



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

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNE İMATİNİB MESİLAT VE
TANNİK ASİT UYGULAMASININ MOLEKÜLER DÜZEYDE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve UZLA

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Fulya DOĞANER

AKSARAY, 2021

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 182330004 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Merve UZLA tarafından hazırlanan “**MEME KANSERİ HÜCRELERİNE İMATİNİB MESİLAT VE TANNİK ASİT UYGULAMASININ MOLEKÜLER DÜZEYDE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Fulya DOĞANER

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ahu SOYOCAK

İstanbul Aydın Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Neslihan TEKİN KARACAER

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 24/06/2021

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Doç. Dr. Mehmet Ali HİNİS
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinallliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Merve UZLA



TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmak fırsatını vererek beni onurlandıran, karşılaştığım zorluklar karşısında yardım ve anlayışını esirgemeyen, bana her şeyden önce umudu yitirmemek gerektiğini öğreten saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Fulya DOĞANER'e en içten saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarının yürütüldüğü Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi (ASÜBTAM) yöneticilerine ve çalışanlarına,

Tezimde kullandığım İmatinib Mesilat ilacının teminini sağlayan Neutech şirketine ve saygıdeğer kuzenim Murat GÜLER'e,

Zorlu geçirdiğim süreçlerde her zaman özveri, sabır ve sevgileriyle destek olan aileme, manevi kız kardeşim Tuba Gök ve ailesine ayrıca her daim yanımda desteğini esirgemeyen nişanlım Sezer Ataman'a sonsuz teşekkürler.

Merve UZLA
AKSARAY, 2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ	3
2.1 Meme Kanseri	3
2.2 Meme Kanseri Risk Faktörleri, Teşhis ve Tedavi.....	6
2.3 Imatinib Mesilat (IM).....	8
2.4 Tannik Asit (TA).....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1 Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları	13
3.1.1 MCF-7 hücre hattı.....	13
3.1.2 MDA-MB-231 hücre hattı	14
3.2 Sterilizasyon	14
3.3 Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Dondurulması	15
3.3.1 Hücre hatlarının çoğaltılması.....	15
3.3.2 Hücre hatlarının dondurulması	15
3.4 Hücre Canlılığı ve Hücre Sayımı (Tripin Blue Yöntemi)	16
3.5 Stok Çözeltilerin Hazırlanması.....	17
3.6 Sitotoksikite Testi (MTT Yöntemi)	17
3.6.1 MTT reaktifinin hazırlanması.....	18
3.6.2 MTT yöntemi ile optimum hücre sayılarının belirlenmesi	18
3.6.3 MTT yöntemi ile hücrelerde sitotoksikitenin belirlenmesi	18
3.7 Kombine Terapi Uygulaması ve İzobologram Analizi ile Sinerjizmin Belirlenmesi	19
3.8 Migrasyon (Wound Healing Assay).....	20
3.9 İstatistiksel Analiz	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	23
4.1 MTT Bulguları.....	23
4.1.1 Optimum hücre sayıları	23
4.1.2 Imatinib Mesilat, Tannik Asit ve kombine terapi sitotoksikite bulguları.....	23
4.2 Migrasyon Bulguları.....	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	36
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	50

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEME KANSERİ HÜCRELERİNE İMATİNİB MESİLAT VE TANNİK ASİT UYGULANMASININ MOLEKÜLER DÜZEYDE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Merve UZLA

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Fulya DOĞANER

ÖZET

Kanser tedavilerinde en etkili yöntemlerden biri kemoterapötik tedavidir. Daha çok lösemi tedavisinde kullanılan İmatinib Mesilat, klinik olarak meme kanseri tedavisinde kullanılsa da bu kanser üzerine etkileri halen daha araştırılmaktadır. Kemoterapötiklerin yanı sıra, antioksidanlar da kanseri tedavi edici etkilere sahiptir. Bu iki tedavi edici ajanın birlikte kullanımı, tedavi yöntemlerinin etkilerini daha da artırdığını düşündürmektedir.

Pekçok kemoterapötik ilaç ve antioksidan kombinasyonlarının hücre sitotoksitesi, migrasyon, gen ekspresyon seviyeleri ve apoptotik düzeyleri üzerine etkileri halen daha bilinmemektedir. Bu çalışmada ilk kez, bir kemoterapötik olan İmatinib Mesilat (IM) ve bir antioksidan olan Tannik Asit (TA)'ın MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarına, tek tek ve birlikte uygulandıklarında sitotoksite ve migrasyon üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

İmatinib Mesilat (IM), Tannik Asit (TA) ve ikisinin kombine uygulamasının, doza ve zamana bağlı hücre canlılığı üzerine etkisi MTT testi ile saptanmıştır. Bu test sonucunda, MCF-7 hücrelerinde IM ve TA için IC_{50} değerleri 25 μ M iken, MDA-MB-231 hücre hattında ise IC_{50} değerlerinin IM için 20 μ M ve TA için 25 μ M olduğu belirlenmiştir. Her iki hücre hattında da bu ajanların 48. saatte daha etkili olduğu gözlenmiştir. Kombine tedavi uygulaması sonucunda ise IM ve TA'nın sinerjik etkilerinin olmadığı, aditif, bağımsız ya da antagonist etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Migrasyon için her iki hücre hattına IC değerleri uygulanmış ve 0, 4, 8 ve 12 saatlerde yara iyileşmesi gözlenmiştir. IM ve/veya TA uygulanmayan kontrol hücrelerine göre tek tek ya da kombine uygulanan konsantrasyonlarda yara iyileşmesinin olmadığı gözlenmiştir.

Tüm bu veriler sonucunda, kombine olmadan IM ve TA uygulamalarının, her iki hücre hattında da daha sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Tek tek uygulamanın daha etkili olduğu ve sitotoksik etki mekanizmalarının belirlenebilmesi için daha farklı mekanizmaların da araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, İmatinib Mesilat, Tannik Asit, Kombine Tedavi.

Haziran, 2021; 50 sayfa

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF EFFECTS ON THE MOLECULAR LEVELS OF IMATINIB MESYLATE AND TANNIC ACID TREATMENT ON BREAST CANCER CELLS

Merve UZLA

**Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biotechnology and Molecular Biology**

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Fulya DOĞANER

ABSTRACT

One of the most effective methods in cancer treatments is chemotherapeutic treatment. Although Imatinib Mesylate, which is mostly used in the treatment of leukemia, is not clinically used in the treatment of breast cancer, its effects on this cancer are still being investigated. Besides chemotherapeutics, antioxidants also have cancer-curing effects. The combined use of these two therapeutic agents suggests that the effects of treatment methods are increased.

The effects of many chemotherapeutic drugs and antioxidant combinations on cell cytotoxicity, migration, gene expression levels and apoptotic levels are still unknown. In this study, the effects of a chemotherapeutic Imatinib Mesylate (IM) and an antioxidant Tannic Acid (TA) on cytotoxicity and migration when administered individually or together to MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines were investigated for the first time.

The effects of Imatinib Mesylate (IM), Tannic Acid (TA) and their combined application on dose and time dependent cell viability were determined by MTT test. As a result of this test, IC₅₀ values for IM and TA were determined as 25 µM in MCF-7 cells, while IC₅₀ values were determined as 20 µM for IM and 25 µM for TA in MDA-MB-231 cell line. It was observed that these agents were more effective at 48th hour in both cell lines. It was concluded that IM and TA do not have synergistic effects but have additive, independent or antagonistic effects in combined treatment. IC values were applied to both cell lines for migration and wound healing was observed at 0, 4, 8 and 12 hours. No wound healing was observed at individual or combined concentrations when compared to control cells without IM and/or TA.

As a result of all these data, it shows that IM and TA applications without combination have more cytotoxic effects in both cell lines. It was concluded that individual application is more effective and different mechanisms should be investigated in order to determine the cytotoxic effect mechanisms.

Keywords: Breast Cancer, Imatinib Mesylate, Tannic Acid, Combination Treatment.

June, 2021; 50 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Meme kesiti	3
Şekil 2.2. Dünyada kanser insidans oranı	4
Şekil 2.3. Dünyada kanser mortalitesi	4
Şekil 2.4. Türkiye’de tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanser türlerinin yüzde dağılımı	5
Şekil 2.5. Türkiye’de kadınlarda 2007-2012 yılları arasındaki meme kanseri vaka sayısı	5
Şekil 2.6. İmatinib Mesilat (IM)	9
Şekil 2.7. Fenol Grubu	10
Şekil 2.8. Oksidatif stres	10
Şekil 2.9. Tannik Asit (TA) yapısı	11
Şekil 2.10. Tannik Asidin onkolojik sinyal yolağındaki baskılayıcı görevleri	12
Şekil 3.1. MCF-7 hücre hattı İnverted mikroskop görüntüsü (20X)	13
Şekil 3.2. MDA-MB-231 hücre hattı İnverted mikroskop görüntüsü (20X)	14
Şekil 3.3. İzobologram Analizi Grafiği	19
Şekil 4.1. MCF-7 Optimum hücre sayısının belirlenmesi	22
Şekil 4.2. MDA-MB-231 Optimum hücre sayısının belirlenmesi	22
Şekil 4.3. MCF-7 hücrelerine İmatinib Mesilat uygulamasının 24, 48 ve 72. saatlerdeki hücre canlılığı üzerine etkisi	23
Şekil 4.4. İmatinib Mesilat uygulamasının 24, 48 ve 72. saatte MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksitesinin analizi	24
Şekil 4.5. MCF-7 hücre hattının Tannik Asit uygulamasının 24, 48 ve 72. saatlerdeki hücre canlılığı üzerine etkisi	25
Şekil 4.6. Tannik Asit uygulamasının 24, 48 ve 72. saatte MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksitesinin analizi	26
Şekil 4.7. MCF-7 hücre hattına uygulanan kombine tedavinin yüzde canlılığa etkisi	27
Şekil 4.8. MDA-MB-231 hücre hattının İmatinib Mesilat uygulamasının 24, 48 ve 72 saatlerdeki hücre canlılığı üzerine etkisi	27
Şekil 4.9. İmatinib Mesilat uygulamasının 24, 48 ve 72. saatte MDA-MB-231 hücreleri üzerine sitotoksitesinin analizi	29
Şekil 4.10. MDA-MB-231 hücre hattına Tannik Asit uygulamasının 24, 48 ve 72 saatlerdeki hücre canlılığı üzerine etkisi	29
Şekil 4.11. Tannik Asit uygulamasının 24, 48 ve 72. saatte MDA-MB-231 hücreleri üzerine sitotoksitesinin analizi	30
Şekil 4.12. MDA-MB-231 hücre hattına uygulanan kombine tedavinin yüzde canlılığa etkisi	31
Şekil 4.13. MCF-7 migrasyon bulguları	32
Şekil 4.14. MCF-7 hücre hattının 0, 4, 8, 12 saatlik migrasyon görüntüleri	33
Şekil 4.15. MDA-MB-231 migrasyon bulguları	34
Şekil 4.16. MDA-MB-231 hücre hattının 0, 4, 8, 12 Saatlik migrasyon görüntüleri... ..	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. MCF-7 hücrelerine uygulanan kombine tedavilerin $IC_{50\ TA}$ ve $IC_{50\ IM}$ ile karşılaştırıldığında oluşan FIX değerleri.....	26
Çizelge 4.2. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan kombine tedavilerin $IC_{50\ TA}$ ve $IC_{50\ IM}$ ile karşılaştırıldığında oluşan FIX değerleri	31



SİMGELER VE KISALTMALAR

ATM	Serin/Treonin protein kinaz
BRCA1	Meme kanseri tip1 tümör baskılayıcı geni
BRCA2	Meme kanseri tip2 tümör baskılayıcı geni
Cl	Klor
CO₂	Karbondioksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELISA	The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Östrojen Reseptörü
EtOH	Etil Alkol
FBS	Fetal Sığır (Bovine) Serumı
GnRH	Gonadotropin Salgılayan Hormon
HCl	Hidroklorik Asit
HER-2	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
IC	İnhibisyon Konsantrasyonu
IC₅₀	Hücrelerin %50'sine Etki Eden İnhibisyon Konsantrasyonu
IM	İmatinib Mesilat
KML	Kronik Miyeloid Lösemi
M_A	Moleküler Ağırlık
MCF-7	Kanserli meme hücresi hattı (Michigan Kanser Vakfı-7)
MDA-MB-231	Kanserli meme hücresi hattı
mM	Milimolar
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
NAD⁺	Yükseltgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
nm	Nanometre
p53	Tümör Baskılayıcı Gen
PAR	Fotosentetik Olarak Aktif Radyasyon
PARG	Poli Glikohidrolaz
PARP-1	Poli ADP-riboz polimeraz 1
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PR	Progesteron Reseptörü
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloğu
rpm	Round per minute (Dakikadaki tur sayısı)
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
STI-571	imatinib mesilat (eski adı)
TA	Tannik Asit
UV	Ultraviyole
μM	Mikromolar
μL	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci önemli ölüm nedeni olan kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile karakterize edilen, sonucu bazı türler için ölümle biten ve bu nedenle de tedavisi için en çok araştırma yapılan ve çok çeşitli yöntemler denenilen bir hastalıktır (Kayaalp, 1998). Neoplastik hücreler, önce cerrahi olarak veya radyasyon tedavisi ile azaltılır veya gelişimi yavaşlatılır. Bunu kemoterapi, immunoterapi veya bu tedavi yöntemlerinin birlikte kullanılması takip eder. Kemoterapik tedavide amaç, kullanılan ilaçlarla tümörün büyümesini engelleyerek farklı dokularda yeniden gelişmesini önlemek hatta tümüyle ortadan kaldırılması için sitotoksik etki sağlamaktır (Calabresi vd., 1962).

Meme kanseri, dünyada kadınlarda en çok görülen kanser türüdür. Yapılan bazı araştırmalarla ABD'de kadın kanserlerinin %29,7'sini (1998) ve Türkiye'deki kadın kanserlerinin %25'ini (2012) meme kanseri oluşturmaktadır. (Onur, 2005; Ferlay vd., 2015; Baran, 2017). Meme kanseri, kanser ölümleri arasında beşinci sırada yer almaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde en sık, gelişmiş ülkelerde ise akciğer kanserinden sonra ikinci sıklıkla öldüren kadın kanseridir (Baran, 2017).

Kanserin moleküler düzeyde tedavilerinde, kanser hücrelerinin işleyişini kontrol etmek için temel fonksiyonel moleküller hedef alınmaktadır. Bu yollardan biri de çoğunlukla düzensiz sinyalleşmeye neden olan hücre proliferasyonu ile bağlantılı ekspresyon veya mutasyondan kaynaklanan tirozin kinaz aktivasyonudur (Kadivar vd., 2017). En çok Lösemi tedavisinde kullanılan bir kemoterapotik madde olan İmatinib Mesilat (IM) (STI-571), tirozin kinaz reseptörünün seçici bir inhibitörüdür. İmatinib tedavisi ile Kronik Miyeloid Lösemi (KML) olgularında sitogenetik ve moleküler yanıt oranları oldukça artarken, sağkalım oranlarının da arttığı gözlenmiştir. Tirozin kinaz inhibitörlerinin, KML tedavisindeki bu başarısı sayesinde, patogenezinde tirozin kinazların rol oynadığı diğer hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceğini düşündürmüştür (Yenerel, 2010). Bu nedenle, meme kanseri tedavisinde de umut vadedeceği düşünülmektedir. İmatinib Mesilatın meme kanseri hücre dizilerindeki etkilerinin araştırıldığı kısıtlı çalışmalar olması sebebiyle tüm mekanizma çözülene kadar hastalarda kullanımı şu an mevcut değildir. Klinik düzeyde bu ilacın kullanımı için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Kanser tedavisinde hücresel ölümün gerçekleşmesi için radyoterapik ve bazı kemoterapötik uygulamalar

yapıldığında, hücrelerde serbest radikal üretimi gözlenmektedir. Kanser hücreleri haricinde kalan sağlıklı hücreler üzerine de etkili olan bu uygulamalara ek olarak antioksidanlar verildiğinde ise ilaçların antitümör etkisini azaltmadığı ve serbest radikal ve serbest radikal aracılı oksidatif reaksiyonları nötralize ederek sağlıklı hücrelerin hayatta kalma süresini uzattığı bildirilmiştir (Weijl vd., 1997; Simone vd., 2007). Kemoterapi ile birlikte tek başına veya kombine uygulanan antioksidanların etkilerinin incelendiği pek çok çalışma bulunmaktadır. (Block vd., 2007; Simone vd., 2007; Blumenthal vd., 2000; Conklin, 2000).

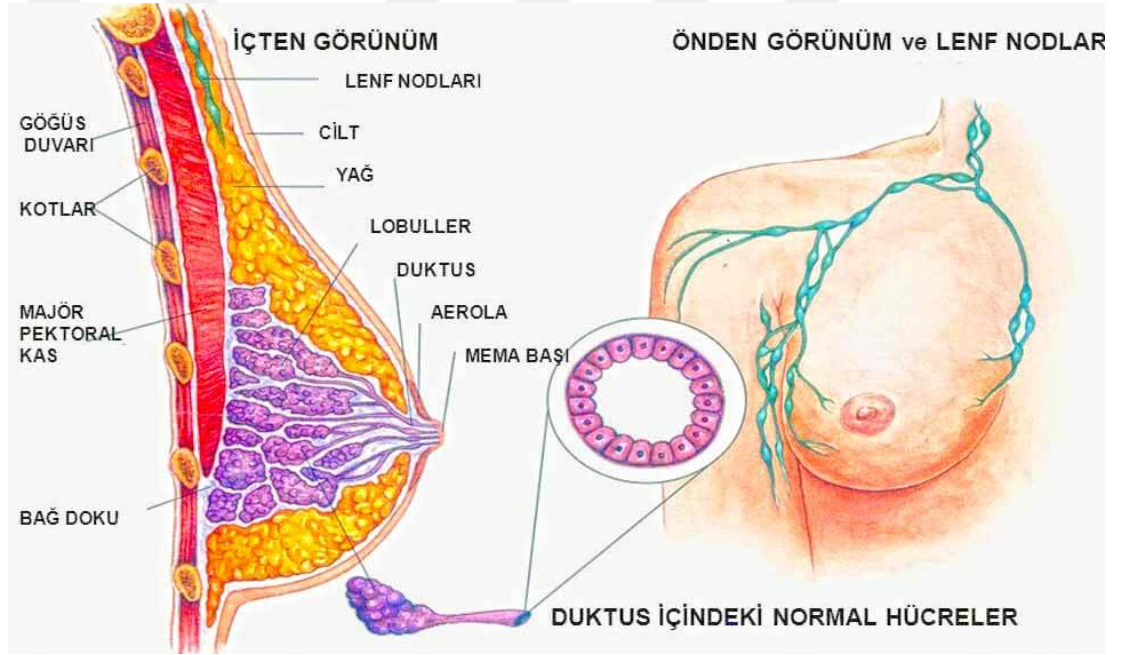
Kemoterapi ile birlikte antioksidan takviyesi yapılması konusunda bir başka görüş ise, antioksidanların serbest radikalleri süpürerek kemoterapötik ajanların etkisini de azaltabileceğidir. Bu konuda yapılan bir araştırmada, meme kanserli hastalara kemoterapötik tedavi ile birlikte demir ve B12 vitamini gibi antioksidan takviyesi uygulandığında hastalığın nüksünü ve ölüm riskini artırabileceği gösterilmiştir (Ambrosone vd., 2019). Bu iki görüşü de destekleyen çalışmaların sonuçları, antioksidanlarla kemoterapötik ajanların birlikte değerlendirilmesi gerektiğini ve bu konuda hem *in vivo* ve hem de *in vitro* ortamda çalışmalar yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda meme kanserinde klinik düzeyde şu an kullanılmayan bir kemoterapötik madde olan Imatinib Mesilatın ve polifenolik antioksidanlardan olan tannik asidin birlikte ve ayrı ayrı kullanıldığında, ER(+) özellik gösteren MCF-7 ve ER(-) özellik gösteren MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin migrasyon ve sitotoksitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Imatinib Mesilatın meme kanseri tedavisinde etkin şekilde kullanılması konusuna ve tartışmalı olan antioksidan-kemoterapötik madde etkileşimi konusuna katkı sağlayacak bir çalışma olacağı düşünülmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

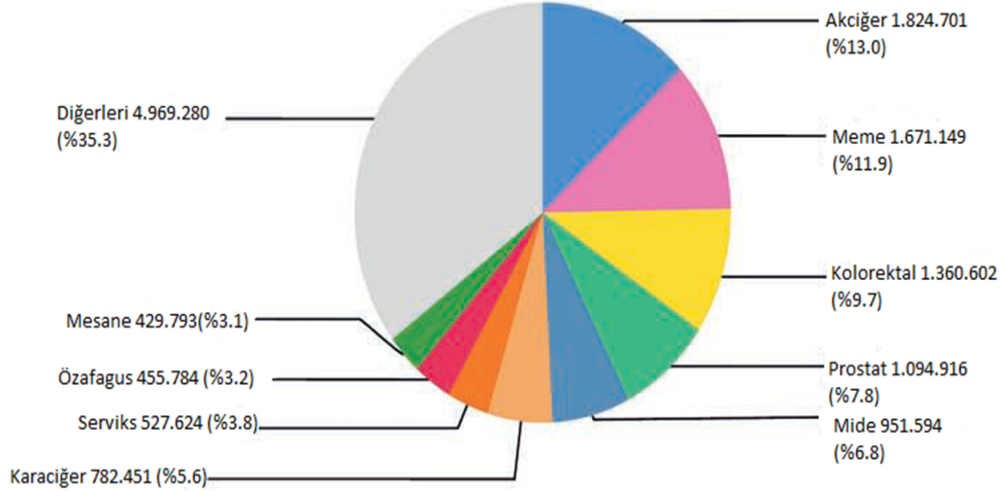
2.1 Meme Kanseri

Meme dokusu hem erkeklerde hem kadınlarda olmasına rağmen meme bezleri sadece postpartum dönemde fonksiyonel olmakta ve süt bezlerinden yenidoğan bebeği beslemeye yönelik süt salgılanmaktadır. Meme dokusu, süt bezleri (lobüller), üretilen sütü meme ucuna taşıyan süt kanalları (duktuslar) ve bunların arasında bulunan destek dokuları, yağlar, sinirler, kan ve lenf damarlarından oluşur (Şekil 2.1). Lobüller bir araya gelerek lob adı verilen yapılarda toplanır. Her memede 15-20 adet lob vardır. Lob, lobül ve süt kesecikleri ince süt kanalları ile birbirine bağlanır (Karayurt, 2015; Jaspars vd., 1997).



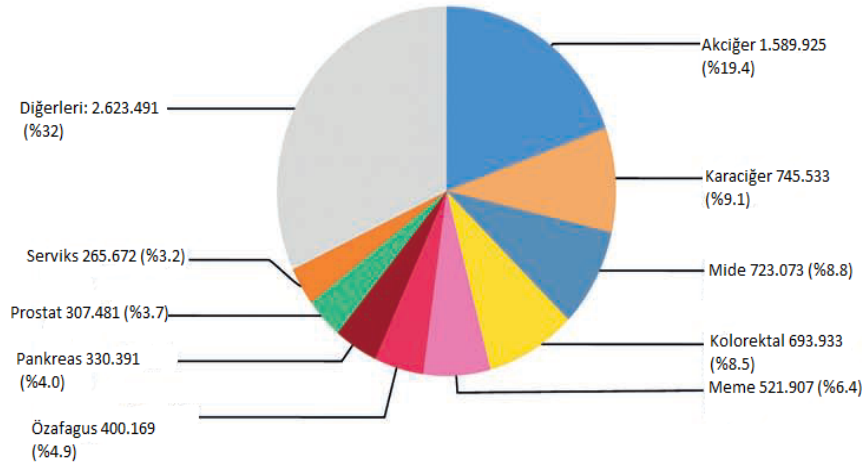
Şekil 2.1. Meme kesiti (URL-1).

Meme kanseri, kadınlarda en çok, dünya genelinde ise en sık görülen ikinci malign kanser türüdür (Şekil 2.2). 2012 yılında meme kanseri tanısı konulan 1,67 milyon kadınlarda görülen bütün kanserlerin %25'ini oluşturmaktadır. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin çoğunda en sık görülen kanser türü olmasına rağmen insidans hızları bölgeler arasında, Kuzey Amerika'da yüz binde 92 Orta ve Doğu Afrika'da yüz binde 27 olmak üzere, yaklaşık dört kata kadar farklılık göstermektedir. En yüksek hızlar gelişmişlik düzeyi en yüksek ülkelerde görülmektedir (Ferlay vd., 2013; Gültekin ve Boztaş, 2014).



Şekil 2.2. Dünyada kanser insidans oranı (World Health Organization GLOBOCAN 2012 (IARC)'tan alınarak düzenlenmiştir).

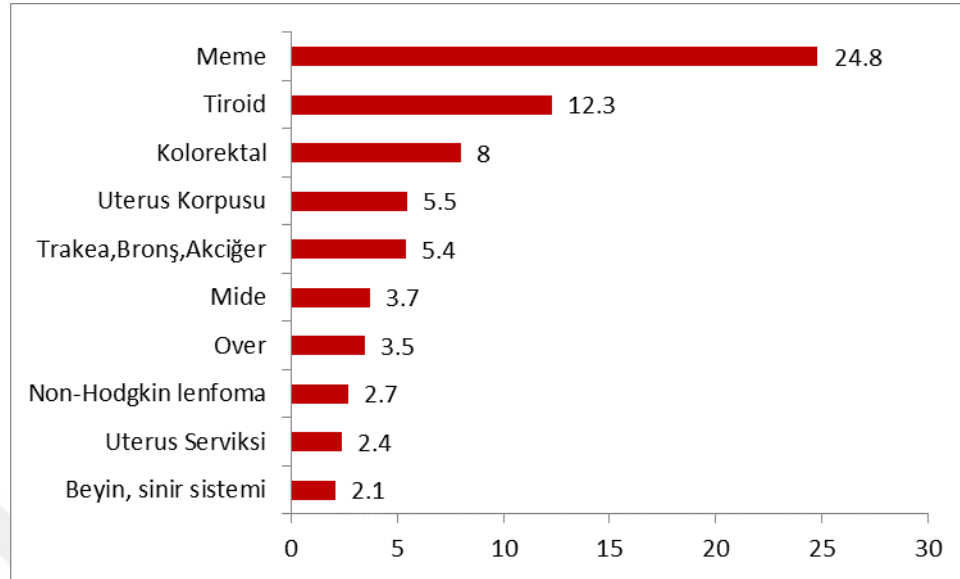
Meme kanseri, kanser mortaliteleri arasında beşinci sırada yer almaktadır (Şekil 2.3). Gelişmekte olan ülkelerde en sık, gelişmiş ülkelerde ise akciğerden sonra ikinci sıklıkla görülen kadın kanseridir. Meme kanserinde bölgeler arasındaki mortalite ve insidans hızları arasındaki farkın daha az olmasının sebebi yüksek insidans olan gelişmiş ülkelerdeki erken tanı faaliyetleri ve uygun tedavi ile iyi bir sağkalım sağlanıyor olmasıdır (Ferlay vd., 2013, 2015).



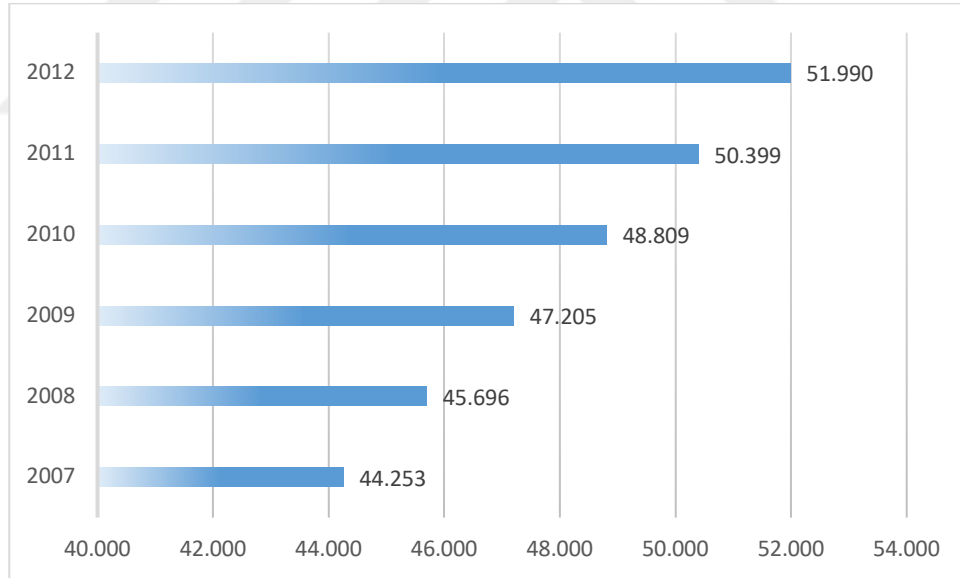
Şekil 2.3. Dünyada kanser mortalitesi (World Health Organization-GLOBOCAN 2012 (IARC)'tan alınarak düzenlenmiştir).

Meme kanseri, Türkiye'de de en sık görülen kanser türüdür (Şekil 2.4) ve insidansı giderek artmaktadır (Şekil 2.5). 2016 yılında yapılan bir istatistik raporuna göre; meme

kanserine yakalanan hasta sayısının 2007 yılında 44,253 iken, 2012 yılında 51,990'a yükseldiğini bildirmektedir (Ozmen vd., 2009).



Şekil 2.4. Türkiye’de tüm yaş gruplarındaki kadınlarda en sık görülen bazı kanser türlerinin yüzde dağılımı (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2016).



Şekil 2.5. Türkiye’de kadınlarda 2007-2012 yılları arasındaki meme kanseri vaka sayısı (Özmen vd., 2014).

Meme kanseri vakaların %5-10’u kalıtsal sebeplerle ortaya çıkmaktadır. Meme kanserinin farklı alt tipleri, tanı ve tedavide zorluğa neden olan lümen veya bazal öncü hücre popülasyonunda meydana gelen farklı gen mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (Salouage vd., 2010). Aile öyküsünde meme kanseri olan kişilerde meme kanseri görülme riskinin daha fazla olduğu bildirilmiştir (Oztekin vd., 1998).

Meme kanserinde genetik değişiklikler çeşitli faktörlere bağlıdır. Genetik değişiklikler germline mutasyonlara ya da somatik mutasyonlara bağlı olabilir. Sonradan kazanılan mutasyonlar çevredeki karsinojenlere maruz kalma ile ilişkilidir (Hu vd., 2000). Çevresel karsinojenlere maruz kalma sonucunda oluşan mutasyonlar haricinde, germline mutasyonlardan kaynaklanan tümör baskılayıcı genlerin baskılanması, proto-onkogenlerin aktivasyonundan kaynaklı apoptoz mekanizmasının bozulması ve büyüme faktör reseptörlerinde oluşan bozuklukların kontrolsüz hücre çoğalımı sonucu meme kanserinin gelişimine neden olduğu belirtilmektedir (Black, 1994; Van de Vijver, 1993).

Meme kanseri patogeneğinde, Östrojen (ER), Progesteron (PR) reseptörleri ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (HER-2/neu) önemli rol oynadığı bilinmektedir (Speirs, 2000; Esteva-Lorenzo, 1998). Ayrıca BRCA1, BRCA2, ATM, p53 ve PTEN genleri ise özellikle kalıtsal meme kanserinde önemli rol oynamaktadır (Easton vd., 1993; NCCN, 2009).

2.2 Meme Kanseri Risk Faktörleri, Teşhis ve Tedavi

Meme kanserinde; yaşı, ilk adet, gebelik yaşı, coğrafik varyasyonlar, aile hikayesi, diyet, hormon seviyelerindeki değişiklik, radyasyona maruz kalma, kimyasallar, vücut kitle endeksi, beslenme alışkanlığı, benign meme lezyonları, alkol ve sigara kullanımı gibi faktörler risk oluşturmaktadır (Ronckers vd., 2004; Terry vd., 2006; Mahoney vd., 2008).

Meme kanserinin özellikle erken teşhisi için 20 yaşımdan itibaren her ay kendi kendine muayene ve 1-3 yıl arasında klinik muayene, 40 yaşı üstünde her yıl mamografi ve klinik muayene (eğer aile hikayesinde kalıtsal meme kanseri var ise 25 yaşımdan itibaren) yapılmalıdır. Günümüzde meme kanseri teşhislerinde fiziksel muayene ile memede kitle saptandığında, kitlenin kanser olup olmadığı biyopsi ile anlaşılır. Meme kanseri tedavi açısından diğer kanserlere göre daha avantajlıdır. Tedavisinde birincil yöntem cerrahi müdahaledir ki, bu yöntem genellikle meme dokusunun tümünün alınmasını teşkil eder. Koltuk altı lenf bezleri de çıkartılarak muhtemel yayılma engellenir. Tanıda koltuk altı lenf düğümü metastazlarının önemi büyüktür (Matsen ve Neumayer, 2013). Meme kanserinde cerrahi yöntem haricinde, hormon tedavisi, ışın tedavisi veya kemoterapi de uygulanabilir (Ölgen, 2002). Bu tedavi yöntemleri,

hastalığın evresi, tümörün biyolojik özellikleri, hasta yaşı, metastaz olup olmaması, diğer hastalıkların varlığı gibi faktörlerin değerlendirilmesiyle belirlenir (Koçak vd., 2011; Hortobagyi, 1998).

Kemoterapötik tedavi, kanserin anti-neoplastik ilaçlar ile tedavi edilmesidir. 1959'da meme kanseri tedavisinde anti-tümör antibiyotikler kullanılmasına rağmen, günümüzde sitotoksik kemoterapötikler, hormonlar, hormon antagonistleri, hedefe yönelik kemoterapötikler ve biyolojik kemoterapötikler olarak sınıflandırılan anti-neoplastik ilaçlar kullanılmaktadır (Akgiin vd., 2000).

Bu gruplarda yer alan başlıca ilaçlar şunlardır:

- Anti-östrojen/östrojen reseptörü antagonistleri (Tamoksifen, Toremifen, Fulvestran)
- Aromataz enzim inhibitörü (Anastrozol, Eksemestan, Letrozol)
- Progesteron antagonisti (Megestrol asetat)
- Östrojen/ Östrojen antagonisti (Etinilestradiol)
- Gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) (Löprolid, Goserelin)
- Kortikosteroid (Prednizon, Deksametazon) (Baran, 2017)

Klinik tedavilerin yetersiz ya da eksik kalması sonucunda alternatif tedavi yöntemlerine ilgi giderek artmaktadır. Fitoterapi kullanımı Amerika Birleşik Devletleri'nde %86 ve Almanya'da %52'dir (Ernst, 2000). Ülkemizdeki sıklığı bilinmese de birçok sayıda hastanın fitoterapiyi kullandığı bilinmektedir (Algier vd., 2005).

Günümüzde karmaşık ve çok sebepli bir hastalık olan kanser gibi hastalıkların tedavisinde başarılı ve kalıcı sonuçlar oluşturabilmek için tek bir ilaç veya tek bir yöntemle tedavi etmenin çoğu zaman mümkün olmadığı bilinmektedir. Bu nedenle hastaya birden fazla tedavinin uygulandığı terapötik müdahalelere “Kombinasyon tedavisi” denir. Bu yöntemle, birçok ilacın ve diğer kanser tedavi yöntemlerinin kombine edilmesi ile tedavideki başarı oranı artmaktadır (Kuş, 2020).

Kemoterapötik ilaçlar bazı durumlarda tek başına etki gösteremez ve ikinci bir ilaç ya da fitoterapi ile desteklenmesi gerekir. Kombine kemoterapi denilen bu yöntem, tedavinin etkisini artırmak, toksisite ve direnci azaltmak için kullanılmaktadır. Bu

sayede, daha düşük dozlardaki kemoterapötik ilaçlar kullanılıp karıştırılarak normal hücrelerde toksisite azaltılır ve daha etkili bir tedavi amaçlanır (Mayer ve Janoff, 2007). Bu etkisinin yanında, kemoterapötik ilaç kullanımının azalmasına, sinerjik ve aditif etkinin ortaya çıkmasına ve çoklu ilaç dirençliliği gelişiminin engellenmesine de yardımcı olmaktadır (Chou, 2010; Chou, 1984).

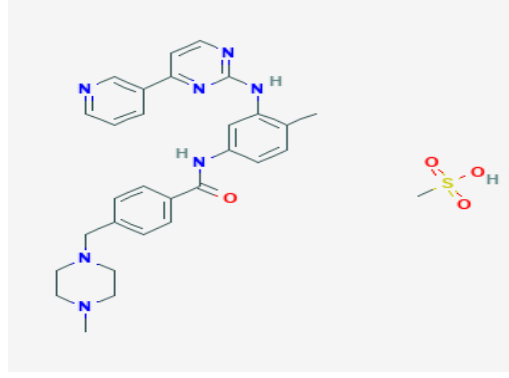
Kombine tedavi seçilirken dikkat edilen hususlar şunlardır;

1. Toksisite düzeyi açısından farklı grup ilaçlar seçilmelidir
2. Kombine edilen ilaçların etki mekanizmaları farklı olmalı ve çapraz direnç oluşturmamalıdır
3. Tek başlarına kullanımda etkisi olduğu bilinen ilaçlar kombine edilmelidir
4. Kombine tedavi, klinik çalışmalarda hastalığın ilk evrelerinde başlatılmalıdır

Bu hususlar gözönüne alınarak *in vitro* çalışmalarla, her kemoterapötik ilacın birbiri ile etkileşimleri ve antioksidan veya fitoterapötik ajanlarla etkileşimleri her bakımdan araştırılabilir. Bu sayede anti-proliferatif etkiye sebep olan etken maddelerin konsantrasyonları ve uygulama süreleri belirlenerek en iyi kombine tedavi elde edilebilir ve farklı dozlardaki sinerjik, antagonist ya da aditif etkileri de belirlenebilmektedir (Chou, 2010).

2.3 İmatinib Mesilat (IM)

İmatinib Mesilat (IM; Gleevec, Novartis, eski adıyla STI-571) (Şekil 2.6), 1990 yılında Novartis adlı İsviçre firması tarafından 2-fenilaminopirimidin türevi olarak üretilmiştir. Platelet-derived growth factor (PDGF) reseptörünü hedef alan spesifik bir tirozin kinaz inhibitörüdür.



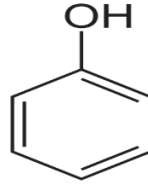
Şekil 2.6. İmatinib Mesilat (IM) (IUPAC:4-[(4-Metil-1piperazinil)metil]--[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil] benzamid metansulfonat]) kimyasal yapısı (PubChem) (URL-2).

Tirozin kinazlar, onkogenik dönüşümde önemli rol oynarlar. Protein kinazların amplifikasyonu ve translasyonundaki artışa bağlı olarak tirozin kinaz aktivitesi artar. Tirozin kinazın aktivitesinin artması da sinyal ileti yollarının aktivitesine ve proliferasyona sebep olmaktadır. Tirozin kinaz inhibitörlerinin büyük bir kısmı anjiyogenez sürecinde önemli reseptör tirozin kinazları (RTK) hedef alır (Madhusudan ve Ganesan, 2004).

Daha çok Kronik Myeloid Lösemi (KML) tedavisinde kullanılan Imatinib Mesilat, bu başarısı sayesinde diğer kanser tiplerinde de denenmektedir (Mercan, 2010). Glioblastoma (Voelzke, 2008), küçük hücreli akciğer kanseri (Spigel vd., 2007), anaplastik tiroid kanseri (Rao vd., 2006), over granuloza hücre tümörleri (Rocconi vd., 2008), medulloblastoma (Abouantoun ve MacDonald, 2009) ve neuroblastomada (Vitali vd., 2008) denendiği uygulamalar bulunmaktadır.

2.4 Tannik Asit (TA)

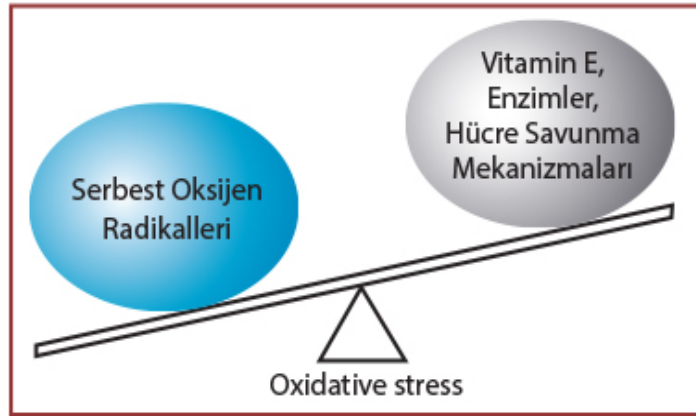
Bitkilerde fenilpropan ve fenolik gruplar fitoöstrojenleri oluşturmaktadır. Fitoöstrojenlerin yapısında bulunan fenol grubu, östrojen agonisti ve antagonisti özelliklerini tanımlamada önemli rol oynar. Fenolik bileşikler kimyasal olarak aromatik benzen halkası içeren maddeler ve bunların türevleridir. Benzen halkasında bir -OH bağlanması ile fenol grubu oluşur (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Fenol Grubu (URL-3).

Bitkilerde özellikle meyvelerde bolca bulunan, kendilerine has tat ve renkleri oluşturan bileşiklerden olan fenolik bileşikler, bitkilerin çevresel strese karşı oluşturdıkları sekonder metabolitlerdir. Canlılardaki aerobik metabolizma, bazal koşullarda bile prooksidanlar olarak bilinen, reaktif oksijen ürünlerini (ROS) oluştururlar (Whitehead vd., 1995). Biyolojik moleküllerin, prooksidan hasarına karşı koymada endojen ve vücudun antioksidan metabolizmalarının yetersiz kaldığı durumlarda eksojen kaynaklı antioksidanlara ihtiyacı vardır. Vücutta prooksidanların artması sonucunda oksidatif hasar veya oksidatif stres meydana gelmektedir (Şekil 2.8). Bunun sonucunda ise yaşlanma süreci etkilenir, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, sepsis, dejeneratif nörolojik hastalıklar, böbrek yetmezliği, infertilite, kas ve karaciğer hastalıkları ortaya çıkar (Gutteridge ve Halliwell, 1993).

Oksidatif Stres

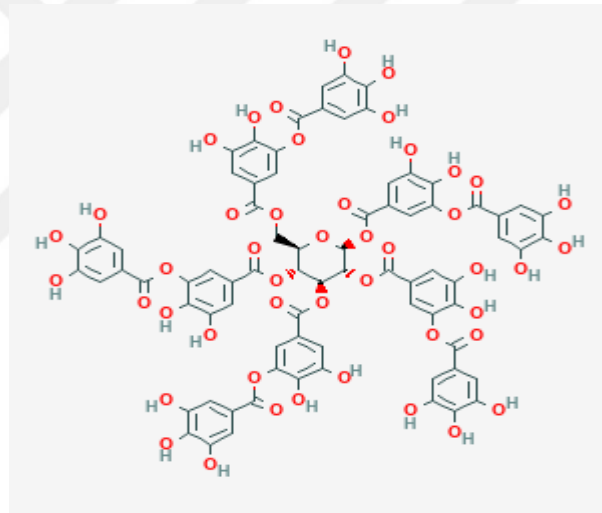


Şekil 2.8. Oksidatif stres (URL-4).

Antioksidanlar kullanılarak bu hastalıkların önüne geçilmek istenmektedir. Bu antioksidan bileşiklere vitaminler, terpenoidler, polifenoller ve azot içeren bileşikler örnek verilebilir. Antioksidan bileşiklerden olan fenolik bileşikler ise, yeşil çay, siyah çay, kırmızı şarap, kahve, çikolata, zeytin, baharatlar, kabuklu yemişler vb. yiyecek ve içeceklerde bulunmaktadır.

Fenolik bileşikler sınıfında yer alan tanenler ise, 500-20.000 Dalton ağırlığındadır. Yapılarında azot bulundurmeyen, polifenolik yapıda ve amorf bileşiklerden olan tanenler, bitkilerin kabuk, kök, meyve, tohum, yaprak ve bitki özü gibi farklı yerlerinde bulunabilirler. Antikanserojen, antioksidan, antimutajenik, antimikrobiyal ve antiallerjik etkileri bulunan tanenler; Gallotanenler, Ellagitanenler, Kompleks tanenler ve Kondanse tanenler olmak üzere dört temel sınıfa ayrılmaktadır (Ergezer ve Çam, 2008).

Yaygın olarak tannik asit (TA) olarak adlandırılan hidrolize edilebilir tanenler (Şekil 2.9), gallotanninler veya ellagictanninler içerir (Nam vd. 2001). Tannik asit, kolza, bakla, çay, meşe palamudu, kırmızı şarap, fındık, ceviz gibi kabuklu yemişlerle çoğu bitki ve meyvelerden elde edilen, açık sarı- kahverengi toz, pul ya da süngersi bir kütle halindeki biçimsiz (amorf) maddelerdir (Kolaç vd., 2017; Soyocak vd., 2011).

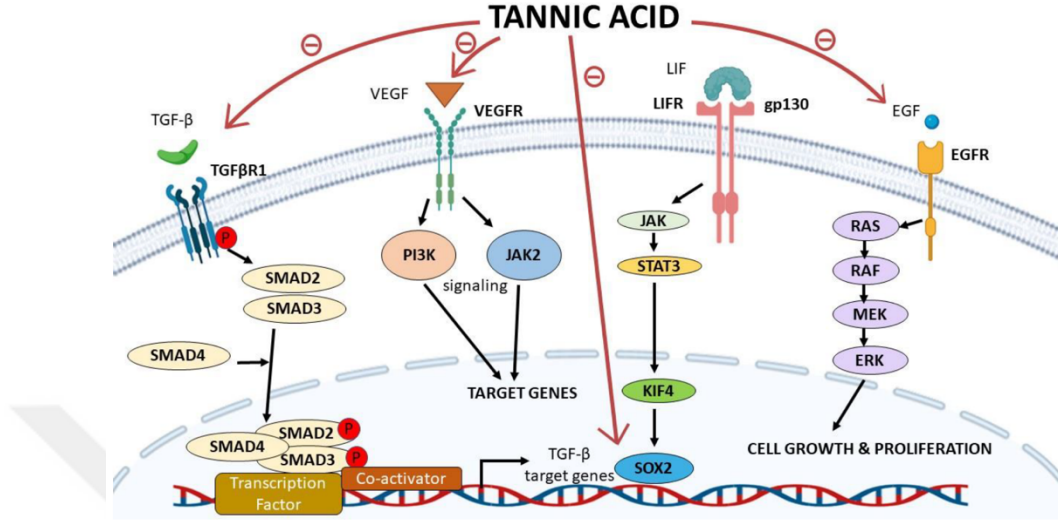


Şekil 2.9. Tannik Asit (TA) Yapısı $C_{76}H_{52}O_{46}$ (PubChem) (URL-5).

Tannik asidin monomeri olan gallik asit, hayvan hücrelerinde apoptozu indüklemeye yeteneğine de sahiptir (Khan ve Hadi, 1998). Gallik asit, insan glioblastom hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün indüklenmesinde pro-oksidan olarak görev yapar (Sakagami vd., 1997).

Tannik asit, birkaç onkolojik sinyal yolunda gerekli olan pek çok protein için bir baskılayıcı görevi görür. Hücre bölünmesi (proliferasyon), farklılaşması (diferansiasyon), adhezyon, morfogenez, ekstraselüler matriks oluşumu ve programlı hücre ölümü (apoptoz) gibi çeşitli hücresel süreçlerin kontrolünü sağlayan TGF- β 'nin transkripsiyonunu inhibe ederek antioksidan etki gösterir. Ayrıca VEGF/VEGFR'yi de

inhibe ederek kanserde önemli bir anjiyogenez sinyal yolunu da inhibe etmektedir. SOX2 geninin ekspresyonunu inhibe ederek EGF/EGFR sinyal yolunu ve dolayısıyla hücre büyümesini ve proliferasyonunu inhibe eder (Şekil 2.10) (Youness vd., 2021).



Şekil 2.10. Tannik Asidin onkolojik sinyal yolağındaki baskılayıcı görevleri (Youness vd., 2021).

Tannik asit, DNA onarımı, genomik stabilite ve programlanmış hücre ölümü gibi bir dizi hücresel işlemde yer alan bir protein ailesi olan Poli (ADP-riboz) glikohidrolaz (PARG) inhibitörüdür ve PAR zincirinin devrini yavaşlatarak NAD⁺ tükenmesini sınırlayarak PARP-1 aracılı hücre ölümünü önler. Antienflamatuar, antikanser ve antiviral etkileri bilinmektedir (Zhao vd., 2005). TA ayrıca bir antioksidan görevi görerek, serbest radikalleri indirger. Demir ve bakır iyonlarını şelatlama yeteneği de antioksidan etkisine bağlanmıştır (Andrade vd., 2005). Tannik asit sitotoksik özelliğe sahip olduğundan toksik etkilerin uyarılmasını da sağlayabilir (Labieniec ve Gabryelak, 2003). TA'lerin *in vitro* incelenmesinde kanser hücre hatlarında, apoptozu indüklediği dolayısıyla hücre çoğalmasını baskıladığı tespit edilmiştir (Chen vd., 2003).

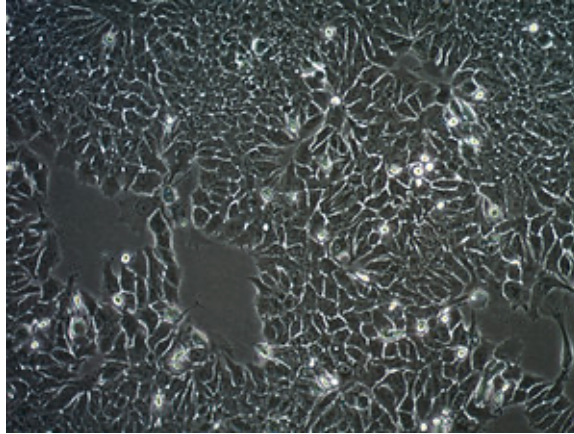
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

Bu tez çalışmasında, İstanbul Aydın Üniversitesi'nden temin edilen, Östrojen Reseptörü (ER) (+) olan MCF-7 ve ER (-) olan MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları kullanılmıştır.

3.1.1 MCF-7 hücre hattı

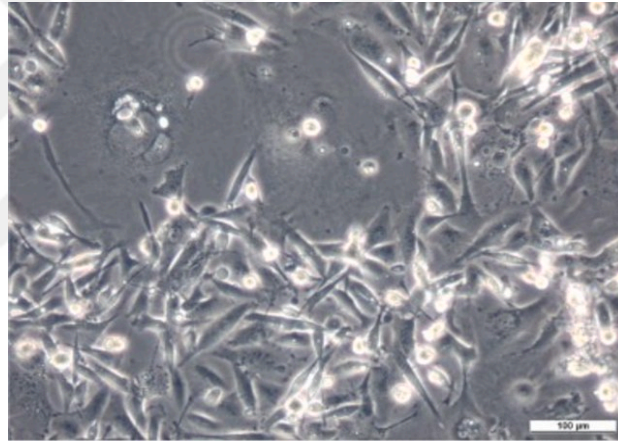
Meme kanserine model hücre hatlarından biri olan MCF-7 hücreleri, 69 yaşında evre IV invaziv duktal karsinomalı beyaz ırk bir bayan hastanın meme epitel dokusundan 1970 yılında elde edilmiştir (ATCC) (Şekil 3.1). HER-2 geninin ekspresyonu normaldir. MCF-7 hücrelerinin sitogenetik analizlerinde; kromozom sayılarındaki anormal artış ve azalış, hatalı eşleşmiş bazların onarım sisteminde bozukluklar görülmektedir. DNA tamir genlerindeki mutasyonlar veya tamir proteinlerinin az veya aşırı salgılanması, direnç gelişiminde önemli bir faktördür (Schwarz vd., 2002). Sitoplazmik östrojen reseptörleri yoluyla östradiolü işleme yeteneği gibi farklılaştırılmış meme epitelinin birçok özelliğini gösterir. MCF-7, sıkı hücre birleşimleri oluşturan lümen hücrelerinden oluşur (Brooks vd., 1973).



Şekil 3.1. MCF-7 hücre hattı İnverted mikroskop görüntüsü (20X) (Sigma Aldrich, 2021).

3.1.2 MDA-MB-231 hücre hattı

Kafkas kökenli, 51 yaşındaki bir kadının metastaz yapmış adenokarsinomundan elde edilmiştir. MDA-MB-231 östrojen reseptör alfa, progesteron ve HER2 reseptörü negatif meme kanseri hücre dizileridir. Kemoterapiye duyarlılığı farklar gösterir ve kemoterapiye orta derecede duyarlıdır (Holliday ve Speirs, 2011). Yapışkan ve metastatik epitel hücrelerdir. Agresif ve invaziv karakter göstermektedir. Diğer invaziv kanser hücrelerine benzer şekilde ekstrasellüler matriksi proteolitik aktivitesiyle parçalama yeteneğine sahiptir (Yin, 2011). MDA-MB-231 hücreleri, zayıf tutunma özelliği gösterebilir. Hücreler mikroskopta üzüm benzeri ya da yıldız şeklinde görülmektedir (Şekil 3.2) (Neve vd., 2006). Güçlü tümör oluşturma özelliğine sahiptirler. Metastatik hücrelerdir ve bu hücre dizisinin en önemli özelliklerin birisidir (Burdall, Hanby, Lansdown ve Speirs, 2003).



Şekil 3.2. MDA-MB-231 Hücre Hattı İnverted mikroskop görüntüsü (20X) (Sigma Aldrich, 2021).

3.2 Sterilizasyon

Hücre kültüründe kullanılan tüm cihaz, sarf malzeme ve kimyasal malzemeler steril edilerek kullanıldı. Kullanıma hazır besiyerleri, antibiyotik ve FBS gibi tüm sıvı ajanlar por büyüklüğü 0.22 µm olan filtreden geçilerek sterilize edilirken, cam malzemeler, etüv ve su banyosunda kullanılacak sular, pipet uçları, 15 ve 50 ml'lik falconlar ise 121 °C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra UV ışınlarına maruz bırakıldı. Çalışma ortamının, kabinin temizliği ve kabine alınacak malzemelerin sterilizasyonu için %70'lik alkol ve en az 20 dakika UV ışını kullanıldı. Tüm işlemler sırasında steril eldiven kullanıldı.

3.3 Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Dondurulması

3.3.1 Hücre hatlarının çoğaltılması

Her iki hücre hattı da 25 cm²'lik flakslarda (Greiner Bio One,), %10 fetal bovine serum (FBS) (Biowest, USA), %1 penisilin/streptomisin (Biological Industries, USA) ve Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Biowest, USA) karışımından oluşan besiyeri ile 37°C, % 5 CO₂ ve % 95 nem varlığında CO₂'li inkübatörde (ShellAB, USA) çoğaltıldı. Çoğalma hızı ve kontaminasyon varlığı düzenli olarak İnverted mikroskop (Olympus, USA) ile gözlendi. Hücre sayılarındaki artışa bağlı olarak besiyeri değişikliği veya pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

Flask tabanının %80'ini dolduran hücreler deney için yeterli flask sayısına ulaşana kadar çoğaltma (pasajlama) işlemi yapıldı. Pasaj işlemleri şu şekilde gerçekleştirildi;

- Flakslardan steril cam pastör pipeti ile besiyeri çekildi ve 1 ml Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (Biowest, USA) ile yıkandı.
- Yıkama işleminden sonra 1 ml 1X Tripsin-EDTA (Biowest, USA) çözeltisi eklendi (Tripsinizasyon) ve inkübatörde 1-2 dakika arasında aktivite göstermesi için bekletildi.
- Daha sonra flaskın tabanından kalkan hücreler cam pastör pipet yardımı ile toplandı ve içinde 3ml besiyeri bulunan falkon tüplere aktarıldı.
- 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Kalan pellet 1000 µl'ye tamamlanarak, içerisinde 4 ml besiyeri bulunan 2 flaska eşit miktarda (500'er µl) paylaştırıldı ve inkübasyona bırakıldı.
- Pasajlanan hücrelerin yoğunluğu ve canlılığı her gün kontrol edildi.

3.3.2 Hücre hatlarının dondurulması

Hücre hatlarının *in vitro* kültürasyon nedeniyle özelliklerinde bazı değişiklikler oluşabildiği için, kültür ortamında sonsuza dek devam ettirilmesi mümkün değildir. Hücre kültürü çalışmalarını etkileyen ve çoğunlukla geri dönüşümü olmayan bu değişikliklerle karşılaşmamak ve herhangi bir kontaminasyon durumunda hücre ve zaman kaybını önlemek için, hücrelerin kısa ve uzun süreli stoklanması gerekir.

Hücreler yeterli yoğunluğa geldiğinde aşağıdaki yöntem uygulanarak stoklama işlemi yapılmıştır.

- Kontaminasyon içermeyen ve kontrollü artış gösteren hücrelerin bulunduğu flakslardan besiyeri çekildi.
- PBS ile yıkanır ve pasajlama işlemindeki gibi 1 ml 1x Tripsin EDTA tripsinizasyon gerçekleştirirler.
- 3 ml tam besiyeri üzerine tripsinizasyon gerçekleştirilen hücreler alınır.
- 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi.
- Süpernatant atılır ve pellet %20 besiyeri, %10 dimetilsülfoksit (DMSO) ve %70 FBS içeren stok vasatı ile resüspanse edildi.
- 2 ml'lik cryo tüplere alınarak önce -20 °C'ye kaldırılır ve daha sonra -80 °C'ye kaldırıldı. Daha uzun süreli bir saklama için -196 °C olan sıvı nitrojen tankının içerisine aktarıldı.
- Tekrar kullanılmak istendiğinde sıvı azottan çıkartılıp 37°C su banyosunda çözülerek ortamdaki DMSO'nun uzaklaştırılması için besiyeri ile 2 kez 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı. Süpernatant uzaklaştırılıp uygun besiyeri eklenerek çoğaltılması sağlandı.

3.4 Hücre Canlılığı ve Hücre Sayımı (Tripan Blue Yöntemi)

Deneylerde kullanılacak hücrelerin canlılığı ve miktarı, Tripan Blue boyama yöntemi ile inverted mikroskopta Neubauer lamında sayılarak gerçekleştirildi.

- Hücre çoğaltma işlemi basamağında anlatılan Tripsinizasyon işlemi ile toplanan hücreler santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım atıldı ve besiyeri ile 1 ml'ye tamamlandı.
- Pipetaj yapılarak, içerisinden 20 µl alınan hücre besiyeri karışımına 20 µl Tripan Blue solüsyonu (Biological Industries, USA) eklendi.
- Pipetaj yapıldı ve ölü hücrelerin boyanması için 2 dk bekletildi.
- Bu karışımdan 15 µl alınıp Neubauer lamına aktarıldı.
- Neubauer lamının ortasındaki 1 mm alandaki 5 karedeki maviye boyanan cansız hücreler ve boyanmayan tüm hücreler sayıldı. 1 ml'deki hücre sayısı ve canlılığı da aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$\text{Hücre sayısı} = \text{Her Karedeki Sayım ortalama} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 10^4 \quad (3.1)$$

$$\text{Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Toplam Canlı Hücre}}{\text{Toplam Hücre (Canlı ve Cansız)}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.5 Stok Çözeltilerin Hazırlanması

İmatinib Mesilat (Gleevec)'in moleküler ağırlığı (M_A) 589,7 g/mol'dur. pH bağımlıdır ve organik çözücülerde az miktarda çözünmektedir. En fazla 0,1 N HCl, DMSO veya saf suda çözünmektedir. Etanol ve metanolde az çözünürken, n-oktanol, aseton ve asetonitrilde çözünmez. Stok İmatinib Mesilat çözeltisi için, 0,5897 g tartılıp 10 ml otoklavlanmış distile suda çözündürüldü (100 mM) ve -20 °C'de saklandı. Stok İmatinib Mesilat'dan seri sulandırma yapılarak 1000 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M konsantrasyonlar hazırlandı. Her iki hücre hattı için de 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarda bu konsantrasyonlar kullanıldı.

Tannik asit, 1701,22 g/mol moleküler ağırlığa (M_A) sahiptir. Su, etanol, gliserol ya da asetonunda iyi çözünür. Benzen, kloroform, dietileter, karbon disülfid, karbon tetraklorid ile çözünmez. Stok tannik asit çözeltisi için, 0,177122 g tartılarak 10 ml % 96'lık etanol'de çözündürüldü (10 mM) ve -20 °C'de saklandı. Stok Tannik asitten seri sulandırma yapılarak 1000 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M konsantrasyonlar hazırlandı. Her iki hücre hattı için de 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarda bu konsantrasyonlar kullanıldı.

3.6 Sitotoksikite Testi (MTT Yöntemi)

MTT yöntemi, hücrelerin canlılığı ve proliferasyonunu belirlemede kullanıldığı gibi, ilaç ya da tedavi uygulamalarından sonra hücre proliferasyonunun dış faktörlere verdiği yanıtın *in vitro* analizinin temelini de oluşturmaktadır. Bu yöntemde temel prensip, mitokondri enzimlerinin hücre ölümünden kısa bir süre sonra inaktive olma etkinliği üzerine kuruludur. Tetrazolyum tuzlarının azaltılması analiz için güvenilir kabul edilmektedir. Sarı tetrazolyum (3-(4,5 dimetil tiazolit)-2,5 difenil tetrazolyum bromür) kısmen dehidrojenaz enzimlerinin etkisiyle tetrazolyum NADH ve NADPH gibi indirgeyici eşdeğerler üretmek üzere metabolik olarak aktif hücreler tarafından indirgenir. Hücrelerdeki mor formazan bileşiği spektrofotometrik olarak ölçülür ve boyanın yoğunluğuna göre metabolik aktif hücre durumu belirlenmiş olur.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında optimum hücre sayılarının belirlenmesi, standart eğrinin oluşturulması ve İmatinib Mesilat ile Tannik asit uygulamaları yapılan hücrelerde sitotoksitenin belirlenmesi için MTT yöntemi kullanılmıştır.

3.6.1 MTT reaktifinin hazırlanması

50 mg Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma Aldrich, USA) katısından tartılır ve 10 ml 1X PBS içerisinde çözündürülür. Vorteksleme yapıldıktan sonra filtreden geçirilerek mikro santrifüj tüplerine 1'er ml aktarılır, alimünyum folyo ile kaplanarak -20 °C'de saklanır.

3.6.2 MTT yöntemi ile optimum hücre sayısının belirlenmesi

Hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra, hücre sayımı basamağında anlatılan prosedür uygulandı. 96 kuyucuklu platelere her kuyucukta 100 µl besiyeri içeren 8 tekrarlı 48000, 24000, 12000, 6000, 3000, 1500 ve 750 hücreler ekildi. Plate'in bir sütununa sadece besiyeri eklendi. Daha sonra hücreler 24 saat, 48 saat ve 72 saatlik gruplar olacak şekilde 37°C'de %5 CO₂'li nemlendirilmiş ortamda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra karanlık ortamda her kuyucuğa 20 µl MTT solüsyonu eklendi. 2-6 saat arası 37°C'de %5 CO₂'li nemlendirilmiş ortamda inkübe edildikten sonra besiyeri çekilerek 100 µl DMSO (Biological Industries, USA) eklendi. Yavaşça 20 dakika vortekslendi, süre sonunda oluşan mor rengin 560 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Bu değerlere göre standart grafik oluşturulup 96 kuyucuklu plate'de olması gereken optimum hücre sayısı belirlendi.

3.6.3 MTT yöntemi ile hücrelerde sitotoksitenin belirlenmesi

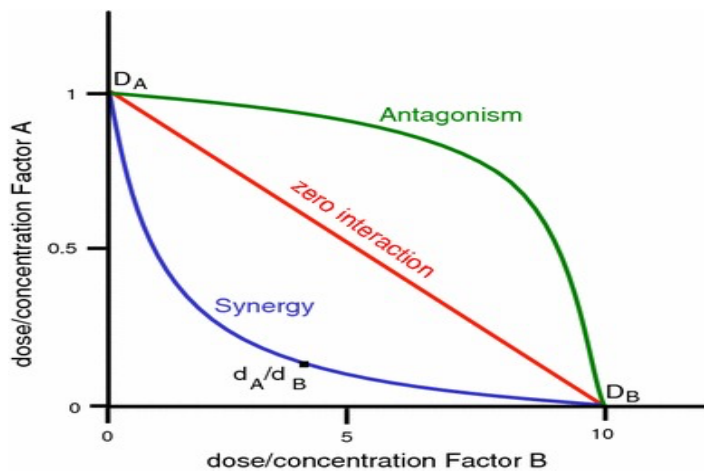
İmatinib Mesilat ile Tannik asit uygulamaları ve bunların kombinasyonlarının sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile belirlenmiştir.

- 96 kuyucuklu platelerde İmatinib Mesilat ya da Tannik asit konsantrasyonlarının uygulanacağı her kuyucuğa 10000 hücre (her konsantrasyon için 8 tekrar) ekildi. Bu platelerde kontrol grubu olarak uygulama yapılmayan hücreler yer alırken, stok çözeltilerin hazırlandığı çözücüler de “çözücü kontrol” olarak değerlendirildi. Bu sayede sitotoksiste üzerine bu çözücülerin etkisi olup olmadığı da belirlendi.

- Bu hücreler, 24 saat % 5 CO₂'li inkübatörde bekletildikten sonra süre sonunda, seri seyreltme yapılan konsantrasyonlarda ve bu aralıkların açıldığı farklı konsantrasyonlarda Imatinib Mesilat veya Tannik asit uygulandı. Bu hücreler 24, 48 ve 72 saat bekletildi.
- Her kuyucuğa 20 µl MTT reaktifi eklendi.
- 2-6 saat arası 37°C'de %5 CO₂'li nemlendirilmiş ortamda inkübe edildikten sonra besiyeri çekilerek 100 µl DMSO (Biological Industries, USA) eklendi. Yavaşça 20 dakika vortekslendi, süre sonunda oluşan mor renk 560 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.
- Imatinib Mesilat veya Tannik asidin MCF-7 ve MDA-MB 231 hücreleri üzerindeki %50 inhibisyonuna (IC₅₀) neden olduğu konsantrasyon aralığını belirlemek amacıyla bu test, farklı zamanlarda yapılan 3 farklı deneyde tüm verilerin ortalaması alınarak kontrole göre IC₅₀ değeri belirlendi.
- Belirlenen konsantrasyonların yüksek olması durumunda belirli konsantrasyon aralıkları daraltılarak MTT testi yeniden uygulandı.

3.7 Kombine Terapi Uygulaması ve İzobologram Analizi ile Sinerjizmin Belirlenmesi

İzobologram analizi herhangi bir ilaç, özüt ya da bileşiğin etken dozlarının kantitatif olarak belirlenmesini ve kombine halde verildiğinde bunların arasındaki sinerjizmin belirlenmesini sağlar. Bu etkiler izobologram grafiği üzerinde gösterilebilmektedir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. İzobologram Analizi Grafiği.

Kombinasyon indeksi hesaplanırken medyan etki denklemi kullanıldı:

$$FIC A = \frac{Kombine\ ila\ Abs.}{IC50 A abs.} \quad (3.3)$$

$$FIC B = \frac{Kombine\ ila\ Abs.}{IC50 B abs.} \quad (3.4)$$

$$FIX = FIC A + FIC B \quad (3.5)$$

FIC= Fraksiyonel inhibe edici ilaç konsantrasyonu

A= 1. İlaç

B= 2. İlaç

FIX= Fraksiyonel inhibe edici index

Kombinasyon indeksi sonuçları; FIX<0,5 ise sinerjik etki, FIX= 0,5-1 ise aditif etki, FIX>1 ise bağımsız etki, FIX>2 ise antagonist etki olarak değerlendirildi.

Her iki hücre hattına da, İmatinib Mesilat ve Tannik Asit IC₅₀ konsantrasyonlarının kombinasyonu sırasıyla %90 IM - %10 TA, %70 IM - %30 TA, %50 IM - %50 TA, %30 IM - %70 TA, %10 IM - %90 TA olacak şekilde doz uygulaması yapıldı.

Daha sonra MTT ile canlılık belirlendi ve medyan etki denklemi ile etki düzeyleri sınıflandırıldı.

3.8 Migrasyon (Wound Healing Assay)

5x10⁵ adet hücre 6 kuyucuklu platelere uygun besiyeri ile ekildi. %5 CO₂'li inkübatörde plate tabanının %90-100 kapladığı süre sonunda hücrelerde 1 ml'lik pipet ucu ile yara oluşturuldu. Besiyeri uzaklaştırıldı. IC₅₀ değerlerinde Imatinib Mesilat ve Tannik Asit uygulamaları ve bunların kombinasyonları (%90 IM + %10 TA, %70 IM + %30 TA, %50 IM + %50 TA, %30 IM + %70 TA, %10 IM + %90 TA) uygulandı. Uygulamalar sonrası 0, 4, 8 ve 12. saatlerdeki fotoğrafları çekildi ve Inverted mikroskop mikrometre barı kullanılarak yaraların kapanma miktarı hesaplandı. Tüm uygulama grupları, kendi 0. saat verilerine göre değerlendirildi.

3.9 İstatistiksel Analiz

Gruplar arasındaki farklılığa göre normal dağılım gösterenler tek yönlü varyans analizi uygulanarak (OneWay ANOVA) analiz edildi. Tablo ve grafiklerde ortalama

± standart sapma kullanıldı. İstatistiksel olarak önemli farklılıklar, $p<0,05$ önemlilik düzeyi * (İstatistiksel olarak anlamlı fark), $p<0,01$ önemlilik düzeyi ** (Yüksek düzeyde olarak anlamlı fark), $p<0,001$ önemlilik düzeyi *** (Çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı fark) ve $p<0,0001$ önemlilik düzeyi **** (Oldukça yüksek düzeyde istatistik olarak anlamlı fark) değerlendirildi. Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 9 (Free Version) programı ile gerçekleştirildi.

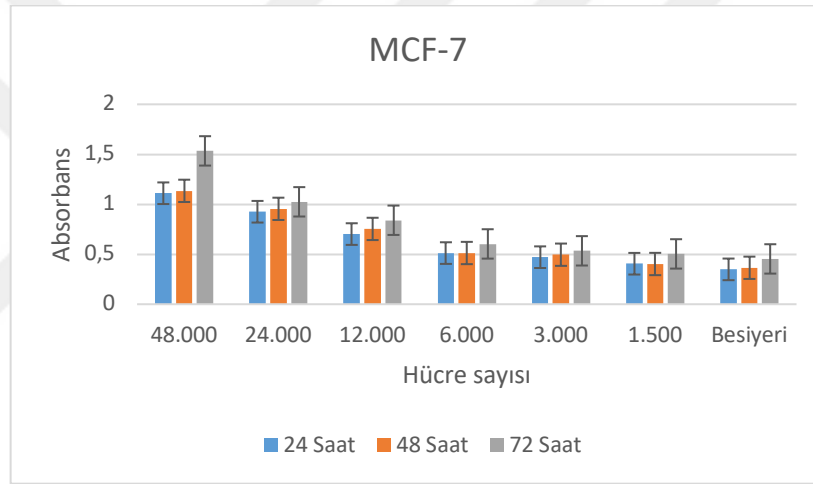


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

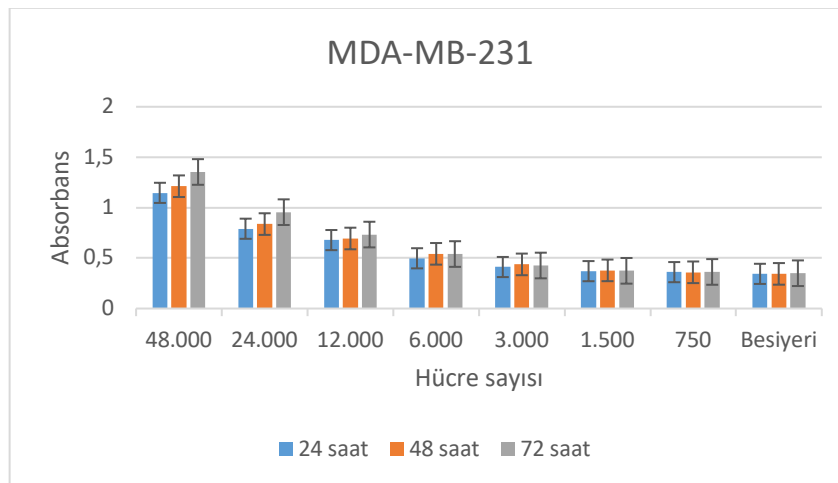
4.1 MTT Bulguları

4.1.1 Optimum hücre sayıları

96 kuyucuklu platelerde kullanılacak hücre miktarını standardize etmek ve 24, 48 ve 72. saatlerde çoğalma süresini belirlemek için uygulama yapılmamış hücrelere MTT yöntemi uygulanmıştır. Tüm saatler ve hücre sayıları incelendiğinde, 96 kuyucuklu platelerde yapılacak uygulamalarda MCF-7 hücrelerinin (Şekil 4.1) ve MDA-MB-231 hücrelerinin (Şekil 4.2) her kuyucuğa 10.000 hücre olacak şekilde ekilmesinin uygun olacağı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.1. MCF-7 Optimum hücre sayısının belirlenmesi.

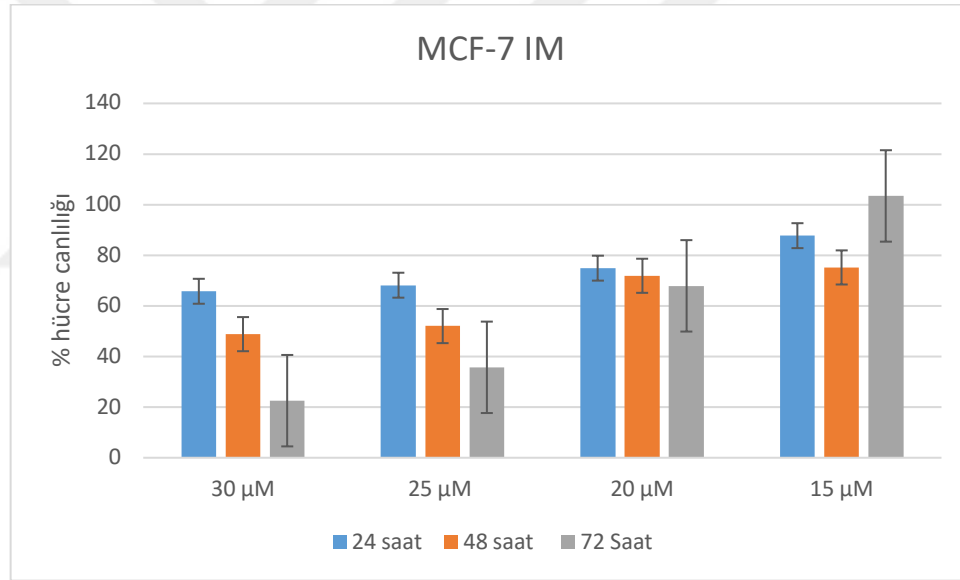


Şekil 4.2. MDA-MB-231 Optimum hücre sayısının belirlenmesi.

4.1.2 İmatinib Mesilat, Tannik Asit ve kombine terapi sitotoksosite bulguları

İmatinib Mesilat (IM) ve Tannik asit (TA) konsantrasyonları, 0,1 μM ve 500 μM arası olacak şekilde seri dilüsyon olarak 3 tekrarlı denenmiş olup, en uygun hücre sitotoksitesine cevap verebileceği aralıkların 10-50 μM arası olacağı gözlenmiştir. Bu nedenle yapılan MCF-7 için 15 μM , 20 μM , 25 μM ve 30 μM 'lık IM konsantrasyonlarının, 12,5 μM , 25 μM , 50 μM 'lık TA konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarına ait sonuçları değerlendirilmiştir.

MCF-7 hücre hattına yapılan 15 μM , 20 μM , 25 μM ve 30 μM 'lık konsantrasyonlarda IM uygulamasının 24, 48 ve 72 saatlik hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 4.3'de verilmiştir. IM saf suda çözündürüldüğünden ve su hücrelere toksik etki yaratmadığından hücrelere saf su uygulaması yapılmamıştır.



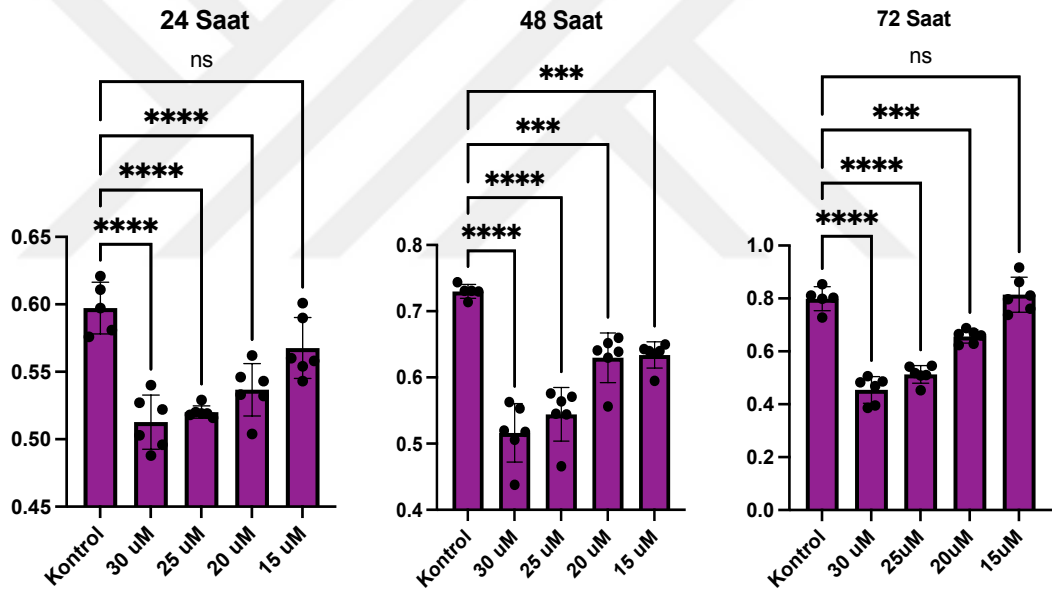
Şekil 4.3. MCF-7 hücrelerine İmatinib Mesilat uygulamasının 24, 48 ve 72. saatlerdeki hücre canlılığı üzerine etkisi.

IM uygulamasının 24 saatte 30 μM uygulanan grupta % 65,77 canlılık, 25 μM uygulanan grupta % 68,17 canlılık, 20 μM uygulanan grupta % 74,91 canlılık, 15 μM uygulanan grupta ise % 87,75 canlılık olduğu gözlenmiştir. Sitotoksitesi istatistiksel olarak analiz edildiğinde (Şekil 4.4); 30 μM ($p<0,0001$), 25 μM ($p<0,0001$) ve 20 μM ($p<0,0001$) konsantrasyonların etkili olduğu, 15 μM 'ın ise etkili olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

48 saatlik uygulamada 30 μM için % 48,83 canlılık, 25 μM için % 52,02 canlılık, 20 μM için % 71,89 canlılık ve 15 μM için % 75,19 canlılık olduğu gözlenmiştir. Her dört konsantrasyonun da etkisi istatistiksel olarak kabul edilebilir düzeyde ($p_{30}<0,0001$, $p_{25}<0,0001$, $p_{20}<0,001$ ve $p_{15}<0,001$) olduğu gözlenmiştir.

72 saatlik uygulamada 30 μM 'da % 22,55 canlılık, 25 μM 'da % 35,72 canlılık, 20 μM 'da % 67,92 canlılık ve 15 μM 'da % 103,44 canlılık olduğu gözlenmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde 30 μM ($p<0,0001$), 25 μM ($p<0,0001$) ve 20 μM ($p<0,001$) konsantrasyonlar etkili olurken 15 μM 'lık konsantrasyonun ($p>0,5$) 48. saatte gösterdiği etkiyi kaybettiği gözlenmiştir.

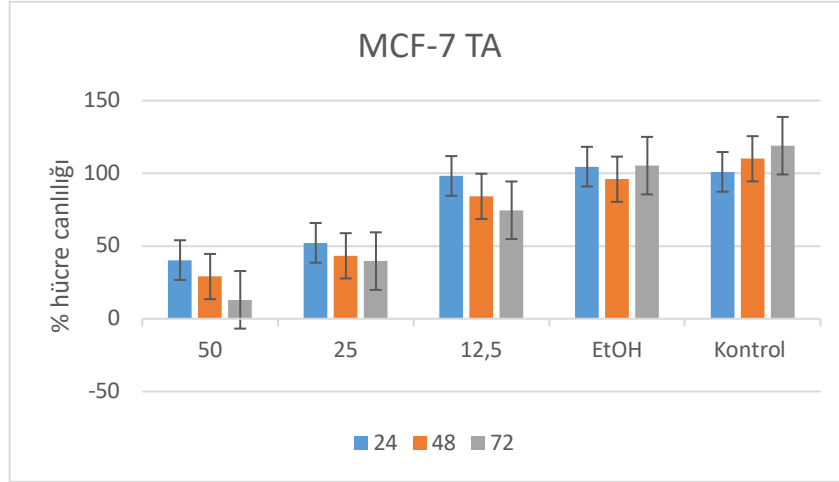
Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, MCF-7 hücreleri için IM'ın IC_{50} değeri 25 μM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. İmatinib Mesilat uygulamasının 24, 48 ve 72. saatte MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksitesinin analizi (ANOVA, STD: $p<0,05$).

MCF-7 hücre hattına yapılan 12,5 μM , 25 μM ve 50 μM 'lık konsantrasyonlarda TA uygulamasının 24, 48 ve 72 saatlik hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 4.5'de verilmiştir. TA'nın EtOH'da çözündürüldüğünden EtOH ile kontrol grubu da karşılaştırılmıştır. TA çözeltisi hazırlanırken EtOH'da çözündürüldüğünden EtOH ile kontrol grubu da karşılaştırılarak 24, 48 ve 72. saatlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. 24, 48, 72 saatlik uygulamada elde ettiğimiz sonuçlara

göre EtOH'ın hücreler üzerine sitotoksik bir etkisi gözlenmemiştir ($p>0,5$).



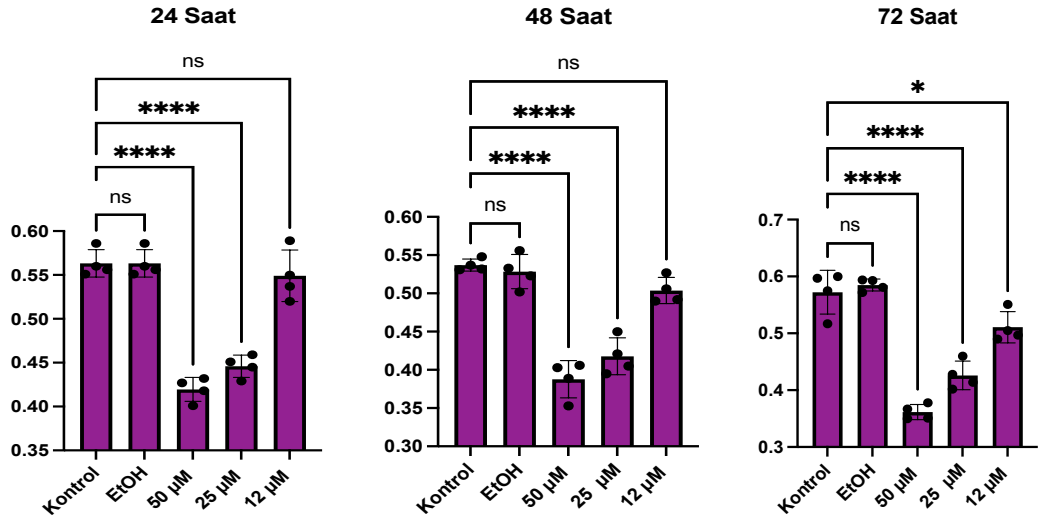
Şekil 4.5. MCF-7 hücre hattının Tannik Asit uygulamasının 24, 48 ve 72. saatlerdeki hücre canlılığı üzerine etkisi.

TA uygulamasının 24 saatte, 50 μM uygulanan grupta % 40,33 canlılık, 25 μM uygulanan grupta %52,17 canlılık ve 12,5 μM uygulanan grupta % 98 canlılık olduğu gözlenmiştir. Sitotoksitesi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde (Şekil 4.6); 50 μM ($p<0,0001$) ve 25 μM ($p<0,0001$) konsantrasyonlarda çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu, 12,5 μM konsantrasyonun ise etkili olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

48 saatlik TA uygulaması sonucunda, 50 μM 'da % 29,01 canlılık, 25 μM 'da % 43,28 canlılık, 12,5 μM konsantrasyonda ise % 84,18 canlılık olduğu gözlenmiştir. Sitotoksitesi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; 50 μM konsantrasyonda ($p<0,0001$) ve 25 μM konsantrasyonda ($p<0,0001$) çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu, 12,5 μM ($p>0,1$) konsantrasyonda ise etki göstermediği belirlenmiştir.

72 saatlik TA uygulamasında ise 50 μM 'da % 13,00 canlılık, 25 μM 'da %39,62 canlılık ve 12,5 μM konsantrasyonda ise % 74,61 canlılık olduğu gözlenmiştir. Her üç konsantrasyonun da etkisi istatistiksel olarak kabul edilebilir düzeyde ($p_{50}<0,0001$, $p_{25}<0,0001$, $p_{12,5}<0,05$) olduğu gözlenmiştir.

Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, MCF-7 hücreleri için TA'ın IC_{50} değeri 25 μM olarak belirlenmiştir.



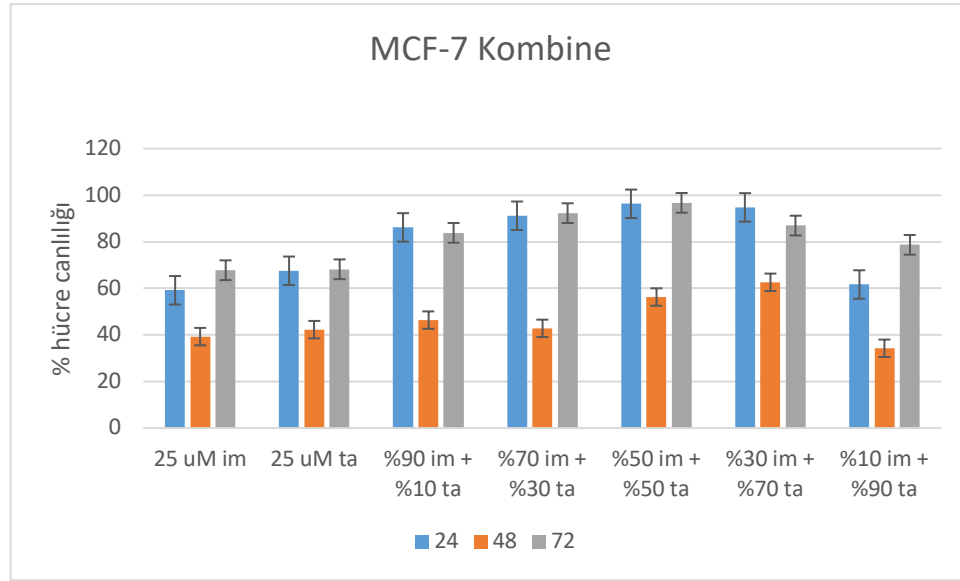
Şekil 4.6.Tannik Asit uygulamasının 24, 48 ve 72. saatte MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksitesinin analizi (ANOVA, STD: $p < 0,05$).

MCF-7 hücre hatlarına IM ve TA kombine tedavisi izobologram analizi kullanarak sonuçlandırılmıştır. Hesaplama daha önce verilen ilaç etkileşim formülleri kullanılmıştır.

Çizelge 4.1 incelendiğinde sadece 24 ve 48. saatlerdeki %10 IM- % 90 TA kombine tedavisinin MCF-7 hücre hattında bağımsız etki gösterdiği, geri kalanların ise antagonist etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.1. MCF-7 Hücre hattına uygulanan kombine tedavilerin $IC_{50\ TA}$ ve $IC_{50\ IM}$ ile karşılaştırıldığında oluşan FIX değerleri. a=sinerjik etki, b=aditif etki, c=bağımsız etki, d=antagonist etki ns, *, **, ***, **** işaretleri kontrol konsantrasyonuna göre etki düzeyi için (ANOVA) ns= $p > 0,05$, *= $p < 0,1$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, ****= $p < 0,0001$.

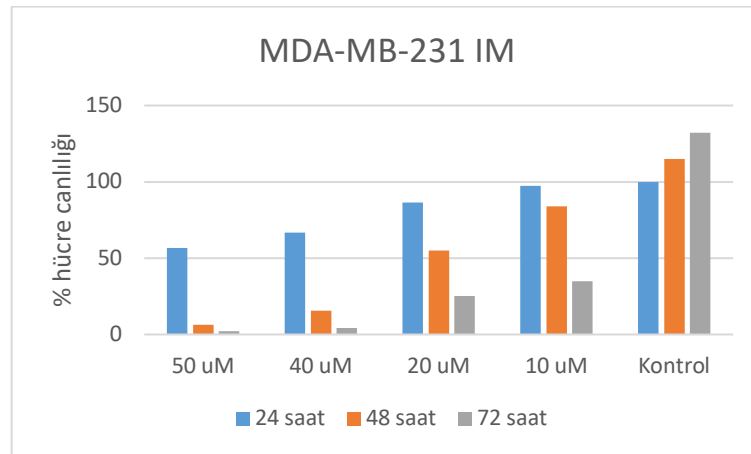
Kombine Tedavi	24 Saat	48 Saat	72 Saat
%90 IM-%10 TA	2,72 d ns	2,27 d ****	2,45 d ns
%70 IM-%30 TA	2,89 d ns	2,10 d ****	2,71 d ns
%50 IM-%50 TA	3,09 d ns	2,76 d ****	2,83 d ns
%30 IM-%70 TA	3,00 d ns	3,07 d ****	3,55 d ns
%10 IM-%90 TA	1,95 c ****	1,68 c ***	2,31 d *



Şekil 4.7. MCF-7 hücre hattına uygulanan kombine tedavinin yüzde canlılığa etkisi.

ANOVA sonuçlarına göre konsantrasyon uygulanmayan kontrol grubu ile kıyaslandığında sadece %10 IM- %90 TA uygulanan grup 24. saatte etkilenmiş olup diğer konsantrasyonlarda anlamlı etki ($p < 0,0001$) gözlenmiştir. 48. saatte ise tüm konsantrasyonlarda anlamlı etki gözlenmiştir (Şekil 4.7).

MDA-MB-231 hücre hattına yapılan 50 μ M, 40 μ M, 20 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda uygulamasının 24, 48 ve 72 saatlik hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 4.8’de verilmiştir. IM saf suda çözündürüldüğünden ve su hücrelere toksik etki yaratmadığından hücrelere saf su uygulaması yapılmamıştır.



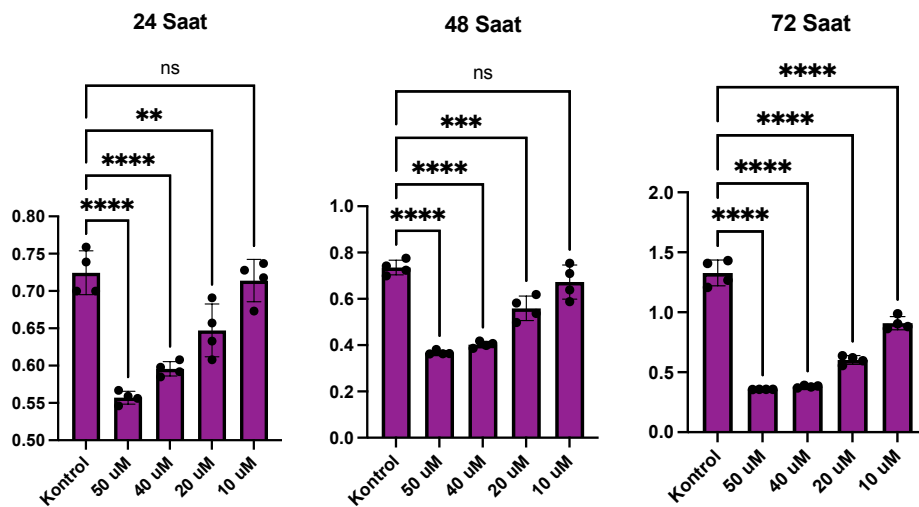
Şekil 4.8. MDA-MB-231 hücre hattının İmatinib Mesilat uygulamasının 24, 48 ve 72 saatlerdeki hücre canlılığı üzerine etkisi.

IM uygulamasının 24 saatte 50 μ M uygulanan grupta % 56,77 canlılık, 40 μ M konsantrasyonda % 66,77 canlılık, 20 μ M'da % 86,51 canlılık ve 10 μ M konsantrasyonda ise % 97,29 canlılık olduğu gözlenmiştir. Sitotoksitesi istatistiksel olarak analiz edildiğinde (Şekil 4.9); 50 μ M ($p<0,0001$) ve 40 μ M'da ($p<0,0001$) etkili olurken 20 μ M'da ($p<0,01$) etkisi azalmış ve 10 μ M'da ($p>0,5$) etki göstermediği gözlenmiştir.

48 saatlik uygulamada hücre canlılıkları incelendiğinde; 50 μ M'da % 6,48 canlılık, 40 μ M'da % 15,38 canlılık, 20 μ M'da % 55,18 canlılık ve 10 μ M konsantrasyonda ise % 84,10 canlılık olduğu gözlenmiştir. 50 μ M ($p<0,0001$) ve 40 μ M ($p<0,0001$) konsantrasyonlar en etkili konsantrasyon ve 20 μ M konsantrasyon 24. saate göre daha anlamlı konsantrasyon iken ($p<0,001$), 10 μ M konsantrasyonda anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,5$).

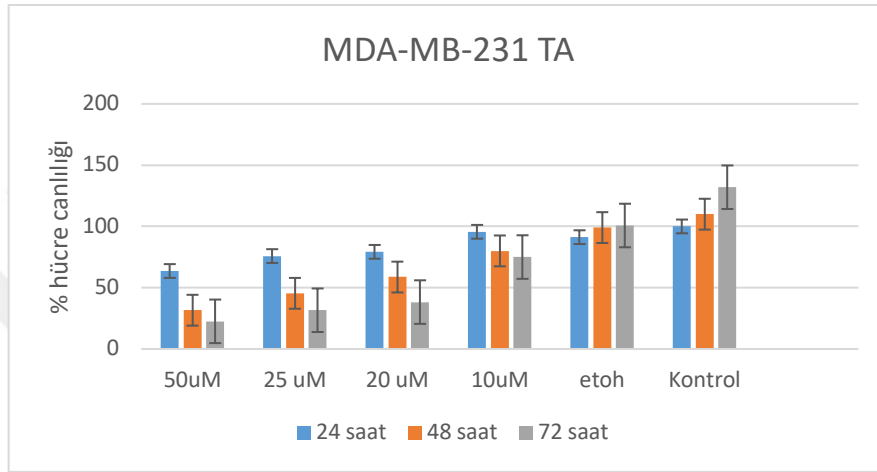
72 saatlik uygulamada 50 μ M'da % 2,03 canlılık, 40 μ M'da % 4,28 canlılık, 20 μ M'da % 25,02 canlılık ve 10 μ M konsantrasyonda % 34,97 canlılık olduğu ve aşırı bir sitotoksite olduğu gözlenmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde tüm konsantrasypnlarda anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p_{50}<0,0001$, $p_{40}<0,0001$, $p_{20}<0,0001$, $p_{10}<0,0001$).

Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, MCF-7 hücreleri için IM'ın IC₅₀ değeri 20 μ M olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. İmatinib Mesilat uygulamasının 24, 48 ve 72. saatte MDA-MB-231 hücreleri üzerine sitotoksitesinin analizi (ANOVA, STD: $p<0,05$).

MDA-MB-231 hücre hattına 50 μ M, 25 μ M, 20 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda TA uygulamasının 24, 48 ve 72 saatlik hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 4.10'da verilmiştir. TA'nın EtOH'da çözündürüldüğünden EtOH ile kontrol grubu da karşılaştırılmıştır. TA çözeltisi hazırlanırken EtOH'da çözündürüldüğünden EtOH ile kontrol grubu da karşılaştırılarak 24, 48 ve 72. saatlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılmıştır. 24, 48, 72 saatlik uygulamada elde ettiğimiz sonuçlara göre EtOH'ın hücreler üzerine sitotoksik bir etkisi gözlenmemiştir ($p>0,5$).



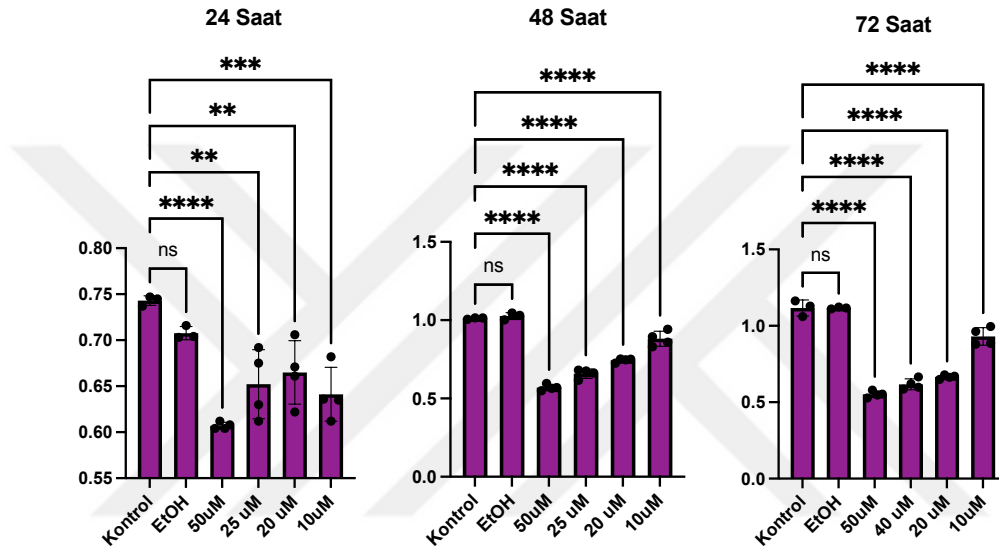
Şekil 4.10. MDA-MB-231 hücre hattına Tannik Asit uygulamasının 24, 48 ve 72 saatlerdeki hücre canlılığı üzerine etkisi.

TA uygulamasının 24 saatte, 50 μ M uygulanan grupta % 63,63 canlılık, 25 μ M'da %75,82 canlılık, 20 μ M'da %79,25 canlılık ve 10 μ M'da %95,24 canlılık olduğu gözlenmiştir. Sitotoksitesi istatistiksel olarak analiz edildiğinde (Şekil 4.11); 50 μ M'da ($p<0,0001$) çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu 25 μ M ($p<0,01$) ve 20 μ M ($p<0,01$) konsantrasyonlarda yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve 10 μ M ($p<0,001$).konsantrasyonda da azalma olduğu gözlenmiştir.

48 saatlik TA uygulaması sonucunda, 50 μ M'da % 31,63 canlılık, 25 μ M'da % 45,41 canlılık, 20 μ M'da % 58,69 canlılık ve 10 μ M konsantrasyonda % 80,04 canlılık olduğu gözlenmiştir. Sitotoksitesi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; her konsantrasyonda ($p_{50}<0,0001$, $p_{25}<0,0001$, $p_{20}<0,0001$ $p_{10}<0,0001$) çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir.

MDA-MB 231 hücrelerine TA uygulamasının 72 saatlik verileri değerlendirildiğinde ise; 50 μM 'da % 22,56 canlılık, 25 μM 'da % 31,62 canlılık, 20 μM 'da % 38,26 canlılık ve 10 μM 'da % 75,01 canlılık olduğu gözlenmiştir. Tüm konsantrasyonların sitotoksik etkisi istatistiksel çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu ($p_{50}<0,0001$, $p_{25}<0,0001$, $p_{20}<0,0001$ $p_{10}<0,0001$) göstermektedir.

Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, MDA-MB 231 hücreleri için TA'nın IC_{50} değeri 25 μM olarak belirlenmiştir.



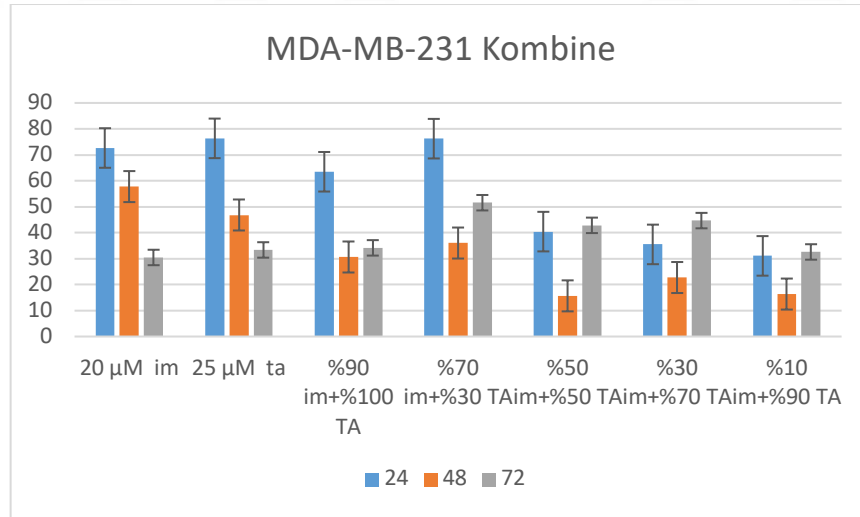
Şekil 4.11. Tannik Asit uygulamasının 24, 48 ve 72. saatte MDA-MB-231 hücreleri üzerine sitotoksitesinin analizi (ANOVA, STD: $p<0,05$).

MDA-MB-231 hücre hatlarına IM ve TA kombine tedavisi izobologram analizi kullanarak sonuçlandırılmıştır. Hesaplamada daha önce verilen ilaç etkileşim formülleri kullanılmıştır.

Çizelge 4.2. MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan kombine tedavilerin IC_{50} TA ve IC_{50IM} ile karşılaştırıldığında oluşan FIX değerleri. a=sinerjik etki, b=aditif etki, c=bağımsız etki, d=antagonist etki ns,*, **, ***,**** işaretleri kontrol konsantrasyonuna göre etki düzeyi için (ANOVA) ns=p>0,05, *=p<0,1, **=p<0,01, ***=p<0,001, ****=p<0,0001.

Kombine Tedavi	24 Saat	48 Saat	72 Saat
%90 IM-%10 TA	1,70 ^{c ****}	1,18 ^{c ****}	1,91 ^{c ****}
%70 IM- %30 TA	2,03 ^{d ***}	1,38 ^{c ****}	3,23 ^{d ****}
%50 IM-%50 TA	1,07 ^{c ****}	0,60 ^{b ****}	2,68 ^{d ****}
%30 IM-%70 TA	0,94 ^{b ****}	0,87 ^{b ****}	2,79 ^{d ****}
%10 IM-%90 TA	0,82 ^{b ****}	0,62 ^{b ****}	2,03 ^{d ****}

Çizelge 4.2 ve Şekil 4.12 incelendiğinde kombine tedavinin her saatte anlamlı bir şekilde azaldığı, fakat hiçbir konsantrasyonda sinerjik etki göstermediği sonucuna varılmıştır.



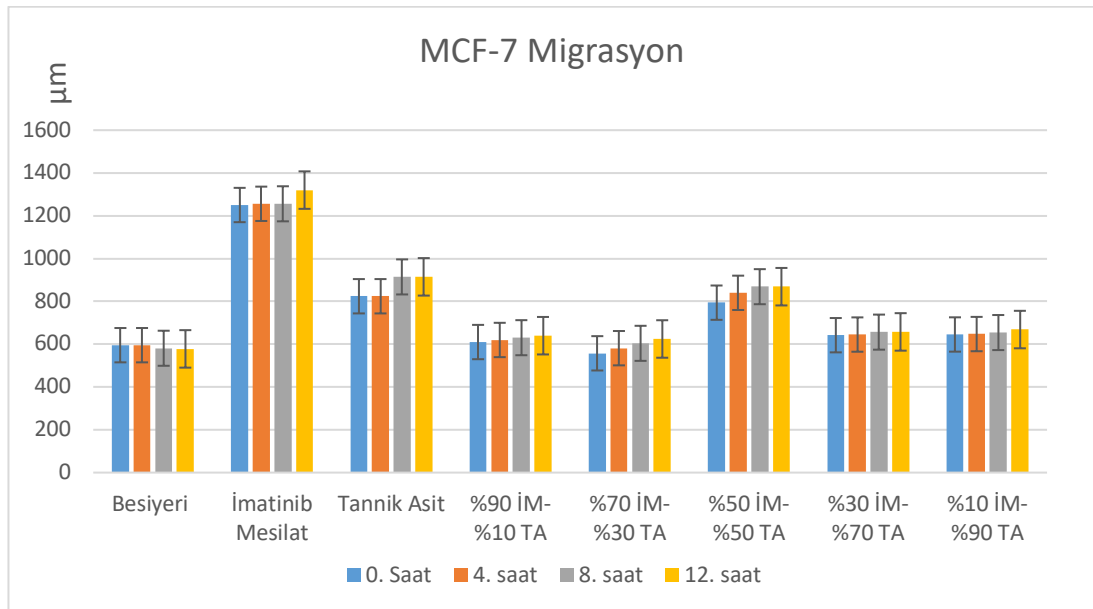
Şekil 4.12. MDA-MB-231 hücre hattına uygulanan kombine tedavinin yüzde canlılığa etkisi.

4.2. Migrasyon Bulguları

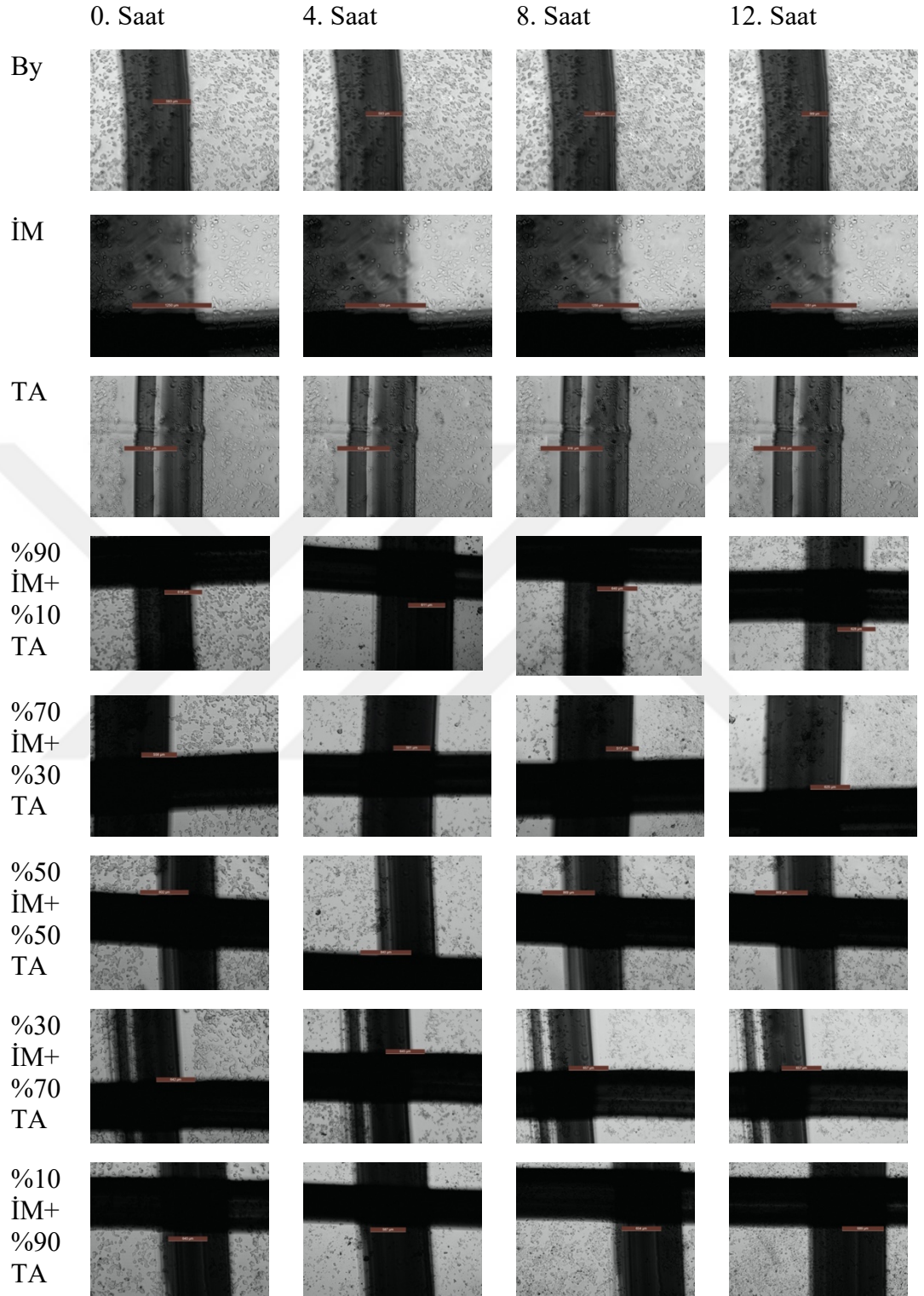
İmatinib Mesilat (IM), Tannik Asit (TA) ve IM-TA kombinasyonunun migrasyon üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla yara iyileşmesi deneyi yapılmıştır. Herhangi bir ilaç uygulaması yapılmayan, sadece hücre barındıran kuyucuklar negatif kontrol olarak adlandırıldı. Her kuyucuktaki 0. saatteki yara genişliği referans alınarak 4, 8, 12 saatlerdeki görüntüleri karşılaştırıldı.

Yapılan analizler sonucunda, 12 saatlik süre içerisinde MCF-7 (Şekil 4.13) ve MDA-MB-231 (Şekil 4.15) hücre hatlarında doz uygulanmayan kontrol grubunda kapanma gözlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hatlarında oluşturulan yara kapanmasının (Şekil 4.16), MCF-7 hücre hatlarına (Şekil 4.15) göre daha etkili kapanma gösterdiği gözlenmiştir.

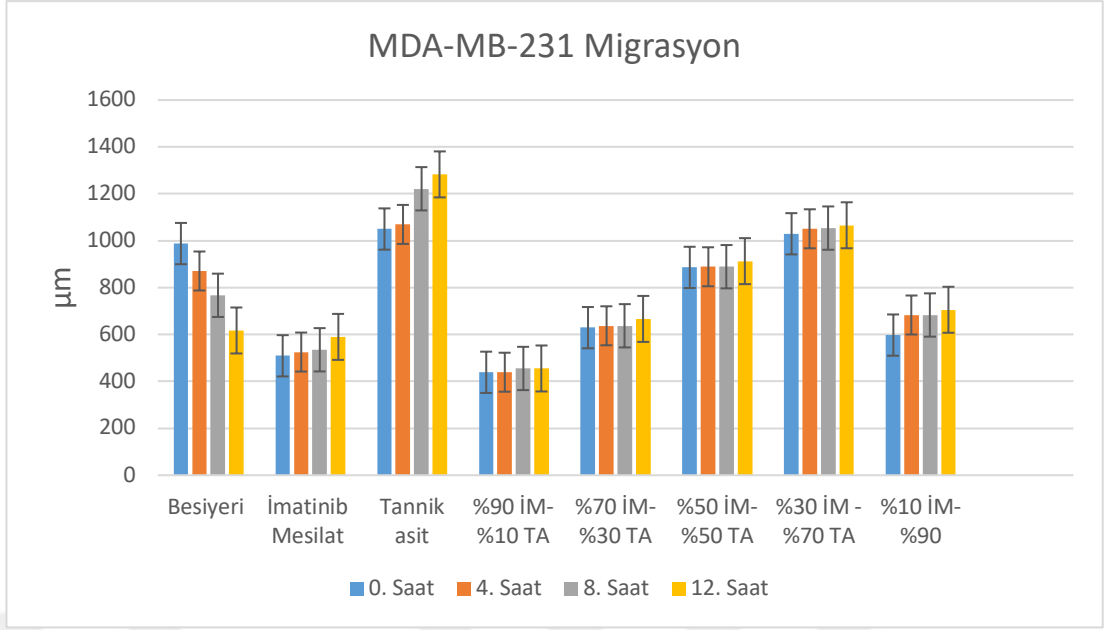
Her iki hücre hattında da, tek başına TA uygulamasının yara kapanmasında engelleyici etkisi olduğu belirlenmiştir. TA uygulamasının MDA-MB-231 hücrelerinde migrasyonu engellemede MCF-7 hücrelerine göre daha başarılı olduğu gözlenmiştir. Kombine uygulamalarda ise, TA miktarı arttıkça yara iyileşmesinde gecikme gerçekleşmiştir. IM uygulaması da her iki hücre hattında yara iyileşmesi üzerine etkili olsa da TA kadar etkili olmadığı gözlenmiştir.



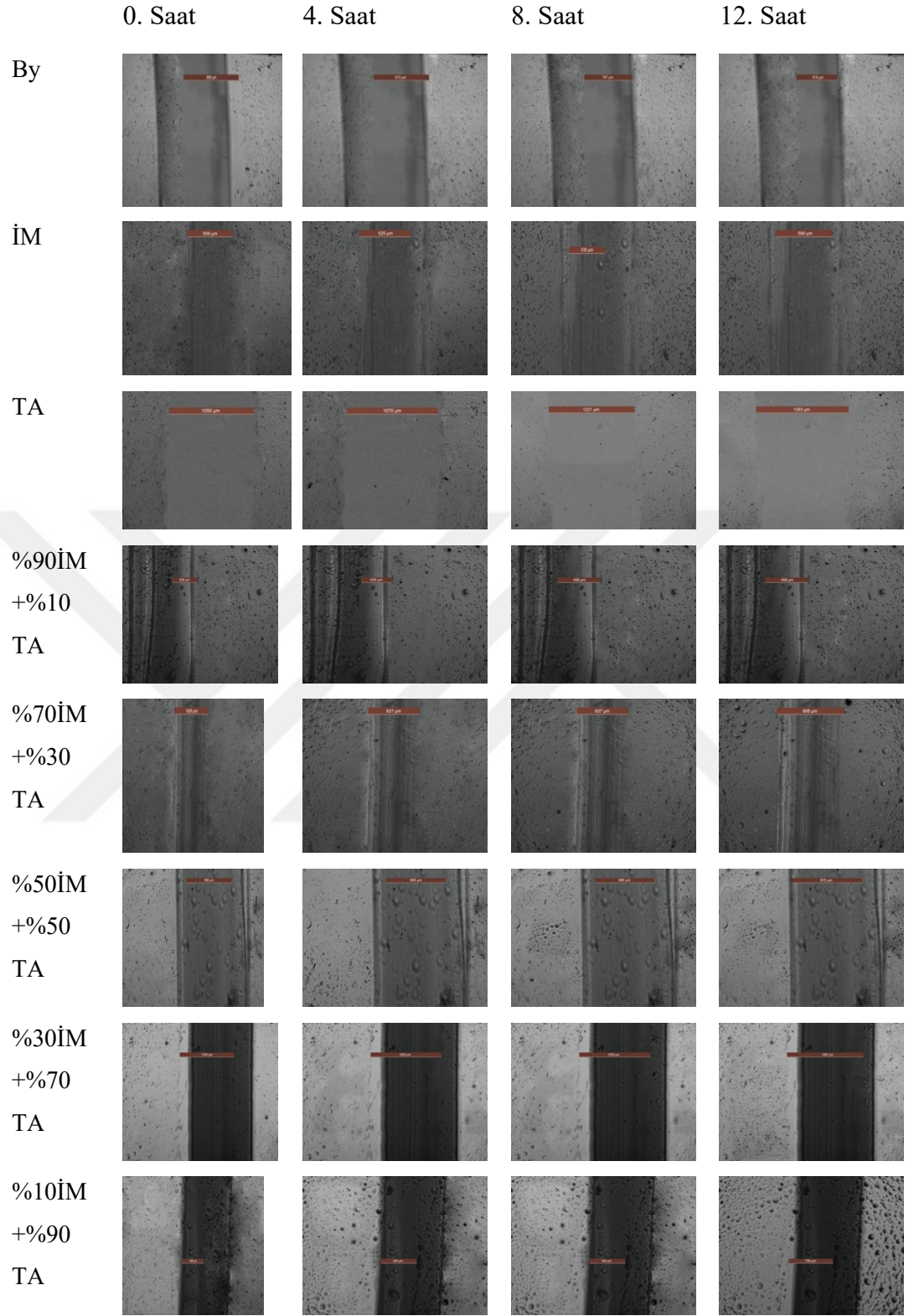
Şekil 4.13. MCF-7 migrasyon bulguları.



Şekil 4.14. MCF-7 hücre hattının 0, 4, 8, 12 saatlik migrasyon görüntüleri.



Şekil 4.15. MDA-MB-231 migrasyon bulguları.



Şekil 4.16. MDA-MB-231 hücre hattının 0, 4, 8, 12 saatlik migrasyon görüntüleri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Sinyal iletimindeki mutasyonlar, kanser gelişimi ve metastazında etkili yolaklardır. Membrana yerleşen tirozin kinaz reseptörlerinin devamlı aktivasyonunda gözlenen düzensiz sinyalleşmeler nedeniyle, kanser hücrelerinin proliferasyonunda tirozin kinaz reseptörlerinin, inhibe edilmesi önemli tedavi yöntemi olarak değerlendirilmektedir (Kadivar vd., 2017; Yenerel, 2010).

Kadınlarda en çok görülen kanserlerin başında yer alan meme kanserinin tedavisinde en etkili ve ilk tercih edilen yöntem cerrahi müdahaledir (Kierszenbaum, 2007). Hastanın tümör dokusunun küçültülmesi ya da yok edilmesinde cerrahi müdahale kadar etkili olan diğer yöntemler kemoterapötik tedavi ve radyoterapidir (Ölgen, 2002; Mian, 2016).

Çalışmamızda kemoterapötik olan Imatinib Mesilat (IM) ve bir antioksidan olan Tannik Asit (TA)'ın MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarına, tek tek ve birlikte uygulandıklarında sitotoksikite ve migrasyon üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Kemoterapötik bir ilaç olan ve daha çok lösemi tedavisinde kullanılan Imatinib Mesilat, klinik olarak meme kanseri tedavisinde kullanılsa da bu kanser üzerine etkileri halen daha araştırılmaktadır (Kadivar vd., 2017; Weigel vd., 2010).

Kemoterapötikler serbest radikal üreterek hücrel ölümüne neden olurken, antioksidanlar serbest radikalleri ve serbest radikal aracılıklı oksidatif reaksiyonları nötralize etmektedir. Bu nedenle biyolojik sistemlerde pek çok yan etkiye yol açmaktadır. Kemoterapötik ve antioksidan birlikte uygulandığında *in vivo* ve *in vitro* deneylerde antioksidanların kemoterapötik ilaçların etkisini azaltmadığı, bunun aksine *in vivo* çalışmalarda hayatta kalma süresini tek başına kemoterapi uygulananlara göre arttırdığını göstermektedir (Weijl, 1997; Jaakkola, 1992). Bu sonuçlar antioksidanların, kemoterapötik tedavi ile alındıklarında tedavi etkinliğini arttırdığını göstermektedir.

Kemoterapi ile birlikte antioksidan takviyesi yapılması konusunda bir başka görüş ise, antioksidanların serbest radikalleri süpürerek kemoterapötik ajanların etkisini de azaltabileceğidir. Bu konuda yapılan bir araştırmada, meme kanserli hastalara kemoterapötik tedavi ile birlikte demir ve B12 vitamini gibi antioksidan takviyesi uygulandığında hastalığın nüksünü ve ölüm riskini artırabileceği gösterilmiştir (Ambrosone vd., 2019). Yaptığımız çalışmada, IM ve TA'in tek başlarına uygulandığında, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında daha etkili olduğu, kombine uygulanan konsantrasyonlarda sinerjik etki göstermemiş, bağımsız, aditif ya da antagonist etki göstermişlerdir. Bu uygulamaların antagonist etki göstermesi, her iki ilacın da birbirinin tedavi edici etkisini azalttığını göstererek çalışmamızdaki sonuçları desteklemektedir.

Kadivar ve diğerlerinin (2017) yaptığı bir çalışmada, meme kanseri (T-47D ve MCF-7) ve sağlıklı hücre hattında (MCF-10A) IM'in sitotoksik, apoptotik, hücre döngüsü, gen ve protein ekspresyon seviyelerini araştırmışlardır. 2-10 μ M konsantrasyonlarda 96, 120 ve 144 saatlik IM uygulamasında, 144. saatte meme kanseri hücre hatlarına verilen dozlarda IC₅₀ değerinin en yüksek ve en sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Sağlıklı MCF10A hücrelerinde ise 144. saatte bile düşük sitotoksositeye ve etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda da MCF-7 hücrelerine 24, 48 ve 72 saatlik IM uygulamasında IC₅₀ değerinin bu çalışmadan daha yüksek olduğu (25 μ M) belirlenmiştir. Aynı zamanda MDA-MB-231 hücre hatlarında da aynı sürelerde IM uygulamasının MCF-7'ye benzer olduğu (20 μ M) olduğu gözlenmiştir. Bu iki çalışma karşılaştırıldığında uzun süre düşük dozda, kısa süre yüksek dozda IM uygulamaların sitotoksosite üzerine etkili olduğunu göstermektedir.

Nie ve ekibi (2016), MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında, TA'in, sitotoksik, apoptotik ve FAS aktivitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, MDA-MB-231 hücrelerine 6, 12, 18 ve 24 saat uygulanan TA'nın IC₅₀ değerlerinin 2,5-6 olduğunu MCF-7 hücrelerinde ise yine aynı saatlerde 4-10 μ M arasında olduğu belirtilmiştir. Her iki hücre hattında da uygulama süresi arttıkça düşük konsantrasyonların düşük etki gösterdiği vurgulanmıştır. Bu çalışmadan farklı olarak aynı hücre hatlarında 24, 48 ve 72 saatlik TA uygulamasının 25 μ M olduğu, zamana bağlı olarak bir değişiklik gözlenmediği belirlenmiştir.

Weigel ve diğerlerinin (2010) yaptığı çalışmada, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine İmatinib Mesilat ve PDGF BB uygulanarak migrasyona, İmatinib Mesilat ve Doksorubisin kombinasyonu uygulanarak hücre proliferasyonu ve apoptotik etki üzerine etkileri araştırılmıştır. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü molekülü olan PDGF B'ye özgü ligand olan PDGF BB, 10 ng/ml'lik konsantrasyonda, MDA-MB-231 hücre hattında hücre büyümesini % 186 oranında artırırken, MCF-7 hücre hattında ise PDGF BB sadece % 20 oranla proliferasyonu artırdığını gözlemlemişlerdir. MDA-MB-231 hücre hattında İmatinib Mesilat tek başına ve PDGF BB ile stimüle edilerek uygulandığında hücre göçünü her iki durumda da önemli düzeyde azaltmıştır. MCF-7 hücre hattında ise PDGF BB uygulaması hücre göçünü önemli düzeyde değiştirmemiştir, İmatinib Mesilat uygulaması ise 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda hücre göçünü önemli düzeyde azaltmıştır. 0,25 nM-12,5 nM konsantrasyonlarda Doksorubisin ve 1,5-12 µM konsantrasyonlarda İmatinib Mesilat ayrı ayrı ve kombine olarak her iki hücre hattına da verilmiştir. Kombine tedavi MDA-MB-231 hücre hatlarında ilave bir etkiye sebep olarak hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir, MCF-7 hücre hattında ise yüksek doz aralıklarında yüksek etki gösterirken, IC₅₀'den düşük olan konsantrasyonlarda antagonist etki göstermiştir. İmatinib ve doksorubisin, her iki hücre hattında da apoptoz indüksiyonuna yol açmış, ancak ilaçlar kombine edildiğinde sadece MCF-7 hücrelerinde apoptozda daha fazla artış saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da İmatinib Mesilat bu çalışmaya benzer şekilde MDA-MB-231 hücre hattı üzerine daha etkili olup proliferasyonu önemli ölçüde azaltmış, MCF-7 hücre hattında ise daha az proliferasyonu inhibe edici etki göstermiştir.

Weigel ve diğerlerinin yaptığı başka bir çalışmada (2009) ise, MDA-MB-231, MCF-7, ZR75-1 ve T47-D meme hücre hatlarında, İmatinib Mesilat uygulamasıyla reseptör ekspresyonu ve fosforilasyon durumundaki değişiklikler, 2-10 µM ilaç konsantrasyonları kullanılarak değerlendirilmiştir. İmatinib Mesilat'ın MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları için IC₅₀ değerlerini 6 µM olarak belirleyerek, anti-proliferatif etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. İmatinib'in tek başına ve vinorelbin ile kombinasyon halinde anti-proliferatif ve pro-apoptotik etkileri, bir MTT ve TUNEL tahlili ile araştırılmıştır. İmatinib Mesilat, incelenen tüm hücre hatlarının büyümesini engellemiş ve apoptozu indüklemiştir. Bu etki, vinorelbin ile kombine edildiğinde artmıştır. PDGFR β ve Akt'nin fosforilasyonu üzerinde doza bağlı bir inhibitör etki tespit edilmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan imatinib mesilatın

başka ilaçlarla kombine olarak verildiğinde etkili olduğu gözönüne alındığında, bu hücre dizileri üzerine imatinib mesilat ve başka kemoterapötik maddeler ile kombine dozları belirlenerek bu ilacın etkinlik düzeyi incelenerek tedavi sürecine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Weigel ve ekibinin yaptığı bu iki çalışmada uygulanan kemoterapötik ajanların etkisi arttığı gözlenirken bizim kullandığımız fenolik bileşik olan TA ve kemoterapötik ajan İM'in kombine tedavisi sinerjik etki oluşturmamıştır. Bu da bize etki mekanizmalarının farklı olabileceğini düşündürmektedir ve ek çalışmalara ihtiyacımız vardır.

Yerushalmi ve diğerlerinin yaptığı çalışmada (2007), MCF-7 ve nöroblastoma hücresi olan SKNMC hücre hatlarına İmatinib Mesilat ve radyasyon terapisi, İmatinib Mesilat ve Sisplatin uygulaması yapılarak hücre döngüsü analizi, proliferasyon etkisi ve apoptoz üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmamızla uyumlu olarak, elde ettikleri verilere göre MCF-7 hücre hattı için IC₅₀ değeri 20 µM olarak belirlenmiş ve doz arttıkça SKNMC hücre hattına kıyasla MCF-7 üzerine olan etki çok fazla değişmemiştir. Bu sebeple apoptozun değerlendirilmesi ve hücre döngüsünün analizi MCF-7 hücre hattı üzerine yapılmamıştır. SKNMC hücre hattı üzerine ise İmatinib Mesilatın apoptoz etkisi ihmal edilebilir düzeydedir. SKNMC ve MCF-7 hücrelerinin 5 gün boyunca kombine İmatinib Mesilat ve sisplatin varlığında inkübasyonu, her bir ajanın tek başına kullanılmasına kıyasla apoptozda sadece hafif bir artış ile her iki hücre hattı üzerinde ilave bir hücre öldürme etkisi göstermiştir.

Kalındemirtaş ve diğerlerinin KML hücre hattı olan K562 hücre hattı üzerinde yaptığı çalışmada (2019) apigenin, luteolin, 5-desmetil sinensetin flavonoidleri ile İmatinib Mesilat'ın kombine dozlarının hücre proliferasyonu üzerine etkisi ölçülmüştür. Flavonoidler 25-200 µM arası İmatinib Mesilat ise 5-50 µM arası konsantrasyonlarda hücrelere verilmiş, apoptoz/nekroz aktivitesi ve P-gp aktivitesi ölçülmüştür. Apigenin, luteolin ve 5-desmetil sinensetin gibi flavonoidlerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 140 µM, 100 µM ve >200 µM olarak belirlenmiş ve en yüksek sitotoksik etkiye sahip olan flavonoidin luteolin olduğunu belirlemişlerdir. İncelenen flavonoid-IM kombine tedavileri arasında, luteolin ve IM kombinasyonunda sinerjik etki olduğu saptanmıştır. Luteolin konsantrasyonu azaltıldığında sinerjik etki devam ederken IM dozu azaltıldığında antagonist bir etki olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, IC₅₀ değerlerinin apigenin ve IM kombinasyonunun hafif bir sinerjistik etkisi olduğu ve

apigenin dozu ya da IM konsantrasyonu düşürüldüğünde güçlü bir antagonistik etki gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Son olarak sinensetin ve IM kombinasyonunda IC₅₀ değerlerinin yarısı (Sin: 100, Im: 2.5 µM) ve dörtte biri (Sin: 50, Im: 1.25 µM) kullanıldığında antagonizm tespit edilmiştir. 72 saatlik inkübasyondan sonra, tüm flavonoidler, yaklaşık %50'lik bir apoptoz oranı ile ilişkilendirilmiş ve P-glikoprotein aktivitesinin tüm gruplarda arttığını gözlemlemişlerdir. Çalışmamızla karşılaştırdığımızda bulgularımızda TA'nın dozu arttıkça her iki hücre hattında da farklı etkiler gözlenmiştir. Bunun sonucunda İmatinib Mesilatla flavonoidlerin birlikte kullanılacağı durumlarda birbiri üzerine olan etkileri mutlaka araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Kim ve ekibinin, lösemi, akciğer ve kolon kanseri hücre hatlarından oluşan çalışmalarında (2012), İmatinib Mesilat ve flavonoid olan 3-Hidroksiflavon, tek tek ve kombine tedavi olarak uygulanmıştır. Sonuç olarak, 3-hidroksiflavonun antikanser yeteneği en etkili çıkmıştır. 3-HF varlığında, akciğer kanseri (A549) ve lösemi (K562) hücrelerinin canlılığı önemli ölçüde azalmıştır. Normal hücre grupları üzerinde sitotoksik etki gözlenmemiştir. İmatinib Mesilata karşı direnç geliştirilmiş olan K562-R hücreleri 48 saatlik inkübasyondan sonra 1 µM İmatinib Mesilat ve 10 µM 3-HF kombine tedavisi altında apoptotik kromatin yoğunlaşması ve parçalanması göstermiş; kombine tedavinin apoptozu artırdığını öne sürmüştür. Bu çalışmadan yola çıkarak, flavonoidlerle imatinib mesilatın kombine verilmesi tedaviyi artırdığından, kanser hücre dizileri üzerine etkili olabileceği düşünülmektedir.

Tikoo ve ekibinin hem *in vivo* hem de *in vitro* yaptığı bir çalışmada (2011), *in vivo* aşamada H9c2 embriyonik sıçan kalp miyoblastlarında, doksorubisin ile bir PARG/PARP inhibitörü ve bir antioksidan olan tannik asidin, doksorubisin kaynaklı kardiyotoksikite üzerindeki etkisini araştırmışlardır. *In vitro* aşamada MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde de anti-kanser aktivitesini değerlendirmişlerdir. Sonuçlar, tannik asidin PARP-1 aktivasyonunu önlediğini, Bax'ı azalttığını ve H9c2 hücrelerinde Bcl-2 ekspresyonunu artırdığını, böylece doksorubisin kaynaklı hücre ölümünü önlediğini göstermektedir. Ayrıca, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin hücre canlılığını azaltmış, meme tümörlerinde p53 ekspresyonunu arttırmış ve maksimum tümör hacmi azalması göstermiştir. Sonuçlar, DXR ile birlikte tannik asit kombinasyonunun, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin hücre

canlılığını belirgin şekilde azalttığını ve tannik asidin DXR'nin anti-kanser aktivitesini güçlendirdiğini göstermiştir. Çalışmamızda IM ve TA kombinasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde daha etkili olduğunu gözlemledik. Ayrıca bu araştırmacıların yaptıkları çalışmada buldukları etkili TA konsantrasyonunu bizim çalışmamızla uyumlu olarak 25 μ M olduğunu belirlemişlerdir.

Darvin ve diğerleri (2017) MCF-7, T47D, SK-BR 3 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerine tannik asidin proliferasyon üzerine etkisini, G1 döngüsünü ve apoptoz üzerine etkisini araştırmışlardır. Tannik asit tedavisi, hücre döngüsünün pozitif modülatörleri olan siklin D1, siklin E, CDK4 ve CDK6'nın hem transkripsiyonel hem de translasyonel ekspresyonunu doza bağlı olarak inhibe etmiştir. CDK4 ve CDK6'nın transkripsiyonel regülasyonu, p53 durumlarından bağımsız olarak MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde benzer bir durum izlemiştir. MCF-7 hücreleri, siklin D1'in belirgin transkripsiyonel inhibisyonunu sergilerken, MDA-MB-231 hücrelerinde daha az anlamlı inhibisyon gözlemlenmiştir. Sonuçlar, TA'nın EGF-R/Jak2/STAT1/3 ve P38/STAT1/p21Waf1/Cip1 yollarını modüle ettiğini ve meme kansinomlarında G1-tutuklama ve intrinsik apoptozu indüklediğini göstermiştir. TA ile yapılan bu çalışmada görülen sonuçlardan da anlaşılacağı üzere kanser hücrelerinde kemoterapötik ve fenolik bileşiklerin apoptotik süreçte ve hücre döngüsü üzerine etkileri olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak bu çalışmada İmatinib Mesilat ve tannik asit uygulamasının ayrı ayrı hücreler üzerine etki gösterdiği belirlenmiştir. Birlikte verildiklerinde ise hücre ölümünü bazı gruplarda artırmasına rağmen sinerjik bir etki oluşmadığı gözlenmiştir. Bazı kombine gruplarında bağımsız etki bazılarında ise antagonist etki göstermektedir. Migrasyon sonuçlarımız değerlendirildiğinde ise yine diğer çalışmalardaki gibi her iki ilaç da migrasyonu inhibe etmiştir. Tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde, antioksidanlarla kemoterapötiklerin birlikte kullanılıp kullanılmayacağı görüşlerini de destekleyen çalışmaların sonuçları nedeniyle, kemoterapi ile birlikte antioksidan takviyesi yapılması çok tartışmalı bir konu haline dönüşmüştür. Doğal bileşikler, geniş bir kanser yelpazesine sahip anti-proliferatif etkilere sahiptir. Tanenler ve tanen içeren gıdalar meme kanseri dahil olmak üzere bir çok kansere karşı anti kanser aktivitesine sahiptir. Herhangi bir antioksidanın herhangi bir kemoterapötik ajanla birlikte farklı etki gösterebileceği de göz önüne alınmalıdır. Bununla birlikte, etkilerinin altında

yatan mekanizma daha fazla çalışma gerektirir. Herhangi bir kemoterapi ve antioksidan kombinasyonunun kanseri tedavi etmede etkili olacağını söylemek mümkün değildir. Bu nedenle, kemotapötik ve antioksidan kombinasyonlarının sağlıklı ve kanser hücreleri üzerindeki sitotoksisite, apoptoz, gen ekspresyon, migrasyon ve invazyon düzeylerindeki etkileri hem *in vivo* ve hem de *in vitro* ortamda değerlendirilmelidir. Çalışmamızda TA ve IM'in hücre döngüsü, apoptoz, sinyal yolaklardaki ve gen ekspresyonları üzerine herhangi bir analiz gerçekleştirilmediği için bu verilerin de yukarıdaki çalışmalarla karşılaştırılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

- Abouantoun, T. J. ve MacDonald, T. J., 2009. Imatinib blocks migration and invasion of medulloblastoma cells by concurrently inhibiting activation of platelet-derived growth factor receptor and transactivation of epidermal growth factor receptor. *Molecular cancer therapeutics*, 8, 5, 1137-1147.
- Akgiin, H., Balkan, A., Bilgin, A. A., Çalış, Ü., Dalkara, S., Erdoğan, H., Erol, D. D., Ertan, M., Özkanlı, F., Palaska, E., Saraç, S. ve Şafak, C., 2000. Antikanser ilaçlar, *Farmasötik Kimya*, 1. Baskı, Irmak Matbaası, Ankara, 1180-1219.
- Algier A.A., Hanoğlu, Z., Özden, G. ve Kara, F., 2005. The use of complementary and alternative (non-conventional) medicine in cancer patents in Turkey. *European Journal of Oncology Nursing*, 9, 138-46.
- Ambrosone, C. B., Zirpoli, G. R., Hutson, A. D., McCann, W. E., McCann, S. E., Barlow, W. E. ve Albain, K. S., 2020. Dietary supplement use during chemotherapy and survival outcomes of patients with breast cancer enrolled in a cooperative group clinical trial (SWOG S0221), *Journal of clinical oncology*, 38, 8, 804.
- Andrade, Jr., R.G., Dalvi, L.T., Silva Jr., J.M., Lopes, G.K., Alonso, A. ve Hermes-Lima, M., 2005. The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals, *Arch, Biochem, Biophys*, 437, 1-9.
- Baran, Y., 2017. *Kanserin Moleküler Biyolojisi*, Yusuf Baran, 1. Baskı, Kısayol Yayıncılık, Türkiye.
- Black DM., 1994. The genetics of breast cancer. *European Journal of Cancer*, 30A, 61, 1957.
- Block, K. I., Koch, A. C., Mead, M. N., Tothy, P. K., Newman, R. A. ve Gyllenhaal, C., 2007. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials, *Cancer Treatment Reviews*, 33, 5, 407-418.
- Blumenthal, R. D., Lew, W., Reising, A., Soyne, D., Osorio, L., Ying, Z. ve Goldenberg, D. M., 2000. Antioxidant vitamins reduce normal tissue toxicity induced by radioimmunotherapy, *International Journal of Cancer*, 86, 2, 276-280.
- Brooks, S. C., Locke, E. R. ve Soule, H. D., 1973. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *Journal of Biological Chemistry*, 248, 17, 6251-6253.
- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R. ve Speirs, V., 2003. Breast cancer cell lines: friend or foe?, *Breast cancer research*, 5, 2, 1-7.
- Calabresi, P. A. U. L. ve Welch, A. D., 1962. Chemotherapy of neoplastic diseases, *Annual review of medicine*, 13, 1, 147-202.

- Chen, X., Beutler, J. A., Mccloud, T. G., Loehfelm, A., Yang, L., Dong, H. F., Howard, O., Chertov, Y., Salcedo, R. ve Oppenheim, J.J., 2003. Tannic acid is an inhibitor of CXCL12 (SDF-1 α)/CXCR4 with antiangiogenic activity, *Clinical Cancer Research*, 9, 8, 3115-3123.
- Chou, T. C. ve Talalay, P., 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Advances In Enzyme Regulation*, 22, 27-55.
- Chou, T. C., 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method, *Cancer Research*, 70, 2, 440-446.
- Conklin, K. A., 2000. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects, *Nutrition And Cancer*, 37, 1, 1-18.
- Darvin, P., Joung, Y. H., Kang, D. Y., Sp, N., Byun, H. J., Hwang, T. S., Yang, Y. M., Cho, K.H., Park, K. D., Lee H.K. ve Yang, Y. M., 2017. Tannic acid inhibits EGFR/STAT 1/3 and enhances P38/STAT 1 signalling axis in breast cancer cells, *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, 21, 4, 720-734.
- Easton, D. F., Bishop, D. T., Ford, D. ve Crockford, G. P., 1993. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families, *The Breast Cancer Linkage Consortium*, *American journal of human genetics*, 52, 4, 678.
- Ergezer, H. ve Çam, M., 2008. Tanenler: Sınıflandırma, Yapıları Ve Sağlık Üzerine Etkileri. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Erzurum, Türkiye, 229-232.
- Ernst E., 2000. The usage of complementary therapies by dermatological patients: a systemic review, *Br J Dermatol* 2000, 142, 857-61.
- Esteva-Lorenzo F.J., Sastry L. ve King C.R., 1998. The erbb-2 gene: from research to application. In *hormones and growth factors in development and neoplasia*, Edited By Dickson R.B, Salomon D.S., New York: John Wiley ve Sons; 421-444.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Bray, F., Forman, D. ve Parkin, M.D., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *International journal of cancer*, 136, 5, E359-E386.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., Forman D. ve Bray, F., 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012, *European journal of cancer*, 49, 6, 1374-1403.
- Gutteridge, J. M. ve Halliwell, B., 1993. Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence, *Free Radical Research Communications*, 19, 3, 141-158.

- Gültekin, M. ve Boztaş, G., 2014. Türkiye Kanser İstatistikleri, Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 43.
- Holliday, D. L. ve Speirs, V., 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research*, 13, 4, 1-7.
- Hortobagyi, G. N., 1998. Treatment of breast cancer, *New England Journal of Medicine*, 339, 14, 974-984.
- Jaakkola, K., Lähteenmäki, P., Laakso, J., Harju, E., Tykkä, H. ve Mahlberg, K., 1992. Treatment with antioxidant and other nutrients in combination with chemotherapy and irradiation in patients with small-cell lung cancer, *Anticancer Research*, 12, 3, 599- 606.
- Jaspars, J. J. P., Posma, A. N., Van Immerseel, A. A. H. ve Gittenberger-De Groot, A. C., 1997. The cutaneous innervation of the female breast and nipple-areola complex: implications for surgery, *British Journal of Plastic Surgery*, 50, 4, 249-259.
- Kadivar, A., Kamalidehghan, B., Javar, H. A., Karimi, B., Sedghi, R. ve Noordin, M. I., 2017. Antiproliferation effect of imatinib mesylate on MCF-7, T-47D tumorigenic and MCF 10A nontumorigenic breast cell lines via PDGFR- β , PDGF-BB, c-Kit and SCF genes, *Drug design, development and therapy*, 11, 469.
- Kalındemirtaş, F. D., Birman, H., Candöken, E., Gazioğlu, S. B., Melikoğlu, G. ve Kuruca, S. 2019. Cytotoxic effects of some flavonoids and imatinib on the k562 chronic myeloid leukemia cell line: data analysis using the combination index method, *Balkan Medical Journal*, 36, 2, 96.
- Karayurt, Ö., 2015. Meme Kanseri, Onkoloji Hemşireliği Kitabı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 5, 49, 619-623.
- Kayaalp, S. O., 1998. Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 1, 8, 1007-1072.
- Khan, N. S. ve Hadi, S. M., 1998. Structural features of tannic acid important for DNA degradation in the presence of Cu (II). *Mutagenesis*, 13, 3, 271-274.
- Kim, J. H., Song, M., Kang, G. H., Lee, E. R., Choi, H. Y., Lee, C., Cho, S. G., Kim, J., Kim, Y. ve Kho, B.N., 2012. Combined treatment of 3-hydroxyflavone and imatinib mesylate increases apoptotic cell death of imatinib mesylate-resistant leukemia cells, *Leukemia Research*, 36, 9, 1157-1164.
- Koçak, S., Çelik, L., Özbaş, S., Sak, S. D., Tükün, A. ve Yalçın, B., 2011. Meme kanserinde risk faktörleri, riskin değerlendirilmesi ve prevansiyon: İstanbul 2010 Konsensus Raporu, *Meme Sağlığı Dergisi/Journal Of Breast Health*, 7, 2.

- Kolaç, T., Gürbüz, P. ve Yetiş, G., 2017. Doğal Ürünlerin Fenolik İçeriği Ve Antioksidan Özellikleri. İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi, 5, 1, 26-42.
- Kuş, T., 2020. Onkolojide İmmünoterapi, Ali Murat SEDEF, 1. Baskı, Akademisyen Kitabevi, Ankara, Türkiye.
- Labieniec, M. ve Gabryelak, T., 2003. Effects of Tannins on Chinese Hamster Cell Line B14. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 539, 1-2, 127-135.
- Madhusudan, S. ve Ganesan, T. S., 2004. Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy, Clinical Biochemistry, 37, 7, 618-635.
- Mahoney, M. C., Bevers, T., Linos, E. ve Willett, W. C., 2008. Opportunities and Strategies for Breast Cancer Prevention Through Risk Reduction, CA: A Cancer Journal For Clinicians, 58, 6, 347-371.
- Matsen, C. B. ve Neumayer, L. A., 2013. Breast cancer: a review for the general surgeon. JAMA surgery, 148, 10, 971-980.
- Mayer, L. D. ve Janoff, A. S., 2007. Optimizing combination chemotherapy by controlling drug ratios, Molecular Interventions, 7, 4, 216.
- Mercan, E., 2010. KML'li hastalarda imatinib mesilat tedavisinin sonuçları ve izlemlerinin değerlendirilmesi, Doctoral dissertation, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Mian, M., Tinelli, M., De March, E., Turri, G., Meneghini, V., Pescosta, N., Zambello, R., Berno, T., Marabese, A., Mondello, P. ve Zambello, R., 2016. Bortezomib, thalidomide and lenalidomide: Have they really changed the outcome of multiple myeloma?, Anticancer research, 36, 3, 1059-1065.
- Nam, S., Smith, D. M. ve Dou, Q. P., 2001. Tannic acid potently inhibits tumor cell proteasome activity, increases p27 and Bax expression, and induces G1 arrest and apoptosis. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 10, 10, 1083-1088.
- National Comprehensive Cancer Network, 2016. NCCN clinical practice guidelines in oncology, genetic/familial high-risk assessment, breast and aaovarian, Fort Washington, National Comprehensive Cancer Network, 1-105.
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T. ve Gray, J. W. 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes, Cancer cell, 10, 6, 515-527.
- Nie, F., Liang, Y., Jiang, B., Li, X., Xun, H., He, W., Lau, H.T. ve Ma, X., 2016. Apoptotic effect of tannic acid on fatty acid synthase over-expressed human breast cancer cells, Tumor Biology, 37, 2, 2137-2143.

- Onur, H., 2005. Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antip Yayınları
- Ozmen, V., Ozcinar, B., Karanlik, H., Cabioglu, N., Tukenmez, M., Disci, R., Ozmen, T., Igci, A., Muslumanoglu, M., Kecer, M. ve Soran, A., 2009. Breast cancer risk factors in Turkish women—a University Hospital based nested case control study, *World Journal of Surgical Oncology*, 7, 1, 1-8.
- Oztekin, M., Koyuncu, H., Ulasli, M. ve Unan, S., 1998. The Effects of Myrtus Communis L. Oil on Ehrlich Tumor, *Proceedings of The 2nd Balkan Congress Of Oncology*.
- Ölgen, S., Bıçak, I. ve Nebioğlu, D. 2002. Angiogenesis Ve Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar, *J. Fac. Pharm*, 31, 3, 193-214.
- Özmen, V., 2014. Türkiye'de Meme Kanseri: Klinik ve Histopatolojik Özellikler (13.240 Olgunun Analizi), *Meme Sağlığı Dergisi/Journal of Breast Health*, 10, 2.
- Rao, A. S., Kremenevskaja, N., von Wasielewski, R., Jakubcakova, V., Kant, S., Resch, J. ve Brabant, G., 2006. Wnt/ β -catenin signaling mediates antineoplastic effects of imatinib mesylate (gleevec) in anaplastic thyroid cancer, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(1), 159-168.
- Rocconi, R. P., Matthews, K. S., Kimball, K. J., Conner, M. G., Baker, A. C. ve Barnes, M. N., 2008. Expression of c-kit and platelet-derived growth factor receptors in ovarian granulosa cell tumors, *Reproductive Sciences*, 15, 7, 673-677.
- Ronckers, C. M., Erdmann, C. A. ve Land, C. E., 2004. Radiation And Breast Cancer: A Review of Current Evidence, *Breast Cancer Research*, 7, 1, 21.
- Russo, J., Hu, Y. F., Yang, X. ve Russo, I. H., 2000. Chapter 1: Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer, *JNCI Monographs*, 2000, 27, 17-37.
- Sakagami, H., Jiang, Y., Kusama, K., Atsumi, T., Ueha, T., Toguchi, M., Iwakura, I., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T. ve Yoshida, T., 2000. Cytotoxic activity of hydrolyzable tannins against human oral tumor cell lines—a possible mechanism. *Phytomedicine*, 7, 39–47
- Salouage, I., Klouz, A., Ferchichi, H., Charfi, H., Ouanes, L., Boussaid, M. ve Lakhal, M., 2010. Effect of Myrtus Communis L. on An Experimental Model of A Rat Liver İschemiareperfusion. *Acta Horticulturae*, 853, 379-382.
- Schwarz, V.A, Hornung, R, Fedier, A, Fehr, M.K, Walt, H, Haller, U. ve Fink, D., 2002. Photodynamic Therapy of DNA Mismatch Repair-Deficient and Proficient Tumour Cells, *British Journal of Cancer*, 86, 1130-1135.
- Simone, C. B., Simone, N. L., Simone, V. ve Simone, C. B., 2007. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can

- increase kill and increase survival, part 1. *Alternative Therapies in Health And Medicine*, 13, 1, 22-28.
- Speirs, V. ve Kerin, MJ., 2000. Prognostic Significance of Oestrogen Receptor Beta In Breast Cancer, *Br J Surg*, 87, 405-409.
- Spigel, D. R., Hainsworth, J. D., Simons, L., Meng, C., Burris III, H. A., Yardley, D. A., Grapski, R., Schreeder, M., Mallidi, P.V. ve Greco, A., F., 2007. Irinotecan, carboplatin, and imatinib in untreated extensive-stage small-cell lung cancer: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network, *Journal of Thoracic Oncology*, 2, 9, 854-861.
- Terry, M. B., Zhang, F. F., Kabat, G., Britton, J. A., Teitelbaum, S. L., Neugut, A. I. ve Gammon, M. D., 2006. Lifetime alcohol intake and breast cancer risk, *Annals Of Epidemiology*, 16, 3, 230-240.
- Tikoo, K., Sane, M. S. ve Gupta, C., 2011. Tannic acid ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity and potentiates its anti-cancer activity: potential role of tannins in cancer chemotherapy, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 251, 3, 191-200.
- Van de Vijver, F. J. R., Willemse, G. R. C. M. ve Van de Rijt, B., 1993. Het testen van cognitieve vaardigheden van allochtone leerlingen. *De Psycholoog*, 28, 4, 152-159.
- Vitali, R., Mancini, C., Cesi, V., Tanno, B., Mancuso, M., Bossi, G. ve Raschellà, G., 2008. Slug (SNAI2) down-regulation by RNA interference facilitates apoptosis and inhibits invasive growth in neuroblastoma preclinical models, *Clinical Cancer Research*, 14, 14, 4622-4630
- Voelzke, W. R., Petty, W. J. ve Lesser, G. J., 2008. Targeting the epidermal growth factor receptor in high-grade astrocytomas, *Current treatment options in oncology*, 9, 1, 23-31.
- Weigel, M. T., Dahmke, L., Schem, C., Bauerschlag, D. O., Weber, K., Niehoff, P. ve Mundhenke, C., 2010. In Vitro Effects of Imatinib Mesylate on Radiosensitivity and Chemosensitivity of Breast Cancer Cells, *BMC Cancer*, 10, 1, 1-14.
- Weigel, M. T., Meinhold-Heerlein, I., Bauerschlag, D. O., Schem, C., Bauer, M., Jonat, W., Maass, N. ve Mundhenke C., 2009. Combination of Imatinib and Vinorelbine Enhances Cell Growth Inhibition in Breast Cancer Cells Via PDGFR B Signalling, *Cancer Letters*, 273, 1, 70-79.
- Weijl, N. I., Cleton, F. J. ve Osanto, S., 1997. Free Radicals and Antioxidants in Chemotherapy-Induced Toxicity, *Cancer Treatment Reviews*, 23, 4, 209-240.
- Whitehead, T. P., Robinson, D., Allaway, S., Syms, J. ve Hale, A., 1995. Effect of Red Wine Ingestion on The Antioxidant Capacity of Serum, *Clinical Chemistry*, 41, 1, 32-35.

World Health Organization-GLOBOCAN 2012 (IARC).

Yenerel, M.N., 2010. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin KML Dışı Kullanımı, XXXVI. Ulusal Hematoloji Kongresi, 97-99.

Yerushalmi, R., Nordenberg, J., Beery, E., Uziel, O., Lahav, M., Luria, D. ve Fenig, E., 2007. Combined Antiproliferative Activity of Imatinib Mesylate (STI-571) With Radiation or Cisplatin In Vitro, Experimental Oncology.

Yin, K. B., 2011. The mesenchymal-like phenotype of the MDA-MB-231 cell line, Breast Cancer-Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis, 385-402.

Youness, R.A., Kamel, R., Elkasabgy NA, Shao, P. ve Farag, M.A., 2021, recent advances in tannic acid (gallotannin) anticancer activities and drug delivery systems for efficacy improvement; a comprehensive review, Molecules 2021, 26, 1486.

Zhao, X., Sun, H., Hou, A., Zhao, Q., Wei, T. ve Xin, W., 2005. Antioxidant Properties of Two Gallotannins Isolated from The Leaves of Pistacia Weinmannifolia, Biochim, Biophys, Acta 1725, 103–110.

URL-1 <<https://Fizyoo.Com/Meme-Anatomi/>> Erişim Tarihi: 7.06.2021

URL-2
<<https://Pubchem.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Image/Imgsrv.Fcgi?Cid=123596&T=L>>
Erişim Tarihi: 20.12.2020

URL-3
<<https://Upload.Wikimedia.Org/Wikipedia/Commons/Thumb/8/8b/Phenol2.Svg/200px-Phenol2.Svg.Png>> Erişim Tarihi: 19.12.2020

URL-4 <https://Synevo.Com.Tr/Upload/Oksidat_1.Jpg> Erişim Tarihi: 19.12.2020

URL-5
<<https://Pubchem.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Image/Imgsrv.Fcgi?Cid=16129778&T=L>>
Erişim Tarihi: 20.12.2020

URL-6 <https://Www.Sigmaaldrich.Com/Content/Dam/Sigma-Aldrich/Product3/199/92020424_1.Tif/_Jcr_Content/Renditions/92020424_1-Large.Jpg> Erişim Tarihi: 23.04.2021

URL-7<https://Www.Sigmaaldrich.Com/Deepweb/Content/Dam/Sigma-Aldrich/Product1/016/Sccl01_Mcf_7_Tamr_1_Bf_Image_Sccl01_Mcf_7_Tamr_1_Bf_Image_All.Jpg/_Jcr_Content/Renditions/Sccl01_Mcf_7_Tamr_1_Bf_Image_Sccl01_Mcf_7_Tamr_1_Bf_Image_All-Large.Jpg> Erişim Tarihi: 23.04.2021

ÖZGEÇMİŞ

Ad ve Soyadı : Merve UZLA

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji
Bölümü, 2013-2017

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji
Anabilim Dalı, 2018-2021

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Erasmus + / Yaz Stajı - Litvanya (2016)
2. Dilkur Akademi Yabancı Dil Kursu – Eğitmen
3. GLP Sertifikası
4. Klonlama ve Rekombinant DNA Sertifikası