildi. Thoma lamı distile su, alkol ve tekrar distile su sıralamasıyla temizlendi. Mikroskop altına konulan thoma lamının üzeri hafifçe ıslatılarak lamele yapıştırıldı. 1:1 (v/v) oranında tripan mavisi ile hücre süspansiyonu steril ependorf içinde birleştirildi (50 µL:50 µL). Thoma lamının her iki tarafındaki lam ve lamelin birleştiği ortadaki kapiller boşluklara 10 µL tripan mavisi ile boyanmış hücre süspansiyonu verildi. Yapılan sayım sonucunda gerekli hesaplamalar yapılarak Wound Healing plate içinde bulunan culture- insert'in her bir kuyucuğuna 70µl ortam içinde $35x10^3$ hücre olacak şekilde hücre ekildi. Hücrelerin kültür yüzeyine tamamen yapışması sağlanan kadar inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin kültür yüzeyine tamamen yapıştığı mikroskop altında gözlemlendikten sonra Wound Healing plate içindeki culter-insert dikkatli bir şekilde foreceps ile köşesinden tutularak culter-insert plate den çıkarıldı. Wound Healing plate'lerinden kontrol gruplarına yaklaşık 1'er ml ilaçsız ortam ve tedavi gruplarına ise 1ml medium içinde etkin doz içeren ilaçlı ortam eklendi. Plate'lerin kapakları dikkatlice kapatılıp, *inverted*mikroskop altında 1. saatin görüntüsü alındı. Gözlemlenmek üzere inkübatörde inkübasyona bırakılarak, 4. , 6. , 8. , 10. , 12. , ve 24. saatlerde olmak üzere kontrol gruplarında hücreler kültür yüzeylerinin tamamını kaplayana kadar grupların *inverted* mikroskop altında görüntüleri alındı ve gruplar arası fark analiz edildi.

3.5.6. Koloni Formasyon (Agaroz Koloni-3D)Analizi

3.5.6.1. Yöntemin Prensibi

Koloni formasyon analizi için agaroz kullanıldı. Analiz süresi sonunda koloniler boyanıp, sayılarak gruplar arasındaki farklılık tespit edildi (126).

3.5.6.2. Agarın Hazırlanması

Koloni formasyon analizi için bottom layer ve top layer olmak üzere iki tabaka katman hazırlandı. Bottom layer için %1,2 agaroz, top layer için %0,6 agaroz hazırlandı.

%1.2 bottom layer agaroz hazırlamak için 0,12 gram agaroz (Sigma) steril beher içinde hassas terazi üzerinde tartılıp, 10,5 ml steril distile su üzerine ilave edilip mikrodalga içinde kaynamaya bırakıldı. %0,7 top layer agaroz hazırlamak için 0,08 gram agaroz (Sigma) steril beher içinde hassas terazi üzerinde tartılıp, 10,5 ml steril distile su üzerine ilave edilip mikrodalga içinde kaynamaya bırakıldı (126).

3.5.6.3. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

Bottom Layer Agaroz Hazırlığı

Bottom layer koloni formasyon analizinde hücrelerin bulunmadığı katmandır. %1.2 agaroz çözeltisi hazırlandı. Beher mikrodalga içine konuldu ve kaynamaya bırakıldı. Kaynadıktan sonra laminer flow kabinet içinde hazır olan %20 FBS içeren DMEM-F12 ile eşit hacimle süspanse edildi. 6 kuyucuklu steril kültür kabının her kuyucuğuna agaroz ve ortam karışımı dikkatlice eklendi. Agaroz 6 kuyucuklu steril kültür kabının içinde katılaşmaya bırakıldı (126).

Top Layer Agaroz Hazırlığı

Top layer koloni formasyon analizinde agaroz ve hücre süspansiyonunu içeren katmandır. %0,7 agaroz çözeltisi hazırlandı. Beher mikrodalga içine konuldu ve kaynamaya bırakıldı. Kaynadıktan sonra Mikrodalgadan çıkarılan agaroz laminer flow kabinete alındı. Daha önceden tedavi edilmiş ve Thoma Lamı ile sayılmış hücreleri içeren %20 FBS içeren DMEM-F12 hücre süspansiyonuna (2,5 ml) eşit hacimde agaroz (2,5 ml) ilave edildi. Agaroz katılaşmadan agaroz ve hücre süspansiyonu 5'er ml 6 kuyucuklu steril kültür kabının her kuyucuğuna bottom layer üzerine ilave edildi. Agaroz tamamen katılaşana kadar 6 kuyucuklu kültür kabı laminer flow kabinet içinde bekletildi. Agaroz katılaştıktan sonra tedavi gruplarına hücre canlılık testleri ile belirlenmiş etkin dozu içeren ortam ve kontrol gruplarına %20 FBS içeren normal ortam ilave edildi. 6 kuyucuklu steril kültür kapları inkübatöre konarak inkübe

edildi. 14 gün sonra kuyucuklara vital screen boyası eklendi ve 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası *invertedmikroskop* altında koloniler sayılıp görüntü alındı (126).

3.5.7. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

3.5.7.1. Yöntemin Prensibi

Süperoksit anyonunun (O2.-), moleküler oksijene ve hidrojen perokside dönüşmesini katalize eden süperoksit dismutaz (SOD), en önemli antioksidatif enzimlerden biridir. SOD aktivitesini belirlemek için birkaç dolaysız ve dolaylı yöntem geliştirilmiştir.

SOD Test Kiti-WST, bir süperoksit anyonu ile indirgendikten sonra suda çözünebilir bir formazan boyası üreten WST-1 gibi suda çözülebilen tetrazolyum tuzu kullanılarak SOD analizine izin verir. O_2 ile indirgeme oranı, ksantin oksidaz (XO) aktivitesi ile doğrusal olarak ilgilidir ve SOD ile inhibe edilir. Bu nedenle IC50 (SOD veya SOD benzeri materyallerin % 50 inhibisyon aktivitesi) kolorimetrik bir yöntemle 440 nm'de ölçüm yapılarak belirlenebilir.

3.5.7.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

SOD analizinde daha önce hazırlanmış olan hücre lizatları kullanıldı. Yöntem prosedürü kit prosedürü takip edilerek yapıldı. Öncelikle kit prosedüründe yazılı olan WST çalışma solüsyonu, enzim çalışma solüsyonu, SOD solüsyonları hazırlandı. Prosedürde yazılı olan blank solüsyonları da belirlenen oranlarda hazırlandı. 96 well plate'e öncelikle sırasıyla hazırlanan standart SOD solüsyonu ve blank çözeltiler ayrı ayrı kuyucuklara eklendi. Daha sonra her bir kuyucuğa ayrı bir örnek konularak, tüm örnekler plate'lere koyuldu. SOD solüsyonu, blank çözeltiler ve çalışma örnekleri üzerine WST çalışma solüsyonu ve enzime çalışma solüsyonu belirtilen miktarlarda eklendi. 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. 450 nm mikroplate okuyucuda ölçüm yapıldı. Yapılan ölçüm sonuçlarına göre aşağıdaki formül kullanılarak SOD inhibisyonu değerlendirildi.

$$\text{SOD Aktivitesi (\%inhibisyon)} = \frac{[(\text{Ablank 1 - Ablank 3}) - (\text{Asample - Ablank 2})]}{(\text{Ablank 1 - Ablank 3})\}} \times 100$$

3.5.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Tayini

3.5.8.1. Yöntemin Prensibi

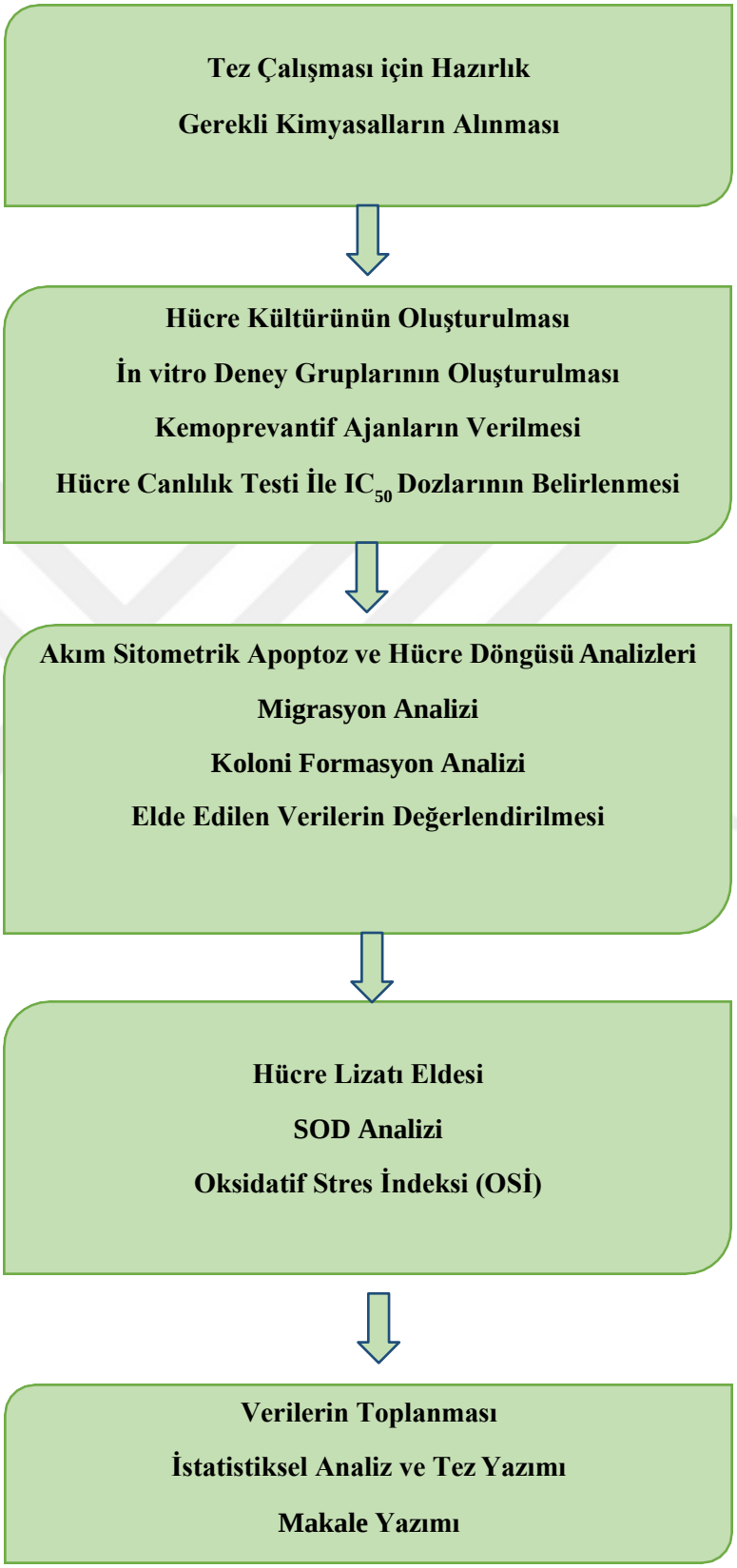
Serbest oksijen radikalleri Total Oxidant Status-TOS (Rel assay diagnostics) ve Total Antioxidant - TAS Status (Rel assay diagnostics) kitleri ile analiz edildi.

3.5.8.2. Hücrelerin Hazırlanması ve Deney Prosedürü

TAS kiti uygulamasında blank olarak 303 µL deiyonize su kullanıldı. 96 kuyucuklu steril kültür kabının kullanılacak her kuyucuğuna 250 µL Reagent 1 eklenerek üzerine 15 µl standart ya da örnek konuldu. 660 nm'de mikroplate okuyucuda ölçüm yapıldı. İlk ölçümden sonra tüm kuyucuklara 38 µl Reagent 2 ilave edilip inkübe edildi. 660 nm'de mikroplate okuyucuda ikinci ölçüm yapıldı.(Biotek Elx 808 - 660nm)

TOS kit uygulamasında blank olarak 301 µl deiyonize su kullanıldı. . 96 kuyucuklu steril kültür kabının kullanılacak her kuyucuğuna 250 µl Reagent 1 eklenerek üzerine 38 µL standart ya da örnek konuldu. 530 nm'de mikroplate okuyucuda ölçüm yapıldı. İlk ölçümden sonra tüm kuyucuklara 13 µL Reagent 2 ilave edilip inkübe edildi. 660 nm'de mikroplate okuyucuda ikinci ölçüm yapıldı. (Biotek Elx 808 - 660nm)

3.6. Araştırma Planı ve Takvimi



3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analiz R studio programı (v.0.98.501) ve R script dili kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) kullanılarak incelendi. Tanımlayıcı istatistik; değişkenlerin ortalama ± standart hata (S.E.M) verilerek yapıldı. Gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) testi kullanıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanırsa post hoc test kullanılarak (Holme-Sidak ya da Tukey) ikili karşılaştırmalar yapıldı. p-değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları

Normal meme hücre hattı hem satın alma hem de kültürde idame edilme maliyeti yüksek olduğundan dolayı araştırmaya alınmamıştır**.** Buna karşın her hücre tipi için etken maddenin eklenmediği gruplar 'kontrol' olarak değerlendirilmiştir.

3.9. Etik Kurul Onayı

Araştırma, 02.09.2015 tarihinde 2259-GOA protokol numaralı, 2015/20-11karar numarası ile görüşülmüş ve etik kurul onayı alınmıştır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsünde Temel Onkoloji Anabilim Dalından izin alınmıştır.

4.BULGULAR

4.1. Hücre Canlılık Testi Bulguları

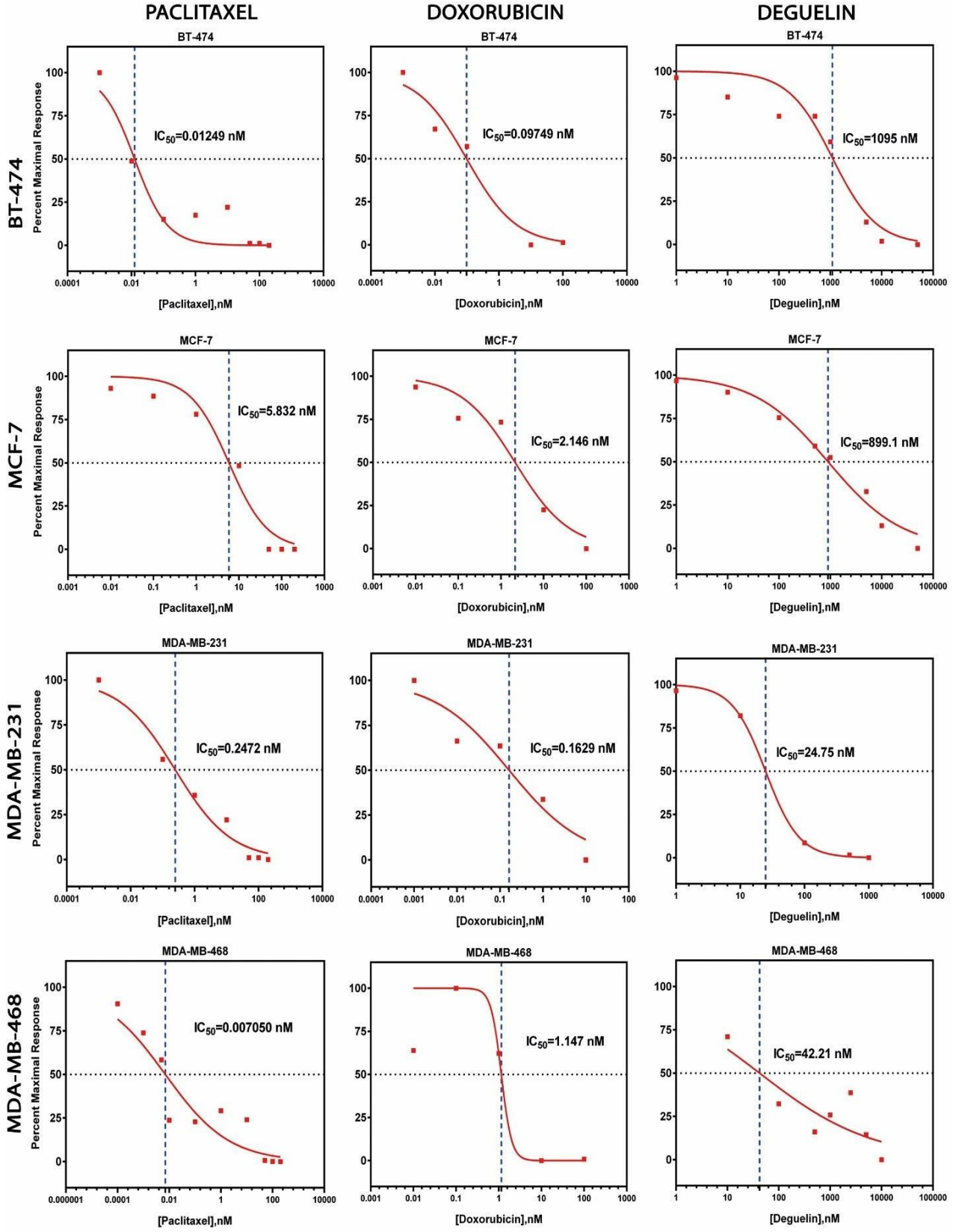
MDA-MB-231, BT-474, MDA-MB-468 ve MCF-7 hücre hatlarında 72 saat süresince doksorubisin, paklitaksel ve deguelin artan konsantrasyonları uygulanarak Doksetaksel konsantrasyonlarının hücre canlılığına etkisi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

72 saatlik doksorubisin (100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM ve 0,01 nM) artan konsantrasyonları uygulaması sonucunda hücre canlılığının %50 oranda azaldığı IC50 dozu MDA-MB-231 hücre hattında 0,1 µM, BT-474 hücre hattında 0,1 µM, MDA-MB-468 hücre hattında 1,5 µM ve MCF-7 hücre hattında 2,5 µM olarak belirlenmiştir.

72 saatlik paklitaksel (200 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM ve 0,01 nM) artan konsantrasyonları uygulaması sonucunda hücre canlılığının %50 oranda azaldığı IC50 dozu MDA-MB-231 hücre hattında 0,5 nM, BT-474 hücre hattında 0,01 nM, MDA-MB-468 hücre hattında 0,01 nM ve MCF-7 hücre hattında 10 nM olarak belirlenmiştir.

72 saatlik deguelin (50000 nM, 10000 nM, 5000 nM, 1000 nM, 500 nM, 100 nM, 10 nM ve 1 nM) artan konsantrasyonları uygulaması sonucunda hücre canlılığının %50 oranda azaldığı IC50 dozu MDA-MB-231 hücre hattında 30 nM, BT-474 hücre hattında 2500 nM, MDA-MB-468 hücre hattında 50 nM ve MCF-7 hücre hattında 1000 nM olarak belirlenmiştir

DMSO grubundaki hücre sayısı ile kontrol grubu arasında hiçbir fark gözlenmediği ve istatistiksel anlamlılık da olmadığı için bundan sonraki diğer çalışmalarda DMSO grubu çalışılmadı.



Şekil 4. 1. Hücre Hatlarında Elde edilen Doksorubisin, Paklitaksel ve Deguelin 72 saatlik IC50 Dozları

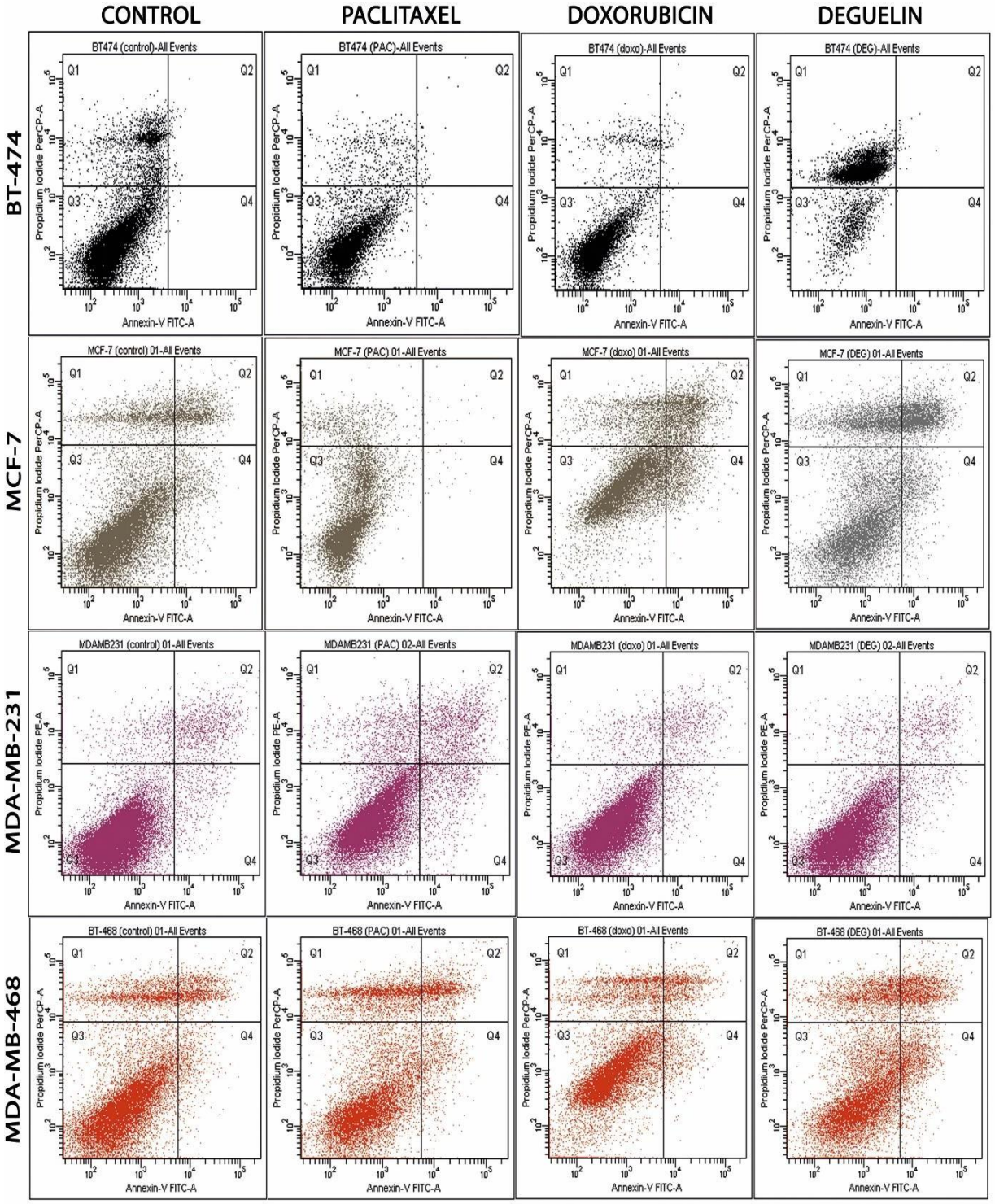
4.2. Akım Sitometrik Analizi

4.2.1. Akım Sitometrik-Apoptoz Analizi

Çalışmada kullanılan hücre hatlarında Deguelinin apoptotik hücre oranını anlamlı ölçüde arttırdığı saptanmıştır (Şekil (4.2), Şekil (4.3), Şekil (4.4), Şekil (4.5) ve Şekil (4.6)).

MDA-MB-231, BT-474, MDA-MB-468 ve MCF-7 hücre hatlarında ilaç grupları ile kontrol grubu arasında apoptoz analizinde Q2+Q4 (Geç+erken apoptoz) faz hücre oranında anlamlı fark elde edildi ($p<0.05$)

MDA-MB-231 hücre hattında Deguelinin Paklitaksel kadar etkili olmasa da Doksorubisinden daha yüksek oranda apoptoza yönlendirdiği, MCF-7 hücre hattında Deguelinin kontrol ve Paklitaksel grubuna arasında anlamlı ölçüde fark olduğu, MDA-MB-468 hücre hattında diğer tüm gruplarla Deguelin arasında anlamlı fark olduğu ve BT-474 hücre hattında ise Deguelinin etkisinin daha az olduğu görülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4. 2. Hücre hatlarında belirlenen IC50 dozları ile 72 saatlik Doksorubisin, Paklitaksel ve Deguelin uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik-Apoptoz Analizi bulguları

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Tube Name: MDAMB231 (control) 01
Record Date: Dec 11, 2015 12:13:35 AM

Population	#Events	%Total
All Events	30,000	100.0
Q1	593	2.0
Q2	998	3.3
Q3	27,963	93.2
Q4	446	1.5

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Tube Name: MDAMB231 (doxo) 01
Record Date: Dec 11, 2015 12:17:56 AM

Population	#Events	%Total
All Events	20,000	100.0
Q1	543	2.7
Q2	631	3.2
Q3	18,506	92.5
Q4	320	1.6

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Tube Name: MDAMB231 (PAC) 01
Record Date: Dec 11, 2015 12:20:58 AM

Population	#Events	%Total
All Events	15,000	100.0
Q1	955	6.4
Q2	1,015	6.8
Q3	12,381	82.5
Q4	649	4.3

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Tube Name: MDAMB231 (DEG) 01
Record Date: Dec 11, 2015 12:23:26 AM

Population	#Events	%Total
All Events	15,000	100.0
Q1	360	2.4
Q2	425	2.8
Q3	13,889	92.6
Q4	326	2.2

Şekil 4. 3. MDA-MB-231 Hücre Hattında Apoptoz Analiz Verileri

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Tube Name: MCF-7 (control) 01
Record Date: Dec 11, 2015 12:27:36 AM

Population	#Events	%Total
All Events	20,000	100.0
Q1	2,220	11.1
Q2	1,327	6.6
Q3	15,672	78.4
Q4	781	3.9

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Tube Name: MCF-7 (doxo) 01
Record Date: Dec 11, 2015 12:29:45 AM

Population	#Events	%Total
All Events	15,000	100.0
Q1	1,981	13.2
Q2	2,330	15.5
Q3	9,349	62.3
Q4	1,340	8.9

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Tube Name: MCF-7 (PAC) 01
Record Date: Dec 11, 2015 12:30:38 AM

Population	#Events	%Total
All Events	15,000	100.0
Q1	5,678	37.9
Q2	25	0.2
Q3	9,275	61.8
Q4	22	0.1

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Tube Name: MCF-7 (DEG) 01
Record Date: Dec 11, 2015 12:31:24 AM

Population	#Events	%Total
All Events	15,000	100.0
Q1	3,160	21.1
Q2	2,757	18.4
Q3	8,208	54.7
Q4	875	5.8

Şekil 4. 4. MCF-7 Hücre Hattında Apoptoz Analiz Verileri

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Specimen Name: 26012017 (Serap)
Tube Name: BT474 (control)

Population	#Events	%Total
All Events	22,080	100.0
Q1	2,631	11.9
Q2	62	0.3
Q3	19,378	87.8
Q4	9	0.0

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Specimen Name: 26012017 (Serap)
Tube Name: BT474 (doxo)

Population	#Events	%Total
All Events	10,000	100.0
Q1	617	6.2
Q2	68	0.7
Q3	9,286	92.9
Q4	29	0.3

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Specimen Name: 26012017 (Serap)
Tube Name: BT474 (PAC)

Population	#Events	%Total
All Events	10,000	100.0
Q1	943	9.4
Q2	52	0.5
Q3	8,993	89.9
Q4	12	0.1

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Specimen Name: 26012017 (Serap)
Tube Name: BT474 (DEG)

Population	#Events	%Total
All Events	10,000	100.0
Q1	8,734	87.3
Q2	32	0.3
Q3	1,233	12.3
Q4	1	0.0

Şekil 4. 5. BT-474 Hücre Hattında Apoptoz Analiz Verileri

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Tube Name: BT-468 (control) 01
Record Date: Dec 11, 2015 12:33:16 AM

Population	#Events	%Total
All Events	20,000	100.0
Q1	2,918	14.6
Q2	1,166	5.8
Q3	15,334	76.7
Q4	582	2.9

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Tube Name: BT-468 (doxo) 01
Record Date: Dec 11, 2015 12:35:12 AM

Population	#Events	%Total
All Events	15,000	100.0
Q1	2,651	17.7
Q2	947	6.3
Q3	10,869	72.5
Q4	533	3.6

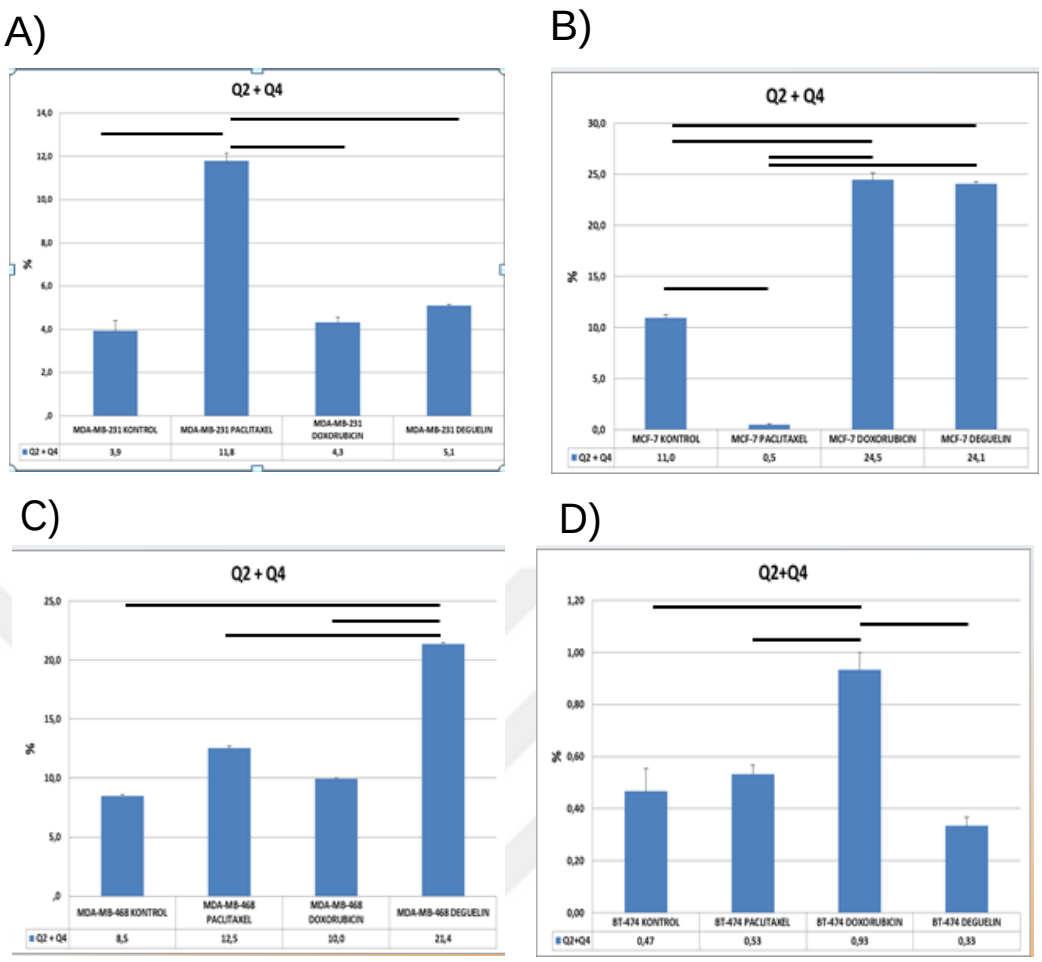
Experiment Name: Annexin-V Experiment
Tube Name: BT-468 (PAC) 01
Record Date: Dec 11, 2015 12:38:27 AM

Population	#Events	%Total
All Events	15,000	100.0
Q1	3,469	23.1
Q2	1,216	8.1
Q3	9,604	64.0
Q4	711	4.7

Experiment Name: Annexin-V Experiment
Tube Name: BT-468 (DEG) 01
Record Date: Dec 11, 2015 12:37:44 AM

Population	#Events	%Total
All Events	15,000	100.0
Q1	2,458	16.4
Q2	1,756	11.7
Q3	9,314	62.1
Q4	1,472	9.8

Şekil 4. 6. MDA-MB-468 Hücre Hattında Apoptoz Analiz Verileri



Şekil 4. 7. Hücre hatlarında Apoptoz Analiz (Q4+Q2) sonuçları

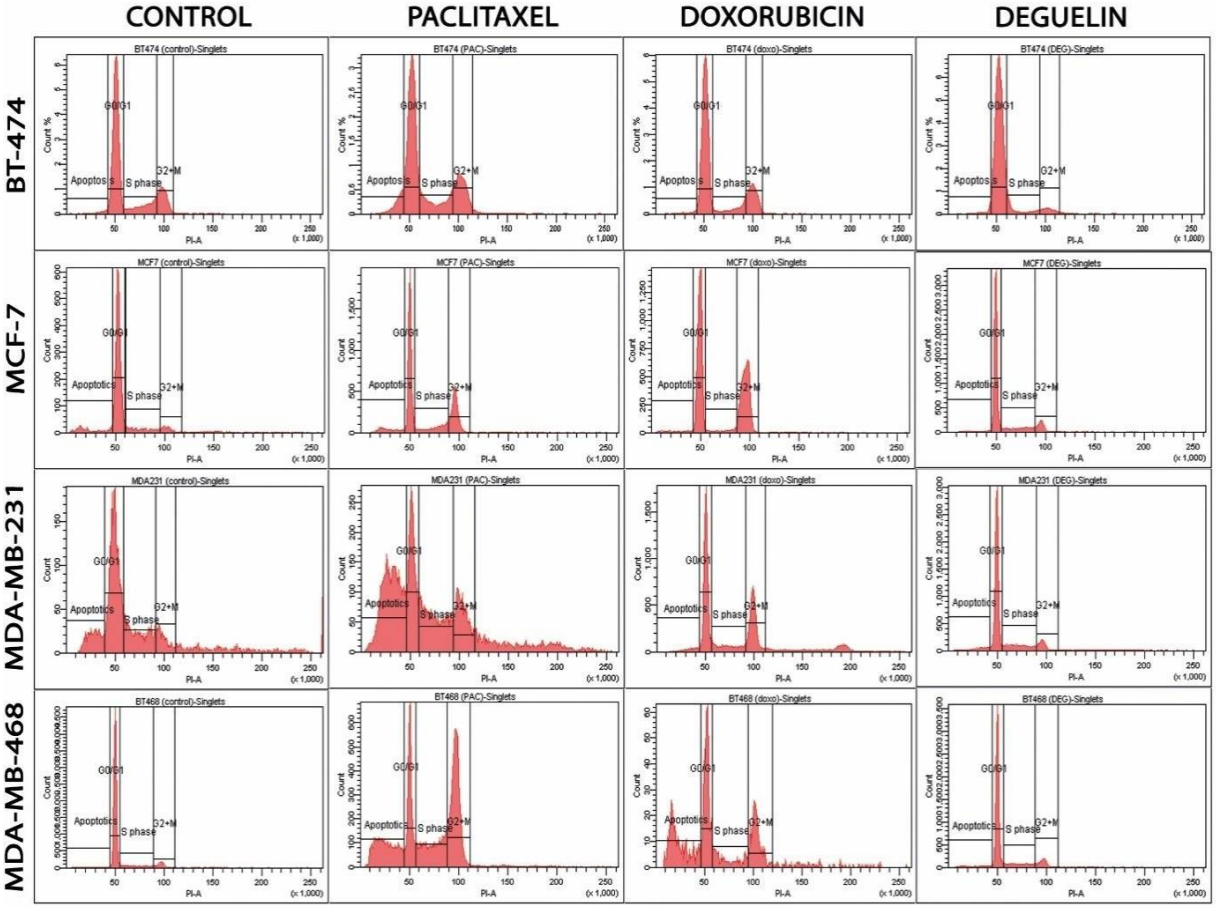
(A: MDA-MB-231 hücre hattı; B: MCF-7 hücre hattı;

C: MDA-MB-468 hücre hattı; D: BT-474 hücre hattı)

4.2.2. Hücre Döngüsü

Hücre hatlarında tüm gruplar arasında hücre döngüsünün özellikle GO/G1 aşamasında hücre oranları arasında anlamlı farklılıklar elde edildi ($p<0.05$).

MDA-MB-231 hücre hattında Deguelin hücre döngüsünün her aşamasında standart ajanlarla benzer özellikler göstermiştir. Özellikle Deguelin ile kontrol grubu ve Deguelin ile Paklitaksel grubu arasında GO/G1 faza giren hücre yüzdesinde anlamlı fark elde edildi ($p<0.05$). MCF-7, MDA-MB-468 ve BT-474 hücre hatlarında ise Deguelin, Doksorubisin ve Paklitaksel grupları ile benzer özellik göstermiştir. GO/G1 fazındaki etkisi ise bu ajanlara göre anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0.05$) (Şekil (4.8), Şekil (4.9), Şekil (4.10) ve Şekil (4.11)).



Şekil 4. 8. Hücre hatları üzerinde belirlenen IC50 dozları ile 72 saatlik Doksorubisin, Paklitaksel ve Deguelin uygulaması sonucu elde edilen Akım Sitometrik Hücre Döngüsü Analiz bulguları

Specimen Name: 10122015-MDAMB231(Serap)
Tube Name: MDA231 (control)
Record Date: Dec 11, 2015 4:55:37 AM

Population	#Events	%Parent	%Total	PI-A Mean
Singlets	3,971	19.9	19.9	73,064
Apoptotics	466	11.7	2.3	27,758
G0/G1	1,862	46.9	9.3	49,438
S phase	743	18.7	3.7	74,058
G2+M	307	7.7	1.5	98,810

Specimen Name: 10122015-MDAMB231(Serap)
Tube Name: MDA231 (doxo)
Record Date: Dec 11, 2015 4:58:46 AM

Population	#Events	%Parent	%Total	PI-A Mean
Singlets	17,679	88.4	88.4	82,994
Apoptotics	563	3.2	2.8	34,194
G0/G1	7,433	42.0	37.2	50,588
S phase	2,150	12.2	10.8	72,287
G2+M	5,087	28.8	25.4	99,446

Specimen Name: 10122015-MDAMB231(Serap)
Tube Name: MDA231 (PAC)
Record Date: Dec 11, 2015 5:06:02 AM

Population	#Events	%Parent	%Total	PI-A Mean
Singlets	10,564	52.8	52.8	70,385
Apoptotics	3,626	34.3	18.1	30,272
G0/G1	2,023	19.1	10.1	51,913
S phase	2,108	20.0	10.5	74,478
G2+M	1,401	13.3	7.0	103,270

Specimen Name: 10122015-MDAMB231(Serap)
Tube Name: MDA231 (DEG)
Record Date: Dec 11, 2015 5:09:01 AM

Population	#Events	%Parent	%Total	PI-A Mean
Singlets	17,290	86.4	86.4	59,857
Apoptotics	903	5.2	4.5	31,445
G0/G1	11,265	65.2	56.3	49,348
S phase	2,993	17.3	15.0	71,321
G2+M	1,584	9.2	7.9	96,389

Specimen Name: 10122015-MCF7 (Serap)
Tube Name: MCF7 (control)
Record Date: Dec 11, 2015 5:21:45 AM

Population	#Events	%Parent	%Total	PI-A Mean
Singlets	4,654	23.3	23.3	60,188
Apoptotics	411	8.8	2.1	23,753
G0/G1	3,312	71.2	16.6	52,783
S phase	434	9.3	2.2	75,780
G2+M	247	5.3	1.2	102,731

Specimen Name: 10122015-MCF7 (Serap)
Tube Name: MCF7 (doxo)
Record Date: Dec 11, 2015 5:23:58 AM

Population	#Events	%Parent	%Total	PI-A Mean
Singlets	15,410	77.0	77.0	69,497
Apoptotics	410	2.7	2.1	23,438
G0/G1	7,858	51.0	39.3	49,177
S phase	574	3.7	2.9	72,251
G2+M	6,455	41.9	32.3	95,731

Specimen Name: 10122015-MCF7 (Serap)
Tube Name: MCF7 (PAC)
Record Date: Dec 11, 2015 5:32:50 AM

Population	#Events	%Parent	%Total	PI-A Mean
Singlets	13,662	68.3	68.3	66,491
Apoptotics	1,142	8.4	5.7	28,085
G0/G1	6,366	46.6	31.8	50,026
S phase	1,976	14.5	9.9	75,032
G2+M	3,983	29.2	19.9	96,036

Specimen Name: 10122015-MCF7 (Serap)
Tube Name: MCF7 (DEG)
Record Date: Dec 11, 2015 5:36:50 AM

Population	#Events	%Parent	%Total	PI-A Mean
Singlets	15,702	78.5	78.5	58,174
Apoptotics	416	2.6	2.1	31,008
G0/G1	10,981	69.9	54.9	49,484
S phase	2,485	15.8	12.4	72,816
G2+M	1,732	11.0	8.7	95,478

Şekil 4. 9. MDA-MB-231 ve MCF-7 Hücre Hatlarında Hücre Döngüsü Analiz Verileri

Specimen Name: 10122015-BT468 (Serap)
Tube Name: BT468 (control)
Record Date: Dec 11, 2015 5:41:55 AM

Population	#Events	%Parent	%Total	PI-A Mean
Singlets	17,969	89.8	89.8	55,339
Apoptotics	478	2.7	2.4	29,752
G0/G1	14,254	79.3	71.3	50,058
S phase	1,847	10.3	9.2	70,481
G2+M	1,308	7.3	6.5	96,385

Specimen Name: 10122015-BT468 (Serap)
Tube Name: BT468 (doxo)
Record Date: Dec 11, 2015 5:52:01 AM

Population	#Events	%Parent	%Total	PI-A Mean
Singlets	1,084	5.4	5.4	63,199
Apoptotics	325	30.0	1.6	24,076
G0/G1	351	32.4	1.8	52,029
S phase	115	10.6	0.6	72,916
G2+M	233	21.5	1.2	103,185

Specimen Name: 10122015-BT468 (Serap)
Tube Name: BT468 (PAC)
Record Date: Dec 11, 2015 5:55:30 AM

Population	#Events	%Parent	%Total	PI-A Mean
Singlets	15,127	75.6	75.6	68,990
Apoptotics	3,275	21.7	16.4	25,673
G0/G1	2,920	19.3	14.6	50,406
S phase	3,085	20.4	15.4	73,270
G2+M	5,537	36.6	27.7	96,965

Specimen Name: 10122015-BT468 (Serap)
Tube Name: BT468 (DEG)
Record Date: Dec 11, 2015 5:58:40 AM

Population	#Events	%Parent	%Total	PI-A Mean
Singlets	16,364	81.8	81.8	57,212
Apoptotics	783	4.8	3.9	27,131
G0/G1	11,631	71.1	58.2	50,191
S phase	2,158	13.2	10.8	71,824
G2+M	1,729	10.6	8.6	96,293

Specimen Name: 26012017 (Serap)
Tube Name: BT474 (control)
Record Date: Jan 26, 2017 11:42:15 ...

Population	#Events	%Parent
Singlets	13,920	69.6
Apoptosis	269	1.9
G0/G1	9,027	64.8
S phase	2,078	14.9
G2+M	2,413	17.3

Specimen Name: 26012017 (Serap)
Tube Name: BT474 (doxo)
Record Date: Jan 26, 2017 11:46:52 ...

Population	#Events	%Parent
Singlets	13,370	66.8
Apoptosis	202	1.5
G0/G1	9,225	69.0
S phase	1,152	8.6
G2+M	2,683	20.1

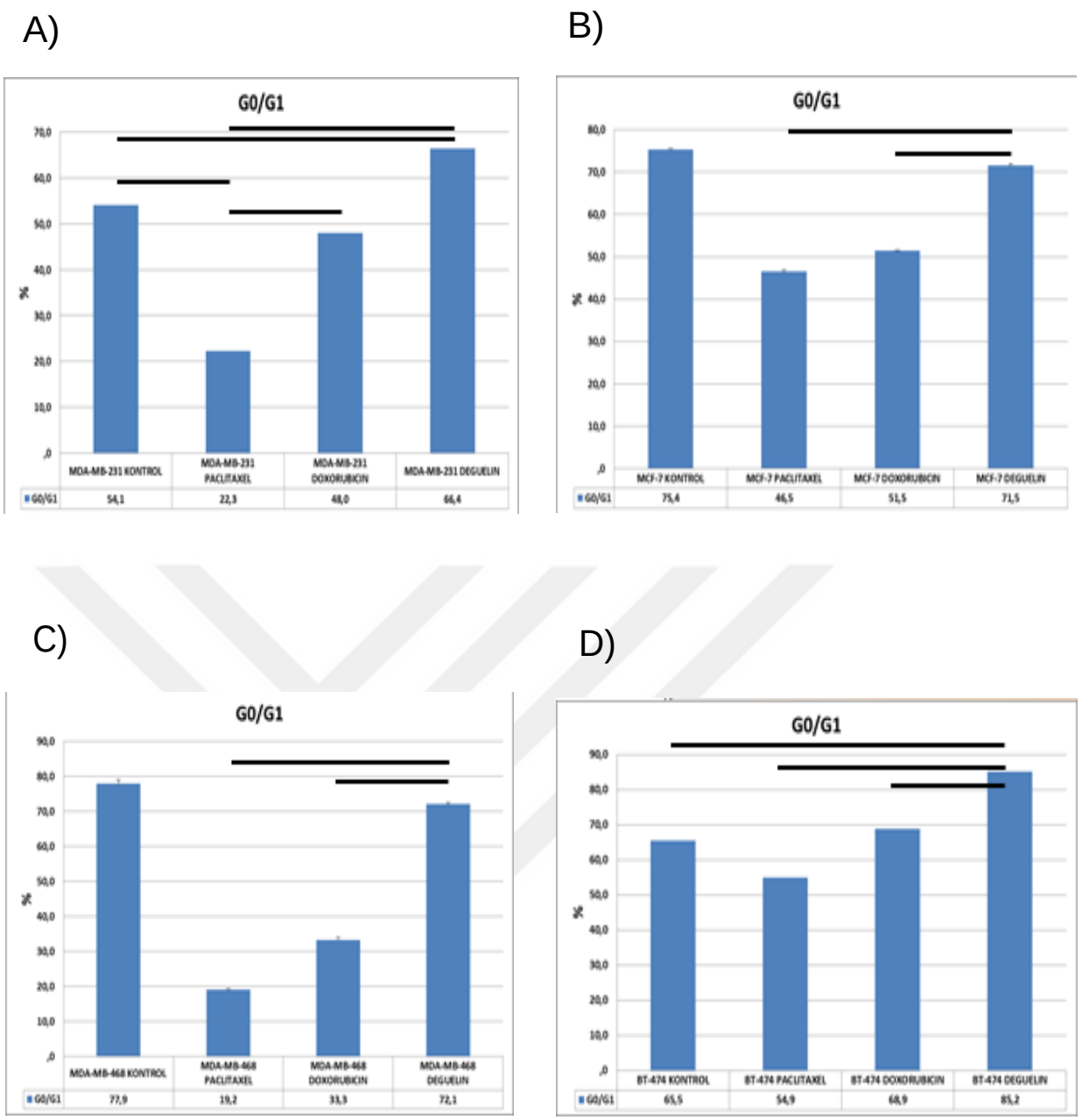
Specimen Name: 26012017 (Serap)
Tube Name: BT474 (PAC)
Record Date: Jan 26, 2017 11:49:23 ...

Population	#Events	%Parent
Singlets	11,524	57.6
Apoptosis	871	7.6
G0/G1	6,188	53.7
S phase	1,839	16.0
G2+M	2,366	20.5

Specimen Name: 26012017 (Serap)
Tube Name: BT474 (DEG)
Record Date: Jan 26, 2017 11:51:43 ...

Population	#Events	%Parent
Singlets	15,485	77.4
Apoptosis	281	1.8
G0/G1	13,080	84.5
S phase	1,199	7.7
G2+M	749	4.8

Şekil 4. 10. MDA-MB-468 ve BT-474 Hücre Hatlarında Hücre Döngüsü Analiz Verileri



Şekil 4. 11. Hücre Hatlarında Hücre Döngüsü Analiz (G0/G1) sonuçları

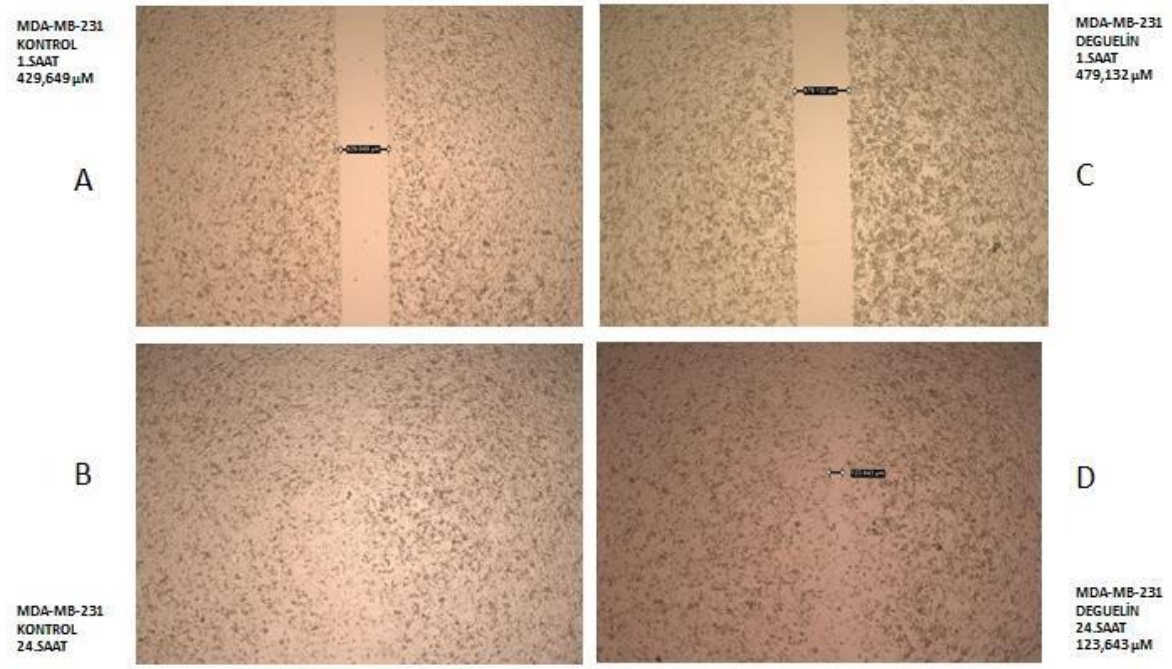
(A: MDA-MB-231 hücre hattı; B: MCF-7 hücre hattı;

C: MDA-MB-468 hücre hattı; D: BT-474 hücre hattı)

4.3. Wound Healing Assay (Migrasyon Analizi)

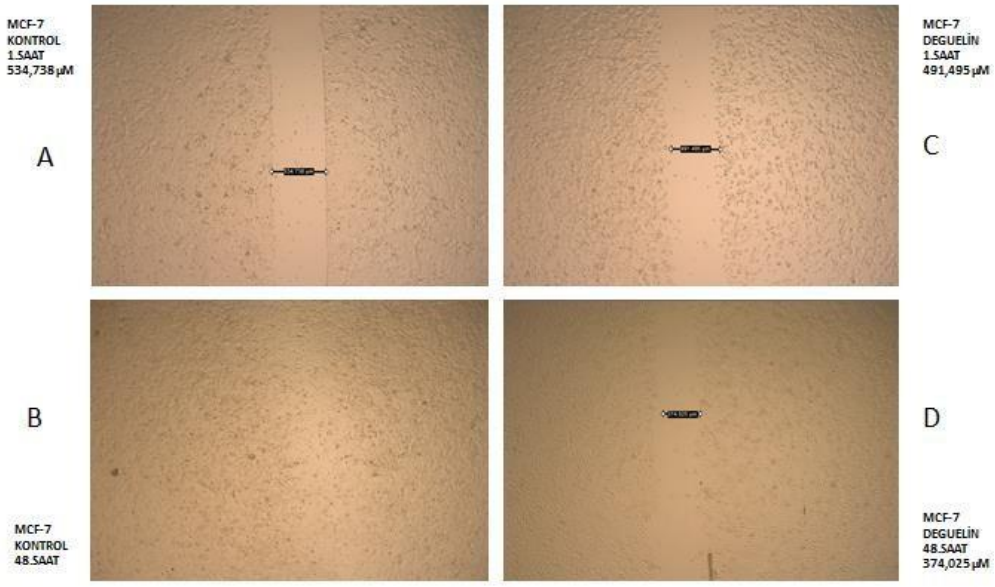
Hücre hatlarında kontrol ve Deguelin grupları arasında migrasyon analizi yapıldı. MDA-MB-231 hücre hattında 24 saat, MCF-7 hücre hattında 48 saat, MDA-MB-468 ve BT-474 hücre hatlarında ise 58 saat sonunda elde edilen sonuçlara göre deguelin‘e maruz bırakılan tüm hücre hatlarında hücrelerin üreme ve çoğalma hızının inhibe edildiği gözlenmiştir (Şekil (4.12), Şekil (4.13), Şekil (4.14), Şekil (4.15) ve Şekil (4.16)).

MDA-MB-231 hücre hattı agresif ve daha hızlı çoğalan bir hücre hattı olduğu için Deguelin‘in etkisinin diğer hücre hatlarına göre daha az olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12).



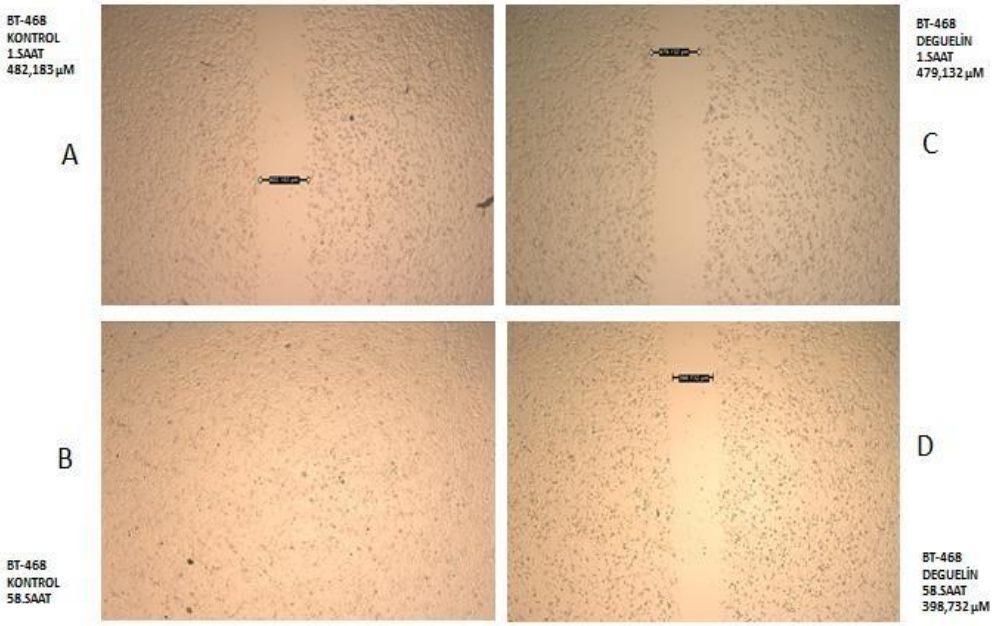
Şekil 4. 12. MDA-MB-231 hücre hattında migrasyon analizinde mikroskop altında 4X‘lik büyütmede 1. ve 24. saat sonunda fotoğraflanan yara iyileşme süreci

(**A:** MDA-MB-231 hücre hattında kontrol grubunda 1.saat sonunda ayrık bölgenin mesafesi 429,649 µm. **B:** MDA-MB-231 hücre hattında kontrol grubunda 24. saat sonunda ayrık bölge hücreler ile kapanmış. **C:** MDA-MB-231 hücre hattında deguelin grubun 1.saat sonunda ayrık bölgenin mesafesi 479,132 µm. **D:** MDA-MB-231 hücre hattında deguelin grubun 24. saat sonunda ayrık bölge 123,643 µm)



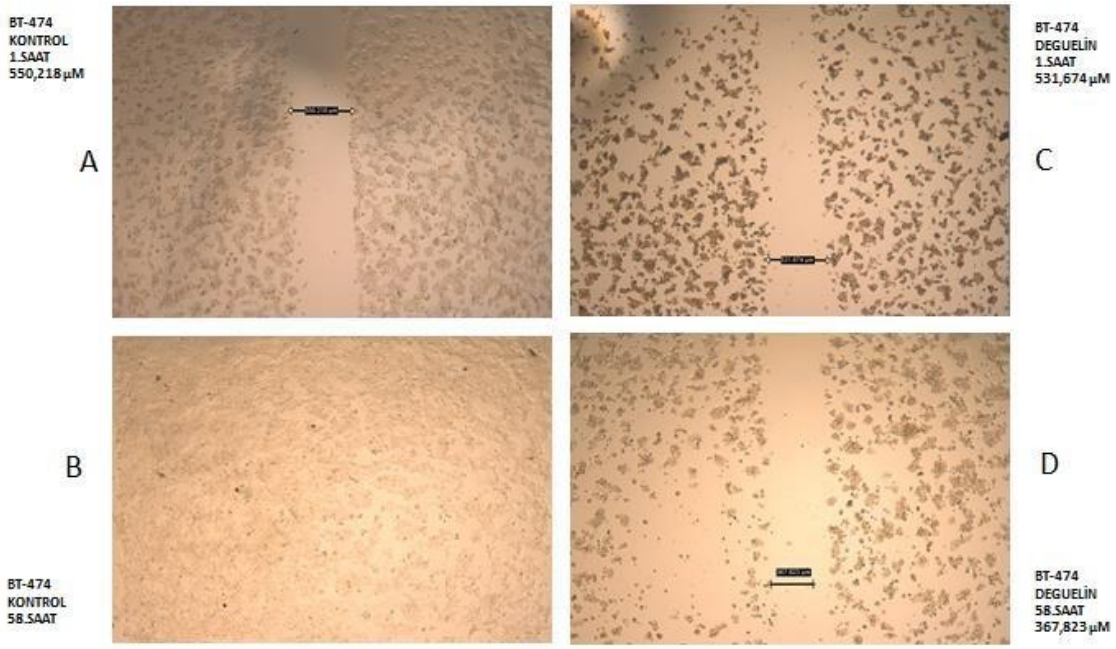
Şekil 4. 13. MCF-7 hücre hattında migrasyon analizinde mikroskop altında 4X'lik büyütmede 1. ve 48. saat sonunda fotoğraflanan yara iyileşme süreci

(**A:** MCF-7 hücre hattında kontrol grubunda 1.saat sonunda ayrık bölgenin mesafesi 534,738 µm. **B:** MCF-7 hücre hattında kontrol grubunda 48. saat sonunda ayrık bölge hücreler ile kapanmış. **C:** MCF-7 hücre hattında deguelin grubun 1.saat sonunda ayrık bölgenin mesafesi 491,495 µm. **D:** MCF-7 hücre hattında deguelin grubun 24. saat sonunda ayrık bölge 374,025 µm)



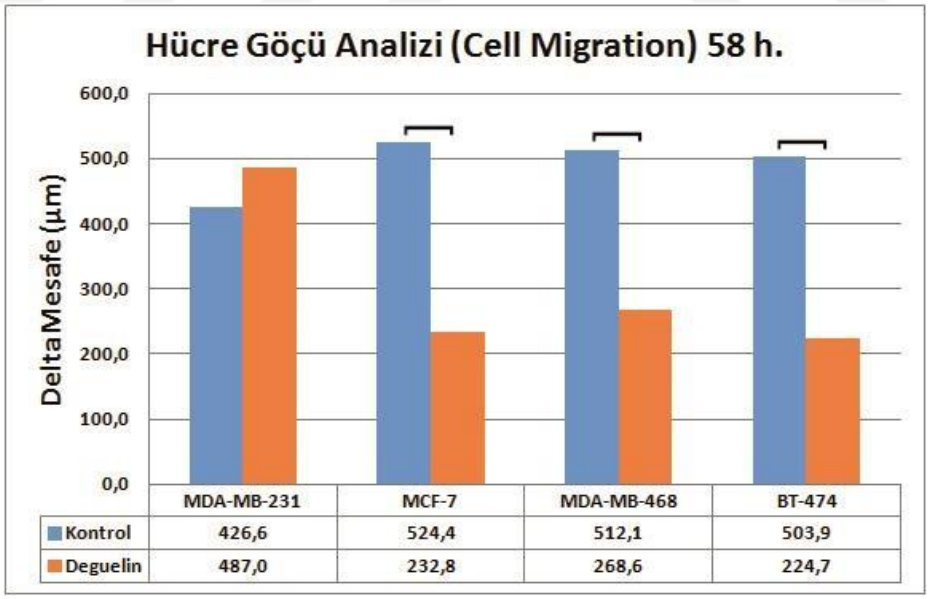
Şekil 4. 14. MDA-MB-468 hücre hattında migrasyon analizinde mikroskop altında 4X'lik büyütmede 1. ve 58. saat sonunda fotoğraflanan yara iyileşme süreci

(**A:** MDA-MB-468 hücre hattında kontrol grubunda 1.saat sonunda ayrık bölgenin mesafesi 482,83 µm. **B:** MDA-MB-468 hücre hattında kontrol grubunda 58. saat sonunda ayrık bölge hücreler ile kapanmış. **C:** MDA-MB-468 hücre hattında deguelin grubunda 1.saat sonunda ayrık bölgenin mesafesi 479,132 µm. **D:** MDA-MB-468 hücre hattında deguelin grubun 58. saat sonunda ayrık bölge 398,732 µm)



Şekil 4. 15. BT-474 hücre hattında migrasyon analizinde mikroskop altında 4X'lik büyütmede 1. ve 58. saat sonunda fotoğraflanan yara iyileşme süreci

(**A:** BT-474 hücre hattında kontrol grubunda 1.saat sonunda ayrık bölgenin mesafesi 550,218 µm.
B: BT-474 hücre hattında kontrol grubunda 58. saat sonunda ayrık bölge hücreler ile kapanmış.
C: BT-474 hücre hattında deguelin grubun 1.saat sonunda ayrık bölgenin mesafesi 531,674 µm.
D: BT-474 hücre hattında deguelin grubun 58. saat sonunda ayrık bölge 367,823 µm)

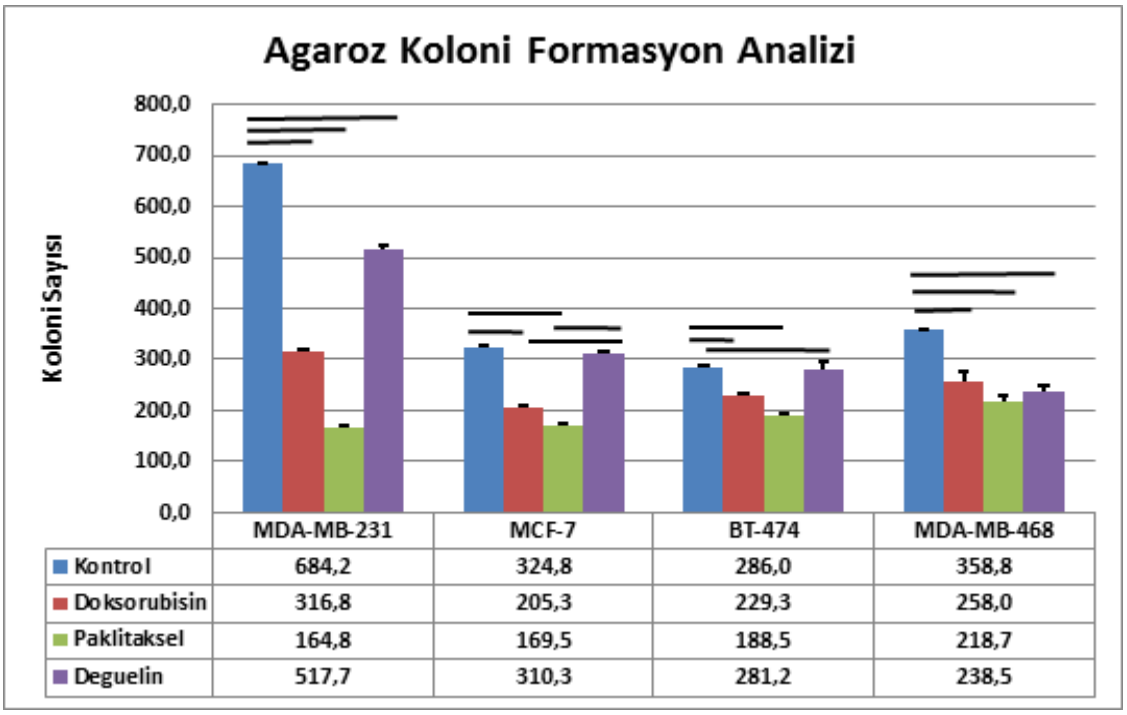


Şekil 4. 16. Hücre hatlarında migrasyon analizinde başlangıca göre fark grafiği

4.4. Koloni Formasyon (Agaroz Koloni-3D) Analizi

Yapılan agaroz koloni formasyon analizinde tüm hücre hatlarında Deguelinin etkisi kullanılan diğer ajanlara daha az olmuştur.

Bununla birlikte Deguelin ve kontrol grupları arasında da MCF-7 ve BT-474 hücre hattı hariç anlamlı farklılık bulundu ($p<0.05$) (Şekil 4.17).

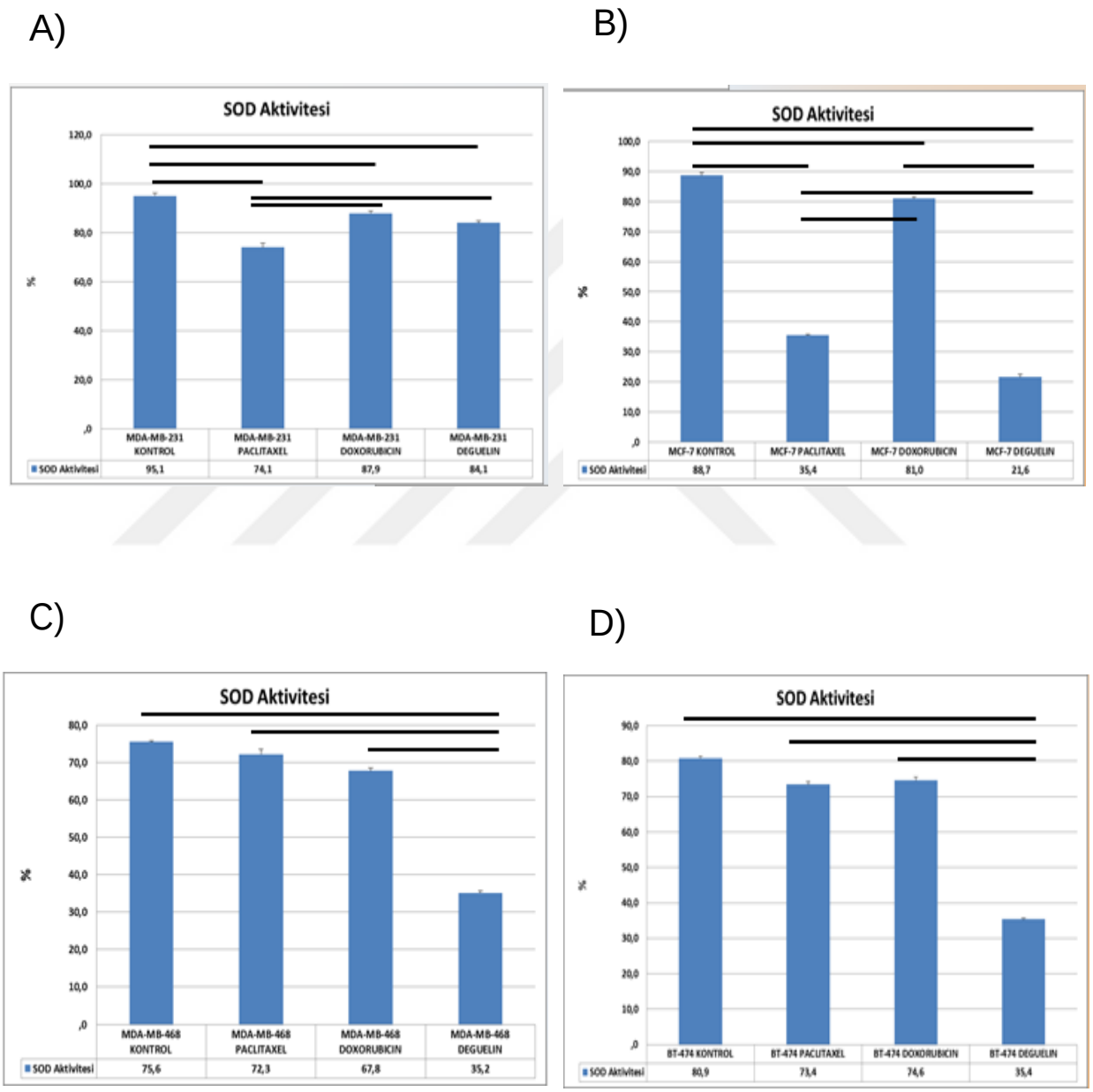


	MDA-MB-231	MCF-7	BT-474	MDA-MB-468
Kontrol	684,2	324,8	286,0	358,8
Doksorubisin	316,8	205,3	229,3	258,0
Paklitaksel	164,8	169,5	188,5	218,7
Deguelin	517,7	310,3	281,2	238,5

Şekil 4. 17. Hücre hatlarında Koloni Sayısı Analiz sonuçları

4.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

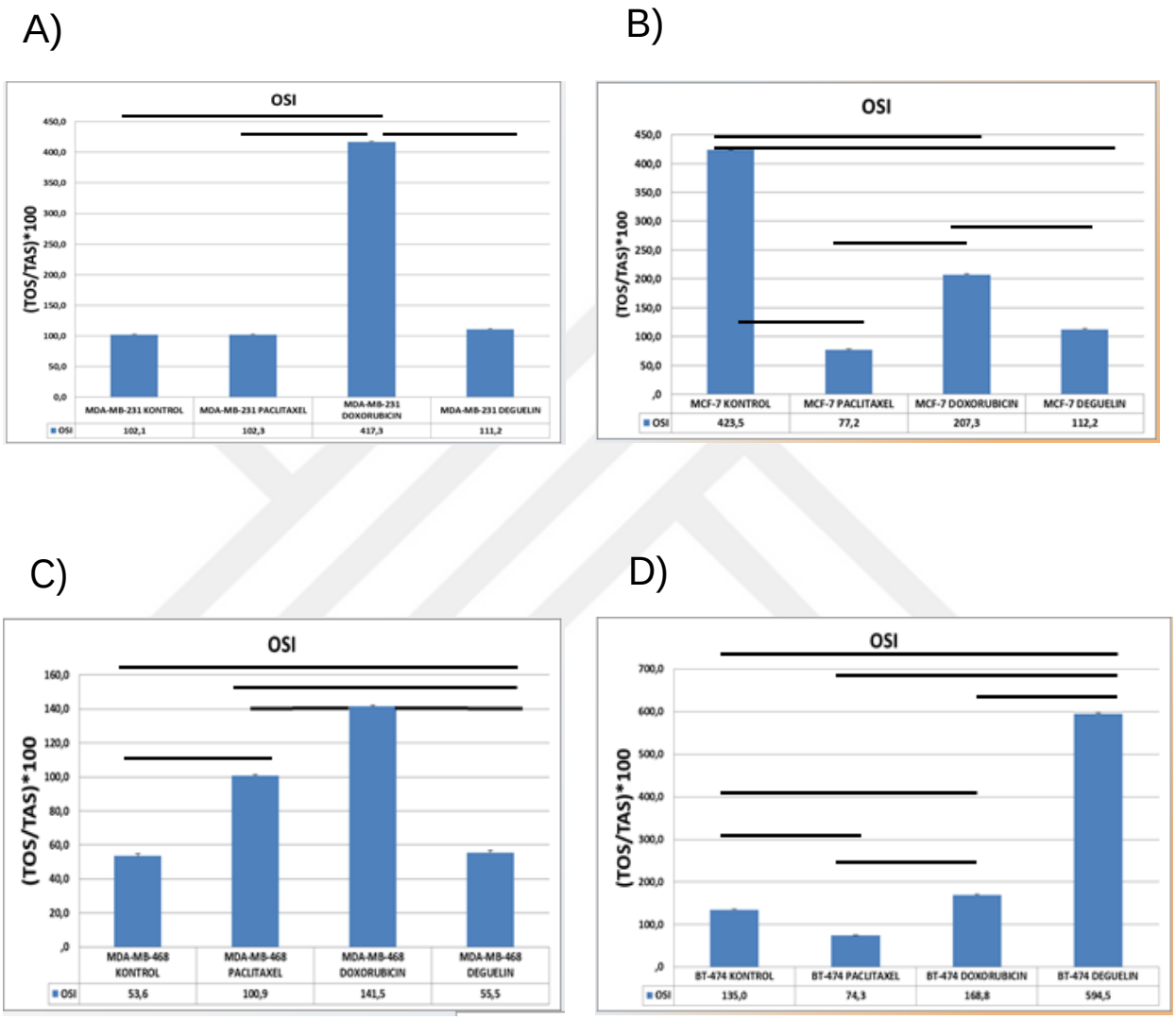
SOD analizi sonuçlarına göre tüm MDA-MB-231 hücre hattı hariç diğer hücre hatlarında SOD aktivitesinde deguelin grubu ile kontrol, doksorubisin ve paklitaksel grupları arasında anlamlı ölçüde farklılık elde edildi ($p<0.05$) (Şekil 4.18).



Şekil 4. 18. Hücre hatlarında SOD Aktivitesi sonuçları
(A: MDA-MB-231 hücre hattı; B: MCF-7 hücre hattı;
C: MDA-MB-468 hücre hattı; D: BT-474 hücre hattı)

4.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Tayini

OSİ analizi sonuçlarına göre tüm MDA-MB-231 hücre hattı hariç diğer hücre hatlarında OSİ değerlerinde deguelin grubu ile kontrol, doksorubisin ve paklitaksel grupları arasında anlamlı ölçüde farklılık elde edildi ($p<0.05$) (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Hücre hatlarında OSİ sonuçları

(A: MDA-MB-231 hücre hattı; B: MCF-7 hücre hattı;

C: MDA-MB-468 hücre hattı; D: BT-474 hücre hattı)

5.TARTIŞMA

Meme kanseri tedavisinde kullanılan ajanlar genellikle oldukça toksiktir. Doksorubisin ve Paklitaksel bu ajanlar içinde en sık kullanılanlarındandır. Doksorubisin, fazla yan etkisi olan etkili kemoterapik bir ajandır. En önemli yan etki doza bağlı olarak ortaya çıkan kronik kardiyomiyopatidir. Bunun dışında saç dökülmesi, kemik iliği supresyonu, lokal toksisite, mukozit, nefrotoksisite sık görülen yan etkileridir (107). Paklitaksel klinikte uygulanan ilk taksan türevidir. Nötropeni, aşırı duyarlılık, dispne, hipotansiyon, ürtiker, mukoza iltihabı, nörotoksisite, periferal nöropati, mide bulantısı, kusma, miyalji, diyare, alopesi (saç dökülmesi), miyopati ve karaciğer fonksiyonlarında artış, pulmoner yağ embolisi sık görülen yan etkilerindendir (97). Bu yan etkiler nedeniyle standart tedaviye alternatif olarak daha potent ve toksisitesi daha az ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Son zamanlarda da, bitkisel ilaçlar çok az yan etkileri ile tedavi seçeneği olarak araştırılmaktadır. Deguelin ise birçok insan kanserine karşı ümit verici flavonoid ailesinin bir bileşiği olan kolon, prostat, insan malign bronşiyal epitelyal hücreleri ve küçük olmayan akciğer kanseri hücre hatlarında apoptozu indüklediği gösterilmiş olan doğal bir bileşiktir (6,7). Bu çalışma, anti-kanser ilaç adayı olabilecek deguelinin meme kanseri hücre hatları üzerindeki etkinliğini denemek ve toksisitesini, meme kanseri standart tedavisinde kullanılan sitotoksik ilaçlar ile karşılaştırmak amacıyla gerçekleştirildi.

Çalışmamızda deguelin, doksorubisin ve paklitaksel'in, MDA-MB-231 (İnvaziv duktal karsinom), MDA-MB-468 (Adenokarsinom), MCF-7 (İnvaziv duktal karsinom-wild type) ve BT-474 (invaziv duktal karsinom) hücre hatlarında hücre canlılığına etki, hücre döngüsü ve apoptoz, koloni sayısı, migrasyon, süperoksit dismutaz ve oksidatif stres üzerine etkileri açısından incelendi. Hücre hatları uygun koşullarda kültüre edildikten sonra hücre canlılık testi CCK-8 kullanılarak her hücrenin her ajan ile hücre canlılığının %50'sini inhibe eden doz (IC50) belirlendi. Günümüz literatüründe deguelinin meme kanseri ile ilgili yayınlanmış çalışmaları henüz çok azdır. Bu çalışma ile deguelinin meme kanseri hücre hatları üzerindeki hücre büyümesi inhibisyonu, hücre döngüsü tutulumu, apoptoz yolakları aktivitesi ve serbest oksijen radikalleri, migrasyon ve anjiyogenez üzerine etkileri standart tedavide kullanılan doksorubisin ve paklitaksel ajanları ile karşılaştırılarakilk kez araştırıldı.

MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7 ve BT-474 hücre hatlarında deguelin'in IC50 dozunu belirlemek için ilk 24 saatlik yapılan deneyler sonrasında sitotoksidite testlerinde IC50 etkinliğinin çok yüksek dozlara çıkması nedeniyle 48 saatlik deneyler yapıldı. Ancak tekrar

yüksek IC50 doz elde edildi ve sonuçta 72 saatlik deneylerde daha düşük dozlarda Deguelin‘in etkili dozu saptandı. Deguelin‘in etkili IC50 dozu 72 saatlik deneyde elde edildiği için dosetakselin de 72 saatlik etkili IC50 dozu belirlendi. Hücre hatlarının IC50 dozlarına bakıldığında, MCF-7 hücre hattında doksorubisin, paklitaksel ve deguelin dozları diğer hücre hatlarına göre daha yüksek bulunmuştur (doksorubisin:2,5 µM, paklitaksel:10 nM, deguelin:1000 nM). Deguelin‘in etkin dozu ise BT-474 hücre hattında ve MCF-7 hücre hattında daha yüksek saptandı (BT-474 hücre hattında 2500 nM, MCF-7 hücre hattında 1000 nM). Belirlenen IC50 dozları ile hücreler akım sitometrik olarak apoptoz ve hücre döngüsü analizleri gerçekleştirilmiştir.

Thamilselvan ve ark. prostat kanseri hücre hatlarında deguelin çalışmasında 72 saatlik degulinin etkin dozu nM olarak elde edilmesi (127), yapılan başka bir çalışmada MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 hücre hatlarında 72 saatlik doz sonucu IC50 dozunun nM olarak bulunması bu çalışmada elde edilen analiz sonuçlarını desteklemektedir (128).

72 saatlik Doksorubisin, Paklitaksel ve Deguelin uygulamasından sonra elde edilen bulgular, Deguelinin MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve BT-474 hücre hatlarının hepsinde hücreleri hücre döngüsünün GO/G1 fazında tutulumunu istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırdığını göstermiştir. Rajendra G. Mehta ve arkadaşları meme kanseri hücre hatlarında yaptıkları çalışmada MCF-7 ve BT-474 hücre hatlarında 72 saatlik Deguelin uygulaması sonucunda G1 fazında tutulumun fazla olduğunu göstermişlerdir (129). Apoptoz analizlerinde ise, MCF-7 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Deguelinin hücreleri apoptoza (geç+erken apoptoz) anlamlı ölçüde daha fazla yönlendirdiği, MDA-MB-231 ve BT-474 hücre hatlarında ise Deguelinin apoptoz etkisinin diğer ajanlara kıyasla daha az olduğu saptanmıştır. Meme kanseri, kronik lenfotik lösemi ve hepoteselüler karsinoma gibi hücre hatlarında yapılan çalışmalarda da Deguelinin hücreleri apoptoza yönlendirdiği bildirilmiştir (129,130,131).

Komşu dokuları istila etme (invazyon) ve uzak bölgelere metastaz yapabilme yeteneği kanser hücrelerinin en önemli ayırt edici özelliğidir. Ajanların bu özellikler üzerindeki etkilerini tespit edebilmek için migrasyon analizi ve 3D yapıları ile ilgili koloni formasyon analizi yapılmıştır. Yapılan Wound Healing analizine göre, deguelin‘e maruz bırakılan tüm hücre hatlarında hücrelerin üreme ve çoğalma hızının inhibe edildiği gözlenmiştir. Jing-Gung Chung ve ark. insan akciğer kanseri hücre hattı üzerinde yaptıkları çalışmada Deguelinle tedavi edilen grupta migrasyon hızında azalma ve yara açıklığında daha yavaş kapanma gözlenmiştir (132). Benzer şekilde Honggang Zhao ve ark. tarafından yapılan çalışmada da deguelinin

akciğer kanseri hücre hatları olan A549 ve H460 hücre hatlarında migrasyon ve invazyonu baskıladığı bildirilmiştir (133). MDA-MB-231 hücre hattı agresif ve daha hızlı çoğalan bir hücre hattı olduğu için deguelin‘in etkisinin diğer hücre hatlarına göre daha az olduğu görülmektedir. Agaroz koloni formasyon analizinde kullanılan tüm hücre hatlarında feguelinin etkisi diğer ajanlara göre daha az olmuştur. Ancak kontrol grubu ile feguelin grubu arasında farklılık bulunmuştur.

Kanser hücreleri; karsinojenez uyarılması, anormal metabolik aktivite ve mitokondriyal hasarla sonuçlanan yüksek hücre içi reaktif oksijen radikalleri stresi (ROS) ile karakterizedir (134). Oksidatif stres, hücresel metabolizma sırasında oluşan reaktif oksijen türlerinin artışı (ROS) ile onları detoksifiye eden antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır (135). Oksidatif stres dengesi kanser gelişimi ve antikanser tedavi cevabında önemli bir faktördür. Tümor gelişimi ile ilgili birçok sinyal yolağı reaktif oksijen radikalleri ile dolaylı ya da direk mekanizmalarla düzenlenir (136). Süper oksit dismutaz (SOD) enzimi, antioksidan enzimlerde en önemlisidir. Süperoksit radikalinin moleküler oksijene ve hidrojen peroksite dönüşümünü katalizler ve hücre içinde süperoksit radikal seviyesini azaltılır. Organizmada radikallere karşı ilk savunma süperoksit dismutaz sayesinde gerçekleşir (137). Çalışmada yer alan tüm hücre hatlarında değerledirme yapılabilmesi için antikanser belirteçlerden olan oksidatif stres (OSİ) ve süperoksit dismutaz (SOD) parametreleri karşılaştırıldı. Deguelin'in, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 hücre hatlarında standart kemoterapötiklerden anlamlı ölçüde daha etkili olarak SOD ve OSİ değerlerini azalttığı görüldü. BT-474 hücre hattında ise deguelin kontrol ve diğer standart kemoterapötiklere göre SOD aktivitesini düşürmesine rağmen, OSİ parametresinde kontrol grubuna göre belirgin yüksek değer elde edildi.

Dr. Fengrui Yang ve ark. yaptığı bir çalışmada deguelin ile tedavi edilen diabet hastası ratlarda deguelinin oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (138).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Deguelin'in; meme kanseri hücre hatlarında bulunan etkin konsantrasyonda kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği hipotezi elde ettiğimiz bulgular ile doğrulandı.

Yapılan apoptoz ve hücre döngüsü analizlerinde ise Deguelinin diğer ajanlara kıyasla hücreleri anlamlı ölçüde daha faza apoptoza (geç+erken apoptoz) yönlendirdiği ve hücreleri kanser çoğalmasının önlenmesinde önemli bir faz olan GO/G1 fazında tutulumunu arttırdığı gözlenmiştir.

Migrasyon analizinde literatürle uyumlu şekilde Deguelinin hücre migrasyon ve invazyonunu inhibe ettiği gözlenerek hipotezimiz doğrulandı. Ancak yapılan koloni formasyon analizinde ise kullanılan tüm hücre hatlarında Deguelinin etkisi diğer standart tedavide kullanılan ajanlara göre daha az olmasına rağmen kontrol grubu ile arasında farklılık bulunmaktadır.

Deguelin, meme kanseri hücre hatlarında antikanser ilaç adayı olarak etkilidir. Bu etkinin standart tedavide kullanılan Doksorubisin ve Paklitaksel ajanları ile antikanser etkinliği ve bu etkinin mekanizmalarının çalışmaları tez araştırmasında yapılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda bu anti-kanser ajanların kombine ve tek başına Deguelin etkisinin *in vivo* araştırmalarda test edilmesi gerektiğini düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. Global cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians, (2011), 61, 69–90.

2. National Cancer Institute, 2015

3. Desantis, C., Siegel, R., Bandi, P., & Jemal, A. ,Breast cancer statistics, CA: A Cancer Journal for Clinicians, (2011), 61, 408–418

4. Carlsson A., Wingren C., Kristensson M., Rose C., and at all., Molecular serum portraits in patients with primary breast cancer predict the development of distant metastases, (2011), PNAS

5. Han D., Li S., at all. LKB1/AMPK/mTOR Signaling Pathway in Non-small-cell Lung Cancer. Asian Pac J Cancer Prev, 14 (7), 4033-4039.

6. Yan Y., Wang Y., at all. Efficacy of Deguelin and Silibinin on Benzo (a) pyrene-Induced Lung Tumorigenesis in A/J Mice1. Neoplasia (2005) 7, 1053–1057.

7. G. Murillo, G. I. Salti, J. W. Kosmeder IIb, J. M. Pezzuto, R. G. Mehta, Deguelin inhibits the growth of colon cancer cells through the induction of apoptosis and cell cycle arrest, European Journal of Cancer 38, (2002), 2446–2454

8. Chun KH, Kosmeder JW, Sun S, et al. Effects of deguelin on the phosphatidyinositol 3-kinase/akt pathwayand apoptosis in premalignant human bronchial epithelial cells. J Natl Cancer Inst, (2003), 95:291–302.

9. Lee HY. Molecular mechanisms of Deguelin induced apoptosis in transformed human bronchial epithelial cells. Biochem Pharmacol, (2004), 68:1119–24.

10. Kim WY., Chang DJ., at all. A Novel Derivative of the Natural Agent Deguelin for Cancer Chemoprevention and Therapy. Cancer Prev Res (2008); 1: 577-587.

11. Abdolmohammadi M.H., Fouladdel Sh., Shafiee A., Amin Gh., Ghaffari S.M, Azizi E., Anticancer effects and cell cycle analysis on human breast cancer T47D cells treated with extracts of Astrodaucus persicus (Boiss.) Drude in comparison to doxorubicin, (2008) DARU Vol. 16, No. 2

12. Van Hensbergen Y., J. Broxterman H., W. Elderkamp Y., Lankelma J., Judith C.C., Marc Heijn B., Boven E., Hoekman K., M. Pinedo H., A doxorubicin-CNGRC-peptide Conjugate with prodrug properties, Biochemical Pharmacology 63 (2002):897-903

13. A. Tapia M., González-Navarrete I., Dalmases A., Bosch M., Rodriguez-Fanjul V., Rolfe M., S. Ross J., at all., Inhibition of the Canonical IKK/NFκB Pathway Sensitizes Human Cancer Cells to Doxorubicin, Cell Cycle, (2007) 6:18, 2284-2292,

14. Gueritte-Voegelein F, Guenard D, Lavelle F, Le Goff MT, Mangatal L, Potier P. Relationships between the structure of taxol analogues and their antimitotic activity. J Med Chem. 1991;34(3):992–998.

15. Onat D. Meme Anatomisi ve Fizyolojisi. Ankara: Türkiye Klinikleri Yayınevi 1996;39:77.

16. Romrell LI, Bland KI. Anatomy of the breast, axilla, chest wall and related metastatic sites. In: Bland KI, Copeland EM, Eds. The breast-Comprehensive management of benign and malignant diseases. 4th Ed. London: Saunders Co, 2009

17. ÖzmenV., Cantürk Z., Çelik V., Güler N., Kapkaç M., Koyuncu A., Müslümanoğlu M., Utkan Z., Meme Hastalıkları Kitabı, Güneş Tıp Kitabevleri, 2012, Bölüm 1, Sayfa 3.

18. Moore KL, Dalley AF. Clinically Oriented Anatomy. In: Thorax: Breast. Moore KL. 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 1999:72-79.

19. Spratt JS, Tabin GR. Gross anatomy of the breast. In: Donegan WL, Spratt JS, eds. Cancer of the breast. 4th edition. Philedelphia. London: W.B.Saunders 1995:22-42.

20. Kopans DB. Breast Imaging. 3rd Edition. Philedelphia: Lipincott Williams & Wilkins 2007

21. Wohlfahrt J, Melby M. Age at any birth is associated with breast cancer risk. Epidemiology. 2004; 12: 68-73

22. Farra WB, Wa1ker MJ, Minton LP. Physiology of the Breast. Cancer of the Breast Ed.Williams 4.Baskl,W.B Saunders, USA: 1995:43-51.

23. Bland Kİ, Edward M, Copeland M. Breast: Physiologic considerations in Normal, Benign and neoplastic States. Physiologic Basis of Modem surgical carte. Mosby, USA:1998:1019-1056

24. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G; Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Cancer Research UK. Epidemiology unit, University of Oxford UK. Endogenous sex hormon and breast cancer in postmenopausal women: J Natl. Cancer Inst. 2002;94 (8): 606-16

25. Sayek İ. Temel Cerrahi 2004; 75:895-897.

26. Ariel MA: Breast cancer, A Historic review: Is the past proloque, in Ariel MA, Cleary JB Breast cancer, diagnosis and treatment. New York, NY, Mc Graw-Hill, 1987

27. Robinson JD: Treatment of breast cancer through the ages. Am J Surg. 1986; 151(3):317-33

28. Halsted WS: A clinical and histological study of certain adenocarsinomata of the breast. Ann Surg 1898; 28: 557

29. Christopher I. Li, MD, PhD, Breast Cancer Epidemiology, Springer ScienceşBusiness Media, LLC 2010

30. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, et al. Thedecrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. N Engl J Med2007;356(16): 1670-4.

31. Hortobagyi GN, Esserman L, Buchholz TA. Neoplasm of the breast. In: Holland JF, Frei E(Eds.). Cancer medicine. 7th ed. London: BC Decker Inc; 2006. p. 1584-1643.

32. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2018. Atlanta, Ga:American CancerSociety, 2008(https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf)

33. Sağlık Bakanlığı Türkiye Sağlık İstatistikleri. (http://www.saglik.gov.tr/)

34. Aydıner A., Topuz E., Meme Kanseri Tanı-Tedavi-Takip, Nobel tıp Kitabevi, 2007, Sayfa 1.

35. Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN (1995) Proportion of breastcancer cases in the United States explained by well-established risk factors. J Natl CancerInst 87:1681–1685

36. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209women with breast cancer and 101,986 women without the disease. Lancet 2001, 358:1389–1399

37. Garber J. Risk Factors. in: Silva EO, Zumda S (Eds.). Breast cancer. 3dh ed. Oxford:Elsevier Saunders; 2005. p26-53.

38. Sheinfeld Gorin S, Albert SM. The meaning of risk to fi rst degree relatives of women with breast cancer. Women Health 2003; 37(3): 97-117

39. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. Triple-negative breast cancer-- current status and future directions. Ann Oncol. 2009;20:1913-27

40. Lynch HT, Synder CL, Riley BD et al. Hereditery breast cancer at the bedside. ASCO Educational Book .2002; 105-15

41. Martin AM, Weber BL: Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. J Natl Cancer. 2000; Inst 92: 1126

42. Box BA, Russel CA. Breast Cancer. In: Casciato DA (Ed.). Manual of clinical oncology. 5th ed.Philedelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2004. p233-53.

43. Wrensch M, Chew T, Farren G, Barlow FB, et al. Risk factors for breast cancer in a population with high incidence rates. Breast Cancer Res 2003; 5(4): 88-102.

44. Mincey BA. Genetics and the management in women at high risk for breast cancer. Oncologist 2003; 8(5): 466-73.

45. Lipworth L, Bailey LR, Trichopoulos D. History of breast- feeding in relation to breast cancer risk: a review of the epidemiologic literatüre 2000; 92 (4) : 302- 12.

46. Brind J, Chinchili V, Severs W, Summy Long J. Induced abortion as an indipendent risk factor for breast cancer: a comprehensive review and meta-analysis. Epidemiol Community Health1996; 50: 481-96

47. Cordera F, Jordan VC. Steroid receptors and their role in the biology and control of breast cancer growth. Semin Oncol 2006;33:631-41.

48. Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, et al. Estrogenreceptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association withgrowth factor receptor expression and tamoxifen resistance. J Natl Cancer Inst2005;97:1254-61.

49. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with Breast cancer and 100 239 women vvithout breast cancer from 54 epidemiological studies. Lancet 1996;347(9017):1713-27.

50. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 vvomen with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Lancet 1997;350(9084):1047-59.

51. Reickman ME, Judd JT, Lonscope C et al. Effect of alcohol consumption on plasma and urinary hormone concentrations in premenopausal women .J Natl Cancer Inst.1993; 85: 722-6

52. Hunter DJ, Spiegelman D, Adam HO, et al, Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer : a pooled analysis: N Engl J Med.1996; 334: 356-61

53. Courneya KS, Katzmarzyk PT, Bacon E. Physical activity and obesity in Canadian Cancer survivors: population-based estimates from the 2005 Canadian Community Health Survey. Cancer In pres 2008.
54. Garber J. Risk Factors. in: Silva EO, Zumda S (Eds.). Breast cancer. 3dh ed. Oxford: Elsevier Saunders; 2005. p26-53.
55. Eliyatkın N., Yalçın E., Zengel B., Aktaş S., Vardar E., Meme Karsinomunda Moleküler Sınıflama: Gelenekselden Yeni Döneme Yolculuk, J Breast Health 2015; 11: 59-66, DOI: 10.5152/tjbh.2015.1669
56. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 2000;406:747-752. (PMID: 10963602)
57. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. Oncogene 2007;26:6469-6487.
58. Wesolowski R, Ramaswamy B. Gene expression profiling: changing face of breast cancer classification and management. Gene Expr 2011;15:105-115.
59. Ergüney S., AJCC Kanser Evreleme Atlası, Nobel Tıp Kitabevi, 2013, Bölüm VII, s. 423-426.
60. Ferahman M., Meme Kanserinde Güncel TNM Evrelemesi, Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: 54 • Aral›k 2006; s. 87 – 91
61. http://www.turkcerrahi.com/makaleler/meme/meme-kanseri/tnm-evrelemesi/, 20/04/2019
62. Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al., Breast. In: eds. *AJCC Cancer Staging Manual.* 6th ed. New York, NY: Springer-Verlag; 2002:223-240.
63. Kinsinger L., Harris R., Lewis C., and Wooddell M., Chemoprevention of breast cancer: recommendations and rationale. Rockville, Md.: Agency for Healthcare Research and Quality; Ann Intern Med. 2002 Jul 2;137(1):56-8.
64. Morrow M, Strom EA, Bassett LW, et al.; American College of Radiology; American College of Surgeons; Society of Surgical Oncology; College of American Pathology. Standard for breast conservation therapy in the management of invasive breast carcinoma. CA Cancer J Clin. 2002;52(5):277-300.

65. Mieog JS, van der Hage JA, van de Velde CJ. Preoperative chemotherapy for women with operable breast cancer. Cochrane Database Syst Rev.2007;(2):CD005002.
66. Lukaszewicz K, Wtorek J, Bujnowski A, et al. *Monitoring of breast tissue thermo-ablation by means of impedance measurements*. J Physics: Conference Series, IOP Publishing; 2010. p. 1–4.
67. Şenel Beşe N., İnvazif Meme Kanserinin Tedavisinde Radyoterapinin Rolü, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No:54, Aralık 2006; s. 115 – 120
68. Ring A, Webb A, Ashley S, et al. Is surgery necessary after complete clinical remission following neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer? *J Clin Oncol.* 2003;21(24):4540-4545.
69. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JP. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(3):188-194.
70. Fisher B, Anderson S, Redmond CK, Wolmark N, Wickerham DL, Cronin WM. Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or vvithout irradiaton in the treatment of Breast cancer. N Engl J Med 1995;333: 1456-61.
71. Veronesi U. Conservation surgery and irradiation in stages 1 and 2 disease. European experience. In: Bland KI, Copeland EM (Eds.) The Breast: Comprehensive management of benign and malignant diseases. 2nd ed. Philedelphia: W.B. Saunders;1998.p.1191-6.
72. Michael H. Torosian, Totowa, NJ, Breast Cancer A Guide to Detection and Multidisciplinary Therapy. Humana Pres. 2002; pp.19-95. 123.
73. Rippon B.M. Invasive Breast Cancer Staging and Treatment. Apractical Approach to Breast Disease. Grady F.L.: Little Brown and Company, Boston, 1995.
74. Harris JR, Morrow M. Treatment of Early Stage Breast Cancer in Harris JR et al(Ed): Diseases of The Breast. Philadelphia, Lippincott, 1996;pp.487-578. 117.
75. Atkins H, Hayward JLI, Klaugman DL. Treatment of Early Breast Cancer, A Report of Ten Years Clinical Trial. Brit. Med. J. 1972;2:423-429.
76. Bevers TB, Anderson BO, Bonaccio E, Buys S, Daly MB, Dempsey PJ., at all., NCCN clinical practice guidelines in oncology: breast cancer screening and diagnosis, J Natl Compr Canc Netw. 2009 Nov;7(10):1060-96.

77. Cotton L, Lafferty K. A New Textbook of Surgery. Hodden and Stoughton, London, 1988; pp.26-75. 125.
78. Frazier G.T. Surgical Treatment of Breast Cancer. Plastic and Reconstructive Surgery1994;531-587. 126.
79. Marchant JD. Invasive Breast Cancer Surgical Treatment Alternatives. Obstetrics and Gynocology Clinics of North America,1994;21:659-672.
80. Yüce Sarı S., Gültekin M., Yıldız F., Meme Kanseri Radyoterapisinde Standartlar, Gelişmeler ve Tartışmalı Konular, Turkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics 2018;11(1):31-40
81. Cinieri S, Orlando L, Fedele P, Cusmai A, D'Amico M, Rizzo P, et al. Adjuvant strategies in breast cancer: new prospectives, questions and reflections at the end of 2007 St Gailen International Expert Consensus Conference. Ann Oncol 2007;18 Suppl 6:63-5.
82. Fugh Berman A, Epstein S. Tamoxifen: disease prevention or disease substitution? *Lancet*. 1992;340(8828):1143–1145.
83. Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators-mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med*. 2003;348(7):618–629.
84. Gose PE, Yow O. An overview of aromatase inhibitors in the treatment of metastatic breast cancer. Current Oncology.2001; 8(2): 1-9
85. Cinieri S, Orlando L, Fedele, et al. Adjuvant strategies in breast cancer: new prospectives, questions and reflections at the end of 2007 St Gailen International Expert Consensus Conference. Ann Oncol. 2007; 18: 63-5.
86. Kettel LM: Clinical application of the antiprogestins Clin Obstet Gynecol .1995; 38:921-34
87. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; 10th St. Gallen conference. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007 [published correction appears in *Ann Oncol.* 2007;18(11):1917]. *Ann Oncol.* 2007;18(7):1133-1144.
88. Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R., Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and

hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overvievv of the randomised trials. Lancet 2005;365(9472):1687-717.

89. Pritchard Ki, Shepherd LE, O'Malley FP, Andrulis IL, Tu D, Bramvvell VH, et al; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. HER2 and responsiveness of Breast cancer to adjuvant chemotherapy. N Engl J Med 2006;354(20):2103-11.
90. Sparano JA. Taxanes for breast cancer: an evidence-based review of randomized phase II and phase III trials. *Clin Breast Cancer*. 2000;1(1):32– 40.
91. Burstein HJ, Manola J, Younger J, et al. Docetaxel administered on a weekly basis for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(6):1212– 1219.
92. Pegram MD, Konecny GE, O Callaghan C, et al. Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(10):739–749.
93. Vu T, Claret FX. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front Oncol*. 2012;2:62.
94. Baselga J, Carbonell X, Caslaneda Soto N, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol*. 2004;23(10):2162–2171.
95. Terwogt, J.M.M., Nuijen, B., Huinink , T., Beijnen, J. H., 1997. Alternative Formulation of Paclitaxel. Cancer Treatment Reviews 23, 87-95. 43.
96. Singla, A., K., Garg, A., Aggarwal, D. 2001. Paclitaxel and Its Formulatins. International Journal of Pharmaceutics 235, 179-192.
97. Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., McPhail, A.T. "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia" J. Am. Chem. Soc, 93(9), 2325-2327 (1971).
98. Panchagnula, R. 1998. Pharmaceutical Aspects of Paclitaxel. . International Journal of Pharmaceutics 172, 1-15.
99. Schiff, P.B., Fant, J., Horwitz, S.B. "Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol" Nature, 277, 665-667 (1979).
100. Belotti, D., Vergani, V., Drudis, T. 1996. The Microtubule-Affecting Drug Paclitaxel Has Antiangiogenic Activity. Clin cancer Res 2: 1843:1849
101. Mastropaolo, D., Camerman, A., Luo, Y., Brayer,G.D., Camermantt, N. 1995. Crystal and molecular structure of paclitaxel (taxol). Proc Natl Acad Sci 92, pp. 6920-6924

102. Kayaalp SO, Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar, Kayaalp SO, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Cilt I, IX. Baskı, HacettepeTAŞ, 2002:394-5. 3.
103. Küçükhüseyin C., Kanser kemoterapisi. Özüner Z. Temel ve Klinik Farmakoloji. 3. baskı Barış Kitabevi, İstanbul, 1995:1116-7.
104. Aubel-Sadron G, Londos-Gagliardi D. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. Biochimie. 1984;66:333-52.
105. William E, Evans et al. Clinical pharmacology of cancer chemotherapy in children, anthracyclines. Saunders, Pediatr Clin North Am, Clinical Pharmacology. 1989;36:1206-9. 59.
106. Çetinkaya Y, Kabakçı MG, Aydemir K, et al. Antrasiklinler ve kalp. İlaç ve Tedavi Dergisi. 1995;8:214-8.
107. Tola HT., Doksorubisin İle Oluşturulan Deneysel Kardiyotoksisite Üzerine N-Asetilsisteinin Biyokimyasal Ve Histopatolojik Düzeylerdeki Koruyucu Etkilerinin Araştırılması, T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Isparta, 2008.
108. Fang N, Casida JE. Anticancer action of cube' insecticide: correlation for rotenoid constituents between inhibition of NADH: ubiquinone oxidoreductase and induced ornithine decarboxylase activities. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:3380–4.
109. Yamamoto Y, Zolfaghari R, Ross AC. Regulation of CYP26 (cytochrome P450RAI) mRNA expression and retinoic acid metabolism by retinoids and dietary vitamin A in liver of mice and rats. FASEB J 2000;14:2119–27.
110. Chun KH, Kosmeder JW III, Sun S, et al: Effects of deguelin on the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and apoptosis in premalignant human bronchial epithelial cells. J Natl Cancer Inst 95: 291-302, 2003
111. Cailleau R, Olive M, Cruciger QV. *Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization*. *In Vitro*, 1978. **14**(11):911– 915.
112. Liu H, Zang C, Fenner MH, Possinger K, Elstner E. *PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro*. Breast Cancer Res Treat, 2003. **79**(1):63-74.

113. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. *Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer*. Breast Dis, 2010. **32**(1-2):35–48.

114. Bates SE, et al. Expression of the transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor receptor pathway in normal human breast epithelial cells. Endocrinology 126: 596-607, 1990.

115. Brinkley BR, et al. Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro. Cancer Res. 40: 3118-3129, 1980.

116. Lasfargues EY, et al. A human breast tumor cell line (BT-474) that supports mouse mammary tumor virus replication. In Vitro 15: 723-729, 1979. PubMed:

117. Lasfargues EY, et al. Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. J. Natl. Cancer Inst. 61: 967-978, 1978

118. Fagan DH, Fettig LM, Avdulov S, Beckwith H, Peterson MS, Ho YY, Wang F, Polunovsky VA, Yee D. , Acquired Tamoxifen Resistance in MCF-7 Breast Cancer Cells Requires Hyperactivation of eIF4F-Mediated Translation. *Horm Cancer*. 2017 Jun 2.

119. Venugopal K, Ahmad H, Manikandan E, Thanigai Arul K, Kavitha K, Moodley MK, Rajagopal K, Balabhaskar R, Bhaskar M.,The impact of anticancer activity upon Beta vulgaris extract mediated biosynthesized silver nanoparticles (ag-NPs) against human breast (MCF-7), lung (A549) and pharynx (Hep-2) cancer cell lines. , *J Photochem Photobiol B*. 2017 May 24;173:99-107

120. Baselga J., Norton L., Albanell J., Kim YM., and Mendelsohn J., Recombinant Humanized Anti-HER2 Antibody (Herceptinâ„¢) Enhances the Antitumor Activity of Paclitaxel and Doxorubicin against HER2/neu Overexpressing Human Breast Cancer Xenografts, CANCER RESEARCH 58. (July 1. I998), 2825-2831.

121. Astashkina, A., Mann, B., Grainger, D. W., A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity, Pharmacology & Therapeutics 134 (2012) 82–106.

122. Lee, E.C., Cytogenetic Analysis of Continuous Cell Lines. In The ACT Cytogenetic Laboratory Manual, Raven Press, New York. 2nd ed. 1991; 2: 107-148.

123. Held P., An Absorbance-based Cytotoxicity Assay using High Absorptivity, Water-soluble Tetrazolium Salts, Applications Dept., BioTek Instruments, Inc., 2009.

124. Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". Journal of Immunological Methods., 1983, 65: 55–63.
125. eBIOSCIENCE Akım Sitometri protokolleri, http://media.ebioscience.com/data/pdf/best-protocols/cell-preparation-for-flow-cytometry.pdf, Erişim Tarihi: 12.02.2013
126. Corsona , T., Soft Agar Colony Formation Assay, PhD, Indiana University School of Medicine, http://iueye.iu.edu/corson, April 2007
127. Thamilselvan V, Menon M, Thamilselvan S. Anticancer efficacy of deguelin in human prostate cancer cells targeting glycogen synthase kinase-3 b/b-catenin pathway. Int. J. Cancer, 2011;129:2916-2927.
128. Suh YA., Kim JH., A Sung M., Boo HJ., Yun HJ., Lee SH., Lee, HJ., Suh YG., Kim KW., and Lee HY., A novel antitumor activity of deguelin targeting the insulin-like growth factor (IGF) receptor pathway *via* up-regulation of IGFbinding protein-3 expression in breast cancer,Cancer Lett. 2013 May 10; 332(1): 102–109.doi:10.1016/j.canlet.2013.01.022.
129. Murillo G., Peng X., E.O. Torres K. and G. Mehta R., Deguelin Inhibits Growth of Breast Cancer Cells by Modulating the Expression of Key Members of the Wnt Signaling Pathway, Cancer Prev Res 2009;2(11) November 2009
130. Geeraerts B., Vanhoecke B., Vanden Berghe W., Philippe J., Offner F., Deforce D., Deguelin inhibits expression of IjBa protein and induces apoptosis of B-CLL cells in vitro, Leukemia, 2007, 21, 1610–1618
131. Lee JH., Lee DH., Lee HS., Choı JS., Kım KW. and Hong SS., Deguelin inhibits human hepatocellular carcinoma by antiangiogenesis and apoptosis, Oncology Reports, 2008, 20: 129-134
132. Hsiao YT., Fan MJ., Huang AC., Lien JC., Lin J., Chen JC., Hsia TC. at all., Deguelin Impairs Cell Adhesion, Migrationand Invasion of Human Lung Cancer Cellsthrough the NF-κB Signaling Pathways, The American Journal of Chinese Medicine, 2018, Vol. 46, No. 1, 209–229
133. Zhao H., Jiao Y. and Zhang Z., Deguelin inhibits the migration and invasion of lung cancer A549 and H460 cells via regulating actin cytoskeleton rearrangement, Int J Clin Exp Pathol 2015;8(12):15582-15590

134. Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. Drug Resist Updat. 2004;7:97–110
135. Weinberg F, Chandel NS: Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. Cell Mol Life Sci 2009, 66:3663–3673.
136. Gorrini C, Harris IS, Mak TW: Modulation of oxidative stress as ananticancer strategy. Nat Rev Drug Discov 2013, 12:931–947.
137. Lau AT, Wang Y, Chiu JF: Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. J Cell Biochem 2008, 104:657–667.
138. Chen J., Liu W., Yi H., Hu X., Peng L. And Yang F., The Natural Rotenoid Deguelin Ameliorates Diabetic Neuropathy by Decreasing Oxidative Stress and Plasma Glucose Levels in Rats via the Nrf2 Signalling Pathway, Cell Physiol Biochem July 25 2018;48:1164-1176, DOI: 10.1159/000491983

8. EKLER

Etik Kurul Raporu

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**etikkurul@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	2259-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Deguelin'in Deneysel Meme Kanseri Tedavisindeki Etkinliğinin Araştırılması	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Hilal KOÇDOR	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2015/20-11**	**Tarih: 02.09.2015**
	Doç.Dr.Hilal KOÇDOR'un sorumlusu olduğu **"Deguelin'in Deneysel Meme Kanseri Tedavisindeki Etkinliğinin Araştırılması"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	katılamadı
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	katılamadı
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	katılamadı
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Müge KİRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda Seren İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	katılamadı
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

SERAP ÇELEBİ YILMAZ

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	41218386968
Doğum Tarihi	06/09/1988
İletişim Adresi	PAŞAALANI MAH. 182. SOK NO:1 KARESİ/BALIKESİR
Telefon	(546) 286 32 54
E-posta	serapcelebi37@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

01 Şubat 2016 - Şu Anda (3 yıl 6 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ (YL) (TEZLİ)

01 Eylül 2012 - Şu Anda (6 yıl 11 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (YL) (TEZLİ)

24 Haziran 2007 - 24 Haziran 2011 (4 yıl 1 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ, BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.28 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Şubat 2013 - Şu Anda (6 yıl 6 ay) (Tam Zamanlı)
DANIŞMAN, DİĞER (Türkiye İş Kurumu)

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)